

アポミクシス性特異的遺伝子の機能解析

— Floral dip 法による *ASG-1* 遺伝子導入と組換えシロイヌナズナの作出 —

西村佳子¹, 鉄村琢哉², 濱口卓郎³, 杉田 亘⁴, 市川裕章⁵, 吉田 薫⁶, 徐 成体⁷, 陳 蘭莊(庄)^{1*}

¹生物工学研究室, ²宮崎大学農学部, ³宮崎県庁, ⁴宮崎県総合農業試験場, ⁵農業生物資源研究所,
⁶東京大学農学部, ⁷中国青海省畜牧獣医科学院

2012年10月11日受付; 2013年1月29日受理

**Functional analysis of apomixis specific gene:
Plant regeneration of transformed *Arabidopsis* with *ASG-1* gene using floral dip method**

**Yoshiko Nishimura¹, Takuya Tetsumura², Takuro Hamaguchi³, Tohru Sugita⁴,
Hiroyuki Ichikawa⁵, Kaoru Yoshida⁶, Chengti Xu⁷, Lanzhuang Chen^{1*}**

¹Laboratory of Plant Biotechnology, Faculty of Environmental and Horticultural Science, Minami Kyushu University, 3764-1, Tatenochi, Miyakonojo city, Miyazaki 885-0035, Japan; ²Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1, Gakuenkibanadai, Miyazaki 889-2192, Japan; ³Miyazaki Prefectural Office, 2-10-1, Tachibana-Tori higashi, Miyazaki 880-8501, Japan; ⁴Miyazaki Prefectural Agricultural Experiment Station, 5805, Shimonaka, Sadowaracho, Miyazaki 880-0212, Japan; ⁵National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan; ⁶Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan; ⁷Qinghai Academy of Animal Science and Veterinary Medicine, Xining, Qinghai 810016 China

Received October 11, 2012; Accepted January 29, 2013

Apomixis is an asexual reproductive mode that bypasses the fusion process between egg cell and sperm cell to form seed in plant. It is expected in various fields, such as fixation of F_1 to down seed cost, shorting breeding times by fixation of hopeful traits in earlier stage of breeding process, and so on. The authors have already been successful in obtaining apomixis-specific genes, such as *ASG-1*, from apomictic guinea grass by means of differential screening method. In order to quickly clarify the functions of *ASG-1* the model plant of *Arabidopsis* was used and transformed with *ASG-1* mediated by floral dip method in this study. Three binary vectors were used to contain *ASG-1*, named as pActnos/Hm2, sense- pSMA35H2 and antisense- pSMA35H2. As the results, 1) 317 of transformed plants were obtained from the three kinds of vectors after selection with hygromycin B-supplemented medium; 2) when comparing them with the control plant, there showed 4 kinds of phenotypes with different morphological traits, named as Type A (6.9%), Type B (11.0%) Type C (4.7%) and Type D (9.1%) in usage of three vectors. The plants obtained were continued to be analyzed by PCR, with 8 kinds of primers designed based on *ASG-1* and hygromycin B sequences. The results of PCR showed that they all gave *ASG-1* specific bands but in different rates, as following as 53.8% in S1-A1, 89.2% in S1-A3, 86.2% in S2-A2, 61.5% in S3-A1, and 92.3% in HML-HMR, respectively. Now, the transgenic plants are propagated and the generation is succeeded through seeds, so that the variation of plants could be analyzed with morphological and molecular methods.

Key words: Apomixis, *Arabidopsis thaliana*, *ASG-1*, floral dip.

緒 言

植物のアポミクシス (Apomixis) は無配偶生殖とよ

ばれている。これは受精を行わずに種子形成を行うため、有性生殖とは異なり母親の遺伝子型だけが子の世代に伝わる生殖様式である。有性生殖を中心とする考えの中で、長年にわたり『育種障害』の1つであると見なされてきたが、近年の急激なバイオテクノロジーの進歩に伴い、このユニークな生殖様式は、

*連絡著者: E-mail, lzchen@nankyudai.ac.jp

F₁の固定による種子生産のコストダウンや育種途中の有望な中間母本の固定による育種年限の短縮などへの利用が期待され、地球上の人口増加による食糧危機の回避に画期的な役割を果たせるのではないかと注目を集めている。またアポミクスは必ず種子を経由するため、通常の栽培においては種子の採集が困難であるサツマイモをはじめとする栄養繁殖性植物の種子繁殖への転換の可能性も秘めている。

本研究室では、イネ科牧草である条件的アポミクス性ギニアグラスを用いて、アポスポリー性胚嚢始原生殖細胞 (AIC) の出現時期に注目してアポミクス性特異的遺伝子 (*ASG-1*) のクローニングに成功している^{1,2)}。その *ASG-1* 遺伝子の機能解析をするため、これまでにギニアグラスやイネ、サツマイモに遺伝子導入を行っている。

本研究では、より迅速に *ASG-1* の機能解析を行うためにシロイヌナズナの‘コロンビア’を用い、floral dip 法^{3,4,5,6)}を用いて *ASG-1* 遺伝子導入の可能性を探り、*ASG-1* 遺伝子導入系の確立を図った。感染後、抗生物質による選抜を行って T₁植物を作出し、様々な特徴を持つ変異体について調査を行った。合わせて T₁植物から DNA の抽出を行い、*ASG-1* の遺伝子配列をもとに作成した特異的なプライマー (18~20bp) と hygromycin B 遺伝子に特異的なプライマーの全8種類を用いて PCR による遺伝子導入の有無の確認を行った結果、T₁植物において *ASG-1* の特異的なバンドが検出されたので報告する。

材料および方法

1. 植物材料の準備

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) の‘コロンビア’の種子は英国ノッティンガム大学ストックセンターより分譲されたものを使用した。無菌播種を行うために1.5 mlのチューブに葉さじで取り分け、1 mlの70%エタノールで軽くすすいだ後に遠心し、上清を捨てた。次にブリーチ剤 (50%) を1 ml加えて4分間ピペットマンでピペッティングを行って殺菌をし、遠心をして上清を捨てた。洗浄は滅菌水で5回行った。殺菌・洗浄して上清をピペットマンで取り除いたチューブに0.1%の寒天を適量加え、種子をピペットマンで十分に懸濁した後、チップにいっぱい吸い込んで、MS培地 (スクロース:10 g/l, MES:0.5 g/l, 寒天:8 g/l) 上に筋状に種子を播いた。シャーレをサージカルテープで巻き、アルミホイルで包んで4℃、2日間休眠打破を行った後、23℃、16時間日長で発芽を促した。本葉が2~3枚出てきたところでメトロミックとパーミュキュライト (体積比1:1) に順化を行った。植物を生育させ、伸びた花茎を一度摘心してさらに花茎の誘導を促して形質転換に使用した。

2. 形質転換用プラスミドベクターの構築

1) センス用 *ASG-1* 用 pSMA35H2-NG ベクターの構築 (図1-1): *ASG-1* の cDNA 領域を 35S プロモーター (13.8kb) にセンスの向きに連結したコントラストを作製した。

コントラストの作製にはクローニング用ベクター (pGEM5, Promega) を用いた。まず、35S プロモーターを含み、Getamycin 耐性遺伝子、Rifampicin 耐性遺伝子および Spetinoicin 耐性遺伝子を有するシャトルベクター (pSMA35H2-NG) の *SmaI* サイト (35S プロモーターと Nos terminator の境界) にクローニング用ベクター pGEM5 (Promega) を挿入し、pGEM5 で利用可能な 35S プロモーターを持つデスティネーションベクターを構築した。pSMA35H2-NG ベクター β -glucuronidase (GUS) 配列と置換し、Nopaline synthase (NOS) promoter にセンス方向で連結したコンストラクトを作製した。

2) アンチセンス用 *ASG-1* 用 pSMA35H2-NG ベクターの構築 (図1-2): *ASG-1* の cDNA 領域を 35S プロモーター (13.8kb) にアンチセンスの向きに連結したコントラストを作製した。コントラストの作製にはクローニング用ベクター (pGEM5, Promega) を用いた。まず、35S プロモーターを含み、Getamycin 耐性遺伝子、Rifampicin 耐性遺伝子および Spetinoicin 耐性遺伝子を有するシャトルベクター (pSMA35H2-NG) の *SmaI* サイト (35S プロモーターと Nos terminator の境界) にクローニング用ベクター pGEM5 (Promega) を挿入し、pGEM5 で利用可能な 35S プロモーターを持つデスティネーションベクターを構築した。pSMA35H2-NG ベクター β -glucuronidase (GUS) 配列と置換し、Nopaline synthase (NOS) promoter にアンチセンス方向

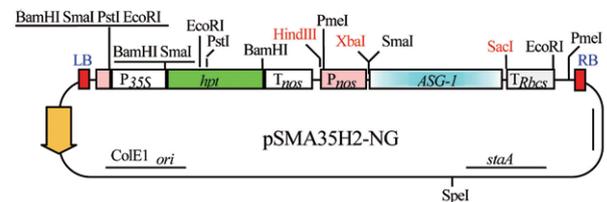


図1-1. センス用 *ASG-1* 遺伝子導入に用いたバイナリベクター pSMA35H2-NG のコントラスト

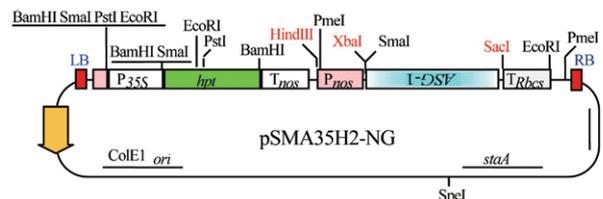


図1-2. アンチセンス用 *ASG-1* 遺伝子導入に用いたバイナリベクター pSMA35H2-NG のコントラスト

spR: Spectinomycin/streptomycin resistance gene from Tn7; *staA*: Region involved in plasmid stability from *Pseudomonas* plasmid pVS1; *repA-HC*: replication protein A gene from pVS1 (high-copy type) for plasmid maintenance in *Agrobacterium*; ColE1 ori: ColE1 replication origin from pBR322; TRbcS: Polyadenylation signal from *Arabidopsis RbcS-2B* gene

で連結したコンストラクトを作製した。

3) pActnos/Hm2ベクターの構築 (図2): *ASG-1* の cDNA 領域をイネのアクチンプロモーター (Act1; 1,266bp) にセンスの向きに連結したコンストラクトを作製した。コンストラクトの作製には Gateway System (Invitrogen) を用いた。まず、アクチンプロモーターを含み、ハイグロマイシン耐性遺伝子およびカナマイシン耐性遺伝子を有するシャトルベクター (pActnos/Hm2) の *Sma*I サイト (アクチンプロモーターと Nos terminator の境界) に Gateway vector conversion cassette A (Invitrogen) を挿入し、Gateway System で利用可能なアクチンプロモーターを持つデスティネーションベクターを構築した (pActnos/Hm2-GW)。

ASG-1 の cDNA を鋳型に attB 配列を含むプライマー (Upper primer: aaaaagcaggtTTCATTCTACATCACAGC-AT と Lower primer: agaaagctgggt CACACTCAAATACC-AACACT; 小文字は attB 配列) を用いて PCR 反応を行った。増幅した PCR 産物を鋳型に、attB プライマー (attB1: ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT と attB2: ACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGT) を用いてさらに PCR 反応を行った。増幅した PCR 産物とドナーベクター (pDONR221, Invitrogen) の間で BP 反応を行わせ、エントリーベクターを構築した。エントリーベクターとデスティネーションベクターの間で LR 反応を行わせ、目的のコンストラクトを完成させた。PCR 反応の条件や BP 反応および LR 反応の条件は、全て Invitrogen 社の Gateway System のプロトコルに従った。

構築したベクターの大腸菌およびアグロバクテリウムへの形質転換法は参考書に準じて行った⁹⁾。pSMA35H2ベクターのセンスおよびアンチセンスの形質転換はいずれも GV3101/pMp90を用いた。一方、pActnos/Hm2ベクターの形質転換は EHA105を用いて行った。

3. 形質転換

形質転換の方法は、今までに報告された floral dip 法^{4,5)} を基本として行った。形質転換開始1週間前に AB 培地上で菌を準備した。25 ml の遠心管に 2.5 ml の抗生物質入り LB 培地 (hygromycin B: 50 mg/l) を加え、コロニーから葉さじ (小) で 1/2 ほどのアグロバクテリウムのコロニーを取り、23 °C、120 rpm で一晩振と

う培養した。翌日、抗生物質入りの LB 培地 100 ml を 500 ml フラスコに入れ、一晩振とう培養した前培養液を 100 μ l 加え、16時間 28 °C、120 rpm で振とう培養を行い、16時間後、直ちに氷上に移した。50 ml の遠心管に培養液を入れ、4000 rpm で 5分遠心して集菌した。菌を 1/2 MS 塩 (BAP: 1 μ l, Silwet-L77: 20 μ l) 100 ml に懸濁し、ピペットマンを用いて液を垂らして、または花枝が長い場合は花を遠心管に入れて浸漬して感染させた。透明ケースを被せ、さらにサランラップで覆いをし、1日後にサランラップを外して、その後は非形質転換体と同様に栽培した。栽培は終始 23 °C、16時間日長で行った。葉が少し茶色くなったところで水切りをして乾燥させ、T₁種子を採集した。

4. 形質転換植物の選抜

T₁種子は、感染前の無菌播種と同様の方法で殺菌・洗浄を行い、抗生物質入りの MS 培地 (スクロース: 10g/l, MES: 0.5 g/l, hygromycin B: 50 mg/l, carbenicillin sodium salt: 100 mg/l, 寒天: 8g/l) にチップで筋状に播種し、サージカルテープを巻き、アルミホイルで包んで 4 °C、2日間休眠打破を行った後、23 °C、16時間日長で培養した。形質転換されたものは子葉が出てきた後に根が伸長し、非形質転換体と生育に差が出たものを選抜して通常と同様にメトロミックスとバーミュキュライト (体積比 1:1) に鉢上げを行った。

5. DNA の抽出と PCR

選抜した植物の中から無作為的に DNA の抽出を行った。抽出方法は DNA ミニプレップ法⁷⁾ を用いた。1% アガロースゲルで DNA のバンドを確認した後、*ASG-1* の遺伝子配列をもとに作成した特異的なプライマー (S1: ATGGCATTTCGTGATGGGA, S2: GGGTAAACCTTCCCCATG, S3: GTTCTAGCCTGGTGGATTC, A1: CCTCTTGCCAAAGATCACG, A2: ATCGACGAGGCTAGAACCT, A3: AGGTTTTACCCTCGAGCACA) と hygromycin B 遺伝子をもとに設計されたプライマー (HM-L: CGCAAGGAATCGGTCAATAC, HM-R: TTTGTGTACGCCCGACAGT) の全 8 種類で位置関係をもとに組合せを行い (図3)、双方向から PCR による増幅を行った。なお PCR は 95 °C、1分; 94 °C、30秒; 52 °C、30秒; 72 °C、1分; の 35 サイクルで行い、72 °C、5分で伸長し、4 °C で保存した。PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い、*ASG-1* 遺伝子の特異的なバンドの確認を行った。

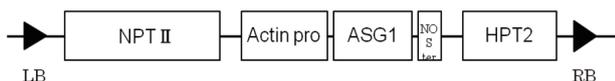


図2. *ASG-1* 遺伝子導入に用いたバイナリベクター (pActnos/Hm2) のコントラスト T-DNA 領域の配置を示した

NPT II: カナマイシン耐性遺伝子; Actin pro: アクチンプロモーター; ASG1: *ASG-1* cDNA 領域; NOS ter: NOS ターミネーター; HPT2: ハイグロマイシン耐性遺伝子; LB: レフトボーダー; RB: ライトボーダー

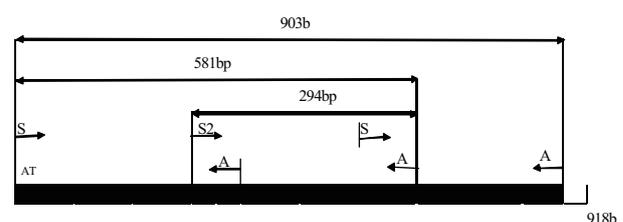


図3. *ASG-1* をもとに設計されたプライマーの位置関係

6. T₁植物に見られる変異とその発現率

T₁植物は、花茎や開花までの期間、および植物の葉、茎、莢、大きさなどについて調査を行い、変異を4つのタイプに大別し、その発現率の調査を行った。

結果および考察

1. 感染した T₀植物

Floral dip 法によって *ASG-1* 遺伝子を感染したシロイヌナズナは、感染10日後には全体的に赤くなった。シロイヌナズナは外的要因によってもストレスによって赤くなることが知られているが、栽培条件を同じくしているほかの T₀植物においては、一部懸濁液をかけた部分が赤くなったものの、その傾向は見られないため、感染によってシロイヌナズナが強くストレスを受けたものと思われる。また感染時に花茎が十分に発達していないものについては、1週間後に改めてもう一度 floral dip 法で感染を行った。この操作による感染率の向上は認められなかった。

2. 形質転換植物の選抜

T₁種子を抗生物質入りの MS 培地に播種後、23 °C、16時間日長で培養すると2日後には発芽が始まった。ほとんどの種子で発芽後、子葉までは生長するものの、その後は根の萎縮が見られ、1週間前後で非形質転換

体と形質転換体の生育に差がみられ選抜が容易となった(図4A)。さらに培養を続けると根の萎縮がみられたものは白く枯死した(図4B)。選抜した T₁植物を新しい抗生物質入り MS 培地に移植しても枯死することなく、形質転換体と非形質転換体の選抜を行う上で枯死するまで長時間培養することや、再培養をする必要はないものと思われる。本研究では最短で4日間程で根の伸長に注目することで抗生物質による遺伝子導入が確認でき、さらに1週間前後で生育の差による選抜ができた。

3. Floral dip 法による *ASG-1* 遺伝子の導入と導入率

4種類のアグロバクテリウムによる1種類(18株)あたりの *ASG-1* の遺伝子の導入と導入率を表1に示した。ベクター別の18株あたりの T₁植物の獲得においては、pSMA35H2のS2が124個体と一番多く、また1株あたりの T₁植物の個体数も64個体あり、同じプライマーを用いたS3よりも全個体数および1株あたりの個体数ともに大きく上回った。またpSMA35H2のA3に関しても T₁植物の個体数は29株と少ないものの形質転換体を得ることができた。*ASG-1* 導入率はpActnos/Hm2が0.620%と一番高かった。しかしどのアグロバクテリウムを用いた場合も十分な割合で T₁植物を得ることができた。今回の手法で floral dip 法による *ASG-1* 遺伝子のシロイヌナズナへの導入方法を確立することができた。

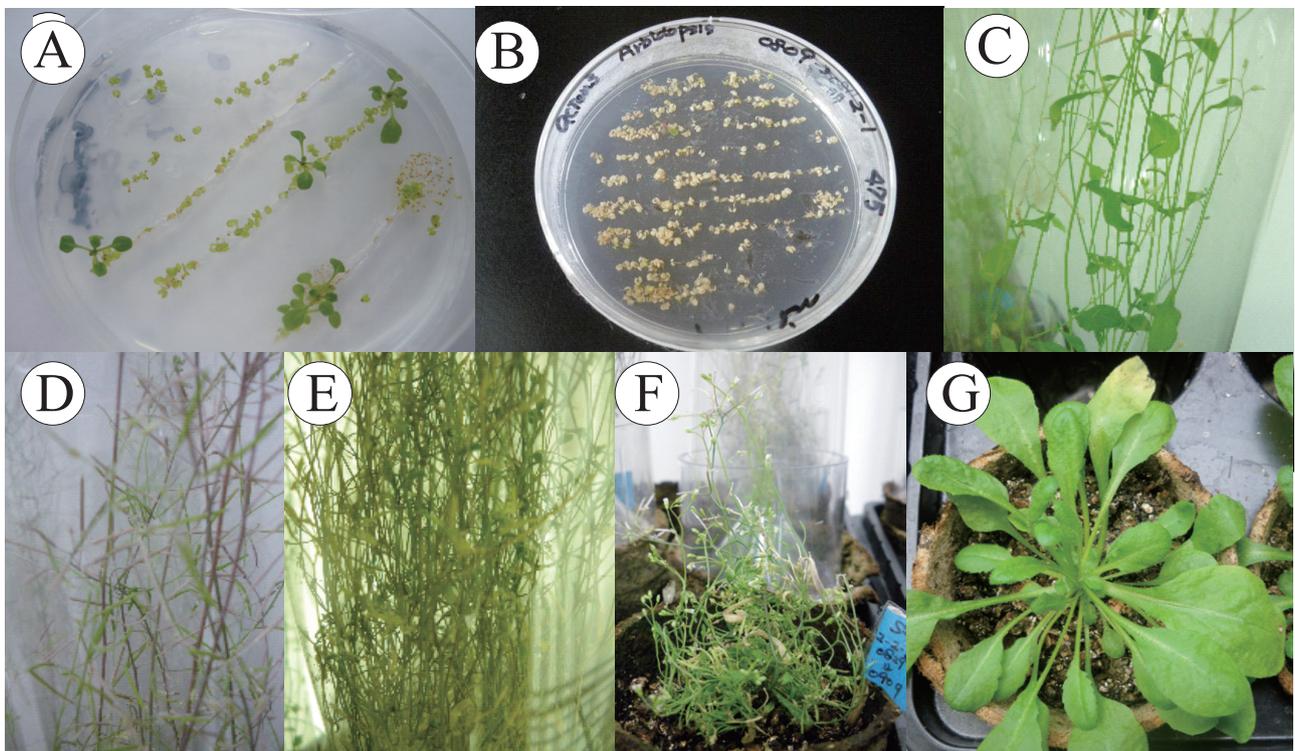


図4. T₁植物の選抜と T₁植物に見られた変異

A: 抗生物質による形質転換体と非形質転換体の生育の違い, B: 2週間後の抗生物質入り培地上で枯死した植物, C: T₁植物での変異体(Type A)葉が多く、葉のサイズが大きく結実がほとんどみられないもの, D: (Type B) 何らかのストレスによって赤くなったもの, E: (Type C) 花、花茎が異常なもの, F: (Type C) 全体的に植物が小さく、花茎が異常なもの, G: (Type D) 花茎がでるまでに1ヶ月以上かかるもの

4. T₁植物に見られる変異とその発現率

T₁植物において、非形質転換体とは大きく異なる4種類の変異が見られた。形態的には Type A は葉の数が多く、葉のサイズも大きく結実がほとんど見られないもの (図4C)、Type B は全体的に何らかのストレスを感じ赤くなったもの (図4D)、Type C は全体的に植物が小さく、花や花枝が異常なもの3種類に大別できた (図4E, F)。また生育期間による変異として、花茎が出るまでの期間が2ヶ月近くかかるもの (図4G) を Type D とした。花茎が出るまでに1ヶ月以上かかるものはロゼットが大きく濃い緑色をしており、花茎が通常よりも肥大していた。しかし、花茎が出てからは他の植物より生育が旺盛となり、最終的には生育による差は見られなくなった。また、アグロバクテリウムの種類による花茎が出るまでの期間 (表2) は pActnos/Hm2 が平均49.5日であったのに対し、pSMA35H2の A3は24.9日であった。しかし、A3の中には花茎が出るまでの期間が55日というものもあり、一番短い期間の21日より2倍以上開花に時間がかかっており、花茎が出るまでの期間にはベクターによる差は確認できなかった。

アグロバクテリウムの種類による形質転換植物のうち、非形質転換体と形態的に違いが見られなかったものは全個体数の66.2% (59.7-82.2%) であり、多くの変異体が見られた (表3)。pActnos/Hm2を用いたものでは、花がほとんど咲かず結実もせずに葉が多く大きく成長した Type A が全体の10.3%を占め、ついで全体的に赤くなった Type B が6.9%、Type C と Type D はともに3.4%であった。pSMA35SH2の S2は全体の4割が変異体となり、Type A が全体の10.1%

であったが、特にロゼットが大きく成長し、花茎が出るまでに2ヶ月以上かかる Type D が20.2%であった。S3では、ほとんどの個体で莢が正常に成熟し、形態的に変異が見られるものが少なかったものの、全体が何らかのストレスで赤くなる Type B が11.1%であった。A3では、Type B が28.0%、全体的に小さく花枝が異常となる Type C が他のアグロバクテリウムで形質転換された個体よりも多く、全体の10.0%となった。*ASG-1* 遺伝子導入による変異は主に生殖に関する花の部分に多く見られ、生殖に関わると考えられる *ASG-1* 遺伝子が何らかの作用をおよぼしていることが示唆された。

5. *ASG-1* 遺伝子の PCR での確認

T₁植物体から無作為的に DNA を抽出し、*ASG-1* の遺伝子配列をもとに作成した特異的なプライマーと hygromycin B 遺伝子をもとに設計されたプライマーの全8種類を用いて、双方向から PCR による増幅を行った (図5)。電気泳動の結果、S1-A1, S1-A3, S2-A2, S3-A1, HML-HMR の4つの組合せではすべてで *ASG-1* 遺伝子の特異的なバンドが認められ、また特徴的なバンドパターンも見られた。個体によっては *ASG-1* に特異的なバンドが部分的に入っているものも認められたが、5種類の組合せにおいて必ずいずれかの組合せで *ASG-1* の特異的なバンドが認められ、様々な部分に部分的に *ASG-1* が導入されたと考えられる。また、*ASG-1* の特異的なバンドの発現率は最も長い S1-A1 (903bp) のバンドが53.8%で、S1-A3は89.2%であった (表4)。そのほかは下流に位置するほど発現率は S2-A2で86.2%、S3-A1で61.5%と低くなった。hygromycin B 遺伝子をもとに設計されたプライマーの HML-HMR では92.3%のバンドが認めら

表1. Floral dip 法で *ASG-1* 遺伝子導入したシロイヌナズナの形質転換率

ベクター	T ₁ 植物の総数 (A)	選抜した植物の数 ¹⁾ (B)	形質転換率 (B/A) %
pActnos/Hm2	14,027	87 (0-26)	0.620
pSMA35H2 S2	35,595	124 (0-64)	0.348
pSMA35H2 S3	14,859	23 (0-8)	0.155
pSMA35H2 A3	7,203	29 (0-12)	0.403

1) (): T₀植物1株あたりに得られた形質転換植物の範囲

表2. T₁植物における *ASG-1* ベクター別花茎までの生育期間

ベクター	花茎までの日数	最短-最長日数
pActin/Hm2	49.5	43 - 57
pSMA35H2 S2	37.5	18 - 30
pSMA35H2 S3	28.1	37 - 38
pSMA35H2 A3	24.9	21 - 55
平均	35.0	18 - 57

表3. T₁植物に見られたベクターごとのタイプ別変異の割合

ベクター	T ₁ 植物の個体数	枯死した植物の割合	正常な植物の割合	T ₁ 植物に見られたタイプ別変異の割合			
				A	B	C	D
pActin/Hm2	87	1.1%	74.7%	10.3%	6.9%	3.4%	3.4%
pSMA35H2 S2	129	2.3%	59.7%	10.1%	3.1%	4.7%	20.2%
pSMA35H2 S3	45	4.4%	82.2%	0.0%	11.1%	2.2%	0.0%
pSMA35H2 A3	50	0.0%	62.0%	0.0%	28.0%	10.0%	0.0%
全体	317	1.9%	66.2%	6.9%	11.0%	4.7%	9.1%

れた。

今回の手法で floral dip 法による *ASG-1* 遺伝子のシロイヌナズナへの導入方法を確立できたことは、今後のアポミクシス性特異的遺伝子 *ASG-1* の機能解析を

迅速に進める上で重要な手法の1つを確立できたことを意味する。

要約

植物のアポミクシスは無配偶生殖とよばれ、卵細胞が受精せず種子を形成する。このユニークな形質は F_1 の固定や育種年限の短縮など様々な面で期待されている。著者らはこれまでにアポミクシス性ギニアグラスからアポミクシス性特異的遺伝子 (*ASG-1*) のクローニングに成功している。本研究では *ASG-1* の機能を解析するため、*ASG-1* を入れた3種類のベクター (pActnos/Hm2-sense, pSMA35 SH2-sense と pSMA35 SH2-antisense) を用いてモデル植物であるシロイヌナズナの‘コロンビア’に floral dip 法で遺伝子導入を行った。抗生物質入りの MS 培地 (スクロース:10 g/l, hygromycin B:50 mg/l, MES:0.5 g/l, アガー:8 g/l) で選抜した結果、317株の T_1 植物を得ることができた。花茎が出るまでの期間や開花日数、植物体の大きさなどについて調査を行った結果、非形質転換体と大きく異なる4つのタイプの変異体を得ることができた。花茎が出るまでの期間は pActnos/Hm2で49.5日、pSMA35 SH2の A3では24.9日だった。*ASG-1* の遺伝子配列をもとに作成した特異的な6種類のプライマーと hygromycin B 遺伝子をもとに設計された2種類プライマーを組合せた PCR では、いずれの場合でも *ASG-1* 遺伝子の特異的なバンドが認められた。以上の結果から本研究で用いた手法で効率的に *ASG-1* 遺伝子を導入した組換えシロイヌナズナを作出できることが示された。

謝辞

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究B) 23380009によるものである。

参考文献

- 1) Chen, L.Z., Miyazaki, C., Kojima, A., Saito, A. and Adachi, T. (1999) Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic guineagrass (*Panicum maximum*). *J. Plant Physiol.* **154**: 55-62.
- 2) Chen, L.Z., Guan, L.M., Seo, M.K., Hoffmann, F. and Adachi, T. (2005) Developmental expression of *ASG-1* during gametogenesis in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). *J. Plant Physiol.* **162**: 1141-1148.
- 3) Steven, J.C. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735-743.
- 4) Narusaka, M., Shiraishi, T., Iwabuchi, M. and Narusaka,

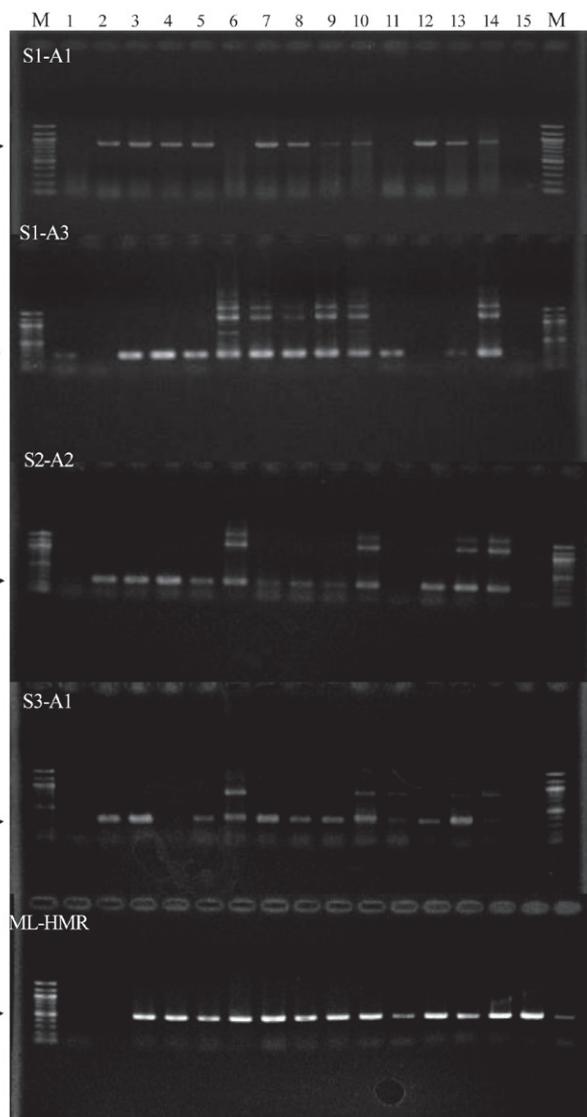


図5. PCR による *ASG-1* 遺伝子の検出

M: 100bp; 1: シロイヌナズ; 2: N68/96-8-O-11; 3-5: pActnos/Hm2; 6-8: pSM35H2 (S2); 9-11: pSM35H2 (S3); 12-15: pSM35H2 (A3); ▶: 特異的バンド; プライマーは M&M を参照

表4. PCR 産物による *ASG-1* の特異的なバンドの発現率

プライマーの組合せ	特異的なバンドの数 / 供試した数	目的バンドの発現率 %
S1-A1	35/65	53.8
S1-A3	58/65	89.2
S2-A2	56/65	86.2
S3-A1	40/65	61.5
HML-HMR	60/65	92.3

- Y. (2010) The floral inoculating protocol: a simplified *Arabidopsis thaliana* transformation method modified from floral dipping. *Plant Biotech.* **27**: 349-351.
- 5) 大門靖史, 阿部光知, 荒木崇 (2005) 4-4減圧浸潤法及び花序浸し法によるシロイヌナズナの形質転換「モデル植物の実験プロトコール (イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編)」改訂3版 島本功, 岡田清孝, 田畑哲之監修 pp.149-154 秀潤社.
- 6) 鹿内利治 (2009) シロイヌナズナの形質転換「低温科学」**67**: 615-616.
- 7) 後藤弘爾 (2005) シロイヌナズナの DNA・RNA 単離法「モデル植物の実験プロトコール (イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編)」改訂3版 島本功, 岡田清孝, 田畑哲之監修 pp. 90-92 秀潤社.
- 8) 横井修司, 鳥山欽哉 (1996) 形質転換植物の作出法 アグロバクテリウムによる方法 「モデル植物の実験プロトコール (イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編)」改訂3版 島本功, 岡田清孝, 田畑哲之監修 pp. 93-98 秀潤社.

