

## 耐塩性遺伝子マングリンを導入した遺伝子組換えジャガイモの作出と評価

田中 悠亮 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景と目的】

塩害によって引き起こされる土壌中の塩分濃度の上昇は、植物の根からの吸水の制限やイオンの恒常性の崩壊につながり、植物に悪影響を及ぼす。近年、気候変動や不適切な灌漑農業などにより世界の各地で深刻な塩害が進行していることから、作物の栽培に利用できる土地は減少し続けており、2050年には農耕地のおよそ半分が塩害により使用不可能になると予想されている<sup>1)</sup>。一方で、人口増加は現在も続いており、食糧需要は増加している。

これらの背景から、食糧需要に供給を近づけるため、高い塩耐性をもつ作物を開発することは有意義である。ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) は世界中で広く栽培されている作物だが、塩ストレスをはじめとした土壌環境の影響を特に受けやすい作物でもある。本研究では、先行研究において耐塩性を向上させる効果があると報告されている遺伝子「マングリン」を用いて、塩害の影響を受けにくい遺伝子組換えジャガイモの作出を試みた。

## 【材料】

・植物: 本研究では、古くから研究材料として使用され、比較的耐塩性のある品種 Desiree を用いた。非組換え体(NT)を含む系統は Murashige and Skoog (MS) 固形培地上で継代培養 (25°C, 16 時間明期, 8 時間暗期) し維持している。

・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 sexangula* より、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<sup>2)</sup>。マングリンは分子シャペロン様活性の機能を持つと考えられており<sup>3)</sup>、タンパク質の変性や凝集を抑制する効果や、変性や凝集したタンパク質をリフォールディングする効果により、ストレス耐性の向上に寄与することが期待される。先行研究において、タバコ (*Nicotiana tabacum*) やユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) にも導入されており、その耐塩性を高めることが報告されている<sup>3)</sup>。

## 【方法】

1. 組換え体作出: 継代後 4~6 週間後の植物体の葉を用いて、アグロバクテリウム法によりジャガイモにマングリン遺伝子を導入した。アグロバクテリウムの感染を受けた外植片を、植物ホルモンを加えた MS 固形培地の上で培養し、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グリン遺伝子の他に除草剤バスタに対する耐性遺伝子も含まれており、適当な時期に再分化誘導用の培地にバスタを加えることで、バスタ耐性をもつ組換え体のみ再分化体を誘導した。さらに、得られた再分化体をバスタを含む MS 固形培地上で培養し、発根が確認できた個体を組換え体候補系統とした。

2. *In vitro* 耐塩性評価試験: コントロール条件の 0 mM NaCl と 50 mM NaCl を含む MS 固形試験管培地に、継代後 4 週間の NT と組換え体の茎頂、腋芽を計 7 本ずつ継代した。21、30、40 日間培養を行った後、成長量を計測することで組換え体の耐塩性を評価した。

## 【結果と考察】

1. 組換え体作出: 再分化誘導用の培地内のバスタによる選抜を経て、56 系統の再分化体が得られたが、最終的に 8 系統のみがバスタを含む MS 固形培地上で発根し、成長を見せた。これらの内、アグロバクテリウムが完全に除去された 3 系統 (118-1, 144-2, 264-1) においては gPCR により目的遺伝子の導入が確認された。残りの 5 系統も確認を進めている。

これまでに約 700 枚の葉外植片に対しアグロバクテリウムの感染を行い、その半数で再分化が起こっていた。しかし、その中からバスタ耐性を持つ再分化体は 7 外植片からしか得られなかった。バスタを含まない段階では再分化体を得られていることから、アグロバクテリウムの植物への感染が成功しなかった、または感染を受けた細胞から再分化体が出現しなかったと考えている。耐塩性評価試験に供試する系統数を増やすため、最適なアグロバクテリウムの感染条件や外植片の培養条件について検討を行いながら組換え体の作出を続けている。

2. *In vitro* 耐塩性試験: NT、組換え体 3 系統と、バスタ耐性を示し、増殖の良い 4 系統 (114-1, 121-1, 144-6, 362-1) を用いて耐塩性試験を行った。21 日目の成長量を以下の図に示す。非ストレス条件、塩ストレス条件共に、全供試系統の成長量は NT と比較して高く、特に 118-1 は多重比較検定により両条件共に NT と比較して有為に高いという結果が得られた ( $P < 0.05$ )。

通常の培養条件、塩ストレス条件下のどちらにおいても、NT に比べ成長が良かったことについては、導入されたマングリンの機能である分子シャペロン様活性により、通常の培養条件では成長が促進され、塩ストレス条件下では成長阻害が軽減されたことを示唆している。

今後は、追試験を行い再現性の確認を行うと共に、新規に作出される組換え体も含めて優良系統を選抜し、栽培土壌を用いたより実地的な栽培条件での耐塩性試験を行う予定である。

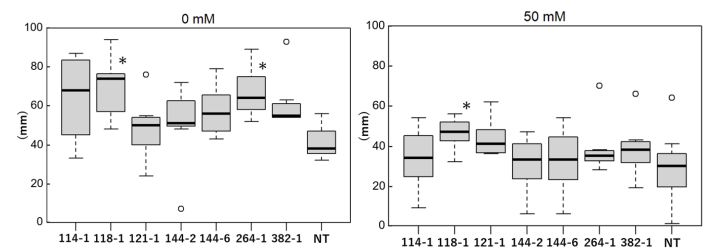


図 *In vitro* 耐塩性評価試験  
0 mM, 50 mM NaCl 条件下での 21 日目までの成長量を箱ひげ図で示す。上部の\*は外れ値を除外した上での Tukey-HSD 検定による有意差を示す。 ( $P < 0.05$ )

## 【参考文献】

1. Plant Physiology and Biochemistry 48: 993-998 (2010)
2. Plant Cell Physiology 43: 903-910 (2002)
3. Journal of Plant Research 126: 141-150 (2013)