

アグロバクテリウム法によるタバコ巻葉ウイルス 外被タンパク質遺伝子のタバコへの導入と 導入遺伝子のホモ化に関する研究

二上 崇*・谷口美穂**・角谷直人***・森島啓子****・丹田誠之助*****・池上正人*****

(平成 17 年 3 月 14 日受付/平成 17 年 9 月 13 日受理)

要約: タバコ *Nicotiana tabacum* cv Burley21 へ *Agrobacterium tumefaciens* を用いてジェミニウイルス科 (*Geminiviridae*) に属する *tobacco leaf curl virus* (TbLCV) の外被タンパク質遺伝子を導入した。外被タンパク質遺伝子を導入したタバコを自殖して後代系統を養成し, T1 世代, T2 世代における分離比を算定することにより, 導入遺伝子のコピー数を推定した。分離比から 1 コピー, 2 コピー, 3 コピーと推定される形質転換タバコ系統を得た。1 コピー, 2 コピーと考えられる形質転換植物については更に自殖を繰り返し, 導入遺伝子をホモに持つ組換え系統を得た。

キーワード: 外被タンパク質, 形質転換, タバコ

諸 言

ジェミニウイルスはジェミニウイルス科 (*Geminiviridae*) に属する 1 本鎖 DNA ウイルスである。ジェミニウイルスは宿主範囲, ゲノム構造, 媒介昆虫の違いにより *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus*, *Begomovirus* の 4 属に分類されている¹⁾。

Begomovirus に属する *Tobacco leaf curl virus* (TbLCV) は, 単一の環状 1 本鎖 DNA をゲノムとして持つ。自然界における宿主範囲は, ナス科, キク科, スイカズラ科植物である。病徴は黄化, 萎縮, 巻葉, 葉脈黄化などを示す。尾崎らの研究では種子伝搬, 土壌伝搬はせずコナジラミ (*Bemisia argentifolii*) によって伝搬され²⁾, 増殖には TbLCV のゲノムにコードされている外被タンパク質が必要である³⁻⁵⁾。TbLCV は 1968 年に奈良県の宇陀郡一帯の山間部あるいは中山間部で栽培されているトマトで黄化萎縮病を呈する株が発見されて話題になった⁶⁻⁸⁾。しかし日本ではかなり古くから発生していたと考えられ, 万葉集の一首でヒヨドリバナに TbLCV によると思われる病徴を詠んだとされる和歌が採録されている⁹⁾。現在, TbLCV によると考えられるトマトに感染したウイルス病が高知, 山口で報告されている¹⁰⁾。また, タバコでは盛岡以南でタバコ巻葉ウイルスによるものと考えられるウイルス病が報告されているが, TbLCV 抵抗性の作物は作出されていない¹¹⁾。

外被タンパク質遺伝子を導入した報告としては, Powell *et al.*, (1986) らのグループによる TMV の外被タンパク質遺伝子を導入したタバコが最初であるが, TMV の感染に対する病徴の遅延や軽減が報告されている¹²⁾。その後, 外被タンパク質遺伝子を導入することにより, ウイルス耐性を付与した植物は数多く作出されている¹²⁻¹⁷⁾。

そこで本研究は TbLCV の外被タンパク質遺伝子をタバコに導入するとともに, 今後の研究でウイルス検定をして抵抗性の程度とメカニズムを調べることができるように, 外被タンパク質遺伝子を遺伝的に固定することを目的として行った。

材料および方法

1. タバコおよびアグロバクテリウム

タバコは *Nicotiana tabacum* cv Burley21 を実験材料として用いた。種子を 70% エタノールで 30 秒, 1% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 10 分表面殺菌した後, 滅菌水で 3 回洗浄した。1/2MS 培地¹⁸⁾ (1/2 倍×主要無機要素, スクロース 10 g/l, 寒天 8 g/l) を分注したマゼンタボックスに播種し 25°C, 16 時間照明下で培養し供試材料とした。

Agrobacterium tumefaciens の菌系としては強病原性の EHA101 を用いた。

* 東京農科大学大学院農学研究科農学専攻

** 株式会社ベックス生化学部

*** 玉川大学農学部生物環境システム学科

**** 国立遺伝学研究所名誉教授

***** 東京農科大学名誉教授

***** 東北大学大学院農学研究科

2. タバコ巻葉ウイルスの抽出とアグロバクテリウムベクターへの導入

1989年に大阪府立大学農学部尾崎武司教授よりトマトに感染していたタバコ巻葉ウイルス-奈良分離株の分譲を受け、トマトに接ぎ木接種による継代を行い-80°Cで保存した感染葉を実験材料として用いた。

全DNA抽出はDELLAPORTA *et al.*, (1983)¹⁹⁾らの改変法を用いた。-80°Cで冷凍保存した30mgのトマトに感染しているTbLCV感染葉を乳鉢に入れ、氷上で粉状になるまで磨砕し、300 μ lの抽出緩衝液[0.1M Tris-HCl (pH 8.0), 0.05M EDTA (pH 8.0), 0.5M NaCl, 1% 2-メルカプトエタノール]を加え再び磨砕した。13,100g, 4°C, 10分間遠心して、上清を新しいマイクロチューブに移した。次に、最終濃度が1%となるようにSDS (Sodium dodecyl sulfate)を加え65°Cで10分間静置し、200 μ lの5M CH₃COOKを加え溶液をよく混合し、氷上で20分間静置した。その後、13,100g, 4°C, 10分間遠心し、上清を新しいマイクロチューブに移した。0.7倍量の2-ブロパノールを加えよく混合し、-20°Cで30分間静置した後、13,100g, 4°C, 30分間遠心して核酸を沈殿させ、真空乾燥機で乾燥した後に、200 μ lの滅菌水に溶解した。抽出した全DNAをもとにTbLCVの外被タンパク質領域をPCR法によって増幅し、pGEM-T EasyVector (Promega)にサブクローニングし、大腸菌JM109へ形質転換した。なお、プライマーはSHIMIZU *et al.*, (1999)²⁰⁾のTbLCV外被タンパク質遺伝子の塩基配列に基づいて次のように設計した。

CP1 (5'-GCTCTAGAGACCTTCAAGATCTGGAC-3')

CP2 (5'-GCTCTAGAGAACTATGTCGAAGCGCT-3')

PCRの反応条件は、第1段階として94°C, 5分間を1サイクル、第2段階として94°C, 1分間, 65°C, 1分20秒間, 72°C, 2分40秒間を25サイクル、第3段階として72°C, 7分間を1サイクルに設定して行った。サブクローニングした外被タンパク質領域の塩基配列をDSQ-2000L (SHIMADZU), AFLexpress DNA Sequencer (Amersham Biosciences)を用いて調べDNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング)で塩基配列を解析した。

プラスミドは名古屋大学 中村研三教授から分譲を受けたpIG121Hmを用いた²¹⁾。pGEM-T EasyVectorから外被タンパク質領域をXba Iサイトで切り出し、アグロバクテリウムベクターであるpIG121HmのGUS遺伝子とGUS遺伝子のプロモーターである35Sプロモーターの間にあるXba Iサイトへ挿入した。アグロバクテリウムの形質転換はジーンバルサー (Bio-Rad 社製)を使用し、エレクトロポレーション法で行った。形質転換の確認と導入遺伝子の確認はPCRで行った。正方向時にはプライマーCP2とgus671c (5'-ATCACGCAGTTCAACGCTGAC-3')で逆方向時にはプライマーCP1とgus671cでそれぞれ約2kbpのバンドが検出できるように設計した。反応条件は第1段階として94°C, 3分間を1サイクル、第2段階として94°C, 1分間, 55°C, 1分間, 72°C, 2分間を25サイクル、第3段階として72°C, 7分間を1サイクル行った。

3. タバコの形質転換

アグロバクテリウム EHA101は28°C, 3日間, 100mg/l カナマイシンおよび15g/l寒天を添加したAB培地 (K₂HPO₄ 1.2g/l, NaH₂PO₄ 0.4g/l, NH₄Cl 10.4g/l, MgSO₄ 7H₂O 0.12g/l, KCl 0.06g/l, CaCl₂ 2H₂O 5mg/l, FeSO₄ 7H₂O 1mg/l, グルコース 5g/l)で培養した。得られたシングルコロニーを28°C, 16時間, 100mg/lカナマイシンを添加したAB液体培地で培養し、得られたアグロバクテリウム懸濁液に約1cm四方に切ったタバコの葉を入れ5分間感染させた。感染後MSNB培地 (MS培地+, NAA 0.1mg/l, BA 1mg/l, 寒天 8g/l)で2日間共存培養した。共存培養後、選抜培地であるMSNBCaK培地 (MS培地+, NAA 0.1mg/l, BA 1mg/l, カナマイシン 100mg/l, カルベニシリン 250mg/l, 寒天 8g/l)に移した。継代培養は選抜培地移植後、最初は1週間目にその後は2週間ごとに行った。

4. 形質転換の確認と分離比の算定

再分化したシュートを250mg/lセフトキシム, 250mg/lカルベニシリンを含むMS液体培地で1時間以上浸し、除菌を行い10mlのMSCaK培地 (MS培地+, カナマイシン 100mg/l, カルベニシリン 250mg/l, 寒天 8g/l)の入っている管びんに1本ずつ移植した。1ヶ月後濃緑色の葉を保っているものからDNAを抽出し、PCRで外被タンパク質遺伝子の確認を行った。

外被タンパク質遺伝子の確認できた個体 (T0)を養成し、T1種子を採取後、選抜マーカーである抗生物質耐性の有無により分離比を算定し導入遺伝子のコピー数を算定した。抗生物質耐性の有無を判別するための最適濃度を定めるために、まず非形質転換タバコの抗生物質感受性を調べた。10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200mg/lのハイグロマイシンを添加したMS培地に70%エタノールで30秒, 1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で10分表面殺菌した後、滅菌水で3回洗浄した種子を播種した。1シャーレあたり100粒播種し1区画2シャーレずつ行った。カナマイシン耐性の検定においても同様の方法で行った。

組換え体のT1種子は上記と同様に表面殺菌し、100mg/lハイグロマイシンを含むMS培地の入ったシャーレにおいて1シャーレにつき100粒播種し、1個体につき3シャーレ行った。遺伝子座のコピー数が1コピー, 2コピー, 3コピーの場合に期待される分離比の適合性をカイ二乗法で検定した²³⁾。

T1種子を播種し、発芽した個体の葉からDNAを抽出しPCRを行い、外被タンパク質遺伝子の確認できた個体をT2世代の採種に用いた。T2種子においても同様の培地を入れた2シャーレで検定を行い、導入遺伝子のホモ化の有無を調べた。

ハイグロマイシンに耐性を示さない系統1-19, 1-37, 2-60-3, ハイグロマイシン耐性を持つ系統1-74においては、ハイグロマイシン耐性遺伝子をPCRで確認した。プライマーはHPH-1 (5'-GCTGGGGCGTCGTCGGTTTCCA-CTATCCG-3') HPH-2 (5'-CGCATAACAGCGCTCAT-

TGACTGGAGC-3') を用い PCR 条件は, 第 1 段階として 94°C, 5 分間を 1 サイクル, 第 2 段階として 94°C, 1 分間, 56°C, 1 分間, 72°C, 1 分間を 30 サイクル, 第 3 段階として 72°C, 5 分間を 1 サイクルに設定して行った。

結果および考察

1. 外被タンパク質遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列

pGEM-T EasyVector へサブクローニングした結果, 3 つのクローンを得ることができた。塩基配列を調べたところ 3 つのクローンのうち 2 つのクローンは同じ塩基配列を示し, 残りの 1 つのクローンは開始コドンの ATG の T が C に置換されて ACG となっていた。開始コドンを持つクローンを pTLCP1, 置換しているクローンを pTLCP2 とした。得られた 3 つのクローンのうち 2 つが同じ塩基配列を示し, 残りの 1 つのクローンも開始コドンの 1 塩基以外は同じ塩基配列を示したことから, 単一ゲノムのジェミニウイルスである TbLCV は外被タンパク質なしでは増殖しないことから³⁻⁵⁾, この開始コドンを持たないクローン pTLCP2 は PCR の際に生じた偶然の変異によるものと考えられた。

得られた 2 つのクローンを, タバコ巻葉ウイルス-奈良分離株 (TbLCV-Jp; Genbank Accession No. AB028604)²²⁾ と比較した。TbLCV-Jp と pTLCP1 を比べると 3 塩基違い, 386 塩基目の T が C に, 525 塩基目の T が C に, 588 塩基目の A が G に置換されていた。アミノ酸においては 129 番目のメチオニンがトレオニンに変化していたが他の 2 カ所ではアミノ酸レベルでは変化がなかった。奈良分離株 TbLCV-Jp と塩基配列が 3 塩基の違いがあったのは, 奈良分離株の感染葉を接ぎ木接種法により継代維持していたためにウイルスの世代が TbLCV-Jp と違い, 世代が進んで生じた変異¹⁰⁾ と考えられた。

TbLCV-Jp と pTLCP2 を比べると 4 塩基違い, 開始コドンの ATG の T が C に置換されて ACG となっており, 開始コドンが存在せず, 外被タンパク質遺伝子が翻訳されない遺伝子となっていた。他は pTLCP1 との場合と全く同じだった。

pTLCP1 を導入した植物では外被タンパク質によって引き起こされると考えられる cross-protection でウイルスの増殖をおさえ, 外被タンパク質遺伝子が産生されない pTLCP2 については, pTLCP1 を導入した外被タンパク質を作るタバコとは異なり RNA からタンパク質の翻訳を抑えるジーンサイレンシングによってウイルスの増殖をおさえようとするものである。

2. アグロバクテリウムベクターへのクローニング

pTLCP1 から外被タンパク質遺伝子を制限酵素を用いて切り出し, ベクター pIG121Hm へクローニングした結果, 正方向でベクターへ導入したクローンを得ることができた。得られたクローンを pIGCP56 と命名した。同様に pTLCP2 から得られたクローンを pIGCP40 と命名した。正方向ではプライマー CP2 と gus671c で約 2 kbp のバン

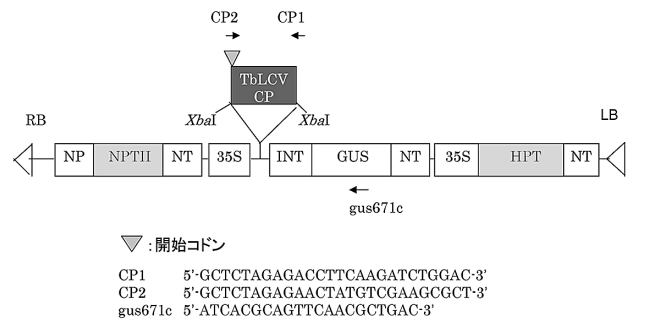


図 1 pIG121Hm の T-DNA 領域の遺伝子地図およびプライマー結合部位

ドを逆方向ではプライマー CP1 と gus671c で約 2 kbp のバンドを検出することができた。

pIGCP56 をアグロバクテリウム EHA101 へ形質転換したものを EHpIGCP56 と, pIGCP40 をアグロバクテリウム EHA101 へ形質転換したものを EHpIGCP40 と命名した。

3. T1 世代における分離比

非形質転換タバコのハイグロマイシンおよびカナマイシンに対する感受性を調べた結果, どちらの場合も 100 mg/l を添加した MS 培地において十分に生育を抑制し濃緑色の葉を保たなかった (データは示していない)。100 mg/l のハイグロマイシンを添加した MS 培地での反応をもとに分離比を算定した。ハイグロマイシンに対して耐性を持たない系統に対しては 100 mg/l のカナマイシンを添加した MS 培地を用いて検定し分離比を算定した。

再分化個体をカナマイシンを含む MS 培地を入れた管びんに 1 本ずつ移植し選抜を行った結果, pTLCP1 を導入したタバコ, pTLCP2 を導入したタバコのどちらにおいても 80% 以上の個体で濃緑色の葉をたもった。PCR による外被タンパク質遺伝子を確認した結果, pTLCP1 と pTLCP2 を導入したタバコのどちらにおいても濃緑色の葉をたもった個体の 90% 以上で外被タンパク質遺伝子を確認できた。

pTLCP1 を導入したタバコの T1 世代では発芽した個体のすべてにおいてハイグロマイシンに対する耐性を示す系統はなかったことから, T1 世代で外被タンパク質遺伝子をホモ化できた系統はなかったと考えられた (表 1)。分離比から系統 1-8, 1-81 では導入遺伝子が 2 コピーであると考えられた (表 1)。系統 1-5 は分離比から 2 コピーと推定されたが, P 値が 1% 以下の危険率だったので再実験の必要があると考えられた。系統 1-81 においては 1 回目と 2 回目の分離比に差がみられた。この差は同一染色体上の同じ位置に連続して導入遺伝子が挿入されているか, 同一染色体上の近い位置に導入遺伝子が挿入したために, メンデル遺伝の分離をしない可能性があると考えられた (表 1)。系統 1-55 においては分離比から導入遺伝子が 3 コピーだと

表 1 pTLCP1 遺伝子を導入した T1 系統の幼植物における抗生物質耐性遺伝子の分離

系統番号	ハイグロマイシン耐性	カナマイシン耐性(注1)	発芽(%)	発芽数	感受性個体数	耐性個体数	分離比	χ^2 (注2)	P	推定コピー数
1-5	0	-	99.7	299	33	266	13.1	11.693	0-0.01	2
1-6	0	-	96.7	290	64	226	13.5	1.329	0.20-0.30	1
1-8	0	0	99.3	298	24	274	11.4	1.655	0.10-0.20	2
1-18	0	-	99.3	298	71	227	13.2	0.219	0.50-0.70	1
1-19	x	0	99.3	298	68	230	13.4	0.756	0.30-0.50	1
1-37	x	0	99.7	299	60	239	14.0	3.681	0.02-0.05	1
1-42	0	-	99.3	298	76	222	12.9	0.040	0.80-0.90	1
1-44*	0	0	28.3	85	20	65	13.3	0.098	0.70-0.80	1
1-44*	0	0	93.7	281	69	212	13.1	0.030	0.80-0.90	1
1-46	0	0	95.7	287	82	205	12.5	1.952	0.10-0.20	1
1-49	0	-	95.3	286	77	209	12.7	0.564	0.30-0.50	1
1-53	0	-	99.3	298	69	229	13.3	0.541	0.30-0.50	1
1-55	0	-	91.0	273	2	271	1135.5	1.222	0.20-0.30	3
1-57	0	-	99.0	297	76	221	12.9	0.055	0.80-0.90	1
1-60	0	-	98.3	295	75	220	12.9	0.028	0.80-0.90	1
1-67	x	0	97.3	292	69	223	13.2	0.292	0.50-0.70	1
1-74	0	0	94.0	282	75	207	12.8	0.383	0.50-0.70	1
1-78	0	-	99.0	297	75	222	13.0	0.010	0.90-0.95	1
1-81*	0	-	79.3	238	54	184	13.4	0.678	0.30-0.50	1
1-81*	0	-	99.3	298	26	272	110.5	3.115	0.05-0.10	2

(注) xは拒抗性なし、-は実験を行っていないことを示す
 (注1) ハイグロマイシン耐性を持たないものはカナマイシン培地で行った
 (注2) 分離比1.3, 1.15, 1.63の場合で計算したうちで最小値を χ^2 値とした
 (注3) *は1回目の発芽率が90%以下だったためにやり直したことを示す

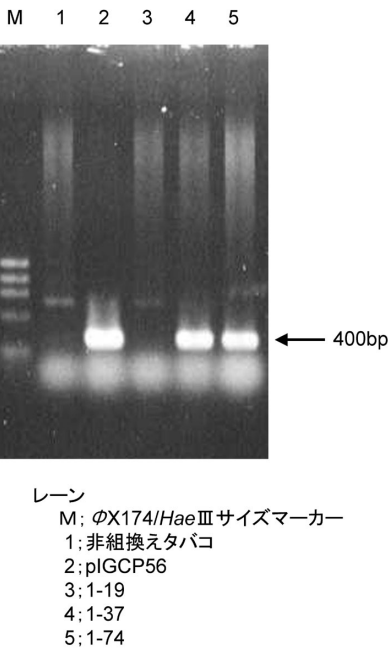


図 2 ハイグロマイシン耐性遺伝子の PCR による確認 (矢印の 400 bp はハイグロマイシン耐性遺伝子を示す)

考えられた。それ以外の系統は分離比からいずれも 1 コピーであると考えられた (表 1)。ハイグロマイシンに対して耐性を示さなかった系統 1-19, 1-37, 耐性を示した系統 1-74 について、ハイグロマイシン耐性遺伝子の有無を PCR で確認したところ、系統 1-19 では検出できなかった (図 2)。ハイグロマイシン耐性遺伝子が検出できなかったのは、アグロバクテリウム感染のときにハイグロマイシン耐性遺伝子の部分が抜け落ちた可能性があると考えられた。耐性を持たない系統 1-37 と耐

表 2 pTLCP2 遺伝子を導入した T1 系統の幼植物における抗生物質耐性遺伝子の分離

系統番号	ハイグロマイシン耐性	カナマイシン耐性(注1)	発芽(%)	発芽数	感受性個体数	耐性個体数	分離比	χ^2 (注2)	P	推定コピー数
2-2	0	-	99.0	297	75	222	13.0	0.010	0.90-0.95	1
2-12	x	0	97.0	291	69	222	13.2	0.258	0.50-0.70	1
2-14	x	0	97.7	293	76	217	12.9	0.138	0.70-0.80	1
2-20	0	-	98.7	296	68	228	13.4	0.649	0.30-0.50	1
2-23	x	0	97.7	293	70	223	13.2	0.192	0.50-0.70	1
2-24	x	0	96.3	289	72	217	13.0	0.001	0.95-0.98	1
2-25	0	-	92.3	277	5	272	154.4	0.106	0.70-0.80	3
2-29	0	-	86.7	260	74	186	12.5	1.662	0.10-0.20	1
2-34	x	0	96.7	290	73	217	13.0	0.005	0.90-0.95	1
2-42	0	-	99.3	298	69	229	13.3	0.541	0.30-0.50	1
2-46	0	-	97.7	293	74	219	13.0	0.010	0.90-0.95	1
2-48*	0	-	74.3	223	8	215	126.9	2.698	0.10-0.20	2
2-48*	0	-	86.7	260	15	245	116.3	0.103	0.70-0.80	2
2-52	0	-	99.3	298	14	284	120.3	1.225	0.20-0.30	2
2-53	x	0	93.0	279	61	218	13.6	1.464	0.20-0.30	1
2-60	0	-	99.7	299	78	221	12.8	0.188	0.50-0.70	1

(注) xは拒抗性なし、-は実験を行っていないことを示す
 (注1) ハイグロマイシン耐性を持たないものはカナマイシン培地で行った
 (注2) 分離比1.3, 1.15, 1.63の場合で計算したうちで最小値を χ^2 値とした
 (注3) *は1回目の発芽率が90%以下だったためにやり直したことを示す

性を持つ系統 1-74 においてはハイグロマイシン耐性遺伝子の検出ができた (図 2)。ハイグロマイシン耐性遺伝子が検出できたにも関わらず、ハイグロマイシンに対して耐性を示さなかった系統 1-37 は転写抑制型、または転写後抑制型のジーンサイレンシングの可能性を示した。

pTLCP2 を導入したタバコの T1 世代において、系統 2-48, 2-25 において分離比から導入遺伝子が 2 コピーであると考えられ、系統 2-25 においては分離比から導入遺伝子が 3 コピーであると考えられた (表 2)。

4. T2 世代における導入遺伝子のホモ化

pTLCP1 を導入したタバコの T2 世代において、系統 1-8-6, 1-57-4, 1-74-1, については発芽した個体すべてがハイグロマイシンに対して耐性を示したことから導入遺伝子がホモ化できたと考えられた (表 3)。ホモ化できたと考えられる系統 1-74-1 の 20 個体から DNA を抽出し導入遺伝子を確認したところ、抽出した 20 個体すべてにおいて確認された (図 3)。

pTLCP2 を導入したタバコの T2 世代において系統 2-34-2, 2-48-1, 2-48-2, 2-60-3 において発芽した個体すべてでハイグロマイシンもしくはカナマイシンに対して耐性を示したことから導入遺伝子がホモ化できたと考えられた (表 3)。

ハイグロマイシン耐性を持たない系統 2-60-3 の 6 個体から DNA を抽出し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を確認したところ、6 個体すべてにおいてハイグロマイシン耐性遺伝子が確認できた (図 4)。2-60-3 の系統では発芽 1 週間目ではハイグロマイシンに対して耐性を示したが、その後徐々にハイグロマイシンに対する耐性を示めさなくなった (データは示してない)。ハイグロマイシン耐性を失った理由としては、ハイグロマイシン耐性遺伝子が検出できたことから転写後抑制型ジーンサイレンシングが起きている可

表 3 T2 世代の遺伝子の確認と分離比および固定の有無

導入遺伝子	系統番号	ハイグロマイシン耐性	カナマイシン耐性	分離比	固定の有無
pTLCP1	1-8-6	○	—	なし	◎
	1-18-2	○	—	1:3.00	x
	1-18-4	○	—	1:2.65	x
	1-19-1	—	○	1:2.77	x
	1-57-4	○	—	なし	◎
	1-74-1	○	—	なし	◎
	1-74-5	○	—	1:3.35	x
	1-74-7	○	—	1:2.14	x
	1-78-1	○	—	1:3.00	x
	1-78-8	○	—	1:3.52	x
1-78-9	○	—	1:3.24	x	
pTLCP2	2-29-1	○	—	1:4.08	x
	2-29-5	○	—	1:3.83	x
	2-29-9	○	—	1:3.00	x
	2-34-2	x	○	なし	◎
	2-34-7	—	○	1:3.02	x
	2-48-1	○	—	なし	◎
	2-48-2	○	—	なし	◎
	2-48-4	○	—	1:2.50	x
	2-48-5	○	—	1:2.67	x
	2-60-2	○	—	1:2.02	x
2-60-3	x	○	なし	◎	

(注) —は実験を行っていないこと, xは耐性がないこと, ○は耐性があることを示す。
◎は固定できたことを示す。分離比でなしは比にできなかったことを示す。

能性が高いと考えられた。

今回の研究により外被タンパク質を作る遺伝子 pTLCP1 と作らない遺伝子 pTLCP2 の二種類の外被タンパク質遺伝子について, それぞれ 1 コピーおよび 2 コピーを導入したタバコの組換え体を作成し, 更に固定系統を得ることに成功した。これらの系統は TbLCV の外被タンパク質遺伝子を導入したタバコにおける外被タンパク質発現の有無とコピー数が抵抗性にどのように関わるかを研究するうえで貴重な材料となると考えられる。

謝辞: プラスミド pIG121Hm ベクターを分譲していただきました名古屋大学 中村研三教授に御礼申し上げます。

本報告を作成するにあたり御校閲していただきました駒嶺 穆東北大学名誉教授に御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり, ご指導いただいた東京農業大学農学部農学科園芸バイオテック学研究室 雨木若慶助教授に御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり指導いただいた清水佐知子氏, 北村健一氏に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) STANLEY, J. and JONATHAN, R.L., 1992. A symptom variant beat curly top geminivirus produced by open reading frame C4. *Virology*, **190** (1), 506-509.
- 2) 尾崎武司, 1985. 我が国に発生するコナジラミ伝搬性ウイルスの同定分類と発生生態に関する研究. 文部科学省研究補助金 一般研究 (B) 研究結果報告.
- 3) HOWARTH, A.J. and GEORGE, J.V., 1989. Phylogeny of geminiviruses., *J. Gen. Virol.*, **70** (10), 2717-2727.
- 4) SAIKIA, A.K. and MUNIYAPPA, V., 1989. Epidemiology and control of tomato leaf curl virus in southern India. *Trop. Agric.*, **66** (4), 350-354.
- 5) PADIDAM, M., ROGER, N.B. and CLAUDE, M.F., 1996. The role

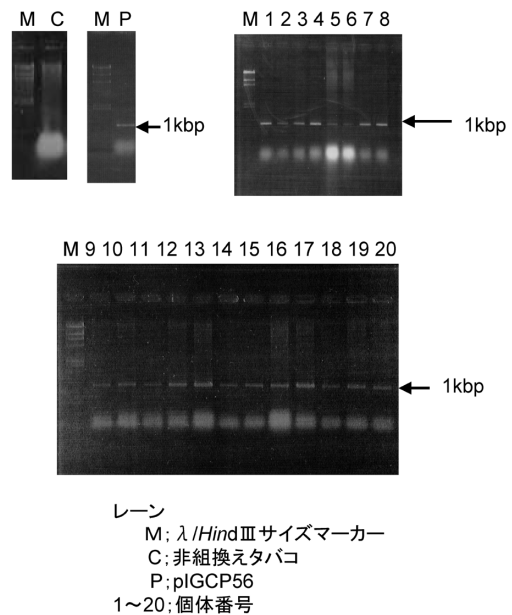


図 3 T2 世代の 1-74-1 系統の 20 個体における外被タンパク質遺伝子の PCR による確認 (矢印の 1 kbp は外被タンパク質遺伝子を示す)

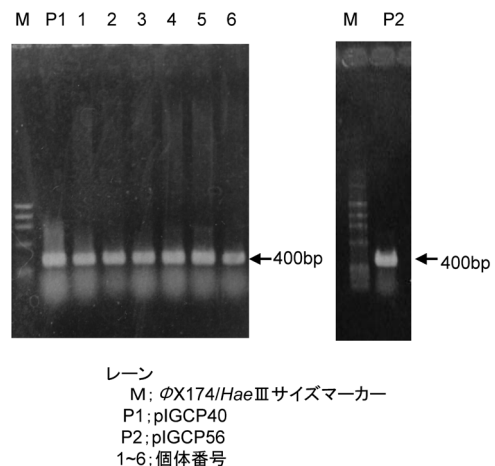


図 4 2-60-3 系統におけるハイグロマイシン耐性遺伝子の PCR による確認 (矢印の 400 bp はハイグロマイシン耐性遺伝子を示す)

of AV2 ("Precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology*, **224**, 390-404.

- 6) 小島博文・尾崎武司・井上忠男, 1981. トマト黄化萎縮病の発生生態とその防御. 関西病中研報, **23**, 8-14.
- 7) 尾崎武司・小島博文・井上忠夫, 1976. ワタコナジラミで媒介されるトマトの新病害「黄化萎縮病」. 植物防疫, **30** (11), 28-32.
- 8) 尾崎武司・小島博文・井上忠夫, 1979. タバコ巻葉ウイルスによるスイカズラ (*Lonicera japonica* Thunb.) の葉脈黄化病状. 日植病報, **45**, 62-69.
- 9) 井上忠男・尾崎武司, 1980. 植物ウイルス病に関するもっとも古い記録とみられる万葉集の歌について. 日植病報, **23**, 49-50.
- 10) 北村健一, 2002. 東京農業大学大学院 農学研究科 農学

専攻 修士論文.

- 11) 桐山 清・西村紀子, 1969. 東北地方におけるタバコのウイルス病について. 盛岡たばこ試研場報告, **4**, 85-97.
- 12) PAWELL, P.A., NELSON, R.S., HOFFMANN, N., ROGER, S.G., FRALEY, R.T. and BEACHY, R.N., 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Sciencs*, **232**, 738-743.
- 13) GADANI, F., MANSKY, L.M., MEDICI, R., MILLER, W.A. and HILL, J.H., 1990. Genetic engineering of plants for virus resistance. *Arch Virol.*, **115** (1-2), 1-21.
- 14) FITCHEN, J.H. and BEACHY, R.N., 1993. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu Rev Microbiol.*, **47**, 739-763.
- 15) HACKLAND, A.F., RYBICKI, E.P. and THOMSON, J.A., 1994. Coat protein-mediated resistance in transgenic plants. *Arch Virol.*, **139** (1/2), 1-22.
- 16) LOMONOSSOFF, G.P., 1995. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu Rev Phytopathol.*, **33**, 323-343.
- 17) MILLER, E.D. and HEMENWAY, C., 1998 History of coat protein-mediated protection. *Meth Mol Biol.*, **81**, 25-38.
- 18) MURASHIGE, T. and SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with Tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, **15**, 473-497.
- 19) DELLAPORTA, S.L., JONATHAN, W. and JAMES, B.H., 1983. A plant DNA miniprep: Version II: *Plant molecular biology reporter.*, **4** (1), 19-21.
- 20) SHIMIZU, S. and IKEGAMI, M., 1999. Complete nucleotide sequence and the genome organization of tobacco leaf curl geminivirus from Japan. *Microbiol Immunol.*, **43** (10), 989-992.
- 21) OHTA, S., MITA, S., HATTORI, T. and NAKAMURA, K., 1990. Construction and expression in tobacco of betaglucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.*, **31** (6), 805-813.
- 22) KITAMURA, K., MURAYAMA, A. and IKEGAMI, M., 2004. Evidence for recombination among isolates of Tobacco leaf curl Japan virus and Honeysuckle yellow vein mosaic virus. *Arch Virol.*, **149** (6), 1221-1229.
- 23) 齋藤靖人・大野隆弘・小鞠敏彦, 1998. サテライト RNA 遺伝子を導入したキュウリモザイクウイルス耐病性タバコの作出. 葉たばこ研究報告, **7**, 177-201.

Agrobacterium-mediated Introduction
of Coat Protein Gene of *Tobacco leaf curl virus* (TbLCV)
to Tobacco Plants and Production
of Homozygous Plants

by

Takashi NIKAMI*, Miho TANIGUCHI**, Naoto KADOTANI***, Hiroko MORISIMA****,
Seinosuke TANDA***** and Masato IKEGAMI*****

(Received March 14, 2005/Accepted September 13, 2005)

Summary : Coat protein gene of *Tobacco leaf curl virus* was introduced to *Nicotiana tabacum* cv Burley 21 by mediation with *Agrobacterium tumefaciens*. Transgenic plants obtained were inbred, offspring plants were harvested and then segregation ratios were computed of T1 generation plants using resistance for hygromycin as a marker trait. For results obtained, copy numbers of introduced coat protein gene were inferred. We obtained transgenic plants containing one copy, two copies and three copies of introduced coat protein gene. The homozygous lines were obtained by inbreeding of transgenic tobacco plants which contained one or two copies of introduced coat protein gene.

Key words : coat protein, tobacco, transformation

* Department of Agricultural Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Bio Chemist Division of BEX. CO., LTD.

*** Department of Bioenvironmental Systems, Faculty of Agriculture, Tamagawa University

**** Professor Emeritus, Research Organization of Information and Systemes National Institute of Genetics

***** Tokyo University of Agriculture (Honorary Professor)

***** Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University