

微生物由来エチレン生成酵素の植物での発現に関する研究

Study of transgenic plants expressing a bacterial ethylene-forming enzyme.

荒木 誠士

Seishi ARAKI

要 約

植物がメチオニンからエチレンを生成するのに対し、微生物 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK 2 由来のエチレン生成酵素(EFE)は 2-オキソグルタル酸を基質としてエチレンを生成する。このエチレン生成酵素(EFE)をコードする *efe* 遺伝子とマーカー遺伝子である β -グルクロニダーゼ遺伝子(*gus*)の融合遺伝子 *efe-gus* 融合遺伝子をタバコに導入した。*efe-gus*融合遺伝子の導入より非形質転換体の 20 倍以上のエチレンを生成する形質転換体を得られ、植物体全体で *gus*遺伝子の発現が認められた。高量のエチレンを生成する形質転換タバコは、顕著なわい化症状等の形態異常を示した。

また、*efe-gus*融合遺伝子の制御にタバコBY 2 培養細胞の培養後期に発現するタバコアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*NtADH*) のプロモーターを用いた形質転換タバコを作成した。*NtADH*プロモーター制御下のエチレン生成と *gus*遺伝子の発現は根に限定されたが、無酸素条件下では茎でも誘導が認められた。

この結果は、微生物由来のエチレン生成酵素遺伝子 (*efe*) は植物組織において発現しエチレンを生成すること、*NtADH*プロモーターによって根で発現し、無酸素条件下では茎でも発現すること示した。

キーワード：エチレン、エチレン生成酵素、2-オキソグルタル酸、形質転換、アルコールデヒドロゲナーゼ

第1章 緒論

第1節 研究の背景

1 植物へのエチレンの作用

植物におけるエチレンは植物ホルモンとして多様な作用を持っている。^{1)~3)} その作用には、果実の成熟、落葉、落果など老化に関するもののほかに、病害感染時におけるキチナーゼや β -1-3-グルカナーゼ遺伝子等の感染防御遺伝子の発現の誘導、ウリ科植物における雌花形成の促進等の花の分化や形成、接触刺激による伸長抑制等があげられる。このようにエチレンは植物ホルモンとして利用する場合多くの有用と思われる作用を有している。^{1)~3)}

また、最近では分子生物学的にエチレンの作用が解析されてきている。ウリ科植物における雌花形成の促進では、雌性型のキュウリで混成型でみられない1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)合成酵素遺伝子 (*CS-ACS1G*) がクローニングされ、⁴⁾ また、蒲池らは混成型キュウリでACC合成酵素 (*CS-ACS2*) が早く誘導される

ほど下位節より雌花が形成され、雌花形成数と発現量に相関することを示した。⁵⁾

感染防御遺伝子の発現の誘導では、塩基性キチナーゼや β -1-3-グルカナーゼ遺伝子プロモーター領域にエチレン応答エレメント(ERE)のGCC-boxが存在することが明らかになっている。^{6) 7)}

これらのことより、エチレン生成量のコントロールによって、花の性の分化の制御や、感染防御遺伝子の誘導による病害抵抗性の向上等作物の改良が可能になると期待される。

2 植物における遺伝子組換え

植物の遺伝子組換えの方法には、DNAを直接植物細胞内に導入する方法と、植物病原菌である *Agrobacterium* がもつ植物の染色体に遺伝子を組み込む能力を利用した方法⁸⁾ がある。

DNAを直接導入する方法には、プロトプラストに電気パルスを与えて導入するエレクトロポレーションとDNA

を付着させた金粒子をヘリウムガス銃で打ち込むパーティクルガン法の2つの方法があげられる。

Agrobacterium 法は、*A. tumefaciens* のTiプラスミドから病原性の遺伝子を除き、植物に導入される領域をバイナリーベクターとし、バイナリベクターに導入する遺伝子を組み込んで、*Agrobacterium* を感染させることにより遺伝子を導入する方法である。現在、*Agrobacterium* 法は双子葉植物を中心に多くの植物種で導入の報告がある。

第2節 既往の研究

1 植物におけるエチレン生成と生成機構

高等植物におけるエチレンは、第1図に示すようにメチオニンからS-アデノシルメチオニン(SAM)、ACCを経て合成される。^{9) 10)} メチオニンから生成されたSAMはACC合成酵素(ACS)によりACCに変換され、エチレンはACCがACC酸化酵素(ACO)により酸化的に分解されることにより生成される。¹¹⁾ エチレンの生成は、主にACCの量に依存しており、エチレン生成活性とACSの細胞内活性が対応することから、ACSがエチレン生成を制御していると考えられている。¹¹⁾

2 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK2のエチレン生成酵素およびその遺伝子に関する研究

エチレンの生合成は、植物がL-メチオニンからACCを経て生成する経路のほかに、第1図に示すように微生物が全く異なった経路で生成することが知られている。微生物によるエチレン生成は、L-メチオニンから2-ケトメチルチオ酪酸(KMBA)を経由するもの¹²⁾ と、2-オキソグルタル酸(2-OG)から生成する¹³⁾ 2つの経路が知られている(第1図)。L-メチオニンからKMBAを経由して生成する経路を持つ微生物には、*Cryptococcus albidus*¹²⁾ などがあるが、最終段階を触媒する反応が酸素ラジカルを介した化学反応である。また、2-OGから生成する経路を持つ微生物には、*Penicillium digitatum* IF09372¹³⁾、*Fusarium oxysporum*¹⁴⁾ や*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK2¹⁵⁾ などがあり、そのうちの*P. syringae* pv. *phaseolicola* PK2のエチレン生成酵素(EFE)とその遺伝子については熊本工大(現、崇城大)で福田、小川らによって詳細な研究が行われてきている。

^{15)~18)}

長濱らは、1992年 *P. syringae* pv. *phaseolicola*

PK2からエチレン生成酵素の完全精製を行い、この生成酵素の性質を種々検討し、反応機構を解析した。¹⁹⁾ 一方、石原らは、*P. syringae* pv. *phaseolicola* PK2のエチレン生成酵素遺伝子(*efe*)のクローニングを試み、*efe*遺伝子が内在性プラスミドのうち最も小さい分子量のプラスミドpPSP1上にあり、1,050bpの*efe*遺伝子は350アミノ酸残基から成るタンパク質(分子量39,444)をコードしていることを明らかにした。²⁰⁾ また、坂井らは、CO₂からエチレンの生産を目的として、*efe*遺伝子をラン藻に導入した。^{21) 22)}

第3節 研究の目的と進め方

1 研究の目的

前述のごとく、エチレンの基質は、植物と微生物では異なっている。そこで、微生物由来のエチレン生成酵素遺伝子を植物(タバコ)に導入し、その発現と影響を解析する。また、エチレンの生成部位をコントロールできる可能性を調べ、植物の耐病性の向上した系統を作出する。

2 研究の進め方

研究の目的に従って、次のように具体的な研究の進め方を設定した。

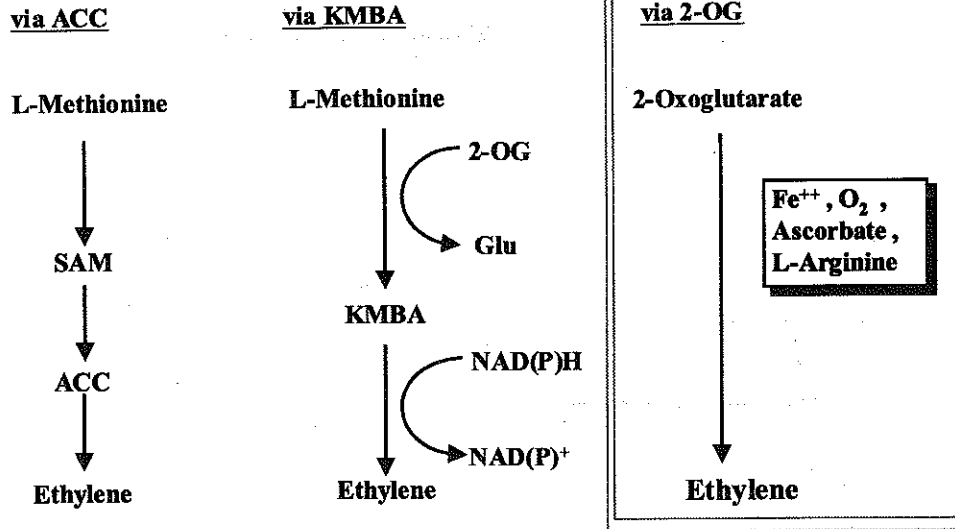
1) カリフラワーモザイクウイルス35SRNAのプロモーターを用いた微生物由来エチレン生成酵素遺伝子の植物(タバコ)における発現とその影響(第2章)。

2) タバコ液体培養細胞において培養後期に発現することが知られているアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(*NtADH*)のプロモーター^{23) 24)}を用いた微生物由来エチレン生成酵素遺伝子の発現の制御(第3章)。

本論文は以上のような流れで構成されている。

(A) Plants

(b) Microbes



第1図 植物および微生物におけるエチレン生合成経路

第2章 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK2 のエチレン生成酵素遺伝子のタバコにおける発現と影響

第1節 緒言

エチレン生成量のコントロールは、花の性の分化の制御や、感染防御遺伝子の誘導による病害抵抗性の向上等作物の改良に有用だと思われる。現在、エチレンに関する植物遺伝子組換えは、切り花や果実の日持ちを良くするため、ACC合成酵素遺伝子のアンチセンスを導入し、エチレン生成量の減少を目的とする研究が多い。²⁰⁾ しかし、前述したとおり、エチレンは多様な生理作用を持っており、菌やウイルスに対する病害抵抗性遺伝子の誘導においても重要であり、エチレン生成量の低下は病害抵抗性の低下など悪影響を示すことが考えられる。

P. syringae pv. *phaseolicola* PK2由来のエチレン生成酵素は、植物と異なりメチオニンからではなく、2-オキソグルタル酸からエチレンを生成する。また、植物の場合、メチオニンから生成されたSAMがACC合成酵素(ACS)によりACCに変換され、ACC酸化酵素(ACO)がACCを酸化的に分解することによりエチレンが生成される。一方、微生物*P. syringae* pv. *phaseolicola* PK2由来のエチレン生成酵素は2-オキソグルタル酸から1つの酵素でエチレンを生成する。また、2-オキソグルタル酸は、TCAサイクルの中間物質であり、エチレン生成の基質として十分量が存在すると考えられる。これらのことから、*P. syringae*のエチレン生成酵素をコードするエ

チレン生成酵素遺伝子 (*efe*) は植物のエチレン生成量の制御による有用な形質付与に有効であると考えられた。

*efe*遺伝子とマーカー遺伝子であるβ-グルクロニダーゼ(GUS)をコードする*gus*遺伝子の融合遺伝子を作成し、バイナリーベクターpBI121のカリフラワーモザイクウイルス35SRNA(CaMV35S)プロモーターの制御下に連結し、植物における*P. syringae*の*efe*遺伝子導入用のベクターを構築した。構築したベクターは、アグロバクテリウム法により植物に導入した。このとき導入植物には、モデル植物であるタバコ (*Nicotiana tabacum* var. *Samsun*) を使用した。導入後、植物における*efe*遺伝子の発現とエチレン生成、エチレン生成の形態等による影響、ならびに病害抵抗性に関与する2、3の酵素活性について検討した。

第2節 実験材料および方法

1 使用した植物種、菌株及びプラスミドベクター

大腸菌内でのタバコ発現プラスミドの構築に使用した菌株とプラスミドベクター、ならびに植物への*efe*遺伝子の導入に使用した植物種、菌株およびプラスミドベクターを第1表に示した。

第1表 使用した菌株およびプラスミド

(1)大腸菌株		(2)アグロバクテリウム菌株	
<i>E. coli</i> M109		<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	
<i>E. coli</i> JM109::pRK2013			
(3)植物体			
<i>Nicotiana tabacum</i> var. Samson			
(4)プラスミド			
pUC19	<i>lac</i> promoter, Ap ^r , ori(ColE1)		
pBI101	<i>gus</i> , Km ^r		
pBI121	CaMV35S promoter, <i>gus</i> , Km ^r		
pEFE01	<i>efe</i>		
pGUS	<i>gus</i>		
pEFEGUS	<i>efe-gus</i> , Km ^r		
pCaMVFEFEGUS	CaMV35S promoter, <i>efe-gus</i>		
pBICaMVFEFEGUS	CaMV35S promoter, <i>efe-gus</i> , Km ^r		

2 使用培地および培養方法

1) 大腸菌の使用培地および培養法

E. coli JM109株の培養には、Luria Bertani (LB) 培地 (第2表) を使用した。pBICaMVFEFEGUSを導入した*E. coli* JM109株は、カナマイシン50 μg/mlを添加したLB培地で37°C、一晩振とう培養した。

2) *Agrobacterium tumefaciens*の使用培地及び培養法

A. tumefaciens LBA4404株の培養にはLB培地を使用した。pBICaMVFEFEGUSを導入した*A. tumefaciens* LBA4404株は、カナマイシン50 μg/mlを添加したLB培地で30°C、一晩から2日間培養した。

3) タバコの使用培地および培養法

(1) 継代培養

タバコの継代培養には植物ホルモンを含まないMSF培地 (第3表)²⁶⁾ 40mlが入った450ml容 Mayoネズ瓶を使用した。タバコ植物体は1ヶ月毎に基頂を含む上位約3葉を切り取り新しい培養瓶に移植し継代培養した。

(2) タバコリーフディスクからの再分化

継代培養しているタバコ植物体の葉を直径9mmのコルクボーラーで打ち抜いてリーフディスクを作成し、再分化培地へ置いた。約1ヶ月後、リーフディスクからカルスをへて再分化したシュートをMSF培地40mlが入った450ml容 Mayoネズ瓶に移植した。

第2表 使用培地ならびに使用した溶液組成

(1) LB培地		(2) カナマイシン溶液	
Bacto Tryptone	10g/l	50mg/ml超純水 (1000倍濃度)	-20°C保存
Bacto Yeast ext.	5g/l		
NaCl	10g/l	(3) アンピシリン溶液	
pH	7.5	50mg/ml超純水 (1000倍濃度)	-20°C保存

第3表 タバコの培養における使用培地ならびに使用した溶液組成

(1) MSF培地			
MS培地			
ゲルライト	0.3%		
pH	5.8		
(2) タバコ再分化培地			
MS培地			
1-naphthalene acetic acid(NAA)	0.1 μ g/ml		
6-benzylaminopurine(BA)	1.0 μ g/ml		
ゲルライト	0.3%		
pH	5.8		
(3) Murashige Skoog (MS)培地			
MS-1溶液($\times 1,000$)	100ml/l		
鉄分溶液	10ml/l		
ビタミン・アミノ酸溶液	10ml/l		
ショ糖	30g/l		
(4) MS-1溶液 ($\times 10$)		(6) 鉄分溶液 ($\times 100$)	
NH ₄ NO ₃	16.5g/l	Na ₂ -EDTA	3.73g/l
KNO ₃	19g/l	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.78g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.4g/l		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7g/l		
KH ₂ PO ₄	1.7g/l		
MS-1-2溶液	10ml		
(5) MS-1-2溶液($\times 1,000$)		(7) ビタミン・アミノ酸溶液 ($\times 100$)	
H ₃ BO ₃	6.2g/l	myo-イノシトール	10g/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3g/l	グリシン	200mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6g/l	ニコチン酸	50mg/l
KI	830mg/l	塩酸ピリドキシン	50mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	250mg/l	塩酸チアミン	10mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	25mg/l		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	25mg/l		

3 発現プラスミドの構築方法

1) 植物における発現ベクターの構築

pBI101 (Toyobo社) から *gus* 遺伝子 (*Sma*I-*Sac*I フラグメント) を切り取り、pUC19 の同じサイトに挿入し pGUS を作成した。

P. syringae pv. *phaseolicola* PK2 よりクローニングされた *efe* 遺伝子を担う pEFE01²⁰⁾ より *efe* 遺伝子 OPR を PCR により増幅し、pGUS の *Xba*I-*Bam*HI サイトに挿入し、

pREFEGUS を作成した。

pREFEGUS の *Hind*III-*Xba*I サイトに pBI121 のカリフラワームザイクウイルス 35SRNA (CaMV35S) のプロモーターを挿入し pCamVEFEGUS を作成した。pCamVEFEGUS を *Hind*III-*Sna*BI で切断し、CaMV35S プロモーターと *efe-gus* 融合遺伝子のフラグメントを pBI101 の *Hind*III-*Sna*BI サイトに挿入し、pBICamVEFEGUS を作成した。

2) 大腸菌からのプラスミド抽出法

抗生物質を含む10mlのLB培地にプラスミドを保持する組換え大腸菌を1白金耳接種し、37℃で一晩培養した。培養には50ml培養遠心管を使用した。遠心分離 (10,000 rpm, 10min, 4℃) により集菌し、4mlの懸濁緩衝液を加えてボルテックスミキサーを用いて良く懸濁した。アルカリ溶液4mlを添加し穏やかに転倒混和し5分放置した。酢酸カリウム溶液4mlを加えて穏やかに転倒混和し、遠心分離 (15,000rpm, 10min, 4℃) し、上澄み液を新しい50ml培養遠心管に移した。10mlのクロロホルムを加えて10分間転倒混和し、遠心分離 (15,000rpm, 10min, 4℃) した。水層部分を注意深く新しい15ml培養遠心管に移し、等量のプロパノールを加え転倒混和し、-20℃で2時間静置した。遠心分離 (15,000rpm, 10min, 4℃) し、上澄み液を除いた後、沈殿を70%エタノールでリンスした。風乾後、200 μ lのTE 緩衝液に溶解した。その後、フェノール・クロロホルム抽出2回、クロロホルム抽出1回を行い、エタノール沈殿を行った。

沈殿は70%エタノールでリンスした後、減圧乾燥し100 μ lのTE 緩衝液に溶解した。試薬は特級試薬を使用し、Milli-Q (ミリポア社製) による超純水を用いて調整した。調整した溶液は、オートクレーブ (121℃, 15 min) を行った。

3) アガロース電気泳動法

(1) アガロースゲルの作成

目的の濃度になるように三角フラスコにアガロースを計りとりTAE緩衝液またはTBE緩衝液 (第4表) に加え加熱溶解した。溶解後、50~60℃まで冷えたら型に流しこみコームを挿入後、室温で固化した。

(2) 電気泳動

電気泳動槽にゲルをセットし、TAE (またはTBE) 緩衝液をゲルが浸かるまで加えた。試料を添加後、定電圧 (50V~100V) をかけ泳動した。

(3) ゲルの染色

泳動後、ゲルを取りだし、染色液 (第4表) に20分以上浸して染色した。水で脱色後、トランスイルミネーター (300nm)、またはゲル撮影装置 (ATTO社製) で観察した。

4 タバコの形質転換法

1) *A. tumefaciens* の形質転換法

バイナリベクターpBICaMVEFEGUSの*A. tumefaciens*への導入には、triparental mating method²⁷⁾を用い、使用した菌株は、第5表に示した。2種類の*E. coli*と*A. tumefaciens* LBA4404株を2mlの抗生物質を添加したLB培地に植え、*E. coli*は37℃で、*A. tumefaciens*は28℃で1晩培養した。それぞれ遠心 (5,000rpm, 5min, 室温) し、上澄み液を捨て沈殿をLB培地1mlに懸濁した。再度遠心し、沈殿をLB1mlに懸濁した。3種類の菌をLB寒天培地上に100 μ lずつ混合してまき、28℃で1日培養した。コロニーをスパーテルでかきとり、10mM MgSO₄ 1mlに懸濁し、カナマイシン25 μ g/ml、リファピシン100 μ g/ml、ストレプトマイシン300 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布した。28℃で1日培養し単一コロニーを選択した。

2) タバコへのアグロバクテリウム法による形質転換

タバコの形質転換は、Horschらによるリーフディスク法で行った。²⁸⁾ 継代培養しているタバコ植物体の葉を直径9mmのコルクボーラーで打ち抜きリーフディスクを作成した。pBICaMVEFEGUSを保持する*A. tumefaciens* LBA4404株をLB培地で一晩培養し、培養液を感染培地 (第6表) で10倍に希釈した。希釈した培養液にリーフディスクを15分浸漬した。余分な液を滅菌濾紙で除いた後、第6表に示した共存培地に置き3日間弱光下で培養した。感染処理したリーフディスクは、カナマイシン100 μ g/ml、セフトキシム250 μ g/mlを添加した選抜培地 (第6表) に移植し26℃、連続照明下で培養した。約1ヶ月後に、リーフディスクから再分化してきたシュートは、カナマイシン200 μ g/mlとセフトキシム250 μ g/mlを添加したホルモンフリーのMS培地に移植し選抜した。

第4表 アガロース電気泳動に使用した試薬組成

(1) TAE緩衝液		(2) TBE緩衝液	
Tris-acetic acid (pH8.0)	40mM	Tris	89mM
EDTA	1mM	EDTA	2mM
		Boric acid	89mM
(3) 染色液			
TAE緩衝液			
エチジウムブロマイド	0.5 μ g/ml		

第5表 *A. tumefaciens*の形質転換に使用した菌株

導入株	
<i>A. tumefaciens</i> LBA4404株 (streptomycin(Sm)、rifampicin(Rif) 耐性)(26)	
伝達因子保持株	
<i>E. coli</i> JM109::pRK2013 (Kanamycin(Km)耐性)	
バイナリーベクター保持株	
<i>E. coli</i> JM109::pBICaMVEFEGUS (Km耐性)	

第6表 タバコの形質転換培地組成

(1) 感染培地	
MS培地(第3表参照)	
1-naphthalene acetic acid(NAA)	0.1 μ g/ml
6-benzylaminopurine (BA)	1.0 μ g/ml
pH	5.2
(2) 共存培地	
MS培地(第3表参照)	
1-naphthalene acetic acid(NAA)	0.1 μ g/ml
6-benzylaminopurine (BA)	1.0 μ g/ml
グルコース	10g/l
ゲルライト	0.2%
pH	5.2
(3) 選抜培地	
MS培地(第3表参照)	
1-naphthalene acetic acid(NAA)	0.1 μ g/ml
6-benzylaminopurine (BA)	1.0 μ g/ml
カナマイシン	100 μ g/ml
セフトキシム	200 μ g/ml
ゲルライト	0.3%
pH	5.8
(4) カナマイシン溶液	
100mg/ml超純水(1000倍濃度) -20℃保存	
(5) セフトキシム溶液	
100mg/ml超純水(500倍濃度) -20℃保存	

5 GUS染色による導入遺伝子発現の確認方法

GUS染色はJeffersonらの方法²⁹⁾を改変したKosugiらの方法を用いた。³⁰⁾ 葉および茎の切片は、固定液(第7表)に浸し真空ポンプで減圧下に浸し固定化した。根の場合は固定化を省いた。リン酸ナトリウム緩衝液(pH

7.0)で洗浄後、X-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid)溶液(第7表)に浸し、37℃で一晩インキュベートした。葉および茎の切片はエタノールに漬浸し、クロロフィルを除き、青色の染色を観察した。

第7表 GUS染色に使用した試薬

(1) リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0)	50mM (final concn.)
(2) 固定液	
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0)	50mM (final concn.)
ホルムアルデヒド	0.3%
(3) X-Gluc溶液	
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0)	50mM (final concn.)
X-Gluc	1mM (final concn.)
メタノール	20%

6 エチレン生成量の測定法

タバコ植物体全体のエチレン生成量の測定には、MSF培地40mlを入れた450ml培養瓶で13~16日培養した形質転換タバコと野生型タバコを使用した。エアーポンプで無菌空気を5分間送り込み、培養瓶内の空気を置換した。培養瓶の蓋を気相を採取するためのシリコンゴム栓付きの蓋に換えて25℃で24時間培養した。培養瓶内の気相を0時間と24時間培養後にガスタイトシリンジで1ml、採取し第8表の条件でガスクロマトグラフィー(Yanaco GC 3800)で分析した。

植物体全体のエチレン生成量を測定後、地上部を切り取り、ゴム栓付きの30mlのフラスコに移した。培養瓶内の根は培養瓶内を再び無菌空気で置換後蓋をし、18時間25℃で培養した。フラスコ内と培養瓶内の気相をそれぞれ0時間と18時間培養後に1ml採取しガスクロマトグラフィーで分析した。

第8表 ガスクロマトグラフィーの条件

Column packing	: Active alumina
Column length	: ϕ 3mm \times 2m
Column Temp.	: 120℃
Injection Temp.	: 165℃
Carrier gas	: N ₂ (40ml/min.)
Detector	: FID

7 PCRによる導入遺伝子の確認方法

1) タバコからのDNA抽出法

エチレン生成酵素 (EFE) 遺伝子を導入したタバコは、DNA抽出の阻害要因である多糖類やポリフェノールを排除する操作を追加したWagnerらの方法³¹⁾を改良した向

井らの方法³²⁾を用いた。抽出に使用した試薬は第9表に示した。

タバコの葉を切り取り秤量後、乳鉢に移し液体窒素中で粉碎した。遠心管に試料の10倍量の氷冷した Isolation緩衝液を入れ、粉碎した葉を加えた。氷上で攪拌後、遠心分離 (15,000rpm, 10min, 4℃) し上澄み液を除いた。沈殿に試料の5倍量のLysis緩衝液を加え、よく攪拌した後、液量の1/10倍量の10% Sarcosineを加え、室温に10分間放置した。等量の2×CTAB溶液を加え、65℃で10分間インキュベートした。等量のクロロホルム液を加え、穏やかに攪拌した後、遠心分離 (15,000rpm, 10min, 室温) した。水相を分取し、等量のイソプロノールを加え、穏やかに攪拌した後、遠心分離 (15,000rpm, 10min, 4℃) した。上澄み液を除き沈殿を軽く風乾させた後、適量のTEに溶解した。フェノール抽出を2回、フェノール/クロロホルム抽出を1回行い、水相に等量のイソプロパノールを加え遠心分離 (15,000rpm, 10min, 4℃) した。70%エタノールで洗浄後、遠心分離 (15,000rpm, 5min, 4℃) し、沈殿を真空乾燥させた後、TE緩衝液に溶解した。

第9表 分離緩衝液組成

(1) Isolation緩衝液	
Polyethylene glycol (M.W. 6,000)	10%
Sorbitol	0.35M
Tris-HCl (pH8.0)	0.1M
β -mercaptoethanol	2%
(2) Lysis緩衝液	
Sorbitol	0.35M
Tris-HCl (pH8.0)	0.1M
β -mercaptoethanol	2%
(3) L-Sarcosine	
	10%
(4) 2×CTAB溶	
Cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB)	2%
Tris-HCl (pH9.5)	0.1M
EDTA	20mM
NaCl	1.4M
β -mercaptoethanol	0.5%
(5) TE 緩衝液	
Tris-HCl (pH8.0)	10mM
EDTA	1mM
(6) クロロホルム液(クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1)	

2) プライマーおよびPCRの条件

形質転換により得られたタバコ植物において、*efe-gus* 融合遺伝子の導入を確認するため、PCRによる分析を行った。プライマーの合成は、TAKARA社に外注した。

(1) *efe*遺伝子領域(約1,000bp)増幅のためのプライマー
EFE-1(センスプライマー)

5' -CTC TAG AGA TGA CCA ACC TAC AGA CTT TCG AG-3'
(32mer)

EFE-2(アンチセンスプライマー)

5' -GGG ATC CTC TGA GCC TGT CGC GCG GGT GTC-3'
(30mer)

(2) *efe-gus*融合遺伝子(約1,700bp)増幅のためのプライマー

EFE-1(センスプライマー)

5' -CTC TAG AGA TGA CCA ACC TAC AGA CTT TCG AG-3'
(32mer)

GUS-1(アンチセンスプライマー)

5' -GTC CAG TTG CAA CCA CCT GTT G-3' (22mer)

(3) PCR条件

PCR反応液組成(第10表)、PCR反応条件を第11表に示した。PCR装置は、Gene Amp PCR System 2400(PERKIN ELMER社製)を使用した。

第10表 PCR反応液組成

genomic DNA(約20~50ng)	1 μ l
センスプライマー(100pmol)	1 μ l
アンチセンスプライマー(100pmol)	1 μ l
2mM dNTP	8 μ l
Amp Taq	0.5 μ l
10×Amp Taq 緩衝液	10 μ l
滅菌水	78.5 μ l
Total	100 μ l

第11表 PCR反応条件

94°C	5 min	1 cycle
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	35 cycles
72°C	1 min	

使用機器 : Gene Amp PCR System 2400
(PERKIN ELMER社製)

8 サザンブロットング法

サザンブロットングにおける、プローブの標識およびバンド検出は、AlkPhos Direct System (Amersham社製) を使用した。

1) DNAの制限酵素処理とアガロース電気泳動

ゲノムDNA抽出は、7-1)「タバコからのDNA抽出法」(8ページ)の方法で行った。ゲノム DNA 5 μg を *Hind*III または *Eco*RI で切断し、0.6%アガロースで電気泳動した。

2) サザンブロットング

ナイロンメンブレンは、Hybond-N⁺ (Amersham社製) を使用した。ナイロンメンブレンへの転写は、アルカリブロットング法を用いた。

3) ハイブリダイゼーションおよび検出

プローブはPCRで増幅した1kbの *efe* 遺伝子の断片を使用した。プローブの標識、ハイブリダイゼーションおよび検出は、AlkPhos Direct Systemのマニュアルに従った。メンブレンはしわがよらないようにラップをかけ、感光カセットに入れX線フィルムに30分~2時間感光させて検出した。

9 2-オキシグルタル酸およびメチオニンの培地への添加実験

efe 遺伝子を導入した形質転換タバコを2-オキシグルタル酸およびメチオニンを0、0.1、1、10mM含む培地に移植した。1ヶ月培養後、形態およびエチレン生成量を測定した。

10 酵素活性の測定法

1) キチナーゼ

(1) 粗酵素液の調製

組織0.5gを50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) 10ml中でホモジナイズした。不溶物を除くため遠心分離 (10,000×g、30min、4°C) し、上澄み液を新しいチューブに移した。上澄み液に硫酸 (乳鉢で粉碎しておく)

を20%飽和になるように加え、良く溶かし、遠心分離 (10,000×g、20min、4°C) した。上澄み液を新しいチューブに移し、上澄み液に乳鉢で粉碎した硫酸80%飽和になるように加え良く溶かした。一晚静置 (4°C) 後、遠心分離 (10,000×g、20min、4°C) し、上澄み液を捨て沈殿を2.5mlの50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) に溶解した。抽出緩衝液25mlで平衡化したPD10ゲル濾過カラム (ファルマシア社製) にアプライし、初めの溶出液2.5mlを捨てた。抽出緩衝液3.5mlをアプライし、溶出液3.5mlを新しい15mlチューブに採取した。これを粗酵素液とした。

(2) 活性の測定

10ml試験管に基質溶液1ml (第12表) を入れ32°Cに加熱した。粗酵素液 (10~50 μl) を添加し、1~2時間、37°Cで反応させた。糖呈色液2mlを添加し、ビー玉で蓋をして、沸騰水中で15分間加熱した。冷水につけて冷却後、吸光度 (420nm) を分光光度計で測定した。コントロールは、基質溶液に糖呈色液を入れその後、酵素液を加えたものとした。活性はN-アセチルグルコサミンの生成量で示した。なお活性の表示は μmol/mgprotein/h で表した。

2) ペルオキシダーゼ

(1) 粗酵素液の抽出

0.2gの組織を秤量し乳鉢へ移し、抽出緩衝液 (第13表) 1mlを加え乳鉢ですりつぶした。1.5mlチューブに移し、遠心分離 (14,000×g、20min、4°C) し、上澄み液を新しいチューブに移した。PD10ゲル濾過カラム (ファルマシア社製) で脱塩し、粗酵素液とした。

(2) ペルオキシダーゼ活性の測定

反応緩衝液 (第13表) 3mlに酵素液100 μlを加え、吸光度 (666nm) を測定した。3.5% H₂O₂を3 μl添加し (終濃度0.1mM H₂O₂)、吸光度 (666nm) を0、5、10分後に測定した。活性はブランクとの吸光度 (666nm) の差で示し、A666 /min/mgproteinで表示した。

3) フェニルアラニンアンモニアリアーゼ

(1) 粗酵素液の調製

0.2gの組織を秤量し乳鉢に移し、抽出緩衝液 (第14表) 1mlを加えすりつぶし、遠心分離 (14,000×g、20min、4°C) した。上澄み液を新しいチューブに移し、再度遠心分離し上澄み液を粗酵素液とした。

(2) フェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性測定

反応緩衝液 (第14表) に粗酵素液を加えtotal volumeを3mlにした。40°C、1時間インキュベートし、吸光度 (290nm) を分光光度計で測定した。活性はケイ皮酸の生

成量 (nmol) で示した (nmol/h/mgprotein)。なお、ブランクは、10mM L-フェニルアラニンを除いたものを使用した。

りだし、根から培地を注意深く取り除き水道水で洗浄した。培養瓶から取り出した形質転換タバコは、野菜育苗用の培土をいれた直径12cmの黒ビニールポットに移植した。1ヶ月後、野菜育苗用の培土をいれた1/2000アールのワグネルポットに移植し、栽培を行った。

11 閉鎖系温室における栽培試験方法

1) 栽培条件

*efe*遺伝子を導入した形質転換タバコの栽培は、閉鎖系温室でおこなった。MSF培地で1ヶ月毎に継代している *efe*遺伝子を導入した形質転換タバコを培養瓶から取

2) 特性調査

草丈、最大葉の長さおよび幅、葉の数、節間の長さを計測した。

第12表 キチナーゼ活性測定に使用した試薬

(1) リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0)	50mM
(2) 基質溶液	
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0)	50mM
グリコールキチン	0.05%
(3) 糖呈色液	
炭酸ナトリウム	50mM
フェリシアン化カリウム	0.37mM

第13表 ペルオキシダーゼ活性測定に使用した試薬

(1) 抽出緩衝液	
リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0)	50mM
EDTA	0.1mM
アスコルビン酸ナトリウム	1mM
KCl	0.2M
グリセロール	20% (W/V)
(2) 反応緩衝液	
リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0)	50mM
10-(carboxymethylaminocarbonyl)-3,7-bis(dimethylamino)-phenothiazine sodium salt (DA67)	0.1mM
(3) 過酸化水素水	3.5%

第14表 フェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性測定に使用した試薬

(1) 抽出緩衝液	
N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-	0.1M
3-propanesulfonic acid (HEPPS)-	
KOH緩衝液 (pH8.5)	
β-メルカプトエタノール	10mM
ピリドキサルリン酸	10 μM
(2) 反応緩衝液	
HEPPS-KOH緩衝液 (pH8.5)	50mM
L-フェニルアラニン	10mM

第3節 結果

1 発現プラスミドの構築

石原らによって構築されたpEFE01の*efe*遺伝子とpBI101の*gus*遺伝子を融合した、*efe-gus*融合遺伝子を作成し、CaMV35Sプロモーターにつなぎ、pBI101に挿入し、pBICaMVEFEGUSを構築した。第2図にpBICaMVEFEGUSの構造を示した。

2 エチレン生成酵素遺伝子のタバコへの導入とPCRによる導入遺伝子の確認

CaMV 35Sプロモーターの支配下に*efe-gus*融合遺伝子を置いた組換えプラスミドpBICaMVEFEGUSを保持する *A. tumefaciens* LBA4404をタバコリーフディスクに感染させた。感染後、タバコリーフディスクをカナマイシン100mg/l、セフトキシム250mg/lを含む再分化培地に移植した。移植後2週間後から再分化した22系統の植物体をMSF培地に移植した。以後1ヶ月毎に選抜のためカナマイシンを添加したMSF培地で継代培養を行った。カナマイシン添加培地における根の旺盛な成長を基準に選抜した結果、第15表に示すように12系統の形質転換体が得られた。

カナマイシンにより選抜した12系統のDNAを抽出し、*efe*遺伝子の全長を増幅するように設計したプライマーによるPCRを行った結果、10系統で*efe*遺伝子の導入が確認された(第3図(A))。

PCRによって*efe*遺伝子の導入が確認できなかったC-4、E-2は、カナマイシン添加培地では正常な成長をしているため、カナマイシン抵抗性遺伝子のみ導入されている

と考えられた。

3 エチレン生成酵素遺伝子導入による形態変化

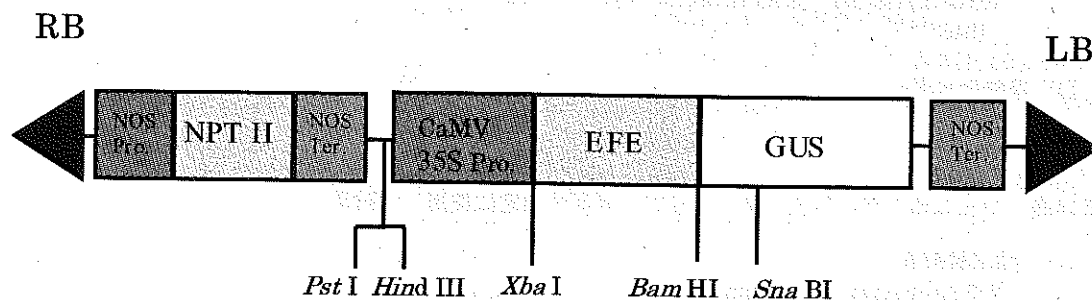
この10系統には、非形質転換体とほとんど同じ形態のもの、形態異常を示すものが得られた。また、中間的症状を示す系統も得られた。

- 顕著な形態異常としては次のような症状がみられた。
- (1) 地上ではわい化症状が現れ、節間が短くなり草丈が低くなった。
 - (2) 葉は小さくなり、波打った。
 - (3) 根は径が太くなり、根数は減少した。
 - (4) 根毛が多発し、根の組織は脆くなった。
 - (5) 長期間の培養では土際からカルス化症状が見られた。

野生型と同じ形態を示す系統(A-5、M-5)、強く形態異常を示す系統(K-2)、中間的な形態を示す系統(B-2)を選抜した。

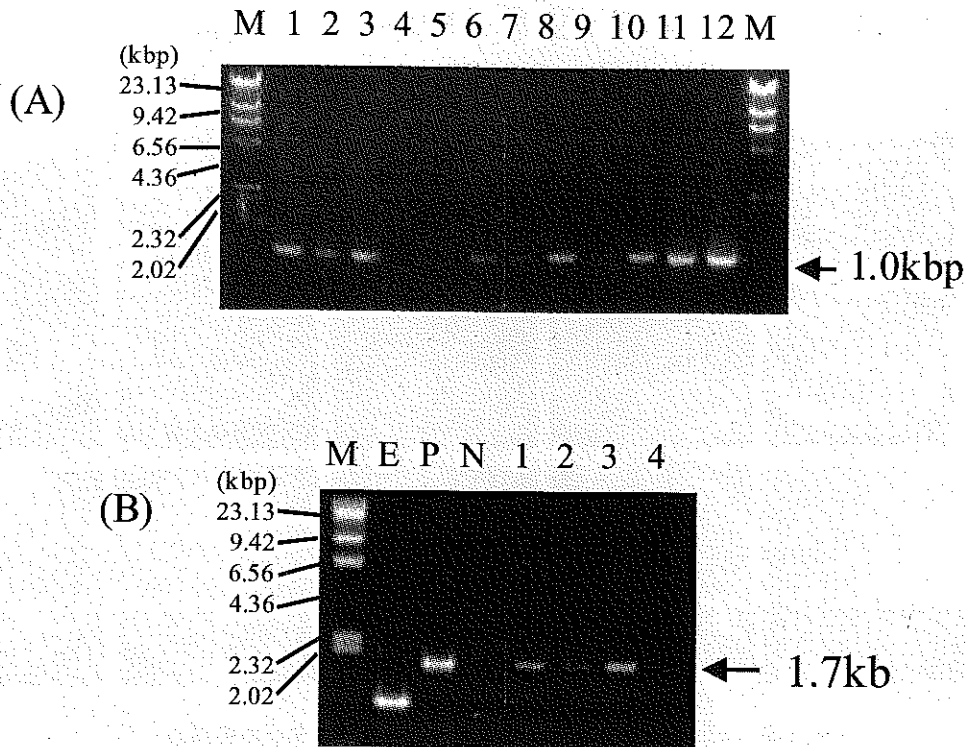
*efe*遺伝子の全長と*gus*遺伝子の一部の1.7kbを増幅するように設計したプライマーによるPCRを行った結果、4系統で*efe-gus*融合遺伝子の導入が確認された(第3図(B))。

非形質転換体とほとんど同じ形態を示す系統(A-5、M-5)、形態異常を示す系統(K-2)、中間的な形態を示す系統(B-2)の形態を第4図に示した。K-2は、わい化し、葉が小さくなり波打つ等、典型的な形態異常を示した。A-5およびM-5は、M-5が草丈が高い傾向がみられたが、ほとんど野生型と同じ形態を示した。B-2は、K-2よりも弱い、形態異常の表現型を示した。



第2図 pBICaMVEFEGUSの構造

- NOS Pro. : ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター
- NOS Ter. : ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター
- NPT II : カナマイシン耐性遺伝子
- CaMV35Spro. : カリフラワーモザイクウイルス35SRNA遺伝子プロモーター
- EFE : エチレン生成酵素(EFE)遺伝子
- GUS : β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子
- RB : T-DNAのライトボーダー
- LB : T-DNAのレフトボーダー



第3図 形質転換タバコのPCR産物の電気泳動

(A) 1.0kb *efe*遺伝子の増幅. プライマー: EFE1とEFE2

lane M, λDNA cut with *Hind*III as a maker;

lane 1, A-5; lane 2, B-2; lane 3, C-1; lane 4, C-4;

lane 5, E-2; lane 6, F-2; lane 7, F-4; lane 8, H-4;

lane 9, I-1; lane 10, K-2; lane 11, M-5; lane 12, P-2;

(B) 1.7kb *efe-gus*融合遺伝子の増幅. プライマー: EFE1とGUS1

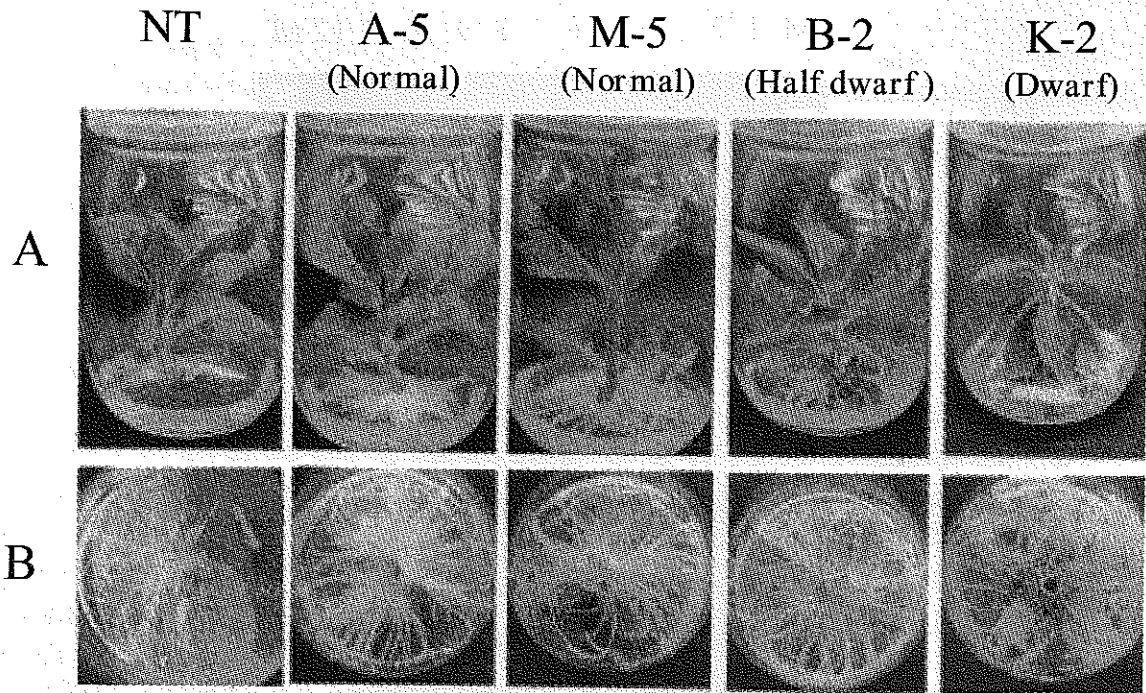
lane E, 1.0kb *efe* gene amplified using EFE1 and EFE2 primers.;

lane P, 1.7kb region of *efe-gus* fusion gene amplified using EFE1 and GUS1 primers.;

lane N, non-transformant; lane 1, A-5; lane 2, M-5; lane 3, B-2; lane 4, K-2.

第15表 *efe-gus* 融合遺伝子導入タバコ系統の特性

Lines	Morphology	<i>efe</i> gene
A-5	Normal	Positive
B-2	Half dwarf	Positive
C-1	Normal	Positive
C-4	Normal	Negative
E-2	Normal	Negative
F-2	Dwarf	Positive
F-4	Dwarf	Positive
H-4	Dwarf	Positive
I-1	Normal	Positive
K-2	Dwarf	Positive
M-5	Normal	Positive
P-2	Normal	Positive



第4図 *efe-gus*融合遺伝子を導入した形質転換タバコの形態

A: 植物体全体; B: 根

4 GUS染色による導入遺伝子発現の確認

*efe*遺伝子と融合遺伝子を形成している *gus*遺伝子の発現を葉・茎横断面・根で観察した結果、第5図に示すように強い形態異常を示した系統 (K-2) では葉・茎横断面・根の全てでGUSの発現が認められた。葉では表面の全面で強く発現した。茎では、維管束部分のみで強く発現していた。また、維管束部分が肥大していた。根では根端部で強く発現した。B-2系統は、葉、および茎横断面で GUSの発現が認められた。

5 エチレン生成量の測定

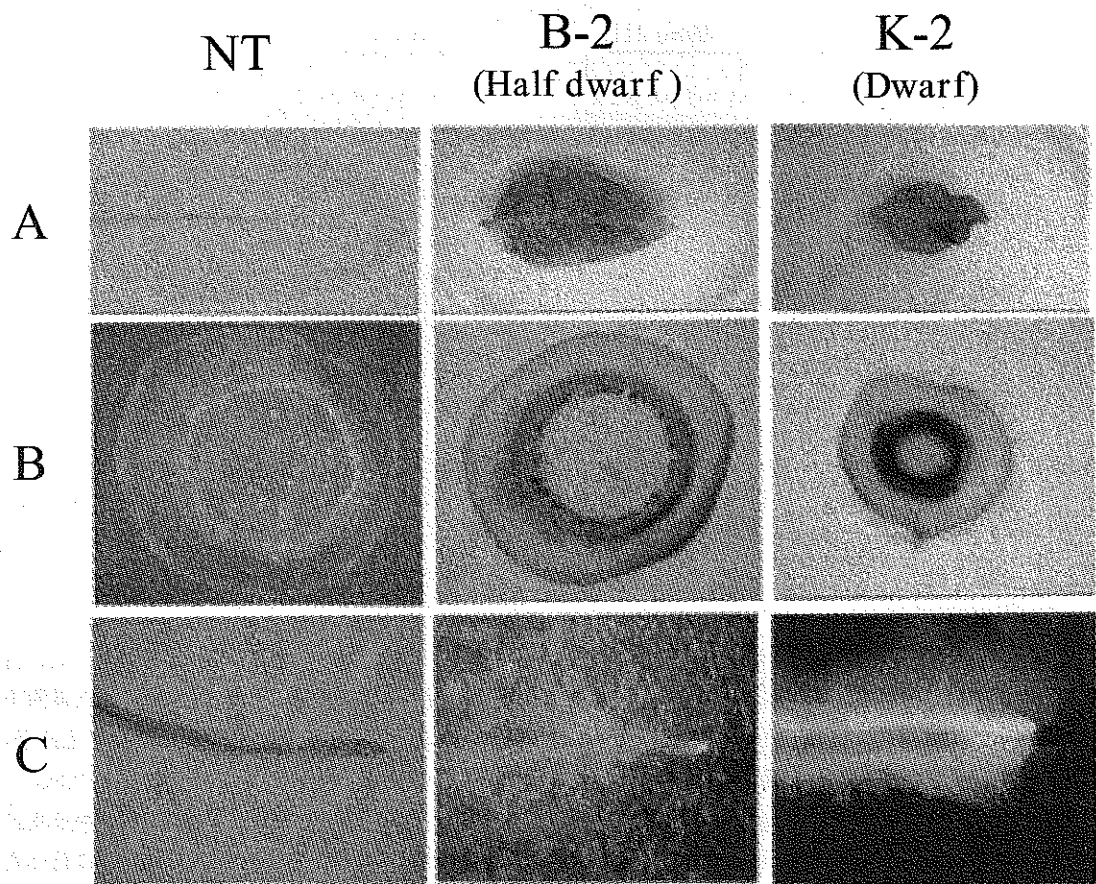
4系統 (A-5、M-5、B-2、K-2) のエチレンの生成量を植物体全体および切り取った葉と根を用いて測定し、結果を第6図に示した。植物体全体のエチレン生成量ではA-5、M-5の生成量は野生型と変わらなかったが、K-2は野生型の20倍以上のエチレンを生成していた。B-2は約6倍のエチレンを生成していた。

葉でのエチレン生成量は、植物体全体のエチレン生成量と同じ傾向を示した。根では、野生型とM-5はほとんどエチレンを生産しなかったのに対し、A-5とB-2は、少量のエチレン生成が観られ、K-2は根においても多量のエチレンを生成していた。

6 サザンブロッティングによる導入遺伝子のコピー数の確認

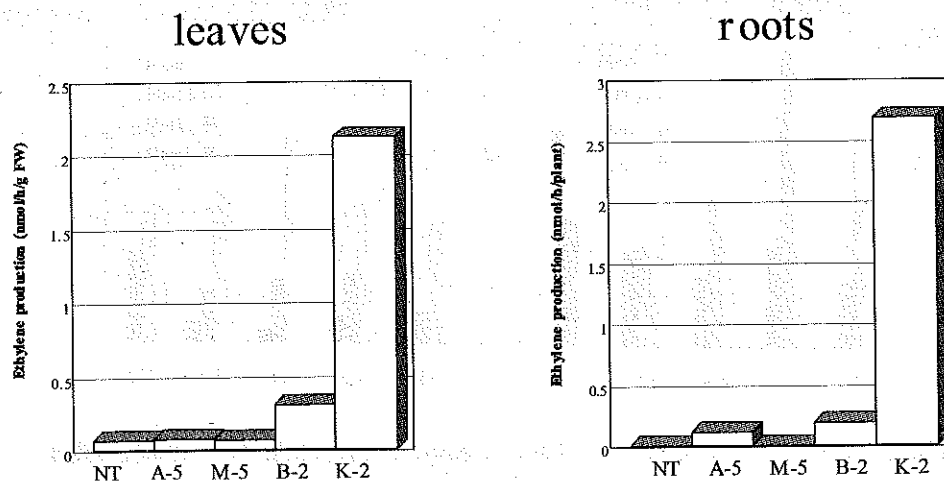
*HindIII*による切断では、M-5とK-2が1本、A-5が2本、B-2が6本のバンドが見られた (第7図)。

*EcoRI*による切断では、A-5、M-5、B-2が2~3本、K-2が1本のバンドが見られた (第7図)。

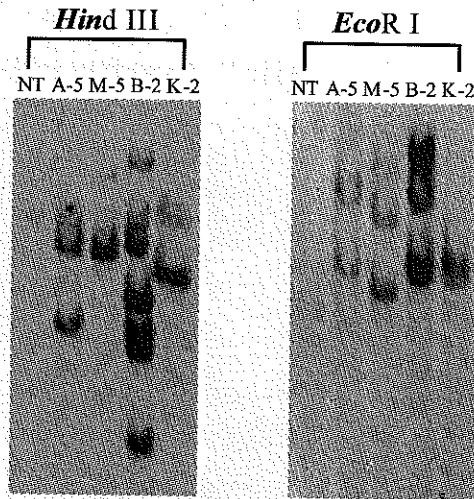


第5図 形質転換体の GUSの組織化学的活性

A: 葉全体; B: 茎の横断面; C: 根



第6図 *efe-gus*融合遺伝子を導入した形質転換タバコのエチレン生成量



第7図 形質転換体のサザンブロット分析

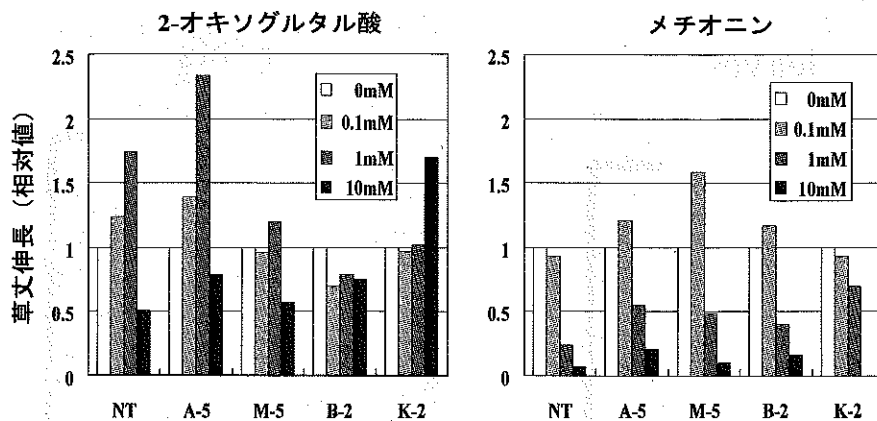
7 2-オキソグルタル酸およびメチオニンの培地への添加の効果

エチレン生成酵素の基質である2-オキソグルタル酸を0.1mM、1mM、10mMの濃度でMSF培地に添加した。この培地に野生型と形質転換体4系統 (A-5、M-5、B-2、K-5) を移植し培養した。野生型では、0.1mM、1mMでは、伸長が良くなる傾向を示したが、10mMでは伸長を抑制した(第8図)。形質転換体でも同様の傾向を示したが、K-2だけは1mMまでは影響をほとんど受けず10mMで伸長が促進さ

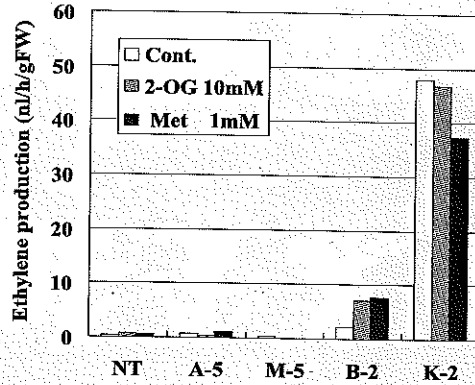
れた。

これらのエチレン生成量を測定した結果を第9図に示した。野生型と形質転換体のエチレン生成量は無添加(第9図)と同様の傾向を示し、2-オキソグルタル酸の添加によるエチレン生成量の変化はなかった。

また、L-メチオニンの添加も同様に行ったが、全ての系統で1mMで伸長を抑制し、10mMで枯死した(第8図)。エチレン生成量も、2-オキソグルタル酸と同様にエチレン生成量に変化はなかった(第9図)。



第8図 2-オキソグルタル酸およびメチオニン添加による形質転換タバコの草丈伸長度



第9図 2-オキソグルタル酸およびメチオニン添加による形質転換タバコのエチレン生産量の変化

2-OG: 2-オキソグルタル酸; Met: メチオニン

8 酵素活性の変化

1) キチナーゼ

多量のエチレン生成を示した系統 (K-2) は、野生型に対し約5倍のキチナーゼ比活性 (Totalタンパク質当たり) の上昇が認められた (第16表)。

2) ペルオキシダーゼおよびフェニルアラニンアンモニアリアーゼ

ペルオキシダーゼとフェニルアラニンアンモニアリアーゼの酵素活性は、エチレン生成量の増加による比活性の上昇は認められなかった。

第16表 形質転換タバコのキチナーゼ活性

系統	キチナーゼ比活性 ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{h}$)	相対活性
Wild type	0.65	1.0
A-5	0.53	0.8
M-5	0.38	0.6
B-2	1.00	1.5
K-2	3.13	4.8

9 閉鎖系温室栽培における特性調査

形態異常を示す系統 (K-2) は、温室内でもわい化し第10図に示すように極端に節間短くなり、葉が小さくなり波打つ等、典型的な形態異常を示した。中間的な症状を示した系統 (B-2) は、温室内でも中間的な症状を示した。着花は認められたが、落花が著しかった。

また、ほとんど野生型と同じ形態を示していたM-5は、培養瓶内で草丈が高い傾向がみられたが閉鎖系の温室で栽培した結果、節間長が長くなる傾向を示した (第17表)。

第17表 隔離温室で栽培した形質転換タバコの特性

系統	節間の数	平均節間長
Wild type	23	35mm
A-5	32	29mm
M-5	20	43mm
B-2	24	22mm
K-2	68	4.3mm



WT A-5 M-5 B-2 K-2



K-2



B-2

第10図 隔離温室で栽培した形質転換タバコ

第4節 考察

現在、エチレンの生成の制御に関する研究は、エチレンを抑制する研究が多く行われている。²⁸⁾ Grierson らは、ACC酸化酵素遺伝子のアンチセンスのトマトへの導入でエチレン生成量が抑制され、トマト果実が熟するのが遅れることを示し²⁹⁾、また、Klee らは、*Pseudomonas*の ACC デアミナーゼを導入したトマトでエチレン生成量が抑制されたことを報告した。³⁰⁾ これらの研究は、遺伝子操作によるエチレン生成の抑制が、植物の改良に役に立つことを示している。

一方、形質転換植物でのエチレン生産の改良が病害抵抗性に関連する遺伝子の発現を促進するという報告³¹⁾があったにもかかわらず、今までのところエチレン生成を積極的に利用する試みはなされてこなかった。

今回の実験で、*P. syringae* pv. *phaseolicola* PK2

のエチレン生成酵素遺伝子(*efe*)をタバコに導入し、導入した*efe*遺伝子がタバコにおいて発現し、エチレン生成量を野生型の20倍以上にまで増大させて、その形態に大きな影響を及ぼすことを示した。細菌の*efe*遺伝子を導入した系統には、非形質転換体とほとんど同じ形態の系統、形態異常を示す系統、さらに、中間的症状を示す系統が存在した。

*efe*遺伝子を導入した組換えタバコにおいて、顕著な形態異常としては次のような症状がみられた。

- (1) 地上ではわい化症状が現れ、節間が短くなり草丈が低くなった。
- (2) 葉は小さくなり、波打った。
- (3) 根は径が太くなり、根数は減少した。
- (4) 根毛が多発し、根の組織は脆くなった。
- (5) 長期間の培養では地際からカルス化症状が見られ

た。

これらの形態異常は、形態異常を強く示す系統ほどエチレン生成量が多く *efe* 遺伝子と融合遺伝子を形成しているマーカー遺伝子 *gus* の発現も強く認められることから、今回導入した *P. syringae* pv. *phaseolicola* PK2 の *efe* 遺伝子の発現によりエチレン生成量が増加した結果であると考えられた。

導入系統の中から野生型と同じ形態を示す系統 (A-5、M-5)、強く形態異常を示す系統 (K-2)、中間的形態を示す系統 (B-2) を選抜し、サザンハイブリダイゼーションによる分析をした結果、野生型と同じ形態を示す系統 (A-5、M-5) は 2~3 コピーの導入、中間的形態を示す系統 (B-2) は、6 コピー以上の導入が認められたが、一方、強く形態異常を示す系統 (K-2) は、シングルコピーの導入と考えられた。

植物の遺伝子導入の場合、導入した遺伝子が複数の場合、発現が抑制されることが知られている。Hobbsらは、タバコへの *gus* 遺伝子の複数コピーの導入は、1コピー導入よりも GUS の発現が低くなることを報告した。³⁶⁾ また、Linnらは、トウモロコシの A1 遺伝子を導入したペチュニアにおいて、A1 遺伝子の 1 コピー導入のときは発現したのに対し、A1 遺伝子の複数導入の場合、発現が認められなかったことを報告し、その理由として、メチル化等によるジーンサイレンシングのためと考えている。³⁷⁾ これらの例は、今回の形質転換タバコにおいて *efe* 遺伝子の一つのコピー挿入が K-2 系統であり、複数の挿入を示した B-2 系統よりもエチレン生成において優れていたことと同じ現象と考えられる。野生型と同じ形態を示す系統

(A-5、M-5)、中間的形態を示す系統 (B-2) の導入された *efe* 遺伝子のコピー数は、A-5、M-5 は 2~3 コピー、B-2 は 6 コピーであり、複数コピー導入によるジーンサイレンシングが生じた結果、*efe* 遺伝子の発現が抑えられたと考えられる。また、K-2 は、1 コピーの導入により *efe* 遺伝子が正常に発現したと考えられる。

2-オキソグルタル酸を基質とする微生物由来エチレン生成酵素 (EFE) によるエチレン生成の増加の結果、細胞内で 2-オキソグルタル酸の不足が生じ、TCA サイクルの中間物のレベルが減少し、野生型に比べてわい化した可能性も考えられた。そこでこの可能性を検証するために、2-オキソグルタル酸を添加した培地での形態とエチレン生成量を調査したが、2-オキソグルタル酸の添加によりエチレン生成量の変化は起こらなかった。このことは、EFE の基質として十分な量が既に細胞内に存在したためか、あるいは 2-オキソグルタル酸の細胞内への取り込みが起こらなかったためと考えられる。また、メチオニンの添加によりエチレン生成量に変化が認

められなかったことから、培養瓶中のエチレンは EFE の作用によると考えられる。

非形質転換体とほとんど同じ形態を示す系統 (A-5、M-5)、形態異常を示す系統 (K-2)、中間的形態を示す系統 (B-2) を閉鎖系の温室で栽培した結果、形態異常を示す系統 (K-2) は、温室内でもわい化し、葉が小さくなり波打つ等、典型的な形態異常を示し、密閉容器外でもエチレン生成酵素の影響を受けることが示された。また、ほとんど野生型と同じ形態を示していた M-5 は、培養瓶内で草丈が高い傾向がみられたが、閉鎖系の温室で栽培した結果節間長が長くなる傾向を示した。

第5節 要約

P. syringae の *efe* 遺伝子を *gus* 遺伝子と 9 アミノ酸のリンカーで結合した *efe-gus* 融合タンパク質遺伝子を 35 S プロモーターにつないだ pBICaMVFEFEGUS を構築し、アグロバクテリウム感染によるリーフディスク法によりタバコに遺伝子導入した。

カナマイシン添加培地における選抜の結果 12 系統の再分化個体が得られた。これらの 12 系統の DNA を抽出し、*efe* 遺伝子の全長を増幅するように設計したプライマーによる PCR を行った結果、10 系統で *efe* 遺伝子の導入が確認された。この 10 系統には、非形質転換体とほとんど同じ形態の系統や、形態異常を示す系統が得られた。顕著な形態異常としては、節間が短くなり草丈が低くなる、葉が波打ち小さくなる、根が太く脆くなり根毛が多発する等の症状が見られた。また、中間的的症状を示す系統も得られた。これらの中から典型的な形態を示す 4 系統 (A-5、M-5、B-2、K-2) を選抜した。

4 系統 (A-5、M-5、B-2、K-2) のエチレンの生成量を植物体全体および切り取った葉と根を用いて測定した。非形質転換体と形態異常が無い系統 (A-5、M-5) のエチレンの生成量は変わらなかったが、強い形態異常を示した系統 (K-2) は、非形質転換体の 20 倍以上のエチレンを生成していた。また、強い形態異常を示した系統 (K-2) では、エチレンで誘導されるキチナーゼ活性の上昇が認められた。一方ペルオキシダーゼやフェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性には変化が認められなかった。*efe* 遺伝子と融合遺伝子を形成している GUS の発現を葉・茎横断面・根で観察した結果、強い

形態異常を示した系統 (K-2) では葉・茎横断面・根の全てでGUSの発現が認められた。また、隔離温室で栽培した結果、密閉容器内の形態形成と同様に、K-2株は著しい形態異常を示した。

以上のことより、微生物由来のエチレン生成遺伝子が、植物において発現し、エチレン生成量を20倍以上にまで増大させて、その形態に大きな影響を及ぼすことが確認できた。

第3章 タバコアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*NtADH*) のプロモーターによる細菌のエチレン生成酵素遺伝子のタバコにおける発現とその特性

第1節 緒言

第2章で、10系統の組換えタバコを作成した。これはタバコ細胞内で構成的に働くカリフラワーモザイクウイルス35SRNA (CaMV35S) のプロモーターの制御下で、細菌のエチレン生成酵素 (EFE) と β -glucuronidase (GUS) から成るキメラタンパク質を発現させたものであった。その結果、キメラEFEは根、茎、葉のどの組織でも発現し、組織特異性はなかった。雌花の形成やキチナーゼ等の防御遺伝子の発現のコントロールのためには、エチレン生成酵素遺伝子の発現時期および発現する組織を制御する必要がある。そこで、エチレン生産を組織特異的、あるいは成長段階の特別な時期に制御できる可能性を新たなプロモーターを用いて研究することにした。

新名らはBY2培養タバコ細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY2) を用い、液体培養の増殖後期に特異的に発現するタバコアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*NtADH*) を見いだしている。^{23) 24)} 本章ではEFE-GUS融合タンパク質の遺伝子をこの*NtADH*プロモーターの制御下に置いた場合、EFE-GUS融合タンパク質がタバコで組織特異的に発現するかどうかを調べることを目的とした。

第2節 実験材料および方法

1 使用した植物種、菌株およびプラスミドベクター

大腸菌内でのタバコ発現プラスミドの構築には、*NtADH*遺伝子のプロモーターを保持するpUC19::p18と第2章で作成したpBICaMVFEFEGUSを使用した。植物への*NtADH* promoter *efe-gus*融合遺伝子の導入は、第1表と同じものを用いた。

2 使用培地および培養方法

1) 大腸菌の使用培地および培養法

E. coli JM109の培養には、Luria Bertani (LB) 培地 (第

2表) を使用した。pUC19::p18 を導入した*E. coli* JM109株は、アンピシリン50 μ g/mlを、pBICaMVFEFEGUSまたはpBIADHpEFEGUSを導入した*E. coli* JM109株は、カナマイシン50 μ g/mlを添加したLB培地で37°Cで一晩振とう培養した。

2) *A. tumefaciens*の使用培地および培養法

A. tumefaciens LBA4404株の培養にはLB培地を使用した。pBIADHpEFEGUS を導入した*A. tumefaciens* LBA4404株は、カナマイシン50 μ g/mlを添加したLB培地で30°Cで一晩から2日間培養した。

3) タバコの使用培地および培養法

タバコの継代培養およびタバコリーフディスクからの再分化は、第2章第2節2-3)「タバコの使用培地および培養法」(4ページ)の方法で行った。培地も第3表と同じものを使用した。

3 発現プラスミドの構築方法

*efe-gus*融合遺伝子を*NtADH*遺伝子のプロモーターの支配下で発現できるプラスミドを構築した。5'側に*Hind*III、3'側に*Xba*Iサイトを付加するように設計したプライマーを使用して、pUC19::p18の*NtADH*遺伝子のプロモーター領域 (約450bp) をPCRにより増幅した。PCR断片をpUC18にクローニングした後、*Hind*III-*Xba*Iで切り出した。次に pBICaMVFEFEGUSのCaMV35Sプロモーターを*Hind*III、*Xba*I 2重切断により取り除き、*NtADH*遺伝子のプロモーター領域 (約450bp) を挿入した。

1) PCR産物の精製

*NtADH*遺伝子のプロモーター領域 (約450bp) のPCRフラグメントの精製はWizardTM PCR Preps DNA Purification System (Promega社製) を用い、操作手順はキットのプロトコールに従った。

2) PCR産物の末端平滑化およびリン酸化・ライゲーション

PCR産物の末端平滑化およびリン酸化・ライゲーションはSureCloneTM Ligation Kit (Pharmacia社製) を用い、操作手順はキットのプロトコールに従った。なお、PCR産物の末端平滑化およびリン酸化の反応混液組成は第18表に、ライゲーションの反応混液組成は第19表に示した。

3) 形質転換およびプラスミドの確認

コンピテントセルの調整法はHanahan法を用い、常法通り形質転換を行った。²⁶⁾ pUC系プラスミドをベクターとして使用する場合は、抗生物質としてアンピシリン

(50 μ g/ml) を用い、pBI系プラスミドをベクターとして使用する場合は、抗生物質としてカナマイシン

(25 μ g/ml) を用いた。また、プラスミドの抽出にはアルカリ溶菌法 (第2章第2節2-2) 「使用培地および培養方法」参照) を用いた。プラスミドはアガロースゲル電気泳動で確認を行った。

4) アガロースゲルからのDNA断片抽出

アガロースゲルからのDNA断片抽出にはQIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用い、操作方法はキットのプロトコールに従った。抽出したDNA断片の濃度は約100 ng / μ lであった。

5) pBIプラスミドへのライゲーション

pBICaMVEFEGUS (約1 μ g) を *Hind*III・*Xba* I で消化し、フェノール・クロロホルム処理後、エタノール沈殿処理を行い、滅菌水10 μ l に溶解した。これをベクターとして用いた。同様に *NtADH* 遺伝子のプロモーターを含む pUC18:: *NtADH* より *Hind*III・*Xba* I 処理で450bpのプロモーター (*NtADH*) を単離した。ライゲーション組成を第20表に示した。

4 タバコの形質転換法

タバコの形質転換は第2章第2節3-2) 「タバコへのアグロバクテリウム法による形質転換」(6ページ) で示したアグロバクテリウム法により行った。構築したプラスミドpBIADH μ pEFEGUSの *A. tumefaciens* LBA4404株への導入はエレクトロポレーション³⁹⁾ により行った。

1) アグロバクテリウム・エレクトロコンピテントセルの調整

A. tumefaciens LBA4404株をLB培地100mlに植菌し、30℃の振とう培養器で一晩培養した。培養液を遠心分離 (10,000 \times g, 4℃, 10min) し、上澄み液を除去した。沈殿した菌体を滅菌水に懸濁し再び遠心分離を行い洗浄した。滅菌水での洗浄を3回繰り返す。最後の遠心の後、沈殿した菌体を10%グリセロール200 μ l に懸濁し、40 μ lづつに小分けし-80℃のフリーザーで保存した。

2) アグロバクテリウムへのプラスミドの導入

コンピテントセル40 μ l を水中で溶解し、濃度を10ng/ μ lにしたpBIADH μ pEFEGUSのDNA溶液を1 μ l を加えた。電極幅1mmのエレクトロポレーション用キューベットに移し1分間水中で静置後、エレクトロポレーション装置 (ELECTRO CELL MANIPULATOR ECM600 BTX社製) にキューベットをセットした。第21表に示した条件で導入を行った。導入処理後、速やかにLB培地400 μ l を加え、50mlの

遠心チューブに移し室温で1時間静置した。静置後、アグロバクテリウム菌液は、カナマイシン100 μ g/lを含むLB培地に100 μ lづつ植菌し、30℃で一晩培養後、コロニー形成を観察した。

第18表 PCR産物の末端平滑化およびリン酸化の反応混液組成

精製済PCR産物 (0.3 pmol)	16 μ l
10X平滑化・リン酸化buffer	2 μ l
Klenow fragment	1 μ l
ポリヌクレオチドキナーゼ	1 μ l
全量	20 μ l

第19表 ライゲーションの反応混液組成

カラム流出液	7 μ l
pUC18/ <i>Sma</i> I/BAP (50 μ g/ml)	2 μ l
2X Ligation Buffer	10 μ l
0.2M DTT	1 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l
全量	20 μ l

第20表 ライゲーション組成

pBICaMVEFEGUS /	5 μ l
<i>Hin</i> dIII・ <i>Xba</i> I (約500ng)	
<i>NtADH</i> promoter (約1 μ g)	10 μ l
5X Ligation Buffer	4 μ l
T4 DNA Ligase (1unit / μ l)	1 μ l
全量	20 μ l

第21表 エレクトロポレーションの条件

電極間隔	1	mm
抵抗値	129	Ω
電圧	14.4	kV/cm
パルス幅	5.0	msec

使用機器名: ELECTRO CELL MANIPULATOR
ECM600 (BTX社製)

3) タバコの形質転換

pBIADHpEFEGUSを導入した*A. tumefaciens* LBA4404株を用いて、第2章第2節4-2)「タバコへのアグロバクテリアウム法による形質転換」(6ページ)と同じ方法でタバコ植物体を形質転換した。

5 GUS染色による導入遺伝子発現の確認方法

形質転換タバコ組織のGUSの組織化学的活性染色は、第2章第2節5「GUS染色による導入遺伝子発現の確認方法」(7ページ)に示したJeffersonらの方法²⁹⁾を改変したKosugiらの方法を用いた。³⁰⁾

6 PCRによる導入遺伝子の確認方法

*NtADH*遺伝子のプロモーターと*efe*遺伝子の1Kbを増幅するプライマーを設計した。合成は、oligoexpress PCR (ファルマシア社)に依頼した。PCRの条件は、第2章第2節7-2)「プライマーおよびPCRの条件」(7ページ)と同様に行った。

センスプライマー(*NtADH*-1)

5' -GCT TGG AAG ATG AAT TCA CGT TTG ACC-3'
(27mer)

アンチセンスプライマー(*EFE*-3)

5' -GGC AAT TAC CAA CAA CCC ATA GTC AG-3'
(26mer)

7 エチレン生成量の測定法

地上部(葉および莖)と根のエチレン生成量の測定においては、地上部を切り取り新しいMSF培地40mlを入れた450mlの培養瓶に移植したものと培養瓶内に残った根を使用した。それぞれ、培養瓶内をエアポンプで無菌空気を5分間送り込んで置換後、気相を採取するためのシリコンゴム栓付きの蓋をし、24時間25℃で培養した。プラスチック内と培養瓶内の気相をそれぞれ0時間と24時間培養後に1ml採取しガスクロマトグラフィー(Yanaco GC3800)で分析した。ガスクロマトグラフィーの条件は、前章の第8表と同じである。

8 *NtADH*遺伝子プロモーターの発現解析

1) 無酸素処理法

MSF培地40mlを入れた450ml培養瓶で15日培養した形質転換タバコと野生型タバコを使用した。初めに有酸素状態のタバコ植物体全体のエチレン生成量を測定した。培養瓶内を無菌空気で置換し、シリコンゴム栓付きの蓋をして25℃で22時間培養した。培養瓶内の気相を0時間と22時間培養後にガスタイトシリンジで1ml採取しガスクロマトグラフィーで分析した。

有酸素状態のエチレン生成量を測定後、フィルターろ過で無菌化したN₂ガスを2分間培養瓶内に送り込み、培養瓶内をN₂ガスで置換し無酸素状態にした。シリコンゴム栓付きの蓋をし、25℃で45時間培養した。培養瓶内の気相をそれぞれ0時間と45時間培養後に1ml採取しガスクロマトグラフィーで分析しエチレン生成量を測定した。エチレン測定後、第2章第2節5「GUS染色による導入遺伝子発現の確認方法」(7ページ)に示した方法でGUSの組織化学活性染色を行った。

2) 遮光処理法

MSF培地40mlを入れた450ml培養瓶で30日培養した形質転換タバコを使用し、次の2つの方法で遮光した。

(1) 1枚の葉をアルミホイルで包み遮光し、培養瓶内をN₂ガスで置換し無酸素状態にする方法

(2) 培養瓶内をN₂ガスで置換し無酸素状態にした後、培養瓶全体をアルミホイルで包み遮光する方法。

処理後、第2章第2節5「GUS染色による導入遺伝子発現の確認方法」(7ページ)に示した方法でGUSの組織化学活性染色を行った。

第3節 結果

1 発現プラスミドの構築

長屋らによって構築されたpUC19::p18のタバコアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(*NtADH*)のプロモーター領域(約450bp)を5'側に*Hind*III、3'側に*Xba*Iサイトを付加するように設計したプライマーを使用してPCRにより増幅した。pBICaMVFEFEGUSを*Hind*III・*Xba*Iで2重切断しCaMV35Sプロモーターを除き、*NtADH*遺伝子のプロモーター領域(約450bp)を挿入し、pBIADHpEFEGUSを構築した。第11図にpBIADHpEFEGUSの構造を示した。

2 タバコへの導入とPCRによる導入遺伝子の確認

*NtADH*遺伝子のプロモーターの支配下に*efe-gus*融合遺伝子を置いた組換えプラスミド、pBIADHpEFEGUSを保持する*A. tumefaciens* LBA4404をタバコリーフディスクに感染させた。感染後、タバコリーフディスクをカナマイシン100mg/l、セフトキシム250mg/lを含む再分化培地移植した。移植後2週間後から再分化した植物体をMSF培地に移植した。以後1ヶ月毎に選抜のためカナマイシンを添加したMSF培地で継代培養を行った。カナマイシン添加培地における根の旺盛な成長を基準に選抜した結果、第22表に示すように28系統の形質転換体が得られた。

カナマイシンにより選抜した28系統のDNAを抽出し、*NtADH*遺伝子のプロモーターと*efe*遺伝子の一部1kbを増幅するように設計したプライマーによるPCRを行った結

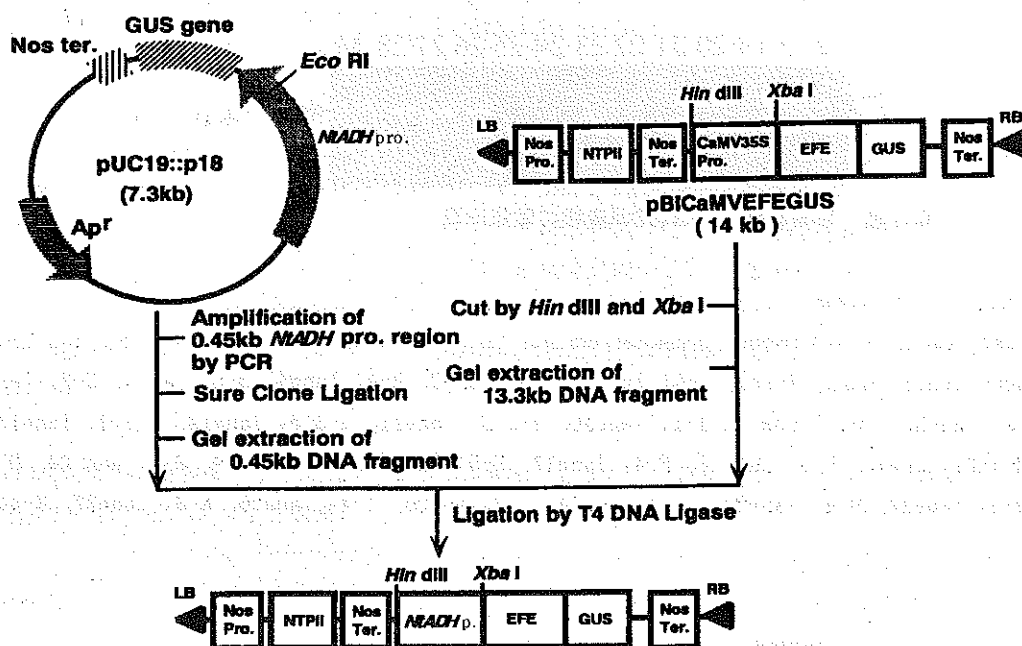
果、28系統で*efe*遺伝子の導入が確認された(第12図)。

3 GUS染色による導入遺伝子発現の確認

*efe*遺伝子の導入が確認された28系統でGUSの組織化学的活性染色による導入遺伝子発現の確認を行った。

28系統のうち21系統は根でGUSの発現が認められた(第2表)。しかし、葉および茎では発現は認められなかつ

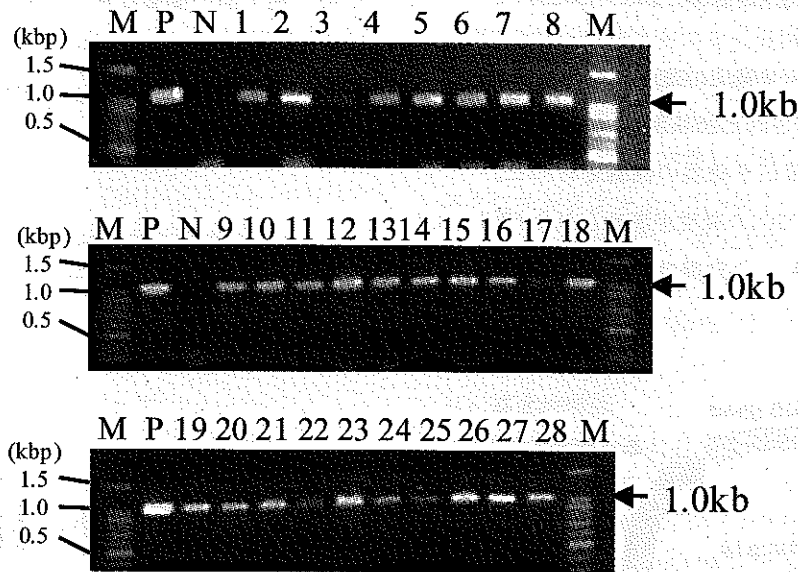
た。また、地上部の極端な形態異常を示すものは得られなかった。第13図に示すように根でのGUS発現が強く、地上部で若干形態異常を示す2系統(C-4、E-1-1)を選抜した。



第11図 pBIADHpEFEGUS の構造

第22表 pBIADHpEFEGUSによるタバコ形質転換の結果

系統名	PCR検定	GUS発現		系統名	PCR検定	GUS発現	
		根	葉			根	葉
A-1	Positive	Positive	Negative	E-5	Positive	Positive	Negative
B-3	Positive	Positive	Negative	F-4	Positive	Positive	Negative
B-4	Positive	Negative	Negative	F-5	Positive	Positive	Negative
B-6	Positive	Positive	Negative	G-2	Positive	Negative	Negative
C-2	Positive	Positive	Negative	G-3	Positive	Positive	Negative
C-4	Positive	Positive	Negative	H-2	Positive	Positive	Negative
D-1	Positive	Positive	Negative	H-3	Positive	Positive	Negative
D-5	Positive	Positive	Negative	H-4	Positive	Positive	Negative
E-1-1	Positive	Positive	Negative	I-1	Positive	Negative	Negative
E-2-2	Positive	Positive	Negative	I-2	Positive	Negative	Negative
E-2-3	Positive	Positive	Negative	J-4	Positive	Negative	Negative
E-2-4	Positive	Positive	Positive	K-3	Positive	Positive	Negative
E-4-1	Positive	Negative	Negative	K-4	Positive	Positive	Negative
E-4-2	Positive	Negative	Negative	K-5	Positive	Positive	Negative

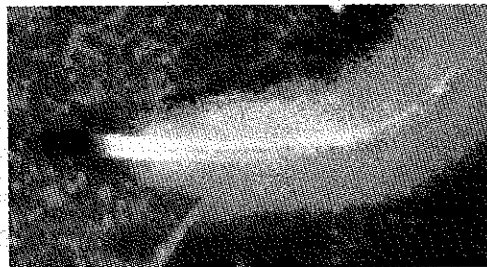


第12図 形質転換タバコのPCR産物の電気泳動

lane M, 100bp ladder maker;

lane P, 1.0kb region of *NtADH* gene promoter/*efe-gus* fusion gene amplified using *NtADH1* and *EFE3* primers.;

lane N, non-transformant; lane1, A-1; lane2, B-3; lane3, B-4; lane4, B-6; lane5, C-2; lane6, C-4; lane7, D-1; lane8, D-5; lane9, E-1-1; lane10, E-2-2; lane11, E-2-3; lane12, E-2-4; lane13, E-4-1; lane14, E-4-2; lane15, E-5; lane16, F-4; lane17, F-5; lane18, G-2; lane19, G-3; lane 20, H-2; lane21, H-3; lane22, H-4; lane23, I-1; lane24, I-2; lane25, I-4; lane26, K-3; lane27, K-4; lane28 K-5



第13図 根におけるGUSの発現

E-1-1形質転換タバコのGUS染色

4 エチレン生成量の測定

選抜した2系統(C-4, E-1-1)のエチレン生成量を、野生株とK-2株(第2章で作成)のそれらと比較検討した。結果を第23表に示した。葉と茎ならびに根でのエチレン生成量は明らかにK-2株より低かったが、C-4とE-1-1株は根で特異的にエチレンを生成していることが分かった。

5 *NtADH*遺伝子プロモーターの発現解析

1) 有酸素条件と無酸素条件における*NtADH*遺伝子プロモーターによるエチレン生成量

選抜した2系統(C-4, E-1-1)の有酸素条件と無酸素条件におけるエチレン生成量を、野生株とK-2株のそれらと比較検討した結果を第24表に示した。野生株とK-2株では無酸素条件のエチレン生成量は有酸素条件の約半分に減少したが、C-4とE-1-1株は無酸素条件におけるエチレン生成量はわずかな減少または若干の増加であった。

2) 有酸素条件と無酸素条件における*NtADH*遺伝子のプロモーターによる発現部位の解析

無酸素処理したC-4とE-1-1株のGUSの発現を検討した結果、有酸素条件で発現が観察されなかった茎の維管束でGUSの発現が観察された(第14図)。葉では発現は認められず、遮光処理によっても葉での発現は観察されなかった。

第23表 *NtADH*遺伝子のプロモーター制御下の*efe-gus*遺伝子を導入した形質転換タバコのエチレン生成量

Transformants	ethylene production rate* (nmol h ⁻¹ gFW ⁻¹)	
	leaves and stems	roots
Wild type	0.04±0.00	0.03±0.03
K-2(::pBICaMVEFEGUS)	0.99±0.21	0.68±0.52
C-4(::pBIADHpEFEGUS)	0.04±0.00	0.13±0.05
E-1-1(::pBIADHpEFEGUS)	0.03±0.00	0.33±0.02

*Values are represented as a mean of duplicate measurements ± standard error

FW: fresh weight

第24表 *NtADH*遺伝子のプロモーター制御下の*efe-gus*遺伝子を導入した形質転換タバコの有酸素条と無酸素条件におけるエチレン生成量

Transformants	ethylene production rate* (nmol h ⁻¹ gFW ⁻¹)	
	aerobic	anaerobic
Wild type	0.02±0.02	0.01±0.01
K-2(::pBICaMVEFEGUS)	1.59±0.22	0.64±0.09
C-4(::pBIADHpEFEGUS)	0.12±0.00	0.11±0.02
E-1-1(::pBIADHpEFEGUS)	0.13±0.03	0.20±0.04

*Values are represented as a mean of duplicate measurements ± standard error

FW: fresh weight

有酸素条件

無酸素条件



第14図 無酸素処理による茎におけるGUS発現誘導

E-1-1形質転換タバコのGUS染色

第4節 考察

タバコアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(*NtADH*)のプロモーターに連結した*efe-gus*遺伝子がタバコの根で特異的に発現し、嫌気条件下では茎でも発現した事実は、*Arabidopsis*のアルコールデヒドロゲナーゼが嫌気条件下など種々の環境ストレス下で誘導される報告^{40) 41)}と一致する。新名らは*NtADH*遺伝子プロモーターをBY2培養タバコ細胞(*Nicotiana tabacum* L. cv. BY2)を用いた液体培養の増殖後期に特異的に発現するプロモーターとして単離したが^{23) 24)}、このことも液体培養の後期の溶存酸素濃度の低下に関連している可能性がある。この*NtADH*遺伝子プロモーターの発現は酸素によって抑制されるのであろう。このように根特異的に発現できるプロモーターの発見は今後植物において種々の部位特異性プロモーターの発見に寄与できるものと考えられる。また、根におけるエチレンの生産は根毛の多発による養分の効率吸収や、キチナーゼ等の誘導による土壌病害に対する抵抗性の向上が期待できる。

第5節 要約

*efe-gus*融合タンパク質遺伝子を*NtADH*遺伝子プロモーターにつないだpBIADHpEFEGUSを構築し、アグロバクテリウム感染によるリーフディスク法によりタバコに遺伝子を導入した結果28系統の再分化個体が得られた。これらの28系統のDNAを抽出し、*NtADH*遺伝子プロモーターと*efe*遺伝子の一部を増幅するように設計したプライマーによるPCRを行った結果、28系統で*efe*遺伝子の導入が確認された。このうち21系統のものは根でGUSの発現が認められた。しかし、葉および茎では発現は認められなかった。また、地上部の極端な形態異常を示すものは得られなかった。根でのGUS発現が強く、地上部で若干形態異常を示す2系統(C-4、E-1-1)を選抜した。2系統(C-4、E-1-1)のエチレンの生成量を地上部(葉および茎)と根にわけて測定した。CaMV35SプロモーターのK-2系統は地上部(葉および茎)と根で多量のエチレンを生成したのに対し、2系統(C-4、E-1-1)は、根のみで、C-4はK-2の20%、E-1-1はK-2の50%に相当するエチレンを生成していた。無酸素処理をしGUS

の発現を観察した結果、茎でGUSの発現が認められた。また、無酸素状態でのエチレン生成量は、野生型タバコおよびCaMV35SプロモーターをもつK-2系統は、半分以上に減少したのに対し、*NtADH*遺伝子プロモーターをもつC-4、E-1-1の2系統はほとんど減少しなかった。以上のことより、*NtADH*遺伝子プロモーターが制御した微生物由来の*efe*遺伝子は根で特異的に発現し、無酸素状態では茎でも誘導されることが確認できた。

第4章 総括

第1節 要約

第2章では、*P. syringae*の*efe*遺伝子を*gus*遺伝子と9アミノ酸のリンカーで結合したEFEGUS融合タンパク質遺伝子をCaMV35SプロモーターにつないだpBICaMV-EFEGUSを構築し、アグロバクテリウム感染によるリーフディスク法によりタバコに遺伝子導入した結果、12系統の再分化個体が得られた。PCR分析の結果、このうち10系統で*efe*遺伝子の導入が確認された。この10系統には、非形質転換体とほとんど同じ形態の系統や、形態異常を示す系統が得られた。顕著な形態異常としては、節間が短くなり草丈が低くなる、葉が波打ち小さくなる、根が太く脆くなり根毛が多発する等が認められた。また、中間的的症状を示す系統も得られた。これらの中から典型的な形態を示す4系統(A-5、M-5、B-2、K-2)を選抜した。4系統(A-5、M-5、B-2、K-2)のエチレンの生成量を植物体全体および切り取った葉と根を用いて測定した。非形質転換体と形態異常が無い系統(A-5、M-5)のエチレンの生成量は変わらなかったが、強い形態異常を示した系統(K-2)は、非形質転換体の20倍以上のエチレンを生成していた。また、強い形態異常を示した系統(K-2)では、エチレンで誘導されるキチナーゼ活性の上昇が認められた。一方ペルオキシダーゼとフェニルアラニンアンモニアリアーゼの活性には変化が認められなかった。*efe*遺伝子と融合遺伝子を形成しているGUSの発現を葉・茎横断面・根で観察した結果、強い形態異常を示した系統(K-2)では、葉・茎横断面・根の全てでGUSの発現が認められた。また、隔離温室で栽培した結果、密閉容器内の形態形成

と同様に、K-2株は著しい形態異常を示した。以上のことより、微生物由来の*efe*遺伝子が、植物において発現し、エチレン生成量を20倍以上にまで増大させて、その形態に大きな影響を及ぼすことが確認できた。

第3章では、*efe-gus*融合タンパク質遺伝子を*NtADH*遺伝子のプロモーターにつないだpBIADHpEFEGUSを構築し、アグロバクテリウム感染によるリーフディスク法によりタバコに遺伝子を導入した結果、28系統の再分化個体が得られた。PCR分析の結果、28系統で*efe*遺伝子の導入が確認された。このうち21系統のものは根でGUSの発現認められた。しかし、葉および茎では発現は認められなかった。また、地上部の極端な形態異常を示すものは得られなかった。根でのGUS発現が強く、地上部で若干形態異常を示す2系統(C-4、E-1-1)を選抜した。2系統(C-4、E-1-1)のエチレンの生成量を地上部(葉および茎)と根にわけて測定した。CaMV35SプロモーターのK-2系統は地上部(葉および茎)と根で多量のエチレンを生成したのに対し、2系統(C-4、E-1-1)は、根のみで、C-4はK-2の20%、E-1-1はK-2の50%に相当するエチレンを生成していた。無酸素処理をしGUSの発現を観察した結果、茎でGUSの発現が認められた。また、無酸素状態でのエチレン生成量は、野生型タバコおよびCaMV35SプロモーターをもつK-2系統は、半分以下に減少したのに対し、*NtADH*遺伝子のプロモーターをもつC-4、E-1-1の2系統はほとんど減少しなかった。

以上のことより、*NtADH*遺伝子のプロモーターが制御した微生物由来の*efe*遺伝子は根で特異的に発現し、無酸素状態では茎でも誘導されることが確認できた。

第2節 考察

植物体へ植物本来のエチレン生成酵素(ACC oxidase)のアンチセンスRNAを導入したり、*Pseudomonas*のACC deaminaseを導入し、植物の細胞内のACC濃度を低下させると、トマトの熟成が遅れることが報告されている。このようにエチレン生産を抑制する方法は遺伝子組み換え法により有用な作物を生産できることを示している。一方、組換え植物へのエチレン生産の増強は植物病原菌耐性に関する遺伝子の発現を促進することが報告されている以外今まで全く試みられていない。本研究では、タ

バコの染色体へ植物のエチレン生成系と全く異なる細菌*Pseudomonas*のエチレン生成酵素遺伝子(*efe*)を組み込み、エチレン生産が増加することを示した。これらの組換えタバコ株間のエチレン生産のレベルはかなり大きく変動したが、大部分の組換え植物は形態異常を示した。この形態への影響は植物体からのエチレンの増大が原因であるが、このエチレンの増大は植物本来のACC経路からのものでなく、2-オキソグルタル酸を基質として生成されたものである。このことは培地へのL-メチオニンの添加が何らエチレン生成に影響を与えなかったことにより示された。植物が生理的ダメージや病原菌による感染などのストレスにさらされるとエチレンが生産されることから、エチレン生成が増加すると形態異常とは別の生理学的な変化を現れることが期待された。これらに関して3つの酵素活性の変動を測定した結果、キチナーゼ活性の上昇が認められた。病害抵抗性については、今後に残された課題である。組換えタバコ株の中でK-2株で強いエチレン生産やGUS活性が認められ、他のエチレン生産の低かった3株は細菌の*efe*遺伝子を多コピー組み込んでいたことにより、多コピー挿入は逆に遺伝子発現を抑制する傾向があると推定される。この現象はプロモーターの抑制機構として興味深い。K-2株は1コピーの*efe*遺伝子が組み込まれおり、かつ繰り返し植え継いでも安定であったことにより、このK-2株の染色体のどの部分に*efe-gus*遺伝子が導入されたか興味深い。

タバコのアルコール脱水素酵素遺伝子(*NtADH*)のプロモーターに連結した*efe-gus*遺伝子がタバコの根で特異的に発現し、嫌気条件下で茎で発現した事実は、*Arabidopsis*のアルコール脱水素酵素が嫌気条件下など種々の環境ストレス下で誘導される報告と一致する。新名らは*NtADH*遺伝子のプロモーターをBY2培養タバコ細胞

(*Nicotiana tabacum* L. cv. BY2)を用いた液体培養の増殖後期に特異的に発現するプロモーターとして単離したが、このことも液体培養の後期の溶存酸素濃度の低下に関連している可能性がある。この*NtADH*遺伝子のプロモーターの発現は酸素によって抑制されるのであろう。このように根特異的に発現できるプロモーターの発見は今後植物において種々の部位特異的遺伝子の発現に寄与できるものと考えられる。また、根におけるエチレンの生産によって根毛の多発による養分の効率吸収や、キチナーゼ等の誘導による土壌病害に対する抵抗性の向上が期待できる。

参考文献

- 1) 下川敬之、エチレン、東京大学出版会 (1988).
- 2) 太田保夫、植物の一生とエチレン、東海大学出版会 (1980).
- 3) 高橋信孝、増田芳雄、植物ホルモンハンドブック、下巻、161-202 培風館 (1994).
- 4) Trebitsh, T., Staub, J. E. and O'Neill, S. D. (1997) Identification of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene linked to the female (F) locus that enhances female sex expression in cucumber. *Plant Physiol.* 113: 987-995.
- 5) Kamachi, S., Sekimoto H., Kondo N. and S. Sakai (1997) Cloning of a cDNA for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase that is expressed during development of female flowers at the apices of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Physiol.* 38: 1197-1206.
- 6) Shinshi, H., Usami, S. and Ohme-Takagi, M. (1995) Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Mol. Biol.* 27: 923-932.
- 7) Ohme-Takagi, M., Suzuki, K., Shinsi, H. (2000) Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant Cell Physiol.* 41:1187-1192.
- 8) Ooms, G., Hooykaas, P. J., Moolenaar, G. and Schilperoort, R. A. (1981) Crown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids: analysis of T-DNA functions. *Gene* 14: 33-50.
- 9) Kende, H. (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 44:283-307.
- 10) Yang, S. F. and Hoffman, N. E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:155-189.
- 11) Adames, D. O. and Yang, S. F. (1979) Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:170-1174.
- 12) Fukuda, H., Takahashi, M., Fujii, T. and Ogawa, T. (1989) An NADH: Fe(III) EDTA oxidoreductase from *Cryptococcus albidus*: an enzyme involved in ethylene production *in vivo*? *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 1107-1127.
- 13) Fukuda, H., Kitajima, H., Fujii, T., Tazaki, M. and Ogawa, T. (1989) Purification and some properties of novel ethylene-forming enzyme produced by *Penicillium digitatum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 59: 1-6.
- 14) Thomas, H. and Thomas B. (1991) Ethylene biosynthesis in *Fusarium oxysporum* f. sp. tulipae proceeds from glutamate/2-oxoglutarate and requires oxygen and ferrous ions *in vivo*. *Arch. Microbiol.* 157: 18-22.
- 15) Fukuda, H., Ogawa, T., Tazaki, M., Nagahama, K., Fujii, T., Tanase, S. and Morino, Y. (1992) Two reactions are simultaneously catalyzed by a single enzyme: the arginine-dependent simultaneous formation of two products, ethylene and succinate, from 2-oxoglutarate by an enzyme from *Pseudomonas syringae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 483-489.
- 16) Fukuda, H., Ogawa, T., Ishihara, K., Fujii, T., Nagahama, K., Omata, T., Inoue, Y., Tanase, S. and Morino, Y. (1992) Molecular cloning in *Escherichia coli*, expression, and nucleotide sequence of the gene for the ethylene-forming enzyme of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 826-832.
- 17) Fukuda, H., Ogawa, T. and Tanase, S. (1993) Ethylene production by micro-organisms. In *Adv. Microbial Physiol.* Edited by Rose, A.H. vol. 35, pp. 275-306. Academic Press Inc., London.
- 18) Nagahama, K., Ogawa, T., Fujii T., Tazaki, M., Tanase, S., Morino, Y. and Fukuda, H. (1991) Purification and properties of an ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK2. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2281-2286.
- 19) Nagahama, K., Yoshino, K., Matsuoka, M., Sato, M., Tanase, S., Ogawa, T. and Fukuda, H. (1994) Ethylene production by strains of the plant-pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* depends upon the presence of indigenous plasmids carrying homologous genes for the ethylene-forming enzyme. *Microbiology* 140: 2309-2313.
- 20) Ishihara, K., Matsuoka, M., Inoue, Y., Tanase, S.,

- Ogawa, T. and Fukuda, H.(1995) Overexpression and *in vitro* reconstitution of the ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae*. *J. Ferment. Bioeng.*, 79: 205-211.
- 21) Sakai, M., Ogawa, T., Matsuoka, M. and Fukuda, H. (1997) Photosynthetic conversion of carbon dioxide to ethylene by the recombinant cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942, which harbors a gene for the ethylene-forming enzyme of *Pseudomonas syringae*. *J. Ferment. Bioeng.* 79:434-443.
- 22) Wang, J.S., Araki, T., Ogawa, T., Sakai, M., Matsuoka, M. and Fukuda, H.(1999) Prediction of photosynthetic production rate of ethylene using a recombinant cyanobacterium. *J. Theor. Biol.* 196:9-17.
- 23) Sinmyo, A., Shoji, T., Bando, E., Nagaya, S., Nakai, Y., Kato, K., Sekine, M., and Yoshida, K. (1998) Metabolic engineering of cultured tobacco cells. *Biotechnol. Bioeng.* 58:329-332.
- 24) Nagaya, S., Nakai, Y., Kato, K., Sekine, M., Yoshida, K., and Shinmyo, A. (2000) Isolation of growth-phase-specific promoters from cultured tobacco cells. *J. Biosci. Bioeng.* 89: 231-235.
- 25) Wilkinon, J.Q., Lanahan, M.B., Clark, D.G., Bleecker, A.B., Chang, C., Meyerowitz, M., and Klee, H.(1997) A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants. *Nature Biotechnol.* 15:444-447.
- 26) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15: 473-497.
- 27) Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12: 8711-8721.
- 28) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Wallroth, M., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- 29) Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion maker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- 30) Kosugi, S., Ohashi, Y., Nakajima, K. and Arai, Y. (1990) An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Sci.* 70: 133-140.
- 31) Wagner, D. B., Furnier, G. R., Saghai-Marooif, M. A., Williams, S. M., Dancik, B. P. and Allard, R. W. (1987) Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2097-2100.
- 32) 向井護、山本直樹、新版植物のPCR実験プロトコール 57-62、秀潤社(1997)。
- 33) Grierson, D., Hamilton, A. J., Bouzayen, M., Kock, M., Lycett, G. W. and Barton, S. (1992) Regulation of gene expression, ethylene synthesis and ripening in transgenic tomatoes. *In* Inducible plant proteins, ed. J.L.Wray. Cambridge University Press, pp. 155-174.
- 34) Klee, H.J., Hayford, M.B., Kretzmer, K.A., Barry, G.F. and Kishore, G.M. (1991) Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell* 3: 1187-1193.
- 35) Ohtsubo, N., Mitsuhashi, I., Koga, M., Seo, S. and Ohashi, Y. (1999) Ethylene promotes the necrotic lesion formation and basic PR gene expression in TMV-infected tobacco. *Plant Cell Physiol.* 40: 808-817.
- 36) Hobbs, S.L., Kpodar, P. and DeLong, C.M. (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol. Biol.* 15: 851-864.
- 37) Linn, F., Heidmann, I., Saedler, H. and Meyer, P. (1990) Epigenetic changes in the expression of the maize A1 gene in *Petunia hybrida*: role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. *Mol. Gen. Genet.* 222: 329-336.
- 38) Hanahan, D.(1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol. Biol.* 166:557-580.
- 39) Mersereau, M., Pazour, G.J. and Das, A. (1990) Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene* 90:149-151.
- 40) Hoeren, F. U., Dolferus, R., Wu, Y., Peacock, W. J. and Dennis E. S. (1998) Evidence for a role for *AtMYB2* in the induction of the *Arabidopsis*

Alcohol Dehydrogenase gene (*ADH1*) by low oxygen. *Genetics*. 149:479-490.

41) Dolferus, R., Jacobs, M., Peacock, W. J., and Dennis, E.S. (2000) Differential interactions of

promoter elements in stress responses of *Arabidopsis Adh* gene. *Plant Physiol.* 105: 1075-1087.

謝 辞

本論文を遂行するにあたり、終始御懇篤に御指導、御鞭撻下さいました崇城大学大学院工学研究科応用微生物工学専攻の小川隆平教授ならびに松岡正佳助教授に深謝いたします。

また、本論文を作成するに当たり、御校閲ならびに御助言を戴きました崇城大学大学院工学研究科応用微生物工学専攻の鶴大典教授、大庭理一郎教授に厚く御礼を申し上げます。

本論文の遂行にあたり、タバコアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(*NtADH*)のプロモーターを分与していただいた奈良先端科学技術大学院大学の石名惇彦教授、吉田和哉助教授ならびにエチレンのガスクロマトグラフィーによる測定に御協力戴きました長濱一弘博士に御礼を申し上げます。

また、このような機会と貴重なご助言、ご指導を戴きました熊本県農業研究センターの田口茂所長、山田英紀次長、上田実次長、久保研一農産園芸研究所所長、田中正美生物資源部部长に御礼を申し上げます。

また、多大なご協力を戴きました坂井美穂博士、木村宏、沢村剛、古閑秀治の各諸子ならびに崇城大学小川研究室の皆様、生物資源部の渡辺秀士研究主幹、野田孝博主任技師、大久保征宣技師、丸山誠司技師ならびに臨時職員の皆さまに感謝いたします。

本論文に関係する報告

1) Seishi Araki, Masayoshi Matsuoka, Masami Tanaka and Takahira Ogawa. (2000) Ethylene formation and phenotypic analysis of transgenic tobacco plants expressing a bacterial ethylene-forming enzyme. *Plant Cell Physiol.* 41:327-334

2) Seishi Araki, Masayoshi Matsuoka, Masami Tanaka, Kazuya Yoshida, Atsuhiko Shinmyo and Takahira Ogawa (2001). Expression of an ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae* under the control of alcohol dehydrogenase gene promoter in tobacco roots. *Biotechnol. Letters* 23:433-436

Study of transgenic plants expressing a bacterial ethylene-forming enzyme.

Seishi ARAKI

Summary

A bacterial ethylene-forming enzyme (EFE) catalyzes oxygenation of 2-oxoglutarate to produce ethylene and carbon dioxide in contrast to a plant enzyme which uses 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as a substrate. Several lines of transgenic tobacco were constructed expressed an EFE from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK2. The gene encoding a chimeric protein consisting of EFE and β -glucuronidase (GUS) was introduced into the tobacco genome using a binary vector which directs expression of the EFE-GUS fusion protein under the control of constitutive promoter of cauliflower mosaic virus 35S RNA. Two lines of transgenic plants produced ethylene at consistently higher rates than the untransformed plant, and their GUS activities were expressed in different tissues. A significant dwarf morphology observed in the transgenic tobacco displaying the highest ethylene production resembled the phenotype of a wild-type plant exposed to excess ethylene. These results demonstrate a potential use of bacterial EFE to supply ethylene as a hormonal signal via an alternative route using an ubiquitous substrate 2-oxoglutarate in plant tissues.

Further, 28 lines of transgenic tobacco that expressed an ethylene-forming enzyme from *P. syringae* fused with β -glucuronidase as a histochemical marker under the control of tobacco alcohol dehydrogenase gene (*NtADH*) promoter were constructed. The *NtADH* promoter was previously shown to be active in late growth stage when expressed in BY2 cultured tobacco cells (*Nicotiana tabacum*). Ethylene production and expression of maker gene in transgenic tobacco took place only in roots, and that the root-limited expression was explicable by induction of *NtADH* promoter under anaerobic condition.

Keyword ethylene, ethylene-forming enzyme, 2-oxoglutarate, transformation, alcohol dehydrogenase