

誰でも必ず成功するイネの遺伝子組換え実験法

石 黒 郁 美・富 澤 貴 寿

1. はじめに

遺伝子組換えとは外来遺伝子を染色体に導入することで形質を変化させる技術であり、形質転換とも呼ばれる。除草剤耐性、病害耐性などの農業形質を付与した遺伝子組換え作物 (Genetically Modified Organism ; GMO) の作出だけでなく、作物成分の改変による栄養価の向上を目的とした品種改良や、微生物の代謝経路を利用した物質生産など様々に利用されている。

一方で、遺伝子組換え技術は農業的・工業的利用の他、生物学研究の発展にも大きく貢献してきた。例えば、特定の遺伝子の過剰発現・発現抑制による機能解析、ジーントラップ法・アクチベーションタギング法による遺伝子の探索など多くの実験手法に必須の技術となっている。

植物の研究において遺伝子組換え法には、直接導入法と細菌の感染機構を利用した方法の二つがある。直接導入法では、金やタンゲステンなどの金属粒子にDNA断片をコーティングしたものを弾丸とし、空気圧をかけて高速で射出して細胞内に直接送り込む、パーティクルガン法がよく用いられる。しかし、この方法では動植物問わず多様な種に対して遺伝子導入が行えるメリットがあるものの、目的の遺伝子が複数コピーで入り解析が困難になる、高い技術力が必要になり遺伝子組換え効率が実験者の技術に大きく左右されるといったデメリットがある。そこで開発されたのが細菌の感染機構を利用した方法の一つである、アグロバクテリウム法である。ア

グロバクテリウム法では、細菌の感染が可能な種に限定されるものの、目的遺伝子は少コピー数で導入され、サンプルと実験手法さえ確立されれば比較的实验者の技術の影響を受けずに遺伝子組換え体を得ることができる。シロイヌナズナなどのモデル植物ではアグロバクテリウムによる遺伝子組換え法が確立されているため、多くの研究室で利用されている。

イネにおいてもHieiら (1994) により、アグロバクテリウムによる遺伝子組換え法が確立されて以来、様々な実験方法の改良が行われてきた(Sallaud et al. 2003 ; Toki et al. 2006 ; Nishimura et al. 2006 ; 寺田ら 2005)。これらの手法は直接導入法に比べて実験者の技術に左右されにくく汎用性はあるものの、実験室ごとに培養器や条件が異なるため、実験方法を適宜変更していくことが必要になる。したがって、遺伝子組換え系の確立にはノウハウの蓄積が重要になるが、そのような文献は非常に少なく実験者の主観に委ねられているところが多い。

実際、我々もNishimuraら (2006) に従い7回の遺伝子組換え実験を行ったが、遺伝子組換え体を得ることは出来なかった。そこで、高効率なイネの遺伝子組換え系が確立されている東京大学大学院 農学生命科学研究科 栽培学研究室の経塚淳子准教授、安野奈緒子博士に、実際に実験方法を指導して頂いたところ、2-10%の効率で遺伝子組換え体を得ることができた。さらに条件検討により方法を改良した結果、遺伝子組換え効率を20-30%まで引き上げることに成功した。現在までに木原生物学研究所では4名がイネの遺伝子組換え実験に成功していることから、実験者の技術に左右されないことも確認されており、非常に汎用性の高い遺伝子組換え系を確立することができた。また、この技術を用いることで、3年間で10種類の遺伝子をイネに導入している。

本稿ではアグロバクテリウム法の原理およびイネにおける遺伝子組換え実験法について述べ、特にノウハウの蓄積に貢献するものとする。

2. 原理

アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) は土壌細菌の一種であり、主に双子葉植物に感染し、感染部位にクラウンゴールと呼ばれる腫瘍を形成する。このクラウンゴールはアグロバクテリウムの持つTiプラスミド (Tumor induced plasmid) により誘導される。このTiプラスミド上には病徴発現 (*Vir*) 遺伝子群と宿主に導入されるT-DNA領域が存在する。このT-DNA領域には植物ホルモンであるオーキシシンとサイトカイニン、アミノ酸であるオパインの合成酵素遺伝子がコードされている。オーキシシンは主にセルロースの分解を促すことで細胞の伸長性を増大させ、サイトカイニンは主に細胞分裂を促進させる作用を持つ。また、オパインはアグロバクテリウムのみが代謝できる特殊なアミノ酸である。

アグロバクテリウムなどの細菌が双子葉植物の細胞と接触すると、植物細胞から防御応答の一つとしてフェノール化合物が分泌される。このフェノール化合物に反応してTiプラスミド上の*Vir*遺伝子群の発現が誘導されるとT-DNAが植物細胞に導入され、核内へと移行し最終的には植物の染色体に組み込まれる。これにより、アグロバクテリウム由来の遺伝子が導入された植物細胞は、自身に本来であれば必要のない植物ホルモンやアミノ酸を合成し、アグロバクテリウムの生育環境であるクラウンゴールを形成する。

このような、外来遺伝子を植物細胞の染色体に導入する性質を利用したのがアグロバクテリウムによる遺伝子組換え法である。T-DNA領域からクラウンゴール形成に重要なオーキシシン、サイトカイニン、オパイン合成酵素遺伝子を制限酵素処理により除去し、代わりに目的遺伝子を酵素反応に

より組み込んだプラスミドが用いられる。また近年では、目的遺伝子を持つT-DNA領域と*Vir*遺伝子群がそれぞれ別のプラスミドに分割されたバイナリーベクターシステムが利用されている。

さらにアグロバクテリウムはフェノール化合物を分泌する双子葉植物を宿主とするため、宿主でない単子葉植物においては長らくこの手法を利用することが出来なかった。しかし、最近の研究成果により単子葉植物においてもフェノール化合物として外部からAcetosyringoneを投与し*Vir*遺伝子群の発現を誘導することで、双子葉植物と同様にアグロバクテリウム法による遺伝子組換えが可能になり、この方法は急速に普及してきている。

3. 実験プロトコール

3-1. 試薬

・20×N6 BASAL SALT MIXTURE (79.6mg/ml) …4℃保存

CHU (No) BASAL SALT MIXTURE (PhytoTechnology Laboratories C416)	39.8g
+MilliQ to	500ml

・1000×FeEDTA

(FeSO₄·7H₂O 27.8mg/ml, Na₂EDTA 37.3mg/ml) …遮光・4℃保存

FeIII EDTA (同仁化学E011)	10.53g
+MilliQ to	250ml

・1×MS vitamin …遮光・4℃保存

Murashige and Skoog Vitamin Powder (SIGMA7150)	1瓶
+MilliQ to	100ml

・1×MS …4℃保存

ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (和光純薬 392-00591)	1袋
+MilliQ to	1000ml

・ 5000×2,4-D (20mg/ml) …遮光・4℃保存

2,4-D (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸; 和光純薬 040-18532)	200mg
+DMSO (ジメチルスルホキシド; 和光純薬 043-07216) to	10ml

・ 1000×Claforan (100mg/ml) …遮光・4℃保存

Claforan (sanofi-aventis (旧aventispharma) ODO26A)	0.5g
+滅菌MilliQ to	5ml

* 溶解後、フィルター滅菌

・ 1000×Acetosyringone (200mg/ml) …遮光・4℃保存

3,5-dimethoxy-4-hydroxyacetophenone (ALDRICH D134406)	2g
+DMSO (ジメチルスルホキシド; 和光純薬 043-07216) to	10ml

・ AB salt …オートクレーブ後、室温保存

NH ₄ Cl (和光純薬 017-02995)	5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (和光純薬 131-00405)	1.5g
KCl (nacalai tesque 28514-75)	0.75g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (nacalai tesque 06731-05)	66mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O (和光純薬 094-01082)	12.5mg
+MilliQ to	250ml

・ AB buffer …オートクレーブ後、室温保存

K ₂ HPO ₄ (nacalai tesque 28727-95)	15g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (和光純薬 192-02815)	6.5g
+MilliQ to	250ml

・ Sucrose (nacalai tesque 30404-45)

・ Glucose (nacalai tesque 16806-25)

・ Sorbitol (nacalai tesque 32021-95)

・ Casamino acid (BD 223050)

・ Gellan gum (関東化学 17611-13)

・ Agar powder (和光純薬 010-08725)

・ 50000×NAA (1mg/ml 1-Naphthylacetic acid ; SIGMA N1641)

・ 500×Kinetin (1mg/ml Kinetin solution ; SIGMA K3252)

- ・ 1000×Hygromycin
(50mg/ml Hygromycin B Solution ; 和光純薬 084-07681)
- ・ 1M KOH
- ・ 70%エタノール
- ・ 次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (nacalai tesque 31518-35)
- ・ 滅菌水 (MilliQ)
- ・ 培土 (くみあい粒状培土D ; 全農)

3-2. 器具・装置

- ・ 小型粉すり機 (コメットIII 一穂用もみすり器 ; 藤原製作所)
- ・ チューブ (15ml, 50ml)
- ・ 滅菌シャーレ (直径6, 10cm)
- ・ 滅菌プレート (24穴)
- ・ マジェンタボックス (GA7 ; バイオメディカルサイエンス)
- ・ ディスポカップ (200ml)
- ・ 滅菌濾紙
- ・ ディスポピペット (10ml)

3-3. 方法

3-3-1. イネ完熟種子からのカルス誘導

(1) 2N6 (カルス誘導) 培地の調製

20×CHU (N ₆) BASAL SALT MIXTURE	50ml
1000×FeEDTA	1000 μ l
1000×MS vitamin	1000 μ l
Sucrose	30g
Casamino acid	1g
<hr/>	
+MilliQ to	1000ml

1M KOHによりpH5.6-5.8に合わせ、ジェランガム4gを加える。

- (2) オートクレーブ後、50℃程度まで冷ましてから
5000×2,4-D 200 μ lを加えて攪拌し、20mlずつシャーレに分注する。
- (3) 離水を防止するため、培地は分注後に15分ほど乾かし、
4℃で保存する。2N6培地の使用期限は3ヶ月である。
- (4) 50mlチューブに種皮を剥いだイネ完熟種子を入れ、
70%エタノール 30mlを加えて60秒間洗浄する。
- (5) デカンテーションによりエタノールを除去し、
20%次亜塩素酸ナトリウム水溶液 30mlを加えて1時間振倒滅菌する。
*殺菌操作も種子へのダメージとなり
カルスの増殖などに影響する可能性があるため、時間超過しない。
- (6) 滅菌水を使用し、種子を3回程度洗浄する。
- (7) 余分な水気を切り、2N6培地に9粒ずつ種子を置く。
*種子は等間隔に並べて置き、最大13粒までとする。
- (8) サージカルテープで封をし、明条件・32℃で3-4週間培養する。
*2週間おきに培地を交換する。
*カビが生えていないか常にチェックする。
*カビが生えた場合はプレートごと廃棄する。
*遺伝子組換えには播種後1ヶ月以内のものを使用すると良い。

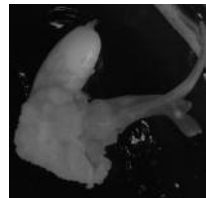
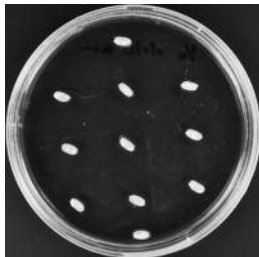


Fig.1 ; 播種後0日目の種子 (左)、明条件誘導のカルス (右)

3-3-2. カルスの前培養

(1) 3-4週間誘導したカルスを種子から外し、新たな2N6培地に移す。

*培地上にポロポロとこぼれてきた鮮やかな黄白色のカルスが良い。

*種子につながった塊状のカルスをつぶして使用することができるが、増殖が遅いため使用しない方が望ましい。

*こげ茶や黒ずんでいるもの、白色のカルスは前培養しない。

*種子が付いたカルスは前培養とは別の2N6培地に移し、再利用する。

(2) サージカルテープで封をし、明条件・32℃で3-7日間培養する。

*前培養期間は最低1日とれば良いが、

カルスは大きい方が増殖しやすいので5日程度が最適である。

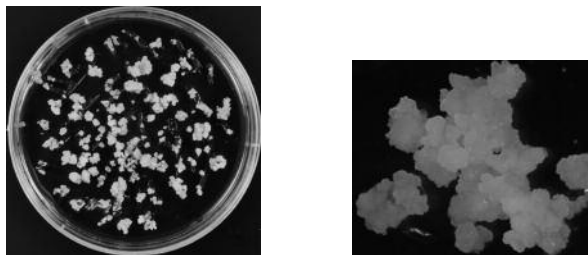


Fig.2 ; 前培養中のカルス (左)、種子を除去し再び増殖させたカルス (右)

3-3-3. アグロバクテリウムの培養

(1) AB (アグロバクテリウム培養) 培地の調製

Glucose	1.25g
Agar powder	3g
<hr/>	
+ MilliQ to	225ml

(2) オートクレーブ後、50℃程度まで冷ましてから

AB salt 12.5ml, AB buffer 12.5ml, 1000×Hygromycin 250 μ lを加えて攪拌し、20mlずつシャーレに分注する。

- (3) 離水を防止するため、培地は分注後に15分ほど乾かし、4℃で保存する。AB培地の使用期限は3ヶ月である。
- (4) グリセロールストックから菌を白金耳で取り、AB培地に画線する。
*菌をAB培地に広げる際、量の勾配を作ると良い。
- (5) サージカルテープで封をし、暗条件・23℃で3-4日間培養する。
*暗条件・28℃, 1-2日間でも良い。
*コロニーが確認できる程度にアグロバクテリウムが増殖していれば良く、増やしすぎないように注意する。

3-3-4. アグロバクテリウムの接種と共培養

- (1) MSL (アグロバクテリウム感染) 培地の調製

1000×MS vitamin	250 μ l
Sucrose	7.5g
<hr/>	
+1×MS to	250ml

1M KOHによりpH5.6-5.8に合わせる。

- (2) オートクレーブ後、室温で保存する。
MSL培地の使用期限は3ヶ月である。

- (3) N6CO (共培養) 培地の調製

20×CHU (N ₆) BASAL SALT MIXTURE	12.5ml
1000×FeEDTA	250 μ l
1000×MS vitamin	250 μ l
Sucrose	7.5g
Glucose	2.5g
<hr/>	
+MilliQ to	250ml

1M KOHによりpH5.6-5.8に合わせ、ジェランガム0.75gを加える。

- (4) オートクレーブ後、50℃程度まで冷ましてから
5000×2,4-D 50 μ l, 1000×Acetosyringone 250 μ lを加えて攪拌し、
20mlずつシャーレに分注する。

- (5) 離水を防止するため、培地は分注後に15分ほど乾かし、
4℃で保存する。N6CO培地の使用期限は1ヶ月である。
- (6) 滅菌シャーレに前培養したカルスを移す。
- (7) MSL培地を15mlチューブに5ml, 滅菌シャーレに1ml分注する。
また、MSL培地を使用して分光光度計の零合わせをしておく。
- (8) ピンセットで剥ぎ取ったアグロバクテリウムをMSL培地 1mlを分注し
たシャーレに入れ、ピペッティングで丁寧に懸濁し、その全量を
MSL培地 5mlの入った15mlチューブに加える。
- (9) 15mlチューブ中のアグロバクテリウム懸濁液 1mlを使って分光光度計
で濃度を測定する。
*測定するときの濃度は $OD_{600}=0.1$ 以下になるように希釈すると良い。
- (10) 終濃度 $OD_{600}=0.01$, 合計20mlになるよう、
濃度決定したアグロバクテリウム懸濁液とMSL培地を
カルスの入ったシャーレに加える。
*終濃度は厳密である必要はなく、 $OD_{600}=0.01$ 以下でも構わない。
- (11) さらに $1000\times$ Acetosyringone 20 μ lを加える。
- (12) 時々ゆすりながら3分間(重要)置く。
- (13) シャーレを斜めにし、アグロバクテリウム懸濁液を
10mlピペットで吸い上げて廃棄する。
*一気に吸いすぎないように注意し、迅速に行う。
- (14) さらに200 μ lピペットマンと滅菌濾紙を利用し、
懸濁液を完全に吸い取る(重要)。
- (15) カルスをN6CO培地に十分に広げて移す。
- (16) サージカルテープで封をし、暗条件・23℃で48時間培養する。
*アグロバクテリウムを増やしすぎないことが重要である。
共培養後、培地が白くなり菌が肉眼で確認された場合は廃棄する。

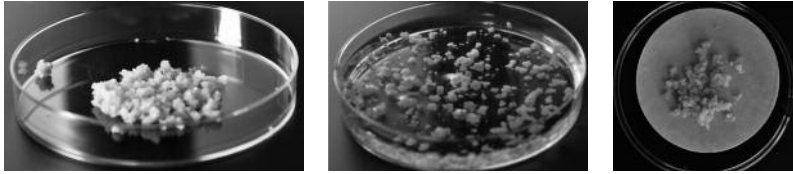


Fig.3 ; 前培養カルス (左)、3分間の感染中 (中央)、カルスからの菌液の除去 (右)

3-3-5. アグロバクテリウムの除菌と一次選抜

(1) N6SE (一次選抜) 培地の調製

20×CHU (N ₆) BASAL SALT MIXTURE	50ml
1000×FeEDTA	1000 μl
1000×MS vitamin	1000 μl
Sucrose	30g
Casamino acid	1g
<hr/>	
+MilliQ to	1000ml

1M KOHによりpH5.6-5.8に合わせ、ジェランガム4gを加える。

(2) オートクレーブ後、50℃程度まで冷ましてから

5000×2,4-D 200 μl, 1000×Claforan 1000 μl, 1000×Hygromycin 1000 μlを加えて攪拌し、20mlずつシャーレに分注する。

(3) 離水を防止するため、培地は分注後に15分ほど乾かし、4℃で保存する。N6SE培地の使用期限は3ヶ月である。

(4) 50mlチューブに滅菌水を30ml程度入れてから、N6CO培地上のカルスを50mlチューブに移す。

*できる限り培地を移さないよう注意する。

*一回に洗浄するカルス量は50mlチューブで5ml分程度。

(5) 20秒程度丁寧に振ってカルスを洗い、水をデカンテーションで捨てる。

(6) (5) の操作を10回繰り返す。

(7) 滅菌水30mlに1000×Claforan 30 μlを加え、(6) 同様カルスを洗浄する。

- (8) 水を半分くらい捨て、残りの水とともにカルスを勢いよく新しいシャーレに移す。
*少量であればチューブの蓋にカルスを取り出しても良い。
- (9) カルスをN6SE培地に9粒ずつ置く。
*カルスは等間隔 (最低1cmずつ空ける) に並べる。
*増殖したカルスが判別しやすいようにカルスの大きさをなるべくそろえて並べる。
*できる限り大きなカルスから優先的に並べる。
直径1mm程度のカルスは選抜段階で枯死するため、N6SE培地には移さない。
- (10) サージカルテープで封をし、暗条件・32℃で3-4週間培養する。
*カルスの成長を早めたい場合は1週間おきに培地替えを行うと良い。
ただし、継代操作がダメージになるため、選抜カルスが小さい場合は成長を待って培地替えを行う。
*培養期間は2-3週間でも遺伝子組換え体を得ることはできる。
*カルス同士の間には仕切りがなく混ざる危険性があるため、シャーレは水平に置くなど扱いに注意する。

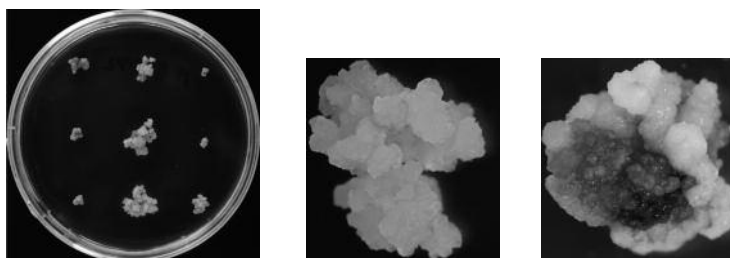


Fig.4 ; 一次選抜中(左)、ハイグロマイシン耐性カルス(中央)、枯死カルス(右)

3-3-6. 二次選抜・再分化培地への継代

(1) ReIII (二次選抜・再分化) 培地の調製

1000×MS vitamin	1000 μ l
Sucrose	30g
Sorbitol	30g
Casamino acid	2g
<hr/>	
+1×MS to	1000ml

1M KOHによりpH5.6-5.8に合わせ、ジェランガム4gを加える。

(2) オートクレーブ後、50℃程度まで冷ましてから

50000×NAA 20 μ l, 500×Kinetin 2000 μ l, 1000×Claforan 1000 μ l, 1000×Hugromycin 1000 μ lを加えて攪拌し、1mlずつ24穴プレートに分注する。

(3) 離水を防止するため、培地は分注後に15分ほど乾かし、パラフィルムで封をして4℃で保存する。ReIII培地の使用期限は3ヶ月である。

(4) N6SE培地で増殖したカルスを、ReIII培地に移す。

*白色でフニャっとしたものや茶色に変色しているカルスは取り除く。

*培地との接地面積を増やすため、1カルスから増殖したカルスを複数
の穴に分けて入れる。

(5) サージカルテープで封をし、明条件・32℃で10日間ほど培養する。

*耐性カルスは明らかに元気に増殖を開始する。

(6) 増殖したカルスを新しいReIII培地に移す。

*白色でフニャっとしたものや茶色に変色しているカルスは取り除く。

(7) サージカルテープで封をし、再び明条件・32℃で1週間ほど培養する。

*導入遺伝子にもよるが、この段階でカルスは再分化を開始し、
緑色になってくる。

*培養条件は明条件16時間、暗条件8時間でも可。

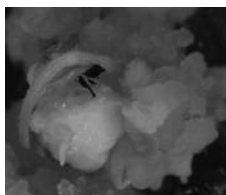


Fig.5 ; シュート原基形成、発根が確認された再分化カルス

3-3-7. ホルモンフリーの再分化培地への継代

(1) MSF (再生) 培地の調製

1000×MS vitamin	1000 μ l
Sucrose	30g
Sorbitol	30g
<hr/>	
+1×MS to	1000ml

1M KOHによりpH5.6-5.8に合わせ、ジェランガム4gを加える。

- (2) オートクレーブ後、6cmシャーレまたはマジエンタボックスに分注する。
6cmシャーレの場合10ml, マジエンタボックスの場合は30mlである。
- (3) 離水を防止するため、培地は分注後に15分ほど乾かし、パラフィルムで封をして4℃で保存する。MSF培地の使用期限は6ヶ月である。
- (4) ReIII培地で増殖したカルスをMSF培地 (6cmシャーレ) に移し、
明条件・32℃で1-2週間培養する。
*再分化していなくても増殖を続けているカルスは移しておく。
*2週間おきに培地を交換する。
- (5) 6cmシャーレの蓋まで届くくらいにシュートが成長したら、
新たなMSF培地 (マジエンタボックス) に移してさらに培養する。

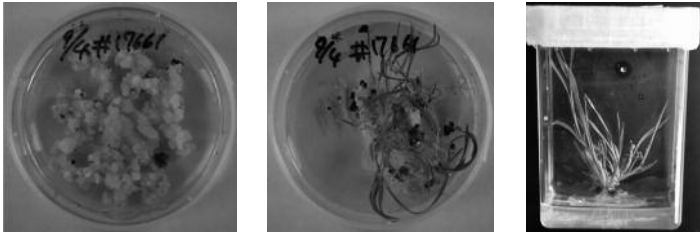


Fig.6: 増殖し続けるカルス (左)、再分化カルス (中央)、再生した個体 (右)

3-3-8. 植物の再生と土への移植

- (1) シュートがマゼンタボックスの蓋に届くくらいになったら、植物体を培地から取り出し、培地を丁寧に洗い流してからデスポカップに入った培土に移す。
- (2) 植物体をビニル袋で覆い、明条件で培養する。
*長日条件でも可能だが、短日が最適である。
- (3) 根がデスポカップの底から見えるくらいになったら少しずつビニル袋の上部を開けていく。
1週間程度でビニル袋を全部開けてしまうくらいのペースとする。
- (4) 植物体が温室の湿度に適応し成長してきたら、ビニル袋を外す。
*ビニル袋が葉に密着していると成長に悪影響があるので、こまめに観察する。
- (5) 根がしっかりと張ってきたら、デスポカップの底に切り込みを入れ、カップごと水を張ったたらいにいれ、種子が登熟するまで育成する。

4. 遺伝子組換えイネによる導入遺伝子の機能解析

遺伝子組換えイネを用いた研究の例として、当研究所で行った、2種のAP2様遺伝子*OsIDS1*および*SNB*の機能解析を紹介する。

被子植物の花器官形成を説明するものとして、ABCモデルが有名である。このABCモデルとは花芽分裂組織 (Floral meristem ; FM) において、がく片、花弁、雄ずい(雄しべ)、心皮(雌しべ)の4つの組織の指定をA, B, Cの3つのクラスに分類される転写因子が制御していると考えられるものである。クラスA遺伝子のみが発現しているWhorl1ではがく片が、クラスA遺伝子とクラスB遺伝子が発現しているWhorl2では花弁が指定される。さらに、クラスB遺伝子とクラスC遺伝子が発現しているWhorl3では雄ずいが、クラスC遺伝子のみが発現しているWhorl4では心皮が指定される (Fig.7)。

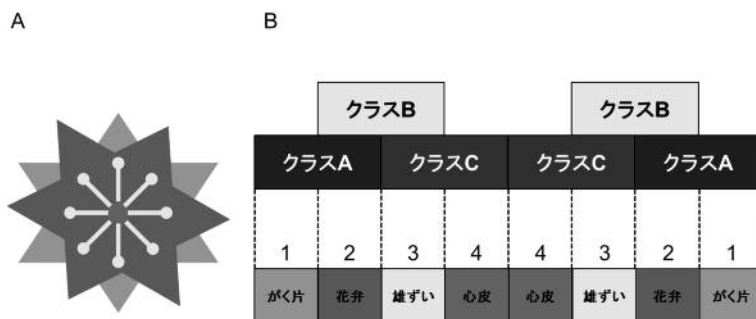


Fig. 7 ; ABCモデル

A) 花器官の模式図

B) ABCモデルの模式図

上段はクラスA遺伝子, クラスB遺伝子, クラスC遺伝子を、下段は上段に示した遺伝子により誘導される花器官を、数字はWhorl名を示す。

このクラスA遺伝子の一つとして、シロイヌナズナでは*APETALA2* (*AP2*) がクローニングされており、機能未同定の*AP2*ドメインを2つ持つことや、花器官形成だけでなく花芽分裂組織の維持にも関与することが報告されている。さらに、ABCモデルに含まれる転写因子のなかでは唯一植物体全身で発現しており、花器官のみでなくクラスC遺伝子に分類される*AGAMOUS*の発現抑制を通して葉などの器官形成にも関与していることが示唆されている (Chen 2004 ; Zhao et al. 2007)。

このように双子葉植物の花器官形成に関与する遺伝子の機能解析は進められているものの、単子葉植物における花器官形成に関しては知見が少ない。単子葉植物であるイネでは、アミノ酸配列相同性から5種類の*AP2*様遺伝子が存在することが示された (Lee et al. 2007 ; Zhu et al. 2009)。この5種*AP2*様遺伝子のうちの一つ、*SUPER NUMERARY BARACT* (*SNB*) では、欠損変異体や*RNAi*による発現抑制系統における表現型解析が行われた。その遺伝子欠損変異体では副護穎の増加や麟皮の異常が観察されたことから*SNB*は小穂から小花形成にかけての器官形成に重要であることや花器官全体の形成に関与することが示唆されている (Lee et al. 2007)。そこで我々は5種の*AP2*様遺伝子のうち機能未同定な*OsIDS1*の機能を解析するため、Fig.8に示したコンストラクトを使用して*RNAi*法により*OsIDS1*と*SNB*の発現を抑制した遺伝子組換えイネを作出し (Table 1)、その形態調査を行った。

短日条件に設定した人工気象機において*OsIDS1*発現抑制系統ではシュート伸長・花器官形成のいずれにおいても、コントロールと比較して大きな違いは見られなかった。一方、*SNB*発現抑制系統では過去の報告と同じ花器官形成の異常に加え、コントロールおよび*OsIDS1*発現抑制系統に比べて草丈が低いことが観察された (Fig.9)。さらに*OsIDS1*と*SNB*の両遺伝子の発現抑制系統は再分化するものの、土への移植後はシュートが伸長せずに

全て枯死した。(1) *OsIDS1*発現抑制系統で表現型への影響が見られなかったこと、(2) *SNB*発現抑制系統では草丈が低かったこと、(3) 両遺伝子の発現抑制系統ではシュートが伸長せず全て枯死したことにより *OsIDS1*と *SNB* 両遺伝子の発現抑制は、より顕著な成長阻害を引き起こすことが示された。

*OsIDS1*はAP2ドメインを持つ転写因子と推定されているが、*OsIDS1*発現抑制系統でも再分化が見られたことから、*OsIDS1*の機能不全を *SNB*が補償しているものと考えられた。一方、*SNB*の発現抑制系統は *OsIDS1*により機能補償されない。このことから *SNB*がイネの成長にメインに働いていることが示唆された。今後はそれぞれの発現抑制系統の種子を使用して各成長器官の発生を調べ、*OsIDS1*の機能解析をさらに進める予定である。

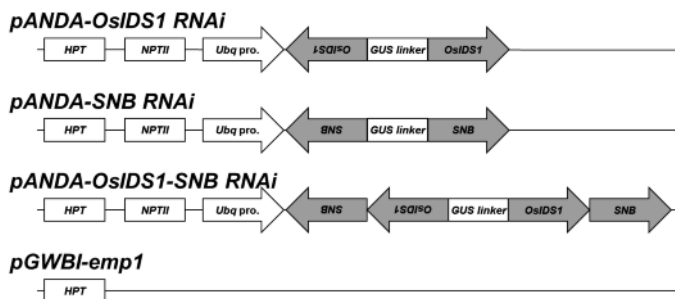


Fig. 8 ; 遺伝子組換え実験に用いた発現抑制用コンストラクト

RNAiコンストラクトとして *pANDA vector* (Miki et al. 2004) を使用した。また、*pGWBI vector* (Nakagawa et al. 2007) はコントロールとして用いた。

Table 1 ; 遺伝子組換え実験の結果

	供試カルス数	再分化個体	再分化効率
<i>pANDA-OsIDS1 RNAi</i>	117	15	26.5 (31/117)
<i>pANDA-SNB RNAi</i>	90	10	18.9 (17/90)
<i>pANDA-OsIDS1-SNB RNAi</i>	126	15	19.0 (24/126)
<i>pGWBI-emp1</i>	122	5	54.9 (67/122)

再分化効率は 緑化した系統 / 一次選抜培地に継代した供試カルス×100で算出した。再分化個体は系統数を、再分化効率の () 内は実測値を示す。また、*pANDA-OsIDS1* 導入系統ではPCRにより目的遺伝子の導入を確認したところ、すべてで導入遺伝子が確認されたため、再分化効率は遺伝子組換え効率と一致する。

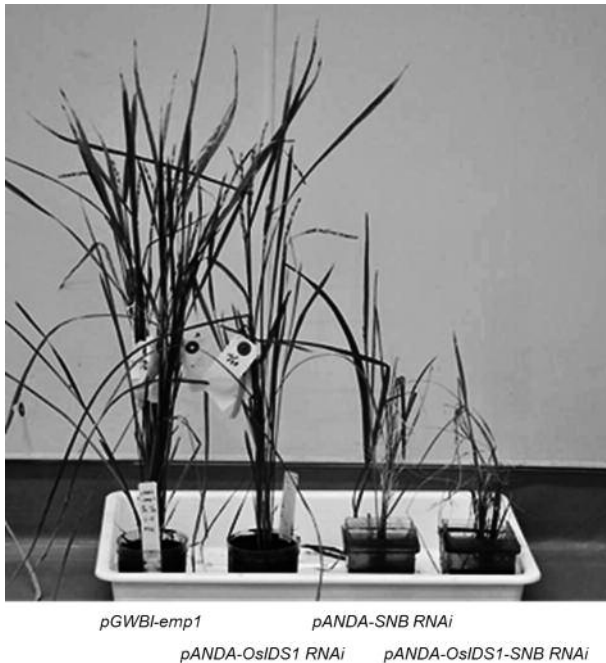


Fig.9 ; 草丈の比較

左から *pGWBI-emp1*, *pANDA-OsIDS1 RNAi*, *pANDA-SNB RNAi*, *pANDA-OsIDS1-SNB RNAi* の遺伝子組換え体各1系統を並べてある。

謝辞

本研究に際し、高効率なイネ遺伝子組換え法に関して指導して頂いた東京大学大学院 農学生命科学研究科 栽培学研究室の経塚淳子准教授、安野奈緒子博士に心から御礼申し上げます。

さらに、本研究を進めるにあたり、直接御指導頂きました一色正之准教授に厚く御礼申し上げます。このような充実した研究を行えたのも一色先生の御指導のおかげであり、深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Chen X. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis*. *Science*. 303. 2022-2025 (2004).
2. Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*. 6. 271-282 (1994).
3. Lee DY, Lee J, Moon S, Park SY, An G. The rice heterochronic gene *SUPER NUMERARY BRACT* regulates the transition from spikelet meristem to floral meristem. *Plant J*. 49. 64-78 (2007).
4. Miki D, Shimamoto K. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiol*. 45. 490-495 (2004).
5. Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci Bioeng*. 104. 34-41 (2007).
6. Nishimura A, Aichi I, Matsuoka M. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Nature protocol* 1. 2796-2802 (2006).
7. Sallaud C, Meynard D, van Boxtel J, Gay C, Bès M, Brizard JP, Larmande P, Ortega D, Raynal M, Portefaix M, Ouwerkerk PB, Rueb S, Delseny M, Guiderdoni E. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor Appl Genet*. 106. 1396-408 (2003).
8. Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, Tanaka H. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J*. 47. 969-976 (2006).
9. Zhao L, Kim Y, T. Dinh T, Chen X. *miR172* regulates stem cell fate and defines the inner boundary of *APETALA3* and *PISTILLATA* expression domain in *Arabidopsis* floral meristems. *Plant J*. 51. 840-849 (2007).
10. Zhu QH, Upadhyaya NM, Gubler F, Helliwell CA. Over-expression of *miR172* causes loss of spikelet determinacy and floral organ abnormalities in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biol*. 17. (2009).
11. 寺田理枝. イネのアグロバクテリウムによる形質転換法. 改訂3版 モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編. 139-144.