

リンゴの形質転換における *Agrobacterium* 除菌用抗生物質の検討

小森貞男^{1*}・渡邊麻紗乃¹・渡邊 学²・田中紀充¹・壽松木 章¹・
和田雅人³・副島淳一³・松本省吾⁴・安達義輝¹・李 積軍⁵

¹ 岩手大学農学部 020-8550 盛岡市上田

² 岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター 020-8550 盛岡市上田

³ 農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点 020-0123 盛岡市下厨川

⁴ 岐阜大学教育学部 501-1193 岐阜市柳戸

⁵ 岩手大学大学院連合農学研究科 020-8550 盛岡市上田

Antibiotics for *Agrobacterium* Elimination in Apple Transformation

Sadao Komori^{1*}, Masano Watanabe¹, Manabu Watanabe², Norimitsu Tanaka¹, Akira Suzuki¹,
Masato Wada³, Junichi Soejima³, Shogo Matsumoto⁴, Yoshiteru Adachi¹ and Jijun Li⁵

¹ Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda, Morioka, Iwate 020-8550

² Field Science Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda, Morioka, Iwate 020-8550

³ Apple Research Station, National Institute of Fruit Tree Science, Shimokuriyagawa, Morioka, Iwate 020-0123

⁴ Faculty of Education, Gifu University, Yanagito, Gifu 501-1193

⁵ United Graduate School of Agricultural Science, Iwate University, Morioka, Iwate 020-8550

Abstract

We investigated several antibiotics including carbenicillin (CBPC), clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC), cefotaxime (CTX), meropenem (MEPM), vancomycin (VCM) and doxycycline (DOXY) for *Agrobacterium* elimination during apple transformation. The growth of *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 was suppressed at 1,500 mg · L⁻¹ of CBPC, 750 mg · L⁻¹ of CVA/AMPC, less than 500 mg · L⁻¹ of CTX, 50 mg · L⁻¹ of MEPM and 200 mg · L⁻¹ of DOXY, but growth was not suppressed at 1,500 mg · L⁻¹ of VCM. In the shoot length, there was no difference among antibiotic-free, CBPC, CTX and VCM treatments. However, the shoot length in the high-concentration treatment of CVA/AMPC and DOXY was significantly shortened. However, the number of shoots increased as the concentration of MEPM rose. In CTX treatment, the shoot regeneration rate from leaf segments was lowered in comparison with antibiotic-free treatment; however, the regeneration rate was maintained to some degree even after high-concentration CTX treatment. The regeneration rate from leaf segments after MEPM treatment was superior to the antibiotic-free treatment. After DOXY treatment, leaf segments did not grow at all and finally died. These findings indicated that bacterial cell wall synthesis inhibitors such as CTX and MEPM were effective in eliminating *Agrobacterium*.

Key Words : cefotaxime, *Malus × domestica* Borkh., meropenem, shoot regeneration

キーワード : cefotaxime, *Malus × domestica* Borkh., meropenem, シュート再分化

緒 言

リンゴの形質転換体作成については1990年代前半以降、国内外で多くの報告がある(伴野ら, 1993; De Bondt ら, 1996; 星ら, 1998; 五十嵐ら, 1999; James ら, 1989; 金丸ら, 2002; 加藤ら, 2000; Maximova ら, 1998; Ogasawara ら, 1994; Pawlicki・Welander, 1994; Puiet・Schaart, 1996; 斎藤ら, 2001; 山下ら, 1996). 著者らもすでに *Agrobacterium tumefaciens* を使用したリンゴの形質転換体を作成している(伊藤ら,

1997; 小森ら, 1997; Kotoda ら, 2000; 滋田ら, 2004; 辻村ら, 2004).

この間、海外では形質転換効率が10%を越える実験系(Norelli ら, 1996)が報告されたり、カルス経由の再分化系(Caboni ら, 2000; Rugini・Muganu, 1998; Sedira ら, 2001)による形質転換が試みられている。しかし、使用可能な品種も限定されてしまううえに、複数の培地に継代するなどの煩雑な操作を要求する場合もある(Maximova ら, 1998)。従って、リンゴの多くの品種については依然として形質転換系が確立されていないのが現状である。また、形質転換効率が低いことが原因となって、新たな品種で形質転換を行う場合の基本的知見が不足している。さらに、獲得した

2008年12月10日 受付. 2009年5月11日 受理.

* Corresponding author. E-mail: komoris@iwate-u.ac.jp

形質転換体に二重、三重に形質転換を行う場合、現在使用している Kanamycin (KM) 以外の選抜用抗生物質を用いる必要がある。選抜用抗生物質の種類によっては、KM を用いる場合と葉切片からのシュート再分化率および再分化時期が異なる可能性がある。

これらの問題に対処するためには抗生物質を培地に添加した場合のシュート再分化率を向上させ、再分化時期を制御できる実験系を確立する必要がある。そこで著者らは、リンゴの効率的かつ汎用的な形質転換体作出技術を確立することを目的に、形質転換が困難な‘王林’と比較的形質転換効率が高い‘Greensleeves’を用いて、改めてリンゴ形質転換条件を検討した。本報では、*Agrobacterium* 除菌用抗生物質の種類とその効果について報告する。

材料および方法

供試品種は継代培養で維持している‘王林’と‘Greensleeves’である。継代用培地として、MS 基本培地 (Murashige・Skoog, 1962) に $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ スクロース, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($4.44 \mu\text{M}$) ベンジルアミノプリン (BAP), および $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0.49 \mu\text{M}$) インドール酪酸 (IBA) を加え、pH を 5.7 ~ 5.8 に調節した後、Bacto agar $6.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ を加えた固形培地を使用した。植物体の継代は 4 週間ごとに行い、40 ~ 50 mm に伸長したシュートを 450 mL 容の培養瓶 (直径 80 mm, 高さ 130 mm) に 1 瓶当たり 4 本ずつ植え込み、 25°C 恒温、16 時間日長の培養室で培養した。実験には 4 週間培養した植物体を供試した。すべての抗生物質は滅菌水に溶解しフィルター滅菌した。使用した抗生物質の薬名と略号は以下のとおりである。

Carbencillin (CBPC), Clavulanic acid/Amoxicillin (CVA/AMPC), Cefotaxime (CTX), Meropenem (MEPM), Vancomycin (VCM), Doxycycline (DOXY)

1. 抗生物質の種類と濃度が *Agrobacterium* の除菌に及ぼす影響 (実験 1)

第 1 表に示した抗生物質を添加した *Agrobacterium* 増殖用固形培地 ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Bacto trypton, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Bacto yeast extract, $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Bacto agar) に *Agrobacterium* 溶液 $30 \mu\text{L}$ ($\text{OD}_{600} = 1.0$) をコンラージ棒で塗布し、 25°C の暗黒条件で培養した。対照として抗生物質無添加区を設けた。各処理区あたり 4 シャーレを供試し、*Agrobacterium* の増殖程度を置床後 4 週間目に調査した。使用した菌系は *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 である。

2. 抗生物質の種類と濃度がリンゴ培養シュートの増殖と伸長に及ぼす影響 (実験 2)

シュートの培養は、前述の継代用培地にそれぞれの抗生物質を添加し、培養瓶に約 80 mL ずつ分注した培地で行った。使用した抗生物質の種類と濃度を第 2 表に示した。対照として抗生物質無添加の区を設定した。この培地に継代培養で維持している‘王林’のシュートを 40 ~ 50 mm の長さで切り取り、培養瓶当たり 4 本ずつ植え込んだ。1 処理 2 瓶 (8 シュート) を供試した。培養は 25°C 恒温、16 時間日長の培養室で行い、生育状況を 4 週間 (29 日) 後、一部 7 週間 (49 日) 後に調査した。

3. CTX の濃度が葉切片の再分化に及ぼす影響 (実験 3)

CTX を 250, 500 および $1,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 添加した MBNZ511 培地 (Maximova ら, 1998) に‘Greensleeves’の葉切片を置床し、シュート再分化に及ぼす CTX の影響を調査した。対照として抗生物質無添加区を設定した。温度条件は 25°C 恒温、光条件は暗黒条件で 2 週間、16 時間日長の弱光で 2 週間、その後 16 時間日長の強光条件で培養した。継代は 1 か月ごとに行い、1, 2 および 4 か月後に調査を行った。なお、MBNZ511 培地の組成は MS 基本培地に $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ソルビトール, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($22.2 \mu\text{M}$) BAP, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($4.54 \mu\text{M}$) チジアズロン (TDZ), および $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($5.37 \mu\text{M}$) ナフタ

Table 1 Effects of six kinds of antibiotics and their concentrations on *Agrobacterium* elimination.

Antibiotic	Concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Number of colonies	Antibiotic	Concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Number of colonies
CBPC	500	*	MEPM	1	*
	1,000	50		5	319
	1,500	0		10	250
	2,250	0		25	2
	3,000	0		50	1
	3,750	0		75	1
	4,500	0		100	0
CVA/AMPC	750	1	VCM	750	57
	1,125	0		1,000	39
	1,500	0		1,500	17
CTX	500	0	DOXY	25	100
	1,000	0		50	91
	1,500	0		100	11
	2,000	0		200	1
				300	0

*: *Agrobacterium* propagated on the medium full face.

Table 2 Effects of six kinds of antibiotics and their concentrations on numbers of shoot and shoot length of 'Orin'.

Antibiotic	Concentration (mg · L ⁻¹)	Number of shoots regenerated	Mean shoot length (mm)	Antibiotic	Concentration (mg · L ⁻¹)	Number of shoots regenerated	Mean shoot length (mm)
CBPC 1 ^z	0	10	25.3 a	MEPM 1 ^z	0	10	25.3 a
	500	10	34.1 a		1	11	34.1 a
	1,000	13	30.3 a		5	13	32.9 a
	1,500	9	31.2 a		10	13	28.5 a
CBPC 2 ^y	0	7	25.6 a	MEPM 2 ^y	0	7	25.6 a
	1,500	6	22.2 a		10	8	25.9 a
	2,250	6	26.9 a		25	10	29.0 a
	3,000	5	16.0 a		50	10	30.9 a
	3,750	4	19.7 a		75	7	30.0 a
	4,500	4	17.2 a		100	9	32.6 a
CVA/AMPC ^y	0	6	30.2 a	VCM ^y	0	6	30.2 a
	750	5	23.3 ab		750	6	28.4 a
	1,125	7	17.2 b		1,000	7	24.2 a
	1,500	5	18.8 b		1,500	8	22.6 a
CTX ^y	0 ^x	6	30.2 a	DOXY ^y	0	7	25.6 ab
	0 ^x	7	25.6 ab		25	5	29.6 a
	500	4	29.1 ab		50	7	14.9 c
	1,000	7	28.2 ab		100	4	16.0 bc
	1,500	5	19.9 b		200	4	13.3 c
	2,000	7	26.3 ab		300	4	14.8 c

^z Investigated 49 days after planting on medium containing antibiotics.

^y Investigated 29 days after planting on medium containing antibiotics.

^x Controls were investigated two times.

The same letters in each mean shoot length did not show significant differences on Student T-test at P < 0.05.

レン酢酸 (NAA) を加え pH 5.7 ~ 5.8 に調節した固形培地で、支持体には 2.5 g · L⁻¹ ゲルライトを用いた。

4. MEPM と DOXY が葉切片の再分化に及ぼす影響 (実験 4)

再分化培地として MS (B5) 培地 (伊藤ら, 1997) を用いた。MS (B5) 培地の組成は MS 無機塩と B5 微量有機物の培地に 30 g · L⁻¹ スクロース, 3.30 mg · L⁻¹ (15 μM) TDZ, および 0.93 mg · L⁻¹ (5 μM) NAA を加え pH 5.7 ~ 5.8 に調節した固形培地で、支持体には 3 g · L⁻¹ ゲルライトを用いた。使用品種は '王林' である。培地には MEPM が 75 および 100 mg · L⁻¹, または DOXY は 200 および 300 mg · L⁻¹ を添加した。対照として抗生物質無添加区を設定した。MEPM 添加区, DOXY 添加区は 1 処理区あたり 75 葉切片とした。温度・光条件は実験 3 と同様である。

結 果

1. 抗生物質の種類と濃度が *Agrobacterium* の除菌に及ぼす影響 (実験 1)

抗生物質の種類と濃度が *Agrobacterium* の増殖に及ぼす影響を第 1 表に示した。CTX 添加区では調査したすべての濃度で *Agrobacterium* の増殖が認められなかった。CVA/AMPC 添加区では、750 mg · L⁻¹ で直径 24 mm の大きな一

つのコロニーを形成したが、1,125 および 1,500 mg · L⁻¹ 添加区では *Agrobacterium* の増殖を抑えることができた。それ以外の CBPC, MEPM, VCM, DOXY では濃度の上昇とともにコロニー数が減少し、CBPC 添加区では 1,500 mg · L⁻¹ 以上, MEPM 添加区では 100 mg · L⁻¹ 以上, DOXY 添加区では 300 mg · L⁻¹ 以上の濃度でコロニーの形成が見られなかった。VCM 添加区では 1,500 mg · L⁻¹ でもコロニーの形成を抑えられなかった。

2. 抗生物質の種類と濃度がリング培養シュートの増殖と伸長に及ぼす影響 (実験 2)

抗生物質の種類と濃度がリング培養シュートの生育に及ぼす影響を第 2 表に示した。CBPC 添加区ではシュート長に有意な差は無かったが、高濃度になるに従ってシュートの本数が少なくなる傾向がみられた (第 1 図 A)。

CVA/AMPC 添加区では 1,125 mg · L⁻¹ 以上で無添加区と比較してシュート長が有意に短かった (第 1 図 B)。

CTX 添加がシュート長に及ぼす影響については、500, 1,000, 2,000 mg · L⁻¹ の各濃度と対照の無添加区との間に差は認められなかった。1,500 mg · L⁻¹ 添加区では無添加区に対して有意に短くなった (第 1 図 C)。

MEPM 添加区ではシュート伸長に関して、無添加区および各濃度間で有意な差は認められないものの、各添加区は

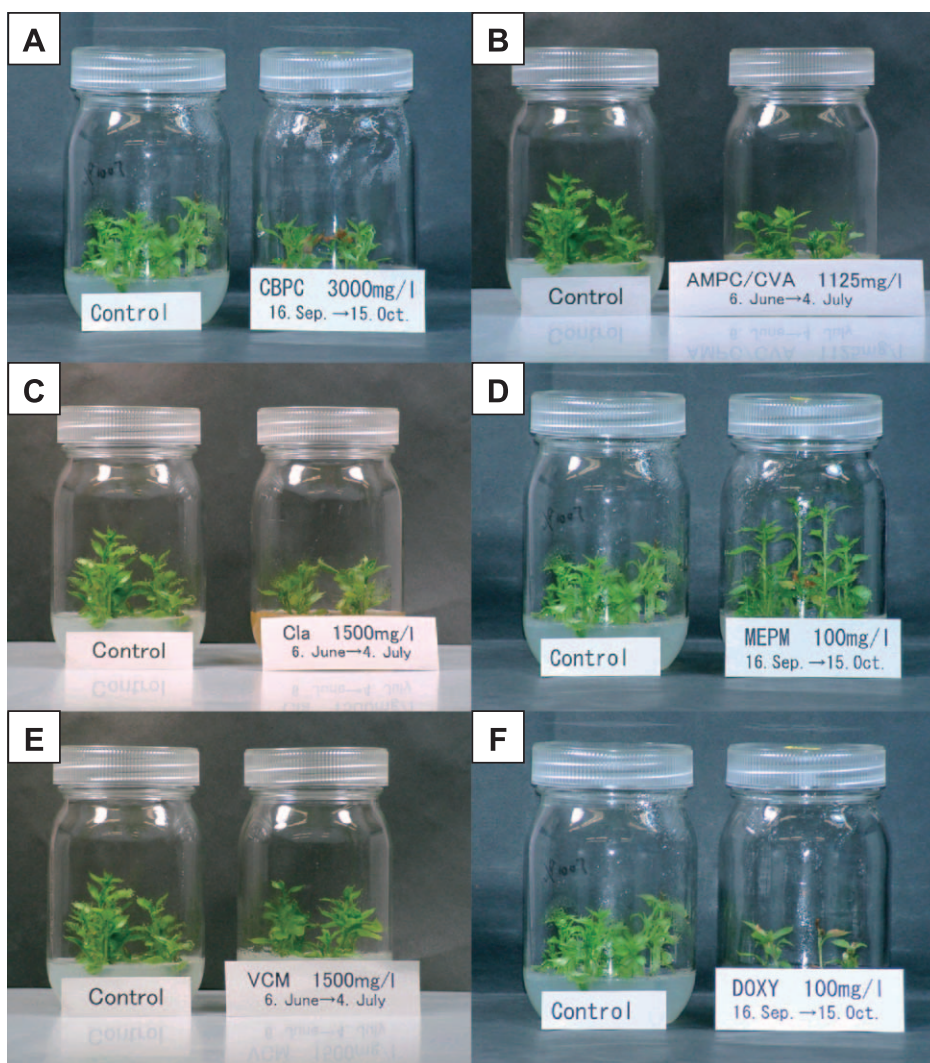


Fig. 1 Effects of several antibiotics on shoot growth of 'Orin'.

A: CBPC, B: CVA/AMPC, C: CTX, D: MEPM, E: VCM, F: DOXY.

Claforan (Cla) is a brandname in sanofi aventis of cefotaxime sodium (CTX).

無添加区より平均のシュート長が長く、濃度の上昇にともなうシュート長が長くなる傾向が認められた。この伸長は節間長の伸長に伴うものと推定される(第1図D)。また、シュート数もMEPM添加によって無添加区より増加する傾向が認められた。

VCMを添加した場合は無添加区と比較していずれの濃度区でも有意な差は認められなかった(第1図E)。

DOXY添加区では濃度の上昇に伴って有意にシュート伸長が抑制された。また、100 mg・L⁻¹以上の濃度では、葉の先端やシュート基部の褐変が認められ、シュート数は増加しなかった(第1図F)。

3. CTXの濃度が葉切片の再分化に及ぼす影響(実験3)

葉切片からのシュート再分化率は、置床後1か月目では無添加区が33.3%、CTX添加区では250, 500および1,000 mg・L⁻¹がそれぞれ29.4, 28.7および24.8%と大きな差は無かった。2か月目には無添加区で84.3%と著しいシュート形成

が観察されたが、CTX添加区では250, 500および1,000 mg・L⁻¹がそれぞれ32.4, 32.0および25.7%と4%以下の増加率にとどまり、濃度の上昇に伴ってシュート再分化率が下がる傾向が認められた。4か月目のシュート再分化率は無添加区で88.2%と2か月目と比較して約4%の増加であった。一方、250, 500および1,000 mg・L⁻¹添加区はそれぞれ

Table 3 Effect of CTX concentration on shoot regeneration from 'Greensleeves' leaf segments.

Concentration (mg・L ⁻¹)	Number of leaf segments	Shoot regeneration (%)		
		1 MAP ^z	2 MAP	3 MAP
0	51	33.3	84.3	88.2
250	102	29.4	32.4	48.0
500	50	28.7	32.0	38.0
1,000	101	24.8	25.7	28.9

^zMonth after planting.

Table 4 Effects of MEPM and DOXY on shoot regeneration, callus formation and vitrification of 'Orin'.

Antibiotic	Concentration (mg · L ⁻¹)	Number of leaf segments	Shoot regeneration (%)	Callus formation (%)	Vitrificated segments (%)
MEPM	75	75	66.7	33.3	58.0
	100	75	88.0	12.0	63.6
DOXY	200	75	0	0	0
	300	75	0	0	0
Control	0	75	32.4	58.7	61.3

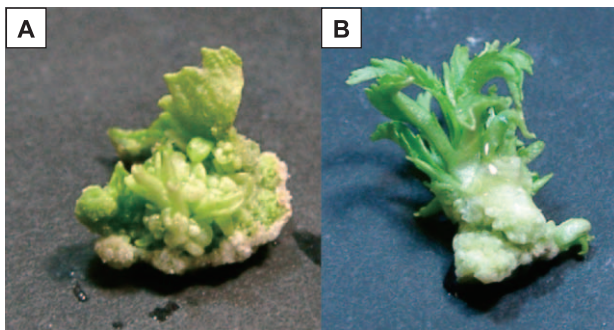


Fig. 2 Effect of MEPM on shoot regeneration of 'Orin'.
Leaf segments were investigated 2 months after planting.
a: control (antibiotic free). Leaf segment formed shoot mass.
b: MEPM 100 mg/l. Leaf segment formed a large shoot.

48.0, 38.0 および 28.9% で 2 か月目と同様に高濃度区ほどシュート再分化が抑制された (第 3 表).

4. MEPM と DOXY が葉切片的の再分化に及ぼす影響 (実験 4)

MEPM と DOXY が葉切片からのシュートの再分化に及ぼす影響を第 4 表に示した. MEPM は 75 mg · L⁻¹ 添加区のシュート再分化率が 66.7%, 100 mg · L⁻¹ 添加区で 88.0% と対照の無添加区 32.4% に比べて高い再分化率を示した. 無添加区で再分化したシュートは 2 mm 以下のシュートが多く, そのほとんどがシュートマス状態となっていた (第 2 図 A). MEPM 添加区ではシュートの伸長が速くシュートマス化している葉切片は無添加区と比較して少なかった (第 2 図 B). また, 再分化した個体のガラス化率は無添加区, 75 mg · L⁻¹ 添加区, 100 mg · L⁻¹ 添加区いずれも 60% 前後で差がなかった (第 4 表). DOXY を添加した培地に置床した葉切片は, 200 および 300 mg · L⁻¹ のいずれでも全く生育せずに枯死した.

考 察

リンゴの形質転換実験で *Agrobacterium* の除菌に用いる抗生物質は *Agrobacterium* の増殖を効率的に抑え, しかもリンゴの生育に負の影響を与えない薬剤が望ましい. 今回供試した抗生物質のうち, VCM は 1,500 mg · L⁻¹ の濃度でも植物体の生育への影響は認められないものの除菌が不完全であるため, リンゴの形質転換には使用できないと考えられる. DOXY は 200 mg · L⁻¹ 以上の濃度で *Agrobacterium*

の増殖を抑制する効果が期待できるが, 培養植物体の生育は 50 mg · L⁻¹ ですでに無添加区より劣り, 葉切片は 200 mg · L⁻¹ 添加培地で全く生育せずに枯死した. このことから DOXY についてもリンゴの形質転換には使用できないと考えられる.

CBPC は 1,500 mg · L⁻¹ 以上の濃度で *Agrobacterium* の増殖を抑制する効果が期待できる. 植物体の生育は 1,500 および 2,250 mg · L⁻¹ の濃度まではシュート長, シュート本数とも無添加区と比較して差はないため, 上記の濃度で葉切片からのシュート再分化への影響などを調査する必要がある.

CVA/AMPC は 750 mg · L⁻¹ で *Agrobacterium* の増殖を抑制する効果が期待でき, 培養植物体の生育も無添加区と有意差はなかった. しかし 1,125 mg · L⁻¹ 以上の濃度では植物体の生育が有意に劣ることから 750 mg · L⁻¹ 以下の濃度でさらに使用の可能性を探る必要がある.

CTX は 500 mg · L⁻¹ の濃度で *Agrobacterium* の増殖を十分に抑制することが可能である. シュートの長さおよび本数も 1,000 mg · L⁻¹ 程度の高濃度まで無添加区と差が認められない. 一方, 'Greensleeves' の葉切片からの再分化は 250 mg · L⁻¹ ですでに抑制されているが, 1,000 mg · L⁻¹ の高濃度でも 30% 程度の再分化率を示している. このことから目的に応じて広い濃度範囲で使用できる抗生物質であることが推察される. CTX 添加期間とシュート再分化の関係, CTX が葉切片およびシュート生育に及ぼす影響についての品種間差を把握する必要がある.

MEPM は 25 mg · L⁻¹ 以上の濃度で *Agrobacterium* の増殖を抑制する効果が期待できる. 培養植物体の生育は無添加区と有意な差はないがシュート長, シュート本数ともに添加区の方が生育が優れる可能性がある. さらに葉切片のシュート再分化に関しては, 無添加区と比較してシュート再分化率が高く, シュートの伸長も速いことが推察された. また, シュートマス化する葉切片も比較的少ないことが判明した (第 2 図). 抗生物質の添加によってリンゴの生育および再分化が促進されることは形質転換体獲得の際に有利と考えられる.

1. 各抗生物質の作用機序

Agrobacterium は土壌細菌で果樹に根頭がん腫病を起こす病原細菌も含まれる. 感染部位の根や幹などにがん腫 (crown gall) を形成し Ti プラスミドを有する *Agrobacterium*

tumefaciens と毛状根 (hairy root) を形成し Ri プラスミドを有する *Agrobacterium rhizogenes* など、病徴と栄養要求性から4種に分類される。分類上は根粒菌 (*Rhizobium*) と近縁でリゾビウム科 (*Rhizobiaceae*) に属するグラム陰性好気性桿菌である (Allen・Holding, 1974)。今回の報告では従来の分類に従って *Agrobacterium tumefaciens* と表記したが、近年 Young ら (2001) および Young (2004) は *Agrobacterium* 各種の特徴である病原性はプラスミドに由来することを示し、リゾビウム科に属する *Rhizobium*, *Agrobacterium* などの近縁種・属について 16S rDNA の塩基配列に基づいて分類し直している。それによると *Agrobacterium tumefaciens* (syn. *Agrobacterium radiobacter*) は種小名の *radiobacter* の優先権を認め *Rhizobium radiobacter* に、*Agrobacterium rhizogenes* は *Rhizobium rhizogenes* に種名を変更することを提案しており、この提案が広く認められつつある。

今回の実験で *Agrobacterium* 除菌に最も効果がみられた CTX と MEPM はグラム陰性菌に対して広く抗菌作用を示す抗生物質で、それに次いで有効と推察された CBPC と CVA/AMPC はグラム陰性菌に対する抗菌スペクトルは CTX, MEPM ほど広くない。一方、VCM はグラム陰性菌には抗菌作用がない (山中, 1996)。この5種類の抗生物質は細菌に特有の細胞壁合成を阻害する選択性の高い抗生物質である。従ってリンゴの生育に有意な負の影響が現れなかったものと考えられる。一方、DOXY はグラム陰性菌に対する抗菌スペクトルが CTX, MEPM と同程度に広いが (山中, 1996)、タンパク質合成阻害剤で細菌だけでなく宿主のリンゴへの影響も推察される。DOXY の添加でリンゴシュートおよび葉切片の生育が抑制された原因は DOXY の選択毒性の低さにあると考えられる。抗生物質の選択毒性は、細菌の細胞壁などの細菌に特有な構成成分に作用する場合、質的・絶対的で宿主への影響が少ないことが期待できる。一方、宿主細胞にも必須なタンパク質合成、核酸合成、細胞膜の機能を阻害する場合、量的・相対的で宿主細胞への影響が懸念される。今後 *Agrobacterium* 除菌用の抗生物質を検索する場合、選択毒性の高い細胞壁合成阻害剤の中でグラム陰性菌と好気性菌に広い抗菌力を有する抗生物質を試験することが効率的と推察された。

Agrobacterium 除菌試験への使用が報告されている抗生物質のうち Timentin (CVA/TIPC) は Cheng ら (1998) が有効性を報告している。Shackelford・Chlan (1996) は CBPC, CTX, CVA/AMPC, Erythromycin (EM), Spectinomycin (SPCM), Polymixin B (PL-B), Cloramphenicol (CP), Methicillin (DMPPC) および Moxalactam (LMOX) を供試し、LBA4404 には CTX が、EHA101 には LMOX が最も効果があったとしている。なお、CVA/TIPC, LMOX, DMPPC は細胞壁合成阻害剤で、EM, SPCM, CP はタンパク質合成阻害剤、PL-B は細胞膜機能阻害剤である。グラム陰性菌に対する抗菌スペクトルの広さと選択毒性から Shackelford・Chlan (1996) が CTX と LMOX が最も効果的とする結論は理解できる。LMOX

は小川・三位 (2002) もタバコで有効性を認めている。CP は広くグラム陰性菌に効果を示すが、タンパク質合成阻害剤であるため宿主である植物の生育への影響が懸念される。

2. 植物, *Agrobacterium* および抗生物質の相互作用

今回の実験結果と Joung ら (2001) の結果では、*Agrobacterium* を除菌できる CBPC の濃度が大きく異なっている。また、Joung ら (2001) は VCM で *Agrobacterium* を除菌しているが、今回の実験では $1,500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ の VCM でも除菌できなかった。VCM はグラム陰性菌である *Agrobacterium* には効果がないはずで、植物が介在しない条件での我々の実験結果もその知見を支持している。Joung ら (2001) は *Campanula glomerata* の葉切片に感染させた *Agrobacterium* を VCM を添加した培地で除菌しているが、これは VCM が直接 *Agrobacterium* 除菌に効果を示したのではなく、VCM の添加が植物の成長に何らかの効果を及ぼしたため間接的に細菌が排除されたと推察されるが詳細は不明である。このことは *C. glomerata* の葉切片に感染させた *Agrobacterium* を除菌するのに用いた CBPC 濃度が、植物が介在しない本報の *Agrobacterium* 除菌濃度より著しく低いこともからも推察される。他の植物でも CBPC は *Agrobacterium* 除菌用抗生物質として広く使用されている。植物種と使用濃度の例を示すとタバコ $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Horsch ら, 1985)、トマト $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Horsch ら, 1985)、レタス $250 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Michelmore ら, 1987)、アブラナ科植物 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fry ら, 1987; Radke ら, 1988)、サトウキビ $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (松岡ら, 2002)、ゴマノハグサ科のトレンア $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Aida・Shibata, 1995) で、いずれも今回の *Agrobacterium* 除菌濃度よりかなり低い濃度で使用されている。このことから CBPC, CVA/AMPC, CTX, MEPM を用いてリンゴ葉切片に感染させた *Agrobacterium* を除菌する場合、今回の結果より低濃度で適用できる可能性がある。実用化には *Agrobacterium* を感染させたリンゴ葉切片の成長に及ぼす各抗生物質の影響を詳細に把握する必要がある。MEPM はタバコ (小川・三位, 2002) の報告があり、その有効性が示されている。

今後、除菌用抗生物質として MEPM を用いて、さらにリンゴの培養方法、*Agrobacterium* の感染方法の検討を行い、シュート再分化率の向上、再分化時期の制御を可能にすることで、多品種に適用できる培養条件、Hygromycin B などの選抜用抗生物質でも形質転換体が獲得できる条件を設定する必要がある。

摘 要

Agrobacterium 法によるリンゴの形質転換体作出の際に用いる除菌用抗生物質の検討を行った。供試した抗生物質は Carbenicillin (CBPC), Clavulanic acid/Amoxicillin (CVA/AMPC), Cefotaxime (CTX), Meropenem (MEPM), Vancomycin (VCM) および Doxycycline (DOXY) の6種類である。*Agrobacterium tumefaciens* EHA101 の増殖は CBPC が $1,500 \text{ mg} \cdot$

L⁻¹, CVA/AMPC 750 mg・L⁻¹, CTX 500 mg・L⁻¹ 以下, MEPM 50 mg・L⁻¹, DOXY 200 mg・L⁻¹ で抑制され, VCM では 1500 mg・L⁻¹ でも抑制できなかった. 一方, 培地に抗生物質を添加した場合のリンゴのシュート長は抗生物質無添加区と比較して CBPC, CTX および VCM では差がなく, CVA/AMPC および DOXY では高濃度区で有意に短くなった. MEPMは濃度上昇に伴ってシュート数が増加する傾向が認められた. 葉切片からのシュート再分化に及ぼす影響は, CTXでは無添加区と比較してシュート再分化率が低くなるものの, 高濃度でも一定の再分化率を維持した. MEPMは無添加区よりシュート再分化率が高かった. DOXYでは葉切片が全く肥大せずすべて枯死した. 抗生物質の作用機序を考慮した場合, グラム陰性菌に広く抗菌作用を有し選択毒性の高い CTXと MEPMなどの細胞壁合成阻害剤が *Agrobacterium* の除菌に有効であることが推定された.

引用文献

- Aida, R. and M. Shibata. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Torenia* (*Torenia fournieri*). *Breed. Sci.* 45: 71-75.
- Allen, O. D. and A. J. Holding. 1974. Genus II. *Agrobacterium*. p. 264-267. In: Buchanan, R. E., and N. E. Gibbons (eds.). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. eight edition. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- 伴野 潔・上原秀之・熊代克己. 1993. *Agrobacterium rhizogenes* によるリンゴの形質転換と植物体再生. *園学雑*. 62 (別2): 174.
- Caboni, E., P. Lauri and S. D'Angeli. 2000. In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Rep.* 19: 755-760.
- Cheng, Z. M., J. A. Schnurr and J. A. Kapaun. 1998. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Rep.* 17: 646-649.
- De Bondt, A., K. Eggermont, I. Penninckx, I. Goderis and W. F. Broekaert. 1996. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus × domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 15: 549-554.
- Fry, J., A. Barnason and R. B. Horsch. 1987. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vector. *Plant Cell Rep.* 6: 321-325.
- Horsch, R. B., J. Fry, N. L. Hoffman, D. Eichholtz, S. G. Rogers and R. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plant. *Science* 227: 1229-1231.
- 星 伸枝・仲谷房治・峰 正樹・西原昌宏・山村三郎. 1998. キチナーゼ遺伝子導入リンゴの斑点落葉病に対する抵抗性の検定. *育学雑*. 48 (別2): 245.
- 五十嵐 恵・小笠原博幸・月沢美紀子・初山慶道・鈴木正彦. 1999. *rol C* 遺伝子導入によるわい化マルバカイドウの作出. *育学研*. 1 (別1): 130.
- 伊藤祐二・小森貞男・大村三男・金山喜則・山木昭平・副島淳一. 1997. ソルビトール合成酵素遺伝子を増幅した形質転換リンゴの作出. *育学雑*. 47 (別1): 157.
- James, D. J., A. J. Passey, D. J. Barbara and M. Bevan. 1989. Genetic transformation of apple (*Malus Pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Rep.* 7: 658-661.
- Joung, Y. H., M. S. Roh, K. Kamo and J. S. Song. 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Campanula glomerata*. *Plant Cell Rep.* 20: 289-295.
- 金丸直明・伊藤祐二・小森貞男・斎藤美智子・高橋佐栄・副島淳一・白武勝裕・山木昭平. 2002. ソルビトール-6-リン酸脱水素酵素のリンゴ形質転換体の作出とその発現解析. *園学雑*. 71 (別2): 513.
- 加藤秀憲・斎藤美智子・大橋祐子・阿部和幸・古藤田信博・岩波 宏・副島淳一. 2000. ザルコトキシン遺伝子を導入した形質転換リンゴの作出. *園学雑*. 69 (別1): 178.
- 小森貞男・伊藤祐二・西澤洋子・副島淳一. 1997. キチナーゼ遺伝子を増幅した形質転換リンゴの作出. *育学雑*. 47 (別1): 158.
- Kotoda, N., M. Wada, S. Komori, S. Kidou, K. Abe, T. Masuda and J. Soejima. 2000. Expression pattern of homologues of floral meristem identity genes *LFY* and *API* during flower development in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125: 398-403.
- 松岡 誠・N. S.アリフィン・田村泰章・谷尾昌彦・寺内方克. 2002. アグロバクテリウムによるサトウキビ形質転換体の作出—超音波処理はアグロバクテリウム除菌に有効である—. *熱帯農業*. 46 (別2): 94-95.
- Maximova, S. N., M. Dandekar and M. J. Guiltinan. 1998. Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. *Plant Mol. Biol.* 37: 549-559.
- Michelmores, R., E. Marsh, S. Seely and B. Landry. 1987. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 6: 439-442.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Norelli, J., J. Mills and H. Aldwinckle. 1996. Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *HortScience* 31: 1026-1027.
- Ogasawara, H., S. Ueda, T. Harada, R. Ishikawa, M. Niizeki and K. Saito. 1994. Introduction of a herbicide resistant gene into an apple root-stock with *Agrobacterium tumefaciens*. *Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ.* 57: 1-8.

- 小川洋一・三位正洋. 2002. メロペネムおよびモキサラクタムはアグロバクテリウム法によるタバコの形質転換効率を向上させる. 育学研. 4 (別2): 204.
- Pawlicki, N. and M. Welander. 1994. Adventitious shoot regeneration from leaf segments of *in vitro* cultured shoots of the apple rootstock Jork 9. J. Hort. Sci. 69: 687–696.
- Puiet, K. J. and J. G. Schaart. 1996. Genetic modification of commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elster via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method. Plant Sci. 119: 125–133.
- Radke, S. E., B. M. Andrews, M. M. Moloney, M. L. Crouch, J. C. Kridl and V. C. Knauf. 1988. Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of reintroduced napin gene. Theor. Appl. Genet. 75: 685–694.
- Rugini, E. and M. Muganu. 1998. A novel strategy for the induction and maintenance of shoot regeneration from callus derived from established shoots of apple [*Malus × domestica* Borkh.] cv. Golden Delicious. Plant Cell Rep. 17: 581–585.
- 斎藤 彰・五十嵐 恵・初山慶道・小笠原博幸・鈴木正彦. 2001. *rol C*遺伝子導入を導入したリンゴ台木 (マルバカイドウ) の特性. 園学雑. 70 (別2): 124.
- Sedira, M., A. Holefors and M. Welander. 2001. Protocol for transformation of the apple rootstock Jork 9 with the *rolB* gene and its influence on rooting. Plant Cell Rep. 20: 517–524.
- Shackelford, N. J. and C. A. Chlan. 1996. Identification of antibiotics that are effective in elimination *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Biol. Rep. 14: 50–57.
- 滋田徳美・石谷栄子・小森貞男・辻村 匡・壽松木 章. 2004. *Agrobacterium*感染時にリンゴの再分化に影響を与える諸条件の検討. 園学雑. 73 (別2): 280.
- 辻村 匡・小森貞男・壽松木 章・千葉しず香・滋田徳美. 2004. *Agrobacterium*感染時のリンゴの再分化に及ぼす共存培養期間および除菌操作の影響. 園学雑. 73 (別1): 194.
- 山中康光. 1996. 化学療法薬. p. 437–498. 田中 潔編. 現代の薬理学. 増補第18版. 金原出版. 東京.
- 山下裕之・増田哲男・羽生田忠敬. 1996. *Agrobacterium rhizogenes* によるリンゴ台木からの毛状根形成とその再分化個体の特性. 園学雑. 65 (別1): 80.
- Young, J. M. 2004. Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar and Jones 2001 as *Rhizobium larrymoorei* (Bouzar and Jones 2001) comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 149.
- Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr and H. Sawada. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 89–103.