

エレクトロポレーションによるAgrobacterium rhizogenes MAFF03-01724株の形質転換

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	田中, 伸和 高尾, 実里 松本, 武 町田, 泰則
発行元	日本植物病理學會
巻/号	59巻5号
巻号補足	
掲載ページ	p. 587-593
発行年月	1993年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



エレクトロポレーションによる *Agrobacterium rhizogenes* MAFF03-01724 株の形質転換

田中 伸和*・高尾 実里*・松本 武*・町田 泰則**

Nobukazu TANAKA*, Misato TAKAO*, Takeshi MATSUMOTO* and Yasunori MACHIDA**:
Transformation of *Agrobacterium rhizogenes* Strain MAFF03-01724 by Electroporation

Abstract

Agrobacterium rhizogenes MAFF03-01724 (mikimopine type), isolated in Japan, showed resistance to ampicillin, carbenicillin, chloramphenicol, kanamycin, rifampicin, streptomycin, tetracycline and vancomycin. Two kanamycin sensitive mutants (Km^s) and two chloramphenicol sensitive ones (Cm^s) were obtained from strain 1724 by treatment with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) for transformation by transfer of foreign genes possessing antibiotic selection markers. Transformants were obtained from the Km^s mutant by electroporation with binary vector, pBIN19, and/or pF11 constructed by cloning of *Bam*HI fragment (8.5 kb) of pRI1724 into pHSG298 vector. To improve transformation frequency, strain 1724 was cultured in a flask with baffles and cells washed with 10% glycerol by repeated pipetting in extrusion. By this modified preparation, transformation frequency of pBIN19 increased fifty times.

(Received February 19, 1993)

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, antibiotic resistance, mutant, electroporation.

緒 言

毛根病菌 *Agrobacterium rhizogenes* は、植物に毛状根を誘発する土壌伝染性植物病原細菌³⁾で、菌体内に巨大プラスミド (Ri プラスミド) を保有していることが知られている^{2,10)}。Ri プラスミド上には、植物細胞に移行してゲノム DNA に挿入される断片 (T-DNA) が存在し、ここには、毛状根の誘発に関与する幾つかの遺伝子および誘発した毛状根中でオパインと呼ばれる非タンパク態アミノ酸誘導体を生産させる遺伝子がコードされている²⁰⁾。

A. rhizogenes 感染によって誘発された毛状根を切り出し、適当な植物組織培養用培地上で培養すると旺盛な増殖を示す。この性質を利用した有用二次代謝産物の生産系が構築されている。一方、毛状根から再生した植物体は、矮化や器官の小型化などに代表される

「毛状根症候群」と呼ばれる形態を示すことが知られており、本形質を利用した植物改良も開始されている。しかしながら、国内で供試されてきた *A. rhizogenes* の多くは外国産の輸入菌株で、その使用には常に植物防疫法の規制を受けるのである。

一方、国内産 *A. rhizogenes* としては、千葉県のメロン温室内で発生した毛根病の病原菌であるメロン毛根病菌 MAFF03-01724 株 (以下、1724 株と略) が知られている¹³⁾。本菌株は、誘発した毛状根内でオパインの一種であるミキモピンを生産させる⁵⁾。本菌株は国内産菌株であるため、当然ながら植物防疫法による規制を受けることなく、毛状根誘発や培養、再生個体の栽培などが可能である。既に我々は、本菌株が保有する Ri プラスミドよりプラスミドおよびコスミド・ライブラリーを作製し、T-DNA および *vir* 領域の存在を確認している¹⁶⁾。一方、本菌株の性状については、塩見らが

* ダイセル化学工業(株)総合研究所生理評価研究所 Bioassay Laboratory, Research Center, Daicel Chemical Industries, Ltd., Shinzaike, Aboshi-ku, Himeji, Hyogo 671-12, Japan

** 名古屋大学理学部生物学科 Department of Biology, Faculty of Science, Nagoya University, Furou-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464, Japan

詳細な試験を行っている¹³⁾が、抗生物質感受性に関するまとまった報告はない。抗生物質感受性の有無を調べない限り、本菌株に抗生物質耐性遺伝子をマーカーとする外来DNAを導入し、形質転換することは困難である。

植物形質転換用ベクターを *Agrobacterium* 属細菌に導入するためには、そのベクターが少なくとも大腸菌と *Agrobacterium* 属細菌間を移行可能であることが必要とされている。特に、最近では、トリペアレンタル・メイティング法によって、バイナリー・ベクターを大腸菌から *Agrobacterium* 属細菌に送りこむ方法が、簡単で確実な方法として定着している⁹⁾。しかしながら、本法を用いる場合には、導入したい遺伝子をいったん移行可能なベクターに連結しておく必要があり、また、供与菌と受容菌および移行ヘルパープラスミドを保有する菌を同時に培養する必要がある。さらに、これら3種の菌のうち、目的のベクターを受容した菌のみが生育する選択培地を作製し、選抜を行う必要があり、手順と日数を要する。一方、外来DNAを *Agrobacterium* 属細菌に直接導入する方法がある。この場合、大腸菌のようなコンピテント細胞を作製する方法は *Agrobacterium* 属細菌では確立されておらず、もっぱら、凍結・融解の繰返しによって膜を緩め、DNAを導入する方法が用いられてきた⁹⁾。本法は簡便な方法であるが、形質転換効率が概して高くない。簡便で

かつ効率の良い *Agrobacterium* 属細菌の形質転換方法が求められていたが、最近、次々にエレクトロポレーション法によって効率良く *Agrobacterium* 属細菌にDNAを導入できることが報告されている^{8,9,11,19)}。

本報では、*A. rhizogenes* 1724株の抗生物質に対する性質、ニトロソグアニジンを用いた1724株からのカナマイシンおよびクロラムフェニコール感受性変異株の取得とエレクトロポレーション法による形質転換法の確立、形質転換効率を上げるための菌の調整法の改良などについて報告する。

材料と方法

細菌およびプラスミド 本実験で使用した *Agrobacterium* 属細菌の菌株およびその性質を Table 1 に示した。*A. rhizogenes* MAFF03-01724株¹³⁾ (ミキモピン型毛状根誘発プラスミド pRi1724 を保有) は、農林水産省農業生物資源研究所遺伝資源センター (茨城県つくば市) より分譲を受けた。*A. tumefaciens* LBA4404株およびバイナリー・ベクター pBIN19¹⁾ は、東洋紡績⁸⁾より購入した。大腸菌のクローニング・ベクター pHSG298 は、宝酒造⁸⁾より購入した。pF11 は、pRi1724 の 8.5 kb の *Bam*HI 断片 (T-DNA および *vir* 領域外) を pHSG298 の *Bam*HI 部位に組み込むことによって作製した。

培地および抗生物質 *Agrobacterium* 属細菌の培養

Table 1. Strains and antibiotic resistance

Strain	Antibiotic resistance ^{a)}	Source
<i>Agrobacterium</i> spp.		
<i>A. rhizogenes</i> MAFF03-01724 (pRi1724)	Am ^R , Cb ^R , Cm ^R , Km ^R , Rif ^R , Sm ^R , Tc ^R , Vm ^R	13)
<i>A. rhizogenes</i> DC-AR2 (pRi1724)	Am ^R , Cb ^R , Cm ^R , Km ^S , Rif ^R , Sm ^R , Tc ^R , Vm ^R	Derivative of strain 1724 (this study)
<i>A. rhizogenes</i> DC-AR3 (pRi1724)	Am ^R , Cb ^R , Cm ^S , Km ^S , Rif ^R , Sm ^R , Tc ^R , Vm ^R	Derivative of strain DC-AR2 (this study)
<i>A. rhizogenes</i> DC-AR4 (pRi1724::kan)	Am ^R , Cb ^R , Cm ^R , Km ^R , Rif ^R , Sm ^R , Tc ^R , Vm ^R	Strain DC-AR2 harboring pRi1724 containing pF11 with Km ^R gene (this study)
<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 (pAL4404)	Km ^S , Sm ^R	Host bacterium for binary vectors, 4)
<i>A. tumefaciens</i> C58C1	Km ^S , Rif ^R	C 58 cured of pTiC58, 18)
Plasmids		
pHSG298	Km ^R	Cloning vector constructed from pUC18 (Takara Shuzo Co., Ltd.)
pF11	Km ^R	Plasmid constructed from pHSG298 and 8.5 kb of <i>Bam</i> HI fragment from pRi1724 (this study)
pBIN19	Km ^R	Binary vector, 1)

a) Abbreviations were described in Table 2.

Table 2. Antibiotic resistance of *A. rhizogenes* strain 1724

Antibiotic	Abbreviation	Concentration ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}	Resistance ^{b)}
Ampicillin	Am	50	+
Carbenicillin	Cb	100	+
Chloramphenicol	Cm	34	1.2×10^{-5}
Kanamycin	Km	50	+
Rifampicin	Rif	50	2.3×10^{-5}
Streptomycin	Sm	100	+
Tetracycline	Tc	50	3.5×10^{-4}
Vancomycin	Vm	100	+

a) Concentrations of antibiotics used in LB agar plates.

b) + and numerical values indicate resistance and frequencies of resistant mutant, respectively.

には、LB 培地 (10 g バクトトリプトン, 5 g イーストエキストラクト, 5 g NaCl, 脱イオン水 1 l, pH 7.0), LBMG 培地 (5 g バクトトリプトン, 2.5 g バクトイーストエキストラクト, 2.5 g NaCl, 5 g マンニトール, 1.16 g グルタミン酸ナトリウム, 0.25 g KH_2PO_4 , 0.1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 mg ビオチン, 脱イオン水 1 l, pH 7.0), SOC 培地 (2% バクトトリプトン, 0.5% バクトイーストエキストラクト, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM グルコース, pH 7.0) を使用した⁶⁾。固形培地は、全て 1.5% となるようバクタアガーを用いて固化した。

使用した抗生物質については、Table 2 に示した。

抗生物質感受性の検定 *A. rhizogenes* 1724 株は、 -70°C で冷凍保存し、使用時に LB 固形培地上で 30°C で 36 時間培養した。本菌株を 5 ml の LB 液体培地に接種し、 30°C で 24 時間振盪培養して、 $\text{OD}_{600} = 0.7 \sim 0.8$ まで増殖後、この $100 \mu\text{l}$ を 5 ml の LB 液体培地に接種し、 30°C でさらに 16 時間振盪培養した。この菌液を LB 液体培地で 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 倍に希釈後、各種抗生物質を添加した LB 固形培地および何も添加しない LB 培地 3 プレートずつに $100 \mu\text{l}$ ずつ塗布接種し、 30°C で 36 時間培養した後に、それぞれのプレート上に出現したコロニーを数え、その平均数を用いて抗生物質耐性の有無の検定および耐性菌の出現頻度を算出した。

抗生物質感受性変異株の取得 *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (NTG) 処理法は、尾辻の大腸菌における突然変異誘発法¹²⁾ を改変して行った。すなわち、1724 株を $100 \mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン添加 LB 固形培地上で 30°C で 36 時間培養し、ストレプトマイシン耐性 1724 株のコロニーを取得した。次に、これを 2 ml の LBMG 液体培地に接種して、 30°C で 16 時間振盪培養後、その 0.5 ml を 7.5 ml の LBMG 液体培地に接種し、さらに 30°C で 6 時間振盪し、対数増殖

期まで培養した。この菌液を、 4°C , 5,000 rpm, 10 分間遠心分離し、沈澱を 8 ml の LBMG 液体培地に懸濁後、2 mg/ml NTG を含む 0.4 ml の LBMG 液体培地を加え (NTG 最終濃度 $100 \mu\text{g/ml}$)、 30°C で 4 時間振盪培養を行った。 4°C , 6,000 rpm, 10 分間の遠心分離を行い、沈澱を 4 ml の 0.85% NaCl 溶液に懸濁し、その 0.1 ml を 2 ml の LBMG 液体培地に接種して、 30°C で 16 時間振盪培養した。この培養液を $10^5 \sim 10^6$ 倍に希釈し、その $100 \mu\text{l}$ をストレプトマイシン添加 LB 固形培地に塗布接種し、 30°C で 36 時間培養した。出現したコロニーのうち、約 500 個をストレプトマイシン添加 LB 固形培地およびカナマイシン添加 LB 固形培地に楊子で移植し、 30°C で 36 時間培養してカナマイシン感受性変異株を選抜した。カナマイシンおよびクロラムフェニコール感受性を併せ持つ変異株も上述の方法で、カナマイシン感受性菌株より作出した。

エレクトロポレーション エレクトロポレーション法によって DNA を導入するための *Agrobacterium* 属細菌は、Mattanovich ら⁸⁾ および Wen-jun ら¹³⁾ の方法を改変して調製した。すなわち、*Agrobacterium* 属細菌を 10 ml の LB 液体培地に接種し、 30°C で 16 時間振盪培養後、その 1 ml を 2 l のフラスコに入れた 300 ml の LB 液体培地に接種し、 30°C で 16 時間振盪培養して、 $\text{OD}_{600} = 0.5 \sim 0.7$ まで増殖させた。この培養液を 10 分間氷冷後、 4°C , 6,000 rpm, 10 分間の遠心分離によって集菌した。菌体は、300 ml, 150 ml, 6 ml の冷 10% (v/v) グリセロールへの懸濁と上記の遠心分離を繰り返すことによって洗浄した。最後の遠心分離後、沈澱を 3 ml の冷 10% グリセロールに懸濁し、エレクトロポレーション用の菌として使用した。これらの操作は全て氷上で行った。

形質転換効率の上昇のためには、上記の手順のうち、培養時に 3 個のバッフルが付いた 2 l フラスコ中の 300 ml の LB 液体培地もしくは 3 個のバッフルが付

いた500 ml フラスコ中の75 ml のLB 液体培地にそれぞれ1 ml もしくは0.25 ml の16 時間培養菌液を接種した。前処理¹⁴⁾は、集菌後に50 ml の0.2% *N*-ラウロイルサルコシナトリウム (サルコシル) 溶液もしくは1.0 M NaCl に懸濁し、5 分間室温で振盪 (150 rpm) し、4°C, 6,000 rpm, 10 分間の遠心分離を行って再度集菌後、洗浄操作を行った。懸濁時には、10 ml の先の細い駒込ピペットを用いて、菌液の吸入・排出を50 回以上繰り返し、十分にピペッティングを行った。

調製菌は、バイナリー・ベクター導入実験では40 μ l ずつを、相同組換え実験では200 μ l ずつを2 ml のプラスチック・バイアルに分注して使用した。なお、調製菌の保存は、ドライアイス・エタノール・バス中で急速冷凍後、-70°Cで行った。

導入DNA としては、バイナリー・ベクター導入実験にはpBIN19、相同組換え実験にはpF11を用いた。エレクトロポレーションは、バイオ・ラッド社のジーン・パルサー™を使用した。バイナリー・ベクター導入実験では、40 μ l の調製菌液に少量 (5 μ l 以下) の滅菌水に溶解した40 ng のpBIN19を添加し、よく混合し氷上に置いた。これを、氷冷したサンプル・キューベット (電極間距離0.2 cm) に移し、12.5 kV/cm, 25 μ F, 600 Ω (10 msec) でエレクトロポレーションを行った。これに、0.8 ml のSOC 液体培地を加え、30°Cで1 時間振盪培養し、抗生物質を添加したLB 固形培地に塗布接種して30°Cで36 時間培養し、形質転換コロニーを形成させた。相同組換え実験では、200 μ l の調製菌液に少量 (20 μ l 以下) の滅菌水に溶解した0, 0.2, 5.0, 10.0, 20.0 μ g のpF11を添加し、よく混合して上記条件でエレクトロポレーション、培地への塗布接種および培養を行い、コロニーを形成させた。

毛状根誘発とミキモピン検出 シソ科キランソウ属植物である *Ajuga reptans* var. *atropurpurea* のリーフ・ディスクに、我々が先に報告した方法⁷⁾で、1724 株由来の抗生物質感受性変異株を接種し、毛状根誘発能の検定を行った。ミキモピンの検出は、簡便な濾紙電気泳動法¹⁵⁾を用いた。

A. rhizogenes からのプラスミドの単離とドットブロット・ハイブリダイゼーション *A. rhizogenes* 1724 株を10 ml のLB 液体培地に接種し、30°Cで16 時間振盪培養後、その3 ml をとり、4°C, 10,000 rpm, 10 分間の遠心分離によって集菌した。これを、100 μ l の溶菌用緩衝液 (50 mM グルコース, 10 mM EDTA, 25 mM トリス-HCl, pH 8.0) に懸濁し、続いて200 μ l のアル

カリ-SDS 溶液 (0.2 N NaOH, 1%ラウリル硫酸ナトリウム) を添加し、65°Cで30 分間静置して溶菌させた。次に、150 μ l の3 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.8) を添加し、5 分間氷上に置いた。4°C, 10,000 rpm, 10 分間の遠心分離後、上清を等量のフェノール、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1)、クロロホルム：イソアミルアルコール (24:1) で抽出して除タンパクを行い、最後に2 倍量のエタノールを加え、-20°Cに2 時間静置してプラスミドを沈澱させた。4°C, 10,000 rpm, 10 分間の遠心分離後、沈澱を10 μ l のTE 緩衝液 (10 mM トリス-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解し、プラスミド溶液とした。この1 μ l をニトロセルロース膜にスポットし、風乾後、80°Cで2 時間DNA を膜に固定した。プローブは、ビオチン-dATP でラベルしたpHSG298を用い、ハイブリダイゼーションならびにシグナルの検出は、先の我々の論文に記載した方法¹⁶⁾を用いて行った。

結果と考察

1724 株の抗生物質耐性

A. rhizogenes 1724 株は野生菌株であるため、これまで各種抗生物質に対する耐性についてほとんど調べられていない。我々は、すでに毛状根誘発実験において、培地へカルベニシリンおよびバンコマイシンを高濃度 (各々500 μ g/ml) で添加することによって、本菌株の増殖がほとんど抑えられることを見出している⁷⁾。そこで、上記の抗生物質を通常の *Agrobacterium* 属細菌の培養時に使用される濃度 (各々100 μ g/ml) で添加したLB 固形培地で本菌株を培養すると、菌は全く感受性を示すことなく増殖し (Table 2), この濃度では本菌株の増殖を抑えることは不可能であることが判明した。次に、一般的に使用される抗生物質、すなわち、アンピシリン、クロラムフェニコール、カナマイシン、リファンピシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリンに対する本菌株の感受性を調べた。その結果、本菌株はアンピシリン、カナマイシン、ストレプトマイシンには全く感受性がなかった。一方、クロラムフェニコール、テトラサイクリンおよびリファンピシンでは感受性があったが、クロラムフェニコールでは 1.2×10^{-5} 、リファンピシンでは 2.3×10^{-5} 、テトラサイクリンでは 3.5×10^{-4} の頻度で耐性菌が出現した。以上より、1724 株は上記の各種抗生物質に対して完全もしくは不完全な耐性菌株であることが判明した。

Table 3. Transformation frequencies

Strain	Plasmid	Pretreatment	Transformation frequency ^{a)} (transformants/ μ g DNA)
<i>A. tumefaciens</i>			
LBA4404	pBIN19	—	3.0×10^6
C58C1	pBIN19	—	8.0×10^5
<i>A. rhizogenes</i>			
DC-AR2	pBIN19	—	2.1×10^3
		baffle ^{b)}	8.6×10^3
		baffle ^{c)}	7.8×10^4
			1.1×10^5
		sarcosyl ^{d)}	4.7×10^1
		NaCl ^{e)}	6.7×10^2

a) Frequency represents the average number of colonies obtained from three-independent electroporations.

b) Cultured in a 2 liter flask with baffles.

c) Cultured in a 500 ml flask with baffles.

d) Treated with 0.2% *N*-lauroylsarcosine sodium salt solution for 5 min.

e) Treated with 1 M NaCl solution for 5 min.

カナマイシン感受性およびクロラムフェニコール感受性変異株の取得

1724 株の形質転換を行うためには、本菌株に抗生物質感受性を付与する必要がある。このため、NTG によって突然変異株の分離を試みた。材料と方法に記した手法を用いることによって、約 500 個の NTG 処理コロニーから 2 個のカナマイシン感受性変異株を選抜した。このうち 1 株は不完全感受性であり、菌濃度が高いとき耐性菌が若干出現したが、残る 1 株は完全なカナマイシン感受性であった。ここで得られた変異株 (DC-AR2 株) が 1724 株由来であることを検定するために、本変異株を *A. reptans* var. *atropurpurea* のリーフ・ディスクに接種したところ、約 2 週間後に毛状根が出現した。本毛状根中のオパインの有無を濾紙電気泳動で調べたところ、ミキモピンが検出され、DC-AR2 株が 1724 株由来であることが証明された (データは省略)。

クロラムフェニコール感受性変異株は、上記のカナマイシン感受性 DC-AR2 株を再度 NTG 処理することによって得られた。クロラムフェニコール感受性変異株は、カナマイシン感受性変異株の場合と同じく、約 500 コロニーから 2 個得られた (DC-AR3-1, DC-AR3-2)。これらも毛状根誘発能およびミキモピン生産能を維持していた。

エレクトロポレーション法による DNA の導入

エレクトロポレーション法によって、1724 株由来の DC-AR2 株に pBIN19 が導入できた。しかし、その形質転換頻度は $2.1 \times 10^3 / \mu\text{gDNA}$ で *A. tumefaciens* LBA4404 株での $3.0 \times 10^6 / \mu\text{gDNA}$ 、C58C1 株での

$8.0 \times 10^5 / \mu\text{gDNA}$ に比べ、著しく低かった (Table 3)。これは、1724 株およびそれ由来の菌株では、培養時に生産される菌体外ポリサッカライドによって、その一部が直径 2~5 mm 程度の凝集塊を形成しながら増殖することが原因の一つであると考えられた。そこで、この凝集塊をできるだけ少なくし、形質転換頻度を上げるために、バッフル付きのフラスコで菌を培養し、洗浄時に十分なピペッティングを行って、物理的に凝集塊を細かくする方法、およびサルコシルなどの界面活性剤や NaCl 溶液による洗浄によって、菌体外ポリサッカライドを化学的に除去する方法を試みた。その結果、上記の物理的操作を行うことで形質転換頻度を $8.6 \times 10^3 / \mu\text{gDNA}$ に上昇することができた (Table 3)。さらに、フラスコを 2 l から 500 ml の小型のバッフル付きのものに代え、培養時の凝集塊の形成をさらに抑えたところ、形質転換頻度は最高 1.1×10^5 にまで上昇できた。この 50 倍以上の頻度上昇によって、本菌株の形質転換頻度を他の *Agrobacterium* 属細菌のそれに近づけることができ、上記の改善は形質転換体取得数が少ない菌株にとっては有意義であると考えられる。一方、サルコシルや NaCl 溶液による化学的操作は、逆に形質転換頻度が下降し、利用できないことが分かった。また、繰返しの実験より、 -70°C による冷凍保存の影響はほとんど無いことが分かった。

pF11 を用いた相同組換え実験でも、形質転換コロニーを取得することができた。pF11 は、pRi1724 の 8.5 kb の *Bam*HI 断片の他、pHSG298 のカナマイシン耐性遺伝子を有しているが、*Agrobacterium* 属細菌の菌体中では増殖できない。したがって、1724 株では、pF11

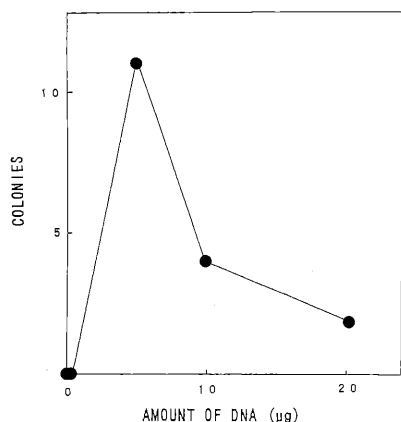


Fig. 1. Correlation between number of transformants and amount of DNA in recombination experiment. 0, 0.2, 5.0, 10.0 and 20.0 µg of pF11 were transferred into *A. rhizogenes* strain DC-AR2 by electroporation.

の 8.5 kb の *Bam*HI 断片が pRi1724 上の同じ配列と相同組換えし、pRi1724 に組み込まれてカナマイシン耐性遺伝子が発現したときのみ増殖できる。Fig. 1 に見られるように、形質転換体の取得数は極めて少なく、5.0 µg もの DNA を導入しても僅か 11 コロニーにすぎなかった。しかしながら、従来の凍結・融解法では 5 µg の DNA を導入しても形質転換体は全く取得できなかったため(未発表データ)、本法は DNA 導入効率が低い方法といえる。なお、pRi1724 に PF11 が組み込まれていることは、本法で得られた DC-AR4 株群 (Table 1) の形質転換菌から単離したプラスミド DNA と、pHSG298 をプローブとしたドットブロット・ハイブリダイゼーションを行うことによって確認した。Fig. 2 に示すように、その多くのプラスミド DNA 中に pHSG298 が組み込まれていることが確認されたが、少数の自然復帰突然変異体が混入していることも明らかとなった。

エレクトロポレーション法の有用性

以上のように、国内産 *A. rhizogenes* 1724 株よりカナマイシン感受性変異株 DC-AR2 株およびカナマイシンとクロラムフェニコール感受性変異株 DC-AR3 株を取得し、エレクトロポレーション法によって外来 DNA を導入する方法を確立した。DC-AR2 株には、トリペアレンタル・メイティング法でもパイナリー・ベクター pBIN19 の導入が可能であった (未発表データ)。しかし、エレクトロポレーション法では、取り扱う菌が 1 種類でよく、形質転換体を取得するまでの時間も短いため、今後はさらに利用頻度が高まると思わ

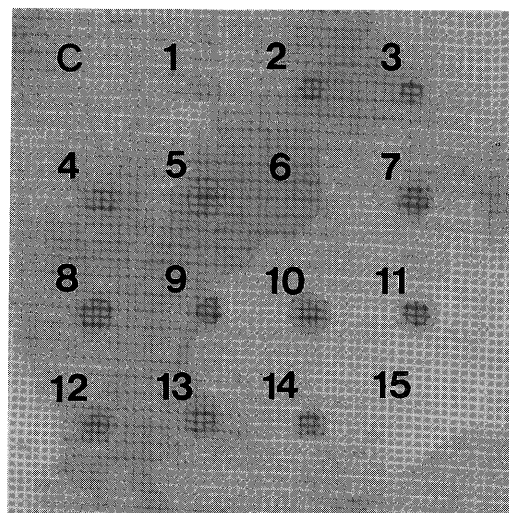


Fig. 2. Detection of pHSG298 sequence in pRi1724::kan by dot-blot hybridization. Abbreviations: C, plasmid isolated from *A. rhizogenes* strain DC-AR2; 1-11, plasmids isolated from strain DC-AR2 introduced by 5 µg of pF11 with electroporation; 12-15, plasmids isolated from strain DC-AR2 introduced by 10 µg of pF11 with electroporation. Since no hybridized signal was detected in plasmid spots of 6 and 15, it is assumed that they naturally reversed resistance to kanamycin.

れる。Mozo と Hooykaas¹¹⁾ は、*A. tumefaciens* の 1 晩培養液 500 µl から小スケールで単離した Ti プラスミドを直接エレクトロポレーション法で *Agrobacterium* 属細菌に導入できることを報告している。我々も、エレクトロポレーション法によってカナマイシン耐性遺伝子を組み込んだ pRi1724 (pRi1724::kan, 約 220 kb) が C 58 C1 株に導入できることを見出しており¹⁷⁾、多くの有用遺伝子をコードした巨大 DNA を *Agrobacterium* 属細菌に導入し、本細菌の性質の改良や植物形質転換に利用する道は開けているといえる。

摘 要

国内産 *Agrobacterium rhizogenes* 1724 株をエレクトロポレーション法によって形質転換する方法を確立した。1724 株は、アンピシリン、カルベニシリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、バンコマイシンには耐性を示し、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、リファンピシリンには、不完全な耐性を示し、 10^{-4} ~ 10^{-6} で耐性菌が出現した。本菌株をニトロソグアニジン処理することによって、カナマイシン感受性変異

株を、さらに再度ニトロソグアニジン処理することによって、カナマイシン及びクロラムフェニコール感受性変異株を取得できた。これらの変異株にエレクトロポレーション法によってバイナリー・ベクター pBIN19 が導入できた。また、pRi1724 の 8.5 kb の *Bam*HI 断片と pHSG298 (カナマイシン耐性遺伝子を持つ大腸菌のクローニング・ベクター) との組換えプラスミド pF11 をカナマイシン感受性変異株に導入

し、pRi1724 との相同組換えを行うことによって、pRi1724 にカナマイシン耐性遺伝子を付与することができた。一方、エレクトロポレーション法による形質転換効率を上昇するには、バッフル付きのフラスコでの培養と入念なピペッティングが有効であることが分かり、この操作を用いて形質転換頻度が約 50 倍向上した。

引用文献

1. Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucl. Acids Res. 12 : 8711-8721.
2. Chilton, M.-D., Tepfer, D.A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F. and Tempé, J. (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of host plant root cells. Nature 295 : 432-434.
3. Elliot, C. (1951). Manual of Bacterial Plant Pathogens. 2nd ed. rev. Chronica Botanica Co., Waltham, Massachusetts.
4. Hoekema, A., Hirsch, P.P., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of Vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303 : 179-180.
5. Isogai, A., Fukuchi, N., Hayashi, M., Kamada, H., Harada, H. and Suzuki, A. (1990). Mikimopine, an opine in hairy roots of tobacco induced by *Agrobacterium rhizogenes*. Phytochemistry 29 : 3131-3134.
6. Lichtenstein, C. and Draper, J. (1985). DNA Cloning Volume II (Glover, D.M. ed.). IRL Press, Oxford, Washington, D.C. pp. 67-119.
7. Matsumoto, T. and Tanaka, N. (1991). Production of phytoecdysteroids by hairy root cultures of *Ajuga reptans* var. *atropurpurea*. Agric. Biol. Chem., 55 : 1019-1025.
8. Mattanovich, D., Ruker, F., da Camara Machado, A., Laimer, M., Regner, F., Steinkellner, H., Himmler, G. and Katinger, H. (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation. Nucl. Acids Res. 17 : 6747.
9. Mersereau, M., Pazour, G.J. and Das, A. (1990). Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. Gene 90 : 149-151.
10. Moore, L., Warren, G. and Strobel, G. (1979). Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. Plasmid 2 : 617-626.
11. Mozo, T. and Hooykaas, P.J.J. (1991). Electroporation of megaplasmid into *Agrobacterium*. Plant Mol. Biol. 16 : 917-918.
12. 尾辻 望 (1972). 細菌・ファージ遺伝実験法 (蛋白質核酸酵素編集部編). 共立出版, 東京. pp. 161-163.
13. 塩見敏樹・白川 隆・竹内昭士郎・大泉利勝・植松清次 (1987). *Agrobacterium rhizogenes* biovar 1 によるメロン毛根病. 日植病報 53 : 454-459.
14. 田中伸和 (1988). 名古屋大学大学院農学研究科博士論文. pp. 46.
15. 田中伸和 (1990). 濾紙電気泳動法によるオパインの検出法. 植物組織培養 7 : 45-47.
16. Tanaka, N., Matsumoto, T. and Oka, A. (1993). Molecular analysis of T-DNA region on the root-inducing plasmid (pRi) in a mikimopine type *Agrobacterium rhizogenes* strain 1724. Ann. Phytopath. Soc. Japan 59 : 155-162.
17. 田中伸和・松本 武・町田泰則 (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* MAFF03-01724 株が保有する pRi1724 の移行とその解析. 日植病報 59 : 593-599.
18. Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A. and Schell, J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing ability. Nature 252 : 169-170.
19. Wen-jun, S. and Forde, B.G. (1989). Transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. Nucl. Acids Res. 17 : 8385.
20. White, F.F. and Sinker, V.P. (1987). Plant DNA Infection Agents (Hohn, T. and Schell, J. eds.). Springer-Verlag, New York. pp. 149-177.