

## 技術ノート

エレクトロポレーションによる *Agrobacterium* 属細菌への DNA 導入法

田中伸和\*

植物形質転換に用いられる *Agrobacterium* 属細菌にバイナリー・ベクターなどを導入するためには、これらのベクターをクローン化した大腸菌、ベクターの *Agrobacterium* 属細菌への移行を手助けするヘルパー・プラスミドを持つ大腸菌、および受容菌である *Agrobacterium* 属細菌の3種を混合培養する、いわゆる triparental mating 法が一般的である<sup>1)</sup>。本法は、特に複雑な操作を必要としない点で、植物遺伝子操作に携わる者にとっては取っつき易い方法であるが、pBIN 19系のようなカナマイシン耐性マーカーを持つベクター<sup>2)</sup> および *A. tumefaciens* LBA 4404 株<sup>3)</sup> のようなカナマイシン感受性菌株以外を用いようとすると、ベクターの導入はかなり困難になってくる。また、いくら取っつき易い方法とはいえ、3種の細菌を培養・混合し、受容菌だけを選抜する手順、さらに、受容菌が本当に目的菌であるかを検定する手順は、結構時間と労力を要するのである。

一方、*Agrobacterium* 属細菌と DNA を混合し、急速凍結と融解を繰り返しながら膜を緩め、DNA を直接導入する方法もある<sup>4)</sup>。しかし、本法は一般的に形質転換効率が悪く、頻度も一定しないようである。

ところで、植物プロトプラストへ外来 DNA を導入する方法の一つとしてお馴染みのエレクトロポレーション法は、大腸菌や *Bacillus* 属細菌などでも十分な技術確立が成されており、最近では *Agrobacterium* 属細菌でも次々に導入方法を開発した報告がなされている<sup>4-7)</sup>。本法のメリットは、1) 事前に調製し冷凍保存した受容菌を、DNA 導入時に即使用できる、2) マーカーを付与した DNA が導入された受容菌のみ選抜するため、triparental mating 法のように供与菌やヘルパー・プラ

スミドを持つ大腸菌を間違えて選抜することがない、3) triparental mating 法に比べ、3菌株の前培養および mating の手順が省け、時間の短縮が図れる、4) 導入すべき DNA は適当に純化されている必要があるが、少量(バイナリー・ベクターでは 40 ng 程度)でよい、5) 調製した受容菌のロット内では、形質転換頻度が安定している、などである。

本稿では、現在著者らが行っているエレクトロポレーションによる *Agrobacterium* 属細菌への外来 DNA 導入法について具体的に紹介する。

エレクトロポレーション法によって DNA が導入される *Agrobacterium* 属細菌は、10% グリセロール液で十分に洗浄し、菌を培養した培地中の塩類を除去しておく必要がある。筆者らは、すでに Mattanovich ら<sup>4)</sup> および Wen-jun ら<sup>7)</sup> によって報告された方法を改変して調製した<sup>8)</sup>。すなわち、

1. *Agrobacterium* 属細菌を 10 ml の\*LB 液体培地に接種し、30°C で 16 時間振盪培養し、
2. 培養液 1 ml を 2 l のフラスコに入れた 300 ml の LB 液体培地に接種し、30°C で 16 時間振盪培養して、OD<sub>600</sub> = 0.5-0.7 まで増殖し、
3. 培養液を 10 分間水冷後、4°C、6,000 rpm、10 分間の遠心分離によって集菌し、
4. 菌体を、300 ml、150 ml、6 ml の冷 10% (v/v) グリセロールへの懸濁と上記の遠心分離を繰り返すことによって洗浄し、
5. 菌体を 3 ml の冷 10% グリセロールに懸濁し、
6. 調製菌 40  $\mu$ l ずつを 2 ml の冷凍用プラスチック・バイアルに分注し、
7. 保存の場合は、液体窒素もしくはドライアイス-エタノール・バス中で急速冷凍後、-70°C で行う。

(3以降の操作は、全て氷上で行うこと。)

\*LB 液体培地: 10 g バクトトリプトン (Difco), 5 g バクトイーストエキス (Difco), 5 g NaCl, 1 l 脱イオン水, pH 7.0.

ところで、*Agrobacterium* 属細菌には、培養時に著しく菌体外にポリサッカライドを分泌する菌株がある。例

Nobukazu TANAKA\*

Introduction of DNA into *Agrobacterium* spp. by Electroporation.

\*ダイセル化学工業(株)総合研究所・生理評価研究所  
(〒671-12 姫路市網干区新在家 1239)

\*Bioassay Laboratory, Research Center, Daicel Chemical Industries, Ltd., Shinzaike 1239, Aboshi-ku, Himeji, Hyogo, 671-12 Japan

**Table 1.** Transformation frequency of *Agrobacterium* spp. by electroporation.

Strain	Plasmid	Transformation frequency (Transformants/ $\mu\text{g}$ DNA)
<i>A. tumefaciens</i>		
LBA4404	pBIN19	$3.0 \times 10^6$
C58C1	pBIN19	$8.0 \times 10^5$
<i>A. rhizogenes</i>		
DC-AR2* <sup>1</sup>	pBIN19	$2.1 \times 10^3$
DC-AR2* <sup>2</sup>	pBIN19	$1.1 \times 10^5$

\*<sup>1</sup>Mutant, resistant to kanamycin, derived from *A. rhizogenes* strain MAFF 03-01724<sup>9)</sup>.

\*<sup>2</sup>Cultured in a 500 ml flask with baffles.

えば、日本産の *A. rhizogenes* MAFF03-01724 株 (ミキモピン型)<sup>9,10)</sup> などでは、培養液中に 2-3 mm ものコンペイトウ型凝集塊が多数出現し、形質転換頻度を低下させる (Table 1)。このような菌株を用いる際は、菌の培養時に 3-4 個のバフルの付いた小型 (500 ml 程度) のフラスコを用いること、および洗浄時の懸濁操作で 10 ml の口の細い駒込ピペットを用いて十分にピペッティングし、凝集塊を細かくすることによって、形質転換効率の改善が行える (Table 1)<sup>9)</sup>。

ジーン・パルサー™ (Bio Rad 社) を用いたエレクトロポレーションのプロトコルを紹介する。導入 DNA としては、バイナリー・ベクター pBIN 19<sup>2)</sup> を使用した。操作手順は、

1. 40  $\mu\text{l}$  の調製菌液に少量 (5  $\mu\text{l}$  以下) の滅菌水に溶解した 40 ng の pBIN 19 を添加し、
2. よく混合し氷上に数分間置いた後、これを、氷冷したサンプル・キュベット (電極間距離 0.2 cm) に移し、
3. 12.5 kv/cm, 25  $\mu\text{F}$ , 600  $\Omega$  (10 msec.) でエレクトロポレーションを行い、
4. 0.8 ml の\*SOC 液体培地を加え、2 ml のプラスチック・バイアルに移し、
5. 30 °C で 1 時間振盪培養し、
6. カナマイシンを添加した LB 固形培地に塗布接種し、
7. 30 °C で 36 時間培養し、形質転換コロニーを取得する。

\*SOC 液体培地: 20 g バクトトリプトン (Difco), 5 g バクトイーストエキス、0.19 g KCl, 2.03 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2.46 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.58 g NaCl, 3.6 g グルコース, 1 l 脱イオン水, pH 7.0.

なお、*A. tumefaciens* C58C1<sup>11)</sup>, LBA4404 株<sup>9)</sup>, および *A. rhizogenes* DC-AR 2 株 (1724 株由来のカナマイシン感受性変異株)<sup>9)</sup> を用いた形質転換頻度を Table 1 に示す。

エレクトロポレーション法を用いれば、ベクターだけでなく、*Agrobacterium* 属細菌の染色体 DNA や保有プラスミド DNA の断片と他の有用遺伝子を含む DNA 断片とを連結した DNA を導入し、相同組換えによって染色体 DNA やプラスミド DNA に有用遺伝子を組み込んでしまうことも可能である。筆者らは、1724 株の毛状根誘発プラスミド pRi1724<sup>12)</sup> の解析を行う中で、pRi1724 の約 8.2 kb の断片にカナマイシン耐性遺伝子を連結し、エレクトロポレーション法を用いて DC-AR2 株に導入した<sup>13)</sup>。その結果、カナマイシン耐性遺伝子は相同組換えによって pRi1724 に組み込まれ、カナマイシン耐性遺伝子を持つ pRi1724::kan (約 220 kb) が取得できた。ただし、このときの形質転換頻度は著しく低かった (200  $\mu\text{l}$  の調製菌液に 5  $\mu\text{g}$  の pF 11 を導入し、11 コロニー取得)。しかしながら、DC-AR2 株に凍結-融解法<sup>1)</sup> で直接 DNA を導入しても形質転換は全く不可能であったため、エレクトロポレーションは有効な DNA 導入法であるといえる。

また、エレクトロポレーション法を用いれば、*Agrobacterium* 属細菌に 200 kb を越える巨大な Ti プラスミドや Ri プラスミドをも導入可能である。Mozo と Hooykaas<sup>6)</sup> は、*A. tumefaciens* の 1 晩培養液 500  $\mu\text{l}$  から小スケールで単離した Ti プラスミドを、直接エレクトロポレーション法で *Agrobacterium* 属細菌に導入できることを報告している。筆者らは、前述のエレクトロポレーション法によって、DC-AR 2 株から単離した pRi1724::kan を、C58C1 株に導入できることを見いだしている<sup>13)</sup>。このときの形質転換頻度は、 $1.5 \times 10^2 / \mu\text{g}$  DNA であった。

以上のように、エレクトロポレーションによって容易に *Agrobacterium* 属細菌に外来 DNA を導入することが出来る。特に、扱う菌株が 1 種類でよいため、培養、選抜などの手順が大幅に短縮されるのが有り難い。今後は、*Agrobacterium* 属細菌への DNA 導入は、本法が主

流になっていくものと考えている。

(1993年5月8日受理)

文 献

- 1) Lichtenstein, C., J. Draper, 1985. In "DNA Cloning Volume II" (ed. by Glover, D.M) p.67-119. IRL Press, Oxford, Washington DC.
- 2) Bevan, M., 1984. Nucl. Acids Res., **12** : 8711-8721.
- 3) Hoekema, A., P.P. Hirsch, P. J. J. Hooykaas, R.A. Schilperoort, 1983. Nature, **303** : 179-180.
- 4) Mattanovich, D., F. Ruker, A. da Camara Machado, M. Laimer, F. Regner, H. Steinkellner, G. Himmler, H. Katinger, 1989. Nucl. Acids Res., **17** : 6747.
- 5) Mersereau, M., G.J. Pazour, A. Das, 1990. Gene, **90** : 149-151.
- 6) Mozo, T., P. J. J. Hooykaas, 1991. Plant Mol. Biol., **16** : 917-918.
- 7) Wen-jun, S., B. G. Forde, 1989. Nucl. Acids Res., **17** : 8385.
- 8) 田中伸和, 高尾実里, 松本 武, 町田泰則, 1993. 日植病報, (印刷中).
- 9) 塩見敏樹, 白川 隆, 竹内昭士郎, 大泉利勝, 植松清次, 1987. 日植病報, **53** : 454-459.
- 10) Isogai, A., N. Fukuchi, M. Hayashi, H. Kamada, H. Harada, A. Suzuki, 1990. Phytochemistry, **29** : 3131-3134.
- 11) Van Larebeke, N., G. Engler, M. Holsters, S. Van den Elsacker, I. Zaenen, R.A. Schilperoort, J. Schell, 1974. Nature, **252** : 169-170.
- 12) Tanaka, N., T. Matsumoto, A. Oka, 1993. Ann. Phytopath. Soc. Japan, **59** : 155-162.
- 13) 田中伸和, 松本 武, 町田泰則, 1993. 日植病報, (印刷中).