

広葉樹の形質転換系の開発

生物機能開発部

毛利 武

林木は永年性であり、生殖活動を開始するまでの期間が極めて長い。従って、従来の育種技術により、人間が望む新たな品種を作出することは非常に困難である。林木の遺伝子操作技術は、親の望ましい形質の全てを保持させたまま、単一の形質のみを選択的に改変するための有効な手段といえる。現在、形質転換（遺伝子組換え）植物体を作成するには、主に二つの手法が用いられている。その一つは、アグロバクテリウム法であり、土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* または *A. rhizogenes* が植物に感染し、アグロバクテリア細胞内のプラスミドの一部を植物ゲノムDNAに組み込み、ホルモン異常を起こさせる現象を利用したものである。しかし、この手法を用いることができるのはアグロバクテリウムの宿主となる植物種に限定される。そこで、アグロバクテリウム法を適用できない植物種には、パーティクルガン法が用いられる。パーティクルガン法は、DNAを金属粒子（直径1 μ m程度）にコーティングし、音速以上に加速して植物細胞に打ち込み、細胞壁、細胞膜を貫通させて細胞内に組み込むことにより植物を形質転換する方法である。

本研究では、アグロバクテリウム法によってポプラ、シラカンバ、キリの形質転換系を開発することを目的として実験を行った。その際の導入遺伝子としては、レポータ遺伝子として最も一般的な大腸菌由来の β -グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子を用いた。さらに、キリではホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子を用いてパーティクルガン法による遺伝子導入も試みた。



写真1. *Agrobacterium tumefaciens*を用いて形質転換したポプラ（スケール=1cm）

アグロバクテリウム法による形質転換実験において、茎はポプラ形質転換体の作出で最も有効な組織切片であった。形質転換体の葉は組織化学的染色法で全体が青く染色され、GUS遺伝子が強く発現していることが示された。また、試験管内定量法による分析では、形質転換体の葉は非形質転換体の葉と比較して約200倍のGUS活性を示した。さらに、サザンプロット分析により、形質転換体にはゲノム当たり約1コピーのGUS遺伝子が組み込まれていることを明らかにした。

同様に、アグロバクテリウム法によるシラカンバ、キリの形質転換実験での諸条件を検討したところ、シラカンバでは茎、キリでは葉柄が最も有効な組織切片であった。次に形質転換体を分析したところ、強いGUS活性が検出され、サザンプロット法によって形質転換体のゲノムDNA中にGUS遺伝子が組み込まれていることを確認した。

また、キリを用いたパーティクルガン法による遺伝子導入実験では、遺伝子導入処理したキリの組織片は高い発光強度を示し、一過性のルシフェラーゼ遺伝子の発現が認められた。

以上のように、広葉樹のポプラ、シラカンバ、キリにおいて効率の良い形質転換系を確立した。これらの形質転換系は、経済的に有用な遺伝子、形態形成を制御する遺伝子や病虫害にかかわる遺伝子を発現させる形質転換体の作出を可能とした。



写真2. *A. tumefaciens*を用いて形質転換したシラカンバ（スケール=2cm）