

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658012

研究課題名(和文) 遺伝子の発現を安定化させるゲノムDNA配列の体系的スクリーニング及びその解析

研究課題名(英文) Development of a systematic method to screen DNAs to make gene expression stable and analysis of the DNAs.

研究代表者

岸本 直己 (Kishimoto, Naoki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所企画管理室・企画チーム長

研究者番号：00370651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：転写レベルの遺伝子不活化(Transcriptional gene silencing:TGS)を回避して導入遺伝子を安定的に発現させるためのDNA配列を植物ゲノムから検索する方法の確立と、それを用いて新規な"TGS抑制配列"("ASR")の検索を試みた。岸本ら(2013)が用いたタバコ形質転換体の方法論を応用し、導入したArabidopsis開花遅延遺伝子FWAが必ずTGSを起こす実験系に基づく新規ASRの体系的検索法を開発し、岸本ら(2013)が発見したASR602についてTGS抑制領域を絞り込むことができた。しかし植物のランダムDNAライブラリーから新規ASRを検索するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：To screen novel DNA fragments showing ability to circumvent position effects in eukaryote genomes, including transcriptional gene silencing (TGS) of transgenes, I planned to establish a method for screening DNAs suppress TGS (Anti-silencing regions: ASRs) from plant genome and to try screening of random DNA library from plant genome using the method. To develop a systematic method to screen such DNAs, I applied the concept of the screening method in Kishimoto et al. (2013), which use a silenced transgenic tobacco plant in which secondary introduced transgene shows obligatory promoter-homology dependent TGS, to this study. I developed a screening method to assay abilities of DNAs suppressing TGS, based on the phenomena that Arabidopsis FWA genomic transgene shows obligatory TGS in the genome. Using this method, I determined which region to suppress TGS most efficiently in ASR602 found by Kishimoto et al. (2013). However I could not construct random genomic library for the screening.

研究分野：高等植物の分子遺伝学

キーワード：バイオテクノロジー 植物 遺伝子 サイレンシング 育種学

### 1. 研究開始当初の背景

近年の研究により、真核生物のゲノム内では、内在性遺伝子の発現やトランスポゾンの転位に「エピジェネティックな制御機構」が働いていることが判ってきた(Allisら、2007)。一方、形質転換された遺伝子がゲノム内に挿入された位置に依存して転写が抑制される現象(位置効果)など、“転写レベルの遺伝子不活化(Transcriptional gene silencing: TGS)”は、一度生ずると後代に遺伝するため(Mitsuhashi et al., 2006等)組換え技術を用いた分子育種の大きな障害となっている。最近、TGSも「内在性領域に作用するエピジェネティックな機構」によって制御されていることが明らかになってきた(Allisら、2007)。これらの知見を総合すると、真核生物ゲノム内には、TGSの生起を決定するDNA配列が存在すると考えられる。実際に、真核生物ゲノム内からは、TGSを阻止するDNA配列が見い出されているが、これらはすべて既知の遺伝子領域の機能解析結果として見い出されたものであり、植物において当該配列の体系的なスクリーニングを実施した研究は見当たらない。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、2つある。1つは、植物ゲノム内から、“TGSを阻止するDNA配列”(anti-silencing region: ASR)を体系的にスクリーニングする方法を確立すること、もう1つは、その方法を用いて、体系的なスクリーニングを行うことである。本スクリーニング方法を確立するための要点は、3つある(1)から(3)。

(1) 「導入遺伝子が必ずTGSを起こす形質転換システム」を利用する(詳細は後述;概念図は図1)。

(2) 次に、マーカー遺伝子のプロモーター領域上流に、他種植物ゲノムDNA断片を挿入した“形質転換用ゲノミックライブラリー”を作製する。もし、導入されたゲノミックライブラリーの中に、導入遺伝子を安定的に発現させる配列、即ち“TGSを阻止するDNA配列”が含まれていれば、導入遺伝子が不活化を免れる形質転換個体が得られるはずである。つまり、“TGSを阻止するDNA配列”を有する形質転換個体では、マーカー遺伝子は(TGSを起こさずに)発現するはずである(図1)。

(3) 従って、(1)と(2)を用いて形質転換個体を作製し、マーカー遺伝子が発現している個体(=マーカー遺伝子がTGSを免れた個体)を選抜する。これら選抜された個体は“TGSを阻止するDNA配列”を有しているので、選抜個体からDNAを抽出し、PCRを用いて簡便に“TGSを阻止するDNA配列”を回収することが出来る。

本研究代表者らは、本研究実施前までに行った先行研究において、TGSを示すタバコ形質転換体を用いた「導入遺伝子が必ずTGSを起こす形質転換システム」を構築し、この系を用いてミヤコグサDNAライブラリーの小規模スクリーニング(ゲノムサイズのわずか1%に相当)を実施し、“TGSを阻止するDNA配列”(ASR)を3種類単離した。

この系を用いてミヤコグサDNAライブラリーの小規模スクリーニング(ゲノムサイズのわずか1%に相当)を実施し、“TGSを阻止するDNA配列”(ASR)を3種類単離した。

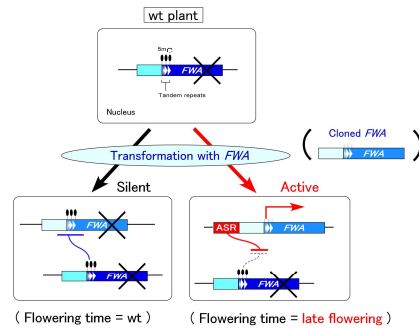


図1 ASRスクリーニングの原理

×は、転写抑制状態(不活化状態)を表す。5mC:メチル化シトシン、ASR:遺伝子発現を安定化するDNA配列[anti-silencing region]、FWA:シロイヌナズナの開花遅延遺伝子

そのうち1配列は、異種植物(シロイヌナズナ)において、異なるプロモーターのTGS阻止活性を有することも明らかにした(研究開始当時には、これらの結果について、特許出願中、かつ、論文投稿中であった。)

本研究では、この先行研究の実施過程で見出した原理、即ち、タバコ形質転換体を用いた「導入遺伝子がTGSを起こす形質転換システム」の原理を、より簡便な“シロイヌナズナの開花遅延遺伝子FWAの形質転換システム”に応用して(本研究目的(1))、複数の植物種から“TGSを阻止するDNA配列”を、より大規模かつ体系的にスクリーニングするシステムを確立すると共に、そのシステムを用いて、当該スクリーニングを実施すること(本研究目的(2))を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) “形質転換用ゲノミックライブラリー”の作製:

シロイヌナズナの開花遅延遺伝子FWAをマーカー遺伝子として(後段(2)で詳述)そのプロモーター領域にあるdirect repeatsの上流に、他種植物ゲノムDNA断片を挿入した“形質転換用ゲノミックライブラリー”を作製する。本研究では、ゲノミックDNAライブラリーとして供試する植物種として、ゲノム配列解析が進んでいるイネ、トマト、ミヤコグサ等を供試予定であった。

(2) 「導入遺伝子が必ずTGSを起こす形質転換システム」を用いた目的配列のスクリーニング:

本研究代表者らの先行研究によって確立された、TGSを示すタバコ形質転換体を用いた「導入遺伝子が必ずTGSを起こす形質転換システム」を用いたASRのスクリーニング法の原理を、既にシロイヌナズナで明らかにされ

ていた「開花遅延遺伝子 *FWA* を形質転換すると、*FWA* は、必ず TGS を起こす」という現象に応用し、より簡便な ASR のスクリーニング方法確立を試みた。

この「形質転換システム」の原理は以下の通りである：シロイヌナズナの *FWA* 遺伝子は野生型に形質転換すると必ず TGS を起こす (Cao and Jacobsen, 2002)。即ち、*FWA* 遺伝子は野生型で不活化状態にあり、そのプロモーター領域にある direct repeats が高メチル化されている；当該領域が低メチル化している変異体 (*fwa*) では、*FWA* は発現し、野生型に比べて開花時期が遅くなる；一方、野生型に、当該領域を含む *FWA* 遺伝子を *Agrobacterium* を用いて形質転換しても、導入された *FWA* 遺伝子は不活化されるため、開花時期は野生型と同じである (Cao and Jacobsen, 2002)。もし、導入する *FWA* 遺伝子のプロモーター領域上流に“TGS を阻止する DNA 配列”を融合させれば、*FWA* は発現し、野生型に比べて開花が遅くなると予想される。この予想は、先行研究で行った確認実験結果、即ち、前述のタバコ形質転換体を用いた ASR スクリーニングで得た ASR の 1 つ、ASR602 をシロイヌナズナ *FWA* 遺伝子形質転換系を用いて“TGS を阻止する能力”が確認できた結果からも支持される (Kishimoto et al., 2013)。従って、「導入遺伝子が“必ず”TGS を起こす形質転換システム」としては、この「シロイヌナズナ *FWA* 遺伝子の形質転換系」を利用し、“スクリーニングの指標”としては、評価が非常に容易な“開花時期の遅れ”を用いる (図 1)。

先行研究で開発したタバコ形質転換体を用いたシステムでは、独立した形質転換個体 1000 株から 1-2 株程度の割合でスクリーニングできた (Kishimoto et al., 2013)。シロイヌナズナを用いる本スクリーニング系では、比較的小面積で多数のスクリーニングが可能であり、更に、一世代が週単位であるため、時間的にも効率良くスクリーニングが可能になると予想される。また、本方法では、以下の通り、“TGS を阻止する DNA 配列”を有している個体の選抜と“当該配列”の回収も容易である。即ち、(1)と(2)を用いて作製した形質転換個体を栽培し、“*FWA* 遺伝子の活性化”即ち“開花時期の遅れ”を示した個体を選抜すれば良い。また、選抜された個体の DNA から、ライブラリー構築に用いたコンストラクト内の特異的プライマーを用いて、PCR によって簡単に“TGS を阻止する DNA 配列”を回収することが可能である。

上述の様に、シロイヌナズナ *FWA* 遺伝子の形質転換系を応用して、(1)で記した各種植物 DNA 断片からなるゲノミックライブラリーをスクリーニングすれば、先行研究で開発したタバコ形質転換体を用いる方法よりも、更に簡便で迅速な ASR スクリーニング方法が確立できると予想される。また、大規模スクリー

ングも実施可能になると考えられる。

#### 4. 研究成果

Kishimoto et al. (2013) が開発した、TGS を示すタバコ形質転換体を利用した ASR スクリーニング法の原理を応用し、導入したシロイヌナズナ開花遅延遺伝子 *FWA* を野生型に形質転換すると必ず TGS を起こす実験系に基づく新規な ASR スクリーニング法を開発することができた。

本方法を用いて、DNA 断片の“TGS を阻止する能力”をモニターできることを確認する目的で、Kishimoto et al. (2013) によって発見された ASR602 について、TGS を抑制する能力を領域の絞り込みを行った (図 2)。

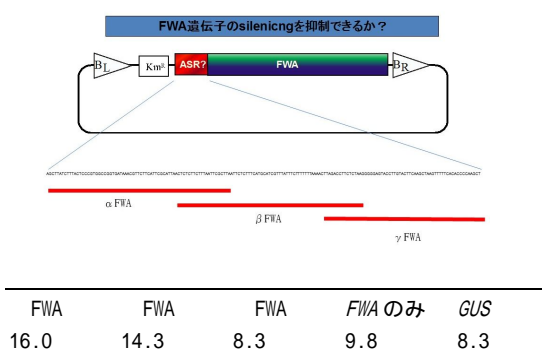


図 2 新規な ASR スクリーニング法の有効性を確認するための実験。「*FWA*」、「*FWA*」、「*FWA*」: Kishimoto et al. (2013) で見いだされた ASR602 を 3 分割し、*FWA* のプロモーター領域上流に融合させたコンストラクト 3 種類を示す。「*FWA* のみ」: 上記 ASR602 の 3 領域を全く含まないコンストラクトの形質転換体。「*GUS*」: *GUS* コンストラクト (図なし)。

(「*FWA* のみ」と「*GUS*」は、いずれもネガティブコントロール用コンストラクトを形質転換した個体)。

表の上段: 実験区 (それぞれ異なるコンストラクトを形質転換した個体群)。表の下段: 数値は、各コンストラクト形質転換体シロイヌナズナの開花時ロゼッタ葉数。葉数が多いほど開花が遅い、即ち、*FWA* 遺伝子が発現していることを示唆している。

ASR602 (171bp) をおおよそ均等に 3 分割して、導入する *FWA* 遺伝子のプロモーター領域上流に融合させた 3 種類のコンストラクトを構築し、シロイヌナズナ野生型 (Col-0) に形質転換した。その結果、全 5 実験区でいずれも供試個体数は少ないが (3~10 個体の範囲) 最も 5' 上流領域と中間の領域(「*FWA*」と「*FWA*」)が“TGS を阻止する能力”を有していること、最も 3' 下流領域には“TGS 阻止能力”が殆どないこと、が示唆された (図 2 の表)。

以上の様に、本法を用いて、Kishimoto et al. (2013) が発見した ASR602 について TGS 抑制領域を絞り込むことが出来たことから、本法が ASR スクリーニングに利用できることが証明された。しかし、*FWA* 遺伝子を用いて構築する予定だった植物種のランダム DNA ライブラリーは、ライブラリー構築用に購入した

ベクターの公表配列に誤りがあったこと等により、研究期間中に DNA ライブラリーを構築することができなかった。従って、研究期間中に、それら DNA ライブラリーを用いた新規 ASR の体系的なスクリーニングを実施するまでには至らなかった。現在、ライブラリーの構築に取り組んでいる。

#### <引用文献>

- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Epigenetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007, 502
- Mitsuhara Ichiro, Yatou Osamu, Iwai Takayoshi, Naito Yumi, Nawa Yoshiko, Ohashi Yuko, Genetic studies of transgenic rice plants overproducing an antibacterial peptide show that a high level of transgene expression did not cause inferior effects on host plants, Plant Biotechnology 23(1), 63-69, 2006
- Cao Xiaofeng, Jacobsen Steven E., Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in De Novo DNA methylation and gene silencing, Current Biology, 12(13), 1138-1144, 2002
- Kishimoto Naoki, Nagai Jun-ichi, Kinoshita Takehito, Ueno Keiichiro, Ohashi Yuko, Mitsuhara Ichiro, DNA elements reducing transcriptional gene silencing revealed by a novel screening strategy, PLoS One, 8(1), 2013, e54670

#### 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1件)

Kishimoto Naoki, Nagai Jun-ichi, Kinoshita Takehito, Ueno Keiichiro, Ohashi Yuko, Mitsuhara Ichiro, DNA elements reducing transcriptional gene silencing revealed by a novel screening strategy, PLoS One, 査読有, 8(1), 2013, e54670  
DOI:10.1371/journal.pone.0054670

##### [学会発表](計4件)

岸本直己、長井純一、木下剛仁、上野敬一郎、大橋祐子、光原一郎、新規スクリーニング法により単離された転写型遺伝子サイレンシングを軽減する DNA エlement、第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ 4W51「遺伝子サイレンシング: その進化的普遍性と多様性」講演、平成 24 年 12 月 14 日、「福岡国際会議場(福岡県・福岡市)」  
Kishimoto Naoki、Nagai Jun-ichi、Kinoshita Takehito、Ueno Keiichiro、Ohashi Yuko、Mitsuhara Ichiro, Isolation of DNA elements reducing

transcriptional gene silencing by a novel screening strategy. COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES “Plant Epigenetics, Stress and Evolution” (Oral session), 平成 24 年 10 月 30 日、「蘇州市(中華人民共和国)」

木下剛仁、長井純一、岸本直己、上野敬一郎、大橋祐子、光原一郎、ミヤコグサから単離した TGS 抑制エレメントによるプロモーターコピー数に依存したサイレンシングの回避、日本育種学会第 122 回講演会口頭発表、平成 24 年 9 月 14 日、「京都産業大学(京都府・京都市)」

長井純一、木下剛仁、岸本直己、上野敬一郎、大橋祐子、光原一郎、転写型遺伝子不活性化(transcriptional gene silencing)を抑制する DNA 配列のスクリーニング法の開発、第 30 回日本植物細胞分子生物学会大会口頭発表、平成 24 年 8 月 5 日、「奈良先端科学技術大学院大学(奈良県・生駒市)」

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

岸本直己(KISHIMOTO, Naoki)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所・企画管理室・企画チーム長  
研究者番号: 00370651

##### (2)研究分担者 なし

##### (3)連携研究者

光原一郎(MITSUHARA, Ichiro)  
独立行政法人農業生物資源研究所・植物科学研究領域・上級研究員  
研究者番号: 80370683