

# アグロバクテリウムによるイネの形質転換とスーパーバイナリーベクターの利用

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
巻/号	184
掲載ページ	p. 8-12
発行年月	1995年4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



## 特集

## 植物バイオテクノロジーの新しい研究手法

アグロバクテリウムによるイネの形質転換と  
スーパーバイナリーベクターの利用

樋江井 祐弘

アグロバクテリウムによる形質転換法は、効率の高い実用的な手法として多くの双子葉植物でもちいられている。自然界でのアグロバクテリウムは、双子葉植物を宿主としている。このため、イネ、コムギ、トウモロコシなどの単子葉植物には、この形質転換系を適用できないと考えられてきた。我々は、イネを対象として供試組織を中心に研究を進めた結果、イネにおいてもアグロバクテリウムによる遺伝子導入が高い効率で可能であることをみいだした。

サザン分析、後代への遺伝およびT-DNA ボーダー配列の解析の結果、目的遺伝子がイネのゲノムに安定的に組みこまれていることを確認した。また、スーパーバイナリーベクターと呼ぶ改良ベクターが、イネにおいても高い形質転換能力を示すことが明らかとなった。

## 1. はじめに

アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) が双子葉植物に感染するとクラウンガールとよばれる腫瘍が形成される。この腫瘍は、アグロバクテリウムの Ti プラスミドから植物細胞の染色体に、植物ホルモン合成に関与する遺伝子を含む T-DNA が転移し組みこまれることによって形成される。この仕組みを利用して、腫瘍をおこさないで植物細胞へ外来遺伝子を導入するベクター系が開発され、タバコ、ジャガイモ、ナタネなど、多くの双子葉植物でもちいられている。しかしながら、イネ科の主要穀物を含む単子葉植物に対しては、自然界におけるアグロバクテリウムの宿主範囲が

Yukoh HIEI : *Agrobacterium*-mediated transformation of rice and super-binary vector

双子葉植物に限られていることから、一部の例外的な植物種<sup>1)</sup>を除き、この系を利用できないと考えられてきた。このため、単子葉植物の形質転換には、エレクトロポレーションやパーティクルガンの適用がこころみられてきている。イネでは、エレクトロポレーション法が広くもちいられている。しかし、この方法は4倍体や不稔などの培養変異が頻出する問題点が指摘されており、新たな形質転換方法の開発が望まれている。

アグロバクテリウムによる単子葉植物への外来遺伝子の導入に関する研究については、これまでもいくつか報告がなされてきているものの、形質転換を裏付ける十分な証拠がえられていなかった<sup>2,3,4,5)</sup>。Potrykus は遺伝子導入に関する総説において、これまでの報告では、アグロバクテリウムの付着による形質発現の可能性、内在微生物の形質転換による発現の可能性が完

全に否定できないことを指摘し、イネ科植物にアグロバクテリウム法が適用できる可能性は低いとしている<sup>6)</sup>。しかし、アグロバクテリウムによる形質転換法には、比較的大きな DNA 断片を導入することができ、導入 DNA 断片のコピー数が低い、導入 DNA 断片の再構成が少ないなどの特徴がある。この方法をイネ科植物に利用できれば利点は大きいと考え、イネを対照として研究を進めた。その結果、意外にも容易に、しかも非常に高い効率で形質転換が可能であることをみいだした。また、形質転換体の解析結果は、安定的な形質転換を裏付けるものであった。以下に、その方法の概要、えられた形質転換体の特性などを紹介する。

## 2. 方法の概要

バイナリーベクター系を採用し、T-DNA にはハイグロマイシン抵抗性遺伝子、GUS 遺伝子をそれぞれ35S プロモーターの下流に配置した。GUS の構造遺伝子中にはヒマのカタラーゼ遺伝子のイントロンを配置した<sup>7)</sup>。これによりアグロバクテリウム内では GUS 遺伝子が発現しない。菌系には強病原性の EHA 101 をもちいた。

まず、どのような植物組織が遺伝子導入に適しているのか、個体再生能を有する組織（芽生えの茎頂、胚盤、未熟胚、幼根断片、種子由来カルス、幼根由来カルス、懸濁培養細胞）を対象にアグロバクテリウムの感染性を調査した。接種方法は、バクテリアの懸濁液に組織を浸漬した後、アセトシリンゴンを含む寒天培地上で3日間程度共存培養するという簡易なものである。なお、アセトシリンゴンはアグロバクテリウムの病原性領域 (*vir*) を活性化するフェノール物質である。共存培養後 X-gluc による GUS アッセイを行ったところ、幼根断片を除くすべての供試組織で発現が認められた。とくに細胞分裂が盛んな領域で青色スポットが高頻度で観察された。

各組織をハイグロマイシンを含む選択培地に移植して3週間程度培養したところ、種子由来カルス、未熟胚、懸濁培養細胞から耐性の細胞集塊がえられた。なかでも、種子由来カルスで効率が高かった。耐性細胞を再分化培地上で培養することにより、ハイグロマイシン耐性植物がえられた。再生個体の多くは GUS 遺伝子を発現しており形質転換体と認識された。

## 3. スーパーバイナリーベクターの利用

アグロバクテリウムの菌系 A 281 は、感染能力が高い強病原性の菌系として知られている。A 281 から T-DNA を除去した EHA 101 は、形質転換能力の高い菌系として、種々の植物の形質転換に利用されている。A 281 が持つ Ti プラスミド、pTiBo 542 についての解析の結果、強病原性をもたらす領域が *vir* 領域の *virB*, *G* であることが特定されている。この領域を T-DNA を有する側のプラスミド中に配置したバイナリーベクターが、スーパーバイナリーベクターである (図 1)。このベクターがきわめて

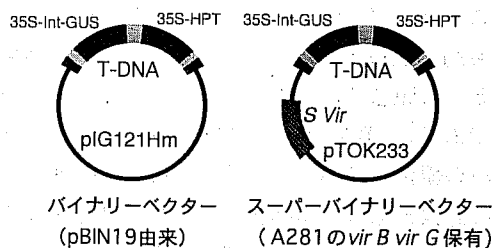


図1 試験に用いたバイナリーベクターとスーパーバイナリーベクター

高い形質転換能力を示すことは、トマトなどですでに報告されている<sup>8,9)</sup>。イネにおいても同様な結果を示すかどうか、通常バイナリーベクターとの比較をおこなった。アグロバクテリウム菌系として、前述の EHA 101 のほかに双子葉植物で広くもちいられている菌系である LBA 4404 をもちいた。したがって、2種のベクターと2種の菌による4種の組合せを比較したことになる (図 2)。イネには培養が困難な

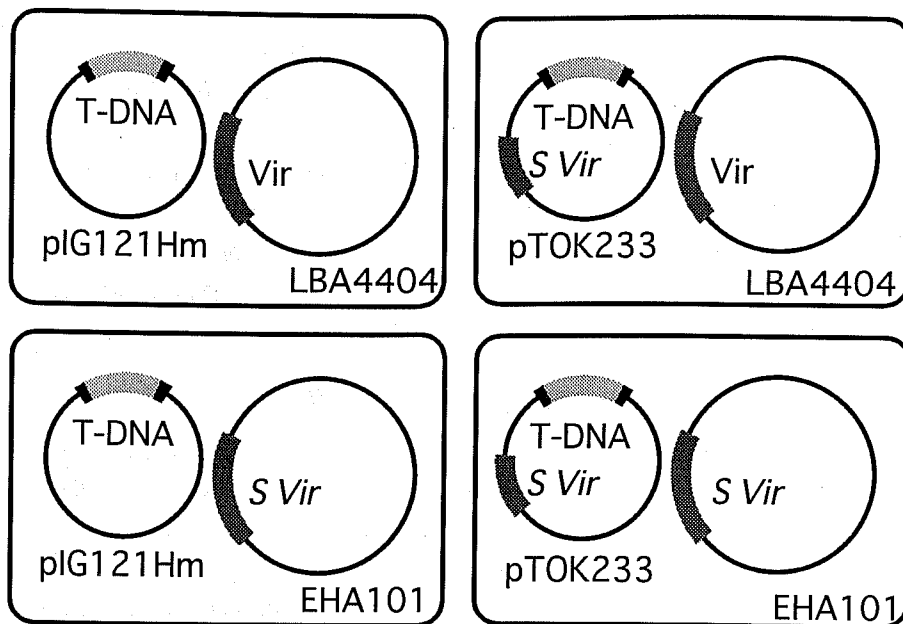


図2 比較した4組合せのアグロバクテリウム系統

コシヒカリを含む3品種をもちいた。形質転換能力は、ハイグロマイシン抵抗性かつGUS発現を示したカルスの選抜効率により評価した。その結果、いずれの品種においてもLBA4404とスーパーバイナリーベクターの組合せでもっとも高い選抜効率を示した(表1)。その効果がとくに顕著であったのは、コシヒカリにおいてであり、LBA4404と通常のバイナリーベクターの組合せの場合の10倍以上の選抜効率を示した。良食味のイネ品種はコシヒカリと類縁のものが多いため、イネの遺伝子工学的改良の研究には、スーパーバイナリーベクターの価値は

非常に高いと思われる。

#### 4. 形質転換効率および形質転換体の特徴

形質転換効率(共存培養にもちいたカルスの数を分母とし、ハイグロマイシン抵抗性かつGUS陽性の個体を再生したカルス数を分子として形質転換効率を示した)は、もちいたいずれのイネ品種においても20%前後という高い値を示した(表2)。

表2 スーパーバイナリーベクターでの形質転換効率

イネ品種	実験	カルス数			
		接種(A)	Hyg耐性	再分化(B) HygR, GUS+*	形質転換効率 (B/A, %)
月の光	1	42	20	12	28.6
	2	112	35	15	13.4
	3	64	48	18	28.1
	4	65	29	13	20.0
朝の光	1	86	19	11	12.8
	2	77	23	15	19.5
コシヒカリ	1	74	16	13	17.6
	2	138	34	26	18.8
	3	215	49	40	18.6

\* ハイグロマイシンによる選抜条件下でGUS陽性個体を再分化したカルス数

表1 ベクターの種類と形質転換カルスの選抜効率

イネ品種	実験	GUS陽性, Hyg耐性カルス数/接種カルス数 (%)			
		LBA4404 (pLG121Hm)	EHA101 (pLG121Hm)	LBA4404 (pTOK233)	EHA101 (pTOK233)
		月の光	1	22	26
	2	14	44	58	11
	3	26	27	45	12
コシヒカリ	1	2	3	23	-
	2	1	6	22	1
	3	3	6	25	-
	4	1	11	23	2
日本晴	1	21	25	34	9

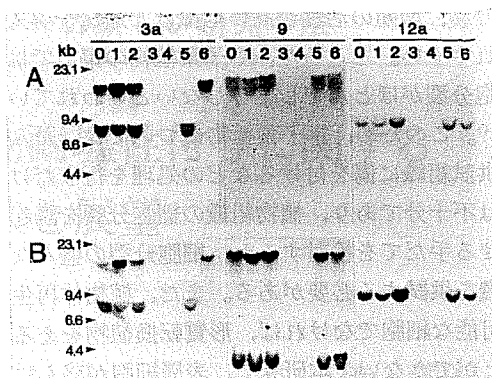
多くの形質転換実験が目標とするのは、目的遺伝子が発現し、他の形質は元品種と同等な特性を示す個体を作成することにある。多数の形質転換体を温室で栽培し形態の諸特性を評価したところ、調査した個体はいずれも正常な形態を示し、プロトプラストを介した形質転換系にみられるような4倍体などの変異体は認められなかった。また種子稔性に関しても7割ほどの個体は種子由来の対照植物と同等の稔性を示した。

## 5. 形質転換の証明

再生植物体からDNAを抽出し、T-DNA領域中の制限サイトが1カ所のみである制限酵素で処理し、導入遺伝子断片HPTおよびGUSをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った。20の独立な形質転換体を分析したところ、各個体に特有のハイブリダイゼーションパターンが検出され、目的遺伝子がイネゲノム中にランダムに組みこまれていることが確認された。また、アグロバクテリウムが植物体組織内に残存した場合に予測されるシグナルは検出されなかった。

形質転換後代（自殖第1代、第2代）における導入遺伝子の発現を調査したところ、遺伝的分離が観察され、その結果はメンデル遺伝に適合していた。また、サザン分析においても、遺伝的分離が観察され、発現調査の結果と一致していた（写真1）。

T-DNAは、25bpの左右の境界配列中で切断されて植物細胞へと導入されることが双子葉植物で明らかになっている。この実験でえられた数個体の形質転換イネについて、カセットプライマー法<sup>10)</sup>をもちいて、T-DNAの左右端の塩基配列を決定した。その結果、右側領域についてはタバコ<sup>11)</sup>で報告されているのと同じ部位で切断されていることが確認された。一方、左側領域での切断部位は右のように特定の部位で切断されないことが報告されている。イネにお



A : HPTプローブ, B : GUSプローブ, レーン0 : 形質転換当代, 1-6 : 形質転換自殖後代, 1,2,5,6 : GUS陽性かつHyg耐性, 3,4 : GUS陰性かつHyg感受性  
発現形質の調査により、両形質とも9,12aは1因子分離、3aは2因子分離を示した系統。

写真1 形質転換体後代のサザン分析

いても、左ボーダー配列の内部のことなる部位で切断されていることが判明した<sup>12)</sup>。この結果は、イネでも、双子葉植物の場合と同様のメカニズムでT-DNAが植物の染色体へと移行することを示すものである。

## 6. 単子葉植物へのT-DNAの移行

イネでなぜアグロバクテリウムによる遺伝子導入が成功したのかを考えてみたい。クラウンゴールの誘導はアグロバクテリウムが植物の傷口から侵入し、植物細胞に付着することからはじまる。双子葉植物は傷口をなおすために様々な物質をだすが、そのなかに前述したフェノール物質があり、感染を誘導すると考えられている。ところが、単子葉植物は*vir*を活性化する物質を分泌しないか、あるいは活性の弱い物質しか分泌しないと報告されている<sup>13)</sup>。実際に、イネの遺伝子導入には*vir*の強力な活性化物質であるアセトシリンジンの添加が必須であった。また、双子葉植物では傷口の修復の過程で細胞の増殖がおきることが重要である。アグロバクテリウムが植物にT-DNAを導入する際、植物細胞のなかでDNAの複製、修復に関する機構が働いている必要がある。いいかえれば、細胞

の分裂、増殖の活性が高い組織ほど遺伝子導入されやすい。ところが、単子葉植物の傷口では細胞分裂がほとんどしようじないといわれている<sup>14)</sup>。このため、単子葉植物については、たんに供試組織に傷を付けるなどの処理を行うだけでは不十分であり、植物組織の細胞分裂を誘起させる手だてを検討するか、細胞分裂の盛んな組織を供試する必要がある。また、植物体再生の可能な細胞でなければ、形質転換植物をえることができない。本研究で、表層細胞が盛んに増殖している種子由来カルスをもちい、かつ、培養条件も至適化を行うことによって、この条件を満たすことができたと考えられる。

## 7. おわりに

形質転換体各個体のことになったゲノム位置での導入遺伝子の存在、後代へのメンデル遺伝、T-DNA のボーダー配列の確認などにより、アグロバクテリウムによってイネに外来遺伝子を導入することが可能であることが明確に証明された。また、本研究の結果は、高い効率で形質転換体がえられること、培養による変異が少ないことなど、優れた点が多いことを示している。今後、この手法はイネにおけるさまざまな分子生物学や遺伝子工学の研究に活用されると期待できるし、他の単子葉植物においてもアグロバクテリウムを利用した効率のよい形質転換法が開発されると考えられる。また、その場合、形質転換能力の高いスーパーバイナリーベクターの利用は効果的であると思われる。

(日本たばこ産業(株) 遺伝育種研究所)

## 引用文献

- 1) Bytebier, B. *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84 : 5345~5349
- 2) Chan, M.-T. *et al.* (1992) *Plant Cell Physiol.*, 33 : 577~583
- 3) Gould, J. *et al.* (1991) *Plant Physiol.*, 95 : 426~434
- 4) Raineri, D. M. *et al.* (1990) *Bio/Tech.*, 8 : 33~38
- 5) Shen, W.-H. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90 : 1488~1492
- 6) Potrykus, I. (1990) *Bio/Tech.*, 8 : 535~542
- 7) Ohta, S. *et al.* (1990) *Plant Cell Physiol.*, 31 : 805~813
- 8) Komari, T. (1990) *Plant Cell Rep.*, 9 : 303~306
- 9) Saito, Y. *et al.* (1992) *Theor. Appl. Genet.*, 83 : 679~683
- 10) Isegawa, Y. *et al.* (1992) *Mol. Cell. Probes*, 6 : 467~475
- 11) Zambryski, P. *et al.* (1982) *J. Mol. Appl. Genet.*, 1 : 361~370
- 12) Hiei, Y. *et al.* (1994) *Plant Journal*, 6 : 271~282
- 13) Usami, S. *et al.* (1988) *Biochem.*, 85 : 3748~3752
- 14) Kahl, G. & Schell, J. S. (1982) *Molecular Biology of Plant Tumors*, Academic Press : 211~257