

6. アグロバクテリウム法によるネリカの形質転換					
〔要約〕アグロバクテリウムの未熟胚への接種、および接種後の選抜条件を至適化することによりネリカ品種の形質転換法を開発した。得られた形質転換体の外来遺伝子の植物染色体への組み込み、発現、後代への伝達および分離を確認した。この手法により、遺伝子組換えによるネリカの品種改良が可能となる。					
所属	国際農林水産業研究センター・生物資源領域		連絡先	0980 (82) 2396	
専門	バイテク、育種	対象	稲類	分類	研究

【背景・ねらい】

ネリカ (NERICA=New Rice for Africa) は、WARDA (Africa Rice Center) を中心とするグループにより開発されたアジアイネ (*Oryza sativa* L.) にアフリカイネ (*O. glaberrima* Steud.) を交配した種間雑種品種であり、高生産性の新しいイネ品種として大きな期待を集め、一部ではその普及が始まっている。理論上、ネリカには *O. glaberrima* のゲノムが 12.5% 導入されており、これまでネリカへの遺伝子導入系は確立されていない。本研究では、遺伝子組換え技術により乾燥等のストレスに対する抵抗性をネリカ品種に付与することを目的として、ネリカの形質転換系を開発する。

【成果の概要・特徴】

1. アグロバクテリウム法によるネリカの遺伝子導入系を開発した。以下の手法により、陸稲ネリカ 18 品種のうち 14 品種において形質転換体を得ることができた。
2. 方法
 - ・バイナリーベクター pBIG-ubi::GUS (図 1A) を保持する *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株をネリカ未熟胚に接種し、3 日間共存培養した。
 - ・共存培養後の未熟胚において、GUS 発現を確認した (図 1B)。
 - ・選択培地 [500 mg/l クラフォランおよび 20 mg/l ハイグロマイシンを含む N6D 培地 (Toki, 1997)] 上で共存培養後の未熟胚を培養することにより、アグロバクテリウムの除去および形質転換カルスの選抜を行った。形成されたカルスは、再分化培地 [250 mg/l クラフォランおよび 20 mg/l ハイグロマイシンを含む MS-NK 培地 (Ishizaki and Kumashiro, 2008)] 上で植物体を分化した (図 1C)。形質転換効率には品種間差違が認められた (図 2)。
 - ・再生個体は 30 mg/l ハイグロマイシンを含むホルモンフリーの MS 培地上で生長した (図 1D)。
3. 形質転換体の解析
 - ・再生個体へのハイグロマイシン抵抗性遺伝子および GUS 遺伝子の導入を PCR により確認した (図 1E)。
 - ・形質転換体の葉において、GUS 活性を確認した (図 1F)。
 - ・温室内で育成した形質転換体の大部分 [86.9% (166/191)] は正常な形態を示し、高い種子稔性を示した (図 1G)。
 - ・導入遺伝子の後代への伝達および分離をサザンブロットにより確認した (図 3)。

【成果の活用面・留意点】

1. ネリカ品種への有用遺伝子導入に活用できる。
2. 形質転換効率について、品種間差違が存在するが、広く普及が見込まれる NERICA1 および NERICA4 は問題なく形質転換可能である。

[具体的データ]

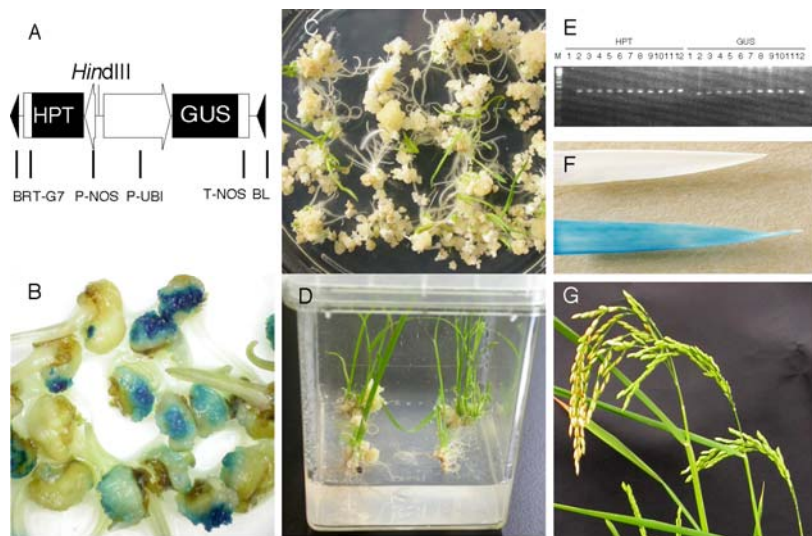


図1 アグロバクテリウム法によるネリカ形質転換体の作出. A, バイナリーベクターpBIG-ubi::GUSのT-DNA領域の構造およびHindIIIサイト; B, アグロバクテリウム接種7日後の未熟胚におけるGUS活性; C, 20 mg/l ハイグロマイシンを含む培地上で再生したシュート; D, 30 mg/l ハイグロマイシンを含む培地上での再生個体の生長; E, 再生個体のPCR検定 (lane 1, 非形質転換体; lanes 2-11, 形質転換体; lane 12, バイナリーベクターpBIG-ubi::GUS); F, 形質転換体の葉におけるGUS活性(上, 非形質転換体, 下, 形質転換体); G, 温室内で生長した形質転換体.

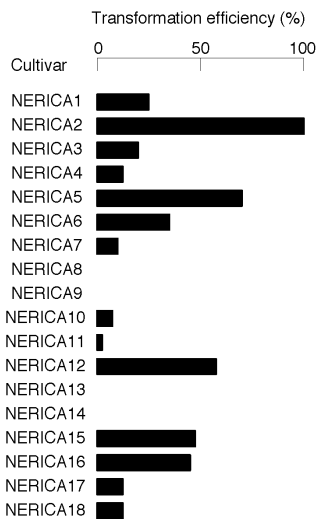


図2 ネリカ18品種における形質転換効率(形質転換体の数/アグロバクテリウムを接種した未熟胚の数: %).

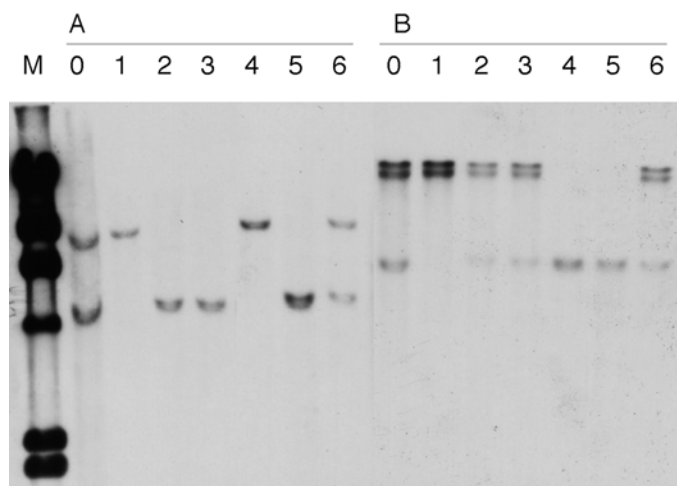


図3 T₁世代におけるサザンブロット. AおよびBは別のT₀個体由来する. ゲノムDNAをHindIIIで消化後, HPT遺伝子の断片をプローブとしてハイブリダイズした. Lane 0, T₀植物; lanes 1-6, T₁植物.

[その他]

研究課題: アフリカイネの乾燥・冠水耐性の改善

中課題番号: A-1)-(2)

予算区分: 交付金[ストレス耐性ネリカ]

研究期間: 2007年度(2006~2010年度)

研究担当者: 石崎琢磨・神代隆

発表論文等:

- 1) Ishizaki, T. and Kumashiro, T. Genetic transformation of NERICA, interspecific hybrid rice between *Oryza glaberrima* and *O. sativa*, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* (2008) 27: 319-327.
- 2) 石崎琢磨, 神代隆 アグロバクテリウム法によるネリカの形質転換法開発. 第25回日本植物細胞分子生物学会講演要旨集, 106.