

# ポリカチオンを利用する遺伝子導入の新技術

農業研究センター作物開発部  
育種工学研究室 津川秀仁

ポリカチオンを用いる遺伝子導入法は、エレクトロポレーション法やパーティクルガン法などの物理的方法とは異なり、粒子間のイオン結合と、プロトプラストが持つ『物を細胞内に取り込む』作用を利用した科学的遺伝子導入である。この方法をビデオを用いて紹介する。

## 1. ポリカチオン法の原理（原理図1. 2）

ポリカチオン法は、粒子間のイオン結合とプロトプラストが物を取り込む作用を利用している。DNAとプロトプラストはそれぞれマイナスチャージをしているので、プラスチャージのポリカチオンを加えてDNAとプロトプラストの結合の仲立ちをさせる。プロトプラスト表面に結合したプラスミドは、プロトプラストの食作用により細胞内に取り込まれる。

この原理により、DNAをプロトプラストに入れる訳である。

## 2. ポリカチオンを用いる遺伝子導入法の概要

- 1) プロトプラストの精製
- 2) プロトプラストの懸濁液
- 3) ストック液

表1はストック液の組成を示す。リン酸緩衝液はカリウム塩を用いる。ポリオルニチンは、分子量が高いものが有効で、14万程度の物を用いている。導入するDNAは、遺伝子発現ベクターに組み込み、精製したものである。

### 4) 混合の仕方（ポイント）

- ・このポリカチオン法を成功させるポイントの一つは『混ぜ方』である。どのような順序で混ぜるかが、大きなポイントになっている。
- ・まずストック液を使用時の10倍の濃度に希釈しておく。次に緩衝液とポリオルニチンとDNAを混合し、接種液を作る。そして、プロトプラストを混合させる訳である。

### 5) ストック液の希釈

- ・ポリオルニチン及びDNAのストック液を0.5Mマンニトールで希釈し、使用時の10倍濃度の液とする。ポリオルニチン液は40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の液となり、DNAは20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となる。ポーテックスミキサーでよく攪拌し均一な濃度にする事が重要である。

### 6) 接種液の混合

- ・試験管1本当たり5 mlとなるように、各成分を混合すると、表2に示した液量

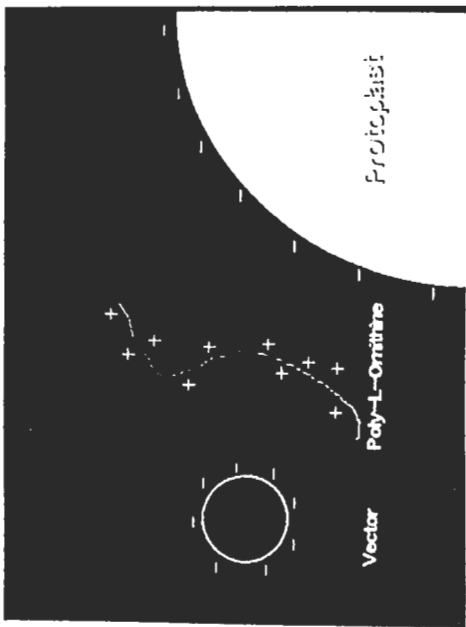


図1 原理図1

この方法は、粒子間のイオン結合とプロトプラストが物を取り込む作用を利用したものである。  
DNAとプロトプラストはマイナスチャージ、プラスチャージのポリカチオンを加え、DNAとプロトプラストの結合の仲立ちをさせる。

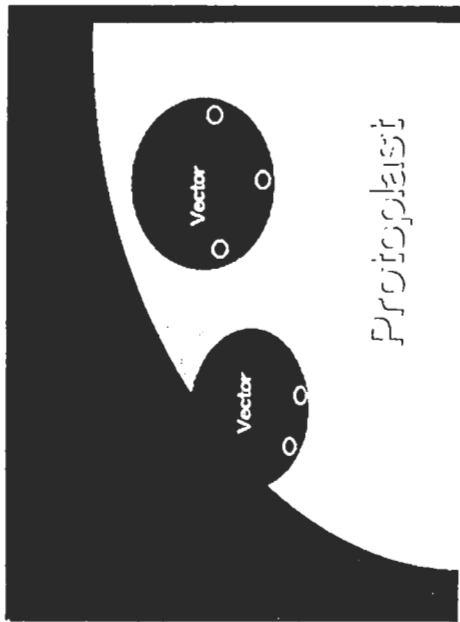


図2 原理図2

プロトプラスト表面に結合したプラスミド (DNA) は、プロトプラストの裏作組により細胞内に取り込まれる。

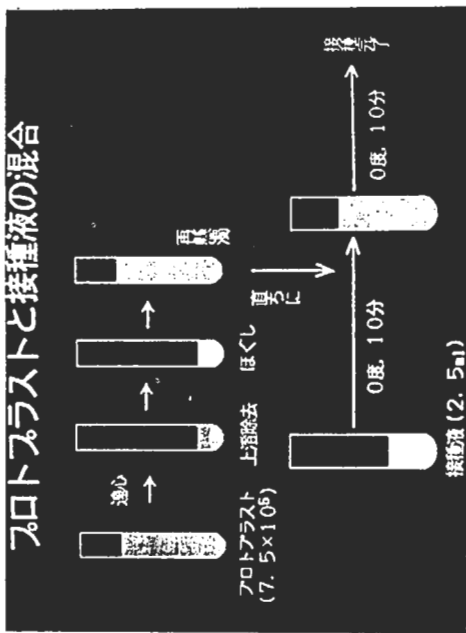


図3 原理図3

ポイントは「混ぜ方」  
緩衝液とポリオルニチン及びDNAを混合した接種液を作っておく。ポーターックスミキサーでよく攪拌しておく。  
沈殿しているプロトプラストを直前に懸濁し、接種液を添加する。10分後に遠心、洗浄後、培養する。

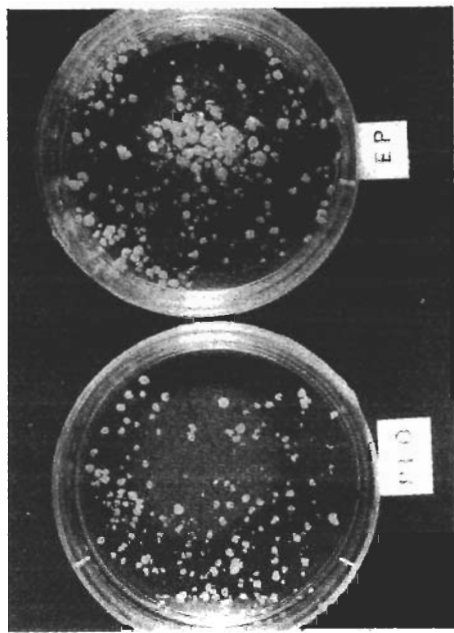


図4 ハイグロマジン耐性遺伝子導入カルスの獲得  
P10: ポリカチオン法、EP: エレクトロポレーション法

を加えることになる。

- ・まず、0.5Mマンニトールを試験管にとり、これにリン酸緩衝液、ポリオルニチン、DNAを加えていく。全部加え終わったら、氷の中に立てておく。
- ・この調合を、順序通りに加えていく操作を図3で示す。
- ・まず、bufferを加える。
- ・次はポリオルニチン。
- ・最後にDNAを加え、試験管を攪拌する。
- ・そして、氷の中に立て、10分程度冷やしておく。
- ・この間に、ポリオルニチンとDNAはコンプレックスをつくり、プロトプラストの添加を待つことになる。

#### 7) プロトプラストの前処理

- ・そのプロトプラストだが、加える前に表面をきれいにしておく必要がある。それは、沈殿しているプロトプラストを新たな液に懸濁して『直ぐに』使うことを示している。
- ・プロトプラストを、接種液に加える直前に、遠心で沈め、新たなマンニトール液に再懸濁して、直ぐに接種液に加える。

#### 8) プロトプラストの添加

- ・プロトプラストの沈殿をほぐし、2.5 mlの冷やしたマンニトール液を注ぎ接種液を加える。
- ・次の遠心のために、細い試験管に戻す。
- ・氷の中に10分程度立てておく。この間に、DNAとポリオルニチンのコンプレックスはプロトプラスト内に取り込まれる。

#### 9) 遠心・上澄除去・培地添加

- ・接種後、プロトプラストを遠心で沈めたあと、マンニトール液で一回洗浄する。そして、プロトプラスト用培地を加える。

#### 10) プロトプラスト用培養液の調製

- ・プロトプラストの培養には、コンディショニング培地と呼ぶ液体培地を用いる。
- ・コンディショニング培地とは、予めイネの培養細胞をプロトプラスト用培地で培養し、その培地から培養細胞を除去したものである。現在では、コンディショニング培地とプロトプラスト培地を等量ずつ混合したものを使用している。

#### 11) トランジェントアッセイ

- ・GUS 遺伝子の発現を調べる『トランジェントアッセイ』の実験では、プロトプラストをエッペンドルフチューブに入れ、チューブを寝かせて培養する。GUS 活性は1日の培養で、十分検出することができる。

### 3. ポリカリオン法の有効性

この方法の適用には、プロトプラスト培養系が確立していることが前提となるが、導入効率が高く、プロトプラストのダメージが少なく、キャリアーDNAが

不要なこと、高価な機械が不要なこと、大量のプロトプラストを処理できることなどが利点として挙げられる。

表 1. ストック液の種類と使用濃度

ストック液	使用濃度
リン酸緩衝液 (0.5M)	0.25 M
ポリオルニチン (1 mg/ml)	4 $\mu$ g/ml
DNA (2 mg/ml)	2 $\mu$ g/ml
マンニトール	0.5 M
プロトプラスト	$1.5 \times 10^6$

表 2. 接種液の混合

0.5 Mマンニトール	1.25 ml
リン酸緩衝液 (0.5M)	0.25 ml
ポリオルニチン (40 $\mu$ g/ml)	0.5 ml
DNA (20 $\mu$ g/ml)	0.5 ml

### 細胞特性からみた導入条件の検討

35S-GUS 遺伝子をポリカation法により、イネプロトプラスト(日本晴)へ導入し、GUS アッセイ値を測定し、導入効率を比較した。一部比較のため、エレクトロポレーション法の導入も行った。1) 導入装置; 日本分光, CET200、2) EP 条件; プロトプラスト濃度 $1.5 \times 10^6$ /ml、キャリアーDNA 20  $\mu$ g/ml、35S - GUS 2  $\mu$ g/ml、電界強度1000V/cm、パルス幅 1 ms、パルス印加数6回

表3. プロトプラストとプラスミドを混合した後の放置温度及び処理時間

	処理温度・時間(分)	4MU・nM/1.5×10 <sup>6</sup>	標準対比
1	氷冷・10(標準)	79.4 ± 11.8	1.00
2	〃 20	54.6 ± 4.3	0.69
3	〃 30	53.2 ± 2.0	0.67
4	〃 40	50.0 ± 2.9	0.63
5	氷冷→室温・10	76.6 ± 3.8	0.96
6	〃 20	86.2 ± 14.6	1.09
7	〃 30	121.8 ± 12.0	1.53
8	〃 40	81.4 ± 0.0	1.03

表4. プロトプラスト懸濁浸透圧濃度

	処理法	4MU・nM/1.5×10 <sup>6</sup>	標準対比
1	氷冷0.5M(標準)	54.6 ± 6.7	1.00
2	氷冷→室温0.5M(10分)	100.8 ± 16.2	1.85
3	全過程室温0.5M	96.4 ± 2.2	1.77
4	比較(EP,carrier 含)*	214.8 ± 15.8	3.93
5	モニター→0.35M(氷冷→室温)	62.4 ± 7.7	1.14
6	〃 0.4M	69.6 ± 13.5	1.27
7	〃 0.6M	98.0 ± 13.0	1.79
8	〃 0.7M	138.2 ± 18.0	2.53

\* carrierを含まないと、半分以下に低下する。

表5. 処理条件の組み合わせ

	処理法	4MU・nM/1.5×10 <sup>6</sup>	標準対比
1	氷冷0.5M(標準)	70.6 ± 7.1	1.00
2	室温0.5M(10分)	92.0 ± 11.2	1.30
3	室温0.5M遠心後CM添加遠心	181.2 ± 19.0	2.57
4	室温加液0.7M	130.2 ± 21.2	1.84
5	〃 遠心回収時0.7M	103.4 ± 28.3	1.46
6	〃 全過程0.7M	240.8 ± 35.0	3.41

## 実験手順の主な改良箇所

プロトプラストの精製



ポリオルニチンの混合液の調製



プロトプラストとプラスミドの混合  
静置



遠心回収



培養

bufferの浸透圧

- ・プロトプラストの浸透圧
- ・処理温度

回収後のCM添加

表 6. 改良比較表

処 理 条 件	改良前	改良後
混合液のマニトール濃度	0.5 M	0.7 M
混合時の温度	氷冷	室温
CM添加効果	(未確認)	効果確認

### 参考文献

1. 建部 到(1994)タバコ・プロトプラストにおけるウイルスの感染と増殖. ウイルス22(1-2).1 ~13.
2. 津川秀仁他 4名(1993)イネ・プロトプラストを用いたトランジェントアッセイ系Ⅱ. 培養条件の改良による遺伝子発現の向上. 育雑43巻(別1号).108
3. 大槻義昭・津川秀仁他 4名(1994)ポリオルニチンを用いるプロトプラストへの効率的遺伝子導入法. 育雑44巻(別1号).64