

カタラーゼ遺伝子を導入したキクの花質発現

駒野雅保*・篠山治恵*・石川武之甫*・永井輝行**

Transgenic Chrysanthemum Plants Carrying the Castor Bean *cat1* or *cat2* Gene Contain Catalase at Altered Levels

Masayasu KOMANO*, Harue SHINOYAMA*, Bunho ISHIKAWA* and Teruyuki NAGAI*

キク (*Dendranthema × grndiflorum* (Ramat.) Kitamura) のカタラーゼ量および活性を上げるために、ヒマ植物由来のカタラーゼ遺伝子 *cat 1* および *cat 2* を、それぞれアグロバクテリウム法によりキクに導入し、形質転換キクを作成した。サザンハイブリダイゼーションにより導入遺伝子を確認した形質転換キクの中から、遺伝子発現およびタンパク質解析をおこなった。その結果、CaMV35S プロモーターを用いた時、形質転換キクのカタラーゼ量は、非形質転換キクの内在するカタラーゼ量の 1.2 から 2 倍の量であった。しかし形質転換キクのカタラーゼ活性においては、非形質転換キクとほとんど差がなく、カタラーゼ遺伝子導入によるキクのカタラーゼ活性の増加は見られなかった。

Key Words : キク, カタラーゼ, 形質転換植物, ストレス耐性, 低温耐性

I. 緒言

キクは、福井県の主要な花卉生産品目のひとつであり、冬季の施設栽培においては、北陸特有の少日照のため、日中もハウス内の暖房が必要となる。そのため、経費節減が可能な、低温伸長性などの低温生育性の高い品種が望まれている。

一方で、低温ストレスと植物との関係の研究も数多く報告されている。その中で、低温馴化能力のあるトウモロコシの品種では、低温条件下に活性酸素の一種である過酸化水素が過剰発生するとともに、活性酸素消去酵素であるカタラーゼの遺伝子が急激に増加し、低温傷害を防ぐことが報告されている^{2) 3) 4)}。またイネの胚に含まれるカタラーゼの量が、低温発芽能力の強さを決める要因のひとつとなっている⁷⁾。これらの報告から、カタラーゼの量および活性を高めることが低温ストレスに対して耐性を示す可能性があると推測される。

しかし、実際にカタラーゼ遺伝子を植物に導入し、過剰発現させた形質転換植物においては、乾燥⁸⁾、塩害⁸⁾、病気¹⁾ に対する耐性や抵抗性の獲得が報告されているが、ま

だ低温ストレスに対しては、耐性を獲得することは、確認されていない⁸⁾。

1997年に当農業試験場にて、キクの葉片における安定的なアグロバクテリウム法の開発がおこなわれ、外来遺伝子をキクに効率よく導入することが可能となった⁵⁾。

そこで、カタラーゼ遺伝子をキクに導入し、形質転換キクのカタラーゼ量を非形質転換キクよりも過剰に生産させて、ストレス耐性を高め、低温傷害を軽減し、あるいは、低温伸長性を獲得した、低温ストレス耐性のある植物を作成する技術の開発を行っている。今回は、作出した形質転換キクのカタラーゼ量とカタラーゼ活性を測定したので、その結果を報告する。

II. 材料および方法

1. 供試植物

試験材料として、キク品種 '秀芳の力' の茎頂を、植物ホルモンを含まないMS基本培地上で、25℃、16時間日長、3,000lx 下で培養し、継代している無菌植物を用いた。

2. 導入遺伝子

ヒマ由来のカタラーゼ遺伝子 *cat 1*⁶⁾ および *cat 2*⁶⁾ を、CaMV35S プロモーターを含むバイナリーベクター、pBI121 + Hm に連結し、構築したベクター-pCOE I および pCOE III

* 福井県農業試験場 園芸バイオ部 バイオ研究 G

** 福井県農業試験場 園芸バイオ部

(福井県立大学 旭正教授より分譲)を用いた。また対照として、Intron-GUS (名古屋大学 中村研三教授より分譲)を指標とした。これらのバイナリーベクターは、*Agrobacterium* EHA101 菌株に形質転換されたものを遺伝子導入に使用した (図1)。

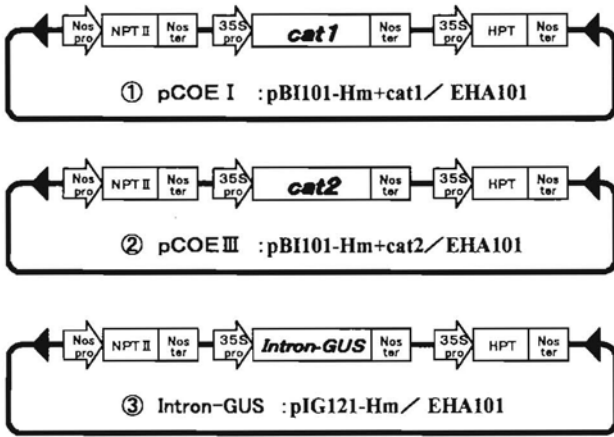


図1：導入遺伝子の構築図

3. 形質転換方法

キクへの安定的な形質転換法として開発した、アグロバクテリウムを用いたリーフディスク法⁵⁾にて、キクにカタラーゼ遺伝子を導入した。アグロバクテリウムの感染溶液には、MS液体培地に菌濃度 OD₆₀₀値=0.1~0.15, 5%界面活性剤 Tween20に調整し、15分間感染後、カザミノ酸を含む共存培地で培養した。除菌培地にはセフトキシシン、選抜培地にはジェネティシンの抗生物質を用いた。再分化してきた個体は、MS基本培地にて、供試植物と同条件にて培養した。

4. サザンハイブリダイゼーションによる導入遺伝子の解析

作出した形質転換キクの本葉を、乳鉢内で液体窒素を用いて細かく粉砕後、200mg から DNA を抽出し、10μg を HindIIIにて制限酵素処理を行った。DIG システム (ロシュ・ダイアグノスティックス社) を用いたサザンハイブリダイゼーション法により、0.6%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った後、ゲルを 0.4N の NaOH でアルカリ変性し、オーバーナイトでプロットングを行った。プロットング終了後、2×SSC で洗浄し、120℃、20 分間でベーキング処理を行った。導入した *cat 1* と *cat 2* 遺伝子の、それぞれの共通配列 550bp から同社の PCR ラベリングキットを用いてプローブを作成し、42℃で 16 時間ハイブリダイゼーション

を行い、洗浄液 (2×SSC+0.1%SDS : RT と 0.1×SSC+0.1%SDS : 68℃) で洗浄した。DIG 検出キットの手順に従い、化学発光基質 CDP-Star を用いて検出した。検出には、ルミノイメージアナライザー (LAS-1000plus : 富士フィルム社) を使用した。

5. 形質転換キクの全 RNA 抽出

サザンハイブリダイゼーション法により遺伝子導入が確認された個体、16 系統を用いて全 RNA の抽出をおこなった。同培養条件にて培養した形質転換キクの上葉 6 枚を、乳鉢内で液体窒素を用いて細かく粉砕し、粉末 200mg から RNA 抽出キット : RNeasy Plant Mini kit (キアゲン社) にて抽出し、分光光度計により濃度を測定した。

6. RT-PCR 法による導入遺伝子の発現解析

抽出した全 RNA、250ng、25ng、5ng をおのおの鋳型にして、RT-PCR を行った。プライマーは、導入したヒマ由来のカタラーゼ遺伝子、*cat 1* と *cat 2* の cDNA 中の塩基配列が同じ領域から作成し、DNA 断片 (約 0.5kbp) を増幅するものを用いた。酵素および試薬は RT-PCR キット : TitanTM One Tube RT-PCR kit (ペーリンガー社) を使用し、反応条件は、cDNA 合成が 60℃、30 分、アニーリング温度が 55℃、30 秒、合成時間は、68℃、45 秒、サイクル数は、35 サイクル (残り 25 サイクルからは、1 サイクルごとに、合成時間を 5 秒延長した。)、反応総液量は 50μl とした。増幅された PCR 産物 10μl を用いて、1.2%アガロースゲルによる電気泳動により、カタラーゼ遺伝子産物を確認した。

7. ノーザンハイブリダイゼーションによる遺伝子発現の解析

RT-PCR 法にて、遺伝子の発現が確認された形質転換キクを用いて、DIG システム (ロシュ・ダイアグノスティックス社) によるノーザンハイブリダイゼーションを行った。抽出した全 RNA 15μg を変性後、ホルムアルデヒドを含む 1.2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、ゲル上にある全 RNA を写真撮影したのち、オーバーナイトでプロットングを行った。プロットング終了後、2×SSC で洗浄し、120℃20 分間でベーキング処理を行った。導入した *cat 1* と *cat 2* 遺伝子の、それぞれの共通配列 550bp を用いて、同社の RNA プローブラベリングキットを用いて RNA プローブを作成し、50℃、16 時間ハイブリダイゼーションを行い、洗浄液 (2×SSC+0.1%SDS : RT と 0.1×SSC+0.1%SDS : 68℃) で洗浄した。洗浄後、DIG 検出キットの手順に従い、化学発光基質 CDP-Star を用いて検出した。検出には、ルミノイメージアナライザー (LAS-1000plus : 富士フ

4. ノーザンハイブリダイゼーションによる遺伝子発現の解析

ノーザンハイブリダイゼーションでの検定では、RT-PCRで遺伝子の発現が確認されたすべての個体で、カタラーゼ遺伝子の転写を示すバンドは検出できなかった。

5. カタラーゼタンパク質の生産量の解析

導入したカタラーゼ遺伝子が確認された9検体を、ウエスタンブロットティングした結果、これらの個体のカタラーゼタンパク質生産量は、非形質転換キクのカタラーゼタンパク質生産量に比べて、*cat 1* 導入個体では、1.2~1.5 倍量の、*cat 2* 導入個体では2倍のカタラーゼを生産する形質転換キクが確認された。しかし、極度に過剰発現した形質転換キクは作出されなかった(写真3)。

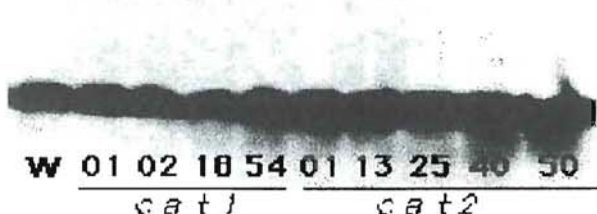


写真3：ウエスタンブロットティングによるタンパク質解析 (W:非形質転換キク)

6. カタラーゼ活性の測定

カタラーゼ活性を測定した結果、非形質転換キクと形質転換キクとの活性の差は、ほとんどみられなかった。このことから、非形質転換キクと作出した形質転換キクとでは、カタラーゼの生産量があつたにもかかわらず、過酸化水素分解能力は変わらないと考えられた(図2)。

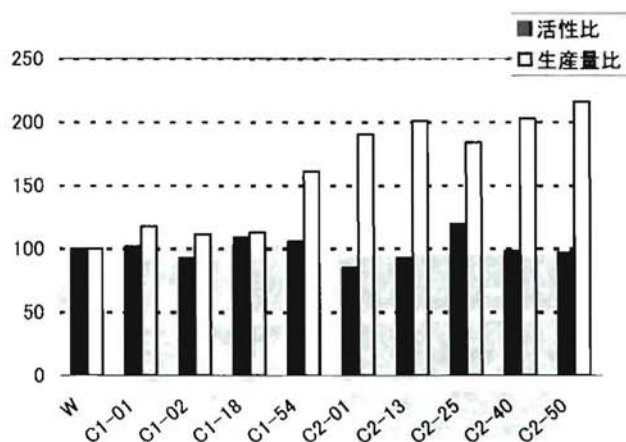


図2：カタラーゼ活性の比較 (W：非形質転換キク)

IV. 考察

ノーザンハイブリダイゼーションの結果から、作出した形質転換キクに、カタラーゼ遺伝子が導入されていることが確認できた。導入遺伝子の数は、1個から複数個とさまざままで、複数のカタラーゼ遺伝子が導入された個体の中には、極端にわい化し、葉の萎縮した個体や葉が肉厚になる個体などが1個体ずつあった。これは、たくさんの導入遺伝子がキクのゲノムのなかに導入されたため、導入遺伝子がキク本来の遺伝子を破壊したと考えられた。しかしほとんどの形質転換キクでは、遺伝子を導入していない非形質転換キクと変わらなかったことから、カタラーゼ遺伝子の導入による形態の変化は起きないと推測された。

遺伝子の発現においては、検定した個体すべてでカタラーゼのRNAが検出されたことから、導入したカタラーゼ遺伝子の転写が作出した形質転換キクの中で行われていることが確認できた。よって導入したカタラーゼ遺伝子が、ジーンサイレンシングなどによる遺伝子の不活性化を起こすことなく、形質転換キクの中で機能していることが確認された。しかしこのRNAを用いたノーザンハイブリダイゼーションの検出では、すべての個体でカタラーゼ遺伝子の転写を示すバンドは検出できなかったことから、導入したカタラーゼ遺伝子の発現量は低いと考えられた。一般的に、多コピーの遺伝子が導入されると、遺伝子発現が強化されるケースと、ジーンサイレンシングにより、遺伝子の発現が全くなくなるケースになることが多い。ところが今回の結果では、導入したカタラーゼ遺伝子はキク内でRNAに転写されて発現しているが、遺伝子の発現量はノーザンハイブリダイゼーションで検出できるほど高い発現量ではなかったことから、使用したプロモーターが導入した遺伝子の発現を極端に高めることができなかったと考えられた。

同様にウエスタンブロットティング法によるタンパク質生産量の解析においても、作出した形質転換キクの中でもっともカタラーゼ生産量の多い個体は、非形質転換キクの2倍のカタラーゼ生産量しかなかった。このことは遺伝子発現解析の結果と同じく、使用したプロモーターが高発現しなかったためと考えられたが、非形質転換キクよりもカタラーゼ量の多い形質転換キクを作出することができた。

しかしカタラーゼ活性においては、タンパク質の生産量が1.2から2倍も増加した形質転換キクが作出したにもかかわらず、どの個体も活性増加につながらなかった。このことは、内在するカタラーゼの生産量と導入遺伝子によっ

イルム社)を使用した。

8. 形質転換キクの粗タンパク質の抽出

サザンハイブリダイゼーション法により遺伝子導入が確認された個体, 10 系統を用いて粗タンパク質を抽出した。キクの上葉をそれぞれ4枚ずつ採取し, タンパク質抽出用 Buffer (50mM Tris-HCl : pH8.0, 10mM DTT 1mM PMSF) を加えて抽出し, 10,000rpm で10分間遠心後, 上澄みを回収した。回収した抽出液を, プロテインアッセイキット (BIORAD 社) にてタンパク質の定量を行い, 各サンプルを同濃度に調整した。

9. ウェスタンブロッティング法によるカタラーゼタンパク質の検定

抽出したタンパク質を各レーン 20 μ g ずつ, 12.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い, セミドライ方式により PVDF メンブレンに転写した。転写後, アルカリホスファターゼの検出手順に従って調整した。1次抗体は2,000倍希釈で, 2次抗体は2,500倍希釈を用いた。

化学発光基質 CDP-Star を PVDF メンブレンに添加し, ルミノイメージアナライザー (Las-1000puls : 富士フィルム社) にて取り込み, 画像解析処理を行った。

10. カタラーゼ活性の測定 (簡便法)

抽出した粗タンパク質抽出液 2 μ l と, 活性測定用溶液 (50mM リン酸バッファー : pH7.0, 0.06%過酸化水素) 400 μ l を, UV測定用キュベット内で攪拌した。攪拌後すぐに, 分光光度計により波長 240nm の吸光度の減少を測定し, その傾きからカタラーゼ活性を算出した。

III. 結果

1. 形質転換キクの作出

キクへのカタラーゼ遺伝子の導入によって, 感染させた葉片から, *cat 1* 導入試験で107個体, *cat 2* 導入試験で64個体の再分化植物を作出した。それらを MS 基本培地で培養し, 節培養によって増殖した。作出した形質転換キクの中には, 極端にわい化し, 葉の萎縮した個体や葉が肉厚になる個体などが1個体ずつあった。

2. サザンハイブリダイゼーション法による遺伝子解析

作出した形質転換キクから, 導入したカタラーゼ遺伝子を示すバンドが確認できた。また非形質転換キクからは, バンドは確認されなかった。このことより, 形質転換キクには, カタラーゼ遺伝

子の導入が確認できた。また, 作出された形質転換キクには, 1コピーから多いもので5コピー以上の導入遺伝子があった(写真1)。極端にわい化し, 葉の萎縮した個体や葉が肉厚になった個体では, 5コピー以上のカタラーゼ遺伝子が導入された。

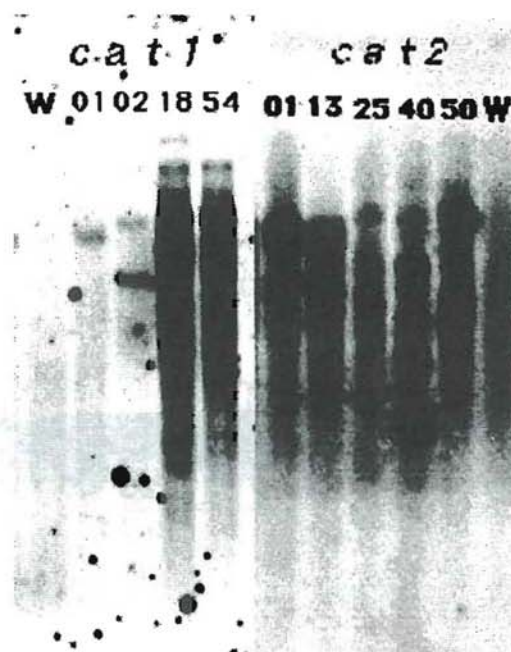


写真1 : サザンハイブリダイゼーション
(W:非形質転換キク)

3. RT-PCRによる遺伝子発現解析

電気泳動の結果, 非形質転換キクからは, PCR産物のバンドは確認されず, サザンハイブリダイゼーションにより確認された形質転換キクの個体すべてから, 目的のサイズ (0.5kbp) のPCR産物を示すバンドが確認できた。鋳型となった全RNAを希釈することで, 合成されたPCR産物量の差から, カタラーゼ遺伝子の発現の強い個体と弱い個体が判別できた。(写真2)。

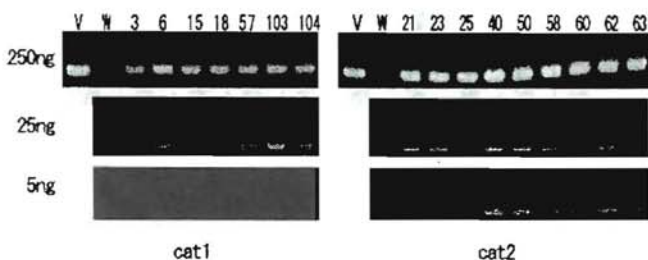


写真2 : RT-PCRによる遺伝子発現解析
(V:ベクター, W:非形質転換キク)

て生産されたカタラーゼが、一定量のカタラーゼ活性しかもたないように調整したためと考えられた。

以上のことから、今回作出した形質転換キクは、カタラーゼの量が増加したものの、カタラーゼ活性を高められなかった。理由として、今回用いた CaMV35S プロモーターがキクでは高発現しなかったことが考えられる。当農業試験場にて行われた、キクの葉片における安定的なアグロバクテリウム法の開発で、CaMV35S プロモーターを用いてレポーター遺伝子である GUS 遺伝子を導入したが、作出した形質転換キクの GUS 染色によって青く染まる染まり方は、非常に弱かった⁵⁾。このことから、キクの形質転換系において、CaMV35S プロモーターでは、導入遺伝子を高発現させることができないことが推測された。

しかし一方で弱い発現でも、病気に対する抵抗性が観察されている¹⁾。このことは必ずしも形質転換キクが高発現である必要はなく、カタラーゼ量のわずかな増加や発現する場所によって、その効果が現れる可能性があることを示している。カタラーゼの局在する場所は、ミクロボディの部分であることから、CaMV35S プロモーターによって、従来の場所とは違うところでカタラーゼが発現しているなら、ストレス耐性が付与されることも考えられる。

今後、カタラーゼ活性を上げるために、導入遺伝子やプロモーターを検討するとともに、今回作出した形質転換キクを用いて、ストレス条件下での非形質転換キクとのカタラーゼ活性の比較とストレス傷害を検定する。

- 4) Prasad TK, Anderson MD and Stewart CR (1995) Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings. *Plant Physiol* 108: 1597-1605
- 5) 篠山治恵 駒野雅保 野村幸雄 数馬俊晴 (1998) キク葉片における安定的な *Agrobacterium* 形質転換系の確立. 福井県農業試験場研究報告 35: 13-21
- 6) Suzuki M, Ario T, Hattori T, Nakamura K and Asahi T (1994) Isolation and characterization of two tightly linked catalase genes from castor bean that are differentially regulated. *Plant Molecular Biology* 25: 507-516
- 7) Tanida M (1996) Catalase activity of rice seed embryo and its relation to germination rate at a low temperature. *Breeding Science* 46: 23-27
- 8) Willekens H, Chamnongpol S, Davey M and Schraudner M (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *The EMBO Journal* Vol.16 No.16: 4806-4816

引用文献

- 1) Polidoros AN, Mylona PV and Scandalios JG (2001) Transgenic tobacco plants expressing the maize Cat2 gene have altered catalase levels that affect plant-pathogen interactions and resistance to oxidative stress. *Transgenic Research* 10: 555-569
- 2) Prasad TK, Anderson MD, Martin BA and Stewart CR (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6: 65-74
- 3) Prasad TK, Anderson MD and Stewart CR (1994) Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol* 105: 619-627

Transgenic Chrysanthemum Plants Carrying the Castor Bean *cat1* or *cat2* Gene Contain Catalase at Altered Levels

Masayasu KOMANO, Harue SHINOYAMA, Bunoho ISHIKAWA and Teruyuki NAGAI

Summary

We are conducting a series of experiments to examine whether or not the introduction of a foreign catalase gene into chrysanthemum causes changes in characters of the plant. First we succeeded in making transgenic chrysanthemum (*Dendranthema × grndiflorum* (Ramat.) Kitamura) plants carrying either of two catalase genes (*cat1* and *cat2*) in castor bean under the control of the CaMV35S promoter using the *Agrobacterium*-mediated transformation method. Southern blot analysis confirmed the presence of the foreign catalase gene in the genomes of the transformants. Next we analyzed the intensity of expression of the introduced catalase gene in the transformants. The transformants contained 1.2 to 2-fold catalase protein as compared with the non-transformed, cultivar plants. Catalase activities in the transformants, however, were about the same as those in the cultivar plants, suggesting that the introduced catalase genes express only very weakly under the control of the CaMV35S promoter.