

イネに導入したコムギ Glu-1Dx5 遺伝子の  
後代への遺伝について

2009. 02. 17

宇都宮大学 農学部 生物生産科学科

植物生産学コース 作物栽培学研究室

053195C 藤田千咲

## 目次

I 要旨	2
II 緒言	3
III 材料と方法	4
IV 結果と考察	7
V 謝辞	12
VI 引用文献	13
Summary	15

## I 要旨

コムギ Glu-1Dx5 遺伝子を導入した Fatmawati を用い、導入遺伝子が確実に後代へ遺伝するかどうかを調査した。Glu-1Dx5 遺伝子を導入した Fatmawati を自家受粉させて後代を得、葉から抽出した DNA を PCR 法で増幅させたものを電気泳動させ、導入遺伝子の有無を確認した。Glu-1Dx5 遺伝子を導入した個体を T0 とし、その後代を T1 とし、102 個体を調査した結果、30 個体で Glu-1Dx5 遺伝子を確認した。同じように、T2 を 200 個体調査した結果、96 個体で Glu-1Dx5 遺伝子を確認した。

## II 緒言

イネやコムギは、世界の三大穀物であり、人類がエネルギーを得るために非常に重要な作物である。これらの穀物は、世界中で栽培されており、年間生産量はそれぞれ6億 t 近くに及ぶ。熱帯地域であるインドネシアでは、高温湿潤な気候上、コムギの栽培が困難である。そのため、国内のコムギの需要をまかなうためには、諸外国からの輸入に頼らざるを得ないが、コムギの価格は高騰している。一方、イネの栽培は盛んであり、インドネシアの米の生産量は54,400,000t（農林水産省 2006）と世界第3位である。イネは、他の穀物に比べて単位面積当たりの人口扶養力が大きいという特徴をもっている。水田は治水防止機能などもあり、多面的機能を維持しているという利点もある。そこで、東南アジアで栽培されているインディカ米のFatmawatiに、コムギのGlu-1Dx5遺伝子を導入し、製パン性を持つイネを作出し栽培することで、イネを生産しながらコムギの需要をまかなえることが可能になると予想される。2007年に、Nono Carsonoによりイネの培養系確立と遺伝子銃によるコムギのGlu-1Dx5遺伝子の導入が行われた（Nono 2007）。Wadaら（2009）が、Glu-1Dx5遺伝子が導入されたT0個体をPCR法で調査したところ、15個体からGlu-1Dx5遺伝子が検出された。また、Glu-1Dx5遺伝子を持つT2個体の胚乳抽出物をSDS電気泳動法で調査したところ、コムギGlu-1Dx5遺伝子産物と同一分子量のタンパク質が検出され、導入遺伝子のイネ胚乳中で発現が確認された。このように作成された遺伝子導入イネは、米の製パン特性改良の育種計画に応用が期待される。

遺伝子導入した作物を品種として確立するためには、導入した遺伝子が後代へ安定して遺伝することが不可欠である(Choi ら 2003)。本実験では、Glu-1Dx5 遺伝子を導入した Fatimawati の後代 T1 と T2 を用い、導入遺伝子が確実に遺伝しているかどうかを調査した。

### III 材料と方法

#### 1 材料

Glu-1Dx5 を導入した Fatmawati を T0 とし、自家受粉により得た後代の一代目を T1 とした。この T0, T1 の植物体は、Nono Carsono が 2007 年に作出したものを使用した(Nono 2007)。また、Glu-1Dx5 遺伝子が確認された T1 個体からいくつかの個体を選び、それを自家受粉させることにより得た種子を T2 とした。T2 個体については、冷水のかけ流しによる浸種を行い、セルポットに播種をした。15cm 程に伸長させた後、1/5000a ワグネルポットに移植し、宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターで管理をした。1ポットにつき、JA 全農栃木の有機配合ひとふりくんを 10g ずつ施用した。十分伸長させた後、DNA 抽出のために葉を採取した。T1 世代ではすべての個体から、T2 世代では同じ親からの子孫を 10 個体ランダムに採取した。採取した葉はジッパー付きのビニール袋に入れ、さらに袋ごと氷の入った発泡スチロール容器に入れた。その後葉を 0.1g 量り取り、70%エタノールに浸して消毒し、キムワイプでよく拭き取った。消毒した葉は新しいジッパー付きのビニール袋に入れ、冷凍庫で保管した。

#### 2 DNA 抽出

DNA 抽出は、Ly Tong(2004)を参考におこなった。葉を乳鉢に入れ、上から液体窒素を注いで凍結させてから粉砕した。粉末状になった葉を 1.5ml のマイクロテストチューブに葉匙を用いて入れ、GE ヘルスケアバイオサイエンス株式会社の Nucleon Phytopure から Reagent1 を 600  $\mu$ l, Reagent2 を 200  $\mu$ l 加え、一分間よく振った。そのマイクロテストチューブを 65°C に設定した TAITEC の Dry Thermo Unit DTU-1C ヒートブロックに置いて 1 分ごとに振り混ぜ、それを 10 回繰り返した。その後、氷を入れた発泡スチロール容器に入れ、20 分間冷やした。20 分後、-20°C 下で保存していたクロロホルムを 500  $\mu$ l, GE へ

ヘルスケアバイオサイエンス株式会社の Nucleon PhytoPure から Phytopure Resin を 100  $\mu$ l 加え、よく混ぜた。Phytopure Resin は透明の上澄み部分と沈澱部分が同量になるように TE を足し、よく振って上澄み部分と沈澱部分をよく混ぜてから使用した。その後、液が漏れないよう Laboratory Film をチューブの蓋周りに巻き、スポンジで固定しタイテック株式会社の恒温振とう槽 NTS-1300 で 10 分間振とうした。Laboratory Film を外した後、ヘルウス株式会社の Biofuge fresco 遠心分離機で 20°C 下、4000 回転で 10 分間遠心した。その後マイクロテストチューブ内の上澄みを新しいチューブに移し、同量のイソプロパノールを加えよく振った。それを Heraeus 社の Biofuge fresco 遠心分離機で 20°C 下、8000 回転で 5 分間遠心した。白い DNA の沈澱を吸い込まないように上澄みを取り除き、洗浄のために 70%エタノールを 100  $\mu$ l 入れ、指でチューブを振動させた。これを再び Heraeus 社の Biofuge fresco 遠心分離機で 20°C 下、8000 回転で 5 分間遠心し、上澄みを取り除いた。これを 2 回繰り返した。その後、エタノールを乾燥させるため、チューブの蓋をあけて 10 分間放置した。完全に乾いたら TE を 100  $\mu$ l 加えて Scientific Industries 社の VORTEX GENIE-2 ボルテックスミキサーで DNA を溶かし、チューブごと冷凍庫に保存した。

### 3 PCR

抽出で得た DNA 溶液の濃度を GE ヘルスケアの NanoVue 分光光度計で測定し、蒸留水を加えて 20ng/ $\mu$ l にした。この DNA 溶液を 1  $\mu$ l、TOYOBO 社の KOD Dash 10 $\times$  Buffer を 2  $\mu$ l と 2mM dNTPs を 2  $\mu$ l、つくばオリゴサービス株式会社の Glu-1Dx5 プライマーを 0.2  $\mu$ l、TOYOBO 社の KOD Dash を 1.25U と蒸留水を加えて 20  $\mu$ l の PCR 溶液を作った。Glu-1Dx5 プライマーの配列はそれぞれ、F プライマーが CTGGATCCATGCAGGCTACC、R プライマーが AAHHATCCGAGACATGCAGC である。これを Applied Biosystems の GeneAmp® PCR System 9700 にセットし、94°C で 30 秒間変性、55°C で 4 秒間アニーリ

ング, 74°Cで1分25秒間伸長反応させ, これを1サイクルとして30サイクル行った.

#### 4 電気泳動

##### a. 電気泳動用ゲルの作成

1×TEB Buffer 40ml にアガロース 0.4mg を加え, 電子レンジで加熱した. 沸騰し始めたら取り出して振り混ぜ, これをアガロースが完全に溶けるまで繰り返した. その後, エチジウムブロマイドを 4 $\mu$ l 入れ, 空気が入らないように混ぜた. エチジウムブロマイドは発がん性物質であるため, 使用には手袋を着用した. これをゲル用のトレイに流し入れ, コームをさしてゲルが固まるまで約 20 分置いた.

##### b. 電気泳動

アズワン株式会社のサブマリンゲル電気泳動 ISEP-1010 に 1  $\mu$ /ml のエチジウムブロマイドを加えた 1×TEB Buffer を入れ, ゲルをトレイごとセットした. PCR 産物約 6  $\mu$ l を, パラフィルム上で 6×Loading Buffer Triple Dye (Wako NIPPON GENE) 約 1  $\mu$ l と混ぜ, コームで開いたゲル上の穴に流しこんだ. 100V の低電圧で, 約 1 時間半電気泳動させた. 泳動後は, ゲルに FUJIFILM の LAS-1000 で UV を当てて写真を撮り, 同じく FUJIFILM の Image Reader LAS-1000 UV mini Version 1.12 で画像を確認した.

#### IV 結果と考察

Glu-1Dx5 遺伝子の分子量は 3.2kb である。そのため、電気泳動の結果ゲル上 3.2kb の位置に DNA バンドが現れた個体に、Glu-1Dx5 遺伝子が含まれていると考えられる(写真 1)

T1 世代について、Glu-1Dx5 遺伝子の有無を調査した結果を第 1 表に示した。DNA バンドが確認できた個体に○、確認できなかった個体に×の記号をつけた。個体を区別するため、それぞれの個体に数字とアルファベットで名前をつけた。数字は栽培したポット番号を表し、アルファベットはポットごとにそれぞれの株に割り振ったものである。

102 個体を調査したうち、Glu-1Dx5 遺伝子が確認されたのは 30 個体であった。親である T0 個体には皆 Glu-1Dx5 遺伝子が確認されているため、導入遺伝子が親から子に遺伝した割合は 1/4 となる。

T2 世代について、Glu-1Dx5 遺伝子の有無を調査した結果を第 2 表に示した。第 1 表と同様に、DNA バンドが確認できた個体に○、確認できなかった個体に×の記号をつけた。左の数字とアルファベットは親の名前を用い、中央の数字は実際に栽培したポットの番号を表す。右端の数字は、ポットごとにそれぞれの株に割り振ったものである。

200 個体を調査した中、Glu-1Dx5 遺伝子が確認できたのは 96 個体であった。親の T1 個体はすべて Glu-1Dx5 遺伝子を持っていたが、T2 個体では約半数で Glu-1Dx5 遺伝子が確認された。T1 の調査より導入遺伝子の存在する個体が増えている理由として、選抜により導入遺伝子が安定したことや、筆者の DNA 抽出技術が安定したことが考えられる。

また、この調査では、親の個体により遺伝子の有無に偏りが見られた。第 1 図は、同一の親を持つ個体をひとつのグループとし、Glu-1Dx5 遺伝子が確認された個体の数を示したものである。19B~E の後代では、どの個体でも Glu-1Dx5 遺伝子が確認されず、逆に 5A~5D, 5E, 5F の後代では、多くの個体から Glu-1Dx5 遺伝子が確認された。

第1表 T1の調査結果.

1A~6D		7A~9H		10A~13G		14A~17F		18A~21D	
1A	×	7A	○	10A	×	14A	×	18A	×
		7B	○	10B	×	14B	○	18B	×
2A	×	7C	×	10C	×	14C	○	18C	×
2B	×	7D	×	10D	×	14D	○	18D	×
2C	×			10E	×	14E	×		
		8A	×	10F	×	14F	○	19A	○
3A	○	8B	×	10G	×			19B	○
3B	×	8C	×			15A	○	19C	○
3C	×	8D	×	11A	×	15B	×	19D	○
3D	×	8E	×	11B	×	15C	○	19E	○
		8F	×	11C	×	15D	×		
4A	×	8G	×	11D	×	15E	×	20A	○
4B	×							20B	○
4C	○	9A	×	12A	×	16A	×	20C	○
		9B	×	12B	×	16B	×	20D	○
5A	○	9C	×	12D	×	16C	×		
5B	○	9D	×	12E	×	16D	×	21B	×
5C	○	9E	×			16E	×	21C	○
5D	○	9F	×	13A	×	16F	×	21D	○
5E	×	9G	×	13B	×				
5F	○	9H	×	13C	×	17A	×		
5G	○			13D	×	17B	×		
				13E	×	17C	×		
6A	○			13F	×	17D	×		
6B	×			13G	×	17E	×		
6C	○					17F	×		
6D	○								

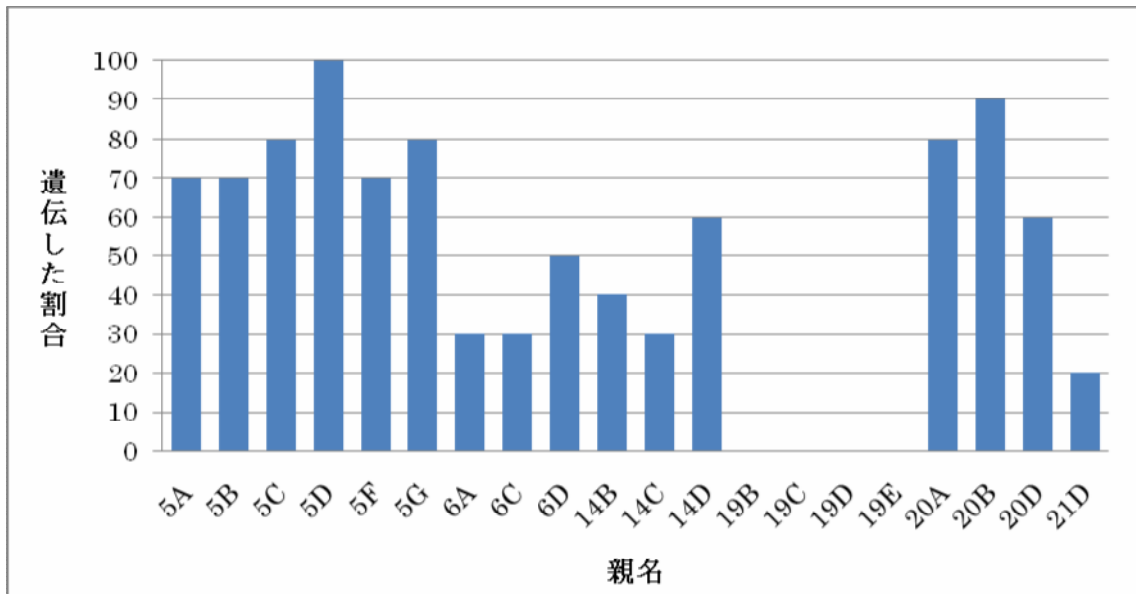
第2表 A T2 の調査結果.

5A~5B		5C~5D		5F~5G		6A~6C		6D~14B	
5A <sub>1</sub> -1	×	5C <sub>1</sub> -1	○	5F <sub>1</sub> -1	○	6A <sub>1</sub> -1	×	6D <sub>1</sub> -1	×
5A <sub>1</sub> -2	○	5C <sub>1</sub> -2	×	5F <sub>1</sub> -2	×	6A <sub>1</sub> -2	×	6D <sub>1</sub> -2	×
5A <sub>1</sub> -3	○	5C <sub>1</sub> -3	○	5F <sub>1</sub> -3	○	6A <sub>1</sub> -3	×	6D <sub>1</sub> -3	×
5A <sub>1</sub> -4	○	5C <sub>1</sub> -4	○	5F <sub>1</sub> -4	○	6A <sub>1</sub> -4	×	6D <sub>1</sub> -4	×
5A <sub>1</sub> -5	○	5C <sub>1</sub> -5	○	5F <sub>1</sub> -5	○	6A <sub>1</sub> -5	×	6D <sub>1</sub> -5	×
5A <sub>2</sub> -1	×	5C <sub>2</sub> -1	○	5F <sub>2</sub> -1	○	6A <sub>2</sub> -1	○	6D <sub>2</sub> -1	○
5A <sub>2</sub> -2	○	5C <sub>2</sub> -2	○	5F <sub>2</sub> -2	○	6A <sub>2</sub> -2	×	6D <sub>2</sub> -2	○
5A <sub>2</sub> -3	×	5C <sub>2</sub> -3	×	5F <sub>2</sub> -3	×	6A <sub>2</sub> -3	○	6D <sub>2</sub> -3	○
5A <sub>2</sub> -4	○	5C <sub>2</sub> -4	○	5F <sub>2</sub> -4	×	6A <sub>2</sub> -4	×	6D <sub>2</sub> -4	○
5A <sub>2</sub> -5	○	5C <sub>2</sub> -5	○	5F <sub>2</sub> -5	○	6A <sub>2</sub> -5	○	6D <sub>2</sub> -5	○
5B <sub>1</sub> -1	○	5D <sub>1</sub> -1	○	5G <sub>1</sub> -1	○	6C <sub>1</sub> -1	×	14B <sub>1</sub> -1	×
5B <sub>1</sub> -2	○	5D <sub>1</sub> -2	○	5G <sub>1</sub> -2	×	6C <sub>1</sub> -2	○	14B <sub>1</sub> -2	×
5B <sub>1</sub> -3	○	5D <sub>1</sub> -3	○	5G <sub>1</sub> -3	○	6C <sub>1</sub> -3	×	14B <sub>1</sub> -3	×
5B <sub>1</sub> -4	○	5D <sub>1</sub> -4	○	5G <sub>1</sub> -4	○	6C <sub>1</sub> -4	○	14B <sub>1</sub> -4	×
5B <sub>1</sub> -5	×	5D <sub>1</sub> -5	○	5G <sub>1</sub> -5	○	6C <sub>1</sub> -5	○	14B <sub>1</sub> -5	×
5B <sub>2</sub> -1	○	5D <sub>2</sub> -1	○	5G <sub>2</sub> -1	×	6C <sub>2</sub> -1	×	14B <sub>2</sub> -1	○
5B <sub>2</sub> -2	×	5D <sub>2</sub> -2	○	5G <sub>2</sub> -2	○	6C <sub>2</sub> -2	×	14B <sub>2</sub> -2	×
5B <sub>2</sub> -3	○	5D <sub>2</sub> -3	○	5G <sub>2</sub> -3	○	6C <sub>2</sub> -3	×	14B <sub>2</sub> -3	○
5B <sub>2</sub> -4	○	5D <sub>2</sub> -4	○	5G <sub>2</sub> -4	○	6C <sub>2</sub> -4	×	14B <sub>2</sub> -4	○
5B <sub>2</sub> -5	×	5D <sub>2</sub> -5	○	5G <sub>2</sub> -5	○	6C <sub>2</sub> -5	×	14B <sub>2</sub> -5	○

第 2 表 B

14C~14D		19B~19C		19D~19E		20A~20B		20D~21D	
14C <sub>1-1</sub>	×	19B <sub>1-1</sub>	×	19D <sub>1-1</sub>	×	20A <sub>1-1</sub>	○	20D <sub>1-1</sub>	×
14C <sub>1-2</sub>	○	19B <sub>1-2</sub>	×	19D <sub>1-2</sub>	×	20A <sub>1-2</sub>	○	20D <sub>1-2</sub>	○
14C <sub>1-3</sub>	○	19B <sub>1-3</sub>	×	19D <sub>1-3</sub>	×	20A <sub>1-3</sub>	○	20D <sub>1-3</sub>	○
14C <sub>1-4</sub>	○	19B <sub>1-4</sub>	×	19D <sub>1-4</sub>	×	20A <sub>1-4</sub>	×	20D <sub>1-4</sub>	×
14C <sub>1-5</sub>	×	19B <sub>1-5</sub>	×	19D <sub>1-5</sub>	×	20A <sub>1-5</sub>	○	20D <sub>1-5</sub>	×
14C <sub>2-1</sub>	×	19B <sub>2-1</sub>	×	19D <sub>2-1</sub>	×	20A <sub>2-1</sub>	○	20D <sub>2-1</sub>	○
14C <sub>2-2</sub>	×	19B <sub>2-2</sub>	×	19D <sub>2-2</sub>	×	20A <sub>2-2</sub>	○	20D <sub>2-2</sub>	○
14C <sub>2-3</sub>	×	19B <sub>2-3</sub>	×	19D <sub>2-3</sub>	×	20A <sub>2-3</sub>	○	20D <sub>2-3</sub>	×
14C <sub>2-4</sub>	×	19B <sub>2-4</sub>	×	19D <sub>2-4</sub>	×	20A <sub>2-4</sub>	○	20D <sub>2-4</sub>	○
14C <sub>2-5</sub>	×	19B <sub>2-5</sub>	×	19D <sub>2-5</sub>	×	20A <sub>2-5</sub>	×	20D <sub>2-5</sub>	○
14D <sub>1-1</sub>	○	19C <sub>1-1</sub>	×	19E <sub>1-1</sub>	×	20B <sub>1-1</sub>	○	21D <sub>1-1</sub>	×
14D <sub>1-2</sub>	×	19C <sub>1-2</sub>	×	19E <sub>1-2</sub>	×	20B <sub>1-2</sub>	○	21D <sub>1-2</sub>	○
14D <sub>1-3</sub>	×	19C <sub>1-3</sub>	×	19E <sub>1-3</sub>	×	20B <sub>1-3</sub>	○	21D <sub>1-3</sub>	○
14D <sub>1-4</sub>	○	19C <sub>1-4</sub>	×	19E <sub>1-4</sub>	×	20B <sub>1-4</sub>	○	21D <sub>1-4</sub>	×
14D <sub>1-5</sub>	○	19C <sub>1-5</sub>	×	19E <sub>1-5</sub>	×	20B <sub>1-5</sub>	○	21D <sub>1-5</sub>	×
14D <sub>2-1</sub>	×	19C <sub>2-1</sub>	×	19E <sub>2-1</sub>	×	20B <sub>2-1</sub>	○	21D <sub>2-1</sub>	×
14D <sub>2-2</sub>	×	19C <sub>2-2</sub>	×	19E <sub>2-2</sub>	×	20B <sub>2-2</sub>	○	21D <sub>2-2</sub>	×
14D <sub>2-3</sub>	○	19C <sub>2-3</sub>	×	19E <sub>2-3</sub>	×	20B <sub>2-3</sub>	×	21D <sub>2-3</sub>	×
14D <sub>2-4</sub>	○	19C <sub>2-4</sub>	×	19E <sub>2-4</sub>	×	20B <sub>2-4</sub>	○	21D <sub>2-4</sub>	×
14D <sub>2-5</sub>	○	19C <sub>2-5</sub>	×	19E <sub>2-5</sub>	×	20B <sub>2-5</sub>	○	21D <sub>2-5</sub>	×

第1図 親個体と遺伝した割合の関係.



## V 謝辞

この論文作成にあたり，ご指導いただいた作物栽培学研究室の吉田智彦教授，和田義春准教授には大変お世話になりました．また，自身の研究でお忙しい中実験手順を1から教えてくださった Ly Tong さん，遠いインドネシアからアドバイスをしてくださった Nono Carsono さん，試薬を提供してくださった植物病理学研究室の夏秋知英教授に深く感謝申し上げます．

## VI 引用文献

Ly Tong 2004. The Adaptability for Direct-seeding of Cambodian Rice Varieties.

宇都宮大学大学院 修士論文. 1-68.

農林水産省 2003 農林水産研究開発レポート No.6 (2003)

([www.s.affrc.go.jp/docs/report/report6/1.pdf](http://www.s.affrc.go.jp/docs/report/report6/1.pdf))

農林水産省 2006. 農産物品目別生産統計

(<http://www.toukei.maff.go.jp/world/index.files/seihin.htm>)

Nono Carsono 2007. The Establishment of in vitro Culture and Genetic Transformation of the Wheat Glu-1Dx5 Gene to Rice Plants by Gene Gun Bombardment.

Graduate School of Agricultural Science Tokyo University of Agriculture and Technology.  
1-110.

Sangtong, V, D.L. Moran, R. Chikwamba, K. Wang, W. Woodman-Clikeman, M.J. Long, M. Lee and M.P. Scott 2002. Expression and inheritance of the wheat Glu-1Dx5 gene in transgenic maize.

Theoretical and Applied Genetics 105:937-945.

Yoshiharu Wada, Nono Carsono, Anas, Ly Tong and Tomohiko Yoshida 2009. Genetic Transformation of the High Molecular Weight Glutenin (Glu-1DX5) to Rice cv. Fatmawati. Plant Prod. Sci. Accepted (印刷中).

H. W. Choi · P. G. Lemaux · M.-J. Cho 2003. Long-term stability of transgene expression driven by barley endosperm-specific hordein promoters in transgenic barley. Plant cell Reports 11: 1108-20.

## **Inheritance of the wheat Glu-1Dx5 gene in transgenic rice.**

Chisaki Fujita

### Summary

In this experiment, the inheritance of the wheat Glu-1Dx5 gene was studied in the progenies derived from transgenic rice cultivar “Fatmawati”. I analyzed the progenies (T1, T2) of transgenic Fatmawati with the wheat Glu-1Dx5 gene, using the DNA extraction, PCR and electrophoresis. Thirty of 102 T1 generation plants and 96 of 200 T2 generation plants had Glu-1Dx5 gene.

写真1 電気泳動の結果. 矢印で示した部分が, 19A-19E の Glu-1Dx5 遺伝子のバンドを示している. また, 左端は DNA マーカー, 右端は日本晴れの DNA である.

