

耐塩性遺伝子マンダリンを導入した遺伝子組換えジャガイモの作成と耐性評価

青山 誠裕 (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】

土壌中に多量の塩分が存在することにより、植物は根からの吸水を制限され、その細胞構造や生体内反応に多大な影響を受け、生育を阻害される。現在世界中で灌漑地を中心に広がっている塩害は、作物の生育不良を引き起こすことにより年間 3 億円もの経済損失を生じさせており、利用可能な農耕地の縮小は深刻なものになっている。一方で、世界の人口は増加の一途を辿っており、60 年後には現在の 1.5 倍にまで増加すると予測されている。今後も増え続ける人口と食糧需要に対して、利用可能な農耕地は減少している。この現状を打破するための一つの手段として、遺伝子組換え技術を用いた主要作物の耐塩性強化が挙げられる。四大作物の一つであるジャガイモは、土壌中に生産物を作るため、特に塩ストレスの影響を受けやすい作物だと考えられる。

本研究では、耐塩性遺伝子と考えられるマンダリン遺伝子をジャガイモに導入した組換え体の作成を行うとともに、先行研究により作成された 18 系統の組換え体から優良系統の選抜を進めている。

【材料】

・植物

本研究ではジャガイモ (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) を用いた。Desiree はオランダで作出された品種で、古くから研究材料に用いられているとともに、耐塩性を持つことが知られている。非組換え体 (NT) と先行研究で作成された組換え体 (FG1~13, CG1~5) は Murashige and Skoog (MS) 固形培地を用いて 8 週間の間隔で継代し、25 °C、16 時間明期、8 時間暗期の条件下の培養室で培養した。

・導入遺伝子

マンダリン遺伝子はマンダリンの一種である *Bruguiera sexangulata* から、塩ストレス下での大腸菌の生存率を向上させる遺伝子として単離された。マンダリンは全 256 個のアミノ酸からなるタンパク質で、他のタンパク質の熱処理による変性を抑制し、再活性化することが示されており、分子シャペロン様活性を持つと考えられている。さらにタバコ (*Nicotiana tabacum*) とユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) で、その耐塩性を強化することが確認されている。

【方法】

1. 組換え体の作成

先行研究に倣い継代後 4~8 週間の植物体から葉を切り取り、アグロバクテリウム法により、ジャガイモにマンダリン遺伝子を導入した。外植片は植物ホルモンを加えた MS 固形培地の上に置き、カルスの形成と再分化体の形成を誘導した。導入した遺伝子には、マンダリン遺伝子の他に除草剤バスタに対する耐性遺伝子が含まれており、再分化を誘導する培地にバスタを加えることで、遺伝子が導入されていない再分化体の発生を抑制した。

さらに、得られた再分化体はバスタを加えた MS 固形培地に継代し、発根の有無でバスタ耐性を再検証した。

発根した再分化体は、アグロバクテリウムが残存していないかを確認した後に、DNA を抽出しゲノミック PCR によりマンダリン遺伝子の導入を確認する。

2. 耐塩性一次選抜

コントロール条件の 0 mM NaCl と、塩ストレス条件の 50 mM NaCl を含む MS 固形試験管培地に、継代後 4~8 週間の NT と組換え体 (FG1~13, CG1~5) を継代した。そして 40 日間培養をおこなった後、新たに伸びた腋芽の長さを計測することで、組換え体の耐塩性を評価した。

【結果】

1. 組換え体の作成

外植片から再分化体が得られているが、バスタ培地での選抜では発根が認められず、得られた組換え体は現在までない。

2. 耐塩性一次選抜

全 18 系統の組換え体に対して、3 反復の選抜試験を実施する計画であり、選抜過程の一例を図示する。塩ストレス条件下で NT よりも高い生長量を示すもの。もしくは、塩ストレス条件下での相対生長率 (50 mM / 0 mM) が NT よりも大きいものを選抜の基準とし、3 回分の結果を考慮して以降の試験に用いる。図では、FG3, 4 は前者の、FG1, 2 は両方の基準を満たしている。1 回目の評価では 5 系統、2 回目では 6 系統がこの基準を満たしており、そのうち 3 系統は両方で基準を満たしている。このように、マンダリン遺伝子を導入したことにより、ジャガイモの耐塩性が培養レベルで向上したと考えられる。

今後は、新たに作成される組換え体も同様の一次選抜を行い、栽培土による評価試験を経て、最終的に生産力試験で耐塩性を評価し、優良系統の選抜を進めていく。

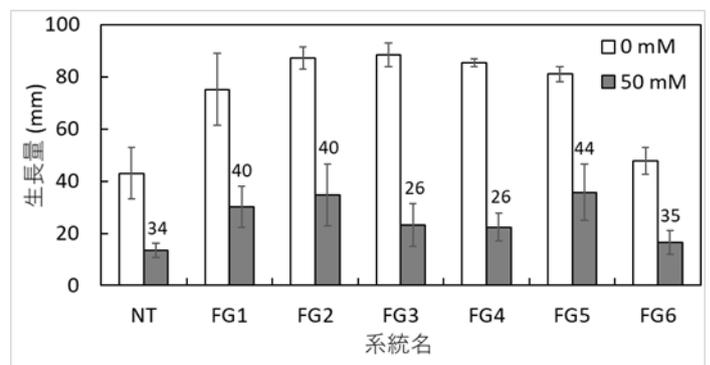


図. 培養 40 日間での生長量

Bar は SE、数値は相対生長率 (% : 50 mM / 0 mM)