

野末雅之・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

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 developed the simple and efficient in planta transformation methods for fiber crops such as mulberry, kenaf and cotton. In the methods, meristems of either apical (kenaf and cotton) or axillary bud (mulberry, kenaf and cotton) of young plants were inoculated by *A. tumefaciens* after being pricked with a needle. The inoculated plants were grown to maturation in pots under non-sterile conditions. Transformation of these plants is demonstrated by phenotypic inheritance from T_0 plants to the plants of the following generation and detection of transgene using the second generation of transformants, namely the offspring propagated by stem cuttage of mulberry, and T_1 plant for kenaf and cotton plants. The transgenic plants obtained in this study showed economically good traits. The transgenic mulberry was released from apical dominance and branched well. The other mulberry grew fast and had big leaves. The transformed kenaf have thicker stem.*

研究目的

遺伝子組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組織培養細胞が用いられ、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、組織培養細胞でなく通常の植物に直接 *A. tumefaciens* を接種し形質転換する *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）への遺伝子の導入に応用し、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。

5年間の研究内容と成果

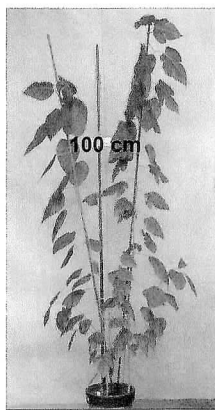
1 クワの *in planta* 形質転換法

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には非常に長い期間と労力が必要とされ、クワの新たな品種改良法として外来遺伝子を導入可能な形質転換系の開発が望まれていた。そこで、我々の開発した *in planta* 形質転換法のクワへの応用を試みた。

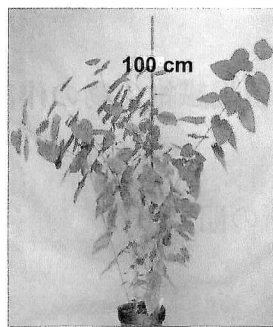
実験方法

クワにおける *A. tumefaciens* の接種の標的組織として腋芽を使用した。*A. tumefaciens* M-21 変異株と pBI-Res バイナリーベクターを保持する *A. tumefaciens* を遺伝子導入用のベクターとして用いた。M-21 株は T-DNA 中の植物ホルモンオーキシン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。このことから M-21 株を使用した場合、形質転換がお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る。pBI-Res バイナリーベクターを使用するとプラスミドレスキュー法により形質転換植物 DNA から T-DNA が挿入された部分を単離することが可能になる。形質転換の確認は植物の上部の葉から DNA を抽出し PCR 法とプラスミドレスキュー法により行った。

結果および考察



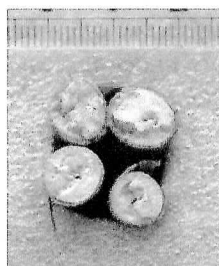
非形質転換体



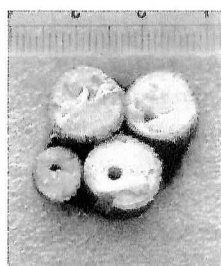
形質転換体

M-21 株で形質転換したクワは期待通り植物ホルモンのバランスが崩れ、親株と比較して分枝が増加したものや、茎が太くかつ堅くなったものが得られた。pBI-Res バイナリーベクターを保持する *A. tumefaciens* で形質転換したところ、非形質転換個体と比べ生長が速く、葉が大きくなる形質転換クワが得られた。形質転換クワを挿し木により得られた次世代植物の染色体 DNA 中に T-DNA が存在していることを PCR 法によって確認すると共にプラスミドレスキュー法により T-DNA が挿入された染色体上の遺伝子の一部を分離し、その配列を決定した。この形質転換クワの示した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、一般的に形質転換が困難とされる木本植物の形質転換にも適用できると思われる。

2 ケナフの *in planta* 形質転換法



非形質転換体



形質転換体

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ができ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導入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の形質転換を試みた。

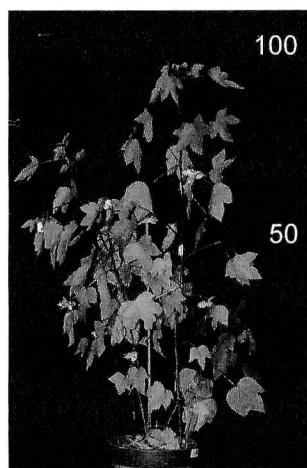
実験方法

ケナフにおける *A. tumefaciens* の接種の標的組織として茎頂と腋芽を使用した。接種には *A. tumefaciens* M-21 変異株を使用した。形質転換の確認は植物の上部の葉から DNA を抽出し PCR 法により行った。

結果および考察

形質転換ケナフは親株に比較して、茎が太くなり、草丈も高くなった。形質転換ケナフの染色体 DNA から PCR 法によって Tn5 挿入されたオーキシシン合成酵素遺伝子の挿入を確認した。この形質転換ケナフはケナフ繊維の収量を増大につながる。

3 ワタの *in planta* 形質転換法



形質転換ワタ

ワタは全世界で年間 2000 万トン生産される重要な繊維作物である。ワタの形質転換法の問題点は組織培養で植物体へ再生できる品種が Coker に限られており、実用品種へは直接遺伝子導入できないことである。実用品種を直接形質転換できるワタの *in planta* 形質転換法の開発を目的とした。

実験方法

アジア綿の赤木黒種を形質転換実験に使用した。*A. tumefaciens* の接種の標的組織として茎頂と腋芽を使用した。接種には *A. tumefaciens* M-21 変異株、プラスミドレスキューできる pBI-Res を保持する *A. tumefaciens* と一般的に良く使用されるバイナリーベクター pIG-121-Hm を保持する *A. tumefaciens* を使用した。形質転換の確認は植物の上部の葉から DNA を抽出し PCR 法およびサザンハイブリダイゼーション法により行った。

結果および考察

ワタの形質転換の成否を PCR 法で確認したところ、54 個体中 1 個体から形質転換を示すバンドが検出された。この結果は、サザンハイブリダイゼーション法でも確認された。形質転換頻度は低いが、*in planta* 法でワタを形質転換することができた。

以上、本研究では主要な繊維作物であるワタ、カイコの飼料作物として重要なクワ、近年注目を浴びている繊維作物であるケナフでの *in planta* 形質転換法の開発を試み、それぞれの植物において形質転換植物を得ることに成功した。得られた形質転換植物のいくつかは収量の向上に役立つ性質を示した。