

サツマイモの遺伝子組換え植物作出プロトコル

石川県立大学 生物資源工学研究所 准教授

おおたに もとやす
大谷 基泰

石川県立大学 生物資源工学研究所 助教

なか や ち おさむ
中谷内 修

サツマイモには高次倍数性や交配不和合群といった様々な交雑障壁が存在するために、交雑育種によって効率よく画期的な品種を育成することが難しい。そこで、遺伝子組換えやゲノム編集を利用して画期的な品種の育成を目指すことが期待されている。1980年代まではサツマイモは難培養性植物とされており、遺伝子組換え植物を獲得することは極めて難しいと考えられていた。しかし、その後の茎頂組織からの胚性カルス誘導に成功したことをきっかけにして (Liu & Cantlife, 1984)、サツマイモにおいても遺伝子組換え植物獲得の成功例が相次いで報告されることになった。そして現在では、サツマイモの遺伝子組換え植物の作出はルーティンワークとして行えるようになった。ここでは、我々が現在使っているサツマイモの遺伝子組換え植物作出のプロトコルを紹介する。

我々が利用しているサツマイモの遺伝子組換え方法は、胚性カルス (embryogenic callus) を用いたアグロバクテリウム法であり、1998年に Otani らによって発表された方法を改変したものである。この方法は、①サツマイモの胚性カルス誘導と②胚性カルスへのアグロバクテリウム菌の接種と選

抜・再分化という2つのステップからなる。以下に各ステップについて説明していく。

①サツマイモの茎頂組織からの胚性カルス誘導と増殖 (Otani & Shimada, 1996の方法を改変)

このステップでは、茎頂組織から胚性カルスを誘導し増殖する。供試材料としてサツマイモの無菌植物体を用意することが望ましい。無菌植物体は、季節を問わず実験に供試できることと殺菌消毒の作業が不要であることがメリットになる。

無菌植物体の作成方法

サツマイモの無菌植物体の作出は村田 (1992) の茎頂培養方法を改変しておこなっている。茎頂培養をおこなうメリットはウイルスフリー化も同時に出来る点である。村田の方法からの改変点は以下の通りである。

- アンチホルミン溶液の有効塩素濃度を1%から3.5%に変更
- 基本培地をMS培地からLS培地に変更
- 培地に添加する植物ホルモン条件を0.01 mg/l NAA と 1 mg/l BA に変更
- 培地固化剤を寒天から0.25% ゲランガム

に変更

また、茎頂組織を使わずに側芽を培養することによって無菌植物体を獲得する方法もある。その場合には、ウイルスフリー化した無菌植物体ではないことは留意しておく必要がある。側芽培養に供試する蔓は、汚染度の低いものを用意する必要がある。例えば、塊根から萌芽した勢いのある芽や夏場の降雨の少ない時期に勢いよく伸長している芽が適していると考えられる。側芽培養による無菌植物の獲得は以下のようにしておこなっている。

- 1) 側芽を1～2個持つ茎切片を用意する。殺菌消毒後に両端を切り落とすのでやや長めに採取すると良い。
- 2) 70%エチルアルコールに30秒間浸漬してから、Tween80を数滴垂らした3.5%（有効塩素濃度）アンチホルミン溶液（次亜塩素酸ナトリウム溶液）に5分間浸漬した後、滅菌水で十分に水洗する*。

*十分な量の滅菌水で3回以上水洗する。

- 3) 茎切片の両端の変色した部分よりも少し内側をメスで切り落とした後、LS（MSでも可）ホルモンフリー培地（3%ショ糖、0.25%ゲランガム（品種によってはビトリフィケーションを回避するために0.8%寒天で代用する）を含む）上に茎切片を挿す。
- 4) 26℃、約14時間明所下で培養する。

茎頂組織からの胚性カルス誘導と増殖

このステップでも茎頂培養をおこなうが、ウイルスフリー化を目的とした茎頂培養法とは以下の2点で異なる。まず、摘出する茎頂組織の大きさは、ウイルスフリー

化を目的とした場合には1～2枚の葉原基を付けた幅0.5 mm位までのサイズに収める必要があるのに対して、胚性カルスの誘導を目的とする場合には、幅1 mmを超えるサイズでも利用可能である点が異なる。さらに、側芽の茎頂も利用可能であることも相違点である。予備的な実験結果から、両者の間で胚性カルスの形成率に顕著な差異は認められていない。また、サイズに関しても、ウイルスフリー苗の作出時に使う幅0.5 mm迄の大きさの茎頂組織は反応が緩慢で、さらに枯死するものが頻発するためにより大きなサイズの茎頂組織を供試する方が良い結果に繋がりやすい。

- 1) 無菌植物体の茎頂を含む茎先端部約3 cmをメスで切断して採取し、滅菌シャーレ内の滅菌水に浸す。
- 2) 茎先端部を自作した茎頂培養用針（図1）*¹に突き刺してから実体顕微鏡下で茎頂より葉原基2～4枚程度を含む生長点（幅1 mm前後）を切り出して胚性カルス誘導・増殖培地（表1）*²に植え付け、26℃、暗黒条件下で培養する。

*¹ 自作針は（図1）、割り箸などに木綿針を布粘着テープで巻き付けて固定

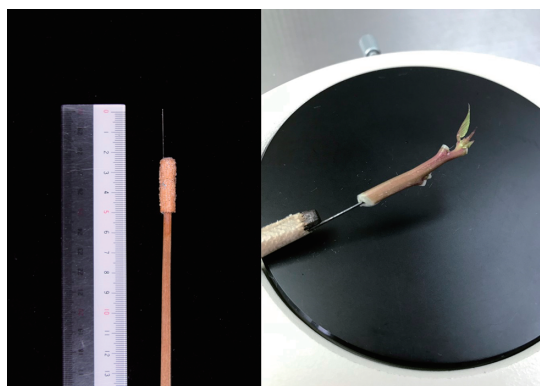


図1 自作のサツマイモの茎頂培養用針（左）とサツマイモの蔓先を刺した状態

表1 サツマイモの遺伝子組換えに用いる培地の組成

培地名	胚性カルス誘導・増殖培地	共存培養培地	選抜培地	再分化培地
基本培地	LS	LS	LS	LS
炭素源	3% ショ糖	3% ショ糖	3% ショ糖	3% ショ糖
培地固化剤	0.32% ゲランガム	0.32% ゲランガム	0.32% ゲランガム	0.32% ゲランガム
植物ホルモン	1 mg/l 4FA ^{*1}	1 mg/l 4FA ^{*1}	1 mg/l 4FA ^{*1}	
抗生物質			25 mg/l ハイグロマイシンB	25 mg/l ハイグロマイシンB
抗生物質			500 mg/l カルベニシリン二ナトリウム塩	500 mg/l カルベニシリン二ナトリウム塩
その他		10 mg/l アセトシリンゴン		
その他		2.3 g/l MES ^{*2}		

全ての培地のpH値はオートクレーブ前に5.9に調整する。抗生物質は濾過滅菌した水溶液をオートクレーブ処理後の培地に添加する。

*1：4-fluorophenoxyacetic acid

*2：2-morpholinoethane-sulfonic acid

したもの。布粘着テープはオートクレーブによる滅菌処理には耐えられるので、自作針をコピー用紙などで包んでからオートクレーブバッグなどに入れてオートクレーブに掛けて滅菌する。

*2 1 mg/ml濃度の4-フルオロフェノキシ酢酸（4FA、Aldrich）ストック溶液は、100 mgの4FAに1規定の水酸化ナトリウム溶液を少しずつ加えていき完全に溶けた状態で、次に蒸留水を加えて100 mlにメスアップする。ストック溶液は遮光性のあるガラス瓶に入れて4℃で保存する。

3) 培養1ヶ月半から2ヶ月後に、形成されたカルスを新鮮な同組成の培地へ移植する。以降は1ヶ月間隔で新鮮な培地に移植する。その後、淡黄白色～黄色（カロチンサツマイモの場合には黄色～橙色、紫イモの場合には淡赤紫色～紫色）を呈し、粒状でやや乾いた状態のカルスである胚性カルスと、増殖が著しく早く白色～半透明で非常に細かく湿った状態の非胚性カルスに識別出来るようになった段階

（図2）で胚性カルスのみを継代培養して増殖させる。

- 胚性カルスを選抜した後は、1ヶ月間隔で2～3分割して新鮮な培地に移植する。
- 継代培養後21～30日経った胚性カルスを遺伝子組換えの実験に供試する。

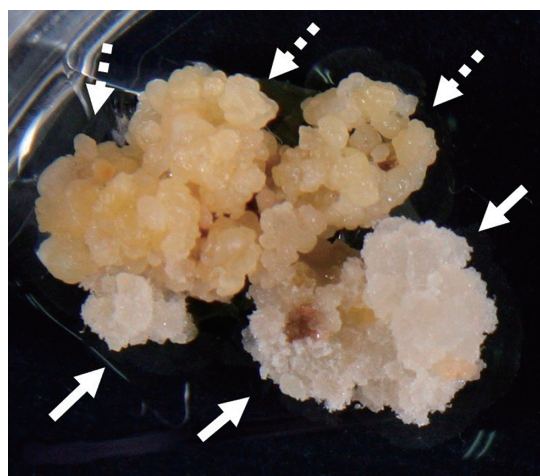


図2 培養60日後の‘エレガントサマー’の茎頂組織由来胚性カルス（点線矢印）と非胚性カルス（実線矢印）

②胚性カルスへのアグロバクテリウム菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) の接種と選抜・遺伝子組換えサツマイモの再分化 (Otani et al., 1998) の方法を改変

アグロバクテリウム菌の形質転換とバイナリーベクター

植物の形質転換に用いられるアグロバクテリウム菌にはいくつかの系統があるが、我々は現在EHA101株 (Hood et al., 1986) を用いている。また、アグロバクテリウム菌へのバイナリーベクターの導入 (形質転換) は凍結融解法 (An et al., 1988) を若干アレンジした方法で行っている。また、バイナリーベクターにはpZH2Bを (Hajdukiewicz et al., 1994, Kuroda et al., 2010) 用いている (図3)。pZH2Bのベクター部分にはバクテリアで働くプロモーターに連結されたスペクチノマイシン耐性遺伝子が組み込まれており、植物体に導入されるレフトボーダーとライトボーダーの間には、35Sプロモーターに連結されたハイグロマイシン耐性遺伝子が組み込まれている。したがって形質転換体の選抜にはハイグロマイシンを用いる。

このハイグロマイシン耐性遺伝子はバクテリア中でも発現するので、pZH2Bを導入された大腸菌やアグロバクテリウム菌の選抜には、スペクチノマイシンに加え、ハイグロマイシンを用いることもできる。ただし、我々は、被形質転換アグロバクテリウム菌の選抜においては、選抜培地中のハイグロマイシンの濃度を、形質転換バクテリアの選抜に用いられる一般的な濃度よりも低い濃度になっている。その方が形質転換体をより早くより多く得られるからである。

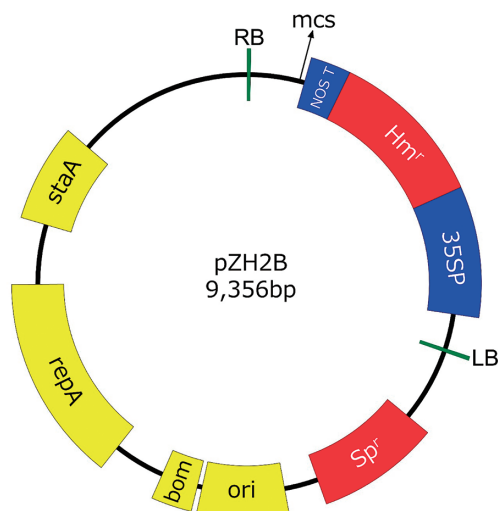


図3 pZH2Bのマップ

RB : right border, LB : left border, Hm^r : ハイグロマイシン耐性遺伝子, Sp^r : スペクチノマイシン耐性遺伝子, 35SP : CaMV 35Sプロモーター, nosT : nosターミネーター, ori : ColE1-type rep origin, repA : pVS1 replication protein, staA : pVS1 partitioning protein, bom : basis of mobility, mcs : マルチクロニング部位

アグロバクテリウム菌コンピテントセルの作製

- 1) カナマイシン (100 µg/ml) の入った YEP 培地 (Horsch et al., 1985) (寒天培地) に保存菌を接種し、24~48時間培養する。
- 2) 培養した菌をカナマイシン (100 µg/ml) の入った YEP 培地 (液体培地 5 ml) に接種し、24~48時間培養する (seed culture)。
- 3) seed culture 2 ml を 50 ml の YEP 培地に接種する。
- 4) OD₆₀₀ が 1.0 になるまで (約 4 時間) 27℃ で振盪培養する。
- 5) 培養液を 50 ml のコニカルチューブに移し、4℃、3,000×g で 15 分間遠心し、上澄みを捨てる。
- 6) 氷上で冷やしてある 10 mM CaCl₂ 溶液 1 ml にバクテリアのペレットを穏やかに

再懸濁し、氷上に20分間置いておく。

- 7) 滅菌したマイクロチューブに100 μ lずつ菌懸濁液を入れ、液体窒素中で急速に凍結する。
- 8) 作成したコンピテントセルは -80°C で保存する。

アグロバクテリウム菌の形質転換

- 1) コンピテントセルをフリーザーから出し、ただちに(凍結状態)導入したいDNA(バイナリーベクター)を1 μ g加える。
- 2) DNAとコンピテントセルの混合物を 37°C のウォーターバスで5分間培養する。
- 3) 混合物に1 mlのLB培地(Bertani, 1951)を加え、 27°C で4時間培養する。
- 4) 4°C 、 $5,000 \times g$ で2分間遠心し、上澄みを捨て、100 μ lのLB培地に再懸濁する。
- 5) 抗生物質(スペクチノマイシン50 mg/l、ハイグロマシン12.5 mg/l)を含むLB寒天培地上に菌懸濁液を塗布し、 26°C で48~72時間培養する。
- 6) 得られた被形質転換アグロバクテリウム菌のコロニーを用いてコロニーPCRを行い、植物に導入したいDNA断片を増幅する。
- 7) 増幅したPCR断片の塩基配列を調べ、アグロバクテリウム菌が、目的の遺伝子が正しく組み込まれたバイナリーベクターによって形質転換されたことを確認する。

アグロバクテリウム菌の接種と除菌

- 1) 冷蔵庫(4°C)で保存してあるLB培地*上のアグロバクテリウム菌のコロニーもしくは冷凍庫(-20°C)で保存しているストックを白金耳で取り、新鮮なLB培

地上に画線を引き、 26°C 、暗黒条件下で培養する。

* バイナリーベクターpZH2B(図3)とアグロバクテリウム菌系統EHA101を用いる場合は、50 mg/l カナマイシンと50 mg/l ハイグロマイシンBを添加する。

- 2) 画線培養2~3日後に、増殖してきたバクテリアのコロニーを細い葉さじのへら部分で米粒大の大きさに1回掻き取り(図4)、50 mlの液体の共存培養用培地が入った100 ml容の三角フラスコ中に移植し、巡回振盪培養器で15~30分間振盪処理(約120 rpm)する(26°C)。振盪処理前と処理後にバクテリアのコロニーの入った三角フラスコを手で10回程度巡回させることによってコロニーをより細かくする。
- 3) 巡回振盪処理の終わったアグロバクテリウム菌の懸濁液を滅菌したステンレスメッシュ製かご*(図5)の入った300 ml容のビーカーに移し、次に、ステンレスメッシュ製かごの中にサツマイモの胚性カルスを1シャーレ分入れて、ピンセットを用いて室温で穏やかに2分間振盪して接種をおこなう。

* ステンレスメッシュ製のかごは、市販のステンレスメッシュを縦横8 cmの大きさの八角形に切り出してから折って作製する。ステンレス製の茶こしで代用することも可。

- 4) 胚性カルスが入ったステンレスメッシュ製かごをガラスシャーレ内の2枚重ねした濾紙上でひっくり返しておくことによって胚性カルスを2枚重ねした濾紙上*に移し過剰なアグロバクテリウム菌

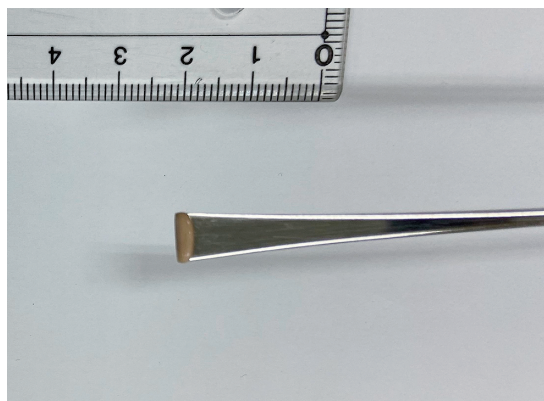


図4 薬さじのへら部分ですくい取ったアグロバクテリウム菌のコロニー（1回の接種分）

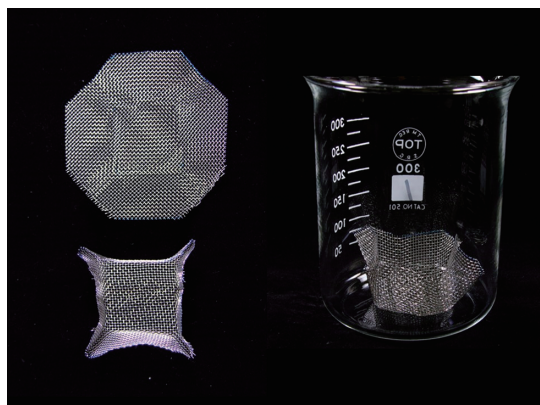


図5 ステンレスメッシュ製かご（左）と300 ml容のビーカーにセットした状態（右）

液を吸い取らせる。

* $\phi 122 \times 26$ mmのガラスシャーレ内にADVANTEC定性濾紙 No.2 $\phi 110$ mmを2枚重ねて入れる。アグロバクテリウム菌の除去（操作9）でも同じものを用いる。

- 5) カルスを共存培養用培地（固体培地）に広げるように植え付けて、23℃、暗黒条件下で2日間*共存培養する。

* 共存培養期間を3日間に伸ばすと感染効率は向上するが、その後の除菌が難しくなる。

- 6) 共存培養2日後、1シャーレあたり滅菌処理したステンレスメッシュ製かごの入った300 mlビーカー1個と空の300 mlビーカー4個を用意する。50 mg/l メロペン*を含む滅菌水を各ビーカーに50 mlずつ入れる。

* メロペン水溶液の調整。市販のメロペン点滴用バイアル0.5 gを蒸留水で溶かしてから10 mlにして50 mg/mlの濃度のストック溶液を作る。このストック溶液をクリーンベンチ内で濾過滅菌した後に1 mlずつマイクロチューブに

分注してから-20℃で冷凍保存する。

- 7) アグロバクテリウム菌を接種した胚性カルスをステンレスメッシュ製かごに移してから、メロペンを含む滅菌水中でピンセットを使いかごを激しく振盪してカルスに付着しているアグロバクテリウム菌を洗い落とす。
- 8) 胚性カルスの入ったステンレスメッシュ製かごを新しいビーカーに移して3分間ほど放置してから7)と同様の操作を繰り返す。以降、残りのビーカーについても同様の操作をおこなっていく。
- 9) 5個のビーカーを用いた水洗後*、カルスの入ったステンレスメッシュ製かごをガラスシャーレ内の2枚重ねた濾紙上でひっくり返して置き、カルスに付着した過剰な水分を吸い取らせる。

* 通常は5回的水洗によって胚性カルスに付着したアグロバクテリウム菌の殆どを洗い落とすことが出来るが、5回目の洗浄でも滅菌水が濁っていてアグロバクテリウム菌の洗い落としが不十分な場合には6回目、7回目の水洗を追加する。

- 10) 濾紙上の胚性カルスを選抜培地（表1）*に植え付けて、パラフィルムなどでシールし、26℃、暗黒条件下で培養する。

* カルベニシリン二ナトリウム水溶液の調整。カラベニシリン二ナトリウム（Apollo Scientific Ltd.）を蒸留水に溶かして500 mg/mlの濃度のストック溶液を作り、クリーンベンチ内で濾過メッキした後に1 mlずつマイクロチューブに分注してから-20℃で冷凍保存する。濾過滅菌の際には、高流量タイプのユニット（ザルトリウス社ならミニザルトハイフロー 品番16532）を用いる。

- 11) 選抜培地へ移植後1週間目に新鮮な選抜培地へ移植する。以降は2週間毎に新鮮な選抜培地へ移植する。

植物体再分化

- 1) 選抜培地で約50日間培養をおこなった胚性カルスをそのまま全てを再分化培地へ移植し*、26℃、14時間照明下で培養を続ける。

* 新たに形成されてきたハイグロマイシン耐性カルスや不定胚と共に、褐変したカルスごと移植しなければいけない。初期の段階の再分化培地上では何も再分化しなかった褐変カルスでもその後の移植によって不定胚を再分化してくることが多いために、諦めずに移植する。

- 2) 再分化培地へ移植14日後に新鮮な再分化培地に移植し、同様の条件下で培養する。以降は3～4週間毎に新鮮な選抜培地へ移植する。
- 3) 再分化培地上で形成されたハイグロマイ

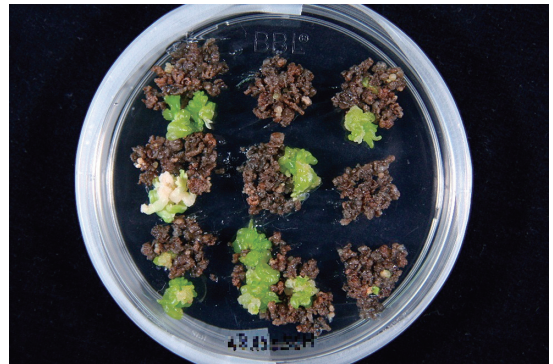


図6 再分化培地上で再分化したハイグロマイシン耐性不定胚（緑や白色の構造物）

シン耐性不定胚（図6）および再分化植物体を新鮮な再分化培地が入ったプラントボックスや培養瓶に移植し、同様の条件下で培養を続ける。3～4週間毎に新鮮な同組成の培地へ移植する。

- 4) その後、再分化した植物体の茎頂部3～5 cmを切断して新鮮な再分化培地上に挿し、生長と発根を促す。数週間で発根と根の伸長が認められれば形質転換体であると判断できる。非遺伝子組換えサツマイモはこの段階で発根できずに枯死する。

遺伝子組換えサツマイモの鉢上げと栽培

- 1) 再分化培地上で発根した再分化植物体をピンセットを使って培養容器から取り出して、容器*¹に入った水*²の中で再分化植物体の根などに付着している培地をきれいに洗い落とす。

*¹ 容器は実験後オートクレーブ処理するために耐熱性のあるものを用意する必要がある。

*² 培地の洗い落としに用いた水や培地の残渣はオートクレーブ処理してから廃棄する。

- 2) オートクレーブによって滅菌処理した園芸用培養土（くみあいニッピ園芸培土1号（全農））が入った黒ビニールポット（φ 6 cm × 5.5 cm）に再分化植物体を植え付けてから水切りかごに並べて入れる。最後に水切りかごの底の網の高さまで水を張ってから透明な蓋をしてから人工気象室や人工気象器内に入れて26℃、14時間照明下で馴化をおこなう。
- 3) 約2週間後に新しく葉が展開してきたら、水切りかごの蓋を少しずつずらして隙間を開け徐々に外気に馴らしていき、最終的に蓋を完全に外す（図7）。
- 4) ポット植え植物体の全長が30 cmを超えて段階で、株元で切り取り、滅菌処理したくみあいニッピ園芸培土1号が入ったワグネルポット（1/5000 a）*に移し換え、最低温度25℃の隔離温室内で約120日間栽培する。

* ワグネルポットに限らず、プランターで栽培しても良い。

- 5) 隔離温室内で栽培開始後100～120日目*に塊根を収穫できる。

* 品種によって収穫時期が異なる。‘花らんまん’や‘高系14号’は比較的早く収

穫が可能であるのに対して、‘White Star’は長期の栽培が必要である。

今後

ここで紹介した遺伝子組換えサツマイモの作出方法では、‘花らんまん’や‘White Star’といった培養しやすい品種を用いた場合には、接種したカルスのうち約50%のカルスから遺伝子組換え植物体が再分化してくる。筆者らの経験からサツマイモの遺伝子組換えでは、研究対象とする品種・系統毎の胚性カルス形成の成否がその後の遺伝子組換え植物の獲得にとって極めて重要であると考えている。ここで紹介したプロトコルでは胚性カルス形成を目的とした植物ホルモンとしては4FAを用いているが、その他にもdicambaやpicloram、2,4-Dもサツマイモ茎頂組織からの胚性カルスには有効であることが分かっている。今後、オーキシン様の植物ホルモンを軸にして品種や系統毎に最適な培地条件を検討していく必要があると考えられる。

また、サツマイモの遺伝子組換えではハイグロマイシンが選抜用抗生物質として最も有効ではあるが、実際は他の選抜マーカー遺伝子の選択肢が無い現状である。その為、遺伝子組換え実験を繰り返しおこなうことが困難な状況である。今後、サツマイモの遺伝子組換えにおいて有効な新しい選抜マーカー遺伝子を見つけ出す必要性があると考えられる。

今後、サツマイモのゲノム解読の進展により、遺伝子組換えやゲノム編集がサツマイモの育種に有効利用されていくことは想像に難くない。その際に、様々なニーズに対応できるように効率的な遺伝子組換え系



図7 人工気象室内で鉢上げ後の馴化が完了した遺伝子組換えサツマイモ植物（品種は‘White Star’）

やゲノム編集系を確立しておくことは極めて重要である。ここで紹介したサツマイモの遺伝子組換え系がさらに改良発展されていくことを期待したい。

謝辞

石川県立大学名誉教授の島田多喜子博士からはサツマイモのバイオテクノロジー研究を進めるにあたって熱心に指導していただくと共に非常に多くの有益な助言を賜りました。東海大学農学部村田達郎教授からはサツマイモの組織培養法にとどまらず接ぎ木法や栽培法など多岐にわたって有益な助言や材料の提供をしていただきました。ここに深謝の意を表します。

引用文献

An, G. P., R. Ebert, A. Mitra, S. B. Ha, (1988). In “Plant Molecular Biology Manual” (eds. by Gelvin, S. B., R. A. Schilperoort), p. A 3/1-19, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Bertani, G. (1951). *Journal of Bacteriology* 62: 293-300.

Hajdukiewicz, P., Svab, Z., and Maliga, P. (1994). *Plant Molecular Biology* 25: 989-994.

Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T., and Chilton, M. D. (1986). *Journal of Bacteriology* 168: 1291-1301.

Horsch, R. B., Fry, J., Hoffman, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., and Fraley, R., (1985). *Science* 227: 1229-1231.

Kuroda, M., Kimizu, M., and Mikami, C. (2010). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74 (11):2348-2351.

Linsmaier, E. M., and Skoog, F. (1965). *Physiologia Plantarum* 18: 100-127.

Liu, J. R., and Cantliffe, D. J. (1984). *Plant Cell Reports* 3: 112-115.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Otani, M., Shimada, T., Kimura, T., and Saito, A. (1998). *Plant Biotechnology* 15: 11-16.

Otani, M., and Shimada, T. (1996). *Breeding Science* 46: 257-260.

村田達郎 (1992). 穀物・いも類・牧草類の増殖と育種. pp.235-252.