

エゾマツのカルコン合成酵素遺伝子の PCR クローニングと塩基配列

松本麻紀*1・兼行民治郎*2・寺田珠実*2
井上広喜*3・嶋田重裕*4

PCR Cloning and DNA Sequencing of Chalcone Synthase Gene of *Picea jezoensis*

Maki MATSUMOTO*1, Tamijiro KANEYUKI*2, Tamami TERADA*2,
Hiroki INOUE*3 and Shigehiro KAMODA*4

1. はじめに

トウヒ属のエゾマツ (*Picea jezoensis*) は日本では北海道に分布し、モミ属のトドマツと共に北海道の針広混交林を形成する主要な樹木である。更新が倒木上に限られるため、近年それは減少の一途をたどって居り、資源の枯渇が懸念されている。エゾマツの重要な病害としては雪腐れ病と青変を挙げることができる。雪腐れ病は稚幼樹時代に雪の中で綿様の菌に侵される病気で、ラコディウム菌やファンディウム菌が知られている¹⁻³⁾。また、青変はヤツバキクイムシが媒介するオフィオストマ様菌類に因ると言われている^{4,5)}。

カルコン合成酵素 (CHS) は、フラボノイド生合成系酵素の一つで、3分子のマロニル-CoA と 1分子の 4-クマロイル-CoA からのカルコン合成を触媒する酵素である。この酵素は、スチルベン合成酵素 (STS) と共に植物の防御物質生産に関わる重要な酵素として知られている⁶⁻⁸⁾。CHS は高等植物に普遍的に存在するが、トウヒ属では *Picea mariana* の CHS の全塩基配列が解析された (DDBJ accession No. AF227627) ことを除くと、*P. abies* (DDBJ accession No. AF417107) と *P. grauca* (DDBJ accession No. AF227922) で CHS の部分配列が報告されているのみである。エゾマツの耐病性と CHS ファミリーとの関係を詳細に調べていく上で、これらの分子情報は欠くことができない。本研究では *P. mariana* の CHS 塩基配列を基に primer を設計し、PCR 増幅された DNA 断片をクローニングし、塩基配列を解析した。

2. 実験方法

2.1 植物材料

本研究では、北海道演習林山部苗畑のエゾマツ 2 年生苗 1 個体を用いた。

*1 東京大学大学院農学生命科学研究科生圏システム学専攻

*1 Department of Ecosystem Studies, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo.

*2 東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻

*2 Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo.

*3 理化学研究所植物科学研究センター

*3 Laboratory for Adaptation and Resistance, RIKEN Plant Science Center.

*4 東京大学大学院農学生命科学研究科附属北海道演習林

*4 The University Forest in Hokkaido, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo.

2.2 ゲノム DNA の調製

エゾマツの新葉を液体窒素中で粉末にし、植物 DNA 抽出用キットである PhytoPure plant DNA extraction kit (Amersham Pharmacia Biotec) を用いて添付の使用 방법에従い、ゲノム DNA の抽出を行った。

2.3 アガロース電気泳動

0.75% のアガロースを支持体として、TAE バッファー (0.04 M Tris, 8.3 mM 酢酸ナトリウム, 1.1 mM EDTA·2Na) をゲル作成および泳動時に用いた。泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーターを用いて DNA を検出し、写真撮影をした。

2.4 PCR クローニング

2.4.1 PCR

P. mariana の N 末端側の primer piceaCHSN (5'-ATGGCTGGAGGACTGATGGCGGATT-TGGAG) と C 末端側の primer piceaCHSC (5'-TCACTGCAGGGGAACACTCTTCAGGACG-AC) を合成した。

DNA polymerase は Ex Taq DNA polymerase (Takara) を用いた。反応槽は GeneAmp2700 (ABI) を用い、温度サイクルは、94-1'-(94-20", 60-20", 72-2')×30-72-4' に設定して PCR を行った。

2.4.2 TA クローニング

PCR 産物は pGEM T easy vector (Promega) とライゲーション (Takara ligation kit) した後、*E. coli* JM109 のコンピテントセルを用いてトランスフォームした。アンピシリン 100 µg/ml 入りの LB 寒天培地に撒き、37°C で一晚培養した。

2.4.3 plasmid DNA の調製 (アルカリ SDS 法)

コロニーを滅菌した楊枝でつつき、アンピシリン 100 µg/ml 入り LB 培地 3 ml の入った滅菌試験管に楊枝ごと落とし、37°C で一晚振とう培養した。培養液は遠心分離機 (6,000 rpm) に掛け、集菌した。菌を I 液 (50 mM グルコース, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), オートクレーブ滅菌して使用) 100 µl に良く懸濁させ、II 液 (0.2 N 水酸化ナトリウム, 1% SDS) 200 µl を加え良く溶菌させた。III 液 (4.6 M 酢酸カリウム, 3.1 M 酢酸) 150 µl を加えよく混合した後、16,000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。上澄みを回収し、2 倍量のエタノールを加え良く混合し、16,000 rpm で 10 分間遠心分離を行った後、沈殿を回収し、70% エタノールでリンスした。風乾した後、TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 50 µl に溶かし plasmid 保存液とした。

2.4.4 スクリーニング

調製した plasmid DNA を鋳型として、PCR 法によりスクリーニング及びインサート DNA のサイズチェックを行った。primer は、ブドウ、ピーナツ、マツの CHS 及び STS の塩基配列情報を基に CHS と STS の共通 primer として設計した primer2 (5'-AGAACGACTGTTTC G/T ACGGTGAGGCC) と primer3 (5'-GCTTCGATCCTTGC T/C AT T/C GG C/A AC A/T GC) を用いた。

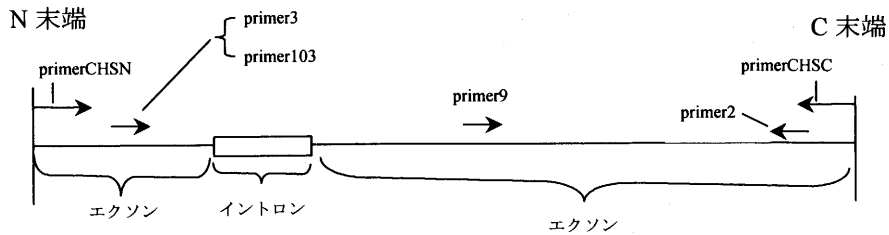


図-1 primer の位置関係

Fig. 1. Positions of primers.

Forward: primerCHSN, 3, 103, 9, reverse: primerCHSN, 2.

2.5 塩基配列の解析

DNA 塩基配列の解析には Prism310 DNA Sequencer (ABI) を用いた。シーケンス反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing, FS(ABI) を用い、標準のプロトコルに準拠して行った。シーケンス反応に用いた primer は CHS および STS 共通 primer で N 末端近傍の primer103 (5'-GCTTCGATCCTTGCTATTGGCACAGC), vector のクローニングサイトの外側に位置する T7 プロモーター、および SP6 プロモーター配列から合成した primerT7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGC) と primerSP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAC), クローニングに用いた piceaCHSN と piceaCHSC, イントロンの下流に位置する primer9 (5'-TGGGGACAGCCCAAGTCTAAG) の 6 つを用いた。プライマーの位置関係を Fig. 1 に示した。

3. 結果と考察

3.1 PCR クローニング

トランスフォームした *E. coli* JM109 は、アンピシリン 100 µg/ml 入りの LB 寒天培地に約 200 コロニーを形成した。そのうち 48 個のコロニーから plasmidDNA を調製し、PCR 法を用いて目的遺伝子のスクリーニングを行った。48 個のうち 33 個から 1.3 kbp 付近の増幅が認められた。これらは CHS 遺伝子である可能性が示唆された。

3.2 DNA 塩基配列の解析

初めに PCR スクリーニングで陽性と思われた 33 クローンから No. 2, 4, 7, 10, 12, 15 の 6 つのクローンに対して primer103 を用いて DNA 塩基配列を解析した。その結果、No. 4, 7, 15 では、イントロン部分を含めた塩基配列に違いが認められなかったため、No. 7, 15 を除いて、他の 5 種の primer を用いて DNA 塩基配列の解析を行い、N 末端と C 末端の primer 部分を除く全塩基配列を決定した (Fig. 2)。 *P. mariana* の CHS とのホモロジーは、No. 2 では 92.8%, No. 4 および No. 10 では 93.3%, No. 12 では 97.3% であった。イントロン長は 104 (No. 4, 10) と 92 (No. 2, 12) の 2 種が認められた。No. 2 と No. 12 では C 末端の数塩基が欠落していた。これは、primerCHSC の 5' 側が分解されたことによる可能性があるが、原因は不明である。

P. mariana の CHS やマツ属の CHS (DDBJ accession No. AJ004800) および STS (DDBJ accession No. AB030139) のアミノ酸配列と比較したところ (Fig. 3), *P. mariana* の CHS とのホモロジーは、No. 2, No. 4 および No. 10 では 97.6%, No. 12 では 98.4% であった。また、活性

1
 mariana ATGGCTGGAG GACTGTGGC GGATTTGGAG GCATTGAGG AGGCTCAGAG GCGAGATGG CCGGCAAGA TCGTGGCTAT TGGCACTGC ACTCTOCCA ATGCTGTGGA TCAGAGCACT
 No.2 ***** --T----- --A----- T----- --G--T-- --A--
 No.4 ***** -----T-----T-----T-----G-----G-----
 No.10 ***** -----T-----T-----G-----G-----
 No.12 ***** -----G-----
 primerN ATGGCTGGAG GACTGTGGC GGATTTGGAG

121
 mariana TATCCGGATT ACTACTTCAA AATCACCAAC AGGAGCATA TGACAGAGCT CAAGGAGAA TTCCAAGAA TGT
 No.2 ---C--- ---G--- --GTAGTT CCGACATCAA TTTCATCTT ATATTATCTG AACTGACTTC
 No.4 ---A--- --AG-A-- --GTAGTT CCGACATCAA TTTCATCTT ATATTATCTG GCGATAAAAT
 No.10 ---A--- --AG-A-- --GTAGTT CCGACATCAA TTTCATCTT ATATTATCTG GCGATAAAAT
 No.12 ---A--- --AG-A-- --GTAGTT CCGACATCAA TTTCATCTT ATATTATCTG AACTGACTTC

241
 mariana GCG ACAAGTCGGC AATAAAGAAG AGATACATGT ACTTGACGGA CGAGATTCTT AAGGAGAATC
 No.2 TGTTTATATG CTTATATTCC TGTGTATGTC TCAAGTGTGT TACAG -----G---C---C-----
 No.4 TGATCAGAAA TGTGTTATA TGCTTATATT CATATGATGA TCTGCGTGT GTTGCGAG -----C-A-----T-----G-----C-----
 No.10 TGATCAGAAA TGTGTTATA CGCTTATATT CATATGATGA TCTGCGTGT GTTGCGAG -----C-A-----T-----G-----C-----
 No.12 TGTTTATATG CTTATATTCC TGTGTATGTC TCAAGTGTGT TACAG -----G---C---C-----

361
 mariana CCACAGTCTG CGAGTACATG GCGGCATGCG TGGAGCGAGC TGAGGACATG GTCTGTGTGG AGGTGCGGAG GCTGGGAAAA GAGGCGCCA CCAAGGCCAT CAAGGAGTGG GGGCAGCCA
 No.2 -----G-----T----- --C-----T-----TG-----A-----A-----
 No.4 --G--- --A-C--- G-----A-C---T-----TG-----A-----
 No.10 --G--- --A-C--- G-----A-C---T-----TG-----A-----
 No.12 -----C-----G-----

481
 mariana AGTCAAAGAT TACTCATGTC ATTTTCTGCA CTAACAGTGG AGTGGACATG CCGGAGCGG ACTATCAGCT GACAAAGCTT CTGCGCTCC GCCCAGCGT TAAGAGATTC ATGATGTACC
 No.2 --G--- --T-----G-----T----- -----G-----
 No.4 --G--- C----- --T-----T----- -----T-----
 No.10 --G--- C----- --T-----T----- -----T-----
 No.12 --G--- --T-----T----- -----T-----

601
 mariana AACAGGGCTG CTTTGGCGGA GGCACGTTTC TCGCGTGGC TAAGGATCTG GGAGAGAACA ATCGGGAGCC TCGGGTTCTG GTCTGTCTGA GTGAATCAC GGCTGTAA GA TCGTGGCC
 No.2 -----C-----T-----C-----C-----C-----C-----G-----
 No.4 --C-A-- --C-----C-----A-C-----C-----C-----T-----C-----C-----
 No.10 --C-A-- --C-----C-----A-C-----C-----C-----T-----C-----C-----
 No.12 -----C-----C-----

721
 mariana CTCTCGACAC TCACCTGAC AGTATGTCG GCGAGCTCT CTTGGCGAT GGTGAGCTG CGCTCATGTT GGGAGCGCAT CCGATCCCGC AAGTGGAGAA GCGCTTTTC GAGCTGATG
 No.2 -----T-----C-----G-C-----C-----T-----C-----TG-----G-----T-----
 No.4 --A--- --T-T--- -----C-----G-----C-----GG-----C-----C-----
 No.10 --A--- --T-T--- -----C-----G-----C-----GG-----C-----C-----
 No.12 -----T-----C-----G-----C-----GG-----C-----C-----

841
 mariana GGACTGCACA GACAACTTCT CCGACAGCG AGCGAGCGAT CGATGGACAC CTGAGAGGG TAGGCTGAC CTTTCACCTT CTGAAAGAG TTCAGGCGCT TATCTGAGG AACTAGAAAA
 No.2 -----C-----C-----G-----T-C-G--- -----C-----C-----C-----C-----G-----C-----A--T-C---
 No.4 --G--- --C-----C-----C-----C-G--- -----C-----C-----C-----C-----G-----C-----C-----
 No.10 --G--- --C-----C-----C-----C-G--- -----C-----C-----C-----C-----G-----C-----C-----
 No.12 -----C-----A-----

961
 mariana AGAGTCTGTT GGAGCCTTTC CAGCAGTTTG GAATCTGGA CTGGAACAA TTATTCTGGA TCGCCATCC AGGAGGGCGT GCCATCTGAG ATCAGTGA GGCCAAGCTG AATTGGATC
 No.2 C---A--- -----C-----G-----T-----C-----G-----C-----G-----A-----C-----
 No.4 C---A--- -----C-----G-----A-----A-----A-----C-----
 No.10 C---A--- -----C-----G-----A-----A-----A-----C-----
 No.12 -----C-----C-----

1081
 mariana CCAGAAACT GAGAGCGCC AGCGAAGTAC TGAGCGAATA TGGAAACATG TCGAGTGGST GCGTGGACTT CATCTTGGAC GAGATGAGGA AGTCTCTCAA GGAANAAGA TGTCTAGCCA
 No.2 -----C-G-----A-----G C-----C-----C-----C-----A-----G-----A-----G-----
 No.4 -----G-----C-----C-----C-----T-----T-----CG A-----G-----G-----
 No.10 -----G-----C-----C-----C-----T-----T-----CG A-----G-----G-----
 No.12 -----G-----G-----G-----C-----G-----C-----G-----A-----G-----

1201
 mariana CCGGAGAGG ATTGGATGTG GGAGTCTGT TTGGATTGG GCGGGGCTC ACTGTGAAA CAGTGTCTCT GAAGAGTGT CCCTGCAGT GA
 No.2 -----C-----T-----A-C--- *****
 No.4 -----C-----C----- *****
 No.10 -----C-----C----- *****
 No.12 ----- *****
 primerC GTCTGCTT GAAGAGTGT CCCTGCAGT GA

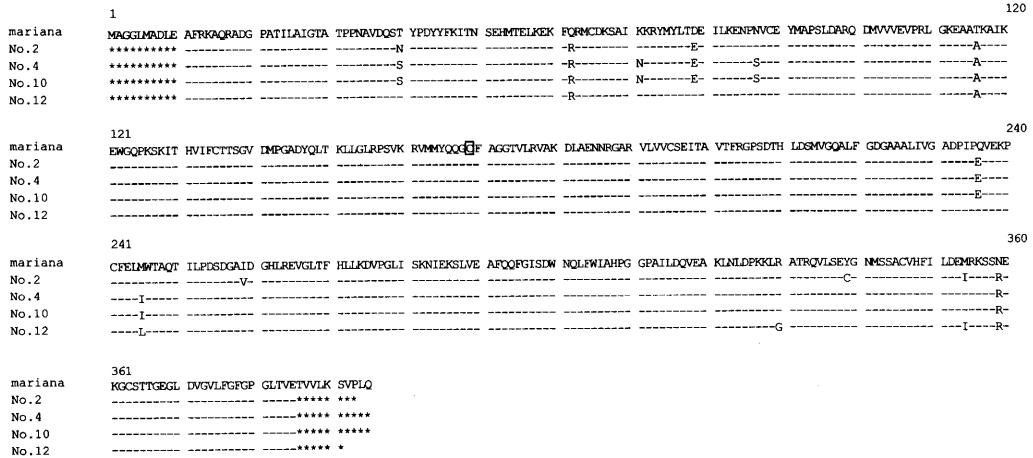


図-3 エゾマツのカルコン合成酵素のアミノ酸配列

Fig. 3. Alignment of amino acid sequences of chalcone synthase of *Picea jezoensis*.
 マリアナトウヒのカルコン合成酵素と相同なアミノ酸は-で表示した。
 プライマー部分は*で表示した。
 活性部位の Cys169 を四角で囲んだ。
 Amino acids homologous to chalcone synthase of *Picea mariana* were exhibited by -.
 Sequences of cloning primers were shown by asterisk.
 Active center Cys169 was boxed.

に必須と考えられている Cys169⁹⁾ や loopII~IV¹⁰⁾ の存在が確認された。これらのことから、これらの遺伝子は CHS をコードするものと思われた。

今回解析した4つの遺伝子は全て CHS 遺伝子に類似しており、STS 遺伝子ではないと思われた。用いた primer は *P. mariana* の CHS 遺伝子の primer であったので妥当な結果と言える。一方、STS 遺伝子は N 末端と C 末端の片方かあるいは双方とも CHS 遺伝子とは相同性の低い塩基配列を有するということが示唆された。マツ属の STS 遺伝子の塩基配列を基に合成した primer STSN と primer STSC を用いた PCR では増幅されるバンドは観察されなかった(データは示さず)。このことから、エゾマツの STS の N 末端あるいは C 末端のいずれかは CHS の配列と大きく異なる可能性が考えられる。今後、CHS と STS の共通 primer を用いてさらに遺伝子解析を進めていく予定である。また、イントロンを人為的にスプライシングした後に、酵素を発現させ、活性を測定し、CHS であるか STS であるかの確認を行うつもりである。

図-2 エゾマツのカルコン合成酵素の塩基配列

Fig. 2. Alignment of DNA sequences of chalcone synthase of *Picea jezoensis*.
 マリアナトウヒのカルコン合成酵素と相同な塩基は-で表示した。
 プライマー部分は*で表示した。
 イントロンは下線を付した。
 primerN と primerC はそれぞれ primerCHSN と CHSC を表す。
 DNA Sequences homologous to chalcone synthase of *Picea mariana* were exhibited by -.
 Sequences of cloning primers were shown by asterisk.
 Underline showed introns.
 PrimerN and primerC showed primer CHSN and CHSC, respectively.

要 旨

2年生のエゾマツの新葉からゲノム DNA を抽出し、*Picea mariana* のカルコン合成酵素の塩基配列を基に設計したプライマーを用いて PCR 増幅した DNA 断片をクローニングした。48 個のうち、PCR スクリーニングで陽性と思われるクローンを 33 個得ることができた。4 クローンについてはさらに塩基配列を解析し、N 末端と C 末端の primer 部分を除く全塩基配列を決定した。活性に必須と考えられている Cys169 や、loop II~IV の存在が確認されたことから、これらの遺伝子はカルコン合成酵素をコードするものと思われた。

キーワード: エゾマツ, カルコン合成酵素遺伝子, PCR クローニング, DNA 塩基配列解析

引用文献

- 1) 程 東昇・五十嵐恒夫, エゾマツの天然更新初期段階に於ける菌害 (II), 日林論, **98**, 511-512, 1987.
- 2) CHENG, D. and IGARASHI, T., Histopathology of Yezo spruce and Glehn's spruce seeds infected by the dark snow-blight causal fungus *Racodium therryanum*, *J. Jpn. For. Soc.*, **70**(8), 344-351, 1988.
- 3) 程 東昇・五十嵐恒夫, 暗色雪腐病菌 *Racodium therryanum* に対する 4 種針葉樹種子間の感受性の差異, 日林論, **99**, 529-530, 1988.
- 4) 松崎 健・高橋郁雄・芝野博文・宮森吉次, 風害翌年の東京大学北海道演習林におけるエゾマツのヤツバキクイムシの加害状況, 日林北支講, **31**, 130-132, 1983.
- 5) 山岡裕一, ヤツバキクイムシに伝播されるオフィオストマ様菌類 3 種のエゾマツ生立木に対する病原性の比較, 第 110 回日本林学会大会要旨集, 671-672, 1999.
- 6) DIXON, R. A. and PAIVA, N. L., Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant cell*, **7**, 1085-1097, 1995.
- 7) GRÄSGEN, W. E., ROSE, A., MADLUNG, J., KOCH, W., GLEITZ, J. and SEITZ, H. U., Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors, *Planta*, **204**, 490-498, 1998.
- 8) ZHU, Q., DRÖGE-KASER, W., DIXON, R. A. and LAMB, C., Transcriptional activities of plant defense genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **6**, 624-630, 1996.
- 9) LANZ, T., TROPF, S., MARNER, F.-J., SCHRÖDER, J. and SCHRÖDER, G., The role of cysteins in polyketide synthase, *The Journal of Biological Chemistry*, **266**(15), 9971-9976, 1991.
- 10) SUN, D., FUKUMA, K., KAGAMI, J., YAMAZAKI, Y., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y. and SANKAWA, U., Identification of amino acid residues important in the cyclization reaction of chalcone and stilbene synthases, *Biochem. J.*, **350**, 229-235, 2000.

(2002 年 10 月 25 日受付)

(2003 年 1 月 10 日受理)

Summary

Genomic DNA was extracted from new needles of 2-year-old *Picea jezoensis*. Sequences of chalcone synthase (CHS) genes were amplified from the genomic DNA by PCR with primer pairs designed based on the CHS sequence of *Picea mariana*. The products of PCR were cloned into a plasmid vector. Forty-eight clones were tested for PCR screening, and 33 clones were obtained. The sequences about 4 of them were analyzed. All sequences, except for the part of primer used for amplification of CHS genes, were determined. These were considered to be CHS genes by comparison with that of *P. mariana*. Because all of them have Cys169, loopII, loopIII and loopIV that is required for active enzymes, they do not seem to be pseudogene.

Key words: *Picea jezoensis*, chalcone synthase genes, PCR cloning, DNA sequencing

Abstract

PCR Cloning and DNA Sequencing of the Chalcone Synthase Gene of *Picea jezoensis*

Maki MATSUMOTO, Tamijiro KANEYUKI, Tamami TERADA,
Hiroki INOUE and Shigehiro KAMODA

Sequences of chalcone synthase (CHS) genes were amplified from the genomic DNA of *Picea jezoensis* by PCR with primer pairs based on the CHS sequence of *Picea mariana*. The products of PCR were cloned into a plasmid vector. After PCR screening, 33 clones were obtained. The sequences about 4 of them were analyzed. All sequences except for the part of primer used for amplification of CHS genes were determined. These were considered to be CHS genes by comparison with that of *P. mariana*. Because all of them have conserved amino acid residues that construct the active center, they do not seem to be pseudogenes.

Forest Management Reform and Regional Forestry Promotion by Means of FSC Certification

Kenjiro KISHI and Norihiko SHIRAIISHI

FSC certification is expected to be a useful tool for forest management reform and regional forestry promotion because it is performance based and it also enables an appeal to the environmental-friendliness of the public through its logo mark. A private forest management company was reviewed from the viewpoint of certification assessment. It needed some modification in system development but field operations were mostly satisfactory. If this company is certified as a resource manager under the FSC scheme, it will contribute to regional forestry promotion through expanding scale and by management reform.