

氏名 赤 間 一 仁

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第22号

学位授与の日付 平成4年 3月16日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 シロイヌナズナにおけるアグロバクテリウムを介した

高頻度形質転換系の開発についての研究

論文審査委員 主 査 教 授 藤 田 善 彦

教 授 村 田 紀 夫

教 授 西 村 幹 夫

助教授 岡 田 清 孝

論文内容の要旨

シロイヌナズナは、高等植物の高次形質の発現制御機構を分子レベルで解明するためのモデル植物として、近年研究が急速に進んできた。シロイヌナズナは世代時間がきわめて短く、ゲノムサイズが極めて小さいなどの特徴を兼ね備えているので、分子遺伝学的な研究方法を適用することが容易である。この研究方法は、まず様々な突然変異体を分離し、次いで変異を生じた遺伝子を単離・解析して、遺伝的制御ネットワークを理解しようとするものである。

従来、シロイヌナズナの突然変異体は種子を突然変異誘発剤で処理することによって得られた。この方法では、遺伝子の塩基配列の一部が他の塩基に置き換えられるので、変異遺伝子を同定・分離することが比較的困難であった。最近、シロイヌナズナの細胞にアグロバクテリアを感染させ、植物ゲノムの中にアグロバクテリアのDNA断片を挿入させて突然変異体（このような突然変異体は挿入突然変異体と呼ばれる）を得る技術が開発された。挿入突然変異体から変異遺伝子を単離することは、きわめて容易である。それゆえ、効率よく挿入突然変異体を得る実験技術の開発が強く望まれていた。DNA断片を植物細胞に導入する技術は、形質転換技術または遺伝子導入技術とよばれる。また、遺伝子転換した細胞から再生させた植物体をトランスジェニック植物体と呼ぶ。

これまでに発表された形質転換技術は、効率がまだ低く、再現性にも信頼がなかった。そこで、効率が高く安定した形質転換技術を確立することを本研究の主目的とした。研究内容は、以下の3項目にまとめられる。

1. 形質転換に用いる植物組織の比較とカルス誘導培地上の前培養期間の解析

発芽後7日のシロイヌナズナの芽生えから、子葉、胚軸、根を切り分け、カルス誘導培地（CIM）上で数日間培養し、ついでシュート誘導培地（SIM）上に移して、シュートの再生効率を調べた。その結果、CIM上で8日間前培養した場合、もっとも効率が高かった。また、子葉、胚軸、根の中では、胚軸がもっとも高い効率を示した。

さらに、 β -グルクロニダーゼの遺伝子（GUS）と抗生物質であるカナマイシンとハイグロマイシンの耐性遺伝子（NPTIIとHPT）を持つTiプラスミドが入ったアグロバクテリアを作製し、このバクテリアをCIM上で前培養

した組織片に感染させて、GUS遺伝子の発現量を測定した。この実験によって、CIM上で6-8日間前培養した組織片は、アグロバクテリアに感染する効率も上昇していることがわかった。

2. 形質転換に用いるアグロバクテリア株とシロイヌナズナの系統の比較

4種類のシロイヌナズナの系統(Wassilewskija、Columbia、Landsberg、Bensheim)の芽生えから、子葉、胚軸、根の3種類の器官を切りだし、それぞれに3種類のアグロバクテリア株(EHA101、C58C1、LBA4404)を感染させて、合計36通りの組み合わせについて形質転換の効率を比較した。その結果、(1)シロイヌナズナのWassilewskija系統の胚軸にアグロバクテリアのEHA101株を感染させる場合が、もっとも高い形質転換効率を示した。この場合、組織片の80-90%が形質転換したシュートを再生した。(2)シロイヌナズナの系統とアグロバクテリア株の間に、効率の高い組み合わせと低い組み合わせがあることがあきらかになった。例えば、BensheimやColumbia系統はアグロバクテリアのEHA101株との組み合わせがよいのに対して、Landsberg系統はアグロバクテリアのC58C1株との組み合わせの方が効率が高い。この結果は、アグロバクテリアの感染過程に多数の遺伝子が関与しており、ここで用いたシロイヌナズナの系統やアグロバクテリアの株ではこれらの遺伝子の性質が異なっていることを示唆している。

3. 形質転換したトランスジェニック・シロイヌナズナの解析

約350系統のトランスジェニック・シロイヌナズナを作製し、挿入されたT-DNAの数の分布について検討した。まず、カナマイシンとハイグロマイシンに対する耐性を調べたところ、非耐性の株は3%以下であった。トランスジェニック植物の子孫について耐性と非耐性の分離比を調べたところ、約半数のものが3:1の分離比を示した。ついで、124系統のトランスジェニック・シロイヌナズナから葉をとってDNAを抽出し、サザン解析をおこなったところ、44%が1コピーのT-DNAを持つことがわかった。この結果は、ここで開発した方法が遺伝子タッキングによる突然変異体の分離に適していることを示している。約350系統のトランスジェニック・シロイヌナズナの中から、わい性や子葉の色素異常突然変異体を得られた。

論文の審査結果の要旨

アブラナ科の植物であるシロイヌナズナはゲノムサイズが小さいこと、世代時間が短いことから維管束植物個体の高次現象を遺伝学的に解析する対象として重要であり、多くの研究者が研究対象にしている。遺伝解析の上で重要な手法として突然変異体の作出があるが、申請者は遺伝子タッキングによるその作出法に注目し、アグロバクテリウムを用いた効率の高い遺伝子導入法の確立をめざして本研究をおこなった。シロイヌナズナの組織からのカルス誘導およびカルスよりシュート形成の条件の検討、またアグロバクテリウム株およびその感染条件の詳細な検討をおこない、もっとも効率の高い、シロイヌナズナの系統（エコタイプ）、組織、バクテリウム株の組み合わせを決定して、80-90%という高効率の遺伝子導入法の確立に成功した。この結果に至る申請者のおこなった研究および確立された新しい遺伝子導入法などの成果は学位申請に値するものである。この研究成果は、原著論文にまとめて公表されることになっており、提出された学位請求論文は学位授与の要件を満たしているものと判定された。