

アグロバクテリウム法によるイネ品種 「コシヒカリ」の効率的形質転換*

橋爪不二夫・土屋 亨*・宇垣正志**・神山康夫*

資源開発部・三重大学生物資源学部*・農水省農業生物資源研究所**

要 旨

イネの形質転換法として、現在はアグロバクテリウム法が主流となっている。ところが、一般に使われる pBI101 由来のバイナリーベクターによる形質転換では、材料として培養しやすい品種が用いられていることが多い。そこで、pBI101 由来の pIG121Hm を用いて、主要品種「コシヒカリ」の形質転換条件を検討した結果、アグロバクテリウムの感染材料である胚盤由来カルスの誘導後日数が重要であることが明らかになった。すなわち、培地条件の改良によって概ね 3 週間で胚盤由来カルスを誘導し、材料とすることで、形質転換体を効率的に作出することが可能となった。

キーワード：アグロバクテリウム法、イネ、カルス誘導後日数、形質転換、コシヒカリ

緒 言

近年、高等植物への外来遺伝子導入による形質転換など、遺伝子工学的手法を作物の品種改良に利用する試みが盛んに行われている。形質転換を利用すると、既存品種の長所を残し欠点だけを克服できることや、あらゆる生物が持つ有用な形質を取り出してきて付与できることなど、従来の育種法では達成し得なかった画期的な新品種の育成が可能となる。

イネの形質転換にはこれまでエレクトロポレーションやパーティクルガンといった物理的方法が用いられてきたが、形質転換効率が低いことやソマクローナル変異による不稔個体の発生など問題点が多かった。ところが、Hiei et al.¹⁾により胚盤由来カルスを材料とすることでアグロバクテリウム法がイネの形質転換においても適用できることが報告され、簡便で形質転換効率の高いこの方法が広く利用されるようになってきた²⁾。ただ、実用的な作物改良の手法として利用する場合、材料は育成地において重要な品種を選ぶことになるが、一般的なバイナリーベクターを用いた形質転換では培養しやすい品種

に対象が限定される。そこで、本研究ではイネ品種の中でも特に経済的重要性の高いコシヒカリを対象として効率的な形質転換法の確立を図った。

方 法

コシヒカリの完熟種子を、2, 4-D 2 mg/ℓ を含む修正 N 6 培地^{3) 4)} (アンモニア態窒素を除き、硝酸態窒素 1/4 量に減少) に植え付け、室温 30℃ の人工気象室内でカルスを誘導した。このとき培地に加えるアミノ酸及び糖組成の影響を調べた。アミノ酸としては、プロリン (Pro) 3 g/ℓ, Pro 3 g/ℓ + カザミノ酸 (Cas) 0.3 g/ℓ, グルタミン (Gln) 1 g/ℓ + アスパラギン酸 (Asp) 1 g/ℓ をそれぞれマルトースを含む培地に添加した。糖については、マルトース 30 g/ℓ あるいはシュクロース 30 g/ℓ を用い、さらにそれぞれに 10 g/ℓ グルコースを付加した 4 区を設定した (アミノ酸は Gln+Asp)。各区 54 個の種子を植え付け、3 週間後誘導されたカルスの総数を調査した。

ベクターには pBI101 に由来し、カナマイシン耐性遺伝子 (NPTⅡ)、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT)

* 本研究は日本育種学会 1997 年中部地区談話会において発表した。

* 三重大学生物資源学部 (〒514-8507 三重県津市上浜町)

** 農水省農業生物資源研究所 (〒305-8602 茨城県つくば市観音台)

及びイントロン GUS (Intron-GUS) を含む pIG121 Hm⁵⁾ を、アグロバクテリウムの系統は EHA101⁶⁾ を用いた。カルス誘導培地と同じ組成の液体培地（アセトシリシリンゴン 10mg/ℓ 添加）に導入する遺伝子を保持したアグロバクテリウムを懸濁し、カルスに感染させた。28℃で2～3日共存培養した後、カルベニシリン (Cb) 250mg/ℓ、ハイグロマイシン (Hyg) 50mg/ℓ を含むカルス誘導培地で数回継代した。得られたハイグロマイシン耐性カルスをベンジルアデニン (BA) 0.5mg/ℓ、インドール酢酸 (IAA) 0.2mg/ℓ を含む再分化培地 (Cb125mg/ℓ, Hyg25mg/ℓ) に移植した。

再分化個体は閉鎖系温室で順化し、葉片を採取し X-Glucuronide1mM を含む GUS アッセイ用緩衝液に浸漬した。また、葉から DNA を抽出し、DIG ラベルしたハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (HPT) および GUS 遺伝子をプローブとしたサザン分析により、コピー数を調査した。

また、コシヒカリ以外の品種について、上記のカルス誘導培地 (Gln+Asp, マルトース添加) でカルスを誘導し、同様に形質転換を行った。

結 果

誘導後日数が 19 日、27 日の胚盤由来カルスを用いると、それぞれ 34.0%、25.0% と形質転換効率（ハイグロマイシン耐性再生植物体数/供試カルス数）が高いのに対し、37 日後の同カルスでは 0% と急激に低下した（表 1）。

コシヒカリの胚盤由来カルス誘導に対するアミノ酸の

表 1. コシヒカリのカルス誘導後日数とハイグロマイシン耐性個体の割合

カルス誘導 後日数 (日)	供 試 カルス数	ハイグロマイシン耐性 ^{a)}	
		カルス (%)	再生植物 (%)
19	100	57.0	34.0
27	100	54.0	25.0
34	100	4.0	0.0

^{a)} 供試カルスに対する割合

表 2. 培地に添加するアミノ酸と誘導されたコシヒカリの胚盤由来カルス数

添加アミノ酸	供試種子数	誘導カルス数
無添加	54	11
プロリン ^{a)}	54	54
プロリン ^{a)} + カザミノ酸 ^{b)}	54	22
グルタミン ^{c)} + アスパラギン酸 ^{c)}	54	228

^{a)} 3 g/ℓ, ^{b)} 0.3 g/ℓ, ^{c)} 1 g/ℓ

影響を調べたところ、グルタミンとアスパラギン酸を添加した場合には無添加区と比べ、約 22 倍の数のカルスが得られた（表 2）。

また、同様に糖組成の影響をみると、マルトース単用、シュクロース単用で誘導数が高く、グルコースを併用するとやや減少した（表 3）。

ハイグロマイシン耐性イネをサザン分析した結果、1～7 コピーの HPT および GUS の導入が認められた（データ未記載）。GUS アッセイにより、葉、茎、根、種子で濃青色に染まる部分が見られた。

コシヒカリ以外の品種についても、同様の方法で形質転換体を得られた。あゆみもちが 5% と低かったほかは 15～25% の形質転換率を示した（表 4）。

考 察

コシヒカリの場合、胚盤由来カルスの誘導後日数の差異により、得られるハイグロマイシン耐性個体の割合に大きな差が見られた。誘導期間が 4 週間を超えたカルスを材料とするとハイグロマイシン耐性イネは全く得られず、安定して形質転換個体を得るためには概ね 3 週間で胚盤由来カルスを誘導する必要がある。形質転換には共存培養のとき用いるアセトシリシリンゴンが重要な役割を果たしているが、この現象においても胚盤由来カルスの

表 3. 培地の糖組成と誘導されたコシヒカリの胚盤由来カルス数

糖 組 成	供試種子数	誘導カルス数
マルトース ^{a)}	54	570
マルトース ^{a)} + グルコース ^{b)}	54	475
シュクロース ^{c)}	54	524
シュクロース ^{c)} + グルコース ^{b)}	54	314

^{a)} 30 g/ℓ, ^{b)} 10 g/ℓ, ^{c)} 30 g/ℓ

表 4. 誘導後 3 週間のカルスを用いたときのイネ主要品種の形質転換効率

品 種	供 試 カルス数	ハイグロマイシン耐性 ^{a)}	
		カルス (%)	再生植物 (%)
コシヒカリ	100	54.0	24.0
ナツヒカリ	100	19.0	16.0
あきたこまち	150	24.0	17.3
キヌヒカリ	100	18.0	15.0
どんとこい	100	24.0	20.0
ヤマヒカリ	100	36.0	25.0
山田錦	100	54.0	24.0
あゆみもち	100	6.0	5.0

^{a)} 供試カルスに対する割合

誘導初期にアセトシリゴンに類似した生理活性物質が関与しているものと推察される。

培養時の細胞増殖の遅いコシヒカリで、3週間で増殖が盛んな細かいカルスを誘導するには、培地へのグルタミンとアスパラギン酸の添加が有効であった。一般にイネの培養時に有効とされているプロリン、カザミノ酸の添加では細かいカルスが誘導されにくい傾向があった。このようなカルスでは、増殖能が低いうえに、上記の生理活性物質の分泌が少ないため外来遺伝子の導入が起こりにくいものと考えられる。

グルコースはアグロバクテリウム菌の増殖のため共存培地には添加するが、カルスの誘導に用いると抑制的に作用した。したがって、マルトースあるいはシュクロースを単独で用いるのが有効と思われる。

サザン分析およびGUSアッセイの結果、導入した遺伝子はイネのゲノムDNAに組み込まれ、発現していることが確認できた。

この方法を「コシヒカリ」以外の他の品種についても試みたところ、糯米である「あゆみもち」では5%と低い形質転換効率であった。これは粳米との遺伝的背景の違いが原因と推察される。一方、「コシヒカリ」を含む粳米7品種では15~25%と高い形質転換効率を示した。したがって、今回開発したイネの形質転換系は主要なジャポニカ品種の分子育種に幅広く利用できるものと考えられる。

引用文献

- 1) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T., 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*, L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.*, 6 : 271-282.
- 2) Toki, S. 1997. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Mol. Biol. Report.*, 15 : 16-21.
- 3) Tsugawa, H., Otsuki, Y., 1993. Wide application of cell culture system of rice. I. Koshihikari. *Jpn. J. Breed.*, 43 (suppl. 2) : 121 (in Japanese).
- 4) Chu, C.-C., Wang, C.-C., Sun, C.-S., Hsu, C., Yin, K.-C., Chu, C.-Y., Bi, F.-Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*, 18 : 659-668.
- 5) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Nakamura, K., 1990. Construction and expression in tobacco of a beta-glucuronidase (*GUS*) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.*, 31 : 805-813.
- 6) Hood, E., Helmer, G., R. Fraley, R., Chilton, M.-D., 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.*, 168 : 1291-1301.

Efficient Transformation of Rice Cultivar "Koshihikari" Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

Fujio HASHIZUME*, Tohru TSUCHIYA**,
Masashi UGAKI*** and Yasuo KOWYAMA**

Abstract

Recently, the methods for transformation of rice plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* have frequently been employed. However, most studies on transformation of rice by binary-vector derived from pBI101 were carried out for the limited cultivars, which were easy to culture. We attempted the cultural conditions to transform a major cv, "Koshihikari" by pIG121Hm derived from pBI101 and found that the inducing period of scutella-calli was of importance. Thus the efficient production of transformants could be attained when the scutella-calli were induced for about three weeks on improved callus-inducing media and co-cultured with *Agrobacterium tumefaciens*.

Key words : *Agrobacterium*-mediated method, Koshihikari, Inducing period of calli, Rice, Transformation

* Mie Prefectural Science and Technology Promotion Center, Agricultural Research Center, Ureshino, Mie 515-2316, Japan.

** Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514-8507, Japan.

*** National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan.