

ブドウスティルベンシンターゼ遺伝子導入によるカラタチの形質転換

葉原 実・能塚一徳・小林省蔵¹⁾・鶴 丈和²⁾(福岡県農業総合試験場果樹苗木分場・¹⁾ 果樹試験場カキ・ブドウ支場・²⁾ 現南筑後地域農業改良普及センター)

Minoru KUWAHARA, Kazunori NOTSUKA, Shozo KOBAYASHI and Takekazu TSURU :

Genetic Transformation in Trifoliolate Orange (*Poncirus trifoliata* Raf.) by Introducing the *Vitis* Stilbene Synthase Gene

ブドウのファイトアレキシンであるレスベラトロールは、病害抵抗性に関与しているばかりでなく、動脈硬化防止作用や抗癌作用を有する機能性物質としても注目されている。そこで、レスベラトロール合成の鍵酵素であるスティルベンシンターゼ (以下 SS と省略) 遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターの調節下に連結して、カラタチ (*Poncirus trifoliata* Raf.) に導入しその形質転換体の特性について調査した。

1. 材料および方法

Kobayashi¹⁾ が *Vitis labrusca* cv. Concord より SS 遺伝子を単離して (SSlab), pBII21 の GUS 遺伝子部分へ挿入した pBSLAB を用いて、アグロバクテリウム法でカラタチの形質転換を行った。Kaneyoshi¹⁾ (1994) の方法に従い、外植片に中葉系カラタチ実生の上胚軸の切片を用いて感染後、アセトシリンゴン100ppm を含む MS 培地上で25℃、暗黒条件下で6日間共存培養した。その後、カナマイシン100ppm を添加した MS 培地で抵抗性シュートおよび発根個体を選抜した。発根個体の葉から全 DNA を抽出し、PCR 法により導入遺伝子を確認した。形質転換体のレスベラトロール含量は、Jeandet¹⁾ (1997) の方法により再生した植物の葉から80%メタノールで抽出し、Sato¹⁾ (1997) の方法により HPLC で定量した。

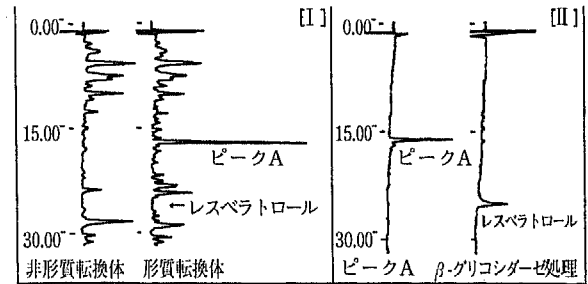
2. 結果および考察

カナマイシン抵抗性シュートは546供試切片から105個体、抵抗性発根個体はその96%に当たる101個体得られ、さらにカナマイシン抵抗性発根個体から形質の変異がなく生育が良好な83個体を選抜された。導入遺伝子の存在を確認するために PCR を行った結果、NPT II は供試した83個体の全部から、SS 遺伝子は供試個体の83%に当たる77個体からそれぞれ特異バンドが検出された (第1表)。SS 遺伝子が発現すると代謝産物としてレスベラトロールが産生されるため、葉のレスベラトロール含量を

第1表 スティルベンシンターゼ遺伝子のカラタチへの導入経過

供試 切片数	カナマイシン抵抗性		遺伝子検出個体数		
	シュート 数	発根 個体数	供試 個体数	NPT II	SS
546	105	101	83	83 (100) a)	77 (83)

注) a), () 内は検出率%



第1図 形質転換体の葉の HPLC 分析結果 (I) および β-グリコシダーゼ処理によるバイシードの同定 (II)

HPLC で定量したが、形質転換体からはレスベラトロールは検出されなかった (第1図)。しかし、非形質転換体には存在しないが、形質転換体には存在するピーク A が検出された。このピーク A はレスベラトロールの配糖体と予想されたため、ピークを分取して β-グリコシダーゼ処理を行った。その結果、ピークはレスベラトロールの保持時間にシフトしたため、ピーク A はレスベラトロールの配糖体のバイシードであることが確認された。形質転換体からはレスベラトロールを産生する個体は認められなかった。しかし、バイシードは62供試個体中57個体で検出された。バイシード含量の個体別分布は101~200 μg/g・f・w に最も多く、その平均は144 μg/g・f・w (3~557) であった (第2表)。以上のことから、CaMV35S プロモーター調節下にある SS 遺伝子をカラタチに導入すると、SS 遺伝子が恒常的に発現しレスベラトロールは合成されるものの、それらが即座にカラタチの内生グリコシルトランスフェラーゼにより配糖体に変換されるものと想定された。

なお、本研究は平成8年度農林水産省依頼研究員研修で一部実施した。

引用文献

- 1) KOBAYASHI, S., C.K.DING, Y.NAKAMURA, I.NAKAJIMA and R.MATSUMOTO, *Plant Cell Rep.* 19 : 904-910, 2000.

第2表 形質転換体の葉のバイシード含量の個体別分布

導入 遺伝子	供試 系統数	バイシード含量の分布 (μg/g・f・w)						平均 (μg/g・f・w)
		0	1-10	11-100	101-200	201-500	501-	
SSlab	62	5	4	14	27	11	1	144