

Agrobacterium tumefaciens によるアルファルファの形質転換 —— NPT II と GUS 遺伝子の発現 ——

大井 弘幸・堀川 洋 (帯広畜産大学)

Transformation of alfalfa using *Agrobacterium tumefaciens*

— Expression of NPT II and GUS genes —

Hiroyuki Ohi, Yoh Horikawa

(Obihiro Univ. Agri & Vet. Med.)

緒 言

今日、多くの形質転換植物が作りだされているが、双子葉植物に最もよく利用されている遺伝子操作技術は *Agrobacterium tumefaciens* を使う方法である。本実験では、*A. tumefaciens* の持つプラスミドをベクターとして、アルファルファへの NPT II (カナマイシン耐性) 遺伝子と GUS (β -グルクロニターゼ) 遺伝子の導入効率を調査した^{1, 2, 3)}。

材料及び方法

(供試材料)

アルファルファ：グリム、サラナック、バークス、モアパ

Agrobacterium tumefaciens 系統：

LBA4404

プラスミド：pBI101 NPT II (カナマイシン耐性) 遺伝子、GUS (β -グルクロニターゼ) 遺伝子を有する (Fig.1.)。

(供試部位の作成)

5%アンチホルミン溶液で15分間殺菌した種子を無菌水で3回洗浄した。濾紙に無菌水を吸わせてから、ハイポネ培地 (1g/1 ハイポネック

ス、20g/1 サッカロース、8g/1 寒天、pH 5.8) に無菌播種した。約2週間後、子葉と胚軸を切り取り *A. tumefaciens* を感染させる材料とした。

(*A. tumefaciens* の培養と感染)

pBI101 をプラスミドとして持つ *A. tumefaciens* LBA4404 を 100 μ g/ml リファピシン、300 μ g/ml ストレプトマイシン、25 μ g/ml カナマイシンを含む LB 液体培地 (10g/1 バクトトリプトン、5g/1 イーストエキストラクト、5g/1 塩化ナトリウム、1N-水酸化ナトリウム 0.2ml/1、1.2% バクトアガー、pH 7.2) 25ml で、一晚28°Cの振とう培養をした。作成した植物材料の子葉 (各品種180-230個体) と胚軸 (160-310個体) を *A. tumefaciens* 培養液に浸し、10分後に取り出し濾紙で余分な培養液を取り除いて、培地に置床した。この時、*A. tumefaciens* の感染を行わないものをコントロールとした。

(選抜濃度の決定)

カナマイシンによる選抜濃度は、バークスのカ

ルス50mgを、25、50、75、100、125、150 mg/1のそれぞれのカナマイシンを含有するSH培地(2mg/1 2, 4-D、0.2mg/1 Kinetin)に置床し、1ヶ月後のカルスの生重と生育程度から決定した。

(培養とカナマイシンによる形質転換体の選抜)

培地はSH培地を基本培地とし、培養法は2段階法を用いた。*A. tumefaciens*の感染後、SH培地(2mg/1 2, 4-D、0.2mg/1 Kinetin)に置床し、共存培養した。3日後に100 μ g/mlバンコマイシン、250mg/1カルベニシリンを含むSH培地(2mg/1 2, 4-D、0.2mg/1 Kinetin)に置床し、増殖した*A. tumefaciens*の除菌を行った。2週間培養後、100mg/1カナマイシンを含むSH培地(5mg/1 2, 4-D、2mg/1 Kinetin)を不定胚誘導培地として継代して、さらにカナマイシン耐性の選抜を行い、2次選抜とした。その後、100mg/1カナマイシンと50mM硫酸アンモニウム、22.4mMプロリンを含むホルモン・フリーのSH培地を再分化培地⁴⁾として継代し、それ以降1ヶ月毎に培地を継代してシュートの形成を試みた。また、コントロールはカイナマイシンを含まない培地で同様に培養した。

(蛍光法による形質転換体の確認)

2次選抜後、再分化培地で2カ月間培養したカナマイシン耐性個体の組織を用いた。組織(50-100mg)をエッペンドルフチューブ(1.5ml)にいれ、100 μ lの抽出緩衝液(50mMリン酸緩衝液 pH 7.0、10mM EDTA、0.1% TritonX-100、10mM 2-メルカプトエタノール)を加えた。十分にホモジナイズ

し、12,000ppmで5分間遠心し、上清(80 μ l)を他のエッペンドルフチューブに移した。これに抽出緩衝液を170 μ l加え、さらに基質溶液(4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide)を加えて、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートして紫外光による蛍光反応の有無で形質転換体か否かを判断した⁵⁾。

結 果

形質転換したカルスをカナマイシンで選抜するために、0-100mg/1の各濃度のカナマイシン含有培地にバータスのカルスを置床した1ヶ月後の結果をFig. 2に示す。カナマイシン濃度が75mg/1以上になるとカルスの生重が著しく小さくなった。しかし、抗生物質による選抜ではエスケープが生じると予想されるため⁶⁾、本実験では100mg/1を形質転換体の選抜濃度とした。

Fig. 3にカナマイシンによる1次選抜と2次選抜の結果を示した。2次選抜の結果により、子葉ではグリム(46.4%)、サラナック(42.8%)、胚軸ではモアパ(38.6%)が高い形質転換効率を示した。

GUS遺伝子を利用した蛍光法によって、形質転換体の組織は紫外光の照射により蛍光反応を示したが、非形質転換体及びコントロールの組織は反応を示さなかった。Fig. 4にその選抜結果を示した。子葉ではサラナック(17.0%)、グリム(15.5%)、胚軸ではバータス(10.6%)が高い結果を示した。また、バータスを除いては胚軸よりも子葉の方が高い傾向にあった。

以上の結果より、カナマイシンによる選抜では4品種全体の平均で17.2%のエスケープが生じていることが明らかとなった。

最終的な形質転換効率は、子葉ではグリムで15.5%、サラナックで17.0%、バータスで5.0

%、モアパで9.5%、また胚軸ではグリムで7.8%、サラナックで6.7%、バータスで10.6%、モアパで5.7%であった (Table 1)。

考 察

本実験の結果では、品種と供試部位の組み合わせによって、*A. tumefaciens* による形質転換効率が異なった。カナマイシンの選抜濃度はバータスの結果を基に決定したため、バータスに比べてグリムとサラナックでエスケープ率が高い結果となった。これは、品種によってカナマイシンに対する耐性が違うことが原因とも考えられることから、品種毎に選抜濃度を設定する必要があると思われる。また、抗生物質で選抜する過程で非形質転換細胞であっても抗生物質に対する耐性を示すものがしばしば見られることが⁶⁾、エスケープが生じた原因と考えられる。

本実験の形質転換効率は他の報告と比較して高くはなかった。Mireille Chabaud, et al.⁷⁾ が *M. varia* で報告した形質転換効率に関する4つのパラメーターによると、葉はキズをつけやすく感染部位を増やすことが出来るので胚軸よりも適していること、*A. tumefaciens* の系統は植物の遺伝子型との相互関係が適しているものを選ぶこと、共存培養の期間は3日間よりも4日間の方が適していること、しかし、長すぎると植物組織に悪影響を及ぼすこともあるので、植物組織への影響を考慮に入れて設定すること、カナマイシンの濃度は50, 100 mg/l でも選抜結果に影響しないことを示している。したがって、各品種の遺伝子型に適した処理を施すことによって、形質転換効率を高める事が出来るものと考えられるので、今後更に検討していきたい。

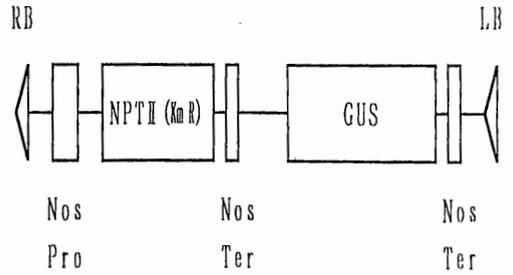


Fig. 1. T-DNA region of pBII01 showing the left (LB) and right (RB) border regions, neomycin phosphotransferase II (NPT II) gene, and β -glucuronidase (GUS) gene.

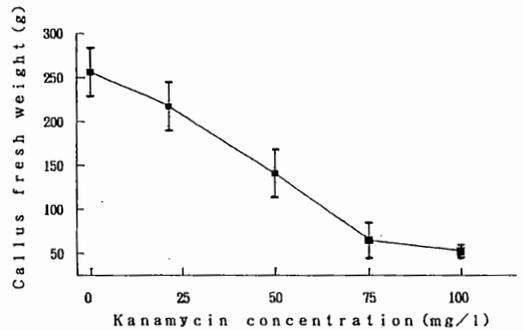
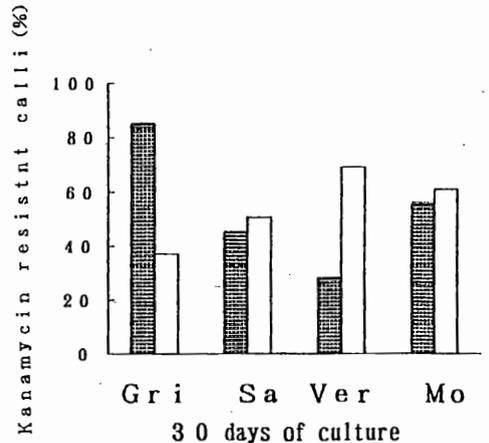


Fig. 2. The effects of kanamycin concentration to growth of callus.



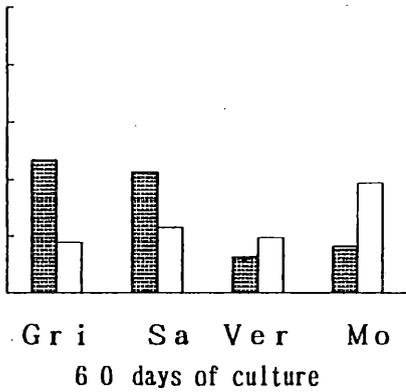


Fig.3. Percentage of calli showing kanamycin resistant of cotyledon (□) and hypocotyl (▨) after 30 (right) and 60 (left) days of culture on medium containing 100 mg/l kanamycin.

(Gri : Grimm, Sa : Saranac, Ver : Vertus, Mo : Moapa)

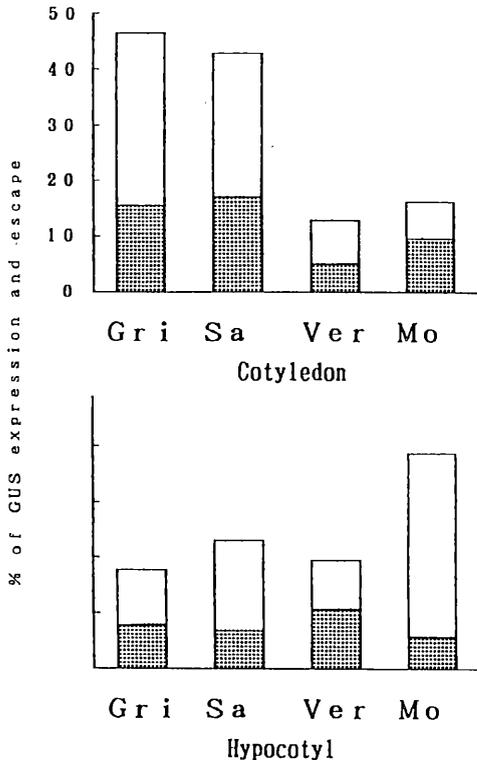


Fig. 4. Percentage (□) of calli showing GUS expression and escape (▨) of coty-

ledon and hypocotyl after 90 days of culture on medium containing 100 mg/l kanamycin.

(Gri : Grimm, Sa : Saranac, Ver : Vertus, Mo : Moapa)

Table 1. Tested cultivar and transformation frequency.

Cultivar	Number of explants tested	Resistant calli to kanamycin (%)		Calli showing GUS expression (%)
		30 days ¹⁾	60 days ²⁾	
Grimm	C ¹⁾ : 2 2 0	1 8 7 (85.0)	1 0 2 (46.4)	3 4 (15.5)
	H ²⁾ : 2 0 5	7 6 (37.1)	3 6 (17.6)	1 6 (7.8)
Saranac	C : 2 2 9	1 0 3 (45.0)	9 8 (42.8)	3 9 (17.0)
	H : 3 1 3	1 5 8 (50.5)	7 2 (23.0)	2 1 (6.7)
Vertus	C : 1 8 1	5 1 (28.2)	2 3 (12.7)	9 (5.0)
	H : 2 0 7	1 4 3 (69.1)	4 0 (19.3)	2 2 (10.6)
Moapa	C : 1 9 9	1 1 0 (55.3)	3 2 (16.1)	1 9 (9.5)
	H : 1 5 8	9 6 (60.8)	6 1 (38.6)	9 (5.7)

1) C : cotyledon, H : hypocotyl.

2) Days after treatment.

Summary

Kanamycin resistant calli of alfalfa were obtained by infection with *Agrobacterium tumefaciens* to cotyledon and hypocotyl tissue. Explants were inoculated with *A. tumefaciens* containing NPT II and GUS genes produced kanamycin resistant calli on medium containing Kanamycin. Transformation and stable integration of transgenes were confirmed by GUS assay.

In the results, kanamycin resistant calli were induced from 27% of all explants on selective medium, although 64% of them were escape. After all, GUS expression were 10% of all explants tested.

引用文献

- 1) M. R. Thomas, R. J. Rose, and K. E. Nolan (1992)
Plant Cell Reports 11 : 113 - 117.
- 2) Elias A. Shahin, Albert Spielmann, Kitisri Sukhapinda, Robert B. Simpson, and Mayer Yashar² (1986)
CROP Sci, 26 : 1235-1239, NOVEMBER - DECEMBER 1235-1239.
- 3) Maria Deak, Gyorge B. Kiss, Csaba Koncz, and Denes Dudits (1986)
Plant Cell Reports 5 (3) : 97- 100.
- 4) Koike M., Y. Yoshida, Y. Kagaya and T. Shimada (1991)
Plant Tissue Culture Letters 8 (3) : 152 - 157.
- 5) 内宮 博文 (1990) 植物遺伝子操作マニュアル—トランスジェニック植物の作り方、講談社
- 6) 小西 裕和、鎌田 博 (1991) 植物の化学調節 26 : 92-96
- 7) Mireille Chabaud, Joan E. Passiatore, Frank Cannon, and Vicky Buchanan - Wollaston (1988)
Plant Cell Reports 7 : 512 - 516.