

平成22年 6月14日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380194
 研究課題名（和文） 巨大DNAを効率良く導入するマイクロキャリアの開発と導入領域の分子細胞学的解析
 研究課題名（英文） DEVELOPMENT OF MICROCARRIER FOR INTRODUCING LARGE DNA EFFICIENTLY AND MOLECULAR CYTOLOGICAL ANALYSIS OF ITS INTRODUCED REGION
 研究代表者
 向井 康比己（MUKAI YASUHIKO）
 大阪教育大学・教育学部・教授
 研究者番号：30110795

研究成果の概要（和文）：マイクロビーズを用いてコムギの穀粒品質に関わる遺伝子群を含む巨大DNA断片をイネの細胞へ導入する技術を開発した。本形質転換法では特別なプロモーターやバイナリーベクターの構築を必要としない。得られたイネの形質転換植物において、コムギ遺伝子が正常に発現し、後代に安定して伝わることを明らかにした。コムギ由来の巨大DNA断片のイネゲノム内での位置情報はFISHやファイバーFISH法で可視化された。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel system that introduced large DNA fragments of wheat including the gene cluster related to grain hardness into rice by the use of bioactive beads-mediated transformation. This transformation method does not require the special promoter and the construction of binary vectors. The fragments of wheat genome DNA were stably transmitted to offspring and the transgenes were normally expressed in transgenic rice. The location of large DNA fragments of wheat and the transgenes in rice genome were made visible by FISH and fiber FISH methods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：巨大DNA、形質転換、穀粒品質遺伝子、共導入、バイオアクティブビーズ、人工染色体、FISH法、可視化

1. 研究開始当初の背景

(1) 食料・環境問題は我が国において今後最も重要となる課題のひとつである。新しい形質・機能を備えた新植物の創製は食糧確保と環境保全に取り組むために必要不可欠な基

盤になると考えられており、植物の分子育種技術はめざましい発展を遂げ、従来、何十年もの歳月を要してきた植物育種は急激に加速されることとなった。

(2) アグロバクテリウム法、パーティクルガ

ン法、エレクトロポレーション法など従来の形質転換技術が全て欧米の特許のため、組換え植物の実用化においていろいろと制約があったので、欧米の持つ基本特許に抵触しない遺伝子導入技術の開発が期待されていた。その1つであるバイオビーズを用いた形質転換法は、福井らにより開発され、その成果が出始めていた。

(3) 有用遺伝子群を含む巨大 DNA 断片を効率良く別のゲノムに導入することは、新規形質転換生物を作成するのに必須であるばかりでなく、ゲノム融合させた細胞内のゲノムの動態を解析するのにも重要であると考えられていた。

(4) 巨大 DNA を入れる試みは、世界的に見ても数研究室で行われているだけであり、いずれもアグロバクテリウム法を用いている。この方法だと、導入 DNA 断片が複雑なリアレンジメントが頻繁に起こることを我々が報告していた。導入ゲノムを可視化するための基本的技術である染色体 FISH やファイバー FISH に関する研究は、本研究チームの2研究室(大阪教育大、大阪大)が世界をリードしており、これまで数多くの新技術、新知見を報告してきた。

(5) 我が国独自の技術であるバイオビーズを用いた遺伝子導入による分子育種技術がイネのみならず、他の生物にも波及することが期待された。本法により、一つ一つの遺伝子に発現のために必要な領域を付加する煩雑性も軽減され、人工染色体を用いて一度に多くの有用遺伝子を導入することができるため、短期間に多様な研究材料を作製することができるようになると考えられた。それにより、遺伝子の大きさや選択マーカの数などに制約されることなく様々な生物を用いた研究領域が開拓されると予想された。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、マイクロビーズを用いた巨大 DNA 断片の新規形質転換システムの開発および導入 DNA 分子のゲノム内動態の分子細胞学的解析を目的とする。

(2) そのために、既に開発した巨大 DNA の細胞への導入技術をもとに、より効率的な形質転換法を開発し、併せて外来の巨大 DNA 断片のレシビエントゲノム内での位置情報を可視化による解析を行い、さらにそれらの巨大 DNA の核内での動態を把握し、形質発現との関連を明らかにする。

(3) 具体的には、イネ細胞を対象としてコムギの穀粒品質に関わる遺伝子群を含む巨大 DNA 断片を導入するための大容量マイクロキャリアを自由に構築・操作する技術を開発する。

(4) 導入した外来の巨大 DNA がゲノム内のどこに、どのような状態で組み込まれているか

という情報を、染色体およびファイバー FISH 法で把握する。マイクロビーズ法による導入 DNA 断片のゲノム構造を明らかにし、外来遺伝子の発現が染色体上の導入場所によって違いがあるかどうか調べる。

(5) 導入した巨大 DNA の核内における3次元的な局在解析や動態解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 本実験では、タルホコムギ由来のコムギ粉硬質・軟質に関する遺伝子群 (puroindoline-a, puroindoline-b, GSP-1)、種子貯蔵タンパク質遺伝子 (LMW および HMW グルテニン、グリアジン-D1) を含むバイナリー BAC (バクテリア人工染色体) クローンを用いた。これらの巨大 DNA のクローンはカナマイシン耐性遺伝子をもつので、イネに効率良く導入できる、バイオビーズ法に適した選択マーカ (ハイグロマイシン耐性) をもつ BAC ベクターにつなぎかえる。

(2) イネ (日本晴) プロトプラストを対象に 100kb サイズの巨大 DNA クローンを効率良く導入するための条件として、アルギン酸カルシウムのサイズ、粘度、加える DNA の量、PEG の濃度などのパラメータについて形質転換効率に対しての最適な組み合わせを検討する。

(3) イネゲノムに導入されたコムギの巨大 DNA 断片やそこに含まれる遺伝子の検出および挙動を FISH 法およびファイバー FISH 法で調べる。コムギゲノムがイネのどの染色体に挿入したかを調べるために、マッピングに必要なイネの染色体 FISH マーカーをイネ BAC ライブラリーから選抜する。研究の初年度ではまだ、バイオビーズ法による具体的な形質転換体が得られないので、これまでアグロバクテリウム法で得た形質転換体を用いてコムギゲノムのイネ細胞中での動態解析および形質発現解析を行った。後半部では新規形質転換体を用いて同様の実験を行った。

(4) 形質転換個体の確認は PCR 法とサザンブロットティングで行い、遺伝子発現はノーザンおよびウエスタンやタンパク質電気泳動、質量分析法で解析した。形質転換体を隔離温室で育て、自殖しホモ個体を選抜した。ホモ個体は FISH により 2 個のシグナルをもつもの選抜することによって得られた。

(5) 連続ゲノム導入は、コムギ puroindoline 系遺伝子をもつ形質転換体に、さらにコムギの貯蔵タンパク質 (LMW グルテニン) 遺伝子を含む BAC を導入し、有用コムギゲノムの蓄積を行った。バイオビーズ法による巨大 DNA の共導入 (マルチゲノム導入) は、複数の巨大 DNA をバイオビーズに包摂し、イネにコトランスフォーメーションすることにより行われた。

(6) バイオビーズ法によって巨大 DNA 断片が

形質転換イネ植物において安定に遺伝するかどうかは、次世代以降の植物 (T3 まで) に対してサザン法および FISH 法で調べた。
 (7) 形質転換イネにおけるコムギ巨大 DNA の核内における 3 次元的な局在解析は、細胞核の標本に対してこれら遺伝子を含む BAC をプローブにした FISH により行った。

4. 研究成果

(1) 有用遺伝子群を含むコムギ巨大 DNA の操作法とベクター開発：コムギ粉硬質・軟質に関する遺伝子群 (puroindoline-a、puroindoline-b、GSP-1) を含む BAC-10 (バクテリア人工染色体、カナマイシン耐性) をバイオビーズ法に適した選択マーカー (ハイグロマイシン耐性) をもつ BAC ベクターにつきかえた (pBI BAC10)。形質転換に適した高純度の DNA は QIAfilter Plasmid Midi キットを用いて調整することができた。
 (2) コムギゲノムのイネへの形質転換システムの確立：イネプロトプラストを対象に 100kb サイズのコムギの巨大 DNA クローンを効率良く導入するための条件として、アルギン酸カルシウムのサイズ、粘度、加える DNA の量、PEG の濃度などのパラメータについて形質転換効率に対しての最適な組み合わせを見いだした。

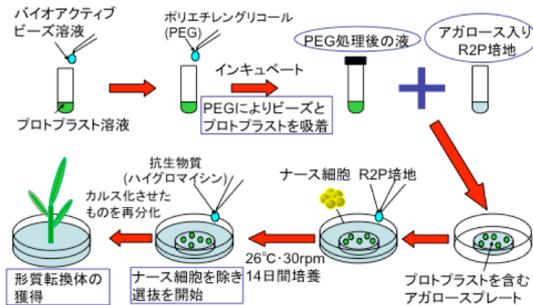


図 1 コムギ巨大 DNA のイネへの形質転換方法

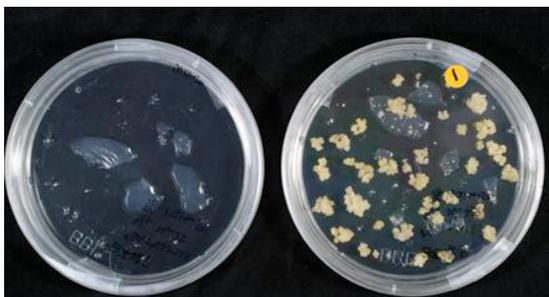


図 2 形質転換イネのカルス (右)

(3) コムギの巨大 DNA をもつ形質転換イネの作出とその特性：バイオビーズ法を用いて複数のコムギ遺伝子を含む約 100 kb の巨大 DNA を導入した 20 個体の形質転換イネの作出に成功した。得られた形質転換体の内、9 個体

にはコムギ粉硬質・軟質性に関する遺伝子群が含まれている BAC が導入されており、導入遺伝子の存在は、導入遺伝子をターゲットとした PCR、サザンハイブリダイゼーションにより確認した。PCR 解析の結果は、導入遺伝子の存在と共に、巨大 DNA の中でいくつかの再編成が起きていることを示唆した。一方で、サザンハイブリダイゼーションの結果は、すべての形質転換体で低コピーの遺伝子導入が起きていることを示唆した。これらの結果は、バイオビーズ法を用いた巨大 DNA 断片の導入による形質転換イネの作出が可能であること、また本手法が低コピーの遺伝子導入を可能とする手法であることを示した。得られた形質転換体のうち、1 個体では後代で抗生物質耐性をマーカーとした分離解析を行い、導入遺伝子をホモにもつ個体を得た。ホモ個体は FISH により確認した。

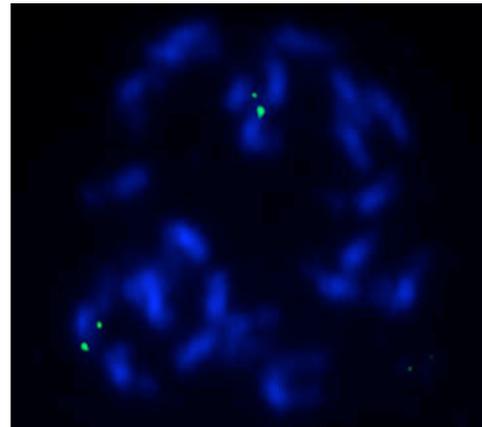


図 3 イネの形質転換体 (ホモ個体) におけるコムギゲノムの FISH 法による検出

このホモ個体において導入遺伝子の発現を RNA レベル、タンパク質レベルで解析した。両レベルで導入遺伝子の 1 つである puroindoline-b 遺伝子の発現を検出した。一方で、もう一つの導入遺伝子の 1 つである GSP-1 遺伝子についてはその発現を確認することができなかった。また、バイオビーズ法でコムギの穀粒品質 (穀粒硬度) に関わる遺伝子 (puroindoline b および GSP-1) をもつ巨大 DNA 断片を導入したイネの形質転換体の次世代植物 (T1) の形質を調査したところ、コムギ DNA 導入によるマイナス効果は見られなかった。

(4) バイオビーズ法により巨大 DNA のマルチ導入の実験：穀粒硬度に関わる遺伝子群の他に、製パン性に関する HMW グルテニン、LMW グルテニン、グリアジン遺伝子をバイオアクティブビーズ法で複数同時に導入 (共導入) する実験 (マルチゲノム導入) を行った。1 組み合わせにおいて puroindoline a 遺伝子と LMW グルテニン遺伝子が導入されている系統が得られたが、他の 8 組み合わせにおいて

は再分化までいたる形質転換体を得ることはできなかった。しかし、共導入に成功した次世代の植物に対して FISH 法で両遺伝子を可視化したところ、LMW グルテニン遺伝子のみが検出され、puroindoline a は検出できなかった。これらのことは共導入した巨大 DNA の不安定さを示すもので、今後の改良が望まれる。

(5) 形質転換イネにおける導入 DNA 断片の安定性：バイオアクティブビーズ法によって導入された巨大 DNA 断片について形質転換イネの後代植物 (T1、T2、T3) に対してサザン法および FISH 法で調べたところ、導入 DNA の消失や再編成は起きていなかったため、T1 以降は安定的に遺伝することが証明された。

(6) コムギゲノムのイネへの形質転換システムの効率化：マイクロビーズを用いた巨大 DNA 断片の新規形質転換システムをより効率的に改良するために、今までの 10 分の 1 のスケールで形質転換実験を行う系を開発した。スケールを小さくして導入実験を行っても細胞の生存率や形質転換効率にほとんど影響がないことを示す結果が得られたので、植物細胞に対してさらに効率的な巨大 DNA の導入が可能になる。

(7) 形質転換イネにおける導入 DNA 断片の核内における 3 次元的解析：形質転換イネ核内におけるコムギのデンプン合成に関わる遺伝子 (*Dbe-1*) や貯蔵タンパク (LMW グルテニン) 遺伝子、*Ha* 座位の遺伝子の動態を 3 次元で解析した。細胞核の標本に対してこれらの遺伝子を含む BAC をプローブにして FISH を行ったが、核内の特定のドメインに存在するかどうかは確定できなかった。形質転換イネにおいて、*Ha* 座位に関する遺伝子発現はみられたものの、共導入した貯蔵タンパク (LMW グルテニン) 遺伝子の形質発現がみられなかったため、コムギ巨大 DNA の細胞内における動態解析を行った。導入した巨大 DNA のメチル化やヒストンタンパク質におけるアセチル化、リン酸化など修飾との関連は見いだせなかった。



図 4 *Ha* 座位 3 遺伝子を集積した系統の穂

(8) *Ha* 座位に関する 3 遺伝子を集積系統の開発とその特性：バイオビーズ法で得られた *pinB* と *GSP-1* の 2 つのみをもつ系統とアグロバクテリウムで得られた *pinA* と *GSP-1* のみ

をもつ系統を交配して、*Ha* 座位に関して *pinA*、*pinB*、*GSP-1* の 3 つの遺伝子が揃った系統を得た。多重遺伝子の中で特定の遺伝子が欠失したものや組み合わせの種類または重複によって、遺伝子発現がどう変わるかを調査した。コムギの *pinA* や *pinB* が加わることで、非形質転換イネと比べて胚乳の中央部が白濁し、可視的な構造の変化が見られた。

(9) これまで得られた形質転換イネにおいて、イネのどの染色体にコムギゲノムが挿入されたかを染色体マーカーとともに、多色 FISH 法で調べた。導入染色体はイネの 12 組染色体のうち、2、3、4、6、8、10 染色体のいずれかであることが推定された。

(10) 本研究で開発した巨大な DNA のデリバリーシステムは、バイナリーベクターの構築を必要とせず、また、標的遺伝子を含む人工染色体を用いることで遺伝子発現のための特別なプロモーターを必要としないので、独創的であるとともに、多様な生物に応用することができる。

(11) 巨大 DNA 断片を用いる意義は、農業的に有用な遺伝子群が染色体上にタンデムに並んでいる場合が多いことと、プロモーターもオーセンティックなものをそのまま利用できることである。そのため大容量マイクロキャリアを自由に構築・操作する技術はこれを機にますます発展すると予想され、実際の育種や遺伝子治療において必須の技術として期待されよう。

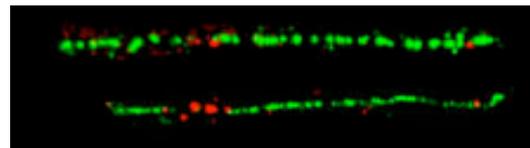


図 5 ファイバー-FISH 法による導入コムギ DNA 断片 (緑) および *Ha* 座位遺伝子 (赤) の可視化

(12) イネゲノムに導入されたコムギの巨大 DNA 断片やそこに含まれる遺伝子の検出および挙動を調べることはこの研究のもう 1 つの独創的な点である。これまで、形質転換体の実験はイネやアラビドプシスを用いて多く行われてきたが、トランスジーンがある植物に導入された場合、どこにどれだけ入ったか、そしてその位置がトランスジーンが発現にどのように影響するかという研究はほとんど行われてこなかった。ファイバー-FISH 法で遺伝子を DNA 上で線状に検出する場合は 1 次元可視化と呼び、トランスジーンの数やコピー数が明らかになる。2 次元可視化とは従来の FISH 法のように中期染色体核板上にその位置を検出した場合で、導入された染色体が明らかにされる。核内における遺伝子やゲノムの空間的な配置を検出する場合は

3次元可視化と呼ぶ。多次元可視化による本研究の解析は、導入した外来ゲノムの様々な次元の動態を FISH 法により視覚化したことで、非常にユニークあるといえよう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Wada N., Kajiyama S., Cartagena J.A., Lin L., Akiyama Y., Otani M., Suzuki G., Mukai Y., Aoki N., Fukui K., The effects of puroindoline b on the ultrastructure of endosperm cells and physicochemical properties of transgenic rice plant, *Journal of Cereal Science*, 査読有り, Vol.51, 2010, 182-188
- ② Mukai Yasuhiko, New frontiers of chromosome sciences for sustainable agriculture, *Advances in Chromosome Sciences*, 査読有り, Vol.3, 2009, pp.25-29
- ③ Wada N., Kajiyama S., Akiyama Y., Otani M., Shimada T., Suzuki G., Mukai Y., and Fukui K., Transformation of rice with high molecular weight DNAs using bio-active beads method, *Advances in Chromosome Sciences*, 査読有り, Vol.3, 2009, pp.206-207
- ④ Wada N., Kajiyama S., Akiyama Y., Kawakami S., No D., Uchiyama S., Otani M., Shimada T., Nose N., Suzuki G., Mukai Y., and Fukui K., Bioactive beads-mediated transformation of rice with large DNA fragments containing *Aegilops tauschii* genes, *Plant Cell Report*, 査読有り, Vol.28, 2009, 759-768
- ⑤ Yamamoto Maki, Mukai Yasuhiko, Extended DNA fiber FISH in plants: Visible messages from cell nuclei, *Nucleus*, 査読有り, Vol.50, 2007, 439-452

[学会発表] (計9件)

- ① 和田直樹、Bioactive beads-mediated transformation of rice with large DNA fragments containing *Aegilops tauschii* hardness genes, *Plant & Animal Genome XVIII*, 2010年1月11日、Town & County Hotel, San Diego
- ② 鈴木剛、コムギ硬軟質に関わる friabilin 関連遺伝子群のイネへの導入と蓄積、日本育種学会第116回講演会、2009年9月26日、北海道大学
- ③ 向井康比己、チガヤ花粉はムギ類のどのゲノムに対して半数体を誘発するか、日本育種学会第116回講演会、2009年9

月26日、北海道大学

- ④ 向井康比己、New frontiers of chromosome sciences for sustainable agriculture, *The 3rd Asian Chromosome Colloquium*, 2008年12月3日、大阪大学
- ⑤ 和田直樹、Transformation of rice with high molecular weight DNAs using bio-active beads method, *The 3rd Asian Chromosome Colloquium*, 2008年12月3日、大阪大学
- ⑥ 向井康比己、分子細胞遺伝学の進展-FISH法とGISH法、日本育種学会第114回講演会シンポジウム、2008年10月12日、滋賀県立大学
- ⑦ 和田直樹、バイオアクティブビーズ法によるハードネス遺伝子群導入イネの作出、日本育種学会第114回講演会、2008年10月12日、滋賀県立大学
- ⑧ 和田直樹、Development of a new plant transformation system with large DNAs using bioactive beads methods, *The 1st international global COE symposium on Bio-Environmental Chemistry*, 2008年1月28日、Hotel Hankyu EXPO Park Osaka
- ⑨ 和田直樹、バイオアクティブビーズ法によるコムギ有用遺伝子群を含む巨大DNAのイネへの導入、大阪大学イノベーションセミナー2007、2007年10月22日、大阪大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向井 康比己 (MUKAI YASUHIKO)
大阪教育大学・教育学部・教授
研究者番号：30110795

(2) 研究分担者

福井 希一 (FUKUI KIICHI)
大阪大学・工学研究科・教授
研究者番号：00311770