

研究ノート

キュウリへの外来遺伝子導入

西林双龍*・金子広康**

キュウリへの外来遺伝子導入は Trulson 等(1986)¹⁾によつてはじめて報告された。彼らは Ri プラスミッドのバイナリーベクターを保持した *Agrobacterium rhizogenes* をキュウリの胚軸切片に感染させた後、胚軸切片から根を誘導した。そして、カナマイシンによる細胞選抜で根からの再生系で形質転換体を数個体得ている。その後、Chee(1990)²⁾は Ti プラスミッドのバイナリーベクターを保持した *Agrobacterium tumefaciens* を子葉切片に感染させ、カナマイシンによる細胞選抜で子葉からの再生系で形質転換体を多数得ている。この2つの報告では NOS-NPT II 遺伝子のみがキュウリに導入された。また、Sarmiento 等(1992)³⁾は CaMV 35S-NPT II 遺伝子を Ti プラスミッドベクターに導入し *A. tumefaciens* を介して葉と葉柄の再生系で形質転換体を数個体得ている。さらに田部井ら(1990)⁴⁾はキュウリ種子子葉切片に *A. tumefaciens* を接種した後、回転培養で選抜してカナマイシンないしハイグロマイシン抵抗性の幼植物を得ている。一方、Slightom 等⁵⁾は NPT II 遺伝子以外の実用的な遺伝子として CMV の外被タンパク質遺伝子(CP)をキュウリにはじめて導入し、形質転換キュウリが CMV に対して耐性を示すことを確認した。彼らは野外実験でも CMV 耐性を確認している。

ここでは、我々が確立したキュウリにおける再生系とキュウリへの外来遺伝子導入法と CMV-CP 遺伝子導入による CMV 耐性キュウリ作出について報告する。

我々が当初見つけた子葉からの再生は切片に直接器官が形成されるものが大部分で、カルス経由の再生は非常に低頻度だった。まずはじめに、子葉切片からの再生率

を高める条件検討を行った。完熟種子の子葉と播種後1-3日目の子葉で高い植物再生率が得られ、播種後4-5日目の子葉では再生率が低いことが分かり、再生率が高い播種後2日目の子葉を用いることにした。また、7つの基本培地(MS, NN, N6, B5, KM, DPD, White)で子葉切片からの再生率を比較したところ、MS基本培地で再生率が最も高く、次にNN基本培地が高かった。その他の基本培地では再生率が低くDPDとWhiteの基本培地はキュウリの子葉からの再生にまったく適していなかった。従つて、再生率の最も高かったMS基本培地を用いることにした。MS基本培地のpHを変えて子葉切片の再生率を比較したが、培地のpHは再生率に特に影響を与えず、pH4.0-7.5の範囲で高い再生率を示した。またIAA-BAP, NAA-BAP, 2,4-D-BAPのホルモンの組み合わせと濃度を変えて植物の再生率を比較したが、どの組み合わせでも再生した。アグロバクテリアの除菌剤であるカーベニシリンはむしろ子葉からの再生率を高めた。また、19品種で子葉からの植物再生率を調べた結果、品種によって再生率の高いものから低いものまで見られたので、再生率の高い品種を選んで形質転換実験を行った。

A. tumefaciens の系統は植物細胞への感染能が高いと言われているEHA101⁶⁾を用い、またベクターとしてTiバイナリーベクターpIG121-Hmを用いた。このTiバイナリーベクターのT-DNA領域はNOS-NPT II(カナマイシン抵抗性)、CaMV 35S-I-GUS, CaMV 35S-HPH(ハイグロマイシン抵抗性)遺伝子の順序で構築されている。*A. tumefaciens* はYEB培地で、22-23°Cで2-7日間培養し、その培養液をMS液体培地で1/100に希釈して子葉切片に処理した。*A. tumefaciens* の2日間と7日間培養で、子葉切断面細胞の形質転換効率にはX-glucによるGUSの発現の解析からは目で見えなかった。

A. tumefaciens 処理した子葉の切片をさまざまな条件で共存培養した結果、共存培養時ホルモンがないと子葉切断面細胞でGUSの発現を示す形質転換細胞の出現が非常に少ないことが分かった。そして、ホルモンの組み

Soryu NISHIBAYASHI* and Hiroyasu KANEKO**
Introduction of Foreign Genes into Cucumber Plants.

* (株)三菱化学総合研究所 農化研
〒227 横浜市青葉区鴨志田町1000

** (株)埼玉原種育成会
〒346-01 南埼玉郡菟浦町

* Mitsubishi Chemical Corp., Agricultural Chemicals Lab.,
Yokohama Research Center, 1000 Kamoshida-cho, Aoba-ku, Yokohama 227, Japan

** Saitama Genshu Ikuseikai, Shoubu-machi, Minami-saitama-gun 346-01, Japan

合わせと濃度の比較を行ったところ、共存培養に MS 基本培地を用い 4 mg/l IAA, 1 mg/l 2iP のホルモン条件で安定して形質転換細胞が得られることが分かった。この条件で共存培養した後に 100 mg/l のカナマイシンを含んだ再生培地に子葉切片を置床して植物体を再生させ、再生植物の葉における NPT II アッセイを行ったがすべてネガティブな結果だった。カナマイシンによる細胞選抜実験を数十回行い、子葉切片数の合計が数万個になるまで繰り返し実験したが、この条件では形質転換体は 1 個体も得られなかった。次に *A. tumefaciens* を処理した約 5000 (数回の実験の合計) の子葉切片を共存培養した後 20 mg/l のハイグロマイシン B を含んだ再生培地に置床したところ、数個体が再生してきた。しかし、X-gluc による GUS の発現を再生植物でチェックしたが GUS の発現はまったく確認出来なかった。また、品種間差を考え別の品種でも種々条件を変えて形質転換実験を行ったが、子葉の切片からは 1 個体も形質転換体を得られなかった。次に Chee (1990)²⁾ のキュウリ子葉切片を用いた形質転換法と彼らの使用したものと同じ品種を使って追試実験したが、形質転換体は得られなかった。Chee の方法では子葉切片を *A. tumefaciens* 処理した後に暗所に置いているが、我々が数回行った実験ではその方法だと子葉はすべて白くなって死に、Chee が報告している胚様体はまったく得られなかった。以上の結果から子葉の切片を使った形質転換は無理と判断した。

子葉切片からの植物再生はほとんどが切断面付近からの直接的器官形成によって行われている。この器官形成は *A. tumefaciens* が感染していない切断面より奥の部分から起る結果、再生植物はほとんどエスケープになると考えられた。これはナタネの子葉の形質転換実験において、まったくうまくいかなかった結果(市川私信)とよく似ていた。ナタネの場合、子葉の代わりにカルジーン社の方法である胚軸の再生系を使った形質転換実験に切り替えられた。従って我々ももう一度キュウリでカルス経由の再生系を探すことにした。

胚軸における再生系を検討した結果、植物体の再生頻度はあまり高くないがカルス経由の不定胚様形態形成を経て幼植物が得られた。この再生系で形質転換体を得られた⁷⁾。我々の形質転換法の特徴は共存培養用培地にアセトシリシロンを入れたこととハイグロマイシン B で細胞選抜したことである。以下それについて記述する。

Agrobacterium tumefaciens で処理した胚軸切片の切断面細胞での形質転換は 50-100 μ M アセトシリシロン処理で促進されることが分かった。*Agrobacterium* で処理した胚軸切片をアセトシリシロン有無の共存培養用培

地 (pH 5.2) で 5 日間培養して、CaMV 35S-I-GUS 遺伝子の発現を組織化学的に解析したところ、アセトシリシロンを含む共存培養用培地で培養した胚軸切片でのみ X-gluc による青色に発色した形質転換細胞が確認され、アセトシリシロン無しの場合では GUS の発現はまったく確認されなかった。すなわち、アセトシリシロンが細胞の形質転換効率を高めていることが分かった。しかしながら、アセトシリシロン無しの共存培養用培地で培養された胚軸部分を 20 mg/l ハイグロマイシン B を含む再生培地に置床したところ、胚軸切片 100 の内 88 個からハイグロマイシン耐性カルスが誘導された。すなわち、アセトシリシロン無しでも形質転換は行えることが判明した。しかし、共存培養を 2 日間と短くするとアセトシリシロン無しではハイグロマイシン耐性カルスの誘導頻度は 4% と非常に低く、一方アセトシリシロンが有ると 66% と高くなった。この結果からもアセトシリシロン処理がキュウリの胚軸細胞における形質転換効率を高めていることが分かる。

またカナマイシンとハイグロマイシン B による細胞選抜の効果を比較した。一般によく用いられる 50-100 mg/l のカナマイシンを含む再生培地でコントロールの胚軸切片を培養すると、胚軸細胞が死なず胚軸全体がカルス化して元のサイズの数倍まで肥大化した。カルスの表面は白い毛のような状態だった。*A. tumefaciens* で処理した胚軸切片をカナマイシンで細胞選抜しても、当然エスケープの細胞が多く、形質転換した細胞とそうでない細胞とが混在していた。すなわち、カナマイシンはキュウリの胚軸切片での細胞選抜に不適當であった。

一方、ハイグロマイシン B はキュウリの胚軸切片で有効であることが分かった。20-30 mg/l のハイグロマイシン B を含んだ再生培地にコントロールの胚軸切片を置床して約 2 週間培養した場合、カルス増殖はほとんど見られず、切片はほとんど死んだ。一方、*A. tumefaciens* 処理した胚軸切片を 20-30 mg/l のハイグロマイシン B の入った培地で培養すると胚軸からカルスが形成され、X-gluc で調べた限りそのカルス内にはエスケープの細胞がカナマイシン処理と比較して明らかに少なかった。胚軸カルスにおける GUS を発現している細胞の領域はハイグロマイシン B で細胞選抜した方がカナマイシンで細胞選抜したものと比較して数倍広がった。これは用いたプロモータが異なることに起因していると思われる。今回 NPT II 遺伝子は NOS プロモータを、HPH 遺伝子は CaMV 35S プロモータを用いている。CaMV 35S プロモータは NOS プロモータより強く働くと報告されており、用いたプロモータの発現の強さ

の差が形質転換細胞の増殖の差となって反映されたものと思われる。

ハイグロマイシン B で細胞選抜した胚軸から出てきたカルスからの再生は培養開始後 4-6 週間 で起きた。不定胚様構造が出来、これらを MS ホルモンフリー培地に移すと幼植物になった。再生した幼植物の葉で GUS の発現を調べた結果、解析した 21 個体の内 12 個体で GUS の発現が確認された。GUS の発現を示した個体の内 8 個体でサザン解析を行った結果、すべての個体がサザンポジティブバンドを示した。制限酵素の種類を変えて解析した結果、4 個体で T-DNA 領域が 1-3 コピー導入されたと推定できた。再生した葉における GUS の発現は葉全体で行われていたが、再生植物が高さ約 20 cm まで成長した時の成熟した葉で GUS の発現を調べると、解析した 5 個体すべての葉で GUS の発現が消失していた (Table 1)。しかし 1 個体の葉柄の維管束で X-gluc による弱い GUS の発現が確認された。キュウリでは葉の成熟にもなって CaMV 35S プロモータの発現が低下ないし消失しているようである。また、成熟した高さ約 1.5 m のキュウリのいろいろな組織細胞で GUS の発現を調べたが、成熟葉、葉柄、つる、花卉、果肉等では GUS の発現がまったく見られず、胚、葯、根で強い GUS の発現が見られた。ただし、葯ではコントロール植物でも時たま、バックグラウンドの活性が見られるため、導入遺伝子の発現によるものかどうか明瞭ではない。しかしその他の部分ではコントロール植物で GUS の発現がまったく見られず、形質転換した結果 GUS が発現

Table 1. GUS activity of regenerated and mature leaves of transgenic Ro cucumber plants as assessed by MUG staining.

Organ	Plant no.	GUS activity (pmol/mg/min)
Regenerated leaf	1	3396.8
	8	3481.2
	9	4437.1
Control leaf	C-1	4.6
Mature leaf	1	1.0
	2	3.1
	3	1.5
	4	0.5
	5	0.4
Control leaf	C-2	0.4

No. 1-5, 8, 9, C-1 and C-2 plants are independent ones. No. 1-5 plants displayed strong GUS expression in the regenerated leaves, by treatment of X-gluc. No. 1-5 and 8 plants are Southern positive ones.

したと考えてよい。次代植物でも同じ組織で GUS の発現が確認され、また子葉で GUS が強く発現することが分かった。

CaMV 35S プロモータは一般的に分裂組織や維管束部分で強く働くと考えられているが、キュウリでは再生直後の葉の維管束部分で CaMV 35S プロモータが活発に働いているにもかかわらず、十分成長した植物の根、葉、葉柄、花の維管束部分ではまったく働いていないという今までの報告と異なる結果となった。すでに発表されているキュウリの形質転換法の論文^{1,2)}で用いられている遺伝子は NOS-NPT II 遺伝子である。これらの論文では形質転換体の葉において NPT II アッセイを行っており、形質転換体が NPT II 酵素活性ポジティブである結果を示している。この結果が事実だとすればキュウリの葉では NOS のプロモータが活発に働いていることになる。キュウリにおける外来遺伝子のプロモータの発現については興味ある問題を含んでいる。

植物ウイルスの外被タンパク質遺伝子 (CP) がその遺伝子由来の同じ種類の植物ウイルスに対して効果があることは Beach 等⁹⁾ によってはじめて報告された。Beach 等は TMV の CP 遺伝子をタバコに導入して、形質転換体の葉に TMV を接種した場合非形質転換体よりウイルス病の発病が遅れることを見ている。その後、様々な植物ウイルスの CP 遺伝子が単離され、種々の植物にそれら単離された CP 遺伝子が導入された。キュウリへの植物ウイルス由来 CP 遺伝子導入は Slightom 等⁹⁾ によってはじめてなされた。彼等はアメリカ産 CMV の CP 遺伝子を単離し CaMV 35S プロモータと接続してアメリカ産のキュウリに導入し、形質転換体が CMV に対して耐性を示すことを報告した。そして、さらに CMV-CP 遺伝子を導入したキュウリを野外の圃場に植え、自然条件下で形質転換体が非形質転換体と比較して CMV に対して耐性を示すことを報告した。

しかし我々がキュウリへの CMV-CP 遺伝子導入を試みた時には Slightom 等⁹⁾ はもうすでに上記の報告をしていた。Slightom 等が使った CMV はアメリカの系統で、その CP 遺伝子が導入されたキュウリを日本にもってきても、日本の CMV に対してその形質転換体が発病する可能性がある。またアメリカのキュウリ品種は日本人には好まれていない。我々は日本の CMV から CP を単離して、日本のキュウリ品種にその CP 遺伝子を導入し、日本人の嗜好にあったキュウリの品種改良を行う目的で、日本産 CMV-O 系統の CP 遺伝子⁹⁾ を日本産キュウリ品種に導入した。

最初の実験では、形質転換体がすぐ確認出来るように

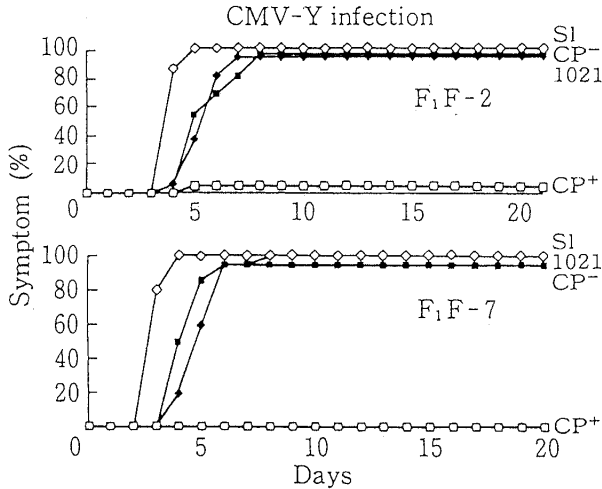


Fig. 1 Symptom development of F₁F-2 and F₁F-7 transgenic cucumber plants after inoculation of 100 µg/ml CMV-Y. S1(Sharp 1)and 1021: control plants.

CaMV 35S-I-GUS 遺伝子といっしょに CaMV 35S-CP 遺伝子を導入した¹⁰⁾。そして、GUS の発現と PCR 法とサザン法で形質転換体であることを確認した。それらの種子を採り、次代植物の子葉で CMV 接種実験を行った。コントロール植物の子葉に CMV-Y を接種した場合、1 µg/ml の濃度で子葉に斑点状の病徴が見られたが、実際の CMV 接種実験は 100 µg/ml で行うことにした。コントロール植物 2 種類と形質転換体 2 系統で CMV 接種実験を行ったところ、コントロール植物 2 種類とも 5-9 日後 100% の発病率であったのに対し形質転換体は観察開始後 3 週間経ても病徴が見られなかった (**Fig. 1**)。形質転換体では、コントロール植物が発病した濃度 (1 µg/ml) の 500 倍と 1,000 倍の濃度で接種しても発病がまったく見られなかった。CMV の外被タンパク質に対する抗体を使ったウエスタン解析では、100 µg/ml の CMV を子葉に接種して 4 日後に非形質転換体の葉で CMV の増殖を示すバンドが確認されたが、形質転換体ではまったく確認されなかった。我々が作出した CMV-O-CP 遺伝子導入キュウリは日本産 CMV-Y に対し非常に強い抵抗性を示した。

その他キュウリのウイルス病として良く知られている ZYMV を形質転換体の子葉に接種した場合には、発病が確認された。しかし、CMV と ZYMV の混合感染だとキュウリのウイルス病は非常に激しくなるのが一般的

で、今回用いたキュウリも同様の結果だった。一方、形質転換体に CMV と ZYMV を同時に感染させた場合、その発病の程度がかなり軽減され、ZYMV の発病の程度と同じかそれより少し発病している程度に抑えられた¹⁰⁾。

(1995 年 12 月 11 日受理)

文 献

- 1) Trulson, A. J., R. B. Simpson, E. A. Shahin, 1986. *Theor. Appl. Genet.*, **73**: 11-15.
- 2) Chee, P. P., 1990. *Plant Cell Reports*, **9**: 245-248.
- 3) Sarmento, G. G., K. Alpert, F. A. Tang, Z. K. Punja, 1992. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **31**: 185-193.
- 4) Tabei, Y., K. Kurihara, T. Nishio, T. Kanno, 1990. *Jpn. J. Breed.*, **40**(suppl. 2) : 186-187.
- 5) Gonsalves, D., P. Chee, R. Provvidenti, R. Seem, J. L. Slightom, 1992. *Bio/Technology*, **10**: 1562-1570.
- 6) Hood, E. E., G. L. Helmer, R. T. Fraley, M. D. Chilton, 1986. *J. Bacteriol.*, **168**: 1291-1301.
- 7) Nishibayashi, S., H. Kaneko, T. Hayakawa, 1995. *Plant Cell Reports*(in press).
- 8) Powell Abel, P., R. S. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S. G. Rogers, R. T. Fraley, R. N. Beachy, 1986. *Science*, **232**: 738-743.
- 9) Hayakawa, T., M. Mizukami, M. Nakajima, M. Suzuki, 1989. *J. of General Virology*, **70**: 499-504.
- 10) Nishibayashi, S., H. Kaneko, T. Hayakawa, T. Nakajima, 1994. *Mitsubishi Kasei R & D Review*, **8**: 46-52.