

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 *Agrobacterium tumefaciens*によるイネ形質転換方法に関する研究

氏名 樋江井 祐弘

論文内容の要旨

イネは、トウモロコシおよびコムギと共に世界の3つの最も重要な作物のうちのひとつである。また、イネは、植物の分子生物学、バイオテクノロジーおよび遺伝学の研究において、タバコやシロイヌナズナと共に最も頻繁に用いられてきた3つの実験用植物のひとつでもある。現在ではこれらの分野の研究において、*Agrobacterium tumefaciens* を介した遺伝子導入は欠くことのできない実験手法として確立している。しかし1990年の初めまでは、イネ科の主要穀物をはじめとする単子葉植物が自然界における宿主ではないという理由から、*A. tumefaciens* によるイネの形質転換は不可能であると考えられてきた。このため、エレクトロポレーション法やパーティクルガン法によるイネ形質転換法が先んじて開発された。しかし、DNA直接導入法と呼ばれるこれらの方法は、導入遺伝子が多コピー導入されることや導入遺伝子の再編成事例が多いなどの問題を抱えていた。他方 *A. tumefaciens* 法には、形質転換効率が高い、染色体の中へ組み込まれる遺伝子のコピー数が少ない、末端が明確な比較的大きな断片を導入できる、再編成が少ないなどの多数利点があるため、*A. tumefaciens* 法によるイネ科作物への遺伝子導入は、挑戦事例も多く、可能性を示す知見も得られていたために、その可否をめぐる論議が続いていた。

このような背景の下、本研究は、*A. tumefaciens* によりイネに効率よく外来遺伝子を導入できることを疑いなく示したものである。ハイグロマイシン耐性遺伝子および細菌細胞中では発現しないイントロン介在レポーター遺伝子を導入遺伝子とし、*A. tumefaciens* を完熟種子の胚盤由来カルスに感染させることにより、外来遺伝子を安定発現するイネ形質転換体を効率よく作製できることを明らかにした。また、このようにして作製した形質転換体では、イネの染色体のさまざまな部位に外来遺伝子が導入され、それらは後代の植物にメンデル則に従い安定に遺伝することを証明した。外来遺伝子とイネゲノムの接点のDNA配列が、双子葉植物での *A. tumefaciens* によ

る遺伝子導入において観察された特徴とよく一致したことから、*A. tumefaciens* は、双子葉植物にも単子葉植物にも同様な機構で T-DNA を植物細胞へ移入し、染色体に組み込むことが推察された。さらに、得られた形質転換植物の多くが形態的に正常で稔性が高いこと、導入した遺伝子が 5 世代以上にわたり安定して発現することも明らかにした。

イネ完熟種子は、非常に扱いやすい実験材料である。供試種子は、室温で保存することができ、発芽率の高い種子でありさえすれば、形質転換に適した良好なカルスが得られることが多い。しかし、良好なカルスが得られる品種は限定され、インディカ品種、中でもアイソザイム分析によってグループ I に分類される品種群は、組織培養が極めて難しい。実際に、グループ I 品種の完熟種子由来カルスへの遺伝子導入は困難であった。研究を進めたところ、最も好適と認められたのは、未熟胚に直接 *A. tumefaciens* を感染させる方法であった。好適な未熟胚は、温室で健全に生育したイネの特定の発達段階の種子から得られた。未熟胚を利用することにより、広範な品種において同じような高効率で胚盤細胞へ遺伝子導入が可能であった。実際に 10 種類におよぶインディカのグループ I 品種すべてで効率よく遺伝子が導入され、多数の形質転換植物が得られることを確認した。

未熟胚を供試し、遺伝子導入効率をさらに向上させるような物理化学的処理の探索を行ったところ、*A. tumefaciens* を感染させるにあたって、前もって高温処理や遠心処理などの前処理を行うことに、顕著な導入効率向上効果が認められた。遠心後は、胚からの芽や根の成長が抑制され、かつ、カルスの誘導が良好となることも観察された。機構は不明であるが、未熟胚の組織や細胞の成長の様相が、遠心により何らかの影響を受け、分化の方向から、未分化の方向に転じたのではないかと推測した。これら前処理を行うことにより、広範な品種において供試未熟胚 1 個あたり 10 個体以上の独立な形質転換植物を得ることができた。

最後に、得られた知見を体系化し、種々のイネ品種に外来遺伝子導入する際の基点となる実験手順書を提示した。