

# 植物への形質転換効率が向上する スーパーアグロバクテリウム

筑波大学 生命環境系 助教 野中 聡子

2019年7月23日

# 従来技術とその問題点

既に実用化されている形質転換技術として、遺伝子銃やアグロバクテリウムを用いた方法がある。

アグロバクテリウムを介した形質転換法

形質転換時植物よりエチレン、GABAが発生

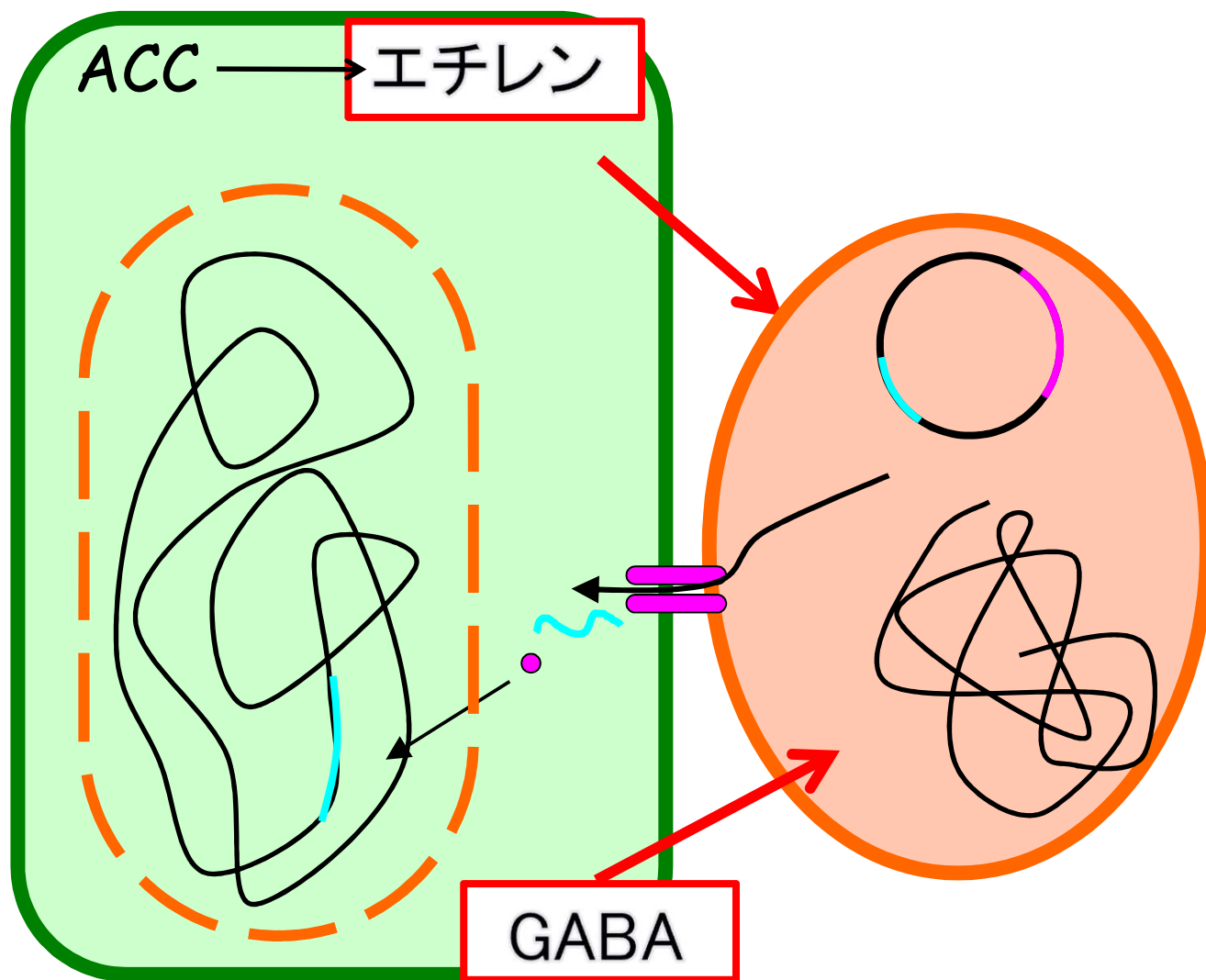
これらの上昇により遺伝子導入効率が低下

広い植物種への利用が阻まれている。

# 新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、様々な植物種への形質転換効率を向上することに成功した。
- 従来は、モデル植物への形質転換の使用に限られていたが、植物の形質転換阻害物質を抑制する能力をアグロアクテリウムへ付与することにより様々な植物種での形質転換効率が可能となった。
- 本技術の適用により、トマトへの形質転換が2-3倍上昇、形質転換にかかるコストが50%から75%程度まで削減。

# スーパーアグロバクテリウムの概要



Plant cell

ACC分解酵素の付与  
GABA分解酵素の付与



遺伝子導入能力の向上

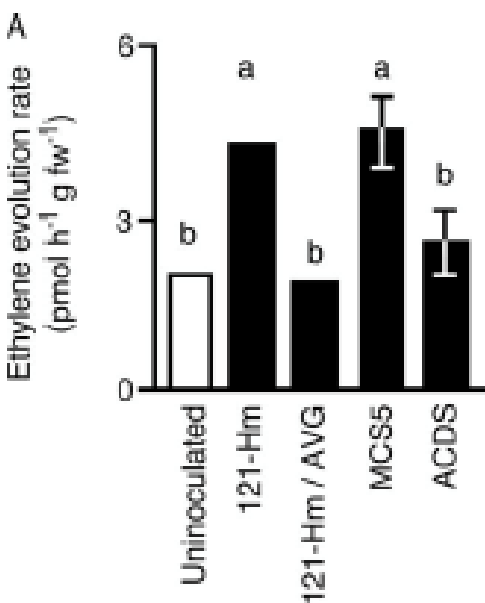


広い植物種への形質転換を可能にする!!

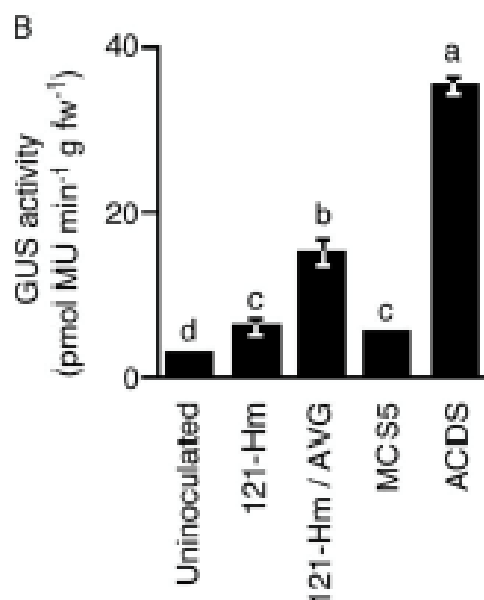
# 最新の成果①

エチレン発生抑制能を付与したアグロバクテリウムは形質転換効率を向上させる。

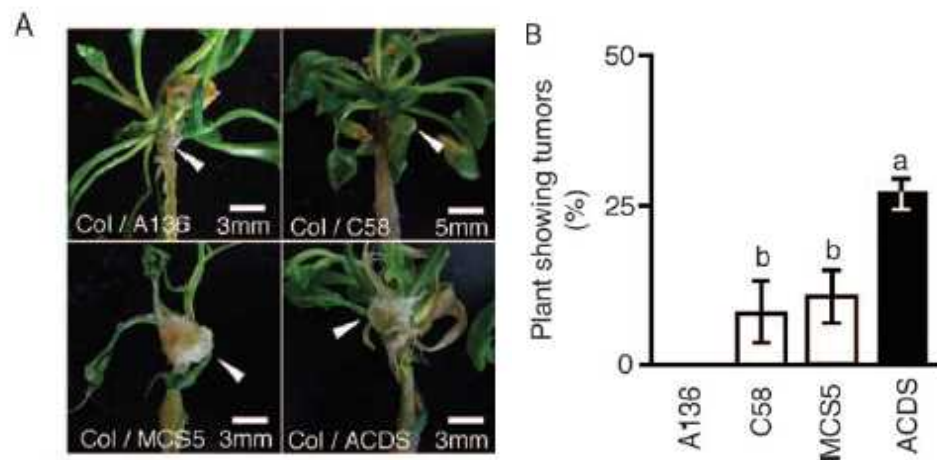
## エチレン発生



## 一過的遺伝子発現



## 安定的な形質転換

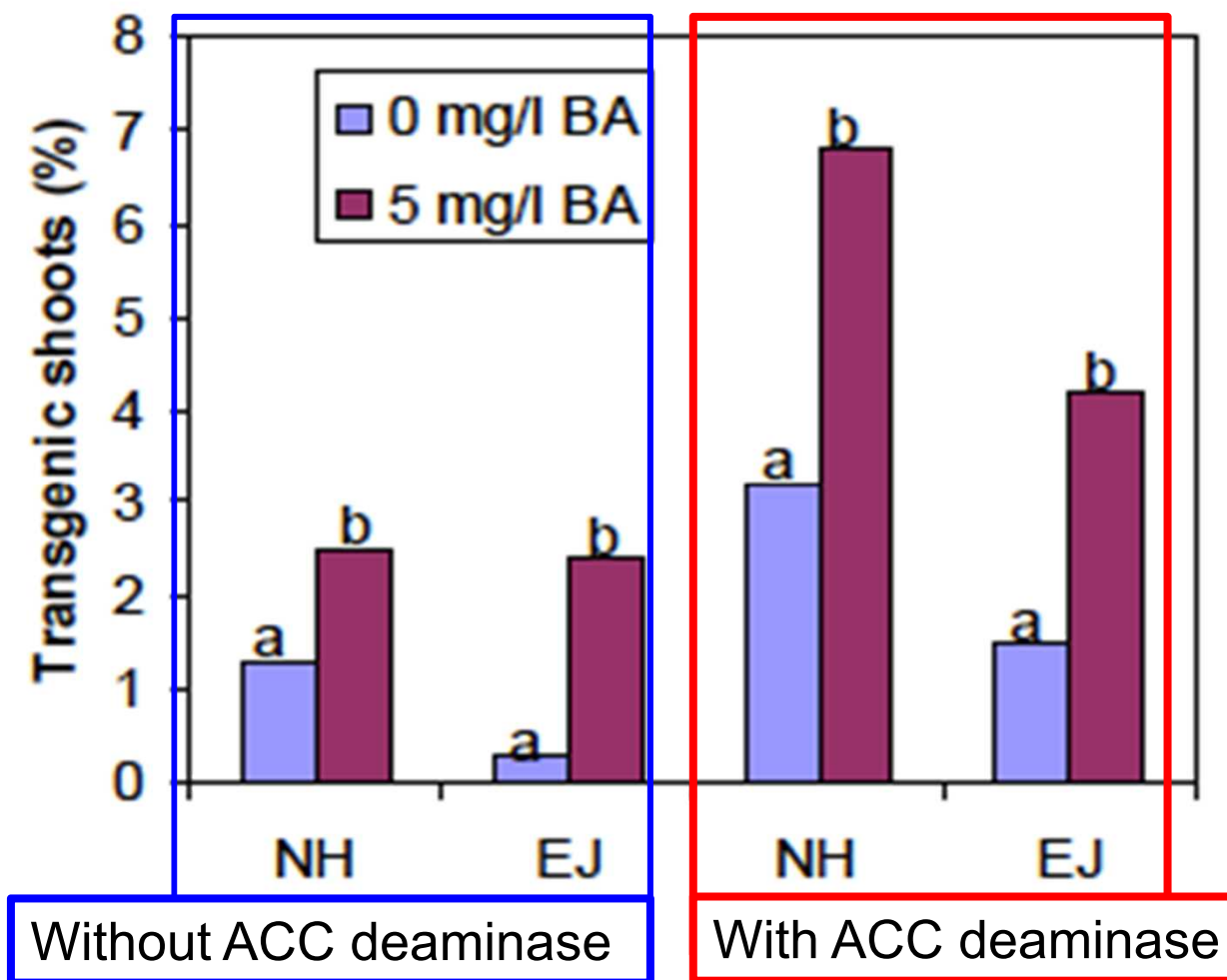


メロン

シロイヌナズナ

## 最新の成果②

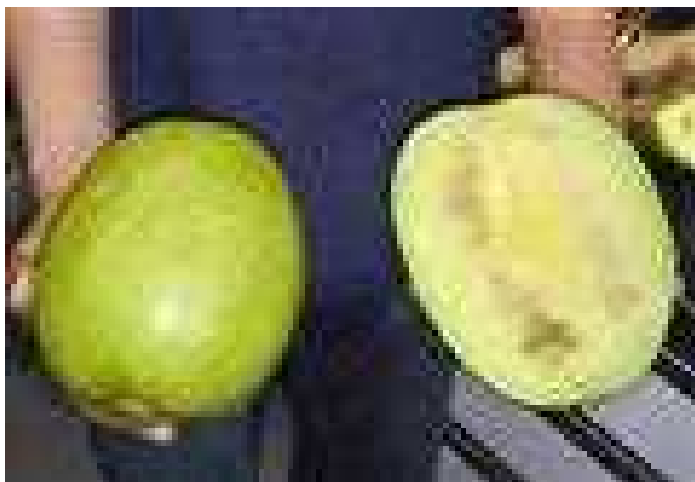
エチレン発生抑制能を付与したアグロバクテリウムは形質転換効率を向上させる。



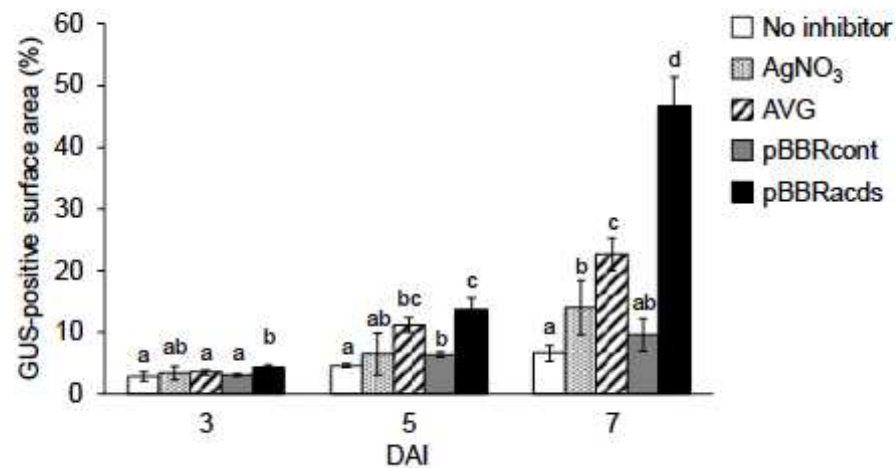
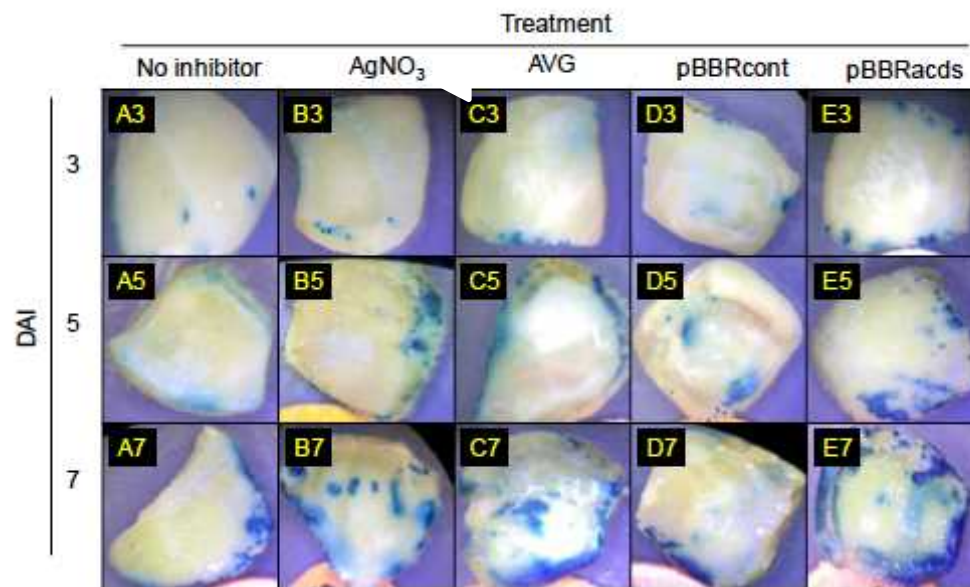
エグシメロン

# 最新の成果③

エチレン発生抑制能を付与したアグロバクテリウムは形質転換効率を向上させる。



アフリカの野生スイカ

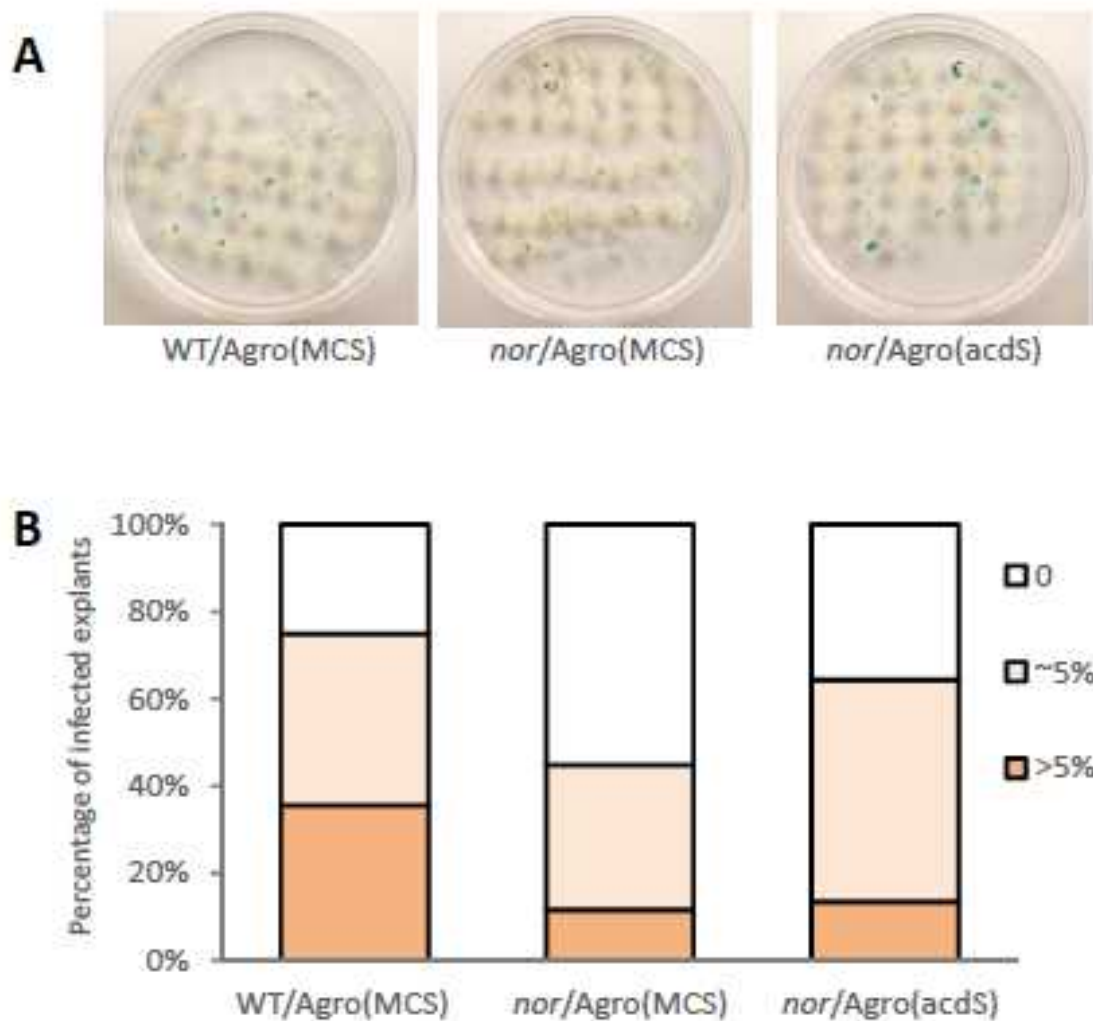


# 最新の成果④

エチレン発生抑制能を付与したアグロバクテリウムは形質転換効率を向上させる。



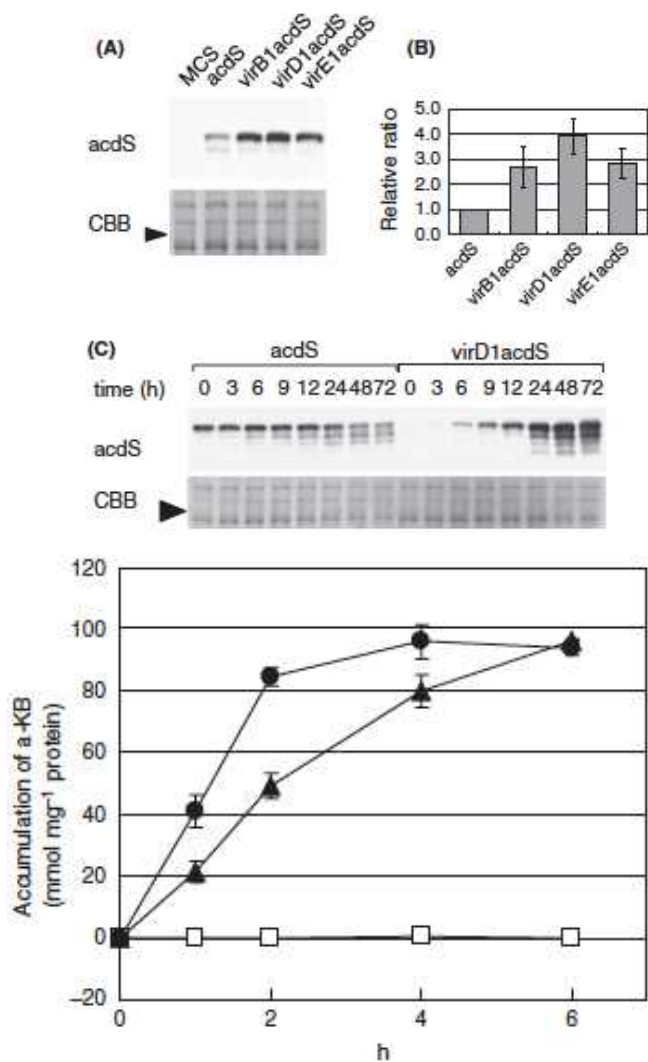
▲  
エチレン過剰変異トマト





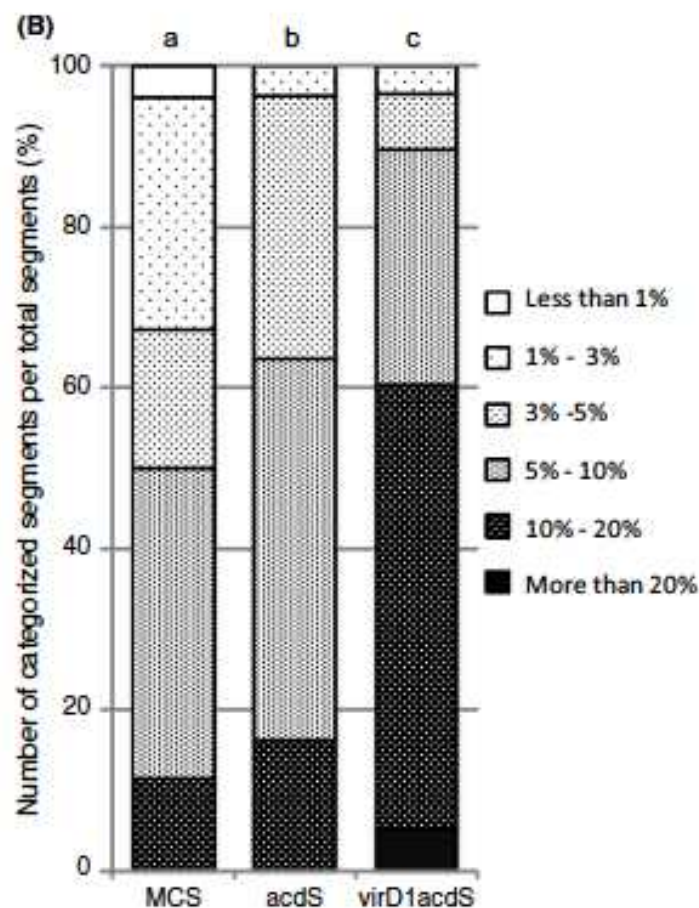
# 最新の成果⑤

プロモーターの改良により遺伝子導入効率はさらに向上した。



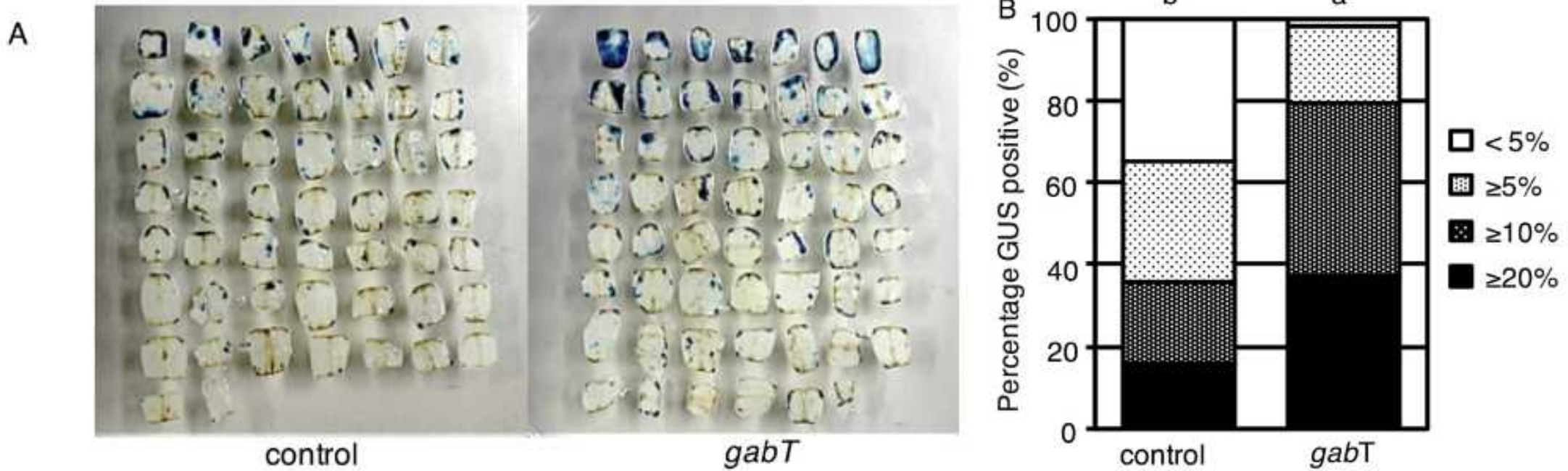
(A) Category of GUS stained explant

Less than 1%  
1% - 3%  
3% - 5%  
5% - 10%  
10% - 20%  
More than 20%



# 最新の成果⑥

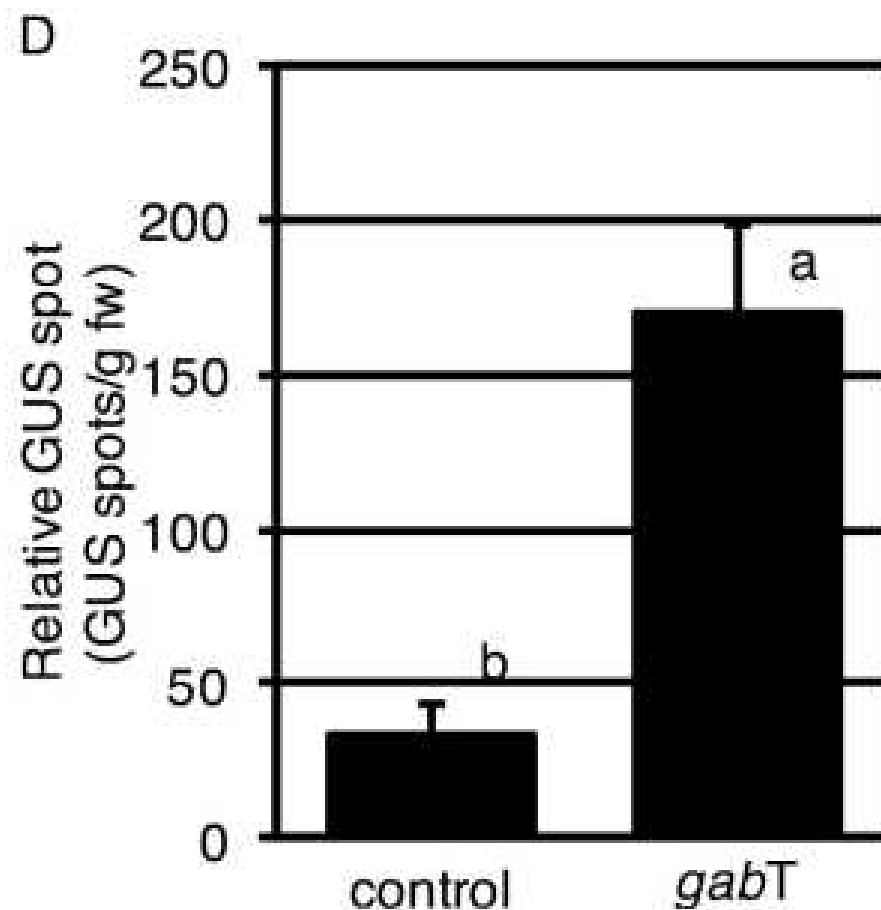
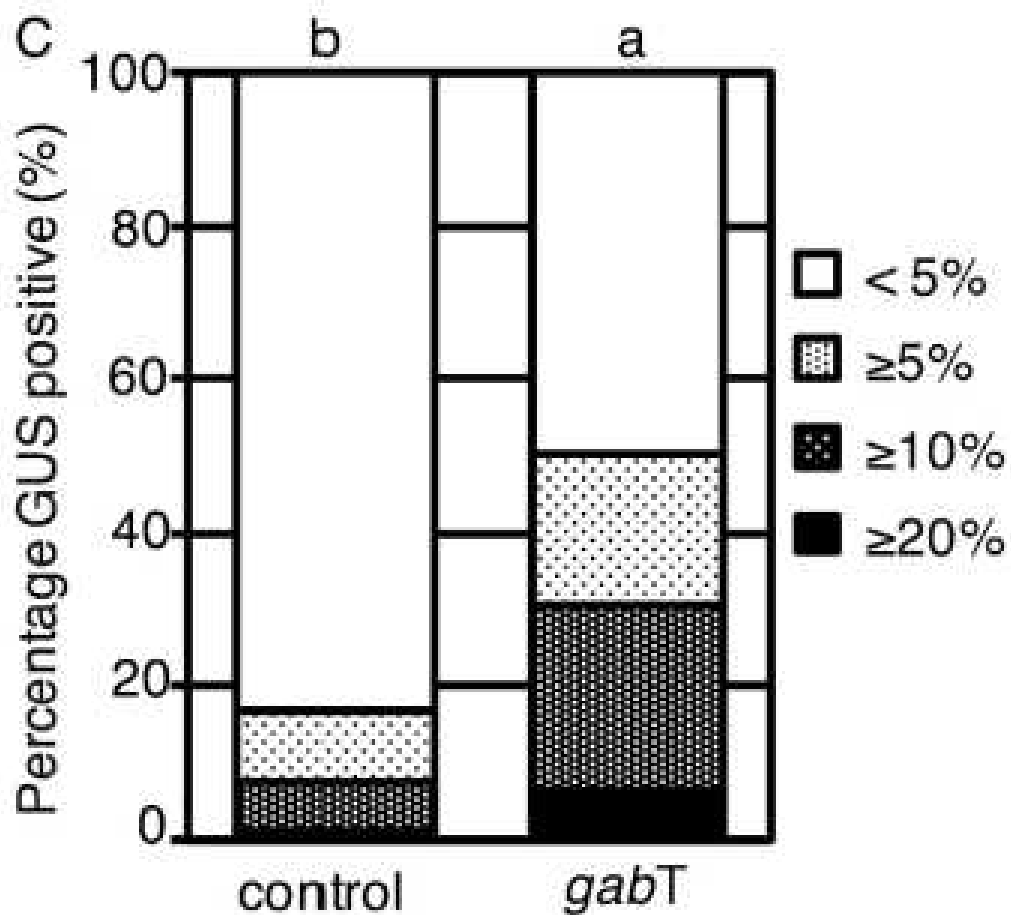
GABA発生抑制能を付与したアグロバクテリウムは形質転換効率を向上させる。



トマト cv. Micro-Tom

# 最新の成果⑦

GABA発生抑制能を付与したアグロバクテリウムは形質転換効率を向上させる。



トマト cv. Moneymaker

エリアンサス

# 最新の成果⑧

## GABA発生抑制能を付与したアグロバクテリウムは形質転換効率を向上させる。(アグロインフィルトレーション)

Plant Cell Reports (2019) 38:75–84  
https://doi.org/10.1007/s00299-018-2350-1

ORIGINAL ARTICLE



### Efficient transient protein expression in tomato cultivars and wild species using agroinfiltration-mediated high expression system

Ken Hoshikawa<sup>1,3</sup> · Satoshi Fujita<sup>1</sup> · Na Renhu<sup>1</sup> · Kentaro Ezura<sup>1</sup> · Tsuyoshi Yamamoto<sup>1</sup> · Satoko Nonaka<sup>1,2</sup> · Hiroshi Ezura<sup>1,2</sup> · Kenji Miura<sup>1,2</sup>

Received: 19 September 2018 / Accepted: 7 October 2018 / Published online: 17 October 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

#### Abstract

**Key message** The new transient protein expression system using the pBYR2HS vector is applicable to several tomato cultivars and wild species with high level of protein expression.

**Abstract** Innovation and improvement of effective tools for transient protein expression in plant cells is critical for the development of plant biotechnology. We have created the new transient protein expression system using the pBYR2HS vector that led to about 4 mg/g fresh weight of protein expression in *Nicotiana benthamiana*. In this study, we validated the adaptability of this transient protein expression system by agroinfiltration to leaves and fruits of several tomato cultivars and wild species. Although the GFP protein was transiently expressed in the leaves and fruits of all tomato cultivars and wild species, we observed species-specific differences in protein expression. In particular, GFP protein expression was higher in the leaves and fruits of Micro-Tom, *Solanum pimpinellifolium* (0043) and *S. pimpinellifolium* (0049-w1) than in those of cultivars and wild species. Furthermore, *Agrobacterium* with GABA transaminase enhanced transient expression in tomato fruits of Micro-Tom. Taken together with these results, our system is applicable to several tomato cultivars and species as well as a model tomato, even though characteristics are often different among tomato cultivars or species. Thus, the system is an effective, simple, and valuable tool to achieve rapid transgene expression to examine gene function in tomato plant cells.



トマト cv. Micro-Tom



# 想定される用途

- 形質転換が難しい**実用作物品種への形質転換**に適用する  
難形質転換植物への効率的な**ゲノム編集技術**への適用が  
期待できる。
- 難形質転換植物へ一過的強発現システムを導入し、**効率的なタンパク質生産**を可能にする。
- **遺伝子機能解析ツール**としてのウィルス誘導ジーンサイレンシングシステムなどを難形質転換植物で利用することが可能である。

# 実用化に向けた課題

- 現在、**トマト、エリアンサス、トルバム、アシュワガンダ**について一過的発現が可能なところまで開発済み。今後、様々な植物種で**一過的遺伝子発現**や**安定的な形質転換**について、実験データを取得し作出したアグロバクテリウムの能力を評価する。

# 企業への期待

- 未解決のより多くの植物種での形質転換効率の評価については、**植物病原菌の感染メカニズム**を応用することにより克服できると考えている。
- **より多くの植物種**を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、**遺伝子組換え作物を開発中の企業、タンパク質高生産分野**への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 植物への高効率遺伝子導入能を付与したアグロバクテリウム菌
- 出願番号 : PCT/JP2014/052844 (2014.2.7)、登録番号 (日本)6300377 (米国)9944936)
- 出願人 : 筑波大学
- 発明者 : 江面 浩、中村 幸治、野中 聡子、染谷龍彦、周 莎



# お問い合わせ先

**筑波大学 国際産学連携本部**

**技術移転マネージャー 徳川 和久**

**TEL 029-859-1669**

**FAX 029-859-1693**

**e-mail [tokugawa.kazuhisa.ga@un.tsukuba.ac.jp](mailto:tokugawa.kazuhisa.ga@un.tsukuba.ac.jp)**