

MATベクターシステムによる
選抜マーカー・フリー形質転換植物の作出

杉田 耕一

博士（理学）

総合研究大学院大学

生命科学研究科

分子生物機構論専攻

平成12年度

(2000)

目次

緒論	1
第1章 トウモロコシ転移因子 <i>A c / D s</i> 系を用いた <i>ipt</i> 型 MAT ベクターによる選抜マーカー・フリー形質転換タバコ、及び樹木の作成	
第1節 緒言	6
第2節 実験材料および方法	7
第3節 結果	12
1. <i>ipt</i> 型 MAT ベクター pNPI106 の構造	
2. タバコ多芽体形成およびタバコ正常芽の出現	
3. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコの解析	
4. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコに導入された有用遺伝子のコピー数	
5. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコに導入された有用遺伝子の遺伝的安定性	
6. 選抜マーカー・フリー形質転換アスピンの作成	
第4節 考察	19
第5節 要約	21
第2章 酵母の部位特異的組換え系 <i>R / R S</i> を用いた <i>ipt</i> 型 MAT ベクターによる選抜マーカー・フリー形質転換タバコの作成	
第1節 緒言	22
第2節 実験材料および方法	22
第3節 結果	30
1. <i>ipt</i> 型 MAT ベクター pNPI132 の構造	
2. 多芽体形成および正常芽の出現	
3. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコの解析	
4. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコに導入された有用遺伝子のコピー数	
第4節 考察	33
第5節 要約	34
第3章 誘導型プロモーターにより制御された <i>R / R S</i> 系を用いた <i>ipt</i> 型 MAT ベクターによる選抜マーカー・フリー形質転換タバコの作成	
第1節 緒言	36
第2節 実験材料および方法	36
第3節 結果	43
1. タバコ多芽体における GST-II-27 プロモーターの発現様式解析	

2. GST-MATベクター pMAT8、及びコントロールベクター pRZIPT35SGUS の構造	
3. 多芽体形成および正常芽の出現	
4. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコの解析	
5. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコに導入された有用遺伝子のコピー数	
第4節 考察	48
第5節 要約	50
第4章 ipt 型MATベクターによる遺伝子多重導入	
第1節 緒言	52
第2節 実験材料および方法	52
第3節 結果	55
1. GST-MATベクター pMAT8:NosGFP の構造	
2. 多芽体形成および正常芽の出現	
3. 遺伝子多重導入された選抜マーカー・フリー形質転換タバコの解析	
4. 多重導入時の有用遺伝子の安定性	
第4節 考察	60
第5節 要約	61
総括と展望	63
引用論文	71
主論文	77
参考論文	78
謝辞	79

略語

MF 植物；選抜マーカー・フリー形質転換植物(selectable marker-free transgenic)

MAT:(Multi-Auto-Transformation)

bp;塩基対 (base pair)

CaMV;カリフラワーモザイクウイルス (cauliflower mosaic virus)

GUS; β -グルクロニダーゼ (β -glucuronidase)

ipt;イソペンテニルトランスフェラーゼ (isopentenyltransferase)

MS;ムラシゲ&スコーグ (Murashige & Skoog)

Km^r;カナマイシン耐性 (kanamycin resistant)

Km^s;カナマイシン感受性 (kanamycin sensitive)

Hm^r;ハイグロマイシン耐性 (hygromycin resistant)

PCR;ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction)

GST-II-27;グルタチオン S-トランスフェラーゼ サブユニット II の 27 kDa
(glutathione S-transferase subunit II 27kDa)

GFP;緑色蛍光蛋白質 (green fluorescence protein)

緒論

形質転換植物の商品化スピードは目覚ましく、1999年には世界耕地面積の2.5% (4,000万 ha) で商品化形質転換植物が栽培された (1)。世界で始めて形質転換植物の作成が報告されてからまだ16年 (2)、しかも商品化目的の栽培開始からは4年しか経っていないことを考えると、急速な発展を遂げているといえる。発展途上国を中心とする急速な人口増加、肉食増による飼料用穀物消費量の増加、環境破壊による農業面積の減少による世界的な食糧不足を解決するため、遺伝子工学技術を駆使した効率的なハイテク農業は益々重要な技術として認識されてくると考えられる。また、単なる食料としてだけでなく、医薬品や化学製品を生産できる高付加価値な形質転換植物や、悪環境を浄化する形質転換植物なども既に現実のものとなりつつある。このように、形質転換植物は21世紀の人類にとって欠かすことのできない重要な技術となることは間違いないであろう。

現在までに商品化されている形質転換植物の大部分は、除草剤耐性か害虫耐性が付与された植物である。農薬の削減による消費者の安全性向上、環境負荷の低減などのメリット以上に、生産性の向上がもたらされる生産者サイドのメリットが大きい形質転換植物である。そのため、現時点で食料が豊富に存在するヨーロッパ諸国や日本などの先進諸国では、現在も消費者に完全に受け要られているとは言い難い状況である。しかし、今後は高栄養・高品質・医薬や健康機能性などの消費者がメリットを実感できる次世代の形質転換植物が商品化され始めることにより、徐々にその有効性が認識されていくと推測されている。

また同時に、形質転換植物の商品性向上、消費者へのイメージ向上、及び地球環境への負荷低減化をさらに推進する遺伝子組換え技術の創出を進めることが今後の形質転換植物の推進に必要不可欠である。すなわち、いまや形質転換植物という商品は、自動車やコンピューター産業などと同様な技術革新や地球環境への配慮が求められる第2世代に移行しなければならない時期にきている。具体的に求められる技術として、植物遺伝子組換えに関し世界的に著名な米国 Purdue 大学の Stanton B Gelvin 教授は以下のように述べている (3)。「Scientists have entered a new era of agricultural biotechnology. No longer is it sufficient merely to introduce a gene into a plant. The new generation of technology requires that genes be introduced into agronomically important crops in single copy and without the integration of extraneous vector 'backbone' sequences and, perhaps, even selectable markers.」。本論では、この中で述べられている選抜マーカー遺伝子を持たず目的の有用遺伝子のみが導入されたマーカー・フリー形質転換植物 (MF 植物) を作成できる *ipt* 型 MAT (Multi-Auto Transformation) ベクターシステムの開発について述べる。

さらに、MF 植物作成システムにより、同一選抜マーカー遺伝子を用いた実用的な遺伝子多重導入が可能になり、様々な有用形質が付加された多機能性形質転換植物の商品化に道が開かれた。勿論、別の選抜マーカー遺伝子を用いれば、遺伝子多重導入は可能であった。

しかしながら、タバコのようなモデル植物を除いた実用化植物では、形質転換用選抜マーカーは限られてしまうことが多い。よって、遺伝子多重導入の際に同一選抜マーカーが利用できることは大変な利点である。現在、商品化されている形質転換植物は一つの有用遺伝子のみが導入されている。逆に言えば、一つの有用遺伝子でも商業的効果が発揮される有用遺伝子だから実用化されたと言える。しかしながら、イネやシロイヌナズナを中心としたゲノムプロジェクトの進展により有用遺伝子リストは増大する一方であり、MF植物作成システムの開発により様々な有用形質を導入した高付加価値な形質転換植物が実用化できると考えられる。

MF植物作成方法として、1990年代前半に3つのシステムが報告されているが、全て実用化には至らなかった(4-7)。その最大の原因は、交配を経た次世代以降でのみMF植物が得られる点である。1990年代前半は、形質転換植物の商品化が目前の時期でもあり、欧米の企業にとって、選抜マーカー遺伝子の残留に関する公的規制の動向は大変重要な問題として認識されていた(8)。しかしながら、前記方法の非実用性から、商品化形質転換植物へは利用されなかった。

以上のような形質転換植物の現状と21世紀に向けた今後の方向性を踏まえ、本論文では、交配を必要とせず組織培養段階で肉眼によりMF植物を選抜することができる*ipt*型MATベクターシステムの開発と(9-13)、*ipt*型MATベクターシステムを用いた遺伝子多重導入について述べる(14)。*ipt*型MATベクターシステムは、世界で始めて非交配でMF植物を作成することを可能にした画期的実用化技術である。非交配システムであることから、ポテト、イチゴ、リンゴなどの栄養繁殖種や樹木などで始めてMF植物の作成と遺伝子多重導入ができる可能性が開けた。

*ipt*型MATベクターシステムには二つの特徴がある。一つは、従来から選抜マーカー遺伝子として用いられてきた抗生物質耐性遺伝子や除草剤耐性遺伝子に代わり、アグロバクテリウムのT-DNAから単離したサイトカイニン合成酵素であるイソペンテニルトランスフェラーゼ(*ipt*)遺伝子を選抜マーカー遺伝子として用いた点である。イソペンテニルトランスフェラーゼ(EC2.5.1.-, 5'-AMP Δ^2 -isopentenyltransferase)は、アグロバクテリウムのT-DNA上にコードされている腫瘍化遺伝子の一つであり、植物細胞内でサイトカイニン合成を促進させる(Fig.1)(15,16)。植物由来のサイトカイニン合成遺伝子は未だ単離されていないため、アグロバクテリウムの*ipt*遺伝子が導入された形質転換植物は、サイトカイニンの機能解析用材料として用いられてきた。現在までに、キューリ(17)、タバコ(17-21,23)、シロイヌナズナ(19)、モモ(22)、ポプラ(24)で*ipt*遺伝子が導入された形質転換植物が作成され、サイトカイニンの作用解析が報告されている。CaMV35Sプロモーター等の定常発現型プロモーターにより*ipt*遺伝子を発現させると、植物細胞内サイトカイニン含量は通常の数百倍に達する(17)。その結果、顕著な頂芽優性の崩壊と発根阻害が生じ、異常形態の多芽体が形成される。また、*ipt*遺伝子が導入された細胞は、植物ホルモンフリー培地においても自己増殖を続け、やがて不定芽の再分化を引き起こす。そして最

最終的に、多芽体へと増殖していく。すなわち、*ipt* 型 MAT ベクターシステムでは、*ipt* 遺伝子と共に有用遺伝子を導入し、植物ホルモンフリー培地で形成された多芽体を肉眼で選抜すれば有用遺伝子が導入された形質転換芽を選抜することができる (Fig. 2)。しかしながら、このような多芽体のままでは、形質転換植物作成のための実用的選抜マーカー遺伝子とは言い難い。そこで *ipt* 型 MAT ベクターシステムでは、*ipt* 遺伝子を DNA 除去因子により除去させ、発根する正常形態の芽を出現させることが第 2 の特徴である (Fig. 2)。*ipt* 型 MAT ベクターでは、有用遺伝子が DNA 除去因子外に配置されているため、選抜マーカーである *ipt* 遺伝子が除去されても有用遺伝子は形質転換植物染色体に保持されたままとなる。本論文では、*ipt* 型 MAT ベクターシステムによる MF 植物の作成に利用できる DNA 除去因子の検討と、効率のよい実用的 *ipt* 型 MAT ベクターの作成、及び *ipt* 型 MAT ベクターシステムによる遺伝子多重導入を行った。

第 1 章では、*ipt* 遺伝子の除去因子としてトウモロコシの転移因子 *Ac/Ds* 系を利用した *ipt* 型 MAT ベクターを構築し、タバコ及び樹木アスペンで有用性を検討した。その結果、*Ac/Ds* 系による *ipt* 遺伝子の除去により MF タバコだけでなく、MF アスペンも得られることが判明した。しかしながら、その作成効率は極めて低く実用化レベルに達しなかった。

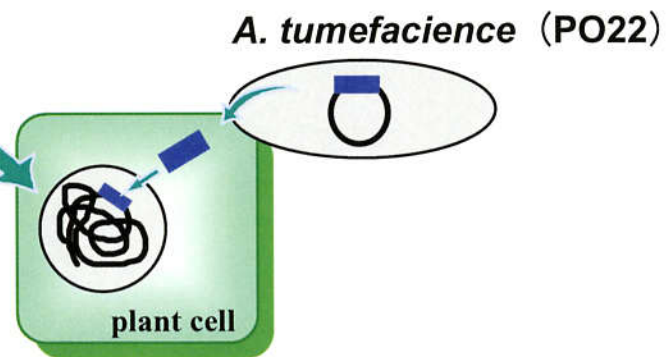
第 2 章では、*ipt* 遺伝子の除去因子として酵母由来の部位特異的組換え系 *R/RS* を利用した *ipt* 型 MAT ベクターを構築し、タバコで有用性を検討した。*R/RS* 系の組換え酵素遺伝子 *R* のプロモーターとしては、CaMV35S プロモーターを利用した。その結果、高効率で MF タバコが出現し、*R/RS* 系が *ipt* 型 MAT ベクターに適したシステムであることが示された。しかし、*R/RS* の高効率が、逆に有用遺伝子 (T-DNA) の多コピー化を引き起こすということも判明した。

第 3 章では、*R/RS* 系の組換え酵素遺伝子 *R* のプロモーターとして、トウモロコシ由来の GST-II-27 プロモーターを利用した GST-MAT ベクターを構築し、タバコで有用性を検討した。GST-II-27 プロモーターは、除草剤解毒剤 "safener" により誘導される誘導型プロモーターである。その結果、効率よく MF タバコが出現し、しかも有用遺伝子が低コピーで導入されていることが判明した。

第 4 章では、GST-MAT ベクターによる遺伝子多重導入を試みた。第 2 章において *ipt* 型 MAT ベクターによりモデル遺伝子である GUS 遺伝子と Km^r 遺伝子が導入された MF タバコ植物に対し、GST-MAT ベクターにより GFP 遺伝子を多重導入した。その結果、GFP 遺伝子が多重導入された MF タバコを作成することに成功した。

以上の結果から、*ipt* 型 MAT ベクターシステムは MF 植物の作成と遺伝子多重導入に有効であること、およびモデル植物であるタバコだけでなく他の実用植物へも応用できることが示唆された。

crown gall disease



the *ipt* gene is one of the tumor inducing genes from a T-DNA

Fig.1 Tumor inducing genes of a T-DNA

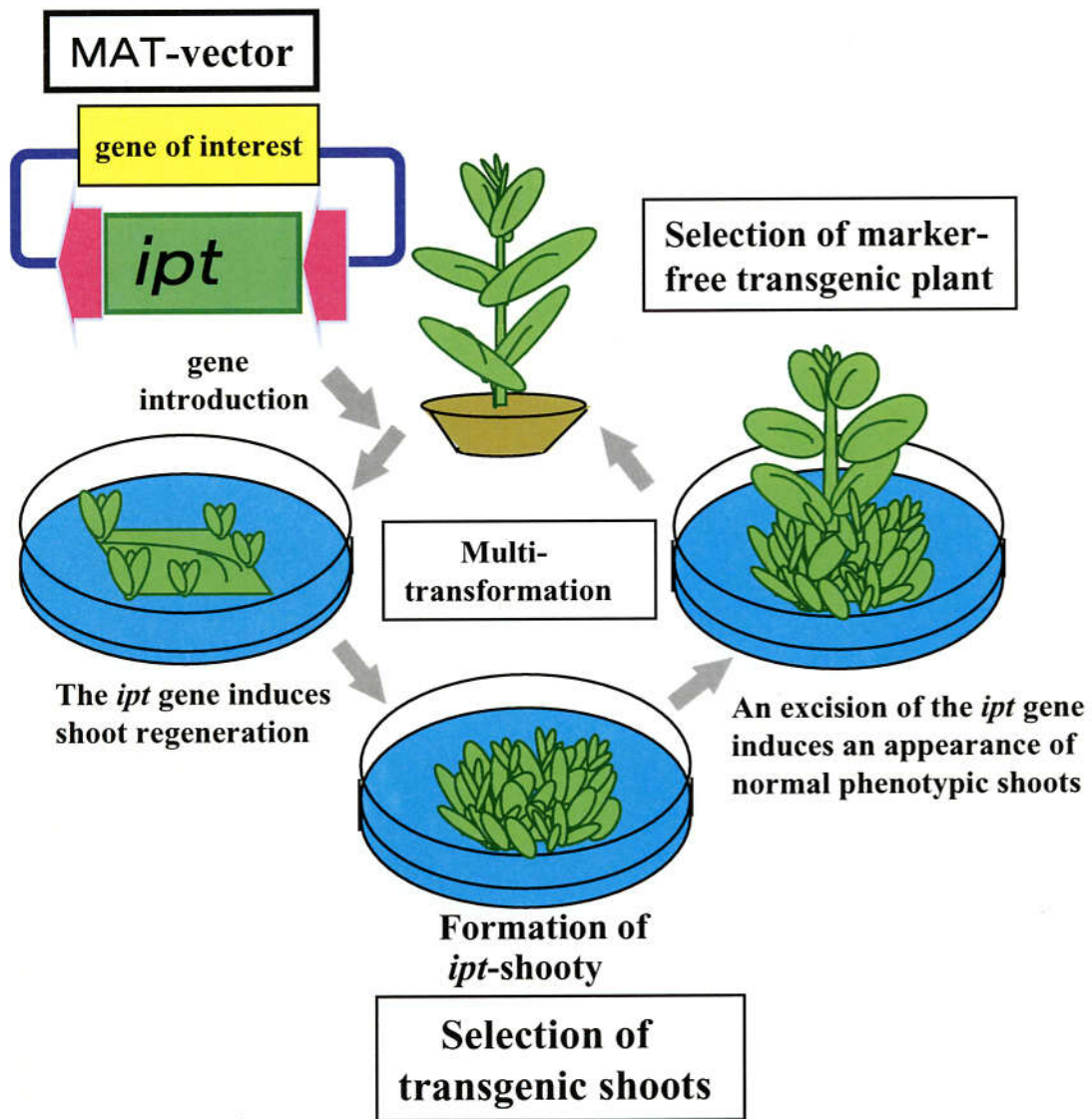


Fig.2 Schematic diagram of the MAT-vector system

第1章 トウモロコシ転移因子 *Ac/Ds* 系を用いた *ipt* 型MATベクターによる選抜マーカー・フリー形質転換タバコ、及び樹木の作成

第1節 緒言

ipt 型MATベクターでは、*ipt* 遺伝子により引き起こされる植物ホルモンフリー培地における不定芽再分化と、その異常な多芽体形状を観察することにより有用遺伝子が導入された形質転換組織（多芽体）を肉眼で選抜することができる。しかしながら、形質転換組織が発根もしない異常な多芽体形状のままでは、*ipt* 遺伝子の選抜マーカー遺伝子としての有用性はない。そこで、本章では、*ipt* 遺伝子を除去するDNA因子としてトウモロコシ転移因子 *Ac/Ds* 系を用いた *ipt* 型MATベクターについて述べる (9)。

Ac/Ds 系は、植物の転移因子の中で最も研究が進んでいるDNA型転移因子である (26-28)。*Ac* は 11 bp の inverted repeat に挟まれた約 4.5 kb の長さで、内部には転移を触媒する転移酵素遺伝子をコードしている。*Ac* 転移酵素は末端から少し内側の領域に結合し転移を引き起こすことが判明している (29, 30)。*Ds* は *Ac* の内部領域変異型であり、正常な転移酵素を発現できないために自ら転移することはできない。しかし、転移酵素がトランスに供給されれば転移することができる。さらに、*Ac/Ds* 系は、タバコ (31)、トマト (32)、ポプラ (33)、イネ (34, 35) などの異種植物においても正常に転移することが報告されている。また、*Ac/Ds* 系の転移効率は 100% ではなく、約 10% は転移に伴う脱離後に再挿入されることなく消滅してしまうことも報告されている (32)。

本章では、*ipt* 遺伝子を *Ac* 自身の転移に影響を及ぼさない部位に挿入した *ipt/Ac* カセット (Fig. 3) を作成し、*Ac* の転移に伴い *ipt* 遺伝子が除去されるか検討した。また、*ipt/Ac* カセットの転移に伴う *ipt* 遺伝子の消失による MF タバコ、及び MF アスピンの出現効率を検討した。

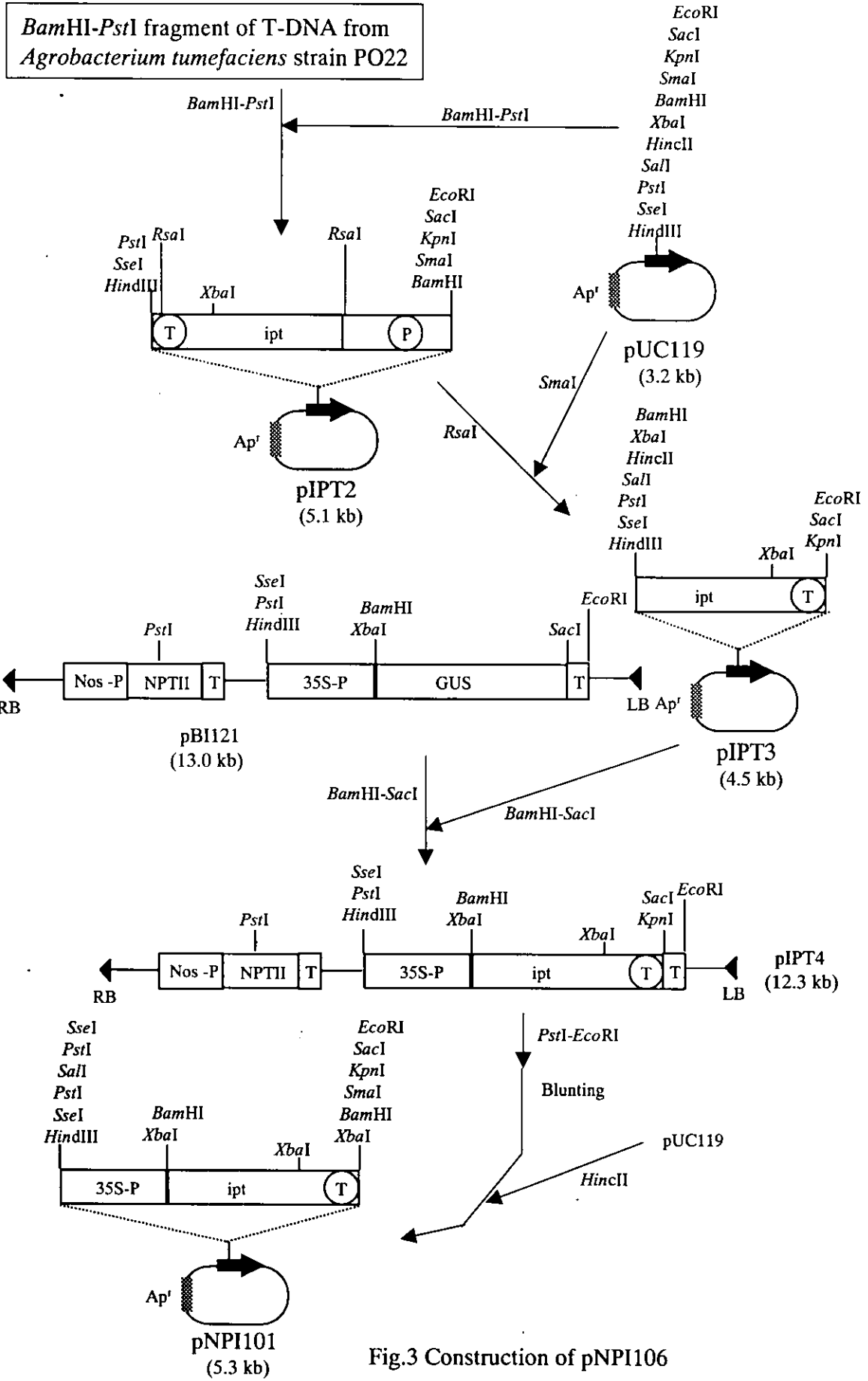


Fig.3 Construction of pNPI106

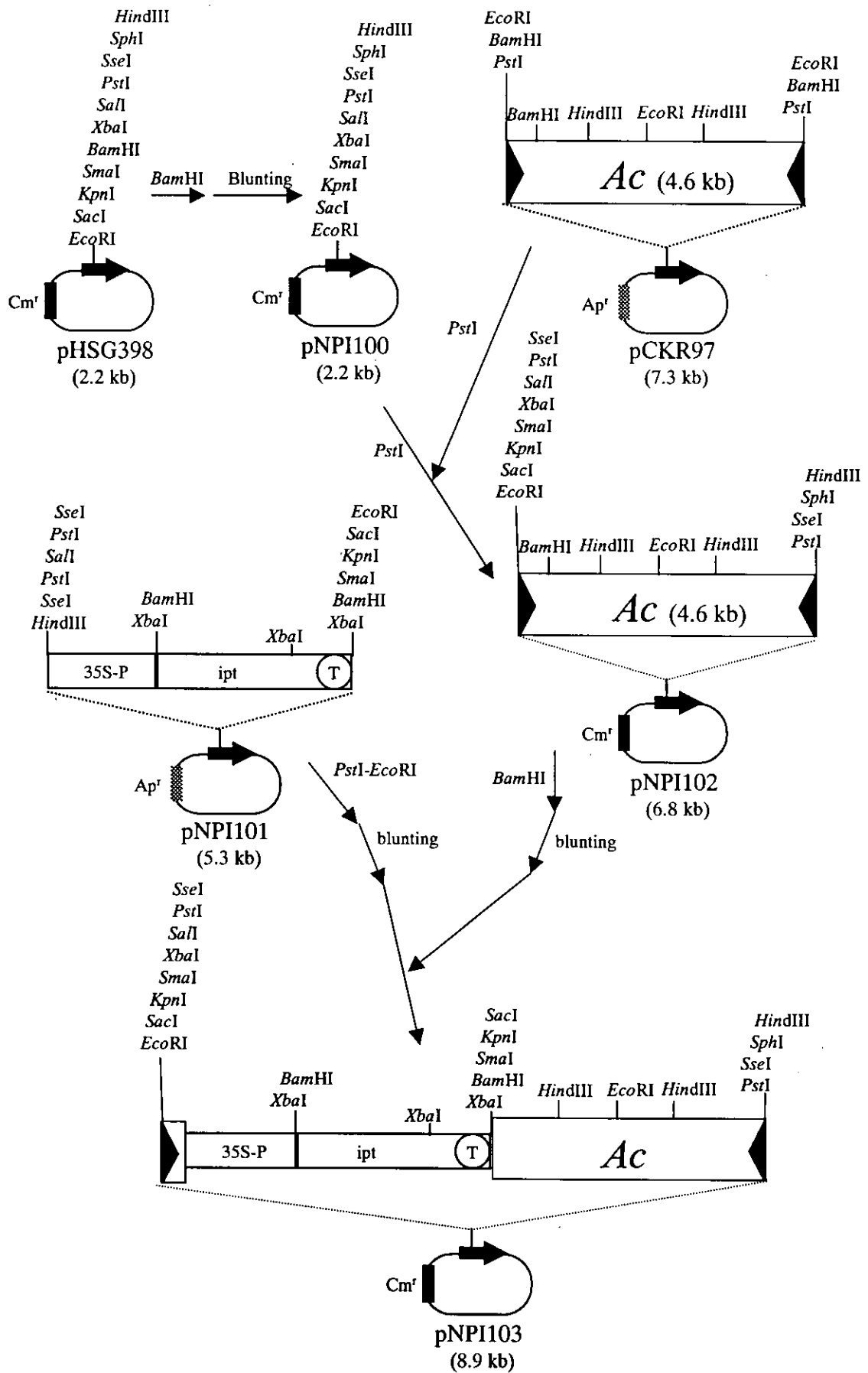


Fig.3 continued

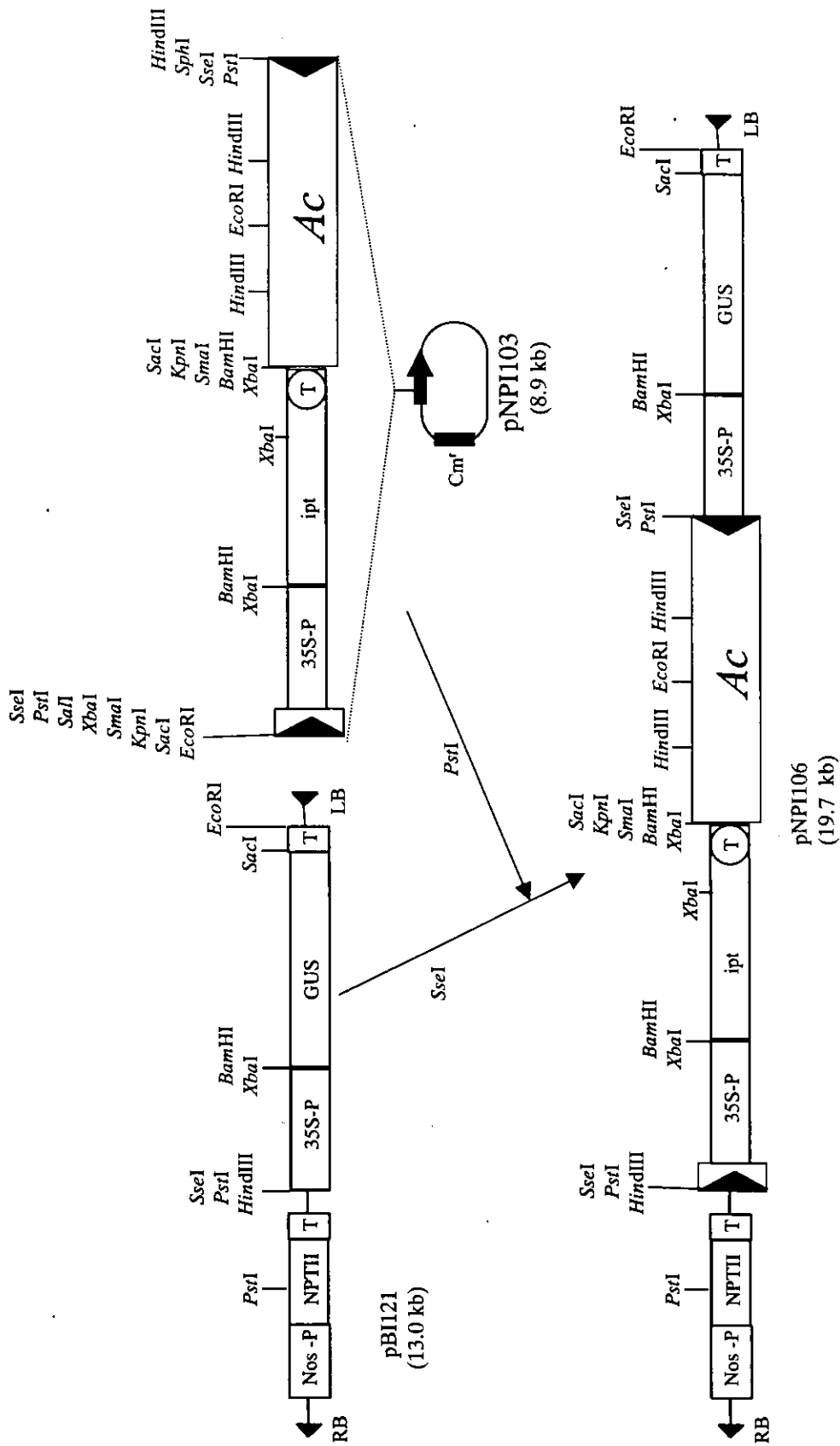


Fig.3 continued

第2節 実験材料および方法

1. プラスミド (*ipt* 型MATベクター pNPI106) の構築 (Fig. 3)

日本産野生型アグロバクテリウム・ツメファシエンス P022 株の T-DNA 上に存在する *ipt* 遺伝子を制限酵素 *Pst*I-*Bam*HI で切り出し、pUC119 (宝酒造より購入) の *Pst*I-*Bam*HI 部位に ligation して pIPT2 を作成した。次に、*ipt* 遺伝子の構造遺伝子とターミネーター領域を制限酵素 *Rsa*I で切り出し、pUC119 の *Sma*I 部位に ligation して pIPT3 を作成した。さらに、*ipt* 遺伝子の構造遺伝子とターミネーター領域を制限酵素 *Bam*HI-*Sac*I で切り出し、pBI121 (CLONTECH 社より購入) の *Bam*HI-*Sac*I 部位に ligation して pIPT4 を作成した。pIPT4 から CaMV35S プロモーターに連結された *ipt* 遺伝子を制限酵素 *Hind*III-*Sac*I で切り出し、T4 ポリメラーゼにより平滑末端化後、pUC119 の *Sma*I 部位に ligation して pNPI101 を作成した。一方、pCKR97 (34) を制限酵素 *Pst*I で切断してトウモロコシ転移因子 *Ac* を切り出し、pNPI100 (pHSG398 の *Bam*HI 部位が欠失) の *Pst*I 部位に ligation して pNPI102 を作成した。次に、pNPI101 から再び CaMV35S プロモーターに連結された *ipt* 遺伝子を制限酵素 *Pst*I-*Eco*RI で切り出し、T4 ポリメラーゼにより平滑末端化後、制限酵素 *Bam*HI で切断して平滑末端化された pNPI102 に ligation して pNPI103 を作成した。本章で研究に用いた pNPI106 は、pNPI102 から CaMV35S プロモーターに連結された *ipt* 遺伝子を含む *Ac* を切り出し、pBI121 の *Sse*8387I に ligation して作成した。

2. プラスミドの調製及び大腸菌の形質転換

大腸菌、及びアグロバクテリウム・ツメファシエンスからのプラスミドの少量調製は、プラスミド自動分離装置 PI-500 (KURABO 社) により行った。また、プラスミドの大量調製は、Plasmid Midi Kit (QIAGEN 社) を用いた。

プラスミドによる大腸菌の形質転換は、Competent High JM109 または DH5 α キット (TOYOBO 社) により行った。

3. アグロバクテリウムの形質転換

アグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404 株を (36)、10ml の YEB 液体培地 (ビーフエキス 5g/l、酵母エキス 1g/l、ペプトン 1g/l、ショ糖 5g/l、2mM MgSO₄、22°C での pH7.2 (以下、特に示さない場合、22°C での pH とする。)) に接種し、OD630 が 0.4 から 0.6 の範囲に至るまで、28°C で培養した。培養液を、6900 × g、4°C、10 分間遠心して集菌した後、菌体を 20ml の 10mM HEPES (pH8.0) に懸濁して、再度 6900 × g、4°C、10 分間の遠心で集菌し、次いでこの菌体を 200 μ l の YEB 液体培地に懸濁して、これをプラスミド導入用菌液とし

た。0.5ml チューブ内で、プラスミド導入用菌液 50 μ l と 3 μ l の MAT ベクタープラスミド pNPI106 を混合し、これをエレクトロポレーション法（ジーンパルサーII システム [BIORAD 社]）を用いプラスミドを導入し（37）、次いで 200 μ l の YEB 液体培地を加えて 25 $^{\circ}$ C で 1 時間振とうして培養した。この菌体を、50mg/l カナマイシン添加 YEB 寒天培地（寒天 1.5w/v%、他の組成は上記に同じ。）に播種して 28 $^{\circ}$ C で 2 日間培養し菌コロニーを得た。さらに、この菌コロニーを YEB 液体培地に移植して更に培養した後、本章 2 節- 2 と同様にプラスミドを抽出し、アグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404 株に pNPI106 が導入されていることを確認した。

4. タバコの形質転換及び培養条件

温室内で生育させたタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. *xanthi*) の成葉を、1v/v% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 5 分間浸漬して殺菌し、滅菌水で 3 回洗浄した後、中脈を取り除いて約 8 mm 角の葉片となるように調製した。このタバコ葉片を、pNPI106 を導入したアグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404 株の菌液 (OD=0.25、YEB 液体培地で一夜培養後、滅菌水で希釈して菌体濃度を調整。) に約 1 分間浸して、滅菌した濾紙の上に置いて余分な菌液を除いた。これを、アセトシリニンゴン 50 mg/l を添加した植物ホルモンを含まない (ホルモンフリー) MS 寒天培地に、葉の裏が上になるように置床して、暗所で 3 日間、25 $^{\circ}$ C で培養した。その後、カルベニシリン 500 mg/l のみを含むホルモンフリー MS 寒天培地に移植した。約 1 ヶ月後、分化した芽を葉片から分離し、再び、カルベニシリン 500 mg /l を含む MS 寒天培地に移植した。さらに 1 ヶ月後までに多芽体が形成された。多芽体の一部 (できる限り一芽) を切り取り、MF 植物が出現するまで、一ヶ月毎に同培地に移植し続けた。

5. アスピンの形質転換及び培養条件

背丈が約 10 cm に成長したアスペン (*Populus Sieboldii* \times *Populus grandidentata*) の無菌苗より、節を含まないように茎を 5 mm 程度に切断し、さらにこれを縦割にしてアグロバクテリウム感染材料とした。これら茎片を pNPI106 を導入した A. ツメファシエンス LBA4404 株の菌液 (OD=0.25、アセトシリニンゴン 40 mg/l を含む YEB 液体培地で一夜培養後、滅菌水で希釈して菌体濃度を調整。) に 2 ~ 3 分間浸して、滅菌した濾紙の上に置いて余分な菌液を除いた。これをアセトシリニンゴン 40 mg/l を添加したホルモンフリー-1:3MS 寒天培地に置床して、暗所で 3 日間、25 $^{\circ}$ C で培養した。その後、カルベニシリン 500 mg/l のみを含むホルモンフリー-1:3MS 寒天培地に移植し、20 日毎に同培地へ植え継ぎを行った。

6. タバコ及びアスペンからの染色体 DNA 抽出と DNA 分析

DNA抽出は改良CTAB法により行い(38)、PCR分析およびサザンハイブリダイゼーションを行った。

ipt 遺伝子を増幅させるプライマーとして IPT1 (5'-CTTGACAGGAAAGACGTCG-3') および IPT2 (5'-AATGAAGACAGGTGTGAC-3')、予想される大きさは約 0.8 kb である。*ipt* 遺伝子及び R 遺伝子が脱離した時にのみ増幅されるプライマーとして EX1 (5'-TTGTCAAGACCGACCTGTCC-3') および EX2 (5'-TGCATCGGCGAACTGATCGT-3') を用いた。予想される大きさは、約 3.0 kb である。PCR 反応は、変性 94°C 1 分、アニーリング 60°C 1 分、伸長 72°C 2 分 30 サイクルで行った。

サザンハイブリダイゼーションに用いたプローブは、DIG PCR DNA labeling kit (Boehringer Mannheim 社) によりラベリングした。10 μ g のゲノミック DNA を、制限酵素 *Hind*III で切断し、0.8% アガロースゲル電気泳動を行った。このアガロースゲルをアルカリ・酸処理した後、ナイロンメンブランに転写した。ハイブリダイゼーション反応は DIG Easy Hyb キット (Boehringer Mannheim 社) により、wash と化学発光反応は DIG Wash and Block Buffer set (Boehringer Mannheim 社) により行った。また、化学発光シグナルは、フジフィルム LAS1000 により検出した。

7. Km^r 試験および GUS 染色

Km^r 試験は、葉片をカナマイシン 200 mg/l を含む SF 寒天培地 (MS 培地、BA 1 mg/l、NAA 0.2 mg/l) に置床し、一ヶ月後までに Km^r カルスまたは芽分化が生じるか否かにより判定した。GUS 発現は、GUS 組織化学染色法に従って行った (39)。

第3節 結果

1. *ipt* 型 MAT ベクター pNPI106 の構造

Fig. 4 に pNPI106 の T-DNA 領域の構造と、PCR プライマーの位置・方向を示す。CaMV35S プロモーターにより発現する *ipt* 遺伝子は、Ac 内の転移に影響が無い部位に挿入されている (*ipt*/Ac カセット)。従って、Ac 本来の転移に伴い *ipt*/Ac カセットも転移することができる。また、pNPI106 では、有用遺伝子モデルとして GUS 遺伝子と Km^r 遺伝子を用いた。特に、Km^r 遺伝子は選抜マーカーとして使用していない。GUS 遺伝子と Km^r 遺伝子は、*ipt*/Ac カセットの外側に配置されているため、染色体 DNA 上に残留することができる。すなわち、*ipt* 型 MAT ベクター pNPI106 では *ipt*/Ac カセットの転移を利用し、*ipt* 遺伝子は除去され有用遺伝子のみが存在する MF 植物を作出できる。

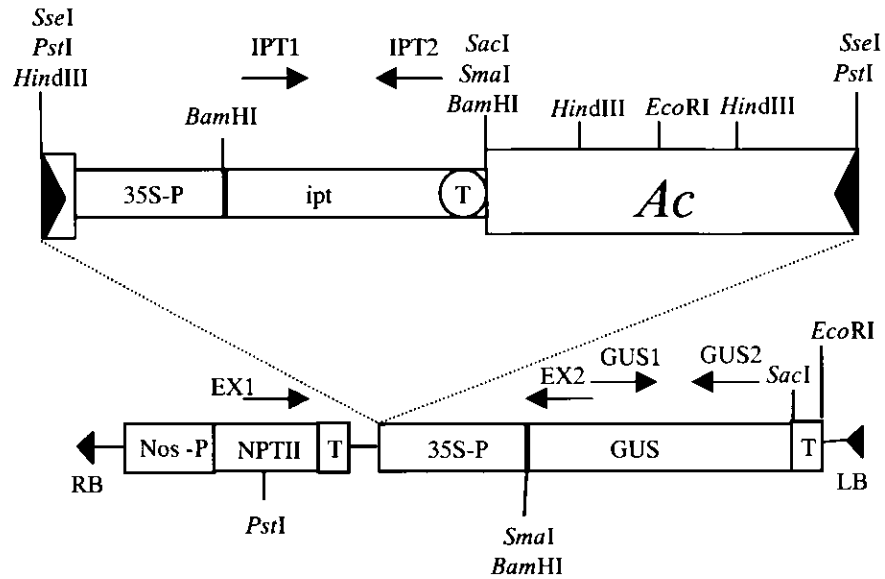


Fig.4 Diagram of MAT vector pNPI106. Plasmid pNPI106 has a "hit and run" cassette in which the chimeric *ipt* gene with 35S promoter is inserted into *Ac* as a selectable marker. The GUS and NPTII genes are unselected markers in these experiments. Arrows, PCR primers; 35S-P, CaMV35S promoter; *ipt*, isopentenyl transferase gene; circled T, isopentenyl transferase terminator; Nos-P, nopoline synthase promoter; T, nopoline synthase terminator; NPTII, neomycin phosphotransferase gene; GUS, β -glucuronidase gene

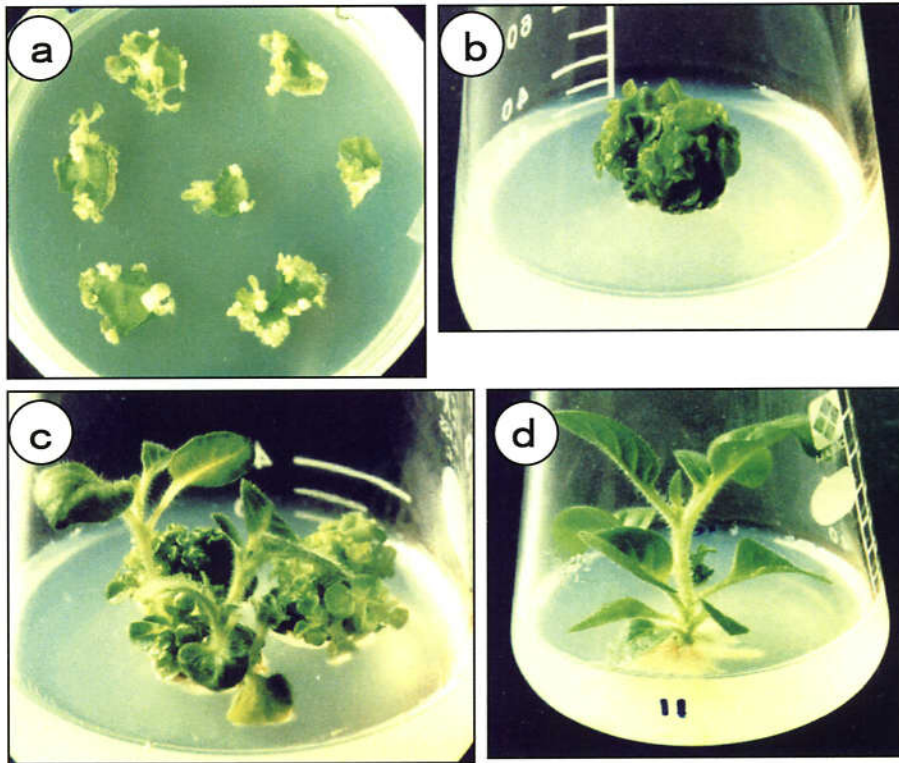


Fig.5 Visible selection of marker-free transgenic tobacco plants. (a) Regeneration of adventitious shoots from leaf segments on selective medium. (b) Differentiation of ESP from adventitious shoots. (c) Appearance of “normal” morphological shoots from ESP. (d) Normal rooted plant.

2. タバコ多芽体形成およびタバコ正常芽の出現

pNPI106 を保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンズ LBA4404 株を、50 片のタバコ葉片に感染させ、ホルモンフリーMS 培地上で培養した。感染後約 3 週間目までに、独立した 100 系統の不定芽を分離することができた (Fig. 5a)。これら不定芽をホルモンフリーMS 培地に移植し、さらに約 1 ヶ月培養 (感染から約 2 ヶ月) を継続した。その結果、63 系統 (63 %) は多芽体を形成し (Fig. 5b)、残りの 37 系統 (37 %) は正常な芽を形成した。この 37 系統の正常芽は、Km^r 試験及び GUS 組織化学染色の結果、非形質転換細胞から分化したエスケープであった。

MF タバコを生産するため、63 系統の多芽体をホルモンフリーMS 培地で継続培養した。その結果、感染 6 ヶ月以内に 63 系統の内 3 系統 (4.8 %) の多芽体から MF タバコと期待される正常芽が出現した (Fig. 5c)。この 3 系統の正常芽は正常に発根した (Fig. 5d)。

3. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコの解析

MF タバコと期待される正常芽 3 系統から、各系統 2 芽ずつ染色体 DNA を抽出した。また、正常芽を出現させた多芽体 1 系統と、正常芽を出現させなかった多芽体 2 系統からも染色体 DNA を抽出し同時に PCR 分析を行った (Fig. 6)。*ipt* 遺伝子を検出できる PCR プライマー (IPT1 と IPT2) を用いて PCR 反応を行った結果、正常芽を出現させた多芽体 1 系統 (Fig. 6a: Lane5)、及び正常芽を出現させなかった多芽体 2 系統で *ipt* 遺伝子の存在を示す約 0.8 kb のバンドが検出された (Fig. 6a: Lane3-4)。しかしながら、MF タバコと期待された正常芽 3 系統 6 芽では、*ipt* 遺伝子の存在を示す約 0.8 kb のバンドは検出されなかった (Fig. 6a: Lane6-11)。さらに、*ipt*/Ac カセットが脱離した時のみ検出できる PCR プライマー (EX1 と EX2) を用いて PCR 反応を行った (Fig. 6b)。その結果、MF タバコと期待された正常芽 3 系統 6 芽全てと (Fig. 6b: Lane6-11)、正常芽を出現させた多芽体 1 系統において (Fig. 6b: Lane5)、*ipt*/Ac カセットの脱離を示す約 3 kb のバンドが検出された。これらの結果から、正常芽 3 系統は MF タバコであることが確認された。

さらに、MF タバコにおけるモデル有用遺伝子 GUS 遺伝子と Km^r 遺伝子の発現を解析した。GUS 組織化学染色の結果、3 系統すべての MF タバコにおいて強い染色が観察された。また、カナマイシンを含む芽分化培地を用いた Km^r 試験の結果、3 系統すべての MF タバコの葉片から Km^r カルス及び芽の分化が観察された。

これらの結果から、MF タバコは、*ipt*/Ac カセットは除去されたが、有用遺伝子は染色体上に残留し正常に発現していることが判明した。

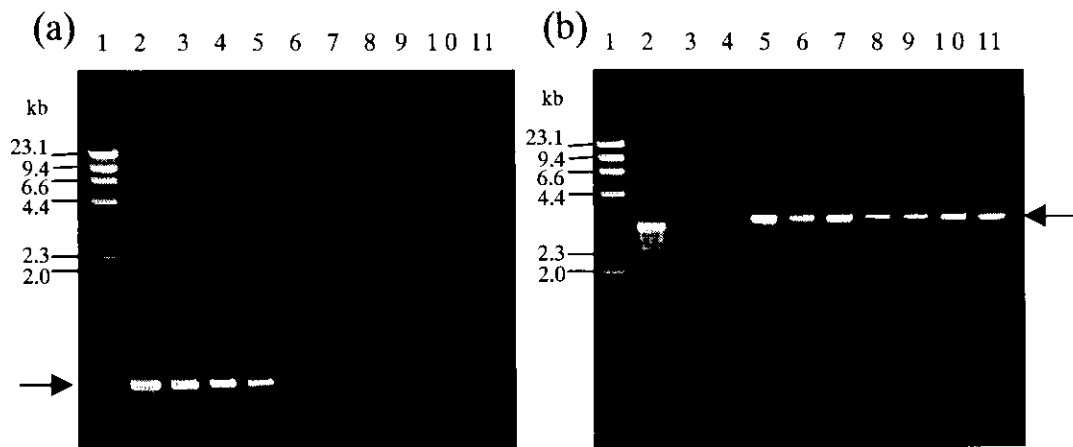


Fig.6 PCR analysis of ESP shoots and normal plants obtained from ESP shoots. (a) Amplification of the DNA fragments using primers c and d flanking the *ipt* gene (Fig.1). The arrow indicate a fragment of approximately 800 bp. (b) Amplification of the fragments using primers a and b (Fig.1) flanking the position of hit and run cassette. The arrow indicate amplified fragments of 3 kb that result from empty donor sites. Lanes: 1, λ *Hind*III size marker; 2, plasmid pNPI106 in *a* and plasmid pBI121 in *b*; 3 and 4, DNA from two independent ESP shoot-derived clones, in which normal shoots did not reappear; 5, DNA from a ESP shoot-derived clone, in which normal shoots reappear; 6-11, DNA from two independent normal shoots from each of three ESP shoot-derived clones. Lanes 6 and 7 represent 2 shoots from line 2, lane 8 and 9 represent 2 shoots from line 3, and lanes 10 and 11 represent 2 shoots from line 4.

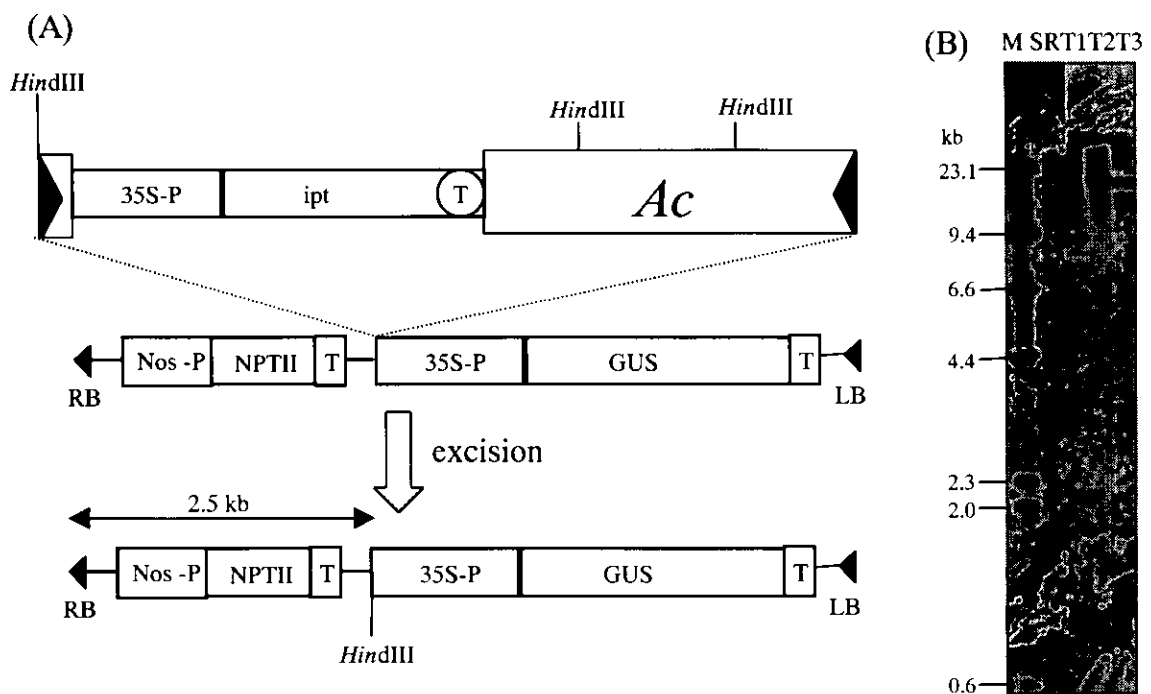


Fig.7 Km^I gene copy number.

A. Restriction map of the T-DNA region of plasmid pNPI106 and the DIG-labeled Km probe region. B. Southern blot of genomic DNA from each marker-free transgenic tobacco plants, digested with *Hind*III and hybridized with the DIG-labeled Km probe. Lane T1-T3: marker-free transgenic tobacco plants appeared from *ipt*-shooty explants; Lane SR: untransformed control; Lane M: the λ -*Hind*III size marker.

4. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコに導入された有用遺伝子のコピー数

MF タバコ 3 系統の染色体DNAを *Hind*III で切断し、DIG ラベルしたプローブKMを用いサザンハイブリダイゼーションを行い、モデル有用遺伝子 Km^r 遺伝子のコピー数を決定した (Fig. 7)。その結果、2 系統 (Fig. 7B, レーン T2, T3) では1コピーの Km^r 遺伝子が、1 系統 (Fig. 7B, レーン T1) は2コピーの Km^r 遺伝子が染色体に挿入されたと推測された。

ここで、コピー数とは、サザンハイブリダイゼーション法により検出された有用遺伝子のバンド数を単に示しているのみである。従って本論文では、検出された同一バンド (DNA断片) 内に複数の有用遺伝子が組み込まれている場合にも、1コピーとして論じることとする。例えば、Fig. 7B のレーン T1 のシグナルに比較し、レーン T2 および T3 のシグナルが強く検出されたことから、レーン T2 および T3 の MF タバコでは、同一DNA断片内に2個以上の Km^r 遺伝子が組み込まれている可能性も否定できない。

5. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコに導入された有用遺伝子の遺伝的安定性

MF タバコ 3 系統に導入された有用遺伝子の次世代への安定的伝達を確認するため、各系統の種子をカナマイシンを含むMS培地に播種した。その結果、サザンハイブリダイゼーションにより1コピーと推測された2系統では、それぞれ $Km^r : Km^s = 138:38$ 、 $87:21$ となり、やはり Km^r 遺伝子が1遺伝子座に組み込まれていることが判明した。また、サザンハイブリダイゼーションにより2コピーと推測された1系統では、 $Km^r : Km^s = 89:9$ となり、 Km^r 遺伝子が2遺伝子座に組み込まれていることが判明した。また、このような交配による解析においても、1遺伝子座に2コピー以上の Km^r 遺伝子が組み込まれている可能性は否定できない。

さらに、これらMFタバコ3系統のカナマイシン耐性次世代の各10芽についてGUS組織化学染色を行った結果、全てで染色が確認できた。

これらの結果から、*ipt* 型MATベクター pNPI106により導入されたモデル有用遺伝子 (Km^r 遺伝子とGUS遺伝子) は安定的に次世代に伝達されることが判明した。

6. 選抜マーカー・フリー形質転換アスピンの作成

pNPI106を保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンズ LBA4404株を、50片のアスペン茎片に感染させ、ホルモンフリー1:3MS培地上で培養した。感染後約1ヶ月までに、多くの不定芽を分離することができた (Fig. 8a)。これら不定芽を同培地に移植し、さらに約1ヶ月培養 (感染から約2ヶ月) を継続し、20系統の多芽体を分離することができた (Fig. 8b)。これら20系統の多芽体について、さらに6ヶ月間 (感染から約8ヶ月) 培養を継続した結果、3系統の多芽体 (6.0%) からMFアスペンと期待される正常芽が出現

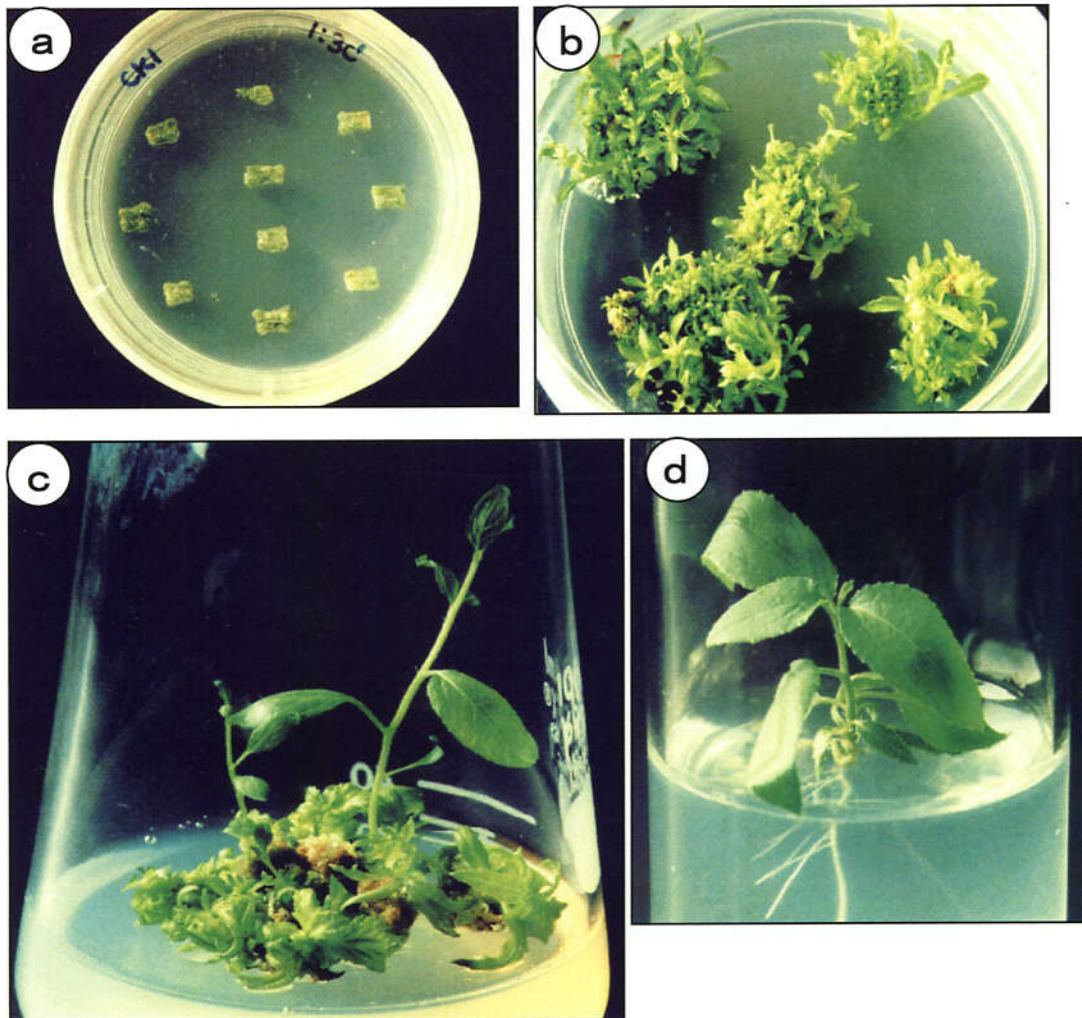


Fig.8 Visible selection of marker-free transgenic hybrid aspens. (a) Regeneration of adventitious shoots from stem segments on nonselective medium. (b) Differentiation of ESP from adventitious shoots. (c) Appearance of “normal” morphological shoots from ESP. (d) Normal rooted plant.

した (Fig. 8c)。この3系統の正常芽は正常に発根した (Fig. 8d)。MF アスペンと期待された正常芽3系統からそれぞれ各系統2芽ずつから染色体DNAを抽出し、Fig. 6と同様に *ipt* 遺伝子を検出できるPCRプライマー (IPT1とIPT2)を用いてPCR反応を行った。その結果、これら3系統からは *ipt* 遺伝子の存在を示す約0.8 kbのバンドは検出されなかった。さらに、これら3系統の正常芽についてGUS組織化学染色を行った結果、1系統のみで染色が確認できた。

すなわち、20系統の多芽体から1系統のMFアスペンを作出することに成功した。

第4節 考察

本章において、CaMV35Sプロモーターにより発現される *ipt* 遺伝子が、タバコおよびアスペンにおいて実用レベルの選抜マーカーとして利用できることが示唆された。現在までに、*ipt* 遺伝子は多くの植物に導入され、その機能発現が報告されている (17-25)。また、本章において、一般的に形質転換植物の作成が難しいといわれている樹木アスペンにおいて、タバコ同様に選抜マーカーとして使用できることを示した。よって、*ipt* 遺伝子は他の植物種へも広く選抜マーカーとして利用できると考えられる。また、従来の選抜マーカーである抗生物質耐性遺伝子の場合には、培地中に抗生物質を添加しなければならない。そのため、植物細胞へのダメージはある程度避けられず、その結果として再分化効率への悪影響が生じる。また、培地に添加された外性ホルモンにたいする感受性は、植物種および品種により異なる。それに対し、*ipt* 遺伝子はサイトカイニンの細胞内含量を増加させることにより、植物細胞分裂と再分化を促進することができる。従って、従来の方法では形質転換植物の作成が難しかった植物種においても有用な選抜マーカーとして利用できる可能性がある。

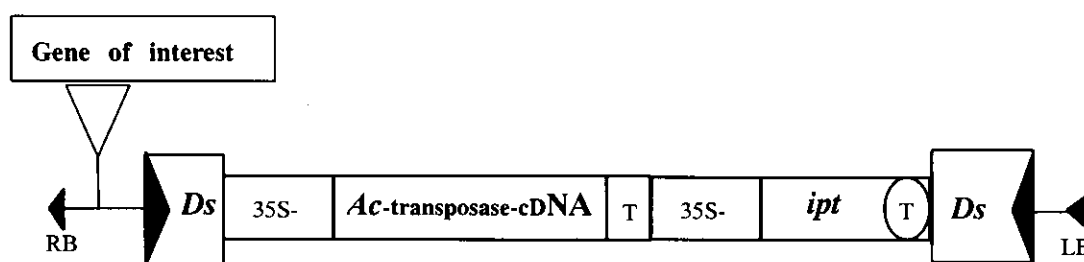


Fig. 9 The practical *Ac/Ds* type MAT-vector

本章では、*ipt* 遺伝子の除去因子として、トウモロコシの転移因子 *Ac* を用いた。その結果、4.8%のタバコ多芽体からMFタバコ植物を、5.0%のアスペン多芽体からMFアスペンを作成することができた。このように、本章で作成した *ipt* 型MATベクター pNPI106によるMF植物作成効率は極めて低かったが、*Ac/Ds*系を改良することにより高効率化できると

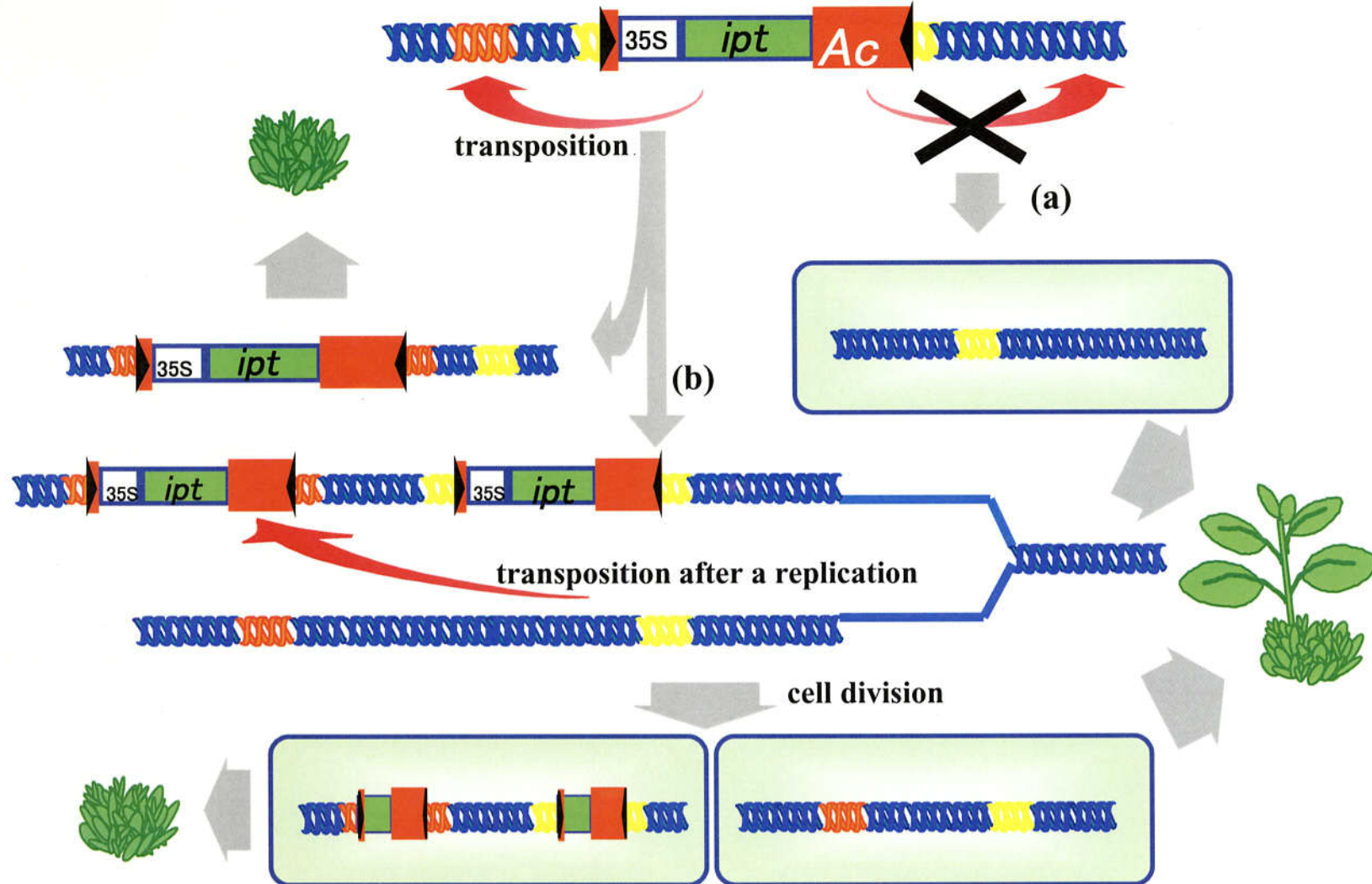


Fig.10 Elimination of the *ipt* gene

考えられる。*ipt* 型 MAT ベクター pNP1106 では、*Ac* の 5' 末端領域に *ipt* 遺伝子が挿入され、*Ac* の転移酵素遺伝子プロモーター自身が発現させた *Ac* 転移酵素により転移反応が行われている。しかしながら、*Ac* 転移酵素 cDNA を CaMV35S プロモーターにより発現させることにより、*Ds* の効率的な転移が起きることが報告されている (27, 28, 35)。従って、Fig. 9 で示すような *Ac/Ds* 系を用いた実用的 *ipt* 型 MAT ベクターを今後検討する必要がある。

Ac による *ipt* 遺伝子の除去機構として 2 つ推測される。第一は、*Ac* が転移に伴い脱離したのち再挿入に失敗する単純な転移ミスである (Fig. 10a)。第二は、染色体の複製後に脱離した *Ac* が、娘染色体に再挿入された場合である (Fig. 10b)。この場合、転移距離は特に問題ではなく、娘染色体であればどこでもよい。染色体複製後の *Ac* の娘染色体への転移は、トウモロコシは勿論 (40)、形質転換トマトにおいても報告されている (32)。さらに、トウモロコシの転移因子 *Ac* は多くの異種植物に導入され、トウモロコシ同様の転移反応が起きることが報告されている (27)。従って、*Ac* を用いた *ipt* 型 MAT ベクターシステムは、様々な植物種に応用できると思われる。

また、*Ac* を用いた *ipt* 型 MAT ベクターにより作成された MF タバコに導入されたモデル有用遺伝子のコピー数を決定した結果、1 または 2 コピーで導入されている可能性が示唆された。有用遺伝子の低コピー化は、遺伝子不活性化を防ぐために重要であると考えられる (41)。

第5節 要約

アグロバクテリウム由来のサイトカイニン合成遺伝子 *ipt* 遺伝子と、それを除去するための転移因子 *Ac* を組み合わせた *ipt/Ac* カセットをもつ *ipt* 型 MAT ベクター pNP1106 を構築し、タバコとアスペンを材料として MF 植物の作成を行った (9)。

タバコの場合、分化した不定芽のうち 63 % が多芽体となり、そのうちの 4.8 % の多芽体から MF エタバコと推測される正常芽が出現した (Fig. 5)。PCR 分析の結果、これら正常芽は、*ipt/Ac* カセットの転移に伴う脱離により *ipt* 遺伝子が消失した MF タバコであることが確認された (Fig. 6)。また、MF タバコに残留していた有用遺伝子は正常に発現しており、次世代での遺伝子発現も確認できた。さらに、得られた 3 系統の MF タバコに導入された有用遺伝子のコピー数を解析した結果、2 系統は 1 コピーであり 1 系統は 2 コピーであることが示唆された (Fig. 7)。*ipt/Ac* カセットをもつ *ipt* 型 MAT ベクターシステムは、有用遺伝子が低コピーで導入された系統を優先的に選抜できる可能性も示唆された。

また、一般に形質転換が難しいとされている樹木のモデルとして用いたアスペンにおいても、20 系統 の多芽体から 1 系統の MF アスペンを作成することに成功した (Fig. 8)。

第2章 酵母の部位特異的組換え系 *R*/*RS* を用いた *ipt* 型 MAT ベクターによる選抜マーカー・フリー形質転換タバコの作成

第1節 緒言

第1章において、*ipt* 遺伝子による多芽体形成と、*ipt* 遺伝子を除去する DNA 因子の組合せにより MF 植物が作出できる基本原理が実証された。しかしながら、*Ac* を用いた *ipt* 型 MAT ベクターシステムによる MF 植物の作成効率は低く実用的なシステムとは言い難い。

そこで、*Ac* に代わり酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* のプラスミド pSR1 に存在する部位特異的組換え系 *R*/*RS* 系を用いた *ipt* 型 MAT ベクターシステムの検討を行った (11)。*R*/*RS* 系は他の部位特異的組換え系と同様に、組換え酵素 *R* が結合する組換え配列 *RS* が順方向に2つ存在すると *RS* 間の DNA 断片の脱離が生じる (42-44)。*R*/*RS* 系は、酵母において 180 kb の DNA 断片の脱離や、染色体間の転座をひきおこすことが報告されている (45)。また、*R*/*RS* 系を導入した形質転換植物の解析から、酵母内と同様の部位特異的組換え反応が起きることも報告されている (46, 47)。

従って本章では、2つの順方向 *RS* の間に、CaMV35S プロモーターにより発現される組換え酵素 *R* 遺伝子と *ipt* 遺伝子が挟まれた *ipt* 型 MAT ベクターを構築した。そして、タバコを材料として MF 植物の作出効率を検討した。

第2節 実験材料および方法

1. プラスミド (*ipt* 型 MAT ベクター pNPI132) の構築 (Fig. 11)

(財) 醗酵研究所より入手した *Zygosaccharomyces rouxii* からプラスミド pSR1 を抽出し (45)、*R* 遺伝子及び *RS* 配列を単離するための PCR 用鋳型 DNA とした。*R* 遺伝子を増幅させるプライマーとして 5'-CCTCTAGAATGCAATTGACCAAGGATACTG-3' および 5'-CCGAGCTCTTAATCTTGTGTCAGGAGGTGTCA-3' を用いた。予想される大きさは約 1.4 kb である。*RS* 配列は2セットのプライマーにより、末端配列だけが異なる2種類の *RS* 配列 (*RS*1 と *RS*2) を増幅させた。*RS*1 を増幅させるプライマーとして、5'-AGGATTGAGCTACTGGACGGGAATCCTGCA-3' および 5'-CAACTCGAGCAATCAAAGCTTCTCGTAGTC-3' を用いた。*RS*2 を増幅させるプライマーとして、5'-AGGATTGAGCTACTCGAGGGGAATTCTGGA-3' および 5'-ACTGGACCAATCCCTGCAGGTCGTAGTCAA-3' を用いた。PCR 反応は、変性 95°C 1 分、アニーリング 60°C 30 秒、伸長 72°C 1.5 分 30 サイクルで行った。

*RS*1 を制限酵素 *Pst*I-*Xho*I で切断し、pSL1180 (Pharmacia 社) の *Pst*I-*Xho*I 部位に ligation して pNPI126 を作成した。また、*RS*2 も制限酵素 *Pst*I-*Xho*I で切断し、pHSG398 (宝酒造) から *Eco*RI と *Hind*III 部位を削除した誘導體 pNPI121 の *Pst*I-*Sal*I 部位に ligation

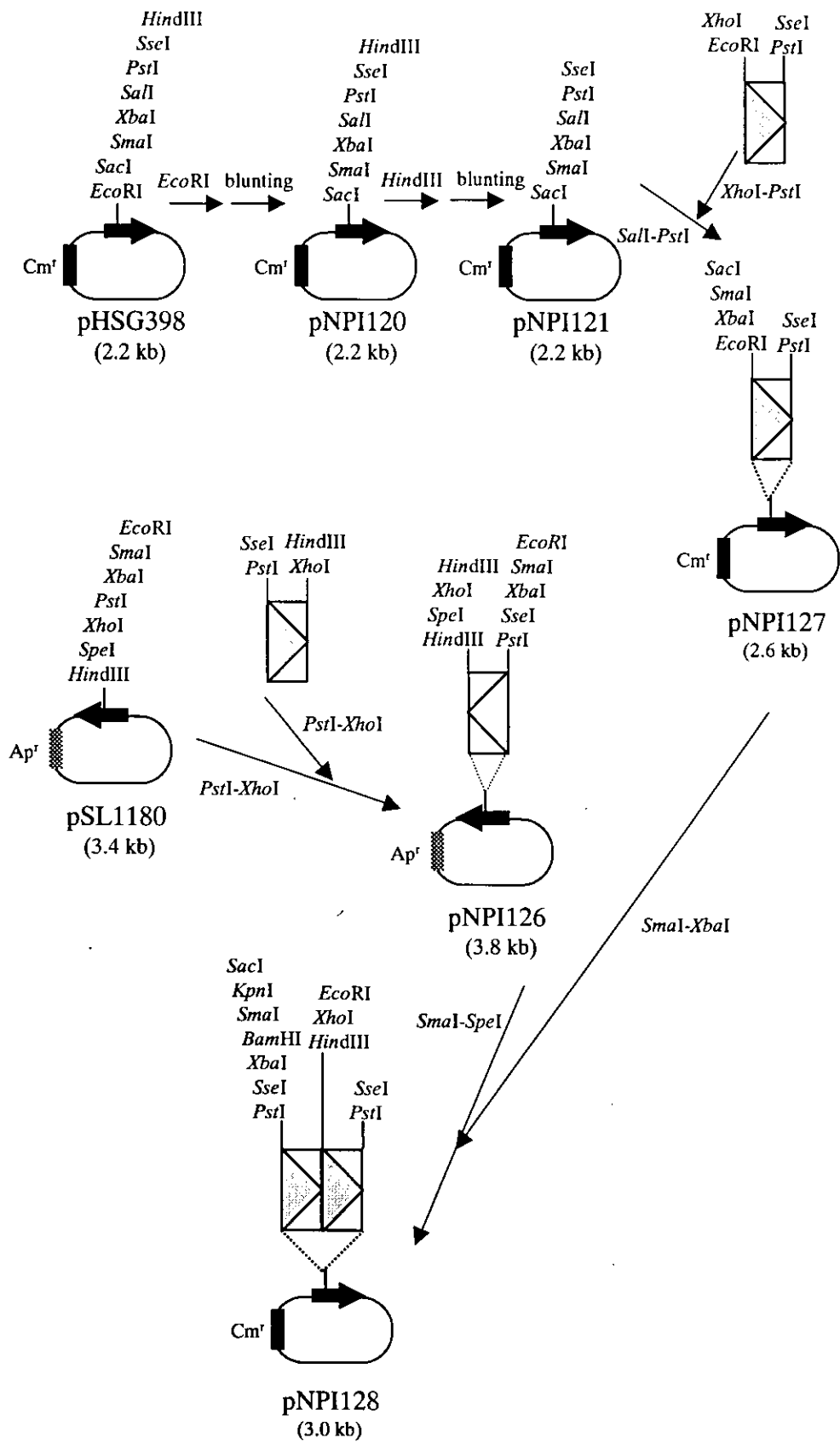


Fig.11 Construction of pNPI132

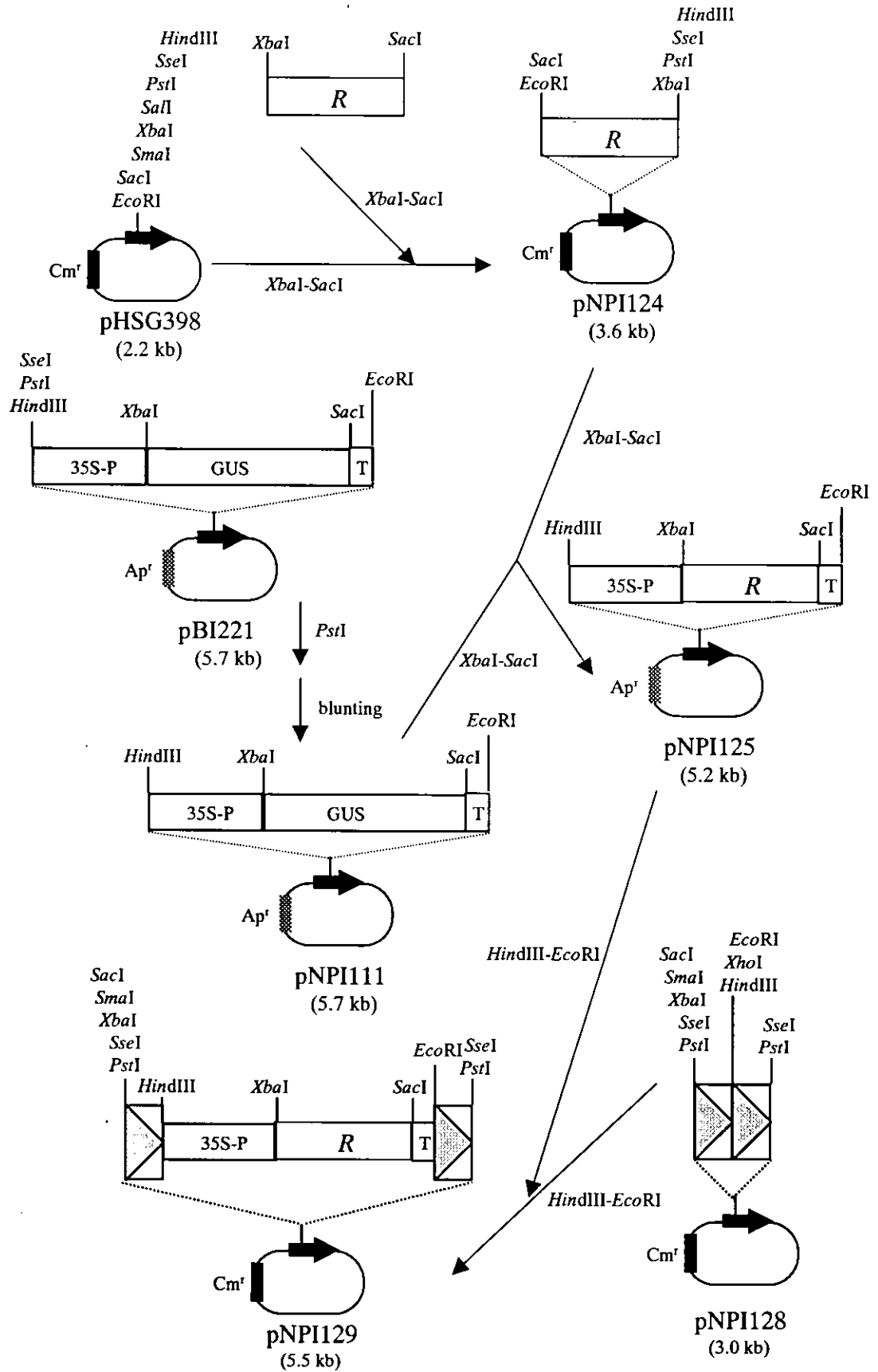


Fig.11 Continued

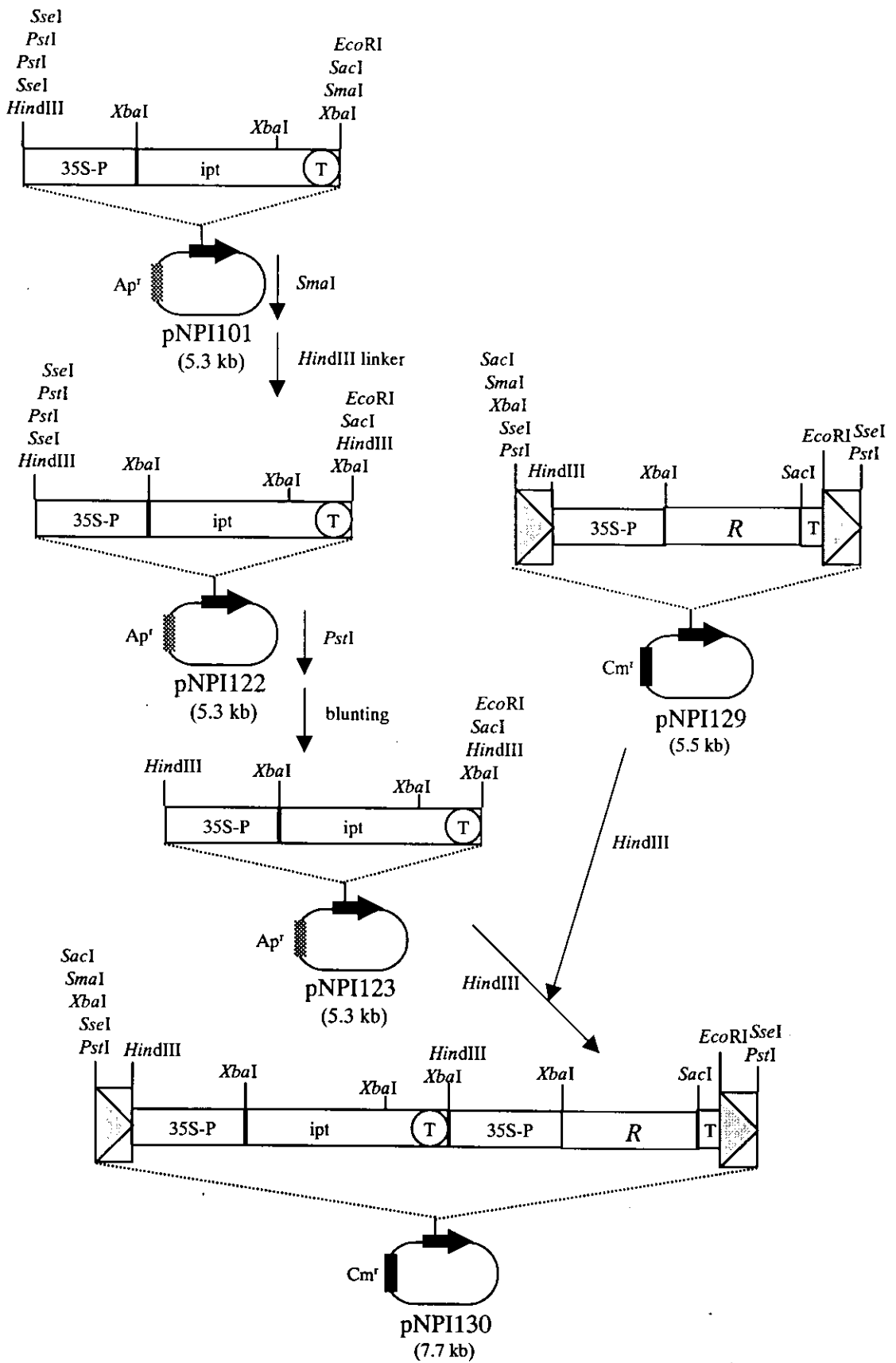
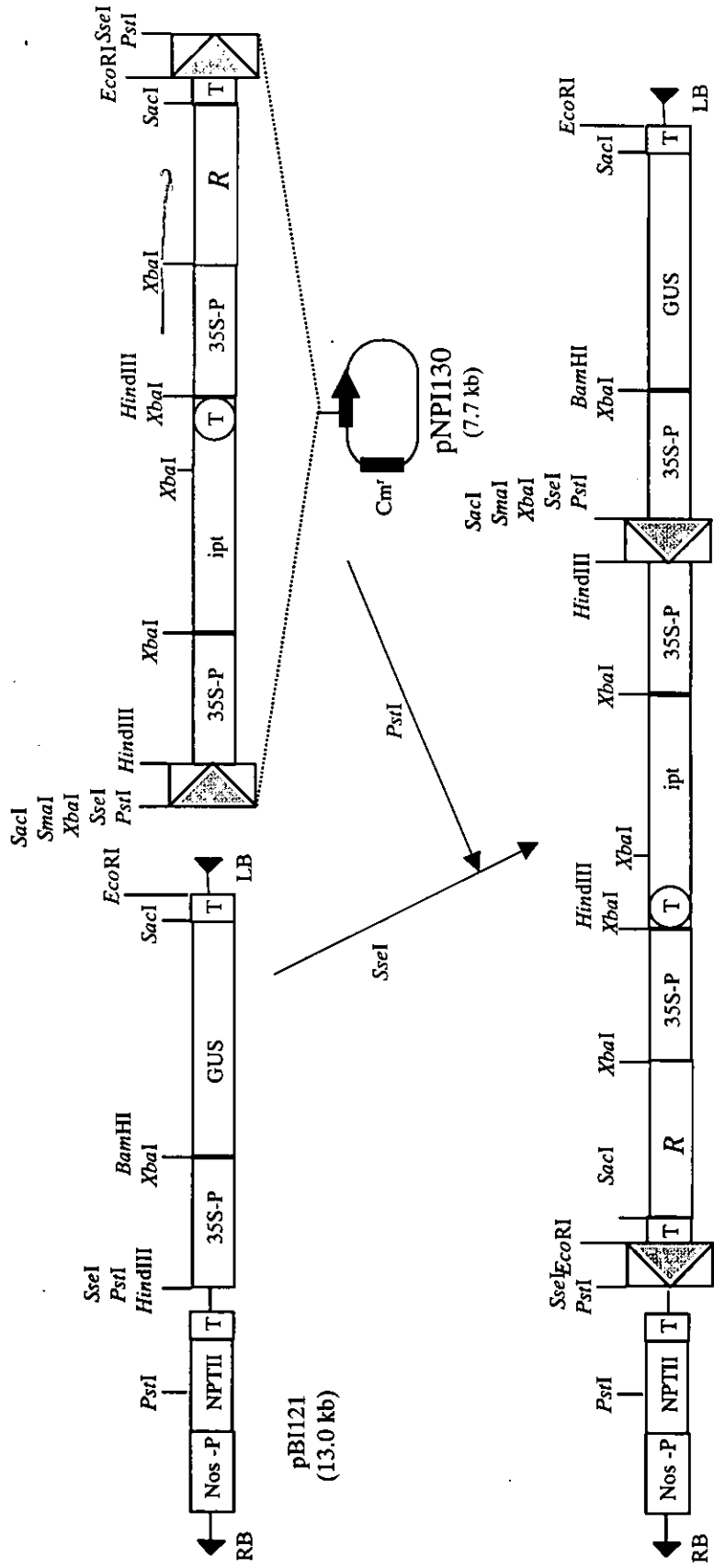


Fig.11 Continued



pNPI132
(18.5 kb)

Fig.11 continued

して pNPI127 を作成した。次に、pNPI126 を制限酵素 *SmaI-SpeI* で切断して RSI を切り出し、pNPI127 の *SmaI-XbaI* 部位に ligation して pNPI128 を作成した。

R 遺伝子を制限酵素 *XbaI-SacI* で切断し、pHSG398 (宝酒造) の *XbaI-SacI* 部位に ligation して pNPI124 を作成した。さらに、pNPI124 を制限酵素 *XbaI-SacI* で切断して R 遺伝子を切り出し、pBI221 (CLONTECH 社) から *Sse8387I* 部位を削除した誘導体 pNPI111 の *XbaI-SacI* 部位に ligation して pNPI125 を作成した。次に、pNPI125 を制限酵素 *HindIII-EcoRI* で切断して CaMV35S プロモーターに連結された R 遺伝子を切り出し、pNPI128 の *HindIII-EcoRI* 部位に ligation して pNPI129 を作成した。

第 1 章で作成した pNPI101 の *SmaI* 部位に *HindIII* リンカーを挿入し、さらに *Sse8387I* 部位を削除した pNPI123 を作成した。この pNPI123 を制限酵素 *HindIII* で切断して CaMV35S プロモーターに連結された *ipt* 遺伝子を切り出し、pNPI129 の *HindIII* 部位に ligation して pNPI130 を作成した。

本章で研究に用いた pNPI132 は、pNPI130 を制限酵素 *PstI* で切断し CaMV35S プロモーターに連結された *ipt* 遺伝子と R 遺伝子を含むカセットを切り出し、pBI121 の *Sse8387I* 部位に ligation して作成した。

2. プラスミドの調製及び大腸菌の形質転換

大腸菌、及びアグロバクテリウム・ツメファシエンズからのプラスミドの少量調製は、プラスミド自動分離装置 PI-500 (KURABO 社) により行った。また、プラスミドの大量調製は、Plasmid Midi Kit (QIAGEN 社) を用いた。

プラスミドによる大腸菌の形質転換は、Competent High JM109 または DH5 α キット (TOYOBO 社) により行った。

3. アグロバクテリウムの形質転換

アグロバクテリウム、ツメファシエンズ LBA4404 株 (36) を、10ml の YEB 液体培地 (ビーフエキス 5g/l、酵母エキス 1g/l、ペプトン 1g/l、ショ糖 5g/l、2mM MgSO₄、22°C での pH7.2 (以下、特に示さない場合、22°C での pH とする。)) に接種し、OD₆₃₀ が 0.4 から 0.6 の範囲に至るまで、28°C で培養した。培養液を、6900 × g、4°C、10 分間遠心して集菌した後、菌体を 20ml の 10mM HEPES (pH8.0) に懸濁して、再度 6900 × g、4°C、10 分間の遠心で集菌し、次いでこの菌体を 200 μ l の YEB 液体培地に懸濁して、これをプラスミド導入用菌液とした。0.5ml チューブ内で、プラスミド導入用菌液 50 μ l と 3 μ l の MAT ベクタープラスミド pNPI132 を混合し、これをエレクトロポレーション法 (ジーンパルサー II システム [BIORAD 社]) を用いプラスミドを導入し (37)、次いで 200 μ l の YEB 液体培地を加えて 25°C で 1 時間振とうして培養した。この菌体を、50mg/l カナマイシン添加 YEB 寒天培地 (寒天 1.5w/v%、

他の組成は上記に同じ。)に播種して28℃で2日間培養し菌コロニーを得た。さらに、この菌コロニーをYEB液体培地に移植して更に培養した後、本章2節-2と同様にプラスミドを抽出し、アグロバクテリウム・ツメファシエンズ LBA4404 株に pNPI132 が導入されていることを確認した。

4. タバコの形質転換及び培養条件

温室内で生育させたタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. SR1) の成葉を、1v/v%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に5分間浸漬して殺菌し、滅菌水で3回洗浄した後、中脈を取り除いて約8mm角の葉片となるように調製した。このタバコ葉片を、pNPI132を導入したアグロバクテリウム・ツメファシエンズ LBA4404 の菌液 (OD=0.25、YEB液体培地で一夜培養後、滅菌水で希釈して菌体濃度を調整。)に約1分間浸して、滅菌した濾紙の上に置いて余分な菌液を除いた。これを、アセトシリゴン 50 mg/l を添加した植物ホルモンを含まない (ホルモンフリー) MS寒天培地に、葉の裏が上になるように置床して、暗所で3日間、25℃で培養した。その後、カルベニシリン 500 mg/l のみを含むホルモンフリーMS寒天培地に移植した。約1ヶ月後、分化した芽を葉片から分離し、再び、カルベニシリン 500 mg/l を含むMS寒天培地に移植した。さらに1ヶ月後までに多芽体が形成された。多芽体の一部 (できる限り一芽) を切り取り、MF植物が出現するまで、一ヶ月毎に同培地に移植し続けた。

5. タバコからの染色体DNA抽出とDNA分析

DNA抽出は改良CTAB法により行い (38)、PCR分析およびサザンハイブリダイゼーションに用いた。

ipt 遺伝子を増幅させるプライマーとして IPT1 (5'-CTTGCACAGGAAAGACGTCG-3') および IPT2 (5'-AATGAAGACAGGTGTGACGC-3') を用いた。予想される大きさは約0.8kbである。*ipt* 遺伝子及び R 遺伝子が脱離した時にのみ増幅されるプライマーとして EX1 (5'-TTGTCAAGACCGACCTGTCC-3') および EX2 (5'-TGCATCGGCGAACTGATCGT-3') を用いた。予想される大きさは、約3.0kbである。GUS 遺伝子を増幅させるプライマーとして GUS1 (5'-GTGGAATTGATCAGCGTTGG-3') および GUS2 (5'-GTGGAATTGATCAGCGTTGG-3') を用いた。予想される大きさは、約1.4kbである。PCR反応は、変性94℃1分、アニーリング60℃1分、伸長72℃2分30サイクルで行った。

サザンハイブリダイゼーションに用いたプローブは、DIG PCR DNA labeling kit (Boehringer Mannheim社)によりラベリングした。10μgのゲノミックDNAを、制限酵素 *Hind*III で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。このアガロースゲルをアルカリ・酸処理した後、ナイロンメンブランに転写した。ハイブリダイゼーション反応はDIG

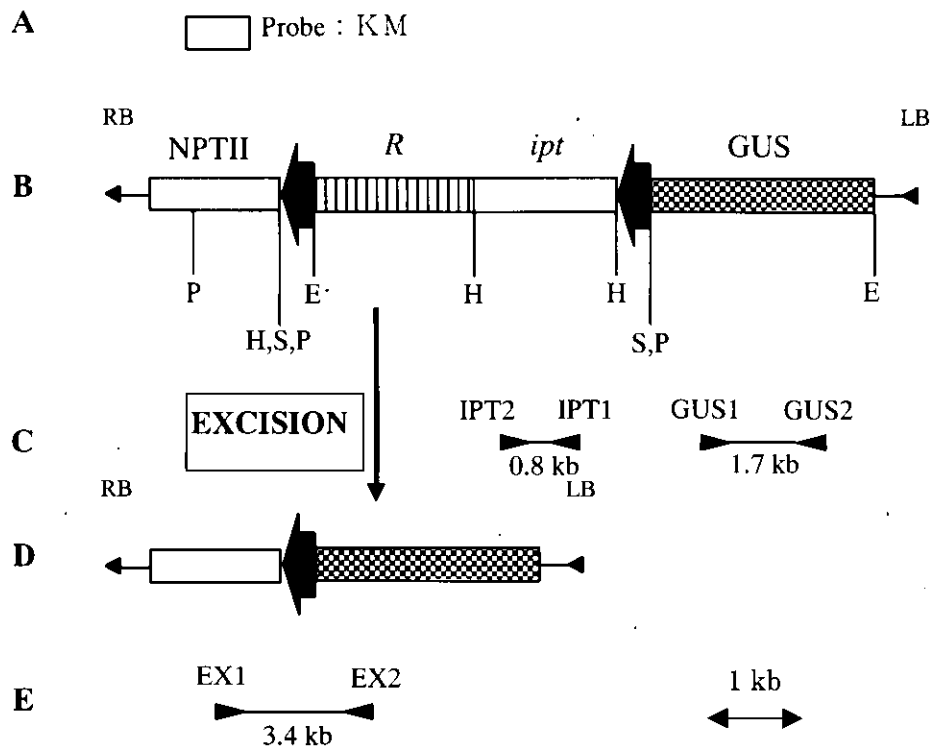


Fig.12 Map of the T-DNA region of pNPI132.

A The probe KM was labeled with DIG-dUTP between two PCR primers of the NPTII coding sequence (Materials and Methods). **B** Map of the T-DNA region of pNPI132. A detailed map of the promoter and the terminator is abbreviated. The GUS, *ipt* and *R* gene is driven by the CaMV 35S promoter. The NPTII is driven by the nopaline synthase promoter. The terminator of GUS, *R* and NPTII is the nopaline synthase and that of the *ipt* gene is its native terminator. **C** Small black triangles are PCR primers to amplify the *ipt* gene and GUS gene. The expected size of PCR products is also shown. **D** The expected map of T-DNA region following an excision of the R/RS system. **E** Small black triangles are PCR primers to amplify excision products. The expected size of PCR products is also shown.

RB = right border sequence of a T-DNA, LB = left border sequence of a T-DNA.

E = *EcoRI*, H = *HindIII*, P = *PstI*, S = *SseI*.

Easy Hyb キット (Boehringer Mannheim 社) により、wash と化学発光反応は DIG Wash and Block Buffer set (Boehringer Mannheim 社) により行った。また、化学発光シグナルは、フジフィルム LAS1000 により検出した。

6. Km^r 試験および GUS 染色

Km^r 試験は、葉片を カナマイシン 200 mg/l を含む SF 寒天培地 (MS 培地、BA 1 mg/l、NAA 0.2 mg/l) に置床し、一ヶ月後までに Km^r カルスまたは芽分化が生じるか否かにより判定した。

GUS 発現は、GUS 組織化学染色法に従って行った (39)。

第3節 結果

1. *ipt* 型 MAT ベクター pNPI132 の構造

Fig. 12 に pNPI132 の T-DNA 領域の構造と、PCR プライマーの位置・方向及びサザンハイブリダイゼーション用プローブの領域を示す。

CaMV35S プロモーターにより発現する *ipt* 遺伝子および *R* 遺伝子は、2つの順方向 RS 間に挿入されている。従って、CaMV35S プロモーターにより発現した組換え酵素が2つの RS に結合し、脱離反応を引き起こす。また、pNPI132 では、有用遺伝子モデルとして GUS 遺伝子と Km^r 遺伝子を用いた。特に、Km^r 遺伝子は選抜マーカーとして使用していない。GUS 遺伝子と Km^r 遺伝子は、順方向 RS カセットの外側に配置されているため、染色体 DNA 上に残留することができる。

すなわち、*ipt* 型 MAT ベクター pNPI132 では *R*/RS 系による順方向 RS 間の脱離反応を利用し、*ipt* 遺伝子は除去され有用遺伝子のみが存在する MF 植物を作出できる。

2. 多芽体形成および正常芽の出現

pNPI132 を保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンズ LBA4404 株をタバコ葉片に感染させ、ホルモンフリー MS 培地上で培養した。感染後約 1 ヶ月までに、独立した 134 系統の不定芽を分離することができた (Fig. 13a)。これら不定芽をホルモンフリー MS 培地に移植し、さらに約 1 ヶ月培養 (感染から約 2 ヶ月) を継続した。その結果、66 系統 (49.3%) は多芽体を形成し (Fig. 13b)、残りの 68 系統 (50.7%) は正常な芽を形成した。

MF タバコを生産するため、66 系統の多芽体をホルモンフリー MS 培地で継続培養した。その結果、感染 8 ヶ月以内に 66 系統の内 49 系統 (74.2%) の多芽体から MF タバコと期待される正常芽が出現した (Fig. 13c)。この 49 系統の正常芽は正常に発根した (Fig. 13d)。

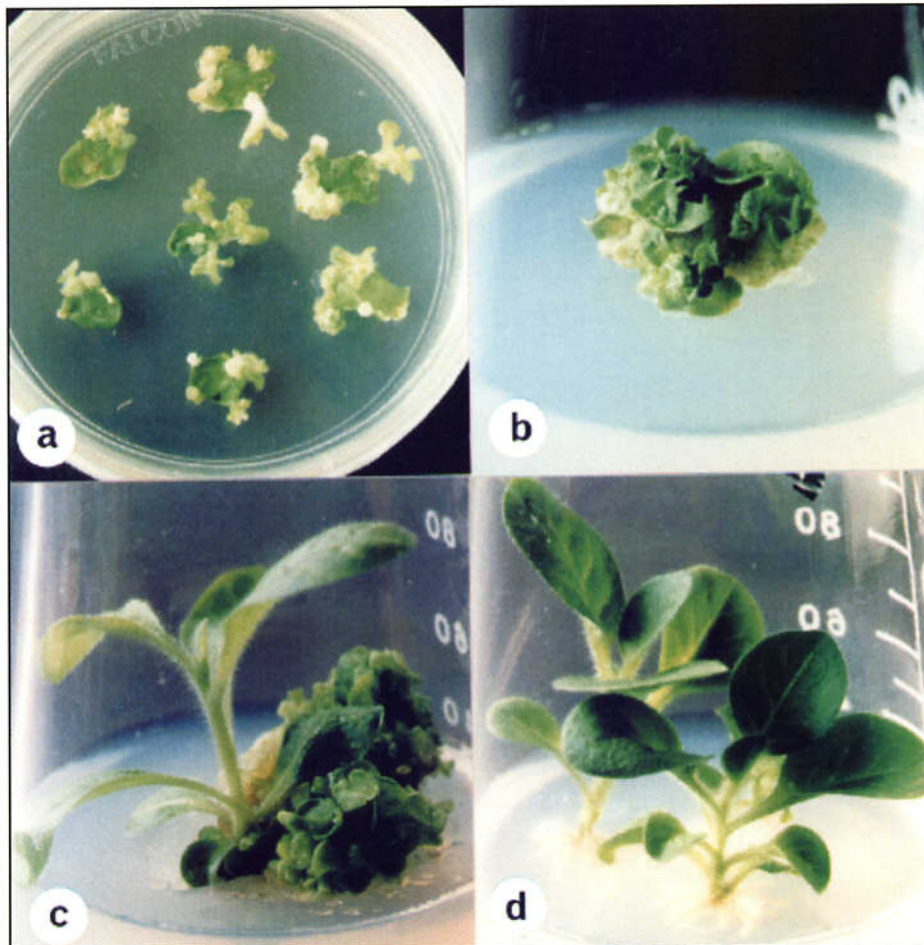


Fig.13 Production of marker-free transgenic tobacco plants
a Regeneration of adventitious buds on hormone-free MS medium. **b** *ipt*-shooty, approximately 1 month after transplantation of adventitious buds. **c** Phenotypically normal shoots generated from extreme *ipt*-shooty. The number of phenotypically normal shoots and the timing of their appearance was different between *ipt*-shooty lines. **d** Phenotypically normal shoots were rooted.



Fig.14 PCR analysis of genomic DNA from *ipt*-shooty and phenotypically normal shoots.

PCRs were performed as described in Materials and methods using primers IPT1 and IPT2 (lane 2~4), primers EX1 and EX2 (lane 5~7), primers GUS1 and GUS2 (lane 8~10) which were represented in Fig.1-C,E. Lane 1, size markers (λ /*Hind* III digest - ϕ X174/*Hae* III digest) purchased from TOYOBO. Lane 2 and 8, amplification of the positive control (plasmid pNPI132). Lane 5, amplification of the positive control (plasmid pBI121). Lane 3 and 6 and 9, amplification of DNA from an *ipt*-shooty. Lane 4 and 7 and 10, amplification of DNA from a phenotypically normal shoot generated from an *ipt*-shooty.

3. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコの解析

MF タバコと期待された正常芽について、GUS 組織化学染色、Km^r 試験、及び PCR 分析を行った。PCR 分析の 1 例を Fig. 14 に示す。

不定芽から多芽体を經由せず直接正常芽に分化した 68 系統の内、ランダムに抽出した 16 系統について、GUS 組織化学染色および Km^r 試験を行った。その結果、2 系統において GUS 染色および Km^r が確認された。さらに PCR 分析の結果、この 2 系統については、*ipt* 遺伝子の存在を示すバンドは検出されず、GUS 遺伝子およびカセットの脱離を示すバンドは検出された。これらの結果から、不定芽から多芽体を經由せず直接的に正常芽に分化した 2 系統の正常芽は、MF タバコであることが確認された。

また、49 系統の多芽体から出現した MF タバコと期待される正常芽について、GUS 組織化学染色および Km^r 試験を行った。その結果、39 系統が Km^r を示し、その内の 26 系統の正常芽は GUS 染色も確認された。さらに、PCR 分析を行った結果、GUS 染色および Km^r が確認された 26 系統の正常芽は、*ipt* 遺伝子の存在を示すバンドは検出されず、GUS 遺伝子およびカセットの脱離を示すバンドが検出された。さらに、GUS 染色が観察されず Km^r のみを示した 13 系統の正常芽についても PCR 分析を行った結果、4 系統では GUS 遺伝子およびカセットの脱離を示すバンドが検出された。すなわち、この 4 系統では正常に GUS 遺伝子が導入されているにも関わらず、何らかの理由により活性ある酵素を発現していないと推測される。これらの結果から、49 系統の多芽体から出現した MF タバコと期待される正常芽の内、30 系統 (61.2%) は GUS 遺伝子と Km^r 遺伝子が導入されており、さらにその内の 26 系統は GUS 遺伝子と Km^r 遺伝子が共に発現している MF タバコであることがわかった。

4. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコに導入された有用遺伝子のコピー数

MF タバコ 36 系統の染色体 DNA を *Hind*III で切断し、DIG ラベルしたプローブ KM を用いサザンハイブリダイゼーションを行い、モデル有用遺伝子 Km^r 遺伝子のコピー数を決定した。その結果、10 系統は 1 コピー、2 系統は 2 コピー、残りの 24 系統は 3 コピー以上の多コピーであることが判明した。

第4節 考察

第 1 章で示したように、*ipt* 遺伝子の除去因子として転移因子 *Ac* を用いた場合には、タバコおよびアスペン共に約 5% の多芽体からしか MF 植物が出現しなかった。そこで本章では、酵母由来の R/RS 部位特異的組換え系を用いた実用的な高頻度 *ipt* 型 MAT ベクターを作成し、モデル植物タバコを材料に解析を行った。その結果、61.2% のタバコ多芽体から MF 植

物が出現したことから、*R/RS* 系が *ipt* 型 *MAT* ベクターシステムに最適な除去因子であることが示唆された。

本章で用いた *ipt* 型 *MAT* ベクター pNPI132 では、*R/RS* 系は組換え酵素遺伝子 *R* が *CaMV35S* プロモーターにより発現される。そのため、*R* は植物細胞導入直後から多芽体形成まで定常的に高発現していると考えられる。従って、多芽体形成以前のあらゆる段階で *ipt* 遺伝子が除去されてしまい、不定芽分化と多芽体形成にいたらず選抜できなかった MF 細胞が多く存在したと推測される。しかしながら、*ipt* 遺伝子が多芽体形成以前に早期除去された場合でも、不定芽分化が生じ多芽体を経由せず MF 植物が作成された系統もあった。また、本章で得られた MF タバコの約 70% は、T-DNA が 3 コピー以上導入されていた。これは、*ipt* 遺伝子が早期分化時期に除去されてしまうが、*ipt* 遺伝子が多く導入された系統では全ての *ipt* 遺伝子が完全に除去されるまでの期間が少し長くなった結果、不定芽分化と多芽体形成が行われたためであると推測される。有用遺伝子の多コピー化は、遺伝子不活性化を引き起こすことが知られている (41, 48)。実際、本章の実験結果においても、5 コピー以上導入された 4 系統において *GUS* 遺伝子の不活性化が観察された。また、酵母を用いた研究から (45)、*RS* 配列の多コピー化が様々な染色体変異を引き起こす可能性がある。このような *R/RS* 系による *ipt* 遺伝の早期除去を改良するためには、二つの方法が考えられる。一つは、本章で *R* の発現に用いた *CaMV35S* プロモーターに代わり、誘導型プロモーターを利用する方法である。様々な誘導型プロモーターが単離・開発されており (49-52)、*ipt* 型 *MAT* ベクターに適した誘導型プロモーターを検討する必要がある。第二の方法は、除去される *RS* 配列間に *Km^r* 遺伝子などの選抜マーカー遺伝子を挿入し、不定芽分化までカナマイシン選抜等を行う方法である (13)。さらに、*CaMV35S* プロモーターは、アグロバクテリウム内でも発現することが報告されている (53)。そのため、本章で用いた *ipt* 型 *MAT* ベクターの場合には、既にアグロバクテリウム内で *RS* 配列間の脱離が生じていたと考えられる。そこで、アグロバクテリウム内における *R/RS* 系の不活性化のため、*R* 遺伝子にイントロンを挿入した *ipt* 型 *MAT* ベクターシステムも開発している (13)。

R/RS 系は、本章で用いたタバコ以外に、アスペン (54)、イネ (55)、シロイヌナズナ (47) において効率的に機能することがわかっており、*R/RS* 系を用いた *ipt* 型 *MAT* ベクターシステムが様々な植物種において広く応用できると考えられる。

第5節 要約

ipt 遺伝子と、それを除去するための部位特異的組換え系 *R/RS* を組み合わせたカセットをもつ *MAT* ベクター pNPI132 を構築し、タバコを材料として MF 植物の作成を検討した。その結果、分化した不定芽のうち 49.3% が多芽体となり、そのうちの 61.2% の多芽体から *GUS* 遺伝子と *Km^r* 遺伝子が共に導入された MF タバコが出現した。また、第1章で用いた転移因子 *Ac* の結果と異なり、pNPI132 は多芽体を経由せず直接的に正常形態の MF タバコを出

現させた。さらに、得られた 36 系統の MF タバコに導入された Km^r 遺伝子のコピー数を解析した結果、33.3 %は 1 コピーまたは 2 コピーの低コピーであるが、残りの 67.7 %は 3 コピー以上の多コピーであった。

これらの結果から、CaMV35S プロモーターにより制御された *R/RS* 系は、高頻度で MF 植物を作出できることが確認できた。しかしながら、その高効率で、有用遺伝子の多コピー化を引き起こしやすいという欠点が見出された。

第3章 誘導型プロモーターにより制御された *R/RS* 系を用いた *ipt* 型 MAT ベクターによる選抜マーカー・フリー形質転換タバコの作成

第1節 緒言

第2章において、*R/RS* 系を用いた *ipt* 型 MAT ベクターシステムにより高効率で MF 植物を作成できることを報告した。しかしながら、得られた MF 植物の 70% において 3 コピー以上の有用遺伝子が導入されていた。これは、組換え酵素が植物細胞に導入直後から CaMV35S プロモーターにより強力に発現したため、1 コピーだけ導入された細胞からは *ipt* 遺伝子が早期に削除されてしまい、不定芽分化そして多芽体形成まで至らなかったためと推測される。有用遺伝子の多コピー化は、有用遺伝子の不活性化を引き起こすことが知られている (41, 48)。また、有用遺伝子の多コピー化と同時に *R/RS* 系の脱離反応により残留する RS 配列数が増せば、*ipt* 型 MAT ベクターシステムによる遺伝子多重導入の際に有用遺伝子の脱離やその他の予期せぬ組換え反応を引き起こす可能性が増加する。

そこで、本章では、不定芽分化と多芽体形成過程までは *ipt* 遺伝子の除去反応を抑制するため、*R* 遺伝子をトウモロコシ GST-II-27 プロモーターの制御下において GST-MAT ベクターを構築し、タバコを材料にその有用性を検討した (12)。トウモロコシ GST-II-27 プロモーターは、除草剤解毒剤 "Safener" により発現誘導され (56, 57)、タバコなどの異種植物においても同様に発現誘導される (58)。

第2節 実験材料および方法

1. プラスミド pMAT8:35SGUS、pRZIPT35SGUS、pRZKMIPTGSTGUS の構築 (Fig.15)

バイナリーベクタープラスミド pBI121 (CLONTECH 社) を制限酵素 *Sph*I で切断し、*Km^r* 遺伝子と RB 配列をした後、*Eco*RI 部位を *Sse*8387I 部位に改変した。このプラスミドを、制限酵素 *Sse*8387I で切断し、LB 配列を持つ pBshp3 を作成した。一方、pBI121 の *Tfi*I 断片を切り出し、これを pUC18 から *Sse*8387I 部位と *Sph*I 部位を削除した誘導体に ligation して pRBpUC を作成した。pRBpUC を制限酵素 *Hae*II で切断し、RB 配列および *lacZ'* マルチクロニング部位を含む断片を切り出し平滑末端化後、pBshp3 の *Sph*I 部位を平滑末端化後 ligation して pRZ11 を作成した。すなわち、pRZ11 は、RB 配列と LB 配列に挟まれた T-DNA 領域に *lacZ'* マルチクロニング部位を含むバイナリーベクタープラスミドである。

pIPT2 から *ipt* 遺伝子自身のプロモーターに連結された *ipt* 遺伝子を切り出すため制限酵素 *Hind*III-*Eco*RI で切断し、pNPI128 の *Hind*III-*Eco*RI 部位に ligation して pNPI128IPT2 を作成した。一方、トウモロコシ GST-II-27 プロモーターを pGIE7 から制限酵素 *Nde*I で切

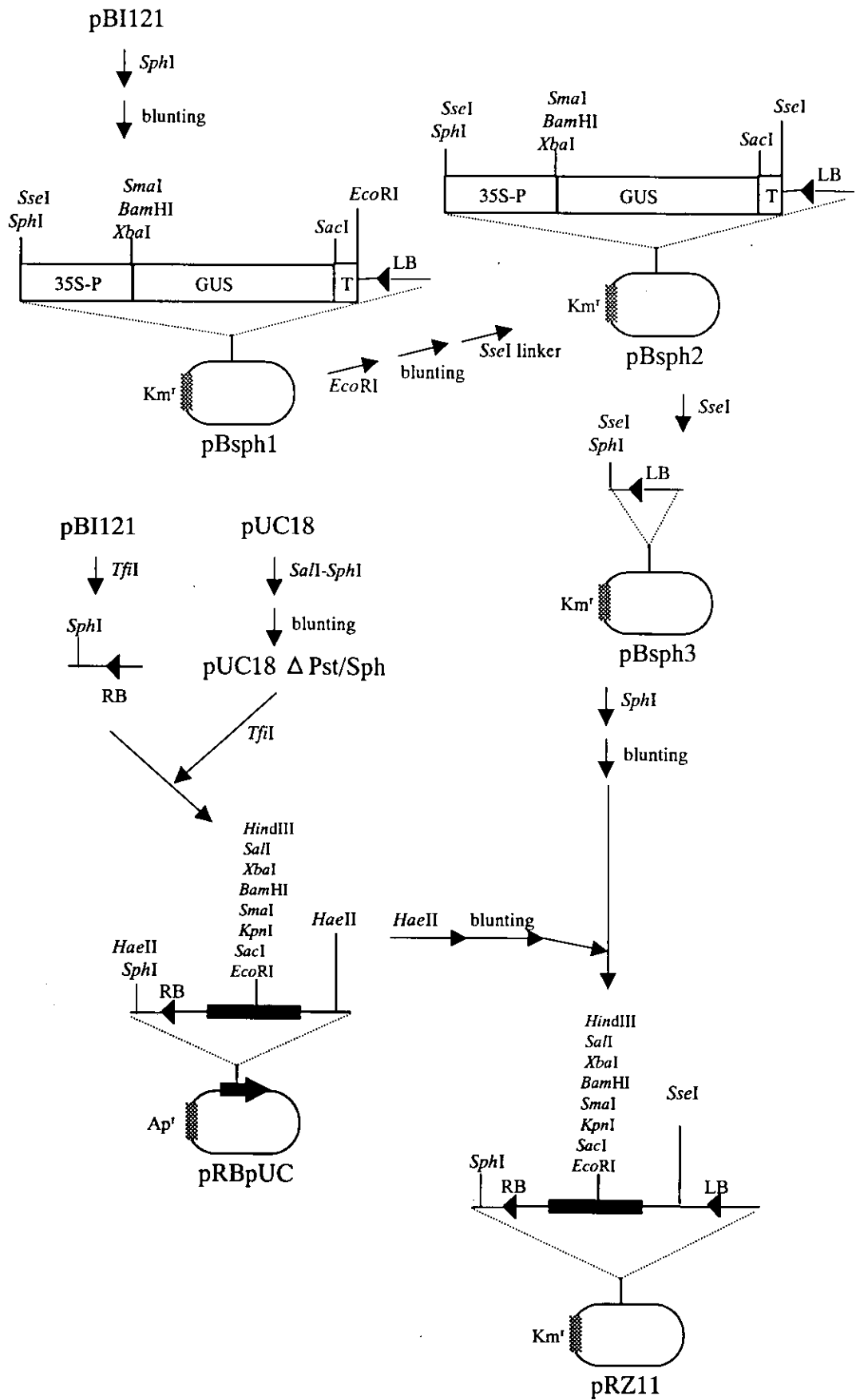


Fig.15A Construction of pMAT8:35SGUS

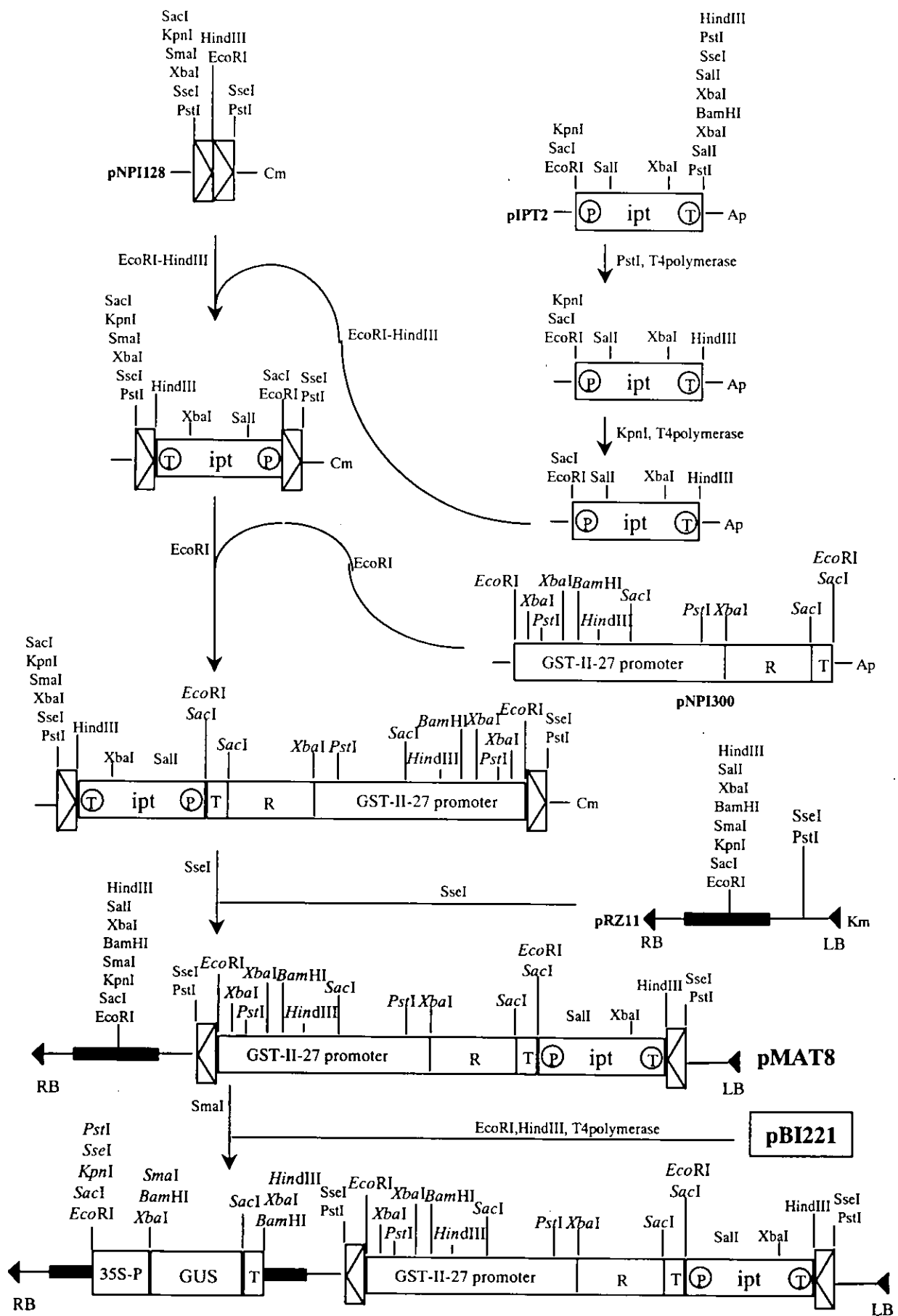


Fig.15A Continued

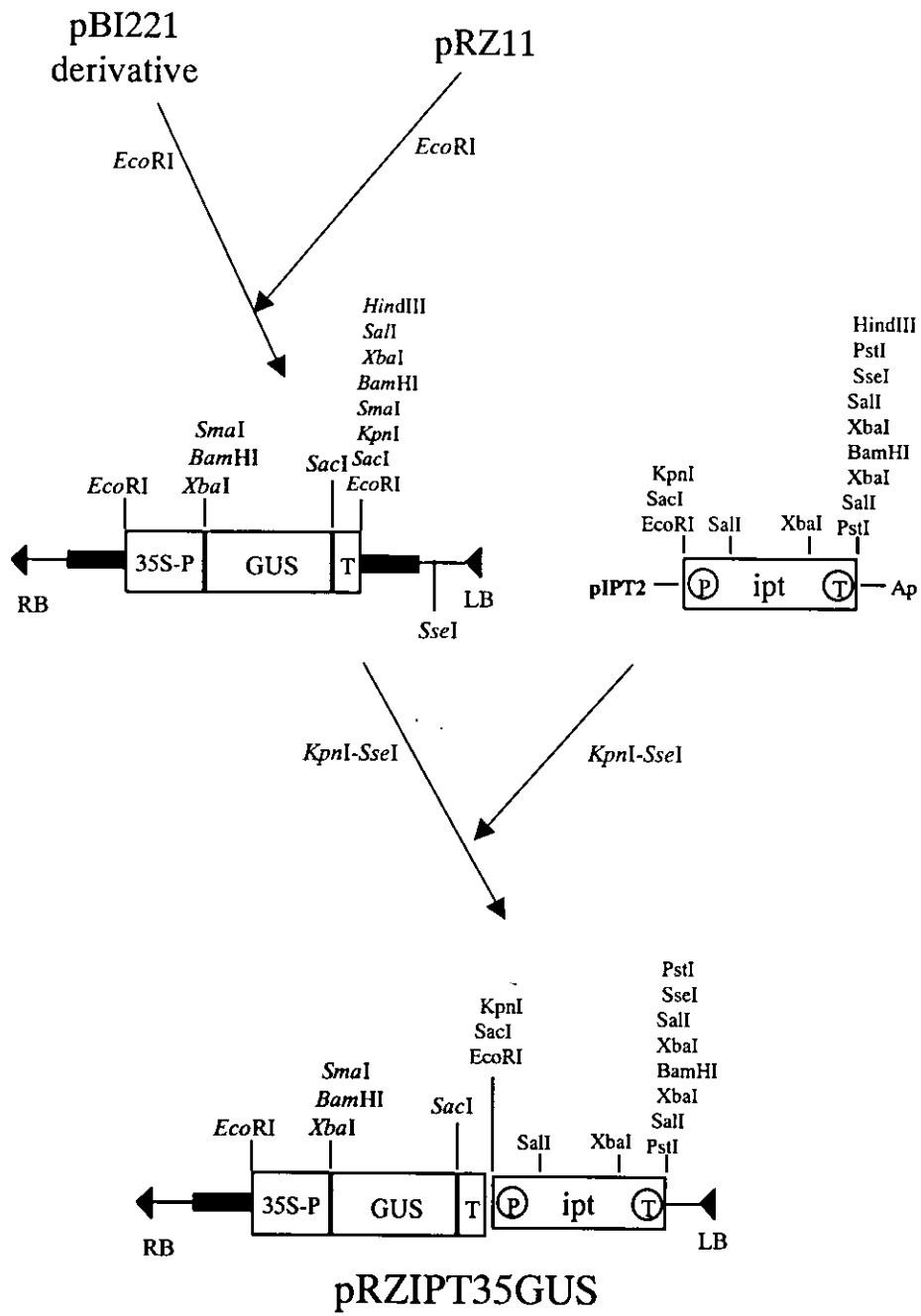


Fig.15B Construction of pRZIPT35GUS

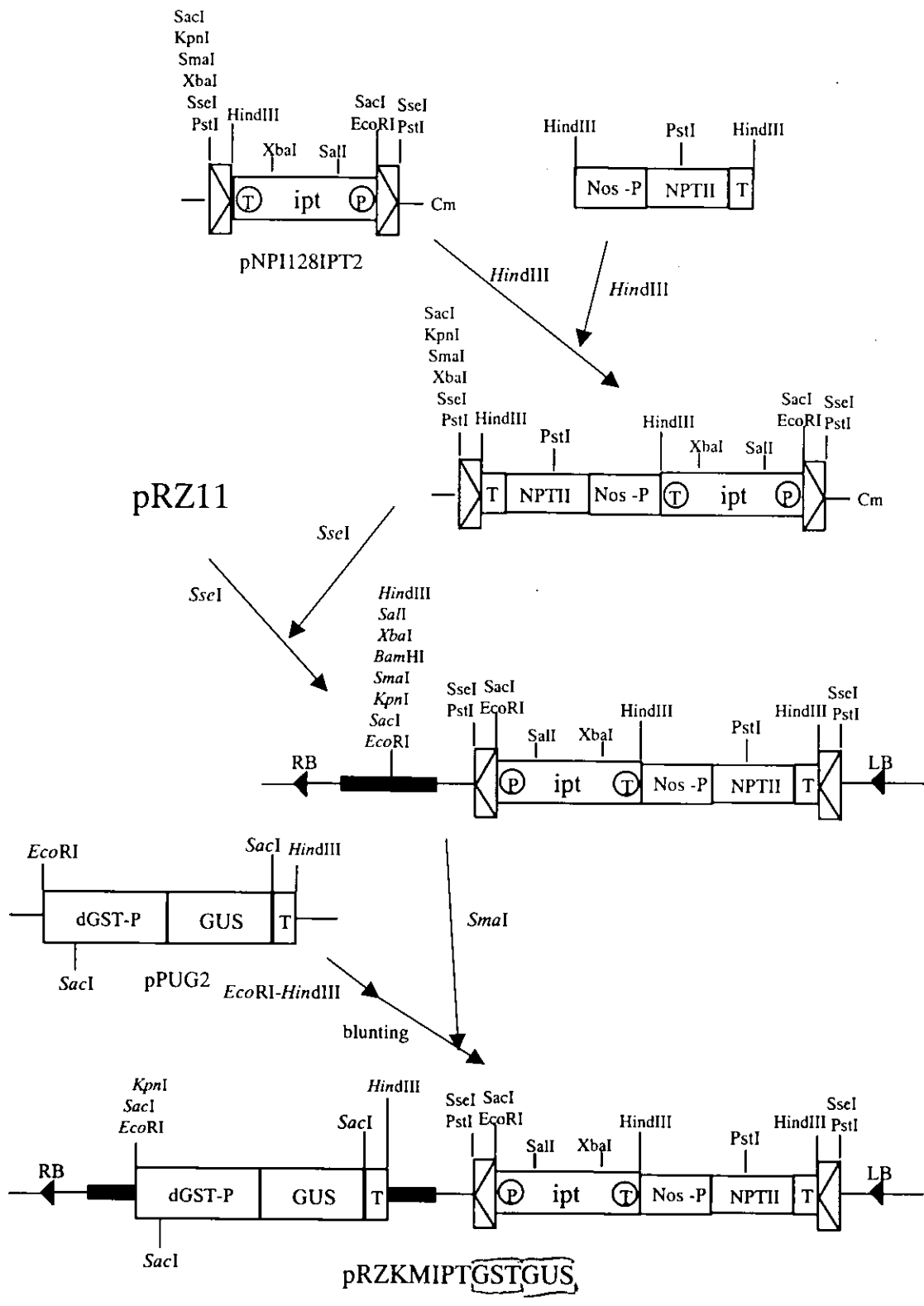


Fig.15C Construction of pRZKIPTGSTGUS

り出し平滑末端化後、*R* 遺伝子に連結して pNPI300 を作成した。pNPI300 を制限酵素 *EcoRI* で切断し、GST-II-27 プロモーターに連結された *R* 遺伝子を切り出し、pNPI128IPT2 の *EcoRI* 部位に ligation して pNPI128IPT2GSTR を作成した。本章で研究に用いた MAT ベクター pMAT8 は、pNPI128IPT2GSTR を制限酵素 *Sse8387I* で切断し *ipt* 遺伝子自身のプロモーターに連結された *ipt* 遺伝子と GST-II-27 プロモーターに連結された *R* 遺伝子含むカセットを切り出し、pRZ11 の *Sse8387I* 部位に ligation して作成した。さらに、pBI221 (CLONTECH 社) を制限酵素 *HindIII-EcoRI* で切断して CaMV35S プロモーターに連結された GUS 遺伝子を切り出し平滑末端化後、pMAT8 の lacZ' マルチクローニング部位の *SmaI* 部位に ligation して pMAT8:35SGUS を作成した (Fig. 15A)。

pMAT8:35SGUS の多芽体形成効率に対するポジティブコントロールとして *R* 遺伝子を含まない pRZIPT35GUS を作成した。pBI221 (CLONTECH 社) の *HindIII* 部位を *EcoRI* に改変した pBI221 誘導体を、制限酵素 *EcoRI* で切断して CaMV35S プロモーターに連結された GUS 遺伝子を切り出し、pRZ11 の *EcoRI* 部位に ligation して pRZ35GUS を作成した。次に、pIPT2 を制限酵素 *KpnI-Sse8387I* で切断し *ipt* 遺伝子自身のプロモーターに連結された *ipt* 遺伝子を切り出し、pRZ35GUS の *KpnI-Sse8387I* 部位に ligation して pRZIPT35GUS を作成した (Fig. 15B)。

タバコ多芽体における Safener による GST-II-27 プロモーターの発現誘導条件を決定するため、pRZKMIPTGSTGUS を作成した。Km^r 遺伝子を制限酵素 *HindIII* で切り出し、これを pNPI128IPT2 の *HindIII* 部位に ligation した。次に、Km^r 遺伝子と *ipt* 遺伝子自身のプロモーターに連結された *ipt* 遺伝子を含むカセットを制限酵素 *Sse8387I* で切り出し、pRZ11 の *Sse8387I* 部位に ligation して pRZKMIPT を作成した。さらに、pPUG2 を制限酵素 *EcoRI-HindIII* で切断し、GST-II-27 プロモーターに連結された GUS 遺伝子を切り出し平滑末端化後、pRZKMIPT の lacZ' マルチクローニング部位の *SmaI* 部位に ligation して pRZKMIPTGSTGUS を作成した (Fig. 15C)。

2. プラスミドの調製及び大腸菌の形質転換

大腸菌、及びアグロバクテリウム・ツメファシエンスからのプラスミドの少量調製は、プラスミド自動分離装置 PI-500 (KURABO 社) により行った。また、プラスミドの大量調製は、Plasmid Midi Kit (QIAGEN 社) を用いた。

プラスミドによる大腸菌の形質転換は、Competent High JM109 または DH5 α キット (TOYOBO 社) により行った。

3. アグロバクテリウムの形質転換

アグロバクテリウム、ツメファシエンス LBA4404 株 (36) を、10ml の YEB 液体培地 (ピーフ

エキス 5g/l、酵母エキス 1g/l、ペプトン 1g/l、ショ糖 5 g/l、2mM MgSO₄、22°Cでの pH7.2 (以下、特に示さない場合、22°Cでの pH とする。)に接種し、OD₆₃₀ が 0.4 から 0.6 の範囲に至るまで、28°Cで培養した。培養液を、6900×g、4°C、10 分間遠心して集菌した後、菌体を 20ml の 10mM HEPES (pH8.0) に懸濁して、再度 6900×g、4°C、10 分間の遠心で集菌し、次いでこの菌体を 200 μl の YEB 液体培地に懸濁して、これをプラスミド導入用菌液とした。0.5ml チューブ内で、プラスミド導入用菌液 50 μl と 3 μl の GST-MAT ベクタープラスミド pMAT8:35SGUS またはコントロールプラスミド pZKIPT35SGUS または GST-II-27 プロモーター解析用プラスミド pZKMIPTGSTGUS を混合し、これをエレクトロポレーション法 (ジーンパルサーII システム [BIORAD 社]) を用いプラスミドを導入し (37)、次いで 200 μl の YEB 液体培地を加えて 25°C で 1 時間振とうして培養した。この菌体を、50mg/l カナマイシン添加 YEB 寒天培地 (寒天 1.5w/v%, 他の組成は上記に同じ。) に播種して 28°C で 2 日間培養し菌コロニーを得た。さらに、この菌コロニーを YEB 液体培地に移植して更に培養した後、本章 2 節-2 と同様にプラスミドを抽出し、アグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404 株にプラスミドが導入されていることを確認した。

4. タバコの形質転換及び培養条件

温室内で生育させたタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. SR1) の成葉を、1v/v% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 5 分間浸漬して殺菌し、滅菌水で 3 回洗浄した後、中脈を取り除いて約 8 mm 角の葉片となるように調製した。このタバコ葉片を、pZKIPT35SGUS または pMAT8:35SGUS を含むアグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404 の菌液 (OD=0.25、YEB 液体培地で一夜培養後、滅菌水で希釈して菌体濃度を調整。) に約 1 分間浸して、滅菌した濾紙の上に置いて余分な菌液を除いた。これをアセトシリゴン 50 mg/l を添加した植物ホルモンを含まない (ホルモンフリー) MS 寒天培地に、葉の裏が上になるように置床して、暗所で 3 日間、25°C で培養した。その後、チカルシリン 500 mg/l のみを含むホルモンフリー MS 寒天培地に移植した。約 1 ヶ月後、分化した芽を葉片から分離し、再び、チカルシリン 500 mg/l を含む MS 寒天培地に移植した。さらに 1 ヶ月後までに多芽体が形成された。多芽体の一部 (できる限り一芽) を切り取り、MF 植物が出現するまで、30 mg/l Safener (R29148) 含有ホルモンフリー MS 寒天培地 1 ヶ月毎に移植し続けた。

また、pZKMIPTGSTGUS を含むアグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404 を前記同様に感染させ、チカルシリン 500 mg/l とカナマイシン 100 mg/l を含むホルモンフリー MS 寒天培地に移植した。約 1 ヶ月後、分化した芽を葉片から分離し、再び、同培地に移植した結果、1 ヶ月後までに多芽体が形成された。多芽体の一部を切り取り、GST-II-27 プロモーター発現解析に用いた。

5. タバコからの染色体 DNA 抽出と DNA 分析

DNA 抽出は改良 CTAB 法により行い (38)、PCR 分析およびサザンハイブリダイゼーションに用いた。

ipt 遺伝子を増幅させるプライマーとして IPT6 (5'-GGAGTATCTCATCCATGCACG-3') および Exc (5'-CGATTAAGTGGTAACGCC-3') を用いた。*ipt* 遺伝子及び R 遺伝子が脱離した時のみ増幅されるプライマーとして Exb (5'-AGCCTGAATGGCGAATGCCT-3') および Exc (5'-CGATTAAGTGGTAACGCC-3') を用いた。GUS 遺伝子を増幅させるプライマーとして GUS1 (5'-GTGGAATTGATCAGCGTTGG-3') および GUS2 (5'-GCACCGAAGTTCATGCCAGT-3') を用いた。PCR 反応は、変性 94°C 1 分、アニーリング 55°C 1 分、伸長 72°C 2 分 30 サイクルで行った。

サザンハイブリダイゼーションに用いたプローブは、DIG PCR DNA labeling kit (Boehringer Mannheim 社) によりラベリングした。10 μ g のゲノミック DNA を、制限酵素 *Hind*III または *Eco*RI で切断し、0.8% アガロースゲル電気泳動を行った。このアガロースゲルをアルカリ・酸処理した後、ナイロンメンブランに転写した。ハイブリダイゼーション反応は DIG Easy Hyb キット (Boehringer Mannheim 社) により、wash と化学発光反応は DIG Wash and Block Buffer set (Boehringer Mannheim 社) により行った。また、化学発光シグナルは、フジフィルム LAS1000 により検出した。

6. GUS 組織化学染色

GUS 発現は、GUS 組織化学染色法に従って行った (39)。

第3節 結果

1. タバコ多芽体における GST-II-27 プロモーターの発現様式解析

トウモロコシ由来の GST-II-27 プロモーターが、タバコなどの異種植物でも同様に機能することは報告されていた (58)。しかしながら、*ipt* 遺伝子により形成された多芽体状態でのような発現様式を示すか不明であった。そこで、pZKMIPTGSTGUS を導入し (Fig. 16A)、 Km^r の多芽体を作成した。 Km^r 多芽体の一部を切り取り、Safener 0, 10, 30 mg/l を含むホルモンフリー MS 培地に移植し、2 週間後に GUS 組織化学染色を行った (Fig. 17)。その結果、Safener 30 mg/l を含む培地で増殖した多芽体で広範囲の GUS 染色が観察された (Fig. 17c)。しかし、Safener 非含有培地においても弱い GUS 染色が観察された (Fig. 17a)。また、Safener 50 mg/l 以上の添加は、タバコに毒性を示し、増殖抑制が顕著となることが観察された。これらの結果より、GST-MAT ベクターによる MF 植物の出現誘導には、Safener 30 mg/l を含む培地が最適であると判定した。

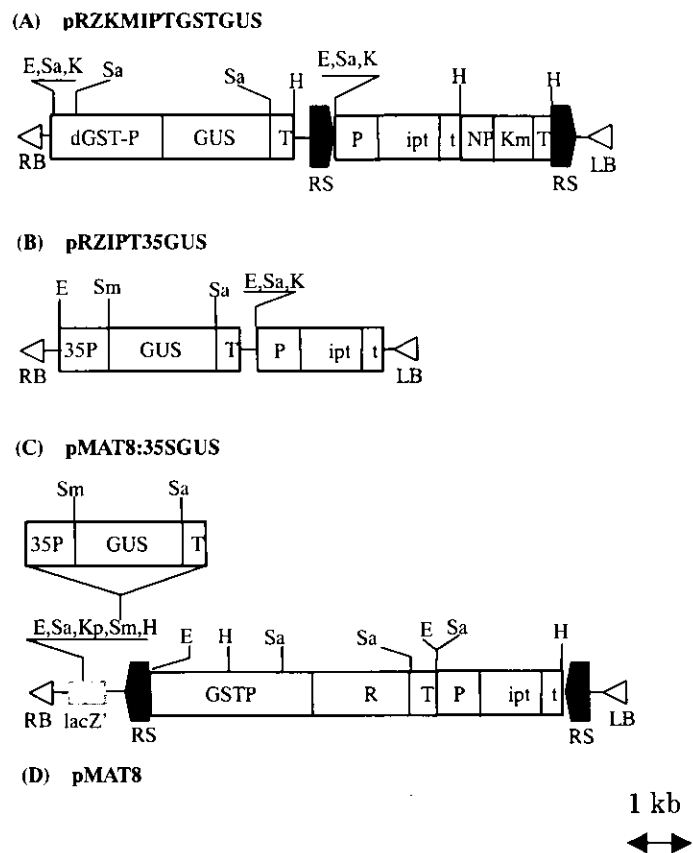


Fig.16 Schematic representation of the T-DNAs used for transformation.

RB, right border; LB, left border; dGST-P, deleted promoter of glutathione-S-transferase gene; T, polyadenylation sequence of nopaline synthase gene; P, promoter of *ipt* gene; t, polyadenylation sequence of *ipt* gene; NP, promoter of nopaline synthase gene; 35P, CaMV35S promoter; GSTP, promoter of glutathione-S-transferase gene; GUS, glucuronidase gene; *ipt*, isopentenyltransferase gene; Km, neomycin phosphotransferase gene; *R*, recombinase gene of yeast site-specific recombination *R*/*RS* system; RS, recombination sequence of *R*/*RS*. Restriction sites are indicated for: E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; Sa, *Sac*I; Sm, *Sma*I.

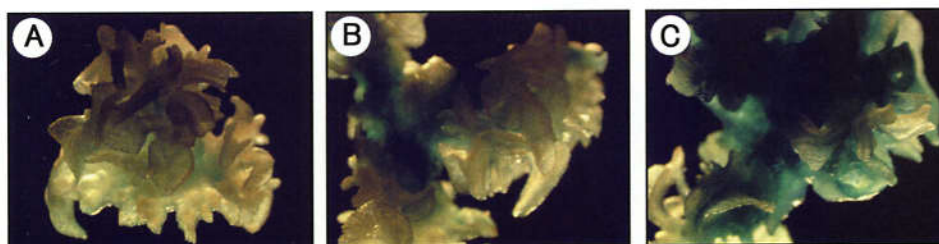


Fig.17 Histochemical analysis of Safener induction. The induction and histochemical analysis of the effect of Safener in *ipt*-shooty carrying the dGST-GUS fusion were conducted as described in Materials and Methods. A. non-induction. B. Safener induction (10 mg/l). C. Safener induction (30 mg/l).

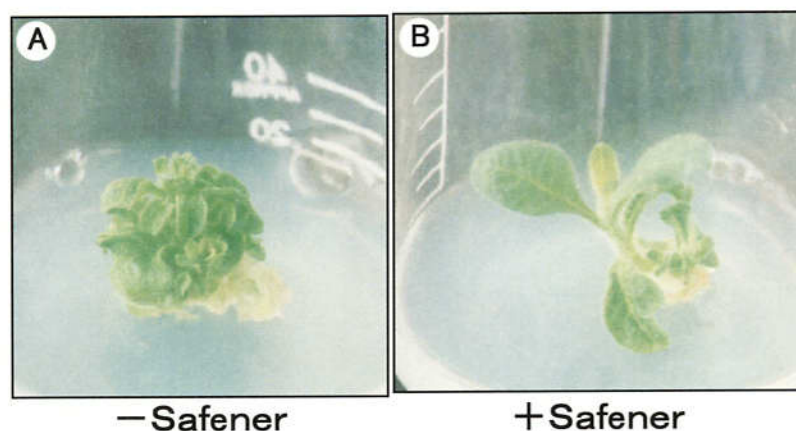


Fig.18 Differentiation of an *ipt*-shooty and appearance of putative marker-free transgenic shoots.

A. *ipt*-shooty, approximately 1 month after transplantation of adventitious buds. B. Normal phenotypic shoots (putative marker-free transgenic shoots) appeared from an *ipt*-shooty on Safener-induced medium. The number of normal phenotypic shoots and timing of their appearance was different among *ipt*-shooty lines. These normal phenotypic shoots were cut and transplanted to fresh medium for rooting.

2. GST-MATベクター pMAT8、及びコントロールベクターpRZIPT35SGUS の構造

Fig. 16 に pMAT8、pMAT8:35SGUS、及び pRZIPT35SGUS の T-DNA 領域の構造を示す。

GST-MATベクター pMAT8 では、*ipt* 遺伝子自身のプロモーターにより発現する *ipt* 遺伝子および GST-II-27 プロモーターにより発現する *R* 遺伝子が2つの順方向 RS 間に挿入されている。従って、GST-II-27 プロモーターにより発現した組換え酵素が2つの RS に結合し、脱離反応を引き起こす。また、pMAT8 は、第1、2章で述べたMATベクターと異なり、有用遺伝子を挿入するための *lacZ'* クローニング部位が用意されている。pMAT8:35SGUS では、この *lacZ'* 部位に有用遺伝子モデルである GUS 遺伝子を挿入した。GUS 遺伝子は、順方向 RS カセットの外側に配置されているため、染色体DNA上に残留することができる。すなわち、pMAT8:35SGUS では、Safener に発現誘導される GST-II-27 プロモーターにより制御された *R*/RS 系による順方向 RS 間の脱離反応を利用し、*ipt* 遺伝子は除去され有用遺伝子のみが存在する MF 植物を作出できる。

一方、コントロールベクターpRZIPT35SGUS は、*R* 遺伝子を保持しておらず、*ipt* 遺伝子および GUS 遺伝子は安定的に染色体DNAに存在する。

3. 多芽体形成および正常芽の出現

GST-MATベクターpMAT8:35SGUS 及び非MATベクターpRZIPT35SGUS を保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンズ LBA4404 株をタバコ葉片に感染させ、ホルモンフリーMS培地上で培養した。感染後約1ヶ月までに、それぞれ42系統及び13系統の不定芽を分離した。これら不定芽をホルモンフリーMS培地に移植し、さらに約1ヶ月培養を継続した(感染から約2ヶ月)。その結果、pMAT8:35SGUS により形成された42系統の不定芽の内37系統(88%)が多芽体となり、pRZIPT35SGUS により形成された13系統の不定芽の内12系統(92%)が多芽体を形成した。残りの不定芽は多芽体を經由せず正常芽に分化した。また、pMAT8:35SGUS により形成された内37系統の多芽体の内21系統(57%)で、pRZIPT35SGUS により形成された12系統の多芽体の内5系統(42%)でGUS染色が観察できた。これらの結果から、GST-MATベクターは、GST-II-27 プロモーターにより *R*/RS 系の脱離が抑制され、有用遺伝子が導入された多芽体を効率的に形成することが判明した。

さらに、MFタバコを生産するため、pMAT8:35SGUS により形成されたGUS染色が観察された多芽体の内20系統について、Safener 30 mg/l を含むホルモンフリーMS培地へ移植した。その結果、Safener 誘導3ヶ月以内(感染5ヶ月)に7系統のMFタバコと推測される正常芽が出現した(Fig. 18B)。また、pRZIPT35SGUS により作成された多芽体については、Safener 培地での培養を行わなかった。

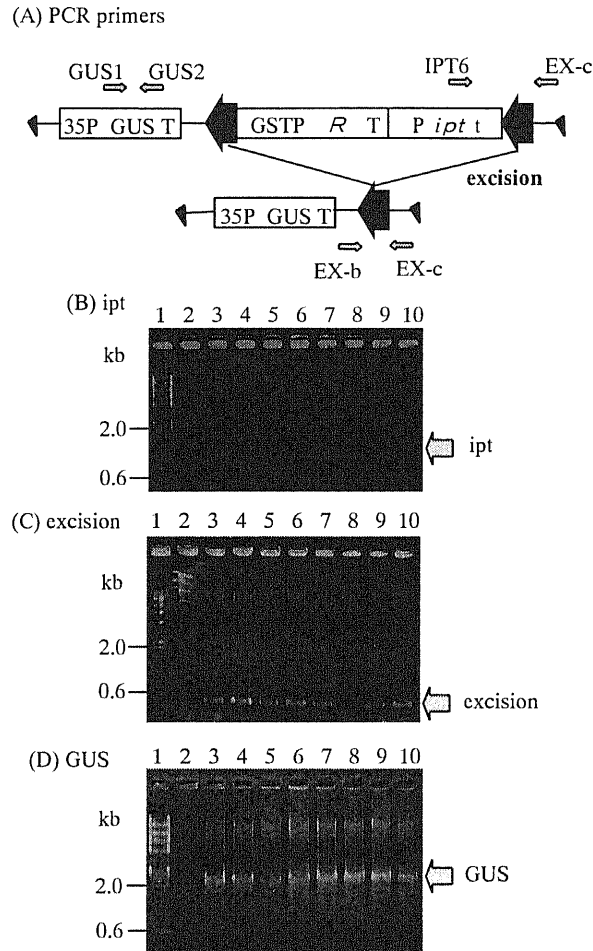


Fig.19 PCR analysis of putative marker-free transgenic tobacco plants. A. The T-DNA region of plasmid pMAT8:35SGUS and PCR primers. B. PCR amplification of the *ipt* fragment (primer IPT6-EXc). C. PCR amplification of the excision (primer EXb-EXc). D. PCR amplification of the GUS fragment (primer GUS1-GUS2). Lane 4-5: amplified from normal phenotypic shoots directly appeared from adventitious buds; Lane 6-10: amplified from normal phenotypic shoots appeared from *ipt*-shooty explants; Lane 3: amplified from a *ipt*-shooty; Lane 2: amplified from untransformed tobacco control; Lane 1: the λ -*Hind*III size marker.

4. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコの解析

Safener 誘導により出現した 7 系統の MF タバコと推測される正常芽と、不定芽から直接的に正常芽に分化した 5 系統の正常芽について GUS 組織化学染色を行った。その結果、Safener 誘導後に出現した 7 系統の内の 5 系統と、直接的に正常芽に分化した 5 系統の正常芽の内 2 系統について、GUS 染色が観察された。次に、PCR 分析により、モデル有用遺伝子 GUS の有無を確認した (Fig. 19D)。その結果、GUS 染色が観察された計 7 系統では全て予測された GUS 遺伝子の断片が確認されたが、GUS 染色が観察できなかった系統では GUS 遺伝子の断片は増幅されなかった。従って、これら GUS 染色が観察できなかった正常芽は、非組換え細胞から分化したエスケープであると考えられる。

さらに、GUS 染色が観察された 7 系統の正常芽について、PCR 分析により *ipt* 遺伝子の残留有無を分析した (Fig. 19B)。その結果、これら全ての系統では *ipt* 遺伝子が増幅されず除去されていることが確認できた。また、これら系統からは、*ipt* 遺伝子を含む R/RS 系の脱離が起きたときのみを検出されるバンドも確認された (Fig. 19C)。

これらの結果より、Safener 誘導を行った 20 系統の多芽体から出現した 5 系統 (25%) の正常芽と、不定芽から直接的に分化した 2 系統の正常芽は、有用遺伝子のみが導入された MF タバコであることが示された。

5. 選抜マーカー・フリー形質転換タバコに導入された有用遺伝子のコピー数

MF タバコ 7 系統の染色体 DNA を *Hind*III または *Eco*RI で切断し、DIG ラベルしたプローブ GUS を用いサザンハイブリダイゼーションを行い、モデル有用遺伝子 GUS 遺伝子のコピー数を決定した (Fig. 20)。その結果、6 系統は 1 コピー、1 系統は 2 コピーの低コピーであることが判明した。この結果から、GST-MAT ベクターは、1 コピーの系統から優先的に MF タバコを出現させる傾向があることが確認された。

第4節 考察

第 2 章において、R/RS 系を用いた *ipt* 型 MAT ベクター pNPI132 により高頻度で MF タバコが作成された。しかしながら、pNPI132 では CaMV35S プロモーターにより R 遺伝子の発現が行われていたため、逆に MF タバコにおける T-DNA の多コピー化が欠点であることが判明した。そこで、本章では、R 遺伝子のプロモーターとして、トウモロコシ由来の GST-II-27 プロモーターを用いた GST-MAT ベクター pMAT8:35SGUS を作成し、タバコを材料として有用性を解析した (12)。

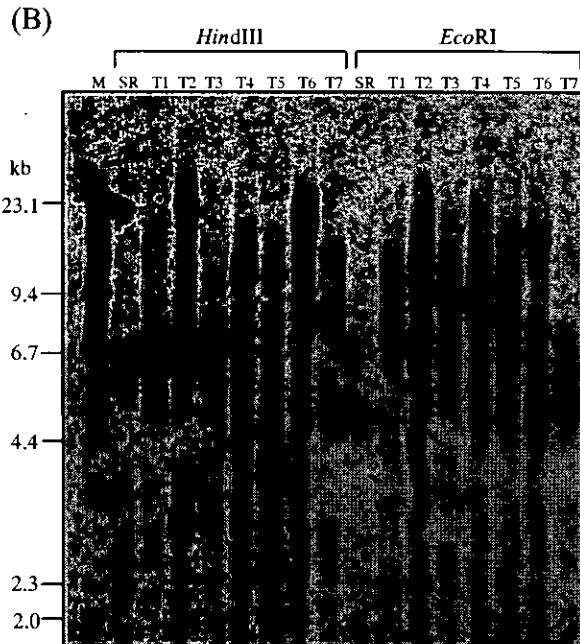
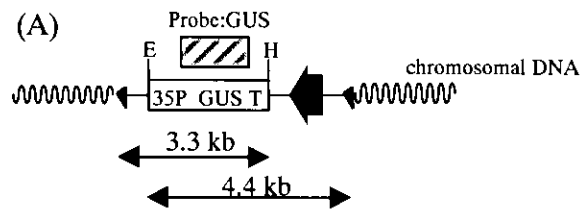


Fig.20 GUS gene copy number.

A. Restriction map of the T-DNA region of plasmid pMAT8:35SGUS and the DIG-labeled GUS probe region. B. Southern blot of genomic DNA from each marker-free transgenic tobacco plants, digested with *HindIII* or *EcoRI* and hybridized with the DIG-labeled GUS probe. Lane T1-T2: marker-free transgenic tobacco plants directly appeared from adventitious buds; Lane T3-T7: marker-free transgenic tobacco plants appeared from *ipt*-shooty explants; Lane SR: untransformed control; Lane M: the λ -*HindIII* size marker.

第2章において考察したように、pNPI132では*ipt*遺伝子の早期脱離が起りやすいため、多芽体形成効率の低下も起こっていたと考えられる。pNPI132を用いた第2章の結果では、アグロバクテリウム感染後の葉片から分化した不定芽の約50%が多芽体を形成した。それに対し、本章で用いたpMAT8:35SGUSは、約90%の不定芽が多芽体を形成した。この効率は、コントロールpRZIPT35SGUSの結果と同等であった。これらの結果から、GST-II-27プロモーターを*R*遺伝子のプロモーターとして用いることにより、*ipt*遺伝子の早期脱離を抑制できることが判明した。また、多芽体に対する“safener”誘導実験の結果、25%の多芽体からMFタバコが得られた。また、多芽体を經由せずMFタバコに分化した系統も得られた。これは、Fig.17の分析からわかるように、GST-II-27プロモーターが非誘導下でも弱く発現するためである (Fig.17a)。これらの結果から、GST-II-27プロモーターは*ipt*遺伝子の早期脱離を抑制すると同時に、その後のMF植物作成にも効率的なプロモーターであることが判明した。

さらに、得られたMFタバコ7系統に導入されたモデル有用遺伝子GUSのコピー数を決定した (Fig.20)。その結果、6系統では1コピーの、残りの1系統では2コピーのGUS遺伝子が導入されていた。この結果から、GST-MATベクターは、単にMF植物を作成できるだけでなく、低コピーの有用遺伝子が導入された系統を自然に選抜できる可能性が示唆された。したがって、GST-MATベクターシステムは遺伝子不活性化の回避やMATベクターシステムによる遺伝子多重導入のために非常に有効なシステムである。

また、本章では誘導型プロモーターの一例としてGST-II-27プロモーターを用いた (56-58)。現在までに多くの植物用誘導型プロモーターが報告されており (49-52)、さらに精巧な*ipt*型MATベクターシステムの開発が可能だと思われる。

本章では、モデル植物タバコについて報告したが、GST-MATベクターはアスペンにおいても有効なシステムであることが判明している (54)。従って、タバコ以外の他の植物種にも利用できると思われる。

第5節 要約

GST-II-27プロモーターは、除草剤解毒剤Safenerにより誘導され (56,57)、タバコなど異種植物でも同様に機能することがわかっている (58)。本章における、GST-II-27プロモーターの発現誘導実験でも、タバコ多芽体をSafener 30mg/lを含む培地に置床すると発現誘導が促進された (Fig.17)。そこで、*R*組換え酵素遺伝子をトウモロコシGST-II-27プロモーターの制御下においたGST-MATベクターを構築した。タバコを材料にその有用性を検討した結果、不定芽分化と多芽体形成までは*ipt*遺伝子の削除は押さえられ、葉片から分化した不定芽の内、88%が多芽体となった。さらに、これら多芽体に対しSafener誘導を行い組換え酵素の発現を促進させた所、25%の多芽体からMF植物を出現させることもできた (Fig.18)。また、GST-II-27プロモーターは、Safener誘導なしでもカルス部分

や傷害により発現するため、不定芽から多芽体を經由せず直接分化した正常芽にも MF 植物が含まれていた。

さらに、GST-MATベクターシステムにより作出した MF 植物 7 系統について有用遺伝子コピー数を決定した結果、6 系統が 1 コピーであった (Fig. 20)。

これらの結果より、GST-MATベクターシステムは有用遺伝子が 1 コピー導入された MF 植物を効率よく作出できることが判明した。

第4章 *ipt*型MATベクターによる遺伝子多重導入

第1節 緒言

第1章から第3章において、*ipt*型MATベクターシステムは、交配を必要としないMF植物作成システムとして有用であることを報告した。MF植物作成システムは、単に形質転換植物の安全性向上に役立つだけでなく、今後の遺伝子組換え技術による植物育種や基礎研究にも大変意義の有る技術である。すなわち、MF植物作成システムにより、同一な選抜マーカー遺伝子を用いた遺伝子導入の繰り返し（有用遺伝子の蓄積）が可能となる。

現在商品化されている形質転換植物の大部分は、一つの有用遺伝子が導入されている。その一方では、ゲノムプロジェクトの進展や、様々な遺伝子タグ技術の発達により有用遺伝子が単離され続けている。また、植物の2次代謝系の改変を目的とした場合、多数の代謝系遺伝子改変がより有効であると考えられる(59)。従って、次世代の形質転換植物は複数の有用形質が導入されることが要求されると推測される。

遺伝子導入の繰り返しは、異なる選抜マーカー遺伝子を用いることによっても実行できる(59)。しかしながら、タバコなどの実験用モデル植物と異なり、植物の多くの実用品種は一般に形質転換が難しく、有効な選抜マーカー遺伝子も限られる事が多い。例えばイネでは、*Km^r*遺伝子は選抜マーカー遺伝子としては有効ではなく、*Hm^r*遺伝子が有効な選抜マーカー遺伝子として常用されている(60)。従って、同一選抜マーカー遺伝子を用いたルーチンシステムにより遺伝子多重導入できることは、大変効率的な実用技術であると言える。しかも、*ipt*型MATベクターシステムは交配が不必要であることから、多重導入に必要な期間が短く、ポテト・イチゴ・リンゴなどの栄養繁殖植物に対しても同様に応用することが可能となった。

そこで、本章では、*ipt*型MATベクターシステムが遺伝子多重導入に利用できるかどうか検討するため、*ipt*型MATベクターで作成したMFタバコに対しGST-MATベクターにより2回目の多重導入を行い有用性を検討した(14)。

第2節 実験材料および方法

1. プラスミド pMAT8:NosGFP の構築 (Fig. 21)

PCR法により増幅したノパリンシンターゼプロモーター配列を制限酵素 *KpnI*-*Bam*HI で切断し、pHSG398(宝酒造)の *KpnI*-*Bam*HI 部位に ligation した。さらに、このプラスミドを制限酵素 *KpnI*-*Sa*II で切断してノパリンシンターゼプロモーター配列を切り出し、pblue-sGFP(S65T)nosKS の *KpnI*-*Sa*II 部位に ligation した(61,62)。次に、このプラスミドを制

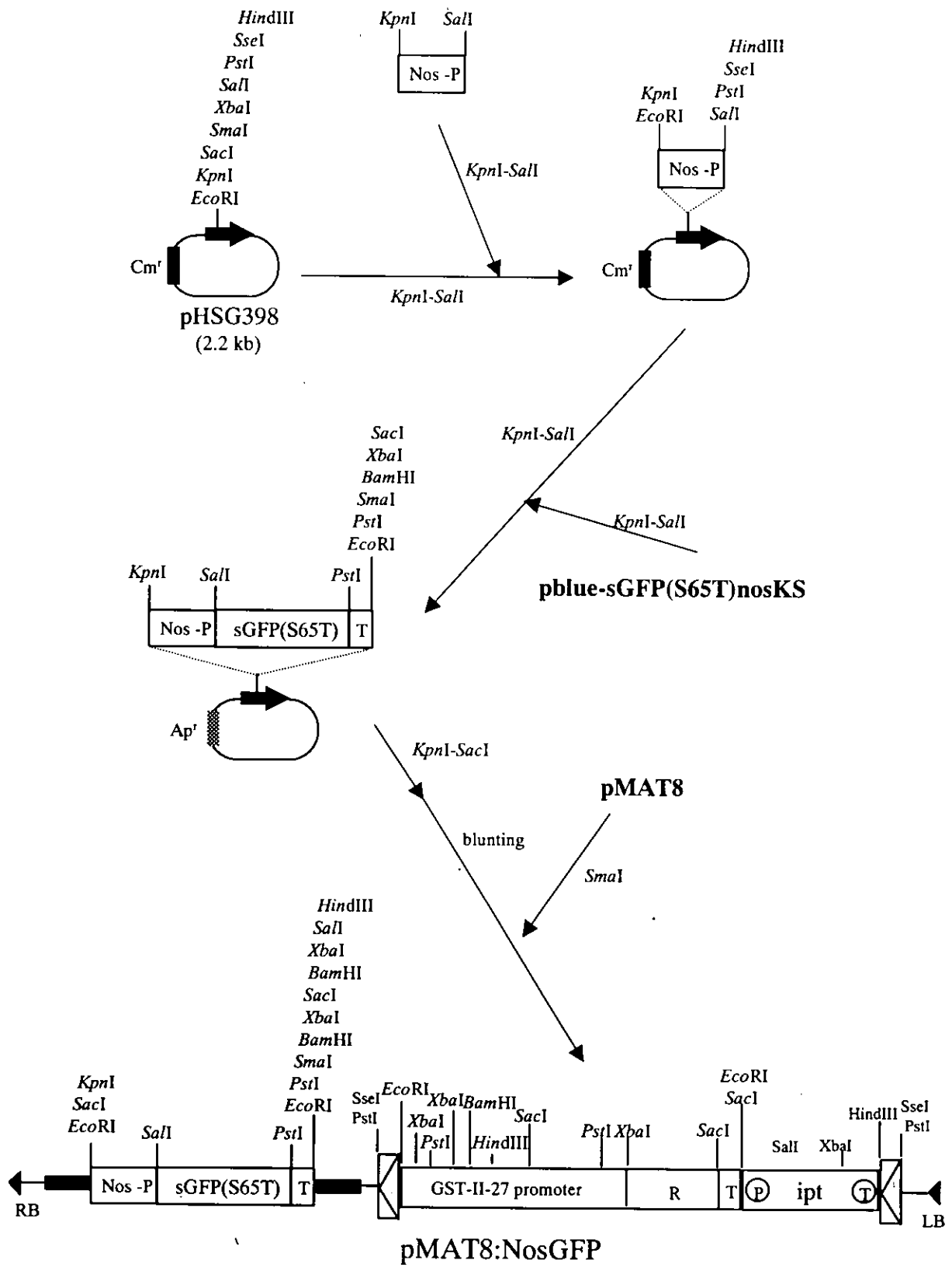


Fig.21 Construction of pMAT8:NosGFP

制限酵素 *KpnI-SacI* で切断してノパリンシンターゼプロモーターに連結された GFP 遺伝子を切り出し平滑末端化後、pMAT8 の *lacZ'* マルチクローニング部位の *SmaI* 部位に ligation して pMAT8:NosGFP を作成した。

2. プラスミドの調製及び大腸菌の形質転換

大腸菌、及びアグロバクテリウム・ツメファシエンスからのプラスミドの少量調製は、プラスミド自動分離装置 PI-500 (KURABO 社) により行った。また、プラスミドの大量調製は、Plasmid Midi Kit (QIAGEN 社) を用いた。

プラスミドによる大腸菌の形質転換は、Competent High JM109 または DH5 α キット (TOYOBO 社) により行った。

3. アグロバクテリウムの形質転換

アグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404 株 (36) を、10ml の YEB 液体培地 (ビーフエキス 5g/l, 酵母エキス 1g/l, ペプトン 1g/l, ショ糖 5 g/l, 2mM MgSO₄, 22°C での pH7.2 (以下、特に示さない場合、22°C での pH とする。)) に接種し、OD₆₃₀ が 0.4 から 0.6 の範囲に至るまで、28°C で培養した。培養液を、6900 × g, 4°C, 10 分間遠心して集菌した後、菌体を 20ml の 10mM HEPES (pH8.0) に懸濁して、再度 6900 × g, 4°C, 10 分間の遠心で集菌し、次いでこの菌体を 200 μ l の YEB 液体培地に懸濁して、これをプラスミド導入用菌液とした。0.5ml チューブ内で、プラスミド導入用菌液 50 μ l と 3 μ l の pMAT8:NosGFP を混合し、これをエレクトロポレーション法 (ジーンパルサー II システム [BIORAD 社]) を用いプラスミドを導入し (37)、次いで 200 μ l の YEB 液体培地を加えて 25°C で 1 時間振とうして培養した。この菌体を、50mg/l カナマイシン添加 YEB 寒天培地 (寒天 1.5w/v%, 他の組成は上記に同じ。) に播種して 28°C で 2 日間培養し菌コロニーを得た。さらに、この菌コロニーを YEB 液体培地に移植して更に培養した後、本章 2 節 - 2 と同様にプラスミドを抽出し、アグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404 株にプラスミドが導入されていることを確認した。

4. タバコの形質転換及び培養条件

温室内で生育させた MF タバコ (第 2 章で作成) の成葉を、1 v/v% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 5 分間浸漬して殺菌し、滅菌水で 3 回洗浄した後、中脈を取り除いて約 8 mm 角の葉片となるように調製した。このタバコ葉片を、pMAT8:NosGFP を含むアグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404 の菌液 (OD=0.25、YEB 液体培地で一夜培養後、滅菌水で希釈して菌体濃度を調整。) に約 1 分間浸して、滅菌した濾紙の上に置いて余分な菌液を除いた。これを、アセトシリゴン 50 mg/l を添加した植物ホルモンを含まない (ホル

モンフリー) MS 寒天培地に、葉の裏が上になるように置床して、暗所で3日間、25℃で培養した。その後、チカルシリン 500 mg/l のみを含むホルモンフリーMS寒天培地に移植した。約1ヶ月後、分化した芽を葉片から分離し、再び、チカルシリン 500 mg/l を含むMS寒天培地に移植した。さらに1ヶ月後までに多芽体が形成された。多芽体の一部(できる限り一芽)を切り取り、MF植物が出現するまで、30 mg/l Safener (R29148)含有ホルモンフリーMS寒天培地1ヶ月毎に移植し続けた。

5. タバコからの染色体DNA抽出とDNA分析

DNA抽出は改良CTAB法により行い(38)、PCR分析およびサザンハイブリダイゼーションに用いた。

ipt 遺伝子を増幅させるプライマーとして IPT7(5'-ATGGTACAAGCCAACCTTGC-3') および IPT8(5'-CCAGCAATGGTGTAATCAGC-3') を用いた。pMAT8:NosGFP の T-DNA 上から *ipt* 遺伝子及び R 遺伝子が脱離した時にのみ増幅されるプライマーとして EXb(5'-AGCCTGAATGGCGAATGCCT-3') および EXc(5'-CGATTAAGTGGTAACGCC-3') を用いた。第2章で作成したMFタバコの脱離部位を増幅させるプライマーとして EX1(5'-TTGTCAAGACCGACCTGTCC-3') および EX2(5'-TGCATCGGCGAACTGATCGT-3') を用いた。GUS 遺伝子を増幅させるプライマーとして GUS1(5'-GTGGAATTGATCAGCGTTGG-3') および GUS2(5'-GCACCGAAGTTCATGCCAGT-3') を用いた。PCR反応は、変性 94℃ 1分、アニーリング 55℃ 1分、伸長 72℃ 2分 30 サイクルで行った。また、GFP 遺伝子を増幅させるプライマーとして GFP5(5'-GTGAGCAAGGGCAGGAGCTGTTTC-3') および GFP3(5'-TACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTG-3') を用いた。PCR反応は、変性 94℃ 1分、アニーリング 54℃ 1分、伸長 72℃ 2分 30 サイクルで行った。

サザンハイブリダイゼーションに用いたプローブは、DIG PCR DNA labeling kit (Boehringer Mannheim 社)によりラベリングした。10 μg のゲノミックDNAを、制限酵素 *Hind*III または *Sac*I で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。このアガロースゲルをアルカリ・酸処理した後、ナイロンメンブランに転写した。ハイブリダイゼーション反応は DIG Easy Hyb キット (Boehringer Mannheim 社)により、wash と化学発光反応は DIG Wash and Block Buffer set (Boehringer Mannheim 社)により行った。また、化学発光シグナルは、フジフィルム LAS1000 により検出した。

第3節 結果

1. GST-MATベクターpMAT8:NosGFPの構造

Fig. 22 に、第2章で構築した pNP1132 及び本章で構築した pMAT8:NosGFP の T-DNA 領域の構造と、PCRプライマーの位置・方向を示す。

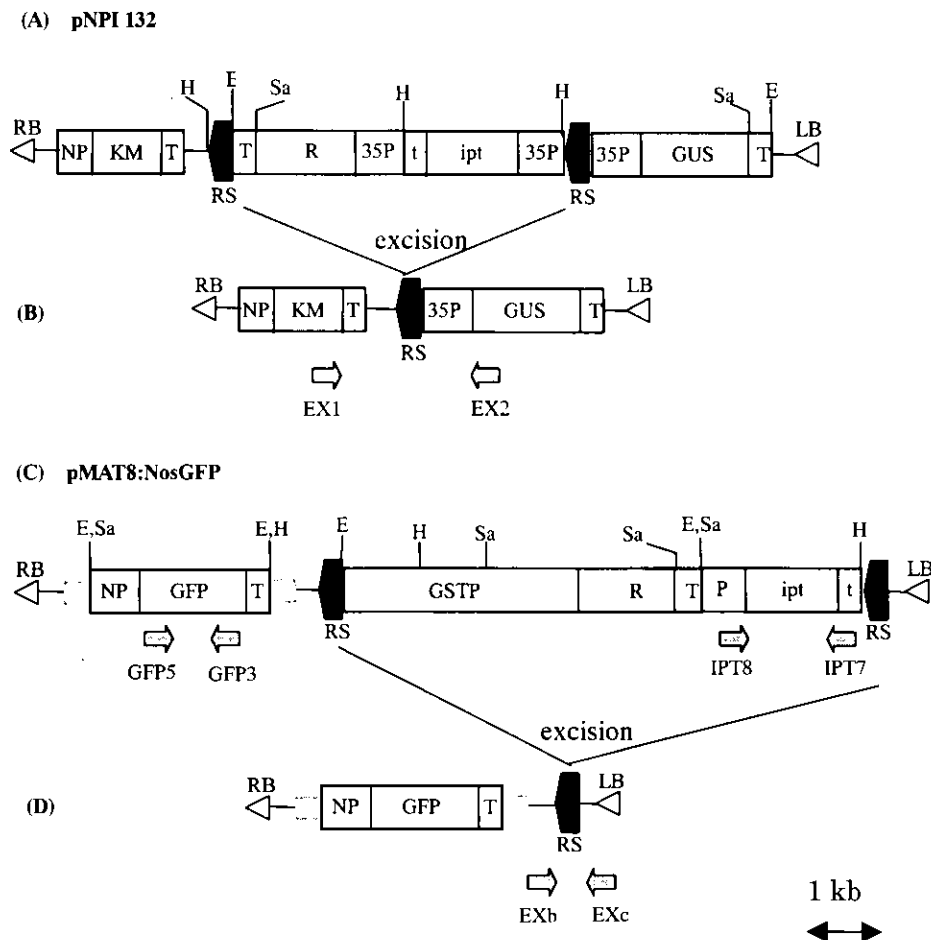


Fig.22 Schematic representation of the T-DNAs used for repetitive transformations and PCR primers. RB, right border; LB, left border; shaded box, *lacZ'* region; T, polyadenylation sequence of nopaline synthase gene; P, promoter of *ipt* gene; t, polyadenylation sequence of *ipt* gene; NP, promoter of nopaline synthase gene; 35P, CaMV35S promoter; GSTP, promoter of glutathione-S-transferase gene; GUS, glucuronidase gene; *ipt*, isopentenyltransferase gene; KM, neomycin phosphotransferase gene; GFP, green-fluorescent protein gene; R, recombinase gene of yeast site-specific recombination *R/RS* system; RS, recombination sequence of *R/RS*. Restriction sites are indicated for: E, *EcoRI*; H, *HindIII*; Sa, *SacI*.

第2章で述べたとおり、pNPI132では有用遺伝子のモデルとしてGUS遺伝子とKm^r遺伝子が用いられた。本章で多重導入用材料として用いられたMFタバコ系統は、1コピーのT-DNA (GUS遺伝子とKm^r遺伝子、及び一つのRS配列)が染色体に組み込まれている。

G S T-M A TベクターpMAT8では、*ipt*遺伝子自身のプロモーターにより発現する *ipt* 遺伝子および GST-II-27 プロモーターにより発現する *R* 遺伝子が2つの順方向RS間に挿入

されている。従って、GST-II-27 プロモーターにより発現した組換え酵素が2つのRSに結合し脱離反応を引き起こす。また、pMAT8は、第1, 2章で述べたMATベクターと異なり、有用遺伝子を挿入するためのlacZ'クローニング部位が用意されている。pMAT8:NosGFPでは、このlacZ'部位に有用遺伝子モデルであるGFP遺伝子を挿入した(61, 62)。GFP遺伝子は、順方向RSカセットの外側に配置されているため、染色体DNA上に残留することができる。

2. 多芽体形成および正常芽の出現

pMAT8:NosGFPを保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンズLBA4404株を、第2章で作成したMFタバコ葉片に感染させ、ホルモンフリーMS培地上で培養した。感染後約1ヶ月までに、独立した36系統の不定芽を分離することができた。これら不定芽をホルモンフリーMS培地に移植し、さらに約1ヶ月培養を継続した(感染から約2ヶ月)。その結果、36系統の不定芽の内34系統(94%)が多芽体となり、残りの不定芽は多芽体を經由せず正常芽に分化した。この結果は、第3章のpMAT8:35SGUSと同様であり、GST-MATベクターシステムによる効率的な多芽体形成が再現された。

さらに、GFP遺伝子が多重導入されたMFタバコを効率よく迅速に生産するため、34系統の多芽体についてPCR分析を行い*ipt*遺伝子を含むR/RSカセットの脱離が生じている系統を選抜した。その結果、34系統の多芽体の内20系統(59%)で既にカセットの脱離が検出された(Fig. 23)。これら20系統の多芽体からGFP遺伝子が多重導入されたMFタバコの出現を誘導するため、Safener 30 mg/lを含むホルモンフリーMS培地に移植し継続培養した。その結果、Safener誘導3ヶ月以内(感染5ヶ月)に7系統(35%)のMFタバコと推測される正常芽が出現した。

3. 遺伝子多重導入された選抜マーカー・フリー形質転換タバコの解析

Safener誘導により出現した7系統の正常芽について、PCR分析を行い多重導入されたMFタバコかどうか分析した(Fig. 24)。その結果、7系統の正常芽すべてについてpNPI132からの脱離を示すバンドが検出された(Fig. 24A)。この結果により、最初に作成されたMF植物に組み込まれていたT-DNA領域に予期せぬ遺伝子再編成が生じていないことが推測された。また、7系統の正常芽の内5系統で、GFP遺伝子の増幅と(Fig. 24B; laneT1, T3-T6)、R/RS系の脱離を示すバンドが確認された(Fig. 24D; laneT1, T3-T6)。さらに、GFP遺伝子が多重導入され、R/RS系の脱離が検出された5系統の内4系統では*ipt*遺伝子のバンドは検出されなかった(Fig. 24C; laneT1, T3, T4, T6)。しかし、残りの1系統では*ipt*遺伝子が存在していることが確認できた(Fig. 24C; laneT5)。これらの結果より、Safener誘導を行った20系統の多芽体から出現した4系統(20%)の正常芽は、GFP遺伝子が多重導入されたMFタバコであることが示された。

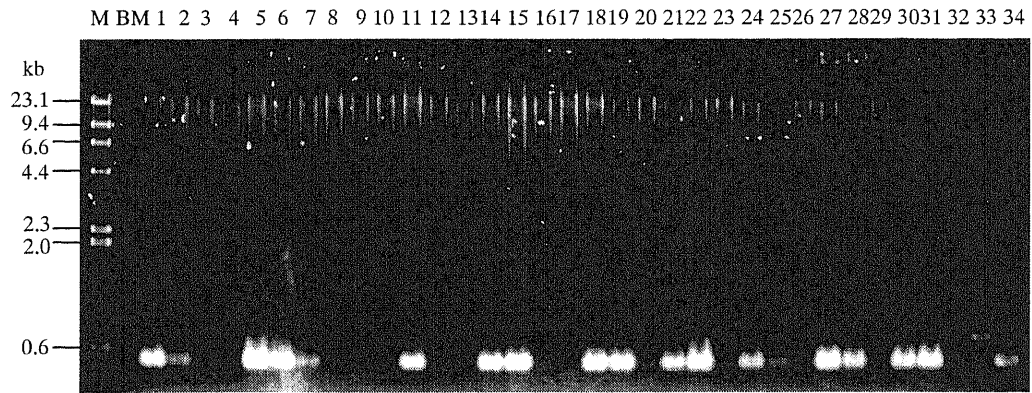


Fig. 23 PCR analysis of the *ipt*-shooty showing amplification of an excision (primer Exb-Exc) of pMAT8. Lanes 1-34, independent *ipt*-shooty lines; Lane BM: amplified from marker-free transgenic tobacco line 132BMO6 untransformed with pMAT8; Lane M: the λ -*Hind*III size marker.

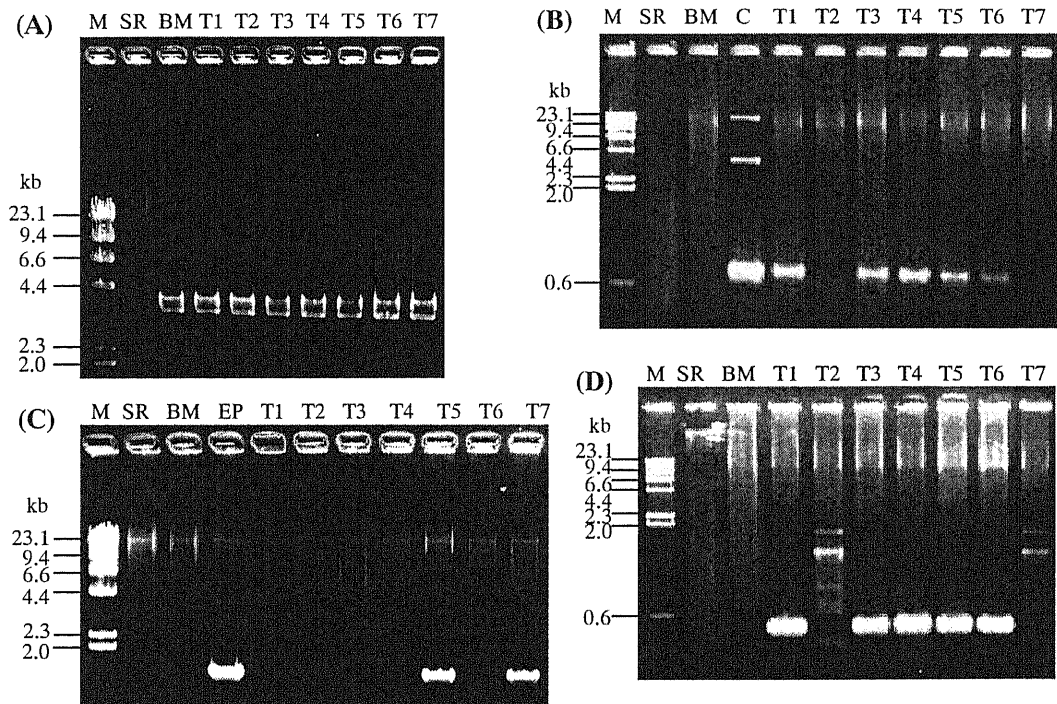


Fig.24 PCR analyses of phenotypically normal shoots appeared from 132BMO6 *ipt*-shooty explants. A. PCR amplification of the excision fragment (primer EX1-EX2) showing existence of *nptII* and *uidA* genes. B. PCR amplification of the GFP fragment (primer GFP5-GFP3). C. PCR amplification of the *ipt* fragment (primer IPT7-IPT8). D. PCR amplification of the excision (primer EXb-EXc). Lane T1-T7: amplified from phenotypically normal shoots; Lane EP: amplified from a *ipt*-shooty; Lane SR: amplified from untransformed tobacco control; Lane C: amplified from plasmid pMAT8:NosGFP; Lane BM: amplified from marker-free transgenic tobacco line 132BMO6; Lane M: the λ -*Hind*III size marker.

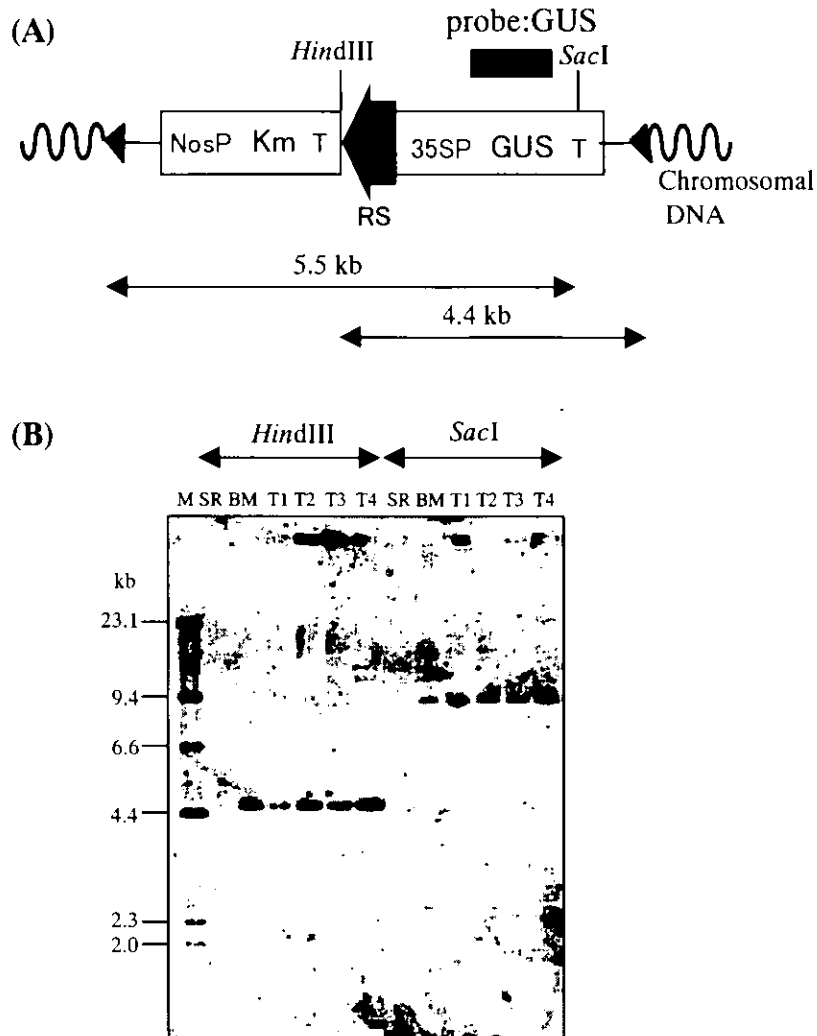


Fig.25 Southern analysis of transgene-stacked marker-free transgenic tobacco plants. Genomic DNA from each transgene-stacked marker-free transgenic plants were digested with two restriction enzymes (*HindIII* or *SacI*) and hybridized with the GUS coding regions. A. Restriction map of the integration region of the T-DNA and the DIG-labeled probe region. B. Southern analysis of transgene-stacked 132BMO6 line. Lane T1-T4: independent transgene-stacked marker-free transgenic tobacco plants; Lane BM: original marker-free transgenic tobacco line 132BMO6. Lane SR: untransformed control; Lane M: the λ -*HindIII* size marker.

4. 多重導入時の有用遺伝子の安定性

GFP 遺伝子が多重導入された MF タバコ 4 系統の染色体 DNA を *Hind*III または *Sac*I で切断し、DIG ラベルしたプローブ GUS を用いたサザンハイブリダイゼーションを行った (Fig. 25)。その結果、これら 4 系統で検出されたバンドパターンは、多重導入される前の MF タバコと同一であることがわかった。この結果から、遺伝子多重導入の際、最初に作成された MF 植物に組み込まれていた T-DNA 領域で予期せぬ遺伝子再編成は生じなかったことが確認された。

第4節 考察

本章では、第 2 章で作成した MF タバコに対し GST-MAT ベクターシステムにより遺伝子多重導入を行った。その結果、第 3 章で示した GST-MAT ベクターシステムと同等な高効率で、遺伝子の多重導入が行われた遺伝子多重導入 MF タバコを作出することができた。また、遺伝子多重導入 MF タバコには、1 回目に導入された有用遺伝子は安定的に染色体に保持されていた。

さらに、本章では、効率的・迅速な遺伝子多重導入 MF タバコ作成系を見出した。すなわち、“safener”誘導前の多芽体を PCR 分析することにより、R/RS 系が活発に作動する系統を絞ることができた (Fig. 23)。これにより、“safener”誘導のための植え継ぎ数が減少し作業効率が向上した。これは、第 2 章で示したように、GST-II-27 プロモーターが “safener” 誘導前の多芽体でも弱い発現が起きているためだと考えられる。その結果、多芽体を經由せず不定芽から直接に MF タバコが出現したと推測される。

また、本章の実験では、多芽体から出現した MF タバコと推測された正常形態の芽の一部で、*ipt* 遺伝子の残留が検出された (Fig. 24C: lane T5, T7)。これは、*ipt* 遺伝子が何らかの理由により不活性化されたためであると考えられる。実際に、メチル化により *ipt* 遺伝子が不活性化されたという報告がある (63)。

ipt 型 MAT ベクターシステムに用いた R/RS 系は、他の部位特異的組換え系と同様に、脱離後に一つの組換え配列 RS を残す。そのため、*ipt* 型 MAT ベクターシステムにより遺伝子導入を繰り返す際、既に MF 植物に存在する RS 配列と 2 回目以降に導入される RS 配列の間でも部位特異的組換え反応が生じ有用遺伝子の消失などを引き起こす可能性がある。R/RS 系を導入した組換え酵母の実験から、180 kb の長い DNA 断片の脱離や、異なる染色体間の部位特異的組換えによる染色体転座が生じることが報告されている (45)。また、P1 フェージの Cre/*loxP* 系を導入した組換え植物でも、巨大 DNA 断片の脱離と異なる染色体間の部位特異的組換え反応が生じることが報告されている (64)。従って、*ipt* 型 MAT ベクターシステムによる遺伝子多重導入では、RS 配列と有用遺伝子を含む T-DNA が 1 コピーで導入された MF 植物系統に対して 2 回目以降の遺伝子導入を繰り返す方が望ましい。そ

ここで本章では、*ipt* 型 MAT ベクターシステムによる遺伝子多重導入の基礎的評価のため、第一回目の遺伝子導入の際に有用遺伝子が 1 コピーで導入されたタバコをモデル植物材料として用いた。さらに、第 2 章で示唆されたように、有用遺伝子が 1 コピーだけ導入された MF 植物を出現させる傾向が強い GST-MAT ベクターシステムを用いた。サザンハイブリダイゼーションによる解析の結果、危惧されたような他の部位特異的組換え反応は検出されなかった (Fig. 25)。しかし、この結果は選抜した 1 系統に対してのみ遺伝子導入を行った結果にすぎず、*ipt* 型 MAT ベクターシステムによる遺伝子多重導入時に危惧される他の部位特異的組換え反応が本当に生じないかどうかは、さらに多くの系統に対する評価試験が必要だと思われる。また、このような欠点を根本的に解決する方法が 2 つ考えられる。第一は、*R/RS* 系に代わり *Cre/loxP* 系などの他の部位特異的組換え系を用いることである (65-68)。第二は、*R/RS* 系の *RS* 配列を人工的に改変することである。*Cre/loxP* 系において報告されている様に (69)、塩基置換や欠失が与えられた人工的 *RS* 配列は、野性型 *RS* 配列や自身とは異なる変異が与えられた人工的 *RS* 配列とは部位特異的組換え反応が起きなくなる。既に多数の人工的 *RS* 配列を作成しており、これら人工的 *RS* 配列を用いた新たな遺伝子多重導入用 MAT ベクターの開発を進めている。

本章では、*ipt* 型 MAT ベクターシステムが、交配が不必要で実用的な遺伝子多重導入システムであることを示した。*ipt* 型 MAT ベクターシステム以外の遺伝子多重導入方法としては、パーティクルガンを用い、一つの選抜マーカー遺伝子を含むプラスミドと共に多数の異なる遺伝子を持つプラスミドを同時に導入する co-bombardment 法が最近報告された (70)。アグロバクテリウム法においても、co-transformation 法がよく知られているが、この方法では一度の多重導入が限界だと考えられる。従って、*ipt* 型 MAT ベクターシステムは、アグロバクテリウム法を用いる遺伝子多重導入システムとしては世界で始めての実用的方法だと言える。また、*ipt* 型 MAT ベクターシステムは、第 1 章で示したようにタバコ以外の植物種アスペンにおいても有用であることが示されており (9, 54)、他の様々な植物種において遺伝子多重導入が可能だと考えられる。特に、アスペンのような樹木や、栄養繁殖植物への遺伝子多重導入には極めて有効なシステムである。

第5節 要約

ipt 型 MAT ベクターシステムを用いた非交配な遺伝子多重導入システムの有効性を検証するため、第 2 章で作成した MF タバコに対し GST-MAT ベクターシステムにより遺伝子多重導入を行った。第 3 章で示した GST-MAT ベクター pMAT8 を用い GFP 遺伝子の多重導入を行った結果、第 3 章と同様に高頻度で多芽体が形成された。また、safener 添加による GST-II-27 プロモーター発現誘導の前に、既に *R/RS* 系が作動し *ipt* 遺伝子の脱離が生じ始めている多芽体システムを PCR 法により選抜することができた (Fig. 23)。次に、これら多芽体からの *ipt* 遺伝子の脱離と MF タバコの出現をさらに促進させるため safener によ

る誘導を行った。その結果、safener 誘導を行った多芽体の 20 %から MF タバコが得られた。これら MF タバコには、多重導入された GFP 遺伝子が導入されていた。

また、R/RS 系は脱離反応後に一つの RS 配列を残すため、*ipt* 型 MAT ベクターシステムによる多重導入を行う際に残留した RS 配列と、新たに導入された RS 配列の間で組換え反応が起きる可能性があった。そこで、得られた遺伝子多重導入 MF タバコについてサザンハイブリダイゼーションを行い、有用遺伝子の安定性を解析した (Fig. 25)。その結果、残留した RS 配列と新たに導入された RS 配列の間では組換え反応が起きず、有用遺伝子は安定的に保持されていた。

これらの結果より、*ipt* 型 MAT ベクターシステムにより交配を経由せず効率的な遺伝子多重導入を行えることが判明した。

総括と展望

21世紀の地球環境や人類の継続的繁栄のためには、基礎的な分子生物学的研究と遺伝子工学技術の融合による医薬・工業・農業の発展が必要不可欠である。特に、形質転換植物は人口増加問題の解決策として注目をあびている。しかしながら、ここ数年、形質転換植物に対する消費者の抵抗感は増しており、2000年の作付面積は減少すると推定されている。このような状況を打破し、有益な形質転換植物を開発していくためには、少しでも安全性が高まるような新しい技術の開発が必要である。その一つが抗生物質耐性遺伝子や除草剤耐性遺伝子のような従来の選抜マーカー遺伝子に代わる新規選抜マーカーシステムである。最近報告され始めた新規選抜マーカーシステムは、二つに大別することができる。第一は、抗生物質耐性遺伝子ではない微生物由来の選抜マーカー遺伝子(non-antibiotic marker)を用いるシステムである。例えば、大腸菌由来の phosphomannose-isomerase を用いたマンノース添加培地による選抜や(71)、誘導型プロモーターDexにより発現されるアグロバクテリウム由来の *ipt* 遺伝子を用いた方法が最近報告された(72)。これらは、いずれも植物の2次代謝系を改変しているだけであり、そもそも植物内に存在していた物質を生産させるため安全性が高いと考えられる。しかしながら、現在の消費者の反応は過敏であり、微生物由来というだけで抵抗感をもたれてしまうのが現状である。そこで第二の新規選抜マーカーシステムとして上げられるのが、マーカー・フリー作成システムである。この場合、抗生物質耐性遺伝子なども従来どおり利用でき、最終的に除去するという考え方である。両者を比較すると、マーカー・フリー作成システムの方が non-antibiotic marker に比べて安全性が高いと認識されると考えられる。また、マーカー・フリー作成システムは、遺伝子多重導入を可能にするという利点も併せ持っている。

MATベクターシステム開発以前の1990年代前半から、3つのマーカー・フリー作成システムが報告されていた(7)(Table.1)。これらは、転移因子(6)、部位特異的組換え(4,5)、co-transformation(73,74)を用いて、選抜マーカーである抗生物質耐性遺伝子と有用遺伝子を交配により分離することによりMF植物が作成される。これらの方法は、交配が必要で労力・時間がかかるため実用化には至らなかった。特に、樹木や栄養繁殖種への応用は不可能であった。そこで、本論文では、全く新しいアイデアを用いた *ipt* 型MATベクターシステムによるMF植物作成システムに関して論じた。*ipt* 型MATベクターシステムは、従来のMF植物作成システムと異なり、交配が不必要な実用的システムである。

第1章では、*ipt* 遺伝子をトウモロコシの転移因子 *Ac* 内に挿入した *ipt* 型MATベクターを構築し、タバコおよびアスペンにおいてMF植物の作成に成功した。低頻度ながらアスペンにおいてもMF植物作成に成功したことにより、ポテトなど他の栄養繁殖種へも *ipt* 型MATベクターが応用できる可能性を示した。しかし、タバコおよびアスペン共に、約5%の多芽体からMF植物が得られたのみであり、実用的な頻度には到達しなかった。しかしながら、高頻度型の *Ac/DS* 系を用いれば、MF植物作成効率を向上させることができると推測さ

Table.1 Transformation systems for the production of marker-free transgenic plants

Author (reference)	Selectable marker gene	Excision system	Plant species	Is transgene stacking reported ?	Is sexual crossing essential ?
Yoder et al (6)	Km ^r	<i>Ac/Ds</i>	Tomato	No	Yes
Russell et al (4)	ALS ^r	<i>Cre/loxP</i>	Tobacco <i>Arabidopsis</i>	No	
Dale et al (5)	Hm ^r	<i>Cre/loxP</i>	Tobacco	No	
Daley et al (73)	Km ^r	Co-transformation	Tobacco Rapeseed	No	
Komari et al (74)	Hm ^r	Co-transformation	Tobacco Rice	No	
Ebinuma et al (9)	<i>ipt</i>	<i>Ac</i> (ipt-type MAT)	Tobacco Aspen	No	No
Sugita et al (11)	<i>ipt</i>	<i>R/RS</i> (ipt-type MAT)	Tobacco	No	
Sugita et al (12)	<i>ipt</i>	<i>R/RS</i> (ipt-type MAT)	Tobacco	No	
Sugita et al (14)	<i>ipt</i>	<i>R/RS</i> (ipt-type MAT)	Tobacco	Yes	
Matsunaga et al (54)	<i>ipt</i>	<i>R/RS</i> (ipt-type MAT)	Aspen	No	
Endo et al (55)	<i>ipt</i>	<i>R/RS</i> (ipt-type MAT)	Rice	No	
Ebinuma et al (10)	<i>rol</i>	<i>R/RS</i> (rol-type MAT)	Tobacco	No	
Minlong et al (75)	<i>rol</i>	<i>R/RS</i> (rol-type MAT)	Snapdragon	No	
Gleave et al (76)	Km ^r <i>codA</i>	<i>Cre/loxP</i>	Tobacco	No	
Zubko et al (77)	Km ^r <i>tms2</i>	<i>attP</i>	Tobacco	No	

れる。また、転移因子 *Ac* を用いた *ipt* 型 MAT ベクター MF タバコには、低コピーの有用遺伝子が導入されているという長所が見出された。

第 2 章では、*ipt* 遺伝子を除去するため酵母由来の部位特異的組換え系 *R/RS* と組み合わせた *ipt* 型 MAT ベクターを構築し、タバコを材料として MF 植物作成を検討した。その結果、不定芽の内 49.3 % が多芽体となり、そのうちの 61.2 % の多芽体から GUS 遺伝子と Km^r 遺伝子が共に導入されている MF タバコを作成することに成功した。さらに、MF タバコに導入された Km^r 遺伝子のコピー数を解析した結果、約 70 % は 3 コピー以上の多コピーであった。これらの結果から、CaMV35S プロモーターにより制御された *R/RS* 系は、高頻度で MF 植物を作出できるが、有用遺伝子の多コピー化を引き起こしやすいという欠点を見出す事ができた。

第 3 章では、組換え酵素遺伝子をトウモロコシ GST-II-27 プロモーターの制御下において GST-MAT ベクターを構築し、タバコを材料にその有用性を検討した。タバコ多芽体を Safener 30mg/l を含む培地に置床し培養した結果、25 % の多芽体から MF 植物を出現させることができた。また、Safener 誘導前の不定芽分化と多芽体形成までは *ipt* 遺伝子の削除は押さえられた。さらに、GST-MAT ベクターにより作出した MF 植物 7 系統について有用遺伝子コピー数を決定した結果、6 系統が 1 コピーであった。これらの結果より、GST-MAT ベクターは有用遺伝子が 1 コピー導入された MF 植物を効率よく作出できることが判明した。

有用遺伝子の低コピー化傾向は、遺伝子不活性化を避けた安定的な遺伝子発現に利点となる。第 2 章の *ipt* 型 MAT ベクター pNPI132 で得られた結果と異なり、GST-MAT ベクターで得られた MF 植物では有用遺伝子の低コピー化が生じた理由として Fig. 26 で示したような原理が推測される。すなわち、pNPI132 では組換え酵素が CaMV35S プロモーターにより発現されているため (Fig. 11, 12)、植物細胞に導入された直後から組換え酵素が発現してしまう。その結果、いったん *ipt* 遺伝子が導入されても、芽に分化するより前の段階で *ipt* 遺伝子が除去されてしまい芽分化までも至らない場合が多くあったと考えられる。特に、有用遺伝子及び *ipt* 遺伝子が 1 コピーで導入された際に、その傾向が強かったと推測される (Fig. 26A)。逆に、有用遺伝子及び *ipt* 遺伝子が 3 コピー以上で導入された場合には、完全に *ipt* 遺伝子が除去される効率と時間が低下するため、多くの多芽体が分化し、その後 MF 植物を出現させることができたと考えられる (Fig. 26B)。また逆に、CaMV35S プロモーターは多芽体形成過程でも強力に組換え酵素を発現させたため、多コピーの系統からでも MF 植物を出現させることができたとも考えられる。第 3 章で得られた結果は、この推論を裏付けることとなった。すなわち、組換え酵素が誘導型 GST-II-27 プロモーターにより発現されているため (Fig. 15, 16)、有用遺伝子及び *ipt* 遺伝子が 1 コピーで導入された場合でも不定芽分化以前のような早期段階で効率よく *ipt* 遺伝子が完全に除去されることがなかったと推測できる。また逆に、多芽体への Safener 誘導後には、*ipt* 遺伝子が 1 コピーで導入された場合の方が MF 植物を出現させることができたと考えられる (Fig. 26C)。

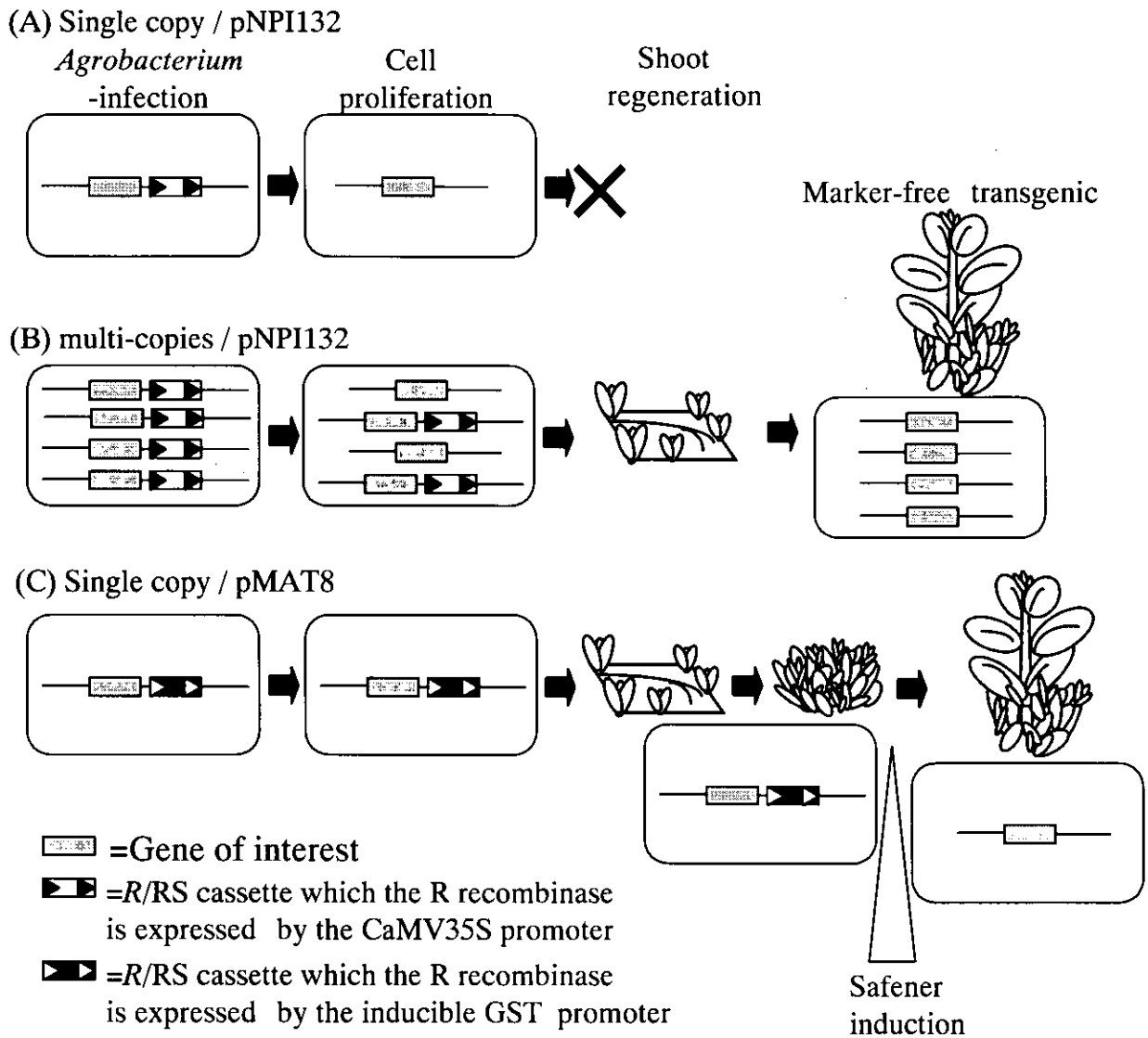


Fig.26 An inducible expression of R recombinase decrease the copy number of a gene of interest

第4章では、*ipt*型MATベクターシステムを用いた非交配な遺伝子多重導入システムの有効性を検証するため、第2章で作成したMFタバコに対しGST-MATベクターにより遺伝子多重導入を行った。第3章で示したGST-MATベクターpMAT8を用いGFP遺伝子の多重導入を行った結果、第3章と同様に高頻度で多芽体が形成された。さらに、MFタバコの出現をさらに促進させるため safener による誘導を行った結果、多芽体の20%からMFタバコが得られた。これらMFタバコには、多重導入されたGFP遺伝子が導入されていた。また、残留していたRS配列と新たに導入されたRS配列の間では組換え反応が起きず、有用遺伝子は安定的に保持されていた。これらの結果より、*ipt*型MATベクターは交配を経由せず遺伝子多重導入を効率よく繰り返す事ができることが実証された。

本論では、有用遺伝子のモデルとして、*Km^r* 遺伝子、GUS 遺伝子、GFP 遺伝子を用いた。いずれもプロモーターとターミネーターを合わせても2~3 kb の長さであった。本論で用いた *ipt* 型MATベクターは、5~8 kb の *ipt* 除去カセットをT-DNAに持ち、全長で15~18 kb のベクタープラスミドである。よって、本論では有用遺伝子を含む全長約20 kb の *ipt* 型MATベクタープラスミドを用いたことになる。現在までの実験においては、この程度のベクター長においては、アグロバクテリウム内での安定性や植物への遺伝子導入効率に悪影響を及ぼしたという結果はなく、5 kb 前後の有用遺伝子では何ら問題ないと考えられる。しかしながら、有用遺伝子が10 kb 以上に及ぶ場合にどのような影響が出るか今後検討しなければならない。

本論により、*ipt*型MATベクターシステムにより効率的にMF植物が作成できることがわかった。しかし、*ipt*型MATベクターシステムによるMF植物出現機構に関しては未解明であり、*ipt*型MATベクターシステムのさらなる改良のためにも解明しなければならない。MF植物出現機構は、非形質転換細胞由来のエスケープ芽の分化機構と基本的に同様だと考えられる(Fig. 27)。*ipt*型MATベクターシステムでは、抗生物質耐性遺伝子による選抜がおこなわれないため、エスケープ細胞、*ipt*遺伝子が導入されている細胞、*ipt*遺伝子が削除されたマーカー・フリー細胞の3種の細胞が混在することになる。すなわち、*ipt*遺伝子が発現している細胞からサイトカイニンが放出され、その影響で *ipt* 遺伝子が導入されていないエスケープ細胞や *ipt* 遺伝子が削除されたマーカー・フリー細胞から正常形態の芽が分化したと推測される。しかしながら、この推測は実験的に何も証明されておらず、今後研究を進めなければならない。

本論では、*ipt*型MATベクターシステムについてのみ論じたが、我々は *ipt* 遺伝子の代わりに *rol* 遺伝子群を選抜マーカー遺伝子として用いた *rol* 型MATベクターシステムによりMFタバコを作成することにも成功している(10,13)。*rol* 遺伝子群は、アグロバクテリウム・リゾゲネスのT-DNA上に存在する遺伝子群であり、植物感染部位から毛状根を発生させる。従って、*rol* 遺伝子群がR/RS系内に存在する *rol* 型MATベクターシステムでは、まず毛状根の分化により形質転換組織を選抜し、次に毛状根から植物体を再生させる。*rol* 遺伝子群が染色体上に残留し発現していると葉の波打ちなどの特徴的な奇形を示

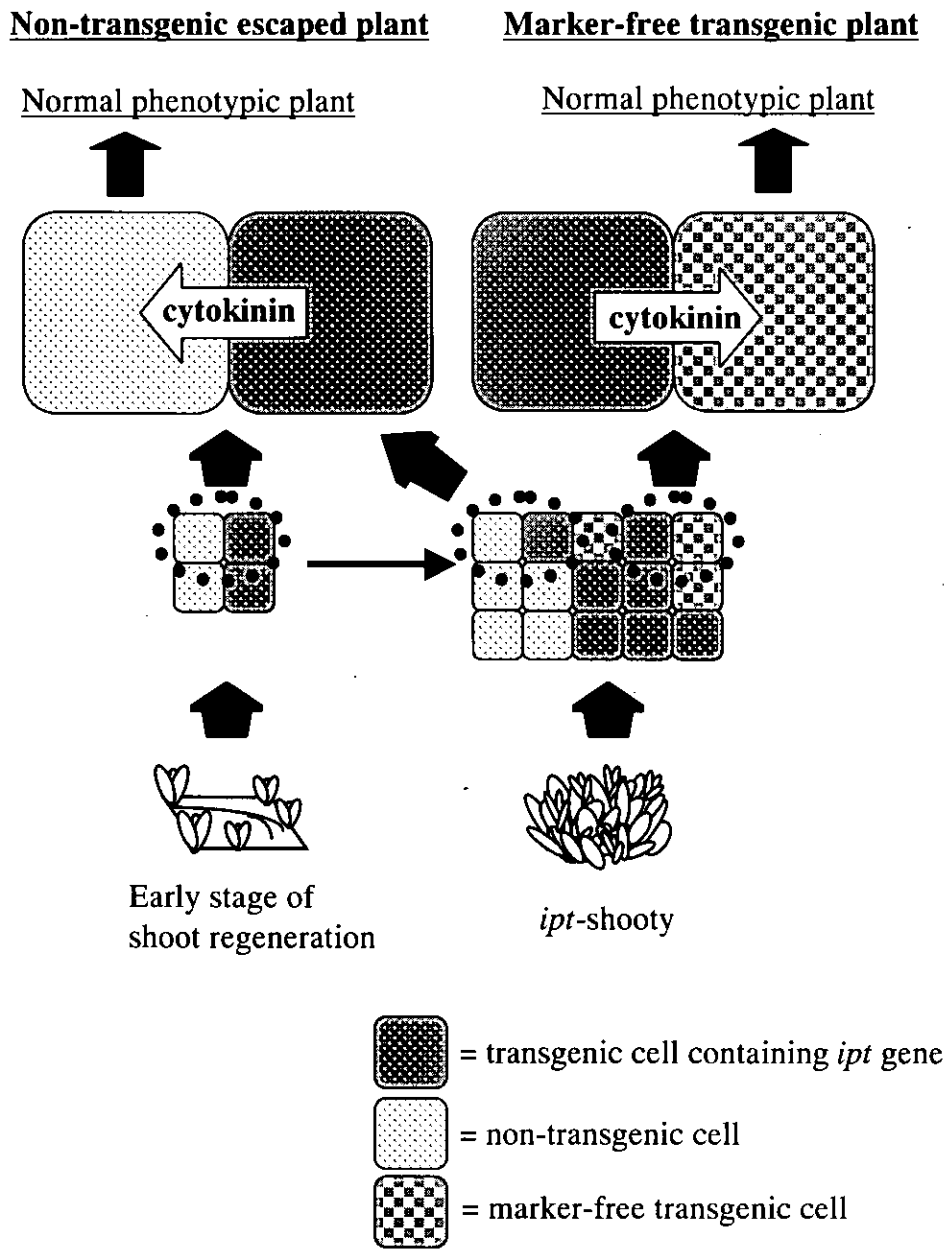


Fig.27 The mechanism of appearance of non-transgenic escaped plants and MF plants

すが、R/RS系により *rol* 遺伝子群が削除されていると正常形態の植物体が再生されることから、交配を経由することなく肉眼で MF タバコを識別できた。しかしながら、*rol* 遺伝子群により引き起こされる形態異常は、*ipt* 遺伝子により生じる多芽体ほど強力でなく、*rol* 遺伝子群が完全に消去された MF 植物を肉眼で識別することは容易ではない。最近、モデル植物であるタバコ以外に、*rol* 型 MAT ベクターシステムを用いた MF キンギョソウの作成について報告されたことから (75)、他の植物種にへも応用できると期待されている (Table. 1)。

また、*ipt* 型 MAT ベクターシステムで報告されている適用植物種に関しては、モデル植物であるタバコだけでなく本論第 1 章で論じたようにアスペンにおける適用例を報告した。また、最近、第 3 章で述べた GST-MAT ベクターシステムについても、アスペンに適用できることを報告した (54)。アスペンなどの樹木や、栄養繁殖種における MF 植物の作成に関して、交配が不要な *ipt* 型 MAT ベクターシステムが唯一の報告例となっている。さらに、我々は *ipt* 型 MAT ベクターシステムを用いて、単子葉植物のイネにおいても効率よく MF 植物を作成することに成功しており (55)、トウモロコシや小麦など主要穀物への応用も期待できる。これらの報告から、*ipt* 型 MAT ベクターシステムは、広く様々な植物種に対して適用できると考えられる (Table. 1)。

最近、MAT ベクターシステム以外に、交配を必要としない MF 植物作成システムが 2 つ報告された (Table. 1)。1 つは、cytosine deaminase (*codA*) 遺伝子と *loxP*-Cre 系の組み合わせである (76)。このシステムは、2 つの順方向 *loxP* 配列の間に *Km^r* 遺伝子と *codA* 遺伝子があり *loxP* 配列の外側に有用遺伝子が配置されたベクター (pART54) と、Cre 組換え酵素遺伝子を持つベクター (pCrel) の 2 つのベクターからなる。第 1 に、pART54 が 1 コピー導入された *Km^r* 形質転換タバコが選抜され、第 2 に、その *Km^r* 形質転換タバコに対し pCrel が導入された。その後、5-fluorocytosine (5-fc) 含有培地で培養を行い、正常に生育するタバコが選抜された。すなわち、cytosine deaminase は 5-fc から植物に有害な 5-fluorouracil を生産するため、*loxP*-Cre 系により *codA* 遺伝子が削除された場合に生き残れる。さらにこのシステムでは、5-fc 含有培地で生存した形質転換タバコの DNA 分析を行い pCrel が染色体上に組み込まれていない系統を検出しなければならない。この報告では、5-fc 含有培地で生存した 773 の形質転換タバコの内 2 つ (0.25%) だけが MF タバコであり、非常に低効率なシステムであった。もう 1 つの交配を必要としない MF 植物作成システムは、アグロバクテリウム由来のオーキシン合成系 (*tms2*) 遺伝子とフェージ attP 配列の組み合わせである (77)。このシステムは、2 つの順方向 attP 配列の間に *Km^r* 遺伝子と *tms2* 遺伝子があり attP 配列の外側に有用遺伝子が配置されたベクターからなる。第 1 に、このベクターが導入された *Km^r* 形質転換タバコを選抜、第 2 に、その *Km^r* 形質転換タバコをカナマイシン含有培地で培養し白色葉 (*Km^s*) を切り取り、第 3 に、この白色葉を naphthalene acetamide (NAM) 含有・カナマイシン非含有培地で培養し発根の有無で *tms2* 遺伝子の削除を選抜することができた。すなわち、*tms2* 遺伝子活性により NAM から大量のオーキシンが生産されるため、*tms2* 遺伝

子が存在する場合にはカルス化され、*tms2* 遺伝子が attP 配列により削除された場合には発根が生じた。タバコを用いた報告では、11 系統の Km^r カルスの内、2 系統の Km^r カルスから白色葉が生じ、低頻度ながら MF タバコの再生に成功している。これら 2 つの交配が不要なマーカー・フリー作成システムは、モデル植物であるタバコにおいて実証されているのみである。それに対し MAT ベクターシステムは、Table.1 で示したように、タバコだけでなくアスペン、イネ、キンギョソウにおいても MF 植物の作成が報告されている。また、本論第 2 章、3 章で述べた R/RS 系を用いた *ipt* 型 MAT ベクターシステムを用いれば効率よく MF 植物を作成することができる。よって、MAT ベクターシステムは、交配が不必要な MF 植物作成システムとして、現在では最も実用性が高いシステムである。

また、*ipt* 型 MAT ベクターシステムは単に MF 植物作成システムというだけでなく、不定芽の再分化効率を上昇させるという利点を併せ持つことも他のマーカー・フリー作成システムより優れている点である (78, 79)。従来の選抜マーカーの場合、培地中に抗生物質を添加しなければならなかったため、植物細胞へのダメージは避けられなかった。特にこの点は、形質転換が困難な植物において問題となっている。それに対し *ipt* 型 MAT ベクターシステムは、植物細胞の増殖を活発化する植物ホルモン・サイトカイニンを細胞内で過剰生産するため再分化効率が上昇する。従って、従来のシステムでは形質転換が難しかった植物種や実用品種への応用が大いに期待される。

以上、本論文では、*ipt* 遺伝子と転移因子 *Ac* または部位特異的組換え系 R/RS を組み合わせた *ipt* 型 MAT ベクターシステムが実用的な MF 植作成システムであることについて論じた。また、*ipt* 型 MAT ベクターシステムが、遺伝子多重導入システムとしても有用であることも述べた。本論文の研究成果により、さらに形質転換植物の実用化が促進されると共に、基礎研究の領域でも活用されることを期待する。

引用論文

1. 日経バイオテク編：日経バイオ年鑑99、日経BP社（1998）
2. Horsh RB, Fraley RT, Rogers SG, Sanger PR, Lloyd A, Hoffman N: Inheritance of foreign genes in plants. *Science* 223.: 496-498 (1984).
3. Gelvin SB: The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinion in Biotech.* 9: 227-232 (1998).
4. Russell SH, Hoopes JL, Odell JT: Directed excision of a transgene from the plant genome. *Mol. Gen. Genet.* 234: 49-59 (1992).
5. Dale EC, Ow DW: Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 10558-10562 (1991).
6. Goldsbrough AP, Lastrella CN, Yoder JJ: Transposition mediated Re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Bio/Technology* 11: 1286-1292 (1994).
7. Yoder JJ, Goldsbrough AP: Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Bio/Technology* 12: 263-267 (1994).
8. Flavell RB, Dart E, Fuchs RL, Fraley RT: Selectable marker genes: Safe for plants? *Bio/Tech.* 10: 141-144 (1992).
9. Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M: Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 2117-2121 (1997).
10. Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M, Komamine A: Principle of MAT vector. *Plant Biotech.* 14: 133-139 (1997).
11. Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma H: Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing. *Plant Cell Reports* 18: 941-947 (1999).
12. Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E, Ebinuma H: The transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. *The Plant Journal* 22: 461-468 (2000).
13. Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Endo S, Kasahara H: Selection of marker-free transgenic plants using the oncogenes (IPT, ROL A,B,C) of *Agrobacterium* as selectable markers. pp.25-46. In: Jain SM, Minocha SC (eds) *MOLECULAR BIOLOGY OF WOODY PLANTS II*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands (2000).
14. Sugita K, Matsunaga E, Kasahara T, Ebinuma H: Transgene stacking in plants in the absence of sexual crossing. *Molecular Breeding* 6: 529-536 (2000).
15. Akiyoshi DE, Klee H, Amasino RM, Nester EW, Gordon MP : T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 5994-5998 (1984).

16. Barry GF, Rogers SG, Fraley RT, Brand L: Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 4776-4780 (1984).
17. Smigocki AC, Owens LD: Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 5131-5135 (1988).
18. Schmulling T, Beinsberger S, De Greef J, Schell J, Van Onchelen H, Spena A: Construction of a heat-inducible chimaeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue. *FEBS letters* 249: 401-406 (1989).
19. Medford JI, Horgan R, El-Sawi Z, Klee HJ: Alternations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *The Plant Cell* 1: 403-413 (1989).
20. Smart CM, Scofield SR, Bevan MW, Dyer TA: Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. *The Plant Cell* 3: 647-656 (1991).
21. Estruch JJ, Prinsen E, Van Onckelen H, Schell J, Spena A: Viviparous leaves produced by somatic activation of an inactive cytokinin-synthesizing gene. *Science* 254: 1364-1367 (1991).
22. Smigocki AC, Hammerschlag FA: Regeneration of plants from peach embryo cells infected with a shooty mutant strain of *Agrobacterium*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116: 1092-1097 (1991).
23. Li Y, Hagen G, Guilfoyle TJ: Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins in specific tissues and organs. *Dev. Biol.* 153: 386-395 (1992).
24. Schwartzenberg KV, Doumas P, Jouanin L, Pilate G: Enhancement of the endogenous cytokinin concentration in poplar by transformation with *Agrobacterium* T-DNA gene *ipt*. *Tree Physiol.* 14: 27-35 (1994).
25. Hobbie L, Timpte C, Estelle M: Molecular genetics of auxin and cytokinin. *Plant Mol. Biol.* 26: 1499-1519 (1994).
26. Fedoroff NV: Maize transposable elements. In: Berg DE, Howe MM (eds) *Mobile DNA*, pp. 375-411 American Society for Microbiology, Washington, DC (1989).
27. 飯田滋、稲垣善茂、島本功 (1992) 植物の転移因子とトランスポゾンタギング。蛋白質核酸酵素 4: 1-15.
28. 杉田耕一、飯田滋 (1993) 転移因子を利用した高等植物の染色体操作。Nippon Nogeikagaku Kaishi 67: 716-719.
29. Kunze R, Starlinger P: The putative transposase of transposable element *Ac* from *Zea mays* L. interacts with subterminal sequences of *Ac*. *The EMBO Journal* 8: 3177-3185 (1989).
30. Coupland G, Plum C, Chatterjee S, Post A, Starlinger P: Sequences near the termini are required for transposition of the maize transposon *Ac* in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9385-9388 (1989).

31. Baker B, Schell J, Lorz H, Fedoroff N: Transposition of the maize controlling element "Activator" in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4844-4848 (1986).
32. Belzile F, Lassner MW, Tong Y, Khush R, Yoder JJ: Sexual transmission of transposed *Activator* elements in transgenic tomatoes. *Genetics* 123: 181-189 (1989).
33. Howe GT, Goldfarb B, Strauss SH: *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 59-71 (1994).
34. Izawa T, Miyazaki C, Yamamoto M, Terada R, Iida S, Shimamoto K: Introduction and transposition of the maize transposable element *Ac* in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 227: 391-396 (1991).
35. Shimamoto K, Miyazaki C, Hashimoto H, Izawa T, Itoh K, Terada R, Inagaki Y, Iida S: *trans*-Activation and stable integration of the maize transposable element *Ds* cotransfected with the *Ac* transposase gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* 239: 354-360 (1993).
36. Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA: A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*. 303: 179-180 (1983).
37. Nagel R, Elliott A, Masel A, Birch RG, Manners JM: Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67: 325-328 (1990).
38. Doyle JJ, Doyle JL: Isolation of plant DNA from fresh tissue. *FOCUS*. 12: 13-15 (1989).
39. Jefferson RA: Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405 (1987).
40. Chen J, Greenblatt IM, Dellaporta SL: Molecular analysis of *Ac* transposition and DNA replication. *Genetics* 130: 665-676 (1992).
41. Matzke M, Matzke AJM, Scheid OM: Inactivation of repeated genes - DNA-DNA interaction?. In: Paszkowski J (ed) *Homologous recombination and gene silencing in plants*, pp 271-307. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands (1994).
42. Araki H, Jearnpipatkul A, Tatsumi H, Sakurai T, Ushino K, Muta T, Oshima Y: Molecular and functional organization of yeast plasmid pSR1. *J. Mol. Biol.* 182: 191-203 (1985).
43. Araki H, Nakanishi N, Evans BR, Matsuzaki H, Jayaram M, Oshima Y: Site-specific recombinase, R, encoded by yeast plasmid pSR1. *J. Mol. Biol.* 225: 25-37 (1992).
44. Craig NL: The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu. Rev. Genet.* 22: 77-105 (1988).
45. Matsuzaki H, Nakajima R, Nishiyama J, Araki H, Oshima Y: Chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* by using a site-specific recombination system of a yeast plasmid. *J. Bacteri.* 172: 610-618 (1990).

46. Onouchi H, Yokoi K, Machida C, Matsuzaki H, Oshima Y, Matsuoka K, Nakamura K, Machida Y: Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucl. Acids Res.* 19: 6373-6378 (1991).
47. Onouchi H, Nishihama R, Kudo M, Machida Y, Machida C: Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 247: 653-660 (1995).
48. Hobbs SLA, Warkentin TD, DeLong CMO: Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol. Biol.* 21:17-26 (1993).
49. Gatz C: Chemical control of gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 89-108 (1997).
50. Aoyama T, Chua NH: A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant J.* 11: 605-612 (1997).
51. Salter MG, Paine JA, Riddell KV, Jepson I, Greenland AJ, Caddick MX, Tomsett AB: Characterisation of the ethanol-inducible alc gene expression system for transgenic plants. *The Plant Journal* 16:127-132 (1998).
52. Martinez A, Sparks C, Hart CA, Thompson J, Jepson I: Ecdysone agonist inducible transcription in transgenic tobacco plants. *The Plant Journal* 19:97-106 (1999).
53. Ohta S, Mita S, Hattori T, Nakamura K : Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containig an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol* 31: 805-813 (1990).
54. Matsunaga E, Sugita K, Ebinuma H: An sexual production of selectable marker-free transgenic woody plants. (for submitted).
55. Endo S, Sugita K, Ebinuma H: A rapid production of selectable marker-free transgenic rice. (for submitted).
56. Jepson I, Lay VJ, Holt DC, Bright SWJ, Greenland AJ: Cloning and characterization of maize herbicide safener-induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isoforms I, II, and IV. *Plant Mol. Biol.* 26: 1855-1866 (1994).
57. Holt DC, Lay VJ, Clarke ED, Dinsmore A, Jepson I, Bright SWJ, Greenland AJ: Characterization of the safener-induced glutathione S-transferase isoforms II from maize. *Planta* 196: 295-302 (1995).
58. Bridges IG, Bright SWJ, Greenland AJ, Holt DC, Jepson I, Schuch W: Plant-derived enzyme and DNA sequences, and use thereof. Patent no WO9301294 (1993).
59. Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, Toval G, Romero J, Pilate G, Lep le JC, Boerjan W, Ferret V, Nadai V, Jouanin L: Structural alternations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid *O*-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiol.* 119: 153-163

(1999).

60. Hiei Y, Komari T, Kubo T: Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 35: 205-218 (1997).
61. Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J: Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* 6: 325-330 (1996).
62. Niwa Y, Hirano T, Yoshimoto K, Shimizu M, Kobayashi H: Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants. *The Plant Journal* 18: 455-463 (1999).
63. John MC, Amasino RM: Extensive change in DNA methylation patterns accompany activation of a silent T-DNA *ipt* gene in *Agrobacterium tumefaciens*-transformed plant cells. *Mol. Cell. Biol.* 9: 4298-4303 (1989).
64. Qin M, Bayley C, Stockton T, Ow D.W: Cre recombinase-mediated site-specific recombination between plant chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 1706-1710 (1994).
65. Dale EC, Ow DW : Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene* 91:79-85 (1990).
66. Maeser S, Kahmann R : The *Gin* recombinase of *Mu* can catalyze site-specific recombination in plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 230:170-176 (1991).
67. Lyznik LA, Mitchell JC, Hirayama L., Hodges TK : Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucl. Acids Res.* 21:969-975 (1993).
68. Lloyd AM, Davis RW : Functional expression of the yeast FLP/FRT site-specific recombination system in *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genet.* 242:653-657 (1994).
69. Araki K, Araki, M, Yamamura K: Targeted integration of DNA using mutant *lox* sites in embryonic stem cells. *Nucl. Acids Res.* 25: 868-872 (1997).
70. Chen L, Marmey P, Taylor NJ, Brizard JP, Espinoza C, D'Cruz P, Huet H, Zhang S, Kochko A, Beachy RN, Fauquet CM: Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nature Biotech.* 16: 1060-1064 (1998).
71. Negrotto D, Jolley M, Beer S, Wenck AR, Hansen G: The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep.* 19: 798-803 (2000).
72. Kunkel T, Niu QW, Chan YS, Chua NH: Inducible isopentenyltransferase as a high efficiency marker for plant transformation. *Nature Biotech.* 17: 916-919 (1999).
73. Daley M, Knauf VC, Summerfelt KR, Turner JC: Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. *Plant Cell Reports* 17: 489-496 (1998).
74. Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T: Vectors carrying two separate T-DNAs for

- co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformation of transformants free from selection markers. *The Plant Journal* 10: 165-174 (1996).
75. Minlong C, Takayanagi K, Kamada H, Nishimura S, Handa T: Transformation of *Antirrhinum majus* L. by a *rol*-type multi-autotransformation (MAT) vector system. *Plant Sci.* 159: 273-280 (2000).
 76. Gleave, A.P., Mitra, D.S., Mudge, S.R. & Morris, B.A.M.: Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol. Biol.* 40: 223-235 (1999).
 77. Zubko E, Scutt C, Meyer R: Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes. *Nat/Biotech.* 18: 442-445 (2000).
 78. James DJ, Passey AJ, Barbara DJ : *Agrobacterium*-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria* × *Ananassa* Duch.) using disarmed binary vectors. *Plant Sci* 69: 79-94 (1990).
 79. Endo S, Kasahara T, Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma H: The isopentenyl transferase gene is effective as a selectable marker gene for plant transformation in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SR1). *Plant Cell Reports* (in press).

主論文

1. Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M: Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 2117-2121 (1997).
2. Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma H: Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing.
Plant Cell Reports 18: 941-947 (1999).
3. Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E, Ebinuma H: The transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency.
The Plant Journal 22: 461-468 (2000).
4. Sugita K, Matsunaga E, Kasahara T, Ebinuma H: Transgene stacking in plants in the absence of sexual crossing.
Molecular Breeding 6: 529-536 (2000).

参考論文

1. Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M, Komamine A: Principle of MAT vector.
Plant Biotech. 14: 133-139 (1997).
2. Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Endo S, Kasahara H: Selection of marker-free transgenic plants using the oncogenes (IPT, ROL A,B,C) of *Agrobacterium* as selectable markers. pp.25-46. In: Jain SM, Minocha SC (eds) MOLECULAR BIOLOGY OF WOODY PLANTS II.
Kluwer Academic Publishers, The Netherlands (2000).
3. Endo S, Kasahara T, Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma H: The isopentenyl transferase gene is effective as a selectable marker gene for plant transformation in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SR1).
Plant Cell Reports (in press).
4. 杉田耕一、飯田滋 (1993) 転移因子を利用した高等植物の染色体操作.
Nippon Nogeikagaku Kaishi 67: 716-719.
5. 海老沼宏安、杉田耕一、松永悦子、山門幹子 (1997) 植物の新しい遺伝子組換え技術—MATベクターシステム.
化学と生物, 35: 72-74.
6. 杉田耕一、松永悦子、山門幹子、海老沼宏安 (1997) 形態変化でマーカー・フリー組換え植物を選抜！！～MATベクター～.
バイオサイエンスとインダストリー, 55: 40-42.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導を賜りました財団法人進化生物学研究所 駒嶺穆教授、日本製紙株式会社技術研究所主席研究員 海老沼宏安博士に心より感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、適切な御助言と御教示を賜りました西村幹夫教授、堀内嵩教授、飯田滋教授、長谷部光泰教授に感謝の意を表します。

本研究にあたり、転移因子 *Ac* を御供与頂きました飯田滋教授、GFP 遺伝子を御供与頂きました静岡県立大学丹羽康夫博士、GST-11-27 プロモターを御供与頂きました英国ゼネカ社に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究の共同研究者としてご協力頂きました日本製紙株式会社技術研究所樹木工学研究室の皆様は深く感謝申し上げます。

本研究の機会を与えて頂きました日本製紙株式会社研究開発本部長を始めとする研究開発本部の皆様は厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行に際し、私を支えてくれた妻と子供たち、両親、義両親に心から感謝します。