

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20780007

研究課題名（和文） コムギ形質転換効率を左右する遺伝子の同定

研究課題名（英文） Identification of genes affecting the efficiency of genetic transformation in wheat.

研究代表者

安倍 史高 (ABE FUMITAKA)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所麦類遺伝子技術研究

チーム・主任研究員

研究者番号：30370547

研究成果の概要（和文）：形質転換が困難な穀物であるコムギの形質転換系を効率的に改良するために、形質転換過程におけるコムギ培養細胞の遺伝子発現様式を解析した。植物材料にはコムギ品種の中では形質転換に最も適した「Bobwhite」を用いた。独自に見いだした形質転換効率が向上する条件により特徴的な発現変動を示す遺伝子をマイクロアレイ解析により探索した。選定した遺伝子について、RT-PCR法によりその発現変動を「Bobwhite」と「農林61号」の2品種間で比較した。

研究成果の概要（英文）：In order to improve the system of genetic transformation in wheat, gene expression patterns of wheat cultured cells through transformation process were studied. Wheat cultivar "Bobwhite" which is the most suitable cultivar to transform was used as plant material. The change of gene expression levels caused by improved condition of transformation was analyzed using microarray. Expression variation of selected genes was compared with two varieties, Bobwhite and Nourin-61, by RT-PCR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物分子育種、形質転換、網羅的遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

形質転換技術は、画期的な新規形質を付与した農作物を作出するための大きな可能性を持つ技術としてその発展が期待されている。また、形質転換技術は遺伝子機能解析を行う上で欠くことのできない技術となっている。しかし、重要な穀物であるコムギでは、形質転換技術が十分に確立されて

おらず、コムギにおける遺伝子機能解析を行う上で大きな妨げとなっている。さらに、コムギは穀粒の組成が多様であり、小麦粉として高品質または強力・薄力粉といった特徴的な性質を持つ栽培品種への形質転換技術の適用が強く求められている。

本研究開始前までに、遺伝子機能解析に実用可能なコムギ形質転換系の確立に向け

て検討を行い、形質転換実績の最も高い国外コムギ品種「Bobwhite」(Bw)を用いて、直接導入法によるコムギ形質転換に成功した。検討の中から、(1) 外植片である未熟胚の登熟中に低温で乾燥させる処理を行うこと(外植片の前処理)、(2) 遺伝子導入処理後の未熟胚から誘導したカルスを高浸透圧条件で選抜培養すること、この二つの条件を組み合わせることで、形質転換効率が約7倍に向上することを見いだした。外植片の前処理は、その後の遺伝子導入処理や高浸透圧条件に対して細胞の状態を適応させる効果があり、高浸透圧条件での選抜培養は、導入遺伝子の過剰な組み込みを抑制する効果があることを明らかにした。しかし、上記の二条件による反応は品種により異なっていた。このため、栽培品種への適用拡大が今後の課題であり、さらに、国内特有の形質に対応するために、国内品種で形質転換が困難である原因を具体的に明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

形質転換が困難であるコムギ栽培品種を用いた形質転換系を確立するためには、外植片や培養細胞の状態の最適化と遺伝的要因の解明の二点について解決する必要がある。そこで本研究では、(1) コムギ形質転換における外植片と培養細胞の状態の指標となる遺伝子を特定すること、(2) コムギの形質転換効率を大きく左右する遺伝子を同定することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

本研究の実験材料には、不定胚形成能が高く形質転換実績の最も高い Bw と、不定胚形成能が低く形質転換が非常に困難なコムギ栽培品種「農林 61 号」(N61)ならびにその交配分離集団を用いた。

(1) コムギにおける不定胚形成能の品種間差異

Bw と N61 の交配分離集団 210 系統のうち開花日が近かった 100 系統について、開花約 2 週間後の未熟胚を取り出して培養・再分化させ、不定胚形成能を調査した。各系統の不定胚形成能を複数の世代で調査することで、品種間の形質の差異が遺伝的に固定されるか調べた。

(2) コムギの培養過程における網羅的な遺伝子発現解析

形質転換効率に影響することを明らかにした独自の改良条件である外植片の前処理と培養中の高浸透圧条件(図 1)によって、発現様式が大きく変動する遺伝子をマイクロアレイ解析により探索した。植物

材料には形質転換に成功している Bw を用い、コムギ 38,000 遺伝子の情報が載ったアジレント社製の 60mer オリゴアレイで網羅的な発現解析を行った。外植片への前処理の遺伝子発現変動については、対照を開花 15 日後の未熟胚(IE15d)とし、通常登熟させた場合(IE18d)に比べ前処理を行った場合(IE15d+P)に発現が大きく変動している遺伝子を探索した(図 1)。次に、遺伝子導入処理後の浸透圧条件による遺伝子発現の変動については、選抜培養直前の遺伝子導入処理 3 日後のカルス(C3d, P3d)を対照として、通常の浸透圧条件と高浸透圧条件(マルトース濃度で 3.75 倍)で 2 週間選抜培養を行ったカルス(C2w, H2w, P2w, PH2w)で発現量の異なる遺伝子を探索した(図 1)。選抜マーカー遺伝子の導入・選抜を行い、実際の形質転換条件を忠実に再現した状態で遺伝子発現変動を解析した。

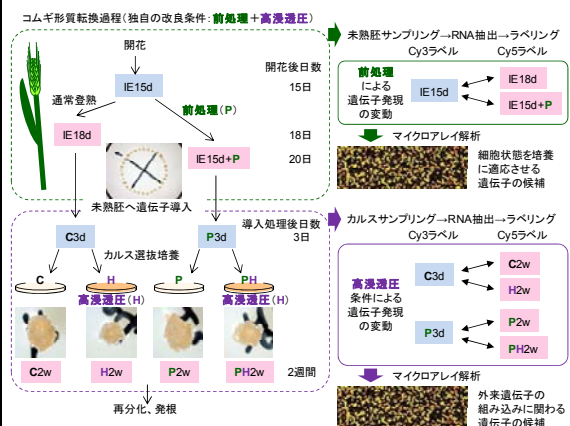


図 1 マイクロアレイ解析の概要

(3) 選定した遺伝子の発現様式の品種間比較

マイクロアレイ解析の結果より選定した候補遺伝子について、それぞれ約 100bp を増幅させるプライマーを設計した。次に、各条件の未熟胚と培養カルスをサンプリングし、各過程における発現様式を RT-PCR 法により解析することで、マイクロアレイ解析の再現性を確認した。これにより、外植片と培養細胞の状態の指標となる遺伝子を特定した。また、同時に、形質転換効率が大きく異なる Bw と N61 で候補遺伝子の発現様式と不定胚形成能および形質転換効率との関係を解析することで、不定胚形成能および形質転換効率を大きく左右する遺伝子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) Bw と N61 の交配分離集団の不定胚形成能を調査した結果、Bw よりもさらに不定胚形成能が高い系統(図 2、系統名

BN99, BN160) や、N61 よりもさらに不定胚形成能が低い系統 (図 2、系統名 BN46, BN80) が分離した。それぞれの系統の形質は、F₃~F₅ 世代において同様な結果 (図 2 は F₅ 世代) を示した。このことから、両品種間の不定胚形成能は、遺伝的な因子によって左右され、その形質は遺伝的に固定されることが明らかとなった。

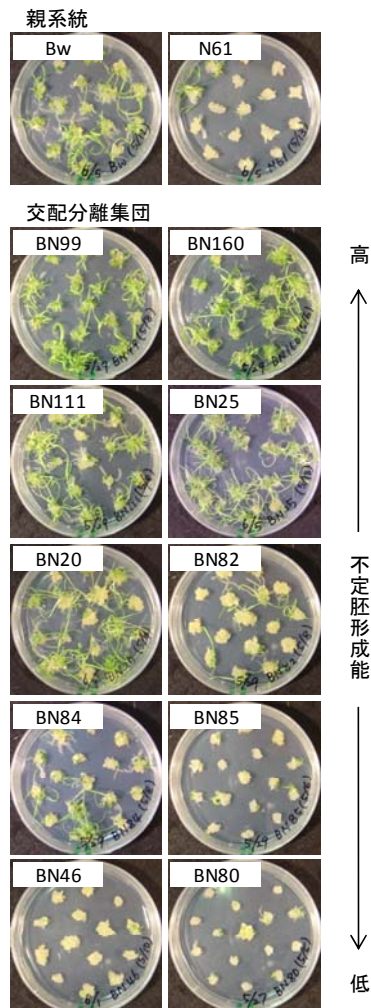


図 2 不定胚形成能

(2) マイクロアレイ技術を用いて、Bw における①外植片の前処理と②遺伝子導入処理後の浸透圧条件による遺伝子発現の変動を解析した。

①外植片の前処理による遺伝子発現の変動

前処理を行わなかった未熟胚 (IE18d) に比べて前処理を行った未熟胚 (IE15d+P) の方で発現量が 5 倍以上高い遺伝子は、116 個存在した。このうちシグナル強度が 2,000 以上と発現量が比較的高い遺伝子は 68 個存在し、ヒートショックタンパク質や LEA タンパク質、ABA 応答遺伝子など低温や乾燥のストレスに応答することが報告されて

いる遺伝子が多く含まれていた。これまでに、外植片の前処理はその後の遺伝子導入処理や高浸透圧条件に対して細胞の状態を適応させる効果があることを示唆する結果は得られていたが、本研究によりストレス馴化の過程と同様な遺伝子発現挙動が明らかとなり、形質転換系が改良された理由の一端を分子レベルで実証することができた。

逆に発現量が低くなる遺伝子は、3 倍以下で 68 個、シグナル強度が 2,000 以上のものは 12 個と少なく、そのほとんどが機能未知な遺伝子であった。

②遺伝子導入処理後の浸透圧条件による遺伝子発現の変動

高浸透圧条件による遺伝子発現の変動は、未熟胚への前処理を行なっているかどうかによって、変動している遺伝子の数が大きく異なった。すなわち、前処理を行わなかった場合 (図 1、C2w と H2w の比較) では、高浸透圧条件で 5 倍以上の発現量の遺伝子は 142 個であったが、前処理を行った場合 (図 1、P2w と PH2w との比較) では、39 個であった。また逆に、高浸透圧条件で 5 倍以下の発現量の遺伝子は、前処理を行っていない場合は 36 個に対して、前処理を行った場合は 10 個であった。さらに、前処理によって誘導される低分子タンパク質をコードする遺伝子は、高浸透圧条件でも誘導されるものが多かった。このことは、前処理によって高浸透圧条件への適応が前もってなされていた、すなわち馴化されていたことを示していると考えられた。

以上のマイクロアレイ解析の結果より、未熟胚とカルスの両方で発現量の差異が検出されるといったように、複数のアレイで繰り返し検出されている遺伝子を中心に、特徴的な発現様式を示す以下の遺伝子を選定した。

- 前処理により発現が誘導される転写因子 (図3、Gene 1, 2)
- 形質転換に適した条件において発現が減少するトランスポーター遺伝子 (図3、Gene 3, 4)
- 前処理と高浸透圧条件で発現が大きく変動する窒素代謝関連遺伝子 (図3、Gene 5, 6)
- 前処理と高浸透圧条件で発現が誘導される種子休眠関連遺伝子 (図3、Gene 7, 8)
- 発現変動が最も大きい低分子タンパク質をコードする遺伝子 (図3、Gene 9, 10)
- 活性酸素種等の解毒に関与する遺伝子 (図3、Gene 11, 12)
- 高浸透圧条件で発現が誘導されるリピッドトランスフェラーゼ (図3、

Gene 13, 14)

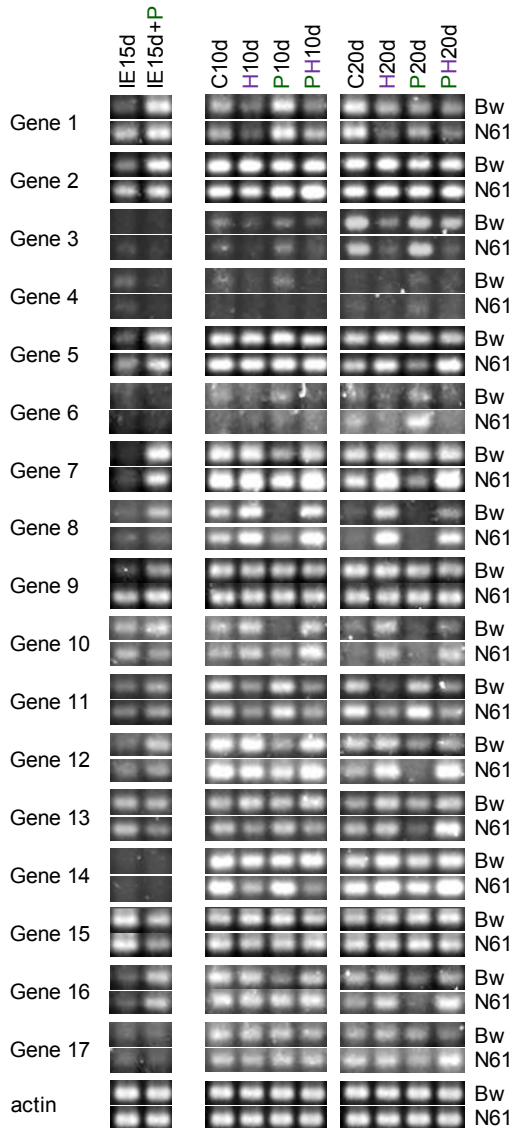
- 機能未知であるが、改良条件下で特徴的な発現誘導を示す遺伝子 (図3、Gene 15, 16, 17)

(3) 選定した遺伝子の発現様式の品種間比較

選定した遺伝子について、BwとN61の未熟胚と培養細胞での発現様式をRT-PCR法により解析した (図3)。Bwについては、マイクロアレイの解析結果と一致していた。N61についても、ほぼ同様の結果となり、品種間で明瞭に異なる遺伝子を見いだすことはできなかった。

コムギ品種間での形質転換効率の差異の原因となる遺伝子を同定するには至っていないが、コムギの組織培養においてこれまでに報告のない遺伝子の発現挙動が明らかとなった。

図3 RT-PCR法による発現解析



5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

Fumitaka Abe, Scope of wheat research using transgenic techniques in Japan, 2010 Proceedings of NARO International Workshop, Food Processing and End-Use Qualities of Field Crops and Starch, 2010年7月5日, 道新ホール大会議室 (帯広市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安倍 史高 (ABE FUMITAKA)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所麦類遺伝子技術研究チーム・主任研究員

研究者番号: 30370547

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者