

令和 5 年 5 月 6 日現在

機関番号：34316

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21318

研究課題名（和文）園芸植物における長期安定発現を目的としたDNAメチル化抵抗性プロモーターの開発

研究課題名（英文）Development of DNA methylation-resistant promoter for long-term stable expression in horticultural plants

研究代表者

三柴 啓一郎（Mishiba, Kei-ichiro）

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号：70390888

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は非モデル植物の外来遺伝子発現を安定させるDNAメチル化抵抗性プロモーターの開発を目的に、35Sプロモーター配列のDNAメチル化誘導機構の解明を試みた。

種々の改変35Sプロモーター配列をシングルコピーで導入した組換えリンドウやタバコを作出し、DNAメチル化解析を行った。その結果、35Sエンハンサー領域内の214塩基の重要性が確認された。さらに、非改変35SプロモーターではDNAメチル化の誘導がみられないタバコにおいて、転写活性の喪失によるDNAメチル化の誘導が確認された。これらの知見により2種間に共通したDNAメチル化誘導機構が示唆され、新規プロモーター開発への重要な足掛かりとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

35Sプロモーターはモデル植物で広く利用されている一方で、一部の植物種では期待通りに高発現せず、一定期間後に発現が減衰することが知られている。形質転換が困難な植物種では、潜在的に選抜マーカー遺伝子のDNAメチル化による発現抑制が生じることも指摘されている。このような問題を解決するために、本研究ではDNAメチル化の遮断により遺伝子発現の減衰を防ぐ、という発想に基づいた、DNAメチル化抵抗性プロモーターの開発を目指している。本研究で得られた知見は、外来遺伝子導入における技術革新や、高等植物がウイルスなどの外来のDNA配列に対して、ゲノムの恒常性を維持するための知見獲得につながると考えている。

研究成果の概要（英文）：This study attempted to elucidate the mechanism of the 35S promoter sequence-specific DNA methylation with the aim of developing a DNA methylation-resistant promoter that stabilises foreign gene expression in non-model plants.

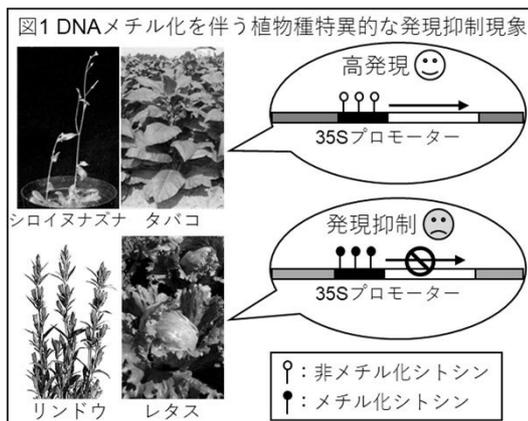
Transgenic gentian and tobacco plant lines with single copies of various modified 35S promoter sequences were generated and analyzed for DNA methylation. The results confirmed the importance of 214 bases within the 35S enhancer region. Furthermore, induction of DNA methylation by loss of transcriptional activity was confirmed in tobacco, where the unmodified 35S promoter did not induce DNA methylation. These findings suggest a common mechanism of DNA methylation induction between the two species and provide an important stepping stone for the development of the DNA methylation-resistant promoter.

研究分野：分子育種学

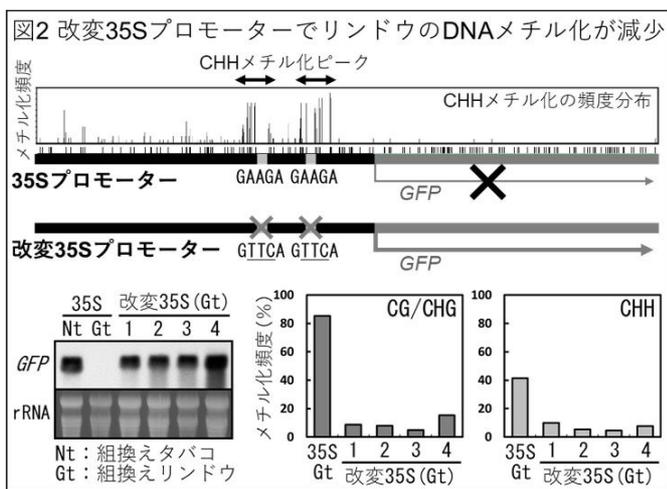
キーワード：DNAメチル化 遺伝子導入 プロモーター リンドウ タバコ

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、植物の形質転換で広く利用されている、カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター配列に特異的な DNA メチル化を伴った発現抑制が、リンドウやレタスで起こることを見出している。この現象はモデル植物のシロイヌナズナやタバコではみられないことから、種特異的な現象であることが推定された(図1)。ここで見出された DNA メチル化誘導現象は、導入遺伝子のコピー数や挿入位置、また RNA を介した DNA メチル化誘導機構に依存しないことから、未知のメカニズムで誘導されている可能性も示唆されている。



研究代表者は 35S プロモーターにおける DNA メチル化の標的配列を探索するために、CHH (H は A か C か T) 配列に着目した。CG や CHG 配列は、一度メチル化されると維持型 DNA メチル化酵素により細胞分裂後もメチル化状態が維持される。一方、CHH 配列はメチル化状態が維持されないため、新規に起こるメチル化のみが反映される。この CHH メチル化の解析により、リンドウやレタスに導入した 35S プロモーターの 2 領域が新規メチル化の標的になることを見出した(図2)。この 2 領域には GAAGA 配列が含まれていたため、これを GTTCA に置換した改変 35S プロモーターをリンドウやレタスに導入したところ、元の 35S プロモーターと比較して DNA メチル化の頻度が減少し、連結した GFP 遺伝子の高発現が確認された(図2)。



2. 研究の目的

35S プロモーターはモデル植物を中心に広く利用されている一方で、レタスやキクなどの植物種では期待通りに高発現せず、ユビキチンやアクチン等のプロモーターで、より安定して高発現が得られることが報告されている。この場合、組換え植物の作出当初は 35S プロモーターでも高発現が観察されるが、一定期間の培養や栽培後に発現が減衰している。このような導入遺伝子の発現が減衰する現象は、潜在的には多くの植物種で起きている可能性がある。組換え植物の開発では外来遺伝子発現の減衰は大きな損失につながることから、35S プロモーター配列において DNA メチル化が生じるメカニズムを解明することは、分子育種において有益な情報をもたらすことが期待される。

また、形質転換が困難な植物種では、リンドウやレタスと同様の発現抑制現象が生じている可能性がある。例えばメキシカンライムでは、薬剤選抜せずに PCR で組換え体を選抜したところ、得られた組換え体の多くで選抜マーカー遺伝子の DNA メチル化が観察された。リンドウでは 35S プロモーターで生じた DNA メチル化が近傍領域にまで拡大した結果、マーカー遺伝子の DNA メチル化と発現抑制がみられた。したがって、組換え体の作出が困難な植物種では、マーカー遺伝子の発現抑制がその要因になっている可能性がある。

このように非モデル植物では、遺伝子導入が困難なことや、導入遺伝子の発現が減衰することがしばしば問題になる。これらの問題を解決するために、本研究では DNA メチル化の遮断により遺伝子発現の減衰を防ぐ、という発想に基づいた、DNA メチル化抵抗性プロモーターの開発を目指した。そのための基礎的な知見を得るために、本研究では、35S プロモーター配列における DNA メチル化の誘導機構について、様々な角度から検証を行った。

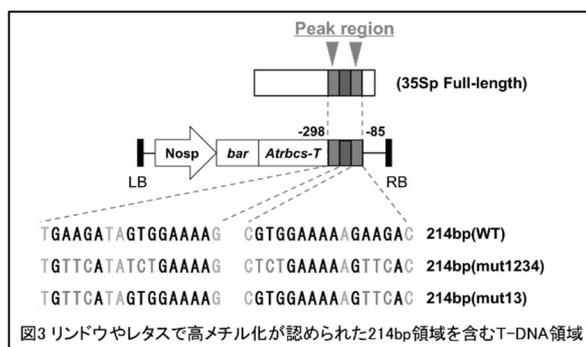
3. 研究の方法

本研究では、様々な改変 35S プロモーター配列を含む T-DNA コンストラクトを持つバイナリーベクターをアグロバクテリウム EHA101 株に導入し、これらのアグロバクテリウム株を用いたリーフディスク法により、リンドウ (*Gentiana triflora* × *G. scabra* cv. Polano-White)、あるいはタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. SR-1) に形質転換した。獲得した組換え植物体は、タバコは 25 長日条件下、リンドウは 16 短日条件下で、MS 寒天培地にて無菌培養した。

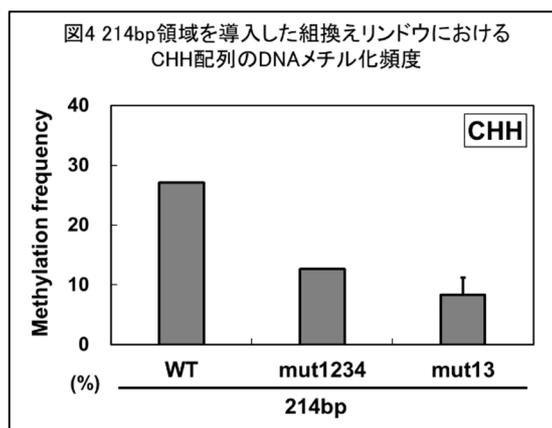
組換え植物の葉組織からの DNA 抽出は、Plant Genomic DNA kit (TIANGEN) を用いて行った。抽出したゲノム DNA は、サザンブロット解析やバイサルファイト法による DNA メチル化解析に供試した。サザンブロット解析は DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) のプロトコルに従って、ハイブリダイゼーションや検出を行った。バイサルファイト法では、ゲノム DNA を、制限酵素 *DraI* で切断し、Wizard DNA Clean-Up キット (Promega) を用いて DNA を精製した。この精製 DNA について、EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN) を用いてバイサルファイト処理を行った。バイサルファイト処理 DNA は、リンドウやレタスで高メチル化が確認された 35S プロモーターの 214bp 領域を特異的に増幅するプライマーを用いて PCR 増幅した。PCR 産物を pZErO-2 ベクター (Thermo Fisher Scientific) にクローニングし、シーケンス解析を行った。シーケンスデータは MEGA を用いて整理化して、メチル化シトシンの数を集計した。

4. 研究成果

本研究は、非モデル植物における 35S プロモーターの DNA メチル化誘導機構を明らかにし、その知見を DNA メチル化抵抗性プロモーターの開発にフィードバックすることを目的として行った。DNA メチル化誘導に影響を及ぼす領域やそのメカニズムを推定するために、本研究ではリンドウやレタスで高メチル化が認められた 214bp 領域のみ [214bp(WT)]、あるいはこの 214bp 領域に変異を導入した配列 [214bp(mut13)、214bp(mut1234)] を含む T-DNA を持つバイナリーベクター (図 3) と、35S プロモーターの基本転写領域 (-90~-1) を欠失させた、あるいは転写活性に必要とされる *as-1* エlement を 4 塩基置換することで転写活性化能を抑制させた改変 35S プロモーター (それぞれ core、*as-1* とする) に *sGFP* 遺伝子コード領域を連結したコンストラクトを含む T-DNA 領域を持つバイナリーベクターを構築し、アグロバクテリウムに導入した。これらのアグロバクテリウム系統を用いて、リンドウやタバコへの形質転換を行った。その結果、リンドウでは 214bp(WT) を導入した 11 系統、214bp(mut1234) を導入した 9 系統、214bp(mut13) を導入した 10 系統の組換え植物を作出した。組換え植物の葉組織よりゲノム DNA を抽出してサザンブロット解析を行い、導入された T-DNA のコピー数を調査した。その結果、214bp(WT) で 1 系統、214bp(mut1234) で 1 系統、214bp(mut13) で 4 系統がシングルコピーであると推定されたため、これらの系統を DNA メチル化解析に供試した。タバコでは 214bp(WT) で 100 系統、214bp(mut1234) で 75 系統、core で 15 系統、*as-1* で 74 系統の組換え植物を得た。このうち、214bp(WT) で 31 系統、214bp(mut1234) で 19 系統、core で 6 系統、*as-1* で 33 系統よりゲノム DNA を抽出し、サザンブロット解析を行った。その結果、214bp(WT) で 3 系統、214bp(mut1234) で 5 系統、core で 3 系統、*as-1* で 4 系統がシングルコピーであると推定されたため、これらの系統を DNA メチル化解析に供試した。



組換えリンドウのシングルコピー系統における DNA メチル化解析は、214bp(WT) の #3 系統、214bp(mut1234) の #3 系統、また 214bp(mut13) の #1、#4、#5 系統について、バイサルファイト処理を行った DNA をテンプレートとして、導入した 214bp 領域を PCR 増幅した。得られた PCR 産物をクローニングし、独立したクローンの塩基配列決定を行い、チミンに変換されなかったシトシン配列をメチル化シトシンとみなし、その頻度を求めた。その際、二本鎖 DNA において対称なシトシン配列 (CG/CHG 配列) と、非対称なシトシン配列 (CHH 配列) を区別して解析した。図 4 は、214bp(WT)、214bp(mut1234)、及び 214bp(mut13) 導入組換えリンドウの CHH 配列におけるメチル化シトシンの頻度を示している。214bp(WT) の #3 系統では、CG/CHG 配列において 34.8%、CHH 配列において 27.1% の頻度で DNA メチル化がみられた。一方、214bp(mut1234) の #3 系統では CG/CHG 配列で 56.2%、CHH 配列で 12.6% の DNA メチル化がみられ、214bp(mut13) では、CG/CHG 配列において平均して 14.3%、CHH 配列において 9.0% の DNA メチル化が認められた (図 4)。CHH 配列の DNA メチル化の分布については、214bp(WT)、214bp(mut1234)、214bp(mut13) とともに、-289 から -241、-148 ~ -85 において比較的高頻度な DNA メチル化が確認された。



本研究による DNA メチル化解析の結果と、当研究室の先行研究で解析された 64bp 領域 (214bp 領域における高メチル化の 2 つのピークのうちの片方を含む -148 ~ -85 の領域) を導入し

た組換えリンドウ系統、 core 導入系統、及び 35S プロモーター全長を導入した系統について、全ての改変 35S プロモーターに共通して含まれる 64bp 領域における CHH 配列の平均 DNA メチル化頻度を比較した。その結果、64bp(WT)で 8.9%、214bp(WT)で 48.2%、214bp(mut1234)で 24.4%、214bp(mut13)で 21.1%、 core で 38.0%、さらに 35S プロモーター全長では 51.4% であり、214bp(WT)、 core、及び 35S プロモーター全長を導入した系統で高頻度の DNA メチル化が誘導されることが明らかとなった。また、64bp 領域において 214bp(WT)導入系統と 214bp(mut1234)および 214bp(mut13) 導入系統を比較すると、214bp(mut1234)では 23.8%の、214bp(mut13)では 27.1%の DNA メチル化頻度の低下が確認された。さらに 214bp(WT)、214bp(mut1234)及び 214bp(mut13)導入系統については、214bp 領域の平均 DNA メチル化頻度についても比較した。その結果、214bp(WT)で 27.1%、214bp(mut1234)で 12.6%、214bp(mut13)では 9.0%となり、214bp(mut1234)では 214bp(WT)導入系統と比較して 14.5%、214bp(mut13)では 18.1%の DNA メチル化頻度の低下が確認された。このように、214bp(mut1234)と 214bp(mut13)で DNA メチル化頻度の低下は同程度であったことから、' GAAGA ' 配列の改変のみで DNA メチル化頻度の低下を引き起こすことが示唆された。

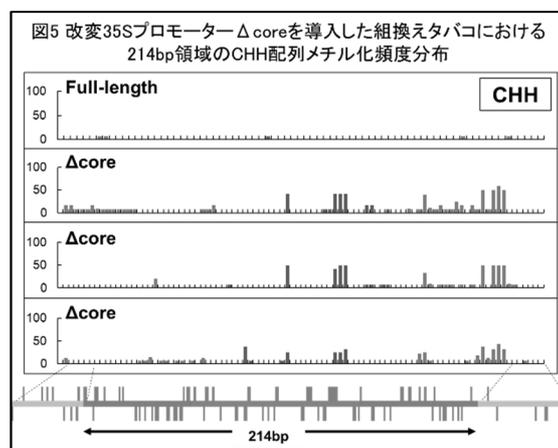
改変 35S プロモーターを含む T-DNA がシングルコピーで導入された組換えタバコにおいても、DNA メチル化解析を行った。214bp(WT)を導入した 3 系統 (#2、#30、#37)と、214bp(mut1234)の 3 系統 (#2、#21、#22) について解析した結果、214bp(WT) 導入系統では CG/CHG 配列で平均 4.7% (#2: 4.8%、#30: 2.1%、#34: 7.3%) の、CHH 配列では平均 2.7% (#2: 1.6%、#30: 1.2%、#34: 5.3%) の頻度で DNA メチル化が認められ、214bp(mut1234) 導入系統では CG/CHG 配列で平均 1.8% (#2: 4.3%、#21: 0.6%、#22: 0.4%)、CHH 配列では平均 1.3% (#2: 3.5%、#21: 0.1%、#22: 0.2%) の DNA メチル化が認められた。CHH 配列の DNA メチル化の分布については、214bp(WT) 系統#37 において、リンドウで高メチル化が認められたピーク領域の一つ (-148~-85) で比較的高頻度な DNA メチル化が確認された。214bp(WT) 系統#2 と#30 においては明確なピークは確認されなかったものの、リンドウでピークのみられた領域 (-298~-241、-148~-85) で DNA メチル化の誘導が確認された。

さらに、35S プロモーターの転写活性と DNA メチル化の誘導との関係性を明らかにするために、 core と *as-1* をシングルコピーで導入した組換えタバコ系統の DNA メチル化解析を行った。 core の 3 系統 (#21-1、#22、#22-3) と *as-1* の 4 系統 (#12、#16、#27、#34) について解析した結果、 core 導入系統では CG/CHG 配列で平均 14.0% (#21-1: 21.4%、#22: 8.8%、#22-3: 11.9%)、CHH 配列では平均 7.8% (#21-1: 9.1%、#22: 6.7%、#22-3: 7.6%) の頻度で DNA メチル化が認められた。CHH 配列の DNA メチル化の分布では、リンドウで認められた CHH 配列の高メチル化の片方のピーク領域 (-148~-85) で、中程度の DNA メチル化が確認された (図 5)。一方 *as-1* 導入系統では、CG/CHG 配列において平均 6.6% (#12: 3.9%、#16: 13.9%、#27: 3.8%、#34: 5.0%) の、CHH 配列においては平均 5.6% (#12: 3.1%、#16: 12.1%、#27: 3.0%、#34: 4.3%) の頻度で DNA メチル化が認められた。

本研究で解析を行った 214bp(WT)、214bp(mut1234)、 core、及び *as-1* を導入した組換えタバコ系統と、当研究室の以前の研究で解析した 35S プロモーター全長を導入した組換えタバコ系統について、214bp 領域における CHH 配列の平均 DNA メチル化頻度を比較した。その結果、214bp(WT)導入系統で 2.7%、214bp(mut1234)導入系統で 1.3%、 core 導入系統で 7.8%、

as-1 導入系統で 5.6%、35S プロモーター全長導入系統で 0.2%の頻度で DNA メチル化が認められた。CHH 配列の DNA メチル化について、214bp(WT)導入系統と 214bp(mut1234) 導入系統を比較すると、214bp(mut1234)で 1.4%の DNA メチル化頻度の低下が確認された。これらの結果から、タバコにおいては 2 つのモチーフの改変が、DNA メチル化頻度の低下を引き起こすことが示唆された。また、35S プロモーター全長を導入した系統に対して、 core 及び *as-1* を導入した系統を比較すると、DNA メチル化頻度が core で 7.6%、 *as-1* では 5.4%増加していることが確認された。

本研究の結果、214bp 配列を導入した組換えリンドウやタバコの DNA メチル化誘導において、2 つのモチーフの重要性が確認され、さらにこれらの植物種間で DNA メチル化誘導の普遍性が示唆された。これまで 35S プロモーターの DNA メチル化誘導が認められないと考えられていたタバコにおいて、転写活性を喪失させた改変 35S プロモーターを導入した系統で DNA メ



チル化の誘導が検出されたことは、DNA メチル化による発現抑制を受けないプロモーターの開発への寄与が期待される重要な知見であると考えます。今後は本知見を基にして、DNA メチル化の誘導とプロモーターの転写活性の関係性について、DNA 結合タンパク質の解析を行うことなどにより DNA メチル化誘導現象の詳細な機構解明を目指すと同時に、DNA メチル化による発現抑制を受けないプロモーターの開発を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kei-Ichiro Mishiba, Kae Nishida, Naoto Inoue, Tomoya Fujiwara, Shunji Teranishi, Yuji Iwata, Satomi Takeda, Nozomu Koizumi	4. 巻 39
2. 論文標題 Genetic engineering of eggplant accumulating -carotene in fruit.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1029-1039
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00299-020-02546-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三柴啓一郎、西田佳永、井上直人、藤原知也、寺西俊滋、岩田雄二、山本涼平、竹田恵美、小泉望
2. 発表標題 -カロテンを果実に蓄積させた遺伝子組換えナス
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田部井豊、七里吉彦、三柴啓一郎、安本周平	4. 発行年 2022年
2. 出版社 国際文献社	5. 総ページ数 413
3. 書名 ひとりではじめる植物バイオテクノロジー入門 組織培養からゲノム編集まで	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------