

報告番号 甲第 4268 号

動植物細胞への遺伝子導入と導入遺伝子の  
発現状況の可視化に関する研究

永谷 尚紀

①

目次

動植物細胞への遺伝子導入と導入遺伝子の

発現状況の可視化に関する研究

1-1 遺伝子導入	1
1-1-1 植物細胞への遺伝子導入	2
1-1-2 アグロバクテリウムを用いた遺伝子導入	3
1-1-3 エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入	4
1-1-4 コーナーゲル法による遺伝子導入	4
1-2 導入遺伝子発現状況の検出	5
1-2-1 GUS遺伝子による検出	5
1-2-2 Green fluorescent protein (GFP) による検出	6
1-2-3 Green fluorescent protein (GFP) による検出	6
1-3 動物細胞への遺伝子導入	10
1-3-1 遺伝子導入技術の分類	10
1-3-2 本論文の概要	12
1-3-3 参考文献	14
2 論文の概要	15
2-1 論文の概要	15
2-2 論文の概要	16
2-2-1 論文の概要	16
2-2-2 論文の概要	17
2-2-3 論文の概要	17
2-2-4 論文の概要	18
2-2-5 論文の概要	18
2-2-6 論文の概要	19
2-2-7 論文の概要	19
2-2-8 論文の概要	20
2-2-9 論文の概要	20
2-2-10 論文の概要	21
2-2-11 論文の概要	21
2-2-12 論文の概要	22
2-2-13 論文の概要	22
2-2-14 論文の概要	23
2-2-15 論文の概要	23
2-2-16 論文の概要	24
2-2-17 論文の概要	24
2-2-18 論文の概要	25
2-2-19 論文の概要	25
2-2-20 論文の概要	26
2-2-21 論文の概要	26
2-2-22 論文の概要	27
2-2-23 論文の概要	27
2-2-24 論文の概要	28
2-2-25 論文の概要	28
2-2-26 論文の概要	29
2-2-27 論文の概要	29
2-2-28 論文の概要	30
2-2-29 論文の概要	30
2-2-30 論文の概要	31
2-2-31 論文の概要	31
2-2-32 論文の概要	32
2-2-33 論文の概要	32
2-2-34 論文の概要	33
2-2-35 論文の概要	33
2-2-36 論文の概要	34
2-2-37 論文の概要	34
2-2-38 論文の概要	35
2-2-39 論文の概要	35
2-2-40 論文の概要	36
2-2-41 論文の概要	36
2-2-42 論文の概要	37
2-2-43 論文の概要	37
2-2-44 論文の概要	38
2-2-45 論文の概要	38
2-2-46 論文の概要	39
2-2-47 論文の概要	39
2-2-48 論文の概要	40
2-2-49 論文の概要	40
2-2-50 論文の概要	41
2-2-51 論文の概要	41
2-2-52 論文の概要	42
2-2-53 論文の概要	42
2-2-54 論文の概要	43
2-2-55 論文の概要	43
2-2-56 論文の概要	44
2-2-57 論文の概要	44
2-2-58 論文の概要	45
2-2-59 論文の概要	45
2-2-60 論文の概要	46
2-2-61 論文の概要	46
2-2-62 論文の概要	47
2-2-63 論文の概要	47
2-2-64 論文の概要	48
2-2-65 論文の概要	48
2-2-66 論文の概要	49
2-2-67 論文の概要	49
2-2-68 論文の概要	50
2-2-69 論文の概要	50
2-2-70 論文の概要	51
2-2-71 論文の概要	51
2-2-72 論文の概要	52
2-2-73 論文の概要	52
2-2-74 論文の概要	53
2-2-75 論文の概要	53
2-2-76 論文の概要	54
2-2-77 論文の概要	54
2-2-78 論文の概要	55
2-2-79 論文の概要	55
2-2-80 論文の概要	56
2-2-81 論文の概要	56
2-2-82 論文の概要	57
2-2-83 論文の概要	57
2-2-84 論文の概要	58
2-2-85 論文の概要	58
2-2-86 論文の概要	59
2-2-87 論文の概要	59
2-2-88 論文の概要	60
2-2-89 論文の概要	60
2-2-90 論文の概要	61
2-2-91 論文の概要	61
2-2-92 論文の概要	62
2-2-93 論文の概要	62
2-2-94 論文の概要	63
2-2-95 論文の概要	63
2-2-96 論文の概要	64
2-2-97 論文の概要	64
2-2-98 論文の概要	65
2-2-99 論文の概要	65
2-2-100 論文の概要	66

永谷 尚紀

# 目次

## 第1章 緒言

1-1	はじめに	1
1-2	植物細胞への遺伝子導入	2
1-2-1	アグロバクテリウムを用いた遺伝子導入	2
1-2-2	エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入	4
1-2-3	パーティクルガンによる遺伝子導入	4
1-3	導入遺伝子発現状況の検出	5
1-3-1	$\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) による検出	7
1-3-2	グリーンフルオロセセントプロテイン (GFP) 遺伝子による検出	10
1-4	動物細胞への遺伝子導入	10
1-4-1	遺伝子導入細胞の分離	12
1-5	本論文の構成	12
1-6	参考文献	13

## 第2章 シリコンカーバイドウィスカーを用いた イネへの遺伝子導入

2-1	緒言	16
2-2	実験方法	16
2-2-1	試薬	16
2-2-2	供試植物及びプラスミド	17
2-2-3	遺伝子導入	17
2-2-4	一過的 GUS 遺伝子発現の観察	20
2-3	結果及び考察	20
2-3-1	遺伝子導入後の細胞と SCW	20
2-3-2	DNA 量の検討	22
2-3-3	マンニトールとソルビトールの濃度による影響	22

2-3-4	遺伝子導入のための継代と混合時間の影響	25
2-4	結言	28
2-5	参考文献	28
第3章 グリーンフルオレセントプロテイン (GFP) レポーター遺伝子の単子葉植物への導入とその解析		
3-1	緒言	30
3-2	実験	31
3-2-1	試薬	31
3-2-2	遺伝子導入用植物細胞およびプラスミド	31
3-2-3	装置	32
3-2-4	パーティクルガンによる植物細胞への GFP 遺伝子の導入	32
3-2-4-1	プラスミド DNA 付着金粒子の調整法	32
3-2-4-2	パーティクルガンの操作	32
3-2-4-3	植物細胞への GFP 遺伝子の導入	33
3-2-5	イネ胚に導入した金粒子の確認	33
3-2-6	イネ胚での一過的 GFP 遺伝子の発現	33
3-2-7	イネ胚由来カルスでの Polymerase Chain Reaction (PCR) によるゲノム DNA からの GFP 遺伝子の検出	35
3-2-8	イネ胚由来カルスでの GFP 遺伝子の発現	35
3-3	結果及び考察	36
3-3-1	パーティクルガンによりイネ胚に導入された金粒子	36
3-3-2	イネ胚での一過的 GFP 遺伝子の発現	36
3-3-3	イネ胚カルスでの PCR 法によるゲノム DNA からの GFP 遺伝子の検出	40
3-3-4	ストレスに対する GFP 遺伝子の発現状況	43
3-4	結言	43
3-5	参考文献	45

## 第4章 マグネタイトカチオニックリポソームを用いた 遺伝子導入と遺伝子導入細胞の分離

4-1 緒言	46
4-2 実験方法	46
4-2-1 試薬	46
4-2-2 供試細胞及びプラスミド	47
4-2-3 MCLs の作製	47
4-2-4 遺伝子導入法	49
4-2-5 細胞分離効率及び遺伝子導入細胞分離効率の評価法	49
4-3 結果及び考察	49
4-3-1 MCLs 量変化に対する細胞分離効率	49
4-3-2 遺伝子導入細胞の分離	49
4-3-3 他の細胞への適用	54
4-4 結言	54
4-5 参考文献	56

## 第5章 結言

研究業績 (原著論文)	59
-------------	----

## 第一章

### 緒言

#### 1-1 はじめに

スタンフォード大学の Berg らが動物ウイルス SV40 (simian virus 40) の DNA と小型にしたバクテリオファージλの DNA を結合させ試験管内で DNA の組換え分子をつくることに 1972 年に成功して以来、遺伝子操作は発展を遂げている。翌 1973 年には、カリフォルニア大学サンフランシスコ校の Cohen と Boyer が制限酵素 EcoRI と DNA リガーゼを用いて大腸菌のプラスミドとブドウ状球菌のプラスミドの組換え DNA を作り、これを大腸菌に導入して増殖させることにも成功している。彼らの実験を経て現在では、遺伝子操作 (遺伝子工学) は分子生物学、生化学においてのみならず、他の生物学諸分野、医学、薬学、農学から理工学方面の研究にまで、不可欠なものとなりつつある。また、現在では、大腸菌のような原核生物での遺伝子操作、研究にとどまらず、真核生物 (動物、植物) での研究も盛んに行われている。このように多様化し、一般的になってきている遺伝子操作であるが、実施にあたっては比較的高価な設備と高度な技術を必要とする場合が多い。そこで、本論文では簡便な遺伝子操作、解析の実現を目指し、簡便な植物への遺伝子導入と導入遺伝子の発現の解析、動物細胞への遺伝子導入と簡便な遺伝子導入細胞の分離を目的に検討を行った。

## 1-2 植物細胞への遺伝子導入

現在、植物細胞への遺伝子導入技術としては、アグロバクテリウムの Ti プラスミドをベクターに用いる間接導入法と<sup>1-3)</sup>、エレクトロポレーションやポリエチレングリコール (PEG) によるプロトプラストへの直接導入法<sup>4-7)</sup>、パーティクルガンを用いた培養細胞への直接導入法がある<sup>8)</sup>。他にも植物ウイルスをベクターに用いる方法<sup>9)</sup>、マイクロインジェクションによる直接導入法なども試みられているが、今のところ一般的とは言えない。ここでは、現在、広く用いられているアグロバクテリウムの Ti プラスミドを用いる方法と、エレクトロポレーションによるプロトプラストへの直接導入法、パーティクルガンによる培養細胞への直接導入法について述べる。

### 1-2-1 アグロバクテリウムを用いた遺伝子導入

アグロバクテリウムが植物体に感染する際、菌体内 Ti プラスミドの一部が植物核 DNA へ転移を起こす現象を利用して外来遺伝子を導入する方法である。植物核 DNA へ転移を起こす領域は T-DNA (20kb 前後) と呼ばれ、その両端部には 25bp からなるダイレクトリピートが存在する。このダイレクトリピートと Ti プラスミド上の *vir* 領域 (35kb 程度) が T-DNA の転移には必須である。*vir* 領域には、T-DNA の切り出しと転移に関与する遺伝子群が存在することが、知られている。そこで導入遺伝子を T-DNA の中に挿入しアグロバクテリウムの中へ移すと、アグロバクテリウム中の T-DNA 部分を介して、相同組み換えによって Ti プラスミド中へ組み込まれる。その結果、外来遺伝子が、Ti プラスミド上へ組み込まれる。こうして得られた形質変換アグロバクテリウムが、植物へ感染すると、T-DNA 領域が、同じ Ti プラスミド上の *vir* 領域の働きによって切り出され、植物核に移行する (Fig.1-1)。アグ

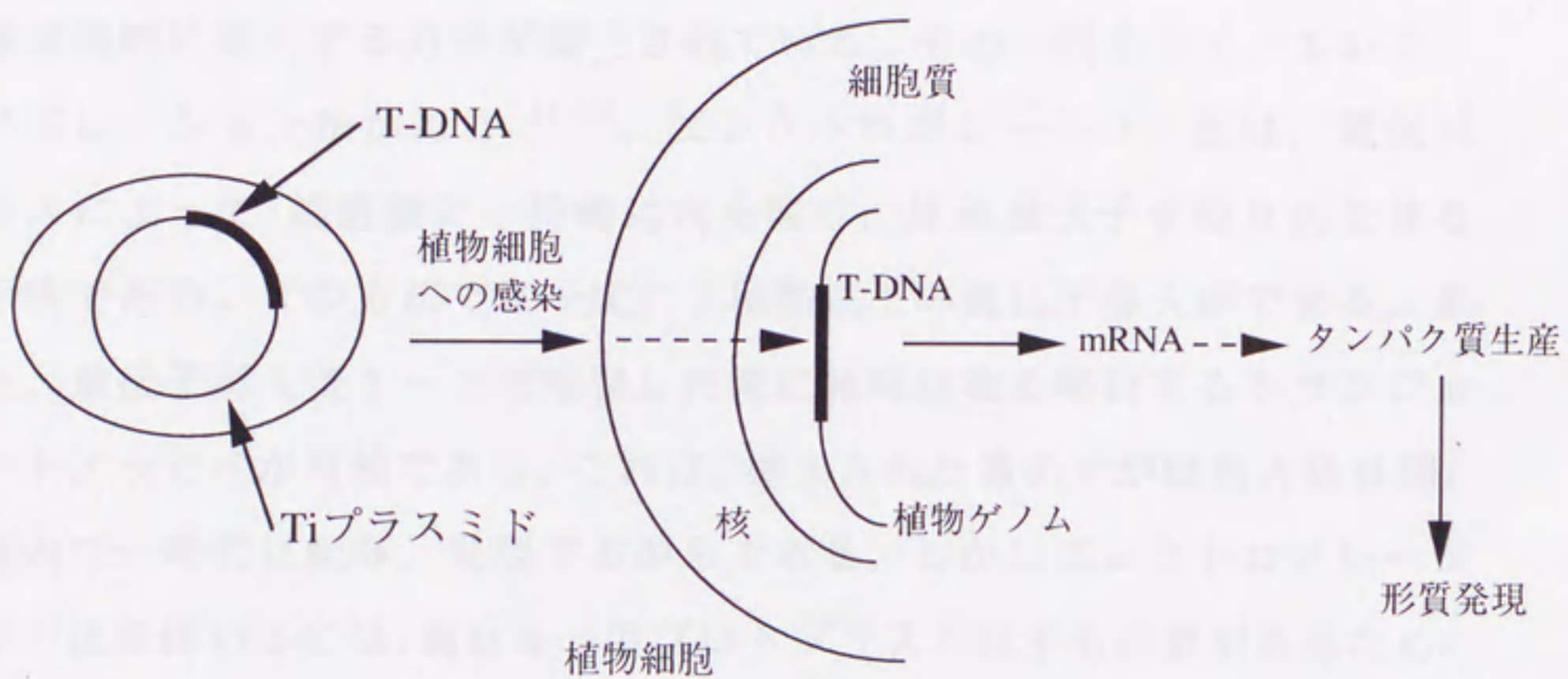


Figure 1-1. アグロバクテリウムによる植物への遺伝子導入



ロバクテリウムを外来遺伝子導入に用いる場合、双子葉植物でなければならず、単子葉植物では難しいとされていたが、導入時期を選んでやればイネに対しても効果的であるという報告がなされた<sup>10)</sup>。

#### 1-2-2 エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入

単子葉植物の多くはアグロバクテリウムに感染しないため、遺伝子を直接細胞に導入する方法が確立されている。その一例として、エレクトロポレーション法がある<sup>11-13)</sup>。エレクトロポレーション法は、電気パルスによって細胞膜に一時的に穴を開け、外来遺伝子を取り込ませる手法である。この方法では一度に2種類以上の遺伝子導入ができる。また、遺伝子導入後1～2日培養した後に発現産物を解析するトランジェントアッセイが可能である。これは、導入された遺伝子が始めの数日間、核内で一時的に転写、発現するからである。しかしエレクトロポレーション法を用いるには、細胞を一度プロトプラスト化する必要があるため、プロトプラストから植物体再生までの培養法が確立していない場合、形質転換植物を用いた遺伝子発現の解析が難しいという欠点がある。

#### 1-2-3 パーティクルガンによる遺伝子導入

タバコなどの双子葉植物に比べ、アグロバクテリウムにほとんど感染しない単子葉植物である穀類では、エレクトロポレーション法、PEG法などを用いなければ外来遺伝子の導入は困難である。しかしアグロバクテリウムに感染しない単子葉植物に外来遺伝子の導入可能なエレクトロポレーション法、PEG法は、外来遺伝子を導入する際、細胞を一度プロトプラスト化する必要がある。そのためプロトプラストから植物体再生までの培養法が確立していない場合、形質転換植物を用いた遺伝子発現の解析が難しいという欠点がある。したがってプロトプラストを経ないで細胞に直接遺伝子導入できるパーティクルガン法

(microprojectile bombardment) (Fig.1-2) を用いることによってプロトプラストから植物体再生までの培養法が確立していない植物体への外来遺伝子導入、遺伝子発現の解析が可能である。パーティクルガン法は、遺伝子をコーティングした金属粒子を音速に近いまたはそれ以上の初速度で発射し細胞内に金属粒子と同時に遺伝子を導入する方法である。パーティクルガン法で導入した遺伝子の発現効率を高めるには導入条件の系統的な最適化が必要である。最適条件を決める際、植物においてはレポーター遺伝子である GUS ( $\beta$ -glucuronidase) 遺伝子あるいは CAT(chloramphenicol acetyltransferase) 遺伝子を導入し、その一時的発現量で導入効率を測定し最適条件を決定している。一時的に遺伝子を発現した細胞の中で遺伝子を染色体に組み込んだ形質転換細胞は 1/10 以下とも 1/100 以下とも言われている<sup>14)</sup>。さらに形質転換した細胞の中で再分化能を有する細胞はそれ以下になるためパーティクルガン法において導入条件を最適に決定することは重要とされている。パーティクルガンによる遺伝子導入は植物においてだけでなく、現在ではショウジョウバエ、線虫、動物細胞あるいは動物個体への遺伝子導入も試みられている<sup>15)</sup>。

### 1-3 導入遺伝子の発現状況の検出

従来、任意のタンパク質の細胞内局在を知る方法として、分画あるいは精製といった生化学的手法や、目的のタンパク質を認識する抗体を作製し使用する免疫学的手法が用いられてきた。これらの方法は、直接的な情報が得られるといった利点がある一方で、煩雑で熟練を要する操作や、生体での情報が得られないといった欠点がある。また、外来の遺伝子を植物細胞に導入し、その遺伝子の転写調節領域を検索したり、発現の組織特異性などを調べる場合に、各種レポーター遺伝子を用いる技

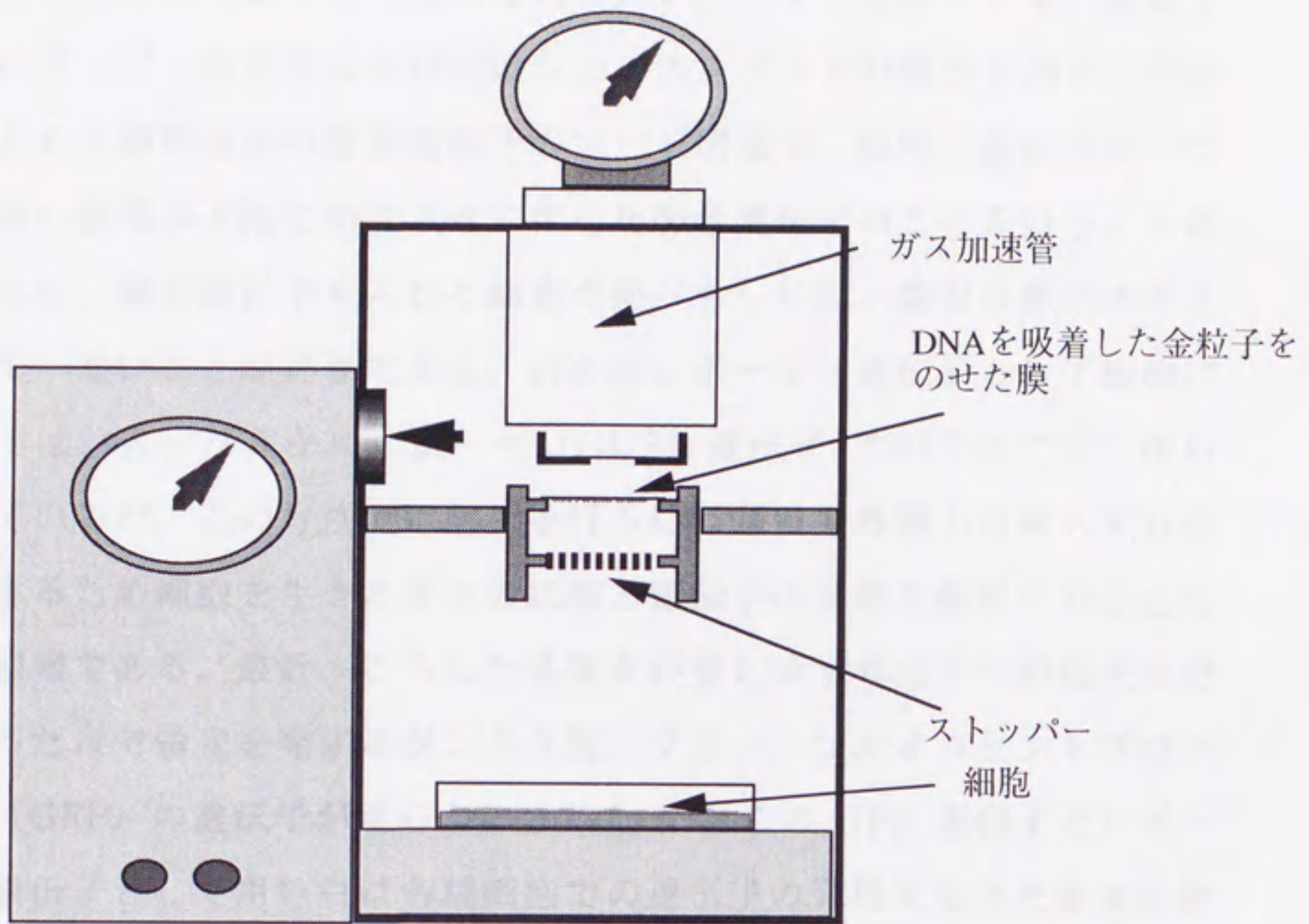
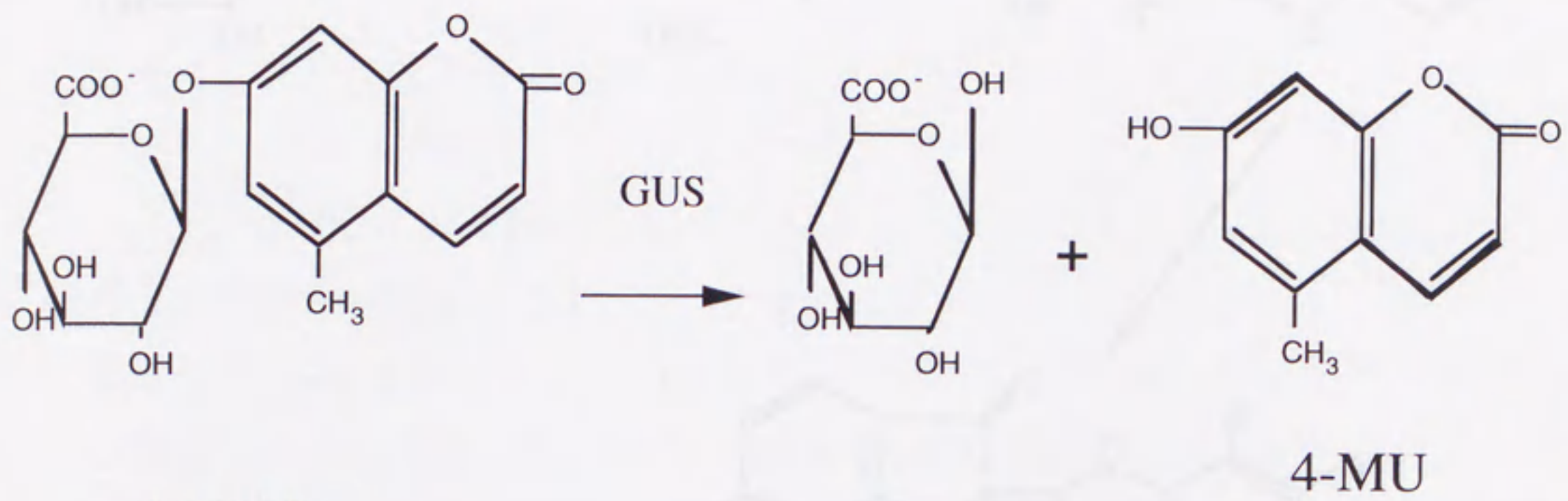


Figure1-2. パーティクルガンの模式図

術が簡便な方法としてよく用いられる。レポーター遺伝子とは、遺伝子のプロモーター活性あるいは他のシス・エレメントの働きを調べるために、主に大腸菌由来の酵素遺伝子のコード領域を、目的の遺伝子のプロモーター領域の下流に結合させて作った融合遺伝子のことをいう。この場合には、融合遺伝子を入れる細胞が同一もしくは、類似の酵素活性を持っていないことが必要である。例えばレポーター遺伝子として植物においては、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子<sup>16)</sup>が今まで主に用いられているが、この方法では解析を行うには基質を外部から導入する必要があるため細胞を生きたままの状態での遺伝子の発現を観察することは大変困難である。最近、こうした基質を必要とせず外部から励起光を照射するだけで蛍光を発するタンパク質、グリーンフルオロセントプロテイン (GFP) の遺伝子が明らかにされた<sup>17)</sup>。この GFP 遺伝子をレポーター遺伝子として用いれば各種細胞での遺伝子の発現を生きたままの状態での解析することが可能であり、プロモーターの制御がどのようなようになされているかをリアルタイムに解析することも可能であると考えられる<sup>18)</sup>。以下に GUS と GFP の検出法について述べる。

### 1-3-1 $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) による検出

GUS の活性は、4-methylumbelliferyl glucuronide (4-MUG) を基質とするとき、その産物である 4-methyl umbelliferone (4-MU) の発する特異的な蛍光によって定量することができる (Fig.1-3)。4-MU は安定性が高く、バックグラウンドが低いので容易に定量が可能である。また基質として 5-bromo-4-chloro-3-indoyl  $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc) を用いると、産物として indigotin という不溶性の藍色の色素ができるため、この性質を利用して、細胞内あるいは組織内の GUS 活性の局在性を容易に調べることが可能である (Fig.1-4)。しかし、GUS を用いた外来遺伝子の検出は、4-MUG、X-Gluc を使ったどちらの方

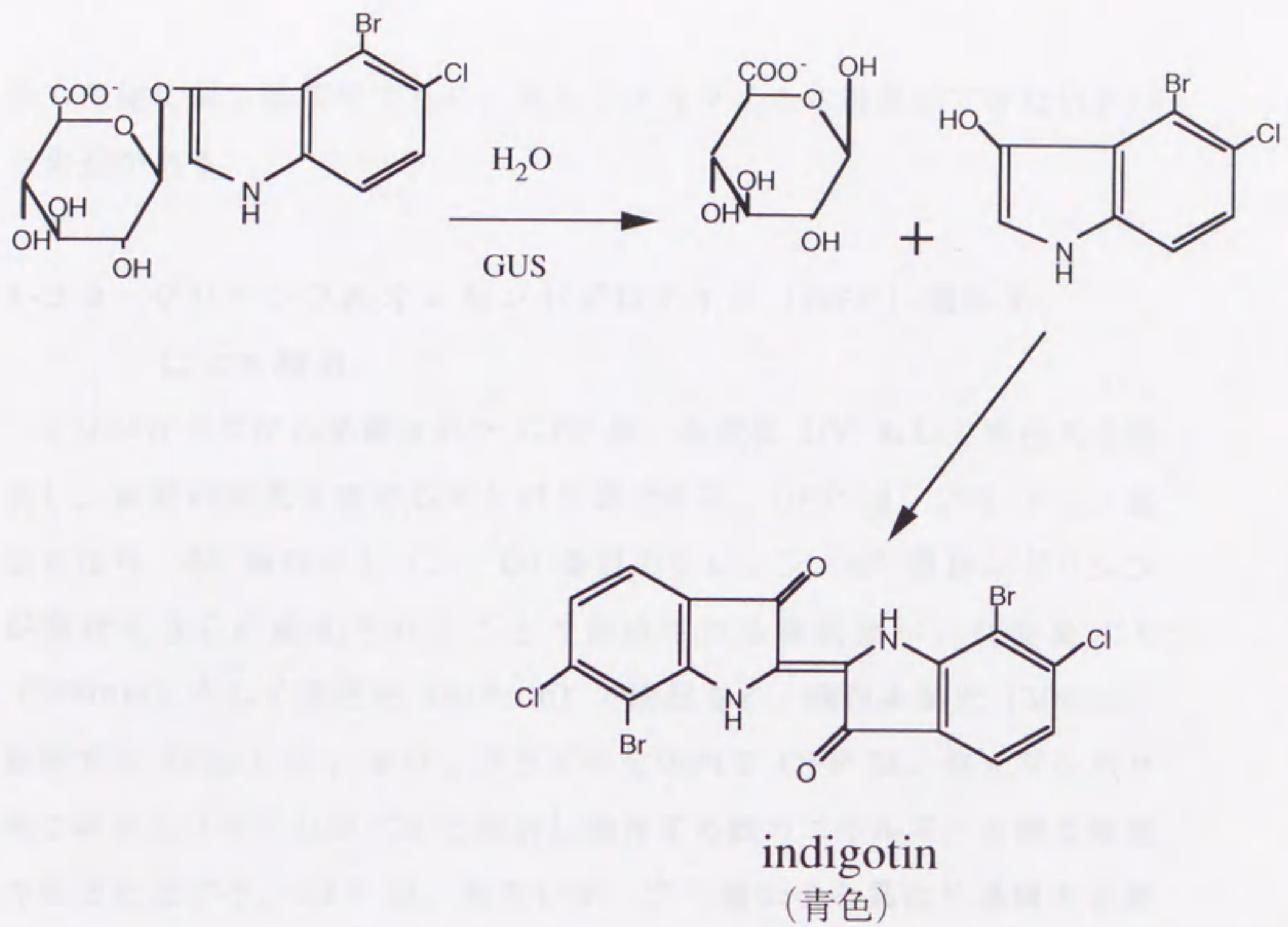


4-MUG

4-MU

励起 365nm  
 蛍光 455nm

**Figure 1-3.** GUSの蛍光基質を用いた活性の測定法



**Figure 1-4.** 発色基質X-Glucを用いたGUS活性の測定法

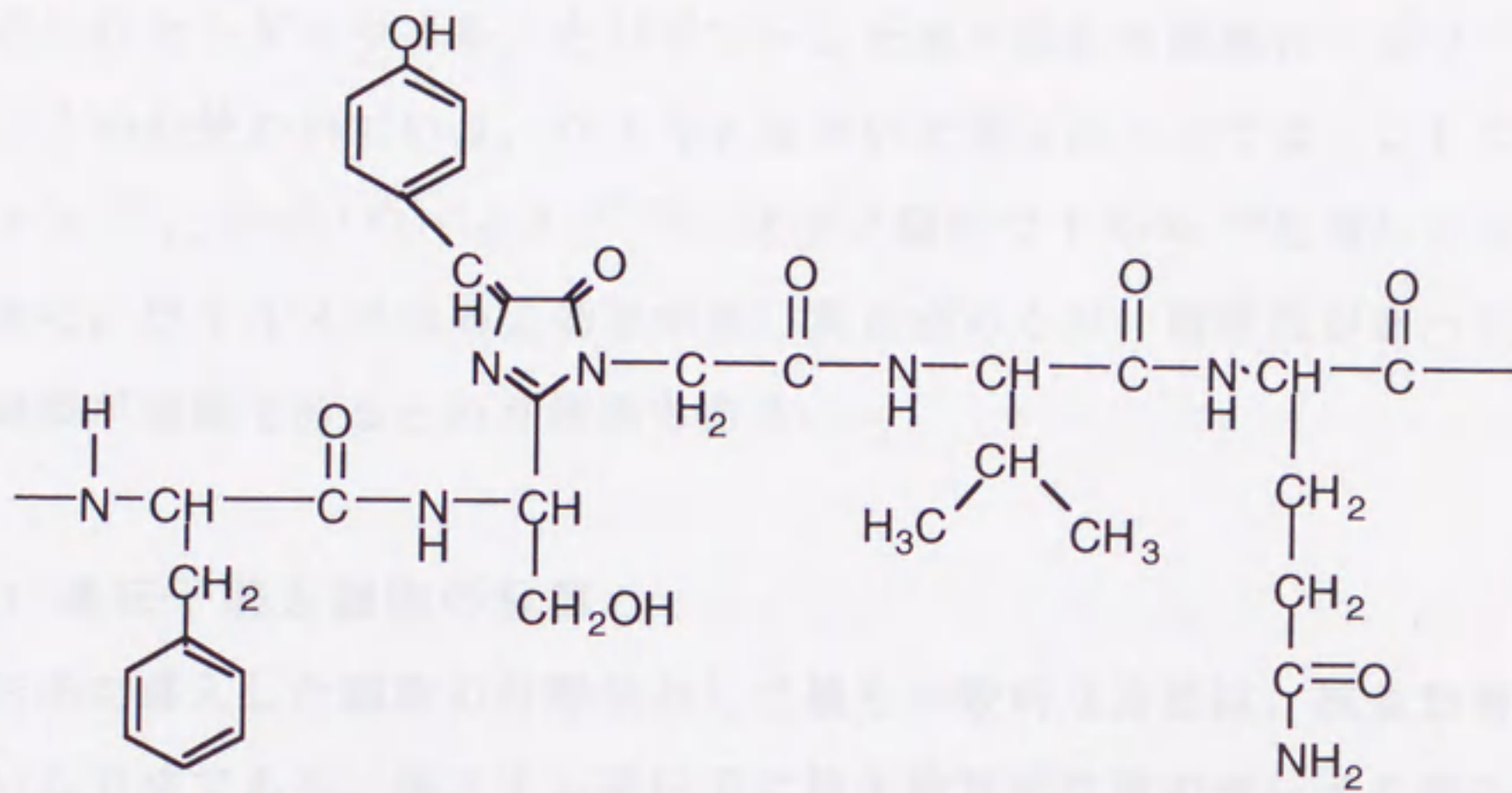
法も生体に対し破壊的であり、またリアルタイムに測定ができないという欠点がある。

### 1-3-2 グリーンフルオレセントプロテイン (GFP) 遺伝子 による検出

オワンクラゲから単離された GFP は、長波長 UV もしくは青色光を吸収し、緑色の蛍光を発するタンパク質である。GFP は、238 アミノ酸からなり、65 番目のセリン、66 番目のチロシン、67 番目のグリシンが環状化さらに酸化されることで形成される発色団が、長波長 UV (396nm) もしくは青色光 (475nm) で励起され、緑色の蛍光 (508nm) を発する (Fig.1-5)。オワンクラゲの生体内で GFP は、発光タンパク質であるエクオリンが  $\text{Ca}^{2+}$  と結合し発光する際のエネルギーを得て緑色の蛍光を発する。GFP は、他のレポーター遺伝子と異なり基質を必要としない。そのため生体内で発現するだけで細胞を生きたままりリアルタイムに遺伝子の発現をモニタリングすることが可能である。今まで GFP は、微生物、培養細胞などで発現できることは報告されている<sup>19,20)</sup>。植物に関して最近、オレンジやポテトの細胞で発現することが報告された<sup>21,22)</sup>。この GFP と任意のタンパク質を結合し、融合タンパク質を作製すると、目的のタンパク質の細胞内局在を、例えば蛍光顕微鏡下で容易に観察することができる。GFP の蛍光シグナルの検出には試料の固定あるいは基質を必要としないため、生体観察が可能である。

## 1-4 動物細胞への遺伝導入

動物細胞への遺伝子導入法はいろいろ検討されてきたが、すべての細胞に適用できる普遍的な手段はない。物理的導入法としては、微細なガラス管を用いて細胞 (核) へ遺伝子を注入するマイクロインジェクション



-His-Ser-dehydroTyr-Gly-Val-Gln-

**Figure 1-5.** GFPの蛍光を有するアミノ酸配列部位

### 1.4.2 蛍光の形成

蛍光形成は、この構造を基盤として行われる。

蛍光形成には、Serine残基の側鎖が重要な役割を果たしている。Serine残基の側鎖は、His-Ser-dehydroTyr-Gly-Val-Gln-配列の一部として存在し、蛍光形成に寄与している。Serine残基の側鎖は、His-Ser-dehydroTyr-Gly-Val-Gln-配列の一部として存在し、蛍光形成に寄与している。

His-Ser-dehydroTyr-Gly-Val-Gln-配列の一部として存在し、蛍光形成に寄与している。

His-Ser-dehydroTyr-Gly-Val-Gln-配列の一部として存在し、蛍光形成に寄与している。

His-Ser-dehydroTyr-Gly-Val-Gln-配列の一部として存在し、蛍光形成に寄与している。

His-Ser-dehydroTyr-Gly-Val-Gln-配列の一部として存在し、蛍光形成に寄与している。



チオニックリポソーム法<sup>25)</sup>も同様に食作用を利用している。紫外線で不活化したセンダイウイルスとリポソームを組み合わせ膜融合リポソームというの也被われている。ウイルスを用いた導入法としては、レトロウイルス<sup>26)</sup>、アデノウイルス<sup>27-29)</sup>、アデノ随伴ウイルス<sup>30)</sup>を用いた方法がある。ウイルス法は導入効率が高い利点があるが、病原性があつたり、調製が煩雑であるという側面もある。

#### 1-4-1 遺伝子導入細胞の分離

遺伝子を導入した細胞の分離法として最も一般的な方法は、抗生物質を用いる方法である。導入する遺伝子に抗生物質耐性用の遺伝子を組み込んで、遺伝子が発現すれば抗生物質が効かなくする方法である。しかし、この方法は時間のかかる方法である。また、最近の報告では蛍光タンパクを遺伝子導入細胞で発現させフローサイトメーターを用いて分離する方法も提案されている<sup>31)</sup>。細胞膜抗原をコードした遺伝子を目的の遺伝子と同時に細胞に導入し、抗体を表面に修飾した磁性微粒子を用いて分離する方法も開発されている<sup>32)</sup>。

### 1-5 本論文の構成

本論文は、全編5章から構成されている。

第1章は緒言であり、植物への遺伝子導入及び導入遺伝子の解析法と動物細胞への遺伝子導入と遺伝子導入細胞の分離を概説するとともに、本研究の目的を述べたものである。

第2章では、イネに対する簡便な遺伝子導入法としてシリコンカーバイドウィスカー(SCW)を用いた方法を検討する。SCWは針状の微粒子であり、イネカルスと混ぜる(ボルツテクス)ことによってカルスに細孔が生じ遺伝子導入が可能となる。しかし、効率的に導入するには様々

な条件を検討しなければならない。そこで、イネカルスで SCW を用いる遺伝子導入での最適条件を検討する。

第3章では、単子葉植物（イネ）を用い、所定のプロモーター（ストレスタンパク質）の下流にグリーンフルオレセントプロテイン（GFP）遺伝子を配置して遺伝子を導入し、植物細胞内で GFP 遺伝子の発現を観察し、ストレスをかけることによる遺伝子の発現の状況を生体のまま画像処理技術と合わせて観察する。

第4章では、動物細胞に対する簡便な遺伝子導入法と遺伝子導入細胞分離の簡便な方法として、磁性微粒子に正に荷電したリン脂質を被覆したマグネタイトカチオンリポソーム（MCLs）を用いる方法を検討する。

第5章は、以上の研究を総括的にまとめ、今後の課題を述べる結言である。

## 1-6 参考文献

- 1) Maiti, I.B., Wagner, G.J., Yeagan, R., Hunt, A.G. (1989). *J. Cell. Biochem.*, suppl. 13D, 338-338.
- 2) Hoekema, A., Hirsch, P., Hooykaas, P., Schilperoort, R. (1983). *Nature*, 303, 179-180.
- 3) De Framond, A., Barton, K., Chilton, M.D. (1983). *Bio/Technology*, 1, 262-269.
- 4) Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchiya, H., Hinata, K. (1998). *Bio/Technology*, 6, 1072-1074.
- 5) Zhang, W., Wu, R. (1988). *Theor. Appl. Genet.*, 76, 835-840.
- 5) Yang, H., Zhang, H.M., Davey, M.R., Mulligan, B.J., Cocking, E.C. (1988) *Plant Cell Reports*, 7, 421-425.

- 6) Datta, S.K., Peterhans, A., Datta, K., Potrykus, I. (1990). *Bio/Technology*, 8, 736-740.
- 8) Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C. (1987). *Nature*, 327, 70-73.
- 9) Hayes, R.J., Petly, I.T.D., Coutls, R.H.A., Buck, K.W. (1988). *Nature*, 334, 179-182.
- 10) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. (1994). *The Plant Journal*, 6, 271-282.
- 11) Kyozuka, J., Hayashi, Y., Shimamoto, K. (1987). *Mol. Gen. Genet.*, 206, 401.
- 12) Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T., Fujimoto, H. (1989). *Nature*, 338, 274
- 13) Kyozuka, J., Izawa, T., Nakajima, M., Shimamoto, K. (1990). *Maydica.*, 35, 353.
- 14) Gordon-Kamm, W.J., et al.: *The Plant Cell*, 2:603-618, 1990.
- 15) Tang, D.C. et al.: *Nature*. 356:152-154, 1992.
- 16) Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987). *EMBO J.*, 6, 3901-3907.
- 17) Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J. (1992). *Gene*, 111, 229-233.
- 18) Chalfine, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994). *Science*, 263, 802-805.
- 19) Inouye, S. and Tsuji, F.I. (1994). *FEBS Letters*, 341, 277-280.
- 20) Kitts, P., Adams, M., Kondepudi, A., Gallagher, D. Kain, S. (1995). *CLONTECHniques*, X, (1), 1-3.
- 21) Niedz, R.P., Sussman, M.R., Satterlee, J.S. (1995). *Plant Cell Reports*, 14, 403-406.

- 22) Baulcombe, D.J., Chapman, S., Curz, S.S. (1995). *The Plant Journal*, 7, 1045-1053.
- 23) Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hoschneider, P.H. (1982). *EMBO J.*, 1, 841-845
- 24) Potter, H., Weir, L., Ledere, P. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7161-7165.
- 25) Haga, N., Yagi, K. (1989). *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 7, 175-183.
- 26) Hock, R.A., Miller, A.D., Osborne, R.A. (1989) *Blood*, 74, 876-881.
- 27) Davidson, B.L., Allen, E.D., Kozarsky, K.F., Wilson, J.M., Roessler, B.J. (1993). *Nat. Gentet.*, 3, 219-223.
- 28) Akli, S., Caillaud, C., Vigne, E., Straford-Perricaudet, L.D., Poenaru, L., Perricaudet, M., Kahn, A., Peschanski, M.R. (1993). *Nat. Gentet.*, 3, 224-228
- 29) Bajocchi, G., Feldman, S.H., Crystal, R.G., Mastrangeli, A. (1993). *Nat. Gentet.*, 3, 229-234.
- 30) Samulski, R.J., Berns, K.I., Tan, M., Muzyczka, N. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2077-2081.
- 31) Dell'arciprete, R., Stella, M., Fornaro, M., Ciccocioppo, R., Capri, M.G., Naglieri, A.M., Albert, S. (1996). *Jornal of Histochemistry and Cytochemistry*, 44, 629-640.
- 32) Rols, M.P., Delteil, C., Senn, G., Teissie, J. (1994). *Nucl. Acids Res.*, 22, 540-541.

## 第二章

### シリコンカーバイドウィスカーを用いた イネへの遺伝子導入

#### 2-1 緒言

現在、植物細胞への遺伝子導入技術としては、アグロバクテリウムの Ti プラスミドをベクターに用いる間接導入法と<sup>1, 2, 3)</sup>、エレクトロポレーションやポリエチレングリコール(PEG)によるプロトプラストへの直接導入法(物理的導入法)<sup>4, 5, 6, 7)</sup>、パーティクルガンを用いた培養細胞への直接導入法<sup>8)</sup>がある。他にも植物ウイルスをベクターに用いる方法や<sup>9)</sup>、マイクロインジェクションによる直接導入法なども試みられているが<sup>10)</sup>、今のところ一般的とは言えない。直接導入法でのエレクトロポレーションや PEG を用いる方法では、細胞をプロトプラストにする必要がある。マイクロインジェクション法では高圧ガスを用いたり高価な機械が必要であったりする。そこで、プロトプラストにせず混合するだけで遺伝子が導入できるシリコンカーバイドウィスカー(SCW)を用いてイネカルスに簡便に遺伝子することを検討した。SCW は、針状の粉末でカルスト混ぜることによって細胞に細孔をあけ遺伝子を導入する方法である。<sup>11, 12, 13, 14, 15)</sup>

#### 2-2 実験方法

##### 2-2-1 試薬

遺伝子導入に用いた SCW は、東海カーボン株式会社の平均の直径が 0.5 $\mu$ m で長さ 25 $\mu$ m の Tokawhisler TWS-100 を用いた。その他の試薬については遺伝子工学用として精製された市販品、あるいは市販の特

級品を用いた。またすべて滅菌水を使用した。

### 2-2-2 供試植物及びプラスミド

本実験で使用した植物細胞は、タバコ細胞 BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2) とイネ (*Oryza sativa* L. cv. Notohikari) を用いた。タバコ細胞 BY-2 は 1 週間ごとに継代培養し、培地は Table 2-1 に示した組成の改変 LSD 培地<sup>16)</sup> に 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) を 0.2mg/l と 3% グルコース (30g/l) を加え pH 5.8 に調整した。イネは胚由来カルスで、培地は Table 2-2 に示した組成の改変 N6 培地 (N6S) に 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) を 0.1mg/l と 8% グルコース (80g/l) を加え pH 5.8 に調整した。1 週間毎に継代培養を行い、2 週間毎に 1mm の金属メッシュで裏ごしているものを用いた。植物細胞に導入するプラスミドとしては、レポーター遺伝子としてイネのアクチン由来のプロモーターの下流に GUS ( $\beta$ -D-glucuronidase) 遺伝子、Nos のターミネーターを配置したプラスミド pAct1-F<sup>17)</sup>を用いた。pAct1-F の調製はプラスミド DNA (pAct1-F) を持つ組み替え大腸菌 JM109 をアンピシリン (50  $\mu$ g/ml) 入りの LB 培地、37°C で液体培養し、アルカリ-SDS 法を用いて調製した。抽出したプラスミド DNA の精製は塩化セシウムを用いた超遠心法で行った。遠心管から回収したプラスミド DNA からエチジウムブロマイドと塩化セシウムを除去してエタノール沈殿させ、これを遠心し、沈殿を乾燥して適量の蒸留水で溶かし濃度を 1  $\mu$ g/ $\mu$ l とした。

### 2-2-3 遺伝子導入

培地を除いた細胞を約 300mg 取り 1.5ml のマイクロチューブに入れ、その後に 25  $\mu$ l の DNA 溶液 (1mg/ml) と 40  $\mu$ l の滅菌した SCW (5% w/v) を入れ、等モル濃度ソルビトールとマンニトールを加えた培地

**Table2-1.** Modified LSD medium composition for suspension culture of rice cells, BY2

Component	Concentration [mg/l]
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,485
KNO <sub>3</sub>	1,710
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	600
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	220
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	260
myo-inositol	100
Thiamine HCl	1.0
2,4-D	0.2

**Table 2-2.** Modified N6 medium composition for suspension culture of tobacco cells, Noyohikari

Component	Concentration [mg/l]
KNO <sub>3</sub>	2830
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	463
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	166
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	185
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.6
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	4.4
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.5
KI	0.8
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.025
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
Fe-EDTA	43
myo-inositol	100
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Glycine	2.0
Thiamine HCl	1.0



を 250 $\mu$ l 加えた。マイクロチューブを指で軽くたたき混ぜた後、15 分間室温で放置し、マイクロチューブミキサー（岩城硝子株式会社 TUPLE MIXER TWIN3-28）で混ぜ遺伝子を導入した。N6S 培地に加えたマンニトールとソルビトールの濃度と、マイクロチューブミキサーで混ぜる時間は変化させ導入効率を検討した。

#### 2-2-4 一過的 GUS 遺伝子の発現の観察

遺伝子導入のために混合した後に、カルスを N6S 寒天培地を入れた 90mm $\times$ 15mm ペトリ皿に移し 25 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。培養後、プレート上のカルスに GUS 染色液（1.9mM 5-bromo-4chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronic acid, 0.5mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 0.5mM  $K_4Fe(CN)_6$  and 0.3%(w/V) Triton-X-100) をかけて、37 $^{\circ}$ C で 12~18 時間放置し、GUS の発現によるカルスのブルースポットの数顕微鏡で数えた。GUS の発現は、ブルースポットの数 1g のカルスに換算して評価した。

### 2-3 結果及び考察

#### 2-3-1 遺伝子導入後の細胞と SCW

BY-2 を用いて SCW が遺伝子導入（チューブミキサーでの混合）直後にどのような状態になっているか観察した。導入条件は、25 $\mu$ l の DNA 溶液（1mg/ml）と 40 $\mu$ l の滅菌した SCW（5% w/v）を入れ、0.5 モル濃度ソルビトールとマンニトールを加えた改変 LSD 培地を 250 $\mu$ l 加え、マイクロチューブを指で軽くたたき混ぜた後、15 分間室温で放置し、マイクロチューブミキサーで 5 分混ぜ遺伝子を導入した。導入後、25 $^{\circ}$ C で 24 時間放置し、顕微鏡で細胞と SCW の状態を観察した（Fig. 2-1）。顕微鏡で観察すると、SCW が細胞に刺さっているのが観察され



0.5mm

**Figure 2-1.** Photograph of BY2 cells and SCW

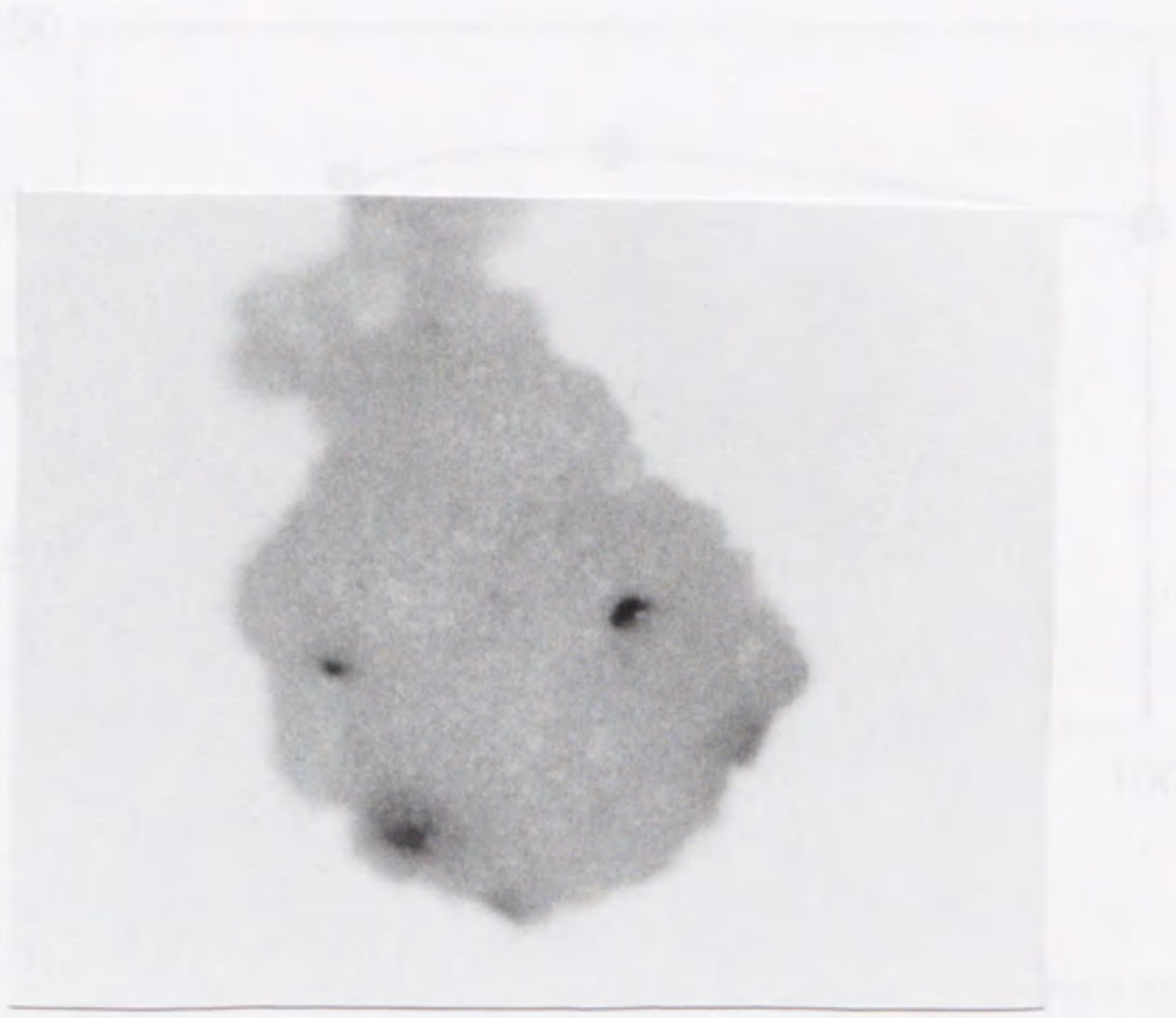
た。このことは、SCW を用いて物理的に細胞に細孔をつくり、遺伝子が導入される可能性があることがわかった。

### 2-3-2 DNA 量の検討

次にイネカルスを用いて DNA (プラスミド) 量を変化させることによって遺伝子導入効率が変わるか検討した。導入条件は、約 300mg のイネカルスに DNA 濃度を変化させた DNA 溶液を 25 $\mu$ l と 40 $\mu$ l の滅菌した SCW (5% w/v) を入れ、0.5 モル濃度ソルビトールとマンニトールを加えた改変 LSD 培地を 250 $\mu$ l 加え、マイクロチューブを指で軽くたたき混ぜた後、15 分間室温で放置し、マイクロチューブミキサーで 15 分混ぜ遺伝子を導入した。導入後、N6S 寒天培地に細胞をまき 25 $^{\circ}$ C で 24 時間放置し、GUS 染色液を用いて GUS が発現しているか確認した (Fig. 2-2)。Fig. 2-2 に示すようにカルスにブルースポットが観察でき、顕微鏡で数え評価しところ、プラスミドの量が増えるに従いブルースポットの数が増えるが、25 $\mu$ g より多くしても、それ以上ブルースポットは増えなかった (Fig. 2-3)。

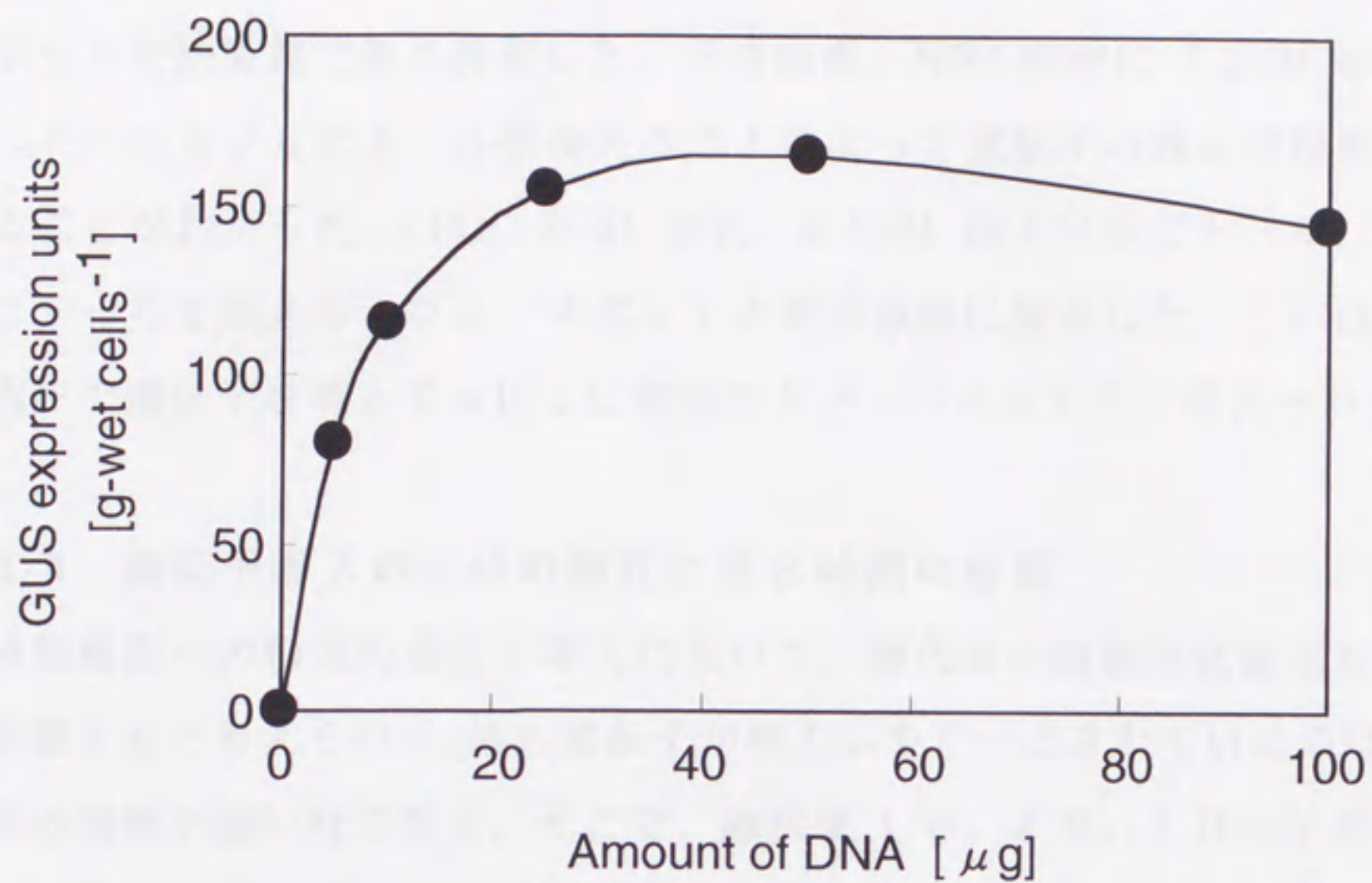
### 2-3-3 マンニトールとソルビトールの濃度による影響

SCW で細胞に細孔をあけ遺伝子導入際に、浸透圧を高めた溶液を用いることによって遺伝子が入りやすくなると考えられる。そこで、等モル量のマンニトールとソルビトールを用いた。モル濃度を変化させると遺伝子導入効率に影響が見られると考えられるので確かめた。遺伝子の導入条件は、約 300mg のイネカルスに DNA 濃度を変化させた DNA 溶液を 25 $\mu$ l と 40 $\mu$ l の滅菌した SCW (5% w/v) を入れ、0.5 モル濃度ソルビトールとマンニトールを加えた N6S 培地を 250 $\mu$ l 加え、マイクロチューブを指で軽くたたき混ぜた後、30 分間室温で放置し、マイクロチューブミキサーで 15 分混ぜ遺伝子を導入した。導入後、N6S 寒天



5.0mm

**Figure 2-2.** Photograph of rice cells with GUS expression after DNA delivery.

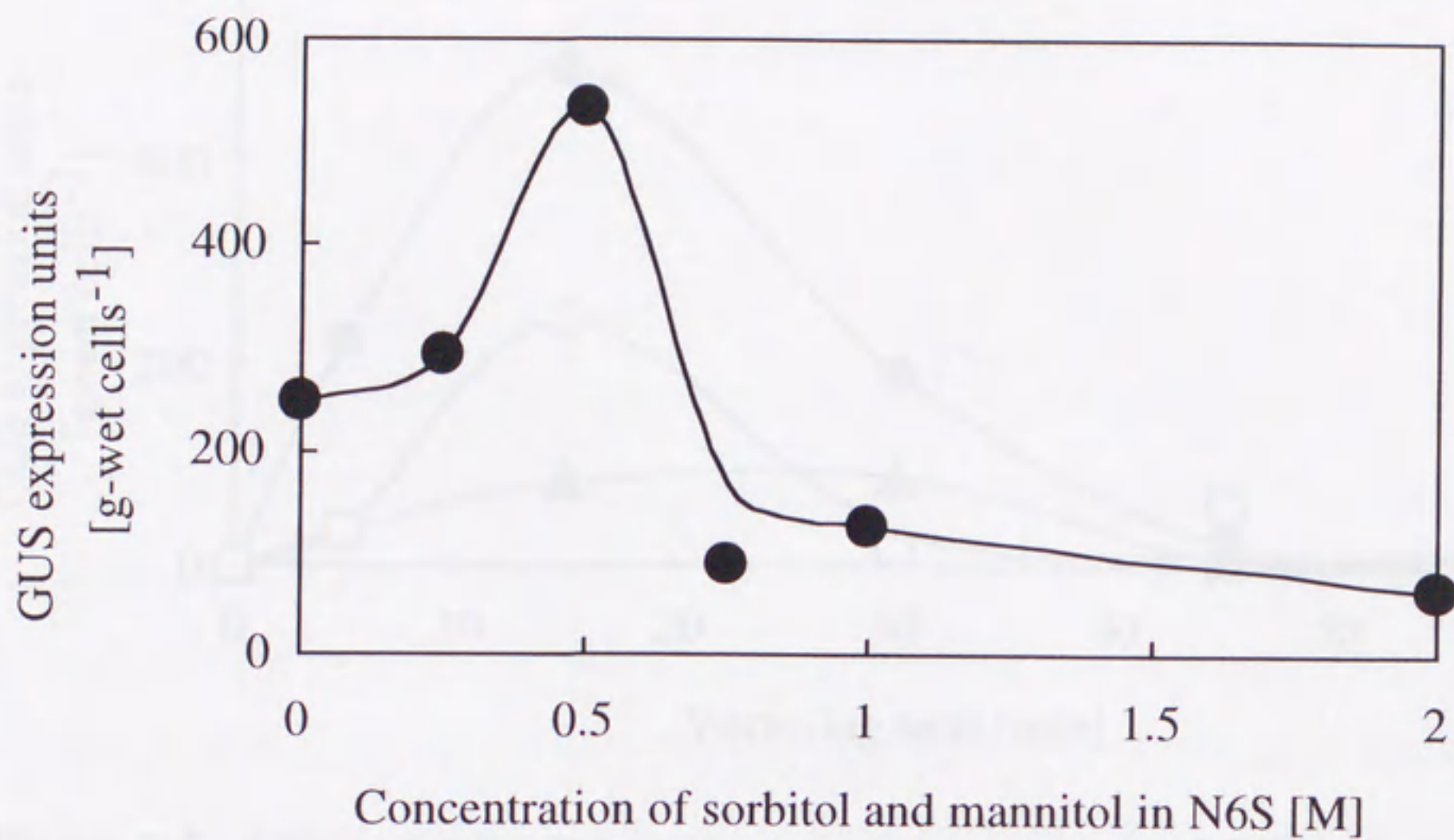


**Figure 2-3** Effect of amount of DNA for delivery into the rice cells. GUS expression unit is defined as the number of blue spots per 1 g wet cells.

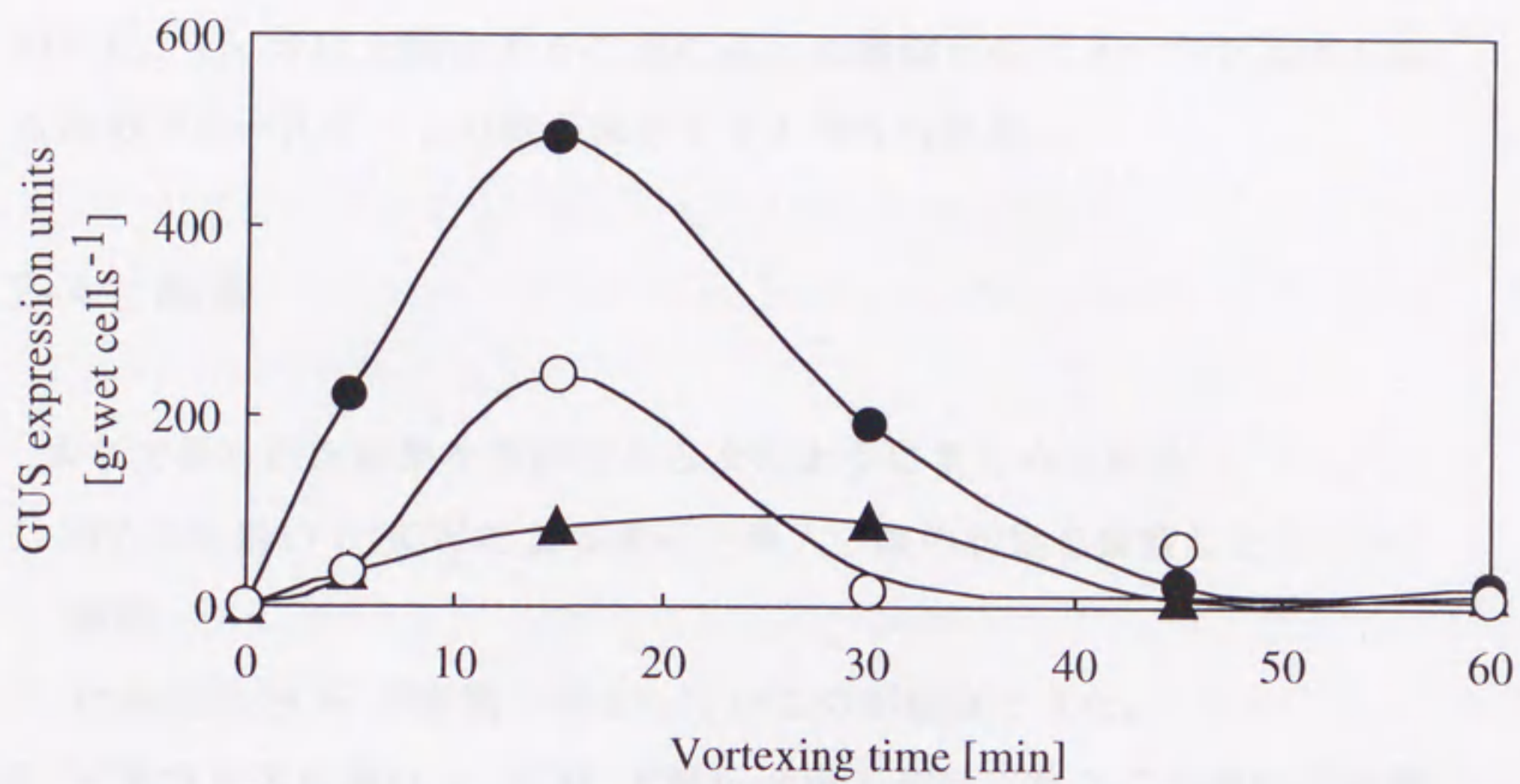
培地に細胞をまき 25℃で 24 時間放置し、GUS 染色液を用いてブルースポットを顕微鏡で数え評価した。その結果、N6S 培地に 0.25M のマンニトールとソルビトールを加えることによって遺伝子の導入が促進されることがわかった。(Fig. 2-4) また、0.25M 以上ソルビトール、マンニトールを加えるとブルースポットの数が急激に減少した。これは、浸透圧で遺伝子を導入する以上に細胞にダメージを与えたと考えられる。

#### 2-3-4 遺伝子導入のための継代と混合時間の影響

植物細胞への物理的遺伝子導入において、継代後の細胞の状態は大きく影響すると考えられる。最も遺伝子が導入しやすいとされているのは、細胞の増殖が速い時である。そこで、継代後 1 日、3 日、7 日のイネカルスを用いて遺伝子の導入を行った。また、SCW を用いた遺伝子導入法では、針状の SCW によって細胞に細孔ができることを利用しているが、細胞との混合時間を長くするに従い細胞にとって修復不可能なほど傷がつき遺伝子導入効率が下がると考えられる。そこで、混合時間も変えて検討を行った。他の遺伝子導入条件は、約 300mg のイネカルスに DNA 濃度を変化させた DNA 溶液を 25 $\mu$ l と 40 $\mu$ l の滅菌した SCW (5% w/v) を入れ、0.5 モル濃度 (各 0.25M) ソルビトールとマンニトールを加えた N6S 培地を 250 $\mu$ l 加え、マイクロチューブを指で軽くたたき混ぜた後、30 分間室温で放置し、マイクロチューブミキサーで導入後、N6S 寒天培地に細胞をまき 25℃で 24 時間放置し、GUS 染色液を用いてブルースポットを顕微鏡で数え評価した。その結果、継代後の日数では継代後 3 日が最も良かった (Fig. 2-5)。継代 1 日後、継代 3 日後とブルースポット数は増えて行くが、継代 7 日後に著しくブルースポット数は減少した。これは、継代 3 日後で細胞の増殖が速くなり、継代 7 日後には細胞の増殖がほとんど止まることに関係すると考えられる。また、DNA とイネカルスの混合時間においては、15 分が最も良



**Figure 2-4.** Effect of sorbitol and mannitol concentrations in N6S medium for delivery into the rice cells.



**Figure 2-5.** Effect of subculture time and mixing time with SCW for delivery into the rice cells. Symbols for subculture time. ○, 1 day ; ●, 3 days ; ▲, 7 days.



かった、15分以上混合することによって細胞へのダメージが大きくなるためブルースポットの数が増減すると考えられる。

## 2-4 結言

本章で得られた結果を要約すると次のようにまとめられる。

- 1 BY-2を用いてSCWによる遺伝子導入の際の状態を観察したところ、細胞に針状のSCWが細胞に刺さっているのが観察できた。
- 2 イネカルスを用いてSCWで遺伝子導入を行ったところ遺伝子が導入GUS遺伝子が発現しているのが観察できた。今回の実験で得られた条件は、1.5mlのマイクロチューブに約300mgのカルスに対して25 $\mu$ l (25 $\mu$ g)のDNA溶液、40 $\mu$ lの滅菌したSCW (5% w/v)、0.25Mのマンニトールとソルビトールを加えたN6S培地250 $\mu$ lを加えた後に30分室温で放置し、15分チューブミキサーで混ぜることであった。この条件でイネカルスに遺伝子導入を行ったところカルス1gあたり533個の遺伝子導入細胞が観察できた。

## 2-5 参考文献

- 1) Maiti, I.B., Wagner, G.J., Yeargan, R., Hunt, A.G. (1989). *J.Cell.Biochem.*, suppl.13D, 338-338.
- 2) Hoekema, A., Hirsch, P., Hooykaas, P., Schilperoort, R. (1983). *Nature*, 303, 179-180.
- 3) De Framond, A., Barton, K., Chilton, M. D. (1983). *Bio/Technology*, 1, 262-269.

- 4) Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchiya, H., Hinata, K. (1988). *Bio/Technology*, 6, 1072-1074.
- 5) Zhang, W. and Wu, R. (1988). *Theor. Appl. Genet.*, 76, 835-840.
- 6) Yang, H., Zhang, H.M., Davey, M.R., Mulligan, B.J, Cocking, E.C. (1988) *Plant Cell Rerorts*, 7, 421-425.
- 7) Datta, S.K., Peterhans, A., Datta, K., Potrykus, I. (1990) *Bio/Technolog*, 8, 736-740.
- 8) Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C. (1987). *Nature*, 327, 70-73.
- 9) Hayes, R.J., Petly, I.T.D., Coutls, R.H.A., Buck, K.W. (1988) *Nature*, 334, 179-182.
- 10) Kaeppler, H.F., Gu, W., Somers, D.A., Rines, H.W. and Cockburn, A.F. (1990). *Plant Cell Rep.*, 9, 415-418.
- 11) Kaeppler, H.F., Somers, D.A., Rines, H.W. and Cockburn, A.F. (1992). *Theor. Appl. Genet.*, 84, 560-566.
- 13) Frame, B.R., Drayton, P.R., Bagnall, S.V., Lewnau, C.J., Bullock, W.P., Wilson, H.M., Dunwell, J.M., Thompson, J.A., Wang, K. (1994). *Plant J.*, 6, 941-948.
- 14) Asano, Y., Otsuki, Y., Ugai, M. (1991). *Plant Sci.*, 79, 247-252.
- 15) Dunahay, T.G. (1993). *Bio/Techniques*, 15, 452-460.
- 16) Kato, A., Asakura, A., Tsuji, K., Ikeda, F., Iijima, M. (1980) *J. Ferment. Technol.*, 58, 373-382.
- 17) McElroy, D., Zhang, W., Cao, J. and Wu, R. (1990). *The Plant Cell*, 2, 163-171.

## 第三章

### グリーンフルオレセントプロテイン (GFP) レポーター遺伝子の単子葉植物への導入とその解析

#### 3-1 緒言

外来の遺伝子を導入した場合、その遺伝子がプロモーターによってどのように制御されて発現しているかはレポーター遺伝子を用いて解析されている。例えばレポーター遺伝子として植物においては、 $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子<sup>1)</sup>が今まで主に用いられているが、この方法では解析を行うには基質を外部から導入する必要があるため細胞を生きたままの状態での遺伝子の発現を観察することは大変困難である。最近、こうした基質を必要とせず外部から励起光を照射するだけで蛍光を発するタンパク質、グリーンフルオレセントプロテイン(GFP)の遺伝子が明らかにされた<sup>2)</sup>。この GFP 遺伝子をレポーター遺伝子として用いれば各種細胞での遺伝子の発現を生きたままの状態での解析することが可能であり、プロモーターの制御がどのようになされているかをリアルタイムに解析することも可能であると考えられる<sup>3)</sup>。そこで本章では、単子葉植物(イネ)を用い、これに所定のプロモーターの下流に GFP 遺伝子を配置して遺伝子を導入し、植物細胞内で GFP 遺伝子がどのように発現するかを調べた。

## 3-2 実験

### 3-2-1 試薬

培地としては、極東製薬工業株式会社製の LINSMAIER-SKOOOG Medium を用いた。Taq DNA Polymerase としては、宝酒造株式会社製の TaKaRa Taq を用いた。植物細胞包埋用の樹脂としては、Kulzer 社製の Technovit7100 を用いた。その他の試薬については遺伝子工学用として精製された市販品、あるいは市販の特級品を用いた。またすべて滅菌水を使用した。

### 3-2-2 遺伝子導入用植物細胞およびプラスミド

本実験で使用した植物細胞は、*Oryza sativa* L. cv. Notohikari (イネ) を用いた。イネは、種子から粉を取り除き滅菌処理をし、2mg/ml の 2,4-D 入りの Linsmaier-Skoog(LS)<sup>4)</sup>培地を含んだ濾紙上に一週間培養し、種子から胚を取り出し、その胚を実験材料として用いた。植物細胞に導入するプラスミドとしては pUbi-GFP と遺伝子導入細胞のマーカージン遺伝子 (薬剤耐性) としてイネのアクチン由来のプロモーターの下流に *bar* (phosphinotricin acetyl transferase) 遺伝子、*Nos* のターミネーターを配置したプラスミド pDM302<sup>5)</sup>を用いた。またユビキチンプロモーターのコントロールとしてユビキチンプロモーターの下流に GUS 遺伝子、*Nos* のターミネーターを配置したプラスミド pAHC27<sup>6)</sup>を使用した。pUbi-GFP の調製はプラスミド DNA(pUbi-GFP)を持つ組み替え大腸菌 JM109 をアンピシリン(50  $\mu$ g/ml)入りの LB 培地、37°C で液体培養し、アルカリ-SDS 法を用いて調製した。抽出したプラスミド DNA の精製は塩化セシウムを用いた超遠心法で行った。遠心管から回収したプラスミド DNA からエチジウムブロマイドと塩化セシウムを除去してエタノール沈殿させ、これを遠心し、沈殿を乾燥して適量の蒸

留水で溶かし濃度を  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  とした。また pDM302、pAHC27 も同様の方法で調製、精製を行った。

### 3-2-3 装置

植物細胞への遺伝子導入用装置としてパーティクルガンとして Bio-Rad 社製の BiolisticR PDS1000/He を用いた。倒立型蛍光顕微鏡としてカール ツァイス株式会社製の Axiovert 135 を励起フィルタ 450-490nm、バリアフィルタ 515-565nm を用いて使用した。組織切片の作製は、マイクローム社製のローターリーマイクローム HM340E を用いて行った。また画像解析装置としては Photometrics 社製の CCD カメラおよび Signal Analytics Corporation 製の IPLab SpectrumTM を画像解析ソフトとして用いた。PCR 用のサーマルサイクラーとして Perkin-Elmer 社製の DNA Thermal CyclerTM 480 を用いた。

### 3-2-4 パーティクルガンによる植物細胞への GFP 遺伝子の導入

#### 3-2-4-1 プラスミド DNA 付着金粒子の調整法

金粒子の直径は  $1.6\mu\text{m}$  のものを用いた。一回の遺伝子導入に対する金粒子の調製法としては、 $0.3\text{mg}$  の金粒子に対し  $2\mu\text{g}$  のプラスミド DNA を加え、 $1.0\text{M CaCl}_2$ 、 $15\text{mM}$  スペルミジンとなるように調製し 30 分間放置する。その後、遠心し上澄みを捨て 70%エタノールで洗浄し、100%エタノール  $10\mu\text{l}$  に懸濁することによって調製した<sup>7)</sup>。

#### 3-2-4-2 パーティクルガンの操作

プラスミド DNA を付着させた金粒子を  $0.3\text{mg}$  (100%エタノール  $10\mu\text{l}$ ) をマイクロキャリアーに塗布し、エタノールが蒸発した後にパーティクルガンに装着した。発射圧力の強さは 1100psi、マイクロキャリアーからストッパーまでの距離は 1.5cm、ストッパーから細胞までの距離は

5cm とした(Fig.3-1)。

#### 3-2-4-3 植物細胞への GFP 遺伝子の導入

イネの胚に、pUbi-GFP と同時に pDM302 を付着させた金粒子をパーティクルガンで遺伝子導入を二回行った。また、同様の方法でコントロールとして pAHC27 の遺伝子導入も行った。

#### 3-2-5 イネ胚に導入した金粒子の確認

イネ胚にパーティクルガンで金粒子を導入するにあたり、胚細胞のどの部分まで金粒子が侵入しているかの確認を行った。イネ胚にパーティクルガンで遺伝子を導入直後にイネ胚を樹脂によって包埋しミクロトームを用いて厚さ  $5\mu\text{m}$  の切片とし光学顕微鏡を用いてイネ胚のどの部分に金粒子が存在するか確認した。包埋の方法は、エタノール：酢酸が 7 : 3 の溶液で一晩固定し、その後 70%エタノールで 10min、80%エタノールで 10min、90%エタノールで 10min、95%エタノールで 10min、最後に 99.5%エタノールで 20min 脱水処理をし、一晩予備浸漬を行い、その後、樹脂によって包埋処理を行った。

#### 3-2-6 イネ胚での一過的 GFP 遺伝子の発現

イネ胚に対して pUbi-GFP を導入後、0 時間、24 時間、48 時間のイネ胚を樹脂を用いて包埋しミクロトームを用いて厚さ  $5\mu\text{m}$  の切片とし蛍光顕微鏡、画像処理装置によって観察した。包埋の方法は、3-2-5 と同様の方法を用いておこなった。また同様の操作を pAHC27 をパーティクルガンによって導入し 0 時間、24 時間、48 時間で GUS アッセイを行ったイネ胚に対しても行った。

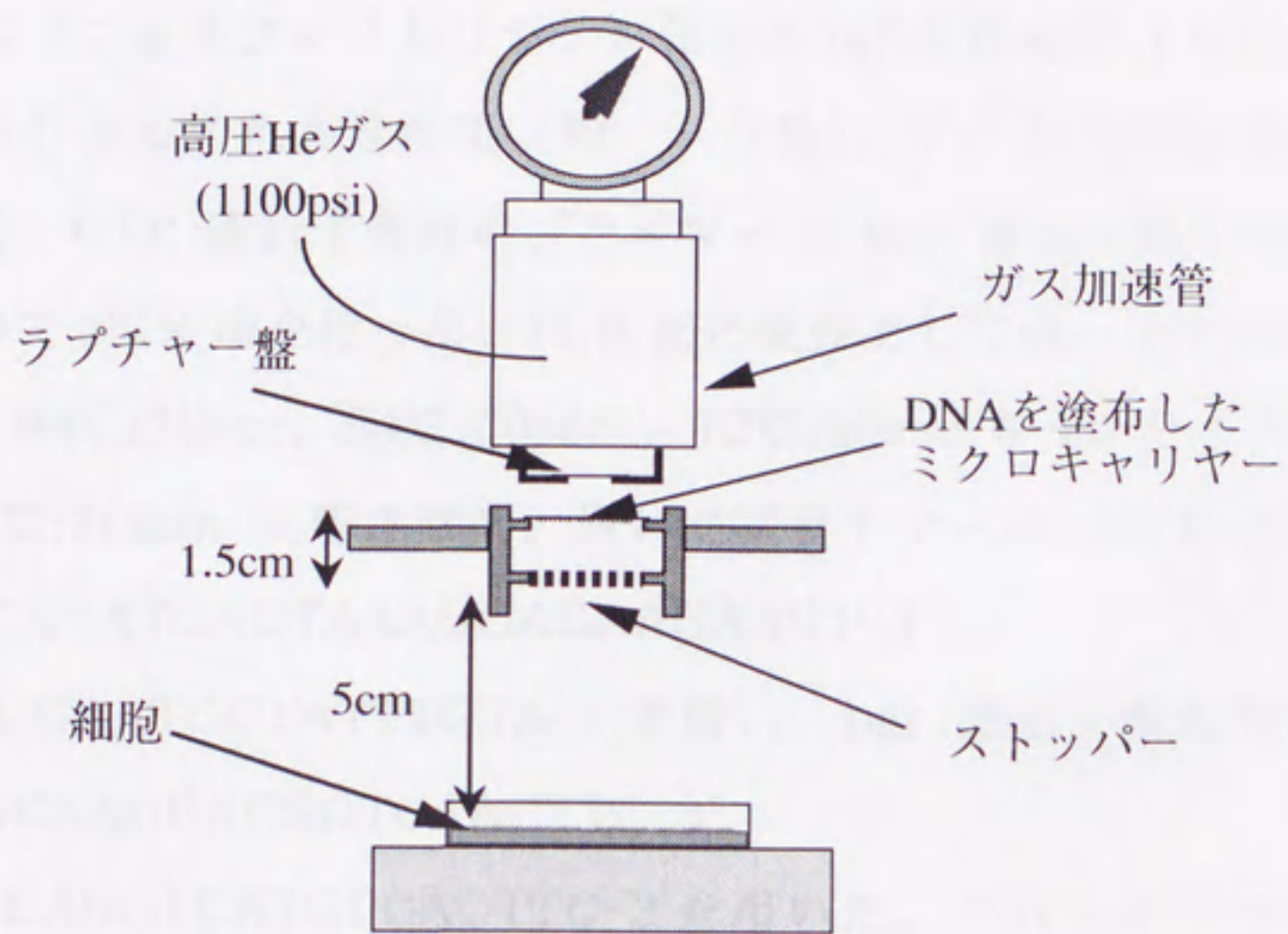


Figure 3-1. パーティクルガン条件設定

### 3-2-7 イネ胚由来カルスでの Polymerase Chain Reaction

#### (PCR)法によるゲノム DNA からの GFP 遺伝子の検出

イネ胚に対して pUbi-GFP と同時に pDM302 を導入した 2 日後にピアラホオス (フォスフィノトリシン) ( $5\mu\text{g/ml}$ ) を含んだ LS(2,4-D) 寒天培地に移しカルス化させた後 (約一ヶ月後)、ゲノム DNA を抽出した。その後、GFP 遺伝子断片のプライマーと bar 遺伝子断片のプライマーを用いて PCR 法を行った。PCR 反応条件としては、 $94^{\circ}\text{C}:3\text{min}$  放置した後、 $94^{\circ}\text{C}:30\text{sec}$ 、 $54^{\circ}\text{C}:30\text{sec}$ 、 $72^{\circ}\text{C}:90\text{sec}$  を 30 サイクル行い最後に  $72^{\circ}\text{C}:10\text{min}$  反応させた。用いたプライマーは、GFP 遺伝子断片用として 5'-ATGAGTAAAGGAGAAGAAGACT-3'、5'-TTCTACGAATGCTATTTGTA-3' を用い、bar 遺伝子断片用として 5'-CGAGACAAGCACGGTCAACTTC-3'、5'-AAACCCACGTCATGCCAGTTC-3' を用いた。これらのプライマーを用いて PCR 法を行うことによって、ゲノム DNA 中に GFP 遺伝子、bar 遺伝子が存在すれば GFP では約 780bp、bar 遺伝子では約 420bp の遺伝子断片が増幅される。

### 3-2-8 イネ胚由来カルスでの GFP 遺伝子の発現

pUbi-GFP、pDM302 を導入したイネ胚を遺伝子導入後ピアラホオス ( $5\mu\text{g/ml}$ ) を含んだ LS(2,4-D) 寒天培地に移しカルス化させた後、イネカルスを  $45^{\circ}\text{C}$  の恒温槽で 10 分間加温し、GFP の発現を画像解析装置で観察した。



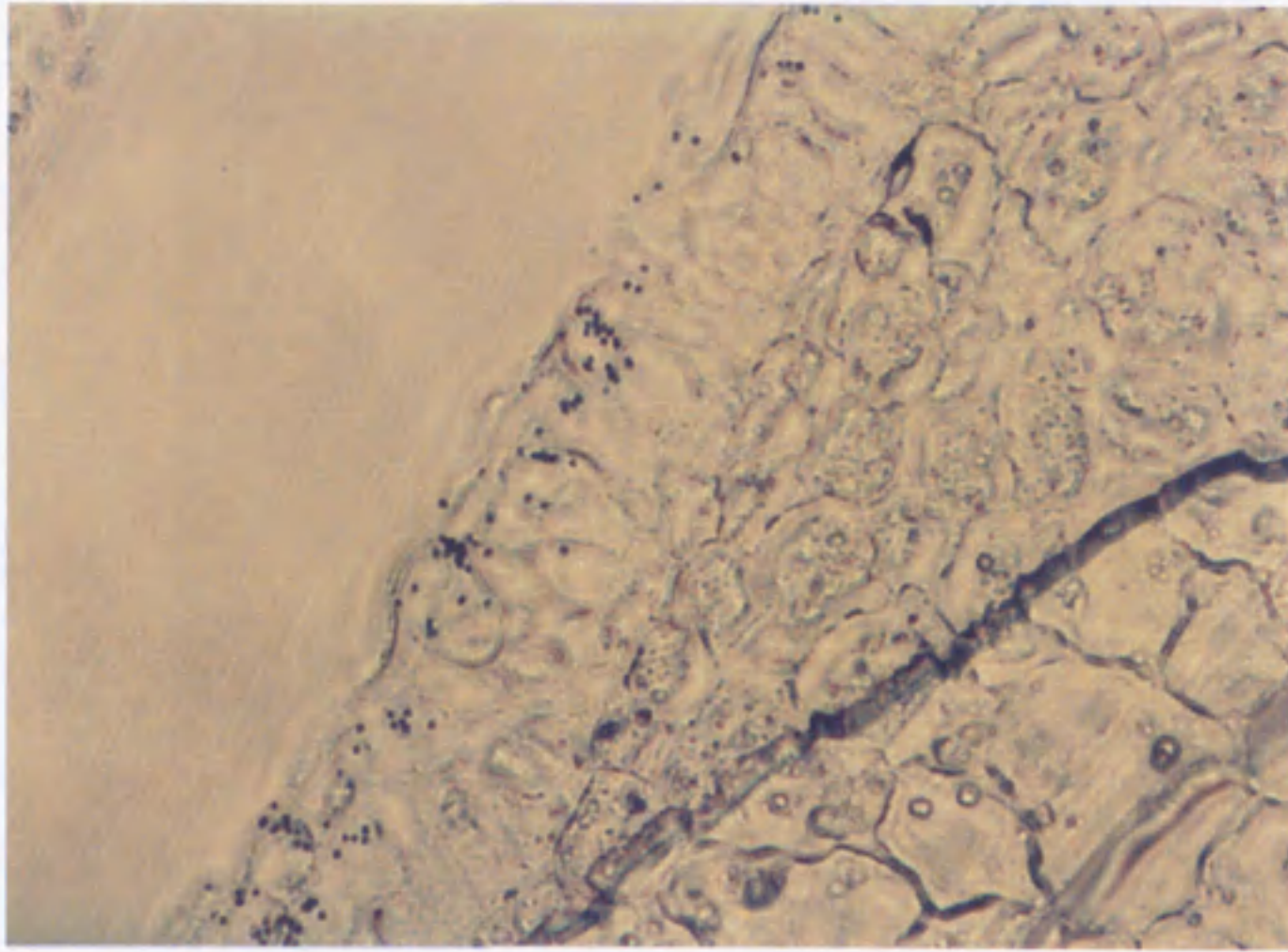
### 3-3 結果及び考察

#### 3-3-1 パーティクルガンによるイネ胚に導入された DNA 金粒子

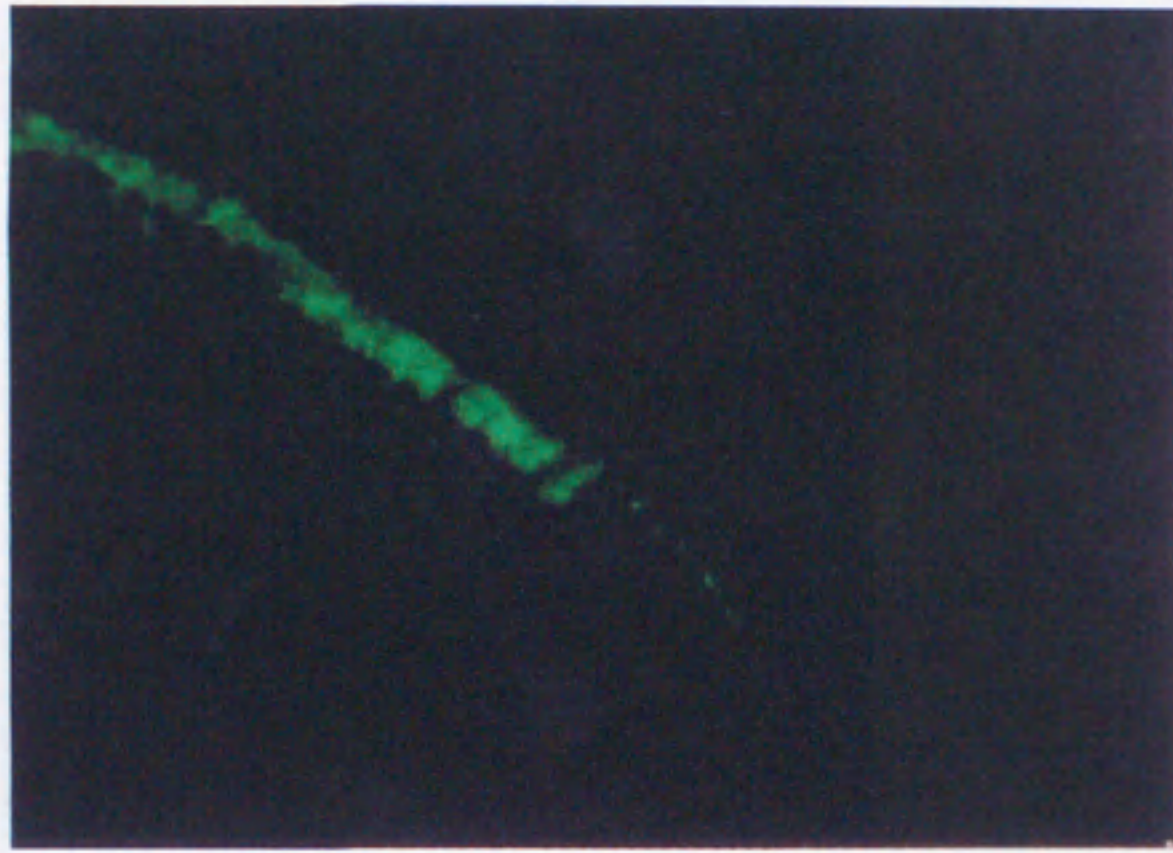
イネ胚にパーティクルガンで DNA を吸着させた金粒子導入直後に、樹脂でイネ胚を包埋しミクロトームで  $5\mu\text{m}$  の切片とし光学顕微鏡で観察したところ、金粒子は胚組織の最表層に分布していた(Fig.3-2)。組織内部にある細胞への金粒子の導入にはさらに強力な圧力が必要と考えられるが、それによって最表層の細胞は破壊されてしまうことは避けられないことである。今回の実験では通常行われているパーティクルガンの方法に従って行ったが、このように最表層にしか金粒子が存在しないことは、この観察によって明白にできた。さらに最表層の細胞にほぼもれなく金粒子が導入されていることも明らかとなった。

#### 3-3-2 イネ胚での一過的 GFP 遺伝子の発現

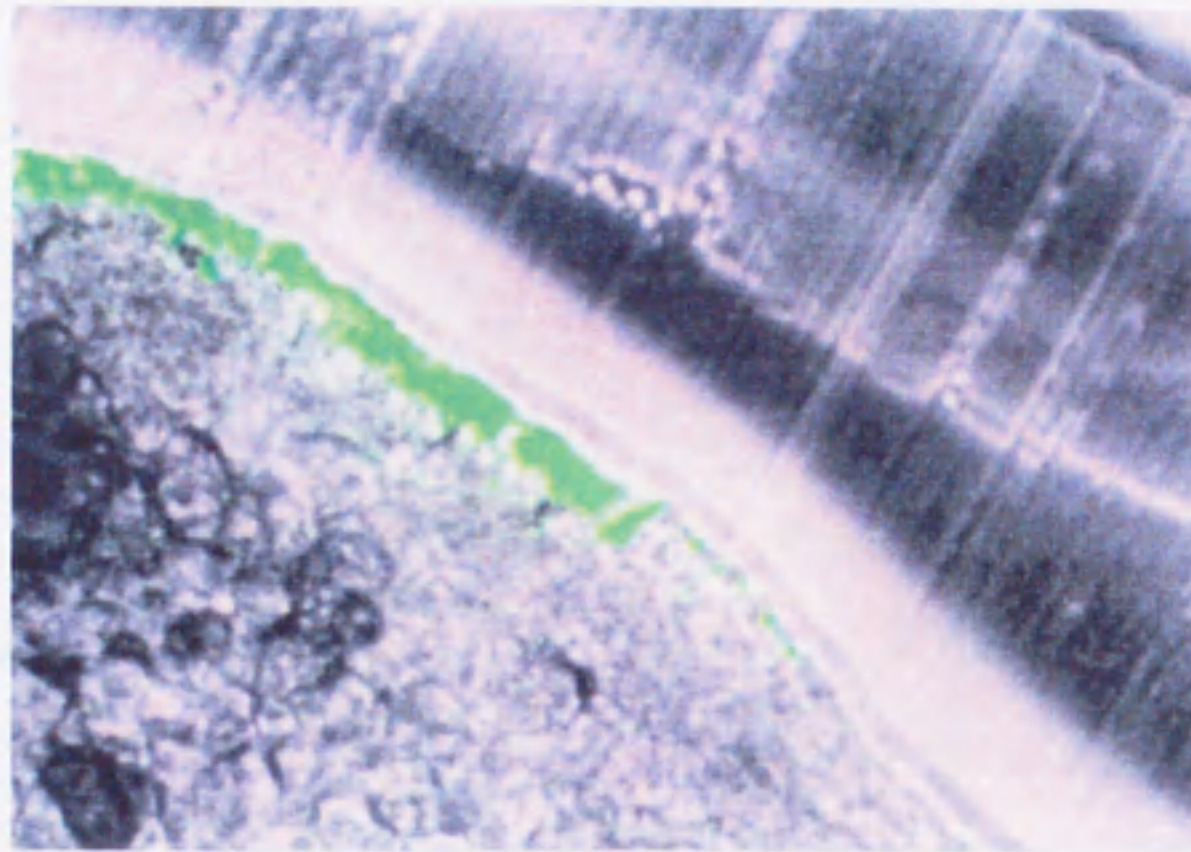
イネ胚に対して pUbi-GFP を導入後、0 時間、24 時間、48 時間のイネ胚を樹脂を用いて包埋しミクロトームを用いて厚さ  $5\mu\text{m}$  の切片とし蛍光顕微鏡によって観察したところ、遺伝子導入後 24 時間、48 時間のイネ胚の表層の部分に GFP 遺伝子の発現がみられた(Fig.3-3)。このように金粒子が存在していた表層細胞に発現がみられることは、これが外来から導入された GFP 遺伝子によるものであることを支持している。またこの蛍光像を画像処理装置を用いてさらに鮮明にした(Fig3-4)が得られた。これにより蛍光を発している部位が細胞表層のからどれくらいの深さまであるかや、その分布に関する情報が明確に示されると考えられた。今回の実験では遺伝子導入後 24 時間、48 時間経過してから測定したが、その間に細胞の増殖や変化もあり、これらの影響も含めて Fig.3-3、Fig.3-4 のデータが解析できると考えられる。また pAHC27 を導入し 0 時間、24 時間、48 時間で GUS アッセイを行い同様にして



**Figure 3-2.** Location of gold particles in the embryo slice after bombardment.



**Figure 3-3.** The fluorescent image of sliced rice embryo with pUbi-GFP.

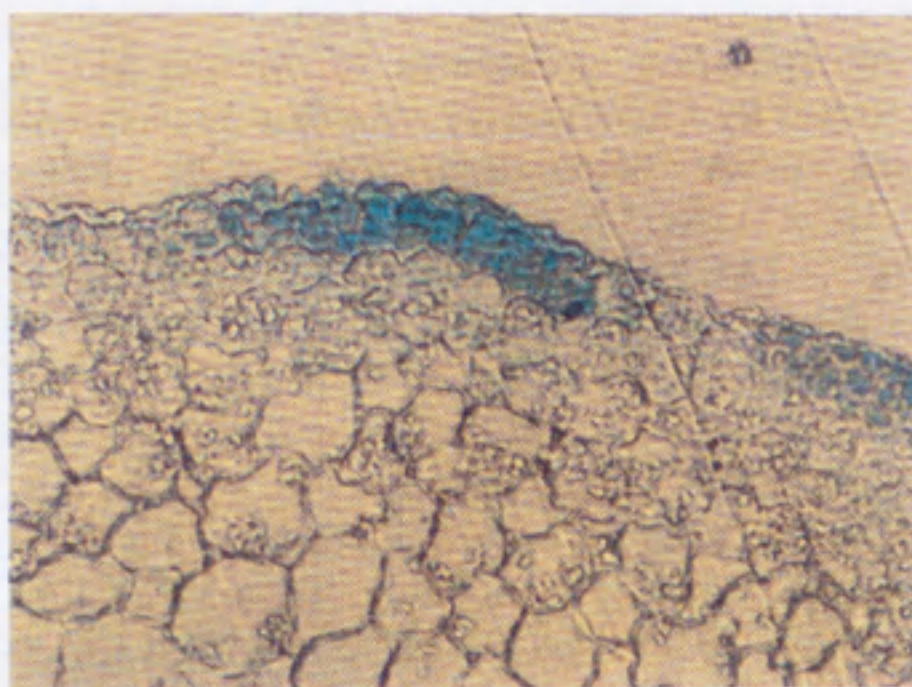


**Figure 3-4.** The fluorescent image of sliced rice embryo with pUbi-GFP after treatment of image analyzer.

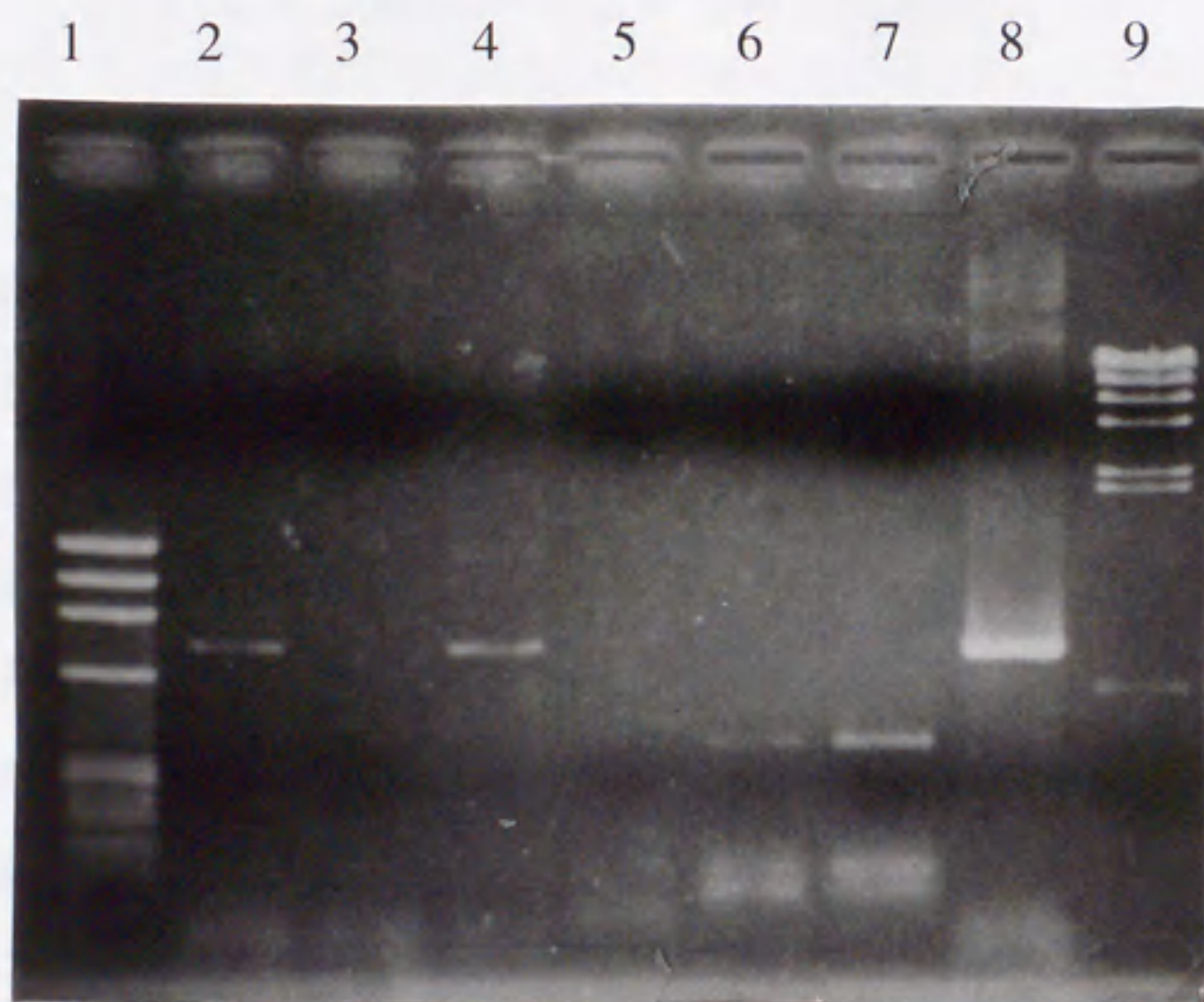
切片にし観察したところ、遺伝子導入後 24 時間、48 時間のイネ胚に GUS 遺伝子の発現を示す blue spot が見られた(Fig.3-5)。このように GUS 活性の測定結果は、細胞表層にのみ発現が見られるものであり、GFP の蛍光像と類似的である。このことは GFP を用いる方法の正当性を支持するものと考えられ、GUS を用いる場合は酵素反応によって発色させるため発色用の基質を外部から細胞内へ導入する操作を必要とするが、GFP はこうした操作も不要で、これによって GFP の優位性が示唆された。次にイネ胚に対して *in vivo* で GFP 遺伝子の一過的発現を観測しようとイネ胚に UV ランプを照射し観測を行ったが、GFP 由来の蛍光を観測することはできなかった。これは切片試料と異なり細胞塊となったサンプルであるため励起光の光が十分に照射できないとか、蛍光が散乱によって分散してしまい十分な検知ができないなどのためだと考えられるが、今後計測法の検討を行えば *in vivo* での計測も可能になると考えられる。

### 3-3-3 イネ胚カルスでの PCR 法によるゲノム DNA からの GFP 遺伝子の検出

イネ胚に対し pUbi-GFP と pDM302 の両方を導入し 5  $\mu$ g/ml 除草剤 Basta(phosphinotricin)を含んだ LS(2,4-D)寒天培地に移しカルス化させた後、ゲノム DNA を抽出し GFP 遺伝子断片と *bar* 遺伝子断片を PCR を用いて検出したところ、GFP 遺伝子断片のみをもつカルス、*bar* 遺伝子断片のみをもつカルス、両方の遺伝子断片を有する 3 種類のカルスが存在していることが示唆された(Fig.3-6)。*bar* 遺伝子を含むプラスミドと GFP を含むプラスミドの両者を同時に導入したのは、薬剤耐性によって遺伝子導入カルスを選択するためであり、最終的には GFP 遺伝子導入されたカルスを効率的に選択するためであった。今回の結果より一応、両者の遺伝子が導入されたカルスの存在が確認できた。



**Figure 3-5.** The color image of sliced rice embryo with pAHC27.



- 1: Marker ( $\phi$  x174 DNA-Hae III Digest)
- 2: Sample a (GFP)
- 3: Sample b (GFP)
- 4: Sample c (GFP)
- 5: Sample a (*bar*)
- 6: Sample b (*bar*)
- 7: Sample c (*bar*)
- 8: Control (GFP)
- 9: Marker ( $\lambda$  DNA-Hind III Digest)

**Figure 3-6.** PCRによるGFP、*bar*遺伝子断片の増幅

なお bar 遺伝子断片の増幅が確認されなかったのは、薬剤（フォスフィントリシン）による選択が不完全であったと考えられた。

#### 3-3-4 ストレスに対する GFP 遺伝子の発現状況

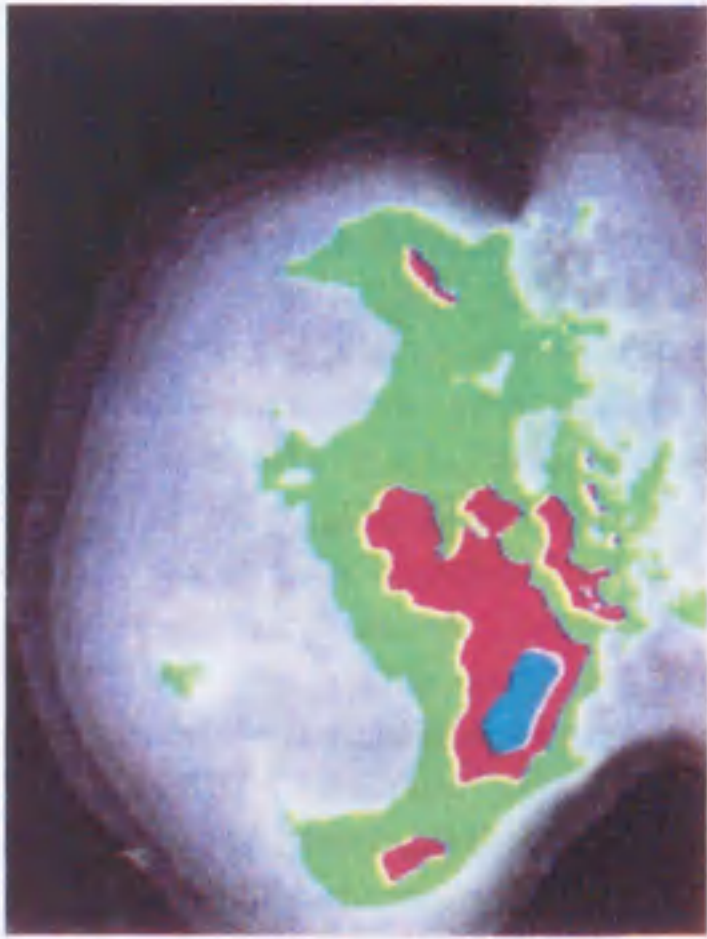
イネ胚カルスを 45℃ の恒温槽で 10 分間加温し、熱ストレスを加えた。導入遺伝子のプロモーターであるユビキチンプロモーターは、熱などのストレスによって発現が誘導されるため、GFP の発現が促進されると考えられる。そこで、GFP の発現を蛍光顕微鏡で観察した。カルスを蛍光顕微鏡で観察したところ PCR 法で GFP 遺伝子断片が検出された胚カルスにおいて GFP 由来の蛍光が観察された。また、GFP 遺伝子断片が増幅されなかった、胚カルスにおいては GFP 由来の蛍光が見られなかった。この GFP の発現状況を蛍光高度として画像解析装置を用いて解析を行った (Fig.3-7)。Fig.3-7 に示されている画像では、緑、赤、青、濃紺の順に蛍光強度が大きくなっている。ストレスをかけ 2 時間後に強い発現を確認することができた。

### 3-3 結言

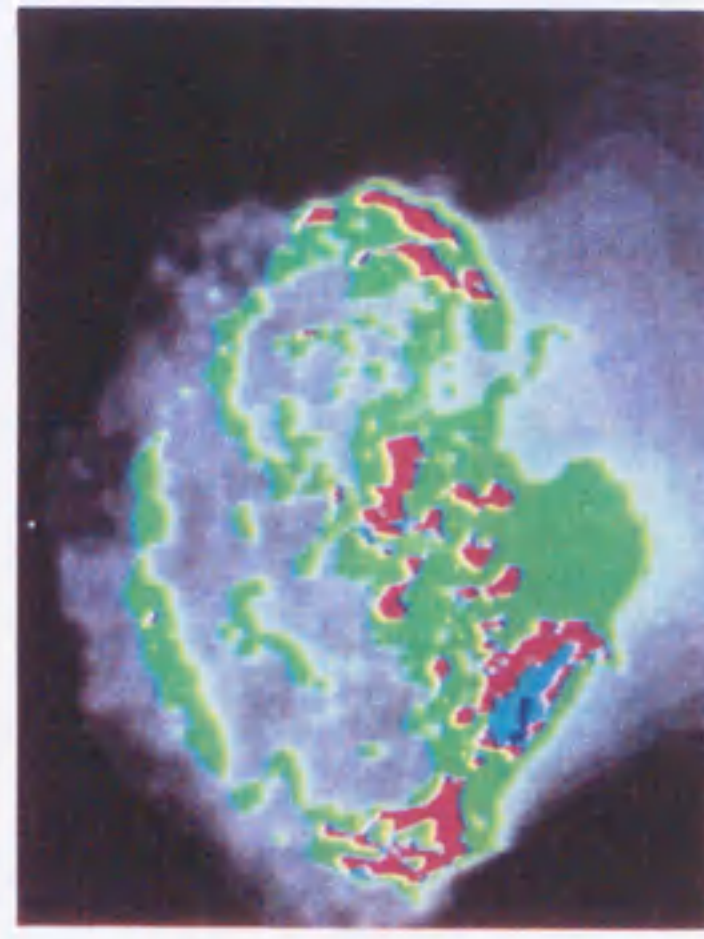
本章で得られた結果を要約すると次のようにまとめられる。

- 1) パーティクルガンで遺伝子導入直後にイネ胚を樹脂で包埋し切片とし、光学顕微鏡で観察することによってイネ胚における金粒子の分布がわかった。
- 2) 胚組織の表層にしか金粒子は、分布しておらず表層の細胞のみ遺伝子導入が行われていると考えられた。
- 3) イネ胚において GFP 遺伝子の、一過的発現を観測することができた。また樹脂によって包埋し切片とし観察することで胚組織の表層にしか遺伝子は発現しておらず、これは GUS での結果と同様であった。

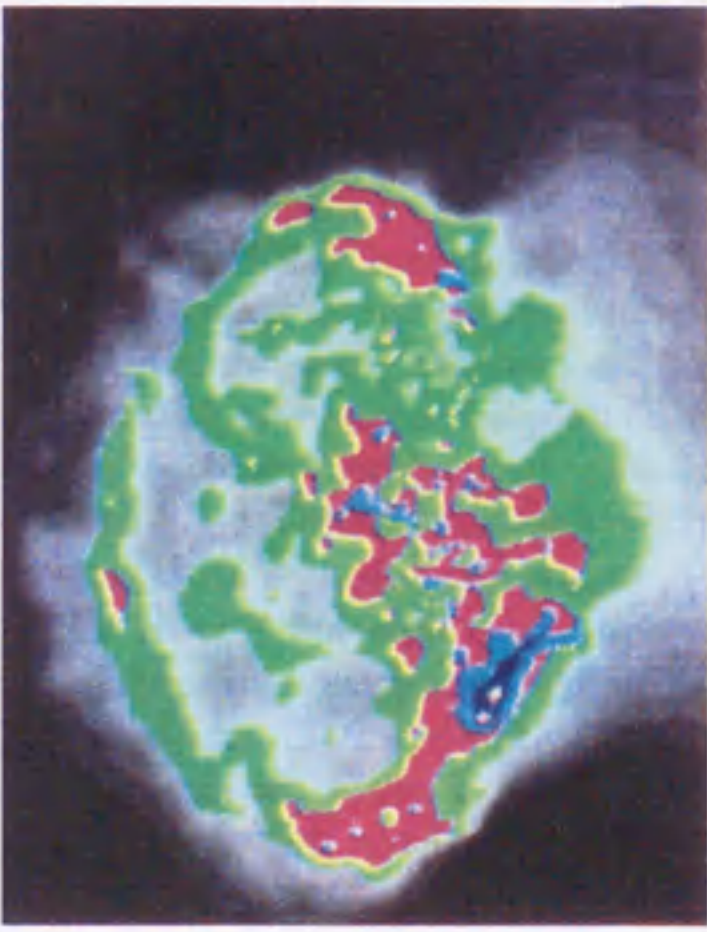




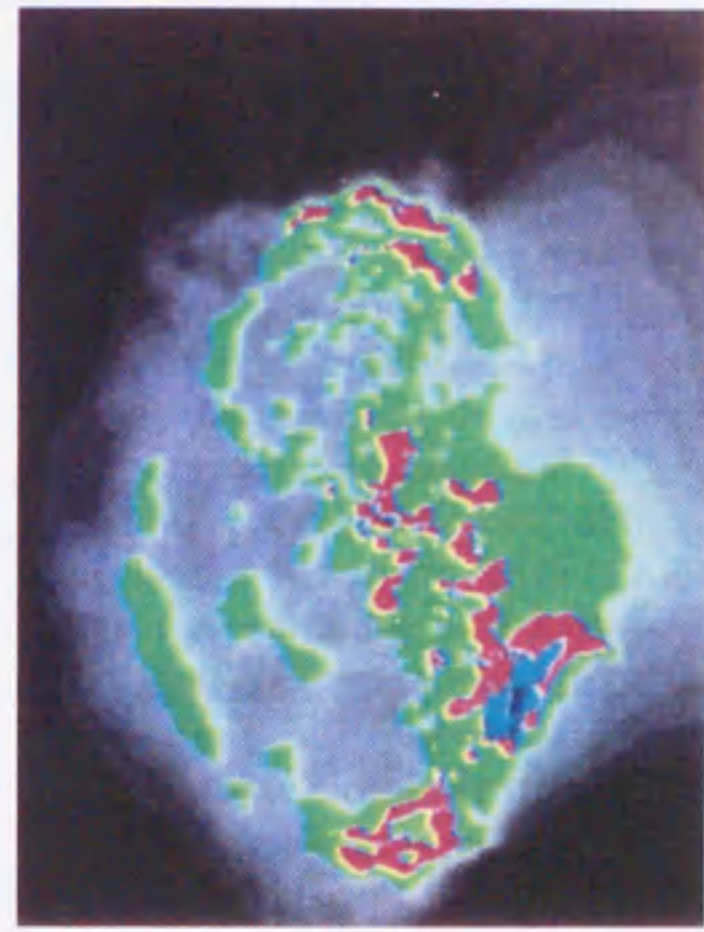
30min



60min



120min



180min

**Figure 3-7.** The pseudocolor image pUbi-GFP transgenic rice calli were obtained after heat shock treatment.

また金粒子の分布にも等しいと考えられる。

- 3) イネ胚に GFP 遺伝子と bar 遺伝子を導入することによって、除草剤耐性を備え GFP も備えたイネ胚カルスが得られた。またそのイネ胚カルスは、GFP 由来の蛍光を備えていた。
- 4) 画像解析装置を用いて GFP 遺伝子の発現状況をカルスの状態で連続的に観察することができた。

### 3-5 参考文献

- 1) Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987). *EMBO J.*, 6, 3901-3907.
- 1) Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J.(1992). *Gene*, 111, 229-233.
- 2) Chalfine, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994). *Science*, 263, 802-805.
- 4) Linsmaier, E.M., Skoog, F. (1965). *Plant*, 18, 100-126.
- 5) Cao, J., Duan, X, McElroy, D., Wu, R. (1992). *Plant Cell Rep.*, 11, 586-591.
- 6) Christensen, A., Sharrock, R., Quail, P. (1987). *Plant Mol. Biol.*, 18, 675-689.
- 7) Takumi, S., Otani, M., Shimada, T. (1994). *Plant Sci.*, 103, 161-166.

## 第四章

### マグネタイトカチオニックリポソームを用いた 遺伝子導入と遺伝子導入細胞の分離

#### 4-1 緒言

遺伝子導入細胞の分離には、抗体を用いて分離する方法が多く用いられている。しかし、これらの方法では薬剤耐性マーカー遺伝子を使う方法かマーカータンパクを細胞表面に表出させ細胞に目的以外のタンパク質を発現させる必要があり、また分離操作も煩雑である。当研究室では、磁性微粒子に正に荷電したリン脂質を被覆したマグネタイトカチオニックリポソーム(MCLs)を開発しており、温熱治療法に応用している<sup>1)</sup>。この MCLs とプラスミド遺伝子を細胞に同時に取り込ませ、遺伝子が導入された細胞を磁石を用いて簡便にすばやく分離できるか検討した。

#### 4-2 実験方法

##### 4-2-1 試薬

磁性微粒子を覆うリン脂質作成用に N-( $\alpha$ -trimethylammonioacetyl)-didodecyl-D-glutamatechloride (TMAG、相互薬工株式会社)、Dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC、Sigma Chemical Co.)、Dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE、Sigma Chemical Co.)を用いた。培地としては、Gibco BRL の Dulbecco's modified eagle medium (D-MEM) または、Minimum Essential Medium(MEM)を用いた。血清としては、Filtron の Foetal bovin serum を MEM 非必須アミノ酸として Gibco BRL の 100X 溶液を用いた。磁性微粒子は、戸田工業社製の直径 25nm のを使用した。その他の試薬

については遺伝子工学用として精製された市販品、あるいは市販の特級品を用いた。またすべて滅菌水を使用した。

#### 4-2-2 供試細胞及びプラスミド

供試細胞としては、ラットの脳腫瘍細胞 T-9、マウス繊維芽細胞 NIH/3T3、モンキー繊維芽細胞 CV-1 及び COS-1 を用いた。T-9 は、MEM 培地（10%の成牛血清と抗生物質（ペニシリン 100U/ml、ストレプトマイシン 100 $\mu$ g/ml、アンフォテリシン B 0.25 $\mu$ g/ml、MEM 非必須アミノ酸 5mM）を添加）を用いて、NIH/3T3、CV-1、COS-1 においては D-MEM（10%の成牛血清と抗生物質（ペニシリン 100U/ml、ストレプトマイシン 100 $\mu$ g/ml、アンフォテリシン B 0.25 $\mu$ g/ml）を添加）を用いて 37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%で培養された。DNA 導入効率の評価に用いたのは、CMV プロモーターにルシフェラーゼを配置した pCMV-LUC (Fig.4-1) を用いた。

#### 4-2-3 MCLs の作製

磁性微粒子は、水での洗浄を充分に行って余分なイオン成分を取り除き、超音波処理を行うことにより水に分散するようにした。これをナス型フラスコ内壁に TMAG:DLPC:DOPE=1:2:2 の組成（モル比）で作製したリン脂質膜に加え、ボルテックス攪拌しながら膜を膨潤させた<sup>2)</sup>。膨潤させた膜と磁性微粒子に 15 分間の超音波処理を施し、その後 pH7.4 の 10 倍濃度のリン酸緩衝液（PBS）を加え、更に超音波処理を 15 分間行い、MCLs を作製した<sup>3)</sup>。MCLs の濃度は、チオシアン酸カリウムによる呈色（比色法）により定量し、PBS を用いて MCLs の濃度を 5mg/ml とした<sup>4)</sup>。

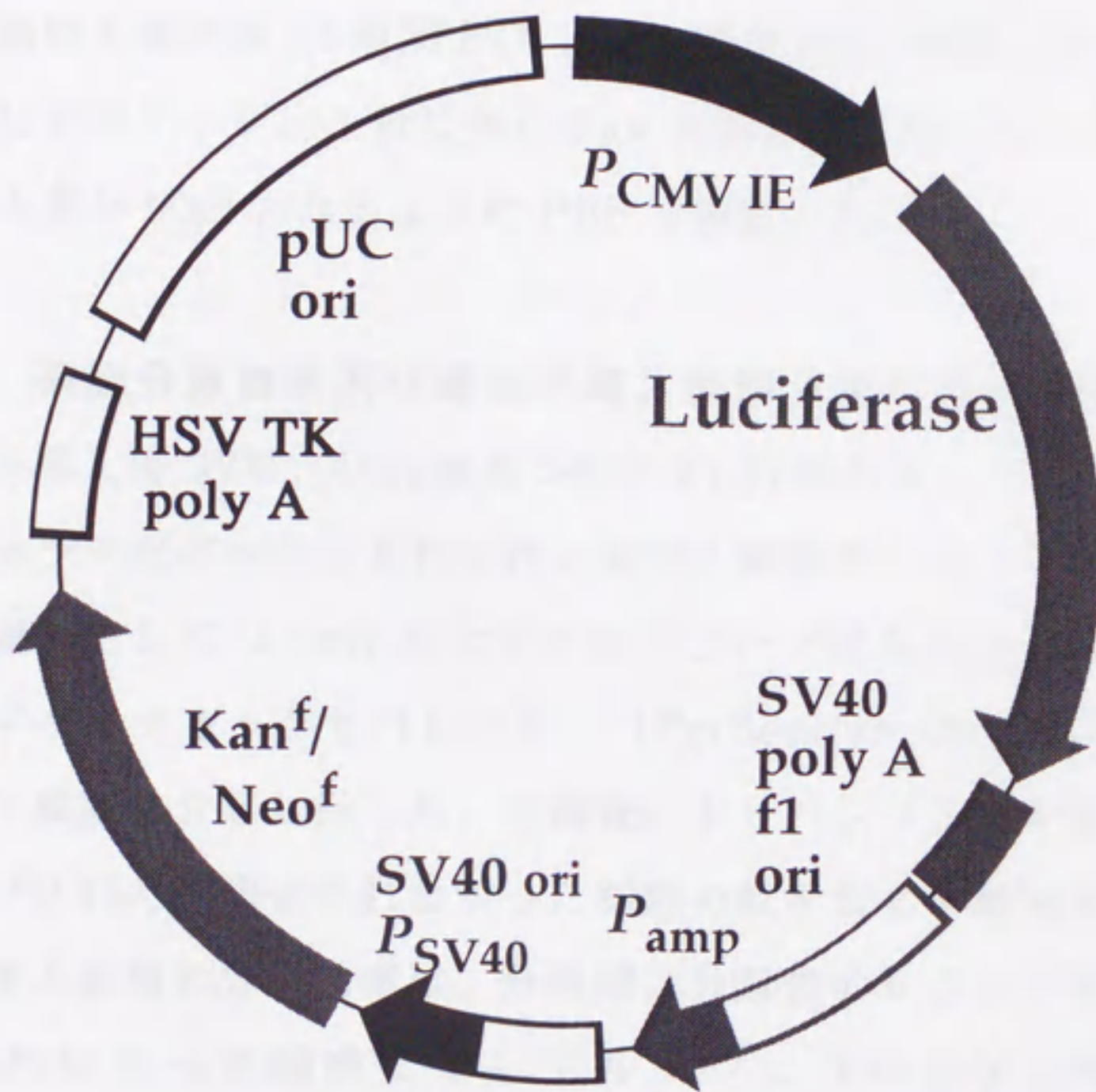


Figure 4-1. pCMV-Luc

#### 4-2-4 遺伝子導入法

遺伝子導入のための MCLs と DNA (プラスミド) の複合体は、MCLs に DNA を入れボルテックス攪拌を行い作製した。細胞は、6cm のディッシュに細胞を継代後 24 時間 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% で培養したのを用いた。導入遺伝子はディッシュ 1 枚に対し 2 $\mu$ g と固定し、MCLs と DNA の複合体の導入量が 50 $\mu$ l となるように PBS で調製した。

#### 4-2-5 細胞分離効率及び遺伝子導入細胞分離効率の評価法

遺伝子導入後 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% で 24 時間培養した後に細胞分離とルシフェラーゼアッセイを行った。まず、細胞をトリプシンで処理し、細胞浮遊液として 1.5ml のマイクロチューブに集めた。細胞の分離効率は、マグネティックセパレーター (PerSeptive Biosystems, Inc.) を用いて細胞を分離し行った。分離後にトリパンプルーを用いて磁石にトラップされた細胞とされなかった細胞の数を数え分離効率を求めた。遺伝子導入細胞の分離効率は、分離前、分離後のトラップされた細胞と分離されなかった細胞に対してルシフェラーゼアッセイキット (Promega Co.) を用いてルシフェラーゼの発光を ATP アナライザー (AF-100 東亜電波工業株式会社) で測定し細胞一個あたりの発光に換算して評価した。

### 4-3 結果及び考察

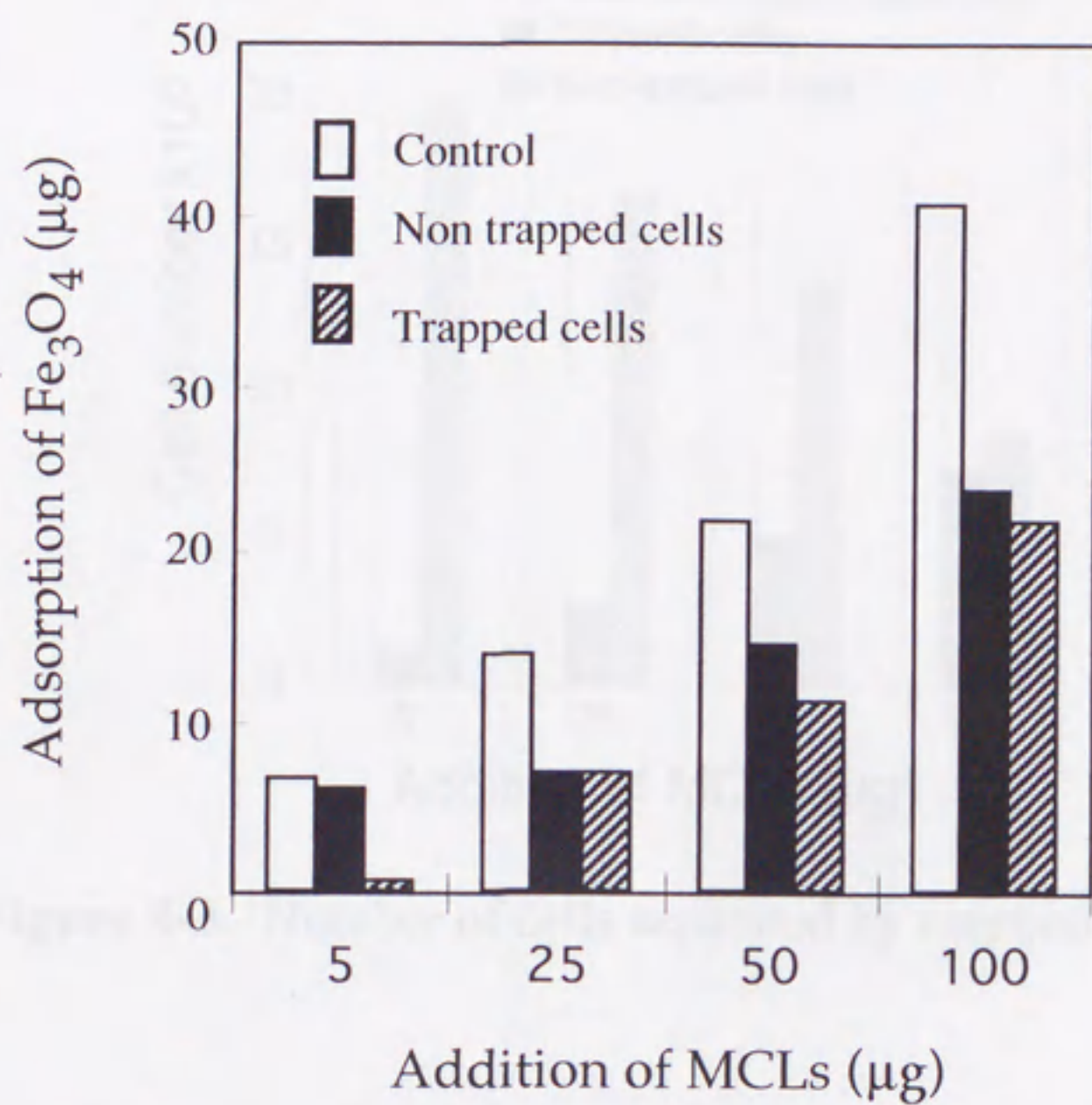
#### 4-3-1 MCLs 量変化に対する細胞分離効率

MCLs の導入量を変化させ細胞の分離効率がどのように変化するか検討した。導入条件は、T-9 細胞を 6cm のディッシュに継代後 24 時間 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% で培養し遺伝子量を 2 $\mu$ g と固定し MCLs を 5、25、50、100 $\mu$ g と変化させ導入を行った。導入を行いマグネティックセパレーターで分

離後それぞれの細胞の鉄 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) の濃度を測定した (Fig. 4-2)。MCLs の導入量を増やすに従って、鉄の濃度が増加しているのが見られる。5 $\mu\text{g}$  の時に分離後の鉄の濃度が極端に少ないのは、MCLs のカチオニック性がプラスミドによって打ち消され細胞への導入が困難になっているためだと考えられる。また、磁気分離による細胞を数えた (Fig. 4-3)。MCL の量を増やして行くに従い磁石にトラップされる細胞が増加していく。ここでは、25 $\mu\text{g}$ 、50 $\mu\text{g}$  の場合先ほどの鉄濃度に比較してトラップされている細胞の数が少ないことが見られる。鉄の濃度は、25 $\mu\text{g}$  の時に磁石にトラップされた細胞、トラップされなかった細胞ほぼ同じ濃度であったが、細胞数はトラップされなかった細胞が 6 倍ほど多くなっている。このことからトラップされた細胞中には多くの磁性微粒子が存在していると考えられる。

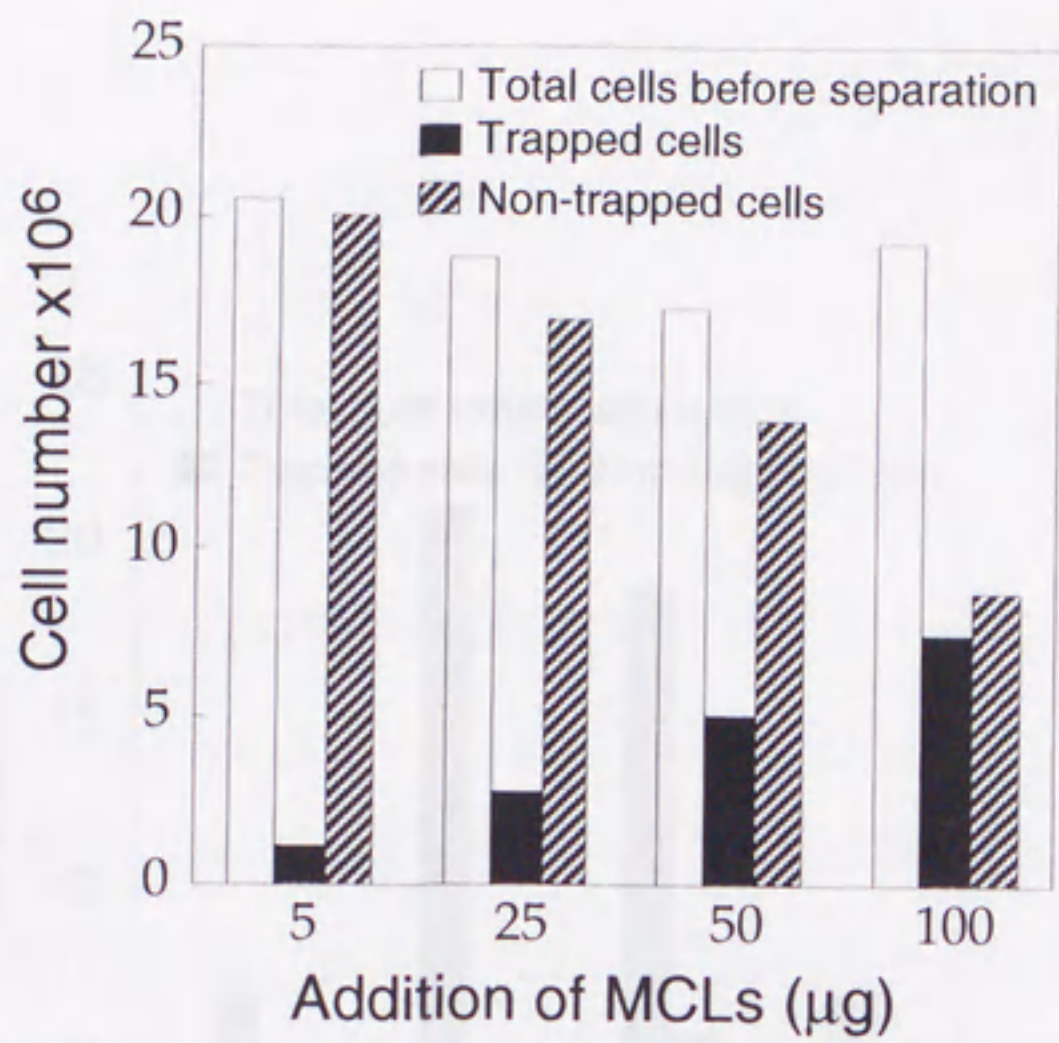
#### 4-3-2 遺伝子導入細胞の分離

MCLs と DNA の複合体による遺伝子導入細胞の分離効率を検討した。導入条件は、T-9 細胞を 6cm のディッシュに継代後 24 時間 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  濃度 5% で培養し遺伝子量を 2 $\mu\text{g}$  と固定し MCLs を 5、25、50、100 $\mu\text{g}$  と変化させ導入を行った。導入後 24 時間でマグネティックセパレーターで分離した細胞あたりのルシフェラーゼ活性を比較した (Fig. 4-4)。MCLs 25 $\mu\text{g}$  で導入し分離することによって一番効率よく遺伝子導入細胞を分離することができた。分離することによって分離前に比べてルシフェラーゼの活性にして約 5 倍の活性を持った細胞を分離することができた。MCLs が 5 $\mu\text{g}$  ではプラスミドによって MCLs のカチオニック性が減少し導入しにくくなっていると考えられ、また逆に MCLs 100 $\mu\text{g}$  ではカチオニック性は充分であるが MCLs 当たりのプラスミドの量が減るため、細胞当たりのプラスミド数も減少し、遺伝子導入細胞を分離しても導入遺伝子の発現量の低い細胞まで分離してしまうため遺伝子

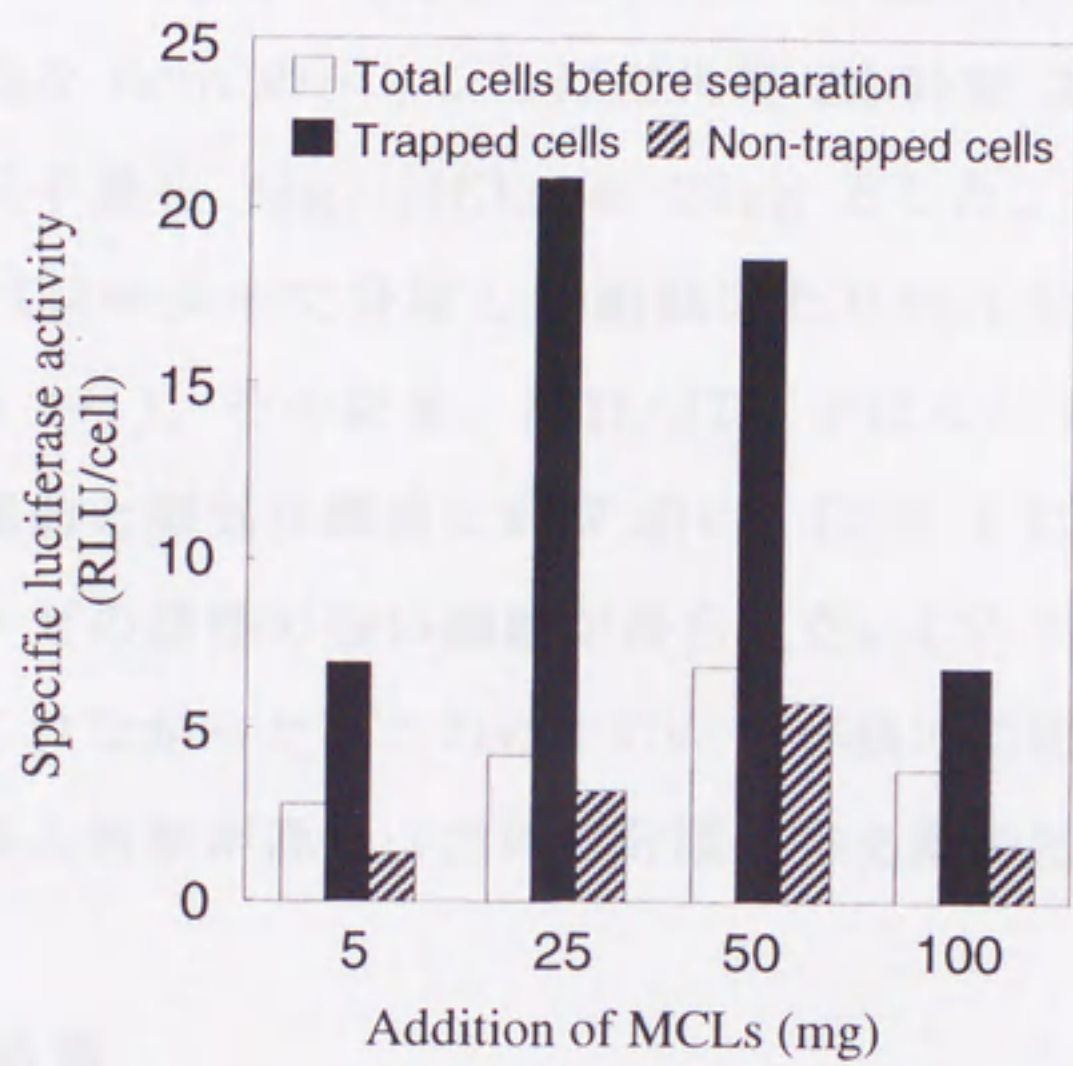


**Figure 4-2.** Adsorption of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> separated by magnetic separator





**Figure 4-3.** Number of cells separated by magnetic separator.



**Figure 4-4.** Specific luciferase activity separated by magnetic separator.

導入細胞の分離効率が悪くなっていくと考えられる。

#### 4-3-3 他の細胞への適用

T-9細胞の他、マウス繊維芽細胞NIH/3T3、モンキー繊維芽細胞CV-1及びCOS-1を用いて遺伝子の導入、分離を行った。遺伝子の導入条件は、細胞を6cmのディッシュに継代後24時間37℃、CO<sub>2</sub>濃度5%で培養し遺伝子量を2μg、MCLsを25μgとした。24時間後にマグネティックセパレーターで分離し、細胞あたりのルシフェラーゼ活性を見た(Table 4-1)。その結果、NIH/3T3ではルシフェラーゼの活性にして磁気分離前と磁気分離後に約7倍の、COS-1に対しても約3倍とルシフェラーゼの活性の強い細胞が得られた。CV-1ではそれほど大きな効果は得られなかった。これは、CV-1が他のに比べMCLsとDNAの複合体の導入効率が低かったので分離効率も落ちたと考えられる。

#### 4-4 結言

本章で得られた結果を要約すると次のようにまとめられる。

- 1 MCLsとDNAの複合体を用いて、遺伝子の導入と遺伝子導入細胞の分離を簡便に行うための条件がわかった。このときMCLs 25μgに対してDNAは2μgであった。
- 2 MCLsとDNAの複合体を用いて、遺伝子導入細胞の分離を行ったところ、T-9細胞においては、分離前と比べて分離後に3倍のルシフェラーゼ活性を持つ細胞ができた。また、NIH/3T3ではルシフェラーゼの活性にして約7倍の、COS-1に対しても約3倍とルシフェラーゼの活性の強い細胞が簡便に分離できた。

**Table 4-1** Effect of magnetic separation on transformant selecting

Cell line	Specific luciferase activity (RLU <sup>a</sup> /cell)		Transformant selecting index <sup>b</sup>
	Total cells before separation	Trapped cells	
Rat glioma cell T-9	4.37	21.1	4.82
Mouse fibroblast NIH/3T3	1.74	12.2	6.99
Monkey fibroblast CV-1	0.623	0.813	1.29
Monkey fibroblast COS-1	904	2830	3.13

<sup>a</sup>RLU: relative light units

<sup>b</sup>Transformant selecting index = (activity of trapped cells) / (activity of total cells before separation)

#### 4-5 参考文献

- 1) Shinkai, M., Yanase, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J. Kobayashi, T. (1996). *Jpn. J. Cancer Res.* 87, 1179-1183.
- 2) Koshizaki, T., Hayashi, Y., Yagi, K. (1989). *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 7, 73-77
- 3) Shinkai, M., Suzuki, M., Iijima, S., Kobayashi, T., (1994). *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 21, 125-137.
- 4) Owen, C. S. and Sykes, N. L. (1984). *J. Immunol. Methods.* 73, 41-48.

## 第五章

### 結言

本論文では簡便な遺伝子操作、解析の実現を目指し、簡便な植物への遺伝子導入と導入遺伝子の発現の解析、動物細胞への遺伝子導入と簡便な遺伝子導入細胞の分離を目的にあげ検討を行った。分子生物学のみならず多くの分野で研究、応用が行われている分野であるが、実際には、高価な設備や高度の技術を要する。この問題をふまえ第二章から第三章では、植物への簡便な遺伝子導入と GFP を用いた生体試料での発現状況の解析を試みた。第四章では、動物細胞に対する遺伝子導入と簡便で迅速な遺伝子導入細胞の分離を試みた。

第二章では、SCW を用いたイネカルスへの簡便な遺伝子導入を検討した。イネに対する遺伝子導入は、エレクトロポレーション法やパーティクルガン法が用いられている。しかし、エレクトロポレーション法ではプロトプラストにする必要があるし、パーティクルガン法では高压ガスを用いる高価な設備を必要とする。最近、イネにおいても導入時期を選びさえすればアグロバクテリウムを用いて導入できることが報告されたが、簡便な遺伝子導入とはいえない。イネカルスの遺伝子導入において、SCW を用いて遺伝子導入を行うことによって、マイクロチューブミキサー（ヴォルツテクス）さえあれば簡便に遺伝子導入できることができた。SCW は、針状の粒子で原理的にはパーティクルガン法と同じ物理的導入である。そのため、条件検討を行えばどんな植物への遺伝子導入も可能であると考えられる。

第三章では、イネに導入した GFP 遺伝子の発現を生体試料での観察を試みた。従来、植物細胞での導入遺伝子の発現の観察は GUS を用いて行われていた。しかし、GUS の発現状況を観察するには、細胞内に基質である X-Gul を導入する必要があり生体試料での観察は困難であ

った。GFP 遺伝子を導入し観察することによって生体試料での遺伝子の発現状況を観察することができた。また、熱ストレスに対する GFP の発現状況も画像解析装置を用いて連続的に観察することにもできた。GFP を用いることによって生体試料での遺伝子の発現状況を観察することは、リアルタイムに遺伝子の発現状況を把握できストレス応答、プロモーター解析を行うには有用な手段である。

第四章では、MCLs と遺伝子の複合体を用いて遺伝子の導入と遺伝子導入細胞の分離を行った。遺伝子の導入法は多く開発されているが、大きく分けると物理的導入、細胞の貪食作用利用、ウイルスを用いる方法がある。今回の論文では、簡便さと安全性を考え貪食作用を利用したりポソーム法を応用した。また、遺伝子導入細胞の分離には、薬剤耐性の遺伝子を用いたり、フローサイトメーターなどを必要とせず磁石を利用するだけなので、簡便に迅速に分離を行うことができる。MCLs と遺伝子の複合体を用いて動物細胞に遺伝子を導入し、遺伝子導入細胞の分離を簡便に迅速に行うことができた。MCLs と遺伝子の複合体が多数導入された細胞を分離しているので *ex vivo* での遺伝子治療、温熱療法と応用することが可能である。

本論文において紹介した遺伝子導入法、解析法、分離法は簡便に行う目的では、その目標は達成できたと考える。遺伝子の導入効率の向上、分離の正確性など改良しなければならない点もあるが、遺伝子操作を簡便に研究する一つの手段となることを期待する。人口増加や、地球環境の悪化、医療にと遺伝子工学は有用な研究となっている。多くの分野の研究者が高価な設備や高度な技術がなくとも研究が行える環境を作り出すことも重要であると考え。本論文の技術は高価な設備や、高度の技術を要せずとも遺伝子工学を研究する助けとなる技術であると考え。

## 研究業績（原著論文）

本博士論文に関係した論文

**Naoki Nagatani**, Hiroyuki Honda, Takiko Shimada, Takeshi Kobayashi;  
DNA delivery into rice cells and transformation using silicon carbide whiskers,  
*Biotechnology Techniques*, 11(7) 471-473 (1997)

**Naoki Nagatani**, Shigeo Takumi, Takiko Shimada, Eiichi Tamiya;  
Semi-real time imaging of the expression of a maize polyubiquitin promoter-GFP gene  
in transgenic rice, *Plant Science*, 124(1) 49-56 (1997)

**Naoki Nagatani**, Masashige Shinkai, Hiroyuki Honda, Takeshi Kobayashi;  
Development of a new transformation method using magnetite cationic liposomes and  
magnetic selection of transformed cells, *Biotechnology Techniques*, 12(7) 525-528  
(1998)

その他の論文

Eiichi Tamiya, Shinichirou Iwabuchi, **Naoki Nagatani**, Yuuji Murakami, Toshifumi  
Sakaguchi, Kenji Yokoyama, Tokuo Chiba, Hiroshi Muramatu;  
Simultaneous topographic and fluorescence imagings of recombinant bacterial cells  
containing a green fluorescent protein gene detected by a scanning near-field  
optical/atomic force microscope.  
*Anal Chem* 69(18) 3697-3701 (1997)

Hiroshi Muramatu, Tokuo Chiba, Tatu Adachi, Shinichirou Iwabuchi, **Naoki Nagatani**,  
Eiichi Tamiya, Masamichi Fujihira;  
Scanning near-field Optical/Atomic force microscopy for fluorescence imaging and  
spectroscopy of biomaterials in air and Liquid: Observation of recombinant *Escherichia*  
*coli* with gene coding to green fluorescent protein  
*Optical Review* Vol.3, No. 6B 471-474 (1996)



## 謝辞

本研究を進めるにあたり、適切な御指導を頂きました小林猛教授に厚く御礼を申し上げます。また、本論文の作成にあたり、有益な御助言を賜りました、名古屋大学工学部、山根隆教授、飯島信司教授に深く感謝いたします。そして常に適切な御助言を頂きました本多裕之助教授、新海政重先生に深く感謝いたします。

また、SCW による遺伝子導入において御協力、御指導を頂きました石川県農業技術短大、島田多喜子教授に深く感謝いたします。GFP を用いた遺伝子発現の解析において御協力、御指導を頂きました北陸先端科学技術大学院大学、民谷栄一教授に深く感謝いたします。研究を進める上でお世話になった生物機能工学科第一講座のみなさんに感謝いたします。最後に、いつも相談にのってくださり協力してくださった Isabelle Anne Bouhon さんに心から感謝します。



inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

### Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



### Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

