

[研究論文] *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 による  
*Mesembryanthemum crystallinum* の形質転換

望月 勇希<sup>1</sup>・齋藤 貴<sup>2</sup>

1 博士前期課程応用化学・バイオサイエンス専攻

2 応用化学科

Transformation of *Mesembryanthemum crystallinum* with *Agrobacterium tumefaciens*  
strain LBA 4404

Yuki MOCHIDUKI<sup>1</sup>, Takashi SAITO<sup>2</sup>.

Abstract

It is known that growth inhibition occurs in plants when salt damage is applied to agricultural lands. This is not an exception even for edible crops, so salt removal is required quickly.

In this study, we focused on phytoremediation using *Mesembryanthemum crystallinum* (ice plant) which is a halophytes having desalting effect. However, this cultivation condition is limited. Because of low pesticide chemical resistance, so it is difficult to use it for phytoremediation.

Therefore, we aimed to create transformants suitable for phytoremediation by introducing genes that have resistant to the external environment including salt to ice plant. In order to establish the technology of transformants, we investigated the method of gene transfer to ice plant.

Keywords: Transformation, Agrobacterium method, *Mesembryanthemum crystallinum*

1. 緒言

現在、沿岸付近の海塩粒子や海水等が侵入する地域、高温で降水量の少ない乾燥地域では多量の塩が集積しており、農作物に対して塩害を引き起こしている<sup>1)</sup>。また、不十分な灌漑により土壤中の塩が蓄積し人為的に引き起こされた塩害も発生している。これにより農作物を育成するための土壌が乾燥し、クラック化することで農作物の育成に障害を起こす状況となっている<sup>2)</sup>。

将来、人口増加に伴い食糧不足が懸念される対策として乾燥や塩害により農耕に不向きとなった塩害農用地での農耕利用を可能とする手法が求められている<sup>3)4)</sup>。本法は、植物を利用した浄化技術であるファイトレメディエーションに着目した。この方法は生産コストが低いことや除塩を行うのと同時に他の植物の生育が可能である利点がある<sup>5)6)</sup>。

このファイトレメディエーションに活用できる植物として *Mesembryanthemum crystallinum* (*M. crystallinum*) に着目した。*M. crystallinum* の特徴の一つに塩生植物であること

が挙げられる。通常、植物は塩に対する耐性を有しておらず、土壌中に栽培限界塩分濃度以上の塩が含まれている場合は枯死する。一方、塩生植物である *M. crystallinum* は高塩分濃度下で生育することが可能である<sup>7)</sup>。

しかし、*M. crystallinum* を用いたファイトレメディエーションを行うにあたって課題がある。農地以外の塩害土壌であれば *M. crystallinum* を用いて除塩を行うことが可能であるが、農薬の残留が考えられる塩害農用地の場合、農薬耐性の無い *M. crystallinum* は枯死し除塩には利用できない。そこで、既存の植物に対して農薬耐性を持たせる検討を行った。既に形質転換法、遺伝子導入法が確立され、これをもとにイネなどの遺伝子組換え植物が育成されていることが報告されている<sup>8)9)10)11)</sup>。

本研究では、これらの植物とは異なり、導入法の確立がなされていない *M. crystallinum* の形質転換を目的とし、遺伝子導入法の確立を行った。*M. crystallinum* に遺伝子を組み込む方法として土壌細菌で植物に寄生することで知られている *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 を用いたアグロバクテリウム導入法を検討した<sup>12)13)14)15)</sup>。また、導入するモデル遺伝子として、アミノグリコシド系抗生物質で

あるカナマイシンに耐性を持たせることができるネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする Neomycin phosphotransferase gene (NPTII 遺伝子) を使用し、*M. crystallinum* への外来遺伝子の導入を試みた。その結果、*M. crystallinum* 内に導入した NPTII の塩基対数である 795 bp と近似した遺伝子が細胞組織中で得られ、アグロバクテリウム法による *M. crystallinum* の形質転換が実現されたので報告する。

## 2. 材料および方法

### 2.1. 供試植物

供試植物として、種子より育成した市販の *M. crystallinum* を用いた。*M. crystallinum* はザクロソウ科マツバギク属に属する双子葉類の 1 年生植物である<sup>16)</sup>。原産は南アフリカのナミビア砂漠であり、本種は冬季に湿度が高く、夏季に乾燥する土壌によく繁茂する。体長は約 20 cm で匍匐植物である<sup>17)</sup>。塩生植物であり海水を含む土壌でも生育できる高い耐塩性を持っており、1 個体あたり約 15 g の NaCl を吸収できると報告されているため、ファイトレメディエーションへの活用が期待できる<sup>3)</sup>。

*M. crystallinum* の発芽誘導の前処理として 3 vol% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液にて種子を 5 分間浸透することで種子の洗浄を行った。その後、定量濾紙 (ADVANTEC  $\Phi$  100 mm) により種子と洗浄液を分離したものをを用いて播種用培地にこれを移した。

播種用培地として MS30 培地 (Murashige and Skoog plant salt mixture  $4.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、スクロース  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) に寒天  $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  の濃度となるように加えたものを用いた。これをオートクレーブ ( $121^\circ\text{C}$ 、20 分間) にて滅菌処理を行い、ペトリディッシュ (FALCON  $\Phi$ 15 mm) に 15 mL ずつ分注した。これに洗浄した種子の播種を行い、1 日当たり明所で 8 時間、暗所で 14 時間、 $28^\circ\text{C}$  の条件下で 1 週間育成を行い、発芽を誘導した。

### 2.2. 供試菌株

供試菌株として *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株 (TAKARA BIO INC.) を用いた。導入したバイナリーベクターはネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードするカナマイシン耐性遺伝子 (Neomycin phosphotransferase gene : NPTII) を含む pRI201-AN (TAKARA BIO INC.) (Fig.1) を用いた。この NPTII は 795 bp の遺伝子である (Table 1)。また、pRI201-AN ではアグロバクテリウム自身の遺伝子を植物に導入する際に必要な遺伝子である Tumor inducing plasmid (Ti プラスミド) 中の T-DNA 領域を決めるボーダー配列として働く、Left Border (LB) と Right Border (RB) が含まれている。その間に NPTII が組み込まれているため植物への形質転換が可能である<sup>18)19)20)</sup>。

*Agrobacterium tumefaciens* の遺伝子導入法としてヒートショック法による導入を行った。1.5 mL のマイクロチュ

ープに  $20 \mu\text{L}$  の菌液と  $1.0 \mu\text{L}$  の pRI201-an を加え、1 分間氷上で静置した。その後  $37^\circ\text{C}$  の湯浴中で 5 分間静置を行った。これを YEP 液体培地 (Yeast extract  $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Peptone  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) に植菌し  $28^\circ\text{C}$ 、暗所下で 3 日間振とう培養した。

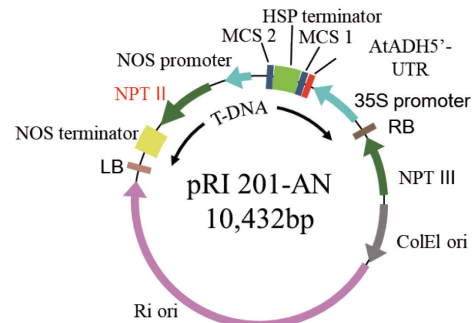


Fig.1 Binary vector map (pRI201-AN)

### 2.3. 感染処理

50 mL 試験管に形質転換処理及び振とう培養を行ったアグロバクテリウムの菌液  $5 \mu\text{L}$  と  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  のアセトシリゴン (4-Hydroxy-3'-5-dimethoxyacetophenone) 水溶液を 10 mL 混合し、感染溶液とした。そこに、2.1 章で発芽誘導し、アグロバクテリウムによる感染を容易にするため根を切除した植物個体を加え浸透し、5 分間静置した。その後余分な感性溶液のろ過を行い、アセトシリゴン  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  とチジアズロン  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  を含む共存培養用 MS30 培地で暗所、 $28^\circ\text{C}$  で 3 日間培養を行った。

### 2.4. アグロバクテリウムの除菌培養

ストレプトマイシン  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  及びカルベニシリン  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  を含む除菌培養用 MS30 培地に継代し、1 日当たり明所で 8 時間、暗所で 14 時間、 $28^\circ\text{C}$  の条件下で 3 日間行い、形質転換アグロバクテリウムの除去を行った。

### 2.5. 導入確認方法

除菌培養後、カナマイシン  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  を含む MS30 培地に継代し 1 日当たり明所で 8 時間、暗所で 14 時間、 $28^\circ\text{C}$  の条件下で 1 週間培養を行い植物個体の選択、カナマイシン耐性遺伝子の発現を確認した。

また、選択培養より生存した植物個体における NPTII 導入の確認として PCR 法を用いて行った。

形質転換を行った植物個体  $0.1 \text{ g}$  に対して ISOPLANT (ニッポンジーン) を用いて DNA の抽出を行った。 $3 \text{ w/v}\%$  ドデシル硫酸ナトリウム水溶液  $300 \mu\text{L}$  と塩化ベンジル  $150 \mu\text{L}$  を混合し、 $50^\circ\text{C}$  で 10 分間ウォーターバスを行うことにより植物細胞の細胞壁及び核膜を破壊した。また、ポリマー溶液  $100 \mu\text{L}$  と酢酸塩溶液  $120 \mu\text{L}$  を加え、氷上で 10 分間静置することで DNA 以外の夾雑物を取り除いた。

その後、得られた DNA 抽出物を用い、PCR にて NPTII 遺伝子の塩基配列に基づいた下記のプライマーを用いて NPT II の増幅を行った (Forward プライマー ; GTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGC、Reverse プ

ライマー; TCATAGAAGGCGGCGGTGGAATCGAAATCT)。PCR の条件は 94 °C で 30 秒の熱変性、65 °C で 1 分のアニーリング、72 °C で 1 分の伸長反応を 1 サイクルとして、これを 30 サイクル行った。

その後、2.0 w/v% アガロースゲルを用いて電気泳動 (100 V, 50 min) と 100 bp DNA ladder (分子量マーカー) により増幅された DNA の分子量を測定し形質転換の有無の確認を行った。

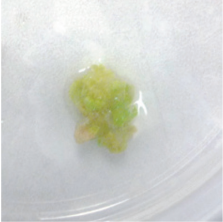

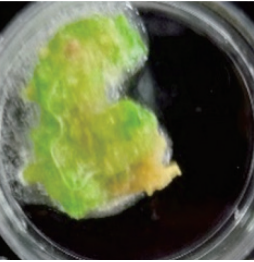
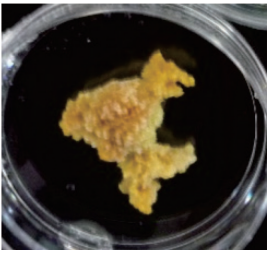
### 3. 実験結果と考察

#### 3.1. カナマイシン含有培地による選択

2.5 より形質転換アグロバクテリウムによる感染処理及び除菌培養を終えたものに対して NPTII 遺伝子の発現の有無を検証するため、カナマイシン含有培地での選択実験を行った。MS30 寒天培地中にカナマイシンを 50 mg·

L<sup>-1</sup> になるように加えたカナマイシン含有 MS30 培地とカナマイシンを加えていない MS30 培地を用いた。形質転換アグロバクテリウムによる感染処理を終えた形質転換植物個体と感染処理のみを行っていない非形質転換植物個体をそれぞれの培地で 1 週間培養した。これら 4 つの条件で実験を実施したところ Table 2 のような結果が得られた。培地にカナマイシンを加えていない形質転換植物個体及び非形質転換植物個体では、カルス形成及びシュート形成以外の違いは確認できなかった。一方、培地にカナマイシンを加えた形質転換個体はカナマイシンを加えていない形質転換個体と同じ様子が確認できたが、非形質転換個体では、植物個体が茶褐色へ変化し枯死が確認された。この結果より、カナマイシンが植物個体に対して生育阻害を起こすことが分かり、形質転換植物個体ではカナマイシンに対して耐性を持っていることが明らかとなった。

Table 2 selection of kanamycin in transgenic plants and non-transgenic plant

	Transgenic plant	Non-transgenic plant
Without kanamycin		
With kanamycin		

### 3.2. NPT II 遺伝子導入確認

得られた形質転換アグロバクテリウム、形質転換植物個体、非形質転換植物個体に対して DNA 抽出、PCR を行い NPTII 遺伝子の増幅を行った。形質転換植物個体に関しては、2.5 章の選択培養より生存した個体を用いた。得られた各 PCR 産物を電気泳動によるバンド発光の確認及び分子量マーカーによる塩基対数の測定を行うことでアグロバクテリウム及び植物個体への NPTII 導入の有無を確認した。

形質転換アグロバクテリウムでは、それぞれ pRI201-AN をヒートショック法により導入したアグロバクテリウムの DNA を用い、PCR 及び電気泳動を行った結果を Fig.2 に示した。A1、A2、A3 は同条件下で遺伝子導入を行い、別の系で培養を行ったサンプルである。どの形質転換体サンプルでも強いバンド発光を示した。それぞれのバンドの塩基対数は 700-800 bp となった。

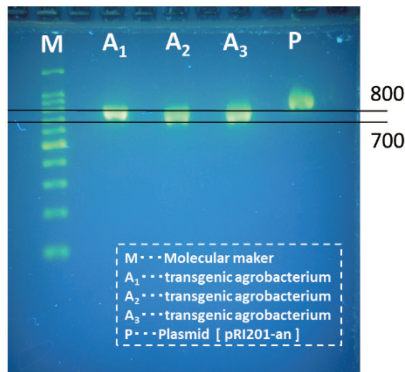


Fig.2 Banding pattern of transgenic *agrobacterium tumefaciens*

本実験で使用した pRI201-AN も同様に PCR を行い、電気泳動にて分析を行った (Fig.3)。Fig.2 に示した形質転換アグロバクテリウムの A1、A2、A3 と同様にして 700~800 bp の箇所に強いバンド発光が見られた。

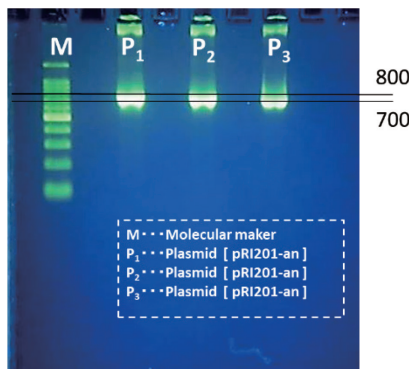


Fig.3 Banding pattern of binary vector (pRI201-AN)

形質転換アグロバクテリウムを *M. crystallinum* に感染処理を行った形質転換植物個体と、感染処理を行っていない非形質転換植物個体の DNA を抽出、PCR を行い電気泳動による分析を行った。その結果を Fig.4 に示した。T1、T2 はそれぞれ異なる系の形質転換アグロバクテリウムを

使用し感染処理を行った形質転換植物個体であり。NT は形質転換アグロバクテリウムによる感染処理を行っていない非形質転換植物個体である。形質転換植物個体である T1、T2 と pRI201-AN である P は形質転換アグロバクテリウム同様、700-800 bp の間に強いバンド発光が見られた。非形質転換植物個体である NT ではバンド発光は検出されなかった。

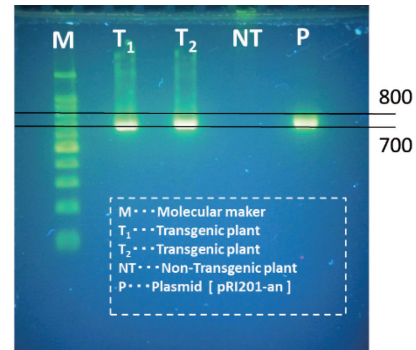


Fig.4 Comparison between transgenic plants, non-transgenic plants and binary vector (pRI201-AN)

再現性の確認のため Fig.4 と同様の植物サンプルを用いて電気泳動による分析を行ったところ、形質転換植物個体である T1、T2 と pRI201-AN である P は 700-800 bp に強いバンド発光が見られた。非形質転換植物個体である NT ではバンド発光が検出されなかった。

電気泳動による検証の結果、形質転換アグロバクテリウム、形質転換植物個体、pRI201-AN の PCR 産物では、どれも 700-800 bp という結果となり、今回導入した pRI201-AN に含まれている物と同じ物質が含まれていることが明らかになった。また、この 700-800 bp という結果は、カナマイシン耐性遺伝子である NPTII の塩基対数である 795 bp と近似した値であることから、形質転換個体、形質転換アグロバクテリウムには NPTII が存在していることが確認された。

## 4. まとめ

本実験ではアグロバクテリウム法による *M. crystallinum* の形質転換の検証を行った。*M. crystallinum* に選択マーカー遺伝子である NPTII 遺伝子の導入を行ったところ選択実験及び PCR 法及び電気泳動より *M. crystallinum* 内に NPTII 遺伝子と同様の塩基対数の DNA が検出された。これは、*M. crystallinum* 内に NPTII が存在しており、アグロバクテリウムによる遺伝子導入がなされたことが認められた。従って、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株を用いた *M. crystallinum* の形質転換が可能であることが明らかになった。

## 参考文献

- [1] 吉田光毅, 秋吉美穂, 藤原靖, ファイトレメディエーションの現状と課題, 大成建設技術センター報, 第38号, 2005.
- [2] 王効拳, 李法雲, 岡崎正規, 杉崎三男, ファイトレメディエーションによる汚染土壌修復, 埼玉県科学国際センター報, 第3号, pp.114-123, 2004.
- [3] Pivetz. B.E., Phytoremediation of contaminated soil and ground water at hazardous waste site, USEPA, pp.1-15, 2001.
- [4] CunninghamSD, Shann JR, Crowley DE and Anderson TA. In E.L. kruger, pytoremediation of soil and water contaminants, ACS symposium, series 664, pp.2-17, 1997.
- [5] 森川弘道, 高橋美佐, 川村義忠, ファイトレメディエーションによる環境修復の新展開, 環境バイオテクノロジー学会誌, vol.1, pp.1-14, 2001.
- [6] Crowley DE, Alvey S and Gilbert ES. In E.L. Kruger, Pytoremediation of soil and water, ACS symposium, series 664, pp.20-36, 1997.
- [7] 東江栄, Mesembryanthemum crystallinum を用いた土壌脱塩技術の可能性, 熱帯農業, 48 (5), pp.294-298, 2004.
- [8] 横井修司, 鳥山欽哉, 日向康吉, 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出法, 植物組織培養, 13 (1), pp.81-84, 1996.
- [9] 増本千都, 宮尾光恵, アグロバクテリウム法によるイネの形質転換, 低温科学, 67, pp.641-647, 2009.
- [10] Environment Directorate, Joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, OECD, 9 (99), 1999.
- [11] Environment Directorate, Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide, OECD, 13 (99), 1999.
- [12] 秋田求, 梶原久資, 太田喜元, 種子感染法によるリーフレタスへの外来遺伝子導入, 植物工場学会誌, 15 (3), pp.215-219, 2004.
- [13] 高津康正, 友常秀彦, 霞正一, 佐久間文雄, 国内産キク品種における茎葉再分化能の差異と効率的な形質転換系の確立, 園芸学会雑誌, 67 (6), pp.958-964, 1998.
- [14] 五十鈴川寛司, 山川隆平, 柴橋輝夫, 中野英秋, アグロバクテリウム法による形質転換トルコギキョウの作出, 山形園試研報, 14, pp.1-11, 2002.
- [15] 豊田秀吉, 嘉美千歳, 住谷一樹, 索建政, 細井好之, 大内成志, Agrobacterium rhizogoeos による主要イチゴ品質の形質転換, 植物組織培養, 10 (1), pp.92-94, 1993.
- [16] Ayumu Kondo, Yuka Hitomi, Toru Funaguma, Induction of CAM by salt stress in the common purple ice plant, , journal of Research of Meijo University, No.9, pp.11-17, 2010.
- [17] Manabu Hayatsu, Suechika Suzuki, Water Stress-induced Ultrastructural Changes of Leaf tissues and Cells in the Ice plant, Science Journal of kanagawa University, 18, pp.55-59, 2007.
- [18] 西林双龍, 金子広康, キュウリへの外来遺伝子導入, 植物組織培養, 13 (2), pp.193-196, 1996.
- [19] 鎌田博, 植物科学の革命児アグロバクテリウム, 科学と生物, 37 (1), pp.59-65, 1999.
- [20] Motomu Akita, Hisashi Kajiwara, Yoshimoto Ohta, Transformation of Leaf Lettuce by Infection of Seeds with Agrobacterium tumefaciens, Journal of Society of High technology in Agriculture, 15 (3), pp.215-219, 2004.