

ミヤコグサ形質転換マニュアル

2000年12月

農業生物資源研究所 生理機能部 窒素固定研究室

モデル植物としてのミヤコグサ(*Lotus japonicus*)は、マメ科植物における数少ないstableな形質転換系を提供するものです。Agrobacteriumを用いた基本的な形質転換法は1992年デンマークAarhus大学のグループによって確立されましたが(Handberg and Stougaard, 1992)、その後、当時この研究室のメンバーであったJiri Stillerらによって改訂されたプロトコルが提案され(Stiller et al., 1997)、またAarhusのグループも改訂された方法を発表しており(Thykjaer et al., 1998)、現在多くの研究室がこれらのプロトコルによって実験を行っています。

以下のミヤコグサ形質転換マニュアルは、Aarhus大学の研究室の最近のプロトコルと、その後のJiri Stillerらによる改訂プロトコルをもとにし、それぞれのグループから入手したいくつかの最近のノウハウを付け加えて、現在私たちの研究室で行っている方法を整理したものです。大筋はJiri Stillerらによる改良法に準拠しています。

ミヤコグサ形質転換はその効率、安定性、必要時間などの点からみて、たとえばアラビドプシスやイネ等に匹敵するほどに容易であるとはいえません。特に再生効率や、方法の安定性(再現性)、再生個体を得るまでの時間等の面で、今後さらに改良が必要だと思えます。また、比較的高頻度に培養変異が起こると思われることから、in-planta法の確立を含めて今後検討が行われるべきでしょう。

In vitroの培養を含む形質転換法は、材料となる植物の培養条件や、グロースキャビネットその他の様々な条件のわずかな違いによって微調整が必要で、それぞれの研究室で実際の条件に応じた最適化の工夫が必要だと思われます。しかし、以下のプロトコルが、これから形質転換実験を始めようとする方に、一応のスタンダードを提供するものとなれば幸いです。疑問点、質問など、またどんな細かい点でも、このプロトコルの改良のための示唆を期待し歓迎します。

この方法は、主としてÅlGifuÅlを材料として最適化したものです。MG-20についても、BAP濃度の変更を要しますが、一応は適用できます。しかしいまのところ、MG-20では不稔などの培養変異に基づくと思われる異常の頻度が高いために、よい結果が得られていません。

なお、ミヤコグサの種子滅菌法や栽培法、培地組成、交配法等に関して、今泉温子氏による「ミヤコグサの基本実験系マニュアル」が公開されていますので、併せて参考にさせていただければと思います。

連絡先： 河内 宏

農業生物資源研究所 生理機能部 窒素固定研究室

E-mail: kouchih@abr.affrc.go.jp

Tel: 0298-38-8377

試薬

B5 Vitamin (1000x)

B5 Vitamin Stock (Sigma: #G1019) 1000x

滅菌済みだが、0.22 μ m メンブレンフィルターで濾過し、1mlずつ分注して-20°Cに保存。

フィルター滅菌には、注射器とDISMIC (ADVANTEC, 0.22 μ m)などを用いる（作業はクリーンベンチ内）。以下同様。

1M MES pH5.2

MES 21.3g を約80mlの滅菌水に溶かす。

1M NaOHでpH 5.2とし、100mlに定容する。

フィルター滅菌し、1.5mlずつに分注して-20°Cに保存。

BAP (1mg/ml)

BAP (Sigma: #B-9395) 50mg を1mlの1M NaOHに溶かし、滅菌水で50mlとする。

フィルター滅菌し、1mlずつに分注して-20°Cに保存。

または、BAP solution (Sigma: #B3274, 1mg/ml)をフィルター滅菌し、1mlずつに分注。

NAA (1mg/ml)

NAA (Sigma; #N-0640) 50mg を24mlの95% EtOHに溶かし、滅菌水で50mlとする。

またはNAA solution (Sigma: N1641, 1mg/ml)。

フィルター滅菌し、1mlずつに分注して-20°Cに保存。

4M (NH₄)₂SO₄

(NH₄)₂SO₄ 26.4g を50mlの滅菌水に溶かす。

フィルター滅菌し、1.5mlずつに分注して-20°Cに保存。

G418 (50mg/ml)

Geneticine solution (Sigma #G-7014, 50mg/ml)

フィルター滅菌し、1mlずつに分注して-20°Cに保存。

Hygromycin B (10mg/ml)

Hygromycin B (Sigma: #H-9773) 250mg を16mlの滅菌水に溶かす。

(純度は通常70%くらい。ロットにより違う)

フィルター滅菌し、1mlずつに分注して-20°Cに保存。

またはHygromycin B solution (Sigma: H5527, 50mg/ml)を用いる（純度は50%以上）。

Cefotaxime (30mg/ml)

Cefotaxime (Sigma: #C-7912) 3 g を100mlの滅菌水に溶かす。

フィルター滅菌し、10mlずつ#2059に分注して-20°Cに保存。

Acetosyringone (20 mg/ml)

Acetosyringone (Aldrich #D134406) をDMSOに20 mg/mlになるように溶かす。

フィルター滅菌し、1mlずつに分注して-20°Cに保存。

アグロバクテリウム用培地

YEP寒天培地（注1）	YE	10g
	Peptone	10g
	NaCl	5g
	を1000mlの水に溶かす。	
	寒天1.5gを200mlメジューム瓶にとり、YEPを100mlずつ分注。	
	オートクレーブして、室温に保存。	

使用に際して、電子レンジで溶かす。

60°C程度に冷えてから、必要な抗生物質を加える。

（濃度） Kanamycin	100 µg/ml
Tetracyclin	5 µg/ml
Rifampicin	100 µg/ml
Spectinomycin	100 µg/ml
Carbenicilin	100 µg/ml
Gentamycin	100 µg/ml

クリーンベンチ内で、9cmプレート6-8枚に注いで固める。

YMB液体培地	Mannitol	1.0g
	YE	0.2g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1g
	NaCl	0.05g
	を500mlの水に溶かし、100mlずつに分注してオートクレーブ、室温に保存。	

用事、1mlの0.3Mリン酸カリウム緩衝液（pH6.8）を加える。

0.3M K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH6.8)

K ₂ HPO ₄	2.59g
KH ₂ PO ₄	2.05g

を水にとかし100mlとする。オートクレーブ。

注1) LB培地でも可。

植物用培地Co-cultivation培地

(1/10 B5, BAP 0.5µg/ml, NAA 0.05µg/ml, MES5.2 5mM, Acetosyringone 20µg/ml)

B5 basal salts (Wako: #399-00621) 0.33 g を1000mlの水に溶かす。
250mlボトルに200mlずつ分注し、オートクレーブ、室温保存(1/10 B5)。

使用時、次のものを加える。

1000x Vitamin stock	20µl	(0.1x)
NAA (1mg/ml)	10 µl	(0.05 µg/ml)
BAP (1mg/ml)	100µl	(0.5 µg/ml)
1M MES (pH5.2)	1.00ml	(5 mM)
Acetosyringone (20 mg/ml)	200 µl	(20 µg/ml)

Callus培地およびShoot Induction培地

(1x B5, 2% sucrose, BAP 0.5µg/ml, NAA 0.05µg/ml, 10mM NH₄, 0.3% phytigel)

B5 basal salts 1.66 g
sucrose 10 g

を500 mlの水に溶かす。

1N NaOH でpH5.5に調整する。

1.5 gのphytagelを加えてオートクレーブ。

熱いうちに

4M (NH ₄) ₂ SO ₄	625 µl	(10mM NH ₄ ⁺)
--	--------	--------------------------------------

を加える。

70°C以下に冷やしてから、次のものを加える。

1000x Vitamin stock	500 µl	(1x)
NAA (1mg/ml)	25 µl	(0.05 µg/ml)
BAP (1mg/ml)	250 µl	(0.5 µg/ml) (注2)
cefotaxime (30 mg/ml)	5 ml	(300µg/ml)

Selection (注3) ;

G418 (50 mg/ml)	100-200 µl/500 ml	(10-20 µg/ml)
HygromycinB (10 mg/ml)	0.75-2 ml/500 ml	(15-40 µg/ml)

Shoot Elongation培地

(1x B5, 2% sucrose, BAP 0.2µg/ml, 0.3% phytigel)

B5 basal salts 1.66 g
sucrose 10 g

を500 mlの水に溶かす。

1N NaOH でpH5.5に調整する。

1.5gのphytagelを加えてオートクレーブ。

70°C以下に冷やしてから、次のものを加える。

1000x Vitamin stock	500 µl	(1x)
BAP stock (1 mg/ml)	100 µl	(0.2 µg/ml)
cefotaxime (30 mg/ml)	2.5 ml	(150 µg/ml)

Root induction培地

(1/2 B5, 1% sucrose, 0.5µg/ml NAA, 0.4% phytigel)

B5 basal salts 0.83 g
 sucrose 5 g

を500 mlの水に溶かす。

1N NaOH でpH5.5に調整する。

2.0gのphytagelを加えてオートクレーブ。

70°C以下に冷やしてから、次のものを加える。

1000x Vitamin stock	250 µl	(0.5x)	
NAA stock (1mg/ml)		250 µl	(0.5 µg/ml)

Root Elongation培地

(1/2 B5, 1% sucrose)

B5 basal salts 0.83 g
 sucrose 5 g

を500 mlの水に溶かす。

1N NaOH でpH5.5に調整する。

2.0gのphytagelを加えてオートクレーブ。

70°C以下に冷やしてから、次のものを加える。

1000x Vitamin stock	250 µl	(0.5x)	
---------------------	--------	--------	--

注2) GifuではBAP濃度1.0µg/mlの方がよい場合がある。しかし、MG20はBAPに弱いので、カルス培地、再分化培地ともに、0.2µg/mlがよい。

注3) Selectionのための最適な抗生物質濃度は、実験的に決める。特にHygromycinは純度が低く一定しないのでロットごとにkill-curveを作って確認する必要がある。Shoot inductionでのselectionはオプションである。カルス培地で5週以上のselectionが行われていれば、shoot inductionは抗生物質なしでよい。あるいは最初の2週だけselectionを続けてもよい(Stiller et al., 1997)。抗生物質の存在は、多かれ少なかれ再分化を遅らせ、再生効率を低下させる。

Kill-curveの作り方：

バイナリベクターを含まないAgrobacteriumを用いて形質転換と同じ操作を行い、3週間の選抜で100%の胚軸切片を殺す最小の抗生物質濃度を定める。Stougaardによればこの最小濃度の2倍を用いる。しかし、Stillerらはこの最小濃度を用いている。我々の経験では、カルス培地でのselectionは最小濃度の4-6倍とやや高い濃度で行い、再分化培地ではselectionを行わないのがよい。この場合いくらかescapeが出ることは避けられないが、全体としてよい結果が得られる。目安となる濃度は、Hygromycinが40 µg/ml、G418では25 µg/ml。

形質転換の操作

1. 種子の滅菌

Lotus japonicus (Gifu) 種子

↓

40粒ずつを小型の磁製乳鉢に入れ、#400のサンドペーパーで擦って表面に傷を付ける（注4）

または、種子を2-3mlの濃硫酸に漬け、20分間静置する（注5）

↓

市販の次亜塩素酸ソーダの1/2希釈液に0.02% Tween 20 を加え、種子をこの中に漬けて10分（硫酸処理後の場合は20分）インキュベートする。この間シーソーしんとう器などを用いて穏やかに攪拌する（注6）。

↓

滅菌水で10分×3回洗う。

↓

滅菌水で20分×3回洗う（注7）。

注4） 少ない数の種子で丁寧に行うことが大事。慣れればほぼ100%の種子が発芽する。種子滅菌法については、「ミヤコグサの基本実験系マニュアル」をあわせ参照のこと。

注5） プラスチック棒などでよく攪拌し気泡をのぞくとともに、固まっている種子をほぐす。20分後、硫酸をピペットで除き、大量の滅菌水で5回程度リンスしてから次のステップに移る。

注6） Falcon2070チューブなどを使い、400-600粒の種子に対して25ml位を用いる。次亜塩素酸ソーダは古くなると有効塩素濃度が下がるので注意が必要。冷蔵庫に保存しあまり古くなったものは使わないが、濃度を濃くすることがよい。十分な滅菌が出来ない場合には、次亜塩素酸ソーダの前に95%エタノールで30秒程度処理すると改善される場合がある。

注7） 20分の洗浄後、水が黄色くなくなるまで繰り返せばよい。

2. 発芽

滅菌種子

↓

滅菌した濾紙(6x6cm)を5mm程度の厚さにパイルし、90x20mmペトリ皿におく。これに20-25mlの滅菌水を加え、この上に約80粒を播種する。

↓

パラフィルムでシールする。

↓

暗黒下、26°Cで4日間培養し、その後2日間連続照明におく（注8）。

(MG-20の場合は暗黒下3日間、その後2日間連続照明)。

注8） 暗黒下3日間、連続照明3日間の方がよいかもしれない。しかし、Stillerらは全く光を与えていない。

3. アグロ感染と共存培養（ co-cultivation ）

感染の2日前からアグロバクテリウムをYEP寒天培地に植菌し、28°Cで培養しておく。菌を掻き取り、4mlのYMBにけんだくする（注9）。

↓

90x20mmペトリ皿に滅菌濾紙の5mmパイルを入れ、20-25 mlのco-cultivation培地を加えておく。

↓
 アグロけんたく液を90mmペトリ皿中においた2枚の滅菌濾紙(6x6cm)に加える。
 ↓
 幼植物の胚軸(長さ1-2cm)を子葉の直下と根との境目で切り、アグロけんたく液で湿らせた濾紙の上に並べる(60-70本)。
 ↓
 10本程度を束ねて、ピンセットで押さえ、メスで3mm程度に細切する。すべて切り終わるまでアグロけんたく液に載せておく。

切片をco-cultivation培地を含む濾紙の上に並べる。ペトリ皿あたり150-200切片。
 ↓
 パラフィルムでシール。
 ↓
 暗黒下、21°Cで6日間共存培養する。

注9) 菌は通常グリセロールストックから植菌する。培地のほぼ全面高密度に画線する。YMBにけんたくする際は、時々手で振り混ぜながら20分程度かけて菌を均一に分散させる。菌によっては分散に時間がかかる場合がある。菌の密度は 10^8 - 10^9 /ml。しかし、液体培養の方が菌の密度をそろえ易いと考えられる。その場合は2晩YEPでmini-cultureしてstationary-phaseに達した菌液の、たとえば50 μ lを4mlのYEPに植菌して、24時間後の菌(集菌して4-5mlのWMBにけんたく)を用いるなどのやり方がある。

4. カルス誘導

共存培地から胚軸切片を載せたまま、一番上の濾紙だけをピンセットで取り上げ、90x20mmペトリ皿中のカルス培地の上に置く(隙間に空気が入らぬように注意)。
 ↓
 23°C、明(17hrs)、暗(7hrs)のグロースキャビネット内におく。以下、グロースキャビネット条件は同じ(注10)。
 ↓
 7日間培養する。
 ↓
 切片を1つずつ、新しいカルス培地に植え継ぐ(注11)。
 ↓
 7日ごとに植え継ぎ、2-5週間選別培養を続ける(注12)。

注10) Stougaardらの方法では連続明条件であり、実際連続明条件でも形質転換は行える。しかし、Stillerらは、23°C、明/暗条件を推奨している。温度や光の条件は、グロースキャビネットによっても違う可能性があるため、試行錯誤によって最適条件を決めていくしかない。

注11) このとき、培地上に静かにおく。埋め込んだり、培地上で擦ったりすると組織が褐変する率が高くなる。なお、ここからはサージカルテープでシールしてもよい。

注12) 緑色のカルスが1mm以上の大きさになったら、出来るだけ早く褐変した組織と切り離す(このステップはとても重要)。

5. 再分化(Shoot Induction)

カルスを再分化培地に植え継ぐ(注13)。
 ↓

7日ごとに植え継ぎ、3-7週間培養を続ける（注14）。

注13）緑色カルスが形質転換体であることが確信できれば、あるいはカルス培地で5週間以上selectionされていれば、再分化培地から抗生物質を除いてもよい。そうでない場合は、最初の2週間はselectionを続ける必要があるかもしれない。この辺の加減は、カルス培地での抗生物質の濃度などにより、ケースバイケースである。

注14）通常カルスの一部または全体が濃緑色になり、shootが分化し始める。再分化が始まったら次のshoot elongationに移る。再分化には7週以上かかる場合もある。再分化はミヤコグサ形質転換法のうちでもっとも問題の多い部分であり、効率は実験によってばらつきが大きい。再分化すれば、ほぼ100%が再生個体に至ると考えてよい。

6 . Shoot Elongation

Shoot原基が形成されたカルスをshoot elongation培地に植え継ぐ。

↓

7日ごとに植え継ぎ、3-6週間培養を続ける。

7 . Root Induction

1cm程度に成長したshootを切り取る（注15）。

↓

Root induction培地に浅く突き刺し、10日間培養する（注16）。

注15）1つのカルスから数本のshootが出るので、それらをすべてroot induction培地に移すが、同一のカルス由来の個体はまとめて、他のものと識別できるようにしておく。

注16）切り口がカルス化するが、この段階で発根はしないのがふつう。しかし誘導は10日間で充分。

8 . Root Elongation

円形プラントボックス（注17）にroot elongation培地（約40ml）を入れ滅菌する。

↓

植物を浅く突き刺す。

↓

3-4週間、26°C（明、16 hrs）、23°C（暗、8hrs）のグロースキャビネットで培養（培地交換の必要はない）。

注17）直径約6cm、高さ約7cmのプラスチック製プラントボックス。蓋に直径5mm程度の穴をあけ、そこに通気用のテフロンシール（ミリポア）を貼る。やや小さいが通気用シールを貼ったものが市販されている（イワキ）。

9 . 鉢上げ

根が1.5-2cm程度伸びたら、root elongation培地から取り出し、2段重ねの角形プラントボックス（注18）にパーミキュライトを詰めたものに移植する（注19）。

↓

必要に応じて根粒菌を接種（注20）

↓

Handberg, K. and Stougaard, J. (1992) *Plant Jour.* **2**(4): 487-496

Thykjaer, T. et al. (1998) In *Cell Biology: A laboratory handbook*, 2nd Ed. pp.518-525. Academic Press

Jiri Stiller et al. (1997) *Jour. Exp. Bot.* **48**(312): 1357-1365.