

ナス科植物へのペルオキシダーゼ遺伝子の導入

都築 正男・浅尾 浩史・荒井 滋・吉田 和哉*・新名 博彦*

Introduction of Peroxidase Gene into *Solanum* spp.

Masao TSUDUKI, Hiroshi ASAO, Shigeru ARAI, Kazuya YOSHIDA* and Atsuhiko SHINMYO*

Key words : peroxidase gene, *Solanum* spp., insect and pathogen resistant, lignin, transgenic plant

植物のペルオキシダーゼは多様なアイソザイムとアイソフォームを構成していることが知られている。このためペルオキシダーゼの触媒する反応は多岐にわたっており、重要な役割を担っていると考えられている。その機能は細胞壁のリグニン生合成¹⁾や過酸化水素の除去¹⁾、有毒還元物質の酸化²⁾、インドール酢酸 (IAA) の酸化³⁾など、植物の生活環上では発生や分化、生長⁴⁾に関与している。これらの働きの一つに、傷害誘導性ペルオキシダーゼの触媒により合成されるリグニンの、病虫害に対する防御反応¹⁾がある。ペルオキシダーゼ遺伝子を導入した耐病虫害性植物の報告は少ないが、イネ傷害誘導性ペルオキシダーゼ遺伝子を導入し、野火病と疫病抵抗性タバコを作出した例⁵⁾がある。本研究では、耐病虫害性のナス科植物を作出するために、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ遺伝子 (*prxC2*)⁶⁾を導入した。

ナス科植物へのペルオキシダーゼ遺伝子の導入

*prxC2*をCaMV35Sプロモーターに連結した融合遺伝子を組み込んだバイナリープラスミドpBI121を持つアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* EHA101株)を、植物体への遺伝子の導入

第1表 アグロバクテリウムに感染させたナス科植物の再分化および形質転換効率

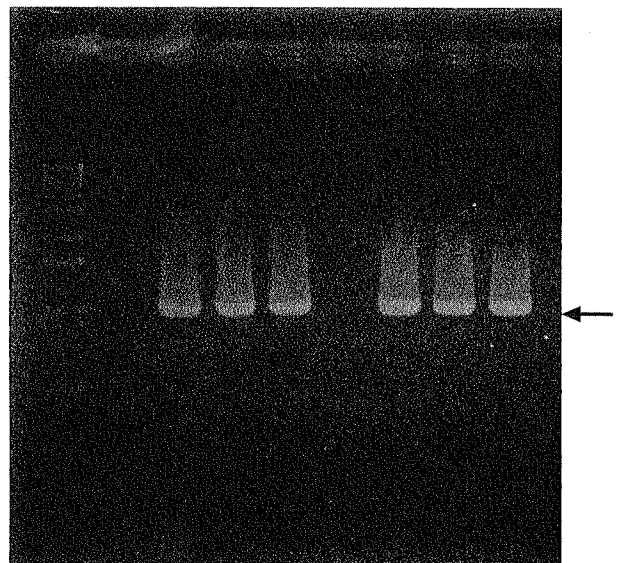
Table 1. Efficiency of regeneration and transformation of *Solanum* spp. infected *Agrobacterium*

品 種	置床数	再分化数 (率%)	発根個体数 (率%)	形質転換体数 (率%)
千両二号	4158	160 (3.9)	19 (0.5)	14 (0.3)
丸なす	1008	43 (4.3)	1 (0.1)	1 (0.1)
ヒラナス	4993	130 (2.6)	103 (2.1)	77 (1.5)

に用いた。無菌播種後10日後のナス科植物 ‘千両二号’ (*Solanum melongena*), ‘丸なす’ (*Solanum*

melongena var. *marunasu*), ‘ヒラナス’ (*Solanum integrifolium*) の胚軸に上述のアグロバクテリウムを感染させ、2日間共存培養した後、選択培地で選抜した。選択はスクロース3%, IAA0.1mg/lを加えたMS培地 (ゲルライト0.3%)にカナマイシン100mg/l, カルベニシリン400mg/lを添加した培地, 発根は植物ホルモン無添加のMS培地 (ゲルライト0.3%)にカナマイシン50mg/l, カルベニシリン400mg/lを添加した培地を用いた。再分化個体は, ‘千両二号’では19個体 (0.5%), ‘丸なす’では1個体 (0.1%), ‘ヒラナス’では103個体 (2.1%)得られた (第1表)。

M 1 2 3 4 5 6 7 8



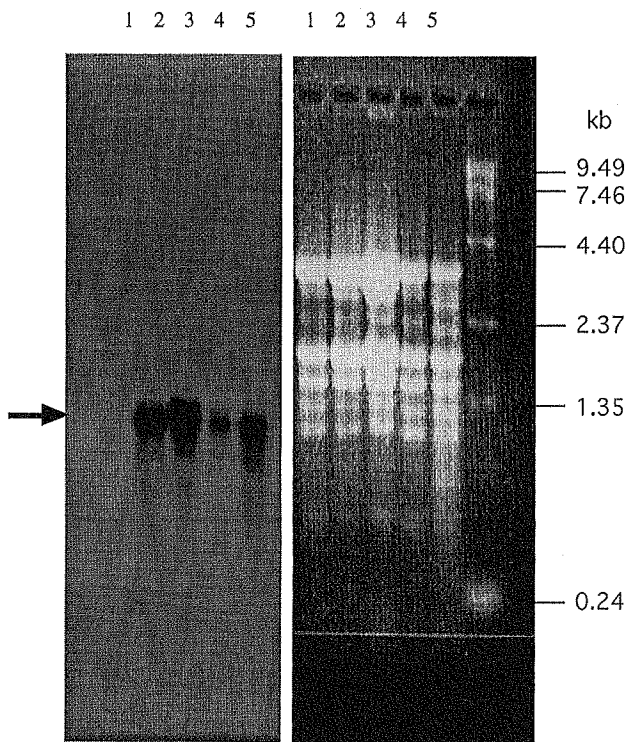
M; マーカー 1; 対照個体 ‘千両二号’
2, 3, 4; 形質転換体 ‘千両二号’ 5; 対照個体 ‘ヒラナス’
6, 7, 8; 形質転換体 ‘ヒラナス’ ← *prxC2* 遺伝子

第1図 PCRによるナス科植物への遺伝子導入の確認
Fig. 1. Confirmation of introduced gene in *Solanum* spp. using PCR

* 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

また、得られた形質転換体の葉から調製した、染色体DNAを鋳型にしてPCRを行い、遺伝子の導入を確認した。その結果、‘千両二号’では14個体(0.3%)、‘丸なす’では1個体(0.1%)、‘ヒラナス’では77個体(15%)の*prxC2*導入個体が得られた(第1図)。

この培養系では再分化率が低く5%未満ではあるが、アグロバクテリウム感染後の早い段階で高い選抜圧をかけているため、得られた再分化個体のほとんどが、*prxC2*導入個体であった。一方、培養初期に薬剤による選抜をかけずに発根段階で選抜を行えば、再分化率が上昇するが、PCRによる確認では遺伝子の導入が見いだされないエスケープ個体数が増加するため、本研究で用いた培養系は形質転換体の選抜を行うのに適していた。



1 ; 対照個体 2, 3, 4, 5 ; 形質転換体
左 ; ノザン解析 右 ; 臭化エチジウム染色 ← *prxC2* 遺伝子

第2図 *prxC2*導入個体の*prxC2* mRNAの発現

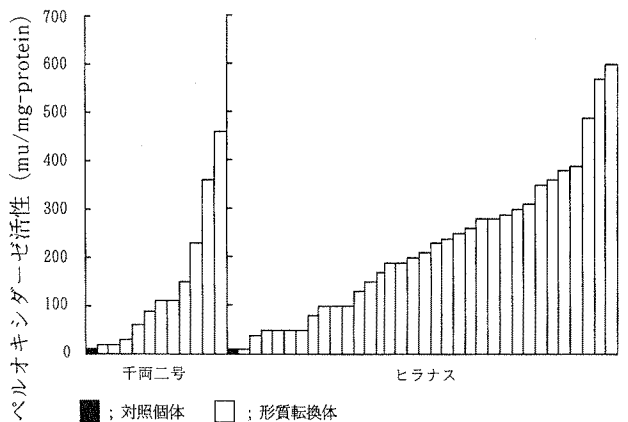
Fig. 2. Expression of *prxC2* mRNA in transgenic *S. integrifolium* ‘Hiranasu’

遺伝子組換えナス科植物のペルオキシダーゼ遺伝子の発現

*prxC2*の導入を確認した個体の転写レベルでの発現を確認するため、葉からATA法¹⁾によって全RNAを調製し、1.5%ホルマリン変性アガロースで電気泳動した後、ナイロンメンブレンに転写

した。次いで³²P-dCTPで標識した*prxC2* cDNAをプローブとしてノザン解析を行った。形質転換体では*prxC2*と同様の分子量のmRNAが検出され、一方、非形質転換体では、発現が見られなかった(第2図)。このことから、導入した*prxC2*がナス科植物においても発現したことが確認された。

さらに*prxC2*導入個体の葉から粗酵素液を調製して、オルトアミノフェノールを基質として、反応により生成するイソフェノキサジンの可視領域480nmの吸収増加を分光光度計で測定することでペルオキシダーゼ活性を算出し、翻訳レベルでの発現を確認した。その結果、形質転換体は非形質転換体の数十倍高いペルオキシダーゼ活性を示す個体が見いだされた(第3図)。



第3図 *prxC2*導入個体のペルオキシダーゼ活性。独立した各個体(‘千両二号’11個体、‘ヒラナス’33個体)の活性を示す

Fig. 3. Peroxidase activity of transgenic *Solanum* spp. Peroxidase activity in independent clones was shown

*prxC2*の発現は物理的傷害によって誘導されることが明らかになっており、傷害ストレス応答に関与する転写制御機構の解明のモデル遺伝子に利用されている⁸⁾。従ってナス科植物においても、この遺伝子を発現させることで、病原菌の感染や昆虫による食害に対する防御反応に寄与できる可能性がある。今後、ペルオキシダーゼ活性が高い個体を中心に、アザミウマや鱗翅目害虫等に対する耐虫性や青枯病等に対する耐病性の確認を行う必要がある。また、今回用いたCaMV35Sプロモーターは恒常的にあらゆる器官で導入した遺伝子を発現させるため、器官や時期特異的に高発現させるプロモーターを用いることで、より実用的な品種の作出が可能と考えられる。

1) Grisebach, H. 1981. The Biochemistry of Plants. Academic Press. 457-478.
2) Gasper, T. etc. 1982. Peroxidase: A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. University of Geneva.
3) Hinman, R. L. etc. 1965. Biochim. 4: 144-154.
4) Horton, R. F. 1993. J. Plant Physiol. 141: 690-696.

5) 平賀勲ら. 1998. 植物の化学調節. 33: 131-136.
6) Fujiyama, K. etc. 1990. Gene. 89: 163-169.
7) 市川祐章ら. 1997. 細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ7 新版植物のPCR実験プロトコル. 秀潤社. 44-48.
8) Kawaoka, A. etc. 1994. J. Ferment. Bioeng. 78: 49-55.