

# 植物形質転換用バイナリーベクター 新発売！ 大腸菌での構築が容易な新規バックボーンベクターです。

## pRI 909 DNA pRI 910 DNA

製品コード	3260	10 µg	¥48,000
製品コード	3261	10 µg	¥48,000

- バイナリーベクター法によるアグロバクテリウムを介する遺伝子導入法に使用可能
- 目的遺伝子を植物染色体へ安定に組み込み可能
- 10種類の制限酵素サイトを含むマルチクローニングサイトを搭載

*Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) や *A. rhizogenes* (*R. rhizogenes*) は、Ti プラスミドあるいは Ri プラスミドと呼ばれる巨大プラスミドを有しており、その一部である T-DNA (transfer DNA) を宿主植物の細胞内に移行させ、植物染色体 DNA に挿入します。T-DNA 上の遺伝子が発現することにより、感染部位にはクラウンガール (Crown gall) や毛状根 (Hairy root) が形成されます。このしくみを利用して、T-DNA 上の病原性の遺伝子を除き、選択マーカー遺伝子とともに目的の外来遺伝子を配置することにより、宿主植物の細胞、核 DNA に外来遺伝子を移行 (*Agrobacterium* - mediated gene transfer)、挿入させること、すなわち植物の形質転換が可能で、Ti プラスミドや Ri プラスミドの *vir* 領域にある複数の遺伝子がこの T-DNA の切り出しから植物への移行に関与しますが、この機能は別のプラスミド上にあっても発揮されることが知られています。以上のことから、T-DNA 領域を有しアグロバクテリウム中で安定に維持され、かつベクターを構築しやすいサイズのプラスミド DNA を、*vir* 領域を搭載する別のプラスミドを持つアグロバクテリウムに導入して植物に感染させるバイナリーベクター法が考え出されました<sup>1)</sup>。当初は、宿主植物に限られていましたが、*vir* 領域にある複数の遺伝子の発現誘導物質 (アセトシリゴンなど) が解明されたことで飛躍的に宿主域が広がり、植物のみならず、麹菌などの糸状菌やマッシュルームなど担子菌にまで応用されつつあります<sup>2)</sup>。これまで製品として販売され、改良されてよく利用されているベクターは pBIN19 由来の pBI101、pBI121 (クロンテック社、終売) とこれをバックボーンにした改良型ベクターです。今回タカラバイオが新しく発売する pRI 909 DNA、pRI 910 DNA は従来型のベクターとは異なり、大腸菌での複製 ori も高コピー型のを搭載しています。本稿では、この新規ベクターを用いてタバコ BY-2 培養細胞ならびにシロイヌナズナ、トマト、イネの植物体へ遺伝子導入を行った例についてご紹介します。

### ■ 製品の概要

pRI 909 DNA、pRI 910 DNA は *A. rhizogenes* (*R. rhizogenes*) の Ri プラスミド<sup>3)</sup> 由来ですが、*vir* 領域は含まず、改変した

Ri ori および T-DNA 領域を含みます。従って、バイナリーベクター法を用いた *Agrobacterium* - mediated gene transfer に用いることができます。大腸菌中では高コピー数のプラスミドとして維持され、マルチクローニングサイトに 10 種類の制限酵素サイトを含んでいるため、ベクター構築が容易です。植物染色体 DNA への T-DNA の挿入には方向性があり、T-DNA の Left Border (LB) 側はしばしば切れ込んで、完全には挿入されないことが知られています<sup>4)</sup>。しかし pRI 909 DNA、pRI 910 DNA の両ベクターは、マルチクローニングサイトが植物での選択マーカーより T-DNA の Right Border (RB) 側に位置しますので、選択マーカーによって選択された形質転換体においては、目的遺伝子が植物の染色体 DNA に完全な形で挿入されている確率が高くなります。

大腸菌およびアグロバクテリウム中で自律的に複製するシャトルベクターである pRI DNA (図 1) は、pUC ori を含むため大腸菌では高コピー数のプラスミドとして維持されます (図 2)。また、改変型 Ri ori によりアグロバクテリウム中でも安定に維持されます。大腸菌、アグロバクテリウムでの選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子 NPT III を、植物での選択マーカーとして改変型カナマイシン耐性遺伝子 NPT II を含んでいます。クローニングサイトとして pUC 系のプラスミドに使われる制限酵素切断部位が使用できます。

pRI 909 DNA と pRI 910 DNA ではマルチクローニングサイトおよびその周辺配列が逆向きです。

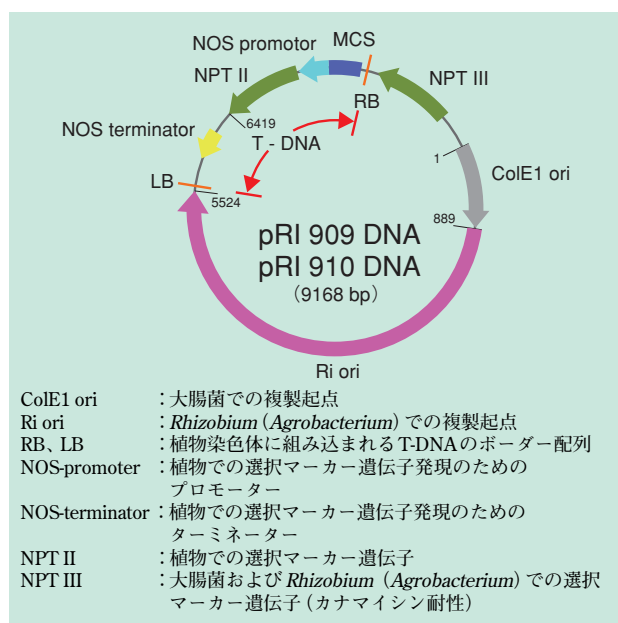


図 1 ベクターマップ

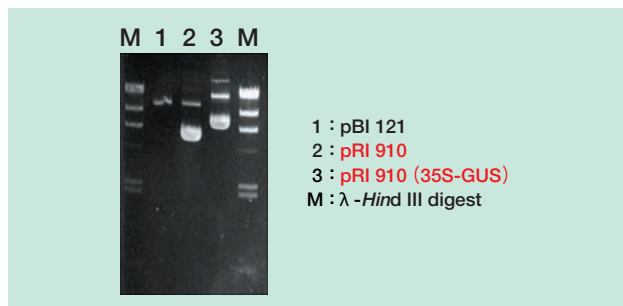


図2 大腸菌からのプラスミドミニプレップの結果

pRI ベクターは大腸菌中のコピー数が高いため、ミニプレップでの確認やプラスミド精製が簡単にでき、目的遺伝子を搭載したベクターの調製も容易です。

## ■ 形質転換プロトコール

### ・アグロバクテリウムの形質転換プロトコール

(Bio-Rad 社製の Gene Pulser II を使用する場合を例示)

- ① *A. tumefaciens* (*R. radiobactor*) LBA4404 のエレクトロポレーション用コンピテントセル\*<sup>1</sup>を氷上でゆるやかに融解する。
- ② 本製品または本製品をもとに作製したプラスミド DNA 1  $\mu$ l\*<sup>2</sup>を 1.5 ml チューブに入れ、氷上に置く。
- ③ ②のチューブに①で溶解したコンピテントセル 20  $\mu$ l を加えて混和する。
- ④ 0.1 cm エレクトロポレーション・キュベットを氷上に用意する。
- ⑤ Gene Pulser II の条件を 25  $\mu$ F、200  $\Omega$ 、2.4 kV に設定する。
- ⑥ コンピテントセルと DNA の混合液 (③) をエレクトロポレーション・キュベットに移し、キュベットを軽く指ではじいて底に集める。キュベットを Gene Pulser II にセットし、Pulse ボタンを押す。
- ⑦ キュベットを取り出し、1 ml の YM 培地\*<sup>3</sup>を加え、15 ml チューブに移す。
- ⑧ 30  $^{\circ}$ C、1 時間振とう培養後、カナマイシンを含む YM 寒天培地へ播種し、30  $^{\circ}$ C で 48 時間培養する。

\* 1 : *A. tumefaciens* (*R. radiobactor*) LBA4404 はバイナリー法の開発者であるオランダのライデン大学の P. J. J. Hooykaas 教授らが開発した菌株で、多くの実績があります。本株は T-DNA の *vir* 領域のみを含むプラスミド pAL4404 (ストレプトマイシン耐性遺伝子含む) を保有しています。タカラバイオはライデン大学より本株の供与を受け、今秋ごろからエレクトロポレーション用コンピテントセルとして販売する予定です。

\* 2 : 実験例 1 では約 20 ng の DNA を使用。

\* 3 : YM 培地 : Yeast Extract 0.4 g、マンニトール 10 g、NaCl 0.1 g、MgSO<sub>4</sub> 0.1 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 0.5 g を 1 L の水に溶解し、pH7.0 に調整してオートクレーブ。

LB 培地に置き換えも可能ですが形質転換効率は低下します。

### ・タバコ BY-2 細胞の形質転換プロトコール

- ① タバコ BY-2 培養細胞\*<sup>1</sup>の培養 4 日目の培養液 4 ml に、2 晩培養した形質転換 *A. tumefaciens* LBA4404 (OD  $\geq$  1.5) の培養液 100  $\mu$ l を加える。
- ② 60 mm 径の培養シャーレで 2 日間共存培養する (25  $^{\circ}$ C、暗所)。
- ③ 共存培養した細胞を 15 ml のチューブに LSD 培地\*<sup>1</sup>で洗いながら集め、10 ml に調整する。
- ④ 卓上低速遠心機で遠心分離 [1,000 rpm (160  $\times$  g)、2 分] し、上清を捨てる。このときの細胞ペレットは 1.5 ~ 2 ml PCV (Packed Cell Volume) となる。

- ⑤ LSD 培地で細胞ペレットを洗い、10 ml にする。

④と⑤を 2 回繰り返す、最終的に 3 ml の LSD 培地細胞懸濁液とする。

- ⑥ 細胞懸濁液 1 ml を新しい 15 ml チューブにとり、LSD 培地 4 ml、カルベニシリン保存液 (100 mg/ml) 50  $\mu$ l、カナマイシン保存液 (50 mg/ml) 10  $\mu$ l と、溶解して 50  $^{\circ}$ C に保温した 1.2 % 寒天入り LSD 培地 5 ml を加えてよく混和し、10 ml とする。

- ⑦ 固まる前に、90 mm 径のシャーレにまき、静置する。

- ⑧ 固まった後、速やかに 25  $^{\circ}$ C に移し、約 2 週間培養する。

\* 1 : タバコ BY-2 培養細胞は理化学研究所・バイオリソースセンター・実験植物開発室から入手できます (RPC 番号:RPC00001)。LSD 培地はこのリソースの推奨培地と同一のものです。

## ■ 実験例 1 : タバコ BY-2 培養細胞の形質転換

### 【方法】

pRI 910 DNA のマルチクローニングサイトに 35 S プロモーター :  $\beta$  グルクロニダーゼ遺伝子 (GUS) : NOS ターミネーターからなる遺伝子カセットを導入したプラスミドベクター pRI 910 (35S-GUS) を、大腸菌を用いて構築した。次に、前述のプロトコールに従って、pRI 910 (35S-GUS) ならびにコントロールとして pBI 121 DNA (35S-GUS およびカナマイシン耐性遺伝子 NPTII を搭載) を用いて *A. tumefaciens* (*R. radiobactor*) LBA4404 の形質転換を行った。さらに、各々の形質転換アグロバクテリウムをタバコ BY-2 培養細胞と共存培養し、タバコ BY-2 細胞の形質転換を行った。

### 【結果】

培養 2 週間後の選択寒天培地上に増殖したタバコ培養細胞を観察したところ (図 3)、pRI 910 (35S-GUS) はコントロールの pBI 121 と同等の形質転換効率を示しました。



図 3 タバコ BY-2 細胞の形質転換 (選択培地での培養)

## ■ 実験例 2 : タバコ BY-2 培養細胞に遺伝子導入した

### $\beta$ グルクロニダーゼ (GUS) の活性染色

### 【方法】

実験例 1 の選択寒天培地で増殖してきたカナマイシン耐性のタバコ BY-2 細胞を 96 穴プレートにとり、常法に従って GUS 染色を行った。

### 【結果】

GUS 染色陽性となるクローンは、本製品を用いて構築した pRI 910 (35S-GUS) でより多数得られました (34 ページ、図 4)。

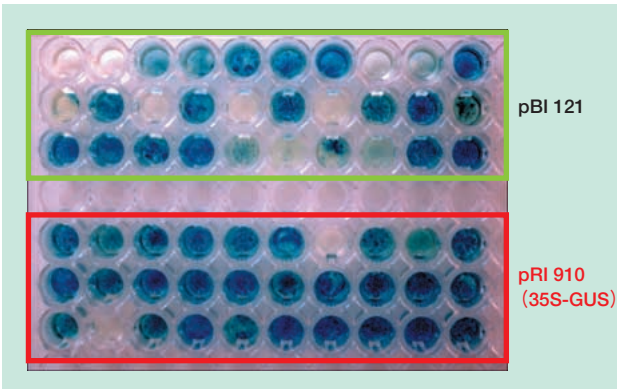


図4 形質転換タバコ BY-2 細胞のGUS 染色

### ■ 実験例 3 : 植物への遺伝子導入例

#### 【方法】

実験例1で構築したpRI 910 (35S-GUS) およびコントロールのpBI 121 DNAを用いて *A. tumefaciens* (*R. radiobacter*) LBA4404の形質転換を行った後、各形質転換アグロバクテリウムをシロイヌナズナ、トマトおよびイネに感染させ、それぞれの形質転換プロトコールに従って形質転換体を取得した。

#### 【結果】

いずれの植物でも導入遺伝子の発現が確認されました(図5A~5C)。

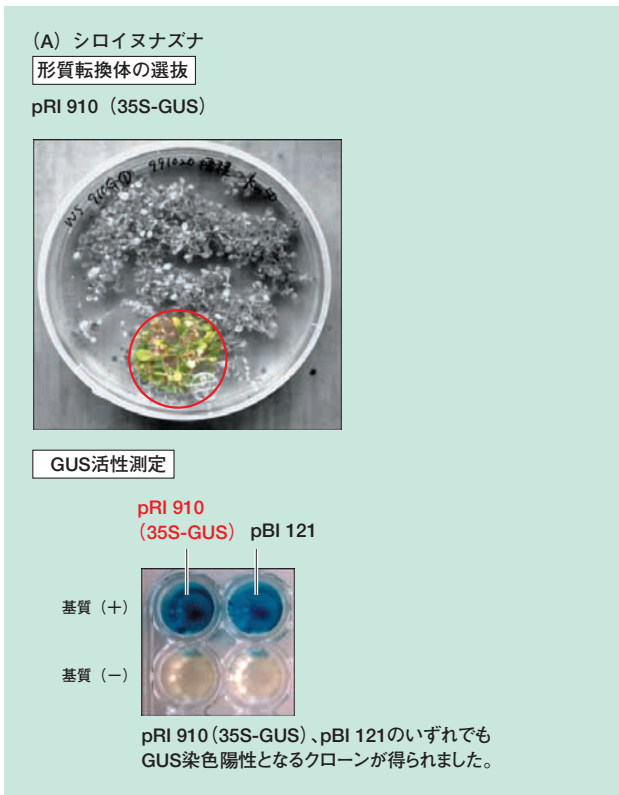


図5A シロイヌナズナへの遺伝子導入と GUS 染色例

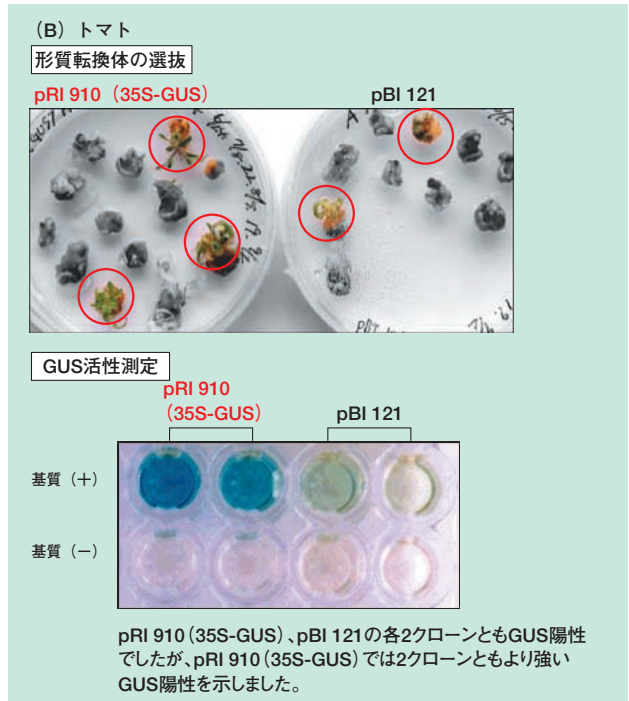


図5B トマトへの遺伝子導入と GUS 染色例

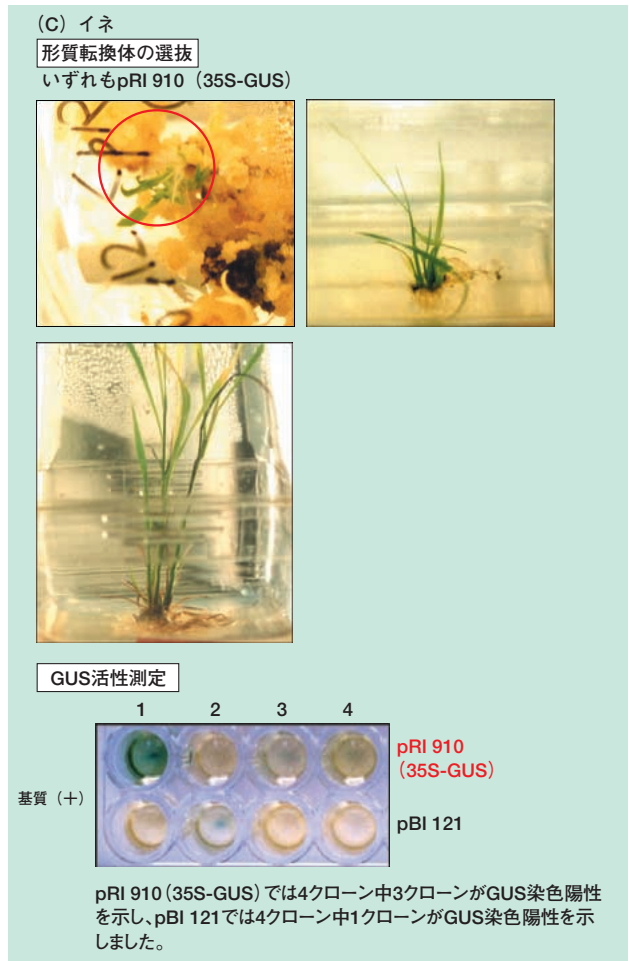


図5C イネへの遺伝子導入と GUS 染色例

#### 【参考文献】

- 1) G. Ooms, P.J. J. Hooykaas, R. J. M. V. Veen, P. V. Beelen, T. J. G. Regensburg-Tuink, R. A. Schilperoort., (1982) *Plasmid*, **7**, 15-29.
- 2) M. J. A. Groot, P. Bundock, P.J. J. Hooykaas, A. G. M. Beijersbergen., (1998) *Nature Biotech.*, **16**, 839-842.
- 3) R. Nishiguchi, M. Takanami, A. Oka., (1987) *MGG*, **206**, 1-8.
- 4) T. Ohba, Y. Yoshioka, C. Machida, Y. Machida., (1995) *Plant J.*, **7**, 157-164.