

SeFLA 遺伝子を導入した耐塩性ジャガイモの開発

中村 匠汰 (筑波大学 生物学類)

指導教員：菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

●研究概要

本研究の目的は *SeFLA* 遺伝子をジャガイモに導入することで、耐塩性が強化された遺伝子組換えジャガイモを作製することである。遺伝子導入を確認した後、独立した各系統において、*SeFLA* 遺伝子の発現が認められ、非組換え体と比べて耐塩性が強化されていることを明らかにした。

●背景・目的

近年、不適切な灌漑農業等によって塩類集積が引き起こされ、作物を栽培することが出来なくなった土地が拡大している。一方で、世界人口は増加の一途を辿っており、これまで以上に食糧を確保することが重要な課題となっている。これらの問題を解決する手段の一つとして、耐塩性形質を持つ作物の開発が挙げられる。本研究では、世界四大作物のひとつであり、食糧、また工業原料としても需要があるジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) に *Saricornia europaeae fasciclin-like arabinogalactan protein* 遺伝子 (*SeFLA* 遺伝子) を導入することにより、耐塩性を強化することを目的としている。

●材料

～植物材料～

ジャガイモの品種は *Desiree* を用いた。*Desiree* は古くから主にヨーロッパで食用として利用され、研究材料としても用いられてきた品種である。また、他の品種と比べて強い耐塩性を持つことが知られている。植物材料は、Murashige and Skoog 固形培地上で25℃、16 時間明期、8 時間暗期 (明条件) の光条件下で培養し、維持した。

～導入遺伝子～

導入遺伝子は、東京農工大学小関研究室において単離された *SeFLA* 遺伝子を用いた。この遺伝子は、アッケシソウの培養細胞から得られた cDNA を大腸菌に導入し、塩条件下で生存する菌体が保持していたものである。そのため、この遺伝子は、大腸菌に耐塩性を付与することが出来ると考えられている。

SeFLA タンパク質は *FLA* ファミリーに属し、主に、細胞伸長、細胞接着、細胞壁構成成分の調節等に関与することが知られている。また、ある *FLA* タンパク質が欠損したシロイヌナズナを塩条件下で培養すると、塩を加えていない条件下で培養したもの比べて形態的な変化が起こることから、*FLA* タンパク質が塩ストレス応答にも関与することが示唆されている。しかし、*SeFLA* タンパク質に関する知見は乏しい。

～アグロバクテリウム～

自然界にはアグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter*) と呼ばれる土壌細菌が存在する。アグロバクテリウムは、Ti プラスミド等を保有しており、その T-DNA 領域を植物のゲノム中に

導入することが知られている。この T-DNA 領域中に任意の遺伝子を組込むことで、目的遺伝子を植物に導入する手法が広く用いられている。本研究では LBA4404 株を使用した。

●実験方法

1. 遺伝子導入

遺伝子導入は、*SeFLA* 遺伝子を含むコンストラクトを保持するアグロバクテリウムを、葉に感染させることにより行った。感染後は、暗条件下でカルスを誘導する培地に静置し、その後、明条件下で再分化を誘導する培地に移植することで再分化個体を得た。カルス誘導中に抗生物質カルベニシリンを加えることで、アグロバクテリウムの除菌を行った。

2. 組換え系統の確立

得られた再分化個体にアグロバクテリウムが残存していないことを確認した後、植物に遺伝子が導入されていることを、ゲノミック PCR により確認した。

アグロバクテリウムを用いた方法では、導入遺伝子は植物ゲノム中にランダムに挿入される。そのため、得られた再分化個体に対してサザンブロット解析を行うことで、系統の差異と *SeFLA* 遺伝子の導入数を確認し、系統の確立を行った。

3. 評価

独立の遺伝子組換え系統について、塩含有培地での培養により耐塩性レベルを評価し、qRT-PCR によって *SeFLA* 遺伝子の発現量を解析した。また、*SeFLA* 遺伝子と緑色蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現するコンストラクトを作製し、*SeFLA* タンパク質の細胞内における局在解析を実施している。

●結果・考察

現在までに独立した遺伝子組換え体、系統 17、28 を得た。系統 17、28 では、*SeFLA* 遺伝子の発現が認められ、非組換え体と比べて耐塩性が強化されていることが明らかとなった。

高い耐塩性を持つ系統の選抜、耐塩性レベルと遺伝子発現量の関係の考察を行うためにも、今後より多くの系統を確立し、評価していく必要があると考える。

