

パーティクルガン法によるアスパラガスの形質転換

重本直樹・甲村浩之

キーワード：アスパラガス、遺伝子組換え作物、パーティクルガン、ハイグロマイシン抵抗性

アスパラガスは広島県の地域特産として注目されている作物の一つであるが、本作物は茎枯病による被害が深刻で、抵抗性品種の育成が望まれている。しかし、交配可能な近縁種には茎枯病に抵抗性を示す種がなく、交配による育種は困難である。

近年、アグロバクテリウム法やパーティクルガン法により、他の作物から単離した遺伝子を導入して、病害抵抗性を付与した遺伝子組換え作物の報告がなされている¹³⁾。アスパラガスについては、アグロバクテリウム法による形質転換体作出例¹⁾²⁾が報告されているが、アグロバクテリウムと宿主となる品種の特異性があるため、適用品種の範囲が狭い等の問題がある。一方、遺伝子導入法の一つであるパーティクルガン法⁹⁾は、細胞壁を有する植物細胞に直接遺伝子導入が可能なることから、遺伝子導入の対象となる材料、品種の範囲が広く、多くの作物でこの方法により遺伝子組換え作物が育成されている。

そこで、遺伝子導入法によるアスパラガスの茎枯病抵抗性品種を育成する前段として、パーティクルガン法による遺伝子組換え作物の作出法を検討した。その結果、遺伝子導入細胞のうち約0.03%の割合で遺伝子組換え体を得ることができたので報告する。

材料及び方法

1. 供試材料

遺伝子導入に用いた embryogenic cell (E. Cell) は、Kohmura ら¹⁰⁾ (1994) が品種‘ヒロシマグリーン’から誘導した embryogenic callus (EC) をカルス維持液体培地 (CSM) (Table 1) で 100rpm の振とう培養を行うことにより誘導した。本細胞は、10日ごとに約 100mg の細胞を 50ml のカルス維持液体培地で継代培養することにより維持した。遺伝子導入は、継代 5 日目の E. Cell 約 480mg をブフナーロートを使って径 70mm

のろ紙 (ADVANTEC 社 No.2) 上に広げ、その後、細胞をろ紙ごとカルス維持寒天培地 (CSM) (Table 1) を分注した径 90mm のシャーレに移して供試した。

2. 遺伝子導入圧力の検討

遺伝子導入にはパーティクルガン PDS-1000/He (BioRad 社) を用いた。金粒子のサイズは 1 μ m とし、プラスミドの金粒子への吸着は、BioRad 社のマニュアルに従って行った。また、*gus* 遺伝子⁷⁾を有するプラスミド pBI221 (Clonetech 社) の導入は、試料までの距離 9cm、ヘリウム圧 900, 1,100, 1,300psi (pounds/inches²) の 3 段階の条件で行った。遺伝子導入後の試料は 24 時間培養し、Jefferson らの方法⁸⁾に従って GUS アッセイを行った後、実体顕微鏡下で遺伝子が導入された細胞数を算定した。培養条件は 26°C、16 時間日長 (65 μ E/m²/S) とし、以下 3, 4 の試験についてもすべて同じ条件で培養した。

3. 選抜時の抗生物質濃度の検討

形質転換体の選抜を目的に、抗生物質の濃度がアスパラガス E. Cell の生育に及ぼす影響を調べた。抗生物質は単子葉植物の選抜によく使われているハイグロマイシンを用いた。継代 5 日目の E. Cell 約 30mg を 0, 20, 40, 60, 80, 100mg/l のハイグロマイシンを含むカルス維持寒天培地上に広げ培養を行った。試験は各濃度毎に 5 サンプルを供試し、2 週間毎に同培地で継代して培地上で生育する耐性カルスの数を算定した。

4. 形質転換細胞の選抜と植物体再生

形質転換細胞の選抜及び植物体の再生の流れを Fig.1 に示した。継代 5 日目の E. Cell をろ紙上に広げた後、ハイグロマイシン抵抗性 (*hpt*) 遺伝子⁵⁾を保有するプラスミド pHPT (CaMV35S プロモーター-*hpt* 遺伝子-nos ターミネーター) をヘリウム圧 900psi、試料までの距離 9cm の条件で導入した。合計 3 サンプルに遺伝子

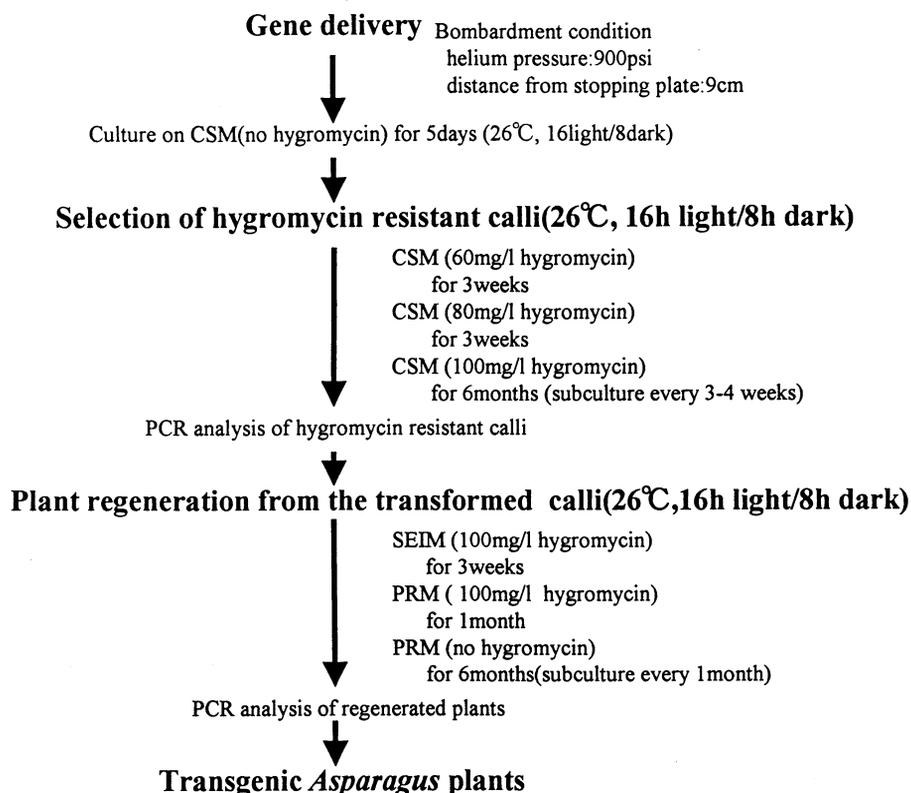
Table 1 Culture media for *Asparagus officinalis*

Media	Use	Component
CSM ^{a)}	Growth of embryogenic callus and embryogenic cell	MS(Murashige and Skoog) ⁹⁾ salts and vitamins, 10 ⁻⁵ M 2, 4-D, 3% sucrose, (0.8% agar), pH5.8
SEIM ^{b)}	Induction of somatic embryo	MS salts and vitamins, 3% sucrose, 1.5% agar, pH5.8
PRM ^{c)}	Plant regeneration	MS salts and vitamins, 3% sucrose, 0.2% gerlite, pH5.8

^{a)} CSM: callus subculture medium

^{b)} SEIM: somatic embryo induction medium

^{c)} PRM: plant regeneration medium

Fig.1 Summary of the transformation of *Asparagus officinalis*

導入を行った。導入後の試料は、ろ紙ごとカルス維持寒天培地上に移し、5日間培養した。次に、ろ紙上の E. Cell を 4ml のカルス維持液体培地に懸濁し、285 μ l ずつを 60mg/l のハイグロマイシンを含む同寒天培地上に広げ、3週間培養した。その後、増殖したカルスをハイグロマイシンの濃度を 80mg/l に調整したカルス維持寒天培地に移植し、3週間培養した。以後は、増殖カルスの一部をハイグロマイシン 100mg/l の培地で 3～4週間ごとに継代培養しながら 6か月間選抜を行った。ハイグロマイシン耐性カルスからの植物体再生は約 30mg のカルスを 200 μ l のホルモンフリーMS 液体培地に懸濁した

後、ハイグロマイシン 100mg/l を含む不定胚誘導培地 (SEIM) (Table 1) 上に広げ、3週間培養を行った。形成された不定胚は、ハイグロマイシン 100mg/l を含む植物体再生培地 (PRM) (Table 1) に移植して約 1 か月間培養を行い、以後ハイグロマイシンフリーの植物体再生培地で培養して植物体を再生した。

5. 導入遺伝子の確認

選抜カルスおよび選抜カルスからの再生植物体における導入遺伝子の確認には PCR 法を用いた。DNA の抽出は、選抜開始 6 か月後のカルスならびにこれらカルス

から再生させた再分化4か月後の植物体からCTAB法¹²⁾により行った。約20mgの試料をCTABバッファ<3% (w/v) セチルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTAB), 1.4%塩化ナトリウム, 0.2% 2-メルカプトエタノール, 20mM EDTA, 100mM トリス-HCl (pH8.0) >中ですり潰し, 60°Cで30分処理後, CTABバッファと同量のクロロホルムを混合, 5,000rpmで遠心分離し, 上清をイソプロパノール沈殿, 70%エタノール洗浄してDNAを調製した。遺伝子を検出するPCR法は, サーマルサイクラー-GeneAmp PCR System Model 480 (Perkin-Elmer社) およびTaq DNA polymerase (Promega社)を用いた。プライマーは, ハイグロマイシン抵抗性遺伝子の翻訳領域のうち320bp断片が増幅されるようにセンス鎖を5'-GTTATGTTTATCGGCACTTTG-3', アンチセンス鎖を5'-GTCCATCACAGTTTGCCAG-3'に設定した。PCR反応は, 94°Cで2分処理した後, 熱変性反応94°C 1分, アニーリング反応60°C 2分, 伸長反応72°C 1分を35サイクル行い, 最後に72°Cで5分間処理した。反応後は, 1.5%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイド染色後にUV下で増幅バンドの有無を確認した。

結 果

1. 遺伝子導入圧力の検討

GUS アッセイすることにより, *gus* 遺伝子が導入された細胞は明瞭な青色のスポットとなり, 試料の中央部より周辺部で多く観察された (Fig.2)。青色スポットを実体顕微鏡下で算定した結果をTable 2 に示した。ヘリウム圧900, 1,100, 1,300psi でそれぞれ約4,500, 4,300, 3,300個の青色スポットが観察され, 検討した3条件では900psi で最も多くの青色スポットが観察された。

2. 選抜時の抗生物質濃度の検討

各ハイグロマイシン濃度の E. Cell に対する影響をTable 3 に示した。ハイグロマイシン無添加の培地では, 培養2週間目で多くのカルスが増殖し, 隣接するカルス同士が融合して正確なカルス数を数えることはできなかった。20mg/lの濃度では200以上のカルスが増殖し, 選抜効果がないと判断して培養を2週間で打ち切った。一方, ハイグロマイシン100mg/lでは培養2週間目ですべての細胞が白色となり完全に枯死した。40, 60, 80mg/lの濃度では, それぞれ80, 46, 7個体のカルスが増殖した。これらカルスを継代し, さらに2週間培養を行って影響を調べたところ, 生存カルス数は40, 60, 80mg/l



Fig.2 Histochemical assay for GUS expression in *Asparagus* embryogenic cells

Table 2 Effect of helium pressure on the gene delivery efficiency into *Asparagus* embryogenic cells

Helium pressure (pounds/inches ²)	Number of blue spots
900	4,505 ± 718 ^{a)}
1,100	4,274 ± 535
1,300	3,320 ± 213

^{a)} Average of three experiments ± standard deviation

の濃度でそれぞれ, 54, 14, 1個体となった。

以上の結果, ハイグロマイシン濃度は80mg/l程度がアスパラガスの E. Cell が生育できる限界濃度であることが明らかになった。

3. 形質転換細胞の選抜と植物体再生

1) 形質転換カルスの選抜

ハイグロマイシン抵抗性遺伝子導入後, ハイグロマイシンの濃度を段階的に上げた培地で選抜することにより, 選抜開始から約7か月目でハイグロマイシン濃度100mg/lで生育する17系統の耐性カルスを得ることができた。これらのカルスは, 非形質転換カルスが選抜培地上で白くなって枯死するのに対し, 黄色のまま旺盛に増殖した (Fig.3)。

2) 耐性カルスにおける導入遺伝子の確認

ハイグロマイシン添加培地上で選抜して得られた17系統のうち, 8系統の耐性カルスからDNAを抽出し, 導入したハイグロマイシン抵抗性遺伝子の有無をPCR法により調べた結果, 7系統においてDNAの増幅断片が観察された (Fig.4)。観察された断片の長さは, ハイグ

Table 3 Number of living calli formed on the culture medium supplemented with hygromycin

Culture periods	Concentration of hygromycin (mg/l)					
	0	20	40	60	80	100
2weeks	many ^{a)}	218	80	46	7	0
4weeks	— ^{b)}	—	54	14	1	0

^{a)} Many calli were formed and fused each other. Independent calli were not distinguished

^{b)} No data



Fig.3 Hygromycin resistant calli selected on the culture medium supplemented with 100mg/l of hygromycin

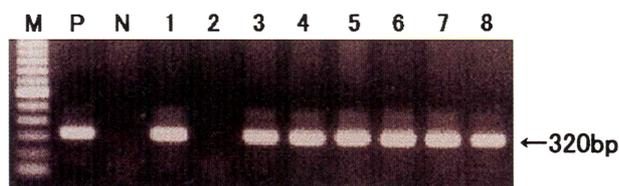


Fig.4 PCR analysis of DNA from hygromycin resistant calli
M: 100bp ladder, P: plasmid pHPT, N: nontransformant,
1-8: hygromycin resistant lines

ロマイシン抵抗性遺伝子を含むプラスミド pHPT を鋳型に PCR 反応を行った際に観察される 320bp の長さとも一致していた。また、非形質転換カルス（レーン N）では増幅断片が観察されなかった（Fig.4）。

3) 植物体の再生

7系統の形質転換カルスを供試し、100mg/lのハイグロマイシンを含む不定胚誘導培地で不定胚誘導を行ったところ、4系統で正常な不定胚が誘導された（Fig.5A）。一方、非形質転換カルスを同培地で不定胚誘導した場合、細胞は白色となってすべて枯死した（Fig.5B）。形質転換カルスから誘導した不定胚は、植物体再生培地でシュートならびに根を伸長させ、完全な植物体にまで再生させることができた（Fig.6）。これら4系統の再生幼植物の形態は、非形質転換アスパラガスと差はなく、形態的変異は認められなかった。

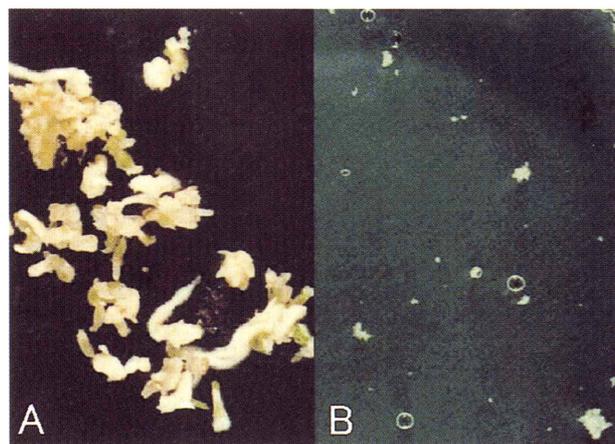


Fig.5 Induction of somatic embryos from the transgenic calli. A: transformant, B: nontransformant



Fig.6 Regenerated plants from the transgenic calli

4) 再生植物体における導入遺伝子の確認

形質転換カルス4系統からそれぞれ再生させた植物体のDNAを鋳型にして、PCR法でハイグロマイシン抵抗性遺伝子を検出したところ、4系統すべてにおいて、カルスから検出した場合と同様に導入遺伝子の存在を示すDNA断片が観察され（Fig.7）、形質転換体であることを確認した。

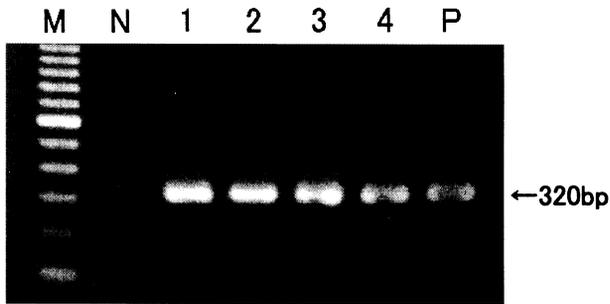


Fig.7 PCR analysis of DNA from regenerated plants from the transgenic calli

M: 100bp ladder, N: nontransformant, 1-4: regenerated plants from the transgenic calli, P: plasmid pHPT

考 察

1. 遺伝子導入圧力の検討

パーティクルガン法は様々な組織に遺伝子導入を行うことが可能な方法で、EC¹⁹⁾、根¹⁷⁾、花粉¹⁴⁾などに遺伝子を導入して、様々な形質転換植物が得られている。今回、著者らは、試料の均一性と扱い易さから EC を液体振とう培養して得た E. Cell を用いて遺伝子導入を行った。アスパラガスの E. Cell の場合、ヘリウム圧は検討した 3 条件では 900psi で最も良く、約 4,500 個の青色スポットが観察された。900psi 以下の条件についても検討の余地はあるが、飯田ら⁶⁾によればパーティクルガンの形質転換効率は $1/10^3 \sim 10^4$ であるということより、本遺伝子導入条件でも形質転換体を選抜することは可能と思われた。また、遺伝子導入された細胞（青色の細胞）の分布は、試料の中心部より周縁部に偏る傾向があり、試料中央部には発射された金粒子の跡が認められた。これは、中央部の細胞に金粒子の散布が偏り細胞のダメージが大きいためと考えられるので、遺伝子導入時にはこれらの点について考慮する必要がある。

2. 選抜時の抗生物質濃度の検討

形質転換体を選抜するのに用いる薬剤としては、カナマイシンやピアラフォスの報告⁴⁾¹⁴⁾がある。本試験におけるアスパラガスの形質転換体選抜には、単子葉植物で多く用いられる抗生物質のハイグロマイシンを用いた。アスパラガスの E. Cell は、ハイグロマイシン 100mg/l の濃度で完全に生育が抑えられ、ハイグロマイシンが培養 2 週間という短い期間で効果があることが明らかになった。しかし、遺伝子導入後の細胞はある程度ダメージを受けていることが考えられるので、本試験では細胞の活性を回復させるため、形質転換カルスを選抜する際の選抜濃度は細胞が完全に枯死しない 60mg/l から開始し、

段階的に 80,100mg/l と濃度を上げて選抜することにした。

3. 形質転換細胞の選抜と植物体再生

段階的にハイグロマイシンの濃度を上げて選抜することにより、選抜開始約 7 か月目で 17 系統のハイグロマイシン耐性カルスを得ることができた。これら 17 系統のうち 8 系統のカルスについて PCR 法により解析した結果、7 系統で遺伝子が導入されていることが確認された。残り 1 系統のカルスが形質転換体でなかったことについては、漸次的に抗生物質の濃度を上げて選抜したため、非形質転換カルスが一部生き残り、最終的に致死濃度での選抜条件下でも生存可能になったためと思われる。

形質転換カルスと認められた 7 系統を不定胚誘導して植物体の再生を図ったところ、4 系統で再生植物体を得られた。3 系統が植物体再生に至らなかった要因としては、カルスの不定胚形成能力がなくなったものと思われる。

再生した植物体について PCR 法により解析した結果、すべての個体でハイグロマイシン抵抗性遺伝子の存在が認められ、導入遺伝子は再分化の最中においても安定して維持されていることが分かった。

形質転換体の選抜効率は、*gus* 遺伝子が導入された青色スポット数と実際に得られた形質転換体数から試算すると、遺伝子導入細胞の約 0.03% であった。従って、1 万個の遺伝子導入細胞あたり 3 個体の割合で形質転換体を得られることになる。この数値は飯田ら⁶⁾が述べているパーティクルガン法での形質転換効率 $1/10^3 \sim 10^4$ と一致している。また、本試験と同様に、パーティクルガン法により E. Cell に遺伝子導入して形質転換体を得た例としては、トウモロコシ⁴⁾、綿³⁾などがあり、アスパラガスの E. cell も遺伝子導入には良好な材料と考えられた。

以上の結果、アスパラガスの遺伝子導入および形質転換体作出技術を確立したことにより、他の作物で単離が進んでいる病害抵抗性遺伝子を導入することが可能になった。最近、キチナーゼ遺伝子や抗菌性タンパク質遺伝子などが多くの作物で単離されている。また、これら遺伝子を導入することによって、病害抵抗性を付与することができた報告¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾もなされており、今後これらの遺伝子導入によるアスパラガスの茎枯病抵抗性品種の育成が期待される。

適 要

アスパラガスの embryogenic cell (E. Cell) を用いて、パーティクルガン法による形質転換系を確立した。具体的な条件は以下の通りである。

1. アスパラガスの embryogenic cell への遺伝子導入時の最適ヘリウム圧は 900psi であった。
2. アスパラガスの embryogenic cell の生育は、ハイグロマイシン 100mg/l で完全に阻害された。
3. ハイグロマイシン抵抗性遺伝子を導入後、ハイグロマイシンの選抜濃度を 60mg/l から開始し、80mg/l, 100mg/l と漸次的に上げることによって、形質転換カルスを得た。
4. 形質転換カルス7系統のうち4系統のカルスから再生植物体を得、すべて形質転換植物であることを認めた。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、農業生物資源研究所の西澤洋子研究員からプラスミド pHPT の分譲を受けた。ここに感謝の意を表する。

引用文献

- 1) BYTEBIER, B., F. DEBOECK, H. DE GREVE and M. VAN MONTAGU: 1987. T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of the monocotyledon *Asparagus officinalis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 5345-5349.
- 2) DELBREIL, B., P. GUERCHE and M. JULLIEN: 1993. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Asparagus officinalis* L. long-term embryogenic callus and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Rep. **12**: 129-132.
- 3) FINER, J. J. and M. D. MCMULLEN: 1990. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. Plant Cell Rep. **8**: 586-589.
- 4) GORDON-KAMM, W. J., T. M. SPENCER, M. L. MANGANO, T. R. ADAMS, R. J. DAINES, W. G. START, J. V. O'BRIEN, S. A. CHAMBERS, W. R. ADAMS, Jr., N. G. WILLETTS, T. B. RICE, C. J. MACKAY, R. W. KRUEGER, A. P. KAUSCH and P. G. LEMAUX: 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. Plant Cell **2**: 603-618.
- 5) GRITZ, L. and J. DAVIES: 1983. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. GENE **25**: 179-188.
- 6) 飯田朝子・山田康之・森川弘道: 1990. パーティクルガンによる植物細胞への遺伝子導入と発現. 植物細胞工学 **2**: 631-637.
- 7) JEFFERSON, R. A., S. M. BURGESS and D. HIRSH: 1986. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 8447-8451.
- 8) JEFFERSON, R. A., T. A. KAVANAGH and M. W. BEVAN: 1987. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. **6**: 3901-3907.
- 9) KLEIN, T. M., L. KORNSTEIN, J. C. SANFORD and M. E. FROMM: 1989. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. Plant Physiol. **91**: 440-444.
- 10) KOHMURA H., S. CHOKYU and T. HARADA: 1994. An effective micropropagation system using embryogenic calli induced from bud clusters in *Asparagus officinalis* L. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. **63**: 51-59.
- 11) MURASHIGE, T. and F. SKOOG: 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant **15**: 473-497.
- 12) MURRAY, M. G. and W. F. THOMPSON: 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res. **8**: 4321-4325.
- 13) 西口正通: 1994. 病害抵抗性関連遺伝子研究の現状と展望. 研究ジャーナル **17**: 11-15
- 14) NISHIHARA, M., M. SEKI, M. KYO, K. IRIFUNE and H. MORIKAWA: Transgenic haploid plants of *Nicotiana rustica* produced by bombardment-mediated transformation of pollen. Transgenic. Res. **4**: 341-348.
- 15) 西原昌宏・山村三郎: 1998. わさびから単離した新抗菌性タンパク質遺伝子とその利用. BRAIN テクノニュース **70**: 21-24.
- 16) 西澤洋子・阿久津克己・日比忠明: 1992. 植物溶菌酵素遺伝子の導入による菌類病抵抗性植物の作出. 植物防疫 **46**: 500-506.
- 17) SEKI, M., N. SHIGEMOTO, Y. KOMEDA, J. IMAMURA,

- Y. YAMADA and H. MORIKAWA: 1991. Transgenic *Arabidopsis thaliana* plants obtained by particle-bombardment-mediated transformation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **36**: 228-230.
- 18) TERRAS, F. R. G., K. EGGERMONT, V. KOVALEVA, N. V. RAIKHEL, R. W. OSBORN, A. KESTER, S. B. REES, S. TORREKENS, F. V. LEUVEN, J. VANDERLEYDEN, B. P. A. CAMMUE and W. F. BROEKAERT: 1995. Small cystein-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defense. Plant Cell **7**: 573-588.
- 19) VASIL, V., A. M. CASTILLO, M. F. FROMM and I. K. VASIL: 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. Bio/Technol. **10**: 667-674.

Production of Transgenic Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) by Particle Bombardment

Naoki SHIGEMOTO and Hiroyuki KOHMURA

Summary

Transgenic asparagus plants were obtained from embryogenic cells by particle bombardment. The results were summarized as follows.

1. Helium pressure to introduce the foreign genes into embryogenic cells was 900 psi(pounds/inches²).
2. The growth of asparagus embryogenic cells were inhibited on the medium with a hygromycin concentration of 100mg/l.
3. Transgenic calli were obtained by selection on the culture medium with a serial dilution of hygromycin (60mg/l to 100mg/l).
4. Seven transgenic callus lines were cultured on the somatic embryo induction medium and induced somatic embryos were transferred onto the plant regeneration medium. Four independent plantlet lines were obtained. In these plantlets, integration of hygromycin phosphotransferase gene was confirmed by PCR analysis.

Key words: *Asparagus officinalis*, transgenic plant, particle-gun, hygromycin resistance