

エレクトロポレーションによる遺伝子導入法の開発

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	西口, 正通 本吉, 總男
巻/号	12巻6号
掲載ページ	p. 18-19
発行年月	1989年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



エレクトロポレーションによる 遺伝子導入法の開発

西口 正通*, 本吉 總男**

1. 背景

形質転換法は、1個ないし数個の外来遺伝子を目的とする植物に導入し、発現させる方法です。どのような生物に由来する遺伝子でも外来遺伝子として利用でき、しかも、その植物の本来持っている遺伝的な性質をほとんど変えることがないという点に、細胞融合法とは異なる特色があります。

植物の形質転換法としては、根頭癌腫病菌が持っているTiプラスミドを外来遺伝子のベクターとして利用する方法が一般的です。しかし、根頭癌腫病菌を仲介にしてベクター上の遺伝子を植物細胞に送り込む必要があるため、根頭癌腫病菌に感染しない植物には利用できません。従って、そのような植物の形質転換には、細胞内に遺伝子を直接導入する方法を利用する必要があります。

2. 目的

エレクトロポレーション法（電気遺伝子導入法）は、直接導入法のうち最も容易であり、実用性が高いと考えられます。植物細胞から分離したプロトプラストと外来遺伝子を含む懸濁液

に、瞬時、高い電圧をかけることにより、プロトプラストを包んでいる細胞膜に小孔が生じ、そこから外来遺伝子がプロトプラストの内部に入るのです。本研究では、効率的なエレクトロポレーションの条件を設定し、形質転換系を確立することを目的としました。

3. 成果

材料として、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ(CAT)という酵素の遺伝子を組み込んだプラスミドpUC8-CaMV₂CATを用い、エレクトロポレーション法によるタバコ・プロトプラストへの導入について調べました(写真1)。このプラスミドが導入されたプロトプラストでは、エレクトロポレーション後、間もなくCAT活性が現れ、24時間後にはピークに達します(図1)。これはCAT遺伝子の細胞内での一時的発現によるものですが、条件設定のための指標として役に立ちます。エレクトロポレーションの最適条件は、500V/cm、パルス10ミリ秒であることが分かりました。CAT遺伝子はメロンやトマトのプロトプラストにも同様に導入し、発現させることができました(図2)。

次に、導入した外来遺伝子が植物の核DNAに組み込まれるかどうかを調べるため、カナマイシン耐性遺伝子(NPTII遺伝子)を含むプラスミドpUC8-CaMVNEOを上記の条件でタバコ・プロトプラストに導入し、カナマイシン

を含む培地で選択した耐性カルスから植物体を再生させました。これらは、核DNAの中に外来遺伝子を持つ、安定した形質転換体であることが確かめられました。

4. 今後の展望

エレクトロポレーション法はTiプラスミドを利用する方法とは違い、プロトプラストからの植物体再生が可能な種であれば、一般的に利用可能です。本研究で示したエレクトロポレーションの条件は、多少の変更を加えることによって、イネ科植物をはじめ、いろいろな植物種の形質転換に利用できると考えられます。

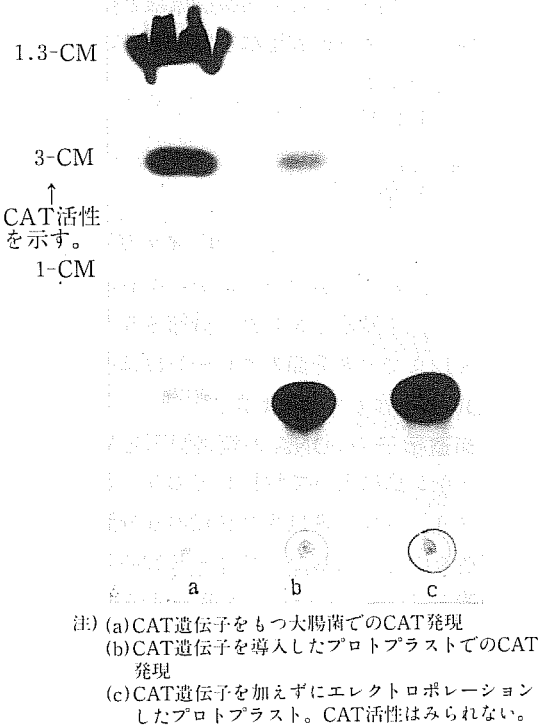


写真1 タバコ葉肉プロトプラストにエレクトロポレーションによって導入したCAT遺伝子の発現 (¹⁴Cで標識したクロラムフェニコールに対するアセチル基転移活性を薄層クロマトとオートラジオグラフィーによって調べる)。

(*九州農業試験場 育種工学研究室長, **農業生物資源研究所 分子育種部長)

主要な発表文献

- 1) Nishiguchi, M., T. Sato and F. Motoyoshi; An improved method for electroporation in plant protoplasts: infection of tobacco protoplasts by tobacco mosaic virus particles, Plant Cell Rep. 6, 90-93 (1987)
- 2) Nishiguchi, M., T. Sato and F. Motoyoshi; Factors influencing the transfer of the chloramphenicol acetyl transferase gene by electroporation and its transient expression in tobacco mesophyll protoplasts, Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour. 3, 105-114 (1987)

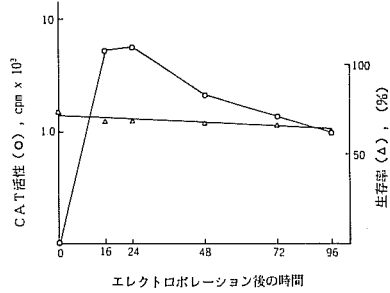


図1 CAT遺伝子をエレクトロポレーションによって導入したタバコプロトプラストにおけるCAT活性の経時的変化。

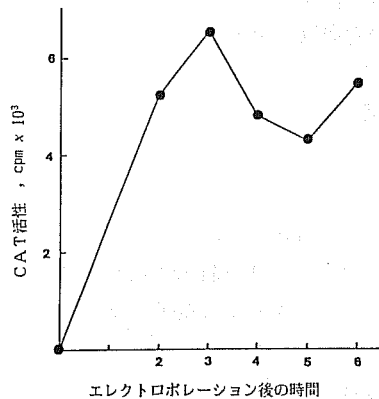


図2 CAT遺伝子をエレクトロポレーションによって導入したメロンプロトプラストにおけるCAT活性の経時的変化。