

PCRによるユリ科植物からのアリイナーゼ遺伝子の検出

上西愛子・野村 研・大矢武志¹⁾・北 宜裕

Detection of Alliinase Gene from Total DNAs of Liliaceae Plants by PCR.

Aiko KAMINISHI, Ken NOMURA, Takeshi OHYA¹⁾ and Nobuhiro KITA

摘 要

本研究では、ネギ属植物に特徴的に含まれる含硫黄成分であるアリインを加水分解してアリシンを生成させるアリイナーゼ(ALI)に着目し、ネギ属植物を含むユリ科植物全体からPCRを用いてALI遺伝子を直接検出する手法の開発に取組んだ。

PCRに用いるプライマーは、本県育成の赤タマネギ品種‘早生湘南レッド’から単離したALI遺伝子のcDNAクローン(Alli-1A)の塩基配列(北ら 2002)と、遺伝子データベース上の既知のタマネギゲノミッククローンの塩基配列をもとに設計し、これを用いてネギ属を含む5科22属34種の植物の全DNAからPCRによるアリイナーゼ遺伝子の検出を試みた。その結果、ネギ属植物の他にヤマユリ等を含む複数のユリ科植物の全DNAから期待される大きさの増幅DNA断片が検出されるとともに、いずれのDNA断片とAlli-1Aをプローブに用いたサザン解析により、ALI遺伝子断片であることが確認された。以上の結果から、本研究で作成したプライマーを用いることにより、各種植物の全DNAからALI遺伝子を安定して検出できること及びALI遺伝子は少なくともユリ科植物に広く存在していることが示唆された。

謝 辞

本研究の実施及び本研究の作成に当たり、横浜市立大学木原生物学研究所笹隈哲夫教授には貴重な御助言ならびに御指導をいただいた。ここに深謝の意を表する。

キーワード：アリイナーゼ、赤タマネギ、ユリ科植物、PCR、サザン解析

Summary

Structural genes of Alliinase (EC4.4.1.4), which hydrolyze alliin (S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide) to produce volatile compound, allicin, could be detected by PCR using a specific primer combination and total DNAs as the template prepared from *Allium* and some of the Liliaceae plants. Specific primers were designed according to the DNA sequences of a genomic clone of alliinase structural gene and alliinase cDNAs in public databases and reliability of the specificity was evaluated by applying them to 34 species which belong to 5 family, 22genus. By using the specific primer combination, amplified DNA fragments with expected size were reproducibly detected by PCR in most of the Liliaceae plants. Southern blot analysis of the DNA fragments confirmed that they represent the structural genes of alliinase. These results indicate that the specific primer combination designed in the present study can be used for the detection of alliinase structural genes and suggest that alliinase genes are widely distributed to the Liliaceae plants.

Keywords: alliinase, red onion, Liliaceae Plants, PCR, southern blot analysis

¹⁾神奈川県環境農政部農業振興課

緒言

タマネギ (*Allium cepa*) やニンニク (*A. sativum*) を含むネギ属植物には揮発性の辛味成分が含まれ、古くからその機能性や香味により薬草としても利用されてきた (Cavallito and Bailey 1944, Block 1985)。このネギ属植物に特有の香味は、組織の破碎に伴って発生する揮発性辛味成分による。生化学的にはアリインと総称される含硫化合物 (S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide) がアリイナーゼ (alliinase; EC4.4.1.4) により加水分解されて生成する揮発性含硫化合物 (アリシン) が香味の主要な構成成分となる。基質であるアリイン及びその加水分解産物であるアリシンに機能性が認められることは科学的にも明らかにされている (Augusti 1990)。

一般にアリインは細胞質に存在し、細胞が破壊されると液胞内にあるアリイナーゼと反応してピルビン酸、アンモニア及びアリシンに加水分解される (Lancaster and Collin 1981)。基質となるアリインは、側鎖の構造から大きく4種類 (*trans*-(+)-S-(1-propenyl)-L-cysteine sulfoxide; PRENCISO, (+)-S-(2-propenyl)-L-cysteine sulfoxide; ALLYLCSO, (+)-S-propyl-L-cysteine sulfoxide; PCSO, (+)-S-methyl-L-cysteine sulfoxide; MCSO) に分類される。タマネギではPRENCISOの割合が高いが、MCSOとPCSOの割合は低く、また、ALLYLCSOを欠く。ニンニクではALLYLCSOの割合が高いがMCSOとPCSOの割合は低くPRENCISOを欠く。このように、ネギ属植物の種ごとに異なる香味は、それぞれの種に含まれる含硫化合物の構成割合が異なることによる (Block 1992)。なお、PCSOはユリ科植物のハナニラ (*Ipheion uniflorum*) からも検出され (Tsuno 1958)、同じくユリ科植物のリュウココリネ属 (*Leucocoryne*) からMCSOとPRENCISO及びアリイナーゼ活性も検出されている (Lancasterら 2000b)。

アリイナーゼはタマネギ鱗茎において可溶性タンパク質の6%以上含まれている (Nock and Mazelis 1987) 酵素で、ニンニク鱗茎 (Mazelis and Crews 1968)、タマネギ鱗茎 (Tobkie and Mazelis 1979)、ナガネギ (*A. fistulosum*, Fujitaら1990)、ワイルドガーリック (*A. ursinum*, Landshuterら1994)、リーク (*A. porrum*, Lohmollerら1994)、ニラ (*A. tuberosum*, Manabeら1998) から精製されている。また、ツルバキア属 (*Tulbaghia*) にも存在するという報告もある (Jacobsenら1968)。アリイナーゼには、主に葉と鱗茎で発現するタイプと根で発現するタイプの異なる二つのアリイナーゼアイソザイ

ムの存在が確認されている (Lancasterら 2000a)。葉及び鱗茎で発現するタイプのアリイナーゼ遺伝子発現に関しては、ニンニクにおけるノーザン解析の結果から、鱗茎から得られたcDNAクローンは根では強く発現していないことが示されている (Rabinkovら 1994)。ニラにおいても葉から単離したcDNAクローンは根では発現しておらず、黄化した葉では発現量が低下していた (Makabeら 1998)。また、タマネギにおいても、シュートから単離したcDNAクローンは、葉と鱗茎では発現し、根では発現しないのに対し、根から単離されたcDNAクローンは根でのみ発現していること及び両者の塩基配列間の相同性は56%と低いことが明らかにされている (Clark 1993, Lancasterら 2000a)。葉及び鱗茎で発現するタイプのアリイナーゼ遺伝子のcDNAクローンは、タマネギ (Van Dammeら 1992, Clark 1993, Kingら1998, 北ら2002)、ニラ (Manabeら 1998)、シャロット (*A. ascalonicum*, Van Dammeら1992)、ニンニク (Van Dammeら 1992, Ravinkovら 1994) から単離されている。しかし、ネギ属植物を含むユリ科野菜はゲノムサイズが大きく、タマネギの場合、モデル植物のシロイヌナズナの105倍、ヒトの30倍のDNAを含む (Arumuganathan and Earle 1991)。したがって、ゲノムDNAを直接解析するのは極めて困難なため、アリイナーゼのゲノミッククローンは、タマネギから一つのみ単離されているだけであるが (Glipinら 1996)、より簡易なアリイナーゼ遺伝子の検出法が開発されれば、他の植物にも同様な含硫黄成分の生合成系の存在についても明らかにすることができるものと期待される。その点で、PCR法は、特異的なプライマーさえ設計できれば、ゲノムサイズに関わりなく、安定して目的遺伝子を検出することができるものと予想される。現在、本県では生食用の、辛味の少ない赤タマネギ品種の育種を進めているところであるが、辛味に関する遺伝的な解析を進めることは、育種上、極めて重要な課題である。さらに、他の科属に含まれる主要な作物からアリイナーゼ遺伝子を検出することができれば、発展的な育種にも応用が可能になるものと期待される。

そこで、本研究では、本県育成の赤タマネギ品種である '早生湘南レッド' を基本にして、タマネギとは辛味が異なる、すなわち基質の構成割合が異なるユリ科植物からのアリイナーゼ遺伝子の検出手法の開発を試みた。

'早生湘南レッド' から単離したアリイナーゼcDNAの塩基配列を基に設計した特異的プライマーを用いて、タマネギを含む5科22属34種の植物の全DNAを鋳型にPCR

第1表 供試植物

作物名	学名	品種名
タマネギ	<i>Allium cepa</i>	早生湘南レッド
ワケギ	<i>Allium wakegi</i>	農総研選抜系統
ナガネギ	<i>Allium fistulosum</i>	湘南
チャイブ	<i>Allium schoenoprasum</i>	市販品
アサツキ	<i>Allium schoenoprasum var. foliosum</i>	農総研選抜系統
ラッキョウ	<i>Allium bakeri</i>	農総研選抜系統
ニンニク	<i>Allium sativum</i>	ホワイト六片
ニラ	<i>Allium tuberosum</i>	グリーンベルト
ガーリックチャイブ	<i>Allium tuberosum</i>	市販品
ギガンチューム	<i>Allium giganteum</i>	市販品
アガパンサス	<i>Agapanthus praecox ssp. orientalis</i>	園芸種
ハナニラ	<i>Ipheion uniflorum</i>	市販品
ヤマユリ	<i>Lilium auratum</i>	野生種
コマツナ	<i>Brassica rapa</i>	みすぎ
キャベツ	<i>Brassica oleracea</i>	金系201号
ブロッコリー	<i>Brassica oleracea</i>	緑嶺
シロガラシ	<i>Sinapis alba</i>	不明
シロイヌナズナ	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Col-0
ダイコン	<i>Raphanus sativa</i>	聖護院
ニンジン	<i>Daucus carota</i>	Chanteney
ジャガイモ	<i>Solanum tuberosum</i>	男爵
トマト	<i>Lycopersicon esculentum</i>	ハウス桃太郎
バジル	<i>Ocimum basilicum</i>	市販品
ダイズ	<i>Glycine max</i>	Harosoy63
イネ	<i>Oryza sativa</i>	コシヒカリ
コムギ	<i>Triticum aestivum</i>	農林61号
オオムギ	<i>Hordeum vulgare</i>	カシマムギ
トウモロコシ	<i>Zea mays</i>	ハニーバンタム
スイカ	<i>Citrullus lanatus</i>	9-9
イチゴ	<i>Fragaria ananassa</i>	女峰
モモ	<i>Prunus persica</i>	照手白
トルコキキョウ	<i>Eustoma russellianum</i>	野生種
ダイアンサス	<i>Dianthus kitusinus</i>	
カーネーション	<i>Dianthus caryophyllus</i>	コーラル

によるアライナーゼ遺伝子の検出を試みた結果、ネギ属植物の他にヤマユリ等を含む複数のユリ科植物の全DNAから期待される大きさの増幅DNA断片が検出されるとともに、いずれのDNA断片ともAlli-1Aをプローブに用いたサザン解析により、ALI遺伝子断片であることが確認された。このことから、本研究で作成したプライマーを用いることにより、各種植物の全DNAからALI遺伝子を安定して検出できること及びALI遺伝子は少なくともユリ科植物に広く存在していることが示唆されたので、ここで取りまとめて報告する。

材料及び方法

1. DNA抽出

PCRによるアライナーゼ遺伝子断片の検出のための鋳型DNAの調製に用いるタマネギについては、赤タマネギ品種は‘早生湘南レッド’、及び‘湘南レッド’を、黄タマネギ品種としては‘二宮丸’及び‘湘南極早生’を、白タマネギ品種として‘White Spanish’を当研究所温室内で育成し用いた。ユリ科植物を含む各種作物については、第1表に示す5科22属34種の植物を同様に温室内で育成した。全DNAは、これらの植物の葉からNucleon Phyto Pure DNA extraction Kit(Amersham

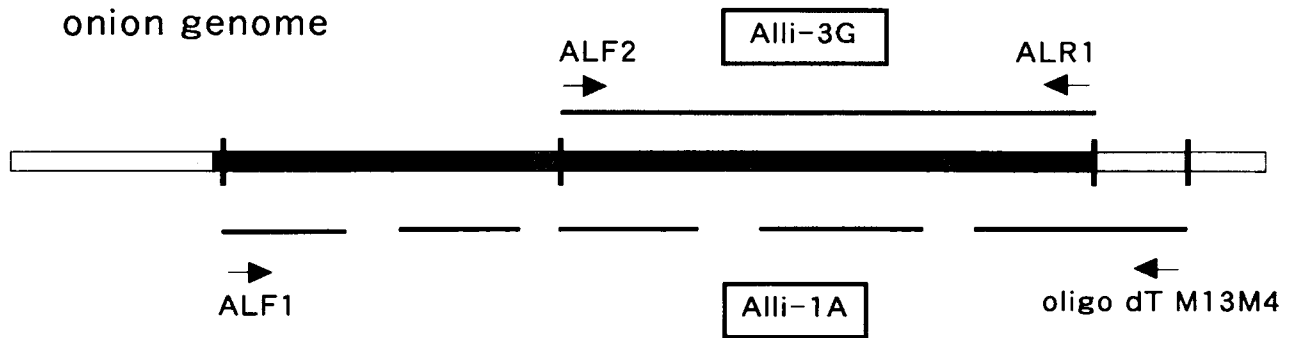
Pharmacia Biotech社製)を用い、キットのプロトコルに従って抽出した。

2. PCR

PCRには各植物の全DNA50ngを鋳型とし、Ex Taq™ Kit(TaKaRa社製)を用い、GeneAmp PCR System 9600(Perkin Elmer社製)で反応させた。アライナーゼ遺伝子断片検出用の特異的プライマーは、Amplify(Engels 1992)を用いて、本県育成の赤タマネギ品種‘早生湘南レッド’から単離したALI遺伝子のcDNAクローン(Alli-1A)の塩基配列(北ら 2002)と、遺伝子データベース上の既知のタマネギゲノミッククローン及び各種ネギ属植物から単離されているアライナーゼcDNAの塩基配列をもとに、フォワードプライマーとしてALF2(3'-CAGGTGTTTAGAGAAC-5')及びリバースプライマーとしてALR1(3'-GGGTACATACATATG-5')をそれぞれ設計した(第1図)。PCRの反応条件は、94℃、3分間の熱変性の後、熱変性94℃で30秒、アニーリング56℃で30秒及び伸長反応72℃で2分を30サイクル行い、最後に72℃で5分間の付加伸長反応を行った。

3. サザンハイブリダイゼーション

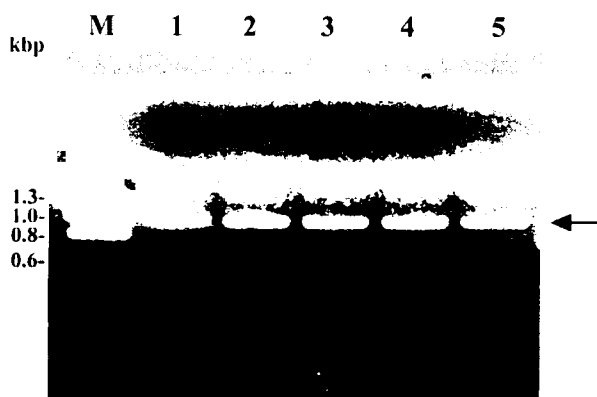
EcoRI及びHind IIIで処理した全DNA及びPCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイ



第1図 アイリナーゼ(ALI)のゲノム遺伝子構造

Glipinら(1996)が単離したタマネギゲノミッククローン(GenBanki登録番号L148614)から推定したアイリナーゼ構造遺伝子を含む領域で、■はエクソン、□はイントロンを示す。矢印はプライマーの位置を示す。ALI遺伝子cDNAクローン「Alli-1A」(北ら2002)と今回単離したALI遺伝子部分断片「Alli-3G」の位置は黒線で示している。

D染色パターンを確認した後、ナイロンメンブレン(Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech社製)にブロットし、アルカリ固定(0.4N NaOH)した。シグナルの検出には、Genomic-Southern HybridizationにはAlkPhos DIRECT kit(Amersham Pharmacia Biotech社製)を用い、キットのプロトコルに従って、55°Cでハイブリダイズさせた。転写したメンブレンは、18時間、X線フィルム(コダック社製)に露光し、レンドール及びレンフィックス(富士写真フィルム社製)を用いて現像・定着した。なお、PCR-Southern HybridizationにはECL Labelling and Detection Kit(Amersham Pharmacia Biotech社製)を用い、55°Cでハイブリダイズさせ、30分間露光して検出した。



第2図 複数のタマネギ品種から検出されたアリナーゼDNA断片

複数のタマネギ品種の葉から抽出した全DNAを鋳型にアリナーゼ検出用プライマー、ALF2とALR1を用いたPCRを行った。増幅されたDNA断片を矢印で示した。M:マーカー、1:早生湘南レッド、2:湘南レッド、3:二宮丸、4:湘南極早生、5:White Spanish

4. PCR増幅産物のクローニング

PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動により分離し、予想された分子量の増幅DNA断片を切り出し、Easy Trap Kit(TaKaRa社製)により精製した。これをLigation Kit(vol.2)(TaKaRa社製)を用いてpT7Blueベクター(Novagen社製)に挿入し、大腸菌JM109系統(TaKaRa社製)に形質転換後、PCRにより挿入断片を有するクローンを選択した。目的とするDNA断片が挿入されたプラスミドをWizard Miniprep Purification System(Promega社製)により分離・精製した後、塩基配列決定用プライマーとしてT7及びU19プライマー(Invitrogen社製)を用い、Thermo SequenaseTMII dye terminator cycle sequencing Kit(Amersham Pharmacia Biotech社製)によりサイクルシーケンスにより塩基配列を決定した。塩基配列は、373S DNAシーケンサー(ABI社製)で決定し、得られた塩基配列はDNASIS(日立ソフトウェアエンジニアリング社製)、BLAST、ClustalX(Thompsonら1997)及びTree View(Mage1997)を用いて相同性解析を行った。

結 果

1. PCR

ゲノムサイズが大きいタマネギの全DNAからアリナーゼ遺伝子断片を特異的に検出できるプライマーを、赤タマネギ‘早生湘南レッド’(北ら2002)及び白タマネギ‘Southport White Globe’(Clarkら1993)、ニンニク(Van Dammeら1992, Ravinkovら1994)、シャロット(Van Dammeら1992)、チャイブ及びニラ(Manabeら1998)のアリナーゼ遺伝子塩基配列を参考に設計した。その結果、ネギ属植物に共通するアリ

ALF2

→

GTGTTTAGAGAACAAACAAAATACTTTGACAAGAAAGGGTACGAGTGGAAAGG
AAATGCAGCGGATTACGTGAACACTTCAACTCCAGAGCAATTCATTGAGATGGTTA
CTTACCTAATAACCCAGAAGGTCTGCTTCGCAATGAAGTAATAAAGGGATGCAA
TCCATCTACGATATGGTTTACTACTGGCCTCATTACACCCCAATCAAGTACAAAGC
GGATSAAGATATCATGTTGTTTACAATGTCTAAATACACTGGACACTCTGGTAGTC
GATTTGG

←

ALR1

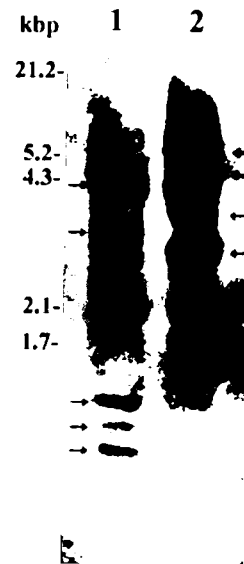
GTGGGCGCT
GATAAAGGATGAACTGTGTATAATAAATTGTTGAATTACATGACAAAGAACACGG
AGGGCACTTCCCAGAAACACAGCTACGATCACTCAAATTCTAAAAGAAGTTGTA
GCAATGGTTAAACACAGAAAGGCACCATGCGCGACCTCAACACATTTGGTTTTCA
GAACTTAGGGAGAGGTGGGTAAATATCACTGCATTGCTCGATAAATCAGACAGAT
TCTCCTATCAAAGCTTCCACAAAGTGAATATTGCAATTACTTCAGGAGAATGAGA
CCTCCATCCCCAT

第3図 アイリナーゼ遺伝子ゲノミッククローン「Alli-3G」の塩基配列

‘早生湘南レッド’の葉から抽出した全DNAからPCRで単離したアイリナーゼ遺伝子の部分塩基配列。エキソンは黒、イントロンは灰色の文字で示している。矢印はプライマーの位置を示す(第1図参照)。

ナーゼ遺伝子内部及び3'末端保存領域にプライマーALF2とALR1を設計し(第1図)、赤タマネギ‘早生湘南レッド’の全DNAを鋳型にPCRを行ったところ、予想される約1kbpのDNA断片が特異的に増幅された(第2図)。そこで、このDNA断片、Alli-3Gをクローニングし、その塩基配列を解析したところ、本クローンは2か所のイントロンを含むアイリナーゼの構造遺伝子の一部であることが確認された(第3図)。そこで、単離したAlli-3Gをプローブに用いてゲノミックサザンプロット解析を行ったところ、複数のバンドが検出され、アイリナーゼ構造遺伝子はマルチプルコピーとして存在していることが明らかになった(データ未記載)。また、アイリナーゼのcDNAクローンであるAlli-1Aをプローブに用いたサザン解析でも同様の結果が得られた(第4図)。

次に、このプライマー組合せにより、他のタマネギ品種の全DNAから再現性よくアイリナーゼ遺伝子断片が検出できるかどうかについて検討した。赤タマネギ‘湘南レッド’、黄タマネギ‘二宮丸’、‘湘南極早生’、白タマネギ‘White Spanish’の全DNAを鋳型にPCRを行ったところ、いずれの品種からもAlli-3Gと同じ分



第4図 ‘早生湘南レッド’の全DNAとアイリナーゼcDNAクローンとのサザンハイブリダイゼーション矢印は検出されたバンドを示す。

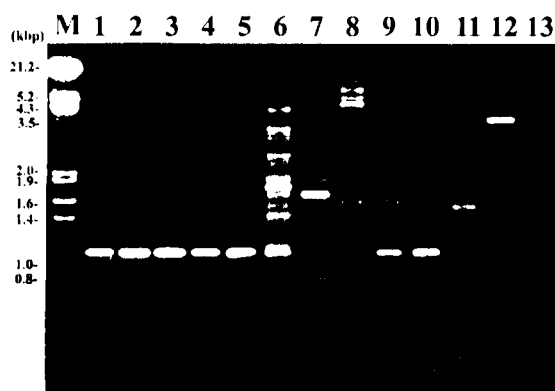
レーン1: *EcoRI*と*HindIII*で処理した‘早生湘南レッド’の全DNA, レーン2: *EcoRI*で処理した‘早生湘南レッド’の全DNA

第2表 各タマネギ品種から単離したアリイナーゼ遺伝子断片のDNAレベルでの相同比較(%)

品種名	(略号)	WSR	SR	N	SG	WS
早生湘南レッド	(WSR)	—	99.5	97.8	95.7	92.7
湘南レッド	(SR)	—	—	97.9	95.8	92.8
二宮丸	(N)	—	—	—	97.2	92.6
湘南極早生	(SR)	—	—	—	—	92.7
White Spanish	(WS)	—	—	—	—	—

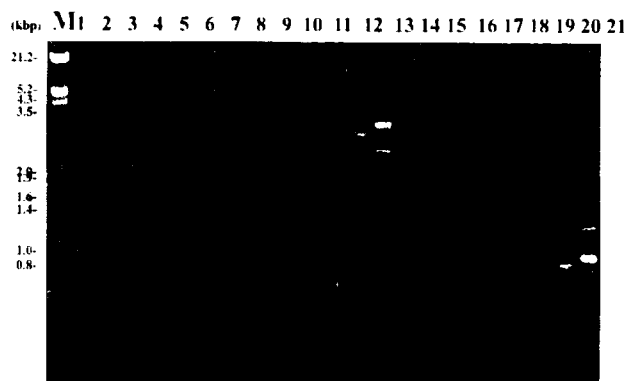
子量のDNA断片が特異的に増幅された(第2図)。さらに、それらの増幅DNA断片をクローニングし、塩基配列を決定したところ、いずれもアリイナーゼの構造遺伝子断片であることが確認された。そこで、上記の各タマネギ品種から得られたアリイナーゼ遺伝子断片の塩基配列を比較したところ、'White Spanish' 以外はいずれも相互に96~99%の極めて高い相同性を示した。これに対し、'White Spanish' は、いずれの品種とも93%程度とやや低い相同性を示したことから(第2表)、他品種とは遺伝的にやや遠縁関係にあることが示唆された。

次に、このプライマー組合せを用いてネギ属9種、ユリ科3種を含む5科22属34種の植物(第1表)の全DNAを鋳型にPCRを行った。その結果、ほとんどのネギ属植物には、共通する約1kbpの増幅DNA断片が認められたが、供試植物全体では、増幅DNAパターンに多型が認められた(第5図、第6図)。すなわち、ネギ属植物のうち、ワケギ、ナガネギ、チャイブ及びアサツキでは、共



第5図 ユリ科植物からアリイナーゼ検出用プライマーセットを用いたPCRにより増幅されたDNA断片

ユリ科植物の葉から抽出された全DNAを鋳型にALF2-ALR1プライマーセットを用いたPCRにより増幅されたDNA断片 M:マーカー, 1:タマネギ'早生湘南レッド', 2:ワケギ, 3:ナガネギ, 4:チャイブ, 5:アサツキ, 6:ラッキョウ, 7:ニンニク, 8:ニラ, 9:ガーリックチャイブ, 10:キガンチウム, 11:アガパンサス, 12:ハナニラ, 13:ヤマユリ



第6図 各種植物からアリイナーゼ検出用プライマーセットを用いたPCRにより増幅されたDNA断片

各種植物の葉から抽出された全DNAを鋳型にALF2-ALR1プライマーセットを用いたPCRにより増幅されたDNA断片 M:マーカー, 1:コマツナ, 2:キャベツ, 3:ブロッコリー, 4:シロガラシ, 5:シロイヌナズナ, 6:ダイコン, 7:ニンジン, 8:ジャガイモ, 9:トマト, 10:バジル, 11:ダイズ, 12:イネ, 13:コムギ, 14:オオムギ, 15:トウモロコシ, 16:スイカ, 17:イチゴ, 18:モモ, 19:トルコキキョウ, 20:ダイアンサス, 21:カーネーション

通してタマネギと同じ分子量の約1kbpのDNA断片が特異的に強く増幅されたが、ラッキョウ、ニンニク、ニラ、ガーリックチャイブ及びキガンチウムでは、同じ分子量のDNA断片のほかに多数の非特異的なDNA断片も増幅された。また、ユリ科アガパンサス属のアガパンサス、アイフェイオン属のハナニラ及びユリ属のヤマユリでは、期待される約1kbpのDNA断片は肉眼では検出されず、異なる分子量のDNA断片が多数増幅された(第5図)。一方、ユリ科以外の植物では、DNA断片が多数増幅されたものの、期待される約1kbpのDNA断片は全く増幅されなかった(第6図)。

2. PCR-Southern Hybridization

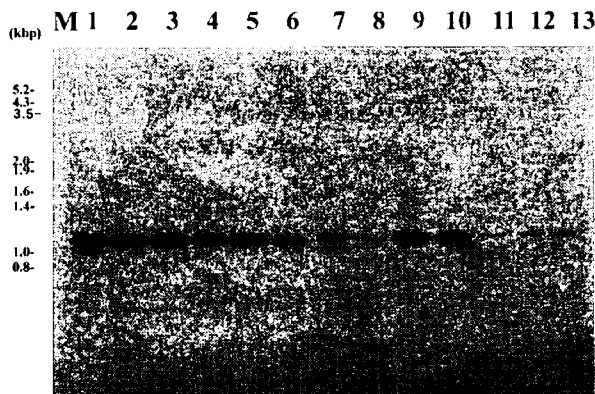
PCRによる増幅DNA産物が、アリイナーゼ遺伝子断片であることを確認するため、赤タマネギ'早生湘南レッド'のアリイナーゼcDNAクローンであるAlli-1A(北ら2002)をプローブにサザンブロットを行った。その結果、供試したすべてのユリ科植物のPCR産物に、期待される約1kbpの増幅DNA断片が検出された(第7図)。これに対して、他の植物ではAlli-1Aとハイブリダイズするバンドは全く検出されなかった(データ未記載)。そこで、シグナルが検出されたヤマユリ、ハナニラ及びキガンチウムから該当するDNA断片をクローニングし、その塩基配列を調べたところ、赤タマネギ'早生湘南レッド'のアリイナーゼ構造遺伝子断片といずれもDNAレベルで80~95%の高い相同性が認められ、アリイナーゼの構

造遺伝子断片であることが確認された。なお、イントロン領域の相同性は、70~82%とエキソン領域の85~92%に比べ明らかに低い値を示すなど、種間における構造変異が検出された(第8図)。

考 察

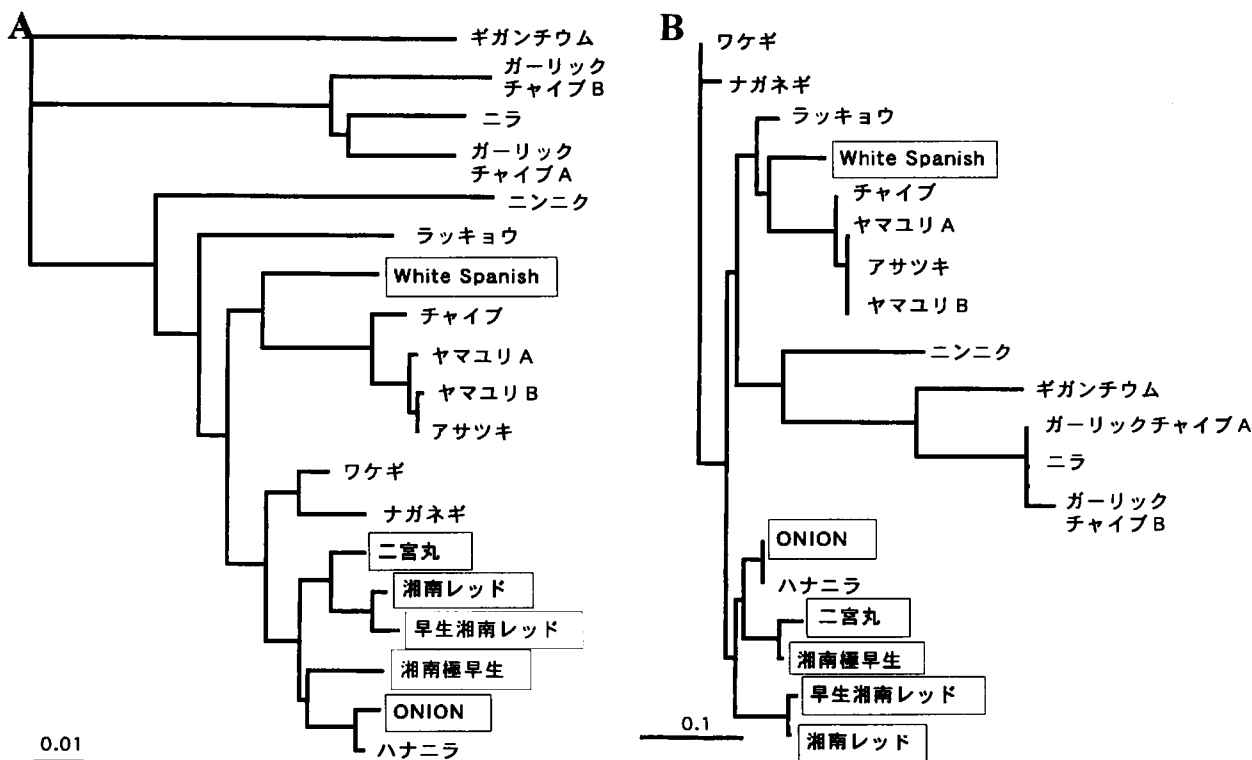
本研究において、本県育成品種‘早生湘南レッド’の葉から抽出した全DNAを鋳型にアライナーゼ構造遺伝子の部分断片を安定して検出できるプライマー及びそれらを用いたPCR条件が明らかになった。本手法を用いることにより、他のタマネギ品種及びユリ科植物からもアライナーゼ遺伝子が検出され、本手法の有効性が確認された。

これまで、アライナーゼの基質となるアリインや含硫化合物に関しては、食用となるネギ属植物だけでなく(Lancaster and Boland 1990)、観賞用の複数のユリ科植物からも検出されている(Tsuno 1958, Lancasterら 2000b)。今回の研究では、主要なユリ科植物にアライナーゼ遺伝子が存在することが明らかになり、タマネギの「香味」と「酵素」の関係が、少なくとも他のネギ属植物にもあてはまることが明らかになった。



第7図 ユリ科植物のPCR増幅DNA断片とアライナーゼcDNAクローンとのサザンハイブリダイゼーション

ユリ科植物の葉から抽出された全DNAを鋳型にALF2-ALR1プライマーセットを用いたPCRにより増幅されたDNA断片(第5図)をナイロンメンブレンに転写し、プローブにはアライナーゼcDNAクローン「Alli1A」を用いた。M:マーカー, 1:‘早生湘南レッド’, 2:ワケギ, 3:ナガネギ, 4:チャイブ, 5:アサツキ, 6:ラッキョウ, 7:ニンニク, 8:ニラ, 9:ガーリックチャイブ, 10:キガンチュム, 11:アガパンサス, 12:ハナニラ, 13:ヤマユリ



第8図 ユリ科植物におけるアライナーゼ部分塩基配列による系統樹

NJ法により解析した。タマネギ品種は四角で囲っている。‘ONION’はGlipinらが単離したタマネギゲノミッククローンを示す。A:アライナーゼ検出用プライマーALF2-ALR1で増幅した領域の塩基配列を基に作成した系統樹。B:第4イントロンに相当する領域の塩基配列を基に作成した系統樹。

ユリ目植物は進化上古い生物で、その分岐点は4000～5000万年前にさかのぼるといわれている。(999)また、ネギ属をユリ科(Liliaceae)に分類するか、ヒガンバナ科(Amalliliaceae)にするか等分類学的にまだ議論が続いている。今回「ユリ科」植物に広くアリイナーゼ遺伝子が存在していることは、分類学的知見にも貢献出来ると考えられる(第8図)。

タマネギ全DNAを鋳型にアリイナーゼcDNAクローンをプローブに用いたゲノミックサザンハイブリダイゼーションにより、これまで報告されていたニンニク(Van Dammeら 1992)及びニラ(Manabeら 1998)において葉から単離したcDNAクローンを鋳型に行ったゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果と同様、複数のバンドが検出された(第4図)。このことから、アリイナーゼは、少なくともネギ属植物において、マルチジーンファミリーを形成していることが示された。また、タマネギにおける染色体地図作成(Kingら 1998)の結果からも、複数のアリイナーゼ遺伝子座の存在が示唆されていることから、今後、赤タマネギ育種を進める上で、辛味に与するアリイナーゼ遺伝子座の数に注目した解析が重要となるものと思われる。

全ゲノムからのPCRによる構造遺伝子の検出は、ゲノムサイズの大きい植物からも簡易に目的とする遺伝子配列を検出できるが、実際には発現していない偽遺伝子(pseudogene)も検出してしまう可能性がある。そのため、PCRだけでは目的遺伝子を検出したとは言いきれず、やはり信頼性を追求するためにはPCR-Southern法等を行い、確実に目的とする遺伝子を検出したことを確認することは必須条件であると思われる。

以上、本研究により、アリイナーゼ遺伝子断片を特異的に検出できるプライマー組合せ、ALF2-ALR1、が開発され、これを用いたPCRにより複数の植物種の全DNAからアリイナーゼ遺伝子断片を特異的に、かつ安定して検出できることが明らかになった。また、アリイナーゼcDNAクローンをプローブに用いることにより、各種植物におけるアリイナーゼ遺伝子の存在状況とその多様性も明らかになった。今後、'早生湘南レッド'の改良育種を進める上においても、機能性を有する含硫化合物としてのアリイン及びアリイナーゼによるその加水分解産物であるアリシンに注目した改良など、新たな育種の展開が可能となるものと期待される。

引用文献

- Arumuganathan,K. and Earle,E.D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mpl. Biol. Rep.* 9:208-218.
- Augusti,K.T. 1990. Therapeutic and medical values of onion and garlic. p93-108 In: H.D.Rabinwitch and J.L.Brewster (eds.). *Onions and Allied Crops*, Vol.III, CDC Press, Boca Raton, Florida.
- Block,E. 1985. The chemistry of onion and garlic. *Scientific American.* 252:94-99.
- Block,E. 1992. The organosulphur chemistry of the *Allium* - implications for the organic chemistry of sulphur. *Angew. Chem. Intl.Ed. Engl.* 31:1135-1178.
- Cavallito,C.J. and Bailey,J.H. 1944. Allicin, the Antibacterial Principle of *Allium sativum*. I. Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action. *J. Am. Chem. Soc.* 66:1950-1951.
- Clark,S.A. 1993. Molecular cloning of a cDNA encoding alliinase from onion (*Allium cepa* L.). PhD Dissertaton. University of Canterbuly, Christchurch. New Zealand.
- Dubouzet,J.G and Shinoda,K. 1999. Relationships among old and New World *Alliums* according to ITS DNA sequence analysis. *Theor. Appl. Genet* 98:422-433
- Engels,B. 1992. Amplify for Analyzing PCR Experiments. version 1.2. University of Wisconsin, Genetics. Madison, WI 5376.
- Fujita,M., Endo,M. and Sano,M. 1990. Purification and characterization of Alliin Lyase from Welsh Onion, *Allium fistulosum* L. *Agric. Biol. Chem.* 54:1077-1079.
- Gilpin,B.J., Leung,D.W. and Lancaster,J.E. 1996. Nucleotide sequence of a nuclear clone of alliinase (accession no.L48614) from onion (PGR 95-125). *Plant Physiol.* 110:336.
- Jacobsen,J.V., Yamaguchi,M., Mann,L.K., Howard,F.D. and Bernhard,J.V. 1968. An alkyl-cysteine sulphoxide lyase in *Tilbaggia violacea* and its relation to other alliinase-like enzymes. *Phytochemistry* 7:1099-1108.
- King,J.J., Bradeen,J.M., Bark,O., McCallum,J.A. and Havey,M.J. 1998. A low-density genetic map of onion reveals a role for tandem duplication in the evolution of an extremely large diploid genome. *Theor. Appl. Genet.* 96:52-62.
- 北 宜裕・柳下良美・大矢武志・道券秀雄・河田隆弘・上西愛子・野村 研. 2002. RT-PCRによる植物有用遺伝子のcDNAクローニングと育種への応用. *神奈川農総研報*142:37-48.
- Lancaster,J.E. and Collin,H.A. 1981. Presence of alliinase in isolated vacuoles and alkyl cystein sulphoxides in the cytoplasm of bulbs in onion (*Allium cepa*). *Plant Sci. Lett.* 22:169-176.
- Lancaster,J.E. and Boland,L. 1990. Flavor Biochemistry. P33-72 In: H.D.Rabinwitch and J.L.Brewster (eds.). *Onions*

- and Allied Crops, Vol.III, CDC Press, Boca Raton, Florida.
- Lancaster, J.E., Shaw, H.L., Joyce, M.D.P., McCallum, J.A. and McManus, M.T. 2000a. A novel alliinase from onion roots. Biochemical characterization and cDNA cloning. *Plant Physiol.* 122:1269-1280.
- Lancaster, J.E., Shaw, M.L. and Walton, E.F. 2000b. S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides, alliinase and aroma in *Leucocoryne*. *Phytochemistry* 55:127-130.
- Landshuter, J., Lohmuller, E.M. and Knobloch, K. 1994. Purification and characterization of a C-S-Lyase from ramson, the wild garlic *Allium ursinum*. *Planta Med.* 60:343-347.
- Lohmuller, E.M., Landshuter, J. and Knobloch, K. 1994. On the isolation and characterization of C-S-lyase preparation from leek, *Allium porrum*. *Planta Med.* 60:337-342.
- Mage, R.D.M. 1997. Tree View for Macintosh (Power PC) version 1.4. Division of Environmental and Evolutionary Biology. IBLS, University of Glasgow.
- Manabe, T., Hasumi, A., Sugiyama, M., Yamazaki, M. and Saito, K. 1998. Alliinase (S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide lyase) from *Allium tuberosum* (Chinese chive). purification, localization, cDNA cloning and heterologous functional expression. *Eur. J. Biochem.* 257:21-30.
- Mazelis, M. and Crews, L. 1968. Purification of the alliin lyase of garlic, *Allium sativum* L. *Biochem. J.* 108:725-730.
- Nock, L.P. and Mazelis, M. 1987. The C-S lyases of higher plants: direct comparison of the physical properties of homogeneous alliin lyase of garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*). *Plant Physiol.* 85:1079-1083.
- Rabinkov, A., Zhu, X.Z., Graf, G. and Mirelman, D. 1994. Alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*): biochemical characterization and cDNA cloning. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48:149-171.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.
- Tobkie, H.E.Jr. and Mazelis, M. 1979. Alliin lyase: preparation and characterization of the homogeneous enzyme from onion bulbs. *Arch. Biochem. Biophys.* 193:150-157.
- Tsuno, S. 1958. The nutritional value of *Allium* plants. XVII. Formation of S-{2-[N-(2-methyl-4-amino-5-pyrimidylmethyl)formamido]-5-hydroxy-2-pentene-3-yl} allyl disulphide with *Ipheion unifrum*. *Bitamin* 14:665-670.
- Van Damme, E.J.M., Smeets, K., Torrekens, S., Van Leuven, F. and Peumans, W.J. 1992. Isolation and characterization of alliinase cDNA clones from garlic (*Allium sativum* L.) and related species. *Eur. J. Biochem.* 209:751-757.