

植物における遺伝子破壊法の開発及び それによる遺伝子機能の解明

Development of a gene targeting method for higher plants

研究代表者 京都大学総合人間学部自然環境学科 助手 佐藤 雅彦
Research Associate, Dept. of Natural Environmental Sciences, Fact. of
Integrated Human Studies, Kyoto Univ.
Masa H. Sato

In order to develop a technique of which a specific gene is disrupted efficiently by homologous recombination, I applied the positive-negative selection method which has been used in animal cell to plant gene-targeting using NPT II and COD A as a positive and negative marker, respectively. First of all, I tried to cloning and sequencing Arabidopsis H⁺-PPase gene by inverted PCR method. The 4.5-kbp PCR clone contained entire coding region of H⁺-PPase as well as partial sequence of atpC2 gene. H⁺-PPase gene consisted of seven-introns and 8-exons. Now, I have been performing a screening of gene-targeted clones by positive-negative selection.

1. 研究目的

近年の生化学的、分子生物学的、分子遺伝学的手法の発達、生命現象の基本的なメカニズムは種を越えて共通である事を示した。これらの事柄は主に酵母を用いた分子遺伝学的手法と動物細胞を用いた生化学的手法の連携によって得られたものが多い。その中において植物における生命現象の分子生物学的理解はかなり遅れをとっていると言わざるを得ない。これにはいくつかの理由が考えられるが、一つには高等植物においては効果的な遺伝子破壊法が存在しないために、単離した遺伝子の機能解析が困難である点にある。このために高等植物の遺伝子解析は、現時点においてアンチセンス RNA による特定遺伝子産物の発現の消去（アンチセンス法）などによる方法で行えない。アンチセンス法は、（1）アンチセンス RNA の発現は、遺伝子導入した植物個体間でばらつきがあり、結果の解釈が難しい。（2）アンチセンス RNA を発

現する遺伝子はヘテロな状態でゲノム組み込まれても、アンチセンス RNA を発現する（変異形質が優性になる）ので、特定の遺伝子の欠失が致死になる場合、この遺伝子の個体レベルにおける機能の推定は不可能になる。など技術的問題点が多い。

近年、高等植物においても、シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的な解析技術の発達により、今まで全くといって良いほど手がつけられなかった高等植物の形態形成に関する分子生物学的な理解が飛躍的に高まっている。しかし高等植物の研究の多くは現在、形態の解析に偏った形で進んでいる。真の高等植物の生命現象の理解には、現在動物、酵母などで行われている遺伝子産物の細胞生物学的解析など総合的な解析手段の導入が不可欠である。

その第一歩として、今回、私は、高等植物の遺伝子解析法の現時点における最大の欠点

を克服するために、シロイヌナズナを用いた植物遺伝子の効果的な破壊技術の開発を目指す。この方法の開発により、現在様々な方法で単離されている機能未同定の多数の遺伝子の解析が可能になると期待される。またこの技術が発展することにより、将来的には農作物などの品種改良を遺伝子レベルでかなり自由に行えるようになり、応用的にも非常に有効な手段になると思われる。

遺伝子破壊する遺伝子は、 H^+ -PPase 遺伝子を用いた。 H^+ -PPase は液胞膜に存在するイオンポンプで無機ピロリン酸を加水分解した

ときのエネルギーを用いて液胞内に水素イオンを輸送する機能を持っている。また液胞膜には H^+ -PPase と同時に ATP を加水分解したときのエネルギーを用いて液胞内に水素イオンを輸送する液胞型の H^+ -ATPase がある。即ち、一つの膜に機能が同じイオンポンプが二種類存在することになる。そのような意味で、 H^+ -PPase 遺伝子を破壊することは生理学的見地からも非常に意義深いと考え、遺伝子破壊のモデルシステムとして H^+ -PPase 遺伝子を選んだ。

エンスを決定した。

2. 研究経過

2.1 方法

シロイヌナズナ H^+ -PPase 遺伝子のクローニング及びシーケンス

H^+ -PPase 遺伝子のクローニング及びシーケンスを行った。クローニングにはインバーテット PCR 法を用いた。この方法は、既知のシーケンス（この場合には H^+ -PPase cDNA の配列）を元に外側に向かうプライマー設計する。次にシロイヌナズナのゲノムを適当な制限酵素で切断し、それをリガーゼを用いて環状に結合する。次に環状にしたゲノムをテンプレートにして外側を向いたプライマーを用いて PCR を行う。PCR 産物をサブクローニングし、この配列をシーケンスする。この配列を元に、遺伝子の両側の内向きプライマーを設計し、今度は無処理のシロイヌナズナのゲノムをテンプレートに PCR を行う。この方法により、シロイヌナズナ遺伝子の全長をクローニングした（図 1）。クローニングした遺伝子はダイデオキシ法によりシーケ

遺伝子破壊用ベクターの作成

クローニングした H^+ -PPase 遺伝子を元にして遺伝子破壊用ベクターを作成した。

遺伝子破壊ベクターはポジティブスクリーニングに使うネオマイシンフォスフトランスフェラーゼを H^+ -PPase 遺伝子の中間部分を削除する形で挿入する。またネガティブマーカーとなるシトシンデアミナーゼ遺伝子は、 H^+ -PPase 遺伝子の外側に挿入した。この様に構築した断片を植物形質転換用ベクター pBI121 に導入した。

シロイヌナズナの形質転換

このように構築した遺伝子破壊用ベクターをアグロバクテリアにエレクトロポレーション法により形質転換し、この形質転換したアグロバクテリアを用いて、インプラント法によりシロイヌナズナを形質転換した。

2.2 結果

H⁺-PPase 遺伝子の構造

インバーテッド PCR で解析したプライマーを用いた PCR の結果、全長約 4.5-kbp の DNA 断片が増幅した。この断片の全長を決定した結果、全長は 4648-bp でこの中に H⁺-PPase 遺伝子と葉緑体の ATP 合成酵素の γ サブユニットをコードする atcC2 遺伝子の一部分が含まれていた (図 2)。シロイヌナズナ H⁺-PPase 遺伝子配列をシロイヌナズナ H⁺-PPase cDNA 配列と比較した結果、7つの短いイントロンで分断された8つのエクソンからなる構造を持っていることが解明された (表 1)。

H⁺-PPase 遺伝子プロモーター部位の解析

単離した遺伝子断片には、H⁺-PPase 遺伝子の上流域約 1.4-kbp が含まれていた。このうち必要最小限のプロモーター領域を決定するためにトランジェントアッセイ法を用いたプロモーターアッセイを行った。

この結果翻訳開始点から約 500-bp 上流までが H⁺-PPase 遺伝子の発現に必要なことが解った。この領域の中には光による発現調節に関与している転写因子 Dof の結合部位が一カ所含まれていた。

H⁺-PPase 遺伝子の相同性解析

BLAST を用いた相同性解析の結果、H⁺-PPase は大腸菌の K⁺ ポンプである。kdpATPase と相同性を持つことが解った。kdpATPase は Na⁺-K⁺-ATPase, Ca-ATPase などと同じ P 型 ATPase に属するイオンポンプで、この相同性の発見は、H⁺-PPase と P 型

ATPase との進化的関係を考える上でも非常に興味深い。

遺伝子破壊破壊シロイヌナズナの作成

遺伝子破壊用ベクター作成の後、インプラント法を用いてシロイヌナズナの形質転換を行った。その結果約 10万個の種子を得、現在カナマイシン、5フルオロウラシル存在下で生育する個体を選別中である。

3. 今後の課題と発展

前年度までに H⁺-PPase 遺伝子のクローニング・シークエンス及び遺伝子の解析を行い、遺伝子破壊用ベクターの構築を行った。

現在、このベクターを用いてシロイヌナズナを形質転換し、遺伝子破壊植物体の単離を行っているところである。現在の問題点は、アグロバクテリアを用いたインプラント法の低い形質転換効率である。今後パーティクルガン法の導入、T-DNA 領域の改良による形質転換効率の向上等を行い、より簡便に遺伝子破壊植物体が単離出来るような技術の開発を目指す。

4. 発表論文リスト

1. Maruyama C., Tanaka Y., Takeyasu K. and Sato M.H. *Plant Cell Physiol.* (1998) "In printing"
2. Sato MH, et al. *J Biol Chem.* (1997) 26; 272(39): 24530-24535.
3. Sato MH, et al. *Biotechniques.* (1997) 23(2): 254-256.

Fig. 1 Cloning H⁺-PPase gene by inverted PCR
(Objective.1)

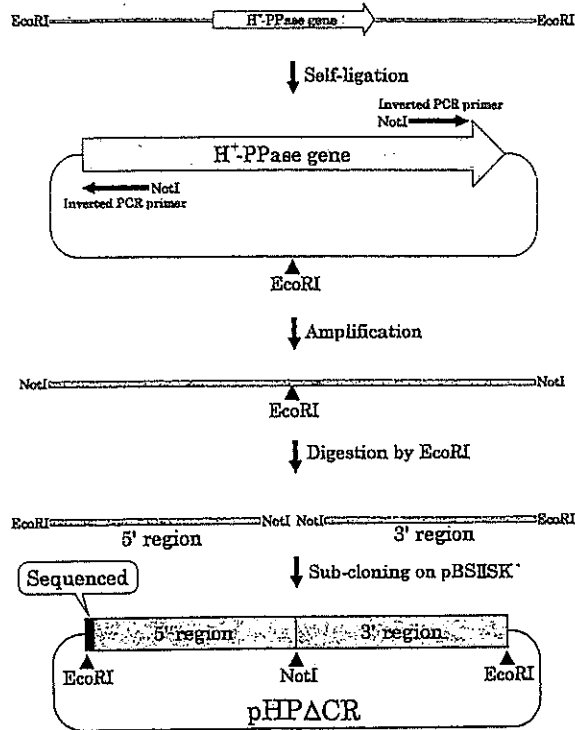
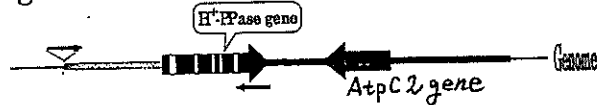


Fig. 2 Cloning the gene for sequencing



| Name | Sequences of start | Sequences of the end | Length |
|------------|------------------------------|-------------------------------|--------|
| 1st exon | ATGGTGGCGCGTGGT M V A P A | ACTGGATTTCCGAAG T A I S E | 282 |
| 1st intron | gtaaatotattcat | gttattgttaagaaag | 199 |
| 2nd exon | GTGCAAGTTCATTTC G A T S F | TCCAAAGAAAGCAAGT P R N P A | 574 |
| 2nd intron | gtaaatcaaacattt | gttatttatttcaag | 88 |
| 3rd exon | GTCATTGCGATAAT V I A D N | AARTGTCAAGAACTG V Y K N W | 379 |
| 3rd intron | gttaattcatttctg | tatttttatttcaag | 102 |
| 4th exon | GCAAGTATTGTTTTG Q L F L | CTAGTAAGCGCTACAG S M A Y S | 86 |
| 4th intron | gtaaatcaaacattt | aatatttatttcaag | 92 |
| 5th exon | CCGTGTCAARATAT P Y Q D | TGTTGATTTGGAAAG A A I S K | 330 |
| 5th intron | gtatgaaacatttatt | gttttttatttcaag | 131 |
| 6th exon | GGATTTCGATTGGG G F A I S | TGTATCTGTTTTCAG Y S S Y Q | 410 |
| 6th intron | gtaaatcatttctg | gttttttatttcaag | 82 |
| 7th exon | ATGGCATAATCAGCA I A I S A | CAAGAAATACATCGAG K K Y I E | 59 |
| 7th intron | gtaaatgaaatttctg | gttttttatttcaag | 82 |
| 8th exon | GGTGGTATGABAG A Q V S E | TTTCAAGTACTTCTAA F K Y F | 206 |

Table.1 The start and end sequences of exons and introns