

エレクトロポレーション法による形質転換リンドウの作出

Production of Transgenic Gentian (*Gentiana triflora* var *japonica*) by Electroporation

工藤陽史*・田中正美

Kiyofumi KUDOH and Masami TANAKA

要 約

リンドウ属 (*Gentiana*, s. lat.) への遺伝子導入技術は確立されていない。本研究では葉肉プロトプラストを用いたエレクトロポレーション法による外来遺伝子導入条件及び形質転換体の再分化条件を明らかにした。あわせて、自殖後代 (T₁) での導入遺伝子の確認を行い、実用遺伝子導入への一連の道筋を示した。導入条件として、波形は矩形波、パルス幅は10ms、電界強度は325V/cm、プロトプラスト濃度は 3.6×10^8 cells/ml、プラスミドDNA濃度は20 μ gがGUSやhpt遺伝子の取り込みとプロトプラストの生存率及びその後の生育から最適であった。再分化条件として、プロトプラストが初期分裂を開始する4日間程度はピペット操作等による衝撃を避ける養成培養や活性炭0.2mg/l添加のゲルライトベースは高い効果を示した。また、選抜はハイグロマイシンを20mg/l添加した選抜培地がよく、hpt遺伝子処理したプロトプラストを約6週間培養して形成したマイクロカルスを選抜培地で3週間培養し、新たな選抜培地に継代することで多数の形質転換体が得られた。順化した形質転換体の花粉粘性は系統間差があったが、自殖して得られたT₁世代でもサザンハイブリダイゼーションによって導入したhpt遺伝子が確認された。

キーワード：リンドウ、プロトプラスト、エレクトロポレーション、形質転換

I 緒言

リンドウは熊本県の県花であり、夏期の切り花として高い需要がある。本県では古くから阿蘇地域など夏期冷涼な地域で栽培されてきたが、現在、生産地では褐色根腐病や複数のウイルス病などによる病害が問題となっている。このため病害抵抗性品種の育成が望まれている。しかし、交雑可能なリンドウ種内には相当する形質遺伝子がなく、従来の交配育種のみでの解決は困難と考えられている。このための一手法として他の生物が保有する有用な遺伝子資源を利用した遺伝子組換え技術による新品種育成が考えられる。

外来の有用遺伝子を導入する試みは各種作物に対して実施され、既に米国では除草剤耐性ナタネや害虫抵抗性トウモロコシ等が実用化されている¹⁾。また、国内ではイネやトマト等でウイルス抵抗性品種など実用化に向けて開発が進んでいる²⁾。リンドウについては複数の研究機関で研究が開始され、本報告の他に葉片を用いたアグロバクテリウム法²⁾や懸濁培養細胞を用いたパーティクルガン法³⁾で遺伝子の導入が確認されている。しかし、

有用遺伝子を導入した実用品種の育成には多数の形質転換体が必要であり、より有効で形質転換獲得の安定する技術が必要とされている。

このような観点から著者らが開発した1gのリンドウ葉から約300個体の再生植物を育成させるプロトプラスト培養法⁴⁾を活用して、エレクトロポレーション法による外来遺伝子の導入法を検討した。すなわち、無菌的に培養したエゾ系リンドウ (*Gentiana triflora* var *japonica*) の葉肉プロトプラストを用い、GUS (β -グルクロニダーゼ) レポーター遺伝子及びhpt (ハイグロマイシンリン酸化酵素) 遺伝子をエレクトロポレーション法 (EP) により導入処理を行った。その結果、hpt遺伝子及びGUS遺伝子を染色体上に組み込んだ形質転換体 (T₀) 作出に成功し、また、その後代であるT₁植物体のゲノムDNAでもhpt遺伝子の存在が確認されたのでここに報告する。

II 材料及び方法

1 供試材料

*熊本県宇城事務所農業振興室

エゾ系リンドウの側芽の茎頂組織を無菌的に切り取り、MS培地組成 (Murashige & Skoog:1962) を1/2にし、1% サッカロース、0.02mg/l NAA (ナフタレン酢酸)、2mg/l BA (ベンジルアデニン) を加え、pH 5.75に調整した液体培地に置床して、25°C、16時間照明下に毎分2~3回の回転で40日間程度培養して形成された多芽球体⁹⁾を必要に応じてMS培地で生育させた植物体の成葉を材料とした。

プロトプラストは2%セルラーゼ・オノヅカR10及び0.2%マセロザイムR10のプロトプラスト単離用酵素に0.5Mマンニトール、0.1%塩化カルシウム、0.1%MESを加え、pH 5.75に調整した酵素液で16~18時間のovernight処理で単離した。

2 実験方法

実験は1995年から1998年にかけて以下の項目で実施したが、それぞれの試験方法の細目については結果及び考察の項に詳しく記した。

1) 形質転換体の作出

(1) 外来遺伝子導入の条件

外来遺伝子の導入には、HARIO製CFP-1の遺伝子導入装置を使用し、プロトプラストを入れるキュベットの電極間距離は0.4cm、外来遺伝子のプラスミドDNAはpBI221(P_{35S}+GUS+T_{NOS})を用いた。印加時の波形は矩形波、波形のパルス幅は10msと一定にして次の項目を検討した。

- ① エレクトロポレーション緩衝液への塩化カルシウム添加効果
- ② 導入処理時の印加電圧の強さ
- ③ 電圧の印加回数
- ④ プラスミドDNAの濃度
- ⑤ 導入処理時のプロトプラスト数

なお、プラスミドDNAの導入効率はMUG(4-メチルアンペリフェリイ-β-D-ガラクトフィラノサイド)を基質に、GUS活性を蛍光光度分析する生化学的方法と、X-Gluc(5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニドシクロヘキシミルアンモニウム)により呈色反応させる組織化学的方法で測定した⁹⁾。また、処理後のプロトプラストの生存率は血球計算板で測定し、各処理がプロトプラストの生育に与える影響については培養しているプロトプラストを1週間間隔に観察して生存数を調査した。

(2) プロトプラスト培養の条件

前項で確立した導入条件を用いて遺伝子導入処理をしたプロトプラストについて、分裂促進とカルス化する条件について次の項目を検討した。

- ① 養成培養の効果
- ② 液体培地の交換方法
- ③ 活性炭の添加方法

(3) 形質転換組織の選抜と植物体再分化の条件

pBI221のGUSUをHPTに置き換えたプラスミドDNA(P_{35S}+HPT+T_{NOS})を導入処理して形成されたカルスを用い、形質転換カルスを効率よく選抜し、同時に植物を再分化させる条件について次の項目を検討した。

- ① ハイグロマイシン濃度とカルスの大きさ
- ② 選抜培地へのカルスの移植時期
- ③ 二次選抜培地へのカルスの継代時期

(4) 発根・苗化と順化の条件

再分化した形質転換体を育成するために発根・苗化と順化条件について次の項目を検討した。

- ① 発根促進のためのホルモン濃度
- ② 発根・苗化のための培養温度

2) 形質転換組織の確認

(1) 組織化学的方法

プロトプラストに導入したGUS遺伝子の組み込みを呈色反応で確認するためX-Glucの反応時間について検討した。

(2) 導入遺伝子の検出

導入した遺伝子を塩基配列で確認するため、リンドウのゲノムDNAの抽出法とPCR法について次の項目を検討した。

- ① DNA抽出法の検討
- ② PCR法の改良

(3) サザンハイブリダイゼーション法による確認

導入した遺伝子の組み込み数についてサザンハイブリダイゼーション法で検討した。

3) コ・トランスフォーメーション法の確立

二種類のプラスミドDNAを混合して遺伝子を導入するコ・トランスフォーメーション法について、次の項目を検討した。

- (1) プラスミドDNAの混合量
- (2) PCR法によるコ・トランスフォーメーション効率の確認

4) 形質転換当代における特性

(1) 形質転換体の花粉粘性

形質転換当代について、閉鎖型の人工気象室で開花させ花粉粘性を調査した。

(2) ハイグロマイシン遺伝子の発現

PCR法で *hpt* 遺伝子の組み込みが確認できた系統について、ハイグロマイシン耐性の発現を選択培地に葉片培養することで検定した。

5) 自殖後代での *hpt* 遺伝子の動態

閉鎖型の人工気象室で開花させ、自殖して得られた後代での導入遺伝子の動態をPCR法及びサザンハイブリダイゼーション法で調査した。

III 結果及び考察

1) 形質転換体の作出

(1) 外来遺伝子導入の条件

- ① エレクトロポレーション緩衝液への塩化カルシウム添加効果

緩衝液は pH5.75に調整した0.5M マンニトール、0.2 mM ME S液とし、プロトプラスト膜の保護作用があるとされる⁷⁾ 塩化カルシウムの添加効果について、プラスミドDNAの濃度は 20 μ g/ml、プロトプラスト数は 1.2×10^5 cells/ml、印加回数は1回に固定して、印加電圧値を0~475V/cmまで変化させて検討した。

その結果、処理して48時間培養した後の GUS 活性は塩化カルシウム添加の緩衝液を使用した場合に著しく劣った(第1表)。波形に減衰波を利用したタバコやイネ⁸⁾ また、矩形波を用いたトマトの例では問題となっていない⁹⁾。しかし、今回のリンドウでは緩衝液中の塩化カルシウムは印加時にプロトプラストの破壊を増進するなど阻害的に働くと考えられた。

第1表 緩衝液中の塩化カルシウムの有無が蛍光分析による酵素活性に与える影響

塩化カルシウムの有無	印加電圧値 (V/cm)									
	0	175	200	225	250	275	300	375	425	475
無	5.8	5.5	21.7	33.2	68.7	57.2	209.3	198.5	112.1	148.6
有	-	7.3	6.0	6.1	5.2	24.0	33.1	13.7	26.6	17.6

* 酵素活性 (4-MU nmole / min/mg protein)

第2表 印加電圧がプロトプラストの生存に与える影響

印加電圧値 (V/cm)	0	125	175	225	275	325	375	425	475	525
生存率 (%)	100	90	89	73	50	36	20	4	3	3

注) 生存率: 2~3回試験の平均

第3表 印加電圧がプロトプラストの生育に与える影響

印加電圧値 V/cm	分裂頻度		コロニー形成	マイクロカルス形成
	2細胞	32細胞		
-	+++	+++	++	++
0	++	++	++	++
175	++	++	++	++
200	++	++	-	-
225	++	++	+	-
250	++	++	-	-
275	+	++	-	-
300	+	+	-	-
325	+	+	-	-
350	+	+	-	-
375	+ -	+	-	-
400	+ -	+ -	-	-
425	+ -	+ -	-	-
450	+ -	-	-	-
475	+ -	-	-	-
525	-	-	-	-

注) -:無、+-:極低、+:低、++:高、+++:極高

② 導入処理時の印加電圧の強さ

プロトプラストに与える印加電圧の影響について、プラスミドDNA濃度を20 μ g/ml、プロトプラスト数は 1.2×10^5 cells/ml、印加回数は1回に固定し、電圧値を0~525V/cmまで変化させて検討した。また、電極キュベットへプロトプラストを出し入れするピペット操作区をコントロールとし、数回の実験を繰り返して計測した。

その結果、375V/cmより高い電圧でプロトプラストの破壊が進んだ(第2表)のに対して、375V/cm以下の電圧まではプロトプラストは32細胞程度まで分裂が進み、225V/cm以下の電圧ではコロニーの形成が見られた(第3表)。

一方、遺伝子の取込みは、225V/cm以上で高いGUS活性が検出され(第4表)、X-Glucを用いた呈色反応による組織化学的方法でも225V/cm以上で活性が高かった(第5表)。

このように、プロトプラスト生存率と遺伝子の取込みを図示すると第1図となり、その後の生育状況からリン

ドウにエレクトロポレーション法で遺伝子を導入する際の電圧値は 325V/cm が最適と考えられた。

第4表 印加電圧が蛍光分析の酵素活性に与える影響

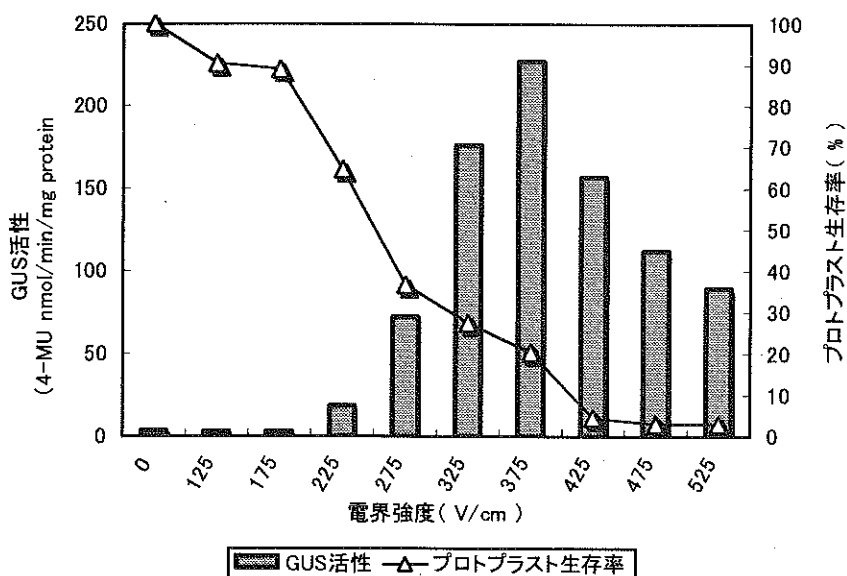
印加電圧値 (V/cm)	0	125	175	225	275	325	375	425	475	525
酵 素 活 性	6	3	2	21	74	228	176	157	114	88

注) 酵素活性: 4-MU nmole / min/mg protein、(2~5回試験の平均)

第5表 印加電圧がX-Glucaseの呈色反応与える影響

印加電圧値 (V/cm)	-	0	100	150	200	225	250	275	300	325	450	575
呈 色 反 応	0	0	0	0	1.5	6.0	6.0	4.0	8.3	5.0	0	0

注) 呈色反応: 発色細胞数 / EP操作前のプロトプラスト数 (1.2×10^5 cell)、(2~3回試験の平均)



第1図 印加電圧がプロトプラストの生存と酵素活性に与える影響

③ 電圧の印加回数

導入効率をあげる目的でプロトプラスト破壊の少ない200V/cm以下の低い電圧値で複数回印加を試みた。また、プラスミドDNA濃度は $20 \mu\text{g/ml}$ 、プロトプラスト数は 1.2×10^5 cells/mlに固定して、電圧印加回数を1~3回まで変化させて検討した。

その結果、印加回数の増加と共に GUS 活性の検出量は減少した(第6表)。このことから電圧の印加回数は1回が適当と考えられた。

第6表 電圧印加回数が蛍光分析の酵素活性に与える影響

印加電圧値 V/cm	印加回数	酵 素 活 性 (4-MU nmole / min/mg protein)
0	1	5.8
175	1	5.5
	2	12.2
	3	4.1
200	1	21.7
	2	7.3
	3	8.4
300	1	209.3

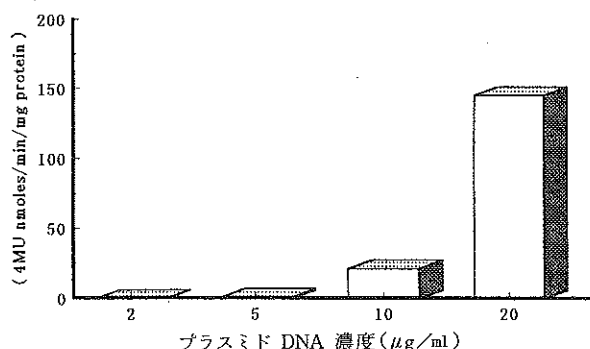
④ プラスミドDNAの濃度

プラスミドDNAを有効に使用して導入効率を上げるため、導入処理時のプラスミドDNAに pBI221を用い、電圧値は 325V/cm、プロトプラスト数は 1.2×10^5 cells/ml、印加回数は1回に固定して、プラスミド濃度を2~20 μ g/mlに変化させて検討した。

その結果、20 μ g/ml以下では濃度を上げるほど GUS 活性の検出量が増加し、特に20 μ g/mlでは著しかった(第7表、第2図)。

第7表 プラスミドDNA濃度が酵素活性に与える影響

プラスミド DNA 濃度 (μ g/ml)	酵 素 活 性 (4-MU nmole / min/mg protein)
2	0.03
5	1.01
10	21.58
20	145.48



第2図 プラスミドDNA濃度とGUS酵素活性

⑤ 導入処理時のプロトプラスト数

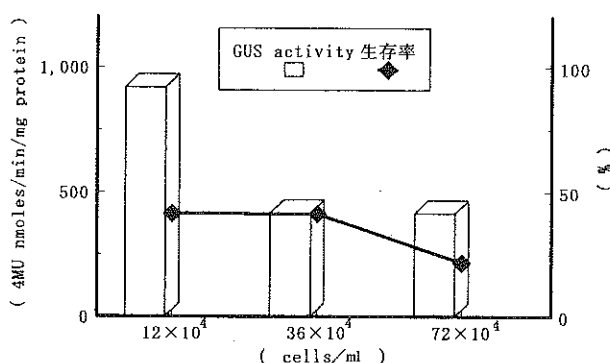
電圧印加時のプロトプラスト数について導入処理時の電圧値は325V/cm、プラスミドDNA濃度は20 μ g/ml、印加回数は1回に固定して、印加時のプロトプラスト数を 1.2×10^5 ~ 7.2×10^5 cells/mlに変化させて検討した。

その結果、GUS 活性の検出量は 1.2×10^5 cells/mlが最も多かったが、電圧印加直後の生存率は 1.2×10^5 cells/mlと 3.6×10^5 cells/mlとで差がみられなかった(第8表、第3図)。このことから電圧印加時のプロトプラスト数は 3.6×10^5 cells/mlが適当と考えられた。

第8表 印加時のプロトプラスト数が酵素活性に与える影響

プロトプラスト数 cells/ml	酵 素 活 性		生存率 %	生 存 数 cells/ml
	/protein	/ 10^5 cells		
1.2×10^5	10.3	79.7	41.5	5.0×10^4
3.6×10^5	9.5	39.2	41.4	14.9×10^4
7.2×10^5	7.5	41.0	21.6	16.6×10^4

注) /protein: 4-MU nmole / min/mg protein
/10⁵ cells: 4-MU nmole / min/10⁵ cells



第3図 印加時のプロトプラスト数と生存率及びGUS酵素活性

(2)プロトプラスト培養の条件

① 養成培養の効果

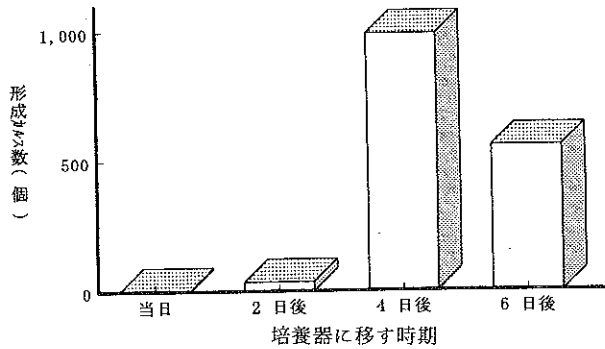
導入処理によるプロトプラスト破壊を少なくする目的で行った養成培養について、導入処理後、1)シャーレ当たり 3.6×10^5 cells/mlになるようにプロトプラスト数を調整し、直ちに液体培地に分注して培養する。2)導入処理した数回分(約 1.5×10^6 cells)をプロトプラスト培養液体培地10mlに懸濁し、26°C、暗黒下で2日、4日、6日間培養した後、プロトプラスト数を 3.6×10^5 cells/mlに再調整し、分注培養する方法で検討した。

その結果、養成培養の効果がみられ、特に4日間の養成培養が最も安定した(第9表、第4図)。プロトプラスト培養では多くの作物で培養開始3~4日目から細胞膜が形成されると同時に分裂が開始されることが知られている^{11, 12, 13)}。著者らもリンドウは早いものでは3日目から分裂することを確認している¹⁴⁾。一般に単離直後のプロトプラストは実験のためのピペット操作等の衝撃に不安定であり¹⁵⁾、導入処理時に電圧が加えられることで、いっそう壊れやすい状態にあると考えられる。そこで、

導入処理後に養成培養することでこの時期のピペット操作を少なくすることにより培養期間中に多くのプロトプラストが修復すること、さらに養成培養後の精製で枯死したプロトプラストが除かれること等でその後の培養が安定化する効果が認められた。一方、養成培養期間が6日間と長くなると養分の不足やプロトプラストの残骸が悪影響を与えることが確認された。

第9表 印加後の静止期間がカルス形成に及ぼす影響

印加後の静止期間	カルス形成数 (個数/シャーレ)
当日	3
2日後	35
4日後	990
6日後	558



第4図 印加後の静止期間とカルス形成

第10表 カルス形成に及ぼす培地更新改良の効果

更新方法	培地の更新回数									平均的カルス形成数	備考	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8		処理等	主な実施年
A (対照)	7日	7	7	7	7	10	10	10	10	70~90/シャーレ	EP無処理 全量交換	H5年まで
B	7	7	7	7	7	7	7	7	7	10~20	EP処理 更新間隔	H6年
C	7	7	7	7	7	15	15	15	15	2~10	EP処理 培養スラス	H7年
D	7	7	7	7	7	7	7	7	7	10~30	EP処理	H7年
E	7	7	7	7	7	7	7	7	2(移植)	6~15×10 ³	EP無処理 後半1/2交換	H8年以降
F	4+3	7	7	7	7	7	7	7	2(移植)	30~60 (選抜培地)	EP処理 養成培養	H8年以降

注) - 1 : 更新方法の項で表中の上段は培地更新の間隔 (日数)、

注) - 2 : 下段は培地更新後の容器中の液体培地量

注) - 3 : 下段の () 内は液体培地の更新量、例えば、+4は新鮮培地を4 ml 加え、-4とは古い培地を4 ml 除いた後に新鮮培地を4 ml 加えて更新

② 液体培地の交換方法

培地交換について、1) 培養開始後4週間は7日間隔、その後は10日間隔でほぼ全ての培地を等量交換 (A、対象)、2) 培養開始後7日間隔でほぼ全ての培地を等量交換 (B)、3) 培養開始後7日間隔で、1/3量づつ新しい培地を加えていき、4週目には20ml とし、その後は15日間隔でほぼ1/2量の培地を交換 (C)、4) (C) の5週目以降をほぼ全量交換 (D)、5) (C) の5週目以降の全量交換を1/2量づつ新しい培地と交換 (E)、6) (E) の第1週に養成培養を実施 (F)、の6つの方法を検討した。

その結果、導入処理したプロトプラストでは4日間の養成培養に4週間までは培地量の約1/3量を新たに添加する方が分裂が促進された。その後は培養容器と液量の関係等から培養液の上限を20ml とし、培地の交換量を1/2量として、交換の間隔は7日間隔が最も安定した (第10表)。

③ 活性炭の添加方法

リンドウプロトプラストのカルス化には活性炭添加の効果が認められ、活性炭を含む寒天ブロックに付着したプロトプラストの生育が良いことが知られていた¹⁰⁾。そこで、プロトプラストと活性炭の接触をより多くするため、0.2%ゲルライトのMS培地に0.6M グルコースと0.2mg/ml 活性炭を加えて内径7 cm の腰高培養シャーレに5 ml 分注してベースを張る添加法で活性炭の効果を

検討した。

その結果、プロトプラストの分裂が促進され、マイクロカルス化やカルス化する数が著しく増加した(第11表)。一般的に植物プロトプラストが培養容器の底面に吸着するようにして生育し、特に、初期のプロトプラストが振動等で不安定になることを好まない傾向にあることが知られていて、活性炭の添加が老廃物の吸着などプロトプラストに好適な環境を提供したと考えられた。

第11表 活性炭の添加がプロトプラストのカルス化に及ぼす効果

活 性 炭 添 加 方 法	添 加 量	分 裂 開 始		コ ロ ニ ー 形 成			カ ル ス 形 成		
		日 数	程 度	日 数	程 度	褐 変 程 度	日 数	程 度	褐 変 程 度
無	0	5	+1	48	+4	+4			
液体培地混合	1%	4	+4	36	+3	-	46	+2	-
1%ブロック	1.0g/20ml 培地	5	+.	40	+3	+4			
(0.2%ゲルライト飽埋)	1.5g/20ml 培地	5	+2	46	+3	+3			
	2.0g/20ml 培地	4	+4	42	+3	+.	68	+	-
ゲルライトベース	1%	4	+5	40	+5	-	50	+5	-

注) +5 (多---10³) ~ +3 (中---10²) ~ - (無--0)

(3) 形質転換組織の選抜と植物体再分化の条件

① ハイグロマイシン濃度とカルスの大きさ

カルスなどの導入組織の選抜や組織からの導入植物の再分化には抗生物質耐性遺伝子を組み込んで同じ抗生物質を添加した選抜培地上で培養する方法がとられている。一般的には NPT II (カナマイシン酸化酵素) 遺伝子が用いられるが、リンドウでは予備実験からカナマイシンでは非形質転換植物でも生き残り、選抜効果が劣ったためハイグロマイシンを用いた。

プロトプラストを液体培地で培養し、1)約6週間後に可視的に観察されるマイクロカルス、2)1)と同時期に一旦、再分化培地に移植し、約1ヶ月後の0.8~1.1mm 角に成長したカルスの2つの方法について、MS培地に3% サッカロース、0.1mg/l NAA、0.2mg/l 4PU (ホルクロルフェニユロン)、0.2%ゲルライトを添加し、pH5.75 に調整した再分化培地を用いて、ハイグロマイシンの濃度を0、5、10、15、20、25mg/l になるように添加した選抜培地を作成して選抜のためのハイグロマイシン濃度を検討した。

その結果、いずれのカルスも20mg/l の濃度で4%以下の生存となった(第12表)。このことから *hpt* 遺伝子を導入したリンドウでは20mg/l のハイグロマイシン添加の選抜培地で選抜が可能と考えられた。また、一次選抜は0.1mm 程度の大きさになる6ヶ月前後のマイクロ

カルスが適当と考えられた。

② 選抜培地へのカルスの移植時期

選抜培地への移植時期は、培養開始から6週間後に肉眼で確認できる程度の大きさに成長したマイクロカルスを用いて、1)培地交換当日にバイオピペットで移植、2)培地交換をして2日経過した後に移植の2つの方法について検討した結果、培地を交換し、2日経過したマイクロカルスをバイオピペットで移植の方がカルス化が進むことが認められた(第13表)。

第12表 ハイグロマイシン濃度がカルス枯死に及ぼす影響

ハイグロマイシン 濃度(mg/l)	コ ロ ニ ー		カルス 枯死率 (%)
	形成数(個/シャーレ)	枯死率 (%)	
	実験1	実験2	
0	90	255	0
5	30	-	66.7
10	20	-	77.8
12		68	69.8
14		43	81.9
16		41	81.8
18		60	73.4
20		8	96.4
40			98.5
80			100.0

第13表 培地交換後の日数経過が移植以上に及ぼす影響

経過日数	カルス形成数	カルス形成までの日数
7日	20~30/シャーレ	16~25日
2日	40~60/シャーレ	7~14日

③ 二次選抜培地へのカルスの継代時期

選抜効率の向上を目的にカルスの二次選抜培地への継代時期について *hpt* 遺伝子を導入したプロトプラスト由来カルスを用い、ハイグロマイシン20mg/l を添加した

選抜培地に、一次選抜培養期間を2週間と6週間、二次選抜培養期間を6週間と12週間とする方法を組み合わせて検討した。

その結果、二次選抜培地への移植なしではエスケープ率が高く、一次選抜2週間に二次選抜6週間の組合せで最も安定した(第14表)。しかし、一次選抜期間が2週間の培養では小さいカルスが多く残り、ピンセット等での二次選抜培地への移植は困難であった。このため一次選抜の期間を3週間に延ばすことでより多数のカルスを二次選抜培地に移植でき、多くの形質転換個体を確保することが可能となった。

第14表 選抜培地への継代方法が形質転換組織からの再分化に与える影響

区 No.	印加電圧値 (V/cm)	一次選抜培地		二次選抜培地		活性カルス		組換え植物体		エスケープ率 (%)
		ハイグロマイシン 濃度(mg/ml)	培養期間 (週)	ハイグロマイシン 濃度(mg/ml)	培養期間 (週)	数/移植カルス数 (個)	率 (%)	数/PCR解析数 (個)	率 (%)	
a	275	20	6	20	12	11/256	4.3	2/4	50.0	50.0
b				無移植		11	-	0/10	0	100.0
c				0		6/6	100.0	5/5	100.0	0.0
d	300	20	6	20	12	19/244	7.8	7/9	77.8	22.2
e				無移植		44	-	5/15	33.3	66.7
f		10	2	20		5/104	4.8	3/4	75.0	25.0
g	325	20	2	無移植	6	19/251	7.6	8/10	80.0	20.0
h				20		32/160	15.0	23/25	92.0	8.0

注) c区は一次選抜培地上で旺盛に生育し、不定芽を形成、b及びe区は移植カルス数が不明

(4) 発根・苗化と順化の条件

① 発根促進のためのホルモン濃度

形質転換体を効率よく発根・苗化及び順化する方法について、再分化したリンドウの展開葉1節の茎頂を用い、濃度をちがえたIBA(インドール酪酸)を添加したMS培地に挿芽して検討した。

その結果、ホルモンフリー培地では細い根が発生したが、IBAを0.1mg/l 加えた培地では発根が早まり、太い根を形成した。しかし、高濃度のIBA培地ではカルス化が著しく発根は劣った(第15表、写真1)。

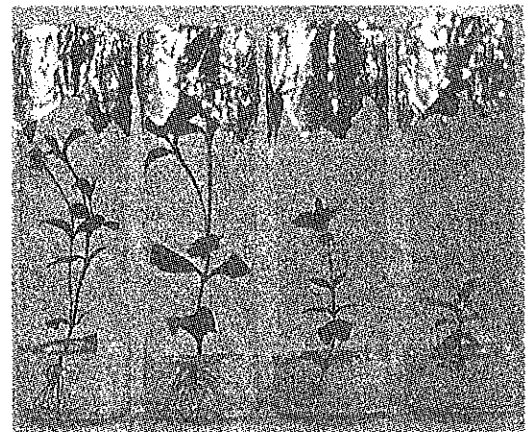


写真1 IBA濃度と発根及び生育

左から0, 0.1, 1.0, 2.0mg/l

第15表 IBA濃度が発根に与える影響

IBA濃度 mg/l	発根率 %	発根数 本	根長 cm	太さ +	カルス形成 %	発根日数
0	100	6.7	1.67	+2	0	10~
0.1	92	7.8	0.74	+4	8.3	7~揃う
1.0	67	3.4	0.16	+1	33.3	遅れる
2.0	67	3.0	0.16	+1	29.2	遅れる

注) 根長: 最大長、太さ: +4(太い)~ +1(細い)

② 発根・苗化のための培養温度

発根・苗化促進のための培養温度について、0.1mg/lのIBAを含むMS培地を用いて、8℃~28℃の温度条件で検討した結果、1ヶ月までは28℃で根の成長は順調であった。しかし、順化可能な発根量を得られる2ヶ月目では23℃で発根状態が最も改善し、地上部の生育も充実し、順化後の生育は安定した(第16表)。

第16表 挿し芽時の温度管理が発根及び順化に与える影響

管理温度 ℃	発根率 %	発根数 本	根長(cm)		生重 mg	順化 活着率 %
			1ヶ月	2ヶ月		
28	100.0	5.6	2.30	5.60	600	80.0
23	100.0	4.1	1.60	6.78	958	90.9
18	91.3	4.4	0.67	4.21	333	100.0
13	8.3	2.1	0.01	0.57	111	50.0
8	0.0	0	0	0	66	-

2) 形質転換組織の確認

以上のような条件で導入処理して得られたリンドウの組織や植物体に遺伝子が組み込まれているかどうかについて、組織化学的方法、生化学的方法、PCR法及びハイブリダイゼーション法による確認を試みた。

(1) 組織化学的方法

プロトプラストに導入したGUS遺伝子をX-Glucと呈色反応させ、顕微鏡下で組織化学的に観察するのに最適な呈色反応時間について検討した。

その結果、反応時間が長くなれば呈色反応の色は濃くなるが、プロトプラスト活性は低下し、24時間以降ではプロトプラストが枯死し観察が困難になった(第17表)。このことからX-Glucによる遺伝子導入の検定のための反応時間は6時間が最適と考えられた。

第17表 X-Glucによる呈色反応時間がGUSの酵素活性及びプロトプラストに与える影響

反応時間(h)	2	4	6	24	48	168
GUSの酵素活性	-	+	++	+++	+++	++
プロトプラストの状態	++	+	+	-	-	-

注) GUSの酵素活性 --- : 無、+ : 確認可能(難)、++ : 確認可能、+++ : 確認可能(易)
プロトプラストの状態 --- : 活性無し、+ : 有り、++ : 良

(2) 導入遺伝子の検出

現状の遺伝子導入法は本研究で進めたエレクトロポレーション法を含め、細胞内に導入する遺伝子の数量、ましてや核の中に複数存在する染色体上の位置を指定して組み込む技術は確立されていない。そこで、組み込まれた遺伝子の検証が必要となり、導入遺伝子を直接確認するには、植物組織に含まれる遺伝子を高精度で抽出し、取り出した遺伝子を効率よく使用する必要がある。

TAB法とSDS法は抽出が可能であった。特に、CTAB法はより純度の高い多くのゲノムDNAの抽出が可能であった(第18表、写真2)。

第18表 リンドウからのゲノムDNA抽出法

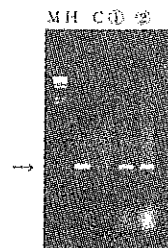
抽出手法	サンプル数	DNAの平均収量(μg)
CTAB法	73	21.0
SDS法	84	7.6
Isoplant法	3	0.0

注) DNA 収量 : 植物体 1 g 当たり

① DNA抽出法の検討

リンドウの形質転換体から使用目的にあったゲノムDNAを簡易に抽出する方法として、CTAB法¹⁷⁾、SDS法¹⁸⁾、Isoplant法¹⁹⁾を検討した。

その結果、最も簡便なIsoplant法では抽出できず、C



M : λ-HindIII マーカー
H : HPT プラスミド DNA
C : control
① : CTAB 法 ② : SDS 法

写真2 DNA抽出法の違いとPCR増幅産物

② PCR法の改良¹⁹⁾

PCR法はゲノムDNAがあれば、導入した遺伝子が再分化組織に組込まれているかどうかの判定を、指定した部分の塩基配列を増幅させることで可能である。

ここでは、35S領域とhpt領域の450bpをカバーする、第5図に示す25bpのプライマーを作成し、CTAB法で得られたDNAを用いて、1)プライマー濃度、2)鋳型DNA濃度、3)温度反応サイクル(第19表)、4)Taq濃

度について検討した。

その結果、遺伝子増幅の両端を決定するプライマー濃度は、10または50 μ M の濃度で特異的なバンドのみを増幅できた (写真3)。また、鋳型となるゲノムDNAの濃度は、100ng が最も安定した (写真4)。

PCRの反応サイクル条件は、94°C-72°Cのサイクル反応では目的とする遺伝子以外の非特異的なバンドの増

幅が見られた。しかし、94°C-60°C-72°Cのサイクル反応では目的とした特異バンドのみが増幅された。

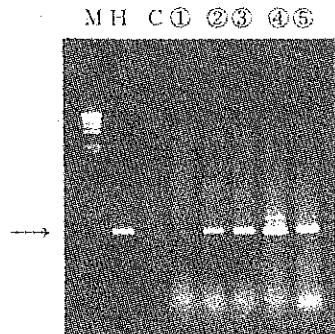
なお、ゲノムDNAの熱変性促進には5分間の煮沸が有効であり、反応回数は25回より35回で安定したバンドが得られ、Taq濃度は20 μ l で安定したバンドが得られた。

HPT-upper : C g C A C A A T C C C A C T A T C C T T T C g C A A (25塩基)
 HPT-lower : g g C A g T T C g g T T T C A g g C A g g T C T T (25塩基)

第5図 プライマーの塩基配列

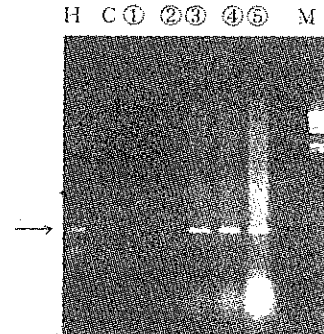
第19表 PCR操作における反応サイクルの改良

a : (前処理) boiling 5 min + on ice 5min → (PCR 反応) 94°C 1 min → 72°C 2 min → 72°C 5 min	45 cycles
b : (前処理 a : に同じ) → (PCR 反応) 94°C 30sec → 60°C 30sec → 72°C 30sec → 72°C 7 min	25 cycles
c : (前処理なし) → (PCR 反応) 94°C 30sec → 60°C 30sec → 72°C 30sec → 72°C 7 min	25 cycles



M : λ -HindIII マーカー
 H : HPT プラスミド DNA
 C : control ① : 2.5 μ M ② : 10 μ M
 ③ : 50 μ M ④ : 250 μ M ⑤ : 2.5 mM

写真3 プライマー濃度とPCR増幅産物



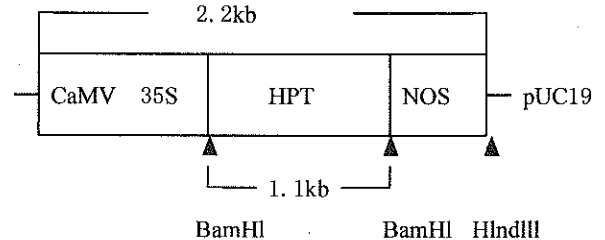
M : λ -HindIII マーカー
 H : HPT プラスミド DNA
 C : control ① : 20 ng ② : 50 ng
 ③ : 100 ng ④ : 200 ng ⑤ : 400 ng

写真4 鋳型DNA濃度とPCR増幅産物

(3) サザンハイブリダイゼーション法による確認¹²⁰⁾

PCR法で確認できた形質転換体について、組み込まれた遺伝子数の確認技術について検討した。

第6図に示す *hpt* 遺伝子をリンドウに導入し、PCR法で遺伝子を確認した4個体 (写真5) について、プローブに *hpt* 遺伝子の *Bam*H I 断片を用いて、リンドウのDNAを制限酵素 *Bam*H I または *Hind* III で切断し、遺伝子をハイブリダイズして確認した結果、1から数コピーの *hpt* 遺伝子の挿入を確認した (写真6)。



第5図 プラスミド DNA (pUC19-HPT) の制限酵素地図

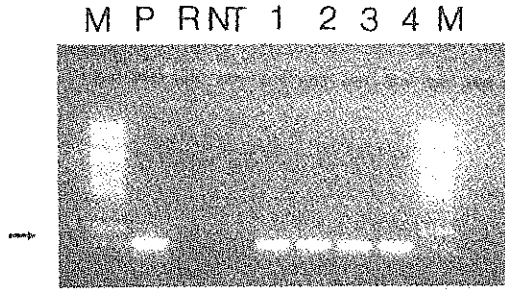


写真5 HPT遺伝子導入形質転換体のPCR泳動

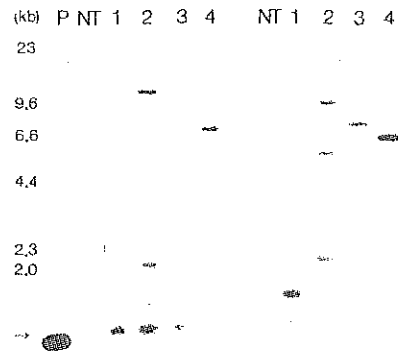


写真6 HPT遺伝子導入形質転換体のサザン解析

3) コ・トランスフォーメーション法の確立

形質転換体を効率よく獲得するためにはハイグロマイシンなどの抗生物質耐性遺伝子を目的遺伝子と同じプラスミド上に組み込んで一度に導入し、選抜培地で淘汰することが一般的である。しかし、できあがった形質転換体は抗生物質耐性も同時に付与されるため自然界での耐性菌の誘発や動植物への影響から、最終的には抗生物質耐性遺伝子は排除する必要がある。この抗生物質耐性遺伝子を排除しやすくするために各遺伝子を別々のプラスミド上に構築して混合し、遺伝子導入するコ・トランスフォーメーション法²¹⁾について検討した。

(1) プラスミドDNAの混合量

別々のプラスミドに構築した GUS 遺伝子と *hpt* 遺伝子を混合して、エレクトロポレーション処理をし、処理後48時間培養したプロトプラストについて4-MUGを基質に GUS 活性を測定した。

その結果、両方のプラスミドDNA濃度はそれぞれ10 μ g/ml とし、合計濃度が20 μ g/ml の条件で導入が安定した。また、GUS 遺伝子単独より混合した方が呈色反応は大きく向上した(第20表、写真7)。

第20表 コ・トランスフォーメーションにおけるプラスミド混合量がGUS酵素活性に与える影響

区 No.	プラスミドの構成(μ g/ml)		酵素活性
	pBI221(GUS)	pUC19-HPT	
a	—	—	24.9
b	10	—	20.0
c	10	10	209.2
d	20	—	178.8
e	20	20	514.5

注) 酵素活性: 4-MU nmole / min/mg protein 効率の確認

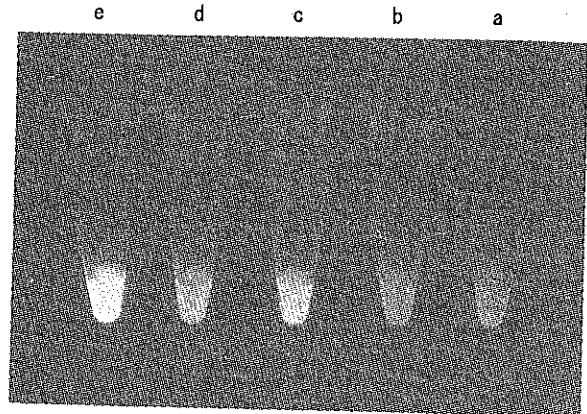


写真7 コ・トランスフォーメーションにおけるプラスミド混合量とGUS酵素活性

(2) PCR法によるコ・トランスフォーメーション効率の確認

目的遺伝子を GUS 遺伝子と CMV-CP (キュウリモザイクウイルス外皮蛋白質) 遺伝子として *hpt* 遺伝子との間でコ・トランスフォーメーション処理して遺伝子を導入し、ハイグロマイシン添加の選抜培地で培養して再分化させて処理の効果を検討した。

その結果、再分化植物体のうち、PCR法で *hpt* 遺伝子が確認できた個体はそれぞれ32個体と21個体であった。

この集団について GUS 遺伝子または CMV-CP 遺伝子の存在をPCR法で検定し、GUS 遺伝子を確認できたのは7個体、CMV-CP 遺伝子を確認できたのは2個体であり、コ・トランスフォーメーション効率は、それぞれ約22%と10%となった(第21表)。

なお、ハイグロマイシンで選抜したため、目的遺伝子だけが組み込まれた形質転換体は認められなかった。

第21表 PCR法によるコトランスフォーメーション効率の確認

目的 遺伝子	形質転換体数		合計	コトランスフォー メーション効率
	HPT 遺伝子	HPT+目的遺伝子		
GUS	25	7	32	21.9%
CMV-CP	19	2	21	9.5

4) 形質転換当代における特性

(1) 形質転換体の花粉稔性

一般に、遺伝子導入した再分化植物では花粉稔性が著しく低下する個体が多発することか認められ、導入した有用遺伝形質が次世代に伝わらず、交配母本としての利用が制約されることが報告されている²³⁾。

そこで、遺伝子が導入された形質転換リンドウ (T。植物体) 28系統を閉鎖型の人工気象器または閉鎖系温室で順化して実験に用いた。

開花当日の花粉を2% cotton Blue で染色し、青く染色されたものを稔性花粉として調査した。

その結果、花粉稔性は4%~96%と系統間で差が大きく、20%以下の低い系統と75%以上の高い系統の2極に分散した (写真8、第7図)。

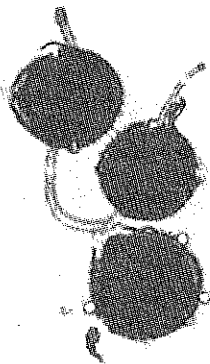
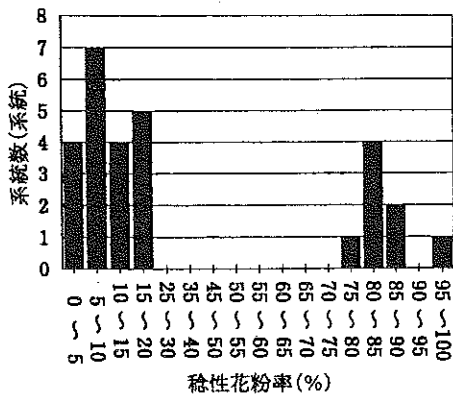


写真8 形質転換体リンドウの花粉粒



第7図 形質転換体リンドウの花粉稔性

(2) ハイグロマイシン遺伝子の発現

遺伝子は導入されていても機能を発現するとは限らない。そこで導入した遺伝子の発現を確認するため、*hpt* 遺伝子の組み込みをPCRで確認した無菌的に継代している形質転換体53系統を用い、葉片を3片に切断してハイグロマイシン20mg/l を含む再分化培地で1ヶ月培養して、不定芽発生等の経過を調査した。

その結果、53系統のうちカルスを形成したものが2系統、緑色のまま変化のないものが2系統、不定芽を作り再分化したものが3系統あり、残りの46系統が対象の非形質転換体と同様に枯死した。この様に、系統間で強弱はあるがハイグロマイシン耐性が認められるのは7系統と思われた (第22表、写真9)。このことから導入した *hpt* 遺伝子の発現は13%と低く、導入遺伝子の発現を高めるには35S 以外のリンドウに有効なプロモーターの探索の必要性が示唆された。

第22表 HPT遺伝子導入形質転換体のハイグロマイシン耐性

反応形態	個体数	対応系統など
多芽体形成	3	D-101、D-122、F-154
カルス形成	2	a-1、(B)-1
無変化(長期生存)	2	A-21、a-6
枯死個体	46	F-140など多数
合計	53	

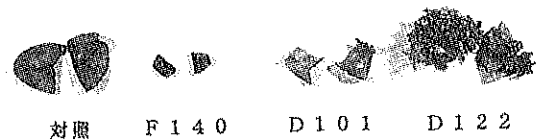


写真9 形質転換体リンドウ葉片のハイグロマイシン耐性

5) 自殖後代での *hpt* 遺伝子の動態

閉鎖型の人工気象室で栽培した形質転換体 (T。植物体) 28系統のうち、花粉粘性の高かった1系統について自殖し、18粒の種子が得られた。得られた種子はジベレリン処理 (100ppm ジベレリンに4℃で3日間浸漬)²³⁾ で催芽処理した後、無菌播種 (70%エタノール5秒、5%アンチホルス5分、滅菌水3回洗浄後、MS培地に置床) して、T₁植物体を育成した。

育成した植物体は、SDS-アムリ法でゲノムDNAを抽出して、PCR法で *hpt* 遺伝子の存在を検定した。

更に、CTAB法で抽出したゲノムDNAを制限酵素 *Hind* III で処理し、サザンハイブリダイゼーションで導入遺伝子の組み込み数を確認した。

その結果、14個体 (T₁世代) が生育し、その全ての株がPCR法で *hpt* 遺伝子の存在を確認できた (写真10)。このうちの3株についてサザンハイブリダイゼーションを行い、当代 (T₀) を含め何れの個体も数コピー以上の *hpt* 遺伝子の組み込みが示唆され (写真11)、少なくとも T₁ 世代までは導入した遺伝子が伝わる事が確認された。

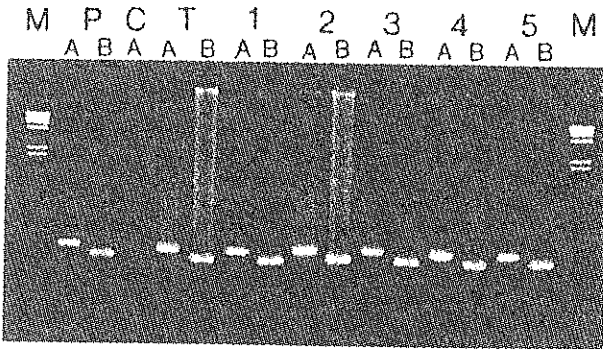


写真10 形質転換体後代 (F₁) のPCR解析

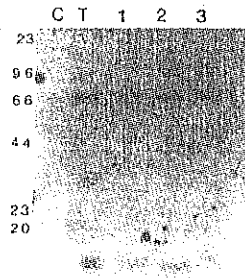


写真11 形質転換体後代 (F₁) のサザン解析

IV 摘要

無菌的に多芽球体で維持しているエゾ系リンドウを試験管内で育成し、その展開葉の葉肉プロトプラストに電圧ポレーション法で遺伝子を導入して、形質転換植物を獲得する諸条件について検討した。

- 1) 遺伝子の導入条件として、GUS 遺伝子の取り込みとプロトプラストの生存率及びその後の生育から、波形は矩形波、パルス幅は10ms、電界強度は325V/cm、プロトプラスト濃度は 3.6×10^5 cells/ml、プラスミドDNA量は20 μ g が形質転換体の獲得に最適であった。
- 2) 導入処理したプロトプラストの育成には、細胞分裂が始まる処理後4日間の養成培養の効果が極めて高く、有効であった。

- 3) 培地の交換は7日間隔で行い、最初の4週間は基の培地量の1/3量を加え、5週目からは1/2量交換が安定し、養成培養と組み合わせることでカルス形成を促した。
- 4) 0.2mg/l の活性炭入りベースはプロトプラストの生育、特に初期生育の促進に効果的であった。
- 5) 形質転換組織の選抜には、20mg/l のハイグロマイシンを含む再分化培地を用いることで可能であった。選抜効率を上げるには、培養開始6週間前後の肉眼で確認できるまで分裂の進んだマイクロカルスの段階で選抜培地に移植する方が容易であった。この選抜培地上で3週間培養後に新しい選抜培地に継代することでエスケープを抑制でき、同時に、再分化も容易であった。
- 6) 苗化及び順化は、茎頂を含む展開葉1節の大きさの茎を0.1mg/l の IBA を添加した培地に挿すことで容易に順化可能な幼苗を確保できた。
- 7) 組織化学的方法や生化学的方法、PCR法など複数の方法で導入遺伝子の確認が可能になった。
- 8) 複数の遺伝子を混合して処理するコ・トランスホメーション法については、2種類の遺伝子が同時に取り込まれる確率は10~20%であるが、合計のプラスミドDNA濃度は20 μ g/ml が安定した。
- 9) 選抜されたカルスから再分化したリンドウのゲノムDNA抽出はCTAB法で安定し、PCR法及び *hpt* 遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション法で検定し、1個以上の *hpt* 遺伝子が染色体上に組み込まれた形質転換体であった。
- 10) 形質転換体の花粉稔性は系統間差が大きかった。花粉稔性の良い系統の自殖によって得られた後代の無菌播種植物からCTAB法によりゲノムDNAを抽出し、PCR法及び *hpt* 遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション法で *hpt* 遺伝子が後代 (T₁) に遺伝することが確認された。
- 11) 以上、遺伝子導入から形質転換体の順化まで、プロトプラストを用いた電圧ポレーション法による一連の技術を検討し、培養中のリンドウ葉1gから100~160個体の形質転換体の作出が可能な技術が確立された。

謝辞 本研究は形質転換体の特性調査の一部を九州農業試験場の閉鎖系隔離温室を利用させていただいた。また、解析機器の利用や試験研究の遂行するにあたり、作物開発部育種工芸研究室の斉藤彰室長をはじめ多くの方々にご助言・ご指導を頂いた。ここに厚くお礼申し上げます。

V 引用文献

- 1) 農林水産省農林水産技術会議事務局：組換え農作物早わかりQ&A
- 2) 細川敬三他：Agrobacterium rhizogenes を用いたリンウの形質転換体の作出，第92回日本育種学会講演会要旨，No47-2 101, 1997
- 3) 細川敬三他：パーテックルガン法によるリンウのハイグロマイシン耐性形質転換体の作出，第92回日本育種学会講演会要旨，No47-2 101, 1997
- 4) 田中正美、小代寛正：熊本県農業研究センター研究報告，第4号，64-74，1995
- 5) 田中正美、小代寛正：熊本県農業研究センター研究報告，第4号，75-85，1995
- 6) 山田康之：植物分子・細胞工学マニュアル，講談社，1992
- 7) 農林水産技術会議事務局・農業生物資源研究所：農林水産試験研究におけるバイオテクノロジー，イネのプロトプラスト培養と利用，平成2年度短期集合研修テキスト，101~113，1990
- 8) 山田康之・岡田吉美：植物バイオテクノロジーII，東京化学同人，103-105，1991
- 9) A. MAYER, G. B. ZONDAG and L. A. M. HENSGENS : Rice Genetics Newsletter Vol. 8, 161-165, 1991
- 10) Kengo Nakata, etc : An Effective Transformation System for *Lycopersicon peruvianum* by Electroporation. Japan. J. Breed, 42:487-494, 1992
- 11) HIROFUMI UCHIMIYA AND TOSHIO MURASHIGE : Evaluation of Parameters in the Isolation of Viable Protoplasts from Cultured Tobacco Cells. Plant Physiol. 54, 9 36-944, 1974
- 12) TAGE ERIKSSON and KRISTINA JONASSON : Nuclear Division in Isolated Protoplasts from Cells of Higher Plants Grown *in Vitro*. Planta Berl. 89, 85-89, 1969
- 13) 建部到：高等植物のプロトプラスト 北方林業第27号 Vol. 23, No. 12 335-339
- 14) 熊本県農業研究センター：リンウのプロトプラスト培養 平成3年度 生物資源部成績書 53-60, 1992
- 15) 河村喜雄他：プロトプラストの耐久力の定量化育種学雑誌 第43巻・第1号, 91-99, 1993
- 16) 熊本県農業研究センター：エゾ系リンウのプロトプラスト培養 平成5年度 生物資源部成績書 27-31, 1994
- 17) 内宮博文：植物遺伝子操作マニュアル，講談社，71-80，1990
- 18) 株式会社ニッポンジーン：ISOPLANT マニュアル
- 19) 島本功、佐々木卓治：細胞工学別冊・植物のPCR 実験プロトコール，秀潤社，1995
- 20) 渡辺格・監修、杉浦昌弘・編集：クローニングとシークエンス・植物バイオテクノロジー実験マニュアル，農村文化社，1989
- 21) Simamoto, K., Terada, R., Izawa, T., Fujimoto, H., :Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. Nature, 338 :274, 1989
- 22) Takashi HANDA : Regeneration and Characterization of Prairie Gentian (*Eustoma grandiflorum*) Plants Transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant tissue Culture Letters, 9 (1), 10-14, 1992
- 23) 吉池貞蔵：花専科*育種と栽培, pp. 73. 誠文堂新光社，東京，1992.

Production of Transgenic Gentian (*Gentiana triflora* var *japonica*) by Electroporation

Kiyofumi KUDOH and Masami TANAKA

Summary

The production of transgenic Gentian plant (*Gentiana triflora* var *japonica*) using protoplast electroporation is investigated on fusion pulse, pulse width 10ms, voltage 325V/cm and plasmid DNA concentration 20 μ g. Plasmid DNA used for transformation of the hygromycin phosphotransferase (*hpt*) gene for selection.

Small calli of protoplast culture after 6 weeks were transferred to regeneration medium containing 20mg/l hygromycin for selection. In the second selection step hygromycin resistant calli were isolated and transferred to regeneration medium containing 20mg/l hygromycin every 3 weeks.

The presence of the *hpt* gene sequences in genomic DNA were assayed by PCR analysis and southern hybridization analysis. And incorporation of the introduced *hpt* gene into the genomic DNA of transgenic Gentian plant and *hpt* gene is transmitted progeny of this.

Keyword : *Gentiana triflora*, protoplast, electroporation, transgenic plant