

微生物由来エチレン生成酵素遺伝子を導入した形質転換タバコに関する研究

荒木誠士・田中正美・松岡正桂<sup>1)</sup>・小川隆平<sup>1)</sup>  
(熊本県農業研究センター・<sup>1)</sup> 崇城大学工学部)

Seishi ARAKI, Masami TANAKA, Masayoshi MATSUOKA and Takahira OGAWA :  
Transgenic Tobacco Expressing a Bacterial Ethylene Formation Enzyme(EFE) Gene

植物ホルモンであるエチレンはストレスへの応答, 果物熟成, 老化および葉の脱離, 防御遺伝子の発現, 花の形成といった多様な生理作用を持っている。

微生物, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK 2 のエチレン生成酵素 (EFE) は植物と異なり, 2-オキソグルタル酸 (2-OG) を基質とし単一の酵素でエチレンを生成する。

この微生物由来の EFE をコードする *efe* 遺伝子を植物に導入した場合, 雌花の形成, キチナーゼ等の防御遺伝子の発現等作用をコントロールできると思われる。

そこで, 微生物由来エチレン生成酵素遺伝子の植物における発現とその影響を調べるため, タバコ (*Nicotiana tabacum* var. *Samson*) に *Pseudomonas syringae* の *efe* 遺伝子を導入し, エチレン生成と形態への影響を調べた。

1. 試験方法

タバコへの *efe* 遺伝子の導入にはアグロバクテリウム感染によるリーフディスク感染法を用いた。pBI121 の *gus* 遺伝子を *efe* と *gus* の融合遺伝子で置き換えた pBICaMVEFEGUS を構築した。*Agrobacterium* は *A. tumefaciens* LBA4404 株を使用した。感染処理後のタバコリーフディスクは NAA0.1mg/l, BA1.0mg/l, Km100mg/l, セフォタキシム250mg/l を添加した MS 培地で培養した。

再分化してきたシュートは, Km100mg/l とセフォタキシム250mg/ml を添加したホルモンフリーの MS 培地に移植し選抜した。

選抜した植物体は PCR 分析により遺伝子の導入を確認し, エチレン生成量の測定,  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 活性検出および形態の観察を行なった。エチレン生成量は密封した培養瓶で培養後, 気相部の気体をガスクロマトグラフィーを用いて測定した。GUS 活性検出は組織化学的染色を行った。

また, pBICaMVEFEGUS のプロモーターをタバコアルコールデヒドロゲナーゼプロモーター (ADHp) に交換した pBIADHpEFEGUS についても同様に試験した。

2. 結果および考察

カナマイシンによる選抜の結果12系統の再分化個体が得られた。これらの12系統を PCR 分析した結果, 10系統で *efe* 遺伝子の導入が確認された。この10系統には非形質転換体とほとんど同じ形態のものから, 形態異常を示すものまで得られた。顕著な形態異常を示す系統は節間が短くなり草丈が低く, 葉が波打ち小さくなり, 根が太く脆くなり根毛が多発する等の症状がみられた。また, 中間的症状を示す系統も得られた。これらの中から4系統 (A-5, M-5, B-5, K-2) を選抜し地上部 (葉および莖) と根におけるエチレンの生成量を測定し

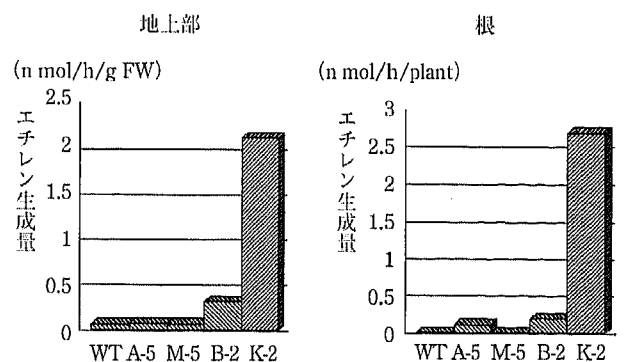
た。形態異常がない系統 (A-5, M-5) のエチレンの生成量は非形質転換体と変わらなかった。しかし, 強い形態異常を示した系統 (K-2) は, 地上部および根で非形質転換体の20倍以上のエチレンを生成していた (第1図)。また, 強い形態異常を示した系統 (K-2) では葉・莖横断面・根のすべてで GUS の発現が認められた。

また, pBICaMVEFEGUS のプロモーターをタバコアルコールデヒドロゲナーゼプロモーター (ADHp) に交換した pBIADHpEFEGUS を導入した結果, GUS 発現は根のみで認められた。また, エチレン生成の増加も根のみで認められた (第1表)。

以上のことより, 微生物由来のエチレン生成遺伝子が, 植物において発現し, エチレン生成量を20倍以上に増加をさせ, その形態に大きな影響を及ぼすことが確認できた。

また, ADHp は根に特異的なプロモーターと考えられた。

今後は, エチレン生成量の増加による防御遺伝子の活性や密閉容器外で育成した場合の形態への影響について検討する。



第1図 *efe-gus* 融合遺伝子を導入した形質転換タバコのエチレン生成量

第1表 pBIADHpEFEGUS により形質転換したタバコのエチレンの生成量

系 統	エチレン生成量 (nmol/h/gFW)	
	地上部	根
WT	0.042±0.003	0.026±0.026
pBICaMVEFEGUS : K- 2	0.987±0.212	0.680±0.516
pBIADHpEFEGUS : C- 4	0.037±0.004	0.129±0.046
pBIADHpEFEGUS : E 1- 1	0.033±0.004	0.332±0.022