

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580007

研究課題名(和文) 動原体機能低下系統を利用した半数体育種法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the haploid breeding method using kinetochore malfunction lines

研究代表者

長岐 清孝 (NAGAKI, Kiyotaka)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：70305481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、(1)動原体機能低下系統の作出および(2)動原体機能低下系統を用いた半数体の作出による「動原体機能低下系統を利用した半数体育種法の確立」を計画した。動原体機能低下系統の作出のために「GFP融合CENH3(動原体特異的ヒストンH3)発現コンストラクト」をイネ、ミヤコグサ、シロイヌナズナ、タバコおよびトマトに導入し、シロイヌナズナ、タバコおよびトマトにおいてGFPが動原体に局在する形質転換体を得た。続いてこれらの形質転換体に「内在性CENH3発現抑制コンストラクト」を導入し動原体機能低下系統の作出を試みたが、内在性CENH3の発現が十分に抑制された系統は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, I tried to establish the haploid breeding method using kinetochore malfunction lines. First, plants expressing GFP::CENH3 (centromere specific histone H3) were made by transformations using Arabidopsis, tobacco and tomato for the purpose. Next, RNAi constructs to knock down internal CENH3 were transformed to the plants. Some transformants having these constructs were isolated but expression levels of internal CENH3 in the transformants were as same as these in wild type. These results suggested that RNAi method is not sufficient for the purpose.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：半数体 動原体

1. 研究開始当初の背景

一般的な作物の育種では、耐病性など野生種のもつ有用形質を既存の作物品種に導入するためには、(1)「作物品種」と「近縁野生種」の交配によるF1雑種の作出、(2)F1雑種の自殖によるF2の作出、(3)F2集団における有用形質をもつ個体の選抜、(4)有用形質を固定し純系を作るための、選抜系統同士の8回程度の交配が必要である。このことから、純系の育種には、一年生植物の場合でも約10年、結実までに数年の生育期間を必要とする多年生植物の場合は、結実までの期間の10倍を必要とする。

このような長期の育種期間を短縮するひとつの方法として、「半数体作出」と「その倍加」による「半数体育種法」が用いられてきた。この方法では、F2から純系を作出するまでの期間を1年までに短縮できる。これまでの半数体作出には、(1)花粉または葯培養から半数体を得る「培養法」や(2)特殊な交雑によるゲノム脱落を利用した「交雑法」が用いられてきた。しかし、これらの方法には、いくつかの問題点が指摘されてきた。「培養法」の問題点としては、(1)花粉培養の条件設定が難しく汎用的でないこと、(2)培養過程でソーマクロナル変異が生じてしまうことが挙げられる。一方で、ゲノム脱落が生じる交雑は非常に特殊な現象であり、「交雑法」は実質コムギの育種においてのみ利用可能であった。しかし、「交雑法」は「培養法」と異なり、異数性が生じにくくゲノム単位での脱落による半数体が得やすいという特長をもつ。

近年この「交雑法」に汎用性をもたせるための新しい手法がシロイヌナズナで開発された(Ravi & Chan 2010 Nature 464: 615-619)。この方法では、まず、動原体タンパク質のひとつである「動原体特異的ヒストン H3 (CENH3 と略す)」の欠失変異体に、GFP と連結した CENH3 を導入して機能の低い動原体をもつ「動原体機能低下系統」を作り出した。次に、この系統と野生型系統を交配すると、CENH3 に連結された GFP が CENH3 の機能を部分的に阻害し、この融合タンパク質をもつ「動原体機能低下系統」由来の染色体のみが「野生型 CENH3」との競争に負けて脱落した半数体が得られた。この方法の利点としては、(1) CENH3 は全ての真核生物に存在する動原体タンパク質であり他の植物種においても同法が利用可能であること、(2)「半数体」として残る側のゲノム提供親には改変の必要がないこと、(3)1種の「動原体機能低下系統」を作出すれば、交配可能な全ての種の育種材料として利用できることなどが挙げられる。反面、CENH3 は真核生物にとって必須のタンパク質であり、欠失系統の作出は非常に困難である(実際、我々を含む日、米、独の研究グループが10年以上に渡って単離を試みたが、上記の報告までは欠失系統は得られなかった)ことが、この方法の問題点と

なる。

2. 研究の目的

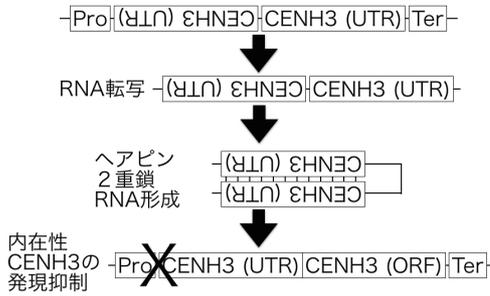
本研究では、「簡便で汎用性のある半数体育種法の確立」を目指し、4種のモデル植物(イネ、ミヤコグサ、シロイヌナズナ、タバコおよびトマト)を用いた半数体育種に利用可能な「動原体機能低下系統」の作出を目的とした。本研究では、「動原体機能低下法」の問題点を克服し、より簡易で汎用性の高い半数体作出法を確立する。まず、問題点解決のため、「欠失系統」ではなく RNA 干渉(RNAi)を利用した「遺伝子発現抑制系統」を用いる。前述のように、CENH3 の欠失系統を得ることは非常に困難であり、多くの作物(特に高次倍数性種)では欠失系統の作出は難しい。そこで、RNAi による遺伝子発現抑制を利用し、どの作物でも汎用的に使える方法を開発する。また、半数体が得られる割合を上げるために、近縁種の CENH3 を利用することにより、より効率的に半数体を作成できる動原体機能低下系統を見いだす。これには、これまでに我々が様々な植物種から単離した CENH3 の情報が利用できる(Nagaki et al. 2004 Nature Genetics 36:138-145, Nagaki & Murata 2005 Chromosome Research 13: 195-203, Nagaki et al. 2005 Plant Cell 17: 3227-3238, Nagaki et al. 2005 Chromosoma 118: 249-257, Ahmet et al. 2010 Chromosome Research 18: 337-347)。

3. 研究の方法

本研究では、各植物分類群の代表であるイネ、ミヤコグサ、シロイヌナズナ、タバコを材料に用い、(1)動原体機能低下系統の作出(上記4種の内在性 CENH3 遺伝子発現を RNAi により抑制すると共に GFP を融合した CENH3 を導入し、動原体の機能を低下させる)および(2)動原体機能低下系統を用いた半数体の作出(動原体機能低下系統と野生型系統の交配により半数体を実際に得る)を計画した。また、本研究の申請後に CENH3 の解析が進み、計画に含まれているタバコと同じナス科植物であり2倍体であることから4倍体タバコに比べて実験系が単純化できるので、トマトを本研究の材料として追加した。

植物種ごとに図1に示した「内在性 CENH3 発現抑制コンストラクト」および「GFP 融合 CENH3 発現コンストラクト」を作製し、アグロバクテリウム法により形質転換した。「内在性 CENH3 発現抑制コンストラクト」は CENH3 の非翻訳領域(UTR と略す)の正逆2コピーをもち、このコンストラクトから転写された RNA はヘアピン2重鎖を形成する。この2重鎖 RNA が RNAi 機構により内在性 CENH3 の遺伝子発現を抑制する。「GFP 融合 CENH3 発現コンストラクト」は GFP 融合 CENH3 タンパク質を発現し、このタンパク質が内在性 CENH3 の機能を不完全に相補することにより「動原体機能低下系統」ができる。「GFP 融合 CENH3 発

A. 内在性CENH3発現抑制コンストラクト



B. GFP融合CENH3発現コンストラクト

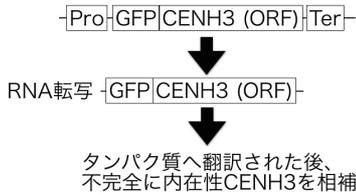


図1、動原体機能低下系統作成用コンストラクト

図中「Pro」はプロモーターを「Ter」はターミネーターを示す。

現コンストラクト」は、UTRをもたず、プロモーターも内在性のものとは異なるので、RNAiによる発現抑制を受けない。

CENH3は、図2で示した様に種間で保存的なヒストンフォールドドメイン(HFDと略す)と変異性の高いアミノ末端(N末端と略す)をもつ。Ravi & Chan (2010, Nature 464: 615-619)の報告では、野生型のCENH3の代わりにCENH3のHFDと通常型ヒストンH3のN末端からなるキメラタンパク質(Tail-swapと略す)をGFP融合タンパク質として利用することにより半数体の作出効率が向上した。この結果に基づき、全長CENH3に加えて、Tail-swapおよびHFDのみをGFPと融合したコンストラクトも作製した。

4. 研究成果

「内在性CENH3発現抑制コンストラクト」および「GFP融合CENH3発現コンストラクト」の同時形質転換を試みたが、用いた5種全て

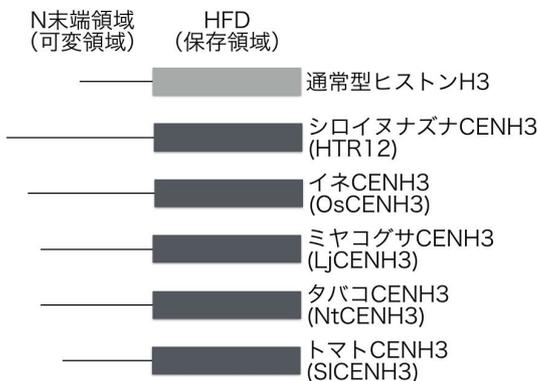


図2、通常型ヒストンH3およびCENH3の保存領域および可変領域

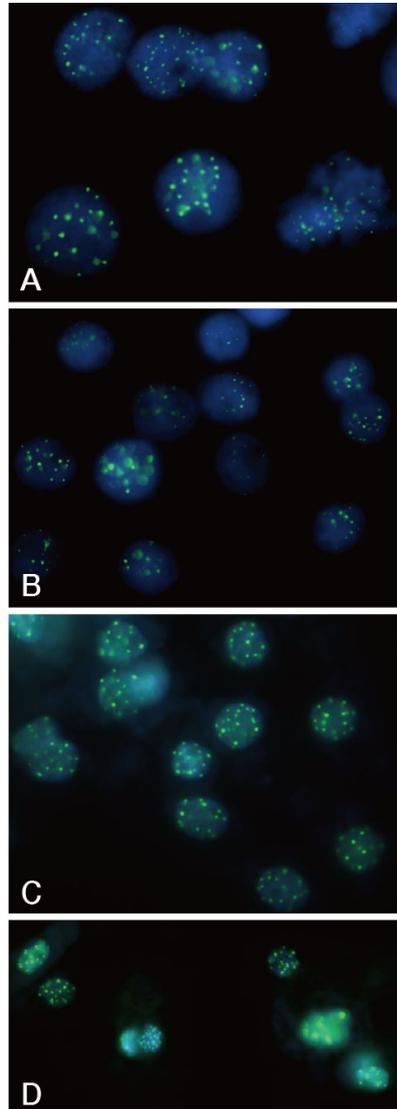


図3、GFP融合CENH3の細胞内局在

A: GFP::NtCENH3、B: GFP::NtCENH3HFD、C: GFP::NtCENH3tail-swap、D: GFP::SICENH3

において両コンストラクトを保持する植物体は得られなかった。

そこで、形質転換を2ステップに分けて行い、第1ステップとしてGFP融合CENH3を発現する植物体の作出を行ったところ、シロイヌナズナ、タバコおよびトマトにおいてGFP融合CENH3を発現し、発現した融合タンパク質が動原体に局在する個体を得られた(図3)。それに対して、イネおよびミヤコグサでは、融合タンパク質が動原体局在を示す形質転換体は得られなかった。

続いて、第2ステップとして、GFP融合CENH3の発現および動原体局在が確認されたタバコおよびトマトの形質転換体に対して「内在性CENH3発現抑制コンストラクト」の形質転換を行った。これらの形質転換には、GFPを全長CENH3と融合したCENH3を発現する系統に対しては、5'または3'UTR領域を元に作製したRNAiコンストラクトが用いられた(図4)。また、CENH3のHFD領域および

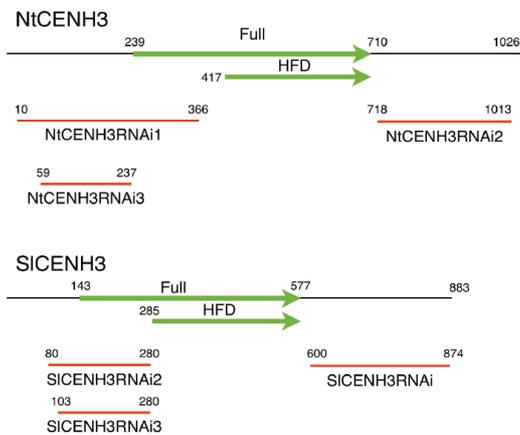


図4、cDNA内のORFおよびRNAi配列の位置

びTail-swapにGFPを融合したものについてはUTR領域に加えて、N末端領域もRNAiコンストラクトに利用した(図4)。続いて、得られた形質転換体の内在性CENH3の発現量をRT-PCR法により調べたところ、調査した全ての形質転換体で内在性CENH3の発現レベルは野生型と変わりなかった(図5)。

植物を材料に用いたRNAiによるCENH3の発現抑制は、1例のみシロイヌナズナで報告されている(Lermontova et al. 2011, Plant Journal 68: 40-50)。この事例の場合、全長ORF(531 bp)のマイナス鎖を発現する発現抑制コンストラクトが用いられていた。他の遺伝子のRNAiによる抑制の報告では200 bp程度の長さの2本鎖RNA領域をもつRNAiコンストラクトから効果が見られていたので、本研究では180-295 bpサイズの2本鎖RNA領域をもつRNAiコンストラクトを用いた(図4)。本研究でRNAiコンストラクトによる十分な発現抑制が観察されなかったのは、これらの2重鎖RNA領域の長さが不十分な可能性がある。しかしながら、各種のCENH3のUTR領域は250-310 bpしか無く、ORF領域は「GFP融合CENH3発現コンストラクト」内にも同配列が存在するので本研究では利用できない。もしこの仮説が正しければ、動原体機能低下システムを作出するためにはRNAiによる発現抑制の代わりにTALEN(transcription

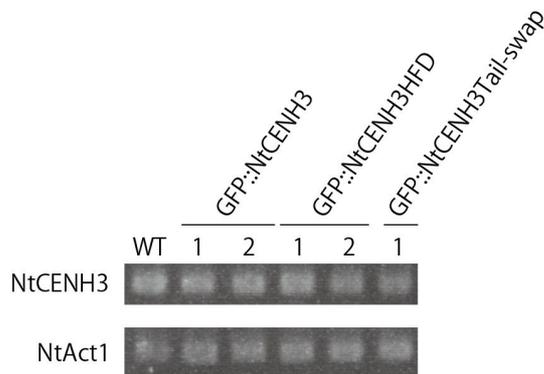


図5、RT-PCRによるNtCENH3発現量の確認

activator-like effector nuclease) 法等により遺伝子破壊を行う必要がある。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岐 清孝 (NAGAKI, Kiyotaka)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号: 70305481