

高消化性・褐色中肋型牧草の作出

(課題番号 07660361)

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金 (基盤研究C)
研究成果報告書 (2)

平成9年3月

研究代表者 川 村 修
(宮崎大学農学部助教授)

はしがき

本報告書は、平成7～8年度文部省科学研究費補助金基盤研究（C）の交付を受けて行った「高消化性・褐色中肋型牧草の作出」の結果をとりまとめたものである。

わが国における牧草の育種は、これまで、多収性を主要な育種目標として進められてきた。しかし、多収ではあっても家畜の嗜好性や消化性に問題のある草種では、飼料としての品質を今後の育種目標として取り上げる必要があり、そのためには品質と密接に関係する遺伝力の高い形質を指標として、効率的で簡易な選抜を行う育種操作が必要となる。

たとえば、暖地型イネ科牧草は、一般に、多収ではあるが品質が劣る。また、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を含むため、遺伝的変異が少なく、新品種を作出するためには従来の変種法あるいは選抜育種法では十分に対応することが出来ない。そこで、これらの育種障害を克服し、暖地型牧草の品質向上を目的とした育種を展開するためには、遺伝子組換え技術による育種法の構築が望まれる。かかる観点から本研究は、飼料作物の消化率向上のための分子育種の足がかりを得る目的で実施された。

本研究の遂行にあたり、株式会社 三井業際植物バイオ研究所 柴田大輔 博士 ならびに新王子製紙株式会社 日尾野 隆 博士 から多大の御援助を頂いた。記して感謝の意を表する次第である。

研究組織

研究代表者： 川 村 修 （宮崎大学 農学部 助教授）
研究分担者： 明 石 良 （宮崎大学 農学部 助 手）
研究協力者： F. ホフマン （カリフォルニア大学アーバイン校教授）

研究経費

平成7年度	1 5 0 0 千円
平成8年度	5 0 0 千円
計	2 0 0 0 千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. RYO AKASHI, TETSUYA UCHIYAMA, ATSUSHI SAKAMOTO, OSAMU KAWAMURA and FRANZ HOFFMANN.

High-frequency embryogenesis from cotyledons of bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus*) and its effective utilization in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation.

Journal of Plant Physiology (in press) 1997

(2) 口頭発表

1. 明石 良・川村 修

飼料作物の品質向上における分子育種

日本草地学会大会 平成8年3月29日

2. 霍田真一・明石 良・高橋 清・日尾野隆・柴田大輔・川村 修

イネ科植物CAD遺伝子の構造解析とその発現様式の解明

1. ソルガムBMR変異体のCAD遺伝子群の構造解析

日本草地学会大会 平成8年3月29日

3. 明石 良・坂谷洋一郎・川辺俊生・三澤尚明・川村 修

イネ科植物CAD遺伝子の構造解析とその発現様式の解明

2. ソルガムBMR変異体のCADタンパク質の性質

日本草地学会大会 平成8年3月29日

4. 明石 良・内山徹哉・坂本篤史・川村 修

遺伝子工学的手法を用いた飼料作物の品質向上に関する研究

1. アグロバクテリウムを用いたバースフットトレフォイルの形質転換

日本草地学会大会 平成8年3月29日

5. 川辺俊生・坪井桂子・川村 修

ソルガム褐色中央脈突然変異体(BMR-6)の性状

- アルデヒドとリグニンの節間内分布について -

日本草地学会大会 平成9年3月31日

研究成果

褐色中肋型突然変異体は、低リグニン含量で消化率が高く、また変異が劣性の単一遺伝子支配であることから細胞壁の構造改変による高品質牧草モデルとして注目され、最近では、リグニンの生合成に関わるシンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ (CAD) の活性低下とこれに関連したリグニンの構造の変化が報告されている。一方、特定の遺伝子の発現制御にアンチセンスRNA法が有効であることが報告され、最近、タバコにアンチセンスCAD遺伝子を導入してCAD遺伝子の発現を人為的に抑制し、低リグニン含量の、いわば褐色中肋型のタバコが作出された。

そこで本研究では、高消化性・褐色中肋型牧草の作出を目的とし、牧草の低リグニン化を目指して実験を行い以下の結果を得た。

1) 形質転換系の確立

アグロバクテリウムLBA4404にプラスミドpBI121 (p nos/NPT II/T nos + 35 S/GUS/T nos) (クローンテック社) をフィルターメーティング法によって導入して培養後、無菌バースフットトレフォイルに感染させた。この場合、LB液体培地を用いて良好な結果を得た。また感染子葉からのカルス形成率および植物体再生に対する培養条件を、特に植物ホルモン濃度の点から検討し、効率の良い形質転換系を確立した。

(巻末資料参照)

2) 形質転換体の確認

1) で得た形質転換体のうち正常に生育する個体についてゲノムDNAを抽出し、PCR法によって導入遺伝子の確認を行った結果、GUS遺伝子と同じ位置 (1.1 kb) に増幅したバンドが検出された。また、X-glucおよび4-MUGを基質としてGUS染色およびGUS活性の測定を行った。その結果、GUS遺伝子の発現量は個体間および器官間においてかなりの差異 (葉>茎>根) が認められた。(巻末資料参照)

3) アンチセンスCAD遺伝子の導入

・方法

ウドCADcDNAの塩基配列をもとにプライマーを合成し、ウドCADcDNA断片 (三井業際研) を鋳型にして94℃1分、55℃1分、72℃1分を30サイクルでPCRを行った。増幅したDNA断片はBluescript II SKのS_{am}IとS_acIサイトにサブクローニングし、その後、バイナリーベクターpGAH/SL-GUSの同サイトにライゲーションすることでバイナリーベクターpGAH/anti-UCADを構築することができた。さらに、これをアグロバクテリウムLBA4404株に導入し、実験に供した。

バースフットトレフォイルの種子を滅菌し、植物ホルモン無添加のMS培地に播種し

3000 lux、16時間照明下、25℃で発芽、生育させた。発芽1～2週間目の無菌植物体の子葉（両端を切る）を切りとり、100 mg/Lのカナマイシンおよび5 mg/Lのハイグロマイシンを含むLB液体培地で28℃1晩培養した菌株懸濁液に40～50分間浸漬し、余分な菌液を濾紙で取り除いた後、0.5 mg/LのBAPを添加したB5寒天培地上（3%ショ糖、0.5%ゲルライト）に置床し、3000 lux、16時間照明下、25℃で培養した。1週間後、子葉片は上記の培地に250 mg/Lクラフォランを添加した培地に移植し培養を継続した。さらに、培養2週間後、クラフォラン添加培地に5 mg/Lハイグロマイシンを添加した同培地に継代し、植物体の再生を促した。

・結果

PCRにおいて増幅されたDNA断片は、約1.2 kbpであり、この断片が報告されているウドCAD cDNAと一致した。

pGAH/SL-GUSで形質転換後のカルス形成率は、培養後29日目で平均23.7%であった。また、植物体の再生率は17.3%であった。一方、アンチセンスCADを導入したpGAH/anti-UCADでの形質転換での耐性カルス形成率は20.3%であった。

・要約

ウドCAD cDNAの塩基配列をもとに、PCRによってCAD cDNA断片を増幅し、それをバイナリーベクターpGAH/SL-GUSに逆方向に配列するように挿入してプラスミドpGAH/anti-UCADを構築した。次いで、パーズフットトレフォイルの子葉にアグロバクテリウムを感染させて形質転換を行った。バイナリーベクター pGAH/SL-GUSを用いた形質転換での成功率は、平均24%で、植物体再生率は17%でpGAH/SL-GUSが有効であることが示唆された。一方、pGAH/anti-UCADでの耐性カルス形成率は20%であった。

4) 導入遺伝子の確認と発現解析

・方法

耐性カルスから再生した植物体よりゲノムDNAを抽出し、PCR法により導入遺伝子の確認を行った。

遺伝子の導入が確認された植物体を1/5000 aワグネルポットに移植しガラス室で栽培した。また種子から発芽した植物体をB5寒天培地上に置床し、その後、形質転換体と同様に生育させ対照植物とした。

1996年11月25日に一斉に地上部を刈取り、その一部は-30℃で保存してCAD活性の測定に、一部は70℃で通風乾燥して粉碎し、リグニンおよびアルデヒドの定量と消化率の測定に供した。

CAD活性の測定においては、茎部のみを用い、リン酸緩衝液で抽出後、40%および70%硫酸による沈殿物をトリス緩衝液に懸濁して脱塩し、NADPH存在下でのコ

ニフェリルアルデヒドの減少を追跡し、蛋白質当たりの酵素活性を算定した。

リグニンは乾燥粉末試料からアセチルプロマイドで抽出し、280nmの吸光度として、アルデヒドはフロログルシン-塩酸反応で発色する物質をアセチルプロマイドで抽出し、545nmの吸光度として定量した。

消化率は山羊の反芻胃内微生物とともに乾燥粉末試料を嫌気的条件下に培養し、残渣のNDF（中性デタージェント繊維；植物細胞壁構成物質）を不消化物とみなして算定した。

・結果

導入遺伝子をPCR法によって分析したところ、プラスミドと同位置にバンドを確認することができた。

CAD活性は、12個体の対照植物の平均値が0.0506 nkat/mg proteinであったのに対して、27個体の形質転換体の平均値は0.0371 nkat/mg proteinで、その差は統計的に有意であった。

一方、リグニンおよびアルデヒド含量、アルデヒド/リグニン、乾物およびNDF消化率については、いずれも対照個体群と形質転換体群との間に有意な差は認められなかった。また、各成分含量とCAD活性との間に有意な相関関係は認められなかった。

・要約

耐性カルスから再生した植物体について導入遺伝子の確認をPCRで行った結果、プラスミドと同位置にバンドを認めた。またこれらの植物体のCAD活性は対照個体のそれより有意に低かった。さらにリグニンとアルデヒドの含量および反芻胃内微生物による消化率を測定した結果、いずれも対照個体との有意な差は認められなかった。

アンチセンスCAD遺伝子の導入によって、CAD活性が抑制されたと考えられる結果を得たにもかかわらず、リグニン、アルデヒド含量および消化率については有意な変化が観察されなかった点については今後の検討が必要である。

**High-frequency embryogenesis from cotyledons of bird's-foot tre
(Lotus corniculatus) and its effective utilization in
Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation**

**RYO AKASHI *¹, TETSUYA UCHIYAMA, ATSUSHI SAKAMOTO, OSAMU KAWAMURA
and FRANZ HOFFMANN¹**

**Division of Grassland and Animal Production, Faculty of Agriculture,
Miyazaki University, Miyazaki 889-21, JAPAN**

**¹Department of Developmental and Cell Biology, University of
California Irvine, Irvine, CA 92697-2300, USA**

*** Corresponding author:
e-mail: a0c410u@cc.miyazaki-u.ac.jp
fax: 81-985-58-2884**

Summary

We have developed a rapid and simple procedure to regenerate bird's-foot trefoil (Lotus corniculatus L.) plants from hypocotyl and cotyledon explants of 10 to 14 days-old seedlings. Both explant types regenerated well on the same medium with only minimal interfacing callus formation but with different modes of morphogenesis. While hypocotyls responded primarily by forming shoot apices, cotyledons mostly underwent embryogenesis. Remaining on the original explantation medium, both structures developed into rootless shoots. The highest shoot regeneration frequency was obtained on B5-based medium containing 0.5 mg/L 6-benzylaminopurine with approximately 80 % of all explants forming on average 19 shoots in four weeks. Only two media were used in the entire regeneration process, the second being the rooting medium of half-strength B5 supplemented with 0.01 mg/L α -naphthaleneacetic acid. Rooting frequency and survival rate after potting were about 100 %.

This regeneration protocol has been successfully applied to Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation. Cotyledon segments were used as acceptor tissue. The explants were co-cultivated with A. tumefaciens strain LB4404 carrying the plasmid vector pBI121. This vector contains the neomycin phosphotransferase II gene (NPTII) and β -glucuronidase reporter gene (GUS), both under the control of the CaMV 35S promoter. Kanamycin-resistant plants regenerated within 45 days after transfer to selective media. On a selection medium containing 100 mg/L kanamycin, shoots were formed by 19.0 % of the explants. The histological GUS assay showed that 7.0 % of the resistant shoots also expressed the GUS gene in a variety of tissues. The stable integration of this gene was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) analysis. Using the embryogenic cotyledon regeneration system transgenic bird's-foot trefoil plants were obtained within 2-3 months.

Key words: Agrobacterium tumefaciens, bird's-foot trefoil, cotyledon explant, β -glucuronidase, Lotus corniculatus, somatic embryogenesis, transgenic plant regeneration.

Introduction

Legumes are cultivated for either food or forage and are the main source of protein-rich plant-derived nutrients. Due to their ability to symbiotically associate with nitrogen fixing bacteria, they can provide rich fodder with relatively low energy input. However, there is an urgent need for the improvement of forage legumes towards a better balanced protein content as it is present in some food legumes like soybean seeds (Handberg and Stougaard, 1992).

The genus Lotus consists of more than 200 legume species with the greatest diversity of species occurring in the Mediterranean (Swanson et al., 1990). Of this genus, tetraploid bird's-foot trefoil (Lotus corniculatus L., $2n=4x=24$) is cultivated in various areas across the American continent, including Argentina, Brazil, Canada and the US, throughout much of Europe, parts of Asia, including India and Japan, as well as in Australia and New Zealand (Grant and Marten, 1985). Bird's-foot trefoil has attained considerable agronomic status as an important grazing pasture legume with a feed value similar to alfalfa. It can persist when heavily grazed, and it does not cause bloat (Seaney and Henson, 1970). Conventional breeding has been only moderately successful due to species-inherent qualities such as polyploidy and partial self-incompatibility. Unconventional breeding techniques, i.e., cell and tissue culture combined with genetic engineering, should contribute to the future improvement of this crop, especially in increasing its nutritional value. In L. corniculatus, the full palette of in vitro regeneration techniques is not available yet. However, a close relative, diploid and autogamous wild type species L. japonicus ($2n=2x=12$) has been quite successfully established as a model species for developing in vitro breeding techniques in the typically recalcitrant legume family (Handberg and Stougaard, 1992).

In tissue culture, bird's-foot trefoil can be regenerated from root segments (Rybczynski and Badzian, 1987; Badzian and Rybczynski, 1994) as well as from callus through shoot induction (Niizeki and Grant, 1971; Tomes, 1979; Swanson and Tomes, 1980) and embryogenesis (Mariotti et al., 1984). Regenerable calli have been induced from a number of tissues as well as from hypocotyl and

cotyledon-derived protoplasts (Ahuja et al., 1983; Vessabutr and Grant, 1995). However, the modes and efficiencies of these regeneration systems have not led to efficient transformation protocols in which regeneration is exogenously controlled. In L. corniculatus, transgenic plants have mostly been produced from hairy root cultures following A. rhizogenes infection (Stougaard et al., 1986; Petit et al., 1987; Tabaeizadeh, 1989; Andersson et al., 1997). These plants contain at least a portion of unwanted tumor DNA which frequently causes abnormalities suggestive of phytohormone imbalance (Klee et al., 1987). There is only one communication on A. tumefaciens-mediated transformation reporting transfer of kanamycin resistance and nos genes in a caulogenic system (Yu and Shao, 1991). Grain and pasture legume species that are amenable to gene transfer by genetic engineering using Agrobacterium-mediated gene delivery include soybean (Hinchee et al., 1988), pea (Puonti-Kaerlas et al., 1990; Schroeder et al., 1993), Stylosanthes (Manners, 1988), alfalfa (Deak et al., 1986; Schroeder et al., 1991), white clover (White and Greenwood, 1987; Christine et al. 1994), and subterranean clover (Khan et al., 1994).

In this communication, we demonstrate plant regeneration from hypocotyl and cotyledon-derived callus via embryogenesis in bird's-foot trefoil and provide an optimized protocol for fast and efficient plant production. The cotyledons produce somatic embryos in high frequency, and only a single medium is needed until rooting. We have adapted this rapid and simple procedure and used it in conjunction with a strain of A. tumefaciens to deliver NPTII and GUS genes to this legume species and to regenerate transgenic plants.

Materials and methods

Plant material, seed sterilization and germination

Seeds of bird's-foot trefoil (Lotus corniculatus L.) cv. Viking were obtained from Snow Brand Seed Company, Japan. Seeds were surface sterilized for one minute in 70 % (v/v) ethanol followed by 2.0 % sodium hypochlorite solution for 20 minutes, then rinsed five times with sterile distilled water and germinated on Murashige and Skoog's (MS) basal medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 0.3 % (w/v) gelum gum (Wako Pure Chem., Japan) at 27 °C and 16 h of light.

Culture procedures

Cotyledons (approximately 0.3 cm²) and hypocotyls (approximately 2 cm long) were collected from 10 to 14 days-old seedlings. Hypocotyls were cut into up to three 0.5 cm long segments. Only one, roughly square-shaped explant was prepared per cotyledon by removal of both ends of the leaf. Explants were placed on B5 (Gamborg et al., 1968) based medium, containing 30 g/L sucrose, 0.3 % gelum gum and nine different combinations of 6-benzylaminopurine (BAP) and α -naphthaleneacetic acid (NAA). Petri dishes were secured with sealing film and incubated under conditions identical to those for germinating seedlings.

After 30 days, explants carrying morphogenic callus were subcultured to plastic box containers (Tekuno-box, Sumitomo Chem. Corp., Japan) with the same medium for continuing growth and subcultured every month. Shoots were transferred to half-strength B5 medium (Tekuno-box) supplemented with 30 g/L sucrose, 0.3 % (w/v) gelum gum and NAA (0.0, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L) for root induction. Regenerated plants were potted, kept at room temperature for 2 weeks and subsequently transferred to a non-climatized greenhouse.

Scanning electron microscopy

Morphological features and modes of differentiation of shoot formation were observed with scanning electron microscopy as described previously (Akashi and Adachi, 1992).

Bacterial strain and plasmid vector

Agrobacterium tumefaciens strain LBA4404, harboring the binary vector pBI121 (Clontech, Palo Alto, CA), was used. Plasmid pBI121 contains the β -glucuronidase (GUS) gene linked to the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and the nopaline synthase (NOS) terminator. A neomycin phosphotransferase II gene (NPTII), conferring kanamycin tolerance, is linked to the NOS promoter and NOS terminator.

Co-cultivation and regeneration of plants

Stocks of A. tumefaciens were prepared by growing the cells in LB medium, consisting of 1.0 % tryptone, 1.0 % NaCl, 0.5 % yeast extract with 25 mg/L kanamycin, 300 mg/L streptomycin, 100 mg/L rifampicin and 100 mg/L acetosyringone, to maximum cell density and diluting them with twice the volume of glycerol prior to freezing at -80 °C. Sample cultures were made by growing the agrobacteria in LB or modified LB medium (with NaCl reduced to 0.1 %, acetosyringone reduced to 4 mg/L and 10 mM D-glucose added) on a shaker for 24 h at 28 °C to a concentration of approximately 1×10^9 cells/ml and used for the inoculation of primary explants.

Cotyledons were harvested and prepared as described above. Infection was performed by dipping the plant tissue into a bacterium suspension (in LB or modified LB) for 30 minutes. Following the infection, tissue pieces and adhering bacteria were co-cultured for 7 days on B5 medium with 0.5 mg/L (BAP) for callus and shoot induction. After co-cultivation, the segments were transferred to a B5-based selection medium containing 30 g/L sucrose, 0.3 % gelum gum, 0.5 mg/L BAP, kanamycin (0, 100, 300, 500 mg/L) and carbenicillin (0, 500 mg/L), and subcultured biweekly. The cultures were kept at 26 °C and 16 h light. Explants carrying embryogenic callus were transferred to plastic box containers (Tekuno-box) containing the same medium for continued differentiation and subcultured every month. Kanamycin-resistant shoots were transferred to rooting medium.

PCR analysis

PCR analysis was carried out for confirmation of integration of the foreign genes. DNA was extracted from leaves (50 mg) of selected regenerants using the Isoplant isolation kit (Wako, Osaka, Japan). The reaction mixture (20 μ l) contained 10 ng DNA, 200 μ M dNTPs, 1 μ M of each primer, 0.5 units Taq polymerase and Taq polymerase buffer (Wako). Samples were heated to 94°C, kept for 5 min at this temperature and then subjected to 45 cycles of the following sequence: 1 min at 94°C, 2 min at 66°C and 3 min at 72°C. Subsequently, they were subjected for 7 min to 72°C and stored at 4°C until used. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide. The primers for the GUS gene were designed for the positions 974-994 and 2054-2074; the sequences are 5'-AAC TGG ACA AGG CAC TAG CGG-3' and 3'-TGC GAC CTG ACC GTA CTT GAA-5' (Jefferson et al., 1986), respectively. The primers for the NPTII gene were designed for the positions 151-171 of the NPTII gene and 505-525 of a 3.4 kb HindIII fragment that contains the NOS gene of pBI121 (NOS terminator); the sequences are 5'-ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG-3' and 3'-TAA TCT CAG GGC GTT AAT ATG-5', respectively (Kaneyoshi et al., 1994).

β -Glucuronidase assay

The fluorometric GUS assay was performed as described by Jefferson et al. (1986) using 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) as substrate. Fluorescence was measured with a Shimadzu spectrofluorophotometer RF-540. Histochemical GUS assay of regenerated plantlets was carried out according to Jefferson et al. (1987). Sections (90 μ m thick) were cut from different parts of the plants and incubated in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 1.9 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc), 0.5 mM K₃Fe(CN)₆, 0.5 mM K₄Fe(CN)₆, 0.3 % (v/v) Triton X-100 and 20 % (v/v) methanol and kept overnight at 37 °C.

Results and discussion

Hypocotyl vs. cotyledon explants

After one week of culture, callus became visible in the center of the cut surface of the hypocotyl segments (Fig. 1a) on all nine media investigated. Differences in growth rate, texture and color were visible but not recorded in detail. After three weeks shoot meristems formed (Fig. 1b) and shoots developed on all media. Some regenerating structures seemed to start out with embryo-like appearance (Fig. 1b), but complete cotyledonary structures could not be identified.

The cotyledon explants showed visible callus after approximately two weeks in culture on all nine media investigated (Fig. 1c), one week later than hypocotyl explants. Callus grew evenly across the cut surface. Morphogenesis started after another week on all media, but distinctly different from regenerating hypocotyl-derived callus. Most structures could be classified as somatic embryos (Fig. 1d) or embryo-like structures (degenerated somatic embryogenesis).

Shoot regeneration

After one month in culture on all nine media investigated, both explant types carried numerous shoots no longer distinguishable in regards to their embryonic or organogenic origin (Fig. 2a). Roots never developed on these media. Media with 0.5 mg/L BAP were clearly superior to media with a lower BAP concentration (Fig. 3). Surprisingly, given the distinctly different modes of shoot formation from hypocotyls (caulogenesis) as compared to cotyledons (embryogenesis), both explant types performed quite similar on all media. Only at 0.1 mg/L, NAA seems to work selectively in favour of the more embryogenic cotyledon-derived callus. Embryogenic cotyledons paired with caulogenic hypocotyls in a single species is not unusual, but normally, different media are required to induce regeneration in the two tissue types (for example, Tetu et al., 1990, in Pisum and Genga and Allavena, 1991, in Phaseolus). The best media produced 70 to 80 % shoot-forming explants (Fig. 3). This number does not significantly increase after the first month in culture and subsequent transfer to fresh medium.

For the three media best in producing morphogenic callus (0.5 mg/L BAP combined with 0.0, 0.01 or 0.1 mg/L NAA), the number of shoots per explant was also recorded after one month in culture (Fig. 4). Here, the embryogenic cotyledon explants showed a much better performance than the organogenic hypocotyl explants, producing an average of 19 shoots per explant on the best medium. NAA seems to have an inhibitory effect. Shoot formation continued for several months. The combined data on the production rate of regenerating callus (Fig. 3) and the regeneration efficiency per explant (Fig. 4) suggest that the B5 medium is best supplemented with 0.5 mg/L BAP for both explant types, and that cotyledons show the overall better performance.

Plant regeneration

After one month, shoot-bearing explants or explant parts of both types, cultured on B5 supplemented with 0.5 mg/l BAP, were transferred to fresh medium for the first transfer period of 30 days. At the end of this first period and for several months thereafter, shoots were harvested and placed into rooting medium. The five media investigated, hormone-free and NAA-supplemented at different concentrations, eventually yielded 100 % root formation, but a supplement of 0.01 mg/L NAA gave the fastest results. After two weeks on rooting medium 60 % of the shoots had rooted, after 3 weeks all of them.

One month after transfer to the rooting medium containing 0.01 mg/L NAA, the first plantlets were ready for potting. At this time, shoots are between 4 and 5 cm in length, and roots should be about twice this size to guarantee 100 % survival in soil. Plants were acclimatized in the laboratory at room temperature for two weeks and then placed in non-climatized green-houses, where they survived hot conditions.

The regeneration protocol presented here is simple. Only B5 medium is used, at full strength supplemented with 0.5 mg/L BAP and at half-strength supplemented with 0.01 mg/L NAA. The explant is cultured on the former until shoots suitable for rooting on the latter medium are formed. The callus interface is minute. When cotyledons

are used as explants, up to 30 well established and greenhouse adapted plants can be produced per seedling within three months. However, shoot production continues beyond that period. Embryogenesis has also been reported in leaf-derived callus of L. corniculatus (Mariotti et al., 1984). This technique seems to be more genotype-sensitive than the use of young seedlings. From 20 plants of the same cultivar (Franco), four yielded regenerating, leaf-derived callus, with only two showing sufficient frequencies. Using much younger explant tissue, all seedlings derived from a given cultivar (Viking) regenerated at high frequency in our system.

Effect of antibiotics on shoot formation

Based on the regeneration data obtained cotyledon explants were chosen as recipient tissue for transformation studies. In preliminary experiments, cotyledon sections were cultured on media containing different concentrations of kanamycin (0, 100, 300, 500 mg/L), plus 500 mg/L carbenicillin to eliminate the agrobacteria, in order to identify the most suitable concentration for selecting transformed shoots. Shoot formation was completely inhibited at a concentration of 100 mg/L kanamycin (Table 1). Carbenicillin alone (500 mg/L) inhibited shoot formation by approximately 20 %.

Transformation procedure

After seven days of co-cultivation of cotyledon explants with agrobacteria, explants were transferred to selection medium, and callus became visible at distinct sites on the cut surface of some cotyledon segments 30 days after the start of the experiment. The first kanamycin-tolerant shoots emerged after 15 additional days. However, most explants never formed calli or shoots but turned brown instead.

In transformation studies with Trifolium subterraneum L. (Khan et al., 1994), it was reported that the transformation efficiency can vary with the medium used for bacteria cultivation and infection. Especially glucose and acetosyringon concentrations were shown to be critical for efficient gene transfer. In our experiment, two infection media were used, LB and modified LB, differing in these critical

substances but differences in transformation rates were not found in a comparative study with 100 explants each. In both cases, similar numbers of GUS-positive shoots (eight and nine, respectively) were found. While 18 % of the 200 explants produced shoots, a total of 328 shoots could be recovered and tested for GUS activity, only 17 proved to be positive. To increase the selection pressure, the kanamycin concentration was increased to 200 mg/L. However, transformants could not be recovered at this concentration. In an experiment utilizing a double selection scheme (100 mg/L kanamycin + 25 mg/L hygromycin) the ratio of antibiotic resistance to GUS-positive shoots was much better. From only 19 shoots, recovered from 118 cotyledon explants on double-selective medium, as many as 16 showed GUS activity. This is in accordance with similar data published in L. japonicus (Handberg and Stougaard, 1992).

Shoots formed in the presence of 100 mg/L kanamycin were excised and placed into kanamycin-free root induction medium. All shoots transferred to this medium formed roots within two to three weeks. Attempts to induce rooting in the presence of 100 mg/L kanamycin were also pursued. However rooting is slow under these conditions. Regenerated plants were potted, kept at room temperature for two weeks and subsequently transferred to a non-climatized greenhouse with all regenerants surviving.

Analysis of transgenic plants

Histochemical location of GUS activity in randomly selected regenerants indicated that the gene is regularly expressed in leaves (Fig. 5a, b), petiolules (Fig. 5c), stems, and roots including the root tips. Petiolules showed consistently high activity. Distinct areas with consistent absence of GUS expression were not identified. This is expected since the CaMV 35S promoter is active in all cell types. Control plants did not show any GUS activity under microscopical analysis. The specific activity of GUS in leaves, stems and roots of transgenic plants was analyzed fluorometrically. Total activity as well as the variation in activity between the different tissues in different plants was considerable. Table 2 shows GUS activity in 13 selected transgenic plants. Overall, leaves showed the highest

activity, followed by stems and roots, but this ranking (found in plants numbered 2, 3 and 5) can deviate or even be reversed in individual plants (numbers 7, 8, 11 and 12).

Stable integration of the two foreign genes (GUS and NPTII) was confirmed by PCR (Fig. 6). Analysis revealed that all 17 kanamycin-tolerant and GUS-positive plants displayed a distinct band corresponding to the relevant sequences of the GUS and the NPTII genes. Figure 6 shows this data for plants numbered 1, 2 and 3, as in Table 2.

The transformation of bird's-foot trefoil as reported here is based on the simplicity and efficiency of the tissue culture procedure utilized. The high regeneration frequency allows the use of A. tumefaciens rather than A. rhizogenes. Plant formation through somatic embryogenesis may limit tissue culture-derived mutations (somaclonal variation), and the technique, based on a single culture medium from explantation until rooting is convenient. Approximately eight transgenic plants could be obtained from 100 cotyledons by using this approach. The average time from co-cultivation (infection) of the tissue explant to transfer of transgenic plants to soil is 12-16 weeks. All transgenic plants survived the acclimatization and produced first flowers after three to four months. After the capacity of transgenic plants to flower was seen, they were cut back and maintained vegetatively since seeds are not produced within the population due to natural self-sterility.

We have used the method introduced in this report repeatedly in attempts to transform L. corniculatus cv. Viking with consistent results in terms of frequency and time demands. One of the foremost aims in improving bird's-foot trefoil is to increase protein quality (Handberg and Stougaard, 1992). We are now using genes which products are expected to improve the nutritional quality of the pasture.

Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (No. 07660361).

References

- Ahuja P.S., S. Hadiuzzaman, M.R. Davey and E.C. Cocking: Prolific plant regeneration from protoplast-derived tissues of Lotus corniculatus L. (bird's-foot trefoil). *Plant Cell Rep.* 2, 101-104 (1983).
- Akashi R. and T. Adachi: Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature inflorescences of apomictic dallisgrass (Paspalum dilatatum Poir.). *Plant Sci.* 90, 213-218 (1992).
- Andersson C.R., D.J. Llewellyn, W.J. Peacock and E.S. Dennis: Cell-specific expression of the promoters of two nonlegume hemoglobin genes in a transgenic legume, Lotus corniculatus. *Plant Physiol.* 113, 45-57 (1997).
- Badzian T. and J.J. Rybczynski: Cytokinin control of shoot regeneration in root segment culture of Lotus corniculatus seedling. *Acta Physiol. Plant.* 16, 61-67 (1994).
- Christine R., D.W.R. White, B. Dudas, R.D. Appleby, P.M. Ealing and A.G. Scott: Agrobacterium-mediated transformation of white clover using direct shoot organogenesis. *Plant Cell Rep.* 13, 309-314 (1994).
- Deak M., G.B. Kiss, C. Koncz and D. Dudits: Transformation of Medicago by Agrobacterium-mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.* 5, 97-100 (1986).
- Gamborg O.L., R.A. Miller and K. Ojima: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158 (1968).
- Genga A. and A. Allavena: Factors affecting morphogenesis from immature cotyledons of Phaseolus coccineus L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 27, 189-196 (1991).

Grant W.F. and G.C. Marten: Bird's-foot trefoil. In: M. E. Heath, R.F. Barnes and D.S. Metcalfe (eds.), Forages: the Science of Grassland Agriculture. Iowa State Univ. Press, Ames. pp 98-108 (1985).

Handberg K. and J. Stougaard: Lotus japonicus, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. Plant J. 2, 487-496 (1992).

Hinchee M.A.W., D.V. Connor-Ward, C.A. Newell, R.E. McDonnell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.R. Re, R.T. Fraley and R.B. Horsch: Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer. Biotechnology 6, 915-922 (1988).

Jefferson R.A., S.M. Burgess and D. Hirsh: β -Glucuronidase from Escherichia coli as a gene fusion marker. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83, 8447-8451 (1986).

Jefferson R.A., T.A. Kavanagh and M.W. Bevan: GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6, 3901-3907 (1987).

Kaneyoshi J., S. Kobayashi, Y. Nakamura, N. Shigemoto and Y. Doi: A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange. Plant Cell Rep. 13, 541-545 (1994).

Khan M.R.I., L.M. Tabe, L.C. Heath, D. Spencer and T.J.V. Higgins: Agrobacterium-mediated transformation of subterranean clover (Trifolium subterraneum L.). Plant Physiol. 105, 81-88 (1994).

Klee H., R. Horsch and S. Rogers: Agrobacterium-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. Annu. Rev. Plant Physiol. 38, 467-486 (1987).

Manners J.M.: Transgenic plants of the tropical pasture legume Stylosanthes humilis. Plant Sci. 55, 61-68 (1988).

Mariotti D., M. Pezzotti, E. Falistocco and S. Arcioni: Plant regeneration from leaf-derived callus of Lotus corniculatus L. cv. Franco. Genet. Agr. 38, 219-232 (1984).

Murashige T. and F. Skoog: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15, 471-497 (1962).

Niizeki M. and W.F. Grant: Callus, plantlet formation, and polyploidy from cultured anthers of Lotus and Nicotiana. Can. J. Bot. 49, 2041-2051 (1971).

Petit A., J. Stougaard, A. Kühle, K.A. Marcker and J. Tempé: Transformation and regeneration of the legume Lotus corniculatus: A system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet. 207, 245-250 (1987).

Puonti-Kaerlas J, T. Eriksson and P. Engstrom: Production of transgenic pea (Pisum sativum L.) plants by Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer. Theor. Appl. Genet. 80, 246-252 (1990).

Rybczynski J.J. and T. Badzian: High regeneration potential of root segments of Lotus corniculatus L. seedlings on hormone free media. Plant Sci. 51, 239-244 (1987).

Schroeder H.E., M.R.I. Khan, W.R. Knibb, D. Spencer and T.J.V. Higgins: Expression of a chicken ovalbumin gene in three lucerne cultivars. Aust. J. Plant Physiol. 18, 495-505 (1991).

Schroeder H.E., A.H. Schotz, T. Wardley-Richardson, D. Spencer and T.J.V. Higgins: Transformation and regeneration of two cultivars of pea (Pisum sativum L.). Plant Physiol. 101, 751-757 (1993).

Seaney R.R. and P.R. Henson: Bird's-foot trefoil. Adv. Agron. 22, 119-157 (1970).

Stougaard J., K.A. Marcker, L. Otten and J. Schell: Nodule-specific expression of a chimaeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic Lotus corniculatus. *Nature* 321, 669-674 (1986).

Swanson E.B. and D.T. Tomes: Plant regeneration from cell cultures of Lotus corniculatus L. and the selection and characterization of 2,4-D-tolerant cell lines. *Can. J. Bot.* 58, 1205-1209 (1980).

Swanson E.B., D.A. Somers and D.T. Tomes: Bird's-foot trefoil (Lotus corniculatus L.). In: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 10, Legumes and Oilseed Crops I, Springer, Berlin, Heidelberg pp. 323-340 (1990).

Tabaeizadeh Z.: Genetic transformation of a pasture legume, Lotus corniculatus L. (bird's-foot trefoil). *Biotechnol. Lett.* 11, 411-416 (1989).

Tetu T., R.S. Sangwan and B.S. Sangwan-Norreel: Direct somatic embryogenesis and organogenesis in cultured immature zygotic embryos of Pisum sativum L. *J. Plant Physiol.* 137, 102-109 (1990).

Tomes D.T.: A tissue culture procedure for propagation and maintenance of Lotus corniculatus genotypes. *Can. J. Bot.* 57, 137-140 (1979).

Vessabutr S. and W.F. Grant: Isolation, culture and regeneration of protoplasts from bird's-foot trefoil (Lotus corniculatus). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 41, 9-15 (1995).

White D.W.R. and D. Greenwood: Transformation of the forage legume Trifolium repens L. using Agrobacterium vectors. *Plant. Mol. Biol.* 8, 461-469 (1987).

Yu J.P. and Q.Q. Shao: Transformation of Lotus corniculatus L. mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Sci. China* 34, 932-937 (1991).

Legends

Figure 1. SEM of cultured hypocotyl (a, b) and cotyledon (c, d) segments of Lotus corniculatus. (a) Callus formation at the central part of the cut surface after seven days of culture. (b) Shoot bud formation after 21 days of culture. (c) Callus formation after 14 days of culture. (d) Regeneration from cotyledon derived callus occurs mainly via somatic embryogenesis or degenerated somatic embryogenesis (21 days).

Figure 2. Shoot formation on cotyledon explants of Lotus corniculatus after 30 days of culture (a). In this explant type, shoots develop only occasionally from shoot apices but usually from somatic embryos. Roots are not formed under these conditions. (b) Plant regeneration under rooting conditions.

Figure 3. Effect of different hormone supplements to B5 medium on the frequency of shoot formation in two explant types of Lotus corniculatus after 30 days of culture. Shoots formed either via organogenesis (mostly in hypocotyls) or embryogenesis (mostly in cotyledons) and are pooled for these data.

Figure 4. Effect of different hormone supplements to B5 medium on the number of shoots per explant in two explant types of Lotus corniculatus after 30 days of culture. Generally, cotyledons show better performance and NAA seems to have an inhibitory effect.

Figure 5. Histochemical analysis of GUS expression in transgenic Lotus corniculatus. (a) Distribution of GUS activity in leaflet section. (b) Distribution of GUS activity in cross section of leaflet. (c) High GUS activity in petiolules.

Figure 6. PCR amplification of the NPT II and GUS genes from total DNA isolated from kanamycin-resistant, GUS-positive plants of Lotus corniculatus (Control = wild type; M = 1 kb DNA ladder; numbers as in Table 2).

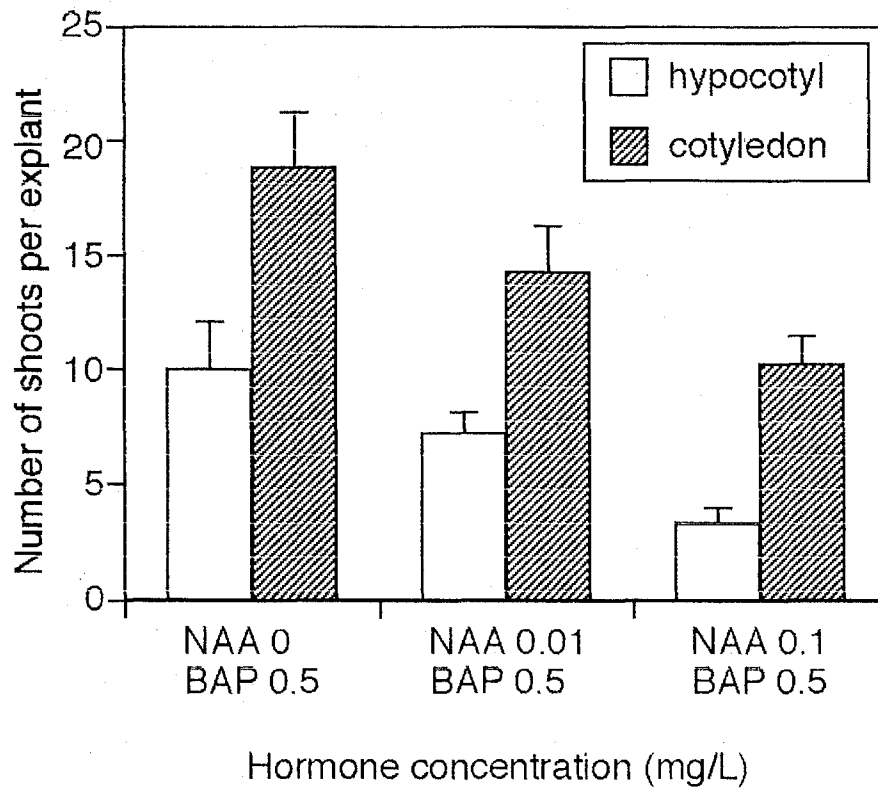
Table 1: Effect of antibiotics on shoot formation from cultured cotyledon sections of L. corniculatus.

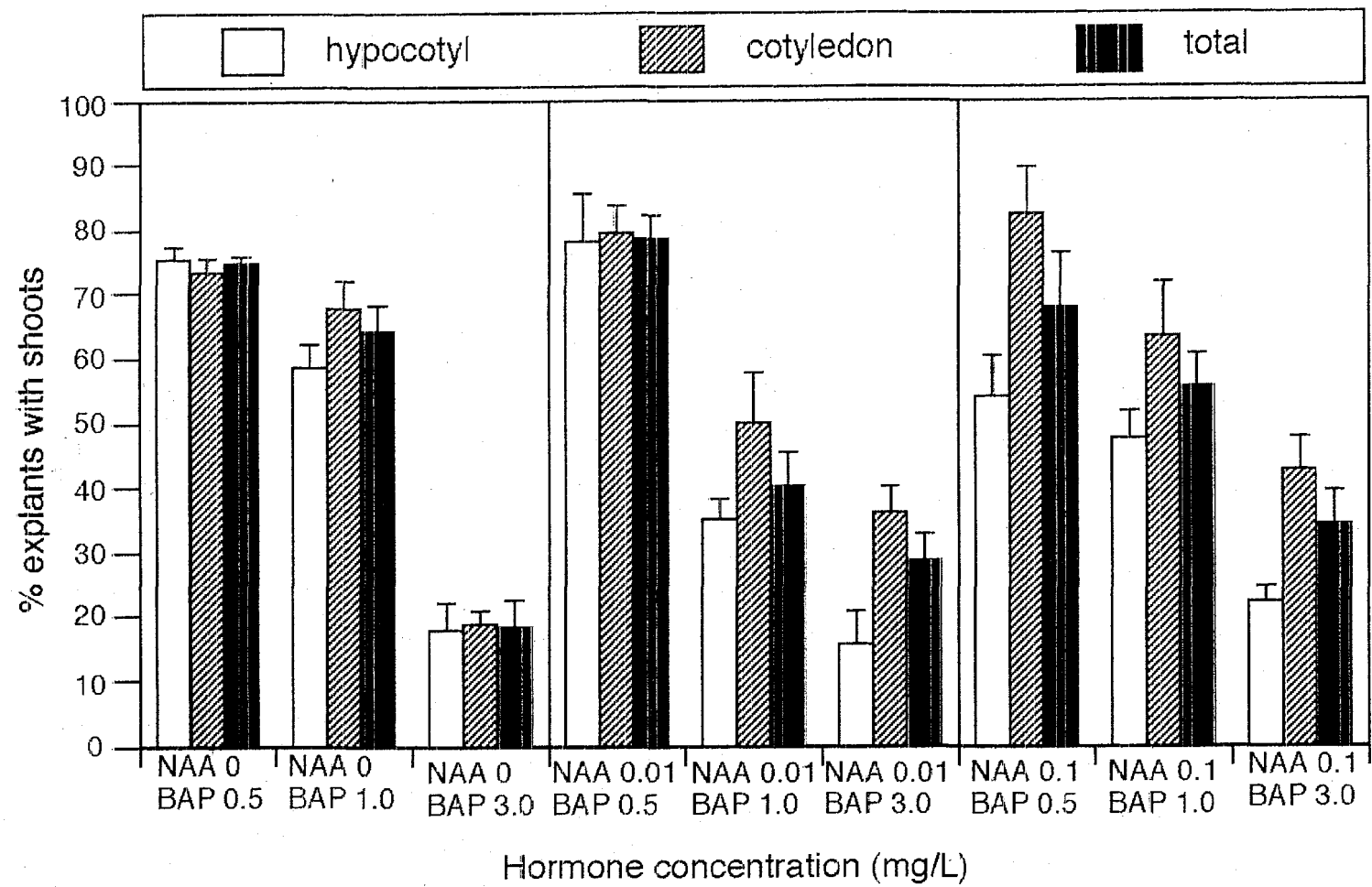
Antibiotic (mg/L)		Number of explants inoculated	Number of explants with shoots	% of explants with shoots
Kanamycin	Carbenicillin			
0	0	60	49	81.7
0	500	62	38	61.3
100	500	63	0	0
300	500	41	0	0
500	500	63	0	0

Table 2: GUS activity in tissues of transgenic plants.

Plant	GUS Activity (4-MU* pmoles/min/mg protein)			
	Leaf	Stem	Root	
Control	1	226	105	153
	2	252	104	131
	3	192	179	83
Mean		223	129	122
Transformant	1	7,168	51,459	11,546
	2	103,056	60,765	42,328
	3	263,472	223,537	8,880
	4	24,422	4,146	125,588
	5	208,008	72,801	2,770
	6	41,073	11,945	21,947
	7	7,356	11,105	22,757
	8	10,475	15,855	16,407
		13,333	17,224	16,008
		14,996	13,849	17,840
		8,672	12,485	14,094
		9,659	13,680	14,343
		7,569	18,744	13,649

* 4-methyl-umbelliferone





飼料作物の品質向上における分子育種

アカシ カワムラ
明石 良*・川村 修 (宮崎大農)

飼料作物の品質向上における分子育種

明石 良*・川村 修 (宮崎大農)

わが国における飼料作物の育種は、これまで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、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困難である。そこで、これらの育種障害を克服し、暖地型牧草の品質向上を目的とした育種を展開するためには、遺伝子組換え技術による育種法の構築が望まれる。我々は、飼料作物の品質向上における分子育種の目標を以下の2点について集約し研究を進めている。

1. 高消化性牧草の育成
2. 良質タンパク質高含有牧草の育成

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、飼料作物としての優れた性状を有していることが報告されている。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ン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 (Pillonel et al. 1991)。また、Bmrのリグニン含量は72%硫酸法で定量すると正常種より少ないがアセチルプロマイド法によるとその差が小さくなること、エステル結合のPCAおよびエーテル結合のFAが少ないこと (第1表)、リグニン構成核のうちグアイアシル (G) 核の比率が高く縮合型構造に富んでいるなどの特徴を有している (第2表)。さらに、Bmrは、リグニン含量が低いにもかかわらず酸フロログルシン反応に強く呈色することからCAD活性の低下によりリグニン前駆体がモノリグノールにならずにアルデヒドのまま重合し、その結果、葉脈が着色するのではないかと考えられる。以上のことから、CAD遺伝子をアンチセンスRNA法などにより人為的に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。また、Bmr系統におけるCADを含む他のリグニン生合成に関する遺伝子を解析することでリグニン生合成と消化性とのメカニズムを分子生物学的観点から理解することができるものと考えられる。

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 (Altenbach et al. 1987)。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・発現させれば良質タンパク質高含有牧草を育成することができる。そこで、我々は35Sプロモーターに2Sアルブミン遺伝子を接続し、プラスミドpBI121を骨格としたベクターを構築した (第1図)。この遺伝子をバーズフットトレフォイルに導入したところ、目的とする遺伝子の存在を確認した。現在、アミノ酸分析を進めている (第2図)。

以上、本研究は牧草の育種を従来の方法から遺伝子導入を基本とした育種技術へと転換させ、牧草の質的改良を行うことを意図している。しかしながら、導入した遺伝子が効果的に発現し機能するためには、さらに多くの問題を解決しなければならない。

Key words: genetic engineering, low-lignin pasture plant, sulfur-rich proteins

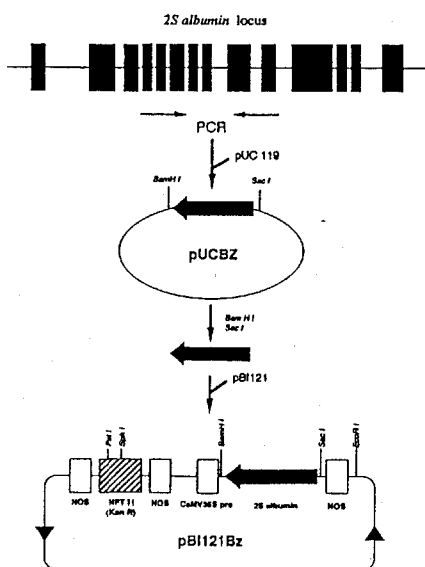
第1表 ソルガム葉身部の化学組成および消化率

遺伝子型	NDF (%乾物)	ADF (%乾物)	リグニン		エステル結合 フェノール酸		消化率 ³⁾	
			ADL ¹⁾ (%乾物)	ABL ²⁾ (%乾物)	p-クマル酸 (mg/g細胞壁)	フェルラ酸 (mg/g細胞壁)	乾物 (%)	NDF (%)
N6	51.8	26.1	3.32	0.414	3.72	5.20	86.8	74.1
Bmr6	52.6	27.4	2.47	0.404	2.07	6.28	90.2	81.3

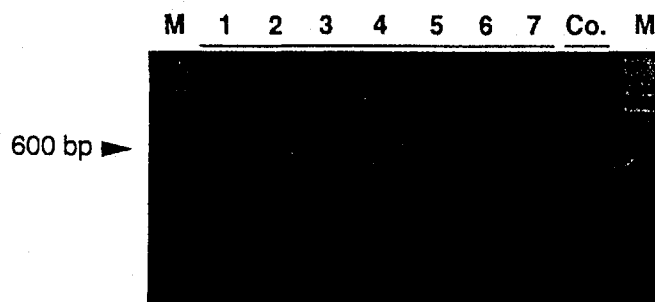
¹⁾酸性デタージェントリグニン、²⁾アセチルプロマイドリグニン (相対値)、³⁾in vitro

第2表 熱分解ガスクロマトグラフによるソルガムのリグニン構成核の比率

遺伝子型	部位	リグニン構成核 (%)		
		H型	G型	S型
N6	葉部	20.7	69.8	9.5
	茎部	36.3	56.4	7.3
Bmr6	葉部	10.1	78.7	11.2
	茎部	24.5	64.9	10.6



第1図 2Sアルブミン遺伝子を導入したプラスミドpBI121Bzの構築



第2図 PCR法による2Sアルブミン遺伝子の検出
Lane 1-7: 形質転換体
Co.: 非形質転換体
M: 1kb DNA Ladder

イネ科植物CAD (Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase) 遺伝子の構造とその発現様式の解明

1. ソルガムBmr変異体のCAD遺伝子群の構造解析
霍田真一*・明石 良・高橋 清¹・日尾野 隆²・柴田大輔³・川村 修
(宮崎大農、¹ジャパンエナジー、²新王子製紙、³三井バイオ研)

イネ科植物CAD (Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase) 遺伝子の構造とその発現様式の解明

1. ソルガムBmr変異体のCAD遺伝子群の構造解析
霍田真一*・明石 良・高橋 清¹・日尾野 隆²・柴田大輔³・川村 修
(宮崎大農、¹ジャパンエナジー、²新王子製紙、³三井バイオ研)

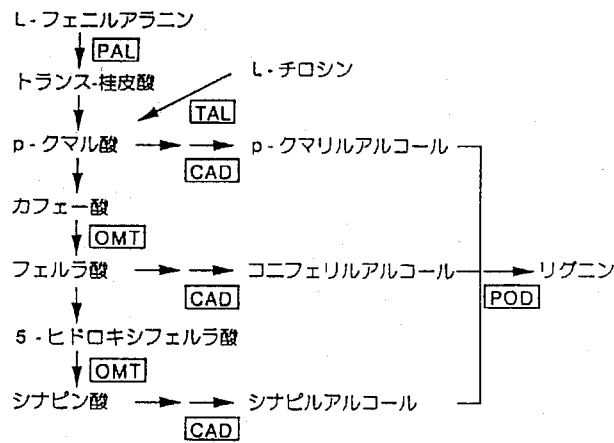
【緒論】牧草の消化率はリグニンによって大きく低下する。したがって、リグニンの生合成経路(第1図)における各酵素の活性発現は消化率と密接に関連することが想定される。CADはリグニンの生合成経路においてシンナミルアルデヒドのモノリグノールへの還元を触媒する酵素であるが、高消化性ソルガムのBmr変異体ではこの酵素活性が低いことが報告されている。このことからCAD活性を人為的に操作することで、他の牧草においても高消化性品種を育成することが可能と考えられる。また、ソルガムのBmr系統とその正常個体におけるCAD遺伝子の構造とその発現様式の解析は、リグニン生合成と牧草消化との関連を分子生物学的に理解する資となる。そこで、本報ではソルガムCADcDNA断片の一部をクローニングし、その塩基配列を決定したので報告する。

【材料および方法】ソルガムCADは、ウド(*Aralia cordata*) CAD (Hibino et al. 1993) のcDNA全長をプローブとしてブランクハイブリダイゼーション法によりソルガムcDNAライブラリー(クローンテック社)からスクリーニングした。得られたcDNA断片はプラスミドベクター(pBluescriptKS⁺)にライゲーションし、大腸菌(JM109)に導入した。青白選択法により菌株を選別後、アルカリ・SDS法で抽出したプラスミドをEcoRIで完全消化した後に、インサート確認のためウドCAD遺伝子をプローブとしてサザン解析を行った。スクリーニングおよびサザン解析にはECLダイレクトDNAラベリング検出キット(Amersham社)を使用し、塩基配列決定にはPharmacia DNAシーケンサーを用いた。

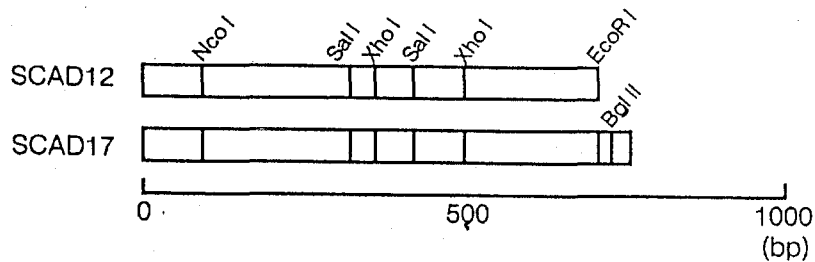
【結果および考察】ソルガムのcDNAライブラリーから1次および2次スクリーニングでハイブリダイズした1クローンを得、このクローンをλDNAサザン解析した結果約1500bpの鎖長を有していた。これをプラスミドベクター(pBluescript KS⁺)にライゲーションし、サブクローニング後、青白選択法により選別した菌株のプラスミドにおけるサザン解析の結果、約700bpのインサートを持つ2種のサブクローンを得た。それぞれのクローンをSCAD12とSCAD17とし、DNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定したところ第2図に示した通りに相同の配列で、SCAD12は738bp、SCAD17では767bpの鎖長であった。このことから、プラスミドベクターにサブクローニングした際、中間配列がEcoRIで消化され、λDNAのインサート部分と異なったサイズになったものと考えられる。これらの決定配列について既報の遺伝子とホモロジー検索を行ったところ、最も相同性の高い遺伝子は、第1表に示したようにCAD遺伝子であり、その相同性は*Eucalyptus gunnii* のpEUCADで61.3%、次いでウドのAICADでは57.5%であった。また、SCAD17とウドのCAD翻

訳領域の比較では、その配列は後半のC末端側の塩基配列から非翻訳領域部分での相同性を示していた(第3図)。現在、これらの断片は遺伝子発現解析のプロープとして十分に使用できるものと判断し、Bmr系統とその正常個体におけるCAD遺伝子の構造解析をゲノミックサザン法で、またその発現解析をノーザン法を進めている。

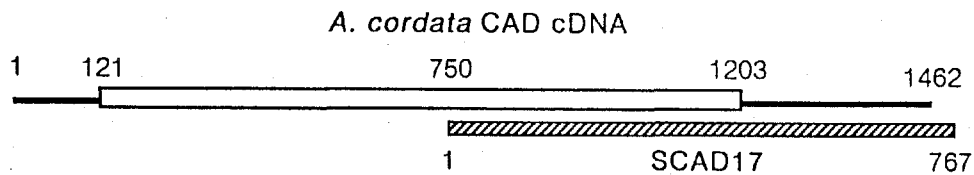
Key words: *Sorghum bicolor*, Bmr, cDNA, Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase (CAD)



第1図 フェニルプロパノイド代謝
 PAL: フェニルアラニンアンモニアラーゼ
 TAL: チロシンアンモニアラーゼ
 OMT: ヒドロキシ桂皮酸-*o*-メチルトランスフェラーゼ
 CAD: シナミルアルコールデヒドロゲナーゼ
 POD: ペルオキシダーゼ



第2図 ソルガムC A D cDNA断片の制限酵素地図



第3図 ソルガムC A D cDNA断片 (SCAD17) と *A. cordata* CAD cDNA 翻訳領域との比較

□ : *A. cordata* CAD cDNA翻訳領域、▨ : ソルガムC A D cDNA断片

第1表 既報のCAD遺伝子とソルガムSCAD17とのDNA塩基配列における相同性比較

種名	遺伝子名	塩基サイズ (bp)	相同性領域 (bp)	相同性 (%)
<i>Eucalyptus gunnii</i>	CAD cDNA	1377	731-1356	61.3
<i>Aralia cordata</i>	CAD cDNA	1462	750-1444	57.5
<i>Pinus taeda</i>	CAD cDNA	1355	656-1254	57.1
<i>Eucalyptus botryoides</i>	CAD genomic DNA	3288	2338-3106	53.1
<i>Eucalyptus gunnii</i>	CAD genomic DNA	5265	4399-5158	51.7

イネ科植物CAD (Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase) 遺伝子の構造と
その発現様式の解明

2. ソルガムBmr変異体のCADタンパク質の性質

明石 良・坂谷洋一郎*・川辺俊生・三澤尚明・川村 修 (宮崎大農)

イネ科植物CAD (Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase) 遺伝子の構造と
その発現様式の解明

2. ソルガムBmr変異体のCADタンパク質の性質

明石 良・坂谷洋一郎*・川辺俊生・三澤尚明・川村 修 (宮崎大農)

【緒論】 CADはケイヒアルコール生合成の最終段階でアルデヒドがアルコールに還元する反応を触媒する酵素で、植物組織におけるリグニン形成と密接な関係がある。その性質は、2、3の植物において検討され、NADPHを補酵素として基質特異性が比較的広いことなどが明らかにされているが詳細は不明である。我々はイネ科植物のCAD遺伝子の発現様式をタンパク質レベルで解析することを目的として、CAD活性が異なるソルガムの正常系統とその変異系統のCAD蛋白を抽出・精製し、その酵素学的性質について検討し、また精製過程でウドCAD抗体 (Hibinoetal.1993) を用いてELISA法により分画したところCAD活性を有する画分を効率よく得ることができたので報告する。

【材料および方法】

1. 酵素の抽出

供試材料はソルガムの正常系統 (N6) とその変異系統 (Bmr6) で、播種後70日目のものを採取し、抽出に供するまで-80℃で保存した。莖葉を2倍量の0.2Mリン酸緩衝液 (42mM 2-Mercaptoethanol, pH7.5) と共に粉碎し1時間攪拌抽出した後、孔径33 μ mのナイロンネットで濾過して遠心した。その上清を硫酸アンモニウム40~70%飽和とし、遠心後の沈殿物を回収した。これを20mM Tris-HCl緩衝液 (42mM 2-Mercaptoethanol, 10% (v/v) ethyleneglycol, pH7.5) で溶解し、同緩衝液で膨潤させたBioGelP-6DGカラム (1.5 \times 10cm) で脱塩した後、DEAE-Sephacelカラム (1.5 \times 23cm) により20~500mMのTris-HCl緩衝液 (pH7.5) で40のフラクションに分画した。なお、総タンパク質の測定にはBio RAD社のProtein Assay Kitを用いた。

2. CAD活性の測定

コニフェリルアルデヒドを基質に用いて、NADPH存在下で37℃で30分間反応させ、コニフェリルアルデヒドの減少を吸光度340nmで測定することによった。

3. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) による測定

DEAE-Sephacelカラムで分画した各フラクションをウドCADを抗体とした交差反応により検出し、吸光度492nmで測定した。

4. SDS-PAGEおよびウェスタンブローディング

SDS-PAGEはLaemmli法に準じて行った。すなわち、12.5%アクリルアミドゲルにより電気泳動を行い、コマシーブリリアントブルーまたは銀染色により染色し検出した。ウェスタンブローディングにはセミドライ方式を適用しPVDF膜に転写させ、ウドCAD抗体を1次抗体としてペルオキシダーゼで標識した抗ウサギIgGと反応させた後、3,3'-ジアミノベンジジンもしくは4-クロロ-1-ナフトールで発色させた。

【結果および考察】 Fig.1にはN6およびBmr6系統におけるDEAE-Sephacelによる蛋白の溶出曲線を示した。両系統とも複数の蛋白溶出ピークが認められたものの、コニフェリルアルデヒドに対するCAD活性はTris-HCl濃度勾配による溶出の中間から後半部分 (フラクション (F) 19~30) で認められた。また、全画分におけるCAD活性の測定結果では両系統ともF0~10、10~20および20~30において活性のピークが存在し、F19~30の活性ピークでは蛋白ピークと一致した。また、その活性はN6の方が高い値を示した (Table1)。一方、全画分におけるELISAでの測定結果ではそのピークがF19~30のみ認められ、CAD活性のピークと同様の傾向を示した。このことから、この画分がCAD蛋白であるものと推察される。次に、2系統においてELISAでピークが認められた画分をSDS-PAGEしたところ、約44kDの蛋白においてN6とBmr6とのバンドパターンが異なっていた (Fig2)。そこでウドCAD抗体を用いてウェスタンブローディングしたところ、N6ではウドCAD抗体と反応する2本のバンドを有したのに対してBmr6は検出されなかった。このことから、これらのバンドがCAD蛋白と関係するものと考えられ、このバンドの消失がBmr6でのCAD活性の低下と関連があるものと推察される。以上のことから、ソルガムの2系統においてCAD蛋白を精製し、その際ELISAを適用してCAD活性を有する画分を効率よく得ることができた。現在、これらのCAD蛋白においてイオン交換クロマトグラフィーによる分画を進めている。

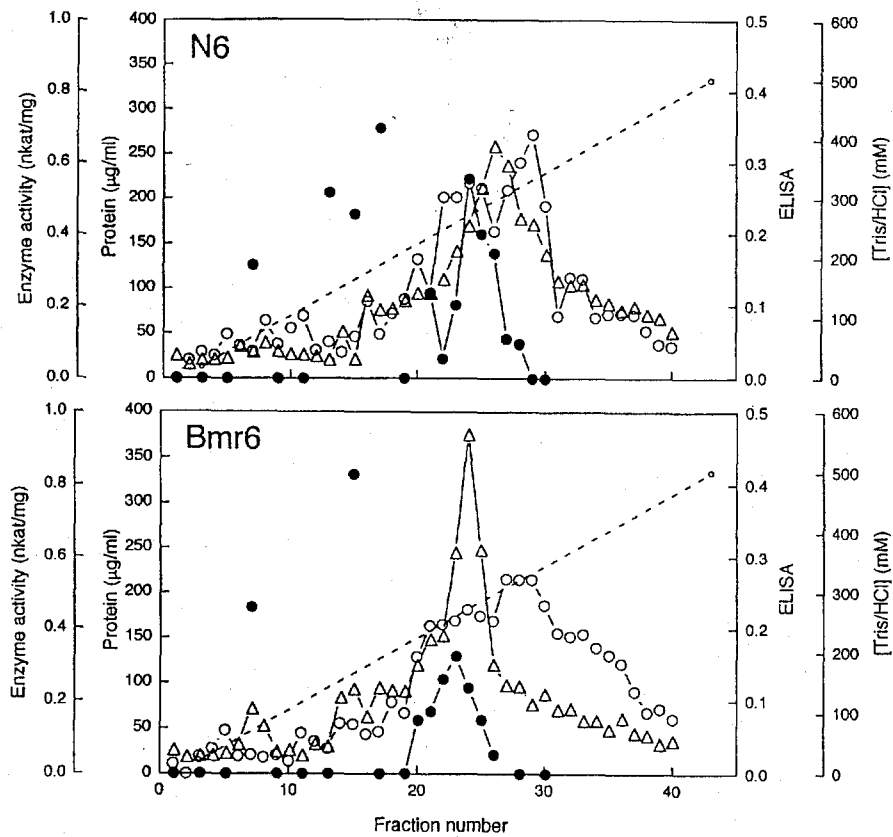


Fig. 1. Separation of cinnamyl alcohol dehydrogenase on DEAE-sephacel. (○—○) Protein; (●—●) dehydrogenase activity; (△—△) ELISA; (○-----○) buffer gradient.

Table 1. Purification procedure for cinnamyl alcohol dehydrogenase from sorgum

Purification step	Genotype	Protein mg	Specific activity nkat/mg protein	Purification - fold
1. Ammonium sulfate (40-70% saturation)	N6	27.1	0.125	-
	Bmr6	27.1	0.031	-
2. DEAE-sephacel	N6	1.1	0.548	4
	Bmr6	0.85	0.322	10

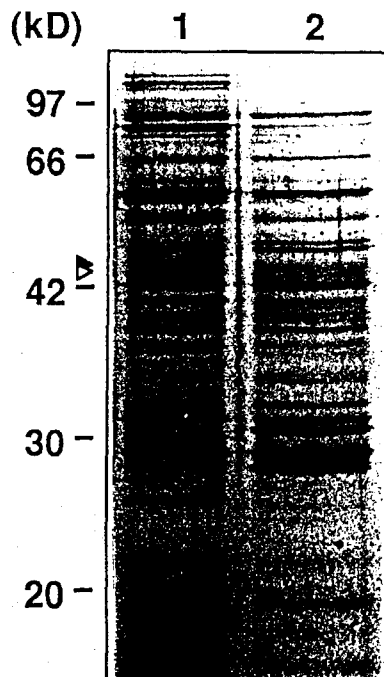


Fig. 2. SDS-PAGE of fraction containing CAD activity taken on DEAE-sephacel. Lane 1, N6; Lane 2, Bmr6. ▶; 44.2 kD, ▷; 43.6kD

遺伝子工学的手法を用いた飼料作物の品質向上に関する研究
1. アグロバクテリウムを用いたバズフットトレフォイルの
形質転換

アカシ 74ヤマ サカモト カワムラ
明石 良・内山徹哉*・坂本篤史・川村 修 (宮崎大農)

遺伝子工学的手法を用いた飼料作物の品質向上に関する研究
1. アグロバクテリウムを用いたバズフットトレフォイルの
形質転換

明石 良・内山徹哉*・坂本篤史・川村 修 (宮崎大農)

【緒論】 最近、特定のタンパク質の発現制御にアンチセンスRNA法が有効であることが報告されている。すでに、この手法により特定の遺伝子の発現を抑制された植物が得られている。したがって、リグニン生合成経路の鍵酵素であるCADのアンチセンス鎖を導入することにより、グニン含量が低く、消化率の高い牧草を作出することが可能と考えられる。

そこで、本研究では遺伝子工学的手法を用いた飼料作物の品質向上におけるモデル実験としてバズフットトレフォイルを用いたアグロバクテリウム法による形質転換を行った。

【材料および方法】 植物材料バズフットトレフォイルは、雪印種苗から購入した品種 (cv. Viking) である。種子は、70%エタノールに1分間、次いで、次亜塩素酸ナトリウム (有効塩素: 2%) に20分間浸漬し滅菌処理を行った。その後、滅菌水で3回洗浄し、ホルモン無添加のMS (3%ショ糖、0.5%ゲルライト) 寒天培地に播種し、3000lux、16時間照明下、25℃で発芽、生育させた。

形質転換には、アグロバクテリウムLBA4404に、プラスミドpBI121(pnos/NPT II/T nos + 35S/GUS/T nos) (クローンテック社) を導入し、25 mg/mlのカナマイシン、300mg/mlのストレプトマイシンおよび100mg/mlのリファンピシンを含むLB液体培地で28℃1晩培養した菌株を用いた。次に、10~14日目の無菌植物体の子葉を切り取り、さらにその両端を2mm程度切り揃えた後、菌の懸濁液に30分間浸漬し、余分な菌液を濾紙で取り除き、0.5mg/LBAPおよび0.1 mg/LNAA を添加したB5寒天培地上 (3%ショ糖、0.3%ゲルライト) に置床して、3000 lux、16時間照明下、25℃で培養した。一週間後、子葉片は上記の培地に500mg/mlクラフォランを添加した培地に移植し培養を継続した。さらに1週間後、クラフォランおよび100mg/mlカナマイシン添加培地 (抗生物質培地) に継代し、その後、2週間おきに新鮮抗生物質培地に継代培養を重ねた。その間子葉片から再生した個体については、植物ホルモン無添加の1/2 B5寒天培地で発根を促し生長させた。生長した再生植物体は無菌状態で生育させ、X-glucおよび4-MUGを基質として用いてGUS染色および活性の測定を行った。得られた形質転換体はアルカリ法によりDNAを抽出し、PCR法によりGUS遺伝子の確認を行った。プライマーは、GUS遺伝子の翻訳領域の3'-末端部の塩基配列 (5'-AACTGGACAAGGCACTAGCGG-3') および3'-末端部の相補的配列 (5'-AAGTTCATGCCAGTCCAGCGT-3') を用い、PCR反応条件は94℃5分の後、94℃1分、63℃2分、72℃3分を45サイクル行った。

【結果および考察】 サブクローバーにおける形質転換では、その効率はアグロバクテリウム培養培地に依存することが報告されている (Rafiquli et al. 1994)。そこで、本実験においては2種類のLB培地で培養したアグロバクテリウムにより形質転換を行った。Table1は、共存培養後、子葉片を選択培地で培養120日目のshoot形成率について示したものである。LB培地では、shoot形成率が19.0%とmLB培地よりも高い値を示したのに対して、全再生shoot数は129と低い値を示した。一方、GUS

遺伝子の認められたshoot数ではLB培地の方が9個体と高く、その効率は7.0%であった。したがって、バースフットトレfoilでの形質転換効率はLB培地の方が高く、サブクローバーで得られた結果と異なっていた。

これらの形質転換体のうち正常に生育する個体についてゲノムDNAを抽出し、PCR法による導入遺伝子の確認を行った。その結果、GUS遺伝子(1.1kb)と同様の位置に増幅したバンドが検出された(Fig.1)。次に、形質転換体13個体におけるGUS遺伝子の発現量を調査したところ、形質転換個体間によって、また器官間において発現量にかなりの差異が認められ、その発現量は葉、茎、根の順に高い傾向にあった(Table2)。

現在、導入遺伝子の存在を確認したクローンにおいてGUS遺伝子の発現の様相を詳細に調査を進めている。また、この系を用いてアンチセンスCAD遺伝子の導入を試みたところ、PCR法によって導入遺伝子を確認することができた。

Key words: bird's-foot trefoil, *Agrobacterium tumefaciens*, pBI121, β -glucuronidase, polymerase chain reaction (PCR)

Table 1 Effect of *Agrobacterium* medium on the frequency of shoot formation and that of transformation.

<i>Agrobacterium</i> culture medium	Number of segments cultured	Number of segments with shoots	Total number of shoots regenerated	Number of GUS+ shoots
	A	B(B/A%)	C	D(D/C%)
LB	105	20 (19.0)	129	9 (7.0)
mLB ¹⁾	94	16 (17.0)	199	8 (4.0)

¹⁾mLB: LB + 0.1%NaCl + 10mM Glucose

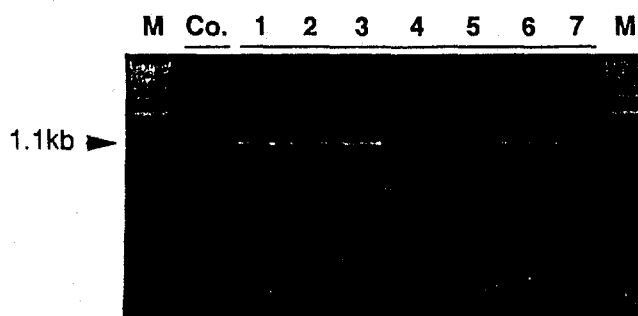


Fig. 1 Detection of GUS gene by PCR.
Co.: non-transformant
Lane 1-7: transformants
M: 1kb DNA Ladder

Table 2 GUS activities in organs of transgenic plants.

Plant	GUS Activity (4-MU pmoles/min/mg protein)			
	Leaf	Stem	Root	
Control	1	226	105	153
	2	252	104	131
	3	192	179	83
	Mean	223	129	122
Transformant	1	7,168	51,459	11,546
	2	103,056	60,765	42,328
	3	263,472	223,537	8,880
	4	24,422	4,146	125,588
	5	208,008	72,801	2,770
	6	41,073	11,945	21,947
	7	7,356	11,105	22,757
	8	10,475	15,855	16,407
	9	13,333	17,224	16,008
	10	14,996	13,849	17,840
	11	8,672	12,485	14,094
	12	9,659	13,680	14,343
	13	7,569	18,744	13,649
Mean	54,762	40,584	25,243	

ソルガム褐色中央脈突然変異体 (BMR-6) の性状
—アルデヒドとリグニンの節間内分布について—

川辺 俊生*・坪井 桂子・川村 修 (宮崎大学農学部)

【目的】

トウモロコシやソルガムなどにおける褐色中央脈突然変異体 (Brown Midrib Mutant 以下BMR) はリグニンの含量が低く消化率が高いという優れた性質を持っており、消化率改良のモデル植物として注目されている。このうちソルガムのBMR-6では、リグニン生合成経路において、シナミルアルデヒドを還元する反応を触媒するシナミルアルコールデヒドロゲナーゼの活性が低下しており、シナミルアルデヒドの一部がそのまま蓄積するものと考えられている。本実験ではこのBMR-6の性状を、特に組織化学的な面から検討することを目的とし、まず茎部の植物組織を顕微解剖学的に分離分画して化学分析を行い、アルデヒドおよびリグニンの分布について正常種 (Normal-6 以下N-6) との比較を行った。

【方法】

材料草として、1996年8月1日に播種したソルガム (N-6およびBMR-6) を同年11月7日 (乳熟初期) に採取した。実験には、最下位節間からかぞえて6番目の節間を用いた。分画においては、実体顕微鏡下で、節間の最外層を出来るだけ薄く剥ぎ表皮画分とし、次いで、髄から表皮に向かって髄中の大維管束と柔組織を分離してそれぞれを維管束画分および柔組織画分とし、残りの組織、すなわち小維管束を含む厚壁組織を厚壁組織画分とした。アルデヒドはフロログルシン塩酸反応陽性物質を測定する Garcia&Latgeの方法で、リグニンはアセチルプロマイド法で測定し、各々の吸光度をもって相対的な含量を検討した。更に厚さ200 μ mの横断切片にフロログルシン塩酸反応およびSchiff反応を適用し、組織染色的にアルデヒドの検出を行った。

【結果】

供試材料の茎部の消化率はBMR-6の方が高い値を示した (表1)。

各組織画分のアルデヒド濃度については、BMR-6はN-6と比べて表皮、厚壁組織、維管束画分で有意に高い値を示した。BMR-6においては維管束画分のアルデヒド濃度が最も高く、次いで柔組織画分で、N-6においては柔組織画分が最も高かったもののBMR-6のそれとほとんど差はなかった。リグニン濃度については、BMR-6がN-6より表皮、厚壁組織、維管束画分で有意に低い値を示した。柔組織画分ではあまり差はなかった。なおリグニンあたりのアルデヒドについても、BMR-6はN-6と比べて表皮、厚壁組織、維管束画分で有意に高い値を示し、柔組織画分ではあまり差はなかった。またN-6、BMR-6ともリグニンあたりのアルデヒドは柔組織画分で最も高かった (表2)。

横断切片におけるフロログルシン塩酸反応およびSchiff反応の結果 (表3) は各組織画分のアルデヒド定量の結果 (表2) とほぼ同様の傾向を示したが、Schiff反応の方がアルデヒド定量の結果により近かった。

4組織画分の合計における各組織画分の割合については、N-6では厚壁組織画分の割合が、BMR-6では柔組織画分の割合が高かった (図1)。BMR-6のアルデヒドは、維管束画分および柔組織画分に比較的多く分布し (図2)、リグニンは厚壁組織画分への分布が比較的少なかった (図3)。

表1 供試材料 (茎部) のin vitro消化率 (%)

	乾物	NDF
N-6	75.8	73.7
BMR-6	83.6	81.3

表2 各組織画分のアルデヒドおよびリグニン含量

	アルデヒド(吸光度/乾物g)		リグニン(吸光度/乾物g)		アルデヒド/リグニン	
	N-6	BMR-6	N-6	BMR-6	N-6	BMR-6
表皮画分	23.0 (**)	44.2	25.9 (*)	18.1	0.9 (**)	2.5
厚壁組織画分	25.6 (*)	38.8	27.4 (*)	21.5	0.9 (*)	1.8
維管束画分	32.4 (*)	62.2	30.3 (*)	22.3	1.1 (**)	2.8
柔組織画分	51.7 NS	51.0	5.5 NS	4.3	10.5 NS	11.9

** : p < 0.01 で有意差あり * : p < 0.1 で有意差あり NS : 有意差なし n = 4

表3 組織化学反応による呈色

	フロゲルソン塩酸反応		Schiff反応	
	N-6	BMR-6	N-6	BMR-6
表皮画分	++	++	-	++
厚壁組織画分	++~-	++~±	-	++~-
維管束画分	++	+++	±	++
柔組織画分	±	+~-	+~-	±

最強の呈色を+++、全く呈色しなかったものを-、とした。

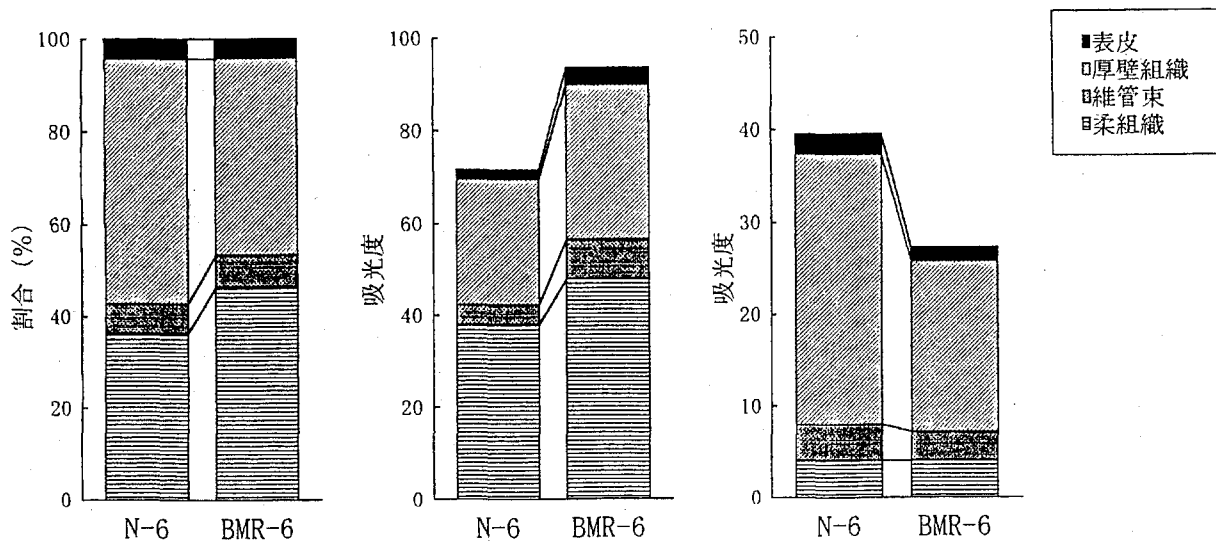


図1 各組織画分の乾物が全組織画分の乾物合計量に占める割合(%)

図2 各組織画分におけるアルデヒドの含量

図3 各組織画分におけるリグニンの含量