

速報

REF (rubber elongation factor) プロモーターによる
GFP 遺伝子のペリプロカ乳管における発現*1

高橋晃司*2 · 陳任*3 · 玉泉幸一郎*3 · 渡辺訓江*4

キーワード：乳管, REF プロモーター, ペリプロカ, 遺伝子組換え, GFP

I. はじめに

パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) は乳管を持っており, 天然ゴムはこの乳管細胞の細胞質であるラテックス (4) 中に含まれる。天然ゴムは植物の生産する炭素資源として貴重な物質であり, 現在, その質や量の向上を目的とした遺伝子組換えが行われている (3)。

遺伝子組換えにおいて目的遺伝子が転写されるにはプロモーターが必要である。従来, CaMV35S プロモーター (以下35S) が多用されてきたが, このプロモーターは全ての部位で発現するために植物体に負荷がかかる。このことから, 乳管で特異的に機能するプロモーターを使用することは, 目的物質の生産や植物体に負荷のかからない遺伝子導入を行うために有効である。

乳管特異的なプロモーターを検索するためには, 候補プロモーターと目的遺伝子で構築したベクターをパラゴムノキに導入し乳管特異性を調べる必要がある。しかし, パラゴムノキは遺伝子組換え効率が低く (10) プロモーター検索には不向きである。そこで, パラゴムノキと同じシス型ゴムを生産し (2), 類似した乳管構造を有し, 遺伝子組換え・再分化効率が高い (8, 9), ペリプロカ (*Periploca sepium*) (1, 11) を用いることにした。

乳管特異的な候補プロモーターである REF プロモーター (以下 REFpro) (6) を用いて β -グルクロニダーゼ (以下 GUS) 遺伝子を導入したシロイヌナズナとタバコにおいて維管束で GUS 活性が確認され (13), また, ペリプロカでは髓と師部に GUS 活性が確認された (12)。しかし, これらの研究では REF プロモーターが乳管で特異的に発現していることを特定できていない。そこで, 本研究では, REF プロモーターが乳管特異的に機能するかどうかを, グリーン蛍光タンパク質 (以下 GFP) 遺伝子を利用することで検討した。

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 を含む領域は日本 DNA データバンク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 のフラグメントを制限酵素 (Hind III, Spe I) で処理した。同時に pBIsGFP ベクター (図-1 B) (7) を制限酵素 (Hind III, Xba I) で同様に処理した。これらを ligation high (TOYOBO) を用いて16℃で1時間ライゲーションし, REFpro-sGFP を持つベクター (図-1 A) を作製した。このベクターは REFpro の下流に sGFP 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-sGFP を含むベクターを導入した (9)。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。35S-sGFP (図-1 B) を含むベクターによる形質転換についても同様に行った。

そして, まず遺伝子組換えを行った各外植体からカルスを形成させた。その後各カルスから再分化したシュートを1クローンとした。

表-1. プライマーの配列

Genomic PCR	
配列	
REFpro	Forward 5' -CGTAAGCTTTGCGATACTCCATGTG-3'
	Reverse 5' -GATCACTAGTCAAAAACGCGATCGCTTAA-3'
35S	Forward 5' -GGAGCGGATAACAATTTACACA-3'
	Reverse 5' -TTCAAGCTTTAGTAACATAGATGACACCG-3'
sGFP	Forward 5' -AGCTGGACGGCGACGTA-3'
	Reverse 5' -CAGGACCATGTGATCGCGCTT-3'
Real-time RT-PCR	
配列	
sGFP	Forward 5' -GTCCGCCCTGAGCAAAGA-3'
	Reverse 5' -TCCAGCAGGACCATGTGATC-3'
GAPD	Forward 5' -GGCATTGTGAGGGTCTTATGAC-3'
	Reverse 5' -TGGTCCATCAACAGTCTTCTGAGT-3'
REFpro	REF プロモーター,
sGFP	sGFP 遺伝子,
35S	CaMV35S プロモーター
GAPD	GAPD 遺伝子

*1 Takahashi, K., Chen, R., Gyokusen, K. and Watanabe, N.: Expression of GFP gene with REF promoter in latex tube of *Periploca sepium*.

*2 九州大学農学部 Fac. Agric., 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 株式会社ブリヂストン中央研究所研究第1部天然ゴム研究ユニット Natural Rubber Res. Unit, Res. Dep. 1, Cent. Res., Bridgestone Co., Tokyo 187-8531

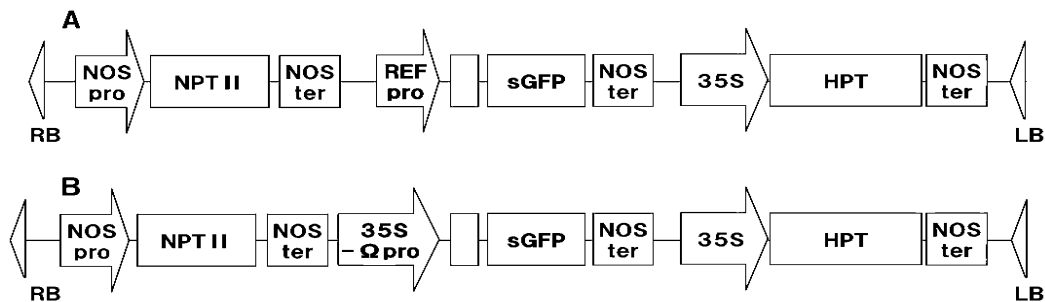


図-1. ベクターの T-DNA 領域

A : REFpro-sGFP を含むベクター REFpro : REF プロモーター
 B : pBIsGFP (35S-GFP) ベクター 35S : CaMV35S プロモーター
 sGFP : sGFP 遺伝子 NPT : カナマイシン耐性遺伝子
 HPT : ハイグロマイシン耐性遺伝子

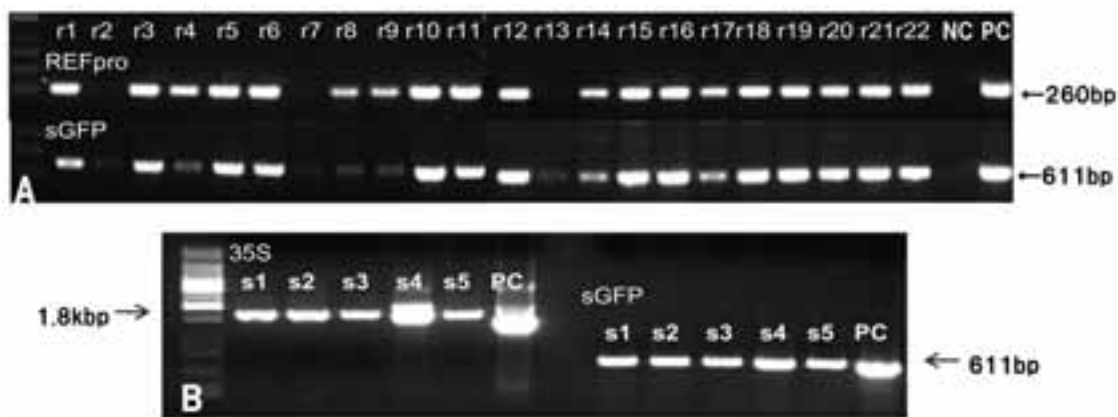


図-2. 再分化クローンの Genomic PCR 分析

A : REFpro-sGFP 再分化クローン (r1 ~ r22) PC : Positive control
 B : 35S-sGFP 再分化クローン (s1 ~ s5) NC : Negative control

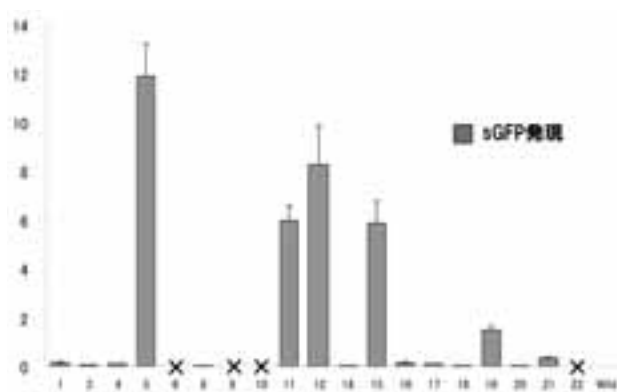


図-3. REFpro-sGFP 再分化クローンにおける sGFP の発現量

3. Genomic PCR 分析

再分化した REFpro-sGFP22クローンと 35S-sGFP5クローンそれぞれの葉から DNA を抽出し (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN), Genomic PCR によって 35S (約 1.8Kbp) または REFpro と sGFP 遺伝子 (約 611bp) 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 RT-PCR 分析

各個体の RNA 発現量を Real-time RT-PCR で相対定量した。

Genomic PCR 分析においてプロモーター、sGFP 遺伝子が共に導入されたのが確認できたクローンの葉から total RNA を抽出し (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN), RNase-Free DNase I Dnase (QIAGEN) で処理を行い混入した DNA を除去した。抽出した RNA 溶液の濃度を測定し、6段階の希釈を行い検量線用のサンプルを作製した。そして遺伝子導入個体と検量線の RNA サンプルを用い cDNA を合成し (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, QIAGEN), Real-time RT-PCR により sGFP 遺伝子の発現量を測定した。内部参照遺伝子としてはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (以下 GAPD) 遺伝子を用いた。

5. GFP 蛍光観察

35S-sGFP 再分化クローンと野生株、そして REFpro-sGFP 再分化クローンにおいて sGFP 遺伝子の発現量が高かった個体を用いて蛍光顕微鏡により GFP 蛍光を観察した。観察は茎を厚さ約 50 μm の切片を作製し行った。

Ⅲ. 結果と考察

1. Genomic PCR 分析

形質転換を行った REFpro-sGFP22クローンのうち、2, 7, 13 以外の 19クローンには REFpro と sGFP 遺伝子が両方とも導入さ

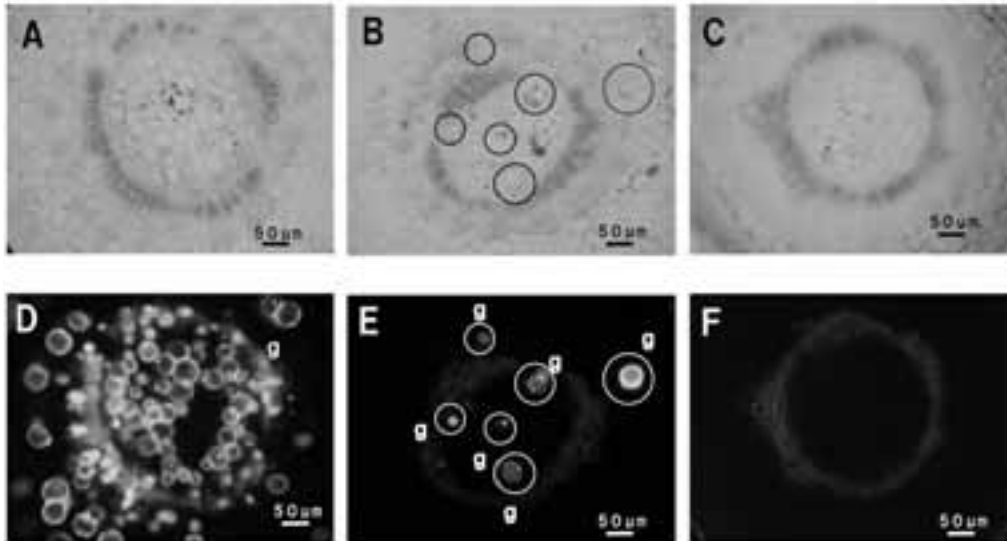


図-4. 再分化クローンの茎における GFP 蛍光の様子
 A, D : 35S-sGFP (横断面) B, E : REFpro-sGFP (横断面)
 C, F : 非組換え体 (横断面) g : sGFP 遺伝子の発現部位

れていた (図-2A)。また, 35S-sGFP クローンは全てのクローンに35S と sGFP 遺伝子が導入されていた (図-2B)。

2. Real-time RT-PCR 分析

Genomic PCR 分析において REFpro と sGFP の遺伝子の導入が確認できた19クローンのうち15クローンで sGFP 遺伝子の発現が確認された (図-3)。この結果は, 組換えクローン内で REFpro が機能したことを示しているが, 4クローンは機能しなかったことから, 発現の仕方については, さらに検討が必要である。発現量については, 35S-sGFP の発現量 (275) に比べ非常に低かった。これは, プロモーターとして機能する部位が少なかったことに起因していると考えられる。

3. GFP 蛍光観察

野生株, 35S-sGFP 再分化クローン, および Real-time RT-PCR の発現量の高かった4クローン (5, 11, 12, 15) を用いた。

GFP 蛍光は野生株では全く見られなかった。35S-sGFP クローンでは組織全体に, REFpro-sGFP クローンでは髄と師部の一部に GFP 蛍光が確認できた (図-4)。

ペリプロカの乳管は髄と師部に存在する (11)。このことから, REFpro-sGFP において見られた GFP 蛍光は髄と師部に存在する乳管で発現している可能性がある。しかし, REF プロモーターはゴムだけではなく脂質の生合成に関与していることから, 脂質を産生している細胞も含めて発現している可能性もある。今後は, 同一の試料で, 脂質の染色と GFP の発現部位の観察を行い, それらを比較することで, 発現部位の特定が可能と考えられる。今回の結果では REF プロモーターが乳管特異的であると結論するまでには至らなかったが, 乳管や脂質細胞で機能しているプロモーターであることを確認できたといえる。

IV. おわりに

今回の結果より, 乳管特異的のプロモーターを検索する上でペリプロカを用いることの有用性が示された。つまり, パラゴムノキからクローニングされた候補プロモーターがペリプロカの乳管で機能すれば, それは利用できる可能性を示した結果である。

今後, この方法を用いて, 乳管特異的のプロモーターの検索を行っていく予定である。

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) Bamba, T. *et al.* (2007) Zeitschrift für Naturforschung-Section C Journal of Biosciences 62 (7-8) : 579-582.
- (3) Blanc, G. *et al.* (2006) Plant Cell Reports. 24 (12) : 724-733.
- (4) Dennis, M. S. *et al.* (1989) J. Biol. Chem. 264 : 18618-18626.
- (5) Dickenson, P. B. (1985) Israel J. Bot. 34 : 283-293.
- (6) Han, K.-H. *et al.* (2000) Tree Physiology 20 : 503-510.
- (7) Kajiyama *et al.* (2007) Plant Biotechnol. 24 : 315-320.
- (8) 宮柱明日香ほか (2003) 九大演報 84 : 43-50.
- (9) 宮柱明日香ほか (2003) 九州森林研究 56 : 178-179.
- (10) Montoro, P. *et al.* (1997) Symposium on the biochemical and molecular tools for exploitation, diagnostic and rubber tree improvement, October 20-22, Mahidol University, Bangkok.
- (11) 長井加奈・玉泉幸一郎 (2006) 九州森林研究 59 : 177-179.
- (12) 長井加奈・玉泉幸一郎 (2007) 九州森林研究 60 : 121-124.
- (13) Priya, P. *et al.* (2006) Plant Science 171 : 470-480.

(2008年12月6日受付; 2009年1月26日受理)