

プラスミド安定化領域を持つバイナリーベクターによる組換えポプラ作出法の開発

伊ヶ崎知弘 (森林総研)・市川裕章 (生物研)・篠原健司 (森林総研)

要旨：ポプラの1種であるブラックコットンウッド(*Populus trichocarpa*)は木本植物で初めて全ゲノムの塩基配列が解読され、約4万5千個のタンパク質遺伝子を有すると推定された。以来、木本植物の分子生物学的研究が飛躍的に進展している。ポプラは雌雄異株植物であり、短期間での着花が困難なため、組換え体の解析には、組換え当代を用いる。そのため、組換え体がキメラである可能性を極力排除する必要があり、組換え体の組織片から再分化させるなど、遺伝的に均質な細胞からなる個体を得るための操作がしばしば適用される。そこで、解析に用いる組換え体を効率的に得るため、プラスミド安定化領域を持つpSMA系のバイナリーベクターを用い、アグロバクテリウム法でポプラの1種のセイヨウハコヤナギ(*Populus nigra* var. *italica*)に導入する実験を行った。選抜薬剤として、カナマイシンやハイグロマイシン、ピアラフォスを用いたが、いずれの薬剤を用いた場合にも効率良く組換え体が獲得できた。

キーワード：遺伝子組換え、ポプラ、プラスミド安定化領域

Abstract: Genetically transformed Lombardy poplar (*Populus nigra* var. *italica*) plants were regenerated from stem segments after co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (pMP90) that harbored one of a series of binary vectors bearing *repA* and *staA* genes from pVS1 replicon for stable maintenance of plasmid. Antibiotics, kanamycin and hygromycin, and an herbicide bialaphos were used for the selection of transgenic cells. Successful transformation was confirmed by the stem segments to produce shoots in the presence of the antibiotics or herbicide. The antibiotic or herbicide resistance gene was controlled by the promoter of a gene for nopaline synthase. RT-PCR analysis also revealed the transgenesis of the antibiotic- or herbicide-resistant shoots from *Agrobacterium*-treated stem segments. The rates of "escapes" and chimeric transgenic plants in this transformation system were examined by the observation of the GFP fluorescence of the roots. Morphology of the regenerated plants resembled that of the original parental strain.

Keywords: transformation, poplar, *Populus nigra*, pVS1 replicon, *Agrobacterium*

I はじめに

遺伝子組換えは、木本植物の特定の形質のみを選択的に改変することができる技術である。この技術を利用することで、我々は生殖するまでに長大な時間を要する木本植物の育種を効率的に行うことができる。*Agrobacterium tumefaciens*を用いた遺伝子導入法は、植物に外来の遺伝子を導入することが可能である。*Agrobacterium*属細菌は、木本植物を含む多くの植物種に感染できることが示されている(1)。しかしながら、組換え木本植物の細胞から植物体を再生させるのには多くの困難がある。実際に組換え実験系が確立されているのは、限られた木本植物種と言え、*Populus*属の木本植物といえども組換え体を得るのには困難が多い(7)。

ポプラの1種のセイヨウハコヤナギ(*Populus nigra* var. *italica*)は、全ゲノム塩基配列が解読されたブラックコットンウッド(*Populus trichocarpa*)(8)の近縁の植物種で、我々は、すでに約2万種の発現遺伝子を単離しており(6)、特定の遺伝子については、その機能や発現パターンなどの解析を行っている(4)。

我々は、セイヨウハコヤナギへの遺伝子導入法をすでに確立し(5)、その効率化も行ってきたが(7)、今回、組換え体を得る効率を上昇させること、さらに、すでにある組換え体に新たに別の遺伝子を導入する方法を確立することを目的に、ニセアカシア(3)やギンドロ(2)の組換えに用いたプラスミド安定化領域を持つpSMA系のバイナリーベクターを用い、抗生物質カナマイシンやハイグロマイシン、除草剤ピア

Tomohiro IGASAKI (Department of Molecular and Cell Biology, Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba 305-8687, Japan)・Hiroaki ICHIKAWA (National Institute of Agrobiological Sciences)・Kenji SHINOHARA (Forestry and Forest Products Research Institute) Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Populus nigra*

ラフォスを用いた場合の組換え体作出を試みた。

II 実験方法

1. 材料 人工気象調節施設で挿し木によって増殖したポプラ (*Populus nigra* var. *italica*) から、形成後 1 週間程度で太さが約 5mm の茎を採取し、長さ 1cm 程度の切片約 750 個を作成し、遺伝子組換え実験の材料とした。

2. バイナリーベクターの構築 遺伝子組換え実験に用いたバイナリーベクターは、プラスミド安定化領域を持つ pSMA 系のバイナリーベクター pSMAK251, pSMAH621(3)及び pSMAB704(2) (図-1), 並びにそれぞれの β -グルクロニダーゼ(*GUS*)遺伝子を緑色蛍光タンパク質(*GFP*)遺伝子に置き換えた pSMAK251EGFP, pSMAH621EGFP 及び pSMAB704EGFP である。

3. ポプラの遺伝子組換え 遺伝子組換え実験は、既存の実験方法(2)に従って行った。ただし、再分化した芽を得る時の抗生物質又は除草剤の濃度は、pSMAK251 及び pSMAK251EGFP を用いた場合は 50 mg/ l カナマイシン, pSMAH621 及び pSMAH621EGFP を用いた場合は 10 mg/ l ハイグロマイシン, pSMAB704 及び pSMAB704EGFP を用いた場合は 5 mg/ l ビアラフォスを用いた。また、得られた組換えポプラの芽を、抗生物質や除草剤を含まない発根培地に置くことで根を誘導した。

4. 蛍光観察 組換えポプラでの根における GFP 蛍光は、GFP フィルターセット(460-490 nm の励起フィルタ及び 510 nm の蛍光フィルタ)で SZX12 顕微鏡(Olympus)により観察した。

5. RT-PCR 組換えポプラの候補個体から RNA を抽出し、各マーカー遺伝子の配列に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行い、導入遺伝子の発現の有無を確認した。

III 結果と考察

1. プラスミド安定化領域によるバイナリーベクター保持率の変化 *A. tumefaciens* の菌株 GV3101 (pMP90)株にプラスミド安定化領域を持つバイナリーベクター及び既存のバイナリーベクター pBI121 を保持させ、抗生物質等薬剤なしの培地で継代培養し、約 2 日ごとにサンプリングして、薬剤選抜を利用した全菌体数に対するプラスミドを保持する菌体数を測定した(図-2)。この結果から、プラスミド安定化領域を持つ pSMA 系のバイナリーベクターは、

選抜薬剤の非存在下でも安定に *A. tumefaciens* に保持されることが判明した。

2. 組換えポプラの作出 pSMA 系のバイナリーベクター pSMAK251, pSMAH621(3) 及び pSMAB704(2) (図-1)のバイナリーベクターを用いて組換え実験を行い、それぞれの選抜薬剤に耐性を示す組換えポプラを得ることに成功した。そこで、新たに各選抜薬剤のバイナリーベクターの *GUS* 遺伝子を *GFP* 遺伝子に置き換えたバイナリーベクター pSMAK251EGFP, pSMAH621EGFP 及び pSMAB704EGFP を構築し、既存の方法(7)と同様の方法で組換えポプラの芽を作出し、得られた芽を抗生物質等選抜薬剤を含まない培地で発根させ、その根を蛍光観察した(図-3)。すると、カナマイシン及びビアラフォスで選抜して得られた芽の根は、10 %程度が緑色蛍光を示したのに対し、ハイグロマイシンで選抜して得られた芽の根は、50 %以上が緑色蛍光を示した(表-1)。また、得られた組換えポプラを、RT-PCR 解析に供したところ、GFP の蛍光観察とほぼ同様の結果が得られた。今回の結果は、ハイグロマイシン選抜では、得られる芽の数自体は少ないが、そのほとんどが組換え体であり、芽の形成段階での選抜効果が高いことを示していた。

IV おわりに

今回の結果から、プラスミド安定化領域を持つ pSMA 系のバイナリーベクターは、抗生物質等の選抜薬剤の非存在下においてもバイナリーベクターを脱落しにくく、*Agrobacterium* を感染させたときの共存培養時間を長く設定した場合の組換え効率の向上に有効であると考えられる。また、通常は選抜が芽の形成と根の誘導の 2 段階で行っているが、ハイグロマイシンを用いた場合は、芽の 1 段階でも高い確率で組換え個体が選抜できた。これらの結果を考慮すると、ポプラの組換え体の作出効率を向上させることや、組換え体に新たに別の遺伝子を導入することが可能であると判断できる。

V 謝辞

本研究を補助して下さった辻井伊久美氏に深く感謝いたします。

VI 参考文献

(1) GELVIN, S.B. (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying"

tool. Microbiol Mol Biol Rev 67: 16-37

(2) IGASAKI, T., ISHIDA, Y., MOHRI, T., ICHIKAWA, H., SHINOHARA, K. (2002) Transformation of *Populus alba* and direct selection of transformants with the herbicide bialaphos. Bulletin of FFPRI 1: 235-240

(3) IGASAKI, T., MOHRI, T., ICHIKAWA, H., SHINOHARA, K. (2000) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Robinia pseudoacacia*. Plant Cell Rep 19: 448-453

(4) IGASAKI, T., WATANABE, Y., NISHIGUCHI, M., KOTODA, N. (2008) The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* family in Lombardy poplar. Plant Cell Physiol 49: 291-300

(5) MOHRI, T., YAMAMOTO, N., SHINOHARA, K. (1996) *Agrobacterium*-mediated transformation of Lombardy poplar (*Populus nigra* L. var. *italica* Koehne) using stem segments. J For Res 1: 13-16

(6) NANJO, T., SAKURAI, T., TOTOKI, Y., TOYODA, A., NISHIGUCHI, M., KADO, T., et al (2007) Functional annotation of 19,841 *Populus nigra* full-length enriched cDNA clones. BMC Genomics 8: 448

(7) NISHIGUCHI, M., YOSHIDA, K., MOHRI, T., IGASAKI, T., SHINOHARA, K. (2006) An improved transformation system for Lombardy poplar (*Populus nigra* var. *italica*). J For Res 11: 175-180

(8) TUSKAN, G.A., DIFAZIO, S., JANSSON, S., BOHLMANN, J., GRIGORIVE, I., HELLSTEN, U., et al. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). Science 313: 1596-1604

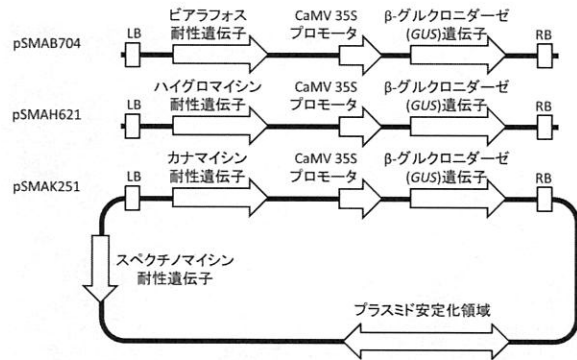


図-1. 組換えポプラの作出に用いたバイナリーベクターの構造の概要

Fig. 1 Schematic representation of the binary vectors for the transformation of poplar LB はレフトボーダー, RB はライトボーダー。LB, left border of T-DNA; RB, right border of T-DNA.

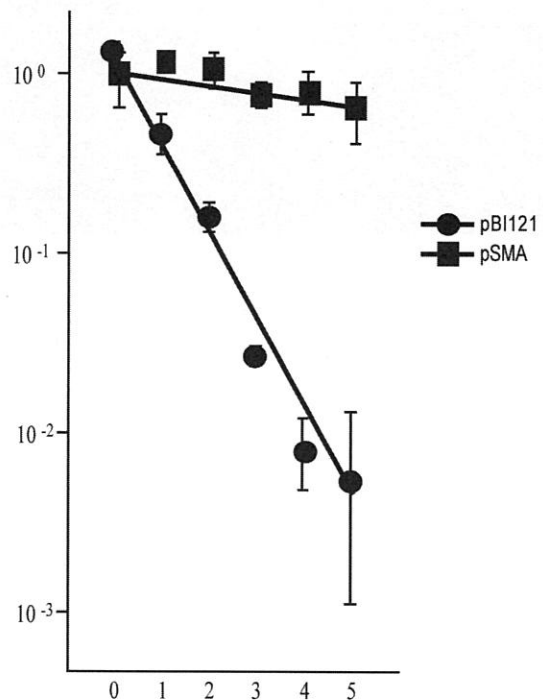


図-2. *Agrobacterium* のバイナリーベクター保持率の比較

Fig. 2 Comparison of the binary vector retention of *Agrobacterium*

プラスミド安定化領域を持つ pSMA 系ベクターと通常の RK2 系の pBI121 ベクターを選抜薬剤なしの条件で培養した。

pSMA vector with a plasmid maintenance region and usual binary vector pBI121 were cultivated on conditions without a selection.

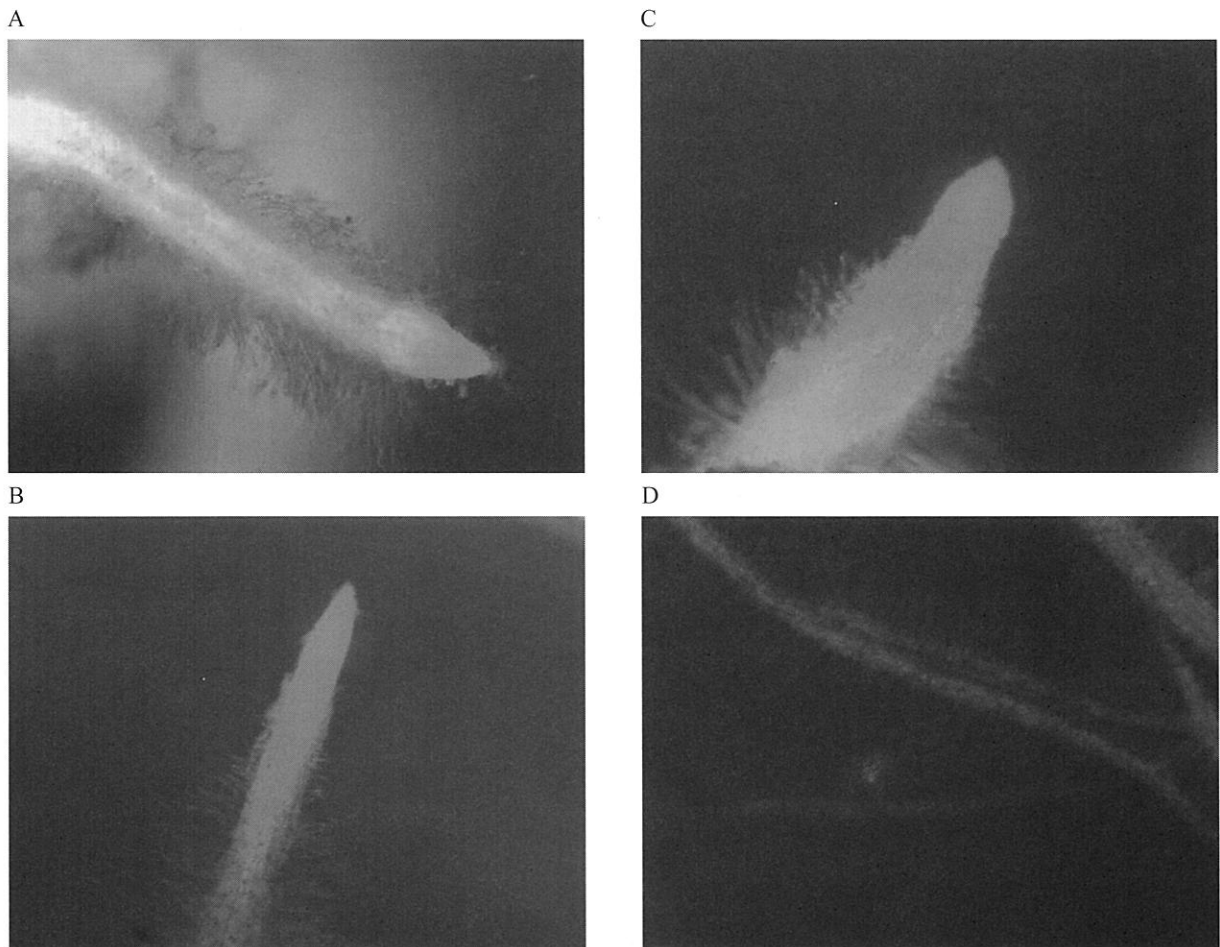


図- 3. 組換えポプラの根の蛍光観察

Fig. 3 Fluorescent microscopy of the GFP-expressed roots of transgenic (A-C) and nontransgenic (D)

A カナマイシン耐性の芽から得られた根, B ハイグロマイシン耐性の芽から得られた根, C ビアラフォス耐性の芽から得られた根, D 非組換え体の根。各組換え体の根は強い緑色蛍光(図中の白色部分)が観察された。

表- 1. 各選抜薬剤を用いた場合の組換えポプラの芽の獲得状況と緑色蛍光保有率
Table 1 Frequency of the transformation of poplar with each binary vector

ベクター	選抜薬剤	処理切片数 (a)	獲得芽数 (b)	蛍光有 (c)	組換え率 (c/a)
pSMAK251EGFP	カナマイシン	246	342	30	0.12
pSMAH621EGFP	ハイグロマイシン	241	43	25	0.10
pSMAB704EGFP	ビアラフォス	247	199	12	0.05

蛍光は選抜薬剤を含まない培地で誘導した根で観察した。