

第 3 章 . キウイフルーツへの

糸状菌病害抵抗性遺伝子の導入

キウイフルーツ (*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang and A. R. Ferguson) は、中国原産のマタタビ科マタタビ属に属する強勢なつる性果樹で、1920 年代になってニュージーランドで経済栽培が始められた世界的にも新しい果樹である。我が国には 1963 年に工藤茂道氏がニュージーランドから種子を導入したのが最初である (大垣, 1984, 1988) が、その後ニュージーランドからの果実輸入の増加とともに、国内でも栽培されるようになった。昭和 50 年代になって、当時生産過剰で問題となっていたウンシュウミカンの転換作物として急速に普及し、広く栽培されるようになった (栗原ら, 1987)。平成 9 年 (1997 年) 現在の我が国におけるキウイフルーツの栽培面積は 3,500 ha で第 12 位、生産量は 39,400 t で第 8 位の果樹である (農林水産省農産園芸局果樹花き課, 1998 年)。

キウイフルーツが導入された当初は生育が旺盛で、病虫害の発生も少なく、栽培が容易な果樹とされていた。しかし、生産が拡大するのに伴って、各地で果実軟腐症、灰色かび病などの糸状菌病が問題になってきた。果実軟腐症は *Botryosphaeria* sp. または *Phomopsis* sp. によって、灰色かび病は *Botrytis cinerea* によって引き起こされる病害であり、両者はともに収穫後の果実に発生しやすいため、問題が特に大きい病害である。これらの病害に対しては、現在決め手となる防除手段がないことから、抵抗性品種の育成が強く要望されている。

我が国におけるキウイフルーツの育種は香川県農業試験場で昭和61年(1986年)から開始されている。しかし、キウイフルーツは雌雄異株の植物で、交雑育種の歴史も浅いため、優秀な交配親となる雄株が少なく、育種は困難な状況にある。現在は主要品種と栽培上花粉親として用いている雄株品種間の交雑実生の中から、果実品質の良好なものの選抜が行われているのみで、病害抵抗性育種は全く行われていない。また、近縁の野生種に病害抵抗性の遺伝資源があるかどうかについても全く調査は行われていない。

一方、キウイフルーツは果樹の中では極めて再分化能の高い植物で、組織片からカルスを経て容易に再生植物を得ることが出来る(Harada, 1975; 志村ら, 1990; 渡辺, 1992)。既に、アグロバクテリウム法を用いて、効率の良い安定した形質転換系が確立されており(Fraser et al., 1995; Matsuta et al., 1993; Uematsu et al., 1991; Janssen and Gardner, 1993)、形質転換法によって有用遺伝子を導入することができる。

そこで本研究では、キウイフルーツの糸状菌病に対する抵抗性を強化することを目的とし、既に確立されている形質転換法を用いて、糸状菌病害抵抗性遺伝子として報告されているキチナーゼ遺伝子および β -1,3 エンドグルカナーゼ遺伝子のキウイフルーツへの導入を行い、得られた形質転換植物の灰色かび病抵抗性を検定した。

第1節 イネキチナーゼ遺伝子のキウイフルーツへの導入

キチナーゼは、植物病原菌を含む多くの糸状菌の細胞壁の主要な構成要素であるキチンを加水分解する酵素である。高等植物はその

構成要素としてキチンを持たないが、植物病原菌の感染や傷害に伴ってキチナーゼを誘導的に産生し、胞子発芽管あるいは菌糸の細胞壁を溶解することによって菌の生育を阻害する。さらに、こうして低分子化された菌体細胞壁のキチンオリゴマーが、植物側にエリシターとして働き、ファイトアレキシンの生産やプロテアーゼインヒビターの合成など、他の一連の植物防御反応を誘導することが明らかにされている (Legrand et al., 1987; Nishizawa and Hibi, 1991; 西澤ら, 1992, 1993a)。キチナーゼ遺伝子を植物に導入し、植物の糸状菌病に対する抵抗性が高まったという報告が Broglie ら (1991) によって最初になされて以来、さまざまな植物にキチナーゼ遺伝子を導入して病害抵抗性を強化する試みが行われている。キチナーゼ遺伝子は既にさまざまな植物から単離されているが (西澤ら, 1992)、Nishizawa らは、イネから 3 種類のキチナーゼ遺伝子を単離している (Nishizawa and Hibi, 1991; Nishizawa et al., 1993b)。このキチナーゼ遺伝子を CaMV 35S プロモーターに連結してタバコ、イチゴ、キュウリに導入した結果、うどんこ病または灰色かび病などの糸状菌病に対する抵抗性を賦与できたと報告されている (浅尾, 1995; Asao et al., 1997; 西澤ら, 1992, 1993a; Tabei et al. 1998)。

本結果を受け、本実験では、イネのキチナーゼ遺伝子をキウイフルーツに導入し、キウイフルーツの糸状菌病害抵抗性を強化しようと試みた。

材料および方法

1. 植物材料および外植片の調整

ガラス室または *in vitro* で育成したキウイフルーツ ‘ヘイワード’ の葉、葉柄、茎の外植片を材料とした。ガラス室の材料については、70% エタノールに数秒間浸漬した後、0.1% Tween 20 を添加した有効塩素濃度 1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 15 分間浸漬して表面殺菌した。滅菌蒸留水で 3 回洗浄した後、無菌的に約 5 mm 角のリーフディスクおよび 5mm の長さの葉柄または茎の外植片を調整した。*in vitro* の材料については、滅菌せず、同様に材料を調整した。

2. アグロバクテリウムの系統

pBI121-RCC2 および pBI121-RCG3 (西澤ら, 1992; Nishizawa et al., 1993b) を保持しているアグロバクテリウム LBA4404 系統 (Hoekema et al., 1983) を用いた。pBI121-RCC2 および pBI121-RCG3 は、バイナリーベクター pBI121 の T-DNA 領域の GUS 遺伝子部分を削除してイネのキチナーゼ遺伝子 (RCC2 または RCG3) を CaMV 35S プロモーターに連結したプラスミドで、他に植物選択マーカーとして nos プロモーターに連結した NPTII 遺伝子を持つプラスミドである (Fig. 9)。RCC2 および RCG3 とともにクラス I キチナーゼをコードしている。RCC2 キチナーゼには液胞輸送シグナルとして知られているカルボキシル末端エキストラペプチドによく似た配列があるため、植物体内では液胞内に局在していると推定されている。一方、RCG3 キチナーゼは液胞輸送シグナルをもたないことから、細胞外に分泌されていると推定されている (西澤ら, 1993a; Nishizawa et al., 1993b)。

pBI121-RCC2 または pBI121-RCG3 を保有する *Escherichia coli* JM109 を生物資源研究所西澤洋子博士から譲渡を受け、pRK2013 を保有する *E.*

coli HB101 を用いたトリペアレンタルメーティング法 (Lichtenstein and Draper, 1985) によって、pBI121-RCC2 または pBI121-RCG3 を *A. tumefaciens* LBA4404 に導入した。

3. アグロバクテリウムの調整と外植片への接種

A. tumefaciens LBA4404/pBI121-RCC2 または LBA4404/pBI121-RCG3 を 50 mg/l カナマイシン、100 mg/l ストレプトマイシン、50 mg/l リファンピシンを含む LB 培地で 28 °C で一昼夜振とう培養して増殖させた。この細菌培養液を第 2 章の材料および方法と同様に調整し、接種を行った。

4. 形質転換体の選抜と植物体再生

形質転換体の選抜は Matsuta ら (1993) の方法に従い、以下のように行った。共存培養には 100 μ M アセトシリンゴンおよび 10 μ M ゼアチンを含む MS 培地を用いた。培養条件は 28 °C 暗黒条件とした。3 日後、50 mg/l カナマイシン、250 mg/l カルベニシリン、10 μ M ゼアチンを含む MS 培地に移植し、形質転換体の選抜とアグロバクテリウムの除菌を行った。培養条件は 26 °C 暗黒条件とした。不定芽が形成されたカルスは外植片からカルスごと切り取り、同じ培地で 26 °C 16 時間日長の光条件下 (3,000 lux) で培養を続けた。継代は 1 ヶ月ごとに行った。不定芽が伸長して葉が展葉し始めたことを確認し、シュートを切り取り、2.5 μ M BA、0.1 μ M ナフトレン酢酸 (NAA)、50 mg/l カナマイシン、250 mg/l カルベニシリンを含む MS 培地に移植して 26 °C 16 時間日長の光条件下 (3,000 lux) で培養し、さらにシュートを伸長させた。

5. 植物体内の残存アグロバクテリウムの確認

第2章の材料および方法と同様に、再生した植物体を一部採取し、その磨砕液を PPGA 培地(西山・江塚, 1977) で培養した。

6. DNA 抽出法の検討

予備的にキウイフルーツからの DNA 抽出法を検討した。キウイフルーツの若葉を液体窒素で粉砕し、第2章の材料および方法、3項と同じ洗浄処理を行った後、SDS法(Honda and Hirai, 1990)または CTAB 法(Rogers and Bendich, 1985)で DNA を抽出した。

7. PCR による導入遺伝子の確認

得られた再生植物の葉から、洗浄処理を加えた SDS 法で全 DNA を抽出した。PCR は Kaneyoshi-Hiramatsu ら(1994)の方法に準じて行った。プライマーとしては、CaMV 35S プロモーター部分の塩基配列から1種類(P35S-F: 5'GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG TAA G3')、RCC2 部分から2種類(同じ箇所を両方向 RCC2-F: 5'CAG CGG CTC GTC GGT TG3', RCC2-R: 5'CAA CCG ACG AGC CGC TG3')、RCG3 部分から4種類(RCG3-2137F: 5'TCT ACA CCT ACG ACG CCT TCG3', RCG3-2339F: 5'CAC ATA CTG CGA GCC CAA GC3', RCG3-2357R: 5'CTT GGG CTC GCA GTA TGT GG3', RCG3-2735R: 5'CAG CAT GTC GCA GTA GCG CTT3'), nos ターミネーター部分から2種類のプライマー(Tnos-R: 5'GTA TAA TTG CGG GAC TCT AAT3', Tnos-R2: 5'CTC ATA AAT AAC GTC ATG CAT TAC A3')を設計し、RCC2 については P35S-F/RCC2-R(増幅される遺伝子断片長: 1080 bp)、P35S-F/Tnos-R(1360 bp)、P35S-F/Tnos-R2(1330 bp)、RCC2-F/Tnos-R(280 bp)、RCC2-F/Tnos-R2

(250 bp) の 5 組のプライマーセットを用い、RCG3 については P35S-F/RCG3-2357R(630 bp)、P35S-F/RCG3-2735R(1010 bp)、P35S-F/Tnos-R(1260 bp)、P35S-F/Tnos-R2(1220 bp)、RCG3-2137F/RCG3-2357R(220 bp)、RCG3-2137F/RCG3-2735R(600 bp)、RCG3-2137F/Tnos-R(840 bp)、RCG3-2137F/Tnos-R2(810 bp)、RCG3-2339F/RCG3-2735R(400 bp)、RCG3-2339F/Tnos-R(640 bp)、RCG3-2339F/Tnos-R2(610 bp) の 11 組のプライマーセットを用い、プラスミド DNA と非形質転換体の DNA を鋳型として PCR を行った。次に、プラスミド DNA からのみ目的とするサイズの遺伝子断片が検出されたプライマーセット(RCC2 については、RCC2-F/Tnos-R および RCC2-F/Tnos-R2 の 2 組、RCG3 については、RCG3-2137F/RCG3-2735R、RCG3-2137F/Tnos-R、RCG3-2137F/Tnos-R2、RCG3-2339F/Tnos-R、RCG3-2339F/Tnos-R2 の 5 組)を用い、数個のカナマイシン抵抗性個体の DNA を鋳型として PCR を行い、導入遺伝子の検出に適したプライマーセットを決定し、以降の PCR 分析に用いた。PCR 反応は全てアステック社製 PC-700 型機を用い、94 °C 1 分間、40 °C 2 分間、72 °C 3 分間を 45 回繰り返した後、72 °C で 7 分間行った。また、植物体内のアグロバクテリウムの残存を調べるため、第 2 章のカキの場合と同様に PCR でアグロバクテリウム中の野生型 Ti-plasmid の virC 遺伝子を検出した。PCR 産物は TAE バッファー中の 2.0 % アガロースゲルで 100 V、30 分間電気泳動した後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、UV 下で観察した。導入遺伝子が確認できたシュートについては、5 μ M IBA を含む MS 培地に置床し、26 °C 16 時間日長の光条件下(3,000 lux)で培養を続け、発根させた。

8. サザンブロット分析による導入遺伝子の確認

得られた再生植物体から全 DNA を抽出し、サザンブロット分析を行った。再生植物体の若い葉より、洗浄処理を加えた CTAB 法を用いて全 DNA を抽出した。RCC2 導入個体については、サンプル当たり 5 μ g の DNA を *Hind*III と *Sac*I で二重消化し、また別の 5 μ g の DNA を *Hind*III または *Sac*I で消化した。RCG3 導入個体については、サンプル当たり 5 μ g の DNA を *Hind*III と *Eco*RI で二重消化し、また別の 5 μ g の DNA を *Hind*III または *Eco*RI で消化した。制限酵素処理は 5 μ g の DNA に対し 200 μ l の溶液中で、20 unit の制限酵素を加え、8 時間 37 $^{\circ}$ C でインキュベートすることによって行った。消化した DNA をエタノール沈殿法によって回収し、20 μ l の TE バッファーに溶かした後、TAE バッファー中の 0.8 % アガロースゲルで電気泳動して分画し、ナイロンメンブランに転写した。プローブとしては、RCC2 の検出には pBI221-RCC2 の *Hind*III-*Sac*I 断片 (1.8 kbp, CaMV35S プロモーター+RCC2) または *Eco*RI-*Sac*I 断片 (1.1 kbp, RCC2)、RCG3 の検出には pBI221-RCG3 の *Hind*III-*Eco*RI 断片 (2.0 kbp, CaMV35S プロモーター+RCG3+nos ターミネーター) または *Sac*I-*Sac*I 断片 (1.0 kbp, RCG3) を DIG ラベルしたものを用いた。ハイブリダイゼーションおよびターゲット DNA の検出は第 2 章の材料および方法と同様に行った。

9. RNA 抽出法の検討

通常 SDS-フェノール法 (Sambrook et al., 1989) またはグアニジンチオシアネート法 (Sambrook et al., 1989)、DNA 抽出の際と同じ洗浄処理を加えた SDS-フェノール法またはグアニジンチオシアネート法、Levi ら (1992) の方法、López-Gómez and Gómez-Lim (1992) の方法、López-Gómez and Gómez-Lim の方法と SDS-フェノール法を組み合わせ

方法(詳細は次項に示した)の7種類の方法を用いて検討した。

10. ノーザンブロット分析

形質転換体の若葉から、López-Gómez and Gómez-Limの方法と SDS-フェノール法を組み合わせた下記の方法を用いて、全 RNA を抽出した。約 200 mg の若い葉を採取し、液体窒素中で凍結して粉碎し、500 μ l TE 飽和フェノールと 500 μ l 抽出バッファー(150 mM トリシュー酸(pH7.5)、50 mM EDTA、2% SDS、1% 2-メルカプトエタノール)の混合液に懸濁した。これに 500 μ l クロロホルム:イソアミルアルコール(24:1)を加え、ボルテックスミキサーを用いて約 10 分間激しく混合した後、15,000 $\times g$ で 4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心分離し、上清を得た。この上清に 500 μ l TE 飽和フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)を加えて混合した後、15,000 $\times g$ で 4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心分離し、上清を得た。この操作を再度繰り返した。得られた上清に、10 M 塩化リチウム溶液を最終濃度が 2.5 M になるように加え、-20 $^{\circ}$ C で 1 時間以上静置した後、15,000 $\times g$ で 4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離し、RNA 沈殿を得た。得られた RNA 沈殿を、500 μ l の 2 M 塩化リチウム、0.5 M EDTA 溶液に懸濁し、15,000 $\times g$ で 4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離して、RNA 沈殿を得た。この操作を再度繰り返した。得られた RNA 沈殿を 75%エタノールで 2 回洗浄した後、TE バッファーに溶解したものを RNA サンプルとした。20 μ g の全 RNA を MOPS バッファー(0.4 M MOPS、0.1 M 酢酸ナトリウム、0.02 M EDTA (pH 7.0))中で、0.66 M のホルムアルデヒドを含む 1.17%アガロースゲルで 30 V で 1 時間、60 V で 2 時間電気泳動して分画した。これを変性液(50 mM 水酸化ナトリウム、0.1 M NaCl)でアルカリ変性し、0.1 M トリス-塩

酸 (pH 7.5) で中和した後、キャピラリートランスファーによってナイロンメンブラン (Tropix 社、トロピロンプラスチャージメンブレ) に転写し、UV クロスリンカーを用いてメンブランに固定した。プローブには、DIG ラベルした *SacI-EcoRI* 断片 (1.1 kbp, RCC2) および *SacI-SacI* 断片 (1.0 kbp, RCG3) を用いた。ハイブリダイゼーションは 5 × SSC、50 % ホルムアミド、50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0)、2 % ブロッキング・リジェント、0.1% N-ラウロイルサルコシン・ナトリウム塩、7 % SDS、50 μg/ml サケ精子 DNA で 68 °C、16 時間行った。メンブランの洗浄はサザンブロット分析の場合と同条件で行った。プローブ・ターゲット DNA の検出はサザンブロット分析と同様に行った。

11. 全タンパク質の抽出

形質転換体の若い葉から全タンパク質を抽出した。約 500 mg の若い葉を採取し、液体窒素中で凍結して粉碎し、0.5 mg 不溶性 PVP、10 ml の抽出バッファー (20 mM クエン酸 - 40 mM リン酸水素ナトリウム (pH 6.8)、10 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM ジチオスレイトール) を加えてよく懸濁した。これを 18,000 ×g で 4 °C、20 分間遠心分離し、上清を得た。この上清に硫酸アンモニウムを最終濃度が 80 % になるように加え、4 °C で 2 時間以上静置した。これを 18,000 ×g で 4 °C、20 分間遠心分離し、沈殿を得た。得られた沈殿を 1 ml の 20 mM クエン酸 - 40 mM リン酸水素ナトリウム溶液 (pH 6.8) に溶解し、不溶物を取り除くために 18,000 ×g で 4 °C、20 分間遠心分離し、上清を得た。この上清 0.5 ml をファルマシア NAP-5 カラム (Pharmacia Biotech, USA) を用いて脱塩し、タンパク質粗抽出液とし

た。タンパク質粗抽出液中のタンパク質含量は Bradford (1976) に従い、bovine serum albumin をスタンダードとして Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad、USA.) を用いて測定した。

12. キチナーゼ活性の測定

タンパク質粗抽出液のキチナーゼ活性は、Asao ら (1997) の方法に準じ、カルボキシメチルキチン (一丸ファルコス (株)、日本) を基質とした場合の還元糖の生成量を測定することによって行った。20 μ g のタンパク質を含む粗抽出液 (20 mM クエン酸 - 40 mM リン酸水素ナトリウム (pH6.8)) 400 ml に 0.4 % のカルボキシメチルキチン溶液 (50 mM クエン酸 - 100 mM リン酸水素ナトリウム (pH6.8)) 400 ml を加え、振とうしながら、37 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベートした。その後、直ちに 1.07 ml のシャーレス変法試薬 (Imoto and Yagishita, 1971) を加えて沸騰水中で 15 分間煮沸した。常温に冷却した後、420 nm の吸光度を測定した。N-アセチル-D グルコサミンをスタンダードとして検量線を作成し、得られた結果はタンパク質粗抽出液中のタンパク質量で換算し、mg タンパク質当たり 1 時間で生成される μ mol グルコサミン等量として示した。酵素活性の測定は各形質転換体につき 2 回繰り返して平均をとった。

13. 病害抵抗性検定

各種糸状菌病のキウイフルーツの葉に対する病原性の調査：まず、キウイフルーツの糸状菌病害の原因菌として報告されている灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) 1 系統、ペスタロチア病菌 (*Pestalotiopsis* sp.) 2 系統、白紋羽病菌 (*Rosellinia necatrix*) 1 系統、果実軟腐病菌

(*Botryosphaeria* sp.、*Phomopsis* sp.)各 1 系統、褐斑病菌 (*Phomopsis* sp.) 2 系統を用い、非形質転換植物体に対して接種を行い、各種糸状菌のキウイフルーツの葉に対する病原性を調査した。接種には、PDA 培地 (佐藤ら、1983) に継代して 3 日間培養したものをコルクボーラー (直径 5 mm) で培地ごと抜いて調整した菌糸ディスクを用いた。ガラス室で育成した非形質転換植物体の展開葉を採取し、各病原菌の菌糸ディスクを葉表面に置床した。これを、湿室、25℃、暗黒条件下に置き、ネクロティックな病斑の形成を観察した。

灰色かび病接種試験。①菌糸ディスクによる接種：灰色かび病菌 (*B. cinerea*) はブドウから単離したものをを用いた。菌は PDA 培地で継代培養して維持した。接種には、上記と同様に調整した菌糸ディスクを用いた。ガラス室で同条件で育成した非形質転換植物体と形質転換植物体の葉を採取し、調整した菌糸ディスクを葉表面に置床し、湿室、20℃、暗黒条件下に置いた。形質転換体あたり、3～6 枚の葉を用いて計 12 カ所接種を行い、接種試験は 2 回繰り返した。接種から 3 日後、ネクロティックな病斑の直径を測定した。

②胞子ディスクによる接種：胞子は菌糸を PDA 培地上で 10 日間培養して形成させた。胞子ディスクの調整は Tabei ら (1998) に準じた。すなわち、胞子を 1×10^6 胞子/ml の密度で 2.5% グルコース、1 mM イノシンを加えた 1.5% 寒天に懸濁し、その懸濁液 10ml を直径 9cm のシャーレで固化したものをコルクボーラー (直径 5 mm) で抜き、この胞子ディスクを接種に用いた。培養室で育成した対照植物と形質転換体の幼苗の葉を採取し、上記のように調整した胞子ディスクを葉裏面に置床し、湿室、20℃、暗黒条件下に置いた。各形質転換体につき 4 枚の葉を用いて各 1 カ所ずつ接種を行い、4 日

後の病斑の直径を測定した。

結 果

1. 形質転換体の作出

LBA4404/pBI121-RCC2 および LBA4404/pBI121-RCG3 を接種した外植片を選択培地上で培養すると、培養約 2 週間後から外植片の切断部にカルスが形成され、培養を続けると 2～3 ヶ月後にカルス表面に不定芽が形成された (Fig. 10)。形成された不定芽をカルスごと切り取って継代し、16 時間日長条件下で培養すると、シュートの伸長が認められた。このシュートを 2.5 μ M BA、0.1 μ M NAA、50 mg/l カナマイシン、250 mg/l カルベニシリンを含む MS 培地で培養し、さらにシュートを伸長させた。

RCC2 導入形質転換体：外植片 452 (葉柄 280、茎 172) を用いて実験を行った結果、最終的に 32 のカナマイシン抵抗性シュート (葉柄由来 27、茎由来 5) が得られた。

RCG3 導入形質転換体：外植片 460 (葉 78、葉柄 367、茎 15) を用いて実験を行った結果、最終的に 27 のカナマイシン抵抗性シュート (葉由来 2、葉柄由来 24、茎由来 1) が得られた。

材料に葉片、葉柄切片、茎切片を用いたが、葉片からは 2.5 %、葉柄切片からは 7.9 %、茎切片からは 5.3% の外植片から、カナマイシン抵抗性シュートが得られた。ガラス室の材料は時期的な制約を受け、5～6 月の新梢がさかんに生育している時期の材料が最も再分化が良かった。葉片および葉柄切片の材料には完全展開葉を用いた。キウイフルーツの葉身は大きく、極めて多くの均一な切片を一

度に調整できるが、滅菌によるダメージが大きく、再分化率は低かった。一方、キウイフルーツの葉柄は長いものでは 20cm 近くあるため、葉身ほどではないが一度に切片をたくさん得ることができ、滅菌によるダメージも少なく、再分化率も高かった。

2. DNA 抽出法の検討

キウイフルーツは組織に多量の高糖類を含んでいるため、通常の CTAB 法または SDS 法では DNA が抽出できなかった。しかし、高糖類を除去するための洗浄処理を行うことにより、どちらの方法を用いた場合も DNA を抽出することができた。DNA の収量は SDS 法の方が高く、20 mg 程度のごく少量のサンプルからも DNA の抽出が可能であった。抽出した DNA サンプルへの高糖類の混入は、CTAB 法の方が少なかった。このことから、PCR 分析には、洗浄処理を加えた SDS 法を、また、サザンブロット分析には、洗浄処理を加えた CTAB 法を用いて DNA を抽出した。

3. PCR による導入遺伝子の検定

選択培地上で再生したシュートにキチナーゼ遺伝子が導入されていることを予備的に調査する目的で、PCR 分析を行った。

RCC2 導入形質転換体：pBI121-RCC2 から特異的なバンドが検出された 2 組のプライマーセット RCC2-F/Tnos-R および RCC2-F/Tnos-R2 を用い、予備的にいくつかのカナマイシン抵抗性シュートについて PCR を行ったところ、どちらのプライマーセットを用いた場合にも各々 280 bp、250 bp の特異的なバンドが検出された。RCC2-F/Tnos-R の方が濃いバンドが得られたことから、このプライマーセットを

RCC2 導入個体検定用の PCR のプライマーとして用いた。25 のシュートについて PCR で RCC2 の導入の検定を行った結果、17 のシュートで (75.0%) 想定される 280 bp のバンドが増幅された。対照として用いた非形質転換体ではバンドは検出されなかった。PCR による増幅産物がシュート内に残存したアグロバクテリウムの混入によるものではないことを確認するため、同じ DNA サンプルを用いて PCR 法で *virC* 遺伝子の検出もあわせて行ったが、バンドは検出されなかった。また、植物組織の一部を採取し、その磨砕液を PPGA 培地で培養したが、アグロバクテリウムの増殖は認められなかったので、植物体内にアグロバクテリウムの残存は無いものと判断した。PCR 分析で RCC2 の存在が確認されたシュートを発根培地に移したところ、発根し、完全な植物体となった。得られた植物体は正常な形態を示した (Fig. 11)。

RCG3 導入形質転換体：pBI121-RCG3 から特異的なバンドが検出された 5 組のプライマーセットを用い、予備的にいくつかのカナマイシン抵抗性シュートについて PCR を行ったが、どのプライマーセットを用いても RCG3 に特異的なバンドは検出されなかった。植物体内にアグロバクテリウムが残存しているかどうかを確認するため、PCR 法で *virC* 遺伝子の検出を行ったが、バンドは検出されなかった。また、植物組織の一部を採取し、磨砕液を PPGA 培地で培養したが、アグロバクテリウムの増殖は認められなかった。従って、得られたカナマイシン抵抗性植物体内にアグロバクテリウムの残存は無いと判断した。PCR 分析ではバンドが検出できなかったため、得られた全てのカナマイシン抵抗性シュートを発根培地に移したところ、23 個体が発根し、完全な植物体となった。得られた植物体

は正常な形態を示した。

4. サザンブロット分析による導入遺伝子の確認

再生植物体の植物ゲノムに導入遺伝子が組み込まれていることを確認するため、サザンブロット分析を行った。

RCC2 導入形質転換体：得られた形質転換体から無作為に 10 個体 (R1-R10) を選び、サザンブロット分析を行った。全 DNA を *Hind*III と *Sac*I で 2 重消化した場合、9 個体で CaMV 35S プロモーターおよび RCC2 に相当する約 1.8 kbp のバンドが検出された (Fig. 12)。また、1 個体 (R9) でこれより僅かにサイズの大きいバンド (約 2.0 kbp) が検出された。従って、この個体では、T-DNA が導入される際に導入遺伝子の一部に再編成が生じたものと考えられた。対照として用いた非形質転換体ではバンドは検出されなかった。全 DNA を *Hind*III または *Sac*I で消化した場合、完全な形の pBI121-RCC2 プラスミドの残存を示す約 15.0 kbp のバンドは検出されなかった。その代わりに、R9 を除く 9 個体で 1 ~ 2 本のさまざまな大きさのバンドが検出され、導入遺伝子が 1 ~ 2 コピー組み込まれていることが確認された (Fig. 13)。R9 において、*Hind*III と *Sac*I で 2 重消化した場合にバンドが検出され、*Hind*III または *Sac*I で消化した場合はバンドが検出されなかった。これは、前者の場合は *Hind*III-*Sac*I 断片 (1.8 kbp, CaMV35S プロモーター+RCC2) をプローブに、後者の場合は *Eco*RI-*Sac*I 断片 (1.1 kbp, RCC2) を用いたためと考えられ、この結果から、R9 では RCC2 が欠失しているものと推定された。しかし、PCR ではバンドが検出されていることから、PCR のプライマーを設計した部位は残っているものと考えられた。以上の結果から、これらは形質転換体であること

が証明された。

RCG3 導入形質転換体：鉢上げして完全な植物体となった 23 個体についてサザンブロット分析を行った。全 DNA を *Hind*III と *Eco*RI で二重消化した場合、15 個体 (65.2 %) で CaMV 35S プロモーター、RCG3 および nos ターミネーターに相当する約 2.0 kbp のバンドが検出された (Fig. 14)。対照として用いた非形質転換体では検出されなかった。バンドの認められた個体のうち、11 個体について全 DNA を *Hind*III または *Eco*RI で消化した。完全な形の pBI121-RCG3 プラスミドの残存を示す約 15.0 kbp のバンドは検出されなかった。その代わりに、各個体からは 1 ~ 7 本のさまざまな大きさのバンドが検出され、導入遺伝子が 1 ~ 7 コピー組み込まれていることが確認された (Fig. 15)。以上の結果から、これらの植物は形質転換体であることが証明された。これらの個体においては、PCR では RCG3 のバンドが検出されなかったが、これは、サンプル DNA の精製が不十分で、サンプル DNA に PCR を阻害する物質が含まれていたことと、用いたプライマーセットの設計が不十分であったことが原因と考えられる。このため、プラスミド DNA のように精製された鋳型 DNA が多量に含まれる条件では RCG3 断片が増幅されたが、サンプル DNA では RCG3 断片が増幅されなかったものと考えられた。

5. RNA 抽出法の検討

ノーザンブロット分析を行うため、まず、キウイフルーツからの RNA 抽出法について検討した。キウイフルーツは組織に多量の多糖類を含んでいるため、通常の SDS-フェノール法 (Sambrook et al., 1989) またはグアニジンチオシアネート法 (Sambrook et al., 1989) では RNA

を抽出することが出来なかった。そこで、多糖類を除去するために DNA 抽出の際と同じ洗浄処理を行った後、SDS-フェノール法またはグアニジンチオシアネート法を用いて RNA の抽出を行ったところ、SDS-フェノール法を用いた場合に RNA を抽出することが出来た。しかし、多糖類の除去が不十分であったため、さらに Levi らの方法、López-Gómez and Gómez-Lim の方法について検討した結果、López-Gómez and Gómez-Lim の方法で多糖類の混入が比較的少ない RNA が得られた。操作をより簡便にするため、López-Gómez and Gómez-Lim の方法と SDS-フェノール法を組み合わせた方法を用いて検討した結果、多糖類の混入が比較的少なく、分解の少ない RNA サンプルが得られた。このことから、ノーザンブロット分析にはこの方法を用いて RNA を抽出した。

6. ノーザンブロット分析による導入遺伝子の mRNA の発現解析

ノーザンブロット分析法を用い、形質転換植物において導入したキチナーゼ遺伝子の mRNA が発現しているかどうかを確認した。

RCC2 導入形質転換体：サザンブロット分析を行った 10 個体についてノーザンブロット分析を行った結果、R9 以外の 9 個体の形質転換体から、想定される 1.0 kbp の RCC2 のバンドが検出された (Fig. 16)。対照として用いた非形質転換体には検出されなかった。この結果から、RCC2 は形質転換植物の細胞内で正常に mRNA に転写されていることが明らかとなった。バンドが検出されなかった R9 はサザンブロット分析で RCC2 の部分的な欠失が確認された個体で、このため RCC2 の転写が行われなかったものと考えられた。

RCG3 導入形質転換体：サザンブロット分析で形質転換体である

ことが確認された 15 個体のうち 13 個体で想定される 1.3 kbp の RCG3 遺伝子のバンドが検出された (Fig. 17)。対照として用いた非形質転換体には検出されなかった。この結果から、バンドの検出された 13 個体では、RCG3 が形質転換植物の細胞内で正常に mRNA に転写されていることが明らかとなった。

7. 形質転換体におけるキチナーゼ活性

RCC2 導入形質転換体：ノーザンプロット分析で RCC2 からの mRNA の転写が確認された 9 個体 (R1-R8, R10) の形質転換体についてキチナーゼ活性を測定した。その結果、すべての形質転換体の葉において、非形質転換体の葉に比べてキチナーゼ活性レベルが高い傾向にあったが、有意に差が認められる個体はなかった (Table 4)。

RCG3 導入形質転換体：ノーザンプロット分析で RCG3 からの mRNA の転写が確認されたもののうち 4 個体 (RG1-RG4) についてキチナーゼ活性を測定した。その結果、形質転換体の葉では非形質転換体に比べてキチナーゼ活性レベルは高い傾向にあったが、有意に差が認められる個体はなかった (Table 5)。

8. 各種糸状菌病のキウイフルーツの葉に対する病原性の調査

非形質転換体に対し、キウイフルーツで報告のある 6 種類の糸状菌病害の原因菌 5 種 8 系統を用い、菌糸ディスクを用いて接種試験を行ったところ、安定して病斑が形成されたのは、灰色かび病菌 (*B. cinerea*)、ペスタロチア病菌 (*Pestalotiopsis* sp.)、白紋羽病菌 (*Rosellinia necatrix*) の 3 種であった。この中で、灰色かび病は、キウイフルーツの重要病害の一つで葉にも被害を及ぼすことから、形質転換体の

病害抵抗性検定に用いることとした。尚、キウイフルーツのもう一つの重要病害である果実軟腐病菌は、葉に対して病原性を示さなかった。

9. 形質転換体の灰色かび病に対する病害抵抗性検定

RCC2 導入形質転換体：上記の 9 個体の形質転換体 (R1-R8, R10) について、菌糸ディスクおよび胞子ディスクの接種によって灰色かび病菌の接種試験を行った。どちらの接種試験においても、非形質転換体と同様に形質転換体にも病斑は形成された。形成された病斑の大きさを比較したところ、形質転換体と非形質転換体の間に有意な差は認められず、抵抗性を示す個体は認められなかった。

RCG3 導入形質転換体：ノーザンブロット分析で RCG3 からの mRNA の転写が確認された 13 個体の形質転換体について、菌糸ディスクおよび胞子ディスクの接種によって灰色かび病菌の接種試験を行った。どちらの試験においても、非形質転換体と同様に形質転換体にも病斑は形成された。形成された病斑の大きさを比較したところ、形質転換体と非形質転換体の間に有意な差は認められず、抵抗性を示す個体は認められなかった。

考 察

本研究において、キウイフルーツで 2 種類のイネのキチナーゼ遺伝子を導入した形質転換体を得ることができた。しかし、これらの形質転換体の中に灰色かび病に対する抵抗性が増強された個体は認められなかった。キチナーゼ遺伝子を導入して抵抗性植物の作出

に成功したと最初に報告したのは Broglie ら (1991) で、彼らはインゲンマメのキチナーゼ遺伝子をタバコとセイヨウアブラナに導入し、*Rhizoctonia solani* に対して抵抗性が高まったと報告した。その後、同じインゲンマメキチナーゼ遺伝子を導入したタバコ近縁種 (*Nicotiana sylvestris*) が *R. solani* に対して、シュガービートのキチナーゼ遺伝子を導入したタバコが *Cercospora nicotianae* に対して、イネのキチナーゼ遺伝子を導入したイネが *R. solani* に対して、トマトのキチナーゼ遺伝子を導入したナタネが、*Cylindrosporium concentricum*、*Phoma lingam* および *Sclerotinia sclerotiorum* に対して、それぞれ抵抗性を示した (Grison et al., 1996; Lin et al., 1995; Nielsen et al., 1993; Vierheilig et al., 1993) ことが報告されている。高等植物由来のキチナーゼばかりでなく、クモノスカビ (*Rhizopus oligosporus*) から単離されたキチナーゼ遺伝子がタバコとリンゴに導入されており、タバコでは *Sclerotinia sclerotiorum* と *B. cinerea* に対して、リンゴでは *Alternaria mali* (斑点落葉病) に対して抵抗性を示したことも報告されている (星ら, 1998; Terakawa et al., 1997)。本実験で用いたものと同じイネのキチナーゼ遺伝子をタバコ、イチゴ、キュウリ、トルコギキョウ、キク、トマト、ブドウに導入した場合、タバコでは *Erysiphe cichoracearum* (うどんこ病) に対して、イチゴでは *Sphaerotheca humuli* (うどんこ病) に対して、キュウリ、トルコギキョウ、キク、トマトでは *B. cinerea* (灰色かび病) に対して、ブドウでは *Elsinoe ampelina* (黒とう病) および *Uncinula necator* (うどんこ病) に対して抵抗性を示したとの報告がなされている (浅尾, 1995; Asao et al., 1997; 丸田ら, 1998; 西澤ら, 1992, 1993a; 佐藤ら, 1999; Tabei et al., 1998; 高津ら, 1998; 山本ら, 1998, 1999)。

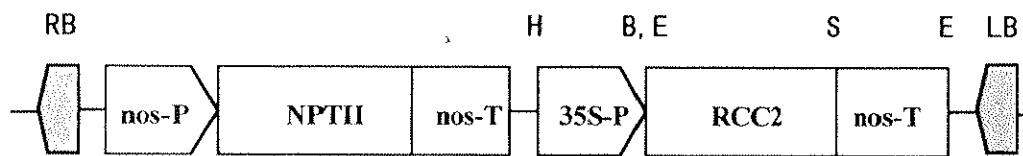
形質転換体のキチナーゼ活性と病害抵抗性の関係について明らか

な相関を示した報告はないが、Broglieら(1991)の報告では、*R. solani* に対して最も強い抵抗性を示した形質転換タバコは、最も高いキチナーゼ活性を示し、その値は葉で非形質転換体の44倍であったとしている。一方、Neuhausら(1991)は、タバコのキチナーゼ遺伝子をタバコに導入し、非形質転換体に比べ120倍のキチナーゼを生産させる形質転換体を作出したが、*Cercospora nicotianae*(タバコ白星病)に対する抵抗性は認められなかったとしている。その他のキチナーゼ遺伝子の導入による病害抵抗性の増強が認められた植物では、非形質転換体に比べてキチナーゼ蛋白量または活性が数倍程度増大していることが報告されているが、導入したキチナーゼ遺伝子の種類、用いた植物の種類、病害抵抗性検定を行った糸状菌の種類も異なるため、単純に比較することができない。また、タバコキチナーゼ遺伝子のC末端にある液胞輸送シグナル配列を除いて導入した *Nicotiana sylvestris* は *Rhizoctonia solani* に対して抵抗性を示さなくなったとされている(Vierheilig et al., 1993)ことから、生産されたキチナーゼの局在性も糸状菌抵抗性に関係するようである。著者らが本研究でキウイフルーツの病害抵抗性検定に用いた *B. cinerea* に対しては、同じイネのキチナーゼ遺伝子を導入したキュウリ(Tabei et al., 1998)、トルコギキョウ(丸田ら, 1998)、キク(高津ら, 1998)、トマト(佐藤ら, 1999)、クモノスカビのキチナーゼ遺伝子を導入したタバコ(Terakawa et al., 1997)で抵抗性の増強が認められているが、キュウリ形質転換体ではキチナーゼ蛋白量が非形質転換体の2~3倍(ELISA分析結果)に、タバコ形質転換体ではキチナーゼ活性が3~4倍に増大していたことが報告されている。

本実験におけるキウイフルーツ形質転換体では、非形質転換体に

比べてキチナーゼ活性が有意に高いものは認められなかったため、抵抗性の増強が認められないのはキチナーゼ活性が十分に上昇した個体が得られないことが原因である可能性がある。今後、より多くの形質転換体を作成し、その中からキチナーゼ活性の高い形質転換体を選抜したり、キウイフルーツ植物体内でより強く発現するプロモーター等を利用して高いキチナーゼ活性を示す形質転換体を作成したりすることにより、この点を明らかにしていく必要がある。

pBI121-RCC2



pBI121-RCG3

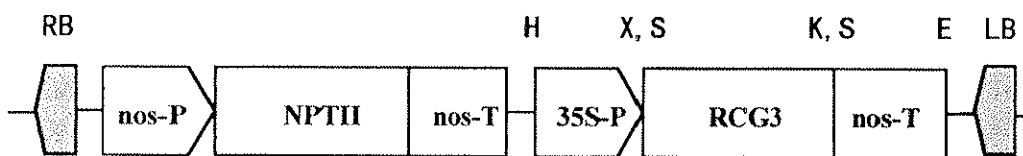


Fig. 9. Diagram of T-DNA regions of pBI121-RCC2 and pBI121-RCG3 .

RB: right border, LB: left border, nos-P: nopaline synthase gene promoter, NPTII: neomycin phosphotransferase II gene, nos-T: nopaline synthase gene terminator, 35S-P: CaMV 35S promoter, RCC2 and RCG3: rice chitinase gene, H: *HindIII*, E: *EcoRI*, B: *BamHI*, X: *XbaI*, S: *SacI*, K: *KpnI*.

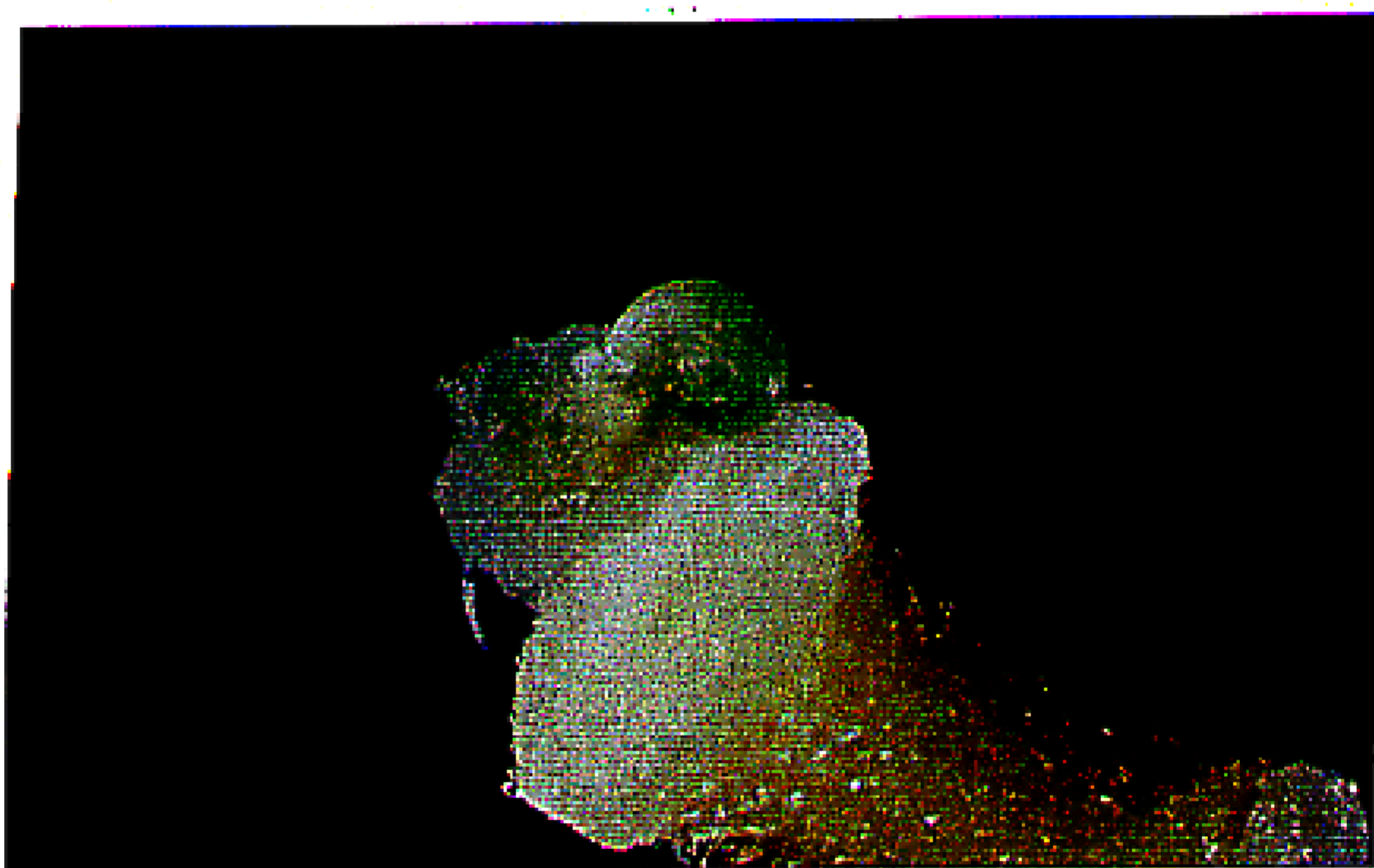


Fig. 10. An adventitious bud differentiated from the calli formed at the cut end of a petiole segment of kiwifruit.



Fig. 11. Transformed kiwifruit plants with rice chitinase gene (RCC2).

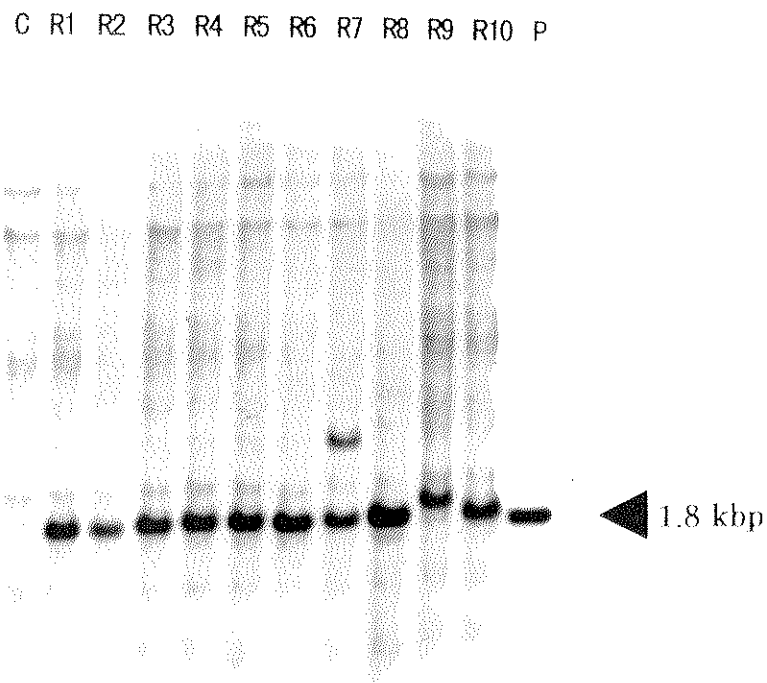


Fig. 12. Southern blot analysis of transformed kiwifruits with rice chitinase gene (RCC2) when DNAs were double-digested by *HindIII-SacI*. The CaMV 35S-P and RCC2 were detected by chemiluminescence after probing with a DIG-labeled fragment of CaMV 35S-P and RCC2.

Lane C: DNA from non-transformed control plant, lanes R1-R10. DNAs from transformants, lane P: DNA of pBI121-RCC2, ◄: Fragment size of CaMV 35S-P and RCC2.

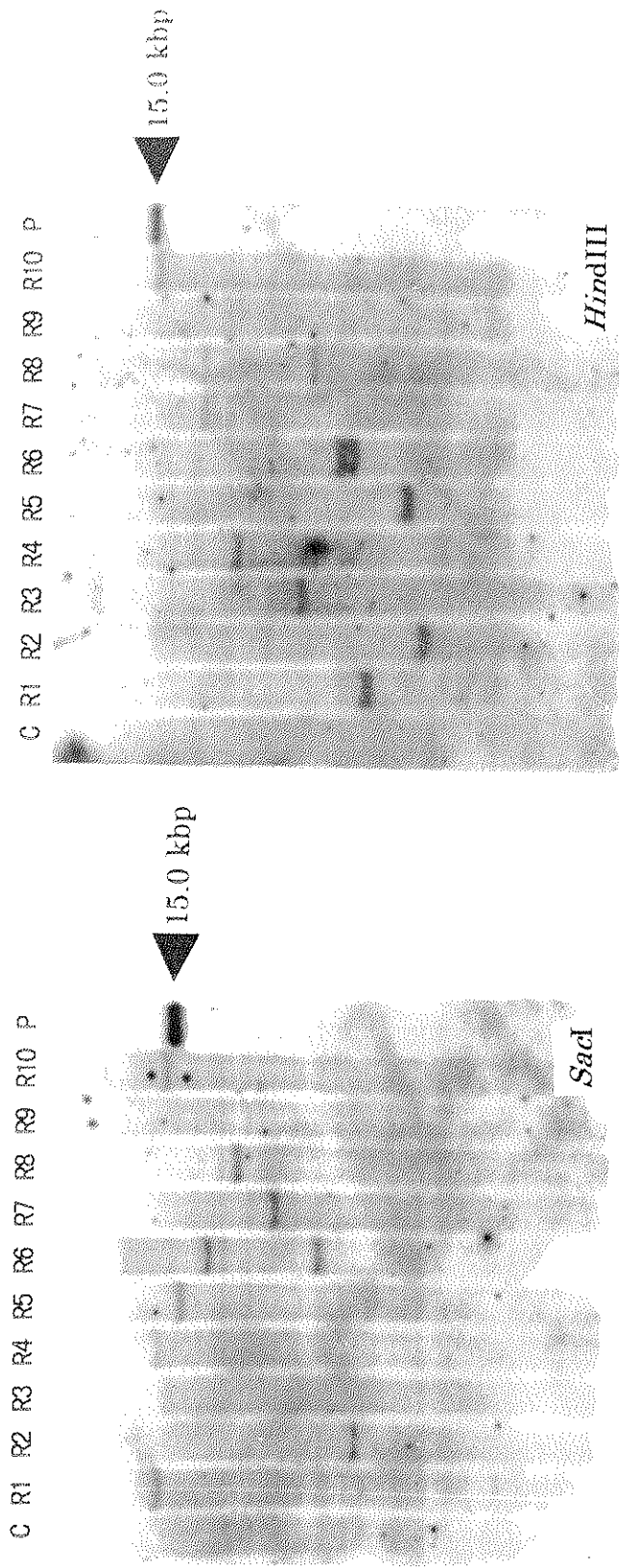


Fig. 13. Southern blot analysis of transformed kiwifruits with rice chitinase gene (RCC2) when DNAs were single-digested by *SacI* (left) or *HindIII* (right). The RCC2 was detected by chemiluminescence after probing with a DIG- labeled RCC2 fragment.

Lane C: DNA from non-transformed control plant, lanes R1-R10: DNAs from transformants, lane P: DNA of pBI121-RCC2, \blacktriangledown : Fragment size of pBI121-RCC2.

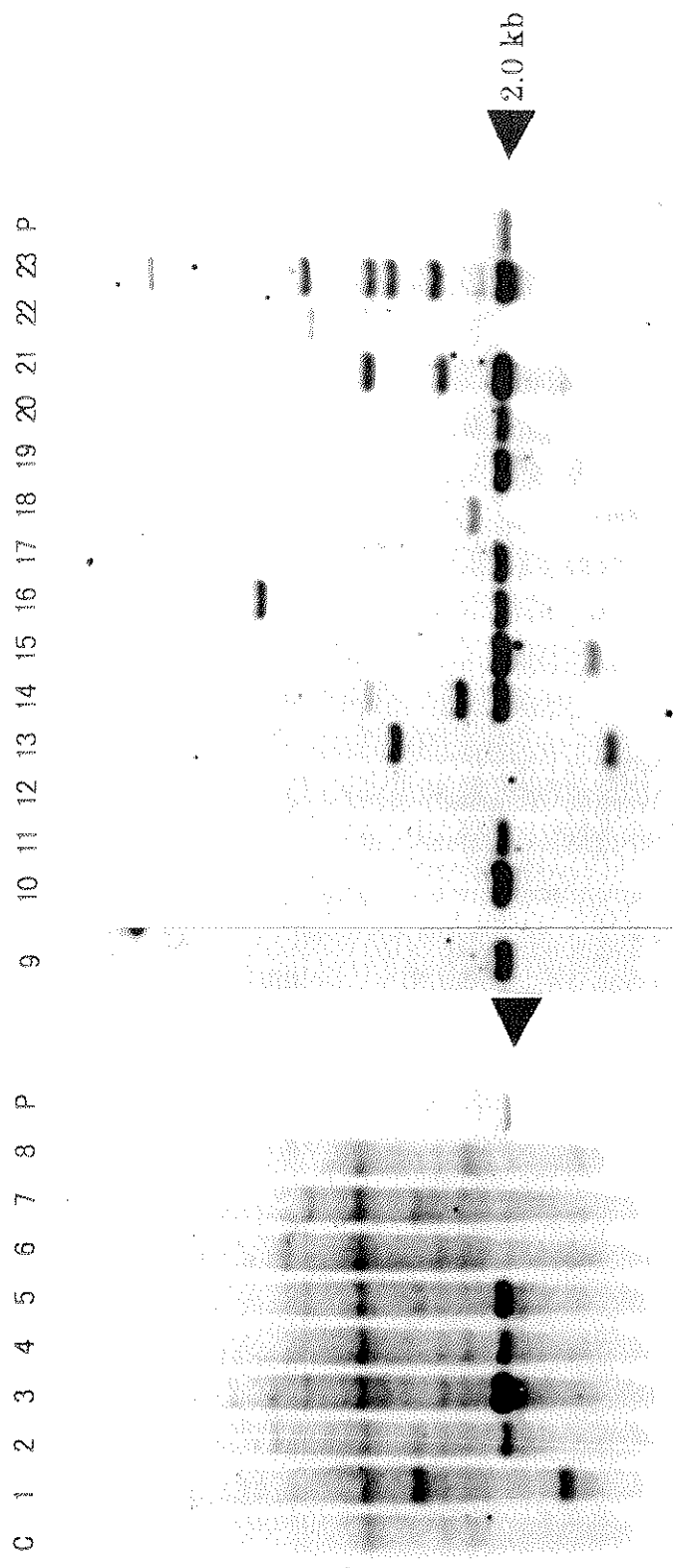


Fig. 14. Southern blot analysis of transformed kiwifruits with rice chitinase gene (RCG3) when DNAs were double-digested by *Hind*III-*Eco*RI. The RCG3 was detected by chemiluminescence after probing with a DIG-labeled RCG3 fragment.

Lane C: DNA from non-transformed control plant, lanes 1-22: DNAs from transformants, lane P: DNA of pBI121-RCG3, ◀ : Fragment size of CaMV 35S-P, RCG3 and nos-T.

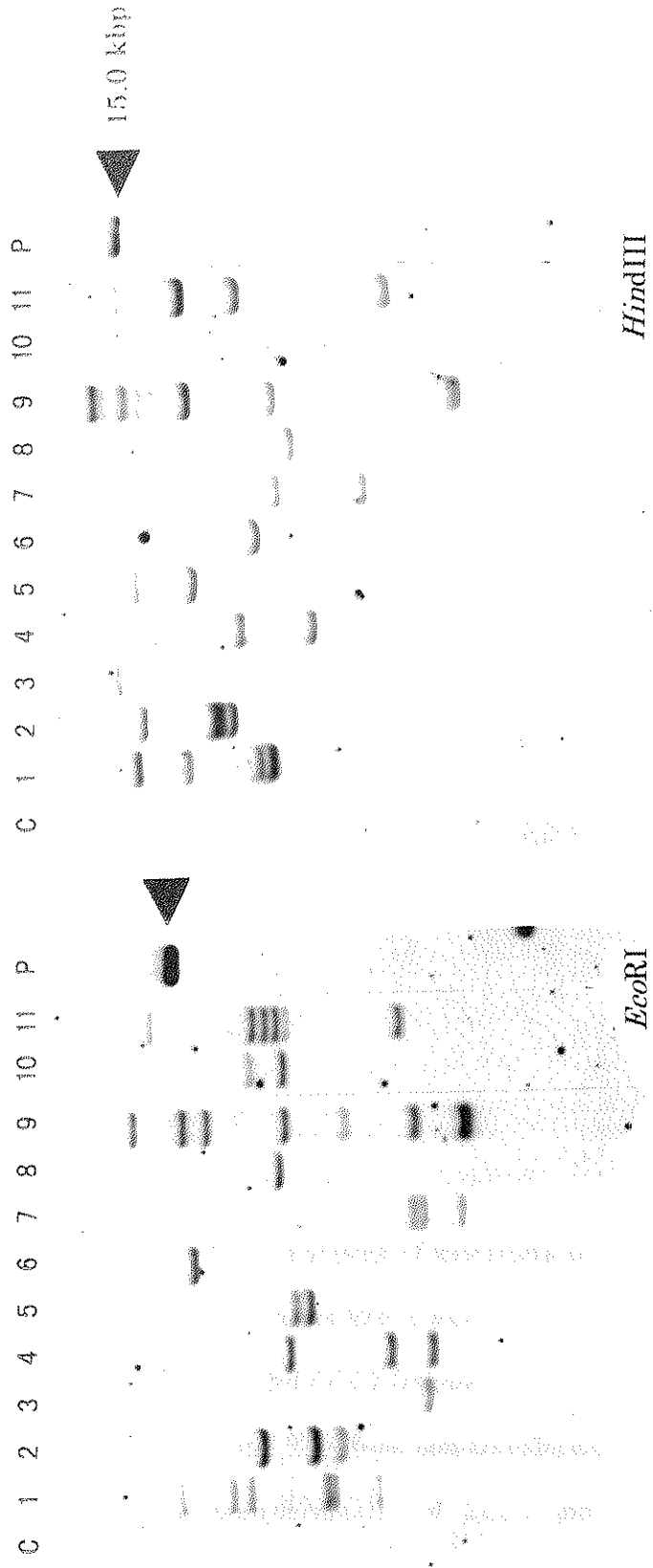


Fig. 15. Southern blot analysis of transformed kiwifruits with rice chitinase gene (RCC3) when DNAs were single-digested by *EcoRI* (right) or *HindIII* (left). The RCC3 was detected by chemiluminescence after probing with a DIG-labeled RCC3 fragment.

Lane C: DNA from non-transformed control plant, lanes 1-11: DNAs from transformants, lane P: DNA of pBI121-RCC3, ▼ : Fragment size of pBI121-RCC3.

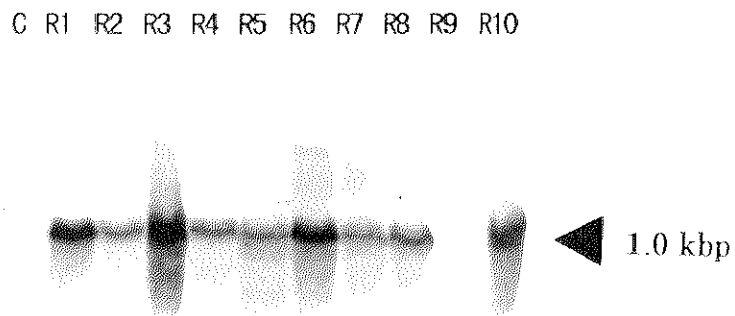


Fig. 16. Northern blot analysis of kiwifruits transformed with rice chitinase gene (RCC2). The mRNA of RCC2 was detected by chemiluminescence after probing with a DIG-labeled RCC2 fragment.

Lane C: total RNA from non-transformed control plant, lanes R1-R10: total RNAs from transformants, ◀: Size of mRNA from RCC2.

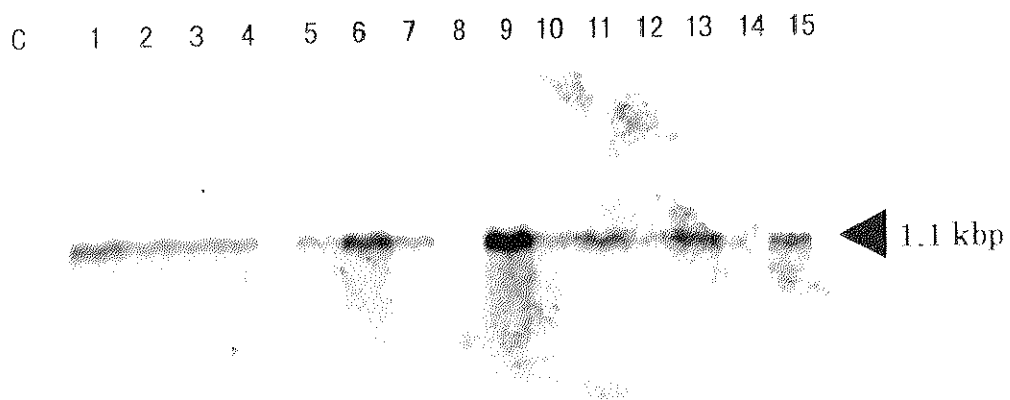


Fig. 17. Northern blot analysis of kiwifruits transformed with rice chitinase gene (RCG3). The mRNA of RCG3 was detected by chemiluminescence after probing with a DIG-labeled RCG3 fragment.

Lane C: total RNA from non-transformed control plant, lanes 1-16: total RNAs from transformants (lanes 1-4: which same as RG1-RG4 in Table 5), ◀ : Size of mRNA from RCG3.

Table 4. Chitinase activity in young leaves of transformed kiwifruits with rice chitinase gene (RCC2). Cont.: Non-transformed control plant, R1-R8 and R10: Transformants.

N-acetyl-D-glucosamine (μ moles/hr·mg of protein)	
Cont.	3.5
R 1	4.8
R 2	5.8
R 3	4.1
R 4	4.3
R 5	6.5
R 6	5.7
R 7	5.1
R 8	4.6
R10	5.0

Table 5. Chitinase activity in young leaves of transformed kiwifruits with rice chitinase gene (RCG3). Cont.: Non-transformed control plant, RG1-RG4: Transformants.

N-acetyl-D-glucosamine (μ moles/hr·mg of protein)	
Cont.	3.8
RG 1	5.5
RG 2	6.6
RG 3	6.8
RG 4	6.2

第2節 ダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼ遺伝子のキウイフルーツへの導入

β -1,3-エンドグルカナーゼは、植物病原菌を含む多くの糸状菌の細胞壁の主要な構成要素である β -1,3-グルカンを加水分解する酵素である。健康な植物体では β -1,3-エンドグルカナーゼは通常低いレベルにあるが、植物病原菌の感染や傷害に伴って β -1,3-エンドグルカナーゼが誘導的に産生されることから、本酵素の誘導はキチナーゼと同様に植物の防御反応に関連していると推定されている。Keen and Yoshikawa (1983) はダイズとダイズ疫病菌との相互作用について研究し、ダイズの β -1,3-エンドグルカナーゼは直接的に植物病原菌の生育を阻害しないが、抗菌性ファイトアレキシンの産出を誘導するエリシターを病原菌の細胞壁から可溶化する働きのあることを報告した。ダイズの β -1,3-エンドグルカナーゼの cDNA は既にクローニングされ、塩基配列が決定されている (Takeuchi et al., 1990)。この cDNA を CaMV 35S プロモーターに連結して発現させたタバコの形質転換体は、*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (タバコ疫病菌) および *Alternaria alternata* (タバコ野火病菌) に対して強い抵抗性を示したと報告されている (Yoshikawa et al., 1993)。

これらの結果を受け、本実験ではダイズの β -1,3-エンドグルカナーゼ cDNA をキウイフルーツに導入し、キウイフルーツの糸状菌病害抵抗性を改良しようと試みた。

材料および方法

1. 植物材料および外植片の調整

前節の材料および方法に記載した方法で調整した。

2. アグロバクテリウムの系統

BIN 19 (Bevan, 1984) を起源とするバイナリーベクター pROKla-EG (Yoshikawa et al., 1993) を保持しているアグロバクテリウム LBA4404 系統 (Hoekema et al., 1983) を用いた。pROKla-EG は T-DNA 領域に nos プロモーターに連結した NPTII 遺伝子および CaMV 35S プロモーターに連結したダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼ cDNA を持つプラスミドである (Fig. 18)。

pROKla-EG を保有する *Escherichia coli* JM103 を元北大理学部教授吉川正明博士 (故人) から譲渡を受け、pRK2013 を保有する *E. coli* HB101 を用いたトリペアレンタルメーティング法 (Lichtenstein and Draper, 1985) によって、pROKla-EG を *A. tumefaciens* LBA4404 に導入した。

3. アグロバクテリウムの調整と外植片への接種

A. tumefaciens LBA4404/pROKla-EG を 50 mg/l カナマイシン、100 mg/l ストレプトマイシン、50 mg/l リファンピシンを含む LB 培地で 28 °C で一昼夜振とう培養して増殖させた。この細菌培養液を第 2 章の材料および方法と同様に調整し、接種を行った。

4. 形質転換体の選抜と植物体再生

形質転換体の選抜は、前節の材料および方法と同様に、Matsura (1993) の方法に従って行った。

5. 植物体内の残存アグロバクテリウムの確認

再生植物体内におけるアグロバクテリウムの残存を、第2章の材料および方法と同様に調べた。

6. PCRによる導入遺伝子の早期確認

前節の材料および方法と同様に、得られた再生植物体の葉から全DNAを抽出し、PCRを行った。プライマーとしては、CaMV 35Sプロモーター部分の塩基配列から1種類(P35S-F: 5'GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG TAA G3')、ダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼcDNA部分から1種類(EG-R1: 5'AAC CAT CTT GCA CTA CCA CCG AAG G3')、*nos*ターミネーター部分から2種類(Tnos-R: 5'GTA TAA TTG CGG GAC TCT AAT3', Tnos-R2: 5'CTC ATA AAT AAC GTC ATG CAT TAC A3')を設計し、P35S-F/EG-R1(増幅される遺伝子断片長: 830 bp)、P35S-F/Tnos-R (1510 bp)、P35S-F/Tnos-R2 (1480 bp)の3組のプライマーセットを用い、pROKla-EGおよび非形質転換体のDNAを鋳型としてPCRを行った。PCR反応はアステック社製PC-700型機を用い、94℃ 1分間、40℃ 2分間、72℃ 3分間を45回繰り返した後、72℃で7分間行った。その後、再生個体のDNAを鋳型として同様にPCRを行い、導入遺伝子の検出に適したプライマーセットを決定した。また、植物体内のアグロバクテリウムの残存を調べるため、第2章のカキの場合と同様にアグロバクテリウム中の野生型Ti-plasmidの*virC*遺伝子をPCRで検出した。導入遺伝子が確認できたシュートについては、前節の材料および方法と同様に発根処理をして発根させた。

7. サザンブロット分析による導入遺伝子の確認

得られた再生植物体から無作為に 10 個体を選び、前節の材料および方法に記載した方法で全 DNA を抽出し、サザンブロット分析を行った。サンプルあたり 5 μ g の DNA を用いて *Hind*III と *Eco*RI で二重消化した。また、別の 5 μ g の DNA を *Hind*III または *Eco*RI で消化した。消化した DNA はアガロースゲル電気泳動で分画した後、ナイロンメンブランに転写した。プローブとしては、約 1.3 kbp の pEG488 (故吉川正明博士より譲渡、Takeuchi et al., 1990) の *Eco*RI-*Eco*RI 断片 (ダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼ cDNA) を DIG ラベルしたものを用いた。ハイブリダイゼーションおよびターゲット DNA の検出は第 2 章の材料および方法と同様に行った。

8. ノーザンブロット分析

サザンブロット分析に用いたものと同じ 10 個体の形質転換体の若い葉から、前節の材料および方法に記載した方法で全 RNA を抽出し、ノーザンブロット分析を行った。プローブには、サザンブロット分析と同じ DIG ラベルしたダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼ cDNA (1.3 kbp) を用いた。

9. 全タンパク質の抽出

形質転換体の若い葉から全タンパク質を抽出した。約 500 mg の若い葉を採取し、液体窒素中で凍結して粉砕し、0.5 mg 不溶性 PVP、10 ml の抽出バッファー (100 mM トリシュー塩酸 (pH 7.3)、0.5 M EDTA、10 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM ジチオスレイトール) を加えてよく懸濁した。これを 18,000 $\times g$ で 4 $^{\circ}$ C、20 分間遠心分離し、上清を得た。この上清に硫酸アンモニウムを最終濃度 80 % になるよ

うに加え、4℃で2時間以上静置した。これを18,000×gで4℃、20分間遠心分離し、沈殿を得た。得られた沈殿を0.5 mlの50 mM 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.5)に溶解し、不溶物を取り除くために18,000×gで4℃、20分間遠心分離して上清を得た。この上清をファルマシア NAP-5 カラム(Pharmacia Biotech、USA)を用いて脱塩し、タンパク質粗抽出液とした。タンパク質粗抽出液中のタンパク質含量はBradford(1976)に従い、bovine serum albumin をスタンダードとし、Protein Assay Dye Reagent(Bio-Rad、USA)を用いて測定した。

10. ウェスタンブロット分析

ダイズβ-1,3-エンドグルカナーゼ抗体を用いてウェスタンブロット分析を行った。サンプル当たり10 μgの可溶性全タンパク質を、厚さ1 mmの10%アクリルアミド分離用ゲルおよび5%アクリルアミド濃縮用ゲルを用いて、定法に従ってSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動して分画した。ゲルをアトー社製ホライズブロット転写装置のプロトコールに従って前処理し、同装置を用いてPVDFメンブラン(クリアブロット・P膜、アトー社製)に転写した。タンパク質の検出はWestern-Light Chemiluminescent Detection System(Tropix、USA)を用いて行った。プロトコールに従い、ダイズβ-1,3-エンドグルカナーゼ抗体を反応させた後、アルカリフォスファターゼで標識された2次抗体を作用させ、disodium 3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan]-4-yl) phenyl phosphate(CSPD)を基質とした化学発光によってターゲットタンパク質を検出した。

11. エンドグルカナーゼ活性の測定

タンパク質粗抽出液のエンドグルカナーゼ活性は、Keen and Yoshikawa (1983) の方法に準じ、ラミナリンを基質とした場合の還元糖の生成量を測定することによって行った。20 μ l のタンパク質粗抽出液を 0.5 mg/ml ラミナリンを含む 480 μ l の 50 mM 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.5) に加え、35 $^{\circ}$ C、30 分間振とうしながらインキュベートした。その後直ちに 500 μ l のネルソン alkaline copper reagent を加え、ネルソン法 (Ashwell, 1957) によって還元糖の生成量を測定した。グルコースをスタンダードとして検量線を作成し、得られた結果はタンパク質粗抽出液中のタンパク質量で換算し、mg タンパク質当たり 1 分間に生成される nmol グルコース等量として示した。酵素活性の測定は各形質転換体につき少なくとも 3 回繰り返して行った。得られた結果について、Statistical Analysis System (SAS) を用いて一元配置の分散分析を行い、Dunnett の片側 t 検定法を用いて対照に対する有意差の検定を行った。

12. 病害抵抗性検定

菌糸ディスクによる接種：前節の材料および方法に記載した方法で接種を行った。形質転換体あたり 3 ~ 6 枚の葉を用いて計 12 カ所接種を行い、接種試験は 3 回繰り返した。

胞子ディスクによる接種：前節の材料および方法に記載した方法で接種を行った。各形質転換体につき 4 枚の葉を用いて各 1 カ所ずつ接種を行った。

得られた結果について、SAS を用いて一元配置の分散分析を行い、Tukey の多重比較法を用いて有意差の検定を行った。

結 果

1. 形質転換体の作出

LBA4404/pROKla-EG を接種した外植片を選択培地上で培養すると、培養約 2 週間後から外植片の切断部にカルスが形成され、培養を続けると 2 ~ 3 ヶ月後にカルス表面に不定芽が形成された。最終的に外植片 452 (葉 111、葉柄 247、茎 174) から、31 のカナマイシン抵抗性シュート (葉由来 9、葉柄由来 16、茎由来 6) が得られた。

2. PCR 分析による導入遺伝子の確認

選択培地上で再生したシュートに β -1,3-エンドグルカナーゼ cDNA が導入されていることを予備的に調査する目的で、PCR 分析を行った。p35-F/EG-R1、p35-F/Tnos-R、p35-F/Tnos-R2 の 3 組のプライマーセットを用いてプラスミド DNA を鋳型として PCR を行ったところ、どのプライマーセットを用いた場合でも、各々 830 bp、1510 bp、1480 bp の想定されるサイズの遺伝子断片が増幅された。予備的にいくつかのカナマイシン抵抗性シュートについて、この 3 つのプライマーセットを用いて PCR を行ったところ、p35-F/EG-R1 を用いた場合にのみ特異的な 830 bp のバンドが検出され、あとの 2 組ではバンドは検出されなかった。このことから、形質転換体の PCR 分析には p35-F/EG-R1 をプライマーセットとして用いた。その結果、26 のカナマイシン耐性シュートのうち、65.4 % に相当する 17 本で目的とする 830 bp の大きさのバンドが検出された。対照として用いた非形質転換体ではバンドは検出されなかった。PCR による増幅産物がシュート内に残

存したアグロバクテリウムの混入によるものでないことを確認するため、同じ DNA サンプルを用いて PCR 法で *virC* 遺伝子の検出もあわせて行ったが、バンドは検出されなかった。また、植物組織の一部を採取し、その磨砕液を PPGA 培地で培養したが、アグロバクテリウムの増殖は認められず、植物体内にアグロバクテリウムの残存は無いと判断した。PCR 分析で β -1,3-エンドグルカナーゼ cDNA の存在が確認されたシュートを発根培地に移したところ、発根し、完全な植物体となった。得られた植物体は正常な形態を示した (Fig. 19)。

3. サザンブロット分析による導入遺伝子の確認

再生植物体の植物ゲノムに導入遺伝子が組み込まれていることを確認するため、無作為に 10 個体を選んで (T1-T10) サザンブロット分析を行った。全 DNA を *Hind*III と *Eco*RI で二重消化した場合、CaMV 35S プロモーター、 β -1,3-エンドグルカナーゼ cDNA、*nos* ターミナーターに相当する 2.3 kbp のバンドが全ての個体で検出された。しかし、コントロールとして用いた非形質転換体では検出されなかった (Fig. 20)。全 DNA を *Hind*III または *Eco*RI で消化した場合、完全な形の pROK1a-EG プラスミドの残存を示す 15.0 kbp のバンドは検出されなかった。その代わりに、どの個体も 1 ~ 5 本のさまざまな大きさのバンドが検出され、導入遺伝子が 1 ~ 5 コピー組み込まれていることが確認され、これらは形質転換体であることが証明された (Fig. 21)。

4. ノーザンブロット分析による導入遺伝子の mRNA の発現解析

ノーザンブロット分析法を用い、形質転換植物におけるダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼ mRNA の発現を確認した。10 個の形質転換体全てで、想定される 1.3 kbp のダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼ mRNA のバンドが検出された (Fig. 22)。対照として用いた非形質転換体ではバンドは検出されなかった。この結果から、ダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼ cDNA は形質転換植物の細胞内で正常に mRNA に転写されていることが明らかとなった。ノーザンブロット分析における検出バンドの濃さは個々の形質転換植物で異なっており、特に形質転換体 'T8' は非常に濃いバンドを示した。バンドの濃さは mRNA の発現量を反映しているため、'T8' はダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼ mRNA の発現量が多いものと考えられた。

5. ウェスタンブロット分析による導入遺伝子の発現解析

ウェスタンブロット分析法を用い、形質転換植物におけるダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼの発現を確認した。10 個の形質転換体全てで、約 33.5 kDa のダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼのバンドが検出された (Fig. 23)。対照として用いた非形質転換体にはこのバンドは検出されなかった。この結果から、ダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼは形質転換植物の細胞内で産出されていることが明らかとなった。

6. 形質転換植物におけるグルカナーゼ活性

ラミナリンを基質として 10 個体の形質転換体の若い葉におけるグルカナーゼ活性を測定した。その結果、形質転換体のグルカナーゼ活性は個体によってさまざまなレベルであったが、このうち 4 個

体 (T3, T7, T8, T10) が非形質転換体に比べて有意に高いレベルを示した (Fig. 24)。最も高い活性を示した個体は T8 で、非形質転換体の約 6 倍の高いレベルであった。次いで T3、T7、T10 が非形質転換体の 3 ~ 4 倍で、残りのものは 3 倍以下であった。T8 は mRNA 発現量、タンパク質の産出量、酵素活性のいずれにおいても非常に高いレベルを示した。

7. 形質転換体の灰色かび病に対する病害抵抗性検定

3 系統の形質転換体 (T2, T8, T10) を用いて接種試験を行った。T8 は非形質転換体に比べて約 6 倍、T10 は約 4 倍のグルカナーゼ活性を示し、グルカナーゼ活性の増大が有意に認められた系統であり、一方、T2 は最も低い活性値を示し、非形質転換体と差が認められなかった個体である。形質転換体および非形質転換体の葉を用い、菌糸ディスクによる接種を行った結果、3 日後にはどの形質転換体にも非形質転換体と同様な病斑が形成された。しかし、T8 と T10 に形成された病斑の大きさは、非形質転換体に形成された病斑に比べて有意に小さかった (Table 6)。一方、T2 に形成された病斑の大きさは非形質転換体のものに比べて差が認められなかった。これらの結果から、グルカナーゼ活性レベルが高い形質転換体においては、この酵素による何らかの影響によって菌糸の生育が抑制されているものと考えられた。胞子ディスクによる接種を行った場合にも同様な結果が得られた (Table 6, Fig. 25)。接種源として菌糸ディスクを用いた場合よりも胞子ディスクを用いた場合の方が、その差はより明らかであった。胞子ディスクを用いた場合、形質転換体に接種した場合も非形質転換体に接種した場合も、胞子は胞子ディスク内で

ほぼ 100 % 発芽しており、胞子発芽率に差は認められなかった。従って、この差は胞子ディスクと菌糸ディスクにおける菌糸密度の差によるものと考えられる。

T8 と非形質転換体については、さらに胞子ディスクによる接種試験を行ったところ、同様な結果が得られた。

考 察

Yoshikawa ら (1993) は、本研究で用いたものと同じダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼ cDNA をタバコに導入し、得られた形質転換体タバコが *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* および *Alternaria alternata* に対して高度の抵抗性を示したことを報告している。この場合、形質転換タバコは非形質転換タバコの約 4 倍の β -1,3-エンドグルカナーゼ活性を示し、グルカナーゼ活性のレベルと糸状菌抵抗性の程度には高い相関が認められたとしている。伊藤ら (1994, 1995) は同じ cDNA を加茂ナスに導入し、高いグルカナーゼ活性を持つ形質転換体の加茂ナスは *Phytophthora capsici* (疫病菌) に対して高度の抵抗性を示したと報告している。ダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼは直接的に菌糸の生育を阻害しないが、菌糸の細胞壁から抗菌性のファイトアレキシンを誘導するエリシターを可溶化させる働きを持つことが明らかにされている (Keen and Yoshikawa, 1983)。Yoshikawa ら (1993) は、糸状菌の攻撃を受けたとき、ダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼ cDNA を導入した形質転換タバコでは非形質転換タバコに比べて、葉におけるフェニルアラニンアンモニアリアーゼのような植物の防御反応に関与しているとされる遺伝子の転写物がより多く誘導されること

を報告している。

本実験において、形質転換キウイフルーツは、灰色かび病に対して高度な病害抵抗性を示さなかった。しかし、酵素活性の高い形質転換体では非形質転換体に比べて病斑の拡大が抑制され、導入された cDNA から産出されたダイズ β -1,3-エンドグルカナーゼがなんらかの防御反応を誘導し、植物細胞内に侵入した菌糸の伸長を阻害したものと考えられた。本研究における形質転換キウイフルーツにおいてどのような反応が起こり、それがどのようにして病斑の拡大を遅らせるのかについては明らかではなく、今後の詳細な研究が必要である。また、本実験では、灰色かび病を引き起こす *B. cinerea* に対する葉における抵抗性についてのみ調査したが、もう一つの重要病害である果実軟腐病については抵抗性検定を行っていない。これは、果実軟腐病を引き起こす *Botryosphaeria* sp. と *Phomopsis* sp. は果実にしか病原性を示さず、予備的に葉に病原菌の接種を行っても病斑が形成されなかったためである。本実験で得られた形質転換キウイフルーツはまだ小さく、果実を付けるまでには数年かかるため、今後、結実を待ってこれらの病害に対する抵抗性検定を行う必要がある。また、灰色かび病についても本実験では葉における抵抗性について調査したが、実際に問題となるのは収穫後の果実であるため、果実における抵抗性について再度検定する必要がある。

pROKla-EG

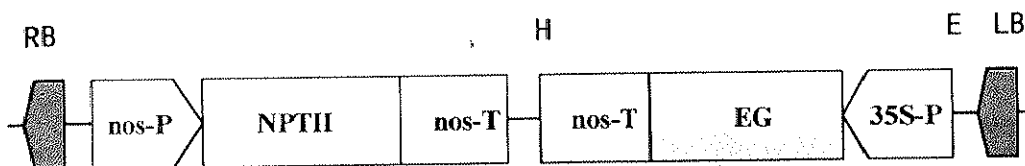


Fig. 18. Diagram of T-DNA region of pROKla-EG cDNA.

RB: right border, LB: left border, nos-P: nopaline synthase gene promoter, NPTII: neomycin phosphotransferase II gene, nos-T: nopaline synthase gene terminator, 35S-P: CaMV 35S promoter, EG: soybean β -1,3-endoglucanase cDNA, H: *Hind*III, E: *Eco*RI.



Fig. 19. Transformed kiwifruit plants with soybean β -1,3-endoglucanase cDNA.

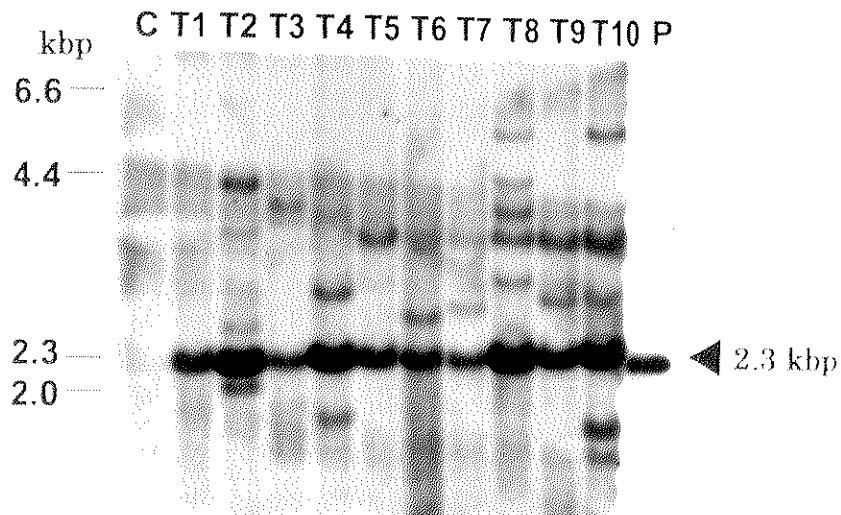


Fig. 20. Southern blot analysis of transformed kiwifruits with soybean β -1,3-endoglucanase cDNA when DNAs were double-digested by *Hind*III-*Eco*RI. The CaMV 35S-P, soybean β -1,3-endoglucanase cDNA and nos-T were detected by chemiluminescence after probing with a DIG-labeled fragment of CaMV 35S-P, soybean β -1,3-endoglucanase cDNA and nos-T.

Lane C: DNA from non-transformed control plant, lanes T1-T10: DNAs from transformants, lane P: DNA of pROKla-EG, ◀ : Fragment size of CaMV 35S-P, soybean β -1,3-endoglucanase cDNA and nos-T.

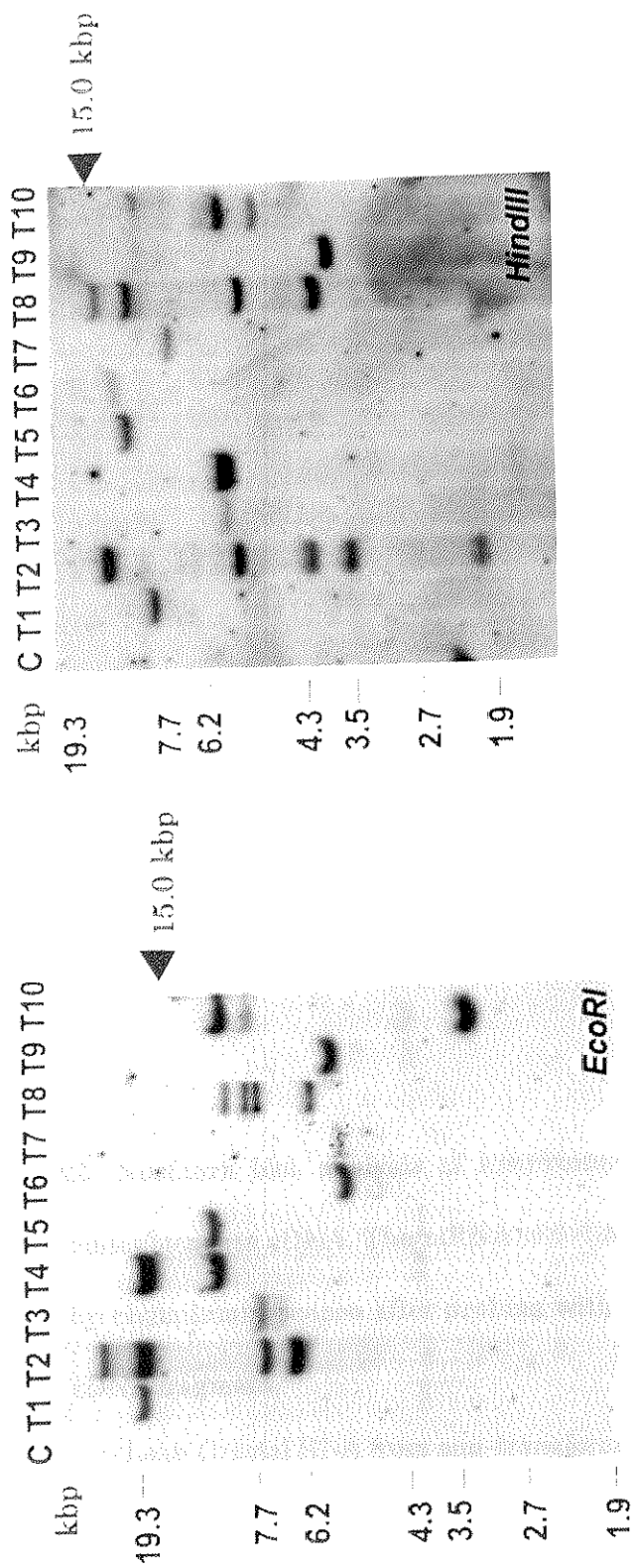


Fig. 21. Southern blot analysis of transformed kiwifruits with soybean β -1,3-endoglucanase cDNA when DNAs were single-digested by *EcoRI* (left) or *HindIII* (right). The β -1,3-endoglucanase cDNA was detected by chemiluminescence after probing with a DIG-labeled β -1,3-endoglucanase cDNA fragment.

Lane C: DNA from non-transformed control plant, lanes T1-T10: DNAs from transformants, lane P: DNA of pROKla-EG, \blacktriangle : Fragment size of pROKla-EG.

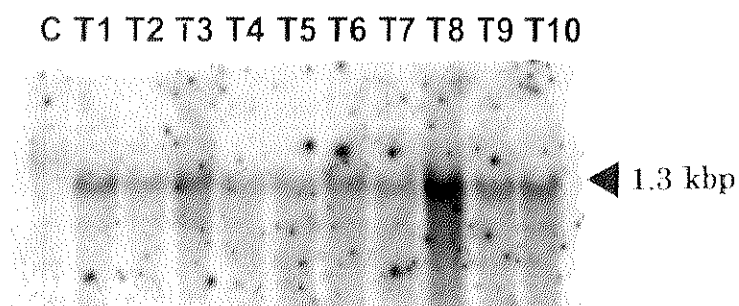


Fig. 22. Northern blot analysis of kiwifruits transformed with soybean β -1,3-endoglucanase cDNA. The mRNA of β -1,3-endoglucanase cDNA was detected by chemiluminescence after probing with a DIG-labeled β -1,3-endoglucanase cDNA fragment.

Lane C: total RNA from non-transformed control plant, lanes T1-T10: total RNAs from transformants, ◀: Size of mRNA from soybean β -1,3-endoglucanase cDNA.

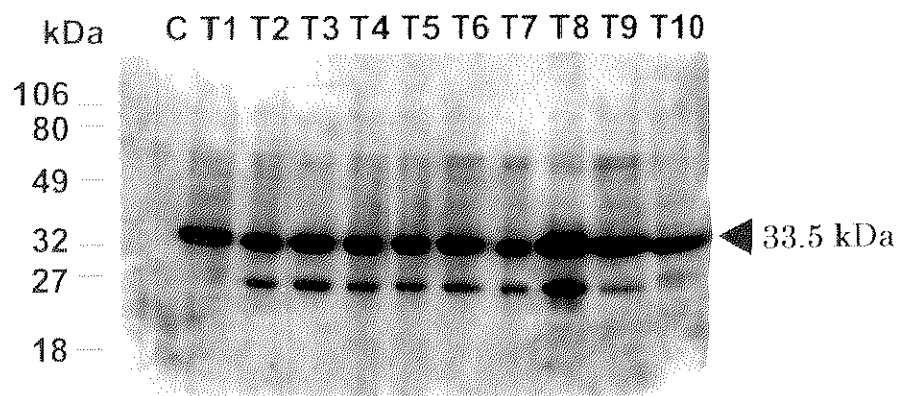


Fig. 23. Western blot analysis of transformed kiwifruit with soybean β -1,3-endoglucanase cDNA using an antiserum specific against the soybean β -1,3-endoglucanase.

Lane C: non-transformed control plant, lanes T1-T10: transformants. \blacktriangleleft : Size of soybean β -1,3-endoglucanase.

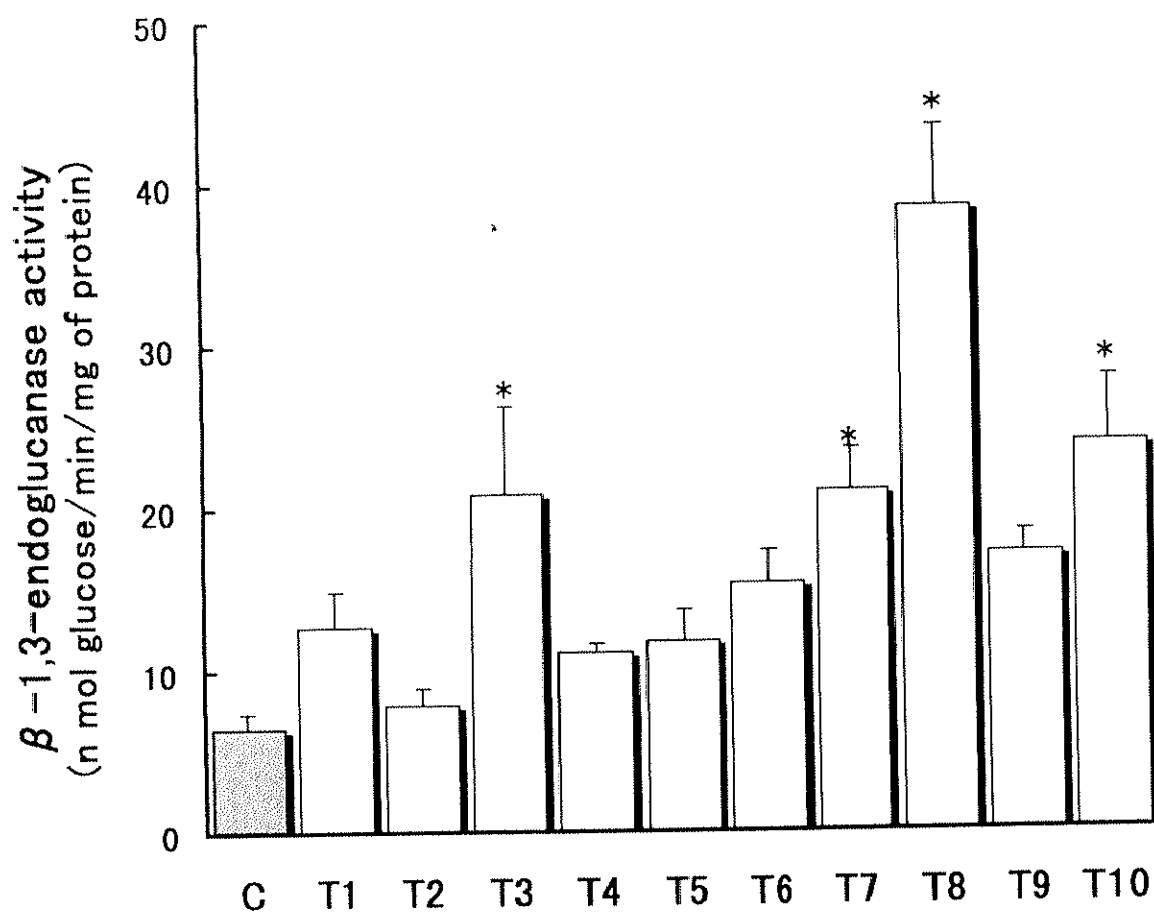


Fig. 24. β -1,3-Endoglucanase activity in young leaves of kiwifruit transformed with soybean β -1,3-endoglucanase cDNA. C: non-transformed control plant, T1-T10: transformants. Vertical bars represent SE of means and asterisks indicate a significant difference from the control at the 0.05 % level by Dunnett's one-way t-test.

Table 6. Means of diameter of the lesion formed on leaves of control and transformed kiwifruit with soybean β -1,3-endoglucanase cDNA by inoculation with *Botrytis cinerea*. Different letters indicate significant difference at the 0.05 % level by Tukey's standardized-range test

	Lesion diameter (mm \pm SE)			
	Inoculation with mycelial disks		Inoculation with spore disks	
	(after 3 days)		(after 4 days)	
Control	29.2	\pm 0.44 a	18.7	\pm 0.51 a
T2	29.6	\pm 0.62 a	20.9	\pm 2.12 a
T8	26.1	\pm 0.35 b	10.6	\pm 0.37 b
T10	27.2	\pm 0.41 b	12.2	\pm 0.79 b



Fig. 25. Disease symptoms formed on leaves of the control (left) and the transformed kiwifruit with soybean β -1,3-endoglucanase cDNA (right) by inoculation with spore disks of *B. cinerea*.

要 約

キウイフルーツの糸状菌病に対する抵抗性を強化することを目的とし、キウイフルーツに CaMV 35S プロモーターに連結したイネキチナーゼ遺伝子およびダイズ β -1,3 エンドグルカナーゼ遺伝子を導入し、形質転換体を作成した。イネキチナーゼ遺伝子導入形質転換体では、導入遺伝子は植物細胞内で mRNA に転写されていたが、非形質転換体と比べて有意にキチナーゼ活性が高まった個体は得られず、灰色かび病に対する病害抵抗性の増強が認められた個体は得られなかった。ダイズ β -1,3 エンドグルカナーゼ遺伝子導入形質転換体では、非形質転換体と比べて有意にグルカナーゼ活性が高まった個体が得られた。最も高い活性を示した形質転換体は非形質転換体の約 6 倍のグルカナーゼ活性を示した。灰色かび病に対する病害抵抗性検定では、高度な病害抵抗性を示す個体は得られなかったが、グルカナーゼ活性の高まった形質転換体では、非形質転換体と比べて病斑の拡大がかなり抑制された。

要 約

要 約