

## 植物への形質転換効率を向上させるアグロバクテリウムの改良

### 研究成果のポイント

1. 作物への形質転換効率を向上させる、スーパーアグロバクテリウム ver. 4 を開発しました。
2. 植物形質転換の際に植物から発生する植物ホルモンのエチレンと、低分子アミノ酸である $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)に着目し、これらを同時に抑制する能力をアグロバクテリウムへ付与しました。
3. 実験トマト品種「Micro-Tom」において、安定的な形質転換効率を3倍向上させることを達成し、従来菌株による形質転換と比較して、使用する植物材料などのリソースを、7割以上削減することに成功しました。

国立大学法人筑波大学 生命環境系 つくば機能植物イノベーション研究センターの江面浩教授、野中聡子助教らの研究グループは、理化学研究所 門田康弘研究員との共同研究により、新規のスーパーアグロバクテリウムver.4の分子育種に成功しました。

植物の形質転換は、植物病原菌の一種であるアグロバクテリウムを改変、無病化し、植物へ接種して利用するのが一般的です。その際、植物ホルモンのエチレンや低分子アミノ酸の一種である $\gamma$ アミノ酪酸(GABA)などが、植物から発生することが知られています。これらの物質は、植物が持つ病害菌抵抗物質としても知られており、アグロバクテリウムの形質転換においては、阻害的に働きます。実際に、本研究グループは、エチレン前駆物質ACC(1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸)を分解するACCデアミナーゼやGABAを分解するGABAトランスアミナーゼ活性をアグロバクテリウムへ付与し、形質転換効率を向上させることに成功してきました。

本研究では、ACCデアミナーゼとGABAトランスアミナーゼ活性をアグロバクテリウムへ同時に付与することに成功しました。その結果、従来のアグロバクテリウム菌株と比較してトマトへの形質転換効率を3倍上昇させることに成功しました。これにより、従来のアグロバクテリウム菌株を利用した形質転換と比較して、植物材料の量など、必要なリソースを7割以上削減することが可能になります。本研究で開発したスーパーアグロバクテリウムver.4の活用により、様々な植物種での形質転換の効率化が期待されます。

本研究の成果は、2019年10月7日付「Frontiers in Plant Science」で公開されました。

\* 本研究は、科研費若手(B)「高効率遺伝子導入のための次世代スーパーアグロバクテリウムの分子育種」24780001、基盤(C)「広い植物種への高効率形質転換を可能にする次世代型スーパーアグロバクテリウムの開発研究および「新エネルギー技術研究開発／バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発(先導技術開発)／エネルギー植物の形質転換技術および組換え植物栽培施設での栽培技術の研究開発」(新エネルギー・産業技術総合開発機構)の支援のもと実施されました。

## 研究の背景

アグロバクテリウム<sup>注 1)</sup>を用いた植物の形質転換<sup>注 2)</sup>は、モデル植物においては高効率で安定的に行えるものの、その他の実用植物においては品種や系統により難しいものもあり、幅広い植物への形質転換系の改良が求められています。アグロバクテリウムを介した形質転換は、遺伝子導入、導入細胞の選抜、再分化の 3 ステップから成ります(図 1)。最初のステップである遺伝子導入は多くの植物種で共通するものであり、これを促進する系の開発は、多くの植物で形質転換効率の向上に貢献すると考えられます。実際に、遺伝子導入の向上により形質転換効率が向上した例は、従来、形質転換が難しいとされてきたインディカイネやキュウリなどで報告されています。そこで本研究グループは、形質転換の最初のステップである遺伝子導入過程の改善に取り組みました。

これまでの研究から、植物ホルモンのエチレン<sup>注 3)</sup>、サリチル酸、アブシジン酸、低分子アミノ酸の一種である $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)<sup>注 4)</sup>などが、アグロバクテリウムによる植物への形質転換を阻害することが知られています。我々の以前の研究では、エチレン前駆物質 ACC を分解する ACC デアミナーゼの酵素活性をアグロバクテリウムへ付与し、形質転換効率の向上に成功しています(スーパーアグロバクテリウム ver.1)(参考文献 1、2)。また、GABA を分解する GABA トランスアミナーゼ活性をアグロバクテリウムへ付与し、導入効率及び形質転換効率を向上させることに成功しています(スーパーアグロバクテリウム ver. 3)(参考文献 3、4)。本研究では、ACC デアミナーゼ活性と GABA トランスアミナーゼ活性を、同時にアグロバクテリウム菌株に付与し、一過的な遺伝子導入効率および安定的な形質転換効率を評価しました。

## 研究内容と成果

シュドモナス菌から ACC デアミナーゼ酵素遺伝子(*acdS*)、大腸菌から GABA 分解酵素遺伝子(*gabT*)を単離し、アグロバクテリウム菌株への酵素活性付与に利用しました。*acdS* 遺伝子と *gabT* 遺伝子のアグロバクテリウム菌株への導入は、様々な細菌で保持されることが可能な広宿主域ベクター pBBR1MCS-5 プラスミドを用い、これらの遺伝子の発現制御は、アグロバクテリウム内で恒常的に発現する *lac* 遺伝子プロモーターを利用しました。ACC デアミナーゼ活性と GABA トランスアミナーゼ活性は、両遺伝子を保持しない従来のアグロバクテリウム菌株では検出されず、*acdS* 遺伝子と *gabT* 遺伝子を導入したアグロバクテリウムにおいてのみ検出されました。ACC デアミナーゼ活性と GABA トランスアミナーゼ活性を付与したアグロバクテリウム(スーパーアグロバクテリウム ver.4)は、実験トマト品種「Micro-Tom」への一過的な遺伝子導入および安定的な形質転換効率を向上させることに成功しました(図 2A、B)。さらに、高バイオマス生産植物であるエリアンサスにおいても、一過的な遺伝子導入効率を向上させることに成功しました(図 2C)。

本研究で開発したスーパーアグロバクテリウム ver.4 は、従来のアグロバクテリウム菌株よりも形質転換効率を 3 倍向上させることができます。このことは、従来のアグロバクテリウム菌株の利用よりも、使用する植物材料の量など、形質転換に必要なリソースを 72%ほど低減させることが可能になることを示します。また、スーパーアグロバクテリウム ver.4 は、ver.1 および ver.3 よりも安定的な形質転換効率をさらに 1.5 倍向上させることに成功しています。

## 今後の展開

本研究で開発したアグロバクテリウムは、アグロバクテリウムの感染時に植物に蓄積するエチレンの発生抑制と GABA の分解を同時にし、遺伝子導入効率を向上させました。エチレン発生抑制能力や GABA 分解能力を単独で有するスーパーアグロバクテリウム ver.1 や ver.3 は、多くの実用作物品種を含むウリ科植物、アブラナ科植物、ナス科植物などで効果があることが示されています。このため、本研究で作出したスーパーアグロバクテリウム ver.4 は、これらの実用作物への形質転換効率をさらに向上させることが期待されます。

参考図

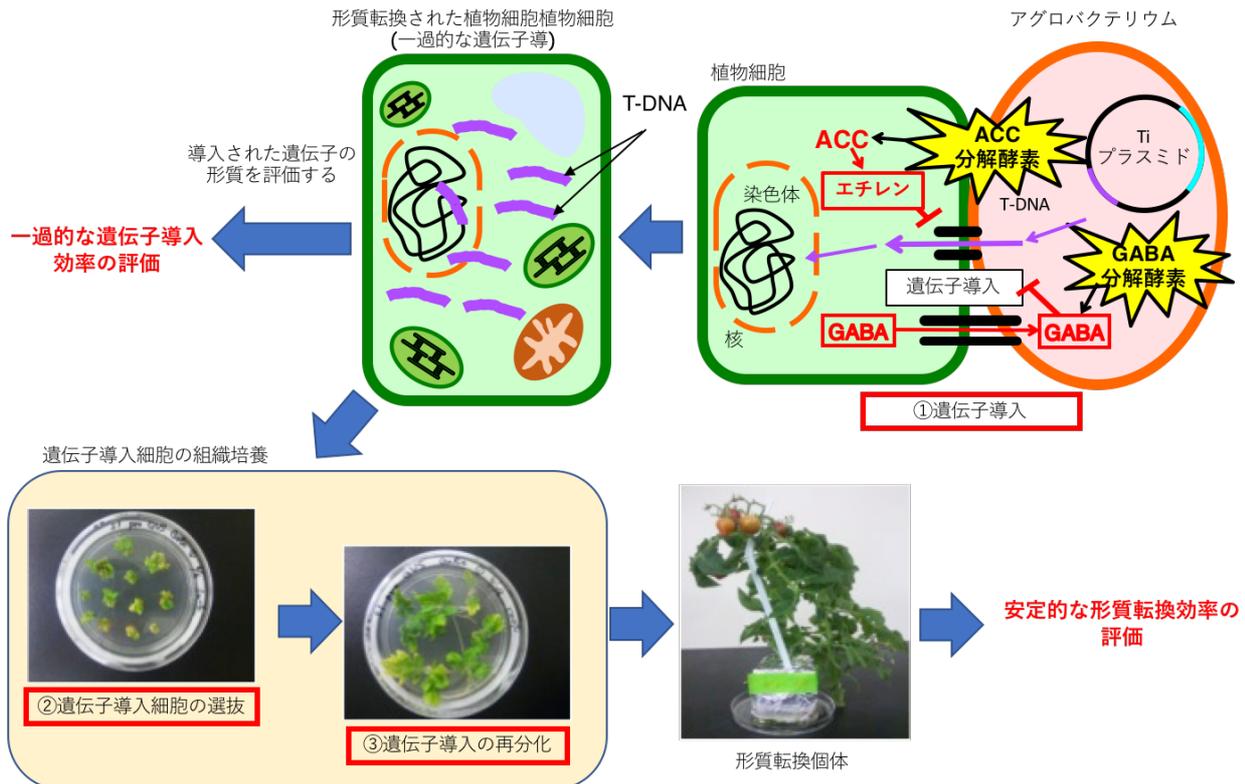


図1 本研究における形質転換の過程

アグロバクテリウムを介した形質転換は、遺伝子導入、導入細胞の選抜、再分化の3ステップから成ります。

エチレンと GABA がアグロバクテリウムにより植物への遺伝子導入を阻害することが知られています。それぞれを抑制する酵素を同時にアグロバクテリウムへ付与し、一過的な遺伝子導入および安定的な形質転換効率の向上を図ります。エチレンの前駆物質は 1 アミノシクロプロパン1アミノアシド(ACC)です。本研究では、この ACC を分解する酵素 ACC デアミナーゼをアグロバクテリウムへ付与しエチレンの発生を抑制します。また、GABA 分解酵素 GABA トランスアミナーゼをアグロバクテリウムへ付与し GABA を抑制します。

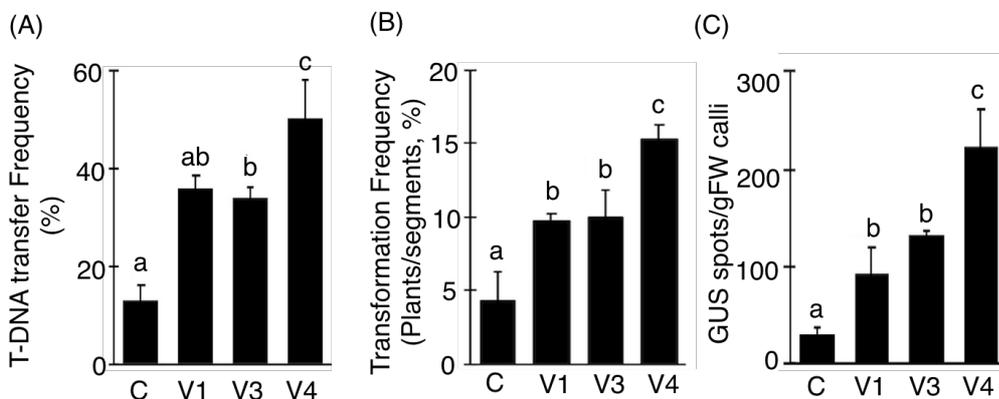


図2 スーパーアグロバクテリウム ver.4 の効果

スーパーアグロバクテリウム ver. 4 は、一過的な遺伝子導入効率と安定的な遺伝子導入効率を従来菌株より3倍向上させました。

(A) トマトへの一過的な遺伝子導入効率、(B) トマトへの安定的な形質転換効率、(C) エリアンサスへの一過的な遺伝子導入効率

エラーバーは標準偏差を表し、アルファベットは統計学的に有意差があることを示す。Tukey-Kramer method, multiple comparison method ( $P < 0.01$ ). C:対照区(従来のアグロバクテリウム菌株)、V1: スーパーアグロバクテリウム ver.1、V3: スーパーアグロバクテリウム ver.3、V4: スーパーアグロバクテリウム ver.4

## 用語解説

### 注 1) アグロバクテリウム

アグロバクテリウムは土壌細菌であり、*Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis* などがあります。本稿でのアグロバクテリウムとは、*A. tumefaciens* を示します。*A. tumefaciens* は、根頭癌腫病を引き起こす土壌細菌として知られています。アグロバクテリウムは、植物に感染し、自身の持つ遺伝子 (Transfer-DNA, T-DNA) を複雑な機構を経て、植物ゲノムへ導入します。この植物ゲノムへ Transfer-DNA (T-DNA) を挿入することがアグロバクテリウムを介した形質転換です。T-DNA 上には根頭癌腫病を誘発するオーキシンやサイトカイニンなどの植物ホルモン合成遺伝子やアグロバクテリウムの餌となるアミノ酸を合成する酵素遺伝子があります。我々が植物形質転換をする際には、T-DNA 上の根頭癌腫病を引き起こす遺伝子を取り除き、その代わりに植物へ形質転換したい遺伝子に置き換えて(無病化して)利用しています。

### 注 2) 植物形質転換

交配不可能な植物や微生物、動物の持つ有用遺伝子を人為的に植物ゲノムに組み込み、遺伝形質を植物細胞に導入する技術です。遺伝子組換え作物などは、この技術を用いて作成されており、除草剤耐性作物、病害虫抵抗性作物など有用形質を持つ様々な作物が開発されています。形質転換法には、上述したアグロバクテリウムを介した方法のほかに、パーティクルガンやエレクトロポレーションなどを用いた物理的導入法があります。

### 注 3) エチレン

気体状の植物ホルモンとして知られており、植物の生理活性・情報伝達を調節する役割を果たしています。果実の成熟、葉の離脱、花の老化に関連しており、エチレンの除去によりこれらの現象が抑制されることが知られています。また、植物が冠水した際や、低温にさらされた際に、病原菌の感染を受けるなどの生理学的ストレスや、植物が高温状態や低温状態、乾燥状態にさらされるなどの環境ストレスによっても、生合成が誘導されます。

### 注 4) $\gamma$ アミノ酪酸(GABA)

GABA は、非タンパク質構成アミノ酸であり、ナス科、イネ科などの植物に含まれます。GABA は、植物病原菌の感染などのストレスとともに合成が促進されることが知られており、実際に植物-アグロバクテリウム間相互作用においても、根頭癌腫病を抑制する物質として使われています。また、ヒトが摂取した場合には、血圧抑制やストレス緩和に効果があるとされています。

## 参考文献

1. Nonaka S, Someya T, Zhou S, Takayama M, Nakamura K, Ezura H. (2017) An *Agrobacterium tumefaciens* strain with gamma-aminobutyric acid transaminase activity shows an enhanced genetic transformation ability in plants. *Sci Rep.* 7: 42649. doi: 10.1038/srep42649.
2. 江面 浩、南澤 究、野中 聡子、菅原 雅之: 植物へ遺伝子を導入する効率が向上したアグロバクテリウム菌およびその作製方法 (特許 第 4534034 号 平成 22 年 06 月 25 日)
3. Nonaka S, Sugawara M, Minarnisawa K, Yuhashi KI, Ezura H. (2008) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase enhances *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer into plant cells. *Appl. Environ. Microb.* 74, 2526-2528.
4. Hiroshi Ezura, Kouji Nakamura, Satoko Nonaka, Tatsuhiko Someya Sha Zhou: *Agrobacterium* having highly efficient gene transfer ability to plant imparted thereto (Patent No. US 9,944,936 B2, Apr. 17, 2018)

### 掲載論文

【題名】 Super-Agrobacterium ver.4: Improving the Transformation Frequencies and Genetic Engineering Possibilities for Crop Plants.

(スーパーアグロバクテリウム ver.4: 作物における形質転換効率と遺伝子高額の改善の可能性を与える)

【著者名】 Nonaka S, Someya T, Kadota Y, Nakamura K, Ezura H.

【掲載誌】 Frontiers in Plant Science (<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01204>)

### 問合わせ先

野中 聡子(のなか さとこ)

筑波大学 生命環境系／つくば機能植物イノベーション研究センター 助教

江面 浩(えづら ひろし)

筑波大学 生命環境系／つくば機能植物イノベーション研究センター 教授