

パーティクルガンを用いた単子葉植物 ホテイアオイへの遺伝子直接導入法の開発 —ホテイアオイの無菌化と外来遺伝子の一過性の発現—

*Development of the direct gene transfer method to
monocotyledon water hyacinth using particle gun.
—Sterilization of water hyacinth and transient expression of foreign gene—*

其木茂則, 佐俣哲郎, 堂ヶ崎知格, 久松 伸

麻布大学大学院環境保健学研究科

Shigenori Sonoki, Tetuo Samata, Chikaku Douglasaki, Shin Hisamatsu

Graduate School of Environmental Health, Azabu University

Abstract. To develop phytoremediation technology for hydrosphere, we decided to utilize water hyacinth. In this study, sterilization of water hyacinth as base technique for transgenic plant and search of a promoter to foreign-gene expression were performed. For sterilization of water hyacinth, the seed was a good material. However, even if the sterilized seed planted on the culture medium, budding was not observed. Then, when the seed which deleted a part of outer cover was planted, budding was observed. Furthermore, CaMV35S promoter, general promoter for higher plant, can use also for water hyacinth.

目 的

近年, 植物を利用して有害な環境汚染物質を除去する環境修復技術, すなわちファイトレメディエーションが注目されている (1,2)。利用する植物は, 除去する対象物質やその物質が存在する地域によっても異なり, 野生株ばかりでなく有用遺伝子を導入したトランスジェニック植物も研究対象となっている (2)。このトランスジェニック植物の開発は, 主に草本類の双子葉植物を中心に行われており, アグロバクテリウムを利用した形質転換方法が主流である (3)。一方, このアグロバクテリウムを用いた形質転換法は, 多くの単子葉植物では利用できないため, 物理的な遺伝子導入方法であるパーティクルガ

ン法が良く用いられている (4)。

ところで, ファイトレメディエーションは主に土壌の汚染物質除去を中心に研究が行われている。湖沼や河川においては, 野生型の水生植物を利用して富栄養化低減のための環境浄化の研究が主流となっているが, ダイオキシン類のような難分解性有機化合物などの除去を行う場合, 一般の野生型の植物では分解が困難と考えられる。そこで本研究では, 湖沼や河川におけるファイトレメディエーションを行うために, 増殖能力が高く, 湖沼の富栄養化低減にも利用されている単子葉水生植物ホテイアオイ (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) を用いたファイトレメディエーション技術の開発を行うことにした。

ホテアオイは観賞用として市販されており、栄養生殖によって容易に植栽を行うことができるが、河川や湖沼では、その繁茂力により水利事業の障害になるなど、害草として取り扱われている。そのためホテアオイに関する研究の多くは、ホテアオイの駆除に関するものが中心となっており、有用遺伝子を組込んだトランスジェニックホテアオイを作出するためには、無菌ホテアオイの作出、組織培養技術の確立、外来遺伝子を発現させるためのプロモータの選択、クローン化技術の確立など、様々な基盤技術について研究を行う必要がある。そこで今回、これら必要な基盤技術のうち、ホテアオイの無菌化と外来遺伝子の発現に用いるプロモータの検討を行うこととした。

方 法

ホテアオイ種子：実験に用いたホテアオイ種子は、夏季に採種し次のような操作を行い保存した。まず、採種した種子をろ紙を敷いたシャーレに入れ、1晩室温にて風乾させた。風乾させた種子を1.5 mlのエッペンドルフチューブに入れ、キムワイブを詰めて蓋をした（乾燥保存）。また、同様にエッペンドルフチューブに種子を入れ、蒸留水1 mlを加えて蓋をした（湿潤保存）。これらの種子を4℃あるいは27℃で、実験を行うまで保存した。

種子滅菌及び発芽試験：ホテアオイの種子は、70%エタノールに15秒、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度1%）に10分間浸すことで滅菌を行い、さらに滅菌水で3回洗浄した。この滅菌種子をクリーンベンチ内のシャーレ上に置き、メスを用いて種子の先端部を切除した後、Murashige-Skoog寒天培地に置床し、29℃、明期16時間、暗期8時間に設定したグロースキャビネット内でインキュベートした。

外来遺伝子の一過性の発現実験：CaMV35Sプロモータ下流にGFP遺伝子及びNOSターミネータを連結したプラスミドを直径1 μmの金粒子にコーティングし、パーティクルガン（PDS-1000/He, BioRad）を用い、ヘリウム圧1,100 psiでホテアオイ個体から切除した葉に対して打ち込んだ。その後、蛍光顕微鏡を用いてGFPの蛍光を観察した。

結果と考察

ホテアオイの無菌化の出発材料として、栄養生殖で得られる子株を、70%エタノール、次亜塩素酸ナトリウム溶液、抗生物質（リファンピシリン等）（5）、及び除菌剤（PPM™, Phyto Technology Lab.）を用いて滅菌を試みたが、各種薬剤の濃度及び処理時間を変化させても無菌化はできなかった。また、ホテアオイの様々な組織を同様の操作で処理を行ったが、無菌化することはできなかった。しかしながら、葉柄と根の間の基部を処理した場合、無菌化を行うことは困難であったが、培地中に植物成長調節物質を添加しなくても側芽が得られることが分かった。

一方、ホテアオイはおもに栄養生殖によって増殖を行うが、日本では年に1度、夏季の終わりに開花、結実することが知られている。開花は1日のみであり、開花後は花卉を水中に沈めるような形態をとり、その状態で3~4週間程度保持しなければ、発芽可能な成熟した種子を得ることが出来ない。そのため、池などの野外で生育させた場合は、種子の回収が困難になる。今回、実験室内で栽培しているホテアオイから成熟した種子を得ることが出来たことから、この種子を用いてホテアオイの無菌化を行うことにした（Fig. 1A）。得られた種子を70%エタノール及び次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて滅菌し、直ちに培地に置床したところ、微生物の発生は認められず、無菌化を行うことができたと考えられた。しかしながら、この無菌化した種子から発芽する個体は得られなかった。多くの植物では、種子は長期間の休眠状態を保つことが出来るが、発芽させるためには春化处理などの何らかの方法でこの休眠状態の解除を行う必要もあり、熱帯原産のホテアオイにおいて、この休眠状態を打破するには、保存温度など様々な点から検討を行う必要があると考えられる。

このようなことから無菌化した種子の発芽を促すために、先端部外皮の一部をメスで切り取った滅菌種子（Fig. 1B）を置床したところ、保存温度、保存中の水分状態にかかわらず、効率よく発芽することが分かった（Fig. 1C, Table 1）。ただし、いくつかの種子では生長が途中で止まる個体も観察されたが、

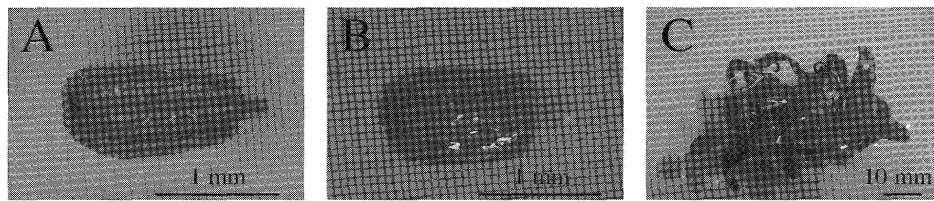


Fig. 1 Sterilized seed and seedlings of water hyacinth. A, The seed before sterilization. B, The seed deleted a part of outer cover after sterilization. C, Seedlings of 20 days after sowing.

Table 1 Germination rate of water hyacinth seeds.

Conserve temperature	Conserve condition	The number of seeds	Living population (survival rate)		
			1 week	2 weeks	3 weeks
4°C	dry	87	77 (88.5%)	32 (36.8%)	30 (34.5%)
	wet	226	177 (78.3%)	43 (19.0%)	32 (14.2%)
27°C	dry	80	64 (80.0%)	23 (28.8%)	20 (25.0%)
	wet	51	49 (96.1%)	16 (31.4%)	9 (17.6%)

4週間生存した幼苗は、その後正常に生長を続けることがわかった。また、4°C、乾燥状態で保存した種子は、2年以上経過しても発芽率は70%以上であった。今回の実験では、休眠状態の解除が種子の保存温度によるものではなく、種子内部への水分供給の程度によるものではないかと推測された。以上のことから、ホテイアオイの無菌化は種子を出発材料とし、種子先端部外皮の一部を切除すれば、容易に生長することが分かった。

一方、ホテイアオイにおいて外来遺伝子を発現させるためのプロモータを検討するため、まず、一般的な高等植物で良く用いられるCaMV35Sプロモータを用いて実験を行った。実験では、レポータ遺伝子として蛍光タンパク質であるGFPの遺伝子を用い、物理的な遺伝子導入方法であるパーティクルガンを利用し、GFPの一過性の発現を調べることでプロモータとして機能するかを調べた。その結果、遺伝子導入後、2~3日でGFPの蛍光を観察することができた (Fig. 2)。従って、CaMV35Sプロモータは、単子葉水生植物のホテイアオイでも機能することが分かった。

要約

ホテイアオイを用いた水圏のファイトレメディエーション技術を開発するために、ホテイアオイの無

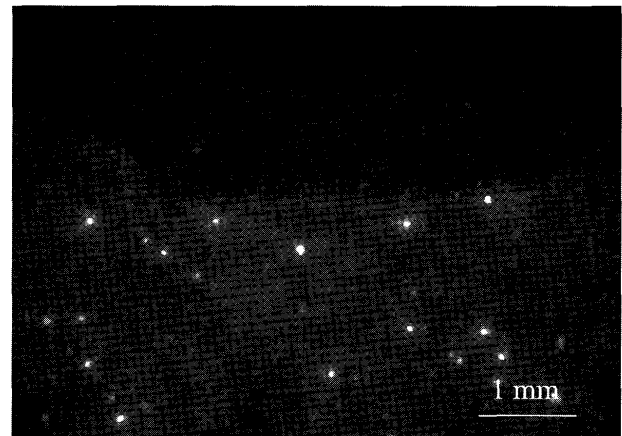


Fig. 2 Transient expression of GFP in water hyacinth leaf.

菌化とホテイアオイで有効なプロモータの検討を行った。その結果、ホテイアオイの種子を滅菌し、外皮の一部を削除することで無菌化と発芽を行うことができた。また、高等植物において外来遺伝子を発現させるためによく使用されるCaMV35Sプロモータは、ホテイアオイでも利用できることがわかった。

文献

- 1) Macek, T., Mackova, M., and Kas, J., *Biotechnol. Adv.* 18: 23-24 (2000).
- 2) Pilon-Smits, E., *Annu. Rev. Plant Physiol.* 56: 15-40 (2005).
- 3) Walkerpeach, C. and Welten, J., *Plant Mol. Biol. Manu.*

- 2nd ed., Kluwer Academic Publishers, B1: 1-19 (1994).
- 4) Kikkert, J. R., *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 33: 221-226 (1993).
- 5) Okamoto, C., Kabata, K., and Kikuchi, M. *J. Japan. Grassl. Sci.*, 37: 471-474 (1992).