

技術ノート

Ti プラスミドによって形質転換した植物細胞の検出

鈴木正彦*

高等植物にクラウンゴールをひき起こす病原菌 *Agrobacterium tumefaciens* に存在する Ti プラスミドは最近、外来の遺伝子を植物に導入するベクターとして用いられている。人為的に外来の遺伝子を挿入された Ti プラスミドは直接に植物のプロトプラストに導入されることもあるが、多くの場合それらを内在させた *A. tumefaciens* を植物に接種し植物を形質転換させる方法がとられている。

筆者は植物組織に *A. tumefaciens* を接種する場合は、無菌苗の茎切片をホルモンフリーの合成培地 (MS, B5, K3) 上に置きその上に菌を白金耳で塗り付けている。1~2 週間で対照区は褐変するのに対し菌を接種された、形質転換した細胞はカルスを形成するので容易に選択することができる。 *A. rhizogenes* (Ri プラスミド) や T-DNA 領域の適当な部位を欠失させた *A. tumefaciens* を接種したものでは引き続き培養を行うと毛状根や根、茎等が現れてくる。

組織片を用いずに単細胞に接種したい時は植物からプロトプラストを単離し細胞壁を再生した細胞を用いる。筆者はタバコやキク等の無菌苗を茎頂培養でふやし、2~3 時間の酵素処理や低濃度の酵素液で一晩酵素処理を行って葉肉からプロトプラストを得ている。一晩酵素処理を行って得られたプロトプラストは2~3 時間処理したものに比べ多少分裂能力が落ちるが量的にも多くとれ、前日から酵素処理を始めるので翌日すぐにプロトプラストを得ることができ都合がよい。また無菌苗を用いる場合は表皮をむかないで 5mm 角程度に刻むだけで十分きれいなプロトプラストが得られ表面殺菌の操作が不要なので簡便である。植物によっては酵素処理を行う前に一晩植物体を低温処理 (冷蔵庫等に入れておく) をすると活性の高いプロトプラストが得られる。また通常、

無菌苗はホルモンフリーの培地に植え継ぐが BAP を 0.05 µg/ml ぐらい加えた方が活性の高いプロトプラストが得られるという報告もある。

このようにして得たプロトプラストを3~5 日培養すると細胞壁を再生するので、細胞数で100 倍になるように菌を培地に加え2 日くらい培養すると Ti プラスミドが植物内に入りこみ感染が成立する。このあと細胞を洗いカーベニンリン等を含む培地に移し遊離の菌を殺す。

Ti プラスミドによって形質転換した細胞はこのようなホルモンフリーの培地で育つのでまず選択できるが、植物によってはオーキシンフリーの培地でも増殖するものや継代培養中に馴化が起こり増殖可能になるもの等もあるのでさらに形質転換した細胞かどうかを確認しなければならない。形質転換した細胞はホルモンフリーの培地で育つという特徴のほかに、導入された Ti プラスミドによって固有のオピニン類を産生するので、それらを検出したり、また Ti プラスミドの一部 (T-DNA) が細胞の染色体に組み込まれているのでサザン法によっても検出できる。さらに T-DNA の中に外来の遺伝子を挿入した場合はその遺伝子が発現しているかどうかを mRNA をノザン法で、産物であるタンパクを ELISA 法等で検出することができる。

なかでもオピニン類の検出は簡便であるのでよく用いられる。現在、植物の腫瘍から発見されたオピニン類はオクトピン、ノバリン、アグロピン、アグロシノピンがありそれぞれの Ti, Ri プラスミドに対応している。アグロシノピン以外のオピニンは濾紙電気泳動で検出できるが、アグロシノピンの合成の検出には薄層クロマトグラフィーで分離後、オートラジオグラフをとる。詳細は文献を参照されたい。

(1984年2月10日受理)

文 献

- 鈴木正彦, 1983. 組織培養, 9(12): 478-482.
同, 1984. 同, 10(1): 47-51.

* Masahiko SUZUKI: Detection of Plant Cells Transformed by Ti Plasmids
植物工学研究所 (〒227 横浜市緑区鴨志田町 1000)
Plantech Research Institute (1000 Kamoshida, Midoriku, Yokohama 227)