



遺伝子工学的手法を用いた牧草への家畜免疫増強因子(サイトカイン)の導入

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2012-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 明石, 良 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10458/4248

遺伝子工学的手法を用いた牧草への 家畜免疫増強因子（サイトカイン）の導入

（研究課題番号：13660270）

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(1)）
研究成果報告書

平成 16 年 3 月

代表者：明 石 良
（宮崎大学農学部助教授）

I はしがき

わが国の畜産は輸入飼料依存型に偏重しているため、糞尿処理の環境問題、輸入飼料による伝染性病害伝搬、食料自給率低下などの問題が生じており、今後、自給飼料を大幅に増産する必要性が強く指摘されている。これを推進するための研究サイドとして、画期的な高品質でかつ高機能牧草の新品種を開発することが挙げられる。

これまで飼料作物の育種は、多収性を最重要育種目標として掲げ、集団選抜法を主流とした技術により進められてきた。しかしながら、暖地型イネ科牧草のように乾物生産性は優れているものの、家畜による利用性に問題がある草種では、飼料作物としての高品質化を今後の育種目標として取り上げなければならず、そのためには品質と密接に関係する遺伝力の高い形態形質を指標として、効率的で簡易な選抜を行う育種操作が必要となる。ところが、暖地型イネ科牧草には、無性生殖によって胚嚢の中で体細胞起源の胚を形成する単為生殖（アポミクシス）性草種や栄養繁殖系草種が多く、遺伝的変異が少なく、新品種を作出するためには従来の交雑育種法あるいは選抜育種法では十分に対応することはできない。そこで、これらの育種障害を克服し、暖地型イネ科牧草の品質向上を目的とした育種を展開するためには、バイオテクノロジー的手法、特に遺伝子組換え技術による育種法の構築が望まれる。

遺伝子組換え技術を利用した育種を展開する上で最も重要な技術は、(1) 組織培養法の確立、(2) 遺伝子組換え法の確立、および、(3) 有用な遺伝子の単離である。しかしながら、現実的にはそれらの各段階は、どれをとっても今のところ決して容易なものではなく、また、暖地型イネ科牧草における組織培養法および遺伝子組換え法の確立に関する報告は、寒地型イネ科牧草のそれに比べ少ない。このような状況の中で、近年、様々な遺伝子組換え技術が発達しており、プロトプラスト培養を必要とせず、カルスや懸濁培養細胞もしくは未熟胚および完熟胚などの組織に外来遺伝子を導入するパーティクルガン法が開発され、その成功例が相

次いで報告されている。また、イネを中心として、これまで不可能であったアグロバクテリウム法による形質転換も行うことが可能となった。したがって、形質転換に利用可能なカルスおよび培養細胞を安定的に供給できる培養系が、遺伝子組換え法による分子育種的展開の第一歩であると言っても過言ではない（明石ら，2003）。

一方、遺伝子レベルでの研究は分子育種学的研究が急速に進展し、植物における遺伝子地図の作成、遺伝子単離とその機能解明および形質転換による遺伝子導入などの研究成果が相次いで報告されている。また、消化性向上に関与するリグニンの生合成遺伝子や免疫増強を強化するサイトカイン遺伝子などに関する分子生物学的研究も進められており、世界的にみて分子育種学的研究が遅れている牧草にこれらの研究成果を活用すれば、画期的な高品質・高機能性飼料作物を開発できる可能性は高い（明石ら，2003）。

本研究は、家畜の健康増進や抗病性を向上させるサイトカインや抗菌ペプチドを牧草へ導入し、家畜免疫増強因子を付与した牧草を育成することを目標として、特に暖地型イネ科牧草における遺伝子組換え技術の基本的操作である組織および細胞培養法とそれに基づいた遺伝子組換え技術の確立に至る一連の操作法について検討したものである。

II 研究組織

研究代表者：明石 良

(宮崎大学農学部・助教授)

III 研究経費

平成13年度	1,500千円
平成14年度	1,400千円
平成15年度	700千円
<hr/>	
計	3,600千円

IV 研究発表

(1) 学会誌等

1. Akashi R., T. Uchiyama, A. Sakamoto, O. Kawamura and F. Hoffmann (1998) High-frequency embryogenesis from cotyledons of bird's-foot trefoil *Lotus corniculatus* and its effective utilization in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *J. Plant Physiol.*, 152: (1) 84-91.
2. Akashi R., S.-S Hoffmann-Tsay and F. Hoffmann (1998) Selection of a super-growing legume root culture that permits controlled switching between root cloning and direct embryogenesis. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 758-764.
3. Akashi R., S. Harris, S.-S Hoffmann-Tsay and F. Hoffmann (2000) Plants from protoplasts isolated from a long-term root culture (Super Root) of *Lotus corniculatus*. *J. Plant Physiol.*, 157: 215-221.
4. Akashi R., C. Yuge, T. Gondo, O. Kawamura and F. Hoffmann (2002) Bialaphos-resistant Cells of Dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.) through Particle Bombardment with a Simple Self-built Inflow Gun, *Grassland Science* 47: 588-593.
5. 権藤崇裕・石井由紀子・明石 良・川村 修 (2003) バヒアグラス(*Paspalum notatum* Flugge)における効率的な種子由来エンブリオジェニックカルス誘導法とパーティクルガンによる形質転換条件の検討. *日本草地学会誌* 49: 33-37.
6. 明石 良・権藤崇裕・川村 修 (2003) バイオテクノロジーを利用した暖地型イネ科牧草の育種. *日本草地学会誌* 49: 79-87.
7. Akashi R., T. Kawano, M. Hashiguchi, Y. Kutsuna, S.-S Hoffmann-Tsay and F. Hoffmann (2003) Super roots in *Lotus corniculatus*: a unique tissue culture and regeneration system

in a legume species. *Plant and Soil* 255: 27-33.

8. 河野朋恵・明石 良 (2003) マメ科植物におけるスーパールート. 根の研究 12: 3-8.

(2) 口頭発表

1. 権藤崇裕・明石 良・川村 修: 種々の培養処理が GUS 発現に及ぼす影響. -パーティクルガン法を用いた暖地型イネ科牧草の形質転換系確立-. 日本草地学会大会第 55 回発表会 (2000 年 7 月 21 日)
2. 河野朋恵・明石良・川村修: パーズフットトレフォイル由来スーパールートのキチナーゼ分泌機構について-バイオテクノロジーによる牧草の機能性開発に向けて-. 日本草地学会第 55 回発表会 (2000 年 7 月 21 日)
3. Kawano T., Y. Miyamoto, R. Akashi and F. Hoffmann: Super root cultures of *Lotus corniculatus* maintain low internal chitinase concentrations through vast excretion of this protein. Second Int. Symposium Molecular Breeding of Forage Crops, Lone and Hamilton. (2000 年 11 月 19 日)
4. Akashi, R., S. Harris, M. Hashiguchi, S.-S. Hoffmann-Tsay, and F. Hoffmann: Plants from protoplasts isolated from a long-term root culture (super root) of *Lotus corniculatus*. Second Int. Symposium Molecular Breeding of Forage Crops, Lone and Hamilton. (2000 年 11 月 19 日)
5. Gondo T., R. Akashi and O. Kawamura: Particle bombardment of embryogenic callus of bahiagrass (*Paspalum notatum*) and selection of bialaphos-resistant callus. Second Int. Symposium Molecular Breeding of Forage Crops, Lone and Hamilton. (2000 年 11 月 19 日)
6. Akashi R., T. Kawano, S.-S. Hoffmann-Tsay, and F. Hoffmann: Super-roots in *Lotus corniculatus*: A unique culture and regeneration system in a legume species. Proc. of the 6th Symposium of the International Society of Root Research, Nagoya (2001 年 11 月 11 日)
7. Gondo T., R. Akashi, O. Kwamura and F. Hoffmann: Stable transformation of bahiagrass (*Paspalum notatum*) by particle bombardment. Proc. of the 10th IAPTC&B Congress, Florida. (2002 年 6 月 23 日)
8. Akashi R., T. Kawano, M. Hashiguchi, Y. Kutsuna, S.-S Hoffmann-Tsay and F. Hoffmann: Super roots in *Lotus corniculatus*: a unique tissue culture and regeneration system. Proc. of the 10th IAPTC&B Congress, Florida. (2002 年 6 月 23 日)

9. Hashiguchi M., T. Kawano, R. Akashi, S.-S Hoffmann-Tsay and F. Hoffmann: High-frequency plant regeneration from long term root culture (super roots) in *Lotus corniculatus*. Proc. of the 10th IAPTC&B Congress, Florida. (2002年6月23日)
10. Kutsuna Y., M. Hashiguchi, R. Akashi, S.-S Hoffmann-Tsay and F. Hoffmann: *Agrobacterium*-mediated transformation of super roots in *Lotus corniculatus*. Proc. of the 10th IAPTC&B Congress, Florida. (2002年6月23日)
11. 久網泰代・橋口正嗣・明石 良：西洋ミヤコグサ由来スーパールートにおける形質転換. 植物微生物研究会第12回研究交流会 (2002年10月11日)
12. Gondo T., R. Akashi. O. Kawamura and F. Hoffmann: Stable transformation of bahiagrass (*Paspalum notatum*) by particle inflow gun of seed-derived highly regenerative embryogenic callus and inheritance of transgenes expression. Third Int. Symposium Molecular Breeding of Forage and Turf, Dallas and Ardmore. (2003年5月18日)
13. 権藤崇裕・明石 良：バヒアグラス遺伝子組換え体における導入遺伝子の発現解析. 日本育種学会第104回講演会 (2003年9月19日)
14. 橋口正嗣・河野朋恵・明石良：ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) における *in vitro* 根粒菌感染法. 日本草地学会第57回発表会 (2002年9月21日)
15. 河野朋恵・橋口正嗣・鳥居絵理・新美光弘・明石良・川村修：バズフットトレフォイル由来スーパールートにおける窒素固定能とその地上部の飼料成分について. 日本草地学会第57回発表会 (2002年9月21日)
16. 久網泰代・橋口正嗣・明石良：アグロバクテリウム法を用いたバズフットトレフォイル由来スーパールートの形質転換. 日本草地学会第57回発表会 (2002年9月21日)
17. 権藤崇裕・明石良・川村修：パーティクルガン法を用いたバヒアグラスの形質転換体作出－暖地型イネ科牧草の形質転換系確立－. 日本草地学会第57回発表会 (2002年9月21日)
18. 松元潤・権藤崇裕・明石良・川村修：ローズグラスにおける体細胞不定胚および多芽体の誘導. 日本草地学会第57回発表会 (2002年9月21日)
19. 松元潤・権藤崇裕・明石良：ローズグラス (*Chloris gayana*) における遺伝子組換え体の作出. 日本草地学会第59回発表会 (2004年3月26日)
20. 権藤崇裕・山川一富・明石良・川村修：バヒアグラスの組織培養における硫酸銅添加培地での連続的な不定胚形成. 日本草地学会第59回発表会 (2004年3月26日)

V 研究成果

1. バヒアグラスにおける遺伝子組換え系の確立

バヒアグラスは、南米原産の暖地型イネ科牧草で、耐寒性が強く、耐踏圧性、耐旱性も強い。また、草型はほふく性で地下茎により広がり、密な草地を作ることから、西南暖地の低標高地帯では最も重要な放牧用草種として、さらに、深根性で土壌表面を密に被覆することから緑地としても利用されている。

本研究は、遺伝子組換えを用いてバヒアグラスの消化性を改善するために、その基本技術である遺伝子組換え法を確立するものである。

<材料および方法>

植物材料はバヒアグラス（品種 Pensacola）を用い、先の報告（権藤ら，1998）に準じてカルスは種子から誘導した。誘導開始 60 日後、旺盛に生長したカルスは、2,4-D, BAP, CuSO₄ を組み合わせて添加した MS 固形培地に移植し、14 日間隔で同新鮮培地に継代し維持すると共に、カルス増殖量および再分化率について調査した。一方、パーティクルガン処理は、2.0mg/L 2,4-D, 0.1mg/L BAP, 50mM CuSO₄ を添加した MS 固形培地（DBC 培地）で2回の継代培養（計 28 日）以後の旺盛に生長したカルスを浸透圧処理し、プラスミド pDBI を用いて、前報と同様な導入条件で行った（権藤ら，1998）。

形質転換カルスの選抜は、ガン処理後 3 日間ピアラホス無添加の DBC 培地でカルスを増殖させた後、3.0mg/L ピアラホス添加の DBC 培地に 14 日間隔で継代培養することにより行った。その後、得られた形質転換カルスは 3.0mg/L ピアラホス添加再分化培地でシュートの再生を促した。再分化した植物体における導入遺伝子の確認は、10.0mg/L ピアラホス添加のホルモンフリー-1/2MS 寒天培地で発根した植物体について PCR 法を用いて行った。なお、本実験

における培養温度および条件は、カルス誘導では 27℃・暗所で、DBC 培地での継代培養と形質転換カルスの選抜では 31℃・明所で行った。

<結果および考察>

図 1 は、異なる培養温度および培地組成がカルスの増殖量に及ぼす影響について調査した結果をまとめたものである。バヒアグラスにおけるカルス増殖量は培地組成に関わらず 31℃で高い傾向を示し、最も旺盛な培養条件は、31℃の DBC 培地であった。

表 1 は、ホルモンおよび CuSO₄ 濃度がカルスの再分化に及ぼす影響について示したものである。2.0 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BAP, 50mM CuSO₄ の培地組成が再分化カルス数、再分化植物体数およびカルス当たりの再分化植物体数の全てにおいて、最も高く、カルス当たりの再分化植物体数は 7.9 であった。

表 2 は、培養培地がガン処理後のカルスにおけるトランジェント GUS 発現に及ぼす影響についてまとめたものである。DBC 培地で培養したカルスでは、1 ショット当たりのガン処理カルス数は少ないものの、その GUS 発現数は平均 896 で、D 培地の平均 343 に比べ高い値を示した。また、カルス当たりの GUS 発現数は平均 36 でその発現強度も高いものであった (図 2-a)。ガン処理後、DBC 培地で 3 日間増殖させたカルスは、それぞれ濃度の異なるピアラホス添加 DBC 培地で継代培養を行った。選抜培養 50~60 日後、褐色を呈したカルスの一部からピアラホス耐性カルスが増殖し (図 2-b)、これらのカルスの多くが GUS 発現を示した (図 2-c)。

表 3 は、ピアラホス選抜濃度が形質転換効率に及ぼす影響についてまとめたものである。形質転換カルスは、全てのピアラホス選抜濃度で認められ、その効率は 3.0mg/L ピアラホス添加培地で 2.2%と最も高い値であった。その後、得られた形質転換カルスから多くの緑色植物体が再生し (図 2-d)、その再分化個体の約半数が 10.0mg/L ピアラホス添加のホルモンフリ

ー1/2MS 寒天培地で発根した。発根した植物体は、導入遺伝子の確認のために PCR 法で GUS 遺伝子の確認を行ったところ、その約 40%にあたる 39 個体が形質転換体であった (図 3)。

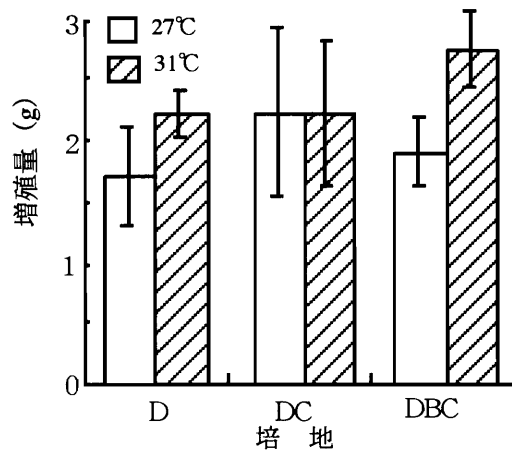


図 1. 異なる培養温度および培地組成がカルスの増殖量に及ぼす影響

D培地: MS+2mg/L 2,4-D+0mg/L BAP+0.1μM CuSO₄
 DC培地: MS+2mg/L 2,4-D+0mg/L BAP+50μM CuSO₄
 DBC培地: MS+2mg/L 2,4-D+0.1mg/L BAP+50μM CuSO₄

表 1. ホルモンおよびCuSO₄濃度がカルスの再分化に及ぼす影響

ホルモン濃度 (mg/L)		CuSO ₄ (μM)	供試カルス数*	再分化カルス数(%)	再分化植物体数	植物体数/カルス
2,4-D	BAP					
2.0	0	0.1	63	23 (36.5)	40	1.7
2.0	0	50	63	49 (77.8)	285	5.8
2.0	0.1	0.1	63	19 (30.2)	50	2.6
2.0	0.1	5.0	63	45 (71.4)	155	3.4
2.0	0.1	50	63	54 (85.4)	425	7.9

* 31°C、明条件下で28日間培養したカルス

表 2. 培養培地がカルスのトランジェントGUS発現に及ぼす影響

培養培地	ガン処理カルス数*	GUS発現数*	GUS発現カルス数(%)*	カルス当たりのGUS発現数
D	40	343	33 (82.5)	10
DBC	26	896	25 (96.2)	36

* 4ショット当たりの平均値

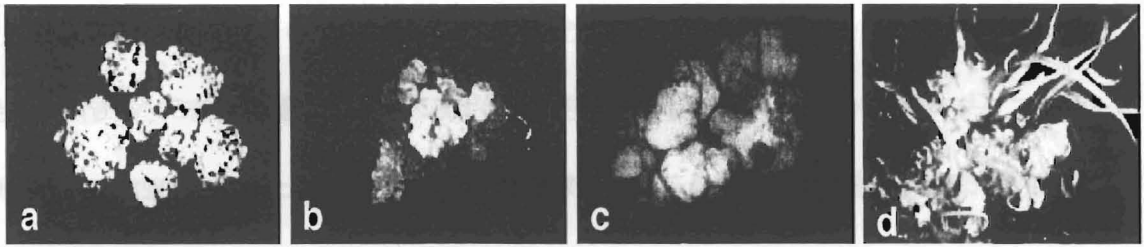


図2 パヒアグラスにおける形質転換体作出

- a) ガン処理後のトランジェント GUS 発現, b) 選抜培地上で増殖したピアラホス耐性カルス,
c) ピアラホス耐性カルスの GUS 発現, d) 形質転換カルスの植物体再分化

表3. ピアラホス選抜濃度が形質転換効率に及ぼす影響

ピアラホス選抜濃度 (mg/L)	ガン処理カルス数	GUS発現を示す耐性カルス数 (%)	再分化植物体数	発根植物体数 (%)	PCR GUS+植物体数 (%)
3.0	360	8 (2.2)	135	52 (38.5)	22 (42.3)
5.0	360	6 (1.7)	82	42 (51.2)	15 (35.7)
10.0	360	1 (0.3)	16	6 (37.5)	2 (33.3)

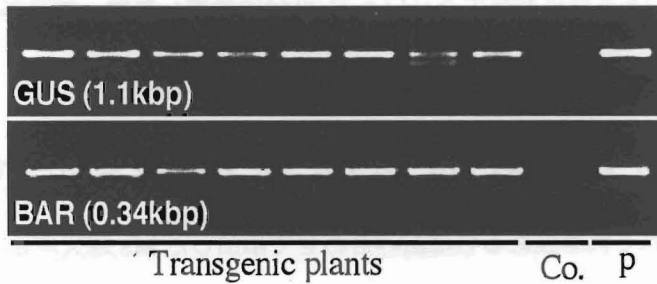


図3. 形質転換体におけるPCRによる導入遺伝子の確認

2. ローズグラスにおける遺伝子組換え系の確立

ローズグラスは、暖地型牧草の中ではわが国で最も広く栽培されているものの、生育適温が高いため、沖縄、南西諸島などの無霜地帯では多年生草種として、関東以西の降霜地帯では1年生夏作用草種として利用されている。しかしながら、1年利用の地域では1番草や晩秋の収量が低く、また、多年利用の地域では秋から春にかけての収量が十分でないという問題点がある。

本研究は、遺伝子組換え技術を用いて上記の問題点を克服するために、エンブリオジェニックカルスおよび多芽体カルスの効率的な誘導法と植物体再分化について検討し、効率的で安定的な培養系の確立したものである。

<材料および方法>

多芽体誘導の供試材料は、ローズグラスの品種「カタンボラ」の種子を用い、70%エタノールで1分、2%次亜塩素酸ナトリウムで20分間滅菌した後、滅菌水で3回洗浄し、実験に供した。エンブリオジェニックカルスは、異なる濃度の2,4-D (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0mg/L), ピクロラム (2.0, 5.0, 10.0mg/L), BAP (0, 0.1, 0.5, 1.0mg/L) およびカイネチン (0, 0.1, 0.5, 1.0mg/L) をそれぞれ単独あるいは組み合わせて添加したMS寒天培地 (0.3% Gellan Gum) で誘導した。一方、多芽体カルスは、2,4-D (0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0mg/L) および2.0mg/L BAP を組み合わせて添加したMS寒天培地で形成させた。また、植物体再分化は0.01mg/L NAA, 2.0mg/L BAP, 1.0mg/L カイネチンおよび1.0mg/L GA₃をそれぞれ単独あるいは組み合わせて添加したMS寒天培地で促した。

遺伝子組換えはエンブリオジェニックカルスおよび多芽体カルスの両カルスを用いて行った。両カルスへの遺伝子導入は、ユビキチンプロモーターにそれぞれ連結したピアラホ

ス耐性遺伝子 (*bar*) と GUS 遺伝子を有するプラスミド pAHC25 を用い、パーティクルガン法により行った。ガン処理条件は、ヘリウムガス圧 5.0kg/cm^2 、ターゲットディスタンス 9.6cm 、チャンバー内圧 0.1Mpa とし、1 シャーレ当たり 1 ショットとした。浸透圧処理は標的細胞を等濃度のマンニトールおよびソルビトール (終濃度が $0\text{-}1.5\text{M}$) を含む MS 固形培地 (2.0mg/L 2,4-D または 0.1mg/L 2,4-D, 2.0mg/L BAP) でガン処理前 4 時間、ガン処理後 16 時間行った。遺伝子導入効率、ガン処理 16 時間後、Jefferson らの方法により (権藤ら, 2003), GUS 遺伝子を一過的に発現させ、青色に発現する細胞数を測定することにより算出した。形質転換カルスの選抜は、ガン処理後 0-30 日間ピアラホス無添加の MS 固形培地 (0.1mg/L 2,4-D, 2.0mg/L BAP) でカルスを増殖させた後、 3.0mg/L ピアラホス添加の MS 固形培地 (0.1mg/L 2,4-D, 2.0mg/L BAP) に 30 日間隔で継代培養することにより行った。その後、得られた形質転換カルスは 3.0mg/L ピアラホス添加再分化培地でシュートの再生を促した。再分化した植物体における導入遺伝子の確認は、 10.0mg/L ピアラホス添加のホルモンフリー $1/2\text{MS}$ 寒天培地で発根した植物体について PCR 法を用いて行った。

<結果および考察>

表 1 は、オーキシンの種類およびその濃度がエンブリオジェニックカルス形成に及ぼす影響について示したものである。エンブリオジェニックカルス形成率は、2,4-D 添加区がピクロラム添加区に比べ高い値を示した。表 2 は、2,4-D, BAP およびカイネチンがエンブリオジェニックカルス形成に及ぼす影響についてまとめたものである。エンブリオジェニックカルス形成率は、 2.0mg/L 2,4-D 添加区において最も高い値 (29.5%) を示した。表 3 は、2,4-D および BAP 濃度が多芽体カルス形成に及ぼす影響についてとりまとめたものである。多芽体カルス形成率は、 0.1mg/L 2,4-D と 2.0mg/L BAP 添加区において最も高く、その値は 15.0% であった。

表 4 は、NAA, BAP, カイネチンおよびジベレリンがエンブリオジェニックカルスからの植物体再分化に及ぼす影響についての結果である。植物体再分化率は、ホルモン無添加培地において最も高く、その値は 83.3%であった。表 5 は、NAA および BAP が多芽体カルスからの植物体再分化に及ぼす影響について示したもので、植物体再分化率は、ホルモン無添加区での暗培養条件下で最も高い値だった。しかしながら、これらの植物体は、暗培養条件下で形成した後に、明培養条件下に移すことで、この生長を大いに促すことができた (図 1)。

表 6 は、ガン処理に用いた組織培養が GUS 遺伝子発現に及ぼす影響について調査したものである。その結果、多芽体カルスにおいて多くの GUS 遺伝子スポット数が認められ、また、その発現強度も高いものであった。一方、浸透圧濃度および培養日数がトランジェント GUS 発現に及ぼす影響について調査したところ、GUS 遺伝子発現数は浸透圧濃度が高くなるにつれ増加する傾向にあり、7 日目の多芽体カルスにおいて高い GUS 遺伝子導入率が認められた (図 2-a,b)。また、効率よく形質転換体を得るために選抜マーカーであるピアラホスにおける最適濃度について検討を行ったところ、3.0-5.0mg/L ピアラホス添加区において十分な生長阻害が認められた。

表 7 は、無選抜培養期間が形質転換効率に及ぼす影響についてまとめたものである。形質転換効率は 15 日間の無選抜培養を行った試験区において最も高く、その値は 1.6%であった。

得られた形質転換多芽体カルスと再分化植物体は (図 2-c,d)、ゲノムを抽出し、PCR 法による導入遺伝子の確認を行ったところ、*bar* 遺伝子 (402bp) および GUS 遺伝子 (1.1kb) が導入したプラスミドと同様のサイズに増幅したバンドを検出し、遺伝子組換え体であることが確認された。また、形質転換体の葉における GUS 遺伝子の発現は葉脈に沿って認められた (図 2-e,f)。

表1 異なるオーキシシン類およびその濃度がエンブリオジェニックカルス形成に及ぼす影響

ホルモン濃度 (mg/L)		供試種子数	カルス形成数 (%)	エンブリオジェニックカルス形成数 (%)
2,4-D	BAP			
a: 2,4-D				
0.5		85	84 (98.9)	0 (0.0)
1.0		79	78 (98.7)	5 (6.3)
2.0		88	86 (97.7)	26 (29.5)
5.0		98	92 (93.9)	7 (7.1)
10.0		87	81 (93.1)	6 (6.9)
b: Picloram				
	2.0	71	71 (100.0)	0 (0.0)
	5.0	63	63 (100.0)	0 (0.0)
	10.0	83	82 (98.8)	0 (0.0)

表2 2,4-D, BAPおよびKinetin濃度がエンブリオジェニックカルス形成に及ぼす影響

ホルモン濃度 (mg/L)			供試種子数	カルス形成数 (%)	エンブリオジェニックカルス形成数 (%)
2,4-D	BAP	Kinetin			
2.0	0.0	0.0	88	86 (97.7)	26 (29.5)
2.0	0.1	0.0	78	73 (93.6)	3 (3.8)
2.0	0.5	0.0	76	71 (93.4)	4 (5.3)
2.0	1.0	0.0	81	75 (92.6)	6 (7.4)
2.0	0.0	0.1	66	62 (93.9)	1 (1.5)
2.0	0.0	0.5	70	67 (95.7)	3 (4.3)
2.0	0.0	1.0	62	57 (91.9)	8 (12.9)

表3 2,4-D および BAP 濃度が多芽体カルス形成に及ぼす影響

ホルモン濃度 (mg/L)		供試種子数	多芽体カルス形成数 (%)
2,4-D	BAP		
0.0	2.0	81	0 (0.0)
0.1	2.0	80	12 (15.0)
0.5	2.0	70	0 (0.0)
1.0	2.0	83	0 (0.0)
2.0	2.0	62	0 (0.0)

表4 NAA, BAP, Kinetin および GA₃ 濃度が植物体再分化に及ぼす影響

ホルモン濃度 (mg/L)				供試 カルス数	再分化 カルス数 (%)	生長量 ¹⁾
NAA	BAP	Kinetin	GA ₃			
0.0	0.0	0.0	0.0	42	35 (83.3)	++
0.01	2.0	0.0	0.0	42	32 (76.2)	+++
0.0	0.0	1.0	1.0	38	16 (42.1)	+
0.0	0.0	0.0	1.0	34	16 (47.1)	+

¹⁾ + : 若干, ++ : 中庸, +++ : 旺盛

表5. NAAおよびBAP濃度が多芽体カルスからの再分化に及ぼす影響

ホルモン濃度 (mg/L)		培養 条件	供試多芽体 カルス数	再分化 カルス数 (%)	生長量 ¹⁾
NAA	BAP				
0.0	0.0	暗	48	48 (100.0)	+++
0.0	0.0	明	41	38 (92.7)	++
0.0	2.0	明	40	35 (87.5)	+++
0.01	2.0	明	35	26 (74.3)	++

¹⁾ + : 若干, ++ : 中庸, +++ : 旺盛

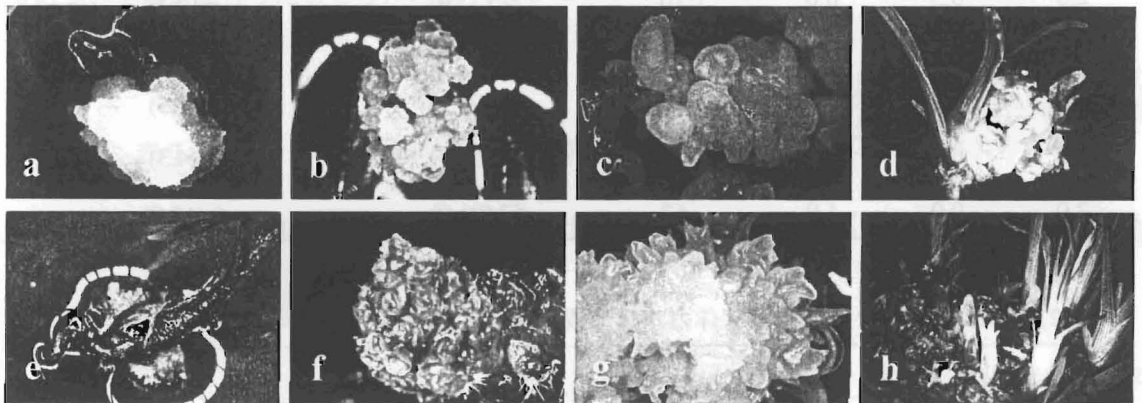


図1 ローゼグラスにおけるカルス形成から植物体再分化に至る形態学的変化

a) 種子由来初期カルス, b) 継代培養中のエンブリオジェニックカルス, c) 体細胞不定胚形成, d) 植物体再分化, e) 種子由来初期カルス, f) 継代培養中の多芽体カルス, g) 暗所での植物体再分化, h) 明所での植物体再分化

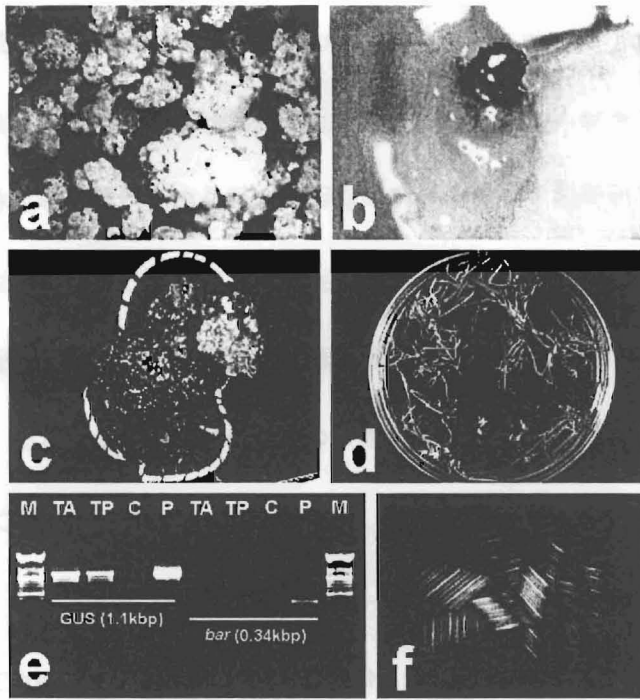


図2 ローズグラスの遺伝子組換えと導入遺伝子の発現

a, b) ガン処理後のトランジェント GUS 発現, c) ピアラホス耐性多芽体カルス, d) 形質転換多芽体カルスの植物体再分化, e) 形質転換体における PCR による導入遺伝子の確認, f) 形質転換体の葉における GUS 発現

表6 ガン処理に用いた培養組織がGUS遺伝子発現に及ぼす影響

組織	ガン処理に 用いた組織数	GUS遺伝子 スポット数	GUS遺伝子 発現 ¹⁾
エンブリオジェニックカルス	48	68	+
多芽体カルス	52	142	++

¹⁾ + : 弱, ++ : 中, +++ : 強

表7 無選抜培養期間が形質転換効率に及ぼす影響

無選抜 期間 (日数)	ガン処理した シャーレ数	供試多芽体 カルス数	ピアラホス耐性 多芽体カルス数	形質転換 効率 (%)
0	6	152	0	0.0
7	9	237	0	0.0
15	9	251	4	1.6
30	9	262	3	1.1

3. バーズフットトレフォイル（スーパールート）における遺伝子組換え法の確立

スーパールート（Super Growing Root）は、植物ホルモン非存在下で無限的に生長することから、植物におけるホルモン調節機構の解明や根粒形成研究を行う上での興味深い材料である（Akashi et al.,1998, 2000）。

本研究は、スーパールートを用いて根粒形成に関わる種々の遺伝子の機能を分子レベルで解明するために、アグロバクテリウム法による形質転換系の確立を試みるものである。

<材料および方法>

スーパールートは、20mL のホルモン無添加の MS 液体培地(pH6.8 : Murashige and Skoog 1962) を含む三角フラスコ（100mL 用）で 2 週間毎の継代培養を行い、約 5 年間維持しているものである（Akashi et al.,1998）。

スーパールートから再分化した植物体（図 1a）は、植物ホルモン無添加の 1/2MS 寒天培地（3%スクロース，0.7%agar）に移植し、生長させた（図 1b）。継代培養 30~40 日後、十分に生長した植物体は、葉、茎および根に切り分け、0.5mg/L BAP を添加した MS 寒天培地（3%スクロース，0.3%ゲルライト）に置床し、カルス形成および植物体再分化を促した。

形質転換は、プラスミド pBI121 を導入したアグロバクテリウム LBA4404 を用い、前報（明石ら，1995）のバーズフットトレフォイルと同様である。形質転換体を効率良く得るために、選抜培地におけるカナマイシン濃度について検討を行った。スーパールートは、カナマイシン（0，5，10mg/L）を添加したホルモン無添加の MS 液体培地で培養し、7 日毎に根の長さを測定した。選抜培地で培養 90 日後、形成されたカルスは、GUS 染色で導入遺伝子を確認した後、0 または 10mg/L カナマイシンを含む 0.5mg/L NAA 添加の MS 液体培地において暗所、25℃で培養し、根を誘導した。カルスから形成した根（0.5cm）は、GUS 発現を調査した

後に発現が認められた個体のみを植物ホルモン無添加の MS 液体培地に継代し、生長させた。

約 10cm に生長した根は、1cm 程度に切り、0.5mg/L BAP を添加した MS 寒天培地で植物体の再分化を促した。再分化したシュートは、1/2MS 寒天培地に移植し、再び根を再分化させ、完全な植物体にした。再生した植物体は十分に生長させた後に、ISOPLANT 法 (Wako)を用いて植物体から DNA を抽出し、PCR 法により NPT II 遺伝子の確認を行った。

<結果および考察>

表 1 は、スーパールートにおける異なる外植体がシュート形成に及ぼす影響についてまとめたものである。シュート形成率は、葉で 87.0%と最も高く、次いで茎の 85.7%であり、根は 47.6%と最も低い値であった。一方、1 外植当たりのシュート数は、葉、茎および根の順で、それぞれ 8.2, 7.3, 4.3 個体であった。したがって、形質転換に用いる外植体として葉切片が適当であるものと考えられる (図 1c,d,e)。選抜培地で培養 90 日後、図 1f に示すように外植片のまわりに増殖したカルスが認められ、これらのカルスを GUS 染色したところ、図 1g に示すようにカルスの一部で GUS 発現が認められた。表 2 は、スーパールートの葉切片における形質転換カルス形成率について調査したものである。カルスを形成した外植片数は 56 個で、そのうち 18 個が形質転換カルスを形成し、その形成率は 20.0-44.0%であった。図 2 は、スーパールートにおける異なるカナマイシン濃度が根の伸長に及ぼす影響を調査した結果である。根の伸長は 10mg/L カナマイシン添加により十分に抑えられた。そこで、0 または 10mg/L カナマイシンを添加した根誘導培地で形質転換カルスを培養したところ、10-14 日目に発根が認められた。表 3 は、スーパールート葉由来形質転換カルスにおける異なるカナマイシン濃度が根誘導率に及ぼす影響をとりまとめたものである。根の形成数はカナマイシン無添加区において 705 本であるのに対し、添加区では 200 本であった。しかしながら、形質転換根誘導率は、無添加

区では75.3%，添加区では95.5%であり，添加区の方が高い値を示した。

形質転換根を十分生長させ（図 1j），再分化培地に置床したところ，多くのシュートが認められた（図 1j）。これらのシュートは 1/2MS 寒天培地で発根を促し生長させ，GUS 染色を行った結果，葉および根端部分で特に強い活性が認められた（図 1k,l）。また，形質転換体からゲノム DNA を抽出し，PCR 法による導入遺伝子の確認を行った結果，NPTⅡ遺伝子（1.4kb）と同様の位置に増幅したバンドが検出された（図 1m）。

表1 スーパールートにおける異なる外植体がシュート形成に及ぼす影響

組織	培養外	シュートを形成	シュート	形成した	1外植片当たりにおけるシュート数
	植片数	した外植片	形成率	全シュート数	
	A	B	B/A (%)	C	C/B
葉	46	40	87.0	328	8.2
茎	42	36	85.7	264	7.3
根	42	20	47.6	86	4.3

表2 スーパールートの葉切片における形質転換カルス形成率

実験	感染に用いた 外植片数	カルスを形成した	
		外植片数	
		A	B (B/A%)
exp. 1	305	25	11 (44.0)
exp. 2	319	16	4 (25.0)
exp. 3	295	15	3 (20.0)

表3 スーパールート由来形質転換カルスにおける異なるカナマイシン濃度が根誘導率に及ぼす影響

Km濃度 (mg/L)	形質転換体カルス数	発根数	形質転換した根数
		A	B (B/A%)
0	65	705	531 (75.3)
10	65	200	191 (95.5)

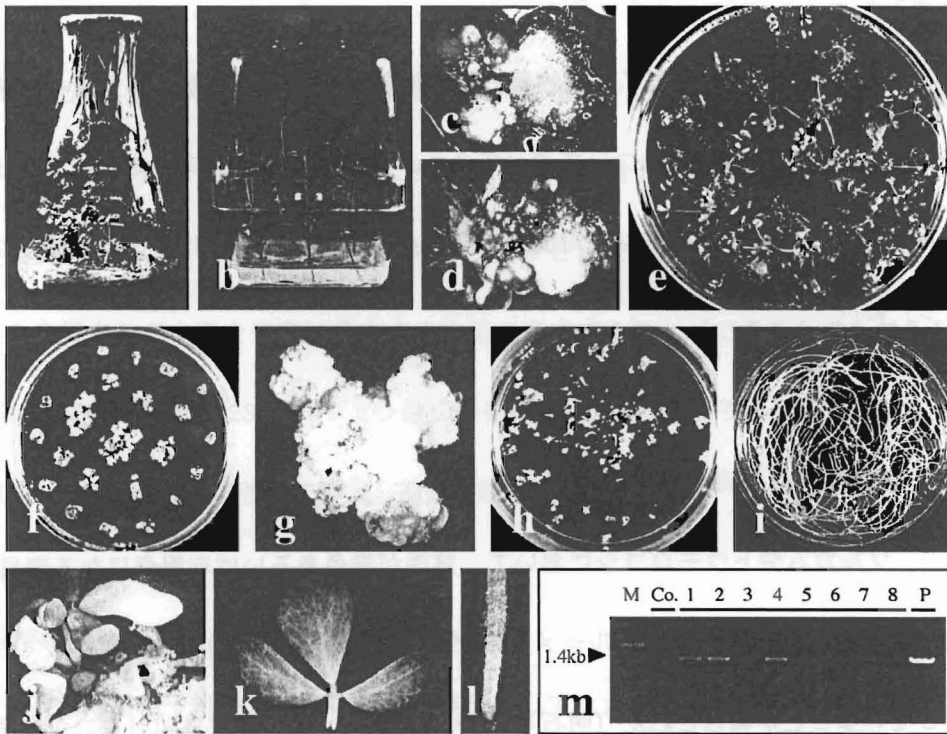


図 1 a) バーズフットトレフォイル由来スーパールートにおける再生した植物体 b) スーパールート由来植物体における継代培養 c) 培養開始 21 日目における葉切片からの植物体再分化 d) 培養開始 35 日目における葉切片からの植物体再分化 e) 培養開始 49 日目における葉切片からの植物体再分化 f) 感染処理後 90 日目の葉切片およびカナマイシン耐性カルス g) カナマイシン耐性カルスにおける GUS 発現 h) カナマイシン耐性カルスから誘導された根 i) 生長した形質転換根とその GUS 発現 j) 形質転換根から再生した植物体とその GUS 発現 k) 形質転換根の根端における GUS 発現 l) 生長した形質転換体の葉における GUS 発現 m) PCR による NPT II 遺伝子の確認 Co.: 非形質転換体 Lane 1-8: 形質転換体 P: プラスミド DNA M: 100bp DNA マーカ

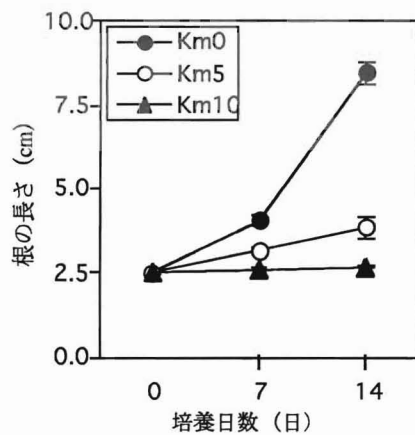


図 2 スーパールートにおける異なるカナマイシン濃度が根の伸長に及ぼす影響

V 本研究の成果の意義と今後の課題

これまでに、暖地型イネ科牧草の組織培養およびそれに基づいた遺伝子組換え技術の確立に関する基本的な成果について述べてきた。ここでは、品質向上のための遺伝子組換えについて触れ、これらの育種的な利用面での問題点を指摘し、さらに今後の展望について述べることにしたい。

(1) 高消化性牧草の育成

ソルガムやトウモロコシにおいて、葉脈が褐色あるいは赤褐色になる変異体 (Bmr) が見出されており、正常種に比べルーメン内での消化性が高く、飼料用作物としての優れた性状を有していることが報告された (明石ら, 2003)。また、この変異体はリグニン含量が低く、リグニン生合成経路においてモノリグノールの生合成を触媒する酵素であるシナミルアルコールデヒドロゲナーゼ (CAD) 活性も低いことが指摘され、この酵素がリグニン含量を制御しているものと示唆された。したがって、暖地型イネ科牧草におけるリグニン含量の低下が消化性を向上する一つの重要な要因であることが考えられる。そこで、CAD 遺伝子に注目し、ソルガムの Bmr 系統における CAD 遺伝子の解析とともにその遺伝子のクローニングを行い、CAD 遺伝子のアンチセンス RNA を作成し導入することで人為的にリグニン含量を抑制することで高消化性牧草を育成することが可能になると考えられる。したがって、今後の研究として CADcDNA のアンチセンス鎖をバヒアグラスおよびバヒアグラスに導入し高消化性イネ科牧草を作成する。

(2) 良質タンパク質高含有牧草の育成

牧草の品質改良の一つに、メチオニンやシステインのような含硫アミノ酸含量を高

め良質タンパク質含量を向上させることが挙げられる。このような質的向上を促す遺伝子には、ブラジルナッツの 2S アルブミン遺伝子があり、特に種子タンパク質中のメチオニン含量を増加させている。この遺伝子は種子特異的に発現するため、種子のみならず各組織において発現するように安定的なプロモーターに接続してベクターとして構築し、牧草に導入・発現させれば茎葉にも良質タンパク質を豊富に含有する牧草を育成することができるものと考えられる。今後、35S プロモーターに 2S アルブミン遺伝子を接続し、パーティクルガン用プラスミドベクターを構築し、暖地型イネ科牧草に導入し品質を改善する。

(3) 免疫増強因子を導入した機能性牧草の育成

近年、遺伝子組換え植物の新たな展開として、人や家畜を含む動物の感染に対するワクチンを従来の注射法で投与するのと異なり、ワクチン抗原遺伝子を導入した遺伝子組換え作物を給与することにより、植物が産生するワクチン抗原を腸管や口腔の粘膜から吸収できるような新しいタイプの経口（粘膜）免疫法が開発されつつある。このことにより、家畜ではワクチン注射のコストを削減することができ、また、野生動物においても餌からワクチンを投与することが可能となり、その有用性および範囲は広い。今後は、それに関連する遺伝子を探索し導入するとともに、新たな機能性牧草の作出に挑戦したい。

以上のように、牧草において遺伝子組換え技術を利用した分子育種は、まだ緒に付いたばかりである。しかしながら、カルス誘導、継代培養および植物体再分化に至る組織培養系および遺伝子組換え法の確立では一定の成果が認められ、これによる高品質牧草作出の可能性は非常に高いものであることが示された。