

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14632

研究課題名(和文) エピゲノム変化を介したアグロバクテリウムによる遺伝子導入抑制機構の解明

研究課題名(英文) Epigenomic change induced by Agrobacterium infection

研究代表者

川勝 泰二 (Kawakatsu, Taiji)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主任研究員

研究者番号：30435614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アグロバクテリウムを用いた形質転換法は、イネへの外来遺伝子導入のゴールドスタンダードである。本課題ではイネにおける細胞特異的なエピゲノム解析技術解析基盤技術開発とアグロバクテリウム感染による遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。目的細胞から簡便に核を単離するINTACT法がイネに適用できることを明らかにした。また、アグロバクテリウム感染は急激な遺伝子発現変化を誘導せず、感染3日後にミトコンドリア関連の遺伝子が多く発現誘導されることを明らかにし、形質転換効率向上に向けた基盤的知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Agrobacterium-mediated transformation is a gold-standard for gene integration in to rice genome. This project aimed to establish the methodology for cell type specific epigenome analysis and to analyze transcriptome dynamics during Agrobacterium infection. We successfully applied INTACT method to rice to isolate pure nuclei from cells of interest. Time-series RNA-seq revealed Agrobacterium infection induced expression of mitochondria related genes only after 3 days after infection. These results provide the insights for rice callus responses to Agrobacterium infection to improve transformation efficiency.

研究分野：機能ゲノム学

キーワード：イネ アグロバクテリウム 形質転換

1. 研究開始当初の背景

1994年にアグロバクテリウムによるイネの形質転換法(アグロバクテリウム法)が開発されて以来、アグロバクテリウム法がイネへの遺伝子導入のゴールドスタンダードになっている。イネのモデル品種である日本晴では相同組換えを用いた遺伝子ノックアウトや遺伝子機能改変が可能になってきたが、一般的な遺伝子機能解析手法になり得ていない。また、多くの実用品種の形質転換効率は日本晴の1/10~1/100程度であり、形質転換個体を得ることすら難しい現状である。

研究代表者は複数のイネの転写因子が、アグロバクテリウム共存下のカルスでは下流遺伝子の発現を誘導できないことを見いだした。このことはアグロバクテリウム感染細胞ではエピジェネティックな制御によりグローバルに遺伝子発現誘導が抑制されていることを示しており、アグロバクテリウムに対してエピゲノム変化を介した防御応答をしている可能性が示唆された。実際、ヒストンバリエントであるH2A変異体ではT-DNAのゲノムへの導入が阻害され、エピゲノムとT-DNA導入の関連が示唆されているが、感染時のゲノムワイドなエピゲノム変化については未解明である。

2. 研究の目的

形質転換効率の異なるイネ品種由来カルスを材料に、アグロバクテリウム感染細胞核を単離し、次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現解析を行い、アグロバクテリウム感染細胞特異的に発現変動する遺伝子の同定、アグロバクテリウム感染細胞特異的クロマチンランドスケープのダイナミクスを捉えることで、アグロバクテリウムによる遺伝子導入抑制メカニズムを解明することを目的とする。

本研究ではアグロバクテリウム感染細胞の核を単離して、感染細胞特異的なトランスクリプトーム解析、エピゲノム解析を行う。アグロバクテリウムによる遺伝子導入抑制メカニズムが解明されれば、形質転換効率の飛躍的向上が見込まれ、現在形質転換効率が低い実用品種の遺伝子組換えイネ実用化の加速が期待できる。また、相同組換えを利用した遺伝子機能改変手法や狙った遺伝子座への遺伝子導入手法が一般化することが期待できる。

3. 研究の方法

本研究ではイネカルスを用いて、アグロバクテリウム感染細胞特異的遺伝子発現解析およびアグロバクテリウム感染細胞特異的エピゲノム解析を行う。まず、1) アグロバクテリウム感染細胞の核を単離する系を確立する。単離した核を用いて、polyAが付加した核内RNAを用いたRNA-seqを行い、2) アグロバクテリウム感染に応答した遺伝子発現変動を解析する。ATAC-seqによりヌクレオソーム分布パターンを同定することで、3) アグロバクテリウム感染に応答したゲノムワイドなクロマ

チン構造の変化を明らかにする。また、発現変動遺伝子とクロマチン構造から、4) 発現変動遺伝子の遺伝子発現制御配列領域を同定し、エピゲノム変化を介したアグロバクテリウムに対する防御応答機構を解明する。

4. 研究成果

(1) アグロバクテリウム感染細胞核の単離

核膜をビオチン化し、ビオチン-ストレプトアビジンの親和性を用いて核を単離するINTACT法を用いてアグロバクテリウム感染細胞核を単離するため、N末側に核膜局在シグナルペプチドを、C末側にビオチンリガーゼ認識配列を付加したGFPをトウモロコシユビキチンプロモーターで恒常的に発現させるバイナリーベクター(GFPベクター)と、ビオチンリガーゼ(BirA)をトウモロコシユビキチンプロモーターで恒常的に発現させるバイナリーベクター(BirAベクター)を構築した。GFPベクターをイネ品種コシヒカリ、カサラス(形質転換効率: コシヒカリ<<カサラス)に形質転換後、自殖によりGFPが導入された形質転換体を増殖した。GFPを核膜にターゲティングするためにシロイヌナズナRabGTP遺伝子由来の核膜局在シグナルペプチドを用いており、これまでにINTACT法をイネに適用した例はなかった。そこでINTACT法がイネに適用できるかを確認するため、並行してGFPカセットとBirAカセット両方を搭載したGFP-BirAベクターを構築し、イネ品種キタアケに形質転換した。GFP-BirAベクター形質転換体からカルスを誘導し、INTACT法を実施した結果、イネでも純度が高い核を簡便に単離できることを明らかにした(図1)。

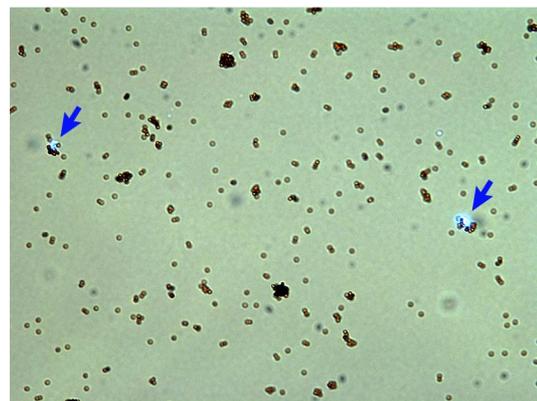


図1 INTACT法により単離したイネカルス核。ストレプトアビジン磁気ビーズにDAPI染色された核がキャプチャーされている(青矢印)。

次に、アグロバクテリウム感染細胞核がビオチン化を受けるか確認するため、GFPベクター形質転換体から誘導したカルスとBirAを持つアグロバクテリウムを3日間共存培養し、抗GFP抗体およびストレプトアビジン-HRPを用いてウェスタンブロットを行った(図2)。コシヒカリとカサラスいずれの形質転換体でも抗GFP抗体を用いたウェスタンブ

ロットで検出されるバンドと同じサイズのバンドがストレプトアビジン-HRP で検出された (図2 矢頭)。しかしシグナルを得るためには長時間の露光が必要であり、アグロバクテリウム感染細胞核はビオチン化されるが、カルスあたりのビオチン化された核の割合が非常に低かった。この原因として、アグロバクテリウムに感染する細胞の割合が低いことや、3日間の感染では十分なビオチン化が起こらないことが考えられた。

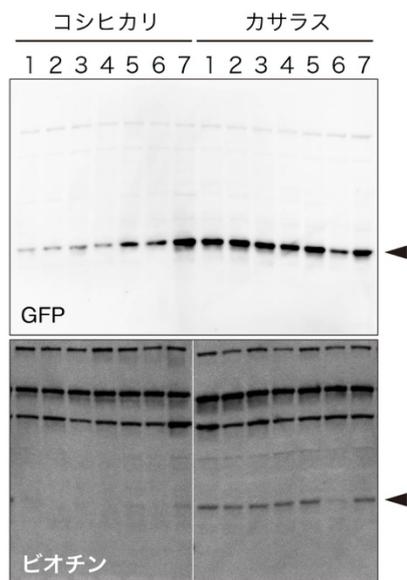


図2 アグロバクテリウム感染による核膜上 GFP のビオチン化

抗 GFP 抗体 (上パネル) およびストレプトアビジン-HRP (下パネル) を用いたウェスタンブロット。矢頭は抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロットで検出されるバンドの位置を示す。下パネルは同一メンブレンにおける解析だが、上パネルのレーンと合わせるためにコシヒカリとカサラスのレーンを入れ替えた (白線)。

同程度の量の GFP が発現しているコシヒカリとカサラス間ではビオチン化効率がカサラスの方が顕著に高いことから、アグロバクテリウムの感染効率がカサラスの方がコシヒカリよりも高いことが明らかになった (図2 コシヒカリ#6 とカサラス#6、コシヒカリ#7 とカサラス#2)。このことから、コシヒカリの難形質転換性はアグロバクテリウム感染効率が低いことが原因であることが示唆された。また、アグロバクテリウム感染していないカルス塊と感染したカルス塊を用いて H3K9me2 及び H3K9ac のイムノブロットを行った結果、顕著な差は観察されなかった。したがって、カルス塊としてはアグロバクテリウム感染の有無でゲノム全体の顕著なエピゲノム変化は起こらないことが明らかになった。

GFP ベクター形質転換コシヒカリでは BirA ベクターを持つアグロバクテリウムを感染させた際のビオチン化効率が極めて低かったため、GFP ベクター形質転換カサラスのみ

INTACT 法でアグロバクテリウム感染細胞の核単離を試みた。しかし、上述のようにウェスタンブロットでは GFP がビオチン化されることを確認していたが、INTACT 法では十分な量の核を得ることができなかった。オルガネラゲノムはヌクレオソームフリーの状態であるため、オルガネラゲノムが多く存在する状態で ATAC-seq を行うと、大部分のリードがオルガネラゲノム由来となってしまふ。このことから ATAC-seq には純度が高い核が必要である。アグロバクテリウム感染細胞の核を高純度で単離して ATAC-seq を実施する予定であったが断念し、ATAC-seq 同様にクロマチンアクセスビリティを間接的に解析できる MNase titration の条件検討を行った。MNase 処理時間によってシグナルが強くなる領域、弱くなる領域、変化しない領域が存在することを明らかにし、イネでも MNase titration が適用できることを確認した。

(2) アグロバクテリウム感染に応答した遺伝子発現変動

アグロバクテリウム感染に対する防御応答として発現変動する遺伝子を同定するため、イネ品種日本晴の種子から誘導したカルスにアグロバクテリウムを感染させ、時系列 RNA-seq を行った。コントロールとして、アグロバクテリウム抜きバッファでアグロバクテリウム感染と除菌ステップを行った。全て 2 反復で、感染 0、5、24、48、72 時間後にサンプリングを行い、RNA を抽出した。KAPA Stranded mRNA-seq library prep kit を用いて RNA-seq ライブラリを調整し、HiSeq4000 50SR モードでシーケンシングを行った。IRGSP-1.0 リファレンスゲノムと MSU7 アノテーションに対して STAR aligner を用いてリードをマッピングした結果、全てのサンプルで 20M 以上のリードが遺伝子にユニークにマップされた。それぞれの遺伝子にユニークにマップされたリード数を元に、edgeR を用いてアグロバクテリウムを感染したサンプルとコントロールサンプル間で有意 (FDR < 0.05) に発現変動した遺伝子の検出を試みたが、感染 5、24、48 時間後では発現変動遺伝子が検出できなかった。感染 72 時間後のサンプルでは 409 遺伝子の発現が上昇し、609 遺伝子の発現が減少した。これらの発現変動遺伝子にどのような機能を持つものが多いのかを調べるため、AgriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) で Gene Ontology Enrichment 解析を行った。発現減少遺伝子にはいずれの Gene Ontology に関連する遺伝子が濃縮されていなかったが、発現上昇遺伝子には cellular component としてミトコンドリアに関連する遺伝子が濃縮されていた。ミトコンドリアは ATP 合成によるエネルギー生産の場である一方で、活性酸素生成源としてプログラム細胞死にも重要な役割を担うことが明らかとなってきた。したがって、アグロバクテリウムに感染した細胞は通常の細胞よりもエネルギーを生産す

ることで防御応答に資する、もしくは単純にアグロバクテリウム感染によって細胞死が誘導されていることが示唆された。特定の biological process や molecular function に関わる遺伝子は濃縮されていなかったため、今後の検証が不可欠である。検出された発現変動遺伝子の数や変動幅も小さかった原因として、我々のグループで用いている形質転換法が至適化されすぎている可能性も考えられる。今後解析を進める際には一般的に用いられている形質転換法を用いることを検討する必要がある。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川勝 泰二 (KAWAKATSU, Taiji)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・生物機能利用研究部門・主任研
究員

研究者番号：30435614