3Aa-7

DNA形質転換における外来遺伝子の組み込み機構と発現

内宮博文, 師田浩史 (筑波大・生物)

近年, 高等植物を用いた外来遺伝子の導入に関する研究が急速に進展しつつある。特に, “プロトプラスト” への遺伝子の直接導入法は, 双子葉植物から単子葉まで宿主領域を拡大する上で重要である。本研究では, タバコ ($2n=48$) 葉肉プロトプラストを用い, 細菌のプラスミドベクターによる形質転換系の確立を試みると共に, 形質転換体における遺伝子発現, DNAの組み込み機構等について検討した。

使用したベクター (pCTIT3) は, 植物での発現マーカーとして, カナマイシン耐性のキメラ遺伝子とTiプラスミドに由来するノパリン合成酵素の遺伝子を保持している。さらに, タバコ核DNAよりクローン化された *arS* 配列 (1.2kb) をベクターに付加した。その結果, プロトプラストへのDNA導入からカナマイシン耐性カルスの選択ならびに植物体の分化までには, 3~4ヶ月必要であった。本ベクターを用いて得られた形質転換体17クローンのうち, 15クローンより植物体を得る事が出来た。それらについて, 種子形成, 植物体の特徴を検定した (表1)。さらに, 得られた種子をカナマイシン (200~400 $\mu\text{g/ml}$) を含む培地で発芽させ, 遺伝解析を行ったところ, 外来遺伝子は対合する一本の染色体上に導入されているものと推定された。

また, カナマイシンへの耐性の程度は, クローン間で異なるが導入された遺伝子量との対応関係は認められなかった。 (表1)

つぎに, 2つのマーカー遺伝子を同時に保持する形質転換体 (表1のT3系統) を用い, 導入された遺伝子の安定性について遺伝解析を行った。この為, 異なる遺伝子型をもつ子孫を得た。つぎに2つのマーカー遺伝子に特異的なプローブを作成し, サザン法により分析した。その結果, 2つの遺伝子は同一染色体上に連鎖して存在する事が確かめられた。さらに染色体上への挿入に際しては, プラスミドの一部が導入された可能性を示唆するデータが得られた。今後, これらの知見を基にベクターと宿主染色体DNAの境界領域配列の決定, 遺伝子発現と位置効果の関係, ベクターのターゲティングの可能性等について究明する必要があるものと思われる。

Characteristics of plants obtained by DNA transformation of tobacco protoplasts.

Clone No.	No. of subclones	Fertility		Kanamycin ⁽¹⁾ tolerance level	Others
		seed-set	germination		
T1	(4)	+	+	W	Nos (+)
T2	(2)	+	+	W	
T3	(4)	+	+	S	Nos (+)
T4	(4)	+	+	W	
T5	(1)	+	-	-	
T6	(3)	+	+	S	
T7	(4)	+	+	S	
T8	(4)	+	+	W	
T9	(1)	-	-	-	
T12	(2)	+	+	W	
T13	(1)	+	+	W	Variegated
T14	(7)	+	+	-	
T15	(5)	+	+	W	
T16	(1)	-	-	-	
T17	(3)	+	+	W	
(36)		12/15		11/12	

(1) W: 200 μg Kanamycin sulfate/ml
S: 400 μg Kanamycin sulfate/ml