

理科教材としての遺伝子導入系

—3. 学校教育現場で作出可能なトランスジェニック植物—

System of introduction of foreign genes into plants as a teaching material in science education

—3. Transgenic plants capable of producing at educational institution—

松本省吾*・田中洋輔**・福井博一**

Shogo MATSUMOTO・Yosuke TANAKA・Hirokazu FUKUI

Summary

A nopaline type *Agrobacterium tumefaciens* strain GOU1 induced morphologically normal shoots and roots with a crown gall tumor at infection site of *Kalanchoe daigremontiana* stems. The nopaline was detected from the shoots, roots and tumors, suggesting that they had been transformed. We introduced the procedure for obtaining the transgenic plants to high school teachers and students.

Key words: techniques of genetic engineering, introduction of foreign genes, plant
遺伝子組換え, 遺伝子導入, 植物

I. はじめに

これまでに我々は、遺伝子組換え植物に関するアンケートを実施し多くの人が遺伝子組換え農作物・食品に高い関心を持っていることを明らかにするとともに（松本ら，2000），遺伝子組換え植物を正確に理解するためのモデル実験系の開発を進めてきた（松本ら，2001）。遺伝子組換え植物作出方法にはアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) 法，パーティクルガン（遺伝子銃）法，エレクトロポレーション（電気穿孔）法等があるが，高等学校で実施可能なことを念頭に，特別な設備，装置を必要としないアグロバクテリウム法を用いモデル実験系を開発した（松本ら，2001）。具体的には，アグロバクテリウムRG3株のカランコエ (*Kalanchoe daigremontiana*) への感染により，感染部位に茎葉分化が見られ，かつ，茎葉部分からノパリンが検出されたことから，どこでも行えるトランスジェニック植物作出の実験系がほぼ確立されたことを報告した（松本ら，2001）。本実験系は，自然界において交雑不可能な植物と微生物の間で遺伝子組換えが起こっていることを知ることに繋がり，また，全てではないが，この自然界で起きていることをベースにして構築されたアグロバクテリウム法により遺伝子組み換え植物が作出されていることを知ることに繋がる。さらに，前報（松本ら，2001）で述べたように，実際に実験に使用したアグロバクテリウムRG3株等は岐阜県下で単離されており，植物材料も園芸店等で販売されており馴染みのあるカランコエを用いている。教材として身近な材料を用いており，実験方法は簡単でアグロバクテリウム感染後のカランコエの管理も植物体が乾燥に極めて強いいため容易である等の優れた点があった。しかしながら，得られた茎葉を成長させるのが困難な点が問題点としてあった（松本ら，2001）。

*岐阜大学教育学部理科教育（生物学）Department of Biology, Faculty of Education, Gifu University

**岐阜大学農学部 Faculty of Agriculture, Gifu University

本研究では、カランコエの茎部にアグロバクテリウムを感染させることにより葉部に感染させたときよりも野生型に近い茎葉分化が起こること、根の分化が見られることを新たに見いだした。今回得られた新たな知見を加えて完成させた学校教育現場で実施可能な植物遺伝子導入系について報告する。

II. 材料及び方法

1. アグロバクテリウム

A. tumefaciens は、岐阜県内で単離されたノパリン型GOU1株、RG3株とノパリン型、オクトピン型に属さないHolland5株を実験に供した（周ら，1999；西脇，2000）。菌株は、LBプレート上で28℃にて培養した。

2. 植物体への感染

カランコエ (*Karanchoe dagremontiana*) 葉及び茎部への感染は、Matsumotoら，(1992) または周ら，(1999) の方法に従って行い、経時的にクラウンゴール形成の程度と茎葉分化の有無を調べた。

3. ノパリンの検出

ノパリンの検出は、*A. tumefaciens* GOU1株感染部位から生じた茎葉、根、クラウンゴール部を用い、田中，(1990) の方法に従って行った。

III. 結果及び考察

我々は、アグロバクテリウム (*A. tumefaciens*) RG3株をカランコエ (*K. dagremontiana*) 茎部に感染させることにより、感染部位より茎葉分化が生じることを明らかにした（松本ら，2001）。この茎葉部からはノパリンが検出され、茎葉部がアグロバクテリウムの有する遺伝子が導入されているトランスジェニック植物であることが確認された。しかしながら、この実験系の問題点として経時的に茎葉部が成長せず、まれに成長の見られた茎葉部は生育に伴って奇形化し、器官として明らかに野生型と異なってしまうことがあった。すなわち、アグロバクテリウム感染後2ヶ月位までの段階では肉眼的に明らかな異常は見られなかったが、4ヶ月の段階では明らかな異常が認められた (Fig. 1)。

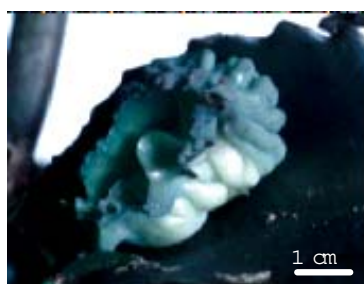


Fig. 1 Response of *k. dagremontiana* leaf to infection of *A. tumefaciens* strain GOU1 (4 months after inoculation).

カランコエは葉の周辺がくびれて芽となり、この芽から殖えていく植物であり、無性生殖により増殖する植物として中学理科の教科書にも取り上げられている。すなわち、カランコエでは正常な葉から花器官分化を経ることなく子孫が作られており、葉は非常に重要な器官である。今回、葉の周辺がくびれた肉眼的に野生型と見分けのつかない再分化植物体を得るために、前報（松本ら，2001）で

試みなかったカランコエ茎部にアグロバクテリウムを感染させ、正常な茎葉分化が見られるか調べた。

その結果、アグロバクテリウムGOU1株感染後1.5ヶ月で感染部位より肉眼的に野生型と見分けのつかない葉器官が得られた (Fig. 2 A, B)。これに対し、カランコエ葉部にアグロバクテリウムを

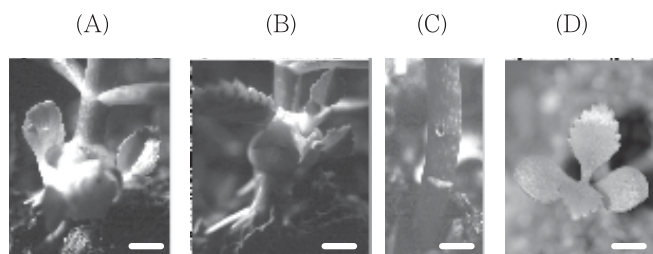


Fig. 2 Response of *k. diagremoniana* leaves to infection of *A. tumefaciens* strain GOU1 (A, B) and no bacteria (control) (C). (D), Seedling of *k. diagremoniana*. ■■■, 5mm.

感染させることにより得られた葉器官は、感染後2ヶ月の段階で茎から生じた葉器官に比べ小さく、葉幅が細く、葉の周辺に明瞭なくびれは見られなかった (未発表データ, 松本ら, 2001)。このアグロバクテリウムGOU1株を茎部に感染させることにより生じた葉器官の切片を光学顕微鏡にて観察したところ、気孔が見られ、細胞レベルで野生型との間に顕著な違いは認められなかった (Fig. 3)。

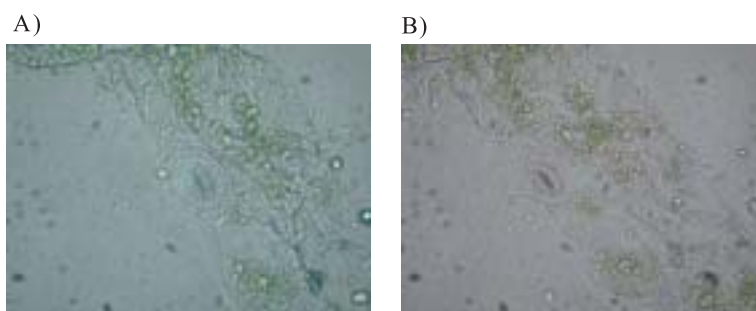


Fig. 3 A stoma cell of *k. diagremoniana* leaf (A) and regenerated leaf obtained by inoculation of *A. tumefaciens* strain GOU1 (B).

また、葉器官内に導管要素と推定される箇所が観察された (未発表データ)。以上のことから、アグロバクテリウムを葉に感染させたときよりも茎に感染させたときの方が、肉眼的に葉の周辺部に明瞭なくびれが見られた点で、より野生型に近いことが判明した。さらに、茎にアグロバクテリウムを感染させた場合には、葉への感染時には見られなかった根の分化が認められた (Fig. 2A, B)。これら、アグロバクテリウムGOU1株感染により得られた葉部、根部、ゴール部についてノパリンの検出を試みたところ、全ての組織抽出液からノパリンが検出され、いずれも形質転換体、すなわちトランスジェニック植物 (細胞) であることが確認された (Fig. 4)。形質転換体の出現頻度を調べたところ、アグロバクテリウムGOU1株感染に供した10個体中7個体から再分化個体が生じ、葉への感染よりも出現頻度が高かった (Table 1)。なお、前報 (松本ら, 2001) では、アグロバクテリウムRG3株、GOU1株のカランコエ葉への感染実験を4回繰り返し、4回とも再分化個体が得られたことを報告したが、これは、1回の実験につき葉身に4カ所感染させ、そのうち最低でも1カ所から再分化個体が得られたことを意味している。今回の実験は、アグロバクテリウムRG3株、GOU1株をカランコエ3個体由来の計5葉の3ないし4カ所に一度に感染させた結果である。前報 (松本ら, 2001) では、アグロバクテリウムGOU1株以外にRG3株を葉に感染させたときも再分化個体が得られた。今回の実験でも

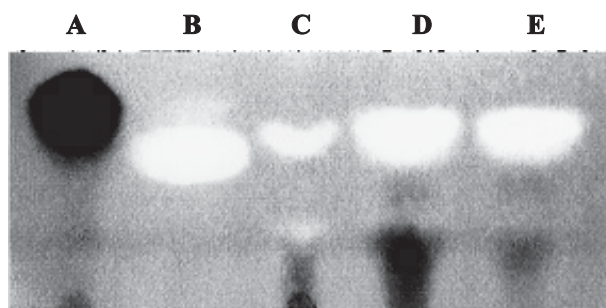


Fig. 4 Detection of nopaline in extracts of regenerated plants by paper electrophoresis.

A, methylene green (20 μ g). B, nopaline (50 μ g). C, extracts of regenerated roots (ca. 100 μ g). D, extracts of regenerated leaves (ca. 100 μ g). E, extracts of galls (ca. 100 μ g).

Table 1. The percentage of regenerated shoots on *K. diagemontiana* stem and leaf 6 weeks after inoculation with *A. tumefaciens* strains

Section of <i>K. diagemontiana</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strains		
	GOU1	RG3	Holland5
stem	70(7/10) ^a	0(0/10)	11(1/9)
leaf	39(7/18)	83(15/18)	0(0/18)

^aThe numerators are number of regenerated shoots, and the denominators are number of inoculated sites.

アグロバクテリウムRG3株を葉に感染させたときにはGOU1株よりも高い頻度で再分化個体が生じたが、興味深いことに茎に感染させたときには、再分化個体を全く得ることができなかった (Table 1)。アグロバクテリウムGOU1株とRG3株は、共に岐阜県下で単離されたノパリン型のアグロバクテリウムである。今のところRG3株の茎感染により再分化個体の得られない理由は不明であるが、今後、カラコエの個体再分化機構の解明にこれらアグロバクテリウムが有用な手がかりを与えるかもしれない。また、アグロバクテリウムHolland5株を茎に感染させたときには再分化個体はほとんど得られず、葉に感染させたときには前報 (松本ら, 2001) と同様、全く得られなかった (Table 1)。アグロバクテリウムHolland5株をカラコエ茎部に感染させたときは、経時的にゴール部が肥大し、感染部位より上の部分が枯死した。これは、ゴールにより維管束系がふさがれ、根からの養分吸収に問題が生じたためと考えられる。これらの個体では、感染部位より上の部分が枯死した後ゴール部も枯死した。これに対し、GOU1株、RG3株を茎に感染させることにより葉器官を分化した個体では、ゴール部の肥大がHolland5株感染のものに比べて抑えられ、枯死する個体は少なかった。多くの植物でGOU1株、RG3株感染後半年以上にわたり再分化した葉器官を見続けることが可能であった。また、葉に感染させて生じた葉器官に見られた奇形化 (Fig. 1) は見られなかった。得られた葉器官を切り取り、オーキシンである1-ナフタレン酢酸 (NAA) を0.5ppm含む水にて育成したところ、1週間後には葉の基部から発根が見られ (Fig. 5B)、5週間後には葉のくびれの部分から幼植物体を生じた (Fig. 5C)。このことから、再分化した葉器官は子孫を残せる器官であることが判明した。

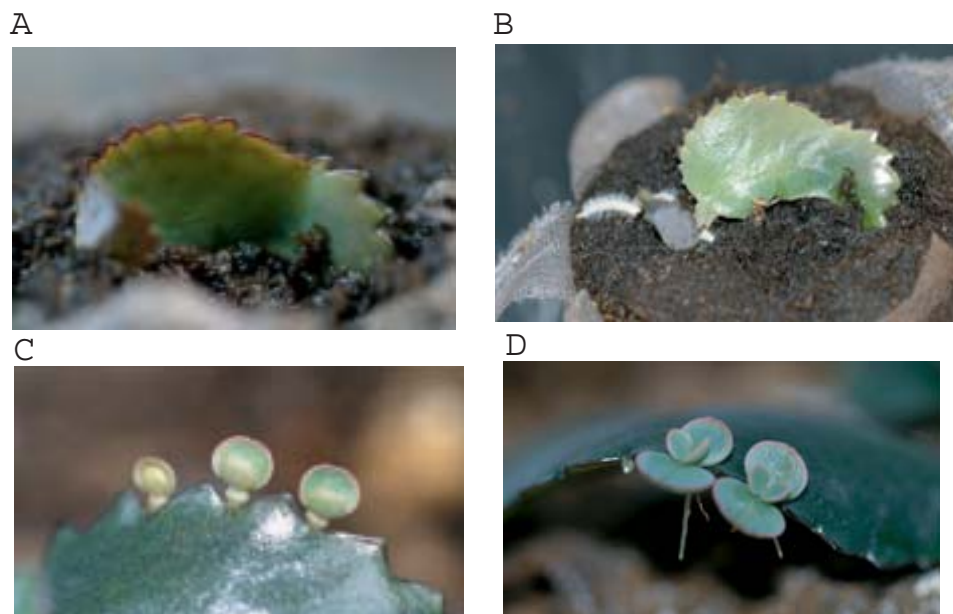


Fig. 5 Growing of regenerated leaf. The leaf was excized from the gall (mother plant), and put onto the soil including 0.5ppm NAA for 1 week, then no NAA for eight weeks. A, 0 days after excision. B, One week after excision. C, Five weeks after excision. D, Eight weeks after excision.

前報（松本ら，2001）と今回の実験で得られた知見を基に，平成14年8月21日に岐阜大学遺伝子実験施設において開催された'理科系教官のための組換えDNA実験教育研修会'の中で高等学校の教員等に本研究内容を紹介した。紹介の後，いくつかの質問があり関心の高さがうかがわれた。その後，平成12年12月9日に岐阜県立恵那高等学校にて行われたセミナー'遺伝子組み換え植物の現状と未来'の中で直接高校生に本研究内容を紹介した。93% (26名/28名)の生徒が，遺伝子組換え植物を理解するのに本研究内容の実験系が役に立つと述べた。また，86% (24名/28名)の生徒が，自ら遺伝子組換え植物を作る実験をやってみたいと述べたことから，今後，実際に学校教育現場で本研究内容の実験系が活用されることが期待される。

IV. 謝辞

高等学校教員ならびに高校生に本研究内容を紹介する機会を与えて下さいました岐阜大学遺伝子実験施設 鈴木 徹助教授，(財)岐阜県研究開発財団，岐阜県先端科学技術体験センター 田村直明氏，恵那高等学校 齊藤宣昭校長に深く感謝いたします。

V. 文献

Matsumoto, S., K. Ophel, K. G. M. Skene and N. S. Scott [1992] Partial characterization of *Agrobacterium vitis* strains, *Vitis*, 31 : 195-203.

松本省吾, 鈴木 学, 高木諭美 (2000) 理科教材としての遺伝子導入系 -1.遺伝子組換え技術とその利用に関するアンケート調査-, 岐阜大学教育学部研究報告 =自然科学=, 25 (1) : 15-31.

松本省吾, 高木諭美, 鈴木 学, 田中伸和, 福井博一 (2001) 理科教材としての遺伝子導入系 -2.岐阜県産アグ

ロバクテリウムの感染によるトランスジェニック植物の作出, 岐阜大学教育学部研究報告 =自然科学=, 26(1) : 49-53.

西脇 誠 [2000] 植物バイオテクノロジーの教材化, 岐阜大学教育学部修士論文, 15-35.

周 林, 鈴木邦典, 福井博一, 松本省吾, 景山幸二, 松原陽一 [1999] *In vitro*におけるバラの根頭がん腫病抵抗性の品種間差異, 園芸学会雑誌, 68 (2) : 440-445.

田中伸和 [1990] 濾紙電気泳動法によるオパインの検出法, 植物組織培養, 7 : 45-47.