

マングローブの耐塩性遺伝子を導入したジャガイモの作成と耐性評価

永田 真悟 (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】

現在、世界の人口は急激に増加しており 2050 年までに 96 億人に達すると言われている。この人口をまかなう食料を確保するためには作物の生産量を増加させる必要がある。一方で、一部の地域では気候変動や不適切な灌漑農業等により塩害が発生し利用可能な耕作地が減少している。塩害が発生した耕作地では作物の生育が妨げられる。特に地下部に生産物を作る作物はその影響を強く受けることになる。このような主要作物の例としてジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) が挙げられる。ジャガイモは小麦、米、トウモロコシに並ぶ世界四大作物であり世界で幅広く栽培されていたため、塩害の影響を受けにくい耐塩性ジャガイモを作成することは農業的に有意義である。品種特性を変えず耐塩性ジャガイモを作成する有効な方法の一つに遺伝子組換え技術の利用が挙げられる。先行研究により、耐塩性を付与する遺伝子として知られるマングリン遺伝子をジャガイモに導入し、培養レベルで耐塩性を示す 9 系統の形質転換体が作成された。本研究では、これら 9 系統から実用化に向けた優良系統の選抜を行うため、栽培室における耐塩性評価を行う。また、優良系統の数を増やすため、新たな形質転換体の作成も進めていく。

【材料・方法】

・植物材料

ジャガイモの品種は Desiree を用いた。Desiree はオランダで育成され、ヨーロッパを中心に広く栽培された品種で、古くから研究に用いられている。また比較的耐塩性が高い品種として知られている。これらの植物材料は Murashige and Skoog (MS) 固形培地に 4~8 週間の間隔で継代培養し、培養室で維持した。(25°C、16 時間明期、8 時間暗期)

・導入遺伝子

マングリン遺伝子はマングローブの一種である *Bruguiera sexangulata* の培養細胞から大腸菌に耐塩性を付与する遺伝子として単離された。マングリンは全 256 アミノ酸からタンパク質で、シロイヌナズナやトマトの allene oxide cyclase (AOC) と高い相同性を有している。しかし、マングリンはシロイヌナズナやトマトの AOC とは大きく異なり AOC をコードしておらず、N 末端側にマングリン特有のアミノ酸配列が有している。先行研究により、マングリン遺伝子は大腸菌、酵母、タバコ、ユウカリで耐塩性を強化することが確認されており、N 末端の配列が耐塩性を付与するために必要な最少機能域である事が明らかとなっている。

【方法】

1. 形質転換体の作成

マングリン遺伝子を保有するアグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter* LBA4404 株) にジャガイモの外植片を感染させた。感染後、アグロバクテリウムの遺伝子導入を促進

するための共存培地に暗条件下で 3 日間培養した。その後、除菌培地に外植片を移行させ暗条件下でアグロバクテリウムの除去とカルスの誘導を行った。以降、カルスが形成された外植片から順次、明条件下で再分化を誘導する培地に移行させ、再分化体を得た。

得られた再分化体が形質転換体であるかの確認は、アグロバクテリウムが残存していないか確認した後、再分化体にマングリン遺伝子が導入されているか確認するために DNA を抽出しゲノミック PCR を行った。

2. 耐性評価

MS 固形培地に 4~8 週間培養した植物材料を土壌に順化させ、四角錘ポットで植物体の地上部の長さが 4~6 cm まで成長してから試験を行った。試験は 2 日 1 回塩処理を行い、10 日間の地上部の成長比で評価した。

マングリン形質転換体の耐塩性の評価をするためには試験に使用する塩濃度を決定する必要がある。そこでまずは Non transformant (NT) を用いて塩濃度の条件検討を行った。条件検討では 0 mM、200 mM、300 mM、400 mM、500 mM の塩濃度で処理を行った。塩濃度決定後、マングリン形質転換体の耐塩性を評価した。

【結果・考察】

1. 形質転換体の作成

これまでに約 80 個体の再分化体が得られており、マングリン遺伝子の導入確認を実施している。

2. 耐性評価

NT を用いた塩濃度の条件検討の結果を図に示す。コントロールである NaCl を添加しない場合、植物体は 10 日間で約 1.8 倍の成長がみられた。NaCl 濃度 200 mM でも約 1.3 倍の成長がみられたが 300 mM になるとほぼ成長が停止した。400 mM 以上になると萎れる植物体が認められることから、耐塩性評価に用いる塩濃度を 300 mM とした。現在、先行して作成された 9 系統の形質転換体について、栽培室での耐塩性試験を実施している。

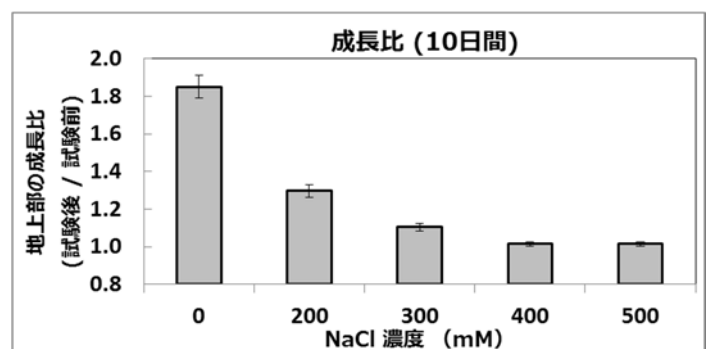


図 各塩濃度に対する NT 地上部の成長比