

速報

形質転換ペリプロカにおけるビタミンE生合成関連遺伝子の発現量の測定^{*1}仲山美葵^{*2} · 陳任^{*3} · 玉泉幸一郎^{*3} · 渡辺訓江^{*4} · 山東智紀^{*4}

キーワード：天然ゴム，ビタミンE，パラゴムノキ，ペリプロカ，Real-time PCR

I. はじめに

天然ゴムは主にパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) で生産される植物性有用資源である。パラゴムノキ由来の天然ゴムは、豊富さ、品質の高さ、収穫の容易さから、世界の天然ゴム生産量の98%を占めている。

天然ゴムの原料となるラテックスにはゴム成分のほかにタンパク質、脂質、糖アルコール、ビタミンEといった成分が含まれている。近年、ビタミンEは抗酸化作用によりゴム製品中において天然老化防止剤として作用することが明らかになってきた(6)。現在、ビタミンEの生合成遺伝子はほとんどが単離され、シロイヌナズナなどの植物において遺伝子組換えによるビタミンE含量の増大や組成改変が報告されている(2)。パラゴムノキEST中にもこれらのビタミンEのホモログ遺伝子が多く見出されることから、同様に遺伝子組換えによるビタミンE含量の増加ができると考えられる。

ただし、パラゴムノキは再分化効率が低く、形質転換系としての利用が難しい(4)。そのためわれわれはcis型ゴム産出植物のモデル植物として、再分化効率・遺伝子組み換え効率が高いペリプロカ (*Periploca sepium*) (1) を用いている。

ビタミンEはトコフェロール4種類、トコトリエノール4種類の総称である。植物の光合成組織には、一般的に広くトコフェロールが含まれていることが知られており、トコトリエノールは単子葉植物の種子内など一部の器官にしか見つからない。パラゴムノキの場合は葉に α -トコフェロール、ラテックスに α -トコトリエノールが含まれており、ビタミンEの研究材料として大変興味深い。ペリプロカの場合は葉に α -トコフェロールが含まれる。

本研究では、パラゴムノキからクローニングしたビタミンE生合成関連遺伝子をGFP遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子を含むバイナリーベクターに導入し、アグロバクテリウム法を用いてこれをペリプロカに導入した。さらにGFP発現の様子を観察し、Genomic PCRによる目的遺伝子導入の確認、Real-time PCRによる目的遺伝子の発現量の定量を行った。

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。HPPDを含む領域は遺伝子データベースに公開されている配列情報からDegenerate PCRとRACE法によりクローニングした(以下、HbHPPD)。HbHPPD断片を制限酵素(XbaI, SpeI)で37℃2時間処理した。同時にpMSIsGFPベクターを制限酵素(KpnI, SpeI)で同様に処理した。これらをligation highを用いて16℃で1時間ライゲーションし、HbHPPDを持つベクターを作製した(図-1)。PMSIsGFPベクターはGFP遺伝子、抗生物質耐性としてカナ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EHA105に形質転換した。これを用いて、約0.8cmに切ったペリプロカの茎にHbHPPD遺伝子を含むDNA領域を導入した。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℃、明期16時間の条件下で培養した。

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HbHPPD遺伝子(約1,375Kbp)とGFP遺伝子(約682bp)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。

4. Real-time PCR分析

3.において、両遺伝子の存在が確認された再分化個体の葉からRNAを抽出し(RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN)、cDNAを合成した(High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, QIAGEN)。このcDNAを用いてReal-time-PCRを行った。内部標準遺伝子、HbHPPD遺伝子増幅のためのプライマーは表-1の通りであった。

発現量が一定の内部標準遺伝子:Actinについて、20ng/ μ LのRNA溶液10 μ LをもとにRT-PCRを行い、そのCt値から検量線をもとに内部標準遺伝子の発現量を定量し、このサンプル量を基

^{*1} Nakayama, M., Chen, R., Gyokusen, K., Watanabe, K. and Santo, T. : Real-time PCR analysis for vitamin E biosynthesis gene expression of *Periploca sepium* transformant

^{*2} 九州大学大学院生物資源環境科学府 Grad. Sch. Biore. and Bioenv. 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

^{*4} 株式会社ブリヂストン Bridgestone Corp., Tokyo 104-8340

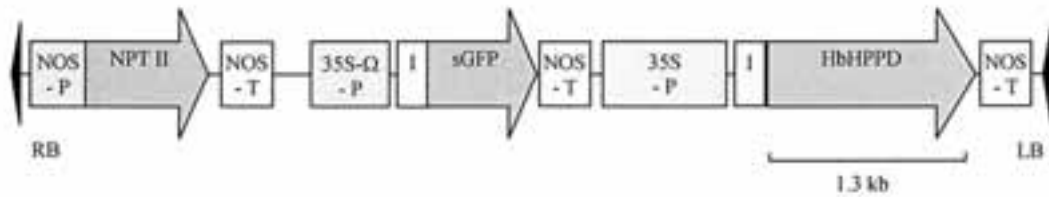


図-1. ベクターの T-DNA 領域
 NPT II : カナマイシン耐性遺伝子
 sGFP : sGFP 遺伝子
 35S - P : CaMV35S プロモーター

準とした相対値を求めた。

次に、HbHPPD 遺伝子について、内部標準遺伝子の場合と同量の RNA 溶液をもとに RT-PCR を行った。その Ct 値から検量線をもとに目的遺伝子の発現量を定量した。

反応に使用した RNA の誤差を補正するため、得られた HbHPPD 遺伝子の定量結果を内部標準遺伝子で得られた相対値で除し、これを発現相対値とした。

Ⅲ. 結果と考察

1. Genomic PCR 分析

再分化した22個体のうち、19個体で HbHPPD 遺伝子、GFP 遺伝子の両方の存在が確認された (図-2)。ペリプロカにおける遺伝子組換え効率は70%程度であると報告されているが (3)、本研究においては85%と高い値が得られた。

2. Real-time PCR 分析

Genomic PCR 分析で HbHPPD 遺伝子と GFP 遺伝子の両方を確認した再分化個体について Real-time PCR 分析を行った結果、19個体のうち、14個体で HbHPPD 遺伝子の発現が確認された (図-3)。最も発現量の大きいものでは内部標準遺伝子の23倍の発現量が確認された。

このようなクローン間の発現量の差は形質転換体ゲノム内での導入遺伝子の導入部位やコピー数 (5) に起因すると考えられ、今回発現が確認されなかったのはコピー数の過剰によるものではないかと考えられる。

以上、HbHPPD 遺伝子の導入された形質転換体を得られ、遺伝子の発現が確認された。このようにビタミン E 生合成関連遺伝子である HbHPPD の発現が確認された形質転換体を得られたことで、植物体におけるビタミン E 含量の増加が期待される。今後、この形質転換体を成長させ、実際のビタミン E 含量を測定し、実際の測定値と今回得られた Real-time PCR の結果の対応などについて、考察していく予定である。

引用文献

- (1) 馬場健史ほか (2001) 日本生物工学会講演要旨集. p. 165.
- (2) Edger B Cahoon. *et al.* (2003) Nature Biotechnology 21 : 1082-1087.
- (3) 宮柱明日香ほか (2003) 九州森林研究 56 : 178-179.
- (4) Montoro, P. *et al.* (1997) Symposium on the biochemical

表-1. プライマー配列

Genomic PCR			
HbHPPD	Forward	5' - ATACGGCTTGTCGCTTCTCCTG - 3'	
	Reverse	5' - CGCATCCACCCTTCTGGTATCT - 3'	
Real-time PCR			
HbHPPD	Forward	5' - GCCATCGCCATAGAAGTTGAG - 3'	
	Reverse	5' - CGCGCAGCGTAGTGTT - 3'	
Actin	Forward	5' - TTGTTAGCAACTGGGATGATATGG - 3'	
	Reverse	5' - CAGGGTGTCTTCAGGAGCAA - 3'	

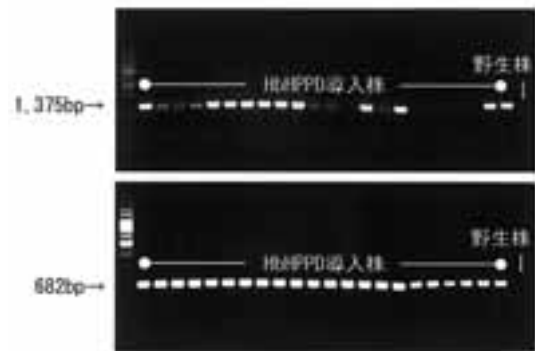


図-2. 再分化個体の GenomicPCR 分析
 上 : HbHPPD の1, 375bp フラグメントの増幅
 下 : GFP の682bp フラグメントの増幅

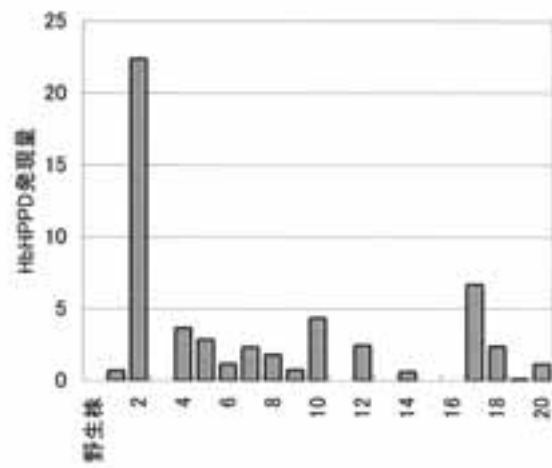


図-3. 再分化個体の Real-time PCR 分析

and molecular tools for exploitation, diagnostic and rubber tree improvement October. 20-22, Mahidol University, Bangkok.

(5) Reed B. Wickner. *et al.* (2002) *Advances in Genetics* 46 :

485-525.

(6) S. Al-Malaika. *et al.* (2000) *Polymers & Polymer Composites* 8 (8) : 537-542.

(2007年11月19日受付 ; 2008年 1月24日受理)