

【第1回森林遺伝育種学会奨励賞受賞研究】

スギ A9 様遺伝子のプロモーターは形質転換体の雄花で強く活性化する

栗田 学^{*1}

はじめに

この度は森林遺伝育種学会奨励賞をいただき、誠にありがとうございます。ご推薦くださいました東京農業大学の林隆久先生、森林総合研究所森林バイオ研究センターの石井克明森林バイオ研究センター長、そして選考に携わっていただいた多くの先生方に厚く御礼申し上げます。また、今回受賞の対象となった標記の研究を進めるにあたり、九州大学の渡辺敦史先生、森林バイオ研究センターの谷口亨研究室長、小長谷賢一主任研究員をはじめ、森林バイオ研究センター並びに林木育種センターの多くの皆様にご指導、お力添えをいただきました。この場をお借りして心より御礼申し上げます。本稿では Plant Cell Reports 誌に掲載された論文 (Kurita et al. 2013) を改変して紹介させていただきます。

研究の背景

スギは日本で最も重要な林業用樹種の1つであり、スギの育種において主要な目標としては、成長量の増大、材質の改良、そして花粉症対策として花粉放出量の低減があげられる。目的とする形質を司る遺伝子が明らかになっている場合、当該遺伝子を導入することによって目的形質のみを植物体に付与することが可能であるため、遺伝子組換え技術は従来育種と比較し、短い世代で目的形質を改良した品種を作出できる可能性を秘めている。しかしながら、形質転換体を野外で栽培するにあたって、導入遺伝子が花粉を介して同種・近縁種の野生植物に意図せず伝搬することが懸念されている。そこで花粉による導入遺伝子の意図しない拡散を防止するためにスギにおいて雄性不稔化技術の開発が進められた。

遺伝子組換え技術を用いた植物の雄性不稔化技術は樹木を含む様々な植物種で開発されている (Brunner et al.

2007; Zhang et al. 2012)。その際、雄性不稔化には雄花特異的なプロモーター¹⁾と細胞毒性遺伝子 (例えば *Barnase* 遺伝子: *Bacillus amyloliquefaciens* 由来の RNA 分解酵素など) から構成される雄性不稔化ベクターが用いられている (Konagaya et al. 2008; Hofig et al. 2006)。しかし、形質転換体において *Barnase* 遺伝子の異所的な発現²⁾により栄養成長が抑制されるという事例が報告されている (Lemmetynen et al. 2004; Wei et al. 2007)。スギの雄性不稔化を進める上で、スギの成長形質や材形質に負の影響を与えないためにも、雄花特異的に活性化するプロモーターの単離が重要であると考えられた。

遺伝子の転写調節は転写調節領域に存在する「シスエレメント³⁾」と転写調節因子等の「トランスエレメント⁴⁾」との相互作用によって高度に調節されており遺伝子の正確な時期・組織特異的な発現にはシスエレメントとそれと相互作用するトランスエレメントが必要である (Yuh et al. 1998)。このように遺伝子の発現調節は様々な因子が関与し、高度に調節されているため、目的とする形質のみを付与し実用的な形質転換体を効率的に作出するためには、対象とする生物種で確実に機能するプロモーターを用いることが重要であると考えられる。実際、トウモロコシの内胚乳特異的に発現する *O2* 遺伝子のプロモーターをタバコに導入すると内胚乳だけでなく、胚、子葉、花粉で活性化される (Stalberg et al. 1998)。また、貯蔵タンパク質の *napA* プロモーターはセイヨウアブラナの種子で活性化されるが、タバコに導入すると種子と同様に葯、孔辺細胞でも活性化される (Stalberg et al. 1998)。このように、組織特異的なプロモーターとして単離したプロモーターも、導入する植物種によって非特異的な発現活性を示すようになる可能性があり、スギの雄性不稔化を効果的に進めるにはスギから雄花特異的なプロモーターを単離する必要があると考えられた。

スギにおいて雄花特異的な発現活性を示すプロモーターを単離するため、我々はスギの雄花特異的に発現する

*E-mail: mkuri@affrc.go.jp

¹ くりた まなぶ 森林総合研究所林木育種センター

遺伝子を含む Suppression Subtractive Hybridization (SSH) ライブラリーを作製した (Kurita et al. 2011)。我々は花粉四分子期の SSH ライブラリーから単離した *Cj_ssh_male_t_003* 遺伝子 (*CjMALE1* と名付けた) に着目しプロモーターの単離を行った。*CjMALE1* 遺伝子はシロイヌナズナやセイヨウアブラナの *A9* 遺伝子と高い相同性を示す。*A9* 遺伝子はタペート組織⁵⁾で特異的に発現することが知られており (Paul et al. 1992)、ラジアータマツから単離された *A9* の相同遺伝子も同様の発現パターンを示すことが明らかになっている (Walden et al. 1999)。すなわち *A9* の相同遺伝子は進化の過程でその発現パターンが高度に保存されており、スギにおいても同様にタペート組織で特異的に発現する可能性が考えられた。実際我々は *CjMALE1* 遺伝子が新芽、針葉、根で発現していないことを明らかにしている (Kurita et al. 2011)。我々は、*CjMALE1* 遺伝子のプロモーターの単離を行い、スギとシロイヌナズナに導入してその機能を明らかにした。

CjMALE1 プロモーターの機能解析

我々はTAIL-PCR法⁶⁾を用いて *CjMALE1* プロモーターをスギゲノム DNA から単離した。翻訳開始点から上流 2,718bp までの領域を *GUS* 遺伝子に連結し、*CjMALE1-2.5K::GUS* 構築物を作製した (図-1)。また、翻訳開始点から上流 1,029bp までの領域を *GUS* 遺伝子⁷⁾に連結し、*CjMALE1-1K::GUS* 構築物を作製した (図-1)。

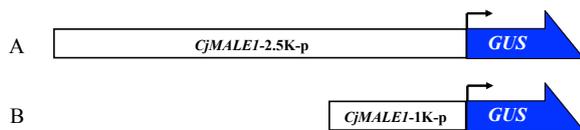


図-1 構築物の模式図。A : *CjMALE1-2.5K::GUS*、B : *CjMALE1-1K::GUS*。

それぞれの構築物をスギに導入して形質転換体を作出した。形質転換体にジベレリン処理を行い雄花の誘導をおこなった。誘導した雄花、シュートをサンプリングし *GUS* 活性を調べた。その結果、*CjMALE1-2.5K::GUS* 構築物を導入したスギにおいて葯で特異的な *GUS* 活性が確認された。また、雄花の発達段階ごとに切片を作製して *GUS* 活性が確認される部位及び時期について解析を行った結果、タペート組織と減数分裂前の花粉母細胞で *GUS* 活性が確

認された (図-2)。同様に *CjMALE1-1K::GUS* 構築物を導入したスギ形質転換体においても *GUS* 活性を調べたところ、*GUS* 活性が認められる組織、及び時期ともに *CjMALE1-2.5K::GUS* を導入した形質転換スギと同じであった。これらの結果、*CjMALE1* プロモーターはスギのタペート組織と花粉母細胞における発現活性を有し、また発現調節に必要なシスエレメントは翻訳開始点から上流 1,029bp までの領域に含まれている事が明らかとなった。

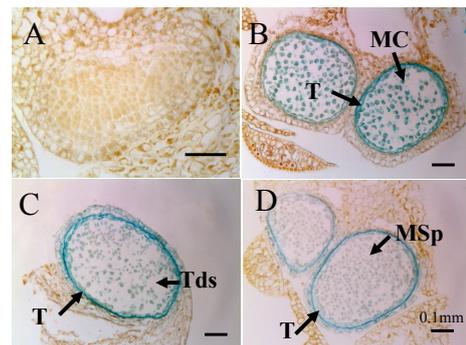


図-2 *CjMALE1-2.5K::GUS* 導入スギの *GUS* 染色写真。

GUS 染色が確認される組織を矢印で示した。A : 花粉母細胞期の雄花、B : 減数分裂期の雄花、C : 花粉四分子期の雄花、D : 小孢子期の雄花。T : タペート組織、MC : 減数分裂期の花粉母細胞、Tds : 花粉四分子、Msp : 小孢子。Kurita et al. (2013) を改変。

また、*CjMALE1-1K* プロモーターの他の植物種における機能を調べるため、*CjMALE1-1K::GUS* 構築物をシロイヌナズナに導入し *GUS* 活性を調べた。その結果、調べた全ての形質転換系統において、葯で特異的な強い *GUS* 活性が確認された。一方で葯以外の組織 (花卉、がく、心皮、花糸、茎、種子、葉、根) では *GUS* 活性は確認されなかった。さらに花の切片を作製し *GUS* 活性が確認される部位及び時期について解析を行った結果、スギに導入した場合と同様、タペート組織と減数分裂前の花粉母細胞で *GUS* 活性が確認された (図-3)。花粉はタペート組織から養分や酵素の供給を受けて発達が進む (Bedinger 1992 ; Xu et al. 2006)。花粉形成は種子植物において広く保存されている重要なプロセスである。そして花粉形成に重要な役割を果たすタペート組織も裸子植物を含む様々な植物種に広く保存されている (Dickinson and Bell 1972 ; Moitra and Bhatnagar 1982)。それゆえ、タペート組織の形成あるいは機能に関連するいくつかの遺伝子の発

現パターンは様々な植物種において高度に保存されている可能性が考えられる。実際 A9 クレードの遺伝子のタペート組織特異的な発現パターンはセイヨウアブラナやラジアータマツ等、いくつかの植物種で保存されている (Crossley et al. 1995, Hofig et al. 2003)。今回我々が単離した *CjMALE1* プロモーターはスギ及びシロイヌナズナにおいてタペート組織及び減数分裂開始前の花粉母細胞で機能することが明らかになった。

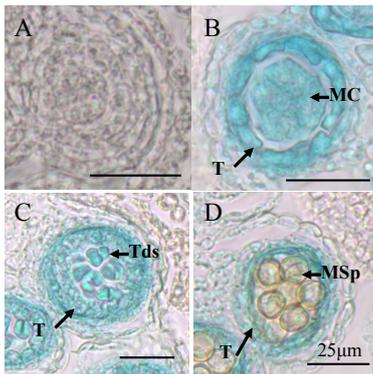


図3 *CjMALE1-1K::GUS* 導入シロイヌナズナの GUS 染色写真。GUS 染色が確認される組織を矢印で示した。A：花粉母細胞期の葯、B：減数分裂期の葯、C：花粉四分分子期の葯、D：小孢子期の葯。T：タペート組織、MC：減数分裂期の花粉母細胞、Tds：花粉四分分子、Msp：小孢子。Kurita et al. (2013) を改変。

CjMALE1 プロモーターのシスエレメント解析

CjMALE1-1K プロモーターの時期・組織特異的な発現制御機能を司るシスエレメントを探索するため、PLACE データベース (Higo et al. 1999) を用いた配列解析を行った。その結果、MADS-box 遺伝子の一種である AGL15 の結合配列 (CARGCW8GAT 配列)、ジベレリン応答性配列 (GARE1OSREP1 配列や GAREAT 配列)、タバコの後期花粉遺伝子 *g10* プロモーターで単離されたモチーフ (GTGANTG10 配列)、転写因子 MYB ファミリーの結合配列 (MYBCORE 配列、MYBGAHV 配列)、トマトの花粉での組織特異的な発現を司る POLLENILELAT52 配列、トウモロコシの花粉特異的な遺伝子 *ZM13* の活性に必要な QELEMENTZM13 配列など他の植物種で同定されたシスエレメントと同一性の高い配列が検出された。また、*CjMALE1* はシロイヌナズナの A9 遺伝子の相同遺伝子と考えられ、A9 遺伝子のプロモーターはタバコのタペート

組織で活性化することが知られている (Paul et al. 1992)。そこでスギの *CjMALE1-1K* プロモーターとシロイヌナズナの A9 プロモーターに共通して存在するシスエレメントを同定するため、シロイヌナズナの A9 プロモーターについても PLACE データベースを用いた配列解析を行った。その結果、GAREAT、GTGANTG10、MYBCORE、MYBGAHV、POLLENILELAT52、QELEMENTZM13 等が双方のプロモーターに共通して存在することが明らかになった (図4)。これら共通に存在するシスエレメントが *CjMALE1* プロモーターの機能 (特にタペート組織での発現を活性化する機能) に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

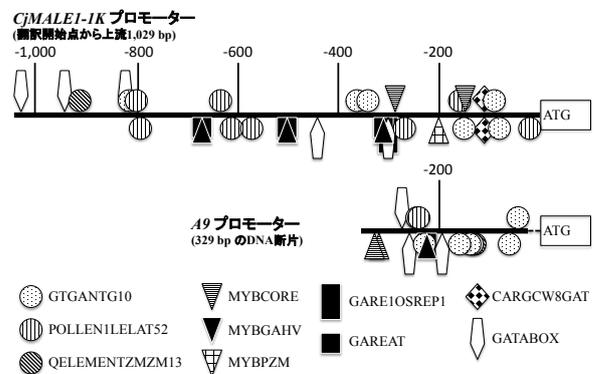


図4 *CjMALE1-1K* プロモーターと A9 プロモーターに存在するシスエレメントの模式図。丸、三角、四角、菱形、五角形はプロモーター上のシスエレメントの位置を示している。Kurita et al. (2013) を改変。

おわりに

遺伝子の発現はシスエレメントとトランスエレメントの相互作用によって調節されている。トランスエレメントはシスエレメントと相互作用することによってプロモーター領域にシグナルを入力し、そしてそのシグナルは隣接する領域で統合される。その結果として組織特異的な発現あるいは抑制、そして発現の強さなどが決定される (Yuh et al. 1998)。今回の報告で、*CjMALE1* プロモーターはスギとシロイヌナズナで同様に葯での活性を示すことが確認された。これらの結果は裸子植物であるスギと被子植物であるシロイヌナズナの転写調節システム (シスエレメントだけでなくトランスエレメントも含めたシステム) が、高度に保存されている可能性を示唆し

ている。

我々は、スギの葯で強く発現する *CjMALE1* 遺伝子のプロモーターの単離に成功した。また、一昨年にマツから単離した *A9* の相同遺伝子 *PrMC2* 遺伝子のプロモーターを用いてマツとユーカリの雄性不稔化に成功したとの報告が行われている (Zhang et al. 2012)。我々が単離した *CjMALE1* プロモーターもスギの雄性不稔化技術の開発のための有用なプロモーターである可能性が考えられる。

用語説明

- 1) プロモーター：遺伝子発現のスイッチとなる DNA 領域。遺伝子が働く時期や場所を制御している。
- 2) 異所的な発現：遺伝子が本来発現する細胞以外で発現すること。
- 3) シスエレメント：遺伝子の上流や下流に存在し、遺伝子の発現を制御する転写調節因子等が認識し相互作用する配列。
- 4) トランスエレメント：シスエレメントと相互作用し、遺伝子の転写調節を行うタンパク質。転写調節因子など。
- 5) タペート組織：花粉を取り囲む細胞層であり、花粉形成に必須の組織。タペート組織が花粉発達に必要な養分や物質を発達途中の花粉に供給する。
- 6) TAIL-PCR 法：既知の塩基配列情報をもとに作製した特異的プライマーと任意の配列からなる任意プライマーを用いて PCR 反応を行うことによって、既知の配列に隣接する未知の DNA 領域を単離する方法。
- 7) *GUS* 遺伝子： β -グルクロニダーゼをコードする遺伝子。プロモーターの機能解析に用いられる。*GUS* 遺伝子が発現する細胞は基質を加えた反応液中でインキュベートすると青色に染まるため、色を指標にプロモーターの機能を推定することができる。

引用文献

- Bedinger P (1992) The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* 4: 879–887
- Brunner A, Li J, DiFazio S, Shevchenko O, Montgomery B, Mohamed R, Wei H, Ma C, Elias A, VanWormer K, Strauss S (2007) Genetic containment of forest plantations. *Tree Genetics & Genomes* 3: 75–100
- Crossley S, Greenland A, Dickinson H (1995) The characterisation of tapetum-specific cDNAs isolated from a

Lilium henryi L. meiocyte subtractive cDNA library. *Planta* 196: 523–529

- Dickinson HG, Bell P (1972) The role of the tapetum in the formation of sporopollenin-containing structures during microsporogenesis in *Pinus banksiana*. *Planta* 107: 205–215
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research* 27: 297–300
- Hofig K, Moller R, Donaldson L, Putterill J, Walter C (2006) Towards male sterility in *Pinus radiata* - a stilbene synthase approach to genetically engineer nuclear male sterility. *Plant Biotechnology Journal* 4: 333–343
- Hofig K, Moyle R, Putterill J, Walter C (2003) Expression analysis of four *Pinus radiata* male cone promoters in the heterologous host *Arabidopsis*. *Planta* 217: 858–867
- Konagaya K, Ando S, Kamachi S, Tsuda M, Tabei Y (2008) Efficient production of genetically engineered, male-sterile *Arabidopsis thaliana* using anther-specific promoters and genes derived from *Brassica oleracea* and *B. rapa*. *Plant Cell Reports* 27: 1741–1754
- Kurita M, Taniguchi T, Nakada R, Kondo T, Watanabe A (2011) Spatiotemporal gene expression profiles associated with male strobilus development in *Cryptomeria japonica* by suppression subtractive hybridization. *Breeding Science* 61: 174–182
- Kurita M, Konagaya K, Watanabe A, Kondo T, Ishii K, Taniguchi T (2013) The promoter of an *A9* homolog from the conifer *Cryptomeria japonica* imparts male strobilus-dominant expression in transgenic trees. *Plant Cell Reports* 32: 319–328
- Lemmettyinen J, Keinonen K, Sopanen T (2004) Prevention of the flowering of a tree, silver birch. *Molecular Breeding* 13: 243–249
- Moitra A, Bhatnagar S (1982) Ultrastructure, cytochemical, and histochemical studies on pollen and male gamete development in gymnosperms. *Gamete Research* 5:71–112
- Paul W, Hodge R, Smartt S, Draper J, Scott R (1992) The isolation and characterisation of the tapetum-specific *Arabidopsis thaliana A9* gene. *Plant Molecular Biology* 19: 611–622
- Stalberg K, Ellerstrom M, Sjobahl S, Ezcurra I, Wycliffe P, Rask L (1998) Heterologous and homologous transgenic expression directed by a 2S seed storage promoter of *Brassica napus*. *Transgenic Research* 7: 165–172
- Walden A, Walter C, Gardner R (1999) Genes expressed in

- Pinus radiata* male cones include homologs to anther-specific and pathogenesis response genes. *Plant Physiology* 121: 1103–1116
- Wei H, Meilan R, Brunner A, Skinner J, Ma C, Gandhi H, Strauss S (2007) Field trial detects incomplete *barstar* attenuation of vegetative cytotoxicity in *Populus* trees containing a poplar *LEAFY* promoter :: *barnase* sterility transgene. *Molecular Breeding* 19: 69–85
- Xu S, Liu G, Chen R (2006) Characterization of an anther- and tapetum-specific gene and its highly specific promoter isolated from tomato. *Plant Cell Reports* 25: 231–240
- Yuh C, Bolouri H, Davidson E (1998) Genomic cis-regulatory logic: Experimental and computational analysis of a sea urchin gene. *Science* 279: 1896–1902
- Zhang C, Norris-Caneda KH, Rottmann WH, Gullledge JE, Chang S, Kwan BY, Thomas AM, Mandel LC, Kothera RT, Victor AD, Pearson L, Hinchee MA (2012) Control of pollen mediated gene flow in transgenic trees. *Plant Physiology* 159: 1319-1334