

作物研究所における効率的なコムギ形質転換系の開発

安倍史高・森 正彦

抄 録

コムギは世界の主要な穀物であり、遺伝子組換え技術を用いた農業形質改変の大きな標的となる作物である。また、コムギは穀粒の組成が特異かつ多様であるため、これをイネなどのモデル植物を用いて解析することは難しい。このため、高効率なコムギ形質転換系の確立はコムギの遺伝子研究において重要である。この20-30年の間、コムギの形質転換系の開発と改良のための多くの取り組みがなされてきた。コムギは形質転換が困難な作物であるが、近年、パーティクルガン法とアグロバクテリウム法による遺伝子導入手法の改良もあり、コムギの遺伝子研究において組換え技術の適用が可能となってきた。コムギの形質転換効率を左右する要因には、用いる品種や外植片の状態、最適な選抜マーカー遺伝子、基本的な組織培養条件がある。本稿では、効率的なコムギ形質転換系を確立するために重要なこれらの要因について、作物研究所における実際の研究経験に基づき概説した。

キーワード：コムギ、遺伝子組換え技術、形質転換、未熟胚、パーティクルガン、アグロバクテリウム、導入遺伝子の発現

平成23年11月2日受付 平成24年2月2日受理

本報告は、生研センターイノベーション創出事業の一環として取りまとめたものである。

Development of effective transformation system in wheat at the NARO Institute of Crop Science

Fumitaka ABE and Masahiko MORI

Abstract

Wheat is a major world crop and is a primary target for improvements in agronomic traits using recombinant DNA technology. Because grain composition is unique to wheat and has a large number of varieties, it is difficult to analyze using model plants such as rice. Therefore, the establishment of high throughput transformation systems in wheat is important to wheat gene analyses. Over the last few decades, numerous efforts have been made in wheat genetic transformation. Although wheat is one of the most difficult crops to transform, recent progress in biolistic- and *Agrobacterium*-mediated DNA delivery has enabled application of this technology to wheat gene analyses. Factors influencing wheat transformation efficiency include the cultivar, state of the explant, the selectable marker gene, and tissue culture conditions. In this paper, the important factors for developing a wheat transformation system are reviewed according to an actual case of research at the NARO Institute of Crop Science.

Key Words: wheat, recombinant DNA technology, transformation, immature embryo, particle bombardment, *Agrobacterium*, transgene expression

I 緒 言

コムギは世界中で主食として利用され、カロリーとタンパク質の重要な供給源となっている主要穀物の一つである。近年、異常気象によるコムギの不作を原因として、その価格が高騰するなど、穀物の需給事情は厳しさを増している。さらに将来の人口増加の予測のなかで、食料危機が懸念されている。このような背景のもと、遺伝子組換え技術は、これまでにない高収量・安定生産を可能とするような画期的な農作物を作出するための技術として期待されている。また、遺伝子組換え技術を使えば、外来の遺伝子を挿入することで生じる形質変化（形質転換）を調べることができるため、生物の形質発現にかかわる遺伝子の機能を解析するような基礎研究を行う上でも、欠くことのできない基盤技術となっている。コムギは異質六倍体で各遺伝子が3セットずつ存在し、点突然変異が形質変化に結びつかないことが多いことから、突然変異を利用して、形質から遺伝子を同定する遺伝学的な解析が困難な作物である。そこで遺伝子組換え技術を用い、新奇の遺伝子配列を挿入することで遺伝子機能を解析する、いわゆる逆遺伝学的手法がコムギでは特に有効となると期待される。

コムギの形質転換実験の最初の成功例は、直

接導入法 (Vasil *et al.* 1992) とアグロバクテリウム法 (Cheng *et al.* 1997) のどちらの方法においても、イネでの成功の2年後に報告されている。しかし、その後はイネのように技術が十分に確立されてきておらず、形質転換を用いたコムギの遺伝子機能解析はまだ例が少ない (Yan *et al.* 2006)。コムギの形質転換効率の向上を目指した手法の改良の試みが多数報告されているが、それらの改良手法を試したとしても、市販キットを用いる分子生物学実験のように、誰が行っても同じ結果が得られることはほとんどない。その大きな理由は、コムギの遺伝子組換えには習熟が必要な多くの手順を踏む必要があり、この全ての操作において最適な実験条件を忠実に再現することが困難なためである。論文にはチャンピオンデータが掲載されることが通例であり、失敗した実験データやその原因の考察、その他、数値としては示すことが難しい多くのノウハウが公表されることはない。本稿では、一般に論文では触れられない部分にも焦点を当て、著者らがコムギの形質転換系の確立を進める中で直面した課題を中心に紹介する。形質転換が困難な作物の遺伝子組換え研究の実際について、理解を深めていただければ幸いである。

II コムギの遺伝子導入と組織培養

植物の形質転換系においては、組換え体を得るために通常2つの過程を経る。すなわち、始めに宿主細胞のゲノムに外来DNAを組み込み、次に組織培養によりその細胞に由来する植物体を再生させる。コムギにおいては、組織培養が困難であることが、効率的な形質転換系の確立を妨げる主要な要因となる。なお、後述のように、品種によって適した遺伝子導入手法や組織

培養条件などは異なり、結果として形質転換効率が大きく異なる。また、コムギにおいて効率的な形質転換系が確立されている外植片（組織培養に用いる細胞）と遺伝子導入手法は限られている。

1 品種

コムギの形質転換を困難としている最大の理由は、組織培養が難しいことである。組織を培養してカルス化させて細胞を増殖させること、増殖した細胞から植物体を再分化させることの両方がコムギでは難しく、品種によってカルスの形成率や再分化効率は大きく異なる。こうした培養特性の品種間差によって、形質転換効率は大きく異なってくる。さらに、培養特性以外にも、外来DNAの組み込み易さや選抜薬剤への耐性程度などの品種間差が形質転換効率を左右する。

コムギの形質転換が初めて成功した際に用いられていた品種は、春コムギのBobwhiteであり (Vasil *et al.* 1992)、その後のほとんどの形質転換実験にもこのBobwhiteが用いられている (Sahrawat *et al.* 2003)。ただし、同じBobwhiteと名前が付いていても、形質転換効率が大きく異なる兄弟系統が存在する。Pellegrineschi *et al.* (2002) により、CIMMYTの保有するBobwhiteと名の付く129系統についてカルスの形成率、再分化効率、パーティクルガン法による形質転換効率が調べられている。カルスの形成率は0%から100%まで、再分化効率は0%から89%まで、形質転換効率は0%から70%までと、大きな差が見いだされている。形質転換効率の系統間の差は、カルスの形成率や再分化効率だけでは説明できず、この他にも形質転換効率を左右する未知の要因があると考えられる。Bobwhiteの系統の中では、形質転換に適しているかつ早生で使いやすい1つの系統 (系統名, SH98 26) が選抜されている。

欧州の栽培品種のパーティクルガン法による形質転換効率は、平均で0.4%と報告されている (Varshney and Altpeter 2001)。著者らが日本の品種を用いた場合には、形質転換効率は欧州の品種と同程度の品種もあったが、全く成功しない品種もあった。日本の栽培品種である農林61号やイワイノダイチでは、これまでに数千個の外植片 (未熟胚) に遺伝子導入処理を行った

が、未だ導入個体は得られたことがない。北海道の冬コムギのキタノカオリを用いた場合は0.5%、古い品種の赤達磨では1.8%の効率で導入個体が得られた。Bobwhite SH98 26を用いた場合では4.0%であった。このように、品種によって形質転換効率は大きく異なる。また、アグロバクテリウム法においては、パーティクルガン法よりもさらに品種による影響が大きいことが知られている。このため、効率的なコムギ形質転換系の確立には、まず適した品種を用いることが大前提となる。

2 外植片

コムギを含む穀物の形質転換系において、未熟胚の胚盤組織は最も適した外植片となる。未熟胚を適切な培地で培養することにより、不定胚形成能を有するカルスを増殖させて、複数の植物体を再生することができる。その他に、未熟な花序 (Rasco-Gaunt *et al.* 1999) や花粉 (Folling and Olesen 2001, Ingram *et al.* 1999) を外植片として用いたコムギの形質転換例もあるが、その報告数は未熟胚に比べて圧倒的に少ない。そこで、ここでは著者らも用いている未熟胚を外植片とした場合について述べる。

外植片となる未熟胚には組織培養に適した発育ステージがある。胚は、未熟なほど細胞の分化能が高く、培養して不定胚を形成できるが、発達ステージが進むにつれて分化能は低下し、不定胚を形成しにくくなる (He *et al.* 1988)。一方、形質転換系には遺伝子導入や選抜の工程があり、未熟な胚ほど培養操作によるダメージに耐えることができない。このような理由から形質転換系の外植片としては、品種や生育環境などによって多少異なるが、胚の直径が1-1.5 mmの発育ステージII (Rogers and Quantrano 1983) にあたる未熟胚が適している。

イネでは完熟種子の胚を外植片として利用できるように、種子を保存しておけばすぐにでも実験を開始することができるが、外植片として未熟胚を用いねばならないコムギでは、その調製に時間がかかる。このため、実験をスムーズに

進行させるには、計画的に植物材料を育成しておく必要がある。著者らは、常時、同じインターバルで播種して植物材料を育成し、未熟胚を得られるようにしている。一般的なコムギの育成温度（平均18℃）では、開花約2週間後の未熟胚が形質転換に適した発育ステージとなるが、1日に開花する小花数は、植物体1個体あたり多くて20個程度しかない。加えて、胚は発達過程にあり、実験に適した発育ステージにとどまる期間は短いため、発育ステージがそろった未熟胚を一定量得るためには、育成する植物材料も相当数準備する必要がある。

人工気象器で温度、湿度、照度、日長など生育環境を厳密に制御して植物材料を育成した場合でも、均一な未熟胚を揃えて得ることは容易ではない。例えば、同じ穂の中でも、小花の付いている位置によって登熟環境が異なり、胚の発育ステージが異なる。穂の先端部の小花はもととも種子が小さく、胚乳の水分が少ない上に、上方に設置した陽光ランプに近く、照射光による熱のため登熟が早く進む。一方で、基部の小花は種子が大きく、胚乳の水分が多いため登熟が遅くなる。このような理由から、同じ日に開花した小花であっても、穂の先端部の未熟胚は発育ステージが進んでおり、基部の未熟胚は発育ステージが進んでいないという傾向がある（図1）。また、植物材料を育成する土の種類と量、水や肥料の与え方などによっても、未熟胚の大きさや形状、色が異なり、その後の組織培養での反応も変わってくる。このような変化の幅が生じる原因の一つとして、未熟胚中の植物ホルモンの影響が示されている（Hess and Carman 1998, Jimenez and Bangerth 2001）。パーティクルガン法では、未熟胚の早熟発芽を抑えてカルス形成率を高めるために、未熟胚の

幼芽と幼根を含む胚軸を切徐して用いられることが多い（図2）。

植物材料の育成環境が変わると、実験結果に再現性が得られなくなることがある。著者らの経験談としては、新しく人工光の育成室を使い始めた際に、それまで維持してきた遺伝子導入効率が、4ヶ月間にわたり全く得られないことがあった。このときに執った対策は、灌水量を減らしたことと、遅れ穂を刈り取ってポット当たりの穂数を少なくしたことで、この処置により、効率は低いながらも組換え体は得られるようになった。しかし、最終的には自然光の育成室を新たに利用できるまで、以前の効率には回復しなかった。人工光のみで育成した植物体は、自然光で育成したものと比較して外見上の大きな違いはなく健全に見えたが、外植片の生理状態は形質転換に適していなかったと考えられる。植物材料の育成環境は、外植片の細胞が外来DNAを取り込むことのできる能力（competency）に影響を与え、その能力が高いかどうかは、導入処理を行ってから形質転換効率を確認するまで、最低でも3ヶ月後にならないと判明しない。そして、その後に植物材料の育成環境の見直しを始めるため、上記のような不具合が生じた場合には、実験計画は大きく遅れてしまうことになる。

このように、未熟胚の生長は植物材料の生育環境に敏感に反応し、その状態が形質転換効率を大きく左右する。形質転換に適した外植片の状態などを数値化することができないため、他所で確立された形質転換系を自分の実験室で再現しようとする場合に、つまづく原因となりやすい。外植片は形質転換系の出発点であり、良好な外植片を用意できるかどうか、コムギ形質転換を成功させるための最初の難題である。

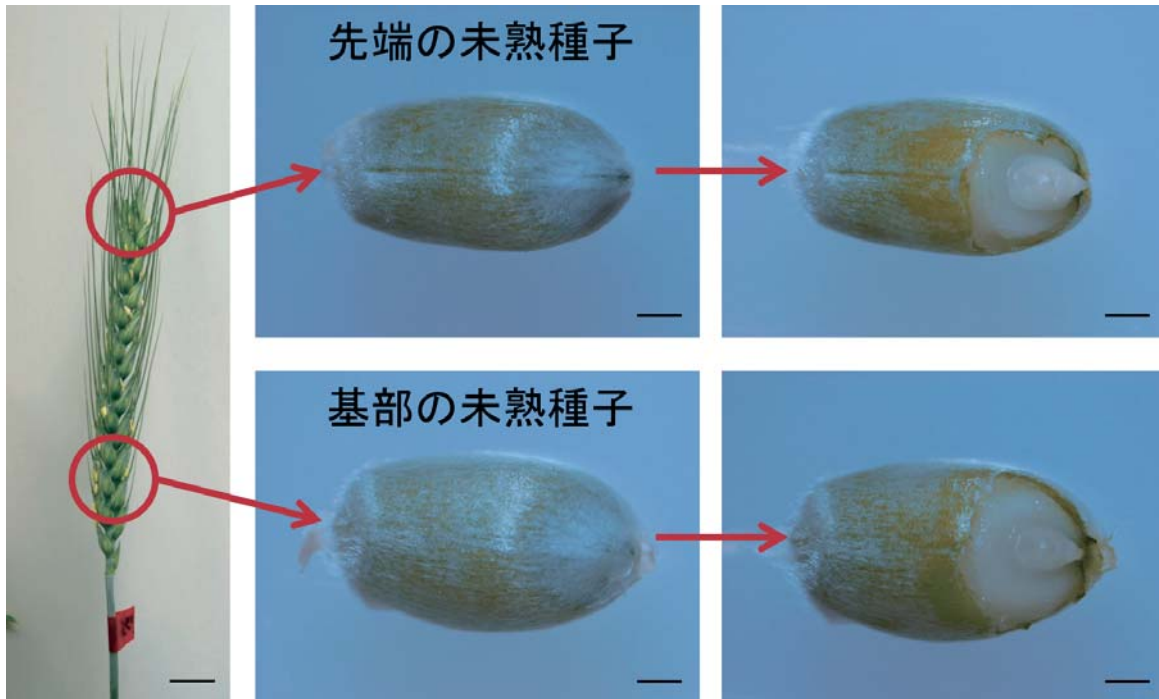


図1 穂の先端と基部の未熟種子とその未熟胚の発育ステージ

穂の先端と基部よりそれぞれ未熟種子を取り出し(中)、種皮を剥いて未熟胚を観察した(右)。未熟種子は基部の方が大きいですが、未熟胚は先端の方が大きく発育ステージも進んでいる。パーティクルガン法では、この写真での基部の未熟胚ほどの発育ステージが適している。Barは、左の穂の写真は1 cm、種子の写真は1 mm。

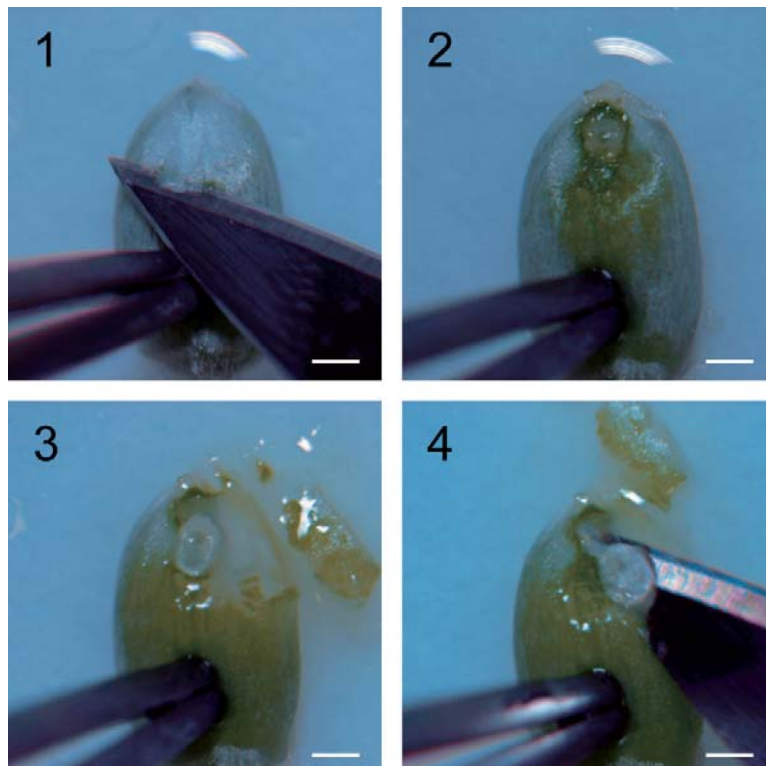


図2 外植片の準備

メスを使って未熟胚の胚軸を、切り取り(1, 2)、胚盤部分を取り出し(3)、裏返して胚盤側を上に向けて(4)、培地に置く。

Bar=1 mm

3 遺伝子導入手法

コムギの遺伝子導入手法としては、パーティクルガン法とアグロバクテリウム法が用いられる。これらの手法には、それぞれ利点と欠点がある。

1) パーティクルガン法

パーティクルガン法では、DNAをコーティングした金やタンゲステンの粒子を、減圧したチャンバー内で細胞に打ち込む。細胞の核内まで到達したDNA分子は、ゲノムDNAの損傷からの修復や複製の過程でゲノム内に組み込まれると考えられている。コムギの形質転換は、初めパーティクルガン法を用いて成功し (Vasil *et al.* 1992)、その後もパーティクルガン法は、コムギにおける遺伝子導入手法として広く用いられてきた (Sahrawat *et al.* 2003)。この手法は、外来DNAの導入効率が高く、植物に限らず広範囲の生物種に適用が可能である。コムギにおいても、欧州の多くの品種での適用例がある (Varshney and Altpeter 2001)。一方で、外来DNAがゲノムに多コピー組み込まれやすく不稔となったり、DNA配列の複雑な再構成が生じやすいため、導入した遺伝子の発現が不安定な組換え体が多いといった欠点がある (Barcelo *et al.* 2001, Kohli *et al.* 2003)。

パーティクルガン法の装置としては、Bio-Rad社製のPDS/1000Heが広く用いられている。この装置を用いる場合に設定できる条件について、未熟胚と未熟な花序を用いたコムギの形質転換系で詳しく検討されている (Rasco-Gaunt *et al.* 1999)。DNAを金粒子にコーティングするときの条件としては、DNAと金粒子の量比、使用する二価イオンの種類と濃度、スペルミジンの濃度、金粒子のサイズなどが検討されている。また、打ち込むときのPDS/1000He装置の条件としては、1回に打ち込むDNA量、打ち込みの加速圧、回数、打ち込む金粒子の飛散距離などが検討されている。パーティクルガン法ではこれらの導入に関する条件の設定は比較的容易で、

結果が安定して再現できるため、状態の良好な外植片を準備できれば、安定的かつ効率的なコムギの形質転換系の確立が可能である。

2) アグロバクテリウム法

アグロバクテリウムは、グラム陰性菌に属する土壌細菌で、自然状態では主に双子葉植物に感染し、クラウンゴールと呼ばれる腫瘍を形成する。Tiプラスミドに座乗するボーダー配列に挟まれたT-DNA (transfer DNA) を植物細胞に注入して、T-DNAを植物細胞のゲノムに挿入する。T-DNAには植物ホルモンを生成する遺伝子がコードされており、これによって植物体に腫瘍が形成され、アグロバクテリウムが増殖しやすい環境となる。アグロバクテリウム法では、このT-DNAの遺伝子配列を導入したい配列に置き換えることで、植物細胞に外来DNAを組み込むことを可能としている。

アグロバクテリウム法は、パーティクルガン法に比べて品種の適用範囲が狭く、外来DNAの導入効率は低い。しかしながら、ゲノムに組み込まれるコピー数が少なく、DNA配列の再構成も少ないため、導入した遺伝子が安定的に発現している個体が得られやすいという大きな利点を持つ。

双子葉植物で形質転換が可能な条件では、単子葉植物の細胞にはアグロバクテリウムが感染しないため、当初、単子葉植物でのアグロバクテリウム法の適用は困難であると考えられていた。しかし、Hiei *et al.* (1994) が初めて単子葉 (イネ) のアグロバクテリウム法に成功し、その後トウモロコシ (Ishida *et al.* 1996)、オオムギ (Tingay *et al.* 1997)、コムギ (Cheng *et al.* 1997) の順に成功例が報告されている。ただし、コムギのアグロバクテリウム法を用いた論文を継続して発表している研究機関は限られており、まだパーティクルガン法のように広く用いられている状況にはない。

Wu *et al.* (2003) により、コムギのアグロバクテリウム法による形質転換において、重要な条件が検討されている。単子葉植物では、アグロバクテリウムの感染を活性化させるフェノ

ール化合物のアセトシリングンの添加が必須であることが示されており、また、外植片に適した未熟胚のサイズ、感染液に加える界面活性剤 (Silwet L-77) の最適濃度、外植片の調製 (胚軸を切除する操作) から感染までの前培養時間が検討されている。前培養時間の検討では、胚軸を切除してから1時間を過ぎると感染効率が明らかに低下することが示され、この理由として、外植片の調製時の傷により病原菌への防御機構が働くためと考察されている。このことは、調製中の外植片の状態は時間単位で変化してしまうことを示している。微小な未熟胚を多数集めるためには時間を要するため、未熟胚を手際よく扱えるよう作業に習熟するといったことも、効率的な形質転換系の確立には重要な要素となる。

最近、石田ら (2009) によりアグロバクテリウム法によるコムギ形質転換系の改良法が報告され、著者らもこの改良法を用いることで、コムギの形質転換に成功するようになってきた。後述のように、パーティクルガン法では導入遺伝子が正常に発現している個体を得られにくいいため、この方法を用いて必要な数の形質転換体を得るには、アグロバクテリウム法の2倍以上の外植片を必要とする。このため、今後は導入を行わなければならない品種が限定される場合を除けば、アグロバクテリウム法を用いた形質転換系が主流となっていくものと思われる。

4 組織培養と選抜

遺伝子導入処理が行なわれた外植片は、次に組織培養の工程にはいる。培養してカルスを形成させ、外来DNAが組み込まれた細胞を選抜し、その細胞由来の植物体を再生させることが行われる。

1) 組織培養

コムギのカルス誘導には、合成オーキシンで

ある2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)が広く用いられている。イネやトウモロコシなどと比較して、コムギではカルスの増殖速度が低いいため、2mg/Lの2,4-D濃度のままカルスの培養期間を長くっていると、明らかに再分化効率が低下する。このため、最初に2mg/Lの2,4-D濃度でカルス誘導を行い (図3-1, 2)、その数日後に、0.5mg/Lの2,4-D濃度の培地に移植する (図3-3, 4)。そのまま1ヶ月ほどカルスを維持して細胞を増殖させた後、0.1mg/Lの2,4-Dと5mg/Lのzeatin (天然サイトカイニン) を含む再分化培地に移植して再分化シュートを形成させる (図3-5)。最後に、1cmまで成長したシュートを選び、植物ホルモンを含まない発根培地に植えて発根させる (図3-6)。

コムギの再分化効率に影響する要因として、カルス誘導時の2,4-Dの濃度、糖の濃度、硝酸銀や硫酸銅の添加などが検討されている (Sahrawat *et al.* 2003)。しかし、組織培養に関するこれらの要因は、用いる品種によりその効果が全く見られないこともあるので、品種ごとの検討が必要となってくる。

2) 選抜

コムギにおいて形質転換された細胞を選抜する薬剤としては、除草剤の有効成分であるフォスフィノスリシン (phosphinothricin, PPT) と抗生物質のカナマイシンあるいはハイグロマイシンを用いた例が多い (Sahrawat *et al.* 2003)。それぞれの耐性遺伝子 (*bar*, *nptII*, *hpt*) を選抜マーカー遺伝子として目的遺伝子と同時に導入することで、選抜薬剤に耐性の細胞を選択的に増殖させることができる。その他には、*phosphomannose isomerase* (*pmi*) 遺伝子 (Wright *et al.* 2001) やイネ由来の変異型アセト乳酸合成酵素 (*ALS*) 遺伝子 (Ogawa *et al.* 2008) を、選抜マーカー遺伝子として用いたコムギの形質転換例もある。

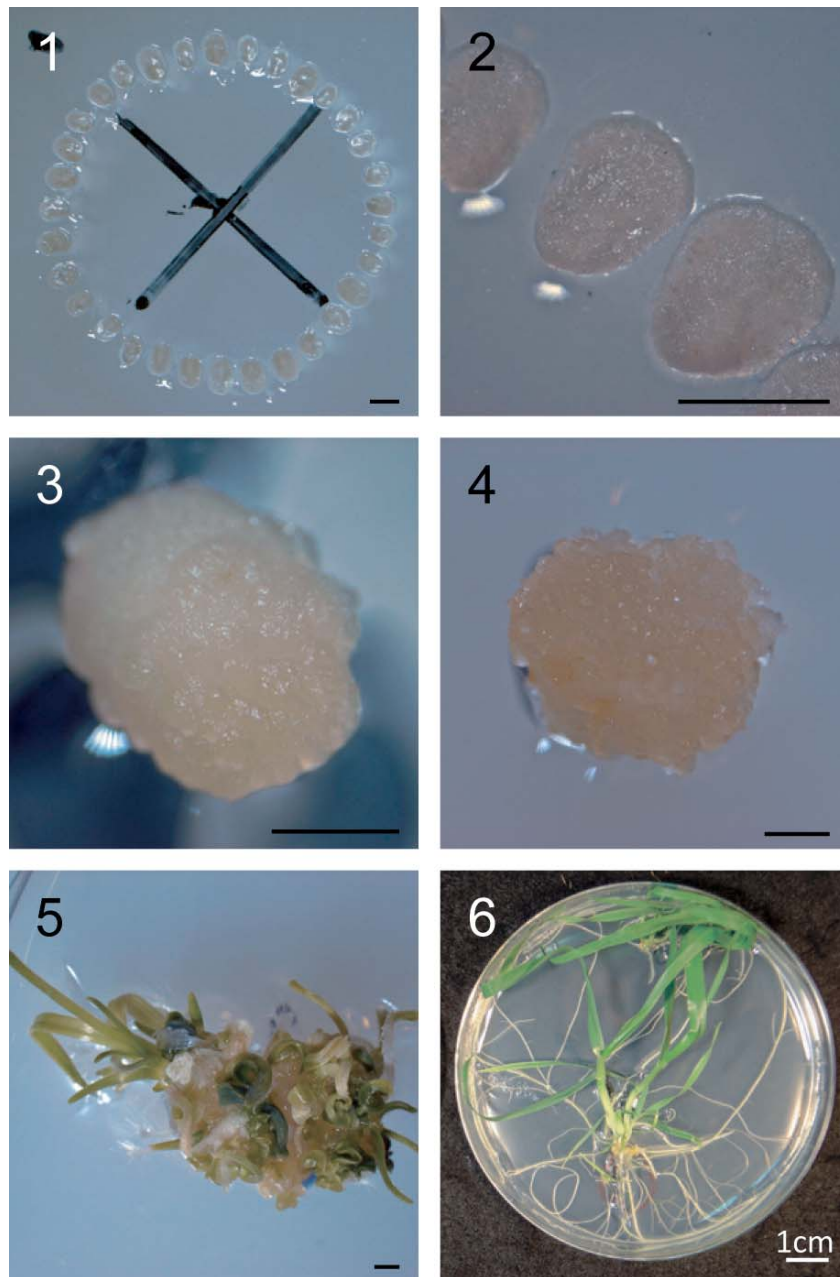


図3 コムギの形質転換と組織培養

1：パーティクルガンによる導入処理直前の外植片。胚軸を切り取った胚（32胚）を直径1 cmの円形に並べる。2：導入処理2日後の胚。3：導入処理1週間後の胚。カルスが形成されてくる。4：導入処理2週間後のカルス。5：再分化培地に移して3週間後。再分化シュートが成長してくる。6：発根培地で発根させる。
1-5：Bar=1 mm。6：Bar=1 cm。

著者らがパーティクルガン法を用いて、Bobwhite SH98 26の未熟胚に遺伝子導入を行い、PPTで選抜した実施例を紹介する。この場合、カルスの培養期間では3 mg/LのPPT濃度、再分化培地では1 mg/LのPPT濃度とし、発根培地では4 mg/LのPPT濃度を用いて選抜を行っている。カルスの培養期間では選抜効果はあまり高くなく、ほとんど全てのカルスが増殖する。再分化時には選抜効果が強く出るので、選抜圧を下げ、再分化シュートをできるだけ形成させ、その後の発根培地で再び選抜圧を上げて強い選抜を行うようにしている。このような選抜の過程を経ても、導入遺伝子の組み込まれていないエスケープ個体が残存するため、鉢上げ後の植物体の葉の一部を利用してゲノムDNAを抽出し、PCR法を用いて導入遺伝子の存在を確認することで最終的な選抜を行っている。

上記の選抜条件で、導入した外来DNAが培養過程でどのように発現しているかをモニターした。レポーター遺伝子として*GUS*遺伝子（β-グルクロニダーゼ遺伝子：この遺伝子産物と合成基質による青い呈色反応を利用して遺伝子発現を容易にチェックできる）を用い、パーティクルガン法で*GUS*遺伝子を導入した直後から継続的に*GUS*の発現状況を調べた。その結果、導入直後から数日後まで、調べた全ての胚の全体にわたって、相当に強い*GUS*の発現が見られた（図4）。その後は、部分的に染色の強度に違いが生じてくるが、30日後でも調べた全てのカルスで*GUS*の発現が見られた（図4）。次に、再分化培地に移植して7日後のカルスに再分化シュートが形成された段階で調べたところ、中心のカルス部分では強い*GUS*の発現が確認されたにもかかわらず、それぞれのカルスに形成された再

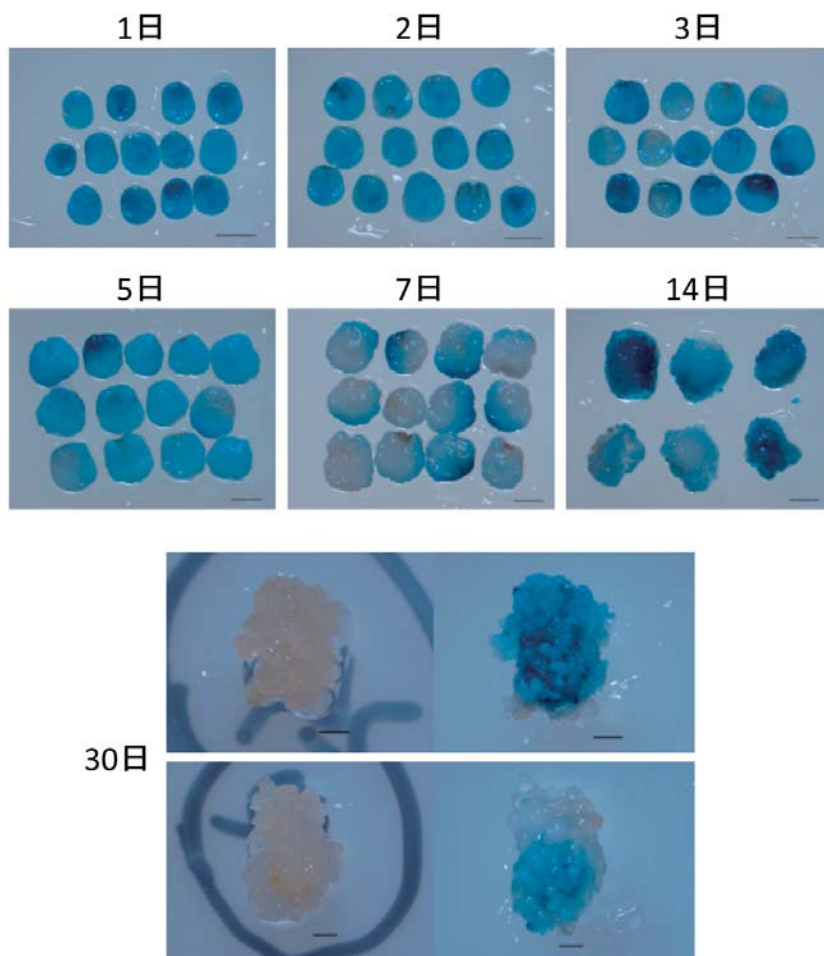


図4 GUS染色による培養中の形質転換細胞の検出

導入処理後から1日か継続的にサンプリングし、培養組織をGUS染色した。再分化培地に移す直前の30日後のカルスのみ、染色前（左）と染色後（右）の写真を示した。
Bar=1 mm

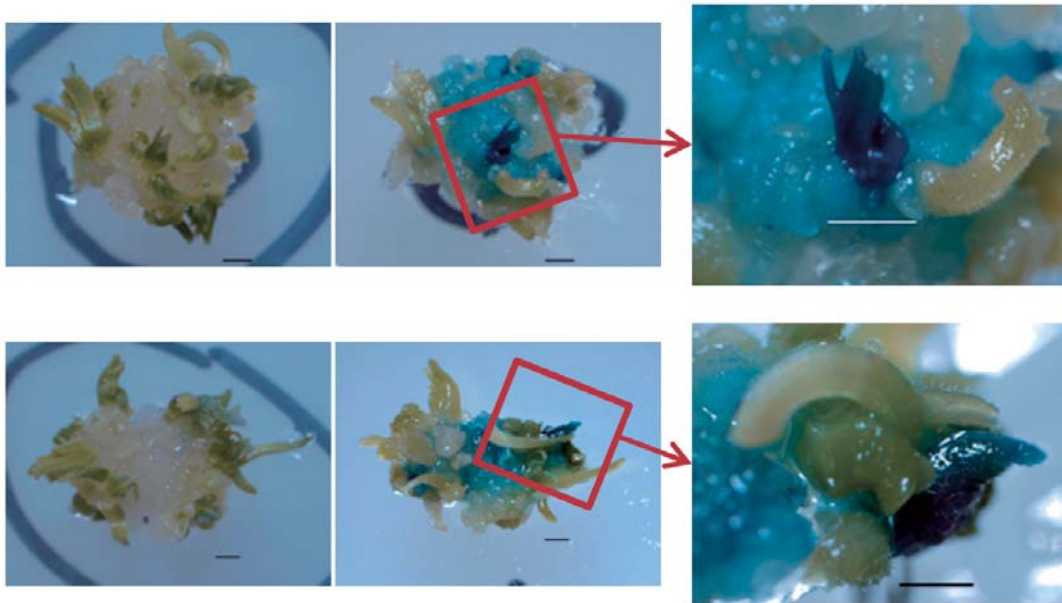


図5 GUS染色による形質転換シュートの検出

再分化培地に置床7日後の培養組織をGUS染色した。写真は上下列ともGUS染色前(左)、GUS染色後(中)、GUS活性の見られた再分化シュートの拡大写真(右)。一つの培養組織から10本ほどの再分化シュートが成長してきているが(左)、GUS活性が観察される再分化シュートはそれぞれの培養組織では1本のみであり(中)、そのすぐ横の再分化シュートはGUS活性が見られない(右)。Bar=1 mm。

分化シュートのほとんどは、GUSの発現が確認されなかった(図5)。この実験では再分化シュートを形成したカルスを12個調べたが、このうちGUSが発現している再分化シュートを持つカルスは3個だけであり、GUS発現の見られる再分化シュートは一つのカルスあたり1本だった。つまり、カルスには形質転換細胞が常に存在し

ているが、そのうちのごく一部しか形質転換された植物体として再分化してこないことになる。このため、形質転換効率を高めるには、いかに不定胚を形成しうる細胞に遺伝子が導入できるか、あるいは、遺伝子の導入された細胞からいかに効率的に不定胚を形成させることができるかという観点からの検討が可能だと考えられる。

III 導入遺伝子の発現

外来DNAが組み込まれた植物体を得られたとしても、その個体で目的遺伝子が発現しているとは限らない。前述のようにパーティクルガン法においては、導入遺伝子が安定的に発現している個体を得られにくい。

1 導入遺伝子の再構成

導入遺伝子は一般的に、遺伝子発現を誘導するプロモーター配列、発現させたい遺伝子のアミノ酸配列をコードする配列、転写終結させる

ターミネーター配列を連結させた発現カセットで構成される。パーティクルガン法では、細胞の核に外来DNAが到達してからゲノムに組み込まれるまでの間に、発現カセットの一部が分解されたり、それらが繰り返し連結されたり、相同な部位で他のDNA分子と組換えが起こるなど、DNA配列の複雑な再構成が生じる(Kohli *et al.* 2003)。このような再構成があると、発現カセットの構造が維持できなくなり、その遺伝子の発現が得られない。一方、アグロバクテリウム法では、アグロバクテリウムがつくる感

染に關与するタンパク質と一本鎖のT-DNAの複合体の状態で細胞内に注入されるため、組み込みの過程でのDNA配列の再構成が抑制されるという利点がある。

薬剤により選抜されてくるのは、選抜マーカーとして用いている薬剤耐性遺伝子が発現している細胞であり、その細胞で目的遺伝子が発現しているとは限らない。当然ながら、得られた組換え体には選抜マーカー遺伝子に比べて目的遺伝子の発現カセットが正常でない確率が高くなる。著者らは、*GUS*遺伝子（その発現は選抜されない）を目的遺伝子として用いて、パーティクルガン法とアグロバクテリウム法で形質転換を行い、作出した組換え体での*GUS*遺伝子の発現状況を調査した。PCR法で選抜マーカー遺伝子が組み込まれていることを確認した遺伝子導入個体は、パーティクルガン法では67個体、アグロバクテリウム法では13個体を得たが、そのうちそれぞれ42個体（63%）と12個体（92%）が目的遺伝子（*GUS*）の形質転換体であった（表1）。パーティクルガン法で作出した個体については、形質転換体の約3割にあたる13個体が不稔であり、29個体からのみ自殖種子が得られた。つまりこの結果からは、パーティクルガン法で作出した67個体のうち、形質転換体としてその後の解析に使える個体は43%しかないと判明した。一方、アグロバクテリウム法で作出した個体には不稔の個体はなく、作出した個体の92%がその後の解析に使えることとなる。すなわち、薬剤選抜の後、パーティクルガン法ではアグロバクテリウム法の2倍以上の個体数を作出しなければならない計算となる。このように、導入遺伝子の脱落・再構成の少ない、

“質の高い”形質転換体を作成するためには、アグロバクテリウム法の方が有効である。

2 DNAの導入形態の影響

パーティクルガン法では、大腸菌で大量に増幅できる環状のプラスミドDNAを金粒子にコーティングする方法が主流であるが、プラスミドDNAには、大腸菌内での複製には必要だが植物の形質転換には不要なベクター配列という部分が含まれ、目的遺伝子と共に植物細胞に導入されてしまう。このベクター配列を除いた直鎖状DNAを導入することで、導入されるコピー数が少なくなり、導入遺伝子が安定して発現している個体を得られやすいことが報告されている（Uzé *et al.* 1999, Yao *et al.* 2006）。この方法では高純度で高濃度の直鎖DNAを準備しなくてはならないが、効果的に植物細胞で導入遺伝子を発現させるためには有効な手段の1つである。

プラスミドの構造としては、1つのプラスミドDNAに目的遺伝子と選抜マーカー遺伝子の発現カセットが含まれている場合と、別々のプラスミドDNAに分かれている場合があるが、著者らはそれぞれで形質転換効率が異なることを確認している（表1）。選抜マーカー遺伝子（*bar*）とレポーター遺伝子（*GUS*）が1つのプラスミドDNAに含まれる場合（表1；single）と、*bar*と*GUS*をそれぞれ2つのプラスミドに分けて1:1.5のモル比で混ぜて共導入した場合（表1；co）の形質転換効率を調べたところ、形質転換効率はsingleがcoの倍以上高かった（表1）。2つのプラスミドDNAに分けて導入した

表1 コムギ形質転換系の遺伝子導入効率と形質転換効率

導入手法	導入DNA	導入処理未熟胚数	PCR+個体数	遺伝子導入 ^a 効率 (%)	GUS+個体数	形質転換 ^b 効率 (%)	不稔個体数
パーティクルガン法	single	1632	67	4.10	42	2.57	13
	co	1440	35	2.43	16	1.11	4
アグロバクテリウム法		393	13	3.31	12	3.05	0

^a 遺伝子導入効率=PCR+個体数/導入処理未熟胚数×100

^b 形質転換効率=GUS+個体数/導入処理未熟胚数×100

場合でも、後代での分離を調べると、全ての個体で *bar* と *GUS* が共分離しており、*bar* と *GUS* の両方とも1つの遺伝子座に組み込まれていると考えられた。選抜マーカー遺伝子のプラスミドを分けることは、目的とする遺伝子の発現カセットとの組み合わせを頻繁に変える場合には都合が良い。ただし、効率が2倍ほど異なることを考慮すると、作業量の観点からは、1つのプラスミドに選抜マーカー遺伝子と導入の目的となる遺伝子をまとめた方が能率は良くなる。

3 導入遺伝子の発現量

著者らは、イネとコムギの両方で、同一コンストラクトを導入した組換え体を扱った経験がある。CaMV 35Sプロモーター、もしくは、トウモロコシのユビキチンプロモーターの下流に *GUS* 遺伝子を連結したコンストラクトである。どちらのコンストラクトについても、イネに比べてコムギで *GUS* の発現が弱かった。CaMV 35Sプロモーターは、イネの葉では *GUS* の発現が確認できるが、コムギの葉では全く発現が見られない。トウモロコシのユビキチンプロモーターについては、イネでは活性反応液に入れるとすぐに青い染色が観察されるのに対して、コムギでは1日反応させて染色がかるうじて観察できる程度である。同一プロモーターを用いた場合

くつかに、イネに比べてコムギでの目的遺伝子の発現が弱い原因としては、コムギのゲノムサイズが大きいことが考えられる。コムギは、イネの約35倍のゲノムサイズを持つが、発現している遺伝子の種類はほぼ同じである。このことからコムギでは、ゲノムの中で発現遺伝子のない領域の割合はイネと比較して多くなっており、このような、遺伝子が発現しにくいようなゲノム領域に外来DNAが組み込まれる確率が必然的に高くなっていると考えられる。また、異質六倍体であるため、同祖遺伝子の発現制御が複雑であることも、組み込まれた外来DNAの発現に影響していると考えられる。

導入遺伝子の発現量や発現部位の制御をするために、今後有用な新規プロモーターの開発は重要になると思われる。近年、発現カセットのプロモーター以外でも、発現量を増やすための改良方法がイネなどで報告されている。イネの *alcohol dehydrogenase* 遺伝子の5'非翻訳領域を遺伝子上流部分に結合させることで、転写産物の量は同じでもタンパク質への翻訳を増加させることが示された (Sugio *et al.* 2008)。また、ヒートショックタンパク質のターミネーターを用いることで、転写産物が多く蓄積することが示されている (Nagaya *et al.* 2010)。これらの技術が、コムギで機能するか未確認であるが、今後の活用が期待される。

IV 最後 に

遺伝子組換え技術を用いたコムギの様々な形質の改良—除草剤耐性、病虫害耐性、環境ストレス耐性、栄養価・品質、収量性—は、全世界で精力的に進められている (Vasil, 2007)。作物研究所におけるコムギの遺伝子組換え研究では、耐穂発芽性、耐湿性が重要な研究対象となっており、著者らはこれらの形質改良に向けて遺伝子機能解析を進めている。耐穂発芽性に関わる遺伝子については、種子の登熟と発芽の過程で発現する遺伝子の網羅的な解析からいくつか

の候補が発見され、このうちの1つは、種子の休眠を深くすることで、コムギを発芽させないように働く遺伝子であることを遺伝子組換え技術を利用して実証することができた (Nakamura *et al.* 2011)。また、耐湿性に関しては、根の通気組織に着目し、通気組織を十分に形成するトウモロコシの近縁野生種の特オシントおよびイネから通気組織形成に関与することが期待される遺伝子を単離し、コムギへ導入して効果を検証する研究を進めている。この取り組み

は、交雑のできない異なる種を遺伝資源として利用し、その有用な遺伝子のみを導入できるという遺伝子組換え技術の最大の利点を活用した画期的な試みである。GMコムギの商業栽培はなされていないものの、重要な穀物であるコムギの遺伝子機能解析は、大きな価値を生み出す可能性がある。コムギにおいてどのような遺伝子がどのように改変されれば有効なのか、さらなる研究が必要である。

コムギの形質転換系の確立に向けて検討を行う場合、長期的な取り組みが欠かせない。その先の遺伝子組換え技術を用いた遺伝子機能解析まで含めれば、さらに長期的な視点が必要である。形質転換が成功か失敗かといった結果を得るためには1年近くの時間を要する。植物の育成、遺伝子導入処理、組織培養、植物体で導入遺伝子発現の確認を行うまで、多くの工程を経

る。そこで、失敗という結果となったときに、研究を始めたばかりの段階ではどれだけの原因があるのかを正確に特定することはほぼ不可能である。系の確立が困難であることを認識し、焦らず継続することが重要となる。特に、アグロバクテリウム法では、未熟胚を切り出してから感染までの時間によって感染効率が左右されることから、作業を習熟するといったことも系の確立に重要な要素となることは先に述べた通りである。こうしたことは、実際に手を動かしてみなければ、その困難性や重要性が理解できないものと思う。現状では、コムギの遺伝子組換え技術に関してわが国での取り組みは明らかに不足している。今後、長期的な視点に立った人材の確保、養成がなされ、より多くの取り組みが進展することを期待する。

謝 辞

農研機構作物研究所川口健太郎氏には、組換え研究における多大なる協力および本稿の校閲をいただいた。農研機構生研センターのイノベーション創出事業課題において、著者らと共同で研究を行っている農研機構作物研究所小柳敦史氏、名古屋大学大学院中園幹生氏、農研機構畜産草地研究所間野吉郎氏、国際農林研究センター小原実広氏には、遺伝子組換え技術による通気

組織形成能を改変した新規コムギの作出を目指す中で、今後求められるコムギの遺伝子組換え技術に関して有用な議論を行うことができた。また、綿貫裕子氏、内藤由美氏、吉原旬子氏、藤野敬子氏には、大変細かいコムギの形質転換作業の実験補助を行っていただいた。各氏に対し、ここに深く感謝の意を表する。

引用文献

Barcelo, P., S. Rasco-Gaunt, C. Thorpe and P.A. Lazzeri (2001) Transformation and gene expression. In: P.R. Shewry, P.A. Lazzeri, K.L. Edwards (eds) *Advances in Botanical Research 34: incorporating Advances in Plant Pathology*. Academic Press, London, 59-126 pp

Cheng, M., J.E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C.M. Hironaka, D.R. Duncan, T.W. Conner and Y. Wan (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115, 971-980.

Folling, L. and A. Olesen (2001) Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-

- derived callus and microspores by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 20, 629-636.
- He, D.G., Y.M. Yang and K.J. Scott (1989) A comparison of scutellum callus and epiblast induction in wheat: the effect of genotype, embryo age and medium. *Plant Sci.* 57, 225-233.
- Hess, J. and J. Carman (1998) Competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment and endogenous hormone levels. *Crop Sci.* 38, 249-253.
- 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 DNA. *Plant J.* 6, 271-82.
- Ingram, H.M., J.B. Power, K.C. Lowe and M.R. Davey (1999) Optimisation of procedures for microprojectile bombardment of microspore-derived embryos in wheat. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 57, 207-210.
- Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari and T. Kumashiro (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat. Biotechnol.* 14, 745-750.
- 石田祐二・樋江井祐弘・小鞠敏彦 (2009) アグロバクテリウムによるコムギの形質転換法の改良. 第27回植物細胞分子生物学会講演要旨集, 150pp.
- Jimenez, V.M. and F. Bangerth (2001) Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 67, 37-46.
- Kohli, A., R.M. Twyman, R. Abranches, E. Wegel, E. Stoger and P. Christou (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol. Biol.* 52, 247-258.
- Nagaya, S., K. Kawamura, A. Shinmyo and K. Kato (2010) The *HSP* terminator of *Arabidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells. *Plant Cell Physiol.* 51, 528-332.
- Nakamura, S., F. Abe, H. Kawahigashi, K. Nakazono, A. Tagiri, T. Matsumoto, S. Utsugi, T. Ogawa, H. Handa, H. Ishida, M. Mori, K. Kawaura, Y. Ogihara, and H. Miura (2011) A wheat homolog of MOTHER OF FT AND TFL1 acts in the regulation of germination. *Plant Cell* 23, 3215-3229.
- Ogawa, T., H. Kawahigashi, S. Toki and H. Handa (2008) Efficient transformation of wheat by using a mutated rice acetolactate synthase gene as a selectable marker. *Plant Cell Rep.* 27, 1325-1331.
- Pellegrineschi, A., L.M. Noguera, B. Skovmand, R.M. Brito, L. Velazquez, M.M. Salgado, R. Hernandez, M. Warburton and D. Hoisington (2002) Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants. *Genome* 45, 421-430.
- Rasco-Gaunt, S., A. Riley, P. Barcelo, P.A. Lazzeri (1999) Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Rep.* 19, 118-127.
- Rogers, S.O. and Quatrano R.S. (1983) Morphological staging of wheat caryopsis development. *Amer. J. Bot.* 70, 308-311.
- Sugio, T., J. Satoh, H. Matsuura, A. Shinmyo and K. Kato (2008) The 5'-untranslated region of the *Oryza sativa* alcohol dehydrogenase gene functions as a translational enhancer in monocotyledonous plant cells. *J. Biosci. Bioeng.* 105, 300-302.
- Sahrawat, A.K., D. Becker, S. Lütticke and H. Lörz (2003) Genetic improvement of wheat via alien gene transfer, an assessment. *Plant Sci.* 165, 1147-1168.
- Tingay, S., D. McElroy, R. Kalla, S. Fieg, M. Wang, S. Thornton and R. Brettell (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* 11, 1369-1376.
- Uzé, M., I. Potrykus and C. Sautter (1999) Single-stranded DNA in the genetic transfor-

- mation of wheat (*Triticum aestivum* L.): transformation frequency and integration pattern. *Theor. Appl. Genet.* 99, 487-495.
- Varshney, A. and F. Altpeter (2001) Stable transformation and tissue culture response in current European winter wheats (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Breed.* 8, 295-309.
- Vasil, V., A.M Castillo, M.E. Fromm and I.K. Vasil (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/technology* 10, 667-674.
- Vasil, I.K. (2007) Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep.* 26, 1133-1154.
- Wright, M., J. Dawson, E. Dunder, J. Suttie, J. Reed, C. Kramer, Y. Chang, R. Novitzky, H. Wang and L. Artim-Moore (2001) Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. *Plant Cell Rep.* 20, 429-436.
- Wu, H., C. Sparks, B. Amoah and H.D. Jones (2003) Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep.* 21, 659-668.
- Yan, L., D. Fu, C. Li, A. Blechl, G. Tranquilli, M. Bonafede, A. Sanchez, M. Valarik, S. Yasuda and J. Dubcovsky (2006) The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 19581-19586.
- Yao, Q., L. Cong, J.L. Chang, K.X. Li, G.X. Yang and G.Y. He (2006) Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment. *J. Exp. Bot.* 57, 3737-3746.