

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780174

研究課題名(和文) スギ雄花特異的遺伝子はなぜカルスで発現しないのかー遺伝子組換え技術への応用ー

研究課題名(英文) Why are male flower-specific genes of *Cryptomeria japonica* not expressed in callus?

研究代表者

栗田 学 (Kurita, Manabu)

独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター育種部・室長

研究者番号：40370829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)： スギMuka14遺伝子のプロモーターのメチル化の程度を調べる事によって、遺伝子発現とメチル化の関連性を調べた。その結果、Muka14遺伝子の翻訳開始点上流約1kbを境に、上流域ではCpG配列がメチル化され、下流域ではメチル化されていない事が明らかになった。Muka14遺伝子の雄花特異的な発現には翻訳開始点上流1kbまでの領域が必要であり、今回明らかになった非メチル化CpGの分布域と重なる。今回の我々の結果は、プロモーター領域のメチル化の程度を指標にして、目的遺伝子の発現調節に必須な領域を推定し、組換え体作出に利用するためのプロモーター単離を効率化できる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)： We tried to clarify the association between gene expression and methylation by analyzing the degree of methylation of the Muka14 promoter using bisulfite sequencing. We found that CpG sequences were methylated more than 1 kb upstream of the translation start point of the Muka14 gene, but were unmethylated downstream. The region required for male flower-specific expression of Muka14 is consistent with the distribution of unmethylated CpG. Our results suggest that the essential domains for the expression of target genes can be predicted using the methylation of promoters as an index.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：スギ エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

林木の組換え技術の実用化研究は、炭素循環型社会の造成に大きく貢献しうる研究である。しかし、組換え林木の利用にあたっては花粉による導入遺伝子の拡散を防止するため、無花粉化技術の開発が不可欠であり、これまでに次のような予備的な研究結果を得ている。

(1) スギの雄花特異的に発現する遺伝子 *Muka14* を単離し、葯での強い発現活性化能をもつプロモーター (*Muka14-p*) の単離に成功した。

(2) スギ雄花プロモーターと細胞毒性遺伝子を連結して作製した雄性不稔誘導ベクターを利用して、シロイヌナズナの雄性不稔化に成功した。

(3) *Muka14-p* はスギのカルスで異所的な発現を示すことがわかった。

(4) 内在性 *Muka14* はカルスでは発現していないことから、我々の単離した *Muka14-p* はカルスで発現を OFF にするために必要な情報が含まれていない可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究はスギにおける遺伝子組換え技術の高度化を目指し、導入遺伝子が目的とする組織以外の組織での発現（異所的な発現）を完全に抑える技術の開発を目的とする。スギの雄花特異的な発現を示す遺伝子 *Muka14* をモデルに、スギの雄花と雄花以外の組織における *Muka14* ゲノム配列のメチル化の程度の違いを解析し、エピジェネティックな発現調節機構の観点から遺伝子の発現抑制メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本研究は裸子植物スギにおける遺伝子の発現調節機構、特に発現を抑制する分子メカニズムを明らかにし、遺伝子組換え技術の高度化（目的組織のみで導入遺伝子を発現させる）のための基盤となる研究を行う。以下の手法により研究を進める。

(1) *Muka14* 遺伝子の発現パターンの解析
Muka14 遺伝子の発現パターンによってメチル化の程度に違いがあるかどうか調べるため、*Muka14* 遺伝子の詳細な発現パターンの解析を行った。

(2) スギの葯の単離手法の開発
スギの雄花から *Muka14* 遺伝子が発現している組織（花粉四分子期前後の葯及び小孢子）

を効果的に単離する手法の開発を行う。

(3) バイサルファイト処理
スギの雄花から単離した葯 (*Muka14* 遺伝子:ON) と針葉 (*Muka14* 遺伝子:OFF) からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理を行った。

(4) PCR プライマーの設計
バイサルファイト処理後のゲノム DNA をテンプレートに、*Muka14* 遺伝子領域を PCR 増幅するためのプライマーセットを設計した。

(5) バイサルファイトシーケンス
バイサルファイトシーケンス法によって葯由来 *Muka14* 遺伝子領域と新芽由来 *Muka14* 遺伝子領域においてメチル化の程度を比較解析した。

4. 研究成果

(1) *Muka14* 遺伝子の発現パターンの解析

Muka14 遺伝子の発現の ON, OFF とゲノム DNA のメチル化の程度を比較解析するためには *Muka14* 遺伝子の発現時期及び発現組織を正確に抑えておく必要があった。まず、*Muka14* 遺伝子の発現組織を詳細に解析するため、*Muka14-2.5K::GUS* 構築物を導入したスギ形質転換体にジベレリン処理を行い着花を誘導した。9 月中旬以降定期的に雄花のサンプリングを行い、GUS 解析を行った。その結果、*Muka14* 遺伝子は減数分裂期前の花粉母細胞及びタペート組織で発現することが明らかにになった (図 1)。

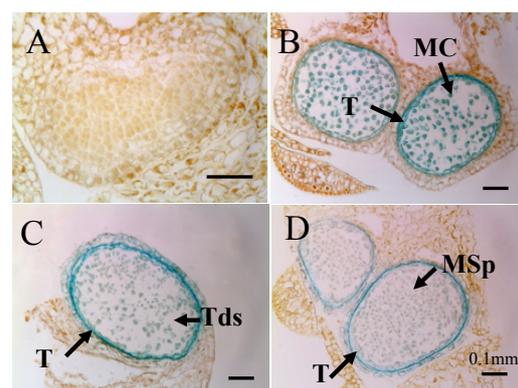


図 1 *Muka14-2.5K::GUS* 導入スギの GUS 染色写真

GUS 染色が確認される組織を矢印で示した。A : 花粉母細胞期の雄花、B : 減数分裂期の雄花、C : 花粉四分子期の雄花、D : 小孢子期の雄花。T : タペート組織、MC : 減数分裂期の花粉母細胞、Tds : 花粉四分子、Msp : 小孢子。Kurita et al. (2013) を改変。

また、*Muka14* 遺伝子の時期・組織特異的な発現に必要な転写調節領域を調べるため、*Muka14*-2.5K::*GUS* の欠失変異コンストラクト (*Muka14*-1K::*GUS*) を作成しスギに導入した。形質転換体にジベレリン処理を行い着花を誘導した。9月中旬以降定期的に雄花のサンプリングを行い、GUS 解析を行った。その結果、GUS 活性が減数分裂期前の花粉母細胞及びタペート組織で確認された (図 2)。この結果はすることが明らかになった。*Muka14* 遺伝子の発現調節に必要な領域が *Muka14*-1K に含まれる、翻訳開始点より上流約 1kb の領域に含まれている事を示唆している。

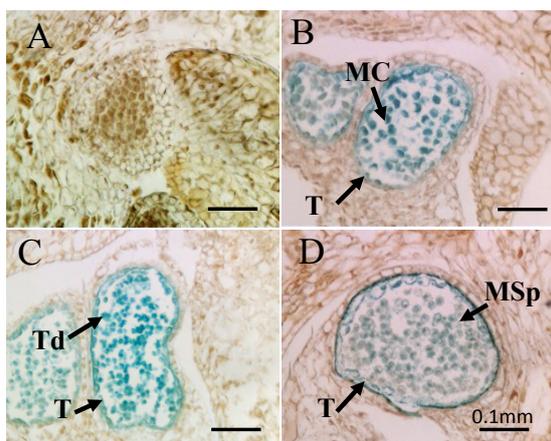


図 2 *Muka14*-1K::*GUS* 導入スギの GUS 染色写真

GUS 染色が確認される組織を矢印で示した。A: 花粉母細胞期の雄花、B: 減数分裂期の雄花、C: 花粉四分子期の雄花、D: 小孢子期の雄花。T: タペート組織、MC: 減数分裂期の花粉母細胞、Tds: 花粉四分子、Msp: 小孢子。Kurita et al. (2013) を改変。

(2) スギの葯の単離手法の開発

Muka14 遺伝子の発現の ON, OFF とゲノム DNA のメチル化の程度を比較解析するためには *Muka14* 遺伝子が発現している時期に発現している組織を効果的に収集しその組織からゲノム DNA を単離する必要がある。そこで雄花から花粉母細胞及びタペート組織を中心に形成される「葯」を効率よく採取するための手法として Cryomicrodissection 法を適用し、葯組織の効果的な採取手法を開発した。Cryomicrodissection 法を用いることによって、*Muka14* 遺伝子が発現する花粉母細胞とタペート組織を効率よく収集することが可能となり、シュートから抽出したゲノム DNA 由来の *Muka14* 遺伝子領域とメチル化の程度を比較する際に、メチル化の違いがより鮮明に検出できると考えられた。

(3) バイサルファイト処理

Muka14 遺伝子が活性化している葯、及び発現が認められないシュートにおいて *Muka14* 遺伝子のゲノム領域においてメチル化の程度に違いがあるかどうかを調べるため、葯及びシュートからゲノム DNA を抽出し、EpiTect Bisulfite キット (QIAGEN 社製) 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によって、シトシンが脱アミノ化され、ウラシルに変換される。一方、メチルシトシンは脱アミノ化によりチミンへと変換される。しかしこのバイサルファイト反応において、メチルシトシンからの反応は非常に長い時間を要する。したがって、一定時間内の反応においては、シトシンはウラシルに、メチルシトシンはそのままとなる。このように DNA 塩基のバイサルファイト試薬に対する感受性の違いを利用する事がこの実験方法の特徴となっている。

(4) PCR プライマーの設計

バイサルファイト処理を行った後、*Muka14* 遺伝子のプロモーター領域を効率よく増幅するために、PCR プライマーの設計を行った。*Muka14* 遺伝子のプロモーター約 3.5kb の領域において、バイサルファイト処理の影響を受けないと考えられる配列を検索し、該当する 12 箇所にプライマーを設計した。本プライマーを用いることでバイサルファイト処理に影響されず、目的の DNA 領域を増幅することが可能となり、メチル化解析をスムーズに行えると考えられる。

(5) バイサルファイトシーケンス

Muka14 遺伝子の発現している組織としてスギの葯、*Muka14* 遺伝子の発現していない組織としてシュートからそれぞれゲノム DNA を抽出しバイサルファイト処理を行った。*Muka14* 遺伝子のメチル化の程度を調べるため翻訳開始点から上流約 3kb に渡り PCR で増幅して塩基配列の決定をおこなった。バイサルファイト処理をしていないシュート由来の塩基配列をコントロールにして *Muka14* 遺伝子上流域のメチル化の程度を解析した。

メチル化の標的配列として CpG が知られている。葯由来 *Muka14* 遺伝子の配列とシュート由来 *Muka14* 遺伝子の CpG 配列を比較した結果、メチル化の程度に違いは認められなかった (図 3)。この結果は *Muka14* 遺伝子が DNA のメチル化の程度の違いによって発現が調節されている可能性が低いことを示唆している。一方で、*Muka14* 遺伝子の翻訳開始点より上流約 1kb を境に、ゲノム DNA のメチル化が大きく異なっていることが明らかになった。即ち、翻訳開始点上流 1kb よりさらに上

流域では CpG 配列がメチル化され、また下流域ではメチル化されていない事が明らかになった。*Muka14* 遺伝子の雄花特異的な発現には翻訳開始点より上流 1kb までの領域が必要である事が分かっており、今回明らかになった非メチル化 CpG の分布域と重なる。今回の結果は、プロモーター領域のメチル化の程度を指標にして、目的遺伝子の発現調節に必須な領域を推定し、様々な機能を付与した組換え体作出に利用するためのプロモーター単離を効率化できる可能性を示唆している。

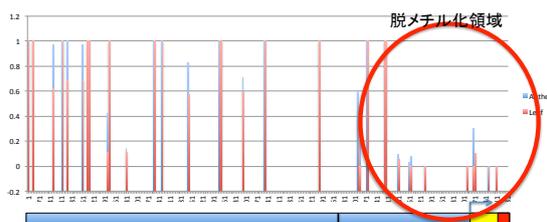


図3 *Muka14* 遺伝子のメチル化解析

Muka14 遺伝子のプロモーターについて、メチル化の有無を解析した。X 軸は CpG 配列の *Muka14* 遺伝子上での位置を示し、Y 軸はメチル化 CpG の割合を示す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Manabu Kurita, Ken-ichi Konagaya, Atsushi Watanabe, Toru Taniguchi. The promoter of an A9 homolog from the conifer *Cryptomeria japonica* imparts male strobilus-dominant expression in transgenic trees. *Plant Cell Reports*. 査読あり、32: 319-328, 2013.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 小長谷 賢一、栗田 学、坪村 美代子、平尾 知士、渡辺 敦史、石井 克明、谷口 亨、遺伝子組換え技術による無花粉スギの作出と形質評価、森林遺伝育種学会、2013 年 11 月 8 日、東京大学
- ② 小長谷 賢一、栗田 学、坪村 美代子、平尾 知士、渡辺 敦史、石井 克明、谷口 亨、Barnase-barstar システムを用いた遺伝子組換え雄性不稔スギの作出と形質評価、植物細胞分子生物学会、2013 年 9 月 10 日、北海道大学
- ③ Manabu Kurita, Ken-ichi Konagaya, Atsushi Watanabe, Toru Taniguchi. Isolation And Functional Analysis Of

The Male Strobilus-Specific Promoters Of *Cryptomeria japonica* For Development Of The Male Sterility System. 日本植物生理学会、2013 年 3 月 21 日、岡山大学

- ④ 栗田 学、小長谷 賢一、渡辺 敦史、近藤 禎二、石井 克明、谷口 亨、スギの雄花特異的に発現する遺伝子のプロモーターの機能解析、森林遺伝育種学会、2012 年 11 月 8 日、東京大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 学 (KURITA MANABU)

森林総合研究所・林木育種センター育種部・室長

研究者番号：40370829