

パーティクルガンによる小麦未熟胚への遺伝子導入

中村 俊樹・池田 順一・日高 操・森川 道弘*

(東北農業試験場・*広島大学理学部)

Transformation of Wheat Immature Embryos by Particle-Gun.

Toshiki NAKAMURA Junichi IKEDA So HIDAKA and Michihiro MORIKAWA*

(Tohoku National Agriculture Experiment Station・*Faculty of Science, Hiroshima University)

1 はじめに

植物への外来遺伝子の導入は、80年代後半から著しい成果をあげており、タバコなどのモデル植物だけでなく、イネやトウモロコシといった主要作物についても、形質転換体が得られている。しかしながら、イネと同様に世界的に重要な作物であるコムギにおいては、未だにプロトプラストからの個体再分化の報告は数報しかなく、それらの再現性も非常に低くプロトプラストの再分化系が完全に確立されていない状態である。そのためPEG法やエレクトロポレーションといった非常に効率の高い遺伝子導入法が利用できないのが現状である。近年コネール大学のサンフォード²⁾は、金属粒子にDNAを吸着させ、それを鉄砲の原理を応用して細胞内に撃ち込むパーティクルガン (Particle gun) 法を報告した。この方法を用いれば、プロトプラストからの培養系は必ずしも必要でなく、理論的にはいかなる器官組織にも外来遺伝子の導入が可能である。したがって、コムギのようにプロトプラストからの培養系が非常に難しい植物においては、本法は非常に有効な遺伝子導入法といえる。著者らは、本法を用いてコムギの未熟胚に外来遺伝子の導入を行い、コムギの形質転換を図った。

2 試 験 方 法

材料としては、普通系コムギ (*Triticum aestivum* L.) の Chinese Spring の開花後14日目の未熟胚及びその培養2週間後のカスルを用いた。遺伝子導入処理後の未熟胚は、MS培地を用いて培養し、カスル誘導、植物体再分化を図った。導入遺伝子としては、 β -glucuronidase (GUS) 遺伝子をマーカー遺伝子として待つプラスミド pBI221 または、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT) をセレクション遺伝子として待つpcHを用いた。これらの遺伝子は、ミニアルカリ法により大腸菌より抽出し、超遠心機により精製したものをを用いた。GUS遺伝子の発現は、遺伝子導入処理後、25℃、暗所で24時間培養した後に、基質 X-Glucuronide を添加し調査した。

本実験に用いたパーティクルガンの装置 (図1) は、森川³⁾が東京ライフルとの共同により開発した圧縮空気圧方式であり、最大加速圧力は240kg/cm²以上である。また金属微粒子としては、金粒子 (1-5 μ m) をを用いた。

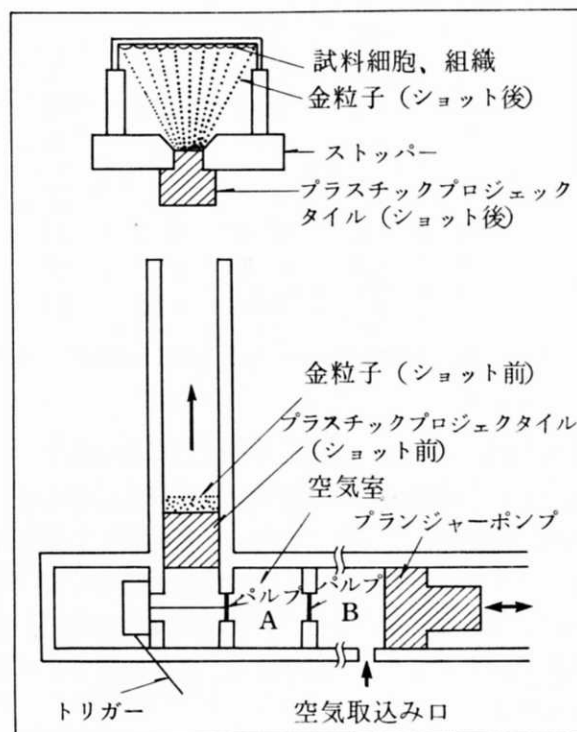


図1 圧縮空気圧式パーティクルガン装置の原理。森川ら³⁾による。

3 試験結果及び考察

1) 導入条件の検討

GUS遺伝子を用いて、パーティクルガンによる未熟胚及び培養カスルに対する遺伝子導入の条件を検討した (表1) と、ところ、未熟胚では圧縮空気圧200kg/cm²、銃撃回数1回、銃砲から試料までの距離8cmでGUS遺伝子の発現 (表1) が最も高かった。カスルは、同空気圧で距離を6cmと短くしてもGUS遺伝子の発現は非常に少なかった。これをタバコの培養細胞が115-150kg/cm²で最高の発現

表1 プロジェクタイトイル発射時の条件とGUS遺伝子発現*の関係

圧縮 空気圧 (kg/cm ²)	回数	距離 (cm)	供試未熟 胚 (カス ル) 数	GUS 発 現未熟胚 (カスル) 数	個体当り のGUS 発現数
150	1	8	43	34	4.5
150	2	8	60	53	14
150	3	8	(47)	(30)	(4.5)
200	1	8	50	47	20
200	1	6	(56)	(3)	(2.2)

*: GUS 遺伝子の発現は、処理後24時間目に確認

率を得る¹⁾ことと比較すると、細胞壁がかなり強く金粒子が細胞内に導入されていないことが考えられ、培養カルスは材料としては不適当と考えられた。以上の結果よりHPT遺伝子の導入に関しては、未熟胚を用い、圧縮空気圧200 kg/cm²、銃撃回数1回、銃砲から試料までの距離8 cmで実験を行った。

2) コムギ未熟胚のハイグロマイシン耐性

HPT遺伝子導入後ハイグロマイシンによる選抜を行うために、未処理(コントロール)の未熟胚の耐性を調べた(表2)ところ、カルス誘導段階では培地に30 µg/ml以上存在すれば、グリーンスポットの形成は確認されなかった。更に再分化培地においては、20 µg/ml以上のハイグロマイシンが存在すれば、不定芽の形成はおこらないことが明らかになった。したがってハイグロマイシン耐性の形態転換カルス及び植物体を得るための選抜濃度としては、20-30 µg/mlが最適と考えられた。これは、イネにおける選抜濃度と一致している。本実験では、選抜濃度を30 µg/mlと高く設定して選抜をおこなった。

表2 ハイグロマイシンに対するコムギ未熟胚(コントロール)の耐性

ハイグロマイシン濃度 (µg/ml)	供試未熟胚数	置床後1カ月		置床後2カ月*	
		グリーン スポット	不定根	不定芽	不定根
0	40	40	0	39	25
10	40	40	25	12	40
20	40	28	34	0	40
30	40	5	30	0	38
40	40	0	40	0	40
50	40	0	32	0	32
100	40	0	0	0	0

*: 置床後1か月は、カルス誘導培地(MS 2, 4-D 2 ppm)、次の1か月間は再分化培地(MS 2, 4-D free)。

3) ハイグロマイシン耐性植物の選抜

前記の条件によってHPT遺伝子を未熟胚に導入し、ハイグロマイシン含有培地で耐性植物の選抜を行った(表3)ところ、カルス誘導段階では、約半数のカルスにグリーンスポットが確認された。その後の再分化段階では、合計39個の幼植物体の再分化が認められた。対照区において、30 µg/mlまハイグロマイシンでは再分化が全く起こらない(表2)ことを考え合わせれば、これらの幼植物体が形質転換体である可能性は高いと考えられた。しかしながら、この時点では植物体の大きさが非常に小さく(草丈1 cm以下)DNAの抽出には供試できず、HPT遺伝子の確認は行えなかった。そのため新しい培地にこれらの植物体を移

植し生長を図ったが、その過程でほとんどの幼植物体が枯死してしまった。この原因としては、選抜に用いたハイグロマイシンの濃度が高かったことが考えられた。森川によると、アラビドプシスにおいても選抜を高濃度や長期間かけると形質転換個体でも枯死する可能性がある(私信)。そこで、選抜開始後80日の段階でも緑色の2個体をハイグロマイシンを含まない培地に移し現在生育させている。これらの植物体が十分大きくなった段階でDNAを抽出し、サザン法により導入されたHPT遺伝子の存在を確認すると同時に、種子をとり後代におけるハイグロマイシン耐性の有無を確認する予定である。

表3 ハイグロマイシン耐性遺伝子(HPT)導入後のハイグロマイシンによる耐性カルス及び耐性植物の選抜

選抜後日数 (ハイグロマイシン濃度) 供試未熟胚数	30日 (20 µg/ml) グリーン スポット カルス数	60日 (30 µg/ml) 再分化 幼植物数	80日 (30 µg/ml) 再分化 幼植物数
1,189	666 (56%)	21 (1.7%)	2*
250	109 (43%)	8 (3.2%)	0
309	206 (66%)	10 (3.2%)	0

*: 現在ハイグロマイシンを含まない培地で培養中

4 ま と め

今回の実験により、パーティクルガンによって未熟胚細胞への外来遺伝子の導入は、可能なことが明らかになった。しかしながら形質転換植物を得るためには、さらに選抜条件の検討が必要であると考えられた。本実験にあたりHPT遺伝子(pHCプラスミド)を分譲くださった東京大学応微研の内宮博文教授に心より感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) Iida, A.; Seki, M.; Yamada, Y.; Morikawa, H. 1990. Gene delivery into culture plant cells by DNA-coated gold particles accelerated by a pneumatic particle gun. TAG 80: 813-816.
- 2) Klein, T.M.; Wolf, E.D.; Wu, R.; Sanford, J. C. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327: 70-73.
- 3) 森川 弘道, 飯田 朝子, 山田 康之. 1990. パーティクルガンによる植物細胞の形質転換. 化学と生物 28: 682-688.