

# 野末雅之・斉藤英毅・野川優洋・小島峯雄

## 目的別テーマ：バイオテクノロジーを活用した新規繊維生物の作出

### 15年度研究テーマ

15-2-12：繊維作物の分子育種のための基盤技術の開発

### ABSTRACT

*Molecular breeding of crop plants using genetic transformation is a promising approach for crop improvement. Molecular breeding requires a development of a gene transfer method for each crop. We have already developed a simple and efficient "in planta transformation method" for buckwheat. In this year, we have developed the in planta transformation methods for mulberry and kenaf plants. In the both methods, we used an avirulent mutant (M-21) of *A. tumefaciens*, which had been isolated by us, for the following reason; in this mutant, tryptophan monooxygenase gene in T-DNA that is involved in auxin biosynthesis is destructed, whereas all other genes including *ipt* gene for cytokinin biosynthesis are intact. Consequently, transformants produced by this *A. tumefaciens* were expected to show a dramatically altered phenotype due to hormone imbalance, which is a good indication of transformation. Young mulberry plants in pots were decapitated and the meristem of axillary buds were inoculated with *A. tumefaciens*. The inoculated mulberry plants were allowed to grow in pots. With kenaf plants, the meristem of either apical or axillary buds were inoculated with *A. tumefaciens* and grown as mulberry plants. Transformation of both plants is demonstrated by phenotype and PCR detection of transgene using the second generation of transformants, namely the offspring propagated by stem cuttage of mulberry, and  $T_1$  plant of kenaf. The transformants of both plants showed economically good traits; well branched phenotype with mulberry and thicker stem with kenaf.*

### 研究目的

遺伝子組み換え技術を使用する分子育種は従来の育種法では克服できない種の壁を越えた有用な遺伝子の導入が可能になる。分子育種を行うためにはそれぞれの作物ごとに遺伝子を導入する方法の開発が必要である。植物の形質転換法としては、*Agrobacterium tumefaciens* を使用する方法が一般的である。遺伝子を導入する細胞にはカルス細胞が用いられ、形質転換後にカルス細胞から植物を再生させる必要がある。この方法ではカルス培養中に起きる体細胞変異や、植物によってはカルスからの植物への再生が難しいことが問題となっている。我々は動物の胚性幹細胞（ES細胞）に相当する分裂組織が植物に存在することに注目し、カルス細胞ではなく通常の植物を直接 *A. tumefaciens* を用いて形質転換する *in planta* 形質転換法をソバにおいて開発した。この *in planta* 形質転換法を各種繊維植物（クワ、ケナフ、ワタ、アマなど）への遺伝子導入に応用し、繊維作物の品質と収量の向上を目指す分子育種に道を開くことを目的とした。

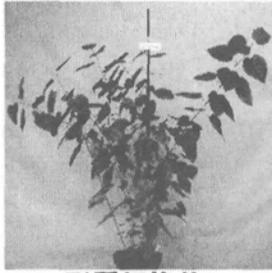
### 一年間の研究内容と成果

#### クワの *in planta* 形質転換

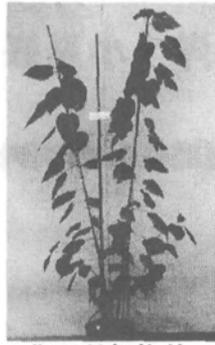
カイコの飼料作物であるクワは、多年生の木本植物であり従来の育種法で品種改良するのは非常に長い期間と労力が必要とされる。クワの新たな品種改良法として遺伝子操作系の開発が望まれている。そこで、我々が開発した *in planta* 形質転換法のクワへの応用を試みた。

#### 実験方法

本研究では *Agrobacterium tumefaciens* M-21変異株を遺伝子導入用ベクターとして用いた。M-21株はT-DNA中の植物ホルモンIAAの合成酵素遺伝子がトランスポゾン Tn5挿入により破壊されているが、サイトカイニン合成酵素遺伝子は健全である。従って、本菌を用いた形質転換した植物は、ホルモンバランスが崩れ、劇的に変化した表現形質を示すことが予想される。このことによって、形質転換が起こったことが容易に肉眼で確かめられることが期待された。



形質転換体



非形質転換体

### 結果および考察

形質転換クワの染色体DNAから、PCR法によりTn5挿入IAA合成酵素遺伝子が増幅されたことから、*in planta*形質転換法によりクワが形質転換されていることが確認された。

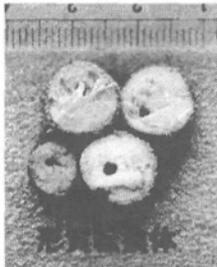
さらにM-21株で形質転換されたクワは期待通り植物ホルモンのバランスが崩れ、親株に比較して、分枝が増大したものや茎が太くかつ、固くなった形質転換クワが得られた。この形質はクワの葉の高生産性につながるはずである。我々の *in planta* 形質転換法は、クワの品種改良だけでなく、他の木本植物の品種改良にも適用できる。

### ケナフの*in planta*形質転換

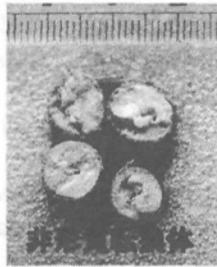
ケナフは最近注目されている繊維作物である。ケナフは多量の炭酸ガスを吸収することから地球温暖化防止にも役立つ作物である。ケナフを分子育種するには遺伝子操作系を開発する必要がある。そこで、我々が開発した *in planta* 形質転換法を応用してケナフへの遺伝子導入を試みた。

### 実験方法

本研究では *Agrobacterium tumefaciens* M-21 変異株を遺伝子導入用ベクターとして用いた。



形質転換体



非形質転換体

### 結果および考察

形質転換ケナフ (T<sub>1</sub>) のDNAから、PCR法によりTn5挿入IAA合成酵素遺伝子が増幅されたことから、*in planta*形質転換法によりケナフが形質転換されていることが確認された。

形質転換ケナフは親株に比較して、茎が太くなり、背も高くなった。この形質より、形質転換ケナフは繊維の収量が高いはずである。

### 展望

我々の *in planta* 形質転換法がクワとケナフに応用可能であったことから、他の繊維作物（ワタやアマ）の形質転換にも挑戦する。*In planta* 形質転換法を利用した分子育種の方法はいくつか考えられるが、まずT-DNA挿入変異法を試みる。*A. tumefaciens* を用いた植物の形質転換では、T-DNAが植物の染色体DNAにランダムに組み込まれることが知られている。つまり、*in planta* 形質転換法で植物を形質転換すると、植物ゲノムの遺伝子のいずれかはT-DNAが挿入されることによって破壊されることになる。生育に必須な遺伝子が破壊されると形質転換体は生き残ることができないが、それ以外の様々な遺伝子が破壊されることにより、形質転換体には多様な表現型が現れてくる。そこで、*In planta* 形質転換法で得られた形質転換体の中から、背が高くなる、葉が大きくなる、枝が増えるなど興味深い表現型の変化が見られた個体を選抜する。選抜した個体の変異を自家受粉等により固定できれば、新しい品種として利用可能になる。また、選抜した形質転換体から、T-DNA挿入部位周辺のDNA断片を単離し、どの遺伝子が壊れているのかを明らかにすることができれば、他の作物の分子育種の際の標的遺伝子としても利用可能と考えられる。