

であるが、単子葉植物をはじめとする遺伝子導入の困難な植物種については、高効率で簡便な遺伝子導入法の開発が待たれている。(独)農業生物資源研究所 新生物資源創出研究グループ 植物細胞工学研究チーム 萩尾高志 主任研究官のグループは、遺伝子導入が困難とされてきたムギへの遺伝子導入法を新規開発し、公開した。本技術は、植物種子を高濃度のベクターDNAの溶存したバッファー中で冷却下減圧処理したのち、エレクトロポレーションにより外来遺伝子を導入するものであり、ムギに加え、イネにおいても外来遺伝子の導入に成功している。

また、導入対象遺伝子ベクターを有するリゾビウム菌体を植物の幼分裂組織へ接種することにより遺伝子組換え植物体を得る手法が近年報告されており、新規遺伝子導入法として注目されている。

有用物質を生産する薬用植物は、一般に形質転換が困難であることが知られており、遺伝子導入による生合成鍵酵素の過剰発現や、生合成経路改変といった遺伝子工学的手法による有用物質生産等の形質改変実施上の障害となっている。とくに、未分化組織からの再分化の段階が障壁となっていることが多く、そのステップを経ずに形質転換体を得られる幼植物、または種子への遺伝子導入法は、薬用植物への遺伝子導入法のブレイクスルーとなる可能性が高い。本研究(1)においては、まず、ニチニチソウ等の有用薬用植物を材料とし、それらの幼植物へのリゾビウム菌体の接種による外来遺伝子導入法の適用の可否を検討し、次に、研究(2)においてはケシ種子を材料として、種子への遺伝子導入法の適用を試みることにより、各種条件の最適化を行い、薬用植物を対象とした新規遺伝子導入法を確立をすることを目的とする。

また、遺伝子組換え体作出の過程で、高効率かつ迅速に遺伝子導入の起こった個体(部位)を得るためには、遺伝子導

入体と非組換え体の選抜の効率を上げる必要がある。本研究(3)では、ナス科の薬用植物であるベラドンナを材料に、レポーター遺伝子として頻用される β -グルクロニダーゼ遺伝子(GUS)およびオワンクラゲ由来の緑色蛍光蛋白質(GFP)の、遺伝子導入個体選抜への応用の可否を確認すること、および、これらの遺伝子を発現する陽性対照植物体の作出を目的とする。

2. ケシのリゾビウム形質転換体自殖後代植物におけるアヘンアルカロイド成分の分析ならびにT-DNA遺伝様式の解析

ケシはモルヒネをはじめとするアヘンアルカロイド類を生産する重要な薬用植物のひとつである。本植物のアヘンアルカロイド生合成経路に関わる酵素・遺伝子群については精力的に解明が進められているが、未だ完全解明には至っていない。

本研究においては、モルヒネの生合成中間体であり、通常は蓄積されることのないテバインを高蓄積する、ケシのリゾビウム感染によるアヘンアルカロイド成分形質変異体(T-DNA挿入型形質変異体)を材料とし、高テバイン形質を安定に保持する自殖後代植物の保存・栽培を行い、分子生物学的手法により、アヘンアルカロイドの生合成酵素・遺伝子群について新たな知見を得ることを目的とする。

B. 研究方法

1. 薬用植物への新規外来遺伝子導入法の適用に関する研究

(1) 幼植物を材料とした遺伝子導入法の検討

材料植物

ケシ(一貫種)(PSIK)、オニゲシ(POL2)、マルバダイオウ(Rr)、ニチニチソウ(インド系001-06)(CrI)種子を

75%エタノールで1分間殺菌後、滅菌水ですすぎ、次いで2%次亜塩素酸ナトリウム溶液(Tween 20 1滴/30 mlを含む)、室温で10分間表面殺菌後、滅菌水で3回すすぎ、2%ショ糖を含む主要無機塩類が1/2濃度のMurashige & Skoog (1/2MS)培地(5 ml/18φ試験管)に植付けた。PSIK、POL2、Rrは20°C/14時間明、15°C/10時間暗で、CrIは24°C/14時間明、20°C/10時間暗で発芽させて得られた幼植物から切片(約5 mm長、PSIK及びPOL2は、子葉及び胚軸、Rrはシュート、子葉、胚軸及び幼根、CrIは子葉、胚軸及び幼根)を調製し、1%ショ糖、ナフタレン酢酸(NAA) 1 mg/l及びカイネチン(Kin) 2 mg/lを含むMS液体培地[MS(1)N1K2、6ウェルプレート、3 ml/ウェル]で1-2日間前培養(PSIKは2日間、それ以外は1日間)し、以下の実験に用いた。

共存培養

カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター下流に β -glucuronidase 遺伝子(GUS)をサブクローニングしたバイナリーベクターを保有する *Rhizobium radiobacter* LBA4404/pBI121 株及び同バイナリーベクターのGUSをgreen fluorescent protein (S65T) (sGFP)に置き換えたバイナリーベクターを保有する *R. radiobacter* LBA4404/ pBI-sGFP 株をカナマイシン 50 mg/l、リファンピシン 25 mg/l、そしてストレプトマイシン 150 mg/l を添加したYEB固形培地で培養し、コロニーを得た。これらの菌を白金耳ですくいとり、20 μ g/ml アセトシリンゴン溶液 2 ml に懸濁させ(菌数約 10^7 個/ml)、その1 ml を上記前培養培地 3 ml に加え、20°C、暗所、80 rpm で6日間共存培養した。感染直後の切片は、クラフォラン 1 g/l を含むMS(1)N1K2 液体培地に移植して除菌を行い、この操作を2回繰り返した(1-3日後に培地を交換)。除菌操作後の切片は、

G418 添加 (20 mg/l) MSN1K2 培地 (ショ糖 2 または 3% を含有)、20°C (PSIK、POL2 及び Rr) または 25°C (CrI) 暗所で培養し、再び菌の増殖が認められた切片は、クラフォラン 500 mg/l 添加培地に移植し除菌操作を行った。

形質転換の確認

形質転換の確認は、GUS活性染色(反応液: 0.5 mg/l X-glu in 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.3, 37 °C, 一晚)あるいは蛍光顕微鏡VB-7000(キーエンス)下でのsGFPの確認(極大励起波長490 nm、極大蛍光波長510 nm)により行った。

(2) 種子への遺伝子導入法の検討

遺伝子導入対象種子

従来法であるリゾビウム法による遺伝子導入効率が低いケシを材料に選び、遺伝子導入を試みた。実験に用いたのは、ケシ(一貫種)の完熟種子(H13年採種 優良果)である。

遺伝子導入用ベクター

リゾビウム法による遺伝子導入には、前述のpBI121、およびpBI-sGFPを使用した。

種子への遺伝子導入法には、高い遺伝子導入効率を示すことが報告されているジェミニウイルスベクターを使用した。生物研の萩尾高志主任研究官より譲渡を受けたジェミニウイルスベクター pWI-GUSを制限酵素 *Pst*I で消化し、GUS 遺伝子部分をゲル分画により除き、再ライゲーションすることにより pWI-MCS を作製した。本ベクターに pTH2 より調製した sGFP 遺伝子を導入し、pWI-sGFP を構築した (Fig. 3)。

なお、sGFP 遺伝子 (pTH2) は静岡県立大学大学院生活健康科学研究科食品栄養化学専攻(食糧細胞工学研究室)丹羽康夫博

士より譲渡を受けたものである。

種子への遺伝子導入

エレクトロポレーションなどの諸条件は生物研のプロトコルに準拠して行った。下記に示すのは、ケシへの遺伝子導入用に検討中のプロトコルの一例である。

[催芽処理] ろ紙(5A, Advantec)を2枚敷いた90 mmシャーレに発芽バッファー8 mlとベンレートT 100倍(w/v)液2 mlを加えたる紙上にケシ種子を置き、20°C暗所で1日もしくは2日、催芽処理を行った。催芽後、吸水した種子を純水で5回洗浄し、60 mmシャーレに約200粒ずつ分け、下記の組成のエレクトロポレーション(EP)バッファーを加えた。なお、使用したプラスミドDNAはQIAfilter plasmid maxi kit (QIAGEN)で精製したpWI-MCS、もしくはpBI-sGFPで、最終濃度が0.1 mg/mlとなるよう調整した。コントロールにはTEバッファーを用いた。

[減圧・冷却] 種子およびEPバッファーを60 mmシャーレに移し、氷上で3時間減圧処理した。減圧度はチャンバーの圧力計の表示で最低0.095 MPaであった。

[エレクトロポレーション(EP)] 減圧処理したケシ種子をバッファー全量と共に氷上のEP用チャンバーに移し、EP機器にセットした。下記の条件でパルスを加えたのち、氷上に戻し、1時間静置した。

[養生] ろ紙(5A, Advantec)を2枚敷いた90 mmシャーレに、発芽用バッファーを10 ml加えたものに種子を移し、20°C暗条件の培養室で養生処理を行った。

[sGFP蛍光観察] 養生1日後、および2日後に蛍光観察を行った。

発芽バッファー

PVP (polyvinyl pyrrolidone) 0.2%
次亜塩素酸ナトリウム 約0.01%
(有効塩素濃度として)

エレクトロポレーション機器

スクエアパルス式エレクトロポレーター

CUY21EDIT-S

シャーレスタンド型チャンバー白金電極
CUY495P10 (以上 Nepa Gene社)

エレクトロポレーション用バッファー

dd H ₂ O	194 μl
2% PVP (polyvinyl pyrrolidone)	100 μl
10 % Tween 20	6 μl
0.1 M spermidine	20 μl
plasmid DNA (final conc. 0.1 μg/μl)	40 μl
2.5 M CaCl ₂	40 μl
Total	400 μl

エレクトロポレーション条件

cuvette: 1.0 cm gap

voltage: 50 V/cm

pulse: 50 msec. square pulse

interval: 75 ms

number of pulse: 50

(3) レポーター遺伝子導入ベラドンナの作出

ベラドンナへのリゾビウム法による遺伝子導入

ベラドンナへのGUS、sGFP遺伝子の導入は*Rhizobium radiobacter*を介した遺伝子導入法(リーフディスク法)により行った。遺伝子導入用ベクターpBI121(GUS)、pBI-sGFP(改変型緑色蛍光タンパク質:sGFP)をそれぞれ導入した*Rhizobium radiobacter* LBA4404株の菌液にベラドンナの葉の切片を浸漬し、感染を成立させた。リゾビウムの除菌にはクラフォラン(Cla)を用い、カナマイシン(Km) 100 mg/lを含有する選択培地で形質転換体を選抜した。NAA 1 mg/l、BA 10 mg/lを含む選択培地MS(2)GN1B10ClaKm上でリーフディスクより成長したカルスを、NAA 0.1 mg/l、BA 3 mg/lを含む選択培地MS(2)GN0.1B3 ClaKmへ移殖した。さらに、カルスより成長したシュートを

植物体再生用MSG(0.3)培地に移植して、形質転換体候補となる再生植物体を得た。

ベラドンナ形質転換体候補のPCRによる遺伝子導入確認

再生植物体の主に葉など約100 mgを採取し、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)によりゲノムDNAを調製した。導入遺伝子の検出はGUS、sGFPそれぞれの全長を増幅するように設計したプライマーを用いたPCRにより行った。なお、プライマー配列およびPCR条件は下記のとおりである。

GUS遺伝子検出用プライマー:

GUS-1S:

5'-ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCC-3'

GUS-1814A:

5'-ATTCATTGTTTGCCTCCCTGCTG-3'

sGFP遺伝子検出用プライマー:

sGFP-Nend-S:

5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3'

sGFP-Cend-A:

5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'

Program: 94°C 5 min →

(94°C 30 sec → 58°C 30 sec → 72°C 1 min) x 30 → 72°C 10 min → 4°C ∞

GeneAmp 2400 (Perkin Elmer)

ベラドンナ形質転換体候補のGUSアッセイおよびsGFP蛍光観察

形質転換体(候補)再生植物体より新鮮葉を採取し、エッペンドルフチューブ中でホモジナイゼーションバッファーを加え破碎し、遠心分離した上清を粗酵素液とした。GUSの基質となる4-メチルウンベリフェリルグルクロニド(4MUG)と粗酵素液をエッペンドルフチューブ中で混和し、37°Cで1時間反応させたのち、UV光下4-メチルウンベリフェロン(4MU)の蛍光(455 nm、青色)を観察した。

sGFPの蛍光は、培養試験管中の再生植物体に励起光(青色光)を照射し、発せ

られる緑色蛍光(510 nm)を実体蛍光顕微鏡VG-05シリーズ(キーエンス)、バンドパスフィルターFF01-513/17(中心波長513 nm、Semrock)で観察した。

2. ケシのリゾビウム形質転換体自殖後代植物におけるアヘンアルカロイド成分の分析ならびにT-DNA遺伝様式の解析

材料および栽培条件一般

本研究で材料とするケシのリゾビウム感染による形質転換体PsM1-2株は、そのT0世代のアヘンアルカロイド成分含有量の分析結果から、野生株と比較してモルヒネの生産量が減少し、通常蓄積されることのないテバインを多量に蓄積することを特徴とする(Fig. 7)。我々は、本形質転換体株を材料として、その形質変異因子の探索を進めており、これまでに、リゾビウムT-DNAのケシゲノムDNAへの挿入部位の探索により、少なくとも4ヶ所のT-DNA挿入部位が存在することを示唆する結果を得ている。

これらの挿入部位のうち高テバイン形質の原因となる遺伝子座を同定するため、自殖T1世代におけるT-DNA挿入部位の遺伝様式、ならびにアヘンアルカロイド成分について精査したが、これらの間に相関は認められなかった。しかしながら、PsM1-2株T1世代の分析結果から、これまでに同定されている4ヶ所のT-DNA挿入部位の挿入パターンが同一で、高テバイン形質(HT)もしくは低テバイン形質(LT)を示すものが存在することが明らかになった(Fig. 8)。

そこで、そのようなペアの自殖後代植物における、T-DNA挿入部位の遺伝様式とアヘンアルカロイド成分含有量について解析することにした。これにより、既に同定されているT-DNA挿入部位の影響を排除した、未同定の変異因子の探索が可能になると考えられた。

Fig. 8に示すPsM1-2 T1世代2系統 (HT1とLT1、および、HT2とLT2の2ペア) の自殖種子 (T2世代) を温室内に播種し、室温20°C、湿度60%、16時間明、8時間暗 (補光照明を使用)、5寸鉢 (赤玉土-堆肥-クレハ培養土 = 3:1:1)、灌水1日1回、ハイポネックス500倍液 週1回、の条件で栽培を行った。開花期、花卉の形態や草丈などは随時調査を行った。

アヘンアルカロイド分析

開花後、約4週後に未熟果実を切傷刀で傷つけ、滲出した乳液を回収した。乳液は50°Cで一晩風乾し、アヘンとした。アヘンの約5 mgに、5 mlのメタノールを加え、30分間超音波下で抽出を行い、その400 µlをUltrafree-MC spin column (Millipore)でろ過後、300 µlをHPLC分析に供した。HPLC分析は下記条件でイオンペアクロマトグラフィーにより行った。

[HPLC条件]

Instruments: Waters Alliance PDA System

(separation module: 2795, PDA: 2996)

Column: TOSOH TSK-GEL ODS100V (pore size 5 mm, φ4.6 x 250 mm)

Solvents: CH₃CN (A), 10 mM Sodium 1-Heptanesulfonate (pH 3.5) (B)

Column temperature: 30°C

Flow rate: 0.7 ml/min

Pressure: ca. 900 psi

Solvent gradient (A%): 0 min 28%, 15 min 34%, 25-39 min 40%, 40 min 28%

Detection: UV 200-400 nm (qualitative), UV 284 nm (quantitative analysis)

新規T-DNA挿入部位のアダプターライゲーションPCR法による探索

本形質転換体においては上記の4ヶ所の他にもT-DNAの挿入が起きていることが予想されたため、T0世代植物を対象として新規T-DNA挿入部位の探索も行った。

[*Hae*III消化-アダプター付加ライブラリーの調製]

T0世代より抽出したゲノムDNAを*Hae*IIIで消化し、アダプターをライゲーションすることによりアダプターライゲーションPCR(AI-PCR)用アダプター付加ライブラリーを調製した。なお、アダプターは下記の2本のオリゴDNAを等量混和してdenature後、穏やかにannealさせたものである。

AP-LS:

5'-CGTTGAGAGGCATTATCTTCGGGC
TAAGGCGTCGTCGCGACGTCACGC-3'

AP-SS:

5'-PO₄-GCGTGACGTC-NH₂-3' (5'側リン酸化、3'側アミノ化修飾)

[AI-PCR]

Template: PsM1-2(T0) *Hae*III digested-adaptor ligated genome DNA library

Primer sets (100 pmole each)

Right border:

1st PCR: MAFF-14963S + AP1

2nd PCR: MAFF-14997S + AP2

Left border:

1st PCR: AP1 + MAFF-401A

2nd PCR: AP2 + MAFF-368A

Program: 94°C 5 min →

(94°C 1 min → 58°C 2 min → 72°C 3 min) x 30 → 72°C 10 min → 4°C ∞

GeneAmp 2400 (Perkin Elmer)

[Primer Sequence]

MAFF-14963S:

5'-AGCCGACAACGTGCAATTTGC-3'

MAFF-14997S:

5'-GAGCCACCTGCCTTCAGACC-3'

MAFF-401A:

5'-TCAACTTGTGGCGAGTCTCC-3'

MAFF-368A:

5'-AACTCGTACGGCATAGTCGG-3'

AP1:

5'-CGTTGAGAGGCATTATCTTCGG-3'

AP2:

5'-TTATCTTCGGGCTAAGGCG-3'

T-DNA挿入部位のPCR解析

*Hae*III消化ゲノムライブラリーより新たに見出された、T-DNA挿入部位5ヶ所のゲノムDNAに特異的に設計したプライマー配列およびPCR条件は下記のとおりである。

[Primer Sequence]

MAFF-226A:

5'-TTGTTGCACGGCGACGATTGG-3'

LB2-1072S:

5'-CGTCGTTGTATGATGAATCGC-3'

HaeLB3-S1:

5'-CAACAGTTCGCAGGCAAGTC-3'

HaeLB4-S1:

5'-TGACTAATCCTGACTCCAACC-3'

HaeRB5-A1:

5'-CCTGCAACAACACTAACAACGAG-3'

HaeRB6-A1:

5'-GGGTGGTATTGTAACCTCACTC-3'

Program: 94°C 5 min →

(94°C 30 sec → 58°C 30 sec → 72°C 1 min) x 30 → 72°C 10 min → 4°C ∞

GeneAmp 2400 (Perkin Elmer)

C. 研究結果

1. 薬用植物への新規外来遺伝子導入法の適用に関する研究

(1) 幼植物を材料とした遺伝子導入法の検討

PSIK及びPOL2は、除菌操作後のカルスの生育が不良で、選択培地 (G418含有) で良好に生育するカルスは得られなかった。一方、Rr及びCrIは、除菌操作後の選択培地で良好に生育するカルスが得られた。Rr胚軸からは、シュートの分化が認められ、選択培地で良好に生育するシュートが得られた (Table 1)。

Rr及びCrI培養物 (カルス、シュートまたは不定根) のGUS活性染色の結果、Rr

はGUS活性が認められた組織はなかった (Table 2)。一方、CrIカルスではGUS活性が検出された (Fig. 1)。同様にRr及びCrI培養物のsGFP検出による形質転換の確認を行ったところ、Rrは形質転換を確認出来ず、CrIではsGFPを発現する形質転換体を得られた (Table 3、Fig. 2)。

Table 4にニチニチソウの形質転換効率を示した。無菌発芽させた実生から調製した切片を材料に2種類のレポーター遺伝子 (GUS、sGFP) での形質転換効率を調べた結果、子葉切片を用いるとレポーター遺伝子の種類に関わらず、100%の高効率で形質転換細胞が得られることが判明した。

(2) 種子への遺伝子導入法の検討

pWI-sGFPはpWI-GUSのGUS遺伝子をpTH2由来のsGFP遺伝子と置換し作成した (Fig. 3)。本ベクターを用いてケシ種子への遺伝子導入実験を開始したが、現在のところケシ種子において、一過的なsGFPの発現は確認されていない。現在、エレクトロポレーション条件をはじめとする諸条件について検討中である。

(3) レポーター遺伝子導入ベラドンナの作出

ベラドンナにGUS遺伝子を導入した形質転換体 (候補) Ab/pBI121のうち、PCRによりGUS遺伝子の導入が確認された系統では、野生株では認められない4MUによる強い蛍光が観察された。なお、PCRで陽性の系統間で、GUS活性 (4MUの蛍光強度) に差があることが認められた (Fig. 4)。

また、sGFP遺伝子導入体 (候補) Ab/pBI-sGFPでは、PCRによるsGFP遺伝子の検出結果と、sGFPタンパク質の蛍光の有無はよく対応しており、PCRで陽性であった株は、全草で緑色蛍光が観察さ

れた(Fig. 5)。成長した緑色の葉などにおいては葉緑体クロロフィルによる680 nm周辺の赤色蛍光の強度が強かったが、510 nm周辺の緑色蛍光を選択的に透過するバンドパスフィルターにより蛍光を観察することができた。

なお、選択培地上のsGFP遺伝子導入組換え体(候補)カルスを蛍光顕微鏡下観察すると、組換えが起こった蛍光を発する部分と、組換えの起きていない蛍光を発しない部分に分かれる(Fig. 6)。すなわち、実体顕微鏡で励起光照射下、蛍光を発するカルスまたはシュートのみを選抜し、以後の選択培地または植物体再生用培地に移殖すれば高効率に組換え体の再生植物が得られることになり、選抜レポーター(マーカー)としてのsGFPの有用性が確認された。

2. ケシのリゾビウム形質転換体自殖後代植物におけるアヘンアルカロイド成分の分析ならびにT-DNA遺伝様式の解析

PsM1-2株T2世代植物の形態について

選抜したHT、LT各系統の自殖種子T2世代を温室内に播種し、上記条件下栽培したところ、成長、開花し、結実した。

T2世代各系統の形態についてまとめたのがFig. 8である。

同条件下栽培を行った一貫種野生株と比較したところ、花卉の平均枚数は野生株が3.8枚であったのに対し、T1世代では5.6枚から7.0枚と増加傾向が認められた。また、T0世代と同様に、開花期は野生株と比較して遅延傾向が認められた。草丈に関してはT0世代では矮化を特徴としたが、T2世代では野生株よりも高くなる傾向があった。

HaeIII消化ゲノムライブラリーからの新規T-DNA挿入部位探索

HaeIII消化ゲノムライブラリーを鋳型としてAI-PCRを行い、得られた特異的増

幅産物をアガロースゲル電気泳動で精製後、シーケンシングベクターにクローニングし、塩基配列を解析した。その結果、T-DNAのRB側とそれに接するゲノムDNA断片2種(RB5, RB6)、また、T-DNAのLB側末端とそれに接するゲノムDNA断片3種(LB2, LB3, LB4)の各断片配列が得られた。

これらの配列情報からゲノム側に特異的なプライマーを設計し、野生株ゲノムDNAを鋳型にして各ゲノム断片間で組み合わせを変えてPCRを行ったところ、LB3-RB6の組み合わせ(プライマーセットHaeLB3-S1 + HaeRB6-A1)で特異的な増幅が認められ、両断片は、同一T-DNA挿入部位の両端であることが明らかになった(Fig. 9)。

以上の情報から、新たに4ヶ所のT-DNA挿入部位が存在することが示唆され、これまでの結果とあわせ、本形質転換体(T0)には少なくとも8ヶ所の独立したT-DNA挿入部位が存在するものと結論された。

アヘンアルカロイド成分分析結果

T2世代植物のHT、LT各系統についてアヘンアルカロイドの成分分析を行った結果、一貫種野生株と同レベルのテバインを含む低テバイン形質を示したものは少数で、T1世代のテバイン含有量に関わらず、高頻度に高テバイン形質が出現することが判明した(Fig. 10)。

T-DNA挿入パターン解析結果

当初判明した4ヶ所のT-DNA挿入部位(RB1-RB4)の挿入パターンをmultiplex-PCR法で解析したところ、T2世代のパターンはT1世代と完全に同一であり、脱落等は認められなかった。

T2世代のHT1, HT2, LT1, LT2の各植物群のうち、テバイン含有量が最高値または最低値を示したものについて、新たに判明した4ヶ所も含め計8ヶ所のT-DNA

の挿入パターンを解析し、その結果をアヘンアルカロイド含量と共に記したのが Fig. 11である。

この結果からは、HT形質に特異的な挿入部位は認められず、また、例を挙げるとT-DNA挿入パターンが一致するHT2 L#4とHT2 B#5や、LT1 #2-3とLT1 #2-4においても、テバイン含有量が大きく異なる形質が現れており、アヘンアルカロイド成分含有量と8ヶ所のT-DNA挿入パターンとの間に相関は認められないことが明らかとなった。

D. 考察

1. 薬用植物への新規外来遺伝子導入法の適用に関する研究

(1) 幼植物を材料とした遺伝子導入法の検討

GUS, sGFP の2種類のレポーター遺伝子を用い、幼植物を感染対象とした共存培養法によるケシ(一貫種)、オニゲシ、マルバダイオウ及びニチニチソウ形質転換法の確立を試みた。これまでにケシ(一貫種)では、*Rhizobium* 菌液に胚軸を直接浸漬することで形質転換細胞を得ているが、除菌操作が煩雑であったため、感染直後に除菌用クラフォラン濃度をこれまでの2倍濃度(1 mg/ml)で用い、さらに除菌培地を2回交換する方法を試みた。

マルバダイオウ及びニチニチソウでは除菌後も選択培地で良好に生育するカルス・組織が得られたが、ケシ及びオニゲシでは得られなかった。ケシ及びオニゲシは、除菌用クラフォランや選択用 G418 への感受性が強く、高濃度のクラフォランや選択に用いた濃度の G418 (20 mg/l) により障害を受けたものと推察される。

マルバダイオウカルス、シュート及び不定根は、選択培地で良好に生育したが、レポーター遺伝子の発現は確認できなかった。マルバダイオウは、抗生物質への耐性が強く、今回用いた選択条件では形質転換細胞を選抜できないものと思われる。

る。

今回用いた植物材料の中で、ニチニチソウからは形質転換細胞が得られ、特に子葉を材料とした場合の形質転換効率は100%と高効率であった。しかしながら、カルスは植物体への再分化を必要とするため、今後、分化組織における形質転換法の確立が課題となる。

(2) 種子への遺伝子導入法の検討

生物研の報告では、種子への遺伝子導入法による形質転換効率は比較的低い(ダイズで1%程度)とされ、遺伝子導入に成功した種子を得るためには多数の種子を用い実験を継続する必要があると考えられる。また、催芽、冷却・減圧処理、エレクトロポレーション条件など種々のパラメーターについて検討する必要がある。

また、本実験系では多量(高濃度)のプラスミドDNAを必要とするが、pWI系ベクターは複製起点(p15A)が低コピーベクター(pACYC)に由来するため、コピー数が少なく、多量のプラスミドDNAの調製がネックとなっている。本ベクターの高コピー化などの改良も今後の課題のひとつである。

(3) レポーター遺伝子導入ベラドンナの作出

GUS遺伝子がPCRにより検出されたGUS遺伝子導入植物体の系統間で、GUSの活性に差が認められた。これは、GUS遺伝子が組み込まれた植物ゲノム上の位置の影響などによるものと考えられ、標的遺伝子を高活性で発現する植物体を得るためには、複数の系統を作成し、選抜する必要があると考えられる。

sGFPの蛍光観察においては、今回、透過波長域の狭いバンドパスフィルターの使用により、510 nmの蛍光を選択的に観察することができた。クロロフィルの自家蛍光に限らず、種々の有機化合物を生

産する薬用植物に特有の問題として、550 nmの蛍光を発するベルベリンを生産するオウレンなどのように、それらの蛍光が影響するケースも多く、sGFPの蛍光波長特異的な観察条件が必須と考えられる。

2. ケシのリゾピウム形質転換体自殖後代植物におけるアヘンアルカロイド成分の分析ならびにT-DNA遺伝様式の解析

T1植物のアヘンアルカロイド成分分析結果およびT-DNA挿入パターンの解析結果から、PsM1-2株の形質変異は、T-DNAの挿入に因る一遺伝子の破壊という単純なメカニズムで生じているものではないことが示唆されていたが、今回、さらに4ヶ所のT-DNA挿入部位の存在が明らかになり、それらとアヘンアルカロイド成分含有量変異との間に相関が認められないことから、形質変異原因遺伝子座の特定は困難と考えられる。本形質変異体のアヘンアルカロイド成分変異等の形質変異は、T-DNAのゲノムDNAへの挿入に因るものと予想し、その探索を進めてきたが、これまでのところ原因遺伝子の同定には至っていない。しかしながら、テバインは鎮痛薬などの新薬開発のリード化合物として有望であり、テバインを高蓄積する本形質変異体の有用性は非常に高い。遺伝子工学的手法によるアヘンアルカロイド組成を改変したケシの作出における素材として、また、モルヒネ合成酵素群の発現差異解析等の材料としても有用であると考えられ、本形質変異体を見出した意義は大きい。

E. 結論

1. 薬用植物への新規外来遺伝子導入法の適用に関する研究

(1) 幼植物を材料とした遺伝子導入法の検討

幼植物を感染対象とした共存培養法によるケシ（一貫種）、オニゲシ、マルバダ

イオウ及びニチニチソウ形質転換法の確立を試み、ニチニチソウの子葉を材料とした場合に形質転換効率100%の高効率で形質転換細胞を得た。今後、分化組織における形質転換法の確立が課題となる。

(2) 種子への遺伝子導入法の検討

植物細胞核内での複製能を有するジェミニウィルスベクターpWI-GUSのGUS遺伝子をsGFP遺伝子に置換したpWI-sGFPベクターを構築し、ケシ種子への遺伝子導入実験を開始したが、現在のところ一過的なsGFPの発現は観察されていない。本遺伝子導入法は低効率であることが報告されており、遺伝子導入時の種々のパラメーターの最適化が今後の課題である。

(2) レポーター遺伝子導入ベラドンナの作出

ベラドンナのGUSおよびsGFP遺伝子導入植物体の作出に成功した。これらは、今後の遺伝子組換え植物作出の際の陽性対照として利用する予定である。

また、ベラドンナカサのsGFP蛍光観察により、sGFPの発現部位、すなわち遺伝子導入の起った部位が、目視により確認できることが明らかになった。これは、レポーター遺伝子であるsGFPが遺伝子組換え体の目視による簡便な選抜に利用可能なことを示すものであり、今後、sGFPを選抜マーカーとして利用することにより、迅速な、エスケープのない、遺伝子導入体の選抜が可能になるものと考えられる。

2. ケシのリゾピウム形質転換体自殖後代植物におけるアヘンアルカロイド成分の分析ならびにT-DNA遺伝様式の解析

テバインを高含有量で蓄積する、ケシのリゾピウムT-DNA挿入型形質変異体の形質変異因子の解明を目標として、

T-DNA挿入部位の解析、ならびに自殖後代植物の遺伝子、化合物レベルでの解析を進めたが、いずれのアプローチに拠っても形質変異因子の同定には至らなかった。しかしながら、自殖T2世代植物は高頻度の高テバイン形質を示すことから、自殖交配により高テバイン形質を安定に保持する系統が得られつつあることは明らかである。本植物はテバイン供給源として、また、モルヒネ生合成研究の材料植物として有望な遺伝資源であり、今後、自殖交配を進めた後代植物の活用が期待される。

以上の研究より得られた知見および情報は、いずれも、薬用植物分野における有用形質を付与した遺伝子組換え体作出に関わる、遺伝子導入から遺伝子組換え植物体の選抜および再生、そして形質転換体の化合物レベルおよび遺伝子レベルの評価、さらには有用二次代謝産物の生産能改変といった各段階に密接につながるものであり、遺伝子組換え薬用植物の実用化へ向けた基盤技術の確立にいずれも欠くことのできないものであると言える。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 河野徳昭、吉松嘉代、木内文之：ケシ形質転換体におけるアルカロイド変異原因遺伝子の探索，第24回日本植物細胞分子生物学会（つくば）（2006.7）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(図表) 1. 薬用植物への新規外来遺伝子導入法の適用に関する研究
 (1) 幼植物を材料とした遺伝子導入法の検討

Table 1. Organogenesis of *Rhizobium*-infected segments after 1 month

Plant	Part	GUS			sGFP		
		Callus	Shoot	Root	Callus	Shoot	Root
PSIK	Cotyledon	±	-	-	±	-	-
	Hypocotyl	±	-	-	±	-	-
POL2	Cotyledon	-	-	-	-	-	-
	Hypocotyl	-	-	-	-	-	-
Rr	Shoot	±	-	-	±	-	±
	Cotyledon	+	-	-	+	-	+
	Hypocotyl	+	+	+	-	+	-
	Radicle	-	-	++	-	-	+
CrI	Cotyledon	++	-	-	++	-	-
	Hypocotyl	±	-	-	±	-	-
	Radicle	±	-	-	-	-	+

Table 2. GUS activity in the cultures

Plant	Clone	GUS activity
Rr	St1	-
	Hyp1	-
	Rd1	-
	Rd2	-
	Rd3	-
CrI	3-Cot1	+
	3-Hyp2	+
	4-Cot1	+
	4-Cot2	+
	4-Cot3	+
	4-Rd1	-
	4-Rd2	+
	4-Rd3	+

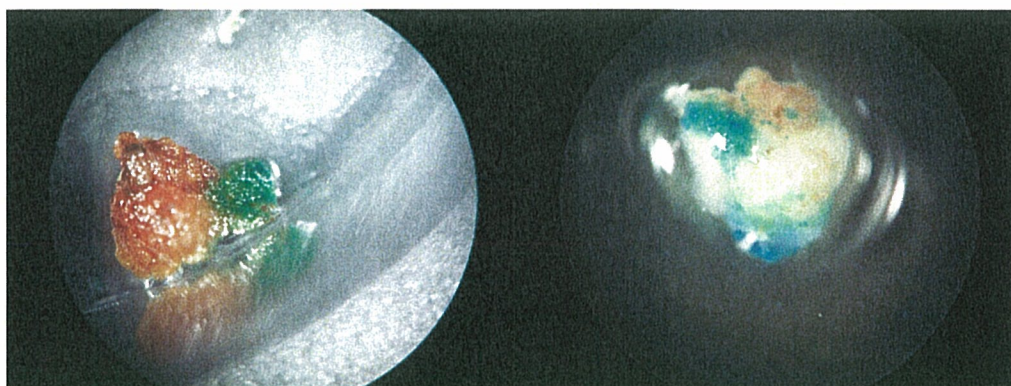


Fig. 1. GUS activity in the transformed callus cultures of *Catharanthus roseus*

Table 3. GFP detection in the cultures

Plant	Clone	GFP detection
Rr	Cot1	-
	Hyp1	-
	Hyp3	-
	Hyp4	-
	Rd1	-
CrI	1-Cot1	+
	1-Cot2	+
	1-Hyp1	+
	1-Hyp2	+
	1-Rd1	-
	2-Cot1	+
	2-Cot2	+
	2-Rd1	-

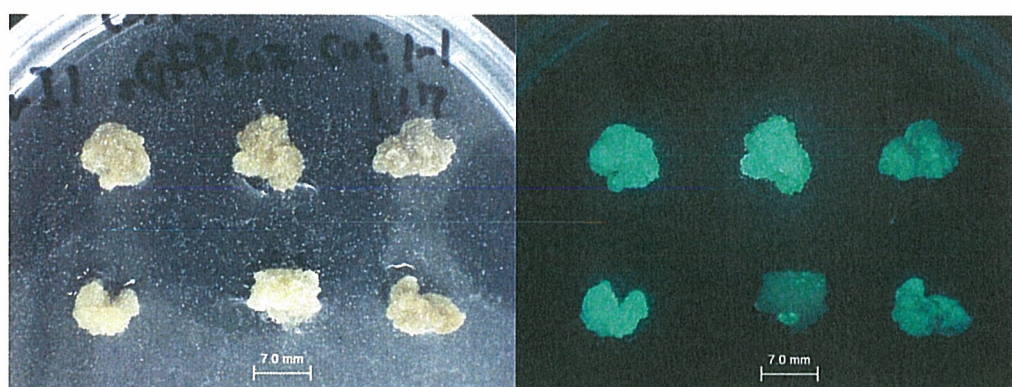


Fig. 2. Transformed callus cultures (left: light microscopy, right: fluorescence microscopy) of *Catharanthus roseus*

Table 4. Transformation efficiency of *Catharanthus roseus*

Materiall	GUS			sGFP		
	Tested seg. no.	Positive seg. no.	Efficiency %	Tested seg. no.	Positive seg. no.	Efficiency %
Cotyledon	4	4	100	4	4	100
Hypocotyl	4	1	25	4	2	50
Radicle	4	2	50	4	0	0

(図表) (2) 種子への遺伝子導入法の検討

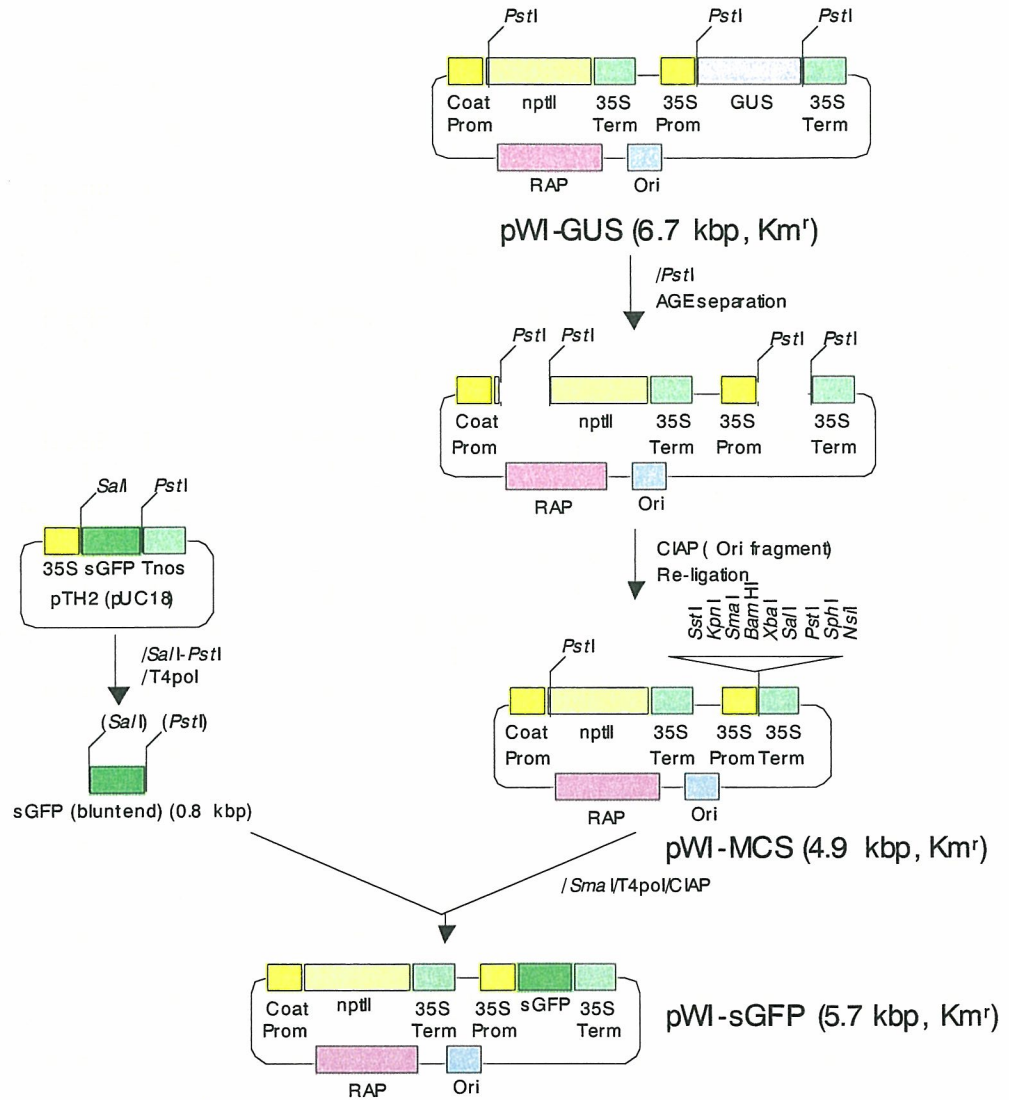


Fig. 3. pWI系ベクターの構築図

(図表) (3) レポーター遺伝子導入ベラドンナの作出

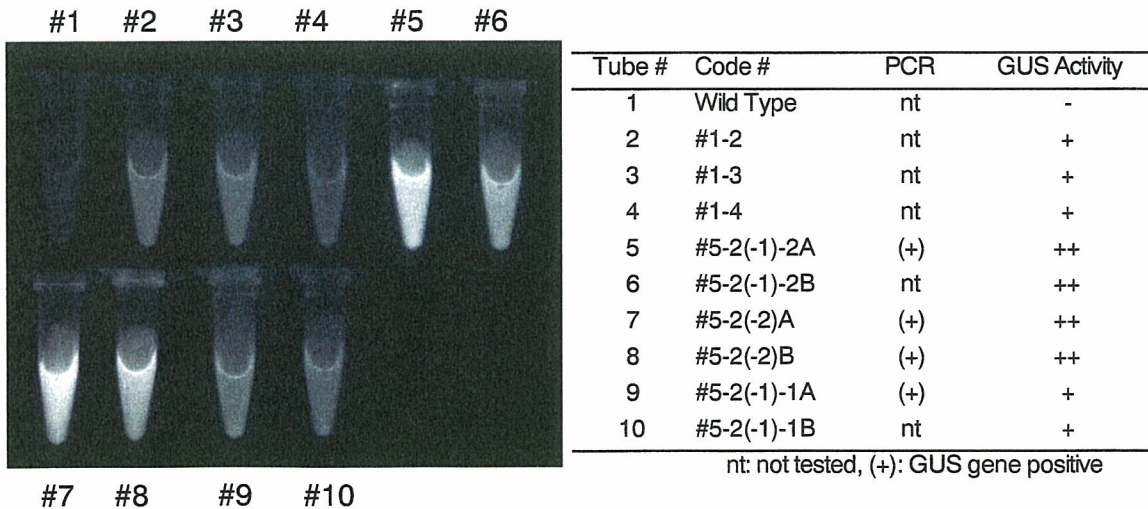


Fig. 4. Ab/pBI121のGUSアッセイ結果

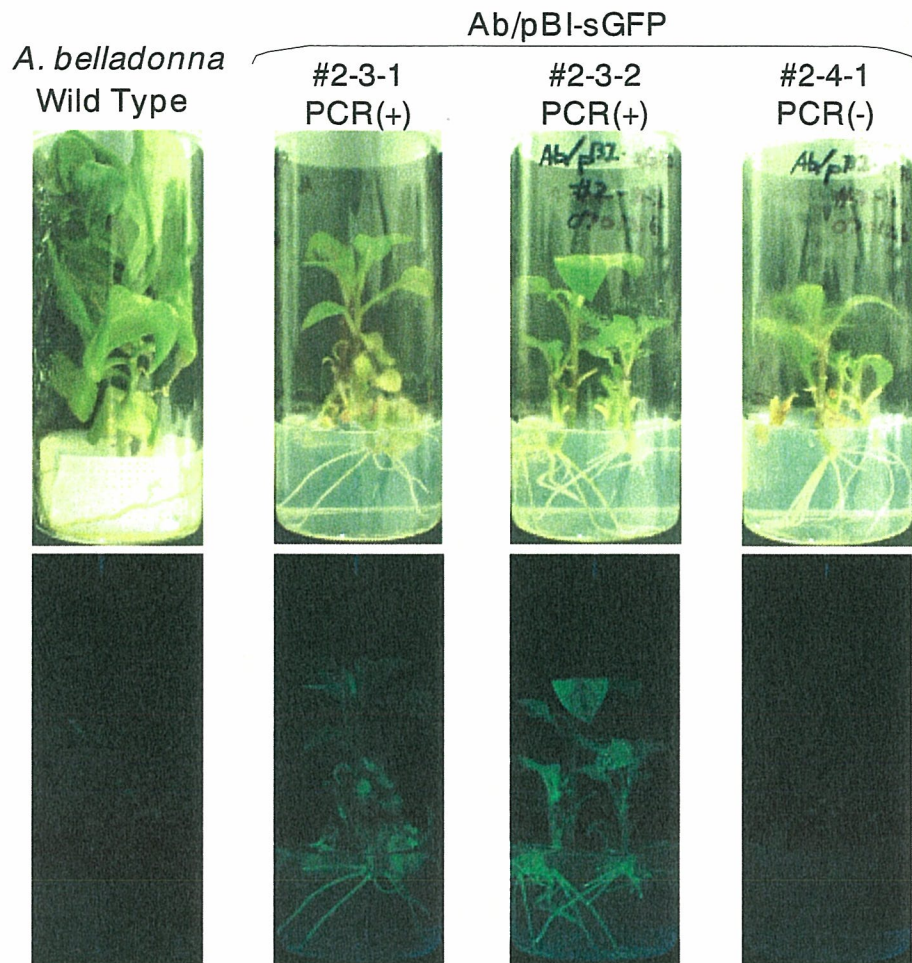


Fig. 5. Ab/pBI-sGFPの蛍光観察結果(上段:白色光、下段:青色光)

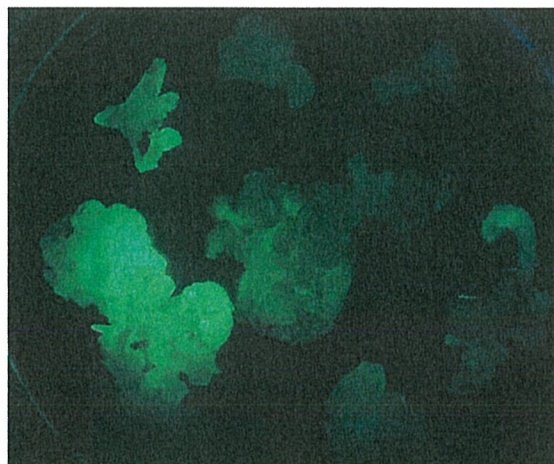
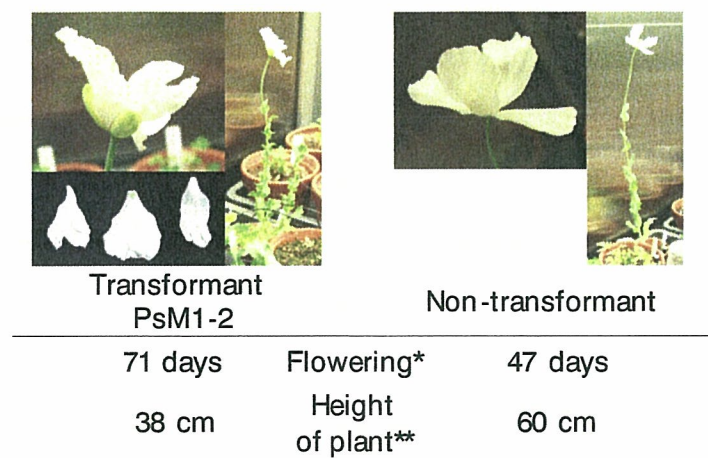


Fig. 6. Ab/pBI-sGFPカルスの蛍光
(MS(2)GN1B10ClaKm培地)

(図表) 2. ケシのリゾビウム形質転換体自殖後代植物におけるアヘンアルカロイド成分の分析ならびにT-DNA遺伝様式の解析

Morphological Characteristics of Opium Poppy Transformed with *Rhizobium rhizogenes* Strain MAFF03 -01724



*: days after transplanting to soil (phytotron) **: height of flowering plant

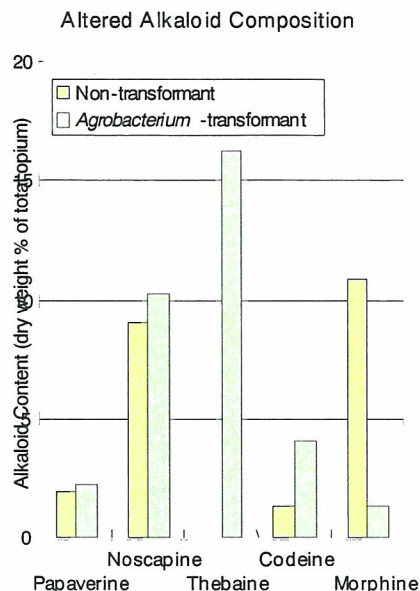
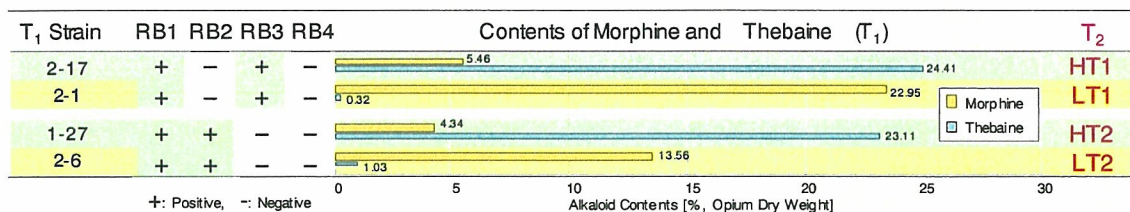


Fig. 7. ケシの *Rhizobium rhizogenes* 感染による T-DNA 挿入型形質変異体は形態の異常 および あへんアルカロイド成分含有量の変異を示した



Line	WT	HT1	HT2	LT1	LT2
個体数	12	6	15	13	10
花卉(枚)	3.8	5.8	5.7	5.6 ^{*2}	7.0
花卉の切れこみ (%)	8	83	60	31 ^{*2}	80
開花期 (days)	53 ± 4	80 ± 2	91 ± 13	83 ± 7 ^{*2}	76 ± 4
草丈 (cm)	36.0 ± 7.6	45.1 ± 3.4	44.7 ± 5.4	35.8 ± 7.2	44.1 ± 3.1
節数 (本葉の枚数)	6.7	10.5	14.4	9.5	13.7
朔果 (長さ, cm)	2.2	3.5	2.4	3.1	2.4
朔果 (幅, cm)	1.1	1.9	1.5	1.7	1.5
分枝 (個数)	0.3	0.2	0.3	0.8	0.5
あへん乾燥重量 (mg)	1.7 ± 0.7 ^{*1}	12.1 ± 3.0	9.6 ± 3.0	11.4 ± 3.8	10.3 ± 4.6

*1: n = 11, *2: n = 12

Fig. 8. 本実験で解析対象とした PsM1-2 T₂植物及びその形態的特長

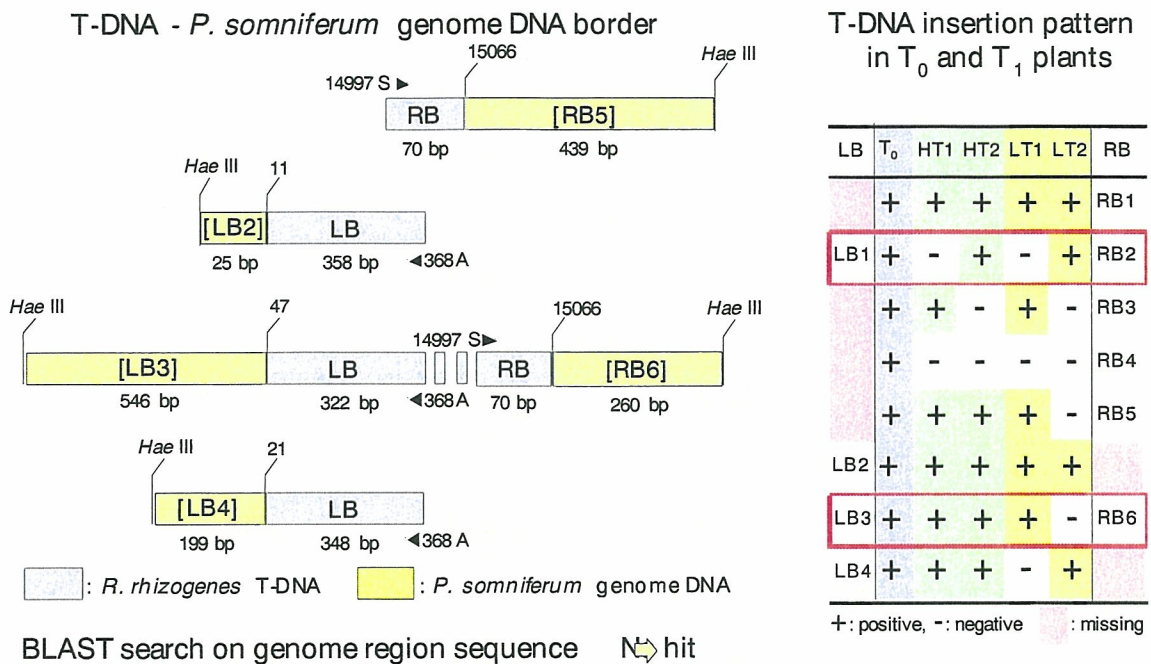


Fig. 9. *Hae* III消化ゲノムライブラリーからアダプターライゲーション PCRにより新たに見出された T-DNA 挿入部位周辺配列の構造

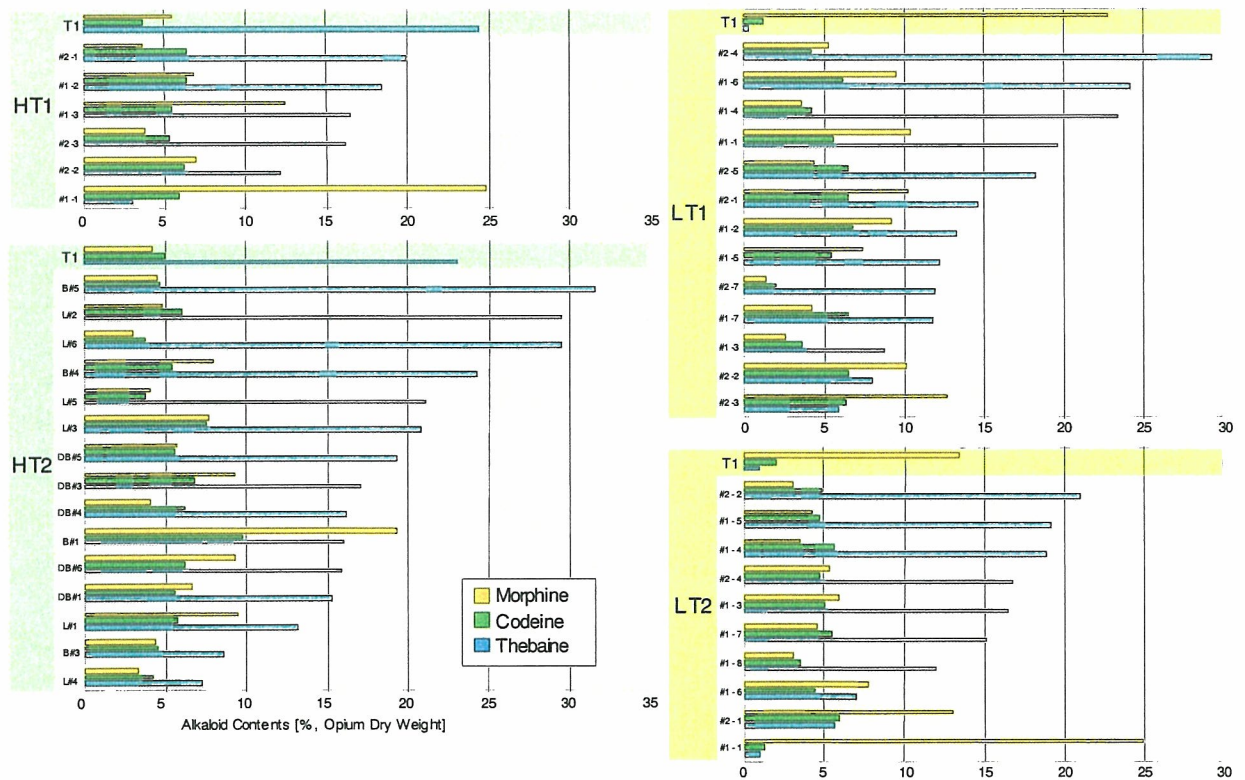


Fig. 10. PsM1 -2 T_2 植物のアヘンアルカロイド成分含有量

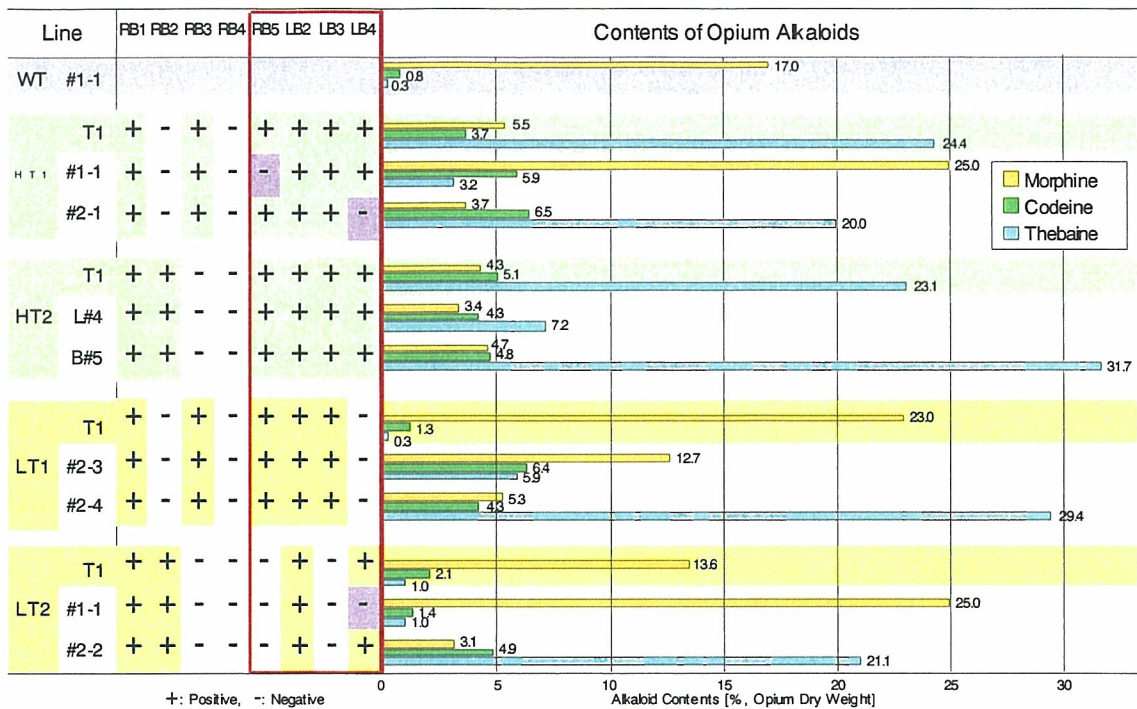


Fig. 11. PsM1 -2 T₂植物のアヘンアルカロイド成分含有量と T-DNA 挿入パターン

遺伝子組換え薬用植物の成分の解析手法に関する研究

分担研究者 淵野裕之 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

協力研究者 河野徳昭 （独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) にベンザルアセトン合成酵素遺伝子を導入した植物体と野生株の成分を GC-MS および LC-MS を用いて比較し、それらの成分の解析手法を検討した。その結果、GC-MS レベルでは差が見られなかったが、LC-MS を用い、代謝物解析用のソフトウェアを用いて比較することにより、遺伝子導入体にもみに見られる成分がいくつか確認された。

今回用いた代謝物解析用ソフトウェアによる分析手法は、今後遺伝子組換え薬用植物を作出した際に成分変化を確認する有用な分析手法となると考えられた。

A. 研究目的

現在、種々の薬用植物をはじめとする高等植物から、有用物質生産に関わる生合成遺伝子の情報が集積されつつあるが、シロイヌナズナのようなゲノム情報が潤沢で栽培が容易なモデル植物に、有用物質生産植物由来の遺伝子群を組み込み、有用二次代謝産物の生産能を付与することは、ポストゲノム時代のアウトプットの一形態として非常に有望であると考えられる。本研究においては、全ゲノム情報が得られたモデル植物のシロイヌナズナに、薬用植物の二次代謝産物生産に関わる酵素をコードする遺伝子を導入し、その代謝物プロファイルを比較することにより、遺伝子組換えにより成分がどのような変化を受けるかを分析する手法をの検討を行った。

B. 研究方法

実験に用いたシロイヌナズナの系統

野生株：*Arabidopsis thaliana*, ecotype Colombia.
(Col-0)

BAS 遺伝子導入株: *A. thaliana* (Col-0) 株に、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターで *Rheum palmatum* 由来 benzalacetone synthase (RpBAS, EMBL/DDBJ/GenBank accession No. AF326911) 遺伝子を強発現する発現カセットを導入した遺伝子組換え体。

上記発現カセットを保持する *Rhizobium radiobacter* GV3101 株を用い、フローラルディップ（花序浸し）法により、ピアラホス耐性を選択マーカーとして BAS 導入組換え体を得、自殖交配を行った T2 世代以降のホモ個体を以後の実験に用いた。なお、本形質転換体植物は静岡県立大学院薬学研究科生薬学教室（野口博司教授）において作出されたものである。

シロイヌナズナの栽培条件

シロイヌナズナの栽培は、ロックウール上で発芽させ、ロゼット形成したものを、アラシシステム (Arasystem 360 KIT, Betatech Bvba, Belgium) に移植し、成長後、自然に枯死するまでを 1 サイクルとした。

RO 水で3回洗浄し、Hyponex (6-10-6) 2000 倍液で膨潤させたロックウールをプラスチックバット上に 120 個配置し、野生株、BAS 導入株それぞれの種子をロックウール1 個あたり 1 粒ずつ播種し、ラップをかけた。発芽時期を同期させるため 4°C、暗所で 3 日間静置したのち、22°C、16 時間明条件、湿度 60%のグロースキャビネットに移動した。

グロースキャビネット移動後、3 日後には両系統とも発芽が認められ、播種約 10 日後にラップを除去した。播種約 3 週後にロゼットが形成された株を、アラシシステムにオートクレーブしたバーミキュライトを入れたものに、1 ウェルあたり 1 株をロックウールごと移植した。灌水は Hyponex

(6-10-6) 2000 倍液を使用し、アラシシステムの下部受け皿を満たすように約 4 日おきに灌水した。

播種約 10 週後、種子が完熟し、地上部が枯れはじめたころ灌水を停止し、自然に乾燥させた。播種約 13 週後に地上部を収穫した。

BAS 遺伝子の PCR による検出

野生株、BAS 導入株の両系統について、栽培期間中に葉より DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いゲノム DNA 抽出を抽出し、*Rheum palmatum* 由来 benzalacetone synthase (RpBAS, EMBL/DDBJ/GenBank accession No. AF326911) 遺伝子の全長配列を増幅するように設計したプライマーにより、導入遺伝子の有無を確認した。プライマー配列ならびに PCR 条件は下記のとおりである。

BAS 全長増幅用プライマー:

センス方向 RrBAS-1S : 5'-ATG GCA ACT GAG GAG ATG AAG

アンチセンス方向 RrBAS-1155A : 5'-CTA GCT AAT TAC GGG CAC ACT-3'

Program: 94°C 5 min →

(94°C 30 sec → 58°C 30 sec → 72°C 1 min) x 30 → 72°C 10 min → 4°C ∞

GeneAmp 2400 (Perkin Elmer)

分析試料の調製

BAS 遺伝子導入株並びに野生株の地上部 2 g を

量りとり MeOH 30 ml にて 50°C で 6 時間抽出し、ろ過後ろ液を試料溶液とした。

GC-MS 分析: 上記試料を約半量まで濃縮して試験溶液とした。

LC-MS 分析: 上記試料を濃縮せずそのまま用いた。

GC-MS分析条件

使用機器 QP5050A (SHIMADZU)

(RUN1) SUPELCO SLB-TM-5ms Capillary Column, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm film thickness; Initial temp, 250°C; Detector temp, 250°C; Column temp, 100°C (0-20 min), 100-150°C (25-30 min, 5°C/min), 150°C (30-90 min), 150-200°C (90-115 min, 5°C/min), 200°C (115-200 min).

(RUN2) SUPELCO SLB-TM-5ms Capillary Column, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm film thickness, Initial temp, 230°C; detector temp, 230 °C, Column temp 90°C (0-15 min), 90-120°C(15-30 min), 120°C(30-60 min), 120-150°C(60-75 min), 150°C(75-110 min), 150-220°C (110-120 min), 220°C (120-160 min).

LC-MS 分析条件

使用機器 QSTAR XL (Applied Biosystems)

イオン源としては、ESI (TIS)、APCI の二つを用いた。それぞれを negative, positive 両モードで測定した。

- (1) TIS (positive mode), short column (ODS), 0.1% HCOOH — CH₃CN grad 50 min
- (2) APC (positive mode), short column (ODS), 0.1% HCOOH — CH₃CN grad 50 min
- (3) APCI (positive mode), 2.1 x 150 mm (ODS), 0.1% HCOOH — CH₃CN grad 50 min
- (4) APCI (negative mode), 2.1 x 150 mm (ODS), 10 mM AcONH₄/H₂O — 10 mM AcONH₄/CH₃CN grad 50 min
- (5) APCI (negative mode), 2.1 x 150 mm (ODS), 10 mM AcONH₄/H₂O — 10 mM AcONH₄/CH₃CN grad 70 min
- (6) APCI (negative mode), 2.1 x 150 mm (ODS), CH₃CN — H₂O grad 80 min

Wild Type を control、BAS 体を sample として代

謝物検索ソフトウェア Metabolite ID (Applied Biosystems)で評価した。

Metabolite ID における代謝物検索 (Transformation)を以下の条件を入力して行った。

+147.0446 (+p-coumaroyl)

+163.0395 (+caffeoyl)

+131.0497 (+cinnamoyl)

+179.0344 (+trihydroxycinnamoyl)

+149.0603 (+dihydro+p-coumaroyl)

+309.0974 (+p-coumaroyl+glucose)

+311.1131 (+dihydro+p-coumaroyl+glucose)

C. 研究結果

シロイヌナズナの栽培

Fig. 1 に示すように、ロゼット期、抽苔期のいずれにおいても、野生株と BAS 導入株との間で顕著な成長の差異、形態の差異は認められなかった。

播種約 13 週後に地上部を収穫し、以後の実験に用いた。なお、根はロックウール、バーミキュライトとの分離が困難で、収穫できなかった。

両系統を 3 回栽培を行った際の、それぞれ 5 ないし 6 株の地上部の草丈の平均値 (±標準偏差) は、1 回目 Col-0: 31.8±9.7 cm (n=6), BAS: 31.7±6.6 cm (n=5); 2 回目 Col-0: 36.5±7.5 cm (n=5), 35.8±4.3 cm (n=5); 3 回目 Col-0: 24.2±11.4 cm (n=5); BAS: 34.6±1.2 cm (n=5) となり、成長に顕著な差は認められなかった。

BAS 遺伝子の PCR による検出

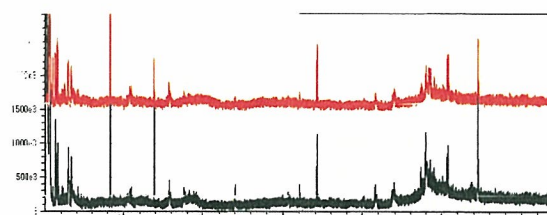
野生株、BAS 導入体の両者より抽出したゲノム DNA を鋳型に、BAS 特異的なプライマーで BAS 遺伝子の検出を行ったところ、Fig. 2 に示すように BAS 導入体のみには BAS 遺伝子の全長に相当する約 1.2kbp のバンドが現れ、その増幅産物のサイズから、BAS 導入体における BAS 遺伝子の存在を確認した。

GC-MS 分析

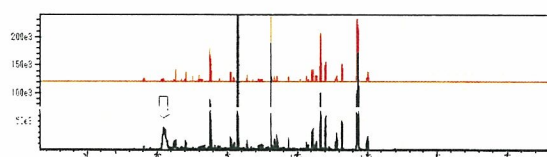
今回植物の抽出を比較的広範囲な極性の化合物を抽出可能なメタノールにて行ったため、分析条件としてキャピラリーカラムの耐温温度が比

較的高いカラムを用い、200°Cまで昇温プログラムを組み分析を行った(RUN1)。また、生成が予想されるベンザルアセトン類の bp は低いと思われることから、低温条件の長い昇温プログラムでも検討を行った(RUN2)。しかし、TIC では野生株と BAS 導入体の差がほとんど見られなかった。尚、RUN2 において、BAS 導入体のみで見られるピークが現れたが、このピークは、MS から 5-dodecenol と考えられ、今回の組換えによる成分の変化とは直接関係ないものと思われた (Fig. 3)。

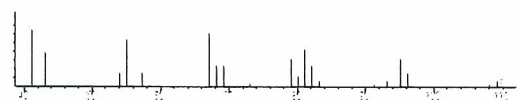
RUN 1



RUN 2



(上段 : BAS、下段 : WT)



(矢印部分の MS スペクトル)

Fig. 3 BAS 導入体(BAS)と野生株(WT)の GC-MS

LC-MS 分析

まず、BAS の反応並びにその後の変換により生成することが予想される benzalacetone (m/z 146), 4-methoxybenzalacetone (m/z 192), 4-hydroxybenzalacetone (m/z 176)について標準品との Rt の比較および XIC にて検索を行ったが、これらの化合物の明確な存在は確認できなかった。また、TIC においても、実験の部に示す (1) - (5) の条件では顕著な差は見られなかった。但し、base peak chromatogram で比較すると一部に明らかな違いが見られた。