

カーネーションへのザルコトキシン遺伝子の導入

吉村幸江*・大石一史**・成田玲子***・大矢俊夫****

摘要：カーネーションの重要病害である萎ちょう細菌病の抵抗性品種を作出するため、抗菌性ペプチドを産生するザルコトキシン遺伝子をアグロバクテリウム法を用いて導入した。導入効率は0.2%であり、形質転換体の形態と花粉稔性は正常であった。形質転換体36個体のうち2個体が簡易検定法（「*in vitro* 挿し穂接種法」）で萎ちょう細菌病に抵抗性を示した。このうち、1個体は導入遺伝子の活性を促すサリチル酸処理により従来法（「浸根接種法」）でも発病が抑制された。

キーワード：カーネーション、ザルコトキシン、遺伝子導入、萎ちょう細菌病

Production of Transgenic Carnation Introduced Sarcotoxin Gene

YOSHIMURA Yukie, OHISHI Kazushi, NARITA Reiko and OHYA Toshio

Abstract: Bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*) is one of the most serious diseases of carnations (*Dianthus caryophyllus*) in Japan. The sarcotoxin gene which produced sarcotoxin IA, an insect bactericidal peptide was introduced into carnation *via Agrobacterium*-mediated gene transfer. Transformation efficiency was 0.2%, and the form and the pollen fertility of the transgenic carnations were normal. Two of 36 lines of the transgenic carnations showed the resistance against infection with *Burkholderia caryophylli* by *in vitro* simple method. And one of these exhibited moderate resistance with using the cut-root soaking method by salicylic acid treatment for promote activity of the introduced gene.

Key Words: Carnation, Sarcotoxin, Transformation, Bacterial wilt disease

*環境基盤研究部 **環境基盤研究部（現園芸研究部） ***環境基盤研究部（現東京都）

****環境基盤研究部（現作物研究部）

(2007.9.10 受理)

緒言

カーネーション (*Dianthus caryophyllus* L.) は本県において、産出額が全国第2位の主要な品目である。カーネーション萎ちょう細菌病は夏の高温期に多発する立ち枯れ性の土壌伝染病害であり、日本でのカーネーション栽培上最も重要な病害の一つとされている。

現在栽培されているカーネーション品種のほとんどは萎ちょう細菌病に対して罹病性である¹⁾上に、効果的な防除法がないため、抵抗性品種の作出が強く望まれている。*Dianthus*属野生種の中に萎ちょう細菌病抵抗性が高い種が見いだされ、この野生種との種間交雑により抵抗性カーネーションの作出が試みられているが、野生種の性質が強く、営利品種としてはさらに育成選抜する必要がある²⁾。

そこで、本研究では、交雑育種のように長期間を必要とせず、短期間に有用形質のみを付与できる遺伝子導入法を利用した。遺伝子導入にはセンチニクバエから単離され、細菌病に強い抵抗性を示す、ザルコトキシン (sarcotoxinIA) 遺伝子を用い、カーネーションへの病害抵抗性付与を試みた。そして、得られた形質転換体について、遺伝子発現及び萎ちょう細菌病に対する抵抗性を調査したので報告する。

材料及び方法

1 供試系統と導入遺伝子

遺伝子導入には本場所有のカーネーションのうち、不定芽形成能の高い³⁾、No.156(「99-SP-450-5」)を用いた。温室で栽培した株から未展開葉を除き上位4対の葉を採取し、表面殺菌後基部側5mmを多芽体形成培地(MS、3%Sucrose、TDZ0.5mg/l、NAA0.2mg/l、pH5.8)に置床し、多芽体を作出した。得られた多芽体の基部側5mm(以降、多芽体葉基部)を外殖体とした。

ザルコトキシン遺伝子の導入にはMi tsuharaら⁴⁾がCaMV 35プロモーター、tobacco PR1aプロモーター及びザルコトキシンIA cDNAをつないで構築したベクター(PSS)及びpIG121-Hmを導入ベクターとして用いた。アグロバクテリウムは*Agrobacterium tumefaciens* EHA105を用いた。

2 培養及び遺伝子導入方法

遺伝子導入はアグロバクテリウム法で行った。外殖体に用いた多芽体葉基部はバイナリーベクターを含むアグロバクテリウム懸濁液(MS液体培地でOD₆₀₀0.1に希釈)に30分間浸漬後、ろ紙上で余分な接種液を除き、共存培地(MS、3%Sucrose、0.5mg/lTDZ、0.2mg/lカザミノ酸、100µMアセトシリゴン、pH5.8)に7日間置床(25℃、5000lux、16時間照明)した。その後除菌培地(MS、3%

Sucrose、0.2mg/lNAA、0.5mg/lTDZ、20mg/lジェネティシン、150mg/lセフトキシム、pH5.8)で外殖体表面のアグロバクテリウムを除菌し、選抜培地(MS、3%Sucrose、20mg/lジェネティシン、pH5.8)に置床して2~3週間毎に培地を交換しながら、培養(25℃、5000lux、16時間照明)を継続した。

選抜培地上で1cm以上根が伸長した再分化個体については、馴化後市販の園芸用培土を用いて3号鉢に移植し、閉鎖系温室(23~28℃)で育成した。

3 遺伝子導入の確認

選抜培地に移植後、1cm以上根が伸長した再分化個体からDNeasy PLANT Mini kit (Qiagen)でDNAを抽出し、PSSベクターのシグナルペプチドとザルコトキシン遺伝子を含む領域を増幅するように設計したプライマー(センスプライマー5'-GGGATTTGTTCTCTTTTACACA-3'、アンチセンスプライマー5'-GTGCTGTAGCAGCAACAT-3')を用いて定法によりPCRを行い、アガロースゲル電気泳動で導入遺伝子の有無を確認した。

mRNAの転写は生葉からRNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いて全RNAを抽出し、RevertraDash (TOYOBO)により、RT-PCR法(プライマーはPCR法と同様)で調査した。

さらに、CTAB法でDNA(20µg)を抽出し、*EcoRV*で消化した後、ザルコトキシン遺伝子をプローブとしてDIG non-radioactive nucleic acid labeling and detection system (Roshe)を用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、導入遺伝子の同定を行った。

4 萎ちょう細菌病抵抗性の検定

病害抵抗性の検定は2005年1月、2006年6、8、9月及び2007年1月に行った。

萎ちょう細菌病菌はisolate 4¹⁾を用い、2×YT培地(1.6%トリプトン、1%酵母エキス、0.5%NaCl)で振とう培養(28℃、3日間)した後、OD₆₀₀1.0(2.7×10⁸cfu/ml)に調整したものを接種原液とした。

萎ちょう細菌病菌の接種は簡易検定法(「*in vitro*挿し穂接種法」⁵⁾)と従来法(「浸根接種法」¹⁾)で行った。

「*in vitro*挿し穂接種法」は閉鎖系温室で育成した形質転換体の約15cmの穂を供試した。穂の切り口から1cmまでの部分を萎ちょう細菌病懸濁液(1.0×10⁶cfu/ml)に1分間浸漬し、余分な菌液を拭き取った後、滅菌水を入れた直径2.1cmのガラス管瓶に挿し、30℃、6,000lux、16時間照明のインキュベータで培養し、発病を調査した。

「浸根接種法」は挿し穂をパーミキュライトに挿し、発根した穂を供試した。発根した穂の根を約2cm切りとり、萎ちょう細菌病懸濁液(5×10⁶cfu/ml)に1時間浸漬した後、滅菌した培養土に移植し、閉鎖系温室(28~30℃)又は30℃、6,000lux、16時間照明のインキュベータで培養し、発病を調査した。

表1 遺伝子導入結果

接種切片数 (A)	再分化個体数	PCR陽性個体数 (B)	遺伝子導入率(%) (C)
17,134	38	36	0.2

注) (C)=(B)/(A)×100

また、耐病性検定時にはPSSの上流に位置する、PR1aプロモーターを活性化させるため、萎ちょう細菌病接種2日前に5mMのサリチル酸水溶液を茎葉散布する区を設定した。

5 形質転換体の形態及び花粉稔性

閉鎖系温室で育成した形質転換体について、外側花弁が180°に展開した日を開花日とし、形態と花粉稔性を調査した。花粉稔性は開花日に採取した花粉をスライドガラス上の寒天培地(シヨ糖20%、ホウ酸0.5mM、寒天0.6%)に置床し、25℃で24時間静置した後、1%酢酸カーミン溶液による染色の有無及び花粉発芽を調査した。

試験結果

1 遺伝子導入

ザルコトキシン遺伝子を16,804切片の外殖体に導入したところ、38切片が不定芽を形成し、選抜培地で1cm以上の発根が認められた。このうち、PCR法により、ザルコトキシン遺伝子断片の増幅が認められた個体は36であり、遺伝子導入効率は0.2%であった(表1)。

PCR法で遺伝子導入を確認した個体を馴化し、閉鎖系温室で栽培した形質転換体は順調に生育し、花芽を形成した。形質転換体の草姿、花姿は共に非形質転換体と変わらず、正常であった(図1)。また、開花した花から花粉を採取し、その稔性を調査したところ、供試した全ての花粉で1%酢酸カーミン溶液による染色が認められ、開花4日後までは花粉発芽が認められた。

RT-PCR法でmRNA合成の確認を行ったところ、供試した全ての個体でmRNAの合成が認められた(図2)。このうち、8系統でサザンブロット解析を行い、形質転換体力

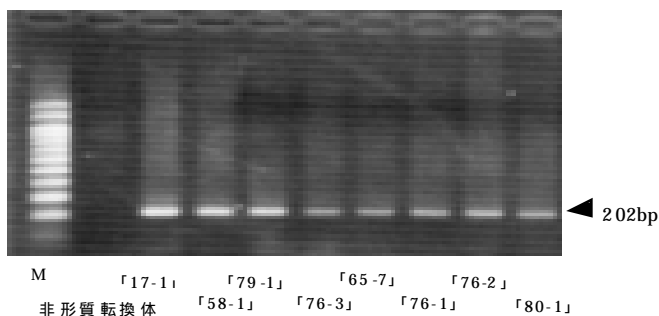


図2 RT-PCR法によるザルコトキシン遺伝子の検出



図1 形質転換カーネーションの花姿
左から非形質転換体(上)、同左(横)、「76-1」(上)、同左(横)

カーネーションのゲノム上に1~4コピーのザルコトキシン遺伝子が存在することを確認した(図3)。

2 耐病性検定

形質転換体の耐病性は閉鎖系温室で育成した全個体について、サリチル酸を処理し「*in vitro*挿し穂接種法」を用いて調査した。そして、中程度の抵抗性を示した2系統及び強い抵抗性を示した4系統を選抜した。このうち、強い抵抗性を示した4系統について、「*in vitro*挿し穂接種法」に加えて「浸根接種法」で耐病性を調査した。各系統の発病割合はどちらの検定法でも同様の傾向を示し、「76-1」で最も強い抵抗性が認められた。また、「65-7」「80-1」では抵抗性は認められなかった。

「*in vitro*挿し穂接種法」では、「76-1」「76-2」の発病割合が対照の非形質転換体と比べ低く抑えられた。特にサリチル酸処理区では、接種14日後で非形質転換体の約半数が発病したのに対し、「76-1」「76-2」は発病が20%以下に抑えられた(表2)。また、サリチル酸処理区は無処理区に比べ、発病が抑えられる傾向にあった。

「浸根接種法」でも、サリチル酸処理により全系統で発病が抑えられた。中でも、「76-1」は「*in vitro*挿し穂接種法」と同様に最も発病が抑えられ、接種後40日までは発病が認められなかった。接種後50日で発病がみられたものの、罹病株の進行具合はかなり遅く、接種後60日を経過しても葉の一部が萎ちょうするにとどまった。一方、サリチル酸を処理しない場合、形質転換体では明らかな抵抗性は示されず、非形質転換体よりやや低いか、むしろ高い割合で発病が認められる系統があった。野生種で萎ちょう細菌病に抵抗性を示すヘンテリー(*Daianths henteri*)は「*in vitro*挿し穂接種法」で接種14日後に約3割、「浸根接種法」で接種後50日後に

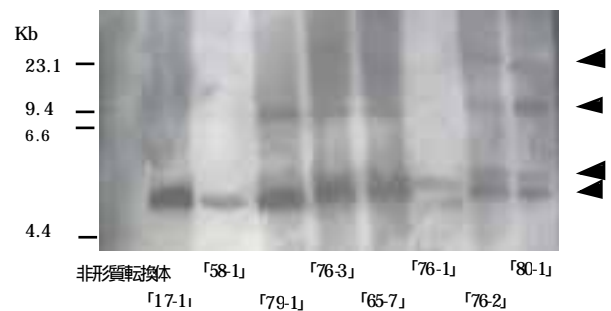


図3 サザンブロットによるザルコトキシン遺伝子の検出

約2割が発病したものの、供試系統で最も低い値を示した(表3)。

表2 「*in vitro*挿し穂接種法」での発病割合(%)

供試系統	接種後日数			
	サリチル酸無処理		サリチル酸処理	
	7日	14日	7日	14日
非形質転換体(n=16)	53	75	27	47
形質転換体				
「65-7」(n= 8)	63	88	29	43
「76-1」(n=12)	33	42	0	15
「76-2」(n=11)	55	55	9	18
「80-1」(n= 9)	67	89	38	
ヘンテリー(n=3)		33	-	-

注) n : 供試個体数

考 察

ザルコトキシン(sarcotoxin)IAはセンチニクバエが産生する抗菌性ペプチドで、グラム陰性細菌に対して非常に高い抗菌性を示す⁶⁾ことが確認されている。また、この遺伝子を導入したタバコでは、軟腐病や野火病といった細菌病に対する抵抗性が示されている⁴⁾ため、カーネーションへの遺伝子導入で、萎ちょう細菌病に対する抵抗性を付与することが期待できる。

遺伝子導入で新形質を付与するためには、効率よく宿主に遺伝子を導入し、それが宿主内で働かなければならない。本研究では始めにGUS遺伝子を用い、アグロバクテリウム法でカーネーション「99-SP-450-5」の多芽体葉基部への遺伝子導入条件を検討した上でザルコトキシン遺伝子を導入した。そして、0.2%の導入効率で36個体の形質転換体を作成した。さらに、得られた形質転換体では、ゲノム上に導入遺伝子が存在し、発現を確認することができた。本研究のように種を超えた遺伝子の導入は遺伝子導入技術でのみ得られるものであり、その発現を認められたことは導入可能な遺伝子の幅がさら

に深まる結果となった。

ザルコトキシン遺伝子の導入を確認した後、目的形質である、萎ちょう細菌病に対する抵抗性を調査した。本病に対する抵抗性は従来、「浸根接種法」で判断しているが、結果を得るまでに約3ヶ月間を要する。また、病原菌を接種した穂を30日に保って栽培するため、検定場所及び供試数が制約される。大石らが開発した「*in vitro*挿し穂接種法」は約2週間で抵抗性の有無が判断できる上に多くの検体を調査でき、効率的な抵抗性検定が可能である。そこで、馴化し閉鎖系温室で育成した全形質転換体の病害抵抗性検定には、「*in vitro*挿し穂接種法」を用い、抵抗性系統の選抜を行った。そして、選抜された4系統について、従来法である「浸根接種法」を併用して再度検定を行った。

両法とも、どの系統でもサリチル酸処理で発病が著しく抑えられた。サリチル酸は植物の病害抵抗性に関わる重要なシグナル物質であることが知られている⁷⁾。サリチル酸処理により非形質転換体でも発病が抑えられる傾向にあったのは、カーネーション体内で何らかの病害抵抗性機能が働いたためと考えられる。また、導入したPSSベクターは上流に誘導性の高発現プロモーターである、タバコPR1aタンパク質遺伝子のプロモーター⁸⁾を有している。このプロモーターは病原体感染に伴う壊死斑形成またはサリチル酸で強く誘導されることが分かっている⁴⁾。サリチル酸処理により、「*in vitro*挿し穂接種法」で「76-1」「76-2」が強い抵抗性を示し、「浸根接種法」で「76-1」の発病が抑制されたのはPR1aプロモーターの特異的な発現による可能性が考えられる。しかし、サリチル酸を処理しない場合ではPR1aプロモーターの誘導が不十分であり、どの形質転換体も抵抗性を示す野生種のヘンテリーには及ばなかった。本研究で用いたザルコトキシン遺伝子と同じ遺伝子を導入したタバコは細菌病に対して強い抵抗性を示している。これはPSSベクターの有するタバコ由来のPR1aプロモーターの感染特異的発現とCaMV 35Sプロモーターのエンハンサー様発現の相互作用によるものと示唆されている⁹⁾。本研究の形質転換体が安定した抵抗性を示さなかったのはこの相互作用が

表3 「浸根接種法」での発病割合(%)

供試系統	接種後日数											
	サリチル酸無処理						サリチル酸処理					
	10日	20日	30日	40日	50日	60日	10日	20日	30日	40日	50日	60日
非形質転換体(n=12)	0	25	33	42	43	50	0	0	14	29	29	29
形質転換体												
「65-7」(n= 6)	0	0	50	50	50	83	0	0	14	14	14	14
「76-1」(n=14)	0	14	36	36	36	36	0	0	0	0	17	17
「76-2」(n=17)	0	0	29	35	41	41	0	11	14	29	29	29
「80-1」(n= 6)	0	0	0	50	50	50	0	0	0	0	40	50
ヘンテリー(n=9)	0	0	0	0	22	22	-	-	-	-	-	-

注) n : 供試個体数

うまく機能しなかったためと考えられる。

また、鱗翅目昆虫由来の抗菌性ペプチド・セクロピンを植物に導入した例で、転写産物は確認されたものの、抗菌性ペプチドの生成は認められなかったという報告がある^{10,11)}。本研究ではウエスタンブロッティング法でペプチド生成の確認をしていないため、形質転換体内でのザルコトキシン生成の有無が定かではない。しかし、形質転換体のゲノム上にザルコトキシン遺伝子が存在し、導入遺伝子からmRNAが転写されていることが確認されたことから、作られたペプチドが分解されている可能性が考えられる。「*in vitro*挿し穂接種法」及び「浸根接種法」の接種後40日までは抵抗性を示す形質転換体があったことから、接種後一時的にザルコトキシンが生成し発病が抑えられたものの、日数の経過に従って生成したザルコトキシンが分解され、病害抵抗性を保てなかったとも考えられる。

現在、萎ちょう細菌病抵抗性カーネーション育成のため、野生種との交雑育種が進められ、強度の抵抗性をもった中間母本が作出されている²⁾。しかし、交雑育種系統はカーネーションとはほど遠く、営利品種としては不十分である。

遺伝子組換え技術の大きなメリットは導入する遺伝子の起源に制約されないことである。本研究では、昆虫から単離された遺伝子を種の全く異なるカーネーションに導入し、形質転換体を得ることに成功した。しかも、それらの形態は正常であり、稔性も正常であった。野生種との交雑を長期間繰り返しても十分な草姿が得られない交雑育種と比べ、宿主の性質には影響を与えずに、目的遺伝子のみを導入できる遺伝子組み換え技術は大変有効であると思われる。しかし、今回の目的形質である、萎ちょう細菌病抵抗性は野生種ヘンテリーには及ばなかった。病害抵抗性品種育成には明らかに強い抵抗性が必要であるため、本研究で作出した形質転換体は育成母本としては、あと一歩と思われる。

遺伝子導入技術で最も重要な点はいかに導入遺伝子、目的形質を発現させるか、である。遺伝子導入に成功しても、それがうまく発現し、必ずしも満足できる形質転換体を得ることはできない。本研究で得られた形質転換体も実用的にはもう少し工夫が必要である。今回目指した病害抵抗性は環境要因に大きく左右される。環境要因に左右されずに抵抗性を付与するためには、強く、安定した遺伝子発現が必要となる。そのために、本研究で導入したプロモーターをカーネーションで効率よく働くものに改変したり、ザルコトキシン遺伝子に加え、複数の抗菌性ペプチドを導入して相乗・相加的な効果を狙うことが次の手段として考えられる。

今後、本研究で得られた知見をもとにさらに工夫を重ねることにより、遺伝子組み換えでの病害抵抗性カーネーション作出が実現できると期待する。

謝辞:本研究を実施するにあたり、独立行政法人農業生物資源研究所光原一郎氏並びに大橋祐子氏からPSSを、同市川裕章氏からEHA105を分譲いただいた。また、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構花き研究所小野崎隆氏より萎ちょう細菌病菌を分譲頂いた。ここに記して謝意を表する。

引用文献

1. Onozaki, T., T. Yamaguchi, M. Himeno and H. Ikeda. Evaluation of 277 carnation cultivars for resistance to bacterial wilt. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68(3), 546-550(1999)
2. 小野崎隆, 池田広, 山口隆, 姫野正巳, 天野正之, 柴田道夫. 萎凋細菌病抵抗性中間母本 カーネーション農1号の育成とその特性. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 1(1), 13-16(2002)
3. 成田玲子, 真子伸生, 加藤泰之. カーネーションの高再分化系統の選抜と培養条件(2003)愛知農総試研報35, 149-154(2003)
4. Mitsuhashi, I., H. Matsufuru, M. Ohshima, H. Kaku, Y. Nakajima, N. Murai, S. Natori, Y. Ohashi. Induced expression of sarcotoxin IA enhanced host resistance against both bacterial and fungal pathogens in transgenic tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 13, 860-868(2000)
5. 大石一史, 小川ちひろ, 神戸三智雄. カーネーション萎凋細菌病に対する抵抗性の簡易検定法. 関西病虫研報(47), 71-73(2005)短報
6. Okada, M. and S. Natori. Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (fleshfly) larvae. *J. Biol. Chem.* 260, 7174-7177(1985)
7. 大橋祐子. 分子レベルからみた植物の耐病性. 秀潤社. 東京. p.131-140(1997)
8. Ohshima, M., I. Mitsuhashi, M. Okamoto, S. Sawano, K. Nishiyama, H. Kaku, S. Natori and Y. Ohashi. Enhanced resistance to bacterial diseases of transgenic tobacco plants overexpressing Sarcotoxin IA, a bactericidal peptide of insect. *J. Biochem.* 125, 431-435(1999)
9. 光原一郎, 大島正弘, 大橋祐子. 抗菌性ペプチド遺伝子導入植物における細菌病および糸状菌病抵抗性. *化学と生物.* 37(3), 205-209(1999)
10. Jaynes, J.M. P. Nagpala, L. Destefano-Beltran, J.H. Huang, J-H. Kim, T. Denny and S. Cettier. Expression of a Cecropin B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers

enhanced resistance to bacterial wilt caused by
pseudomonas solanacearum. Plant Sci. 89, 43-53
(1993)
11. Mills, D., F.A. Hammerschlag, R.O. Nordeen and

L.D. Owens. Evidence for the breakdown of
cecropin B by proteinases in the untermcellular
fluid of peach leaves. Plant Sci. 104,17-22
(1994)