

■原 著■ 2004 年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

遺伝子組換えタマネギに生分解性プラスチック原料を 生合成させる試み II

安積良隆^{1,3} 上西愛子² 野村 研² 北 宜裕² 齋藤光實¹

Trial to Establish to New Technique to Produce Raw Materials for Bio-Degradable Plastic in Genetically Modified Onion (*Allium cepa* L.) II

Yoshitaka Azumi^{1,3}, Aiko Kaminishi², Ken Nomura²,
Nobuhiro Kita² and Terumi Saito¹

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Biotechnology and Bio-Resource Division, Kanagawa Prefectural Agricultural Research Institute, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1204, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: yoshitk@info.kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We have been conducting experiments for the purpose of exploiting new techniques to produce beneficial materials, such as bio-degradable plastic, within genetically modified (GM) onion cells. A transforming procedure to produce GM onions was established, in which *Agrobacterium tumefaciens* was used to introduce foreign genes into the onion genome. As a result, we obtained GM onion seedlings, expressing introduced Green Fluorescent Protein (GFP) gene, by selecting on hygromycin-containing medium. An *Arabidopsis* gene, *AtMTP1* encoding vacuole membrane protein, was examined for its capability as a guide to transfer foreign gene products into vacuoles. *AtMTP1-GFP* fusion genes were delivered into the epidermis cells of an onion bulb by a particle gun. Under a fluorescence microscope, the gene product was detected on vacuole membranes. Our present results, together with the former results, indicated that it is possible to express foreign genes under control of an alliinase gene promoter, and accumulate the gene product in the vacuole at a high level.

Keywords: *Allium cepa* L., genetically modified (GM) plant, GFP (Green Fluorescent Protein), *AtMTP1*

序論

日本ではタマネギは明治時代に伝染病予防に効果があるということで一般に食されるようになったが、エジプトでは古代からスタミナ食品として栽培されてきた。現在では栄養価が高く、健康促進効果があるタマネギは、毎日の食卓に欠かせない野菜である。タマネギは血液をさらさらにする効果があると言われているが、これはアリシンなどの含硫化合物である硫化アリルが血糖値を低下させる効果があるためである。タマネギの辛み成分のもとであるアリシンは傷害によって液胞から放出されたアリインから細胞質に存在するアリイナーゼの働きによって細胞内で生合成される^{1,2)}。また、タマネギにはケルセチン

と呼ばれる抗酸化フラボノイドの一種が多量に含まれており、血栓予防に働いている。さらにタマネギに多く含まれるグルタチオンは酸化還元状態を正常に維持する作用があり、肝臓機能強化に効果がある。タマネギは寒冷地で良く育ち、土地の肥えていないところや狭隘な耕地でも容易に栽培することができる。また収穫した、いわゆるタマネギ（鱗茎部分）は室温で傷みにくく、保存性に優れている。輸送に便利であるため世界中で生産され、その収穫量はトマトについて野菜の中では第二位である。

石油から工業的に作られるプラスチック製品は自然界では分解されにくく、不要になったものはゴミ

として貯まってしまい、環境に悪影響を及ぼす。ある種の細菌はプラスチック原料となる poly(D-3-hydroxybutylate) (PHB) を合成する。これを原料に製造されたプラスチック、生分解性プラスチック (bio-degradable plastic; BDP) は生物の働きによって容易に分解される。神奈川県理学部生物科学科の齋藤光実研究室では PHB を合成あるいは分解する細菌の研究を行ってきた^{3,4)}。これまでに PHB の合成に必要な酵素の遺伝子 *phbA*, *phbB*, *phbC* などをクローニングしている。これらの遺伝子を導入すれば、その細胞内で PHB を合成できる可能性がある。

これまでに神奈川県農業総合研究所・生物資源部では神奈川県特産のタマネギ、湘南レッドを材料にアリイナーゼ遺伝子の解析を行ってきた。これまでにアリイナーゼ遺伝子の cDNA クローンを単離するのに成功しており、アリイナーゼ遺伝子のプロモーターの解析も行っている。また、タマネギ植物への遺伝子導入、つまりタマネギ形質転換体の作製の成功例は世界的に見ても数少ないが、これについても研究を行っており、形質転換系の確立に取り組んでいる⁵⁾。形質転換植物を作製するには遺伝子が導入された細胞より植物体を再生する必要があるが、この時重要なのはサイトカイニンとオーキシンの濃度とその比である。平成 14 年度までに、我々はタマネギのカルス細胞から植物体を再生するのに成功した。また選択形質として、カナマイシン耐性よりもハイグロマイシン耐性の方が選択効率が高いことがわかってきた⁶⁾。そこで昨年度は、35S プロモーターと呼ばれる植物細胞で高発現を誘導するプロモーターに Green Fluorescent Protein の遺伝子と β -Glucuronidase 遺伝子を融合させた 35S::GFP::GUS 融合遺伝子をハイグロマイシン耐性の遺伝子と連結させて、タマネギに形質転換する実験を行った⁷⁾。本年度は、得られた植物体を培養してレポーター遺伝子の発現を調べた。

タマネギの鱗莖葉細胞の大部分は液胞が占める。一般に液胞は老廃物の集積場のように考えられがちであるが、タマネギの鱗莖細胞の場合、アリンがここに蓄えられているなど、貯蔵庫としての機能があると考えられる。発芽時に必要なエネルギー源やその他の代謝産物もここに貯蔵されているものと考えられる。液胞に細胞内で合成されたタンパク質を局在化させるシグナルが存在すると考えられているが、これまでのところその配列は明らかにされていない。シロイヌナズナで液胞膜に局在するタンパク質の遺伝子 *AtMTP1* が報告されている⁸⁾。この遺伝子の産物は液胞膜を 6 回貫通するため、融合させた

い遺伝子の挿入部位を操作することによって液胞膜の内側にも細胞質側にも配置することができると考えられる。シロイヌナズナの *AtMTP1* の遺伝子産物がタマネギの細胞に於いても液胞膜上に局在するかどうかについても調べた。

材料と方法

形質転換タマネギの栽培

形質転換を行ったタマネギカルスを昨年度の方法を引き継ぎ、培養した⁹⁾。以下に形質転換体作製と培養の方法を簡単に説明する。基本的に操作は無菌的に行い、培養は 24°C、蛍光灯連続照射下で行った。エタノールで滅菌したタマネギの種子を、2 mg/L の 2,4-D を含む MS 培地 (カルス誘導培地) 上で培養し、カルスを形成させた。カルス部分を切り取り、35S::GFP::GUS 融合遺伝子を植物形質転換用デスチネーションベクター上に持つアグロバクテリウム培養液中に浸した。このベクターは島根大学農学部中川強助教授から供与されたもので、融合遺伝子は pGWB6 というハイグロマイシン耐性を賦与するベクターに組み込まれている。これを Gene Pulser (Bio-Rad) を用いてアグロバクテリウム C58 株に導入した。2 mg/L 2,4-D と 10 mg/L アセトシリシリンゴンを含む MS 培地 (共存培地) 上で 3 日間暗所で培養し、形質転換を誘発した。カルスを 200 mg/L クラフォランで洗浄後、10 mg/L 2-ip、200 mg/L クラフォランを含む MS 培地 (除菌培地) 上で 1 週間培養した。その後、10 mg/L 2-ip、200 mg/L クラフォラン、25 mg/L ハイグロマイシン含む MS 培地 (再分化培地) 上で培養した。シュートが成長した時点で、200 mg/L クラフォラン、25 mg/L ハイグロマイシン含む MS 培地 (発根培地) に移し、発根を促した。十分に発根した再生植物体は、非滅菌の通常の土壌で生育させることができる。

形質転換の確認のため、融合遺伝子の発現の有無を調べた。発根し成長しているタマネギに培養瓶の外から、青色 LED (発光ダイオード) ランプ ((株) 美館, MC-L12B) からの励起光を照射して、550 nm 以下の波長の光を遮断するフィルター (ケンコー, YA3) を装着したデジタルカメラで撮影した。

遺伝子導入実験

AtMTP1 クローンは名古屋大学生命農学研究科前島正義教授に分与して頂いた。大腸菌 DH5 α に形質転換後、Flexi Prep DNA purification kit (Amersham) を用いてクローン DNA を精製した。10 μ g のクローンの DNA と 2 mg の金粒子を 50 μ L の TE 緩衝液中で混合し、エタノール沈澱する

ことによって、金粒子に DNA を吸着させた。遠心後、100 μ L のエタノールに懸濁した。遺伝子銃 IDERA ((株) タナカ、札幌) を用いて、一度に 5 μ L の金粒子懸濁液をタマネギ鱗茎葉の芯側の表皮細胞に打ち込んだ。24 $^{\circ}$ C で 20 時間培養後、表皮を剥がし、蛍光顕微鏡 (オリンパス BX60) で観察した。

結果

タマネギ形質転換実験

我々はこれまでタマネギ形質転換体を作製するための条件検討を行って来た。昨年度、これまでに行っ

たタマネギ形質転換の条件検討の結果に従って、タマネギに *35S::GFP::GUS* 融合遺伝子を導入する実験を行った。本年度は、タマネギ形質転換体作製実験を引き続き行った。用いた遺伝子は *35S* プロモーターと *GFP* 遺伝子と *GUS* 遺伝子を融合させた人工遺伝子である。*35S* プロモーターはカリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーターで、植物細胞内で高い発現を誘導する。*GFP* 遺伝子は Green Fluorescent Protein をコードする遺伝子で、この遺伝子産物は生きた細胞内でも励起光を照射すると緑の蛍光を発し、容易に検出することができること

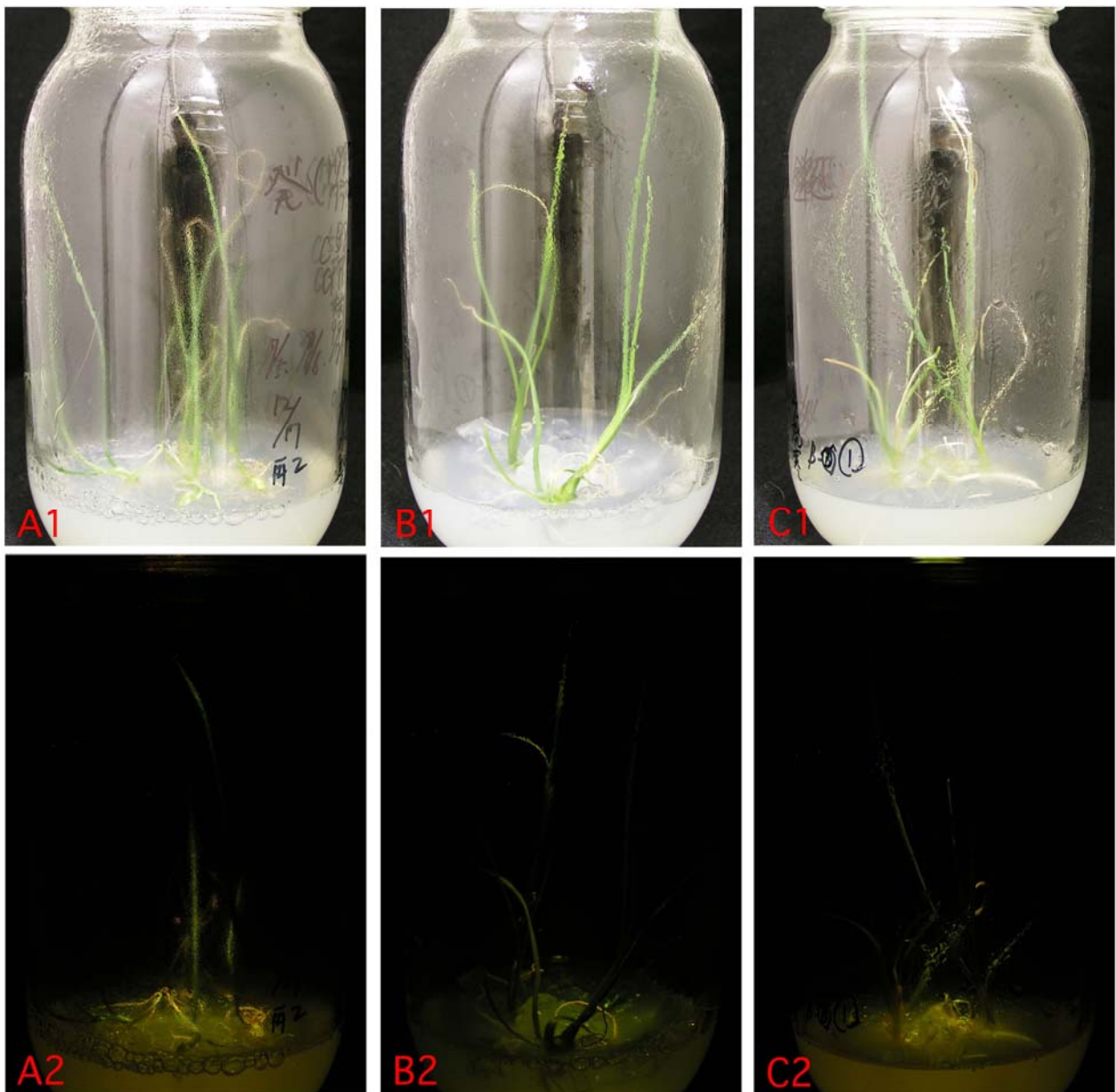


図 1. 形質転換タマネギの作製. 形質転換は材料と方法に記載したとおり行った. 胚軸に形成したカルスに *35S::GFP::GUS* 融合遺伝子を Ti プラスミド上に持つアグロバクテリウムを感染させ、形質転換を誘導した. 図に示したものは、ハイグロマイシンを含む培地上で地上部が分化し、すでに発根も進んでいるものである. A1 と A2, B1 と B2, C1 と C2 は同じ形質転換体で、A1, B1, C1 は白色光下で、A2, B2, C2 は青色 LED ランプの照明下で撮影したものである.

からレポーター遺伝子として用いられる。*GUS* 遺伝子は β -Glucuronidase をコードする遺伝子で、この遺伝子産物も酵素活性によって高感度に検出できるためレポーター遺伝子として用いられる。

昨年度は、オーキシシン (2,4-D) を含むカルス誘導培地上で形成したカルスの細胞に遺伝子導入を行って、除菌後、シュート (苗条; 茎や葉といった植物の地上部。) を誘導するためのサイトカイニン (2-ip) を含む再分化培地で培養した。本年度は其中で生長が見られるものを選抜し、引き続き培養した。2~3ヶ月間培養して、ある程度大きくなったものを根の形成を誘導するために、植物ホルモンを含まない発根培地に移した。発根を誘導して3~6ヶ月して、いくつかの植物体で発根が確認できた (図 1 A1, B1, C1)。選択効率の良いハイグロマイシンを含む培地で発根し生育しているため、この時点でおそらく形質転換であろうと考えられた。

次に融合遺伝子が確実に導入されているかどうかの確認であるが、植物の一部を切り取り、DNA を抽出して PCR を行う方法が考えられたが、まだ無菌培養中であるので植物の一部を切り取るのは断念した。その代わりに、GFP からの蛍光の有無で形質転換が起こっているかどうかを調べることにした。融合遺伝子が導入されて発現していれば、GFP::GUS 融合タンパク質が細胞内に蓄積し、これに励起光である青色光を照射すれば緑色の蛍光を発するはずである。培養瓶を暗所に置き、青色光を照射して、青色光を遮断するフィルターを取り付けたデジタルカメラで撮影した (図 1 A2, B2, C2)。35S プロモーターは鱗茎部分では強い発現を誘導しないことが知られているが、それでも緑の蛍光が認められた。青色光を照射しているので、植物の緑色部分からの反射光では無いと考えられる。特に白色の根の部分でも、緑色の光を発しているのも、これは GFP からの蛍光であると考えられる。この結果は融合遺伝子がタマネギ細胞内に導入され発現していることを示している。

導入遺伝子発現実験

シロイヌナズナの液胞膜に局在する *AtMTP1* 遺伝子産物がタマネギ細胞でも液胞膜に蓄積するかどうかを調べた。*AtMTP1* と *GFP* を融合させた遺伝子の DNA 分子を金粒子に吸着させた後、遺伝子銃 (パーティクルガン) を用いて、タマネギの鱗茎葉の表皮細胞に打ち込んだ。20 時間後に GFP からの蛍光で *AtMTP1* を検出した。図 3 から解るように、蛍光は細胞膜の内側で検出された。タマネギでは液胞が細胞質の大部分を占め、液胞以外の部分は

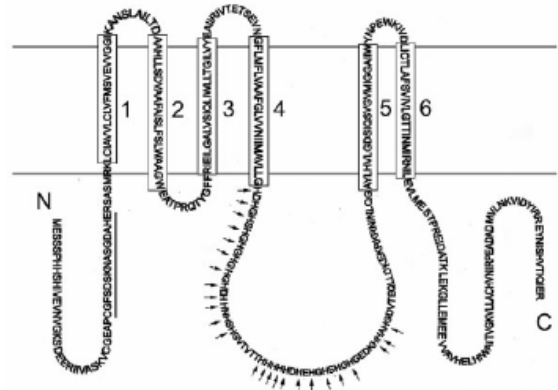


図 2. *AtMTP1* の予想される構造. *AtMTP1* は液胞膜を貫通する部位を 6 か所 (1~6 の□で囲まれた部分), 持つことからこのようなモデルが考えられる. N はタンパク質の N 末端を, C は C 末端を表す. 参考文献 7) より複写.

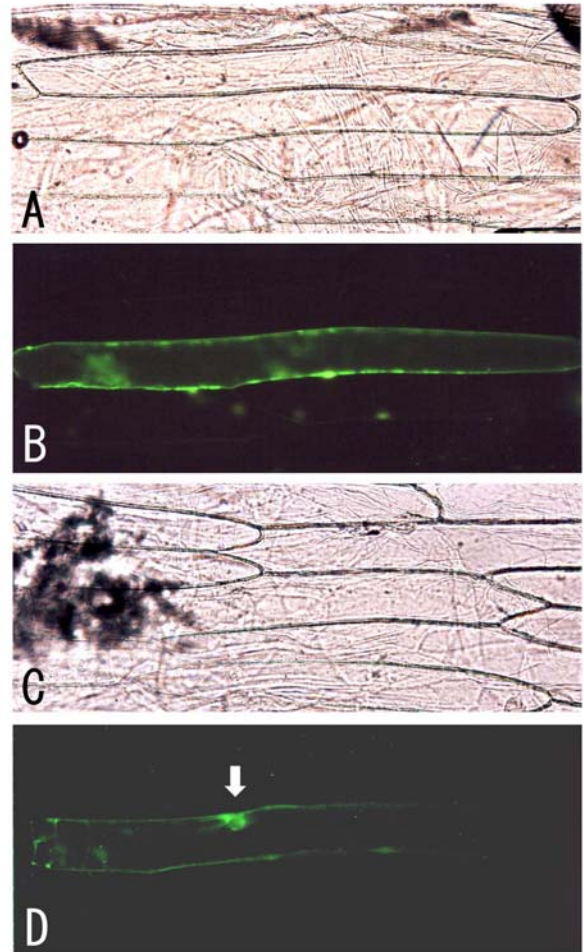


図 3. *AtMTP1* の遺伝子銃による導入実験. タマネギの鱗茎葉の表皮細胞に遺伝子銃を用いて *AtMTP1::GFP* 融合遺伝子の DNA を打ち込み、遺伝子産物が細胞内のどこに局在するかを調べた. A と B, C と D は同じ視野の細胞を観察したもので、A と C は明視野観察, B と D は蛍光観察. □は核領域を表す.

細胞膜のすぐ内側に薄層状態になっているのが観察されている。細胞核は細胞膜付近に存在するが、核を中心に物質輸送の経路が張り巡らされている。こ

のため、核も液胞膜によって被われているが、液胞膜が複雑に入り組んだ状態となる。その結果核膜付近では GFP からの強い蛍光が見られた (図 3、 \square に示された部分)。GFP の観察結果は液胞膜の分布状態と良く一致し、タマネギ細胞でも AtMTP1 は液胞膜上に局在することを示している。

考察

我々はタマネギに有用物質を生合成させる系を開発するために研究を進めてきた。これまでの成果として、タマネギカルスから植物体を再生するホルモン条件を確立し、ハイグロマイシンのタマネギにおける有効性を確認することができた。この結果を踏まえて、*GFP::GUS* レポーター融合遺伝子を材料にしてタマネギ形質転換実験を行った。昨年度に得たシュートが出かけていたカルスを、本年度はハイグロマイシンを含む再分化培地でさらに培養し、そこで生長したものを発根培地に移すことによって発根を誘導することができた。現在、ほぼ完全な植物体に再生しているが、脆弱であるため非滅菌状態に置くにはまだ早いと判断される。これまでほぼ密封状態で培養されてきた植物であるので、非密封の状態に置くには十分に生長させる必要がある。今後、1-2ヶ月のあいだには通常の土壌に移し換えることができるのではないかと考えている。

形質転換体であることをもっとも簡単に調べる方法は、この場合、GFP からの蛍光を調べることである。今回はデジタルカメラで撮影してみたが、GFP の発光を精確に観察するには蛍光顕微鏡を用いる必要がある。今後、十分成長したら一部を切り取り、切片を作製するなどして GFP からの蛍光を確認する予定である。GUS 活性を調べるのも一つの手段であるが、この場合も植物体の一部を切り出す必要がある。最終的には PCR 法により、遺伝子の存在を確認しなければならない。

すでに形質転換を始めてから1年半が経過しているが、順調に行けば今年の秋には形質転換タマネギ (T1 世代) から、その次世代である種子 (T2 世代) が得られるものと予想される。形質転換体を作製するのに時間を費やしたが、一度できてしまえば、増やすのは容易いと考えられる。しかし、その前に T2 同士の交配によって純系を得る必要がある。

シロイヌナズナの液胞膜に局在する AtMTP1 がタマネギでも液胞膜に局在することが確認できた。このタンパク質は6回膜を貫通し、細胞質側に露出する部分と液胞側に露出する部分がある。これまでのところ、どの部分が液胞側でどの部分が細胞質側であるか分かっていないが、それが確認されれば、

液胞側に露出する部分に例えば、PHB を合成する酵素の遺伝子、*phbA*、*phbB*、*phbC* を組み込めば、一度の形質転換で3つの遺伝子を導入し、その産物を液胞内で働かせることができる可能性もある。アリナーゼ遺伝子は鱗茎細胞で強く発現していることが知られている。昨年度の研究でアリナーゼのプロモーターにより *GFP* 遺伝子をタマネギ細胞で発現させることに成功した。アリナーゼプロモーターの下流に先のような構成を持つ遺伝子を配置すれば液胞内で PHB を蓄積させることができると考えられる。残念ながら、そのような人工遺伝子を作製するに至らなかったが、本研究によってタマネギ形質転換系の確立、高発現を誘導するプロモーターの確認、有用物質を合成する材料が蓄積していると考えられるタマネギの液胞への輸送のガイドとなる遺伝子の検証が行われ、将来における研究の発展の基盤を整備することができたと言える。そのような意味で非常に意義があったと評価できる。今後は、これまでに得られた個々の方法と材料を組み合わせ、発展していくことを期待する。

謝辞

本研究は神奈川大学総合理学研究所産学共同研究助成を受けて行われました。お礼申し上げます。

文献

- 1) Van Damme EJ, Smeets K, Torrekens S, Van Leuven F and Peumans WJ (1992) Isolation and characterization of alliinase cDNA clones from garlic (*Allium sativum* L.) and related species. *Eur. J. Biochem.* **209**: 751-757.
- 2) Do GS, Suzuki G and Mukai Y (2004) Genomic organization of a novel root alliinase gene, ALL1, in onion. *Gene* **325**: 17-24.
- 3) Saegusa H, Shiraki M, Kanai C and Saito, T (2001) Cloning of an intracellular Poly[D(-)-3-Hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J. Bacteriol* **183**: 94-100.
- 4) Kobayashi T, Shiraki M, Abe T, Sugiyama A and Saito T (2003) Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its identification as a novel intracellular poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase. *J. Bacteriol* **185**: 3485-3490.
- 5) 上西愛子, 野村研, 大矢武志, 北 宜裕 (2002) 赤タマネギ '早生湘南レッド' における初生根端カルスからの再生体誘導. *神奈川農総研研究報告 第142号*. pp.57-61.
- 6) 安積良隆, 田島邦弘, 森川真吾, 宮沢 哲, 湯村貴文, 竹田光宏, 鈴木秀穂, 上西愛子, 北 宜裕 (2002) 植物工場を目指したタマネギ形質転換系の確立. *神奈川大学総合理学研究所年報 2002*. pp.99-102.
- 7) 安積良隆, 齋藤光実, 松本佳代, 北 宜裕, 上西愛子,

野村研 (2003) 遺伝子組換えタマネギに生分解性プラスチックを生合成させる試み. *神奈川大学総合理学研究所年報 2003*. pp.133-140.

8) Kobae Y, Uemura T, Sato MH, Ohnishi M, Mimura

T, Nakagawa T and Maeshima M (2004) Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1749-58.