

機能獲得型変異体を用いた植物の遺伝子機能解析

Characterization of plant gene function using gain-of-function technology

近 藤 陽 一

(理化学研究所植物科学研究センター)

はじめに

植物遺伝子の機能解析を行うために変異体を用いる方法は、現在最も有効なものの一つである。変異体にはある遺伝子の機能を欠損させた機能欠損型変異体と、機能を増強させた機能獲得型変異体の二種類が存在する。遺伝子機能解析のために機能欠損型変異体を用いるのは最も一般的な方法であり、薬剤による変異法、T-DNAタギング法等、様々な変異体作出法が開発されてきた。しかしながら植物の多くの遺伝子はファミリーを形成しており、一つの遺伝子の欠損変異による遺伝子機能解析は困難な場合がある。これは遺伝子ファミリーの中で生理機能を相補している事によると考えられており、実際に多くの単遺伝子欠損の変異体は、通常生育条件下では野生型と区別がつかない。しかしながら機能獲得型変異体では特定の遺伝子の効果が優性に表れるため、ファミリーを構成している遺伝子の機能解析においてこの様な問題点を避ける事が可能である。そのため多くの研究者が機能獲得型変異体を利用し、重要な成果を残してきた。機能獲得型変異体を作成する方法は、長年アクチベーションタギング法及び、その応用のみであったが、近年になって新しい方法が開発されてきている。本稿ではアクチベーションタギング法を始め、機能獲得型変異体の作出法を中心に概説し、得られた成果についても紹介しながら、本方法がもたらす優位性について解説していきたい。

1. アクチベーションタギング法

アクチベーションタギング法は植物の遺伝子をランダムに過剰発現させるために、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター (*a) のエンハンサーを利用した方法である。Waldenらはこの方法のために、エンハンサーを四つ並べたDNA配列をT-DNA (*b) 領域のボーダー配列近辺に導入したT-DNAベクターを構築した (図1)。このT-DNA領域はアグロバクテリウムを介して植物のゲノム中にランダムに挿入される事により、挿入位置近傍の遺伝子を活性化する事が出来る。挿入位置はプラスミドレスキュー法、アダプターPCR法、TAIL-PCR法といった様々な方法で速やかに決定する事が出来る。柿本らはこのベクターをシロイ

ユナズナの培養細胞の系に適用し、過剰発現させる事により植物ホルモンであるサイトカイニンなしにカルスから茎を再分化する事が出来る新奇のヒスチジンキナーゼを単離した(8)。この報告が事実上、植物で機能獲得型変異体作出法を利用して遺伝子の機能を同定した初めての例である。これ以降シロイヌナズナを用いた高効率な形質転換法によるアクチベーションタグ系統の作成や、トランスポゾンの利用等、様々な応用が開始され、形態形成、二次代謝、環境応答等に関わる多くの遺伝子が同定されてきた。

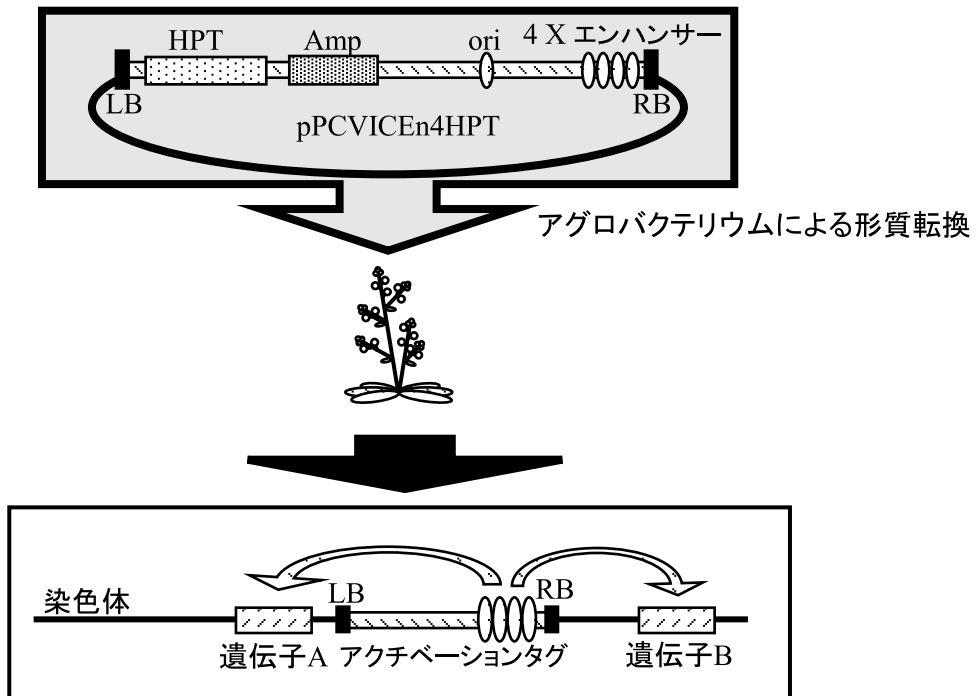


図1. アクチベーションタグging法の概観

アクチベーションタグging用ベクターのT-DNA領域には、4×カリフラワーモザイクウイルス35Sエンハンサー (4×エンハンサー)、レフトボーダー配列 (LB)、ライトボーダー配列 (RB)、植物選抜用ハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT)、バクテリア選抜用アンピシリン耐性遺伝子 (Amp)、大腸菌用複製起点 (ori) が含まれている。Ampとoriはプラスミドレスキュー法に必要な配列である。T-DNA (アクチベーションタグ) は植物のゲノム中にランダムに挿入され、近傍の遺伝子を活性化する (本図では遺伝子A及び、遺伝子B)。筆者らのレビュー (2010, Annual review of Plant Biology) より改変。

1.1. 形態形成に関わる遺伝子の同定

植物ホルモンであるオーキシンは植物の形態形成に大きく関わっている事が知られている。中澤らはシロイヌナズナのアクチベーションタグ系統より実生の胚軸が短くなる変異体を三つ単離し、これらの表現型がGH3ファミリーに属する別々の遺伝子の過剰発現によるものである事を示した(14, 18, 19)。GH3とはオー

キシシン添加により発現が誘導される遺伝子として大豆より単離されたもので、類似遺伝子がシロイヌナズナ内に20以上存在する(4)。興味深い事に、単離された三つの変異体の内、*df1-D* (*c) と *df2-D* は明所でのみ胚軸が短くなるが、*ydk1-D* は明所と暗所の両方で胚軸が短くなった。その他、各変異体で同様の表現型を示す組織と、異なる表現型を示す組織が観察された。これらの観察結果は、それぞれのGH3がオーキシシンに関わる同じシグナル伝達経路に関わると共に、異なるシグナル伝達経路にも関わっていると考えると説明がつく。ちなみにGH3タンパク質はオーキシシンの不活性化酵素であるという報告が後になされている。

YUCCAファミリーはオーキシシン合成に関わる酵素の一群であり、シロイヌナズナでは11の遺伝子で構成されている(24)。アクチベーションタグ系統より、これらの内6つの遺伝子に関わる変異体が単離され解析されてきた(9, 13, 21, 24)。全ての変異体において子葉の上偏成長など、既に知られていたオーキシシン産生が過剰に起こっている変異体に特徴的な表現型が観察されたが、それぞれの変異体にもみられる表現型も幾つか観察された。加えてそれぞれの遺伝子の機能欠損型変異体を掛け合わせた二重変異体、三重変異体、四重変異体が極端な矮性を示した。これらの観察結果はGH3ファミリーの場合と同様に、YUCCAがファミリー内でそれぞれ異なる役割を有しているが、多くの生理機能も共有している事を示している。このような遺伝子ファミリー内の生理機能の冗長性がファミリーを構成する遺伝子の解析を妨げている事は明らかであり、機能欠損型の変異体系統を用いた解析には限界がある。このような遺伝子の解析が可能である事は、機能獲得型変異体を解析する事の優位性の一つである。

1.2. 二次代謝に関わる遺伝子の同定

アクチベーションタグ法を用いた解析は、特に二次代謝産物の合成経路を制御する転写因子の機能を明らかにしてきた。シロイヌナズナのアクチベーションタグ系統より単離された *pap1-D* は、植物の二次代謝研究に関わる変異体としては最も有名なものの一つである。この変異体は、その本葉や茎、根に至るまで紫色を呈し、その原因はアントシアニン等の幾つかのフラボノイドが過剰に生産されたためである(1)。二次代謝産物の一種であるフラボノイドは、花や種子の色、紫外線や強光に対する防御等、植物の生命活動において様々な役割を果たしている。*pap1-D* では、そのフラボノイド合成に必要な幾つかの酵素 (CHS、DFR、PAL、GST) の遺伝子発現が活性化されていた。これら遺伝子発現の異常は、*pap1-D* における新奇のMYB様転写因子の過剰産生が原因であった。従ってこのMYB転写因子が、フラボノイド合成経路に関わる酵素の遺伝子発現を制御していると考えられる。MYB様転写因子はシロイヌナズナ内に類似遺伝子が100以上

存在する巨大ファミリーである(12, 17)。興味深い事にシロイヌナズナのPAP1遺伝子をタバコで過剰発現させると、シロイヌナズナと同様にアントシアニンの蓄積が促進された。この結果は異種植物にオーソログを導入した場合、オーソログが異種植物内で元来の生理機能を有し得る事を示している。この事はシロイヌナズナの様な高効率な形質転換法が確立されたモデル植物に、薬用植物や新種の植物等の遺伝子を導入し、選抜する事によって有用遺伝子を単離出来る可能性を示差している。

1.3. 環境応答に関わる遺伝子の同定

植物は生育の過程で、病害、乾燥、低温、強光等、様々なストレスを環境より受ける。様々なストレスに対する耐性を植物に付与する有用遺伝子の単離は、育種や作物の改良に重要であると考えられる。遺伝子の過剰発現は植物に機能付加をもたらす可能性がある事から、機能獲得型変異体系統を選抜する事は、その様な有用遺伝子を単離するのに適していると考えられる。CDR-1Dはその様な変異体の一つであり、トマト斑葉細菌に対する耐性を示す変異体として、シロイヌナズナのアクチベーションタグ系統より単離された(22)。植物の細菌に対する抵抗反応にはR遺伝子特異的な抵抗性(真性抵抗性)と、R遺伝子が関与しない基礎的レベルの抵抗性(圃場抵抗性)の二種類ある事が知られている。CDR-1Dの表現型は、新奇のアスパラギン酸プロテアーゼの過剰産生により、前者の抵抗性が活性化された結果であった。アスパラギン酸プロテアーゼも、シロイヌナズナ内に類似遺伝子が多数存在するファミリーを構成している。CDR-1Dとは逆に、FMO1-3Dは基礎的レベルの抵抗性が活性化する事により耐病性が増加した変異体である(10)。この表現型はクラス3FMOタンパク質というオキシゲナーゼの一種の過剰産生によるものであった。CDR1やFMO1-3の分子機能は未だ明らかではないが、これらの変異体に関わる研究は、機能獲得型変異体系統を用いた選抜が有用遺伝子の単離に適している事を示す好例である。

2. その他の機能獲得型変異体作出法

ここまで示してきた様に、アクチベーションタギング法は遺伝子機能の解析や有用遺伝子の単離のために、機能獲得型変異体を作成する有効な方法である。しかし幾つかの問題点が存在する。最大の問題点は、変異体の表現型を引き起こしている原因遺伝子の決定に労力を要する事であろう。これはT-DNAの挿入位置近傍の遺伝子全てが原因遺伝子の候補になりうる事による。T-DNAに挿入されたエンハンサーは10kbp以上遠くの遺伝子発現を活性化する場合もあり、候補遺伝子の数はかなりの数になる場合もある(7)。もう一つの問題点は、ゲノム中のT-

DNAの挿入位置に明らかな片寄りが見られる事である(7)。ゲノム全体の遺伝子に関わる変異体を全て得ようとする、この問題は大きな足かせになる。近年になって、これらの問題点を克服するために幾つかの方法が開発されてきた。

2.1. FOXハンティングシステム

(Full-length cDNA Over-eXpressing gene hunting system)

シロイヌナズナを始めとして、イネ、コムギ、ポプラ、オオムギ等、近年になって様々な植物の完全長cDNAコレクションが作成されてきている。完全長cDNAには各遺伝子がコードしているタンパク質の完全な情報が網羅されており、FOXハンティングシステムは機能獲得型変異体作出のためにこの完全長cDNAコレクションを利用した方法である(図2)。FOXハンティングシステムでは、まず完全長cDNAを等モルに混合したカクテルを作成し、これを用いて過剰発現プロモーターである35Sプロモーターの直下に完全長cDNAを挿入したT-DNAベクターのライブラリーを作成する。このライブラリーを用いてアグロバクテリウムを介した植物への形質転換を行い、完全長cDNAがランダムに過剰発現している機能獲得型変異体系統の作成を行う。この系統はFOXラインと呼ばれている。変異体の表現型を引き起こしている原因遺伝子の決定は、T-DNA領域の既知の配列を利用して導入されている完全長cDNAを速やかに決定する事により可能である。開発者である市川らはこの方法を利用して重複のない約10,000のシロイヌナズナ完全長cDNAから、約15,000のFOXラインを作出した(6)。このFOXラインより単離された本葉が薄緑色を呈する変異体に導入されていた機能未知の完全長cDNAを、野生型に再導入したところ表現型が再現された。また導入されていた完全長cDNAの発現量と表現型とに、明らかな相関が認められた。これらの事はFOXハンティングシステムが遺伝子の機能決定に有効である事を示している。最近になってFOXラインを利用した遺伝子機能の解析例が幾つか報告され、本システムはアクチベーションタギング法に替わる方法として世界的に認知され始めている(3, 15)。

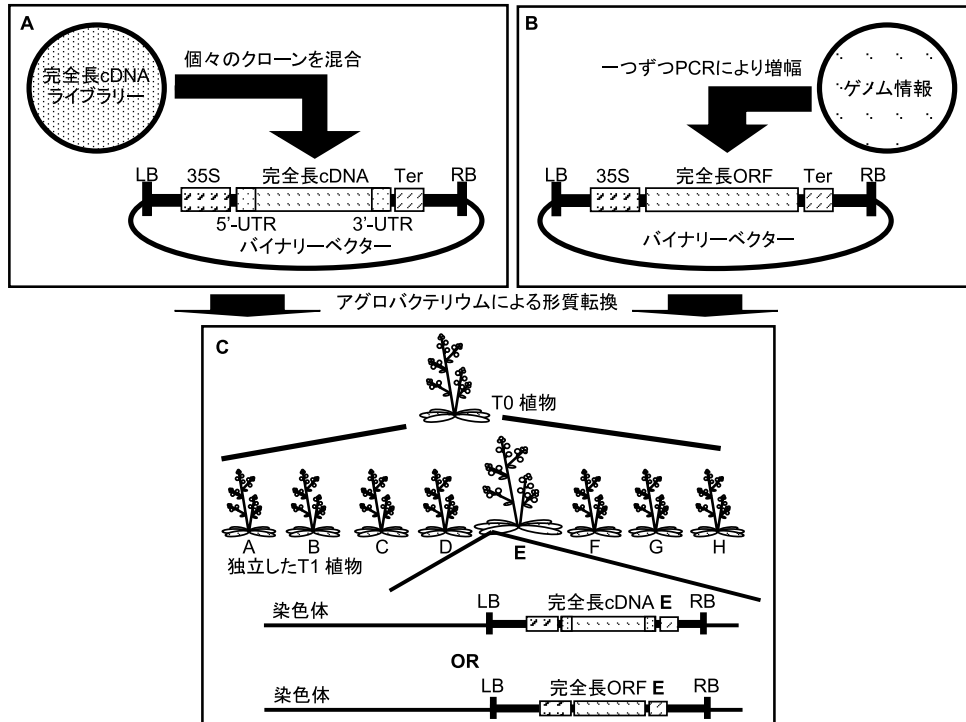


図2. FOXハンティングシステム及び、ORFクローン発現系の概観

FOXハンティングシステム (A) では、完全長cDNAライブラリーを植物発現用のバイナリーベクターに導入する。ベクターのT-DNA領域には、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター (35S)、ノバリン合成酵素ターミネーター (Ter)、レフトボーダー配列 (LB)、ライトボーダー配列 (RB) が含まれている。ORFクローン発現系 (B) では、各遺伝子のORFを一つずつPCRによって増幅し、植物発現用のバイナリーベクターに導入する。これらのバイナリーベクターを利用し、アグロバクテリウムを介して植物に形質転換を行い、T-DNA領域を植物のゲノム中に挿入する (C)。表現型が観察された系統 (本図では大型化したE系統) に導入されていた完全長cDNA及び、ORFは、ベクター特異的な配列を利用したPCRにより簡便に決定する事が出来る。筆者らのレビュー (2010, Annual review of Plant Biology) より改変。

1.2.で述べた様に、シロイヌナズナの様なモデル植物と、機能獲得型変異体作出法の組み合わせは、異種植物の有用遺伝子を発見するための強力な方法になると考えられる。これを実証するため、著者らは約13,000のイネ完全長cDNAから、約33,000のシロイヌナズナのFOXラインを作成した(11)。このFOXラインを形態、二次代謝産物蓄積、ストレス耐性等、様々な条件で選抜を行う事により、イネの完全長cDNAが導入されたシロイヌナズナの変異体候補が幾つも得られている。この中で本葉が薄緑色を呈する変異体に着目し、導入されていたイネ完全長cDNAを確認したところ、イネのフェレドキシン・NADP+酸化還元酵素 (FNR) であった。FNRは光合成の明反応において重要な役割を担うタンパク質である。

この完全長cDNAをイネに導入したところ、シロイヌナズナと同様に植物体が薄緑色を呈した。これらの結果は異種間の発現システムを利用する事により、様々な植物の遺伝子機能の解析を高速に行う事が出来る可能性を示している。

2.2. ORF (Open Reading Frame) クローン発現系

全ゲノム配列が解読された生物は、ゲノム上の全遺伝子を予測する事が可能である。予測された開始コドンから停止コドンまでのORFと呼ばれる遺伝子の単位は、5' 及び3' のノンコーディング配列が除去された遺伝子の最小機能単位である。個別にPCRによって増幅され、収集されたORFコレクションは蛍光タンパク質と融合させ、網羅的に細胞内局在を解析するなど、様々な遺伝子機能解析に用いる事が可能である。機能獲得型変異体作出のために、このORFコレクションを利用する方法がORFクローン発現系である (図2)。

Weisteらはシロイヌナズナを用いて転写因子の一種であるERFファミリーのORFコレクションを作成し、35Sプロモーターの直下にこれを挿入したT-DNAライブラリーを作成した(20)。このライブラリーを用いてシロイヌナズナへの形質転換を行い、ERFファミリーのORFがランダムに過剰発現している機能獲得型変異体系統の作成を行った。この系統より、形態形成異常や酸化ストレス耐性を示す変異体が単離されている。原らは150アミノ酸以下の分泌性タンパク質を、シロイヌナズナのゲノム情報より予測した。得られた153の短い分泌性タンパク質をコードしているORFコレクションを作成し、シロイヌナズナの機能獲得型変異体系統の作成を行った。その結果、孔辺細胞などで特異的に発現し、葉の表皮細胞の配向を制御する因子であるEPF1を発見した(5)。

これらの例で示される様に、ORFクローン発現系は対象遺伝子の数を絞り込まずにはならない。これはORFの収集が各ORFを個別にPCRによって増幅し、クローニングするという地道な作業によって行われるためである。そのためバイオインフォマティクスによる事前選抜が非常に重要である。

3. 今後の課題

機能獲得型変異体を利用した遺伝子機能解析は、アクチベーションタギングシステムが開発されてから多くの成果を残してきた。その一方で幾つかの問題点も指摘されている。問題の一つは、過剰発現する事により胚性致死を引き起こす様な遺伝子の機能獲得型変異体は、作出する事が出来ない事である。これは常時発現プロモーターを利用しているためであり、誘導性のプロモーターを代替する等により解決しつつある(16)。

最大の問題点は、遺伝子本来の生理機能と、常時発現プロモーターによる異所

的発現による効果を区別する事が難しい事である。そのため最終的には機能欠損型変異体の解析も行わないと、その遺伝子の生理機能について信頼性の高い情報が得られない。これは本稿で紹介した、アクチベーションタギングシステム以外の全ての方法にも当てはまる。この問題点を解決するために、組織特異的プロモーターを利用するなどの試みがなされてきた(2)。しかし未だブレイクスルーになる様な方法はなく、その様な方法の開発が期待されている。

結語

本稿では植物の機能獲得型変異体を利用した遺伝子機能解析について、変異体作出法を中心に得られた知見を紹介し、本方法の優位点を概説してきた。以下にまとめる。1) 遺伝子ファミリーを構成している遺伝子について個別に解析出来る。2) 作物等に機能付加をもたらす様な有用遺伝子の単離に適している。3) 異種間の発現システムを利用する事により、有用植物の遺伝子機能を解析する事が出来る。以上の三点が主な優位点であるが、その他にも機能付加という特徴を生かして様々なアプローチが可能である。最近では機能獲得型変異体系統をケミカルゲノミクスに利用しようという試みもなされてきている。この方法では植物にある形質をもたらす化学物質の標的タンパク質の単離に、機能獲得型変異体系統を利用しようというものである。実際に植物ホルモンであるブラシノステロイド合成系路の阻害剤であるブラシナゾールに耐性を示す変異体が、シロイヌナズナのアクチベーションタグ系統より単離されている(23)。

これまで植物科学は、植物の形態形成、光合成、環境応答等に関与する重要な遺伝子の機能を明らかにしてきた。現在、これらの知見や新たな研究成果を利用して、バイオマスの増産、環境ストレス耐性の付与等、植物の機能を改良するなど、社会に貢献出来る様な成果が求められる時代になってきている。機能獲得型変異体を用いた植物遺伝子の機能解析は、この様な植物の改良に直接繋がる技術として、今後ますますその重要度を増していく事になるだろう。

語句説明

*a: カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター

植物感染性のウイルスであるカリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーター。このプロモーターは非常に強力であり、植物への遺伝子導入に広く利用されている。

*b: T-DNA

植物感染性の細菌の一種であるアグロバクテリウムはTiプラスミドと呼ばれる

巨大なプラスミドを有しており、植物に感染するとT-DNA領域と呼ばれるプラスミドの一部を植物ゲノム中に挿入する。目的の遺伝子を植物に導入する場合T-DNA中にクローニングし、それを植物ゲノム中に挿入させるのが植物の一般的な形質転換方法である。

*c: dfl1-D

ある遺伝子の変異体の名称を表す場合アルファベット小文字の斜体を用いるが、機能獲得型変異体を表す場合は、更に-Dを付けるのが一般的である。

参考文献

1. Borevitz JO, Xia Y, Blount J, Dixon RA, Lamb C. 2000. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 12: 2383-94
2. Brand L, Horler M, Nuesch E, Vassalli S, Barrell P, et al. 2006. A versatile and reliable two-component system for tissue-specific gene induction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141: 1194-204
3. Breuer C, Kawamura A, Ichikawa T, Tominaga-Wada R, Wada T, et al. 2009. The Trihelix Transcription Factor GTL1 Regulates Ploidy-Dependent Cell Growth in the *Arabidopsis* Trichome. *Plant Cell*
4. Hagen G, Guilfoyle TJ. 1985. Rapid induction of selective transcription by auxins. *Mol Cell Biol* 5: 1197-203
5. Hara K, Kajita R, Torii KU, Bergmann DC, Kakimoto T. 2007. The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes Dev* 21: 1720-5
6. Ichikawa T, Nakazawa M, Kawashima M, Iizumi H, Kuroda H, et al. 2006. The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant J* 48: 974-85
7. Jeong DH, An S, Park S, Kang HG, Park GG, et al. 2006. Generation of a flanking sequence-tag database for activation-tagging lines in japonica rice. *Plant J* 45: 123-32
8. Kakimoto T. 1996. CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 274: 982-5
9. Kim JI, Sharkhuu A, Jin JB, Li P, Jeong JC, et al. 2007. yucca6, a dominant mutation in *Arabidopsis*, affects auxin accumulation and auxin-related phenotypes. *Plant Physiol* 145: 722-35
10. Koch M, Vorwerk S, Masur C, Sharifi-Sirchi G, Olivieri N, Schlaich NL. 2006. A

- role for a flavin-containing mono-oxygenase in resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*. *Plant J* 47: 629-39
11. Kondou Y, Higuchi M, Takahashi S, Sakurai T, Ichikawa T, et al. 2008. Systematic approaches to using the FOX hunting system to identify useful rice genes. *Plant J*
 12. Kranz HD, Denekamp M, Greco R, Jin H, Leyva A, et al. 1998. Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 263-76
 13. Marsch-Martinez N, Greco R, Van Arkel G, Herrera-Estrella L, Pereira A. 2002. Activation tagging using the En-I maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 1544-56
 14. Nakazawa M, Yabe N, Ichikawa T, Yamamoto YY, Yoshizumi T, et al. 2001. DFL1, an auxin-responsive GH3 gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *Plant J* 25: 213-21
 15. Okazaki K, Kabeya Y, Suzuki K, Mori T, Ichikawa T, et al. 2009. The PLASTID DIVISION1 and 2 components of the chloroplast division machinery determine the rate of chloroplast division in land plant cell differentiation. *Plant Cell* 21: 1769-80
 16. Papdi C, Abraham E, Joseph MP, Popescu C, Koncz C, Szabados L. 2008. Functional identification of *Arabidopsis* stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiol* 147: 528-42
 17. Romero I, Fuertes A, Benito MJ, Malpica JM, Leyva A, Paz-Ares J. 1998. More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 14: 273-84
 18. Takase T, Nakazawa M, Ishikawa A, Kawashima M, Ichikawa T, et al. 2004. ydk1-D, an auxin-responsive GH3 mutant that is involved in hypocotyl and root elongation. *Plant J* 37: 471-83
 19. Takase T, Nakazawa M, Ishikawa A, Manabe K, Matsui M. 2003. DFL2, a new member of the *Arabidopsis* GH3 gene family, is involved in red light-specific hypocotyl elongation. *Plant Cell Physiol* 44: 1071-80
 20. Weiste C, Iven T, Fischer U, Onate-Sanchez L, Droge-Laser W. 2007. In planta ORFeome analysis by large-scale over-expression of GATEWAY-compatible cDNA clones: screening of ERF transcription factors involved in abiotic stress

- defense. *Plant J* 52: 382-90
21. Woodward C, Bemis SM, Hill EJ, Sawa S, Koshiba T, Torii KU. 2005. Interaction of auxin and ERECTA in elaborating Arabidopsis inflorescence architecture revealed by the activation tagging of a new member of the YUCCA family putative flavin monooxygenases. *Plant Physiol* 139: 192-203
 22. Xia Y, Suzuki H, Borevitz J, Blount J, Guo Z, et al. 2004. An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signaling. *EMBO J* 23: 980-8
 23. Yamagami A, Nakazawa M, Matsui M, Tujimoto M, Sakuta M, et al. 2009. Chemical genetics reveal the novel transmembrane protein BIL4, which mediates plant cell elongation in brassinosteroid signaling. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 415-21
 24. Zhao Y, Christensen SK, Fankhauser C, Cashman JR, Cohen JD, et al. 2001. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291: 306-9