

アグロバクテリウム法によるスギ培養細胞への遺伝子導入効率の系統間差

古川原聡・西口満・二村典宏・丸山毅・伊ヶ崎知弘・小長谷賢一・谷口亨・篠原健司(森林総研)

要旨：遺伝子組換えスギの開発を効率的に進めるためには、材料となるスギ培養細胞について遺伝子導入効率や不定胚形成能、個体再生効率の高い系統を選択しなければならない。これらの要素において系統間差を生じさせる原因を明らかにすれば、適切な材料の選択指針をつくることができると考えられる。本研究では、スギ培養細胞6系統を用いアグロバクテリウム法による遺伝子導入効率の系統間差を調べた。35Sプロモーターと連結した β -glucuronidase遺伝子(*GUS*)を導入して、アグロバクテリウムとの共存培養後に*GUS*活性を保持する細胞数を計測したところ、*GUS*導入効率は系統間で50倍以上の差があることが分かった。また通常の培地における細胞増殖速度は、1系統を除いて、*GUS*導入効率の高い系統において低かった。カナマイシン感受性は*GUS*導入効率の高い系統ほど高い傾向が認められた。

キーワード：組換えスギ、 β -glucuronidase、アグロバクテリウム法、遺伝子導入効率、不定胚形成細胞

I はじめに

樹木の優良個体の作出に遺伝子組換え技術を適用するためには、樹種に適合する効率的かつ安定的な遺伝子導入技術を開発しなければならない。日本の主要な林業樹種であるスギ(*Cryptomeria japonica* D. Don)に関しては遺伝子導入技術としてアグロバクテリウム法を適用できることが分かっているが(3)、遺伝子導入効率の変動要因については十分に調べられておらず、その効率や安定性には改善の余地がある。本実験では、スギ培養細胞についてアグロバクテリウム法による遺伝子導入効率の系統間差の程度を明らかにした。また、細胞の成長速度やカナマイシン感受性の系統間差との関連についても調べた。

II 材料と方法

スギ精英樹(多賀, 久慈)の自然受粉で得られた未成熟種子胚から不定胚形成細胞を誘導した。久慈に由来する細胞は3系統(A1, A2, A3)、多賀に由来する細胞は2系統(B1, B2)を用いた。また、スギ精英樹郡山2号を雌親、箱根4号を雄親とした人工交配で得られた未成熟種子胚から誘導した不定胚形成細胞を1系統(C1)を用いた。

35Sプロモーターと連結したイントロン*GUS*を含むpIG121Hm(1)をバイナリーベクターとして用い、アグロバクテリウム(GV3101::pMP90株)に導入した。MS培地を改変した不定胚形成細胞の継代培養培地(4)で10日間培養した各系統のスギ培養細胞(生重1g)とYEB培地で一晚培養したアグロバクテリウムの共存培養を谷口、小長谷の方法(4)により行った。共存培養2日目に*GUS*染色を行い、デジタルマイクロスコープで培地上の青色に染まった細胞数を計測した。以上の操作を各系統につき1個のカルス

を用いて行った。

カナマイシン濃度を6段階(0, 5, 10, 25, 50 mg/L)に設定した改変MS培地上でそれぞれの系統の細胞を2週間培養し、細胞の増殖速度を測定してカナマイシン感受性を比較した。細胞の増殖速度は培養開始時と終了時のカルス生重それぞれの自然対数を取り、それらの差を培養日数(14日)で除すことによって評価した。また、改変MS培地上で1週間培養した細胞の乾重率(細胞の乾燥重量/生重量)と細胞壁画分の重量を測定した。熱エタノール(80%)で可溶性成分を抽出した後の残渣を細胞壁画分とした。それぞれの条件下で各系統の細胞について1個のカルスを用いた。

III 結果と考察

*GUS*染色の結果から、スギ培養細胞への遺伝子導入効率には大きな系統間差があることが分かった(表-1)。導入効率が最も低い系統(A3)に対して導入効率が最も高い系統(A1)の間には50倍以上の差があった。遺伝子組換えスギの作出にあたって、事前に遺伝子導入効率の良い系統を選択することが重要である。

A3系統を除き、*GUS*導入効率の高い系統ほどカナマイシンを含まない通常の培地における細胞の増殖速度が低かった(図-1)。カナマイシン感受性の系統間差は遺伝子導入効率と似た傾向を示した。*GUS*導入効率が高かったA1, C1, B1系統の細胞は10 mg/Lのカナマイシンによって細胞増殖が著しく抑制されたが、*GUS*導入効率が低かったA2, A3系統はカナマイシン濃度が50 mg/Lの培地条件においても細胞増殖が比較的高く維持されていた(図-1)。以上の結果から、アグロバクテリウム感染後の細胞の選抜において系統ごとにカナマイシン濃度を調整することの重要

Satoshi KOGAWARA, Mitsuru NISHIGUCHI, Norihiro FUTAMURA, Tsuyoshi Emilio MARUYAMA, Tomohiro IGASAKI, Ken-ichi KONAGAYA, Toru TANIGUCHI, Kenji SHINOHARA (For. Forest Prod. Res. Inst., Ibaraki 305-8687, Japan). *Agrobacterium*-mediated transformation with various somatic embryogenic cell lines of *Cryptomeria japonica*

性が示された。

細胞の乾重率には明確な系統間差がなかった(表-2)。細胞壁画分の含量には系統間差があったが、GUS 導入効率の系統間差とは関連性が認められなかった(表-2)。アグロバクテリウムの感染効率は細胞壁の量に規定されないと考えられる。細胞壁の構造的な変化がアグロバクテリウムの感染効率に影響する可能性が報告されており(2)、本実験に用いた細胞においても細胞壁の質的な違いによるアグロバクテリウム感染効率の系統間差が生じている可能性がある。

表-1. GUS 導入効率の系統間差

Table 1. Transfection efficiency by histochemical GUS assay.

系統	GUS活性を持つ細胞の数 (細胞1gあたり)
A1	891
C1	151
B1	35
B2	28
A2	20
A3	6

表-2. 細胞の乾重率と細胞壁画分の系統間差

Table 2. Wet-to-dry weight ratio and cell wall fraction of each cell line.

系統	乾重率 (%)	細胞壁画分の含量 (%)
A1	4.6	42.4
C1	4.3	38.7
B1	4.4	42.8
B2	4.5	37.2
A2	4.4	38.4
A3	5.1	45.6

引用文献

- (1) OHTA S, MITA S, HATTORI T, NAKAMURA K (1990) Construction and expression in tobacco of a beta-glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* **31**: 805-813.
- (2) GASPAR YM, NAM J, SCHULTZ CJ, LEE LY, GILSON PR, GELVIN SB, BACIC A (2004) Characterization of the *Arabidopsis* lysine-rich arabinogalactan-protein *AtAGP17* mutant (*rat1*) that results in a decreased efficiency of *Agrobacterium* transformation. *Plant Physiol.* **135**:2162-2171.
- (3) TANIGUCHI T, OHMIYA Y, KURITA M, TSUBOMARU M, KONDO T (2008) Regeneration of transgenic *Cryptomeria japonica* D. Don after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic tissue. *Plant Cell Rep.* **27**:1461-1466.
- (4) 谷口亨・小長谷賢一 (2012) スギの形質転換プロトコール. (形質転換プロトコール【植物編】. 田部井豊編, p286-293, 化学同人, 京都)

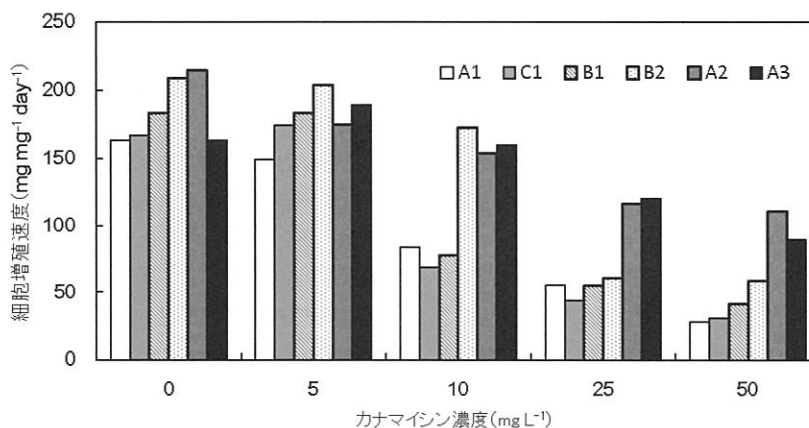


図-1. カナマイシン感受性の系統間差

Fig 1. Kanamycin sensitivity of each cell line.