

いちご遺伝子の機能解析法の確立

1. 試験のねらい

DNA マイクロアレイによって選抜したイチゴ炭疽病応答性遺伝子は、炭疽病菌 (*Glomerella cingulate* OTT512 菌株) を接種した時に特異的に発現が変動する遺伝子であり、その中には耐病性に関与する遺伝子が含まれていると考えられる。そこで、炭疽病応答性遺伝子の機能を解析するため、いちご野生種における遺伝子導入技術を開発し、いちご遺伝子の機能解析法を確立する。また、炭疽病応答性遺伝子をいちご野生種に導入し、炭疽病耐病性との関連を検討する。

2. 試験方法

(1) GUS 遺伝子を用いたいちご野生種の遺伝子導入技術の開発

アグロバクテリウム法によって、GUS (β -グルクロニダーゼ：試薬を加えると組織が青く染まる) 遺伝子をいちご野生種に導入し、その条件を検討した。

(2) いちご野生種への炭疽病応答性遺伝子の導入と導入遺伝子の確認

9 種類の炭疽病応答性遺伝子全長配列を供試し、いちご野生種への遺伝子導入技術を用いて、遺伝子導入個体を作成した。作成した個体は、PCR による導入遺伝子の確認と、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現量の確認を行った。

(3) 炭疽病応答性遺伝子導入いちご野生種系統の炭疽病耐病性検定

炭疽病応答性遺伝子の発現を確認した個体は、無菌培養で 5 個体以上に増殖し、系統とした。いちご野生種は炭疽病感受性であり、導入した遺伝子が耐病性遺伝子であれば、耐病性が向上するため、各遺伝子導入系統を水耕栽培で順化し、炭疽病菌を接種して耐病性検定を行った。

3. 試験結果および考察

(1) いちご野生種に表-1 の条件で GUS 遺伝子の導入を試みた結果、15 個体で GUS 遺伝子が導入され (形質転換効率 6.25%)、そのうち 9 個体が青く染まり、GUS 遺伝子の発現が確認できた。いちご野生種への遺伝子導入技術が確立できた (図-1、2)。

(2) 供試した 9 種類の炭疽病応答性遺伝子のうち、6 種類でいちご野生種形質転換体が得られ、PCR 増幅によって全ての個体で目的遺伝子の導入が確認された。また、遺伝子 1~3 の 3 種類の遺伝子では、リアルタイム RT-PCR の結果、導入遺伝子が強く発現している個体が確認された (表-2)。

(3) 5 種類の炭疽病応答性遺伝子がそれぞれ導入されたいちご野生種 (表-2) について、各系統 5~16 個体を供試して炭疽病耐病性検定を行った結果、耐病性が向上した系統は認められなかった。

(4) 以上のことから、いちご野生種を用いた栽培種いちご遺伝子の機能解析法が確立できた。しかし、炭疽病耐病性に関連する遺伝子は見出せなかった。

4. 成果の要約

いちご野生種を用いた遺伝子導入技術を開発し、いちご遺伝子の機能解析法を確立した。

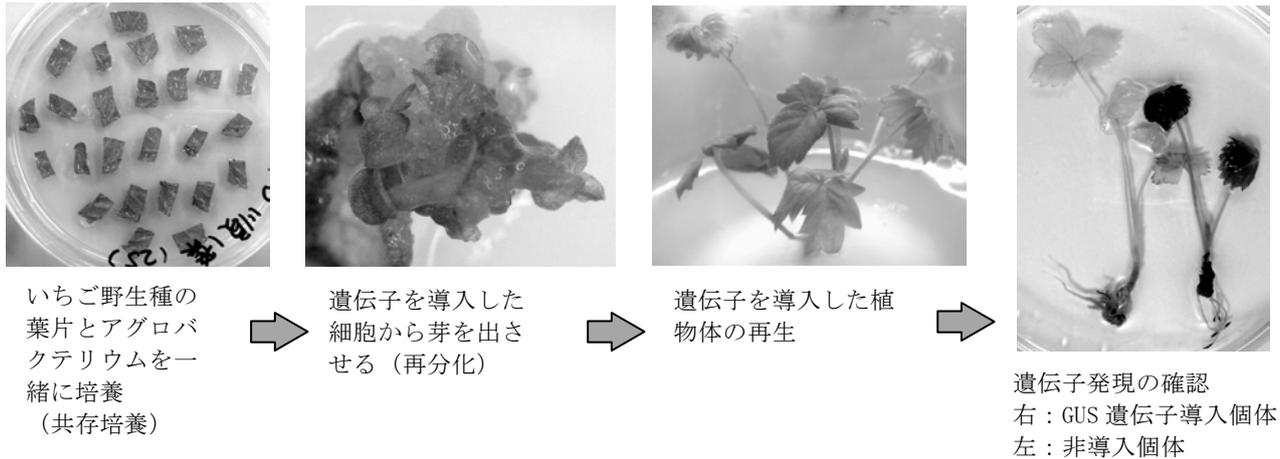
(担当者 生物工学部 応用生物研究室 鈴木恵美子、高野純一*、石川美幸**、世取山守、生井潔)

*現 塩谷南那須農業振興事務所、**元職員

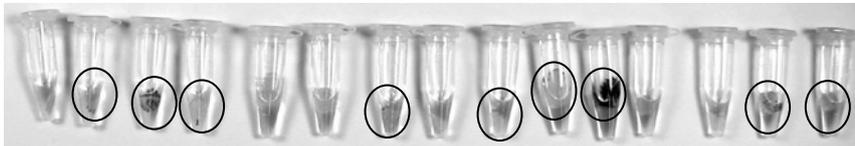
表－1 各培養段階における培地と添加する抗生物質濃度

培養	植物ホルモン(mg/L)			カルベニシリン 濃度(mg/L)	カナマイシン 濃度(mg/L)	培養期間 (日)
	BA	IBA	KIN			
除菌	2	0.25	0	500	0	7
選抜1	2	0.25	0	200	10	14
選抜2	2	0.25	0	200	15	14
選抜3	2	0.25	0	200	20	14
選抜4	2	0.25	0	200	25	30
継代	2	0.25	0	200	15	
増殖	0.125	0	0.25	200	15	
発根	0	0	0	200	15	

MSを基本培地とする。BAはベンジルアデニン、IBAはインドール酪酸、KINはカイネチン。



図－1 いちご野生種を用いた遺伝子導入技術の概要



図－2 GUS 遺伝子導入個体の小葉を用いた染色結果（○は青く染まった小葉）

表－2 炭疽病応答性遺伝子導入いちご野生種個体の作成状況

遺伝子番号	クローン名	推定される遺伝子名	取得個体数 ^a /供試葉片数	効率 ^b (%)	導入遺伝子の確認 ^c	発現量 ^d (倍)	耐病性検定 供試系統数
1	Stg005C01	<i>Chitinase</i>	32/644	4.97	32/32	0.26~61.9	15
2	Stg021F11	<i>Thaumatin-like protein</i>	9/948	0.95	9/9	2524~9226	3
3	Stg037D09	不明	2/1239	0.16	2/2	∞	1
4	Suk018D02	<i>MYB</i>	5/1255	0.40	5/5	0.91~2.07	4
5	Stg006C11	不明	0/1225	0.00	—	—	—
6	Stg023A10	<i>Methionine synthase</i>	1/1227	0.08	1/1	0.22	—
7	Stg034D01	<i>Allergenic isoflavone reductase-like protein Bet v 6.0102</i>	1/1280	0.08	1/1	1.88	1
8	Stg044F06	<i>Zinc finger protein</i>	0/1227	0.00	—	—	—
9	Suk004G02	<i>Homeobox protein</i>	0/1241	0.00	—	—	—

a：取得個体数とは、アグロバクテリウム法による再生個体数を示した。

b：形質転換効率(=取得個体数/供試葉片数)を示した。

c：PCRによる導入遺伝子の導入確認個体数/供試個体数を示した。

d：リアルタイムRT-PCRによって導入遺伝子の発現量を計測した。数値は、非形質転換体の内在性遺伝子の発現量に対する形質転換体の相対発現量を示した。Stg037D09の発現量は、非形質転換体の発現が認められなかったため、∞と表示した。