

遺伝子組換え植物におけるゲノムおよび mRNA発現個体の迅速選抜手法の検討

秋吉 美穂・吉田 光毅・遠藤 昇

Keywords : transgenics plant, PCR, genomic PCR, RT-PCR

植物, 遺伝子組換え, 遺伝子導入, PCR, ゲノムPCR, RT-PCR

1. はじめに

耐塩性植物の開発や生物分解性プラスチック合成遺伝子を導入した WPC (Wood & Plastic Combinations) の生物生産技術開発においては、外来の遺伝子を植物（イネなど）に導入し、導入遺伝子が安定して発現する個体（系統）を選抜する必要がある。耐塩性植物の開発においては、海水で生存するシバからとった 3 つの遺伝子をイネに遺伝子導入し、それらを交配することによって遺伝子を集積し、イネの耐塩性を向上させることを目的としている。また、WPC の生物生産技術

開発では、微生物の持つ生分解性プラスチック合成に関連する遺伝子を 2 つ連結して植物に遺伝子導入し、同一個体で 2 つの遺伝子を働かせる技術確立を行っている。

これらの研究を進めるにあたっては、目的とする外来遺伝子を植物細胞に遺伝子組換えし、細胞から植物体を再生（再分化）させ、幼苗まで育成の後、遺伝子（ゲノム DNA）を抽出し、目的遺伝子が入っているかどうか調査する必要がある。さらにその遺伝子が働いているか（mRNA に転写されているか）についても調べ、目的遺伝子が安定的に発現する系統を選抜するこ

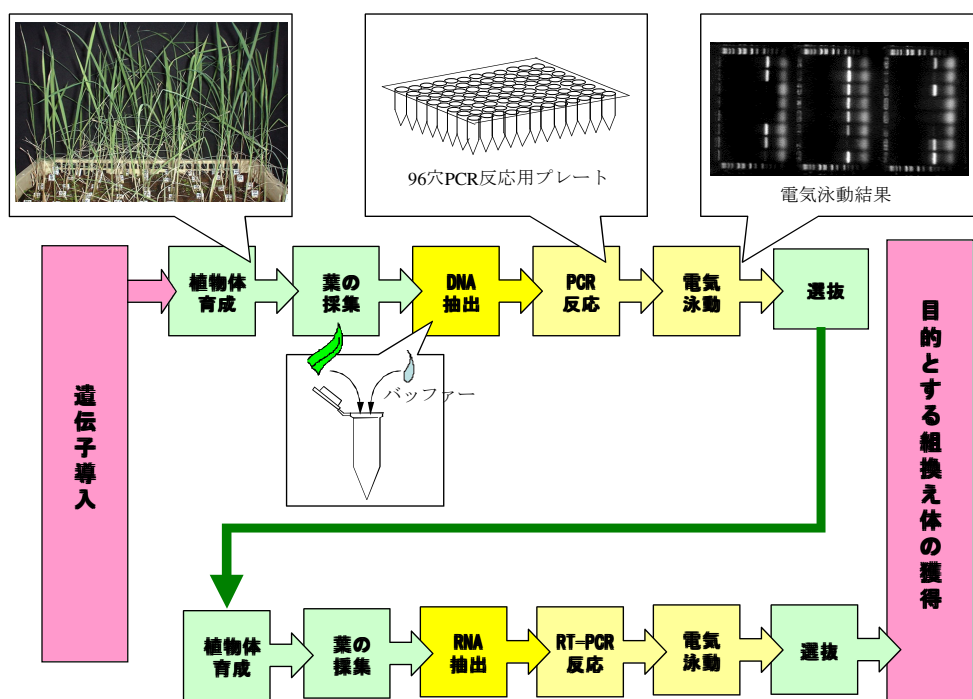


図-1 ゲノム PCR のフロー
Flow of Genomic PCR

とが要求される。ゲノム DNA の検出法としては、サザン分析 (Southern Blotting Analysis)、PCR 分析 (Polymerase Chain Reaction) 法などがあり、mRNA の検出にはノーザン分析 (Northern Blotting Analysis)、RT-PCR 法 (Reverse Transcription PCR) などが一般的に用いられる方法である。これらの分析法の中で、PCR 反応を利用する検出法は簡便であるところから、広く用いられる技術となっている。

ゲノム DNA の検出に先立ち、DNA を抽出する必要がある、Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) などの界面活性剤を用いた抽出法^{1) 2)}、あるいはキットとして市販される抽出カラムを用いる方法など目的に応じて使い分けられている。外来遺伝子の検出においては、少量の DNA で十分であるが、図-1 に示したフローに沿って数百から数千個体の選抜を行う必要があるため、この目的に合致した抽出法を確立することが重要である。例えば、CTAB 法では純度の高い DNA が得られるが、1) DNA 抽出に用いる葉の量が多く、葉サンプルを採集できるまでに 1-2 ヶ月の育成期間が必要である、2) 1 サンプルを抽出するのに時間と労力がかかるなどの問題点がある。この点、カラムを用いた抽出法では、少量の DNA であるが CTAB 法に比べて時間の短縮が可能となる。それでも 100 サンプルを抽出するのに 1 週間を要するなどの問題点も残る。

近年、遺伝子導入の確認²⁾や植物の持つ遺伝子を対象にした判別法^{3) 4)}として、簡易抽出法が検討されており、一般的な検出法として PCR 法が採用されている。そこで、我々は遺伝子導入の確認のために、池田ら³⁾の手法を参考にして、より迅速な選抜手法の検討を行った。また、簡易法を用いた DNA 抽出でゲノム DNA を確認した個体について、遺伝子の発現を検出する RT-PCR を行うことによる効率化についても検討した。

2. 材料および方法

2. 1 DNA 抽出用植物材料の調整

遺伝子を導入したイネ細胞から再分化させた遺伝子導入個体 (Transformation zero generation, T_0) を寒天培地からポット (ジフィーストリップ) に移植した。培土はイネ育苗培土を用いた。遺伝子導入後代 (T_1)、交配後代 (F_1) は種子を採取し、イネ育苗培土に播種し育成した。個体には個別に番号をつけ、データと照合ができるようにした。抽出サンプルには 2-4 葉期の若い葉を使用した。

2. 2 DNA 抽出バッファの検討

植物体から、葉片 (5mm×5mm) をサンプリングし、1.5ml マイクロチューブに入れ (氷上)、-80℃で保存した。緩衝液 (以下バッファーという) を 100 μ l 添加後、パワーホモジナイザーでよくすりつぶし、4℃、12000rpm、5min 遠心分離し、上澄 10 μ l を PCR のテンプレート (鋳型) とした。

簡易抽出に最適なバッファーを選定するために、滅菌蒸留水、TE バッファー、1/10 TE バッファー (PCR 反応液の塩濃度が高いと反応しない可能性があるため、TE バッファーを 10 倍に希釈) の 3 種類を比較した。DNA の抽出には温度処理の効率化が報告されているので^{3) 4)}、1/10 TE バッファーについては温度処理の有無についても検討した。温度条件はよく用いられている 65℃、15 分間温浴を用いた。

2. 3 PCR 反応におけるプライマーの検討

PCR 反応は二重鎖 DNA を熱処理することにより 1 本鎖とし、10-20 塩基対の相補的 DNA 断片 (以下プライマーという) から DNA 重合反応を行わせ、目的遺伝子の一部を増幅させる反応である。

目的遺伝子の一部を増幅するためのプライマーは、形質転換体において増幅された断片が UV 照射下で帯状 (以下バンドという、図-1 電気泳動結果を参照) に観察され、非形質転換体ではバンドが検出されないものでなければならない。池田らによれば、PCR の増幅サイズの短いプライマーのほうが長いものより PCR 反応の感度が高い (未発表) ようなので、増幅サイズの異なるプライマーとして最終増幅産物がサイズ 226、398、544、878bp になるプライマーの設計を行い、増幅部位の比較を行った。

重合反応を触媒する DNA ポリメラーゼは反応時間が短い KOD' (東洋紡製) を用いた。(2. 2) で調製した DNA テンプレート 10 μ l をとり、96 穴 PCR 反応プレート (図- 1) の各穴に分注し、PCR 反応溶液を 10 μ l 加えて、PCR 反応を行った。反応の条件は、98℃で 2 分の後、98℃ 30 秒、55℃ 2 秒、72℃ 30 秒を 30 サイクル行い、伸長反応 74℃ 5 分の後、4℃で保持した。

2. 4 電気泳動を用いた DNA の検出と個体選抜

PCR 反応で増幅された DNA 断片は、純度の高い寒天を媒体 (アガロースゲル) とし、電気的に分子サイズをふるいわけする電気泳動法により検出される。使用するゲルは、泳動用バッファーである TAE バッファーに 2%アガロースゲルタイプ S (ニッポンジーン製) を加えて溶解し、エチジウムブロマイド (蛍光試薬) を添加し、冷却したものを用いた。泳動槽は、フォーラ

ックサブマリンゲル電気泳動装置 NB-1017 型と NB-2010 型（日本エイドー社製）を使用した。PCR 終了後の反応液には 1/10 量の泳動用色素を添加し、8 連ピペットでゲルのウェルに注入し、泳動槽にゲルを静かに浸し、80V で 2-3 時間電気泳動を行った。泳動後、ゲルを UV 照射下にて写真を撮影した。

写真で各個体の PCR 増幅産物であるバンドの大きさを確認した。その際ポジティブコントロールとして、遺伝子導入に使用したベクター中の挿入 DNA 断片の PCR 産物を同時に電気泳動した。コントロールと同じ位置（分子サイズが等しい）にバンドが検出されたサンプルは遺伝子が導入された個体として扱い、バンド検出されなかったサンプルについては遺伝子が導入されていなかった個体として扱った。遺伝子導入個体は各個体番号で表に基づき選抜し、ポットに移植して RNA 抽出用の葉が採集できるように育成した（DNA 抽出よりも多量の葉片サンプルが必要なため）。葉のサンプルは DNA 抽出と同様に若い葉を使用した。

2. 5 RT-PCR を用いた発現遺伝子の検出

それぞれの個体から葉（約 100mg、幅 1cm×12cm）を採集し、乳鉢、乳棒を用いて液体窒素でパウダー状になるまで粉碎した。抽出には RNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN 社製）を用い、一緒に抽出される DNA を除去するため DNase 処理をし、精製には RNeasy Mini Kit を用いた（プロトコールは <http://www.qiagen.com/jp/> を参照）。

精製した RNA は 260nm の吸光度を測定して濃度を求め、 $1\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ になるように希釈し、RT-PCR に供試した。RT-PCR は、RNA を逆転写反応で cDNA に変換し、この cDNA をテンプレートとして PCR を行う 2 段階の反応で、特定の発現遺伝子を検出できる。

逆転写酵素には Omniscript Reverse Transcriptase（QIAGEN 社製）を用い、Oligo - dT primer（東洋紡社製）、RNase inhibitor（東洋紡社製）を混合し、反応液を調製した。RNA 希釈液に調整した反応液を $10\mu\text{l}$ ずつ添加し、 37°C で 1 時間、RNA 逆転写反応を行った（プロトコールは同上を参照）。

反応液を $1-2\mu\text{l}$ とり、RT-PCR のテンプレートとして用いた。PCR 反応の条件、酵素は DNA の PCR 反応と同様に行った。電気泳動についても DNA と同じ方法を用いた。

3. 結果および考察

遺伝子組換え植物の選抜を行うためには、図-1 の

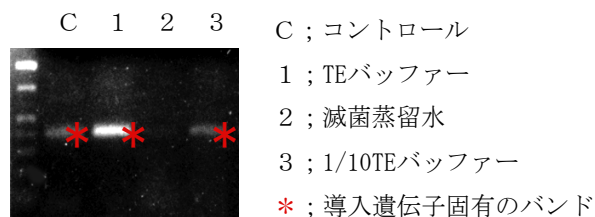


図-2 異なる抽出バッファーを用いたゲノム PCR の結果
Results of Genomic PCR Using Defferent Buffers

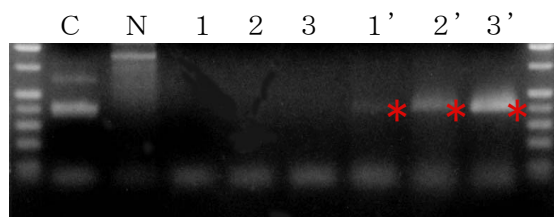


図-3 抽出液の温度処理の有無によるゲノム PCR の結果
Results of Genomic PCR of Heating or Not for Extractions

C ; コントロール、 N ; 非組換え体
1-3; 温度処理 (65°C , 15min)、1'-3'; 未処理
* ; 導入遺伝子固有のバンド

フローに示した 14 の工程が必要であり、各々の工程において時間と労力の効率化をはかることにより、迅速な簡易法が確立される。しかし、植物が生育する期間など自然条件に左右される工程も含まれているので、検討可能な部分は限られている。そこで、本報では、14 の工程のうち、(1)DNA 抽出工程、(2)PCR 反応工程、(3)電気泳動工程、(4)RNA 抽出工程の 4 つの工程の効率化について検討した。

3. 1 DNA 抽出工程

3. 1. 1 抽出バッファー

サンプルに最適なバッファーを選ぶ目的で、滅菌蒸留水、TE バッファー、1/10 TE バッファーの 3 つの区を比較した結果、滅菌蒸留水ではバンドは検出されず、TE バッファーと 1/10 TE バッファーではバンドが検出されたが、TE バッファーのバンドのほうが見えやすかった（図-2）。また、温度処理した抽出液をプライマーに用いた場合は、バンドが検出されず（図-3）、抽出バッファーには TE バッファーを用い、熱処理を加えない条件がよいことが確認された。

3. 1. 2 サンプルの保存条件

サンプルの保存条件の検討として、抽出液を 4°C 、 -20°C 、 -80°C で 1 晩保存したものをテンプレートとして PCR 反応を行った。その結果、 -20°C 、 -80°C 保存では、抽出後すぐに PCR を行った場合と変わらなかった

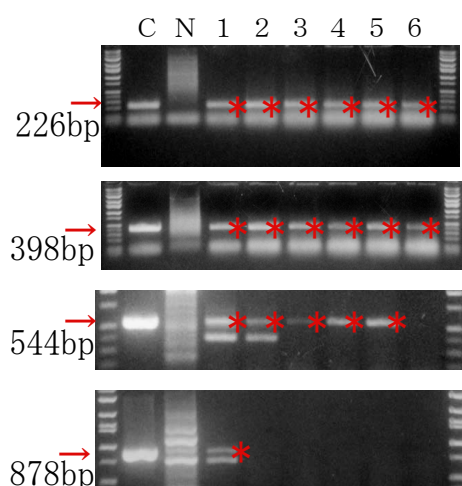


図-4 増幅サイズの異なる鋳型を用いたゲノム PCR の結果
Results of Genomic PCR Using Primers with Which Amplification Sizes Differs
C ; コントロール, N ; 非組換え体
Lane 1-6 ; 組換え体, * ; 導入遺伝子固有のバンド

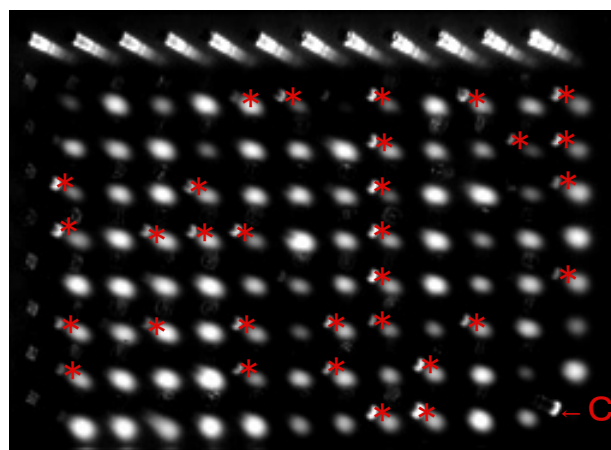


図-5 96 サンプルのゲノム PCR の結果
Results of Electrophoresis of Genomic PCR for 96 Samples
C ; コントロール
* ; 導入遺伝子固有のバンドを検出

が、4℃では、バンドの検出における再現性が低かった。また、-80℃では 1 ヶ月凍結保存した抽出液でも DNA が検出された。これらのことから、植物体の生長に応じてサンプルを採集し、葉をそのままあるいは抽出液にして-80℃に保存したものから、PCR 反応をすることが可能であることが確認された。

3. 2 PCR 反応工程

異なるプライマーを用いて、PCR 増幅産物を比較した結果、増幅 DNA 断片が短い場合 (226、398bp) に比べて、長い DNA 断片 (544、878bp) では、検出における再現性が低かった (図-4)。この抽出法では精製工程を省略しているため、夾雑物が含まれている。長い増幅産物の場合には、PCR 反応が夾雑物の影響で障害

された可能性が高い。

使用するプライマーを選定する際には、導入遺伝子に対する特異性が高いこと、増幅断片の長さは 200－400bp (長くても 500bp) 位が良好であることが確認できた。

3. 3 電気泳動工程

通常用いられている 1 段モールド型の電気泳動装置は、1 枚のゲル上にサンプルを並列するので、多数のサンプルを泳動するには、装置をいくつか並べて置かねばならず、スペースを必要とする。また、サンプルをアガロースゲルのウェル (サンプルを注入する穴) に分注するのに労力を要する。

そこで、著者らは NB-1017 型と NB-2010 型の泳動装置を用いた。どちらも、8 連分注ピペットに対応しているので、サンプルをウェルに注入する労力を省力化できる。NB-1017 型は、1 枚のゲルに 24 サンプル (図-1)、4 枚ゲルを重ねて泳動するので、省スペースで 96 サンプルを同時に処理できる。一方、NB-2010 型は、1 枚のゲルで 96 サンプル (図-5)、4 枚のゲルを泳動できるので、同時に 384 サンプルまでサンプル数を拡張できる。両装置とも多サンプルを扱うのに適しているが、増幅されるバンドの特性により使い分けが必要がある。

つまり、増幅されるバンドは目的遺伝子に特異的であるが、非組換え体に類似した配列がある場合には、誤ってバンドが増幅される (フェイントバンド) ことがある。フェイントバンドが目的とする遺伝子のバンドと近い位置に出る場合には、判定が困難になるので、泳動距離を長くする (泳動時間を長くする) あるいはゲルの濃度を高くして分離能を高めるなどの工夫が必要になる。

著者らは、フェイントバンドが出る場合には、NB-1017 型を用いて、泳動距離を長めにとることでバンドの増幅サイズを確認できた。単一バンドの場合には多サンプルを同時に扱える NB-2010 型を用いた。NB-2010 型は、ゲルを斜めに泳動する特殊な装置なので、電気泳動距離が極端に短くなっている。濃度の高いアガロースゲル (3%の濃度) を使用することにより分離能を高めることができ、検定の迅速化を図ることができた。

3. 4 RNA 抽出工程

3. 4. 1 RNA 取り扱い操作

RNA は実験者の手や口から出る RNA 分解酵素 RNase で分解され易いため、通常は、RNA 実験専用の実験台を用意し、専用の器具を使用するなどの注意を要する。

著者らのスペースの問題から RNA 専用の実験台を別に用意することが困難であったので、1) RNase を不活化する RNase-OFF(宝酒造社製)で実験台や器具を拭く、2) 実験者は手袋を必ず着用する、3) 試薬や抽出液に接するピペットチップをフィルター付きのチップにする、以上 3 点に注意して RNA 実験を行うことにした。

この方法で得られた RNA から RT-PCR 反応した結果は再現性が高く、RNA 分解の誤差はあっても無視できる程度であった。そこで、RNase-OFF を使用することで、壊れやすい RNA を取り扱う実験に対応できることを確認した。

3. 4. 2 RNA 抽出

RNA 抽出工程の迅速化を検討した。一般的に、多量の RNA が必要なノーザン分析などの場合には、グアニジウム法、SDS-フェノール法、CTAB 法などがよく用いられている。しかし、これらの方法では、精製度が高い RNA を大量に抽出できても、液体室素でかなり細かく粉砕する工程に時間を要し、多くのサンプルを同時に処理することは難しい。通常 1 人の実験者が 1 時間で 2 サンプル、その後の抽出工程を考慮すると、1 回の抽出操作に 4-6 サンプルを粉末化するのが限度である。さらに、抽出後の精製にフェノールやクロロホルムといった有機溶媒を用いる工程が含まれている。

そこで、著者らはフェノールやクロロホルムといった有機溶媒が不要な RNA 抽出キット (QIAGEN 社製) による抽出法に注目した。RNA 抽出キットを用いて抽出する場合も液体室素で粉砕する工程はあるが、はじめに必要なサンプル量が 100mg と少ないため、1 時間に 4-5 サンプルの粉末化が可能であり、通常 1 人の実験者が 1 連の抽出操作で 12 サンプルを処理することができる。

抽出された RNA の収量を比較してみると、グアニジウム法ではサンプル 1g から約 1mg の total RNA が得られるのに対し、抽出キット使用の場合はサンプル 100mg に対して約 50 μ g であり、逆転写反応 50 回分に相当する量が得られた。

3. 4. 3 DNase 処理

RNA 抽出キットのプロトコールによると DNase 処理は不要となっている。しかし、DNase 処理をしないと若干の DNA が混在することがあり、少量でも DNA が混在すると、RT-PCR の結果に信頼性がなくなる。そのため多少煩雑になるが、著者らは、DNase 処理および精製工程を加え、信頼度を高める方法を採用した。

以上の 4 工程の検討結果から、1) ゲノム DNA の検

定の抽出液には TE バッファーを用い、温度処理をしないこと、2) 抽出液を保存する場合は -80°C で凍結保存すること、3) 使用するプライマーは、増幅断片の長さが 200-400bp (長くても 500bp) に設計すること、4) 電気泳動装置は、先に述べたように NB-1017 型と NB-2010 型を使いわけること、5) RNase OFF の使用により、専用場所、器具が不要となり、6) RNA の取り扱い操作を簡略化できたこと、7) RNA 抽出キットを用いることにより、クロロホルム等の有機溶媒が不要で、12 サンプル/2 日/人区の抽出が達成できた。簡略化したプロトコールの詳細は図-6 に示す。

4. まとめおよび今後の展開

これまで DNA 抽出キットを用いていた場合は、約 100 本のサンプルを分析するのに、サンプルを採集し、液体室素で葉を粉砕し、カラムで抽出し、PCR 反応、電気泳動といった一連の行程で 1 週間を要していた。今回検討した簡易抽出手法では、サンプル採集、抽出、PCR 反応、電気泳動、選抜で、約 2 日間で評価が可能となり、労力も省力化され時間的にも大幅な短縮化がなされた。

また、この簡易抽出法を用いて、マーカー遺伝子を含む 8 個の遺伝子について PCR を試みたが、どの遺伝子についても、材料の状態や増幅産物のサイズ (長くても 500bp くらいまで) に注意すれば遺伝子の有無を検出することができた。これらの結果から、本簡易抽出法は他の実験系、例えば PCR を利用した多型検出法である RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 等への応用性が示唆された。

イネ以外にマーカー遺伝子を導入した *Tamali* sp. や *Chenopodium* sp. について同様の抽出法を試みたところ、PCR 反応でバンドが検出でき、本法の適用性が確認された。さらに、イネに導入した遺伝子を単離したものと植物であるシバやその他の植物へ適用を広げたり、他の用途への応用について今後さらに試していく必要はあるが、この簡易抽出法が利用できるものについては、DNA 抽出作業の省力化および検定時間の短縮化が図れると考えられる。

今後は次の選抜段階となる発現確認方法について、結果の信頼性を保持しつつ、さらなる効率化に向けて検討を進めていくつもりである。

謝辞

本報の一部は、バイオテクノロジー開発技術研究組

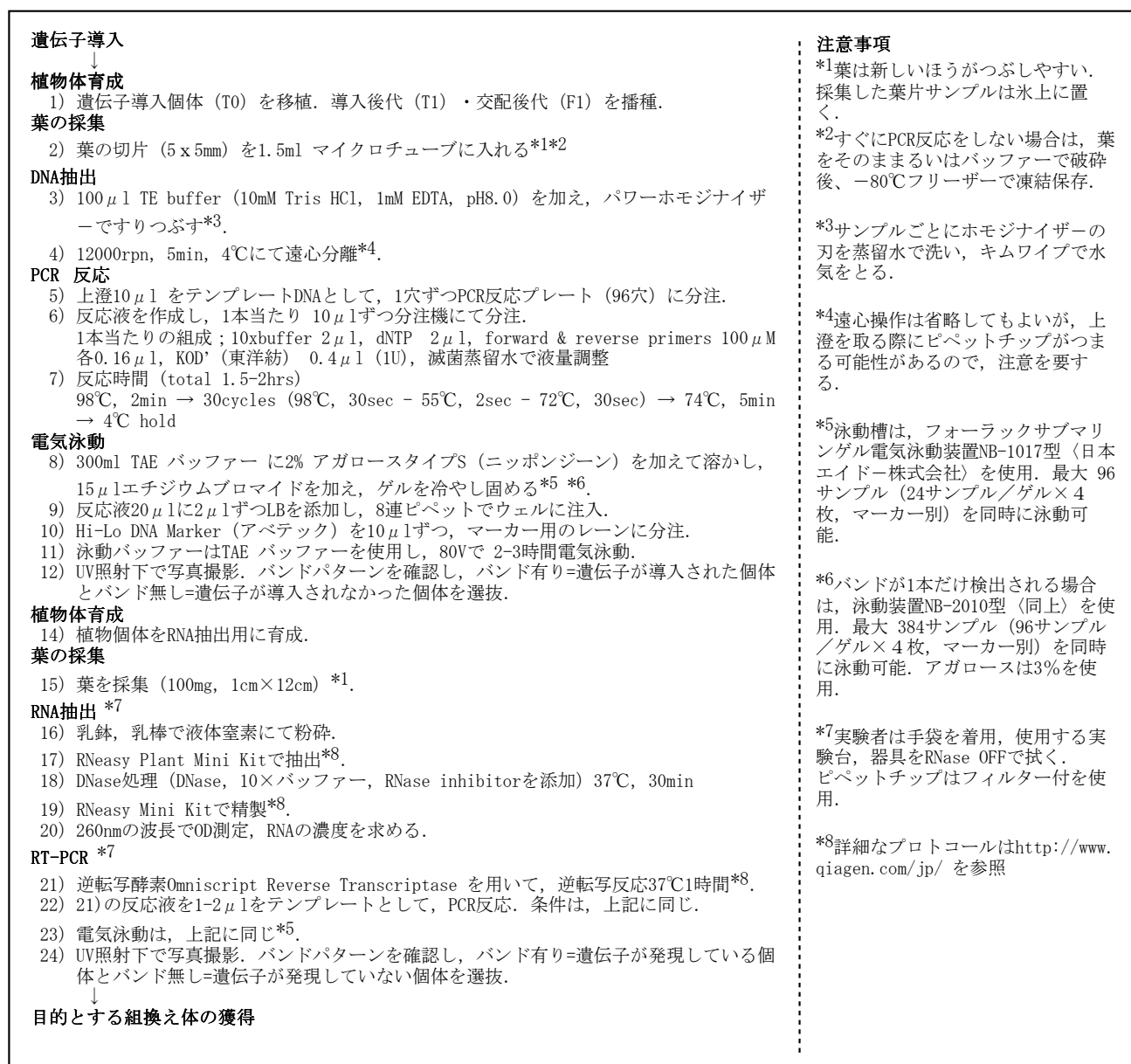


図-6 遺伝子組換え植物における遺伝子の確認のプロトコール

Protocol of for Detecting the Foreign DNAs and Their Expression in Transgenic Plants

合委託「植物細胞の砂漠地域適応化技術開発」プロジェクトおよび新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 委託の「植物利用エネルギー使用合理化工業原料生産技術開発」プロジェクトによって行ったものである。また、多数のサンプルを扱うための実験器具や手法は、農林水産先端技術産業振興センター (STAFF) 農林水産先端技術研究所 の第 11 回バイオテクノロジー研修会「ゲノム塩基配列の解析」を参考とした。

参考文献

- 1) 渡辺 格, 杉浦昌弘: クローニングとシーケンス, 農村文化社, pp. 252-256, 1989.
- 2) 島本 功, 佐々木卓治: 新版植物の PCR 実験プロトコール, 秀潤社, pp. 34-68, 1997.

- 3) 池田延行, 山田哲也, 上島脩志, 石井尊生: イネ Wild QTL 解析 6. イネにおけるマイクロサテライトマーカーを利用した効率的な marker-assisted selection のための超簡単 DNA 抽出法, 育種学研究, Vol.2, 別 2, p. 134, 2000.
- 4) Urasaki, N., Tarora, K., Uehara, T., Chinen, I., Terauchi, R. and Tokumoto, M.: Rapid and Highly Reliable Sex Diagnostic PCR Assay for Papaya (Carica papaya L.), Breeding Science, Vol.52, No. 4, pp. 333-335, 2002.