

遺伝子組換えによるエチレン低生産性
カーネーションの作出と解析

小杉祐介

①

遺伝子組換えによるエチレン低生産性
カーネーションの作出と解析

小杉 祐介

略語表

BA	6-Benzylaminopurine
BSA	Bovine serum albumin
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
IPTG	Isopropyl thio- β -D-galactoside
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethanesulphonic acid
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propanesulphonic acid
NAA	α -Naphthaleneacetic acid
SDS	Sodium dodecyl sulphate
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

目次

第1章. 緒論.....	1
第2章. 既往の研究.....	4
第3章. エチレン低生産性カーネーション形質転換体の作出.....	13
3.1. 緒言.....	13
3.2. 材料と方法.....	13
3.3. 結果.....	29
3.4. 考察.....	51
第4章. <i>sACO1</i> 形質転換系統切花の自然条件における老化現象.....	55
4.1. 緒言.....	55
4.2. 材料と方法.....	55
4.3. 結果.....	62
4.4. 考察.....	72
第5章. <i>sACO1</i> 形質転換系統花卉の外生エチレンに対する反応.....	74
5.1. 緒言.....	74
5.2. 材料と方法.....	74
5.3. 結果.....	79
5.4. 考察.....	93
第6章. 総合考察.....	96
摘要.....	103
謝辞.....	107
引用文献.....	108
付表.....	118

第1章. 緒論

エチレンは、種子発芽、茎葉の成長・老化、果実の成熟など植物の成長と分化の過程を多岐にわたり調節する植物ホルモンである。エチレンは特に、花卉の老化においても重要な役割を果たしている (Abeles et al. 1992)。高等植物において、エチレンは、L-メチオニンから、S-アデノシル-L-メチオニン (Ado-Met)、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) を経て生合成される。Ado-Met から ACC への転換は ACC 合成酵素が触媒し、ACC からエチレンへの転換は ACC 酸化酵素が触媒する (Kende 1993, Yang and Hoffman 1984)。

花は萼、花弁、雌ずい、雄ずいなど異なる組織から構成される複合器官であり、それぞれの組織の老化速度は異なる。そのなかでも花弁は一般的に短命である。花が観賞用として用いられる際には、多くの場合、花弁の寿命がその観賞期間を決定する (Borochoy and Woodson 1989)。花弁の老化 (萎れ) は、花弁細胞において、細胞膜の浸透性の特異的な制御の消失、細胞を構成する物質の加水分解などによって、細胞が崩壊した結果見られる現象であると考えられている (Borochoy and Woodson 1989, Panavas et al. 1998)。花弁がエチレン誘導型の老化を示す花きは、カーネーション、ペチュニア、デルフィニウム、スイートピーなど多種にわたる。これらの花きでは主に花弁から内生的に生産されるエチレン、あるいは外部から与えられたエチレンによって花弁の老化が促進される。一方、花弁におけるエチレンの生合成やエチレンの作用を阻害すると、花弁の老化が抑制され花の鮮度が維持される (Reid and Wu 1992)。花き産業においては、花の鮮度は収穫されてから市場を経て消費者の手に渡り、さらに消費者の手に渡った後も十分な観賞期間が維持される必要がある。したがって、エチレン誘導型の花の老化を示す花きにおいては、

花の品質を維持するために、エチレンの生成あるいは作用を人為的に抑制するための技術開発が必要である。

現在、エチレン誘導型の老化を示す切花の鮮度保持剤として、エチレンの作用阻害剤であるチオ硫酸銀錯イオン (silver thiosulfate anionic complex, STS) が主に使用されている。STS は、これらの切花の観賞に堪える期間を2倍以上に延長する極めて効果の高い鮮度保持剤であり、カーネーションなどの切花においては、収穫後、生産者レベルで処理されて出荷されている。しかし、STS の有効成分は銀イオンであることから環境汚染が懸念され、将来的には使用が規制されるものと予想されている (Serek et al. 1995)。現在、環境や人畜に安全であり、しかも STS に匹敵する効果が得られる鮮度保持技術が必要とされている。

遺伝子組換によるエチレン低生産性化あるいは非感受性化への形質転換は花の観賞に堪える期間を延長させることが可能である (Savin et al. 1995, Aida et al. 1999, Wilkinson et al. 1997, Bovy et al. 1999) ことから、鮮度保持技術の1つになる可能性がある。さらに、エチレン低生産性あるいは非感受性に改変された植物は、有効な鮮度保持技術を開発するための新しい知見を得るうえで必要な花のエチレン生成と作用の制御機構を解明するための有用な研究材料になる可能性がある。したがって、エチレン低生産性あるいは非感受性に改変された植物の作出と解析は、花きの新たな鮮度保持技術を開発するうえで極めて重要である。

カーネーションの切花は、花き産業において生産額が国内においては3位、世界においては2位に位置する主要な品目である。そして、エチレン誘導型の老化を示す花きのなかでも、とりわけエチレンによる花の老化現象が顕著である。鮮度保持のための処置が施されていない切花では、満開後約1週間頃から花弁が内側に丸まり込むインローリング (in-rolling) 現象が起こり、その後、花弁は急速に萎れて観賞価値を失う。花弁のインローリングは花弁において大量に生成するエチレンの作用によって誘導される。花弁におけるエ

チレン生成の増加は自己触媒的である，つまりエチレン生成はエチレンによって促進される (Borochoy and Woodson 1989, Reid and Wu 1992)．花卉における自己触媒的なエチレン生成とインローリングは，受粉によって雌ずいにおいて生成したエチレンや外部から処理されたエチレンによっても誘導される．一方，これらの現象はエチレンの合成阻害剤や作用阻害剤の処理によって抑制される．花卉における自己触媒的なエチレン生成の増加には ACC 合成酵素活性と ACC 酸化酵素活性の増加が伴なう (Manning 1985, Peiser 1986)．また，ACC 合成酵素遺伝子 *DC-ACS1* [cDNA クローン CARACC3 (Park et al. 1992) に相当] と ACC 酸化酵素遺伝子 *DC-ACO1* [pSR120 (Wang and Woodson 1991) に相当] の mRNA の蓄積量が増加することから，これらの遺伝子が，花卉における自己触媒的なエチレン生成の増加に関与するものと考えられている (Woodson et al. 1992)．

本研究では，カーネーション品種 Nora を材料に，エチレン低生産性の形質転換体を作成し，その性質を解析することを目的とした．第 1 章では，センス・アンチセンス技術によって，カーネーション花卉老化時に見られる自己触媒的なエチレン生成に関与するものと考えられている ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子の発現が抑制された形質転換体の作出に関して述べる．第 2 章では，センス ACC 酸化酵素遺伝子が導入された形質転換系統 *sACO1* の切花の自然条件における老化現象に関して述べる．第 3 章では，*sACO1* 形質転換系統の花弁の外生エチレンに対する反応性に関して述べる．

第2章. 既往の研究

花の老化に対するエチレンの関与は、カーネーションやバラの切花の輸送や取り扱いの際に、エチレンによって汚染された空気によって老化が促進されること、また、花自身がエチレンを生成することから認識されるようになった (Crocker and Knight 1908). Zimmerman et al. (1931) は、バラの花を構成する組織にエチレンを処理してその反応を観察し、エチレンによって花の脱離と老化が誘導されることを確認した。さらに、Nichols (1966) は、カーネーションの花の老化時に、エチレン生成量の増加が伴うことを発見した。

切花の鮮度を維持する手段としては、切花を低温に保存することが効果的であり、これは生産、流通段階で通常行われている基本的な鮮度保持手段である。カーネーション等のエチレンが老化を誘導する切花では、これに加えて、エチレン生成あるいは作用を抑制するための薬剤で処理されている。Beyer (1976) は、銀イオンがエチレンの作用を抑制して切花の鮮度を維持する能力があることを報告した。1978年には、銀イオンをキレート化してチオ硫酸銀錯イオン (silver thiosulfate anionic complex, STS) として茎の切り口から投与すると、植物体の導管内を容易に輸送されて花器官に達することから、カーネーション切花に対する鮮度保持効果がより高くなることが報告された (Veen and van de Geijn 1978)。STSによるエチレンの作用阻害は、銀イオンがエチレンの結合サイトに結合することによるものであると考えられている (Sisler et al. 1986, Veen 1983)。STSは、カーネーションに処理した場合、観賞に堪える期間は約2倍になるなど、極めて効果の高い鮮度保持剤であり、その鮮度保持効果が明らかになってから現在に至るまでの約20年間、カーネーションをはじめとする様々な花きの鮮度保持に用いられてきた。しかし、STS剤はその有効成分が銀イオンであることから、重金属による環境汚染が懸念され、将来的には使用が禁止される可能性があり (Serek et al. 1995)、STS剤の処理に代

わる，新たな花きの鮮度保持技術が求められるようになってきている。

高等植物においてエチレンが，*S*-アデノシル-L-メチオニン (AdoMet) → 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) → エチレンの経路で生合成され，これらが ACC 合成酵素と ACC 酸化酵素によって触媒されることが明らかにされた (Kende 1993, Yang and Hoffman 1984)。その後，ACC 合成酵素と ACC 酸化酵素の生化学的な解析が進められ，これらの酵素の阻害剤については切花鮮度保持薬剤としての可能性についても検討がなされた。ACC 合成酵素は，触媒反応の補酵素としてピリドキサル-5'-リン酸 (PLP) を要求するため，PLP を補酵素とする一般的な阻害剤であるアミノエトキシビニルグリシン (aminoethoxyvinylglycine, AVG) やアミノオキシ酢酸 (aminooxyacetic acid, AOA) によって活性が阻害される (Baker et al. 1977)。AOA については，STS に匹敵するカーネーション切花の老化抑制効果が確認されたことから (Fujino et al. 1980)，STS 剤の代替鮮度保持剤として用いられるようになってきている。Satoh and Esashi (1980) は，ACC のアナログ物質である 2-アミノイソ酪酸 (2-aminoisobutyrate, AIB) が，オナモミ種子の子葉切片，黄化エンドウの上胚軸切片，黄化ヤエナリの下胚軸切片におけるエチレン生成を阻害する物質として発見し，ACC 酸化酵素活性の拮抗阻害剤であることを確認した。Serrano et al. (1990) は，10 mM の AIB 処理によって，カーネーション切花の老化時のエチレン生成が 85%以下に低下し，花の寿命が延びた (花の新鮮重を基準にして 4 日) ことを報告している。また，AIB と同様，ACC のアナログ物質である 1-アミノシクロブタン-1-カルボン酸 (1-aminocyclobutane-1-carboxylate, ACBC) は，カーネーション ACC 酸化酵素の部分精製標品を用いた酵素反応阻害実験の結果，ACC 酸化酵素の極めて強力な拮抗阻害剤であることが分かり，カーネーション切花の鮮度保持効果も確認された (Kosugi et al. 1997)。

これら，ACC 合成酵素と ACC 酸化酵素の酵素活性の阻害剤のほかにも，エチレンの生成と作用を抑制する化学物質が発見され，切花の鮮度保持効果が確認されている。Serek et al. (1994a) は 1-メチルシクロプロペン (1-

methylcyclopropene, 1-MCP) がエチレンの作用阻害剤として働くことを発見し、ペチュニア、カーネーション、ファレノプシスなどの切花への処理によって STS に匹敵する鮮度保持効果を確認した (Porat et al. 1995, Serek et al. 1994b). また, Midoh et al. (1996) は 1,1-dimethyl-4-(phenylsulfonyl)semicarbazide (DPSS) がカーネーション切花の鮮度保持剤として有効な薬剤であることを発見した. DPSS は STS よりも鮮度保持効果が強く, すでに実用化されている. DPSS は花のエチレン生成と作用を抑制するが (Midoh et al. 1996), *in vitro* での実験から ACC 合成酵素あるいは ACC 酸化酵素の阻害剤ではないことが確認されており (Satoh et al. 1997), その作用機作はまだ明らかになっていない.

切花への糖の投与が切花の鮮度保持に効果があることは古くから知られている. 最近, Ichimura and Suto (1999) は, 糖処理とスイートピー切花の寿命, 花のエチレン生成量について解析を行い, 切花への 10% スクロースの連続処理によって, 切花の花持ち日数が 3 倍になること, さらに花卉の糖濃度と花持ち日数の間には正の相関があることを報告している.

以上のように, エチレンの生成と作用を阻害する様々な薬剤について, 花きの鮮度保持剤としての可能性が検討されてきた. 一方では遺伝子組換え技術によりエチレン生成あるいは作用の抑制された植物の作出が行われるようになった. 遺伝子組換えによってエチレン低生産性, あるいは, エチレン非感受性に改変された植物が作出されるようになった背景には, エチレン生合成系遺伝子とエチレン作用系遺伝子の単離が可能になったことがあげられる.

ACC 合成酵素 cDNA は, Sato and Theologis (1989) によって, ズッキーニの果実から作成した発現ライブラリーと ACC 合成酵素の部分精製標品を抗原として調製した抗体を用いて, 初めて単離された. この cDNA は大腸菌と酵母で発現され酵素活性が確認された. 他方, Hamilton et al. (1990) は, 成熟トマト果実由来の cDNA クローン pTOM13 (Slater et al. 1985) をアンチセンス遺伝子として導入したトマト形質転換体を作成して, 果実のエチレン生成量が低下すること, 外部から ACC を与えてもエチレン生成が増加しないことを明

らかにして、pTOM13 が ACC 酸化酵素遺伝子をコードしている可能性を示唆した。これは、pTOM13 を発現させた酵母などで ACC 酸化酵素活性が認められたことによって実証された (Hamilton et al. 1991, Spanu et al. 1991)。これらの研究以後、PCR 法の普及と相俟って、多くの植物種から ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子の単離が行われている。そして、多くの場合、ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子は多重遺伝子族を構成し、各遺伝子は内生あるいは外生の異なる刺激に依存し、異なる発現様式を示すことが明らかになっている。カーネーションについては、Park et al. (1992) がカーネーション老化花卉から ACC 合成酵素遺伝子の cDNA クローン CARACC3 (*DC-ACS1*) を初めて単離した。その後、2 つの ACC 合成酵素遺伝子の cDNA CARAS1 [Henskens et al. 1994; または DCACS2, Jones and Woodson 1999] (*DC-ACS2*), DCACS3 (Jones and Woodson 1999) (*DC-ACS3*) が単離され、カーネーションにおいても他の植物と同様、ACC 合成酵素遺伝子は多重遺伝子族を構成していることが明らかになった。一方、ACC 酸化酵素遺伝子については、現在までに只 1 つの cDNA クローン pSR120 が単離されている (Wang and Woodson 1991)。pSR120 は、当初、カーネーションの老化花卉に特異的に発現する遺伝子の cDNA クローンとして単離され、推定アミノ酸配列が、成熟時のトマト果実から単離された cDNA クローン pTOM13 と 77% のホモロジーを持つことが示された。pTOM13 が ACC 酸化酵素遺伝子をコードしていることが明らかになった結果、pSR120 が ACC 酸化酵素遺伝子をコードしていることが推定された。最近になって、Hibi et al. (in preparation) はカーネーション ACC 酸化酵素遺伝子のゲノミッククローン *DC-ACO1* を単離し、pSR120 が *DC-ACO1* によってコードされていることを明らかにした。これらのカーネーション ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子が、花の老化時に組織特異的に制御されていることを示す報告がなされている。Woodson et al. (1992) は、*DC-ACS1* と *DC-ACO1* の mRNA 量が、カーネーション花卉老化時に同時に増加すること、これらの増加はエチレン作用阻害剤処理によって抑制されること、老化前の

花のエチレン処理によって増加することを明らかにした。この結果から、*DC-ACS1* と *DC-ACO1* が老化時の花卉において、ACC 合成酵素活性と ACC 酸化酵素活性の増加とそれによる自己触媒的なエチレン生成の増加に関与していることが示された。また、*DC-ACS2*, *DC-ACS3* については、主に雌ずいにおいて発現していることが確認され、これらの遺伝子が、自然条件または受粉後に見られる雌ずいにおけるエチレン生成に関与していることが示唆されている (ten Have and Woltering 1997, Jones and Woodson 1997, Jones and Woodson 1999)。同様に、エチレン生合成系遺伝子の組織特異的な制御は、受粉後の花の老化が著しいファレノプシス (Bui and O'Neill, 1998) においても確認されており、これら遺伝子の組織特異的な発現が、受粉刺激によって初めに雌ずいで起こり、その後、花卉で起こるエチレン生成と花の老化に関与していると考えられている。

アグロバクテリウム法などの植物の形質転換技術の発達、また、植物においてアンチセンス遺伝子の導入による内生遺伝子の発現抑制が明らかにされた (van der Krol et al. 1988) ことによって、アンチセンス ACC 合成酵素遺伝子、あるいはアンチセンス ACC 酸化酵素遺伝子が導入されたエチレン低生産性の形質転換植物が作出されるようになった。Hamilton et al. (1990) は、トマト果実成熟時に発現する遺伝子の cDNA クローンの 1 つとして単離した pTOM13 (ACC 酸化酵素遺伝子 cDNA) を、アンチセンス遺伝子としてカリフラワーモザイクウイルス 35S (CaMV35S) プロモーターの制御下に置き、トマトに導入した。得られた形質転換体では果実のエチレン生成が 99%以上抑制され、果実の追熟が抑制された。また、Oeller et al. (1991) は、トマト ACC 合成酵素遺伝子 (*LE-ACS2*) の cDNA がアンチセンス方向に導入されたトマト形質転換体の果実において、エチレン生成が 99%以上抑制され、成熟が抑制されたことを明らかにした。その後、アンチセンス ACC 酸化酵素遺伝子が導入されたメロン (Ayub et al. 1996)、ブロッコリー (Henzi et al. 1999)、カーネーション (Savin et al. 1995)、トレニア (Aida et al. 1998) の形質転換体が作出され、

エチレン生成が低下したことが報告されている。Savin et al. (1995) は、花卉老化時に発現する ACC 酸化酵素 cDNA (*DC-ACO1* に相当する遺伝子) をアンチセンス遺伝子として、高発現プロモーターである MAC プロモーターの制御下に置き、カーネーション品種 Scania に導入した。得られた形質転換体では、花のエチレン生成が 10%以下に抑制され、花卉のインローリング現象が消失し、切花の観賞に堪える期間が延長した。しかし、この品種では、花卉インローリングの消失に加え、花卉数の減少、花卉の頭色不良といった、花の価値を低下させる副作用が現れたことを報告している。

1990 年に、Napoli et al. (1990) は、カルコン合成酵素遺伝子をセンス方向に導入したペチュニア形質転換体において内生のカルコン合成酵素遺伝子の発現が抑制されるコサプレッション現象を発見した。この現象が起こる詳細な機構は現在明らかになっていないが、センス遺伝子の導入はアンチセンス遺伝子の導入と並ぶ内生遺伝子の発現を抑制するための手段として注目されるようになり、エチレン生合成系遺伝子についてもセンス方向に導入された形質転換体が生産された。Nagata et al. (1995) は、トマト ACC 合成酵素遺伝子 (*LE-ACS2*) cDNA をセンス遺伝子として導入したトマトの形質転換体を生産し、果実のエチレン生成の抑制と果実の成熟速度の遅延を報告している。Aida et al. (1998) は、受粉や柱頭への傷害(創傷)による花の老化が著しいトレニアについて、同植物から単離された ACC 酸化酵素遺伝子断片をセンス遺伝子、アンチセンス遺伝子として導入した形質転換体を生産し、センス遺伝子の導入がアンチセンス遺伝子の導入よりも、花の鮮度延長効果があったことを報告している。

1990 年代になって、シロイヌナズナの突然変異体の遺伝学的な解析が進展し、エチレンの受容体とシグナル伝達系に関与するコンポーネントの遺伝子が単離されるようになった。エチレン受容体遺伝子としては、エチレン非感受性突然変異体 *etr1* から *ETR1* 遺伝子が初めて単離された (Bleecker et al. 1988)。 *ETR1* 遺伝子によってコードされるタンパク質は、N 末端側に 3 つの膜貫通領

域を持ち、C末端側半分の領域は原核生物の情報伝達系に多く見られる2因子制御系と類似性のあるヒスチジンキナーゼドメインとレシーバー様ドメインから構成されていることから、エチレン受容体であることが示唆された (Chang et al. 1993). さらに *ETR1* を発現させた出芽酵母を用いた C^{14} -エチレン結合実験から、エチレンの受容体をコードしていることが明らかになった (Shaller et al. 1995). その後、シロイヌナズナからは *ETR1* と類似した構造をもつ *ETR2* (Sakai et al. 1998), *EIN4* (Hua et al. 1998) や、*ETR1* に見られるレシーバー様ドメインを持たない *ERS1* (Hua et al. 1995), *ERS2* (Hua et al. 1998) が単離されている. 1998年には、これらの受容体がネガティブレギュレーターであるという報告がなされている (Hua and Meyerowitz 1998). エチレンのシグナル伝達系に関与する遺伝子は、現在までに3種類の遺伝子 (*CTR1*, *EIN3*, *EIN2*) がシロイヌナズナから単離されている. *CTR1* は恒常的なエチレン反応を示すシロイヌナズナの T-DNA 挿入突然変異体から単離された (Kieber et al. 1993). 変異体の解析、塩基配列の解析から、*CTR1* によってコードされるタンパク質は、哺乳類において MAP-キナーゼカスケードを開始させる RAF キナーゼと相同性が認められるネガティブレギュレーターであることが明らかになっている. 弱いエチレン非感受性を示す T-DNA 挿入突然変異体から単離された *EIN3* (Chao et al. 1997) によってコードされるタンパク質は、ethylene binding element 結合タンパク質 (EREBPs) が関与するエチレン応答遺伝子の転写活性化に働くカスケードを開始させる転写因子であることが明らかにされている (Solano et al. 1998). 強力なエチレン非感受性突然変異体 *ein2* から単離された *EIN2* (Alonso et al. 1999) によってコードされるタンパク質は、*CTR1* と *EIN3* の中間で作用していることが明らかにされている (Chao et al. 1997). 変異体を用いた遺伝学的な解析から、シロイヌナズナでは、5つの受容体で受け取られたシグナルは、すべて *CTR1* を介して伝達されているものと考えられているが、複数のエチレン受容体がエチレンの作用にそれぞれどのような役割を果たしているかについては明らかになっていない (Bleecker 1999). カーネーション

では、現在までに2つのエチレン受容体遺伝子が単離されている [DC-ERS1, (初めは DCERS), DC-ERS2]. DC-ERS1 (Charng et al. 1997) は、ゲノム DNA として単離され、その後花弁から cDNA が単離された。しかしこの遺伝子の mRNA は、老化花弁にはほとんど蓄積されていない。DC-ERS2 (Shibuya et al. 1998) の mRNA は、エチレン生成の増加が開始する以前の満開時の花弁において蓄積しており、花弁の老化の進行に伴ってその蓄積量が減少することが確認されている (渋谷ら 1999)。

シロイヌナズナのエチレン受容体遺伝子 *ETR1* に変異が挿入された *etr1-1* 遺伝子は、エチレン非感受性の形質をもたらす優性対立遺伝子であること (Chang et al. 1993) から、*etr1-1* 遺伝子を導入することによって、花におけるエチレンの作用と老化を抑制する試みがなされた (Bovy et al. 1999, Wilkinson et al. 1997)。Wilkinson et al. (1997) は、*etr1-1* を導入したペチュニアの形質転換体において、受粉によって誘導される花冠の萎れが抑制され、花の観賞に堪える期間が2倍以上に延びたことを報告している。また、Bovy et al. (1999) は *etr1-1* を導入したカーネーション形質転換体の切花において、花弁のインローリングが起こらず、切花の観賞に堪える期間が2~3倍に延びたことを報告している。

以上のように、遺伝子組換えによるエチレンの低生産性化、非感受性化は、花きの鮮度保持技術の1つのオプションとして研究が行われているが、他方、エチレンの生成あるいは作用が抑制された形質転換植物が、エチレンの生成と作用の制御機構の研究材料として用いられた例がある。例えば、Theologis et al. (1993) は、アンチセンス ACC 合成酵素遺伝子の導入によってエチレン生成が抑えられたトマトの形質転換体を用いて、エチレンによって誘導されるシグナル伝達系路とエチレンに非依存的なシグナル伝達系路がトマト果実の追熟に関与していることを明らかにした。

このように、遺伝子組換えによるエチレン低生産性化、エチレン非感受性化は、花きの鮮度を維持するための1つの技術になる可能性があると同時に、

新しい鮮度保持技術の開発に必要な，エチレンの生成や作用の制御機構の解明を目指した基礎研究の有用な研究材料を提供する可能性を持っている．

第3章. エチレン低生産性カーネーション形質転換体の作出

3.1. 緒言

カーネーションの花において、自然老化、受粉あるいは外生エチレン処理によって引き起こされる自己触媒的エチレン生成反応は、花粉における ACC 合成酵素遺伝子 *DC-ACS1* と ACC 酸化酵素遺伝子 *DC-ACO1* の大量発現が基礎になっている。そこで本章では、これら遺伝子の発現が抑制されたエチレン低生産性形質転換体を得ることを目的にして、これらの遺伝子をセンスまたはアンチセンス方向に導入した形質転換体の作出を試みた。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 植物材料

老化花卉由来全 RNA を得るために、カーネーション (*Dianthus caryophyllus* L. 品種 Nora) の切花を栽培農家から購入した。満開に達した段階で、茎を 2 cm 残して切り戻し、脱塩水を入れたバイアル (30 ml 容) に 1 花ずつ生けて室内に置いた。花卉の老化は、エチレン生成量を測定することにより判断した。切花をバイアルに生けた状態で、ガラス容器 (450 ml 容) に入れて蓋をして密閉し、室温で 1 時間放置した。ビニールテープで密栓した空気採取口にツベルクリンシリンジの針 (No. 1/3) を挿し込み、容器内の空気サンプルを 1 ml 採取した。空気サンプル中のエチレンをガスクロマトグラフィーによって測定した [装置, HITACHI Gas Chromatograph 263-30; 活性アルミナカラム (内径 3 mm×長さ 1 m); ガス流速, N_2 40 ml min⁻¹, H_2 25 ml min⁻¹, air 250 ml min⁻¹; カラム温度, 100 °C; インジェクタおよびディテクタオープン温度, 150 °C]。測定は 1 日 1 回行い、エチレン生成量が 3 nmol flower⁻¹以上に達した花から、

花卉のみを採取した。花卉の新鮮重量 (Fresh weight) を測定した後、 -80°C で凍結保存した。

アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) を用いたカーネーションの形質転換には、品種 Nora の腋芽の茎頂部から誘導し、*in vitro* で継代培養したシュート (不定芽) を外植片材料として用いた。シュートの培養は以下の方法によって行った。品種 Nora の腋芽 (15 cm~20 cm に成長したもの) を宮城県園芸試験場から入手した。腋芽を 75% エタノールに 2 分間浸漬して洗浄した。クリーンベンチ内で、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度 1%; 0.1 % Tween20 を含む) に 15 分間浸漬して表面殺菌を行い、滅菌水で 3 回濯ぎを行った。滅菌したカミソリを用いて、先端分裂組織を含む約 1 cm の茎頂部を切り出した。茎頂部からのシュートの誘導には、ペトリ皿に調製した BN 培地 (付表 2; pp.123) を用いた。分離した茎頂部を BN 培地に置床して蓋をし、サージカルテープ (3M Health Care) で固定した。置床した茎頂部を、グロースチャンバー内 [16 時間日長 ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$] に置いた。約 2 週間後に茎頂部からシュートが誘導された。1 ヶ月毎に、形成されたシュート塊から、2~3 枚の葉を持つ小片を切り出して、新たな BN 培地上で増殖させた。1 年以上継代培養を続けたシュートを、形質転換のための外植片として用いた。

3.2.2. 花卉からの全 RNA の抽出

カーネーション花卉からの全 RNA の抽出は、SDS-フェノール法 (Palmiter 1974) を参考にして行った。1 回の抽出操作には 2~5 g の花卉を用いた。 -80°C で凍結した花卉を、乳鉢と乳棒を用いて液体窒素と共に磨砕し、粉末にした。滅菌したビーカーに、滅菌したスターラーバーを入れ、花卉 1 g あたり、抽出緩衝液 (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 1% SDS, pH 9.0) 5 ml, 2-メルカプトエタノール 1 ml, フェノール (1 M Tris-HCl, pH 9.0 で飽和したもの) -クロロホルム-イソアミルアルコール (25 : 24 : 1, v/v) 5 ml をビーカーに加え、あらかじめ攪拌した。これに花卉の粉末を加え、10 分間攪拌した。この懸濁液

を、50 ml 容ポリプロピレン製チューブ（サンプルテック）に分注し、振盪機に横向きに固定して回転振盪（250 rpm, 5 分間, 室温）後、遠心分離（1,400 ×g, 25 分間, 4 °C）した。上層（水層）は新たなチューブに回収し、氷水中に置いた。下層（フェノール層）に、抽出緩衝液を花卉 1 g あたり 1 ml 加え、同様に振盪、遠心分離して得られた上層を、初めの上層に加えた。回収した上層画分に等量のフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール（25:24:1, v/v）を加え、同様に振盪、遠心分離を行った（2 回）。上層画分を 50 ml 容ポリアロマー製遠沈管（ナルゲン）に回収した。1/20 量の 5 M NaCl, 2.5 倍量のエタノールを加えて混合し、-20 °C で、15 分間冷却した後、遠心分離（8,000 ×g, 15 分間, 4 °C）した。上清を取り除き、沈澱に冷 70% エタノールを加え、同様に遠心分離した。上清を取り除き、15 分間、室温に放置して、沈澱から水分を取り除いた後、冷却した滅菌 UP (ultra pure) 水 10 ml を加えて、氷水中で冷却しながら溶解した。これに 1/4 量の 10 M LiCl を加えて混合し、氷水中で 30 分間放置した後、遠心分離（8,000 ×g, 15 分間, 4 °C）した。上清を取り除き、沈澱に、冷却した UP 水を 10 ml 加え、氷水中で冷却しながら溶解した。この溶液について再度エタノール沈澱を行った後、沈澱を 0.1~1 ml の滅菌した UP 水に溶解し、全 RNA 試料として -80 °C で保存した。

3.2.3. ACC 酸化酵素遺伝子と ACC 合成酵素遺伝子 cDNA の翻訳領域の単離

(1) オリゴヌクレオチドプライマーの設計

カーネーション ACC 合成酵素遺伝子 *DC-ACS1* の cDNA クローン CARACC3 (Park et al. 1992) の翻訳領域の両端 20 bp を参考にして上流、下流のオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、その 5' 末端に、*SpeI* 認識サイトを付加した (CARAS-*SpeI* F, CARAS-*SpeI* R) (付表 1; pp.119)。また、カーネーション ACC 酸化酵素遺伝子 cDNA クローン pSR120 (*DC-ACO1*) (Wang and Woodson 1991) の翻訳領域の両端 20 bp の塩基配列を参考にして、上流、下流のオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、その 5' 末端に *XbaI* 認識サイトを付加した

(CARAO-XbaI F, CARAO-XbaI R) (付表 1 ; pp.119). また, プライマーは日清紡東京研究センターに合成を依頼した.

(2) RT-PCR による ACC 合成酵素遺伝子 cDNA 翻訳領域の増幅

20 μ l の逆転写反応液 [2 μ g 全 RNA (65 °C で 10 分間加熱後急冷して変性させたもの), 2.5 μ M 下流プライマー (CARAS-SpeI R), reverse transcriptase XL (AMV) (Life Sciences) 5 units, RNase inhibitor (TaKaRa) 20 units, 1 mM dNTP mixture, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3] を 0.2 ml 薄壁チューブに調製し, サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer) を用いて 42 °C で 30 分間反応させた. 反応液を 99 °C で 5 分間加熱して酵素を失活させた.

80 μ l PCR 反応液 [0.2 μ M 上流プライマー (CARAS-SpeI F), 2.8 units DNA polymerase (Expand High Fidelity PCR System, Hoffmann-La Roche), 2.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3] を逆転写反応液に加え, 全量 100 μ l とした. サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer) を用い, PCR を行った [温度条件: 94 °C 5 min, 55 °C 2 min, 72 °C 1.5 min, (94 °C 1min, 55 °C 50 sec, 72 °C 1.5 min) \times 20 サイクル, 72 °C 15 min]. PCR 産物を, 1.0%アガロースゲル/TAE (40 mM Tris, 40 mM 酢酸, 1 mM EDTA) バッファーを用いた電気泳動によって分離した. 泳動後のゲルをエチジウムブロマイドによって染色し, UV トランスイルミネーターを用いて観察した. 増幅断片 (約 1.5 kb) をアガロースゲルから抽出 (EASYTRAP ver.2, TaKaRa) して回収した.

(3) RT-PCR による ACC 酸化酵素遺伝子 cDNA 翻訳領域の増幅

RT-PCR は, ACC 合成酵素遺伝子 cDNA 翻訳領域の増幅に用いた方法に準じた. ただし, プライマーは CARAO-XbaI F, CARAO-XbaI R を用い, PCR の温度条件は, 94 °C 5 min, 60 °C 2 min, 72 °C 1.5 min, (94 °C 1min, 60 °C 50 sec, 72 °C 1.5 min) \times 20 サイクル, 72 °C 15 min で行った. PCR 産物は, 1.0%アガロースゲル/TAE バッファーを用いた電気泳動によって分離し, 増幅断

片 (約 1 kb) をアガロースゲルから抽出して回収した。

(4) 増幅断片のクローニング

プライマー CARAS-SpeI F と CARAS-SpeI R から増幅された約 1.5 kb の cDNA 断片を制限酵素 *SpeI* で消化した。プライマー CARAO-XbaI F と CARAO-XbaI R から増幅された約 1 kb の cDNA 断片については *XbaI* で消化した。制限酵素反応は、制限酵素と、その至適バッファーで 37 °C で 2 時間以上インキュベートして行った。反応後、常法に従ってフェノール、クロロホルム処理、エタノール沈澱を行った。これらの断片 (約 1.5 kb, 約 1 kb) について、それぞれ、クローニングベクター pBluescript II(SK+) phagemid (Stratagene) の *SpeI* サイト、*XbaI* サイトにライゲーション (Ligation Kit ver.2, TaKaRa) を行った。

大腸菌の形質転換は、Ca/Mg 法を用いた。大腸菌 XL 1-Blue 菌株の培養した菌体に、冷却した 50 mM CaCl₂ を氷水中で冷却しながら処理した後、50 mM CaCl₂, 20% グリセロール溶液として凍結したものをコンピテントセルとした。ライゲーション反応産物を加えた 100 µl の溶液 (10 mM KCl, 30 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂, 2.1% ポリエチレングリコール 6,000) を調製し、氷水中で冷却後、コンピテントセル 100 µl を加えて混合し、氷水中で 20 分間、室温で 10 分間置いた。その後、1 ml の LB 液体培地 (1% tripton, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7.0) を加えて、37 °C で 1 時間穏やかに振盪した。培養液を、LB 寒天培地 [50 µg ml⁻¹ アンピシリン, 1.5% 寒天を含む; 40 mM IPTG 500 µl と 2% X-gal ジメチルホルムアミド溶液 500 µl を培地表面から添加] 上に広げ、37 °C で 18 時間培養した。出現した白色コロニーを釣菌し、50 µg ml⁻¹ アンピシリン添加 LB 液体培地に接種し、37 °C で 18 時間振盪培養した。培養液からプラスミドを抽出 (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) した。得られたプラスミドを制限酵素 (*SpeI* または *XbaI*) によって再切断し、cDNA 断片の挿入を確認した。cDNA 断片の挿入が確認されたプラスミドを含んだ菌液について、グリセロールストック (グリセロール濃度 15%) として -80 °C で凍結保存した。プライマー CARAS-SpeI F と CARAS-SpeI R から得られた約 1.5 kb の cDNA 断片を含むク

ローンは pBluescript-DCACS(OR) (図 3-1), プライマー CARAO-XbaI F と CARAO-XbaI R から得られた約 1 kb の cDNA 断片を含むクローンは pBluescript-DCACO(OR)とした (図 3-2).

(5) 塩基配列の確認

ダイデオキシ法によるシーケンスを行い, クローニングされた cDNA 断片の塩基配列を確認した. 0.2 μ g のインサート DNA を含むプラスミドを鋳型に, 10 μ M のプライマー (付表 1; pp.120, 121) と PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit With AmpliTaq DNA Polymerase, FS (Perkin Elmer) を用い, サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer) を用いてサイクルシーケンス反応 [(96 $^{\circ}$ C 10 sec, 50 $^{\circ}$ C 5 sec, 60 $^{\circ}$ C 4 min) \times 25 サイクル] を行った. 各プライマーを用いたサイクルシーケンス反応産物 20 μ l についてエタノール沈澱を行った. 得られた沈澱を 4 μ l のローディングバッファー [25 mM EDTA (50 mg ml⁻¹ blue dextran を含む) と脱イオン化ホルムアミドを 1:5 で混合したもの] に溶解し, 100 $^{\circ}$ C, 10 分間加熱後, 氷中で急冷して泳動試料とした. 電気泳動とシーケンスデータの読み込みはオートシーケンサー (373A DNA Sequencer, Applied Biosystems) を用いた. 泳動用ゲルは, ポリアクリルアミドゲル [1 \times TBE (89 mM Tris, 89 mM ほう酸, 2 mM EDTA), 6%アクリルアミド, 50%尿素] を用いた. シーケンスデータは DNASIS ソフトウェア (日立ソフトウェアエンジニアリング) と GENETYX-SV/RC (ソフトウェア開発) を用いて解析した.

3.2.4. Ti プラスミドを用いたコンストラクトの構築

(1) バイナリーベクター

pIG121-Hm (Ohta et al. 1990) (図 3-7) は, その T-DNA 領域内にイントロンが挿入された β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子 (*uidA*) が挿入されており, その 5'上流に隣接するカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター, 3'下流に隣接する *A. tumefaciens* ノパリン合成酵素 (NOS) ターミネータ

ーによって制御されている。また、ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ (NPT) II 遺伝子とハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ (HPT) 遺伝子が挿入されており、これによってカナマイシンとハイグロマイシンによる形質転換体の選抜が可能である。pMLH2113-GUS (図 3-9) は、pBE2113-GUS (Mitsuhara et al. 1996) に二重エンハンサーの接続した CaMV35S プロモーターの制御下に置かれた HPT 遺伝子が接続されたものであり (Mochizuki et al. 1999), カナマイシンに加え、ハイグロマイシンによる形質転換体の選抜が可能である。T-DNA 領域に GUS 遺伝子が挿入されており、5' 上流に隣接する E12- Ω プロモーターと 3' 下流に隣接する NOS ターミネーターによって制御されている。E12- Ω プロモーターは、CaMV35S プロモーターのエンハンサー領域 (-419~-90 bp) が重複した E12 とタバコモザイクウイルス (TMV) の Ω 配列が、CaMV35S プロモーターのそれぞれ上流、下流に接続された構造をとっている (Mitsuhara et al. 1996)。

(2) pIG121-Hm への ACC 合成酵素遺伝子, ACC 酸化酵素遺伝子の挿入

pBlueScript-DCACS1 を *Spe*I で消化した。0.7%アガロースゲル/TAE バッファーを用いた電気泳動によって ACC 合成酵素遺伝子 cDNA 翻訳領域を含む断片 (約 1.5 kb) を分離し、アガロースゲルから抽出 (EASYTRAP ver.2, TaKaRa) して回収した。pIG121-Hm (約 15 kb) を *Xba*I, *Sac*I 処理し、GUS 遺伝子領域 (約 1.9 kb) を切除した。GUS 遺伝子領域の切除をアガロース電気泳動によって確認した後、常法に従ってフェノールクロロホルム処理、エタノール沈澱を行い、精製した。GUS 領域が切断された pIG121-Hm と、ACC 合成酵素 cDNA 断片を混合 (モル比, 1:30) した。混合した DNA 溶液 (約 0.5 pmol) を含む反応液 (0.5 mM dNTP mixture, 1 unit Klenow fragment, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 7 mM MgCl₂, 1 mM DTT) を調製し、30 °C で 20 分間保温した後、75 °C で 10 分間加熱して酵素を失活させ、平滑末端化した。反応液全量について、ライゲーションを行った (Ligation Kit ver.2, TaKaRa, 17 °C で 12 時間以上反応)。ライゲーション産物全量について、大腸菌菌株 XL-1 Blue のコンピテン

トセルを用いた形質転換を行った。形質転換体コロニーの選抜は、LB 寒天培地 (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ カナマイシン, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ハイグロマイシン, 1.5%寒天を含む) 上で行った。

pBlueScript-DCACO1 については, *XbaI*, *NotI* で消化して ACC 酸化酵素 cDNA 翻訳領域を含む断片 (約 1 kb) を分離し, アガロースゲルから抽出 (EASYTRAP ver.2, TaKaRa) して回収した。これを, *XbaI*, *SacI* 処理により GUS 遺伝子領域を切断した pIG121-Hm と混合し, 上記と同様に, 平滑末端化処理, ライゲーションを行った。ライゲーション反応産物について大腸菌菌株 XL-1 Blue のコンピテントセルを用いた形質転換を行い, LB 寒天培地 (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ カナマイシン, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ハイグロマイシン, 1.5%寒天を含む) 上での選抜によって, 形質転換コロニーを得た。

ACC 合成酵素遺伝子, ACC 酸化酵素遺伝子の挿入された Ti プラスミドを含む大腸菌クローンを選抜するために, コロニーからのダイレクト PCR を行った。コロニーの 1 部を採取し, 反応液 [各 cDNA の増幅に用いた上・下流プライマー (各 0.3 μM), dNTP mixture (0.2 mM), Taq DNA polymerase (Sawady technology) (0.7 units), MgCl_2 1.5 mM, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.8, 全量 25 μl] に加え, 本章 3.2.3 に記した各 cDNA 断片の増幅に用いた温度条件で反応を行った。反応液を 1.0%アガロースゲル/TAE バッファーによって分離し, DNA 断片 (ACC 合成酵素遺伝子, 約 1.5 kb ; ACC 酸化酵素遺伝子, 約 1 kb) の増幅を確認した。DNA 断片の増幅が確認されたコロニーを釣菌し, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ カナマイシンと 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ハイグロマイシンを添加した LB 液体培地に接種し, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 18 時間振盪培養した。得られた培養液について, プラスミド抽出 (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) を行うと同時に, グリセロールストック (グリセロール濃度 15%) として -80 $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

選抜されたクローンから抽出した各 Ti プラスミドに挿入された ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子の挿入の方向を PCR によって確認した。Ti プラスミド上で, 挿入された遺伝子の両端に隣接する CaMV35S プロモーター

の下流 30 bp の塩基配列 (+鎖) と NOS ターミネーター鎖の上流 30 bp の塩基配列 (-鎖) から設計したオリゴヌクレオチドプライマー (35S1 F, NOST1 R) (付表 1; pp.122) に対して, 各 cDNA 断片の増幅に用いた上流および下流プライマー (CARAS-SpeI F, CARAS-SpeI R, CARAO-XbaI F, CARAO-XbaI R) を組み合わせて PCR を行った [反応液: 1 μ l プラスミド溶液, 0.3 μ M プライマー, 0.2 mM dNTP mixture, 0.7 units Taq DNA polymerase (Sawady technology), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.8, 全量 25 μ l]. 反応液を 1.0% アガロースゲル/TAE バッファーによって分離し, 増幅された DNA 断片 (ACC 合成酵素遺伝子の場合, 約 1.5 kb; ACC 酸化酵素遺伝子の場合約 1 kb) の有無を確認した. 35S1 F と挿入遺伝子の下流プライマー (CARAS-SpeI R または CARAO-XbaI R) を組み合わせた PCR, または, 挿入遺伝子の上流プライマー (CARAS-SpeI F または CARAO-XbaI F) と NOST1 R を組み合わせた PCR で増幅が確認されたプラスミドには, 導入遺伝子が制御遺伝子に対してセンス方向に挿入されているものと判断した. またこれとは逆に, 35S1 F と挿入遺伝子の下流プライマー, または, 挿入遺伝子の上流プライマーと NOST1 R を組み合わせた PCR で増幅が確認されたプラスミドには導入遺伝子が制御遺伝子に対してアンチセンス方向に導入されているものと判断した. ACC 合成酵素遺伝子 cDNA 断片がセンス方向に挿入された Ti plasmid を pIG121-DCACS(OR+), アンチセンス方向に挿入されたものを pIG121-DCACS (OR-), ACC 酸化酵素遺伝子 cDNA 断片がセンス方向に挿入されたものを pIG121-DCACO(OR+), アンチセンス方向に挿入されたものを pIG121-DCACO(OR-) と名づけた.

(3) pMLH2113-GUS への ACC 酸化酵素遺伝子 (センス方向) の挿入

pBlueScript-DCACO1 を *Sac*I, *Bam*HI 処理した. 0.7%アガロースゲル/TAE バッファーを用いた電気泳動により, ACC 酸化酵素遺伝子 cDNA 断片 (約 1 kb) を分離し, アガロースゲルから抽出して回収した. pMLH2113-GUS (約 15 kb)

を *Bam*HI, *Sac*I 処理し, GUS 遺伝子領域 (約 1.9 kb) をアガロースゲル電気泳動により分離し, ベクター部分 (約 13 kb) をアガロースゲルから抽出して回収した. 回収した pMLH2113 ベクター部分は ACC 酸化酵素遺伝子 cDNA 断片と混合した (モル比, 1 : 10). 混合した DNA 溶液 (約 0.5 pmol) はライゲーションさせた (Ligation Kit ver.2, TaKaRa ; 17°C で 12 時間以上反応). ライゲーション産物は, 大腸菌菌株 XL-1 Blue のコンピテントセルを用いて形質転換を行った. 形質転換体コロニーの選抜は, LB 寒天培地 (50 µg ml⁻¹カナマイシン, 100 µg ml⁻¹ハイグロマイシン, 1.5 %寒天を含む) 上で行った.

出現したコロニーは, ACC 酸化酵素 cDNA 翻訳領域の増幅に用いたプライマーを用いて, 上記と同様の方法でコロニーからのダイレクト PCR を行った. 約 1 kb の DNA 断片の増幅が確認されたコロニーを選び, 50 µg ml⁻¹カナマイシンと 100 µg ml⁻¹ハイグロマイシンを添加した LB 液体培地に接種し, 37 °C で 18 時間振盪培養した. 得られた培養液から, プラスミドの抽出 (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) を行うと同時に, グリセロールストック (グリセロール濃度 15%) として -80 °C で凍結保存した.

抽出したプラスミドは, 上記と同様の方法でベクター側のプライマー (35S1 F, NOST1 R) と挿入した ACC 酸化酵素 cDNA 断片の増幅に用いたプライマー (CARAO-XbaI F, CARAO-XbaI R) を組み合わせて PCR を行い, ACC 酸化酵素遺伝子 cDNA 断片のセンス方向の挿入を確認した. ACC 酸化酵素遺伝子 cDNA 断片がセンス方向に導入されたことが確認された Ti plasmid を, pMLH2113-DCACO(OR+)と名づけた.

3.2.5. 構築した Ti プラスミドのアグロバクテリウムへの導入

構築した Ti プラスミドは, freeze-thaw 法 (An et al. 1988) に従って, アグロバクテリウムに導入した. アグロバクテリウム EHA101 系統 (Hood et al. 1984) を, カナマイシン添加 (50 µg ml⁻¹) LB 液体培地 3 ml に接種し, 28 °C で 24 時間振盪培養した. この培養液 1 ml を, 100 ml 三角フラスコに入れたカナマ

イシン添加 ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) LB 液体培地 25 ml に接種し, 28°C で振盪培養した. 2 時間毎に培地の吸光度 (A_{600}) を測定した. A_{600} 値が約 1 に達した培養液を, 50 ml 容ポリプロピレン製チューブ (サンプルテック) に分注し, 遠心分離 ($1,400 \times g$, 5 分間, 4°C) して集菌した. 培地を取り除いて氷水中に置き, 滅菌, 冷却した 20 mM CaCl_2 溶液を $500 \mu\text{l}$ 加えて再懸濁した. $100 \mu\text{l}$ の再懸濁液を 1.5 ml 容マイクロ遠心チューブに分注し, 氷水中に置いた. これに, Ti プラスミド溶液 ($1 \mu\text{g}$) を加えて混合した後, チューブに液体窒素をかけて菌液を凍結させた. 15 分後, チューブを 37°C で 5 分間温浴させ菌液を解凍し, 1 ml の LB 液体培地を加え, 28°C で 2 時間, 穏やかに振盪して培養した. その後, 遠心分離 ($3,000 \times g$, 5 分間, 室温) して集菌した. 培地を取り除き, $100 \mu\text{l}$ の LB 液体培地を加えて再懸濁した. $50 \mu\text{l}$ の再懸濁液を, LB 寒天培地 ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$ アンピシリン, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ハイグロマイシン, 1.5% 寒天を含む) 上に広げ, 28°C で 2~3 日間培養した. 出現したコロニーは, ACC 合成酵素遺伝子, あるいは ACC 酸化酵素遺伝子 cDNA 断片の増幅に用いた上・下流のプライマーを用いて, 本章 3.2.4. に記した方法に従ってコロニーからダイレクト PCR を行い, 目的遺伝子が挿入された Ti プラスミドの導入を確認した. Ti プラスミドの導入が確認されたコロニーを釣菌し, $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ アンピシリン, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ハイグロマイシン添加 LB 液体培地に接種し, 28°C で 18 時間振盪培養した. 培養液はグリセロールストック (グリセロール濃度 15%) として -80°C で凍結保存した.

3.2.6. カーネーション形質転換操作, 形質転換個体の再分化と育成

アグロバクテリウムを用いたカーネーションの形質転換は Firoozabady et al. (1995) の方法に若干の変更を加えて行った. アグロバクテリウム菌液, カーネーションの培養シュートの取り扱いクリーンベンチ内で行い, 器具類はすべて滅菌したものを用いた.

(1) アグロバクテリウムのカーネーション培養シュート片への感染

Ti プラスミドを導入したアグロバクテリウムのコロニーを、カナマイシン 50 mg l^{-1} 、ハイグロマイシン 100 mg l^{-1} を添加した LB 液体培地 3 ml に接種し、 28°C で 24 時間振盪培養を行った。この培養液 $300 \mu\text{l}$ を、滅菌した 100 ml 容ひだ付き三角フラスコに入れた LB 液体培地（カナマイシン 50 mg l^{-1} 、ハイグロマイシン 100 mg l^{-1} 添加） 30 ml に接種し、 28°C で振盪培養した。2 時間毎に培養液の吸光度 (A_{660}) を測定した。 A_{660} 値が約 1 に達した培養液を、 50 ml 容ポリプロピレン製チューブ（サンプルテック）に移し、遠心分離 ($1,400 \times g$, 15 分間, 室温) して集菌した。培地を取り除き, Minimal A 培地 ($10.5 \text{ g l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $4.5 \text{ g l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $1 \text{ g l}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g l^{-1} クエン酸ナトリウム, $0.2 \text{ g l}^{-1} \text{ MgSO}_4$, 2 g l^{-1} グルコース) (Lech and Brent 1992) 25 ml に再懸濁し, 感染用の菌液とした。1 年以上継代培養を継続したカーネーション品種 Nora のシュート塊 (葉長約 10 mm に成長した新鮮なもの) を葉の基部を残した状態で分解し, 葉数 2~3 枚のシュート片を得て, 感染用の外植片として用いた。外植片を, ピンセットを用いて調製した感染用菌液に浸し, 室温に置いた。15 分後, 外植片を回収して滅菌したペーパータオル上に広げ, 余分な菌液を取り除いた。ペトリ皿 (直径 $90 \text{ mm} \times$ 深さ 20 mm , 岩城硝子) に調製した $100 \mu\text{M}$ アセトシリゴン添加 BD 培地 (付表 2; pp.123) に, 外植片を置床した。蓋をサージカルテープ (3M Health Care) で固定し, グロースチャンバー内で暗黒下, 24°C で 1 週間置いた。

(2) アグロバクテリウムを感染した外植片からのシュートの再分化

ペトリ皿に, 10 mg l^{-1} ハイグロマイシン, 500 mg l^{-1} カルベニシリンを添加した BD 培地 (付表 2; pp.123) を調製し, 共存培養後の外植片を置床し, グロースチャンバー内 (16 時間日長; 光量, $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; 温度, $24 \pm 1^\circ \text{C}$) で 3 週間インキュベートした (除菌培養)。

ペトリ皿に, 20 mg l^{-1} ハイグロマイシン, 500 mg l^{-1} カルベニシリンを添加し

た IT 培地 (付表 2 ; pp.123) を調製した。これに, 除菌培養後の外植片のうち, ハイグロマイシン存在下で生育し, 基部に葉原基をつけた外植片を選んで置床し, グロースチャンバー内で生育させた。その後, 外植片について, 3 週間毎の継代培養を 2 回行った。外植片からは, 再分化培地移植約 1 ヶ月後に, ガラス状化したシュート塊が形成された。

(3) 再分化したシュートからの植物体の再生

再分化したシュート塊を, 茎の伸長を誘導するために, ペトリ皿に調製した MS 培地 (Murashige and Skoog 1962 ; 20 mg l⁻¹ ハイグロマイシン, 10 g l⁻¹ フェイタアガーを含む) (付表 2 ; pp.123) に移植し, グロースチャンバー内で生育させた。シュート塊は, 3 週間毎に同じ成分の培地に継代した。茎の伸長が開始したシュート塊については, ポット (アグリポット, 直径 70 mm × 高さ 121 mm, 岩城硝子) に調製した培地上で生育させた。茎が伸長したシュートを, ポットに調製した MS 培地 (20 mg l⁻¹ ハイグロマイシン, 2.5 g l⁻¹ ゲルライトを含む) (付表 2 ; pp.123) に移植し, 発根を誘導した。

発根し, ガラス状化が見られなくなった植物体を取り出し, 根についた培地を洗い落とし, ビニール製の鉢に入れたバーミキュライトに移植した。湿度を維持するために, プラスチック製の袋を被せ, P1 閉鎖系温室内 (18 時間日長 ; 光量, 200~500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 昼温度, 23 °C ; 夜温度, 17 °C) に置き, 寒冷紗による遮光条件下 (光量 40~60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で 2 ヶ月間生育させた。保湿用の袋に, 徐々に穴を開け, 植物体を温室環境に馴化させた。馴化した植物体は, 園芸用培養土 (クレハ) に移植し, 寒冷紗を取り除いた状態で生育させた。

3.2.7. カーネーションゲノム DNA の抽出

カーネーション葉からのゲノム DNA の抽出は, CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) 法 (Murray and Thompson 1980) に従って行った。約 3 g の

若い葉をカミソリで切り刻み、液体窒素で冷却しながら磨砕して粉末にし、ポリプロピレン製 50 ml 容チューブに加えた。これに 2×CTBA 溶液 (2% CTAB, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) 6 ml を、さらに 1×CTBA 溶液 3 ml を加え、70 °C で 5 分間混合した。さらに、55 °C で 40 分間、往復振盪 (40 strokes min⁻¹) した後、等量のクロロホルム-イソアミルアルコール (24 : 1) を加え、室温で 20 分間穏やかに振盪した。その後、遠心分離 (500 ×g, 30 分間, 室温) を行い、上層を新しい 50 ml チューブに移した。同様の操作を上層の濁りがなくなるまで繰り返した。得られた上層に、等量の CTAB 沈澱バッファー (1% CTAB, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) を重層し、穏やかに混合し、さらに 5ml の CTAB 沈澱緩衝液を重層し、混合した。この操作によって現れた糸状の CTAB-DNA 複合体を、先端を曲げたパスツールピペットを用いて回収した。パスツールピペットのまま、15 ml ポリプロピレン製チューブに入った NaCl-TE (1 M NaCl, 1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 2 ml に浸し、55 °C で回収した複合体を溶解した。上清については、遠心分離 (1,400 ×g, 5 分間, 室温) を行い、回収した沈澱に 1 ml の NaCl-TE を加え、55 °C で溶解した。溶解液を混合し、等量のイソプロパノールを重層し、DNA を析出させた。上清を取り除いた後、析出した DNA を 70%エタノール 5 ml、さらに、エタノール 5 ml で洗浄した。洗浄後の DNA を室温で風乾し、500 μl TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA,) に溶解した。その後、RNase A 処理 (60 μg, 37 °C, 30 分) し、溶液に含まれる RNA を分解し、ゲノム DNA 溶液とした。

3.2.8. サザン解析

(1) ゲノム DNA のメンブレンへの転写

ゲノム DNA 10 μg を *Hind*III で消化した (至適バッファー条件で、300 units の酵素と 37 °C で、12 時間以上反応させた)。消化したゲノム DNA 全量を、0.8%アガロースゲル/TAE バッファーを用いた電気泳動によって分離した。泳動後のゲルをエチジウムブロマイドによって染色し、UV トランスイルミネ

ーターを用いて観察し、ゲノム DNA が完全に消化されていることを確認した。アガロースゲル中に分離された DNA に、加水分解処理（ゲルを 0.25 M HCl に室温で 10 分間浸漬）と変性処理（ゲルを 1.5 M NaOH, 0.5 M NaCl 溶液に室温で 15 分間浸漬）を行った後、バキュームトランスファー（Vacugene XL, Amersham Pharmacia Biotech AB)によって、ナイロンメンブレン（Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech AB)に転写した（転写条件：転写溶液, 1 M NaOH；吸引圧力, 55 hPa；転写時間, 1.5 時間）。転写後のメンブレンを 2×SSC (33.3 mM NaCl, 33.3 mM クエン酸ナトリウム, pH 7.0) 中で 1 分間濯ぎ、ペーパータオルで水分を取り除いた後、アルミホイルに包み、80 °C で 2 時間処理し、DNA を固定した。

(2) プローブの標識とハイブリダイゼーション

プローブの標識とハイブリダイゼーションは、AlkPhos Direct labeling reagents (Amersham Pharmacia Biotech AB)を用いて行った。

pBluescript-DCACO (OR) から回収した ACC 酸化酵素 cDNA 溶液 10 µl (100 ng) を 1.5 ml 容マイクロ遠心チューブにとり、100 °C で 5 分間加熱後、急冷して変性させた。これに、添付されている反応バッファー 10 µl, labeling reagent mix 2 µl, crosslinker solution 10 µl を加えて混合し、37 °C で 30 分間インキュベートして反応させ、DNA を標識してプローブ溶液とした。

DNA を固定したメンブレン（面積 120 cm²）をハイブリダイゼーションバッグに入れ、添付のハイブリダイゼーションバッファー（0.5 M NaCl, 4%ブロッキング試薬を含む）30 ml を加え、55 °C で穏やかに振盪しながら 15 分間以上インキュベートした。その後、調製したプローブ溶液を、最終濃度が 10 ng ml⁻¹になるように添加して混合し、55 °C で穏やかに振盪しながら 16 時間以上インキュベートした。ハイブリダイゼーションを行ったメンブレンを、55 °C に加熱した 1 次洗浄バッファー（2 M 尿素, 1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.2%ブロッキング試薬, 50 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0）中で、10

分間、55 °Cで穏やかに振盪した。1次洗浄は、バッファーを取り替えて2回繰り返した。1次洗浄したメンブレンを、2次洗浄バッファー（50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, pH 10.0）中で、5分間、室温で穏やかに振盪した。2次洗浄はバッファーを取り替えて2回繰り返した。2次洗浄液を取り除いた後、メンブレンをサランラップ上に載せ、検出試薬（CDP-Star detection reagent, Amersham Pharmacia Biotech AB）5 mlを滴下し、5分間放置した。余分な検出試薬を取り除いたのち、サランラップ（旭化成）でメンブレンを包んだ。メンブレンのハイブリダイゼーションシグナルは、X線フィルム（RX-U, 富士写真フィルム）に5時間露光して検出した。

3.3. 結果

3.3.1. ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子の単離

エチレン低生産性形質転換体を作成するための導入遺伝子を得るために、カーネーション品種 Nora から、ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子の各 cDNA の翻訳領域の単離を行った (図 3-1, 図 3-2)。

カーネーション品種 Nora の老化花卉由来全 RNA を用いた RT-PCR を行った。DC-ACS1 cDNA (CARACC3) の翻訳領域の両末端 20 bp の塩基配列から作成したオリゴヌクレオチドプライマー (CARAS-SpeI F, CARAS-SpeI R) を用いた RT-PCR 反応産物には、約 1.5 kb の DNA 断片の増幅が確認された。また、pSR120 の両末端 20 bp の塩基配列から作成したオリゴヌクレオチドプライマー (CARAO-XbaI F, CARAO-XbaI R) を用いた RT-PCR 反応産物には、約 1 kb の DNA 断片の増幅が確認された。DC-ACS1 cDNA (CARACC3) の翻訳領域は 1554 bp (Park et al. 1992)、また、cDNA (pSR120) の翻訳領域は 966 bp (Wang and Woodson 1991) であることから、増幅された cDNA 断片は、それぞれ DC-ACS1 と DC-ACO1 の各 cDNA の翻訳領域をコードしているものと予想された。

これらの cDNA 断片をサブクローニングし、塩基配列を決定した。単離された約 1.5 kb の cDNA 断片は、1554 bp の翻訳領域を含んでいた。これは、DC-ACS1 cDNA (CARACC3) の翻訳領域のサイズと同じであり、塩基配列レベルのホモロジーは 99.6% であった (図 3-1)。単離された cDNA は、DC-ACS1 cDNA の翻訳領域と 6 塩基の違いが認められた [845 G→A, 927 A→C, 979 G→C, 1270 A→G, 1271 A→G, 1629 T→G (番号は、DC-ACS1 cDNA の塩基配列上の番号を示す)] (図 3-3)。これらの塩基の相違は、推定アミノ酸配列では、4 個所のアミノ酸の違いに相当した [238 Asp→Asn, 265 Asn→Thr, 380 Arg→Gly, 499 Ile→Ser (番号は、DC-ACS1 cDNA の推定アミノ酸配列番号を示す)] (図 3-4)。得られたクローンは pBlueScript-DCACO(OR) と名づけた。

単離された 1 kb の cDNA 断片は 966bp の翻訳領域を含んでいた。これは、

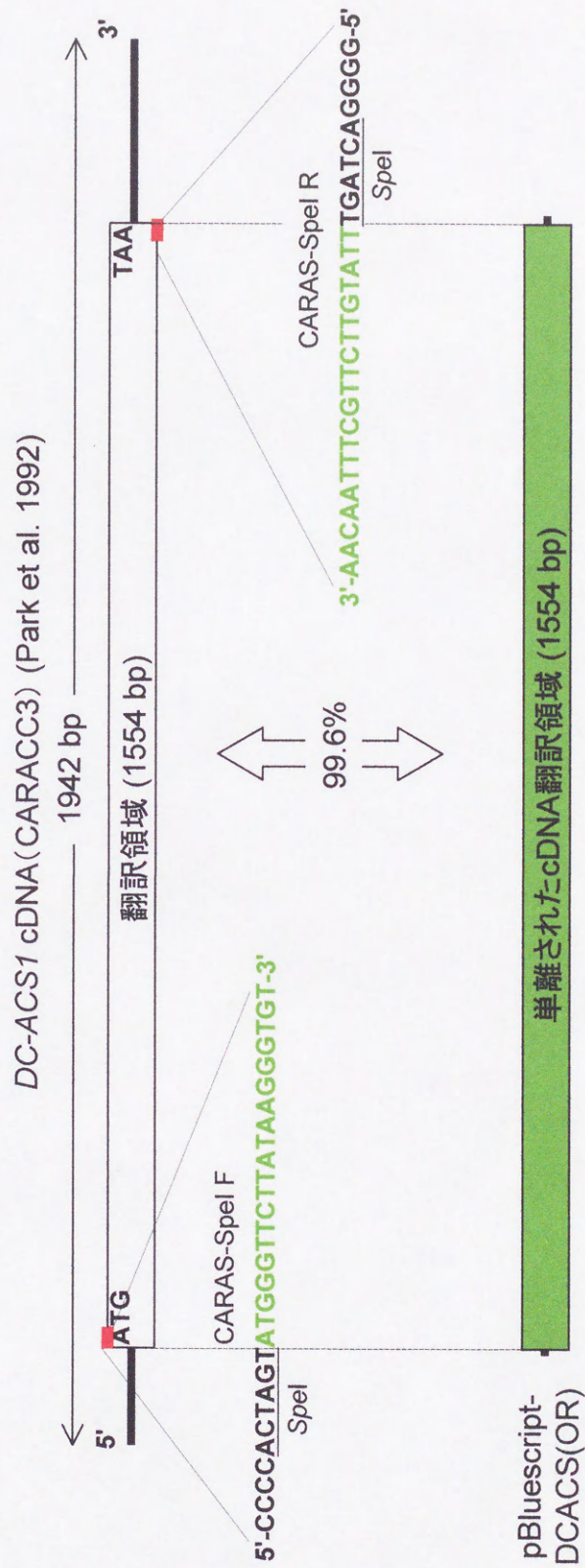


図 3-1. 単離されたACC合成酵素遺伝子cDNA翻訳領域

DC-ACS1cDNA (CARACC3, 全長 1942 bp) (Park et al. 1992) の翻訳領域 (1554 bp) の両端20 bpの塩基配列から設計したオリゴヌクレオチドプライマー (CARAS-SpeI F, CARAS-SpeI R) を用いて、品種Nora老花弁由来全RNAを鋳型としたRT-PCRを行った。

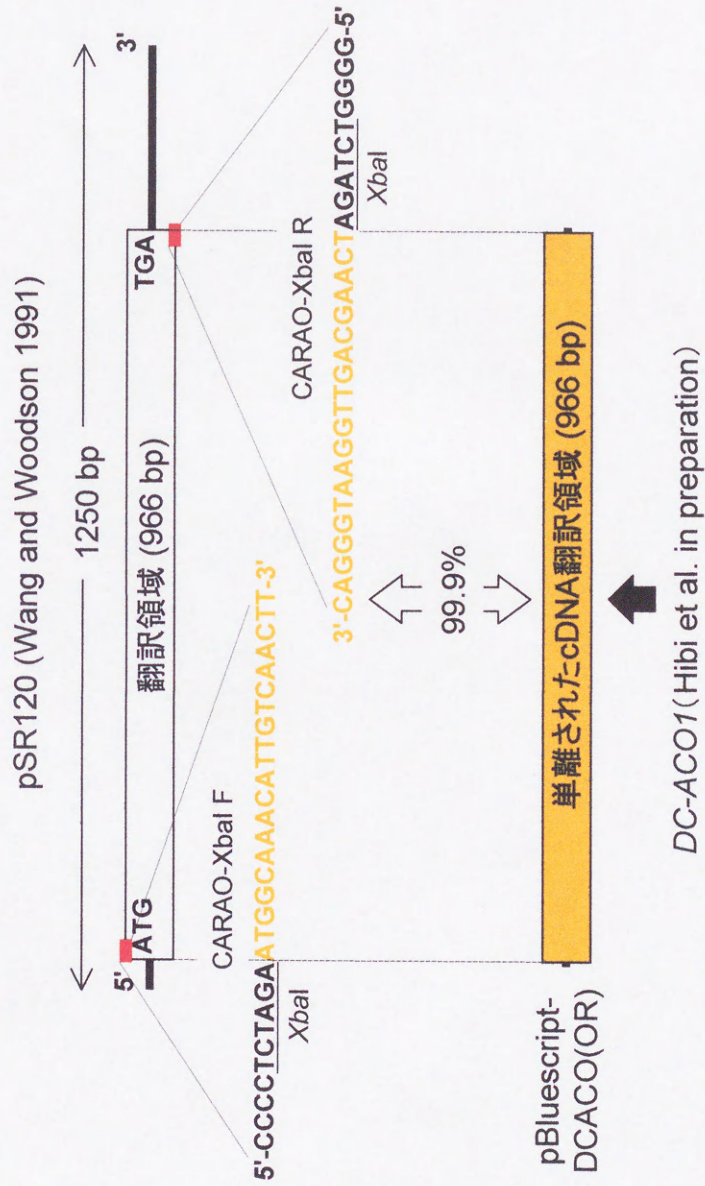


図 3-2. 単離されたACC酸化酵素遺伝子cDNA翻訳領域

pSR120 (全長 1250bp) (Wang and Woodson 1991) の翻訳領域 (966 bp) の両端20 bpの塩基配列から設計したオリゴヌクレオチドプライマー (CARAO-XbaI F, CARAO-XbaI R) を用いて、品種Nora老化花弁由来全RNAを鋳型としたRT-PCRを行った。

134 : ATGGGTTCTT ATAAGGGTGT TTACGACCGT GAAATTCTTT CAAAAATCGC

 1 : ATGGGTTCTT ATAAGGGTGT TTACGACCGT GAAATTCTTT CAAAAATCGC

CARAS-Spel F

184 : TACGAACGAT GGCCATGGTG AGAATTTGGA GTACTTTGAT GGGTGGAAAG

 51 : TACGAACGAT GGCCATGGTG AGAATTTGGA GTACTTTGAT GGGTGGAAAG

234 : CTTATGATAG AGATCCTTAT CATTCTACCA AGAATTCTAA TGGCGTTATT

 101 : CTTATGATAG AGATCCTTAT CATTCTACCA AGAATTCTAA TGGCGTTATT

284 : CAAATGGGTC TCGCTGAAAA TCAGCTTTGC TTCGATTTAG TTACGGAGTG

 151 : CAAATGGGTC TCGCTGAAAA TCAGCTTTGC TTCGATTTAG TTACGGAGTG

334 : GCTACTCAAA AACCCACAAG CCTCAATTTG TACCAACGAA GGTGTAAATA

 201 : GCTACTCAAA AACCCACAAG CCTCAATTTG TACCAACGAA GGTGTAAATA

384 : AGTTCATGGA TATTGCCATT TTTCAGGATT ATCATGGTTT GCCCGAGTTT

 251 : AGTTCATGGA TATTGCCATT TTTCAGGATT ATCATGGTTT GCCCGAGTTT

434 : AGAAGTGCTG TGGCAAAATT TATGGGGAAG GCAAGAGATG AGAAAGTCAT

 301 : AGAAGTGCTG TGGCAAAATT TATGGGGAAG GCAAGAGATG AGAAAGTCAT

484 : ATTCAATCCA GATAGAATTG TAATGAGTGG TGGAGCCAGT GCAAGTGAAA

 351 : ATTCAATCCA GATAGAATTG TAATGAGTGG TGGAGCCAGT GCAAGTGAAA

534 : CTCTTTTGTT TTGCTTGGCC AACCCCGGTG ACGCCTTTTT AATTCGCTCT

 401 : CTCTTTTGTT TTGCTTGGCC AACCCCGGTG ACGCCTTTTT AATTCGCTCT

図 3-3 (全4ページ). CARACC3 (Park et al. 1992) 翻訳領域 (134 bp~1687 bp) (上段) と pBluescript-DCACS(OR) (下段) の塩基配列 (いずれも 1554 bp) の比較.

相違の認められた塩基を赤字で示した. 下線は cDNA の増幅に用いたプライマー領域に相当する配列. ホモロジーは 99.6%.

図 3-3 (続き).

```

584 : CCTTATTATC CCGCATTAA CCGCGATTTA CGGTGGAGAA CTGGAGTAAA
*****
451 : CCTTATTATC CCGCATTAA CCGCGATTTA CGGTGGAGAA CTGGAGTAAA

634 : TTTAATCCCA TTTACTTGCT CGAGCTCGAA TAATTTCAAA ATCACTAAGG
*****
501 : TTTAATCCCA TTTACTTGCT CGAGCTCGAA TAATTTCAAA ATCACTAAGG

684 : AAGCCTTACA ATCGGCATAT GAAGACGCC TAAAAAGAA CATCAAAGTT
*****
551 : AAGCCTTACA ATCGGCATAT GAAGACGCC TAAAAAGAA CATCAAAGTT

734 : AAGGGTATTA TCGTCACAAA CCCGTCAAAT CCCTTAGGAA CGGTCCTAGA
*****
601 : AAGGGTATTA TCGTCACAAA CCCGTCAAAT CCCTTAGGAA CGGTCCTAGA

784 : CAAGGACACC CTAAAAATGT TATTAACATT CGTAAATGCG AAAAATATAC
*****
651 : CAAGGACACC CTAAAAATGT TATTAACATT CGTAAATGCG AAAAATATAC

834 : ACCTTGTTG TGACGAGATA TATGCAACCA CAGTATTTAA TTCGCCGAGC
*****
701 : ACCTTGTTG TACGAGATA TATGCAACCA CAGTATTTAA TTCGCCGAGC

884 : TTTATAAGTG TTGCTGAGGT TATAAAGGAC ATGCCTCATG TAAATCAAGA
*****
751 : TTTATAAGTG TTGCTGAGGT TATAAAGGAC ATGCCTCATG TAACTCAAGA

934 : CCTTGTTTCAT ATTTTATATA GTTTGTCCAA GGACATGGGC ATGCCGGGCT
*****
801 : CCTTGTTTCAT ATTTTATATA GTTTGTCCAA GGACATGGGC ATGCCGGGCT

984 : TTAGGGTTGG GATCATTTAC TCTTATAATG ACCGTGTCGT CTCAACTGCT
*****
851 : TTAGGGTTGG GATCATTTAC TCTTATAATG ACCGTGTCGT CTCAACTGCT

```

図 3-3(続き).

```

1034 : CGTCGAATGT CGAGTTTGG ACTTGTTTCT TCTCAAAC TC AGTTTATGAT
*****
901 : CGTCGAATGT CGAGTTTGG ACTTGTTTCT TCTCAAAC TC AGTTTATGAT

1084 : CGCGGCATTG CTCTCAGATG ATGATTTTGT TAGACGATTC TTGGTTGAGA
*****
951 : CGCGGCATTG CTCTCAGATG ATGATTTTGT TAGACGATTC TTGGTTGAGA

1134 : GTAGAGACAG ACTCTTTCGA AGGCACCAGC ATTTCAACA GCGAGCTGGCT
*****
1001 : GTAGAGACAG ACTCTTTCGA AGGCACCAGC ATTTCAACA GCGAGCTGGCT

1184 : AAGATAGGAA TAGGATGCCT CCAAGGAAAC GCGGCATTGT TTGTTTGGAT
*****
1051 : AAGATAGGAA TAGGATGCCT CCAAGGAAAC GCGGCATTGT TTGTTTGGAT

1234 : GGATTTGAGG CATCTATTAG ACGAAGCAAC GTTTGAAGA GAGTTAAAGT
***** **
1101 : GGATTTGAGG CATCTATTAG ACGAAGCAAC GTTTGAAGGA GAGTTAAAGT

1284 : TATGGAGAGT GATCATCAAT GAAGTGAAAA TCAATGTGTC ACCGGGTTCG
*****
1151 : TATGGAGAGT GATCATCAAT GAAGTGAAAA TCAATGTGTC ACCGGGTTCG

1334 : TCCTTCCTGT GCTCTGAGCC AGGGTGGTTT AGGGTTTGCT TTGCCAACAT
*****
1201 : TCCTTCCTGT GCTCTGAGCC AGGGTGGTTT AGGGTTTGCT TTGCCAACAT

1384 : GGACAATGCG ACCTTAGACG TTGCACTCAA TCGAATTAGG TCTTTTGTA
*****
1251 : GGACAATGCG ACCTTAGACG TTGCACTCAA TCGAATTAGG TCTTTTGTA

1434 : CCCGTGGAAG GGTGGACAAT TCAACAATGA CAACAACATC AGCAAGAGCA
*****
1301 : CCCGTGGAAG GGTGGACAAT TCAACAATGA CAACAACATC AGCAAGAGCA

```

図 3-3(続き).

```
1484 : GCAGCAACAA CAACAACAAC AACACAACA ACAACAACAA CAACAACAAC
*****
1351 : GCAGCAACAA CAACAACAAC AACACAACA ACAACAACAA CAACAACAAC

1534 : AACACGACA ATTAAGAAGA AACGAGGGCA AATGGAGCTT CGACTTAGCT
*****
1401 : AACACGACA ATTAAGAAGA AACGAGGGCA AATGGAGCTT CGACTTAGCT

1584 : TCAACAATCG AAGATTCGAA GACGGTTTAA TGTCACCTCA TAGCATCCTA
*****
1451 : TCAACAATCG AAGATTCGAA GACGGTTTAA TGTCACCTCA TAGCAGCCTA

1634 : TTATCTCCTC ACTCTCCTAT GCCTCAATCA CCCCTTGTTA AAGCAAGAAC
*****
1501 : TTATCTCCTC ACTCTCCTAT GCCTCAATCA CCCCTTGTTA AAGCAAGAAC

CARAS-Spel R

1684 : ATAA
****
1551 : ATAA
```

(終り)

```

1 : MGSYKGVYDR EILSKIATND GHGENLEYFD GWKAYDRDPY HSTKNSNGVI
*****
1 : MGSYKGVYDR EILSKIATND GHGENLEYFD GWKAYDRDPY HSTKNSNGVI
CARAS-Spel F
51 : QMGLAENQLC FDLVTEWLLK NPQASICTNE GVNKFMIDAI FQDYHGLPEF
*****
51 : QMGLAENQLC FDLVTEWLLK NPQASICTNE GVNKFMIDAI FQDYHGLPEF

101 : RSAVAKFMGK ARDEKVI FNP DRIVMSGGAS ASETLLFCLA NPGDAFLIPS
*****
101 : RSAVAKFMGK ARDEKVI FNP DRIVMSGGAS ASETLLFCLA NPGDAFLIPS

151 : PYPYAFNRDL RWRTGVNLIP FTCSSSNFK ITKEALQSAY EDALKKNIKV
*****
151 : PYPYAFNRDL RWRTGVNLIP FTCSSSNFK ITKEALQSAY EDALKKNIKV

201 : KGIIVTNPSN PLGTVLDKDT LKMLLTFVNA KNIHLVCDEI YATTVFNPS
*****
201 : KGIIVTNPSN PLGTVLDKDT LKMLLTFVNA KNIHLVCNEI YATTVFNPS

251 : FISVAEVIKD MPHVNQDLVH ILYSLSKDMG MPGFRVGIY SYNDRVVSTA
*****
251 : FISVAEVIKD MPHVTQDLVH ILYSLSKDMG MPGFRVGIY SYNDRVVSTA

301 : RRMSSFGLVS SQTQFMIAAL LSDDDFVRRF LVESRDRLFR RHQHFTSELA
*****
301 : RRMSSFGLVS SQTQFMIAAL LSDDDFVRRF LVESRDRLFR RHQHFTSELA

351 : KIGIGCLQGN AALFVWMDLR HLLDEATVER ELKLWRVIIN EVKINVSPGS
*****
351 : KIGIGCLQGN AALFVWMDLR HLLDEATVEG ELKLWRVIIN EVKINVSPGS

401 : SFLCSEPGWF RVCFANMDNA TLDVALNRIR SFVTRGRVDN STMTTTSARA
*****
401 : SFLCSEPGWF RVCFANMDNA TLDVALNRIR SFVTRGRVDN STMTTTSARA

```

図 3-4(全2ページ). CARACC3 (Park et al. 1992) (上段)とpBluescript-DCACS(OR) (下段)の推定アミノ酸配列(いずれも517 aa)の比較.

相違の認められたアミノ酸を赤字で示した. 下線はcDNAの増幅に用いたプライマー領域に相当する配列. ホモロジーは99.2%.

図 3-4(続き).

```
451 : AATTTTTTTT TTTTTTTTTT IKKKRGQ MEL RLSFNNRRFE DGLMSPHSIL
      *****
451 : AATTTTTTTT TTTTTTTTTT IKKKRGQ MEL RLSFNNRRFE DGLMSPHSSL
```

```
501 : LSPHSPMPQS PLVKART
      *****
```

```
501 : LSPHSPMPQS PLVKART
      CARAS-SpeI R
```

(終り)

```

40 : ATGGCAAACA TTGTCAACTT CCCTATCATT GACATGGAGA AGCTCAATAA
*****
1 : ATGGCAAACA TTGTCAACTT CCCTATCATT GACATGGAGA AGCTCAATAA
CARAO-Xba 1F

90 : TTATAATGGT GTTGAGAGGA GTCTTGTTTT GGACCAAATT AAGGATGCTT
*****
51 : TTATAATGGT GTTGAGAGGA GTCTTGTTTT GGACCAAATT AAGGATGCTT

140 : GTCACAACTG GGGATTCTTC CAGGTGGTGA ACCATAGTTT GTCACATGAA
*****
101 : GTCACAACTG GGGATTCTTC CAGGTGGTGA ACCATAGTTT GTCACATGAA

190 : CTGATGGACA AAGTGGAGAG GATGACAAAA GAGCATTACA AGAAATTCAG
*****
151 : CTGATGGACA AAGTGGAGAG GATGACAAAA GAGCATTACA AGAAATTCAG

240 : GGAGCAAAAAG TTCAAAGACA TGGTTCAGAC CAAAGGTTTA GTGTCTGCTG
*****
201 : GGAGCAAAAAG TTCAAAGACA TGGTTCAGAC CAAAGGTTTA GTGTCTGCTG

290 : AGTCTCAAGT CAATGACATT GATTGGGAGA GCACCTTCTA CCTTCGTCAT
*****
251 : AGTCTCAAGT CAATGACATT GATTGGGAGA GCACCTTCTA CCTTCGTCAT

340 : CGTCCCACCT CCAACATCTC CGAGGTCCCT GATCTCGACG ACCAATACAG
*****
301 : CGTCCCACCT CCAACATCTC CGAGGTCCCT GATCTCGACG ACCAATACAG

390 : GAAGTTGATG AAGGAGTTTG CAGCCCAGAT TGAGAGGTTA TCCGAGCAAC
*****
351 : GAAGTTGATG AAGGAGTTTG CAGCCCAGAT TGAGAGGTTA TCCGAGCAAC

440 : TGTGGACTT GTTATGTGAG AACCTTGCC TTGAGAAAGC GTACCTTAAG
*****
401 : TGTGGACTT GTTATGTGAG AACCTTGCC TTGAGAAAGG GTACCTTAAG

```

図 3-5(全3ページ). pSR120(Wang and Woodson 1991) 翻訳領域(40 bp ~1005 bp) (上段)とpBluescript-DCACO(OR)(下段) (いずれも966 bp) 塩基配列の比較.

相違の認められた塩基を赤字で示した. 下線はcDNAの増幅に用いたプライマー領域に相当する配列. ホモロジーは99.9%.

図 3-5(続き).

```

490 : AATGCCTTCT ATGGTGCCAA TGGCCCCACT TTTGGTACCA AGGTCAGCAA
      *****
451 : AATGCCTTCT ATGGTGCCAA TGGCCCCACT TTTGGTACCA AGGTCAGCAA

540 : CTACCCGCCT TGCCCCAAAC CCGACCTTAT CAAAGGACTT AGGGCCCACA
      *****
501 : CTACCCGCCT TGCCCCAAAC CCGACCTTAT CAAAGGACTT AGGGCCCACA

590 : CCGACGCTGG TGGCATCATT CTCTTGTTCC AGGACGACAA GGTCAGCGGC
      *****
551 : CCGACGCTGG TGGCATCATT CTCTTGTTCC AGGACGACAA GGTCAGCGGC

640 : CTCCAGCTCC TCAAGGATGG TCATTGGGTT GATGTTCCCTC CCATGAAACA
      *****
601 : CTCCAGCTCC TCAAGGATGG TCATTGGGTT GATGTTCCCTC CCATGAAACA

690 : CTCCATTGTT GTTAACTTGG GGGACCAACT TGAGGTTATT ACAAATGGCA
      *****
651 : CTCCATTGTT GTTAACTTGG GGGACCAACT TGAGGTTATT ACAAATGGCA

740 : AGTACAAGAG TGTGATGCAC CGCGTGATAG CGCAGACAGA TGGTAACAGG
      *****
701 : AGTACAAGAG TGTGATGCAC CGCGTGATAG CGCAGACAGA TGGTAACAGG

790 : ATGTCGATAG CATCATTCTA CAACCCGGGA AGTGATGCCG TGATTTACCC
      *****
751 : ATGTCGATAG CATCATTCTA CAACCCGGGA AGTGATGCCG TGATTTACCC

840 : GGCGCCAACA TTGGTGAAAA AAGAAGAGGA GAAATGCAGA GCATACCCAA
      *****
801 : GGCGCCAACA TTGGTGAAAA AAGAAGAGGA GAAATGCAGA GCATACCCAA

890 : AATTTGTGTT CGAGGATTAC ATGAATCTCT ACTTAAAGCT CAAGTTCCAA
      *****
851 : AATTTGTGTT CGAGGATTAC ATGAATCTCT ACTTAAAGCT CAAGTTCCAA

```

図 3-5 (続き).

940 : GAGAAGGAGC CCAGGTTTGA AGCAATGAAG GCCATGGAAA CCACGGGTCC

901 : GAGAAGGAGC CCAGGTTTGA AGCAATGAAG GCCATGGAAA CCACGGGTCC

990 : CATTCCAAC T GCTTGA

951 : CATTCCAAC T GCTTGA

CARAO-Xba 1R

(終り)

```

1 :  MANIVNFPII DMEKLNNYNG VERSLVLDQI KDACHNWGFF QVVNHSL SHE
*****
1 :  MANIVNFPII DMEKLNNYNG VERSLVLDQI KDACHNWGFF QVVNHSL SHE
CARAO-Xba 1F

51 :  LMDKVERMTK EHYKKFREQK FKDMVQTKGL VSAESQVNDI DWESTFYLRH
*****
51 :  LMDKVERMTK EHYKKFREQK FKDMVQTKGL VSAESQVNDI DWESTFYLRH

101 : RPTSNISEVP DLDDQYRKLM KEFAAQIERL SEQLLDLLCE NLGLEKAYLK
*****
101 : RPTSNISEVP DLDDQYRKLM KEFAAQIERL SEQLLDLLCE NLGLEKGYLK

151 : NAFYGANGPT FGTKVSNYPP CPKPDLIKGL RAHTDAGGII LLFQDDKVS G
*****
151 : NAFYGANGPT FGTKVSNYPP CPKPDLIKGL RAHTDAGGII LLFQDDKVS G

201 : LQLLKDGHWV DVPPMKHSIV VNLGDQLEVI TNGKYKSMH RVIAQTDG NR
*****
201 : LQLLKDGHWV DVPPMKHSIV VNLGDQLEVI TNGKYKSMH RVIAQTDG NR

251 : MSIASFYNPG SDAVIYPAPT LVEKEEEKCR AYPKFVFEDY MNLYLKLKFQ
*****
251 : MSIASFYNPG SDAVIYPAPT LVEKEEEKCR AYPKFVFEDY MNLYLKLKFQ

301 : EKEPRFEAMK AMETTGPIPT A
*****
301 : EKEPRFEAMK AMETTGPIPT A
CARAO-Xba 1R

```

図 3-6. pSR120 (Park et al. 1992) (上段)とpBluescript-DCACO(OR) (下段)の推定アミノ酸配列 (321 aa) の比較.

相違の認められたアミノ酸残基を赤字で示した. 下線はcDNAの増幅に用いたプライマー領域に相当する配列. 両配列のホモロジーは99.7%.

pSR120 に含まれる cDNA の翻訳領域のサイズと同じで、塩基配列レベルのホモロジーは 99.9%であった (図 3-2). pSR120 の翻訳領域とは、1 塩基の違いが認められ、pSR120 の 479 番目の塩基 (G) に相当する塩基が C であった (図 3-5). この塩基の違いは、推定アミノ酸配列では、pSR120 の推定アミノ酸配列 147 番目の Ala と、単離された cDNA の場合の Gly の違いに相当した (図 3-6). 得られたクローンは pBlueScript-DCACS(OR) と名づけた.

3.3.2. コンストラクトの構築

単離された ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子の各 cDNA 翻訳領域を、センス遺伝子またはアンチセンス遺伝子としてカーネーションに導入するために、バイナリーベクターである Ti プラスミド pIG121-Hm (Ohta et al. 1990) と pMLH2113-GUS (Mitsuhara et al. 1996, Mochizuki et al. 1999) を基本にしてコンストラクトを構築した.

pIG121-Hm は、T-DNA 領域内に β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子 (*uidA*) が挿入されており、その 5' 上流に隣接するカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター、3' 下流に隣接する *A. tumefaciens* ノパリン合成酵素 (NOS) ターミネーターによって制御されている (図 3-7, 1 段目). そこで、pIG121-Hm から GUS 遺伝子領域を取り去り、代わりに pBlueScript-DCACS(OR) から回収した ACC 合成酵素遺伝子 cDNA 翻訳領域、または pBluescript-DCACO(OR) から回収した ACC 酸化酵素遺伝子 cDNA の翻訳領域を平滑末端にしてライゲーションを行い、挿入した. 得られたクローンから、導入遺伝子が調節遺伝子 (CaMV35S プロモーター, NOS ターミネーター) に対してそれぞれセンス, アンチセンス方向に挿入されたものを選抜し、4 種類のコンストラクト (pIG121-DCACS(OR+), pIG121-DCACS(OR-) (図 3-7), pIG121-DCACO(OR+), pIG121-DCACO(OR-)) を得た (図 3-8).

pMLH2113-GUS は、T-DNA 領域に GUS 遺伝子が挿入されており、5' 上流に隣接する EI2- Ω プロモーターと 3' 下流に隣接する NOS ターミネーターによって

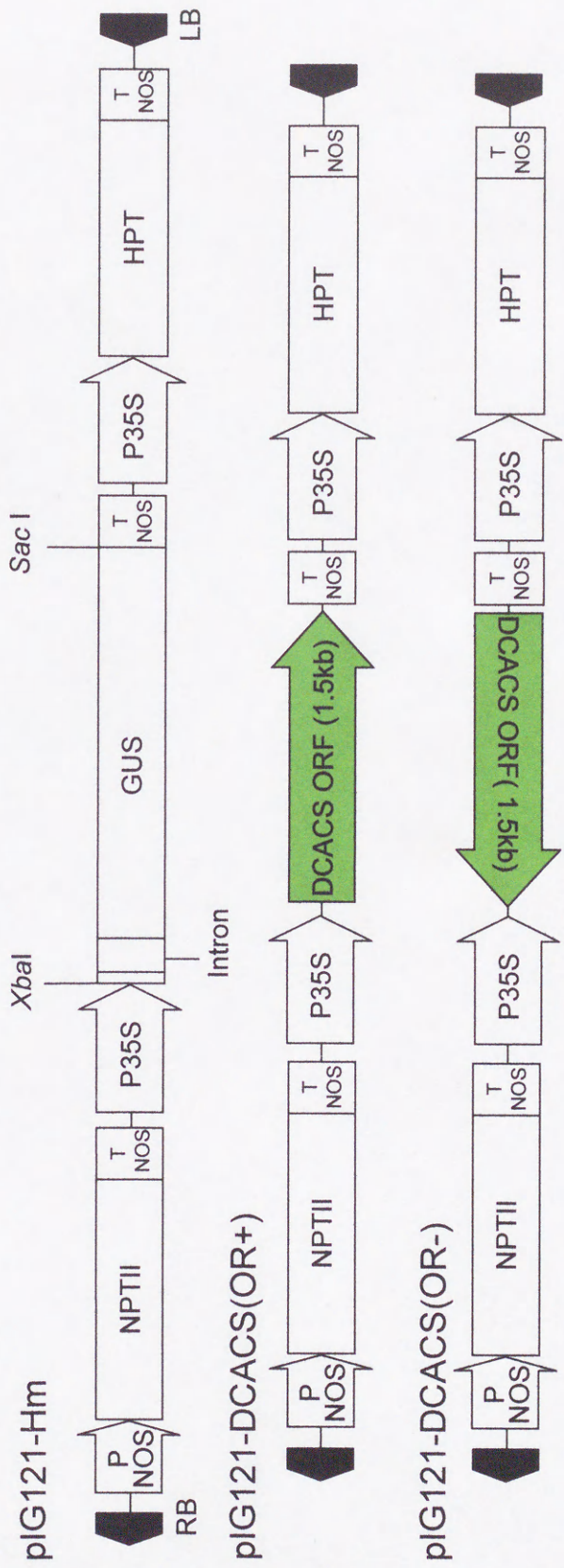


図 3-7. バイナリーベクターpIG121-HmとACC合成酵素遺伝子をセンス・アンチセンス方向に導入するためのコンストラクトpIG121-DCACs(OR+)、pIG121-DCACs(OR-)のT-DNA領域。

pIG121-Hm(1段目)からpIG121-DCACs(OR+) (2段目)とpIG121-DCACs(OR-) (3段目)を構築した。RB, T-DNA領域のright border; LB, T-DNA領域のleft border; NPTII, ネオマイシンフオスフトランスフェラーゼ(NPT)II遺伝子; PNOS, *A. tumefaciens*ノバリン合成酵素遺伝子プロモーター領域; TNOS, *A. tumefaciens*ノバリン合成酵素遺伝子ターミネーター領域; P35S, CaMV35Sプロモーター領域; DCACs(ORF), ACC合成酵素遺伝子cDNA翻訳領域; HPT, ハイグロマイシンフオスフトランスフェラーゼ(HPT)遺伝子。

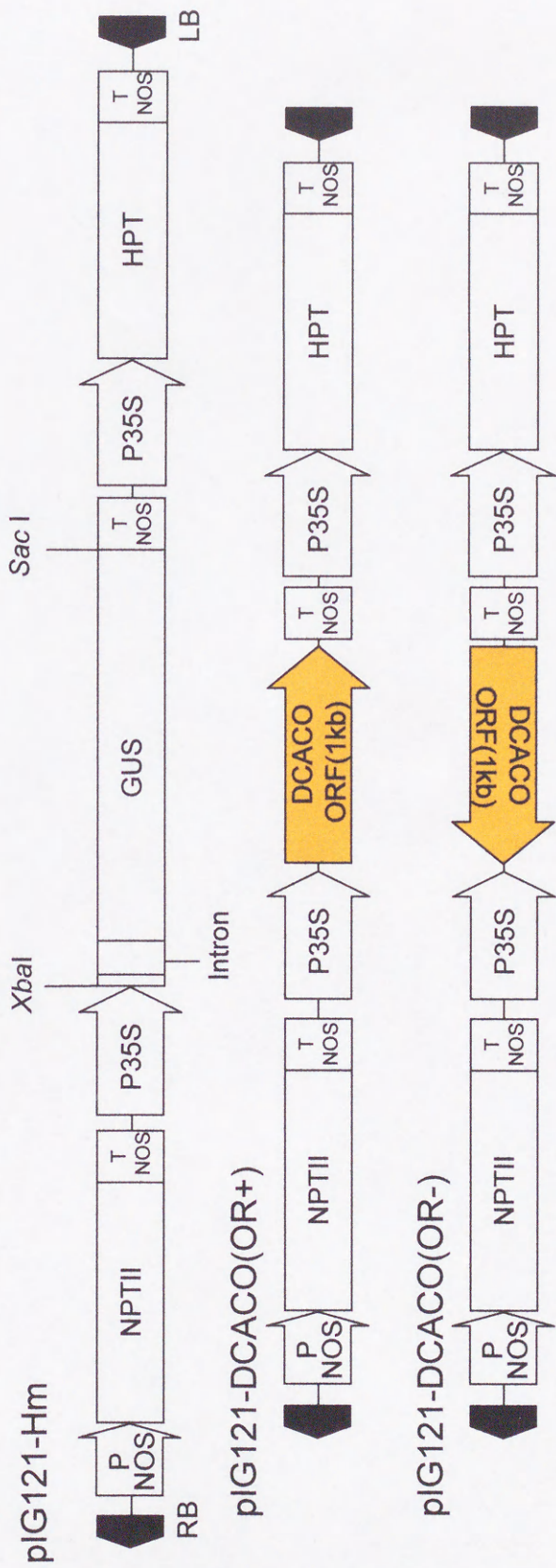


図 3-8. バイナリーベクターpIG121-HmとACC酸化酵素遺伝子をセンス・アンチセンス方向に導入するためのコンストラクトpIG121-DCACO(OR+), pIG121-DCACO(OR-)のT-DNA領域.

pIG121-Hm (1段目)から pIG121-DCACO(OR+) (2段目) と pIG121-DCACO(OR-) (3段目)を構築した. RB, T-DNA領域のright border; LB, T-DNA領域の left border; NPTII, ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ (NPT)II遺伝子; PNOS, *A. tumefaciens* ノパリン合成酵素遺伝子プロモーター領域; TNOS, *A. tumefaciens* ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター領域; P35S, CaMV35Sプロモーター領域; DCACO(ORF), ACC酸化酵素遺伝子cDNA翻訳領域; HPT, ハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ (HPT) 遺伝子.

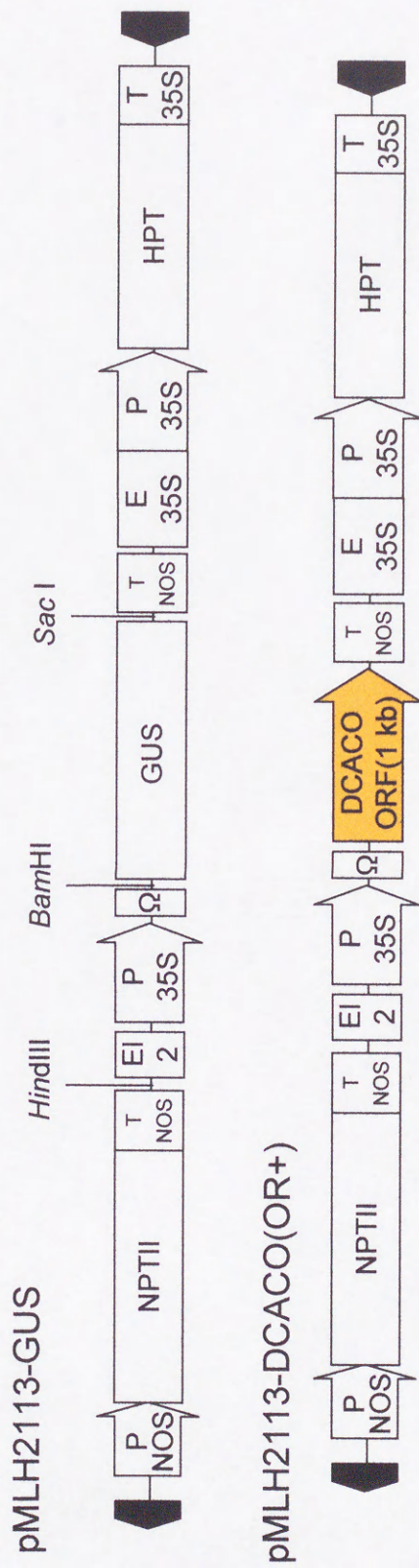


図 3-9. バイナリーベクターpMLH2113-GUSとACC酸化酵素遺伝子をセンス方向に導入するためのコンストラクト pMLH2113-DCACO(OR+) のT-DNA領域.

バイナリーベクターpMLH2113-GUS(上段)からpMLH2113-DCACO(OR+) (下段)を構築した. RB, T-DNA領域のright border; LB, T-DNA領域のleft border; NPTII, ネオマイシンフオスフトランスフェラーゼ(NPT)II遺伝子; PNOS, *A. tumefaciens* ノパリン合成酵素遺伝子プロモーター領域; TNOS, *A. tumefaciens* ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター領域; EI₂, CaMV35Sプロモーター5'上流域(-419~-90)×2; P_{35S}, CaMV35Sプロモーター配列; Ω, TMVの5'非翻訳領域; DCACO(ORF), ACC酸化酵素遺伝子cDNA翻訳領域; HPT, ハイグロマイシンフオスフトランスフェラーゼ(HPT)遺伝子; E_{35S}-P_{35S}, エンハンサー領域が重複したCaMV35Sプロモーター配列; T_{35S}, CaMV35Sのターミネーター配列.

制御されている (図 3-9, 上段). そこで, E12 Ω プロモーターの下流に置かれている GUS 領域を, 制限酵素 *Bam*HI と *Sac*I によって取り除き, 代わりに pBluescript-DCACO(OR)から *Bam*HI/*Sac*I 断片として回収した ACC 酸化酵素遺伝子 cDNA の翻訳領域を挿入し, ACC 酸化酵素遺伝子がセンス方向に導入されたコンストラクト pMLH2113-DCACO(OR+)を得た (図 3-9).

3.3.3. 形質転換体の作出

構築した各 Ti プラスミドを含む EHA101 を感染させた品種 Nora の外植片 (図 3-10, A) から, 再分化培地に置床して約 1 ヶ月後に, ハイグロマイシン耐性のシュートが現れ, その約 1 ヶ月後には, 20~30 枚のシュート塊に成長した (図 3-10, B). 表 3-1 に本研究で得られた形質転換系統を示した. pIG121-DCACS(OR+)では 400 個の外植片から 2 系統, pIG121-DCACS(OR-)では 920 個の外植片から 3 系統, pIG121-DCACO(OR+)では 800 個の外植片から 1 系統のシュート塊が得られた. pIG121-DCACO(OR-)については 920 個の外植片を処理したが, ハイグロマイシン耐性のシュート塊は得られなかった. pMLH2113 (GUS 遺伝子を含む) によって形質転換を行った 300 個の外植片からは 5 系統, pMLH2113-DCACO(OR+)については 380 個の外植片から 1 系統のシュート塊が得られた. 得られたハイグロマイシン抵抗性のシュートは約 5 ヶ月後, 脱ガラス化し節間伸長を開始し (ノーマライゼーション) (図 3-10, C), その後, 発根した植物体に成長した. 発根した植物体は約 2 ヶ月後, 通常の温室環境に馴化し, さらに約 2 ヶ月後に通常の植物体にまで生育し (図 3-10, D), 第 1 花を開花させた (図 3-10, E). 形質転換操作開始から第 1 花の開花までには約 12 ヶ月を要した. ハイグロマイシン抵抗性のシュートはいずれも順調に生育して, 通常の植物体に再生した. pIG121-DCACS (OR+)を導入して得た 2 系統をそれぞれ *sACS1*, *sACS2*, pIG121-DCACS(OR-)を導入して得た 3 系統を *aACS1*, *aACS2*, *aACS3*, pIG121-DCACO(OR+)を導入して得た 1 系統を *sACO2*, pMLH2113-DCACO(OR+)を導入して得た 1 系統を *sACO1* と名づけた.

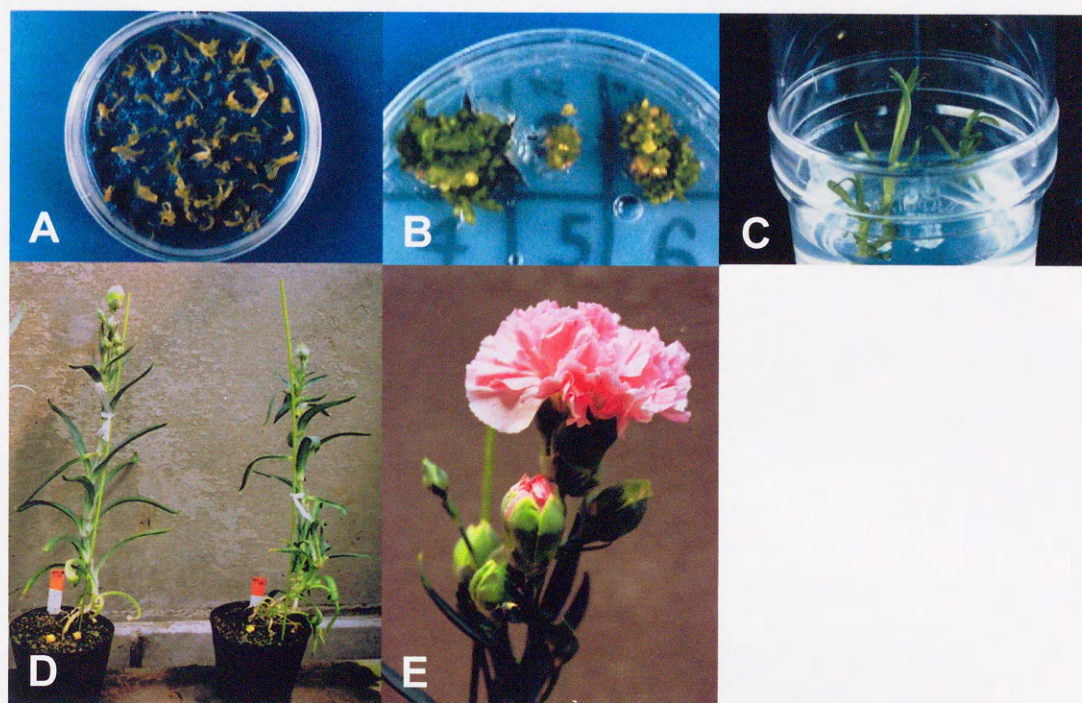


図 3-10. アグロバクテリウムを感染させた外植片からの形質転換体の再生過程.

A, 外植片へのアグロバクテリウムの感染(感染操作開始1週間後); B, 再分化したハイグロマイシン耐性シュート(再分化培地置床開始約2ヶ月後); C, 脱ガラス状化し節間が伸長したシュート(ホルモンフリー培地置床開始約5ヶ月後); D, E, つぼみをつけた形質転換体と開花した第1花(馴化を開始してから約4ヶ月後).

表 3-1. 得られた形質転換系統.

コンストラクト		処理外植片数	系統数*	系統名
pIG121-	DCACS(OR+)	400	2	sACS1, sACS2
	DCACS(OR-)	920	3	aACS1, aACS2, aACS3
	DCACO(OR+)	800	1	sACO2
	DCACO(OR-)	920	0	
pMLH2113-	GUS	300	5	
	DCACO(OR+)	380	1	sACO1

* 各コンストラクトが導入されたアグロバクテリウムを感染させた外植片から、ハイグロマイシン存在下で別々のシュートとして再分化し、再生された植物体の数.

pMLH2113-GUS を用いた場合の形質転換効率は 1.7%であった。一方、エチレン生合成系遺伝子を用いた場合の全体の形質転換効率は0.2%と低率であった。

3.3.4. sACO1 系統の導入遺伝子の確認

得られた形質転換系統のうち最も成長が早かった， pMLH2113-DCACO(OR+)から得られた形質転換系統 *sACO1* の葉からゲノム DNA を抽出しサザン解析を行った (図 3-11)。ゲノム DNA は *Hind*III で消化した。pMLH2113-DCACO(OR+)の T-DNA 領域には，*Hind*III 認識配列が 1 箇所存在する (図 3-9) ことから，*Hind*III で消化したゲノム DNA から検出される断片の数から，導入された遺伝子のコピー数を知ることができるものと期待された。プローブには，単離した ACC 酸化酵素遺伝子 cDNA 翻訳領域 (966 bp) を含む DNA プローブを用いた。解析の結果，*sACO1* 形質転換系統のゲノム DNA からは，非形質転換体には検出されない断片が 5 つ検出された。

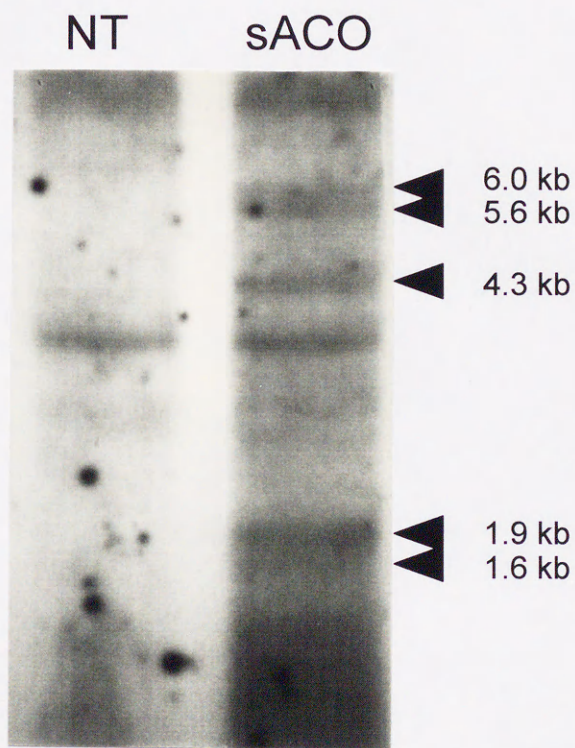


図 3-11. sACO1形質転換系統のゲノムDNAから検出された導入遺伝子.

非形質転換系統(NT)とsACO1形質転換系統(sACO)から抽出したゲノムDNA10 μ gをHindIII消化した後, アガロースゲル電気泳動によって分離して得られたプロットから, ACC酸化酵素遺伝子を検出. プローブは, pBluescript-DCACO(OR)から回収した ACC酸化酵素遺伝子cDNA翻訳領域をAlkphos Direct labelling kit (Amersham Pharmacia)によってラベルしたものをを用いた. 矢印は, sACO1形質転換系統ゲノムDNAのみに検出されたDNA断片を示す.

3.4. 考察

ACC 合成酵素遺伝子 *DC-ACS1* と ACC 酸化酵素遺伝子 pSR120 は、花卉における自己触媒的エチレン生成に関与するものと考えられている (Woodson et al. 1992). 本研究では、エチレン低生産性に改変するために、これらの遺伝子の発現を、センス・アンチセンス法によって抑制することに着目した. 導入遺伝子を得るために、品種 Nora から花卉老化時に発現している ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子の cDNA の翻訳領域の単離を行った. pBluescript-DCACS(OR)として単離した cDNA 断片は、*DC-ACS1* 翻訳領域と同じサイズの翻訳領域 (1554 bp) を含み、*DC-ACS1* cDNA の塩基配列とは 6 個所の塩基に相違が認められた. pBluescript-DCACO(OR)として単離した cDNA 断片は、pSR120 翻訳領域と同じサイズの翻訳領域 (966 bp) を含んでいた. この翻訳領域の塩基配列は、pSR120 の翻訳領域と、1 塩基を除いて同一であった. pSR120 cDNA 塩基配列では 479 番目の塩基が C であったのに対し、単離した cDNA 断片ではこの塩基が G であった. この塩基の違いは、品種 Nora から単離したゲノムクローン *DC-ACO1* (Hibi et al. in preparation) にも認められる. これらの cDNA の翻訳領域は、それぞれ *DC-ACS1* cDNA、pSR120 の翻訳領域と塩基配列レベルで 99%以上のホモロジーが認められたことから、センス、アンチセンス法による内生遺伝子の発現抑制のための導入遺伝子として使用できるものと判断し、これらの cDNA 断片を導入遺伝子として Ti plasmid 上にコンストラクトを構築した.

バイナリーベクター pIG121-Hm 上に構築したコンストラクトでは、導入遺伝子は CaMV35S プロモーターの制御下に置かれている. また pMLH2113-GUS を基本に構築した pMLH2113-DCACO(OR+)では、導入遺伝子が E12- Ω プロモーターの制御下に置かれている. E12- Ω プロモーターは CaMV35S プロモーターのエンハンサー領域 (-419~-90 bp) の重複配列である E12, タバコモザイクウイルス (TMV) の Ω 配列が、CaMV35S プロモーターのそれぞれ上流・下流

に接続された高発現のプロモーターである (Mitsuhara et al. 1996). GUS をレポーター遺伝子として用いて行ったタバコ形質転換体の解析では, このプロモーターは通常の CaMV35S プロモーターの 10 倍以上の GUS 遺伝子を発現することが明らかにされている (Mitsuhara et al. 1996). 導入遺伝子をアンチセンス方向に挿入したコンストラクト, pIG121-DCACS(OR-), pIG121-DCACO(OR-), pMLH2113-DCACO(OR-)によって得られる形質転換体では, アンチセンス遺伝子の発現によって, 内生の ACC 合成酵素遺伝子または ACC 酸化酵素遺伝子の発現が抑制され, エチレン低生産性になることが期待された. 一方, 導入遺伝子をセンス方向に挿入したコンストラクト, pIG121-DCACS(OR+), pIG121-DCACO(OR+) によって得られる形質転換体では, 高発現プロモーターの制御下に置かれたセンス遺伝子の発現によって, 内生の ACC 合成酵素活性または ACC 酸化酵素活性が増加し, エチレン過剰生産性になる可能性と, これと逆に導入遺伝子がコサプレッション等のジーンサイレンシングを引き起こすことによって, 内生遺伝子の発現が抑制され, エチレン低生産性になる可能性が予想された.

Agrobacterium tumefaciens の EHA101 系統は LBA4404 系統などよりもカーネーションのシュートに対する感染効率が低いことが報告されている (Firoozabady et al. 1995). 品種 Nora の外植片を用いた場合, EHA101 は LBA4404 の 3~4 倍の感染効率を示す (鶴野 1999) ことから, 本研究では *A. tumefaciens* EHA101 系統を用いた. 一般に形質転換体の選抜薬剤としてはカナマイシンがよく用いられるが, カーネーションの場合, もともと発根・再生能力が高いために多くのエスケープが現れることから, 選抜薬剤としては不適當であることが報告されている (Firoozabady et al. 1995). 一方, ハイグロマイシンは, 20 mg l⁻¹ の濃度で非形質転換体のシュートを十分に取り除くことができる (鶴野 1999) ことから, 本研究で形質転換体の選抜薬剤として用いた. pMLH2112-GUS を用いた場合の形質転換効率は 1.7%であったのに対し, ACC 合成酵素遺伝子, ACC 酸化酵素遺伝子を導入するためのコンストラクトを用いた場合の全体の

形質転換効率は 0.2%と低かった。このことは、導入されたエチレン生合成系遺伝子が、形質転換体の再分化能力に対して何らかの影響を及ぼしていることが原因であると考えられた。エチレンが *in vitro* でのシュートの再分化能力に影響を与える例が現在までにいくつか報告されている。Bovy et al. (1999) は、シロイヌナズナエチレン受容体の優性突然変異遺伝子 *etr1-1* を導入してエチレン非感受性に形質転換したカーネーションでは、形質転換効率が減少し、さらに、シュート培養および個体の育成中に枯死が起こることを報告している。一方、Fal et al. (1999) は、*in vitro* でのカーネーションシュートの再分化と成長がエチレンの除去によって促進されることを報告している。また、セイヨウカラシナでは、エチレン処理によるリーフディスクからのシュートの再分化効率の低下、エチレン生合成阻害剤、作用阻害剤処理による再分化効率の上昇が報告され (Pua and Chi 1993)、これは、アンチセンス ACC 酸化酵素遺伝子を導入したエチレン低生産性のセイヨウカラシナ形質転換体においても確認されている (Pua and Lee 1995)。形質転換体の作出には、アグロバクテリウムによる感染操作から約 12 ヶ月と長期間を要した。カーネーション形質転換体を迅速に獲得するためには、そのうちの約 5 ヶ月を占める、形質転換シュート塊のノーマライズと発根を誘導するのに要する期間を短縮する方法を開発する必要があると思われる。

構築したコンストラクトを用いた形質転換操作の結果、pIG121-DCACS(OR+)から 2 系統 (*sACS1*, *sACS2*), pIG121-DCACS(OR-)から 3 系統 (*aACS1*, *aACS2*, *aACS3*), pIG121-DCACO(OR+)から 1 系統 (*sACO2*), pMLH2113-DCACO(OR+)から 1 系統 (*sACO1*) の合計 7 系統の形質転換体を得られた。得られた形質転換系統のうち、最も生育が早かった pMLH2113-DCACO(OR+)から得られた系統 *sACO1* について、ゲノム DNA のサザン解析を行った。ACC 酸化酵素遺伝子の翻訳領域をプローブにして検出を行ったところ、*HindIII* によって消化されたゲノム DNA から、非形質転換体には検出されない断片が 5 つ検出された。このことから、*sACO1* 形質転換系統には、最

低 5 コピーの，複数の導入遺伝子が存在するものと考えられた．導入遺伝子の存在が確認されたことから，*sACO1* 形質転換系統の性質についてさらに解析を進めることにした．

第4章. *sACO1* 形質転換系統切花の自然条件における老化現象

4.1. 緒言

本章では、センス ACC 酸化酵素遺伝子の導入が確認された *sACO1* 系統の切花の老化、花のエチレン生成、花弁におけるエチレン生合成系酵素の活性、エチレン生合成系遺伝子の発現を調べ、*sACO1* 形質転換体の切花の自然老化時の性質を解析した。

4.2. 材料と方法

4.2.1. 植物材料

カーネーション品種 Nora の花は、雄ずいが発達せず、花粉が不稔であるために、自殖系統を得ることが不可能である。したがって、*sACO1* 形質転換系統の解析は、形質転換当代 (T_0 世代) の植物体について行った。対照区には、挿し芽によって生育させた品種 Nora を非形質転換系統として用いた。植物体はいずれも P1 閉鎖系温室内 (18 時間日長; 光量, $200\sim 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 昼温度, 23°C ; 夜温度, 17°C) で栽培した。

4.2.2. 切花の老化の観察

花を満開に達した段階 (d_0 ; 最も外側の花弁が、花茎に対して 90° の角度まで展開した段階) で採取した。茎を 20 cm まで切り戻した花を、脱塩水を入れたガラス容器 (直径 28 mm×高さ 55 mm) に生けた。切花は、P1 閉鎖系温室内 (18 時間日長; 光量, $200\sim 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 昼温度, 23°C ; 夜温度, 17°C) で、寒冷紗による遮光条件下 (光量 $40\sim 60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) に置いた。脱塩水は 1 日 1 回交換した。切花の満開後の様子 (花弁のインローリングと萎れ) を観

察し，1日1回写真撮影した．観察は各系統5個の花について行った．

4.2.3. 花のエチレン生成量の測定

各系統5個の花を，満開になった段階（d0）で採取した．茎を2 cmまで切り戻し，脱塩水を入れたバイアル（30 ml容）に生け，P1閉鎖系温室内に遮光条件で置いた．それぞれの花をバイアルに生けた状態で，ガラス容器（450 ml容）に入れて蓋をして密閉し，23 °Cで1時間放置した．ビニールテープで密栓した空気採取口にツベルクリンシリンジの針を挿し込み，容器中の空気を1 ml採取した．採取した空気に含まれるエチレンを，第3章（3.2.1）の方法に従ってガスクロマトグラフィーで測定した．測定は6時間毎に行った．

4.2.4. 葉と茎のエチレン生成量の測定

茎頂から数えて第6葉と第6節を植物体から切り取り，カミソリを用いて垂直方向に切断し，厚さ1.5 mmの切片にした．葉または茎の切片を，10 ml容のガラスバイアルに入れ，1 mlのUP水中に浸し，ゴム栓で密閉した．これを25 °Cで2時間インキューベートした後，ツベルクリンシリンジを用いてバイアルから1 mlの空気を採取した．空気サンプル中に含まれるエチレンをガスクロマトグラフィーを用いて測定した．

4.2.5. 花弁のACC酸化酵素活性の測定

花弁のACC酸化酵素の抽出と酵素活性の測定は，Kosugi et al.（1997）の方法に従って行った．凍結保存した花弁を冷却した乳鉢に入れ，冷却した抽出バッファー（50 mM MOPS-NaOH，pH 7.5，10%グリセロール，30 mM アスコルビン酸ナトリウム，5 mM DTT）（花弁1 gに対して3 ml）とポリビニルピロリドン（花弁1 gに対して0.1 g）を加え，乳棒を用いて15分間磨砕した．これを50 ml容の遠沈管に分注して遠心分離（16,000 ×g，15分間，4 °C）し，上清を回収した．上清を，ゲルろ過カラム（Econo-Pac 10 DG Desalting Column，

Bio-Rad Laboratories) に通して高分子画分を回収し、酵素液として用いた。酵素液中に含まれるタンパク質含量は、BSA を標準として、Bradford (1976) の方法に従って測定した。活性測定は次の方法で行った： 200 μ l の酵素液を含む 1 ml の酵素反応液 (55 mM MOPS-NaOH, pH 7.5, 5.5% グリセロール, 2.75 mM DTT, 25 mM アスコルビン酸ナトリウム, 25 mM NaHCO_3 , 10 mM ACC, 50 μ M FeSO_4) を 5 ml 試験管に調製し、ゴム栓で密閉した。これを、30 $^\circ\text{C}$ で 5 分間インキュベートした後、ゴム栓に、1 ml の新鮮な空気をあらかじめ取り込んだツベルクリンシリンジの針を挿し込み、試験管中の空気を 1 ml 採取した。採取した空気に含まれるエチレンをガスクロマトグラフィーを用いて測定した。ACC 酸化酵素活性は、30 $^\circ\text{C}$ 、5 分間で、1 nmol の ACC をエチレンに変換する活性を 1 unit と定義した。

4.2.6. 花卉の ACC 含量の測定

1 g の花卉と 80% のエタノール 5 ml を試験管に入れ、60 $^\circ\text{C}$ で 3 時間加熱した後、抽出液を回収した。さらにこの花卉に 2.5 ml の 80% エタノールを加えて 60 $^\circ\text{C}$ で 1 時間加熱し、抽出液を回収した (2 回)。得られた抽出液を混合し、遠心エバポレーター (温度 50 $^\circ\text{C}$) を用いて乾燥させた。乾燥させた抽出物を 1 ml の UP 水に溶解した。これに等量のクロロホルムを加えて混合し、抽出物に含まれる脂質を取り除いた。回収した上層を ACC 抽出液とした。

ACC 含量は、Lizada and Yang (1979) の方法を用い、ACC を化学的に酸化して生成する等モルのエチレンを測定することで求めた。5 ml の試験管に 0.4 ml の抽出サンプルを入れて氷水中に置き、20 mM CuCl_2 と 0.1 ml の $\text{NaOCl} / \text{NaOH}$ 反応液 [Antiformin (10% Cl) と飽和 NaOH 水溶液を等量混合したもの] を加え、ゴム栓で密栓しボルテックスミキサーで 5 秒間攪拌した。ゴム栓に 1 ml のツベルクリンシリンジの針を突き刺し、氷中に 2.5 分放置した。その後、再び攪拌し、突き刺したシリンジで 1 ml の空気を採取した。採取した空気に含まれるエチレンをガスクロマトグラフィーで測定した。0.4 ml の抽出したサ

ンプルに、対照として 5 nmol ACC を加えた反応液を調製して同様に反応させ、エチレンを測定した。2 種類の反応液から生成したエチレン量の差が 5 nmol であることから、この値によって ACC のエチレンへの変換効率を補正して、サンプルに含まれる ACC 含量を算出した。

4.2.7. 花卉の ACC 合成酵素活性の測定

ACC 合成酵素の活性測定は、Sato et al. (1995) の方法を基本にして行った。酵素液の取り扱いには 4 °C で行った。4.2.5 において抽出した酵素液 8 ml を 2 ml ずつ Amicon Centricon-SR 3 (分画分子量 3,000, Millipore) に加え、5,000 ×g で 3 時間、4 °C で遠心し、合計 3 ml の濃縮酵素液を回収した。ACC 合成酵素に至適化したバッファー (ACS バッファー; 100 mM Na-phosphate, pH 7.8, 5 μM PLP, 0.5 mM 2-メルカプトエタノール, 10 % グリセロール) を調製し、ゲルろ過カラム (Econo-Pac 10 DG Desalting Column, Bio-Rad Laboratories) を平衡化した。これに、得られた濃縮酵素液を 3 ml 通した後、4 ml の ACS バッファーを通して、バッファーが交換された 4 ml の溶出液を得た。この溶出液を 1 ml ずつ 4 本の Amicon Centricon-SR 3 (分画分子量 3,000) に加え、5,000 ×g で 2.5 時間、4 °C で遠心し、合計 1 ml の酵素液を回収した。

100 μl の酵素液を含む 0.4 ml の酵素反応液 (100 μM Ado-Met, 5 μM PLP, 100 μg BSA, 100 mM Hepes-KOH, pH 8.5) を調製した。これを 30 °C で 15 分間インキュベートした後、生成した ACC を Lizada and Yang (1979) の方法によって測定した。ACC 合成酵素活性は、30 °C, 1 時間で、1 nmol の Ado-Met を ACC に変換する活性を 1 unit と定義した。酵素液中のタンパク質含量は、BSA を標準として、Bradford (1976) の方法に従って測定した。

4.2.8. 花卉全 RNA の抽出

各系統 5 個の花を、満開になった段階 (d0) で採取した。茎を 2 cm まで切り戻し、脱塩水を入れたバイアル (30 ml 容) に生け、P1 閉鎖系温室内に遮光

条件下で置いた。満開時 (d 0) および、満開後 3 日 (d 3), 4 日 (d 4), 5 日 (d 5), 7 日 (d 7) 経過した段階の花から全ての花卉を採取し、液体窒素で凍結した後、 -80°C で保存した。サンプリングした花卉から、第 3 章 (3.2.2) に記した方法により全 RNA を抽出した。吸光度計を用いて、抽出液の 260 nm における吸光度を測定し、抽出液の全 RNA 含量を算出した。

4.2.9. ノザン解析

花卉の ACC 酸化酵素遺伝子および ACC 合成酵素遺伝子 mRNA の蓄積量の変化を調べるためにノザン解析を行った。

(1) ブロッティング

10 μg の全 RNA を 10 mM MOPS, pH 7.0, 2.5 mM 酢酸ナトリウム, 0.5 mM EDTA, 2.2 M ホルムアルデヒド, 50% 脱イオン化ホルムアミドの存在下で、 65°C で 15 分間加熱後急冷し、変性させた。変性させた全 RNA を、変性アガロースゲル (1% アガロース, 2.2 M ホルムアルデヒド) / MOPS バッファー (20 mM MOPS, pH 7.0, 5 mM 酢酸ナトリウム, 1 mM EDTA) を用いた電気泳動によって分離した (泳動条件: 50 V, 1.5 時間)。全 RNA を分離したゲルは 2 つ作成した。1 つは、エチジウムブロマイド染色を行い、UV トランスイルミネーターを用いて、リボゾーム RNA の観察、各サンプルにおける全 RNA の分離状態を確認した。もう一方のゲルは、分離した RNA をブロッティングに用いた。

変性アガロースゲルに、50 mM NaOH 処理 (25 分間穏やかに振盪) と 200 mM 酢酸ナトリウム処理 (20 分間穏やかに振盪, 2 回) を行い、ゲル中に分離した RNA を変性させた。変性した RNA は、バキュームトランスファー (Vacugene XL, Amersham Pharmacia Biotech AB) によって、ナイロンメンブレン (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech AB) に転写した (転写条件: 転写溶液, $20\times\text{SSC}$; 吸引圧力, 55 hPa; 転写時間, 2 時間)。転写後のメンブレンは、50 mM NaOH を染み込ませ、5 分間放置した後、 $2\times\text{SSC}$ で 1 分間濯ぎ、 80°C で 2 時間処理

して、RNAを固定した。

(2) プローブの調製

ACC酸化酵素遺伝子 [DC-ACO1 (pSR120)] mRNA と ACC合成酵素遺伝子 (DC-ACS1) mRNA の検出のために、それぞれ pBluescript-DCACO(OR) と pBluescript-DCACS(OR) として単離した同遺伝子 cDNA の翻訳領域を digoxigenin (DIG) によって標識した DNA プローブを作成した。反応液 [pBluescript-DCACO(OR) または pBluescript-DCACS(OR), 100 pg; 各 cDNA 断片の増幅に用いた上流・下流プライマー, 各 0.5 μ M; PCR DIG Labeling Mix (Hoffmann-La Roche), 10 μ l; Taq DNA polymerase, 10 units; 全量 100 μ l] を調製して、PCR を行った [反応条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, (94 $^{\circ}$ C 45 sec, 55 $^{\circ}$ C 50 sec, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min) \times 28 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 15 min]。反応産物は、アガロースゲル/TAE バッファーを用いた電気泳動によって DNA の増幅を確認 (ACC酸化酵素遺伝子, 約 1 kb; ACC合成酵素遺伝子, 約 1.5 kb) した後、常法に従ってエタノール沈澱を行い、100 μ l の TE に溶解してプローブ溶液とした。

(3) ハイブリダイゼーションとシグナルの検出

DIG 標識抗体のハイブリダイゼーションとシグナルの検出に使用した、ブロッキング試薬, DIG 認識抗体(アルカリフォスファターゼを結合した抗 DIG-抗体 Fab フラグメント), CSPD (発光基質) は, DIG Luminescent Detection Kit (Hoffmann-La Roche) に添付されたものを用いた。RNA を固定したナイロンメンブレン (50 cm²) をハイブリダイゼーションバッグに入れ, 4 ml のプレハイブリダイゼーション液 (5 \times SSC, 10 \times Denhardt's 溶液, 10 mM Na-phosphate, pH 6.5, 0.5% SDS, 50% 脱イオン化ホルムアミド, 0.1 mg ml⁻¹ salmon sperm DNA) を加え, 気泡を取り除いた後密閉し, 50 $^{\circ}$ C で 3 時間穏やかに振盪した。別に調製した 4 ml のプレハイブリダイゼーション液に, 調製した DIG プローブ (100 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱後, 急冷したもの) を加えて (最終濃度, 600 ng ml⁻¹) 混合し, ハイブリダイゼーション液とした。プレハイブリダイゼーション後のメンブレンを新しいハイブリダイゼーションバックに入れ, 調製したハイ

ブリダイゼーション液を加え、気泡を取り除いた後密閉し、50 °Cで16時間以上穏やかに振盪した。プローブ処理後のメンブレンは、2×SSC、0.1% SDS 中で室温で10分間振盪（2回）後、0.2×SSC、0.1% SDS 中で68 °Cで15分間振盪（2回）して、ハイブリダイズしなかったプローブを取り除いた。

検出はすべて室温で行った。ハイブリダイゼーション後のメンブレンは、DIG 1 バッファー（0.1 M マレイン酸、pH 7.6, 0.15 M NaCl, 0.02% NaN₃）に浸して5分間振盪した（2回）。その後、ハイブリダイゼーションバッグに入れ、DIG 2 バッファー（0.1%ブロッキング試薬を含むDIG 1 バッファー）を加えて30分間振盪した後、新しいハイブリダイゼーションバッグに入れ替え、DIG 2 バッファーで10,000倍希釈したDIG認識抗体を加えて30分間振盪した。抗体処理後のメンブレンは、0.2% Tween 20 を含むDIG 1 に浸し、15分間振盪して洗浄した（2回）。抗体を洗浄したメンブレンは、DIG 3 バッファー（0.1 M Tris-HCl, pH 9.6, 0.1M NaCl, 50 mM MgCl₂）に3分間、Assay 溶液（100 mM ジエタノールアミン, 2 mM MgCl₂, 0.02% NaN₃）に5分間浸した。その後、メンブレンをハイブリダイゼーションバッグに入れ、Assay 溶液で100倍希釈したCSPD 溶液を加えて気泡を取り除いた後、密閉し、10分間処理した。CSPD 処理後のメンブレンは、ハイブリダイゼーションバッグに入れて密閉した。メンブレンのハイブリダイゼーションシグナルは、X線フィルム（RX-U, 富士写真フィルム）に露光して検出した（露光時間：ACC 酸化酵素遺伝子プローブ, 4時間；ACC 合成酵素遺伝子プローブ, 10時間）。

4.3. 結果

4.3.1. *sACO1* 形質転換系統の切花の寿命

図 4-1 に、*sACO1* 形質転換系統と非形質転換系統の切花の満開後 10 日間の様子を写真撮影したものを示した。非形質転換系統の切花（図 4-1, 上段）は、満開 5 日後まで鑑賞に堪える状態を維持した。満開 6 日後（d 6）になると、花卉のインローリングが開始し、満開 9 日後（d 9）に花卉は完全に萎れ枯死した。一方、*sACO1* 形質転換系統の切花（図 4-1, 下段）では、観賞に堪える状態が満開 10 日後（d 10）まで維持され、この期間、花卉のインローリングは全く認められなかった。満開 11 日後（d 11）以降、花卉の先端部から色褪せと乾燥が認められた。

4.3.2. 花のエチレン生成量の変化

満開時に採取した花のエチレン生成量の変化を、非形質転換系統と *sACO1* 形質転換系統で比較した（図 4-2）。非形質転換系統の花では、満開 4 日後から 6 日後の間にクライマクテリックなエチレン生成の増加がみられ、エチレン生成量は最大 $4 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ に達した（図 4-2, 上段）。一方、*sACO1* 形質転換系統の花では、エチレンはほとんど検出されず（非形質転換系統の 3%以下）、クライマクテリックなエチレン生成のピークは見られなかった（図 4-2, 下段）。

4.3.3. 葉と茎のエチレン生成量

成熟した葉（第 6 葉）と茎（第 6 節）のエチレン生成量を非形質転換系統と *sACO1* 形質転換系統で比較した（図 4-3）。

非形質転換系統の葉のエチレン生成量は $0.087 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ であった（図 4-3, 上段・左）。一方、*sACO1* 形質転換系統の葉では $0.023 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ （図 4-3, 下段・左）と、非形質転換系統の葉よりもエチレン生成量は少なかった（約 26.1%）。茎のエチレン生成量については、非形質転換系統では $0.013 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ （図 4-3,

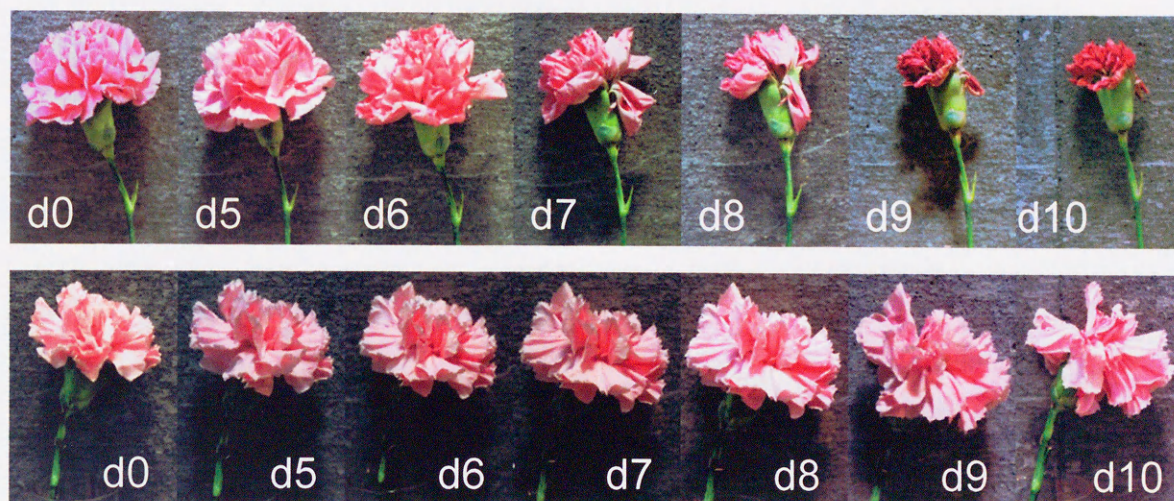


図 4-1. 非形質転換系統(品種Nora)の切花(上段)とACO1形質転換系統の切花(下段)の満開後の様子.

両系統各5本の切花を、花が満開になった段階で採取し、茎を約20 cmに切り戻して脱塩水に生け、P1閉鎖系温室に遮光条件で置いた。写真は、満開時(d 0)および、満開5～10日後(d 5～d10)のもの。

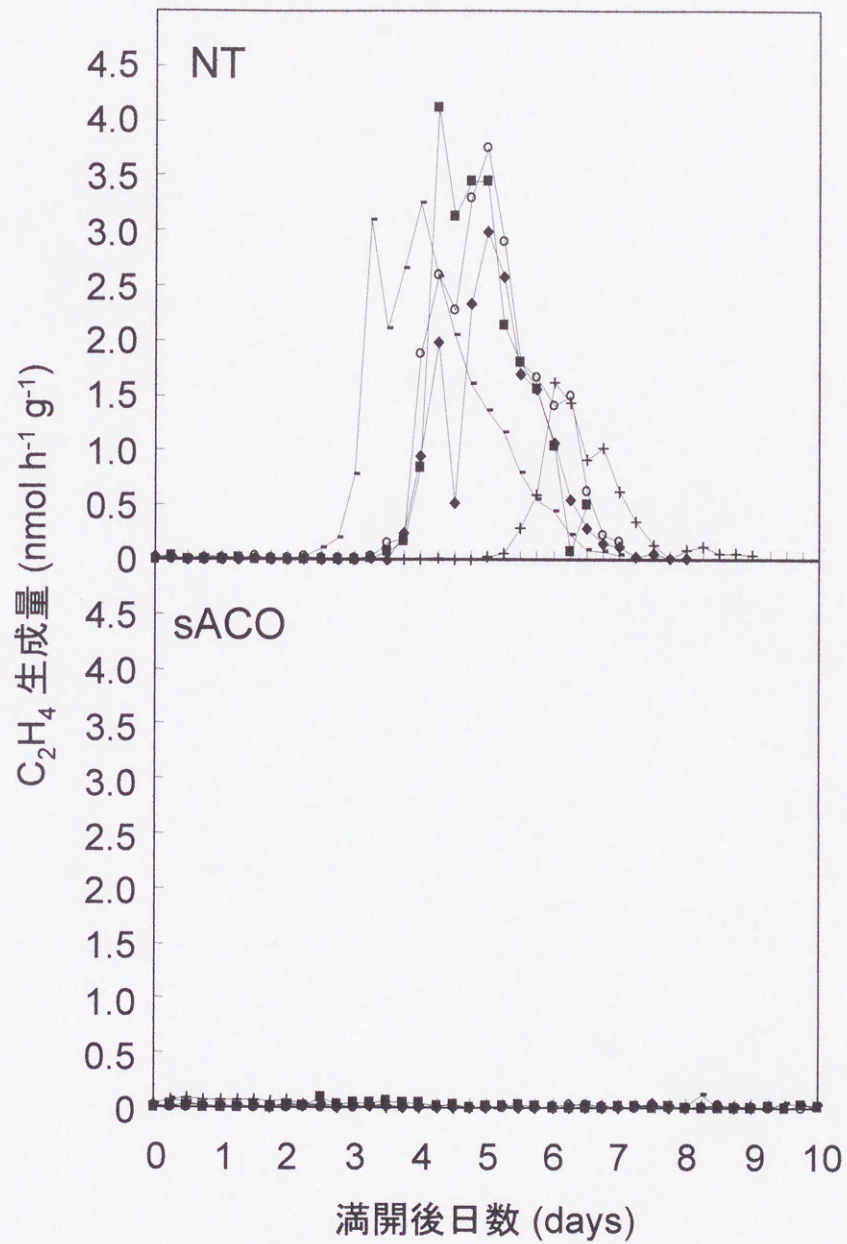


図 4.2. 満開後の花のエチレン生成量の変化.

満開時に採取した花のエチレン生成量を6時間毎に測定した。各系統5個の花のそれぞれのエチレン生成量をプロットした。NT, 非形質転換系統; sACO, *sACO1*形質転換系統。

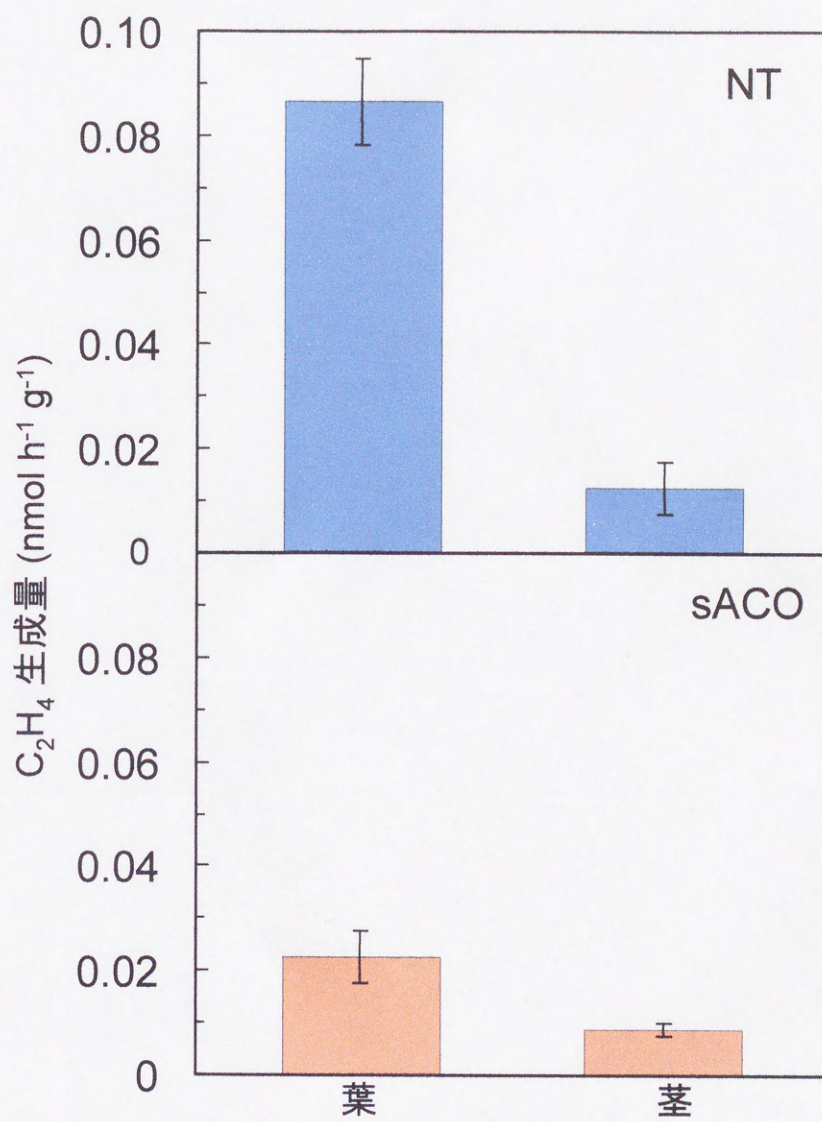


図 4.3. 非形質転換系統 (NT) と *sACO1* 形質転換系統 (sACO) の葉 (第6葉) と茎 (第6節) のエチレン生成量.

上段・右)であったのに対して, *sACO1* 形質転換系統では $0.009 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (図 4-3, 下段・右) と, 両者の間に有為な差は認められなかったものの, 非形質転換系統よりもエチレン生成量が少ない傾向を示した.

4.3.4. 花卉の ACC 酸化酵素活性, ACC 合成酵素活性, ACC 含量

非形質転換系統においてエチレン生成の増加が開始する満開 4 日後の花卉から抽出した酵素液に含まれる ACC 酸化酵素活性と ACC 合成酵素活性を, 非形質転換系統と *sACO1* 形質転換系統で比較した (図 4-4, 図 4-5). 非形質転換系統の花卉の ACC 酸化酵素活性は $1.06 \pm 0.06 \text{ units (mg protein)}^{-1}$ であったのに対して, *sACO1* 形質転換系統の花卉の ACC 酸化酵素活性は $0.05 \pm 0.01 \text{ units (mg protein)}^{-1}$ と, 非形質転換系統の約 5%であった (図 4-4).

この酵素液をゲルろ過カラムに通して, 緩衝液組成を ACC 合成酵素に至適化し, ACC 合成酵素活性を測定した. 非形質転換系統の花卉の ACC 合成酵素活性は $0.053 \pm 0.004 \text{ units (mg protein)}^{-1}$ であったのに対して, *sACO1* 形質転換系統花卉の ACC 合成酵素活性は $0.015 \pm 0.002 \text{ units (mg protein)}^{-1}$ と, 非形質転換系統の場合の 30%以下であった (図 4-5).

満開 5 日後の花卉の ACC 含量を比較したところ, 非形質転換系統の花卉の ACC 含量は $22.6 \pm 6.7 \text{ nmol g}^{-1}$ であったのに対し, *sACO1* 形質転換系統花卉の ACC 含量は $6.3 \pm 1.6 \text{ nmol g}^{-1}$ と, 非形質転換系統の場合の約 30%であった (図 4-6).

4.3.5. 花卉のエチレン生合成系遺伝子の発現

満開後の花卉における ACC 酸化酵素遺伝子と ACC 合成酵素遺伝子の発現を調べるために, 満開時および, 満開 3, 4, 5, 7 日後 (d 3, d 4, d 5, d 7) の花卉について, ACC 酸化酵素遺伝子 *DC-ACO1* (cDNA クローン pSR120 に相当する) と ACC 合成酵素遺伝子 *DC-ACS1* の mRNA の蓄積パターンをノザンブロットによって解析した (図 4-7).

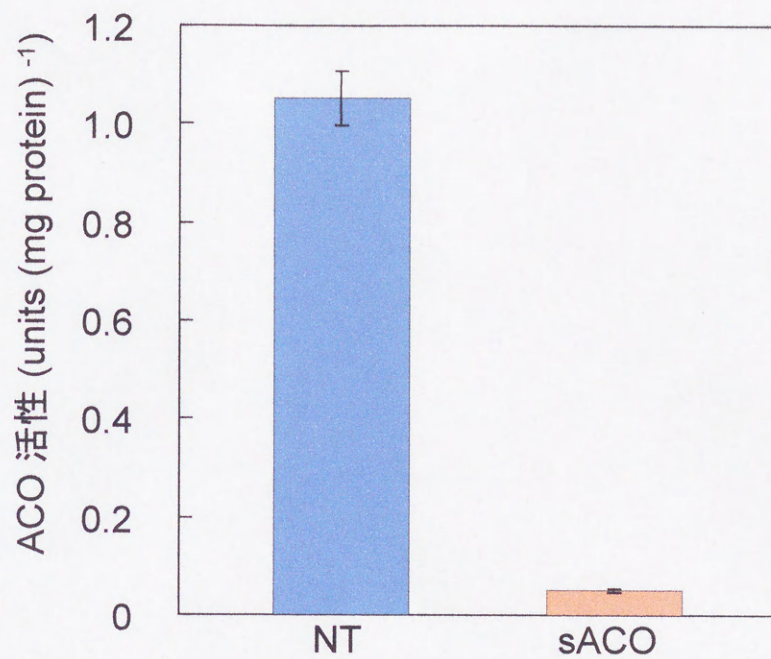


図 4.4. 非形質転換系統と Δ ACO1形質転換系統の花弁におけるACC酸化酵素活性.

非形質転換系統(NT)と Δ ACO1形質転換系統(sACO)の満開4日後の花弁から抽出した酵素液に含まれるACC酸化酵素活性を比較した. 1 unit は, 30 °C, 5分間に 1 nmol のACCをエチレンに変換する活性と定義した.

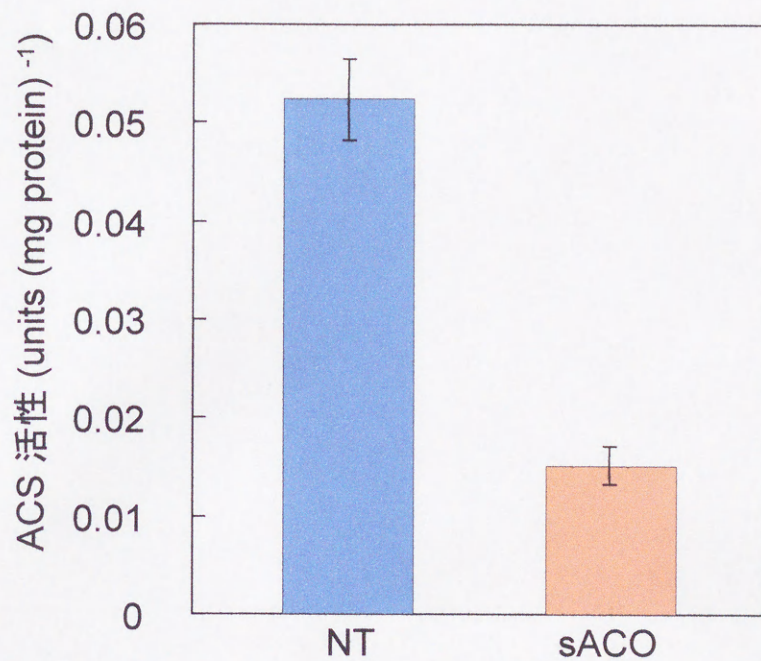


図 4-5. 非形質転換系統と*sACO1*形質転換系統の花弁における ACC合成酵素活性.

非形質転換系統 (NT) と *sACO1* 形質転換系統 (sACO) の満開4日後の花弁から抽出した酵素液に含まれるACC合成酵素活性を測定した. 1 unit は, 30 °C, 1時間に 1 nmol のAdo-MetをACCに変換する活性と定義した.

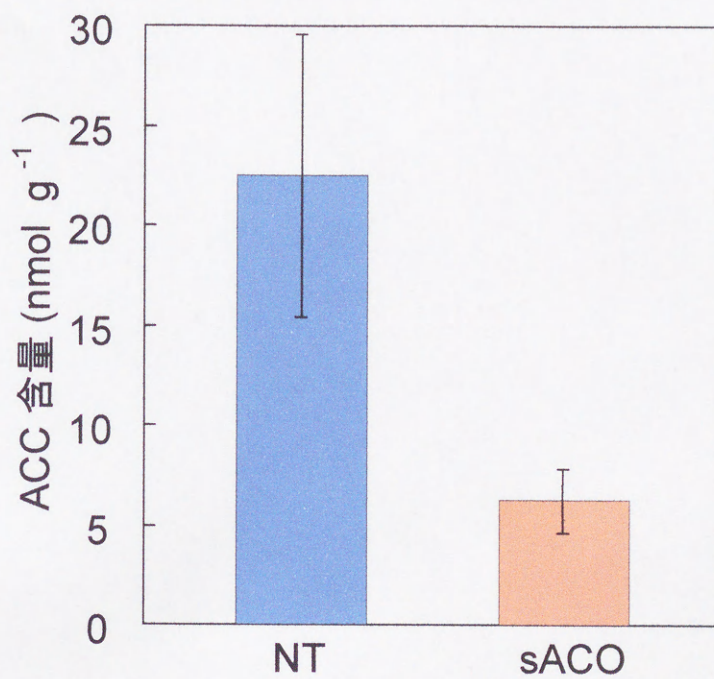


図 4-6. 非形質転換系統と *sACO1* 形質転換系統の花弁 ACC 含量.

非形質転換系統 (NT) と *sACO1* 形質転換系統 (sACO) の満開5日後の花弁から抽出されたACCの量を比較した。

ACC 酸化酵素遺伝子 mRNA については，非形質転換体系統の花弁では満開 4 日後に初めて検出され，満開 5 日後に蓄積量が最大になり，満開 7 日後にわずかに減少した．一方，*sACO1* 形質転換系統の花弁では，いずれの時期にも ACC 酸化酵素遺伝子 mRNA は検出されなかった（図 4-7，1 段目）．

ACC 合成酵素遺伝子 mRNA については，非形質転換系統の花弁では，満開 4 日後に初めて検出され，以降，蓄積量は満開 7 日後まで一定であった．一方，*sACO1* 形質転換系統の花弁では，いずれの時期にも ACC 合成酵素遺伝子 mRNA の蓄積は認められなかった（図 4-7，2 段目）．

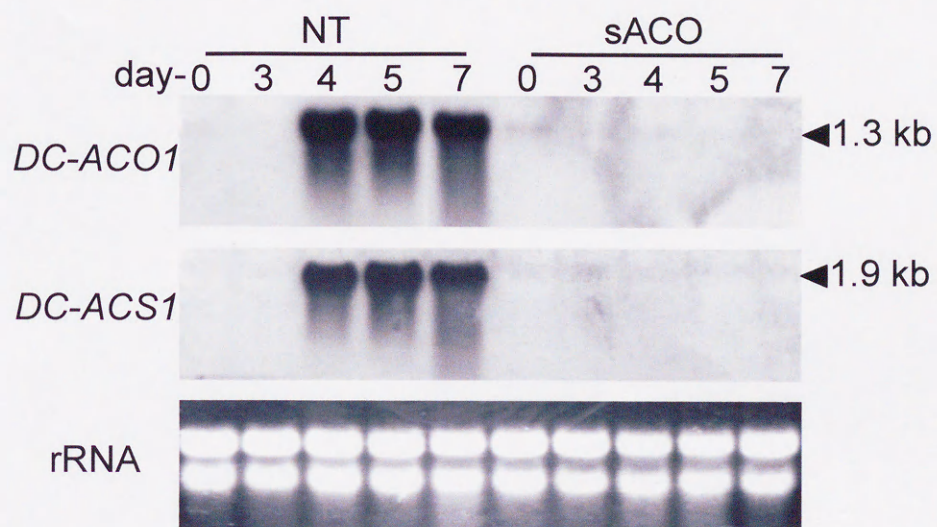


図 4-7. 非形質転換系統と *sACO1* 形質転換系統の切花の、花卉における ACC 酸化酵素遺伝子と ACC 合成酵素遺伝子の mRNA の蓄積.

非形質転換系統 (NT) と *sACO1* 形質転換系統 (*sACO*) の満開時 (d 0) および、満開後 (d 3, d 4, d 5, d 7) の花卉から抽出した全 RNA 10 μ g を分離したブロットを作成し、DIG 標識プローブによって *DC-ACO1* mRNA (1 段目), *DC-ACS1* mRNA (2 段目) を検出した。3 段目 (*rRNA*) はリボゾーム RNA。

4.4. 考察

本章では、第3章において、最低5コピーのセンス ACC 酸化酵素導入遺伝子の存在が確認された *sACO1* 形質転換系統について、自然条件における切花の老化現象を解析した。

非形質転換系統の切花では満開5日後に花弁のインローリング現象が認められ、その後花弁は急速に萎れ、満開9日後には観賞価値を失った。一方、*sACO1* 形質転換系統の切花では、インローリング現象が全く見られず、その結果、鑑賞に堪える期間は満開10日後まで維持され、切花の寿命は非形質転換体の2倍にまで延びた。一方、*sACO1* 形質転換系統の切花では、満開11日後以降になると、花弁の先端部から乾燥と色褪せが観察された。この現象は、エチレンに依存せずに起こる現象であることが知られている。例えば、エチレンの作用阻害剤である STS を処理した切花では、花弁のインローリングは起こらないが、花弁の乾燥と色褪せが起こることが観察されている (Veen et al. 1979)。また、アンチセンス ACC 酸化酵素の導入によって花弁のエチレン生成が抑制されたカーネーション形質転換体では、花弁のインローリングは抑制されたが、花弁の乾燥と色褪せは抑制されなかったことが報告されている (Savin et al. 1995)。

sACO1 形質転換系統の花では、実験期間を通してエチレン生成はほとんど検出されず (非形質転換系統の3%以下)、クライマクテリックな生成量の増加は全く見られなかった。このことから、花弁のインローリングが起こらなかったのは、花弁における自己触媒的なエチレン生成が抑制されているためであると考えられた。

sACO1 形質転換系統におけるエチレン生成量の低下は、花だけではなく、成長した葉と茎においても確認された。pMLH2113-GUS から得られた品種 Nora の形質転換体では、花弁と葉の両方で GUS 活性が確認されている (鶴野 1999)。このことから、導入遺伝子は、E12- Ω プロモーターの制御下に置かれ

たことによって、花卉だけではなく、栄養器官におけるエチレン生成にも影響を及ぼしているものと考えられた。しかし、*sACO1* 形質転換系統では、葉の老化が遅延するといった変化は観察されなかった。

sACO1 形質転換系統の花弁では、ACC 酸化酵素活性が非形質転換系統の 5%、ACC 合成酵素活性と ACC 含量は、非形質転換体の 30%と少なかった。このことから、*sACO1* 形質転換系統においてエチレン生成が抑制されていたのは、ACC 合成酵素と ACC 酸化酵素の両方の酵素活性が低レベルに抑えられていたためであることが分かった。満開時の花弁と、非形質転換体においてエチレン生成量の増加が観察される満開3日から7日後の花弁についてノザン解析を行ったところ、非形質転換系統では満開4日から7日にかけて ACC 酸化酵素遺伝子と ACC 合成酵素遺伝子の両方の mRNA が蓄積したのに対して、*sACO1* 形質転換系統では、これらの mRNA の蓄積は、いずれの時期にもほとんど見られなかった。このことから、*sACO1* 形質転換系統において、ACC 合成酵素活性と ACC 酸化酵素活性が低レベルに抑制され、クライマクテリックなエチレン生成の増加が起こらなかったのは、ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子の発現が抑制されているためであると考えられた。

第5章. *sACO1* 形質転換系統花卉の外生エチレンに対する反応

5.1. 緒言

第4章において、*sACO1* 形質転換系統カーネーションの切花は、自然条件では、花卉における自己触媒的なエチレン生成が抑制され、その結果、花卉のインローリングが起こらないことが分かった。そこで本章では、*sACO1* 形質転換系統の花弁が、外部から処理されたエチレンに対してどのような反応を示すかについて解析を行った。

5.2. 材料と方法

5.2.1. 植物材料

P1 閉鎖系温室内で栽培した *sACO1* 形質転換系統、非形質転換系統（品種、Nora）の植物体から、満開時（d 0）の花を5個ずつ採取した。花から萼片を取り除き、花托から引張り取った花弁を材料にした。

5.2.2. 花弁へのエチレン処理、エチレン処理花弁のエチレン生成量の測定と形態の観察

1つの花から単離したすべての花弁を二等分し、エチレン処理区、エチレン無処理区の実験に用いた。各処理区に当てた花弁を、基部を下にして50 ml容のバイアルに入れた。花弁の乾燥を防止するために、バイアルに2 mlのUP水を加えた。これを1 L容のガラス瓶に入れ、蓋をして密閉した。エチレン処理区には、ビニールテープで密栓した注入口に、ツベルクリンシリンジ針を突き刺してエチレンを注入し、ガラス瓶中のエチレン濃度を $10 \mu\text{l}^{-1}$ に調整した。エチレン無処理区では、エチレンの代わりに等量の空気を注入した。花

弁の入ったガラス瓶は、白色蛍光灯による照明下 ($20 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-1}$), 25°C で放置した。

処理 18 時間後、花卉をバイアルごとガラス瓶から取り出し、新鮮な空気中に 1 時間置き、処理した高濃度のエチレンを取り除いた。その後、450 ml 容のガラス容器中に入れて密閉し 1 時間放置した。ツベルクリンシリンジを用いて容器中の空気を 1 ml 採取した。採取した空気に含まれるエチレンを、第 3 章 (3.2.1) の方法に従ってガスクロマトグラフィーで測定した。エチレン生成量測定後の花卉は、写真撮影の後、花ごと別々に -80°C で保存した。

5.2.3. 処理花卉からの全 RNA の抽出

エチレン処理、無処理花卉からの全 RNA の抽出は、花ごと別々に行った。抽出操作は、第 3 章 (3.2.2) に記した方法に従って行った。

5.2.4. RT-PCR によるシステインプロテイナーゼ遺伝子 cDNA の単離

既報告のカーネーションシステインプロテイナーゼ遺伝子 cDNA クローン pDCCP1 (Jones and Woodson 1995) の 5'末端 30 bp の配列を参考に、上流のオリゴヌクレオチドプライマーを作成した (DCCP1-F) (付表 1 ; pp.122)。下流プライマーは、pDCCP1 の推定終始コドンを中心を含む 30 bp (一鎖) の塩基配列を参考に作成した (DCCP1-R) (付表 1 ; pp.122)。

$20 \mu\text{l}$ の逆転写反応液 [65°C で 10 分間 処理した total RNA $2 \mu\text{g}$, $2.5 \mu\text{M}$ 下流プライマー, reverse transcriptase XL (AMV) (Life Sciences) 5 units, RNase inhibitor (TaKaRa) 20 units, 1 mM dNTP mixture, 5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3] を 0.2 ml 薄壁チューブに調製し、サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer) を用いて 42°C で 30 分間反応させた。反応液を 99°C で 5 分間加熱して酵素を失活させた。 $80 \mu\text{l}$ PCR 反応液 [$0.2 \mu\text{M}$ 上流プライマー, Taq DNA polymerase (Sigma) 3 units, MgCl_2 1.5 mM, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3] を逆転写反応液に加え、全量 $100 \mu\text{l}$ とした。

サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer) を用い、以下の反応条件で PCR を行った: 94 °C 5 min, 60 °C 2 min, 72 °C 3 min, (94 °C 1 min, 60 °C 2 min, 72 °C 3 min) × 29 サイクル, 72 °C 15 min. PCR 産物を, 1.0%アガロースゲル/TAE バッファーを用いた電気泳動によって分離した. エチジウムブロマイドによって染色した後, UV トランスイルミネーターを用いて観察し, 増幅断片 (約 1.3 kb) を確認した.

反応産物は, 常法に従ってフェノール, クロロホルム処理, エタノール沈澱を行った後, TA クローニングベクター (pT7Blue, Novagene) にライゲーション (Ligation Kit ver.2, TaKaRa) を行った (16 °C, 6 時間). ライゲーション産物全量について, 大腸菌菌株 XL-1 Blue のコンピテントセルを用いた形質転換を行った. 形質転換体コロニーの選抜は, LB 寒天培地 (50 µg ml⁻¹ アンピシリン, (1.5%寒天を含む) 上で行った. 目的インサートの存在を確認するために, 第 3 章 3.2.4. に記した方法によってコロニーからダイレクト PCR を行った. プライマー DCCP1-F, DCCP1-R から約 1.3 kb の cDNA 断片の増幅が確認されたコロニーを釣菌し, 50 µg ml⁻¹ アンピシリンを添加した LB 液体培地に接種し, 37 °C で 18 時間振盪培養した. 得られた培養液について, プラスミド抽出 (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) を行うと同時に, グリセロールストック (グリセロール濃度 15%) として -80 °C で凍結保存した. 単離されたクローンは pT7Blue-DCCP と名づけた.

クローニングされた 1.3 kb の cDNA 断片の塩基配列を確認するために, 第 3 章 3.2.3. に記した方法に従って, ダイデオキシ法によるシークエンスを行った. pT7Blue クローニングサイトに隣接する M13-M3 プライマー, M13-RV プライマー (付表 1 ; pp.122) と cDNA 断片の増幅に用いたプライマー (DCCP1-F, DCCP1-R) を用いてサイクルシークエンス反応を行って解析した. 確認された配列から, その先の塩基配列を決定するためのプライマー (DCCP1-F2, DCCP1-F3, DCCP1-R2, DCCP1-R3) (付表 1 ; pp.122) を作成し, サイクルシークエンス反応と解析を進め, 単離した約 1.3 kb の cDNA 断片の塩基配列を

決定した。

5.2.5. エチレン処理花卉から抽出した全 RNA のノザン解析

(1) ブロットニング

エチレン無処理花卉 2 サンプルと、エチレン処理花卉 3 サンプルから抽出した全 RNA 各 10 μg を、第 4 章 (4.2.9.) に記した方法に従って、変性アガロースゲルを用いた電気泳動で分離し、ナイロンメンブレンに転写した。RNA をブロットしたメンブレンは、同じものを 3 枚作成し、それぞれを 3 種類の mRNA (ACC 酸化酵素遺伝子, ACC 合成酵素遺伝子, システインプロテイナーゼ遺伝子) の検出に用いた。

(2) プローブの調製

ACC 酸化酵素遺伝子, ACC 合成酵素遺伝子の各 mRNA を検出するためのプローブは、第 4 章 (4.2.9.) で調製した DIG 標識 DNA プローブを使用した。

システインプロテイナーゼ遺伝子 mRNA を検出するために、本章 5.2.4. で単離したシステインプロテイナーゼ遺伝子 cDNA クローン pT7Blue-DCCP に含まれる cDNA 断片を DIG 標識した DNA プローブを調製した。反応液 [1 μg pT7Blue-DCCP, 0.5 μM プライマー (DCCP1-F, DCCP1-R), 10 μl PCR DIG Labeling Mix (Hoffmann-La Roche), 10 units Taq DNA polymerase (Sigma), MgCl_2 1.5 mM, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3 ; 全量 100 μl] を調製して、PCR を行った [反応条件 : 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 65 $^{\circ}\text{C}$ 2min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3min, (94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min) \times 28 サイクル, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 min]。反応産物は、アガロースゲル/TAE バッファーを用いた電気泳動によって分離した。約 1.3 kb の増幅された断片をアガロースゲルから抽出 (EASYTRAP ver.2, TaKaRa) して TE 溶液として回収し、プローブ溶液とした。

(1) ハイブリダイゼーションとシグナルの検出

RNA を固定したナイロンメンブレン (50 cm^2) に、第 4 章 (4.2.9.) に記した方法に従って、プローブをハイブリダイズさせ、シグナルを検出した。 X

線フィルムへの露光は、ACC 酸化酵素遺伝子 mRNA と ACC 合成酵素遺伝子 mRNA の検出には 13 時間；システインプロテイナーゼ遺伝子 mRNA の検出には 4 時間行った。

5.3. 結果

5.3.1. エチレン処理後の花卉の形態的な変化

sACO1 形質転換系統の花弁が外生エチレンによってインローリングを起こすかどうかを検討するために、エチレン処理 ($10 \mu\text{l l}^{-1}$, 18 h) を行い、形態的な変化を観察した (図 5-1). *sACO1* 形質転換系統の花弁では、エチレン処理後、非形質転換系統の花弁と同様に、インローリングが起きた。

5.3.2. 花卉のエチレン生成量

外生エチレンが、*sACO1* 形質転換系統のエチレン生成に及ぼす影響を調べるために、エチレン処理 ($10 \mu\text{l l}^{-1}$, 18 h) 1 時間後の花卉のエチレン生成量を測定した (図 5-2). エチレン無処理区の花弁におけるエチレン生成は、非形質転換系統の花弁と *sACO1* 形質転換系統の花弁との間に有為な差は認められなかった (非形質転換系統, $0.080 \pm 0.084 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$; *sACO1* 形質転換系統, $0.110 \pm 0.064 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) 一方、エチレン処理区では、非形質転換系統の花弁のエチレン生成量は $10.3 \pm 1.4 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ であったのに対し、*sACO1* 形質転換系統の花弁のエチレン生成量は $0.5 \pm 0.1 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ と、非形質転換系統の 5% 以下に抑えられていた。

5.3.3. エチレン処理花卉におけるエチレン生合成系遺伝子 mRNA の蓄積量

外生エチレン存在下の *sACO1* 形質転換系統の花弁において、ACC 酸化酵素遺伝子 (*DC-ACS1*) と ACC 合成酵素遺伝子 (*DC-ACO1*) の発現がどのように制御されているかを調べるために、各 mRNA の蓄積量をノザン解析により解析した (図 5-3, 1 段目と 2 段目). エチレン無処理区では、*sACO1* 形質転換系統、のいずれの花弁においても、ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子の mRNA の蓄積はほとんど認められなかった。一方、エチレン処理区では、非形質転換系統の花弁に ACC 酸化酵素遺伝子と ACC 合成酵素遺伝子の各 mRNA



図 5-1. 非形質転換系統と *sACO1* 形質転換系統のエチレン処理花弁におけるインローリングの誘導.

非形質転換系統 (NT) と *sACO1* 形質転換系統 (sACO) の満開時 (d 0) の花から花弁を単離し, $10 \mu\text{l l}^{-1}$ のエチレンを 18 時間処理した (C_2H_4). 対照区にはエチレンと等量の空気を注入した (Air). 写真は処理終了後 1 時間後の花弁.

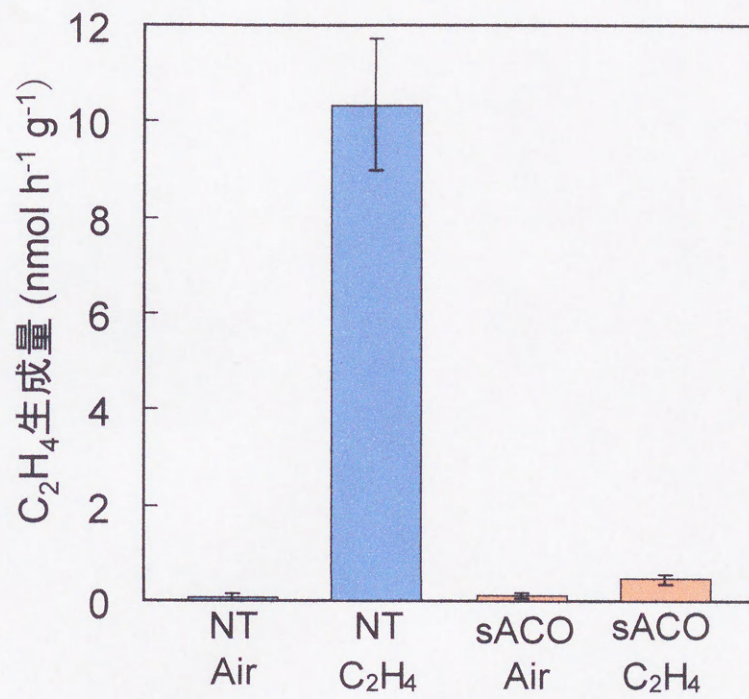


図 5-2. 非形質転換系統と *sACO1* 形質転換系統のエチレン処理花卉におけるエチレン生成量.

非形質転換系統 (NT) と *sACO1* 形質転換系統 (sACO) の各系統4個の花について, 採取した花卉をそれぞれ二等分し, 10 μ l l⁻¹, 18時間のエチレン処理 (C₂H₄) あるいは無処理 (Air) を行い, 1時間後の花卉のエチレン生成量を測定した.

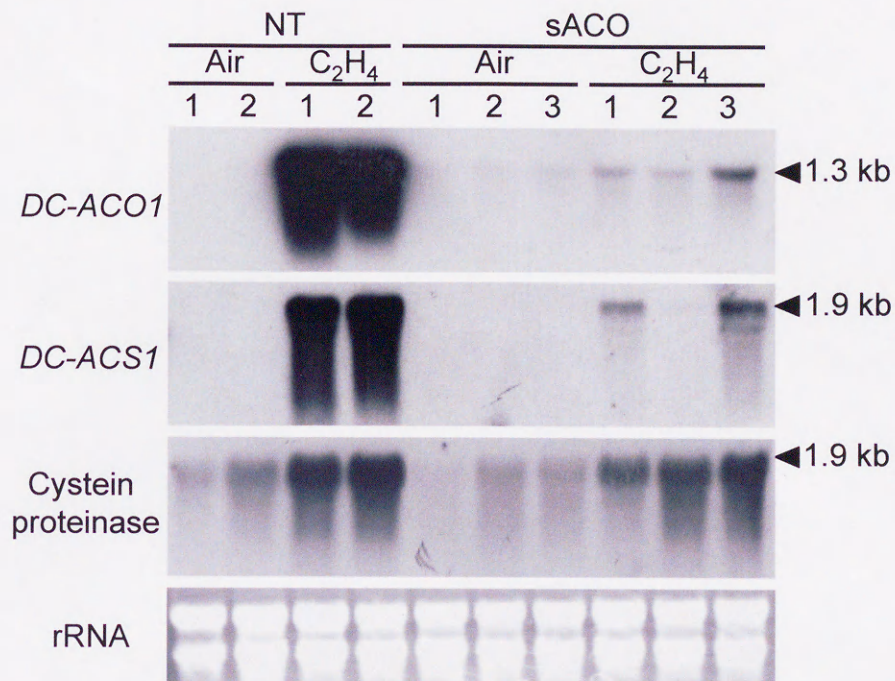


図 5-3. 非形質転換系統と *sACO1* 形質転換系統のエチレン処理花卉における ACC 酸化酵素遺伝子, ACC 合成酵素遺伝子, システインプロテイナーゼ遺伝子の mRNA の蓄積.

非形質転換系統 (NT) と *sACO1* 形質転換系統 (sACO) について, $10 \mu\text{l l}^{-1}$, 18 時間のエチレン処理 (C₂H₄) あるいは無処理 (Air) の花卉から抽出した全 RNA 10 μg を分離したプロットを作成し, DIG 標識プローブによって DC-ACO1 mRNA (1 段目), DC-ACS1 mRNA (2 段目), システインプロテイナーゼ mRNA (3 段目) を検出した. 4 段目 (rRNA) はリボゾーム RNA.

が大量に蓄積していたのに対し、*sACO1* 形質転換系統の花弁では、ACC 酸化酵素遺伝子と ACC 合成酵素遺伝子の mRNA は、わずかな蓄積が認められたものの、蓄積量は非形質転換体に比べて極めて少なかった。

5.3.4. システインプロテイナーゼ遺伝子 mRNA の蓄積量

システインプロテイナーゼ遺伝子 (pDCCP1) は、ACC 合成酵素遺伝子 (*DC-ACS1*)、ACC 酸化酵素遺伝子 (*DC-ACO1*) と同様、花弁老化時に、また、エチレンによって発現が活性化されることが明らかにされている (Jones and Woodson 1995)。そこで、外生エチレン存在下の *sACO1* 形質転換系統の花弁においてシステインプロテイナーゼ遺伝子の発現がどのように制御されているかを調べるために、ノザン解析を行った。

システインプロテイナーゼ遺伝子 mRNA を検出するためのプローブを得るために、カーネーション品種 Nora の老化花弁から抽出した全 RNA から、システインプロテイナーゼ遺伝子 cDNA の単離を行った (図 5-4)。Jones and Woodson (1995) によって報告されているカーネーションシステインプロテイナーゼ遺伝子 cDNA クローン pDCCP1 の 5'末端 30 bp と推定終始コドンを中心を含む 30 bp の塩基配列から、上流・下流のオリゴヌクレオチドプライマーを作成して RT-PCR を行い、約 1.3 kb の cDNA 断片を増幅した。この cDNA をサブクローニングして塩基配列を決定したところ、使用したプライマー配列を両端に含む 1306 bp の DNA 断片であり、pDCCP1 塩基配列から予想された cDNA 断片のサイズ (1299 bp) よりも 7 塩基長いことが分かった。pDCCP1 の塩基配列と比較したところ、pDCCP1 の塩基配列上の以下に示した部分に違いがある DNA 断片であった (図 5-5)。

1. 234 番目と 235 番目の塩基の間に 3 塩基 (GGC) の挿入。
2. 238 番目 C が G に置換。
3. 242 番目と 243 番目の塩基間に 2 塩基 (CG) の挿入。
4. 244 番目と 245 番目の塩基間に 1 塩基 (G) の挿入。

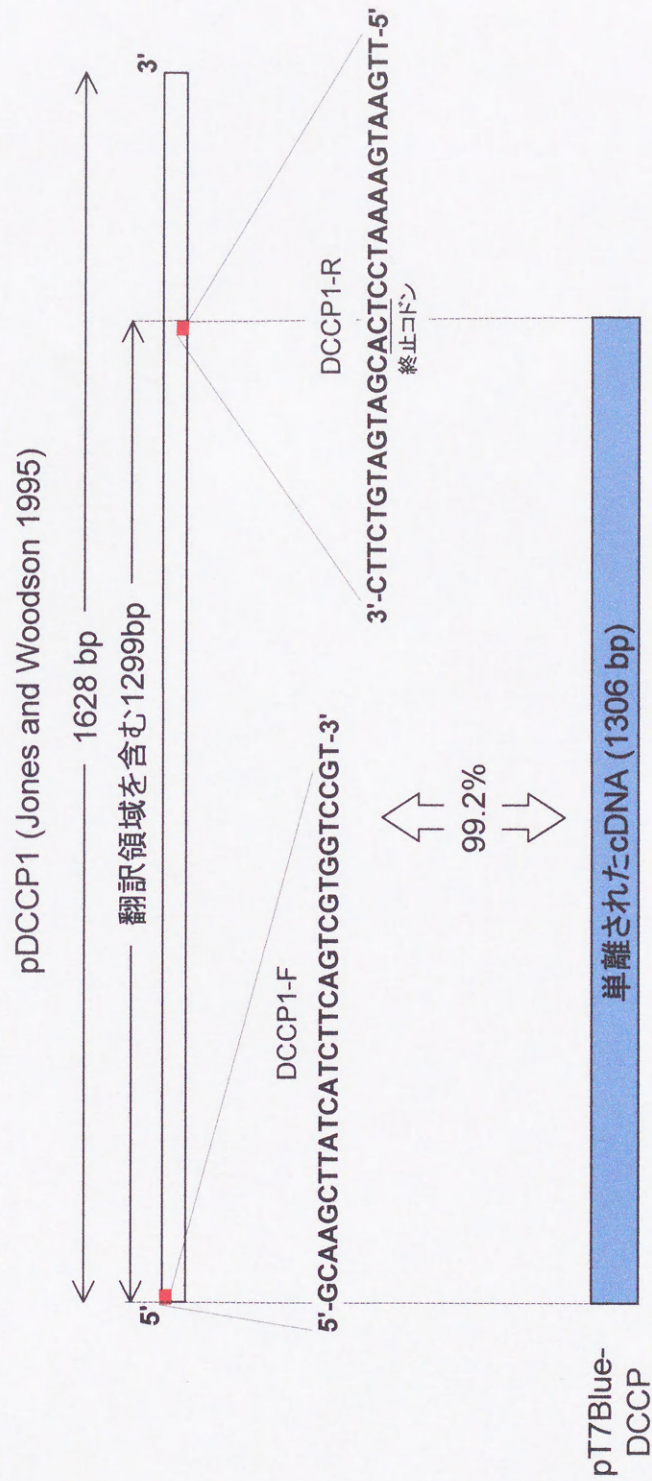


図 5-4. 単離されたシステインプロテイナーゼ遺伝子cDNA.

pDCCP1 (1628 bp) (Jones and Woodson 1995) の翻訳領域を含む1299 bp) の両端30 bpの塩基配列から設計したオリゴヌクレオチドプライマー (DCCP1-F, DCCP1-R) を用いて, 品種Nora老化花弁由来全RNAを鋳型としたRT-PCRを行った.


```

1 : GCAAGCTTAT CATCTTCAGT CGTGGCTCGT TAAACACCGC AAAAACTACA
*****
1 : GCAAGCTTAT CATCTTCAGT CGTGGCTCGT TAAACACCGC AAAAACTACA
DCCP1-F
51 : ACGCCCTCGG CGAAAAGGAG AAGAGGTTTG CGATTTTATG GGATAATTTG
*****
51 : ACGCCCTCGG CGAAAAGGAG AAGAGGTTTG CGATTTTATG GGATAATTTG

101 : GAATTTATTG ACCAACATAA TAATAATAAT AATGGTGGTG GTGGTGGTGA
*****
101 : GAATTTATTG ACCAACATAA TAATAATAAT AATGGTGGTG GTGGTGGTGA

151 : GTTTGAGTTA GGGTTGAATA AGTTTGCTGA TTTGACTAAC GACGAGTTTC
*****
151 : GTTTGAGTTA GGGTTGAATA AGTTTGCTGA TTTGACTAAC GACGAGTTTC

201 : GGAGGATTTA TTTCGGCGTA AAGCGGCCGG AGAA---GGC CGAGA--GC-
*****
201 : GGAGGATTTA TTTCGGCGTA AAGCGGCCGG AGAAGGCCGG CGAGACGGCG

245 : GTGAAGAGTG ATCGGTATGC GGTGAAGGAG GGTGATGAGT TGCCGGAGAG
*****
251 : GTGAAGAGTG ATCGGTATGC GGTGAAGGAG GGTGATGAGT TGCCGGAGAG

295 : CGTTGACTGG CGGAAGAAAG GTGCTGTTTC TCATGTTAAA GACCAGGGGC
*****
301 : CGTTGACTGG CGGAAGAAAG GTGCTGTTTC TCATGTTAAA GACCAGGGGC

345 : AGTGTGGGAG TTGTTGGGCG TTTTCCGCTA TTGGTGCTGT CGAAGGAATA
*****
351 : AGTGTGGGAG TTGTTGGGCG TTTTCCGCTA TTGGTGCTGT CGAAGGAATA

395 : AACAAGATTG TTACCGGTGA CCTGATTACA TTGTCTGAGC AAGAGCTCGT
*****
401 : AACAAGATTG TTACCGGTGA CCTGATTACA TTGTCTGAGC AAGAGCTCGT

```

図 5-5 (全3ページ). pDCCP1 (Jones and Woodson 1995) の1 bp~1299 bp (上段) と pT7Blue-DCCP (1306 bp) (下段) の塩基配列の比較.

相違の認められた塩基を赤字で示した. 下線はcDNAの増幅に用いたプライマー領域に相当する配列. 両配列のホモロジーは99.3%.

図 5-5 (続き).

```

445 : TGACTGTGAC ACGTCTTACA ACTCTGGATG TGATGGTGGT CTTATGGACT
*****
451 : TGACTGTGAC ACGTCTTACA ACTCTGGATG TGATGGTGGT CTTATGGACT

495 : ACGCTTTCCG ATTCATCATC AACAAATGGCG GTATTGACAC TGACAAGGAC
*****
501 : ACGCTTTCCG ATTCATCATC AACAAATGGCG GTATTGACAC TGACAAGGAC

545 : TACCCTTACA AGGCCACTGA CGGTTCTTGT GA-CAGTAAC AGGAAGAACG
*****
551 : TACCCTTACA AGGCCACTGA CGGTTCTTGT GACCAGT-AC AGGAAGAACG

594 : CTAAGGTTGT TACAATTGAC GGTTTAGAAG ATGTTCCCTGC AAACAATGAG
*****
600 : CTAAGGTTGT TACAATTGAC GGTTTAGAAG ATGTTCCCTGC AAACAATGAG

644 : AAGGCGTTGC AGAAGGCAGT TGCTCACCAG CCTGTAAGGC TTGCTATTGA
*****
650 : AAGGCGTTGC AGAAGGCAGT TGCTCACCAG CCTGTAAGGC TTGCTATTGA

694 : AGCAGGTGGC AGAGACTTCC AACTCTACAA ATCTGGCGTT TTCACGGGAA
*****
700 : AGCAGGTGGC AGAGACTTCC AACTCTACAA ATCTGGCGTT TTCACGGGAA

744 : GCTGTGGCAC GTCACTTGAT CATGGTGTCG TGGCCGTAGG GTACGGCACC
*****
750 : GCTGTGGCAC GTCACTTGAT CATGGTGTCG TGGCCGTAGG GTACGGCACC

794 : ACCGATGACG GGAAGGACTA CTGGATTGTA AGAAACTCAT GGGGAGACGA
*****
800 : ACCGATGACG GGAAGGACTA CTGGATTGTA AGAAACTCAT GGGGAGACGA

844 : CTGGGGTGAA GACGGGTACA TAAGAATGGA GCGTAACACT GAGTCTAAAA
*****
850 : CTGGGGTGAA GACGGGTACA TAAGAATGGA GCGTAACACT GAGTCTAAAA

```

図 5-5 (続き).

```

894 : GCGGCAAATG TGGTATCGCA ATCGAGCCAT CGTACCCGGT CAAGACCAGC
*****
900 : GCGGCAAATG TGGTATCGCA ATCGAGCCAT CGTACCCGGT CAAGACCAGC

944 : CCAAACCCAC CTAACCCAGG TCCGTACCT CCGTCTCCAC CACCTGCACC
*****
950 : CCAAACCCAC CTAACCCAGG TCCGTACCT CCGTCTCCAC CACCTGCACC

994 : CAAAGTCGTC TGTGACTCTT ACTCATCATG CCCTAGTGCG ACCACCTGTT
*****
1000 : CAAAGTCGTC TGTGACTCTT ACTCATCATG CCCTAGTGCG ACCACCTGTT

1044 : GCTGTGTCTA TGAATACGGT CCTTACTGCT ACATGTGGGG TTGCTGCCTT
*****
1050 : GCTGTGTCTA TGAATACGGT CCTTACTGCT ACATGTGGGG TTGCTGCCTT

1094 : CTCGAGGCCG CTTCTTGCTG CGACGACGAT TCGAGCTGCT GTCCTCATGA
*****
1100 : CTCGAGGCCG CTTCTTGCTG CGACGACGAT TCGAGCTGCT GTCCTCATGA

1144 : CTACCCCGTC TGTAACACC C AACAAGGCAC TTGCAGCAAG AGCAAGAACA
*****
1150 : CTACCCCGTC TGTAACACT C AACAAGGCAC TTGCAGCAAG AGCAAGAACA

1194 : ACCCCTTCAC CGTCAAGGCA TTGAAGCGAA CT-CCGCTAC ACTCCACGCT
*****
1200 : ACCCCTTCAC CGTCAAGGCA TTGAAGCGAA CTCCGCTAC ACTCCACGCT

1243 : AATTTCCGGT GGTTTTAAGG ACTTAAAGAA GACATCATCG TGAAGTTTTT
*****
1250 : AATTTCCGGT GGTTTTAAGG ACTTAAAGAA GACATCATCG TGAAGTTTTT

DCCP1-R

1293 : CATTCAA
*****
1300 : CATTCAA

```

(終り)

```

1 : QAYHLQSWLV KHRKKNYNALG EKEKRFAIFR DNLEFIDQHN NNNNGGGGGE
*****
1 : QAYHLQSWLV KHRKKNYNALG EKEKRFAIFR DNLEFIDQHN NNNNGGGGGE
      DCCP1-F
51 : FELGLNKFAD LTNDEFRRYIY FGVKRPEK-A ES-VKSDRYA VKEGDELPES
*****
51 : FELGLNKFAD LTNDEFRRYIY FGVKRPEKAA ETAVKSDRYA VKEGDELPES

99 : VDWRKKGAVS HVKDQGQCGS CWAFAIGAV EGINKIVTGD LITLSEQELV
*****
101 : VDWRKKGAVS HVKDQGQCGS CWAFAIGAV EGINKIVTGD LITLSEQELV

149 : DCDTSYNSGC DGGLMDYAFR FIINNGGIDT DKDYPYKATD GSCDSNRKNA
*****
151 : DCDTSYNSGC DGGLMDYAFR FIINNGGIDT DKDYPYKATD GSCDQYRKNA

199 : KVVITIDGLED VPANNEKALQ KAVAHQPVRL AIEAGGRDFQ LYKSGVFTGS
*****
201 : KVVITIDGLED VPANNEKALQ KAVAHQPVRL AIEAGGRDFQ LYKSGVFTGS

249 : CGTSLDHGVV AVGYGTTDDG KDYWIVRNSW GDDWGEDGYI RMERNTESKS
*****
251 : CGTSLDHGVV AVGYGTTDDG KDYWIVRNSW GDDWGEDGYI RMERNTESKS

299 : GKCGIAIEPS YPVKTSPNPP NPGSPSPSP PPKVVCDY SSCPSATTCC
*****
301 : GKCGIAIEPS YPVKTSPNPP NPGSPSPSP PPKVVCDY SSCPSATTCC

349 : CVYEYGPYCY MWGCCPLEAA SCCDDSSCC PHDYPVCNTQ QGTCSKSKNN
*****
351 : CVYEYGPYCY MWGCCPLEAA SCCDDSSCC PHDYPVCNTQ QGTCSKSKNN

399 : PFTVKALKRT PLHSTLISGG FKDLKKTSS
***** * *
401 : PFTVKALKRT PATLHANFGW F-----
      DCCP1-R

```

図 5-6. pDCCP1 (Jones and Woodson 1995) (上段)とpT7Blue-DCCP (下段)の推定アミノ酸配列の比較.

相違の認められたアミノ酸残基を赤字で示した. 下線はcDNAの増幅に用いたプライマー領域に相当する配列を示す. 両配列のホモロジーは94.9%.

5. 576 番目 と 577 番目の塩基間に 1 塩基 (C) の挿入.
6. 581 番目 A が欠落.
7. 1162 番目 C が T に置換.
8. 1225 番目と 1226 番目の塩基間に 1 塩基 (C) の挿入.

単離された 1306 bp の cDNA 断片と pDCCP1 の塩基配列レベルのホモロジーは 99.3%であった. これらの塩基配列の相違は, pDCCP1 の推定アミノ酸では以下に示した部分が違っていた (図 5-6).

1. 78 aa と 79 aa 間に 1 残基 (Ala) の挿入.
2. 81 aa (Ser) が Thr に置換.
3. 81 aa と 82 aa 間に 1 残基 (Ala) の挿入.
4. 193 aa (Ser) が Gln に置換.
5. 194 aa (Asn) が Tyr に置換.
6. 410 aa (Lys) 以降, コドンが 1 塩基分フレームシフト (8 残基の置換と 8 残基の欠失).

単離された 1306 bp の cDNA 断片と pDCCP1 のアミノ酸配列レベルのホモロジーは 94.9%であった. この cDNA クローンを pT7Blue-DCCP と名づけた.

pT7Blue-DCCP の推定アミノ酸配列を, 他の植物由来のシステインプロテイナーゼ遺伝子 [カーネーションシステインプロテイナーゼ遺伝子 pDCCP1 (Jones and Woodson 1995) , イネ oryzain-A 遺伝子 RICOZA, oryzain-B 遺伝子 RICOZB, oryzain-C 遺伝子 RICOZC (Watanabe et al. 1991), daylily (*Hemerocallis × hybrida*) システインプロテイナーゼ遺伝子 SEN102 (Sen102) (Valpuesta 1995)] の推定アミノ酸配列と比較した (図 5-7). pT7Blue-DCCP の推定アミノ酸配列では, 194 aa Tyr を除き, これらのシステインプロテイナーゼ遺伝子に強力に保存されているアミノ酸残基は保存されていた.

pT7Blue-DCCP の cDNA 断片の全配列 (1306 bp) を用いて DIG 標識 DNA プローブを作成し, ノザン解析を行った (図 5-3, 3 段目). エチレン無処理区では, 微量のシステインプロテイナーゼ遺伝子 mRNA の蓄積が両系統の花弁で

```

pT7Blue-DCCP 1: -----Q-----A----- 3
pDCCP1 1: -----Q-----A----- 3
Ricoza 1: ----MRISMALAAALLLLLLSLA--AADMSIVSY----GERS--E--- 33
Ricozb 1: ----M-AARAAAAAFLLLLIVVGHRSMSIISYN-AEHGARGLEEGPT 43
Ricozc 1: MAHRRRIILLLAVAAVAATSAAAAASSGFDDSNPIRSVTDHAASALESTVI 50
Sen102 1: -----MAKPKFIALALVALSF-LSIA-QSIP-FTEKDLASE-- 33

pT7Blue-DCCP 4: ----HL-QSWLVKHKRNY-NA-LGEKEKRFARFDNLEFIDQHNNNNNG 45
pDCCP1 4: ----HL-QSWLVKHKRNY-NA-LGEKEKRFARFDNLEFIDQHNNNNNG 45
Ricoza 34: E-EARRLYAEWKAHEGKSY-NA-VGEEERRRYAARFDNLRIDEHNAADA 80
Ricozb 44: EAEARAAYDLWLAENGGSPNALGGEHERRFLVFWDNLKFVLAHNARADE 93
Ricozc 51: AALGR-TRGALRFARFAVRHGKRYGDAAEVQRRF-RIFSESLELVRS-TN 97
Sen102 34: DSL----W-NL-YEKWRTHHTVA-RDLDEKNRRF-NVFKENVKFIHEFNQ 75

pT7Blue-DCCP 46: GGGGEFELGLNKFADLTNDEFRRRIYFG--VKRPEKAAETAVKSDRYAVKE 93
pDCCP1 46: GGGGEFELGLNKFADLTNDEFRRRIYFG--VKRPEK-AES-VKSDRYAVKE 91
Ricoza 81: CVHS-FRLGLNRFADLTNEEYRDTYLG--LRNKPR-RERKV-SDRYLAAD 125
Ricozb 94: C--GGFRLGMNRFADLTNEEFRATFLG--AKVAERS--RAA-GERYRHDG 136
Ricozc 98: RRGLPYRLGINRFADMSWEEFQASRLGA-AQNC-SA-TLAGNH-R-M-RD 141
Sen102 76: KKDAPYKLALNKFGIMTNOEFRSKYAGSKIQHRSQRGIQKNTGSFMYEN 125

pT7Blue-DCCP 94: GDELP-ESVDWRKKGAVSHVKDQGCGSCWAFSAIGAVEGINKIVTGDLI 142
pDCCP1 92: GDELP-ESVDWRKKGAVSHVKDQGCGSCWAFSAIGAVEGINKIVTGDLI 140
Ricoza 126: NEALP-ESVDWRTKGAVAEIKDQGGCGSCWAFSAIAAVEDINQIVTGDLI 174
Ricozb 137: VEELP-ESVDWREKGAAPVKNQGGCGSCWAFSAVSTVBSINQLVTGEMI 185
Ricozc 142: APALPETK-DWREDETVSPVKDQGHCGSCWPFSTTGLEARYTQATGPPV 190
Sen102 126: VGSIPAASIDWRAKGAVTGVKDQGCGSCWAFSTIASVEGINQIKTGETV 175

pT7Blue-DCCP 143: TLSEQELVDCDT-SYNSGCDGGLMDYAFRFIINNGGIDTDKDYPYKATDG 191
pDCCP1 141: TLSEQELVDCDT-SYNSGCDGGLMDYAFRFIINNGGIDTDKDYPYKATDG 189
Ricoza 175: SLSEQELVDCDT-SYNEGCGNGLMDYAFDFIINNGGIDTDDYPYKGDDE 223
Ricozb 186: TLSEQELVECSNNGQNSGCGNGLMADAFDFIINNGGIDTDDYPYKAVDG 235
Ricozc 191: SLSEQQLADCATRYNNEFGSGGLPSQAFEYTKYNGGLDTEAYPYTGUNG 240
Sen102 176: SLSEQELVDCDTSYNE-GCGNGLMDYAFEFIQ-KNGITTEDSYPYAEQDG 223

```

図 5-7(全2ページ). 本研究で単離されたシステインプロテイナーゼ遺伝子 (pT7Blue-DCCP) と, 他の植物由来のシステインプロテイナーゼ遺伝子の推定アミノ酸配列の比較.

単離されたpT7Blue-DCCPの推定アミノ酸配列を, カーネーションシステインプロテイナーゼ遺伝子pDCCP1 (pDCCP1) (Jones and Woodson 1995), イネ oryzain-A遺伝子 RICOZA (Ricoza), oryzain-B遺伝子 RICOZB (Ricozb), oryzain-C遺伝子 RICOZC (Ricozc) (Watanabe et al. 1991), daylily (*Hemerocallis × hybrida*) システインプロテイナーゼ遺伝子 SEN102 (Sen102) (Valpuesta 1995) の各推定アミノ酸配列と比較した. 文字が反転しているアミノ酸残基は, 比較した6種類のシステインプロテイナーゼのうち4種類の配列において一致していることを示している. 赤印はpT7Blue-DCCPとpDCCP1の間で相違の認められたアミノ酸残基を示す.

図 5-7(続き).

```

pT7Blue-DCCP 192: SCDQYRKNKVVVTIDGLEDPANNEKALQKAV-AHQPVRLAIEAGGRDFQ 240
pDCCP1 190: SCDSNRKNAKVVVTIDGLEDPANNEKALQKAV-AHQPVRLAIEAGGRDFQ 238
Ricoza 224: RCDVNRKNAKVVVTIDSYEDVTPNSEETSLOKAV-RNQPVSVVAIEAGGRAFQ 272
Ricozb 236: KCDINRENKVVVSTIDGFEDVFPQNDKSLQKAV-AHQPVSVVAIEAGGREFQ 284
Ricozc 241: ICHYKPENAGVKVLDS-VNITLVAEDELKNAVGLVRPVSVAEQVIN-GFR 288
Sen102 224: TCASLLNSPVVSTIDGHQDVFANNENALMQAVA-NQPI SVSTEASCYGFQ 272

pT7Blue-DCCP 241: LYKSGVFTG-SCGT---SLDHGVVAVGYGTTDDGKDYWIVRNSWGDDWGE 286
pDCCP1 239: LYKSGVFTG-SCGT---SLDHGVVAVGYGTTDDGKDYWIVRNSWGDDWGE 284
Ricoza 273: LYSSGIFFTG-KCGT---ALDHGVAAVGYG-TENGGDYWIVRNSWGKSWG 317
Ricozb 285: LYHSGVFTG-RCGT---SLDHGVVAVGYG-TDNGKDYWIVRNSWGPKWGE 329
Ricozc 289: MYKSGVYVTSDHCGTSPMDVNHAVLAVGYGVE-NGVPYWLKNSWGADWGD 337
Sen102 273: FYSEGVFT-GRCGTE-LD--HGVAIVGYGATRDGTYWIKNSWGEWGE 318

pT7Blue-DCCP 287: DGYIRMERNTESKSGKCGIAIEPSYFVKTSPPNPNPG---PSFP-SFPF 331
pDCCP1 285: DGYIRMERNTESKSGKCGIAIEPSYFVKTSPPNPNPG---PSFP-SFPF 329
Ricoza 318: SGYVRMERNIKASSGKCGIAIEPSYPLKNGENPPNPG---FTFP-SFTF 362
Ricozb 330: SGYVRMERNINVTGKCGIAMMASYPTKSGANPKPSPTPTPTPTPTPT 379
Ricozc 338: NGYFTMFMG---K-NMCGIATCASYPIVA----- 362
Sen102 319: SGYIRMORGISDKRGKCGIAMMASYPIKTSANPKNSSTRDEL----- 360

pT7Blue-DCCP 332: APKVVCDSYSSCPSATTCCCVYEYGPYCYMWGCCPLEAASCCDDSSCCP 381
pDCCP1 330: APKVVCDSYSSCPSATTCCCVYEYGPYCYMWGCCPLEAASCCDDSSCCP 379
Ricoza 363: PP-TVCDNYTTPDSTTCCCIYEGKYCYAWGCCPLEGATCCDDHYSCCP 411
Ricozb 380: APDHVCDNDFSCFAGSTCCCAFGRNLQLVWGCCPVEGATCCCKDHASCCP 429
Ricozc 363: ----- 363
Sen102 361: ----- 361

pT7Blue-DCCP 382: HDYFVCNTQQGTCSKSKNNPFTVKALKRTP--ATLHANFGWFGLKEDIIV 429
pDCCP1 380: HDYFVCNTQQGTCSKSKNNPFTVKALKRTPPLHSTLISG-GFKDLKKTSS- 427
Ricoza 412: HEYFICNVQQGTCLMAKDSPLAVKALKRTPAKPNLSFLFGNGK-KSSA-- 458
Ricozb 430: PDYFVCNTRAGTCSASKNSPLSVKALKRTPAKLNTHLIDNM----- 471
Ricozc 363: ----- 363
Sen102 361: ----- 361

```

(終り)

認められた。エチレン処理区では、sACO1 形質転換系統，非形質転換系統のいずれの花弁においても転写物の蓄積量が大幅に増加した。蓄積量は，2つの系統間でほぼ等しかった。

5.4. 考察

sACO1 形質転換系統の切花は、自然条件では、花卉における自己触媒的なエチレン生成が抑制され、その結果、花卉のインローリングが起こらないことが分かった。そこで本章では、*sACO1* 形質転換系統の花弁の、外部から処理されたエチレンに対する反応性（インローリング、エチレン生成、エチレン誘導型の遺伝子の mRNA の蓄積量の変化）について解析を行った。

sACO1 形質転換系統の花弁では、外生エチレンの存在下で、非形質転換系統と同様にインローリング現象が誘導されたことから、インローリング現象についてエチレンに対する反応性は失われていないものと考えられた。一方、エチレン生成量については、非形質転換体では外生エチレン存在下で大幅なエチレン生成量の増加が見られたのに対し、*sACO1* 形質転換系統の花弁では、外生エチレン処理によるエチレン生成の増加はほとんど起こらなかった。ノザン解析の結果、*sACO1* 形質転換系統の花弁では、外生エチレン存在下で ACC 酸化酵素遺伝子 mRNA と ACC 合成酵素遺伝子の mRNA の蓄積がほとんど認められなかったことから、*sACO1* 形質転換系統の花弁では、外生エチレンの存在下でも、導入遺伝子の影響によってこれらの遺伝子の発現は抑制されており、その結果、エチレン生成の増加が起こらなかったものと考えられた。

カーネーション花弁では、ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子に加え、システインプロテイナーゼ遺伝子の発現が、自然老化時、受粉による老化時、また、外部から処理されたエチレンによって誘導されることが知られている (Jones and Woodson 1995)。システインプロテイナーゼは、花卉の萎れに際して起こる花卉細胞の崩壊を誘導する加水分解酵素の 1 つとして働いているものと考えられている (Panavas et al. 1998)。そこで本研究では、カーネーション花弁の萎れの遺伝子レベルの 1 つの指標として、システインプロテイナーゼ遺伝子 mRNA の蓄積パターンを解析した。

ノザン解析のためのプローブを得るために、品種 Nora から、pDCCP1 (Jones and Woodson 1995) に相当するシステインプロテイナーゼ遺伝子 cDNA を単離を試みた。pT7Blue-DCCP として単離された cDNA は、pDCCP1 の cDNA に対して、合計 8 塩基の挿入、1 塩基の欠落、2 塩基の置換が認められた。この塩基配列の違いは、推定アミノ酸配列では、2 残基の挿入と 3 残基の置換、1 塩基分のコドンのフレームシフトに伴う 8 残基の置換と 8 残基の欠失に相当し、アミノ酸配列レベルのホモロジーは 94.9%であった。しかし、194 aa Tyr を除き、植物由来のシステインプロテイナーゼに強力に保存されているアミノ酸残基は保存されていた。単離された pT7Blue-DCCP が pDCCP1 と同じ遺伝子にコードされているものであるかについては、さらに解析を行う必要があると考えられた。また、今回、システインプロテイナーゼ cDNA を単離したカーネーションの品種は Nora であり、pDCCP1 が品種 White Sim から単離されたことから考えると、これらの差違は品種間差を示している可能性もある。しかし、この cDNA 断片は塩基配列レベルで pDCCP1 と 99%以上のホモロジーがあったことから、システインプロテイナーゼ遺伝子 mRNA を検出するためのプローブとして使用できるものと判断し、この cDNA 断片の全鎖長をプローブにしてノザン解析を行った。

システインプロテイナーゼ遺伝子 mRNA は、エチレン無処理の花弁において、低レベルの蓄積が両系統において見られた。これは、pDCCP1 をプローブに用いた Jones and Woodson (1995) による解析でも認められている。エチレン処理花弁についてみると、システインプロテイナーゼ遺伝子 mRNA は、*sACO1* 形質転換系統花弁では、非形質転換体と同様、エチレン処理によって蓄積量が大幅に増加した。このことから、エチレンによるシステインプロテイナーゼ遺伝子の発現誘導は、ACC 酸化酵素遺伝子、ACC 合成酵素遺伝子とは異なり、導入遺伝子の影響を受けていないものと考えられた。

カーネーション花弁では、花弁のインローリング、エチレン生成量の増加、ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子の発現、システインプロテイナー

ゼ遺伝子の発現は，自然条件または受粉による老化時，外生エチレンによって同時に誘導される現象であり，通常のカーネーション花卉では分離することが不可能である．*ACO1* 形質転換系統の花弁では，これらの現象が，エチレンに反応して誘導されるもの（花弁インローリングとシステインプロテイナーゼ遺伝子の発現）と誘導されないもの（エチレン生合成系遺伝子の発現とエチレン生成）が明確に分離されたことから，これらの現象は，老化時のカーネーション花卉において，別々に制御されているものと考えられた．

第6章. 総合考察

遺伝子組換によってエチレン低生産性,あるいは,非感受性に改変された花きの作出は,花きの鮮度保持技術の1つになる可能性があると同時に,花のエチレン生成と作用の制御機構を解明して新たな鮮度保持技術を開発するための有効な研究材料として極めて重要であると考えられる.本研究では,エチレン誘導型の老化を示す花きのなかでも特にエチレンによる花の老化が顕著であると同時に,花き産業のなかでも切花として重要な品目の1つであるカーネーションを材料に,エチレン低生産性形質転換体を作成し,その性質を解析することを目的とした.

ACC 合成酵素遺伝子 *DC-ACS1* (Park et al. 1992) と ACC 酸化酵素遺伝子 *DC-ACO1* (Wang and Woodson 1991, Hibi et al. in preparation) は,自然老化時,受粉による老化時,外生エチレンによる老化時に花卉において大量に発現することから,花卉における自己触媒的なエチレン生成に関与しているものと考えられている (Woodson et al. 1992, ten Have et al. 1994).そこで,本研究ではエチレン低生産性カーネーション形質転換体を作成するためにこれらの遺伝子の発現抑制に着目した.品種 Nora から単離された ACC 合成酵素遺伝子 cDNA の翻訳領域と *DC-ACS1* cDNA (CARACC3) の翻訳領域とのホモロジーは 99.2%,また,単離された ACC 酸化酵素遺伝子 cDNA の翻訳領域と pSR120 の翻訳領域とのホモロジーは 99.9%と,いずれも老化時の花卉において大量に発現するこれらのエチレン生合成系遺伝子と 99%以上のホモロジーが認められた.したがってアンチセンス遺伝子またはセンス遺伝子の手法による内生遺伝子の発現抑制には,導入遺伝子として十分に機能するものと考えられた.

センス ACC 酸化酵素遺伝子の導入された *sACO1* 形質転換系統の切花では,通常のカーネーション切花に見られるインローリング現象が全く見られなかった.*sACO1* 形質転換系統の満開後の花においては,エチレン生成の増加は

全く見られなかったことから、このことがインローリング現象の消失の原因であると考えられた。sACO1 形質転換系統の切花では満開 11 日後以降、花卉の先端部から乾燥と色褪せが開始した。これは、エチレンの作用阻害剤である STS 処理を行った切花 (Veen 1979) や、アンチセンス ACC 酸化酵素遺伝子の導入によって花卉における自己触媒的なエチレン生成が抑制されたカーネーション形質転換体の切花 (Savin et al. 1995)、シロイヌナズナエチレン受容体遺伝子の優性突然変異を含む対立遺伝子 (*etr1-1*) の導入によってエチレン非感受性になったカーネーション形質転換体 (Bovy et al. 1999) でも観察されており、エチレンの作用または生合成が抑制された場合に観察されるエチレン非依存的な老化現象であると考えられた。

花卉のインローリング現象が消失したことによって、sACO1 形質転換系統の切花の観賞に堪える期間は非形質転換体切花の約 2 倍になった。これは、現在鮮度保持剤として使用されている STS を処理した切花の鮮度に匹敵する効果であり、センス ACC 酸化酵素遺伝子の導入によって得られた形質転換体の切花の延命効果が、技術的には、現在の切花の鮮度保持の目標レベルに達したことを示している。本研究において、対照区として用いた非形質転換体 (品種 Nora) の切花は、発根した腋芽を栽培して得られた植物体から採取したものである。in vitro の培養系から再生した植物体から採取した切花の寿命は、通常の栄養繁殖によって増殖させた植物体から採取した切花よりも花の寿命が短くなる傾向があることが報告されている (Bovy et al. 1999)。実験に用いた sACO1 形質転換系統の植物体は、外見上非形質転換体と違いは認められなかったものの、馴化処理から 4 ヶ月～16 ヶ月経過した形質転換当代 (T_0 世代) の植物体であり、in vitro のシュート培養が馴化処理後の生育に影響を及ぼしている可能性がある。品種 Nora は花粉が不稔であるために、sACO1 形質転換系統を種子繁殖することは困難であるが、挿し芽などの栄養繁殖によって長期間にわたって栽培していく過程で、完全に馴化された正常な植物体に再生することによって、本系統の切花の観賞に堪える期間はさらに延長する可能性が

考えられる。

sACO1 形質転換系統の切花において、花のエチレン生成と花卉のインローリングが起こらなかったのは、導入遺伝子の影響によって ACC 酸化酵素遺伝子 (*DC-ACO1*) と ACC 合成酵素遺伝子 (*DC-ACS1*) の各 mRNA の蓄積が抑制され、その結果 ACC 酸化酵素、ACC 合成酵素の活性の増加が抑制されたことによるものであることが分かった。この結果から、エチレン生合成系遺伝子 (*DC-ACO1*, *DC-ACS1*) の発現の誘導が、自己触媒的なエチレン生合成の増加とそれによる花卉のインローリングと萎れを誘導していること (Woodson et al. 1992) が再確認された。

sACO1 形質転換系統の作出に用いたコンストラクト pMLH2113-DCACO(OR+)では、センス ACC 酸化酵素遺伝子が、高発現プロモーターである EI2- Ω の下流に挿入されている。EI2- Ω は構成的な高発現を目的としたプロモーターであり、タバコの GUS 形質転換体において、通常の CaMV35S プロモーターの 10 倍以上の GUS 遺伝子を発現する能力があることが確認されている (Mitsuhashi et al. 1996)。一方、タバコにセンス ACC 酸化酵素遺伝子を EI2- Ω の制御下に導入した場合、ACC を添加した TMV 感染リーフディスクで ACC 酸化酵素遺伝子 mRNA の蓄積とエチレン生成の増加が高まった形質転換体と同時に、これらの増加が抑制された形質転換体を得られており (Ohtsubo et al. 1999)、EI2- Ω が導入遺伝子の高発現だけではなくコサプレッションを誘導する可能性があることが示唆されている。したがって、*sACO1* 形質転換系統についても、EI2- Ω が、導入されたセンス ACC 酸化酵素遺伝子と内生 ACC 酸化酵素遺伝子の発現が抑えられるコサプレッションを引き起こしている可能性が考えられた。

カーネーション花卉では、自然老化時、受粉による老化時、また、外生エチレンによって、エチレンが自己触媒的に生成する。自己触媒的なエチレン生成が起こる時には、ACC 合成酵素遺伝子と ACC 酸化酵素遺伝子が同時に発現し、これらの mRNA の蓄積パターンは一致している。Woodson et al. (1992)

は、ACC 合成酵素遺伝子 (*DC-ACS1*) と ACC 酸化酵素遺伝子 (*DC-ACO1*) の各 mRNA はいずれも、花卉において、外部から処理されたエチレンに反応して蓄積量が増加すること、また、エチレンの作用阻害剤である 2,5-norbornadiene を花に処理すると、自然老化時にみられるこれら遺伝子の mRNA の蓄積が阻害されることを明らかにしている。本研究においても、花卉において、ACC 酸化酵素遺伝子と ACC 合成酵素遺伝子の mRNA の蓄積の変化が同時に見られた。つまり、非形質転換系統の花弁では、自然老化時と外生エチレン存在下で両方の mRNA の蓄積量が増加し、*sACO1* 形質転換系統では、いずれの場合も両方の mRNA の蓄積が抑制されていた。興味深いことに、*sACO1* 形質転換系統の花弁では、外生エチレン処理下においても、ACC 合成酵素遺伝子 mRNA の蓄積は抑制されたままであった。これらのことから、カーネーション花弁には、ACC 合成酵素遺伝子が発現するには、同時に ACC 酸化酵素遺伝子が発現する必要がある、また逆に、ACC 酸化酵素遺伝子の発現が ACC 合成酵素遺伝子の発現を必要とする、何らかの相互依存的な機構が存在する可能性が考えられる。

カーネーション花弁の老化には、エチレン生成、言い換えると ACC 合成酵素遺伝子、ACC 酸化酵素遺伝子の発現、あるいはこれらの遺伝子の mRNA の蓄積と、インローリングと萎れに見られる形態的な変化が起こる。この 2 つの現象は、自然条件での老化、受粉による老化、外部から処理されたエチレンによる老化が起こる時の花弁では同時に起こり、お互いに分離することが不可能であった。*sACO1* 形質転換系統の花弁では、自然条件での切花の老化時のエチレン生成が全く起こらなかった。また、外生エチレン存在下でもエチレン生成の増加は抑制されていた。いずれの場合も、ACC 酸化酵素遺伝子、ACC 合成酵素遺伝子の mRNA の蓄積はほとんど増加しなかった。一方、花弁のインローリングについては自然条件では全く起こらなかったのに対し、外生エチレン存在下では誘導され、さらにシステインプロテイナーゼ遺伝子 mRNA の蓄積量は、外生エチレン存在下で非形質転換系統と同様に増加した。

つまり、通常のカーネーション切花の老化時には分離できなかったエチレン生成の誘導と花卉のインローリングの誘導の2つの現象が、*ACO1* 形質転換系統では外生エチレンに対する反応性の違いから分離した現象として現れた。システインプロテイナーゼ遺伝子は、ACC 合成酵素遺伝子、ACC 酸化酵素遺伝子と同様に、自然条件または受粉による老化時、外生エチレンによる老化時に発現が誘導されることが知られている (Jones and Woodson 1995)。花卉の老化時には、システインプロテイナーゼは、花卉老化時に起こる細胞死を引き起こす加水分解酵素の1つとして働いているものと考えられている (Panavas et al. 1998, 1999)。言い換えると、システインプロテイナーゼはカーネーション花卉のインローリングと萎れの直接的な原因として働く分解酵素群の1つであると考えられる。本研究の結果、カーネーション花卉においては、エチレンによって誘導されるインローリング現象、システインプロテイナーゼ遺伝子の発現は、エチレン生合成系遺伝子である ACC 合成酵素遺伝子と、ACC 酸化酵素遺伝子の発現とは独立して制御されていることが明らかにされた。

以上のことから、カーネーション花卉の老化に関与するエチレンのシグナル伝達系路のモデル (図 6-1) が考えられた。花卉における自己触媒的なエチレン生成は、エチレン生合成系遺伝子 (ACC 合成酵素遺伝子、ACC 酸化酵素遺伝子) の発現によるエチレン生合成系酵素活性の増加を介して誘導される。一方、花卉のインローリングと萎れはシステインプロテイナーゼ遺伝子など、細胞の崩壊を引き起こす分解活性に関与する遺伝子の発現誘導を介して起こるものと考えられる。カーネーションでは、現在までに3つのエチレン受容体遺伝子が単離されている (*DC-ERS1*, *DC-ERS2*, *DC-ETR1*)。 *DC-ERS1* (Charng et al. 1997) についてはゲノム DNA として単離され、その後花卉由来 mRNA から cDNA が単離されたが、この遺伝子の mRNA は老化花卉においてほとんど蓄積していない。 *DC-ERS2* (Shibuya et al. 1998) については、満開時の花卉においてエチレン生成の増加が開始する以前に mRNA が蓄積しており、花卉

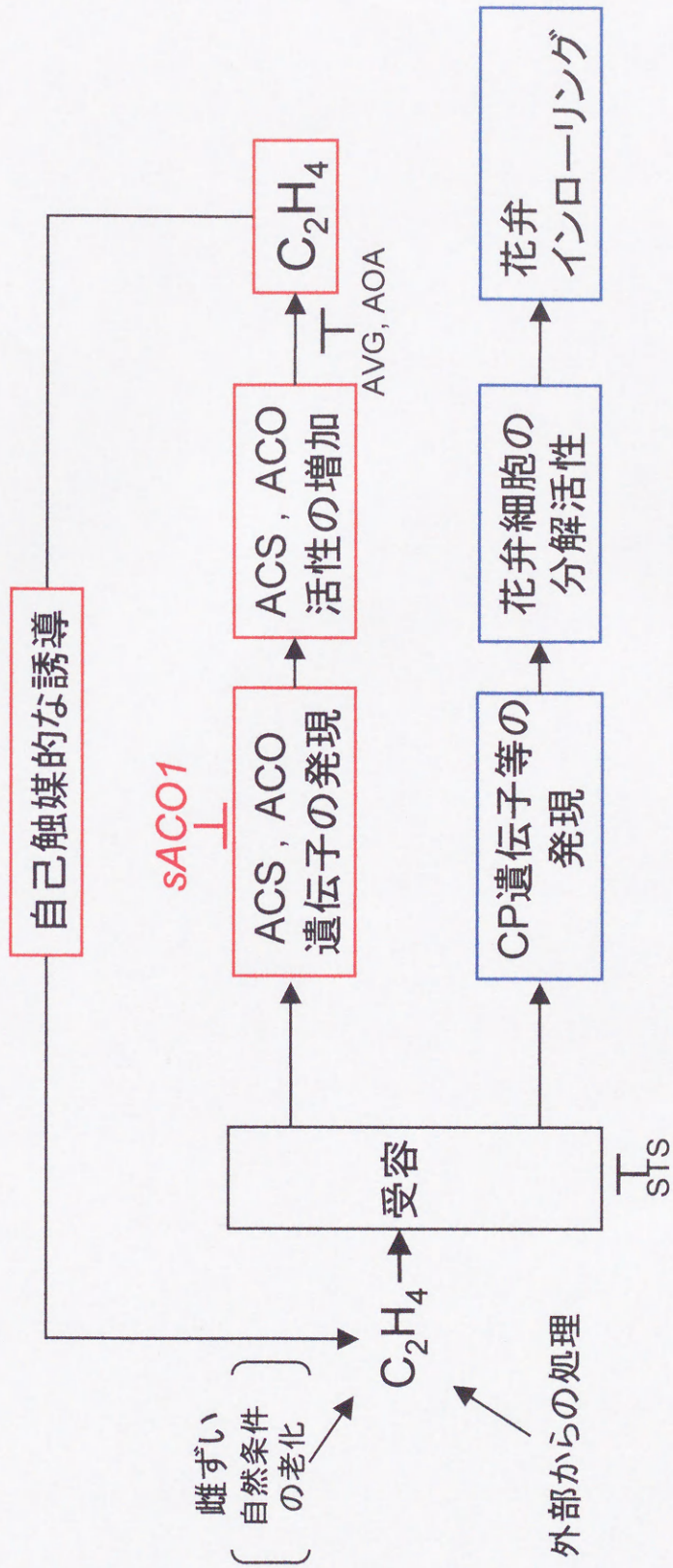


図 6-1. カーネーション花弁老化に関するエチレンシグナル伝達系のモデル

sACO1形質転換系統の花弁では抑制されている部分を赤色で示した。

の老化の進行に伴ってその蓄積量が減少することが確認されている (渋谷ら 1999). *DC-ETR1* については cDNA クローンとしてカーネーションの葉から単離されたものである (永田ら 私信) が, 花卉由来の mRNA からは RT-PCR による検出が不可能であったことから, 花卉では発現していないものと考えられている. したがって, カーネーション花卉において発現するエチレン受容体遺伝子は 1 つ (*DC-ERS2*) であると考えられている (Shibuya and Waki, in preparation). 一方, カーネーション花卉のエチレンシグナル伝達系に關与する他の遺伝子としては, 現在までにアラビドプシスのエチレンシグナル伝達系成分の遺伝子に相同性のある遺伝子が cDNA クローンとして 3 つ単離されている (*DC-CTR1*, *DC-CTR2*, *DC-EIN3*). *DC-CTR1* と *DC-CTR2* は同じ段階のコンポーネントをコードしているものと考えられている (Shibuya and Waki unpublished). この事実から, 花卉老化時に見られる自己触媒的なエチレン生成の誘導と, 花卉のインローリングと萎れの誘導は, 同じ受容体で受け取られたエチレンのシグナルが, コンポーネントが使い分けられた異なるシグナル伝達経路によって伝達されることによって, 独立して制御されている可能性が考えられる. *sACO1* 形質転換系統の解析によって, これらの現象が生理学的に分離した現象であることが明確に示された. 今後, エチレンの受容体遺伝子, シグナル伝達系に關与する遺伝子の発現が抑制された形質転換体を作成し, 解析を行うことによって, 花卉老化時にエチレンによって誘導される現象が異なるシグナル伝達系路によって制御されている可能性を証明することができるものと期待される.

本研究は, エチレンの生合成系, 作用系の遺伝子の発現が抑制された形質転換体が, 花きの鮮度保持技術の 1 つとして, また, 花卉老化時のエチレンの生合成と作用の制御機構を解明するための有効な研究材料として利用できる可能性があることを示した.

摘要

エチレンは植物の成長と分化の過程を多岐にわたり調節する植物ホルモンであり、花の老化においても重要な役割を果たしている。エチレンは L-メチオニンから、S-アデノシル-L-メチオニン (Ado-Met)、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) を経て生合成される。エチレンの生合成は ACC 合成酵素 (ACS) と ACC 酸化酵素 (ACO) が触媒する。エチレン誘導型の老化を示す花きでは、花の品質を維持するために、エチレンの生成あるいは作用を人為的に抑制する技術の開発が必要である。現在、花きの鮮度保持剤として広く用いられているチオ硫酸銀錯イオン (STS) は、主成分である銀イオンによる環境汚染が危惧されていることから、代替鮮度保持技術の開発が待望されている。エチレン低生産性あるいはエチレン非感受性の形質転換植物の作出は、鮮度保持技術開発の一環として、また、エチレン誘導型の老化を示す花きにおける花のエチレンの生合成と作用の制御機構を解析するうえで重要な研究材料である。カーネーション花卉の老化は、花卉において生成されるエチレンの作用によるものである。花卉におけるエチレン生成の増加は、雌ざいにおいて生成したエチレン、外部から処理されたエチレンによって自己触媒的に起き、これにはエチレンによる ACS 遺伝子 (*DC-ACS1*) と ACO 遺伝子 (*DC-ACO1*) の発現誘導が関与しているものと考えられている。本論文では、カーネーション花卉において老化時に発現が誘導されるエチレン生合成系遺伝子を導入することにより、エチレン低生産性のカーネーション形質転換体を作成し、その性質を解析することを目的とした。

1. エチレン低生産性カーネーション形質転換体の作出

カーネーション (品種 Nora) の老化花卉から、カーネーション花卉老化時に発現する ACS 遺伝子と ACO 遺伝子の各 cDNA の翻訳領域の単離を行った。単離された cDNA 翻訳領域は、それぞれ既知の ACS 遺伝子 *DC-ACS1* の cDNA、ACO 遺伝子 *DC-ACO1* の cDNA と 99%以上のホモロジーが認められた。単離された cDNA 翻訳領域をセンス・アンチセンス方向に導入するためのコンストラクトをバイナリーベクター上に構築した [pIG121-DCACS(OR+), pIG121-DCACS(OR-), pIG121-DCACO(OR+), pIG121-DCACO(OR-), pMLH2113-DCACO(OR+)]。これらのコンストラクトを用いた形質転換操作の結果、合計 7 系統のハイグロマイシン抵抗性の形質転換体を得た。コンストラクト pMLH2113-DCACO(OR+)から得られた形質転換系統 *sACO1* について、最低 5 コピーの導入遺伝子 (センス ACC 酸化酵素導入遺伝子) の存在を確認した。

2. *sACO1* 形質転換系統切花の自然条件における老化現象

sACO1 形質転換系統の切花では、通常のカerneーション花卉の老化時に見られるインローリング現象が消失していた。切花の観賞に堪える期間は、非形質転換系統の約 2 倍であった。*sACO1* 形質転換系統の花ではエチレン生成はほとんど認められなかった。満開後の花卉の ACO 活性は非形質転換系統の 5%、ACS 活性は 30%、ACC 含量は 30%に抑えられていた。*sACO1* 形質転換系統の花弁では ACO 遺伝子と ACS 遺伝子の両方の mRNA の蓄積が見られなかった。これらのことから、*sACO1* 形質転換系統では、センス ACO 導入遺伝子の影響によって、花卉における内生 ACO 遺伝子と ACS 遺伝子の発現が抑制されたために、ACO、ACS の活性の増加が抑制され、自己触媒的なエチレン生成が起こらず、花卉のインローリングが起こらなかったものと考えられた。

3. *sACO1* 形質転換系統花弁の外生エチレンに対する反応

満開の花から花弁を採取し、エチレン処理を行った ($10 \mu\text{l l}^{-1}$, 18時間). *sACO1* 形質転換系統の花弁は、外生エチレンの存在下で非形質転換系統の花弁と同様インローリングが認められた一方で、エチレン生成量の増加はほとんど起こらなかった。また、ACO 遺伝子と ACS 遺伝子の両方の mRNA の蓄積が見られなかった。外生エチレン存在下でもなお、ACS 遺伝子 mRNA の蓄積がみられなかったことから、カーネーション花弁では、ACS 遺伝子の発現に ACO 遺伝子の発現を必要とする何らかの機構があるものと考えられた。エチレン生合成系遺伝子と同様、外生エチレンによって誘導されることが知られているシステインプロテイナーゼ遺伝子は、*sACO1* 形質転換系統の花弁において、非形質転換系統と同様、発現が誘導された。これらのことから、通常カーネーション花弁の老化時に同時に誘導される現象 (エチレン生合成系遺伝子 mRNA の蓄積とエチレン生成; システインプロテイナーゼ遺伝子 mRNA の蓄積と花弁のインローリング) は独立して制御されているものと考えられた。

まとめ

sACO1 形質転換系統の切花は、観賞に堪える期間が非形質転換体の 2 倍に延び、センス ACO 遺伝子の導入によって得られた形質転換体の切花の延命効果が現在の切花の鮮度保持の目標レベルに達したことが示された。

sACO1 形質転換系統の切花において、花のエチレン生成と花弁のインローリングが起こらなかったのは、花弁における ACS 遺伝子 (*DC-ACS1*) と ACO 遺伝子 (*DC-ACO1*) の各 mRNA の蓄積が抑制され、ACS 活性と ACO の活性の増加が抑制されたことによるものであることが分かった。*sACO1* 形質転換系統では、E12- Ω プロモーターが、センス ACO 導入遺伝子と内生 ACO 遺伝子の発現が抑えられるコサプレッションを引き起こしている可能性が考えられた。

sACO1 形質転換系統の解析から、カーネーション花弁には、ACS 遺伝子と

ACO 遺伝子の発現制御に何らかの相互依存的な機構が存在する可能性が考えられた。また、カーネーション花卉における自己触媒的なエチレン生成と、花卉のインローリング、萎れが、異なるエチレンのシグナル伝達系路を介して独立して制御されることを示す生理学的なモデルが考えられた。花卉のインローリングと萎れの誘導は、同じ受容体で受け取られたエチレンのシグナルが、コンポーネントが使い分けられた異なるシグナル伝達経路によって伝達されることによって、独立して制御されている可能性が考えられる。

本研究は、エチレン生合成系、作用系の遺伝子の発現が抑制された形質転換体が、花きの鮮度保持技術の 1 つとして、また、花卉老化時のエチレン生合成と作用の制御機構を解明するための有効な研究材料として利用できる可能性があることを示した。

謝辞

本論文の作成にあたり，東北大学大学院農学研究科環境適応生物工学研究室教授 羽柴輝良博士，同研究室助教授 佐藤茂博士には，終始御懇切なる御指導と御鞭撻，並びに本論文の御稿閲を賜りました．同研究室助手 吉岡俊人博士には適切な御指導と御助言を賜りました．農林水産省生物資源研究所分子遺伝部上席研究官 大橋祐子博士，同農林水産技術会議事務局研究調査官 望月淳博士（元農林水産省東北農業試験場水田利用部主任研究官）にはバイナリーベクターpMLH2113-GUS を分譲頂きました．名古屋大学大学院生命農学研究科教授 中村研三博士には，バイナリーベクターpIG121-Hm を分譲頂きました．農林水産省生物資源研究所分子遺伝部上席研究官 岩井孝尚博士，宮城県農業センターバイオテクノロジー開発部主任研究員 本藏良三博士には，カーネーションの形質転換系および培養系について御懇切なる御指導を頂きました．ここに記して，深く感謝の意を表します．

引用文献

- Abeles, F.B., Morgan, P.W. and Saltveit, M.E., Jr. (1992) Ethylene in Plant Biology. 2 nd ed. Academic Press, Inc., San Diego, CA, U.S.A.
- Aida, R., Yoshida, T., Ichimura, K., Goto, R. and Shibata, M. (1998) Extension of flower longevity in transgenic torenia plants incorporating ACC oxidase transgene. *Plant Science* 138: 91-101.
- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. and Ecker, J.R. (1999) *EIN2*, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 284: 2148-2152.
- An, G., Ebert, P.R., Mitra, A. and Ha, S.B. (1988) Binary vectors. In Plant molecular biology manual. Edited by Gelvin, S.B. and Schilperoort, R.A. pp. A3/1-A3/19. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Ayub, R., Guis, M., Amor, M.B., Gillot, L., Roustan, J-P, Latché, A., Bouzayen, M. and Pech, J-C. (1996) Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nat. Biotech.* 14: 2-5.
- Baker, J.E., Wang, C.Y., Liberman, M. and Hardenburg, R.(1977) Delay of senescence in carnations by a rhizobitoxine analog and sodium benzoate. *HortScience* 12: 38-39.
- Beyer, E., Jr. (1976) A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol.* 58: 268-271.
- Bleecker, A.B. (1999) Ethylene perception and signaling: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* 4: 269-274.
- Bleecker, A.B., Estelle, M.A., Somerville, C. and Kende, H. (1988) Insensitivity of ethylene conferred by a dominant mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 241: 1086-1089.

- Borochoy, A. and Woodson, W.R. (1989) Physiology and biochemistry of flower petal senescence. *Hort. Rev.* 11: 15-43.
- Bovy, A.G., Angenent, G.C., Dons, H.J.M. and van Altvorst, A-C. (1999) Heterologous expression of the *Arabidopsis etr1-1* allele inhibits the senescence of carnation flowers. *Mol. Breed.* 5: 301-308.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bui, A.Q. and O'Neill, S.D. (1998) Three 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers. *Plant Physiol.* 116: 419-428.
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B. and Meyerowitz, E.M. (1993) *Arabidopsis thaliana* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539-544.
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W. and Ecker, J.R. (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89: 1133-1144.
- Chang, Y.Y., Sun, C.W., Yan, S.L., Chou, S.J., Chen, Y.R. and Yang, S.F. (1997) cDNA sequence of a putative ethylene receptor from carnation petals (PGR 97-144). *Plant Physiol.* 115: 863.
- Crocker, W. and Knight, L.I. (1908) Effect of illuminating gas and ethylene upon flowering carnations. *Bot. Gaz.* 46: 259-276.
- Fal, M.A., Majada, J.P., González, A. and Sánchez Tames (1999) Differences between *Dianthus caryophyllus* L. cultivar *in vitro* growth and morphogenesis are related to their ethylene production. *Plant Growth Regul.* 27: 131-136.

- Firoozabady, E., Moy, Y., Tucker, W., Robinson, K., Gutterson, N. (1995) Efficient transformation and regeneration of carnation cultivars using *Agrobacterium*. *Mol. Bred.* 1: 283-293.
- Fujino, D.W., Reid, M.S. and Yang, S.F. (1980) Effects of aminooxyacetic acid on postharvest characteristics of carnation. *Acta Hort.* 113: 59-64.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968) Nutrient requirement of suppression culture of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Hamilton A.J., Lycett, G.W. and Grierson, D. (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346: 284-287.
- Hamilton, A.J., Bouzawen, M., Grierson, D. (1991) Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 7434-7437.
- Henskens, J.A.M., ten Have, R.A., Woltering, E.J. (1994) Molecular cloning of two different ACC synthase PCR fragments in carnation flowers and organ-specific expression of the corresponding genes. *Plant Mol. Biol.* 26: 453-458.
- Henzi, M.X., McNeil, D.L., Christey, M.C. and Lill, R.E. (1999) A tomato antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase gene causes reduced ethylene production in transgenic broccoli. *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 179-183.
- Hood, E.E., Jen, G., Kayes, L., Kramer, J., Fraly, R.T., Chilton, M-D. (1984) Restriction endonuclease map of TiBo542, a potential Ti plasmid vector for genetic engineering of plants. *Biotechnology* 2: 702-709.
- Hua, J. and Meyerowitz, E.M. (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94: 261-71.
- Hua, J., Chang, C., Sun, Q., Meyerowitz, E.M. (1995) Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis ERS* gene. *Science* 269: 1712-1714.

- Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q.G., Bleecker, A.B., Ecker, J.R. and Meyerowitz, E.M. (1998) *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1321-1332.
- Ichimura, K. and Suto, K. (1999) Effects of the time of sucrose treatment on vase life, soluble carbohydrate concentrations and ethylene production in cut sweet pea flowers. *Plant Growth Regul.* 28: 117-122.
- Jones, M. and Woodson, W.R. (1995) Ethylene-regulated expression of carnation cysteine proteinase during flower petal senescence. *Plant Mol. Biol.* 28: 505-512.
- Jones, M. and Woodson, W.R. (1997) Pollination-induced ethylene in carnation. *Plant Physiol.* 115: 205-212.
- Jones, M.L. and Woodson, W.R. (1999) Differential expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in Carnation. *Plant Physiol.* 199: 755-764.
- Kende, H. (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 283-307.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldman, K.A. and Ecker, J.R. (1993) *CTR1*, a negative regulator of ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-441.
- Kosugi, Y., Oyamada, N., Satoh, S., Yoshioka, T., Onodera, E. and Yamada, Y. (1997) Inhibition by 1-aminocyclobutane-1-carboxylate of the activity of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase obtained from senescing petals of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers. *Plant Cell Physiol.* 38: 312-318.
- Lech, K. and Brent, R. (1992) Media preparation and bacteriological tools. *In* Short Protocols in Molecular Biology. 2nd ed. Edited by Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. pp. 1-3. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, Inc., U.S.A.

- Lizada, M.C.C. and Yang, S.F. (1979) A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal. Biochem.* 100: 140-145.
- Manning, K. (1985) The ethylene forming enzyme system in carnation flowers. *In* Ethylene and plant development. Edited by Roberts, J.A., Tucker, G.A. pp. 83-92. Butterworths, Boston. U.K.
- Maxie, E.C., Farnham, D.S., Mitchell, F.G. Sommer, N.F., Parsons, R.A., Snyder, R.G. and Rae, H.L. (1973) Temperature and ethylene effects on cut flowers of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 98: 568-572.
- Midoh, N., Saijou, Y., Matsumoto, K. and Iwata, M. (1996) Effects of 1,1-dimethyl-4-(phenylsulfonyl)semicarbazide (DPSS) on carnation flower longevity. *Plant Growth Regul.* 20: 195-199.
- Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishiyama, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y. and Ohashi, Y. (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 37: 49-59.
- Mochizuki, A., Nishizawa, Y., Onodera, H., Tabei, Y., Toki, S., Habu, Y., Ugaki, M. and Ohashi, Y. (1999) Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice stem borers, *Chilo suppressalis*. *Entomol. Exp. Appl.* 93: 173-178.
- Murashige T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Murray, M.G., and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Nagata, M., Mori, H., Tabei, Y. (1995) Modification of tomato ripening by transformation with sense or antisense chimeric 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes. *Acta Hort.* 394: 213-218.

- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia plants results in reversible cosuppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell* 2: 279-289.
- Nichols, R. (1966) Ethylene production during senescence of flowers. *J. Hort. Sci.* 41: 279-290.
- Oeller, P.W., Wong, Lu, M-W., Taylor, L.P., Pike, D.A. and Theologis, A. (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254:437-439.
- Ohta, S., Mita, S., Hattori, T. and Nakamura, K. (1990) Construction and expression in Tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31: 805-813.
- Ohtsubo, N., Mitsuhashi, I., Koga, M., Seo, S. and Ohashi, Y. (1999) Ethylene promotes the necrotic lesion formation and basic PR gene expression in TMV-infected tobacco. *Plant Cell Physiol.* 40: 808-817.
- Palmiter, R.D. (1974) Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes: Expedient techniques for the isolation of undegraded polysomes and messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* 13: 3606.
- Panavas, T., Pikula, A., Reid, P.D., Rubinstein, B. and Walker, E.L. (1999) Identification of senescence-associated genes from daylily petals. *Plant Mol. Biol.* 40:237-248.
- Panavas, T., Reid, P.D. and Rubinstein, B. (1998) Programmed cell death of daylily petals: Activities of wall-based enzymes and effects of heat shock. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 379-388.
- Park, K.Y., Drory, A and Woodson, W.R. (1992) Molecular cloning of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from senescing carnation flower petals. *Plant Mol. Biol.* 18: 377-386.

- Peiser, G. (1986) Levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase activity, ACC and ACC-conjugate in cut carnation flowers during senescence. *Acta Hort.* 181: 99-104.
- Porat, R., Halevy, A., Serek, M. and Borochoy, A. (1995) An increase in ethylene sensitivity following pollination is the initial event triggering an increase in ethylene production and enhanced senescence of *Phalaenopsis* orchid flowers. *Physiol. Plant.* 93: 778-784.
- Pua, E-C. and Chi, G-L. (1993) *De novo* shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brassica juncea*) *in vitro* in relation to ethylene. *Physiol. Plant.* 88: 467-474.
- Pua, E-C. and Lee, J.E.E. (1995) Enhanced *de novo* shoot morphogenesis *in vitro* by expressing of antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene in transgenic mustard plants. *Planta* 196: 69-76.
- Raid, M.S. and Wu, M-J. (1992) Ethylene and flower senescence. *Plant Growth Regul.* 11: 37-43.
- Sakai, H., Hua, J., Chen, Q.G., Chang, C., Medrano, L.J., Bleecker, A.B. and Meyerowitz, E.M. (1998) *ETR2* is an *ETR1*-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 5812-5817.
- Sato, T. and Theologis, A. (1989) Cloning of the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 6621-6625.
- Satoh, S. and Esashi, Y. (1980) α -aminoisobutyric acid: a probable competitive inhibitor of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Cell Physiol.* 21: 939-949.
- Satoh, S., Oyamada, N., Yoshioka, T. and Midoh, N. (1997) 1,1-Dimethyl-4-(phenylsulfonyl)semicarbazide (DPSS) does not inhibit the *in vitro* activities of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase and ACC synthase obtained from senescing carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) petal. *Plant Growth Regul.* 23: 191-193.

- Satoh, S., Yoshioka, T. and Kosugi, Y. (1995) Characteristics of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isolated from senescing carnation flower petals. *Acta Hort.* 394: 297-304.
- Savin, K.W., Baudinette, S.C., Graham, M.W, Michael, M.Z., Nugent, G.D., Lu, C-Y., Chandler, S.F and Cornish, E.D. (1995) Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence. *HortScience* 30: 970-972.
- Serek, M., Sisler, E.C. and Reid, M.S. (1994a) Effects of 1-MCP on the vase life and ethylene response of cut flowers. *Plant Growth Regul.* 16: 93-97
- Serek, M., Sisler, E.C. and Reid, M.S. (1994b) Novel gaseous inhibitor of ethylene binding prevents ethylene effects in potted flowering plants. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119: 1230-1233.
- Serek, M., Tamari, G., Sisler, E.C. and Borochoy, A. (1995) Inhibition of ethylene-induced cellular senescence symptoms by 1-methylcyclopropene, a new inhibitor of ethylene action. *Physiol. Plant.* 94: 229-332.
- Serrano, M., Romojaro, F., Casas, J.L., Del Rio, J.A., and Acosta, M. (1990) Action and mechanism of α -aminoisobutyric acid: as a retardant of cut carnation senescence. *Sci. Hort.* 44: 127-134.
- Shaller, G.E. and Bleecker, A.B. (1995) Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis ETR1* gene. *Science* 270: 1809-1811.
- Shibuya, K., Satoh, S. and Yoshioka, T. (1998) A cDNA encoding a putative ethylene receptor related to petal senescence in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers (PGR 98-019). *Plant Physiol.* 116: 867.
- 渋谷健市, 吉岡俊人, 羽柴輝良, 佐藤茂 (1999) カーネーションのエチレン合成系および受容系遺伝子の発現解析. 園芸学会雑誌 第68巻, 別冊2: pp. 432.
- Sisler, E.C., Reid, M.S. and Yang, S.F. (1986) Effect of antagonists of ethylene action on binding of ethylene in cut carnations. *Plant Growth Regul.* 4: 213-218.

- Slater, A., Maundaers, M.J., Edowards, K., Schuch, W. and Grierson, D. (1985) Isolation and characterization of cDNA clones for tomato polygalacturonase and other ripening-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 5: 137-147.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q. and Ecker, J.R. (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev.* 12: 3703-3714.
- Spanu, P., Reinhardt, D., Boller, T. (1991) Analysis and cloning of the ethylene-forming enzyme from tomato by functional expression of its mRNA in *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J.* 10: 2007-2013.
- ten Have, A., and Woltering, E.J. (1997) Ethylene biosynthetic genes are differentially expressed during carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flower petals. *Plant Mol. Biol.* 34: 89-97.
- Theologis, A., Oeller, P.W., Wong, L-M., Rottman, W.H. and Gantz, D.M. (1993) Use of a tomato mutant constructed with reverse genetics fruit ripening, a complex developmental process. *Dev. Genet.* 14: 282-295.
- 鶴野樹々子 (1999) アグロバクテリウムを介したカーネーション形質転換系の検討. 東北大学大学院農学研究科修士論文.
- Valpuesta, V., Lange, N.E., Guerrero, C. and Reid, M.S. (1995) Up-regulation of a cysteine protease accompanies the ethylene-insensitive senescence of daylily (*Heimerocallis*) flowers. *Plant Mol. Biol.* 28: 575-582.
- van der Krol, A.R., Lenting, P.E., Veenstra, J., van der Meer, I.M., Koes, E., Gerats, A.G.M., Mol, J.N.M. and Stuitje, A.R. (1988) An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 333: 866-869.
- Veen, H. (1979) Effects of silver on ethylene synthesis and action in cut carnations. *Planta* 145: 467-470.
- Veen, H. (1983) Silver thiosulfate: An experimental tool in plant science. *Sci. Hort.* 20: 211-224.

- Veen, H. and van de Geijn, S.C. (1978) Mobility and ionic form of silver as related to longevity of cut carnations. *Planta* 140: 93-96.
- Wang, H. and Woodson, W.R. (1991) A flower senescence-related mRNA from carnation shares sequence similarity with fruit ripening-related mRNAs involved in ethylene biosynthesis. *Plant Physiol.* 96: 1000-1001.
- Watanabe, H., Abe, K., Emori, Y., Hosoyama, H. and Arai, S. (1991) Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains). *J. Biol. Chem.* 266: 16897-16902.
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Clark, D.G., Bleecker, A.B., Chang, C., Meyerowitz and Klee, H.J. (1997) A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants. *Nat. Biotech.* 15: 444-447.
- Woodson, W.R., Park, K.Y., Drory, A., Larsen, P.B. and Wang, H. (1992) Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers. *Plant Physiol.* 99: 526-532.
- Yang, S.F. and Hoffman, N.E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 155-189.
- Zimmerman, P.W., Hitchcock, A.E. and Crocker, W. (1931) The effect of ethylene and illuminating gas on roses. *Contrib. Boyce Thomp. Inst.* 3: 459-481.

附表

付表 1(全4ページ). 本研究で使用したオリゴヌクレオチドプライマー .

([]内はプライマーの設計に用いた配列とその位置(bp)を示す)

1. ACC合成酵素遺伝子cDNA翻訳領域の増幅

•CARAS-SpeI F [CARACC3 (Park et al. 1992) 134~153 (+鎖)]

5' -CCCCACTAGTATGGGTTCTTATAAGGGTGT-3'

•CARAS-SpeI R [CARACC3 (Park et al. 1992) 1687~1668 (-鎖)]

5' -GGGGACTAGTTTATGTTCTTGCTTTAACAA-3'

(アンダーラインはSpeI認識配列を示す)

2. ACC酸化酵素遺伝子cDNA翻訳領域の増幅

•CARAO-XbaI F [pSR120 (Wang and Woodson 1991) 40~59 (+鎖)]

5' -CCCCTCTAGAATGGCAAACATTGTCAACTT-3'

•CARAO-XbaI R [pSR120 (Wang and Woodson 1991) 1005~59 (+鎖)]

5' -GGGGTCTAGATCAAGCAGTTGGAATGGGAC-3'

(アンダーラインはXbaI認識配列を示す)

付表 1 (続き) .

3. ACC合成酵素遺伝子cDNAの塩基配列決定のためのサイクルシーケンス反応

•M13 -20 primer

5' -GTAAAACGACGGCAAGT-3'

•CARAS-SpeI F

上記参照

•CAACS02F [CARACC3 (Park et al. 1992) 392~412(+鎖)]

5' -GATATTGCCATTTTTCAGGAT-3'

•CAACS03F [CARACC3 (Park et al. 1992) 653~673(+鎖)]

5' -TCGAGCTCGAATAATTTCAAA-3'

•CAACS04F [CARACC3 (Park et al. 1992) 914~934(+鎖)]

5' -ATGCCTCATGTAAATCAAGAC-3'

•CAACS05F [CARACC3 (Park et al. 1992) 1172~1192(+鎖)]

5' -AGCGAGCTGGCTAAGATAGGA-3'

•CAACS06F [CARACC3 (Park et al. 1992) 1448~1468(+鎖)]

5' -GACAATTCAACAATGACAACA-3'

•M13 Reverse primer

5' -GGAAACAGCTATGACCATG-3'

•CARAS-SpeI R

上記参照

•CAACS01R [CARACC3 (Park et al. 1992) 433~413(-鎖)]

5' -AAACTCGGGCAAACCATGATA-3'

•CAACS02R [CARACC3 (Park et al. 1992) 694~674(-鎖)]

5' -TTGTAAGGCTTCCTTAGTGAT-3'

•CAACS03R [CARACC3 (Park et al. 1992) 955~935(-鎖)]

5' -ACTATATAAAATATGAACAAG-3'

•CAACS04R [CARACC3 (Park et al. 1992) 1213~1193(-鎖)]

5' -GTTTCCTTGGAGGCATCCTAT-3'

•CAACS05R [CARACC3 (Park et al. 1992) 1689~1669(-鎖)]

5' -TGCTGCTGCTCTTGCTGATGT-3'

付表 1 (続き).

4. ACC酸化酵素遺伝子cDNAの塩基配列の決定のためのサイクルシーケンス反応

•M13 -20 primer

上記参照

•CARAO-XbaI F

上記参照

•CAACO02F [pSR120 (Wang and Woodson 1991) 300~319 (+鎖)]

5' -ATGGCAAACATTGTCAACTT-3'

•CAACO03F [pSR120 (Wang and Woodson 1991) 560~579 (+鎖)]

5' -CAATGACATTGATTGGGAGA-3'

•CAACO04F [pSR120 (Wang and Woodson 1991) 820~839 (+鎖)]

5' -CCGACCTTATCAAAGGACTT-3'

•M13 Reverse

上記参照

•CARAO-XbaI R

上記参照

•CAACO01R [pSR120 (Wang and Woodson 1991) 339~320 (-鎖)]

5' -ATGACGAAGGTAGAAGGTGC-3'

•CAACO02R [pSR120 (Wang and Woodson 1991) 599~580 (-鎖)]

5' -CCAGCGTCGGTGTGGGCCCT-3'

•CAACO03R [pSR120 (Wang and Woodson 1991) 859~840 (-鎖)]

5' -TTTCCACCAATGTTGGCGCC-3'

付表 1 (続き) .

5. バイナリーベクターに導入されたACC合成酵素遺伝子, ACC酸化酵素遺伝子の挿入方向の確認のためのPCR.

•35S1F [CaMV35Sプロモーター領域 -29 ~ 0 (+鎖)]

5' -CGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTT-3'

•NOS1R [NOSターミネーター 21 ~ 1 (-鎖)]

5' -TTGCCAAATGTTTGAACGATC-3'

6. システインプロテイナーゼ遺伝子cDNAの増幅

•DCCP1-F [pDCCP1 (Jones et al. 1995) 1 ~ 30 (+鎖)]

5' -GCAAGCTTATCATCTTCAGTCGTGGCTCGT-3'

•DCCP1-R [pDCCP1 (Jones et al. 1995) 1299 ~ 1270 (-鎖)]

5' -TTGAATGAAAACCTTCACGATGATGTCTTC-3'

7. システインプロテイナーゼ遺伝子cDNA塩基配列決定のためのサイクルシーケンス反応

•M13 M3 primer

5' -GTAAAACGACGGCCAGT-3'

•M13 reverse primer

上記参照

•DCCP1-F2 [pDCCP1 (Jones et al. 1995) 1031 ~ 1060 (+鎖)]

5' -GCGACCACCTGTTGCTGTGTCTATGAATAC-3'

•DCCP1-F3 [pDCCP1 (Jones et al. 1995) 330 ~ 359 (+鎖)]

5' -TTAAAGACCAGGGGCAGTGTGGGAGTTGTT-3'

•DCCP1-R2 [pDCCP1 (Jones et al. 1995) 1060 ~ 1031 (-鎖)]

5' -GTATTCATAGACACAGCAACAGGTGGTCGC-3'

•DCCP1-R3 [pDCCP1 (Jones et al. 1995) 359 ~ 330 (-鎖)]

5' -AACAACTCCCACACTGAACCTGGTCTTTAA-3'

(終り)

付表 2. カーネーションシュート培養系, 形質転換系, 再分化系において用いた培地の組成.

•BN 培地(シュート培養)

MS無機塩(Murashige and Skoog 1962)(和光純薬), B5ビタミン類(Gamborg et al. 1968)(Sigma), 3%スクロース, 0.059%MES(同仁化学), 1 mg l^{-1} BA(Sigma), 0.02 mg l^{-1} NAA(Sigma), 0.25%ゲルライト(和光純薬).

•BD培地(共存培養, 除菌培養)

MS無機塩, B5ビタミン類, 3%スクロース, 0.059%MES, 0.5 mg l^{-1} BA, 0.5 mg l^{-1} 2,4-D(Sigma), 0.25%ゲルライト.

•IT培地(再分化)

MS無機塩, B5ビタミン類, 3%スクロース, 0.059%MES, 0.5 mg l^{-1} indolebutyric acid(Sigma), 0.22 mg l^{-1} thidiazuron(ナカライ), 0.25%ゲルライト.

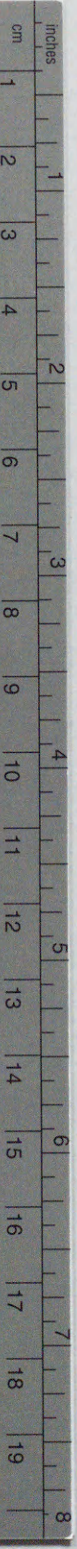
•ホルモンフリーMS培地(ノーマライゼーション)

MS無機塩, B5ビタミン類, 3%スクロース, 0.059%MES, 1%ファイトアガー(GIBCO BRL).

•ホルモンフリーMS培地(発根)

MS無機塩, B5ビタミン類, 3%スクロース, 0.059%MES, 0.25%ゲルライト.





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

