

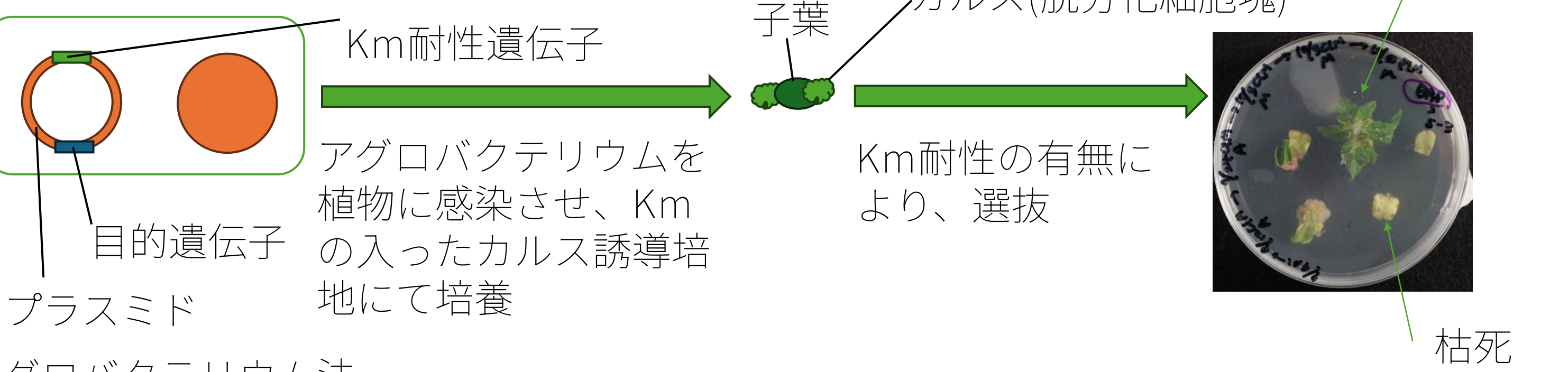
植物形質転換体選抜技術の開発を目指した基礎的検討

森田由梨(1)(2), 菅野茂夫(1)(2)

(1)東京理科大・創域理工学部 (2)産総研・バイオものづくり・植物機能制御研究チーム

背景

植物の遺伝子を導入して、特定の形質を付与する「形質転換」は、農業や産業分野で幅広く利用されている重要な技術である。その技術の中で、よく用いられている方法は、アグロバクテリウム法である。この方法は、カルス(脱分化細胞塊)を誘導し、目的の遺伝子を持つアグロバクテリウムに感染させるといった方法である。その後のワークフローとして、目的の遺伝子が導入されたかを選抜するというステップが必要である。¹



アグロバクテリウム法

アグロバクテリウム法は、カナマイシン(Km)などの抗生物質を用いて、目的の遺伝子が導入された細胞を選抜する手法である。しかし、その手法の欠点として非導入細胞(エスケープ)の混在が挙げられる。また、Kmを始めとする抗生物質の使用は、濃度によっては再生率が低下する。(例: リンゴの葉の切片では、Km 5-8mg/Lではカルス誘導、シュート再生が可能だが、9-25mg/Lでは再生率が大幅低下する²⁾) 低濃度でのKmの使用は、成育への影響が小さくなるものの、選抜の精度を下げる可能性が高い。当研究室では、これらの課題を解決し、ゲノム編集をより産業利用しやすくするための新しい選抜法の開発を進めている。高価で天然型のサイトカイニン(trans-Zeatin)と、入手困難なアグロバクテリウム殺菌用の抗生物質Augmentinでの検討は実施済みであるが、実用化に向けては、より安価で入手可能な試薬での検討が必要である。本発表では、その検討の結果を報告する。

目的

- 2種類のサイトカイニン(trans-Zeatin; tZ, 6-ベンジルアミノプリン; BAP)の違いが、カルス形成やシュートの再生に与える影響を比較
- アグロバクテリウムの過剰増殖を防ぐための、抗生物質メロペネムの利用可能性と濃度の検討

実験方法・条件

試料: 播種後4日目のトマト葉切片(microtom)

培養条件: 25℃、16h 明/8h 暗、光強度 25μmol m⁻²s⁻¹

感染法:

前日

アグロ培養(LB+抗生物質)

当日

- アグロ培養液を遠心→MS培地+アセトシリンゴン+メルカプトエタノールで感染液調製
- 子葉を切り取り、感染液に20分浸漬
- 共存培養用培地に移し、3日間暗所培養

カルス誘導

- CIMへ移植、10~14日ごとに新しいCIMに継代
- シュート誘導も同様

培地の組成

1.tZとBAPとの比較

CIM: tZ/BAP 1.5mg/L, Km 100.0mg/L, Augmentin 375.0mg/L(途中からMeropenem 25mg/L)

SIM: tZ/BAP 1.0mg/L, Km 150mg/L, Meropenem 25mg/L

2. Meropenem濃度検討

CIM: BAP 1.5mg/L, Km 100.0mg/L, Meropenem 12.5/25/50mg/L

SIM: BAP 1.0mg/L, Km 150mg/L, Meropenem 12.5/25/50mg/L

結果

1.tZとBAPとの比較

アグロに感染させたトマト葉切片をCIMに移し、10~14日後に新しいCIMに継代した写真を図1に示す。この時点では、tZとBAPとでは生育に大きな違いが見られなかった。

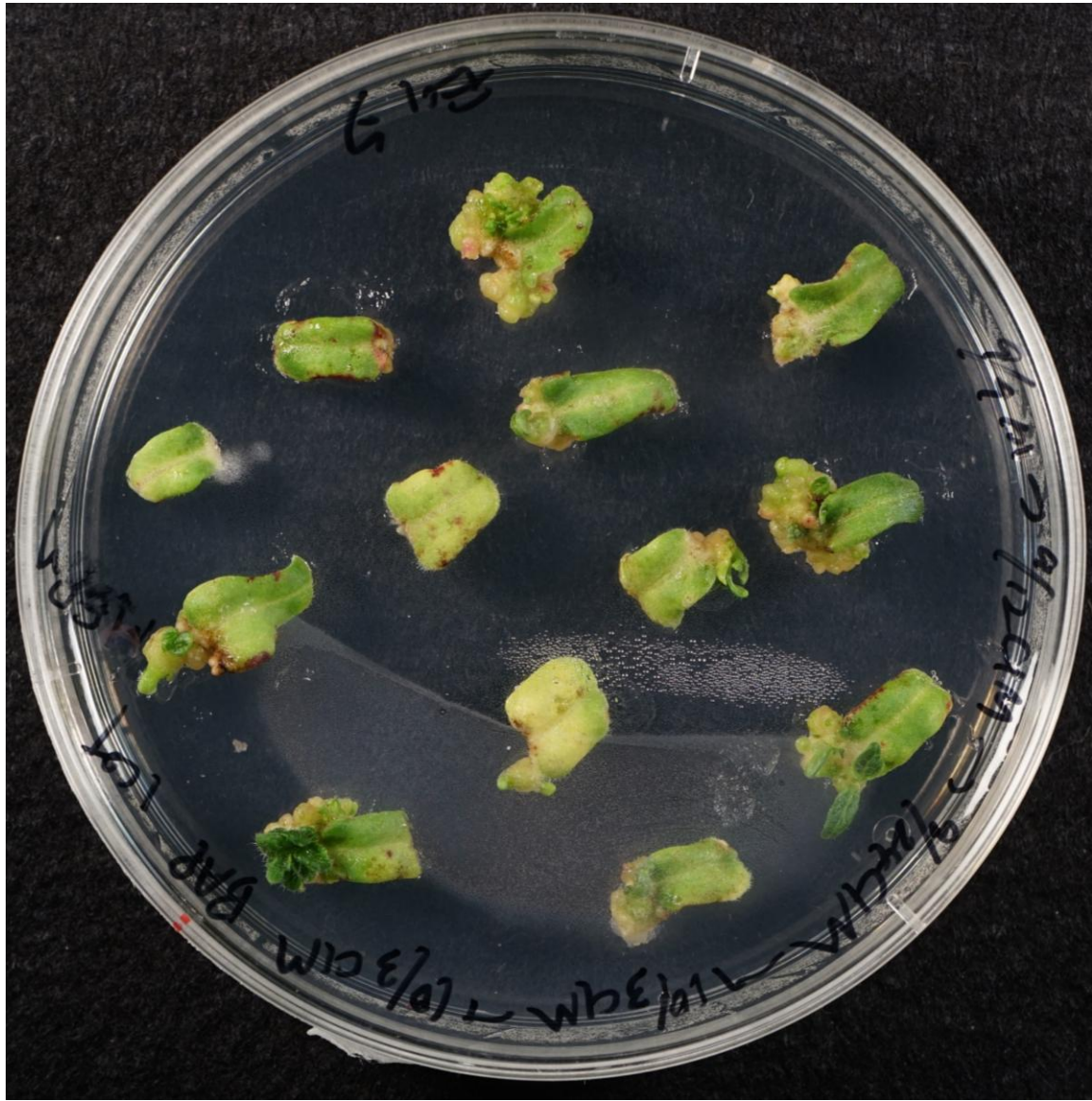


図1: tZ(左)とBAP(右)とのカルス形成の様子と比較

また、シュート誘導についても同様に行った写真を図2に示す。この時点でも、成育に大きな差がなかった。

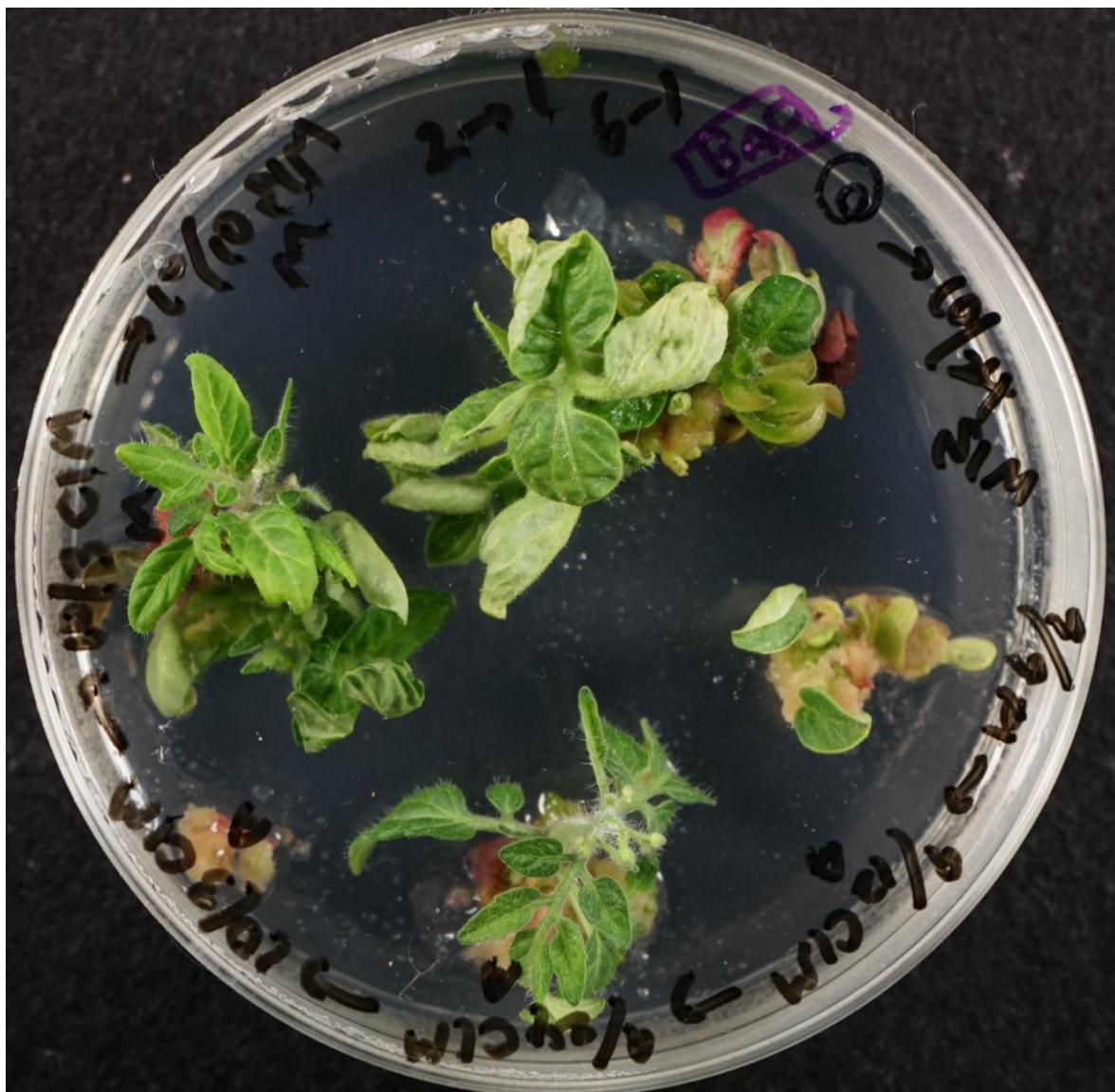
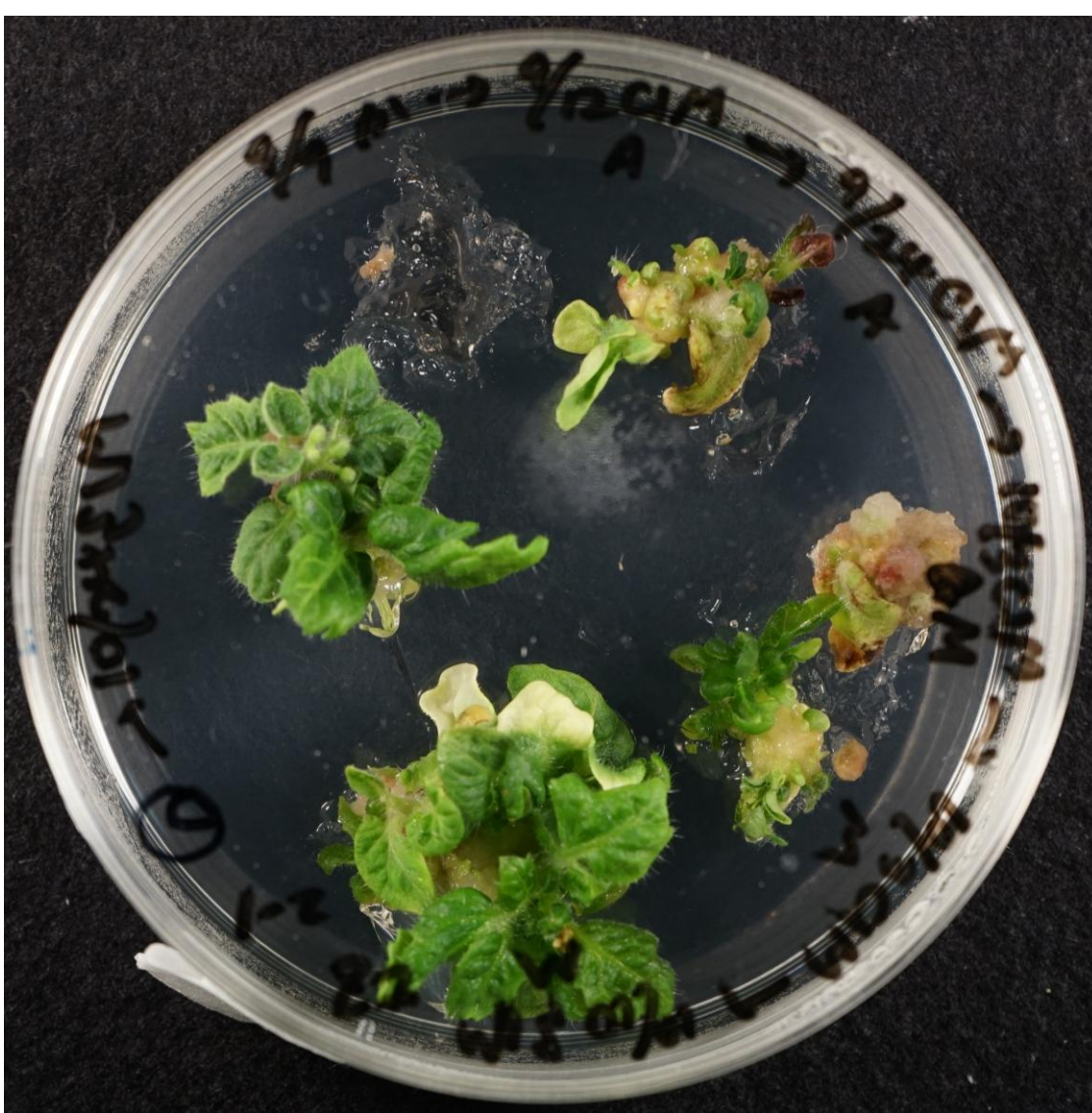


図2: tZ(左)とBAP(右)とのシュート形成の様子と比較

2.Meropenem濃度検討

アグロに感染させたトマト葉切片を異なるMeropenem濃度のCIMに移し、10~14日後に新しいSIMに継代した写真を図3に示す。

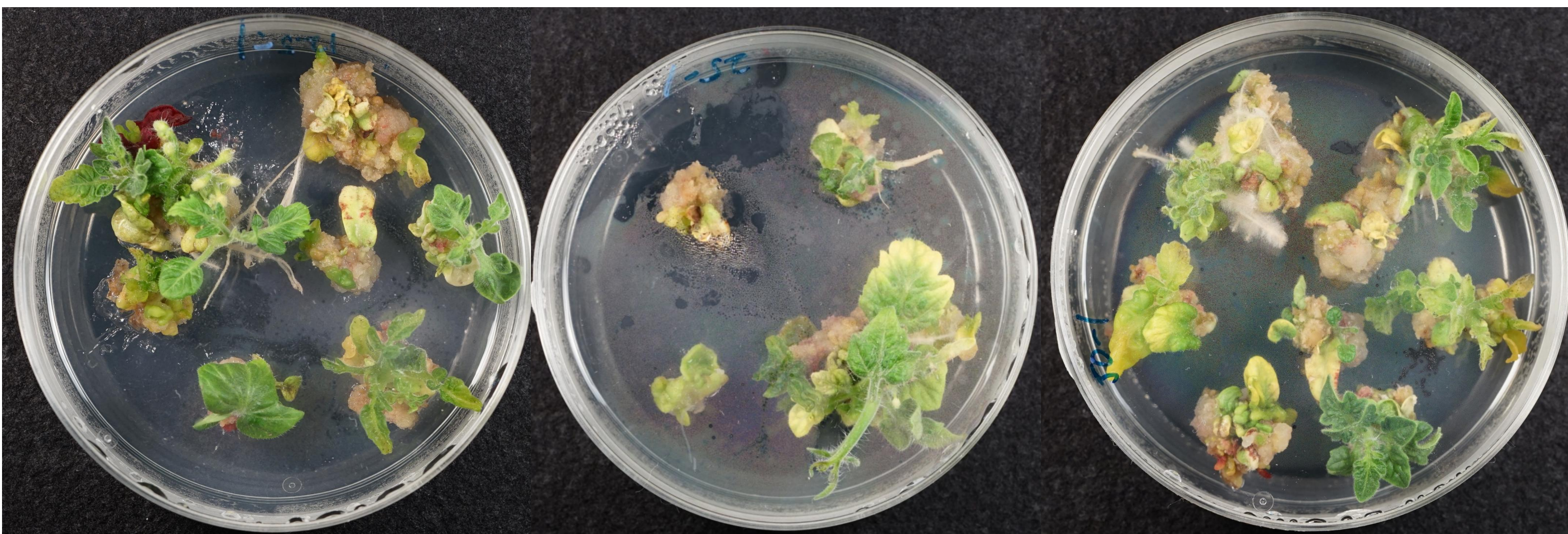


図3: 12.5mg/L(左), 25mg/L(中央), 50mg/L(右)Meropenemのシュート形成の比較

今後の展望

本研究においては、tZとBAPの違いやMeropenemの濃度による成育の違いはほとんど見られなかった。これら検証から、代替試薬の利用可能性が示唆される。しかし、シュート誘導の次の段階のルート誘導の検証では、tZとBAPにおいては、成育に大きな差はなかったものの(図4)、メロペネム濃度検討については、現在、検証を進めている段階である。また、倍数体の確認やジェノタイピングについても実験を計画している段階である。また、今回低濃度として設定した12.5mg/L Meropenem濃度について、アグロの過剰増殖が見られなかったため、12.5mg/L以下の濃度も今後検討していく予定である。また、tZとBAPとの構造の違いの観点から、考察を深めていく必要がある。

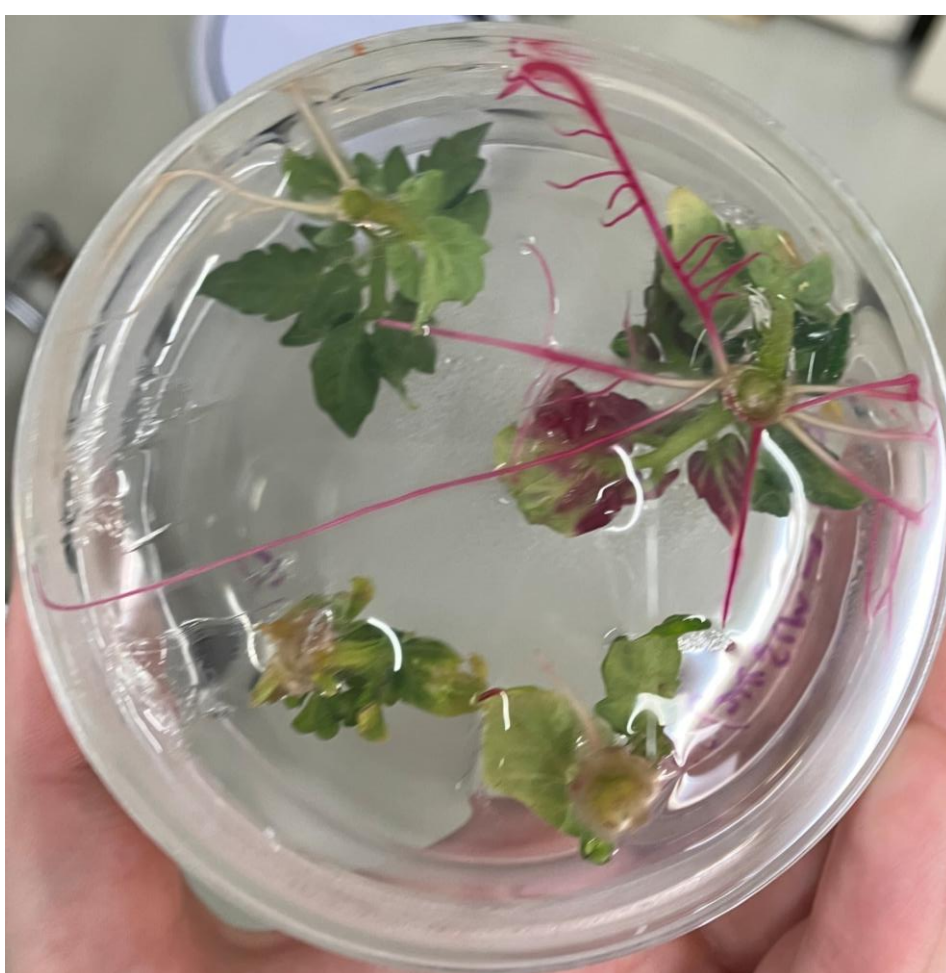


図4: tZ(左)とBAP(右)のルート形成の様子

参考文献

- Shahnam Azizi-Dargahlou, Mahinpouresmaeil., SPRINGER(2023)
- Shalini Verma et al., SPRINGER(2023)