

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840088

研究課題名(和文)ゼニゴケT-DNA挿入変異体集団を用いたオルガネラ低温定位運動の制御遺伝子探索

研究課題名(英文) Screening for genes involved in the cold-induced organelle relocation using a T-DNA insertion library of the liverwort *Marchantia polymorpha*

研究代表者

児玉 豊 (Kodama, Yutaka)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号：00455213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゼニゴケの簡便なアグロバクテリウム形質転換技術(アガートラップ法)を開発し、1万系統以上のT-DNA挿入変異体集団を作出した。この変異体集団を用いて、オルガネラ低温定位運動が壊れた変異体を探索し、1系統の変異体を単離した。様々な解析の結果、この変異体では、既知遺伝子ではなく、新奇遺伝子が破壊されていることがわかった。今後は、この新規遺伝子に関する研究を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：We developed a simplified *Agrobacterium*-mediated transformation technique (AgarTrap method) for the liverwort *Marchantia polymorpha*, and produced a T-DNA insertion mutant library containing over 10 thousands lines. Using the mutant library, we explored mutant(s) deficient in the organelle relocation movement response, and successfully found one mutant. Based on various experiments, we found that the mutant lacks a novel gene, but not known genes involved in the response. In our future work, we will analyze the novel gene.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オルガネラ 葉緑体 低温定位 寒冷定位 T-DNA ゼニゴケ 葉緑体運動

1. 研究開始当初の背景

オルガネラ運動は植物の環境適応にとって重要な生理現象であり、植物細胞内で頻繁に観察される。代表例は、光誘導性の葉緑体運動である(光定位運動)。たとえば葉緑体は、光合成を効率よく行うために弱い光に集まり、光ダメージを避けるために強い光から逃げるということが知られている。これらの反応は、それぞれ、集合反応および逃避反応と呼ばれている。以前、研究代表者は、光定位運動に関する研究を行っていた(PNAS, 2010)。その研究過程で、ホウライシダの葉緑体配置が低温処理で変化することを発見した(J Plant Res, 2008)。25 °C の温度下で弱い光に集まった葉緑体を弱光のまま 4 °C に移すと、葉緑体が弱い光から逃げるということがわかった。過去の文献を調べると、最も新しい報告は、約 100 年前の 1908 年に発表された独語論文で、ヒョウタンゴケを用いて低温誘導性の葉緑体運動が観察されていた(Senn 1908)。しかし詳細な解析は行われていなかった。そこで研究代表者は、100 年ぶりの再発見となった本現象を葉緑体の「低温定位運動(あるいは寒冷定位運動)」と名付け、ホウライシダを用いて詳細な生理実験および関連遺伝子の同定を行った(J Plant Res, 2008)。

ホウライシダを用いた様々な実験の結果、面白い事に、低温定位運動には、光定位運動と同様、青色光受容体フォトトロピン(PHOT)が必須であることがわかり、コケやシダには PHOT を介した低温信号伝達経路の存在が示唆された。また、研究代表者によるゼニゴケを用いた最近の研究から、葉緑体だけでなく、核やペルオキシソームも低温定位運動を起こすことが示されており、低温下では複数のオルガネラが同調的に細胞内配置を変えることがわかってきた(Plant Cell Environ 2013)。このようなオルガネラの低温定位運動は、植物の越冬性や低温耐性などに関与すると示唆されているが、その制御メカニズムは不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、低温定位運動の分子制御メカニズムを明らかにするため、ゼニゴケ変異体集団を作出し、オルガネラ低温定位運動が誘導されない変異体の探索から制御遺伝子を同定することを目指した。

3. 研究の方法

独自のアグロバクテリウム形質転換法を用いてゼニゴケ T-DNA 挿入変異体集団の作出を行った。作出した T-DNA 挿入変異体集団を顕微鏡によって一個体ずつ観察して、低温定位運動が誘導されない変異体を探索した。目的の変異体の単離後は、変異体における既知の制御遺伝子の発現などを確認後、挿入されている T-DNA 領域の周辺配列を解析した。

4. 研究成果

ゼニゴケでは、変異体集団の作出と整備が行われていなかったため、本研究では、T-DNA 挿入変異集団を作出した。これを円滑に実施するために、ゼニゴケ胞子を材料にして、アガートラップ法と名づけた簡便で効率的なアグロバクテリウム形質転換法を開発した(Plant Cell Physiol 2014)。アガートラップ法は、約 1 週間で 100 個体以上の独立した形質転換体を得ることができる手法である。本研究では、アガートラップ法を用いて、1 万系統以上の T-DNA 挿入変異体を作成した(図 1)。

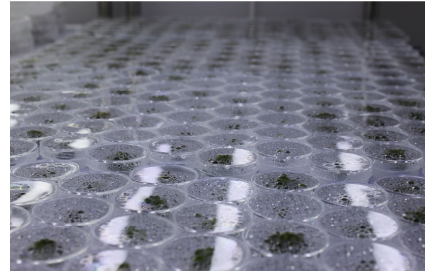


図 1 . シャーレに分離した T-DNA 挿入変異体

その後、この作出した T-DNA 挿入変異体集団を用いて低温定位運動が誘導されない変異体を探索した。その結果、1 系統の変異体(*nep1* 変異体)を単離することができた。*nep1* 変異体では、低温定位運動だけでなく、逃避反応も誘導されなかった。一方、集合反応は正常であった。これまで、ゼニゴケにおいて、このような反応を示す変異体は見つかっていない。また、*nep1* 変異体における既知制御遺伝子の発現を確認したが、全て正常であった。以上の結果から、新奇遺伝子に変異が入っていると予想された。Tail-PCR、Inverse-PCR、リアルタイム PCR、次世代シーケンサーを用いた解析から、少なくとも 10 コピー以上の T-DNA がゲノムに挿入されていることがわかった。現在、複数の候補遺伝子に関して相補実験などを行っており、原因遺伝子の特定を急いでいる。

この実験過程で、相補実験を効率良く行うために、無性芽と葉状体を材料にしたアガートラップ法を開発した(J Plant Res 2015, Plant Biotechnol 2015a)。また、相補遺伝子には蛍光タンパク質遺伝子を融合し、タンパク質の細胞内局在性も調べるため、植物で高輝度となる GFP の選別や、葉緑体自家蛍光をキャンセルできるタイムゲート法の開発も行った(Plant Biotechnol 2015b, Plos One 2016)。以上の技術を駆使して、*nep1* 変異体の原因遺伝子を解析する予定である。また、T-DNA 変異体集団の他にも、EMS 処理によって別の変異体集団も作出しており、この集団からも、1 系統の変異体(*nep2*)を単離した。さらに、低温定位運動がアクチン繊維によって制御されること(PeerJ 2016)、葉緑体の運動反応と同時に凝集反応が誘導されることも明らかにした(J Plant Res 2017)。

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 15 件)

- [1] Tanaka H, Sato M, Ogasawara Y, Hamashima N, Buchner O, Holzinger A, Toyooka K and Kodama Y (2017)
Chloroplast aggregation during the cold-positioning response in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. J Plant Res, 印刷中. 査読有
- [2] Kimura S and Kodama Y (2016)
Actin-dependence of the chloroplast cold positioning response in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. PeerJ, 4:e2513. 査読有
- [3] 藤井雄太, 児玉豊 (2016)
誤解しないBiFC法のすゝめ: 蛍光タンパク質を使ったタンパク質間相互作用イメージング.
植物の生長調節, 51: 48-51. 査読無
- [4] Kodama Y (2016)
Time gating of chloroplast autofluorescence allows clearer fluorescence imaging *in planta*. PLoS ONE, 11(3): e0152484. 査読有
- [5] Tsuboyama-Tanaka S, Nonaka S and Kodama Y (2015)
A highly efficient AgarTrap method for genetic transformation of mature thalli of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. Plant Biotechnol, 32:333-336. 査読有
- [6] 田中(坪山)祥子, 児玉豊 (2015)
アガートラップ法: 寒天に捕らえたゼニゴケを簡単に形質転換する.
植物の生長調節, 50: 83-86. 査読無
- [7] Fujii Y and Kodama Y (2015)
In planta comparative analysis of improved green fluorescent proteins with reference to fluorescence intensity and bimolecular fluorescence complementation ability. Plant Biotechnol, 32:81-87. 査読有
- [8] Tsuboyama-Tanaka S and Kodama Y (2015)
AgarTrap-mediated genetic transformation using intact gemmae/gemmalings of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. J Plant Res, 128:337-344. 査読有

〔学会発表〕(計 54 件)

- [1] Tanaka H and Kodama Y (Poster)
Aggregation of chloroplasts during the cold-positioning response in *Marchantia polymorpha* L. Gordon Research Conference: Chloroplast Biotechnology, Ventura, USA, January 8-13, 2017.
- [2] Fujii Y, Okajima K and Kodama Y (Poster)
Chloroplast avoidance response via the two photosensory domains of phototropin blue light receptor in the liverwort *Marchantia polymorpha*. Gordon Research Conference: Chloroplast Biotechnology, Ventura, USA, January 8-13, 2017.
- [3] Kodama Y, Tsuboyama-Tanaka S and Hamashima N (Poster)
AgarTrap methods: easy and high-efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. 2016 International Symposium on Plant Transformation Biotechnologies, Taipei, Taiwan, October 17-19, 2016.
- [4] Kodama Y (Poster)
Visualization of Phototropin, a Blue-light Photoreceptor, on Chloroplast Outer Membrane of the Liverwort *Marchantia polymorpha*. The 7th Asia & Oceania Conference on Photobiology, Taipei, Taiwan, November 15-18, 2015.
- [5] Tsuboyama-Tanaka S and Kodama Y (Poster)
AgarTrap technology for genetic transformation of *Marchantia polymorpha* L. International Marchantia Workshop 2014, Kobe Japan, December 2014.
- [6] 児玉豊 (招待講演) タイムゲート法: 時間をずらして葉緑体の自家蛍光を消す. 第58回日本植物生理学会年会・鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)・3月・2016年
- [7] 田中(坪山)祥子, 児玉豊 (ポスター)
苔類ゼニゴケをモデルとした簡便な形質転換法の開発. 第6回オプトバイオシンポジウム・宇都宮大学(栃木県・宇都宮市)・12月・2016年
- [8] 濱島典子, 児玉豊 (ポスター) 光合成の最適化に関する遺伝子の探索. 第6回オプトバイオシンポジウム・宇都宮大学(栃木県・宇都宮市)・12月・2016年

[9] 児玉豊 (招待講演) タイムゲート法：時間をずらして葉緑体の自家蛍光を消す．第6回オプトバイオシンポジウム・宇都宮大学 (栃木県・宇都宮市)・12月・2016年

[10] 児玉豊 (招待講演) Tracking Organelle Moving in Plant Cell. 第39回日本分子生物学会年会・フォーラム「細胞動態のイメージングと定量」・パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)・12月・2016年

[11] 児玉豊 (招待講演) タイムゲート法：時間をずらして葉緑体の自家蛍光を消す．第80回日本植物学会大会・沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)・9月・2016年

[12] 児玉豊 (口頭) 葉緑体自家蛍光の時間分解による明瞭な植物蛍光イメージング．第34回日本植物細胞分子生物学会大会・信州大学 (長野県・上田市)・9月・2016年

[13] 濱島典子, 長谷川智士, 早崎芳夫, 児玉豊 (ポスター) 温度制御の可能な顕微鏡システムを用いた葉緑体寒冷定位運動の解析．第79回日本植物学会大会・新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市)・9月・2015年

[14] 濱島典子, 児玉豊 (ポスター) アガートラップ法を用いたゼニゴケ T-DNA 挿入突然変異体集団の作出．第56回日本植物生理学会年会・東京農業大学 (東京都・世田谷区)・3月・2015年

[15] 田中 (坪山) 祥子, 児玉豊 (ポスター) "ゼニゴケ成熟葉状体切片の迅速なアガートラップ形質転換" 第56回日本植物生理学会年会・東京農業大学 (東京都・世田谷区)・3月・2015年

[16] 田中 (坪山) 祥子, 児玉豊 (招待講演) アガートラップ法の開発：寒天に捕らえたゼニゴケを簡単に形質転換する．第32回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム「植物形質転換デザインの最前線」・アイーナいわて県民情報交流センター (岩手県・盛岡市)・8月・2014年

[17] 田中 (坪山) 祥子, 児玉豊 (口頭) アガートラップ法によるゼニゴケ無性芽の簡便な形質転換．第32回日本植物細胞分子生物学会大会・アイーナいわて県民情報交流センター (岩手県・盛岡市)・8月・2014年

〔その他〕

ホームページ

<http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp/kodama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 豊 (KODAMA, Yutaka)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号：00455213