

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 樋 江 井 祐 弘

論 文 題 目 *Agrobacterium tumefaciens* による  
イネ形質転換方法に関  
する研究

### 論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 服 部 東 穂  
委 員 名古屋大学教授 森 仁 志  
委 員 名古屋大学教授 中 園 幹 生  
委 員 名古屋大学准教授 武 田 真

現在、イネの分子生物学、生理学および遺伝学等の研究分野において、*Agrobacterium tumefaciens*を用いるイネへの遺伝子導入法は、欠くことのできない実験ツールとなっている。しかし、かつては、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、イネに *A. tumefaciens* によって遺伝子導入することは不可能であると考えられていた。このため、イネやトウモロコシ、コムギなどの主要穀物では、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、パーティクルガン法などの直接法による遺伝子導入が先に試みられ開発された。しかしながら、このような直接遺伝子導入法には、遺伝子が多コピー導入されたり、遺伝子が断片化・再編成されて導入されるなどの問題があった。これに対し、*A. tumefaciens* 法には、染色体へ組み込まれる遺伝子のコピー数が少ない、末端が明確な大きな断片を導入できるなどの多くの利点があため、イネ科作物への *A. tumefaciens* 法による遺伝子導入も数多く試みられていた。しかし、双子葉植物と同様の機構で外来遺伝子である T-DNA が組み込まれることを、複数の個体を用いて明確に示した報告はなく、その可否について長い論議が継続していた。

このような背景のもと本研究は、*A. tumefaciens* を介してイネに効率よく外来遺伝子を導入できることを明確に証明し、この論議に終止符を打つ役割を果たした。すなわち、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。形質転換体は、*A. tumefaciens* を接種したカルスの 10 % 以上から得られ、非常に高い効率でこれを作製できることを示した。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組み込まれていることを示し、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 5 世代にわたる調査により証明した。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も明らかにした。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、単子葉植物にも双子葉植物と同様な機構で T-DNA が植物細胞へ移入し、植物染色体上に組み込まれるものと考えられた。その後、本研究が突破口となり、トウモロコシ、オオムギ、コムギなどの主要穀物の *A. tumefaciens* による形質転換の成功が次々と報告された。

イネ完熟種子は保存性に優れるため、完熟種子由来のカルスは、*A. tumefaciens* による形質転換実験には非常に利用し易い材料である。しかし、遺伝子導入効率が高い良好なカルスが得られる品種は、主にジャポニカに限定されるという問題があった。アイソザイム分析でグループ I インディカに分類される品種群は、組織培養が極めて

難しいとされてきた。実際に、完熟種子から遺伝子導入に適した細胞分裂活性の高いカルスを獲得することは困難であった。本研究における種々の検討の結果、グループ I インディカに対して最も好適と認められた方法は、未熟胚に直接 *A. tumefaciens* を感染させる方法であった。イネの特定の発達段階の種子から得られる未熟胚を利用することにより、広範な品種においてほぼ同様な効率で胚盤細胞への遺伝子導入が可能であり、実際に 10 種類におよぶインディカのグループ I 品種すべてにおいて、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。

次に本論文では、*A. tumefaciens* 感染による遺伝子導入効率をさらに向上させる試みとして、植物材料への物理化学的前処理の如何を調査した。その中で、単離した未熟胚への高温処理および遠心処理が、顕著に遺伝子導入効率の向上をもたらすことを見出した。遠心処理は、胚からの芽と根の成長を抑制したが、遺伝子導入のターゲットである胚盤表皮細胞のカルス化を促進した。その機構は不明であるが、遠心処理により、組織や細胞が分化の方向から未分化の方向に転じたと推察した。これらの前処理を行うことにより、グループ I インディカ品種を含む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可能となった。

最後に、本研究で実施した多数のジャポニカおよびインディカ品種の形質転換実験より得られた知見を体系化することにより、広範なイネ品種を対象に、効率よく形質転換植物を獲得するための包括的な実験プロトコールを提示した。

以上のように樋江井祐弘は、かつて不可能と言われた単子葉植物の *A. tumefaciens* による形質転換について、イネにおいてそれが可能であることを徹底した解析から証明するとともに、これによる高効率な形質転換方法を樹立した。樋江井の開発したイネの形質転換方法あるいはその改良法は現在世界中で用いられており、今日のイネの分子生物学・分子遺伝学の発展はこの研究なしにはあり得ないと言っても過言ではない。また、形質転換のさらなる高効率化と培養困難なイネ品種に対する形質転換方法の開発にも成功し、本方法は基礎研究のみならず、産業的研究開発目的にみあう技術にまで高められた。このように、本研究成果の植物科学および植物バイオテクノロジー分野に対する貢献は極めて大きいものであることから、当審査委員会は本論文が博士（農学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。