



Title	ヒメツリガネゴケ
Author(s)	杉田, 護; 田崎, 瑛示; 香村, 吉洋
Citation	低温科学, 67, 607-613 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39201
Type	bulletin (article)
Note	5章 形質転換 4
File Information	67-085.pdf



[Instructions for use](#)

4. ヒメツリガネゴケ

杉田 護¹⁾, 田崎 瑛示¹⁾, 香村 吉洋¹⁾

ヒメツリガネゴケは植物の中では例外的に相同組換え能が高いため、核ゲノムと葉緑体ゲノムに遺伝子を導入することが容易である。導入法としては、ポリエチレングリコール法が一般的であるが、パーティクルボンバードメント法も適用可能である。

Transformation of *Physcomitrella patens*

Mamoru Sugita, Eiji Tasaki, Yoshihiro Komura

Homologous recombination occurs at a high frequency between genomic sequences in transforming DNA and the corresponding chromosomal or chloroplast sequences, allowing precise inactivation or modification of genes. For the transformation of *Physcomitrella patens*, polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation of protoplasts is almost exclusively applied even though particle bombardment is as well applicable.

4.1 ポリエチレングリコールを用いたプロトプラストへの遺伝子導入

ポリエチレングリコール (PEG) 法によるヒメツリガネゴケの形質転換と相同組換えによる効率の高い遺伝子ターゲティングが、スイスの Didier Schaefer らによって初めて報告された^{1,2)}。ヒメツリガネゴケの胞子体 (原糸体と茎葉体など) のゲノムはハプロイドであるため、遺伝子を破壊するとその影響がすぐに現れ、逆遺伝学による遺伝子機能の解析に適している。同法による形質転換の実験プロトコルは自然科学研究機構 基礎生物学研究所 生物進化研究部門長谷部研究室ホームページ (<http://moss.nibb.ac.jp/>) やフライブルグ大学の Reski 研究室ホームページ (<http://www.plant-biotech.net/>) から入手できる。同法はコケ原糸体細胞のプロトプラストの調製, PEG を用いたプロトプラストへの DNA の導入, 薬剤耐性形質転換体の選択の 3 つのステップからなる。ここでは当研究室で行っている核と葉緑体の形質転換の実験手順を紹介する^{3,4)}。

4.1.1 原糸体細胞のプロトプラストの調製 (所要時間: 1.5 時間)

使用する試薬および培地のうち重要なものを下線で示し、その組成と調製レシピを表 1 にまとめた。ヒメツリガネゴケ原糸体を 4 日毎に植え継ぐ。ヒメツリガネゴケの培養と植え継ぎの方法については (1) 植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養, 5. ヒメツリガネ

ゴケを参照されたい。

↓

植え継ぎ後 3 日目の原糸体が生育した培養プレート (直径 9 cm プラスチックシャーレ) 10~12 枚分からプロトプラストを調製する。クリーンベンチ内で原糸体を滅菌ピンセットでかき集めて、25 ml の ドリセラゼ溶液^{注1)}

表 1. 使用した試薬と培地の組成

ストック溶液

- ストック A (×100) 4°C 保存
0.5 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
4.5 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- ストック B (×100) 4°C 保存
2.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- ストック C (×100) 4°C 保存
2.5% KH_2PO_4
pH 6.5 に 4 M KOH で調製する。
- ストック D (×100) 4°C 保存
1 M KNO_3
4.5 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
酸化して茶色になったら新しいストックを調製する。
- Alternative TES 液 (×1000)
0.0055% (0.22 mM) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
0.0614% (10 mM) H_3BO_3
0.0055% (0.23 mM) $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
0.0025% (0.1 mM) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
0.0055% (0.19 mM) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
0.0389% (2 mM) $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
0.0028% (0.17 mM) KI

注1) ドリセラゼ溶液 (使用直前に調製する)
2% Driserase-20 (協和発酵工業株式会社)
8% D-Mannitol

1) 名古屋大学遺伝子実験施設

の入った 50 ml ガラス製遠心管 (IWAKI TE-32 PYREX) に入れる。原糸体はシャーレの周辺部 1 cm を残し中央部のみをかき集める。

↓

ガラス製遠心管をアルミホイルで覆い、25°Cの培養室またはインキュベータ内で、5分毎にガラス製遠心管を横方向のままゆっくりと半回転まわす。この操作を30分間行い、細胞壁を除去する。

↓

口径 40 μm のナイロンメッシュでプロトプラストを濾過し、50 ml ガラス製遠心管に集める。ナイロンメッシュはガラス製ロートにセットし、アルミホイルで包んでオートクレーブしたものを用いる。

↓

1,000 rpm, 4°Cで2分間遠心 (TOMY TS-7 ローター使用) し、プロトプラストを沈殿させる。

↓

上清を 25 ml メスピペット (または駒込ピペット) を用いて捨てる。上清を少量残し、ゆっくりと回転しながらプロトプラスト沈殿を懸濁する。

↓

沈殿懸濁液に 8% マンニトール溶液を遠心管の壁面にそってゆっくりと加え 40 ml にする。

この遠心と洗浄の操作をあと 2 回繰り返す。

* 3 回目の遠心をする前のプロトプラスト-マンニトール混液 (40 ml) の一部を取って、血球計算盤を用いてプロトプラストの総数と濃度を算出しておく。

↓

3 回目の遠心後、 1.6×10^6 プロトプラスト/ml になるように MMM 溶液^{#2} をプロトプラスト沈殿に壁面にそってゆっくりと加えて懸濁し、これをプロトプラスト溶液とする。通常、7~20 ml のプロトプラスト溶液が得られる。

ここまでの作業を可能な限りクリーンベンチ内で行う。

* 50 ml のファルコンチューブにドリセラゼ粉末を 0.5 g 入れ、8% D-mannitol を 25 ml 加え溶解する。これを 4,000 rpm で 5 分間遠心する。上清をシリンジに入れフィルター滅菌 (0.45 μm) しながら、50 ml のガラス製遠心管 (IWAKI PYREX) に入れる。

^{#2} MMM 溶液 (20 ml, 使用当日に調製する)

0.5 M D-Mannitol

15 mM MgCl₂

0.1% MES

フィルター滅菌 (0.22 μm) する。

4.1.2 プロトプラストへの DNA の導入

(所要時間: 2 日間)

使用する試薬, および培地は表 1 にまとめた。

30 μl の *DNA 溶液 (30 μg DNA 断片), 300 μl のプロトプラスト溶液, 300 μl の PEG/T 溶液^{#3} の順に, 14 ml ポリピレン丸底チューブ (ファルコン 352006) に加えて混合し, 45°C (恒温水槽) で 5 分間, 20°C で 10 分間インキュベートする。

* 市販のキット (QIAGEN) で調製したプラスミド DNA を制限酵素で完全消化し直鎖状にする。さらにフェノール処理, エタノール沈殿してから, オートクレーブ滅菌したミリ Q 水 (または TE) に溶解する。DNA 濃度を 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整する。

↓

プロトプラスト液体培地^{#4} 6.5 ml を 10 回に分けて 30 分間かけて穏やかに加える。加える手順: 0.3 ml を 3 分毎に 5 回, 次に 1 ml を 3 分毎に 5 回加える。最初の 3 回までは加える都度, チューブを指で軽くはじく (退屈で根気を要する作業。気の短い人には向かない)。

↓

三三九度の要領で全量をプラスチックシャーレ (直径 6 cm, IWAKI code 1010-060) に移し, フタをしてからパラフィルムでシールする。さらにアルミホイルで遮光し, 箱に収めて 25°C で一晩~24 時間培養する。ここまでの所要時間: 1.5 時間。

↓

翌日, P 5000 ピペットマンを用いてプロトプラスト液を 15 ml ファルコンチューブ (35-2096) に移し, 1,000 rpm, 4°C, 2 分間遠心分離し, プロトプラストを沈殿させて上清をデカントまたは P 5000 ピペットマンを用いて除く。

↓

^{#3} PEG/T 溶液 (使用当日に調製する)

40% Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000)

0.1 M Ca(NO₃)₂

0.01 M Tris-HCl (pH 8.0)

7.2% D-Mannitol

2 g の PEG 6000 とスターラーバーをキャップ付き硬質バイアル瓶 (20 ml 容量) に入れてオートクレーブし, これに上記のフィルター滅菌 (0.22 mm) した混合溶液 5 ml を加え, よく溶かして調製する。

^{#4} プロトプラスト液体培地 (100 ml, 使用当日に調製する)

1×ストック A

1×ストック B

0.1×ストック C

0.005% Diammonium (+)-Tartrate ((+)-酒石酸ジアンモニウム) 和光純薬

6.6% D-Mannitol

0.5% Glucose

予め 45°C保温した PRM/T 溶液^{#5} を P 5000 ピペットマンまたは 10 ml メスピペットを用いてチューブの壁面にそってゆっくりと 8 ml 加える。直ぐに予め透明セロハン^{#6} を敷いた PRM/B 培地^{#7} に 2 ml ずつ分注し、プレート面に均一に広げる。この操作を寒天が固まらないうちに手早く行う。

↓

シャーレをサージカルテープ（またはパラフィルム）でシールし、25°C連続明条件下で 3 日間培養する。

4.1.3 薬剤耐性形質転換体の選択（所要時間：4 週間）

3 日後、シャーレのふたを開け、2 本のピンセットを用いて再生したコケをセロハンごと選択培地^{#8} に移す。

↓

^{#5} PRM/T 溶液（45°Cで使用する）

1×ストック B

1×ストック C

1×ストック D

1×Alternative TES

5 mM Diammonium (+)-Tartrate ((+)-酒石酸ジアンモニウム)

10 mM CaCl₂ · 2 H₂O

8 % D-Mannitol

0.8% agar (Sigma A9799, Plant Cell Culture Tested)

オートクレーブした後で、45°Cに保温する。残った溶液は室温で保存しておき、使用前にもう一度オートクレーブする。

^{#6} 透明セロハンの前処理と保存

市販のセロハンには培養に適さないものがある。例えば、セロハンの表面が撥水性を示す、あるいはオートクレーブによりセロハンが白く変質するタイプは培養に適さない。当研究室では、フタムラ化学のセロハン (PL #300) を使用している。セロハンの洗浄方法：シャーレの大きさに切ったセロハン 300 枚を 5 mM EDTA (pH 8.0) 液 500 ml 中でオートクレーブする (1000 ml ビーカーを用いる)。オートクレーブ後、セロハンミリ Q 水（あるいは蒸留水）500 ml 中で念入りにピンセットを用いてすすぎ、ミリ Q 水 500 ml を入れてオートクレーブ滅菌する。この操作をもう一度繰り返す。前処理済みのセロハン室温保存する。培養のコンタミはセロハンが原因となる場合が多いので、使用直前に必ずもう一度オートクレーブする。

^{#7} PRM/B 培地（プロトプラスト再生培地）（使用前日に調製する）

1×ストック B

1×ストック C

1×ストック D

1×Alternative TES

5 mM Diammonium (+)-Tartrate ((+)-酒石酸ジアンモニウム)

10 mM CaCl₂ · 2 H₂O

6% D-Mannitol

0.8% agar (Sigma A9799, Plant Cell Culture Tested)

オートクレーブし、シャーレにまいて固める。使用直前まで 25°Cに保つ。

^{#8} 選択培地（汎用培地+薬剤）

汎用培地 (BCDAT または BCDATG) をオートクレーブ後、50°Cまでさまし、クリーンベンチ内で下記の薬剤を加えよく混ぜ、プラスチックシャーレに分注する。

コケを移したシャーレをサージカルテープでシールし、25°C連続明条件下で培養する (図 1)。このステップを 1 次スクリーニングと呼ぶ。

↓

3 週間後にシャーレのふたを開け、生育したコロニーを先細ピンセットでつまみ、抗生物質などの薬剤を含まないセロハンなし汎用培地 (BCDATG または BCDAT)^{#9} に移す。コロニー毎にピンセットの先端をガスバーナーで焼く。プレートあたり 25 個~60 個のコロニーを移す (図 1)。

↓

1 週間培養した後、コロニーの一部を新たな選択培地^{#8} に移し、さらに 2~3 週間培養する。このステップを 2 次スクリーニングと呼ぶ。

↓

選択培地で生育したコロニーを安定な形質転換体として選抜する。

通常、300 個のコロニーのうち 50 個の安定形質転換体が得られる。ただし目的とする遺伝子の性質によって得られる安定形質転換体の数は大きく変動する。

20 mg/ml ジェネティシン (G 418, 50 mg/ml geneticin disulfate solution, WAKO 075-04893), マーカー遺伝子 *nptIII* を用いる時に使用する。

または、30 mg/ml ハイグロマイシン B (50 mg/ml Hygromycin B solution, WAKO 084-07681), マーカー遺伝子 *hpt (aphIV)* を用いる時に使用する。

または、50 mg/ml ゼオシン (100 mg/ml Zeocin, Invitrogen 46-0509), マーカー遺伝子 *zeocin resistant gene (ble)* を用いる時に使用する。

または、500 mg/ml スペクチノマイシン (spectinomycin dihydrochloride pentahydrate, 粉末, Sigma, 091K1257), 葉緑体形質転換のためのマーカー遺伝子 *aadA* を用いる時に使用する。

^{#9} 汎用培地 (BCD)

1×ストック B

1×ストック C

1×ストック D

1×Alternative TES

1 mM CaCl₂ · 2 H₂O

0.8% agar (Sigma A9799, Plant Cell Culture Tested)

オートクレーブし、シャーレにまく。1 ヶ月間室温保存。

^{#9} 汎用培地 (BCDG) パーティクルボンバードメント法による DNA の導入に用いる。

BCD 培地に 0.5% glucose を加える。

オートクレーブし、シャーレにまく。1 ヶ月間室温保存。

^{#9} 汎用培地 (BCDAT)

BCD 培地に 5 mM Diammonium (+)-Tartrate ((+)-酒石酸ジアンモニウム) を加える。

オートクレーブし、シャーレにまく。1 ヶ月間室温保存。

^{#9} 汎用培地 (BCDATG)

BCDAT 培地に 0.5% glucose を加える。

オートクレーブし、シャーレにまく。1 ヶ月間室温保存。

選択薬剤存在下でプロトプラストから再生した形質転換体には、導入 DNA が核ゲノムに組み込まれた安定形質転換体 (stable transformant) の他に、核ゲノムに不安定に組み込まれたり、ゲノムに組み込まれていない形質転換体 (transient transformant) が存在する。これらの形質転換体を排除し安定形質転換体のみを分離するために、一度選択薬剤を含まない培地で1週間培養し、再び選択薬剤を含む培地で培養 (2次スクリーニング) する。この再選択で生き残った形質転換体を安定形質転換体として選抜する (図1)。

4.1.4 相同組換えの確認

形質転換体コロニーが小さい段階でコロニー-PCR 法を行い簡便に相同組換えの有無を調べる⁹⁾。さらに、プレート5枚分のコケ原系体からゲノム DNA を調製しゲノミックサザン解析を行う。両者の結果を照らし合わせて、導入遺伝子がゲノムに組み込まれたかどうかを判定する。

4.1.5 留意点および課題など

- (1) 導入する遺伝子は、薬剤耐性マーカー遺伝子の上流と下流にそれぞれターゲット領域のゲノム DNA 配列を連結するようにデザインする。ゲノム DNA 領域の長さはそれぞれ1 kb 以上とる必要がある⁹⁾。遺伝子破壊株を作製しようとする場合は、ターゲット領域に薬剤耐性マーカー遺伝子を挿入するよりも、ターゲット遺伝子をそっくり欠失させ薬剤耐性マーカー遺伝子と置換したコンストラクトを構築した方がよい。
- (2) 導入した遺伝子がコンカテマーを形成してゲノム内に組み込まれることがある⁷⁾。形質転換体の導入遺伝子のコピー数を調べておく必要がある。
- (3) 形質転換用の導入 DNA は必ず断片化して直鎖状に

したものを用いる。プラスミドのまま導入すると、核ゲノムへの組み込みがほとんど起こらない。

- (4) PEG による形質転換法は、高価な遺伝子導入器機を必要とせず、簡便に行うことができる利点がある。しかし、PEG によってプロトプラスト融合が起こるため、コケ形質転換体がハプロイドではなくポリプロイドとなってしまうことがある⁹⁾。得られた形質転換体を解析する前に、形質転換体の核相をプロイディーアナライザー (Patec 社 PA 型) により確認しておく。
- (5) プロトプラストの再生率が形質転換効率に大きな影響を与える。確実に形質転換体を得るには、胞子から発芽した原系体を3~4回継代したのものを用いるとよい。
- (6) PEG 法は簡便ではあるが、プロトプラストを調製するのに手間がかかる。

4.2 パーティクルボンバードメントによる DNA 導入法

PEG 法によるヒメツリガネゴケの形質転換が報告された後に、パーティクルボンバードメント法でも DNA 導入が可能であることがいくつか報告された^{9,10)}。パーティクルボンバードメント法はコケの原系体に直接 DNA を導入することができるので、PEG 法のようにプロトプラストを調製する手間がはぶけ、形質転換に使用する DNA 量も5 μ g と少量ですむなどの利点がある。当研究室では、PEG 法だけでなくパーティクルボンバードメントによる DNA 導入で、GFP 蛍光の一過的発現の観察と安定形質転換体の作製を行っている。当研究室で行っている同法の実験プロトコルを紹介する。

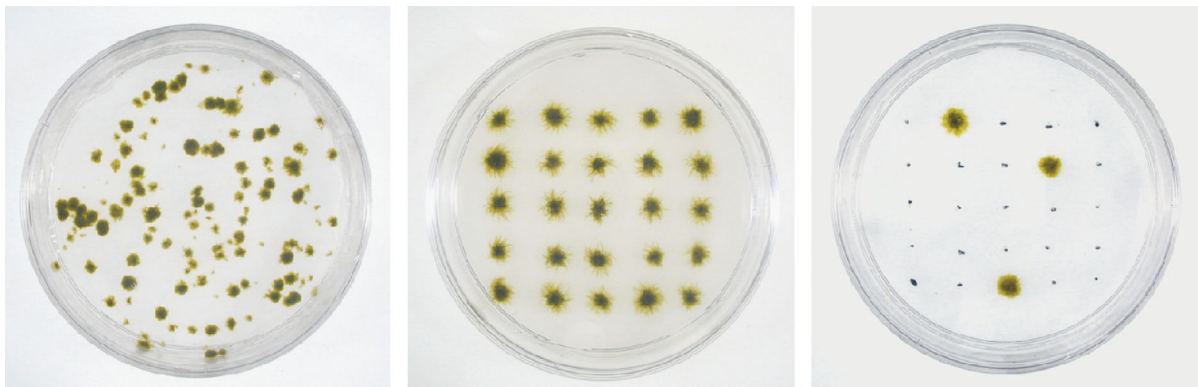


図1：薬剤耐性形質転換体のスクリーニング

DNA 導入後3週間、ジェネティシンを含む選択培地 (BCDAT+G 418) で培養 (1次スクリーニング) し生育してきた多数の原系体コロニー (左)、左写真の原系体コロニーをピンセットで拾い、ジェネティシンを含まない汎用培地 (BCDATG) に移して1週間生育させた原系体コロニー (中)、中写真の1週間培養した原系体コロニーの一部を新たな選択培地 (BCDAT+G 418) に移して3週間培養 (2次スクリーニング) した (右)。

4.2.1 金粒子の滅菌処理 (所要時間: 1 時間)

1.5 ml マイクロチューブに金粒子 (径 1.0 μm BioRad, cat. #1652263) 60 mg を入れる。

↓

70%エタノール (室温) を 1 ml 加え, 5 分間ボルテックスする (TOMY MT-300 で最大の強さ)。

↓

室温で 15 分間静置する。

↓

15,000 rpm, 2 秒間遠心する。

↓

P 1000 ピペットマンを用いて上清を捨て, ミリ Q 水を 1 ml 加える。

↓

1 分間ボルテックスした後, 室温に 1 分間静置する。

↓

15,000 rpm, 2 秒間遠心し, 上清を捨てる。ミリ Q 水を 1 ml 加え, 遠心と洗浄を 3 回繰り返す。

↓

滅菌した 50% グリセロールを 1 ml 加え, 金粒子が均一になる程度にボルテックスする。

↓

-80°C で保存する。

4.2.2 DNA 断片の金粒子へのコーティング

(所要時間: 0.5 時間)

50%グリセロールに保存しておいた金粒子液 25 μl を 1.5 ml のマイクロチューブに入れ, ボルテックスミキサー (TOMY MT-300 など) にセットする。

↓

ボルテックスミキサーをスイッチ ON にし, ボルテックスの強さを 5.0~5.5 (中程度, こぼれない程度の強さ) にセットする。マイクロチューブのふたは開けた状態にする。

↓

次の試薬を順に加える。

2.5 M CaCl_2 25 μl

DNA 溶液 14 μl (5 μg DNA 断片)

1 M スペルミジン 1 μl

滅菌水 15 μl (80 μl になる)

↓

マイクロチューブのふたを閉めて, 3 分間最大の強さでボルテックスする。室温で 1 分間静置する。

↓

5,000 rpm, 4°C で 2 秒間遠心し, P 200 ピペットマンを用いて上清を捨てる。

↓

70%エタノール (室温) を 200 μl 加え, P 200 を用いてピペッティングで懸濁する。チップ内に金粒子が付着しないように注意しながら軽くピペッティングする。

↓

5,000 rpm, 4°C で 2 秒間遠心し, P 200 ピペットマンを用いて上清を捨てる。金粒子を吸い込まないように注意する。

↓

100%エタノール (室温) 200 μl を加え, ピペッティングで懸濁する。

↓

5,000 rpm, 4°C で 2 秒間遠心する。

↓

上清捨て, 100%エタノール 30 μl を加え, ピペッティングで懸濁する。

↓

氷上へ

4.2.3 コケ原糸体への DNA の導入

(所要時間: 0.5 時間)

パーティクルボンバードメントによる DNA 導入には, 植え継ぎ後 3~5 日目のコケ原糸体を用いる。コケ原糸体をプレート上 (直径 9 cm プラスチックシャーレ) に十分に広げるため, 0.5%グルコースを加えた BCDG 培地 (透明セロハンは敷かない) で培養する。ここでは, ㈱タナカ社の IDERA (GAS 法遺伝子導入装置) 型式 GIE-III を使用した場合の操作手順と打ち込み条件を紹介する。

電源スイッチ (MAIN) が OFF, ポンプ作動スイッチ (PUMP RUN) が OFF, 排気切替バルブ (EXHAUST VALVE) が OFF になっていることを確認する。

↓

ヘリウムガス圧調整バルブ (He PRESS ADJ (ACCEL)) が反時計方向 (ガス圧が低い) に位置しており, 真空加圧調整バルブ (VACUUM ADJ (ACCEL)), ヘリウムガス減圧調整バルブ (He PRESS ADJ (REDUC)), チャンバーリークバルブ (AIR LEAK) が時計方向に一杯に回っていることをそれぞれ確認する。

↓

ヘリウムガスポンベのバルブを開き, ヘリウムガスレギュレーターの一次測を 7.0 kgf/cm² 以上に設定した後, 二次測を 7.0 kgf/cm² 以下に設定する。

↓

MAIN スイッチを押す。

↓
排気遮断スイッチ (EXHAUST CUT) が OFF になっていることを確認する。

↓
ヘリウムガス圧計 (He PRESS GAUGE) の表示を見ながら、希望する噴出ヘリウム圧力 (4.0 kgf/cm²) に到達するまで、He PRESS ADJ (ACCEL) を時計方向に徐々に回す。

↓
(希望噴出圧力を超えてしまった場合は、操作マニュアルに従って調整する)

↓
PUMP RUN を押す。

↓
チャンバー内に試料 (コケ原糸体が密生した培養プレート)、DNA コーティング済み金粒子液 (10 μl) を格納したフィルターホルダーをセットし、扉を閉める。培養プレートの底面3カ所をマジックでマークしておく。試料とフィルターホルダー先端の間の距離を75 mm に設定する。フィルターホルダーは使用直前に70%エタノール液中から取り出し、クリーンベンチ内で乾燥させてから金粒子液を加える。

↓
EXHAUST VALVE を VACUUM 表示位置に回し、VACUUM GAUGE の表示を見ながら希望する真空圧 (600 mmHg) に到達したところで、EXHAUST VALVE を OFF の表示位置に戻す。

↓
READY の点灯を確認する。

↓
START スイッチを押す。これにより、金粒子が噴射しコケに打ち込まれる。

↓
AIR LEAK を徐々に反時計方向に回し、チャンバー内に空気を入れる。

↓
試料(培養プレート)を残したまま、フィルターホルダーだけを取り出す。次に、DNA コーティング済み金粒子液 (10 μl) をフィルターホルダーにセットし、上記と同じ要領で金粒子を噴射しコケに打ち込む。これをもう1回繰り返す。このようにして、1枚の培養プレートあたりDNA コーティング金粒子液 30 μl を3回に分けて10 μl ずつマジックでマークした位置に打ち込む。

↓
打ち込み終了後、装置の取り扱い手順に従って使用前の

状態に戻す。

4.2.4 薬剤耐性形質転換体の選択 (所要時間: 4週間)

金粒子を打ち込んだコケプレートをサージカルテープでシールし、暗所で (箱に入れて) 25°C 3日間培養する。一過的発現を観察する場合は一晩の培養でよい。

↓
金粒子を打ち込んだ位置のコケ原糸体をピンセットでつまみ、6 ml のミリ Q 水が入った 50 ml コーニングチューブ (430829) に入れ、コケ原糸体を粉碎する。粉碎は (1) 植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養、5. ヒメツリガネゴケに準じて行う。

↓
コケ原糸体粉碎液 2 ml ずつを予め透明セロハンを敷いた選択培地 3 枚にまく。シャーレをサージカルテープでシールし、25°C連続明条件下で3週間培養する。これ以降の作業は4.1.3 薬剤耐性形質転換体の選択と全く同じ。

↓
3週間後にシャーレのふたを開け、生育したコロニーを先細ピンセットでつまみ、抗生物質などの薬剤を含まないセロハンなし汎用培地 (BCDATG または BCDAT) に移す。

↓
1週間培養した後、新たな選択培地に移し、さらに2~3週間培養する。

↓
選択培地で生育したコロニーを安定な形質転換体として選抜する。

当研究室では、ある遺伝子の下流に GFP 遺伝子をノックインする形質転換を行った際、1次スクリーニングで選抜した360個のコロニーを2次スクリーニングに回した結果、19個の安定形質転換体コロニーを得た。

4.2.5 留意点と対処法

噴射されたヘリウムガス圧によって、コケ試料が吹き飛ぶことがある。これは、培地上についた水分が原因と考えられる。打ち込む金粒子液とコケ試料プレートを常に余分に用意しておく。

参考文献

- 1) D. Schaefer, J. P. Zryd, C. D. Knight, & D. J. Cove, Mol. Gen. Genet. **226** (1991) P.418.
- 2) D. G. Schaefer, & J. P. Zryd, Plant J. **11** (1997) P.1195.
- 3) C. Sugiura, & M. Sugita, Plant J. **40** (2004) P.314.
- 4) M. Hattori, H. Miyake, & M. Sugita, J. Biol. Chem.

- 282 (2007) P.10773.
- 5) G. Schween, S. Fleig, & R. Reski, *Plant Mol. Biol. Rep.* **20** (2002) P.43.
- 6) Y. Kamisugi, K. Schlink, S. A. Rensing, G. Schween, M. von Stackelberg, A. C. Cuming, R. Reski, & D. J. Cove, *Nucleic Acids Res.* **34** (2006) P.6205.
- 7) Y. Kamisugi, A. C. Cuming, & D. J. Cove, *Nucleic Acids Res.* **33** (2005) P.e173.
- 8) G. Schween, S. T. Egener, D. Fritzowsky, J. Granado, M. C. Guitton, N. Hartmann, A. Hohe, H. Holorf, D. Lang, J. M. Lucht, C. Reinhard, S. A. Rensing, K. Schlink, J. Schulte, & R. Reski, *Plant Biol.* **7** (2005) P.228.
- 9) W. Sawahel, S. Onde, C. D. Knight, & D. J. Cove, *Plant Mol. Biol. Rep.* **10** (1992) P.315.
- 10) S. H. Cho, Y. S. Chung, S. K. Cho, Y. W. Rim, & J. S. Shin, *Mol. Cells* **9** (1999) P.14.