

アポミクシス性特異的遺伝子の機能解析 — ギニアグラスの完熟種子由来カルスを用いた植物体再生系の確立 —

西村佳子¹, 梅木一馬¹, 張 君², 徐 成体², 陳 蘭庄^{1*}

¹南九州大学 環境園芸学部 生物工学研究室; ²中国青海省畜牧獣医科学院草原研究所

2014年10月1日受付; 2015年1月29日受理

The functional analysis of apomixis specific genes: Establishment of plant regeneration system using callus induced from seeds of guineagrass (*Panicum maximum*)

Yoshiko Nishimura¹, Kazuma Umeki¹, Jun Zhang², Chenti Xu² and 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;

²Qinghai Academy of Animal Science and Veterinary Medicine, Xining, Qinghai, 810016, China

Received October 1, 2014; Accepted January 29, 2015

Apomixis is a unique reproductive mode that by passes meiosis to produce seed genetically same to the mother parent. So it is expected to promise the economic benefits over than the “Green Revolution” by using apomixis into agriculture. In order to do functional analysis of *ASG-1*, an apomixis specific gene, isolated from facultatively apomictic guineagrass (*Panicum maximum*), using gene transformation method mediated by *Agrobacterium*, the efficient plant regeneration system must be established from the donor plant, that is, guineagrass. Here, we have established a simple and efficient plant regeneration system using callus induced from the mature seeds of guineagrass. As the results, 1) N6D medium, a popular medium for rice, giving the best rates for callus formation, that is, 97.1% in sexual N68/96-8-o-5, and 91.7% and 84.6% in apomict N68/96-8-o-11 and ‘Natsukaze’, respectively; 2) Murashige and Skoog (1962) (MS) medium with 0.2 mg/l of kinetin giving the best rate for plant regeneration among the used 4 kinds of the media; 3) As the rates of plant regeneration showed difference among the used materials, the detail combinations of phyto hormones were used to select the best one for each material. The best results were, MS with 0.2 mg/l of kinetin for N68/96-8-o-5, and MS with 2.0 mg/l of L-proline and 0.2 mg/l of Kinetin for ‘Natsukaze’; 4) After the plants regenerated from the calli were transported into sterilized soil for naturalization, the normal plant was obtained with same morphology to the plant came from the normal seed. Now, we are starting to do the *ASG-1* transformation with the established plant regeneration system.

Key words: Apomixis, *ASG-1*, callus, *Panicum maximum*, plant regeneration, seed.

緒 言

アポミクシスは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。本研究室ではこれまでに、有性

生殖とアポミクシス性生殖のギニアグラスの生殖様式解明結果をもとにして、条件的アポミクシス性ギニアグラスからアポスポリー性胚嚢始原細胞の出現時期に特異的に発現する遺伝子 (*ASG-1*) のクローニングに成功している (Chen *et al.* 1999, 2005)。さらに *ASG-1* 遺伝子の機能解析を行うため遺伝子導入系がすでに確立しているイネやシロイヌナズナなどに遺伝子導入を行い、それぞれ組換え植物体を作出してきた (西村ら,

*連絡著者: E-mail, lzchen@nankyudai.ac.jp

* Corresponding author: E-mail, lzchen@nankyudai.ac.jp

2013).

最終的には *ASG-1* 遺伝子の機能解析を目的として、条件的アポミクシス性ギニアグラスから単離した *ASG-1* 遺伝子を、有性生殖系統およびアポミクシス性系統のそれぞれに導入することを目指しているが、イネ科植物であるギニアグラスはアグロバクテリウム法を用いた遺伝子導入に必要な効率のよいカルスからの再分化系は確立していない。一般に植物は同一種においても品種間で培養の条件が異なるものが多い。そこで本研究では、有性生殖系統のギニアグラスと条件的アポミクシス性ギニアグラス系統および品種を用いて、それぞれの完熟種子由来カルスの誘導から植物体再分化までの培地を検討し、培養系を確立したので報告する。

材料および方法

1. 植物材料の準備

南九州大学温室内で栽培しているギニアグラスの有性生殖系統 N68/96-8-o-5, 条件的アポミクシスで *ASG-1* 遺伝子を捕捉した系統である N68/96-8-o-11, アポミクシス品種「ナツカゼ」を供試し、各個体の穂から手で触れて脱粒する種子を集め、乾燥器内で十分乾

燥させた後、花粉や屑を茶漉しでふるい落とし、瓶に入れて室温で保存した。供試する際は、茶漉しに頼のついたままの種子を入れ、指の腹で磨り潰すようにしてできるだけ種皮を取り除いた種子を使用した。

2. ギニアグラスのカルス誘導における最適培地の検討

播種にはスパーテル 1 杯分 (約 2ml) の種子を用い、50ml の遠沈管に 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム (アンチホルミン), tween20 (0.1%) を加え、室温, 120rpm で 2 時間から 3 時間振とう殺菌を行ったものを用いた (図 1A)。その後、バイオハザード内に移動し、滅菌水で泡立ちがなくなるまで洗浄を行い、ろ紙上で内穎をピンセットで転がすようにはがしながら、十分に種子を乾燥させた (図 1B)。乾燥させた種子を、ピンセットを用いて 1 粒ずつ 1 シャーレあたり 40 粒置床した。カルス形成培地には、ギニアグラスの葉鞘培養 (Chen *et al.* 2002) を行った際に使用した MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) にスクロース: 30g/l, 2, 4-D: 5mg/l, ゲランガム: 3.2g/l を添加した培地 (pH5.8) と、イネの培養で使われる N6D 培地 (スクロース: 30g/l, CHU powder: 3.981g/l, カザミノ酸ダイゴ: 0.3g/l, L-proline: 2.878g/l, N6 ビタミン, 2,4-D: 2mg/l, pH5.8, 寒天: 8g/l) を用い、それぞれの培地でのカルス形成について比較を行った。培養は 30℃,

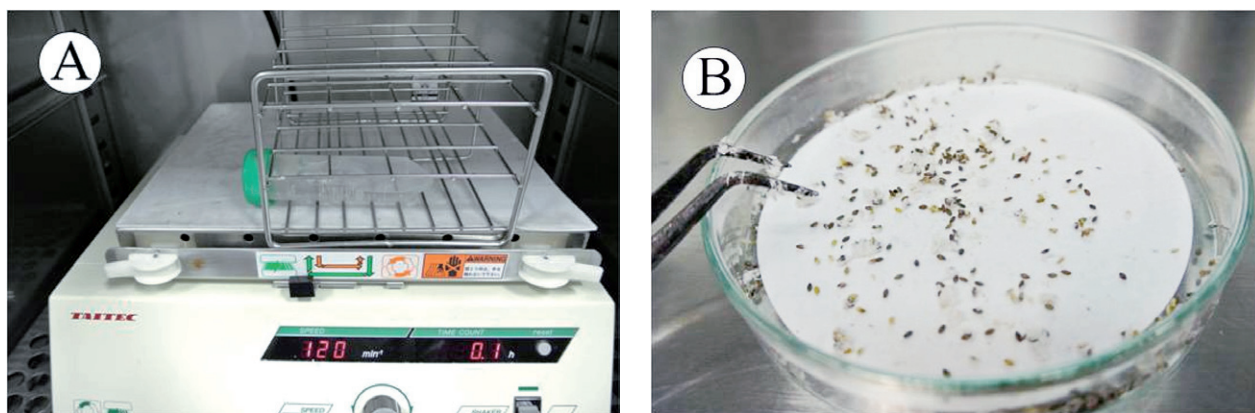


図 1. ギニアグラスの振とう殺菌および播種前の様子

A: ギニアグラスの振とう殺菌の様子, B: 滅菌水で洗浄後の種子

表 1. ギニアグラスの最適な再分化培地の検討に用いたイネ科植物の再分化培地の組成

培地の種類	基本培地	NAA	GA ₃	Kinetin	BAP
RE III (Toki <i>et al.</i> , 2006)	MS	0.02mg/l	—	2.0mg/l	—
RE ギニア (Chen <i>et al.</i> , 2002)	MS	0.01mg/l	—	2.0mg/l	—
スイッチグラス (Li and Qu, 2010)	MS	0.2mg/l	0.5mg/l	—	1.0mg/l
トールフェスク (佐藤・高溝 2012)	MS	—	—	0.2mg/l	—

暗黒下で行った。また3週間ごとに同じ培地で継代培養を行った。

3. 有性生殖系統およびアポミクシス系統でのカルス形成率と系統間差異

ギニアグラスの完熟種子を殺菌消毒して N6D 培地に置床し、有性生殖系統 N68/96-8-o-5 とアポミクシス系統 N68/96-8-o-11 およびアポミクシス品種の‘ナツカゼ’それぞれについて N6D 培地置床後1カ月のカルス形成率および系統間差異について調査を行った。N6D 培地播種後、3週間ごとに同じ培地で再培養を行い、2ヶ月後に4種類の培地にそれぞれ移植後、30℃、24時間日長で培養を続けた。

4. ギニアグラスの完熟種子由来カルスにおける再分化培地の検討

ギニアグラスの完熟種子由来カルスからの最適な再分化培地を見つけるため、アポミクシス系統である N68/96-8-o-11 の完熟種子由来カルスを過去にイネ科植物で報告されている4種類の再分化培地(表1; Toki *et al.* 2006; Chen *et al.* 2002, Li and Qu, 2010; 佐藤・高溝, 2012)に置床して、再分化率を調査した。

5. 3種類のギニアグラスにおける再分化率と最適ホルモン濃度および L-proline 添加の効果

有性生殖系統 N68/96-8-o-5 とアポミクシス系統 N68/96-8-o-11, アポミクシス品種‘ナツカゼ’の完熟種子由来カルスを MS 基本培地にスクロース:30g/l, kinetin:0.2mg/l, 寒天:8g/l を添加した再分化培地(pH5.8)に移植し、再分化率の調査を行った。さらにアミノ酸類である L-proline の効果が期待できることから、MS 基本培地に L-proline を2g/l 添加した培地でも同様の調査を行った。しかし、系統間差異が大きく見られたことから、系統別に最適なホルモンの組み合わせの検討をさらに行った。植物ホルモンの組み合わせにおいては MS 基本培地にスクロース:30g/l, kinetin:2mg/l, 寒天:8g/l を添加した培地(pH5.8)に

おいて、NAA の濃度を0.1, 0.2, 0.3mg/l に変えてそれぞれの再分化率の調査を行った。

6. ギニアグラスの順化

根とシュートが形成された植物体は、メトロミックス(ハイボネックスジャパン)とバーミキュライト(体積比1:1)を混合し滅菌処理した土を用い、直径6cmのポリポットに入れ順化を行った。栽培は人工気象器内で、30℃、24時間日長で行った。

結果および考察

1. ギニアグラスのカルス誘導における最適培地の検討

ギニアグラスの完熟種子では、採取直後の種子をカルス形成培地に播種しても発芽が揃わずばらつきがでた。これにより今後検討しているギニアグラスへの遺伝子導入時に導入に適したステージが揃わないことが危惧されたが、室温で3カ月以上保存することにより、ほぼ同じ時期に発芽が揃うようになり(平均発芽率90%以上)、休眠打破などの前処理を行わなくてもその後の実験に供試することができた。

ギニアグラスのカルス誘導における培地の検討において、陳ら(Chen *et al.* 2002)は MS 基本培地に植物のカルス形成によく用いられるオーキシンの2,4-D を5~10mg/l の範囲で添加した培地を用いてギニアグラスの葉鞘からのカルス誘導を行っているが、今回この培地に完熟種子を播種したところ、カルスは形成されたものの、同じ条件下で N6D 培地に播種したものよりもカルスの形成が緩慢であった(図2A, B)。カルス形成率が高かった N6D 培地には、アミノ酸類である L-proline が2.878g/l 添加されており、Li and Qu (2010) もスイッチグラスの形質転換に用いるカルスの形成に L-proline が有効であると述べている。そこでギニアグラスの完熟種子由来カルスの形成には L-proline が添加してありイネの培養系で広く用いられている N6D 培地を使用することにした。

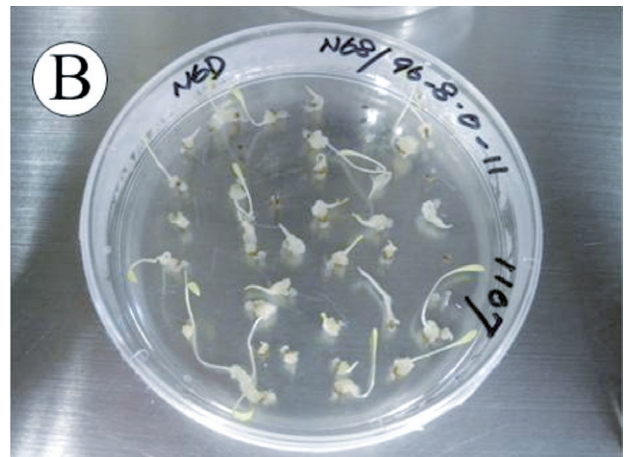
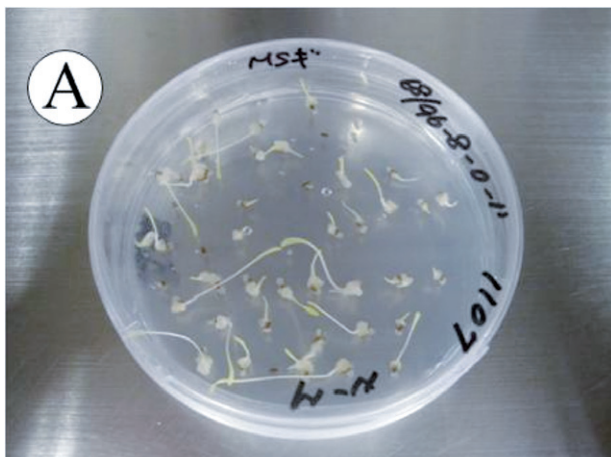


図2. 異なるカルス形成培地でのカルス形成の様子

A: MS ギニア培地でのカルス形成, B: N6D 培地でのカルス形成

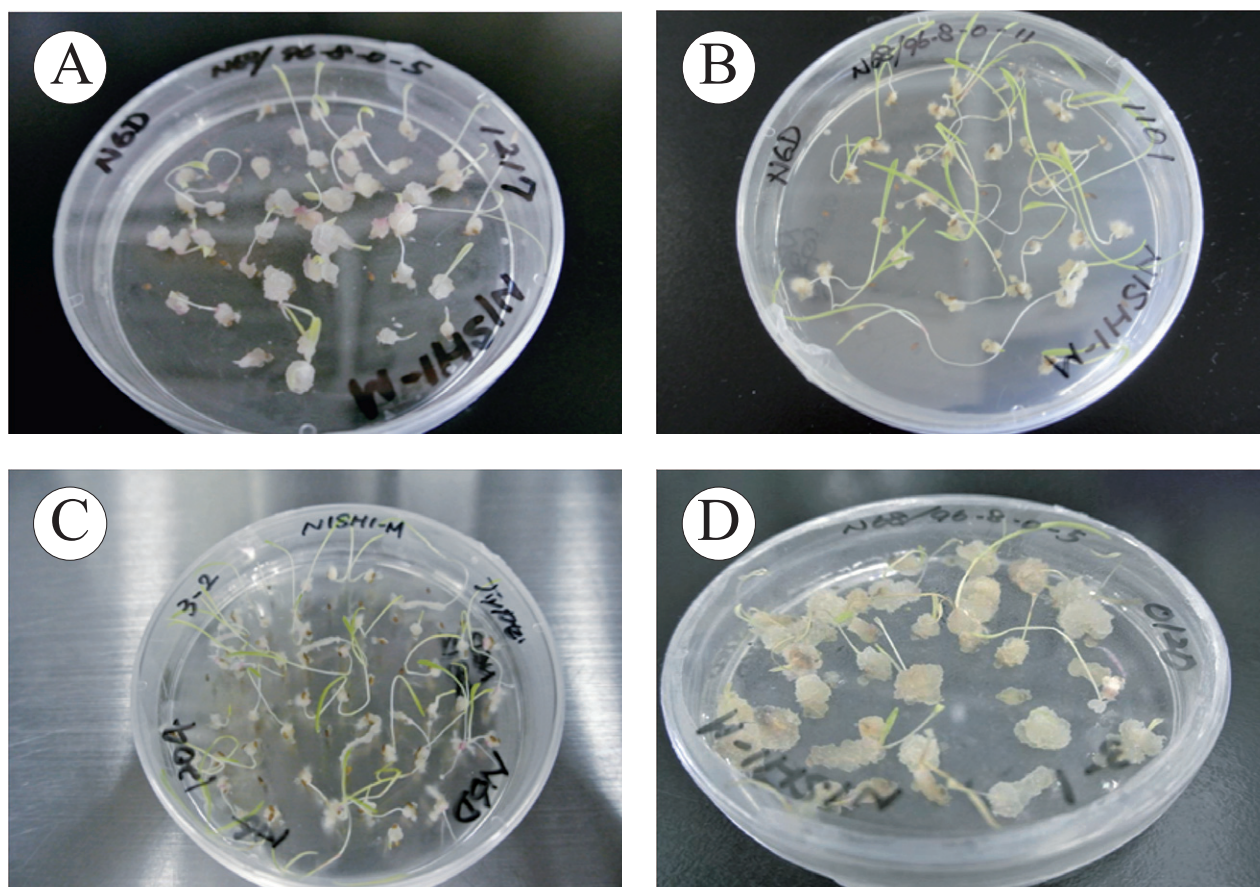


図 3. 3 種類のギニアグラスのカルス形成の様子

A: N68/96-8-o-5 での播種後1 月のカルス形成の様子, B: N68/96-8-o-11 での播種後1 月のカルス形成の様子, C: ‘ナツカゼ’での播種後1 月のカルス形成の様子, D: N68/96-8-o-5 での播種後2 月のカルス

表2. N6D 培地におけるギニアグラスのカルス形成率

ギニアグラスの種類	カルス形成率 (%)
N68/96-8-o-5	97.1(165/170) ²
N68/96-8-o-11	91.7(266/290)
‘ナツカゼ’	84.6(237/280)

²(カルス形成数/置床種子数)

2. 有性生殖系統およびアポミクシス系統でのカルス形成率と系統間差異

植物の培養系において、品種間差異がみられることは広く知られているが、ギニアグラスにおいても有性生殖系統およびアポミクシス系統、アポミクシス品種においてカルスの形成の様子に差がみられた (図 3A, B, C)。有性生殖系統である N68/96-8-o-5 では、発芽と同時に胚由来のカルスが形成され、その後のカルス形成も旺盛だったのに対し、アポミクシスである N68/96-8-o-11 および ‘ナツカゼ’ では、シュートが先に伸び、根の周りや幼鞘の周りにカルスが形成された。今回、形成されたカルスはいずれも白い柔らかいカルスであったが、アポミクシス品種である ‘ナツカ

ゼ’の一部にコンパクトなカルスが見られた (データは示していない)。しかし、3 種類いずれも N6D 培地に置床後 1 月のカルス形成率は高く、特に有性生殖系統である N68/96-8-o-5 のカルス形成率は 97.1%であった (表 2)。また、アポミクシス系統およびアポミクシス品種においてもそれぞれ 91.7%, 84.6%といずれも高いカルス形成率となった (表 2)。特に今回、有性生殖系統の N68/96-8-o-5 のカルス形成が旺盛であり (図 3D)、カルス形成率も高かったことは、今後 *ASG-1* 遺伝子を導入し、アポミクシスの機能解析を進める上で重要であると考えられる。

3. ギニアグラスの完熟種子由来カルスにおける再分化培地の検討

異なる再分化培地における再分化率を表 1 に示した。イネの再分化に用いられる RE III 培地ではカルスが褐変化し、スイッチグラスの再分化培地ではカルスは維持できたが、その後変化は見られなかった。一方、RE ギニアグラスでは根のみが形成され、トールフェスク用の培地では、シュートが形成されたため、MS 基本培地に kinetin : 0.2mg/l を添加した培地が、完熟種子由来のカルスの再分化に適していると考えられた (図 4A, B, C, D; 表 1)。

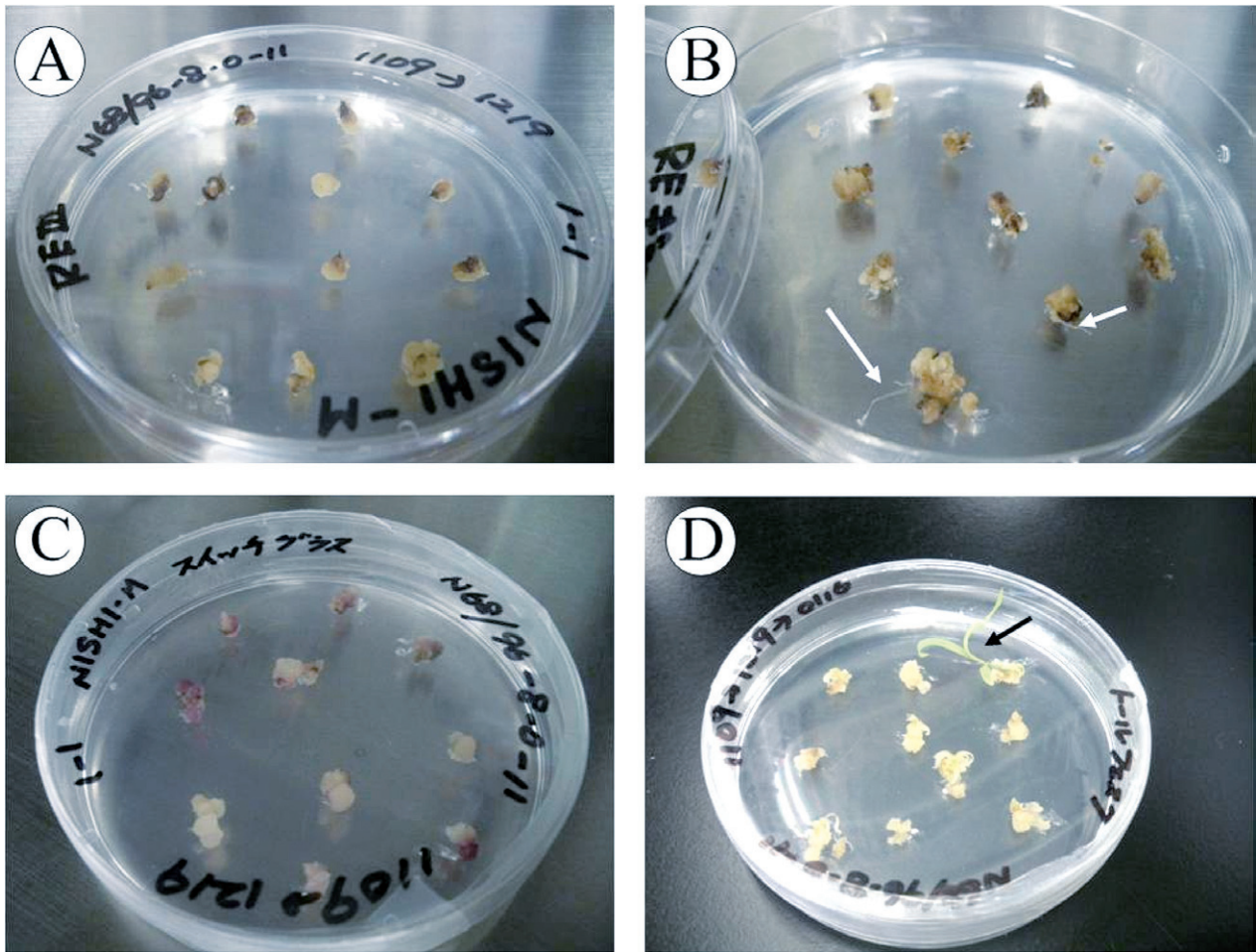


図 4. 4 種類の培地における再分化の様子

A: REⅢ培地, B: REギニア, C: スイッチグラス培地, D: トールフェスク培地

表3. ギニアグラスにおける基本培地への L-proline および NAA 添加が再分化率 (%) に及ぼす影響²

系統名	kinetin: 0.2mg/l	L-proline: 2.0g/l kinetin: 0.2mg/l	NAA: 0.1mg/l kinetin: 0.2mg/l	NAA: 0.2mg/l kinetin: 0.2mg/l	NAA: 0.3mg/l kinetin: 0.2mg/l
N68/96-8-o-5	80	0	8.3	16.6	0
N68/96-8-o-11	25	41.6	8.3	41.6	41.6
‘ナツカゼ’	61.9	91.7	0	25.9	48.3

²(MS培地に kinetin: 0.2mg/l を添加した培地を基本培地として使用した)

4. 3 種類のギニアグラスにおける再分化率と最適ホルモン濃度および L-proline 添加の効果

各種ホルモンおよび L-proline 添加が再分化率に及ぼす結果を表 3 に示した。アポミクシス系統の N68/96-8-o-11 が 25.0% の再分化率で最も低く、次にアポミクシス品種の‘ナツカゼ’が 61.9% の再分化率であった。一方、有性生殖系統である N68/96-8-o-5 の再分化率は 80.0% であった。しかし、品種間での再分化率に差が大きく出たため、カルス形成に大きく関与していると思われる L-proline を 2.0g/l さらに加えた再分化培

地でも同様に調査を行ったところ、kinetin : 0.2mg/l のみを添加した培地では 80.0% と 3 種類のギニアグラスの中で最も高い再分化率であった N68/96-8-o-5 では、まったくシュートや根が形成されなかった。一方、アポミクシス系統においては N68/96-8-o-11 の再分化率が 25.0% から 41.0% と低い水準ながらも向上した。またアポミクシス品種の‘ナツカゼ’は 91.7% と最も高い再分化率となった。このように系統間に大きな差異が見られたことから、系統別に最適な植物ホルモンの組み合わせの検討をさらに行った。その結果、NAA を 0.1mg/l 添加したものでは 3 種類とも再分化率が低

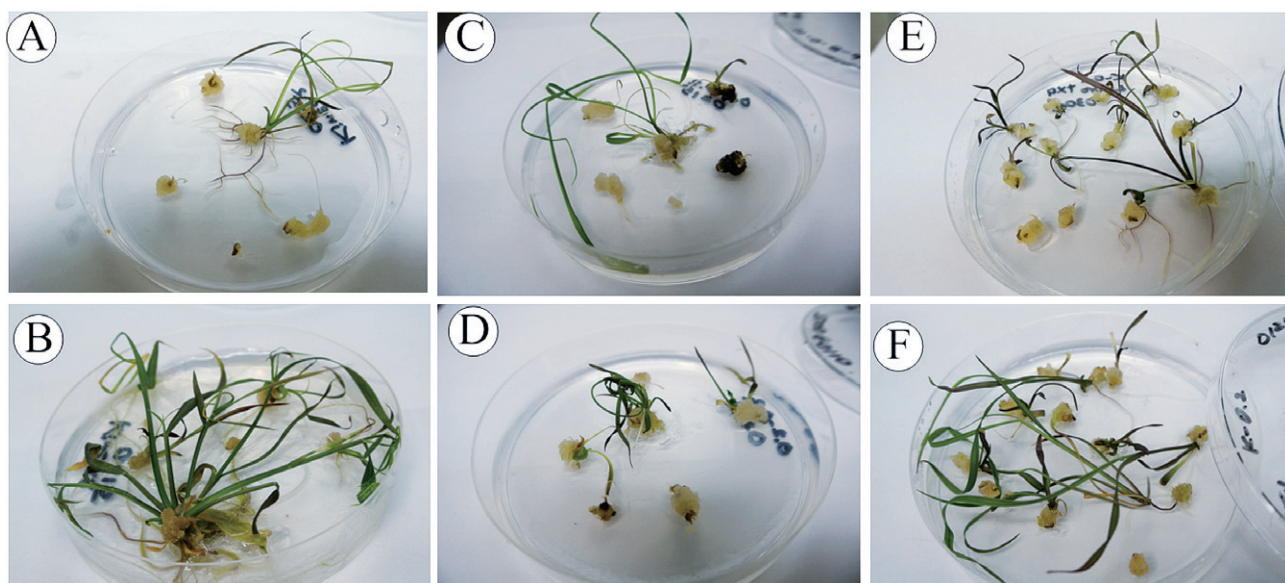


図5. 各系統、品種における異なる培地での再分化の様子

A, B: N68/96-8-0-5 (MS+0.2mg/l: kinetin), C, D: N68/96-8-0-11 (MS+0.2mg/l: NAA, 0.2mg/l: kinetin), E: ‘ナツカゼ’ (MS+2.0g/l: L-proline+0.2mg/l: kinetin), F: ‘ナツカゼ’ (MS+0.2mg/l: kinetin)

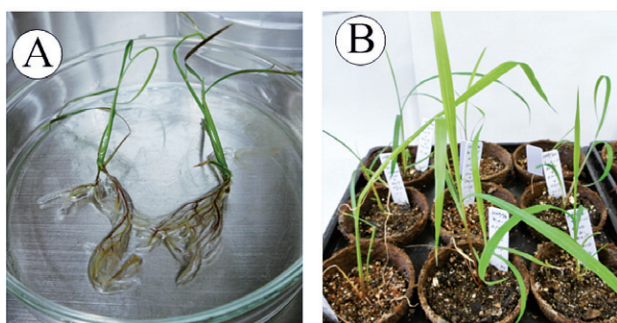


図6. 順化したギニアグラスの様子

A: 再分化培地から順化する前のギニアグラスの幼植物体, B: 純化後のギニアグラスの様子

根の伸長もみられ、そのまま順化することができた(図5E, F)。

5. ギニアグラスの順化

一般には植物体を再生するために発根培地としてホルモンフリー培地に移植した後で順化を行うことが多いが、ギニアグラスは湿潤な気候に弱いため、根とシュートが形成された植物体をそのままメトロミックス(ハイポネックスジャパン)とバーミキュライト(体積比1:1)を混合した土を用い6cmポットに入れて順化を行った。栽培は人工気象器内で30℃、24時間日長で行った。今回、1カルスあたりの植物体再生は最大で5個体と少なかったものの、順化した植物体すべては正常に生育し、普通に播種を行い生育したものと形態的な変化は見られなかった(図6A, B)。

要 約

アポミクシスは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。本研究室ではこれまでに、アポスポリー性胚嚢始原細胞の出現時期に特異的に発現する遺伝子(*ASG-1*)のクローニングに成功している(Chen *et al.* 1999, 2005)。本研究室では*ASG-1*遺伝子の機能解析を目的として、ギニアグラスから単離した*ASG-1*遺伝子の導入を目指しているが、イネ科植物であるギニアグラスではアグロバクテリウム法を用いた遺伝子導入に必要な効率のよいカルスからの再分化系は確立していない。そこで本研究では、有性生殖系統のギニアグラスと条件的ギニアグラス系統およびアポミクシス品種を用いて、それぞれでの完熟種子由来カルス誘導から植物体再分化までの培地を検討

く、NAAの濃度を0.2, 0.3mg/lに上げてそれぞれ再分化率が向上したものの、3種類に共通して使用できる最適な植物ホルモンの組み合わせは見つからなかった。最終的には、有性生殖系統であるN68/96-8-0-5においてはMS基本培地にkinetin: 0.2mg/lのみを添加したものが適し、アポミクシス系統ではkinetin: 0.2mg/lにL-prolineを2.0g/l加えた培地が再分化培地として使用できるということが分かった。各系統、品種における異なる培地での再分化の様子では、N68/96-8-0-5では、MS培地にkinetin: 0.2mg/lを添加した再分化培地で太くしっかりした植物体が形成された(図5A, B)。アポミクシス系統のN68/96-8-0-11ではNAA無添加の再分化培地とNAA: 0.2mg/lを添加した再分化培地ともに植物体に大きな差は見られなかった(図5C, D)。しかし、アポミクシス品種である‘ナツカゼ’においては、L-prolineを添加することによって、葉色が濃く成り、

し、培養系の確立を行った。その結果、ギニアグラスのカルス形成に最適な培地は、イネの培養に用いられる N6D 培地であることが分かった。また、有性生殖系統である N68/96-8-o-5 では 1 ヶ月後のカルス形成率が 97.1% と特に高く、アポミクシス系統の N68/96-8-o-11 でも 91.7%、アポミクシス品種の‘ナツカゼ’も 84.6% のカルス形成率となった。イネ科牧草の再分化培地を 4 種類供試して、最適な再分化培地の検討を行い、MS 培地に kinetin を 0.2mg/l 添加した系で植物体の再生が確認された。その後、3 種類のギニアグラスで再分化率の調査を行い、各系統、品種ごとに再分化率に差異が見られたため、L-proline や NAA (0.1–0.3mg/l) を組み合わせて最適な再分化培地の検討を行った。その結果、有性生殖系統 N68/96-8-o-5 では MS 基本培地に kinetin : 0.2mg/l 加したもの、条件的アポミクト N68/96-8-o-11 およびアポミクシス品種‘ナツカゼ’では、L-proline:2.0g/l と kinetin:0.2mg/l の添加で再分化率が最も高かった。ホルモンフリー培地を経由せずに直接順化したギニアグラスの幼植物体すべては正常に生育し、普通に播種を行い生育したものと形態的な変化は見られなかった。いま、本研究で確立した培養系を使って *ASG-1* 遺伝子組換え実験を実施し始めている。

謝 辞

本研究は科学研究費補助金(基盤研究(B))23380009 によるものである。

参考文献

- 1) Chen LZ, Guan LM, Seo K, Hoffmann F. and Adachi T. (2005) Developmental expression of *ASG-1* during gametogenesis in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). *Journal of Plant Physiology* **162**: 1141-1148.
- 2) Chen LZ, Miyazaki C, Kojima A, Saito A. and Adachi T. (1999) Isolation and characterization of a gene expressed during the period of aposporous embryo sac initial cell appearance in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Journal of Plant Physiology* **154**: 55-62.
- 3) Chen LZ, Okabe R, Guan LM. and Adachi T. (2002) A simple and efficient culture of leaflets for plant regeneration in guineagrass (*Panicum maximum*). *Plant Biotechnology* **19**(1): 63-68.
- 4) Li R. and Qu R. (2010) High throughput *Agrobacterium*-mediated switch grass transformation. *Biomass and bioenergy* **30**: 1-9.
- 5) Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* **15**: 473-479.
- 6) 西村佳子・鉄村琢哉・濱田卓郎・杉田亘・市川裕章・吉田薫・徐成体・陳蘭庄 (2013) 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—南九州大学研報 **43A**: 33-39.
- 7) 佐藤広子・高溝正 (2012) トールフェスクの形質転換プロトコル. 形質転換プロトコル【植物編】 p81-87 化学同人.
- 8) Toki S, Hazra N, Ono K, Onodera H, Tajiri A, Oka S. and Tanaka H. (2006) Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *The Plant Journal* **47**: 969-976.

1) Chen LZ, Guan LM, Seo K, Hoffmann F. and Adachi T. (2005) Developmental expression of *ASG-1* during