

Riプラスミド *rol* 遺伝子によるペチュニアの形質転換

清川繁人\*・嶋田幸久\*・菊池泰弘\*・鎌田 博\*\*・原田 宏\*\*

\*協和発酵工業株式会社筑波研究所

(〒305 つくば市御幸が丘2)

\*\*筑波大学生物科学系

(〒305 つくば市天王台1-1-1)

(1991年12月14日受付)

(1992年3月25日受理)

アグロピン型 Ri プラスミド (pRiA4b) からクローン化した *rol* A, B, C 遺伝子を含む 4.3 kb の EcoRI 断片をバイナリーベクター pBI 121 に挿入し、ペチュニア栽培種に導入した。その結果、カナマイシン耐性を示す形質転換体を得られ、レポーター遺伝子である  $\beta$ -glucuronidase (GUS) 遺伝子の発現も認められた。この形質転換体を人工気象器で栽培したところ、矮化、開花時期の遅れ、葉の波打ち、花粉稔性の消失等の性質がみられた。

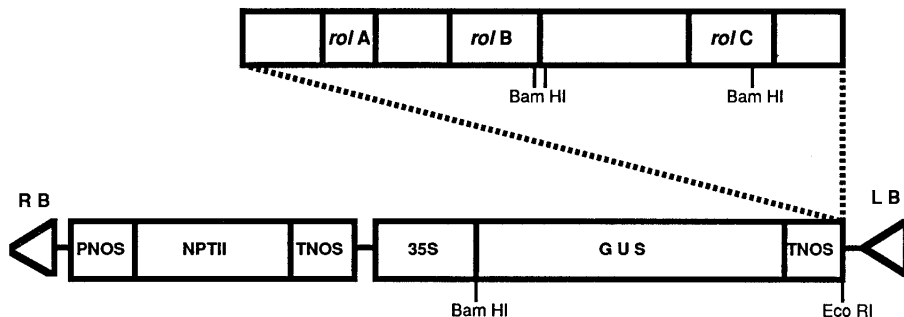
## 1. はじめに

土壌微生物である *Agrobacterium rhizogenes* が植物の茎葉部に感染すると、感染部位から多数の毛状根が形成されることが知られている。また、数種植物ではこの毛状根を *in vitro* で培養することにより、比較的容易に植物体の再分化が起こる<sup>1,2)</sup>。このような毛状根からの再分化個体では、非形質転換体 비해、根の分化や伸長が著しい、葉が幅広となり波打つ、頂芽優性が失われる、節間が短くなり低い草型となる、開花時期が変化する、花粉稔性が低下する、等の特徴的な性質が発現することが多くの植物種で知られている<sup>3)</sup>。筆者らは、これらの変化のうち園芸上有用と思われる形質をペチュニア (*Petunia hybrida*) に導入するための基礎として、アグロピン型 Ri プラスミド pRiA4b を有する *A. rhizogenes* A 4 株を 8 品種のペチュニア栽培種に感染し、毛状根を誘導したが、どの場合においても個体再分化には至らなかった。そこで、*A. rhizogenes* が保有する Ri プラスミド T-DNA のうち、毛状根の誘導や再分化個体の示すさまざまな特性に関与していると考えられる *rol* A, B, C<sup>4)</sup> の 3 つの遺伝子を含む領域をバイナリーベクター<sup>5)</sup> を用いてペチュニアに導入することで、再分化個体の誘導に成功したので報告する。

## 2. 材料および方法

植物材料 (*Petunia hybrida*) としては、市販の栽培種フルコンブルー、フルコンサーモン、フルコンローズ、フルコンレッド、フルコンレッドモーン (以上サカタのタネ)、フラッシュレッド、フラッシュローズ、カスケードレッド (以上第一園芸) を用いた。各品種の種子を 70% エタノールに数秒間浸漬し、次いで、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素: 1%) に 15 分間浸漬して滅菌処理を行った。滅菌水で 3 回洗浄した後、これらの種子を植物ホルモン無添加の MS<sup>6)</sup> 寒天培地に播種し、3,000 lux, 16 時間照明下、25°C で発芽、生育させた。

アグロピン型 Ri プラスミド pRiA4b の TL-DNA を含むハイブリッドコスミド pLJI<sup>7)</sup> を制限酵素 EcoRI で切断し、4.3 kb の断片を回収した。この断片をバイナリーベクター pBI 121<sup>8)</sup> の EcoRI サイトに挿入し、常法<sup>9)</sup> に従って大腸菌 JM 109 株に導入した。形質転換菌が保有するプラスミド pBI121E15 (Fig. 1) を、トリペアレンタルメーティング法<sup>10)</sup> によって *A. tumefaciens* LBA4404 株に導入した。この菌株を 50  $\mu$ g/ml のカナマイシンと 300  $\mu$ g/ml のストレプトマイシンを含む LB 液体培地で 28°C 1 晩培養し、MS 液体培地で菌体を洗浄した。次に、無菌植物体の展開葉を 0.5 cm 角に切り取り、菌の懸濁液に数秒間浸漬させた後、NAA 0~10



**Fig. 1** Physical map of the T-DNA region containing *rol* genes in binary vector pBI 121. PNOS/TNOS: nopaline synthase promoter/terminator, 35S: CAMV 35S promoter, NPT II: neomycin phosphotransferase II gene conferring resistance to kanamycin, GUS:  $\beta$ -glucuronidase gene, LB: T-DNA left border, RB: T-DNA right border.

mg/l, BA 0~10 mg/l を含む MS 寒天培地上に置床し、暗黒下、25°C で3日間培養した。さらに、葉切片を上記の培地にクラフォラン 500 mg/l, カナマイシン 100 mg/l を添加した培地 (抗生物質培地) に移植し、3,000 lux, 16 時間照明下、25°C で培養した。2 週間おきに新しい抗生物質培地に継代し、葉切片から生じた不定芽を植物ホルモン無添加の MS 寒天培地に移植して発根を促した。発根した植物体は、無菌であることを確認した後、Jefferson らの方法<sup>8)</sup>により GUS 遺伝子の活性を組織化学的に調査した。また、1 個体の葉から CTAB 法<sup>11)</sup>により全 DNA を抽出した。制限酵素 *EcoRI* および *XbaI* で DNA を完全に切断し、4.3 kb の *rol* 遺伝子を含む断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。実験により得られた植物体は、パーミキュライトとメトロミックスを 1:1 に混合した培土に移し、人工気象器中で 3,000 lux, 16 時間照明下、25°C で栽培した。

### 3. 結果および考察

野生型 *A. rhizogenes* A 4 株をペチュニア栽培種の節間に感染させたところ、実験に用いた 8 品種全てで毛状根が分化した。これらの毛状根を、オーキシシン (IAA, NAA, 2, 4-D) およびサイトカイニン (BA, カイネチン, ゼアチン) を各 0~10 ppm 含んだ MS 培地上に置床したが、不定芽分化は起こらなかった。非形質転換根についても、上記の培地を用いて不定芽を誘導することはできなかった。一部の植物種では、植物ホルモンを含まない培地上で自発的に毛状根からの再分化が起こるが、本研究に用いたペチュニア栽培種は、本来、根からの再分化能は低いものと思われる。

一方、ペチュニアは葉切片から不定芽が容易に誘導さ

れることから、タバコと同様に、バイナリーベクターを用いた形質転換実験に用いられる。そこで、ペチュニア 8 品種における葉切片からの個体再分化条件を検討したところ、品種により再分化率に違いがみられた。フルコンブルー、フルコンサーモン、フルコンローズ、フルコンレッドモーン、カスケードレッドの 5 品種は、幅広いホルモン濃度域 (NAA では 0.03 mg/l 以上、BA では 0.3 mg/l 以上) で不定芽の分化がみられたが、他は最も良い条件 (NAA 0.3 mg/l, BA 1 mg/l) でも葉切片当り数個の不定芽が生じたのみであった。

不定芽形成率の高かった上記 5 品種について、組換えプラスミドを保有する *A. tumefaciens* LBA 4404 株を葉切片に感染させ、抗生物質培地上で培養したところ、約 1 ヶ月後に全ての品種で緑色カルスが生じた。そこで、この緑色カルスを用いて GUS アッセイを行った結果、全てのカルスで GUS 活性が認められた。さらに 1 ヶ月後、フルコンブルーでのみ不定芽の分化がみられた (Fig. 2)。このときのホルモン濃度は、NAA 0.1 mg/l, BA 3 mg/l であった。ホルモンを含まない MS 培地中で発根させた形質転換体を 7 株分離したが、いずれの株においても葉脈部で強い GUS 活性がみられた (Fig. 3)。また、サザンブロットハイブリダイゼーションの結果、1 コピーの挿入断片の存在が確認された。

同程度の大きさの未感染株 5 株と形質転換株 7 株を鉢に移植し、人工気象器中で栽培した。未感染株は鉢上げ後約 2 ヶ月で開花したが、形質転換株は約 1 ヶ月遅れて開花した (Fig. 4)。このときの草丈は未感染株が平均 29.8 cm であったのに対し、形質転換株では平均 19.3 cm となった。また、形質転換株では、頂芽優性が失われたために分枝が盛んに起こり、水平方向に伸長す



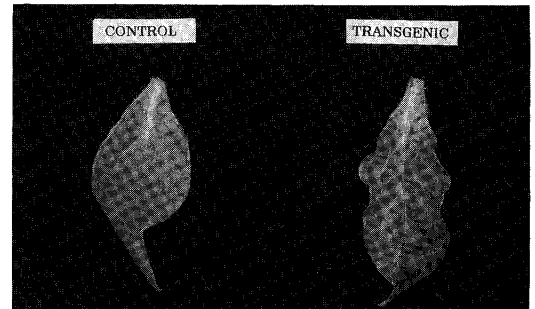
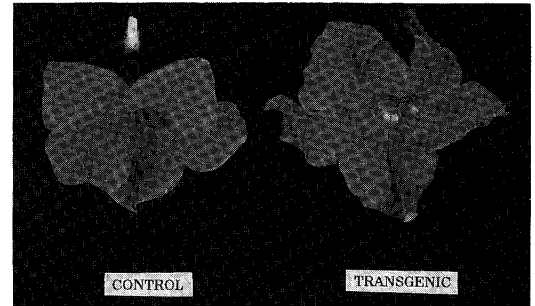
**Fig. 2** Adventitious shoot formation of *Petunia hybrida* cv. Flucon blue on selection medium containing 100 mg/l of kanamycin (one month after infection).



**Fig. 3** GUS expression in a vascular bundle of the leaves of transgenic *Petunia hybrida* cv. Flucon blue.



**Fig. 4** Flowering plants of *Petunia hybrida* cv. Flucon blue (2-3 months after transplantation to soil).



**Fig. 5** The transgenic *Petunia hybrida* cv. Flucon blue (right) showed wrinkled phenotypes in flower petals (A) and in leaves (B) as compared to non-transformed control (left).

る傾向があった。葉や花弁はやや波打つ傾向がみられたが (Fig. 5-A, B), 葉や花の大きさには有意な差は認められなかった。ペチュニアの栽培種は自家不和合であるため、形質転換株間での交配によっては結実はみられなかった。また、未感染の他の品種と形質転換株の間で交配したが、いずれも種子が得られなかった。そこで、形質転換株の花粉を酢酸カーミンで染色したところ、全く染色されなかった。以上のことから、形質転換株では花粉雄性が消失したばかりではなく、雌ずいも正常に機能しなかったものと思われる。形質転換株7株の間では、開花時期や分枝数にばらつきが認められたが、T1世代のみの観察であるため、個体間差であることの証明が得

られなかった。

今回材料として用いたペチュニアにおいても、他の植物で報告されている hairy root syndrome と呼ばれる形態変異が生じた。Riプラスミド *rol* 遺伝子を用いて園芸的に望ましい形質のみを発現させるためには、各 *rol* 遺伝子の生理機色の解明や各遺伝子の修飾・改変が必要

であると思われる。rol 遺伝子の各々の生理機能については酵素レベルの研究が始まったばかり<sup>12,13)</sup>であり、形質転換植物の形質発現との関連について今後さらに詳細な研究が望まれる。

#### 文 献

- 1) Mugnier, J., 1988. Plant Cell Rep., **7**: 9-12.
- 2) Tepfer, D., L. Metzger, R. Prost, 1989. Plant Mol. Biol., **13**: 295-302.
- 3) Tepfer, D., 1984. Cell, **37**: 959-967.
- 4) Taylor, B. H., F. F. White, E. W. Nester, M. P. Gordon, 1985. Mol. Gen. Genet., **201**: 546-553.
- 5) Bevan, M., 1984. Nucl. Acids Res., **12**: 8711-8721.
- 6) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.
- 7) Jouanin, L., 1984. Plasmid, **12**: 91-102.
- 8) Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, M. W. Bevan, 1987. EMBO J., **6**: 3901-3907.
- 9) Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis, 1989. In "Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edn.", Cold Spring Harbor Lab. Press.
- 10) Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, D. R. Helinski, 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**: 7347-7351.
- 11) Rogers, S. O., A. J. Bendich, 1985. Plant Mol. Biol., **5**: 69-76.
- 12) Estruch, J. J., D. Chriqui, K. Grossmann, J. Schell, A. Spena, 1991. EMBO J., **10**: 2889-2896.
- 13) Estruch, J. J., J. Schell, A. Spena, 1991. EMBO J., **10**: 3125-3128.

### Summary

#### Genetic Transformation of *Petunia hybrida* by rol Genes of Ri Plasmid.

Shigeto KIYOKAWA\*, Yukihisa SHIMADA\*, Yasuhiro KIKUCHI\* Hiroshi KAMADA\*\*  
and Hiroshi HARADA\*\*

\*Tsukuba Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., 2 Miyukigaoka, Tsukuba, Ibaraki, 305 Japan

\*\*Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, 305 Japan

A 4.3 kbp fragment of an agropine type Ri plasmid (pRiA4b) including rolA, B, C genes had been cloned. The fragment was introduced into some cultivars of *Petunia hybrida* through binary vector pBI121. Regenerated plants exhibiting kanamycin resistance were obtained and showed GUS expression. When the plants were transferred to soil, they showed hairy root syndrome such as dwarfness, delay of flowering, wrinkled leaves, and loss of pollen fertility.