

各種条件下、セリバオウレン (*Coptis japonica* Makino var. *dissecta* Nakai) に感染させた。セリバオウレン圃場栽培株の若葉を常法により殺菌後、葉柄切片を調製して植物ホルモン無添加WPG (改変WP培地; 10 mg/lグルタミン含有) (WPGHF)固形培地上9日間前培養した後、3日間*Rhizobium*との共存培養(実験1)、あるいは殺菌後の葉柄切片をNAA 1 mg/l + Kin 2 mg/l添加WPG(WPGNK)固形培地で16日間前培養した後、2日間共存培養(実験2)、あるいは殺菌直後の切片を菌液に60分間浸漬(実験3)することにより感染処理を行った。感染直後の除菌はClaforan 500 mg/lとNAA 1mg/l、Kin2mg/lを添加したWPG (WPGNK) 培地を用いた。

除菌完了後のカルス及び不定根は、組換え体選択用ハイグロマイシン (25 mg/l) を含むWPGNK固形培地、20℃、暗所で培養して選抜を繰り返し、GUS活性染色(反応液: 0.5 mg/ml X-gluc in 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.3, 37℃、一晚)により、組換え遺伝子(GUS)の確認を行った。

Cjmdr1センス鎖及びアンチセンス鎖導入体の確認は、ゲノムPCR法によるハイグロマイシン耐性遺伝子(hpt)の検出により行った。

それぞれの形質転換カルス培養から不定胚を経て植物体に分化したクローンは、弱光下で培養して育成した後、野生株の植物体とともに植木鉢に植出し、人工光室あるいは隔離温室内で栽培し、導入遺伝子発現解析に用いた。

1-2. オウレン組換え体の超低温保存法の検討

オウレンの組換え不定胚及び不定根を材料に、非形質転換不定胚で確立したガラス化法による超低温保存法を一部改変し超低温保存を行った。

実験に用いたオウレン組換え体は、Cjmdr1のコード領域全長を、植物の高発現型プロモーター(EL2-35S)下流に組込んだバイナリベクターを有する*Rhizobium radiobacter* PMP90

株を感染させることにより得られた不定胚及び不定根であり、適用した超低温保存の条件は、下記のとおりである。

前培養 (0.2 M sucrose, 1 M glycerol, 20℃, dark, 2 days) → ガラス化液処理 (PVS2, 23℃, 10 min) → 液体窒素中に保存 → 解凍 (40℃水浴, 1 min) → 洗浄 (1 M sucrose, 25℃, 10 min) → 再培養 (WPGNK, 20℃, dark)

超低温保存後再生した不定胚は、ゲノムPCRにより導入遺伝子(hpt)の確認を行い、また、Northern解析により、Cjmdr1 mRNAの発現様式を調べ、未保存のものと比較した。

2. ケシのリゾビウム形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索

ケシ(*Papaver somniferum* L. var. *Ikkanshu*)の胚軸に*Rhizobium rhizogenes* MAFF03-01724株を感染させ、形成されたカルスから再分化したシュートを無菌的に継代培養したPsM1-2系統を材料とした。

まず、PsM1-2をファイトトロン内の土壌(3寸鉢)に植え出した植物体(T0世代)について、移植後の開花時期、花卉の枚数やその形状、草丈、そして、アヘン中のアルカロイド成分および含有量について調査した。同じくT0世代の*in vitro*培養植物体を材料として、ゲノムDNAの抽出を行い、リゾビウムT-DNAのケシゲノムDNAへの挿入部位及びその数(コピー数)について、IPCR(Inverse-PCR)法やAI-PCR法(Adaptor-ligation-PCR)法により探索及び解析を行った。

さらに、モルヒネ生合成経路のとくに終段階の既知遺伝子群についてPsM1-2(T0)系統における発現解析を行い、発現レベルを野生株と比較することにより、アヘンアルカロイド成分含有量変異の原因について検討を加えた。

つぎに、ファイトトロン環境下で開花し、結実したPsM1-2系統の遺伝的に同等な2個体から採取した種子(T1世代)を、温室環境下で播種・栽培を行い、60系統についてT0世代と同様に、形態学的調査およびアヘン中

のアルカロイド成分含有量について調査を行った。この中からアヘンアルカロイド成分含有量を指標に代表的な24系統を選抜し、それらの葉からゲノムDNAを抽出し、T0世代植物において少なくとも4ヶ所存在すると推定されたT-DNA挿入部位のT1世代への遺伝様式について、multiplex-PCR法により解析を行った。

また、T-DNA挿入部位周辺のゲノムDNA配列情報を用い、野生株由来のゲノムDNAとPCRによる増幅産物の有無を比較する手法により、T-DNA挿入部位のホモ・ヘテロ解析を行った。

3. 既存薬用植物に対する新規二次代謝産物生産能付加に関する研究

材料植物は、ラポンチシンなどのスチルベン誘導体を含むマルバダイオウ(*Rheum rhaponticum* L.)と、コントロールとしてベラドンナ(*Atropa belladonna*)を選択した。マルバダイオウ種子を滅菌処理後、無菌的に播種し、20℃明条件下発芽した芽生えの子葉および胚軸の切片を用いた。ベラドンナはin vitro培養植物の葉の切片を用いた。いずれの切片もMS固形培地(2% sucrose, NAA 1 mg/L, BA 10 mg/L, Gelrite)上でマルバダイオウは20℃、ベラドンナは25℃暗所で一晩前培養したものをリゾビウム感染に用いた。

導入遺伝子は、マルバダイオウの植物ポリケタイド類の生産物プロファイル改変を目標とし、静岡県立大のグループによりクローニングされたダイオウ(*Rheum palmatum* L.)のフェニルブタノイド類生合成の鍵酵素であるベンザルアセトン合成酵素(BAS: DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AF326911)、そして、Schröderらによりクローニングされたピーナツ(*Arachis hypogaea*)由来スチルベン合成酵素(STS: 同 L00952)を選択した。これらの植物由来二次代謝産物生合成遺伝子および、ポジティブコントロールとして β -glucuronidase(GUS)遺伝子を植物の高発現型プロモーター、CaMV35Sプロモーターの下流にそれぞれ配置したバイナリ

ベクターを、*Rhizobium radiobacter* LBA4404株に導入し、植物への感染に用いた。

また、同時に、リゾビウム感染条件がカルスおよび不定芽形成率に与える影響についても検討を行うため、希釈したリゾビウム菌液に1時間浸漬した植物組織片をMS固形培地(NAA 1 mg/L, BA 10 mg/L)上で一晩共存培養した場合(感染条件I)と、MS液体培地(NAA 1 mg/L, BA 10 mg/L)に植物組織片とリゾビウム菌液を加えて一晩共存培養した場合(感染条件II)におけるカルスおよび不定芽形成の割合についても調査を行った。

各条件で感染後の切片を、植物成長調節物質(NAA 1 mg/L, BA 10 mg/L)、そしてリゾビウム除菌用にクラフォランを添加したMS培地(2% sucrose)に植付け、マルバダイオウは20℃、ベラドンナは25℃、いずれも暗所で培養した。感染約4-6週後にカルス化が認められたので、形質転換体の選抜のため上記クラフォラン添加培地にカナマイシンを加えた培地に植え継ぎ、引き続き暗条件下で培養を行い、感染約14週後にカルスまたは不定芽の形成率について調査した。

C. 研究結果

1. セリバオウレンの効率的な組換え体作出法の開発及び組換え体の超低温保存法の検討

1-1. レポーター遺伝子を用いた効率的組換え体作出法の検討

リゾビウム菌感染条件の検討

リゾビウム菌感染方法については、殺菌後の葉柄切片をNAA 1 mg/l + Kin 2 mg/l添加WPG(WPGNK)固形培地で16日間前培養した後、2日間共存培養する実験2の方法が、カルス形成、形質転換効率ともに良好であった。

Cjmdr1センスおよびアンチセンス導入体

ゲノムPCR法によるhpt遺伝子検出の結果、得られたハイグロマイシン耐性カルスのうち、Cjmdr1センス導入カルス2クローン、アンチセンス導入カルス3クローンが組換え体であった(図1)。このうち、不定胚形成を

経て植物体に分化したCjmdr1センス導入体 (Sense 2) を鉢に植出し (図2)、栽培3ヶ月後に部位別のCjmdr1 mRNAの発現をNorthern法にて解析したところ、葉、葉柄、根の全ての器官において、mRNAの発現が野生株と比較し低下していた (図3)。同様に、部位別のベルベリン含量も、全ての部位において野生株と比較し低下していた (図4)。カルスからの再分化に至っていないクローンにおいては、アンチセンスクローンで通常黄色を呈するセリバオウレンカルス培養が白色~乳白色になる現象が生じている。

Gus導入体

GUS活性染色陽性であったgus導入カルス培養7クローンのうち、植物体再性能が高く、植物体に分化した2クローンを鉢に植出し (図5)、7ヶ月後に1クローン (II627-7-1) について、GUS活性染色によりgusの発現を調べたところ、葉、葉柄、根のすべての部位において発現が確認された (図6)。また、RT-PCR法でもすべての部位において発現が確認された (図7)。本植物の全ての器官においてベルベリンの生産が確認された (図8)。Gus導入植物体は、植出し7ヶ月後に開花したが種子は得られなかった。

1-2. オウレン組換え体の超低温保存法の検討

Cjmdr1センス形質転換体を材料に超低温保存を行い再生率を調査した。不定根からは再生が認められなかったが、不定胚からは再生率40%で再生が認められた。超低温保存後再生した不定胚と未保存対照のゲノムPCRの結果、超低温保存後の不定胚中に組換え遺伝子 (hpt) は安定に存在することが判明した。また、Northern解析により、再生体においてもCjmdr1の著しい発現の低下が認められ、未保存のセンスクローンにおける発現様式と同様であることを確認した。

2. ケシのリゾビウム形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索

リゾビウム形質転換体(T0)の形質およびアヘンアルカロイド含有量

ケシのリゾビウム感染によるT-DNA挿入型形質転換体PsM1-2系統においては、開花期は土壌への移植後71日後で草丈が38cmと、非形質転換体の47日後、草丈60cmに対し開花期の遅延と矮化が認められた。また、アヘン中のアルカロイド含有量を分析したところ、非形質転換体においては主アルカロイドがモルヒネ (10.9%, 乾燥アヘン重量%) であったのに対し、PsM1-2系統ではテバイン (16.3%, 同%) であった。

リゾビウム形質転換体(T0)の形質変異原因遺伝子の探索

PsM1-2系統における形態およびアヘンアルカロイド成分含有量の変異等の形質変異は、リゾビウム由来T-DNAのケシゲノムへの挿入による遺伝子破壊等によるものと考えられたため、T-DNA挿入部位の探索を行った。

IPCR法、AI-PCR法によりPsM1-2(T0)系統のゲノムDNAについてT-DNAの挿入部位解析を行ったところ、T-DNAのLB(Left Border)とそれに接するケシゲノムDNA配列1種、T-DNAのRB(Right Border)とそれに接するゲノムDNA断片4種の増幅産物が得られた (図10)。この結果から、少なくとも4ヶ所 (コピー) のT-DNAが挿入されていることが示唆された。また、そのうち1ヶ所の5'側上流約700bpの位置にシロイヌナズナの転写調節因子である*AtWRKY4*遺伝子と高い相同性を示すORFのC末端が見出されたため、その全長cDNAをRACE法により獲得し、WRKY調節因子ファミリーに属すると考えられる*PsWRKY1*のクローニングに成功した。なお、4ヶ所のT-DNAの挿入部位の周辺配列のBLAST等の解析により、*PsWRKY1*を含め、ORFの破壊等は起きていないと考えられる。

リゾビウム形質転換体(T0)におけるモルヒネ生合成遺伝子群の発現解析

モルヒネ生合成経路に特異的な酵素群で、現在、遺伝子情報が取得可能なCYP80B1、

4'OMT、SalAT、Cor1、Cor2の5種についてPsM1-2系統と野生株において発現解析を行い、遺伝子の発現レベルでの差異を検討した。また、T-DNA挿入部位のひとつの近傍で見出されたPsWRKY1遺伝子についても発現解析を行った。陽性対照としては、 β -アクチン遺伝子を用いた。その結果、定性的ではあるが、いずれの遺伝子も発現しており、発現レベルに顕著な差は無いことが判明した(図11)。とくに、Cor1、Cor2については野生株と同様に発現しており、テバインの高蓄積、モルヒネの含有量の低下、コデインの含有量が大きく変動していないことなどから、PsM1-2系統においてはテバインからモルヒネに至る2段階の脱メチル化反応が特異的に阻害されていることが示唆された。

PsM1-2系統T1世代における形質およびアヘンアルカロイド成分含有量

つぎに、PsM1-2系統におけるT-DNA挿入部位と形質変異との相関を明らかにするため、自殖後代植物であるT1世代植物の栽培を行った。T0世代より得られた種子を非閉鎖温室内で播種し、60系統についてT0植物と同様に形質調査を行った(表1)。

その結果、T1世代においては、開花期は野生株よりも遅延傾向であり、花卉の枚数には3枚から8枚とバリエーションが見られた。一方、T0世代で特徴的であった矮化傾向は認められなかった。

アヘンアルカロイド成分含有量については、テバインを26.5%(乾燥アヘン重量%)の高含有量で蓄積する高テバイン系統から野生株と同等の低テバイン系統まで分布が見られ、とくに整数比に分離するような傾向は認められなかった。

テバイン含有量別に代表的な24系統を選び、T-DNA挿入部位の遺伝様式の解析を4ヶ所の挿入部位を同時に解析するmultiplex-PCR法により行ったところ、テバイン含有量と4ヶ所のT-DNAの挿入パターンに相関が無いことが判明した(図12)。

また、PCRを用いた判別法により、高テバ

イン形質を示すT1世代の2系統については、T-DNA挿入部位がT0世代の4ヶ所から2ヶ所に減少し、そのうちの1ヶ所についてはホモとなっていることを確認した。

3. 既存薬用植物に対する新規二次代謝産物生産能付加に関する研究

リゾビウム感染条件、植物材料および導入遺伝子がベラドンナおよびマルバダイオウのカルス化および不定芽形成に与える影響を調査した(表2)。まず、導入遺伝子による影響を排除し、感染条件がカルス化および不定芽形成に及ぼす影響について評価するため、LBA4404/pBI121(GUS)株を感染させた区で、感染条件(I)または(II)でのカルス化および不定芽形成率を比較すると、ベラドンナ、マルバダイオウ両植物とも、今回実験に用いた試料数では差異は認められなかった。

マルバダイオウにおいては、LBA4404/pBI121(GUS)株を感染させた場合、胚軸の方が子葉と比較してカルス化率が高いことが明らかになった。また、不定芽の形成率は概して低く、LBA4404/BAS株を感染させた系では不定芽形成に至らなかった。

D. 考察

1. セリバオウレンの効率的な組換え体作出法の開発及び組換え体の超低温保存法の検討

感染条件を詳細に検討することにより、高い形質転換効率での組換えセリバオウレンの作出に成功した。今回得られたgus組換えセリバオウレン植物体におけるGUS遺伝子発現部位を詳細に解析することにより、本強発現プロモーターがセリバオウレン植物体内のどこで実際に発現し、影響を与えているのかを解析することが可能となる。この知見は本プロモーターをセリバオウレンにおいて高度に利用する上で重要である。また、GUS活性染色により容易に組換え体を検出できることから、遺伝子組換え薬用植物が環境に与える影響を評価するための実験系を開発する上でのモデル植物としての利用が

可能である。

本研究で検討した条件により、種々の組換え体の作出が可能となった。しかしながら、圃場栽培株の材料を利用できる時期は初春から初夏までに限られており、一年を通しての組換え体作出を可能にするためには、培養物を材料とする組換え体作出法を確立する必要がある。また、抗生物質による選抜後得られたカルスの多くはエスケープであり、ゲノムPCR法の結果組換え体と判定されたものの割合は低かった。組換え体の選抜方法に関しても、さらに検討が必要と思われる。

Cjmdr1センス導入植物体では、葉、葉柄、根の全ての器官においてCjmdr1の発現低下が認められ、コサップレッションが生じていることが示唆された。また、同植物体では全ての部位において野生株と比較してベルベリン含量の低下が認められ、アンチセンスカルスの中にもベルベリン生産能が低下したものがあつた。この結果は、生合成酵素遺伝子だけでなく、アルカロイド輸送体遺伝子の発現様式もアルカロイド含量に寄与していることを示唆しており非常に興味深い。

Gus導入植物体では、葉、葉柄、根のすべての部位においてgusの発現が確認され、今回用いた強発現プロモーターは、セリバオウレン植物体全体での発現能を有することを確認した。また、本植物の全ての器官においてベルベリンの生産が確認され、レポーター遺伝子自身はベルベリン生産能に影響を及ぼさないことを確認した。Gus導入植物体は開花したが、種子の発達は認められず、媒介昆虫のいない閉鎖温室では、受粉等の処理を行わないと結実しないものと思われた。

2. ケシのリゾビウム形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索

ケシのリゾビウム T-DNA 挿入型形質変異体においてはケシゲノム DNA へ、少なくとも 4ヶ所の T-DNA の挿入が起こっており、それらのアヘンアルカロイド生合成への影響について検討を加えるため、T-DNA 挿入部位の探索およびコピー数の解析を行い、自

殖後代植物について T-DNA の遺伝様式とアヘンアルカロイド成分含有量の関連を調査した。

その結果、T1 世代においてはテバイン含有量は高いものから低い野生株レベルのものまで広く分布し、さらに、同じ T-DNA 挿入パターンを示す系統に、高テバイン形質と低テバイン形質を示すものが現れ、これまでに明らかにした4ヶ所の T-DNA 挿入部位と、アヘンアルカロイド成分含有量との相関が認められなかった。また、T0 世代植物におけるモルヒネ生合成経路の酵素・遺伝子群の発現解析結果から野生株と比較して顕著な変動を示したものは見られなかった。

以上の結果は、PsM1-2 系統における形質変異が 1ヶ所の T-DNA の挿入による一遺伝子の破壊によるものではないこと、明らかになっている 4ヶ所の T-DNA 挿入部位は形質変異との相関がないこと、そして、テバインからモルヒネへの 2 段階の脱メチル化ステップが特異的に阻害されていることを示唆するものである。

これらの情報は、高等植物における二次代謝物の生産調節が複雑な機構で制御されていることを示すものであり、その生産能の改変のためには、生合成経路に直接もしくは間接的に関わる酵素・遺伝子群の網羅的な理解、そしてそれらを制御する技術が必要であると考えられる。

T-DNA 挿入ホモ個体については、T1 世代植物の 2つの T-DNA 挿入部位を有する系統においてひとつの T-DNA 挿入部位がホモになっており、この系統の自殖後代植物の栽培により、T-DNA が 1ヶ所のみ挿入されたホモ個体の獲得が可能と考えられ、交配実験等の材料として有望である。

3. 既存薬用植物に対する新規二次代謝産物生産能付加に関する研究

マルバダイオウの場合、今回試みたいいずれのリゾビウム感染方法においても、胚軸を感染材料とした方が、子葉を材料とした場合と比較してカルス化率が高いことが判明した。

試料数の問題は残るが、感染方法の違いによるカルス化または不定芽形成率への影響は、マルバダイオウにおいては感染に用いた材料の差異に因るものと比較すると小さく、ペラドンナにおいても影響は無いが、あっても小さいと考えられる。

E. 結論

本研究においては、セリバオウレン、ケシ、ダイオウなどの薬用植物を材料として、遺伝子組換え体の作出、保存、評価に関する実験を行った。

1. セリバオウレンの効率的な組換え体作出法の開発及び組換え体の超低温保存法の検討

まず、セリバオウレンについては、圃場栽培株の葉柄を材料に、リゾビウム（アグロバクテリウム）菌を利用した外来遺伝子導入法を確立し、 β -glucuronidase (gus) 遺伝子（レポーター遺伝子）、ベルベリン輸送体（Cjmdr1）センス遺伝子、同アンチセンス遺伝子導入培養細胞を作成した。再生した Cjmdr1 センス植物体では、葉、葉柄、根の全ての器官において Cjmdr1 mRNA の発現低下が認められ、コサップレッションが生じていることが示唆された。また、同植物体の全ての部位において野生株と比較してベルベリン含量の低下が認められた。

Gus 導入植物体については、葉、葉柄、根のすべての部位において gus の発現が確認され、今回の遺伝子導入に用いた強発現プロモーター配列は、セリバオウレン植物体全体での発現能を有することを確認した。また、本植物の全ての器官においてベルベリンの生産が確認され、レポーター遺伝子自身はベルベリン生産能に影響を与えていないことを確認した。Gus 導入植物体は開花したが、種子の発達は認められず、媒介昆虫のいない閉鎖温室では、受粉等の処理を行わないと結実しないものと思われた。

また、超低温保存法の検討では、Cjmdr1 センス形質転換体の不定胚を材料とした場合、40%の割合で再生し、超低温保存前後で

組換え遺伝子 (hpt) が安定に存在すること、そして、再生体においても未保存のクローンと同様に Cjmdr1 の発現が著しく低下していることが認められた。

以上のように、セリバオウレンの高効率遺伝子組換え体作出法およびレポーター遺伝子を用いた遺伝子組換え体の検出法、そして組換え体の超低温保存法に関する有用な知見が得られた。

2. ケシのリゾビウム形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索

ケシのリゾビウム感染による形質変異体のアヘンアルカロイド成分変異は、T-DNA のゲノム DNA への挿入に因るものと予想し、その原因遺伝子（座）の探索を行った。その結果、成分含有量変異は単純な一遺伝子座の破壊に因るものではないことを示唆する結果が得られた。これは、薬用植物を中心とした高等植物における有用二次代謝物合成能の改変のためには、二次代謝物の高度な生産制御機構の解明が必須であることを示すものである。

本研究で用いた PsM1-2 系統が高蓄積するテバインは、鎮痛薬などの新薬開発のリード化合物として有望であり、テバインを高蓄積する本形質変異体の有用性は非常に高い。また、遺伝子工学的手法によるアヘンアルカロイド組成を改変したケシの作出における素材として、ならびにモルヒネ生合成酵素群の解析材料としても有用であると考えられ、本形質変異体を見出した意義は大きい。

また、本研究で解析を行った高テバイン形質を示す PsM1-2 系統 T1 世代植物のうち、2 系統において T-DNA 挿入部位が T0 世代の 4 ヶ所から 2 ヶ所に減少し、そのうち 1 ヶ所についてはホモであることを確認している。これらの系統の自殖後代植物において、安定に高テバイン形質を示すホモ個体の選抜を進め、得られたホモ個体を用いた交配実験により、遺伝子組換え植物の周辺環境に及ぼす影響の評価が遺伝子レベル、化合物レベルの両者において可能になるものと期待される。

3. 既存薬用植物に対する新規二次代謝産物生産能付加に関する研究

マルバダイオウの遺伝子組換え体作出に関しては、胚軸を感染材料とすることで、高効率にカルスの誘導が可能であることが示され、感染材料(部位)に関する新たな知見が得られた。

以上の研究より得られた知見および情報は、いずれも、薬用植物分野における有用遺伝子組換え体作出に関わる、遺伝子導入から遺伝子組換え植物体の選抜および再生、そして形質転換体の化合物レベルおよび遺伝子レベルの評価、さらには有用二次代謝産物の生産能改変、そして有用組換え体の長期保存にわたる各段階に密接につながるものであり、遺伝子組換え薬用植物の実用化へ向けた基盤技術の確立にいずれも欠くことのできないものであると言える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shitan, N., Kiuchi, F., Sato, F., Yazaki, K., Yoshimatsu, K.: "Establishment of *Rhizobium*-mediated transformation of *Coptis japonica* and molecular analyses of transgenic plants", *Plant Biotechnology* 22(2), 113-118. (2005)

2. 学会発表

- 1) 吉松嘉代、土反伸和、佐藤文彦、矢崎一史：物質輸送エンジニアリングによる新規有用植物の育種 1. 遺伝子組換えオウレンの作出、第21回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(香川) (2003.8)
- 2) 土反伸和、吉松嘉代、佐藤文彦、矢崎一史：オウレン形質転換体を用いた *CjMDR1* の機能解析、日本植物生理学会2004年度年会(東京) (2004.3)
- 3) 吉松嘉代、柴田敏郎、木内文之、飯田修、関田節子、牧野由紀子：ケシ属植物の形

態とアルカロイド、日本薬学会第124年会(大阪) (2004.3)

- 4) 吉松嘉代、河野徳昭、木内文之：ケシ形質転換体の形態およびアルカロイド成分変異、第22回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(秋田) (2004.8)
- 5) 吉松嘉代、土反伸和、木内文之、佐藤文彦、矢崎一史：オウレンの分種育種の効率化、第22回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(秋田) (2004.8)
- 6) Kayo Yoshimatsu, Noriaki Kawano, Fumiyuki Kiuchi: Aberrant morphology and altered composition of opium alkaloids in *Rhizobium* transformed opium poppy cultivated in a phytotron, German-Japan Seminar on Molecular Regulation of Plant Secondary Metabolism (Kazusa Academia Park, Japan, 2004.9)
- 7) 河野徳昭、吉松嘉代、木内文之：ケシの *Rhizobium* 形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索、日本薬学会第125年会(東京) (2005.3)
- 8) 吉松嘉代、土反伸和、河野徳昭、木内文之、佐藤文彦、矢崎一史：組換え薬用植物の作出法に関する研究-組換えオウレンの作出と超低温保存、日本薬学会第125年会(東京) (2005.3)
- 9) 吉松嘉代：植物バイオテクノロジーによる新しい薬用植物資源の開発、薬用植物フォーラム2005(つくば) (2005.7)
- 10) 河野徳昭、吉松嘉代、木内文之：ケシの *Agrobacterium* 形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索、第23回日本植物細胞分子生物学会京都大会・シンポジウム (2005.8)
- 11) Yoshimatsu K: Tissue culture of medicinal plants: micropropagation, transformation and production of useful secondary metabolites, 2005 Annual Autumn Meeting of Korean Society for Plant Biotechnology and Korea-Japan joint Symposium on Platform Technology for Plant Bioproducts (Jeju, Korea, 2005. 11)

- 12) Kawano N, Yoshimatsu K, Kiuchi F:
Approach Toward the Creation of
Nonnarcotic Opium Poppy - Morphological
and Genetical Analysis on 'Thebaine
Poppy'-, 2005 Annual Autumn Meeting of
Korean Society for Plant Biotechnology and
Korea-Japan joint Symposium on Platform
Technology for Plant Bioproducts (Jeju,
Korea, 2005. 11), Best Poster Award
- 13) Yoshimatsu K, Kawano N, Inui T, Sato F,
Kiuchi F: Isoquinoline alkaloids in *Papaver
somniaferum* L. and *Papaver orientale* L.
cultivated plants and their tissue cultures,
International Chemical Congress of Pacific
Basin Societies (Honolulu, Hawaii, U.S.A.,
2005.12)
- 14) Kawano N, Yoshimatsu K, Kiuchi F:
Investigation of genes involved in altered
opium alkaloid composition in
Agrobacterium transformed *Papaver
somniaferum*, International Chemical
Congress of Pacific Basin Societies
(Honolulu, Hawaii, U.S.A., 2005.12)
- 15) Akiyama T, Arai T, Liu H-M, Yoshimatsu K,
Kunugi A, Shibuya M, Ebizuka Y,
Yamazaki T, Tanamoto K: Biosynthesis of
phyllo dulcin in *Hydrangea macrophylla* var.
thunbergii, International Chemical Congress
of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii,
U.S.A., 2005.12)
- 16) 河野徳昭、吉松嘉代、木内文之：ケシの
Agrobacterium 形質転換体における形質
変異原因遺伝子の探索、日本農芸化学会
2006 年度大会（京都）（2006.3）
- 17) 吉松嘉代、河野徳昭、北澤尚、根本泰行、
井上修、飯田修、木内文之：新規外国導
入系統ケシの生育特性とアルカロイド組
成・含量、日本農芸化学会 2006 年度大会
（京都）（2006.3）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(図表)

1. セリバオウレンの効率的な組換え体作出法の開発及び組換え体の超低温保存法の検討

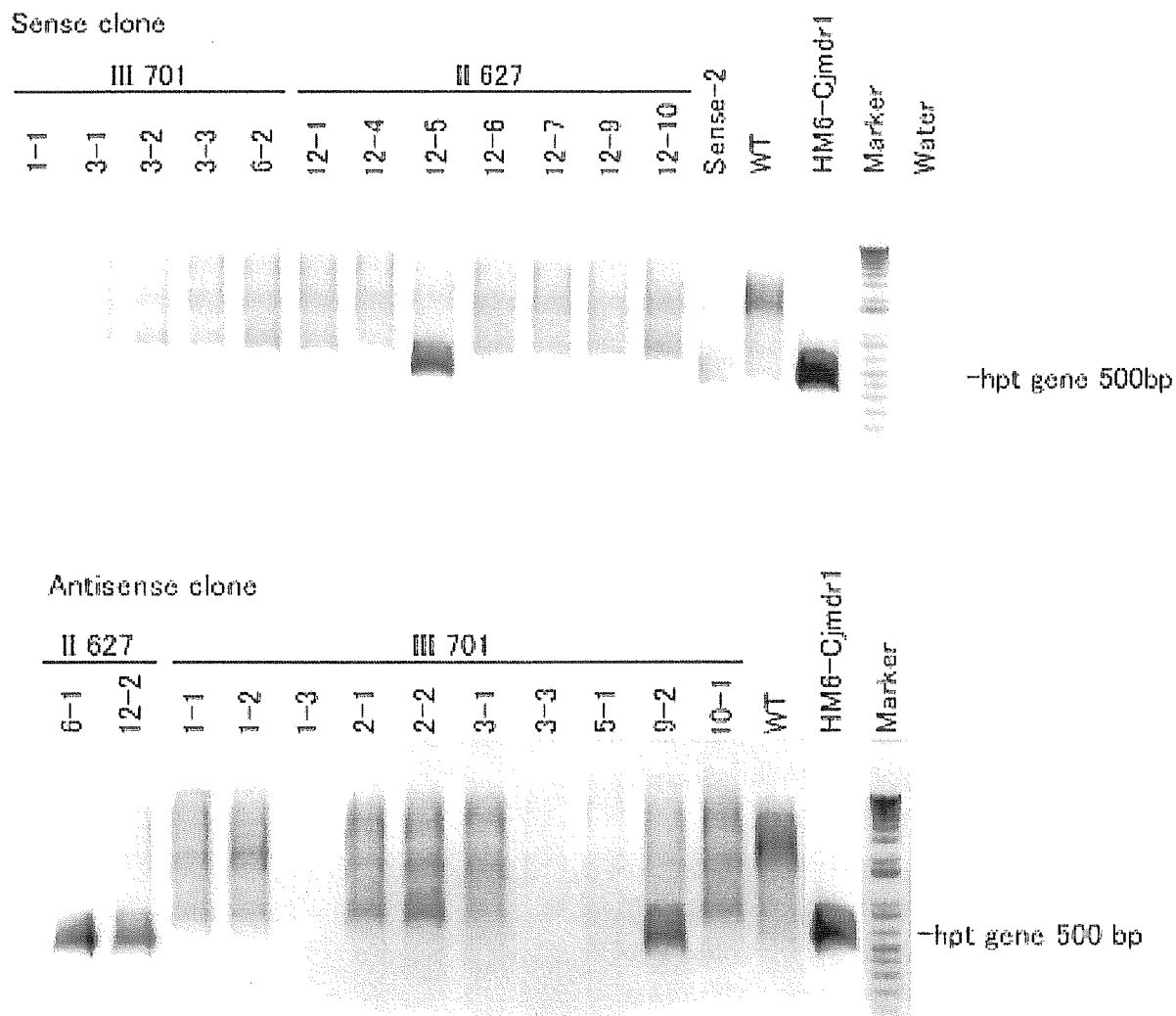


図1. Cjmdr1センス（上）およびアンチセンスクローン（下）のゲノムPCRによるhpt遺伝子の検出

II627、III701：ハイグロマイシン耐性カルスクローン；Sense-2：Cjmdr1センスクローン；WT:野生株；HM6-Cjmdr1:プラスミドベクター（ポジティブコントロール）



図2. 栽培3ヶ月後の野生株（左）とCjmdr1センス導入植物体（右：クローンSense2）

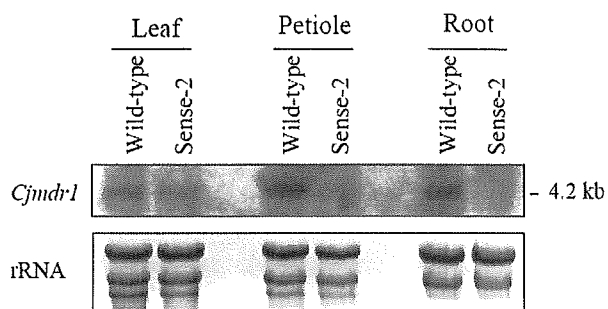


図3. Northern法による*Cjmdr1*センス導入植物体 (Sense2) の*Cjmdr1* mRNA発現解析

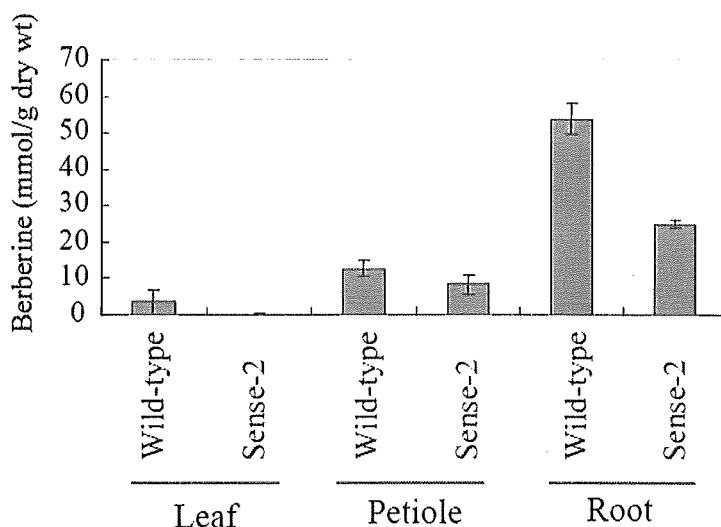


図4. 野生株および*Cjmdr1*センス導入植物体 (Sense2) のベルベリン含量

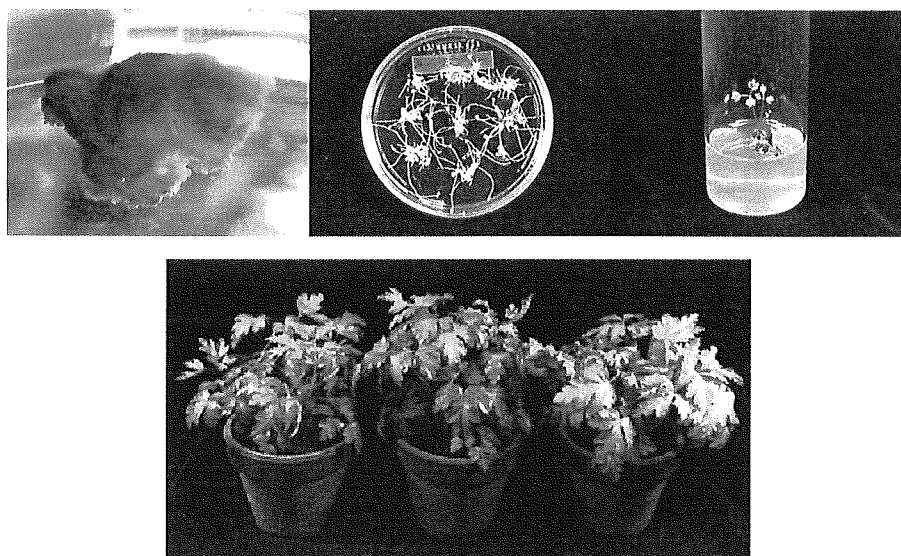


図5. *gus*導入体 (II627-7-1) 左上: カルスのGUS活性染色、中上: 不定胚分化と植物体再生、右上: 弱光下で育成した再生植物体、下: 栽培7ヶ月後の植物体

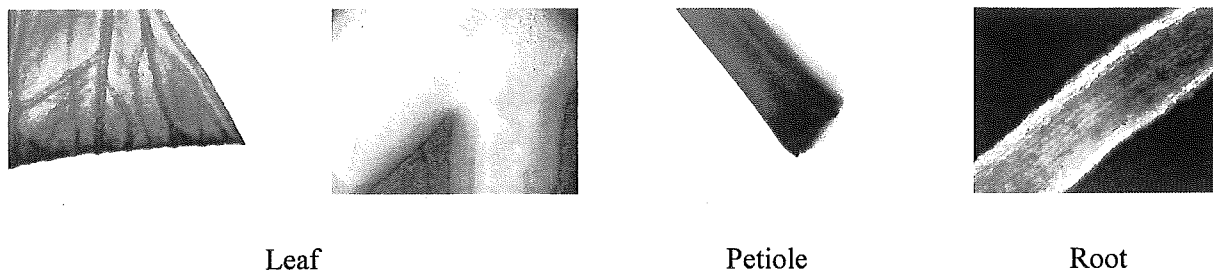


図6. *gus*導入体 (II627-7-1) の各部位におけるGUS活性

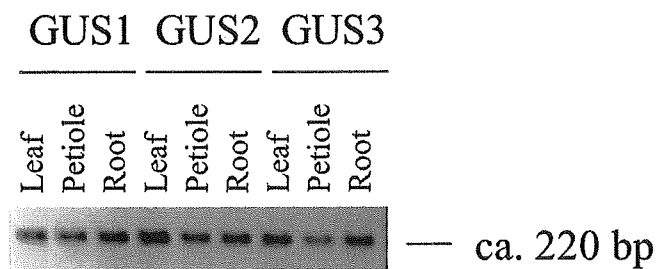


図7. RT-PCR法による*gus*導入体 (II627-7-1) における*gus* mRNAの発現確認

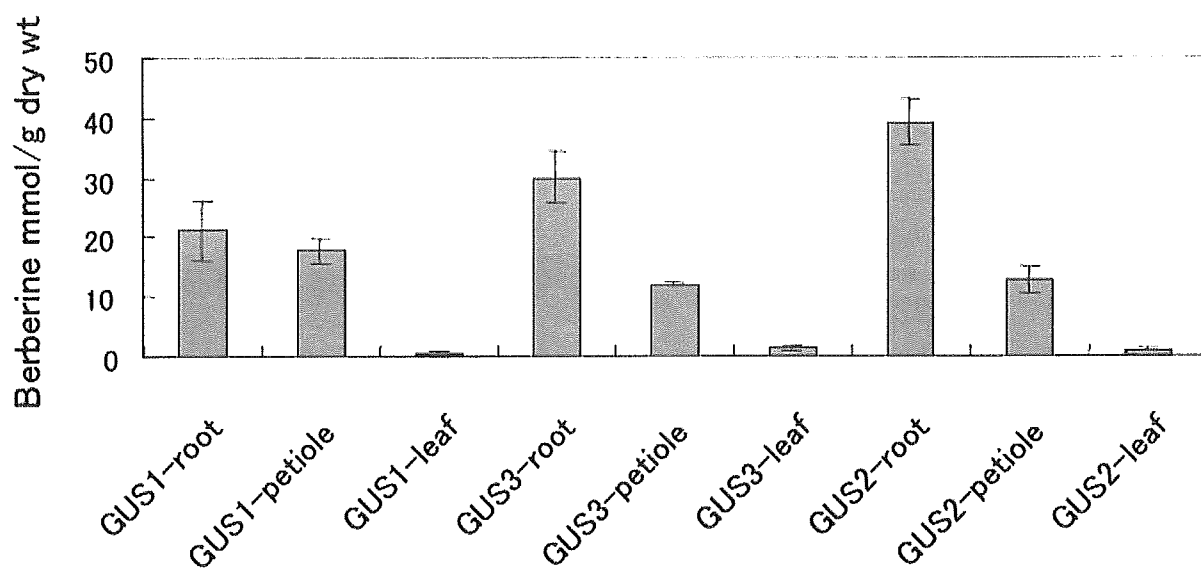


図8. *gus*導入体 (II627-7-1) のベルベリン含量



図9. gus導入体 (II627-7-1) の開花

2. ケシのリゾビウム形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索

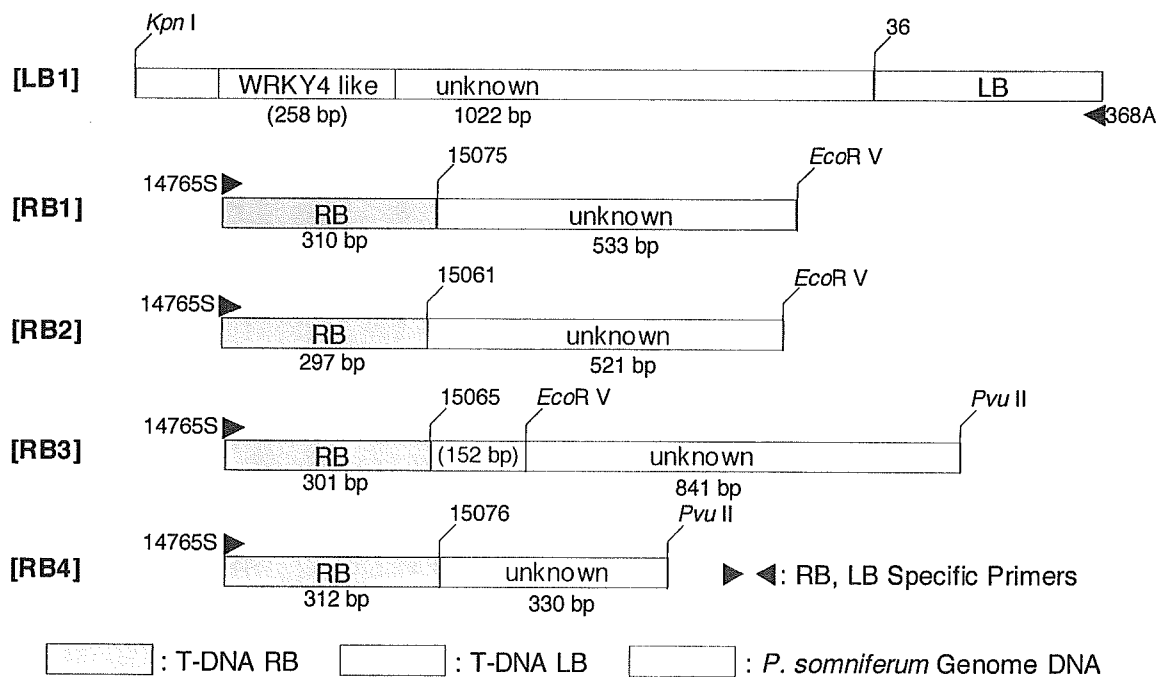


図10. T-DNAのRB, LB末端部および隣接ケシゲノムDNAの構造
 数値はT-DNA(全長15098 bp)の塩基番号を表す

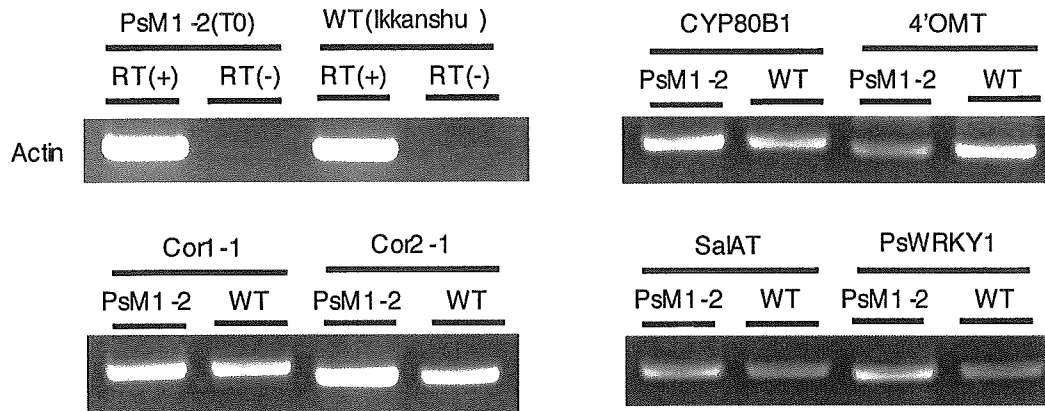
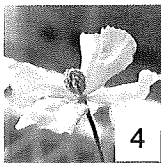
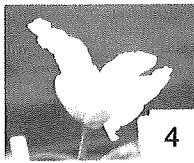
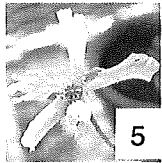


図11. モルヒネ合成経路関連遺伝子群の定性的発現解析結果

Line	WT (n=6)	PsM1-2 (T ₀)	PsM1-2 (T ₁) #1 (n=33)	PsM1-2 (T ₁) #2 (n=27)
Number of Petals			{ <ul style="list-style-type: none"> 3: 1 4: 15 5: 8 6: 6 7: 2 8: 1 	 <ul style="list-style-type: none"> 4: 10 5: 13 6: 4
Splits on Petals	No	Yes	Yes: 16 No: 17	Yes: 11 No: 16
Days to Flowering	53.5 ± 4.8	71*	98.0 ± 14.3	105.0 ± 14.9
Plant height (cm)	42.4 ± 5.8	38*	54.5 ± 7.8	49.2 ± 8.6

*: *in vitro* plantlet transplanted to soil

表1. PsM1-2 T₁世代植物の形態学的特長

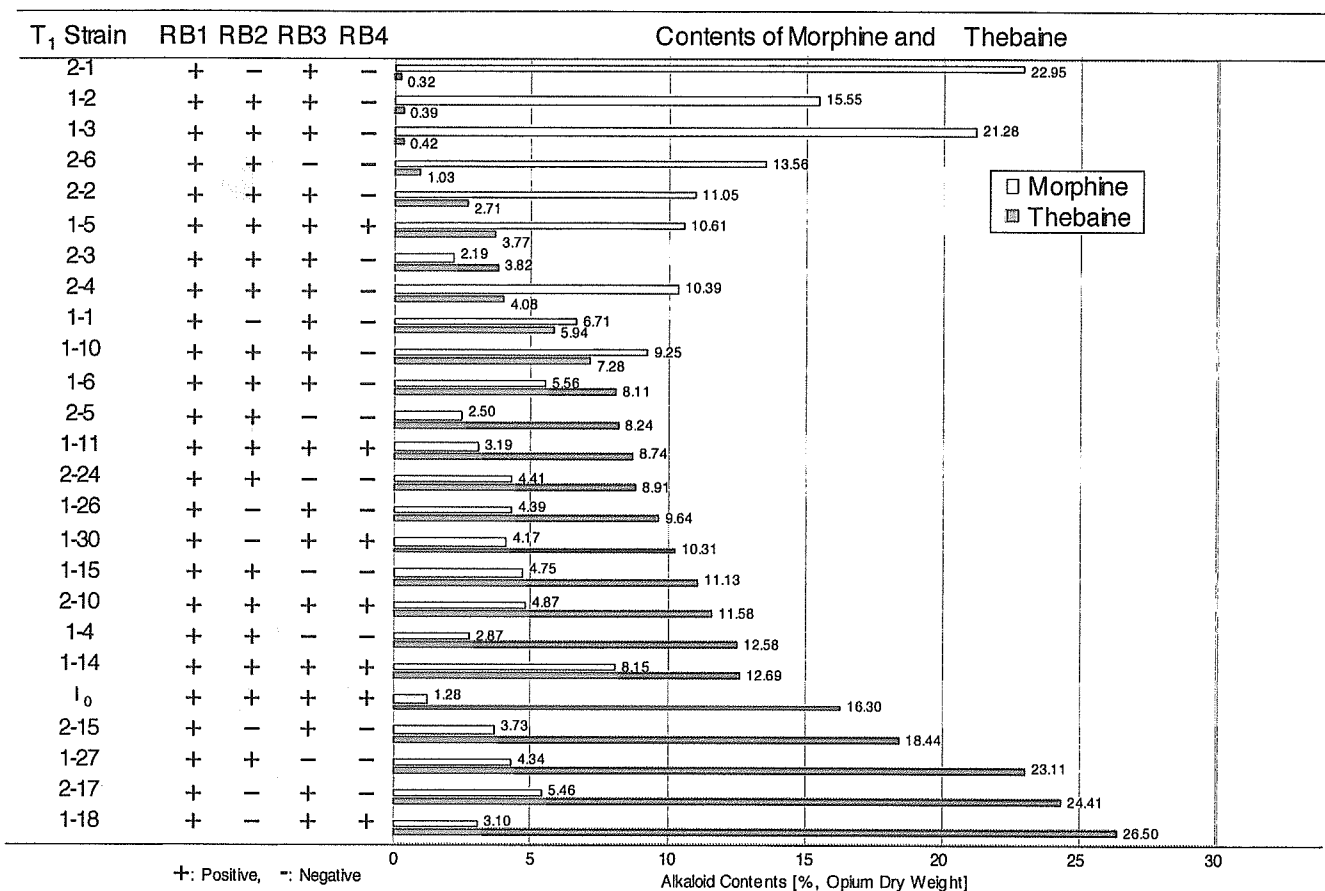


図12. PsM1-2 T1世代植物におけるアヘンアルカロイド成分含有量とT-DNA挿入パターン

3. 既存薬用植物に対する新規二次代謝産物生産能付加に関する研究

<i>A. belladonna</i> (葉)			<i>R. rhaponticum</i> (胚軸)			<i>R. rhaponticum</i> (子葉)		
Gene	感染条件		Gene	感染条件		Gene	感染条件	
	I	II		I	II		I	II
pBI121(GUS)	4/10 (0/10)	6/10 (0/10)	pBI121(GUS)	3/3 (1/3)	3/3 (0/3)	pBI121(GUS)	1/4 (0/4)	0/4 (0/4)
BAS	5/10 (0/10)	6/10 (0/10)	BAS	1/3 (0/3)	0/4 (0/4)	BAS	0/4 (0/4)	0/4 (0/4)
STS	7/10 (3/10)	4/10 (2/10)	STS	2/3 (1/3)	2/3 (1/3)	STS	0/4 (0/4)	0/4 (0/4)

表2. リゾビウム感染条件、植物材料、導入遺伝子がカルス化および不定芽形成に与える影響
カルス化個体数/試料数 (不定芽形成個体数/試料数)

遺伝子組換え薬用植物の環境に与える影響に関する研究

分担研究者 大塚 譲 お茶の水女子大学 生活環境研究センター 教授

薬用植物組換え体の環境に与える影響を検討するため、パン酵母由来のプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) 遺伝子を薬用植物ベラドンナに組み込み組換え体を作製した。PDI の全長遺伝子が組み込まれている pMATE6 プラスミドから PCR 法により全長遺伝子を増幅し、pGEM-T easy ベクターに組みこんだ。得られた株を培養し、プラスミドを単離し、制限酵素で切って、大腸菌と *A. rhizogenes* の両方の複製開始点を持つベクター-pIG' -Hm プラスミドのマルチクローニングサイトにつなぎ代えた。このプラスミドをアグロバクテリウム *Agrobacterium rhizogenes* AR10 にエレクトロポレーション法によりトランスフォーメーションし、PDI 遺伝子をアグロバクテリウムに導入した。菌体から DNA を抽出し PCR により酵母 PDI 遺伝子が組み込まれているかを確認した所、間違い無く組み込まれていた。そこで得られたアグロバクテリウムを薬用植物ベラドンナに感染させるため、leaf-disk 法で *Agrobacterium rhizogene* AR10 をベラドンナに感染した。共存培養した組織片を抗生物質を含む培地で培養したところ、カルスの発生を認めた。このカルスからシュートの誘発をおこなった。さらに無添加培地でカルスからベラドンナ植物体 (plant) と毛状根を作製した。

目的

遺伝子組換え植物が数多く作られているが薬用植物での組換えの例はほとんど無いものの薬用植物に様々な遺伝子を組み込み新規の薬用植物を作るとは今後幅広く行われるものと考えられる。しかしながら薬用植物を宿主とする遺伝子組換え植物を実験室外に持ち出して栽培することは生理活性物質を持っているがために通常の植物より危険性が高いことも予想されその環境への影響を十分に把握しておかなければならない。

植物個体に遺伝子を挿入する方法としてパーティクルガンによる金コロイド法やアグロバクテリウムを用いる方法がある。特殊な装置の必要の無いアグロバクテリウムを用いる方法にはクラウンゴールを形成させる Ti プラスミドを用いる方法と毛状根を形成させる Ri プラスミドを用いる方法がある。Ri プラスミドを用いる方法はすでに薬用植物ベラドンナへの遺伝子導入で用いられているが形質転換植物の様々な性質については調べられていない。

これまでパンの商業生産には生地を膨張させ、焼き上がりを良くするために小麦粉の品質改良剤として臭素酸カリウムが使用されてきたが、1976 年に染色体異常を引き起こす遺伝子毒性を示す物質であることが判明し、1982 年にはラットの腎臓で発ガン性が確認され、さらに臭素酸カリウムによって、中枢神経麻痺、遺伝子損傷、眼球破壊などが生じることが明らかになり、国際ガン研究機関 (IARC) の基準で「ヒト

に対して発ガン性がある可能性がある」とするグループ 2B に指定された。

現在では、最終食品に臭素酸カリウムが残存しないことを条件に、パン用小麦粉にのみ使用が許可されているが、使用を自粛しているメーカーも多い。そのため臭素酸カリウムの代わりにアスコルビン酸が膨化剤としてもちいられているが、生地の伸びが悪く、焼き上がりが硬いなどの問題点がある。

Protein Disulfide Isomerase (PDI EC 5. 3. 4. 1) は、小胞体内腔に存在する約 55kDa のタンパク質で、翻訳後タンパク質のジスルフィド結合を正しく架け替えることでそのタンパク質の高次構造形成と機能の発現を促進させる働きをもち、また、近年ではシャペロンとしての機能も注目されている酵素である。このジスルフィド結合を架け替えるという性質から、食品への添加により、食品中タンパク質の構造を変化させ、新たな物性を生み出すことなどが期待されパン製造への応用も考えられる。しかし現在市販されている、牛の筋肉から精製したものなどは極めて高価なため、工業使用には不適と考えられる。そこで、遺伝子組換えによつての生産が期待される。すでに酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) から PDI 遺伝子は、水永らによって 1991 年に全長遺伝子がクローニングされている。

そこで薬用植物組換え体の環境に与える影響を検討するため、酵母プロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子を組み込んだ遺伝子組換え薬用植物ベラド

ンナを作成し、組換えベラドンナの性質がどのように変化するかを明らかにすることを目的とした。組換えベラドンナはすでに千葉大学のグループにより作成されているが、酵母の遺伝子を組み込んだものは未だ作成されていない。またプロテインジスルフィドイソメラーゼは大腸菌などで組換えタンパク質が作成されている例はあるが、植物に組み込んで発現させ、植物の性質にどのような影響を及ぼすかを調べた例はない。プロテインジスルフィドイソメラーゼは小胞体に存在したタンパク質の SS 結合を生成したり組換えたりする酵素であり不活性型の酵素を活性型に代えることのできる酵素なので今までにない変化を植物に起こす可能性もあり、組換え植物の性質を明らかにする必要がある。

実験方法

1) プラスミド単離

LB 寒天培地に現れたコロニーを釣菌し、LB アンピシリン液体培地 2ml 中にて 37°C で一晩振とう培養し、キット (QIAprep Spin Miniprep Kit) をもちいて、プラスミドを単離した。操作は添付のプロトコール通りに行った。

2) 使用プラスミド

酵母 (*S. cerevisiae*) の全長 PDI 遺伝子 (D00842) をクローニングした pMTY17 のインサート DNA を pUC18 に挿入した pMTE6 をサンプルとしてもちいた(図1)。

3) タンパク質抽出

3-1. 50ml チューブに、10ml Tris-HCl (0.1M・pH7.5)、10mM MgSO₄、1/100 PIC、1mM PMSF、適量のガラスビーズを入れて混合し、-20°C で 15min 冷却した。

3-2. 液体窒素で凍結粉砕した植物を溶かさぬよう速やかに 1. のチューブに入れた。

3-3. 温度が上がらぬよう注意しながら Vortex (15sec × 3 回・1 回ごとに氷で冷却)。

3-4. 遠心分離 (4°C・3500rpm・15min)。

3-5. 上清を 15ml チューブに移し、4 度または -80°C に保存した。

キットを用いて総タンパク質の濃度を測定した。

4) SDS-PAGE 電気泳動・ウェスタンブロッティング

4-1. 抽出したタンパク質濃度をキットを用いて測定し、60μg/12μl になるように濃度調製した。濃度測定は添付のプロトコールに従った。スタンダードは 0、0.4、0.8、1.2μg/μl に調製した BSA 溶液を使用した。この、総タンパク質量が等しいものをそれぞれサンプルとして以下の操作を行い、目的タンパク質発現の確認を試みた。濃度調製を終えたサンプルと 5× SDS-PAGE Sample buffer を 4:1 の割合で混合し、

95°C・3min ボイルして変性した。

4-2. ATTO 電気泳動装置 AE-6530M を用い、7.5%アクリルアミドゲルで、1 枚あたり 20mA の定電流で、BPB マーカーがゲル下端から約 1cm になるまで泳動。サンプルは 1 ウェルあたり 15μl ずつアプライし、泳動終了後 Western blotting を行うものとそのまま染色して比較に使用するものと、2 枚同じ泳動操作を、同じ装置の表裏で行った。

4-3. 泳動終了後速やかにそれぞれのゲルを Western Blotting し、その後 Fair Banks 染色、または、Western blotting を行わずそのまま Fair Banks 染色した。ここで Stacking gel は除き、以後の操作は Separating gel のみで行った。Western Blotting は ATTO ホライズブロット AE-6677 で行い、操作は添付のプロトコールに従った。複数枚のゲルを一度に Blotting する際は、装置添付のプロトコール通り、間にセロハンを挟んだ。電圧は 200mA 前後となるよう留意し、45 分程度 blotting した Fair Banks 染色は染色液 I に浸して o/n 振とう後、染色液 II で 30min・染色液 III で数 h 以上順に振とうし、ろ紙の上に置いて Gel dryer で乾燥させた。

4-4. Blotting が終了したニトロセルロースメンブレンに Ponceau S solution をかけ、5 分染色した。

4-5. 脱イオン水で洗浄し、乾燥させる。タンパク質が写し取られていることを確認して、マーカー一部を油性ペンなどでチェックした。

4-6. TBS で 5min 振とうした。

4-7. 5%Skim milk 入り TTBS で Blocking 1h

4-8. TBS で洗浄 (10min 振とう) した。

4-9. 0.2% Skim milk 入り TBS で一次抗体を希釈し、室温で 1 h 振とうさせて反応した。

4-10. TTBS で 2 回洗浄 (10min 振とう) した。

4-11. 0.2% Skim milk 入り TBS で二次抗体を希釈し、室温で 1 h 振とうさせて反応した。

4-12. TTBS で 2 回洗浄 (10min 振とう) した。

4-13. 乾燥したメンブレンをキットを用いて染色し、スキャナで画像を取り込んだ。

5) アグロバクテリウムへ Ri プラスミドの導入

5-1. アグロバクテリウムコンピテントセルの調製

・試薬

agrobacterium rhizogenes AR10

YEB 培地

10%Glycerol

・方法

5-1-1. 前培養 YEB 培地 2ml で 28°C, overnight 振とう培養した。

5-1-2. 本培養 YEB 培地 100ml に前培養液 2ml 植菌し、28°C 7~8hr 振とう培養した。OD₆₀₀ = 0.5 程度

で培養を止めた。

5-1-3. 培養液を氷冷した。(10min)

以下の操作は、全て氷中で行った。

5-1-4. 5000 g、4°C、5min 遠心分離により集菌した。

5-1-5. 上清をすてた。

5-1-6. 10%Glycerol (4°C氷冷)50ml に懸濁した。

5-1-7. 5000 g、4°C、5min 遠心分離により集菌した。

5-1-8. 上清を棄てた。

5-1-9. 同様の操作を 30ml、2ml の 10%Glycerol (4°C氷冷) で繰り返し行った。

5-1-10. 10%Glycerol (4°C氷冷)1ml に懸濁した。

5-1-11. 50~100 ずつ分注し、-80°C保存。これをエレクトロコンピテントセルとした。

5.2 エレクトロポレーション

・試薬

Agrobacterium rhizogenes AR10 エレクトロコンピテントセル

WLYPDI/pIG' -Hmプラスミド DNA

エレクトロポレーター

SOC 培地

YEB/Rif Km agar 培地

・方法

5-2-1. -80°C保存エレクトロコンピテントセル 50 μ l を氷中で融解した。

5-2-2. プラスミド DNA 0.5 μ g (2.5 μ l) を加えた。

5-2-3. 氷冷したキュベット (0.2 cmギャップ) に移した。

5-2-4. エレクトロポレーション 1800 V (9.0 kV/cm)
50 μ F
200 Ω

1 pulse

5-2-5. パルスの直後に SOC 培地 450 μ l を加え、菌を回収した。

5-2-6. 28°C 1~2hr 静置培養した。

5-2-7. YEB/Rif Km agar 培地にプレーティングした。

5-2-8. 28°C 2 days 培養した。

リファンピシン (Rif) とカナマイシン (Km) による相同組み換えが起こった形質転換体を選抜した。

実験結果

1) ベラドンナ形質転換体作製

全長 PDI 両側に発現用ベクターへ組込む際に必要な制限酵素認識サイトを付加するため、一度 pMTE6 由来の (retention signal) を含む全長 PDI を PCR で増幅し、pGEM-T easy ベクターにサブクローニングした。得たプラスミドベクターを WLYPDI/T と命名した (図 1)。薬用植物ベラドンナの組み換え実験にはアグロ

バクテリウムと相同組換えできるベクター pIG' -Hm を用いた (図 2)。pIG' -Hm プラスミドベクターのマルチクローニングサイトに幾つかの制限酵素認識サイトがある。さらに、カナマイシン耐性遺伝子 NPTII やハイグロマイシン耐性遺伝子を持っている。制限酵素 Not I で pIG' -Hm ベクターと WLYPDI/T のマルチクローニングサイトをそれぞれを切断し、ライゲーションとトランスフォーメーションし pIG' -Hm ベクターに組み込んだ (図 2)。それぞれのコロニーの中に PDI 遺伝子が含まれているかどうかを PCR 法で確認し遺伝子が入っているコロニーを選択した。得られたコロニーからプラスミドを単離し、PDI 遺伝子の含まれていたプラスミドの中に望み通りの方向に組み込まれているかどうかを制限酵素処理で解明した (図 3)。図 3 の写真①番②番はコントロールと形質転換体 WLY/pIG' -Hm をそれぞれを制限酵素 SalI で処理した結果である。③番④番はコントロールと WLYPDI/pIG' -Hm それぞれを制限酵素 HindIII で処理した結果である。正方向に PDI 遺伝子が挿入されていると SalI で約 600bp と約 10000bp、HindIII で約 1200bp、283bp、9000bp の位置にバンドが確認できることから、PDI 遺伝子は正しい方向で pIG' -Hm ベクターに組み込まれたことが判明した (図 3)。

次に WLYPDI/pIG' -Hm を用いて、エレクトロポレーション法で PDI 遺伝子をアグロバクテリウム rhizogenes AR10 に導入した (図 4)。エレクトロポレーションにより形質転換されたと思われるアグロバクテリウムのコロニーが出現した。得られたコロニーの中からいくつかを選びコロニー PCR を行ったところ、一つのコロニーに PDI 遺伝子が組み込まれていたことが確認できた (図 5 上)。そこでさらにこのコロニーのゲノム DNA を抽出し、PCR をかけた (図 5 下)。PCR の結果 WLYPDI/AR10 形質転換体に PDI 遺伝子が AR10 に組込まれたものと判明した。

得られた形質転換体 WLYPDI/AR10 をリフリーディスク法でベラドンナに感染した (図 4)。アグロバクテリウムと共存培養した組織片を抗生物質 claforan を含む培地で培養した。二週間後除菌されたベラドンナ組織片の肥大 (ひだい) が観察され (写真 1 左上)、4 週間後ぐらいにはカルスの成長もみられた (写真 1 右上)。形質転換したカルスを選択のため、抗生物質 hygromycin を添加した培地にベラドンナ葉片を植え継いだ。一ヵ月後抗生物質で選択され、大きくなったカルスからシュートを誘発するため、抗生物質を含まない、植物ホルモンを減量した培地にカルスを植え継いだ (写真 1 右下)。カルスからシュートを誘導するときの培養条件を検討するため、カルスを 16 時間/8 時間明暗サイクル培養と暗所培養を行った。

2) 毛状根の液体培養

カルスから出てきた毛状根を一本ずつ MS 寒天培地で育成し、クローン化し、MS 液体培地に 6-10 本程

度 (2cm ぐらい長さ) を入れて培養した。カルスの大きさや誘発された毛状根の本数も違うため、各カルスから、違う数のサンプルを採集した(表 1、写真 2)。

3) ゲノム DNA の確認

液体培養の毛状根がフラスコにいっぱいになると、培地交換した。毛状根をある程度集めて、液体窒素でつぶした。得られた凍結粉 (一つサンプルにつき約 10mg) から genomic DNA を抽出した。Sigma の GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit を用いて抽出したが収率が低くて、PCR がほとんどかからなかった。このキットでも抽出できたサンプルは 1-3, 1-4 と 1-6 である。PCR 反応でこの三つの毛状根サンプルに yPDI が組み込まれていることを確認した。

4) タンパク質の確認

ほかのサンプルについてはゲノム DNA の確認は未確認のまま、タンパク質を抽出し、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングで確認した。各サンプルの成長速度が違うため、タンパク質抽出に必要な量が得られた培養時間は異なっていた。一回目の実験でタンパク質の抽出ができたサンプルは 1-4, 3-1, 4-1 であった。二回目の実験でタンパク質の抽出ができたサンプルは 1-1, 1-2, 1-3, 1-7, 3-2, 4-2, 5-2 であった。これらを用いてウエスタンブロッティング反応をおこなった (図 6, 7, 8)。

5) トランスジェニックベラドンナ植物体の作製

誘発されたカルスから植物体を得て、一年間にわたって育てた結果、トランスジェニックベラドンナの再生ができた(写真 3-6)。葉 100mg から Sigma の RedExtract-N-Amp キットを用いて DNA を抽出し、PCR を行い、酵母 PDI 遺伝子が導入されていることを確認した。

考察

酵母 PDI 遺伝子をもった薬用植物ベラドンナが作成できた。外見上は花の色などの変化は見られてないが葉の波うちやしわが見られ、アグロバクテリウム感染の特徴を示していた。葉っぱの一部に色の変化も認められた。植物体の毛状根は非形質転換体に比べ非常に増殖がよかった。毛状根で発現したタンパク質量はかなり少なかった。今後アトロピンなどの生理活性物質の量の変化などを検討する必要がある。また毛状根でどれくらい PDI が生産できるのか生産効率の上昇法等検討すべきである。

F. 研究発表

1) 論文発表

投稿準備中

2) 学会発表

1. 王麗雲、大塚 譲 他 2005 年 分子生物学会大会(福岡) 「酵母 PDI の生産」
2. 王麗雲 大塚 譲 他 2004 年 日本農芸化学会 (広島)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 謝辞

植物体の実験に関して木内先生、吉松先生、河野先生、山本先生にお世話になりました。感謝いたします。

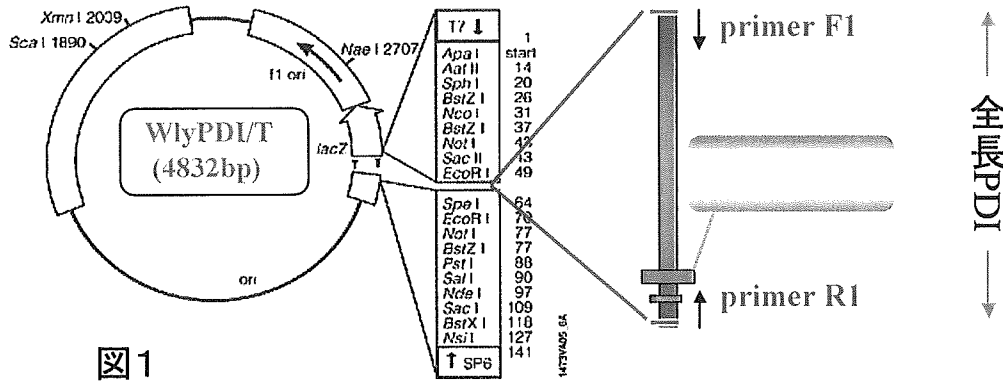


图 1

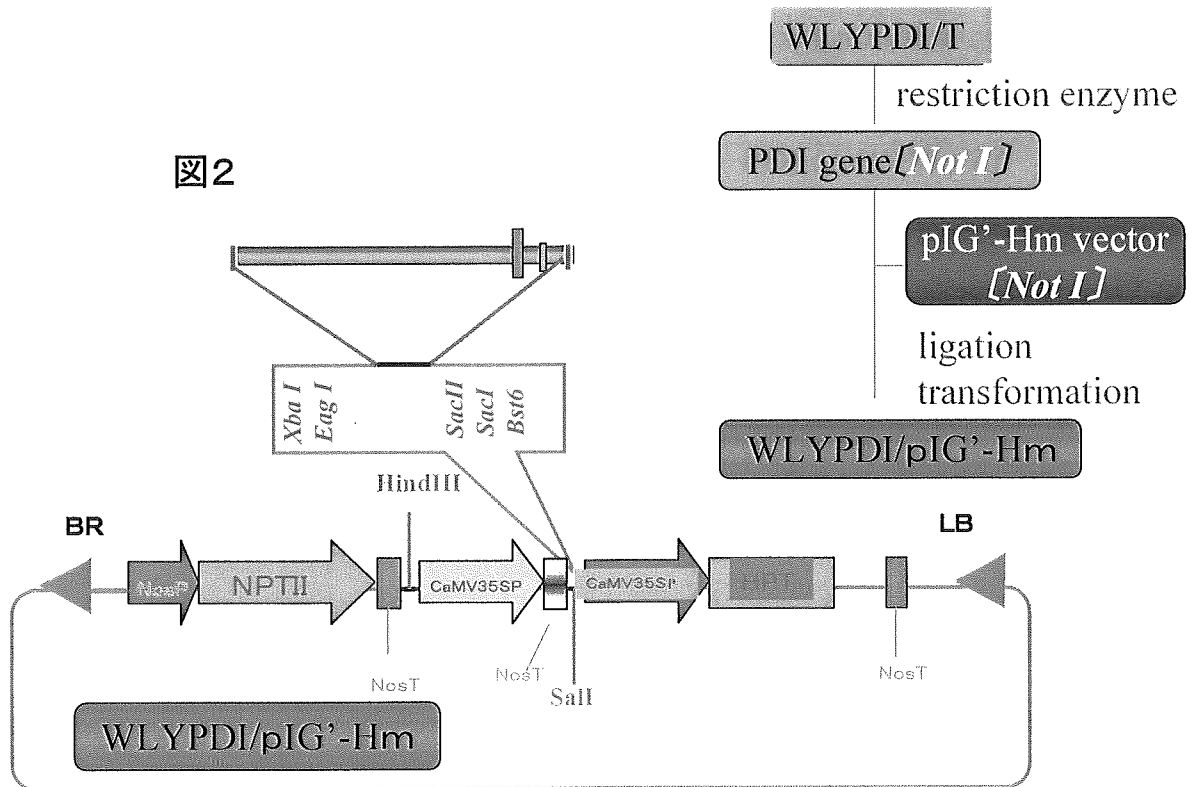


图 2

図3

RE-digestion

- Sample number
- ①: pIG'-Hm vector
 - ②: WLYPDI/pIG'-Hm
 - ③: pIG'-Hm vector
 - ④: WLYPDI/pIG'-Hm
- Restriction enzymes used:
- ①, ②: *Sal I*
 - ③, ④: *Hind III*

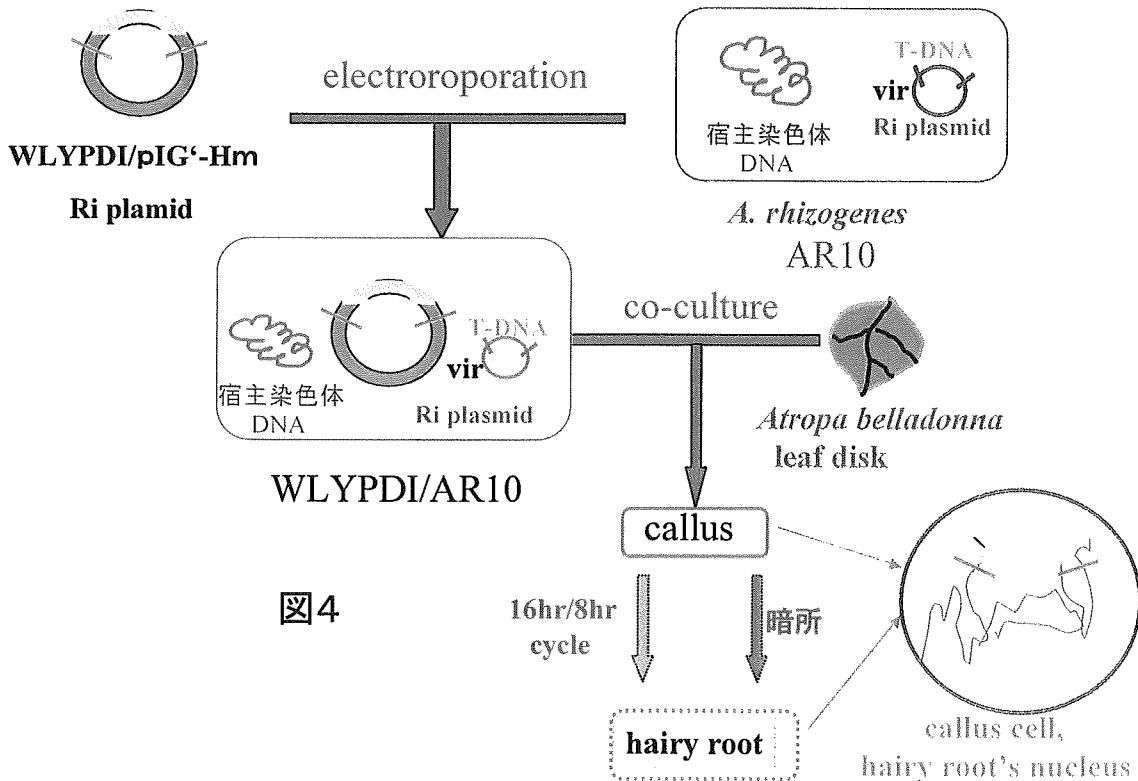
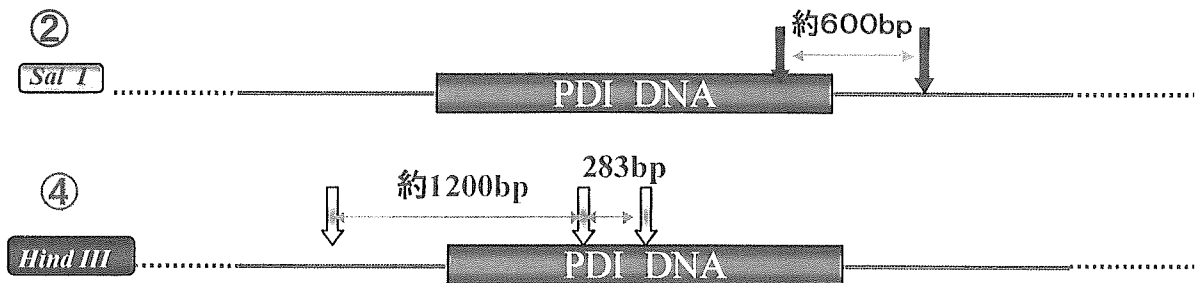
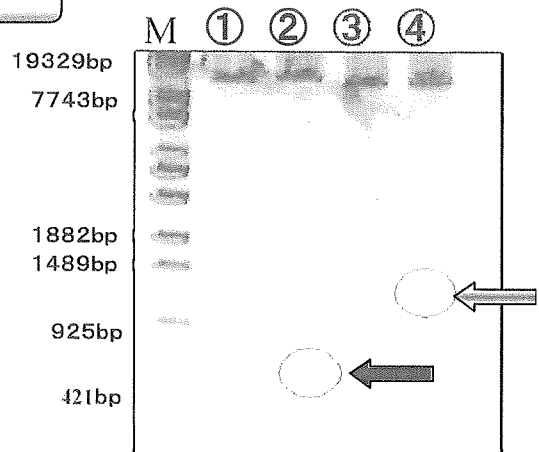


図4