HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	林木の形質転換系の開発
Author(s)	毛利, 武
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第5475号
Issue Date	1999-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3151636
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51616
Type	doctoral thesis
File Information	000000336826.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

林木の形質転換系の開発

1998

毛　利　　武

林木の形質転換系の開発

1998

毛利　武

緒言 (1)

第Ⅰ章　セイヨウハコヤギの形質転換系の開発 (9)

Ⅰ-1　葉肉プロトプラストからの再生系の確立 (9)
Ⅰ-1-1　はじめに (9)
Ⅰ-1-2　材料及び実験操作 (10)
Ⅰ-1-2-1　試料 (10)
Ⅰ-1-2-2　プロトプラストの調製法 (10)
Ⅰ-1-2-3　プロトプラストの液体培養 (12)
Ⅰ-1-2-4　プロトプラスト由来カルスの増殖 (13)
Ⅰ-1-2-5　プロトプラスト由来カルスからの不定芽の分化 (14)
Ⅰ-1-3　実験結果 (15)
Ⅰ-1-3-1　プロトプラストの調製 (16)
Ⅰ-1-3-2　プロトプラストの液体培養 (17)
Ⅰ-1-3-3　プロトプラスト由来カルスの増殖 (20)
Ⅰ-1-3-4　プロトプラスト由来カルスからの不定芽分化 (22)
Ⅰ-1-4　考察 (24)

Ⅰ-2　*Agrobacterium tumefaciens* による形質転換系の開発 (31)
Ⅰ-2-1　はじめに (31)
Ⅰ-2-2　材料及び実験方法 (32)
Ⅰ-2-2-1　試料 (32)
Ⅰ-2-2-2　*Agrobacterium* (32)
Ⅰ-2-2-3　形質転換 (32)
Ⅰ-2-2-4　形質転換体の GUS 活性分析 (33)
Ⅰ-2-2-5　形質転換体 DNA の単離と分析 (34)
Ⅰ-2-3　実験結果 (38)

Ⅰ-2-3-1　形質転換実験に用いる組織切片の検討　(38)
Ⅰ-2-3-2　カナマイシン耐性カルス誘導に対する
　　アセトシリンゴンの影響　(38)
Ⅰ-2-3-3　形質転換体の再生　(38)
Ⅰ-2-3-4　形質転換体の GUS 活性分析　(40)
Ⅰ-2-3-5　サザンハイブリダイゼーション　(42)
Ⅰ-2-4　考察　(43)

Ⅰ-3　イネホメオボックス遺伝子 *OSH1* の大量発現による
　　形態異常の誘導　(47)
Ⅰ-3-1　はじめに　(47)
Ⅰ-3-2　材料及び実験方法　(48)
Ⅰ-3-2-1　試料　(48)
Ⅰ-3-2-2　*Agrobacterium*　(48)
Ⅰ-3-2-3　形質転換　(48)
Ⅰ-3-2-4　形質転換体 RNA の単離と分析　(48)
Ⅰ-3-2-5　RT-PCR サザンハイブリダイゼーション　(51)
Ⅰ-3-3　実験結果　(53)
Ⅰ-3-3-1　形質転換体の形態異常　(53)
Ⅰ-3-3-2　ノーザンハイブリダイゼーション　(53)
Ⅰ-3-3-3　RT-PCR サザンハイブリダイゼーション　(54)
Ⅰ-3-4　考察　(56)

第Ⅱ章　シラカンバの形質転換系の開発　(59)
Ⅱ-1　はじめに　(59)
Ⅱ-2　材料及び実験操作　(60)
Ⅱ-2-1　試料　(60)
Ⅱ-2-2　*Agrobacterium*　(60)
Ⅱ-2-3　形質転換　(59)

Ⅱ-2-4　形質転換体の GUS 活性分析　(61)
Ⅱ-2-5　形質転換体 DNA の単離と分析　(61)
Ⅱ-3　実験結果　(63)
Ⅱ-3-1　形質転換実験に用いる組織切片の検討　(63)
Ⅱ-3-2　カナマイシン耐性カルス誘導に対する
　　アセトシリンゴンの影響　(63)
Ⅱ-3-3　形質転換体の再生　(63)
Ⅱ-3-4　形質転換体の GUS 活性分析　(65)
Ⅱ-3-5　サザンハイブリダイゼーション　(65)
Ⅱ-2-2-3　考察　(67)

第Ⅲ章　ココノエギリの形質転換系の開発　(72)

Ⅲ-1　*Agrobacterium tumefaciens* による形質転換系の開発　(72)
Ⅲ-1-1　はじめに　(72)
Ⅲ-1-2　材料及び実験操作　(73)
Ⅲ-1-2-1　試料　(73)
Ⅲ-1-2-2　*Agrobacterium*　(73)
Ⅲ-1-2-3　形質転換　(73)
Ⅲ-1-2-4　形質転換体の組織化学的 GUS 活性分析　(74)
Ⅲ-1-3　実験結果　(75)
Ⅲ-1-3-1　形質転換実験に用いる組織切片の検討　(75)
Ⅲ-1-3-2　カナマイシン耐性カルス誘導に対する
　　アセトシリンゴンの影響　(75)
Ⅲ-1-3-3　カナマイシン耐性カルス誘導に対する
　　共存培地の炭素源の影響　(77)
Ⅲ-1-3-4　カナマイシン耐性カルス誘導に対する
　　共存培地の pH の影響　(77)
Ⅲ-1-3-5　カナマイシン耐性カルスの GUS 活性分析　(77)

Ⅲ-3-3-6　形質転換体の再生　(77)
Ⅲ-1-4　考察　(78)

Ⅲ-2　パーティクルガン法による形質転換系の開発　(83)
Ⅲ-2-1　はじめに　(83)
Ⅲ-2-2　材料及び実験操作　(84)
Ⅲ-2-2-1　試料　(84)
Ⅲ-2-2-2　プラスミド DNA　(84)
Ⅲ-2-2-3　装置　(84)
Ⅲ-2-2-4　金属粒子へのプラスミド DNA のコーティング　(84)
Ⅲ-2-2-5　ルシフェラーゼ活性の分析　(85)
Ⅲ-2-3　実験結果　(86)
Ⅲ-3-1　ルシフェラーゼの一過性発現　(86)
Ⅲ-2-4　考察　(88)

第Ⅳ章 クロマツ及びアカマツの形質転換系の開発　(91)
Ⅳ-1　はじめに　(91)
Ⅳ-2　材料及び試料　(92)
Ⅳ-2-1　試料　(92)
Ⅳ-2-2　プラスミド DNA　(92)
Ⅳ-2-3　装置　(92)
Ⅳ-2-4　金属粒子へのプラスミド DNA のコーティング　(92)
Ⅳ-2-5　組織科学的 GUS 検出　(92)
Ⅳ-3　実験結果　(93)
Ⅳ-3-1　クロマツ種子胚への *GUS* の導入　(93)
Ⅳ-3-2　クロマツ種子胚へのルシフェラーゼ遺伝子の導入　(95)
Ⅳ-3-3　アカマツ種子胚への *GUS* の導入　(96)
Ⅳ-3-4　アカマツ種子胚への *GUS* の導入　(98)
Ⅳ-4　考察　(99)

第Ⅴ章 スギの形質転換系の開発 (105)
Ⅴ-1 はじめに (105)
Ⅴ-2 材料及び試料 (106)
Ⅴ-2-1 試料 (106)
Ⅴ-2-2 プラスミド DNA (107)
Ⅴ-2-3 装置 (107)
Ⅴ-2-4 金属粒子へのプラスミド DNA のコーティング (107)
Ⅴ-2-5 組織化学的 GUS 検出 (107)
Ⅴ-2-6 ルシフェラーゼ活性の分析 (107)
Ⅴ-3 実験結果 (108)
Ⅴ-3-1 *GUS* の導入 (108)
Ⅴ-3-2 ルシフェラーゼ遺伝子の導入 (108)
Ⅴ-4 考察 (110)

総括 (112)

引用文献 (114)

謝辞 (122)

略語一覧

BAP	benzylaminopurine
CAT	chloramphenicol acetyltransferase
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
DTT	dithiothreitol
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
GR	glutathione reductase
GUS	ß-glucuronidase
NAA	α-naphthaleneacetic acid
IBA	3-indolebutyric acid
ipT	isopetenyl transferase
LB	Luria-Bertani
LUC	luciferase
MOPS	3'(*N*-morpholino) prophane sulphonic acid
MS	Murashige and Skoog
4-MU	4-methyl umbelliferone
4-MUG	4-methylumbelliferyl ß-D-glucuronide
NPT II	neomycin phosphotransferase II
PAL	L-phenylalanine ammonia-lyase
SDS	soduim dodecyl sulphate
SSC	saline-sodium citrate
WPM	woody plant medium
x-gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucronide

緒言

林木は永年性であり、生殖活動を開始するまでの期間が極めて長い。したがって、従来の育種技術により、人間が望む新たな品種を作出することは非常に困難である。林木の遺伝子操作技術は、親の望ましい形質の全てを保持させたまま、単一の形質のみを選択的に改変するための有効な手段といえる。私は平成７年度科学技術振興調整費重点基礎研究により、米国レキシントン市で開催された国際シンポジウム「Engineering Plants for Commercial Products and Application」に参加、発表の機会を与えられた[1)]。このシンポジウムで最も印象に残ったことは、遺伝子操作により米国モンサント社やカルジーン社（現在はモンサント社に買収）で開発された新品種が、安全性評価、特許申請、認可を経て既に商品化へ至っていることである。現在、米国ではエチレン生成を抑制し鮮度保持性を付与されたトマト（フレーバーセーバートマト）、除草剤（ラウンドアップ）抵抗性を付与されたダイズ、耐虫性が付与されたワタなどの遺伝子操作によって作られた新たな農作物が市場に出回っている。一方、林木を対象とする分野では、遺伝子導入も特定の樹種に限定されており、形質転換体の実用化は、農作物の世界に比べ非常に遅れている。

遺伝子導入法

現在、形質転換体を作出する際には、以下に紹介する３つの遺伝子導入法が主に用いられている。

１．Tiプラスミド法

土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* を用いた方法で、次のような特徴がある。

１）一般的には双子葉植物の形質転換に限定される。

２）材料として、植物切片等を用いることができ、プロトプラストを必要

としない。

3）20kb を超える長い DNA を、植物の染色体へ導入できる。

4）細胞あたりのコピー数が少ない。

2．パーティクルガン法

DNA をコーティングした金属粒子を音速以上に加速して植物細胞に打ち込み、細胞壁、細胞膜を貫通させて細胞内に導入することにより遺伝子導入する方法であり、次の特徴がある。

1）*Agrobacterium* を用いた形質転換が困難な単子葉植物、プロトプラスト培養の困難な植物の形質転換が可能である。

2）あらゆる植物組織に遺伝子導入が可能である。

3）葉緑体等のオルガネラゲノムへの遺伝子導入が可能である。

3．エレクトロポレーション法

プロトプラストに電気ショックを与え、細胞膜に穴を開けて遺伝子を導入する方法で、次のような特徴がある。

1）*Agrobacterium* を用いた形質転換が困難な単子葉植物に遺伝子導入が可能である。

2）プロトプラストからの安定した個体再生系が必要である。

3）形質転換細胞の薬剤選択効率が良い。

以上のように3つの手法にはそれぞれ、長所と短所を有している。しかし、現在までの形質転換体に関する報告を分析すると、通常、双子葉植物では Ti プラスミド法、単子葉植物ではパーティクルガン法を用いて遺伝子導入が行われている。

林木においても、ヤマナラシ属の種間雑種（*Populus alba*×*P. grandidentata*）で *A. tumefaciens* を介した形質転換体の作出に成功[3]して以来、他の広葉樹、あるいは針葉樹でも形質転換体の作出に関する報告がなされている。Table 1-1, 1-2 は、それらの現状をまとめたものである[2]。

Table 1 の中の形質転換体に付与された形質について、将来バイオテクノロジーとして直接応用される可能性が高いものを 4 つの項目に分けて以下に述べる。

第一に耐虫、耐病性と除草剤耐性についてである。耐虫性に関しては、*Bacillus thuringiensis* の胞子に含まれる鱗翅目昆虫の幼虫に殺虫効果を示す毒素（Bt トキシン）を生産する遺伝子の導入例[5,19,25,29]が大部分を占め、その中でいくつかは野外実験まで行い、形質転換体の耐虫性を確かめている[5,6]。また、植物には、昆虫の食害に対して、プロテアーゼインヒビターと呼ばれるタンパク質消化酵素の働きを阻害するタンパク質を合成し、昆虫の栄養摂取を妨害する能力がある。そのプロテアーゼインヒビター合成遺伝子（バレイショ由来）をヤマナラシ属の種間雑種（*Populus nigra*×*P. deltoides*）に導入、大量発現させ、野外実験を行った例[11]もある。耐病性に関しては、ウィルスコートタンパク質遺伝子、キチナーゼ、グルカナーゼ遺伝子等の導入が考えられるのだが、現在までのところ林木においての導入例は報告されていない。除草剤耐性遺伝子に関しては、広葉樹で 2 例[3,4]、針葉樹で 1 例[27]のみが報告されている。

第二にリグニン生合成の制御についてである。フェニルアラニン・アンモニアリアーゼ（PAL）やペルオキシダーゼ（POX）の反応過程をアンチセンス法（植物体で転写される mRNA の相補鎖がつくられるように遺伝子を林木

に導入し、植物体の mRNA の量を制御しようとする試み）により、リグニン含量をコントロールしようとする試みもある [8]。パルプ産業にとって、リグニン含量の少ない林木が作出されれば、脱リグニン工程に関わるコストを低減することが可能となる。

第三に大気汚染ガス耐性植物の作出についてである。これは、活性化酸素の解毒において重要な役割を担っているグルタチオンレダクターゼ（GR）遺伝子に着目したものである。林木では、大腸菌由来の GR 遺伝子をヤマナラシ属の種間雑種（*Populus sieboldii*×*P. grandisentata*）に導入し、高い GR 活性を持つ形質転換体の作出が報告されている [9]。林木は、通常でも大気汚染物質の吸収や解毒能力が高いが、GR 活性を高めた形質転換体は、現在問題となっている SO_2 や NO_x に十分な耐性を持った環境緑化林木としての利用が考えられる。

第四に形態形成を制御された林木についてである。形態形成に関与するホメオボックス遺伝子は、現在最も注目されている遺伝子の 1 つである。最近ではシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）由来の花芽形成に関わる遺伝子 *LEAFY* をヤマナラシ属の種間雑種（*Populus tremula*×*P. tremuloides*）に導入し、花芽形成までに要する期間を通常の 8 年からわずか 7 カ月に短縮された形質転換体の作出が Nature 誌に発表された [10]。

本研究では、最初にセイヨウハコヤナギにおいて、薬剤選択効率の良いエレクトロポレーション法を利用するための前段階として葉肉プロトプラストからの植物体の再生系の確立を目的として実験を行った。次に、簡易で形質転換効率の高い Ti プラスミド法によってセイヨウハコヤナギ、シラカンバ、ココノエギリの形質転換系を開発することを目的として実験を行った。そしてセイヨウハコヤナギでは、その形質転換系を利用してイネの形態形成に関

わる遺伝子 *OSH1* を導入し、林木におけるホメオボックス遺伝子の機能を解析した。また、ココノエギリではホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子を用いてパーティクルガン法による遺伝子導入を試みた。

クロマツ、アカマツ、スギでは、*GUS* 及びルシフェラーゼ遺伝子を用いてパーティクルガン法による遺伝子導入のための最適条件を検討した。

Table 1-1. Present status of transgenic broad-leaved trees

English name (scientific name)	method	new traits	literature
hybrid poplar (*Populus alba* × *P. grandidentata*)	Ti plasmid	herbicide resistance (glyphosate), kanamycin resistance	(3)
hybrid poplar (*Populus alba* × *P. tremula*, *Populus trichocarpa* × *P. deltoides*)	Ti plasmid	herbicide resistance (phosphinotricin), kanamycin resistance	(4)
hybrid poplar (*Populus alba* × *P. grandidentata*, *Populus nigra* × *P. trichocarpa*)	partide bombardment	pest resistance (*Malacosoma disstria*, *Lymantria dispar*), *GUS*, kanamycin resistance	(5)
hybrid poplar (*Populus alba* × *P. grandidentata*)	Ti plasmid	CAT resistance, kanamycin resistance	(6)
hybrid poplar (*Populus alba* × *P. tremula*)	Ti plasmid	*ipT* (cytokinin synthesis), kanamycin resistance	(7)
hybrid poplar (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*)	Ti plasmid	*PAL*, kanamycin resistance	(8)
hybrid poplar (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*)	Ti plasmid	*GR* (air pollution resistance), kanamycin resistance	(9)
hybrid poplar (*Populus tremula* × *P. tremuloides*)	Ti plasmid	early flowering, kanamycin resistance	(10)
hybrid poplar (*Populus nigra* × *P. deltoides*)	Ti plasmid	pest resistance (*Chrysomela scripta*), kanamycin resistance	(11)

hybrid poplar (*Populus tremula* × *P. tremuloides*)	Ti plasmid	red xylem, enhanced lignin synthesis	(12)
hybrid poplar (*Populus tremula* × *P. alba*)	Ti plasmid	auxin synthesis, kanamycin resistance	(13)
black poplar (*Populus nigra*)	Ti plasmid	*GUS*, kanamycin resistance	(14)
lombardy poplar (*Populus nigra* L. var. *italica*)	Ti plasmid	morphological change, *GUS*, kanamycin resistance	(15)(16)
aspen (*Populus tremula*)	Ti plasmid	*GUS*, kanamycin resistance	(17)
yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*)	partide bombardment	*GUS*, kanamycin resistance	(18)
sweet gum (*Liquidambar styraciflua*)	Ti plasmid	*GUS*, kanamycin resistance	(19)
black locust (*Robinia pseudoacacia*)	Ri plasmid	kanamycin resistance	(20)
Japanese white birch (*Betula platyphylla* var.*japonica*)	Ti plasmid	*GUS*, kanamycin resistance	(21)
Chinese paulownia (*Paulownia fortunei*)	Ti plasmid	*GUS*, kanamycin resistance	(22)
hybrid eucalyptus (*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*)	Ti plasmid	nopaline synthesis	(23)
longbeak eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*)	Ti plasmid	*GUS*, kanamycin resistance	(24)

Table 1-2. Present status of transgenic conifers

English name (scientific name)	method	new traits	literature
white spruce (*Picea glauca*)	partide bombardment	pest resistance	(25)
black spruce (*Picea mariana*)	partide bombardment	*GUS*, kanamycin resistance	(26)
European larch (*Larix decidua*)	partide bombardment	pest resistance (*Lymantria dispar*) herbicide resistance (glyphosate)	(27)
American larch (*Larix laricina*)	partide bombardment	*GUS*, kanamycin resistance	(28)
hybrid larch (*Larix kaempferi* × *L. decidua*)	Ti plasmid	kanamycin resistance	(29)
Jerusalem pine (*Pinus halepesis*)	Ri plasmid	*GUS*, adventitious roots	(30)

第Ⅰ章　セイヨウハコヤナギの形質転換系の開発

Ⅰ-1　葉肉プロトプラストからの再生系の確立

Ⅰ-1-1　はじめに

植物のプロトプラストを培養すると、細胞壁を再生し、コロニー、カルスを経て葉や根などの器官に分化し、1 個の植物体となる。これは動物細胞にはない植物細胞に特有の現象であり、全形性能と呼ばれている。この全形性能を利用して、プロトプラストに電気ショックを与え、細胞膜に穴を開けて遺伝子を導入する手法がエレクトロポレーション法である。しかしながら、木本植物において、プロトプラストから植物体の再生に成功したという報告は草本植物に比べ少なく、また、その属も限られている。その内の 1 つがヤマナラシ属（*Populus*）であり、1986 年に Russell らによってヤマナラシ属の種間雑種（*P. alba*×*P. grandidentata*）で初めて成功している[32]。それ以後、ヤマナラシ属では、ギンドロ（*P. alba*）、ヤマナラシ（*P. sieboldii*）、クロヤマナラシ（*P. nigra*）で成功例が報告されている[33]。

本章では、ヤマナラシ属のセイヨウハコヤナギにおいて、薬剤選択効率の良いエレクトロポレーション法を利用するための前段階として葉肉プロトプラストからの植物体の再生系確立を目的として実験を行った。

Ⅰ-1-2　材料及び実験操作

Ⅰ-1-2-1　試料

試料は、セイヨウハコヤナギ（英名；lombardy polar、学名；*Populus nigra* L. var. *itarica*）の剥皮枝条[34,35]から直接誘導した不定芽を 0.19 mg/l NAA を添加した MS[36]寒天培地に 2000 lux 蛍光灯下、日長 16 時間、28℃の培養条件で、継代培養して得られた幼植物体の葉肉組織を用いた[33]。

なお、以下のプロトプラスト、カルス、再生個体の培養は全て 28℃で行った。

Ⅰ-1-2-2　プロトプラストの調製法

Ⅰ-1-2-2-1　酵素処理溶液組成

酵素処理溶液の組成は次の通りである

酵素処理溶液の組成	
セルラーゼオノズカ RS	1.0%
ペクトリアーゼ Y-23	0.25%
D-マンニトール	0.6 M

pH　5.6　（1N 水酸化カリウムで調整）

Ⅰ-1-2-2-2　葉肉組織からのプロトプラスト調製

試料は、幼植物体が光合成を行い、デンプンを蓄積しているとプロトプラストの収量が減少するため、プロトプラスト単離の前に 24 時間暗黒下で培養した[33]。

幼植物体の葉をカミソリで約 2 mm 角に切り刻み、0.6 M マンニトール溶液で洗浄した。葉片はただちに、酵素溶液の入った三角フラスコに入れ、暗黒下で、30℃に保ったウォーターバス中で 70 回／分の往復振とうにより酵素処理した。処理時間は 1、2、3、6 時間の 4 条件を設定し、各条件で得られる

プロトプラストの収量及び活性を求めた。

酵素処理後、プロトプラスト溶液は40 μmナイロンメッシュで濾過し、ネジ付き遠心管（10ml 容）に分注し、遠心分離（1200rpm、3 分間）を行った。遠心分離終了後、以下の 2 通りの方法でプロトプラストを精製し、その収量及び活性を測定した。

Ⅰ-1-2-2-3　密度勾配法を用いた精製の評価

まず、密度勾配を用いないプロトプラスト精製法の手順としては、1 回の遠心分離終了後に上清を除き、新たに洗浄液として、0.6M マンニトール溶液を加え、懸濁後、1200rpm で 3 分間遠心分離した。この操作をその後もう一度繰り返し、さらに 0.6M マンニトール溶液の代わりにホルモン無添加の MS 液体培地で同様にして遠心分離を 2 回繰り返した。

また、密度勾配を用いたプロトプラスト精製の方法としては、1 回の遠心分離終了後に上清を除き、サッカロース－デキストラン溶液（0.6M サッカロース、8% デキストラン T-40、5.3mM $CaCl_2$）6ml を新たに加え懸濁した。その溶液の上に、0.6M マンニトール溶液 1.5ml を静かに加えて 2 層をつくり、3600rpm で 10 分間遠心分離した。遠心分離終了後、2 層の境界に集まったプロトプラストをパスツールピペットで別の遠心管に移し、0.6M マンニトール溶液を加え懸濁し、1200rpm で 5 分間遠心分離した。遠心分離終了後、さらに 0.6M マンニトール溶液の代わりにホルモン無添加の MS 液体培地で遠心分離（1200rpm 、3 分間）を 2 回繰り返した。

なお、プロトプラスト収量は血球計算盤を用いて測定した。

Ⅰ-1-2-2-4　プロトプラストの活性測定

プロトプラストの活性はエバンスブルー（Evans blue）を用い、以下のように測定した[38)]。

全ての遠心分離操作が終了後、プロトプラスト懸濁液と等量のエバンスブ

ルー溶液（2.5% Evans blue、0.6M マンニトール）を混合後、その内の１部をピペットで取りスライドグラスの上に滴下し、光学顕微鏡を用いてプロトプラストの活性を調べた。なお、無傷で活性のあるプロトプラストは染色されないが、原形質膜の破損したプロトプラストには染色液が浸透するため濃青色に染まる。

Ⅰ-1-2-3　プロトプラストの液体培養

Ⅰ-1-2-3-1　培地組成

液体培地は基本培地として WPM[39] を用い、浸透圧調整物質として 0.6M マンニトールを添加した。

Ⅰ-1-2-3-2　アンモニウムイオンの影響

WPM に含まれるアンモニウムイオン（硝酸アンモニウムとして添加）はプロトプラスト培養において、プロトプラストを膨張させ正常な細胞分裂を阻害するという報告[39]があるため、その影響を調べた。

なお、培地から硝酸アンモニウムを除いた場合、培地中の窒素源の維持のため硝酸カルシウムの量を 2 倍にした。また、その培地を以後、改変 WPM とした。

Ⅰ-1-2-3-3　ホルモンおよびビタミン

基本培地には、NAA および BAP を A、B、C、D の組合せで加え、細胞分裂及びコロニー形成に対する最適条件を検討した。

	NAA (mg/l)	BAP (mg/l)
A	0.19	0.23
B	0.19	0.02
C	0.02	0.23
D	0.02	0.02

また、基本培地に含まれる以外のビタミンとして、葉酸（0.5 mg/l）及びビオチン（0.5 mg/l）の効果についても調べた。

Ⅰ-1-2-3-4　培養器

培養器としては、24 穴プラスチックシャーレ（1 培養孔容積 2.3ml）及び 3cm プラスチックシャーレ（容積 30ml）を用いた。

Ⅰ-1-2-3-5　培養液の量

培養器中の培養液について、その最適量を調べた。液量はそれぞれ、24 穴プラスチックシャーレの場合、0.5ml、1.0ml、2.0ml、3cm プラスチックシャーレの場合、2.0ml、3.0ml、4.0ml とした。

Ⅰ-1-2-3-6　培地交換

細胞の分裂を促進するためには、浸透圧調整物質の濃度を下げながら培地交換をする必要があるという報告[39]を参考に、次のように培地交換を行った。

浸透圧調整物質（本実験の場合はマンニトール）の量を前培地と比較して 0.1M づつ減らした同組成の培地で、10 日ごと、20 日ごと、30 日ごとに培地交換し、最適期間を調べた。

Ⅰ-1-2-4　プロトプラスト由来カルスの増殖

液体培地で得られた小カルスをさらに増殖させるための培地組成を検討した。また、培養の際の光条件も検討し、液体培地由来カルスの増殖における最適条件を調べた。

Ⅰ-1-2-4-1　培地

基本培地として WPM と改変 WPM を用い、0.8% 寒天を添加した。また、培養器としては、すべて 9cm プラスチックシャーレを用いた。

培地に添加したホルモンの組合せは次の通りである。

E	0.19 mg/l NAA ＋ 0.02 mg/l BAP
F	0.19 mg/l NAA ＋ 0.11 mg/l BAP＋ 0.11 mg/l 2,4-D
G	0.22 mg/l 2,4-D

Ⅰ-1-2-4-2　光条件

次のように光条件を設定し、カルス増殖における最適照度を調べた。

暗黒下

1000 lux（16 時間日長蛍光灯下）

1500 lux（16 時間日長蛍光灯下）

2000 lux（16 時間日長蛍光灯下）

Ⅰ-1-2-5　プロトプラスト由来カルスからの不定芽の分化

寒天培地で十分に増殖したカルスは、不定芽を誘導するための分化培地に移植した。その際に、プロトプラスト由来カルスの不定芽分化に最適な培地組成を検討したので以下に述べる。

基本培地としては、WPM もしくは MS 培地を用い、0.8% 寒天を添加した。

培地に添加したホルモンは次の通りである。

H	0.02 mg/l NAA ＋ 1.13 mg/l BAP ＋ 1.1 mg/l zeatin
I	0.02 mg/l NAA ＋ 0.11 mg/l BAP ＋ 1.1 mg/l zeatin
J	1.13 mg/l BAP ＋ 0.11 mg/l zeatin
K	0.11 mg/l BAP ＋ 1.1 mg/l zeatin

なお、培養は 2000 lux 蛍光灯下、16 時間日長で行った。

Ⅰ-1-3　実験結果

Ⅰ-1-3-1　プロトプラストの調製

セイヨウハコヤナギ葉肉プロトプラストは、20 から 40 μm の大きさに分布していた（Figure 1）。

Ⅰ-1-3-1-1　酵素処理時間

酵素処理時間に対するプロトプラスト収量及びその活性を Table 2 に示す。なお、プロトプラスト収量は密度勾配法による精製を行わず、1 回の遠心分離が終了後のプロトプラスト数とした。

Table 2 に示すようにプロトプラスト収量及びそのうち活性を有すると判断されたプロトプラスト収量は、酵素処理時間が長くなるほどその値は増加する。しかしながら、収量と活性を考慮すると、3 時間処理のプロトプラストは活性も比較的高く、実験に十分な収量が得られることから、以後の実験での酵素処理は 3 時間で行った。

Table 2. Effect of incubation time in enzyme solution on protoplast yield and viability.

incubation time	protoplast yield / g leaf segment*	protoplast viability	viable protoplast yield / g leaf segment*
1h	8.0×10^4	75%	6.0×10^4
2h	6.0×10^5	70%	4.2×10^5
3h	2.0×10^6	70%	1.4×10^6
6h	4.0×10^6	60%	2.4×10^6

*fresh weight

Ⅰ-1-3-1-2　密度勾配法による精製

密度勾配法によるプロトプラストの収量（試料とした葉の生重量 1g 当たり）とそのうち活性を有するプロトプラスト数についての結果を以下に示す。

	プロトプラスト収量	プロトプラスト活性	活性を有するプロトプラスト
精製前	2.0×10^6/g	70%	1.4×10^6/g
密度勾配法による精製	1.8×10^6/g	95%	1.7×10^6/g

上の結果より、サッカロース―デキストラン２層密度勾配法は活性を持ったプロトプラストの精製に適していると判断され、以後の操作はこの勾配法を用いて精製を行った。

Ⅰ-1-3-2　プロトプラストの液体培養

Ⅰ-1-3-2-1　アンモニウムイオンの影響

アンモニウムイオンのプロトプラスト培養に及ぼす影響については、培地中にアンモニウムイオンが含まれるとプロトプラストはいずれのホルモン条件においても約１週間で膨張を開始し、培養開始直後のプロトプラストと比較すると直径が最も大きいものは約４倍に達した。しかし、それらのプロトプラストは1、2度の分裂を起こし、2細胞あるいは4細胞を形成したが、その後は分裂を起こさず、褐色化し死滅した。他方、アンモニウムイオンを含有しない改変 WPM で培養したプロトプラストは、膨張は僅かしか認められず、盛んに分裂し（Figure 2）、ホルモン条件によっては、やがてコロニーを形成するに至った（Figure 3）。

以上の結果から培地中にアンモニウムイオンを添加するのはプロトプラスト培養において好ましくないことが明らかになった。よって、以後の実験では培地にアンモニウムイオンを含まない改変 WPM を用いた。

Ⅰ-1-3-2-2　ホルモンの影響

ホルモンの組合せによる影響は、いずれのホルモン条件でも培地にアンモニウムイオンが含まれていなければ、盛んに分裂を起こした（Figure 2）。しかし、コロニーを形成したものは（Figure 3）、0.19 mg/l NAA ＋ 0.02 mg/l BAP の組合せのみであった。したがって、このホルモン条件を最適ホルモン条件として以後の実験で用いた。

Ⅰ-1-3-2-3 ビタミン添加の影響

プロトプラスト培養において、分裂を促進すると報告[39]のあるビオチン及び葉酸の効果については、培地中へビオチン、葉酸を添加すると、明らかに、プロトプラストの分裂開始を１から２日早めた。よって、以後のプロトプラスト液体培養には、これら両者を培地に添加することにした。

Ⅰ-1-3-2-4　培養液の量の影響

培養器中の液量がプロトプラスト培養に及ぼす影響について以後に述べる。まず、24 穴プラスチックシャーレを用いた場合、液量が 0.5ml（培養孔容積の 21%）、または 1.0ml（培養孔容積の 43%）では、プロトプラストは、互いに接着して大きな塊を形成し、以後、1 度も分裂することなく死滅した。液量を 2.0ml（培養孔容積の 87%）とした場合は、プロトプラストは接着することもなく正常に分裂した。また、3 cm 直径プラスチックシャーレを用いた場合は全て接着が生じ、プロトプラストは分裂しなかった。

以上の結果から、培養器に 24 穴プラスチックシャーレを用い、その培養孔に 2.0ml の培地を分注する条件を以後の実験では用いた。

Ⅰ-1-3-2-5 培地交換の影響

培地の交換についての結果を以下に述べる。まず、培地を 10 日ごとに交換した場合、細胞は盛んに分裂を起こし 30 日後にはコロニー（直径約 100μm～500μm）を形成し（Figure 3）、さらに 15 日後にはコロニー状小カルス（直径約 500μm～1mm）形成に至った（Figure 4-A）。20 日ごとに交換した場合は、細胞は分裂を起こしコロニーを形成するに至ったが、コロニー形成時期が培養約 45 日目であり、形成率も低かった。30 日ごと交換の場合は細胞分裂は起こしたがコロニー形成には至らなかった。

よって、培地交換は 10 日ごとに行うのが最適と判断した。

Ⅰ-1-3-2-5　最適条件

以上、プロトプラストを培養し、コロニー状小カルスを誘導する最適条件としては、以下に述べる通りである。

＊培地にはアンモニウムイオンを含有しない改変 WPM を用いる。

＊培地に添加するホルモンとして 0.19 mg/l NAA + 0.02 mg/l BAP の組合せを用いる。

＊培地には、細胞分裂促進物質としてビオチン及び葉酸を添加する。

＊培養器には 24 穴プラスチックシャーレを用い、1 培養孔あたりの培養液量は 2.0ml とする。

＊培地交換は、10 日ごとに行う。

Ⅰ-1-3-3　プロトプラスト由来カルスの増殖

用いた培養 24 条件（基本培地 2 条件×ホルモン 3 条件×照度 4 条件）の結果については、Table 3 に示す。

Table 3 は、培養 24 条件について、培地移植後 1 カ月後のカルスの縦（無作為に選んだ水平方向）、横（前述に対して 90 度の水平方向）、鉛直方向の平均直径について調べたものである。結果は、培地でみると明らかに WPM にホルモン条件 G つまり、0.22 mg/l 2,4-D を加えた場合に、最もカルスの直径が増加したことが分かる（Figure 4-B, C）。また、照度については、1000 lux 蛍光灯下で培養した場合に、最もカルスの直径が増加した。

なお、改変 WPM を用いた場合は、暗黒下に限り、ホルモン条件 E、つまり 0.19 mg/l NAA＋0.02 mg/l BAP 加えた場合、良好なカルス成長の促進が観察された（Figure 4-D）。ここで注目すべきことは、Table 3 における条件の内、WPM＋ホルモン E のうち、1000、1500、2000 lux で培養したコロニー状小カルスは、さらに 2 週間の培養後、つまり寒天培地に移植してから 6 週間後に不定芽の分化が観察された。しかし、それらの不定芽は茎の伸長がみられず、その後、同組成の培地あるいは発根培地（MS 培地＋0.02 mg/l NAA）に移植したがいずれも茎の伸長は観察されず、やがて褐色化し死滅してしまった。

Table 3. Effect of intensity of light, combination of media and hormones on proliferating microcallus derived from leaf protoplast
(30days after being transferred to agar medium)

	WPM+E	m-WPM+E	WPM+F	m-WPM+F	WPM+G	m-WPM+G
dark	+	++++	+	+	+++	+
1000 lux	++	+++	++	+	+++++	+
1500 lux	+	++	++	+	++++	+
2000 lux	+	++	++	+	++++	+

E 0.19 mg/l NAA + 0.02 mg/l BAP

F 0.19 mg/l NAA + 0.11 mg/l BAP+ 0.11 mg/l 2,4-D

G 0.22 mg/l 2,4-D

+ = ～3 (mm)*

++ = 3～6

+++ = 6～9

++++ = 9～12

+++++ = 12～

m-WPM; modified woody plant medium

*Size of callus was identified by height and two perpendicular diameters.

Ⅰ-1-3-3-1　最適条件

プロトプラスト由来小カルスを寒天培地で増殖させた場合の最適条件は、基本培地としてWPMを用いそれに0.22 mg/l 2,4-D及び0.8% 寒天を添加し、1000 lux蛍光灯下、16時間日長で培養することであった。

Ⅰ-1-3-4　プロトプラスト由来カルスからの不定芽分化

不定芽分化には、実際には前記のカルス増殖条件の内、WPM＋ホルモン条件Gつまり、0.22 mg/l 2,4-Dで1000 lux蛍光灯下で培養したカルス（以後条件αとする）と、改変WPM＋ホルモン条件Eつまり、0.19 mg/l NAA＋0.02 mg/l BAP で暗黒下で培養したカルス（以後条件βとする）を用いた。なお、いずれの場合も、不定芽分化培地に移植した時期は、カルス増殖培地移植1カ月後である。

結果をTable 4に示す。基本培地としてはWPMに比べMS培地を用いた方が不定芽の分化も早く、その後の成長も良かった。

ホルモン条件としては、J及びKで良い結果が得られた。

用いたカルスの前培養条件としては明らかにαの方がβよりも良い結果が得られた。

Ⅰ-1-3-4-1　最適条件

今回の実験の範囲内でプロトプラスト由来カルスから不定芽誘導を導く最適件は、Table 4の結果及びその後の不定芽の成長から考えて、MS培地にホルモンとして0.02 mg/l NAA＋0.11 mg/l BAP＋1.1 mg/l zeatin、または0.11 mg/l BAP＋1.1 mg/l zeatinを加えたものを用いることであった。

なお、本実験で得られた不定芽は発根能を有し、活発に成長した（Figure 5）。

Table 4. Effect of combinations of media and hormones on the period of differentiating shoots from callus derived from leaf protoplasts

	I (MS, α)	II (MS, β)	III (WPM, α)	IV (WPM, β)
H	25 days	—	—	—
I	23 days	43 days	—	—
J	16 days	31 days	25 days	—
K	14 days	25 days	30 days	—

I ; Callus cultured under the condition of α, and transferred to MS medium.
II ; Callus cultured under the condition of β, and transferred to MS medium.
III ; Callus cultured under the condition of α, and transferred to WPM medium.
IV ; Callus cultured under the condition of β, and transferred to WPM medium.
α ; Callus cultured on WPM with 0.22 mg/l 2,4-D under an illumination of 1000 lux.
β ; Callus cultured on modified WPM with 0.19 mg/l NAA + 0.23 mg/l BAP in the dark.
H～K ; combinations of hormones added to agar medium to differentiate shoots.
H ; 0.02 mg/l NAA + 1.1 mg/l BAP + 0.11 mg/l zeatin
I ; 1.1 mg/l BAP + 0.11 mg/l zeatin
J ; 0.02 mg/l NAA + 0.11 mg/l BAP + 1.1 mg/l zeatin
K ; 0.11 mg/l BAP + 1.1 mg/l zeatin
— ; No shoots differentiated.

Ⅰ-1-4　考察

プロトプラスト単離においては酵素処理時間が長くなるにつれてプロトプラスト収量が増加したにもかかわらず活性を持ったプロトプラストの全体にしめる割合は減少した。これは、酵素処理が長時間に及ぶと、初期に単離されたプロトプラストに細胞膜の損傷が起こり活性を失ったためと考えられる。

プロトプラストの液体培養では、培養器に満たす液量が少ないと培養初期において、プロトプラスト同士の接着が起こり、培養が不可能となった。これは、おそらく改変 WPM 培地中に含まれるカルシウムイオン（今回用いた 3 種類の基本培地中に含まれるカルシウムイオンは、改変 WPM で 5.35M に対して WPM では 3.0M、MS 培地では 2.98M であった。）によりプロトプラストの膜電位が低下し、少ない液量では培養器がまわりからの振動の影響を受けやすいために培地中のプロトプラストが不安定になり、お互いに接着したものと推察される。

プロトプラストの液体培養でアンモニウムイオン（硝酸アンモニウム由来）が含まれる WPM を基本培地として用いると、プロトプラストからコロニーが形成されなかった。他方、硝酸アンモニウムを除き硝酸カルシウムの量を 2 倍にした改変 WPM を基本培地に用いるとプロトプラストは盛んに細胞分裂を継続し、コロニーを形成した。よって、プロトプラストの段階の窒素源としては、アンモニウムイオンよりも硝酸イオンが適してることが示された。培地交換は 10 日ごとに行うことが、プロトプラスト培養においては不可欠であった。これは、活発な細胞分裂を起こさせるためには、周りの培地の浸透圧を下げて細胞の膨圧を高めることが必要であると考えられる。また、細胞自身が培地中に放出する代謝物が、細胞自身に影響を与えていると考えると、培地交換によりその影響を少なくした可能性もある。

プロトプラスト由来カルスの増殖では、培養する際の照度は 1000 lux が最適であった。これは、それまでの液体培養が暗黒下で行われていたために、ただちに強光下で培養するよりも、順化という面からも弱光で培養する方が

良いと思われる。また、用いた基本培地 WPM と改変 WPM との比較では WPM を用いた方が好結果を得られたのだが、改変 WPM にホルモン E つまり、0.19 mg/l NAA＋0.02 mg/l BAP を添加した場合にのみ、改変 WPM を用いても比較的良好なカルス増殖が観察された。これは、それまでの液体培養条件が同じ暗黒下、改変 WPM 培地＋0.19 mg/l NAA＋0.02 mg/l BAP で行われていたことに関係があると推測される。

プロトプラスト由来カルスからの不定芽分化においては、用いたカルスの前培養条件は、α（WPM＋ホルモン条件 G、0.22 mg/l 2,4-D で 1000 lux 蛍光灯下で培養）が、β（改変 WPM＋ホルモン条件 F、0.19 mg/l NAA＋0.02 mg/l BAP で暗黒下で培養）の条件よりも不定芽の分化が早く、その後の成長も良好であった。この原因としては、αは 1000 lux 蛍光灯下、βは暗黒下で培養により、葉緑体のクロロフィルの再生度の違いが考えられる。つまり、分化培地に移植した時点でβはほとんど透明なカルスであることからも葉緑体は未発達の状態であり、生合成されるまでの期間が影響していることが推察される。

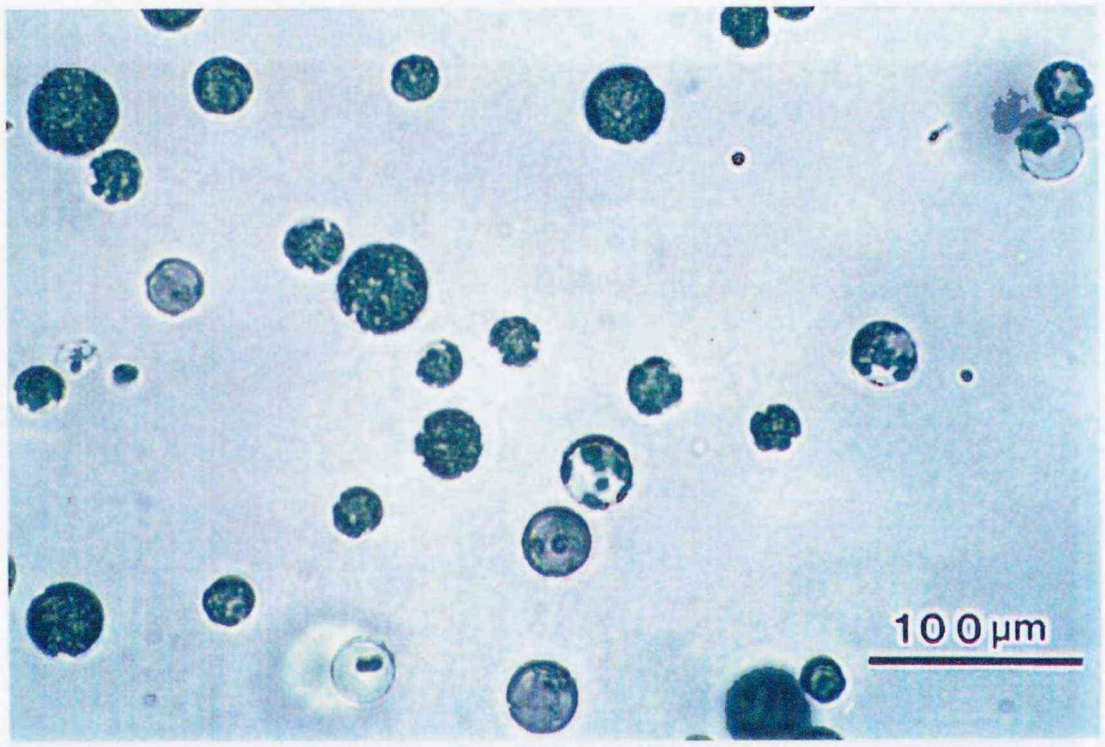


Figure 1. Freshly isolated mesophyll protoplasts from sterile plantlet of lombardy poplar.

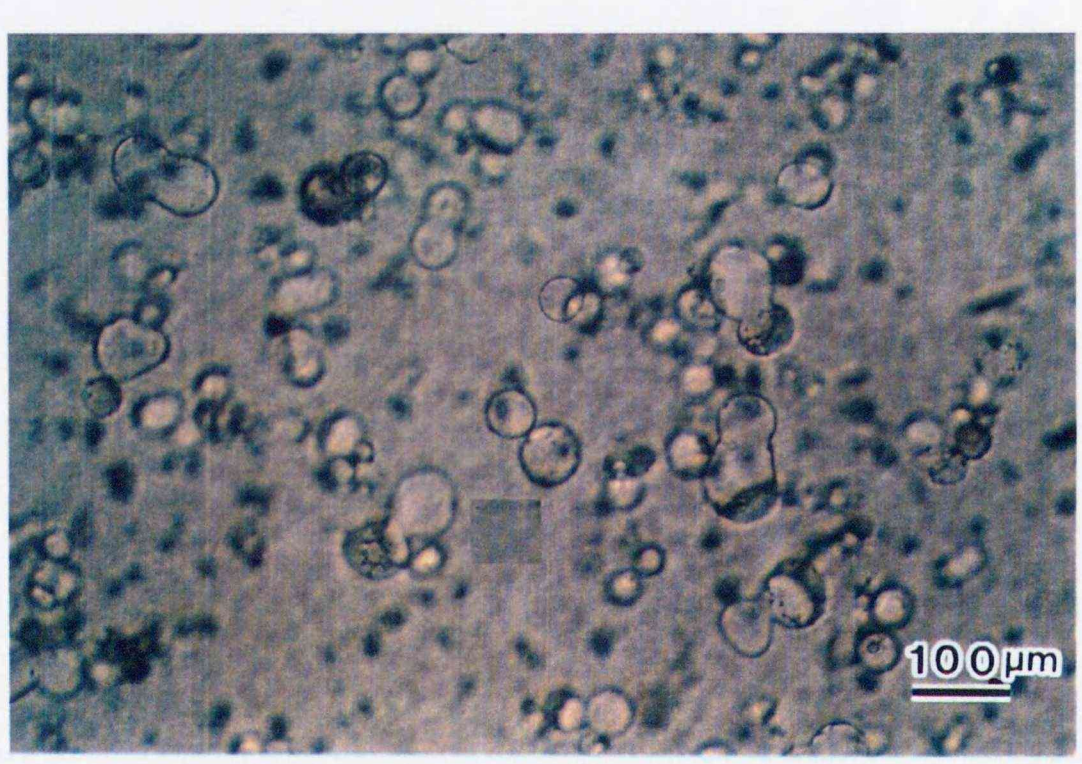


Figure 2. First division of cell derived from leaf protoplasts after 7 days culture.

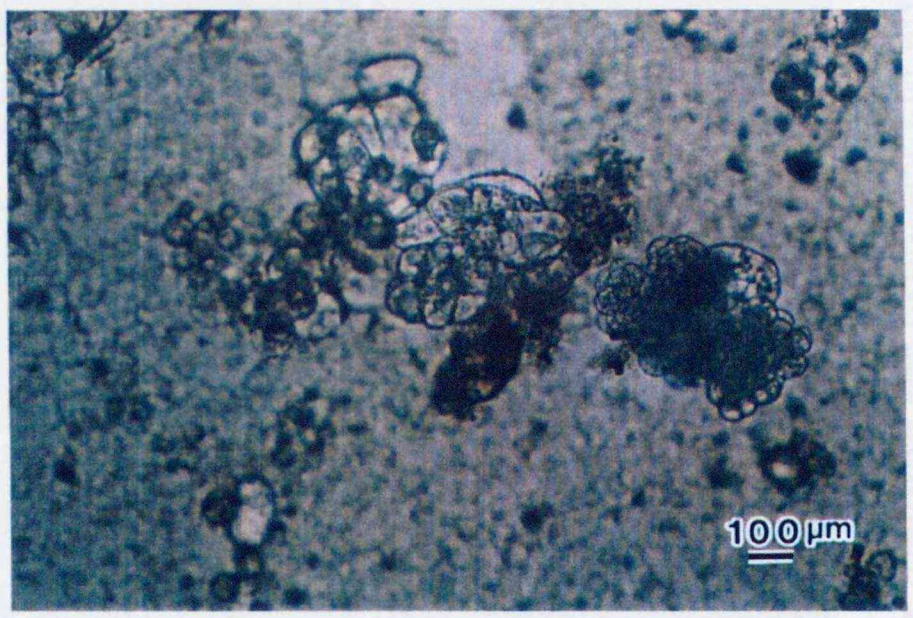


Figure 3. Colony fromation of protoplasts after 30 days culture.

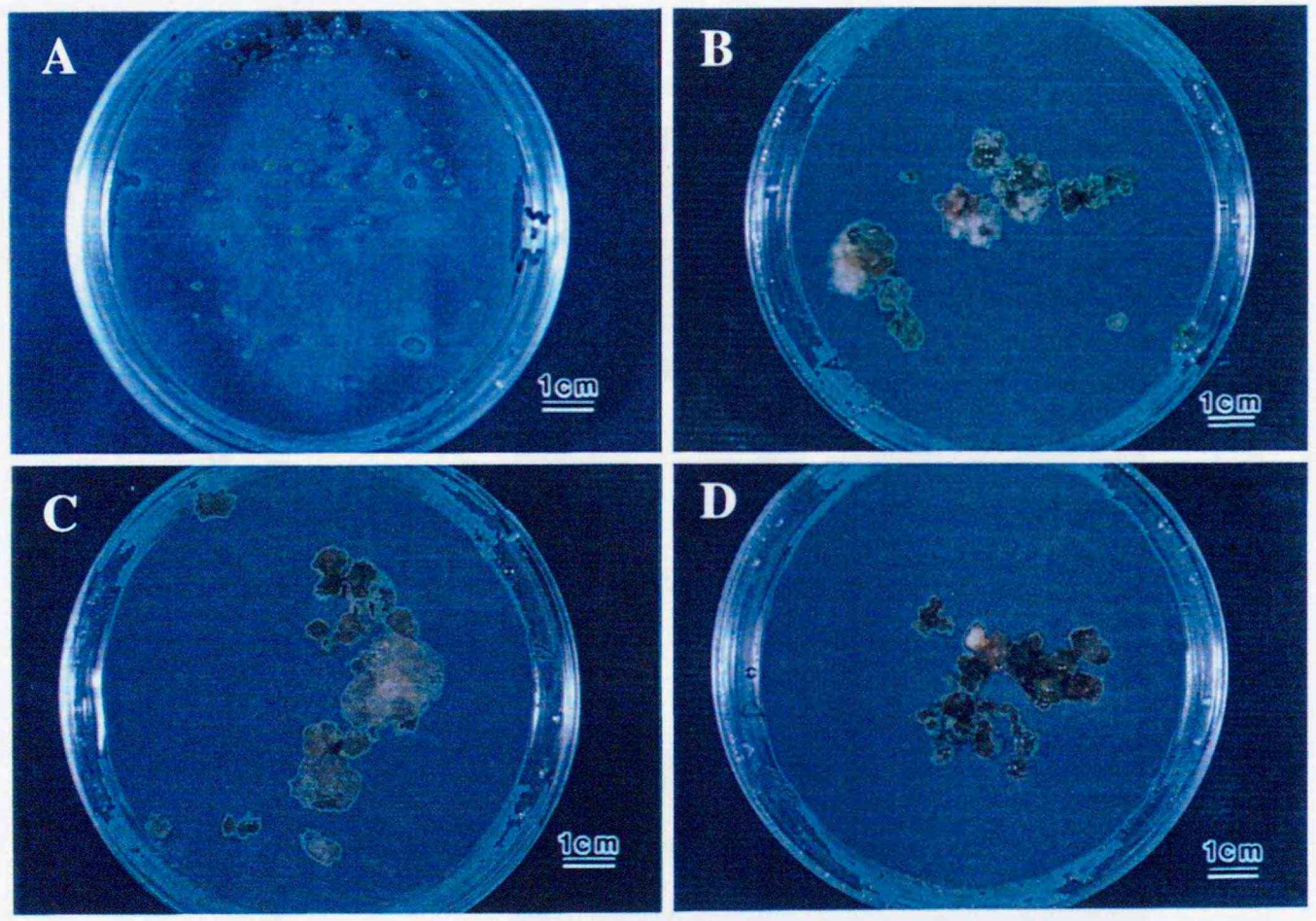


Figure 4. A; Microcalli transferred to agar medium for proliferation after 45 days culture.
B; Proliferation of calli on WPM with 0.22 mg/l 2,4-D under an illumination of 2000 lux.
C; Proliferation of calli on WPM with 0.22 mg/l 2,4-D under an illumination of 1000 lux.
D; Proliferation of calli on modified WPM with 0.19 mg/l NAA and 0.02 mg/l BAP in the dark.



Figure 5. Rooted plantlet derived from leaf protoplast on MS medium with 0.02 mg/l NAA.

Ⅰ-2　*Agrobacterium tumefaciens* による形質転換系の開発

Ⅰ-2-1　はじめに

土壌細菌である *Agrobacterium tumefaciens* が植物に感染すると、クラウンゴールと呼ばれる腫瘍を形成する。このクラウンゴール形成過程の分子機構の解明により、T-DNA の植物細胞への転移と組み込みに必要な *A. tumefaciens* の遺伝情報は、T-DNA の両端の境界配列（LB、RB）と Ti プラスミド上の *vir*（virulence）領域及び *A. tumefaciens* の染色体上の *chv* 領域の 3 つであることが明らかとなった。そして、この境界配列間に外来遺伝子を挿入し、*vir*、*chv*（chromosome virulence）遺伝子を持つ *A. tumefaciens* に導入し、植物に感染させることにより、目的の外来遺伝子を植物染色体に組み込むことが可能となった。この手法を利用して木本植物でも、*A. tumefaciens* による形質転換体の作出がいくつかの樹種で成功している（Table 1-1, 1-2）。

ヤマナラシ属の樹種は、成長が速く、ゲノムサイズも小さく、組織培養が容易であるので、林木における分子生物学を研究する上でのモデル植物として重要である。また、それらの材はパルプ材、マッチ軸木としての供給量が多く、樹木は街路樹や防風林として広く植えられている。そして、ヤマナラシ属で最も一般的に植えられている樹種の 1 つがセイヨウハコヤナギである。

本章では、 *A. tumefaciens* を用いて再現性が高く、効率の良いセイヨウハコヤナギ形質転換系を開発することを目的として実験を行った。

Ⅰ-2-2　材料及び実験方法

Ⅰ-2-2-1　試料

試料は、セイヨウハコヤナギの剥皮枝条から直接誘導した不定芽[32]を 0.5 mg/l IBA を添加した MSB5S（MS 無機塩に B5[40]ビタミン類及び 30 g/l サッカロースを加えた。）寒天培地上において 3000 lux 蛍光灯下、日長 16 時間、25℃の培養条件で、継代培養して得られた幼植物体を用いた。

Ⅰ-2-2-2　*Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 株[41]（CLONTECH 社製 GUS GENE FUSION SYSTEM）に、*GUS* と *NPT II* を含んだバイナリーベクターpBI121 を BIO RAD 社製 Gene Pulser™のマニュアルに従って、エレクトロポレーション法により導入したものを用いた。

A. tumefaciens は 25 mg/l カナマイシンと 300 mg/l ストレプトマイシンを含んだ LB 液体培地[43]を用い、28℃で 18 時間培養した。*Agrobacterium* 培養液は 5×10^8 cells/ml になるように MS 液体培地で希釈し、形質転換実験に用いた。

Ⅰ-2-2-3　形質転換

セイヨウハコヤナギ幼植物体の葉（1 cm 角）、葉柄（1 cm 長）、茎（1 cm 長）、根（1 cm 長）をそれぞれ切片とし、希釈した *Agrobacterium* 懸濁液で 30 分間培養した[43]。

次に、それらの植物体切片は滅菌済み濾紙上で、余分な *Agrobacterium* 懸濁液を除いてから 200μM アセトシリンゴンを添加あるいは無添加の 0.3% ゲルライトを含んだ MSB5S 培地上で 2 日間培養した。

その後、植物体切片を MSB5S 液体培地で 1 回、500 mg/l セフォタキシムを含んだ MSB5S 液体培地で 3 回洗浄した。

洗浄後、植物体切片を選択カルス誘導培地（150 mg/l カナマイシン、500 mg/l

セフォタキシム、500 mg/l カルベニシリン、0.5 mg/l 2,4-D 及び 0.25% ゲルライトを含んだ MSB5S 培地）に移植した。

前記培地上にて誘導されたカナマイシン耐性カルスを、植物体切片から切り離し、選択シュート誘導培地（150 mg/l カナマイシン、500 mg/l セフォタキシム、500 mg/l カルベニシリン、2 mg/l zeatin、0.2 mg/l BAP 及び 0.3% ゲルライトを含んだ MSB5S 培地）に移植した。

誘導されたシュートは、カナマイシン耐性カルスから切り離し、選択発根培地（150 mg/l カナマイシン、500 mg/l カルベニシリン、0.5 mg/l IBA、0.02 mg/l NAA 及び 0.8% 寒天を含んだ MSB5S 培地）に移植した。

Ⅰ-2-2-4　形質転換体の GUS 活性分析

Ⅰ-2-2-4-1　組織化学的 GUS 検出

形質転換体の葉は、x-gluc 溶液〔0.1 mg/l x-gluc 及び 50 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）〕中で全体が浸るようにし、37℃恒温槽中で 1 晩振とうした。反応後、x-gluc 溶液を 70% エタノールで置換し、反応を停止させた。さらに、100% エタノールで置換し、クロロフィル等の色素を除き、形質転換体の葉における GUS 活性を観察した[44]。

Ⅰ-2-2-4-2　蛍光光度 GUS 分析

形質転換体の葉は、約 1cm 角の切片にし、マイクロチューブ中に入れ、100μl の GUS 抽出緩衝液*1 を加え、グラスロッドで破砕した。

マイクロチューブは 15000rpm で 5 分間遠心し、上清 10μl をあらかじめ 37℃で保温した 0.5ml の GUS 分析緩衝液*2 の入ったマイクロチューブに加え、37℃で 1 時間反応させた。

1時間後、0.9mlの0.2M Na_2CO_3溶液を加えて反応を停止させ、蛍光光度計HITACHI, F-3010 Fluorescence Spectrophotometer）によりGUS活性を測定した[45,46]。

*1；GUS抽出緩衝液 (100ml)

0.2M NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7.0)	25ml
0.5M EDTA	2ml
10% Triton X100	1ml
Sarkosyl	0.1g
1M DTT	100μl
H_2O to	100ml

*2；GUS分析緩衝液 (10ml)

5mM 4-MUG	2ml
100% methanol	2ml
GUS抽出緩衝液	6ml

Ⅰ-2-2-5　形質転換体DNAの単離と分析

Ⅰ-2-2-5-1　形質転換体DNAの単離

形質転換体の葉及び茎 1g を液体窒素の入った乳鉢中で粉末状になるまですりつぶし、50ml の遠心チューブに入れた。遠心チューブに、10ml の 2×CTAB溶液〔2% CTAB、0.1M Tris-HCl (pH 9.5)、20mM EDTA、1.4M NaCl、0.5% β-mercaptoethanol〕を加え、激しく攪拌してから60℃で10分間反応させた。

反応終了後、10ml のクロロフォルム／イソアミルアルコール（24：1）溶

液を加え、穏やかに攪拌した。攪拌後、3000rpm、20℃で 10 分間遠心分離にかけた。

遠心分離終了後、上清は別の遠心チューブに移し、上清の 3/4 量のイソプロパノールを加え、穏やかに攪拌した。沈殿した DNA は、70% エタノールで洗浄後、10mM の TE〔10mM Tris (pH 8.0)—1mM EDTA〕に溶かした。次に、1 μg/ml の濃度となるように RNase を加え、37℃で 30 分間反応させた。

反応終了後、反応溶液と同量の水飽和フェノール溶液を加え、穏やかに攪拌した。攪拌後、3000rpm、20℃で 20 分間遠心分離を行った。

遠心分離終了後、上清は別の遠心チューブに移し、上清の 3/4 量のイソプロパノールを加え、ゆっくりと攪拌した。

沈殿した DNA は、70% エタノールで洗浄後、乾燥させた。最後に、DNA を滅菌水にとかし、DNA 量を測定した[47]。

Ⅰ-2-2-5-2　サザンハイブリダイゼーション

Ⅰ-2-2-5-2-1　DNA の調製及び電気泳動

コントロール及び形質転換体のゲノム DNA 2μg をそれぞれ *Bam* HI 及び *Eco* RI で切断し、電気泳動に用いた。

また、*GUS* は、*Bam* HI 及び *Sac* I で pBI121 から切り出し、5pg、10pg、25pg 用いた。

電気泳動は、0.8% アガロースゲルを用い、17V で 15 時間行った。

Ⅰ-2-2-5-2-2　DNA のメンブランへの転写

アガロースゲルを 0.25N HCl の入ったバットに入れ、10 分間ゆっくりと振とうした。

次に蒸留水でアガロースゲルを洗浄後、0.4N NaOH-0.6M NaCl 溶液中で 15 分間、２度振とうした。

ゲルは濾紙の上に置き、ゲルの大きさに切ったナイロンメンブランをゲルの上に密着させ、濾紙、ペーパータオルを重ね、重しをして6時間放置し、DNAをメンブランに転写した[48]。

メンブランを5×SSPE[*3]で1分間洗浄後、UV linker（FUNA®，FS-800）でDNAをメンブランに固定し、80℃で30分間乾燥させた。

*3；SSPEの組成

750mM	NaCl
43mM	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$
6mM	EDTA

Ⅰ-2-2-5-2-3　ハイブリダイゼーション

メンブランはハイブリダイゼーションバックに入れ、メンブラン10 cm^2あたり1mlのハイブリダイゼーション溶液[*4]を加え、ポリシーラーで密封し、42℃で2時間の前処理を行った。

*4；ハイブリダイゼーション溶液組成

50%	formamide
10mM	Tris (pH 7.5)
1%	SDS
10%	dextran sulfate
150 μ g/ml	salmon sperm DNA
1M	NaCl

プローブは、*GUS* を *Bam* HI 及び *Sac* I で pBI121 から切り出し、25ng を RPN. 1601 multi primer DNA labeling kit[*5]（Amersham 社製）を用いてラベリングした。

*5 ； RPN. 1601 multi primer DNA labeling kit

reaction buffer		10μl
	50mM	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$
	10mM	mercaptoethanol
	50%	glycerol
primer/BSA		5μl
[α-^{32}P] dCTP		5μl
klenow (1unit/μl)		2μl
DNA 25ng		28μl
total		50μl

プローブをハイブリダイゼーションバックに入れ、ポリシーラーで密封し、42℃で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。

Ⅰ-2-2-5-2-4　メンブランの洗浄

ハイブリダイゼーション終了後、メンブランは、2×SSC（0.3M NaCl 、30mM Na-citrate）、0.1% SDS で 15 分間 2 回、0.1×SSC、0.1% SDS（60℃）で 15 分間 3 回、それぞれ洗浄した。

メンブラン及び X 線フィルムをカセットにセットし、-80℃で 24 時間オートラジオグラフィーを行った。

Ⅰ-2-3　実験結果

Ⅰ-2-3-1　形質転換実験に用いる組織切片の検討

セイヨウハコヤナギ無菌植物体のどの組織切片から最も効率よくカナマイシン耐性カルスが誘導されるかを検討したところ、茎切片からは高頻度にカナマイシン耐性カルスが誘導された（Table 5）。なお、カナマイシン耐性カルスは、選択培地上で茎切片から２週間以内に誘導された。他方、葉柄切片からは低頻度にしかカナマイシン耐性カルスが誘導されず、葉切片及び根切片からは、誘導されなかった。

Ⅰ-2-3-2　カナマイシン耐性カルス誘導に対するアセトシリンゴンの影響

Agrobacterium が植物体に感染する際のシグナル物質として知られるアセトシリンゴンの共存培地への添加は、カナマイシン耐性カルスの誘導を促進することはなかった。

Ⅰ-2-3-3　形質転換体の再生

茎切片から誘導されたカナマイシン耐性カルスを選択シュート誘導培地に移植したところ、約１ヶ月後にシュートが誘導された。

誘導されたシュートは、カナマイシン耐性カルスから切り離し、選択発根培地に移植したところ、約２週間後に発根が観察された（Figure 6-A, B）。

Table 5. Selection of suitable tissue for effective transformation of lombardy poplar.

Tissue	Number of tissue segments	Number of kanamycin-resistant calli	
Leaf	700	0	(0)[a]
Petiole	100	2	(0.02)
Stem	655	1,048	(1.6)
Root	40	0	(0)

[a] Values in parentheses indicate average numbers of calli induced per tissue segment.

Ⅰ-2-3-4　形質転換体の GUS 活性分析

Ⅰ-2-3-4-1　組織化学的 GUS 検出

形質転換体及びコントロールの葉を x-gluc 溶液中で 1 晩処理し、100% エタノールでクロロフィル等のバックグランドを除いた。

形質転換体の葉は、全体に青く発色しているのが観察され、強い GUS 活性が確認された（Figure 7-B）。他方、コントロールの葉は、発色は肉眼では観察されず、GUS 活性が認められなかった（Figure 7-A）。

Ⅰ-2-3-4-2　蛍光光度 GUS 分析

形質転換体及びコントロールの葉の GUS 活性を 4-MUG を基質として測定した（Table 6）。

形質転換体の葉は、コントロールの葉と比較して、30 倍から約 200 倍の GUS 活性を示した。

なお、形質転換体の GUS 活性は 5 回の継代培養の後でもほとんど変化がなかった。

Table 6. Expression of GUS activity in transformed lombardy poplar plants.

	GUS activity[a] (nmol 4-MU mg protein^{-1}min^{-1})
Control	0.04 ± 0.02
Transformant 1	8.08 ± 0.04
Transformant 2	2.36 ± 0.45
Transformant 3	1.13 ± 0.08

[a] Values are means ± S.E. of four measurements.

Ⅰ-2-3-5　サザンハイブリダイゼーション

形質転換体及びコントロールのゲノム DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行った結果を Figure 8 に示す。

形質転換体のゲノム DNA を泳動したレーン 3 では、*GUS* をそのまま流したレーン 1 と同様に 2kb の位置にバンドが観察された。そして、バンドの強さから形質転換体にはゲノム当たり 1 コピーの *GUS* が導入されたことが推測される。なお、レーン 3 の約 3.5kb の 1 本のバンドは、*GUS* がメチレーションやタンデムインテグレーション等の影響を受けて植物体ゲノムに導入されたために、目的の位置で *GUS* が切り出されず、結果として 2kb の位置で確認されなかったと推測される。他のいくつかの形質転換体についても同様の実験を行ったが、同様の結果となった。他方、コントロールのゲノム DNA を泳動したレーン 2 では、ハイブリダイゼーションシグナルは、全く観察されなかった。

Ⅰ-2-4　考察

本研究は *Agrobacterium tumefaciens* によってセイヨウハコヤナギ形質転換体を作出した最初の成功例である。茎切片は、形質転換体の作出のための最も有効な組織であった。この結果は、葉切片を用いている他のヤマナラシ属の形質転換体の作出例[14,17]とは異なる。実際に、セイヨウハコヤナギでは、葉切片からは全くカナマイシン耐性カルスが誘導されなかった（Table 5）。以上より、形質転換するための最も有効な組織は、木本植物においてもそれぞれ異なっていた。

セイヨウハコヤナギでは、共存培地中へのアセトシリンゴンの添加は形質転換効率に全く影響を与えなかった。他方、後述のシラカンバやココノエギリでは、共存培地にアセトシリンゴンを添加した場合に著しく形質転換効率が上昇した。それらの結果は、アセトシリンゴンの影響は植物種によって異なると述べている Godwin らの報告[49]が、木本植物においても当てはまることを示している。

形質転換体の GUS 活性は、形質転換体間で異なっていた（Table 6）。この結果は、*GUS* の形質転換体ゲノム DNA 中への導入された位置が原因と考えられる。つまり、導入された *GUS* の前後のエンハンサーやサイレンサー、プロモーター等によって *GUS* の発現が影響を受けているからと推定される。

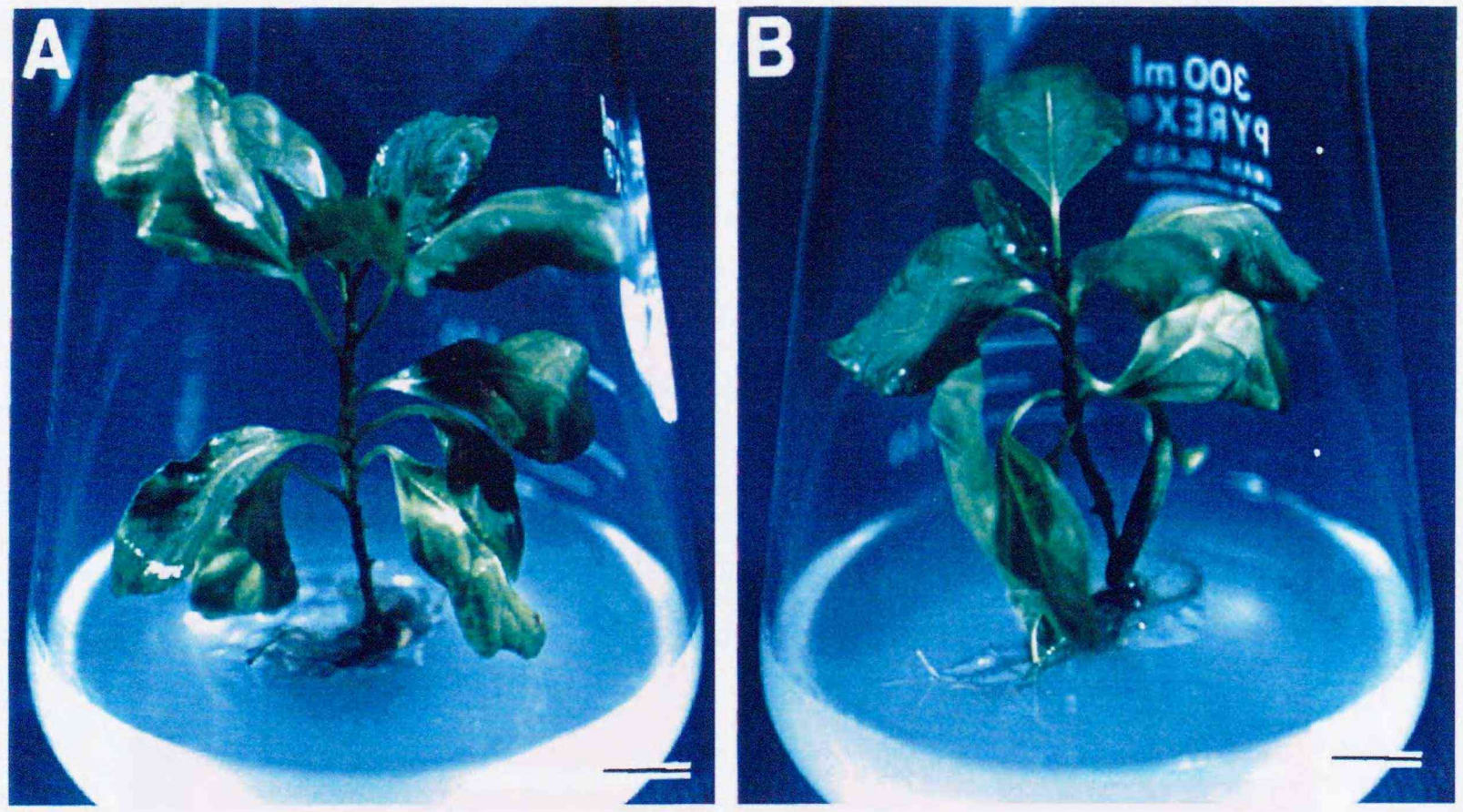


Figure 6. Regeneration of plantlets. A; The control poplar used in this study. B; A transformed poplar plantlet. Bar=1 cm.

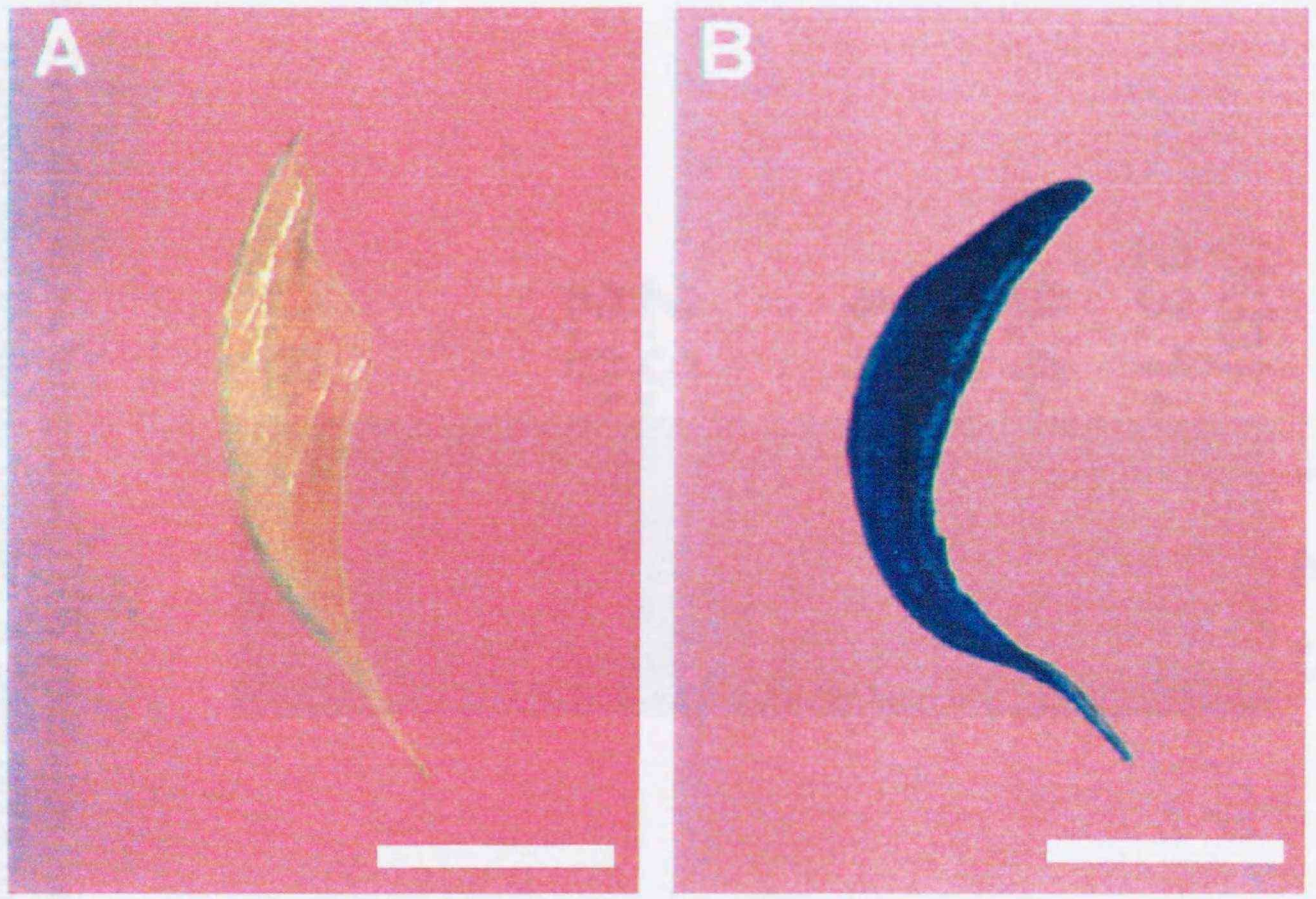


Figure 7. Histochemical assay of GUS activity in transformed lombardy poplar.
A; A control leaf after staining with x-gluc.
B; A transformed leaf after staining with x-gluc.
Bar= 1 cm.

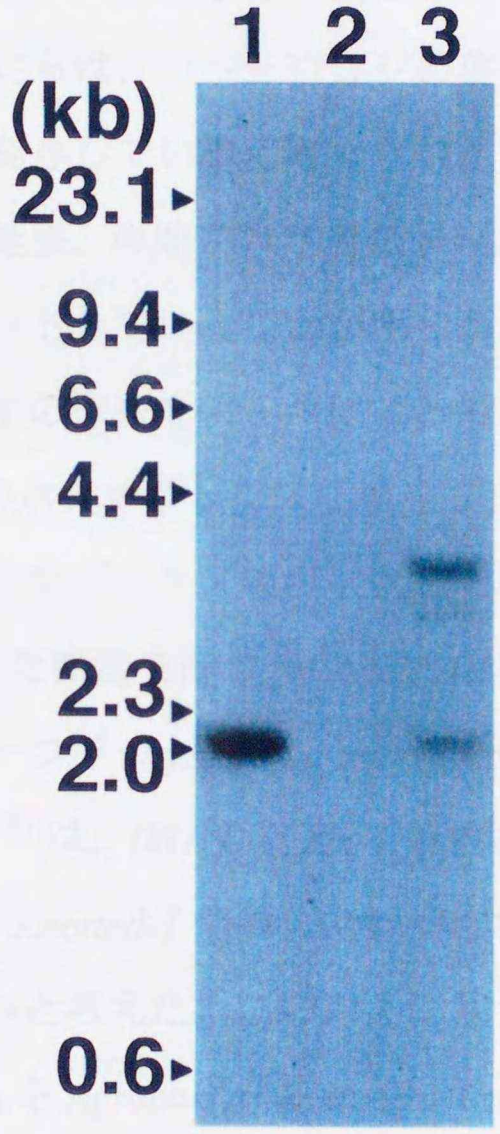


Figure 8. Detection of an integrated GUS gene(s) in the genome of transformed lombrdy poplar. A 2-kb DNA fragment of pBI121, which was used as the DNA probe (3pg; Lane 1), and DNAs from a control poplar (2μg; Lane 2) and from a transformed poplar (2μg; Lane 3), after digestion with *Eco* RI and *Bam* HI, were subjected to electphoresis in a 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane.

Ⅰ-3　イネホメオボックス遺伝子 *OSH1* の大量発現による形態異常の誘導

Ⅰ-3-1　はじめに

植物のホメオボックス遺伝子は、Hake ら[50]によってトウモロコシから初めて単離された。彼女らは、トウモロコシの葉形態の突然変異体（*Knotted-1*）から、その変異に関与していると考えられた遺伝子を単離し、その塩基配列を解析した。その結果、単離された遺伝子（*Kn-1*）は、そのＣ末端にホメオドメイン構造をコードしていることが明らかとなり、これが植物におけるホメオボックス遺伝子の存在を明らかにする最初の報告となった。*OSH1* は、その *Kn-1* 遺伝子のホメオボックス領域をプローブとして、イネの cDNA ライブラリーからホメオボックス遺伝子として単離された。その結果、これまでに *Kn-1* に類似した構造を持つ 10 個以上の独立したクローンが単離された。これらの遺伝子の一つが *Oryza sativa* homeobox 1（*OSH1*）と名付けられた[31]。そして Matsuoka ら[31]は、*OSH1* も *Kn-1* と同様に、植物体内において大量発現することにより、*Knotted-1* 変異体で観察されるような葉形態の変化が観察されるのではないかと考えた。この考えに基づき、35S プロモーターと結合した *OSH1* の cDNA を *Agrobacterium tumefaciens* を用いて形質転換の容易なタバコに導入した。その結果、*OSH1* を導入した形質転換体はきわめて異常な形態を示した[51]。

本章では、前章で確立した形質転換系を利用して、セイヨウハコヤナギに *OSH1* を導入し、大量発現させた形質転換体を作出することを目的として実験を行った。そして、イネ由来の *OSH1* が木本植物でもホメオボックス遺伝子として機能するかを検討した。

Ⅰ-3-2　材料及び実験方法

Ⅰ-3-2-1　試料

試料は、セイヨウハコヤナギの剥皮枝条から直接誘導した不定芽を0.5 mg/l IBAを添加したMSB5S寒天培地に3000 lux 蛍光灯下、日長16時間、25℃の培養条件で、継代培養して得られた幼植物体を用いた。

Ⅰ-3-2-2　*Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens LBA4404株に、前章で用いたpBI121の*GUS*をイネのホメオボックス遺伝子である*OSH1*で置換したバイナリーベクター（名古屋大学松岡信教授提供）を用いた。

*A. tumefaciens*は25 mg/l カナマイシンと300 mg/l ストレプトマイシンを含んだLB液体培地を用い、28℃で18時間培養した。*Agrobacterium*培養液は5×10^8 cells/mlになるようにMSB5S液体培地で希釈し、形質転換実験に用いた。

Ⅰ-3-2-3　形質転換

形質転換体作出の手順は、Ⅰ-2-2-3と同様に行った。

Ⅰ-3-2-4　形質転換体RNAの単離と分析

Ⅰ-3-2-4-1　形質転換体RNAの単離

形質転換体の葉及び茎 2g を液体窒素中で粉末状になるまですりつぶし、50mlの遠心遠心チューブに入れた。遠心チューブに、10mlの2×CTAB溶液を加え、激しく攪拌してから65℃で10分間反応させた。

反応終了後、10mlのクロロフォルム／イソアミルアルコール（24:1）溶液を加え、穏やかに攪拌し、15000rpm、室温で10分間遠心分離を行った。

遠心分離終了後、上層を別の遠心チューブに移した。この操作を3度繰り返し、上清は10mlの遠心チューブに分注し、250μlの10M LiClを加え、20℃で2時間反応させた。

反応後、15000rpm、4℃で20分間遠心分離を行った。

遠心分離終了後、上層を除き、100μlの溶液〔1M NaCl、0.5% SDS、10mM Tris（pH 8.0）、1mM EDTA〕に懸濁した。次に、懸濁液（400μl）と等量のクロロフォルム／イソアミルアルコール（24:1）溶液を加え、穏やかに攪拌し、上清を別の遠心チューブに移した。この操作を3度繰り返した。

それを新しい遠心チューブに移し、1mlの100% エタノールを加え、-80℃で30分間処理後、15000rpm、4℃で20分間遠心分離を行った。

遠心分離終了後、70% エタノールで洗浄後、乾燥させ、滅菌水に溶かし、RNA量を測定した[52]。

Ⅰ-3-2-4-2　ノーザンハイブリダイゼーション

Ⅰ-3-2-4-2-1　RNAの調製及び電気泳動

コントロール及び形質転換体のRNA 2μgを4μlの25mM EDTA、0.1% SDS溶液に溶かし、20μlの sample buffer*6を加え、次に、65℃で15分間（RNAの高次構造を変性するため）、4℃で5分間の順で処理し、1μlの1 mg/ml EtBrを加え、電気泳動に用いた。

電気泳動は、1.0% アガロースゲルを用い、1×MOPS［20mM MOPS (pH 7.0)、5mM CH_3COONa、1mM EDTA］を含む泳動バッファー 中、50Vで5時間行った。

＊6；　sample buffer

formamide	7.5ml
10×MOPS	1.5ml
formaldehyde	2.4ml
distilled H_2O (RNase free)	1.0ml
glycerol	1.0ml
10%(w/v) bromophenol blue	0.8ml

Ⅰ-3-2-4-2-2　RNA のメンブランへの転写

アガロースゲルは 20×SSC で 20 分間洗浄した。

ゲルは濾紙の上に置き、ゲルの大きさに切ったナイロンメンブランをゲルの上に密着させ、濾紙、ペーパータオルを重ね、重しをして 6 時間放置し、RNA をメンブランに転写した。

メンブランを 5×SSPE で 1 分間洗浄後、UV linker で RNA をメンブランに固定し、80℃で 30 分間乾燥させた。

Ⅰ-3-2-4-2-3　ハイブリダイゼーション

メンブランはハイブリダイゼーションバックに入れ、メンブラン 10 cm^2 あたり 1ml のハイブリダイゼーション溶液を加え、ポリシーラーで密封し、42℃で 2 時間の前処理を行った。

プローブは、*OSH1* を *Sma* I 及び *Xba* I で切り出し、25ng を RPN. 1601 multi primer DNA labeling kit（Amersham 社製）を用いてラベリングした。

プローブをハイブリダイゼーションバックに入れ、ポリシーラーで密封し、42℃で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。

Ⅰ-3-2-5-2-4　メンブランの洗浄

ハイブリダイゼーション終了後、メンブランは、2×SSC / 0.1% SDS で 10 分間 2 回、0.1×SSC / 0.1% SDS（42℃）で 30 分間 1 回、0.1×SSC / 0.1% SDS（50℃）で 30 分間 1 回、それぞれ洗浄した。

メンブラン及び X 線フィルムをカセットにセットし、-80℃で 24 時間オートラジオグラフィーを行った。

Ⅰ-3-2-5　RT-PCR サザンハイブリダイゼーション

Ⅰ-3-2-5-1　RT-PCR

RT-PCR は、RNA PCR kit[*7]（宝酒造社製）を用いてプロトコールに従って行った。

*7；　RNA PCR kit

10×RNA PCR buffer

25mM $MgCl_2$

10mM dNTPs

RNase Inhibitor (40U/μl)

AMV Reverse Transcriptase XL (5U/μl)

distilled H_2O (RNase free)

プライマーは以下のような合成オリゴプライマーを用いた。

5’ primer (OSH-1: 17mer, Tm 60℃, 20pmol/μl)

GTC GGA GCC AGC GGC GT

3’ primer (OSH-2c: 17mer, Tm 60℃, 20pmol/μl)

AGG CGG CGG CGT TGG TC

PCR 産物の電気泳動は、1.0% アガロースゲルを用い、100V で 3 時間行った。

Ⅰ-3-2-5-2　DNA のメンブランへの転写

I-2-2-5-2-2 と同様にして DNA をメンブランに転写した。

Ⅰ-3-2-5-3　ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは、I-2-2-5-2-3 と同様に行った。

プローブは、*OSH1* を *Sma* Ⅰ及び *Xba* Ⅰで切り出し、25ng を RPN. 1601 multi primer DNA labeling kit（Amersham 社製）を用いてラベリングした。

プローブをハイブリダイゼーションバックに入れ、ポリシーラーで密封し、42℃で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。

Ⅰ-3-2-5-4　メンブランの洗浄

ハイブリダイゼーション終了後、メンブランは、2×SSC、 0.1% SDS で 10 分間 2 回、0.1×SSC、0.1% SDS（60℃）で 30 分間 1 回、それぞれ洗浄した。

メンブラン及び X 線フィルムをカセットにセットし、-80℃で 3 日間オートラジオグラフィーを行った。

Ⅰ-3-3　実験結果

Ⅰ-3-3-1　形質転換体の形態異常

茎切片から誘導されたカナマイシン耐性カルスを選択シュート誘導培地に移植したところ、約１ヶ月後にシュートが誘導された。

誘導されたシュートは、カナマイシン耐性カルスから切り離し、選択発根培地に移植したところ、約２週間後に発根が観察された。

OSH1 を導入した形質転換体は様々な形態異常を示した。それらの形態異常を示した形質転換体を以下のように分類した（Table 7）。それぞれの形態は Figure 9-A～D に示す。

*葉の形状がコントロールとほとんど同じもの（Normal）
*葉の形状が細葉化したもの（Type 1）
*極度に矮性のもの（Type 2）
*萌芽し、小葉化したもの（Type 3）

以上のように、選択シュート誘導培地上で得られたシュートの 7%は、形態異常を示した。なお、選択シュート誘導培地上で得られたシュートの 7%は、選択発根培地上に移植１ヶ月以内に死滅した（Table 7）。

Ⅰ-3-3-2　ノーザンハイブリダイゼーション

ノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、Type 3 にのみ 1.5kb の位置にプローブとハイブリダイズするバンドが確認できた (Figure 10-A) 。

Ⅰ-3-3-3　RT-PCR サザンハイブリダイゼーション

RT-PCR 産物のサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、Type 2 と Type 3 で 1.0kb の位置にプローブとハイブリダイズするバンドが確認された (Figure 10-B) 。また、オートラジオグラフィーの時間を延長したところ、Type 1 でも同様の位置にバンドが確認された。それらの結果から *OSH1* 産物の蓄積量は、Type 3 で最も高く、Type 1 で最も低かった。

Table 7. Phenotypic categories of transformed poplar plants.

Phenotype	Number of plants
Normal	172 (86.0*)
Type 1	4 (2.0)
Type 2	7 (3.5)
Type 3	3 (1.5)
Dead	14 (7.0)

*Values in parentheses indicate percentages of regenerated plants on the selective rooting medium.

Normal; transformed poplar showing normal type.

Type 1; transformed poplar with slender leaves.

Type 2; transformed poplar appeared in dwarf.

Type 3; transformed poplar with multiple shoot apices and tiny leaves.

Ⅰ-3-4　考察

イネの形態形成に関わる遺伝子である *OSH1* をセイヨウハコヤナギに導入し、大量発現させることによって、様々な形態異常を引き起こした形質転換体が誘導された。それらの形質転換体を形態で分類し、ノーザンハイブリダイゼーション及び RT-PCR サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、*OSH1* の発現量は、萌芽状になった Type 3 で最も高く、葉の形状が細葉状になった Type 1 で最も低かった。それらの結果は *OSH1* の発現量が形質転換体の形態と関係があるように推測される。なお、Normal に分類した形質転換体からは、ノーザンハイブリダイゼーション及び RT-PCR サザンハイブリダイゼーションによって *OSH1* の発現が確認できなかった。この原因は、それらの形質転換体では導入された *OSH1* が何らかの原因で不活性化されているか、または高度にキメラになっている可能性が考えられる。

また、この結果は、*OSH1* の大量発現により形質転換体が形態異常を起こしたシロイヌナズナ[31]やタバコ[51]における結果と一致した。つまり、イネの *OSH1* は、他の草本植物ばかりでなく木本植物においても形態形成に関わった遺伝子として機能することが明らかとなった。しかし、*OSH1* を大量発現させ、形態異常を示した形質転換体は、いずれもコントロールと比較して成長が悪かった。この原因は、Matsuoka ら[31]が述べている様に、植物体内のホルモンバランスが *OSH1* の大量発現によって崩れたことが考えられる。

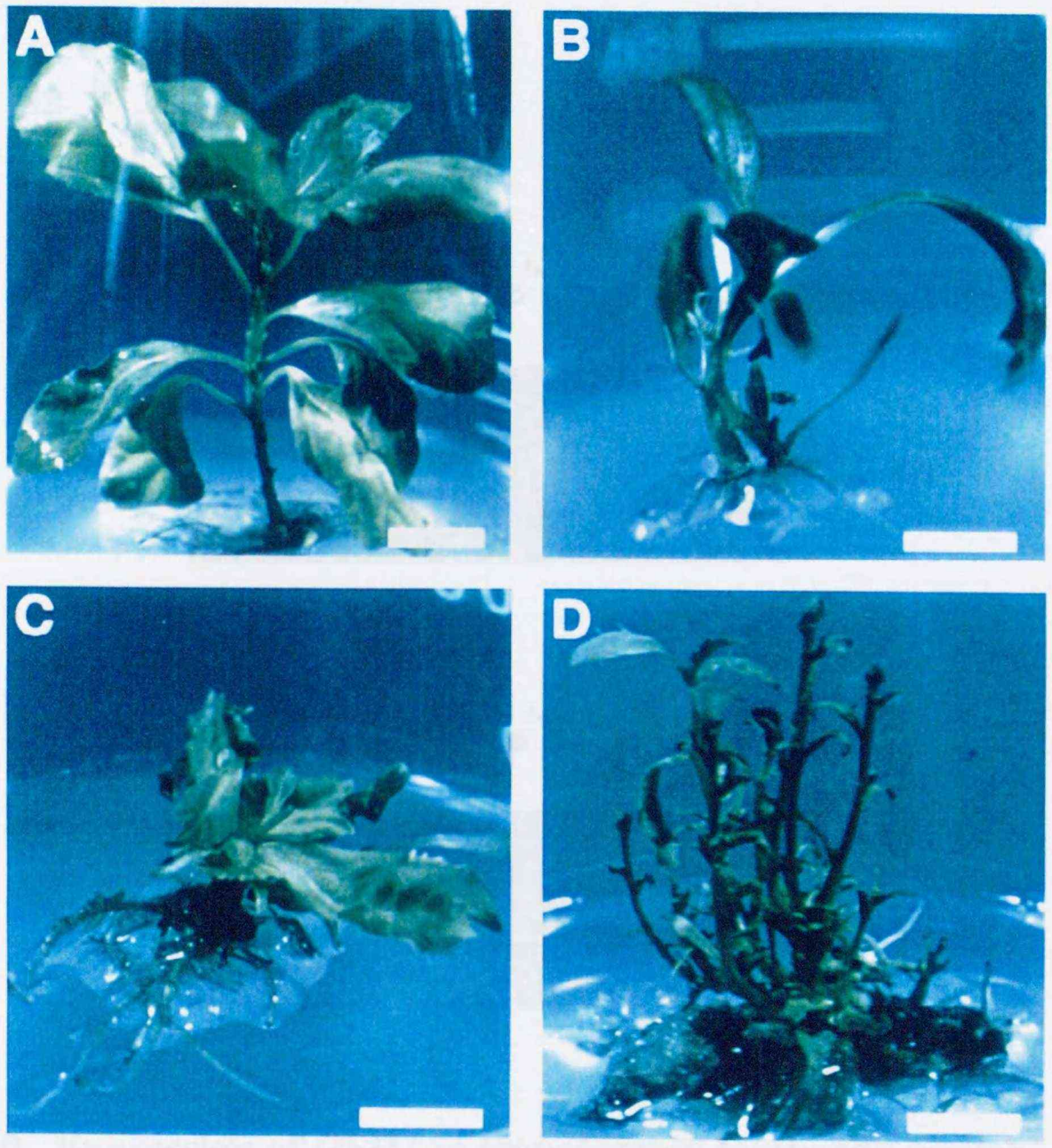


Figure 9. Morphological changes of transformed lombardy poplar induced by overexpression of the rice homeobox gene *OSH1*. A; Wild-type (control) poplar. B; Type 1, with slender leaves. C; Type 2, a dwarf. D; Type 3, with multiple shoot apices and tiny leaves. Bar= 1cm.

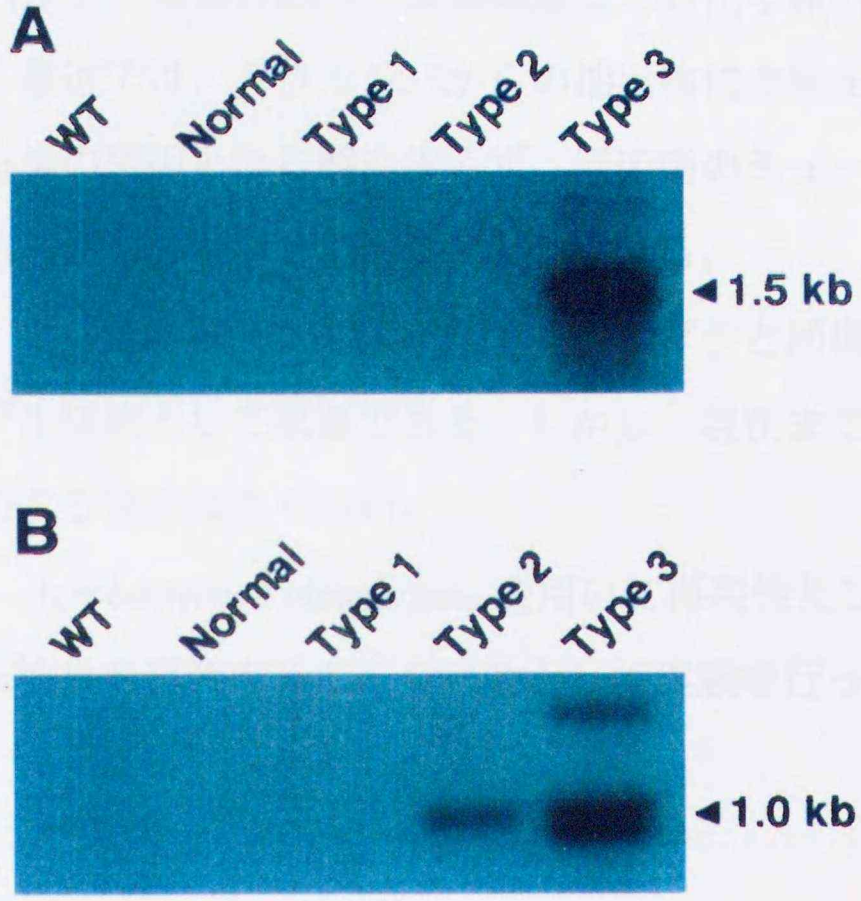


Figure 10. Expression of *OSH1* in transformed lombardy poplar. A; Northern blot analysis. B; RT-PCR/ Southern blot anaysis. WT; wild type (control) poplar. Normal; transformed poplar showing normal type. Type 1; transformed poplar with slender leaves. Type 2; transformed poplar appeared in dwarf. Type 3; transformed poplar with multiple shoot apices and tiny leaves.

第Ⅱ章　シラカンバの形質転換系の開発

Ⅱ-1　はじめに

シラカンバは、更新が容易で、成長が早く、地球温暖化対策にあたって北方地域の二酸化炭素固定に役立つ重要な樹種である。また、その材は、民芸玩具の他、パルプ、家畜の飼料、炭素繊維などの化学原料として利用されている。また、最近では、シラカンバからの抽出物に水素を化合させたキシリトールは、虫歯の原因となる酸を作らず、原因菌のミュータンス菌の増殖を阻害する天然素材の甘味料として注目されている。

欧州では、カバノキ属（*Betula*）の樹木は、ポプラと同様に遺伝子研究を行うためのモデル植物として重要である。しかし、現在までに、シラカンバの形質転換に関する報告は全くない。

本章では、*Agrobacterium tumefaciens* を用いて再現性及び、効率の高いシラカンバ形質転換系を開発することを目的として実験を行った。

Ⅱ-2　材料及び実験方法

Ⅱ-2-1　試料

試料は、シラカンバ（英名；Japanese white birch、学名；*Betula platyphlla* var. *japonica*）の種子から無菌的に発芽させた実生を 0.5 mg/l IBA を添加した MSB5S 寒天培地に 3000 lux 蛍光灯下、日長 16 時間、25℃の培養条件で、継代培養して得られた幼植物体を用いた。

Ⅱ-2-2　*Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens は、I-2-2-2 と同様にして、以後の形質転換実験に用いた。

Ⅱ-2-3　形質転換

シラカンバ幼植物体の葉（1 cm 角）、葉柄（1 cm 長）、茎（1 cm 長）、根（1 cm 長）をそれぞれ切片とし、希釈した *Agrobacterium* 懸濁液で 30 分間培養した。

次に、それらの植物体切片は滅菌済み濾紙上で、余分な *Agrobacterium* 懸濁液を除いてから 50、100、150、200μM アセトシリンゴンを添加あるいは無添加の 0.3% ゲルライトを含んだ MSB5 培地上で 2 日間培養した。

その後、植物体切片を MSB5S 液体培地で 1 回、500 mg/l セフォタキシムを含んだ MSB5S 液体培地で 3 回洗浄した。

洗浄後、植物体切片を選択カルス誘導培地（50 mg/l カナマイシン、500 mg/l セフォタキシム、500 mg/l カルベニシリン、1 mg/l BAP、0.1 mg/l NAA 及び 0.25% ゲルライトを含んだ MSB5S 培地）に移植した。

カナマイシン耐性カルスは、植物体切片から切り離し、選択シュート誘導培地［50 mg/l カナマイシン、500 mg/l セフォタキシム、500 mg/l カルベニシリン、0.1 mg/l zeatin、0.1 mg/l BAP、0.15% ゲルライト及び 0.4% バクトアガー（Difco 社製）を含んだ MSB5S 培地］に移植した。

誘導されたシュートは、カナマイシン耐性カルスから切り離し、選択発根培地（50 mg/l カナマイシン、500 mg/l カルベニシリン、0.5 mg/l IBA、0.02 mg/l NAA 及び 0.8% 寒天を含んだ MSB5S 培地）に移植した。

Ⅱ-2-4　形質転換体の GUS 活性分析

Ⅱ-2-4-1　組織化学的 GUS 検出

I-2-2-4-1 と同様に、x-gluc を基質として形質転換体の葉の GUS 活性を観察した。なお、形質転換処理を施していない葉をコントロールとして用いた。

Ⅱ-2-4-2　蛍光光度 GUS 分析

I-2-2-4-2 と同様に、4-MUG を基質として形質転換体の葉の GUS 活性を蛍光光度計により測定した。なお、形質転換処理を施していない葉をコントロールとして用いた。

Ⅱ-2-5　形質転換体 DNA の単離と分析

Ⅱ-2-5-1　DNA の単離

I-2-2-5-1 と同様の手法により形質転換体の DNA を単離し、収量を測定した。

Ⅱ-2-5-2　サザンハイブリダイゼーション

Ⅱ-2-5-2-1　DNA の調製及び電気泳動

コントロール及び形質転換体のゲノム DNA 2μg をそれぞれ *Bam* HI 及び

Sac I あるいは *Hind* III で切断し、電気泳動に用いた。

また、*GUS* は、*Bam* HI 及び *Sac* I で pBI121 から切り出し、5pg、10pg、25pg 用いた。

電気泳動は、0.8% アガロースゲルを用い、17V で 15 時間行った。

Ⅱ-2-5-2-2　DNA のメンブランへの転写

I-2-2-5-2-2 と同様にして DNA をメンブランに転写した。

Ⅱ-2-5-2-3　ハイブリダイゼーション

メンブランとプローブのハイブリダイゼーションは、I-2-2-5-2-3 と同様に行った。

Ⅱ-2-5-2-4　メンブランの洗浄

ハイブリダイゼーション終了後、メンブランは、2×SSC / 0.1% SDS（室温）で 15 分間 2 回、2×SSC / 0.1% SDS（40℃）で 15 分間 1 回、0.1×SSC / 0.1% SDS（60℃）で 15 分間 3 回、それぞれ洗浄した。

メンブラン及び X 線フィルムをカセットにセットし、-80℃で 36 時間オートラジオグラフィーを行った。

Ⅱ-3　実験結果

Ⅱ-3-1　形質転換実験に用いる組織切片の検討

シラカンバ無菌植物体のどの組織切片から最も効率よくカナマイシン耐性カルスが誘導されるかを検討したところ、葉切片からは1切片あたり0.9個、葉柄切片からは0.81個と効率良くカナマイシン耐性カルスが誘導された。他方、茎切片からは、葉切片の約3分の1の割合でしかカナマイシン耐性カルスは誘導されず、根切片からは全く誘導されなかった（Table 8）。

なお、得られたカナマイシン耐性カルスを無作為に50個選びだし、x-gluc溶液で処理し、GUS活性を調べたところ、48個のカルスは全体が青く発色し、強いGUS活性が確認された。

Ⅱ-3-2　カナマイシン耐性カルス誘導に対するアセトシリンゴンの影響

シラカンバにおいて、共存培地へのアセトシリンゴンの添加は、形質転換効率を増加させた（Figure 11）。1切片当たりで最も多くのカナマイシン耐性カルスが得られたのは、100 μ Mのアセトシリンゴンを添加した場合であった。100 μ M アセトシリンゴンを添加した場合は、培地に全くアセトシリンゴンを添加しなかった場合と比較して、約8倍のカナマイシン耐性カルスが得られた。

Ⅱ-3-3　形質転換体の再生

茎切片から誘導されたカナマイシン耐性カルスを選択シュート誘導培地に移植したところ、約6週間後にシュートが誘導された。

誘導されたシュートは、カナマイシン耐性カルスから切り離し、選択発根培地に移植したところ、約2週間後に発根が観察された（Figure 12-A, B）。

なお、形質転換体は異なった22のカナマイシン耐性カルスから誘導され、それぞれL-1からL-20に分類した。

Table 8. Selection of suitable tissue for effective transformation of Japanese white birch.

Tissue	Number of tissue segments	Number of kanamycin-resistant calli	
Leaf	203	183	(0.9*)
Petiole	102	83	(0.81)
Stem	326	101	(0.31)
Root	32	0	(0)

Tissue segments were co-cultivated with *A. tumefaciens* on medium that contained 100μM acetosyringone. *Values in parentheses indicate average numbers of calli induced per tissue segment.

Ⅱ-3-4　形質転換体の GUS 活性分析

Ⅱ-3-4-1　組織化学的 GUS 検出

形質転換体及びコントロールの葉を x-gluc 溶液中で 1 晩処理し、100% エタノールでクロロフィル等のバックグランドを除いた結果を Figure 13 に示す。

形質転換体の葉は、全体に青く発色しているのが観察され、強い GUS 活性が確認された（Figure 13-B）。他方、コントロールの葉については、発色は肉眼では観察されず、GUS 活性が認められなかった（Figure 13-A）。

Ⅱ-3-4-2　蛍光光度 GUS 分析

形質転換体及びコントロールの葉の GUS 活性を 4-MUG を基質として測定した（Table 9）。

形質転換体の葉は、コントロールの葉と比較して、約 150 倍（L-5）から 450 倍（L-7）の GUS 活性を示した。

Ⅱ-3-5　サザンハイブリダイゼーション

形質転換体及びコントロールのゲノム DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行った（Figure 14）。

プローブは、A で示すように下線部分の *GUS* を用いた。

B で示すように、形質転換体及びコントロールのゲノム DNA を *Bam* HI 及び *Sac* I で切断した場合には、レーン 3 の形質転換体では、レーン 1 のプローブと同様の位置にバンドが観察された。他方、レーン 2 のコントロールではプローブとハイブリダイズするバンドは肉眼では全く観察されなかった。なお、バンドの強さから形質転換体にはゲノム当たり 1 コピーの *GUS* が導入されたことが推測される。

C で示すように、形質転換体及びコントロールのゲノム DNA を *Hind* III で切断した場合には、レーン 2 から 5 までの異なった系統の形質転換体では違った位置にバンドが観察された。このことは、異なった系統の形質転換体では、*GUS* は形質転換体のゲノム DNA の異なった位置にそれぞれ挿入されたことを示している。

Table 9. Expression of GUS activity in transformed Japanese white birch.

Plant	GUS activity[a] (nmol 4-MU mg protein^{-1}min^{-1})
Control	0.04 ± 0.02
Transformants	
L-5[b]	5.76 ± 0.59
L-7	18.09 ± 2.61
L-16	13.74 ± 1.36
L-18	14.32 ± 0.93

[a] Values are means ± S.E. of four measurements.

[b] Four transformants derived from different callus were randomly selected.

Ⅱ-4　考察

本章は *Agrobacterium tumefaciens* によってシラカンバ形質転換を作出した最初の成功例である。

シラカンバでは、共存培地中へのアセトシリンゴンの添加は形質転換効率を著しく向上させた。アセトシリンゴンは、障害を受けた植物組織から分泌されるフェノール物質である。その添加は、 *A. tumefaciens* が植物に感染する際に Ti プラスミドの vir gene を活性化させ、T-DNA 領域を植物ゲノム DNA に組み込むことを促進させる。 *A. tumefaciens* による形質転換におけるアセトシリンゴンの効果は *Arabidopsis thaliana*[53]、*Aptropa belladonna*[54]、*Allium cepa*[54]、*Antirrhium majus*[54,56]、*Brassica campestris*[54]、*Glycine max*[54]、*Nicotina tabacum*[49]、*Cucumis sativus*[55]、 *Lycopersicon esculentum*[57]、 *Malus pumila*[58]の植物種で報告されている。また他の広葉樹では、次章に示す通り、ココノエギリにおいても共存培地へのアセトシリンゴンの添加は形質転換効率を向上させた[22]。これに対して、前述のセイヨウハコヤナギでは、共存培地へのアセトシリンゴンの添加は形質転換効率にほとんど影響を及ぼさなかった[15]。それらの結果は、アセトシリンゴンの影響は植物種によって異なると述べている Godwin らの報告[49]が、木本植物においても当てはまることを示している。

形質転換体の GUS 活性は、形質転換体間で異なっていた（Table 9）。この結果は、前章のセイヨウハコヤナギと同様に *GUS* の形質転換体ゲノム DNA 中への導入された位置が原因の１つと考えられた。そして Figure 14-C の結果は、異なった系統の形質転換体では、実際に *GUS* は形質転換体のゲノム DNA の異なった位置にそれぞれ挿入されていたことを証明した。

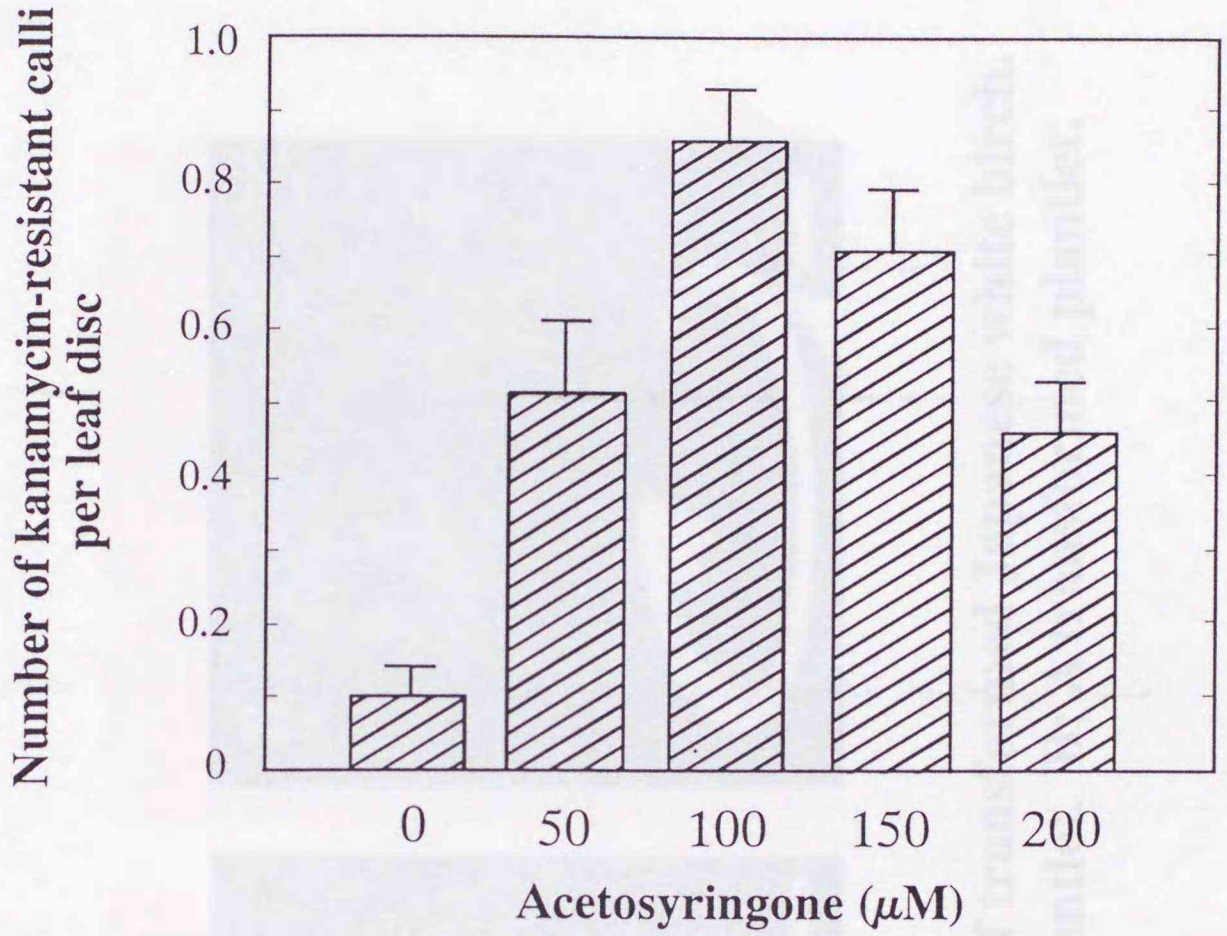


Figure 11. Effects of acetosyringone on the induction of kanamycin-resistant calli after transformation of Japanese white birch. Twenty-one leaf discs were treated with each concentration of acetosyringone as indicated. The number of kanamycin-resistant calli was examined 30 days after induction of calli. Values of calli induced per leaf disc are means ± S.E. of four replicate experiments.

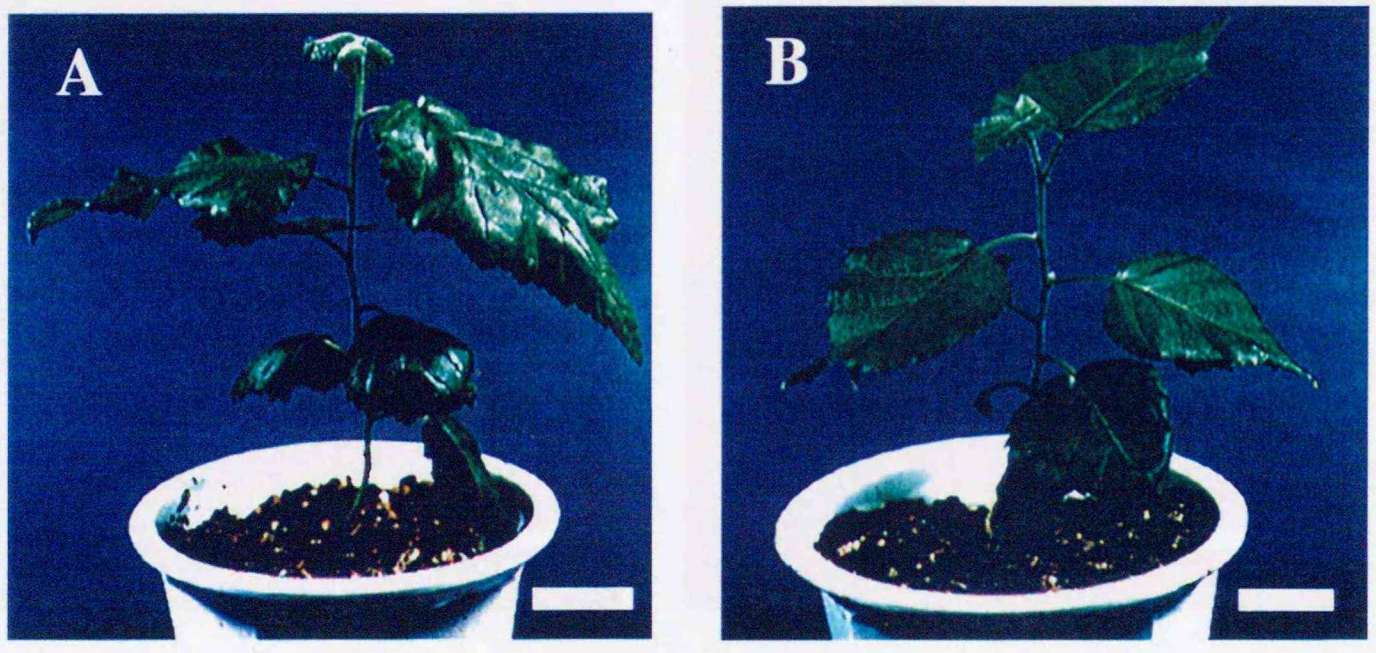


Figure 12. Regeneration of transformed Japanese white birch.
A; A control plantlet. B; A transformed plantlet.
Bar=2 cm.

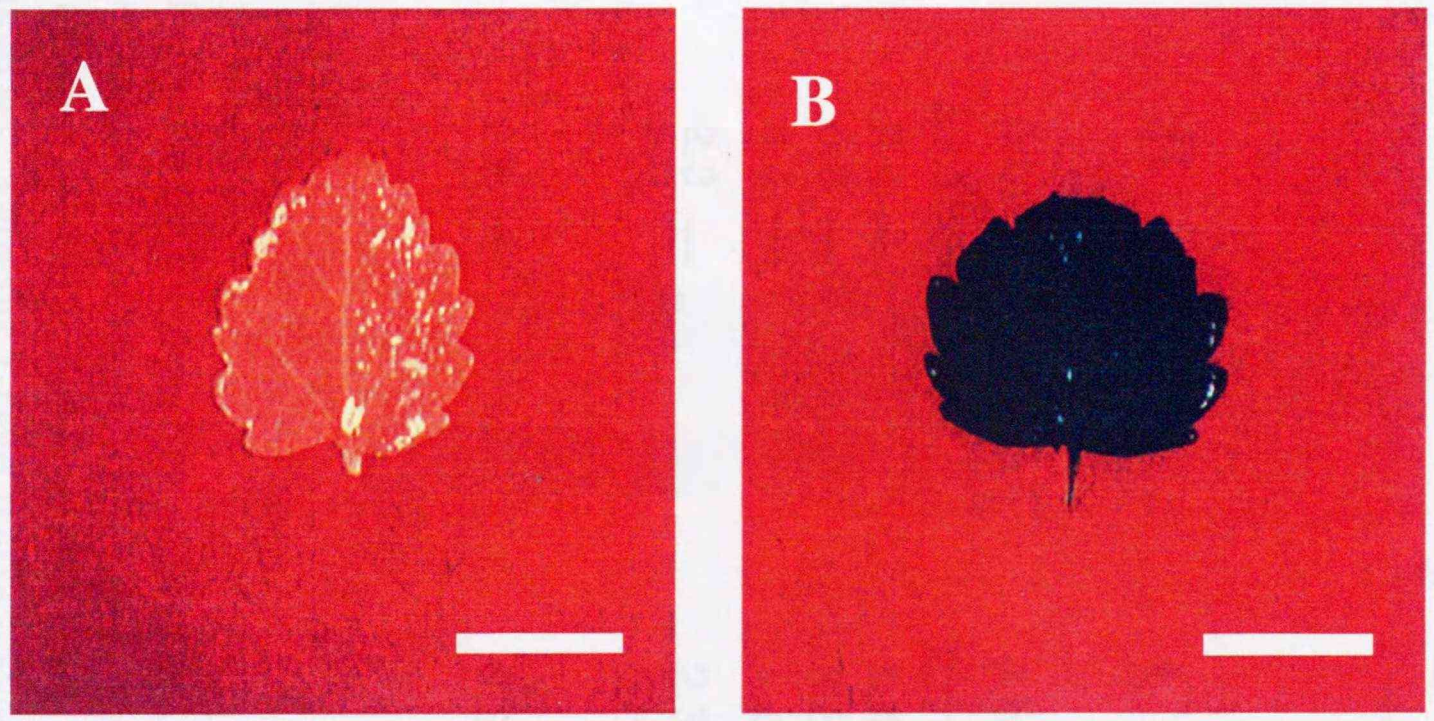


Figure 13. Histochemical assay of GUS activity in transformed Japanese white birch by staining with x-gluc. A; A control leaf. B; A transformed leaf. Bar= 1 cm.

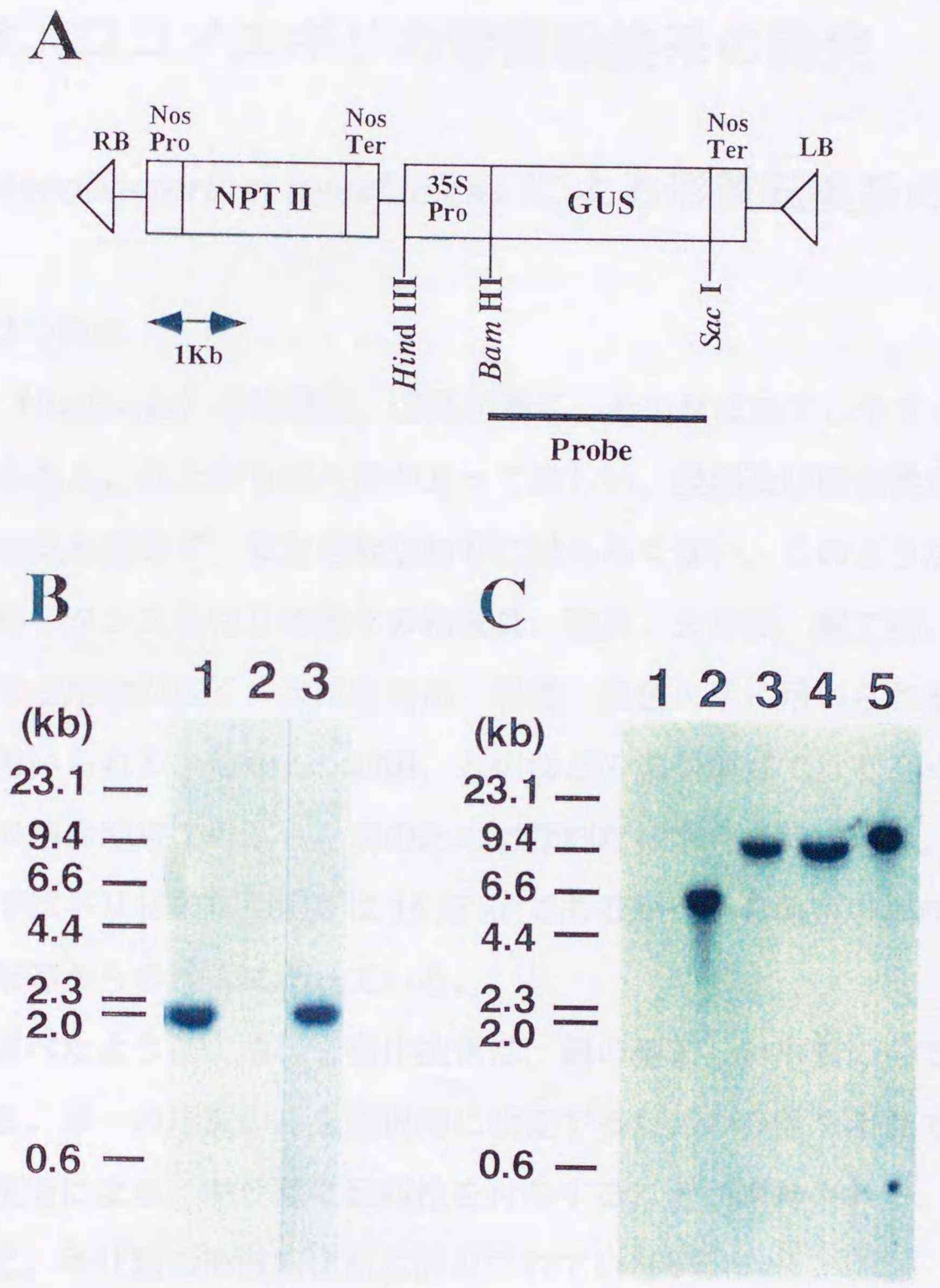


Figure 14. Detection by Southern blot analysis of an integrated GUS gene in the genome of transformed Japanese white birch. (A) The GUS gene, the 2-kb *Bam*HI-*Sac*I fragment of pBI121 that was used as the DNA probe in the Southern blot analysis. Only the T-DNA region is shown. RB, right border of T-DNA; LB, left border of T-DNA; NosPro, promoter of the nopaline synthase gene; NosTer, terminator of the nopaline synthase gene. (B) The *Bam*HI-*Sac*I fragment of pBI121 (5 pg; lane 1), and DNA from control birch (2 mg; lane 2) and from transformed birch (2 mg; lane 3, L-16) that had been digested with both *Bam*HI and *Sac*I. (C) DNA from control birch (2 mg; lane 1) and DNA from transformed birch (2 mg; lanes 2 through 5, L-5, L-7, L-16 and L-18) were digested with *Hin*dIII.

第Ⅲ章　ココノエギリの形質転換系の開発

Ⅲ-1　*Agrobacterium tumefaciens* による形質転換系の開発

Ⅲ-1-1　はじめに

キリ属（*Paulownia*）の樹種は、成長が速く、その材は加工しやすく、狂いや割れが少なく、仕上がりは光沢があって美しい。吸湿及び吸水性が非常に低いため湿気も通さず、また軽軟なわりにはもろくない。このような優れた特性のため、タンスをはじめ種々の和家具、建具、天井板、細工物、彫刻、琴、下駄など用途が広く、炭は絵画用、眉墨、黒色火薬に用いられる。樹皮は薬用に用いられる。しかし、四国、九州などの温暖地域ではてんぐ巣病、東北などの寒冷地域ではふらん病のために深刻な被害を受けている。そのため、国内ではキリ材の年間需要は 15 万 m^3 であるが、その需要の 90%を中国、台湾、北米等からの輸入に頼っている。

緒言で述べたように、遺伝子操作技術は、親の望ましい形質の全てを保持させたまま、単一の形質のみを選択的に改変するための有効な手段である。それらの技術により、キリ類に耐病性を付与することが期待される。しかし、現在までに、キリ類の形質転換系は開発されていない。

本章では、*Agrobacterium tumefaciens* を用い、再現性が高く、効率の良いココノエギリの形質転換系を開発することを目的として実験を行った。

Ⅲ-1-2　材料及び実験操作

Ⅲ-1-2-1　試料

試料は、ココノエギリ（英名；Chinese paulownia、学名；*Paulownia fortunei*）の種子から無菌的に発芽させた実生を 0.5 mg/l IBA を添加した MSB5S 寒天培地に 3000 lux 蛍光灯下、日長 16 時間、25℃の培養条件で、継代培養して得られた幼植物体を用いた。

Ⅲ-1-2-2　*Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens は、I-2-2-2 と同様にして、以後の形質転換実験に用いた。

Ⅲ-1-2-3　形質転換

ココノエギリ幼植物体の葉（1 cm 角）、葉柄（1 cm 長）、茎（1 cm 長）、根（1 cm 長）をそれぞれ切片とし、希釈した *Agrobacterium* 懸濁液で 30 分間培養した。

次に、それらの植物体切片は滅菌済み濾紙上で、余分な *Agrobacterium* 懸濁液を除いてから 50、100、150、200μM アセトシリンゴンを添加あるいは無添加の 0.3% ゲルライトを含んだ MSB5 培地上で 2 日間培養した。

その後、植物体切片を MSB5S 液体培地で 1 回、500 mg/l セフォタキシムを含んだ MSB5S 液体培地で 3 回洗浄した。

洗浄後、植物体切片を選択カルス誘導培地（50 mg/l カナマイシン、500 mg/l セフォタキシム、500 mg/l カルベニシリン、1 mg/l zeatin、1 mg/l BAP、0.1 mg/l NAA 及び 0.25% ゲルライトを含んだ MSB5S 培地）に移植した。

カナマイシン耐性カルスは、植物体切片から切り離し、選択シュート誘導培地（50 mg/l カナマイシン、500 mg/l セフォタキシム、500 mg/l カルベニシリン、1 mg/l zeatin、1 mg/l BAP、0.1 mg/l NAA 、0.15% ゲルライト及び 0.4% バクトアガーを含んだ MSB5S 培地）に移植した。

誘導されたシュートは、カナマイシン耐性カルスから切り離し、選択発根培地（50 mg/l カナマイシン、500 mg/l カルベニシリン、0.5 mg/l IBA、0.02 mg/l NAA 及び 0.8% 寒天を含んだ MSB5S 培地）に移植した。

Ⅲ-1-2-4　形質転換体の組織化学的 GUS 検出

I-2-2-4-1 と同様に、x-gluc を基質としてカナマイシン耐性カルスの GUS 活性を観察した。なお、形質転換処理を施していないカルスをコントロールとして用いた。

Ⅲ-1-3　実験結果

Ⅲ-1-3-1　形質転換実験に用いる組織切片の検討

ココノエギリ無菌植物体のどの組織切片から最も効率よくカナマイシン耐性カルスが誘導されるかを検討したところ、葉柄切片からは約 0.7 個と高頻度にカナマイシン耐性カルスが誘導された（Table 10）。他方、茎切片からは約 0.5 個、葉切片からは約 0.2 個のカナマイシン耐性カルスが誘導され、根切片からは全くカナマイシン耐性カルスが誘導されなかった。

なお、得られたカナマイシン耐性カルスを無作為に 50 個選びだし、x-gluc 溶液で処理し、GUS 活性を調べたところ、49 個のカナマイシン耐性カルスはカルス全体が青く発色し、強い GUS 活性が確認された（Figure 15-A, B）。

Ⅲ-1-3-2　カナマイシン耐性カルス誘導に対するアセトシリンゴンの影響

ココノエギリにおいて、共存培地へのアセトシリンゴンの添加は、形質転換効率を増加させた（Figure 16）。1 葉切片当たりで最も多くのカナマイシン耐性カルスが得られたのは、150μM のアセトシリンゴンを添加した場合であった。150μM アセトシリンゴンを添加した場合は、培地に全くアセトシリンゴンを添加しなかった場合と比較して、約 3 倍のカナマイシン耐性カルスが得られた。

Table 10. Selection of suitable tissue for effective transformation of Chinese paulowna.

Tissue	Number of tissue segments	Number of kanamycin-resistant calli	
Leaf	210	40	(0.19*)
Petiole	210	152	(0.72)
Stem	210	101	(0.48)
Root	210	0	(0)

Tissue segments were co-cultivated with *A. tumefaciens* on medium that contained 150μM acetosyringone. *Values in parentheses indicate average numbers of calli induced per tissue segment.

Ⅲ-1-3-3　カナマイシン耐性カルス誘導に対する共存培地の炭素源の影響

共存培地の炭素源としてサッカロース、グルコース、マルトース、フルクトースを用いて葉柄切片からのカナマイシン耐性カルスの誘導に対する影響を調べた（Figure 17）。結果は、サッカロース及びフルクトースを用いた場合に、効率良くカナマイシン耐性カルスが誘導された。特にサッカロースを用いた場合に誘導されたカナマイシン耐性カルスの数は、グルコースを用いた場合の約 2.5 倍であった。よって、サッカロースは、カナマイシン耐性カルスを誘導するために用いる炭素源として最も適していることが明らかとなった。なお、グルコースを用いた場合には、共存培養の際にアグロバクテリウムの過剰な増殖が起こり、植物切片はクロロシスの症状を示した。この現象は、他の炭素源を用いた場合には起こらなかった。

Ⅲ-1-3-4　カナマイシン耐性カルス誘導に対する共存培地の pH の影響

共存培地の pH（1N 水酸化ナトリウムで調整）を 4、5、6、7、8 とし、葉柄切片からのカナマイシン耐性カルスの誘導に対する影響を調べた（Figure 18）。結果としては、pH が 5 から 8 の間では、カナマイシン耐性カルスの誘導効率はほぼ同様に高いものであった。しかし、pH が 4 の場合に、カナマイシン耐性カルスの誘導効率が他の pH の時と比較して低かった。よって以後は、通常の組織培養に用いられる pH 5.8 に培地を調整して実験を行った。

Ⅲ-1-3-5　形質転換体の再生

葉柄切片から誘導された 500 個のカナマイシン耐性カルスを選択シュート誘導培地に移植したところ、6 つのシュートが得られた。

しかし、それらのシュートを選択発根培地に移植したところ、ほとんどのシュートは発根せず、成長することがなかった。

Ⅲ-1-4　考察

本章は *Agrobacterium tumefaciens* によるココノエギリ形質転換に関する最初の報告である。葉柄切片は、形質転換体の作出のための最も有効な組織であった。ここで、前述のようにカナマイシン耐性カルスを誘導させるための最適な植物切片としては、セイヨウハコヤナギでは茎であり、シラカンバでは葉であった。それらの結果は、形質転換体を作出するための最適な組織は、樹種によって異なることを明示している。

ココノエギリでは、共存培地中へのアセトシリンゴンの添加は形質転換効率を著しく向上させた。それらの結果は前述のシラカンバとは一致し、セイヨウハコヤナギでとは異なるものであった。

共存培地中のサッカロースは、本実験で用いた 4 種類の炭素源の中で最も効率良くカナマイシン耐性カルスを誘導した。Shimoda らの報告 [59]では *A. tumefaciens* のß-ガラクシダーゼ活性量に対する種々の炭素源の影響を調べ、結果として、グルコースが最も効率良く *A. tumefaciens* の vir gene の発現量を著しく増加させた。他方、本実験でグルコースを用いた場合には、4 種類の炭素源の中で最もカナマイシン耐性カルスの誘導効率が低かった。その相違は、 本実験ではカナマイシン耐性カルスの誘導において、間接的に *A. tumefaciens* の vir gene の発現量に対する炭素源の影響を調べているからであると推測される。

葉柄切片から誘導されたカナマイシン耐性カルスを選択シュート分化培地に移植後、シュートは非常に低い割合（約 1%）でしか誘導されなかった。この原因は、カナマイシン耐性カルスに外来遺伝子が導入されたために植物ゲノム DNA 中のシュート分化能に関わる遺伝子が影響を受けた可能性がある。

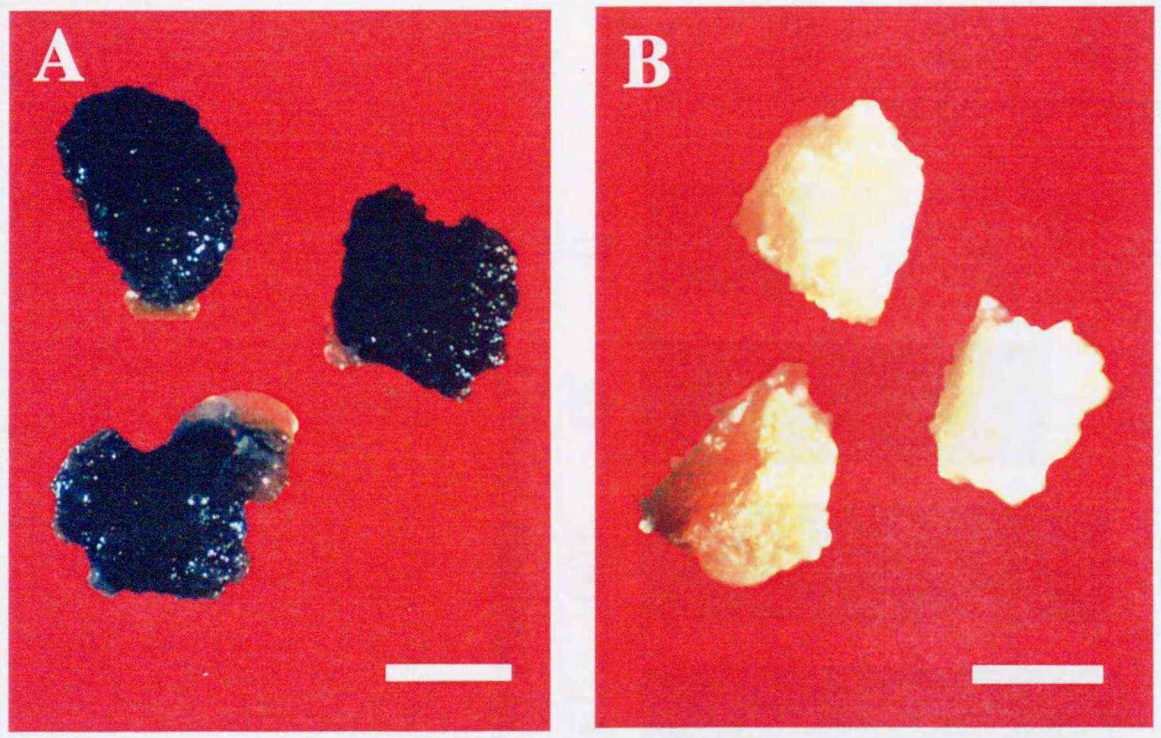


Figure 15. Histochemical staining of transformed paulownia calli for GUS activity with x-gluc. A; Transformed calli. B; Control calli. Bar=1 cm.

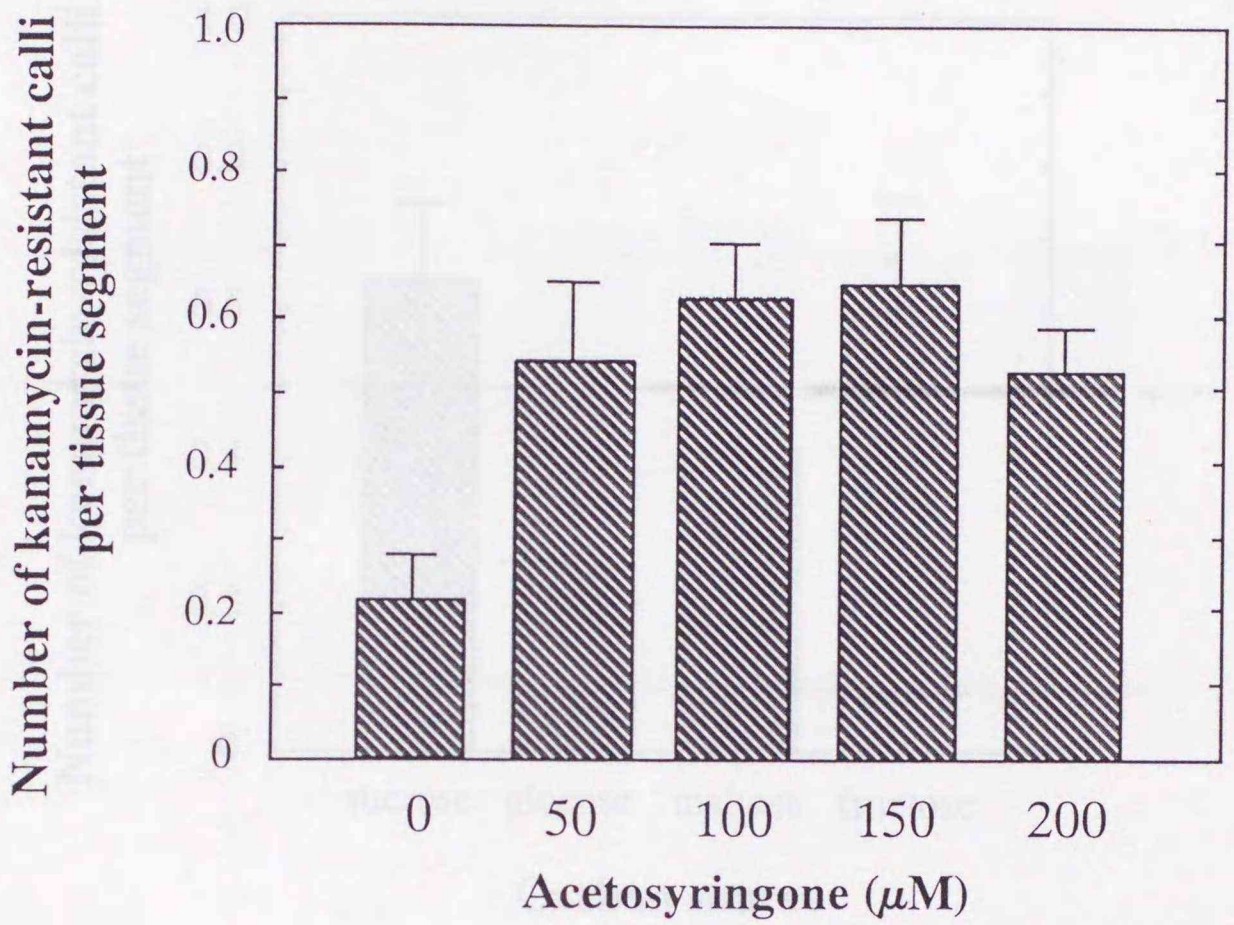


Figure 16. Effects of acetosyringone during transformation of paulownia on the induction of kanamycin-resistant calli. A total of 21 tissue segments in each case was co-cultivated with *A. tumefaciens* on medium that contained 3% (w/v) sucrose and various concentrations of acetosyringone as indicated, at pH 5.8. Numbers of calli induced per tissue segment, after 30 days, are means ± SE of results from five replicate experiments.

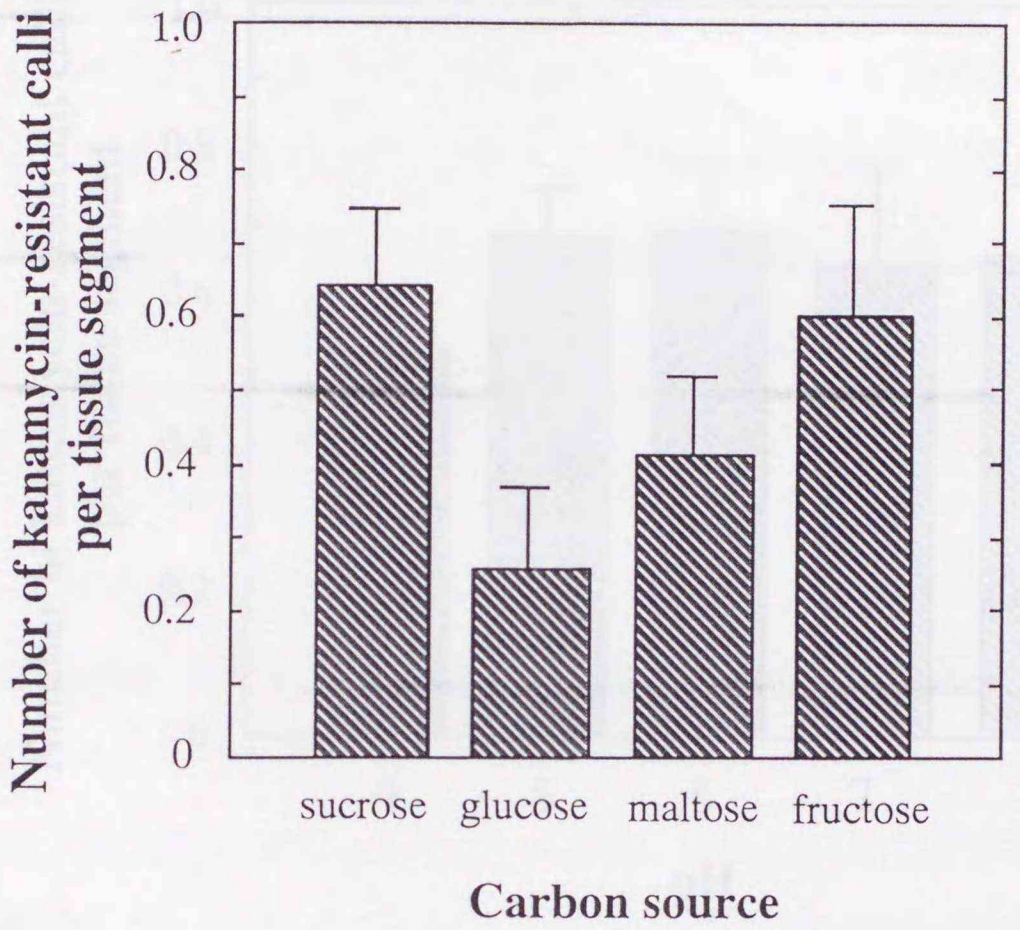


Figure 17. Effects of various sources of carbon during transformation of paulownia on the induction of kanamycin-resistant calli. A total of 21 tissue segments in each case was co-cultivated with *A. tumefaciens* on medium that contained 150 μM acetosyringone and various sources of carbon at 3% (w/v) as indicated, at pH 5.8. Numbers of calli induced per tissue segment, after 30 days, are means ± SE of results from five replicate experiments.

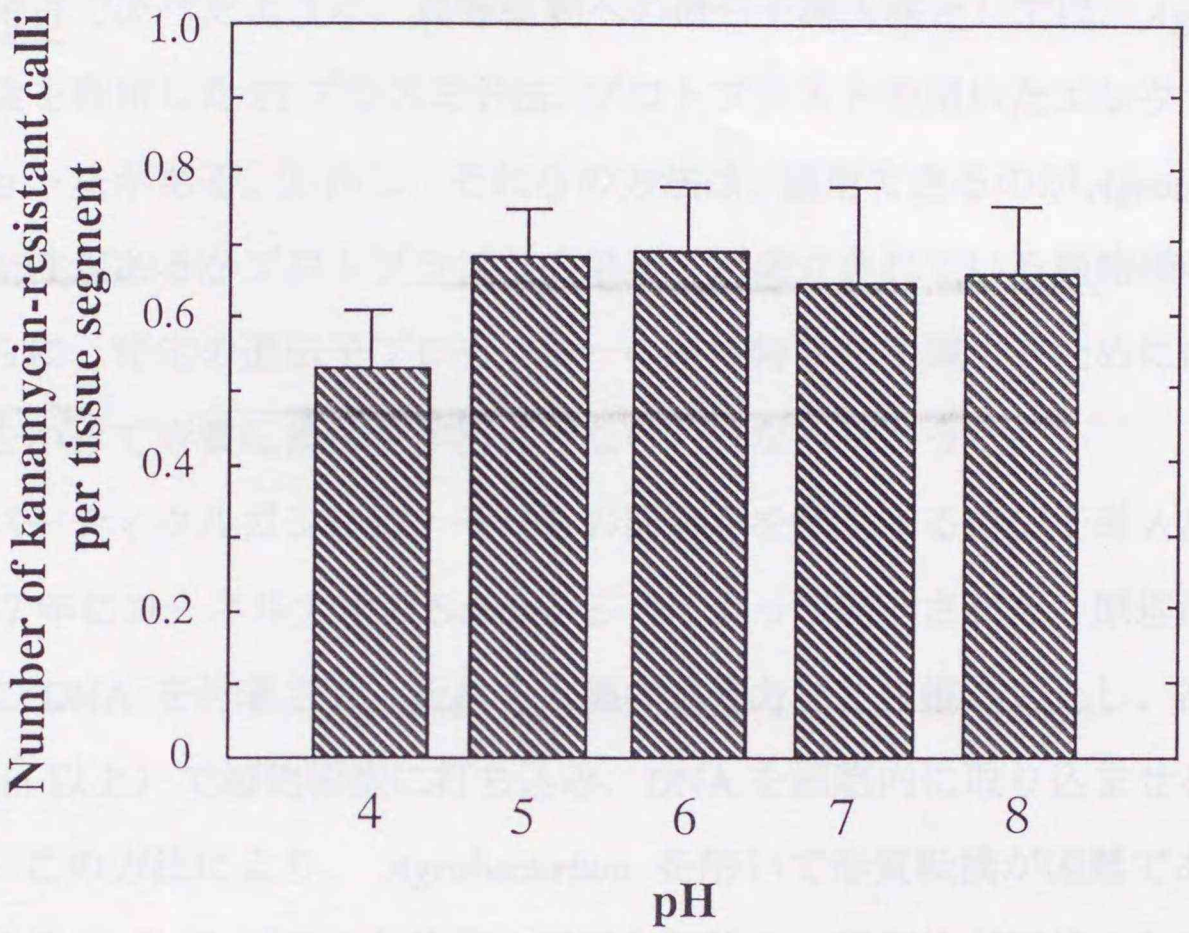


Figure 18. Effects of pH during transformation of paulownia on the induction of kanamycin-resistant calli. A total of 21 tissue segments was in each case co-cultivated with *A. tumefaciens* on medium that contained 150 μM acetosyringone and 3% (w/v) sucrose, with the various pH as indicated. Numbers of calli induced per tissue segment are means ± SE of results from five replicate experiments.

Ⅲ-2　パーティクルガン法による形質転換系の開発

Ⅲ-2-1　はじめに

緒言で述べたように、高等植物への遺伝子導入法としては、*Agrobacterium* 感染を利用した Ti プラスミド法、プロトプラストを用いたエレクトロポレーション法がある。しかし、それらの方法は、適用できるのが *Agrobacterium* に感受性があるかプロトプラストの培養系が確立されている植物種に限定され、さらに、特定の遺伝子プロモーターの組織特異性を調べるためには、長い時間をかけて形質転換体を作出させなければならなかった。

パーティクルガン法は、それらの問題点を解決する遺伝子導入法であり、1987 年にコーネル大学の Sanford ら [xz]によって開発された。原理は、金属粒子に DNA を付着させ、それを火薬の爆発力などを推進力とし、高速（秒速 400m 以上）で植物細胞に打ち込み、DNA を細胞内に取り込ませる方法である。この方法により、 *Agrobacterium* を用いて形質転換が困難であった単子葉植物、プロトプラスト培養の困難な植物の形質転換が可能になった。

本章では、パーティクルガン法を用いて再現性が高く、効率の良いココノエギリ形質転換系を開発する目的で実験を行った [61]。

Ⅲ-2-2　材料及び実験方法

Ⅲ-2-2-1　試料

試料は、ココノエギリの種子から無菌的に発芽させた実生を 0.5 mg/l IBA を添加した MSB5S 寒天培地に 3000 lux 蛍光灯下、日長 16 時間、25℃の培養条件で、継代培養して得られた幼植物体を用いた。幼植物体は葉（2 cm 角）、葉柄（1 cm 長）、茎（1 cm 長）の切片に切り分け、0.3% ゲルライトを添加した MSB5S 培地入った 9cm シャーレの上に並べ、実験に用いた[61]。

Ⅲ-2-2-1　DNA

遺伝子導入には、CaMV 35S プロモーターにホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子[62]を組み込んだ DNA（pDO432）を用いた（Figure 19）。

Ⅲ-2-2-2　装置

装置は Biolistic PDS-1000/He（Bio-Rad 社製）を用いた。ボンバートメント条件[64]は、1100 psi (7584 kPa)、ラプチャーディスクとマクロキャリアの距離を 1cm、マクロキャリアの移動距離を 1.1cm、マイクロキャリアの移動距離を 9cm とした。

Ⅲ-2-2-3　金属粒子へのプラスミド DNA のコーティング

金属粒子は、1μm 金粒子を用い、次の手順でプラスミド DNA をコーティングした。

＊6 回のボンバートメントに対して

1）50% グリセロール中の金粒子（60 mg/ml）を 10 分間懸濁し、50μl（3mg 金粒子）を 1.5ml マイクロチューブにいれた。

2）さらに、以下を順に加え、5 分間懸濁した。

5μl　plasmid DNA (1 μg/μl)

50μl　$CaCl_2$ (2.5M)

20μl　spermidine (free-base, 0.1M)

3）10 分間静置後、2 秒間遠心にかけ、上清を除いた。

4）140μl の 70%エタノールを加え、沈殿を洗浄し、上清を除いた。

5）140μl の 100%エタノールを加え、沈殿を洗浄し、上清を除いた。

6) 70μl の 100%エタノールを加え、3 秒間超音波洗浄機で沈殿を再懸濁した。

7)10μl の懸濁液をマクロキャリアの中心にのせ、1 時間乾燥後実験に用いた。

Ⅲ-2-2-4　ルシフェラーゼ活性の分析

ボンバートメント処理してから 48 時間後に、キリ組織切片の表面にルシフェリン溶液〔1mM ルシフェリン、25mM クエン酸ナトリウム (pH 5.5)〕を噴霧した。

ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、発光画像解析装置（Argus-50/2D）を用いて測定した[65]。

Ⅲ-2-2　実験結果

Ⅲ-2-2-1　ルシフェラーゼの一過性発現

ボンバートメント処理した葉及び茎切片は、高いルシフェラーゼ活性が観察された（Table 11、Figure 20-B, D）。しかし、葉柄切片は茎切片と比べてルシフェラーゼを発現していた割合が低かった。

なお、ルシフェラーゼ活性を示した組織切片をシュート誘導培地（1 mg/l zeatin、1 mg/l BAP、0.1 mg/l NAA 、0.15% ゲルライト及び0.4% バクトアガーを含んだ MSB5S 培地）に移植したところ、約 2 週間後にシュートが誘導された。誘導されたシュートは、組織切片から切り離し、発根培地（0.5 mg/l IBA 及び0.8% 寒天を含んだ MSB5S 培地）に移植したところ、約 2 週間後に発根が観察された。

Table 11. Selection of suitable tissue for microprojectile-mediated DNA transfer to paulownia.

Tissue	Total number of samples	Number of samples expressing luciferase	
Leaf	10	9	(90)[a]
Petiole	15	3	(20)
Stem	20	16	(80)

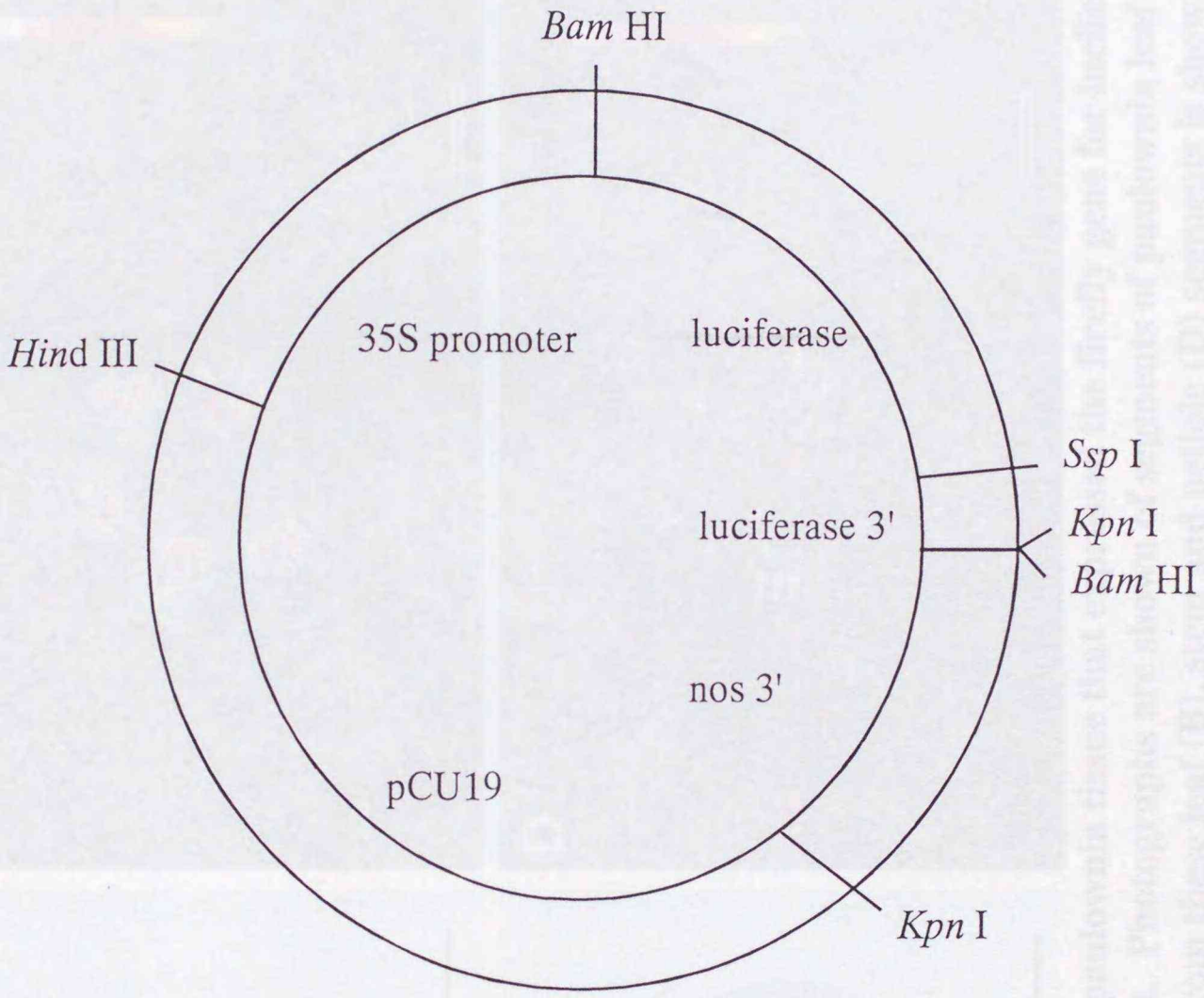
[a]Values in parentheses indicate the percentages of tissue samples that expressed luciferase.

Ⅲ-2-4　考察

本章は、パーティクルガンによるココノエギリ形質転換に関する最初の報告である。ルシフェラーゼ遺伝子を用いた形質転換系の利点は、遺伝子を導入した植物組織切片を非破壊的に分析できることである。つまり、外来遺伝子の一過性発現を確認後も植物組織の培養が可能である。

実験に用いた試料で、葉柄切片は、葉切片や茎切片と比較すると遺伝子導入処理後のルシフェラーゼの発現効率が低かった（Table 11）。この原因は、葉柄切片は葉切片や茎切片と比較して、遺伝子導入処理によって組織が金属粒子によってより障害を受け、細胞活性が落ちたことや何らかの原因でルシフェラーゼの発現が抑制されていたことが推測される。また、本章では、遺伝子導入の際にタバコで報告されている最適条件（Ⅲ-2-2-2、Ⅲ-2-2-3）[64]を用いたが、葉柄切片ではさらに金属粒子の種類及び直径、圧力等の遺伝子導入条件の検討が必要であると考えられる。

前章での結果のようにココノエギリでは、Ti プラスミド法によって高頻度にカナマイシン耐性カルスが得られるが、カナマイシン耐性カルスからのシュート分化率は非常に低かった。しかし、今回の形質転換系を用いることにより、葉柄等から直接シュートを誘導する系が利用できるようになり、カルスからシュートを分化させるステップが不必要となる。



pDO432

Figure 19. Restriction map of pDO432, the plasmid used in the transformation experiments.

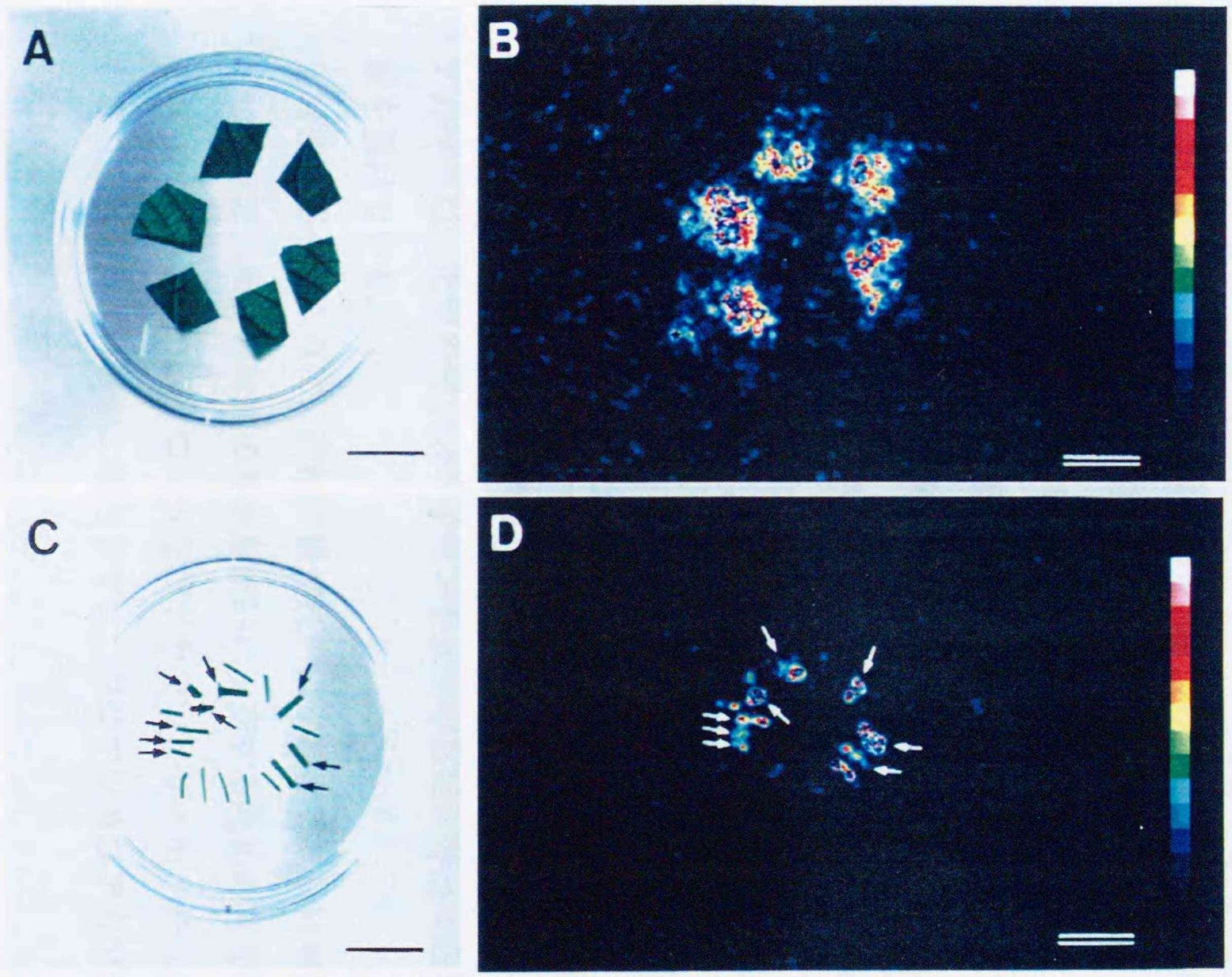


Figure 20. Bioluminescence from segments of paulownia tissue that expressed the firefly gene for luciferase two days after microprojectile bombardment. Photographs are shown of segments of paulownia leaf (A), stem and petiole (C). The bioluminescence from these leaf (B), stem and petiole (D) segments is shown after application of luciferin. The stem segments are indicated by arrows. The color calibration bar indicates increasing numbers of photons from bottom to top (blue to white). Bar=2 cm.

第Ⅳ章　クロマツ及びアカマツの形質転換系の開発

Ⅳ-1　はじめに

針葉樹は効率は低いが*Agrobacterium*に感染することが確かめられている[25]。ところが、それらの樹種のほとんどは、カルスからの不定芽の再生系が確立していない。従って、針葉樹では、パーティクルガン法による形質転換実験が一般的である。1991年にGoldfarb[65]らによって、ダグラスファーで初めて外来遺伝子の一過性発現が報告された。それ以来、多くの針葉樹で形質転換系の開発を試みた研究が報告されている。そして、近年、パーティクルガン法を用いて*Picea glauca*[25]、*Picea mariana*[26]、*Larix laricina*[27]、*Pinus radiata*[28]で形質転換体の作出が報告された。しかし、国内の針葉樹についての形質転換実験に関する報告は、ほとんどないのが現状である。

クロマツ及びアカマツは、日本を代表する針葉樹であり、庭園樹や防砂、防潮のために広く植林されている。また、その材は建築材、土木及び造船用材やパルプ材として用いられる。このように重要な樹種であるクロマツ及びアカマツは、近年のマツノザイセンチュウの蔓延に伴って各地で壊滅的な打撃を受けている。

緒言で述べたように、遺伝子操作技術は、親の望ましい形質の全てを保持させたまま、単一の形質のみを選択的に改変するための有効な手段である。それらの技術により、クロマツ及びアカマツにザイセンチュウ抵抗性を付与することが期待されるが、現在までに、クロマツ及びアカマツの形質転換実験に関する報告は全くない。

本章では、パーティクルガン法を用いて再現性が高く、効率の良いクロマツ及びアカマツの形質転換系を開発する目的で実験を行った[66]。

Ⅳ-2　材料及び実験方法

Ⅳ-2-1　試料

クロマツ（英名；Japanese black pine、学名；*Pinus thunbergii* ）及びアカマツ（英名；Japanese red pine、学名；*Pinus densiflora* ）の種子は、70% エタノールで 2 分間、10% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で 10 分間滅菌後、滅菌水で 3 回洗浄した。

次に、種子から胚を取り出し、ホルモン無添加の MSB5S（0.3% ゲルライト）培地上で 1 日から 5 日間培養後、遺伝子導入処理を行った。

Ⅳ-2-1　プラスミド DNA

遺伝子導入には、*GUS* を含んだ pBI221（Figure 21、CLOTECH 社製）及びルシフェラーゼ遺伝子を含んだ pDO432 を用いた。

Ⅳ-2-2　装置

装置及びボンバートメント条件は、Ⅲ-2-2-2 と同様にした。

Ⅳ-2-3　金属粒子へのプラスミド DNA のコーティング

金属粒子へのプラスミド DNA のコーティングは、Ⅲ-2-2-3 と同様にした。なお、金属粒子は、1.0μm、1.6μm 直径金粒子、0.7μm、1.1μm 直径タングステン粒子の 4 種類を使用した。

Ⅳ-2-4　組織化学的 GUS 検出

I-2-2-4-1 と同様に、x-gluc を基質としてボンバートメント処理した種子胚の GUS 活性を観察した。

Ⅳ-3　実験結果

Ⅳ-3-1　クロマツ種子胚への *GUS* の導入

Ⅳ-3-1-1　種子胚の培養日数

遺伝子導入してから48時間後に試料をx-gluc溶液中で1晩処理したところ、クロマツ種子胚では複数の青色スポットが観察され、*GUS* の一過性発現が確認された（Figure 22-A, B）。

GUS の一過性発現に最適な前培養日数は、用いた粒子によって異なっていた（Table 12）。1.0μm 直径の金粒子を用いた場合には3日間、1.6μm 直径の金粒子を用いた場合には4日間培養した種子胚に遺伝子導入した時に最多の青色スポットが観察された。また、0.7μm 直径のタングステン粒子を用いた場合には2日間、1.1μm 直径のタングステン粒子を用いた場合には3日間培養した種子胚に遺伝子導入した時により多くの青色スポットが観察された。

Ⅳ-3-1-2　金属粒子

金属粒子としては、明らかに金粒子を用いた場合に、タングステン粒子より多くの青色スポットが観察された。金粒子では、1.6μm 直径を使用した場合に、1.0μm 直径と比較して4日間以上培養した種子胚に遺伝子導入した場合に、約2倍の青色スポットが観察された。タングステン粒子では、0.7μm 直径を使用した場合には、どの培養日数の種子胚に遺伝子導入しても僅かの青色スポットしか観察されなかった。

以上より、本実験の範囲内で、クロマツ種子胚への *GUS* の導入は、培地上に4日間おいた種子胚に1.6μm直径の金粒子を用いて遺伝子導入した場合が最適条件であることが明らかとなった。

Table 12. Effects of particle chracteristics and preculture periods of zygotic embryos on the expression of GUS activity in Japanese black pine after mircroprojectile bombardment.

Preculture periods of zygotic embryos (days)	Number of blue spots per zygotic embryo			
	Gold		Tungsten	
	1.0 μm	1.6 μm	0.7 μm	1.1 μm
0	8.2 ± 1.7	12.3 ± 1.6	2.3 ± 0.4	5.2 ± 1.1
1	11.9 ± 2.3	8.9 ± 1.4	5.1 ± 0.5	4.1 ± 0.9
2	17.4 ± 2.6	16.1 ± 1.4	4.4 ± 1.1	11.3 ± 2.4
3	22.3 ± 3.0	23.8 ± 2.1	3.7 ± 0.5	14.6 ± 2.1
4	14.8 ± 1.6	32.4 ± 3.6	2.5 ± 0.5	12.0 ± 1.6
5	12.9 ± 2.4	29.0 ± 4.4	2.2 ± 0.4	10.1 ± 1.0

A total of 9 zygotic embryos were on a petri dish were bombarded at the respective conditions. The numbers of blue spots in the 9 embryos were examined 2 days after microprojectile bombardment. Value of blue spots per zygotic embryo are means ± S.E. of four experiments.

Ⅳ-3-2　クロマツ種子胚へのルシフェラーゼ遺伝子の導入

GUS の導入の最適条件（培地上に 4 日間おいた種子胚に 1.6μm 直径の金粒子を用いた。）で、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子を含む pDO432 をクロマツ種子胚に導入した。48 時間後にボンバートメント処理した種子胚にルシフェリンを噴霧し、発光画像解析装置（Argus50/2D）で分析した結果を Figure 23 に示す。結果として、クロマツ種子胚は高い発光強度を示し、ルシフェラーゼ遺伝子の一過性発現が確認された。

Ⅳ-3-3　アカマツ種子胚への *GUS* の導入

Ⅳ-3-3-1　種子胚の培養日数

遺伝子導入してから48時間後に試料をx-gluc溶液中で1晩処理したところ、アカマツ種子胚では複数の青色スポットが観察され、*GUS* の一過性発現が確認された（Figure 24-A, B）。

GUS の一過性発現に最適な前培養日数は、用いた粒子によって異なっていた（Table 13）。1.0μm 直径の金粒子を用いた場合には2日間、1.6μm 直径の金粒子を用いた場合には4日間培養した種子胚に遺伝子導入した時に最多の青色スポットが観察された。また、0.7μm 直径のタングステン粒子を用いた場合には2日間、1.1μm 直径のタングステン粒子を用いた場合には4日間培養した種子胚に遺伝子導入した時により多くの青色スポットが観察された。

Ⅳ-3-3-2　金属粒子

金属粒子としては、明らかに金粒子を用いた場合に、タングステン粒子より多くの青色スポットが観察された。金粒子では、1.6μm 直径を使用した場合に、1.0μm 直径と比較して3日間以上培養した種子胚に遺伝子導入した時に、約2から3倍の青色スポットが観察された。タングステン粒子を使用した場合には、どの培養日数の種子胚に遺伝子導入しても僅かの青色スポットしか観察されなかった。

以上より、本実験の範囲内で、アカマツ種子胚への *GUS* の導入は、培地上に4日間おいた種子胚に1.6μm 直径の金粒子を用いて遺伝子導入した場合が最適条件であることが明らかとなった。

Table 13. Effects of particle chracteristics and preculture periods of zygotic embryos on the expression of GUS activity in Japanese red pine after mircroprojectile bombardment.

Preculture periods of zygotic embryos (days)	Number of blue spots per zygotic embryo			
	Gold		Tungsten	
	1.0 μm	1.6 μm	0.7 μm	1.1 μm
0	8.3 ± 1.4	5.1 ± 1.1	3.1 ± 0.4	3.1 ± 1.1
1	16.4 ± 2.1	10.8 ± 1.6	5.8 ± 0.5	4.9 ± 1.0
2	13.1 ± 1.8	16.2 ± 2.4	4.9 ± 1.1	2.2 ± 0.6
3	15.2 ± 2.6	23.7 ± 4.2	3.3 ± 0.4	5.3 ± 2.1
4	8.9 ± 1.5	29.2 ± 3.5	2.4 ± 0.4	7.1 ± 1.5
5	6.8 ± 1.0	20.8 ± 3.1	2.9 ± 0.5	4.0 ± 0.9

Value are means ± S.E. of four experiments. For details, see the legend of Table12.

Ⅳ-3-4　アカマツ種子胚へのルシフェラーゼ遺伝子の導入

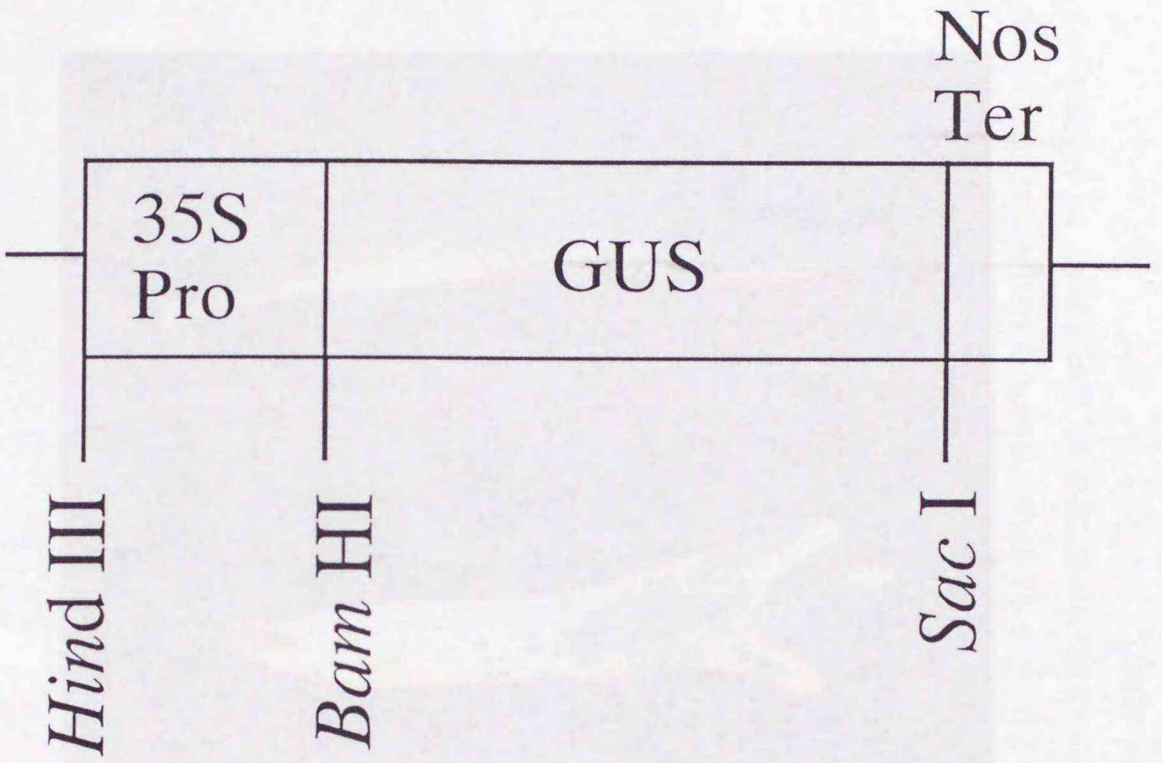
GUS の導入の最適条件（培地上に 4 日間おいた種子胚に 1.6μm 直径の金粒子を用いた。）で、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子を含む pDO432 をアカマツ種子胚に導入した。48 時間後にボンバートメント処理した種子胚にルシフェリンを噴霧し、発光画像解析装置（Argus50/2D）で分析した結果を Figure 25 に示す。結果として、アカマツ種子胚は高い発光強度を示し、ルシフェラーゼ遺伝子の一過性発現が確認された。

Ⅳ-4　考察

遺伝子導入処理したクロマツ及びアカマツ種子胚は、*GUS* の組織化学的検出により、複数の青色ポットが確認され、*GUS* の高い一過性発現を示した。クロマツ及びアカマツとも、1.6μm の金粒子を用い、培地上に 4 日間おいた種子胚を遺伝子導入した場合に最多の青色スポットが観察された。草本植物のパーティクルガンによる遺伝子導入実験では、1.0μm の金粒子を用いている報告が多い[63]。しかし、木本植物では、1.0μm の金粒子と比較して 1.6μm の金粒子を用いた方が高い一過性発現が得られたという報告があり[67]、今回の実験結果はそれと一致した。

そして、金粒子を用いた際の形質転換効率は、タングステン粒子を用いた場合よりも高かった。ほぼ同様の直径である 1.0μm の金粒子と 1.1μm のタングステン粒子を比較した結果より、金属の種類が形質転換効率に影響を及ぼしたことが明らかとなった。このことは、金属の種類によって金属間の凝集力が異なり、結果として DNA コーティング後の金属粒子凝集物の大きさの違い（DNA 懸濁液中で金属粒子は完全に分離しない。）が形質転換効率に影響したと思われる。

また、クロマツ及びアカマツとも培地上に 4 日間おいた種子胚に遺伝子導入した場合に最多の青色スポットが観察された。一般的に、パーティクルガン法による遺伝子導入では、用いる植物組織が最も分裂活性が高い時に遺伝子導入処理した場合に、最も形質転換効率が高いとされている。よって、クロマツ及びアカマツは、培地上に 4 日間おいた状態が、細胞の分裂活性が最も高かったと推定される。



pBI221

Figure 21. Restriction map of pBI221, the plasmids used in the transformation experiments.



Figure 22. Histochemical staining of transformed Japanese black pine embryos for GUS activity with x-gluc. Bar=1 mm.

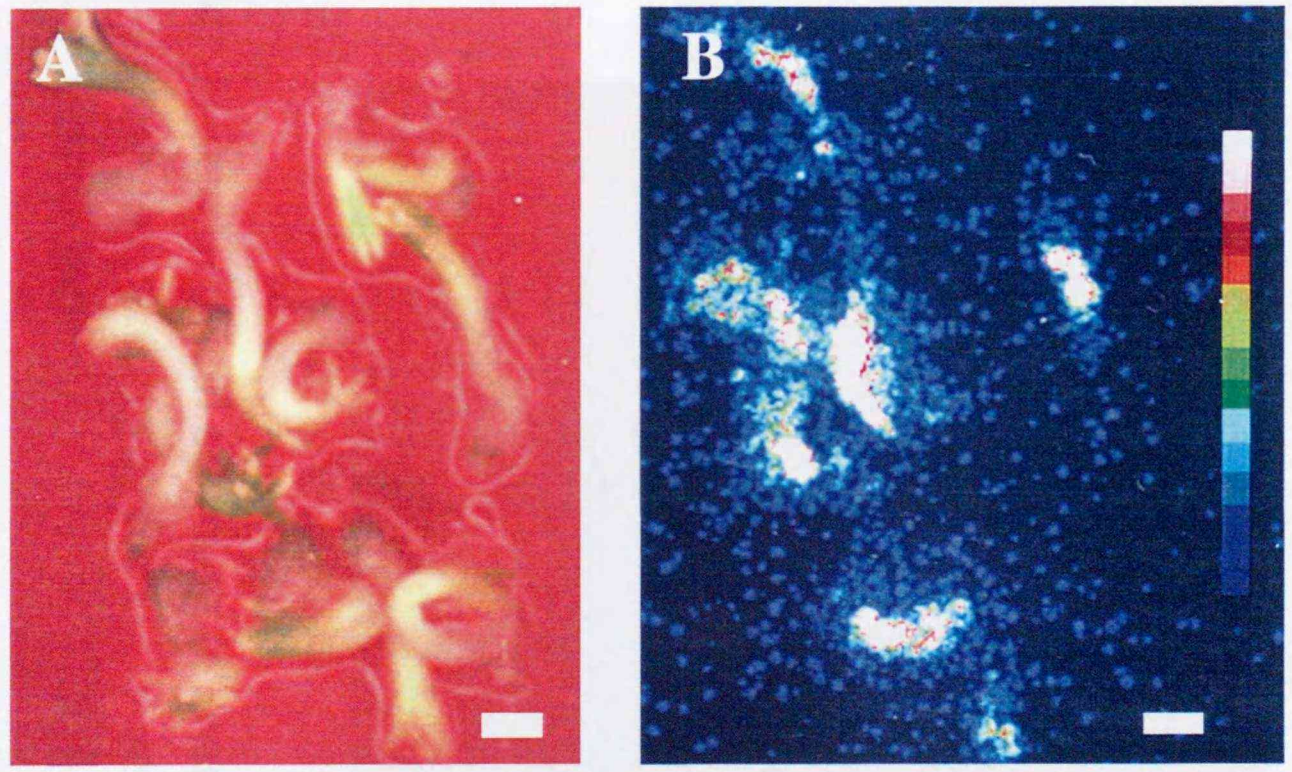


Figure 23. Bioluminescence from Japanese black pine embryos that expressed the firefly gene for luciferase two days after microprojectile bombardment.
A; Photograph is shown of Japanese black pine embryos. B; The bioluminescence from Japanese black pine embryos is shown after application of luciferin.
The color calibration bar indicates increasing numbers of photons from bottom to top (blue to white). Bar=1 mm.

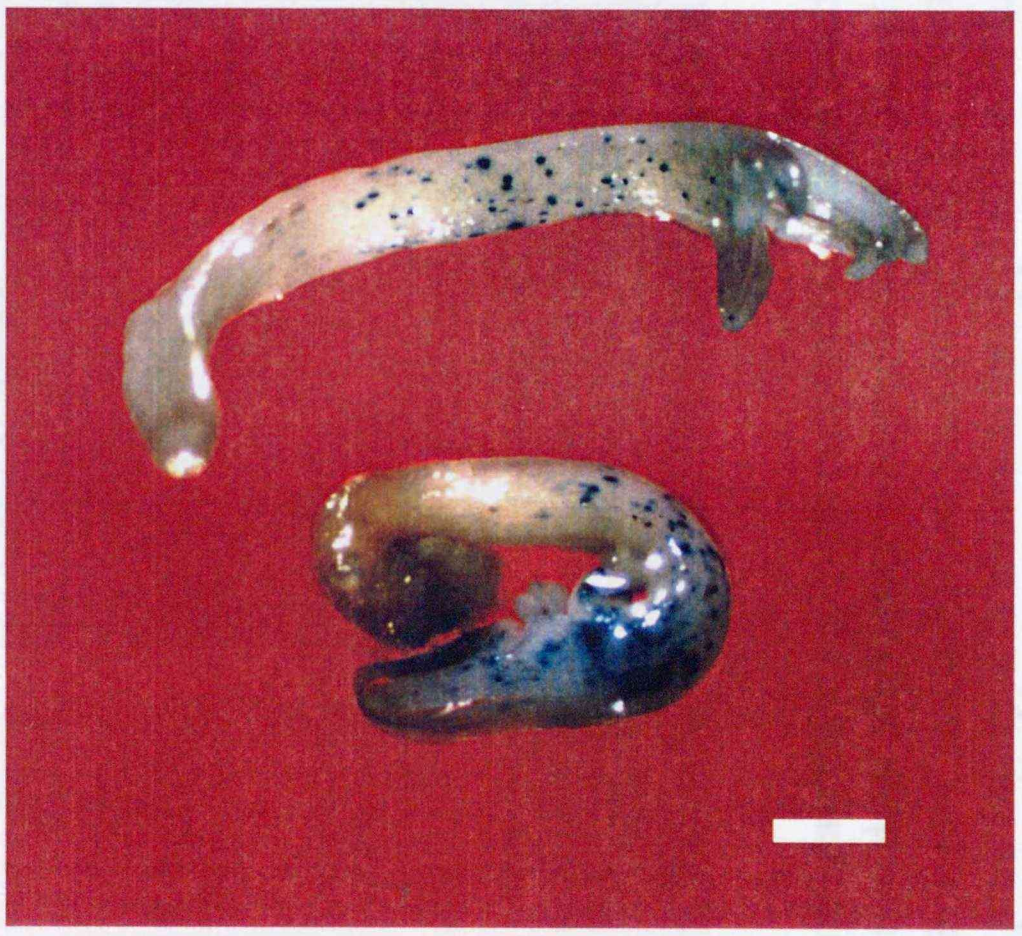


Figure 24. Histochemical staining of transformed Japanese red pine embryos for GUS activity with x-gluc. Bar=1 mm.

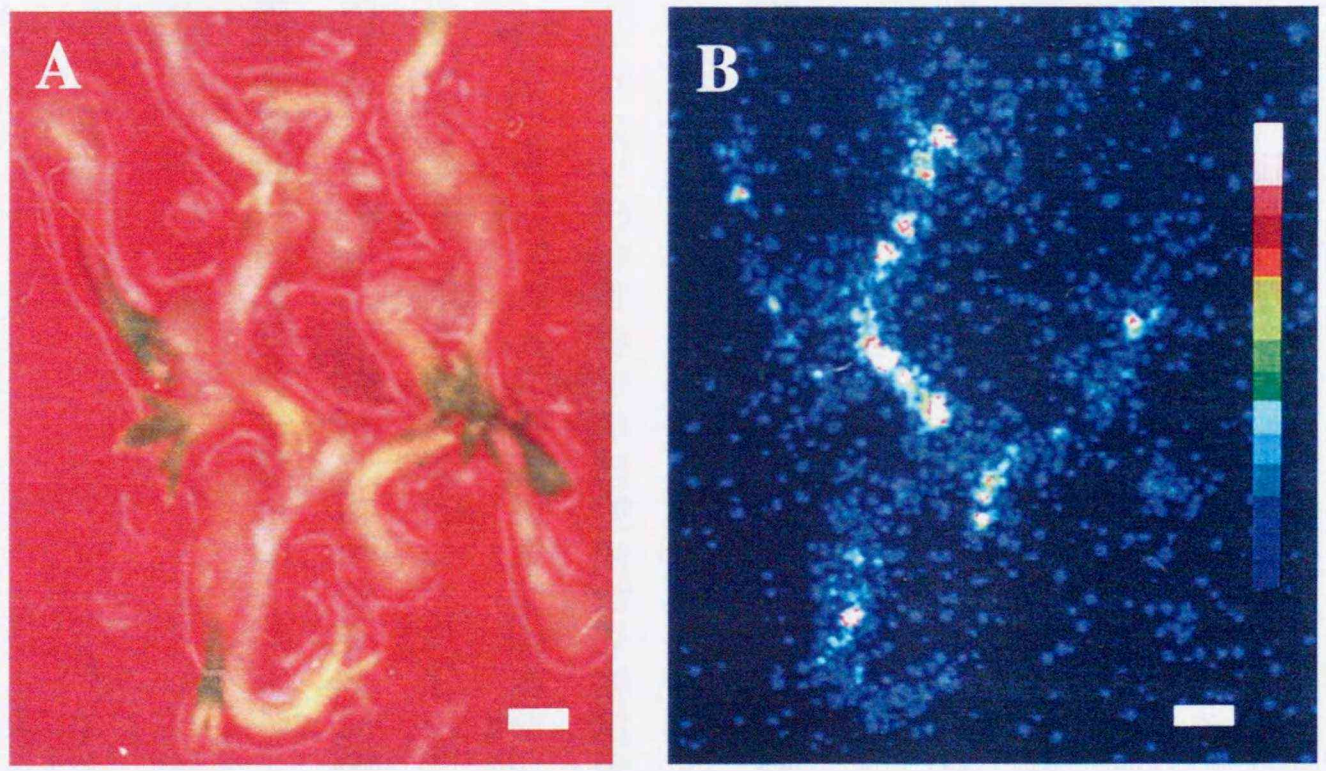


Figure 25. Bioluminescence from Japanese red pine embryos that expressed the firefly gene for luciferase two days after microprojectile bombardment.
A; Photograph is shown of Japanese red pine embryos. B; The bioluminescence from Japanese red pine embryos is shown after application of luciferin.
The color calibration bar indicates increasing numbers of photons from bottom to top (blue to white). Bar=1 mm.

第Ⅴ章　スギの形質転換系の開発

Ⅴ-1　はじめに

スギは、日本で最も重要な林業樹種であり、生活とのつながりも深い。その材は、建築材として柱、板材などほとんどのあらゆる部分に用いられる。特に、木目の美しい板材や磨き丸太は、天井板、欄間など室内装飾材として重用される。また、土木用材や包装材のほか、下駄、割り箸などの生活用材としても大量に用いられる。スギは、日本の造林面積のうち40%以上を占め、ヒノキ、マツ類を抜いて第１位の重要樹種である。その理由としては、前記のような木材の幅広い用途と単位面積あたりの生産量の大きさ、そして保育の容易さなどが挙げられる。

近年、スギ花粉症は日本の大きな社会問題となっている。よって、スギ次世代林の育成のためには、これまでのスギの特性をそのまま生かし、雄花形成やアレルゲンの生産のみを抑制された系統が必要である。こうした要請に対し、従来の育種技術では育種年月が長くかかるため、遺伝子導入によるスギの形質転換体作出技術が必要とされている。

本章では、パーティクルガン法を用いて再現性が高く、効率の良いスギ形質転換系を開発する目的で実験を行った。

V-2　実験操作

V-2-1　試料

実験には、以下に示すスギ（英名：Japanese cedar、学名：*Cryptomeria japonica*）の各組織を用いた。なお、培養は全て 3000 lux 蛍光灯下、日長 16 時間、25℃で行った。

種子胚：70% エタノールで 2 分間、10% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で 15 分間滅菌後、滅菌水で 3 回洗浄した。次に、種子から胚を取り出し、ホルモン無添加の MSB5S（0.3% ゲルライト）培地上で 3 日から 7 日間培養後、遺伝子導入処理をした。

実生切片：種子胚と同様の条件で、種子を滅菌し、ホルモン無添加の MSB5S（0.3% ゲルライト）培地上で発芽させた。実生は、約 2〜3cm の長さまで成長させ、針葉、上胚軸、下胚軸、根の 4 つに切り分けた。実生切片は、ホルモン無添加の MSB5S（0.3% ゲルライト）培地上で 3 日から 7 日間培養後、遺伝子導入処理をした。

懸濁培養物：種子胚と同様の条件で種子を滅菌し、種子胚を取り出し、0.2 mg/l 2,4-D、500 mg/l L-グルタミン、1 g/l カゼイン分解物を含んだ MSB5S 液体培地に移した。懸濁培養物は、2 週間毎に同組成の新しい培地に移植し、振とう培養（80rpm、暗黒下）を続けた。4 回の継代培養後、懸濁培養物は濾紙上に移し、余分な培地を除いた。濾紙上の懸濁培養物は、ホルモン無添加の MSB5S（0.3% ゲルライト）培地上に移し、3 日から 7 日間培養後、遺伝子導入処理をした。

カルス：種子胚と同様の条件で種子を滅菌し、種子胚を取り出し、0.2 mg/l 2,4-D、500 mg/l L-グルタミン、1 g/l カゼイン分解物を含んだ MSB5S 培地（0.4% ゲルライト）に移した。種子胚から誘導されたカルスは、1 ヶ月毎に同組成の新しい培地に移植し、培養（暗黒下）を続けた。2 回の継代培養後、カルスを 1cm 直径の大きさに切り分け、ホルモン無添加の MSB5S（0.3% ゲルライト）培地上に移し、3 日から 7 日間培養後、遺伝子導入処理をした。

Ⅴ-2-2　プラスミド DNA

遺伝子導入には、Ⅳ-2-1 と同様の *GUS* を含んだ pBI221 及びⅢ-2-2-1 と同様のルシフェラーゼ遺伝子を含んだ pDO432 を用いた。

Ⅴ-2-3　装置

装置及び遺伝子導入条件は、Ⅲ-2-2-2 と同条件及び金属粒子（1.3、1.7μm 直径タングステン）、圧力（650、950、1350、1550psi）、遺伝子導入処理回数（2、3 回）を検討した。

Ⅴ-2-4　金属粒子へのプラスミド DNA のコーティング

金属粒子へのプラスミド DNA のコーティングは、Ⅲ-2-2-3 と同様にした。

Ⅴ-2-5　組織化学的 GUS 検出

I-2-2-4-1 と同様に、x-gluc を基質として遺伝子導入処理した試料の GUS 活性を観察した。

Ⅴ-2-6　ルシフェラーゼ活性の分析

Ⅲ-2-2-4 と同様に、ルシフェリンを基質として遺伝子導入処理した種子胚のルシフェラーゼ活性を観察した。

また、Argus-50 control program の area intensisty analysis により、画像上の種子胚を含む一定面積のルシフェラーゼ発光強度を数値化し、さらに種子胚の投影面積（無作為に 10 個の種子胚を選択し平均値を求めた。）で割った。そして、3 日間培養した種子胚の値を 100 とし、各培養日数の種子胚を用いた場合のルシフェラーゼ活性を相対的に比較した。

V-3　実験結果

V-3-1　*GUS* の導入

GUS を導入してから 48 時間後に、遺伝子導入処理した種子胚、実生切片、懸濁培養物、カルスを x-gluc 溶液中で 1 晩処理したが、どの試料からも青色スポットは観察されなかった。

V-3-2　ルシフェラーゼ遺伝子の導入

ルシフェラーゼ遺伝子を導入してから 48 時間後に、試料にルシフェリンを噴霧し、発光画像解析装置（Argus-50/2D）で発光強度を測定したところ、遺伝子導入処理したスギ種子胚は高い発光強度を示し、ルシフェラーゼ遺伝子の一過性発現が確認された（Figure 26）。

遺伝子導入処理をする際の種子胚の培養日数は、ルシフェラーゼ遺伝子の発現に影響した（Table 14）。相対的ルシフェラーゼ発光強度は、培養日数 4 日目の種子胚にルシフェラーゼ遺伝子を導入した場合に最高値を示した。

Table 14. Effects of preculture periods of zygotic embryos on the LUC activity in Japanese cedar after microprojectile bombardment.

Days of preculture	Relative luciferase activity
3	100 ± 12
4	127 ± 10
5	107 ± 11
6	81 ± 7
7	62 ± 6

A total of ten zygotic embryo on a MSB5S medium supplemented with 0.3% (w/v) Gelrite were bombarded. Intensity of bioluminescence derived from ten embryos was measured with a low-light video microscope system. The average intensity per plate was calculated from two plates of same preculture period. Relative LUC activity was calculated by dividing the average intensity by the average area of horizontal section of visualized embryo, and taking the value at 3 days of preculture as 100. Value are means ± S.E. of four replicate experiments.

V-4　考察

スギに *GUS* の導入を試みたが、遺伝子導入処理した種子胚、実生切片、懸濁培養物、カルスは、本章で用いたいかなる条件においても *GUS* の一過性発現を示さなかった。この原因は、*GUS* がスギ種子胚中で何らかの阻害を受けることでその発現が抑制されている可能性がある。また、Levée ら[29]がカラマツの種間雑種（*Larix kaempferi*×*L. decidua*）の形質転換実験の報告で述べているように、植物ゲノム中の DNA の影響で *GUS* が不活性化されていることも考えられる。

他方、ルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合には、遺伝子導入処理したスギ種子胚は、画像解析装置によりルシフェラーゼ活性が観察された。その結果より用いたバイナリーベクターpDO432 中の 35S プロモーターは正常に機能したことが示された。よって、前述の pBI221 の導入によって *GUS* が発現しなかった原因は 35S プロモーターによるものではないことが明らかとなった。

また、培地上に 4 日間おいた種子胚に遺伝子導入した場合に、最も高いルシフェラーゼ活性が観察された（Table 14）。よって、スギ種子胚は前章のクロマツ及びアカマツと同様に、培地上に 4 日間おいた状態が細胞の分裂活性が高かったと推定される。

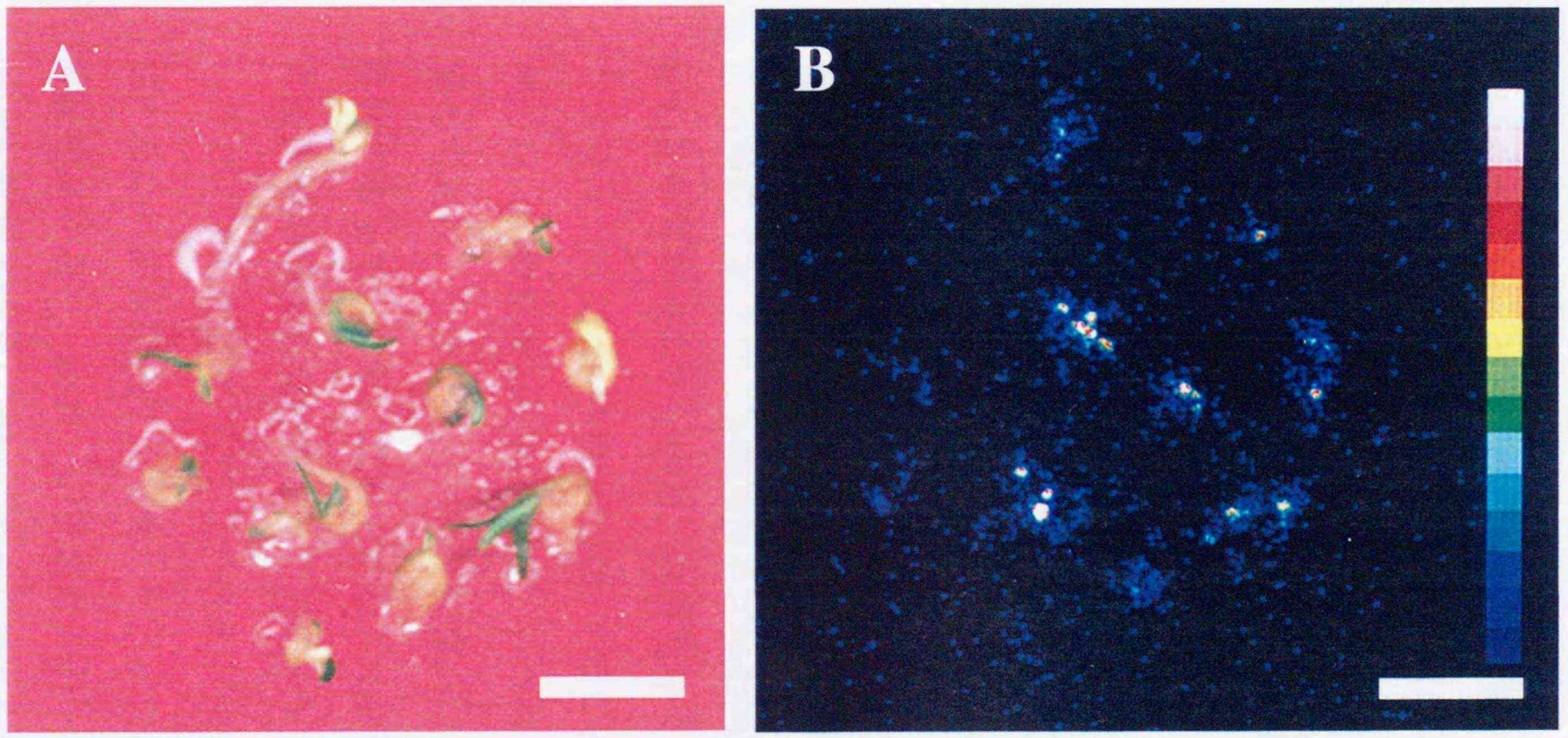


Figure 26. Bioluminescence from Japanese cedar embryos that expressed the firefly gene for luciferase two days after microprojectile bombardment.
A; Photograph is shown of Japanese cedar embryos. B; The bioluminescence from Japanese cedar embryos is shown after application of luciferin.
The color calibration bar indicates increasing numbers of photons from bottom to top (blue to white). Bar=1 mm.

総括

本研究では、林木における効率の良い形質転換系の確立を最終目標とし、広葉樹では、セイヨウハコヤナギ、シラカンバ、ココノエギリ、針葉樹では、クロマツ、アカマツ、スギを対象として実験を行った。

セイヨウハコヤナギでは、形質転換効率の高い Ti プラスミド法によるセイヨウハコヤナギ形質転換系を開発し、さらに、その形質転換系を利用してイネの形態形成に関わる遺伝子 *OSH1* を導入し、大量発現させ、種々の形態異常を起こした形質転換体を作出した。次には、セイヨウハコヤナギでイネの *OSH1* に相当するホメオボックス遺伝子を単離、解析し、その遺伝子を大量発現させたセイヨウハコヤナギ形質転換体の作出が期待される。また、他の植物ホルモンに応答して発現する遺伝子についても、セイヨウハコヤナギの形質転換系を用い、大量発現させた形質転換体やアンチセンス法で発現を抑制した形質転換体を作出し、解析を行うことが可能となった。

シラカンバでは、諸条件を検討することによって Ti プラスミド法による効率の高い形質転換系を開発した。シラカンバは、北欧を中心に遺伝子研究が進んでおり、シラカンバの形質転換系はプロモーター解析等の遺伝子機能を探索する上で、非常に重要である。本研究の成果は、そのようなシラカンバの遺伝子の機能を解析するための研究に大きく貢献する可能性がある。

ココノエギリでは、 Ti プラスミド法とパーティクルガン法によって再現性のある形質転換系を確立をした。次に、本実験で確立したココノエギリ形質転換系を用い、耐病、耐虫性遺伝子を導入したココノエギリ形質転換体を作出が期待される。それらのキリ形質転換体が、現在深刻となっているてんぐす病やふらん病に耐性を示したならば、キリの育種に多大に貢献することができる。

クロマツ及びアカマツでは、パーティクルガン法によって *GUS* 及びルシフェラーゼ遺伝子の効率の良い一過性発現が得られる形質転換系を開発した。

現在、次の段階として薬剤耐性（カナマイシン、ハイグロマイシン）を付与する遺伝子を含む DNA の導入を試みている。そして最終的には、クロマツ及びアカマツ形質転換系を用い、現在深刻となっているマツノザイセンチュウ〔マツノマダラカミキリ（*Monochamus alternatus*）が媒介するとされる〕に耐性を示すような形質転換体の作出が期待される。

スギでは、パーティクルガン法によってルシフェラーゼ遺伝子の効率の良い一過性発現が得られる形質転換系を開発した。近年、スギ花粉症対策として、スギの雄花形成に関わる遺伝子[67]やアレルゲンに関する遺伝子[68]の研究が進んでいる。本研究で開発したスギの遺伝子導入系は、それらの遺伝子の発現を抑制するように組換え、雄花を形成しない、またはアレルゲンの少ないスギ形質転換体の作出のための重要なステップである。

以上のように本研究において、日本の代表的ないくつかの樹種で初めて形質転換系を開発した。それらの形質転換系は、新品種開発や未知の遺伝子の機能を解析するために大きく貢献する可能性がある。今後は、そのために有用遺伝子の探索、その導入、形質転換体での発現調節の解明、再現性が高い個体再生系、形質転換体の植栽による安全性評価実験等のさらなる研究を進める所存である。

引用文献

1) Mohri, T., Futamura, N. and Shinohara K. (1995) Morphological change of transgenic poplar induced by expression of a rice homeobox gene. Abstracts of Engineering Plants for Commercial Products and Applications. Lexington. 33

2) 毛利武・篠原健司 (1995) 林木の遺伝子操作 北海道の林木の育種 38(2): 15-19

3) Fillatti, J.I., Sellmer, J., McCown, B., Haissig, B. and Comai, L. (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. Mol. Gen. Genet. 206: 192-199

4) De Block, M. (1990) Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. Plant Physiol. 93: 1110-1116

5) McCown, B.H., McCabe, D.E., Russell, D.R., Robinson, D.J., Barton, K.A. and Raffa, K.F. (1991) Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. Plant Cell Rep. 9: 590-594

6) Klopfenstein, N.B., Shi, N.Q., Kernan, A., McNabb, H.S., Jr., Hall, R.B., Hart, E.R. and Thornburg, R.W. (1991) Transgenic *Populus* hybrid expresses a wound-inducible potato proteinase inhibitor II-CAT gene fusion. Can. J. For. Res. 21: 1321-1328

7) Confalonieri, M., Balestrazzi, A., and Bisoffi, S. (1994) Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens.* Plant Cell Rep. 13: 256-261

8) Kajita, S., Osakabe, K., Katayama, Y., Kawai, S., Matsumoto, Y., Hata, K. and Moroboshi, N. (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of poplar

using a disarmed binary vector and the overexpression of a specific member of a family of poplar peroxidase genes in transgenic poplar cell. Plant Sci. 103: 231-139

9) Ebinuma, H. (1994) Application of wood biotechnology. International Biotechnology Symposium. Tokyo. 119-123

10) Weigel, D. and Nilsson, O. (1995) A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. Nature 377: 495-500

11) Heuchelin, S.A., McNabb, H.S. and Klopfenstein, N.B. (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Populus* × *euramericana* "Ogy" using the chimeric CaMV 35S-pin2 gene fusion. Can. J. For. Res. 27: 1041-1048

12) Baucher, M., Chabbert, B. Pilate, G., Van Doorselaere, J. Tolleier, M.-T., Petit-Conil, M., Cornu, D., Monties, B., Van Montague, M., Inzé, D., Jouanin, L. and Boerjan, W. (1996) Red xylem and higher lignin extractability by down-regulation a cinnamil alcohol dehydrogenase in poplar. Plant Physiol. 112: 1479-1490

13) Tuominen, H., Sitbon, H. Jacobsson, C., Sandberg, G., Olsson, O. and Sundberg, B. (1995) Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. Plant Physiol. 109: 1179-1189

14) Howe, G.T. (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plant. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 36: 59-71

15) Mohri, T., Yamamoto, N. and Shinohara, K. (1996) *Agrobacterium* mediated transformation of lombardy poplar (*Populus nigra* L. var. *italica* Koehne) using stem segments. J. For. Res. 1: 13-16

16) Mohri, T., Futamura, N., Igasaki, T. and Shinohara, K. (1998)

Morphological changes of transgenic poplar induced by overexpression of the rice homeobox gene *OSH1*. Plant Cell Rep. in press

17) Tzfira, T., Jensen, C.S., Vainstein, A. and Altman, A. (1997) Transformation and regeneration of transgenic aspen plants via shoot formation from stem explant. Physiol. Plant. 99: 554-561

18) Wilde, H.D., Meagher, R.B. and Merkle, S.A. (1992) Expression of foreign genes in transgenic yellow-poplar plants. Plant Physiol. 98: 114-120

19) Sullivan, J. and Lagrimini, L.M. (1993) Tranformation of *Liquidambar styraciflua* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 12: 303-306

20) Han, K.-H., Keathley, D.H., Davis, J.M. and Gordon, M.P. (1993) Regeneration of a transgenic woody legme (*Robinia pseudoacacia* L., black locust) and morphological alternations induced by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. Plant Sci. 88: 149-157

21) Mohri, T., Mukai, Y. and Shinoharam K. (1997) *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation of Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) Plant Sci. 127: 53-60

22) Mohri, T. and Shinohara, K. (1998) Factors influencing the *Agrobacterium*-mediated transformation of paulownia (*Paulownia fortunei*). Plant Cell Tissue Organ Cult. submitted

23) Machado, L.O.R., Andrade, G.M., Cid, L.P.B., Penchel, R.M. and Brasileiro, A.C.M. (1997) *Agrobacterium* strain specificity and shooty tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*). Plant Cell Rep. 16: 299-303

24) Mullins, K.V., Llewellyn, D.J., Hartney, V.J., Strauss, S. and Dennis, E.S. (1997) Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. Plant Cell Rep. 16: 787-791

25) Ellis, D.D., McCabe, D.E., McInnis, S., Ramachandran, R., Russel, D.R.,

Wallace, K.M., Martinell, B.J., Robert, D.R., Raffa, K.F. and McCown, B.H. (1993) Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. Bio/Technology 11: 84-89

26) Charest, P.J., Devantier, Y. and Lachance, D. (1996) Stable genetic transformation of *Picea mariana* (black spruce) via particle bombardment. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 32: 91-99

27) Shin, D.-I., Podila, G.K., Huang, Y. and Karnosky, D.F. (1994) Transgenic larch expressing genes for herbicide and insect resistance. Can. J. For. Res. 24: 2059-2067

28) Klimaszewska, K., Devantier, Y., Lachance, D., Lelu, M.A. and Charest, P.J. (1997) *Larix laricina* (tamarack): somatic embryogenesis and genetic transformation. Can. J. For. Res. 27: 538-550

29) Levée, V., Lelu, M.-A., Jouanin, L., Cornu, D. and Pilate, G. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi*×*L. decidua*) and transgenic plant regeneration. Plant Cell Rep. 16: 680-685

30) Tzfira, T., Yarnitzky, O., Vainstein, A. and Altman, A. (1996) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated DNA transfer in *Pinus halepensis*. Plant Cell Rep. 16: 26-31

31) Matsuoka, M., Ichikawa, H., Saito, A., Tada, A., Fujimura, T. and Kano-Murakami, Y. (1993) Expression of a rice homeobox gene causes alterd morphology of transgenic plants. Plant Cell 5: 1039-1048

32) Russell, J.A. and McCown, B.H. (1988) Recovery of plants from leaf protoplasts of hybrid-poplar and aspen clones. Plant Cell Rep. 7: 59-62

33)斎藤明 (1984) 木本植物の増殖と育種. 細胞工学. 3(3) P251-267.

34)毛利武・三浦清 (1992) セイヨウハコヤナギ葉肉プロトプラストからの幼植物体の再生. 北海道大学農学部演習林研究報告. 49(2): 261-275

34)毛利武・三浦清 (1992) セイヨウハコヤナギ葉肉プロトプラストからの幼植物体の再生. 北海道大学農学部演習林研究報告. 49(2): 261-275

35) Azuma, T., Miura, K. and Takabe, K. (1993) Histological and morphological studies of adventitious bud formation from the callus of poplar. Mokuzai Gakkaishi 39: 111-117

36) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497

37)毛利武 (1992) ヤマナラシ属プロトプラストからの体細胞雑種作出に関する研究. 北海道大学大学院農学研究科林産学専攻修士論文. 4-25

38) Kanai, R. and Edwards, G. E. (1973) Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C_3, C_4, and crassulacean acid metabolism plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two-phase system. Plant Physiol. 52, 484.

39) Sasamoto, H., Hosoi, Y., Ishi, K. and Saito, A. (1989) Factors affecting the formation of callus from leaf protoplasts of *Populus alba*. J. Jpn. For. Soc. 71: 449-455

40) Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158

41) Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykass, P.R. and Shilperoort R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-regions of the *Agrobacterium tumefaciens* T-plasmid. Nature 303: 179-180

42)西山広樹・西方敬人 (1995) バイオ実験イラストレイテッド. 細胞工学. 1 P98

43) Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. and Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227: 1229-1231

44) Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions:

ß- glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6: 3901-3907

45) Yamamoto, N., Tada, Y., and Fujimura, T. (1994) The promoter of a pine photosynthetic gene allows expression of a ß-glucuronidase reporter gene in transgenic rice plants in a light-independent but tissue-specific manner. Plant Cell Physiol. 35: 773-778

46) Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254

47) Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acids Res. 8: 4321-4325

48) Reed, K.C. and Mann, D.A. (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. Nuc. Acids Res. 13: 7207-7221

49) Godwin, I., Gordon, T., Ford-Lloyd, B. and Newbury, H. (1991) The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plants species. Plant Cell Rep. 9: 671-675

50) Hake, S., Vollbrecht, E. and Freeling, M. (1989) Cloning *knotted*, the dominant morphological mutant in maize using *Ds2* a transposon tag. EMBO J. 8: 15-22

51) Kano-Murakami, Y., Yanai, T., Tagiri, A. and Matsuoka, M. (1993) A rice homeotic gene, *OSH1*, causes unusual phenotypes in transgenic tobacco. FEBS Lett. 334(3): 365-368

52) Shinohara, K. and Murakami, A. (1996) Change in levels of thylakoid components in chloroplasts of pine needles of different ages. Plant Cell Physiol. 37(8): 1102-1107

53) Sheikholeslam, S.N. and Weeks, D.P. (1987) Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by

Bhatia, C.R. (1990) The promotion of *Agrobacterium* transformation in *Atropa belladona* L. by acetosyringone. J. Plant Physiol. 136: 404-409

55) Sarmento, G.G., Alpert, K., Tang, F.A. and Punja, Z.K. (1992) Factors influencing *Agrobacterium tumefacies* mediated transformation and expression of kanamycin resistance in pickling cucumber. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 31: 185-163

56) Holford P., Hernandez, N. and Newbery, H.J. (1992) Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during co-cultivation of *Antirrhium majus* with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 11: 196-199

57) João, K.H.L. and Brown, T.A. (1993) Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif':pGSFR1161 in the presence of acetosyringone. Plant Cell Rep. 12: 422-425

58) James, D.J., Uratsu, S., Cheng, J., Negri. P., Viss, P. and Dandekar, A.M. (1993) Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. Plant Cell Rep. 12: 559-563

59) Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, Y., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M., Sagami, Y. and Machida, Y. (1990) Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 6684-6688

60) Klein, T.M., Wolf, E.D. and Sanford, J.C. (1987) High-velocity projectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327: 70-73

61) Mohri, T. and Shinohara, K. (1996) A biolistic approach for the transfer and expression of a luciferase gene in paulownia (*Paulownia fortunei*). J. For. Res. 1:65-66

62) Ow, D.H., Wood, K.V., Deluca, M., de Welt, J.R., Helinski, D.R. and Howell, S.H. (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase

gene in plant cells and transgenic plants. Science 234: 856-859

63) Kikkert, J.R. (1993) The Biokistic® PDS-1000/He device. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 33: 221-226

64) Wick, R.A. (1989) Photon counting imaging: Applications in biomedical reserch. Biotechniques 7: 262-268

65) Goldfarb, B., Strauss, S.H., How, G.T. and Zaerr, J.B. (1991) Transient gene expression of microprojectile-induced DNA in Douglas-fir cotyledons. Plant Cell Rep. 10: 517-521

66) Mohri, T., Igasaki, T., Sato, T. and Shinohara, K. Transfer and expression of ß-glucronidase and luciferase genes in three Japanese conifers using microprojectile bombardment. Plant Biotech. submitted

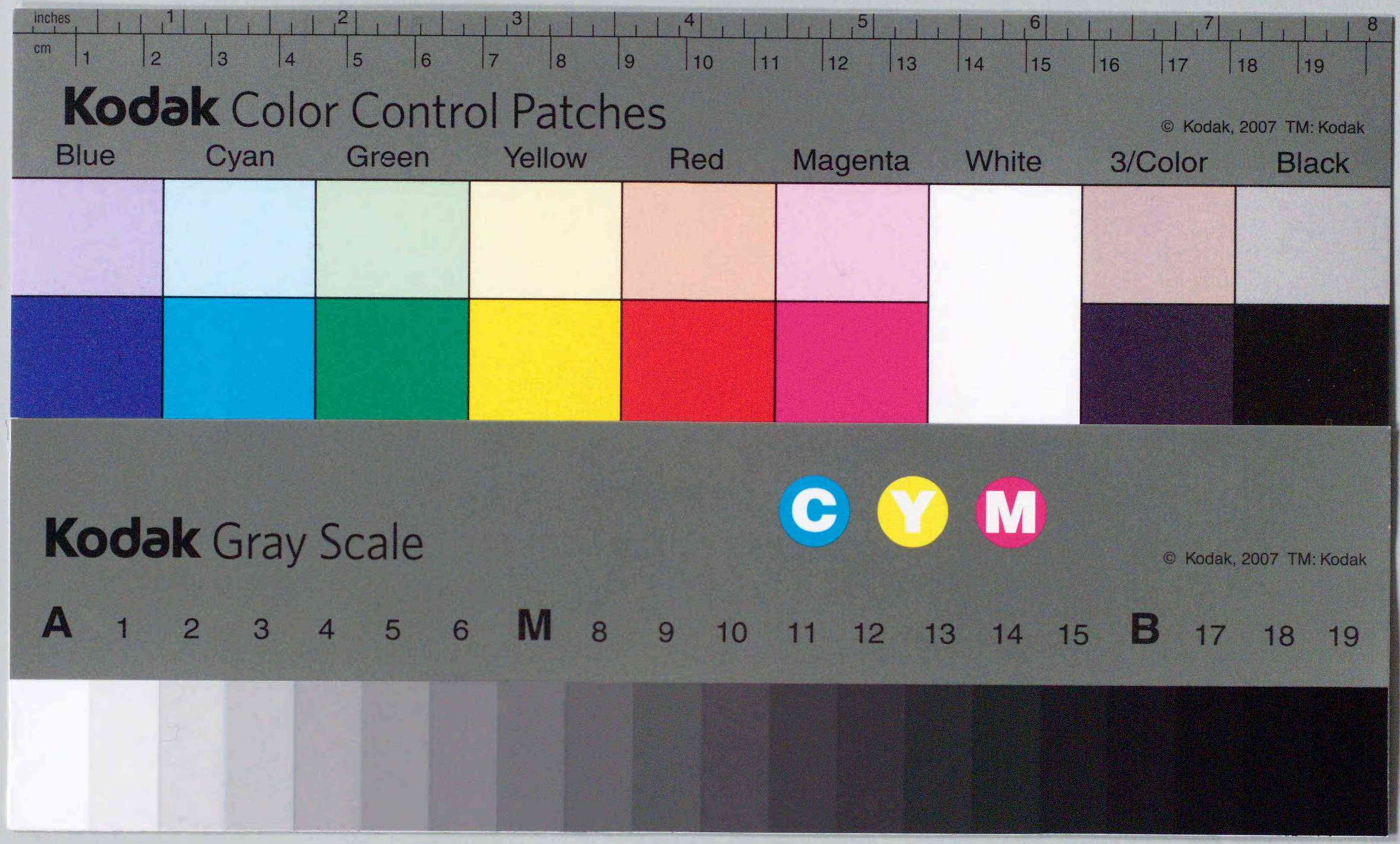
67) Devantier, Y.A., Moffatt, B., Jones, C. and Charest, P.J. (1993) Microprojectile-mediated DNA delivery to Salicaceae family. Can. J. Bot. 71: 1458-1466

68)福井充枝・二村典宏・向井譲・長尾精文・篠原健司 (1998) スギ雄花の発達を支配する遺伝子. 第 109 回日本林学会大会講演要旨集 P357

69) Wang, Y., Mukai, Y., Fukui, M., Futamura, N., Nagao, A. and Shinohara, K. (1998) Pollen-specific expression of the gene for anallergen, *Cry j 1*, in *Cryptomeria japonica*. J. For. Res. 3: 131-134

謝辞

本研究を行うにあたり、御指導及び御助言を頂いた北海道大学三浦清教授、寺澤実教授、三上哲夫教授、小島康夫助教授、玉井裕助手、森林総合研究所石井克明組織培養研究室長、篠原健司遺伝子発現研究室長、生物資源研究所山本直樹光合成研究室長、静岡大学向井譲助教授、また、御協力を頂いた北海道大学森林科学科、森林総合研究所組織培養研究室、遺伝子発現研究室、生理機能研究室の皆さん他に厚く感謝の意を示させていただきます。


inches
cm
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
C
Y
M
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