

パーティクルガンによるサクラに導入した外来遺伝子のトランジェント発現

誌名	明治大学農学部研究報告 = Bulletin of the Faculty of Agriculture, Meiji University
ISSN	04656083
著者	加藤, 寛喜 井上, 真以子 秋濱, 友也
巻/号	112号
掲載ページ	p. 21-27
発行年月	1997年7月

パーティクルガンによるサクラに導入した外来遺伝子の トランジェント発現

加藤 寛喜*・井上真以子・秋濱 友也
(1997年3月28日受理)

Transient Expression of Exogenous Genes in Japanese Cherry Cells by Particle Bombardment

Hiroki KATO*, Maiko INOUE and Tomoya AKIHAMA

Summary

We tried to produce the transgenic Japanese cherry (*Prunus lannesiana* var. *speciosa* cv. *Yaebeni-oshima*) by particle bombardment transformation method.

Particle bombardment method is a way to introduce DNA-coated gold particles using pressurized helium in a vacuum condition.

At first, we investigated optimal and stable bombardment conditions by the observation of transient expression using the GUS (β -glucuronidase) gene.

As a result of this experiment, high levels of transient expression of the GUS gene were obtained following bombardment of the leaf tissue and shoot apex of *in vivo* plants. The most efficient transient expression was achieved when the amount of DNA-coated gold particles was 0.05 mg per projectile, the amount of plasmid DNA was 2 μ g/mg of gold particles, the accelerated-helium pressure was 3~4 kg f/cm², and the distance between the sample and the projectile was 4~6 cm.

緒 言

植物の遺伝子導入において、細胞に導入された遺伝子はその多くがゲノムに組み込まれることなく数日以内に消化される。しかし、その間は転写活性を持つことから、種々のプロモーターにレポーター遺伝子やマーカー遺伝子を連結し、トランジェントな遺伝子発現で遺伝子導入を解析することができる。トランジェントアッセイの最大の利点は、短期間で導入遺伝子の検定を行い導入効率の高い条件を絞り込むことができる点である。それにより、形質転換植物の作出に要する多大な時間と労力を省くことが可能となり、また形質転換系の確立していない植物にも適用が

* (現)北海道大学大学院農学研究科 (〒060 北海道札幌市北区北9条西9丁目)

可能である。パーティクルガン法¹⁾は、プロトプラストからの培養系や、アグロバクテリウム法における除菌作業を必要とせず、原理的にはあらゆる植物組織への導入が可能であるとされる。また、操作も容易である²⁾。これまでパパイヤ³⁾やユウカリの胚⁴⁾イネの完熟種子由来カルス⁵⁾などへの導入が試みられ、形質転換体作出の報告も数多い^{6,7,8)}。

サクラは、分類学上バラ科サクラ亜属に属し、現在自生品種をはじめ、変種や交雑種を含めると300種以上あるといわれている⁹⁾。広く栽培される一方で自然環境下であるため、病害や気象災害等により、品質の保存あるいは繁殖に労力を要しているのが現状である。また、自家不和合性が強く、そのため自殖実生を得ることが難しい。栄養繁殖においても挿し木が困難な品種が多いため接ぎ木による繁殖が主流となっているが、花や若葉の形態、色などに子細な変異が生じる可能性が大きい。これらの問題を解決するために、バイオテクノロジー技術を用いた組織培養によるクローン大量増殖が試みられている^{10,11)}。一方、サクラの有効利用を目指し、アグロバクテリウム法による遺伝子導入も試みられているが¹²⁾、形質転換体の作出に至っていないのが現状である。

そこで、本研究ではその第一歩として、トランジェント発現による遺伝子導入法の確立を試みた。

材料及び方法

1. 材料

本研究室において無菌培養されている、カスミザクラ系のヤエベニオオシマ (*Prunus lan-siesiana* var. *speciosa* cv. Yaebeni-oshima)¹³⁾を用いた。また、財団法人・日本花の会 結城農場より供与された同品種の休眠芽も用いた。

導入遺伝子として、プラスミドベクター pBI121¹⁴⁾と pBI221¹⁵⁾を用いた。

2. プラスミドのコーティング

洗浄した金粒子 1 mg/l 当たり 20 μ l の TE (10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8.0) を加え、ソニケーターで懸濁した。この懸濁液 20 μ l を pBI121 は 8 μ l, pBI221 は 2 μ l の DNA 溶液を含むエッペンドルフチューブに加えた。プラスミドによって量が異なるのは、pBI121 は pBI221 の約 3~4 倍の大きさと推測されたためであり¹⁶⁾、含まれるプラスミド数の差を出来る限りなくすためである。これに、TE 50 μ l, 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 5 μ l, 100% エタノール 110 μ l を加え混合し -20°C に 10 分間静置した。その後 5000 rpm で遠心沈降し、上清を捨て 70% エタノールですすぎ、再び上清を捨て、100% エタノールを 160 μ l 加えた (これを 3 倍濃度サスペンジ

ジョン (T) とする)。これを、ソニケーター (output 8) のホーン壁にチューブを一瞬押しつけ懸濁させた。ここから50 μ l 取り、100%エタノールを150 μ l 加えた (これを標準濃度サスペンジョン (N) とする)。

3. 休眠芽の滅菌

側枝に休眠芽を一芽ずつ付けた状態で約2 cm に調整し、中性洗剤を微量添加した水中で5分間攪拌した後、流水で20分間洗浄した。次に、70%エタノールで1分間処理し、有効塩素濃度0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液にポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20) を数滴加えたものに、10分間浸漬して滅菌を行い、クリーンベンチ内で滅菌水を用いて3回洗浄したものを以後の実験に供試した。

4. 遺伝子導入

パーティクルガン装置はタナカ社の IDERA GIE-III を使用した。葉はシャーレ上に葉の裏側を上にして置床し、導入後は速やかに IBA (Indole-3-butyric acid) 0.1 mg/l BAP (6-benzylaminopurine) 1.0 mg/l 加えた MS 培地 (pH 5.8 Agar 0.8% Sucrose 3%)¹⁷⁾ に置床した。一方、茎頂は固形培地に置床する際、組織の切断により蓄積されるフェノール性化合物の影響や、高濃度の無機塩類等の存在等により、長時間形態維持することは困難である。従って切断時には、茎頂のみ摘出するのではなく適度な長さ (約1 cm~1.5 cm) で茎ごと切断することにより、フェノール性化合物による茎頂の褐変等を軽減させることを試み、培地中に茎頂が隠れないように茎を差し込んで、密集させた状態で置床した。導入後、IBA 0.1 mg/l BAP 1.0 mg/l 加えた MS 培地で培養した。

5. GUS アッセイ

遺伝子導入後、24時間~48時間培養した後、GUS アッセイを行った⁷⁾。サンプルをクリーンベンチ内で3 cm 滅菌シャーレに移し、基質 (25 ml リン酸緩衝液, 50 μ l 0.1M ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム, 50 μ l 0.1M ヘキサシアノ鉄(II)酸カリウム三水和物, 12.5 mg X-Gluc, 75 μ l Triton X を混合したもの) を適量加え37°Cでインキュベートした。茎頂は、GUS アッセイの影響による褐変の助長がみられることから、葉においては24時間処理としていたところ、12時間処理とした。

その後、基質を取り除き50%メタノールで24時間脱色を行ない¹⁸⁾、実体顕微鏡により観察、ブルースポットの確認を行った。

結果及び考察

1. 葉におけるトランジェントアッセイ

pBI221を使用した際、多数のブルースポットが確認された (Fig. 1A)。しかし、弱い条件ではトランジェントな発現が見られなかった。そのデータを基に、pBI121を用いて同様に照射したが、ブルースポットは確認されなかった。

次に、サスペンションの照射量を $4 \mu\text{l}$ から $8 \mu\text{l}$ に増加し、さらに同じサンプルに続けて2回照射を行うことで、導入効率を高めることを試みた。その結果 4 kg f/cm^2 , 6 cm の条件でブルースポットが確認された。照射後の葉を観察したところ、2度の照射は1度のみ照射したもの 비해、組織への影響は大きい傾向が認められた。また、照射条件が厳しいほど衝撃により葉自体が薄くなってしまい、裂傷してしまうものも見られた。次に、プラスミドのコーティング時の濃度を変えることによって、導入効率を高めることが可能なのではないかと考え、濃度を3倍にしたもの (T) を使用し照射を行った。その結果 6 kg f/cm^2 4 cm の条件でブルースポットが確認された (Table 1)。

また、照射を行っていない葉を同様の条件でGUSアッセイしたが、ブルースポット等の特異的な反応は見られなかった。

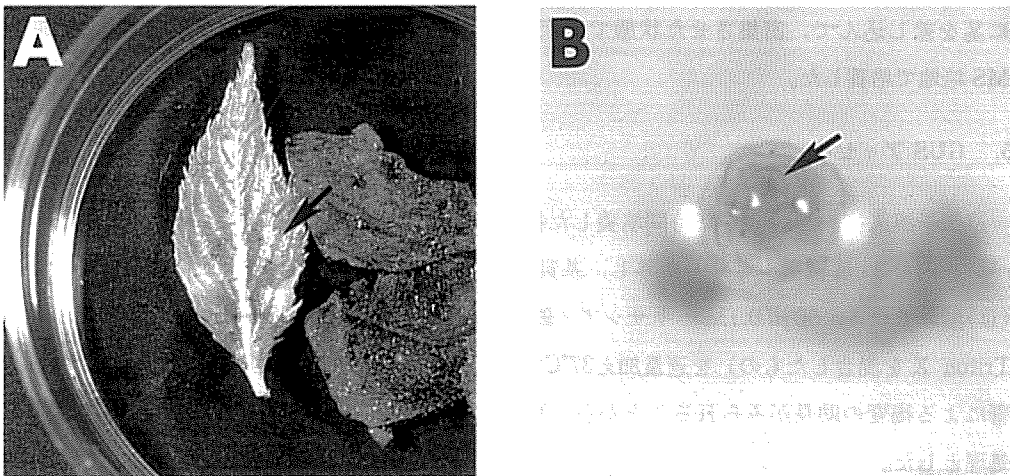


Fig. 1 Transient GUS expression in the leaf (A) and shoot apex of *in vitro* plants (B) after particle bombardment.

The bombardment conditions: (A) The helium pressure accelerated was 6 kg f/cm^2 , and the distance between the sample and the projectile was 6 cm . (pBI221)

(B) The helium pressure accelerated was 3 kg f/cm^2 , and the distance between the sample and the projectile was 4 cm . (pBI221)

Table 1 Transformation experiments in the leaf of Japanese cherry.

Plasmid DNA	bombardment		conditions	Number of expression/samples	Number of blue spots
	He pressures (kgf/cm ²)	distance (cm)	suspension (μ l \times times)		
pBI221	2	6	4 \times 1(N)	3/5	50 \pm 10
	2	8	4 \times 1(N)	2/2	20 \pm 5
	4	6	4 \times 1(N)	5/5	110 \pm 10
	4	8	4 \times 1(N)	4/4	20 \pm 5
	6	6	4 \times 1(N)	2/2	50 \pm 10
	6	8	4 \times 1(N)	2/2	50 \pm 10
pBI121	4	6	4 \times 1(N)	0/3	
	6	6	4 \times 1(N)	0/3	
	4	6	8 \times 2(N)	1/12	3 \pm 1
	6	4	8 \times 1(T)	1/11	3 \pm 1
	6	6	8 \times 2(N)	0/10	
	6	6	8 \times 1(T)	0/3	
	3	4	36 \times 1(N)	0/10	
	3	6	36 \times 1(N)	0/6	

2. 茎頂への遺伝子導入

まず, *in vitro* 個体において pBI221 を用いて, 数パターンの設定条件で照射を行ったが, ブルースポットは確認されなかった。

次に, サスペンションを 8 μ l \times 2(N) に設定し照射を行ったが, ブルースポットは確認されなかった。

同様に, 休眠芽を用いて照射を行ったところ, He 圧 2 kg f/cm², 6 cm の条件で低頻度ではあるが, ブルースポットが確認された。しかし, 休眠芽の茎頂は褐変が早いため, 観察が困難であり, すぐに黒色化してしまった。

最後に, 3 倍濃度で調製されたサスペンション (T) を使用したところ, 休眠芽では 35 個体中 9 個体でブルースポットが確認された (Table 2)。

しかし, ブルースポットは茎頂ドーム上に点在している状態であった。一方, *in vitro* 個体で

Table 2 Transformation experiments in the shoot apex of Japanese cherry. (*in vivo*)

Plasmid DNA	bombardment		conditions	Number of expression/samples	Number of blue spots
	He pressures (kgf/cm ²)	distance (cm)	suspension (μ l \times times)		
pBI221	2	6	8 \times 2(N)	1/21	2 \pm 1
	4	6	8 \times 2(N)	0/70	
	3	4	8 \times 1(T)	9/35	20 \pm 5

Table 3 Transformation experiments in the shoot apex of Japanese cherry. (*in vitro*)

Plasmid DNA	bombardment		conditions	Number of expression/samples	Number of blue spots
	He pressures (kgf/cm ²)	distance (cm)	suspension (μ l \times times)		
pBI221	2	4	4 \times 1 (N)	0/18	
	2	6	4 \times 1 (N)	0/17	
	4	4	4 \times 1 (N)	0/20	
	4	6	4 \times 1 (N)	0/22	
	6	4	4 \times 1 (N)	0/17	
	6	6	4 \times 1 (N)	0/18	
	2	4	8 \times 2 (N)	0/8	
	2	6	8 \times 2 (N)	0/18	
	4	4	8 \times 2 (N)	0/28	
	4	6	8 \times 2 (N)	0/25	
	4	8	8 \times 2 (N)	0/8	
	6	6	8 \times 2 (N)	0/45	
	6	8	8 \times 2 (N)	0/28	
	3	4	8 \times 1 (T)	1/26	2 \pm 1

は26個体中、1個体で、茎頂ドームの全体を覆う状態でブルースポットが確認された (Fig. 1B) (Table 3)。

GUS アッセイの時間設定については、茎頂において GUS アッセイ処理後、2時間おきに観察を行ったが、12時間経過以降に褐変が激しく、ブルースポット数の発現数に、時間の短縮による影響は見られなかったことなどから、茎頂における GUS アッセイの処理時間は、12時間が適当ではないかと考えられる。

また、照射回数において、回数を増すにつれ導入される確率は高まると思われるが、サンプルが受ける影響を考えると、3回以上の照射は適していないと考えられる。

そして、より小さいプラスミドの方が、導入されやすいという傾向もみられる。

今後の展開としては、茎頂のみならず、腋芽や多芽体といった培養系の報告されている組織への導入を試み、そしてパーティクルガンによる形質転換体はキメラ性が高いことから、いかにキメラ性を克服するかが焦点となるであろう。

謝辞 本研究を行うにあたり、供試材料に用いたサクラを分譲していただきました財団法人・日本花の会 結城農場の田中秀明氏に深く感謝致します。

引用文献

- 1) Takeuchi, Y., M. Dotson and N. T. Keen (1992) Plant transformation: a simple particle bombardment device based on flowing helium. *Plant Mol. Biol.* 18: 835-839
- 2) 鳥山欽哉 (1989) イネへの外来遺伝子の導入 組織培養 15(7)16-19

- 3) Jose, L. C. P., A. V. Garcia and L. H. Estrella (1995) Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports* 15: 1-7
- 4) Rochange, F., L. Serrano, C. Marque, C. Teulieres and A. M. Boudet (1995) DNA delivery into *Eucalyptus globulus* zygotic embryos through biolistics: optimization of the biological and physical parameters of bombardment for two different particle guns. *Plant Cell Reports* 14: 674-678
- 5) 島田多喜子, 宅見薫雄 (1994) コシヒカリおよび能登ひかり完熟種子を用いたパーティクルガンによる形質転換体の作出 *育種学雑誌* 44 (別2) 145
- 6) Ritala, A., K. Aspegren, U. Kurten, M. Salmenkallio-Marttila, L. Mannonen (1994) Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. *Plant Mol Biol.* 24: 317-325
- 7) Jae, W. K., T. Minamikawa (1996) Transformation and regeneration of French bean plants by the particle bombardment process. *Plant Science* 117: 131-138
- 8) Finer, J. J. and M. D. McMullen (1990) Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. *Plant Cell Reports* 8: 586-589
- 9) 染郷正孝 サクラの品種について 材木の育種 145: 5-9
- 10) 斎藤弘子, 比留間直也, 秋濱友也 (1994) 多芽体法によるサクラ属・ヤエベニオオシマの大量増殖 *育種学雑誌* 44 (別1) 102
- 11) 南波恵美子, 比留間直也, 秋濱友也, 秋山貴子, 中村規尚 (1993) 多芽体法によるサクラの大量増殖 *園芸学会雑誌* 62 (別1) 452-453
- 12) 比留間直也, 秋濱友也 (1994) サクラ属・センダイヤの茎頂培養と *Agrobacterium* を用いた遺伝子導入 *育種学雑誌* 44 (別1) 100
- 13) 財団法人・日本花の会 日本のサクラの種・品種マニュアル
- 14) Ueno, K., Y. Fukunaga, K. Arisumi (1996) Genetic transformation of *Rhododendron* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 16: 38-41
- 15) Xiaorong, Z., D. W. Urry and H. Daniell (1996) Expression of an environmental friendly synthetic protein-based polymer gene in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Reports*. 16: 174-179
- 16) TOYOBO BIOCHEMICALS FOR LIFE SCIENCE'94 p141
- 17) Murashige, T and Skoog, F. (1962) A Revised medium for rapid grown and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497
- 18) Kosugi, S., Y. Ohashi, K. Nakajima and Y. Arai (1990) An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Science* 70: 133-140