

## 速報

## ペリプロカへのポリイソプレン生合成遺伝子の導入\*1

長井加奈\*2 · 山東智紀\*3 · 玉泉幸一郎\*2 · 福崎英一郎\*3 · 小林昭雄\*3 · 中澤慶久\*4  
馬場健史\*4 · 蘇 印泉\*5

キーワード：ペリプロカ，ポリイソプレン，遺伝子組換え

## I. はじめに

天然ゴム（ポリイソプレン）は、化石資源の代替資源として有用であり、その生合成系の解明、遺伝子組換えによる特性改変などが必要とされている。しかし、天然ゴム生産の主要樹種であるパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis* Muell) は組織培養による再分化が困難で、遺伝子組み換え効率も低い(4)。このため、実験材料には不適であり、代替となるモデル植物が必要である。

ペリプロカ (*Periploca sepium* Bunge) は、中国半乾燥地帯に生育する木本つる性植物で、パラゴムノキと同じシス型ポリイソプレンを含み(1)、再分化系(2)、アグロバクテリウム法による形質転換系(3)が確立しており、パラゴムノキの代替モデル植物として適している。

本報告では、ポリイソプレン生合成機構に関わるとされる2種類の遺伝子について、アグロバクテリウム法によりペリプロカへの導入試験を実施した。

## II. 材料と方法

## 1. 植物材料とアグロバクテリウム菌株

中国西安華山産ペリプロカの培養2ヶ月のシュートから、腋芽を含まない茎(1 cm)を採取し、*Agrobacterium tumefaciens* EHA105株により、形質転換を行った。

## 2. プラスミドベクターと目的遺伝子

形質転換用プラスミドベクターにはpMSIsGFPを使用した。マーカー遺伝子としてGFP遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子(NPT II)、MCS部分に導入遺伝子が含まれている(図-1)。導入遺伝子としては、イソペンテニルニリン酸(IPP)の異化酵素であるIPPisomeraseおよび、IPPを付加重合するcis-prenyltransferaseをコードする遺伝子を用い、それぞれにつきoverexpression, antisense, RNAiの3種類、計6種類の構築を

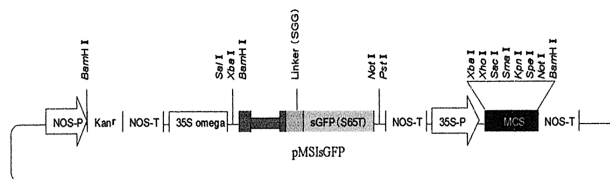


図-1. pMSIs ベクターの T-DNA 領域の構造

用いた。overexpression は発現を増強するために目的とする遺伝子と同じ配列を導入するもの、antisense は発現抑制のために逆配列を導入するもの、RNAi は目的とする RNA を切断するための遺伝子を導入するものである。それぞれの構築物は以下のとおりであった。

- No. 1. cis-prenyltransferase overexpression
- No. 2. cis-prenyltransferase antisense
- No. 3. cis-prenyltransferase RNAi
- No. 4. IPPisomerase overexpression
- No. 5. IPPisomerase antisense
- No. 6. IPPisomerase RNAi

## 3. 形質転換

MS培地(5)に感染促進剤アセトシリシリンゴン(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し(O.D.<sub>250</sub>=0.25)、ペリプロカの茎各約100本を浸漬させた。余分な水分を除去したのち、感染培地と同組成の固形培地(共培養培地)に置床し、3日間暗黒培養を行った。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)と抗生物質カナマイシン(50mg/l)を添加した選抜培地に置床し(6)この抗生物質により初期選抜を行った。

## 4. 植物体再生

初期選抜の後、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、定期的に植替えを行った。培養条件は温度25℃、明期16時間/日、光強度PPFD 50 μ

\*1 Nagai, K. Gyokusen, K. Sando, T. Fukusaki, E. Kobayashi, A. Nakazawa, Y. Bamba, T. and Su, Y.: Introduce polyisoprene biosynthesis genes into *Periploca sepium*.

\*2 九州大学農学部 Fac. Agric., Kyusyu Univ., Fukuoka 812-0053

\*3 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

\*4 日立造船株式会社 Hitachi Zosen Co., Hiroshima 722-2393

\*5 西北農林科技大学 Col. Fore., Northwest. Sci-Tech Univ., Agri. and Fore., China 712100

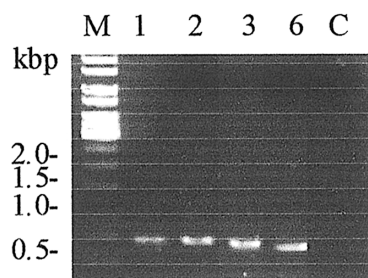


図-2. Genomic PCR 分析 (GFP)

M : Stable 1Kbp DNA Ladder (SIGMA)  
 C : 野生株  
 NC : negative control  
 1 : *cis*-prenyltransferase overexpression  
 2 : *cis*-prenyltransferase antisense  
 3 : *cis*-prenyltransferase RNAi  
 6 : IPPisomerase RNAi

$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 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, 増殖した。

#### 5. Genomic PCR 分析と RT-PCR 分析

蛍光反応を示す個体について, 葉 (50mg) から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し, GFP と導入遺伝子 (*cis*-prenyltransferase, IPPisomerase それぞれをコードする遺伝子) について Genomic PCR 分析を行った。また, Genomic PCR で GFP 遺伝子の導入が確認されたものについて, 葉 (50mg) から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて Total RNA を抽出し, RT-PCR 分析を行った。それぞれコントロールとして野生株の DNA および RNA を用い, RT-PCR では Negative Control として RNA を入れないものを用いた。

GFP 遺伝子増幅のためのプライマーは,

Forward : 5' - AGCTGGACGGCGACGTA AAA - 3'

Reverse : 5' - CAGGACCATGTGATCGCGCTT - 3'

導入遺伝子増幅のためのプライマーは,

Forward : 5' - GAGAGAACACGGGGGACTCTAGAC - 3'

Reverse : 5' - ATCCGCGCCGCGACTAGTG - 3'

を用いた。

### Ⅲ. 結果と考察

6 種類の構築物による形質転換試験全てにおいて蛍光を発する

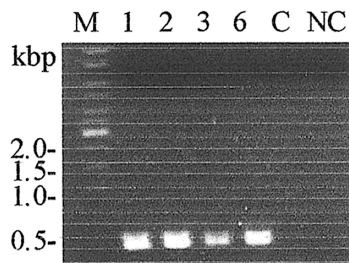


図-3. RT-PCR 分析 (GFP)

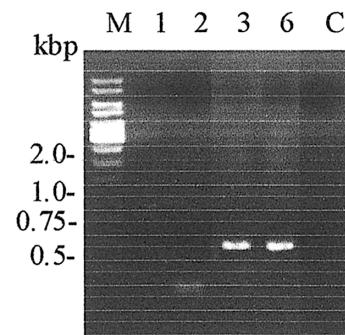


図-4. Genomic PCR 分析 (目的遺伝子)

形質転換体が得られ, カルスの段階での遺伝子導入効率は60~70%であった。これらの形質転換体のうち再生した植物体のサイズが小さかった No. 4 と No. 5 を除く 4 種類の形質転換体において Genomic PCR 分析を行った。GFP 遺伝子に関しては, 4 種類の構築全ての形質転換体で増幅断片 (611bp) が確認できた (図-2, 3)。導入遺伝子は No. 2 (増幅断片254bp), No. 3 (増幅断片592bp) と No. 6 (増幅断片625bp) で確認され, No. 1 (増幅断片1048bp) では確認できなかった (図-4)。No. 1 の形質転換体は, GFP 遺伝子の導入, 発現が確認できたにも関わらず, 導入遺伝子の導入は確認できなかった。これは形質転換体の作成過程で, 目的遺伝子部分のみが欠落したためと考えられる。

本研究では, ペリプロカへのポリイソプレン関連遺伝子のうち, No. 2, No. 3, No. 6 の遺伝子の導入に成功した。今後は残る No. 1, No. 4, No. 5 の形質転換体を作成し, さらに, 天然ゴムの生合成系や特性の解明のため, 導入した遺伝子群のゴム生産への影響を解析する必要がある。

### 引用文献

- (1) 馬場健史ほか (2001) 日本生物工学会 講演要旨集 p165.
- (2) 宮柱明日香ほか (2003) 九大演報84 : 43-50.
- (3) 宮柱明日香ほか (2003) 九州森林研究56 : 178-179.
- (4) Montro, P. *et al.* (2000) Plant Cell Report 19 : 851-855.
- (5) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) Physiol Plant 15 : 473-493.
- (6) Otani, M. *et al.* (1998) Plant Biotech 15 : 11-16.

(2004年11月9日 受付 : 2004年12月22日 受理)