

速報

35S プロモーターと REF (rubber elongation factor) プロモーターの比較^{*1}

— GUS 遺伝子のペリプロカ乳管での発現に関して —

長井加奈^{*2} ・ 玉泉幸一郎^{*3}

キーワード：天然ゴム，プロモーター，REF，ペリプロカ

I. はじめに

天然ゴムは主にパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) で生産される有用な植物原料である。天然ゴムの原料となるラテックスは乳管と呼ばれる器官で生産・貯蔵される。乳管は師部の一部が変化した器官であり、ラテックスは乳管細胞の細胞質が乳化したものである (4)。天然ゴムの生合成には REF (rubber elongation factor) が必要である (3)。REF はゴム生産植物の中でもパラゴムノキのみで確認されているタンパク質で、ラテックス内で最も量の多いタンパク質である (5)。また、REF の量とゴムの生産量は比例することも知られている (11)。

遺伝子の転写にはプロモーターが必要である。中でも CaMV35S プロモーター (以下35S) は高等植物細胞への外来遺伝子導入のために広く用いられている。このプロモーターによる転写促進は器官に非特異的で恒常的であるが、全ての器官で発現するためにターゲットとなる植物体に負荷がかかるという問題がある。従って、器官特異的に転写を促進するプロモーターは、物質の効率的な生産や植物体に負荷を与えない遺伝子発現を行うために有用である。

REF は主にラテックスに存在することから、この上流に存在する REF プロモーター (以下 REFpro) は乳管特異的であると考えられる (1)。これまでに REFpro はタバコとシロイヌナズナの維管束で特異的に遺伝子発現を促すと報告されている (11)。しかし、ゴムを生産する植物で REFpro の働きを調べた研究はまだ行われていない。

パラゴムノキは再分化効率・遺伝子組換え効率が低く (8)、遺伝子組換え実験が困難である。そこで我々は組換え効率の高いペリプロカ (*Periploca sepium*) を実験に用いた。ペリプロカはパラゴムノキと同じシス型の天然ゴムを生産し (2)、乳管構造も類似している (9)。さらに、再分化効率 (6)・遺伝子組換え効率が高い (7) ため、パラゴムノキのモデル植物として適している。

今回の実験では、パラゴムノキからクローニングした REFpro

を、GUS 遺伝子と結合させたベクターを作製した。さらにこれをペリプロカに導入し、GUS 発現の様子を観察した。

II. 材料と方法

1. ベクターの作製

パラゴムノキの葉から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。REFpro を含む領域は DDBJ に公開されている配列 (AF380139) から設計したプライマー (表 1) を用いて増幅した。得られた 260bp のフラグメントを切り取り精製し、これを制限酵素 (Hind III, Spe I) で 37°C 2 時間処理した。同時に pIG121-Hm ベクター (図-1 A) (10) を制限酵素 (Hind III, Xba I) で同様に処理した。これらを ligation high を用いて 16°C で 1 時間ライゲーションし、REFpro-GUS を持つベクター (図-1 B) を作製した。このベクターは REFpro の下流に GUS 遺伝子を含み、その他に抗生物質耐性としてカナマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子を含んでいた。

2. ペリプロカの遺伝子組換え

作製したベクターをアグロバクテリウム LBA4404 に形質転換した。これを用いて、約 1 cm に切ったペリプロカの茎に REFpro-GUS を含む DNA 領域を導入した (7)。遺伝子を組換えたペリプロカは抗生物質を含む再分化培地上で 25°C、明期 16 時間の条件下で培養した。35S-GUS (図-1 A) の形質転換について

表-1. プライマー配列

増幅領域	配列
REFpro	Forward 5'-CGTAAGCTTTGCGATACTCCATGTG-3'
	Reverse 5'-GATCACTAGTCAAAAACGCGATCGCTTAA-3'
35S	Forward 5'-TCATTTGGAGAGAACACGGGGAC-3'
	Reverse 5'-CCAGTCGAGCATCTCTTCAGCGTA-3'
GUS	Forward 5'-TTTAACTATGCCGGATCCATCGC-3'
	Reverse 5'-CCAGTCGAGCATCTCTTCAGCGTA-3'

REFpro : REF プロモーター

35S : CaMV35S プロモーター

GUS : GUS 遺伝子

(*35S と GUS の Reverse Primer は同じ)

*1 Nagai, K. Gyokusen, K. : Comparison of REF (rubber elongation factor) promoter with 35S promoter

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

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

も同様に行った。

3. Genomic PCR 分析

再分化した個体の葉から DNA を抽出し (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN) Genomic PCR によって 35S (約1.2Kbp) または REFpro と GUS 遺伝子 (約530bp) の有無を確認した。目的遺伝子増幅のためのプライマーは表1の通りであった。

3. GUS 分析

組換え 3 日後の植物体と、再分化した個体をそれぞれ分析に用いた。組換え 3 日後の植物体は、アグロバクテリウムを除菌後、X-gluc 溶液に 37℃ で 12 時間浸漬した。植物体の色素を除去するため、70% エタノールに 1 時間浸漬した後、実体顕微鏡で観察した。再分化個体は、茎を厚さ約 0.5mm の切片にし、8 倍に希釈した X-gluc 溶液に 37℃ で 12 時間浸漬した。70% エタノールに 1 時間浸漬した後、生物顕微鏡で観察した。

Ⅲ. 結果と考察

1. Genomic PCR 分析

ペリプロカにおける遺伝子組換え効率は約 70% であると報告されており (7), 本研究においても再分化個体の Genomic PCR 分析では全ての個体でプロモーターと GUS 遺伝子の存在が確認された (図-2)。このことから、REFpro を用いた遺伝子組換えは 35S の場合と同等であると考えられる。

2. GUS 分析

組換え 3 日後の外植体の GUS 分析では、35S ではほぼ茎全体で GUS 発現が認められ (図-3 A), REFpro では師部付近で GUS 発現が確認された (図-3 B)。このことから、今回作製したベクターにおいて、REFpro はプロモーターとして機能したといえる。

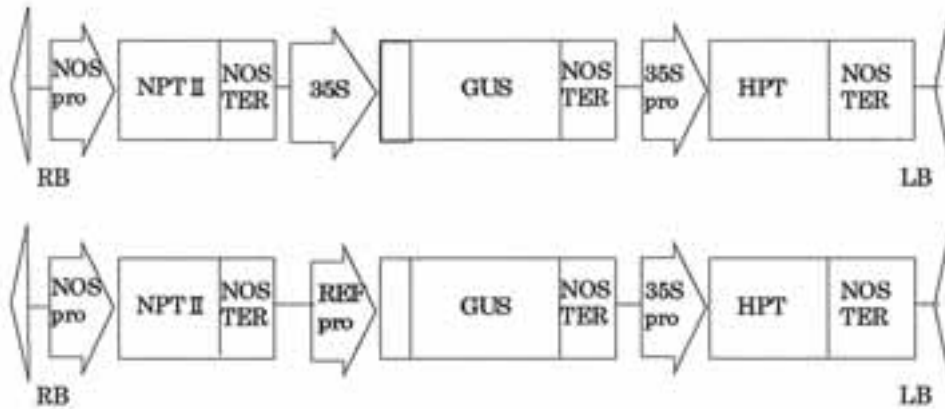


図-1. ベクターの T-DNA 領域

A : pIG121-Hm (35S-GUS) ベクター

B : REFpro-GUS を含むベクター

35S : CaMV35S プロモーター,

REFpro : REF プロモーター,

GUS : GUS 遺伝子,

NPT II : カナマイシン耐性遺伝子,

HPT : スイグロマイシン耐性遺伝子



図-2. 再分化個体の Genomic PCR 分析

A : 35S-GUS 再分化固体 (s1 ~ s6)

B : REFpro-GUS 再分化固体 (r1 ~ r6)

M : 1Kbp DNA Ladder,

PC : Positive control, NC : Negative control

再分化個体の GUS 分析は、Genomic PCR 分析でプロモーターと GUS 遺伝子の両方を確認した個体について行い、35S と REFpro で GUS の発現部位に違いが見られた (図-4)。つまり、35S ではほとんどの細胞で GUS が発現したが、REFpro では主に髓付近と師部付近のみで GUS が発現した。ペリプロカでは、乳管は髓と師部に存在することがわかっている (9)。このことから、今回の結果は REFpro が乳管細胞で特異的に遺伝子発現を促した可能性を示している。もし REFpro が乳管特異的であれば、今後 GUS が発現した細胞群を詳細に調べることにより、ラテックス生産に関与している細胞群を特定することが可能となる。

以上の結果から、今回作製した REFpro をプロモーターとして用いることにより以下の3点の効果が期待できる。①導入遺伝子を乳管細胞だけで発現させることで、植物への負荷を低減した遺伝子組換えが可能となる。② REFpro で発現する細胞群を調べることにより、このタンパク合成に関わっている細胞を特定するこ

とができる。③これらのことにより、ラテックスの生合成に関与している遺伝子の検索が容易となる。

引用文献

- (1) Arokiaraj, P. (2000) S.M.jain, S.c.Minocha (Eds.) , Molecular Biology of Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 305-325.
- (2) 馬場健史ほか (2001) 日本生物工学会講演要旨集, p.165.
- (3) Dennis, M. S. *et al.* (1989) J.Biol. Chem. 264 : 18618-18626.
- (4) Dickenson, P.B. (1985) Israel J. Bot. 34 : 283-293.
- (5) Ko, J. H. *et al.* (2003) Plant Mol. Biol. 53 : 479-492.
- (6) 宮柱明日香ほか (2003) 九大演報 84 : 43-50.
- (7) 宮柱明日香ほか (2003) 九州森林研究 56 : 178-179.
- (8) Montoro, P. *et al.* (1997) Symposium on the biochemical and

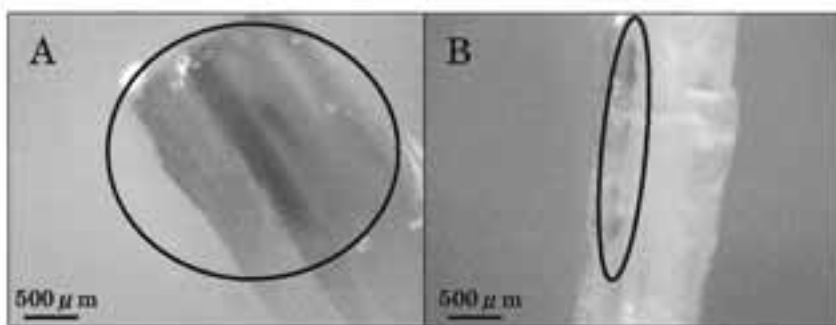


図-3. 組換え3日後の GUS 発現の様子
A : 35S-GUS, B : REFpro-GUS
円 : GUS 発現部位

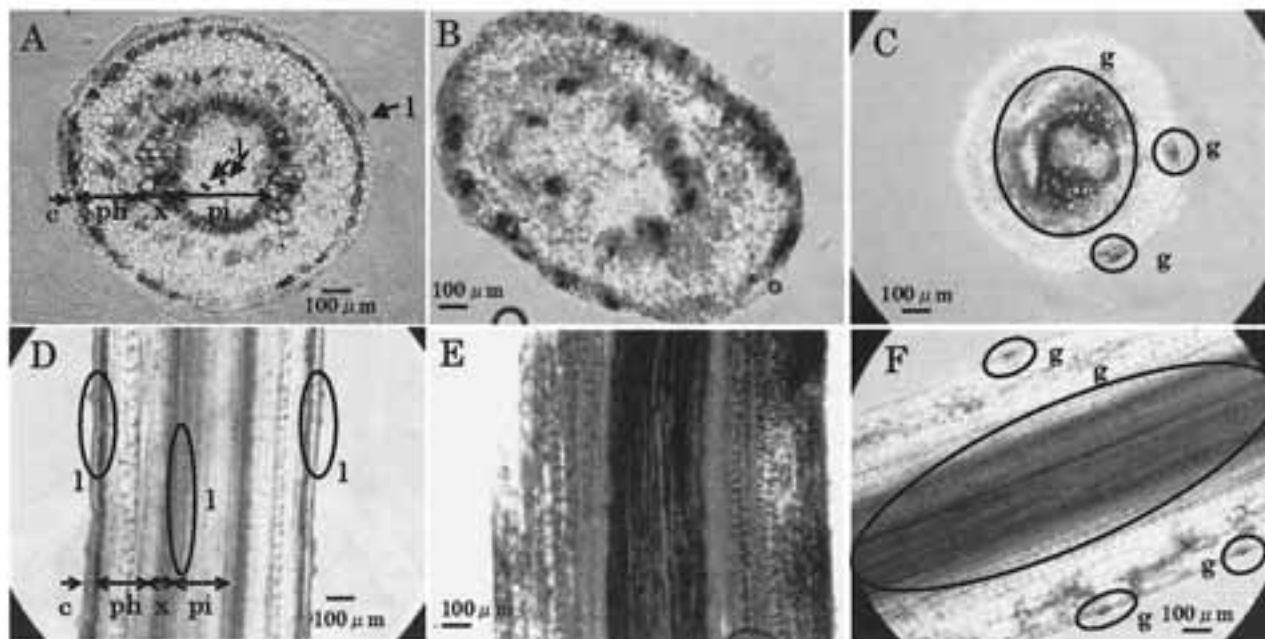


図-4. 再分化個体の茎における GUS 発現の様子
A : 非組換え体 (横断面), B : 35S-GUS (横断面)
C : REFpro-GUS (横断面), D : 非組換え体 (横断面)
E : 35S-GUS (縦断面), F : REFpro-GUS (縦断面)
c : 皮層, ph : 師部, x : 木部, pi : 髓, l : 乳管,
g : GUS の発現部位

- molecular tools for exploitation, diagnostic and rubber tree improvement, October 20-22. Mahidol University, Bangkok.
- (9) 長井加奈・玉泉幸一郎 (2006) 九州森林研究 59 : 177-179.
- (10) Ohta, S. *et al.* (1990) Plant Cell Physiol. 31 (6) : 805-813.
- (11) Priya, P. *et al.* (2006) Plant Science 171 : 470-480.
(2006年11月17日受付 ; 2007年1月30日受理)