

シリコンカーバイド繊維法による イネ科植物細胞への外来遺伝子の導入

堀 川 洋

畜産環境科学科飼料作物科学講座

1. 目 的

植物細胞への外来遺伝子導入法がこれまでいくつか開発されてきた。このうち、アグロバクテリウム法は双子葉植物にのみ利用が可能であり、エレクトロポレーション法はプロトプラストからの再分化系が確立されている植物を対象にしなければならないため、いずれも適用範囲が限定されていた。その後パーティクルガン法の開発によって、現在では原則的に全ての植物細胞に遺伝子を導入することが可能になっている。しかし、装置が高価なことや操作も比較的煩雑であるため、より安価で容易な遺伝子導入法が求められていた。

Kaeppler, H. E. ら (1990) は、特別な装置を必要とせず操作も非常に簡単なシリコンカーバイド繊維法を開発し、トウモロコシとタバコ懸濁培養細胞への遺伝子導入に成功したことを報告した。本研究は、シリコンカーバイド繊維法によるイネ科植物細胞への外来遺伝子導入の可能性を検討した。

2. 方 法

チモシー懸濁培養細胞 チモシー種子からカルス誘導した細胞を MS 液体培地 (2, 4-D, 5 mg/l) で 3 週間ごとに継代培養したものを使用した。

プラスミド DNA プラスミド pBI 221 (Clontech Lab. Inc.) は β -グルクロニダーゼ (GUS) レポーター遺伝子を含んでおり、CaMV 35 S-promoter-GUS-NOS によって構成されている。

DNA 導入法 シリコンカーバイド (炭化けい素, β 型, 長さ 10-80 μm , 直径 0.4 μm , 和光製) を滅菌水で所定の濃度に希釈し、それと懸濁培養細胞, プラスミド DNA および液体培地をエッペンドルフチューブに入れ、ボルテクスミキサーで 60 秒間攪拌することによって、細胞内に外来遺伝子を導入する。処理条件は、表 1 に示した組合せで行った。

GUS 検定 処理後、サンプルを 25°C で 48 時間培養し、これに X-Gluc を含む GUS 反応液を加え 37°C で数日間培養後、外来遺伝子の導入によって青色色素を特異的に発現する細胞を観察した。

3. 結果および考察

最初に Kaeppler らがタバコとトウモロコシ細胞で遺伝子導入に成功したものと同一条件の DNA 5 μl , シリコンカーバイドファイバー 5% (w/v) およびチモシー懸濁細胞 50 μl で実験を行った。しかし、その結果、GUS 発現細胞は全く見られず、遺伝子は導入されなかった。さらに、ファイバー

Table 1. Silicon carbide fiber-mediated delivery of GUS gene into timothy (*Phleum pratense* L.) suspension culture cells.

Volume of DNA (μ l)	Volume of fibers (%)	Volume of cells (μ l)	GUS expression
5	5	50	---
5	10	50	---
5	20	50	---
2	10	200	---
2	20	200	---

--- : Not detected.

量を基準の2, 4倍,あるいは細胞量を4倍として4つの実験を行ったが,いずれにおいてもGUS発現は検出されなかった(表1)。

シリコンカーバイド繊維法による植物細胞への遺伝子導入の成功は,これまでKaepplerら(1990, 1992)の2例しか報告されていない。タバコとトウモロコシの場合には,本法によって細胞当りの遺伝子導入頻度は 10^{-6} と報告されている。これは,同じ物理的圧力を利用して遺伝子を細胞内に導入するパーティクルガン法の 10^{-4} に比較してかなり効率の低いものである。このようなシリコンカーバイド法における効率の低さは,DNA担体としてのシリコンカーバイドが細胞壁と細胞膜を貫通して細胞内に遺伝子を導入するためには,ボルテクスによる物理的作用だけでは必ずしも充分でないことに起因しているものと考えられる。

またシリコンカーバイド法で使用するDNA量は,パーティクルガン法に比べて細胞当たり100倍以上である。したがって,シリコンカーバイド法によるDNA量当りの導入効率はパーティクルガン法に比べて 10^{-4} である。本試験では,使用できるDNA量に制限があったため非常に少量の細胞しか供試できなかった。このため,元来低い頻度の遺伝子導入細胞を確率的にも検出できなかった可能性も考えられる。

今後シリコンカーバイドによる遺伝子導入法を確立するためには,植物種による細胞壁や細胞膜の性状と担体に加える物理的條件の相互関係について更に検討する必要があると考えられる。

4. 引用文献

- 1) Kaeppler, H. E., W. Gu, D. A. Somers, H. W. Rines and A. F. Cokburn (1990) Plant Cell Reports, 9 : 415-418.
- 2) Kaeppler, H. F., D. A. Somers, H. W. Rines and A. F. Cokburn (1992) Theor. Appl. Genet. 84 : 560-566.