

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07456

研究課題名(和文)低温誘導性遺伝子改変に基づくレタスの凍結ならびに低温貯蔵性の改善に関する研究

研究課題名(英文) Improvement of freezing tolerance of lettuce by modification of low-temperature-inducible genes

研究代表者

本城 賢一 (Honjoh, Ken-ichi)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00264101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：レタス由来のGoIS (LsGoIS1、LsGoIS2) 遺伝子ならびにVPE (LsVPE) 遺伝子のcDNAクローニングを行い、塩基配列を決定した。LsGoIS2遺伝子をTF-His-tagとの融合蛋白質として大腸菌で発現させ、酵素処理等を経て精製を行い、約39 kDaの蛋白質を得た。この蛋白質に基質となる物質を加え、反応生成物をHPLCにて調べたところ、galactinolの生成が確認され、本蛋白質の活性確認確認を行った。GoIS遺伝子を高等植物発現用ベクターpRI101ANへの導入し、アグロバクテリウムを使って、レタスに導入を図った。スクリーニングの結果、組換え体レタスを獲得した。

研究成果の概要(英文)：cDNA cloning of GoIS (LsGoIS1, LsGoIS2) gene and VPE (LsVPE) gene from lettuce was isolated to determine the nucleotide sequences. The LsGoIS2 gene was expressed in Escherichia coli as a fusion protein with TF-His-tag, purified by enzyme treatment and so on, to obtain a protein of about 39 kDa. The substance serving as a substrate was added to this protein and the reaction product was examined by HPLC. As a result, formation of galactinol was found meaning that the activity of this protein was confirmed. Introduction of GoIS gene into higher plant expression vector pRI101AN and introduction into lettuce using Agrobacterium. As a result of screening with PCR, transgenic lettuce was acquired.

研究分野：食品保蔵学

キーワード：凍結耐性 レタス GoIS VPE

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化などを起因とする世界各地で頻発する異常気象(干ばつ、洪水など)は農作物に対し甚大な被害を及ぼし、わが国においても毎年のように、何らかの天候不良を起因とする作物の収穫減等が発生している。また、近年ではバイオ燃料が脚光を浴び、食糧用農地が燃料の原料用農地へ転換されるという現象も加わり、食料自給率がカロリーベースで40%に満たず多くの食糧を諸外国からの輸入に依存しているわが国において、食料品価格が高騰するという問題も発生している。このような問題は将来の世界的な食糧不足を予想させることから、我々はあらゆる解決策について検討し準備し続ける必要がある。

この解決法の一つとして、我々はこれまでの研究実績に基づき、低温や凍結という環境変化に強い作物を作出することで凍結耐性を向上させて長期保蔵性の改善を図ることを提案している。これまでに植物の凍結耐性獲得機構の解明研究は行われているが、主としてシロイヌナズナなどの低温に应答して高い凍結耐性を獲得する植物を対象としたものが多い。従って、レタスの様な凍結耐性獲得能が低い植物の低温应答性ならびに凍結耐性に関する研究はほとんど行われていない。しかし、応用性について考えた場合、凍結耐性獲得能が低い植物に適用される可能性が高いことから、分子レベルでのレタスの低温应答機構について理解しておくことは非常に重要である。また、レタスの様な生食用の植物性食品を考えた場合、近年数多く発生している「生食用青果物を原因食品とする食中毒事件」を回避する点からも、凍結(冷凍保管)することで微生物の増殖を抑えることが可能となる意義は非常に大きいと考えられる。

我々は、これまでの植物の凍結耐性獲得機構の解明研究を行ってきた。耐性強化に関わる知見は得られているものの、凍結に弱いあるいは凍結耐性獲得能が低い植物の低温应答性がどのように異なるかなどについては十分な情報があるとは言えない。これまでに、下記の①～③について研究を進め基礎的なデータを収集してきた。

市販のレタス種子10品種を栽培し、非凍結温度の3℃での低温処理を施すことにより、そのうちの3品種が-3℃での凍結耐性を向上させることを見出した。このことは、これまで凍結耐性を獲得しないと考えられてきたレタスにも、-10℃以下での凍結耐性を向上させる他の植物(シロイヌナズナ、ハウレンソウなど)と同様に、低温应答シグナル伝達経路が存在することを示唆するものであった。

次にシロイヌナズナなどで研究が進んでいる既知の低温应答転写因子であるC-repeat binding factor(CBF)遺伝子がレタスにも存在発現していることを確認し、低温应答シグナル伝達経路の一機能遺伝子とし

て働いていることを明らかにした。しかしながら、低温应答性CBF経路があるにも関わらず、レタスの凍結耐性が-3℃程度までしか向上しないことは、この下流に存在して凍結耐性獲得に必要な遺伝子の発現が少ないこと、もしくは凍結耐性向上を妨げる遺伝子「負の因子」が発現し、凍結耐性獲得を阻害している可能性を示すものであった。

cDNAサブトラクション法を用いて、低温処理時に特異的に発現する遺伝子(約300種)をExpressed sequence tag(EST)として取得し、解析を行った。その結果、少なくとも二つの注目すべき遺伝子についてその発現量(ESTとして取得されたクローン数)が多いことを見出した。すなわち、凍結耐性を高める適合溶質であるガラクトキノールの合成に関わる律速酵素Galactinol synthase(GoIS)遺伝子、ならびに凍結耐性を獲得する植物では発現が報告されておらず、その発現により液胞を崩壊させることで細胞死に導くことが報告されているVacuolar processing enzyme(VPE)遺伝子である。前者は凍結耐性獲得に対して「正」に働くと考えられるが、後者は凍結耐性向上を妨げる「負」の因子であり、これら正負の因子の発現量をコントロールすることは凍結耐性向上へとつながるものと期待される。また、VPE遺伝子の発現は細胞死へと繋がることから、凍結耐性のみならず、非凍結温度の冷蔵貯蔵中におけるレタスの品質低下にも繋がる可能性が推察された。

2. 研究の目的

食材となる植物の低温耐性を向上させることで、栽培段階における環境適応性ならびに収穫後の貯蔵性を高めることは、将来予想される食糧不足問題の解決策の一つになり得る。応募者は、葉物野菜であるレタスが低温処理によってわずかながらもその凍結耐性を向上させることを見出している。低温应答性については、レタスの凍結耐性のみならずその低温貯蔵中の品質変化にも影響を及ぼすことが推察される。本研究では、レタスの低温誘導性遺伝子であり、凍結を含めた低温耐性向上に重要だと推定されるGalactinol synthase(GoIS)遺伝子ならびに低温耐性に対して負の働きをすると推定されるVacuolar processing enzyme(VPE)遺伝子に着目し、GoIS遺伝子については発現量を高め、VPE遺伝子についてはその発現抑制する様に改変することで、レタス(植物)の凍結耐性ならびに低温貯蔵性を向上させることを目的とした。

3. 研究の方法

研究材料および栽培方法

レタス栽培種(*Lactuca sativa* L.)のクリスプヘッド型であるパパレタス[中原採取場]を供試した。栽培土壌として、たねまき培土[タキイ種苗]を121℃、20分でオート

クレーブ殺菌したものをを用いた。直径7.5 cmの植物育成ポットに播種し、肥料としてハイポネックス液6-10-5 [ハイポネックスジャパン]を週に1回、約500倍希釈して与えた。

通常栽培は、グロースチャンパーMLR-350 [SANYO]内で、22、16時間明期(光量子束密度約 $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、8時間暗期の条件で行い、毎日灌水した。通常栽培は2週間行った。

遺伝子操作の宿主としては *Escherichia coli* DH5、*E. coli* HB101、*Agrobacterium tumefaciens* GV3101株を用いた。

培地

<MS スクロース寒天培地>

ムラシゲ・スクーグ基礎培地 (MS 培地) [SIGMA] 4.4 g、植物用寒天 [和光] 8.0 g およびスクロース [ナカライテスク] 20 g を混合し、純水で1 Lにメスアップし、pHを5.8に調整し、 121°C 、20分間オートクレーブ滅菌した。

<アグロバクテリウム感染培地>

MS スクロース液体培地に、アセトシリゴン [APPOLO SCIENTIFIC] (終濃度 0.1 mM) とメルカプトエタノール [ナカライテスク] (終濃度 0.01 mM) を添加した。これに組換えアグロバクテリウムを $\text{OD}_{600} = 0.8$ となるように懸濁した。

<共存培養用培地>

オートクレーブ滅菌した MS スクロース寒天培地に、0.1 mM のアセトシリゴン、6-benzylaminopurine (BAP) [SIGMA] 1 mg/L、1-naphthaleneacetic acid (NAA) [ナカライテスク] 0.1 mg/L を添加した。

<カルス誘導培地>

オートクレーブ滅菌した MS スクロース寒天培地に、BAP 0.1 mg/L と NAA 0.1 mg/L、カナマイシン 100 mg/L、カルベニシリン 100 mg/L を添加した。

<不定芽誘導培地>

オートクレーブ滅菌した MS スクロース寒天培地に、BAP 0.01 mg/L と NAA 0.05 mg/L、カナマイシン 100 mg/L、カルベニシリン 100 mg/L を添加した。

<発根培地>

オートクレーブ滅菌した MS スクロース寒天培地に、カナマイシン 100 mg/L、カルベニシリン 100 mg/L を添加した。

低温処理

播種後2週間栽培したレタスを光照射下(光量子束密度約 $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、 4°C で24時間低温処理した。

Total RNA の抽出

レタスの葉をそれぞれ約0.1 g採取し、乳鉢と Microtube Pestles [Scientific Specialties inc.] を用いて、液体窒素中で粉末状になるまで破砕した。このレタス粉末から、RNeasy Plant Mini Kit [QIAGEN] を

用いて、付属のプロトコルに従い Total RNA を抽出した。

cDNA の合成

SuperScript® IV Reverse Transcriptase [invitrogen] を使用し、付属のプロトコルに従い Total RNA から cDNA を合成した。

Reverse transcription-PCR

cDNA を鋳型に、*LsGo1S1*、*LsGo1S2* および *LsVPE* 遺伝子にそれぞれ特異的なプライマー (Table 1) と KOD Fx-Neo [TOYOBO] を用いて、PCR を行った。PCR 産物は PCR Purification Kit [QIAGEN] を用いて精製した。

Table 1 部分断片取得に用いたプライマー

Primer	Sequence
Go1S (DG)	5' -GCRTATATMACKTTCTTGCCMGG-3'
Go1S1 R1	5' -AGTATACCTCCATGGCTTGATCCAG-3'
Go1S2 R1	5' -TGCAGTAGTGCACCACCTTGATCTT-3'
LsVPE F	5' -CGACATCATGTAACCATGCATAC-3'
LsVPE R	5' -ACAGCTCATGCCAAGGTTTTG-3'

TA クローニング

Taq DNA Polymerase [SIGMA-ALDRICH] を用いて、精製した PCR 産物への A 付加が行われた。その後、*E. coli* DH5 を宿主として pGEM®-T Easy Vector [Promega] にサブクローニングした。

塩基配列の決定ならびに解析

TA クローニングされた PCR 産物の塩基配列決定については 株式会社マクロジェン・ジャパンに委託した。決定された塩基配列をもとに、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) の BLAST プログラムを用いて相同性検索が行い、系統樹作成も行った。

3' Rapid Amplification of cDNA (RACE)

LsGo1S1 および *LsGo1S2* 遺伝子の完全長 cDNA のクローニングが SMARTer® RACE 5' / 3' Kit [TaKaRa] を用いて、RACE 法により行われた。キット付属のプロトコルに従い、24時間の低温処理を行ったパパレタスの Total RNA から cDNA が合成された。パパレタスの cDNA を鋳型に、*LsGo1S1* および *LsGo1S2* 遺伝子にそれぞれ特異的なプライマー (Go1S1F3:

5' -CTTCAAGGATATCTACAAGCCAATC-3' ,

Go1S2F2:

5' -GAAGTCCACTCCACCGACGTTATTC-3') と

キット付属のプライマーを使用し、KOD Fx-Neo [TOYOBO] を用いて PCR を行った。

pColdTf/*LsGo1S2* の作製

制限酵素 *KpnI* ならびに *NdeI* 認識配列をそれぞれ付加したプライマーを用いて cDNA を鋳型として *LsGo1S2* 構造遺伝子領域を PCR で増幅後、制限酵素処理を行い、同様に制限酵

素処理した pColdTF ベクター [TAKARA] に導入した。宿主は *E. coli* DH5 を用いた。

大腸菌を用いた GoIS2 発現

LsGoIS2 の発現誘導はベクター添付のプロトコールに従い、37 °C で培養した大腸菌の培養液を 15 °C に移動し、終濃度が 1 mM となるように IPTG を添加後、24 時間振とう培養することで行った。その後、培養後の菌液 1 ml を遠心 (12,000 × g, 4 °C, 10 分間) して菌体を回収した。

SDS-PAGE

菌体に純水を添加した菌懸濁液は 4 × サンプルバッファー (0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glycerol, 10% -mercaptoethanol, 0.002% bromo phenol blue) が添加され、5 分間加熱処理後、10% SDS-PAGE に供された。泳動後のゲルは染色液 (50% methanol, 10% acetic acid, 0.1% coomassie brilliant blue R-250) で染色された。

LsGoIS2 蛋白質の精製

誘導培養後の菌液を遠心 (12,000 × g, 4 °C, 10 分間) し、滅菌水で 2 回洗浄後、5 ml の結合バッファー (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 500 mM NaCl, 20 mM imidazole) に懸濁した。この菌懸濁液に、Lysozyme を 1 mg、PMSF および MgCl₂ は終濃度 1 mM となるように添加した。4 °C で 30 分間振とう後、菌懸濁液を Tommy Ultrasonic Disruptor UP-201 [トミー精工] を用いて氷浴中で超音波破碎 (48 W, 30 秒 × 10 回) し、遠心 (10,000 × g, 4 °C, 10 分間) 後の上清を可溶性画分として回収した。

可溶性画分を、結合バッファー (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 500 mM NaCl, 20 mM imidazole) で平衡化した HisTrap FF crude (5 ml) [GE ヘルスケアバイオサイエンス社製] にアプライした。50 ml の結合バッファーで洗浄後、溶出バッファー (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 500 mM NaCl, 200 mM imidazole) で溶出した。次に、溶出画分を結合バッファー (20 mM sodium phosphate (pH 7.4)) で 10 倍希釈し、希釈後の溶液を結合バッファーで平衡化した HiTrap Q (1 ml) [GE ヘルスケアバイオサイエンス社製] に通した。10 ml の結合バッファーで洗浄し、溶出バッファー (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 1 M NaCl) で溶出し、1 ml ずつ回収した。最も高濃度のタンパク質を含む画分を、20 mM sodium phosphate (pH 7.4) で平衡化した PD-10 カラム [Amersham Pharmacia Biotech 社製] に通し、同バッファーで分画することでバッファーを交換した。続いて、5 ml マイクロチューブ内で反応液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM PMSF) と融合タンパク質 2.48 mg、

Factor Xa [New England Biolabs] 15 μg を混合し、25 °C で一晩反応させることで His-TF タグを切断した。反応液を再度 HisTrap FF crude (1 ml) に通し、素通り画分ならびに洗浄画分に分画した。

GoIS 酵素反応

精製されたタンパク質 15 μg を反応緩衝液 (終濃度 50 mM Hepes-Na (pH 7.0), 4 mM MnCl₂, 2 mM DTT) に加え 30 °C で 15 分間インキュベート後、UDP-ガラクトース (4 mM) と myo-イノシトール (終濃度 20 mM) および BSA (0.16 mg) を加え、全量を 1 ml として、30 °C で一晩反応させてガラクチノール合成反応を行った。また、コントロールとして、精製したタンパク質 (15 μg)、標準品として、UDP-ガラクトース (終濃度 4 mM)、myo-イノシトール (終濃度 20 mM)、ガラクチノール (終濃度 20 mM) を全量が 1 ml となるようにそれぞれ同反応緩衝液に加え 30 °C で一晩インキュベートした。

HPLC を用いたガラクチノールの検出

酵素反応を終えた試料を凍結乾燥機 FDU-506 [EYELA] を使用して 5 時間凍結乾燥した後、75% アセトニトリル溶液 200 μl に溶解して孔径 0.45 μm のフィルター (Cosmonice filter S [メルク株式会社]) に通した。調製された試料のうち 20 μl を HPLC に供した。

HPLC には定量用カラムとして Asahipak NH2P-50 4E [昭和電工株式会社]、検出器として示差屈折計 RID-6A [株式会社島津製作所] を用い、分析条件はカラム温度 : 25 °C、溶離液 : アセトニトリル/水 = 7/3、流速 : 1.0 ml/min とした。クロマトグラムはクロマトステージ [エルシーデザイン株式会社] を用いて記録した。

pR1101AN/LsGoIS2 の作製

pCold/LsGoIS2 を制限酵素 *KpnI* ならびに *NdeI* で処理し *LsGoIS2* を精製後、同酵素で処理した高等植物発現用ベクター pR1101AN [TAKARA] に組み込んだ。宿主は *E. coli* HB101 を用いた。

アグロバクテリウムへの組換え体の導入

Agrobacterium tumefaciens GV3101 株に前項で作製した pR1101AN/LsGoIS2 をエレクトロポレーション法で導入した。

まず、*A. tumefaciens* GV3101 のシングルコロニーを 50 μg/ml のゲンタマイシン含有の LB 培地 (LB/Gm) 10 ml に接種し、30 °C で一晩培養した。この前培養液を 100 ml TB/Gm 培地に接種し、OD₆₀₀ = 1.5 になるまで 30 °C で振とう培養した。その後、遠心 (825 × g, 4 °C, 10 分間) して菌体を回収し、滅菌水で 3 回洗浄後、1 ml 10% glycerol に懸濁し、40 μl ずつ 1.5 ml マイクロチューブに分注し、-80 °C で保存し、これをコンピュートセル

とした。このコンピテントセル 25 μ l に、2 μ l のライゲーション液を混合し氷上で 1 分間静置後、Electro Cell Manipulator ECM 630 [BTX Division of Genetronics, Inc.]を用いて、1500 V、125 μ s、50 μ F の条件でエレクトロポレーションを行った。その後、400 μ l の LB 培地を加えて、25 $^{\circ}$ C で 1 時間静置したものを LB/Km/Gm に塗布して、28 $^{\circ}$ C で 3 日間培養した。

リーフディスク法によるレタスの形質転換

1.5 ml チューブ内で、5 倍希釈したハイター溶液 [花王] 1 ml にパパレタスの種子約 20 粒を 15 分間浸して表面を殺菌後、上清を除いた。次に、滅菌水 1 ml を加えてポルテックスで混合し、上清を除く洗浄操作を行った。洗浄した種子を発芽培地に播種し、5 日間通常栽培を行うことで、発芽させた。

滅菌済みのピンセットとハサミを用いて、発芽後のレタスの子葉を先端から約 5 mm 間隔で切断し、子葉切片を感染培地に入れて 5 分間静置した。滅菌済みのろ紙で子葉切片に付着した培地を取り除き、向軸面が培地に接するように共存培地に置床し、暗黒条件下で 3 日間培養した。以降は通常培養条件下で培養した。共存培養後の子葉切片をカルス誘導培地へと移し、2 週間おきに培地を交換しながら最大 4 週間培養した。次いで、カルスを形成した切片を不定芽誘導培地へと移し、最大 8 週間培養することで不定芽を誘導した。その後、1~2 cm まで成長した不定芽をカルスから切り離し、発根培地で培養した。各誘導段階で、茶色く変色した切片はその都度取り除いた。

レタスからのゲノム DNA の調製

LsGoIS2 を発現する組換えレタスの葉 0.1 g から、「DNeasy[®] Plant Mini Kit」[QIAGEN]を使用し、付属のプロトコルに従いゲノム DNA を調製した。

組換え体確認の PCR

アグロバクテリウムのコロニー、前項で抽出したレタスのゲノム DNA を鋳型に、pRI101 AN ベクターに特異的なプライマー (pRI101-AN F1 : 5' -AGTCACGACGTTGTA -3' , pRI101-AN R : 5' -CAGGAAACAGCTATGAC -3') と KOD Fx-Neo [TOYOBO]を用いて、PCR を行った。反応液組成は酵素付属のプロトコルに従い、反応条件は 94 $^{\circ}$ C で 2 分間の初期熱変性の後、98 $^{\circ}$ C で 10 秒間の熱変性、60 $^{\circ}$ C で 30 秒間のアニーリング、68 $^{\circ}$ C で 1 分間の伸長反応からなる増幅反応を 35 サイクルで行い、その後 68 $^{\circ}$ C で 7 分間の伸長反応とした。アガロースゲル電気泳動により反応生成物の確認を行った。

4 . 研究成果

LsGoIS1 および *LsGoIS2* 塩基配列の決定ならびに *GoIS* 推定アミノ酸配列に基づく系統樹

の作成

EST 等の既知の配列に基づく PCR ならびに RACE 法によって *GoIS* をコードする二種の cDNA 塩基配列を決定した。その結果、*LsGoIS1* は 333 アミノ酸コード領域を含む 1432 bp (DDBJ アクセションナンバー LC385741)、*LsGoIS2* は 339 アミノ酸コード領域を含む 1404 bp (DDBJ アクセションナンバー LC385742) の配列が決定された。ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) と BoxShade Server (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)を用いて、*LsGoIS1* および *LsGoIS2* の相同性検索を行い、その結果を用い、他の植物由来の *GoIS* を含めて推定アミノ酸配列に基づく系統樹を作成した (Fig. 1)。

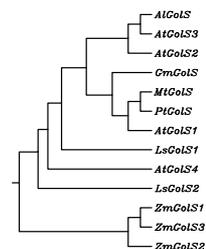


Fig.1 *GoIS* アミノ酸配列に基づく系統樹

LsVPE の塩基配列の決定ならびに推定アミノ酸配列に基づく系統樹の作成

340 アミノ酸コード領域を含む 1281 bp (DDBJ アクセションナンバー LC385743) の塩基配列が決定された (Fig. 1-2)。*LsVPE* 遺伝子の推定アミノ酸配列と他の植物の *VPE* 遺伝子産物との比較が行われた (Fig. 1-3)。また、*LsVPE* と他の植物由来の *VPE* の推定アミノ酸配列との比較のために系統樹を作成した。

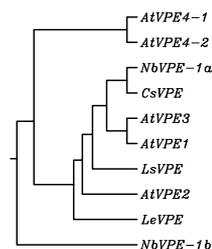


Fig.2 *VPE* アミノ酸配列に基づく系統樹

GoIS2 蛋白質高発現ならびに精製

E. coli DH5 α / pCold TF / *LsGoIS2* を使用し、His-Tag との融合タンパク質として *LsGoIS2* の発現を誘導した。タンパク質発現誘導後ならびにカラム精製の各段階のサンプルを SDS-PAGE に供した (Fig 3)。その結果、誘導後のサンプルは、融合タンパク質と推定される約 96 kDa の位置にバンドが確認された。また、Factor Xa 処理後のサンプルでは、*LsGoIS2* タンパク質と推定される約 39 kDa の位置と、TF タグと推定される約 57 kDa

の位置にバンドが確認された。Factor Xa 処理後のサンプルを HisTrap FF crude カラムに通した結果、目的タンパク質と TF タグとを完全に分離することができなかつた。そこで、再度 HisTrap FF crude カラムに通すことにより、目的タンパク質と TF タンパク質を分離することができた。また、精製された LsGoIS2 蛋白質は酵素活性確認とポリクローナル抗体作製用の抗原として使用した。

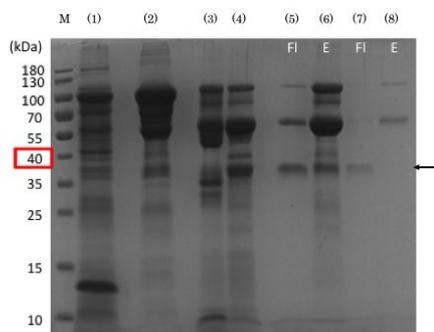


Fig. 3 各精製段階における SDS-PAGE.
M: マーカ、(1)菌破碎液上清、(2) HisTrap 溶出画分、(3) PD10 溶出画分、(4) Factor Xa 処理、(5) HisTrap 素通り画分、(6) HisTrap 吸着画分、(7) 2 回目の HisTrap 素通り画分、(8) 2 回目の HisTrap 吸着画分. 矢印は LsGoIS2 のバンドを示す。

GoIS 酵素活性の確認

精製した LsGoIS2 を酵素反応させ、HPLC に供した (Fig. 4)。酵素反応液からは a、b、c、d および e の 5 つのピークが得られた。a、b および c と同様のものと思われるピークは全ての標準品、コントロールからも検出されたので、これらはバッファー由来のピークであると考えられた。従って、d および e を標準品で得られたピーク (データは未掲載) と保持時間を比較することで同定した。その結果、d の保持時間 (9.0 分) が標準品の myo-イノシトールのピークの保持時間 (9.1 分)、e の保持時間 (13.4 分) がガラクトノールのピークの保持時間 (13.5 分) とそれぞれ一致した。従って、大腸菌で発現させた LsGoIS2 遺伝子産物はガラクトノール合成酵素としての酵素活性を有することを確認した。

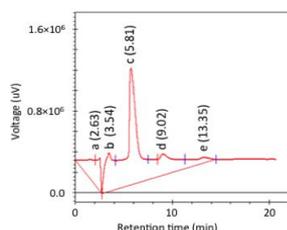


Fig. 4 反応液の HPLC 溶出パターン

組換えレタスの作出

アグロバクテリウムを介したリーフディスク法により組み換えレタスの作出を試みた。5 回の形質転換を行い、不定芽をカルスから切り出して発根培地へと移し、発根段階まで進んだものは 4 検体であった。

その中で、発根培地で培養中の組換えレタスの葉からゲノム DNA を抽出し、これを鋳型にゲノム PCR を行い、増幅産物を電気泳動に供した (Fig. 5)。その結果、ポジティブコントロールである pRI101AN/LsGoIS2 を鋳型として得られたバンドとほぼ同じサイズのバンドが得られたため、発根培地で栽培中の組換えレタスには、pRI101-AN ベクターの T-DNA 領域が組み込まれていることが示された。

得られた形質転換体を用いてストレス耐性評価を行っていく。



Fig. 5 トランスジェニックレタス由来のゲノム DNA を鋳型とした PCR 結果

(A) pRI101AN/LsGoIS2、(B) pRI101AN、(C) トランスジェニックレタスゲノム DNA、(D) マーカ

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 1 件)

黒川 将, 岡野仁美, 川畑 彩, 益田時光, 本城賢一, 宮本敬久, レタス (*Lactuca sativa* L.) 由来の低温誘導性 galactinol 合成酵素遺伝子のクローニング, 第 34 回日本植物細胞分子生物学会 (上田) 大会, 2016 年 9 月, 信州大学, 上田市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本城 賢一 (HONJOH KEN-ICHI)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 00264101

(2) 研究分担者

宮本 敬久 (MIYAMOTO TAKAHISA)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 70190816