

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名: 山川 清栄

2. 養成カリキュラム名: 植物利用エネルギー使用合理化工業原料生産技術研究開発

3. 養成カリキュラムの達成状況

本研究で構築した cDNA マイクロアレイを用いた解析により抽出した、葉および根で特異的高発現している遺伝子に関して、ゲノム配列情報よりこれらの遺伝子のプロモーター領域のクローニングを進めた結果、葉、根併せて 101 種のプロモーター配列を収集することが出来た。続いて、これらのプロモーターに関して一過性発現による活性評価を行い、プロモーター配列としての活性強度を簡便に検定することが出来た。また、組換え体植物作成による発現解析についても 50 余りの系統について有効な結果を得られ、様々な性質を有するプロモーター配列を収集・カタログ化することが出来た。総じて当初の目標が十分に達成されたといえる。

4. 成果 (A 4 版 3 枚程度)

6,347 クローンの cDNA をスライドグラスに固定し、マイクロアレイを作製した。シロイヌナズナの各器官(茎頂、葉、根)から cDNA を調製し、ハイブリダイゼーションを行った結果、各器官で高発現しているクローン群がスクリーニングされた。これらの中から、プロモーター領域を単離する候補クローンとして、葉および根の各器官で特に高発現しているクローン(他器官との蛍光シグナル強度の比が 5 倍以上のもの)を抽出した。

単離されたプロモーターの活性強度検定を行うために、各遺伝子プロモーター配列をレポーター遺伝子に連結し、遺伝子銃を用いた一過性発現検定を行った。まず候補クローンに関して、公開のゲノム配列情報をもとに、同定された遺伝子のプロモーター領域を順次 PCR 増幅し、得られた各種プロモーター断片を、既存のベクターにマルチクローニング部位を導入した一過性発現検定用ベクター pRAB-5 にクローニングした。葉特異発現遺伝子プロモーター、根特異発現遺伝子プロモーター併せて 101 種類のプロモーターをクローニングした。一過性発現検定法としては、ホタルルシフェラーゼ遺伝子およびウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を用いる dual-luciferase 法を用いた。遺伝子導入用植物組織として、葉特異発現プロモーターに関しては、播種後 14-21 日目のシロイヌナズナ(Columbia)の葉組織を用いた。一方根特異発現プロモーターに関しては、一過性発現検定に広く用いられているタバコの BY-2 培養細胞を用いた。葉、根ともに、マイクロアレイ解析で得られた発現強度と、今回の一過性発現検定で得られたプロモーター活性値との間には強い相関は見られなかったが、発現誘導活性の有無を再現性良く判別することが出来た。特に、葉で 4 区、根で 8 区、極端に活性値の低い(pRAB5 の活性値を 1 とした場合の値が 10 以下)クローンが見られた。これらのクローンの活性が低い理由としては、必要なプロモーター領域の範囲が本スキームで獲得した範囲(開始メチオンより 1.5-2.0kb 上流域)から外れているか不足していたために、完全なプロモーターの取得が出来ていないか、もしくは cDNA の発現にプロモーター部位以外のトランス因子の影響が強く絡んでいることなどが考えられた。これらの結果は、組換え体植物作成による詳細な解析結果と併せて実用性を考察する材料として有用であると考えられた。以上の点より、本法が詳細な解析を行うのに先立ちプロモーターの強度を簡便に測定する検定系として有用であることが示された。cDNA マイクロアレイ、ノザン解析の結果との整合性を調べ、この検定法の妥当性を示すことが

出来た。

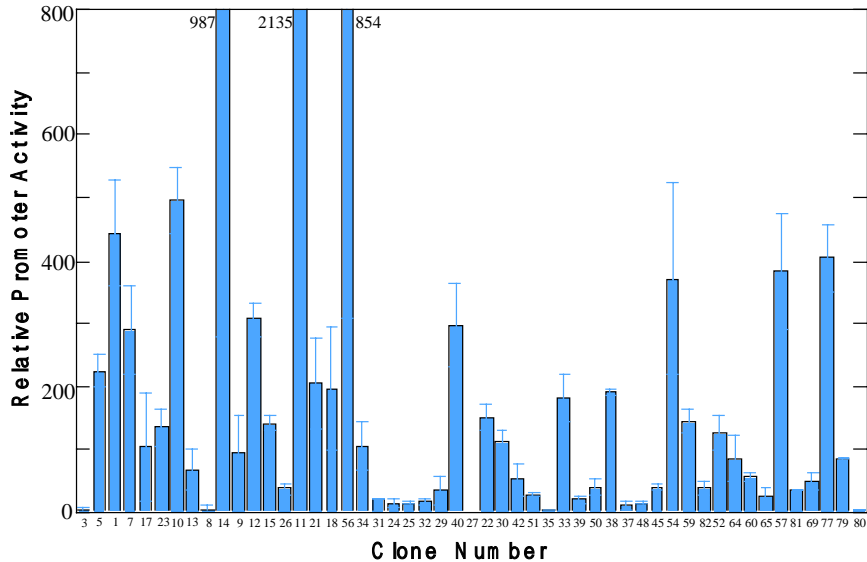


図9-1 葉特異発現遺伝子プロモーターの一過性発現検定

続いて、一過性発現検定により十分な強度のプロモーター活性を有すると判断された遺伝子プロモーター断片について、プロモーター/レポーター融合遺伝子を導入した組換え体シロイヌナズナの作成を行うことにより、安定発現体としての植物体における発現特性の検定を行った。GUS 遺伝子を配列中に含む安定発現用バイナリーベクターpRAB-4 について、pRAB-5 の場合と同様に各種プロモーター断片をクローニングした。pRAB-4 ベクターにクローニングしたプロモーターDNA のアグロバクテリウムへの感染法としては、トリペアレンタルメーティング法を採用した。植物の形質転換法としては、減圧浸潤 (vacuum infiltration) 法を用いた *in planta* 形質転換法を採用した。形質転換・選抜操作の結果、葉特異・根特異併せて 50 余りのプロモーターに関して形質転換体植物を得た。それぞれの系統について、導入されたプロモーターによって遺伝子発現が誘導される組織および時期を調べるため、植物をカナマイシン選抜平板培地および GM 斜面プレート上で栽培し、発芽後 7 日目 (子葉が展開)、14 日目 (本葉 4 枚が展開)、21 日目 (抽苔開始寸前) の植物体を採取した。それぞれの植物体を 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) を含む発色反応液で処理し、青色のインジゴン色素の生成・蓄積を指標として GUS 遺伝子の発現している組織を検出した。その結果、個々の遺伝子プロモーターの発現部位および発現時期についての特徴を知ることが出来た。葉特異プロモーターに関しては、葉肉細胞全面に発現を示すプロモーターが多数を占め、葉脈にのみ発現を示すプロモーターも一部に見られた。それに対し、根特異プロモーターに関しては、発現部位および時期について多様な特徴を有する個々に多様な特徴を有することが示された。維管束 (中心柱) 部位に発現が見られるものとしては、sucrose-UDP glucosyltransferase など分泌タンパク質と考えられる遺伝子プロモーターが見られた。一方、表皮付近に強い発現を示すものでは trypsin inhibitor などストレス応答性と見られる遺伝子プロモーターが目立った。また、根端付近に発現部位が局在する遺伝子プロモーターには、extensin など細胞伸長関連遺伝子のプロモーターが見られた。その他、多くの機能未知遺伝子のプロモーターに関する解析データを得た。これらの結果より、今回の選抜法により、新規プロモーターを含む様々な性質を有するプロモータ

ーが多数収集できたことが示された。

L36

RNA binding protein (gene)
putative RNA binding protein (protein)
transient assay :
Leaf/Root : 19.0



7 days



14 days

21 days

葉および根特異発現遺伝子および遺伝子プロモーターに関して、cDNA マイクロアレイ、一過性発現検定、GUS histochemistry 解析などによってこれまでに得られた情報を集約した遺伝子プロモーターカタログの作成を行った。カタログ作成に際しては、コンピューターソフトとして Office 2000 professional (Microsoft) および GoLive 6.0 (Adobe)の Windows 版を用いた。カタログ内には、これまでに解析を行った葉および根特異発現遺伝子プロモーター50 余系統の解析情報を収録すると共に、cDNA マイクロアレイによる 185 クローンの解析情報や DNA 配列情報などの既知情報など関連情報を網羅するよう努めた。さらにインターネット上に公開されている各種データベースとのリンクを行い、本カタログを利用することにより工業化植物育種の際に必要な各種遺伝子プロモーターの情報が一覧できることを目指して整備した。

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。)

Kohei Ando, Seiyei Yamakawa, Kyoko Miyashita, Kazuya Yoshida, Akiho Yokota, Atsuhiko Shinmyou, and Takayuki Kohchi

Efficient construction of cDNA microarrays utilizing normalized cDNA libraries of *Arabidopsis thaliana*

Journal of Bioscience and Bioengineering, 97 (1) : 85-88 (2004)

(2) 口頭発表 (発表済を対象。)

山川清栄、安藤候平、吉田和哉、河内孝之、新名惇彦

cDNA マイクロアレイを用いたシロイヌナズナ器官特異発現遺伝子同定によるプロモーターの網羅的解析

第 55 回日本生物工学会大会、2003 年 9 月

安藤候平、山川清栄、吉田和哉、横田明穂、河内孝之、新名惇彦

シロイヌナズナ均一化 cDNA ライブラリー由来 cDNA マイクロアレイによる器官特異的発現
遺伝子の系統的同定

第 55 回日本生物工学会大会、2003 年 9 月

山川清栄、安藤候平、千阪綾、吉田和哉、河内孝之、新名惇彦

cDNA マイクロアレイを用いたシロイヌナズナ器官特異発現遺伝子同定に基づくプロモ
ーターの網羅的解析

第 26 回日本分子生物学会大会、2003 年 12 月

(3) 特許等 (出願番号を記載)

なし。