

第4章. キウイフルーツへの

ヒト上皮細胞成長因子遺伝子の導入

果樹は嗜好性食品として主に消費される作物で、市場では菓子と競合する食品である。現在、果物の消費量は頭打ちの状態、よりいっそうの消費拡大または利用用途の拡大をはかるため、果樹に新たな機能性を探す試みが行われている。著者らは第3章において、形質転換法を用い、キウイフルーツに病害抵抗性遺伝子を導入し、交雑育種法では容易に得られなかった病害抵抗性を賦与することを試みたが、形質転換の技術はこのような農業上重要な問題を解決するのに非常に有効であるばかりでなく、従来考えられなかったような機能性を持つ遺伝子を導入し、高付加価値機能性食品として、また医薬品等の材料として、果物に新たな需要を作り出すことも可能である。

ヒト上皮細胞成長因子 (hEGF) は動物起源の約 50 個のアミノ酸からなる小さい蛋白質で、分子量約 6000 の強力な増殖誘導性ペプチドである。in vitro では動物の上皮細胞の増殖を促進する働きを持っている。hEGF の細胞成長促進機能を利用し、角膜手術後の角膜の回復やその他の創傷治療薬としての臨床開発が進められている (Meyer-Ingold, 1993)。また、胃酸分泌を抑制する作用も示すため、抗潰瘍剤としての臨床試験も行われている (Carpenter and Cohen, 1979)。

このような生理活性を持つ蛋白質を含む果実は、機能性食品としての利用が考えられることから、形質転換系が確立しているキウイフルーツに hEGF 遺伝子を導入し、新機能を有する果樹を作出する

ことを試みた。

材料および方法

1. 植物材料および外植片の調整

第3章の材料および方法と同様に調整した。

2. アグロバクテリウムの系統

バイナリーベクター pBE121 (Higo 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。pBE121 は T-DNA 領域に CaMV 35S プロモーターに連結した hEGF 遺伝子と 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. 26)。

pBE121 を保有する *Escherichia coli* JM109 を生物資源研究所の肥後健一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、pBE121 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/pBE121 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、第3章の材料および方法と同様に、Matsutaら(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に記載した方法で調べた。

6. PCRによる導入遺伝子の確認

得られた再生植物体の葉から、第2章の材料および方法に記載した方法で全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、hEGFのN末端とC末端の遺伝子配列から設計したものをを用いた(5'AAC AGC GAC TCT GAA TGC CCG3'、5'CCA CCA TTT CAG GTC GCG GTA3')。PCR反応はアステック社製PC-700型機を用いて行い、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。PCR産物はTAEバッファー中の2.0%アガロースゲルで100V、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、5μM IBAを含むMS培地に置床し、26℃ 16時間日長条件(3,000 lux)で培養を続け、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全DNAを抽出し、サザンブロット分析を行った。再生植物の若い葉より、第2章の材料および方法に記載した方法と同様に、洗浄処理を加えたCTAB法を用いて全DNAを抽

出した。サンプルあたり 5 μ g の DNA を *SacI* と *HindIII* で二重消化した。消化した DNA は TAE バッファー中の 1.0 % アガロースゲルで電気泳動して分画した後、ナイロンメンブランに転写した。プローブには、pBE121 の 0.2 kbp の *BamHI-SacI* 断片 (hEGF 遺伝子) を DIG ラベルして用いた。ハイブリダイゼーションおよび hEGF 遺伝子の検出は第 2 章の材料および方法と同様に行った。

8. RT-PCR による導入遺伝子の発現解析

形質転換キウイフルーツにおける hEGF 遺伝子の発現を RT-PCR 法によって確認した。形質転換体の若い葉から、第 3 章の材料および方法に記載されている方法で全 RNA を抽出した。さらに、DNA の混入を防ぐため、トリフルオロ酢酸セシウム溶液 (1.51 g/ml CsTFA, 0.1 M EDTA (pH7.0)) を用いて 92,000 $\times g$ 、16 時間超遠心して RNA を精製した。この RNA を鋳型とし、GeneAmp ThermoStable rTth Reverse Transcriptase RNA PCR kit (Perkin-Elmer Cetus, USA) を用いて RT-PCR を行った。プライマーには、前述した hEGF の N 末端と C 末端の遺伝子配列から設計したものをを用いた。PCR 反応は、アステック社製 PC-700 型機を用いて行い、94 $^{\circ}$ C 1 分間、72 $^{\circ}$ C 1 分間、40 $^{\circ}$ C 2 分間を 40 回繰り返した後、72 $^{\circ}$ C で 7 分間行った。また、RT-PCR の産物が RNA サンプルに混入したゲノミック DNA 由来のものではないことを確認するため、Taq ポリメラーゼを用いて同様に PCR を行った。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。

9. hEGF 生産量の測定

形質転換体の若い葉約 200 mg を採取し、200 μ l TBEK バッファー (150 mM トリシュー塩酸 (pH7.5)、1 M ホウ酸、50 mM EDTA、500 mM 酢酸カリウム) と海砂を加え、氷中でホモジェナイズした。これを 11,000 $\times g$ で 4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離し、上清を得た。再度 11,000 $\times g$ で 4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離して残渣を除き、その上清 50 μ l を hEGF 生産量の測定に用いた。hEGF 生産量の測定は、EGF-Assay [Human epidermal growth factor (EGF) quantitative ELISA assay] (Oncogene Science, USA) を用いて行った (Fig. 27)。測定は各サンプルにつき 2 回行った。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。

結 果

1. 形質転換体の作出

LBA4404/pBE-121 を接種した外植片を選択培地上で培養した。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。形成された不定芽を第 3 章と同様に培養し、さらにシュートを伸長させた。結果として 86 の組織片 (葉 42、葉柄 44) から 10 系統のカナマイシン耐性シュート (葉由来 5、葉柄由来 5) が得られた。

2. 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 hEGF 遺伝子が導入されている

かどうかを予備的に調査する目的で PCR 分析を行った。その結果、9 個のシュートで想定される約 150 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ないことを確認するため、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された。PCR 分析で hEGF 遺伝子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、最終的に 5 系統が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. 28)。

3. サザンブロット分析による導入遺伝子の確認

得られた 5 系統の植物体に hEGF 遺伝子が導入さ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。得られた 5 系統の再生植物の全てで、CaMV 35S プロモーターおよび hEGF 遺伝子に相当する 0.9 kbp のバンドが検出された。しかし、対照として用いた非形質転換体では検出されなかった (Fig. 29)。

4. RT-PCR による hEGF 遺伝子の発現解析

形質転換体における hEGF 遺伝子の発現を RT-PCR によって分析した。得られた 5 系統の形質転換体全てで、約 150 bp の hEGF 遺伝子のバンドが検出された。しかし、対照として用いた非形質転換体では検出されなかった (Fig. 30)。Taq ポリメラーゼを用いて同様に PCR 分析を行った場合、バンドは検出されなかった。このことから、RT-PCR で検出されたバンドは RNA サンプルに混入したゲノミック

DNA 由来のものではなく、hEGF 遺伝子の転写産物由来のものであることが確認された。

5. 形質転換体における hEGF 生産量の測定

葉からのタンパク質粗抽出液における hEGF 含量を、hEGF 特異抗体を用いた ELISA 法によって分析した。本実験で用いた方法では、非形質転換体の若い葉においても、可溶性タンパク質 1 mg あたり 35 pg の hEGF 相当の反応が認められた。しかし、形質転換体では非形質転換体の 2～3 倍の値を示したため、これら形質転換体の葉で hEGF が生産されていることが確認された (Fig. 31)。hEGF 含量が最も高かった形質転換体では、バックグラウンドを差し引いた値で可溶性タンパク質 1 mg あたり約 65 pg の hEGF の蓄積が確認された。

考 察

これまでに多くの動物起源の遺伝子が植物に導入され、その結果、動物起源のタンパク質やペプチドが植物体内で生産されることが報告されている (Edelbaum et al., 1992; Hiatt et al., 1989; Matsumoto et al., 1993; Schroeder et al., 1991; Zhu et al., 1994)。しかし、一般に植物体内でのその産出レベルは低く、これは植物細胞質内でこれらのタンパク質が安定でないことが原因であると考えられている。しかし、より強く発現を誘導するプロモーターを用いたり、他の安定したタンパク質との融合タンパク質を作らせることでタンパク質発現を高められることが明らかにされている (De Zoeten et al., 1989; Hamamoto et al., 1993; Krebbers and Vandekerckhove, 1990; Takamatsu et al., 1990; Takase and Hagiwara,

1998; Vandekerckhove et al., 1989)。

本実験において、CaMV 35S プロモーターに連結した hEGF 遺伝子を導入した形質転換キウイフルーツで検出された hEGF は、最大で可溶性タンパク質 1 mg あたり約 65 pg でその生産量は極めて低いレベルであった。同じ hEGF 遺伝子を導入した形質転換タバコでは、可溶性タンパク質 1 mg あたり約 60 pg のタンパク質が生産されることが報告されており (Higo et al., 1993)、キウイフルーツの場合もほぼ同程度であった。生産量が低い原因としては、hEGF 遺伝子の mRNA への転写が効率的に行われていないこと、合成されたペプチドが植物細胞内で安定でないこと等が考えられる。hEGF の収量を増やすためには、より強く発現するプロモーターを用いたり、遺伝子配列を植物でよく使用されているコドンに置き換えるなどの対策が必要と考えられる。さらに、生産された hEGF が液胞に送られて分解されている可能性もあるため、各種シグナルペプチドを付加して hEGF が細胞間隙や小胞体中に蓄積するようにするのも有効であると考えられる。また、果実で hEGF を生産させるためには、果実特異的に発現するプロモーターの利用が有効と考えられるが、この場合は幼植物段階での早期選抜のために同時に幼苗で発現するプロモーターに連結したマーカー遺伝子を導入するなどの対策が必要である。

現在、hEGF 形質転換キウイフルーツはまだ結実に至っていないため、果実における hEGF の生産量は不明である。仮に葉と同程度の生産量があるとすると、キウイフルーツ果実 1 個 (約 100 g) には約 1 g のタンパク質が含まれているので、30 ~ 60 ng の hEGF が得られることになる。実際に *in vitro* で hEGF が動物細胞の増殖を促進する濃度は 25 pg/ml であるとされているので (Carpenter and Zengegui,

1986)、上記のような hEGF を含んだ果実は、何らかの生物学上の効果を示す可能性があるとして期待される。今後、形質転換植物が果実を着果するのを待って、果実での hEGF 産出量を調査する予定である。

本実験は、ヒトに対して生理活性のあるペプチドの遺伝子を果樹に導入し、その生産を証明した最初の例である。他に、経口生ワクチンの生産を目的として、ヒトの病原微生物の抗原遺伝子をバナナ (Katz, 1997; Mason and Arntzen, 1995; Mor et al., 1998; Smith et al., 1997)、リンゴ (Sandhu et al., 1999) に導入する試みも行われている。これらは、形質転換法を用いることで植物には本来存在しない遺伝子を導入し、何らかの有益な物質を果実内で生産させることにより、付加価値を持った新しい果樹を作出する可能性を示唆するものであり、新しい育種の方向性を示すものと考えられる。

pBE121

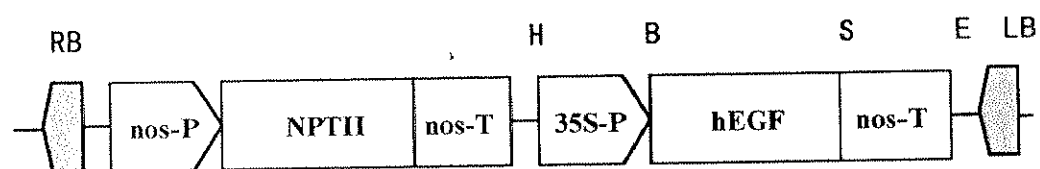


Fig. 26. Diagram of T-DNA region of pBE121.

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, hEGF: chemically synthesized gene for human epidermal growth factor, H: *Hind*III, B: *Bam*HI, S: *Sac*I, E: *Eco*RI.

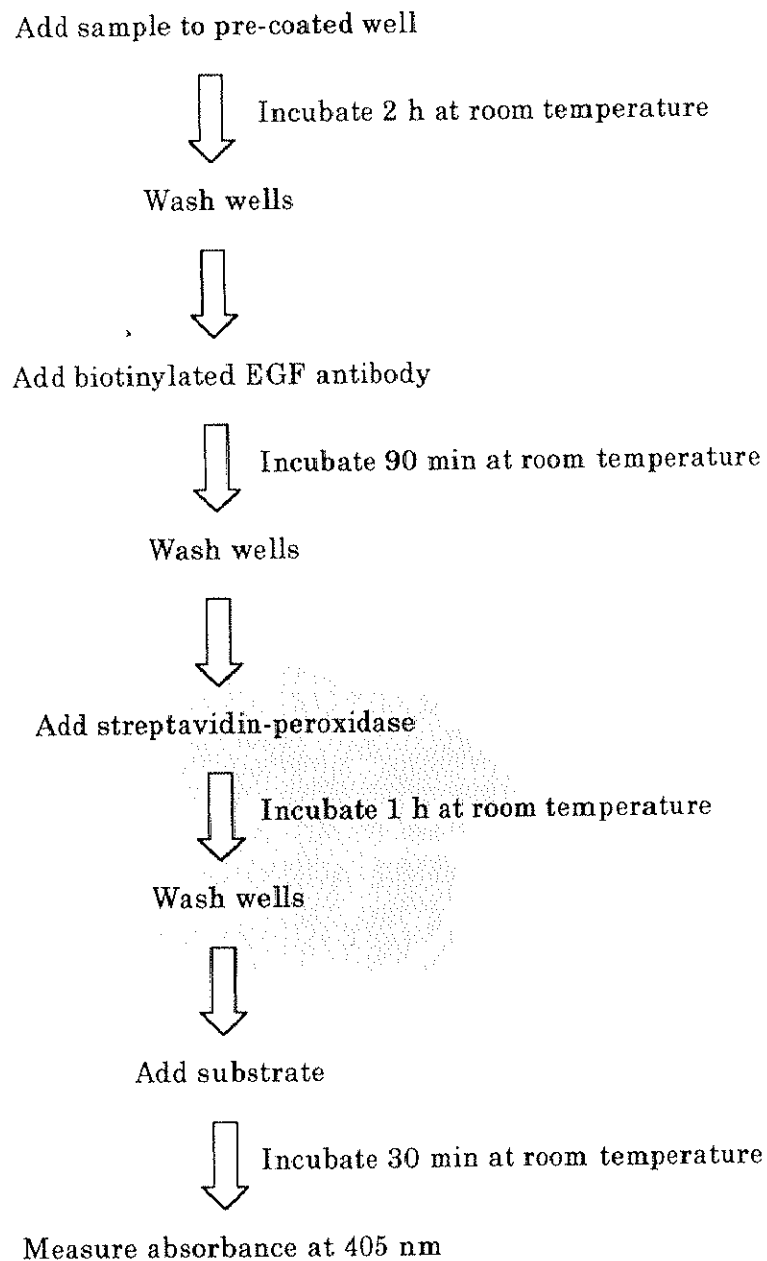


Fig. 27. Summary of procedure of quantitative ELISA assay of human epidermal growth factor (hEGF) using 'EGF-Assay' (Oncogene Science, USA).

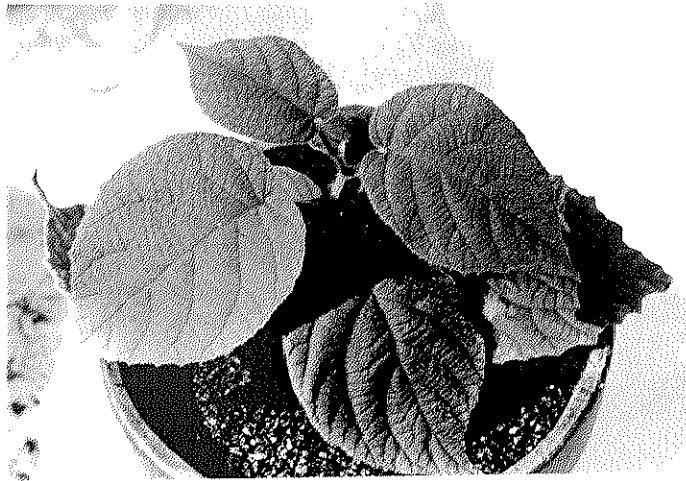


Fig. 28. A kiwifruit plant transformed with hEGF gene.

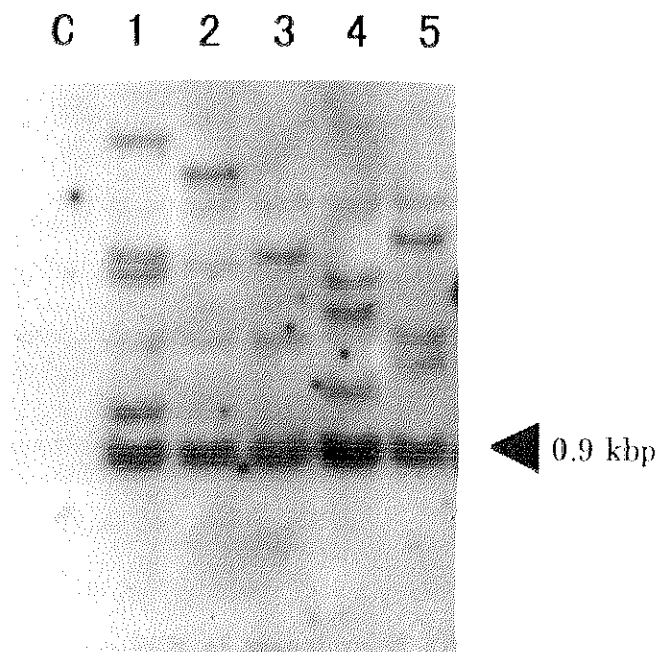


Fig. 29. Southern blot analysis of transformed kiwifruits with hEGF gene when DNAs were double-digested by *SacI-HindIII*. The hEGF gene was detected by chemiluminescence after probing with a DIG-labeled hEGF gene fragment.

Lane C: DNA from non-transformed control plant, lanes 1-5: DNAs from transformants. ◀: Fragment size of CaMV 35S-P and hEGF gene.

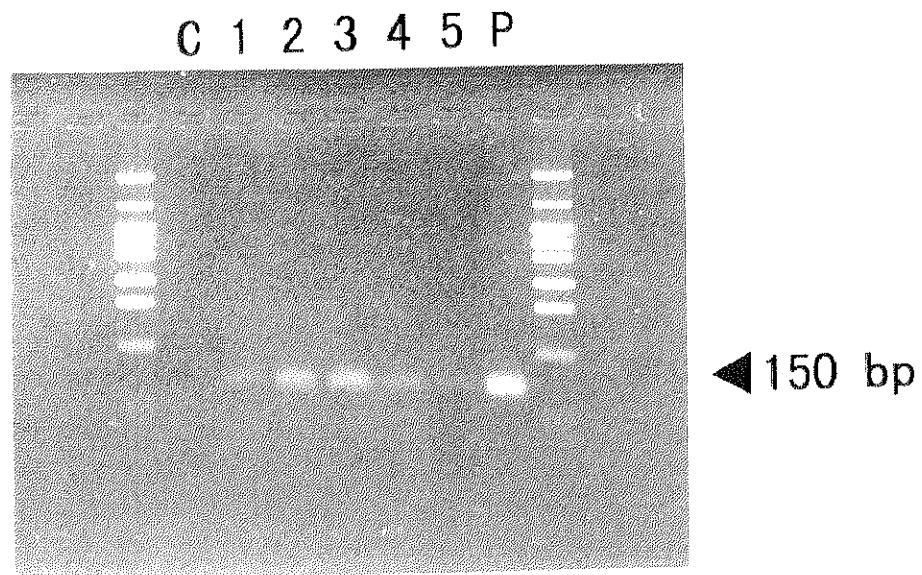


Fig. 30. Reverse transcription-PCR of transformed kiwifruit. Lane C: DNA from non-transformed control plant, lanes 1-5: DNAs from transformants, lane P: DNA of pBE121 as a positive control. DNA size marker (pHY Maker) is shown at the both sides of the gel. ◀ : Fragment size of hEGF gene.

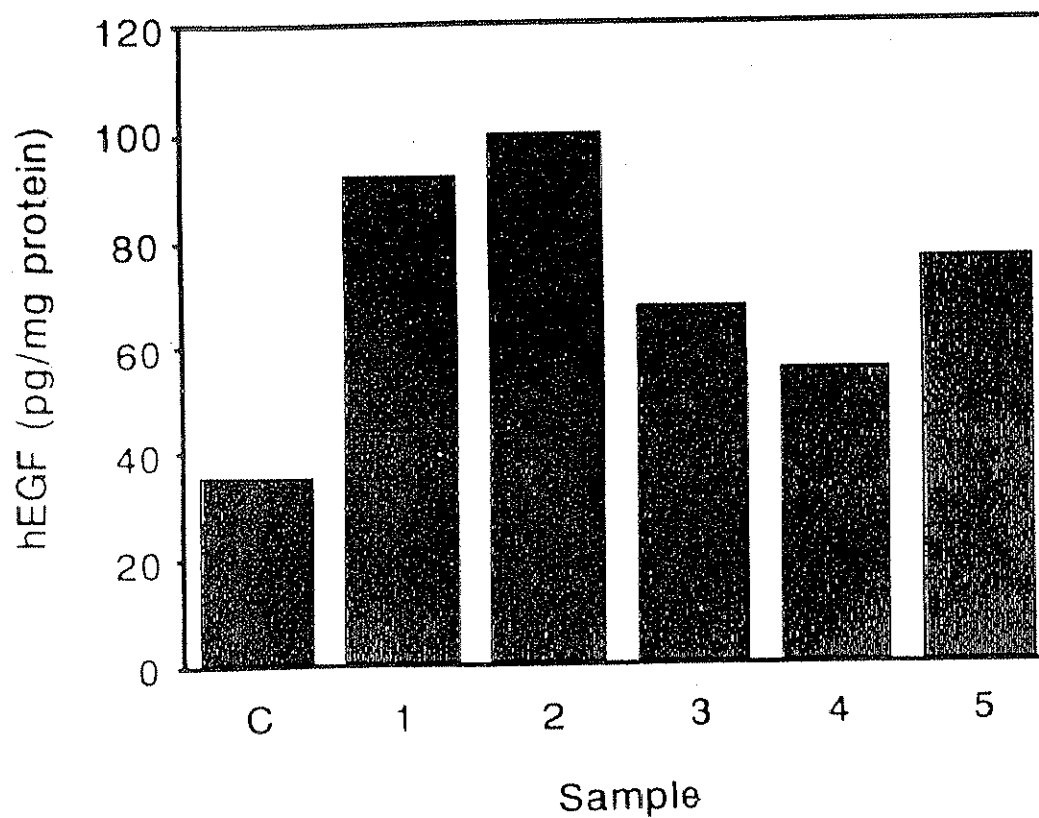


Fig. 31. Human epidermal growth factor (hEGF) protein in the soluble fraction of leaf extracts from the transformed kiwifruits detected by ELISA assay. C: non-transformed control plant, 1-5: transformants. The amounts of hEGF protein are shown as pg per mg soluble protein.

要 約

キウイフルーツに CaMV 35S プロモーターに連結したヒト上皮細胞成長因子 (hEGF) 遺伝子を導入し、形質転換体を作成した。得られた形質転換体の若い葉において hEGF が産出されており、最も多く hEGF を産出する形質転換体では、可溶性タンパク 1 mg あたり 65 pg の hEGF が生産されていた。