

トチュウの形質転換に関する研究*1

村吉美智子*2 · 中澤慶久*3 · 福崎英一郎*4 · 小林昭雄*4 · 玉泉幸一郎*5

キーワード：トチュウ，トランス型ゴム

I. はじめに

ゴムは石油や石炭にある価値を持つ工業原料であるが、一般的に天然ゴムと呼ばれているのは、パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) のラテックスを凝固して得られるシス型ゴムのイソプレンポリマーである。シス型のポリイソプレンは、トウダイグサ科をはじめ、クワ科、キク科、ガガイモ科など多種の植物が生産し、その数は2,500種以上にのぼる (1)。一方、トランス型のポリイソプレンを生産する植物は数種しかなく、パラタゴムノキ (*Mimusops balata*, パラタゴム), グッタベルカノキ (*Palauquium gutta*, グッタベルカ), サボジラ (*Achras zapota*, チクル; シス型ポリマーとの混合物) のほか、トチュウ (*Eucommia ulmoides* Oliv.) が知られている (2)。

トチュウ (杜仲) はトチュウ科 (Eucommiaceae) に属する1科1属1種の落葉喬木である。中国中南部の四川省・雲南省・貴州省・湖南省などに広く分布し、薬用として古くから服用され、樹皮や葉は生薬または飲用として利用されている (3)。一方、葉や樹皮にはトランスポリイソプレンが含まれており、葉や若い枝、あるいは樹皮を折ると銀白色の細い糸を引く。トランスポリイソプレンは、乳液状のゴム質で弾性は少ないが、加熱すると柔らかくなるため、海底ケーブルの絶縁体や歯科材料、チュウインガム、ゴルフボールなどにも使用されている (4)。しかし、シス型ゴムに比べるとトランス型ゴムは研究数が少なく、研究対象としてほとんど注目されていない。

そこで本研究では、ゴム生産に関与する遺伝子を改変し、様々な用途に適したゴム生産能を有する植物を創生することを目的として、アグロバクテリウム法によるトチュウの形質転換系確立を試みた。

II. 材料と方法

1. 供試材料

愛媛県生名島のトチュウ雌株より採取 (2001年11月) した種子を20g/lのショ糖と2.4g/lのゲルライトを含むMS (5) 培地に無菌播種し、25℃の暗黒下で発芽させた。播種後11日目の根と下胚軸を1cm~1.5cmに切り、材料として用いた。形質転換用のプラスミドベクターに、株式会社豊田中央研究所生物部光川典宏氏より分与されたpBIsGFP (S65T) を使用した。これらのベクターにはカナマイシン耐性遺伝子 (*npt II*), ハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hpt*), GFP (S65T) 遺伝子が含まれている。

2. アグロバクテリウムによるpBIsGFP (S65T) の導入

菌株は既にpBIsGFP (S65T) を導入したアグロバクテリウム属菌株, *Agrobacterium tumefaciens* EHA105を用いた。

トチュウの根と下胚軸へのアグロバクテリウムEHA105/pBIsGFP (S65T) の感染は、Otaniら (6) の方法に従った。まず、カナマイシン50mg/l入りのLB-抗生物質寒天培地に冷蔵保存しておいたアグロバクテリウム菌体を白金耳でかきとり、カナマイシン50mg/l入りのLB-液体抗生物質培地に移し、暗黒、26~28℃、140回/分で一晚 (10~12時間) 振盪培養して増殖させた。その後、対数増殖期の培養物を遠沈管に入れて集菌 (5,500rpm, 15min) した。菌体をアセトシリゴン20mg/lを添加した液体培地 (感染用培地) に懸濁し、分光光度計で菌の濃度をO.D.₅₅₀=0.25に合わせた。

クリーンベンチの中で根と下胚軸を感染用培地に入れて手で振盪しながら2分間浸漬した。浸漬後、滅菌した濾紙上で余分な水分を除去してから、アセトシリゴン20mg/lを添加した固体培地 (根および下胚軸-アグロバクテリウム共存培養培地) に移し、25℃の暗黒下で3日間共存培養した。3日後、接種した根と下胚軸をカルベニシリン500mg/lを添加した滅菌水で3回十分に水洗し、アグロバクテリウム菌体を除去した。再度余分な水分を除

*1 Murayoshi, M., Nakazawa, Y., Fukusaki, E., Kobayashi, A. and Gyokusen, K.: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucommia ulmoides* Oliver

*2 日立造船株式会社 (NEDOフェロー) Hitachi Zosen Corp. (NEDO fellow), Hiroshima 722-2393

*3 日立造船株式会社 Hitachi Zosen Corp., Hiroshima 722-2393

*4 大阪大学大学院工学研究科 Dep. Bio., Grad. Sch. Engin., Osaka Univ., Osaka 565-0871

*5 九州大学大学院農学研究院 Fac. Agric., Grad. Sch., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

去してからカルベニシリン500mg/lとカナマイシン50mg/lを添加したカナマイシン耐性の選抜培地に置床し、25℃、PPFD50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、明期16時間/日の照明下で培養した。

また、これらの遺伝子導入の培地はMS培地を基本培地とし、6 μM の α -ナフトレン酢酸(NAA)、6 μM の6-ベンジルアミノプリン(BAP)、20g/lのショ糖および2.4g/lのゲルライトを含み、pHは5.6に調整した。

3. 蛍光顕微鏡による観察

遺伝子導入細胞の確認は、蛍光実体顕微鏡(Nikon システム実体顕微鏡SMZ800/P-FLA、実体蛍光装置フィルターキューブ)を用いて行なった。

Ⅲ. 結果と考察

選抜培地置床後、20日目の根と下胚軸の観察を蛍光実体顕微鏡を用いて行った。Blue light (490nm)を照射すると根のカルス化した部位が緑色の蛍光を発しており、根においてGFP(S65T)遺伝子の導入発現が示唆された(図-1, 2)。これまでに、播種後40~60日のトチュウの根、下胚軸、子葉、葉を材料として行った実験ではGFP(S65T)遺伝子の導入は認められなかったことから、アグロバクテリウムによる遺伝子の導入には、暗黒下で発芽させ、さらに発芽後間もない、比較的柔らかい材料を用いることが有効であることが示唆された。

しかし、今回の遺伝子導入本数は根では72本中1本、下胚軸では63本中0本と少なかった。今後は遺伝子導入効率を高めるために、感染時にインキュベーターを用いて減圧をしながらアグロバクテリウムを感染させることや(7)、超音波洗浄機を用い、材料に傷を入れて感染させることなどの検討が必要である。

謝 辞

本研究は、新エネルギー産業技術総合開発機構(NEDO)委託事業「植物利用エネルギー合理化工業原料生産技術の研究開発」のもとで遂行したものである。

また、本研究を遂行するにあたり、プラスミドベクターpBIsGFP(S65T)を提供していただいた株式会社豊田中央研究所の光川典宏氏に厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- (1) Mooibroek, H. *et al.* (2000) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 355-365.
- (2) 馬場健史ほか(2002) *バイオサイエンスとインダストリー* 60(7): 30-33.
- (3) 中澤慶久ほか(1990) *日林九支研論* 43: 67-68.
- (4) 木島正夫(1978) *トチュウ科*, (朝日百科 世界の植物7, 伊藤道人編, 3416pp, 朝日新聞社), 1876.
- (5) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- (6) Otani, M. *et al.* (1998) *Plant Biotech.*, 15(1): 11-16.
- (7) 荒木崇(1996) *減圧浸潤法による形質転換*, (モデル植物の実験プロトコールイネ・シロイヌナズナ編, 島本功・岡田清孝編, 秀潤社): 109-113.

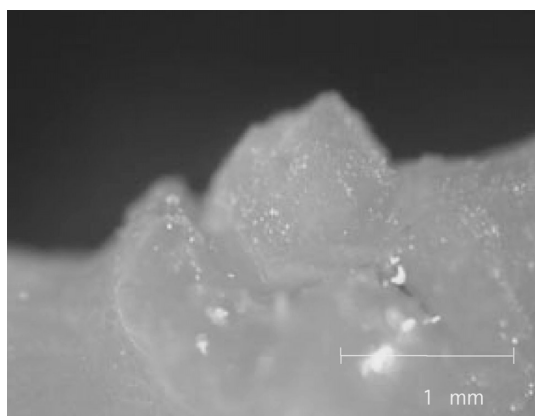


図-1. White light を照射した根

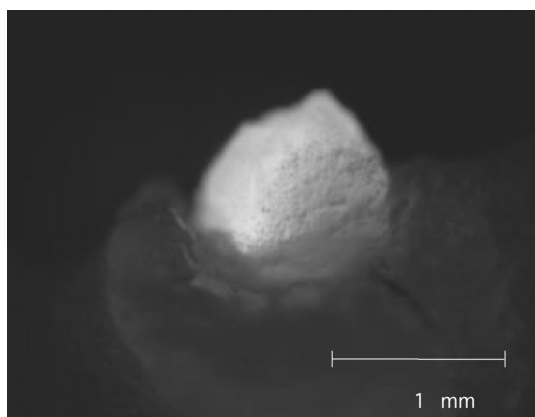


図-2. Blue light を照射した根

(2002年12月13日 受理)