

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292005

研究課題名(和文) イネ科植物人工染色体の創出とカスタム化

研究課題名(英文) Generation and customization of plant artificial chromosomes in cereals.

研究代表者

村田 稔 (Murata, Minoru)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：20166292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、イネとオオムギにおいて、多数の遺伝子の受け皿となる“植物人工染色体”を効率的に創出できる方法を開発することにある。新規にデザインされたT-DNAコンストラクトには二つのLoxP配列が含まれ、うち一つはトランスポゼースによりゲノム中に転移する。この転移はCreリコンビナーゼ遺伝子を発現させ、LoxP間の組換えを誘発することにより環状の染色体が創出されると想定された。実際このコンストラクトを導入したイネでは、染色体10番の欠失が観察され、期待通りにDNA分子の環状化が起きたと考えられた。この環状化DNAにセントロメア機能が付与されれば、人工環状染色体として機能するだろう。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to develop efficient methods for generation of plant artificial chromosomes that are able to accept a number of genes. The newly designed T-DNA construct (pDLHC) contained two LoxPs, one of which is transposable by a transposase. This transposition was designed to induce expression of the Cre recombinase gene, resulting in site-specific recombination between two separated LoxPs. Among the progeny of rice plants transformed with pDLHC, one transformant was found to contain a large deletion on chromosome 10, which was caused by elimination of a DNA molecule circled by recombination between two LoxPs. If the centromere functions would be given to the circular DNA, artificial ring chromosomes would be generated.

研究分野：農学

キーワード：植物人工染色体 染色体変異 ゲノム再構成 配列特異的組換え Cre/LoxP トランスポゾン イネ
オオムギ

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核生物の核ゲノムは、染色体に分割され保存されている。それぞれの染色体には、ゲノムの全遺伝情報を過不足なく安全に娘細胞に伝達するため、少なくとも3つの機能要素(セントロメア、テロメアと複製起点)が含まれている。酵母や動物培養細胞では、これら3要素を人工的につなぎ合わせたDNA分子を細胞内に導入することにより、“人工染色体”が創り出されており、酵母人工染色体 YAC (Murray and Szostack 1983), ヒト人工染色体 HAC (Harrington et al. 1997, Ikeno et al. 1998)と呼ばれている。

(2) 植物においても同様なボトムアップ法によるアプローチが取られ、過去に、トウモロコシで2つの報告例がある (Carlson et al. 2007, Ananiev et al. 2009)。しかしながら、前者については、細胞内で染色体として機能しているかどうかについて本質的な疑問が投げかけられている (Houben et al. 2008)。また、後者のケースでは、ミニ染色体の形成が確認されたものの、ミニ染色体を保持する植物体に稔性がなく、他の研究グループによる検証ができない状況にある。よって現在でもまだ、利用可能な植物人工染色体の創出例はないといっても過言ではない。このような状況下、我々は最近、トップダウン法により、シロイヌナズナにおいて環状の人工染色体の創出に成功した (Murata et al. 2013)。テロメアを持たない環状の染色体は、これまでもいろいろな真核生物で見つっているが、ほとんどのものは不安定で減数分裂を経て次代に伝達されない。しかし我々が作出した環状ミニ染色体 AtARC1 は有糸分裂の際も安定で、野生型に1本添加された状態 ($2n = 2x + 1 = 11$) でも、自殖種子の約40%に伝達される。以上のことから、作物においても人工染色体を用いたゲノム工学が可能となった。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、世界の四大主要作物であるイネとオオムギにおいて、多くの遺伝子を含む巨大DNAの導入が可能な“植物人工染色体”を創出し、それらを広く利用できる

ようカスタマイズすることにある。そのためまず、効率的にゲノムを改変できる方法論の確立を目指す。

(2) 作物への遺伝子導入はこれまで、比較的単純な形質を支配する少数の遺伝子に限って行われ、二次代謝産物など多数の遺伝子に支配された形質についてはほとんど行われてこなかった。これは、これまでの遺伝子導入法では、一度に多くの遺伝子をインタクトな状態で導入することが難しく、挿入位置を制御できないことによる。植物人工染色体は核ゲノム中に付加的に存在するため、これらの問題を解消し、遺伝子導入の新たなプラットフォームを提供する。

3. 研究の方法

(1) イネ科植物用T-DNAコンストラクトの作成

シロイヌナズナに比べ、イネやオオムギでは生育期間が長いため、より効率的かつ簡便な方法が必要となった。そこで、非自律的トランスポゾンDs内にLoxPを配置し、Acトランスポゼース(転移酵素)によって転移すると自動的にCreリコンビナーゼが発現するようデザインしたT-DNAコンストラクトを作成した(図1)。

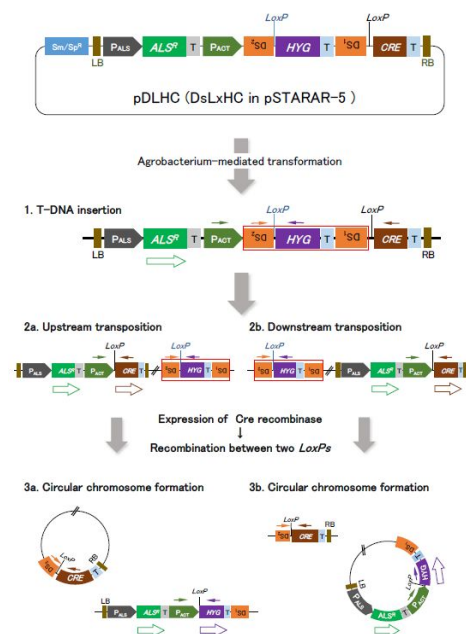


図1. イネ用 T-DNA コンストラクト pDLHC と、Ac トランスポゼースによる核内での変化。

(2) イネおよびオオムギの形質転換

作成したT-DNAコンストラクトを、Acトランスポゼースを発現している“日本晴”(Ito et al. 2004)に、アグロバクテリウムEHA105を介して形質転換し、複数の形質転換体を得た。

コンストラクトのT-DNA領域をバイナリーベクターpB7WGに移した後、アグロバクテリウムEHA105を介して、オオムギ“Golden Promise”に形質転換した。また、Ac転移酵素遺伝子をバイナリーベクターpXhb7FNFI-UBILに組み込み、10数の個体の形質転換体を得た。

4. 研究成果

(1) イネにおけるゲノム再構成

トランスポゼースによるDs(LoxP)カセットの転移: イネ用のコンストラクトpDLHCを導入した個体では、Acトランスポゼースがすでに発現していることから、その当代(T_1)または次代で(T_2)でD(LoxP)カセット(図1)の転移が想定された。そこで、この両世代からDNAを抽出し、アクチンのプロモーター(P_{AC})内とCreリコンビナーゼ遺伝子(CRE)内にデザインされたプライマーを用いてPCRを行った(プライマー位置は、図1参照)。その結果、 T_1 世代では転移は確認できなかったが、 T_2 世代に転移が起こっているものが確認された(図2)。

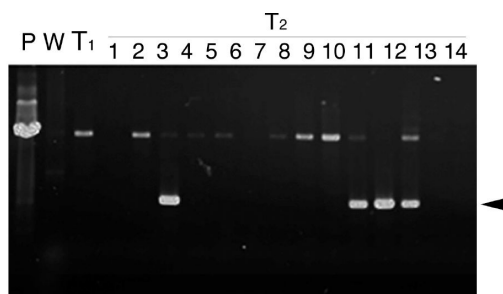


図2. イネ形質転換体のPCR分析。プライマー: PactF+CreR。矢印は、DS(LoxP)カセットの転移に伴う0.7 kbバンド。

Creリコンビナーゼによるゲノム再構成: DS(LoxP)カセットがゲノム中の他の部位へ転移すると、アクチンのプロモーターがCreリコンビナーゼ遺伝子の近位に位置するようになり、Creリコンビナーゼが働くようになる。このCre遺伝子には、人工的なイントロンを導入してあり、大腸菌やアグロバクテリウムでは酵素活性は認められない。実際、転移した後

のイネ形質転換体では、イントロンが除かれ、Creリコンビナーゼの活性が認められた。そこで、形質転換体の染色体を調べたところ、10番染色体が短くなっていることが示された(図3)。

ゲノム再編成の機構: 10番染色体上の欠失の原因は、形質転換によりT-DNAが10番染色体の長腕に挿入され、次代でDs(LoxP)カセットが10番染色体長腕上の他の部位に転移したことによると考えられる。この結果、2つのLoxPが10番染色体上に離れて配置されるため、Creリコンビナーゼによって、LoxP間の特異的な組換えが誘発される。2つのLoxPの方向が同じであれば、この間のDNA分子は環状化し、逆であれば、逆位となる。環状化した場合、セントロメアの活性を持つ塩基配列が含まれれば、そのまま人工環状染色体として核内に維持されるが、セントロメアが含まれない場合では細胞分裂に従って消失する。図3のケースは、この後者に当たると考えられた。故に、多数の形質転換体をスクリーニングすることにより、人工環状染色体が創出されることが期待できる。

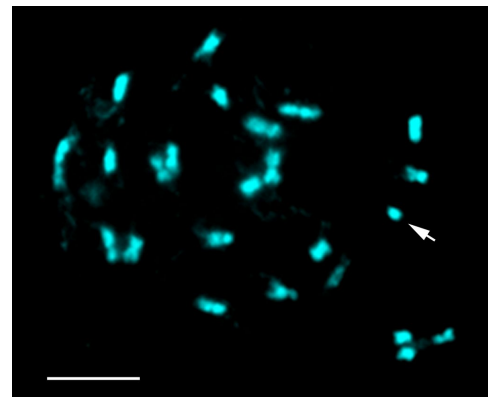


図3. イネ形質転換体(T_2)の体細胞染色体。矢印は短縮化した10番染色体。バー=10 μ m.

(2) オオムギの形質転換

イネと同様のコンストラクトを、オオムギに導入し、数十個体の形質転換体を得た。この場合は、Ac転移酵素遺伝子が組み込まれていない“Golden Promise”を用いたため、T-DNAの挿入位置をTAIL-PCRによって決定することにした。しかしながら、シロイヌナズナで用いた方法(Fujimoto et al. 2016)では、

挿入位置の決定は不確定であった。これは、オオムギのゲノムサイズが大きく、T-DNA のボーダー配列に類似した配列が多く存在することによると考えられた。用いるプライマーを長くし、PCR の条件を検討したが、確実な結果は得られなかった。さらなる改良が必要である。

Ac 転移酵素遺伝子をオオムギの “Golden Promise” に導入し、10 数個体の形質転換体を得た。RT-PCR によって、発現を調べたところ、ほとんどの個体に期待通りのスプライシングが起こっており、DS(LoxP)カセットを転移できると考えられた。今後は、交配によって、で作出した形質転換体に導入し、ゲノム再編成を誘発する。

<引用文献>

- Ananiev, E.V. et al. Artificial chromosome formation in maize (*Zea mays* L.). *Chromosoma* vol.118, 2009, 157-177.
- Carlson, S.R. et al. Meiotic transmission of an in vitro-assembled autonomous maize minichromosome. *PLoS Genet.*, vol. 3, 2007, 1965-1974.
- Harrington, J.J. et al. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat. Genet.*, vol. 15, 1997, 345-355.
- Houben, A. et al. Engineered plant minichromosomes: a bottom-up success? *Plant Cell*, vol. 20, 2008, 8-10.
- Ikeno, M. et al. Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nat. Biotechnol.*, vol. 16, 1998, 431-439.
- Murata, M. et al. Generation of an artificial ring chromosome in *Arabidopsis* by the Cre/*LoxP*-mediated recombination. *Plant J.*, vol. 74, 2013, 363-371.
- Murray, A.W. and Szostak, J.W. Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature*, vol. 305,

1983, 189-193.

Ito, Y. et al. Establishment of an enhancer trap system with Ds and GUS for functional genomics in rice. *Mol Genet. Genom.*, vol. 271, 2004, 639-650.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

Murata, M., Artificial chromosome preparations in arabidopsis. *Current Protocols in Plant Biology*, 査読有, vol. 1, 2016, pp. 53-66,

DOI:10.1002/cppb.20010

Murata, M., Kanatani, A., Kashihara, K.,

One-step generation of chromosomal rearrangements in rice. *Methods in Molecular Biology*, 査読有, vol. 1469, 2016, 63-76, DOI: 10.1007/978-4939-4931-1_5

Fujimoto, S., Matsunaga, S., Murata, M., Mapping of T-DNA and Ac/Ds by TAIL-PCR to analyze chromosomal rearrangements. *Methods in Molecular Biology*, 査読有, vol. 1469, 2016, pp. 207-216, DOI:10.1007/ 978-1-4939-4931-1_17

[学会発表] (計5件)

村田稔、植物人工染色体の現状と将来展望、第8回中国地域育種談話会(第11回ムギ類研究会共催)、2016年12月10日-11日、岡山県・倉敷市

村田稔、金谷麻加、柏原壹成、長岐清孝、植物人工環状染色体の伝達制御、日本遺伝学会第88回大会、2016年9月7日-10日、静岡県・三島市

村田稔、金谷麻加、柏原壹成、長岐清孝、イネにおける人工環状染色体創出の試み、日本遺伝学会第87回大会、2015年9月24日-26日、宮城県・仙台市

村田稔、金谷麻加、柏原壹成、弘中明子、長岐清孝、シロイヌナズナの1Mbサイズ環状人工染色体の作出と安定性、日本遺伝学会第86回大会、2014年9月17-19日、滋

賀県・長浜市

長岐清孝、田中啓介、松島良、小林久人、
村田稔、クロマチン免疫沈降を必要としない
動原体 DNA 配列推定法の開発、日本遺伝
学会第 86 回大会，2014 年 9 月 17-19 日、
滋賀県・長浜市

〔図書〕（計 1 件）

Murata, M.(Editor), Human Press
(Spring Nature), Chromosome and Genomic
Engineering in Plants: Methods and
Protocols, 2016, 218

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 稔 (MURATA, Minoru)
岡山大学・資源植物科学研究所・教授
研究者番号：20166292

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

柏原 壱成 (KASHIHARA, Kazunari)
岡山大学・資源植物科学研究所・技術専門
職員
研究者番号：60379807

(4) 研究協力者

佐藤 和広 (SATO, Kazuhiro)
岡山大学・資源植物科学研究所・教授