

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658036

研究課題名(和文)カルシウムイオン流入抑制によるニホンナシ形質転換系の開発

研究課題名(英文)Development of genetic transformation of Japanese pear by inhibition of calcium ion influx

研究代表者

中島 育子 (NAKAJIMA, Ikuko)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所 栽培・流通利用研究領域・主任研究員

研究者番号：80355362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：16品種のニホンナシ子葉から、5 μ M NAAと10-25 μ M BAのホルモン組合せを用いた場合、‘今村秋’と‘安下庄支那梨’が高効率で再分化することを明らかとした。緑色蛍光タンパク(GFP)遺伝子を持つアグロバクテリウムをニホンナシ子葉に感染させた。カルシウムのキレート剤で防御反応を抑制するEGTAと、物理的に傷をつける超音波処理について検討したところ、EGTA処理はGFP蛍光の発現効率には効果が認められず、超音波処理で効果が認められた。‘安下庄支那梨’子葉から1個体形質転換体が得られた。また、‘今村秋’子葉から着色遺伝子myb導入で形質転換体が3個体得られ、再現性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：High rates of regeneration of adventitious shoots were obtained from the cotyledons of Japanese pears Imamuraaki and Agenosho Shinanashi from 16 Japanese pear cultivars, when the media contained 5 μ M NAA combined with 10 or 25 μ M BA were used. Cotyledons of Japanese pear cultivars were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* which contained a green fluorescent protein (GFP) gene. EGTA (a chelator of calcium) treatments and sonication were applied, which could prevent plant defense reaction and produce physical wounds across the tissue respectively. EGTA treatment did not show a positive effect on expression of GFP fluorescence whereas sonication significantly increased. One plant regenerated from Agenosho Shinanashi showed stable GFP fluorescence and confirmed as a transformant. Three other transformed regenerated shoots by myb gene showed red color, which were derived from Imamuraaki in another experiment. Transformation system in our study was shown to be reproducible.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：ニホンナシ 子葉 再分化 形質転換

1. 研究開始当初の背景

我が国におけるニホンナシの農業生産額は、果樹ではみかん、りんごに続いて第3位で、また農業全体でも上位20位の中に入り、重要な作物である。ニホンナシでは、黒星病や、果実の商品価値を著しく下げるとみつ症、日持ち性などが問題となっており、近年それらの候補遺伝子の解析が進んでいる。ニホンナシで形質転換が困難なのは、ニホンナシへのアグロバクテリウムの感染効率が低く、再分化する場所でアグロバクテリウムの感染が起こる頻度が低いことが大きな要因である。

他の植物ではアグロバクテリウムによる形質転換の効率化のため、感染しやすいアグロバクテリウム系統を用いる方法や、共存培地へのMES添加によるpHの安定化、基本培地の濃度の最適化などの報告例がある。しかしながら、植物の傷害応答および防御反応を抑制する観点に立った培地の改良は行われてきていない。

病原菌に対して起こす植物の防御反応は、病原菌由来のシグナル物質の認識に始まり、カルシウムイオンの流入、リン酸化反応、オキシダティブースト、過敏感反応死、ファイトアレキシンの合成などを含む。また、傷害応答についても、カルシウムイオンの流入がシグナルとなっている。病原菌の感染によるオキシダティブーストはカルシウムイオンのキレート剤や、カルシウム拮抗剤によって抑制されることが報告されている(Miura et al.1995)。また、傷害応答はカルシウム拮抗剤によって抑制されることが報告されている(Dombroski and Bergey 2007)。

このような防御反応を起こしている可能性の他に、細胞壁が厚いなど物理的に感染できない可能性などが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、これまで形質転換が困難であるニホンナシにおいて、再分化効率の高いニホンナシ品種を明らかにするとともに、アグロバクテリウム感染の飛躍的な効率化により、安定的な形質転換系を作出する。具体的には、植物の防御反応のシグナル伝達にかかるカルシウムイオンの人為的制御を行うことにより、アグロバクテリウム感染および感染操作での植物側の傷害応答および防御反応を初期段階で抑制し、感染効率を向上させる。また、アグロバクテリウム感染時の超音波処理など、形質転換の効率化ができる可能性のある他の方法についても検討する。

本研究により、これまでニホンナシで取得されている遺伝子の形質転換体による機能解明、および画期的新品種開発への基盤を築くことが可能となる。

3. 研究の方法

本研究では、植物の防御反応のシグナル伝達にかかるカルシウムイオンの人為的制御等によりアグロバクテリウムの感染効率を向上させ、ニホンナシの形質転換技術を確立するために以下の実験を行う。

(1) ニホンナシおよび多様な遺伝的背景を持つナシ品種の子葉からの再分化

ニホンナシ(*Pyrus pyrifolia* Nakai)品種‘晩三吉’およびマンシュウマメナシ(*P. betulaefolia* Bunge)品種‘ホクシマメナシ’子葉においてMS基本培地(3%ショ糖、0.85%寒天)に、5, 10, 25, 50 μM の 1-naphthaleneacetic acid (NAA)と 5, 10, 25, 50 μM の 6-benzylaminopurine (BA)を組合せて添加し、不定芽の再分化効率の高いホルモン濃度組合せを検討する。最適化された培地条件を用いて、近年のニホンナシ育成品種5品種、ニホンナシ在来品種11品種、マンシュウマメナシ2品種、チュウゴクナシ7品種、セイヨウナシ8品種の合計33品種について、不定芽再分化を調査する。

(2) ニホンナシ子葉を用いたアグロバクテリウム法による形質転換技術の確立

再分化効率の高い品種の子葉をアグロバクテリウムの感染材料に含めて、感染処理による傷害応答、病害応答ともに抑制可能と考えられるカルシウム拮抗剤(ペラパミルなど)の処理について、アグロバクテリウム感染の効率化できる条件を検討する。蛍光実体顕微鏡で遺伝子の動態が可視的に確認できる *gfp* 遺伝子、あるいは実体顕微鏡で遺伝子の動態が確認できるブドウ由来の *myb* 遺伝子を導入する。GFP 蛍光あるいは *myb* 遺伝子の発現による赤い着色を観察することでトランジェントな遺伝子導入効率およびステابلな効率を測り、最適条件を検討する。得られた再分化植物体については、PCR法、サザン法により導入遺伝子を確認する。

(3) 異なる発育段階のニホンナシ子葉を用いた形質転換の効率化

他の植物では、未熟な若い組織を用いると再分化効率が高まることが報告されている。再分化効率の高かったニホンナシ品種の異なる発育段階にある子葉を用いて、さらに再分化効率を高めることで形質転換効率化を検討する。着色遺伝子であるブドウ由来 *myb* 遺伝子を導入し、*myb* 遺伝子による組織の赤い着色によって形質転換のスクリーニングを行う。

4. 研究成果

(1) ニホンナシおよび多様な遺伝的背景を持つナシ品種の子葉からの再分化

‘晩三吉’および‘ホクシマメナシ’子葉においてMS基本培地(3%ショ糖、0.85%寒天)に、5, 10, 25, 50 μM の NAA と 5, 10,

25, 50 μ M の BA を組合せて添加し、不定芽の再分化を検討した。その結果、‘晩三吉’および‘ホクシマメナシ’では、5 μ M NAA と10あるいは25 μ M BA を添加した培地で、不定芽の再分化効率が高かった。最適化された培地条件を用いて、近年のニホンナシ育成品種 5 品種、ニホンナシ在来品種 11 品種を含む合計 33 品種について、不定芽再分化を調査した。その結果、不定芽再分化率がニホンナシ在来品種の‘今村秋’(68%) (図1)および‘安下庄支那梨’(66%)で最も高かった。また、チュウゴクナシ品種では再分化効率が 35%以上と高い傾向にあった。

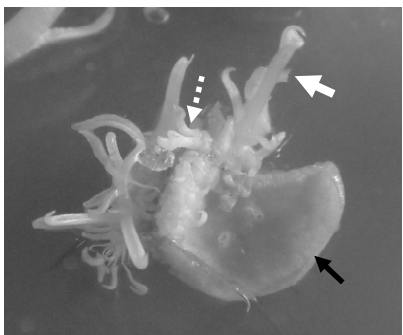


図1 ‘今村秋’子葉からの再分化
白矢印(実線): 不定芽
白矢印(点線): 不定芽様組織
黒矢印: 子葉

(2) ニホンナシ子葉を用いたアグロバクテリウム法による形質転換技術の確立

ニホンナシ 4 品種(‘安下庄支那梨’、‘伯帝竜’、‘幸水’、‘なつしずく’)およびニホンナシ雑種 1 品種(‘二宮’)の完熟種子由来子葉を材料として、アグロバクテリウム感染の効率化を目指した。アグロバクテリウム感染時にオキシダティブーストを抑制するためにカルシウムキレート剤(EGTA)を用いる、あるいは物理的に細胞壁に傷をつけるために超音波処理を行うなどの検討を行ったところ、18 個体の不定芽が再分化した。そのうち、ニホンナシ‘安下庄支那梨’完熟種子由来子葉の両処理を行った処理区から 1 個体の形質転換体を得られ、PCR およびサザン法により遺伝子の導入が確認された。しかし、統計的に EGTA 処理については有意差が認められず、超音波処理について有意差が認められた。また、EGTA 以外のカルシウムキレート剤である Bapta、カルシウム拮抗剤ベラパミルについても検討したが、形質転換の効率化には至らなかった。

(3) 異なる発育段階のニホンナシ子葉を用いた形質転換の効率化

形質転換のさらなる効率化のため、子葉からの再分化効率の高いことを明らかにしたニホンナシ‘今村秋’の子葉を材料として、異なる発育段階の子葉を用いた形質転換の

効率化を検討した。子葉の発育ステージに沿ってアグロバクテリウムの感染実験を行った。7月14日(ステージ1)から9月15日(ステージ4)まで3週間毎に4ステージ(1, 2, 3, 4)で、ニホンナシ‘今村秋’の子葉を採取して形質転換を行った。ブドウの着色遺伝子 *myb* を持つアグロバクテリウム EHA105 を用いた。不定芽様組織を再生した子葉割合や不定芽を再生した子葉数はステージ3が35.3%および32個、ステージ4で28.2%および26個でステージ1, 2より高かった。合計で58の再分化個体を得られた。*myb* 遺伝子による組織の赤い着色によって形質転換のスクリーニングを行ったところ、着色した個体がステージ4から2個体、ステージ3から1個体を得られた。そのため、ステージ4あるいはステージ3の完熟あるいは完熟に近い種子由来の子葉の方が、形質転換効率が高いことが示唆された。

実験を行った際、選抜過程でのアグロバクテリウムのオーバークロスによる致死が形質転換の効率化の妨げの一つとなったため、除菌作用の強い抗生物質であるバンコマイシンについて、通常用いられるセフトキサシムと比較検討した。アグロバクテリウム感染後2ヶ月での外植片の生存率は、カルシウムキレート剤を用いた場合にはバンコマイシンを用いた区の方が高かったが、キレート剤を用いない場合にはバンコマイシンとセフトキサシムの差は認められなかった。

本研究では、形質転換効率は0.2%であった。アグロバクテリウムを感染させて、経時的に観察したところ、感染後2ヶ月ではGFPあるいは*myb*を発現した不定芽様組織が認められたが、5ヶ月後ではほとんどが枯死した。そのため、今後、アグロバクテリウムの感染部位からの再分化を促進させ、不定芽様組織の生育を止めないような方法を試みる必要がある。

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2件)

Ikuko Nakajima, Yohsihiko Sato, Toshihiro Saito, Takaya Moriguchi and Toshiya Yamamoto (2013)

Agrobacterium-mediated genetic transformation using cotyledons in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Breeding Science* 63, 275-283 (査読あり)
DOI 10.1270/jsbbs.63.275

Ikuko Nakajima, Akiko Ito, Shigeki Moriya, Toshihiro Saito, Takaya Moriguchi &

Toshiya Yamamoto (2012)
Adventitious shoot regeneration in
cotyledons from Japanese pear and related
species. In Vitro Cellular & Developmental
Biology-Plant 48, 396-402 (査読あり)
DOI 10.1007/s11627-012-9451-2

〔学会発表〕(計3件)

中島育子,伊東明子,今井剛,齋藤寿広,
森口卓哉,山本俊哉
ニホンナシ‘今村秋’の異なる発育段階
の子葉を用いた形質転換
園芸学会平成24年度秋季大会
平成24年9月22~24日

中島育子,佐藤義彦,伊東明子,今井剛,
森谷茂樹,齋藤寿広,森口卓哉,山本俊哉
ニホンナシ子葉を用いた再分化系およ
び形質転換系の開発
平成24年度果樹バイテク研究会
平成24年10月1~2日

中島育子,佐藤義彦,伊東明子,今井剛,
齋藤寿広,森口卓哉,山本俊哉
ニホンナシ子葉を用いた形質転換系の
開発
平成23年度果樹バイテク研究会
平成23年7月11日

〔その他〕

ホームページ等
農研機構気候変動対応プログラム
<http://adpmi.t.d.c.affrc.go.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 育子 (NAKAJIMA, Ikuko)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・果樹研究所 栽培・流通利用研究領
域・主任研究員
研究者番号：80355362