

氏名(本籍)	もり 森	た 田	りょう 竜	へい 平
学位の種類	博	士	(農	学)
学位記番号	農	博	第	747号
学位授与年月日	平	成	15年	3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	減数分裂期に発現誘導するプロモーターを用いたイネに おけるトランスポゾンタギングシステムの開発研究			
論文審査委員	(主査)	教授	西尾	剛
	(副査)	教授	山谷	知行
		教授	亀谷	壽昭
		助教授	鳥山	欽哉

論文内容要旨

緒言

*Ac/Ds*トランスポゾンタギングは、非自律性因子の*Ds*に*Ac*転移酵素を与えることで転移を誘導し、*Ds*を遺伝子内に挿入して遺伝子を不活化することで遺伝子機能を解析する手法である。*Ds*系統と*Ac*転移酵素系統を交配することで、 F_1 個体の細胞で*Ds*の転移が起こり、これが次世代に遺伝すればトランスポゾンタギング系統となる (Fig. 1)。 *Ac*転移酵素のプロモーターには、通常CaMV 35Sプロモーターが用いられる。しかし35Sプロモーターは、体細胞で強く発現誘導するが、生殖細胞での発現誘導が弱いため次のような問題が起こる。

- [1] 次世代に遺伝する生殖細胞での転移が起こりにくい。
- [2] 同一の F_1 個体から得られる後代が全て同じ転移を起こしていることが多い。
- [3] *Ds*の転移が複数回起こり、タギングされない塩基配列の変異をもたらす。

生殖細胞で*Ds*の転移を誘導すれば、これらの問題を回避して、トランスポゾンタギング系統を効率良く作出できると期待される。生殖細胞で*Ds*の転移を誘導する研究は、タバコとシロイヌナズナで予備的な実験が行われているのみで、トランスポゾンタギング系統の作出に実用化された例が無い。そこで本研究では、減数分裂期に特異的に発現する遺伝子のプロモーターを利用し、イネの生殖細胞での*Ds*転移の誘導を試みた。また、遺伝子領域へ*Ds*が転移しているかを調査し、トランスポゾンタギング系統を効率良く作出できるかを検討した。

第1章 減数分裂特異的遺伝子のプロモーターを用いた生殖細胞での*Ds*転移の誘導

1-1 *LIM*プロモーターの発現誘導解析

生殖細胞で*Ds*の転移を誘導するためのプロモーターとして、テッポウユリの減数分裂期特異的に発現する*LIM10*と*LIM18*に注目し、DNAの分譲を受けた。*LIM10*プロモーターと*LIM18*プロモーターのイネでの発現パターンを解析するために、*GUS*遺伝子を連結して (Fig. 2-A, B) イネに導入した。*LIM10::GUS*導入個体では、全ての形

質転換体で花粉母細胞と小孢子においてGUSの発現が見られた (Fig. 3)。GUSの発現は減数分裂期から小孢子期で見られ、成熟花粉やその他の花器官では見られなかった。*LIM18::GUS*導入個体では、*LIM10::GUS*導入個体と同じ時期の花粉母細胞と小孢子において、*LIM10::GUS*導入個体よりもわずかに弱いGUS発現が見られた。また、栄養器官でGUSの発現が見られた。以上の結果から、*LIM10*プロモーターと*LIM18*プロモーターは、イネにおいて減数分裂期から小孢子期で発現誘導することが分かり、*Ac*転移酵素を発現誘導する目的で利用可能であると考えられた。

1-2 *AcTP*導入系統と*Ds-GUS* T-DNA導入系統の作出およびT-DNA導入位置のマッピング

*LIM10*プロモーターと*LIM18*プロモーターに*Ac*転移酵素を連結したコンストラクト *LIM10::AcTP*と*LIM18::AcTP*を作成し (Fig. 2-D, E)、アグロバクテリウム法を用いてイネの形質転換を行った。T-DNAが1コピーで導入された個体は、*LIM10::AcTP*導入個体が4個体、*LIM18::AcTP*導入個体が9個体であった (Table 1)。また、*Ds*コンストラクトである*Ds-GUS* T-DNA (Fig. 2-C) の遺伝子導入も行った。*Ds-GUS* T-DNAは、*Ds*が切り出された個体を除草剤クロルスルフロンで選抜できるように構築されたコンストラクトである (Fedoroff and Smith, 1993)。*Ds-GUS* T-DNA導入個体を114個体作出したところ、そのうち1コピー導入個体は52個体であった (Table 1)。1コピー導入個体についてT-DNAの隣接領域をクローニングして塩基配列を決定し、相同性検索に基づいてマッピングを行ったところ、29個体のT-DNA挿入位置をマッピングすることができた (Fig. 4)。ほとんど全ての染色体に*Ds*が挿入された集団を得たので、これらの場所から*Ds*を転移させることにより、大規模なタギング系統を作出できると期待された。

1-3 F₁個体とF₂個体の解析

Ds-GUS T-DNA導入個体と、*AcTP*導入個体との交配を行った。*AcTP*系統には *LIM10::AcTP*導入個体、*LIM18::AcTP*導入個体および35S::*AcTP*導入個体を用いた。

*LIM10::AcTP*導入個体を交配したF₁個体を3組合せ、*LIM18::AcTP*導入個体を交配したF₁個体を3組合せ、*35S::AcTP*導入個体を交配したF₁個体を2組合せ得た (Table 2)。得られたF₁個体の葯と葉でのDsの切り出しの検出を行った。Dsが切り出されると2.6kbのバンドが増幅するようにプライマーを設定し、それぞれのF₁個体の葯と葉からDNAを抽出してPCRのテンプレートに用いた。Dsの切り出しを示すバンドは、*LIM10::AcTP*のF₁個体の葯から検出され、葉からは検出されなかった (Fig. 5)。*LIM18::AcTP*のF₁個体と*35S::AcTP*のF₁個体では、葯と葉の両方からDsの切り出しを示すバンドが検出された。*LIM10::AcTP*が、発現解析からの期待通りに生殖細胞特異的にDsの切り出しを誘導することが示された。

Dsの切り出しが起こったF₂個体を除草剤クロルスルフロンで選抜した。耐性個体についてPCRを行い、Dsの切り出しが起こったことを全ての耐性個体について確認した (Fig. 6)。耐性個体についてサザンブロット分析を行い、転移したDsについて解析した。*LIM10::AcTP*の交配組合せでは、Ds #127×*LIM10::AcTP*#23の組合せで、F₂個体348個体をクロルスルフロンで選抜し、32個体の耐性個体を得て、転移したDsを含む15個体を同定した (Fig. 7)。そのうち10個体は検出されたバンドサイズが異なり、生殖細胞で独立に転移したDsを含んでいると考えられた。残りの5個体は、同一部位に転移しており、体細胞でのDs転移が起こったと考えられた。葉ではDsの切り出しが検出されなかったことから、花器官に分化する直前の分裂組織のような限定された部位でDs転移が起こっていることが推測された。Ds#26×*LIM10::AcTP*#3の組合せでは、14個体でDs転移が見られ、2つの独立した転移と2パターンの同一な転移が観察された。Ds#77×*LIM10::AcTP*#22では、7個体でDs転移が見られたが、全て同一バンドパターンであった。*LIM10::AcTP*を交配した3系統では、転移頻度は4.1%で、独立転移頻度は41.7%であった (Table 3)。

*LIM18::AcTP*の交配組合せでは、Ds#120×*LIM18::AcTP*#40の組合せで、F₂個体484個体を選抜し、91個体の耐性個体を得られ、うち2個体でDs転移が見られた (Fig. 8)。同様にDs#58×*LIM18::AcTP*#17では2個体、Ds#70×*LIM18::AcTP*#40では1個体のDs転移が見られた。*LIM18::AcTP*を交配した3系統では、転移頻度は0.7%で、独立

転移頻度は100%であった (Table 3)。

35S::*AcTP*の交配組合せでは、*Ds*#3×35S::*AcTP*#2の組合せで、F₂個体93個体のうち36個体で*Ds*転移が見られたが、全て同一の転移パターンであった (Fig. 9)。*Ds*#58×35S::*AcTP*#2では、1個体で*Ds*転移が見られた。35S::*AcTP*を交配した2系統では、転移頻度は15.9%で、独立転移頻度は5.4%であった。

LIM10::*AcTP*を用いると、*Ds*が転移する頻度は35S::*AcTP*より低いものの、独立した*Ds*転移に由来する個体が多く生じることが分かった。また、*LIM18*::*AcTP*は転移頻度は0.7%と低かったが、100%の独立転移を誘導できることから、転移した*Ds*を含む個体のみを選抜できるシステムを構築すればトランスポゾンタギング系統の作出に有効であると考えられた。また、F₂個体で観察された転移した*Ds*が、F₃個体へ遺伝することを確認した (Fig. 10)。以上のことから、*LIM10*プロモーターを用いて*Ac*転移酵素を発現誘導することで、高い頻度で*Ds*の独立転移を誘導できることを明らかとした。

2章 転移した*Ds*の隣接領域の単離と解析

本研究で開発した*Ds*転移誘導システムを用いて遺伝子破壊系統が得られることを実証するために、作出したトランスポゾンタギング系統から、*Ds*の隣接領域のクローニングを行った。25個体の隣接領域を単離し、そのうち12についてマッピングを行ったところ、6つは同一染色体の215kb以内に、6つは他の染色体に転移していることが分かった (Fig. 11)。また、5つの推定遺伝子に*Ds*が挿入していることが分かり、遺伝子領域へ*Ds*が挿入する率は20%と考えられた。*Ds*が挿入した遺伝子A-29は、Unknown proteinをコードしており、推定第1エクソンに*Ds*が挿入していた (Fig. 12)。A-32は、イネ未熟種子のESTと相同性がある遺伝子であった。A-36はシロイヌナズナのactin depolymerizing factor 5と相同性がある遺伝子であった。A-42は、Unknown protein AL606998-1をコードする遺伝子であり、開始コドン上流57bpの位置に*Ds*が挿入していた。A-45では、Hypothetical protein AC078891-1をコードする

遺伝子と相同性のある遺伝子であった。全ての推定遺伝子についてRT-PCRを行い、A-45以外は、発現している遺伝子であることを確認した (Fig. 13)。これらのタギング系統では発現している遺伝子にDsが挿入しており、挿入したDsがホモになった後代を得れば、その遺伝子の機能解析に用いることができると考えられた。

結語

テッポウユリの減数分裂特異的に発現する遺伝子である*LIM10*のプロモーターを用いてAc転移酵素を発現誘導することで、高い頻度でDsの独立転移を誘導できることを示し、新しいトランスポゾンタギングシステムを構築することができた。また、遺伝子をタギングしたと考えられる個体を得られ、本研究で開発したシステムが、今後重要となるイネ遺伝子の機能解析に利用できることを示した。このシステムを用いれば、イネで大規模なトランスポゾンタギング集団を作出できると期待される。

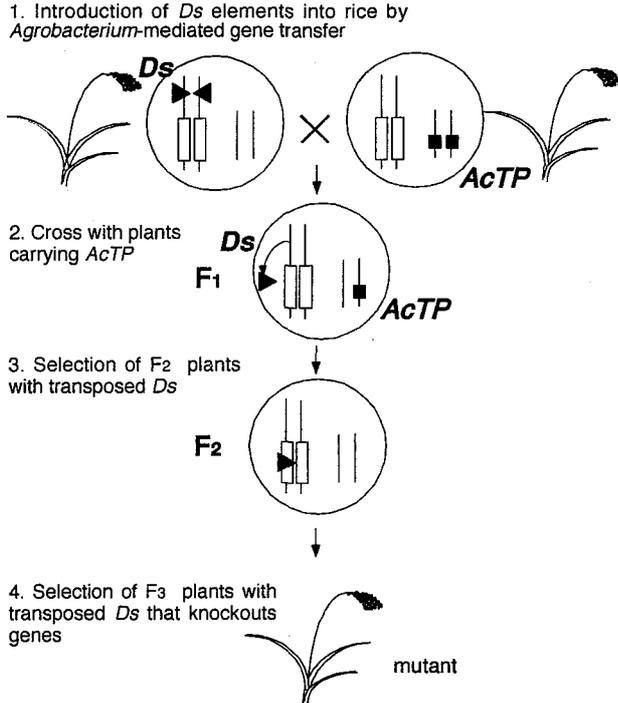


Fig. 1 Flowchart of a system to produce transposon tagging lines using *Ac/Ds* system in transgenic plants.

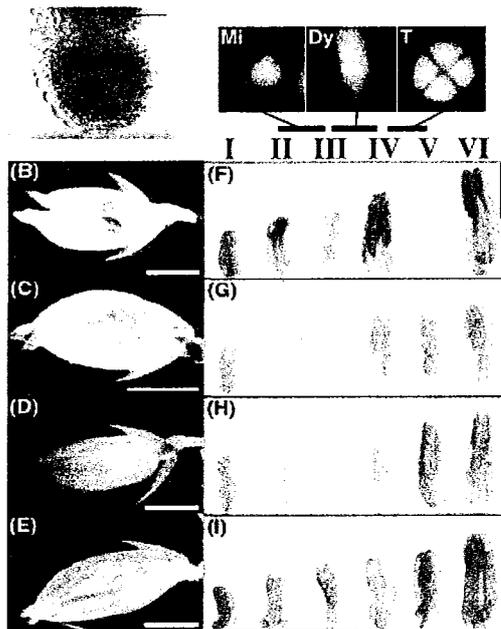


Fig. 3 *LIM10* and *LIM18* promoters regulate GUS expression in anthers at the meiotic stage.

Histochemical GUS assay was carried out in flowers at the meiotic stage (B to E) and in anthers (F to I) at different developmental stages (I to VI) in transgenic rice with *LIM10::GUS* (A, B and F), *LIM18::GUS* (C and G), *35S::GUS* (D and H) and wild-type plants (E and I). Blue staining indicates GUS activity. Upper panels show DAPI staining of microsporocytes (Mi), dyads (Dy) and tetrads (T) observed in each developmental stage of the anther. Stages I and II, before meiosis; stage III, meiosis; stage IV, tetrad; stage V, uninucleate microspore, stage VI, mature. Cross section of anther at meiotic stage is shown in panel (A). Bar = 2 mm (B to E), 500 μ m (A and F to I)

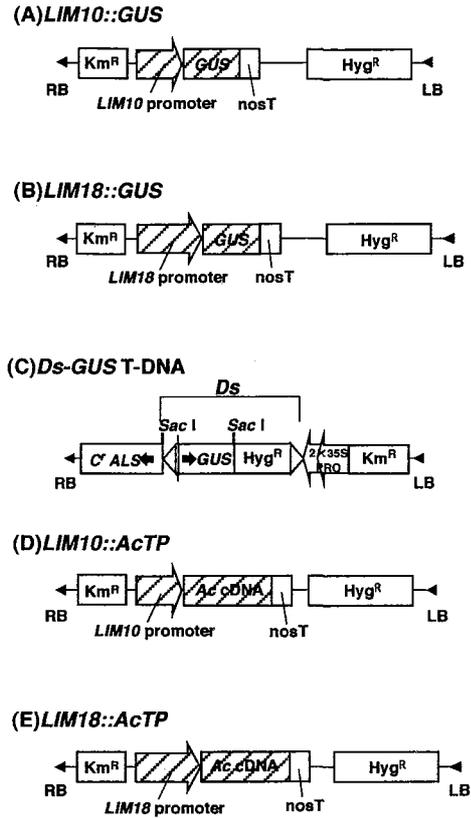


Fig. 2 Constructs of *LIM10::GUS* (A), *LIM18::GUS* (B), *Ds-GUS T-DNA* (C), *LIM10::AcTP* (D), and *LIM18::AcTP* (E). *Km^R* and *Hyg^R*, a gene for kanamycin resistance and a gene for hygromycin resistance, respectively; *GUS*, the gene of β -glucuronidase; *C'ALS*, mutant acetoractate synthase gene of *Arabidopsis thaliana* for chloresulfuron resistance, 35S PRO, CaMV 35S promoter; *Ac cDNA*, cDNA of *Ac* transposase; *nosT*, 3' signal of nopaline synthase gene.

Table 1. Number of transformants with different copy numbers of the transgene.

Transgene	copy number				Total
	1	2	3	3<	
<i>LIM10::AcTP</i>	4	1	1	0	6
<i>LIM18::AcTP</i>	9	7	3	2	21
<i>Ds-GUS T-DNA</i>	52	27	17	18	114

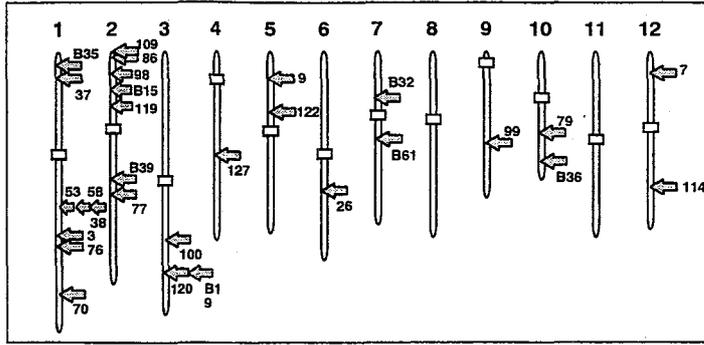


Fig. 4 Chromosomal locations of *Ds*-*GUS* T-DNA insertion sites.

Arrows indicate insertion sites of *Ds*-*GUS* T-DNA. The names of *Ds* lines are indicated beside arrows. Open boxes indicate the position of a centromere.

Table 2. Cross combinations of *Ds*-*GUS* T-DNA lines (*Ds*# No.) and the lines of *LIM10::AcTP*, *LIM18::AcTP* and *35S::AcTP*.

<i>Ds</i> x <i>LIM10::AcTP</i>	<i>Ds</i> x <i>LIM18::AcTP</i>	<i>Ds</i> x <i>35S::AcTP</i>
<i>Ds</i> #26 x <i>LIM10::AcTP</i> #3	<i>Ds</i> #58 x <i>LIM18::AcTP</i> #17	<i>Ds</i> #3 x <i>35S::AcTP</i> #2
<i>Ds</i> #77 x <i>LIM10::AcTP</i> #22	<i>Ds</i> #70 x <i>LIM18::AcTP</i> #40	<i>Ds</i> #58 x <i>35S::AcTP</i> #2
<i>Ds</i> #127 x <i>LIM10::AcTP</i> #23	<i>Ds</i> #120 x <i>LIM18::AcTP</i> #40	

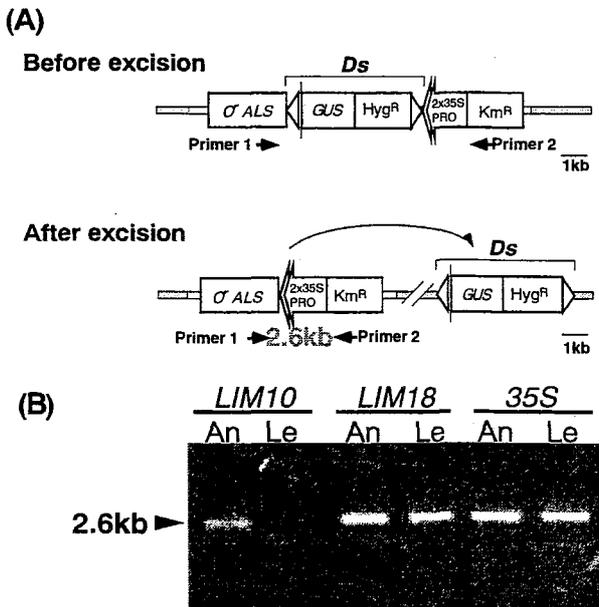


Fig. 5 Detection of *Ds* excision in anthers and leaves of *F1* plants by PCR.

(A) Diagrammatic representation of detection of *Ds* excision by PCR. (B) Results of PCR. A 2.6 kb band indicates the *Ds* excision. DNA was isolated from anthers (An) and leaves (Le), and used as a template of PCR. *LIM10*, *F1* plants with *LIM10::AcTP*; *LIM18*, *F1* plant with *LIM18::AcTP*; *35S*, *F1* plant with *35S::AcTP*.

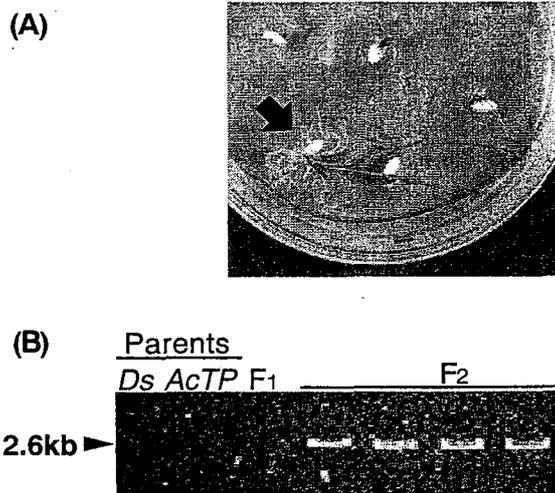


Fig. 6 Selection of *F2* plants with excised *Ds* by chlorsulfuron.

(A) *F2* plants with excised *Ds* element exhibit normal growth (arrow) on a medium containing 500 µg/l chlorsulfuron. (B) *Ds* excision was confirmed by PCR in the same manner as in Fig. 5.

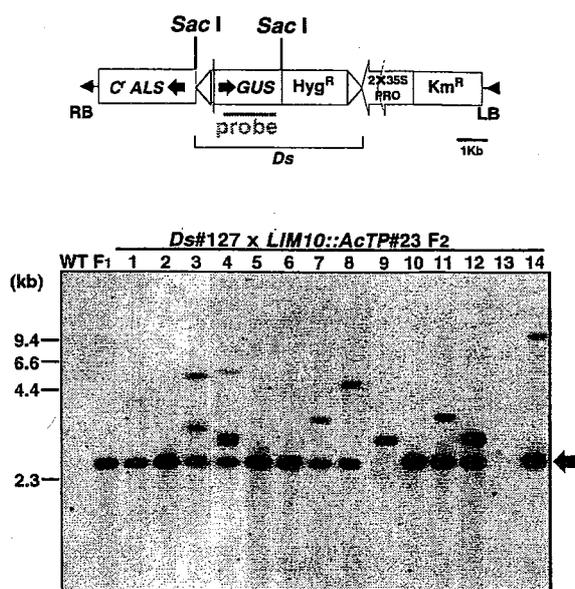


Fig. 7 *Ds* transposition directed by the *LIM10::AcTP* in F2 plants (*Ds*#127 x *LIM10::AcTP*#23). Genomic DNA of a wild-type plant (WT), an F1 plant and each F2 plant was digested with *Sac* I and probed with a part of the *GUS* gene. *Sac* I sites and a position of probe are indicated above the Southern blots. The 2.5 kb band (arrow) corresponds to the non-transposed *Ds* element. Bands at different positions indicate the independent transposition of the *Ds* element.

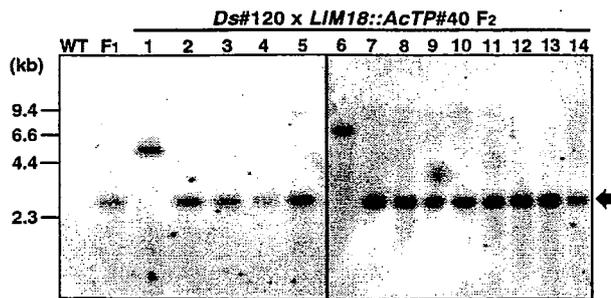


Fig. 8 *Ds* transposition directed by the *LIM18::AcTP* in F2 plants (*Ds*#120 x *LIM18::AcTP*#40). The 2.5 kb band (arrow) corresponds to the non-transposed *Ds* element. Bands at different positions indicate the independent transposition of the *Ds* element.

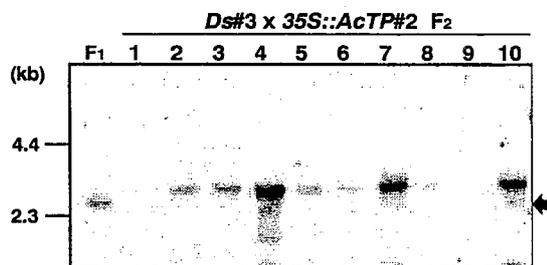


Fig. 9 *Ds* transposition directed by the *35S::AcTP* in F2 plants (*Ds*#3 x *35S::AcTP*#2). The 2.5 kb band (arrow) corresponds to the non-transposed *Ds* element. Bands at different positions indicate the transposition of the *Ds* element.

Table 3. Number of plants with excised *Ds* and transposed *Ds* in the F2 progeny of each F1 plant.

Parents <i>Ds</i> <i>AcTP</i>	Number of F2 plants				Frequency of			
	tested (a)	<i>Ds</i> excision (b)	<i>Ds</i> transposition (c)	independent <i>Ds</i> transposition (d)	<i>Ds</i> excision (b/a)	<i>Ds</i> transposition (c/a)	independent <i>Ds</i> transposition (d/c)	
<i>LIM10::AcTP</i>								
#26 #3	342	47	14	4	13.7	4.1	28.6	
#77 #22	192	18	7	1	9.4	3.6	14.3	
#127 #23	348	32	15	10	9.2	4.3	66.7	
Total	882	97	36	15	11.0	4.1	41.7	
<i>LIM18::AcTP</i>								
#58 #17	94	19	2	2	20.2	2.1	100	
#70 #40	102	51	1	1	50.0	1.0	100	
#120 #40	484	91	2	2	18.8	0.4	100	
Total	680	161	5	5	23.7	0.7	100	
<i>35S::AcTP</i>								
#58 #2	139	35	1	1	25.2	0.7	100	
#3 #2	93	-	36	1	-	38.7	1.1	
Total	232	-	37	2	-	15.9	5.4	

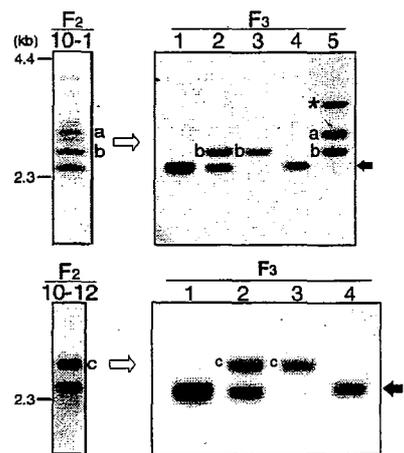


Fig 10. Inheritance of the transposed and non-transposed *Ds* elements in F3 plants.

Genomic DNA was isolated from F3 progeny and Southern blot analysis was performed in the same manner as in Fig. 7. Transposed *Ds* elements were inherited by F3 progeny. "a", "b" and "c" indicate bands corresponding to the transposed *Ds* element in F2 plants. An asterisk indicates a band corresponding to newly transposed *Ds*. Black arrows indicate non-transposed *Ds* elements.

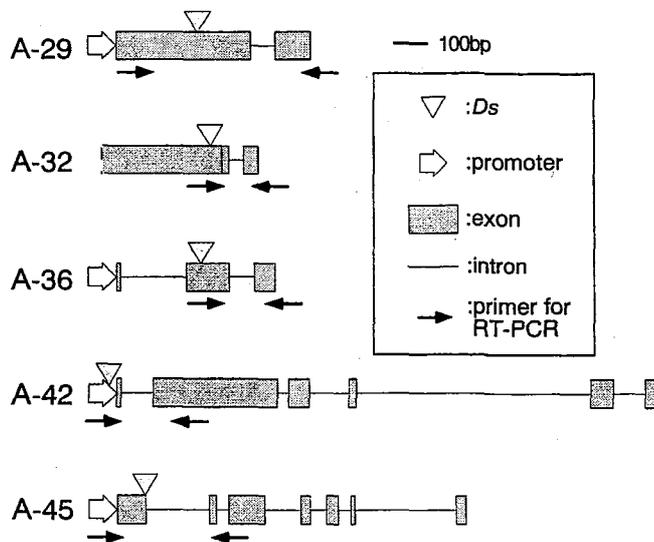


Fig. 12 Diagrammatic representation of the genes flanking the transposed *Ds* elements.

The numbers of the left column indicate the names of genes flanking the transposed *Ds* elements. Triangles indicate *Ds* elements. Open arrows indicate promoter. Boxes indicate exons. Lines indicate introns. Arrows indicate the position of primers for RT-PCR.

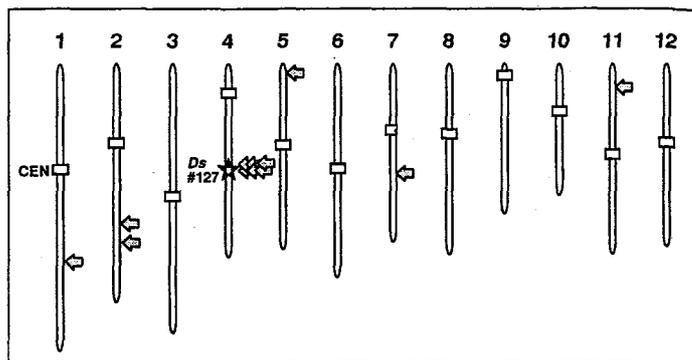


Fig 11. Chromosomal locations of transposed *Ds* elements originated from *Ds*#127 x *LIM10::AcTP*#23.

A *Ds* starter position is indicated by a star. Arrows indicate insertion sites of transposed *Ds*.

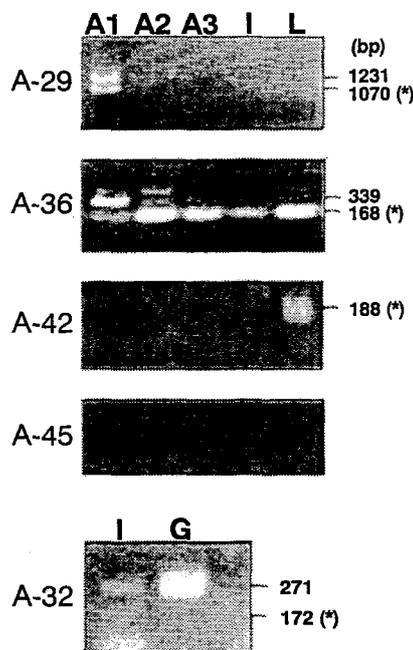


Fig. 13 Expression analysis of the genes, A-29, A-32, A-36, A-42 and A-45, in the wild type plants by using RT-PCR.

cDNAs were synthesized from total RNA from anthers at the uninucleate microspore stage (A1), the bicellular pollen stage (A2), the tricellular pollen stage (A3), immature seeds (I) and leaves (L). They were used as templates for PCR with gene specific primer sets. Genomic DNA (G) was used as a control for PCR. (*) indicate the amplification of cDNA.

論文審査結果要旨

イネのゲノムの全塩基配列決定が昨年報告されたが、これを受けたポストゲノム研究として今後重要な研究は、ゲノム上の遺伝子とその機能を明らかにすることである。そのための有効な手法の一つが、トランスポゾンタギング法である。本研究は、*Ac/Ds*トランスポゾンタギングにおいて、生殖細胞で *Ds* の転移が誘導できれば、多数の独立したタギング系統を得ることができることから、減数分裂期に特異的に発現する遺伝子のプロモーターを利用した生殖細胞での *Ds* 転移システムを構築しようとしたものである。

テッポウユリの減数分裂期特異的に発現する *LIM10* と *LIM18* のプロモーターのイネでの発現誘導パターンを解析するために、*GUS* 遺伝子を連結してイネに導入したところ、*LIM10* プロモーターでは *GUS* の発現は減数分裂期から小孢子期で見られ、成熟花粉やその他の花器官では見られず、*LIM18* プロモーターでは花粉母細胞と小孢子において弱い *GUS* 発現が見られた。この結果から、*LIM10* プロモーターと *LIM18* プロモーターは、イネにおいて *Ac* 転移酵素遺伝子を生殖細胞で発現誘導する目的で利用可能であると考えられた。

Ds-*GUS* T-DNA 導入個体を 114 個体作出し、そのうち 29 個体の T-DNA 挿入位置をマッピングすることができた。ほとんど全ての染色体に *Ds* が挿入された集団を得たので、これらの場所から *Ds* を転移させることにより、大規模にタギング系統を作出できると期待された。

LIM10 プロモーターや *LIM18* プロモーターに *Ac* 転移酵素遺伝子をつないだ *LIM10::AcTP* 及び *LIM18::AcTP* を導入した個体と *Ds*-*GUS* T-DNA 導入個体を交配し、 F_1 個体と F_2 個体における *Ds* 転移の解析を行ったところ、*LIM10::AcTP* が生殖細胞特異的に *Ds* の切り出しを高頻度で誘導することが示された。また、1 個体から異なる染色体上の位置に *Ds* が転移した個体を得ることができた。これに対し、*CaMV35S* プロモーターを用いた場合は、転移頻度は高いものの、同じ位置に転移した後代を得ることが多かった。

作出したトランスポゾンタギング系統から、25 個体の *Ds* の隣接領域を単離し、マッピングを行ったところ、6 つは同一染色体の 215kb 以内に、7 つは他の染色体に転移していることが分かった。また、推定遺伝子内に *Ds* が挿入している 5 つの個体が見出された。

以上のように本研究では、*Ac/Ds* 系によるトランスポゾンタギングにおいて、生殖細胞特異的な発現遺伝子のプロモーターを利用した *Ds* の生殖細胞における転移誘発が有効であることを示し、いくつかの遺伝子のタギング系統を得て、イネにおける *Ac/Ds* トランスポゾンタギング法が確立できた。よって審査員一同は本論文は博士（農学）の学位を授与するに値する内容であると判定した。