



Title	Production of A Novel Transgenic Rice Using Bioactive Beads-Mediated Transformation with Large DNA Fragments
Author(s)	和田, 直樹
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/234
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	和田直樹
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 23772 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学位論文名	Production of A Novel Transgenic Rice Using Bioactive Beads-Mediated Transformation with Large DNA Fragments (バイオアクティブビーズ法を用いた巨大DNA導入による新規形質転換イネの作出)
論文審査委員	(主査) 教授 福井 希一 (副査) 教授 福崎英一郎 教授 藤山 和仁 教授 大竹 久夫 教授 原島 俊 教授 金谷 茂則 教授 紀ノ岡正博 教授 渡邊 肇 教授 清水 浩 教授 四方 哲也 教授 仁平 卓也 教授 野地 博行

論文内容の要旨

巨大 DNA の導入は、代謝経路など複数の遺伝子群が一つの形質に関与している際に、それらの遺伝子群を一度に導入することを可能にする。そのため、植物への巨大 DNA 導入を可能にする新しい遺伝子導入技術の開発が強く望まれてきた。

複数の遺伝子が関与している性質として、コムギ (*Triticum aestivum* L.) 種子における硬軟質性がある。コムギ種子の硬軟質性は、小麦粉粒径、損傷澱粉量、吸水性への寄与を通して小麦粉の最終用途に大きく影響する。硬軟質性は、D ゲノムの第 5 染色体短腕上に存在する *Ha* (hardness) 遺伝子座 によって制御されており、その領域には硬軟質性に関与する *puroindoline a*, *puroindoline b*, *GSP-1* の 3 つの遺伝子が存在している。一方、イネはこれらの遺伝子のホモログを持っておらず、そのため米粉は硬質性のみとなり、その加工用途はきわめて限られている。軟質性のコメを作出できれば、小麦粉同様今までにない米粉の用途を生み出す事ができると考えられる。そこで、本研究では、新規な遺伝子導入方法であるバイオアクティブビーズ法を用いてこれらの遺伝子を含むタルホコムギ (*Aegilops tauschii*) 由来の約 100 kb のゲノム DNA 断片を有する BAC をイネに対して導入し、軟質性を付与したコメを作出することを目的に研究を行った。

バイオアクティブビーズ法を用いて形質転換を行い、9 個体の複数の遺伝子が導入された形質転換体を獲得した。また、導入された遺伝子は安定に次世代へ伝達され、形質転換体系統 9-1-6-3 では導入遺伝子をホモにもつ形質転換体を獲得した。この形質転換体は *puroindoline b*, *hptII*, *GSP-1* 遺伝子を保持しており、FISH 法によってテロメア近傍に DNA が導入されていることが明らかとなった。導入遺伝子の発現を RNA, タンパク質それぞれのレベルで解析し、PINB タンパク質の発現を確認した。これは、*puroindoline b* 遺伝子に対するタルホコムギのプロモーターがイネ胚乳においても働くことを示している。これらの結果より、巨大 DNA の導入に対するバイオアクティブビーズ法の有用性がイネにおいて示唆された。

次に、Puroindoline b (PINB)を胚乳組織で特異的に発現しているホモ形質転換体(T₄世代)を用いて、その胚乳構造の観察および米粉の特性解析を行った。胚乳構造を走査型、透過型電子顕微鏡で観察することにより、原品種である日本晴と形質転換体の間で明らかな違いを見いだした。日本晴においては、それぞれの複粒澱粉粒間にマトリックス様物質が充填されていたが、形質転換体においては、複粒澱粉粒間は隙間の多い構造となっていた。複粒澱粉粒の構成成分である澱粉粒の形状、サイズにおいては、日本晴と形質転換体間に違いは観察されなかった。これらの結果から、PINB はイネにおいてはそれぞれの澱粉粒の表面ではなく、複粒澱粉粒の表面に局在していると考えられた。また、米粉の粒子径、損傷澱粉量は、PINB の発現によって形質転換イネの種子に軟質性が付与されたことを支持していた。

本研究において、バイオアクティブピース法は既存の手法と比べて簡便かつ効率的な巨大DNA導入方法であることが示唆された。本研究で作出された軟質性のコメは、菓子、麺など新たな米粉の加工用途の開発、より良い消化特性をもつことによる飼料米としてのコメの多用途化などに大きく貢献すると期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文では、イネに対してコムギ種子の硬軟質性に関する遺伝子の導入を行い、その導入遺伝子のイネ胚乳構造への影響を解析した結果について述べている。ここで用いたバイオアクティブピース法は新規な遺伝子導入方法であり、タルホコムギ由来の Puroindoline a, Puroindoline b, GSP-1 遺伝子という 3 つの遺伝子を含むゲノム領域をインサートとしてもつ 100 kb 程度の BAC DNA をイネに対して導入し、形質転換イネを得た結果について述べている。

形質転換体の解析から、複数の遺伝子が導入されていることを確認し、次に、Puroindoline b 遺伝子をホモにもつ後代の形質転換体を用いて、Puroindoline b がイネの胚乳構造ならびに米粉の物理化学特性にどのような影響を及ぼすのかを走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡などを用いて解析すると、Puroindoline b の発現がコメに軟質性を付与すること、隙間の多い胚乳構造の形成につながったことを示すのである。

本論文では、バイオアクティブピース法の植物分野への利用に重要な基礎的かつ新規な知見を加えることに大きく寄与し、さらには Puroindoline b のイネ種子に対する影響を明らかにすることにより育種分野への貢献も期待できる。

よって本論文は博士論文として価値のあるものと認める。