



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アグロバクテリウムによるゼニゴケ核ゲノム形質転換法
Author(s)	石崎, 公庸; 河内, 孝之
Description	5章 形質転換 3. ゼニゴケ a
Relation	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
Citation	低温科学, 67, 597-600
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39199
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-083.pdf



3. ゼニゴケ

a. アグロバクテリウムによるゼニゴケ核ゲノム形質転換法

石崎 公庸¹⁾, 河内 孝之¹⁾

苔類ゼニゴケは、アグロバクテリウムを介する形質転換が容易である。孢子から培養した分化初期の葉状体を使うことによって、1 孢子囊あたり数百の独立した形質転換体が短期間で作成できる。世代の大半が半数体であることや無性芽による純系化といった特徴を生かしたユニークな実験が可能となった。

Agrobacterium-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* L.

Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi

Here we describe a rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for the liverwort, *Marchantia polymorpha* L. using immature thalli developed from spores. This protocol should provide molecular techniques to facilitate comparative genomics, taking advantage of this unique model plant that retains many features of the common ancestor of land plants.

3.a.1 概論

苔類ゼニゴケは、他の多くの植物同様に、パーティクルガンによる DNA の直接導入法により形質転換が可能である^{1,2)}。しかし、挿入コピー数が多く染色体の再編成を伴う傾向があることや、導入した DNA が断片化すること等の問題があった。アグロバクテリウムによる形質転換は、一般的に、パーティクルガンやポリエチレングリコール (PEG) などを用いた DNA 直接導入法と比べ、操作が簡便であること、形質転換効率が高いこと、挿入コピー数が比較的低いことなど多くの利点がある³⁾。ゼニゴケにおいても、アグロバクテリウムによる形質転換法が幾度か試されたが、無性芽および無性芽から生育させた葉状体を用いた場合、形質転換効率は低く実用的ではなかった。近年、蛍光灯に加え遠赤色光を照射することにより、成熟した葉状体を生殖成長へと移行させることに成功し、実験室条件下で孢子を大量に採取できるようになった (1.4. 大和らの項参照)。この孢子より短期間培養した分裂の盛んな分化初期の葉状体 (以降、幼葉状体と呼ぶ) をアグロバクテリウムと共培養することにより、1 孢子囊あたり数百ラインという高い形質転換効率が得られた⁴⁾。この際、孢子発芽後 5～7 日目の幼葉状体を用いることが重要である。また、もう一つのポイントとして共培養時にアセトシリンゴンを加えることが挙

げられる⁴⁾。この方法で得られた形質転換体には、核ゲノムへのランダムな T-DNA 挿入が検出され、その挿入コピー数は 1～数コピーであった⁴⁾。共培養の期間を長くすることで得られる形質転換体が増える傾向が認められたが、単一コピーのものを多く得るには、24～48 時間の共培養が推奨される。T-DNA は、その内部で断片化することなくゲノム中に挿入されており、高等植物と同様に、境界配列 (ライトボーダー、レフトボーダー) に依存して DNA の組換えが起こっていた⁴⁾。このことから、苔類ゼニゴケにおけるアグロバクテリウムを介する T-DNA 挿入メカニズムは、高等植物の場合と同じであると考えられる⁴⁾。アグロバクテリウムによるゼニゴケ形質転換は、孢子培養開始から 4 週間程度で形質転換体の分離が可能である。1 細胞に由来する無性芽^{5,6)}を単離して培養することにより、純系が容易に分離できる。また、形質転換に供する幼葉状体は、半数体であるため、導入遺伝子の分離 (ホモ接合体やヘテロ接合体) を考慮する必要がない。そのため、形質転換直後より、T-DNA 挿入による遺伝子破壊の表現型が観察される。このように、ゼニゴケのアグロバクテリウムを介する核 DNA の形質転換は、個々の遺伝子機能の解析に加えて、遺伝子タギングによる T-DNA 挿入変異株の作製など、様々な展開が期待される。

1) 京都大学大学院 生命科学研究科 遺伝子特性学分野

3.a.2 形質転換方法

3.a.2.1 準備

[試薬・培地]

- ・ゼニゴケ孢子囊(表面滅菌済み, 1.4. 大和らの項参照)
- ・2×孢子滅菌液: 0.4% アンチホルミン溶液 (ナカライテスク, 次亜塩素酸ナトリウム溶液を 100% として計算する) 0.2% Triton® X-100 (ナカライ)
- ・ハイグロマイシン-B (和光純薬)
- ・セフォタキシム (商品名クラフォラン: Sanofi-Aventis K.K.)
- ・LB 培地 (アグロバクテリウム培養用)
- ・リファンピシン (ナカライテスク)
- ・アセトシリシロン: 3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone, 100 mM ストック = 19.2 mg/ml in DMSO
- ・液体培地 0M51C 培地 (1.4. 大和らの項参照)
- ・選抜寒天培地 0M51C 固体培地 (1.4. 大和らの項参照) にハイグロマイシン(終濃度 10 µg/ml), セフォタキシム(終濃度 100 µg/ml) を加える。

[器具・装置]

- ・幼葉状体を回収・洗浄するための器具: 6 cm×6 cm の大きさに切断した 50 µm 格子ナイロンメッシュ (NBC Inc. N-No. 305T), 50 ml プラスチックコニカルチューブを切断し, 蓋にドリルで穴をあけたものを組み立てる (図 1 参照)。
- ・培養容器: 100 ml 三角フラスコにシリコ栓をする



図 1: ゼニゴケ幼葉状体の回収洗浄用器具
切断した 50 ml プラスチックコニカルチューブ, 穴を開けた蓋と 6×6 cm に切った 50 µm 格子ナイロンメンブレンを, 右にあるように組み立てる。

- ・ピンセット (歯科用: 先が折れているタイプ)

[バイナリーベクターおよびアグロバクテリウム宿主株]

- ・ハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子 (*hpt*) をマーカーに持つバイナリーベクター. カリフラワーモザイクウイルス 35 S プロモータ (CaMV35S) 制御であることが望ましい. ノパリンシンターゼ遺伝子のプロモータ (*nosP*) 制御では, ゼニゴケでの発現が弱く, 得られる形質転換体の数が, 顕著に減少する. 使用実績のあるバイナリーベクター例として, pUC 由来のマルチクローニングサイトを持つ pCambia1300 (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585.html>) や, Invitrogen 社の GATEWAY® cloning 技術が使用可能な pGWB シリーズが挙げられる⁷⁾.
- ・アグロバクテリウム宿主株: 菌株の検討はしていない. 著者らは, 通常, シロイヌナズナで用いている C58C1 GV2260 (pGV2260)⁸⁾ を使用している. 他のアグロバクテリウム宿主株, 例えば EHA101 など実績がある。

3.a.2.2 ゼニゴケ孢子からの植物体培養

[実験方法]

1. 孢子囊が入った 1.5 ml マイクロチューブに, 滅菌水 (1 孢子囊: 約 10⁵ 個の孢子あたり 100 µl) を加える. チップの先で 1.5 ml マイクロチューブの壁に押し当てるなどして孢子囊を破り, 孢子を懸濁する。
2. 懸濁後, 孢子囊の空袋などのゴミを吸わないように注意して, 孢子懸濁液を別の 1.5 ml マイクロチューブへ移す (図 2 A)。
3. (オプション) コンタミネーションが心配な場合は, 等量の 2×孢子滅菌液で 2 分間処理し, 8,000 × g 1 分間の遠心後, 滅菌水へ懸濁し, 再滅菌する。
4. 孢子懸濁液 100 µl (1 孢子囊分) を 25 ml の 0M51C 培地 (100 ml 三角フラスコ) へ加える (図 2 B)。
5. 130 rpm, 22°C, 50~60 µmol photons m⁻²s⁻¹ の白色光連続照射下で 7 日間振盪培養する (図 2 C)。

3.a.2.3 アグロバクテリウムの準備

[実験方法]

1. バイナリーベクターを形質転換したアグロバクテリウムの培養プレートからシングルコロニーを突き, 5 ml の液体 LB 培地へと植菌し, 28°C, 2 日間培養する. アグロバクテリウムは, 2 日間ではほぼ飽和培養となる. LB 培地には使用するベクターに適切な抗生物質とアグロバクテリウム選抜に 100 µg/ml リファンピシンを加えておく。

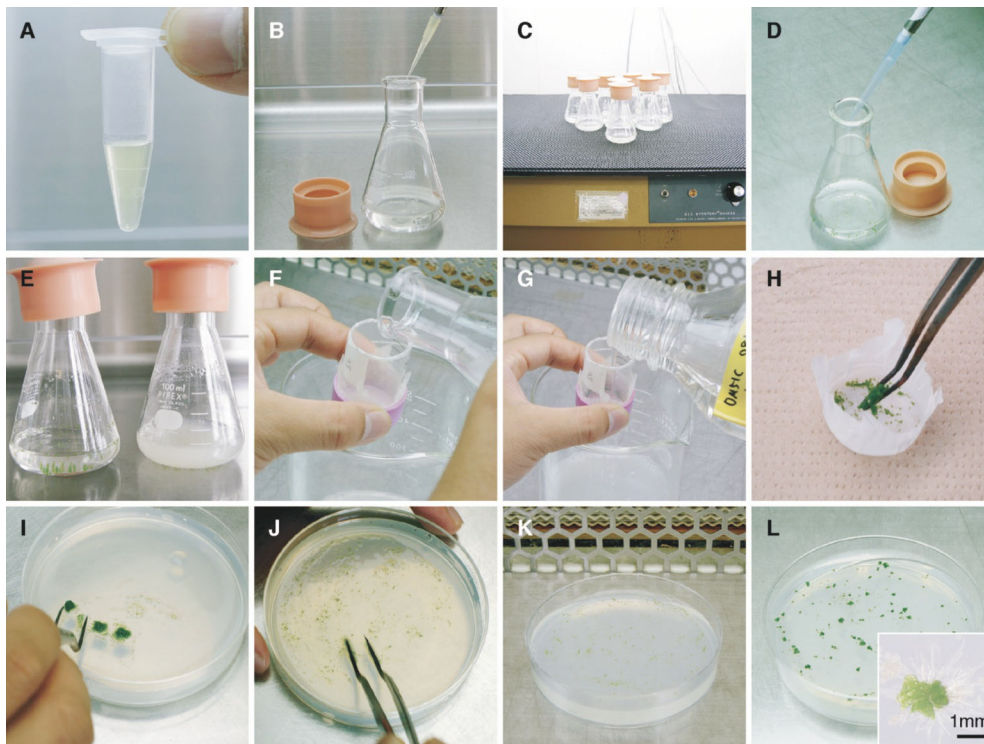


図2：アグロバクテリウムによるゼニゴケ核ゲノム形質転換の手順

A) 懸濁した胞子。B) 0M51C 液体培地への胞子植え付け。C) 胞子振盪培養。D) アグロバクテリウムの投入。E) 共培養前(左)と共培養終了後(右)。F) 共培養液からの幼葉状体の回収。G) 0M51C 培地による洗浄。H) ナイロンメッシュからの幼葉状体の回収。I) 選抜寒天培地上での幼葉状体の分配。J) 選抜寒天培地上に播かれた幼葉状体。K) クリーンベンチ上で余分な水分を飛ばしている様子。L) 選抜寒天培地移行後2週間目の様子。右下は拡大図。

2. アグロバクテリウム培養液 1 ml を 15 ml プラスチックコニカルチューブへ移し、 $2,000 \times g$, 15 分間遠心し、集菌する。

3. 培地を捨て、5 ml の液体 0M51C 液体培地 ($100 \mu\text{M}$ アセトシリンゴン含有) を加え、菌体を懸濁する。この時の濁度は $\text{OD}_{600} = 1 \sim 2$ である。

4. 28°C , 6 時間, 振盪培養する。

3.a.2.4 アグロバクテリウムとゼニゴケ幼葉状体の共培養

[実験方法]

1. 上記 2.1 で調製した 7 日目のゼニゴケ幼葉状体の培養液 25 ml に対し、2.2 で調製したアグロバクテリウム懸濁液を 1 ml 加える (図 2 D)。

2. 終濃度 $100 \mu\text{M}$ となるように、 $25 \mu\text{l}$ のアセトシリンゴンを加える。

3. 130 rpm , 22°C , $50 \sim 60 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の白色光連続照射下で 24~48 時間, 共培養する (図 2 E)。

3.a.2.5 形質転換体の選抜

[実験方法]

1. アグロバクテリウムと共培養したゼニゴケ幼葉状体を、図 1 にあるような道具を用いて、 $50 \mu\text{m}$ 格子ナイ

ロンメッシュ上に回収する (図 2 F)。

2. 約 20 ml の 0M51C 液体培地で 3 回洗う (図 2 G)。

3. ピンセットでゼニゴケ植物体を回収し、約 $100 \mu\text{l}$ の滅菌水を滴下した選抜寒天培地へ移す (図 2 H)。

4. ゼニゴケ幼葉状体を目分量で 3~5 等分し、それぞれ選抜寒天培地へ移す (図 2 I)。

5. ゼニゴケ幼葉状体に 1 mg/ml のセフトキシム溶液を 1 ml 滴下し、ピンセットで選抜寒天培地上に広げる (図 2 J)。

6. クリーンベンチ上で十分に余計な水分を蒸発させる (図 2 K)。

7. 22°C , $50 \sim 60 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の白色光連続照射下で静置培養する。1~2 週間ほどで、仮根の生えた形質転換体が確認できる (図 2 L)。

8. さらに約 2 週間培養すると、杯状体上に無性芽を生ずる個体が出現し始める。無性芽もしくは葉状体の 1 部を新たな選抜寒天培地に植え継ぐ。ゼニゴケの無性芽は 1 細胞由来である^{5,6)} ので、1 無性芽由来の個体を分離すれば、純系が確立できる。

参考文献

- 1) M. Takenaka, S. Yamaoka, T. Hanajiri, Y. Shimizu-Ueda, K. T. Yamato, H. Fukuzawa, & K. Ohyama, *Transgenic Res.* **9** (2000) P.179.
- 2) S. Chiyoda, K. Ishizaki, H. Kataoka, K. T. Yamato, & T. Kohchi, *Plant Cell Rep.* **27** (2008) P.1467.
- 3) A. Kohli, R. M. Twyman, R. Abranches, E. Wegel, E. Stoger, & P. Christou, *Plant Mol. Biol.* **52** (2003) P.247.
- 4) K. Ishizaki, S. Chiyoda, K. T. Yamato, & T. Kohchi, *Plant Cell Physiol.* **49** (2008) P.1084.
- 5) C. R. Barnes, & W. J. G. Land, *Bot. Gaz.* **46** (1908) P. 404.
- 6) S. J. Hughes, *Can. J. Bot.* **49** (1971) P.1319.
- 7) T. Nakagawa, T. Kurose, T. Hino, K. Tanaka, M. Kawamukai, Y. Niwa, K. Toyooka, K. Matsuoka, T. Jinbo, & T. Kimura, *J. Biosci. Bioeng.* **104** (2007) P.34.
- 8) R. Deblaere, B. Bytebier, H. DeGreve, F. Deboeck, J. Schell, M. Van Montagu, & J. Leemans, *Nucleic Acids Res.* **13** (1985) P.4777.