報 文

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 72, No. 1, pp. 35~42, 1998]

分裂活性および遺伝子導入効率の高いイネのプロトプラストの選抜法

高橋かほる, 森田正隆*, 五十嵐由美子**, 吉羽洋周**

(日立工機株式会社勝田研究所, *日立工機株式会社精機事業部, **株式会社日立製作所基礎研究所)

平成9年2月24日受理

Selection Methods for Excellent Rice Protoplasts with Activities of
Cell Division and Transient Expressions

Kahoru TAKAHASHI, Masataka MORITA*, Yumiko IGARASHI**, and Yoshu YOSHIBA**

*Katsuta Research Laboratory, Hitachi Koki Co., Ltd., 1060 Takeda,
Hitachinaka-shi, Ibaraki 312***Scientific Instruments Div., Hitachi Koki Co., Ltd., 1060 Takeda,
Hitachinaka-shi, Ibaraki 312****Advanced Research Laboratory, Hitachi, Ltd., 2520 Akanuma,
Hatoyama-machi, Hiki-gun, Saitama 350-03*

We tried to separate rice protoplasts by their size groups using a Counterflow Centrifugal Elutriation, which is a kind of separation method for cells in an equilibrium of centrifugal force and flow rate. As a result, the protoplasts could be separate in three size groups, S size, M size, and L size. Comparing activities of cell division and transient expressions in each group, L size was the best at both of them. Therefore, we will be able to select excellent rice protoplasts with activities of cell division and transient expression using the Counterflow Centrifugal Elutriation.

(Received February 24, 1997)

Key words: rice; protoplast; activity of cell division, gene insertion; counterflow centrifugal elutriation

緒 言

植物の品種改良において, 近年, 組換え DNA 技術を利用した分子育種技術の開発が行われている。これは有用な遺伝子のみを DNA として直接細胞に導入し, 遺伝子組換え植物を育成する方法である。

この遺伝子導入には, いくつかの方法が開発されているが, 操作が簡便で成功例の多い方法としてエレクトロポレーション法^(1~3)がある。この方法は, 植物のプロトプラストを材料に, その細胞膜を電氣的に穿孔し, 遺伝子を導入する方法である。このためプロトプラストからの植物体再生系が確立していることが必須である。

一方, 植物のプロトプラストは細胞壁を酵素的に除去したもので種々の組織や培養細胞から容易に分離することができる。しかし, 分裂活性の高い, 再分化しやすいプロトプラストを得るには生育初期の若い組織か液体培養細胞などの比較的増殖過程にある細胞塊に限られている。また, 分離したプロトプラストは大きさ, 密度共に均一なものではなく, この違いが分裂活性や遺伝子導入効率に大きな影響を及ぼしていることが示唆されている^(4, 5)。したがって, 大きさあるいは密度によりプロトプラストを分離し, より活性の高いものを選別できれば遺伝子の導入効率を上げるばかりではなく, 安定した組換え植物を得ることができると考えられる。そこで本研究では, 血液⁽⁶⁾, 動物細胞⁽⁷⁾や酵母⁽⁸⁾などですでに成功例のある counterflow centrifugal elutriation 法⁽⁹⁾ (以後 CCE 法と略す) を用いて植

CCE 法: counterflow centrifugal elutriation 法

物, 特にイネの培養細胞からのプロトプラストをサイズごとに分離できるか否か, またその違いが分裂活性および遺伝子導入効率にどのように影響するのか比較検討した. その結果, 植物のプロトプラストにおいても動物細胞同様サイズによる分離が可能なること, そしてサイズの大きなプロトプラストほど分裂活性, 遺伝子導入効率共に高いことが明らかとなった.

材料および方法

1. CCE 法の原理

細胞を大きさや密度の差により分離する方法としては, 1948 年に Lindahl らによって "counterstreaming centrifugation" の原理として初めて報告された⁽⁹⁾, CCE 法を使用した. この方法は細胞の大きさや密度の違いにより多量の細胞を高純度で分離できると

Fig. 1. An Illustration of the Behavior of Cells in the Separation Chamber during Elutriation.

- ① Mixed-cell sample suspended in a medium enters centrifugal end of the chamber.
- ② Sedimentation tendency of the cells is balanced by counterflow in the chamber.
- ③ The fractions can be harvested by increasing the flow rate or decreasing the speed, allowing each fraction to be eluted from the top of the chamber.

いう特徴をもつ. この CCE 法は, 遠心力に対向して細胞懸濁液を緩衝液とともに流すと, 回転半径 r の位置に集合する細胞の大きさは, 回転数, 流速, 細胞と溶媒の密度差によって決定される. したがって, 回転数を固定し, 一定時間ごとに緩衝液の流量を上げるかまたは, 流量を固定し, 一定時間ごとに回転数を下げると均一の細胞集団を, 主として大きさの違いにより集めることができるというものである (Fig. 1). この方法では, 通常密度勾配遠心法では分離が困難である密度の近接した細胞を分離することおよび, 分離チャンバを変えることにより $10^7 \sim 10^{10}$ 個という多量の細胞を一度に処理することが可能である. また細胞懸濁液や培地のまま細胞を分離することが可能であるため, 分離工程における細胞へのダメージを最小限に抑えることができる.

2. イネ品種

朝の光 (うるち米)

3. カルス誘導と液体培養⁽¹⁰⁾

“朝の光”の完熟種子の穎を剥離した後, 70% エタノールに 5 分, 2% 次亜塩素酸ナトリウムに 20 分間浸漬し殺菌した. この種子を 0.3% ゲルライトで固めた 3% ショ糖および 2 mg/liter 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (以後 2,4-D と略す) を含む MS 培地に置床した. これを 25°C の暗黒下で約 1 カ月間培養して発芽させ, この胚軸よりカルスを誘導した. 誘導したカルスは, 1 mg/liter 2,4-D と 3% ショ糖を含む R2 液体培地 60 ml に懸濁し, 300 ml 三角フラスコ中で 100 rpm の旋回培養に移した. その後, 培養細胞は 1 週間ごとに新鮮な培地に移し継代培養した.

4. プロトプラストの調製⁽¹⁰⁾

継代培養により安定した分裂を繰り返すようになった細胞を, 1 mg/liter 2,4-D と 6% ショ糖を含む MS 液体培地に移し培養した. 培養 4 日後, 細胞を低速遠心 ($100 \times g$, 3 分) により集め, プロトプラスト洗浄液 (0.01% CaCl_2 を含む 0.5 M マンニトール) で一度洗浄した後酵素液 (0.05% Pectolyase Y-23, 2% Cellulase Onozuka RS, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1% デキストラン硫酸カリウム, 9% マンニトール) 10 ml を加え, 30°C, 30 rpm, 1 時間, 300 ml 三角フラスコ中で振とうした後, 30°C, 2~3 時間静置した. 処理後, 30 μm 径のナイロンメッシュを通すことにより, プロトプラストと未消化細胞を分離した. 分離したプロトプ

Table Separation of Rice Protoplast by Elutriation

Fraction	Rotor speed (rpm)	Flow rate (ml/min)	Time (min)	Volume (ml)
1	1500	3	10	30
2	1500	4	10	40
3	1500	5	10	50
4	1500	7	10	70
5	1500	10	10	100
6	1500	14	10	140
7	1500	18	10	180
8	0	18	3	50
Total			73	630

ラストは、数回の遠心操作 (100×g, 3分) とプロトプラスト洗浄液により酵素液を除いた。得られたプロトプラストを 10 ml のプロトプラスト洗浄液に再懸濁し、血球計算盤を用いて数を調べるとともに、画像処理装置ルーゼックス (ニレコ社製, Luzex3U) を用いてその細胞径を測定した。

5. エルトリエータによるサイズの異なるプロトプラストの分離

CCE 装置は日立エルトリエータロータ細胞分離システム (日立工機(株)製, R5E 型 以後エルトリエータと略す) を使用し、4.5 ml チャンバで分離を行った。プロトプラストは $1 \sim 2 \times 10^8 / 10 \text{ ml}$ となるようプロトプラスト洗浄液で懸濁し、4℃ 下でエルトリエータに挿入した。今回の実験では、ロータ回転数 1500 rpm 一定とし、初期流量 3 ml/min, 以下 Table の条件で流量を上昇させた。流量 18 ml/min で 10 分間分画した後、遠心機を停止させた。分画した各フラクションを遠心してプロトプラストを集め、適当な濃度でプロトプラスト洗浄液に再懸濁した。

6. プロトプラストの培養⁽¹⁰⁾

エルトリエータにより大きさ別に分離したプロトプラストを 1 ml 当たり $10^5 \sim 10^6$ 個となるように調整し、あらかじめ 45℃ で保温しておいたアガロース培地に懸濁し、径 6 cm のプラスチックシャーレに 1 ml ずつ円盤状に薄く広げ包埋し、置床した。この時、シャーレにはプロトプラストの分裂増殖を助けるために比較的増殖の良い液体培養細胞 (ナース細胞) をプロトプラスト用培地 (1 mg/liter 2,4-D と 13.7% ショ糖を含む R2 液体培地) に数 ml 加え、25℃ 暗黒下 30 rpm で振とう培養した。約 2 週間後、ナース細胞をプ

ロトプラスト用培地で洗い落とし、さらにプロトプラスト培養用培地 (1 mg/liter 2,4-D と 3% ショ糖を含む R2 液体培地と N6 液体培地を 1:1 の割合で混合したもの) に移し、培養した。なお、プロトプラスト培養期間はナース培養期間も含めるものとする。プロトプラスト培養後、1 週間ごとに分裂したプロトプラストを数え、下記の式により分裂率を算出した。

$$\text{分裂率} = \frac{\text{分裂したプロトプラスト数}}{\text{アガロースに包埋したプロトプラスト数}} \times 100$$

7. プラスミド DNA の調製

レポーター遺伝子として β -グルクロニダーゼ (以後 GUS と略す) 遺伝子を用い、その発現プラスミドである pBI221 プラスミド (CLONTECH 社製) を増幅し、下記 3 方法により精製した。

①CsCl を用いた超遠心法⁽¹¹⁾

アルカリ-SDS 法⁽¹¹⁾により抽出した粗プラスミド DNA を RNase 処理した後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行い、生じた沈殿を乾燥させた後 TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 5 ml に溶解し、CsCl 5 g, 10 mg/ml 臭化エチジウム 130 μ l を加え、日立分離用超遠心機 (日立工機(株)製, CP100 α) を用いて、P100AT アングルロータ, 60,000 rpm, 16 時間, 20℃ の条件で分離・精製した。分離したプラスミド DNA 溶液中の臭化エチジウムを 1-ブタノールで除去し、エタノール沈殿を行い、生じた沈殿を 70% エタノールで 1 回洗浄し、乾燥させた後適量の TE 緩衝液に溶解した。

②カラム法

カラムは QIAGEN® カラム QIAGEN-tip 2500 (QIAGEN 社製) を使用した。調製方法は取り扱い説明書どおり行った。カラム抽出により精製されたプラスミド DNA は 0.7 容量のイソプロパノールで沈殿させることにより不純物を取り除き、乾燥させた後適量の TE 緩衝液に溶解した。

③PEG 法⁽¹²⁾

アルカリ-SDS 法で抽出した粗プラスミド DNA を RNase 処理した後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行い、生じた沈殿を適量の TE 緩衝液に溶かし、同量のポリエチレングリコール溶液 (20% PEG8000, 2 M NaCl) を入れ、氷上で 1 時間放置した。その後遠心 (15,000 rpm, 15 分, 4℃) し上清を除いた沈殿を

70% エタノールで1回洗浄し, 乾燥させた後適当量の TE 緩衝液に溶解した.

8. エレクトロポレーションと GUS 活性の測定

エルトリエータにより大きさ別に分離したプロトプ

ラストを 1.5×10^6 個/ml の濃度となるよう EP 緩衝液 (0.1 mM MgSO_4 を含む 0.5 M マンニトール) で調整した. 上記最適調製法で調製したプラスミド $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ をプロトプラスト溶液に加え, 電圧 375 V/cm, 電

①

②

Fig. 2. Size Distribution of Rice Protoplast.

① Before elutriation (average of cell size $15.5 \mu\text{m}$).

② After elutriation. S, S cell (average of cell size, $11.1 \mu\text{m}$); M, M cell (average of cell size, $15.4 \mu\text{m}$); L, L cell (average of cell size, $17.4 \mu\text{m}$).

気容量 220 μ F, パルス幅 1 回の条件でエレクトロポレーション法^(13, 14)により導入した。導入後, 24 時間, 27°C, 暗黒下で静置培養した。また, エルトリエータでは常法と比べて遺伝子導入までに約 3 時間ほどかかり, その間に細胞壁が形成されている可能性があるため, プロトプラスト調製後の放置時間が遺伝子導入効率に及ぼす影響についても検討した。その方法としては, 3 時間室温に放置したプロトプラストと 4°C で放置したプロトプラストに遺伝子を導入し, GUS 活性値を測定し比較を行った。

遺伝子導入したプロトプラストの沈殿に緩衝液 (50 mM リン酸ナトリウム, 10 mM EDTA, 0.1% トリトン X-100, 0.1% サルコシル, 10 mM β -メルカプトエタノール pH 7.0) を加えて超音波破碎し, 遠心分離後の上清を用いた。蛍光基質 4-メチルウンベリフェリル- β -D-グルクロニド (以後 MUG と略す) を 1 mM になるように添加し, 37°C, 2 時間反応後, 0.2 M Na_2CO_3 で反応を停止させた。蛍光値は蛍光強度 (励起波長: 365 nm, 発光波長: 448 nm) を蛍光強度計 Spectrofluorophotometer ((株)島津製作所製, RF-5000) を用いて測定し, GUS 酵素の反応産物である 4-メチルウンベリフェリン (以後 4-MU と略す) を定量した⁽¹⁵⁾。

実験結果

1. エルトリエータによるプロトプラストの分離

今回使用したイネのプロトプラストは Fig. 2-① に示すように, おおよそ 10~25 μ m の大きさに分布しており, 平均細胞径 15.5 μ m であった。Table の分離条件によりエルトリエータを用いてプロトプラストを分離したところ, 各フラクションでの流出プロトプラストの平均粒径は, フラクション 2 (以後 F2 と略す) で 10.5 μ m, F3 で 11.5 μ m, F4 で 15.4 μ m, F5 で 16.2 μ m, F6 で 17.2 μ m, F7 で 18.0 μ m であった。なお F1 は細胞の破片がほとんどであり, F8 は細胞壁が酵素処理されなかった未消化の細胞が多かった。このことから, 酵素処理後の精製で取り残した細胞破片や未消化の細胞を, エルトリエータの分離でより完全に除去することができた。ここで, F2 と F3, F4 と F5, F6 と F7 という平均粒径の近いフラクションをまとめ, それぞれ Small cells (平均細胞径 11.1 μ m 以後 S cell と略す), Middle cells (平均細胞径 15.4 μ m 以

Fig. 3. Comparison with Cell Division of Rice Protoplast.

A broken line is the case without elutriation. Others are the same as described in Fig. 2 (N=3).

後 M cell と略す), Large cells (平均細胞径 17.4 μ m 以後 L cell と略す) とし, その粒径分布は Fig. 2-② のようになった。以上のことから, エルトリエータによりイネのプロトプラストを S cell, M cell, L cell の三つの細胞群に分離することができた。

2. 大きさの違いによるプロトプラストの分裂活性の比較

エルトリエータで分離した S cell, M cell, L cell を培養し, 分裂率を比較した結果を Fig. 3 に示した。培養約 2 週間で細胞壁が形成され細胞分裂をはじめ, その後分裂が進み培養約 7 週間で小さい細胞塊を形成した。培養 3~5 週間までは M cell, L cell 共に, エルトリエータ処理をしていないプロトプラストと同様の分裂速度を示した。その後 M cell およびエルトリエータ無処理のプロトプラストは分裂する細胞が減少したが, L cell は 7 週間まで同様に分裂を続け, その分裂活性はエルトリエータ無処理のものの約 2 倍であった。つまり, 細胞分裂する能力のある細胞が L cell に多く, 言い換えれば L cell は生存率の高い細胞群であると考えられる。また S cell については, ほとんどの細胞が分裂しなかった。

今回の実験結果から大きさの違いにより分裂活性が異なるということ, またサイズの大きいプロトプラストは分裂活性が高い細胞群であるということが判明した。

3. プラスミド DNA の最適調製法の検討

超遠心法, カラム法および PEG 法の 3 種類の方法で調製した pBI221 5 μ g をイネプロトプラストにエ

Fig. 4. Comparison with the Method of the Purification of Plasmid DNA.

Each GUS activity is the relative value to the PEG method. PEG, polyethyleneglycol 8000; column, QIAGEN® column; UC, ultracentrifugation.

Fig. 5. Comparison with Efficiency of Transient Expression.

Each GUS activity is the relative value to the case without elutriation as standard. S, M, and L are elutriation. S, S cell; M, M cell; L, L cell; 4°C, incubation at 4°C for 3 h without elutriation; R.T., incubation at room temperature for 3 h without elutriation; control, without incubation and elutriation ($N=3$).

レクトロポレーション法で導入し, GUS の transient assay を行った. PEG 法の活性値を 1 とした相対値で比較したところ, カラム法は PEG 法の 2.7 倍, 超遠心法は 6.3 倍であった (Fig. 4). このことからプラスミド DNA の調製法は超遠心法が最適であることがわかった.

4. 大きさの違いによる遺伝子導入効率の比較

上記結果よりプラスミド DNA の調製は超遠心法を用いて行った. エルトリエータで分離したものでは, S cell は活性がなく, M cell は対照の平均 1.3 倍, L cell は平均 2.6 倍であった (Fig. 5). また, プロトプラストを調製した後, 室温下でも 4°C 下でも 3 時間放置することにより, 遺伝子導入効率は約半分に低下した.

考 察

1. 大きさの違いによるプロトプラストの分裂活性の比較

エルトリエータは遠心力と流れの二つの力を利用して細胞を大きさや密度差で分離するものであり, その関係は以下の式で表される⁽¹⁷⁾.

$$d = \sqrt{\frac{18\eta v}{r\omega^2(\rho - \rho_0)}}$$

ここで d : 細胞の直径

η : 溶液の粘度

ρ : 細胞の密度

ρ_0 : 溶液の密度

r : 回転中心から分離面までの距離

v : 流速

ω : 角速度

ただし $v=Q/S$ (Q : 体積流量, S : 分離面の断面積)

$\omega=2\pi N$ (N : 回転数)

溶液の粘度, 密度は 4°C の水と同等と仮定し, $\eta=1.574 \times 10^{-2}$ P, $\rho_0=0.999973$ g/cm³ (理科年表より), また本装置では $r=8.95$ cm, $S=3.25$ cm² である. これらと分離条件および今回の実験結果である S, M, および L cell の平均細胞径からそれぞれの細胞群の密度を計算すると

細胞の種類	平均細胞径 (μm)	密度 (g/cm ³)
S cell	11.1	1.027
M cell	15.4	1.028
L cell	17.4	1.039

となり, S cell, M cell では密度差がほとんどなく, L cell は他の細胞より密度が高いという結果が得られた.

一方, Masuda ら (1989)⁽¹⁶⁾ は, 密度勾配遠心法によりイネのプロトプラストを密度の違いにより分離した. そして密度の高いプロトプラストでは液胞が少なく, 細胞質が葉緑体, ミトコンドリアなどのオルガネラで満たされたものが多かった. 一方, 密度の低いプロトプラストでは逆に液胞の発達したものが多かった. 彼らはこれらのプロトプラストを培養し, 分裂活性を比較したところ, 密度の高いプロトプラストが高い分裂活性を有することを認めている. このような知

見から、エルトリエータを用いることにより細胞質がオルガネラで満たされた密度の高い細胞、つまり分裂活性の高い細胞を分離することが可能であると考えられる。

また、エルトリエータ無処理のプロトプラストには液胞の多い S cell が含まれており、これらはそれら自身が分裂しないばかりでなく、分裂活性のあるプロトプラストの分裂を妨げる物質を培地中に放出しているおそれ⁽¹⁰⁾がある。よって、エルトリエータでの分離は分裂活性の高いプロトプラストを選抜するばかりでなく、均一の細胞群とすることで分裂阻害物質から防ぐ効果も期待できる。

2. 大きさの違いによる遺伝子導入効率の比較

一般に遺伝子導入効率は、プラスミド DNA との接触が多いほど高くなるため、プロトプラストの表面積の大きい細胞、つまりサイズの大きい細胞が高いはずである。今回の実験結果はそれを鑑みるに当然のことと思われる。一方、プロトプラストを調製した後、室温下であっても 4℃ 下であっても 3 時間放置することにより遺伝子導入効率は半減した。これはプロトプラストという細胞壁のない状態は細胞にとってかなりストレスの高い状態であり、単離されたプロトプラストは分裂活性を低下させている⁽¹¹⁾と考えられる。プロトプラストは元の細胞とは種々の点で異なっていて、単に「壁の無い細胞 (wall-less cells)」とはみなしえないと言われるゆえんである⁽¹²⁾。このためプロトプラスト化したら、できるだけ早急に遺伝子導入や細胞融合を行わなければその効率は徐々に低下することとなる。エルトリエータでの分離操作では、プロトプラスト調製から遺伝子導入までに約 3 時間要することから、遺伝子導入効率は低下するはずである。それにもかかわらず、L cell の遺伝子導入効率が対照の 2~3 倍と高い理由は、対照の細胞と比べて生存率が高く、エレクトロポレーションという外部からの刺激に強い細胞が L cell に多いことが考えられる。これは前記の分裂活性の比較結果からも理解できる。

以上のことから、エルトリエータを用いてプロトプラストをサイズの差により分離することが可能であり、そのサイズの違いが分裂活性、遺伝子導入効率共に影響を与えていることがわかった。今回の結果から、分裂活性、遺伝子導入効率共にサイズの大きい L cell が高いことが判明した。品種改良に適した細胞選

抜の第 1 段階としてこのエルトリエータは有効であり、今後はサイズにより分離したプロトプラストの植物体再生効率を検討していきたい。

要 約

回転による遠心力と、ロータ内に液を流すことにより遠心力と逆向きに生じる流体力を利用して細胞を分離する CCE 法を用いて、植物のプロトプラストをそのサイズの違いにより分離した。その結果、S cell (平均細胞径 11.1 μm)、M cell (平均細胞径 15.4 μm)、L cell (平均細胞径 17.4 μm) の三つの細胞群に分離することができた。分離したプロトプラストの分裂活性および遺伝子導入効率を比較したところ、どちらもサイズの大きい L cell が最も良好であった。このことから、エルトリエータを用いて分裂活性および遺伝子導入効率の高いプロトプラストを選抜することが可能であり、それが植物の品種改良の早期開発の一助になるものと考えられる。

- (1) H. Uchimiya, T. Fushimi, H. Hashimoto, H. Harada, K. Syono, and Y. Sugawara: *Mol. Gen. Genet.*, **204**, 204-207 (1986).
- (2) K. F. Toriyama, Y. Arimoto, H. Uchimiya, and K. Hinata: *Bio/Technology*, **6**, 1072-1074 (1988).
- (3) K. Shimamoto, R. Terada, T. Izawa, and H. Fujimoto: *Nature*, **338**, 274-276 (1989).
- (4) C. T. Harms and I. Potrykus: *Theor. Appl. Genet.*, **53**, 57-63 (1987).
- (5) 河村善雄, 吉羽洋周, 田中伸司, 佐藤一雄, 菊池次郎, 高橋かほる: 育種学雑誌, **43**, 91-99 (1993).
- (6) Y. Furukawa, J. Kikuchi, Y. Terui, S. Kitagawa, M. Ohta, Y. Miura, and M. Saito: *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 208-216 (1995).
- (7) Y. Terui, Y. Furukawa, J. Kikuchi, and M. Sairo: *J. Cellular Physiol.*, **164**, 74-84 (1995).
- (8) J. Van Dooorn, J. A. C. Valkenburg, M. E. Scholte, L. J. W. M. Oehlen, R. Van Driel, P. W. Postma, N. Nanninga, and K. Van Dam: *J. Bacteriol.*, **179**, 4808-4815 (1988).
- (9) P. E. Lindal: *Nature*, **161**, 648-649 (1948).
- (10) 大槻義昭: イネプロトプラスト培養系, 社団法人農林水産技術情報協会, 1990.
- (11) J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis: *Molecular Cloning*, **1**, 1.33-1.45 (1989).
- (12) J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis: *Molecular Cloning*, **1**, 1.33-1.41 (1989).
- (13) C. D. Riggs and G. W. Bates: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 5602-5606 (1986).
- (14) H. M. Zhang, H. Yang, E. L. Rech, T. J. Golds, A. S.

- Davis, B. J. Mulligan, E. C. Cocking, and M. R. Davey: *Plant Cell Rep.*, **7**, 379-384 (1988).
- (15) R. A. Jefferson: *Plant Mol. Biol.*, **5**, 387-405 (1987).
- (16) K. Masuda, A. Kudo-Shiratori, and M. Inoue: *Plant Sci.*, **62**, 237-246 (1989).
- (17) 早坂 浩, 永田明朗, 是枝正国, 塩月一英, 八坂達臣, 本田福美子, 横山三男: 臨床検査, **29**, 577-580 (1985).
- (18) 石井茂孝: 研究ジャーナル, **13**(5), 29-33 (1990).
- (19) D. A. Evans and J. E. Bravo: "Handbook of Plant Cell Culture", Vol. 1, 1993, pp. 124-176.
-