



Title	アグロバクテリウム法によるイネの形質転換
Author(s)	増本, 千都; 宮尾, 光恵
Citation	低温科学, 67, 641-647 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39205
Type	bulletin (article)
Note	5章 形質転換 7
File Information	67-089.pdf



[Instructions for use](#)

7. アグロバクテリウム法によるイネの形質転換

増本 千都¹⁾, 宮尾 光恵²⁾

イネはアグロバクテリウムの宿主でないため、イネへの遺伝子導入はエレクトロポレーションやパーティクルガン等の直接導入法が主流であった。近年アグロバクテリウムを介した間接導入法が適用され、未経験者でも容易にイネに遺伝子を導入できるようになった。

Agrobacterium-mediated transformation of rice

Chisato Masumoto, Mitsue Miyao

Application of *Agrobacterium*-mediated gene transfer to rice transformation enabled us to produce transgenic rice plants efficiently and easily.

7.1 原理と概要

従来イネへの遺伝子導入は、プロトプラストを用いたエレクトロポレーション法や PEG (ポリエチレングリコール) 法、カルスを用いたパーティクルガン法等、直接導入法が中心であった。1994 年にアグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter*; 旧称 *Agrobacterium tumefaciens*) を介したイネへの遺伝子導入法が開発された¹⁾。本法では特殊な装置が不要で操作も簡単であり、かつ高効率で完全長の遺伝子をゲノムに導入できる。遺伝子導入法と培地組成²⁻⁶⁾、また遺伝子導入用バイナリーベクターと選抜薬剤耐性マーカー遺伝子にも改良が重ねられ、現在では未経験者でも簡単に形質転換イネが作製できるようになった。

単子葉植物であるイネはアグロバクテリウムの宿主範囲外である。アグロバクテリウムの宿主となる双子葉植物では、アグロバクテリウムが感染すると Ti プラスミドの *Vir* 領域を活性化するフェノール化合物 (アセトシリニンゴン, シナピン酸等) が合成され、Ti プラスミドから T-DNA が切り出され、いくつかの過程を経て宿主の核染色体 DNA に組み込まれる。イネはこれらのフェノール化合物を合成しないためアグロバクテリウム法が適用できなかったが、アグロバクテリウム感染時にアセトシリニンゴンを添加することによって、アグロバクテリウムを介した遺伝子導入が可能になった¹⁾。現在用いられている一般的な方法は、再分化能が高い種子胚盤由来のカルスにアグロバクテリウムを感染させる方法 (カル

ス法) で、遺伝子が導入されたカルスを薬剤 (抗生物質) 耐性で選抜したのち、植物体を再分化させる。感染から約 3 ヶ月で形質転換イネが得られる。種子に直接アグロバクテリウムを感染させカルス培養期間を短縮する方法 (種子法) も報告されている⁶⁾。

イネへの遺伝子導入効率が高いことから、アグロバクテリウムの系統 EHA101 と EHA105 がもっともよく使われている。EHA105 は、カナマイシン耐性 (Km^r) の EHA101 からカナマイシン耐性遺伝子を除いた系統で、バイナリーベクター (Km^r) が導入されたアグロバクテリウムをカナマイシン耐性で確実に選抜することができる。選抜用薬剤としては、ハイグロマイシン (hygromycin, Hm; 原核型タンパク質合成阻害剤) が汎用されている。しかし、ハイグロマイシンの場合は耐性カルスの選抜が難しいことから、ビアラフォス (bialaphos; グルタミン合成酵素阻害剤), ALS (アセト乳酸脱水素酵素) 阻害剤等、除草剤を選抜薬剤として用いる方法が複数開発されている。バイナリーベクターは、pBI101 由来のベクターに薬剤耐性遺伝子 (ハイグロマイシン耐性遺伝子, *hpt*; ビアラフォス耐性遺伝子, *bar* 等) を導入したもの (例えば, pBI101Hm, pIG121Hm, pGPTVbar) が汎用されている。また、市販の pCAMBIA シリーズも使用できる (pBI101 系ベクターに比べて大腸菌内での増幅コピー数が多い)。

以下にカルス法による遺伝子導入の概要を示す。

1. 種子からのカルス誘導 (3 週間)

種子をオーキシシン (2,4-D) を含む培地で培養し、胚盤からカルスを誘導。

2. カルスの前培養 (2,4-D を含む培地; 3 日間)

アグロバクテリウム感染に先立ち、カルスの増殖能

1) 農業生物資源研究所 光環境応答研究ユニット

2) 農業生物資源研究所 光環境応答研究ユニット

を高める。

3. アグロバクテリウムの前培養 (3日間)
グリセロールストックからアグロバクテリウムを増殖。
4. カルスのアグロバクテリウム感染 (3日間)
カルスにアグロバクテリウムを接種し、アセトシリンゴン存在下で共存培養し感染させる。
5. アグロバクテリウムの除去と薬剤選抜(2週間×1または×2)
カルスをカルベニシリン (carbenicillin; グラム陰性桿菌用抗生物質, アグロバクテリウム除菌用) 溶液で洗浄し, アグロバクテリウムを除去。引き続き, カルベニシリンと選抜薬剤を含むカルス増殖培地 (2,4-Dを含む) でカルスを選抜。
6. 植物体の再分化 (1-2週間)
オーキシシン (ナフタレン酢酸; NAA), サイトカイニン(カイネチン), 選抜薬剤, カルベニシリンを含む培地で培養し, 遺伝子が導入されたカルスから植物体を再分化。
7. 根の伸長促進と再分化植物の育成 (2-3週間)
ホルモン (オーキシシン, サイトカイニン) を含まない培地 (選抜薬剤を含む) で根を伸長させ, 植物体を大きくする。
8. 再分化植物の土壌への移植

7.2 イネへの遺伝子導入法

アグロバクテリウム EHA 株, pBI 系あるいは pCAM-BIA 系バイナリーベクター, 選抜薬剤としてハイグロマイシンとビアラフォスを用いたカルス法 (文献^{3,4)} を若干改変) を紹介する。種子法に比べて時間がかかるものの, 少ない種子から多数の形質転換イネが得られる。一般的な日本型イネ品種 (日本晴, キタアケ, 農林 6 号, 農林 8 号: 日本晴型) に用いられる培地組成と作製法を表 1-3 に示す。日本晴はカルス培養が容易な品種であり, 50%以上の種子から増殖能の高いカルスが得られ, 遺伝子導入効率 (最終的に得られる形質転換イネの個体数) はアグロバクテリウムを感染させたカルス数の 50%に達する。キタアケの場合は, 日本晴に比べるとカルスの増殖が若干悪く, 遺伝子導入効率は 10-20%である。

コシヒカリ, あきたこまち, ひとめぼれはカルス培養が困難な品種として知られている。これはカルスの亜硝酸還元酵素活性が低いことが原因で, 一般的な培養条件では亜硝酸が蓄積し, カルスが褐変, 壊死するためである⁷⁾。これらの品種でも培地組成を改良することで遺伝子導入が可能になっている⁷⁾。

アグロバクテリウムは 28°C, 暗所で培養する。カルスと植物体は 28-33°C, 明所 (30 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) で培養する。シャーレはガンマ線滅菌されたプラスチックシャーレ (直径 9 cm, 深さ 20 mm (アグロバクテリウム用のみ深さ 15 mm)) を使い, 培地を入れたプレートはサージカルテープでシールする。2-3 日間室温で保存し,

表 1: 抗生物質・ホルモンストック溶液の調製

試薬名・調製法	濃度
Carbenicillin	200 mg/ml
Hygromycin B	50 mg/ml
Bialaphos(明治製菓)	25 mg/ml
Kanamycin	25 mg/ml
すべて Milli Q 水 (DW) に溶解し, フィルター滅菌 (0.22 μm), 1 ml ずつ分注 (Bialaphos は 200 μl ずつ), -20°C 保存。	
2,4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) (Sigma)	0.2 mg/ml
0.04 g を 10 ml エタノール (99.5%) に溶解し, DW で 200 ml にメスアップ。4°C 保存。	
Acetosyringone (Aldorich)	100 mg/ml
DMSO で溶解。フィルター滅菌できないため, できるだけ無菌状態で調製。50 μl ずつ分注, 4°C 遮光保存または -20°C 保存。	
Kinetin	200 $\mu\text{g/ml}$
20 mg を 5 ml の 1 N NaOH に溶解し, DW で 100 ml にメスアップ。4°C 保存。	
NAA (α -naphthaleneacetic acid)	200 $\mu\text{g/ml}$
10 mg を 1 ml の 1 N NaOH に溶解。溶液 100 μl を DW で 5 ml にメスアップ。4°C 保存。	

表2：植物用培地の調製

カルス誘導，共存培養，薬剤選抜用培地
N6D 培地（カルス誘導用，薬剤選抜用）

最終濃度	試薬名・ストック溶液名	1 l
① 3%	Sucrose	30 g
② 300 mg/l ^a	Casamino acids	300 mg
③ 25 mM	Proline	2.9 g
④	Chu N6 basal salt mixture (Sigma)	1 袋
⑤	N6 Vitamin (×1000) ^b	1 ml
⑥ 2 mg/l	2,4-D (×100, 0.2 mg/ml)	10 ml
	↓ 2 N KOH で pH 5.8 に調整し，1 l にメスアップ。	
⑦ 0.4%	Gelrite	4 g
	↓ オートクレーブ	
選抜培地作製時は，約 60°C に冷ましたのち抗生物質を添加。		
300 mg/l	Carbenicillin (200 mg/ml)	1.5 ml
50 mg/l	Hygromycin (50 mg/ml)	1 ml
	または	
5 mg/l	Bialaphos (25 mg/ml)	200 μl

50 ml ずつ深型シャーレ (90×20 mm) に分注。

^a ビアラフォス選抜の場合，カザミノ酸濃度は 200 mg/l。

^b N6 Vitamin ストック溶液 (×1000) 25 ml, Glycine 50 mg ; Nicotinic acid 12.5 mg ; Pyridoxine-HCl 12.5 mg ; Thiamine-HCl 25 mg ; myo-Inositol 2.5 g, -20°C 保存。

2N6-AS 培地 (共存培養用)

最終濃度	試薬名・ストック溶液名	1 l
① 3%	Sucrose	30 g
② 300 mg/l	Casamino acids	300 mg
③	Chu N6 basal salt mixture (SIGMA)	1 袋
④	N6 Vitamin (×1000)	1 ml
⑤ 2 mg/l	2,4-D (×100, 0.2 mg/ml)	10 ml
	↓ 2 N KOH で pH 5.2 に調整し，0.9 l にメスアップ。	
⑥ 0.4%	Gelrite	4 g
	↓ オートクレーブ	
約 60°C に冷ましたのち以下を添加。		
⑦ 1%	10% (w/v) D-(+)-Glucose ^c	100 ml
	(オートクレーブ滅菌)	
⑧ 10 mg/l	Acetosyringone (100 mg/ml)	100 μl

50 ml ずつ深型シャーレ (90×20 mm) に分注。

^c 10% (w/v) D-(+)-Glucose 溶液：グルコースは溶けにくいので，攪拌しながら粉末を添加し，溶解する。

カビ等が生えていないこと確認してから 4°C で保存。
3 ヶ月以上は保存しない。選抜に用いるハイグロマイシン，ビアラフォス濃度はそれぞれ 50, 5 mg/l である (日本晴，キタアケの場合)。

7.2.1 種子の選別，種子滅菌とカルス誘導

玄米を 2,4-D を含むカルス誘導用プレート (N6D 培地) で培養し，胚盤からカルスを誘導・増殖させる。

再分化培地，発根用ホルモンフリー培地
再分化培地

最終濃度	試薬名・ストック溶液名	1 l
① 3%	Sucrose	30 g
② 3%	Sorbitol	30 g
③ 2 g/l	Casamino acids	2 g
④	MS Powder (Wako)	1 袋
⑤	MS Vitamin (×1000) ^d	1 ml
⑥ 2 μg/l	NAA (×10000, 200 μg/ml)	10 μl
⑦ 2 mg/l	Kinetin (×100, 200 μg/ml)	10 ml
	↓ 1 N HCl で pH 5.8 に調整し，1 l にメスアップ。	
⑧ 0.4%	Gelrite	4 g
	↓ オートクレーブ	
約 60°C に冷ましたのち抗生物質を添加。		
100 mg/l	Carbenicillin (200 mg/ml)	0.5 ml
50 mg/l	Hygromycin (50 mg/ml)	1 ml
	または	
5 mg/l	Bialaphos (25 mg/ml)	200 μl

50 ml ずつ深型シャーレ (90×20 mm) に分注。

^d MS Vitamin ストック溶液 (×1000) 25 ml, Glycine 50 mg ; Nicotinic acid 12.5 mg ; Pyridoxine-HCl 12.5 mg ; Thiamine-HCl 2.5 mg ; myo-Inositol 2.5 g, -20°C 保存。

発根用ホルモンフリー培地

最終濃度	試薬名・ストック溶液名	1 l
① 3%	Sucrose	30 g
②	MS powder (Wako)	1 袋
③	MS Vitamin (×1000)	1 ml
	↓ 2 N KOH で pH 5.8 に調整し，1 l にメスアップ。	
	↓ オートクレーブ	
約 60°C に冷ましたのち抗生物質を添加。		
50 mg/l	Hygromycin (50 mg/ml)	1 ml
	または	
5 mg/l	Bialaphos (25 mg/ml)	200 μl

50 ml ずつ深型シャーレ (90×20 mm) に分注。

[準備]

種子 (粃) 約 150 粒；小型粃すり器 (藤原製作所)；プラスチックシャーレ；70% エタノール；次亜塩素酸ナトリウム溶液 (食品添加物用，有効塩素濃度約 5%)；Tween 20；50 ml ファルコンチューブ；滅菌水約 1 l；レシピロ型振盪機；オートクレーブ滅菌した濾紙 (直径 7 cm, 数~10 枚)；オートクレーブ滅菌したピンセット；N6D プレート 10 枚。サージカルテープ。

[実験方法]

1. よく充実した種子 (粃) を選ぶ。黒ずんだり傷のある粃は使わない。小型粃すり器で粃殻を取り除く。白色半透明の玄米 100-150 粒を選抜する。緑色あるいは黒ずんだ玄米はカビ等の混入の原因となるので除く。

表3：アグロバクテリウム用培地の調製

AB 培地 (アグロバクテリウム培養用)		
最終濃度	試薬名・ストック溶液名	1 l
① 3 g/l	K ₂ HPO ₄	3 g
② 1.3 g/l	NaH ₂ PO ₄ ・2 H ₂ O	1.3 g
③ 1 g/l	NH ₄ Cl	1 g
④ 0.15 g/l	KCl	0.15 g
⑤ 10 mg/l	CaCl ₂ ・2 H ₂ O	10 mg
⑥ 2.5 mg/l	25 mg/ml FeSO ₄ ・7 H ₂ O(用時調製)	100 μl
	↓ 2 N KOH で pH 7.2 に調整し, 0.9 l にメスアップ.	
	↓ 300 ml の三角フラスコに 180 ml ずつ分注.	
⑦ 1.5%	Bacto agar	3 g/180 ml
	↓ オートクレーブ	
	約 60°C に冷ましたのち以下を添加.	
⑧ 0.5%	5% (w/v) D-(+)-Glucose (オートクレーブ滅菌)	20 ml
⑨ 1.2 mM	1 M MgSO ₄ ・7 H ₂ O (オートクレーブ滅菌)	240 μl
⑩ 50 mg/l	Kanamycin (25 mg/ml)	400 μl
	ハイグロマイシン選抜の場合	
	50 mg/l Hygromycin (50 mg/ml)	200 μl
	ピアラフォス選抜の場合, 選抜薬剤は添加しない.	

約 20 ml ずつ薄型シャーレ (90×15 mm) に分注.

AAM 培地 (アグロバクテリウム感染用)		
ストック溶液の組成		
1.	AA-1 ストック溶液 (×1000)	100 ml
	次の順に溶解させる. KI 75 mg ; CoCl ₂ ・6 H ₂ O 2.5 mg ; CuSO ₄ ・5 H ₂ O 2.5 mg ; Na ₂ MoO ₄ ・2 H ₂ O 25 mg ; ZnSO ₄ ・4 H ₂ O 0.2 g ; MnSO ₄ ・6 H ₂ O 1 g.	
2.	AA-2 ストック溶液 (×1000)	100 ml
	CaCl ₂ ・2 H ₂ O 15 g	
3.	AA-3 ストック溶液 (×1000)	100 ml
	MgSO ₄ ・7 H ₂ O 25 g	
4.	Fe-EDTA ストック溶液 (×1000)	100 ml
	Fe-EDTA 4 g	
5.	AA-5 ストック溶液 (×1000)	100 ml
	NaH ₂ PO ₄ ・2 H ₂ O 15 g	
6.	AA-SoI ストック溶液 (×100)	100 ml
	L-Arginine 1.77 g	
	Glycine 75 mg	
7.	AA-KCl ストック溶液 (×50)	100 ml
	KCl 15 g	
8.	AA-6 Vitamin ストック溶液 (×1000)	10 ml
	Nicotinic acid 10 mg ; Pyridoxine-HCl 10 mg ; Thiamine-HCl 0.1 g ; myo-Inositol 1 g.	

AA-6 Vitamin は -20°C 保存. それ以外は 4°C 保存.

- 滅菌溶液を作製する. 50 ml ファルコンチューブに次亜塩素酸ナトリウム溶液 20 ml, 滅菌水 20 ml, Tween 20 を 1 滴入れる. チューブ 2 本を用時調製.
- 選抜した玄米 100-150 粒をシャーレに入れる. 玄米

AAM 培地		
最終濃度	試薬名・ストック溶液名	1 l
① 0.3 g/l	L-Aspartic acid ^a	0.3 g
②	AA-1 (×1000)	1 ml
③	AA-2 (×1000)	1 ml
④	AA-3 (×1000)	1 ml
⑤	Fe-EDTA (×1000)	1 ml
⑥	AA-5 (×1000)	1 ml
⑦	AA-6 Vitamin (×1000)	1 ml
⑧	AA-SoI (×100)	10 ml
⑨	AA-KCl (×50)	20 ml
⑩ 0.5 g/l	Casamino acids	0.5 g
⑪ 6.85%	Sucrose	68.5 g
⑫ 0.9 g/l	L-Glutamine	0.9 g
	↓ 2 N KOH で pH 5.2 に調整し, 0.9 l にメスアップ.	
	↓ オートクレーブ	
	室温に冷ましたのちグルコース溶液を添加.	
⑬ 3.6%	36% (w/v) D-(+)-Glucose (オートクレーブ滅菌)	100 ml

100 ml 三角フラスコに 90 ml ずつ分注し, 4°C 保存.

^aL-Aspartic acid は溶解しにくいので最初に加える.

- が浸かる程度に 70% エタノールを加え, 30 秒間手で軽く振盪したのち, 70% エタノールを素早く捨てる. この操作で滅菌溶液を浸透しやすくする.
4. 玄米を滅菌溶液に移し, 150-200 rpm で 15 分間振盪する.
5. デカントで滅菌溶液を交換し, 15 分間振盪する. 以下はクリーンベンチ内で作業する.
6. チューブをデカントして滅菌溶液を捨て, 新たに滅菌水 40 ml を入れ玄米をすすぐ. この操作を 5-6 回繰り返す. 最後に洗浄水を捨てる.
7. プラスチックシャーレに滅菌濾紙を数枚入れ, その上に滅菌した玄米を広げ水を切る.
8. ピンセットで玄米を N6D プレートに置床する (プレート 1 枚あたり 10 粒; プレート 10 枚). この時, 胚だけ培地から出るようにする. シャーレをサージカルテープでシールする.
9. 30-33°C で 21 日間培養する (暗所, 明所どちらでも構わない).
 - 培養開始後数日間は, カビや雑菌が発生していないか毎日チェックする (雑菌等が生えると種子のまわりが白濁する. プレートを光にかざすとわかりやすい). 雑菌等が生えた種子は取り除く. 種子を除いても雑菌は残されたままなので, 雑菌発生場所近傍の種子から増殖したカルスは使用しない.
 - 誘導されたカルスを培地に直接置き直すと, 増殖が促進される.

- カルの増殖が悪い場合（多くは褐色を呈する）は、培地のカザミノ酸（窒素源）濃度を上げると改善されることが多い。

7.2.2 カルの前培養（感染3日前に開始）

増殖能の高いカルス選抜し、新しい N6D プレートに移植する。アグロバクテリウムを感染させるカルの増殖能が遺伝子導入効率に大きく影響する。胚盤上で増殖したカルの塊より、塊からこぼれ落ちたカルスの方が増殖能が高い。褐色がかかったカルスは増殖能が低いので使用しない。カルの増殖に問題がなければ、玄米1個から感染に使用できるカルスが5-20個取れる。

[準備]

N6D プレート2枚；ピンセット（滅菌済み）；サージカルテープ。

[実験方法]

1. 直径約2-3 mmの淡黄色で固いカルスを選び、ピンセットで新しい N6D プレートに置床する（プレート1枚あたり200個、プレート2枚）。この時カルスをプレートに軽く押しつけるようにする。
2. 30-33°C、3日間培養する（暗所、明所どちらでも構わない）。

7.2.3 アグロバクテリウムの前培養（感染3日前に開始）

バイナリーベクターを導入したアグロバクテリウムを増殖させる。ハイグロマイシン選抜の場合、カナマイシンとハイグロマイシンを含む培地（AB培地）で培養する。ピアラフォス選抜の場合、カナマイシンのみを含む培地を使用する。

[準備]

ABプレート（カルス400個あたり1枚）；白金耳または滅菌済みマイクロスパーテル；サージカルテープ。

[実験方法]

1. アグロバクテリウムのグリセロールストックの表面を白金耳またはマイクロスパーテルで掻き取る。
2. ABプレートにアグロバクテリウムを塗布し、サージカルテープでシールする。
3. 28°C、暗所で3日間培養する。30°Cを越えるとアグロバクテリウムからプラスミドが脱落しやすくなるので培養温度に注意する。

7.2.4 アグロバクテリウムの接種と共存培養

カルスにアグロバクテリウムを接種したのち、3日間共存培養して感染させる。接種時のアグロバクテリウム濃度が低い方が感染効率が高い。アグロバクテリウム懸濁液がかすかに濁るか濁らない程度で充分である。

[準備]

50 ml ファルコンチューブ；AAM培地；アセトシリンゴン溶液；2N6ASプレート1枚；滅菌した濾紙（直径7 cm）；マイクロスパーテル（滅菌済み）；駒込ピペット（10 ml、滅菌済み）；ステンレス製茶こし（滅菌済み）；ピンセット（滅菌済み）；プラスチックシャーレ。

[実験方法]

1. 50 ml ファルコンチューブに AAM 培地 40 ml を入れ、アセトシリンゴン溶液（100 mg/ml）を 4 μ l 加える（終濃度 10 mg/l）。
2. 2N6AS プレート上に滅菌した濾紙をのせ、その上にステップ1のアセトシリンゴン入り AAM 培地を 1 ml 注ぐ。
3. 茶こしを空のプラスチックシャーレに置く。シャーレの蓋に滅菌濾紙を2-3枚敷く。
4. 前培養したアグロバクテリウムをマイクロスパーテルで掻き取り（マイクロスパーテルの1/5程度、約5 μ l；図1）、ステップ1の AAM 培地（約40 ml）に懸濁する。懸濁液を駒込めピペットで100回程度ピペッティングしてアグロバクテリウムを分散させる。

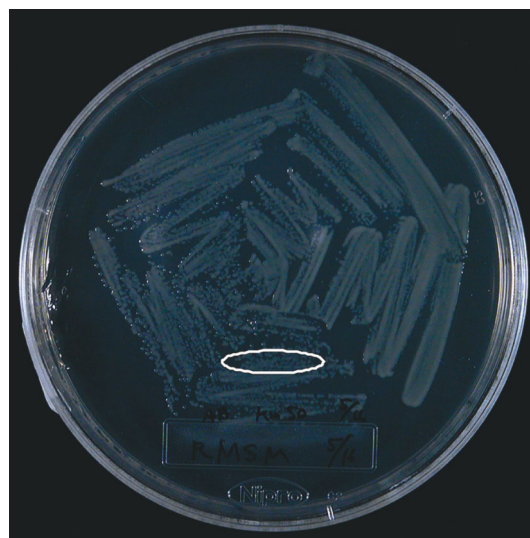


図1：AB培地で3日間培養したアグロバクテリウム。コロニーが判別できる程度に増殖したところ（丸で囲んだ部分）の菌体をマイクロスパーテルで掻き取り、アグロバクテリウム感染用の AAM 培地 40 ml に懸濁する。

5. プラスチックシャーレに置いた茶こし(ステップ3)に前培養したカルスを約200個入れる(100-200個)。この時、直径約2mmの淡黄色の固いカルスを選ぶ。
6. カルスにアグロバクテリウム懸濁液(約40ml)をかけ、茶こしを時々揺すりながら90-120秒間アグロバクテリウムを接種する。
7. シャーレの蓋に敷いたろ紙(ステップ3)の上に茶こしを置き、アグロバクテリウム懸濁液を切る。
8. 2N6ASプレート上に敷いた濾紙(ステップ2)にカルスを置床し(プレート1枚あたり約200個)、サージカルテープでシールする。
9. 28°C、暗所で3日間培養する。3日間培養するとアグロバクテリウムがカルスを覆うように増殖する。

7.2.5 アグロバクテリウムの除去(除菌)とカルスの薬剤選抜

アグロバクテリウムと共存培養したカルスをカルベニシリン溶液(500mg/l)で洗浄したのち、カルベニシリン(300mg/l)と選抜薬剤を含むN6D培地で培養し、薬剤耐性カルスを選抜する。2週間の薬剤選抜を2回繰り返すのが一般的であるが、ハイグロマイシン選抜の場合は耐性カルスと感受性カルスの区別がつきにくいので、2週間選抜培地で培養したのち、再分化を開始する。選抜培地での培養は除菌効果が高いため、最低1回は行う。ビアラフォス選抜の場合は、2回(2週間×2)または3回(2週間×2, 7-10日間×1)の培養で耐性カルスが選抜できる(感受性カルスは増殖せず、褐変する)。

[準備]

50mlファルコンチューブ;滅菌水;カルベニシリンストック溶液;選抜用N6Dプレート(選抜1回あたり8枚);ピンセット(滅菌済み);サージカルテープ。

[実験方法]

1. 滅菌水40mlを入れた50mlファルコンチューブに共存培養したカルス約200個(100-200個)を入れる。蓋をしてチューブを数回反転させ、カルスを洗浄する。この操作を5回繰り返す。
2. 同様に、500mg/lカルベニシリン溶液(滅菌水40mlにカルベニシリンストック溶液を100 μ l添加)でカルスを3回洗浄する。ここまでの操作でカルスは直径約3mmに膨潤する。
3. 選抜用N6Dプレートに直径約3mmのカルスを置床する(プレート1枚あたり25個)。カルスの破片は置床しない。

4. 30-33°C, 14日間培養する(暗所, 明所どちらでも構わない)。

●除菌が不十分でアグロバクテリウムが増殖する場合、カルスを滅菌水で5回、引き続きカルベニシリン溶液で5回洗浄し直すと除菌できる。ただし、この処理はアグロバクテリウムがコロニーを形成して1日以内でないと効果はない。

5. ビアラフォス選抜の場合は、選抜用N6Dプレート上で増殖したカルスの一部を次の選抜培地(カルベニシリン濃度を200mg/lに下げた選抜用N6Dプレート)に移植し(プレート1枚あたり16個)、選抜を繰り返す。

7.2.6 植物体の再分化

NAA, カイネチン, 選抜薬剤を含む再分化培地(MS培地+ビタミン類, ショ糖, ソルビトール, カザミノ酸)でカルスを培養し、植物体を再分化させる。再分化培地にはカルベニシリン(200mg/l)も含まれるが、アグロバクテリウムの増殖が認められる場合、カルスを新しいプレートに移植し直す。

[準備]

再分化用プレート;ピンセット(滅菌済み)。

[実験方法]

1. 再分化用プレートにカルスを移植する。プレートを4区画に分け、1区画に同一カルス由来のカルス5-7個を置床する。
 - 薬剤選抜中に増殖するカルスは小さい塊を形成する。これらの小さいカルス、あるいは薬剤選抜用プレートに置床したカルスから形成した大きい塊の淡黄色の部分の部分を置床する。
2. 28-30°C, 明所で7-14日間培養する(最長1ヶ月)。早いものでは培養3日目からカルスにグリーンスポットが現れ、そこから植物体が再分化する。グリーンスポットをもつカルスが増えたら、1区画あたり5個程度残し、残りは除去する。
3. シュートが1-2cmに伸長したら、発根用ホルモンフリー培地に移植する。再分化プレート上で根が伸長する場合もある。その場合、シュートと根を切らないように移植する。
4. 再分化しなかった場合、カルスを100mg/lカルベニシリンを含む再分化プレートに移植し(プレート1枚あたり5-10個), 28-30°C, 明所で7-14日間培養する。

7.2.7 ホルモンフリー培地による根の伸長促進と土壌への移植

シュートが1-2 cm に伸びた再分化植物をホルモンを含まない培地（ホルモンフリー培地；MS 培地+ビタミン類，ショ糖）に移植し，根を伸長させる。再分化植物が十分に大きくなったら，空気（低湿度）に順化させたのち，土壌に移植する（鉢上げ）。ホルモンフリー培地で1ヶ月培養した個体も鉢上げする。

[準備]

発根用ホルモンフリープレート；ピンセット（滅菌済み）。

[実験方法]

1. シュートが1-2 cm に伸びた再分化植物をホルモンフリープレートに移植する。通常単一のカルスから複数の植物体が再分化するので，まず再分化プレート上で植物を株分けする（シュートと根をもつ苗に分ける）。この時周囲のカルスをできるだけ除く。ホルモンフリープレートに小さな穴をあけ，株分けした苗を埋め込むように移植する。培養にともなってアルビノになるケースもあるので，同一カルス由来の苗をプレート1枚に2-3個体移植する。
2. 28-30°C，明所で2-3週間培養する（最長4週間）。生育が悪い場合，新しいプレートに植え替える。
3. シャーレー杯に植物体が成長したら（草丈7~10 cm，根はプレートの底に展開する），シャーレの蓋をは

ずし水を張って，明所（10 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以下；室内照明用蛍光灯程度の明るさ）に置き，植物体を3日間空気に順化させる。

4. 流水あるいは水を張ったバットの中で培地を洗い落としながら再分化植物を株分けし，土壌に移植する。この時，シュート1個を1個体とする。移植後5日間程度は寒冷紗をかけ強光が当たらないようにする。
 - 順化処理を行っても鉢上げ後枯死する場合がありますので，同一カルス由来の再分化植物を2-3個体移植し，新しい葉が展開したら間引きする。
 - 同一カルス由来であっても，株分けをせずに複数のシュートをまとめて移植するとキメラになる場合がありますので，必ず株分けする。

参考文献

- 1) Y. Hiei, S. Ohta, T. Komari, & T. Kumashiro, *Plant J.* **6** (1994) P.271.
- 2) H. Rashid, S. Yokoi, K. Toriyama, & K. Hinata, *Plant Cell Rep.* **15** (1996) P.727.
- 3) S. Toki, *Plant Mol. Biol. Rep.* **15** (1997) P.16.
- 4) 駒嶺穆, 野村港二, 「生物化学実験法 41 植物細胞工学入門」, 学会出版センター, 1998, P.311.
- 5) 島本功, 岡田清孝, 「新版 モデル植物の実験プロトコール— 遺伝的手法からゲノム解析まで」, 秀潤社, 2001, P.93.
- 6) S. Toki, N. Hara, K. Ono, H. Onodera, A. Tagiri, S. Oka, & H. Tanaka, *Plant J.* **47** (2006) P.969.
- 7) 小川泰一, *化学と生物* **38** (2000) P.189.