

VI

テクノロジー オルガネラ

2. 葉緑体のテクノロジー

アクティベーションタギングと 葉緑体機能発現

後藤新悟・丹羽康夫・小林裕和

レポーター遺伝子導入シロイヌナズナ系統の脱分化カルスにアクティベーションタギングを適用することにより、植物個体を経ないで直接変異系統を選抜することが可能になり、いままでにない新奇な葉緑体機能発現変異系統の選抜に成功した。

▶▶ KEY WORDS : レポーター遺伝子 アクティベーションタギング 葉緑体機能発現

■はじめに■

遺伝子の機能を解明するうえで、変異誘導を基盤にする遺伝学的解析は強力な方法である。DNA断片の挿入によるタギング法は、薬剤や放射線による変異誘導に比べて、変異遺伝子の特定が容易である。DNA断片の挿入により劣性変異が期待されるが、エンハンサーを含むDNA断片を用いることにより、遺伝子が活性化された優性変異が可能なる。この方法は、アクティベーションタギングとして、1992年にWaldenらによりタバコに活用された¹⁾。その後、シロイヌナズナを用いて、各種タグ系統が作製され、2000年にはWeigelらによって30以上のアクティベーションタギング優性変異系統が選抜されている²⁾。

I. 器官特異的な葉緑体機能発現

植物の特徴は独立栄養生長であり、この性質は植物細胞の葉緑体の機能に起因する。光応答がおかしくなった変異系統を用いた研究により、フィトクロム³⁾、青色光受容体であるクリプトクロムおよびフォトトロピン⁴⁾を光受容体とするシグナル伝達機構の解明の進展が著しい。しかしながら、器官特異的な葉緑体機能発現の制御機構に関する知見は乏しい。筆者らの研究室では、1991年より、シロイヌナズナを用い、核コード光合成遺伝子の器官特異的な発現が異常になった各種変異系統の選抜を開始した。まず、光合成遺伝子プロモーターの制御下に各種レポーター遺伝子をおいたシロイヌナズナ形質転換系

統を作製した。次に、変異系統を選抜する1つの方法として、アクティベーションタギングを活用し、脱分化カルスにおいて光合成遺伝子が発現するようになった変異系統 *ces* (*callus expression of RBCS*) を選抜した。

II. アクティベーションタギング

光合成核遺伝子発現の指標として、リブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) のSサブユニット遺伝子 (*RBCS-3B*) に着目し、このプロモーターの下流に薬剤耐性遺伝子であるハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子および、レポーター遺伝子であるβ-グルクロニダーゼ (GUS)*1 遺伝子を配したキメラ遺伝子をアグロバクテリウムを用いてシロイヌナズナに導入した。この系統の根およびカルスはハイグロマイシンBに感受性であり、GUS活性をもたない。一方、葉など光合成遺伝子が発現している器官は、GUS活性を有した。このレポーター遺伝子導入シロイヌナズナにアクティベーションタギングを適用した。

振とう培養により増やしたレポーター遺伝子導入シロイヌナズナ系統の根に、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーター由来のエンハンサー領域を4回反復させたコンストラクトをアグロバクテリウム法により導入した (図1)。上記レポーター遺伝子導入シロイヌナズナ系統には、その作製の過程においてすでに複数の薬剤耐性遺伝子が導入されているため、新規な選択マ

Shingo Goto, Yasuo Niwa, Hirokazu Kobayashi, 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科 食品栄養科学専攻 E-mail: hirokoba@u-shizuoka-ken.ac.jp <http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/pctech/>

Activation tagging to reveal regulation underlying the development of photosynthetic chloroplasts

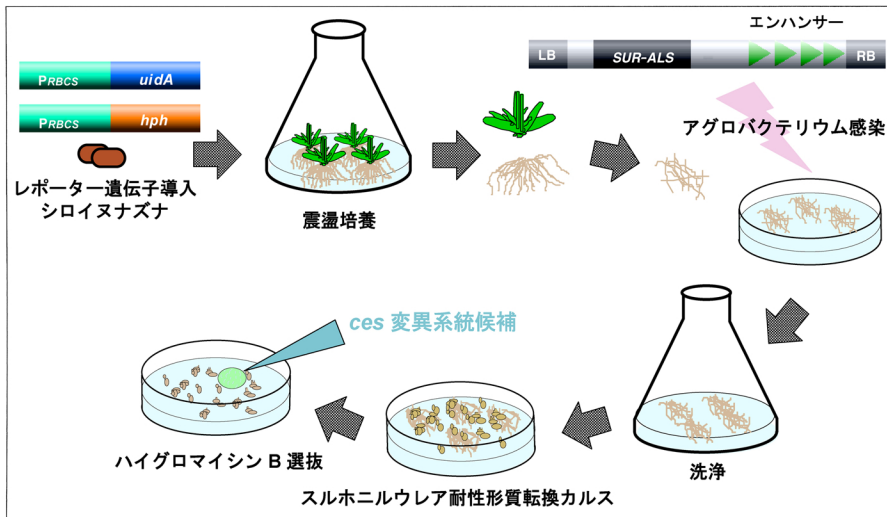


図1 ces変異体系統選抜の手順

PRBCS: RBCS-3Bプロモーター, uidA: GUS遺伝子, hph: ハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子, ALS-SUR: スルホニルウレア耐性遺伝子, エンハンサー: カリフラワーモザイクウイルス35Sエンハンサー, LB: T-DNAレフトボーダー配列, RB: T-DNAライトボーダー配列.

ーカーとして変異型アセト乳酸合成酵素遺伝子(別称: アセトヒドロキシ酸合成酵素遺伝子)を用い, スルホニルウレア耐性により形質転換カルスを選抜した. 形質転換カルスをハイグロマイシンB含有培地に移し, RBCS-3Bプロモーターの制御下におかれたハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子を指標として, 増殖してくるカルスを変異体候補とした(図1). さらに, RBCS-3Bプロモーターの制御下におかれたGUS遺伝子の発現を指標として, 変異体候補をGUS染色によって選抜した.

約4,000の形質転換カルスから, ces101, ces102, およびces103変異系統を選抜することができた. これらの変異系統カルスは, Rubiscoを蛋白質レベルにおいても高発現しており, 薄い緑色を呈した⁵⁾. ces101カルスのRBCS-3B遺伝子の発現量は, リアルタイムRT-PCR解析において, 野生系統カルスの約700倍であった. さらに, 葉緑体光合成遺伝子の転写を制御するσ因子の遺伝子の発現量も顕著に増大していた. また, ces101系統カルスと親系統カルスにおける転写産物量をマイクロアレイにより解析した結果, ces101系統において他の多くの葉緑体機能関連遺伝子の発現が高くなっていた. すなわち, CES101は, 核光合成遺伝子の発現に加えて, 葉緑体光合成遺伝子発現までもその制御下におく調節因子であると考えられた⁶⁾.

■おわりに■

現在までに3つのces変異系統を得て, 原因遺伝子のクローニングを進めている. レポーター遺伝子導入シロイヌナズナ系統の脱分化カルスにアクティベーションタギングを適用することにより, 植物個体を経ないで直接変異系統を選抜することが可能になり, いままでない新奇な優性変異系統の選抜に成功した. 本法により, さらに新たな変異系統が選抜されるものと考えられ, 器官特異的な葉緑体機能発現の制御機構に新たな知見を提供するものと確信する.

文献

- 1) Hayashi, H., Czaja, I., Lubenow, H., Schell, J., Walden, R.: *Science*, **258**, 1350-1353(1992)
- 2) Weigel, D., Ahn, J. H., Blazquez, M. A., Borevitz, J. O., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Ferrandiz, C., Kardailsky, I., Malanchruvil, E. J., Neff, M. M., Nguyen, J. T., Sato, S., Wang, Z. Y., Xia, Y., Dixon, R. A., Harrison, M. J., Lamb, C. J., Yanofsky, M. F., Chory, J.: *Plant Physiol.* **122**, 1003-1013(2000)
- 3) Quail, P. H.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 85-93(2002)
- 4) Banerjee, R., Batschauer, A.: *Planta*, **220**, 498-502(2005)
- 5) Niwa, Y., Goto, S., Nakano, T., Sakaiya, M., Hirano, T., Komeda Y., Kobayashi, H.: 投稿中
- 6) Goto, S., Niwa, Y., Kobayashi, H.: 投稿中

*1 GUSは, 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニドを加水分解し, D-グルクロン酸とインドキシル誘導体を生成する酵素である. インドキシル誘導体2分子が酸化的に重合して青色のインディゴ色素になる. 高等植物には同酵素と同等のはたらきをする酵素がないため, 遺伝子発現を調べるレポーター遺伝子としてよく使われる.