

アイスプラント由来 *RBP* 遺伝子の機能解析と耐塩性付与を目的としたジャガイモへの導入

影山 丈士 (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・目的】

近年、不適切な灌漑農業により、耕作地として利用できない塩害地が拡大しており、今や世界の灌漑地の 5 分の 1 は塩害地となっている。一方で、世界の人口は増加し続けており、今後さらなる食糧需要が予想される。そのため本研究では、世界四大作物の一つであり、食糧、また工業原料としても需要があり、さらにジーンサイレンシングの影響をあまり受けないとされるジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) にアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) の *RNA-Binding Protein (RBP)* 遺伝子を導入することで、耐塩性を強化し、塩害地でも栽培可能なジャガイモを作出するとともに、*RBP* 遺伝子の機能解析として、*RBP* タンパク質の細胞内局在を特定する。

## 【材料】

## 1. 植物材料

ジャガイモは、ヨーロッパで古くから研究材料として用いられ、他品種と比べ比較的高い耐塩性を持つ品種 *Desiree* を使用した。植物材料は、Murashige and Skoog 固形培地上で 25°C、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。

## 2. 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アイスプラント由来 *RBP* 遺伝子を用いた。*RBP* 遺伝子は、アイスプラントの培養細胞から得られた cDNA を大腸菌に導入し、塩条件下で生存していた菌体から単離された。遺伝子の 1 次配列から葉緑体型 RNA シャペロンとして機能し、耐塩性を付与していると推定される。

## 3. アグロバクテリウムと誘導フェノール化合物

植物の遺伝子導入において、本研究ではアグロバクテリウムの LBA4404 株を用いた。

アグロバクテリウムの T-DNA 領域が切り出される過程において、フェノール化合物が重要な役割を果たしており、アセトシリンゴンが広く用いられている。しかし本研究では化合物ライブラリーより新規に発見されたクロロキシニルを用いることで、遺伝子組換え効率の向上を図った。

## 【実験方法】

## 1. 形質転換体の作出

遺伝子導入は、*RBP* 遺伝子を含むコンストラクトを保有するアグロバクテリウムを葉に感染させることで行なった。感染後は、暗条件下でカルス誘導及びアグロバクテリウムを除菌する培地に静置し、その後、明条件下で再分化体を誘導する培地に移植した。この際、培地に除草剤 *Basta* を加えることで、選抜された再分化体を得た。

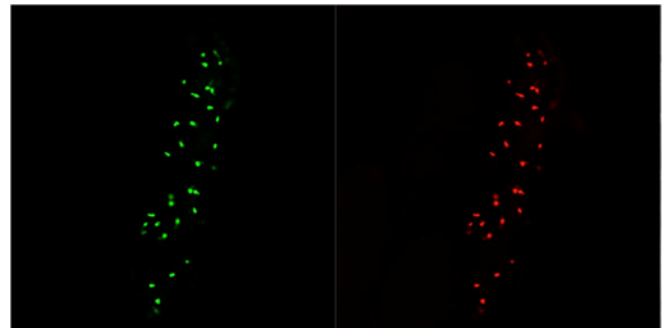
得られた再分化個体から DNA を抽出し、ゲノミック PCR を行うことで遺伝子が導入されていることを確認した。その後、遺伝子の導入が確認された再分化個体についてアグロバクテリウム残存性試験を行なった。アグロバクテリウムが残存していた際は、除菌処理を行ない、アグロバクテリウム除去を再度確認し、確認出来た個体についてはゲノミック PCR を実施した。

## 2. 耐性評価と発現解析

得られた遺伝子組換え系統について、塩含有培地での培養により、30 日間での腋芽の伸長を非組換え体と比較することで耐塩性を評価する。塩条件については、NT において 0、50、60、70、80、90、100、150 mM の条件で検討し、生育が顕著に減少する 80 mM で実施した。また、サザンブロット解析及び qRT-PCR を行うことで、耐塩性レベル、遺伝子導入数、発現量の間での関連性の検証を行っている。

3. *RBP* 遺伝子の機能解析

*RBP* 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成し、パーティクルガン法によってタマネギ表皮細胞に遺伝子導入を行うことで、*RBP* タンパク質の細胞内局在解析を行なった。



RBP-GFP タンパク質蛍光      ミトコンドリア染色  
図. タマネギ表皮細胞における *RBP*-GFP のタンパク質蛍光

## 【結果・考察】

現在までに遺伝子組換え体、3 系統を得た。これらの系統では、*RBP* 遺伝子の発現により、非組換え体に比べ耐塩性が強化されていることが期待される (評価中)。また、パーティクルガン法により *RBP*-GFP タンパク質の蛍光図 (上図左) とミトコンドリア染色図 (上図右) が一致したことから、*RBP* タンパク質はミトコンドリアに局在することが明らかとなった。しかし 1 次配列情報では葉緑体型であるため、緑色組織での検証を実施している。現状のデータでは、*RBP* 遺伝子はミトコンドリアで RNA シャペロンの機能を果たし、耐塩性に寄与していると考えられるが緑色組織では葉緑体で機能する可能性も残る。今度は、緑色組織での細胞内局在性を明らかにすると共に、アイスプラント由来 *RBP* の RNA 結合能等を検証することで、生体内での機能を明らかにしていく必要があると考える。