

A377.7

H72K

95/96-H

アンチセンス核酸工学によるリンゴ 果実の完熟抑制に関する研究

(研究課題番号 : 07660003)

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金
基盤研究(C)(2) 研究成果報告書

平成9年3月

研究代表者 : 原 田 竹 雄

(弘前大学農学部助教授)

アンチセンス核酸工学によるリンゴ果実の 完熟抑制に関する研究

研究組織

研究代表者：原田竹雄（弘前大学農学部助教授）

研究分担者：なし

研究経費

平成7年度 1,700千円

平成8年度 600千円

計 2,300千円

研究発表等

(1) 学会誌等

Genomic nucleotide sequence of a ripening-related 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (MdACS-1) in apple. Harada T, Sunako T, Sakuraba W, Goto S, Senda M, Akada S, Ishikawa R, and Niizeki M (1997) Plant Physiol. (in press)

(2) 口頭発表

原田竹雄・砂子智美・千田峰生・石川隆二・赤田辰治・新関稔
リンゴのライプニング型ACC合成酵素遺伝子の構造解析
日本育種学会90回講演会 東北大学 1995年10月

目 次

I. はじめに	1 - 2
II. リンゴ A C S 遺伝子族の構成比較	3 - 7
III. リンゴ A C S 遺伝子を含む λ ファージクローンの解析 ...	8 - 13
IV. リンゴライプニング型 A C S 遺伝子の塩基配列	14 - 17
V. おわりに	18 - 19
摘要	24
参考資料	38

1. はじめに

リンゴは栽培の歴史も古く、多くの国で栽培されている。我が国では生産額の約半分は青森県で占められており、このリンゴ産業を支える様々な試験研究が県立りんご試験場や弘前大学などで行われている。リンゴの育種においては、主として食味、耐病性、多収穫、果色に加えて、熟期や貯蔵性が常に関心がはらわれてきた。これは、晩熟果は貯蔵性が高く、しかも気温の低下と伴に、熟度の進み方も緩慢となることに関係する。すなわち、貯蔵性のある品種は、販売期間が長いことになり、出荷の調整が容易であるという大きな利点を有するからである。

ライプニングは果実の肥大生長が止まってからの有機酸の消失、細胞の軟弱化などの生理現象過程をいう。リンゴの成熟はライプニングに伴って呼吸量が急激に上昇するクリマクテリック型であり、他のこのタイプの果物と同様、植物ホルモンであるエチレンがライプニング過程へのプログラムスイッチであることが判っている。このことから、リンゴの成熟や貯蔵性はエチレンの生合成と密接な関係にある。もし、エチレンの生合成をリンゴ果実内で制御することが可能となれば、トマトでの成功例と同様、果実のライプニングを抑制することに繋がり、その経済的な価値は極めて大きなものとなろう。また、エチレンはストレス応答に関わる植物ホルモンとしても古くから知られている。すなわち、物理的傷害、病原菌の感染、湛水などの様々なストレスを受けると一過性のエチレン生成の増加が起こり、このエチレン増加に伴い生理的あるいは生化学的な応答反応が引き起こされる。また、花卉の萎凋、茎葉の老化に対するエチレンの影響は、作物の栽培管理や生産物の流通上極めて重要な問題であり、その生合成の制御機構を解明することはライプニングの制御のみならず、様々な農学的観点からも大きな意義を持つことになる。

高等植物では、エチレンはメチオニン→S-アデノシルメチオニン (SAM) → 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) → エチレンの経路で生合成される (Yang et al. 1984)。この経路には SAM から ACC を生成する ACC 合成酵素 (S-adenosyl-L-methionine methylthioadenosine-lyase, EC 4.4.1.14) と、ACC から エチレンを生成する ACC 酸化酵素が関与しているが、ACC 酸化酵素の活性は葉や茎の組織中に常時存在しているのに対し、ACC 合成酵素の活性はエチレン生成に比例して上昇することから、この ACC 合成酵素がエチレン生合成系の律速酵素とされている。従って ACC 合成酵素の発現を人為的に操作することによりエチレン生成を制御できる可能性が示唆され、そのために ACC 合成酵素 (ACS) 遺伝子の単離が試みられた。

1989 年に Sato et al. (1989) によってカボチャの ACS 遺伝子が初めてクローニングされて以来、トマト (Olson et al. 1991, Rottmann et al. 1991)、カーネーション (Ky et al.

1992)、アラビドプシス (Liang et al. 1992, Van Der Straeten et al. 1992) で分子レベルの解析が進み、これまでに① ACS 遺伝子は多重遺伝子族を構成している、② 個々の ACS 遺伝子はオーキシンやライプニング、傷害などの刺激に対して特異的に発現する、③ ACS 遺伝子の発現は転写レベルで制御されていることなどが明らかにされてきた。その一方で、遺伝子工学的手法を用いて ACC 合成酵素遺伝子の発現をアンチセンス RNA によって抑制した形質転換トマトは、果実のエチレン生成を抑えることによりライプニングを抑制することが判明し (Oeller et al. 1991)、クリマクテリック型果実とエチレンの関係は分子レベルで証明された。

そこで本研究では、アンチセンス核酸工学 (横山 1994) による過熟防止措置を施したリンゴの作出を目指して ACS 遺伝子の構造解析を行った。リンゴではすでにライプニング時の果実で発現している ACS 遺伝子の cDNA の塩基配列 (Dong et al. 1991; Lay-Yee and Knighton 1995) が報告されているが、ACS 遺伝子族の構成およびそれらの遺伝子領域の塩基配列に関してはこれまで解析が行われていない。このため、リンゴ ACC 合成酵素遺伝子族の構成を明らかにするために、栽培品種間および種間で同酵素遺伝子族の構成比較を行い、次に個々の遺伝子をそれぞれ単離し、制限酵素地図を作製することによって構造解析を進めた。最後にライプニング型 ACS 遺伝子の塩基配列を明らかにし、対立遺伝子の存在とそれらの特徴について得られた知見を報告する。

II. リンゴACS遺伝子族の構成比較

ACS 遺伝子は トマト(Lincoln et al. 1993) や カボチャ (Huang et al. 1991)、アラビドプシス(Abel et al. 1995)、イネ (Zarembinski and Theologis 1993) 等でクローン化され、個々の遺伝子に関して詳細な解析が行われてきた。しかしながらこれらの研究では、品種間での ACS 遺伝子族の構成比較はされていない。リンゴ栽培品種では貯蔵性が重要な課題となっているが、貯蔵性の悪い品種は貯蔵性の良い品種と比較してエチレン生成が多いことから(Kondo et al. 1991)、エチレン生合成が貯蔵性に関与していることが示唆されている(横田 1985)。ACC 合成酵素はエチレンの生合成を司る重要な酵素であり、品種により酵素の活性に差がみられる場合、その遺伝子領域は貯蔵性に優れたリンゴ品種を識別する上で重要な分子マーカーになる可能性がある。また、近年、PCR 技術の開発により目的の遺伝子領域の増幅が可能になってきた。そこで本章では、PCR 法によりリンゴの ACS 遺伝子の一部を増幅し、実際に同酵素遺伝子の一部であることを確認した後、その増幅 DNA をプローブに用いて、リンゴ栽培品種および野生種について RFLP 分析を行った。

材料および方法

1. 供試材料

リンゴ栽培種 (*Malus domestica* L. Borkh) 14 品種および野生種 (*M. hupehensis* Rehder) を供試した。これらの材料は弘前大学農学部附属藤崎農場および青森県りんご試験場から分譲して頂いた。

2. DNA の調製

Varadarajan et al. (1991) の方法に従って成葉より調製した。すなわち 1 g の試料を液体窒素中で磨砕後、緩衝液 (100 mM Tris-HCl pH 8.0、50 mM EDTA、500 mM NaCl、0.1 % 2-メルカプトエタノール、1.6 % SDS) に懸濁し、65 °C で 15 分間保温した。これに酢酸カリウムを加え、-85 °C で 5 分間静置した後、4 °C、15,000 rpm (アングルローター、75 mm) で 20 分間遠心した。上清にイソプロパノールを加え、-85 °C で 10 分間静置した後、4 °C、14,500 rpm で 20 分間遠心した。沈殿を TE (50 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA) 緩衝液に溶解し、4 °C、14,500 rpm で 10 分間遠心した後、上清に酢酸ナトリウムとイソプロパノールを加え、4 °C、14,500 rpm で 1 分間遠心した。沈殿を TE (10 mM Tris-HCl、1

mM EDTA) 緩衝液に溶解後、CsCl₂-EtBr 平衡密度勾配遠心により RNA を除き精製 DNA を分画した。

3. PCR 反応および増幅断片のクローニング

リンゴ ACS 遺伝子の cDNA の塩基配列 (Dong et al. 1991) をもとに遺伝子特異的なプライマーを合成し、栽培品種 ‘ゴールデンデリシャス’ の成葉から調製した DNA を鋳型に PCR 反応を行った。すなわち、10 ng のゲノミック DNA を 25 μ l の PCR 反応液 (10 mM Tris-HCl pH 8.9、80 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、200 μ M dNTPs、0.25 μ M プライマー、0.625 Units TthDNA ポリメラーゼ) 中で、94 $^{\circ}$ C、1 分 \rightarrow 50 $^{\circ}$ C、1 分 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、1 分の反応を 35 サイクル継続することにより、リンゴ ACS 遺伝子の増幅を行った。増幅 DNA は TA クローニングキット (Invitrogen) を用いて、pCRTM ベクターに連結した後、CaCl₂ 法により大腸菌に導入してクローン化を行った。

4. 塩基配列決定法

クローン化した増幅 DNA は、AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia Biotech) を用いてシーケンス反応を行った。シーケンス反応物を A.L.F. DNASEQUENCER II (Pharmacia Biotech) によって読み取った後、ALF Manager TM (Version 2.21 Pharmacia Biotech) を用いて解析を行った。

5. RFLP 分析

10 μ g のゲノミック DNA に 50 units の制限酵素を加え、全量 100 μ l の反応液中で完全分解した。電気泳動は 0.5 % 又は 0.8 % 水平平板 アガロースを用いて、16 V で 18 時間行った。泳動終了後、ゲルをトランスファー台にのせ、アルカリトランスファー液 (0.4 M NaOH) により一晩ブロッキングを行い、変性 DNA をナイロンメンブレン (Hybond-N+) 上に固定した。次にクローン化した増幅 DNA を ECL direct nucleic acid labelling and detection system (Amersham) を用いて標識し、DNA プロブとした。ハイブリダイゼーションに当たっては、フィルターをあらかじめ ECL direct nucleic acid labelling and detection system のブロッキング溶液中で 42 $^{\circ}$ C、1 時間以上保温した後、DNA プロブを加え、さらに 12 時間以上保温した。ハイブリダイゼーション後フィルターを 6 M 尿素と 0.4 % SDS、2 \times SSC の混合液で 42 $^{\circ}$ C、20 分間ずつ 2 回洗浄し、さらに 2 \times SSC で室温、5 分間ずつ 2 回洗浄した後、発光反応を行い、Hyper film 上で約 1 時間半感光させた。

結果および考察

1. PCR 法による リンゴ ACS 遺伝子領域の増幅

PCR 法により ACS 遺伝子の一部を増幅した。リンゴでは ライプニング時に果実内で発現している ACC 合成酵素の cDNA の塩基配列 (Dong et al. 1991) がすでに報告されていることから、その配列を基に遺伝子特異的なプライマーを合成した。センスプライマーには cDNA の 64 bp - 83 bp までの配列 [5'-TACCATGAGGTCCTCAACAC-3'] を、アンチセンスプライマーには 324 bp - 305 bp までの相補配列 [5'-GGTGAGCACTAAGTGGTTGG-3']を用いた。

PCR 反応を行ったところ、514 bp の DNA が特異的に増幅された (Fig. 1)。しかしながら増幅 DNA の大きさが予想されるサイズ (261 bp) よりも大きかったため、増幅断片の塩基配列を決定した。その結果、この増幅断片上の 2 ヶ所に、cDNA 上にはない未知の配列が存在した。1 つは大きさが 121 bp あり、cDNA の 120 bp 目と 121 bp 目の間に、もう 1 つは大きさが 132 bp あり、cDNA の 252 bp 目と 253 bp 目の間にそれぞれ存在した。これらの境界にはスプライス部位の共通配列 (5' ↓ GT イントロン AG ↓ 3') が存在していたことから、この 2 つの配列はイントロンであると考えられた。さらにこのことはトマト (Lincoln et al. 1993) や カボチャ (Huang et al. 1991)、アラビドプシス (Abel et al. 1995)、イネ (Zarembinski and Theologis 1993) などでも同一部位に イントロンが存在している事実からも裏付けられる。

また、塩基配列を決定した結果、増幅 DNA の塩基配列と Dong et al. (1991) が報告している cDNA の塩基配列との間に 2 ヶ所の相違が見い出された。ひとつは、cDNA の 274 bp 目が A であるのに対し、我々の結果では G であった。これはコドンの 1 番目に存在する塩基であり、universalcode に従えば Dong (1991) らの cDNA のデータではリジン、我々のデータではグルタミン酸に翻訳される。ライプニング時に発現するリンゴ ACC 合成酵素に関してはすでに アミノ酸配列の一部が報告されており (Dong et al. 1991)、我々の結果の方がこの アミノ酸配列と一致する。一方、もうひとつの相違は cDNA の 278 bp 目が T であるのに対し、我々の結果では C であったが、これらの相違は Dong et al. (1991) か我々の読みとりミスと考えていたが、Lay-Yee and Knighton (1995) の完全長 cDNA の配列と我々の配列が完全に一致したことから、PCR 法により得られた増幅 DNA は ACS 遺伝子の一部 (イントロンを含む) と確信した。そこで以後の解析にはこの増幅 DNA をプローブとして用いた。

2. RFLP 分析

リンゴACS 遺伝子族の構成を品種および種間で比較するために、リンゴ栽培種 14 品種および野生種 1 種 (Table 1) の成葉よりそれぞれ調製した ゲノミック DNA の HindIII 分解物に対して RFLP 分析を行った。用いた プローブは PCR 法によって増幅したリンゴ ACS 遺伝子の一部領域 (514 bp) である。その結果 Fig. 2.および Table 1 に示すような RFLP が検出された。

Table 1. Restriction fragment length polymorphisms detected in apple cultivars and one wild species. Fragment sizes are indicated in kbp.

Cultivars and species	Detected fragments kbp					Type of band pattern
	9.8	6.6	4.0	3.5	3.3	
<i>M. Domestica</i>						
Indo	+	+			+	I
Orin	+	+		+	+	II
Jonathan	+	+		+	+	II
Golden Delicious	+	+		+	+	II
Starking Delicious	+	+		+	+	II
Gorden Melon	+	+		+	+	II
Tsugaru	+	+		+	+	II
Delicious	+	+		+	+	II
Toko	+	+		+	+	II
White Winter pearmain	+	+		+	+	II
Mutsu	+	+		+	+	II
Ralls Janet	+	+		+		III
Sensyu	+	+		+		III
Fuji	+	+		+		III
<i>M. hupehensis</i>	+	+	+		+	IV

HindIII で検出された RFLP は、① 3.3 kb のバンド が検出されるもの (印度、1 品種; Type I)、② 3.3 kb と 3.5 kb のバンドが検出されるもの (ゴールデンデリシャス、王林、つがるほか 7 品種; Type II)、③ 3.5 kb のバンドが検出されるもの (国光、ふじ、千秋の 3 品種; Type III)、④ 4.0 kb のバンドが検出されるもの (*M. hupehensis*; Type IV) の 4 つのタイプにわかれた (Fig. 3、Table 1)。

さらに、これらの RFLP パターンを各 タイプ 間で比較したところ、Type II は Type I と Type III のバンドを共通に有していることから両者のヘテロ型であることが示唆された。そこで Type III のバンドパターンを示す ‘国光’ に Type I のバンドパターンを示す ‘印

度’を掛け合わせた品種‘甘錦’についても同様にゲノミックサザン分析を行ったところ、‘甘錦’は Type II のバンドパターンを示した (Fig. 3)。この結果から、Type II は Type I と Type III のヘテロ型であると考えられ、リンゴの栽培品種間で検出された RFLP は Type I、Type III の 2 つのホモ型とその間に形成されるヘテロ型 (Type II) から構成されていることが示唆された。

また、野生種の *M. hupehensis* で Type I の栽培品種で検出された 3.3 kb のバンドが検出された。このことはリンゴ ACS 遺伝子族の進化や多型の成因、さらには栽培品種への分化との関連を考える上で興味深い結果といえる。

最後に、これらの多型と貯蔵性との関係についても検討したが、たとえば貯蔵性が 1 ヶ月程しかない‘千秋’が、貯蔵性の良い‘ふじ’や‘国光’と同じバンドパターンを示すなど、これらの多型と貯蔵性との間には明確な関係は見られなかった。実際、貯蔵性には多くの要因が関与しており、ACS 遺伝子族の RFLP のみで品種間の貯蔵性の差を説明することはできないと思われる。しかしながら、これらの多型が茎葉の老化など貯蔵性以外の形質に関与していることも十分に考えられる。

今後はさらに多くの栽培品種および野生種を供試すると同時に、複数の制限酵素を用いたより詳細な RFLP 分析を行う必要がある。

Ⅲ. リンゴ ACS 遺伝子を含む入ファージクローンの解析

ACS 遺伝子は多重遺伝子族を構成しており、これまでにトマトで6つ (Rottmann et al. 1991; Mori and Imaseki 1994) カボチャで2つ (Huang et al. 1991) 、アラビドピシスで5つ (Liang et al. 1992) 、イネで3つ (Zarembinski and Theologis 1993) の遺伝子があると報告されている。一方、リンゴではライプニング時に発現する遺伝子 (Lay-Yee and Knighton 1995; Rosenfield et al. 1996) と、オーキシシンにより誘導される遺伝子 (Dong et al. 1991, Kim et al. 1992) の2つが報告されているのみで、遺伝子族の構成に関しての知見はほとんど得られていない。

また、前述したように、リンゴ栽培品種間および種間で ACS 遺伝子領域の一部をプローブに用いた場合 RFLP が検出されたが、この成因の特定や、実際これらの構造変異が ACC 合成酵素の機能やその遺伝子発現に及ぼす影響を知るためには、個々の ACS 遺伝子の構造解析が必要である。また、将来、エチレン生成を司る ACS 遺伝子のアンチセンス RNA をライプニング時のみ発現させることによって同酵素遺伝子の働きを抑制し、長期保存の可能なリンゴ果実を作出するためには、トマトの場合と同様にライプニング時に発現する ACS 遺伝子を単離し、そのプロモーター領域を含む遺伝子全領域を詳細に解析する必要がある。しかしながら、リンゴの場合ライプニング時に発現する同酵素遺伝子の cDNA 配列は3種報告されているものの (Lay-Yee and Knighton 1995; Rosenfield et al. 1996)、プロモーター領域を含む遺伝子全領域については全く知見が得られていないのが現状である。

したがって、これらの解析を行う上でリンゴの ACS 遺伝子族を構成する個々の遺伝子全領域のクローン化ならびに塩基配列レベルの解析が必要となってくる。そこで、リンゴ ACS 遺伝子族を構成する個々の遺伝子全領域をクローン化する目的で、栽培品種‘ゴールドデンデリシャス’を用いてゲノミックサザン解析を行い、リンゴ ACC 合成酵素遺伝子族の構成を明らかにした。さらに、ゲノミックライブラリーを作製し、そこから同酵素遺伝子族の遺伝子を含む入ファージクローンをスクリーニングして個々の遺伝子クローンを単離し、制限酵素地図による構造解析を行った。

材料および方法

1. 供試材料

本実験には栽培品種‘ゴールドデリシャス’を供試した。ゲノミックDNAの調製およびゲノミックサザン解析は、IIに述べた方法によった。

2. ゲノミックライブラリーの構築およびスクリーニング

ゲノミックDNAを制限酵素Sau3A Iで部分分解した後、パーシャルフィルイン処理をし、 λ FIX II/Xho I Partial fill-in Vector Kit (STRATAGENE)の λ FIX IIベクター中のXho Iサイトに連結した。Gigapack II Gold Packaging Extract (STRATAGENE)を用いてパッケージング後、大腸菌XL1-Blue MRA (P2)株に感染させ、NZYMM培地(1% NZアミン、0.5% 酵母抽出液、0.5% NaCl、10 mM MgSO₄、0.2% マルトース)を用いて、37℃、一晚培養しプラークを形成させた。プラークをナイロンメンブレン上にブロットし、メンブレンをアルカリ変性液(0.5 M NaOH、1.5 M NaCl)で変性処理後、中和処理を施し、80℃、2時間ベーキングを行った。次に前章に述べた方法によってクローン化した増幅DNAをDIG DNA Labelling and Detection Kit (Boehringer Mannheim Biochemica)を用いて標識し、DNAプローブとした。プラークハイブリダイゼーションは、メンブレンをあらかじめハイブリダイゼーション緩衝液(30%ホルムアミド、5×SSC、2×ブロッッキング溶液、0.1% L-ラウリルサルコシン酸、0.02% SDS)中で、42℃、1時間保温した後、DNAプローブを加え、さらに12時間保温した。1回目のスクリーニングではハイブリダイゼーション後、メンブレンを2×SSCと0.1% SDSの混合液で室温、5分間ずつ2回洗浄し、さらに0.1×SSCと0.1% SDSの混合液で68℃、15分間ずつ2回洗浄した。2回目のスクリーニングでは、2×SSCと0.1% SDSの混合液で室温、5分間ずつ2回洗浄し、さらに0.2×SSCと0.1% SDSの混合液で室温、5分間ずつ2回、0.1×SSCと0.1% SDSの混合液で42℃、15分間ずつ2回洗浄した。洗浄後、発光反応を行い、Hyper film上でそれぞれ2時間感光させた。

3. ファージDNAの調製

スクリーニングにより得られたファージを大腸菌XL1-Blue MRA (P2)株に感染させ、NZYM (NZY、10 mM MgSO₄)液体培地中で、37℃、8～12時間振とう培養した。NaCl(終濃度1 M)とクロロホルムを加え、さらに10分間振とう培養した後、10,000 rpmで10分間遠心し、上清にポリエチレングリコール(終濃度10%)を加え、1時間氷冷した。

12,000 rpm で 20 分間遠心した後、ファージ沈殿を緩衝液（50 mM Tris-HCl、10 mM NaCl、10 mM MgCl₂）に懸濁し、クロロホルム処理した後、上清に等量の 2 × STE（80 mM Tris-HCl pH 7.5、2 % SDS、40 mM EDTA）と プロテナーゼ K（終濃度 1 mg/ml）を加え、70 °C、15 分間保温してファージを破壊した。フェノール処理で除タンパクした後、上清をエタノール沈殿し、ファージDNAを得た。

4. プラスミドへのサブクローニング

ファージDNAとプラスミド Bluescript KS+ をそれぞれ適当な制限酵素で完全分解した。切断したプラスミドについてはあらかじめ アルカリフォスファターゼ（BAP）により 5' 末端を脱リン酸化処理した。次にファージ DNA の制限酵素断片とプラスミド DNA を DNA Ligation Kit（TaKaRa）を用いて 16 °C、一晩連結反応を行った後、被感染能を賦与した大腸菌 JM109 に加え、E.coli Pulser（BIO-RAD）を用いたエレクトロポレーション法により導入を行った。導入後、大腸菌を 2 × YT 液体培地（1.6 % バクトトリプトン、1 % 酵母抽出液、0.5 % NaCl）中に移し、37 °C、1 時間振とう培養を行った後、アンピシリン（終濃度 50 μg/ml）、X-Gal（終濃度 200 μg/ml）、IPTG（終濃度 200 μg/ml）を含む 2 × YT 上層寒天培地（2 × YT、0.8 % 寒天）上で 37 °C 一晩培養し、コロニーを形成させた。形成コロニーの内、白色コロニーを組換え体として選抜した。

5. プラスミド DNA の調製

白色コロニーを 2 × YT 液体培地（終濃度 50 μg/ml アンピシリン）中で 37 °C 一晩振とう培養した。8,000 rpm で 5 分間遠心し、集菌した後、上清を捨て、沈殿をグルコース緩衝液（50 mM グルコース、25 mM Tris-HCl pH8.0、10 mM EDTA）で懸濁した。2 倍量のアルカリ SDS 溶液（0.2 M NaOH、1 % SDS）を加え、5 分間氷冷し、5 M 酢酸カリウム（pH 4.8）溶液で中和後、氷中でさらに 10 分間放置した。15,000 rpm で 15 分間遠心して上清を回収し、等量のイソプロパノールを加えて -20 °C に 20 分放置後、15,000 rpm で 15 分間遠心し、プラスミド DNA を沈殿させた。沈殿物を TE 緩衝液に溶解し、CsCl₂-EtBr 平衡密度勾配遠心法により RNA を除き、精製 DNA を調製した。

結果および考察

1. ゲノミックサザン解析

リンゴACS 遺伝子族の構成をより詳細に解析するために、栽培品種 ‘ゴールデンデリ

シャス’の成葉から調製したゲノミックDNAを5種類の制限酵素（BglⅡ、EcoRⅠ、EcoRV、HindⅢ、SacⅠ）でそれぞれ分解し、ゲノミックサザン解析を行った。用いたプローブは前章のRFLP分析で用いたリンゴACS遺伝子断片である。

その結果、HindⅢでは前述の9.8、6.6、3.5、3.3 kbの4本のバンドが見出されたが、BglⅡでは15.0、10.5、6.2 kbの3本のバンドが、EcoRⅠでは3.7、2.0、1.5 kbの3本のバンド、EcoRVでは10.5、8.8、7.8、6.5 kbの4本のバンド、SacⅠでは21.0、7.0 kbの2本のバンドがそれぞれ検出された（Fig. 4）。用いたプローブDNA塩基配列上にはこれらの制限酵素の認識部位は存在しないことから、リンゴACS遺伝子族は少なくとも4つの遺伝子から構成されていることが示唆された。

ACS遺伝子では多重遺伝子族を構成していることがトマト（Rottmann et al. 1991）やアラビドプシス（Liang et al. 1992）などで明らかにされている。今回のゲノミックサザン解析の結果、リンゴでも他の植物種と同様、複数の遺伝子によって遺伝子族が構成されていることが示唆されただけでなく、今までリンゴで報告されているライプニング時に発現するもの（Dong et al. 1991）とオーキシンにより誘導されるもの（Kim et al. 1992）の他にさらに別のACS遺伝子が存在する可能性が示された。

2. ACS遺伝子を含むλファージクローンの制限酵素地図

ゲノミックサザン解析の結果、リンゴACS素遺伝子族は少なくとも4つの遺伝子から構成されていることが示唆された。そこでこれらの個々のACS遺伝子の構造を解析するために、栽培品種‘ゴールデンデリシャス’のゲノミックライブラリーを作製し、前章に詳述したリンゴACS遺伝子断片をプローブに用いてプラークハイブリダイゼーションを行い、ポジティブプラークをスクリーニングした。その結果、約 5.0×10^5 個のプラーク中で6個のポジティブクローンを得た（これらのλファージクローンをそれぞれλAP1-1、λAP1-2、λAP1-5、λAP2-2、λAP2-4、λAP3-2と命名した）。

これらのλファージクローンについて制限酵素のApaⅠ、XhoⅠを用いて制限酵素地図を作製し比較したところ、λAP1-1、λAP1-2、λAP1-5に関しては同一の制限酵素部位がマップできたことから、同じゲノム領域を含んでいると考えられる。これに対してλAP2-2、λAP2-4、λAP3-2の各クローンはそれぞれ異なる制限酵素部位を有していた（Fig. 5）。次に各種のλファージクローン上のどの領域に遺伝子が存在するのかサザン分析で調べたところ、λAP2-4とλAP3-2はファージクローンの末端部に存在したのに対し、λAP1-2とλAP2-2は中央部に存在していた。トマトやアラビドプシスで報告されているACS遺伝子の領域は大きくても3 kb程度であることから、λAP1-2とλAP2-2

は遺伝子の全領域を含んでいる可能性が高いと判断された。

さらに、 λ AP2-4 と λ AP3-2 についても遺伝子の全領域を含むクローンを得るために、低ストリンジェンシー条件下でもう一度スクリーニングを行った。その結果、さらに7つのポジティブクローンが得られた（これらの λ ファージクローンをそれぞれ λ AP1-6、 λ AP2-1、 λ AP2-3、 λ AP2-5、 λ AP3-3、 λ AP4-1、 λ AP5-2 と命名した）。これらのクローンと前回のスクリーニングで得られた λ AP1-2 と λ AP2-2 を制限酵素の EcoR I、Hind III で分解し、サザンブロット分析を行ったところ、 λ AP1-6 と λ AP2-5、 λ AP4-1 では λ AP1-2、 λ AP2-2 と異なるシグナルが得られた。そこでこれらの λ ファージクローンについても制限酵素の Apa I、Xho I を用いて制限酵素地図を作成したところ、 λ AP1-6 に関しては前回のスクリーニングで得られた λ AP3-2 と同一の制限酵素部位がマップできた。さらにサザンブロット分析から λ AP1-6 は遺伝子の全領域を含んでいる可能性が高いと判断された (Fig. 5)。一方、 λ AP2-5、 λ AP4-1 はこれまでに得られた λ ファージクローンとは異なる制限酵素部位を有していたが、遺伝子領域は末端部に位置していた。(Fig. 5)。以上2回のスクリーニングによって ACS 遺伝子に相同な6つのゲノム領域をクローン化できた。

次に、ライプニング時に発現する ACS 遺伝子のプロモーター領域を含む遺伝子領域を得るためには、その遺伝子を含むクローンを同定することが必要である。このことから、今回得られた6種類の λ ファージクローンの内、どのクローンが対応するかが重要となる。そこでまず、 λ AP1-2 と λ AP1-6、 λ AP2-2 領域中で遺伝子の全領域を含んでいると考えられる約 8.0 kb の Apa I 断片をそれぞれサブクローニングし（それぞれ pAP1-2、pAP1-6、pAP2-2 と命名）、cDNA 上にサイトが存在する EcoR I、Hind III および Sac I を用いて制限酵素地図を作製した (Fig. 6)。その結果、pAP1-2、pAP1-6 領域上に cDNA の制限酵素地図に対応する領域が見出された。一方、pAP2-2 は、cDNA 上に存在する Xho I、EcoR I、Hind III および Sac I の制限酵素サイトのうち、Xho I および EcoR I サイトは一致したものの、その下流に存在する Hind III および Sac I サイトは存在せず異なる制限酵素部位を有していた。しかし、推定遺伝子領域の 5' 側上流域では pAP1-2 と同一の制限酵素部位を有していた (Fig. 6)。このことから、pAP2-2 はライプニング時に発現するものとは別の ACS 遺伝子であるか、もしくは偽遺伝子である可能性が高い。

また、これらのクローンについて制限酵素地図を作製した結果、前述した、栽培品種間に見られた ACS 遺伝子の多型の成因に関しても知見を得ることができた。プローブとハイブリダイズする個々のクローンの Hind III 断片の大きさから、pAP1-2、pAP1-6、

pAP2-2 のそれぞれの クローンは、栽培品種 ‘ゴールドデリシャス’ のゲノミックDNA の HindIII 分解物に対する サザン分析で検出された 3.5 kb、3.3 kb、6.6 kb のバンド に対応することがわかった。このうち、pAP1-2 と pAP1-6 には多型を示す バンドの ゲノム領域が含まれていることから、これらの クローンを詳細に調べた結果、pAP1-6 では推定遺伝子領域の上流にある EcoR I - HindIII 断片の大きさが、pAP1-2 と比べて約 200 bp 短いことがわかった (Fig. 3) 。この領域はちょうどプロモーター領域に相当しているため、この相違が遺伝子の発現にどのような影響を及ぼしているのか興味を持たれた。

今後は、遺伝子族を構成する個々の遺伝子の全領域を完全に含む 入ファージクローンを全て単離し、塩基配列の解析を行うことによって、個々の遺伝子の発現についても解析を行う必要がある。

Ⅳ. リンゴライプニング型ACS遺伝子の塩基配列

前章で明らかにされたリンゴ ACS 遺伝子ファミリーの中で、既報のライプニング型 ACS 遺伝子の cDNA 配列と一部の制限酵素認識部位および塩基配列が一致するクローン DNA を得ることが出来た。また、興味あることに、リンゴ栽培種には対立遺伝子と考えられた 2 種類のライプニング型 ACS 遺伝子が存在し、これをホモ、ヘテロで有する 3 グループに分類された。‘ゴールデンデリシャス’はヘテロ型であったことから、このゲノミックライブラリーから ACS を含む 2 種のクローンを得ることが出来た。このうち一方の pAP1-6 は cDNA の制限酵素地図と完全に一致するが、PAP1-2 は Sac I の下流に Xho I 認識部位があること、またプロモーターと予想される領域では、PAP1-6 に比べて約 200 bp ほど長いことが確認された。既報の ACS cDNA は、我々が実験材料として使用した栽培種 ‘ゴールデンデリシャス’ から得たものであることから、何故、PAP1-6 のタイプのみが cDNA として報告されたのかという疑問が生じた。また、ACS 遺伝子の 5' 隣接領域には、この遺伝子のプロモーター配列があるものと予想される。このシス因子の解析は、遺伝子ファミリー間の機能分担機構についての知見が得られると同時に、ライプニング時に特異的に機能するプロモーターが得られる可能性があり、これを使用しての、ライプニングに関わる基礎と応用の様々な研究に有効利用されることが出来よう。そこで、これら 2 種のライプニング型 ACS 遺伝子とその隣接領域の塩基配列を決定した。

実験材料及び方法

1. 実験材料

リンゴ栽培種 (*Malus domestica* L.Borkh) の ‘ゴールデンデリシャス’ のライプニング型 ACS 遺伝子領域を含むと推定された 2 種のプラスミド、PAP1-2 および pAP1-6 を用いた。

2. サブクローニング

PAP1-2 と pAP1-6 を *EcoR* I と *Hind* III で切断した。それらを 0.8 % のアガロースゲルで電気泳動し、PAP1-2 の 3.5 kb *Hind* III 断片、PAP1-6 の 3.3kb *Hind* III 断片、および両プラスミドの 1.5 kb と 2.0 kb の *EcoR* I 断片をゲルから切り出した後、QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN) を用いて精製した。各断片はファージミドベクター pBluescript II KS+ の

EcoR I と *Hind* III サイトに DNA Ligation Kit(Takara) を用いて 16℃、一晚ライゲーション反応を行った後、コロニートランスフォーメーション法によって形質転換した。転換菌は SOC 液体培地 (2% バクトトリプトン、0.5% バクトイーストエキストラクト、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl₂、10mM MgSO₄、20mM グルコース) で 37℃、1時間振盪培養を行った後、アンピシリン(終濃度 50 μg/ml)、X-Gal (終濃度200 μg/ml)、IPTG (終濃度200 μg/ml) を加えた LB上層寒天培地 (1.0% バクトトリプトン、0.5% バクトイーストエキストラクト、1.0% NaCl、0.8% 寒天) 上で 37℃ 一晚培養し、コロニーを形成させた。形成コロニーの内、白色コロニーを組換え体として選抜した。

3. プラスミド DNA の調製

白色コロニーを LB 液体培地 (終濃度50 μg/ml アンピシリン) 中で 37℃、一晚振盪培養した。8,000 rpm、5 分間の遠心により、集菌した後、Midi Plasmid purification (QIAGEN) のプロトコールに従ってプラスミド DNA を調製した。

4. デリションクロンの作製

制限酵素で切断したプラスミドDNAをフェノール-クロロフォルム処理した後、エタノール沈殿した。沈殿した DNA を Exonuclease III buffer (50mM Tris-HCl pH8.0、100mM NaCl、5mM MgCl₂、10mM 2-メルカプトエタノール) に懸濁し、Exonuclease III を加えた。37℃で30秒、90秒、150秒、210秒、・・・と順次とり出して、氷上の Mung Bean nuclease buffer (30mM 酢酸ナトリウム pH4.5、100mM NaCl、1mM ZnCl₂、10% グリセロール) に入れた。それぞれを 65℃ に 10分間、37℃ に 5 分間静置後、Mung Bean nucleaseを加え、37℃、1 時間酵素反応を行い、フェノール-クロロフォルム処理、エタノール沈殿をした。この DNAを Klenow buffer (7mM Tris-HCl pH8.0、0.1mM EDTA、20mM NaCl、7mM MgCl₂、0.1mM dNTP) に懸濁し、Klenow 酵素を加え、37℃、15 分間反応を行い、エタノール沈殿させた後、サブクロニング法と同様に、ライゲーション反応と形質転換を行った。

5. デリションクロンのプラスミド DNA 調製

目的のプラスミドが導入された大腸菌を LB 液体培地(終濃度50 μg/ml アンピシリン) 中で 37℃ 一晚振盪培養した。8,000 rpm で 5 分間遠心し、集菌した後、上清を捨て沈殿を TEG (25mM Tris-HCl pH8.0、10mM EDTA、50mM グルコース) で懸濁し、リゾチーム-TEG (10mg/ml リゾチーム)を加えて攪拌した。アルカリ SDS 溶液 (0.2N NaOH、1% SDS)、3M 酢酸ナトリウム(pH4.5) をそれぞれ加え、10,000 rpm 10 分間遠心後、上清を回収し等量の

イソプロパノールを加えて、-20℃ に 20 分間、15,000 rpm 10 分間遠心によりプラスミド DNA を沈殿させた。これを TE buffer (10mM Tris-HCl 8.0、1mM EDTA)に溶解し、RNase (0.1mg/ml) で 37℃ 30 分間 RNAを分解した後、フェノール-クロロフォルム処理して、上層を回収し、エタノール沈殿による DNA を TE buffer に溶解した。

6. シークエンス反応

プラスミド DNA は、SequiTherm™ Cycle Sequencing Kit-LC (for LI-COR Sequencing) (Epicenter Technologies) を用いてシークエンス反応させた。反応物を DNA sequencer Model 4000L(LI-COR) によって読みとった後、Base Image IR Software Version 2.10(LI-COR) を用いて解析を行った。

結果および考察

pAP1-2 および pAP1-6 をサブクローニングとデリベーションを行い、*Hind*III 部位から *Eco*R I 認識部位間をシークエンスした。その結果、pAP1-2 では 5,676 bp、pAP1-6では 5,526 bp の塩基配列を決定することが出来た (Fig.7)。

pAP1-6 は 4 つのエキソンからなる 1419bp のコード領域をもっており、既報のライプニング型 cDNA (Lay-Yee et al. 1995) と完全に一致した。また、エキソンの数とサイズ、さらに、イントロンの位置はトマト、イネ、アラビドプシスの ACS 遺伝子と類似していた (Fig. 8)。

一方、pAP1-2 は pAP1-6 とほとんど同じ塩基配列を示した。しかし、コード領域では 7 箇所の塩基置換が存在し、塩基配列から予想される翻訳アミノ酸配列では、1 箇所のみに違いがみられただけであった。また、1-2 型 5' 隣接領域には、1-6 型に比べて転写開始点より -781 bp の位置に 162 bp の挿入配列が認められたことから、前章で観察された、*Hind* III 分解後の RFLP (3.3kb と 3.5kb) は、この挿入配列が起因していることが判明した。

リンゴ栽培品種の RFLP 分析では ACS 遺伝子は 1-2 型、1-6 型のそれぞれをホモでもつ品種とヘテロでもつ品種の 3 タイプに分類されることが示され、さらに、ホモ型同士の交雑実生はヘテロ型となることから、この 2 種の ACS 遺伝子是对立遺伝子の関係にあると考えられた。今回の塩基配列決定より、これらの遺伝子がコードする ACS のアミノ酸配列は 99.8% の相同性を有する点や、また、両遺伝子の隣接領域間でも約 96% の相同性を示したことから、対立遺伝子の関係にあることが裏付けられた。

対立遺伝子間の最大の違いは前述の 162 bp の挿入配列の存否であるので、この配列の両隣接領域にプライマーを設定して、PCR を行うことで、その増幅産物のサイズから、

どちらの遺伝子を有しているかを判断できる。そこで、*M.prunifolia*、*M.transitoria*、*M.sieboldii*、*M.sikkimensis*、*M.asiatica* についてこの点を検討したところ、いずれも 1-6 型であった。このことから、本来の野生種は 1-6 型であったが、このタイプに挿入が起こったことで 1-2 型が誕生したものと考えられた。

この挿入配列の両端には 6 塩基 (ATTAAT) の直列繰り返し配列が存在すること、3' 領域には A に富む配列があることから、レトロトランスポゾン的一种である SINE (short interspersed repetitive element) の特徴が見いだされた。そこで、この挿入領域を含む PCR 産物をプローブとしてゲノミック DNA にハイブリダイズしたところ、多くの断片が検出された。同時に使用したイネゲノムではそのようなシグナルが得られなかったことから、リンゴゲノム上に同配列が多数存在することが判明し、この挿入配列は SINE の一種であることを強く示唆した。SINE は動物から植物まで様々な生物種のゲノムに偏在することが明らかにされてきた (高崎と岡田 1995)。しかし、実際には植物の報告例は少なく (Mochizuki et al. 1991; Umeda et al. 1991)、リンゴでの SINE の特徴づけを詳細に行うことは、このトランスポゾンがどのようにリンゴの変異性に関わっているかなど、多くの観点から興味をもたれる。

前述の様に、既報の cDNA 配列は 1-6 型であった。そこで、1-2 型の転写の有無を検討した。ライプニング時の mRNA を抽出し、RT-PCR により cDNA を作製し、これを両者を区別できる Xho I で消化した。その結果、PCR 産物には Xho I の認識部位がなく、転写は 1-6 型のみであると判断された (図省略)。しかし、1-2 型はライプニング過程で全く転写されないのかどうかは、より明確な手法であるノーザンハイブリダイゼーションにより確認する必要がある。また、栽培種の中には 1-2 型をホモで有する品種も存在することから、転写パターンが 1-6 型と違うのであれば、これらの栽培品種の表現型にどのような影響を与えるか大変興味があるところである。

最後に、5' 隣接領域のシス制御配列 (cis-acting regulatory element) について検討した。その結果の一部を Fig.9、10 に示す。得られた相同配列はあくまでも類似性がコンピューター上で認められたにすぎず、実際にシス制御配列として機能していることを決定したものではない。DNA フットプリンティングなどによる検証が必要とされる。

以上の様に、本研究の最終目的である組換えリンゴの作出のための遺伝子とそのプロモーター領域を得ることが出来た。今後は、上述の遺伝子そのものの特徴づけを行うと共に、アグロバクテリウム法によるリンゴの形質転換を本格的に進める予定である。

V. おわりに

エチレンは他の植物ホルモンと同様、植物の生長や分化の様々な過程に関わっている。すなわち、種子の発芽から落花、落葉そして老化までと植物の一生を通してエチレンは機能している。このうち、果実の成熟作用は、植物ホルモンとしてのエチレンの発見に結びついたほど、古くから知られた現象であった。また、果実は経済的価値が高いことから、貯蔵や輸送における品質劣化の防止策の研究が活発に行われ、その結果、エチレンの影響を減少させるべき種々の貯蔵法が試みられ、CAなどの優れた方法が開発されるに至った。

エチレンは最も簡単な有機化合物であることから、オーキシシンやジベレリンなどに見られる糖結合による貯蔵型（不活性型）を持たない。このため、生合成経路の活性化は細胞内のエチレン量に直接反映することになる。そこで、生合成系の律速酵素であるACSは研究対象として絞られ、精力的に解析が進められてきた。その結果、ACSタンパク質の精製、そしてその遺伝子がクローニングされた。これらの成果は、遺伝子工学による『フレイバーセイバートマト』の作出につながった訳であるが、このことは分子育種法を一般社会に紹介した点から、与えたインパクトは極めて大きなものであった。

一方、アラビドプシスのエチレンに対する様々なトリプルレスポンス変異体から、エチレントランスダクション系に関わる遺伝子が順次単離され、この数年間で、エチレン受容体（レセプター）蛋白質や各種MAPキナーゼの相互関係が驚くべきスピードで解明されてきている。植物ホルモンの生理機構についてはこの数10年間大きな進展はなかったと言えるが、遺伝子工学や組換え植物の手法はまさしくブレークスルーであった。他の植物ホルモンにおいても新知見が次々と見出されているが、その中で最も研究が進んでいるのはエチレン系である。

エチレンはライプニングに代表されるように植物の生育段階の節目に作用することから、エチレン量を適切に調節することで、作物に大きな農業的価値を付与することが可能であろう。例えば、エチレン合成系を抑制することで、花の萎凋や落花を妨げる実験は各国で精力的に進められており、近い将来、従来の2倍や3倍、観賞の期間を楽しむことが出来る花々が我々の周りに飾られることになるかもしれない。一方、逆に、エチレンの生合成をより促進することでも、様々な効果が期待されよう。例えば、エチレン生成は傷害によって上昇するが、これは植物の防御機構におけるトランスダクション系でエチレンはジャスモン酸と伴に直接関与しており、最終的にPIN（Proteinase inhibitor）などの発現を活性化することが判ってきた。そこで、エチレン生成を傷害の直後で促すことは、傷害防御

機構を強めることにつながる可能性がある。また、エチレンの種子発芽促進効果の観点から、種子吸水時にエチレン量を増加させることで、休眠打破をより促進させ、その結果、発芽ぞろいの優れた品種を作出することが出来るかもしれない。

しかし、これらの実現のためには解決しなければならない多くの問題が残されている。その一つは先ず、ACS 遺伝子ファミリーの分担機能を明らかにすることである。現在まで、ライプニング型の他に、オーキシン型、傷害型が知られているが、これらの遺伝子の発現調節などの特徴づけ、すなわち、分子生物学的には遺伝子発現のシス、トランス因子の解明であるが、これらの研究は一部の植物で始まったばかりである。

言うまでもなく、ホルモン作用の特徴は極微量で多大な効果をもたらすことである。このため、遺伝子工学的なホルモン量の改変は改良につながる劇的な効果が得られる反面、調節の度合いを少しでも間違えると意外な落とし穴へとつながることになりかねないことから、ホルモン量は厳格な制御機構により調節される必要があるだろう。進化の過程で植物が獲得した精巧な時間的・空間的ホルモン量の制御機構をより明確にしていくことが、エチレンのみならず、オーキシン、サイトカイニン、ジベレリンなどの他の植物ホルモン量の人為的調節を付与した新たな植物の分子育種への幕開けにつながることを考える。本報告により得られた成果の活用とこれからのさらなる進展が望まれる。

謝 辞

本研究を行うに当たり、ご指導・ご助言をくださった弘前大学育種・遺伝学教室新関稔教授、石川隆二助教授に、また、研究の技術的な支援をくださった弘前大学遺伝子実験施設助教授赤田辰治、千田峰生助手に深くお礼申し上げます。さらに、実験を進めるに当たりお世話になった青森県リンゴ試験場および育種・遺伝学教室の諸氏に厚くお礼を申し上げます。

参考文献

- Abel S, Nguyen MD, Chow W, and Theologis A (1995). ACS4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 270: 19093-19099
- Dong, J. G., W. T. Kim, G. A. Thompson, L. Li, A. B. Bennet and S. F. Yang (1991) Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. Planta 185 : 38-45
- Hamilton, A. J., G. W. Lycett and D. Grieson (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plant. Nature 346 : 284-287
- Huang, P., J. E. Parks, W. H. Rottmann and A. Theologis (1991) Two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in zucchini (*Cucurbita pepo*) are clustered and similar but differentially regulated. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 7021-7025
- Innis, M. A., K. B. Myambo, D. H. Gelfand and M. A. D. Brow (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 9436-9440
- Kim, W. T., A. Silverstone, W. K. Yip, J. G. Dong and S. F. Yang (1992) Induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase mRNA by auxin in mung bean hypocotyls and cultured apple shoots. Plant Physiol. 98: 465-471
- Klee, H. J., M. B. Hayford, K. A. Kretzmer, G. F. Barry and G. M. Kishore (1991) Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. The plant Cell 3 : 1187-1193
- Kondo, S., Uthaibutra, J. And Gemma, H. (1991) Comparison of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, abscisic acid and anthocyanin content of some apple cultivars during fruit growth and maturation. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 60: 505-511

Ky, Y. P., A. Drory and W. Woodsson (1992) Molecular cloning of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from senescing carnation flower petals. *Plant Mol. Biol.* 18 : 377-386

Lay-Yee, M. and Knighton, M.L. (1995) A full-length cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple (Accession No.L31347)(PID:g606759). *Plant Physiol* 107:1017-1018

Liang, X., S. Abel, J. A. Keller, N. F. Shen and A. Theologis (1992) The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 11046-11050

Mochizuki, K., Umeda, M., Ohtsubo, H. And Ohtsubo, E. (1991) Characterization of a plant SINE, p-SINE1, in rice genomes. *Jpn. J. Genet.* 57: 155-166

Montgomery, J., Pollard, V., Deikman, J. And Fischer, R. L. (1993) Positive and negative regulatory regions control the spatial distribution of polygalacturonase transcription in tomato fruit pericarp. *Plant Cell* 5: 1049-1062

Mori, H and H. Imaseki (1993) The isozyme genes for ACC synthase are differentially expressed in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *XV International Botanical Congress Abstracts* : 465

Oeller, P. W., L. Min-Wong, L. P. Taylor, D. A. Pike and A. Theologis (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254 : 437-439

Olson, D. C., J. A. White, L. Edelman, R. N. Harkins and H. Kende (1991) Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 5340-5344

Pousada, R. A. R., R. D. Rycke, A. Dedonder, W. V. Caeneghem, G. Engler, M. V. Montagu and V. D. Straeten (1993) The *Arabidopsis* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene 1 is expressed during early development. *The Plant Cell* 5 : 897-911

Rosenfield, C-L., Kiss, E. And Hrazdina, G. (1996) MdACS-2 (Accession No. U73815) and

MdACS-3 (Accession No. U73816): Two new 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases in ripening apple fruit. *Plant Physiol*:1735

Rottmann, W. H., G. F. Peter, P. W. Oeller, J. A. Keller, N. F. Shen, B. P. Nagy, L. P. Taylor, A. D. Campbell and A. Theologis (1991) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *J. Mol. Biol.* 222 : 937-961

Sato, T. and A. Theologis (1989) Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. USA* 86 : 6621-6625

高崎延佳・岡田典弘 (1995) ; ゲノムに寄生するレトロポゾンの増幅機構。細胞工学 14 ; 1041-1051

Theologis, A. (1992) One rotten apple spoils the whole bushel: The role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70: 181-184

Umeda, M., Ohtsubo, H. And Ohtsubo, E. (1991) Diversification of the rice waxy gene by insertion of mobile DNA elements into introns. *Jpn. J. Genet.* 66: 269-589

Varaderjan, G. S. and C. S. Prakash (1991) A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the potato and its related species. *Plant Mol. Bio. Rep.* 9 : 6-12

Van Der Straeten, D., R. A. R. Pousada, R. Villarroel, S. Hanley, H. M. Goodman and M. V. Montagu (1992) cloning, genetic mapping, and expression analysis of an *Arabidopsis thaliana* gene that encodes 1- aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 9969-9973

Yang, S. F. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35 : 155-89

Yang, X.H., Pua, E.C. And Goh, C.J. (1996) Isolation of a cDNA clone encoding 1-aminocyclop

ropane-1-carboxylate synthase from *Dendrobium crumenatum* (Accession No. U64031) Plant Physiol. 112: 863

横山一成 (1994) アニチンヌ 核酸工学と遺伝情報, “細胞工学” 13(4), 秀潤社, 東京. 255-258

横田 清 (1985) 形態・生理・機能, “果樹全書リンゴ”, 農文協編, 農文協, 東京. 43-88

Zarembinski TI, and Theologis A (1993) Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). Mol Biol Cell 4:363-373

摘 要

遺伝子工学による過熟防止を施したリンゴの作出を行うための基礎的研究として、リンゴ-1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸合成酵素（ACS；EC4.4.1.14）遺伝子族の構成とその構造について解析を行った。

- 1) リンゴ栽培品種‘ゴールドデンデリシャス’のゲノミック DNA からライプニング時に特異的に発現する ACS 遺伝子の一部を PCR により増幅し、これをプローブとした。
- 2) リンゴ栽培種 14 品種および野生種 1 種のゲノミックサザン解析によって、ライプニング型 ACS 遺伝子の RFLP 分析を行ったところ、これらは 4 つのタイプに分類されることが明らかにされた。
- 3) 複数の制限酵素を用いたサザン解析から、ACS 遺伝子は少なくとも 4 つの遺伝子からなる遺伝子族を構成していた。
- 4) 栽培品種‘ゴールドデンデリシャス’のゲノミック DNA ライブラリーを作製し、そのスクリーニング実験から、ライプニング型 ACS 遺伝子の 6 つのゲノム領域をクローン化することが出来た。
- 5) ライプニング型 ACS 遺伝子の塩基配列を決定した結果、3 つのエキソンと 4 つのイントロンからなること、‘ゴールドデンデリシャス’にはその対立遺伝子が存在していた。
- 6) 対立遺伝子のプロモーター領域には 162bp のトランスポゾン様配列が挿入されており、このことが栽培品種間で観察された RFLP の原因であることが判明した。

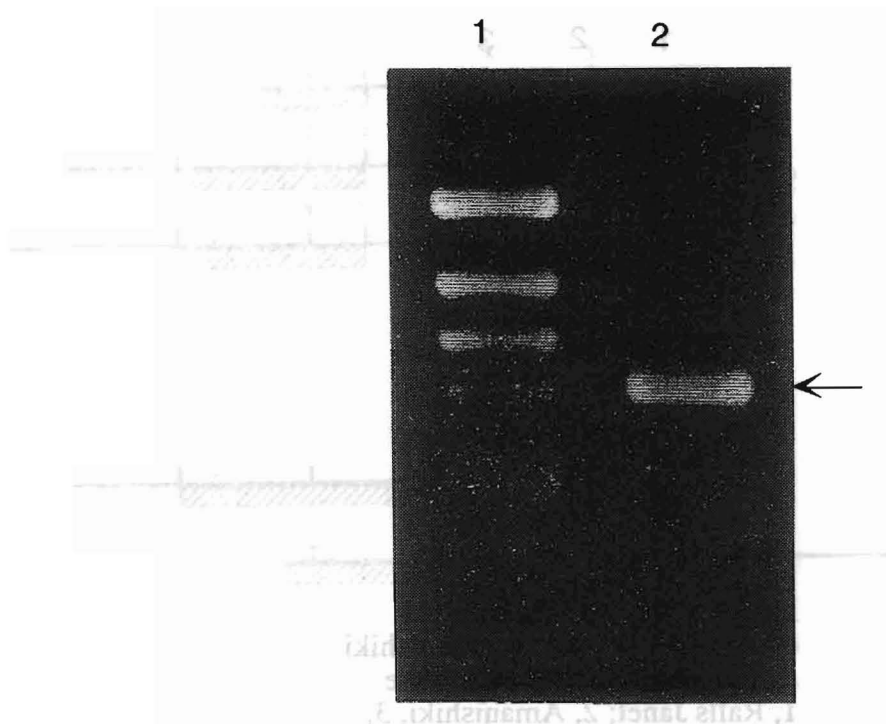


Fig. 1. PCR amplification of ripening-related ACS gene of apple. Lane 1, ϕ X174-HincII; 2, PCR product.

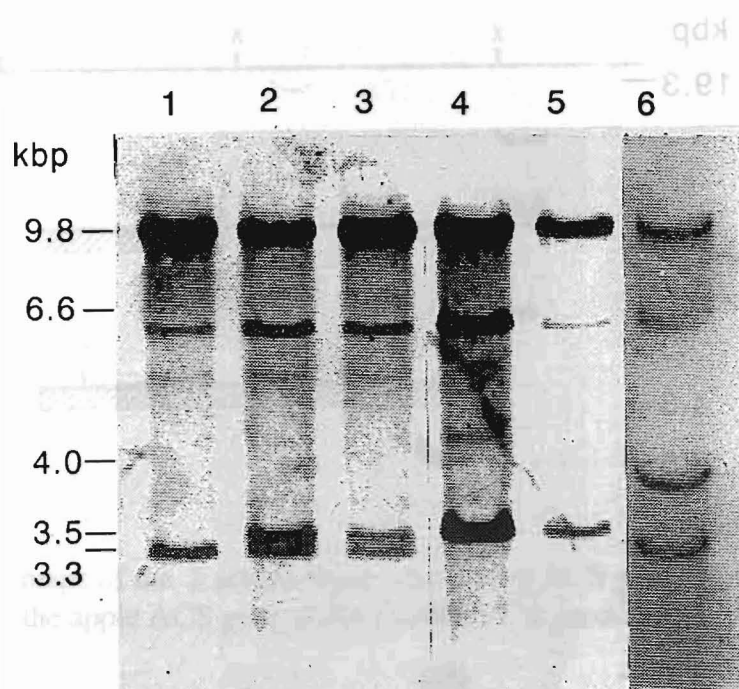


Fig. 2. Southern blot analysis of apple ACS genes among some cultivars and one wild species. DNAs were digested with restriction endonuclease Hind III and electrophoresed in a 0.8% agarose gel. The DNA was transferred onto a nylon membrane filter and hybridized with amplified apple ACS gene (500bp PCRproduct). Lane 1, Indo; 2, Golden Delicious; 3, Tsugaru; 4, Ralls Janet; 5, Fuji; 6, *Malus hupehensis*.

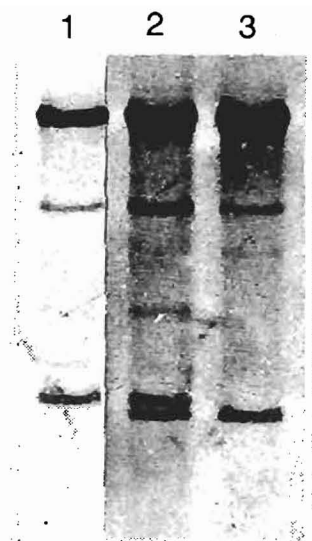


Fig. 3. Southern blot analysis of ACS genes among Amanishiki and its parental cultivars. Lane 1, Ralls Janet; 2, Amanishiki, 3, Indo.

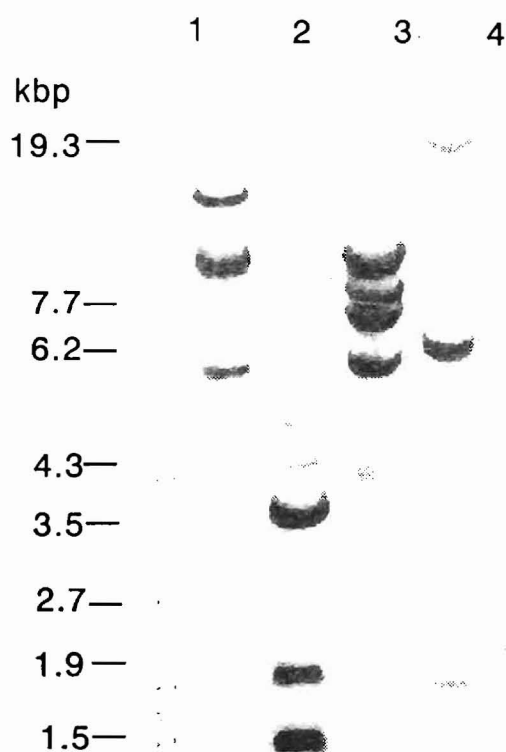


Fig. 4. Genomic Southern blot analysis of apple ACS genes. Genomic DNA was digested with restriction enzymes and electrophoresed in a 0.5% agarose gel. The DNA was transferred onto a nylon membrane filter and hybridized with the ACS gene probe (500bp PCR product). Lane 1, BglII; 2, EcoRI; 3, EcoRV; 4, SacI.

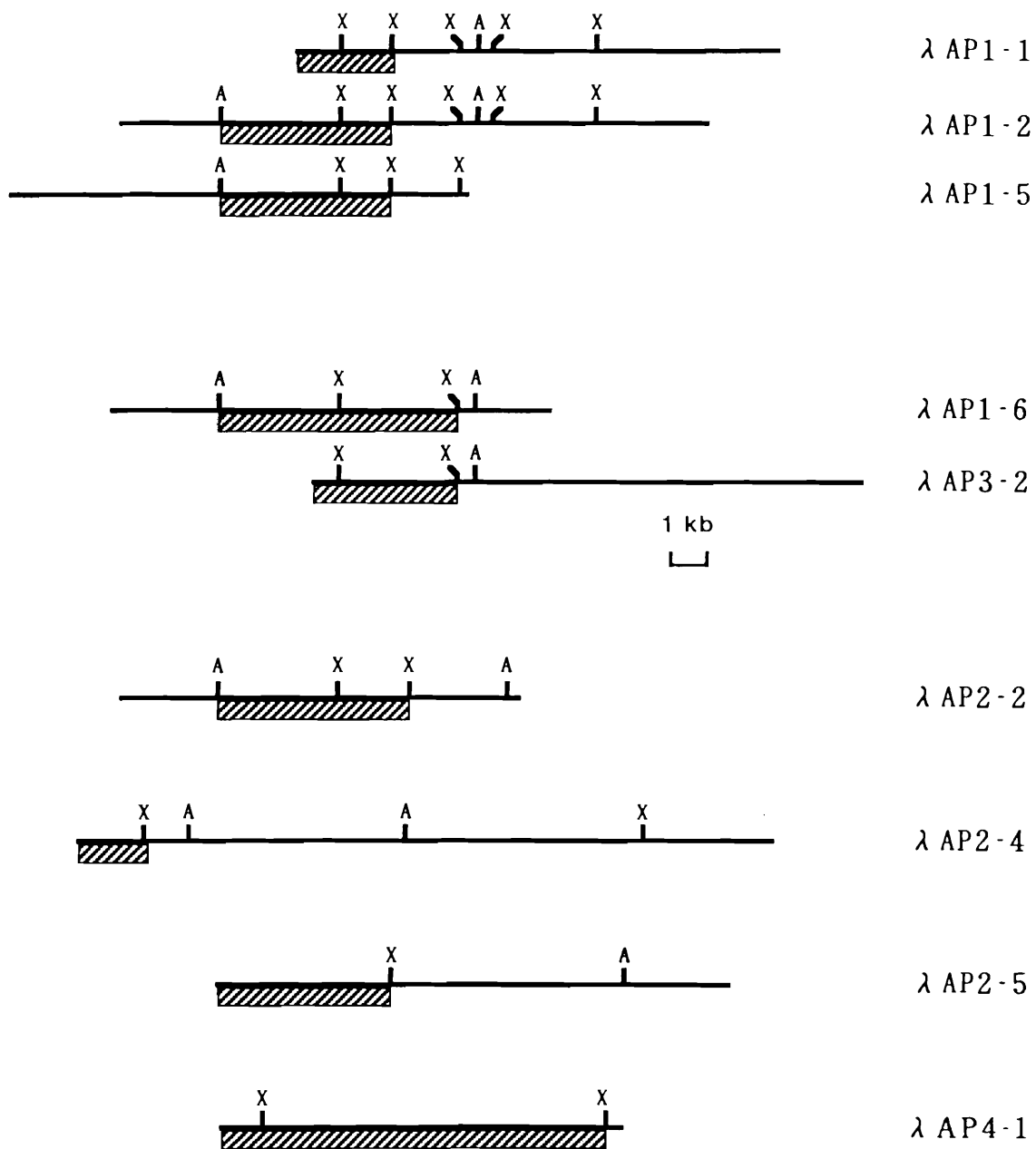


Fig. 5. Restriction maps of the λ phage clones containing ACS gene. Hatched boxes indicate regions that hybridize with the apple ACS gene probe (514bp PCR product). A, ApaI; X, XhoI.

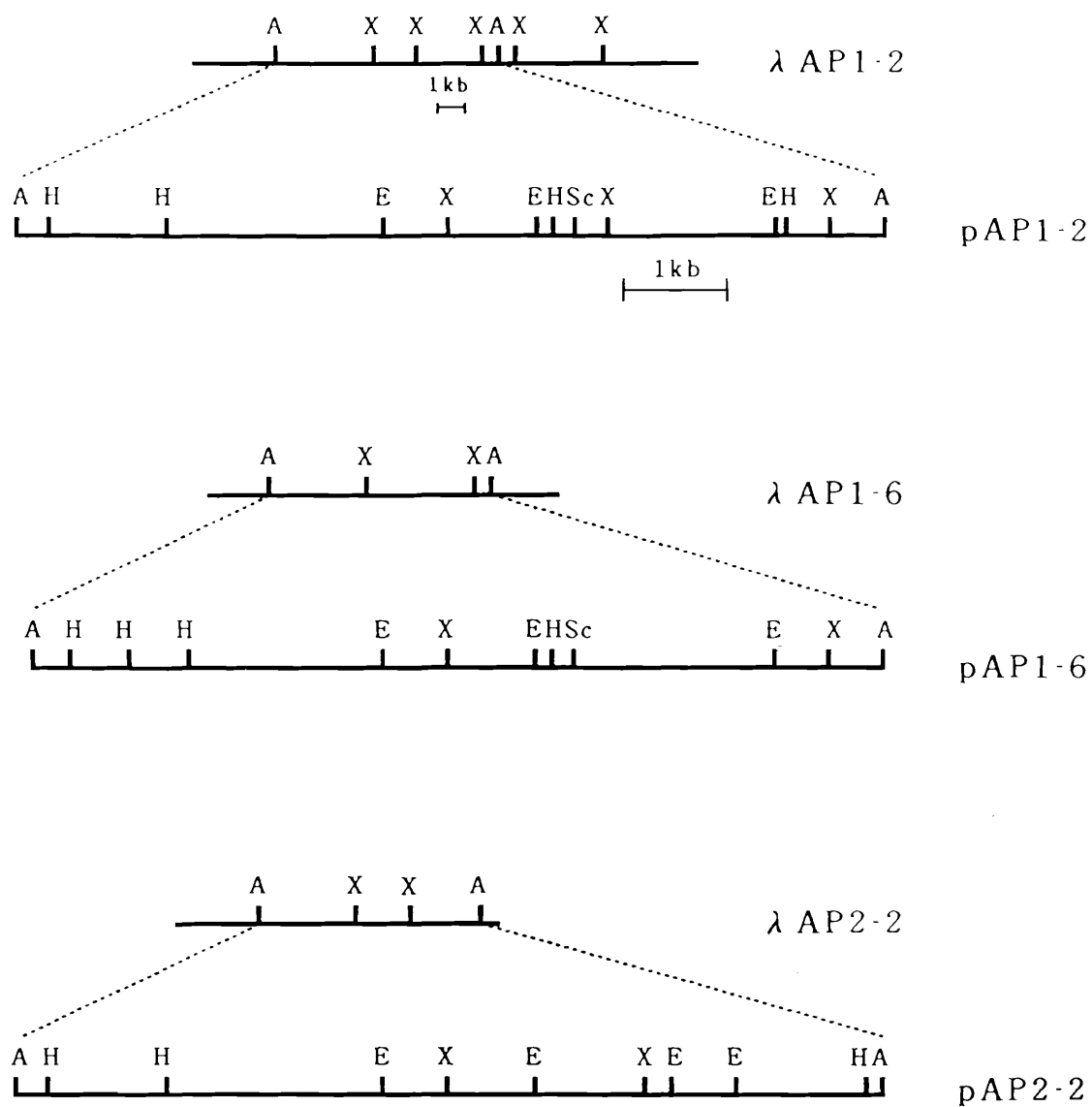


Fig. 6. Comparison of restriction maps of pAP1-2, pAP1-6, pAP2-2. A, *Apal*; 2, *EcoRI*; H, *HindIII*; Sc, *SacI*; X, *XhoI*.

A.

```

-2262 aagcttcgaatcaagttcttggttctttcatcgatgaataaaatccacaatcaaggccaaa
-2202 tccaactgttaggcaagactaggagagcctataaatacagggtccaagacaaagaaatgg
-2142 gtcagaaattcatcaaaacacctagactctcaaactcccaaacactcagaagatcacagaa
-2082 aaatctctgcattctttgtcatacttgtgaagaaccaccaagcacctttacacatgccgg
-2022 ttccctccatcgccattagccaaaaccctgagtcgtttgtttattcgagatcaagtcata
-1962 cgattttcggatcaacaacacacacatttttttcccccagaagatcgaatcagaggatta
-1902 aaaattgttagcagagattgtaaccctaaattcatttaataccaattattactttgtatagc
-1842 tattcttgggttatttatttgcaagaatttcgtgtttacaactctttttctagcacttcca
-1782 tcgacttataagtaatttaggctattcttataattaccaattaatttttagtggaatctca
-1722 acttttttaaaattatttattctcatggaaaaatccaaattctccctctaaatgaacggttaa
-1662 caaaaagggttaacaaaaaggaaactttaacgcaaaactcttggtactgttcactttaat
-1602 gaaaaatcataatttttacactaaaaagtcattcttggtactattcactttaccatttatt
-1542 ttatccttattcggttaaaattcaaagttttcaaacccttttcattagtttcccttaacaaa
-1482 aatggttttattataacaaatgattcttagtgttttcccttggtttgtatacctaattctaa
-1422 aggagatagagtgatgatgttaaatgaagaaaaaaagagagatgccattttgttcgtac
-1362 cggattttcgagggtgactcaaatcaaaacattgtttggttaattggagtaatgaactgag
-1302 cagacataaaaacctgtgcgaactttaaagggttaaaaaaaagggttaaaaaaaaactttt
-1242 aacgaaaaaataatcagttattgttcattttaacgaaaaatcacacttttacattaaaaagt
-1182 caaccctgttactattttattttaccctttattttgttttaaaactcaaaaatttttaagtat
-1122 ttttcatttaattttcttttaaaaaaaatagaaagtgagaaaaatgcccgcacaaaattagtt
-1062 gtggctactagagtcagaagcataatggaccagggtgggtcgctcttggcattttctatg
-1002 atacttgttgtcggttaaggttttgttaacaaaactagaccgcagttattattcttgtttc
-942 actagttacttaacagcatatttaccacatcaattccatcacgggcatcaacagctcgtgg
-882 tagaaactattcaattaccacggtttacatgtagatcgttggttagataacatttaattacca
-822 cgggtcaaatcttggtcccggttggttaaaagtaataattcaccacgattaatgcttctatgt
-762 acatttataatccccacgcaagtttgttaggttaatgccaggtaatggtgaacgcccacc
-702 acttcccagttccaagcaaatagtgagaaaaataaattaatggatgatacttaggaaaattaa
-642 atttggagataaaaatttgcaattatataatgttcacctatacgacttaacacatttat
-582 caatatttaataataaaatcaatcatcaactaccatataatttagtttccaaaattttat
-522 ttacaaatttagtcttttagtattacccttaatttaattatttaattgttgattagtaaacac
-462 taaaacttcattgctttgggatttgggagtgctgaagggtccttcattgatcaaggtcttt
-402 agatggtggagcaaaagcgcgtacaatttaattatcatgttgtttttggatttttattgaa
-342 tcaaaatacttggatcataatgttaagaaaaagaaccagagaaaatctaaagagactttct
-282 taaaagttagattcttcataattttattttatcatgttttttggtacaattttataatatcg
-222 gcgcaaaaattaatgttaaaatgtaagataacagagaattcatagaaagcacaaattttaa
-162 gataatctccttaacatttataaaaaatatgactactcagtgtagcgtgtcattcccttg
-102 ttagacaaataatttctatataatttaaaattatattattacttttttgc tatatatagac
-42 ccctccagttccaacaacatccaatatcccaacttcaaacttgta ATCCAAAACCAAACCT
18 CAAACCTCTCTCTATTGCTTTCTCTTCCTTTCCACACTTCTTTCTTACAGCTTGTATCC
78 ATACAGTAGAAAATTAACCAAAATCGCATGTTATCCAGAAACGCTACGTTCAACTCTCA
1 M R M L S R N A T F N S H
138 CGGCCAAGACTCCTCCTACTTCTTAGGTTGGCAAGAGTATGAGAAGAACCCCTACCATGA

```

Fig. 7-1

13 G Q D S S Y F L G W Q E Y E K N P Y H E
198 GGTCCACAACACAAACGGGATTATTTCAGATGGGTCTAGCAGAAAATCAGgtaattaatta
33 V H N T N G I I Q M G L A E N Q
258 ttataattttacgagccttaatttttttattactaccatgcatatatgtttaccatatgtagtt
318 atatttagtatataaaactttgtgcccgtttcaatatTTTTTTTTttagCTCTGTTTTGA
49 L C F D
378 TCTTCTCGAGTCATGGCTGGCTAAGAATCCAGAAGCAGCTGCATTAAAAAAATGGAGA
53 L L E S W L A K N P E A A A F K K N G E
438 ATCCATATTTGCAGAGCTTGCTCTCTTCCAAGATTATCATGGCCTTCCCGCGTTCAAAAA
73 S I F A E L A L F Q D Y H G L P A F K K
498 Ggtaaactttataaattataataattttatagltataagctcacttttcgtttaatgcaattaa
558 aagctactactagaacaagtccttcttagccagtgtgcatgtctaactcagcttttgattatt
618 tttttcttacagGCAATGGTAGATTTTCATGGCGGAAATCCGAGGGAACAAAGTGACCTTT
93 A M V D F M A E I R G N K V T F
678 GATCCCAACCACTTAGTGCTCACCGCCGGTGCAACTTCAGCGAATGAGACCTTTATCTTC
110 D P N H L V L T A G A T S A N E T F I F
738 TGCCTTGCTGACCCCGGCGAAGCCGTTCTTATTCCTACCCCATACTACCCAGGgtacgta
130 C L A D P G E A V L I P T P Y Y P G
798 tattaaccttcacttcattttttttctttgtttttaacaaacaatttgaactgtaagac
858 ctactttcttagtattctgacgtggggcatgaactccatttcgggataagaaataactaa
918 acactaatttcacccctaataagccgagtattttcttacgtgtcttacagATTTGATAGAG
147 F D R
978 ACCTTAAGTGGCGAACTGGAGTCGAGATTGTACCCATTCACTGCACAAGCTCCAATGGCT
151 D L K W R T G V E I V P I H C T S S N G
1038 TCCAAATTACTGAAACCGCTCTGGAAGAAGCCTACCAAGAAGCCGAAAAACGCAATCTCA
171 F Q I T E T A L E E A Y Q E A E K R N L
1098 GAGTCAAAGGAGTCTTGGTCACGAACCCATCAAACCCATTGGGCACCACAATGACCAGAA
191 R V K G V L V T N P S N P L G T T M T R
1158 ACGAACTCTACCTCCTCCTTTCTTCGTTGAAGACAAGGGCATCCACCTCATTAGCGATG
211 N E L Y L L L S F V E D K G I H L I S D
1218 AAATTTACTCCGGCACAGCTTTTAGCTCCCCATCCTTTATAAGCGTCATGGAAGTTCTCA
231 E I Y S G T A F S S P S F I S V M E V L
1278 AAGATAGAACTGTGATGAGAATTCCGAAGTTTGGCAGCGAGTTCACGTTGTCTATAGCC
251 K D R N C D E N S E V W Q R V H V V Y S
1338 TCTCTAAGGATCTTGGCCTTCCGGGTTTTTCGAGTTGGCGCCATTACTCCAACGACGACA
271 L S K D L G L P G F R V G A I Y S N D D
1398 TGGTTGTGGCCCGCTACAAAAATGTCAAGCTTTGGTCTTGTTTCTTCTCAAACCTCAGC
291 M V V A A A T K M S S F G L V S S Q T Q
1458 ACCTTCTCTCCGCCATGCTATCCGACAAAAAACTCACTAAGAACTACATAGCCGAGAACC
311 H L L S A M L S D K K L T K N Y I A E N
1518 ACAAAGACTCAAACAACGTCAGAAAAAGCTCGTCTCCGGCCTTCAGAAATCTGGCATT
331 H K R L K Q R Q K K L V S G L Q K S G I
1578 GCTGCCTCAACGGCAATGCTGGCTTGTCTGTTGGGTGGATATGAGGCACTTACTTAGGT
351 S C L N G N A G L F C W V D M R H L L R

Fig. 7-2

1638 CCAACACCTTTGAAGCCGAAATGGAGCTCTGGAAAAAGATTGTATACGAAGTTCACCTCA
 371 S N T F E A E M E L W K K I V Y E V H L
 1698 ATATATCTCCTGGATCGTCTTGTCAATTGCACGGAACCTGGTTGGTCCGTGTCTGCTTTG
 391 N I S P G S S C H C T E P G W F R V C F
 1758 CCAACTTGCCCGAGAGAACTCTGGACTTGGCAATGCAGAGACTGAAGGCATTTGTGGGGG
 411 A N L P E R T L D L A M Q R L K A F V G
 1818 AGTATTACAACGTCCCTGAGGTCAATGGCGGCAGCCAAAGCAGCCATTTAAGCCACTCGA
 431 E Y Y N V P E V N G G S Q S S H L S H S
 1878 GAAGACAGTCGCTCACGAAGTGGGTTTCCCGGCTATCCTTCGATGACCGCAGTCCTATTC
 451 R R Q S L T K W V S R L S F D D R S P I
 1938 CCGGTAGATGAAAGGTAGCCTGGTCTGAGTACAAGAAACCGCTAAGGAAAATTACATTTT
 471 P G R *
 1998 AGACCAAACATTTTTCTGCCAAAAAGTTAATTGGTTGAATTTTTTTTTGGTTTTAGTTT
 2058 TTTTTTTTTCTCCGAATGTAGAGAAGTGCACACGGTCCGTGTTTGGGGATGTGAAGTGGC
 2118 TTTTCGCTTCATTTGTAAAAGGGGTGTGCTATCCACATACCCCATTGACTTCTCACATAC
 2178 CTTTGTATTATTTCTGTCCCTTGATTTTCTTAAATTCATCCGATTGGACGGCTGAAAATT
 2238 AAAAAAGTGTGTGAGAAGTAAATGGGGTGTGTGGATATCACACCCCTTTGTAAACTAG
 2298 TTTTGGTGATTGTGTGGCACCAAATTTCTTTATGTCTTCGAAAACAAAATTACTCCAT
 2358 TGTGATTATGATGCATTATTGATTCTATACAATGTGATTAGTGTAtcatgtatattctat
 2418 tctagcgcgaactcccataatcatattgttcacccctaaatcgcgatgggtatcgcag
 2478 acatgccgggaatttactcgaacaggaactggcgggttgcgagcgtgccactactagat
 2538 gctgctagtaggcgagatttgaatggttgagattgcacctgagttcgacttctaaccaag
 2598 agattgtgccattgagtgagagtggtcctaaatcaagggtctttcttttgccctaaagataa
 2658 ggac^utttacttattgttgagaaatgcaacaacatgaaaatgacaagggtgaggaaagtaaa
 2718 tgactgggtattgtagattgcttgtaaagtaaatgactagaaatgagttgtacataaacta
 2778 caaaggagatcgatactatcgggtgagtagcggagctaataaactagacaaaaaatatct
 2838 tttctaaggaa^uctatttgctaaaagaactgggatacgggttgattacagcttttggatgc
 2898 aaatctggccttgaaagcagagtttgggttgtttgtttgttttgattgggtgagtgctgttct
 2958 ctctagggcctctttttcttttataggcgaattagccc^uactgctgtgactttgtcttt
 3018 gcctgaaagcacttggagggtagtgagtcataac^uttttacttgtatigccactgaaaa
 3078 gttttttttttgggctgattatgagttagtc^uccatcacttgacatttaaaatcataagc
 3138 acatggcctatgcattaatgggaaggcgccaatttgtctctgggcttgatgcttgggctt
 3198 cgggcaagtc^ucccttttagttgggtat^uct^uaggcttcca^uacacttgcaacc^uaatgttc
 3258 aaatat^uaacccaaacagtgc^ucccttttaatcat^ugttgagg^utataatcccaagcgcta
 3318 ataatgattaaatagccg^ucgcacgccttctctcgggacttacacatttaaagcaaccg
 3378 tttgctaag^utaaaaccttgcactaatccatgaattc

Fig. 7-3

B.

-2111 aaatccaaatcaagttcttggttcttttcacgatgaataaaatccacaatcaaggccaaa
 -2051 tccaactgttaggcaagactaggagagcctataaatacgaggctccaagacaaagaaatgg
 -1991 gtcagaaattcatcaaaacacctagactctcaaactcccaaacactcagaagatacagaa
 -1931 aaatctctgcgttctttgtcatacttgtgaagaaccaccaagcacctttacacatgccgg
 -1871 ttcttccatcgccattagccaaaaccctgaggcatttggtttattcgagatcaagtcatca
 -1811 cgattttcggatcaacaacacacactttttttcaccagaagatcgaatcagaggattaa
 -1751 aaattgtagcagagattgtaaccctaaattcattaataccaattattactttgtatacgt
 -1691 attcttgggttattttattgcaagaatttcgtgtttacaactctttttctagcacttccat
 -1631 cgacttataagtaatttaggctattcttataattaccaattatttttagtggaatctcaa
 -1571 ctttttttaaaattatttatctcatggaaaatccaaattctcctctaaatgaacggttaac
 -1511 aaaaagtaaactttaacgcaaaactctcggtagtcttcaatttaataaaaaatcataattt
 -1451 ttacaltaaaaagtcattcttgltactattcacittacclttattttatccttatcgtt
 -1391 aaaattcaaagttttcaaacccttttcattagtttcccttaacaaaatggttttattata
 -1331 acagatgattcttagtgttttcccttggttttgtatacctaattctaaaggggatagagtga
 -1271 tgatgttaaatgaaggaaaaagagagagatgccatttttgttcgtaccggattttcgagg
 -1211 ttgactcaaatcaaaacattgtttggtaattggagtaatgaactgagcagacataaaaaac
 -1151 ctgtgcgaacttaaaggttaaaaaaaagggtlaaaaaaaaaaaaacttaaacgaaaaaatct
 -1091 cagtattgttlatttttaacaaaaaltcacacttttacattaaaaagtcaalcctgttlat
 -1031 atttattttaccctttattttlattttaaactcaaagtttttaagtatttttcattaat
 -971 tccltaaaaaaaatagaaagttagaaaaatgcccagacaaaattagttgtggctactagag
 -911 tcaagaagcatatggaccagggtgggtcgcctctggcattttctatgatacttgttgtcg
 -851 gtaaggttttgtaaacaaaactagacccgagtattaatcttgtttclllgtlllllllll
 -791 caallacaagccgattaatgcttctatgtacacttataatccccacgcaagttttaggt
 -731 aatgccaggtaatgggtgaacgccttaccacttcccagtcgaagcaaatagttagaaaaat
 -671 aaattaatggatgatacalggaaaaatlaaatttggagataaaatttgcaaatatataat
 -611 atgtcacctatacgaltaacacatttatcaatatttaataataaatcaatcatcaact
 -551 accatataatttagtttccaaaattttattttacaaatttagtcttttagtattaccctlaa
 -491 ttaattattttaatgttgattagtaaacactaaaacttcatitgctttgggatttgggagt
 -431 tctgaaggctccttcatgatcaalgtcttttagatggtagcaaaagcgcgtacaattaat
 -371 tatcatgttgtttttggatttttattgaatcaaaatacttggatcataatgtttaagaaaa
 -311 agaaccagagaaatctaaagagactttcttaaaaltgagattcttcataattttatttctc
 -251 atgttttttggtacallatttataatatcggggcaaaaaatlaattgttaaaatgtaagataa
 -191 cagagallratagaaagcacalltaagataatctccttaacattttataaaaaatag
 -131 actactcagtgtagcgtgtcatttctttagacaaaataatttctatatattttaaat
 -71 atattattacttttttgclatatalagacccctccagtcacaacacatccaatatccac
 -11 ttcaaacttgtatATCCAAAACCAAAACCTCAAACCTCTCTCTATTGCTTTCTCTTCCTT
 49 TCCACACTTCTTTCTTACAGCTTGTATCCATACAGTAGAAAATTAACCAAAllCGCATG
 109 TTATCCAGAAACGCTACGTTCAACTCTCACGGCCAAGACTCCTCCTACTTCTTAGGTTGG
 169 CAAGAGTATGAGAAGAACCCTACCATGAGGTCCACAACACAAACGGGATTATTCAGATG
 23 Q E Y E K N P Y H E Q E Y E K N P Y H E

Fig. 7-4

229 GGTCTAGCAGAAAATCAGgtaattaattattataatttacgagcttaatTTTTattact
 1 1 G L A E N Q
 289 accatgcatatagtaccatatgtagttatatttagtatataaactttgtgcgcgtttc
 349 aatatTTTTTTTTttagCTCTGTTTTGATCTTCTGAGTCATGGCTGGCTAAGAATCCA
 10 L C F D L L E S W L A K N P
 409 GAAGCAGCTGCATTTAAAAAATGGAGAATCCATATTTGCAGAGCTTGCTCTCTTCCAA
 53 E A A A F K K N G E S I F A E L A L F Q
 469 GATTATCATGGCCTTCCCGCGTTCAAAAAGgtaaacttataaattataataatttatagt
 80 D Y H G L P A F K K
 529 ataagctcacttttcgttaatgcaattaaaagctactactagaacaagtcttctagccgg
 589 ttgcatgtctaactcagcttttgattatTTTTtcttacagGCAATGGTAGATTTTCATGG
 61 A M V D F M
 649 CGGAAATCCGAGGGAACAAAGTGACCTTTGATCCCAACCACTTAGTGCTCACC GCCGGTG
 100 A E I R G N K V T F D P N H L V L T A G
 709 CAACTTCAGCGAATGAGACCTTTATTTCTGCCTTGCTGACCCCGGCGAAGCCGTTCTTA
 120 A T S A N E T F I F C L A D P G E A V L
 769 TTCCTACCCATACTACCCAGGgtacgtatattaaccttcacttcattTTTTtctttg
 140 I P T P Y Y P G
 829 tttttaacaacaatttgaactgtaagacctactttcttagtattctgacgtggggcatg
 889 aactccatttcgggataagaaataactaaacactaatttcateccctaatagcccagattt
 949 ticttacgtgtcttacagATTTGATAGAGACCTTAAGTGGCGAAGTGGAGTCGAGATTGT
 117 F D R D L K W R T G V E I V
 1009 ACCCATTCACTGCACAAGCTCCAATGGCTTCCAAATTACTGAAACCGCTCTGGAAGAAGC
 131 P I H C T S S N G F Q I T E T A L E E A
 1069 CTACCAAGAAGCCGAAAAACGCAATCTCAGAGTCAAAGGAGTCTTGGTCACGAACCCATC
 151 Y Q E A E K R N L R V K G V L V T N P S
 1129 AAACCCATTGGGCACCACAATGACCAGAAACGAACCTACCTCCTCTTCTCCTTCGTTGA
 201 N P L G T T M T R N E L Y L L L S F V E
 1189 AGACAAGGGCATCCACCTCATTAGCGATGAAATTTACTCCGGCACAGCTTTTAGCTCCCC
 221 D K G I H L I S D E I Y S G T A F S S P
 1249 ATCCTTTATAAGCGTCATGGAAGTTCTCAAAGATAGGAAGTGTGATGAGAATTCGGAAGT
 241 S F I S V M E V L K D R N C D E N S E V
 1309 TTGGCAGCGAGTTCACGTTGTCTATAGCCTCTCTAAGGATCTTGGCCTTCCGGGTTTTCG
 261 W Q R V H V V Y S L S K D L G L P G F R
 1369 AGTTGGCGCCATCTACTCCAACGACGACATGGTTGTGGCCGCCGCTACAAAAATGTCAAG
 281 V G A I Y S N D D M V V A A A T K M S S
 1429 CTTTGGTCTTGTCTTCTCTCAAACCTCAGCACCTTCTCTCCGCCATGCTATCCGACAAAAA
 301 F G L V S S Q T Q H L L S A M L S D K K
 1489 ACTCACTAAGAACTACATAGCCGAGAACCACAAAAGACTCAAACAACGTCAGAAAAAGCT
 321 L T K N Y I A E N H K R L K Q R Q K K L
 1549 CGTCTCCGGCCTTCAGAAATCTGGCATTAGCTGCCTCAACGGCAATGCTGGCTTGTCTG
 341 V S G L Q K S G I S C L N G N A G L F C
 1609 TTGGGTGGATATGAGGCACTTGCTTAGGTCCAACACCTTTGAAGCCGAAATGGAGCTCTG

Fig. 7-5

261 W V D M R H L L R S N T F E A E M E L W
 1669 GAAAAAGATTGTATACGAAGTTCACCTCAATATATCTCCTGGATCGTCTTGTCAATTGCAC
 381 K K I V Y E V H L N I S P G S S C H C T
 1729 GGAACCTGGTTGGTTCCGTGTCTGCTTTGCCAACTTGCCCGAGAGAACTCTGGACTTGGC
 401 E P G W F R V C F A N L P E R T L D L A

 1789 AATGCAGAGACTGAAGGCATTTGTGGGGGAGTATTACAACGTCCCTGAGGTCAATGGCGG
 421 M Q R L K A F V G E Y Y N V P E V N G G
 1849 CAGCCAAAGCAGCCATTTAAGCCACTCAAGAAGACAGTCGCTCACAAGTGGGTTTCCCG
 441 S Q S S H L S H S R R Q S L T K W V S R

 1909 GCTATCCTTCGATGACCGCGGTCTATTCCCGGTAGATGAAAGGTAGCCTGGTCTGAGTA
 461 L S F D D R G P I P G R *
 1969 CAAGAAACCGCTAAGGAAAATTACATTTTAGACCAAACATTTTTCTGCCAAAAAGTTAA
 2029 TTGGTTGAATTTTTTTTTCTGTTTGTAGTTTTTTTTCTCCGAATGTAGAGAAGTGCACA
 2089 CGGTCCGTGTTTGGGGATGTGAAGTGGCTTTCGCTTCATTTGTAAAAAGGGTGTGTATC
 2149 CACATACCCATTTGACTTCTCACATACCTTTTGATTATTTCTGTCCCTTGATCTTCTT
 2209 AATTCATCCGATTGGACGACCGAAAAATTAAAAAGTGTGTGAGAAGTAAAATGGGGTGTG
 2269 TGGATATCACACCCCTTTGTAAAACTAGTTTTGGTGATTGTGTGGCACCAAAATTCCTTT
 2329 ATGTCTTCGAAAACAAAATTACTCCATTGTGATTATGATGCATTATTGATTCTATACAA
 2389 TGTGATTAGTGTAtcatgtatattctattctagecggaactteccataatcatattggttc
 2449 ac¹ccctaaattcg¹catgggtatcgagacatgcc¹aagaatttactcgaacaggggaact
 2509 ggcggttg¹cgagcgtgccactactagatgctgctagtag¹cgagatttgaatggttgag
 2569 attgcacctgagttcgacttctaaccaagagattgtgccattgaatgggagtggtc¹aaa
 2629 tcaaggttctttctttgctttaaagataagga¹tttacttatgtggagaaatgcaacaac
 2689 atgaaaatgacaaggtgaggaaagtaaatgacttggtattgtagattgcttgtaaagtaa
 2749 atgactagaaatgagttgtacataaactacaaaggagatcgatactatcggtgagtagc
 2809 ggagctaataaactagacaaaaataatcttttctaaggaa¹atattgctaaaagaactgg
 2869 gatctgggttgattacagcttttggatgcaaatctggcttgaaagcagagtttggttgtt
 2929 tgtttgtttgattggttgagtgtcgttctctctggggcctcttttcttttataggcga
 2689 attagcccgactgctgtgactttgctcttgcc¹gaaagcacttggagggtagtgagtc
 3049 caactttttacttgtattgccactgaaaag¹tttttttttgggctgattatgagttagt
 3109 ccccatcacttgacatttaaaatcataagcacatggcctatgcattaatgggaaggcgcc
 3169 aatttgtctctgggcttgatgcttgggcttcgggcaagtcctccctttagttggtata¹tcc
 3229 aggcttcca¹acacttgcaacccaatgttcaaatattaacc¹gaaacagtgcaccttttaa
 3289 tcatgtttgagg¹tataatcccaagcgtataaatgattaaatagccg¹gcacgccttc
 3349 tctcgggacttacaccatttaaagcaa¹cgtttgctaa¹aaaaccttgactaatccat
 3409 gaattc

Fig. 7-6 A; Complete nucleotide sequence of the Md-ACS1-2 gene including introns and 5'- and 3'- flanking regions. The nucleotide at position +1 corresponds to the transcription initiation site. The nucleotides upstream from the +1 position are negatively numbered. The mRNA coded by the gene is shown in capital letters. The remainder of the sequence is shown in small letters. The nucleotides which were different from those of Md-ACS1-6 are underlined. The derived amino acid sequence is presented in the one-letter code below the DNA sequence. B; Complete nucleotide sequence of Md-ACS1-6 gene and its flanking regions. Characters and numbers show the same as A.

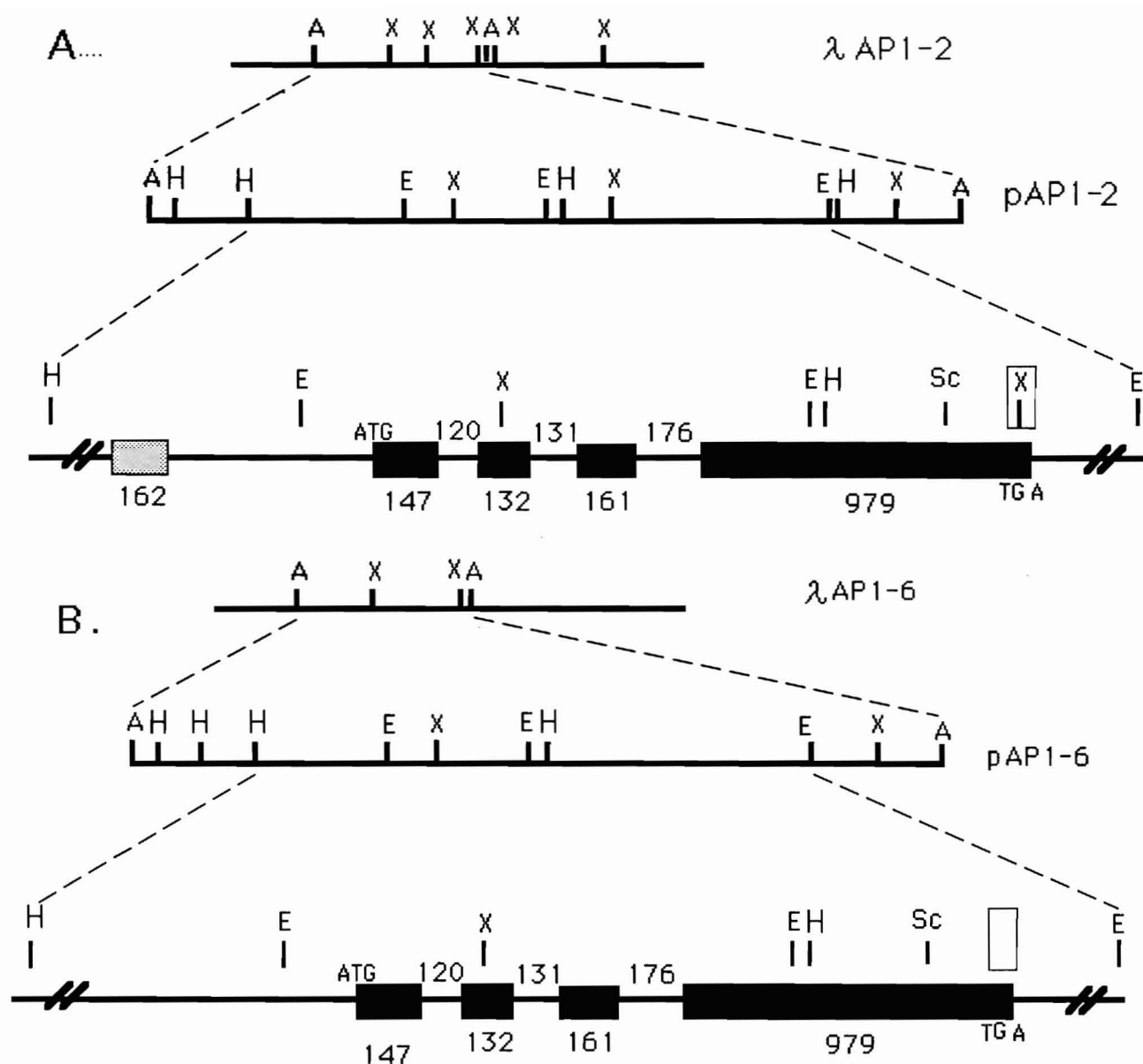


Fig. 8. Structure of Md-ACS1-2 gene. A; Gene organization of ACS1-2 and structure of derived plasmid constructs. A partial restriction map of clone λ AP1-2 and derived plasmids is shown (A, *Apa*I; X, *Xho*I; H, *Hind*III; E, *Eco*RI; Sc, *Sac*I). The exons are shown as filled blocks, and the connecting lines designate the introns. Pached box at 5' flanking region shows the insertion sequence detected. The numbers mean the sizes of introns and exons. B; Gene organization of ACS1-6 and structure of derived plasmid constructs. Characters and numbers show the same as A.

tomato PG Abox	Match% 76.9
	890 900
pAP1-6	ATCTCCTTAACATTATATAAAAAA
	X::: : : :X
tomato PG Abox	TTAATTATAACAGTGGTAAACCA
	10 20
tomato PG Bbox	Match% 78.6
	980
pAP1-6	ATTATTACTTTTTT
	: X::: : : :X
tomato PG Bbox	ACTATTATATTTTT
	10
tomato PG Cbox	Match% 75.0
	630 640
pAP1-6	ATGATCAATGTCTTTAG
	X::: : : : : :X
tomato PG Cbox	ATGAACATAGTGTTTAA
	10
tomato PG Dbox	Match% 65.5
	30 40 50
pAP1-6	ATTTTATTTAAAACTCAAAGTTTTTAAGTATT
	: X::: : : : : : : : : :X
tomato PG Dbox	AATTTATTTATAAATTATATCAAATAAGTTAA
	10 20 30
tomato PG Ebox	Match% 70.0
	460 470
pAP1-6	CATTTATCAATATTTAAATAATAAATC
	X::: : : : : :X :
tomato PG Ebox	ATTTTAAAAAATATTAAATAGTTTGAA
	10 20
tomato PG Fbox	Match% 62.9
	780 790 800
pAP1-6	CATAATTTATTTATCATGTTTTTGGTACAATATTT
	X::: : : : : : : : : : :X
tomato PG Fbox	CATAATATTTTTTTAATTATTCAAATAAATATTT
	10 20 30

Fig. 9. Sequences located in the ACS gene-5'flanking regions showing similarity to tomato PG promoter sequences (Montgomery et al. 1993). : Indicates identical bases.

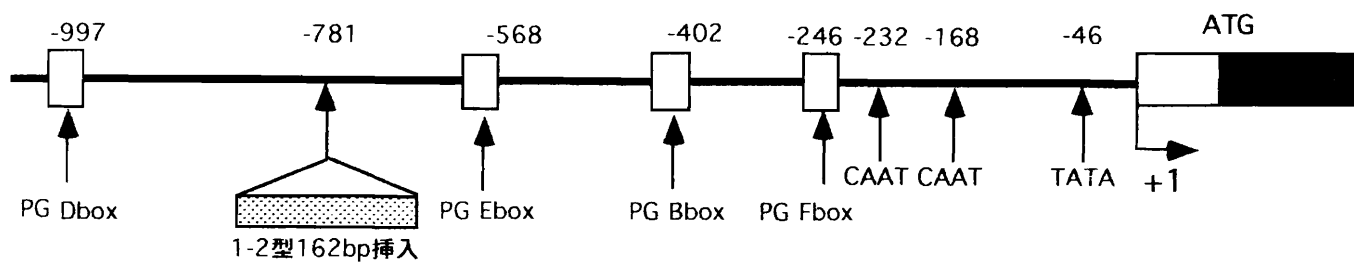


Fig. 10. Representation of the 5'ACS promoter indicating sequence elements of interest. PG means the cis-activating sequences of a polygalacturonase gene in tomato. Base positions are numbered relative to the transcription site.

Submission 1 of a set of 1 submission(s).

SOURCE apple tree

ORGANISM *Malus domestica*

Eukaryotae;mitochondrial eukaryotes;Viridiplantae;

Charophyta;Embryophyta group;Embryophyta; Magnoliophyta;

Magnoliopsida; Rosales;Rosaceae;Malus.

--To be released on March/15/1977--

LOCUS XXXXX 5526 bp DNA PLN 09-FEB-1997

DEFINITION *Malus domestica* ACC synthase (MdACS-1) gene, genomic sequence.

ACCESSION ;

KEYWORDS .

SOURCE apple tree.

ORGANISM *Malus domestica*

Eukaryotae; mitochondrial eukaryotes; Viridiplantae;

Charophyta/Embryophyta group; Embryophyta; Magnoliophyta;

Magnoliopsida; Rosales; Rosaceae; Malus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 5526)

AUTHORS Harada,T., Sunako,T., Sakuraba,W., Goto,S., Senda,M., Akada,S.,
Ishikawa,R. and Niizeki,M.

TITLE Genomic nucleotide sequence of a ripening-related
1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (MdACS-1) in apple

JOURNAL Plant Physiol. (1997) In press

REFERENCE 2 (bases 1 to 5526)

AUTHORS Harada,T., Sunako,T. and Sakuraba,W.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (09-FEB-1997) Faculty of Agriculture, Hirosaki
University, Bunkyocho 3, Hirosaki 036, Japan

COMMENT Lay-Yee, M. Plant Physiol. 107,1017-1018,1995.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..5526

/organism="Malus domestica"

/strain="Golden Delicious"

mRNA join(2113..2358,2479..2610,2742..2902,3079..4513)

CDS join(2212..2358,2479..2610,2742..2902,3079..4060)

/gene="MdACS-1"

/note="EC number=4.1.1.14"

/codon_start=1

/product="ACC synthase"

/translation="MRMLSRNATFNSHGQDSSYFLGWQEYEKNPYHEVHNTNGIIQMC
LAENQLCFDLLESWLAKNPEAAAFKKNGESIFAELALFQDYHGLPAFKKAMVDFM
RGNKVTFDPNHLVLTAGATSANETFIFCLADPGEAVLIPTPYYPGFDRDLKWRTC

VPIHCTSSNGFQITETALEEAYQEA EKRNLRVKGVLVTNPSNPLGTTMTRNELYLL
 FVEDKGIHLISDEIYSGTAFSSPSFISVMEVLKDRNC DENSEVWQRVHVVYLSKE
 LPGFRVGA IYSNDDMVVAAATKMSSFGLVSSQTQHLLSAMLSDKKLTKNYIAENF
 KQRQKKLVSGLQKSGISCLNGNAGLFCWVDMRHLLRSNTFEAEMELWKKIVYEVF
 SPGSSCHCTEPGWFRVCFANLPERTLDLAMQRLKAFVGEYYNVPEVNGGSQSSH
 RRQSLTKWVSRLSFDDRGIPIGR"

BASE COUNT 1698 a 1083 c 975 g 1770 t

ORIGIN

1 aagcttcaaa tcaagttctg gttctttcat cgatgaataa aatccacaat caaggccaaa
 61 tccaactgta ggcaagacta ggagagccta taaatacgag gctccaagac aaagaaatgg
 121 gtcagaaatt catcaaaaca cctagactct caaactccca aacactcaga agatacagaa
 181 aaatctctgc gttctttgct atacttgtaga agaaccacca agcaccttta cacatgccgg
 241 ttcctccatc gccattagcc aaaaccctga ggcatttggt tattcgagat caagtcatca
 301 cgattttcgg atcaacaaca cacacttttt tcacccaga agatcgaatc agaggattaa
 361 aaattgtagc agagattgta accctaaatt cattaatacc aattattact ttgtatacgt
 421 attcttgggt tatttattgc aagaatttcg tgtttacaac tctttttcta gcacttccat
 481 cgacttataa gtaatttagg ctattcttat attaccaatt aatttttagt ggaatctcaa
 541 cttttttaa attatttatc tcatggaaaa tccaaattct cctctaaatg aacggttaac
 601 aaaaagtaaa cttaacgca aaactctcgg tactgttcac ttaatagaaa aatcatattt
 661 ttacattaaa aagtcaatct tgttactatt cactttacc tttattttat ctttatcgtt
 721 aaaattcaaa gttttcaaac ccttttcatt agttttcctt aacaaaatgg tttattata
 781 acagatgatt ctagtgtttt ccttggtttt gtatacctaa ttctaaaggg gatagagtga
 841 tgatgttaaa tgaaggaaaa agagagagat gccatttttg ttcgtaccgg attttcgagg
 901 ttgactcaaa tcaaacatt gtttggtaat tggagtaatg aactgagcag acataaaaac
 961 ctgtgcgaac ttaaaggta aaaaaaagg taaaaaaaaa aaacttaaac gaaaaaatct
 1021 cagtattgtt tattttaaca aaaattcaca cttttacatt aaaaagtcaa tcctgttatt
 1081 atttatttta ccctttattt tatttaaaac tcaaagtttt taagtatttt tcattaattt
 1141 tccttaaaaa aaatagaaag tgagaaaaat gcccgacaaa attagttgtg gctactagag
 1201 tcaagaagca tatggaccag ggtgggtcgc tcttggcatt ttctatgata cttgttgctg
 1261 gtaaggtttt gtaaacaaaa ctagaccgga gtattaattc ttgtttcttt gtttttttt
 1321 caattacaag ccgattaatg cttctatgta cacttataat cccacgcaa gtttgtaggt
 1381 aatgccaggt aatggtgaac gccctacca cttccagtc caagcaaata gtgagaaaa
 1441 aaattaatgg atgatacatg gaaaattaaa ttggagata aaatttgcaa attatataat
 1501 atgtcaccta tacgaattaa cacatttatc aatatttaaa taataaatca atcatcaact
 1561 accatataat ttagtttcca aaattttatt tacaaattta gtcttttagt ttacctcaa
 1621 ttaattattt aatgttgatt agtaaacact aaaacttcat tgctttggga tttgggagtg
 1681 tctgaaggtc cttcatgatc aatgtcttta gatggtggag caaaagcgcg tacaattaat
 1741 tatcatgttg tttttggatt ttattgaat caaaatactt ggatcataat gtaagaaaa
 1801 agaaccagag aaatctaaag agactttctt aaaaatgaga ttcttcataa tttatttatc
 1861 atgtttttgg tacaatattt ataatacgg ggcaaaaatt aatgttaaaa tgtaagataa
 1921 cagagaattc atagaaagca caattttaag ataatctcct taacatttat aaaaaatatg
 1981 actactcagt gtgacgtgct attcctttgt tagacaaata atttctatat atttaaat
 2041 atattattac tttttgcta tatatagacc cctccagtcc aacaacatcc aatatccac
 2101 ttcaaacttg taatccaaaa ccaaacctc aaactctctc tctattgctt tctcttcctt
 2161 tccacacttc tttcttacag cttgtatcca tacagtagaa aattaaccaa aatgcgcagt

2221 ttatccagaa acgctacgtt caactctcac ggccaagact cctcctactt cttaggttgg
2281 caagagtatg agaagaaccc ctacatgag gtccacaaca caaacgggat tattcagatg
2341 ggtctagcag aaaatcaggt aattaattat tataatttac gagcttaatt ttttattact
2401 accatgcata tatgttacca tatgtagtta tatttagtat ataaactttg tgcgcgtttc
2461 aatatttttt ttttctagct ctgttttgat cttctcgagt catggctggc taagaatcca
2521 gaagcagctg catttaaaaa aaatggagaa tccatatttg cagagcttgc tctcttccaa
5461 tctcgggact tacaccattt aaagcaatcg ttgctaact aaaaccttgc actaatccat
5521 gaattc

Genomic nucleotide sequence of a ripening-related 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (MdACS-1) in apple (Accession No. U89156).

Takeo Harada, Tomomi Sunako, Wakako Sakuraba, Satoshi Goto, Shinji Akada, Mineo Senda, Ryuji Ishikawa, and Minoru Niizeki

Department of Bioresources, Faculty of Agriculture, Hirosaki University, Bunkyocho 3, Hirosaki, 036 Japan (T.H., T.S., W.S., R.I., M.N.); Gene Research Center, Hirosaki University (S.A., M.S.); Applied Biochemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, 981 Japan (S.G.)

Correspondence to: Takeo Harada

FAX: (81)172-39-3750

E-mail: tharada@cc.hirosaki-u.ac.jp

Ethylene is a gaseous plant hormone which regulates many physiological processes of plant growth and development. Its synthesis is not only induced by stress such as wounding, but also during unique developmental stage such as seed germination, fruit ripening, and leaf and flower abscission (Yang and Hoffman, 1984). Because large losses of fruits and vegetables are incurred due to ethylene's effects on plant senescence, the significance of a means to control the ethylene synthesis is clear (Theologis, 1992). The enzyme whose activity limits ethylene production is ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) synthase (S-adenosyl-L-methionine methylthioadenosine lyase, EC 4.1.1.14) which catalyses the formation of ACC, the immediate precursor of ethylene. ACC synthase is encoded by at least six divergent genes in tomato. Two of them, LE-ACS2 and LE-ACS4, are expressed during fruit ripening (Lincoln et al., 1993). Expression of antisense RNA derived from LE-ACS2 resulted in an almost complete inhibition of mRNA of both these genes and extending the longevity of the fruits (Oeller et al., 1991).

Apple is also a typical climacteric fruit. Therefore, it is appeared to be possible to extend the storage life of apple fruit by inhibiting ethylene biosynthesis using antisense technique. Furthermore, we are interested in molecular mechanism of the differences of the storage longevity among apple cultivars. Lay-Yee and Knighton (1995) reported a full-length cDNA (MdACS-1) encoding ACS from ripening apple. Recently,

two more cDNAs of ACS (MdACS-2, MdACS-3) from ripening apple were isolated (Rosenfield et al., 1997). Thus, it is considered that apple has also a multigene family of ACS to control ripening process like tomato. However, their genomic sequences are unknown yet. As a first step for the elucidation of the mechanism controlling the storage longevity, the sequence of gene encoding the MdACS-1 gene was isolated by screening a genomic library from *Malus domestica* L. Borkh cv Golden Delicious. A probe DNA was made from PCR using primers designed from MdACS-1 cDNA sequence and 'Golden Delicious' genomic DNA as a template. Three of 13 positive phage clones were appeared to contain the full length of the gene coding regions. One of them (1-6) contained partially a restriction map which was identical to that of the cDNA. The sequencing of the subcloned fragment (5.6 kb) revealed the presence of MdACS-1 gene which consists of four exons and three introns. The number and size of exons and location of introns are similar to other ACS genes isolated from tomato, rice, and *Arabidopsis* (Lincoln et al., 1993; Zarembinski and Theologis, 1993; Abel et al., 1995). The sequence also included 2,111 b and 1,011 b of the 5'- and 3'-flanking regions, respectively. We constructed a chimeric gene containing the full-length promoter region fused to the coding sequence for the GUS gene. By using this characterization of the promoter is currently in progress.

Acknowledgments

This work was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan.

Literature cited

Abel S, Nguyen MD, Chow W, and Theologis A (1995). ACS4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 270: 19093-19099.

Lay-Yee M, and Knighton ML (1995) A full-length cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple (Accession No. L31347)(PID:g606759). *Plant Physiol* 107:1017-1018.

Lincoln JE, Campbell AD, Oetiker J, Rottmann WH, Oeller PW, Shen NF, and Theologis A (1993) LE-ACS4, a fruit ripening and wound-induced

1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Biol Chem* 268:19422-19430.

Oeller PW, Lu MW, Taylor LP, Pike DA and Theologis A (1991)
Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA.
Science 254: 437-439

Rosenfield C-L, Kiss E, and Hrazdina G (1996) MdACS-2 (Accession No. U73815) and MdACS-3 (Accession No. U73816): Two new 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases in ripening apple fruit. *Plant Physiol* 112: 1735.

Theologis A (1992) One rotten apple spoils the whole bushel: The role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70:181-184.

Yang S-F, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 155-189.

Zarembinski TI, and Theologis A (1993) Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Biol Cell* 4:363-373.