アグロバクテリウム法による形質転換ダイズ作出技術の現状

西澤けいと

抄　　録

アグロバクテリウム法による形質転換ダイズ作出の成功が報告されてから23年の間に進められた形質転換技術の進展と現状についてまとめた。アグロバクテリウム法によるダイズの形質転換には、未熟子葉から誘導される不定胚や、発芽種子の子葉節が利用されてきたが、様々な品種に適用しやすいという理由から発芽種子の子葉節にアグロバクテリウムを感染させる手法が現在の主流である。形質転換効率の向上を目的として、高感染性のアグロバクテリウムを利用することに加えて、感染効率を上げる手法（ダイズ組織の傷つけ処理やチオール化合物の共存培養培地への添加等）も開発され利用されている。また、選抜薬剤として以前はカナマイシンを用いる例が多かったが、現在ではハイグロマイシンや、グルホシネート等の除草剤も使用されている。これらの改良が行われたことにより、これまでに複数の米国品種や中国品種、数種の日本品種等で形質転換ダイズの作出が可能となった。形質転換効率（得られた形質転換体系統数/感染に用いた外植片数×100％）は１％未満から15％前後とまだ大きな差があるものの、目的に応じて品種を使い分けることも可能な状態となりつつある。さらに、形質転換効率の向上がもたらされたことにより、マーカーフリーダイズの作出法や特定遺伝子への変異導入法が開発される等、特に米国品種を用いて形質転換技術の高度化が進んでいる。日本品種の形質転換技術については、環境ストレス耐性付与等を目的とした応用研究へ利用できる水準ではあるが、効率の向上や適用品種数増加の余地があることから、今後さらに改良を行う必要があると思われる。

キーワード：大豆、アグロバクテリウム、形質転換、品種、子葉節

平成23年10月20日受付　平成24年２月２日受理

Current situation of *Agrobacterium*-mediated soybean transformation techniques

Keito Nishizawa

Abstract

More than twenty years have passed since transgenic soybeans were first developed by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. In this report, the development and current situation of *Agrobacterium*-mediated soybean transformation techniques are reviewed. Immature seeds which are able to produce somatic embryos and cotyledonary nodes of germinating seeds have been utilized for inoculation with *Agrobacterium*. Recently, cotyledonary nodes of germinating seeds have normally been used for inoculation because regeneration of plants from multiple shoots formed at cotyledonary nodes is easier in various cultivars than that from immature seeds via somatic embryogenesis. For the efficient introduction of exogenous genes into the soybean genome, in addition to the utilization of hypervirulent *Agrobacterium* strains, several improvements in the inoculation procedure (e.g. mechanical wounding of explants, and addition of thiol compounds into the co-cultivation medium) have been developed and applied. Whereas kanamycin was the main reagent previously used for the selection of transformants, hygromycin and herbicides such as glufosinate are also used these days. Various soybean cultivars including US and Chinese cultivars and several Japanese cultivars have been reported to be applicable to *Agrobacterium*-mediated transformation. Although the transformation efficiency (independent transgenic plants produced per 100 explants) still varies greatly (i.e. less than 1% ~15%), opportunities for researchers to use the cultivars which fit their needs for transformation are increasing. Several advanced techniques, such as the production of a marker-free transgenic soybean and targeted mutagenesis, have been developed using US cultivars following improvements in transformation efficiency. As for the transformation technique of Japanese cultivars, the number of cultivars applicable to transformation and the transformation efficiency are still low, though it is not impractical to utilize it for studies for various purposes, therefore, additional refinements are required.

Key Words: soybean〔*Glycine max* (L.) Merrill〕, *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*), transformation, cultivar, cotyledonary node

---

Accepted on 2 February, 2012

Ⅰ 緒　言

植物への外来遺伝子の導入法は直接導入法と間接導入法に大別されるが、間接導入法を代表する手法としてアグロバクテリウム法（*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation）があげられる。この方法は、アグロバクテリウムという土壌細菌が植物細胞に感染しDNAを送り込む能力を利用して、外来遺伝子を植物のゲノムDNAに導入する方法である。アグロバクテリウム法は、遺伝子の導入に特殊な装置を必要としないということや、遺伝子銃法等の直接導入法でしばしば問題となる導入遺伝子の断片化や多コピー化によるジーンサイレンシング（Reddy *et al*. 2003、El-Shemy *et al*. 2004）が起こりにくい（Olhoft *et al*. 2004）といった利点がある。アグロバクテリウム法によるダイズの形質転換は1988年に米国で初めて成功例が報告された（Hinchee *et al*. 1988）。当初は成功例の限られた難しい方法であったが、高感染株の利用や、感染に用いるダイズ組織の選択、形質転換体選抜条件の検討等の様々な改良が重ねられ、現在では、用いる品種にもよるが実行を試みれば形質転換ダイズの得られる可能性が高い技術となった。1996年に商業栽培が開始された除草剤（グリホサート）耐性ダイズは遺伝子銃法で作出されたものであった（Padgette *et al*. 1995）のに対し、2009年に商業栽培が開始された第二世代グリホサート耐性ダイズはアグロバクテリウム法により作出されたものである（Malven *et al*. 2006、Taylor *et al*. 2007）ということにも、近年のダイズ形質転換技術の著しい進展が現れている。本稿では、アグロバクテリウム法による形質転換ダイズ作出技術の進展と現状について現在までの研究報告をまとめる。

Ⅱ アグロバクテリウム法によるダイズの形質転換技術の進展と現状

アグロバクテリウム法によるダイズの形質転換技術について、まず初めに方法の比較を行い、その後に、いずれの方法においても形質転換体作出効率に影響を与えると考えられる共通の項目について論じる。なお、各方法のプロトコールについては培地の調製方法等も含めて詳細に記載されている文献（Ko *et al*. 2006、Olhoft *et al*. 2006）が出版されているため省略する。

1　形質転換体作出法および感染に用いる組織の比較

形質転換体作出法については、アグロバクテリウムを感染させる組織によりその後の操作が大きく異なることから、用いる組織ごとに大別される。アグロバクテリウムの感染に用いる組織は植物体再生能力を有することが必須であり、ダイズの場合には未熟種子（から誘導される不定胚）や、発芽種子の子葉節（の内部に存在する分裂組織）、芽生えの初生葉節（の内部に存在する分裂組織）が利用されている。

1）未熟種子を用いる方法

ダイズ未熟種子を用いる場合（表１、方法SE）には、子葉の一部を切り出して調製した外植片（図１）をアグロバクテリウム懸濁液に浸した後、共存培養培地に置床し４～５日間培養する（感染）。除菌操作によりアグロバクテリウムを取り除いた後、オーキシン（2,4-D）および選抜薬剤を含む培地上で形質転換不定胚（somatic embryo）の誘導を行い、不定胚の成熟および発芽を経て植物体へと再生させる（Parrott *et al*.

1989、Ko *et al.* 2003）。この方法での形質転換効率について1.1～1.7％との報告がある（Ko *et al.* 2003）。しかし、不定胚の誘導効率や植物体への再生効率は品種により大きく異なるため（Komatsuda and Ohyama 1988、Parrott *et al.* 1989、Bailey *et al.* 1993、Hiraga *et al.* 2007）、実質的に利用されているのは両者の効率の優れた「Jack」に限られている（Lim *et al.* 2005）。また、不定胚はオーキシンを含む液体培地中で増殖させ維持することが可能であることから、あらかじめ誘導して増殖させた不定胚にアグロバクテリウムを感染させる方法についても報告されている（Trick and Finer 1997）が普及はしていない。

2）発芽種子の子葉節を用いる方法

ダイズ発芽種子の子葉節（子葉と胚軸の接合部、cotyledonary node）の内部に存在する分裂組織にアグロバクテリウムを感染させる場合には、次のような２通りの材料（図１）を用いて外植片が調製される（各々の引用文献については表１に記載）。

(i) 乾燥種子を十数時間～24時間吸水させた（催芽）種子（表１、方法CNおよびEmbryonic tip）

(ii) 発芽培地上で５日前後生育させ緑化した発芽種子、芽生え［表１、方法CN (G) およびHypocotyl (G)、すなわち (G) の記載のあるもの］

また、これらを用いた外植片の調製法には次のような２通りの方法がある（図１）。

①子葉が付いたまま胚軸を縦半分に２つに割いてできた外植片（胚軸の根端側は切除してある）を用いる方法［表１、方法CNおよびCN (G)］

②胚軸（子葉は取り除く）を外植片として用いる方法［表１、方法Embryonic tipおよびHypocotyl (G)］

いずれの方法も、子葉節の内部に存在する分裂組織もしくはその周辺の領域を表面に露出させることが重要であると考えられる。すなわち、①の方法では胚軸を縦半分に割き、さらに子葉節付近に存在する上胚軸や未熟な初生葉を取り除くことにより子葉節の内部を表面に露出させ、②の方法では子葉を、上胚軸や未熟な初生葉と共に取り除くことにより、子葉節の内部を表面に露出させている。アグロバクテリウム法によるダイズの形質転換に初めて成功したHincheeら（1988）が行ったのは (ii) を用いた①の方法であった。

子葉節（の分裂組織）を用いる方法では、以上のいずれかの方法により調製した外植片（Embryonic tipの場合にはサイトカイニンを含む培地で１日ほど前培養を行う場合もある）をアグロバクテリウムの懸濁液に浸した後、共存培養培地に置床し３～５日間培養する（感染）。除菌操作によりアグロバクテリウムを取り除いた後、サイトカイニンおよび選抜薬剤等を含む培地上で、不定芽（多芽体）の形成やそれらからの形質転換シュートの生育を促し、その後発根を経て形質転換植物体へと再生させる。この方法ではカルスを経ずに不定芽が形成されることから、比較的短期間（6 - 8 カ月）でT_1種子の収穫に至る。Hincheeら（1988）が形質転換に成功した品種は「Peking」と「Maple Presto」という、アグロバクテリウムに感染しやすい品種であったが、その後には、ゲノム解析に用いられた「Williams82」や「Thorne」、「Bert」等の複数の米国品種（表１、Zhang *et al.* 1999、Olhoft and Somers 2001、Olhoft *et al.* 2003、Paz *et al.* 2004、Zeng *et al.* 2004、Paz *et al.* 2006）、「Hefeng 25」等の複数の中国品種（表１、Liu *et al.* 2004、Xue *et al.* 2006、Dang and Wei 2007、Liu *et al.* 2008、Wang and Xu 2008）、「カリユタカ」（表１、Sato *et al.* 2007、Yamada *et al.* 2010）等の数種の日本品種（未発表データを含む）等で形質転換体が作出されている。形質転換効率は、１％未満から15％前後と様々である。これらの違いは、用いられた品種の違いによるところも大きいと考えられるが、後述する選抜薬剤の種類や感染効率を高めるために行う施術等の違いによっても生ずる。最近のアグロバクテリウム法の主流は子葉節に存在する分裂組織を用いるこれらの方法である。

先に述べた方法では培養操作を必要とするが、培養操作を行わず、発芽種子の子葉節に存在する分裂組織にアグロバクテリウムを感染させた後に、土に植えて形質転換植物体を作出するin planta法も試みられている（Chee *et al*. 1989）。この方法では、切開により分裂組織周辺を表面に露出させる代わりに、注射針を用いてアグロバクテリウムを注入している。しかし、形質転換体作出効率が低い［Chee *et al*.（1989）の報告では0.07％］ため利用されていない。

3）芽生えの初生葉節を用いる方法

芽生えの初生葉節に存在する分裂組織にアグロバクテリウムを感染させる方法［表1、方法PN (G)、Olhoft *et al*. 2007］では、発芽培地上に播種後1週間程度の、上胚軸が子葉の1/3～同定度の長さに伸びた芽生えを使用して外植片を調製する（図1）。緑化した芽生えから、胚軸の下部および根と、一対の子葉の片方を切除し、さらに子葉節に存在する腋芽も取り除く。そして、初生葉を取り除いた後、メスで傷を付けた状態の外植片をアグロバクテリウムの感染に用いる。除菌操作によりアグロバクテリウムを取り除いた後、選抜薬剤存在下で形質転換シュートの誘導と生育を促し、植物体へと再生させる。この方法による形質転換効率は約1.6％と報告されている（Olhoft *et al.* 2007）。比較的新しい方法であり、実施例は少ない。

2　品種の比較

未熟種子（不定胚）を利用する方法については、様々な品種の適性が調べられた結果、先に述べたような理由で、「Jack」のみが実質的に用いられている品種である。一方、発芽種子の子葉節を利用する方法についても、様々な品種の適性が調べられている。調査項目は、アグロバクテリウムの感染程度や不定芽誘導能等の培養特性であり、これらには品種間差があることが報告されている（Byrne *et al*. 1987、Hinchee *et al*. 1988、Meurer *et al*. 1998、Paz *et al*. 2004、Sato *et al*. 2007）。例えば、Satoら（2007）の研究によると、催芽種子からcotyledonary node法によって外植片の調製を行った場合の「カリユタカ」の不定芽誘導能（不定芽が形成される外植片の割合や、5㎜以上伸長した不定芽が形成される割合を指標として示される）は、形質転換に頻繁に用いられる米国品種「Thorne」と同等かやや劣る程度であるが、その他に調べられた4品種（「トヨスズ」「オオスズ」「フクユタカ」「タチユタカ」）の不定芽誘導能は「Thorne」より劣ると報告されている。このような研究事例は複数あるが、調査した品種や用いたアグロバクテリウムの系統、培養条件が研究グループにより異なること、および調査した全ての品種の結果が示されているわけではないこと等が原因で、どのような品種がアグロバクテリウム法に適しているか判断することは難しく、必要に応じて自ら確かめるしかないのが現状であると思われる。

3　感染に用いるアグロバクテリウムの系統

アグロバクテリウムはTi（tumor-inducing）プラスミド上のT-DNA領域を植物細胞のゲノムDNAに挿入し、植物にクラウンゴールと呼ばれる腫瘍を形成する。T-DNA領域中に腫瘍形成に関わる遺伝子が含まれており、その両端に境界配列という、植物のゲノムDNAへの挿入に必須である25塩基対の不完全な繰り返し配列が存在する。植物の形質転換を行う際には、T-DNA領域の腫瘍形成に関わる遺伝子を、導入したい目的遺伝子に置き換えて用いる。また、T-DNA領域の植物ゲノムへの挿入には、Tiプラスミド上のVir（virulence）領域が必要であるが、Vir領域中の遺伝子は境界配列に対しトランスに作用する。この特性により、Vir領域をもちT-DNA領域を除去したTiプラスミドと、境界配列を有しそれらの間に導入したい目的遺伝子を組込んだプラスミド（バイナリーベクター）をアグロバクテリウムに共存させて感染に用いることが可能であるが、このようなシステム（バイナリーベクター法）が他の植物と同様、

ダイズにおいても頻繁に用いられている（表１）。

アグロバクテリウム法による遺伝子導入においては、形質転換を行う植物に対して高感染性のアグロバクテリウム系統を利用する必要があるが、ダイズにおいても高感染株のスクリーニングが行われた（Owens and Cress 1985、Byrne *et al*. 1987）。Hincheeら（1988）は、ダイズに対して高感染性を示したA208株（Byrne *et al*. 1987、Hood *et al*. 1987）を利用して形質転換を行った。その後は、A208株の感染性には劣るが、他の植物と同様にダイズに対しても高感染性を示したA281株（Byrne *et al*. 1987、Hood *et al*. 1987）の TiプラスミドpTiBo542の改変型を有する高感染株EHA101株やEHA105株、AGL-1株等（Hellens *et al*. 2000）が頻繁に利用されている（表１）。また、この他にも、ダイズに対して高い感染性を有するChry 5株（Bush and Pueppke 1991）より改変されたKYRT 1株（Torisky *et al*. 1997）も使用されている（表１）。しかし、Chry 5株のTiプラスミド上には2箇所にT-DNA領域が存在し、KYRT 1株のTiプラスミドpKYRT 1にはその一方が残っているため、形質転換ダイズにおいて、バイナリーベクター由来のT-DNA領域とともに、pKYRT 1上に残ったT-DNA領域が検出されたという事例が報告されている（Ko *et al*. 2004）。これらは後代で分離可能であると考えられるが、利用には注意が必要であると思われる。さらに最近でも、ダイズに対して高い感染性を有する株の単離および改変が行われ、モモの根から単離された高感染性系統であるKAT23株の腫瘍形成能を欠損させたSoy 2株が作出された（Yukawa *et al*. 2008）。Soy 2株を利用した形質転換ダイズ作出に関する報告は無いが、レポーター遺伝子の発現を指標とした感染実験において、Soy 2株はEHA105株と比べて2倍以上高い感染性を有することが示されたことから、Soy 2株の利用により形質転換体作出効率が向上する可能性が考えられる。一方、高感染性ではないLBA4404株を用いて高い効率で形質転換ダイズが作出された例もある（表１）。この場合には、バイナリーベクターにpTiBo542のVir領域断片が組込まれたスーパーバイナリーベクター（pTOK 233）（Komari 1990、Hiei *et al*. 1994）を用いて良好な結果が得られている。

また、植物に毛状根を生じさせる*Agrobacterium rhizogenes*（*Rhizobium rhizogenes*）もT-DNAを植物に導入するが、*A. rhizogenes*のRi（root-inducing）プラスミドから毛状根形成に関わる遺伝子を取り除いた系統を用いた形質転換ダイズ作出についても報告されている（Olhoft *et al*. 2007、Curtin *et al*. 2011）。

4　選抜薬剤

形質転換体作出の際には薬剤耐性マーカー遺伝子（*hpt*、*nptII*、*bar*、*cp4 epsps*等）を目的遺伝子とともに共導入し、薬剤を添加した培地上で形質転換体を選抜する。アグロバクテリウム法によるダイズの形質転換において、未熟種子（不定胚）を用いる方法では、抗生物質であるハイグロマイシンが用いられている（Ko *et al*. 2003、表１）。また、子葉節を用いる方法では、2000年頃まではカナマイシンが主に用いられていた（Hinchee *et al*. 1988、Parrott *et al*. 1989）。現在では、カナマイシン（Liu *et al*. 2004、Wang and Xu 2008）の他にハイグロマイシン（Olhoft *et al*. 2003）も用いられている（表１）。これらの抗生物質の他に、除草剤であるグルホシネート（Zhang *et al*. 1999）やグリホサート（Clemente *et al*. 2000）を用いた選抜法も開発され、最近は除草剤による選抜が多く行われている（表１）。いずれの選抜薬剤を用いる場合にも、効率良く形質転換体の選抜を行うには、品種や形質転換法、選抜を行う際の生育段階等に応じて濃度を調節する必要がある。

5　形質転換効率を高める方法

ダイズはアグロバクテリウムが感染しにくい植物の一つとされてきたが、Vir領域にある複数の遺伝子の発現を誘導する物質であるアセトシリンゴンの共存培養培地への添加（Townsend and Thomas 1994）や、共存培養を行う際

の温度やpHの調節（Townsend and Thomas 1994、Dang and Wei 2007、Liu *et al.* 2008）等により、アグロバクテリウムの感染効率が向上することが示された。また、感染に用いる未熟子葉や子葉節に、超音波（Trick and Finer 1997）や金属製のブラシ（Xue *et al.* 2006、Yamada *et al.* 2010）で傷をつけておくことによる感染効率の向上も報告されている。Trick and Finer（1997）やYamadaら（2010）の研究では、β-グルクロニダーゼ（GUS）をレポーター遺伝子として用い、その一過性発現の程度を感染効率の指標としているが、超音波処理や金属製のブラシによる傷つけ処理により、一見して判別可能な程、感染効率が向上した。また、Xueら（2006）の研究では、金属製のブラシ（multi-needle）を用いることにより形質転換体作出効率が０％から12％まで向上したと報告されている。これらのことから、外植片への傷つけ処理が現在でもよく行われている（表１）。さらに、子葉節を用いた形質転換については次のような方法も行われている。すなわち、アグロバクテリウムとの共存培養時に、抗酸化作用を有するシステインやジチオトレイトール等のチオール化合物を添加することにより、傷つけ処理による傷害やアグロバクテリウムの感染によると推定される外植片の褐変や壊死を防ぐとともに、形質転換効率が著しく向上（単独で用いた場合は10倍以上、複数を共に用いた場合には15倍以上となった例もある）することが報告され（Olhoft *et al.* 2001、Olhoft and Somers 2001、Olhoft *et al.* 2003）、現在ではこれらを添加している場合が多い（表１）。また、アグロバクテリウム懸濁液の表面張力を下げ、植物組織内へのアグロバクテリウムの侵入を容易にすること等を意図した、界面活性剤Silwet L-77（ポリエーテル変性シリコーン）の懸濁液への添加による形質転換効率の向上（Liu *et al.* 2008、Yamada *et al.* 2010）についても報告されている（表１）。この他に、選抜薬剤存在下で形質転換シュートを生育させる際に、エチレンの作用を阻害する硝酸銀を添加する場合もある（表１）。硝酸銀添加が形質転換ダイズ作出効率に与える影響については明示されていないが、シュートの産生を促進する効果や、形質転換シュート生育の初期段階において培養物の状態を良好に保つ効果が示唆されている（Olhoft *et al.* 2003）。また、硝酸銀を含む培地で作出された形質転換ダイズでは、挿入された外来遺伝子のコピー数が多いという傾向が見出された一方、後代でのジーンサイレンシングの出現頻度は低かったことから、硝酸銀を添加することにより、薬剤耐性マーカー遺伝子のジーンサイレンシングの低減を介して、選抜薬剤耐性形質転換シュートの出現や生育が促進されるという可能性が指摘されている（Olhoft *et al.* 2004）。

表１　形質転換効率の比較[*1]

品種	方法[*2]	アグロバクテリウム	バイナリーベクター[*3]	感染効率に影響を与える要因[*4]	選抜薬剤[*5]	形質転換体作出効率[*6]	調査した世代	引用文献
Jack	SE	KYRT1	pCAMBIA1305.1 (pPZP)	100 μM AS 傷つけ	Hyg (10–25 mg/L)	1.1–1.7%	T_0	Ko et a.l 2003
Asgrow 3237	CN (G)	EHA101	pPTN140 (pGPVT)	200 μM AS 傷つけ	Gluf (5.0 mg/L)	0–3%	T_0	Zhang et al. 1999
Bert	CN (G)	AGL1	pBSF16	200 μM AS 傷つけ	Gluf (1.3–5 mg/L)	0.9%	T_0	Olhoft and Somers 2001
				200 μM AS 傷つけ 3.3/8.3 mM Cys		2.1%	T_0	
Bert	CN (G)	LBA4404	pTOK233	200 μM AS 傷つけ 10 mg/L $AgNO_3$	Hyg (5–10 mg/L)	0.7%	T_0	Olhoft et al. 2003
				200 μM AS 傷つけ 1 mM DTT 10 mg/L $AgNO_3$		2.7%	T_0	
				200 μM AS 傷つけ 3.3 mM Cys 10 mg/L $AgNO_3$		7.7%	T_0	
				200 μM AS 傷つけ 3.3 mM Cys 1 mM DTT 10 mg/L $AgNO_3$		12.7%	T_0	
				200 μM AS 傷つけ 8.8 mM Cys 1 mM DTT 10 mg/L $AgNO_3$		7.6%	T_0	
				200 μM AS 傷つけ 1 mM Na-thiolsulfate 10 mg/L $AgNO_3$		6.2%	T_0	
				200 μM AS 傷つけ 1 mM Na-thiolsulfate 1 mM DTT 10 mg/L $AgNO_3$		6.9%	T_0	
				200 μM AS 傷つけ 1 mM Na-thiolsulfate 8.8 mM Cys 10 mg/L $AgNO_3$		9.5%	T_0	
				200 μM AS 傷つけ 1 mM Na-thiolsulfate 8.8 mM Cys 1 mM DTT 10 mg/L $AgNO_3$		16.4%	T_0	
Bert	CN (G)	EHA105	pGPVT-HPT (pBIN19)	200 μM AS 傷つけ 10 mg/L $AgNO_3$	Hyg (5–10 mg/L)	0.0%	T_0	
				200 μM AS 傷つけ 1 mM Na-thiolsulfate 10 mg/L $AgNO_3$		3.2%	T_0	
				200 μM AS 傷つけ 1 mM Na-thiolsulfate 3.3 mM Cys 1 mM DTT 10 mg/L $AgNO_3$		6.9%	T_0	
				200 μM AS 傷つけ 3.3 mM Cys 1 mM DTT 10 mg/L $AgNO_3$		7.4%	T_0	
				200 μM AS 傷つけ 8.8 mM Cys 1 mM DTT 10 mg/L $AgNO_3$		12.8%	T_0	
				200 μM AS 傷つけ 1 mM Na-thiolsulfate 8.8 mM Cys 1 mM DTT 10 mg/L $AgNO_3$		14.0%	T_0	
Williams 82	CN (G)	EHA101	pPTN140 (pBIN19)	200 μM AS 傷つけ 3.3 mM Cys	Gluf (3–8 mg/L)	5.9%	T_0	Zeng et al. 2004

Peking	CN (G)	EHA101	pTF101.1 (pPZP)	200 μM AS 傷つけ	Gluf (3-6 mg/L)	0.9%	T_1	Paz et al. 2004
Thorne				200 μM AS 傷つけ		0.2-0.3%	T_1	
				200 μM AS 傷つけ 3.3 mM Cys 1 mM DTT		0.6-2.9%	T_1	
Williams 79				200 μM AS 傷つけ 3.3 mM Cys 1 mM DTT		1.1-1.7%	T_1	
Heinong 37	CN (G)	EHA105	pCAMBIA1301 (pPZP)	200 μM AS 傷つけ 5 mM Cys 0.02% Silwet L-77	Hyg (3-8 mg/L)	7.2%	T_0	Liu et al. 2008
Jilin39						5.0%	T_0	
Hefeng25						11.7%	T_0	
Dongnong42						9.2%	T_0	
Jiyu58						3.8%	T_0	
Hefeng 35	Embryonic tip	EHA105	pCAMBIA2301 (pPZP)	100 μM AS	Km (25-100 mg/L)	11.7%	T_0	Liu et al. 2004
Dongnong 42						8.0%	T_0	
Hefeng 39						15.8%	T_0	
Hefeng 25	Embryonic tip	KYRT1	pCAMBIA3301 (pPZP)	200 μM AS	Gluf (0.5-1 mg/L)	13.60%	T_0	Dang and Wei 2007
Hefeng 35						15.38%	T_0	
Hefeng 39						16.67%	T_0	
Heinong 43						5.26%	T_0	
Heinong 37						4.29%	T_0	
Dongnong 42						12.31%	T_0	
Lefeng 39						18.00%	T_0	
Heinong44	Hypocotyl (G)	EHA105	pBI-Lec (pBIN19)	200 μM AS 1.3 mM Na-thiolsulfate 8.8 mM Cys 1 mM DTT	Km (75 mg/L)	9.3%	T_0	Wang and Xu 2008
Jungery	CN	LBA4404	pGB	100 μM AS 8 mM Cys	Gluf (3-5 mg/L)	0.0%	T_0	Xue et al. 2006
				100 μM AS 傷つけ 8 mM Cys		12.0%	T_0	
Thorne	CN	EHA101	pTF101.1 (pPZP)	200 μM AS 0.8-3.3 mM Cys 1 mM DTT	Gluf (6 mg/L)	4.1%	T_1	Paz et al. 2006
Thorne						1.0%		
Williams						3.6%		
Williams79						1.8%		
Williams82						4.5%		
Thorne	CN	EHA105	pMDC123 (pPZP)	200 μM AS 3.3 mM Cys 1mM DTT	Gluf (6 mg/L)	0.9%	T_0	Sato et al. 2007
Kariyutaka						0.8%	T_0	
Kariyutaka	CN	EHA105	pMDC123 (pPZP)	200 μM AS 傷つけ 3.3 mM Cys 1mM DTT 0.02% Silwet L-77	Gluf (6 mg/L)	4.4%	T_1	Yamada et al. 2010
Dairyland cultivar 93061	PN (G)	AGL1	pSUN1 (pORE)	200 μM AS 傷つけ 0.5 mM Na-thiolsulfate 4.4 mM Cys 0.5 mM DTT	Gluf (3-5 mg/L)	1.6%	T_1	Olhoft et al. 2007

*1 原著論文において形質転換効率に関して明記されている事例を列挙した。

*2 SE: 未熟種子に感染後、不定胚を誘導　CN (G): 播種後数日経った発芽種子の子葉節（子葉を含む外植片を使用）に感染
Embryonic tip: 催芽種子の子葉節（子葉を含まない外植片を使用）に感染　Hypocotyl (G): 播種後数日経った発芽種子の子葉節（子葉を含まない外植片を使用）に感染
CN: 催芽種子の子葉節（子葉を含む外植片を使用）に感染　PN (G): 播種後1週間程度経った芽生えの初生葉節に感染

*3 括弧内は改変が加えられる前の基となったバイナリーベクター

*4 AS: アセトシリンゴン　傷つけ: 超音波処理や、メスやブラシ等を利用した外植片の傷つけ処理　Cys: システイン　DTT: ジチオトレイトール
Silwet L-77: 界面活性剤（ポリエーテル変性シリコーン）
AS、Cys、Na-thiosulfate、DTTについては共存培養培地への添加、Silwet L-77についてはアグロバクテリウム懸濁液への添加、$AgNO_3$については形質転換シュート選抜育成培地への添加。

*5 Hyg: ハイグロマイシン　Gluf: グルフォシネート　Km: カナマイシン　括弧内は培地中の濃度

*6 サザンブロッティング、PCR、GUS染色、除草剤塗布試験等により確認された形質転換体（系統）数/感染に用いられた外植片数 x 100%（複数回行った結果の平均値。
平均値の記載がない場合には、記載されていた効率の最小値と最大値を示した。）

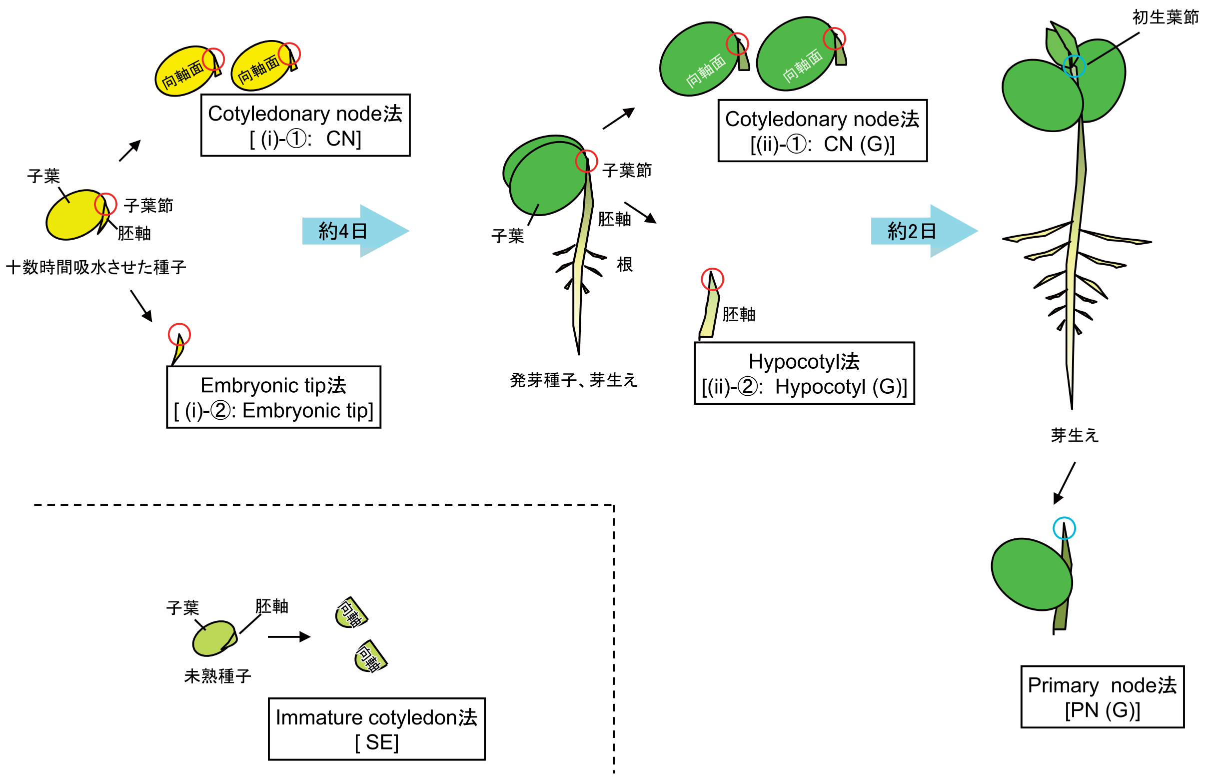

図１　アグロバクテリウム法に用いる様々な外植片の調製法

アグロバクテリウム法によるダイズの形質転換では、未熟種子、吸水させた（催芽）種子、発芽種子、芽生えから外植片の調製を行う。これらの外植片をアグロバクテリウムの感染に用いる。赤丸は子葉節、青丸は初生葉節を示す。[　] 内の数字は本文Ⅱ-1-2節内の記載と同様であり、略号は表１の方法と同様である。CN、CN (G)、SEでは１つの種子から２つの外植片ができる。

Ⅲ　形質転換技術の高度化

形質転換効率の向上がもたらされた後には、米国品種を用いて、高度な形質転換技術の開発が進められた。例えば、T-DNA領域を２箇所に有するバイナリーベクターに、選抜マーカー遺伝子と目的の遺伝子を別々に導入しておき、形質転換体を作出後、目的の遺伝子をもつがマーカー遺伝子をもたない分離後代を得る方法がダイズにおいても確立され（Xing *et al.* 2000）、マーカーフリーダイズの作出に用いられている（Sato *et al.* 2004、Behrens *et al.* 2007）。また、導入される遺伝子のコピー数が少なく、遺伝子の断片化やジーンサイレンシングも起こりにくいというアグロバクテリウム法の特徴が活用され、Ac/Dsトランスポゾンとアクティベーションタギング法やジーントラップ法、エンハンサートラップ法を組み合わせた変異体コレクションの作成も試みられている（Mathieu *et al.* 2009）。さらに、最近になり、ジンクフィンガーヌクレアーゼを利用した遺伝子改変技術により、特定の標的遺伝子への変異導入がダイズにおいても行われた（Curtin *et al.* 2011）。

Ⅳ　おわりに

アグロバクテリウム法によるダイズの形質転換の成功例が報告されてから現在までに、数多くの改良が重ねられ、利用可能な品種数や効率が大きく向上した。最近では、遺伝子の機能解明等を目的とした研究で、モデル植物ではなく、形質転換ダイズがごく自然に使用されるようになってきた。また、以前は遺伝子銃法により作出された限られた品種の形質転換ダイズを用いた解析が主流であったが、ここ数年は、アグロバクテリウム法を利用することにより、各研究の目的に応じた品種で形質転換ダイズが作出され解析が行われるように変化してきている。日本においても、アグロバクテリウム法による国内品種の形質転換が行われるようになり、ダイズの改変や遺伝子機能の解明を目的として利用され始めている（Liu *et al.* 2010）。数年前までは、遺伝子銃法等の直接導入法で不定胚へ遺伝子を導入し植物体を再生させる手法が、日本における唯一の形質転換ダイズ作出法であったことから、「Jack」（もしくは「Jack」と交配した品種）以外の品種では形質転換が不可能であったということを考えると、アグロバクテリウム法により「カリユタカ」（Sato *et al.* 2007）等の数種の日本品種（未発表データを含む）で形質転換が行われるようになったことは大きな前進である。しかし、ダイズの形質転換技術の向上を先導してきた米国や、近年急速に報告数が増加している中国のグループが発表しているような形質転換体作出効率（複数の品種で５～10％の効率であり、中には15％程度の効率を示したものもある）にはおよんでおらず、形質転換技術を利用した応用研究進捗の妨げとなっている。すなわち、日本品種での形質転換体作出効率は「カリユタカ」を用いた4.4％（Yamada *et al.* 2010）が現在までに報告されている最高値であるが、この効率では、解析を行う上で必要な形質転換体数を得るために複数回（おそらく２回程度）の感染作業を行わなくてはならず、労力や時間を要する。筆者らも、出芽期や生育初期のダイズに耐湿性を付与することを目的として、形質転換ダイズを作出しながら研究を進めているが、１遺伝子につき４～５回の感染作業を行っており、形質転換体作出に多くの労力と時間を費やしている。また、ゲノム解析が行われている品種である「エンレイ」で形質転換が成功していないという点も問題である。このように日本品種の形質転換が現時点で容易ではない一因として、米国品種で用いられた培地組成や培養条件に従って形質転換が行われているために、様々な日本品種が有する感染効率や培養特性のポテンシャルが十分に引き出されていない可能性が考えられる。本稿では、形質転換体作出効率に対して品種に関わらず一定の効果が期待される手法を中心に記載したが、今後は、これらの手法の適用とともに、品種に応じた培地組成（植物ホルモンの濃度等）や培養条件の調整を行い、形質転換体作出効率の向上や適用品種数の増加を図ることが必要であると考えられる。

引用文献

Bailey, M.A., H.R. Boerma and W.A. Parrott (1993) Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant-regeneration of soybean. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 29P, 102-108.

Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R.

Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. LaVallee, P.L. Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks (2007) Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. Science, 316, 1185-1188.

Bush, A.L. and S.G. Pueppke (1991) Characterization of an unusual new *Agrobacterium tumefaciens* strain from *Chrysanthemum morifolium* Ram. Applied and Environmental Microbiology, 57, 2468-2472.

Byrne, M.C., R.E. McDonnell, M.S. Wright and M.G. Carnes (1987) Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*-soybean interaction. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 8, 3-15.

Chee, P.P., K.A. Fober and J.L. Slightom (1989) Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiology, 91, 1212-1218.

Clemente, T.E., B.J. LaVallee, A.R. Howe, D. Conner-Ward, R.J. Rozman, P.E. Hunter, D.L. Broyles, D.S. Kasten and M.A. Hinchee (2000) Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. Crop Science, 40, 797-803.

Curtin, S.J., F. Zhang, J.D. Sander, W.J. Haun, C. Starker, N.J. Baltes, D. Reyon, E.J. Dahlborg, M.J. Goodwin, A.P. Coffman, D. Dobbs, J.K. Joung, D.F. Voytas and R.M. Stupar (2011) Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. Plant Physiology, 156, 466-473.

Dang, W. and Z.M. Wei (2007) An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. Plant Science, 173, 381-389.

El-Shemy, H.A., M. Teraishi, M.M. Khalafalla, T. Katsube-Tanaka, S. Utsumi and M. Ishimoto (2004) Isolation of soybean plants with stable transgene expression by visual selection based on green fluorescent protein. Molecular Breeding, 14, 227-238.

Hellens, R., P. Mullineaux and H. Klee (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. Trends in Plant Science, 5, 446-451.

Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. The Plant Journal, 6, 271-282.

Hinchee, M.A.W., D.V. Connorward, C.A. Newell, R.E. Mcdonnell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B. Re, R.T. Fraley and R.B. Horsch (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. Bio/Technology, 6, 915-921.

Hiraga, S., H. Minamikawa, K. Takahashi, R. Takahashi, M. Hajika, K. Harada and N. Ohtsubo (2007) Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of Japanese soybean cultivars. Plant Biotechnology, 24, 435-440.

Hood, E.E., R.T. Fraley and M.D. Chilton (1987) Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 on legumes. Plant Physiology, 83, 529-534.

Ko, T.S., S.S. Korban and D.A. Somers (2006) Soybean (*Glycine max*) transformation using immature cotyledon explants. Methods in Molecular Biology, 343, 397-405.

Ko, T.S., S. Lee, S.K. Farrand and S.S. Korban (2004) A partially disarmed vir helper plasmid, pKYRT1, in conjunction with 2,4-dichlorophenoxyactic acid promotes emergence of regenerable transgenic somatic embryos from immature cotyledons of soybean. Planta, 218, 536-541.

Ko, T.S., S. Lee, S. Krasnyanski and S.S. Korban (2003) Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant.

Theoretical and Applied Genetics, 107, 439-447.

Komari, T. (1990) Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. Plant Cell Reports, 9, 303-306.

Komatsuda, T. and K. Ohyama (1988) Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. Theoretical and Applied Genetics, 75, 695-700.

Lim, H.S., T.S. Ko, K.N. Lambert, H.G. Kim, S.S. Korban, G.L. Hartman and L.L. Domier (2005) Soybean mosaic virus helper component-protease enhances somatic embryo production and stabilizes transgene expression in soybean. Plant Physiology and Biochemistry, 43, 1014-1021.

Liu, B.H., S. Watanabe, T. Uchiyama, F.J. Kong, A. Kanazawa, Z.J. Xia, A. Nagamatsu, M. Arai, T. Yamada, K. Kitamura, C. Masuta, K. Harada and J. Abe (2010) The soybean stem growth habit gene Dt1 is an ortholog of Arabidopsis *TERMINAL FLOWER1*. Plant Physiology, 153, 198-210.

Liu, H.K., C. Yang and Z.M. Wei (2004) Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. Planta, 219, 1042-1049.

Liu, S.J., Z.M. Wei and J.Q. Huang (2008) The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties. Plant Cell Reports, 27, 489-498.

Malven, M., J. Rinehart, N.B. Taylor and E. Dickinson (2006) Soybean event MON89788 and methods for detection thereof. International Patent WO 2006/130436.

Mathieu, M., E. Winters, F.M. Kong, J.R. Wan, S.X. Wang, H. Eckert, D. Luth, M. Paz, C. Donovan, Z.Y. Zhang, D. Somers, K. Wang, H. Nguyen, R. Shoemaker, G. Stacey and T. Clemente (2009) Establishment of a soybean (*Glycine max* Merr. L) transposon-based mutagenesis repository. Planta, 229, 279-289.

Meurer, C.A., R.D. Dinkins and G.B. Collins (1998) Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. Plant Cell Reports, 18, 180-186.

Olhoft, P.M., L.M. Bernal, L.B. Grist, D.S. Hill, S.L. Mankin, Y.H. Shen, M. Kalogerakis, H. Wiley, E. Toren, H.-S. Song, H. Hillebrand and T. Jones (2007) A novel *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation method of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using primary-node explants from seedlings. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 43, 536-549.

Olhoft, P.M., C.M. Donovan and D.A. Somers (2006) Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants. Methods in Molecular Biology, 343, 385-396.

Olhoft, P.M., L.E. Flagel, C.M. Donovan and D.A. Somers (2003) Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. Planta, 216, 723-735.

Olhoft, P.M., L.E. Flagel and D.A. Somers (2004) T-DNA locus structure in a large population of soybean plants transformed using the *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node method. Plant Biotechnology Journal, 2, 289-300.

Olhoft, P.M., K. Lin, J. Galbraith, N.C. Nielsen and D.A. Somers (2001) The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Reports, 20, 731-737.

Olhoft, P.M. and D.A. Somers (2001) L-cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Reports, 20, 706-711.

Owens, L.D. and D.E. Cress (1985) Genotypic variability of soybean response to *Agrobacterium* strains harboring the Ti-plasmid or Ri-plasmid. Plant Physiology, 77, 87-94.

Padgette, S.R., K.H. Kolacz, X. Delannay, D.B. Re, B.J. Lavallee, C.N. Tinius, W.K. Rhodes, Y.I. Otero, G.F. Barry, D.A. Eichholtz, V.M. Peschke, D.L. Nida, N.B. Taylor and G.M. Kishore (1995) Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Science, 35, 1451-1461.

Parrott, W.A., L.M. Hoffman, D.F. Hildebrand, E.G. Williams and G.B. Collins (1989) Recovery of primary transformants of soybean. Plant Cell Reports, 7, 615-617.

Paz, M.M., J.C. Martinez, A.B. Kalvig, T.M. Fonger and K. Wang (2006) Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. Plant Cell Reports, 25, 206-213.

Paz, M.M., H.X. Shou, Z.B. Guo, Z.Y. Zhang, A.K. Banerjee and K. Wang (2004) Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. Euphytica, 136, 167-179.

Reddy, M.S.S., R.D. Dinkins and G.B. Collins (2003) Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. Plant Cell Reports, 21, 676-683.

Sato, H., T. Yamada, Y. Kita, M. Ishimoto and K. Kitamura (2007) Production of transgenic plants and their early seed set in Japanese soybean variety, Kariyutaka. Plant Biotechnology, 24, 533-536.

Sato, S., A.Q. Xing, X.G. Ye, B. Schweiger, A. Kinney, G. Graef and T. Clemente (2004) Production of γ-linolenic acid and stearidonic acid in seeds of marker-free transgenic soybean. Crop Science, 44, 646-652.

Taylor, M., G. Hartnell, D. Lucas, S. Davis and M. Nemeth (2007) Comparison of broiler performance and carcass parameters when fed diets containing soybean meal produced from glyphosate-tolerant (MON 89788), control, or conventional reference Soybeans. Poultry Science, 86, 2608-2614.

Torisky, R.S., L. Kovacs, S. Avdiushko, J.D. Newman, A.G. Hunt and G.B. Collins (1997) Development of a binary vector system for plant transformation based on the supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5. Plant Cell Reports, 17, 102-108.

Townsend, J.A. and L.A. Thomas (1994) An improved method of *Agrobacterium*-mediated transformation of cultured soybean cells. International Patent WO94/02620

Trick, H.N. and J.J. Finer (1997) SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. Transgenic Research, 6, 329-336.

Wang, G.L. and Y.N. Xu (2008) Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference. Plant Cell Reports, 27, 1177-1184.

Xing, A.Q., Z.Y. Zhang, S. Sato, P. Staswick and T. Clemente (2000) The use of the two T-DNA binary system to derive marker-free transgenic soybeans. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 36, 456-463.

Xue, R.G., H.F. Xie and B. Zhang (2006) A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells. Biotechnology Letters, 28, 1551-1557.

Yamada, T., S. Watanabe, M. Arai, K. Harada and K. Kitamura (2010) Cotyledonary node pre-wounding with a micro-brush increased frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean. Plant Biotechnology, 27, 217-220.

Yukawa, K., H. Kaku, H. Tanaka, Y. Koga-Ban and M. Fukuda (2008) Enhanced soybean infection by the legume "super-virulent" *Agro-*

bacterium tumefaciens strain KAT23. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 72, 1809-1816.

Zeng, P., D.A. Vadnais, Z. Zhang and J.C. Polacco (2004) Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Plant Cell Reports, 22, 478-482.

Zhang, Z.Y., A.Q. Xing, P. Staswick and T.E. Clemente (1999) The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 56, 37-46.