

研究ノート

イネにおけるアグロバクテリウムを用いた形質転換植物の作成法

横井修司・鳥山欽哉・日向康吉

アグロバクテリウム法によるイネへの遺伝子導入を行い、簡便に形質転換植物体を得ることができた。本手法の特徴は、(1)誘導後3週間目の胚盤由来のカルスをアグロバクテリウムの感染に使用していること、(2)通常のバイナリーベクターを保持する *Agrobacterium tumefaciens* の EHA101 系統を用いていること、(3)アグロバクテリウムを AA 培地に懸濁していること、(4)アセトシリノン共共存培養時に使用していること、(5)ハイグロマイシン耐性遺伝子を選抜マーカーとして用いていること、(6)再分化効率の高い再分化培地を使用していることである。ここでは、その具体的な方法について紹介する。

効率の高いアグロバクテリウムによるイネの形質転換が Hiei *et al.*(1994)によって報告されている¹⁾。筆者らは、この方法の再現性を確認し、さらにイネのプロトプラスト培養系と当研究室で行ってきたブラシカ類の形質転換の経験を参考にして改良を加え、簡便なイネへの遺

伝子導入系を得ることができた。ここでは具体的な操作法、特に筆者らが留意した細かい注意点などについて、紹介したい。

用いたイネ品種は、培養しやすく再分化効率がよい点でヤマホウシ・日本晴の2品種を用いた。インディカ品種でも遺伝子導入が可能である²⁾。

小型籾摺機で完熟種子の籾を除去し、2%次亜塩素酸ナトリウム溶液(2~3滴のTween 20を添加したもの)を40 ml入れた50 mlの遠沈管に入れ、20分間シェーカー(160 rpm)で振とうして滅菌する。

滅菌後、種子を滅菌水で3回洗浄し、N6 callus induction 培地(Table 1)に16種子/シャーレ(直径9 cm)で置床し、サージカルテープ(Micropore™ Surgical Tape, 3M社, カタログ No 1530-0)でシールして、25°C・16時間明期、8時間暗期、60 $\mu\text{mole} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (以下、この光条件を明所と記す)で3週間培養する(Fig. 1-A)。サージカルテープとは、医療用の粘着テー

Table 1. Media used in this study.

Medium	Composition
N 6 callus induction AB ²⁾	N 6 salts and vitamins ⁶⁾ , 30 g/l sucrose, 2 mg/l 2, 4-D, 2 g/l gelrite, pH 5.8 3 g/l K ₂ HPO ₄ , 1 g/l NaH ₂ PO ₄ , 1 g/l NH ₄ Cl, 0.3 g/l MgSO ₄ · 7 H ₂ O, 0.15 g/l KCl, 0.01 g/l CaCl ₂ , 2.5 mg/l FeSO ₄ · 7 H ₂ O, 5 g/l glucose, 15 g/l agar, pH 7.2
YEP	10 g/l Bacto peptone, 10 g/l Bacto yeast extract, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar, pH 7.2
N 6 co-culture	N 6 salts and vitamins, 30 g/l sucrose, 10 g/l glucose, 2 mg/l 2, 4-D, 10 mg/l acetosyringone, pH 5.2
N 6 selection	N 6 salts and vitamins, 30 g/l sucrose, 2 mg/l 2, 4-D, 2 g/l gelrite, 500 mg/l carbenicillin, 50 mg/l hygromycin, pH 5.8
AA suspension	AA salts and amino acids ⁹⁾ , B 5 vitamins ⁹⁾ , 20 g/l sucrose, 2 mg/l 2, 4-D, 0.2 mg/l kinetin, 10 mg/l acetosyringone, pH 5.8
MS regeneration	MS salts and vitamins ¹⁰⁾ , 30 g/l sucrose, 30 g/l sorbitol, 2 g/l casamino acids, 1 mg/l NAA, 2 mg/l BAP, 250 mg/l carbenicillin, 50 mg/l hygromycin, pH 5.8
MS hormone free	MS salts and vitamins, 30 g/l sucrose, 50 mg/l hygromycin, pH 5.8

2, 4-D, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid; NAA, α -naphthaleneacetic acid; BAP, 6-benzylaminopurine

Shuji YOKOI, Kinya TORIYAMA and Kokichi HINATA

Protocol for Production of Transgenic Rice Plants Mediated by *Agrobacterium*

東北大学農学部植物育種学研究室

(〒981 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1)

Faculty of Agiculture, Tohoku University, Sendai 981, Japan

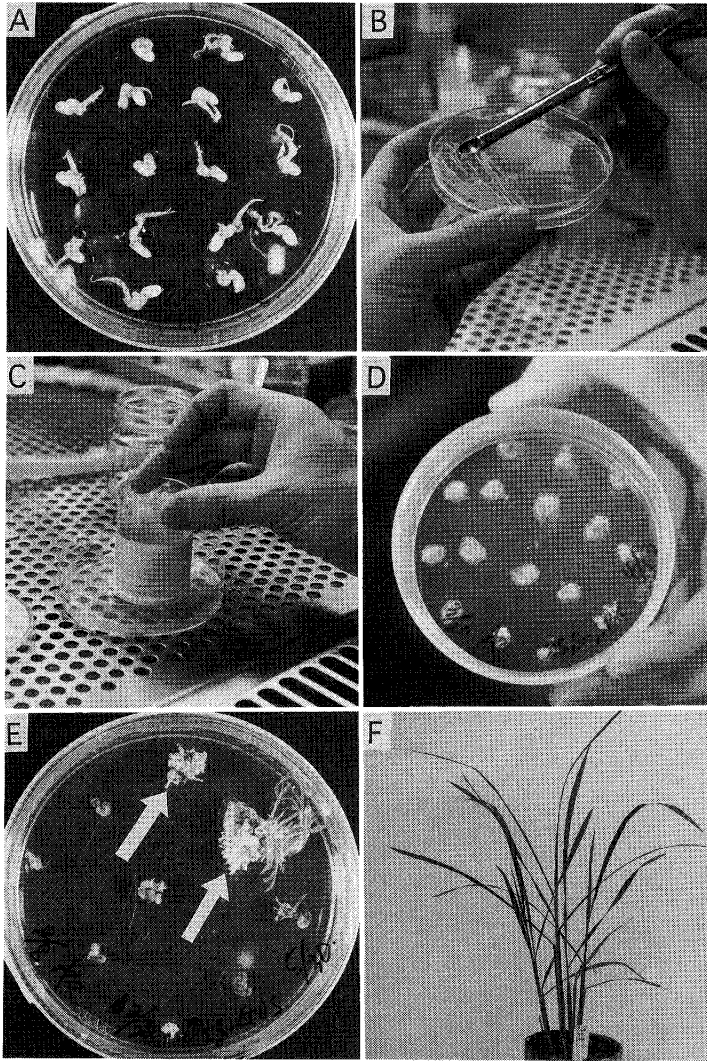


Fig. 1 Transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* (EHA 101/pIG121Hm).

- (A) Three-week-old scutellum derived calli (3-4 mm in diameter) of rice cv. Yamahoushi. The compact calli were separated with scalpel and were used for transformation.
- (B) *Agrobacterium* was cultured on AB medium and collected with a small spoon.
- (C) Scutellum derived calli were put into wide mouth tube having 30 μ m nylon filter and were immersed in the *Agrobacterium* suspension for a few minutes (1.5~2 min.).
- (D) Infected scutellum calli covered with a thin layer of *Agrobacterium* after 3 days of co-cultivation.
- (E) Plant regeneration on a hygromycin-containing medium. Arrows indicate regeneration plants from hygromycin resistant calli. The other calli turned brown.
- (F) Transgenic plants grown in a greenhouse.

プで、通気性がよい。パラフィルムでシールした場合よりも1.3~1.5倍の大きさにカルスが増殖する。以後、シャーレのシールには、すべてこのサージカルテープを用いている。

3週間培養した完熟種子の胚乳と芽の部分をピンセットで除去し、カルス部分のみを新しいN6 callus induction 培地に置床し(16種子/シャーレ)、25°C・明所で3日間培養する。褐変化したり、粘着物質が付いたカルス

は、除去するようにした方がよい(粘着物質は品種によって付くものと付かないものがある)。

形質転換ベクターには、pIG121Hm³⁾を用いた。pIG121Hmは、最も一般的なバイナリーベクターであるpBI121にIntron GUSとハイグロマイシン耐性遺伝子(HPT)を挿入したものであり、スーパーバイナリーベクターではない。

アグロバクテリウムの系統は、EHA101⁴⁾を用いた。EHA101は、菌体そのものがカナマイシン耐性であり、バイナリーベクターを導入する際は、35 Sプロモーター+HPTがアグロバクテリウムでもハイグロマイシン耐性を発現することを利用して、バイナリーベクターが導入された菌体を選抜する。カナマイシンだけでは、選抜されないのに注意されたい。バイナリーベクターをアグロバクテリウムへ導入する際は、Freeze-thaw methodを用いて行った⁵⁾。

バイナリーベクターを導入したアグロバクテリウムは継代培養を行わず、グリセロールストックとして保存する。すなわち、YEP培地(Table 1)で一昼夜培養した培養液をグリセロール原液と1:1の割合で混合してVoltexでよく混合し、その溶液を-80°Cで保存する。このグリセロールストックを滅菌した爪楊枝でAB固形培地(抗生物質適当量を含む、pIG121Hmの場合は50 mg/lハイグロマイシンと50 mg/lカナマイシンの濃度)(Table 1)に塗布する。培地全体に菌体を広げて28°C・暗黒下で3日間培養する。この操作はカルスの前培養を開始した日に行うと丁度よい。

この他にグリセロールストックの一部をとり、YEP培地で28°C・200 rpmで一晩培養する方法があるが、この方法を用いた場合には、AA培地(Table 1)に懸濁する際に菌体をかなり希釈する必要がある(5~10倍程度)。YEP培地を用いた方法でも感染には問題ないが、筆者らはAB培地を用いた培養を行っている。

AB培地上の菌体を滅菌した葉さじでかきとり(Fig. 1-B)、アセトシリンゴン(3,5'-Dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone, Aldrich社, カタログNo. D 13, 440-6)を10 mg/lの濃度で入れたAA suspension培地(Table 1)30 mlに懸濁する。アセトシリンゴンは、DMSO(Dimethyl sulfoxide)に10 mg/mlの濃度で溶解し、遮光して4°Cに保存している。菌体は葉さじで1~2かきくらいで、培地に懸濁したときに少し白濁するくらいでよい(あまり多いとカルスに悪影響がある)。AA suspension培地は、イネの液体振とう培養用のものであり、100 mlの三角フラスコに30 ml入れて、オートクレーブ滅菌して保存している。

懸濁液を直径9 cmのシャーレに入れる(1回の実験で複数のコンストラクトを使用する場合はシャーレに遺伝子の名前を記入するなどの注意が必要である)。

前培養したカルス(1シャーレ分)を30 μmのナイロンメッシュのついた筒(手作り、直径4 cmのガラスの筒を長さ6 cmにカットする、30 μmのナイロンメッシュで筒の先を被い、爪楊枝でナイロンメッシュを軽く止め、ビニールテープを巻いてしっかりと固定する、オートクレーブ滅菌可)に入れ、1.5~2分間筒ごと懸濁液の入ったシャーレに浸漬する(Fig. 1-C)。感覚的な話になるが、筆者らは菌体が多いと感じたときには1.5分間浸漬し、少ないと感じたときには2分間浸漬している。浸漬後、滅菌したペーパータオル上に筒をのせ余分な水分を除去し、N 6 co-culture培地(Table 1)に16種子分のカルスを置床し、サージカルテープでシールする。置床する際に培地の上に滅菌した濾紙を敷くと次の操作の洗浄がしやすくなる(濾紙の有無は感染効率には影響無い)。28°C・暗黒下で3日間培養する。

3日間の共存培養でカルスにうっすら菌体がかぶるくらいになったら(Fig. 1-D)、カルスを洗浄してアグロバクテリウムを除去する。カルベニシリン(注射用ゼオベン、Pfizer社)を500 mg/mlの濃度で滅菌水に溶解したストックを作る。このストックを終濃度が500 mg/lになるように滅菌水に加え、3シャーレに分注する(3シャーレを用意する)。感染時に使用したものと同じ30 μmのメッシュのついた筒にカルスを入れ、アグロバクテリウムを洗い流す。1シャーレ分のカルスをシャーレを取り替えて3回洗浄する(3シャーレ用意したのはこのためである。シャーレの滅菌水がアグロバクテリウムで白濁したら、新しい洗浄水に取り替える)。滅菌したペーパータオルで余計な水分を除去し、N 6 selection培地(Table 1)に置床する。選抜に使用しているハイグロマイシンは、Hygromycin B, Boehringer Mannheim社, カタログNo. 843555(Phosphate buffered salineに溶解した水溶液で市販されている)を使用している。サージカルテープでシールして25°C・明所で3週間培養する。除菌操作が不完全で、アグロバクテリウムが増殖してくるようであれば、もう一度洗浄するか、そのカルス以外を別の新しい選抜培地に移し、アグロバクテリウムが増殖したカルスは見捨てるとうい。

3週間の選抜の後、MS regeneration培地(Table 1)に置床する(9カルス/シャーレ)。カルス全てを再分化培地に置床する(ほとんど死にそうなカルスから耐性カルスが出現し、再分化するものがあるために、この時には選抜にこだわらずに全部を移す)。サージカルテープ

でシールし、25°C・明所で3~5週間培養すると再分化してくる(Fig. 1-E).

再分化個体をハイグロマイシンが50 mg/lの濃度で入ったMS hormone free培地(Table 1)に移植する(1個体/シャーレ). ハイグロマイシン耐性の有無を確認すると同時に植物体を大きくする. 形質転換体はハイグロマイシンを含む培地上で正常に生育するが, 非形質転換体は根が伸びず, 1週間ほどで葉が褐変して枯死する.

植物体がシャーレいっぱい成長したら, 蓋を取って, 水を加えて4~5日間室内で馴化させる. 寒天にカビが生えるので1日に1回は水を取り替える. 馴化させたら閉鎖系温室に移す(Fig. 1-F).

筆者らは, EHA101/pIG121Hmを導入遺伝子に用い, 独立した2回の実験を行った. 1回目の実験には, 品種“ヤマホウシ”を用い, 2回目の実験には, 品種“日本晴”を用いた. 1回目の実験では, 144種子からカルスを誘導し, GUS遺伝子・HPT遺伝子の両方共に導入された個体が36個体(25%)得られ, HPT遺伝子のみが導入された個体が1個体(0.7%)得られた. 2回目の実験では, 169種子からカルスを誘導し, GUS遺伝子・ハイグロマイシン耐性遺伝子の両方共に導入された個体が15個体(8.8%)得られ, HPT遺伝子のみが導入された個体が1個体(0.6%)得られた.

また, 自殖種子を用いて, ハイグロマイシン耐性とGUS活性の有無を調査したところ, 3:1の分離が見られ(Fig. 2), メンデルの法則に従って後代に遺伝していることも確認している.

本研究では, *A. tumefaciens*を用いて, 簡便にイネに

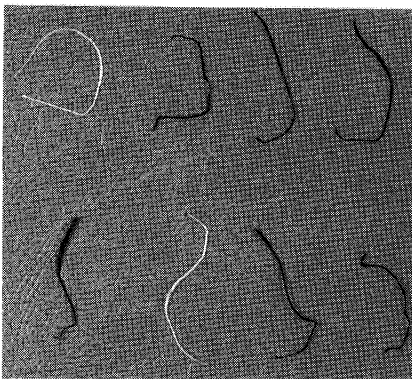


Fig. 2 Test for GUS expression of root segments in selfed progeny.

GUS expression was detected as blue staining using X-glucuronide.

遺伝子導入する形質転換系を得ることができた. Hiei *et al.*(1994)によって報告された方法よりも, 培地の種類が少ないこと, 増殖のよいカルスのみを選択することがない, ということで簡略化された. また, 通常のタバコ等で利用している導入遺伝子で十分形質転換ができ, スーパーバイナリーベクターを使わなくともよい事が分かった.

現在, 筆者らは, pIG121Hm以外の遺伝子の導入にも成功している. 選抜マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を挿入したpBI101等のバイナリーベクターのカセットを予め作製しておき, そこに目的の遺伝子を挿入すれば, 同じ方法で遺伝子をイネに導入することができる. カルス誘導時に100個の種子から胚盤カルスを誘導し, 本法によって遺伝子を導入し, 独立した10~15カルスから植物を再生させている. このイネの形質転換系によれば4~5ヶ月程度で形質転換幼植物を得ることができるので, イネ育種のみならず, イネを材料としたリバースジェネティクスを展開するにも有効と考えている.

この報告は, 「農林水産省バイオテクノロジー先端技術シーズ培養研究」, 「日本学術振興会特別研究員奨励費」によって行った研究成果に基づくものである.

(1995年10月28日受理)

文 献

- 1) Hiei, Y., T. Komari, T. Kumashiro, 1994. *Plant J.*, **6**: 271-282.
- 2) Rashid, H., S. Yokoi, K. Toriyama, K. Hinata, 1995. *育種*, (別1)**45**: 54.
- 3) Ohta, S., S. Mita, T. Hattori, K. Nakamura, 1990. *Plant Cell Physiol.*, **31**: 805-813.
- 4) Hood, E. E., G. L. Helmer, R. T. Fraley, M. D. Chilton, 1986. *J. Bacteriol.*, **168**: 1291-1301.
- 5) An, G. P., R. Ebert, A. Mitra, S. B. Ha, 1988. In "Plant Molecular Biology Manual" (eds. by Gelvin, S. B., R. A. Schilperoort), p. A 3/1-19, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 6) Chu, C. C., C. S. Wang, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu, 1975. *Scient Sin.*, **18**: 659-668.
- 7) Chilton, M. D., T. C. Currier, S. K. Farrand, A. J. Bendich, M. P. Gordon, E. W. Nester, 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 3672-3676.
- 8) Toriyama, K., K. Hinata, 1985. *Plant Sci.*, **41**: 179-183.
- 9) Gamborg, O. L., R. A. Miller, K. Ojima, 1968. *Exp. Cell Res.*, **50**: 151-158.
- 10) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.