

**Agrobacterium 属菌による外来遺伝子導入系の確立**

松田克礼\*\*・豊田秀吉\*・東口佳代\*・堀井禎二\*・大内成志\*\*\*

**Establishment of gene delivery system by *Agrobacterium* species**Yoshinori MATSUDA\*\*, Hideyoshi TOYODA\*, Kayo HIGASHIGUCHI\*,  
Teiji HORII\* and Seiji OUCHI\*\*\***Synopsis**

In this study, we established a gene delivery system for tomato by the use of *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciense*. pBI121 and pRGUS/pTRA415 were transformed into *A. rhizogenes* by triparental mating method and transformants were used for infection of tomato leaf segments. Hairy roots were more efficiently induced from younger leaf segments than mature ones. Gene integration into hairy root chromosome was confirmed by PCR with rol C gene primers and GUS gene primers. Expression of GUS gene in transformed hairy roots was detected by GUS histochemical analysis. The results indicated that the gene delivery system established in this study was useful for introducing foreign genes into tomato plants and for easily detecting introduced gene expression in the hairy roots. MAT vector was also found useful for gene delivery method into tomato plants.

**緒言**

植物の遺伝子工学は、植物細胞へ遺伝子を導入する技術、遺伝子を導入した細胞を選抜する技術、遺伝子組換え個体を細胞から再分化させる技術、の3つの技術より成り立っている。植物細胞への遺伝子導入法としては、物理・化学的方法と生物的方法がある。前者には、エレクトロポレーション、マイクロプロジェクトイルボンバードメント、マイクロインジェクション法があり、後者には、*Agrobacterium* 属菌によるアグロインフェクション<sup>1,11)</sup>があるが、それぞれに長所と短所があつて全能的手法はないのが実状である。

エレクトロポレーション法では主にプロトプラストを標的細胞とするので、プロトプラストの調整やプロトプラストからの個体再生に困難が伴うし、マイクロプロジェクトイルボンバードメント法では多くの場合、標的細胞が多細胞系であるため、それらの構成細胞すべてに遺伝子を導入することは不可能である。マイクロインジェクション法は微小なガラス針を使用して標的細胞に外来遺伝子を顕微鏡下で直接導入するので、高度な技術が必要であり、また、標的細胞が単細胞であるため、一度に大量の細胞を処理することはできない。植物の形質は多数の遺伝子群に支配されているので、それらを改良するには、遺伝

\* 農学部農学科 (Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kinki University, Nara 631, Japan)

\*\* 農学総合研究所 (Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University, Nara 631, Japan)

子組換えを繰り返し行って、多数の遺伝子を蓄積させることが不可欠である。しかしながら、現在の技術では、遺伝子組換えに使用する標識遺伝子（マーカー）が組換え体に残留するため、一度用いた標識遺伝子の再利用ができないのが現状である。また、実用的な標識遺伝子の数は限られているので、異なる標識遺伝子を用いて、多数の異なる遺伝子を導入蓄積することができない。そこで、本実験では、この問題を解決するため、*A. tumefaciens*を用いたMAT (Multi-Auto-Transformation) ベクター・システムを確立するとともに、*A. rhizogenes*による毛状根の誘導条件と迅速な導入遺伝子の確認法の開発を試みた。さらに、植物への遺伝子導入に用いる選択マーカー遺伝子であるカナマイシンおよびピアラホス抵抗性遺伝子の選抜上の有効性についても検討した。

## 材料と方法

### 1. *Agrobacterium* への外来遺伝子の導入

#### 1) 大腸菌の形質転換

大腸菌 (*Escherichia coli*) HB 101株へのプラスミドDNAの導入を行った。導入遺伝子としては、Fig. 1に示したpR-GUS/pTRA415<sup>17)</sup>およびpIPT5、pNPI132、pNPI130、P35S pGPTV-BARを使用し、Mandel and Higaの方法を用いて、遺伝子導入を行った後、アルカリ-SDS法<sup>18)</sup>によってプラスミドDNAを抽出した。次に、抽出したDNAを1%アガロースゲルを用いて電気泳動し、HB 101株への外来遺伝子プラスミドDNAの導入を確認した。

#### 2) *A. tumefaciens*への外来遺伝子の導入

トリペアレンタル・メーティング法<sup>7,20)</sup>によって*A. tumefaciens*LBA4404株への外来遺伝子の導入を試みた。導入遺伝子としては、pR-GUS/pTRA415およびpIPT5、pNPI132、P35S pGPTV-BARを使用した (Fig. 1)。まず、バイナリーベクターを導入した*E. coli* HB101とヘルパープラスミドpRK2013を有する*E. coli* HB101をそれぞれ1 mlのL-Broth (バクトトリプトン 10g/l, イーストエキストラクト 5g/l, NaCl 10g/l) で37°C、1晩振と

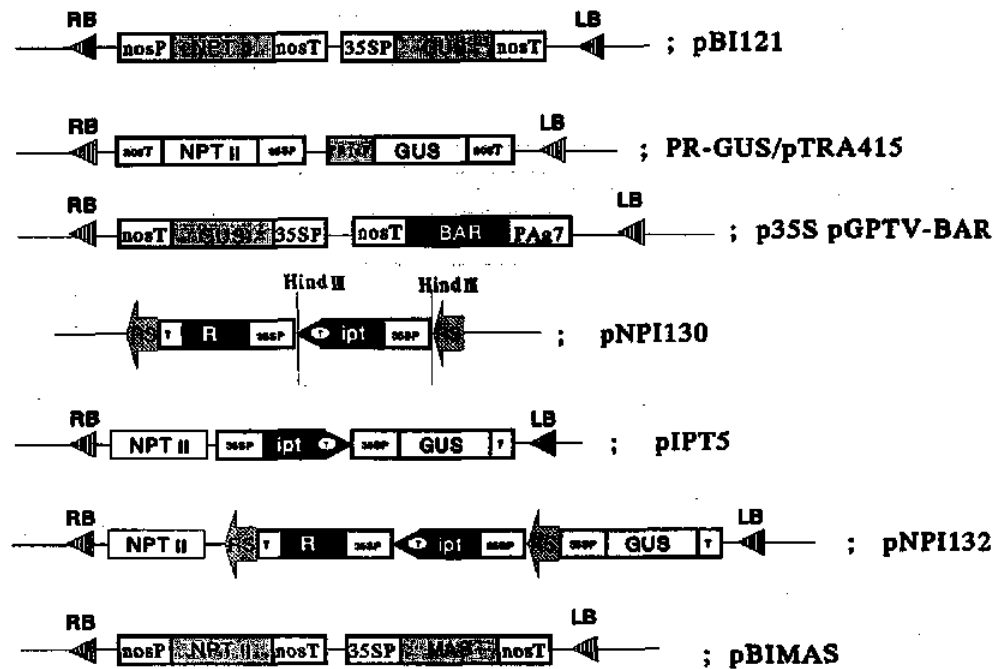


Fig. 1 Vectors used for transformation of bacteria and plants. GUS;  $\beta$ -glucuronidase gene, NPTII; neomycin phosphotransferase gene ipt; cytokinin synthetase gene, R; recombinase gene, BAR; bialaphos resistant gene RS; recombinase recognition site, RB; right border, LB; left border,

う培養した。また、LBA4404 を 1 ml の改変 L-Broth (バクトトリプトン 10 g/l, イーストエキストラクト 5 g/l, NaCl 5 g/l) で 30°C、1~2 晩振とう培養し、得られた 3 種の細菌懸濁液をそれぞれ 100  $\mu$  ずつ改変 L-Broth プレート (1.5% agarose) 上にスプレッダーを用いて表面が完全に乾くまで混合した。30°C で 3 日間コンジュゲーションさせた後、プレートに 5 ml の 10 mM MgSO<sub>4</sub> を加え、スプレッダーで集菌し、集めた菌液を 10 mM MgSO<sub>4</sub> で段階希釈し、希釈液 100  $\mu$  l を抗生物質添加改変 L-Broth 選択培地にプレーティングして 30°C で 3 日間培養した。得られた単一コロニーを同様の抗生物質添加改変 L-Broth 選択培地を用いて、単一コロニーの単離を繰り返し、外来遺伝子が導入された *A. tumefaciens* を選抜した。選抜に使用した抗生物質としては、pR-GUS/pTRA415 には 100  $\mu$  g/ml のリファンピシン<sup>®</sup> および 5  $\mu$  g/ml のテトラサイクリン、pIPT5、pNPI132 および P35S pGPTV-BAR には 100  $\mu$  g/ml のリファンピシン および 50  $\mu$  g/ml のカナマイシンを使用した。

### 3) *A. rhizogenes* への外来遺伝子の導入

本実験には *A. rhizogenes* MAFF 07-20001 株を使用した。導入遺伝子としては、pR-GUS/pTRA415 を使用し、外来遺伝子の導入は上述のトリペアレンタルメーティング法によった。また、外来遺伝子が導入された *A. rhizogenes* の選択培地としては、250  $\mu$  g/ml のストレプトマイシンと 5  $\mu$  g/ml のテトラサイクリン および 100  $\mu$  g/ml のアンピシリンを添加した改変 L-Broth 平板培地を使用した。

### 4) 形質転換した *Agrobacterium* からの外来遺伝子の検出

pR-GUS/pTRA415、pIPT5、pNPI132 および P35S pGPTV-BAR を導入した *A. tumefaciens* と pR-GUS/pTRA415 を導入した *A. rhizogenes* をそれぞれ 3 ml の改変 L-Broth に植菌し、30°C で一晩振盪培養した後、上述のアルカリ SDS 法によりプラスミド DNA を抽出した。次に、pR-GUS/pTRA415、pIPT5、pNPI132 および P35S pGPTV-BAR を導入した *A. tumefaciens* から抽出したプラスミド DNA については GUS 遺伝子

に特異的なプライマー (5'-TCACTCATTACGGC AAAGTGTGGGTC-3', 5'-AATTCATACCTGTTC ACCGACGACCT-3') を、pR-GUS/pTRA415 を導入した *A. rhizogenes* から抽出したプラスミド DNA については GUS 遺伝子に特異的なプライマーと *rol C* 遺伝子<sup>20)</sup> に特異的なプライマー (5'-GAAGGAGTCGTGGCTAGTTAAGTGC-3', 5'-AGCTACTGCCATCACTCCATTCCAAA-3') を用いて PCR<sup>13)</sup> を行い、外来遺伝子と *A. rhizogenes* の T-DNA 領域の検出を試みた。また、*A. tumefaciens* から抽出した pNPI132 および pIPT5 については、pSR1<sup>8,12,19)</sup> 組換え系からなるカセットをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションによって導入遺伝子の確認を行った。プラスミド DNA は電気泳動を行った後、核酸プロッティング装置 (Pharmacia 社製 Vacugene) を使用してナイロンメンブレンに転移し、そのナイロンメンブレンをアルカリ変性液 (1.5M NaCl, 0.5N NaOH)、中和液 (1.5M NaCl, Tris-HCl, pH5.0)、20 $\times$ SSC (3M NaCl, 0.3M クエン酸ナトリウム) で順次処理した。5 $\times$ SSC で 5 分間の洗浄を行った後、メンブレンをろ紙上で乾燥させ、5 分間の紫外線照射によりメンブレンに DNA を結合させた。プローブは、pNPI130 を Hind III で処理し、電気泳動を行った後、i p t 遺伝子と R/RS 部位特異的組換え系からなるカセットをゲルから抽出して ECL 遺伝子検出システムによって標識した。前述のナイロンメンブレンをハイブリダイゼーションバッファー (Amersham 社製) 中で 42°C、60 分間遮光振とうし、プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを最終濃度 10 ng/ $\mu$  l となるようにプレハイブリダイゼーションバッファーに加え、42°C で 12 時間のハイブリダイゼーションを行った。その後、メンブレンを一次洗浄液 (6M 尿素、0.4% SDS、75mM クエン酸ナトリウム) で 42°C、20 分間の洗浄を 2 回行った後、さらに二次洗浄液 (0.3M NaCl、30mM クエン酸ナトリウム) で室温、5 分間の洗浄を 2 回行った。洗浄メンブレンを検出試薬と (Amersham 社製) の混合液に浸漬し、1 分間反応させた後、X 線フィルムによってハイブリダイゼーションシグナルを検出した。

## 2. *Agrobacterium* によるトマトへの遺伝子導入

### 1) *A. rhizogenes*によるトマト毛状根の誘導

本実験には、トマト (*Lycopersicon esculentum* L.) 品種ボンデローザを播種後約40日間、水耕装置で育苗したものをを用いた。*A. rhizogenes*はMAFF07-20001株を使用した。本菌を改変L-Brothで30℃、一晚振盪培養し、得られた細菌増殖液を新鮮な同培地に移し、さらに30℃で5時間培養した細菌液を用いて、リーフディスク法<sup>11,20</sup>により感染を試みた。すなわち、トマト葉を70%エタノールに30秒、アンチホルミンに2分間浸漬して表面滅菌し、滅菌水で3回洗浄した後、滅菌カミソリで約1cm四方の大きさに切断して、リーフディスクとした。このリーフディスクを上述の細菌液に1分間浸漬した後、滅菌したろ紙で余分な菌液を取り除き、0.8%の素寒天プレート上で毛状根が観察されるまで培養した。次に、約2~3cmに伸びた毛状根を滅菌カミソリで切断し、100 $\mu$ g/mlのセフォタキシム<sup>20</sup>を添加したMS培地に置床し、*A. rhizogenes*の除菌を行うとともに毛状根の培養を行った。

### 2) トマト植物の部位別による毛状根誘導効率の検討

接種には*A. rhizogenes* MAFF03-01724株、MAFF07-20001株、MAFF07-20002株を改変L-Brothで一晩振盪培養した細菌液を用いた。また、材料としては第9節葉まで展開したトマトを用いた。トマト葉の第1節葉から第3節葉までを下位葉、第4節葉から第6節葉までを中位葉、第7節葉から第9節葉までを上位葉として3区分し、上述のリーフディスク法によりトマト葉の葉別の毛状根誘導効率の検討を行った。

### 3) アセトシリリングゴンの有効性の検討

*A. rhizogenes* MAFF07-20001株を使用し、リーフディスク法によってトマトに感染させた。すなわち、作製したリーフディスクを上述の細菌液に1分間浸漬した後、50 $\mu$ g/mlのアセトシリリングゴンを添加した0.8%の素寒天プレートとアセトシリリングゴン無添加の0.8

%の素寒天プレートに置床し、アセトシリリングゴンの毛状根の誘導効果を調べた。

### 4) 形質転換体選抜のための抗生物質処理濃度の検討

*A. rhizogenes* MAFF07-20001株により誘導された毛状根を一定期間培養し、生長点を含む毛状根の先端部約3cmを採取した。採取した毛状根を種々の濃度に設定したカナマイシン添加MS固形培地に置床し、26℃で10日間培養して、その伸長を測定した。培地に添加するカナマイシン濃度は、0、1、5、10、20、50、75、100 $\mu$ g/mlとした。また、トマト (品種ボンデローザ) から誘導されたカルスについても同様に検討を加えた。すなわち、抗生物質としてはカナマイシンおよびピアラホスを使用し、設定濃度区としては、0、1、5、10、20、50、100 $\mu$ g/mlのカナマイシン、0、1、2、3、4、5 $\mu$ g/mlのピアラホスを培地に添加して、約27cm<sup>3</sup>のカルスを置床した後、26℃で2週間培養して、その増殖度を調べた。

### 5) *Agrobacterium*によるトマトへの外来遺伝子導入

PR-GUS/pTRA415が導入されたLBA4404株を用いてトマトへの外来遺伝子の導入を試みた。まず、本菌の培養液を、OD<sub>630</sub>が0.25となるように滅菌水で希釈調整し、リーフディスク法による遺伝子導入を試みた。細菌液に浸漬して感染させたリーフディスクをアセトシリリングゴン50 $\mu$ g/mlを添加したホルモンフリーMS寒天培地に置床した。3日間共存培養したリーフディスクを、抗生物質セフォタキシム200 $\mu$ g/mlを含むトマトカルス誘導培地 (0.1 $\mu$ g/mlのカイネチン、1 $\mu$ g/mlの2,4-Dを含む) に移植し、2週間ごとに新鮮な培地に取り換え、除菌を行うとともに培養を継続した。また、PRGUS/pTRA415が導入された*A. rhizogenes* MAFF07-20001株およびpBI121が導入された*A. rhizogenes* MAFF03-01724株についても同様に感染させ、外来遺伝子が導入された毛状根の作出を試みた。

## 3. 形質転換カルスおよび毛状根からの外来遺伝子の検出

## 1) GUS assay による細胞組織化学的検出

PR-GUS/pTRA415を導入して得られたカルスおよび毛状根については、PRプロモーター<sup>9,16,17</sup>の誘導物質である2 mMのサリチル酸を添加したMS固形培地上で2~3日間培養し、得られたカルスおよび毛状根を用いてGUS assay<sup>9</sup>を行った。すなわち、被検カルス、毛状根をGUS検出用溶液に26℃、24時間浸漬し、GUS遺伝子の発現によるインジゴ反応を観察した。また、pBI121の導入によって得られた毛状根については、常法に従ってGUS遺伝子の発現を検出した。

## 2) 染色体DNAの抽出

*A. rhizogenes*によって誘導された毛状根および*A. tumefaciens*により形質転換されたカルスからCrude nuclear pellet法を用いて、染色体DNAを抽出した。まず、0.1~0.3gの被検試料を凍結させ、乳鉢でパウダー状になるまで磨砕した。次に、磨砕液をエッペンドルフチューブに移し、4,000rpm、4℃で5分間遠心分離後、緩衝液を加えて沈殿を懸濁した。さらに、20 $\mu$ lの20% SDSを加え、強く攪拌した後、70℃で15分間加温した。その後、150 $\mu$ lの7.5 M酢酸アンモニウムを加え、攪拌した後、水中で30分以上冷却し、15,000rpm、4℃で10分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清に等量のイソプロパノールを加えてよく混合し、15分間室温で静置後、8,000rpm、4℃で5分間遠心分離した後、360 $\mu$ lのTEバッファを加えて沈殿を溶解した。次に、等量のフェノールを加えて激しく攪拌し、15,000rpm、室温で5分間遠心分離を行った。遠心分離した後、水層を新しいエッペンドルフチューブに移し、40 $\mu$ lの3 M酢酸ナトリウムと1 mlのエタノールを加え、15,000rpm、4℃で10分間遠心分離を行った後、400 $\mu$ lの70%エタノールを加えて、15,000rpm、4℃で5分間遠心分離を行った。次に、沈殿を真空乾燥した後、20 $\mu$ l~50 $\mu$ lのTEバッファに溶解して染色体DNA溶液とした。

## 3) PCR法による外来遺伝子の検出

前項の実験で抽出した染色体DNAを鋳型としてPCR法による外来遺伝子の検出を試

みた。すなわち、*A. rhizogenes*によって誘導された毛状根の染色体DNAについては、rol C遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCR法を行い、*A. tumefaciens*による形質転換カルスの染色体DNAについては、GUS遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCR法を行った。また、pR-GUS pTRA415、pBI121を導入した毛状根の染色体DNAについては、rol C遺伝子に特異的なプライマーとGUS遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCR法を行った。

## 4. トマト毛状根からの再生個体誘導条件の検討

本実験には、リーフディスク法によって、*A. rhizogenes* MAFF 07-20001株を感染させ、誘導した毛状根を用いた。また、植物生長調整物質にはオーキシシンとしてインドール酢酸 (IAA) を、サイトカイニンとしてベンジルアミノプリン (BAP) を使用し、それぞれ0.01、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0  $\mu$ g/mlの濃度区を設け、両者を組み合わせた計49の濃度区のMS固形培地を作製した。次に、生長点を含む毛状根の先端約3 cmを採取し、各濃度区のMS固形培地に置床して、再生個体の誘導を試みた。

5. *A. tumefaciens*によるMATベクター・システム<sup>4,5,10,18</sup>の有効性の検討

トマトへのMATベクター・システムの適用に先立って、すでに条件が確立されているタバコを用いて本システムの評価試験を行い、その有用性について検討することにした。

1) *Agrobacterium*属細菌における35Sプロモーターの発現性の確認

原核生物内では発現しないとされている35Sプロモーターが*Agrobacterium*属細菌において発現することが報告されており、それを実証するための確認試験を行った。すなわち、250 $\mu$ g/mlのストレプトマイシンと50 $\mu$ g/mlのカナマイシンを含む改変L-Brothに40 $\mu$ g/mlのX-Glucを加えたプレートを作製し、このプレート上に白金耳でpNPI132/LBA4404 (p35S-GUS) を画線し、30℃で3日間培養した。

対照としてはpNPI132/HB101を用い、同培地に画線した。

#### 2) *ipt* 遺伝子<sup>13)</sup>に対する評価試験

常法により種子滅菌し、MS培地上で無菌的に育苗したタバコ (*Nicotiana tabacum*) L. cv. (Bright Yellow) にリーフディスク法を用いてコントロール・ベクター、pIPT5の感染を行った。培養3日後にタバコ葉片を、除菌のため、抗生物質セフトキシム200 $\mu$ g/mlを含むホルモンフリーMS寒天培地に移植し、葉片の周辺部分から生じた不定芽を切断分離して同培地に移植した。さらに、培養を継続し、サイトカイニンの過剰合成によって誘導されたとと思われる頂芽優勢を喪失した多芽体 (ESP: Extreme shooty phenotype) と、非組換え体と思われる正常に伸長成長している芽についてGUS assayを行った。

#### 3) MATベクターによるタバコへの遺伝子導入<sup>14)</sup>

導入遺伝子としてpNPI132MATベクターをもつ *A. tumefaciense* をリーフディスク法によってタバコ葉片に感染させた。前項と同様に培養し、得られた不定芽のうち発根しているものや、明らかに正常に伸長成長している芽については非組換え体として除き、その他の芽のうち成長がよいものについては、遺伝子導入候補としてタバコ葉片より切断し、同培地に移植して継続培養を行った。頂芽優勢を喪失したESPを選抜し、1か月ごとに植え継ぎを行い継代培養を行った。培養中に出現した頂芽優勢を回復し、正常な伸長を示したシュートは分離してGUS assayを行った。また、前項でGUS assayを行ったESPとともに、Crude nuclear pellet 法によって染色体DNAを抽出した後、GUS遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCRによって外来遺伝子中に存在するGUS遺伝子の検出を試みた。

### 結果および考察

組換えDNA技術を用いた物理・化学的遺伝子導入法についてはエレクトロポレーション

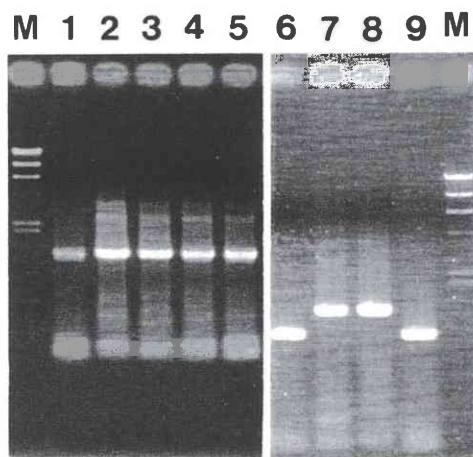
法、マイクロプロジェクトイルボンバードメント法、およびマイクロインジェクション法等があげられる。しかし、これらの方法では個体再生や形質転換細胞の選抜および処理能力等に問題がある。また、生物的遺伝子導入法のアグロインフェクション法は *Agrobacterium* 属細菌が植物体に感染したとき、菌体内に存在するTiあるいはRiプラスミド上のT-DNA領域が植物染色体DNAに組み込まれる現象を利用したものである。そこで筆者らは一度に大量の形質転換細胞を得ることが可能な *Agrobacterium* 属細菌を用いたリーフディスク法による遺伝子組換え植物の作出について検討した。

#### 1. *Agrobacterium* 属細菌への外来遺伝子の導入

*Agrobacterium* に外来遺伝子を導入する方法としては、中間ベクター法とバイナリーベクター法が挙げられる。バイナリーベクター法は、Tiプラスミド上のT-DNA領域を細菌から植物の染色体DNAへ移行させる仕組みを利用したものである。すなわち、外来遺伝子に左右境界配列が組み込まれていれば、外来遺伝子がTiプラスミド上に共存していなくても、Tiプラスミドが持つvir領域によって植物の染色体に異種DNAを同時に導入することができる。また、中間ベクターによって形質転換菌の得られる確率は、中間ベクターが移行する頻度と相同組換えの起きる頻度の2つの要因に依存するので、バイナリーベクター法を用いる方が形質転換効率が高い。以上のことから、本実験では形質転換効率の高いバイナリーベクター法を用いて、アグロバクテリウムの形質転換を行うことにした。

大腸菌の中には、接合伝達能をもつプラスミド(ヘルパープラスミド)を有するものがあって、性鞭毛を介して別の大腸菌やアグロバクテリウムと接合し、プラスミドを伝達することができるものがある。この場合、ヘルパープラスミド以外のプラスミドを持っていれば、それも同時に伝達されることになる。すなわち、バイナリーベクターを有する大腸菌とヘルパープラスミドを有する大腸菌 pRK2013/HB101、さらに *Agrobacterium* 属細菌を混ぜて3者を同じ培

地で培養すると、まずヘルパープラスミドがバイナリーベクターを有する大腸菌へと移り、この大腸菌が *Agrobacterium* 属細菌と接合すると、ヘルパープラスミドの移行に伴い、バイナリーベクターも *Agrobacterium* 属細菌へ移ることになる。そこで、この性質を利用したトリペアレンタルメーティング (triparental mating) 法により、*Agrobacterium* 属細菌への外来遺伝子の導入を行った。その結果、培養4日目に選択培地上で生育するコロニーが得られたので、それぞれのコロニーについて単一コロニー分離を行った。また、得られた形質転換コロニーからプラスミドDNAを抽出し、人工合成したGUS遺伝子特異的プライマーおよびrolC遺伝子特異的プライマーを用いてPCRを行った結果、推定されるDNAサイズの増幅したDNAが検出された (Fig. 2)。以上の結果から、本法によって有

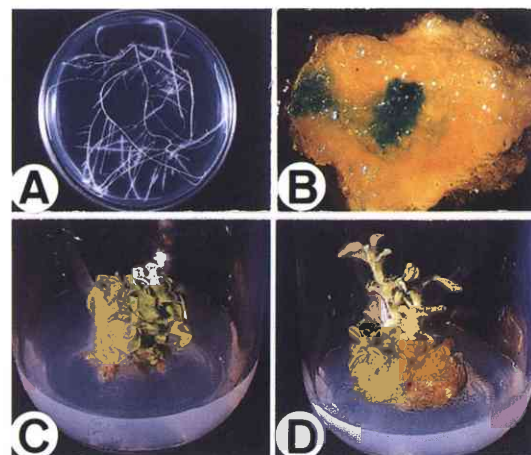


**Fig. 2** Agarose gel electrophoresis of DNA fragments PCR-amplified from transformed bacteria.  
M: Molecular weight marker.  
Lane 1: DNA amplified from pBI121 vector with GUS gene primers.  
Lane 2: DNA amplified from pRGUS/pTRA415 isolated from LBA4404 with GUS gene primers.  
Lane 3: DNA amplified from p35SpGPTV-BAR isolated from LBA440 with GUS gene primers.  
Lane 4: DNA amplified from pIPT5 isolated from LBA4404 with GUS gene primers.  
Lane 5: DNA amplified from pNPI132 isolated from LBA4404 with GUS gene primers.  
Lane 6: DNA amplified from pRGUS/pTRA415 isolated from MAFF07-20001 with rol C gene primers.  
Lane 7: DNA amplified from pRGUS/pTRA415 isolated from MAFF07-2000 with GUS gene primers.  
Lane 8: DNA amplified from pBI121 isolated from MAFF07-20001 with GUS gene primers.  
Lane 9: DNA amplified from pBI121 isolated from MAFF07-20001 with rol C gene primers.

効に外来遺伝子が *Agrobacterium* 属細菌に導入されたと考えた。

## 2. *A. rhizogenes* によるトマトへの遺伝子導入

*A. rhizogenes* は植物に感染し、その染色体DNAにT-DNA領域を組み込むことによって毛状根を誘導する。この特性を利用すれば遺伝子導入の成否を迅速に判断することができると考えられる。そこで、本実験では、毛状根がトマトへの外来遺伝子の導入に有効であると考え、遺伝子導入に最適な条件を検討することにした。まず、リーフディスク法により *A. rhizogenes* MAFF07-20001株をトマトに感染させ、毛状根の誘導を試みた。感染後、リーフディスクを  $100 \mu\text{g/ml}$  のセフトキシムを添加したMS固形培地に置床したところ毛状根の誘導は観察されなかったが、感染後、リーフディスクを素寒天プレートに置床した場合には、毛状根が誘導された。2~3 cmに伸長した毛状根を  $100 \mu\text{g/ml}$  のセフトキシムを含むMS固形培地に置床して本菌の除菌処理を行い、培養を継続したところ毛状根は活発に伸長を続けた (Fig. 3-A)。この結果より、セフトキシムを添加したMS固



**Fig. 3** Induced hairy root of tomato and transformed regenerants.  
A: Hairy roots induced from leaf segments of tomato by *A. rhizogenes*.  
B: GUS staining of callus cells transformed by *A. tumefaciens* with pRGUS/pTRA415.  
C: Multiple shoots of tobacco transformed by *A. tumefaciens* with pNPI132.  
D: Regenerants from multiple shoots induced by pNPI132.

形培地は毛状根の発根には適さないことが明らかとなった。トマトから毛状根の誘導が可能となったので、次に、毛状根の誘導に適したトマト植物の葉令について検討を行なった。A. *rhizogenes* MAF F03-01724株、MAF F07-20001株およびMAF F07-20002株を使用して、葉位別の毛状根誘導について調べた。その結果、3週間後には、それぞれの部位から毛状根が誘導されたが、上位葉が最も適していることが明らかになった。また、毛状根の誘導におけるアセトシリソンの有効性について検討した結果、アセトシリソンを培地に添加することによって毛状根の誘導効率が向上した。このことは、アセトシリソンの *vir* 領域を活性化することによって、T-DNAの植物染色体DNAへの移行を促進させることを示唆する。以上の実験結果から、トマト毛状根の効果的な誘導条件が確立された。

次に、外来遺伝子が導入された毛状根およびカルスを選抜するため、選択培地に添加する抗生物質の処理濃度について検討を行った。その結果、毛状根は5  $\mu$ g/ml以上のカナマイシンを添加したMS固形培地において伸長が阻害されることが明らかになった。また、カルスについては、50  $\mu$ g/ml以上のカナマイシンおよび1  $\mu$ g/ml以上のピアラホスを添加したMS固形培地において増殖が抑制された。以上の結果から、毛状根においてはカナマイシンが選抜剤として有効であることが明らかとなった。一方、カルス細胞においては抗生物質による最低阻害濃度が大きく異なることから、カナマイシン抵抗性遺伝子を選抜マーカーとして用いるよりも、より効力の高い抗生物質耐性遺伝子が組み込まれた選抜マーカーを用いる方が効果的であると考えられた。

### 3. 形質転換植物細胞からの外来遺伝子の検出

#### 1) GUS assayによる組織化学的検出

pR-GUS/pTRA415を導入し、さらに、カナマイシン添加MS培地上で誘導されたトマトカルスについて、GUS assayによる組織化学的検出を行った。サリチル酸で処理した後、カルス細胞のGUS assayを行った結果、カル

ス塊の一部に呈色が認められ、カナマイシンによる選抜からのエスケープが多くみられた (Fig. 3-B)。また、これらのカルス増殖度は低く、カナマイシン耐性遺伝子を導入したカルスからの個体再生頻度は低いと報告されていることから、カナマイシン耐性遺伝子をマーカーとしたA. *tumefaciens*による形質転換には、多くの問題点があると考えられた。

一方、pBI121およびpR-GUS/pTRA415を導入したトマト毛状根についてGUS assayを行った結果、BI121を導入した毛状根は陽性反応を示し、外来遺伝子が導入されていることが確認された。また、サリチル酸処理を行ったpR-GUS/pTRA415導入毛状根においてはGUS陽性反応は認められなかったが、PCR法によって、pR-GUS/pTRA415の導入が確認されたことからそれらの形質転換毛状根においては発現量が皆無、もしくは極微量であると考えられる。

#### 2) 染色体DNAの抽出とPCR法による外来遺伝子の検出

A. *rhizogenes*によって誘導されたトマト毛状根から染色体DNAを抽出し、*rolC* 遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCR法によって、植物の染色体DNAに組み込まれたT-DNA領域の検出を試みた。また、pR-GUS/pTRA415を導入しA. *tumefaciens*により得られた形質転換カルスについては染色体DNAを抽出した後、GUS 遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCRを行なった。pR-GUS/pTRA415、pBI121を導入したA. *rhizogenes*から誘導された毛状根については染色体DNAを抽出後、*rolC* 遺伝子に特異的なプライマーとGUS 遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCRを行い、T-DNAの検出を試みた。まず、A. *rhizogenes*から誘導された毛状根とA. *tumefaciens*により形質転換されたカルスから染色体DNAを抽出し、1%アガロースゲルを用いた電気泳動によって染色体DNAの存在を確認後、アニーリング温度を70℃としたPCRを行った。その結果、Fig. 4に示すようにDNAの増幅バンドが検出されたことから本実験で誘導された根が形質転換毛状根であること、また、形質転換



されたカルス細胞が遺伝子導入カルスであることが確認された。

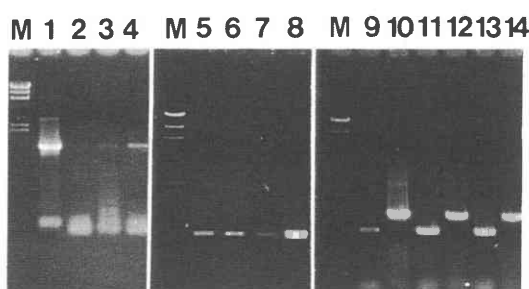


Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments PCR-amplified from transformed callus cells and induced hairy roots.

M; Molecular weight marker.

Lane 1-4; DNA amplified from RGUS/pTRA415 transformed callus cells with GUS gene primers.

Lane 5: DNA amplified from pRi1724 with rol C primers.

Lane 6: DNA amplified from hairy roots induced by MAFF03-01724 with rol C gene primers.

Lane 7: DNA amplified from hairy roots induced by MAFF07-20001 with rol C gene primers.

Lane 8: DNA amplified from hairy roots induced by MAFF07-20002 with rol C gene primers.

Lane 9: DNA amplified from pRi1724 with rol C gene primers.

Lane 10: DNA amplified from pBI121 with GUS gene primers.

Lane 11: DNA amplified from hairy roots transformed by pBI121/MAFF03-01724 with rol C gene primers.

Lane 12: DNA amplified from hairy roots transformed by pBI121/MAFF03-01724 with GUS gene primers.

Lane 13: DNA amplified from hairy roots transformed by pRGUS/pTRA415/MAFF03-01724 with rol C gene primers.

Lane 14: DNA amplified from hairy roots transformed by pRGUS/pTRA415/MAFF03-01724 with GUS gene primers.

#### 4. トマト毛状根からの個体再生条件の検討

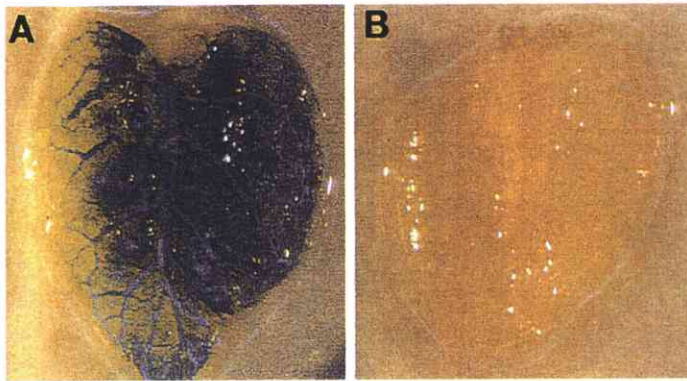
毛状根から再分化した個体には、正常な個体には見られない多くの特徴が見られ、hairy root syndrome とよばれている。これまでに報告された特徴として、不定根の分化が著しい、根の生長が速い、地上部の節間が短い、葉が波状になる、開花時期の遅速がみられる、柱頭の長短がみられる、塊根の肥大が悪い、稔実率が低いなどが挙げられる。このような特性のうち、矮化や活発な不定根分化、早期開

花性などは農業上も重要な問題となり、それら特性を解析することが重要となっている。そこで、本項ではトマト毛状根からの個体再生条件の確立を目的として、毛状根からのカルス誘導条件の検討を行なった。A. rhizogenes MAFF 07-20001株から誘導された毛状根を植物生長調整物質を含むMS固形培地上で培養した結果、BAP濃度が0.3 μg/ml以上の濃度区において毛状根からカルスが誘導された。今後は植物生長調整物質の種類や濃度区についてさらに詳しく検討を重ね個体再分化最適条件を明らかにする予定である。

#### 5. A. tumefaciensによるMATベクターシステムの検討

農作物の優良な形質は多数の遺伝子群に支配されており、これらを改良するには、遺伝子組換えを繰返し、多数の遺伝子を導入・蓄積させることが不可欠である。しかし、従来の技術では、遺伝子組換えに使用する標識遺伝子が遺伝子組換え体に残留するため、一度用いた標識遺伝子の再利用ができず、多数の遺伝子を導入することが難しいという欠点があった。また、組換え植物を食品として利用する場合、標識遺伝子の安全性の確認や環境への影響評価が必要とされている。そこで、本研究ではMATベクターシステムと呼ばれる植物遺伝子導入技術の有効性について検討した。

まずコントロールベクター pIPT5を用いてipt遺伝子に対する評価試験を行った。タバコ葉にpIPT5を導入したA. tumefacienseを感染させたところ、培養約1カ月後にホルモンフリー培地上で葉片の周辺部に多数の不定芽が分化した。さらに、これらの不定芽を葉片より分離し、1カ月間培養したところ、形態的に正常と思われる正常個体と頂芽優勢を喪失した多芽体(ESP)(Fig. 3-C)に識別分類することができた。これらの再生個体より葉を取り、ホルモンフリー培地に置床した。置床した正常個体の葉片からは芽の再分化は起こらなかったが、ESPの葉片からは芽の再分化が観察された。また、これら2種類の再生個体葉からGUS遺伝子発現の検出を試みた結果、Fig. 5に示すよ



**Fig. 5** GUS staining of transformed plants by pIPT5.  
 A: Leaf tissue of tobacco transformed with pIPT5.  
 B: Non-transformed tobacco leaf tissue (control).

うにESPは青く呈色したのに対して正常個体では呈色反応が認められなかった。この結果から、葉片からの再分化個体を再度選抜することによって、容易に非組換え個体を除去できることが明らかとなった。

次に、MATベクター pNPI132を用いてタバコへの遺伝子導入を試みた。pNPI132は、*A. tumefaciens* のTiプラスミド上に存在するサイトカイニン合成酵素 (isopentenyl transferase) 遺伝子 *ipt* と、*Saccharomyces cerevisiae* のpSR1プラスミド由来、部位特異的組換え系因子R/Rsの組み合わせを標識遺伝子として用いたものである。このベクターを用いると、遺伝子導入後、R遺伝子の発現による組換え酵素の働きで、この酵素が作用する認識部位Rsで遺伝子が脱離する仕組みになっている。また、X-Gluc添加改変L-Broth上に画線したpNPI132/LBA4404が青く呈色し、GUS遺伝子が発現していたことから、*A. tumefaciens* における35Sプロモーターの発現が明らかとなった。このことから、pNPI132/LBA4404においては、植物での遺伝子発現に用いた35Sプロモーターが、アグロバクテリウム内で発現し、本菌の継代培養中に *ipt* 遺伝子が脱離する可能性があることを示唆する。そこで、pNPI132ベクターを導入した *A. tumefaciens* は、20%グリセロールを含む改変L-Brothを用いて-20℃に凍結保存し、植物への形質転換にあたっては、この保存株より起こした新鮮な菌を用いることにした。本菌を用いてpNPI132をタバコ葉に導入した結果、前述と同様なESPが得られ、これを分離・継続培養したところ、感染後、約4カ月で正常に伸長す

る個体が出現した (Fig. 3-D)。このシュートを、ESPより分離し、同様の培地に移植したところ、正常に発育した。これらの個体についてGUS assayを行い、GUS遺伝子の発現を確認するとともに、染色体DNA抽出を行い、PCRによってGUS遺伝子の増幅を確認した。*ipt* 遺伝子の脱落を確認するためには、PCRによるさらなる検討が必要であるが、ESPから正常な伸長を示す形態へと変化することから、これらのクローンは組換え因子によって *ipt* 遺伝子が脱落したものであると考えられる。

以上の結果から、*ipt* 遺伝子を導入した細胞は植物成長調整物質無添加培地でも増殖し、不定芽に分化し、それらの組換え個体は、サイトカイニンの過剰生産により、頂芽優勢を喪失した多芽体になること、その後、組換え因子とともに *ipt* 遺伝子が消失し、組換え個体の頂芽優勢が復活することが明らかになった。また、組換え体は、正常伸長し発根する。このように、MATベクターシステムは、*ipt* 遺伝子を用いることによって、培地中に植物ホルモンを添加せずに、組換え個体の再分化を可能にすると同時に、肉眼で容易に、組換え個体とマーカーフリー組換え個体の選抜を可能にすることが明らかとなった。また、選抜時に培地へ抗生物質や除草剤などを添加する必要がないため、植物細胞の活性低下を回避でき、再分化を容易にする効果が得られるという利点がある。このシステムの適用により、これまで導入細胞の選抜が困難であった植物への遺伝子導入、無用な遺伝子をもたない安全性の高い組換え植物の作成、遺伝子組換えの繰り返しによる多数の遺

伝子の導入が可能になると考えられる。タバコにおける評価試験で、MATベクターシステムが、植物への遺伝子導入に有効であることが判明したので、次に、トマトへの遺伝子導入を試みた。pIPT5をトマトへ感染させたところ、多芽体形成は起こらなかった。しかしながら、菌液をトマト茎断片に接種したところ、切断面よりカルスが誘導され、ホルモンを添加しないMS培地で活発な増殖を示した。これを切断分離し、継続培養したカルスからはシュートが形成され、カルスのGUS assayの結果、青色呈色反応を示した。今後は、得られたシュートを分離・培養し、それらの生育形態を検討する予定である。また、多芽体が形成された場合には、この系を用いたトマトへのMATベクターシステム適用の可能性が期待される。また、ホルモン活性を高めるため、ipt遺伝子によって生産される植物ホルモンipaなどを種々の濃度で培地に加え、組換え体獲得のための最適ホルモン条件を検討することも必要となる。以上の結果より、*A. rhizogenes* を用いたリーフディスク法による毛状根の誘導条件を確立することができた。また、外来遺伝子の導入には、トリペアレンタル・メーティング法によりバイナリーベクターを導入した*Agrobacterium* を用いることが適当であると考えられる。*A. tumefaciens* による遺伝子導入系は、MATベクターシステムの採択によって、大きく改善されると考えられるので、植物種に合ったそれぞれの培養条件の確立が必須となる。今後は、トマト毛状根からの再生個体作出システムの確立を試みるとともに、MATベクターシステムのトマトへの適用について検討し、マーカーフリー遺伝子組換えトマト作出法を確立したい。

## 引用文献

- 1) A. C. Smigocki and L. D. O. wens. (1988). Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 : pp.5131-5135.
- 2) 安藤忠彦・坂口健二. (1990). 微生物学基礎講座 8 巻. 遺伝子工学. pp.416-456. 共立出版株式会社. 東京.
- 3) Araki, H., Jeampipatkul, A, Tatsumi, H., T., Ushino, K., Muta, T. and Oshima, Y. (1987). Molecular and functional organization of yeast plasmid pSRI. J. Mol. Biol. 182 : 191-203.
- 4) 海老沼 宏安. (1996). 植物ホルモンを利用した新しい植物遺伝子導入法. MATベクターシステムの開発. pp.45-51.
- 5) Hiroyasu, Ebinuma., Koichi, Sugita., Etsuko, Matsunaga., and Mikio, Yamakado. (1997). Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 : 2117-2121.
- 6) 池原 森男・竹石 桂一・富田 基郎.(1995). 動植物の遺伝子工学. 基礎から応用へ. pp.232-254. 廣川書店. 東京.
- 7) 岩淵 雅樹・志村 令郎. (1992). ラボマニュアル. 植物遺伝子の機能解析. pp31-46.78-80. 丸善株式会社.
- 8) 倉石 衍. (1991). 酵母研究法の新展開. pp. 49-61. 学術出版センター. 東京.
- 9) Masahiro, Ohshima. , Hirotaka, Itoh., Makoto, Matsuoka., Taka, Murakami. and Yuko, Ohashi. (1990). Analysis of Stress-Induced or Salicylic Acid-Induced Expression of the Pathogenesis-Related a Protein Gene in Transgenic Tobacco. The Plant Cell.2 : 95-106. American Society of Plant Physidofist.
- 10) 松永悦子・杉田耕一・山内幹子・海老沼宏安. (1997). 日本植物分子細胞生物学会講演要旨集. pp. 136.

- 11) 長田敏行. (1993). 植物細胞へのDNA挿入. (日本生化学会編). 核酸-細胞工学的技術-. pp. 187-191-196. 東京化学同人.
- 12) 永井 進. (1990). 酵母の細胞工学と育種. pp. 97-111.
- 13) 中山広樹. (1996). バイオ実験イラストレイテッド (3) 本当にふえるPCR. pp. 22-26. 秀潤社.
- 14) 中山広樹・西方敬人. (1995). バイオ実験イラストレイテッド遺伝子解析の基礎. pp. 19-22.53-63. 秀潤社.
- 15) 日本生化学会. (1986). 統生化学実験講座1 遺伝子研究法2. pp. 214-216.
- 16) 西村正暘・大内成志. (1990). 植物感染生理学. pp.30-30.50-54.270-271. 文永堂出版株式会社.
- 17) 大島正弘・大橋祐子. (1991). 病斑形成ストレスによる遺伝子発現. 特にPRタンパク質遺伝子を中心として. 植物細胞工学. 3.7: 618-623.
- 18) Sugita, K., Matsunaga, E., Yamakado, M. and Ebinuma, H. (1997). The "MAT-vector" a powerful transformation vector for generating marker-free transgenic independently of sexual crossing.
- 19) 田中伸和. (1993). エレクトロポレーションによる *Agrobacterium rhizogenes* MAFF03-01724株の形質転換. 日植病報. 59: 587-593.
- 20) 田中 伸和. (1993). コンジュゲーションもしくはエレクトロポレーションによる *Agrobacterium rhizogenes* MAFF 03-01724株が保有するpRi1724の移行とその解析. 日植病報. 59: 594-600.
- 21) 山田康之. (1992). 遺伝子工学的実験法. 植物分子・細胞工学マニュアル. pp. 97. 講談社.
- 22) 山田康之. (1991). 植物バイオテクノロジー (2). pp. 168-175. 東京化学同人.

## 摘 要

本研究では、*Agrobacterium* 属菌を利用したトマトへの外来遺伝子の導入を確立するとともにMATベクターシステムによる遺伝子導入の基礎的条件の検討を行った。3系統の *A. rhizogenes* (MAFF03-01724, -07-20001, -07-20002) および *A. tumefaciens* (LBA4404) にトリペアルメンタルメイティング法を用いて外来遺伝子 (pBI121またはpRGUS/pTRA415) を導入し、その遺伝子がそれぞれの細菌に導入されたことを導入遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCR法によって確認した。遺伝子導入が確認された細菌をトマト葉外植片と共存培養し、感染させた結果、トマト植物の比較的若い葉を用いた場合に効率よく毛状根が誘導された。次に、得られた毛状根から染色体DNAを抽出し、それらを鋳型として導入遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCRを行った。その結果、導入した遺伝子の特異的な増幅が確認されたことから、毛状根を利用したトマトへの外来遺伝子の導入法が確立された。また、MATベクターシステムについても基礎的条件が明らかにされたことからトマト植物への外来遺伝子導入法として利用できると考えた。