

速報

ペリプロカ (*Periploca sepium* Bunge) への外来遺伝子導入に関する研究*1

宮柱明日香*2 · 玉泉幸一郎*3 · 山東智紀*4 · 福崎英一郎*4 · 小林昭雄*4
中澤慶久*5 · 馬場健史*4*5 · 蘇 印泉*6

キーワード：ペリプロカ、遺伝子組換え、PCR、Western blot

I. はじめに

植物に由来したハイドロカーボンであるポリイソプレン（天然ゴム）は、化石資源の枯渇が懸念される中で、将来的に価値が高まることが予想される。しかし、ポリイソプレン生合成機構については未解明な部分が多く、近年、関連遺伝子の特定・単離とそれらの機能評価が進められている。この際、特定された遺伝子の機能評価のためには、当該遺伝子の発現を向上させた形質転換体植物および発現を抑制した形質転換体植物の双方を作成することにより、機能増強（gain of function）および機能消失（loss of function）の両方を確認することが肝要である。しかし、天然ゴム産生能が最も高い植物であるパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) は、再分化をはじめとした組織培養および遺伝子導入が困難である (1) ことから、代替として使用可能なモデル植物の探索が必要となる。

今回用いたペリプロカ (*Periploca sepium* Bunge) は、ガガイモ科の木本つる植物で中国半乾燥地帯に生育している。この植物はこれまでの研究により、有用成分としてゴム成分 (*cis*-isoprene) を含むことを確認している (2)。また、組織片からの再分化が容易であるため、ポリイソプレン生合成機構解明に向けた有用なモデル植物となる可能性が高い。

そこで本研究では、双子葉植物を対象とした一般的な形質転換法であるアグロバクテリウム法によるペリプロカへの外来遺伝子の導入を試みたので報告する。

II. 材料と方法

1. 植物材料

中国西安崑山産ペリプロカの種子を無菌播種し、得られた苗の腋芽を用いて継代培養を行い、クローン個体を増殖した。培地はMS培地 (3) にシヨ糖 20g/l、ゲルライト 2.4 g/lを加え、pH5.8に調整し、温度25℃、明期16時間/日、PPFD50 μ mol

m⁻²s⁻¹の条件下で培養した。培養2ヶ月の無菌苗から、腋芽を含まない茎 (1 cm) を採取し、材料とした。供試数は、各プラスミドベクターあたり100本とした。

2. アグロバクテリウム菌株とプラスミドベクター

形質転換用のプラスミドベクターに、株式会社 豊田中央研究所生物部 光川典宏氏より分与された pBIsGFP (S65T) および pBsGFP (S65T) を使用した。これらのベクターには、カナマイシン耐性遺伝子 (NPT II)、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT)、GFP (S65T) 遺伝子が含まれている (図-1.)。これらを用いて *Agrobacterium tumefaciens* EHA105株による形質転換を行った。

3. 形質転換

MS培地に感染促進剤アセトシリシロン (10mg/l) を添加した液体培地 (感染培地) にアグロバクテリウムを懸濁 (O.D.₅₅₀ = 0.6) し、ペリプロカの茎を2分間浸漬させた。余分な水分を除去した茎を、感染培地と同様の組成の固形培地 (共培養培地) に置床し、3日間暗黒培養をおこなった。共培養後、除菌剤カルベニシリン (500mg/l) 入りの滅菌水で水洗し、カルベニシリン (500mg/l) とハイグロマイシン (25mg/l) を添加した選抜培地に置床した (4)。

4. 植物体再生

選抜培地での初期選抜を2週間おこなった後、シュート伸長を促進させるため、抗生物質フリーおよびホルモンフリー培地に置床し、定期的に植え替えをおこなった。培養条件は温度25℃、明期16時間/日、PPFD 50 μ mol m⁻²s⁻¹の一定とした。

また、蛍光実体顕微鏡 (Nikon システム実体顕微鏡 SMZ800/P - FLA, 実体蛍光装置フィルターキューブ) により蛍光反応を示す個体のみを選抜した。

*1 Miyabashira, A., Gyokusen, K., Sando, T., Fukusaki, E., Kobayashi, A., Nakazawa, Y., Bamba, T. and Su, Y.: Genetic transformation of *Periploca* (*Periploca sepium* Bunge)

*2 九州大学大学院生物資源環境科学府 Grad. Sch. Biore. and Bioenv. Sci., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

*3 九州大学大学院農学研究院 Fac. Agric., Grad.Sch., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

*4 大阪大学大学院工学研究科応用生物学専攻 Dep. Bio., Grad. Sch. Engin., Osaka Univ., Osaka 565-0871

*5 日立造船株式会社 Hitachi Zosen Co., Hiroshima 722-2393

*6 西北農林科技大学 Col. Fore., Northwest. Sci-Tech Univ., Agri. and Fore., China 712100

5. ジェノミック PCR 分析

各プラスミドベクターより得られた、蛍光反応を示すペリプロカ形質転換体 2 個体ずつ計 4 個体をサンプルとして用いた。ペリプロカ形質転換体の全葉 (100mg) からの DNA 抽出は、CTAB 法 (5) を一部改良した方法で行った。

目的遺伝子増幅のためのプライマーは、Forward Primer AGCTGGACGGCGACGTAAA, Reverse Primer CAGGACCA TGTGATCGCGCTT を用いた。

6. Western blot 分析

上記と同様のサンプルを使用した。ペリプロカ形質転換体 (50 mg) を凍結破砕し、CellLytic™P (Sigma) を用いてタンパクを抽出後、12%アクリルアミドゲルで SDS - PAGE をおこなった (6)。また、一次抗体として Anti-GFP, Mouse-Mono (GFP01), Ab-1 (Lab Vision Corporation), 二次抗体として Anti-Mouse IgG-AP (StressGen) を使用した。

Ⅲ. 結果と考察

遺伝子導入に用いた各100本の茎より蛍光反応を示すカルスが得られ、その形質転換効率は平均72%であった。そのうち、各ベクター 7 個体ずつ計14個体のペリプロカ形質転換体が個体再生した。

PCR 分析においては、ペリプロカ形質転換体すべてに目的増幅断片 (611bp) が確認された (図-2.)。また、Western 分析においても陽性対照 (トレンシア形質転換体) およびペリプロカ形質転換体に GFP 分子量である 27kDa のバンドが検出された (図-3.)。

これまででは、ペリプロカ形質転換体に関して、蛍光顕微鏡による GFP の確認にとどまっていたが、本研究で行ったジェノミック PCR 分析により、導入遺伝子の染色体への挿入が確認された。また、Western 分析により、GFP 遺伝子の発現がタンパク質レベルで確認された。さらに、用いた 2 種類のプラスミドベクターに関して相違はみられず、ともに同様の結果が得られた。

本研究により、ペリプロカの形質転換系が確立された。今後は、ポリイソプレネン生合成機構解明に向けたモデル植物としての利用が期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、GFP ベクターを御提供頂いた株式会社豊田中央研究所の光川典宏氏に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- (1) Montro, P. *et al.* (2000) *Plant Cell Report* 19 : 851 - 855.
- (2) 馬場健史ら (2001) 日本生物工学会講演要旨集 : p.165.
- (3) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol Plant* 15 : 473 -493.
- (4) Otani, M. *et al.* (1998) *Plant Biotech* 15 : 11-16.
- (5) Murray, G. C. and Thompson, W. F. (1980) *Nucl Acid Res* 8 : 4321-4325.
- (6) 岡田雅人・宮崎香 (1999) 改訂タンパク質実験ノート (下),

163pp, 羊土社, 東京, 15-22.

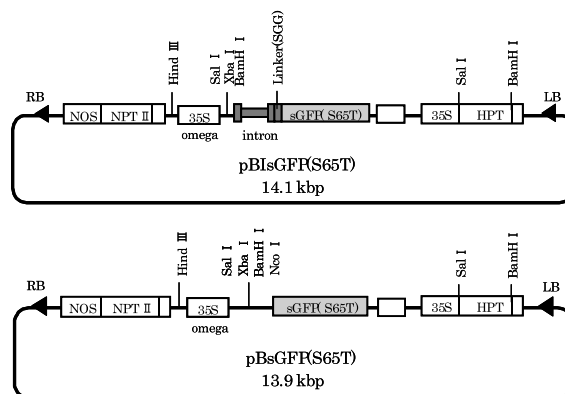


図-1. プラスミドベクターの T-DNA 領域の構造

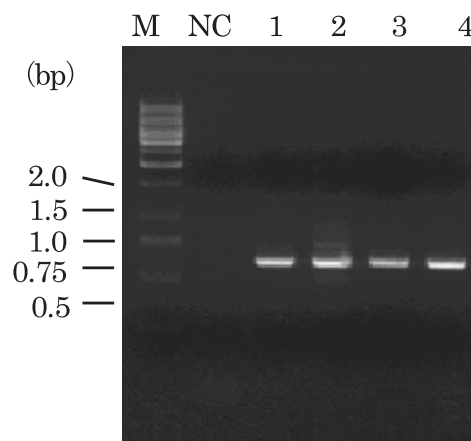


図-2. PCR 分析

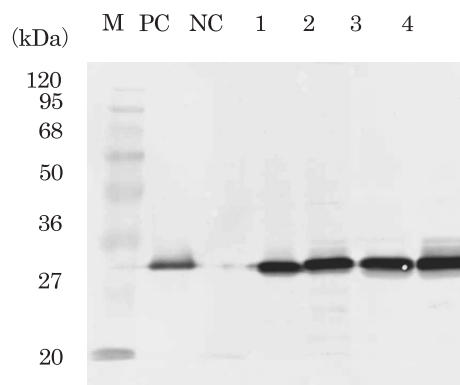


図-3. Western 分析

NC : *Periproca sepium* 野生株
 PC : *Torenia hybrida* cv. Summer wave blue pBIsGFP (S65T) 形質転換体
 1, 2 : *Periproca sepium* pBsGFP (S65T) 形質転換体
 3, 4 : *Periproca sepium* pBIsGFP (S65T) 形質転換体

(2002年12月24日 受理)