

Title	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法に関する研究
Author(s)	村川, 智子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/48703">http://hdl.handle.net/11094/48703</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名	村川 (村山) 智 子
博士の専攻分野の名称	博士 (工 学)
学位記番号	第 21974 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	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法に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 福井 希一  (副査) 教授 卜部 格      教授 金谷 茂則      教授 塩谷 捨明 教授 小林 昭雄      教授 原島 俊      教授 大竹 久夫 教授 福崎英一郎      教授 仁平 卓也      教授 清水 浩 教授 四方 哲也      教授 野地 博行

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文では、バイオアクティブビーズ法にリポフェクチン法やエレクトロポレーション法を組み合わせる方法を開発し、遺伝子導入効率の向上を試みると共に、遺伝物質として染色体をバイオアクティブビーズに包摂する方法を開発し、植物細胞内への導入の際に遺伝物質にかかる化学的、物理的ストレスに対する保護効果について研究を行った一連の研究成果をまとめたものである。

第一章では、本研究の背景をなす植物形質転換法の現状と問題点、バイオアクティブビーズの開発の利点と解決すべき点について記述した。

第二章では、リポフェクチン法とバイオアクティブビーズ法を組み合わせる方法を開発し、タバコ BY-2 プロトプラストにおける遺伝子発現効率を指標にその条件検討を行った。ビーズ表面に存在するリポフェクチンの正電荷とプロトプラスト表面の負電荷を静電的相互作用力を介して強く相互作用させる事により、既存の方法と比較して遺伝子発現効率を約 4 倍に向上させる事に成功した。

第三章では、バイオアクティブビーズ法とエレクトロポレーション法を組み合わせる方法を開発し、タバコ SR-1 プロトプラストにおける遺伝子発現効率を指標に、電界強度をはじめとする機器のパラメーターやアルギン酸ナトリウム濃度および PEG 濃度の最適化を検討した。その結果、既存の方法と比較して遺伝子導入効率が 10 倍に向上しただけでなく、植物プロトプラストに対する遺伝子導入法において、これまでの植物遺伝子導入法の報告の中で最も高い遺伝子導入効率を得る事に成功した。

第四章では、染色体をバイオアクティブビーズに包摂する方法を開発し、染色体にかかる化学的、物理的ストレスに対し、保護効果があるかどうかを検討した。染色体を包摂する方法の開発では、バイブレーション法および油中水滴乳化法を開発し、染色体をほぼ 100% で包摂する方法を開発する事に成功しただけでなく、バイオアクティブビーズのサイズコントロールも可能とした。特に油中水滴乳化法による、バイオアクティブビーズの作製は、染色体に若干の膨潤がみられる程度で、非常に容易、かつ迅速に大量生産することが可能であった。塩処理および物理的ストレスに対する染色体の保護効果について検討を行ったところ、包摂された染色体の形態はセルソーティングやピペッテ

ィング、塩処理等の実験操作後も維持されており、保護効果があることが示唆された。

第五章では、以上の研究を総括すると共に、得られた結果について総合的に考察を行い、バイオアクティブビーズ法の有用性さらには、今後の発展性等について議論した。

## 論文審査の結果の要旨

本論文では、バイオアクティブビーズ法にリポフェクチン法やエレクトロポレーション法を組み合わせる方法を開発し、遺伝子導入効率の向上を試みると共に、遺伝物質として染色体をバイオアクティブビーズに包摂する方法を開発し、植物細胞内への導入の際に遺伝物質にかかる化学的、物理的ストレスに対する保護効果について研究を行った一連の研究成果をまとめたものである。

第一章では、本研究の背景をなす植物形質転換法の現状と問題点、バイオアクティブビーズの開発の利点と解決すべき点について記述している。

第二章では、リポフェクチン法とバイオアクティブビーズ法を組み合わせる方法を開発し、タバコ BY-2 プロトプラストにおける遺伝子発現効率を指標にその条件検討を行った。ビーズ表面に存在するリポフェクチンの正電荷とプロトプラスト表面の負電荷を静電的相互作用力を介して強く相互作用させる事により、既存の方法と比較して遺伝子発現効率を約4倍に向上させる事に成功している。

第三章では、バイオアクティブビーズ法とエレクトロポレーション法を組み合わせる方法を開発し、タバコ SR-1 プロトプラストにおける遺伝子発現効率を指標に、電界強度をはじめとする機器のパラメーターやアルギン酸ナトリウム濃度および PEG 濃度の最適化を検討した。その結果、既存の方法と比較して遺伝子導入効率が10倍に向上しただけでなく、植物プロトプラストに対する遺伝子導入法において、これまでの植物遺伝子導入法の報告の中で最も高い遺伝子導入効率を得る事に成功している。

第四章では、染色体をバイオアクティブビーズに包摂する方法を開発し、染色体にかかる化学的、物理的ストレスに対し、保護効果があるかどうかを検討した。染色体を包摂する方法の開発では、バイブレーション法および油中水滴乳化法を開発し、染色体をほぼ100%で包摂する方法を開発する事に成功しただけでなく、バイオアクティブビーズのサイズコントロールも可能とした。特に油中水滴乳化法による、バイオアクティブビーズの作製は、染色体に若干の膨潤がみられる程度で、非常に容易、かつ迅速に大量生産することが可能である。塩処理および物理的ストレスに対する染色体の保護効果について検討を行ったところ、包摂された染色体の形態はセルソーティングやピペッティング、塩処理等の実験操作後も維持されており、保護効果が示されている。

第五章では、以上の研究を総括すると共に、得られた結果について総合的に考察を行い、バイオアクティブビーズ法の有用性さらには、今後の発展性等について議論している。

以上のように、本論文は新しい形質転換の方法を独自の手法で提供することに成功している。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。