

平成29年度農学部特別研究費研究経過報告書

1. 研究者名 築山 拓司
2. 研究課題名 イネの機能獲得型突然変異体を高効率で作出する技術の開発
3. 研究目的・内容

植物の遺伝子の機能解明や改変には、機能欠失型変異体のみならず、機能獲得型突然変異体の利用が有効である。本研究の最終到達点は、イネ活性型転移因子 *mPing* がプロモーター領域に転移しやすい性質を利用して、イネの機能獲得型突然変異体を高効率で作出する系を構築することである。

4. 研究の経過

近年、植物においても、ゲノム編集技術を用いた外来遺伝子の挿入(ノックイン)が可能となりつつある。しかし、どの遺伝子に対して、どのような配列をノックインするかを見極めるためには、機能獲得型突然変異体を利用し、遺伝子発現の亢進が表現型に及ぼす影響を解析することが今なお有効である。しかし、従来のアクティベーションタギング法を利用した機能獲得型突然変異体の作出は、エンハンサー配列が偶然にプロモーター領域へ挿入されることに依存せざるを得ず、期待する変異体を得ることが困難であった。そこで本研究では、イネ由来エンハンサー配列を人為的に組み込んだ *mPing(e-mPing(enhancer-mPing))* を用いて、イネの機能獲得型突然変異体を高効率で作出する系の構築を試みた。

平成29年度は、まず、*mPing* 内部に4種類のイネユビキチン遺伝子のプロモーター領域をそれぞれ組み込んだ *e-mPing* シリーズ (*e-mPing*-J1, -J2, -I1, -I2) を作出した。*e-mPing*-J1, および -J2 はジャポニカ品種日本晴由来の、*e-mPing*-I1, および -I2 はインディカ品種 IR36 由来のユビキチン遺伝子 *Rubq2* のプロモーター領域を有している。*e-mPing*-J2 および -I2 は、エンハンサー配列に加え、ユビキチン遺伝子のイントロン配列を有している。また、*e-mPing*-I1 および -I2 は、エンハンサー配列の下流に非自律性転移因子 *Kiddo* が挿入されている。これらの配列は下流遺伝子の発現を促進することが知られており、*e-mPing* シリーズをそれぞれ導入した組換えイネでは、*e-mPing* が転移した近傍の遺伝子発現に異なる効果を発揮することが期待される。現在、*e-mPing* シリーズをイネ形質転換用ベクター pCAMBIA1200 に導入し、アグロバクテリウム法を用いてイネ品種銀坊主の形質転換に取り組んでいる。

mPing の転移は、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) を応用したトランスポゾンディスプレイ法(TD法)によって解析できる。本研究費で導入した GELSCAN-2 は、蛍光標識した DNA を高解像度で検出できるイメージャーであり、本研究の遂行に不可欠である。銀坊主8個体から抽出した DNA を用いて TD を行い、GELSCAN-2 でバンド数を計測したところ、1個体平均25本のバンドが得られた。これは、上位機種イメージャーで得られるバンド数と遜色がなかった。したがって、今後、*e-mPing* 導入イネが作出できれば、効率良く *e-mPing* の転移が検出できる。

mPing の転移には、自律性因子 *Ping* がコードする MYB 様タンパク質(以下 PiMYB)と転移酵素(以下 PiTP)が必要である。マルトース結合タンパク質(MBP)をタグとする大腸菌組換えタンパク質発現系を用いて精製した PiMYB と PiTP を混合し、ゲルシフトアッセイによって *in vitro* での *mPing* の切出しを調査した。その結果、*mPing* の切出しを示すバンドを検出することができたが、安定的にバンドを検出することができなかった。このことは、MBP タグが PiMYB と PiTP の相互作用を阻害しているためと考えられた。そこで、6×ヒスチジンをタグとして PiMYB と PiTP の精製を試みた。その結果、収量は少ないものの、PiMYB と PiTP を得ることができた。現在、これらを用いて、*in vitro* での *mPing* の切出しを再度調査している。

5. 本研究と関連した今後の研究計画

今後は、まず、それぞれの *e-mPing* を導入した組換えイネの作出を継続する。銀坊主を含む一部の品種では再分化個体を得ることが困難であるが、われわれの研究から、効率良く形質転換体を得ることができる系が確立できている。また、今年度は GELSCAN-2 を用いた TD 法を確立することができた。したがって、*e-mPing* 導入イネが作出でき次第、*e-mPing* の転移部位を調査することでタギング効率を明らかにしたいと考えている。また、遺伝子上流に *e-mPing* が転移した系統が得られれば、遺伝子発現を調査し、*e-mPing* が遺伝子の発現を亢進する程度を明らかにする予定である。