

2002 年度共同研究プロジェクト報告書

I. 植物工場を目指したタマネギ形質転換系の確立

安積良隆[#]、田畠邦弘、森川真吾、宮澤 哲、湯村貴文、竹田光宏、鈴木秀穂
 (神奈川県大学・理学部・生物科学科)
 上西愛子、北 宜祐
 (神奈川県農業総合研究所・生物資源部)

[#]; 研究代表者

緒言

植物は無機栄養と光エネルギーのみから自分自身を造りだせるだけでなく、動物やその他の従属栄養生物などにも食料とエネルギーを供給し生態系を支えている。人類の発展はいかにこの植物を利用できるかに依存しており、植物をより効率良く利用するための育種が先史時代から続けられてきた。近年ではアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) による天然の植物形質転換のしくみが理解されるようになって、従来の育種法では不可能であった種外からの外来遺伝子を植物に導入する人工の形質転換も実用化されている。つまりアグロバクテリウムが自分の菌体内に保有する Ti プラスミドの T-DNA 領域を植物細胞内に移し、植物を遺伝的に形質転換する現象を利用して、T-DNA 領域内に目的の外来遺伝子を組み込み、アグロバクテリウムを介して植物に導入するという方法である。この技術が様々な植物で利用され、植物の持つ機能を飛躍的に上昇させることができれば、食糧危機や環境問題にも対処できるようになるのではないかと期待されている。タマネギは現在では我々の食卓に欠かせない野菜であるが、生産性や保存性が高く、植物工場として機能的にも非常に優れている。しかしこの植物ではまだ形質転換が実用化されていないため、神奈川県大学・理学部・生物科学科の鈴木秀穂研究室では神奈川県農業総合研究所・生物資源部と共同でタマネギ形質転換系の確立を目指して研究を行ってきた。

本年度の目標

タマネギのカルスから個体を再生することには平成13年までに農総研の上西らが成功していた。しかし平成13年度に神奈川県大学と農総研とで共同で抗生物質であるカナマイシンを用いた形質転換体の選抜を行ったが、遺伝子の導入は認められたがカルスの再分化は起こらず再生個体が得られなかった。平成14年度は再分化を誘導する植物ホルモンや抗生物質の種類や濃度などについてさらに条件検討を行い、タマネギの形質転換系の確立を目指す。

材料の説明

- pBI121; Ti プラスミドの T-DNA 領域を持つプラスミド。T-DNA 領域内にカナマイシン抵抗性にする遺伝子と35S プロモーターによって制御されるGUSレポーター遺伝子とを有する。大腸菌内とアグロバクテリウム内で複製し、植物のどの組織でも発現するレポーター遺伝子を有するため形質転換のポジティブコントロール実験に用いられる。
- pBIE1E; pBI121 の35S プロモーターをアライナーゼというタマネギの塊茎部分で高発現する遺伝子のプロモーターと置換したもの。
- pBI121 Hg^r; pBI121 のカナマイシン抵抗性遺伝子をハイグロマイシン抵抗性遺伝子と置換したもの。

- カルス誘導培地; 2mg/L の 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) を含む MS 培地 (2.5% シューク
ロースと 0.2% ゲランガムを含む)
- 共存培地; 10 mg/L のアセトシリンゴンを含む MS 培地。昨年度までは 2,4-D を含んでいたが、
今年度からは 2-ip を加えることにした。
- 除菌培地; 200 mg/L のクラフォランを含む MS 培地。これも昨年度までは 2,4-D を含んでいた
が、今年度からは 2-ip を加えることにした。
- 再分化培地; 10 mg/L の 2-ip (N^6 -2-isopentenyladenine)、200 mg/L のクラフォラン、形質転換体
選抜用抗生物質を含む MS 培地。
- 発根誘導培地; 形質転換体選抜用抗生物質を含む MS 培地。

成果

1. 植物ホルモンに関する検討

形質転換法の概略としては、表面殺菌したタマネギの種を植物ホルモンのオーキシシン作用を持ちカルスを形成させる効果のある 2,4-D を含むカルス誘導培地上に播種し、カルスを誘導する(図1)。約 1か月後、根にできたカルスを切り取り、吸光度を 0.2 に調整したアグロバクテリウム懸濁液に浸した後、3日間共存培地上で培養し形質転換を完了させる。アグロバクテリウムを除去するために 50 mg/L のクラフォラン溶液で洗浄後、除菌培地で1週間培養する。その後、選抜培地でカルスを培養した後、シュート(芽)形成を誘導する植物ホルモンサイトカニン活性を持つ 2-ip を含む再分化培地上でシュートの形成を誘導する。やがてカルスの一部に緑化が起こり、シュートが形成される。シュートが形成されれば、植物ホルモンを含まない発根培地に移し、根を誘導する。

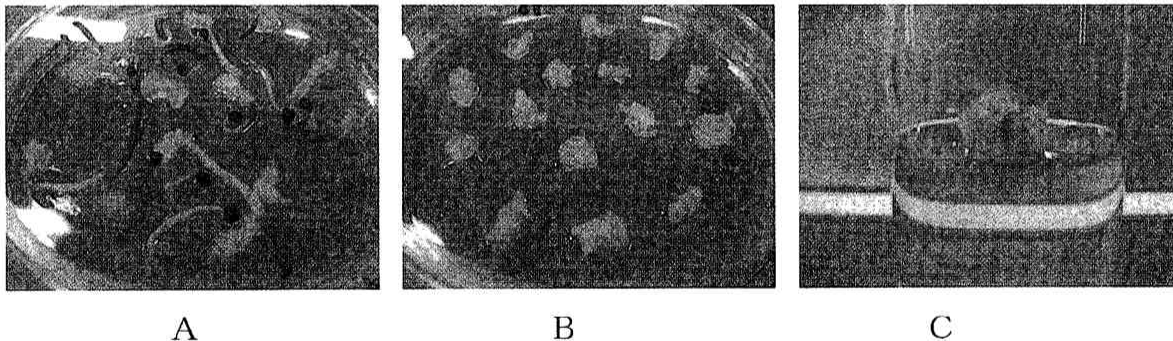


図1. A;カルスを形成したタマネギ種子、B;形質転換を行った直後のカルス、C;緑化し始めたカルス。

昨年度の研究で抗生物質を用いた場合に再分化が起こらなかった理由としてはカルスからの個体再生のホルモン条件の検討が不十分で効率良い再分化が誘導されていなかった可能性が考えられる。従来の方法は滅菌したタマネギの種子を 2,4-D を含む MS 培地上で培養しカルスを誘導する。4週間後、これをアグロバクテリウムに感染させ、2,4-D を含む共存培地上で3日間培養する。その後カルスを洗浄し、2,4-D を含む除菌培地上で1週間培養する。さらに 2,4-D を含む選抜培地上で培養した後、再分化培地に移すといったものであった。

2,4-D はカルスを誘導するのに必要であるが長期間の 2,4-D を含む培地上で培養は再分化を阻害する可能性が考えられた。本年度はカルスが形成されてからは 2,4-D を加えないことにし、共存培地から 2,4-D を除き、代わりにシュート形成を誘導する 2-ip を加えることにした。さらに選抜培地上での培養を省き、2-ip を含む再分化培地に直接移すことにした。これによって 2,4-D を含む培地上での培養が3週間程度短縮される。この変更の結果、pBI121 を保持するアグロバクテリウムで形質転換を行った実験では 1497 個のカルスのうち 14 個のカルスで緑化が起こり、さらにシュートを生じた(図2)。

また pBIE1E を保持するアグロバクテリウムを用いた実験では 1541 個のカルスのうち、91 個で不定根、不定胚、シュートを生じるなどの再分化が観察された。今年度のこの結果からやはり長期間の 2,4-D を含む培地上での培養は再分化に対して阻害的な効果があることが明らかになった。

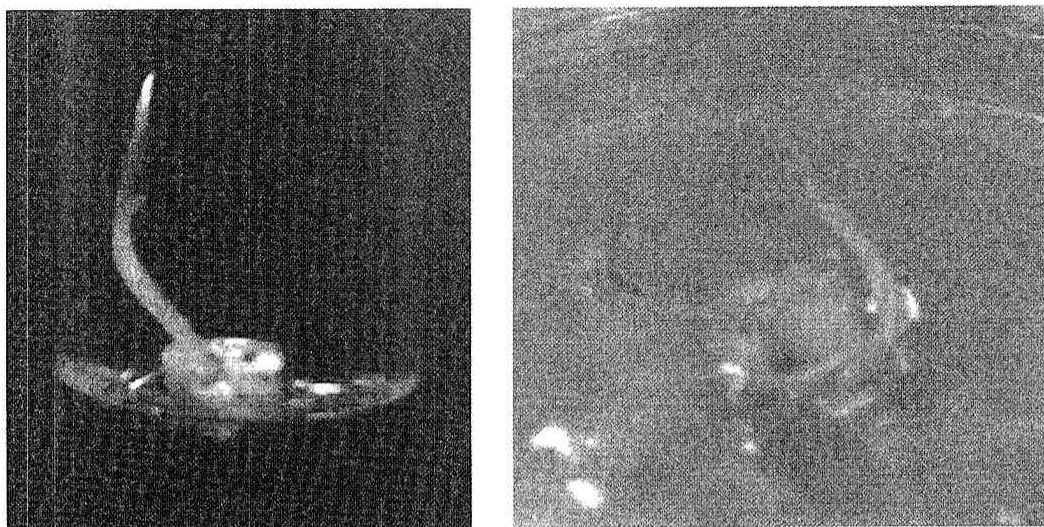
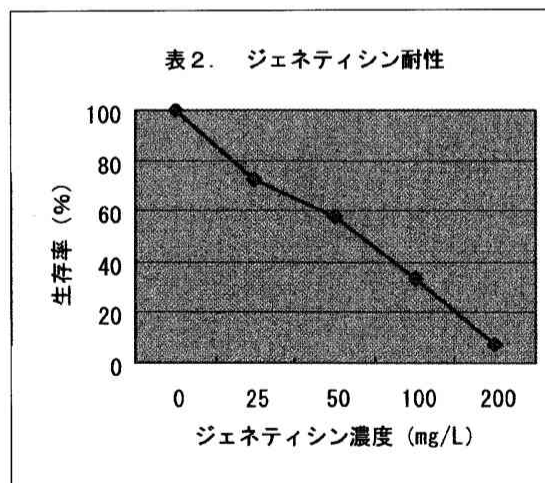
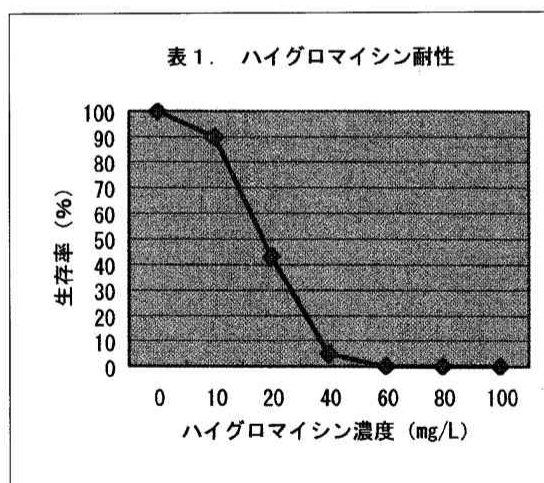


図3. シュートを形成したカルス

2. 抗生物質に関する検討

従来形質転換体の選抜にはカナマイシンがよく利用されてきたが、ジェネティシンやハイグロマイシンを用いた方がより効率よく形質転換体を選抜できるという報告がある。これらの抗生物質に対するタマネギ非形質転換体の耐性を調べた。ジェネティシンでは 200 mg/L で生存率が 6.7%に、ハイグロマイシンでは 40 mg/L で 4.8%に減少した(表1、2)。



50 mg/Lのハイグロマイシンを用いて選抜を行ったところ pBI121 Hm^rを用いた実験では 1637 個のカルスのうち、25個でシュートが生じた。カナマイシンによる選抜と比べ、低濃度で選抜できると考えられる。またカナマイシン選抜ではカナマイシンに抵抗性のないカルスでも成長しないだけで死ぬことがほとんどないようであったが、ハイグロマイシンを用いた場合には大部分のカルスは変色し死滅するらしく、抵抗性のないカルスの識別が比較的容易と考えられる。いずれにせよ生き残ったカルスすべてが形質転換体とは考えられないので、どのような割合で遺伝子が導入されているかを調べることにした。

実際に再分化が起こっているカルスに遺伝子が導入されているのかどうかを、GUS 遺伝子産物である β -グルクロニダーゼの活性の有無とPCR (polymerase chain reaction) によって GUS 遺伝子が増幅されるかどうかによって調べた。 β -グルクロニダーゼ活性は X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide) 溶液中にカルスを浸し、保温すると GUS 遺伝子を発現している細胞は X-gluc を分解し青く染まることから調べることができる(GUS 染色法)。カナマイシン選抜の方では再分化培地上で生育しているカルス 26 個のうち2個で、ハイグロマイシン選抜の方では 11 個のうち1個で青く染まっている部分を確認することができた(図4)。再分化培地上で生育しているカルスについてPCR法によって調べた場合、カナマイシンで選抜した場合には 24 個のカルスのうち8個で、ハイグロマイシンの場合は14個のカルスのうち2個で GUS 遺伝子が増幅された(図5)。またカナマイシン再分化培地上で形成したシュート5個のうち2個では GUS 遺伝子が増幅された。

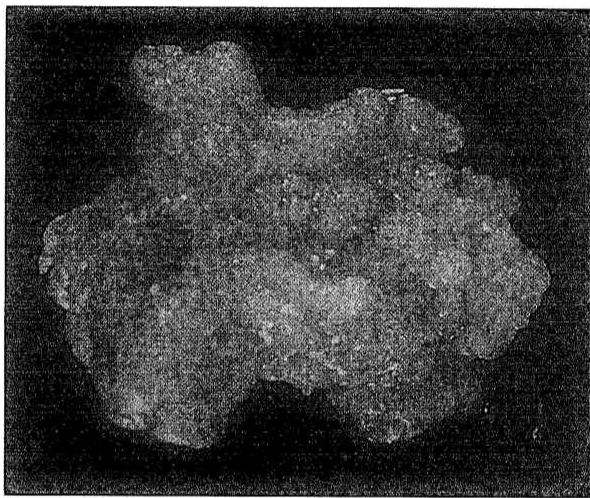


図4. GUS 染色を行ったカルス

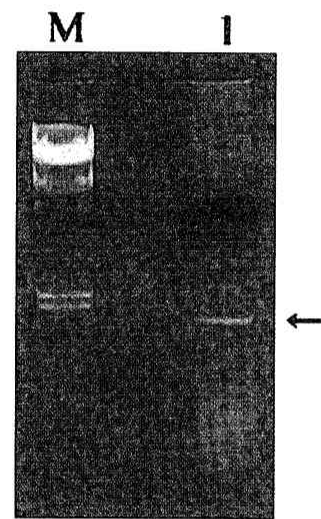


図5. PCR 産物の電気泳動
矢印が増幅された GUS 遺伝子産物

ハイグロマイシンで選抜を行った場合の方がハイグロマイシン感受性のカルスを識別しやすいと判ったが、カナマイシンを用いた場合もハイグロマイシンを用いた場合も、再分化培地上で成長しているカルスでも、シュートを形成しているものでさえ、非形質転換体である場合が多い。そのため形質転換体であるかどうかの判断は抗生物質による選抜だけでは不十分で、GUS 染色、PCR 法、さらには Genomic Southern Hybridization (GSH) を行う必要があると考えられる。

今後の課題

本年度の研究では多くのカルスで再分化が誘導され、1~2%の割合でシュートが形成されるようになった。しかしシュートを形成しても発根しないものがほとんどで、発根を誘導する効率の良い条件を見つけた必要があると考えられる。それでもこれまでに発根培地で根の形成が誘導されたものがいくつか得られたが、GSH 法などによる確認がまだとられておらず、正式に形質転換体を断言できないにいたっていない。今後は発根条件を改善し、実際にタマネギの塊茎部分での外来遺伝子の発現量を調べ、タマネギを物質生産のための植物工場として利用できる可能性があるかないかなどを検討していく予定である。