

イネプロトプラストの bar 遺伝子導入及び選抜条件の確立

津川 秀仁・杉本 和彦*・廣近 洋彦*・大槻 義昭*

(青森県グリーンバイオセンター, *農業生物資源研究所)

Transfer of bar-gene to Rice Protoplasts and Establishment of Selection System
Hidehito TSUGAWA, Kazuhiko SUGIMOTO*, Hirohiko HIROCHIKA* and Yoshiaki OTSUKI*
(Aomori Green Biocenter • *National Institute of Agrobiological Resources)

1 はじめに

bar遺伝子は除草剤のピアラホスに対して、耐性を示す遺伝子である。そのため、直接除草剤耐性植物体を作成する²⁾目的のほか、選抜マーカーとしても利用されるようになってきた。イネプロトプラストへのエレクトロポレーションによる遺伝子導入法は、安定的な手法として確立されている。この方法に基づいて、bar遺伝子を導入し、安定した組換え体を作成するため、その選抜方法について検討した。

2 試験方法

エレクトロポレーション法は、大槻¹⁾の方法に準じて実験を行った。組換え体の作出手順は図1に示した。エレクトロポレーションの導入条件は、電界強度1000V/cm、パルス幅1ms、印加回数6回である(日本分光, CET200)。プロトプラストの培地には、コンディショニング培地(アケノホシ細胞をプロトプラスト用培地で4日間、100rpm振とう培養した上澄液。培養時にプロトプラスト用培地と1:1に混合したもの)を使用した。培養10日目に、ピアラホスを含む培地で1カ月間培養し、成長したコロニーを取り出して、PCRによって遺伝子を確認した。

一方、ピアラホスに対する細胞の増殖に関する影響を確

認する実験を行った。

(1) ピアラホスが懸濁培養細胞の増殖に及ぼす影響
液体培地にピアラホスが0, 0.125, 0.25, 0.5, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調整して、懸濁培養細胞1mlを三角フラスコに入れ、2週間振とう培養した。2週間目に細胞を採取して細胞量を測定した。

(2) プロトプラスト培養におけるピアラホス液体選抜培地の効果

bar遺伝子(pINT-bar) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を常法に従い、エレクトロポレーション法によって挿入し、10日間培養した後、ピアラホス2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度に調整した培地(液体選抜培地)で約1ヶ月間培養し、増殖してきたコロニーの形成状況を観察し、PCR法によって遺伝子の確認を行った。

(3) ピアラホス固形選抜培地の効果

bar遺伝子を導入培養し、コロニーを形成させた後、ピアラホス2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度に調整したゲルライト固形培地(固形選抜培地)に移植し、カルス増殖程度を観察した。増殖が旺盛なカルスをPCR法によって遺伝子の確認を行った。

(4) 選抜方法の組合せ

液体選抜培地と固形選抜培地の組合せにより、効率的な培養方法の検討を行った。

3 試験結果及び考察

(1) ピアラホスが懸濁培養細胞の増殖に及ぼす影響
ピアラホスの添加量が増加するにつれ、細胞量は低下する傾向が見られたが、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では、細胞量はほと

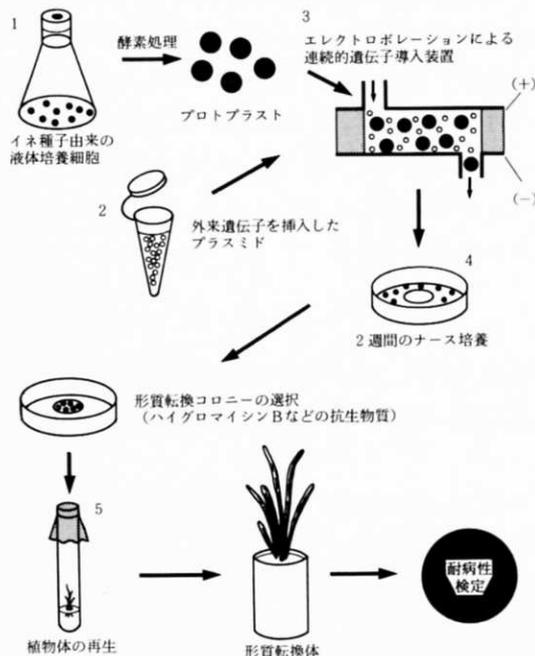


図1 エレクトロポレーション法による組換え体作出法

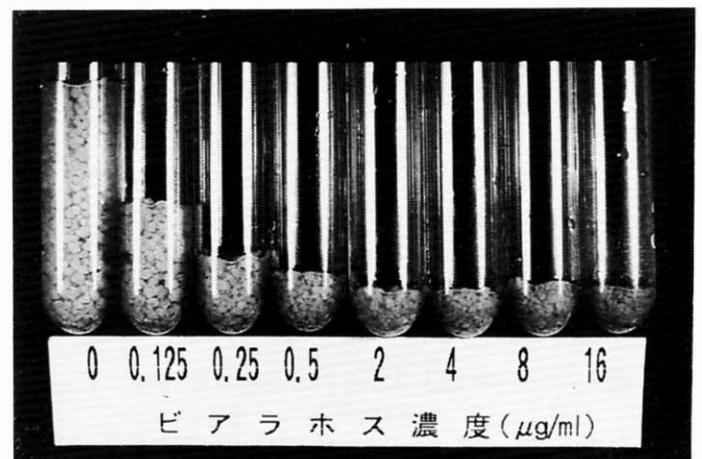


図2 ピアラホスが懸濁培養細胞に及ぼす影響

んど同じであった(図2)。しかし、細胞の色から判断して、完全に枯死しておらず、増殖が停止しているだけのようには思われた。この細胞を、ビアラホス無添加の培地で振とう培養すると再び増殖した。したがって、液体培地中では、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で細胞増殖を抑えることができて、細胞を完全に枯死させることはできないと考えられた。

(2) プロトプラスト培養におけるビアラホス液体選抜培地の効果

pINT-bar $2\mu\text{g}/\text{ml}$ を導入したプロトプラストの培養における選抜培地中では、コロニー形成が無選抜培地と比べて、明らかに形成量と生育量は抑制されていた。選抜培地中で増殖してきたコロニーは1シャーレ当たり、100~300個程度であり、大きめなコロニーをPCR法でチェックしたところ、約半数以上がエスケープであった。

(3) ビアラホス固形選抜培地の効果

ビアラホスを含むカルス増殖培地に遺伝子導入したコロ

ニーを展開したところ、明らかにカルスの増殖に違いが認められた(図3)。増殖したカルスをPCR法によって確認したところ、100%遺伝子が確認された。しかし、コロニー形成時に無選抜培地で培養すると、コロニーが増えすぎるため、選抜効率が低下した。次に、ビアラホス固形培地で、遺伝子導入処理をしないプロトプラスト由来コロニーを展開し、ビアラホス固形培地で培養したところ、すべて細胞が枯死することが確認された(図4)。

以上の結果から、プロトプラスト培養10日目に液体選抜培地(ビアラホス $2\mu\text{g}/\text{ml}$)で1か月間培養し、引き続き固形選抜培地(ビアラホス $2\mu\text{g}/\text{ml}$, ゲルライト)で約2週間培養して大きく成長したカルスを選抜することにより、ほぼ完全に目的遺伝子の入ったカルスだけを取り出すことが可能であると判断された。また、このカルスから再分化した個体について、PCRを行った結果、遺伝子の存在が確認された(図5)。

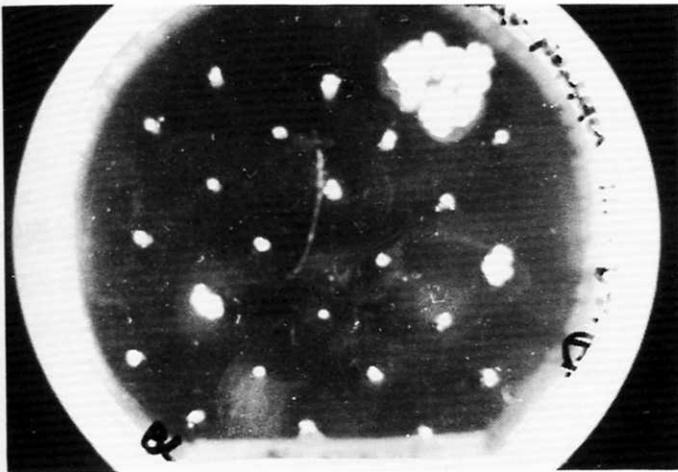


図3 選抜固形培地上でのカルスの増殖

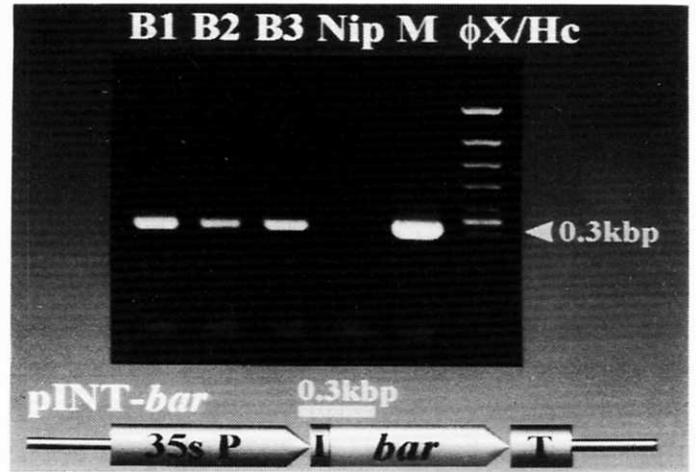


図5 PCR法による遺伝子の確認

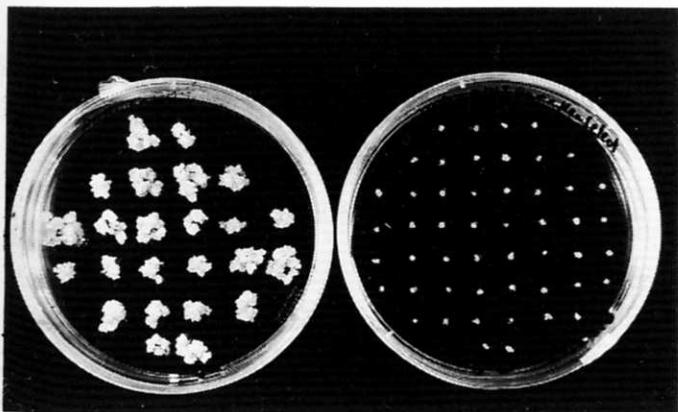


図4 選抜カルス(左)と遺伝子が入っていないカルス(右)のビアラホス固形培地での増殖の違い

引用文献

- 1) 農山漁村文化協会. 1992. 植物の遺伝子組換え技術(2/5). 大槻義昭制作指導. [ビデオテープ].
- 2) Toki, S.; Takamatsu, S.; Nojiri, C.; Ooba, S.; Anzai, H.; Iwata, M.; Christensen, A.H.; Quail, P.Q.; Uchimiya, H. 1992. Expression of a maize ubiquitin gene promoter-bar chimeric gene in transgenic rice plants. Plant Physiol. 100:1503-1507.