

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850003

研究課題名(和文)優れた植物形質転換特性を有する新規ハイブリッドアグロバクテリアの作出

研究課題名(英文)Construction of novel hybrid Agrobacterium strains useful for plant transformation.

研究代表者

山本 真司(Yamamoto, Shinji)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50607348

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、形質転換に利用されていないリゾビウム属細菌の植物形質転換への応用可能性を検討した。まず病原株の持つ病原(Ti/Ri)プラスミドを接合で移動させるための加工など、同細菌間での病原プラスミド交換技術を確立した。次に、同技術を用いて多様なリゾビウム属細菌を材料にTi/Riプラスミド交換株を作製し、その形質転換特性を比較したところ、特定の植物細胞で強く病原遺伝子が誘導される特性など形質転換操作への応用が期待できる菌株を選別できた。本研究で確立した病原プラスミド交換技術は多様なリゾビウム属細菌に広く応用でき、その菌株の持つ潜在的な形質転換有用性の評価を可能にした。

研究成果の概要(英文):In this study, I examined capability of untouched rhizobium strains for a plant transformation technology. Firstly, I established a pathogenic (Ti/Ri) plasmids exchange method, which consists of curing of resident plasmid in recipient cell, addition of transfer origin to the Ti/Ri plasmid in donor cell and conjugation between the donor and the recipient cells. The method was applied to 12 Rhizobium strains for construction of hybrid strains harbor Ti/Ri plasmids from other strains instead of an original one. Total 61 strains including wild type and Ti/Ri-less strains were checked their transformation characteristics, such as an expression of virulence (vir) genes induced by phenolics. As a result, candidate strains useful for transformation, such as the strain strongly expresses vir genes by cocultivation with rice cultured cells, were obtained. The Ti/Ri plasmids exchange method enable us to evaluate the potential characteristics useful for transformation in diverse rhizobium strains.

研究分野：微生物学

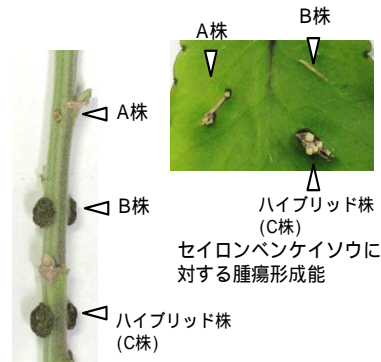
キーワード：形質転換 アグロバクテリア Tiプラスミド Riプラスミド

1. 研究開始当初の背景

アグロバクテリアによる植物の形質転換法は安定に大きな DNA 断片を効率良く導入できることから広く利用されている。しかし穀物や果樹など実用化研究で多様な品種を取り扱う必要のある植物では、ある品種では成功例があっても別の品種ではうまく行かず試行錯誤しているのが現実である。また近年 ZFN (Zinc Finger Nuclease)を用いたジーンターゲットング法など高効率な形質転換系を前提とした優れた技術が開発されてきており、これらを多様な植物種・品種に対して適用するには形質転換の技術的革新が不可欠である。

アグロバクテリアの病原性は、DNA 輸送に直接働く遺伝子の大半を含む病原プラスミド (Ti/Ri プラスミド)とゲノムバックグラウンドによって決まる。そして、その組み合わせによって予期せず形質転換特性 (遺伝子導入効率や感染可能な植物種の範囲(宿主域))が大きく変わることが分かっている。このため、高形質転換能・広宿主域をもつ有用菌株を作出するために Ti/Ri プラスミドを菌株間で交換する実験が試みられてきた。Ti/Ri プラスミドを加工することなく入れ替えるには、プラスミドごとに固有の資化物質を選択マーカー物質として準備するなど、多大な労力と時間が必要だった。このため、このような試みはわずかな数の菌株を対象としたものしか行われてこなかった。今現在でも高形質転換株として汎用されている EHA105 株などは 1980 年代のこのような実験の結果生み出された。しかしこれら既知の菌株においても、対象とする植物種や品種によっては別菌株より劣るケースは少なくない。

近年リゾビウム属細菌の生理学的多様さや系統学的理解が進む一方、植物形質転換に利用されている菌株はわずか数株である。こういった背景から申請者は、様々な植物・土壌から単離保管されている未利用病原株に着目し、これらを簡便に形質転換に利用できる形に加工する (有用株化) 技術を開発してきた。そしてさらに、未利用病原株から多様なハイブリッド (Ti/Ri 交換) 菌株を作出し、形質転換に有用な特性を顕在化・評価する試みを組織的に行うことを企図した。研究当初の段階での Ti/Ri プラスミド移動技術を用いた予備実験ですでに、既存の汎用株よりも宿主域の広がった菌株を作出している (図 1)。



キクに対する
腫瘍形成能

図1 腫瘍形成能の比較

A株、B株は野生型の菌株
ハイブリッド菌株 (C株) は A株に B株の
Ti プラスミドをもたせた新規作出株

2. 研究の目的

本研究では Ti/Ri プラスミド交換技術 (ハイブリッド菌株作出技術) の適用可能な範囲を拡大し、未利用リゾビウム菌株から形質転換に有用な形質を持つハイブリッド菌株の作出を目指した。具体的な目的は以下のとおり。

(1) Ti/Ri プラスミド交換技術を改良し、適用できる菌株の範囲を拡大する

現段階の Ti/Ri 交換技術 (図 2) が成功した菌株は適用した 5 株のうち 3 株だけである。従って、さらに多くの菌株に対応できるように可動化プラスミドの改良とスクリーニングの条件を改善する。現在保有している菌株のうち 8 割以上に適用できる系の確立を目標にハイブリッド菌株作出の基盤技術にする。

(2) ハイブリッドアグロバクテリアの作成

上述技術を適用し、未利用病原株からハイブリッド菌株を作出する。単離元の植物や場所、rRNA 塩基配列による系統関係を考慮し、できるだけ多様な特性を発揮すると考えられる組み合わせで作成し、次年度の形質転換特性の評価に用いる。

(3) 新規ハイブリッドアグロバクテリア菌株の形質転換特性の評価

予備的に作成したハイブリッド菌株 (図 1 の C 株) を含め、新規ハイブリッド菌株の形質転換特性を評価する。具体的にはタバコ、キク、イネなどに対する病原遺伝子誘導能および遺伝子導入効率を測定する。また、優れた性質を示す株を選出し、形質転換の困難な植物に対しても有効な菌株を見出す。

本計画で、同プラスミド交換技術を用い有用な形質を持つ菌株を作出することで、まだ世界中で眠っている多くの未利用病原株の

潜在的な価値を明らかにし、アグロバクテリアによる形質転換技術の革新につなげたい。

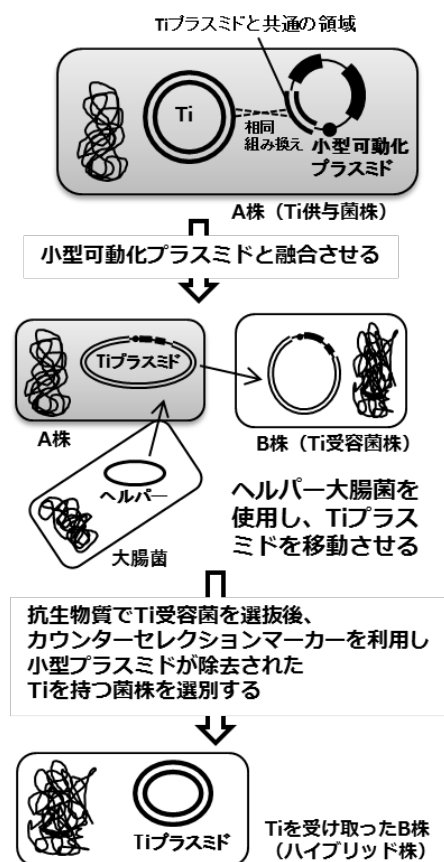


図2 Ti/Riプラスミド移行（交換）技術

3. 研究の方法

申請者らは野生型病原株を有用株化する技術によって、いくつかの未利用病原株の形質転換特性の評価を可能にした。本研究ではさらに多様な菌株を材料として、Ti/Ri プラスミドとゲノムバックグラウンドとの組み合わせによる形質転換特性への影響を評価するために、汎用的なハイブリッド菌株構築技術の確立と新規有用菌株の作出・評価を行った。

(1) Ti/Ri プラスミド交換技術の改良

多様なハイブリッド菌株を作成するには、多くの未利用病原株を材料とする必要があるが、研究開始当初の Ti/Ri プラスミド移行技術では、一部の菌株のプラスミドしか可動化できていなかった。そこで、小型可動化プラスミドの融合と除去の効率上昇、そして Ti/Ri 脱落クローンの判別を容易にするために以下を行った。

可動化プラスミド内の Ti/Ri プラスミドと共通な領域を拡張し、相同組み換えの効率を上昇させる。

当初の可動化プラスミドの持つ Ti/Ri と共

通の領域は約 400 bp であったため、2000 ~ 4000 bp 程度の DNA 断片と交換した。具体的には *virB* (病原遺伝子) の保存性の高い領域を PCR で増幅し、可動化プラスミドに組み込んだ。

ヘルパープラスミドの改良

可動化した Ti/Ri プラスミドを細胞間で移動させるためには、接合移動に必要なタンパク質をコードするヘルパープラスミドが必要となる。ヘルパープラスミドの複製遺伝子を広宿主域プラスミドのものと交換し、Ti/Ri プラスミドの移動効率を評価した。

駐在プラスミド除去用プラスミドの改良

Ti/Ri プラスミドを受容細胞に移動させる場合、受容細胞からそのプラスミドと同じ不和合グループのプラスミドを除去しておく必要がある。現在まで申請者らが開発したプラスミド除去技術では 1 種類の不和合グループ (*incRh1*) のプラスミドしか除去できなかった。そこで Ti/Ri プラスミドが属するその他 3 つの不和合グループ (*incRh2, 3, 4*) に対応する除去用プラスミドを作成した。

Ti プラスミド脱落クローンの選別を容易にする。

一旦融合した小型可動化プラスミドを除去する際に、菌株によっては高頻度で Ti/Ri が丸ごと脱落してしまう。そこで、Ti/Ri プラスミド上の遺伝子によって特異的にルシフェラーゼの発現が促されるレポータープラスミドをあらかじめ菌株に持たせておくことで、Ti/Ri を失ったクローンを容易に判別可能にした。

(2) ハイブリッド菌株の作成

単離元の植物や場所、既に判明している病原性、rRNA およびハウスキーピング遺伝子の塩基配列による系統分類などの情報をもとに、できる限りバリエーションに富んだ菌株を選別し、Ti/Ri プラスミドの交換を行った。

(3) 新規ハイブリッド菌株の形質転換特性の評価

アグロバクテリアは植物の傷口から分泌されるフェノール化合物などの誘導物質によって、病原遺伝子群の発現が促され、DNA 移行が引き起こされる。菌株が異なると植物に対する反応そして病原遺伝子発現誘導量も大きく異なる。本研究では病原遺伝子プロモーター (P_{virE} など) の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポータープラスミドを用い、病原遺伝子誘導物質 (アセトシリゴン) 存在下または各種植物細胞との共存培

養時における病原遺伝子発現誘導量を測定し、菌株の特性を評価した。

4. 研究成果

(1) Ti/Ri プラスミド交換技術の改良

小型可動化プラスミドの改良

Ti/Ri プラスミドで保存性の高い *virB* 領域を増幅する縮重プライマーを設計し、PCR 増幅した DNA 断片を小型可動化プラスミドに組み込んだ。この小型可動化プラスミドを Ti プラスミドを持つアグロバクテリアに導入した結果、相同領域の長さが長いほど、両プラスミド間での融合効率が高まった。相同領域が 4 kbp の場合、従来の小型可動化プラスミドより 100 倍近く融合効率が上昇した。結果、小型可動化プラスミドの導入効率が低い菌株に対しても Ti/Ri プラスミドの可動化が容易になった。

ヘルパープラスミドの改良

可動化した Ti/Ri プラスミドを接合移動させるには、供与細胞に接合タンパク質をコードしたヘルパープラスミドを導入する必要がある。従来のヘルパープラスミドは供与細胞内で複製できないため、広宿主域プラスミド (*incP*) の複製遺伝子領域を導入し複製可能にした。改良型ヘルパープラスミドを供与細胞に持たせた場合、従来のヘルパープラスミドを用いた場合と比べて、可動化 Ti/Ri プラスミドの移動効率は 50 倍以上上昇した。

除去用プラスミドの改良

既存の Ti プラスミド除去用プラスミドでは *incRh1* に属するプラスミドしか除去できなかった。不和合性を利用した Ti/Ri プラスミド除去法の適用範囲を広げるために、除去用プラスミドがもつ *incRh1* プラスミドの複製遺伝子を *incRh2*, *incRh3*, *incRh4* に属するプラスミドのものに入れ替えた。得られた除去用プラスミドを使用することで、効率は低いものの、それぞれ *incRh2*, *incRh3*, *incRh4* に属する Ti/Ri プラスミドを除去することができた。

Ti/Ri-less 株の検出法の改良

Ti/Ri プラスミドの受容や除去操作など本プラスミド移行技術では、細胞が同プラスミドを持つか否かを容易に判別する必要がある。そこで、Ti/Ri プラスミド上に存在する *virA/G* 遺伝子によってルシフェラーゼ遺伝子が発現誘導されるレポータープラスミドを作成した。同レポーターを持つ細胞は Ti/Ri プラスミドが共存する場合にのみ、誘導物質 (アセトシリノゴン) によって発光し、Ti/Ri の有無が寒天培地上で容易に判別可能

となった。

以上の各ステップの改良および栄養要求性のアグロバクテリアを Ti/Ri プラスミドの中継株とすることで、広くリゾビウム属細菌において Ti/Ri プラスミドの交換が可能になった。

(2) ハイブリッド菌株の作成

改良した Ti/Ri プラスミド交換技術を用い、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 8 株、*R. rhizogenes* (*A. rhizogenes*) 2 株、*R. vitis* (*A. vitis*) 1 株、*R. etli* 1 株を材料にハイブリッド菌株を計 49 株作成した。他株の Ti/Ri プラスミドを受容できない *R. radiobacter* MAFF301001 株など現段階では同技術によってハイブリッド化が困難な細胞株も見出された。

(3) 新規ハイブリッド菌株の形質転換特性の評価

野生株、Ti/Ri 除去株を含む計 61 菌株について、感染誘導物質であるアセトシリノゴンによる病原遺伝子発現誘導量を比較した。宿主細胞の種類にかかわらず強い病原遺伝子発現誘導を示すもの、宿主細胞によって大きく同遺伝子の発現量が異なるものなど、Ti/Ri プラスミドの種類によって振る舞いが大きく異なる結果となった。

次に、アセトシリノゴンによる病原遺伝子発現誘導が顕著だったハイブリッド菌株を各宿主細胞ごとに 1 株ずつ選抜し、植物培養細胞 (タバコ BY2 細胞、イネ 0c 細胞) と共存培養させたときの同遺伝子の発現量を評価した。その結果、0c 細胞と共存させたときに、複数の菌株が現在形質転換に汎用されている C58 株よりも 20 倍以上も高い病原遺伝子発現誘導を示した。

(4) まとめと今後の展望

本研究で Ti/Ri プラスミド交換技術の各ステップについて改良を行い、広くリゾビウム属細菌に適用できるようになった。同技術によってリゾビウム属細菌のハイブリッド化を行い、その形質転換特性を評価した結果、形質転換に有用と思われる形質を持った菌株を選別することができた。これら菌株については更に遺伝子導入効率の比較評価など、形質転換特性を精査する必要がある。

リゾビウム属細菌は本来、病原性を持たない (遺伝子導入能力を持たない) 菌株でも、Ti/Ri プラスミドを導入することで病原性を持たせうることが知られている。しかし同細

菌の生理学的多様性や系統解析が進む一方、形質転換に利用されている菌株は未だごくわずかである。リゾビウム属細菌は比較的形質転換が困難な単子葉植物の表面や植物体内でも単離されており、本研究によって確立された Ti/Ri プラスミド交換技術によって有用株化できれば、同細菌による形質転換技術の適用範囲の拡大が期待できる。また、*R. rhizogenes* 病原株が感染植物に誘導する毛状根は現在植物二次代謝産物の生産細胞として注目されている。Ti/Ri プラスミド交換技術は同細菌の感染対象植物の拡大にも寄与し得ると考えられる。

同プラスミド交換技術によって、世界中で単離保管されている多様なリゾビウム属細菌の形質転換特性が評価できれば、形質転換技術の革新とともに病原性に与える諸因子の解析にも役立つ。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

山本真司、鈴木克周

接合を利用したアグロバクテリアの病原プラスミドの交換と植物形質転換有用株の作出

日本遺伝学会 第 85 回大会(横浜)

2013 年 9 月 21 日

慶応義塾大学日吉キャンパス(神奈川県横浜市)

山本真司、坂井綾子、鈴木克周

未利用リゾビウム属細菌の植物形質転換への応用

日本農芸化学会 2015 年度(平成 27 年度)大会 [岡山]

2015 年 3 月 27 日

岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本真司(Yamamoto Shinji)

広島大学・理学研究科・助教

研究者番号: 50607348