



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	核ゲノム
Author(s)	長尾, 一生; 山本, 義治; 小保方, 潤一
Description	5章 形質転換 6. タバコ形質転換 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, 617-621
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39203
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-087.pdf



6. タバコ形質転換

a. 核ゲノム

長尾 一生¹⁾, 山本 義治²⁾, 小保方潤一^{2,3)}

ここではアグロバクテリウムを用いたタバコの核ゲノムの形質転換について紹介する。タバコは葉緑体の形質転換も可能な数少ない植物であり、また大きく育つので生化学実験にも適している。無傷葉緑体も簡単に調製出来る。

Agrobacterium-mediated tobacco nuclear transformation

Issei Nagao, Yoshiharu Y Yamamoto, Junichi Obokata

Tobacco is a model plant that can be used for both nuclear and chloroplast transformation. In this chapter, we introduce well established methods for *Agrobacterium*-mediated transformation of the tobacco nucleus. The protocol includes introduction of a binary vector into *Agrobacterium*, inoculation of tobacco leaf disks with *Agrobacterium*, and selection and regeneration of transformed tobacco.

6.a.1 試薬の調製

6.a.1.1 ストック

1. 抗生物質など

Chloramphenicol 25 mg/ml になるようにエタノールに溶解, -20°Cで保存.

Claforan 医療用の無菌粉末を 100 mg/ml になるように滅菌水に溶解し, -20°Cで保存.

Gentamycin 100 mg/ml になるように蒸留水に溶解し, フィルター濾過により滅菌, -20°Cで保存.

Hygromycin 25 mg/ml になるように蒸留水に溶解し, フィルター濾過により滅菌, -20°Cで保存.

Kanamycin 100 mg/ml になるように蒸留水に溶解し, フィルター濾過により滅菌, -20°Cで保存.

Phosphinothricin (glufosinate, biaraphos, BASTA の有効成分) 10 mg/ml になるように蒸留水に溶解し, フィルター濾過により滅菌, -20°Cで保存.

Rifampicin 25 mg/ml になるようにメタノールに溶解し -20°Cで保存.

Spectinomycin/streptomycin 100 mg/ml になるように蒸留水に溶解し, フィルター濾過により滅菌, -20°Cで保存.

2. 植物ホルモン

BAP (benzyl aminopurine) 1.0 mg/ml になるように 70%エタノールに溶解, -20°C保存.

IAA (indole acetic acids) 1.0 mg/ml になるように 70%エタノールに溶解, -20°C保存. 安定性がやや低いので半年ごとにストックを作り直す.

6.a.1.2 培地

1. MS (Murashige & Skoog) 培地

無機塩類ミックス及び 1,000 倍ビタミンミックスが和光純薬等から市販されているのでそれらを用いる. 必要ならショ糖も加える (1~5%). 溶解後 1 N KOH を用いて pH 5.6 に合わせる. 用途に応じて寒天 (0.8%) を加え攪拌してからオートクレーブする. 用いる寒天は INA AGAR GA-10, 30 (伊那食品工業, フナコシから入手可), Bacto-Agar (Difco) などがある. オートクレーブ後熱いうちに攪拌し寒天を完全に溶解させる. 抗生物質や植物ホルモンはオートクレーブ後 60-70°C に冷ましてから加える. 培養に用いる容器類はとりわけ丁寧に蒸留水ですすぎ, 洗剤等の混入を避ける. 培養専用にして洗剤では洗わないことにしておくのもよい.

2. YEB 培地

アグロバクテリウム用の液体もしくは寒天 (Bacto-Agar 1.2%) 培地. 1 l 当たり Bacto-Peptone (Difco) 5 g, Beef Extract (Difco) 5 g, Bacto-Yeast Extract (Difco) 1 g, ショ糖 5 g, 2 mM MgSO₄, 1 N NaOH で pH 7.2 に合わせてオートクレーブ.

1) 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・次世代ポストゲノム研究棟・細胞機能科学

2) 名古屋大学遺伝子実験施設・遺伝子解析分野

3) 京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・植物ゲノム情報学

6.a.1.3 培養容器

1. 深底シャーレ

高さ 2 cm 程度のもの。カルス培養に用いる。ガス滅菌よりは γ 線滅菌されたものを選ぶとよい。テルモや Bio-bik などから入手可。

2. マジェンタ容器 (GA-7, Sigma)

高さ 10 cm のオートクレーブ可能なプラスチック容器。シュートや幼植物の培養に用いる。

6.a.2 アグロバクテリウムへのプラスミド導入

アグロバクテリウムは双子葉植物に感染する土壤細菌でありバクテリアが持つ Ti プラスミドや Ri プラスミド上の T-DNA 領域が植物の染色体 DNA に組み込まれる^{1,2)}。この性質を利用して外来遺伝子を植物体に導入する方法が考案された³⁾。ここではまず、一般的に用いられているバイナリーベクター系⁴⁾を用いた実験について解説する。外来遺伝子導入、植物での過剰発現、人工的に作成した RNAi を用いた遺伝子発現抑制、レポーター遺伝子導入等の目的のために多数のバイナリーベクターが作成されているが、その一部を表 1 に紹介した。

本章では pBI101⁵⁾ を例にして方法を紹介する。このベクターはバクテリア及び植物で作用するマーカー遺伝子として共にカナマイシン抵抗性遺伝子を含むので、下記のプロトコルではアグロバクテリウム及びタバコの選抜はカナマイシンで行っている。他のベクターを用いる場合は選抜マーカーに合わせて抗生物質を変える必要がある。アグロバクテリウムと植物の選抜マーカーは通常別の遺伝子が担っているので、用いる抗生物質等も異なるのが普通である。リーフディスクの培養時にクラフォランを加えるのはアグロバクテリウムを除くためであ

り、異なるベクターであっても変える必要は無い。

バイナリー法で用いることの出来るアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) はいくつかあるが、LBA 4404 株⁶⁾ がタバコ界では一般的である。LBA 4404 の選抜マーカーはリファンピシン (50 μ g/ml) である。

6.a.2.1 アグロバクテリウムへのベクター導入 (2～3 日)

バイナリーベクターは大腸菌とアグロバクテリウムの両方で複製可能である。以下に大腸菌から調製したベクターをエレクトロポレーションを用いてアグロバクテリウムに導入する方法を説明する。

6.a.2.1.1 エレクトロポレーション用コンピテントセルの調製 (1 日)

- 1) アグロバクテリウムのコンピテントセルを調製する。300 ml の YEB 培地に植菌し、OD₆₀₀ が 0.5～0.6 になるまで (5 時間程度) 28°C で震盪培養する。
- 2) 6000 rpm, 5 分間, 4°C で遠心して上清を除き、氷冷した 10% グリセロールで 3 回程度洗浄する。
- 3) 100～200 μ L の 10% グリセロールに懸濁して 50 μ l ずつ分注して液体窒素中で凍結させる。－80°C で保存する。

6.a.2.1.2 エレクトロポレーション法によるアグロバクテリウムの形質転換 (2～3 日)

1. 融解したコンピテントセル 50 μ l にベクターを 50～100 ng 入れ、エレクトロポレーション用キュベット (電極間の幅 1.0 mm) に移す。キュベットは使用時まで氷冷しておく。
2. BioRad 社のエレクトロポレーター (GenePulser) を用いる。抵抗値 200 Ω , 電気容量 25 μ F, 電圧 1.7 kV で電気パルスをかける (放電時間は 13 msec 程度になる)。用いるキュベットが 1.0 mm 幅ではなく 2.0 mm 幅の場合は電圧は 2.5 kV にする。放電後すぐに 1 ml

表 1: 主なバイナリーベクター

ベクター名	大腸菌／アグロバクテリウム選抜マーカー	植物選抜マーカー	大腸菌・アグロバクテリウムでのコピー数	メモ	入手先情報など
pBI ⁵⁾	Kan	Kan	低	GUS レポーター	TAIR/ABRC, http://www.arabidopsis.org/
pPZP ⁸⁾ , pPZPY ⁹⁾	Cap, Strep/ Spec	Kan, Gent	高	マーカーのすべての組合せあり。pPZPY は植物での高発現カセット。	pPZP: Dr. Pal Maliga, Rutgers University, maliga@mbcl.rutgers.edu pPZPY: http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~obokata-g/yyy/plasmid.html
pGREEN ¹⁰⁾	Kan	Kan, Hyg, Bar, Sul	高	各種レポーターとの組合せあり	http://www.pgreen.ac.uk/

選抜マーカー (耐性が付与される抗生物質) 略称 Bar: biaraphos/phosphinothricin, Cap: chloramphenicol, Gent: Gentamycin, Hyg: hygromycin, Kan: kanamycin, Spec: spectinomycin, Step: streptomycin, Sul: sulphonamide.他にも多数ベクターが開発されている¹¹⁾。

の YEB 培地を加えて懸濁し、試験管に移して 28°C で 1～2 時間震盪培養する。

3. 培養液の全量と 1/100 量をそれぞれカナマイシン (25 $\mu\text{g/ml}$)、リファンピシン (LBA 4404 の場合、濃度は 50 $\mu\text{g/ml}$) を含む YEB 寒天培地にスプレッダーで広げて、28°C で 2～3 日間静置培養すると、コロニーが現れる。

6.a.2.2 アグロバクテリウムに導入されたベクターの確認 (2～3 日)

導入したプラスミドは稀に組み換えを起こし思いがけない構造になっている場合があるため、アグロバクテリウムからプラスミドを抽出し制限酵素パターンの確認を行う。コンストラクトあたり 3 クローン程度見ておく。もし問題が起きたクローンを用いて実験を進めてしまった場合、その発見は非常に遅れることが予想されるので、ここで確認しておいた方が安心である。

アグロバクテリウムからは大腸菌で行われるアルカリ法とほぼ同様の方法でプラスミドを精製出来るが、ゲノムの混入や精製度を向上させるために以下の改変法を用いる⁷⁾。シリカレジンをを用いた大腸菌用プラスミド精製キット (Wizard Minipreps DNA Purification System, Promega など) を用いてもよい。その場合はキットの説明書に従ってプラスミドを精製する。

1. カナマイシン (25 $\mu\text{g/ml}$) を含む 2 mL の YEB 培地で 28°C、1～2 日間培養する。一部をプラスミド精製用に用い、一部をグリセロールと混合して -80°C で保存する。
2. 10000 rpm、3 分間、4°C で遠心し、上清を除く。
3. リゾチーム (4 mg/ml) を含む TEG (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM glucose) で十分に懸濁し、室温で 10～30 分間静置する。
4. 0.2 ml のアルカリ液 (1% SDS, 0.2 N NaOH) を加えて転倒混和し、10 分間室温で静置する。
5. 二倍量のアルカリ液で飽和させた 30 μl のフェノール溶液を加え、転倒混和して十分に混合する。
6. 150 μl の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8) を加えて転倒混和し、15 分間、-20°C で冷やす。
7. 15000 rpm、15 分間、4°C で遠心し、上清を新しいチューブに移す。
8. イソプロパノールを加えて遠心し、上清を捨てる。
9. 100 μl の TE に溶解して LiCl 沈殿を行い、高分子の RNA を除く。
10. エタノール沈殿を行って 100 μl の TE に溶解する。
11. RNaseA (50 $\mu\text{g/ml}$) を加えて 30 分間室温で静置する。

12. フェノールクロロホルム抽出を 2 回行う。

13. エタノール沈殿を行い、20～50 μl の 0.1 x TE に溶解する。

14. 制限酵素で切断して目的のプラスミドが導入されたか確認する。

プラスミドに問題がないことを確認したクローンを用いて、植物体への感染を行う。

6.a.3 植物へのアグロバクテリウムの感染、形質転換細胞の選抜と個体再生

ここで紹介するリーフディスク法と呼ばれるタバコの形質転換法は、簡便で導入される遺伝子のコピー数も少なく、優れた方法として行われてきた。植物体の葉を 1 cm 角に切ってアグロバクテリウムを感染させ、組み換え体の選抜、カルス誘導を行い、その後植物ホルモンの量を調整して植物体を再生させる。これらの操作は無菌的に行うため、無菌的に生育させたタバコを用意して実験を行う。

6.a.3.1 感染に用いる植物体の準備 (2 週間程度)

無菌的に植物を育成するため、まず種子の滅菌を行い、MS 寒天培地に播種し発芽させる。その後、マジェンタ容器に移し 10 cm 程度まで育成し、葉を感染に用いる。タバコの培養は 25°C、明期 16 h/暗期 8 h で行う。

1. 種子を 100～200 粒程度マイクロチューブに入れる。
2. エタノールを 1 ml 入れ、5 分間ボルテックスし、軽く遠心して種子を落とし、エタノールを除く。これを 2 回行う。
3. 次亜塩素酸滅菌溶液 (1.5% 次亜塩素酸, 0.02% Triton-X100) を 1 ml 加え、15 分間ボルテックスにかける。
4. 遠心して種子を落とし、上清を除く。
5. 滅菌水で 3 回程度洗浄する。
6. 100 μl 程度の滅菌水を加え、熱したメスで先を切ったブルーチップを用いて一粒ずつ、MS 寒天培地に播種する。
7. パラフィルム (もしくはサージカルテープ、住友 3 M) を巻いて 1 週間程度生育させる。
8. ある程度、芽が育ってきたら、培地の入ったマジェンタ容器に移植し、本葉が展開するまで生育させ感染実験に用いる。育ちすぎて培養コンテナが窮屈になってきたら、茎と葉一枚を含むようにメスで切り取り、茎を新しい培地に挿すと、枝の付け根のところから茎頂点が、培地に挿した茎からは根が発達してくる。

[培養メモ]

褐変した組織片があるとシャーレ全体に調子が悪くなることがあるので、具合の悪そうな組織片が現れたシャーレからはすみやかに元気な組織片だけを新しい培地に移すとよい。

6.a.3.2 植物体への感染と形質転換カルスの選抜、個体再生（3週間～）

無菌的に生育させたタバコの葉をメスを用いて四角く切りアグロバクテリウムを感染させる。感染させたリーフディスクは、抗生物質と植物ホルモンを含むMS培地で芽が出るまで培養する。芽が出てきたら、適宜植え継ぎながら植物体の再生を行う。この操作は、カビや雑菌が混入しやすいので十分に注意して行う。

1. 目的のベクターを保持したアグロバクテリウムを抗生物質を含む3mlのYEB培地で28°C、24時間程度培養する。5000 rpm、5分間、室温で遠心して集菌し、抗生物質を含まないYEB培地に懸濁して感染に用いる。
2. 無菌的に生育させた植物体を角シャーレ上でメスを用いて1cm角程度に刻み、乾燥しない様に液体のMS培地に浮かべる（葉の裏側を上にする）。主脈は除く様にする。感染させるアグロバクテリウムのクローンに対して20枚程度用意する。
3. 10cmシャーレに葉の裏を上にして置き、菌液を注いで葉になじませる様にして数分静置する。
4. 滅菌したティッシュの上に葉片を置いて余分な菌液を除き、10cmシャーレのMS寒天培地に葉片の裏側を上にして置く。この時、寒天を崩す様にして葉が乾かない様に埋めるように置くと良い。
5. シャーレをパラフィルムでシールし、培養する。無菌的に培養したタバコと言ってもカビの孢子等が付着していることもあるので、数枚のシャーレに分けて操作する方が無難である。
6. 36～48時間後、リーフディスクをMS液体培地に浸して軽く洗浄し、過剰のアグロバクテリウムを除く。これを2回行う。
7. 滅菌したティッシュで余分な水分を除き、抗生物質と植物ホルモン（クラフォラン 500 $\mu\text{g/ml}$, BAP 1 $\mu\text{g/ml}$, IAA 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ）を含むMS寒天培地に移して培養する。
8. 4～5日後、クラフォラン 400 $\mu\text{g/ml}$, カナマイシン 100 $\mu\text{g/ml}$, BAP 1 $\mu\text{g/ml}$, IAA 0.1 $\mu\text{g/ml}$ を含むMS寒天培地に移して培養する。
9. 1～2週間程度培養すると芽が出て来るので、芽が出ている部分を切り離し、クラフォラン 300 $\mu\text{g/ml}$, カ

ナマイシン 100 $\mu\text{g/ml}$ （植物ホルモン無し）を含むMS寒天培地に移して培養する。芽が出ていないリーフディスクは、クラフォラン 300 $\mu\text{g/ml}$, カナマイシン 100 $\mu\text{g/ml}$, BAP 1 $\mu\text{g/ml}$, IAA 0.1 $\mu\text{g/ml}$ を含むMS寒天培地で培養する。また、1週間程度の培養で培地が黄ばんで来る事があるが、その場合は新しい培地に植継ぐ。リーフディスク一枚から1個体だけを選ぶと、確実に独立した形質転換体が得られる。その場合リーフディスク20枚からは最大20の形質転換個体を得られる。

10. 芽が大きくなり発根してきたら、MS寒天培地（クラフォラン 100 $\mu\text{g/ml}$, カナマイシン 100 $\mu\text{g/ml}$ ）の入ったマジェンタ容器に移し、10cm程度まで生育させる。

[操作メモ]

- ・カルスから再生した形質転換体は希にキメラである場合がある。
- ・カルス化・再生の際に希に倍数化してしまう場合がある。細胞が大きいものはその可能性が高い。孔辺細胞に含まれる葉緑体数を数え、野生型個体の倍程度あれば倍数化している。

6.a.3.3 鉢上げ

10cm程度に育った植物はプラスチックボックスから取り出し、根に付着している寒天培地を水道水で丁寧に洗浄し（根を傷つけないように）、鉢上げをし、隔離温室で生育させ種子を得る。

1. 組織を採取した後の植物体は、プラスチックボックスから丁寧に培地ごとに取り出し、主な寒天培地を軽く手で取り除いた後、水道水をかけながら根を傷つけない様に優しく洗い流す。培地が多く残るとカビや雑菌が生えてしまう。
2. 鉢は4号を用いる。底に割れた鉢の破片等で穴を塞ぎ、メトロミックス、パーミキュライトの順に等量入れ、たっぷりと水を注いでおく。用意した鉢に指で穴を開けておき、寒天培地を洗い流した植物体を深めに埋める。プラスチックボックスで培養してきた植物体は乾燥に弱いので、最初はビニール袋を被せておく。1週間程度経ったら、ビニール袋の角の部分ハサミでカットし、さらに数日経ったら、袋の底を抜く様にして乾燥に慣らしていく。植物が元気に育っていたら、ビニール取り外して生育させる。乾燥して萎れているようなら、再度ビニール袋を被せる等しておく。
3. 植物が成長して蕾を付けてきたら、紙袋等を被せて自家受粉させる。導入した遺伝子が1遺伝子座なら、得られた種子をカナマイシンを含む培地に播種する

と、メンデルの法則に従って白色のカナマイシン感受性の個体が4分の1現れる。

4. 形質転換世代 (T_1) もしくは次世代 (T_2) の組織を用いてサザンハイブリダイゼーションやPCRにより導入遺伝子の確認を行う。

6.a.4 最後に

以上タバコを用いて形質転換を行う方法の概略を述べた。植物の培養は期間が長いためにカビ等の混入の影響を大きく受ける。従って操作や生育環境には十分注意して行う必要があるが、同時にある程度ダメになることを見越して材料等は余分に用意する。植物培養操作の習熟は必要になるが、形質転換に関してはそれほど難しい操作は無いため、慣れれば必ず出来る。

参考文献

- 1) M. F. Thomashow, R. Nutter, A. L. Montoya, M. P. Gordon, & E. W. Nester, *Cell* **19** (1980) P.729.
- 2) M. F. Thomashow, R. Nutter, K. Postle, M. D. Chilton, F. R. Blattner, A. Powell, M. P. Gordon, & E. W. Nester, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) P.6448.
- 3) K. A. Barton, A. N. Binns, A. J. Matzke, & M. D. Chilton, *Cell* **32** (1983) P.1033.
- 4) M. Bevan, *Nucleic Acids Res.* **12** (1984) P.8711.
- 5) R. A. Jefferson, T. A. Kavanagh, & M. W. Bevan, *EMBO J.* **6** (1987) P.3901.
- 6) A. Hoekema, P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykaas, & R. A. Schilperoort, *Nature* **303** (1983) P.179.
- 7) C. R. Walkerpeach, & J. Velten, *Plant Molecular Biology Manual*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1994, pB1: 1.
- 8) P. Hajdukiewicz, Z. Svab, & P. Maliga, *Plant Mol. Biol.* **25** (1994) P.989.
- 9) Y. Y. Yamamoto, M. Matsui M, L.-H. Ang, & X.-W. Deng, *Plant Cell* **10** (1998) P.1083.
- 10) R. P. Hellens, E. A. Edwards, N. R. Leyland, S. Bean, & P. M. Mullineaux, *Plant Mol. Biol.* **42** (2000) P.819.
- 11) R. Hellens, P. Mullineaux, & H. Klee, *Trends Plant Sci.* **5** (2000) P.446.