

アイスプラント由来 RBP 遺伝子の導入によるジャガイモの耐塩性強化の試み

松崎 奏 (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、世界人口は増加傾向にあり 2050 年には 90 億人を突破すると予想されている。この増加する人口に伴い、食糧需要の増加が予想されるが、現在、塩害による農業生産量の減少が深刻化している。そこで近年、作物に関して塩ストレス耐性向上を目指す取り組みが求められている。ジャガイモは世界的に広範囲で栽培が可能であり、世界四大作物のひとつとして知られる重要な作物であるが、可食部である塊茎が地下にあるため、塩土壌による農業生産量の低下が他の作物より著しい。したがって、耐塩性ジャガイモ系統の作成は塩害被害の軽減や増加する食糧需要に大きく貢献できると考えられる。ジャガイモはこれまでに交雑育種によって様々な優良品種が確立されているが、同質四倍体という特性から、その特性を変えること無く塩ストレス耐性を付与するには遺伝子組換え技術が有効である。そこで、本研究では遺伝子組換え技術を利用し、塩生植物であるアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) から単離された耐塩性遺伝子である *RNA-Binding Protein (McRBP)* をジャガイモ (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) に導入することで、ジャガイモの耐塩性強化を試みた。

【材料】

1. 導入遺伝子

導入遺伝子として、東京農工大学山田研究室において大腸菌を用いた機能スクリーニングにより耐塩性遺伝子として単離された、*McRBP* を用いた。*McRBP* は、主に葉緑体に存在し、RNA シャペロンの機能を果たしていると考えられている。ストレス条件下で転写中の RNA がヘアピン構造をとり、転写の停止につながる事が知られている。*McRBP* はその高次構造を解き、RNA の転写を正常にすることで、植物の耐塩性を向上させると考えられている。

2. 実験材料

明期 16 時間 / 暗期 8 時間 (明条件) で継代によって試験管培養されたジャガイモを使用した。培養には 0.8% の寒天末を含む Murashige-Skoog 培地を使用し、継代は 2 か月毎に行った。

ジャガイモへの遺伝子導入はアグロバクテリウム LBA4404 株を使用して行った。LBA4404 株は T-DNA の切り出しから移行に関わる遺伝子が存在する、*vir* 領域のみを含むプラスミド pAL4404 を保有しており、ジャガイモをはじめとする様々な植物種の形質転換において使用実績がある。

【実験方法】

1. RBP 遺伝子を含むベクターコンストラクトの作成

島根大学中川強教授より分与を受けた R4L1pGWB432 (下図) に対して、*McRBP* と 35S-pro の導入を試みた。これによって *McRBP* と、レポーターとなる G3GFP、GUS が融合タンパク質として発現するようにコンストラクトを作成した。作成したコン

ストラクトにより *McRBP*、G3GFP、GUS の融合タンパク質を発現させることができ、GFP の蛍光や GUS の染色が *McRBP* の存在を反映する。方法は以下の通りである。

開始コドンから終止コドンの直前までの領域を、レポーターとのフレームを考慮して PCR により増幅させた *McRBP* を、pGEM-Teasy vector に導入した。また、5' 側に *Pst* I、3' 側に *Spe* I サイトを持つよう設計したプライマーを用い、35S-pro を増幅させた。当該制限酵素処理後、*McRBP* を保有する pGEM-Teasy vector に、35S-pro を挿入し、35S-pro を *McRBP* の 5' 側に繋げた。これを用い、35S-pro から *McRBP* までの領域を PCR によって再び増幅させ、pENTR™5'-TOPO の attL4、attR1 に挟まれたクローニングサイトに導入することでエントリークローンを作成した。このエントリークローンと R4L1pGWB432 間で LR 反応を行うことにより、下図の Gateway と示した領域に 35S-pro と *McRBP* を導入した。

2. アグロバクテリウムの形質転換

作成したベクターを Freezing 法によりアグロバクテリウム LBA4404 株に導入し、スペクチノマイシン (SpC : 50 mg/L) を含む Yeast Extract and Beef 寒天培地上で維持した。

3. ジャガイモへの感染

メスにより傷をつけたジャガイモの葉片及び莖片をアグロバクテリウムの懸濁液に 10 分間浸し、濾紙で水気を切った後、共存培地に暗条件で 3 日間静置した。その後、暗条件で 10 日間除菌培地、7 日間再分化培地にて培養した。以後はカナマイシン (Km : 12.5 mg/L) を含む再分化培地上で培養を行い、*McRBP* を発現するジャガイモの再分体を得た。Km を含む再分化培地は 7 日間ごとに交換した。

【結果・考察】

35S-pro、また *McRBP* を pGWB432 ベクターに導入し、アグロバクテリウムを形質転換することができた。ジャガイモへの遺伝子導入、組換え体の取得を目指している。

組換え体は *McRBP*、G3GFP と GUS の融合タンパク質が発現するため、GFP 蛍光や GUS 染色による発色が観察できると考えられ、遺伝子導入の確認が容易に行える。また、簡易 DNA 抽出ゲノミック PCR による遺伝子導入の確認もあわせて行う。

確認できた組換え体に関しては、耐塩性評価試験を行い、優良系統を選抜していく必要があると考える。

