

平成 29 年 2 月 23 日

報道関係者各位

国立大学法人 筑波大学

高効率植物形質転換が可能に ～新規アグロバクテリウムの分子育種に成功～

研究成果のポイント

1. 植物への形質転換効率向上を目指し、新規のアグロバクテリウム菌株の分子育種に成功しました。
2. アグロバクテリウムを介した植物への T-DNA 遺伝子導入を抑制する物質の一つが、非タンパク質構成アミノ酸 (GABA) であることを明らかにしました。
3. GABA を分解する能力を付与した新規のアグロバクテリウム菌株を構築し、実験トマト品種 'Micro-Tom' で 2.5 倍の形質転換効率を達成し、従来の形質転換法との比較で労力の 60%削減に成功しました。
4. 本研究で開発されたアグロバクテリウム菌株は、形質転換が難しいとされている食用中玉トマト品種 'Moneymaker' 及び高バイオマス生産植物であるエリアンサスへの遺伝子導入効率を向上させることに成功しています。今後、幅広い植物種での形質転換効率の向上が期待されます。

国立大学法人筑波大学生命環境系の江面浩教授・野中聡子助教のグループは、植物への形質転換効率向上を目指し、新規のアグロバクテリウム菌株の分子育種に成功しました。

植物形質転換は一般にアグロバクテリウムを用いて行われています。イネやタバコ、アラビドプシスなど実験植物種においては高効率安定的な系があるものの、その他の植物種では、品種や系統により形質転換が難しいものも多く存在し、高効率で安定的な形質転換系の開発が求められています。

アグロバクテリウムを用いた植物形質転換は、1. 植物細胞への遺伝子の導入、2. 遺伝子が導入された細胞の選抜、3. 遺伝子が導入された細胞の再分化というステップを経て起こります。本研究グループは、最初のステップの遺伝子導入が、どの植物種においても共通するものであり、この効率化が幅広い植物種への形質転換を促進すると考えました。そこで、形質転換の最初のステップの効率化の鍵であるアグロバクテリウムの開発に取り組みました。本研究で分子育種された新規アグロバクテリウムは、実験トマト品種 'Micro-Tom' だけでなく、形質転換が難しいとされる食用中玉品種トマト 'Moneymaker' および高バイオマス生産植物であるエリアンサスにおいても遺伝子導入の効率化に成功しており、今後、幅広い植物種において形質転換を向上させることが期待できます。

* 本研究成果は、2017 年 2 月 21 日付けで、英国のオンライン科学誌「Scientific Reports」で

公開されました。

* 本研究は科研費若手(B) 「高効率遺伝子導入のための次世代スーパーアグロバクテリウムの分子育種」24780001、および「新エネルギー技術研究開発／バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発(先導技術開発)／エネルギー植物の形質転換技術及び組換え植物栽培施設での栽培技術の研究開発」(新エネルギー・産業技術総合開発機構)の支援のもと実施されました。

研究の背景

アグロバクテリウム^{注1)}を用いた植物の形質転換^{注2)}は、直接導入法のように特別な機器類を必要とせず手軽に利用できるため、広く用いられています。モデル植物においては高効率安定的な形質転換系があるものの、その他実用植物においては品種や系統により形質転換効率の低いものも多数あり、実用植物種でも高効率で安定した形質転換系の構築が求められています。アグロバクテリウムを介した形質転換は、遺伝子導入、遺伝子導入細胞の選抜、遺伝子導入細胞の再分化の過程を経て起こります。最初の過程である遺伝子導入は実用植物種すべての種で共通するものであり、この改良は、多くの植物種への形質転換効率の向上に貢献することが期待できます。実際に、形質転換が難しいとされてきたインディカイネやキュウリなどでの遺伝子導入の改良により、形質転換効率が向上した例が報告されています。

本研究グループの以前の研究では、アグロバクテリウムによる遺伝子導入時に、植物から発生するエチレンを抑制する能力を付与したアグロバクテリウムを開発し、ウリ科の形質転換効率の向上に成功しています。これまでの研究から、エチレンの他にも γ -アミノ酪酸(GABA)などが植物-アグロバクテリウム間の相互作用において阻害的に働くことが知られています。GABAは、非タンパク質構成アミノ酸であり、ナス科、イネ科などの植物に広く分布しているため、本研究ではGABAに着目しました。GABAは、植物病原菌の感染などのストレスとともに生合成が促進されることが知られています。実際に植物-アグロバクテリウム間相互作用においても、根頭癌腫病を抑制する物質として知られています。しかしながら、根頭癌腫病を引き起こすT-DNA 遺伝子導入^{注3)}へのGABAの関与は明らかにされていませんでした。そこで、本研究においては、GABA 低蓄積系統の実験品種トマト 'Micro-Tom' を用いて GABA が T-DNA 遺伝子導入を抑制することを明らかにしました。次に GABA 分解能を付与するアグロバクテリウムを分子育種し、導入効率及び形質転換効率を評価しました(図1)。

研究内容と成果

本研究において、まずアグロバクテリウムの感染により GABA が蓄積することを示しました。次に、GABA が遺伝子導入を阻害することを GABA 低蓄積系統の実験トマト品種 'Micro-Tom' (Takayama *et al.*、2015) を用いて明らかにしました。対照区と比較して、GABA 低蓄積トマトでは遺伝子導入が向上したことから、GABA が遺伝子導入を阻害していることが明らかになりました。これらの結果は、アグロバクテリウムの感染により植物内で蓄積した GABA が T-DNA 遺伝子導入を阻害していることを示します。この結果を受けて、アグロバクテリウムの感染時に植物に蓄積する GABA の除去が効果的であると考えられました。アグロバクテリウムには GABA 分解酵素と類似性の高い遺伝子があることが知られていましたが、GABA 分解活性があることは報告されていませんでした。そこ

で、大腸菌から GABA 分解酵素遺伝子(*gabT*)を単離し、アグロバクテリウムへ導入しました。*gabT* 遺伝子は、アグロバクテリウム細胞内で恒常的に遺伝子発現を誘導する *lac* 遺伝子のプロモーターを用いて発現を制御しました。*gabT* 遺伝子を導入しないアグロバクテリウムにおいては、GABA 分解活性が観察されなかったものの、*gabT* 遺伝子を導入したアグロバクテリウムにおいては、GABA の分解活性が観察されました。この GABA 分解能を付与したアグロバクテリウムは、実験トマト品種 ‘Micro-Tom’ への遺伝子導入及び形質転換効率を 2.5 倍向上させ、従来の形質転換法と比較し労力を 60%削減することに成功しました。さらに、食用中玉トマト品種 ‘MoneyMaker’、高バイオマス生産植物エリアンサスにおいても遺伝子導入効率の向上に成功しました (図 2)。

今後の展開

本研究で開発したアグロバクテリウムは、アグロバクテリウム感染時に植物に蓄積する GABA を分解し、遺伝子導入効率を向上させました。また、以前の研究では、遺伝子導入時に植物から発生するエチレンを抑制するアグロバクテリウムの作出を行いました。これらのアグロバクテリウムは、多くの実用品種を含むウリ科植物、ブラシ科植物、ナス科植物などで効果があることが示されています。今後は、共同研究などを通して、より多くの実用作物や多様な実験植物への適用を進めていきたと考えています。

参考図

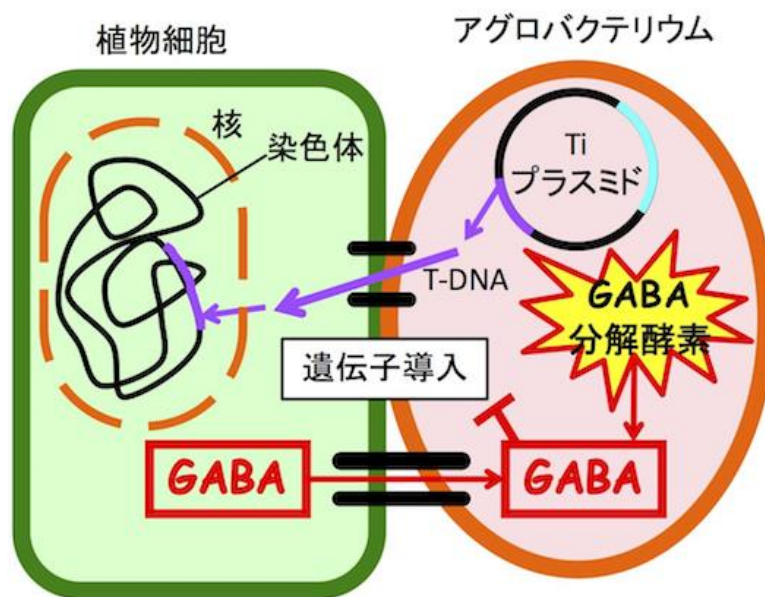


図 1 本研究の戦略

γ-アミノ酪酸(GABA)がアグロバクテリウムに取り込まれ、遺伝子導入を阻害します。本研究では、アグロバクテリウムへ GABA 分解能を付与し、遺伝子導入効率を向上させ、形質転換の効率化を図ります。

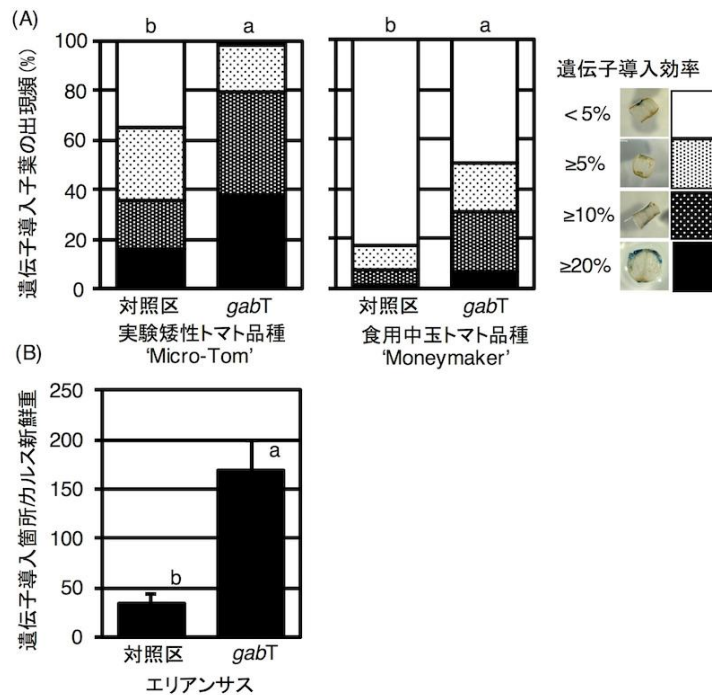


図 2 γ -アミノ酪酸(GABA)分解能付与の遺伝子導入効率への効果。

(A) 2つのトマト品種への遺伝子導入効果。GABA分解能を付与したアグロバクテリウムの感染区(*gabT*)は対照区と比較して、トマト子葉片への遺伝子導入効率を高めました。(B)高バイオマス生産植物エリアンサスへの遺伝子導入効果。GABA分解能を付与したアグロバクテリウムの感染区(*gabT*)は対照区と比較して、エリアンサスへの遺伝子導入率を高めました。

用語解説

注1) アグロバクテリウム：

アグロバクテリウムは土壌細菌であり、*Agrobacterium tumefaciens*、*A. rhizogenes*、*A. vitis*などがあります。中でも*A. tumefaciens*は、根頭癌腫病を引き起こす土壌細菌として知られています。この細菌の無病化されたものが植物形質転換に利用されています。本稿でのアグロバクテリウムとは、*A. tumefaciens*を示します。

注2) 植物形質転換：

交配不可能な遺伝資源プールからも遺伝子を人為的に植物細胞ゲノムに組み込み、遺伝形質を植物細胞に導入する技術です。遺伝子組換え作物などは、この技術を用いて作成されており、除草剤耐性作物、病害虫抵抗性作物など有用形質を持つ様々な作物が開発されています。形質転換法には、パーティクルガンやエレクトロポレーションなどを用いた物理的導入法と土壌細菌であるアグロバクテリウムを用いた間接導入法があります。物理的導入法は特別な装置などが必要であることから、アグロバクテリウム法の方が手軽に試みることができます。幅広い植物種への適応のために現在も様々な工夫がされています。

注3) T-DNA 遺伝子導入：

アグロバクテリウムは、染色体の他にTiプラスミドという巨大なプラスミドを持っています。こ

のプラスミド上には T-DNA (Transfer-DNA) 領域と *vir* 領域を含みます。この *vir* 領域にコードされているタンパク質群の働きにより、T-DNA 領域はアグロバクテリウム細胞から植物細胞に移行します。このことを T-DNA 遺伝子導入といいます。T-DNA 領域には、サイトカイニン、オーキシンなどの植物ホルモンとアグロバクテリウムの養分であるオパインの合成酵素などがコードされています。T-DNA 領域が植物ゲノムへ組込まれると、これらの遺伝子が発現し、アグロバクテリウムの生存に有利な環境を築くことで根頭癌腫病が誘発されます。Ti プラスミドの T-DNA 領域を破壊して無病化したアグロバクテリウム菌株を使用し、植物へ形質転換したい目的の遺伝子を破壊した T-DNA 領域の代わりに乗せて使用することが可能です。

このような、アグロバクテリウムという細菌自身が持つ DNA を植物細胞へ組み込む能力を利用した形質転換方法がアグロバクテリウム法です。

掲載論文

【論文題名】 An *Agrobacterium tumefaciens* strain with gamma-aminobutyric acid transaminase activity shows an enhanced genetic transformation ability in plants.

アグロバクテリウムへの γ -アミノ酪酸活性付与は、植物への形質転換効率を促進する

【著者名】 Nonaka, S., Someya, T., Zhou, S., Takayama, M., Nakamura, K. and Ezura, H.

野中聡子、染谷龍彦、周莎、高山真理子、中村幸治、江面浩

【掲載誌】 Scientific Reports

doi:10.1038/srep42649

参考論文

Takayama, M., Koike, S., Kusano, M., Matsukura, C., Saito, K., Ariizumi, T. and Ezura, H. (2015) Tomato Glutamate Decarboxylase Gene SIGAD2 and SIGAD3 Play Key Roles in Regulating γ -Aminobutyric Acid Levels in Tomato (*Solanum lycopersicum*) Plant Cell Physiol. 56: 1533-1545.

問合わせ先

江面 浩 (えづら ひろし)

筑波大学 生命環境系／遺伝子実験センター 教授

野中 聡子 (のなか さとこ)

筑波大学 生命環境系／遺伝子実験センター 助教