

2001 年度理学総合研究所共同研究報告

J. 赤タマネギ新品種育成のためのアグロバクテリウムを利用した  
形質転換法確立の試み

安積良隆<sup>1</sup>、浅香智子<sup>1</sup>、上西愛子<sup>2</sup>、北 宜裕<sup>2</sup>、鈴木秀穂<sup>1</sup>

<sup>1</sup>神奈川大学 理学部 生物科学科 〒259-1293 平塚市土屋 2946

<sup>2</sup>神奈川県農業総合研究所 生物資源部 〒259-1204 平塚市上吉沢 1617

要旨

タマネギ植物にアグロバクテリウムを介して遺伝子を導入し形質転換タマネギを作成するための条件検討を行った。2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) を含む MS 培地上でタマネギ種子を発芽させカルスを形成させた。これに 3 5S プロモーターによって制御される GUS 遺伝子を持った pBI121 あるいはアライナーゼプロモーターによって制御される GUS 遺伝子を持った pBIE1E を有するアグロバクテリウムを感染させた。選抜培地上で培養した後、2-ip (N<sup>6</sup>-2-isopentenyladenine) を含む再分化培地に移し、芽の形成を誘導した。芽の形成には至らなかったが、カルスから調製した DNA 中に GUS 遺伝子が存在することが GUS 遺伝子を増幅するプライマーを用いた PCR 法によって確かめられた。さらに GUS 遺伝子産物である  $\beta$ -glucuronidase の活性を利用して GUS 遺伝子の発現している細胞を組織化学的に調べたところ、pBI121 を含むアグロバクテリウムで形質転換を行ったカルスでは大部分の細胞で強い GUS 活性が確認された。pBIE1E を用いた方では、pBI121 の場合程強くはないがカルスの周辺部で発現が認められた。これらのことからアグロバクテリウムを介してタマネギに遺伝子を導入することが実際に可能であることが示された。

序論

タマネギは人類にとって重要な作物であり、生産能力も優れた植物である。収穫されたタマネギは保存性も優れている。それゆえタマネギに外来遺伝子を導入し、発現をコントロールすることが可能になれば、タマネギに有用物質を効率良く生産させることができると考えられる。形質転換体を作成するには二つの条件を満たすことが必要である。まず 1 細胞から植物個体が再生できること。次に植物ゲノムに外来遺伝子を導入できることである。単子葉植物ではアグロバクテリウムを介した遺伝子導入は難しいとされていたが、多くの研究の結果、イネやトウモロコシなどの単子葉植物ではアグロバクテリウムによる遺伝子導入の条件が確立されてきた。タマネギでも最近、個体再生の条件

(Eady ら、1998 ; Zheng ら、2000) やアグロバクテリウムを介した遺伝子導入の方法 (Eady ら、2000 ; Zheng ら、2001) が報告されたが、我々の研究ではイネの形質転換の報告 (寺田・飯田、2000 ; 横井・鳥山、2001) を参考にしながら、上西らが神奈川県特産の赤タマネギの形質転換を試みてきた。これまでに再生個体は得られているが、形質転換体の選択マーカーによる選抜を行っていないために得られた個体から導入遺伝子 (GUS 遺伝子) の強い活性は認められなかった。しかし個体再生の条件は確立されたと考えられるので、本研究では pBI121 と pBIE1E の両方が持つ選択マーカー、カナマイシン抵抗性遺伝子を利用したカナマイシンによる形質転換体の選抜のステップを加え遺伝子導入を試みることにした。

## 材料

タマネギ ; 早稲湘南レッド

宿主菌 ; *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Rif<sup>r</sup>, pGV2260)

バイナリーベクター ; pBI121 (Km<sup>r</sup>, 35S プロモーターによって調節される GUS 遺伝子をレポーター遺伝子として持つ)、pBIE1E (pBI121 の 35S プロモーターをアライナーゼのプロモーターと置換したもの)

カルス誘導培地 ; MS 培地、2 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid))

アグロバクテリウム懸濁液 ; MS 培地 (0.5xMS ビタミン、5 % sucrose)、500 mg/L MES (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid, monohydrate)、44nM 6-benzylamino-purine (BAP)、10mg/L アセトシリンゴン (3,5'-dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone)、0.02% Tween 20

培地共存培地 ; MS 培地、2mg/L 2,4-D、10mg/L アセトシリンゴン

除菌培地 ; MS 培地、2mg/L 2,4-D、200mg/L クラフォラン

選択培地 ; MS 培地、2mg/L 2,4-D、200mg/L クラフォラン、200mg/L カナマイシン

再分化培地 ; MS 培地、2mg/L 2-ip (N<sup>6</sup>-2-isopentenyladenine)、200mg/L クラフォラン、200mg/L カナマイシン

## 方法

### 1. 上西らの形質転換法

エタノール及び次亜塩素酸で滅菌したタマネギ種子を明所、23℃で約4週間 2,4-D 入りのカルス誘導培地 (MS 培地、2mg/L 2,4-D) 上で培養する。吸光度 OD<sub>600</sub>=0.2 になるように希釈したアグロバクテリウム懸濁液 (MS 培地 (0.5xMS ビタミン、5 % sucrose)、500 mg/L MES、44nM BAP、10mg/L アセトシリンゴン、0.02% Tween 20) にカルスを浸し、気圧が 400mm Hg になるように減圧し5分間放置する。カルス

を共存培地（MS 培地、2mg/L 2,4-D、10mg/L アセトシリゴン）に移し、27℃、暗所で3日間培養する。200mg/L クラフォランでカルスを洗浄後、除菌培地（MS 培地、2mg/L 2,4-D、200mg/L クラフォラン）に移し、明所、23℃で1週間培養する。カルスを再分化培地（MS 培地、2mg/L 2-ip、200mg/L クラフォラン）上に移し、明所、23℃で培養する。

## 2. 導入遺伝子の PCR 法による確認

0.1g のカルスより nucleon phytopure PLANT DNA extraction KIT (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて DNA を調製した。この DNA を鋳型として、GUS 遺伝子断片を増幅するプライマー GUS-F (GCAACGTCTGGTATCAGCGC) と GUS-R (ACGGTTTGTGGTTAATCAGG) を用いて PCR を行った。0.7%アガロースゲル電気泳動によって、その反応産物を解析した。

## 3. GUS 染色

高橋らの方法 (1997) に従い、カルスを GUS 染色液に浸して 37℃で一晩保温した。翌日カルスを 70%エタノール中に移し、4℃で保存した。Milli-Q 水中に10分間置いた後、5%アガロースゲル中に包埋した。村上らの方法 (1992) を参考にして、カルスブロックを剃刀で切り出しマイクロスライサー TDK-1000 型 (堂阪イーエム) の試料ステージにアロンアルファを用いて接着させた。30~40 $\mu$ m の厚さの切片を作製し、顕微鏡で観察した。

## 結果

上西らの方法では形質転換体の選抜がなされていないので、得られている再生個体に pBI121 あるいは pBIE1E を用いた形質転換体なら導入されているはずの GUS 遺伝子の活性が認められず、GUS 染色を行っても青色化は起こらなかった。つまり得られて再生個体の大部分は形質転換体ではないと考えられ、形質転換体を選抜する必要があった。この目的で上西らの方法に従い、pBI121 あるいは pBIE1E を有するアグロバクテリウムを用いて形質転換を行い、上西らの方法の除菌培地上での培養の後に、選抜培地 (MS 培地、2 mg/l 2,4-D、200mg/l カナマイシン、200mg/l クラフォラン) 上で3週間培養するステップを加え、再分化培地にも 200mg/L のカナマイシンを加えた。しかしその結果、再分化培地に移してもカルスからの植物体の再生が起こらなくなった (図1)。カナマイシンの濃度が高すぎたためカルスの成長が阻害された可能性が考えられたので、選抜培地のカナマイシンの濃度を 100mg/L、再分化培地のカナマイシンの濃度を 200mg/L としたが効果はなかった。カルスからの再生効率を高めるためクラフォランを選抜培地と再分化培地から除いたが、アグロバクテリウムが増殖してくるカ

ルスが現れ、再分化を促進することもなかった。選抜培地に含まれる 2,4-D が影響した可能性が考えられた。

遺伝子の導入が起こっているかどうかを調べるために、GUS 遺伝子の存在を確認することにした。pBI121 あるいは pBIE1E を有するアグロバクテリウムを用いて形質転換を行ったカルスからゲノム DNA を調製して、GUS 遺伝子を増幅するプライマーを用いて PCR を行った。アガロースゲル電気泳動を行ったところ、671bp の PCR 産物を確認することができ、カルス中に GUS 遺伝子が存在すると考えられる (図 2)。しかしこれはカルス中に生き残ったアグロバクテリウム中の pBI121 あるいは pBIE1E から増幅されたものである可能性も考えられた。

アグロバクテリウムはもし生存し続けていたとしても細胞間に存在し、細胞内には存在しないと考えられ、GUS 活性がカルス中のどこに認められるかを明らかにすれば、形質転換が起こっているかどうかを明らかにすることができる。カルスを GUS 遺伝子産物  $\beta$ -グルクロニダーゼの基質である X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -glucuronide) 溶液中に浸し、GUS 染色を行った。pBI121 あるいは pBIE1E を有するアグロバクテリウムを用いて形質転換を行ったいずれのカルスにおいても青色化が起こった (図 3 a, b)。細胞内が染まっているのか、細胞外が染まっているのかを調べるためにマイクロスライサーを用いてカルスの切片を作製して顕微鏡下で観察した。pBI121 を有するアグロバクテリウムで形質転換を行ったカルスでは多くの細胞でその細胞質が強く青く染まっていた (図 3 c)。pBIE1E を有するアグロバクテリウムで形質転換を行ったカルスでも、先のカルス程強くなかったが、カルスの特に周辺部で青く染まった (図 3 d)。

## 考察

タマネギの生産性と保存性の高さを利用してタマネギに有用物質を作らせる基礎研究としてタマネギの形質転換法の確立を目指して実験を行った。我々が研究を進めている間に、Eady ら (2000) あるいは Zheng ら (2001) によってタマネギの形質転換の報告がなされた。これらは培養細胞から胚を形成させて、それからカルスを誘導するもので技術的に非常に煩雑なものであった。さらに日本産のタマネギにこれらの方法が利用可能かどうかは不明である。我々の研究としては、まず上西らが寺田・飯田 (2000) のあるいは横井・鳥山 (2001) のイネの発芽種子からカルスを誘導する方法を参考に、タマネギの形質転換を試みた。その結果、カルスから再生個体が得られたが導入した遺伝子の活性 (GUS 活性) は認められなかった。これは抗生物質を用いた選抜が行われていないため、得られた再生個体の大部分は形質転換体ではなかったためであると考えられた。それでカナマイシンによる形質転換体を選抜するステップを追加することにした。しかしその結果、これまでに再分化培地に 4 ヶ月間培養しても再生個体は得

られていない。これはカナマイシンが成長を阻害しているか、選抜培地中の 2,4-D の影響が可能性として考えられる。カルスは培養基間が長い程成長していたので、カナマイシンがそれほど大きな影響をもたらしているとは考えにくい。本研究では種子の発芽後のカルスの成長が遅かったためカルス誘導培地で 6～8 週間、共存培地に 3 日間、除菌培地に 1 週間、選抜培地に 3 週間、いずれも 2,4-D を含む培地上で培養した。上西らの方法では 5 週間程度しか 2,4-D を含む培地で培養していないのに対して、本研究においては 1 2 週間程度 2,4-D を含む培地上で培養していた。このことが植物の再分化に影響した可能性が高い。今後は除菌培地と選抜培地に含まれる 2,4-D を除いて 2-ip を加えるなどの対策が考えられる。

形質転換を行ったカルスはカナマイシンを含む培地で成長していることからカナマイシン抵抗性遺伝子が導入された形質転換体であると考えられるが、実際に GUS 遺伝子が導入されているかどうかを PCR によって調べたところ、その存在が確認できた。また GUS 染色を行ったところ、細胞質が青く染まったことから GUS 遺伝子は植物の染色体に組み込まれたものと考えられる。これらのことからアグロバクテリウムからタマネギ染色体への T-DNA の輸送と組み込みは起こっており、形質転換には成功したと言える。しかしまだ再生個体を得られていないので、今後植物ホルモンの条件を検討し、植物体を再生する条件を確立する必要がある。それに成功すれば、現在解析を進めているタマネギの塊茎部分で強く発現するアリイナーゼの遺伝子のプロモーター領域を利用して、タマネギ中で有用物質を高発現する形質転換体を作成することができると考えられる。1 年生のタマネギは樹木と違い播種して半年以内に収穫でき、生産性も高く、室温で長期間保存できるなどのメリットがあるため、有用物質生産用植物として有望であると考えられる。

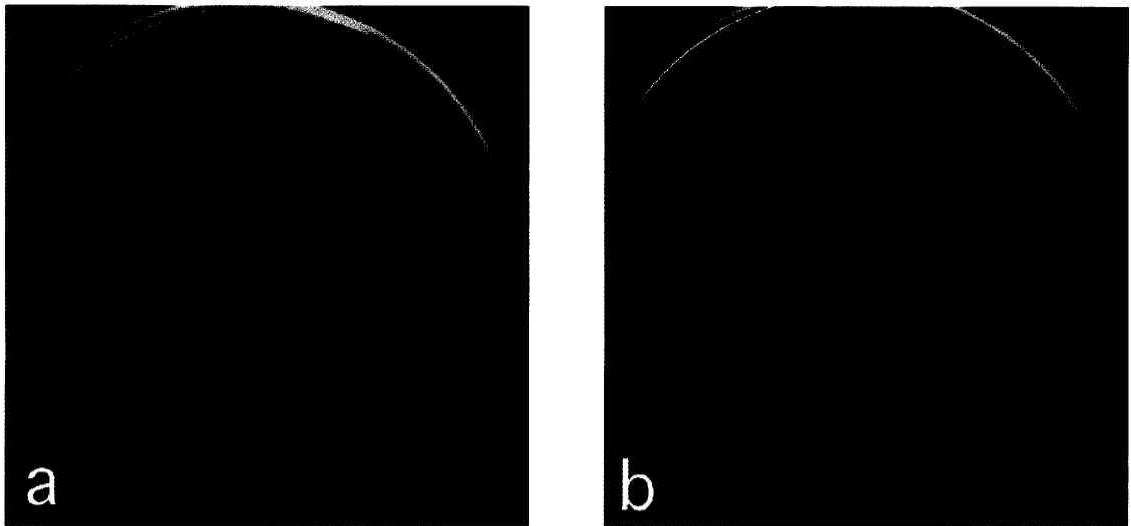


図1 再分化培地上のカルス。再分化培地に移してから13週目 (a) と15週目 (b) のカルス。pBI121 (a) あるいはpBIE1E (b) を保有するアグロバクテリウムで形質転換を行ったもの。

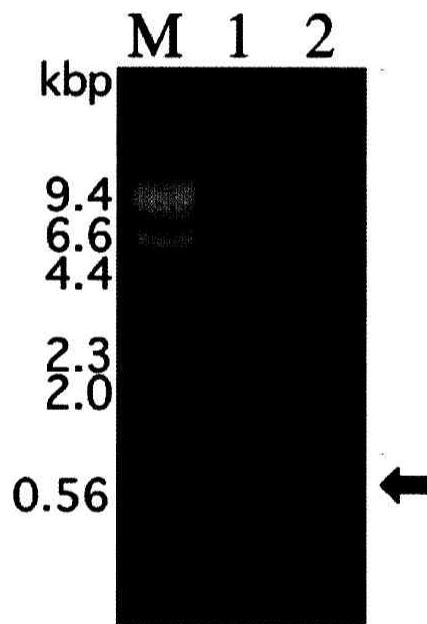


図2 PCR産物の電気泳動図。再分化培地に移して8週間後のカルスからタマネギゲノムDNAを調製した。このDNAを鋳型とし、GUS遺伝子の一部(671bp)を増幅するプライマーを用いてPCRを行い、その産物をアガロースゲル電気泳動によって解析した。矢印がPCR産物。Lane1; pBI121, lane2; pBIE1E, lane M, 分子量マーカー。

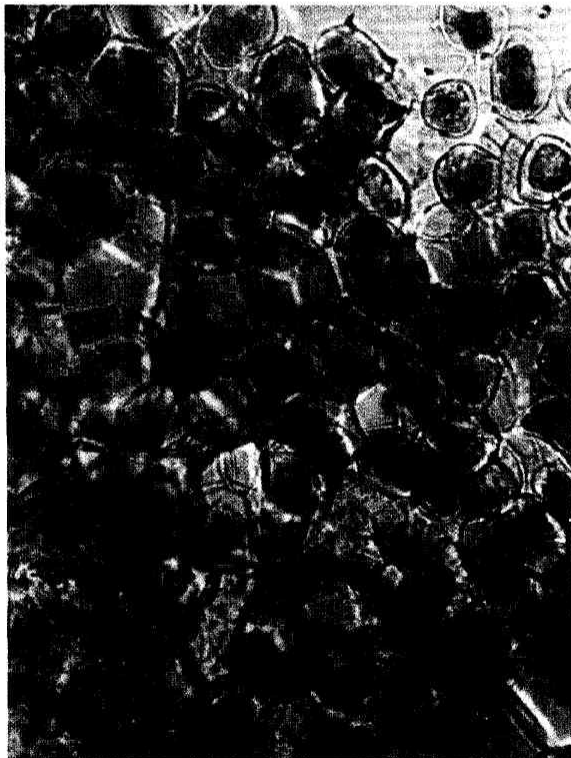
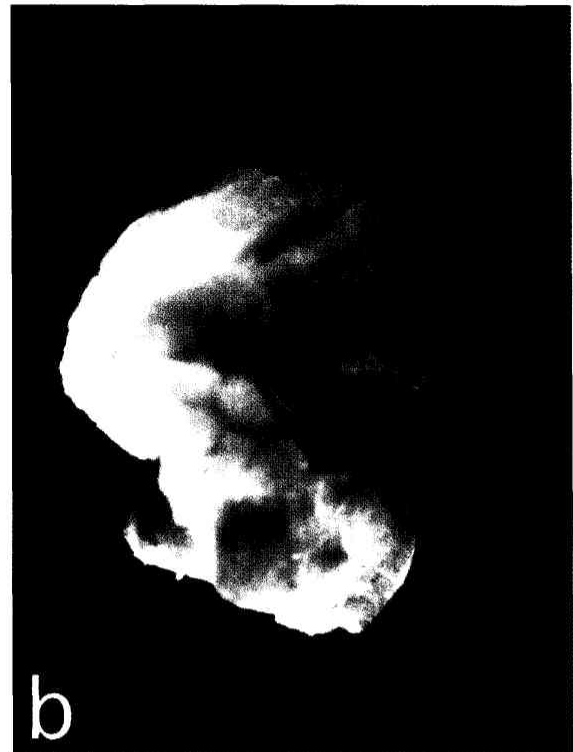


図3 カルスのGUS染色。 a, b ; pBI121 (a) あるいは pBIE1E (b) を保有するアグロバクテリウムで形質転換したカルスを X-gluc 溶液に 37℃で一晩保温し GUS 染色したもの。 c, d ; それぞれの染色されたカルスからマイクロスライサーを用いて厚さ 30 $\mu$ m の切片を作成し顕微鏡下で観察したもの。

## 参考文献

Eady, C.C., Butler, R.C. and Suo, Y. (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo cultures of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Reports* 18:111-116

Eady, C.C., Well, R.J. and Lister, C.E. (2000) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Reports* 19: 376-381

Zheng, S., Henken, B., Sofiari, E., Keizer P., Jacobsen, E., Kik, C. and Krens, F. (1999) Effect of cytokinins and lines on plant regeneration from long-term callus and suspension cultures of *Allium cepa* L. *Euphytica* 108: 83-90

Zheng, S., Khrustaleva, L., Henken, B., Sofiari, E., Jacobsen, E., Kik, C. and Krens, F. A. (2001) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Allium cepa* L.: the production of transgenic onions and shallots. *Molecular Breeding* 7: 101-115

高橋美佐、森川弘道 (1997) 細胞レベルで GUS 活性を観る方法. 福田裕穂、西村幹夫、中村研三 (監修) 植物の細胞を観る実験プロトコール 秀潤社、pp 75-77

寺田理枝、飯田茂 (2000) 岩淵雅樹、岡田清孝、島本功編集 モデル植物ラボマニュアル 分子遺伝学・分子生物学的実験法。シュプリンガー・フェアラーク東京、pp 110-121

村上 高、大橋裕子 (1992) 形質転換植物の組織切片中における GUS レポーター遺伝子発現の検出法. *植物細胞工学* 4 : 281-286

横井修司、鳥山鉄哉 (2001) 島本功、岡田清孝監修 新版モデル植物の実験プロトコール 秀潤社、東京、pp 93-98