

アイスプラント由来 RNA binding protein による環境ストレス耐性ジャガイモの開発

新田 佳奈美（筑波大学 生物学類）

指導教員：菊池 彰（筑波大学 生命環境系）

【導入】

塩害などの環境ストレスによって農作物はダメージを受け、その収量が低下する。食料と飼料の40%を生産している灌漑農地の50%が塩によるダメージを受けており^{*1}、世界人口の増加によって起こる食料問題解決にあたって重大な課題であると考えられる。

ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) は世界4大作物にも数えられる主要な作物であるが、他の作物より根の分布が浅く、地下に可食部である塊茎が出来るという特徴から、土壌の環境条件の影響を受けやすい。そこで、塩ストレス耐性を持つジャガイモの作出に需要があると考えられる。

本研究では、塩生植物であるアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) から単離された RNA binding protein 遺伝子を、ジャガイモに導入し、環境ストレス耐性を向上させることを目的としている。

【材料】

ジャガイモ: *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree

古くから研究材料として使用され、耐塩性が比較的高いオランダ由来の品種である^{*2}。Murashige and Skoog (MS) 固形培地上で継代培養 (25℃、16 時間明期、8 時間暗期) し、維持している。導入遺伝子: RNA binding protein (*McRBP*)

東京農工大学山田研究室において大腸菌の耐塩性スクリーニングにより単離されたアイスプラント由来の遺伝子である。RNA シャペロンとしての機能が考えられており、RNA の転写を安定させ、塩耐性を付与すると考えられている^{*3}。

<1> アグロバクテリウム法による遺伝子導入

【方法】

1. ジャガイモの葉切片に *McRBP* を保有するアグロバクテリウム LBA4404 株を感染させ、植物ホルモンを加えた MS 固形培地でカルス誘導、再分化誘導を行った。
2. 得られた再分化体は選抜マーカーであるカナマイシンで選抜を行った。
3. 植物ホルモンを加えていない培地に再分化体を移植し、発根した個体について、アグロバクテリウムの除去確認試験を行った。
4. 除去確認した再分化体から簡易抽出した DNA を用いて PCR を行い、形質転換体であるかの確認を行った。

【結果・考察】

ジャガイモの葉切片へアグロバクテリウムを感染させ、複数の再分化体を得た。アグロバクテリウム除去確認後の再分化体 DNA において、PCR を行ったが *McRBP* のバンドは確認されなかった。再分化体のうち、発根が良い個体について検証を行うとカナマイシン耐性遺伝子のみが導入されていた。現在までに得られた再分化体は形質転換体ではないエスケープまたは、カナマイシン耐性遺伝子のみ導入されたものであった。そのため、再分化に悪

影響を与えず、かつ形質転換体と非形質転換体の区別がより容易になるカナマイシン濃度の検討をカナマイシン耐性系統の葉切片を用いて行っている。

<2> コンストラクトの作成と遺伝子導入

カナマイシン選抜では再分化体を得られてもエスケープが多いことから、エスケープ出現の可能性が低いグルホシネートを有効成分とする除草剤 Basta を選抜マーカーとする新しいコンストラクトを用いることとした。これに合わせ、アグロバクテリウムの菌株を LBA4404 株から同じナス科のトマト (*Solanum lycopersicum*) で形質転換効率が高い AGL1 株に変更した。

【方法】

1. 全身長発現性の pGWB602、GFP 融合型全身長発現性の pGWB605 にそれぞれ *McRBP* を導入し、シークエンス解析によって遺伝子の導入を確認した。
2. エレクトロポレーションによりベクターをアグロバクテリウムに導入し、コロニーPCR によってコンストラクトを保有するアグロバクテリウムを得た。
3. ジャガイモの葉切片に得られたアグロバクテリウム AGL1 株を感染させ、植物ホルモンを加えた MS 固形培地でカルス誘導、再分化誘導を行った。
4. 得られた再分化体は選抜マーカーである Basta で選抜を行った。

【結果・考察】

Basta を選抜マーカーとするコンストラクトの作成に成功した。このコンストラクトを保有するアグロバクテリウム AGL1 株を用いてジャガイモの葉切片に感染させたところ、再分化体を得られている。現在、Basta を培地に加えて選抜を進め、耐性系統の取得を進めている。今後、アグロバクテリウムの除去が完了した段階で、導入遺伝子の存在を確認し、形質転換体か否かの判定を行う予定である。

【展望】

今後も感染を継続し、形質転換体の取得を目指す。形質転換体を得られた際には、*in vitro* での耐塩性評価を行い、選抜系統を得る。選抜系統については実際の生育環境により近い環境の栽培室や特定網室において耐塩性評価を行いたい。また、発現量評価や、GFP 融合 *McRBP* の局在評価、ストレス環境下での生理的評価を行い、機能の一端を明らかにしたい。

【参考文献】

1. Breeding Science 65: 85-102 (2015)
2. ジャガイモ事典：財団法人いも振興会(2012)
3. Plant Biotechnology Journal 17: 801-811 (2019)