Actinidia arguta リポキシゲナーゼ遺伝子 cDNA の単離

西村 聡¹・古閑 篤史¹・衣川 勝¹・山崎祐未子¹・
加藤 寛¹・片岡 郁雄¹・五味 剣二¹・秋光 和也^{1*}

ABSTRACT

NISHIMURA, S.¹, KOGA, A.¹, KINUGAWA, M.¹, YAMASAKI, Y.¹, KATO, H.¹, KATAOKA, I.¹, GOMI, K.¹ and AKIMITSU, K.^{1*} (2009). Cloning of lipoxygenase cDNA from *Actinidia arguta*. Jpn. J. Phytopathol. 75: 112–115.

A 2658-bp full-length cDNA encoding a lipoxygenase (*AaLOX1*) was identified from Baby kiwi (*Actinidia arguta*). The deduced amino acid sequence of the gene is about 70% identical to plant lipoxygenases (LOXs) of strawberry, potato and cucumber. The amino acid sequence possesses a PLAT motif and several of the typical LOX motifs. *AaLOX1* is predicted to be located in the cytoplasm. *AaLOX1* is inducible, and the transcripts accumulate in leaves within 0.5 hr after either wounding or inoculation with a pathogen or nonpathogen.

(Received July 29, 2008; Accepted October 22, 2008)

Key words: lipoxygenase, *Actinidia arguta*, kiwifruit, Baby kiwi

キウイフルーツに代表される *Actinidia* 属の果樹は、世界各地で栽培される主要果樹の一つであるが (Michailidies and Elmer, 2000), 病害抵抗性に関する生化学的知見は少ない。サルナシ (*Actinidia arguta* Planch.) は、キウイフルーツの近縁種である Baby kiwi として知られ、東アジア諸国で自生する蔓性の落葉樹で、我が国では香川県を含む本州中部以南の温暖地で栽培品種が育成栽培されている (奥山, 1999; Kataoka *et al.*, 2003)。本研究では、我が国で栽培される *Actinidia* 属果樹の抵抗性の生化学的機構の解明に向けた第一歩として、サルナシの栽培品種島根の cDNA より、揮発性 C6 抗菌物質やジャスモン酸を合成する経路で、植物病害抵抗性に深く関与することが知られる脂質過酸化経路の律速酵素であるリポキシゲナーゼ (LOX; EC 1.13.11.12) をコードする cDNA 全長を、抵抗性発現のマーカー遺伝子の一つとして単離したので報告する。

リポキシゲナーゼ遺伝子 cDNA の単離 植物 LOX は、C9, C13 のレノール酸やリノレン酸等の不飽和脂肪酸を酸化する脂質過酸化経路の酵素の一つである (Siedow, 1991; Gomi *et al.*, 2002)。植物 LOX は、傷害、水ストレス、果実の成熟、病原菌接種等で誘導され、ジャスモン酸や揮発性 C6 化合物の生産を担うことが知られる (Brash, 1999; Gomi *et al.*, 2002)。

Actinidia 属のサルナシ品種島根 (平均樹高 100–150 cm) をガラス室内において最低温度 15°C 以上で生育し、幼葉を用いて total RNA を抽出した。傷害処理 (Gomi *et al.*, 2002) 後 2 時間の幼葉を液体窒素中で磨砕した磨砕片 (100 mg) から、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社) を用いて抽出した total RNA を鋳型として、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて、LOX 遺伝子の内部配列を増幅した。増幅プライマーは、forward プライマー LOX#1F (5'-GAC-TACCCCTATGCTGTTGATGG-3') と reverse プライマー LOX#1R (5'-ATGGACACACTGTTGGGAATCCC-3') で、Thermoscript RT-PCR System (Invitrogen 社) を用いて、先に報告したラフレモン *RlemLOX* 遺伝子の単離に用いた方法と同じ条件で (Gomi *et al.*, 2002), 710 bp の内部配列を増幅した。次に、rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法を用いて本遺伝子の全長を単離した。5' RACE, 3' RACE には、Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech 社) を用いた。RT-PCR で使ったものと同じ total RNA (6 µg) を鋳型として、Kit の Marathon cDNA Synthesis Primer (5'-TTCTAGAATTCAGCGGC-CGC(T)₃₀ VN-3') を使って cDNA を合成し、RACE adapter (Kit に含まれる) を dscDNA に付加した。RACE には、LOX#3F (5'-GCACCATATCATATGGGTG-3'), LOX#3R (5'-CACCCATAT-

¹ 香川大学農学部 (〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393) United Graduate School and Faculty of Agriculture, Kagawa University, Miki, Kagawa 761-0795, Japan

* Corresponding author (E-mail: kazuya@ag.kagawa-u.ac.jp)

First two authors have equal contributions on this article.

GATAATGGTGC-3'), LOX#4R (5'-CAGCACGTCTTGGAAAGT-GTCAAATC-3'), LOX#6F (5'-GATTTCCCTGCGCTATGCACTG-3'), LOX#7R (5'-GGCGACGGATGATAACAGGGTTCACTCC-

3')を用いた。これらのPCR産物は、pT7Blue T-vector (Novagen 社) にサブクローンして、dideoxy chain termination 法 (Sanger *et al.*, 1977) により、ABI PRISM Dye Termination Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社) と自動蛍光 DNA シーケンサー (Model310, Applied Biosystems 社) を用いて配列を決定した。RACE 産物配列より得た本遺伝子の 5' および 3' 側の推定 UTR 領域から、本遺伝子の全域を増幅する LOX#10-5' UTR-F プライマー (5'-CTTTTCTACTATTTCAATCCAAATCAC-3') と LOX#9-3' UTR-R プライマー (5'-GGATTCGCTACA-GAACATAC-3') を設計し (Fig. 1), 全領域を増幅して、pT7Blue T-vector にサブクローン後に配列を決定した。これらの RT-PCR, RACE 産物の重なっている領域の配列は全て一致し、この配列以外の配列を持つ断片は検出されなかった。この配列結果から、2658 bp の ORF 領域が明らかとなり、*AaLOX1* 遺伝子と命名した (Fig. 1) (accession 番号 AB300613)。*AaLOX1* 遺伝子は 886 の推定アミノ酸 (分子量 101 kDa; pI 6.62) をコードし、他の多くの双子葉植物の LOX 遺伝子配列同様に TTT (Phe) 配列が 5' 末端の 12 bp 上流に認められた (Fig. 1) (Gomi *et al.*, 2002)。

***AaLOX1* 遺伝子配列の解析** 本推定アミノ酸配列中には植物 LOX モチーフ配列である SHWLNTN, HPIHKLL, HAAVNFG, LAYLKTI が認められ、LOX 酵素反応に必須と考えられる総てのアミノ酸 (His, Asn, Ile) が含まれていた (Fig. 1) (Brash, 1999; Seidow, 1991; Gomi *et al.*, 2002)。また、多くの LOX に認められる脂質結合モチーフである PLAT モチーフが (Bateman and Sandford, 1999) アミノ酸 40-181 領域に認められた。BLAST 解析の結果、イチゴの LOX (accession 番号 AJ578035) と 75%, ジャガイモの LOX (accession 番号 U24232) (Basso *et al.*, 1996) と 73%, キュウリの LOX (accession

Fig. 1. The nucleotide and deduced amino acid sequences of *AaLOX1* from Baby kiwi (*Actinidia arguta*). Arrow bars with primer name LOX#10-5' UTR-F or LOX#9-3' UTR-R at the 5' and 3' ends of nucleotide sequence indicate the positions of annealing sites used to amplify the entire region of *AaLOX1*. Arrows indicate the extension direction of the primers. Plant LOX-typical TTT upstream of start codon (Gomi *et al.*, 2002) is underlined with a dotted line at the nucleotide sequence. The PLAT motif (Bateman and Sandford, 1999) is underlined with a dotted line, and conserved LOX motif regions (Brash, 1999; Seidow, 1991; Gomi *et al.*, 2002) in the amino acid sequence are underlined. Amino acid residues known to hold a metal molecule in the motifs are boxed. Numbers in the left margin indicate nucleotide position. The DDBJ/EMBL/GenBank accession number for Baby kiwi (*Actinidia arguta*) *AaLOX1* gene is AB300613.

本遺伝子は、傷害処理および菌接種により遺伝子発現が誘導されることが明らかになった (Fig. 3). *AaLOX1* 内部配列を増幅する LOX#1F と LOX#1R プライマーの RT-PCR 産物より DIG PCR プローブを作成し、傷処理、菌接種ともに Gomi *et al.* (2002) の方法で行い、処理または接種後 0.5 から 6 時間の total RNA を用いてノーザンブロット解析を行った (Fig. 3). RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社) を用いた RNA 抽出法では

Fig. 3. Induction of *AaLOX1* mRNA accumulation in Baby kiwi leaves after wounding, ACR-toxin treatment, or fungal inoculation. Leaves of Baby kiwi (*Actinidia arguta*) were either wounded or sprayed with pathogenic (HC1) or nonpathogenic (O-94) *Alternaria alternata*, and the leaves were incubated in a moist chamber at 24°C for 0.5 to 6 h in the dark. Twenty µl of ACR-toxin (1 µg/ml) was dropped onto either an wounded (wounding) or unwounded site (no wounding) on the lower surface of Baby kiwi leaves, and the leaves were incubated in a moist chamber at 24°C for 0.5 to 6 h in the dark. Water-treated leaves (water) were used as the control. Total RNA was extracted either immediately (0) or at various times (0.5–6 h) after treatment. Total RNA (8 µg) of the leaves after various incubation periods was subjected to RNA blot analysis for *AaLOX1* expression. Methylene blue staining of 26S- and 18S-rRNA was used to confirm equal RNA loading in each lane.

サルナシ葉からの大量の total RNA 抽出が困難であるため、ノーザンブロット解析に用いた total RNA は Chang *et al.* (1993) の方法を用いて調製した。その結果、傷処理区、菌接種区の何れにおいても、0.5 時間後から *AaLOX1* 遺伝子の誘導が認められた (Fig. 3)。また、宿主特異的 ACR 毒素非生産菌でサルナシにも非病原性である腐生性 *Alternaria alternata* O-94 株とともに、ACR 毒素生産菌でカンキツラフレモンには病原菌であるがサルナシには非病原性である *A. alternata* rough lemon pathotype HC1 株接種区でも誘導された (Fig. 3)。また、HC1 接種区では O-94 株接種区より発現が強く誘導され、宿主特異的毒素生産菌は宿主抵抗性品種や非宿主には強いエリシタ反応を誘起するというこれまでの報告 (Akimitsu *et al.*, 2003) と合致する結果となった。さらに、20 μ l の ACR

毒素 (1 µg/ml) を有傷部または無傷部に滴下処理 (Akimitsu *et al.*, 1989) して *AaLOX1* 遺伝子の発現挙動を検定したところ、有傷部に毒素を滴下した場合は傷害処理の影響が大きく、毒素による誘導が判定できなかったが、無傷部に滴下した場合に処理後 6 時間で誘導が認められ、毒素単独の誘導活性も確認された (Fig. 3)。

Actinidia 属の果樹の抵抗性に関する知見は少ないが、我々は近年キウイフルーツに多くの抗菌性物質が含まれ、これらの抗菌性物質は若年性の枝に特に多いことを明らかにしている (衣川ら, 2008)。*Actinidia* 属の果樹の中で、特にサルナシに関しては抵抗性に関する知見はほとんどなく、サルナシと各種病原菌を用いたモデル研究条件の確立とともに、抵抗性発現のモニターシステムの確立が急務であった。本研究で単離した *AaLOX1* 遺伝子は少なくとも傷害ストレスや菌接種で発現誘導されるタイプの LOX 遺伝子であるため、*A. alternata* を用いた病原菌モデル接種条件が確立したとともに、抵抗性関連遺伝子発現挙動の検定のためのモニター遺伝子の一つとして用いることが可能であると考えられる。

謝 辞

本研究は、科学研究費補助金および香川大学プロジェクト研究経費の支援により進められた。

引用文献

- Akimitsu, K., Kohmoto, K., Otani, H. and Nishimura, S. (1989). Host-specific effects of toxin from rough lemon pathotype of *Alternaria alternata* on mitochondria. *Plant Physiol.* 89: 925–931.
- Akimitsu, K., Peever, T. L. and Timmer, L. W. (2003). Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. *Mol. Plant Pathol.* 4: 435–446.
- Basso, B., Giribaldi, M. G., Mizzi, L. and Righi, M. (1996). Cloning and sequencing of the genomic locus for a novel potato lipoxygenase. *Plant Physiol.* 110: 714.
- Bateman, A. and Sandford, R. (1999). The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. *Curr. Biol.* 9: 588–590.
- Brash, A. R. (1999). Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* 274: 23679–23682.
- Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113–116.
- Gomi, K., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. (2002). Characterization of a lipoxygenase gene in rough lemon induced by *Alternaria alternata*. *J. Gen. Plant Pathol.* 68: 21–30.
- Kataoka, K., Kokudo, K., Beppu, K., Fukuda, T., Mabuchi, S. and Suezawa, K. (2003). Evaluation of characteristics of *Actinidia* interspecific hybrid ‘Kosui’. *Acta Hort.* 610: 103–108.
- 衣川 勝, 加藤 寛, 秋光和也 (2008). 枝枯症菌 *Diaporthe* sp. 接種キウイフルーツ枝における抗菌性物質の生成. *日植病報* 74: 1–6.
- Matsui, K., Minami, A., Hornung, E., Shibata, H., Kishimoto, K., Ahnert, V., Kindl, H., Kajiwar, T. and Feussner, I. (2006). Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry* 67: 649–657.
- Michailides, T. J. and Elmer, P. A. G. (2000). Botrytis gray mold of kiwifruit caused by *Botrytis cinerea* in the United States and New Zealand. *Plant Dis.* 84: 208–223.
- Nakai, K. and Kanehisa, M. (1991). Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* 11: 95–110.
- 奥山仁六 (1999). サルナシ. 農業技術体系果樹編 7 特産果樹 (追録 14), pp. 1–17, 農山漁村文化協会, 東京.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463–5467.
- Siedow, J. N. (1991). Plant lipoxygenases: Structure and function. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 145–188.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673–4680.