

トランスポゾンの異種植物における転移とトランスポゾンタグgingに関する研究 Transposition of transposable elements in the heterologous plant and development of a transposon tagging system.

研究代表者 神戸大学農学部生物環境制御学科 助手

宅見薫雄

Assitant professor, Lab. Plant Genetics, Dep. Biological and Environmental
Science, Fac. Agriculture, Kobe University.

Shigeo TAKUMI

To development a transposon tagging system in wheat (*Triticum aestivum* L.), transgenic wheat lines containing a transposase gene of the maize *Activator* (*Ac*) element were produced and characterized. The *Ac* transposase gene under the control of a cauliflower mosaic virus 35S promoter was introduced into cultured wheat embryos by particle bombardment. Several transgenic wheat plants expressing the transposase gene were independently recovered. Southern and Northern-blot analyses of their progeny showed that the expression of the *Ac* transposase gene was stably inherited, and three fixed *Ac* lines were established. By RT-PCR analysis, products from fully spliced transcripts of the *Ac* element were confirmed. Cultured embryos isolated from the stable *Ac* lines were further bombarded with plasmids having a maize *Dissociation* (*Ds*) element located between a rice *Act1* promoter and a β -glucuronidase (*gus*) gene, and transient *gus* expression was observed after the *Ds* excision. These findings suggest that the maize *Ac* transposase gene is precisely processed and an active transposase protein is synthesized in the transgenic *Ac* lines. The *Ds* element is *trans*-activated and excised in wheat cells by the action of the *Ac* transposase gene. Moreover, to investigate a relationship between the amount of the *Ac* mRNA and the *Ds* excision frequency, the *Ds*-containing plasmid were introduced into 15 independent transgenic wheat callus lines which were transformed with the *Ac* transposase gene. The results supported the hypothesis that *Ds* excision is inhibited above a certain level of the *Ac* transposase as observed in maize and transgenic tobacco.

1. 研究目的

パンコムギは世界の三大穀物の一つとして非常に重要な地位を占める。またコムギ・エギロブス属は、古典遺伝学、細胞遺伝学、分子系統進化学等によるバックグラウンドの豊富さ、あるいは倍数性の進化や種の分化といった独特の遺伝学上の興味を多く有する属である。これまでパンコムギの形質転換はその組織培養の難しさのため、特に再分化能力を備えた懸濁培養細胞あるいはプロトプラストの誘導と維持がほとんど不可能にちかいたために、困難とされてきたが、現在ではパーティクルガン法を用いることで複数の研究グループにより可能となっている (Weeks et al. 1993; Vasil et al. 1993; Takumi and Shimada 1996)。新規遺伝子の有効な単離方法として map-based cloning とトランスポゾンタグging が考えられるが、いずれによってもパンコムギにおいては現時点で遺伝子の単離の例はない。

そこで本研究ではトウモロコシの *Ac/Ds* トランスポゾンを用いてパンコムギにおいてトランスポゾンタグgingによる遺伝子クローニング系の開発に向

けて、転移因子の活性化が可能かどうか、またトランスポゾンの転移によって変異を誘導できるかどうかの検討を目的とする。また、転移の制御に関してはトランスポゼースの発現量との関係などいくつかの知見は得られているものの、同じ双子葉植物でタバコとシロイヌナズナで転写パターンが異なり転移頻度も違うことなど不明な点も多い。導入遺伝子がどの程度正確にプロセッシングを受けるのかといった知見についてもパンコムギでは全く情報がない。そこで導入したトランスポゼース遺伝子のプロセッシングについても解析を行う。

2. 研究経過

2. 1. 方法

形質転換に用いたプラスミド

Ac 形質転換コムギの育成のために pUBA と pCKR532 の2つのプラスミドを用いた。pUBA は選抜のためのピアラホス耐性遺伝子をコードしており (Toki et al. 1992)、pCKR532 はカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター制御下のトウモロ

コシ Ac トランスポゼース遺伝子をコードしている (Shimamoto et al. 1993)。これらのプラスミドは大腸菌に導入し培養後抽出して、塩化セシウム/エチジウムブロマイド密度勾配遠心により精製し、遺伝子導入に供試した。また、Ds 系統の育成には pCKR532 の代わりに pCKR234 を用いた (図 1)。バンコムギの形質転換

2 系統のバンコムギ品種「アカダルマ」と「農林 12号」の開花後 2 週間の未熟種子から幼胚を摘出し、胚盤組織由来のカルスを得た。そこに上記の 2 種のプラスミドをパーティクルガン法により導入した (Takumi et al. 1994)。形質転換植物は 5mg/L のピアラホス存在下で選抜を行い、人工気象器内で馴化、稔実させた。

形質転換植物の解析

ピアラホス耐性植物から全 DNA と全 RNA を抽出し、PCR、RT-PCR、サザンプロット、ノーザンプロット分析により導入遺伝子の解析を行った。サザンプロット、ノーザンプロット分析には ³²P で標識したプローブを用いた。

Ds エlementの切り出しの検出

形質転換バンコムギの培養細胞にプラスミド pSP-WDV-Act1.GUS.N. あるいは pSP-WDV-Act1 (Dsbar)GUS.N. (McElroy et al. 1997) をパーティクル

ガン法により導入し、GUS 遺伝子の一過性の発現を X-gluc を基質として 37℃ で 24 時間インキュベートすることにより現れる Blue spot を顕微鏡下で観察した。これらのプラスミドにはイネアクチン遺伝子プロモーターと GUS 遺伝子が含まれており、pSP-WDV-Act1 (Dsbar)GUS.N. では Ds エlement が切り出された場合にのみ GUS 遺伝子の発現が誘導される (図 1)。抽出と精製には前述の方法に従った。

2. 2. 結果および考察 形質転換植物の育成

2,337 個の幼胚を摘出し、pCKR532 と pUBA をパーティクルガン法により導入した。選抜後、26 個体のピアラホス抵抗性植物 (T₀ 世代) が独立に再分化した。PCR 分析の結果、これら全ての個体が bar 遺伝子を保有していた。このうち 21 個体が稔性のある植物体に成長した。16 の再分化植物 (T₀) に由来する 32 個体の自殖第一代 (T₁) の葉から RNA を抽出し、RT-PCR により導入遺伝子発現個体の選抜を行った。その結果、6 個体の T₀ 植物 (Ac1, Ac3, Ac4, Ac8, Ac20, Ac24) に由来する T₁ 植物から Ac トランスポゼースの発現が確認された。Ac トランスポゼースの発現が認められた個体全てにおいてこの遺伝子の組み込みが確認され、bar 遺伝子と同時に遺伝子導入を行った Ac トランスポゼース遺伝子の co-transformation 効率は 37.5% であった。

Ac トランスポゼースを発現している自殖第一代 6 個体 (Ac1-1, Ac1-2, Ac3-1, Ac3-2, Ac24-1, Ac24-2) の自殖第二代 (各 8-10 個体) を供試して自殖第二代への導入遺伝子の発現の伝達をノーザンプロット分析により調べた (表 1)。トランスポゼース遺伝子および bar 遺伝子の発現が自殖第二代で固定している系統 (Ac1-2, Ac3-1, Ac24-1) と分離する系統があっ

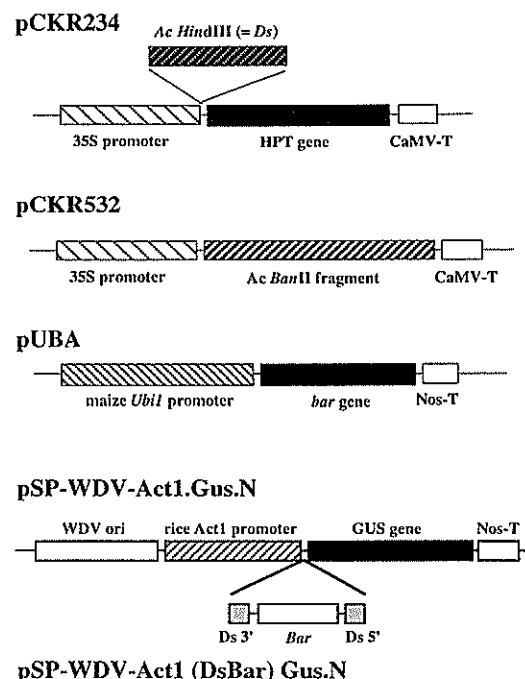


図 1 遺伝子導入に用いたプラスミドの構造

表 1 Ac トランスポゼース遺伝子を導入した形質転換コムギ自殖第二代のノーザンプロット分析

T ₁ 植物の個体番号	解析した T ₂ 植物の数	Ac を発現していた T ₂ 植物の数	Bar を発現していた T ₂ 植物の数
Ac1-1	8	6	0
Ac1-2	8	8	0
Ac3-1	10	10	10
Ac3-2	11	11	7
Ac24-1	10	10	0
Ac24-2	11	6	0

た。Ac1 と Ac24 の後代では *bar* 遺伝子について導入遺伝子のサイレンシングが観察された。さらにこれらの系統の自殖第三代のサザンブロット分析からトランスポゼース遺伝子についてゲノムに固定している系統 (Ac1-2, Ac3-1, Ac24-1) を選抜した。Ac1-2 と Ac3-1 はバンコムギ品種「アカダルマ」に由来し、Ac24-1 は「農林12号」に由来する。

Ac 転写物のプロセッシング

Jarvis et al. (1997) や Martin et al. (1997) はアラビドプシスにおいて *AdDs* トランスポゾンの転移頻度がタバコに比べて著しく低いのはトランスポゼース遺伝子のプロセッシングが効率的に行なわれないからであると報告している。そこでバンコムギにおいて *Ac* トランスポゼース遺伝子のプロセッシングについて RT-PCR 分析により調べた。イントロンを挟むようにトランスポゼース遺伝子のコーディング領域にプライマーを設計し (Jarvis et al. 1997)、3 系統の *Ac* line (Ac1-2, Ac3-1, Ac24-1) の RNA を鋳型にして RT-PCR を行った。また 5 つあるエキソンの第 1 と第 5 エキソンでプライマーを合成し、完全鎖長の転写産物の検出を行った。その結果、イントロンのスプライシングはコムギ細胞内で効率的に行なわれており、完全鎖長の mRNA も検出された。このことからバンコムギ細胞内でトウモロコシの *Ac* トランスポゼース遺伝子は正確にプロセッシングを受けていると結論された。

形質転換植物における *Ds* エLEMENTの活性化

McElroy et al. (1997) はオオムギのカルスで *AdDs* 活性をパーティクルガン法を用いた *GUS* 遺伝子の一過性の発現により簡単に調べる方法を開発した。この方法を用いて 2 系統の *Ac* line (Ac3-1, Ac24-1) の幼胚胚盤組織由来カルスに 2 種類のプラスミド (pSP-WDV-Act1.GUS.N., pSP-WDV-Act1(Dsbar)GUS.N.) を導入し、組み込んだ *Ac* トランスポゼース遺伝子由来のタンパク質の活性を評価した。その結果、

表 2 に示すとおり、形質転換植物においてのみ *Ds* エLEMENTの切り出しが観察された。このことから育成した形質転換植物において活性のあるトランスポゼースタンパク質が導入遺伝子から生産され、これによって外来の *Ds* エLEMENTが切り出されることがわかった。その頻度は 2 系統の間で若干異なった。

Ac 系統と *Ds* 系統の交配後代における *Ds* エLEMENTの活性化

Ac 系統もすでに育成済みの *Ds* 系統も体細胞中の染色体数は 42 本で正常であった。そこで両者を交配し F_1 を 16 組組み合わせ育成した。 F_1 の解析からこれら全ての植物体で *Ac* トランスポゼース遺伝子と *Ds* エLEMENTがゲノム内に共存しており、トランスポゼース遺伝子は発現していた。

3 交配組み合わせ 6 個体の F_1 植物由来 F_2 自殖種子 (各 40 粒ずつ、計 240 粒) をハイグロマイシン存在下で発芽させた。もしハイグロマイシン耐性個体如果出现すればトランスポゼースの働きにより *Ds* エLEMENTがトランスに活性化され切り出されたことを示すが、そのようなハイグロマイシン耐性個体を得ることはできなかった。

そこで 7 交配組み合わせの F_1 植物を育成し、その幼胚胚盤組織 (F_2) 由来カルスからハイグロマイシン耐性植物を再分化させた。計 1328 個の幼胚を処理した結果、2 個体の異なった交配組み合わせ F_1 に由来する 4 個体のハイグロマイシン耐性植物を得ることができた。バンコムギゲノムに組み込まれた *AdDs* エLEMENTは世代を経るにしたがって他の外来遺伝子によく認められるように不活性化される場合がある。しかし組織培養の過程を経ることで脱メチル化などの作用により再活性化されたのではないかと考えられる。4 個体のハイグロマイシン耐性個体については現在解析中であるが、*Ds* エLEMENTの転移がこれらの個体で認められればバンコムギゲノム中でトウモロコシの転移因子が転移した最初の報告となり、バンコムギにおいても他のタバ

表 2 *Ac* トランスポゼースの形質転換および非形質転換コムギの幼胚培養細胞における *Ds* エLEMENTの切り出しの効率 (means±SE)

系統	pSP-WDV-Act1.GUS.N を導入したときの Blue spot の数	pSP-WDV-Act1(Dsbar)GUS.N を導入したときの Blue spot の数	切り出しの効率 (%)
アカダルマ	43.27±1.94	0	0
Ac3-1	41.07±12.57	0.264±0.185	0.56±0.28
農林12号	18.01±3.13	0	0
Ac24-1	15.69±1.27	0.155±0.035	0.98±0.08

コヤアラビドプシスと同様にトランスポゾンタギングシステムを構築できると考えられる。

Ac トランスポゼースの転写量と Ds エLEMENTの切り出し頻度との関係

Ac トランスポゼース遺伝子を恒常的に発現している形質転換コムギカルス系統がすでに育成されている (Takumi 1996)。これらのカルス系統 15 系統を用いて前述の McElroy のアッセイ (McElroy et al. 1997) を行い、Ds エLEMENTの切り出しの効率を評価すると共に、それぞれのカルス系統におけるトランスポゼース遺伝子の発現量を比較した。サザン分析の結果、これらのカルス系統は多コピーの Ac あるいは Ds エLEMENTをすでに持っているが、それらのコピー数の間に有為な差異はない。

ノーザン分析の結果、10 系統のカルスで量的に異なるトランスポゼースの発現が認められ、この全てで pSP-WDV-Act1(Dsbar)Gus.N をパーティクルガン法により導入した際に Ds エLEMENTの切り出しが認められた。トランスポゼースの発現の認められなかったカルス系統では Ds エLEMENTの切り出しは全く認められず、切り出しにはトランスポゼース遺伝子の発現が不可欠であることが再確認された。Ds エLEMENTの切り出しによって得られる blue spot の数を pSP-WDV-Act1.Gus.N を導入した際に得られる blue spot の数で割ることによって Ds エLEMENTの切り出し効率とした。カルス系統毎の切り出し効率は有意に異なっていた。

切り出し効率とトランスポゼース遺伝子の発現量の関係を調べてみると、転写量の多い系統では切り出しの効率は低く押さえられており、形質転換タバコの子葉やトウモロコシの穀粒で観察されている negative dosage effect (Scofield et al. 1993; Heinlein 1996) を支持する結果となった (図 2)。しかしトウモロコシ、タバコ、アラビドプシスでみられているような転写の低いレベルにおける positive dosage effect (Swinburne et al. 1992; Heinlein 1996) ははっきりと認めることができなかった。トランスポゼース遺伝子の転写量の低い形質転換カルスでは、切り出しの効率に非常に大きなばらつきがみられる結果となった。

これらの結果から、トランスポゾンの転移頻度を向上させるために形質転換コムギにおけるトランスポゼース遺伝子の転写量を必ずしも高いレベルに保っておく必要はない、ということが明らかとなった。またこの McElroy のアッセイはコムギ細胞において Ac/Ds エLEMENTの活性を測定する有効な方法

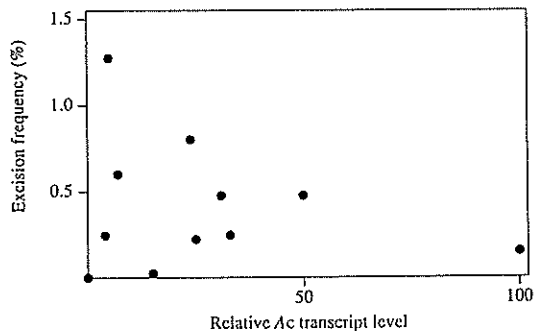


図 2 形質転換コムギカルス系統における Ac トランスポゼース遺伝子の発現量と Ds エLEMENTの切り出し効率との関係

であると結論できた。

3. 研究成果

トランスポゼースを発現した形質転換コムギを育成し、形質転換植物内で活性のあるトランスポゼースが生産されていることを確認した。トランスポゾンの転移を誘導する上でその発現量は十分であると考えられた。

4. 今後の課題と発展

パンコムギにおいてトランスポゾンタギングシステムを確立するためには、Ds エLEMENTをある一定の頻度でコムギゲノム中で転移させることが必要である。しかし外来遺伝子は植物の持つ遺伝子の不活性化機構によってメチル化を受け、Ds エLEMENTが転移できなくなる。Ac 系統と Ds 系統の F₁ 植物にできた幼胚 (F₂) からカルスを誘導することにより Ds エLEMENTを再活性化させて転移を誘導することができそうだ。これによりコムギゲノム中でのトランスポゾンの転移が可能になるであろう。

5. 発表論文リスト

1. *Trans-activation of a maize Ds transposable element in transgenic wheat plants expressing the Ac transposase gene.* Takumi S., Murai K., Mori N. and Nakamura C. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98, 947-953.
2. *Variations in the maize Ac transposase transcript level and the Ds excision frequency in transgenic wheat callus lines.* Takumi S., Murai K., Mori N. and Nakamura C. *Genome*, 1999, 42, in press.