

パーティクルガン法によるユリ属の形質転換 Genetic Transformation of *Lilium* by Particle Bombardment

田中正美
Masami TANAKA

要 約

この研究は形質転換のためのユリの安定した再分化組織培養法を確立することと、外来遺伝子を導入するためのパーティクルガン法の最適な条件を検討することを目的とした。

得られた結果は次の通りであった。

- 1) 5品種・系統で未熟なりん片から子球が誘導され、子球形成には2mg / 1 BAと0.2mg / 1 NAAを添加した1/2のMS培地が効果的であった。
- 2) pBI221に組み込んだGUS遺伝子を金粒子に塗布してりん片に導入処理し、GUSの発色によって一時的な遺伝子導入の効率を評価した。GUSの発現は処理3日後に調査して導入を確認した。

導入の条件はストップングスクリーンと組織片の距離を4 cmとし、ラプチャーディスクは1350 psiがよかった。

- 3) GUSの発色は一次子球で発現し、キメラのりん片からの子球でも発現が確認できた。また、導入されたGUS遺伝子をPCR法で確認した。

キーワード：ユリ、りん片、パーティクルガン法、GUS遺伝子

I 緒 言

ユリ属 (*Lilium*) は切り花の主要品目の一つとして品種改良が世界的に進み、高い需要に支えられた生産が行われている。3,000種を越える多様な品種が品種間または亜属間で育成されていて、今も嗜好の変化に沿った改良が行われている。しかし、交雑等、従来の育種法では取り込むことが困難な形質や形態への要望も高く、新たな育種手法が模索されていて、種内に存在しない遺伝形質を取り込むことが可能な遺伝子導入技術が注目されている。しかし、ユリ類の形質転換に関する報告はいくつか見られる¹⁾が、再生植物で導入遺伝子が確認された例はない。

そこで、ユリの形質転換系を確立することを目標に、りん片を用いた遺伝子導入に利用できる再分化系の検討と、その培養系を利用したボンバード法による外来遺伝子の導入条件について検討した。

ここでは、九州・四国を中心に暖流の流れる沿岸沿いに自生するカノユリ (*Lilium speciosum*)、東北から近畿の山林に自生するヤマユリ (*L. auratum*)、対馬に自生するオウゴンオニユリ (*L. lancifolium* var. *flaviflorum*)及びオリエンタル系の交配種‘カサブランカ’にGUS遺伝子をパーティクルガン(パイオラッド社)で導入し、その発現を観察して遺伝子導入による形質転換系

を確立することを目的とした^{2) 3) 4)}。

II 材料及び方法

1) 培養系及び選抜条件の検討

培養系におけるりん片からの不定芽(子球)の発生条件を知るため、供試材料として無菌的に継代しているカノユリ白系-1、同白系-2、同ピンク系-1、同ピンク系-2及び‘カサブランカ’とヤマユリ、オウゴンオニユリのりん片を用いた。

りん片からの子球発生には第1表に示すように、培地組成はMS培地を1/2に調整した培地、硝酸アンモニウム(NH₄NO₃)濃度を1/2または1/4としたMS培地、ハイポネックス(N:6.5、P:6、K:19)を1または2g/lとする培地について検討した。ホルモンバランスについては2mg/lのBA濃度を基本にNAAやIAA、カイネチンとの組み合わせについて、また、4PU及び2,4-Dの効果についても検討した。

各培地はpHを5.8に調整し、内径10mm、高さ7cmの平底ガラス管(スナップ管)に5ml当て分注してオートクレーブで滅菌した。

培養開始から30日間は暗黒条件で不定芽の発生を促進し、その後の子球の生育には弱光(400 lux~1000 lux)条件で管理して子球やカルス等の発生を調査した。

第1表 りん片からの再分化に用いた培地

記号	基本培地	ビタミン	ショ糖 (g/l)	ホルモン (mg/l)						添加物	支持体
				NAA	IAA	カイネチン	BA	4PU	2,4-D		
a	1/2MS	MS	40	0.2	-	-	2.0	-	-	G	
b	1/2MS	MS	40	0.1	-	-	2.0	-	-	G	
c	1/2MS	MS	40	-	-	-	2.0	-	-	G	
d	1/2MS	MS	40	-	0.2	-	2.0	-	-	G	
e	1/2MS	MS	40	-	-	0.2	2.0	-	-	G	
f	1/2MS	MS	40	-	-	-	-	0.2	-	G	
g	1/2MS	MS	40	-	-	-	-	0.5	-	G	
h	1/2MS	MS	40	-	-	-	-	-	0.5	G	
i	1/2MS	MS	40	-	-	-	-	-	1.0	G	
j	1/2MS	MS	40	0.2	-	-	2.0	-	-	P G	
k	1/2NO ₃ MS	MS	40	0.2	-	-	2.0	-	-	G	
l	1/4NO ₃ MS	MS	40	0.2	-	-	2.0	-	-	G	
m	H(2g)	Ni(10ml)	40	0.2	-	-	2.0	-	-	G	
n	H(1g)	Ni(10ml)	40	0.2	-	-	2.0	-	-	G	

注 MS:ムラシゲスケウグ, H:ハイボネックス, Ni:ニッチ, G:ゲルライト0.2%, P:L-プロリン, pH5.6

2) ハイグロマイシン濃度の検討

供試材料として無菌的に継代しているカノコユリ白系-1、同ピンク系-1、オウゴンオニユリ、ヤマユリ及び‘カサブランカ’のりん片を用いた。

ハイグロマイシンによる選択を想定して、選択培地に添加するハイグロマイシン濃度を0、20、30、50mg/lとして生育状況(枯死)を調査することで検討した。

培地はpH調整後に、ゲルライトを加えてオートクレーブ滅菌し、クリンベンチ内で抗生物質を加えて所定の濃度とした。各濃度の培地は9cmガラスシャーレに20mlずつ分注して供した。

1系統60または80個のりん片を用意し、シャーレには必ず全系統が入るように、各濃度2枚で1系統10または20個を置床した。

3) パーティクルガンによる導入条件の検討

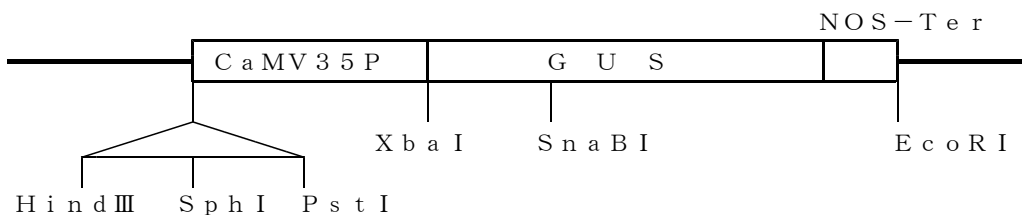
供試材料として無菌的に継代しているカノコユリピンク系-1、‘カサブランカ’及びオウゴンオニユリのりん片を用いた。

遺伝子導入に用いた外植片はMS培地にBA 2mg/l、

NAA 0.2mg/l、ショ糖40g/lを添加した培地で無菌的にりん片を培養して発生した子球のりん片を用いた。pBI221をベクターとした35S-GUS(第1図)を導入遺伝子として用い、パイオラッド社のPDS-1000/Heを使用した。導入条件は金粒子径を1.6μm、真空度を20Hgに固定し、ラブチャーディスクを1100psiと1350psi、試料距離を4cm、7.5cm、10cmに設定して実施した。

GUS遺伝子の組織化学的な発現調査は、20%メタノールを含む1mM X-Gluc溶液で、30℃にインキュベートして16時間以上浸漬して発色を調べる方法によって行った。この際、発生した子球のりん片は無菌状態で上下に2分割して下部を染色処理し、残りの上辺は再培養して2次子球の形成を進めた。

導入したGUS遺伝子の存在はPCR法によっても確認した。供試したプライマーは5'-ctgaactggcagactattcc-3'と5'-caatactccacatcaccac-3'を用い、反応条件としてBoiling 5min; 94℃ 30sec, 60℃ 30sec, 72℃ 30sec (35サイクル); 72℃ 5minで820bp長を増幅した。



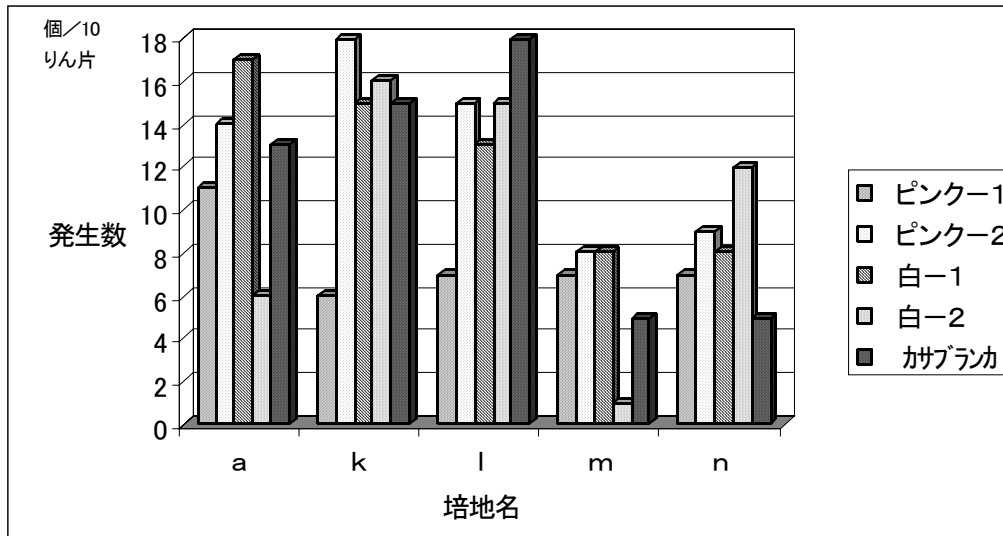
第1図 pBI221ベクターと制限酵素サイト

III 結果及び考察

1) 培養系及び選抜条件の検討

子球の発生は培地組成や添加ホルモンで品種や系統間に差がみられ、培地組成は高山(1987)が述べているように硝酸態窒素の抑制が効果的であった⁵⁾。何れの系統も子球発生後40~45日を経た2~5mmのりん片を用いたが、1りん片当たり0~3個の子球が発生した。供試した系統のうちカノユリのピンク系-1、同白系-1、オウゴンオニユリはMS培地の多量要素を1/2にした培

地、同ピンク系-2、同白系-2、‘カサブランカ’系及びヤマユリは窒素成分のうち硝酸アンモニウムだけを1/2または1/4にした培地で子球の発生は多かった。特に、カノユリ白系-2は硝酸アンモニウムだけを減じた培地で子球発生は顕著であった。また、ハイポネックスを用いた簡易培地はMS培地に劣ったが、その内では1g/lと低濃度の培地で子球発生が多くなった(第2図、第3表)。

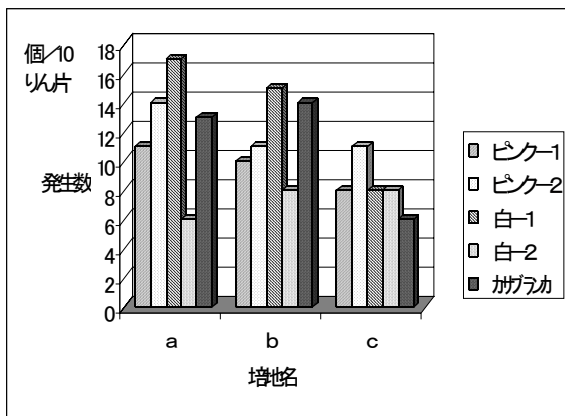


第2図 子球形成に対する培地組成の影響

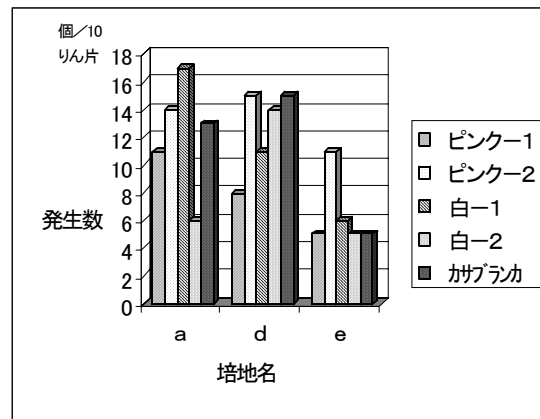
ホルモンの種類や濃度・組み合わせによって子球の発生は異なり、供試した系統のうちカノユリのピンク系-1、同ピンク系-2、同白系-1、オウゴンオニユリ、ヤマユリはBA 2mg/lにNAAを0.2mg/lを添加した培地が多く、カノユリ白系-2および‘カサブランカ’はBA 2mg/lにNAAを0.1mg/lを添加した培地が多か

った(第3図)。また、BA 2mg/lにIAAを0.2mg/l添加した培地では、NAAを0.1~0.2mg/lを添加した培地よりカノユリ白系-2および‘カサブランカ’で子球の発生は多くなった(第4図)。

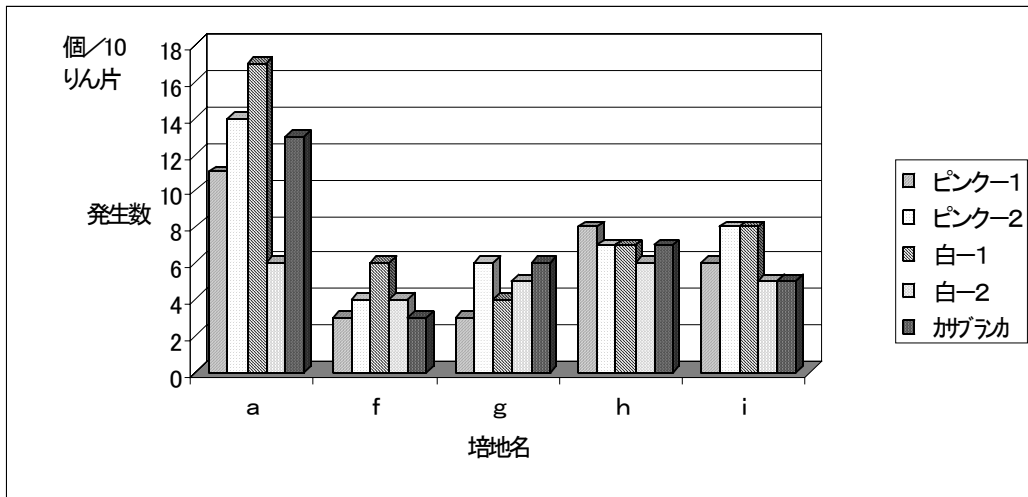
ホルモンとして4PUや2,4-Dを添加した培地では子球の発生は劣り、4PUでは特に劣った(第5図)。



第3図 子球形成に対するNAA添加の効果



第4図 子球形成に対するサイトカイニンの影響



第5図 子球形成に対するホルモンの効果

カルス化はスカシユリのピンク系ではMS培地の多量要素を1/2にし、ホルモンとしてBA 2mg/lにNAAを0~0.2mg/lを添加した培地がよく、同白系や‘カサブランカ’、オウゴンオニユリ、ヤマユリでは4PUを添加した培地がよかった(第2表、第3表)。しかし、カルスを経由した子球の発生は極めて少なかった。

添加物として付加したL-プロリンの効果は認められな

かった(第2表)。

以上、りん片は培養の過程で写真1に示すようにいくつかの形態がみられるが、供試したユリ類は硝酸態窒素成分を減じたMS培地に、ホルモン濃度の組み合わせをBA 2mg/l、NAA 0.2mg/lとした培地で不定芽を経由して子球を形成し、繁殖が可能であった。

第2表 培地組成およびホルモンバランスがユリりん片からの子球形成等に及ぼす影響(70日目)

記号	基本培地	カノコユリ									
		ピンク系-1		ピンク系-2		白系-1		白系-2		カサブランカ	
		球数	形態	球数	形態	球数	形態	球数	形態	球数	形態
a	1/2MS	11(58)	C r	14(77)	C	17(124)	白化	6(22)	r	13(74)	r(小)
b	1/2MS	10(55)	C r	11(68)	C	15(85)	白化	8(44)	白r	14(75)	r(小)
c	1/2MS	8(23)	C	11(41)	C	8(42)	C	8(32)	白	6(36)	-
d	1/2MS	8(37)	C R	15(91)	r	11(69)	R	14(37)	C r	15(110)	R
e	1/2MS	5(23)	r	11(50)	-	6(25)	C r	5(14)	-	5(50)	r
f	1/2MS	3(10)	r	4(13)	r	6(18)	C r	4(9)	C	3(35)	C r
g	1/2MS	3(6)	r	6(28)	r	4(19)	r	4(8)	C r	6(66)	C r
h	1/2MS	8(23)	R	7(44)	R	7(38)	C R(多)	6(36)	R	7(61)	R
i	1/2MS	6(9)	C R	8(59)	R(多)	8(4)	C R	5(16)	r	5(63)	R
j	1/2MS	8(17)	C R	14(102)	r	11(97)	r	7(32)	C r	11(102)	r
k	1/2NO ₃ MS	6(29)	R(多)	18(132)	R(多)	15(105)	R(多)	16(97)	R	15(125)	R
l	1/4NO ₃ MS	7(35)	C R(多)	15(112)	R	13(72)	R(多)	15(77)	R	18(112)	R
m	H(2g)	7(20)	r	8(59)	R	8(30)	R	10(26)	R	5(47)	R
n	H(1g)	7(32)	r	9(77)	r	8(26)	R	12(52)	R	5(33)	R

注：数字--子球形成りん片数 (数字)--子球形成数、C--カルス化、R--発根、r--細い根、白(化)--脱色、※ 20りん片当たり、3反復の平均

第3表 培地組成およびホルモンバランスがユリりん片からの子球形成等に及ぼす影響（68日目）

系 統 名	培 地 名					
	a	b	f	g	k	l
オウゴンオニユリ	11(41) r	14(47) r	4(16) C r	3(12) C r	9(36) R	10(37) R
ヤマユリ	13(43) r	11(38) r	3(13) C r	3(12) C r	15(48) R	16(54) R

注：数字--子球形成りん片数（数字）--子球形成数、C--カルス化、R--発根、r--細い根、白（化）--脱色、※ 20りん片当たり、3反復の平均

2) ハイグロマイシン濃度の検討

品種や系統に差があり、写真2に示すようにオウゴンオニユリでは30mg/lのハイグロマイシン濃度でも全て枯死した。他の供試品種は30mg/lの濃度では一部のりん片

が生存し、50mg/lの濃度で全てが枯死した（第4表）。以上から、ユリ類のハイグロマイシンによる選抜濃度は50mg/lが必要と考えられた。

第4表 ハイグロマイシン含有培地での枯死率（%）

系 統 名	ハイグロマイシン濃度 (mg/l)			
	0	20	30	50
カノユリw-1	0/20(0)	0/20(0)	6/20(30)	20/20(100)
カノユリp-1	0/20(0)	0/20(0)	2/20(10)	40/40(100)
オウゴンオニユリ	0/10(0)	0/10(0)	20/20(100)	20/20(100)
ヤマユリ	0/10(0)	0/10(0)	1/20(0)	20/20(100)
カサブランカ	0/20(0)	0/20(0)	4/20(20)	20/20(100)

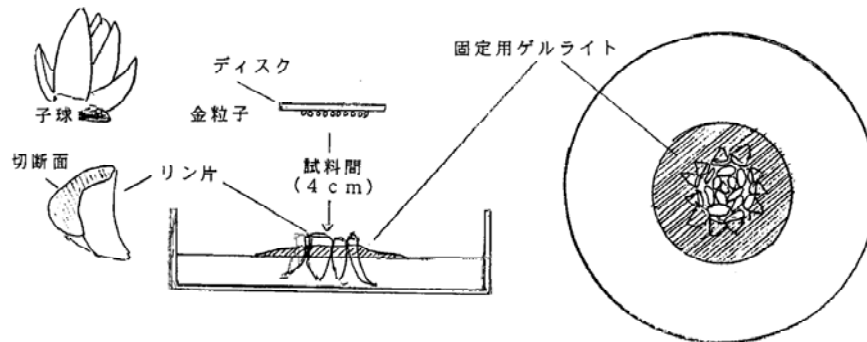
注：枯死数/供試数（枯死率：%）

3) パーティクルガンによる導入条件の検討

りん片の外表面や内表面への発射ではトランゼントなGUS発現はみられず、発射距離を4cmと短くしても効果はなかったが、りん片断面の一部でGUS活性が観察された。そこで、効率的に照射できるように断面を上にして処理した。しかし、ガス圧によってりん片が飛散するため、十分な効果が得られなかった。

ところで、植物は切り離したり傷つけたりすると切り口で分裂活性が高まり、カルスや不定芽等が発生しやす

いことが知られている。ユリでもカルスや子球の発生はりん片の断面や傷口に認められ、しかも、写真3に示すように子球は下辺断面の内側に発生することが多い。また、子球の発生は第3層付近の細胞分裂によって始まるとされている。このことから、パーティクルガンによる照射処理は子球の形成されやすいりん片下辺の断面が修復されず第3層も露出している数時間の処理が有効と考えられた。



第6図 発射用培地へのりん片のセット

りん片を飛散させず、金粒子がりん片下辺断面の内側に処理できるように工夫した。径7cmのガラスシャーレに0.2%濃度のゲルライトを3~4ml分注して滅菌処理し、3~5mmの厚さのりん片固定用プレートを用意する。これに、写真3に示すように下辺断面を上にし、りん片の内側が外向きになるよう放射状に挿してセットする。さらに、滅菌して60℃に調整した0.2%ゲルライトを滅菌パスツールピペットでりん片間に注いで固定することでパーティクルガン処理が安定的に可能になった(第6図)。

この方法で条件を検討し結果、ヘリウムガス圧が1100psiではいずれの距離でもGUSのトランゼントな発現は見られなかった。それに対し1350psiでは4cmの距離

でGUSの発現が見られた(第5表、写真4)。

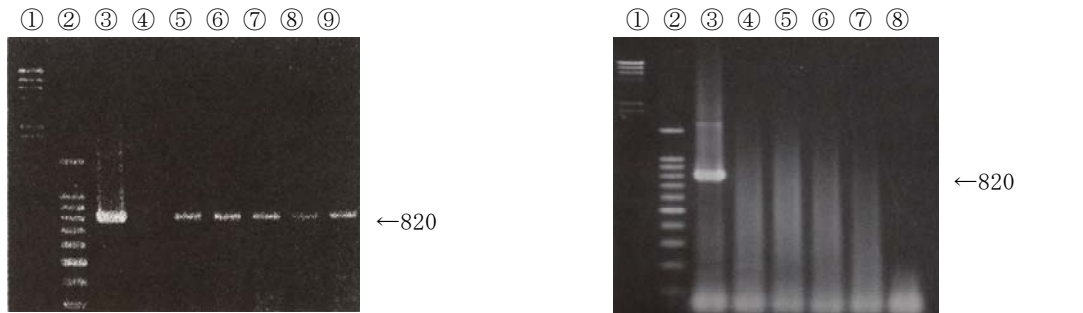
また、新たに発生した子球のりん片師脈(写真5)や根端(写真6)にGUS活性が確認され、キメラに発現する個体も観察された。キメラりん片では発色処理に利用しなかった残りのりん片で、発色した部位に相当する位置に発生した2次子球でもGUS活性が認められたが、発色しない部位の2次子球は活性がなかった(写真7)。

PCR法で導入遺伝子の確認を行った結果、GUS活性が確認された子球では特異バンドが検出された。また、キメラな子球のりん片でもGUS活性が確認された2次子球からは特異バンドが認められたが、発色しない部位の2次子球では検出されなかった(第7図)。

第5表 処理条件の違いによるGUS活性への影響

ディスク強度	発射距離	供 試 品 種		
		カノコユリP-1	カサブランカ	オウゴンオニユリ
1 1 0 0	4.0	- (-) 0/12/20	- (-) 0/20/16	- (-) 0/16/22
	7.5	- (-) 0/15/20	- (-) 0/15/17	- (-) 0/21/20
	10.7	- (-) 0/22/20	- (-) 0/18/15	- (-) 0/20/21
1 3 5 0	4.0	+ (+) 3/12/21	++ (+) 5/18/16	+ (+) 2/ 8/24
	7.5	- (-) 0/16/22	+ (-) 2/18/15	- (-) 0/10/20
	10.7	- (-) 0/15/20	- (-) 0/16/18	- (-) 0/16/21

注：()内は1ヶ月後に発生した子球での活性、 GUS活性子球数/発生子球数/供試りん片数



①:λ Hind III ②:100 Ladder
 ③:ポジ ④:ネガ(カサブランカ)
 ⑤~⑨:形質転換体 ⑤:オニユリ
 ⑥,⑦:カノコユリ ⑧,⑨:カサブランカ
 ⑤,⑥,⑧:1次子球 ⑦,⑨:2次子球

②:λ Hind III ③:100 Ladder
 ③:ポジ ④:ネガ(カノコユリ) ⑤:ネガ(カサブランカ)
 ⑥:キメラ(オニユリ) ⑦:キメラ(カサブランカ)
 ⑧:コントロール

第7図 PCRによるGUS遺伝子の確認(左:子球 右:2次子球-キメラ個体、GUS未発現)

IV 摘要

1) 子球の形成には品種や系統間に差が認められ、MS培地の多量要素を1/2にしたり、窒素成分だけを1/2または1/4にし、ホルモン濃度の組み合わせをBA 2mg/l、NAA 0.2mg/lとした培地で不定芽を経由して子球を形

成し、繁殖が可能であった。

カルス化はスカシユリのピンク系ではMS培地の多量要素を1/2にし、ホルモンとしてBA 2mg/lにNAAを0~0.2mg/lを添加した培地、一方、同白系や‘カサブラン

カ' では4 P Uを添加した培地がよかった。

2) ハイグロマイシン耐性には品種や系統に差があり、オウゴンオニユリでは30mg/lのハイグロマイシン濃度でも全て枯死したが、他の供試系統は50mg/lが必要と考えられた。

3) ユリの形質転換体を得るには遺伝子を子球の発生する組織に発射する必要があり、それにはりん片下辺内側が最も有効であった。また、子球の発生する層が表皮内側の3層と深いことからガス圧は1350psi と高く、発射距離も4cmと短かくして強い処理が必要であった。

4) りん片を飛散させず、金粒子をりん片下辺断面の内側に処理するには、0.2%濃度のゲルライトを径7cmのガラスシャーレに分注して3~5mmの厚さのりん片固定用プレートを用意し、これに、下辺断面を上にし、りん片の内側が外向きになるよう放射状に挿してセットする。さらに、滅菌して60℃に調整した0.2%ゲルライトを滅菌パスツールピペットでりん片間に注いで固定することが重要であった。

5) この方法でりん片下辺の断面にG U Sの発現が見られ、発射処理したりん片から新たに発生した子球のりん片でもG U S活性が確認された。また、キメラに発生する子球も観察され、発色した部位から発生した2次子球でもG U S活性が認められたが、発色しない部位の2次子球は発色活性がなかった。

6) P C R法で導入遺伝子の確認を行い、G U S活性が確認された子球では特異バンドが検出された。

また、キメラな子球のりん片でもG U S活性が確認された2次子球からは特異バンドが認められたが、発色しない部位の2次子球では検出されなかった。

7) 以上から、無菌培養したりん片の下辺断面に4cmの距離から1350psi と高いガス圧で遺伝子を発射することで形質転換体を得られることが確認でき、有用形質遺伝子の導入がパーティクルガン法で可能となった。

謝辞 本研究は「有用遺伝子導入による地域振興作物の新品種育成と育種利用技術の確立：平成7~12年度」の課題で取組んできたうちのユリに関する試験を取りまとめたものである。カノユリ等の材料を提供いただいた天草農業改良普及センターの関係各位に感謝します。

V 引用文献

- 1) 愛媛県農業試験場作物育種室、作物育種試験成績概要 1999~2003 ユリ花粉への遺伝子導入
- 2) 阿部定夫、田村輝夫：1955 カノユリの自然変異に関する研究 「輸出球根に関する研究」
文部省化学試験研究報告 No.26 95-144
- 3) 清水基夫：昭和46年 日本のユリ 誠文堂新光社
- 4) 週刊朝日百科：1996 植物の世界 109 ユリ・チューリップ 朝日新聞社
- 5) 高山眞策：1987 ユリ科植物 植物組織培養アトラス 122-138 R&Dプランニング

Genetic Transformation of *Lilium* by Particle Bombardment

TANAKA, M (Kumamoto Prefectural Agr. Res. Center)

Summary

The purpose of this study is to establish a stable regenerable tissue culture method of *Lilium*, and to investigate the optimal conditions of particle bombardment for foreign gene delivery to tissue of *Lilium*. The results obtained are as follows :

- 1) Bulblets were induced from immature scale of 5 cultivars. For the bulblet formation, 1/2 MS medium supplemented with over 2mg/l BA plus 0.2mg/l NAA were effective.
- 2) To evaluate the efficiency of gene transfer by transient GUS expression, scales were bombarded with gold microprojectiles coated with GUS reporter gene constructs pBI221. The GUS expression were occurred when the culture was initiated 3 days before the bombardment, adjusting the distance between stopping screen and the target tissue to 4 cm, and 1350 psi rupture disk.
- 3) The GUS expression was occurred on the first bulblets, and on the second bulblets for regenerate chimera scales. This insert GUS gene were check up on transgenic bulblets by PCR analysis.

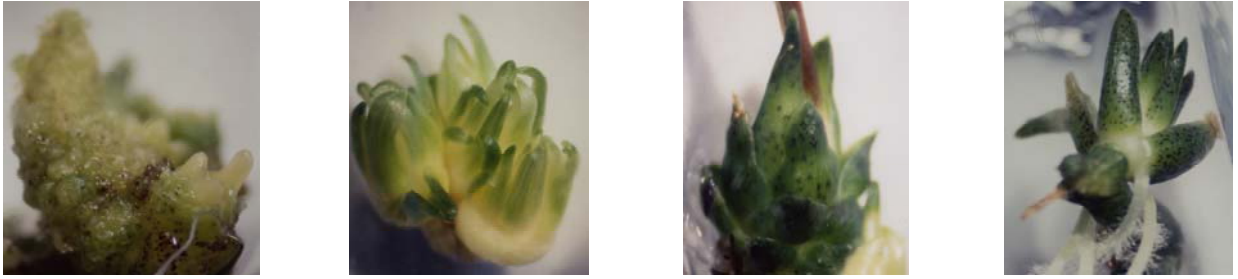


写真1 ユリりん片培養の諸形態 (左から：カルス化、叢生化、子球形成、発根)

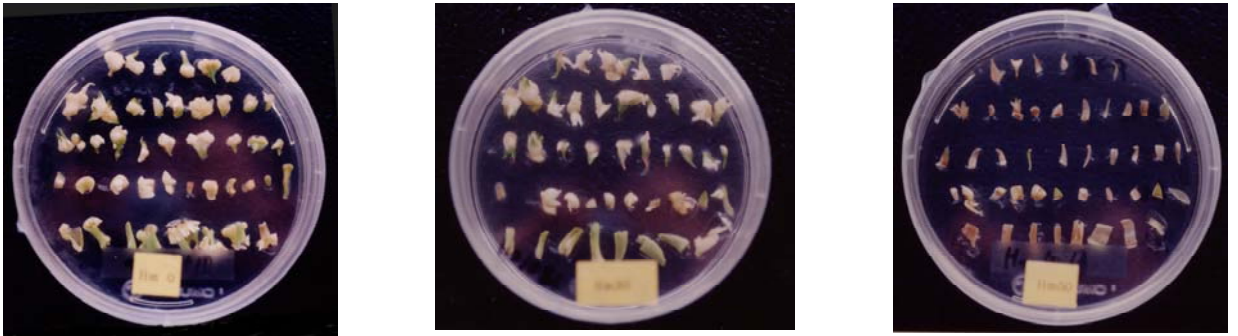


写真2 ハイグロマイシン含有培地での生育状況 (左から：0 mg/l、30 mg/l、50 mg/l)
(図中1列目から：カノユリw-1, 同p-1, オウゴンオニユリ, ヤマユリ, ‘カサブランカ’)

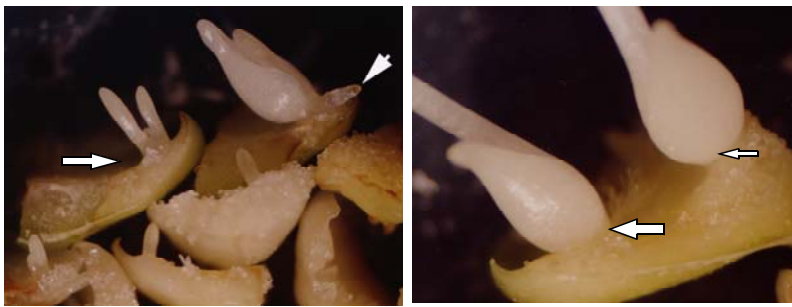


写真3 りん片のセットと子球の発生

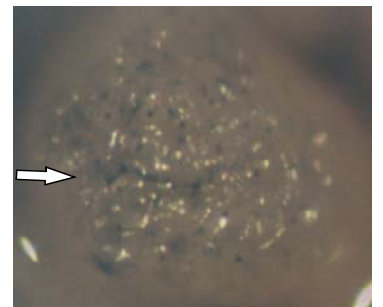


写真4 りん片でのGUS活性

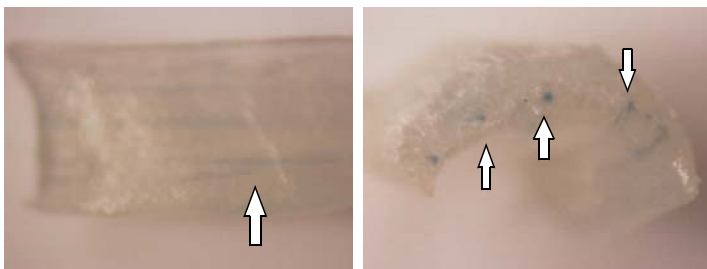


写真5 一次子球のりん片でのGUS活性



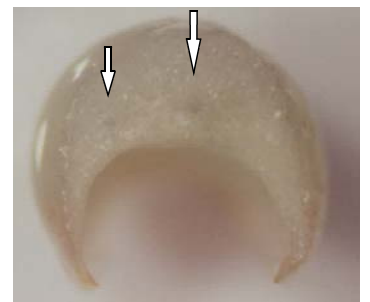
写真6 一次子球の根端でのGUS活性



(子球でのGUSのキメラ発現)



(キメラ付近からの2次子球の発生)



(2次子球のGUS活性)

写真7 子球でのGUSのキメラ発現と2次子球のGUS活性