

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

## 1 6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

Precedingly, we have developed a simple and efficient *in planta* transformation methods for mulberry and kenaf plants. By using this method, we produced two mulberry transformants with good traits in this year. First, we constructed a binary vector (pBI-Res) that is convenient to rescue the DNA segment flanking to T-DNA insertion locus on plant genomic DNA. The binary vector (pBI-Res) was introduced to *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404 strain) and used for *in planta* transformation of mulberry plants. The transformants thus produced exhibited various types of phenotype, which is a reflection of difference in loci of T-DNA insertion. We selected two transformants with good and interesting traits; one is fast-growing and with big leaves, and the other is slow-growing and with small leaves. We are doing the experiments to identify the genes with T-DNA insertions in the genomes of the two transformed mulberry plants.

### 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。昨年度の研究により *in planta* 形質転換法によって外来遺伝子の導入が確認されたクワに、同法を用いて T-DNA 挿入変異を導入し、優良な形質を示す変異植物を作出することを目的とした。

### 一年間の研究内容と成果

*A. tumefaciens* を用いた植物の形質転換では、T-DNA が植物の核ゲノム 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、植物核ゲノム上の遺伝子の何れかは 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、形質転換植物には多様な表現型が現れてくる。そこで、*in planta* 形質転換法により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、枝が増える等の興味深い表現系の変化の見られる個体を選抜する。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。

### 実験方法

本研究では形質転換植物からの T-DNA 挿入部位に隣接する DNA 断片の単離を容易にするために、プラスミドレスキューが可能な pBI-Res バイナリーベクターを使用した (図 1)。pBI-Res バイナリーベクターは、植物に導入される T-DNA 部分に大腸菌で複製可能な複製開始点 (ori) とアンピシリン耐性遺伝子 (Amp<sup>r</sup>) を含んでおり、形質転換植物からゲノム DNA を調製し、図 1 に示した制限酵素で消化後に自己環状化させ、大腸菌に形質転換することにより T-DNA 挿入部位周辺の植物の DNA を回収するこ

とが可能となる。この pBI-Res バイナリーベクターを保持する *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株をクワとケナフの形質転換に使用した。

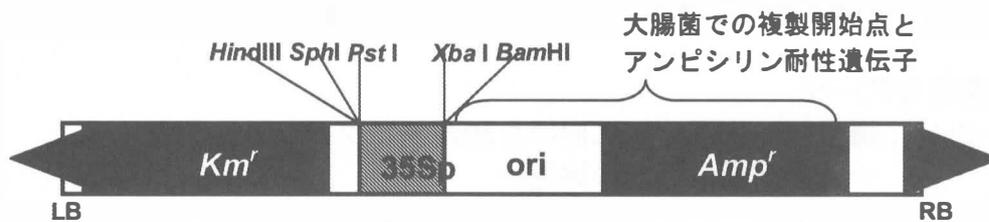


図1 pBI-Res バイナリーベクターの T-DNA 領域

### 実験結果

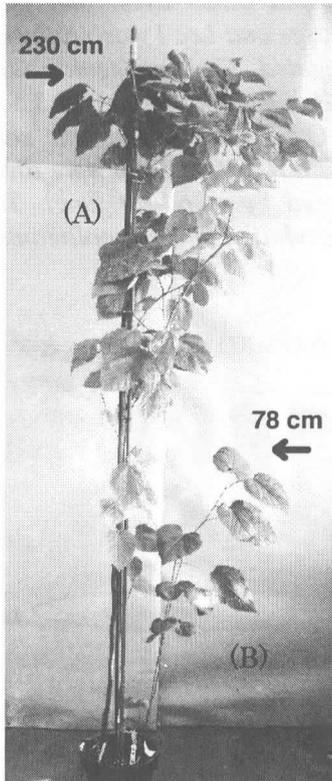


図2 T-DNA 挿入変異法によって作出したクワ変異体

pBI-Res を保持する *A. tumefaciens* を用いた形質転換実験の結果、クワにおいて、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体 (図2の (A) の植物) と生育が極端に悪くなった形質転換体 (図2の (B) の植物) が得られた。どちらの形質転換体においても、pBI-Res に由来する T-DNA が存在することが nested PCR 実験により確かめられた。これらの形質転換クワの挿し木によって得られた個体においても同様の形質を示した。これらの形質転換体ではクワの生育に関連した重要な遺伝子に T-DNA が挿入されていると考えられる。これらの形質転換体において、どの遺伝子が T-DNA 挿入によって破壊されたのかを明らかにするために、プラスミドレスキューによる目的遺伝子断片の単離を試みている。

### 展望

我々の開発した *in planta* 形質転換法の応用の一つとして、T-DNA 挿入変異法による分子育種を試みた。その結果、生育に変化の見られた形質転換クワを作出することができた。生長が速く、葉の大きい形質転換体 (A) は、葉の収量の増大が見込める優良品種になる可能性がある。形質転換体 (A) においてなぜ生長が促進されるのか明らかにするために、この形質転換植物で破壊されている遺伝子を単離しその性質を明らかにする。形質転換体 (B) では生長が悪くなっているが、この植物では生長に重要な遺伝子が破壊されている可能性があり、形質転換体 (A) と同じく (B) においても T-DNA 挿入によって破壊されている遺伝子の特定を行う。将来的にはこれらの遺伝子を他の繊維作物での分子育種の標的遺伝子の一つとして利用することを考えている。