

# トランスジェニックタバコ内でのカーネーション斑紋ウイルス 外被タンパク質遺伝子の発現

誌名	兵庫県農業技術センター研究報告. 農業編 = Bulletin of the Hyogo Prefectural Agricultural Institute. Agricultural section
ISSN	13410326
巻/号	42
掲載ページ	p. 13-18
発行年月	1994年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## トランスジェニックタバコ内でのカーネーション斑紋 ウイルス外被タンパク質遺伝子の発現

増田由紀・岩井豊通・塩飽邦子・渡辺和彦

### 要 約

カーネーション斑紋ウイルス (CarMV) 抵抗性植物を得るために、CarMV の外被タンパク質遺伝子のクローニングと構造解析を行い、トランスジェニックタバコ内での遺伝子の発現を確認した。

- 1 CarMV からゲノムRNA を抽出し、cDNA の合成を行った。
- 2 cDNA クローン pCM161 の塩基配列、1,696 塩基を決定したところ、5' 側より約 360 塩基付近から、348 個のアミノ酸からなる CarMV 外被タンパク質をコードする領域が存在した。
- 3 上流と下流に制限酵素認識配列を導入した外被タンパク質遺伝子を PCR で増幅し、外被タンパク質遺伝子導入用ベクターを作成した。
- 4 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 を用いてタバコの形質転換を行い、サザンハイブリダイゼーションで 32 個体のタバコに CarMV 外被タンパク質遺伝子が組み込まれたことを確認した。
- 5 CarMV 外被タンパク質を持ったタバコ 13 個体のうち 8 個体で外被タンパク質 mRNA の発現が確認できた。

### Expression of Carnation Mottle Virus Coat Protein Gene in Transgenic Tobacco Plants

Yuki MASUDA, Toyomichi IWAI, Kuniko SHIWAKU  
and Kazuhiko WATANABE

### Summary

About 1.7 kb long carnation mottle virus (CarMV) cDNA was cloned and its nucleotide sequence was determined. 1,044 bp long coat protein (CP) coding region was identified and its initiation codon located at 361 bp from 5'-terminus of the cDNA clone. Using the *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system, chimeric gene consisting of the cauliflower mosaic virus 35S promoter, CarMV CP gene, and the nopaline synthase polyadenylation signal was integrated into the genome of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. 'Xanthi'). Transfer CP gene was confirmed by southern hybridization, and plants containing it produced the expected mRNA which were detected by Northern hybridization.

キーワード：カーネーション斑紋ウイルス、外被タンパク質遺伝子、アグロバクテリウム

### 緒 言

兵庫県の主要花きであるカーネーションは、栄養系で繁殖するため、ウイルス感染による品質及び収量の低下が問題となっている。現在、茎頂培養によるウイルスフリー化が行われているが、培養には熟練を要し、コストもかかるため、ウイルス病に抵抗性を持つ新品種の作出が望まれている。

植物への感染と発病に際して、ウイルスはそのゲノムにコードされているタンパク質の発現により、様々な病徴を引き起こす。最近、細胞工学的手法と組み換え DNA

技術を用いた植物形質転換法が開発され、植物ウイルスゲノムの特定部位を植物体に導入・発現させ、ウイルス抵抗性を付与する実験が相次いで成功している。なかでも外被タンパク質遺伝子を発現させることにより抵抗性を獲得した例が数多く報告されている<sup>6)</sup>。そこで、本研究ではカーネーションの主要病原ウイルスであるカーネーション斑紋ウイルス (以下 CarMV) に抵抗性を持つカーネーションを作成するために、ウイルスの外被タンパク質遺伝子のクローニングと構造解析を行い、外被タンパク質遺伝子を組み込んだトランスジェニック植物を作成したので報告する。

## 材料及び方法

## 1 CarMV RNA の抽出

CarMV のゲノムRNA は、純化した CarMV から Carrington と Morris の方法<sup>1)</sup> に準じて抽出した。得られた CarMV RNA は、紫外線吸光度を測定して純度を調べ、ホルムアルデヒドゲル電気泳動を行ってサイズの確認をした。

## 2 CarMV RNA の poly (A) 化

精製した CarMV RNA 10  $\mu\text{g}$  を、50mM Tris pH 7.9, 10mM 塩化マグネシウム, 2.5mM 塩化マンガ、0.25M 塩化ナトリウム, 0.25mM ATP, 0.5g/ml BSA, 大腸菌 poly (A) ポリメラーゼ 2 ユニットを含む反応液 50  $\mu\text{l}$  中で 37°C で反応させ poly (A) 化を行った。フェノール抽出により反応を停止させた後、RNA を TAKARA oligotex™-dT30<super> を用いて回収し、濃縮した。

## 3 cDNA の合成と大腸菌の形質転換

3' 末端に poly (A) 鎖を付加した CarMV RNA を鋳型として cDNA 合成キット (Pharmasia) を用いて cDNA 合成を行った。得られた cDNA は大腸菌を宿主とするベクター (pUC119) に組み込み、塩化カルシウム法により大腸菌 (XL1-Blue) に導入し抗生物質アンピシリン (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), X-Gal (80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), IPTG (80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 存在下で選択した。

## 4 プラスミド DNA の抽出と cDNA のサイズ確認

選択したコロニーからボイル法でプラスミド DNA を抽出し、制限酵素 BamHI と Pst I で切断後、アガロースゲル電気泳動によりベクターに組み込まれた cDNA のサイズを確認した。

## 5 CarMV 外被タンパク質コード領域の塩基配列決定

T7 DNA シークエンスキット (Pharmasia) を用いてジデオキシ法で塩基配列の決定を行った。得られた塩

基配列については、遺伝情報処理システム GENETYX で解析を行った。

## 6 CarMV 外被タンパク質アミノ酸配列決定

純化した CarMV を、0.1M 炭酸水素アンモニウム, 1% SDS, *Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼ (対基質モル比 1/100) を含む反応液中で 37°C で 3 時間処理した。この反応によって生じた部分分解物を SDS-ゲル電気泳動によって分画・回収し、気相シーケンサー (ABI モデル 475A) でアミノ酸配列を決定した。

## 7 CarMV 外被タンパク質遺伝子導入用ベクターの作成

決定した塩基配列をもとに、外被タンパク質遺伝子の upstream に BamHI, 下流に Sac I の認識配列を付加するように oligoDNA を合成し、これをプライマーとして polymerase chain reaction (以下 PCR) を行い遺伝子を増幅した。増幅された遺伝子を BamHI-Sac I で切断し、Ti-プラスミド、pBI121 の  $\beta$ -glucuronidase (以下 GUS) 遺伝子と置き換え PCR による塩基配列の置換の有無を確認するため 6 で行ったように塩基配列を決定した。

## 8 アグロバクテリウムへの導入

Ti-プラスミドのアグロバクテリウムへの導入は、Tri-parental Mating 法<sup>1)</sup> を用いた。大腸菌 pRK2013, CarMV 外被タンパク質遺伝子導入用ベクターを持つ大腸菌そして *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 をそれぞれ抗生物質の入った LT 培地で 12~16 時間振とう培養した。これらを LT 寒天培地上で混合し 28°C で 17 時間放置した後、25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  カナマイシン, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  リファンピシン, 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシンを含む培地に移し選抜した。

## 9 タバコへの外来遺伝子導入

外被タンパク質遺伝子を導入した *A. tumefaciens*,

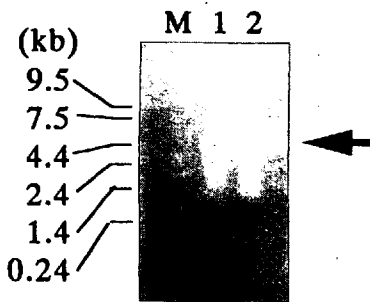


Fig. 1 CarMV RNA  
M, marker, 1, 2, sample

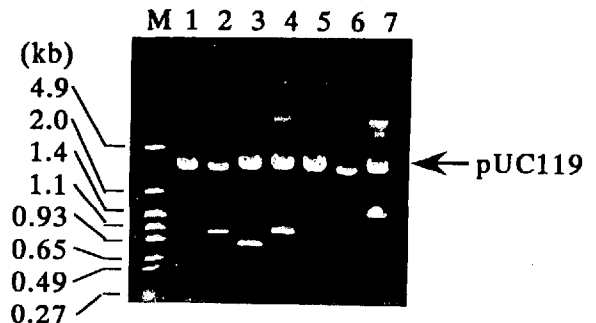


Fig. 2 cDNA clones of CarMV  
M, marker, 1-7, sample

LBA4404 を 16 時間培養したものにタバコ葉の切片を 10 分間浸し、ろ紙で余分な培養液を除いて、MS 培地 (3% しょ糖, 1 μg/ml NAA, 1 μg/ml BA, 0.6% 寒天) で三日間共存培養した。三日後に除菌用抗生物質として 200 μg/ml クラフオランおよび 200 μg/ml バンコマイシンを、選抜物質として 100 μg/ml カナマイシンまたは、30 μg/ml G418 を含む MS 培地に移植し培養を続けた。培養 4~5 週間後に不定芽を切断し発根用 MS 培地 (3% しょ糖, 0.1 μg/ml NAA, 200 μg/ml バンコマイシン, 0.8% 寒天) で発根させ植物体を得た。

10 サザンハイブリダイゼーション

本田らの方法<sup>3)</sup>でタバコのカルスまたは葉から抽出し

た DNA 10 μg を EcoR I で切断し 0.8% アガロースゲルで電気泳動を行い、アルカリ変性させた後フィルターに転写した。アガロースゲルより精製した外被タンパク質遺伝子を DIG でラベルし (ペーリンガー DIG DNA Labeling kit) プローブとした。50% ホルムアミド, 5 X SSC, 2% ブロッキング剤, 0.1% ラウリル酸ナトリウム, 0.02% SDS を含む溶液に変性プローブを加え、42°C で一晩放置してハイブリダイゼーションを行った。SSC と SDS を含む溶液でフィルターを洗浄した後、ペーリンガー DIG Luminescent Detection kit を用いてバンドの検出を行った。

11 ノーザンハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションで外被タンパク質遺伝

```

1  CCCAGTGTGAAGCGGCAGATTCACATGGATATTGAACCGGAAGTACCAGTAGTTGAGAAGCATATGCTCGCTGGGAATAGAGAAAAAAAAGACACC
101 TAGATCGGTGGCCAGGATGCCATCCGCAAACTGCATCTGATAGTACTAACGGGGTAATTGGGTTAATGTTGCTGATAAGATTGAGGTGCACATTCAC
201 TTCAACTTTTAGTTGCCCCGATGGTAACTTAAATCAGATAATAGCGTTGTCATTTTGTGGTCTTCTATTGAACAGCATCTCCGGGCAGAAAGAGCT
301 TGCTATTACAACACTACTCTGTTGATAGTTCTAAACAACAACACATTTCGATAAGTACACCAAAATGGAAAAATAAGGAGAAAGGATCGCGATGAATCCCACT
                                     M E N K G E R I A M N P T
401 GTGCAACGTTGGCGCAGAAGGGGATAAGTTAGCCGTGAAGTTGGTGACAAGAGGGTGGCCCTCTCTGAGTACGAACCAAGAGGAGAGCTGAAATGC
   V Q T L A Q K G D K L A V K L V T R G W A S L S T N Q K R R A E M L
501 TTGCTGGATACACTCCAGCGATCCTAGCCTTCCACCCCGACGACCGGATGACAAAACCTCTCCAAGAACAGTAGGAATTCACAGGACAAGCTGG
   A G Y T P A I L A F T P R R P R M T N P P P R T S R N S P G Q A G
601 AAAGTCCATGACGATGAGTAAAGCCGAACCTGCTATGCACCGTCAAAGGTACCACAGGTGTTATCCCAAGCTTTGAAGACTGGGTCGTTTCCCCCGAAAC
   K S M T M S K T E L L C T V K G T T G V I P S F E D W V V S P R N
701 GTAGCCGTTTTCCCTCAACTCTCGTGTGGCGCAACTTCAACAAGTACCGCATCACTGCGCTCACTGTGAAGTACTACCAGCGTGCAGCTTCGAGA
   V A V F P Q L S L L A T N F N K Y R I T A L T V K Y S P A C S F E T
801 CCAATGGGAGGGTGGCTCTGGGATTCAACGATGATGCTTCGGACACACCACCAACCAAGGTTGGATTTTACGATCTGGGCAAACATGTGAAACTGC
   N G R V A L G F N D D A S D T P P T T K V G F Y D L G K H V E T A
901 TGCACAGACAGCTAAAGATCTAGTATACCAGTAGACGGCAAAACCCGGTTCATCAGGACTCGGCTAGTATGATGCCAAACTAGTCGATTTGGACGA
   A Q T A K D L V I P V D G K T R F I R D S A S D D A K L V D F G R
1001 ATAGTCTTGTCACATACGGGTTTGACAAGGCAGACACTGTGGTGGGCAATGTTTATACAGTACAGGATTGTGCTGAGTGACCAACCAAGACGGCCA
   I V L S T Y G F D K A D T V V G E L F I Q Y T I V L S D P T K T A K
1101 AAATTCACAGGATGCAACGATAAGGTTGCGGATGGACCAACGTATGTGGTCCCTTCGGTTAATGGCAACGAGCTACAACTAAGAGTGGTAGCCGCTGG
   I S Q A C N D K V S D G P T Y V V P S V N G N E L Q L R V V A A G
1201 GAAATGGTGCATTATAGTGGGGGTACGGTTGAAGTGGCTTCAACAAACCCACACTTATGGCCAGGAATCCGCGGTGATGTGGACTATGAAAGTGGC
   K W C I I V R G T V E G G F T K P T L I G P G I R G D V D Y E S A
1301 AGACCTATCGCCATTTCTGAGTGTGGTACACAAATGGAGGGCCAGATATTGAAAAATCACCAAGACCTCAGCAGAAACCAACTCCAATGGGTTGTTTATA
   R P I A I C E L V T Q M E G Q I L K I T K T S A E Q P L Q W V V Y R
1401 GGATGTGAATGCAAGAGAAAGTTTGTAGACACACCGGCGGACGTGTGCTAGAGCTGCCACTCTGCCGAGATGGATCGATATTAACCATCTTTGG
   M *
1501 CAACACCGTGTGTATCAACCAACCTAGTAATTGCGTAGCATCCGACTGTAACCTGTTCTCTGCTGAATGCGAGGGTGGCCCTGTGATCCCAACCATTA
1601 AAAGAAACCAACTGTTGTTGGTGAAGGGCTTGAAGTAGGATCAACCACTGTTTATTAATTAGGGGTGAGAGTATTCACCTGTACTCTTTCCCCGCC
    
```

Fig. 3 Nucleotide sequence of CarMV cDNA  
Decided amino acid sequence is underlined.

子の組み込みを確認したタバコの葉から、SDS-フェノール法により抽出した全RNA 30 $\mu$ gを1.0%のホルムアルデヒドアガロースゲルで電気泳動した後、フィルターに転写した。ハイブリダイゼーションのプロープ及び条件は、サザンハイブリダイゼーションの設定と同様とした。

結 果

1 CarMV RNAの抽出とpoly(A)化

Carringtonらの方法により10mgのウイルス粒子から約400 $\mu$ gのRNAを得ることができた。1.0%ホルムアルデヒドアガロースゲルで抽出したRNAの電気泳動を行った結果、約4.0kbのバンドが検出できた

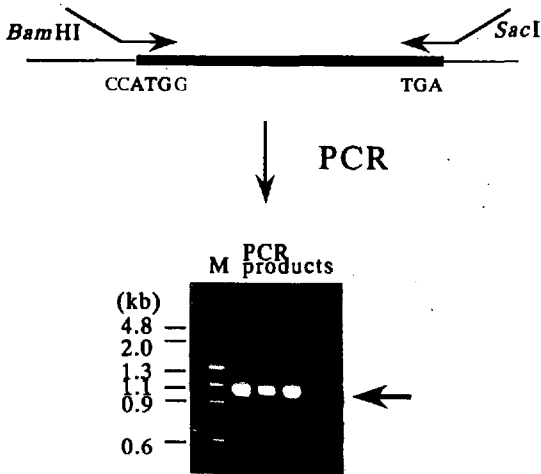


Fig. 4 Amplification of CarMV CP gene  
M, marker

(Fig. 1). この結果は、WaterworthとKaperが1972年に報告したCarMVのゲノムRNAのサイズと一致した<sup>2)</sup>。

2 CarMV cDNAのクローニング

CarMVの外被タンパク質遺伝子は、ゲノムRNAの3'末端に位置し、その大きさは約1kbであることがGuilleyら(1985)により報告されている<sup>2)</sup>。そこで、選抜培地で選択した132コロニーからポイル法で抽出したプラスミドDNAを制限酵素BamHIとPstIで切断し、0.8%アガロースゲルで電気泳動を行い、挿入断片の大きさが1.0kb以上の12クローンを選抜した(Fig. 2)。

すでに報告されているCarMV RNA塩基配列から、

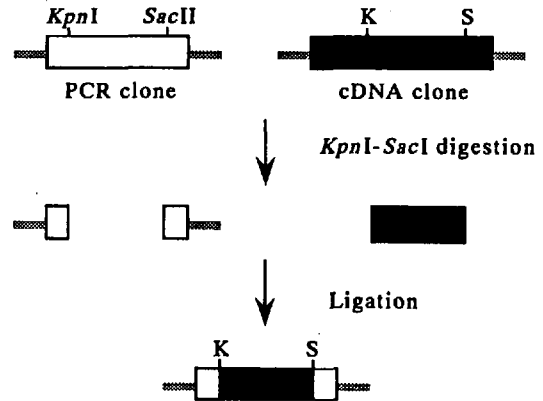


Fig. 5 The recombination of *Kpn*I-*Sac*II fragment

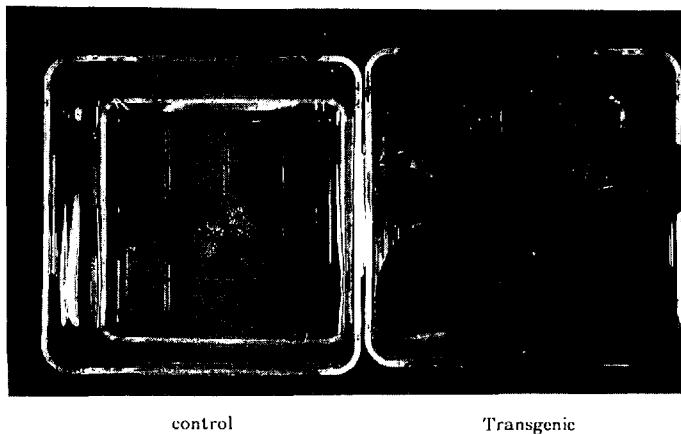


Fig. 6 Transgenic Tobacco

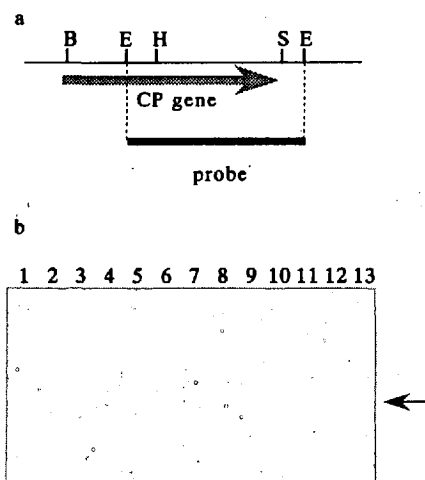


Fig. 7 Genomic Southern hybridization

- a. Restriction map of pCM161.  
 B, *Bam*H I ; E, *Eco*R I ; H, *Hind*III ; and S, *Sac* I.  
 b. Genomic Southern hybridization with CP gene probe.

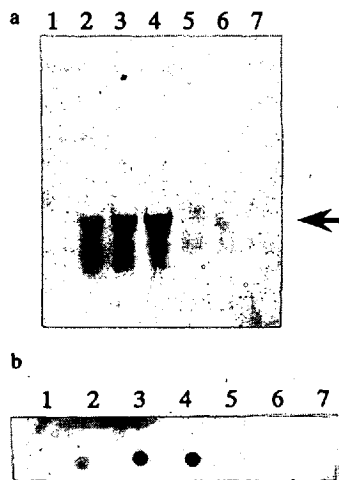


Fig. 8 Northern hybridization

- a. Northern hybridization with CP gene probe.  
 b. RNA dot blot.  
 control (lane 1), samples (lane 2-7).

Table 1 Genomic Southern hybridization

Antibiotic	Number of antibiotic <sup>a</sup> plant	Transgenic plant	
		number	percentage
Km	35	20	66.7
G418	12	12	100

外被タンパク質遺伝子には制限酵素 *Eco*R I, *Hinc* II, *Hind*III の認識部位が存在することがわかっている。そこでこれらの制限酵素の切断パターンを調べ、ウイルス外被タンパク質遺伝子を完全に含むと考えられる cDNA クローン (pCM161) を選択した。

3 CarMV 外被タンパク質コード領域の塩基配列決定

cDNA クローン pCM161 の全塩基配列 1,696 塩基をジデオキシ法により決定した (Fig. 3)。得られた塩基配列を遺伝情報処理システム GENETYX で解析したところ、5' 側より約 360 塩基あたりより、348 個のアミノ酸からなるポリペプチドをコードする領域が存在した。

4 CarMV 外被タンパク質アミノ酸配列解析

CarMV の外被タンパク質を V8 プロテアーゼで処理したところ、分子量約 25kD の大量の部分分解物とその約 1/10 量の分子量 16kD の部分分解物、その他さらに少量の数個の部分分解物が生じた。このうち分子量約 25kD と 16kD の部分分解物を気相シーケンサーにかけたところ、分子量 16kD の部分分解物はブロック化されていたため分析できなかったが、分子量 25kD の部分

分解物については 30 個のアミノ酸配列を分析することができた。この 30 個のアミノ酸配列は、塩基配列から推測されるアミノ酸配列の N 末端から 147~176 番と完全に一致した (Fig. 3)。

5 CarMV 外被タンパク質遺伝子導入用ベクターの作成

PCR により、外被タンパク質遺伝子の 5' 上流に *Bam*H I 認識配列を、3' 下流に *Sac* I 認識配列をそれぞれ導入し、開始コドン (ATG) の周りの塩基配列を翻訳コンセンサスシーケンス (AACAAATGGC) と高い相同性をもつ *Not* I 認識配列 (CCATGG) に置き換えた (Fig. 4)。こうして得られた改変外被タンパク質遺伝子を *Bam*H I と *Sac* I で切断した後、Ti-プラスミド pBI 121 の GUS 遺伝子と置き換え、塩基配列を調べた。その結果 1,047 塩基中、中央の 7 塩基が変化していることがわかった。そこで変異を起こした塩基を元に戻すために、この 7 塩基を含む約 0.6kb の *Kpn* I-*Sac* II 領域を PCR の鋳型に用いた cDNA クローン pCM161 の *Kpn* I-*Sac* II 断片と組み換え、CarMV 外被タンパク質遺伝子導入用ベクター pCarMV-CP を得た (Fig. 5)。

6 トランスジェニックタバコの作成

Triparental Mating により pCarMV-CP を導入した *A. tumefaciens* LBA4404 をタバコ葉切片に感染させ、抗生物質カナマイシンまたは G418 を含む選択培地上で再分化させた。その結果、47 個のカナマイシン抵抗性 (Km<sup>r</sup>) タバコを得た (Fig. 6)。これら Km<sup>r</sup> タバコに CarMV 外被タンパク質遺伝子が組み込まれ

ているかどうかをサザンハイブリダイゼーションによって調査したところ、47個体のタバコのうち32個体で外被タンパク質遺伝子が完全に組み込まれていることを確認した (Fig. 7, Table 1).

### 7 外被タンパク質遺伝子の発現

サザンハイブリダイゼーションにより外被タンパク質遺伝子の組み込みを確認した13個体のタバコから全RNAを抽出しノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、8個体でCarMV外被タンパク質 mRNAが発現していることを確認した (Fig. 8 a). 各トランスジェニックタバコ内で発現しているCarMV外被タンパク質遺伝子 mRNAの量に差がみられた (Fig. 8 b).

### 考 察

CarMVは、全長約4.0kbの一本鎖RNAをゲノムとして持っている。CarMV RNAの3'末端にはpoly(A) RNAが無いため、cDNA合成を行うに先立って、CarMVのpoly(A)化を行った。得られたpoly(A)+CarMV RNAを鋳型として合成したcDNAクローンは最長のもの(pCM161)でも約1.7kbとCarMVゲノムRNA全体の半分以下の長さで、選抜培地でピックアップしたほとんどのcDNAクローンは1kbにも満たないものばかりであった。1~2kbのcDNAクローンを効率よく得るために、cDNA合成の方法や条件を検討する必要がある。

cDNAクローンpCM161の全塩基配列1,696塩基の5'側から約360塩基付近より、348個のアミノ酸からなるポリペプチドをコードする領域が存在した。このアミノ酸配列のN末端から147~176番のアミノ酸配列とアミノ酸シーケンサーで決定したCarMV外被タンパク質のアミノ酸配列とが完全に一致した結果、この領域がCarMV外被タンパク質遺伝子であることが確認できた。

トランスジェニックタバコの作出は、従来行われていた方法にしたがって行った。選抜物質としてカナマイシンとG418の両方を使用し比較した。カナマイシンで選択したタバコの32%は、抵抗性遺伝子の組み込みが起こっていないエスケープであったのに対して、G418で選択したタバコはすべて組換え体であった。しかし、G418を選択物質として培地に加えると不定芽の再分化率や発育が悪くなり、適当な数の再分化個体を得るまでに時間がかかる。タバコの場合エスケープの数を考慮に入れてもカナマイシンで選択した方が効率よく組み換え体を得ることができると推測した。

CarMV外被タンパク質遺伝子の組み込みを確認した32個体のトランスジェニックタバコのうち、13個体で

外被タンパク質遺伝子 mRNAの合成を調べたところ、8個体のタバコでmRNAが合成されていることが確認できたが、残りの5個体ではmRNAの合成は認められなかった。植物体内に組み込まれた遺伝子の不活化の原因としては、1)染色体上で遺伝子の組み込まれた位置の影響や、2)組換え時に遺伝子に何らかの障害を受けて機能しなくなるといったことが考えられる。

### 引用文献

- (1) Carrington, J. C. and T. J. Morris (1984): Complementary DNA cloning and analysis of carnation mottle virus RNA: *Virology* **139**, 22-31
- (2) Guilley, H., J. C. Carrington, E. Balazs, G. Jonard, G. Richards and T. J. Morris (1985): Nucleotide sequence and genome organization of carnation mottle virus RNA: *Nucleic Acids Res.*
- (3) 本田秀夫・平井篤志(1991): 非放射性 DNAプローブによる雑種の検定: *植物細胞工学* **3**(2), 141-146
- (4) Hood, E. E., G. L. Helmer, R. T. Fraley and M. Chilton (1986): The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo 542 outside of T-DNA: *J. Bacteriol.* **168**(3), 1291-1301
- (5) Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1982): *Molecular cloning* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- (6) 難波成任(1991): ウイルス抵抗性トランスジェニック植物開発の現状: *植物防疫* **45**(6), 255-261
- (7) Waterworth, H. E., and J. M. Kaper (1972): Purification and properties of carnation mottle virus and its ribonucleic acid: *Phytopathology* **62**, 959-964