

称号及び氏名	博士（農学）徐 美淑
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 31 日
論文名	「アグロバクテリウム法によるイネ形質転換系の改良とアポミクシス遺伝子の移入 (Improvements of Agrobacterium-mediated transformation and apomictic gene transfer in rice)」
論文審査委員	主査 教授 足立 泰二 副査 教授 大木 理 副査 教授 森 源治郎

## 論文要旨

はじめに

イネ(*Oryza sativa* L.)は農業上重要な作物の1つであり、これまでの育種によってさまざまな品種が開発されており、最近では分子生物学的手法を用いた遺伝的改変の成果も得られつつある。また、農業上有用な遺伝子を分子生物学的に検出・単離し、その遺伝子を異種植物に導入することで、特定遺伝子の機能やメカニズムを明らかにする研究が進められている。一方、これまでイネを含む単子葉植物に特定遺伝子を導入する方法としては、PEG法、microinjection法、electroporation法、pollentube pathway法、particle bombardment法などによって研究の進展がなされてきた。しかし、これらの直接導入法は、いずれも植物細胞内での遺伝子の導入が必ずしも安定的ではなく、問題が多く残されている。それに対してアグロバクテリウム法は、導入遺伝子が安定的に後代に伝達されることから、植物の形質転換に広く使われている。ところが、単子葉植物におけるアグロバクテリウム法による形質転換効率は極めて低いことから、効率の高い形質転換系の改善が強く望まれている。また、植物のゲノムに巨大遺伝

子を導入することは耐病性や多収性等の量的形質に関する新品種開発や巨大遺伝子の機能を解析するためにも必要であるが、アグロバクテリウム法による巨大遺伝子の単子葉植物への形質転換についてはほとんど報告されていない。

本研究は単子葉植物であるイネで効率の高いアグロバクテリウムによる形質転換系を検討するとともに、その形質転換系を用いて巨大遺伝子の形質転換を試み、育種的に重要な生殖様式であるアポミクシスに関する遺伝子 ASG-1 をイネへ形質転換することでその機能解析を展開したものである。

## 第1章 アグロバクテリウムを用いた形質転換系の検討

単子葉植物のイネではアグロバクテリウム法による形質転換は、広く研究に使われているが、特定遺伝子の機能解析に必要とされる多量の形質転換体を得ることは困難であった。一方、アグロバクテリウムによる形質転換では、アグロバクテリウムの系統、選抜マーカー遺伝子、母植物の遺伝子型および組織培養の条件などによって影響を受けることが知られている。特に、形質転換効率を高める過程でアグロバクテリウムを植物の細胞に効率的に感染させる共存培養の条件が重要である。そこで、形質転換効率を向上させるために、アグロバクテリウムの T-DNA が植物細胞内に導入しやすい条件を確立し、遺伝子導入された細胞が完全に植物体へと効率的に再分化する培養系の改良に努めた。すなわち、アグロバクテリウムの T-DNA が植物細胞のゲノムに導入される際に影響を与えると思われる要因を GUS 遺伝子の発現を用いて調査した。ベクターは T-DNA 内にハイグロマイシンやカナマイシン抵抗性遺伝子、また intron GUS 遺伝子を持つ pIG121Hm を使い、イネの種子から誘導したカルスに感染させた。その結果、共存培養の期間、acetosyringone の濃度、カルシウムの濃度等の要因によって GUS 遺伝子のカルスへの形質転換効率が影響されることが明らかにな

った。共存培養の期間は最も影響を与える要因であり、一般的に使われる3日間より長く培養した場合にGUS発現が増加し、10日間の共存培養で最も高い発現率を示した。また、培地成分によるGUS発現率を観察した。最適な共存培養条件はカルシウム 50 mg/L、2,4-D 2 mg/L、acetosyringone 30 mg/L、betaine 120 mg/Lを含む培地であり、この培地を用いることによってGUS発現率は従来の36.2350 mg から約2.5倍の84.3350 mgに向上した。

## 第2章 巨大遺伝子のイネへの形質転換

巨大遺伝子の形質転換については、すでに双子葉植物のタバコでは報告されており、160 kbのヒトゲノムDNAを導入し機能を解析する可能性も示唆されているのが現状である。

本研究では巨大遺伝子の単子葉植物への形質転換の可能性を検討するために、最近その全塩基配列が明らかにされたイネ第10染色体を制限酵素Not Iで切断し、そのうち39 kbの巨大ゲノムDNA断片を用い、第1章で確立した効率的な形質転換系を用いて実施した結果、全処理カルスのうち33%の高い確率で形質転換体を得られた。また、形質転換体はその後代で3:1の分離比で安定的に遺伝することも確認できた。また、160 kbのヒトゲノムDNAのイネへの形質転換を試み、ハイグロマイシンに抵抗性を持つ植物体を容易に選抜することができた。以上の結果は、第1章の形質転換系を用いて巨大遺伝子の単子葉植物への形質転換が可能になったことを示すものである。

## 第3章 植物へ巨大遺伝子を形質転換するためのベクター構築

植物のゲノムに10 kb以上の巨大遺伝子を導入できる能力を与えることは遺伝子の機能検証し、技術の適用範囲を拡大させ、ゲノム研究に新たな局面を開く

ものである。形質転換で一般的に使われている *A. tumefaciens* のバイナリーベクターは 10 kb 以下の遺伝子を導入することが可能であるが、10 kb 以上の巨大遺伝子を導入し、機能解析した例は少ない。

本実験では *A. tumefaciens* 内に 30 kb 以上の巨大遺伝子を導入できる能力を持つバイナリーベクターを作成する目的で、T-DNA の外側に存在する Ti origin 領域の改変を行なった。*A. tumefaciens* の転写領域である Ti origin 領域の下流域に *A. rhizogenesis* から単離した 4.6 kb の転写領域 Ri origin を導入した。また、intron GFP レポーター遺伝子を上述のベクターに組み込むことによって、アグロバクテリウムを感染させた後、GFP 発現によって 10 kb 以上の巨大遺伝子の導入を確認することができた。

#### 第 4 章 ギニアグラスから単離した ASG-1 遺伝子のイネへの形質転換と機能解析

有性生殖(アンフィミクシス、融合生殖)は高等植物で一般的に行なわれる代表的な生殖方法であるが、植物によっては遺伝的組成が母系と同一の種子を形成する無性生殖を行うものがあり、これをアポミクシス(無配偶生殖)と言う。アポミクシスは活用の仕方によっては有性生殖の短所を補完することができ、そのメカニズムを明らかにすると共に、育種的に利用拡大が図られれば農業的利点はきわめて大きい。しかし、大きな期待にもかかわらずアポミクシスの分子生物学的研究はまだ緒についたばかりである。

本実験では条件的アポミクシス植物であるギニアグラスの初期胚発達に関連する候補遺伝子 ASG (Aposporous Specific Gene) - 1 遺伝子を Differential screening 法によって単離し、その遺伝子の機能やメカニズムを明らかにしようとした。

その一つの方法として有性生殖植物であるイネに ASG-1 遺伝子を形質転換することでイネ形質の表現型の変化や胚嚢の構造的変化を観察した。ASG-1 遺伝子は GUS および GFP 遺伝子、ならびにハイグロマイシン抵抗性遺伝子が含まれているバイナリーベクター pKJGV-B2 に組み込み、第 1 章で確立したアグロバクテリウム法によるイネ種子から誘導したカルスに導入した。その結果、共存培養終了後、GUS および GFP 両遺伝子とも発現が見られ、ASG-1 遺伝子の導入が確認された。さらに、ハイグロマイシンを添加した培地で選抜した結果、72% の抵抗性を示す植物体を得られ、高い形質転換率を確認できた。形質転換体について ASG-1 遺伝子の導入を確認するため、全ゲノム DNA で Southern hybridization 分析を行なったところ、7 クローンの抵抗性植物においてイネゲノム内に ASG-1 遺伝子が低いコピー数で安定的に導入されたことを確認できた。また形質転換体では非形質転換体と比較して、出穂まで日数は約 1/2 に短縮された。ASG-1 遺伝子は初期胚の発達に関する遺伝子だと推定されているが、花芽分化に関する遺伝子との関連性も示唆された。

## 審査結果の要旨

本研究は単子葉植物であるイネを用いて、アグロバクテリウムによる効率の高い形質転換系を検討するとともに、その形質転換系を利用して巨大遺伝子の形質転換を試み、育種的に重要な生殖様式であるアポミクシスに関する候補遺伝子 ASG-1 をイネへ形質転換することでその機能解析を展開しようとしたものである。

まず、形質転換効率を向上させるために、アグロバクテリウムの T-DNA が植物細胞内に導入しやすい条件を確立し、異種遺伝子の導入された細胞が完全植物体へと効率的に再分化する培養系の改良に努めた。ベクターは T-DNA 内にハイグロマイシンやカナマイシン抵抗性遺伝子、また intron GUS ( $\beta$ -glucuronidase) 遺伝子を持つ pIG121Hm をイネの種子由来カルスに感染させ、GUS 遺伝子の形質転換効率を算出した。感染前培養、共存培養期間ともに主要な影響要因であり、培地成分の組み合わせによっても形質転換効率を向上させることができた。前培養では 3 日、共存培養ではカルシウム 50 mg/L、2,4-D 2 mg/L、acetosyringone 30 mg/L、betaine 120 mg/L を含む培地で 10 日間の培養が最も効率の良く、従来の方法の約 2.5 倍に GUS 発現率を向上した。

次いで、巨大遺伝子の単子葉植物への形質転換の可能性を検討するために、最近その全塩基配列が明らかにされたイネ第 10 染色体を制限酵素 Not I で切断し、そのうち 39 kb の巨大ゲノム DNA 断片を用いるとともに、160 kb のヒトゲノム DNA をイネの形質転換系に用いて実施した結果、全処理カルスのうち 33% の高い確率で形質転換体を得られた。また、形質転換個体はその後代で 3:1 の分離比で安定的に遺伝することも確認できた。

さらに、植物の形質転換系で一般的に使われている *A. tumefaciens* のバイナリーベクターでは 10 kb 以上の巨大遺伝子を導入し、機能解析でき難いため、ベクターの T-DNA の外側に存在する Ti origin の改変を行なった。*A. tumefaciens* の転写領域である Ti origin 領域の下流域に *A. rhizogenesis* から単離した 4.6 kb の転写領域 Ri origin を導入した。また、CaMV-35S omega intron GFP レポーター遺伝子を組み込むことによって、アグロバクテリウムを用いて巨大遺伝子の導入を確認することができた。

一方、高等植物の遺伝的組成が母系と同一の種子形成をするアポミクシス(無配偶生殖)は、有性生殖の制御であり、育種的に利用拡大の可能性はきわめて大きい。本研究では条件的アポミクシス植物であるギニアグラスの初期胚発達に関連する候補遺伝子 ASG (Aposporous Specific Gene) - 1 遺伝子を上述の改良されたイネ形質転換系に適用することによって、アポミクシス遺伝子の機能およびメカニズムを明らかにしようとした。ASG-1 遺伝子は GUS、GFP 遺伝子ならびにハイグロマイシン

抵抗性遺伝子を含むバイナリーベクター pKJGV-B2 に組み込み、イネ種子由来カルスに導入した。形質転換を確認するとともに、得られたイネ形質転換系統の表現型の変化や胚嚢の構造的変化を追跡観察した。ハイグロマイシンを添加した培地で選抜した結果、抵抗性を示す植物体を得られ、カルスレベルで 72%もの高い形質転換率を確認できた。形質転換体について ASG-1 遺伝子の導入を確認するため、全ゲノム DNA で Southern hybridization 分析を行なったところ、7 クローンの抵抗性植物においてイネゲノム内に ASG-1 遺伝子が低いコピー数で安定的に導入されたことを確認できた。また、形質転換体は非形質転換体と比較して、出穂まで日数が約 12 に短縮された。ASG-1 遺伝子は初期胚の発達に関する遺伝子と推定され、花芽分化との関連性も示唆された。

## 審査委員会の所見

以上のように、本論文はアグロバクテリウム法を用いたイネ形質転換系の改良、アポミクシス遺伝子を移入した形質転換体の機能解析の成果として高く評価できる。本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（農学）の学位を授与することを適当と認める。