

平成24年度共同研究の概要（成果報告書抜粋）

研究種目： 一般研究

研究代表者： 寺地 徹（京都産業大学総合生命科学部・教授）

研究分担者： 山岸 博（京都産業大学総合生命科学部・教授）、辻村 真衣（京都産業大学総合生命科学部・特定研究員（TR））

研究題目（和文）：

葉緑体の形質転換技術を用いたストレス耐性コムギの作出

研究概要（和文）：

平成24年度に実施した研究を以下の3つにまとめる。

1. 葉緑体の遺伝子組換えに用いる植物材料の調製

パーティクルボンバードメント法により、葉緑体へ遺伝子を導入するためには、再分化能の高い外植片が必要である。パンコムギの場合、外植片として開花後2週間の未熟胚を用いる。本共同研究を通じ、1年を通じて未熟胚を調製可能な栽培システムを構築しようとした。具体的には、平成24年8月に、パンコムギの品種、アカダルマとBob Whiteを100粒ずつ播種した。貴センターのグロースチャンバーで栽培して頂き、11月に開花後約2週間の植物から未熟胚を単離した。アカダルマからは4,783個、Bob Whiteからは4,900個の未熟胚を単離し、2,4-D (2mg/L)を含むLS培地に置床して、25°Cで培養したところ、未熟胚の約80%がカルスを形成した。このカルス化率は、京都で栽培した植物材料を用いた場合と同程度であった。

2. 導入コンストラクトの準備

パンコムギの葉からRT-PCR法によりAPXの全長cDNAを得た。相同組換えに必要なコムギ葉緑体DNA断片をインサートとして持つ2種類のプラスミドそれぞれに、apx遺伝子および選抜のための抗生物質耐性遺伝子（aadAまたはnptII）を導入した。この計4種類のプラスミドコンストラクトを葉緑体形質転換用ベクターとして使用した。

3. 遺伝子導入実験

作成したベクターのDNAを、直径0.6μmの金粒子に付着させ、PDS1000-Heシステム（BioRad）を用いてカルスに撃ち込んだ。1プレートあたり約50個のカルスをまとめ、合計126プレートに対し遺伝子導入実験を行った。遺伝子導入後のカルスを、抗生物質を添加した培地に移植し、抗生物質の濃度を徐々に上げつつ個体への再分化を誘導した。現在までに16個の選抜カルスから全DNAを調製し、PCRにより導入遺伝子の増幅を行った。その結果、増幅産物を生じるカルスは認められたものの、葉緑体ゲノムに遺伝子が導入されている証拠は示せていない。さらに詳細な実験を継続中である。