

mangrin 遺伝子を導入した環境ストレス耐性バレイショの作製と評価

古矢 加奈 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

背景

地球温暖化など、環境悪化が進行している今日、深刻な水不足に陥る地域が増加している。地下水の過度な汲み上げによる地下水位の低下や、不適切な灌漑により地表への塩類集積が起り、植物が生育できない土地が増加している。これに対して、遺伝子組換え技術を用いた環境ストレス耐性の付与は、塩類集積地の緑化につながる有効な手段の一つであると考えられる。

先行研究により、マングローブより単離された *mangrin* 遺伝子が植物に耐塩性を付与することが報告されている (Yamada et al 2002, Yu et al 2013)。そこで、食糧・工業製品として用いられているバレイショ (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) に *mangrin* 遺伝子を導入し、環境ストレス耐性遺伝子組換えバレイショの作製を試みることにした。あわせて、作製された遺伝子組換えバレイショに塩ストレス耐性評価試験を行う。

材料と方法

1. 材料

バレイショは MS 固形培地上で 25°C (Murashige and Skoog 1962)、16 時間明期、8 時間暗期の光条件下で培養した。アグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter* LBA4404 株) に、*mangrin* 遺伝子を含むコンストラクト (東京農工大学より譲渡、pAB7113-mang: 図 1) を導入したものを遺伝子導入に使用した。

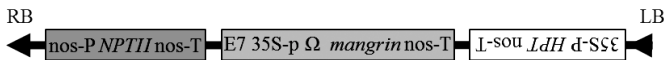


図 1: pAB7113-mang の構成図

pBI101 の RB-LB 間にある β -Glucuronidase を E7 ~ 35S-pro ~ Ω ~ *mangrin* 遺伝子に置き換え、その LB 側に 35S-pro ~ *HPT* 遺伝子 ~ Nos-ter を逆向きに加えたものである。

2. 遺伝子組換えバレイショの作製

バレイショの葉柄を除いた葉、及び、脇芽を含まない節間を 1 cm 程度に切断し、pAB7113-mang を保有するアグロバクテリウムに感染後、共存培地にて 25°C、暗条件下で 2 日培養した。その後、除菌培地にてカルスの形成が確認されるまでの数日間を 25°C、暗条件下で培養した。形成されたカルスは再分化培地にて 25°C、暗条件下で培養を行った。カルスは 2 週間毎に新しい培地に継代し、カルスが枯死するまで培養を継続した。得られた再分化個体は切り出し、材料植物の培養と同じ条件で培養した。

3. 導入遺伝子の確認

得られた再分化個体に対し、2 種類のアグロバクテリウム残存性試験を実施した。すり潰し法では 500 μ l の YEB 液体培地中で葉を 1 枚すり潰し、ミラクロスで濾過し、50 mg/L Rifampicin の入った YEB 固体培地に 100 μ l まく。振盪法で

は、1 mL の YEB 液体培地に葉を 1 枚入れて 1 時間振盪し、50 mg/L Rifampicin の入った YEB 固体培地に 100 μ l まく。その後、28°C・暗所で 3 日間培養を行った。これにより、アグロバクテリウムの除菌を確認した。次に、植物への遺伝子導入を確認するため、簡易 SDS 法により DNA を抽出し、Genomic PCR により *mangrin* 遺伝子の導入を確認した。

4. 塩ストレス耐性評価試験

植物の茎頂を 1 cm の大きさに切り、塩含有培地 (0, 50, 100, 150, 200 mM NaCl) で 4 週間培養した後、地上部の長さや根の本数を測定した。1 区画 5 本の NT を使用して条件検討を行った結果を図 2 に示す。非組換え体 (NT) の地上部の長さが約 1/2 になった 50 mM と根がほぼ生えなくなった 150 mM を組換え体の耐性評価試験条件とした。

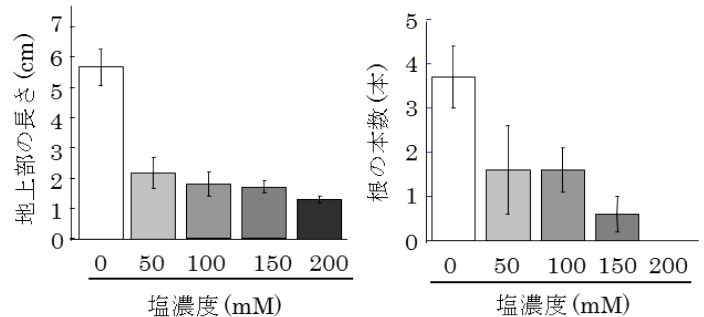


図 2: 塩に対する NT の成長変化

結果と考察

現在までに、17 系統の遺伝子組換えバレイショが作製された。これら遺伝子組換えバレイショに塩ストレス耐性評価試験を行ったところ、50 mM NaCl 培地での成長は NT に近いものの、150 mM NaCl 培地で M20、M26、M27、M33 で発根が認められたことから、この 4 系統は耐塩性を持つと考えられる。

参考文献

- Yamada A, Saitoh T, Mimura T, Ozeki Y (2002) Expression of Mangrove Allene Oxide Cyclase Enhances Salt Tolerance in *Escherichia coli*, Yeast, and Tobacco Cells. *Plant and cell physiology* 43: 903-910
- Yu X, Kikuchi A, Shimazaki T, Yamada A, Ozeki Y, Matsunaga E, Ebinuma H, Watanabe KN (2013) Assessment of the salt tolerance and environmental biosafety of *Eucalyptus camaldulensis* harboring a mangrin transgene. *Journal of Plant Research* 126: 141-150.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.