



# アサガオの蔓の巻き付きと エチレンの関係

～一過的及び安定的な形質転換系を  
用いたエチレン合成系酵素遺伝子の  
接触応答性の解析～

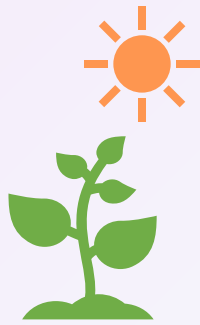
岡田優季  
植物形態学研究室

# 背景

植物は一般に、光合成に有利な、高い位置で葉を展開するための競争を行う



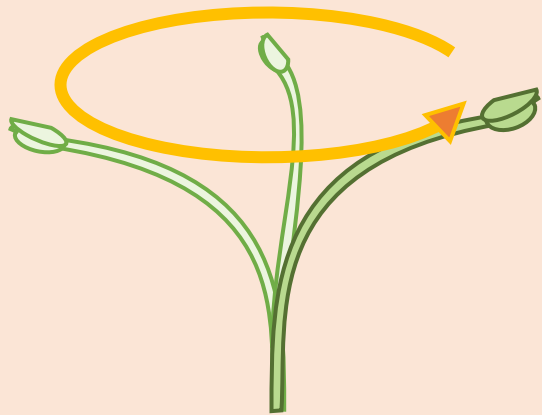
蔓植物：細長い茎(蔓)で他のものに巻き付いて上方に成長する戦略を取る



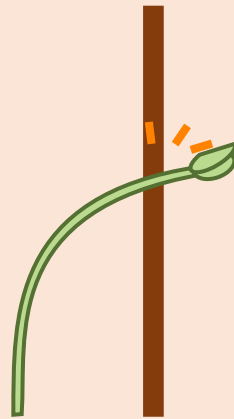
巻き付きの生理学的・分子生物学的な仕組みは  
明らかになっていない

蔓植物の一種である アサガオ (*Ipomoea nil*) の巻き付きの過程

1. 回旋運動で周囲を探る



2. 他のものに**接触**する



接触が引き金となつて巻き付きが起きる

3. 巻き付いて伸長していく



# 背景

## 接触形態形成

植物が接触のような機械的刺激により、自らの形態を変化させる現象

植物ホルモンの一種であるエチレンが接触形態形成の初期過程に重要な役割を果たしていると考えられている

根拠：エチレンは機械的刺激により生合成が誘導され、茎の伸長抑制や肥大化を引き起こす作用を持つ

## 本研究の目的

アサガオの蔓の巻き付きにおけるエチレンの役割を調べる

実験Ⅰ 子葉における減圧浸潤を利用した一過的な発現系の構築

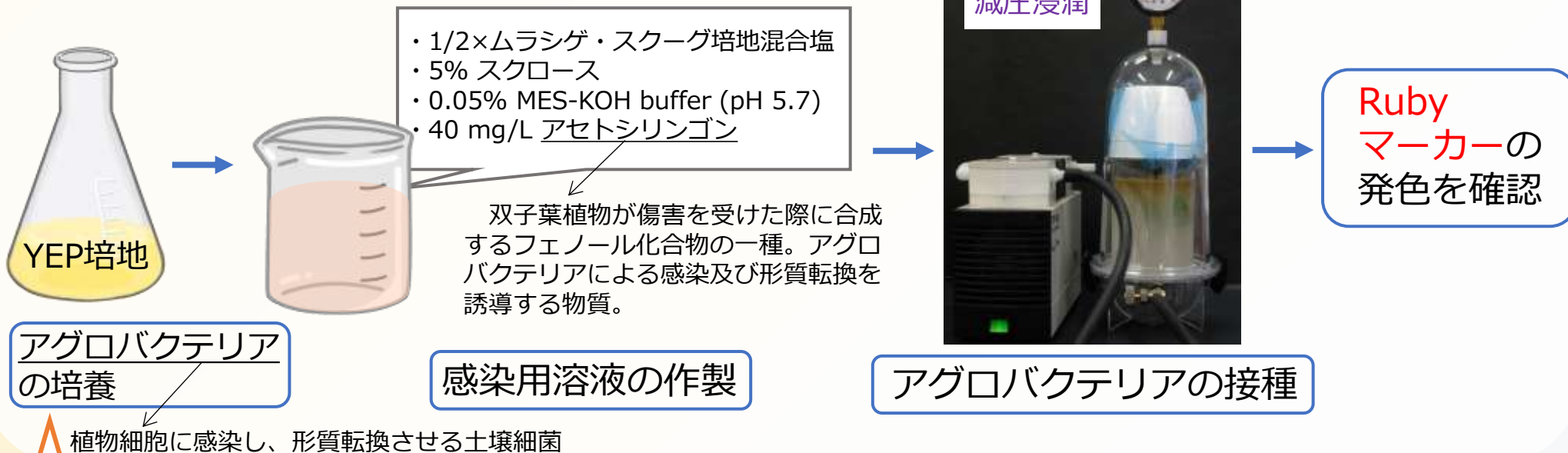
実験Ⅱ 一過的な発現系を利用したエチレン合成系酵素遺伝子の接触応答性の解析

実験Ⅲ 安定的な形質転換体を利用したエチレン合成系酵素遺伝子の解析

# 実験 I 目的・方法

## 目的 アサガオの一過的な発現系を構築する

### 一過的な発現のための形質転換の流れ



遺伝子が導入された箇所で発現する **マーカー** を導入

CaMV35Sプロモーター

植物細胞で制御下の遺伝子を強制的に発現させるプロモーター

Ruby

内在性アミノ酸のチロシンを基質として、**赤い色素**であるベタレインを生成する酵素群の遺伝子

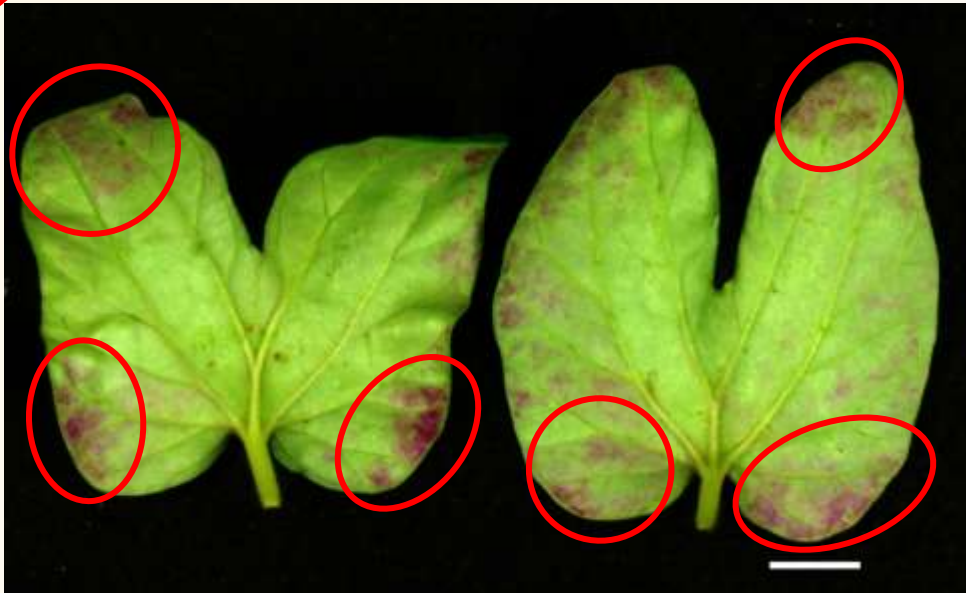
# 結果 I - 1 減圧浸潤の有効性の検討



減圧浸潤なし (3分間浸す)

赤い発色はほとんど見られなかった

Rubyによる赤い発色が見られた



減圧浸潤3分間×1回



減圧浸潤3分間×3回

減圧浸潤は一過的な形質転換に効果的である

# 結果 I - 2 界面活性剤Silwet L-77の濃度と減圧浸潤の時間の検討

感染用溶液中のSilwet L-77の濃度

なし

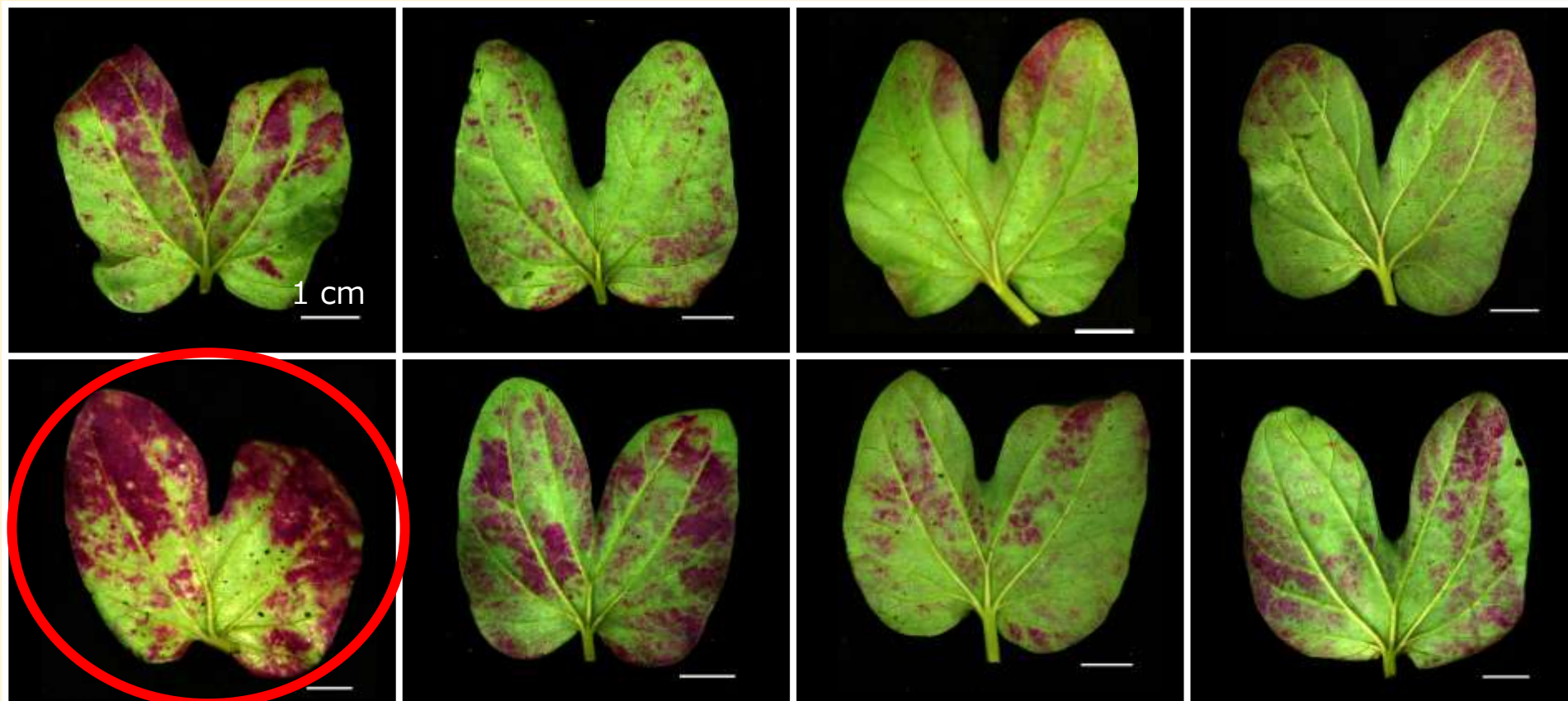
0.01%

0.02%

0.04%

3  
分間  
×  
3  
回

10  
分間  
×  
3  
回



→ Silwet L-77なし、減圧浸潤10分間×3回で最も広範囲に赤く発色

- 界面活性剤は植物体またはアグロバクテリアに悪影響を及ぼしている？
- 減圧浸潤の時間を延ばすことは、一過的な形質転換に効果的である

# 結果 I - 3 減圧浸潤の時間と回数の検討



減圧浸潤3分間×10回

3分間×3回よりは**広範囲に発色**



減圧浸潤10分間×3回

3分間×10回よりも更に**広範囲で発色**

減圧浸潤の時間の延長及び回数増加は、一過的な形質転換に効果的であり、時間の延長がより効果的である

# 実験 I まとめ

## 一過的な発現系の構築

- ・ 減圧浸潤なし…Rubyの発現ほとんどなし
- ・ 減圧浸潤あり…Rubyの発現が確認できた



減圧浸潤は一過的な形質転換に効果的である

- ・ 減圧浸潤の時間を延長した条件及び回数を増加した条件でRubyが強く発現し、特に時間の延長で顕著だった



減圧浸潤の時間の延長及び回数の増加は一過的な形質転換に効果的であり、時間の延長がより効果的である

- ・ 界面活性剤Silwet L-77なしのときに最もRubyの発現が強かった



界面活性剤は一過的な発現系において、形質転換効率を低下、または細胞に悪影響を及ぼす可能性がある

本研究で検討した中では、

- ・ 減圧浸潤10分間×3回
- ・ 界面活性剤なし

の条件が、子葉における一過的な発現系に最も適している

# 実験Ⅱ 導入 蔓の巻き付きとエチレン合成系酵素遺伝子の発現

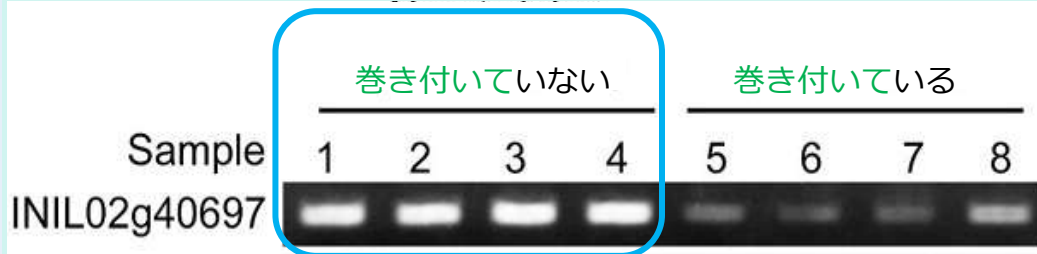
## エチレンの生合成経路



## 蔓の巻き付きに関与していると考えられるアサガオのACS遺伝子

### INIL02g40697

支柱に巻き付いている蔓よりも巻き付いていない蔓で発現量が多い



### INIL05g09675

支柱に巻き付いている蔓の接触している側の組織で発現量が多い



# 実験Ⅱ 目的・方法

目的 一過的な発現系を利用して、ACS遺伝子の接触応答性を解析する

作製・導入したコンストラクト

β-グルクロニダーゼ  
X-gluc を基質として青い発色により  
検出するレポーター遺伝子



ACSプロモーター::GUS  
コンストラクトの作製



減圧浸潤により  
ACSプロモーター::GUS  
コンストラクトを導入

片方の子葉に  
筆で接触 or ハサミで傷



固定  
及び  
GUS  
染色

ACSプロモーター  
による発現を確認  
(青く発色)

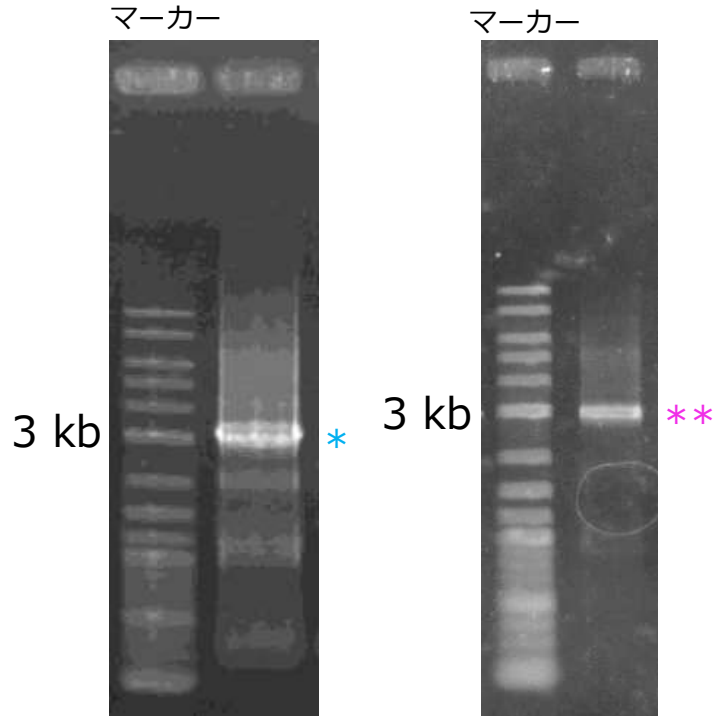
# 結果Ⅱ ① ACSプロモーター::GUSコンストラクトの作製

## ACSプロモーターの単離

アサガオのゲノムDNAを鋳型として、ACS遺伝子上流3 kbをPCRで増幅した

GUSの配列をPCRで増幅

プラスミド (pKH3: 植物の形質転換用のバイナリーベクター) を制限酵素処理またはPCRで増幅



\* : INIL02g40697の上流

\*\* : INIL05g09675の上流

NEBuilderやSLiCEを用いたライゲーション

大腸菌への形質転換・選別

プラスミド精製

PCRや制限酵素によるプラスミドの確認

INIL02g40697または INIL05g09675の  
プロモーターを導入したコンストラクト

アグロバクテリアへの形質転換

# 結果Ⅱ②-1 INIL02g40697の**接触**による発現

**接触**刺激なし  
(コントロール)

筆による**接触**刺激を与えてからの時間

5 分間

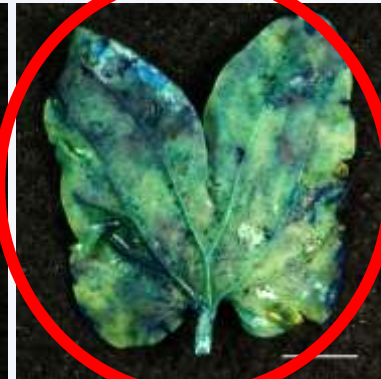
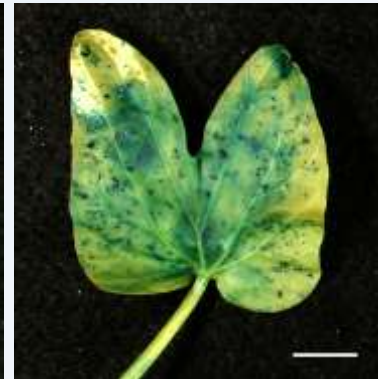
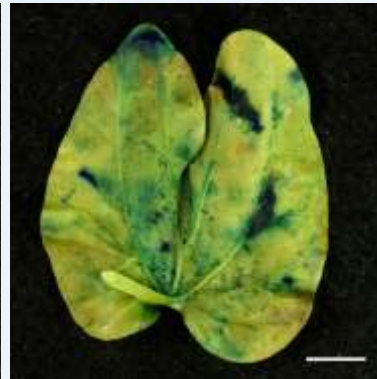
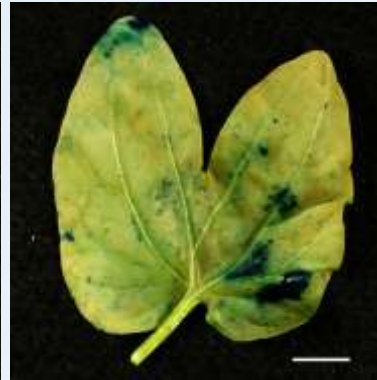
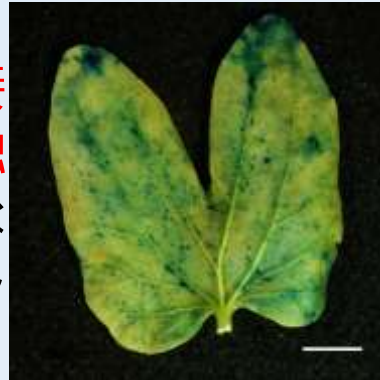
10分間

30分間

120分間

**接  
触  
な  
し**

**接  
触  
あ  
り**



※同じ個体の片方の子葉に**接触**刺激を与えた

※GUS染色を24時間行った後、70%エタノールで葉緑体色素を脱色した

**接触刺激**を与えてから2時間後にGUS活性による**青い発色**が強く確認された

# 結果Ⅱ②-2 INIL02g40697の**傷害**による発現

ハサミで**傷**を付けてからの時間  
5分間                      10分間                      30分間

直後

傷  
害  
な  
し



傷  
害  
あ  
り



傷を付けた箇所



※同じ個体の片方の子葉に**傷**を付けた

※GUS染色を24時間行った後、70%エタノールで葉緑体色素を脱色した

**傷**を付けた箇所でGUS活性による**青い**発色が見られた部分もあったが、**安定した強い応答は見られず**、**傷害**の有無で大きな違いはなかった

# 結果Ⅱ②-3 INIL05g09675の接触による発現

接触刺激なし  
(コントロール)



接触なし

接触あり

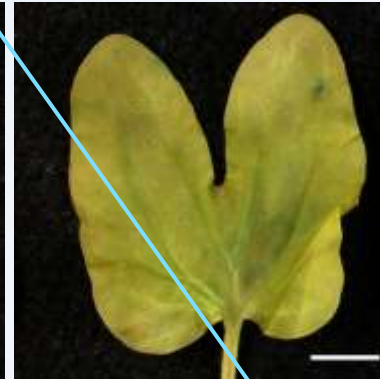
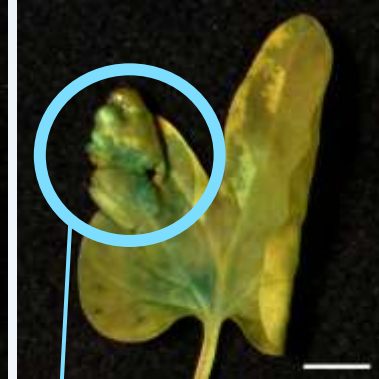
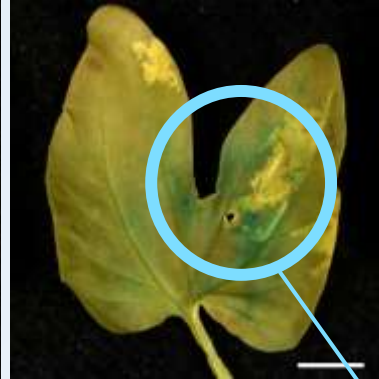
筆による接触刺激を与えてからの時間

5分

10分

30分

120分間



※同じ個体の片方の子葉に接触刺激を与えた  
※GUS染色を24時間行った後、70%エタノールで葉緑体色素を脱色した

傷がある箇所周辺が青くなっている

接触刺激を与えてから10分後に一過的なGUS活性による青い発色が弱く検出された

# 実験Ⅱ まとめ

## 一過的な発現によるACS遺伝子の解析

### INIL02g40697

- ・ **接触**してから2時間後に**GUS**の発現が強く確認された

➡ **接触**が解除されてから数時間後に発現し、**蔓が巻き付け**なくなったときに成長を止める役割をもつ可能性がある？

- ・ **傷**を付けた箇所で安定した強い応答は見られなかった

➡ **傷害**によって発現が促されるわけではない？

**傷**をつけた箇所で所々**青**くなっていたものは基質の浸透のしやすさが原因？

### INIL05g09675

- ・ **接触**刺激を与えてから10分後に一過的な青い発色が検出された

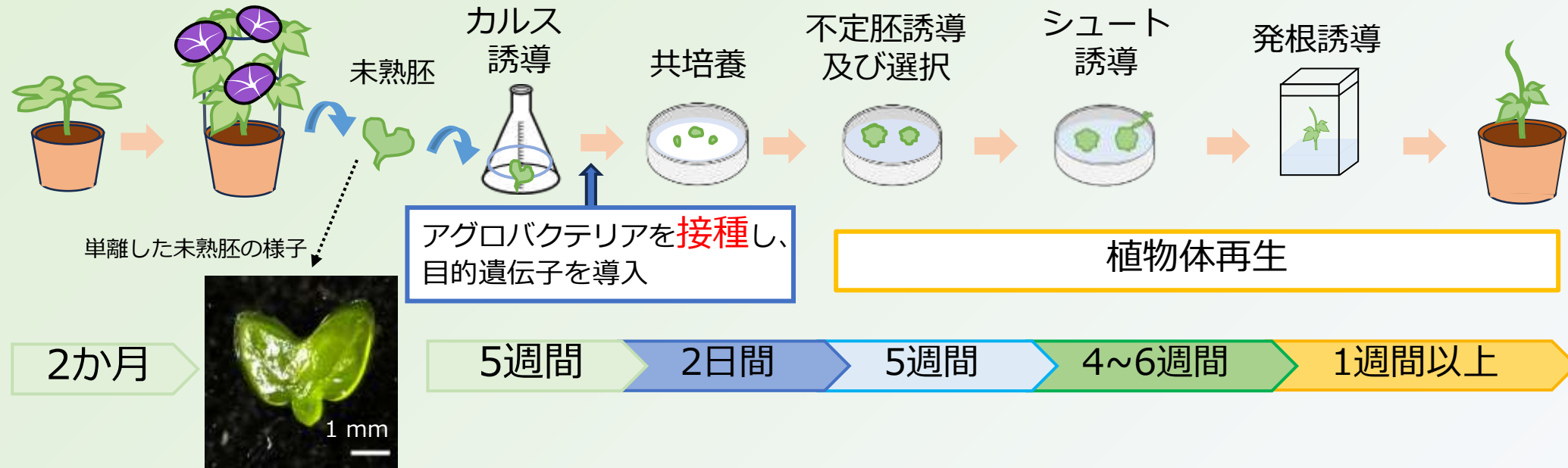
➡ 支柱に**接している**側で伸長を抑制する役割をもつ可能性がある？

➡ 偏差成長を引き起こし**蔓を屈曲**させることで、**巻き付き**に関わっているかもしれない



# 実験Ⅲ 導入 安定的な形質転換体の作製方法

アサガオの安定的な形質転換法（未熟胚からの培養法しか確立されていない）



## 目的

- ① 安定的な形質転換体を利用したACS遺伝子の発現解析
  1. CaMV35Sプロモーター::*GUS*による技術確認
  2. ACSプロモーター::*GUS*コンストラクトによる解析
- ② 減圧浸潤による簡便で安定的な形質転換法の検討

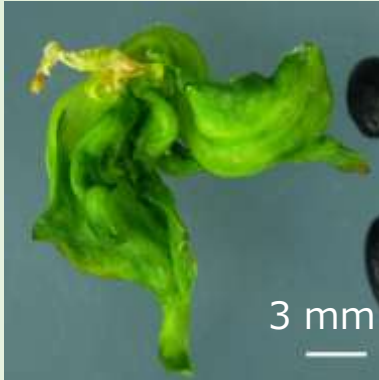
# 結果Ⅲ ①-1 形質転換体の作製 CaMV35Sプロモーター::*GUS*

接種から

6週間後

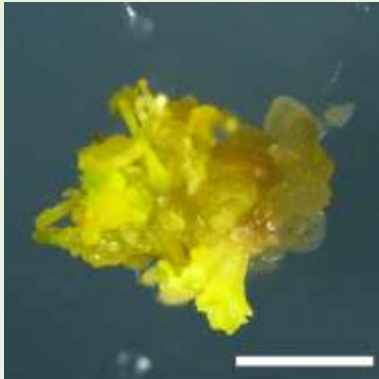
12週間後

形質転換体  
選択用  
抗生物質なし  
非感染



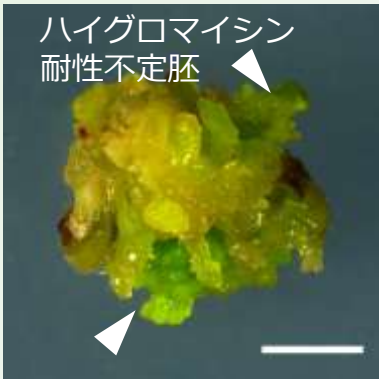
順調に成長した

+ハイグロ  
マイシン  
(10 mg/L)  
非感染



成長が阻害された

+ハイグロ  
マイシン  
(10 mg/L)  
感染



ハイグロマイシン(形質転換体選択用抗生物質)耐性のシュートが形成された

形質転換及び、形質転換体の選択が適切に行われたことを確認できた

# 結果Ⅲ①-2 形質転換体の作製 INIL02g40697プロモーター::*GUS*

接種から

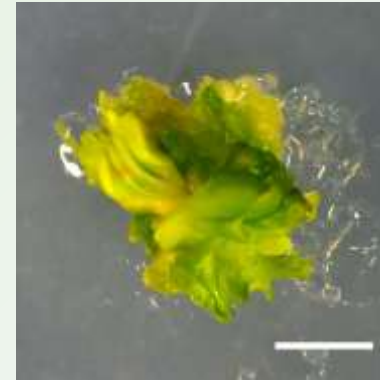
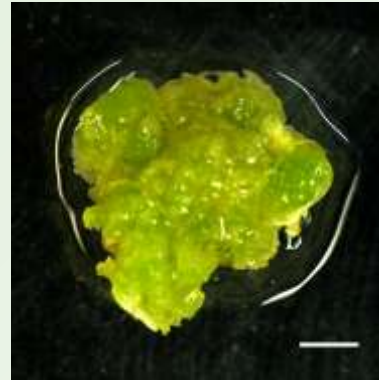
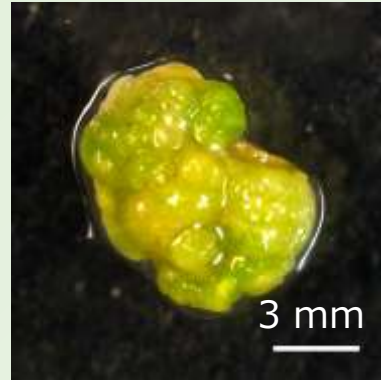
2日後

2週間後

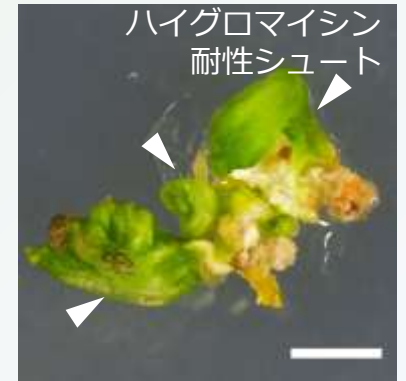
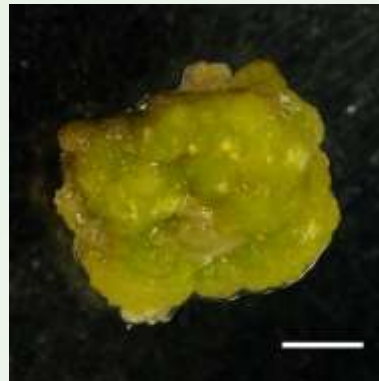
5週間後

9週間後

形質転換体  
選択用  
抗生物質なし



+ハイグロ  
マイシン  
(10 mg/L)



ハイグロマイシン耐性のシュートの形成を確認できた

→ 植物体に再生させて巻き付いている蔓で解析を行う予定

## 結果Ⅲ② 減圧浸潤による安定的な形質転換法の検討

減圧浸潤を用いた簡便で安定的な形質転換法を構築するために、減圧浸潤10分間または3分間×3回、界面活性剤なしの条件で、茎頂への遺伝子導入を目的とし、Rubyマーカーを用いて以下の方法を検討した

### 方法① 主茎や子葉を切除してから減圧浸潤

- ・主茎のみ切除
- ・子葉片方と主茎を含め根元から斜めに切除（腋芽は片方残す）
- ・子葉片方と主茎を切除（腋芽は両方残す）
- ・子葉両方と主茎を切除（腋芽は両方残す）



### 方法② 感染用溶液へサイトカイニンを添加して減圧浸潤

- ・サイトカイニン濃度  
なし | 0.05mg/L | 0.2mg/L | 1 mg/L | 5 mg/L で検討  
子葉両方と主茎を切除して行った

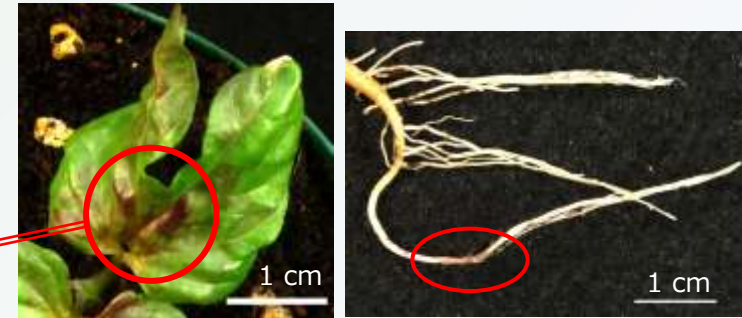
①・② 結果  
新しく出てくる茎や葉にRubyの発現は見られなかった

### 方法③ 蔓切片を減圧浸潤

結果 蔓切片の端の方のみ赤くなった

### 方法④ 発芽種子を減圧浸潤

結果 子葉と根にのみ赤い部分が見られた



子葉や根での形質転換はできたが、茎頂で形質転換できたものはなかった → 安定的な形質転換体の作製に応用するには更に検討が必要

# 全体のまとめ

I. アサガオの子葉で一過的な発現系を構築することができた

減圧浸潤が有効で、特にその時間を延ばすことで形質転換効率が上昇する

II. 一過的な発現系を利用して、ACS遺伝子の接触応答性を解析することができた

INIL02g40697

接触が解除されてから数時間後に発現し、巻き付けなくなった時に成長を止める役割をもつことが示唆される

INIL05g09675

接触刺激によって一過的に発現し、支柱に接している側で伸長を抑制する役割をもつ可能性がある

III. 安定的な形質転換体を利用したACS遺伝子の解析のための培養は順調に進行中である

INIL02g40697プロモーター::*GUS*形質転換体について、形質転換体選択用の抗生物質耐性を示す個体で、シュート形成まで確認できた

# 展望

- 一過的な発現系によるACS遺伝子の接触応答性の解析について

再現性を確認する必要がある

- 安定的な形質転換体を利用したACS遺伝子の解析について

- 現在培養中のINIL02g40697プロモーター::*GUS*形質転換体を植物体まで再生し、巻き付いている蔓で解析を行う
- INIL05g09675プロモーター::*GUS*でも同様に形質転換体を作製する

- 減圧浸潤による簡便で安定的な形質転換法の構築

- 茎頂付近に針で傷を付けた後に減圧浸潤を行うなど、茎頂で形質転換が起きるような方法を検討する必要がある

