

機関番号：10101  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20580003  
 研究課題名（和文）国内品種カリユタカを用いた簡便かつ迅速なダイズ形質転換系の確立とその利用  
 研究課題名（英文）Establishment and utilization of simple and rapid soybean transformation system in a Japanese variety, Kariyutaka  
 研究代表者  
 山田 哲也（YAMADA TETSUYA）  
 北海道大学・大学院農学研究院・助教  
 研究者番号：70374618

研究成果の概要（和文）：高等植物における遺伝子組換え技術は遺伝子の機能を調べるためや新しく品種を育成するために利用される。大豆の遺伝子組換え体は、複雑な工程を経て作出されている。本研究では、大豆の国内品種「カリユタカ」が他の品種に比べ簡単に組織培養できることを利用して、簡便かつ迅速な大豆の遺伝子組換え方法を確立した。なお、本方法は従来の方法と比べ、4倍程度の効率で遺伝子組換え体を作成することができた。

研究成果の概要（英文）：An efficient and stable transformation technology in higher plants is used to identify the gene function or to develop new varieties. Soybean transformation has continued to be laborious and the frequency of recovered transgenic plants is still low. We found that a Japanese soybean variety, Kariyutaka, possessed advantageous characters for transformation. We developed a simple and rapid transformation system in Kariyutaka. The transformation frequency in the method presented in this study was 4 times as high as in that obtained with our previous method.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：植物分子遺伝学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：形質転換，大豆，アグロバクテリウム，種子，Myb 転写因子，フラボノイド

## 1. 研究開始当初の背景

(1) わが国では、ダイズの利用価値を高めるために、食品学ならびに育種・栽培学研究が活発に進められている。

(2) 平成19年度からダイズのゲノムプロジェクトが本格的に始動したこともあり、ダイズの遺伝子機能解析及び組換えによる有用な形質転換ダイズの開発が必要とされていた。

(3) 海外での動向は、米国で既に生産性の向上だけでなく、利用特性の向上を目指した応用研究に形質転換技術が利用されていた。特に、ダイズ種子の機能性成分である脂肪酸やビタミンEの生合成経路を改変した画期的な形質転換ダイズが作出されていた。アグロバクテリウムを介した形質転換方法は、目的遺伝子を安定して発現させることができることに加え、導入遺伝子のコピー数が少なく容易に固定化を図ることができるため、中国

や韓国においてもアグロバクテリウムを介したダイズ形質転換に関する研究が急速に進展していた。

(4) 一方、わが国におけるアグロバクテリウムを介したダイズ形質転換の成功例は極めて少ない現状にあった。

(5) 当初、我々は、米国品種の完熟種子由来の子葉を用い形質転換体の作出に成功していた。しかしながら、その形質転換効率は1%弱、かつ、作製までに要する期間は約10-12ヶ月程度であった。機能解析等に利用するためにはより迅速な方法を確立させる必要があった。

(6) アグロバクテリウムを介した形質転換の最適化を図るため、国内品種において培養特性の評価を行っていた。この過程で、北海道品種のカリユタカが培養初期において多数の花芽を形成することを見出した。カリユタカの培養植物は鉢上げ後約1ヵ月で着莢に至った。これらのことから、このカリユタカの形質転換系を確立することで従来のものよりも極めて早期に形質転換体当時から種子を得ることができると考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 国内品種カリユタカを用い、高効率かつ短期間に形質転換個体を作成できる方法を確立する。

(2) 本方法を利用した遺伝子機能解析の一例として、ダイズ種子の機能性成分であるフラボノイドの生合成経路を改変した形質転換系統を短期間に作出し、本方法が遺伝子機能解析として理想的な系であることを実証する。

## 3. 研究の方法

(1) 形質転換時における培養特性を詳細に評価するため、導入遺伝子にGFP及びイントロンGUSレポーター遺伝子を用い、アグロバクテリウムの感染部位や感染程度などをモニタリングする。

(2) 確立した形質転換系を利用し、遺伝子の機能解析を行う。ミヤコグサに由来するMyb転写因子遺伝子(*LjMyb12*)を対象に、当該遺伝子を過剰発現したダイズを作成し、フラボノイドの生合成に関連する遺伝子の発現解

析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 簡便かつ迅速な形質転換系の開発

アグロバクテリウムを介したダイズ形質転換系の確立を目的に培養条件等の検討を行った。特に、従来の形質転換効率(1%)を向上させるため、いくつかの主要な要素と考えられる点の改良を試みた。まず、外植片を得るための前処理(水浸漬)において種子そのものの崩壊が認められたため、予め種子における水分含量の調整を行った。このことにより、種子の崩壊はほとんどなくなり大幅に改善することができた。

本研究で確立した形質転換方法の概要を図1に示した。

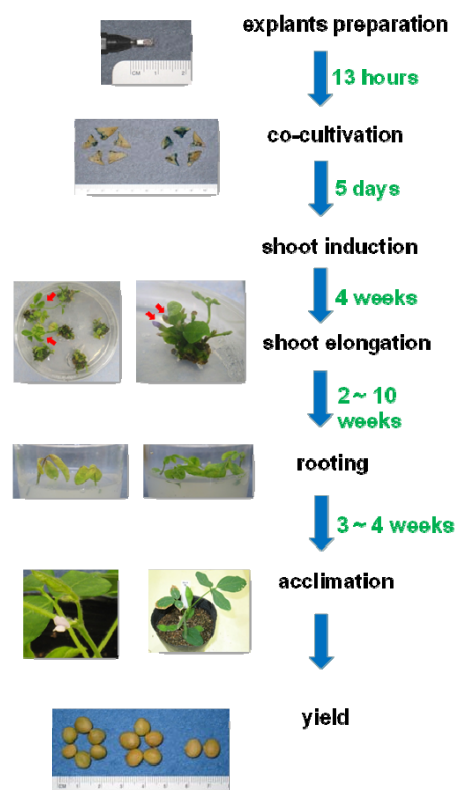


図1. 本研究で確立した形質転換方法

図1に示すようアグロバクテリウムの感染効率を向上させるため、外植片への傷処理を試みた。過去にメスによる外植片への傷処理がアグロバクテリウムの感染に効果をもたらすという報告があるが、極めて煩雑な操作のため、より簡便な方法を模索した。その結果、ステンレス製マイクロブラシを用いることで外植片へ簡便に処理することができた。これにより、アグロバクテリウムの感染効率は飛躍的に向上した。

加えて、形質転換シュートを選抜する

際の発根培地に加える選抜剤の濃度を下げることによって、従来よりも形質転換体を短期間に得ることが可能となった。選抜剤として使用するグルフォシネートの従来の濃度（10 mg/l）では形質転換体であるにも関わらず、選抜圧が高すぎるため発根までに要する期間が長くなっていた。そこで、濃度を 6 mg/l にまで下げ選抜を試みた。その結果、本濃度であっても形質転換シュートの選抜は容易に行うことができた。また、発根までかかる期間は2-3週間程度であった。これらの変更点を全て通して形質転換実験を行ったところ、感染から形質転換体当代の種子を収穫するまでにかかる期間は最短 4.5 ヶ月であった。

図 1 に示す手順を通して形質転換実験を行い、本法の評価を行った。本法で作出した形質転換体当代は、キメラ様個体が多いため、導入遺伝子の確認や発現はその後代で評価した。これらの結果に基づき、後代へ安定して導入遺伝子を伝達した個体のみを形質転換体として形質転換効率へ反映させた。その結果、形質転換効率は従来と比べ 3-5 倍程度向上させることに成功した。

これらのことから、国内品種カリユタカを用いることでアグロバクテリムを介した簡便かつ迅速なダイズの形質転換方法を確立することができた。

## (2) 本法を利用した遺伝子の機能解析

先行研究において、フラボノイドの生合成に関連する酵素遺伝子の発現を制御する Myb 転写因子の一つ *LjMyb12* 遺伝子を単離した。当該遺伝子のダイズ植物体内での機能を解析するため、過剰発現した形質転換ダイズ個体を本研究で確立した方法を通して作出した。恒常的に全身で強発現させるため、当該遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターにより制御した。

加えて、形質転換個体の自殖を繰り返すことで導入遺伝子を固定化した系統を得た。これらの系統を対象に、フラボノイドの生合成に関連する酵素遺伝子の発現解析を行った。

形質転換体の葉組織における発現解析を行ったところ、図 2 に示すようイソフラボンやフラボノールといったフラボノイドの生合成に関連すると考えられる酵素遺伝子の発現が増加していた。特に、フラボノールシントナーゼ遺伝子 (*FLs*) とカルコンイソメラーゼ遺伝子の一つ (*Chi1A*) の発現が顕著に増加していた。

加えて、未熟種子における発現解析を行ったところ、葉組織における発現様式とは大きく異なった(図 3)。すなわち、2 つの遺伝子にのみ発現の増加が認められた。

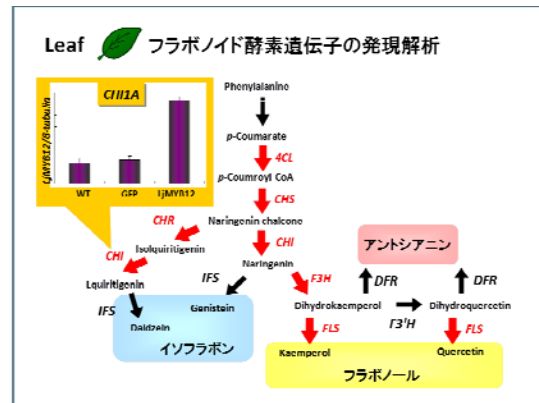


図 2. 葉組織における発現解析結果

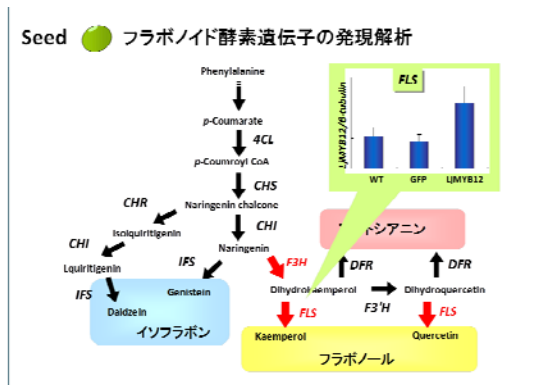


図 3. 未熟種子における発現解析結果

これらの組織における発現制御様式の違いは、供試したカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの制御が未熟種子組織において葉組織よりも弱いことが考えられた。さらに、種子組織では *LjMyb12* に加え別の制御因子の役割が大きく、当該遺伝子の過剰発現のみで多種の遺伝子の制御が難しいことが考えられた。

当該遺伝子を過剰発現することで、種子成分に及ぼす影響を評価するため、LC-MS による完熟種子成分のプロファイリングを行った(表 1)。

表 1. 完熟種子における代謝分析

35S:GFPに対する 35S:LjMYB12の相対値	
<b>イソフラボン</b>	
ダイジン	1.20
マロニルダイジン	1.15
ゲニスチン	0.90
マロニルゲニスチン	0.79
<b>フラボノール</b>	
ケンフェロール配糖体①	4.64
ケンフェロール配糖体②	4.75
ケンフェロール配糖体③	30.44

その結果、イソフラボンに関しては、野生

型と比べ、変動は認められなかったものの、フラボノールの一つであるケンフェロールの配糖体は、形質転換系統において数十倍増加していた(表1)。

以上のことから、本方法を利用して遺伝子の機能解析を行うことが可能であった。

本研究で確立した形質転換方法は、約1年で導入遺伝子を固定化した系統を育成することが可能であった。これは、他の作物における形質転換方法と比較しても、極めて迅速に行える系であるといえる。今後は、本方法の形質転換効率をさらに向上させるための改良に加え、機能解析の実施例を増やすことで本方法が、ダイズ形質転換のモデル系の一つとして活用できることをより強く実証できると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計10件)

(1) T Yamada, S Watanabe, M Arai, K Harada, K Kitamura (2010) Cotyledonary node pre-wounding with a micro-brush increased frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean. *Plant Biotechnology* 27: 217-220. 査読有

(2) Liu B, S Watanabe, T Uchimiya, F Kong, A Kanazawa, Z Xia, A Nagamatsu, M Arai, T Yamada, K Kitamura, Masuta C, K Harada, J Abe (2010) Soybean stem growth habit gene *Dt1* is an orthologue of *Arabidopsis* TFL1. *Plant Physiology* 153: 198-210. 査読有

〔学会発表〕(計31件)

(1) 山田哲也 形質転換技術を利用したダイズ種子成分の代謝工学 第5回ダイズ研究会(招待講演)(平成23年3月5日)北海道大学

(2) T Yamada, M Arai, F Matsuda, K Saito, K Kitamura Establishment of stable transformation system mediated by *Agrobacterium* in Japanese soybean variety. World Soybean Conference Research VIII P. 232 (平成21年8月10日-15日)中国北京

(3) 山田哲也・松田史生・齊藤和季・新井麻衣子・渡辺啓史・原田久也・喜多村啓介 アグロバクテリウムを介したダイズ形質転換系の確立とその利用 第27回日本植物細胞分子生物学会(平成21年7月31日)日本大学

〔図書〕(計2件)

(1) 喜多村啓介編集 サイエンスフォーラム 大豆のすべて (2010年出版)ダイズのゲノム科学と組換え育種の現状と展望 P. 67-71 (山田哲也担当)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.agr.hokudai.ac.jp/ikushu/ide\\_nshigen/](http://www.agr.hokudai.ac.jp/ikushu/ide_nshigen/)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 哲也 (YAMADA TETSUYA)  
北海道大学・大学院農学研究院・助教  
研究者番号：70374618

(2) 研究分担者

喜多村 啓介 (KITAMURA KEISUKE)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：50111240

(3) 連携研究者

なし