

Electroporation による植物への遺伝子導入

武田薬品工業（株）応用技術研究所 小宮威彌

Electroporation は細胞に一定強度の電場パルスを与え、可逆的にporeを形成し細胞膜を透過性にするプロセスで、植物への遺伝子導入に応用される。

植物細胞は動物細胞と異なり細胞壁があるので、通常はセルラーゼなどで細胞壁を除いて得られるプロトプラストをelectroporation に用いる。なお最近細胞壁を持つ植物細胞への遺伝子導入法としてparticle gun、レーザー法などが開発されつつある。

演者は1985年カナダ国立研究所留学中、electroporation により瞬時に植物への遺伝子導入が行えることに興味を持った。以来本法により有用遺伝子を植物染色体に導入する研究を行っている。本講演ではelectroporation の特徴について概説したのち、我々の研究の一部を紹介したい。

1. Electroporation の特徴

遺伝子導入法としてのelectroporation の長所は*Agrobacterium* のような土壌細菌やポリエチレングリコール (PEG) などの化学物質を必要としないことである。従って除菌や洗浄などの操作は不要で、外部へ*Agrobacterium* が漏出する心配もない。

また*Agrobacterium* 媒介法のように応用範囲が宿主とする植物に限定されることはない。ベクターも大腸菌由来の簡単なものを用いることができる。この場合、とくにマーカー遺伝子（薬剤耐性遺伝子）と目的遺伝子とを同一プラスミド上に構築する必要はない。マーカー遺伝子を含むプラスミドを共存させておけば、目的遺伝子のみを持つ簡単なプラスミドを用いて形質転換を行える (co-transformation)。

一方、欠点はelectroporation の応用範囲はプロトプラスト培養の可能な植物種に限定されることであるが、最近の培養技術の急速な進歩により、イネ、トウモロコシなど主要穀物のほか、レタス、トマトなど野菜に至る迄応用されつつある。

しかしながら、外来遺伝子を効率良く植物へ導入する方法としてはelectroporation の評価は高かったとは言えない。遺伝子導入の効率を高めるため多くの研究者により様々な条件（電場パルスの形状、電界強度、パルス幅、poration液の組成、プロトプラストの加熱処理、PEG の併用など）が検討されてきた。それぞれの実験結果は必ずしも一致するものではないが、主として遺伝子の染色体への導入効率が低いためelectroporation による植物の遺伝子組換えの実用化は遠いものと思われてきた。事実、最近話題の除草剤耐性、耐虫性、ウイルス抵抗性植物の作出はいずれも*Agrobacterium* 媒介法による成果であった。

2. Electroporation によるキウリモザイクウイルスコート蛋白遺伝子のタバコへの導入

我々はウイルス抵抗性植物を作出するため、キウリモザイクウイルス (CMV) Y株のコート蛋白遺伝子 (CP gene) を electroporation によりタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow) に導入することを試みた。

CP gene は京都大学農学部古沢研究室でクローニングされた。Electroporation は波型の再現性に優れた矩形波パルス (60 μ sec, 500~1,500V/cm) を用いた。プロトプラストはタバコ葉肉由来のものを用い、まず co-transformation による導入を行った。

すなわち、CP gene を含むプラスミド (pCCP) とカナマイシン耐性遺伝子 (NPT II) を含むプラスミド (pNR) の共存下電場パルスを印加した。pCCP と pNR は制限酵素 *Apal*I でそれぞれ直鎖化したものも co-transformation 実験に供し、環状のものと比較した。Electroporation 後プロトプラストは 50 及び 100 μ g/ml カナマイシン含有培地で選抜し耐性コロニーを得た。直鎖状 pNR を用いた場合は、環状のものを用いた場合より高い頻度 (10^{-4}) でカナマイシン耐性コロニーが出現した。カナマイシン耐性コロニーより再分化した植物体について Southern blott analysis を行った結果、直鎖状 pCCP を用いた場合は、intact な CP gene 断片が検出され、ゲノム当たりのコピー数も高い個体が見出された。

ついで CP gene と NPT II を発現可能な形で同一ベクター上に含むプラスミド (pCP-NPT) を構築した。co-transformation の場合と同様 *Apal*I で直鎖化したのち electroporation に付した。本実験の結果、カナマイシン耐性再生植物体の 90% 以上から intact な CP gene 断片を検出できた。

我々の得た結果は electroporation により効率良く外来遺伝子を植物染色体に導入できることを示している。Electroporation 法は *Agrobacterium* 媒介法、化学的遺伝子導入法、その他現在開発が進んでいる particle gun などの方法と並んで植物の遺伝子組換えの有力な手段になりうると考える。