

(様式第9 別紙2:公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名: 團迫 智子

2. 養成カリキュラム名: 植物代謝関連遺伝子群の機能解析

3. 養成カリキュラムの達成状況

別紙 公開資料 「植物を用いた代謝基盤リソースの整備と植物の物質生産機能の解析」
P 16のとおり

4. 成果

別紙 公開資料 「植物を用いた代謝基盤リソースの整備と植物の物質生産機能の解析」
P 9 ~ 16のとおり

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表(論文掲載済、または査読済を対象。)

該当なし

(2) 口頭発表(発表済を対象。)

該当なし

(3) 特許等の出願件数

該当なし

公開版

開発項目「植物を用いた代謝基盤リソースの整備と植物の物質生産機能の解析」平成 15 年度成果報告書

目次

要旨	3
第 1 章 緒言	6
第 2 章 原材料および実験方法	7
2-1. 遺伝子発現コンストラクトの作製	7
2-2. 培養細胞への遺伝子導入	10
第 3 章 研究開発の成果	11
3-1. 遺伝子発現の網羅的解析	11
3-2. 遺伝子発現コンストラクトの作製	11
3-3. 培養細胞への遺伝子導入	15
3-4. バイオインフォマティクス解析	15
第 4 章 目的に照らした達成状況	18
4-1. 遺伝子発現の網羅的解析	18
4-2. 遺伝子発現コンストラクトの作製	18
4-3. 培養細胞への遺伝子導入	18
4-4. バイオインフォマティクス解析	18
第 5 章 研究発表・講演、文献、特許等の状況	18
5-1. 研究発表・講演	18
5-2. 文献	18
5-3. 特許等	19
5-4. その他の公表 (プレス発表等)	19
第 6 章 参考文献、引用文献	19

要旨

本研究はかずさ DNA 研究所において受託している NEDO プロジェクト「植物の物質生産プロセス制御基盤技術開発 - モデル植物を用いた代謝基盤リソースの整備と植物の物質生産機能の解析」の一環として行われた。

産業技術フェローシップ事業における研究計画としては 1) シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) やミヤコグサ (*Lotus japonicus*) を用いて、代謝に関連する遺伝子の整備および形質転換可能なコンストラクト作製を行う。2) 得られた遺伝子リソースをシロイヌナズナ培養細胞または植物体に導入する。3) 得られた遺伝子導入培養細胞

株をハイスループット解析が可能な DNA アレイと質量分析装置を備えた各種機器分析で、遺伝子発現プロファイリング (トランスクリプトミクス) と代謝プロファイリング (メタボロミクス) を網羅的に測定・解析する。4) 得られた遺伝子発現プロファイリングと代謝プロファイリングは、バイオインフォマティクス技術を用いて大量のデータを効率的に統計処理し、個々の遺伝子機能、代謝物の決定を行う。以上の研究を通して、遺伝子発現コンストラクトの作製、遺伝子の網羅的解析、培養細胞への遺伝子導入、バイオインフォマティクス解析などの技術を習得することを計画している。15 年度においては以下の研究を行った。

遺伝子機能を過剰発現によって調べるために、培養細胞の形質転換に用いる発現コンストラクトの作製を行った。構築は完全長 cDNA クローンの得られている遺伝子に関しては cDNA クローンを用いて行った。Gateway System および高発現バイナリーベクター-pGWB2 が植物細胞内で正常に機能するかどうかを確かめるため、GUS 遺伝子を pGWB2 に挿入し、アグロバクテリウム形質転換法により BY2 培養細胞へ導入した。得られた形質転換 BY2 カルスから無作為に 16 個を選んで X-gluc 染色試薬を用いて GUS 染色を行った。その結果、染色の強弱はあるものの供試したすべての形質転換 BY2 カルスにおいて染色が認められた。この結果から、本プロジェクトでの高発現コンストラクト作製には Gateway System およびバイナリーベクター-pGWB2 を用いて行うこととした。cDNA クローンの pGWB2 への挿入、大腸菌の形質転換、プラスミド抽出、インサートチェックなど一連の操作すべてを 96 個単位で行い、ハイスループットなコンストラクト作製系を確立し、これまでに約 250 の発現コンストラクトを得た。

完全長 cDNA クローンが得られていない遺伝子に関してはかずさ DNA 研究所が保有するシロイヌナズナのゲノムクローンと大腸菌の相同組換え系を利用した構築系の確立を試みた。ゲノムクローンを用いることにより、通常のサブクローニングによく用いられる PCR で目的遺伝子を取得する際に問題となる point mutation を回避することができ、また細胞内で発現量が少ないために RT-PCR や、cDNA ライブラリーから取得することが困難な遺伝子を取得可能であるという利点があげられる。標的遺伝子が含まれる断片のサイズおよび該当する制限酵素の活性強度などの条件から、最も適切と考えられる制限酵素によってゲノムクローンを消化後、電気泳動を行い、標的遺伝子を含むバンドをゲルより回収、精製し、相同組換えに用いた。ゲノムクローンからのプラスミド DNA の大量調製において、大腸菌の培養条件、複数のメーカーのキットを試しての最適なキットの選択、抽出条件の最適化を行った。これらの改良を行いつつ、これまでに約 100 遺伝子の取得を行った。得られたゲノム断片を用いて、相同組換えによる大腸菌体内での *in vivo* サブクローニングを試みた。実験に用いるゲノム断片の量、長さ、断片に含まれる遺伝子の長さ、トラップベクターの量、トラップベクターに含まれる相同領域の長さ、エレクトロポレーション後の培養時間などについて条件をふり、検討を行ったが、ポジティブコントロールの組換えは起こるものの、他の遺

伝子については組換えが起こらなかった。組換えに用いる大腸菌株の検討、トラップベクターの配列の検討、組換えに必要な相同領域の長さの検討などが今後の課題である。これら完全長 cDNA クローンを用いたハイスループットな発現コンストラクト作製技術の開発、ゲノムクローンからの標的遺伝子の切り出し作業の効率化などを通じて、コンストラクト作製に必要な技術を習得した。

コンストラクト作製に用いる遺伝子情報の公開データベースなどからの取得、得られた情報の加工、整理はバイオインフォマティクスの技術を用いて行った。各研究機関、コンソーシアムなどより公開されているシロイヌナズナ遺伝子データベースに記載されているアノテーションを元に約 27,000 のシロイヌナズナ全遺伝子から植物の代謝物プロファイルを特徴付けている豊富な二次代謝物の生合成に関わると考えられる約 4,000 個の代謝関連遺伝子を選抜し、完全長 cDNA クローンの有無を調べた。独立行政法人理化学研究所筑波研究所バイオリソースセンターより 1,000 個の完全長 cDNA クローンを入手し、コンストラクト作製に用いた。

ゲノムクローンからの標的遺伝子取得において、標的遺伝子を含むゲノムクローンの検索、挿入されたゲノム断片における標的遺伝子の正確な位置情報の取得および適当な制限酵素により消化した場合のゲノムクローンの予想される制限酵素地図の作製、標的遺伝子の切り出しに用いる制限酵素の決定を遺伝子解析ソフト、各種データベース、およびコンピュータ言語の 1 種である perl によって作成されたプログラムを用いて自動化した。これら実験に用いる遺伝子のリスト化、完全長 cDNA およびゲノムクローンを選抜を通して、perl を用いたデータの加工、フォーマットの統一、整理における基本的な技術を習得した。

The NEDO fellowship training program has been conducted as part of the NEDO-funded project titled “Development of Fundamental Technologies for Controlling the Process of Industrial Material Production by Plants” under the supervision of Dr. Daisuke Shibata, who is Team Director of the project. The program contains 1) construction of expression vectors carrying metabolism-related genes of either *Arabidopsis thaliana* or *Lotus japonicus*, 2) transformation of *Arabidopsis* suspension cultured cells of the T87 line by the constructed expression vectors, 3) profiling the transgenic T87 cell lines by DNA array technology (transcriptome profiling) and mass spectrometry techniques (metabolome profiling), and 4) analyzing the vast profiling data sets computationally with statistics algorithms to find putative function of each gene. What I did in the fiscal year is as follows;

Binary vectors carrying various metabolism-related genes under a constitutive, strong promoter were constructed. The full-length cDNA clones available in public were selected for the binary vector construction using either the GateWay or pGWB2 vector. Preliminary experiments showed that all 16 lines of transgenic tobacco suspension cultured BY2 cells transformed by the binary

vectors carrying the β -glucuronidase (GUS) gene with an Agrobacterium-mediated protocol exhibited GUS gene expression when detected with X-gluc substrate. The results confirmed the usefulness of these vectors for transgenic research. To accelerate the vector-insert construction, I established the protocol in which the procedure of vector construction, *E. coli* transformation, plasmid preparation and finally confirmation of the construct was optimized for simultaneous processing of 96 samples rather than one-by-one processing. By the protocol, 250 vector constructs were obtained.

As all full-length cDNA clones we need are not publicly available, therefore I tried to cut out the target genes from Arabidopsis genomic clones by exploiting the homologous recombination system of *E. coli*. The method may be beneficial in avoiding the PCR process, which causes mistakes during amplification, and over RT-PCR from small amounts of cDNA. I checked various conditions for homologous recombination, such as optimization of the amount and length of DNA, the amount of vector DNA, the length of homologous region and culturing time after transformation of *E. coli*. However, the results were not satisfactory. I will challenge the problem again next year.

Bioinformatics techniques have been applied to various steps during vector construction. Out of about 27,000 genes of the Arabidopsis genome, it is speculated that at least 4,000 genes are involved in synthesis of the various compounds, which are abundant in secondary metabolites. As an initial trial, 1,000 full-length cDNA clones were found computationally in the Arabidopsis full-length cDNA collection of the RIKEN Resources Center, and obtained from the institution for vector construction. In addition, a software script written by Perl language was used to find restriction sites on a genomic clone and predict the length of restriction fragments.

Through the research mentioned above, I have built up my experience on several experimental and computational techniques.

第1章 緒言

本研究はかずさ DNA 研究所において受託している NEDO プロジェクト「植物の物質生産プロセス制御基盤技術開発 - モデル植物を用いた代謝基盤リソースの整備と植物の物質生産機能の解析」の一環として行われた。プロジェクトにおける研究は、工業原材料を効率よく植物に生産させるために、代謝産物解析の基盤となるリソースの整備を進め、モデル植物を用いて、特定の物質代謝に関わる遺伝子発現機構を分子レベルで解析し、それを制御する方法を開発するという目的のもとに進められており、本研究はプロジェクトの一端を担当するとともにプロジェクトの研究計画に沿った形で行われた。

産業技術フェローシップ事業における研究計画としては 1) すでに全ゲノム配列の解読の完了しているアブラナ科シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) や現在全ゲノム

配列の解読が進められているマメ科ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) を用いて、代謝に関連する遺伝子の整備および形質転換可能なコンストラクト作製を行う。2) 得られた遺伝子リソースをシロイヌナズナ培養細胞または植物体に導入する。得られた遺伝子導入培養細胞株は本プロジェクトにおいて技術開発された凍結保存法を用いてリソースの維持を図るとともに適宜代謝経路に関する機能解析に用いることが可能な独自のシステムを構築する。3) Non-target な解析を目的として、得られた遺伝子導入培養細胞株をハイスループット解析が可能な DNA アレイと質量分析装置を備えた各種機器分析で、遺伝子発現プロファイリング (トランスクリプトミクス) と代謝プロファイリング (メタボロミクス) を網羅的に測定・解析する。4) 得られた遺伝子発現プロファイリングと代謝プロファイリングは、バイオインフォマティクス技術を用いて大量のデータを効率的に統計処理し、個々の遺伝子機能、代謝物の決定を行う。得られた研究成果は工業原料に用いられている植物に応用可能であり、最終的に有用代謝経路の制御を可能にした工業原料植物の作出を目指す。以上の研究において、遺伝子の網羅的解析、バイオインフォマティクス解析などに必要な技術を習得することを予定している。本来の研究計画においては遺伝子発現コンストラクトの作製および培養細胞への遺伝子導入に関する研究および技術習得は平成 16 年度以降において行う予定であったが、網羅的解析には多数の形質転換体が必要であること、形質転換体の作出および解析可能な状態までの育成には数ヶ月を要すること、プロジェクトの目的の一つである形質転換体リソースの整備においてもさらに大量の発現コンストラクトの準備が急務であることなどの理由から、計画を前倒しして 15 年度から研究を開始した。これらを通じて技術の習得を行った。

第2章 原材料および実験方法

2-1. 遺伝子発現コンストラクトの作製

2-1-1. 遺伝子操作技術

大腸菌を用いた遺伝子操作については、特に断りの無いかぎり、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に従った。遺伝子組換え操作は基本的な制限酵素処理、ライゲーション反応を用いたほか、Gateway system (Invitrogen, CA, USA) の部位特異的組換え反応である attB1-attB2 領域と attP1-attP2 領域で組換えの起こる BP 反応、attL1-attL2 領域と attR1-attR2 領域で組換えの起こる LR 反応を用いて行った。プロトコルはキットに付属のものに従った。Invitrogen からは Gateway System 用の種々のベクターが提供されており、attP 部位を持つものを Donor Vector、attL 部位を持つものを Entry Vector、attR 部位を持つものを Destination Vector と称する。

2-1-2. 実験に用いた大腸菌株

Gateway System に用いるベクターの増殖用コンピテントセルには大腸菌 (*Escherichia coli*) DB3.1 株を用いた。BP 反応および LR 反応後の形質転換用コンピテン

トセルの作製には大腸菌 DH5 α 株または DH10B 株を用いた。相同組換え活性を有する大腸菌株として JC8679 株 (*recBC, sbcA*; Clark, 1974) を用いた。相同組換え後のモノマープラスミド取得のための再形質転換用大腸菌には DH10B を用いた。

2-1-3. 遺伝子材料

コンストラクト作製にはシロイヌナズナの遺伝子を用いた。すでに数千の完全長 cDNA (RIKEN Arabidopsis Full Length, RAFL; Seki et al., 2002) クローンが独立行政法人理化学研究所筑波研究所バイオリソースセンター (BRC; Ibaragi) より公開されており、完全長 cDNA を用いた構築は BRC より分与された RAFL クローンを用いて行った。cDNA の得られていない遺伝子についてはかずさ DNA 研究所にて整備されている、シロイヌナズナのゲノム断片が組み込まれた Transformation-competent Artificial Chromosome (TAC; Liu et al., 1999) クローンから切り出し、構築に用いた。

2-1-4. プラスミドの少量調製

得られたコロニーからのプラスミドの調製はミニプレップキット (Wizard *plus* SV Minipreps DNA Purification System; Promega, WI, USA) を用いて行った。またハイスループットなプラスミド調製にはプラスミド自動分離装置 PI-100 (KURABO, Osaka)、SPRINTPREP (Agencourt Bioscience, MA, USA)、COSMCPREP (Agencourt Bioscience) を用いた。プロトコルはすべてキットまた装置に付属のものに従った。

2-1-5. Entry Vector の作製

ハイスループットな構築を可能にするために Donor Vector を改変して作製した Entry Vector、pRAFLINTR を得た。

2-1-6. 実験に用いたバイナリーベクターとその作製

高発現用 Destination Vector は島根大学遺伝子実験施設の中川強先生より分与していただいた pGWB2 を用いた。RNAi 用 Destination Vector は奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物分子遺伝学講座の島本功教授より分与していただいた pANDA35KH を用いた。pGWB2 と pAND35KH はともにバイナリーベクターであり、アグロバクテリウムを介して、植物体または植物培養細胞の形質転換が可能である。

2-1-7. pRAFLINTR へのサブクローニング

BRC より分与された約 100 ng の RAFL クローンから標的遺伝子を切り出して、pRAFLINTR へ挿入した。得られたシングルコロニーを植菌し、往復振盪培養 (37 °C, 217 rev/min, 18 hr) 後、SPRINTPREP を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラスミドは *Ban* (TAKARA BIO) による制限酵素処理を行い、標的 cDNA が挿入されていることをアガロースゲル電気泳動による DNA 断片のサイズで確認した。

2-1-8. バイナリーベクターへの移し変え

2-1-7.で得られたエントリークローンから 2 種のattL配列に挟まれたcDNA断片を attR1、attR2 部位およびクロラムフェニコール耐性 (Cm^r) 遺伝子、*ccdB*遺伝子を持つ バイナリーベクター (pGWB2) へ組換えるため、以下の条件でLR反応 (25 ℃, 2 hr) を行った。反応液を用いて大腸菌の形質転換を行った。それぞれ 50 mg/lのカナマイシン およびハイグロマイシン (Hygromycin B; Wako Pure Chemical Industries, Osaka) を含む LBプレートへ塗布し、37 ℃で一晩静置培養をした。得られたシングルコロニーは上記 抗生物質を含む 2×YT培地 800 μlに植菌し、37 ℃で往復振盪培養 (37 ℃, 217 rev/min, 21 hr) 後、COSMCPREPを用いてプラスミドを抽出した。手順は添付のプロトコルの CosMCPrep for BACsに従った。得られたプラスミドは*Hind* および*Bgl* (TAKARA BIO) による制限酵素処理を行い、組換え反応がなされていることをアガロースゲル電気泳動によるDNA断片のサイズで確認した。

2-1-9. 発現クローンの確認

2-1-8.で抽出したプラスミドおよびattB1- attB2 間を増幅させるプライマーを用いて、PCRによるインサートの増幅を行った。PCR反応後、アガロースゲル電気泳動を行い、目的産物の増幅およびコンタミネーションの有無を確認した。さらに組換え反応が行われなかったプラスミドは、Cm^r遺伝子および*ccdB*遺伝子を持つバイナリーベクター (pGWB2)であることが考えられる為、Cm^r遺伝子の開始コドン下流にアニーリングするプライマーであるCm-forward、*ccdB*遺伝子の終止コドン上流にアニーリングするプライマー*ccdB*-reverseを用いて、同様の条件でPCRを行った。

2-1-10. TACクローンからの標的遺伝子を含むゲノム断片の切り出し

TACクローンを持つ大腸菌をTerrific Broth (TB) 培地 100 ml (50 mg/lカナマイシン) に植菌し、37 ℃のインキュベーター (BIO-SHAKER BR-15; TAITEC, Saitama) で培養後、プラスミドの大量調製を行った。抽出されたDNAを用いて、決定した制限酵素で切断し、標的遺伝子を含むバンドを切り出した。切り出したゲルからWizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いて、DNA抽出を行った。プロトコルはキットに付属のものに従った。精製された回収物を用いて、ゲル電気泳動を行い、取得したDNA断片に間違いがないことを確認した後、相同組換えに用いた。

2-1-11. トラップベクターの作製

相同組換えの際のドナー側となるトラップベクターはかずさ DNA 研究所ヒト遺伝子第一研究室の長瀬隆弘博士より分与していただいた pJGEM または Entry Vector、pENTR1A (Invitrogen) を改変した pJGEMP を鋳型とした PCR によって取得した。また、これら鋳型に存在する attL1、attL2 配列にアニールし、標的遺伝子とも相同な配列を有するプライマ

ーを設計し、PCR によってトラップベクターを作製した。

2-1-12. 相同組換え

TAC クローンから切り出した標的遺伝子を含む DNA 断片とトラップベクターを 1.67 kV の条件でエレクトロポレーションシステム (E.coli Pulser; Bio-Rad Laboratories, CA, USA) により JC8679 株に共導入した。キュベットは 0.1 cm 幅 (Gene Pulser Cuvette; Bio-Rad Laboratories) のものを使用した。1 ml の SOC 培地を加え、37 °C、1-3 hr 培養後、選択マーカーとしてカナマイシン (25 mg/l) を加えた LB 培地に塗布し、37 °C のインキュベーターで 1 晩静置培養した。

2-1-13. cGUS/pGWB2 の作製

pBI121 (Jefferson et al., 1987) から切り出した GUS cDNA を挿入し、cGUS/pDONR201 を構築した。cGUS/pDONR201 と pGWB2 を用いて LR 反応によって、pGWB2 に GUS cDNA を挿入し、cGUS/pGWB2 を得た。得られたベクターはアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA101 株にエレクトロポレーション法を用いて導入した。2.5 kV の条件でエレクトロポレーションシステム (E.coli Pulser) を用い、キュベットは 0.2 cm 幅 (Gene Pulser Cuvette) のものを使用した。1 ml の SOC 培地を加え、28 °C、1 hr 培養後、選択マーカーとしてカナマイシン (50 mg/l)、ハイグロマイシン (50 mg/l) を加えた LB 培地に塗布し、28 °C のインキュベーターで 2 日間静置培養した。得られた形質転換アグロバクテリウムを用いて、タバコ (*Nicotiana tabacum*) 培養細胞 BY-2 株の形質転換を行った。

2-1-14. GUS 染色

形質転換 BY2 カルスの GUS 染色は Jefferson らの方法に従った (Jefferson et al., 1987)。

2-2. 培養細胞への遺伝子導入

2-2-1. 発現クローンのアグロバクテリウムへの導入

アグロバクテリウムのコンピテントセルを氷上で融解して、プラスミド溶液 1 µl を加えて氷上で冷しておいた 0.1 mm キュベットを用いて、1.25 kV でエレクトロポレーションを行った。キュベットに 1 ml の SOC 培地を加えて、カナマイシン (50mg/l) およびハイグロマイシン (50mg/l) を含む YM プレート (12 well micro plate; ASAHI TECHNO GLASS, Chiba) プレートへ 30 µl 塗布し、28 °C で 2 日間静置培養した。

2-2-2. シロイヌナズナ培養細胞 T87 の形質転換

当研究室において確立されたアグロバクテリウムを用いた T87 形質転換法を用いて行った。

第3章 研究開発の成果

3-1. 遺伝子発現の網羅的解析

マイクロアレイのデータはすべて数値化され、数値化データはエクセルファイルによって閲覧、解析することが可能である。エクセルに付属のオートフィルタ機能を用いて遺伝子の選抜を行った。具体的な解析を行うに先立って、当研究室における DNA アレイによって得られた種々の処理条件下における T87 培養細胞の遺伝子発現プロファイル情報をもとに種々の生理条件下で発現量が劇的に上昇する遺伝子の抽出を行った。

3-2. 遺伝子発現コンストラクトの作製

遺伝子の機能解析において、その遺伝子機能を過剰発現、および発現抑制によって調べるためには、培養細胞へ遺伝子を導入する発現コンストラクトの作製が必要不可欠である。構築は cDNA クローンの得られている遺伝子に関しては cDNA クローンを用いて行い、得られていない遺伝子に関してはゲノムから切り出しての構築を試みた。

3-2-1. 完全長 cDNA クローンを用いたコンストラクト作製

RAFL クローンの pGWB2 への導入を行った。遺伝子の選抜および構築に必要な解析に関しては 3-4. に詳述した。コンストラクト作製を迅速に行うため、pRAFLINTR を作製した。cDNA が挿入された Entry Vector と pGWB2 を用いて LR 反応を行い、cDNA 領域をバイナリーベクターへ組換えた。

3-2-2. ハイスループット化の検討

大腸菌の形質転換は DH10B 株を用いるエレクトロポレーション法と DH5 株を用いる熱ショック法の両方を条件検討した。その結果、1 度に 96 クローンを同時に形質転換することが可能な熱ショック法を用いることとした。大腸菌のプラスミド抽出に関しては、従来法に基づいた抽出キットである Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System およびプラスミド自動分離装置 PI-100 と 96 プレートでのプラスミド抽出に対応した抽出キットである SPRINTPREP、COSMCPREP を用いたプラスミド抽出を行い、純度、収量、必要時間などを比較した。その結果、SPRINTPREP または COSMCPREP においては純度、収量の点で従来法に若干劣るものの (Figs. 3-1 and 3-2)、構築には十分な純度、収量を得ることが可能であり、かつ 96 ベースで一度にプラスミドを抽出可能なため、今後の実験には SPRINTPREP および COSMCPREP を用いることにした。

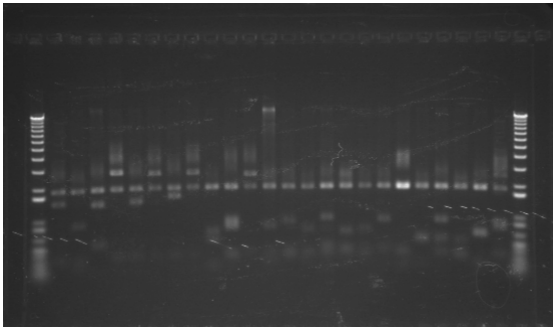


FIG. 3-1. SPRITNPREP を用いたプラスミド抽出

Ban による制限酵素処理後の電気泳動図 (1 × TAE, 150V, 0.8% agarose gel, 45 min) を示した。両端はマーカー (1 Kb Plus DNA Ladder)。挿入されている cDNA によってバンドパターンが異なる。これにより pRAFLINTR に挿入されたクローンの真偽を判断した。

FIG. 3-2. COSMCPREP を用いたプラスミド抽出

Hind および *Bgl* による制限酵素処理後の電気泳動図 (1 × TAE, 150V, 0.8% agarose gel, 45 min) を示した。両端はマーカー (1 Kb Plus DNA Ladder)。挿入されている cDNA によってバンドパターンが異なる。これにより pGWB2 に挿入されたクローンの真偽を判断した。* マークの付いているレーンは、バンドが重複して存在しており、コンタミネーションの可能性が考えられるため、アグロバクテリウムの形質転換には使用せず。

3-2-2-1. インサートチェック法の検討

インサートされた断片の真偽の判断は抽出されたプラスミドの制限酵素処理に加えて、attR1、attB1 および attR2、attB2 の両方にアニーリング可能なプライマーセットと Destination Vector 内の *Cm^r* 遺伝子、*ccdB* 遺伝子にのみアニーリングするプライマーセットを用いた PCR によって得られたバンドのサイズおよびそのバンドの制限酵素処理による電気泳動パターンのチェックによって行った (Figs. 3-3 and 3-4)。

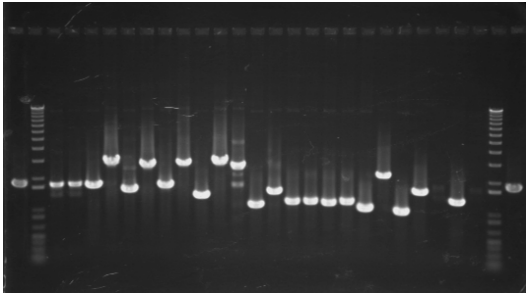


FIG. 3-3. att1-forward および att2-reverse を用いた PCR によるインサートの増幅

PCR 反応後の反応液 10 μ l を用いたアガロースゲル電気泳動 (1 \times TAE, 150V, 0.8% agarose gel, 45 min)。レーン 1, 28 はネガティブコントロールである、Destination Vector をテンプレートに用いたものである。目的とするインサートが挿入されていることを確認した。

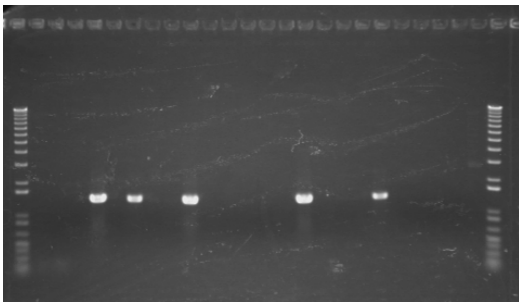


FIG. 3-4. Cm-forward および ccdB-reverse を用いた PCR によるインサートの増幅

プライマーに Cm-forward および ccdB-reverse を用いた際にバンドの増幅が認められた (レーン 5, 7, 10, 16, 20)。これらのプラスミドは組換え反応がうまく行われていないと考えられるため、アグロバクテリウムの形質転換には用いていない。

以上の条件検討および構築の作業を通して、現在までに RAFL クローンから約 250 種の代謝関連酵素等をコードする遺伝子の pGWB2 への導入が完了した。

3-2-3. ゲノムクローンの選抜および TAC クローンからの標的遺伝子を含むゲノム断片の取得

RT-PCR、cDNA ライブラリーから取得することが困難な転写 (発現) 量の少ない遺伝子を相同組換えにより発現コンストラクトに組み込むため、シロイヌナズナのゲノムクローンからの取得を試みた。TAC クローンを用いることにより、通常のサブクローニングによく用いられる PCR で目的遺伝子を取得する際に問題となる point mutation を回避することができ、また細胞内で発現量が少ないために RT-PCR、cDNA ライブラリーから取得することが困難な転写 (発現) 量の少ない遺伝子を取得するという利点がある。遺伝子の選抜および構築に必要な解析に関しては 3-4. に詳述した。標

的遺伝子が含まれる断片のサイズおよび該当する制限酵素の活性強度などの条件から、最も適当と考えられる制限酵素によって TAC クローンを消化後、電気泳動を行い、標的遺伝子を含むバンドをゲルより回収、精製し、相同組換えに用いた。TAC クローンからのプラスミド DNA の大量調製において、大腸菌の培養条件、複数のメーカーのキットを試しての最適なキットの選択、抽出条件の最適化を行った。これらの改良を行いつつ、これまでに約 100 遺伝子の取得を行った。

3-2-4. JC8679 株を用いた相同組換えによるサブクローニングの条件検討

前年度、報告において取得された At3 g 57250 遺伝子 (TAC ID; K05H12) をポジティブコントロールに用い、他の遺伝子取得用トラップベクターを作製し、相同組換えによるサブクローニングを試みた。実験に用いるゲノム断片の量、長さ、断片に含まれる遺伝子の長さ、トラップベクターの量、トラップベクターに含まれる相同領域の長さ、エレクトロポレーション後の培養時間などについて条件をふり、検討を行ったが、ポジティブコントロールの組換えは起こるものの、他の遺伝子については組換えが起こらなかった。トラップベクターに存在する attL1、attL2 部位は非常に似た塩基配列を持っているため、それらが JC8679 株内での相同組換えを阻害しているのかもしれない。その可能性を除外するため、現在、直接 Entry Vector へサブクローニングするのではなく、別のクローニングベクターを介したのち、Entry Vector への組み込みを行う系を検討している。今後はさらに JC8679 株を改良した YZ2000 株 (Zhang, 2000) や JC9604 株 (Clark, 1974) など他の大腸菌株の使用も考慮に入れつつ、引き続き条件検討を行う。

3-2-5. GUS 染色による pGWB2 の動作確認

cGUS/pGWB2 をアグロバクテリウム形質転換法により BY2 培養細胞へ導入し、Gateway System および pGWB2 が植物細胞内で正常に機能するかどうかを確かめた。得られた形質転換 BY2 カルスから無作為に 16 個を選んで X-gluc 染色試薬を用いて GUS 染色を行った。その結果、染色の強弱はあるものの供試したすべての形質転換 BY2 カルスにおいて染色が認められた (Fig. 3-5)。この結果から、本プロジェクトでの高発現形質転換培養細胞作製のバイナリーベクターに pGWB2 を選んだ。

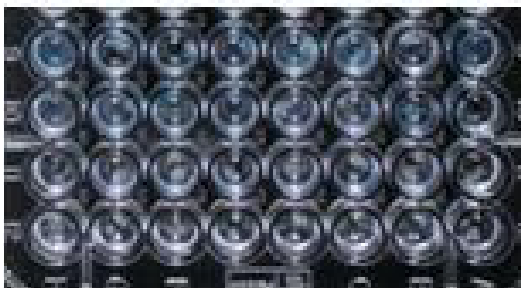


FIG. 3-5. GUS histochemical staining.

上の 2 段は cGUS/pGWB2 を導入した BY2 細胞を染色したもの。下の 2 段は pBI121 を導入した BY2。染色の強さは pBI121 に比べ、cGUS/pGWB2 のほうが高い。

3-3. 培養細胞への遺伝子導入

植物の二次代謝物質合成経路に関与する酵素を中心として約 250 個のコンストラクトを用いたアグロバクテリウムの形質転換が完了し、順次 T87 細胞への導入を開始した。

3-4. バイオインフォマティクス解析

各公開データベースや遺伝子解析ソフト(Genetyx, Genetyx, Tokyo) などの一般的な解析ソフトを用いた標的遺伝子の配列取得、制限酵素地図の作製と並行して、当研究室において作製された種々のソフトを用いて、これら遺伝子解析にかかる時間の短縮化を試みた。解析に用いたデータベースでは遺伝子のアノテーションと塩基・アミノ酸配列データを各公開サーバから最新のものが随時、取得されるようにし、AGI コードやアノテーションのキーワードから、これらの全データに対する同時検索が可能な Web システムが構築されている。シロイヌナズナに関する公開データベースは多く存在するが、同一の遺伝子に対するアノテーションがデータベースによって異なるケースや出力フォーマットに統一性がないといった問題がある。各公開データベースから必要な情報を収集し、加工、整理を行い、研究に用いた。

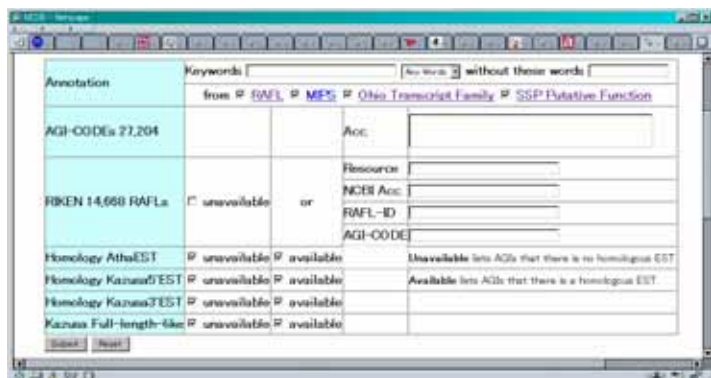
3-4-1. 実験に用いる遺伝子材料のリスト化

シロイヌナズナでは遺伝子と推定される配列はすべて AGI コードによってナンバリングされている。またその塩基配列を元に遺伝子機能が推定され、アノテーションという形で各研究機関、コンソーシアムなどより公開されている。Munich Information Center for Protein Sequences より公開されている MAtDB、Arabidopsis Biological Resource Center より公開されている Tair Database、The Institute for Genomic Research より公開されている The TIGR *Arabidopsis thaliana* Database などのシロイヌナズナ遺伝子データベースに記載されているアノテーションを元にシロイヌナズナ全遺伝子からキーワードごとに AGI コードをリストアップした。約 26000 のシロイヌナズナ全遺伝子から植物の代謝物プロファイルを特徴付けている豊富な二次代謝物の生合成に関わると考えられる約 4000 個の代謝関連遺伝子を選抜した。

3-4-2. 完全長 cDNA クローンの選抜

3-4-1. において得られた遺伝子の AGI コードを当研究室において作成された遺伝子検索、塩基配列取得および制限酵素処理による断片長の計算ソフト (StratEST) を用いて、BRC より公開されている 1000 個の RAFL クローンの ID を一括取得した。コンストラクト作成に用いる遺伝子の選抜を行った。

(A)



(B)

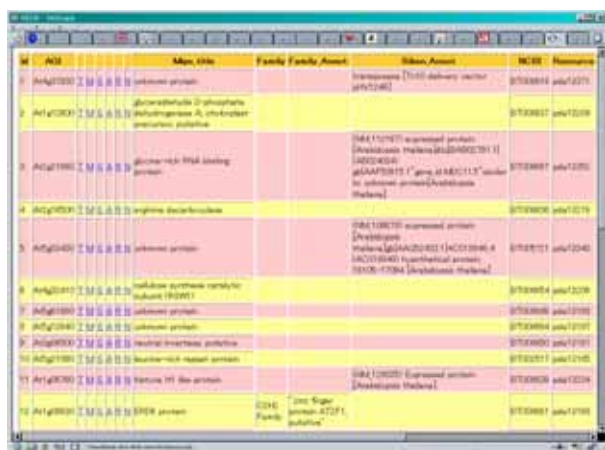


FIG. 3-6. シロイヌナズナ遺伝子のアノテーション統合データベース

アノテーションのキーワードから遺伝子IDやGenBankなどへのAcc.、RIKENからの完全長cDNAクローンの配布状況を短時間で得られる。検索画面 (A) および検索結果画面 (B) を示す。

3-4-3. ゲノムクローンの選抜および制限酵素地図の作製 1

かずさ DNA 研究所にて保有、整備されている TAC クローンにはシロイヌナズナの約 100 kbp のゲノム断片がそれぞれ挿入されており、すべての TAC クローンにおいて挿入されたゲノム断片の両末端約 500 bp の塩基配列がそれぞれ決定されている。配列情報から TAC クローンをゲノムの 5' 側から順に整列させ、遺伝子の AGI コードから、その挿入位置を検索することが可能な TACviewer (Fig. 3-7) を用いて標的遺伝子をもつ TAC クローンを決定した。

FIG. 3-7. TACviewer の操作画面

遺伝子解析ソフト (Genetyx, Fig. 3-8) により、ゲノム断片における標的遺伝子の正確な位置の決定および適当な制限酵素により消化した場合の TAC クローンの制限酵素地図を作製し (Fig. 3-9)、標的遺伝子の切り出しに用いる制限酵素を決定した。

FIG. 3-8. Genetyx の操作画面

FIG. 3-9. 制限酵素地図

3-4-4. ゲノムクローンの選抜および制限酵素地図の作製 2

当研究室において作成された TAC クローン用遺伝子検索および制限酵素処理による断片長の計算ソフト (Highway Star) を用いて、AGI コードから該当する遺伝子が挿入されている TAC クローンを選抜し、実験に用いた (Fig. 3-10)。HighwayStar を用いて遺伝子リストを問い合わせることによって、自動的に、その目的遺伝子が挿入されている TAC クローンのリストが出力され、次に、ベクター配列と挿入されているゲノム配列、目的遺伝子の塩基配列を元に、目的遺伝子をベクターから切り出すことのできる制限酵素と断片長を算出すること、さらに複数の異なる遺伝子を同時に問い合わせることも可能となった。標的遺伝子を含む TAC クローンの選抜から制限酵素消化による断片長リストの取得までに必要な作業時間は従来の Web データベース、遺伝子解析ソフトなどを用いた場合、1 遺伝子あたり、1 時間程度を必要としていたが、Highway Star の導入によって、複数の遺伝子に対する同時検索および制限酵素地図の一括取得が可能となり、作業時間が 1 遺伝子あたり 10 数分と劇的に短縮された。

Sequence from 64398 to 67512 base in Chrom 1 v110803
C/64398
NOTION, This gene is coding by COMPLEMENT STRAND DNA

K17F11 Insert length, 93811 base

Tac	RE	Ident	match (b)	Mis (b)	gap (b)	Tac_start (b)	Tac_end (b)	Chrom_start (b)	Chrom_end (b)	e-value	Score
K17F11_SF1_9865	SF1	9865	741	6	0	43	763	34275	35011	0	1376.2
K17F11_KDT_971	KDT	971	800	15	5	53	741	328084	127399	0	1140.3

! K17F11 At1g01140 AsH QAQGTG

1	vector & insert	19550	104424	10053
11	insert & vector	19544	98178	93816
10	insert	12681	73517	98177
3	At1g01140	11192	26168	37259
4	insert	10519	37360	47878
5	insert	10444	47879	58222
2	insert	8114	13054	26167
12	vector	8224	83817	100040
9	insert	5408	68109	73516
8	insert	3255	62854	68108
6	insert	3066	58323	61888
15	vector	5248	100548	101794
7	insert	1185	61689	62953
16	vector	1139	101795	100903
13	vector	443	100041	100480
14	vector	65	100481	100545

FIG. 3-10. TACベクターからの目的遺伝子の切り出し予測システム

標的遺伝子At1 g 01140 の場合を示す。目的遺伝子を含むと予測されたベクター-K17F11 から、制限酵素AatII による切り出しが可能であり、消化した場合には、目的遺伝子が 11192 bp の長さをもつ断片に含まれることが分かる。

3-4-5. プライマーに用いる塩基配列の決定

標的遺伝子の遺伝子導入用ベクターへの組換え用トラップベクターのPCRによる増幅の際に用いる、両 5' 末端に標的遺伝子と相同な配列を持つプライマーを設計した (Fig. 3-11)。

FIG. 3-11. 相同組換え配列を持つプライマーの設計画面

第4章 目的に照らした達成状況

4-1. 遺伝子発現の網羅的解析

種々の遺伝子発現の変動量についてのデータを取得、条件を満たす遺伝子を抽出する作業を通して、数値化されたマイクロアレイデータの加工および必要な情報の抽出などデータ解析に必要な技術について習得した。

4-2. 遺伝子発現コンストラクトの作製

RAFL クローンを用いたハイスループットな発現コンストラクト作製技術の開発、ゲノムクローンからの標的遺伝子の切り出し作業の効率化などを通じて、コンストラクト作製に必要な技術を習得した。

ゲノムクローンを用いた相同組換え系による大腸菌体内での *in vivo* サブクローニングの技術に関しては、組換えに用いる大腸菌株の検討、トラップベクターの配列の検討、組換えに必要な相同領域の長さの検討などが今後の課題である。これらの実験を通して、ゲノム断片を用いた発現コンストラクトの作製技術を習得する。

4-3. 培養細胞への遺伝子導入

培養細胞への遺伝子導入に必要なアグロバクテリウムの形質転換技術について習得した。

4-4. バイオインフォマティクス解析

実験に用いる遺伝子のリスト化、完全長 cDNA およびゲノムクローンの選抜を通して、perl を用いたデータの加工、フォーマットの統一、整理における基本的な技術を習得した。16 年度においては DNA アレイ解析や種々の分析機器によって得られたデータの解析に必要なバイオインフォマティクス関連技術の習得を行う。

第5章 研究発表・講演、文献、特許等の状況

5-1. 研究発表・講演

特になし

5-2. 文献

特になし

5-3. 特許等

特になし

5-4. その他の公表 (プレス発表等)

特になし

第6章 参考文献、引用文献

Caddick, M. X., Greenland, A. J., Jepson, I., Krause, K. P., Qu, N., Riddell, K. V., Salter, M. G., Schuch, W., Sonnewald, U., and Tomsett, A. B. (1998). An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nat Biotechnol* *16*, 177-180.

Clark, A. J. (1974). Progress toward a metabolic interpretation of genetic recombination of *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Genetics* *78*, 259-271.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., and Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* *6*, 3901-3907.

Liu, Y. G., Shirano, Y., Fukaki, H., Yanai, Y., Tasaka, M., Tabata, S., and Shibata, D. (1999). Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 6535-6540.

Salter, M. G., Paine, J. A., Riddell, K. V., Jepson, I., Greenland, A. J., Caddick, M. X., and Tomsett, A. B. (1998). Characterization of the ethanol-inducible *alc* gene expression system for transgenic plants. *The Plant Journal* *16*, 123-132.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Seki, M., Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Oono, Y., *et al.* (2002). Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science* *296*, 141-145.

Zhang, Y., Muyrers, J. P., Testa, G., and Stewart, A. F. (2000). DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* *18*, 1314-1317