

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24780001

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Molecular breeding of next generation super-Agrobacterium

## 研究代表者

野中 聡子 (Nonaka, Satoko)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：50580825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：モデル植物以外の植物でも高効率な形質転換系の構築を可能にすることを目的とし、アグロバクテリウムの改良に取り組んだ。アグロバクテリウムの感染時に植物はエチレン、GABAなどを合成し防御応答体制に入る。このため、これらの物質により、形質転換効率が下がると考えられた。本研究ではGABAを分解する酵素単独、エチレンを抑制する酵素、GABA分解酵素の2つをアグロバクテリウムへ付与し、形質転換効率が向上した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the increasing of transformation frequency in non-model plants. To increase the transformation frequency, we attempt to improve the *Agrobacterium tumefaciens*. Plant synthesize the ethylene and GABA during co-cultivation, and these compounds prevent *Agrobacterium* from transforming T-DNA. Therefore in this study, we try to breeding new *Agrobacterium tumefaciens* with the ability to reduce GABA. GABA were degraded by GABA transaminase, however the *Agrobacterium tumefaciens* does not have the enzyme. We isolated the GABA transaminase from *Escherichia coli* and introduce the gene using with plasmid. We produced two types of *Agrobacterium* strains. One was harbouring only GABA transaminase gene, and the other had both *acdS* and *gabT* enzymes. The *acdS* degrade ACC which is precursor of ethylene. Therefore, the strain also reduce ethylene during co-cultivation. These strains are increase the transformation frequency in tomato and erianthus.

研究分野：植物育種

キーワード：アグロバクテリウム transformation GABA GAD

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでに形質転換効率の促進を目指し、形質転換時植物から発生するエチレンを抑制する能力をアグロバクテリウムへ付与した。この結果、形質転換効率がメロン、エグシメロン、トマトなどで向上するスーパーアグロバクテリウムの分子育種に成功した(Nonaka et al., 2008 AEM 74: 2526-2528)。

本研究では、双子葉・単子葉を含めた多様な実用植物への形質転換効率を向上させることと、アグロバクテリウムによる形質転換効率のさらなる向上のために、次世代型スーパーアグロバクテリウムを分子育種する。具体的な戦略は、アグロバクテリウムの感染時に植物が生成し、形質転換を抑制する物質に着目し、1)形質転換を低下する物質の分解能力をアグロバクテリウムへ付与する、2) 形質転換を低下する物質に対するアグロバクテリウムの受容阻害、3) 形質転換を低下する物質の抑制機構の打破である。アグロバクテリウムの感染時に  $\gamma$  アミノ酪酸(GABA)、コハク酸セミアルデヒド(SSA)、サリチル酸(SA)などが植物により生成され、これらが形質転換効率を低下することが報告されている(Wang et al., 2006 Molecular Microbiology 2006 62:45-56, Yuan et al., 2007 PNAS)。これらの物質は広い植物種で生成されており、アグロバクテリウムの感染時に、これらの物質を減少、菌体内への取込みを抑制、作用点を解除する能力をアグロバクテリウムへ付与することは、多様な実用植物への形質転換効率を向上させることができる。

(1)形質転換を低下する物質の分解能力をアグロバクテリウムへ付与する

形質転換抑制物質である  $\gamma$  アミノ酪酸(GABA)、コハク酸セミアルデヒド(SSA)、サリチル酸(SA)分解酵素の活性をアグロバクテリウムへ付与し植物が生産するこれらの物質を減少させ高効率に形質転換するアグロバクテリウムを作出する。具体的には、 $\gamma$  アミノ酪酸分解酵素(GABA-T)、コハク酸セミアルデヒド加水分解酵素(SSADH)、サリチル酸分解酵素(NahG)活性をアグロバクテリウムへ付与する。それぞれ単一の酵素をアグロバクテリウムに付与し、効果を評価した後で、ACCデアミナーゼ、GABA-T、SSADH、NahGの活性をすべて付与する。

(2) 形質転換を低下する物質に対するアグロバクテリウムの受容阻害

アグロバクテリウムが GABA を取り込み、形質転換を抑制することが報告されている。

従って、GABA の取り込みを抑制により形質転換効率の向上が期待できる。アグロバクテリウムの GABA 取り込みに関連して、トランスポーターが単離されているので、(Planamente et al., 2010 JBC 285: 30294-30303)本研究では、GABA トランスポーター遺伝子破壊アグロバクテリウムを作出する。また、サリチル酸トランスポーターは発見されていないので、この探索も同時に行うことも計画している。SA 投与によるアグロバクテリウムの遺伝子発現の変化が報告されているので(Anand et al., 2008 Plant Physiology 146: 703-715)、この情報を利用する。

(3) 形質転換を低下する物質の抑制機構の打破

植物が生成する GABA, SSA, SA の作用点の一つにコーラムセンシングシグナルの抑制がある(Chevrit et al., PNAS 2006 103: 7460-7464, Yuan et al., 2007 PNAS 104: 11790-11795, Wang et al., 2006 Molecular Microbiology 62: 45-56)。コーラムセンシングとは、バクテリアの菌体密度がある一定数になった時、特別に作用する機構で、一般的には毒素を出したり、ある物質の生産のスイッチを ON にしたりする機構であるが、アグロバクテリウムの場合は、Ti プラスミドの複製に関与することが知られている。この Ti プラスミドは、アグロバクテリウムから植物への形質転換に関連する遺伝子をコードするプラスミドであり、この複製は形質転換効率に深く関わっている(Pappas 2008 Plasmid 60: 89-107)。従って、コーラムセンシングが抑制されると、Ti プラスミドは複製されなくなり、形質転換効率も低下する。そこで、本研究では、アグロバクテリウムへ遺伝的改変を加え、コーラムセンシングの抑制を解除することと Ti プラスミドの複製を強化することに取り組む。

(4)アグロバクテリウムへの GABA 分解能、SSA 分解能、SA 分解能の付与

GABA 分解酵素(GABA-T)は大腸菌から単離し、アグロバクテリウムへ遺伝子導入し酵素活性も確認した。研究期間内に形質転換能力の評価を行う。サリチル酸分解酵素(NahG)は、シュドモナスから単離しており、アグロバクテリウムへ付与した。今後は、アグロバクテリウム内の酵素活性を測定と形質転換能力の評価を行う。コハク酸セミアルデヒド加水分解酵素(SSADH)は、遺伝子を単離している。研究期間内に、アグロバクテリウムへ酵素活性付与と形質転換能力を評価

する。

(5)形質転換抑制物質のアグロバクテリウムへの取込み阻害

GABA トランスポーター(*atu2422*)が単離されている (Planamnte et al., JBC 285: 30294-30303)のでこの遺伝子破壊株を作出する。研究期間内には、破壊株の形質転換能力を評価する。また、SA トランスポーターを探索するためにアレイデータを解析し、数種類の候補遺伝子を挙げた。また、植物では SA 受容体が発見されているので、これを参考にアグロバクテリウムの受容体の探索も行う。研究期間内には、それぞれの破壊株を作出する。

(6)コーラムセンシング抑制の解除

コーラムセンシングに関与する遺伝子が *attKLM* として単離されているので、この破壊株を作成し、形質転換能力を評価する。また、*repA* 遺伝子が Ti プラスミドの複製に関与しており、コーラムセンシングの抑制により発現が低下するので、コーラムセンシングが抑制されても恒常的に発現する *lacZ* プロモーターへの改変を試みる。

以上により作出したアグロバクテリウムの形質転換能力を評価する。評価には、ゲノム解読が進んでいるメロンと、工業原料のスクワレンを蓄積するユーホルピア、バイオマス生産植物として有効なギニアグラスを用いる。いずれの植物も申請者は、現在培養系の構築している。

形質転換の効率化を目指し、広い植物種で生産し、かつ形質転換を阻害する物質に着目し、その分解能をアグロバクテリウムに付与し、感受性を変化させる。これまで形質転換の効率を向上するために、植物の DNA 損傷修復、クロマチンリモデリング、細胞修復など植物側の要素に着目した研究が多い。これを技術として応用する場合、あらかじめ植物に遺伝的変異を加えておく必要があり、広い植物種へ適用できる形質転換技術としては利用が難しかった。本研究では、広い植物種へ適用するために、アグロバクテリウムへ遺伝的改変を加える。本研究により多種多様な植物種への形質転換効率が飛躍的に向上するアグロバクテリウムの作出できれば、これまで形質転換系を構築することが難しかった植物で形質転換系を構築することを可能にする。作出したアグロバクテリウムの能力を評価する実証例として、本研究では、ゲノム解読が進み遺伝子機能解析へ研究ステージが移行しつつあるが、有効な形質転換系の無くゲノム解析研究の律速段階にあるメロン、工業原料として有用なスクワレンを蓄積する実用植物のユーホルピア、バイオマス生産で注目を集めているエリアンサスを用いる。

本研究の目的は、有用植物への形質転換効率を向上するものであり、この成功は植物研究の律速を解消し、実用へ向けての研究を加速するものである。

2. 研究の目的

形質転換技術は、ゲノム解読後の遺伝子機能解析や植物の機能強化において重要な技術の一つである。イネやシロイヌナズナ、ミヤコグサなどモデル植物では高効率な形質転換系があり、遺伝子機能解析は加速度的に進んでいる。一方で、有用作物においては、未だ有効な形質転換系が無く、遺伝子機能解析や植物分子育種の律速となっている。この律速を解消するために、有用作物や植物への高効率な形質転換系を構築することを目的とした。申請者はこれまでに遺伝子導入時に植物から発生するエチレンを抑制し遺伝子導入効率を促進するスーパーアグロバクテリウムを作出した。本研究では、形質転換効率のさらなる向上と多様な植物種へ適応を目指し次世代型スーパーアグロバクテリウムを分子育種する。

3. 研究の方法

本研究では、アグロバクテリウムに遺伝的改変を加え、高効率に形質転換するアグロバクテリウムを構築する。その戦略は、1) 形質転換抑制物質分解能のアグロバクテリウムへの付与、2) 形質転換抑制物質のアグロバクテリウムへの取込みの阻害、3) コーラムセンシング抑制の解除を行う。すべての戦略に対し、形質転換能力を評価する。最終的にはいずれかあるいはすべての遺伝的改変を加えたアグロバクテリウムを構築する。形質転換能力の評価には、ゲノム解読が進み、遺伝子機能解析へ研究が移行しつつあるメロンと、スクワレンなど有用な工業原料を生産する植物として知られるユーホルピアを用いる。本研究は、高効率形質転換系を確立するので、これらの形質転換系が確立しておらず、研究が律速状況にある植物研究にブレイクスルーを与える。

4. 研究成果

本研究課題において、イネやシロイヌナズ

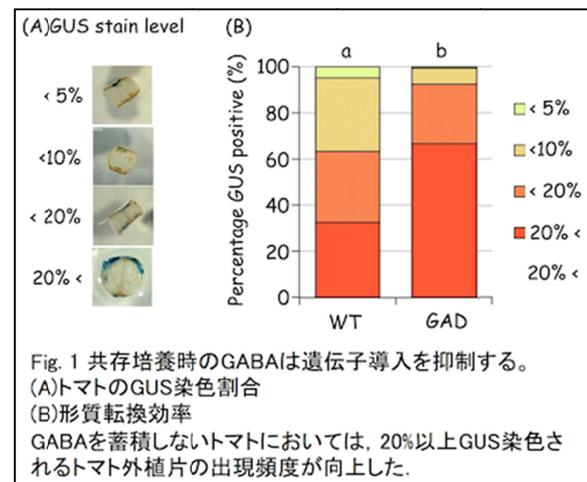


Fig. 1 共存培養時のGABAは遺伝子導入を抑制する。

(A)トマトのGUS染色割合

(B)形質転換効率

GABAを蓄積しないトマトにおいては、20%以上GUS染色されるトマト外植片の出現頻度が向上した。

ナなどモデル植物以外の植物でも高効率な

形質転換系の構築を可能にすることを目的とし、アグロバクテリウムの改良に取り組

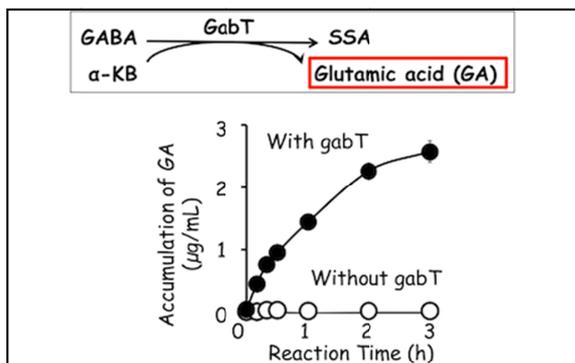


Fig. 2 gabT活性のアグロバクテリウムへの付与  
アグロバクテリウムから粗抽出液を得てGABAを気質として投与し、酵素反応をした。酵素反応後にGABA代謝産物のグルタミン酸量を測定し、GABA活性を評価した。  
●gabT遺伝子を保有するアグロバクテリウム由来の粗抽出液  
○gabT遺伝子を保有しないアグロバクテリウム由来の粗抽出液

んだ。トマト、メロン、ユーホルピア、エリアンサスなどで試したが、再分化系まですでに確立しているのは、トマトであったため、トマトを用いて形質転換効率などへの影響を評価した。エリアンサスについては、再分化系まで確立していないが、カラスへの遺伝子導入系及びその評価方法を確立させることができたので、エリアンサスも用いた。メロンについては、遺伝子導入が促進できたものの、得られた再分化個体はエスケープが多いため、選抜系にも問題があると考えており、現在選抜系を再調整している。ユーホルピアについては、カラスの誘導に成功したので、アグロバクテリウムを感染させたが、遺伝子導入が起こらなかった。今回開発したアグロバクテリウムでは効果がないことが明らかとなった。以下は、トマト、エリアンサスの結果を報告する。先行研究において、アグロバクテリウムの感染時に植物はエチレン、γ-アミノ酪酸(GABA)などを合成しこれらがアグロバクテリウムの感染を阻害することが報告されている。このため、形質転換時にこれらの物質を除去することにより、形質転換効率の向上が期待できた。先行研究において、エチレン前駆物質 ACC を分解する酵素 ACC デアミナーゼ遺伝子をプラスミドでアグロバクテリウムに保持させ、ACCデアミナーゼ活性を付与したところ、共存培養中に植物から発生するエチレンを抑制した結果、メロン、エリアンサスなどで遺伝子導入効率を促進させることに成功した。RNAi 法により GABA 合成酵素(GAD)の発現を抑制し、GABA をほとんど蓄積しないトマトを作出し、これを用いて、形質転換を行ったところ、野生型のトマトと比較し

て形質転換効率が著しく上昇した(Fig. 1)。これは、共存培養時に GABA を除去することが形質転換の向上に有用であることを示す。アグロバクテリウムの全ゲノム配列解読により、アグロバクテリウムは GABA 代謝酵素を持たないことが知られている。そこで、本研究では GABA 代謝酵素の一つである GABA トランスアミラーゼ(gabT)を大腸菌から単離し、アグロバクテリウムヘプラスミドで導入し、gabT 活性をアグロバクテリウムへ付与した (Fig. 2)。GABA 分解酵素単独付与したアグロバクテリウム菌株 (*A. tumefaciens* (gabT))、ACC 分解酵素、GABA 分解酵素の 2 つをアグロバクテリウムへ付与したアグロバクテリウム菌株 (*A. tumefaciens* (acdS, gabT)) を作出し、形質転換効率をそれぞれ評価した (Fig. 3, Fig. 4)。トマトにおいては、共存培養直後のトマト外植片を GUS 染色し、遺伝子導入効率を評価した。画像解析ソフト Image J を用いて外植片あたりの染色率を評価し染色率が 20%以上、10%以上、5%以上、5%以下でクラス分けを行い、それぞれの出現頻度を算

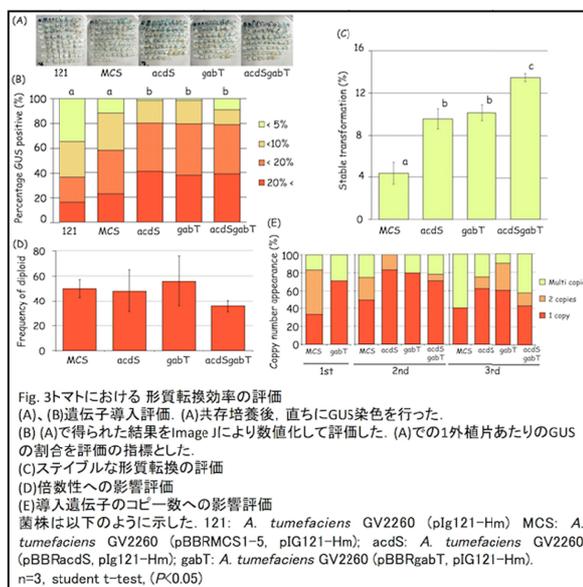


Fig. 3 トマトにおける 形質転換効率の評価  
(A)、(B)遺伝子導入評価。(A)共存培養後、直ちにGUS染色を行った。  
(B) (A)で得られた結果をImage Jにより数値化して評価した。(A)での1外植片あたりのGUSの割合を評価の指標とした。  
(C)ステイブルな形質転換の評価  
(D)倍数性への影響評価  
(E)導入遺伝子のコピー数への影響評価  
菌株は以下のように示した。121: *A. tumefaciens* GV2260 (pIG121-Hm) MCS: *A. tumefaciens* GV2260 (pBBRMCS1-5, pIG121-Hm); acdS: *A. tumefaciens* GV2260 (pBBRacdS, pIG121-Hm); gabT: *A. tumefaciens* GV2260 (pBBRgabT, pIG121-Hm).  
n=3, student t-test, (P<0.05)

出した(Fig. 3(A))。コントロール(121, MCS)と比較して acdS, gabT, acdSgabT では、20%以上、10%以上 GUS 染色されている外植片の出現頻度が向上したことから、アグロバクテリウムへ gabT 活性を付与することにより、遺伝子導入効率を促進することができたことを示す。acdS と gabT を同時に付与した場合(acdSgabT)、遺伝子導入効率は単独付与(gabT)と同程度であった。続いて、ステイブルな形質転換への効果を評価した (Fig. 3(C))。コントロール(MCS)と比較して、gabT 付与アグロバクテリウム(gabT)は、形質転換効率が二倍程度上昇したが、acdS 付

与アグロバクテリウム(acdS)と同等であった。acdS と gabT を同時に付与したアグロバクテリウム菌株は、コントロールと比較して3倍、acdS, gabT 単独付与菌株との比較では、1.4倍効率が向上した(Fig. 3(C))。形質転換の操作を通じて、4倍体など倍化する個体が出現する。倍化は、世代促進や形質評価の障害になるため、形質転換において、倍化した個体は除外する必要がある。したがって、倍化する個体の出現頻度が増えることは、最終的な形質転換効率を抑制することにつながる。そこで、本研究で開発したアグロバクテリウムが倍化した個体の出現頻度へ影響するか評価した(Fig. 3(D))。いずれの処理区においても、得られた形質転換体の2倍体の出現頻度は、同程度であった。このことは、本研究において開発したアグロバクテリウムは、倍数性への影響なく形質転換効率を向上させることができたことを示す。形質転換の際、世代を経て安定的に形質を評価する上で、植物へ導入される遺伝子のコピー数は、重要である。マルチコピーで挿入された場合、世代を促進すると導入した遺伝子が分離し、形質が不安定になるためである。したがって、マルチコピーで遺伝子が挿入された個体は、形質転換体から除外して使用する。したがって、挿入されるコピー数が向上しないことも、形質転換効率を評価する上では重要な要素である。そこで、本研究で開発したアグロバクテリウムの導入コピー数へ与える影響を評価した(Fig. 3(E))。各処理区で得られた形質転換トマトから、ゲノムDNAを抽出し、導入した遺伝子領域のnptII配列をプローブとし、サザンハイブリダイゼーションを行った。検出できたバンドの数から形質転換された遺伝子のコピー数を評価した。コントロールと比較して、1コピーの出現頻度は向上する傾向にあった。本研究により開発したアグロバクテリウムは、ゲノムへ導入するコピー数を増やすことなく形質転換効率を向上させることができた。本研究で開発したアグロバクテリウムが、有用であるか確認するために、形質転換系が確立していないエリアンサスで効果を試した(Fig. 4)。エリアンサスは、バイオマス生産が大きな植物として、近年着目されている。バイオマス生産量のさらなる増産や効率的な利用のために、形質転換系の確立が求められている。エリアンサスカルスを誘導し、アグロバクテリウム感染後共存培養後GUS染色を行い(Fig. 4(A))、遺伝子導入効率を評価した。GUS染色後、

GUSスポット数を数え、カルス1gあたりに出現するGUSスポット数を数え遺伝子導入効率を評価した(Fig. 4(B))。コントロール(MCS)と比較してgabT付与アグロバクテリウムでは、3倍程度遺伝子導入効率が促進した。トマトにおいては、acdSとgabTの効果は同程度であったが、エリアンサスでは、gabTの方が遺伝子導入効率は向上し、acdSの1.8倍向上していた。acdSとgabTを同時に保持させたアグロバクテリウム(acdSgabT)においては、遺伝子導入効率はさらに向上しており、コントロールの5倍、gabT付与の1.5倍向上させた。エリアンサスについては、形質転換系が確立していないので、ステイブルな形質転換への効果を評価することはできていないが、遺伝子導入効率の促進により、ステイブルな形質転換効率が上昇することは、トマトで示した

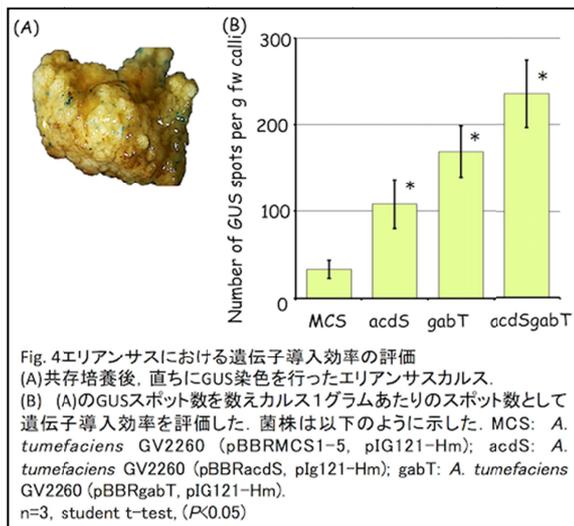


Fig. 4エリアンサスにおける遺伝子導入効率の評価  
(A)共存培養後、直ちにGUS染色を行ったエリアンサスカルス。  
(B) (A)のGUSスポット数を数えカルス1グラムあたりのスポット数として遺伝子導入効率を評価した。菌株は以下のように示した。MCS: *A. tumefaciens* GV2260 (pBBRMCS1-5, pIG121-Hm); acdS: *A. tumefaciens* GV2260 (pBBRacdS, pIG121-Hm); gabT: *A. tumefaciens* GV2260 (pBBRgabT, pIG121-Hm).  
n=3, student t-test, ( $P < 0.05$ )

通りなのでエリアンサスのステイブルな形質転換効率を向上させることも期待できる。当初計画では、1)形質転換抑制物質分解能のアグロバクテリウムへの付与、2)形質転換抑制物質のアグロバクテリウムへの取込みの阻害、3) コーラムセンシング抑制の解除などを計画していたが、1)については、難形質転換植物であるエリアンサスにおいても達成することができた。一方でソルガムには効果が認められず、今回の戦略だけでは十分でないこともわかった。サリチル酸分解酵素付与については、確認していないので、今後は、GABAとは全く独立した系である、SA分解酵素の付与についても検討していきたい。また、引き続き2)及び3)についても行っていきたい。1)のSA分解酵素付与以外の結果については、現在論文に取りまとめている。今回作出したアグロバクテリウムは、エチレンやGABAを多く含む植物でかつ再分化系が確

立している植物であれば，形質転換効率を4倍程度上昇させることができたため，形質転換効率の向上には有効であると考えられるが，かなり限定的なものとなってしまった。形質転換効率を向上させるためには，効率的な選抜方法や再分化系も合わせて構築していく必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Satoko Nonaka, Mariko Takayama, Tatsuhiko Someya, Sha Zhou, Yusuke Takemoto, Hiroshi Ezura *Agrobacterium tumefaciens* with GABA transaminase activity shows enhanced transformation efficiency VIPCA 2014 February 12-14. Vienna (Austria)

Satoko Nonaka, Mariko Takayama, Tatsuhiko Someya, Sha Zhou, Yusuke Takemoto, Hiroshi Ezura. GABA transaminase enhances *Agrobacterium*-mediated transformation Crown gall conference. 2013, November 23-22 Johnston, IA (USA)

Satoko Nonaka, Tatsuhiko Someya, Sha Zhou, Jeong Eun Lee, Kouji Nakamura, Hiroshi Ezura Molecular breeding of *Agrobacterium* for efficient genetic transformation of plant species. VIPCA 2013 February 18-20. Vienna (Austria)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

野中 聡子 (NONAKA, Satoko)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：50580825

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：