



愛媛大学  
Ehime University

# 植物におけるStreptomycin感受性の再評価と選抜マーカーとしての利用

○三木 葵葉・島谷 真奈・秋山 樹菜・小林 括平・賀屋 秀隆

愛媛大学・農学部・食料生産学科



## 要 旨

形質転換植物の選抜用抗生物質としてStreptomycinの利用の可能性について検証している。従来よりHygromycinやKanamycinの利用が主流であるが、Streptomycinはこれらよりも安価であるという利点がある。Streptomycinは、アミノグリコシド系抗生物質で、その作用機序は原核生物の30Sリボソームの16S rRNAに結合することによりタンパク質合成を阻害する。まずは、シロイヌナズナ (Col, *L. er*, *Ws*, C24), タバコ (*Nicotiana tabacum* SR1, *N. sylvestris*, *N. benthamiana*), イネ (Nipponbare) におけるStreptomycin感受性を評価した。シロイヌナズナ, タバコ, イネの発芽時においてそれぞれ30-50 mg/L, 50-300 mg/L, 300 mg/LでStreptomycin感受性が確認出来た。高い感受性を示したシロイヌナズナ ColにStreptomycin耐性遺伝子を形質導入し、選抜マーカーとしての利用を検証した。結果、GUS遺伝子を形質導入した形質転換体をStreptomycin (50 mg/L) を用いて単離出来ることが分かった。

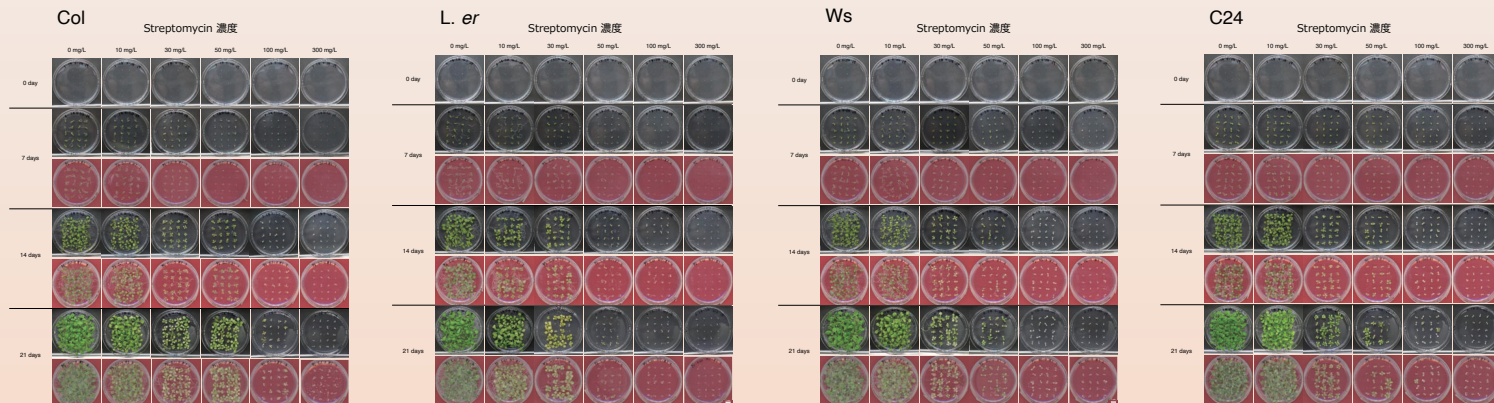


図1. シロイヌナズナのStreptomycin感受性

シロイヌナズナの野生型Col, *L. er*, *Ws*, C24の芽生えにおけるStreptomycin感受性を調べた。Colは50-100 mg/Lで感受性が見られた。*L. er*, *Ws*, C24では、30-50 mg/Lで感受性が見られた。全ての野生型でStreptomycin感受性を確認した。ただし、Colよりも*L. er*, *Ws*, C24はStreptomycin感受性が高いことが分かった。

## Nicotiana tabacum SR1

## Nicotiana sylvestris

## Nicotiana benthamiana

## Oryza sativa Nipponbare

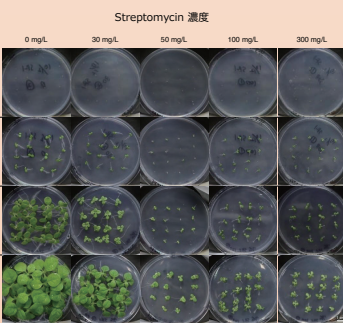


図2. タバコのStreptomycin 感受性

*Nicotiana tabacum* SR1, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana benthamiana*の芽生えにおけるStreptomycin感受性を調べた。50-300 mg/Lで感受性が見られた。

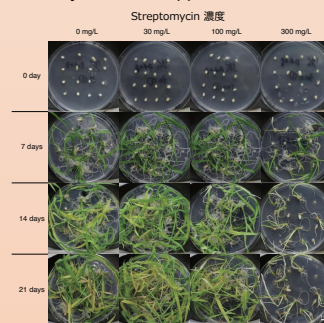
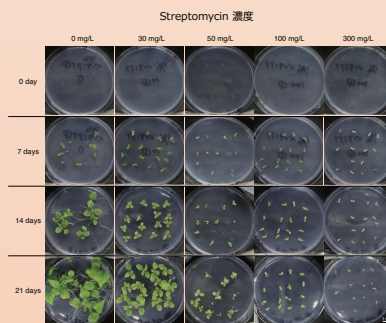
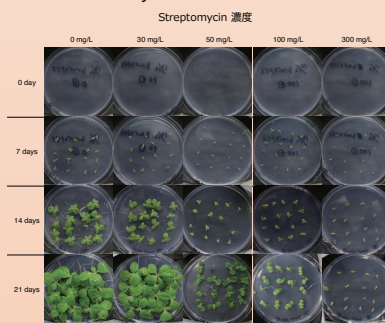
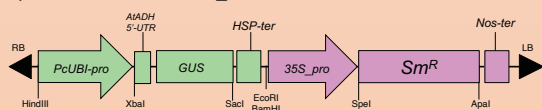


図3. イネのStreptomycin 感受性

*Oryza sativa* cv. NipponbareのStreptomycin 感受性を調べた。300 mg/Lで感受性が見られた。

## pRI-PcUBI-AtADH-GUS\_Sm<sup>R</sup>



Sm<sup>R</sup>: Streptomycin 3'-adenylyltransferase (ANT3)

MGEAVIAEVSTQLSEVVGIVRHLEPTLLAVHLYGSADVGLKPHSIDLLVTVTVRLE  
TTRRALINDLETSPGSEILRAVEVTIVVDIIPWRYPAKRELOFGGEWORNILAGI  
FEPATIDILAILTKAREHSVALVGPAAEELDFPVEQDLILNETLTLWNPPDWAGD  
ERINVLTLRIWYSVATGKIAPKDAADWAMERPAQYQVILEARQAYLGQEDRLAS  
RADOLEEFVHYVKGITKVVGK\*

## 図4. 植物における選抜マーカーとしてのStreptomycin耐性遺伝子発現binary vector

35S promoter でStreptomycin耐性遺伝子 (Sm<sup>R</sup>) を発現させる binary vector を構築した。Sm<sup>R</sup>遺伝子 (Streptomycin 3'-adenylyltransferase: ANT3) には*Escherichia coli* AadA1 gene (927bp, 309 a.a.) の部分配列を用いた。Sm<sup>R</sup> 遺伝子のコドンはシロイヌナズナ用に最適化した。各制限酵素サイトは1箇所切断の制限酵素サイトを表記。backbone vector: pRI binary vector (TaKaRa)

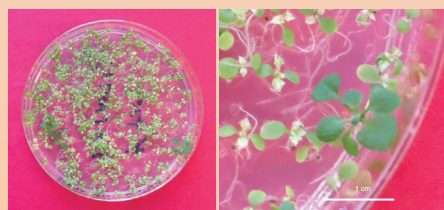


図5. シロイヌナズナ形質転換体T1 screening

pRI-PcUBI-AtADH-GUS\_Sm<sup>R</sup>を持つアグロバクテリウムでfloral dippingしたColのT1世代の種子をStreptomycin 50 mg/Lを含む培地に播種し、約2週間目の植物。他の個体と比較して生長している形質転換体候補のStreptomycin耐性個体を得た。

## Control

感受性個体



## pRI-PcUBI-AtADH-GUS\_Sm<sup>R</sup>

耐性個体

耐性個体

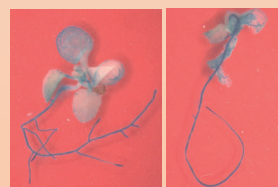


図6. Streptomycin耐性個体のGUS染色

T1 screeningで得られたStreptomycin耐性個体を用いてGUS染色をおこなった。controlとして感受性個体を用いた。耐性個体では全身でGUSによる染色を確認できた。Streptomycin耐性個体はGUS遺伝子を持つ形質転換体であると考えられる。

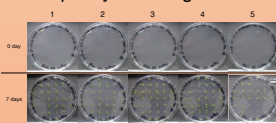
## Streptomycin 50 mg/L

## Streptomycin 100 mg/L

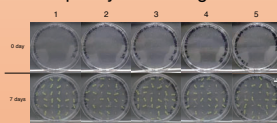
## Spectinomycin 100 mg/L

## Kanamycin 25 mg/L

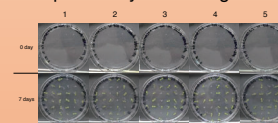
## Hygromycin 10 mg/L



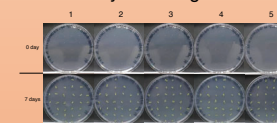
播種数: 150  
耐性個体数: 感受性個体数 = 114 : 36 ± 3.0 : 1.0



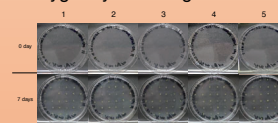
播種数: 150  
耐性個体数: 感受性個体数 = 99 : 51 ± 3.0 : 1.5



播種数: 149  
耐性個体数: 感受性個体数 = 108 : 41 ± 3.0 : 1.1



播種数: 144  
耐性個体数: 感受性個体数 = 0 : 144



播種数: 148  
耐性個体数: 感受性個体数 = 0 : 148

## 図7. Sm<sup>R</sup>形質転換体の各抗生物質への耐性の検証

Sm<sup>R</sup> 形質転換体T2世代の種子を用いて各抗生物質の耐性を検証した。Streptomycinでは、50, 100 mg/Lの高方で分離比が同じく約3:1であった。このことは、どちらの濃度でも形質転換体の選別が可能であることを示している。Streptomycinと同じくアミノグリコシド系の抗生物質であるSpectinomycinではStreptomycinと同じ分離比で耐性個体が分離した。このことは、StreptomycinあるいはSpectinomycinどちらでもSm<sup>R</sup>を持つ形質転換体を選別できることを示している。一方、同じくアミノグリコシド系の抗生物質のKanamycinにおいては全て枯死した。また、Hygromycinにおいても全て枯死した。このことは、Sm<sup>R</sup>遺伝子はKanamycin耐性遺伝子であるNPTII 遺伝子あるいはHygromycin耐性遺伝子のHPT遺伝子とは独立に形質転換体の選抜マーカーとして利用できることを示している。

結 論: Streptomycin耐性遺伝子であるSm<sup>R</sup>はシロイヌナズナにおいて形質転換体選抜マーカーとして利用できることを示した。

Sm<sup>R</sup>耐性遺伝子は分与可能です。お気軽にご連絡ください。