

## Agrobacterium法による形質転換の幅広い宿主への適用

小西 正朗

植物細胞への遺伝子導入法として知られるアグロバクテリウム形質転換法 (*Agrobacterium-mediated transformation*, ATMT) が、幅広い宿主にも適用できることをご存じだろうか。ATMT法は、双子葉植物にクラウンゴールと呼ばれる腫瘍を引き起こす原因菌である *Agrobacterium tumefaciens* の感染機構を利用した形質転換方法であり、Tiプラスミド中のVir (Virulence) 領域とT-DNA (Transferred DNA) 領域が関わっている。双子葉植物が生産するAcetosyringoneなどのフェノール性物質を誘導物質として、T-DNAの切り出しや植物細胞への転移が起こり、Vir遺伝子群の作用で植物の染色体にT-DNAが組み込まれる。通常、25 bpの境界配列に挟まれたT-DNA内には腫瘍形成に必要な遺伝子が組み込まれているが、これらの遺伝子はDNAの移送や組込みには関与していないため人工的な配列に置き換えることができる。現在では、Vir領域のみを含むプラスミドを保持した*A. tumefaciens*株にT-DNA領域を含むベクターを導入するバイナリーベクター法が主流となっている。この方法はAcetosyringoneを生産しない単子葉植物に適用できることが知られている。

1995年にBundockらは、ATMTが*Saccharomyces cerevisiae*の形質転換に利用できることを報告した<sup>1)</sup>。また、de Grootらは、糸状菌にも適用できることを報告した<sup>2)</sup>。*Aspergillus awamori*では従来法よりも600倍高い形質転換効率を示し、*Aspergillus niger*, *Fusarium venenatum*, *Trichoderma reesei*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Neurospora crassa*などの糸状菌やマッシュルームとして知られる食用キノコ*Agaricus bisporus*に適用できることを報告した。真菌にATMT法を適用する場合、T-DNA領域に酵母の選択マーカーと真菌内で自己複製可能な自立複製因子(ARS)を含んだ形もしくは相同組換え領域を含む形で外来DNAを挿入したTiプラスミドを作製し、Vir領域を含むpAL4404を保持している*A. tumefaciens* LBA4404株などにエレクトロポレーション法で形質転換させる。その後、真菌細胞と*A. tumefaciens*形質転換体を混合し、Acetosyringoneを含む培地上に置いたニトロセルロースフィルター上で培養して感染させる。次に、フィルター上の菌を、chloramphenicolを含む真菌用の選択培地中に播種、培養し、*Agrobacterium*を排除して感染が確立した細胞のみを選択的に増殖させることで形質転換体を得る。自己複製因子を含むベクターを

用いた場合、T-DNA領域の配列は非相同末端結合によって細胞内でプラスミドとして再構成され、細胞内に留まる。また、相同組換え領域を含むベクターを使用した場合、homologous recombinationにより、T-DNA領域がゲノム上に移される。この際、Vir領域の病原性に関与する遺伝子(VirE2, VirE3, VirD5, VirF)は、必要ないことが報告されている<sup>3)</sup>。ATMT法は、エレクトロポレーションによる形質転換よりも高い効率が得られることが多いようである<sup>4)</sup>。感染時の培地pHやニトロセルロースフィルターの乾かし方によって形質転換効率に影響することが報告されている<sup>5)</sup>。

ATMTを利用した真菌の物質生産に係る研究例はいくつかあり、AndoらはEicosapentaenoic acidの生産株の育種にATMT法を用いて*Mortierella alpina*のn-3不飽和脂肪酸の生産性を改善した株の育種に成功している<sup>6)</sup>。Liuらは、ATMTの高い形質転換効率を利用して、*Rhodotorula toruloides*のゲノムワイドな挿入変異体ライブラリーを作製し、カロテノイド生合成に関わる新規遺伝子を同定した<sup>7)</sup>。

さらに面白いことに、ATMT法は動物の培養細胞にも適用できることも報告されている<sup>8)</sup>。これらの報告は、植物への*Agrobacterium*の感染機構に係る遺伝子送達システムが幅広い生物種でユニバーサルに適用できることを示している。しかしながら、ATMT法は*Agrobacterium*と目的宿主に対し2段階の形質転換を行う必要があり、比較的容易に高い効率で形質転換が可能な宿主での利用においては優位性がないように思われる。一方、形質転換効率が低い宿主や組換え系が一般化していない宿主へのATMTの適用は一考の価値があるように思える。たとえば、組換え系が一般化していない*Saccharomyces cerevisiae*以外の酵母(non-conventional yeast)などを研究する場合には、強力なツールになりうると思われる。

- 1) Bundock, P. et al.: *EMBO J.*, **14**, 3206 (1995).
- 2) de Groot, M. J. A. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **16**, 839 (1998).
- 3) Hooykaas, P. J. J. et al.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **418**, 349 (2018).
- 4) Lianghui, J. et al.: *Fungal Genet. Biol.*, **47**, 279 (2010).
- 5) Sun, L. et al.: *Biotechnol. Lett.*, **36**, 1309 (2014).
- 6) Ando, A. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 5529 (2009).
- 7) Liu, Y. et al.: *BMC Microbiol.*, **18**, 14 (2018).
- 8) Kunik, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1871 (2001).