



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Development of a bio-active beads system as a new transformation method in higher plants                                                        |
| Author(s)    | 劉, 海波                                                                                                                                           |
| Citation     | 大阪大学, 2004, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/45802">https://hdl.handle.net/11094/45802</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                                                |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 劉 海 波                                                                                                                                                          |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (工 学)                                                                                                                                                      |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 8 9 8 8 号                                                                                                                                                  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 16 年 8 月 12 日                                                                                                                                               |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>工学研究科応用生物工学専攻                                                                                                                              |
| 学 位 論 文 名     | Development of a bio-active beads system as a new transformation method in higher plants<br>(高等植物における新形質転換系としてのバイオアクティブビーズ法の開発)                                |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 福 井 希 一<br><br>(副査)<br>教 授 小 林 昭 雄    教 授 原 島 俊    教 授 ト 部 格<br>教 授 関 達 治    教 授 塩 谷 捨 明    教 授 大 竹 久 夫<br>教 授 金 谷 茂 則    教 授 仁 平 卓 也    教 授 清 水 浩 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は形質転換に用いる DNA 分子の物理的安定性の問題を解決するため、DNA 分子をバイオアクティブビーズに包摂し、安定化させた上で細胞内にデリバリーする手法による新しい形質転換系について述べたものである。バイオアクティブビーズはアルギン酸ナトリウムを固定化担体として用いて作製した無毒無害のマイクロビーズである。この方法を単子葉植物および、複数種類の被子植物の形質転換に応用した、その結果タバコにおいては形質転換体を取得することに成功した。またタバコ細胞においても YAC のような巨大 DNA を細胞中にデリバリーすることに成功した。

第一章では序章として本研究の背景、意義さらにはバイオアクティブビーズ作製法について述べた。

第二章ではバイオアクティブビーズを用いた植物細胞への遺伝子導入について述べた。植物導入ベクターには、CaMV35S プロモーター下流に GFP 遺伝子を連結したプラスミド DNA を用いたタバコ、ナス、ニンジン植物細胞対象としてバイオアクティブビーズを用いてこれら細胞に遺伝子を導入した。GFP をマーカーとした一過性発現により遺伝子導入を確認した。再分化可能なタバコ SR-1 細胞を用いて、バイオアクティブビーズ法により、カナマイシン耐性遺伝子を導入し、形質転換体の取得を試みた。その結果、カナマイシン耐性を持つ植物体を取得し、導入した遺伝子がゲノム DNA に挿入されていることを PCR 法とサザンハイブリダイゼーション法で確認した。

第三章では、バイオアクティブビーズを用いた YAC のデリバリーについて述べた。GFP 遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子、およびシロイヌナズナの 36 遺伝子を含む 124 kb の酵母人工染色体 (YAC) をバイオアクティブビーズ法でタバコ BY-2 の細胞に導入した。24 あるいは 48 時間後に GFP の一過性発現を認めた。また、RT-PCR の結果から、導入されたシロイヌナズナゲノム上の遺伝子のうち三つの遺伝子が発現したことを確認した。

第四章では、バイオアクティブビーズを用いた単子葉植物の形質転換について述べた。従来のアグロバクテリウム法では形質転換が困難であった単子葉植物のイネにおいてバイオアクティブビーズ法で、GFP 遺伝子を含むプラスミド DNA のイネ細胞への導入を試みた。この結果、GFP をマーカーとした一過性発現を観察した。その結果はバイオ

アクティブビーズ法が単子葉植物にも応用可能であることを明確に示したものと見える。

第五章では、以上のことをとりまとめ、本研究が植物の新形質転換系としてバイオアクティブビーズ法が有用である事を論じた。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、新形質転換系であるバイオアクティブビーズ法を単子葉植物および、複数種類の被子植物に応用したものである。

その結果、タバコにおいては形質転換体を取得することに成功した。またタバコ細胞においては巨大 DNA (YAC) を細胞中にデリバリーすることに成功した。以下の主要な結果を得ている。

#### 1. バイオアクティブビーズを用いた植物細胞への遺伝子導入

植物導入ベクターには、CaMV35S プロモーター下流に GFP 遺伝子を連結したプラスミド DNA を用い、バイオアクティブビーズ法でタバコ、ナス、ニンジン由来のプロトプラストに導入した。GFP をマーカーとした一過性発現を観察することにより遺伝子導入を確認した。

再分化可能なタバコ SR-1 細胞を用いて、バイオアクティブビーズ法により、カナマイシン耐性遺伝子を導入し、形質転換体の取得を試みた。その結果、カナマイシン耐性を持つ植物体を取得し、導入した遺伝子がゲノム DNA に挿入されていることを PCR 法およびサザンハイブリダイゼーション法で確認した。

#### 2. バイオアクティブビーズを用いた YAC のデリバリー

GFP 遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子、およびシロイヌナズナゲノムに由来する 36 遺伝子を含む 124 kb の酵母人工染色体 (YAC) をバイオアクティブビーズ方法でタバコ BY-2 の細胞に導入した。24 あるいは 48 時間後に GFP の一過性発現を認めた。また、RT-PCR の結果から導入されたシロイヌナズナゲノムのうち三つの遺伝子が発現したことを確認した。

#### 3. バイオアクティブビーズを用いた単子葉植物の形質転換

従来のアグロバクテリウム法では形質転換が困難であった単子葉植物においてバイオアクティブビーズ法で、GFP 遺伝子を含むプラスミド DNA のイネ細胞への導入を試みた。その結果、GFP をマーカーとした一過性発現を観察した。この結果はバイオアクティブビーズ法が単子葉植物にも応用可能であることを明確に示したものと見える。

以上のように、本論文は、高等植物における新形質転換系としてのバイオアクティブビーズ法を開発して、生物工学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。