

## 第 2 章 カキ形質転換技術の開発

カキ (*Diospyros kaki* Thunb.) は、東アジア原産のカキノキ科カキ属に属する落葉性高木果樹で、我が国で古くから栽培されている主要な果樹の一つである。平成 9 年 (1997 年) 現在、我が国におけるカキの栽培面積は 27,100 ha、果実生産量は 301,200 t で、栽培面積・生産量ともに第 4 位の果樹である (農林水産省農産園芸局果樹花き課, 1998)。北海道南部以南の広い地域で栽培されており、極めて多くの在来品種が存在し、現在に至ってもなお優れた地方品種として栽培が行われているものも多い (傍島, 1983; 山田, 1998)。我が国における本格的なカキの育種は農林水産省果樹試験場で昭和 13 年 (1938 年) に開始されている。早生の品質優良な完全甘ガキ品種の育成を目標に、交雑による育種が行われ、これまでに '駿河'、'伊豆'、'新秋'、'陽豊'、'大秋' などの品種が育成されている。カキは、雌花だけを着生するもの、雌花と雄花を着生するもの、雌花・雄花・両性花を着生するものがある。しかし、主要な甘ガキ栽培品種には雄花を着生するものが少なく、交雑育種を行う際の花粉親が制限されてしまう問題がある。実際、育種の現場では、近親交配によって交雑実生の果実が小さくなるなどの影響が出ている (Yamada, 1993; 山田, 1997a, 1997b; Yamada and Yamane, 1994, 1997)。

カキの育種は、現在、熟期の拡大および果実品質の向上を育種目標として行われているが、緒言で示したように病虫害抵抗性・省力適性などが今後重要な育種目標になってくると考えられる。しかし、このような育種の素材となる遺伝資源の探索は行われておらず、さ

らに交配親の制限といった交雑育種上の制限もあることから、新品種の育成は極めて困難である。形質転換の技術は、このような問題を解決し、今後のカキ育種を進めていく上で極めて重要な手法であると考えられることから、著者はカキの形質転換に関する研究を開始した。

カキの組織培養については京都大学の田尾らによって長年研究が行われており、カキの葉原基からカルスを誘導し、不定芽を形成させ、再生植物体を得る系が確立されている(Tao et al., 1988; Tao and Sugiura, 1992)。しかし、カルスを誘導してから不定芽が形成されるまで長期間の培養が必要であり、品種によっては再分化率が充分ではない等の問題があった。本研究を始めた当初、カキの形質転換法については、田尾らの *Agrobacterium rhizogenes* 野生株を用いた形質転換の成功例があるだけで(Tao et al., 1994)、*A. tumefaciens* による本格的な形質転換法は確立されていない状況にあった。そこで、著者は、カキ種子内胚軸から高頻度で不定芽を再生させる再分化系を確立し、その系を用いて外来遺伝子を導入した形質転換体を効率よく得る方法を開発した。

#### 第1節 種子内胚軸培養による植物体再生条件の検討

アグロバクテリウムによる形質転換法は特別な装置を必要とせず、最も簡便に遺伝子導入を行うことが可能な方法で、果樹類では多くの成功例が報告されている。この方法を用いるためには、効率の高い不定芽の再分化系が不可欠であるため、まず初めに、カキの

植物体再分化のための培養条件を検討した。ついで、効率よく形質転換体を選抜するために必要なカナマイシン濃度を決定するため、非形質転換体の不定芽形成が阻害されるカナマイシン濃度を調査した。また、形質転換後、植物体に残存しているアグロバクテリウムを除去するために抗生物質を用いるが、その抗生物質の不定芽形成に与える影響についても調査した。

## 材料および方法

### 1. 植物材料

カキ「西条」の成熟種子内の胚軸を材料として用いた。種子は、果実収穫後、果肉を取り除いて水洗し、殺菌剤のベンレート粉末を塗布して4℃で保存した。種子を随時0.1%のTween 20を添加した有効塩素濃度2%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に20分間浸漬して表面殺菌した。さらに、滅菌蒸留水で2回洗浄した後、無菌的に胚を摘出した。摘出した胚は70%エタノールに数秒間浸漬し、再度滅菌蒸留水で洗浄した。この胚の子葉部、幼芽を取り除き、胚軸と幼根部分のみとしたもの(以後、便宜的に「胚軸」と略す)を材料として用いた。

### 2. 不定芽再分化のためのホルモン条件の検討

調整した胚軸を窒素成分のみを1/2としたMS培地(1/2NMS, Tao et al., 1988; Tao and Sugiura 1992)に置床した。培地には0.8%(wt/vol)寒天、3%(wt/vol)シュクロースを加え、さらに、植物ホルモンとしてN-(2-クロロ、4-ピリジル)-N'-フェニルウレア(2-Cl-4-PU)、ゼアチン、

ベンジルアミノプリン (BA) の 3 種類のサイトカイニンを各々 0.2、2、5、10 mg/l の濃度で用いた。培養は 26 °C、16 時間日長の光条件下で行った。

### 3. 形質転換体選抜のための抗生物質濃度の検討

形質転換体の選抜に必要な、不定芽形成を阻害するカナマイシンの濃度について検討した。2 mg/l のゼアチンを含む 1/2NMS 培地に、カナマイシンを 12.5、25、50、100、200 mg/l の濃度になるように添加し、前述の方法で胚軸を培養し、不定芽形成に対する影響を調査した。また、アグロバクテリウムを除去するために必要なカルベニシリンおよびクラフォランをそれぞれ 250 mg/l または 500 mg/l で添加し、不定芽形成に及ぼす影響を調査した。

## 結果および考察

### 1. ホルモン条件

培養 1 ~ 2 ヶ月後に、胚軸外植片の切断部から直接数個の不定芽が形成された (Fig. 1)。特に、ゼアチン 2 mg/l および 5 mg/l を添加した培地で培養した場合に、高い頻度で不定芽の形成が認められ、1 個の胚軸につき 1 ~ 3 個の不定芽が形成された (Table 1)。しかし、ゼアチン 5 mg/l を添加した培地で得られた不定芽は、その後培養を続けても正常に伸長しなかった。2-Cl-4-PU を添加した培地では、1 個の胚軸切断部に多数の不定芽が形成された。しかし、それらの不定芽は小さく不完全で、その後培養を続けても正常に生育しなかった。これらのことから、ゼアチン 2 mg/l が、胚軸からの不定芽形

成には最適なホルモン条件であることが明らかになった。胚軸をホルモンフリーの培地で培養した場合も、低い頻度で不定芽は形成された。このことは、胚軸外植片の高い再分化能を示しているものと思われた。カキの成熟種子の胚軸からの植物体再生については、山田らの報告(1987)がある。彼らは本実験と同じ‘西条’の成熟種子の胚軸を用い、これを5～7 mg/lのBAまたは0.5～5 mg/lのゼアチンを添加した培地で培養した場合に、高い頻度で不定芽が形成されたと報告している。本実験でも、ゼアチンについては同様な効果が認められたが、BAについては同様の効果は認められなかった。これらの違いは、彼らが基本培地にWP培地(Lloyd and McCown, 1981)を用いたのに対し、我々は1/2NMS培地を用いたことに起因するものと考えられた。また、本実験では、幼芽および子葉部分を切除して根部はそのまま残した胚軸切片を材料に用いたが、根部側も切除した場合には、両側の切断部から不定芽が形成された。しかし、根部を残した方が、形成された不定芽のその後の伸長が良好であったため、以後の実験では根部を残した胚軸切片のみを用いて実験を行った。

## 2. 形質転換体選抜のための抗生物質濃度

胚軸を12.5、25、50、100、200 mg/lのカナマイシンを添加した培地で培養し、不定芽形成が完全に抑制されるカナマイシンの濃度を検討した。その結果、カナマイシン25 mg/lの濃度で完全に不定芽形成が阻害された(Table 2)。また、クラフォランとカルベニシリンが不定芽形成に与える影響を調べたところ、クラフォランは不定芽形成を阻害しなかったが、カルベニシリンは著しく不定芽形成を阻

害した。以上の結果から、形質転換体の選抜には、25 mg/l 以上のカナマイシンおよび 500 mg/l のクラフォランを添加した培地を用いるのが適当であることが明らかとなった。

以上の結果から、胚軸からの不定芽形成には、ゼアチン 2 mg/l を含んだ培地が適していると判断された。また、この培養系を用い、カナマイシン抵抗性遺伝子を選抜マーカーとして形質転換を行う場合、選抜培養には 25 mg/l 以上のカナマイシンを、アグロバクテリウムの除去には 500 mg/l のクラフォランを添加した培地を用いるのが適当であることが明らかになった。

## 第 2 節 アグロバクテリウム法による形質転換

前節で確立したカキ種子内胚軸外植片からの再分化系を用い、アグロバクテリウム法を利用した形質転換系の開発を行った。現在、植物の形質転換には、アグロバクテリウム LBA4404 系統 (Hoekema et al., 1983) が最も一般的に用いられているが、植物の種類によっては LBA4404 では十分な感染が得られず、さらに高い感染力を持つ EHA101 系統 (Hood et al., 1986) 等が用いられている。本実験では、LBA4404 および EHA101 系統を用い、カキの形質転換に適したアグロバクテリウム系統の検討を行い、得られた再分化シュートについて、組織化学的 GUS 染色法、PCR 分析法、サザンブロット分析法を用いて形質転換体の確認を行った。

## 材料および方法

### 1. アグロバクテリウムの系統とベクター

バイナリーベクター pBI121 (Jefferson et al., 1987) または pTOK233 (Hiei et al., 1994) を有する *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Hoekema et al., 1983) とバイナリーベクター pSMAK251 (山下ら, 1995) を有する *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (Hood et al., 1986) を用いた。用いた3つのプラスミドベクターの T-DNA 領域の概略図を Fig. 2 に示した。pBI121 は T-DNA 領域内に nopaline synthase (nos) プロモーターに連結した neomycin phosphotransferase II (NPTII) 遺伝子、cauliflower mosaic virus 35S (CaMV 35S) プロモーターに連結した  $\beta$ -glucuronidase (GUS) 遺伝子を持つプラスミドで、カナマイシンによる形質転換体の選抜が可能である。pTOK233 は T-DNA 領域内に nos プロモーターに連結した NPTII 遺伝子、CaMV 35S プロモーターに連結したイントロンを含む GUS 遺伝子、CaMV 35S プロモーターに連結した hygromycin phosphotransferase (hpt) 遺伝子、T-DNA 領域外に *Agrobacterium rhizogenes* 由来の virB、virC、virG 遺伝子をもつプラスミドで、カナマイシンとハイグロマイシンによる形質転換体の選抜が可能である。pSMAK251 は T-DNA 領域内に CaMV 35S プロモーターに連結した NPTII 遺伝子、CaMV 35S プロモーターと *Arabidopsis* Rubisco S-2B ターミネーター (rbcS-T) に連結した GUS 遺伝子を持つプラスミドで、pBI121 と同様にカナマイシンによる形質転換体の選抜が可能である。

pBI121 を有する *A. tumefaciens* LBA4404 は果樹試験場小林省藏博士より、pTOK233 を有する *A. tumefaciens* LBA4404 は日本たばこ産業小鞠敏彦博士より、pSMAK251 プラスミドを有する *A. tumefaciens* EHA101 は

農林水産省生物資源研究所市川裕章博士より譲渡を受けた。

## 2. アグロバクテリウムの調整と胚軸外植片への接種

*A. tumefaciens* LBA4404/pBI121 を 50 mg/l カナマイシン、100 mg/l ストレプトマイシン、50 mg/l リファンピシンを含む LB 培地 (Sambrook et al., 1989) で、LBA4404/pTOK233 を 50 mg/l ハイグロマイシンを含む LB 培地で、また EHA101/pSMAK251 を、100 mg/l スペクチノマイシン、25 mg/l クロラムフェニコール、50 mg/l カナマイシンを含む LB 培地で各々 28 °C で一昼夜振とう培養し、増殖させた。これらの細菌培養液を 1700 ×g で遠心分離して集菌し、ホルモンフリーの MS 培地に懸濁した。再度、1700 ×g で遠心分離して集菌し、100 μM のアセトシリンゴンを含む MS 培地に懸濁し、1 ml 当たり  $5 \times 10^8$  個となるように同培地で希釈調整し、接種に用いた。胚軸外植片への接種は、調整したアグロバクテリウム溶液に胚軸外植片を 15 分間浸漬することによって行った。接種後、滅菌した濾紙上で余分な菌液を除去した。

## 3. 形質転換体の選抜と植物体再生

共存培養には 100 μM アセトシリンゴンおよび 2 mg/l ゼアチンを含む 1/2NMS 培地を用いた。アグロバクテリウムの過度な増殖を抑制するため、培地上に滅菌した濾紙を敷き、その上に外植片を置床した。培養条件は 28 °C 暗黒条件とした。3 日後、25mg/l カナマイシン、500 mg/l クラフォラン、2 mg/l ゼアチンを含む 1/2NMS 培地に移植し、形質転換体の選抜とアグロバクテリウムの除菌を行った。培養条件は 26 °C、光条件 16 時間日長とした。1 ~ 2 ヶ月後、形成された不定芽を胚軸から切り取り、カナマイシン濃度を 100 mg/l とした培地



で培養を続けた。継代は1ヶ月ごとに行った。シュートが約10 mmに伸びたものについて、基部を1.5 mMのインドール-3-酪酸(IBA)溶液に浸漬した後、ホルモンフリーのMS培地に置床し、田尾らの方法(Tao et al., 1988)に従って発根させた。

#### 4. 組織化学的 GUS 染色による導入遺伝子の確認

再生した植物体から葉を採取し、Jefferson et al.(1987)の方法に従い、組織化学的 GUS 染色を行った。葉片を約100  $\mu$ lの50 mM 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロニド(X-Gluc)溶液に浸漬し、溶液の褐変を防ぐために約5 mgの不溶性ポリビニルピロリドン(PVP)を加え、37  $^{\circ}$ Cで一昼夜インキュベートした。葉片が青く染色されているか否かを肉眼または実体顕微鏡下で観察した。

#### 5. 植物体内の残存アグロバクテリウムの確認

再生した植物体内にアグロバクテリウムが残存しているか否かを予備的に調べるため、植物体の一部を採取し、滅菌蒸留水を加えて磨砕し、PPGA培地(西山・江塚, 1977)に塗布し、28  $^{\circ}$ C、暗黒条件下で培養した。アグロバクテリウムの残存は、アグロバクテリウムが増殖するか否かによって判断した。

#### 6. DNA抽出法の検討

予備的にカキの葉からのDNA抽出法の検討を行った。カキの若葉を液体窒素中で凍結粉砕し、ポリフェノールと多糖類を除去するために、5~10倍量の洗浄バッファー(100 mM N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-hydroxypropane-3-sulfonic acid (HEPES, pH8.0), 0.1 % PVP, 2 % 2-

mercaptoethanol)に懸濁した後、14,000 ×g、4℃で5分間遠心分離し、沈殿とした。この洗浄処理を再度繰り返して得られた沈殿から、SDS法(Honda and Hirai, 1990)またはCTAB法(Rogers and Bendich, 1985)を用いてDNAを抽出した。

## 7. PCRによる導入遺伝子の確認

得られた再生植物の葉を、液体窒素中で粉砕し、上記の洗浄処理をした後、SDS法を用いてDNAを抽出した。GUS遺伝子を検出するためのプライマーとしては、GUS遺伝子の1.1 kbpの断片を増幅するように設計したプライマーセット GUS-980F(5'AAC TGG ACA AGG CAC TAG CGG3')/GUS-2050R(5'AAG TTC ATG CCA GTC CAG CGT3')(Jefferson et al., 1986)を用いた。PCRはKaneyoshi-Hiramatsuら(1994)の方法に準じて行ったが、鋳型となるDNA量については20 μlの反応液中1 ng、0.1 ngの2段階で検討した。PCR反応はアステック社製PC-700型機を用いて行い、94℃で2分間熱変性を行った後、94℃1分間、40℃または63℃2分間、72℃3分間を45回繰り返した後、72℃15分間行った。NPTII遺伝子を検出するためには、NPTII遺伝子とnosターミナー間の1.4 kbp断片を増幅するように設計したNPTII-151F(5'ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG3')/Tnos-R(5'GTA TAA TTG CGG GAC TCT AAT)(Kaneyoshi-Hiramatsu et al. 1994)、NPTII遺伝子の0.7 kbp断片を増幅するように設計したNPTII-F(5'GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG3')/NPTII-R(5'ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA3')(Mourgues et al., 1996)の2組のプライマーセットを用いた。PCRはGUS遺伝子検出の場合と同様に行ったが、鋳型となるDNA量は20 μlの反応液中0.1 ngとし、アニーリングの温度については45℃、55℃、63℃の3段階で検討

した。

また、得られた GUS 遺伝子および NPTII 遺伝子の PCR 増幅産物が、シュート内に残存したアグロバクテリウムの DNA に起因するものではないことを確認するため、同じ DNA サンプルを用い、アグロバクテリウム中の野生型 Ti-プラスミドの *virC* 遺伝子を PCR で検出した。プライマーとしては *virC* 遺伝子の 0.7 kbp 断片を増幅するように設計したプライマーセット (5'ATC ATT TGT AGC GAC T3' および 5'AGC TCA AAC CTG CTT C3') (Sawada et al., 1995) を用いた。PCR は NPTII 遺伝子検出の場合と同様に行い、アニーリング温度は 55 °C とした。得られた PCR 産物はいずれも、TAE バッファー (40 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、5 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA (pH8.0)) 中の 2.0 % アガロースゲルで 100 V、30 分間電気泳動した後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、UV 下で観察した。

#### 8. サザンブロット分析による導入遺伝子の確認

得られた再生植物体の葉を、液体窒素中で粉砕し、前述した洗浄処理をした後、CTAB 法を用いて全 DNA を抽出した。サンプル当たり 5 µg の DNA を *Hind*III と *Eco*RI で二重消化した。また、別の 5 µg の DNA を *Hind*III で消化した。制限酵素処理は 5 µg の DNA に対し 200 µl の溶液中で、20 unit の制限酵素を加え、8 時間 37 °C でインキュベートすることによって行った。消化した DNA をエタノール沈殿法によって回収し、20 µl の TE バッファー (10 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、1 mM EDTA (pH 8.0)) に溶解した。この DNA を TAE バッファー中の 0.8 % アガロースゲルで 25 V、16 時間電気泳動して分画した後、0.5 M 水酸化ナトリウムでアルカリ変性し、キ

ヤピラリートランスファーによってナイロンメンブラン (Tropix 社、トロピロンプラスチャージメンブラン) に転写し、UV クロスリンカーを用いてメンブランに固定した。プローブには、pSMAK251 の 1.8 kbp の *Xba*I-*Sac*I フラグメント (GUS 遺伝子) を DIG ラベリングキット (ベーリンガー・マンハイム社、ドイツ) を用いてジゴキシゲニン (DIG) ラベルしたものをを用いた。ハイブリダイゼーションは 5 × SSC (standard saline citrate)、0.5 % ブロッキング・リジェント (ベーリンガー・マンハイム社)、0.1 % N-ラウロイルサルコシン・ナトリウム塩、0.02 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で 68 °C、16 時間行った。メンブランは 2 × SSC, 0.1 % SDS、室温、5 分間の条件で 2 回洗浄した後、0.1 × SSC, 0.1 % SDS、65 °C、15 分間 2 回洗浄した。プローブ・ターゲット DNA の検出はベーリンガー・マンハイム社のプロトコール (the chemiluminescent detection of DIG labeled nucleic acids) に従って行った。

## 結 果

### 1. 組織化学的 GUS 染色による導入遺伝子の確認

アグロバクテリウムを接種した外植片を選択培地上で培養した。約 2 ヶ月後に、どの系統のアグロバクテリウムを接種した場合も、外植片の切断面から不定芽が形成された。接種を行っていない外植片からは不定芽は形成されなかった。不定芽形成の頻度は LBA4404/pBI121 を接種した場合 10.9 %、LBA4404/pTOK233 を接種した場合 14.9 %、EHA101/pSMAK251 を接種した場合 27.0 % であった (Table 3)。1 個の外植片あたり 1 個のシュートを切り取って継代培養し、幼葉

を採取して組織化学的 GUS 染色を行った。EHA101/pSMAK251 を接種して得られたシュート 17 本のうち 7 本で組織が青く染色され、GUS 遺伝子の発現が認められた (Fig. 3)。しかし、LBA4404/pBI121 または LBA4404/pTOK233 を接種して得られたシュートでは青く染色されたものはなかった。また、非形質転換植物のシュートは、全く染色されなかった。

LBA4404/pBI121 または LBA4404/pTOK233 を用いた実験は、①接種時の細菌の密度を 6 倍の  $3 \times 10^9$  cfu/ml とする、②アグロバクテリウムの組織内への取り込みを促す目的で、接種時に脱気処理を加える、③接種時に共存培養の期間を 7 日間に延長する、④培地にアグロバクテリウムの virulence 遺伝子を誘導するとされる 1 % グルコースまたは 1mM プロリンを培地に添加する (Ankenbauer and Nester, 1990; Shimoda et al., 1990) など接種条件を変えて繰り返し行ったが、得られた不定芽のなかに染色されるものはなかった。

## 2. アグロバクテリウムの残存の確認

EHA101/pSMAK251 を接種して得られたシュートにおける GUS ポジティブ (GUS(+)) な反応が、植物内に残存したアグロバクテリウムによるものでないことを予備的に調査するため、植物体の一部を採取し、滅菌蒸留水を加えて磨砕したものを、PPGA 培地に塗布して培養した。PPGA 培地は YEB 培地 (Vervliet et al., 1975) や LB 培地に比べてアグロバクテリウムの増殖に適している培地である。アグロバクテリウムが植物体内に残存していた場合、PPGA 培地で培養すると、2 ~ 3 日後には細菌の増殖が確認できるようになるが、YEB 培地または LB 培地では 3 ~ 4 日必要である。試験の結果、GUS(+)

のシュートの磨砕液を PPGA 培地上で 1 週間以上培養してもバクテリアの増殖は確認されず、アグロバクテリウムの残存は無いものと考えられた。尚、対照としてアグロバクテリウムが残存していることが明らかなサンプルの磨砕液を同様に用いた場合は、2 日後には PPGA 培地上でバクテリアの増殖が認められた。

### 3. DNA 抽出法の検討

まず、DNA の抽出法について検討した。洗浄処理を行った後、SDS 法および CTAB 法を用いて DNA を抽出したところ、どちらの方法を用いた場合にも DNA を抽出することができた。DNA の収量は SDS 法の方が高く、20 mg 程度のごく少量のサンプルからも DNA の抽出が可能であった。抽出した DNA サンプルへの多糖類の混入は、CTAB 法の方が少なかった。尚、洗浄処理を行わなかった場合には、どちらの方法によっても DNA を抽出することはできなかった。このことから、PCR 分析には、洗浄処理を加えた SDS 法を、また、サザンブロット分析には、洗浄処理を加えた CTAB 法を用いて DNA を抽出した。

### 4. PCR による導入遺伝子の確認

EHA101/pSMAK251 の接種によって得られた再分化シュートのうち 13 本について、GUS 遺伝子および NPTII 遺伝子の導入を予備的に判定する目的で、PCR 分析を行った。まず、GUS 遺伝子断片および NPTII 遺伝子断片検出のための PCR 条件について検討した。

GUS-980F/GUS-2050R のプライマーセットを用いて、20  $\mu$ l PCR 反応液中 1 ng のサンプル DNA を鋳型として加えて、アニーリング温度

を 63 °C とした場合、プラスミドから 1.1 kbp の GUS 遺伝子のバンドは検出されたが、GUS (+) シュートからは検出されなかった。同じ 63 °C のアニーリング温度で、サンプル DNA を 0.1 ng 加えた場合には、GUS (+) シュートからも GUS 遺伝子のバンドが検出された。アニーリング温度を 40 °C とした場合は、どちらの量でサンプル DNA を加えた場合でも、プラスミドからは GUS 遺伝子のバンドは検出されたが、GUS (+) シュートからは検出されなかった。このことから、GUS 遺伝子断片の検出には、GUS-980F/GUS-2050R のプライマーセットを用い、0.1 ng のサンプル DNA を鋳型として加え、63 °C のアニーリング温度で PCR を行うこととした。

NPTII-151F/Tnos-R、NPTII-F/NPTII-R の 2 組のプライマーセットを用いて PCR を行った結果、NPTII-F/NPTII-R を用いた場合には、どのアニーリング温度においてもプラスミドおよび GUS (+) シュートから 0.7 kbp の NPTII 遺伝子のバンドが検出され、アニーリングの温度を 55 °C とした場合に最も濃いバンドが得られた。NPTII-151F/Tnos-R を用いた場合は、どのアニーリングの温度においても、プラスミドからも GUS (+) シュートからもバンドは検出されなかった。このことから、NPTII 遺伝子断片の検出には NPTII-F/NPTII-R のプライマーセットを用い、55 °C のアニーリング温度で PCR を行うこととした。

上記の条件で PCR を行った結果、GUS (+) の 7 個体では、1.1 kbp の GUS 遺伝子のバンドと 0.7 kbp の NPTII 遺伝子のバンドが増幅され (Fig. 4, lanes 1-7)、GUS 染色の結果と一致した。非形質転換体のシュートではどちらのバンドも検出されなかった (Fig. 4, lane C)。GUS (-) シュートのうち 1 個体 (Fig. 4, lane 12) では、0.7 kbp の NPTII 遺伝子のバンドと、予想される GUS 遺伝子のバンド (1.1 kbp) より小さい

0.6 kbp のバンドが検出された。また、別の GUS(-)シュート (Fig. 4, lane 13) では、0.7 kbp の NPTII 遺伝子のバンドは検出されたが、GUS 遺伝子のバンドは検出されなかった。これら 2 つの個体では、形質転換の過程で GUS 遺伝子の一部分あるいは全部の欠失が生じたものと推定された。残りの 4 つの GUS(-)シュートでは、GUS 遺伝子のバンドも NPTII 遺伝子のバンドも検出されなかったため、これらの個体は、‘エスケープ’ であると考えられた (Fig. 4, lanes 8-11)。

PCR 分析における GUS 遺伝子または NPTII 遺伝子の増幅産物が、シュート中に残存しているアグロバクテリウムに起因するものでないことを確認するため、同じ DNA サンプルを用い、バクテリア中の野生型 Ti プラスミド上の *virC* 遺伝子を PCR で検出したが、全ての再分化シュートにおいて *virC* 遺伝子のバンドの増幅は認められなかった。この結果は、PPGA 培地を用いてアグロバクテリウムの残存がないことを確認した結果と一致した。LBA4404/pBI121 と LBA4404/pTOK233 の接種によって得られた GUS(-)シュートについても同様に PCR を行ったが、GUS 遺伝子のバンドおよび NPTII 遺伝子のバンドは検出されなかった。これらの結果から、LBA4404/pBI121 と LBA4404/pTOK233 の接種によって得られた個体は形質転換体ではなく、何らかの原因によって生じた ‘エスケープ’ であると考えられた。

## 5. サザンブロット分析による導入遺伝子の確認

導入遺伝子が植物ゲノムに組み込まれていることを確認するために、7 つの GUS(+)シュートと 3 つの GUS(-)シュートについて、サザンブロット分析を行った。DNA の抽出には継代を 10 回繰り返



した *in vitro* の植物体を用いた。DNA を *Hind*III と *Eco*RI で二重消化した場合、全ての GUS(+)シュートで、CaMV 35S プロモーター、GUS 遺伝子および *rbcS* ターミネーターに相当する 3.4 kbp のバンドが検出された (Fig. 5, lanes 1-7)。しかし、非形質転換体および 3 つの GUS (-)シュートではこのバンドは検出されなかった (Fig. 5, Lanes C, 8-10)。5 つの GUS(+)シュート (Fig. 5, lane 1, 4, 5, 6, 7) では、3.4 kbp のバンド以外にも、非形質転換体では検出されない、強くハイブリダイズするバンドが 1 ~ 数本検出された。これらのバンドは、形質転換の過程で T-DNA が再編成されて植物ゲノムに組み込まれたことを示すものと考えられた。

つぎに、DNA を *Hind*III で消化した場合の結果を Fig. 6 に示した。pSMAK251 は 15.0 kbp の大きさのプラスミドで、*Hind*III の制限酵素切断部位を 1 カ所 T-DNA 領域内に持っている (Fig. 2)。5 つの GUS(+)シュートでは、プラスミドの残存を示す 15.0 kbp のバンドは検出されなかった (Fig. 6, lanes 2, 4, 5, 6, 7)。その代わりに、各々 1、4、2、1、3 個のさまざまな大きさのバンドが検出された。これらの結果は T-DNA 領域が植物ゲノム中に組み込まれたことを示しており、植物ゲノム中に GUS 遺伝子が各々少なくとも 1、4、2、1、3 コピー挿入されたものと考えられた。2 つの GUS(+)シュートではプラスミドとほぼ同じサイズのバンドが検出された。しかし、PPGA 培地での植物組織磨砕液の培養や PCR による *virC* 遺伝子の検出結果からはアグロバクテリウムの残存は確認されず、また、植物細胞内ではプラスミドは DNA 分解酵素によって分解されてしまうため、プラスミドがそのまま長期にわたって存在することは考えられないことから、このバンドもやはり植物ゲノム中に組み込まれた GUS 遺伝

子を示すものと推定された。このバンドの他にも T-DNA 領域が植物ゲノム中に組み込まれたことを示すサイズの異なるバンドが各々 3 本および 10 本検出され (Fig. 6、lanes 1, 3)、従って、これらの 2 つのシュートにおいても形質転換は起こり、植物ゲノム中に GUS 遺伝子が各々少なくとも 4 または 11 コピー挿入されたものと考えられた。非形質転換体のシュートおよび GUS(-) のシュートではバンドは検出されなかった (Fig. 6、lanes C, 8-10)。これらの形質転換体は発根処理によって発根し、完全な植物体となった (Fig. 7)。

#### 考 察

果樹のように世代期間が長く、導入遺伝子が後代にメンデル遺伝することによって安定した形質転換体であることを確認することが難しいものの場合、形質転換体であることの証明は慎重に行う必要がある (Register III, 1997)。マーカー遺伝子として GUS 遺伝子を用いている場合には、形質転換体の早期選抜のため、組織化学的 GUS 染色が最も簡便で有効な方法である。その他の有用遺伝子を導入した場合は、ごく少量の DNA から遺伝子を検出できる PCR 法が簡便で有効な方法である。しかし、GUS 染色法も PCR 法も植物体内に目的とする遺伝子配列が存在することの証明にはなるが、それが植物体に残存するアグロバクテリウムによるものである可能性を完全に否定することが出来ないし、植物ゲノムに導入遺伝子が組み込まれたことの証明にはならない。マーカー遺伝子として GUS 遺伝子を用いる場合には、ベクターの GUS 遺伝子にイントロンを挿入して植物のゲノム DNA に組み込まれた際のみを発現するように設計

したベクターを用いれば、GUS染色のみでほぼ証明できるものと考えられるが、最終的にはやはりサザンブロット分析を行い、導入遺伝子が組み込まれているかどうかの確認をする必要がある。また、果樹のように形質転換体当代表を利用しようとする作物では、植物体内にアグロバクテリウムの残存が無いことを完全に証明する必要がある。

本実験では、初めに組織化学的 GUS 染色を行うことによって、形質転換体の早期選抜を行った。カキの組織には多量のポリフェノールが含まれているため、組織片がすぐに褐変し、非常に判定しにくかった。そこで、GUS 染色に用いる基質液に不溶性の PVP を添加したところ、褐変を抑制することができた。ポリフェノールの多い植物で GUS アッセイをする場合に PVP の添加が有効であることはクランベリーでも報告されている (Serres et al., 1997)。結果として、EHA101/pSMAK251 を接種して得られた再分化シュート 17 本のうち 7 本のシュートで GUS (+) の反応が認められた。さらに、PCR 法を用いて GUS 遺伝子断片および NPTII 遺伝子断片の増幅を行った。その結果、全ての GUS (+) シュートで、想定されたサイズの GUS 遺伝子断片と NPTII 遺伝子断片が増幅され、GUS 染色の結果と PCR 分析の結果は一致した。尚、PCR を行う際に、20  $\mu$ l の反応液中 1  $\mu$ g のサンプル DNA を鋳型として加えた場合、GUS 遺伝子断片は検出されなかったが、0.1  $\mu$ g のサンプル DNA を加えた場合は検出された。これは、用いたカキのサンプル DNA に PCR 反応を阻害する何らかの物質が混入していたためと考えられ、DNA の量を減らすことによって阻害物質が希釈され、その結果、PCR 反応の阻害を回避することができたものと考えられる。

GUS(+)の反応や PCR による増幅産物が植物中に残存したアグロバクテリウムによるものでないことを確認するため、組織片の磨砕液を PPGA 培地で培養したが、アグロバクテリウムの増殖は認められなかった。また、PCR でアグロバクテリウム中の Ti プラスミド上の virC 遺伝子の検出も行ったが、バンドは検出されなかった。従って、植物体中にアグロバクテリウムの残存は無いものと判断した。最終的に、植物体の生育を待って、サザンブロット分析を行った。すべての GUS(+)シュートにおいて、GUS 遺伝子が植物体ゲノムに組み込まれていることが確認でき、その挿入コピー数は個体により様々であった。2つの個体でプラスミドとほぼ同じ大きさのバンドが検出されたが、PPGA 培地での培養や PCR による virC 遺伝子の検出結果からはアグロバクテリウムの残存は確認されず、また、植物細胞内でプラスミドが長期にわたって存在することは考えられないことから、このバンドもやはり植物ゲノム中に組み込まれた GUS 遺伝子を示すものと推定された。

現在、植物の形質転換には、アグロバクテリウム LBA4404 系統 (Hoekema et al., 1983) が最も一般的に用いられている。しかし、植物の種類によっては LBA4404 では十分な感染が得られず、さらに高い感染力を持つ EHA101 系統 (Hood et al., 1986) 等が用いられている。本実験では、最も一般的に使用されているバイナリーベクター pBI121 だけでなくスーパーバイナリーベクター pTOK233 を保持する LBA4404 系統を用いて実験を行った場合にも、カキの形質転換体は全く得られなかった。pTOK233 は T-DNA 領域の外側に virB、virC、virG 遺伝子を組み込んで vir 遺伝子の発現誘導を強化し、通常はアグロバクテリウムに感染しないイネにも感染するように開発されたベク

ターである (Hiei et al., 1994)。 Tao ら (1995) はアグロバクテリウム野生株のカキへの病原性を調査しているが、LBA4404 の野生株である Ach5 系統では全く癌腫が形成されなかったのに対し、EHA101 の野生株である A281 系統では旺盛な癌腫形成がなされたと報告している。本実験においても、LBA4404 系統を用いた場合には形質転換体は全く得られず、EHA101 系統を用いたときのみ形質転換体を得られたことから、LBA4404 系統のカキに対する感染力は極めて弱く、それに対して EHA101 系統は十分な感染力を持っていることが確認された。このように、カキの形質転換には、アグロバクテリウム EHA101 系統が適しており、LBA4404 系統は適していないことが明らかとなった。

本実験で得られた形質転換体の獲得率は EHA101/pSMAK251 を接種した場合で 11.1 %であった。エスケープ個体の混入率が高いという問題点が残されているが、この点は選抜培養の際のカナマイシンの濃度をさらに検討することによって解決できるものと考えられる。カキの形質転換については、最近 Tao ら (1997) が報告しているが、彼らの報告における形質転換体の獲得率は 1.3 %であった。彼らはプラスミドベクターは異なるが、本実験と同じ EHA101 系統を用いて形質転換を行っており、材料としてはリーフディスクを用いたのに対し、本実験では胚軸切片を用いていることから、この形質転換効率の違いは、主に用いた材料の再分化能の違いによるところが大きいと考えられた。実際、カキの胚軸外植片からはホルモンフリーの培地で培養した場合でも、低い頻度ではあるが不定芽の形成が観察され (Table 1)、胚軸外植片は高い再分化能を有していることが推察された。また、彼らの方法では、リーフディスクからトランスジ

エニツクなカルスを誘導し、そのカルスから不定芽を誘導するという手法を用いているため、形質転換植物体を獲得するまでに長期間を必要とする。それに対し、本実験では、胚軸外植片の切断部に直接不定芽が形成されるため、カルス培養の期間が無く、形質転換体が得られるまでの期間が4～5カ月と比較的短い(アグロバクテリウム感染から不定芽形成まで約2カ月、不定芽の育成に1～2カ月、発根に約1カ月)。また、根部が形質転換体である必要が無い場合は、不定芽を実生胚軸上でそのまま伸長させて利用することができるため、発根処理の過程を省くことができる。従って、本実験で開発された形質転換法は、彼らの方法に比べ、効率良く早期に形質転換体を獲得できる方法といえる。

一方、本形質転換法では、材料に胚軸切片を用いているため、獲得した形質転換体は雑種由来のものとなってしまう、既存の品種に有用遺伝子を導入して得られた形質転換体をそのまま利用することはできない。しかし、病虫害抵抗性や省力適性などのこれまでの主要品種には存在しなかった形質について育種を行う場合には、交配母本用の1～数系統の優良個体の育成が極めて重要であることから、本形質転換法によってこのような有用遺伝子が導入された個体が作出されれば、それを交配母本に利用して交雑育種を行い、従来の交雑育種では得られなかった形質を持つ新品種を育成できるものと考えられる。また、有望な雑種個体の出現が期待できる交配組み合わせで得られた種子の胚軸に、本形質転換法を利用して有用遺伝子を導入し、有用形質を備えた優良品種を作り出すことも可能である。さらに、本形質転換法はカキ台木育種の場面での利用が大いに期待される。カキの台木については、わい性台木や紋羽病などの土

壤病害に対する抵抗性台木などの開発が強く望まれているが、カキは挿し木発根が非常に困難であることから、現在台木には主に栽培品種の実生が用いられており、いまだ確立された台木品種はない。今後、本形質転換法を利用することで、挿し木発根の容易なわい性台木のような有用な台木品種を育成することができると考えられる。

最後に、本実験において開発した、カキのアグロバクテリウム法による形質転換の手順を Fig. 8 に示した。本形質転換系では、貯蔵成熟種子の胚軸をアグロバクテリウムの感染材料として用いているため、種子さえ貯蔵しておけば、ほぼ1年中形質転換実験を行うことが可能である。アグロバクテリウムは EHA101 系統を用いて、菌密度を  $5 \times 10^8$  個/ml に調整した細菌懸濁液に胚軸外植片を約 15 分間浸漬した後、共存培養に供する。共存培養は、2 mg/l のゼアチンおよび 100  $\mu$ M アセトシリンゴンを添加した 1/2NMS 培地に滅菌した濾紙を敷いた上で、28  $^{\circ}$ C、暗黒条件で3日間行う。その後、2 mg/l ゼアチン、25 mg/l カナマイシン、500 mg/l クラフォランを含む 1/2NMS 培地を用い、26  $^{\circ}$ C、16 時間日長条件で培養し、形質転換体の選抜を行う。本形質転換法を用いることにより、アグロバクテリウム感染から 4 ~ 5 ヶ月後には形質転換植物体を得ることが出来る。



Fig.1. Adventitious shoots formed at the cut end of the hypocotyl segments after 2 months of culture.



Table 1. Effects of cytokinins on adventitious bud formation from hypocotyl segments of Japanese persimmon seeds after 1 month of culture.

Cytokinin	Conc. (mg/l)	Number of segments cultured	Number of segments with adventitious buds
2-Cl-4PU	0.2	5	1
	2	8	3
	5	8	3
	10	9	3
Zeatin	0.2	6	1
	2	5	5
	5	6	5
	10	6	0
BA	0.2	6	0
	2	6	2
	5	6	1
	10	6	0
Control	-	9	1

Table 2. Effects of antibiotics on adventitious bud formation from hypocotyl segments of Japanese persimmon seeds after 1 month of culture.

Antibiotic	Conc. (mg/l)	Number of segments cultured	Number of segments with adventitious buds
Kanamycin	12.5	10	3
	25	10	0
	50	10	0
	100	10	0
	200	10	0
Carbenicillin	250	10	2
Claforan	500	10	8
Control	-	10	8

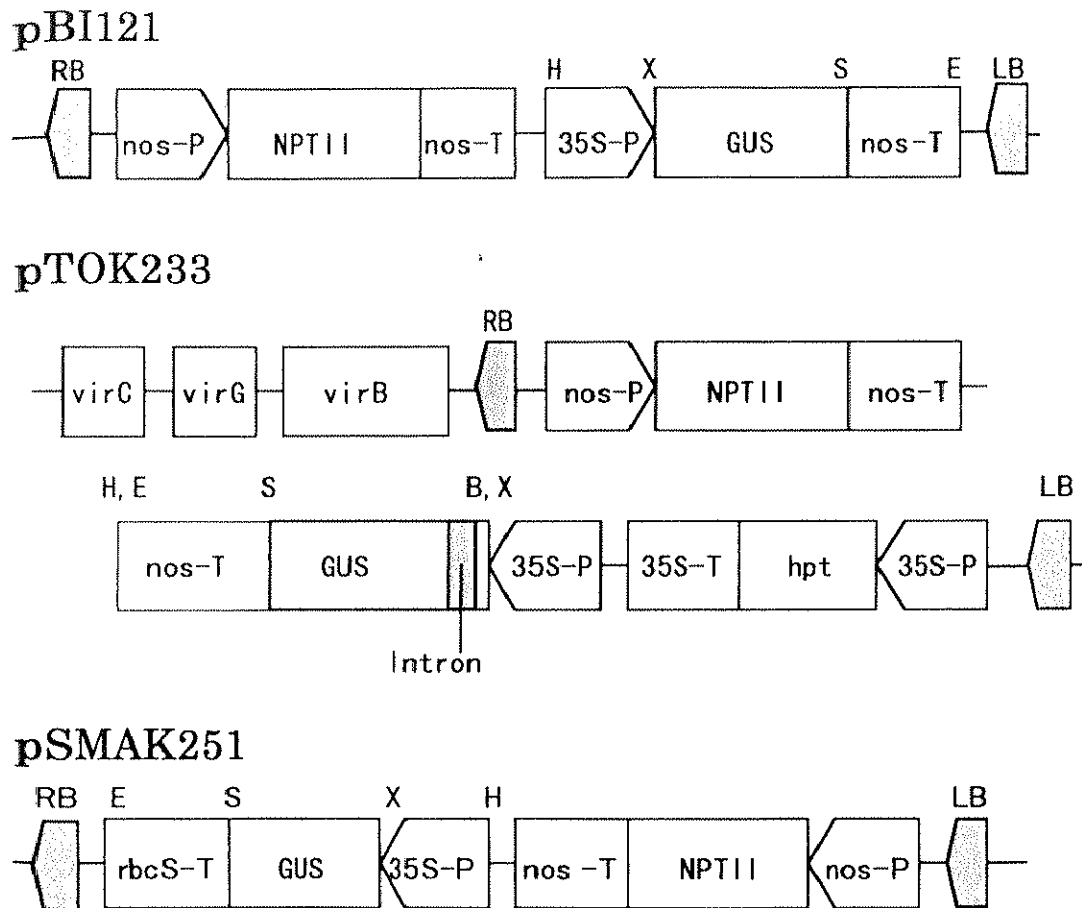
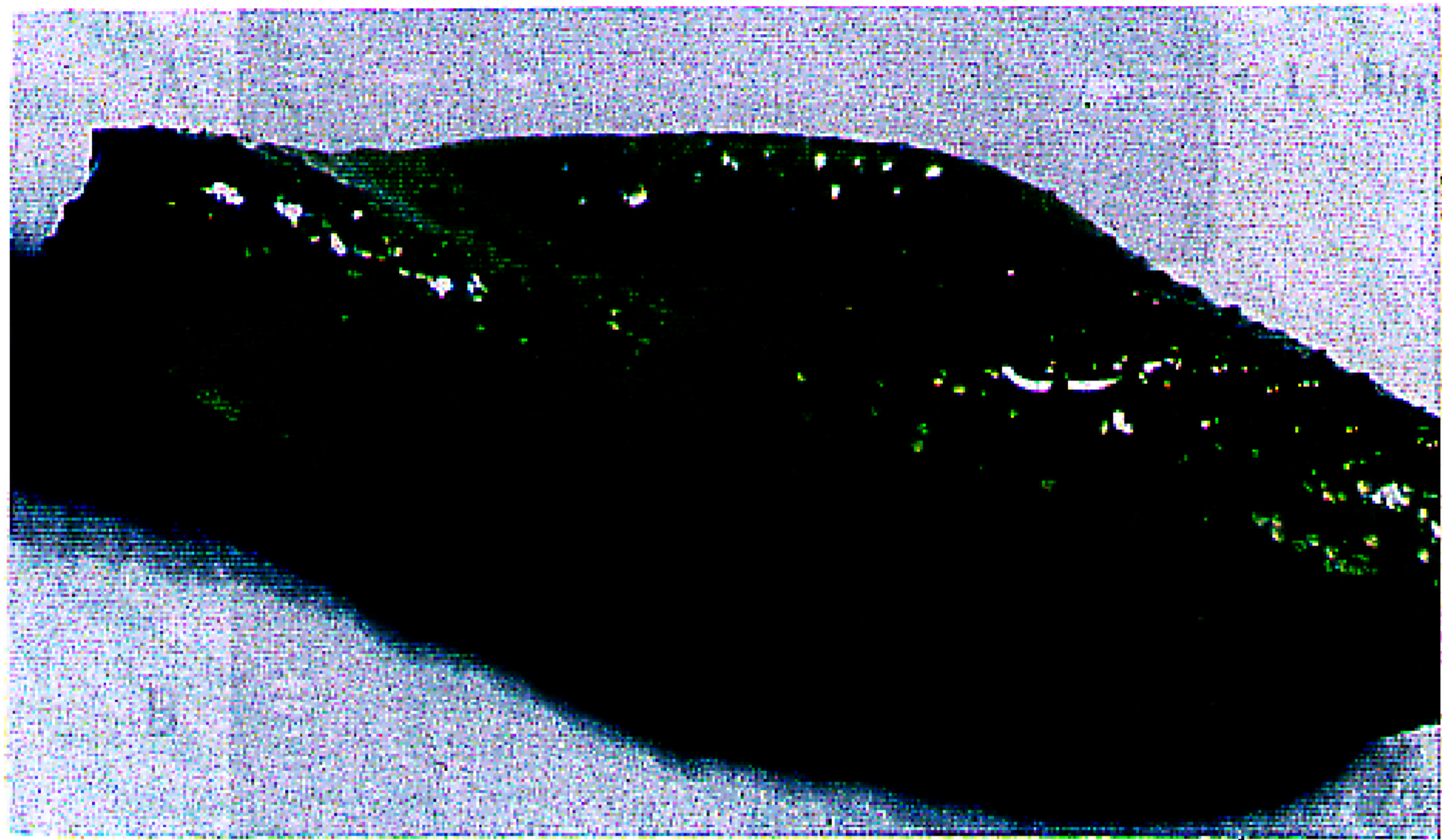


Fig. 2. Diagram of plasmid T-DNA regions (pBI121, pTOK233 and pSMAK251).

RB: right border, LB: left border, 35S-P: CaMV 35S promoter, NPTII: neomycin phosphotransferase II gene, nos-T: nopaline synthase gene terminator, GUS:  $\beta$ -glucuronidase gene, nos-P: nopaline synthase gene promoter, virC, virG, virB: *Agrobacterium rhizogenes* virulence genes, 35S-T: CaMV 35S terminator, hpt: hygromycin phosphotransferase gene, rbcS-T: *Arabidopsis* Rubisco-S-2B terminator, H: *Hind*III, X: *Xba*I, S: *Sac*I, E: *Eco*RI, B: *Bam*HI.

Table 3. Effects of *Agrobacterium* strains and vectors on frequency of transformation.

<i>Agrobacterium</i> strain/Vector	Number of segments cultured(A)	Number of segments with adventitious buds after 2 months of culture(B)(B/A%)	Number of segments with GUS(+) shoots(C) (C/A%)
LBA4404/pBI121	55	6 (10.9)	0 (0)
LBA4404/pTOK233	67	10 (14.9)	0 (0)
EHA101/pSMAK251	63	17 (27.0)	7 (11.1)



**Fig. 3.** Histochemical observation of the GUS gene expression in the leaf of the regenerated shoot from a hypocotyl segment inoculated with EHA101/pSMAK251 after 5 months.

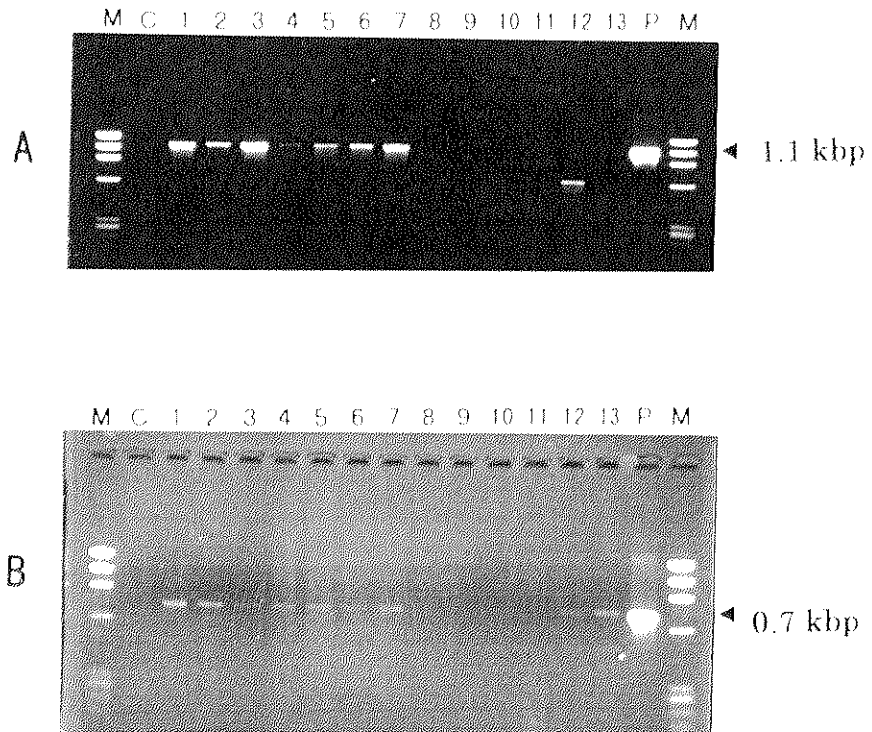


Fig. 4. PCR amplification of the GUS or NPTII gene in the regenerated shoots from the segments inoculated with EHA101/pSMAK251.

A) PCR amplification of the GUS gene. B) PCR amplification of the NPTII gene. Lane C: DNA from non-transformed shoot, lanes 1 to 7: DNA from GUS(+) shoots, lanes 8 to 13: DNA from GUS(-) shoots, P: DNA of pSMAK251. M:  $\phi$ X174-*Hae*III digest.

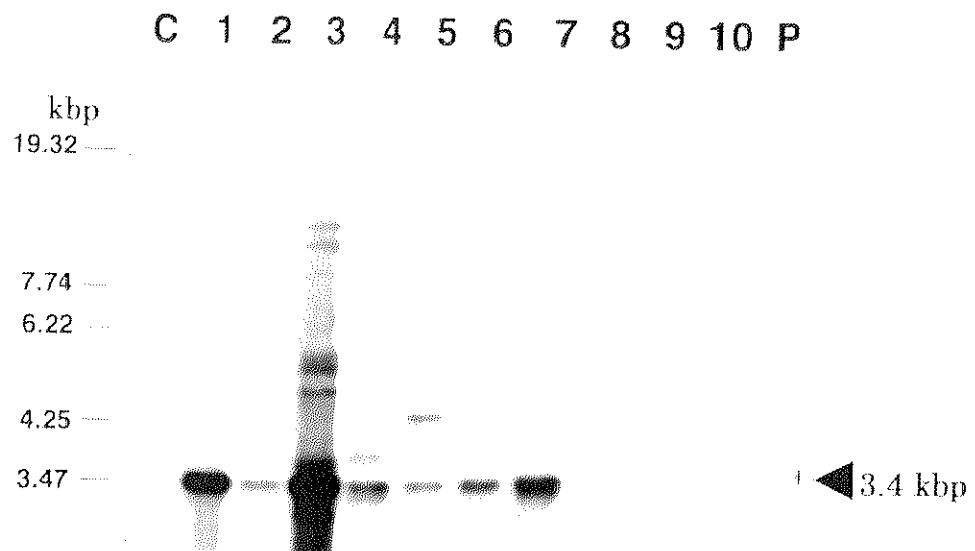


Fig. 5. Southern blot analysis of transformed shoots of Japanese persimmon by EHA101/pSMAK251 when DNAs were double-digested by *Hind*III-*Eco*RI. The GUS gene was detected by chemiluminescence after probing with a DIG-labeled GUS gene fragment.

Lane C: DNA from non-transformed shoot, lanes 1 to 7: DNAs from GUS(+) shoots (the same as lanes 1 to 7 in PCR analysis), lanes 8 to 10: DNAs from GUS(-) shoots (the same as lanes 8 to 10 in PCR analysis), P: DNA of pSMAK251, ◀: Fragment size of CaMV 35S-P, GUS gene and rbcS-T.

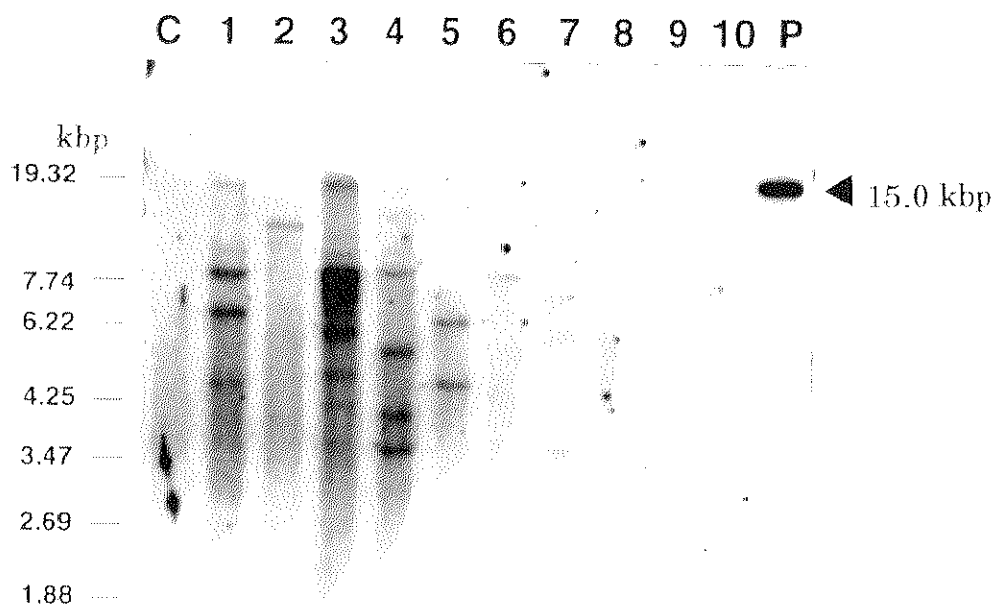


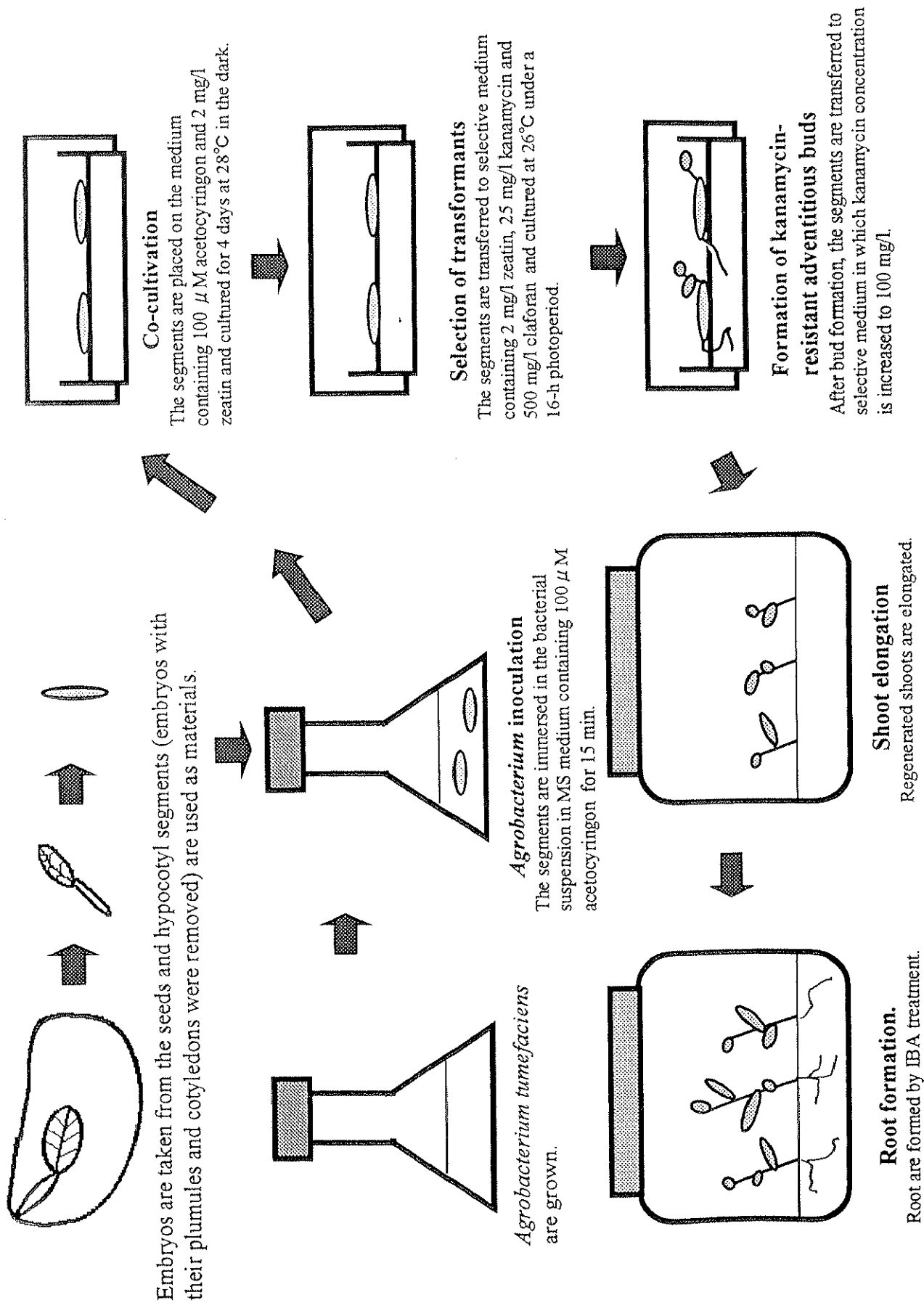
Fig. 6. Southern blot analysis of transformed shoots of Japanese persimmon by EHA101/pSMAK251 when DNAs were digested by *Hind*III. The GUS gene was detected by chemiluminescence after probing with a DIG- labeled GUS gene fragment.

Lane C: DNA from non-transformed shoot, lanes 1 to 7: DNAs from GUS(+) shoots (the same as lanes 1 to 7 in PCR analysis), lanes 8 to 10: DNAs from GUS(-) shoots (the same as lanes 8 to 10 in PCR analysis), P: DNA of pSMAK251, ◀: Fragment size of pSMAK251.





Fig. 7. A transformed Japanese persimmon plant.



**Fig. 8** Method of *Agrobacterium*-mediated transformation from hypocotyl segments of Japanese persimmon.

## 要 約

効率的な形質転換法は、画期的なカキの新品種育成につながる重要な育種法と考えられる。本章では、アグロバクテリウム法を利用したカキの形質転換系を確立するため、カキ胚軸からの再分化条件、形質転換に適したアグロバクテリウム系統等を検討した。

カキ胚軸外植片からの再分化条件を検討した結果、2 mg/l ゼアチンを添加した 1/2NMS 培地で培養した場合、高頻度で胚軸外植片切断部から直接不定芽が形成された。また、カキの形質転換には、アグロバクテリウム EHA101 系統が適しており、LBA4404 系統は適していないことが明らかとなった。共存培養は、2 mg/l のゼアチンおよび 100  $\mu$ M アセトシリンゴンを添加した 1/2NMS 培地で、28  $^{\circ}$ C、暗黒条件で3日間行い、その後、2 mg/l ゼアチン、25 mg/l カナマイシン、500 mg/l クラフォランを含む 1/2NMS 培地を用い、26  $^{\circ}$ C、16時間日長条件で培養することにより、形質転換体を得られた。なお、外来遺伝子の存在は、組織化学的 GUS 染色法、PCR 分析法、サザンブロット分析法によって証明した。

本章で開発したカキの形質転換法は、アグロバクテリウム感染、共存培養および選抜培養に関し、難しい処理は不要で、操作は極めて簡単である。また、アグロバクテリウム感染から4～5ヶ月後には用いた外植片の10%程度から形質転換体を得ることが出来る。本形質転換系は、カキの育種に利用できるものと考えられる。