

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22310129

研究課題名（和文）

モデル植物のゲノム工学的改変と遺伝子発現解析

研究課題名（英文）

Genome engineering and gene expression analysis in a model plant *Arabidopsis thaliana*

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

研究成果の概要（和文）：

シロイヌナズナの核ゲノムを再編成する目的で、P1 ファージ由来の LoxP 配列を、染色体のいずれかに 1-2 コピー挿入した系統を 30 種類作製した。これらを交配によって組み合わせ、Cre リコンビナーゼによる配列特異的組換えを誘発した。これら植物体の PCR 及び FISH 解析から、2 つの LoxP 間での組換えにより相互転座が誘発されることが確認された。また、この相互転座に伴うクロマチン構造の変化が、形態変異を引き起こす可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In order to reconstruct the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana*, we introduced the LoxP sequence, which originated from bacteriophage P1, into the chromosomes, and have created 30 lines carrying one or two copies of LoxP per chromosome. These LoxP sites were combined in the genome by crossing, and the sequence-specific recombination was induced with the Cre-recombinase. PCR and FISH analyses revealed that reciprocal translocations are possibly induced by recombination between two LoxP sites located on different chromosomes. It was also suggested that alteration of chromatin structure associated with the reciprocal translocation, induces phenotypic changes.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 3,700,000  | 1,110,000 | 4,810,000  |
| 2011年度 | 5,300,000  | 1,590,000 | 6,890,000  |
| 2012年度 | 4,800,000  | 1,440,000 | 6,240,000  |
| 総計     | 13,800,000 | 4,140,000 | 17,940,000 |

研究分野：植物分子遺伝学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ゲノム再編成、シロイヌナズナ、染色体、Cre/LoxP、相互転座、遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は、モデル植物として遺伝学的、植物生理学的研究に広く利用されてきた。2000 年末には、他の植物に先駆けて、ゲノムプロジェクトが完了している (AGI 2000)。これは、シロイヌナズナの核ゲノムが、他の植物種に比べて非常にコンパクト (約 150 Mb) で、シンプルであることによっている。シロイヌナズナの染色体基本数は  $n=x=5$  であるが、近縁種のほとんどが  $n=x=8$  であることから、シロイヌナズナは、進化的に、染色体数を順次減じてきたと考えられてきた (Price 1994)。実際、近縁種 *A. lyrata* ( $n=x=8$ ) との比較では、ゲノムの再構成が確認されている (Lysak et al. 2006)。

シロイヌナズナでは、染色体の数的変異 (倍数性、異数性) は報告されているが (Koornneef 1984)、染色体の構造変異については、ほとんど報告例がない。これも、シロイヌナズナのゲノムのコンパクトさを示すものとして考えられてきた。しかし、我々は最近、*in planta* 形質転換法によって作出された 1 つの形質転換体に、4 種もの異なった異常染色体を発見し、それらが、2 つの異なった染色体に挿入された T-DNA 間の組換えに起因していることを突き止めた (Murata et al. 2008)。また、これらの変異染色体がセットで次代に伝達され、ゲノム再構成体として維持できることを示すとともに、これまでに報告されていない新たな表現型変異を見出した (Yokota et al. 2010)。これら変異の原因は、1 番染色体の部分的重複にあると考えられているが、置き換わった染色体部位におけるクロマチン構造の変化が周辺部の遺伝子発現に影響を与えている可能性も示唆されている。しかしながら、このようなゲ

ノム再編成に伴った遺伝的変異に対しては、これまで系統だった研究は行われてこなかった。

## 2. 研究の目的

生物は、様々な手段により自らのゲノムを再構成し、進化してきた。このようなゲノム再構成を人工的に引き起こし、新たな系統を作り出そうとする試みは、酵母などの単細胞生物で始まっているが、高等植物ではまだ倍数性レベルでの改変にとどまっている。本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナの核ゲノムを人工的に再構成させ、系統として確立するとともに、結果として起こる遺伝子発現の変化を詳細に解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

シロイヌナズナの核ゲノムを再編成させるため、以下の 2 つの方法により、LoxP (P1 フェージ由来の 34 塩基対) を 1 カ所または 2 カ所ゲノム中に導入することを試みた。

① T-DNA 領域内に 2 つの LoxP を配置したコンストラクト (pDs-Lox、図 1) の形質転換体を、米国 Arabidopsis Biological Research Center から取り寄せ、ファイバー-FISH 法等により解析した。一箇所にシングルコピーの

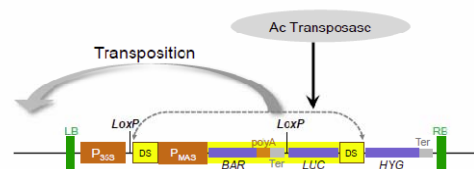


図 1. LoxP 転移用コンストラクト pDs-Lox。

T-DNA が挿入されている系統を選び、トランスポゾン Ac の転移酵素 (TPase) を発現している個体と交配した。導入された T-DNA 上の

2つのLoxPサイトはBar遺伝子を挟んで近接しているが、一つは非自律的トランスポゾン内に配置されているため (DS-LoxP-DS)、転移酵素によって他の領域に転移する。自殖により F2 種子を得、ハイグロマシ耐性個体を選抜した。DS-LoxP-DS の転移位置は、TAIL-PCR (Liu et al. 1995)により決定した。

② 新たに 3 種のコンストラクト (pBlox, pBarLox, pBloxCre, 図 2) を作製し、これら

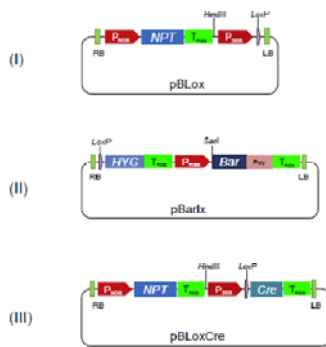


図 2. 本研究で使用された 3 種のバイナリーベクター。

を floral dip 法によりシロイヌナズナに導入し、サザンブロット法によりコピー数を推定した。挿入コピー数が少ないものを選び、TAIL-PCR 法により挿入位置を推定した。

③ 作出した系統を交配し、異なった染色体上に 2カ所 LoxP を含む系統を作出した。これに、Cre リコンビナーゼ発現個体を交配し、LoxP 配列特異的組換えが誘発した。

④ Cre リコンビナーゼを導入した個体に、相互転座等が誘発されているかどうかを PCR、FISH 法等により確認した。

⑤ すでにゲノム再編成が確認された個体から RNA を抽出し、アジレント社のマイクロアレイにより遺伝子発現解析を行った。ゲノム全体の遺伝子発現プロファイルは、Java TreeView (Saladanha 2004)の Karyoscope 分析によった。

#### 4. 研究成果

##### (1) 研究の主な成果

シロイヌナズナの核ゲノムを人工的に再構成させるため、配列特異的組換え Cre-LoxP システムを応用した。これには、異なった染色体に LoxP 配列を導入し、2カ所の LoxP 間で Cre リコンビナーゼによる組換えを誘発する必要がある。そのため、以下の 2 種類のアプローチを取った。

① トランスポゾンによる LoxP 転移：バイナリーベクター pDs-Lox の T-DNA (図 1) がゲノム中に一箇所、シングルコピーで挿入されている系統を選び、Ac TPase 発現個体との交配を行った。Ds-LoxP-Ds が転移した場合は、ハイグロマイシン耐性遺伝子が発現するため、自殖 F2 種子をハイグロマシ含有培地上で発芽させ、耐性個体を選抜した。DS-LoxP-DS の転移位置は、TAIL-PCR により決定した DS の近傍配列から特定した。これまで、20 の転移を確認しており、シロイヌナズナの染色体上にマップした (図 3、緑三角)。

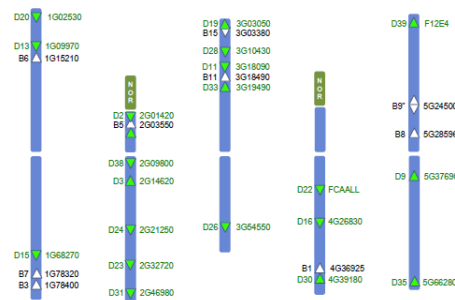


図 3. 本研究で創出された系統の LoxP 挿入位置。白三角 (B#) : アグロバクテリウムによる挿入、緑三角 (D#) : トランスポゾンによる転移、三角形の向きは、LoxP の方向を示す。

② LoxP 導入コンストラクトの作成 : バイナリーベクター pBlox, pBarLox または pBloxCre を用いてシロイヌナズナを形質転換し、サザンブロット法によりコピー数を推

定した。挿入コピー数が少ないものを選び、TAIL-PCR法により決定されたT-DNAのボーダー領域隣接配列から挿入位置をマップした(図3、白三角)。

③ Cre リコンビナーゼによる組換えと相互転座誘発:LoxP間の組換えにより、相互転座が誘発可能かを確認するため、pBloxCre2-2(図3、B15)とpBarlx3-6-1(図3、B9)を交配し、そのF1をFISH法で調べた。その結果、LoxPが挿入されている1番染色体下腕と3番染色体の上腕の間で相互転座が起こっていることが確認された(図4)。しかし、こ

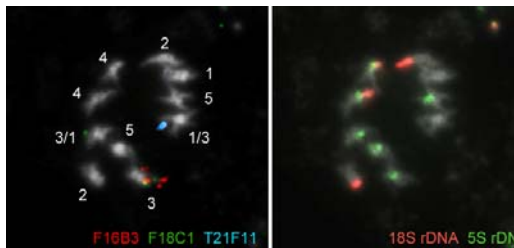


図4. F1個体(pBloxCre2-2 x pBarlx3-6-1)のFISH像。左)プローブ:BACクローンF16B3、F18C1(3番染色体)、T21F11(1番染色体)、右)プローブ:18Sと5SrDNA。3/1と1/3:1番染色体と3番染色体の相互転座。

これらの個体には、野生型と比べて顕著な表現型の変化は認められなかった。一方で、pBlox1-4(1番染色体の下腕末端、図3、B3)とpBarlx3-6(5番染色体上腕、図3、B9)とのF1に、Cre遺伝子(IntCre:5'にイントロンを付加したCre遺伝子)を導入した植物体には、葉がギザギザになる形質(serrated leaf)が現れた。この形質に係わる遺伝子は7種(AT2G23760, AT2G27100, AT3G51060, AT4G32700, AT4G36260, AT4G36870, AT5G37055)知られているが、相互転座に関与する染色体上の遺伝子は、AT5G37055しかない。しかし、この遺伝子の位置は転座ポイント(AT5G24500)から約6.3Mb離れていることから、AT5G37055が直接破壊されたとは考

えにくい。現在、この遺伝子の発現をRT-PCRで解析しており、今後マイクロアレイによる解析を含めクロマチン構造の変化なども含め原因を探る。

④ ゲノム再編成による遺伝子発現への影響:すでに詳細な解析が済んでいるゲノム再編成系統3種(RK1, RK2, RK3)について(Yokota et al. 2010, 2011)、花芽から抽出したRNAを用いて、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果、ゲノム(染色体)が重複している領域に座乗する遺伝子の半数近くは、発現が上昇していた(図5)。しかし、残りの半数以上の遺伝子にははっきりとした発現変化が認められなかった。

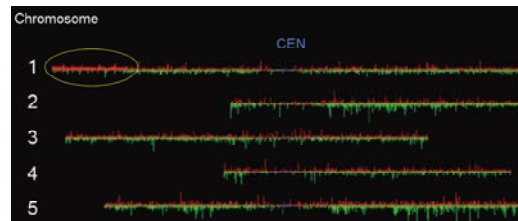


図5. RK1のKaryoscope分析。赤は発現上昇している遺伝子、緑は発現減少している遺伝子。円で囲ったところは、ゲノムの重複が確認されている領域。

一方で、重複領域以外の遺伝子にも、顕著な発現の増減が見られた。発現上昇が認められた遺伝子の効果は、ほとんどが加算的であったが、一部は乗算的であった。発現が抑制された遺伝子は、全体の数%しか確認されなかった。RK1では、他の系統(RK2, RK3)に比べて、減数分裂時ミニ染色体αの対合が安定する傾向にある。そこで、38の減数分裂関連遺伝子については、それらの発現様式を比較した(図6)。その結果、発現が低下した遺伝子は2種同定されたものの、RK1で発現が有意に上昇する遺伝子は確認されなかった。RK1では他の系統と比べて、57の上方発現遺伝子が確認されたが、RK1に現れる花の形態異常との関連はまだ確認されていない。

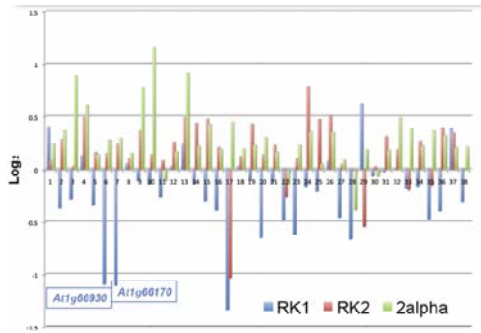


図 6. 3 種の核型再編成系統における減

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

シロイヌナズナではこれまで、Cre/LoxP システムを用いて、欠失突然変異の誘発などが試みられてきた。また、導入したマーカー遺伝子の除去にも利用されてきた。しかし、ゲノム全体を再編成させるような試みは行われていない。今回の我々の研究成果は、Cre/LoxP システムによって、染色体間の相互転座を誘発できることを示し、複数の LoxP を介して大がかりなゲノム再編成が可能であることを示唆した。また、このような相互転座によるクロマチン構造の変化とそれに伴う突然変異も示唆されたことから、新たな変異原としての利用も考えられる。

(3) 今後の展望

今回の研究の中で、pDs-LoxP が 1 箇所に複数コピー導入された系統が特定された。これらの系統を用いると、LoxP を一度に、いろいろな箇所に転移させることができる。今後はこれらの系統を利用することにより、ゲノム全体の再編成の可能性を探る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計2件)

① Yokota, E., Shibata, F., Nagaki,

K., Murata, M. Stability of monocentric and dicentric ring minichromosomes in *Arabidopsis*. *Chromosome Research*, 査読有, 19, 2011, 999-1012.

② Yokota, E., Nagaki, K., Murata, M. Minichromosome stability induced by partial genome duplication in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma*, 査読有, 119, 2010, 361-369.

〔学会発表〕 (計7件)

① 村田稔・柴田洋・藤本聡・長岐清孝、シロイヌナズナにおける染色体再編成の誘発とゲノム安定性、日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 9 月 24-26 日、福岡市。

② Murata, M. *Arabidopsis* ring minichromosomes: A candidate for artificial chromosome vector. Japan-Germany Joint Seminar “Frontiers of Plant Chromosome Research: Centromeres and Artificial Chromosomes”, Oct. 31-Nov. 4, 2011, Gatersleben, Germany

③ 横田悦子・柴田洋・長岐清孝・村田稔、シロイヌナズナ環状ミニ染色体の構造と安定性、染色体学会第 62 回年会、2011 年 11 月 11-13 日、平塚市。

④ 村田稔・柴田洋・弘中明子・柏原壺成・長岐清孝、Cre/LoxP 組換えによるシロイヌナズナ染色体の大規模再編成、日本遺伝学会第 83 回大会、2011 年 9 月 20-23 日、京都市。

⑤ Murata, M. Influence of partial genome duplication on gene expression: a study case in *Arabidopsis*. Gatersleben Research Conference X, Nov. 22-24, 2010, Gatersleben, Germany

⑥ 横田悦子・長岐清孝・村田稔、シロイヌナズナにおいて新規に見出された染色体構造変異とその伝達、染色体学会第 61 回年会、

2010年11月5-7日、船橋市。

⑦ 村田稔・横田悦子・長岐清孝、シロイヌナズナに誘発された部分的ゲノム重複と遺伝子発現、日本遺伝学会第82回大会、2010年9月20-23日、札幌市。

[図書] (計1件)

① Murata, M. Wiley-Blackwell, Plant centromere biology, 2013, 3-14

## 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・技術職員  
研究者番号：60379807