

# 高発現型レポーター遺伝子を用いたチャのカルスへの形質転換条件の検討

誌名	静岡県茶業試験場研究報告 = Bulletin of the Shizuoka Tea Experiment Station
ISSN	03889114
巻/号	23
掲載ページ	p. 29-36
発行年月	2001年3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



# 高発現型レポーター遺伝子を用いたチャのカルスへの形質転換条件の検討

青島洋一・宇垣正志\*・丹羽康夫\*\*

## 1 緒 言

従来の変配による育種方法では、変配できる範囲に限られるとともに、遺伝形質の固定に時間がかかる。最近では、有用形質を支配する遺伝子を植物に導入し、植物の基本的な特性を乱すことなく短期間に確実に形質を発現させる技術(遺伝子導入技術)が、可能になってきた<sup>1)</sup>。

遺伝子導入技術として、アグロバクテリウム感染法やエレクトロポレーション法、パーティクルガン法等が開発されている<sup>1,3)</sup>。現状最も安定した方法として広く用いられているのは、アグロバクテリウム感染法である。

チャへの外来遺伝子導入試験に関しては、これまでにアグロバクテリウム感染法により、子葉や葉切片に対するレポーター遺伝子 GUS ( $\beta$ -グルクロニダーゼ) の導入・発現について報告されている<sup>5,11)</sup>。今後、チャにおいて育種あるいは物質生産技術へ利用を図るためには、「①アグロバクテリウム菌の感染力が強く、②植物へ導入した遺伝子の発現が強く、③遺伝子導入植物個体が効率的に選抜できる」より効果的な遺伝子発現系の構築が有効であると考えられる。しかし、チャに関して詳細に検討された報告は、ほとんどみられない。

生物に外来遺伝子を導入する際に、バイナリーベクター上の遺伝子の近傍に「エンハンサー」と呼ばれる DNA 配列を結合することにより、植物体内へ導入した遺伝子を効果的に発現させることが、指摘されている<sup>15)</sup>。特に、近年植物体内において、導入遺伝子の発現を著しく向上させるエンハンサーを接続した「高発現型プロモーターカセット」が、報告されている<sup>6)</sup>。

これまでレポーター遺伝子として広く利用されてきた GUS 遺伝子の発現は、植物組織を固定した後、染色して

死んだ状態でしか遺伝子導入の有無を確認できなかった。遺伝子の発現を、蛍光実体顕微鏡観察により生きたまま簡便に確認する方法として、発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) の緑色蛍光蛋白質 GFP (green fluorescent protein)<sup>3)</sup>を用いる方法がある。近年、植物での利用に適するよう野生型 GFP を改変した sGFP(S65T) 遺伝子が合成され、植物への遺伝子導入試験のレポーター遺伝子として使用されるようになってきた<sup>7)</sup>。

ここでは、チャカルスに対して GFP レポーター遺伝子を使用した遺伝子導入・発現条件として、最適なアグロバクテリウム菌の菌株、感染させるカルスの種類とともに、高発現型プロモーターカセットを使用して導入遺伝子の発現を高める方法について検討したので、報告する。

## 2 材料及び方法

### 2.1 供試材料

カルスは、当試験場において継代 (MS ホルモンフリー培地) している 3 種類のカルス (由来: 'さやまかおり' (sk) 子葉、'やぶきた' (yab) 子葉、'するがわせ' (sw) 茎頂) を用いた。

アグロバクテリウム菌は、農林水産省農業生物資源研究所遺伝子設計研究室所有の 5 種類の菌株 (EHA101, LBA4404, PC2760, GV3101, MP90) を用いた。

バイナリーベクターは、名古屋大学中村研三氏より分譲していただいた pIG121-Hm<sup>9)</sup>を使用した (図 1)。このベクターは、植物体内に導入した遺伝子を的確に検出できるようにイントロンを含むレポーター遺伝子 GUS(intron-GUS)、抗生物質により形質転換体を選抜する目的で、ハイグロマイシン耐性 (hygromycin

\* 農林水産省農業生物資源研究所遺伝子設計研究室

\*\* 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科食糧細胞工学研究室

<sup>1)</sup> 遺伝子組換え技術に関する現状について (平成10年12月、農水省農林水産技術会議事務局編) 本論文の一部は、第17回日本植物細胞分子生物学会・シンポジウム (1999年7月) にて発表した。

phosphotransferase: HPT) 遺伝子及びカナマイシン耐性 (neomycin phosphotransferase: NPT II) 遺伝子を含む。このベクターを、2.2(1)に示すように更に改変して使用した。

また、レポーター遺伝子 GFP は、sGFP (S65T) 遺伝子<sup>10)</sup>を含むプラスミド (pSA701) から、sGFP 遺伝子部分を切り出して使用した。

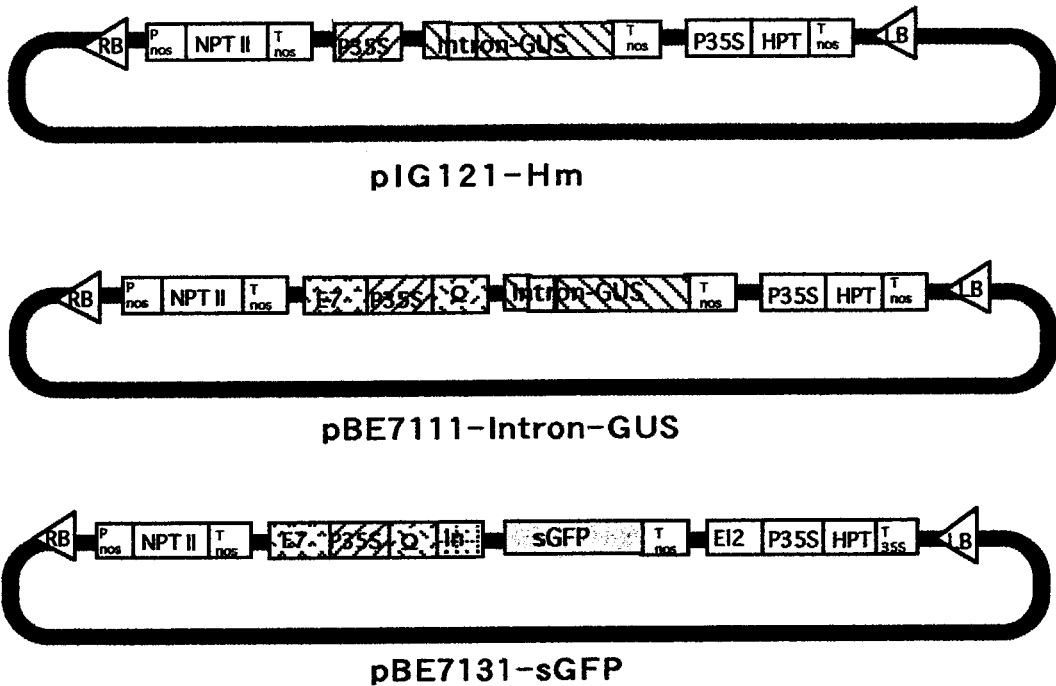


図1：作成したバイナリーベクター (RBとLBの間の部分が植物染色体に導入される)

(レポーター遺伝子としてintron-GUSあるいはsGFPを含む。基本骨格はpBI101である。)

- ※ E12, E7: エンハンサー領域、Pnos, P35S: プロモーター、Tnos, T35S: ターミネーター、Ω: Ω配列、In: イントロン、NPT II: カナマイシン耐性遺伝子、HPT: ハイグロマイシン耐性遺伝子、RB: ライトボーダー、LB: レフトボーダー  
各ベクターの詳細については「2 材料及び方法」参照のこと。

## 2.2 試験方法

(1) バイナリーベクター及びアグロバクテリウム菌株の種類とカルスへの感染・発現活性

バイナリーベクター-pIG121-Hm の GUS 遺伝子 5' 上流域の P35S を、高発現型プロモーターカセット「E7-P35S-Ω」に置換して pBE7111-intron-GUS (図1) を作製し、2種類のベクター (pIG121-Hm、pBE7111-intron-GUS) を、電圧ポレーション法により5種類のアグロバクテリウム菌株 (EHA101、LBA4404、PC2760、GV3101、MP90) に導入した。

各菌株を sk 子葉カルス (MS 固形培地上で継代 6~8 週後のカルスを約 3~5 mm の大きさに切断) に感染させ、共存培養 (28°C、3 日間) 後、図2に示す方法で、感染・発現活性の検定を行った。

感染・発現活性は、「GUS 活性の組織細胞学的検定法」<sup>14)</sup>に従った。カルス組織をメタノールで固定後、基質物質 (X-glucuronide) を加えて 37°C の条件で約 12 時間反応させ、GUS 遺伝子の発現により基質が分解されて生じる青色の沈殿物質の量を、GUS 遺伝子発現活性として評価した。測定は、青色沈殿スポットの現れたカルスの割合 (%) を「GUS 発現率」、染色スポットの強さを 0~4 (0: 発現なし~4: 発現最も強い) の 5 段階のグレードで表し、全カルスあたりに平均したものを、「GUS 発現指数」として数値化した。

なお、試験は 1 試験区 20 個体を供試し、2 反復で実施した。

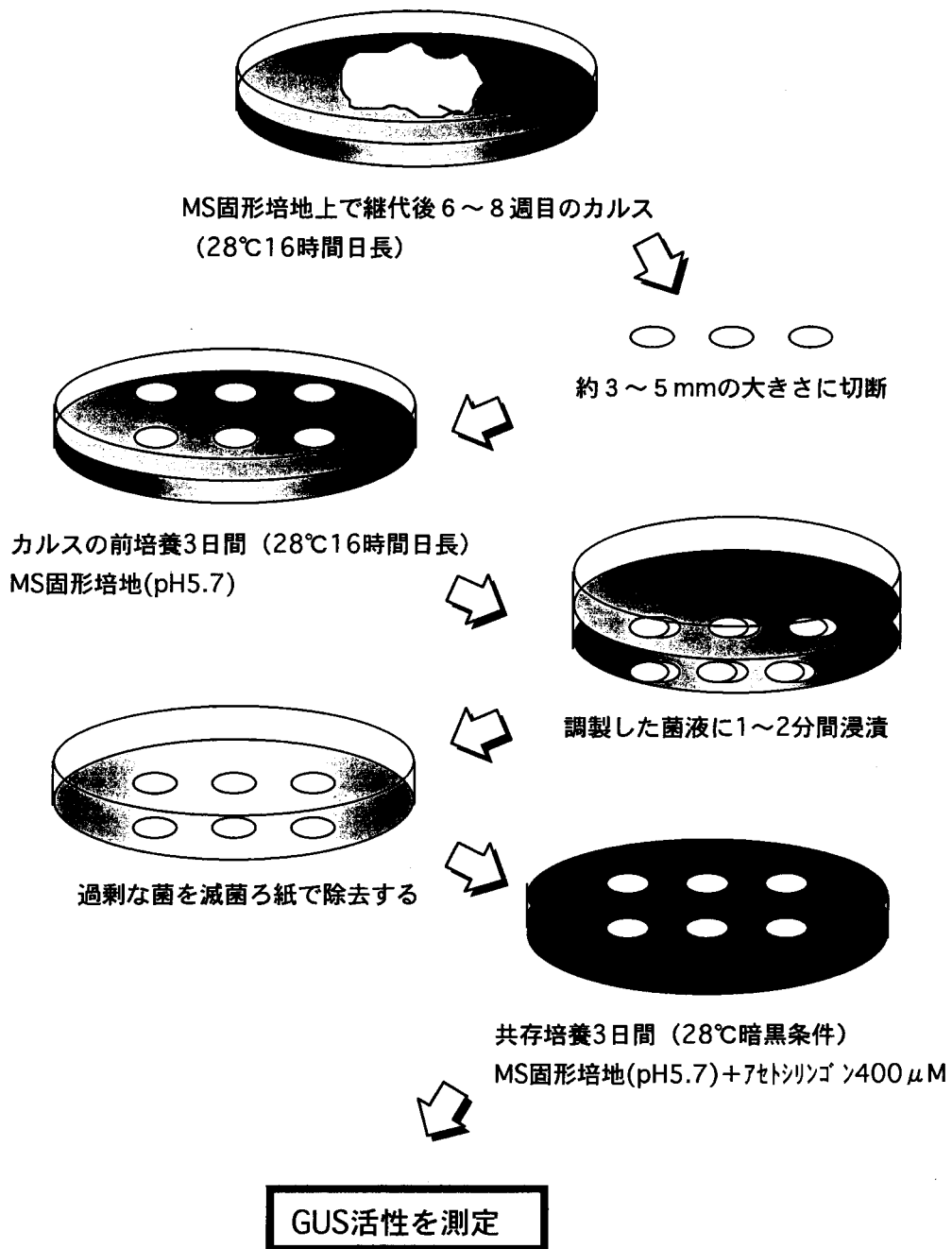


図2 アグロバクテリウムによる形質転換手順

(2) バイナリーベクター及びカルスの種類と感染・発現活性

2.1の結果から、アグロバクテリウム菌として、チャカルスに対して最も感染力の高かった EHA101 を使用し、2種類のバイナリーベクターを使用した。由来の異

なる3種類のカルス(sk子葉、yab子葉、sw茎頂)に対して、(1)と同様の手法で、感染・発現活性の試験を行った。

なお、試験は1試験区20個体を供試し、2反復で実施した。

### (3) GFPを持つバイナリーベクターを用いた形質転換カルの作出と導入遺伝子の検定

2.1及び2.2の結果に基づき、pBE7111-intron-GUSのintron-GUS部分をintron-GFPに置換したpBE7131-sGFP(図1)を作製し、sk子葉カルスに感染・除菌後、抗生物質ハイグロマイシン50ppmを含むMS培地で、選抜培養を行った。選抜培養開始10日後から随時蛍光実体顕微鏡下で観察を行い、緑色蛍光を発するカルスを選抜して継代を行った。そして選抜培養60日後、カルス全体から緑色蛍光を発する形質転換体から全DNAを抽出し、「サザンブロットハイブリダイゼーション法」により、導入GFP遺伝子の検出を行った。

カルスDNAの抽出は、「DNeasy Plant Mini Kit」(キアゲン社)を用いて行った。

抽出したDNAを、制限酵素Hind III及びSac Iで切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動後、ナイロンメンブランフィルターに転写させた。一方、プラスミドpBE7131-sGFP中のsGFP遺伝子部分(0.74kb)を、「ランダムプライムラベリング法」によりジゴキシゲニン(digoxigenin以下「dig」と表記)で標識して、ハイブリダイゼーションプローブを作成した。次に、DNAを転写させたフィルターに対してプローブDNAのハイブリダイゼーション反応(42°C、18時間)を行い、フィルターを洗浄後、digを免疫学的に染色・検出することにより、フィルター上のDNAとハイブリダイズしたdig標識プローブDNAの検出を行った<sup>9)</sup>。

## 3 結 果

### 3.1 バイナリーベクター及びアグロバクテリウム菌株の種類とカルスへの感染・発現活性

sk子葉カルスへの感染・発現活性を、バイナリーベクター及びアグロバクテリウム菌株の種類について比較した結果を、図3に示した。その結果、アグロバクテリウム菌株では、今回使用した中ではEHA101が「GUS発現率」及び「GUS発現指数」とともに高く、チャカルスに対して最も高い感染・発現を示した。またEHA101をはじめ3種類の菌株において、高発現型プロモーターカセット「E7-P35S-Ω」を組み込んだpBE7111-intron-GUSを使用した方が、pIG121-Hmと比較して、カルスへの感染・発現活性が高くなった。

### 3.2 バイナリーベクター及びカルスの種類と感染・発現活性

カルスへの感染・発現活性を、バイナリーベクター及びカルスの種類について比較した結果を、図4に示した。

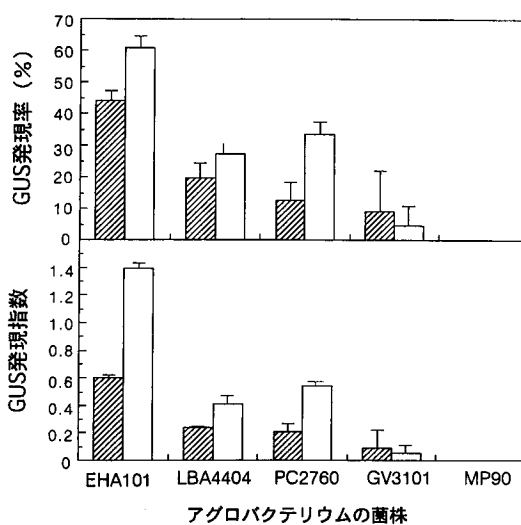


図3：バイナリーベクター及びアグロバクテリウムの菌株とカルスへの感染・発現能力との関係

※ 斜線：pIG121-Hm □：pBE7111-intron-GUS  
sk子葉由来(16時間日長条件下培養)カルスを用いた。  
なお、エラーバーは、標準誤差(S.E.)を表す。(n=2)

その結果、カルスの種類ではsk子葉、yab子葉由来のものがsw茎頂由来のものに比べて「GUS発現率」がやや高く、また高いグレード(グレード4)のスポットの割合が多くなる傾向がうかがえた。

また、バイナリーベクターの種類では、pBE7111-intron-GUSを導入したEHA101菌は全てのカルスの種類で、pIG121-Hmよりも高い発現活性を示した。

### 3.3 GFPを持つバイナリーベクターを用いた形質転換カルの作出と導入遺伝子の検定

カルスへGFP遺伝子の導入を試みた試験では、薬剤選抜培養開始10日後から蛍光実体顕微鏡による観察で

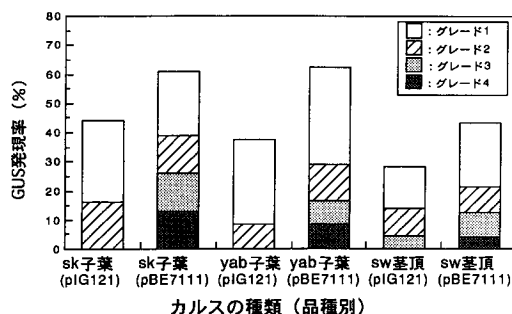


図4：バイナリーベクター及び感染するカルスの種類(品種別)と感染・発現能力との関係

※いずれも16時間日長条件下培養カルスを用いた。菌株はEHA101。

GFP 特有の明緑色の蛍光が確認され、培養開始 60 日後には、ほぼカルス全体から緑色蛍光を発する形質転換カルスを作成することができた(写真 1)。そして、この蛍光発光カルスから抽出した DNA をハイブリダイゼーションした結果、プローブとして用いた GFP 遺伝子とハイブリダイズする約 2.6 kb の DNA 断片が検出され、GFP 遺伝子が、チャカルス内に導入されていることが確認された(図 5)。

#### 4 考 察

チャにおける遺伝子導入技術の利用場面として、いわゆる‘飲用目的’の品種育成の他に、培養組織等を用いて特定の成分、機能を高頻度で発現させて利用する‘物質生産的’な用途が考えられる。重及び松元らは、主として前者への応用をねらい試験を行った<sup>5,11)</sup>。この際には、遺伝子導入した個体の再分化技術が重要となる。

今回、主として後者の用途への応用を図ることを目的に、チャのカルスを用いてより高頻度で発現する遺伝子導入系を作成するために、GUS(intron-GUS) を使用して、最適なアグロバクテリウム菌株の種類、感染させるカルスの種類、及び高発現型エンハンサーカセットの効果について検討した。GFP 遺伝子の発現を蛍光発光で確認する方法よりも、GUS 遺伝子の発現を染色スポットで確認する方法が、より明瞭であることが主な理由である。また、アグロバクテリウム感染後、比較的短期間(3日)で植物体内に導入した遺伝子の発現を確認する試験では、カルスに感染せずに残存するアグロバクテリウム中の GUS 遺伝子の発現を、阻害する必要がある。イントロンを内部に含むレポーター遺伝子 intron-GUS を使用することで、アグロバクテリウムのような原核生物内では、その遺伝子発現を阻害し、植物体内に導入された遺伝子の発現を的確に把握することができる<sup>2)</sup>。

今回の GUS 遺伝子の導入試験では、アグロバクテリウム菌として、重及び松元らが試験に用いた LBA4404 よりも EHA 101 を使用した方が、「GUS 発現率」及び「GUS 発現指数」とともに高く、感染・発現効率が高くなる結果が得られた。一般に、アグロバクテリウム菌の植物に対する感染力の違いは、菌が持つ Ti プラスミドの内部の「Vir 領域」と呼ばれる部分の構造が異なることによるとされている。EHA101 菌株は、この Vir 領域に「スーパービルレントな領域」を有するため、一般的に感染力が高いとされている<sup>4)</sup>。重及び松元らによる試験とは、使用した外植片が異なることと感染初期における評価であるため単純な比較はできないものの、EHA 101 の方が、LBA 4404 よりもチャに対する感染力は高いも

のと考えられた。

またバイナリーベクターの種類では、GUS 遺伝子の発現調節配列として、「E7-P35S-Ω」を持つ pBE7111-intron-GUS を使用することにより、P35S を持つ pIG121-Hm よりも高い発現活性を示した(図 3, 4)。なお、その発現促進効果は、EHA101 菌を使用した場合の GUS 発現指数の比較 (pBE7111-intron-GUS/pIG121-Hm) では、約 2.3 倍であった(図 3)。従ってタバコやイネでレポーター遺伝子の著しい発現促進効果 (P35S に比べてタバコで 17.2 倍、イネで 68.5 倍<sup>6)</sup>) が確認済みの調節配列 (E7-P35S-Ω) は、チャカルスにおいてもイネやタバコほどではないものの、感染初期時の発現促進に効果的であると考えられた。近年、チャ生体内における発現調節配列の解析も進められており<sup>12)</sup>、今後更に、チャに適する発現調節領域の探索関連の研究が、進むことが期待される。

アグロバクテリウム菌を感染させるカルスの種類では、品種が異なるため明白な断定は困難であるが、子葉組織由来のカルスが茎頂組織由来のものに比べて、アグロバクテリウム感染しやすい可能性も考えられる。

一方、遺伝子導入を行う際には目的とする有用遺伝子とともに、植物体内で発現する薬剤耐性などのマーカー遺伝子を導入し、マーカー遺伝子の発現によって形質転換体を選抜するのが一般的な方法である。今回使用したバイナリーベクターは、カナマイシン及びハイグロマイシンに対する耐性遺伝子を持つ。チャ非形質転換カルスが死滅する濃度は、ハイグロマイシン約 50 ppm に対しカナマイシンでは約 400 ppm と高く(青島：未発表)、形質転換カルスを選抜する抗生物質としてハイグロマイシンを用いる方が、効果的であると考えた。更に、GFP 遺伝子の発現は、蛍光実体顕微鏡観察という簡便な方法で形質転換カルスを生きたまま検出できるため、写真 1 に示すように、選抜培養 10 日後頃から検出される蛍光発色部分を選択的に継代・培養していくことで、確実に形質転換体を選抜・増殖させることができた。このように、GFP を使用することで、遺伝子導入個体を効率的に選抜できることが明らかとなった。

選抜・増殖した遺伝子導入個体は、その DNA 中にバイナリーベクターの T-DNA 領域を含み、この DNA 領域は制限酵素 Hind III 及び Sac I で切断すれば、約 2.6 kb のサイズの長さの DNA 断片が生成し、GFP 遺伝子配列を持つ DNA 断片とハイブリダイズする。緑色蛍光を発するカルスから抽出した DNA は、制限酵素切断してサザンハイブリダイゼーション試験の結果、dig 標識した pBE7131-sGFP とハイブリダイズする約 2.6 kb

のDNAバンドが検出され、このカルスには、sGFP遺伝子が導入されていることが確認された。

本試験の結果、EHA101 アグロバクテリウム系統、高発現型レポーター遺伝子を含むバイナリーベクター、感染させるカルスとして子葉組織由来のカルスを使用することで、これまでより高い発現能を持つチャ形質転換カルスを作出することが可能であった。今回作出した遺伝子導入システムは、チャにおいてこれまで報告された遺伝子導入系に比べて、「①アグロバクテリウム菌の感染力が高い、②導入遺伝子を高頻度で発現させることができる、③導入遺伝子の検出が簡便にできる、④‘生きたまま’遺伝子導入個体の選別が効率的に行える。特に‘生きたまま’検出可能であるため、導入したい遺伝子をGFP遺伝子と結合させた状態で使用できる」等の特長がある。今後は、GFPに目的の遺伝子を結合させたバイナリーベクターを構築し、今回の遺伝子導入システムを利用して、「有用生理機能」を高頻度で発現させる培養組織の作出への応用・発展が、期待される。

## 5 摘 要

チャにおける育種及び有用物質生産を、より効率的に実施するためには、チャへの外来遺伝子導入法の確立が必要である。本研究では、アグロバクテリウムを介したチャカルスの遺伝子導入系として、①チャに高い感染能を有するアグロバクテリウム EHA101 系統を選択、②導入遺伝子の発現調節配列として、高発現型プロモーターカセット (E7-P35S-Ω) を持つレポーター遺伝子を使用、③感染させるカルスとして、子葉組織由来のカルスを使用することで、従来より高い発現能を持つチャ形質転換カルスを作出することが、可能であった。

更に、GFP (green fluorescent protein) レポーター遺伝子を利用することで、形質転換体の効率的選抜が可能となった。

## 6 謝 辞

試験材料として、pIG121-Hm を提供して下さいました名古屋大学中村研三博士に、心より御礼申し上げます。

## 7 引 用 文 献

- 1) 萩尾高志 (1997): 利用広がるパーティクルガンによる遺伝子導入と問題点、農業技術、52(8)、337-341
- 2) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. & Kumashiro, T. (1994): Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-

DNA., *The Plant Journal* 6(2), 271-282

- 3) Gerstein, R., M. (訳) 八巻 英 (1998): レポーター遺伝子 GFP の活用、細胞工学、17(2)、pp 286-294
- 4) Jin, S., Komari, T., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1987): Genes Responsible for the Supervirulence Phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281., *J. Bact.* 10, 4417-4425
- 5) Matsumoto, S. & Fukui, M. (1998): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to tea plant cells., *JARQ* 32, 287-291
- 6) Mitsuhashi, I., Ugaki, M., & Ohashi, Y. et al. (1996): Efficient Promoter Cassettes for Enhanced Expression of foreign Genes in Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants., *Plant Cell Physiol.* 37(1) 49-59
- 7) Niwa, Y., Hirano, T., Yoshimoto, K., Shimizu, M., & Kobayashi, H. (1999): Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants., *The Plant Journal* 18(4), 455-463
- 8) 野村慎太郎・稲澤謙治・秀潤社(1994): 脱アイソトープ実験プロトコル、①DIGハイブリダイゼーション pp 42-51
- 9) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., & Nakamura, K. (1990): Construction and Expression in Tobacco of a  $\beta$ -Glucuronidase(GUS) Reporter Gene Containing an Intron within the Coding Sequence., *Plant Cell Physiol.* 31(6), 805-813
- 10) Saito, T., Niwa, Y. & Nakagawa, T. et al. (1999): Expression of a Gene for Cyclophilin Which Contains an Amino-Terminal Endoplasmic Reticulum-Targeting Signal., *Plant Cell Physiol.* 40(1), 77-87
- 11) 重 光雄・山ノ内宏昭・平野 久 (1994): 茶業研究報告、79 (別冊)、30-31
- 12) 竹内敦子・松元哲 (1999): チャ二次代謝酵素遺伝子の糖と光による発現誘導メカニズム、日本植物生理学会 1999 年度年会講演要旨集 P 195
- 13) 内宮博文著、講談社(1991): 植物遺伝子操作マニュアル pp 3-55
- 14) 内宮博文著、講談社(1991): 植物遺伝子操作マニュアル pp 68-70
- 15) 内宮博文・長田敏行編、講談社 (1995): 植物の遺伝子発現 pp 1-25

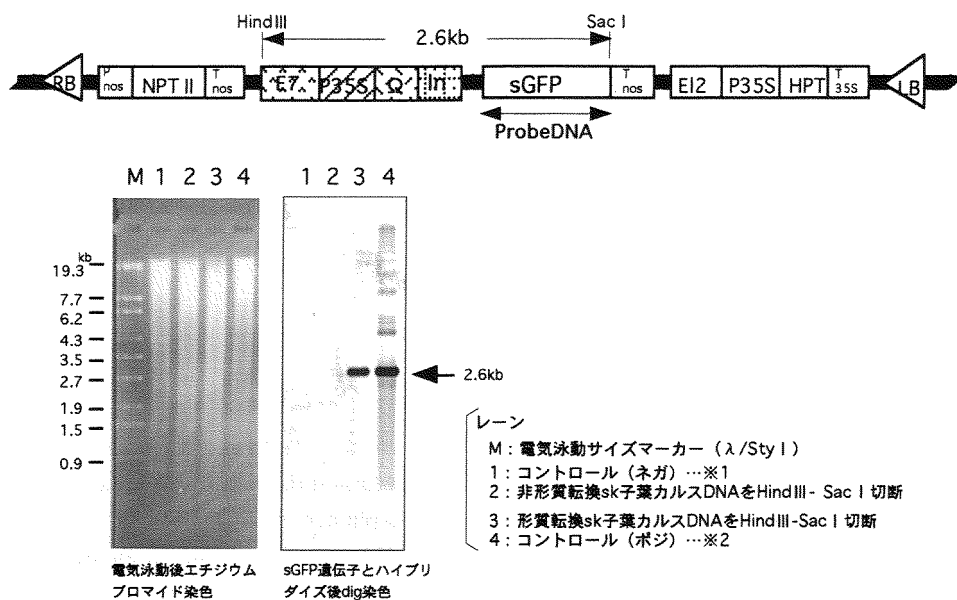


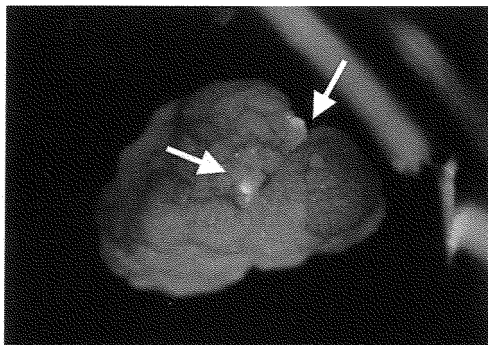
図5 サザンブロットハイブリダイゼーション法によるチャカルスへの導入s-GFP遺伝子の確認

※1: pBE7131-sGFPを含まないEHA101を感染させたsk子葉カルスDNAをHindIII-Sac I 切断

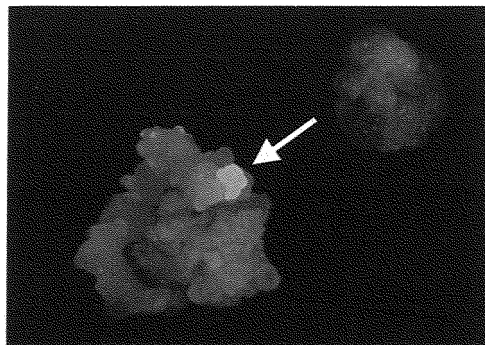
※2: sk子葉カルスDNAとpBE7131-sGFPDNAを混合してHindIII-Sac I 切断

なお、上記遺伝子地図は、バイナリーベクターpBE7131-sGFPのうち遺伝子導入された部分である。

a.



b.



c.

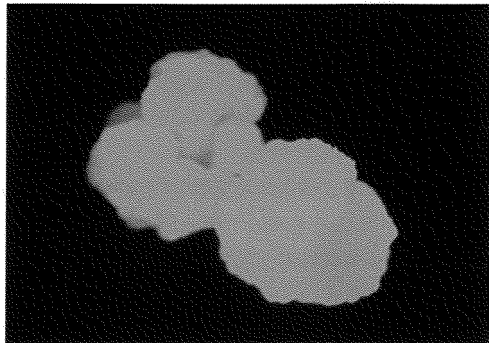


写真1 チャカルスにおけるGFP発現の様子 (蛍光実体顕微鏡による観察)

※ a, b: 感染・除菌後、薬剤選抜培養10日後 (矢印の箇所がGFP遺伝子導入され発現している部分)

c: 感染・除菌後、薬剤選抜培養60日後



Investigation of Gene Delivery Condition in Tea Callus by *Agrobacterium*-mediated Transformation using High Level Expressing Reporter Gene.

Youichi AOSHIMA, Masashi UGAKI\*, Yasuo NIWA\*\*

Summary

For efficient breeding of tea or production of useful materials in tissue culture of tea, it is important to establish a suitable method to introduce foreign genes into tea plant.

To establish a gene delivery method into tea calli by *Agrobacterium*-mediated method, the optimum strain of *Agrobacterium tumefaciens*, effect of an enhanced promoter cassette for gene expression, and the optimum type of tea calli, were examined.

We established a method for production of transformed calli which express the introduced gene at high level by using 1) an *Agrobacterium* strain EHA101, 2) an enhanced promoter cassette (E7-P35S-omega) for expression of foreign genes, and 3) calli derived from tea cotyledon for *Agrobacterium* infection.