

PCR法によるRiプラスミド *rol* 遺伝子の検出と 形質転換確認への応用

清川繁人*・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4月2日受理)

ミキモピン型 Ri プラスミドおよびアグロピン型 Ri プラスミドにおいて、*rol* 遺伝子群の中からホモロジーを有する配列を基に4種のプライマーを合成した。*Agrobacterium rhizogenes* の野生株10株から抽出したDNAを鋳型としてそれぞれ2組のプライマーを用いてPCRを行ったところ、9株で同一の長さの断片が増幅された。

また、*A. rhizogenes* A4株および1724株によるタバコの形質転換体から抽出したDNAについても、同様のPCR法によって*rol* 遺伝子の増幅が確認できた。さらに、ボーダー配列部分を認識するプライマーを用いることにより、形質転換個体では完全に除菌されていることが示された。

1. 緒言

A. rhizogenes が保有する Ri プラスミドの T-DNA 領域には、毛状根の分化に関与する *rol* 遺伝子群が存在する^{1,2)}。この *rol* 遺伝子群の作用により、毛状根から再分化した形質転換個体では、節間が短くなり矮性となる、根の分化や伸長が旺盛である、葉が幅広となり波打つ、頂芽優性が失われる、開花時期が早くあるいは遅くなる、花粉稔性が低下する、等の特徴的な性質があらわれる³⁻⁷⁾。*rol* 遺伝子群によって誘導されるこのような性質を利用し、園芸植物における形態変異の誘導や毛状根培養による二次代謝物質の生産⁸⁾、種苗の土壌順化の促進⁹⁾、形質転換個体を利用した有害物質の吸収¹⁰⁾等の産業上の利用が試みられている。

rol 遺伝子の導入確認は、一般的に、サザンブロットハイブリダイゼーション法や *rol* 遺伝子と連鎖して植物細胞に挿入されるオパイン合成酵素の産物を検出するオパインアッセイ法が利用されている。サザンブロットハイブリダイゼーション法は、DNAを抽出するためにグラム単位の材料を必要とし、植物の品種や組織によってはDNAの収率が低いために分析ができない場合も多い。

一方、オパインアッセイ法は、*rol* 遺伝子検出のための直接的な証拠とは言えず、また、検出感度が極端に低い欠点も有する。

近年、polymerase chain reaction (PCR) 法¹¹⁾による遺伝子の検出やクローニング技術が発達し、分子生物学の分野で広く利用されている。このPCR法により、少量のDNAサンプルからβ-グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子やアグロピン型 Ri プラスミド中の *rol* 遺伝子等で植物のゲノムに組み込まれたことが確認されている¹²⁾。また、PCRの結果が、オパインアッセイやサザンブロットハイブリダイゼーションの結果と一致することも証明されている¹³⁾。しかし、PCR法はプライマーの3側の配列が鋳型となるDNA配列と完全に一致しなければ、目的とするDNAが増幅されない。したがって、特定の遺伝情報を基にして作成したプライマーを用いて形質転換を確認する場合、増幅バンドが検出できる Ri プラスミドの種類は極めて限定される。以上の問題を解決するために、既知の *rol* 遺伝子群と新たに決定したミキモピン型 Ri プラスミド由来の *rol* 遺伝子群¹⁴⁾とのホモロジー検索によってホモロジーを有する配列を見出し、そ

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study.

name	sequences(5'→3')	length(mer)	origin	position
1724A	GTGCTTTCGCATCTTGACAG	20	1724, A4	1449-1468(1724) 9179-9198(A4)
1724B	TCTCGCGAGAAGATGCAGAA	20	1724, A4	3084-3065(1724) 10974-10953(A4)
1724C	CTGTACCTCTACGTCGACT	19	1724, A4	4737-4755(1724) 12643-12661(A4)
1724D	TCAGTCGAGTGGGCTCCTTG	20	1724, A4	5873-5854(1724) 13798-13779(A4)
TL-B	TGGCAGGATATATTGTGATGT	21	A4	520-540(A4)
ORF1	GATGACATCGCAGTCGATGA	20	A4	1482-1463(A4)

れらをプライマーとして用いることにより、8菌株の *A. rhizogenes* が塩基配列が解読されていない *rol* 遺伝子群の検出に成功した。また、タバコの形質転換体を材料に、*rol* 遺伝子の導入確認を鋭敏かつ確実に行えることが示されたので以下に報告する。

2. 材料および方法

(1) プライマーの選択

遺伝子解析プログラム DNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング) により、ミキモピン型 Ri プラスミド pRi1724 の塩基配列¹⁴⁾と既知の pRiA4b 由来の *rol* 遺伝子¹⁵⁾のホモロジー検索をおこない、20 bp 前後連続して相同な配列の中から4カ所を選んだ。また、pRiA4b の TL ボーダーと近傍の ORF1 を認識する配列2カ所を選んだ (Table 1)。プライマーの合成は、Cyclone Plus DNA Synthesizer (Milligen/Biosearch) を用いた。

(2) PCR 法による *rol* 遺伝子の増幅

外国産でアグロピン型 Ri プラスミドを持つ *A. rhizogenes* A4 株および ATCC15834 株、日本産でミキモピン型 Ri プラスミドを持つ *A. rhizogenes* NIAES1724 株¹⁶⁾および NIAES1725 株、A5 株、A13 株、C8 株、D6 株、H4 株、Y1 株のそれぞれから Currier と Nester の方法¹⁷⁾により全 DNA を抽出し、鋳型とした。

プライマーは 1724A-1724B, 1724C-1724D, TL-B-ORF1 の3組を用いた。鋳型 DNA (50 ng) とプライマー (各 0.2 μg) を 10 X Taq DNA polymerase buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 0.1% gelatin) 5 μl に混合し、さらに 100 μM の dNTP mixture と 1U の Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus) を加え、50 μl の反応液を調製した。

PCR は、Program temp control system (PC-700, Astec) により 1 サイクル当りディネーター 93°C 30 秒、アニーリング 55°C 30 秒、エクステンション 73°C 2 分から成る反応を 30 サイクル行った。反応後、1.5% アガロースゲル電気泳動で増幅バンドを比較した。

(3) 形質転換体の誘導および *rol* 遺伝子の検出

タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR-1) の種子を 1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液で 15 分間滅菌し、無菌水で 3 回洗浄した後、0.8% の寒天を含む植物ホルモン無添加の MS 培地に置床した。3,000 lux, 16 時間照明下、25°C で発芽を誘導し、3 ヶ月間培養した無菌植物体の葉脈に、YEB 寒天培地で 1 晩培養した *A. rhizogenes* A4 株または NIAES1724 株をメスで傷つけて感染させた。発芽と同様の光条件下で約 3 週間培養した後、感染部位から生じた毛状根を除菌培地 (植物ホルモン無添加の MS 培地に抗生物質クラフォランを 500 μg/ml 添加したもの) に移植し、さらに培養を継続した。毛状根は新しい除菌培地に 2 週間おき継代した。1~2 ヶ月後、毛状根から生じた不定芽を切り離し、抗生物質を除いた植物ホルモン無添加の MS 培地に移植した。

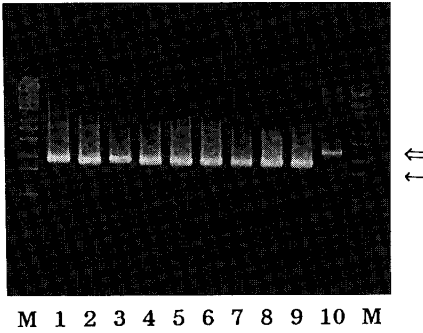
再分化個体の葉から CTAB 法¹⁸⁾により全 DNA を抽出した。50 ng の植物 DNA を鋳型とし (2) で述べた条件と同様の条件下で PCR を行い、増幅バンドをアガロースゲル電気泳動で検出した。

3. 結果および考察

(1) *rol* 遺伝子の共通配列の増幅

ミキモピン型 Ri プラスミドによる形質転換を PCR 法によって調べるための予備実験として、アグロピン型 Ri プラスミドの塩基配列を基に 8 種のプライマーを合成し、*A. rhizogenes* から抽出した全 DNA を鋳型として PCR を行ったが、ミキモピン型 Ri プラスミドの *rol* 遺伝子群を増幅させることはできなかった (未発表データ)。そこで、アグロピン型およびミキモピン型の Ri プラスミドの両者で共通に *rol* 遺伝子群を検出できるプライマーを作成するため、ミキモピン型 Ri プラスミド pRi1724 の *rol* 遺伝子領域をクローニングし、塩基配列を解読した¹⁴⁾。アグロピン型 Ri プラスミド pRiA4b の *rol* 遺伝子領域との比較では、Coding region で約 68~92%、Non-coding region では約 73% のホモロジーがあった。

Fig.1 (A)



(B)

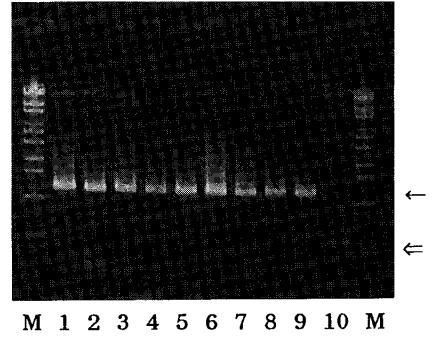


Fig. 1 Electrophoretic patterns of PCR products.

(A) 1724A-1724B primers were used for PCR reactions with the total DNA of *A. rhizogenes* as templates.

(B) 1724C-1724D primers were used for PCR reactions with the total DNA of *A. rhizogenes* as templates.

M: Molecular weight marker of λ DNA digested with *SlyI*. Lanes 1: A4, 2: ATCC15834, 3: NIAES1724, 4: NIAES1725, 5: A5, 6: A13, 7: C8, 8: D6, 9: H4, 10: Y1. Arrows indicate the bands of same length within nine *A. rhizogenes* strains. Open arrows indicate the *A. rhizogenes* strain Y1 specific bands.

PCR用プライマーにおいては、目的遺伝子を特異的に増幅するためには20 mer前後の長さであることが望ましい。そこで、20 bp以上の連続した配列でホモロジーを有する領域を検索したところ22か所存在した。それらの中から4か所を選択し、アグロピン型Riプラスミドを持つ2菌株およびミキモピン型Riプラスミドを持つ8菌株由来のDNAを鋳型としてPCRを行った。

その結果、Y1株を除いた9株で共通な長さのバンドが確認された (Fig. 1-A, B)。Y1株は他のプライマーの組合せでも固有のバンドを増幅することが確認されている。また、10菌株を *in vitro* で継代しているタバコの茎葉部に接種したところ、Y1株のみ毛状根の分化は起こらず、この菌株のみ *rol* 遺伝子の構造が他と著しく異なった弱感染性株である可能性が示された (投稿中)。

(2) 形質転換体からの *rol* 遺伝子の検出

A. rhizogenes A4株およびNIAES1724株の感染部位に発生した毛状根から、それぞれ68株および43株の再分化個体を得た。再分化個体には、形態的に未感染のコントロールと変わらない株が16(A4)~23(1724)%, また、矮性をはじめとした典型的なHairy root syndromeを示した株が84(A4)~77(1724)%みられた。各々の株についてDNAを抽出し、(1)と同様の手順でPCRを行ったところ、矮性株の97%以上で *rol* 遺伝子の増幅が確認されたが (Fig. 2-Lane 4, 6), コントロールと同様の生育を示した株には *rol* 遺伝子は検出できなかった (Fig. 2-Lane 3, 5)。このことは、培養中に導入遺伝子が脱落してキメラ状態になったこと、あるいは毛

Fig.2

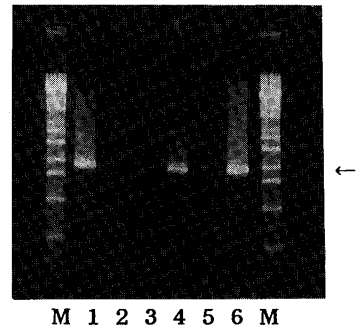


Fig. 2 Electrophoretic patterns of PCR products.

1724A-1724A primers were used for PCR reactions with the total DNA of transgenic tobacco plants as templates. The tobacco plants were obtained from hairy roots transformed with *A. rhizogenes* strains A4 and NIAES1724.

M: Molecular weight marker of λ DNA digested with *SlyI*.

Lanes 1: Bacterial DNA as a control (strain A4), 2: Tobacco DNA of a non-transformed plant (control), 3, 4: Tobacco DNA of transformed plants (strain A4), 5, 6: Tobacco DNA of transformed plants (strain NIAES 1724). An arrow indicates the amplified bands of *rol* genes.

Fig. 3

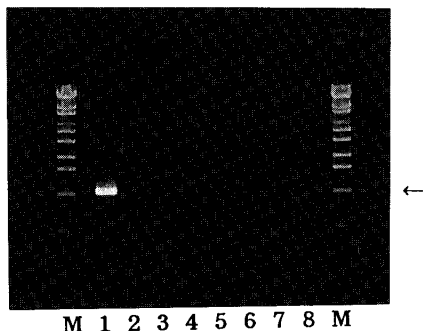


Fig. 3 Electrophoretic patterns of PCR products.

TL-B-ORF1 primers were used for PCR reactions with the total DNA of transgenic tobacco plants as templates. The tobacco plants were obtained from hairy roots transformed with *A. rhizogenes* strains A4 and NIAES 1724. That the template DNAs contained *rol* genes was confirmed by PCR.

M: Molecular weight marker of λ DNA digested with *Sst*I. Lanes 1: Bacterial DNA as a control (strain A4), 2: Tobacco DNA of non-transformed plants (control), 3, 4, 5: Tobacco DNA of a transformed plant (strain A4), 6, 7, 8: Tobacco DNA of transformed plants (strain NIAES 1724). An arrow indicates the amplified bands of border sequences.

状根ではなく正常根から再分化が起こったこと等が原因として考えられる。一方、矮性を示したにもかかわらず *rol* 遺伝子を検出できない株が全体の1(A4)~3(1724)%存在し、これらは T-DNA 全域が導入されたのではなく特定の *rol* 遺伝子のみが導入されたことや、導入された遺伝子に変異を受けて塩基配列が変化したことが推測される。

再分化個体の葉片から DNA を抽出し、PCR で検出可能な最小のサンプル量について検討を行った。その結果、最小 1 mg の葉片から抽出した DNA でも *rol* 遺伝子の増幅が確認された。このとき、DNA の濃度を分光光度計で測定したが検出限界以下であった。

PCR は非常に鋭敏な DNA の検出法であるため、完全に *A. rhizogenes* が除菌されずに残っている場合には菌由来の *rol* 遺伝子が増幅される。コントロール実験として、DNA を添加していない PCR 反応液に、10 cells/ μ l の *A. rhizogenes* 懸濁液を 1 μ l 添加するだけで *rol* 遺伝子の増幅を確認した。このことは、菌体を高温にさらすだけで溶菌し、溶出した DNA が鋳型となって

反応が進むことを示している。したがって、形質転換植物の DNA を鋳型とした PCR においては、検出されたバンドが菌由来でないことを実証する必要がある。そのため、TL-Border と内側の ORF1 部分を認識するプライマーを A4 株の塩基配列を基に合成した。これらのプライマーを用いた場合、T-DNA が組み込まれた植物体ではボーダー部分が欠落するため DNA の増幅が起こらなくなり、除菌されたことの確認ができる。

まず、*A. rhizogenes* 由来の DNA を鋳型とした場合、A4 株および NIAES1724 株で DNA の増幅がみられた。そこで、pRi1724 の *rol* 遺伝子群の挿入が確認されたタバコ形質転換体各 3 系統の DNA を鋳型として PCR を行ったところ、増幅バンドは認められず、完全に除菌されたものであることが実証された (Fig. 3)。

上述の結果をより、PCR 法を利用することで、① Ri プラスミドによる形質転換を簡便に確認でき、②形質転換体における除菌の有無を簡便に確認できた。近年、*A. rhizogenes* を利用した植物の品種改良や物質生産がさかんに行われているが、今回開発した手法が応用面で一層有効に活用されていくものと思われる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、日本産の菌株を譲渡していただいた大阪府立大学大門弘幸博士、ならびに貴重なアドバイスを頂いた筑波大学半田高博士にお礼申し上げる。

文 献

- 1) Moore, L., G. Warner, G. Strobel, 1979. *Plasmid*, **2**: 617-626.
- 2) White, F. F., E. W. Nester, 1980. *J. Bacteriol.*, **141**: 1134-1141.
- 3) Tepfer, D., 1984. *Cell*, **37**: 959-967.
- 4) Pasqua, G., B. Monacelli, M. M. Altamura, B. Calzecchi-Onesti, 1987. *J. Plant. Physiol.*, **130**: 221-231.
- 5) Jouanin, L., F. Vilaine, J. Tourneur, C. Tourneur, V. Pautot, J. F. Muller, M. Caboche, 1987. *Plant Science*, **53**: 53-63.
- 6) Spena, A., T. Schmülling, C. Koncz, J. S. Schell, 1987. *EMBO J.*, **6**: 3891-3899.
- 7) Oono, Y., T. Handa, K. Kanaya, H. Uchimiya, 1987. *Jpn. J. Genet.*, **62**: 501-505.
- 8) Kamada, H., N. Okamura, M. Satake, H. Harada, K. Shimomura, 1986. *Plant Cell Reports*, **5**: 239-242.
- 9) Lambert, C., D. Tepfer, 1991. *BIO/TECHNOLOGY*, **9**: 80-83.
- 10) Tepfer, D., L. Metzger, R. Prost, 1989. *Plant Mol. Biol.*, **13**: 295-302.
- 11) Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stooffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, 1988. *Science*, **239**: 487-491.
- 12) Hamill, J. D., S. Rounsley, A. Spencer, G. Todd, M. J. C. Rhodes, 1991. *Plant Cell Reports*, **10**: 221-224.

- 13) Handa, T., 1992. *Plant Science*, **81**: 199-206.
- 14) Kiyokawa, S., K. Kobayashi, Y. Kikuchi, H. Kamada, H. Harada, 1991. *Nucl. Acid Res.*, submitted.
- 15) L. Slightom, J. L., M. Durand-Tardif, L. Jouanin, D. Tepfer, 1986. *J. Biol. Chem.*, **261**: 108-121.
- 16) Shiomi, T., T. Shirakawa, S. Takeuchi, T. Oizumi, S. Uematsu, 1987. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **53**: 454-459.
- 17) Currier, T. C., E. W. Nester, 1976. *Anal. Biochem.*, **66**: 431-441.
- 18) Rogers, S. O., A. J. Bendich, 1985. *Plant Mol. Biol.*, **5**: 69-76.

Summary

Detection of *rol* Genes of Ri Plasmids by PCR Method and Its Application to Confirmation of Transformation.

Shigeto KIYOKAWA*, Yasuhiro KIKUCHI*, Hiroshi KAMADA** and Hiroshi HARADA**

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

***Institute of Biological Science, Tsukuba University, Tsukuba, Ibaraki, 305 Japan*

Four oligonucleotide primers which showed the same homologous sequences in *rol* genes between mikimopine and agropine type Ri plasmids were synthesized. When two pairs of the primers were used for polymerase chain reaction (PCR) with the total DNA of ten strains of *A. rhizogenes* as templates, fragments with a same length were amplified in nine strains.

Transgenic tobacco plants were obtained from hairy roots transformed with two strains of *A. rhizogenes*, A4 and NIAES1724. Amplification of a single fragment originated from inserted DNA into plant genome occurred by the same reactions. That these results are not due to contamination by bacterial DNA was confirmed by using PCR with border sequences as primers.