

# アポミクシス性特異的遺伝子の機能解析 — HSP::ASG-1::GFP 遺伝子組換えシロイヌナズナの 作出とその遺伝子発現 —

西村佳子<sup>1</sup>, 吉田 薫<sup>2</sup>, 鉄村琢哉<sup>3</sup>, 杉田 亘<sup>4</sup>, 栗原大輔<sup>5</sup>, 東山哲也<sup>5</sup>, 陳 蘭庄<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南九州大学 環境園芸学部 環境園芸学科; <sup>2</sup>東京大学 農学部; <sup>3</sup>宮崎大学 農学部;  
<sup>4</sup>宮崎県総合農業試験場; <sup>5</sup>名古屋大学 理学部

2013年10月11日受付; 2014年1月27日受理

**The functional analysis of apomixis specific genes:  
Plant regeneration and its gene expression of HSP::ASG-1::GFP transgenic *Arabidopsis***

Yoshiko Nishimura<sup>1</sup>, Kaoru Yoshida<sup>2</sup>, Takuya Tetsumura<sup>3</sup>, Toru Sugita<sup>4</sup>,  
Daisuke Kurihara<sup>5</sup>, Tetsuya Higashiyama<sup>5</sup> and Lanzhuang Chen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Plant Biotechnology, Faculty of Environmental and Horticultural Science, Minami Kyushu University, 3764-1, Tatenochi, Miyakonojo city, Miyazaki 885-0035, Japan; <sup>2</sup>Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan; <sup>3</sup>Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1, Gakuenkibanadai, Miyazaki, 889-2192, Japan; <sup>4</sup>Miyazaki Prefectural Agricultural Experiment station, 5805, Shimonaka, Sadowaracho, Miyazaki 880-0212, Japan; <sup>5</sup>Faculty of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan

Received October 11, 2013; Accepted January 27, 2014

Apomixis is a reproductive mode in which egg cell can develop into the seed without the process of fertilization. So that it is expected in obtaining economic effects higher than the “Green Revolution” by using apomixis gene to fix F<sub>1</sub> generation to down the cost of F<sub>1</sub> production fee, to fix the middle lines occurred with hopeful characteristic in breeding process to shorter the years of breeding, and more, to make seed formation possible in the vegetative plants. In our laboratory, we have been successful in obtaining apomixis-specific gene (*ASG-1*) by using apomictic guinea grass as the materials based on the strategy that the length of ovary was used as an index to collect different developing stages for mRNA extraction, cDNA synthesis, and then the differential screening method was used to isolate aposporous embryo sac initial cell (AIC) appearance-stage specific gene. In this study, to analysis the functions of *ASG-1*, we have reconstructed the plasmid HSP::ASG-1::GFP and used floral dip method to introduce the plasmid into *Arabidopsis*. As a result, *ASG-1* specific bands were obtained in the PCR products of transformants which were based on the primers designed up on the *ASG-1*, and then, GFP fluorescence expression were observed in parts of stamen and pistil of flowers aged anthesis, and ovules, and in contrast, there were nothing observed in non-transformants. From this result, it indicated that the *ASG-1* was introduced into *Arabidopsis* by the method of floral deep, and it expressed in flower. Now, the transformants of *ASG-1* are used for cytological observation by differential interference-contrast microscope for its functional analysis.

**Key words:** Apomixis, *Arabidopsis*, *ASG-1*, GFP fluorescence expression, HSP::ASG-1::GFP.

## 緒 言

植物のアポミクシス (Apomixis) は無配偶生殖とよ

ばれ、主に母親の遺伝子型だけが子の世代に伝わる生殖様式を指す。このアポミクシスは長年にわたり育種障害のひとつとされてきたが、目覚ましいバイオテクノロジーの発展により、このユニークな生殖様式による様々な可能性に注目が集まっている。その一例を

\*連絡著者: E-mail, lzchen@nankyudai.ac.jp

挙げると、有望な中間母本の固定による育種年限の短縮や、F<sub>1</sub>固定による種子生産のコストダウンなどがある。また、このアポミクシスは、必ず種子を経由することから、種子繁殖の難しかったサツマイモに代表されるような栄養繁殖性の植物の種子繁殖への転換への応用にも光を与えるなど、近年問題となっている地球上の爆発的な人口増加による食糧危機の回避にも期待が寄せられている。

本研究室ではこれまでに、イネ科牧草である条件的アポミクシス性ギニアグラスの生殖様式を細胞学的に明らかにしたうえ (Chen and Kozono, 1994a, b), 有性生殖と最も違ったアポスポリー性胚嚢始原細胞 (Aposporous Embryo Sac Initial Cell, AIC) の出現時期に注目し、AIC出現時期に特異的に発現する遺伝子 (*ASG-1*) のクローニングに成功している (Chen et al. 1999, 2005). さらにその*ASG-1*遺伝子を異なるベクターを入れて、イネやサツマイモ、シロイヌナズナに遺伝子導入し、その遺伝子の機能解析を行っている (西村ら2013).

本研究では、より迅速に*ASG-1*遺伝子の機能解析を行うために、*ASG-1*遺伝子をヒートショックプロモーター下でシロイヌナズナヒストンH2BとsGFPの融合たんぱく質ユニットに再構築し、シロイヌナズナの‘コロニア’にfloral dip法による*ASG-1*遺伝子導入を行い、感染率は低かったものの、組換え植物体を作成した。次にT<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>世代の組換え植物体のDNAを抽出し、*ASG-1*遺伝子の塩基配列をもとに設計されたプライマーを用いてPCRによる*ASG-1*遺伝子の有無の確認を行ない、いずれの世代でも*ASG-1*遺伝子導入が確認された。さらに組換え植物のT<sub>1</sub>~T<sub>3</sub>各世代でヒートショック処理による

GFP蛍光発現を観察するため、各世代で根、花粉、胚珠などの各部位でのGFPの発現の強度及び時間経過ごとにその強度の変化についても調査を行ったので報告する。

## 材料および方法

### 1. 植物材料の準備

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) の‘コロニア’の種子は英国ノッティンガム大学ストックセンターより分譲されたものを使用した。シロイヌナズナは、無菌播種 (西村ら 2013) をして4℃で2日間休眠打破を行った後、23℃、16時間日長で発芽を促した。本葉が2~3枚出てきたら、メトロミックスとバーミュキュライト (体積比1:1) に鉢上げして順化を行った。伸びた花茎を一度摘心して再び花茎を誘導して形質転換に供試した。

### 2. 形質転換用プラスミドベクターの構築

*ASG-1*のcDNA (GenBank/EMBL/DBJ No. AB000809) 領域をヒートショックプロモーター下でシロイヌナズナヒストンH2BとsGFPの融合たんぱく質発現ユニットに挿入し、コンストラクトを作成した。バイナリーベクターはpGWB4 (島根大学遺伝子実験施設 中川強氏より提供) を用い、*ASG-1*との再構築を行った (図1)。

構築したベクターを用いた大腸菌への形質転換はコンピテントセル (TOYOBO Competent high DH5 *α*) キットの方法に準じた。プラスミドDNAを混入したSOC液体培地で振とう培養した後、LB選択培地に塗布し、37℃、1晩培養を行った。得られた23個のコロニーをPCRにかけ、反応の強いものから2つ選抜・培養し、プラスミドを抽出した。抽出したプラスミドはエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに導入をした。続いてアグロバクテリウムは*ASG-1*遺伝子の塩基配列をもとに設計されたプライマーを用いて遺伝子導入の有無について確認を行った (図2A,B)。

### 3. 遺伝子組換え方法



図1. *ASG-1* 遺伝子導入に用いた pGWB4 バイナリーベクターの配置

1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 15



1 2 3 4 M 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

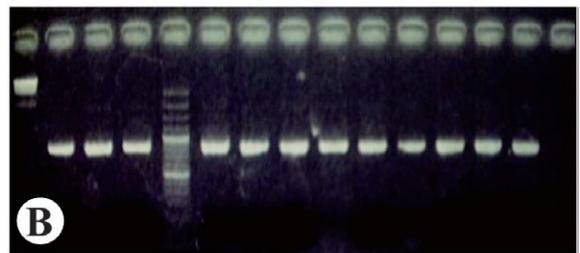


図2. *ASG-1* 遺伝子導入されたコロニーとそのアグロバクテリウムのPCRによる選抜

A: コンピテントセルでの選抜 レーン1はコントロール, レーン2~23: コロニー. B: アグロバクテリウムの遺伝子導入の確認プライマー: S1-A1. M: 100bp マーカー, レーン1はコントロール, レーン2~14: アグロバクテリウム

遺伝子組換え方法は、今までに報告されたfloral dip法 (Steven and Andrew 1998, 大門ら 2005, 鹿内 2009, Narusaka et al 2010) を参考に、本研究室で改変した方法を用いて行った (西村ら 2013)。

#### 4. 遺伝子組換え植物の選抜

T<sub>1</sub> 種子は、感染前の無菌播種と同様の方法で殺菌・洗浄を行い、抗生物質入りのMS培地 (スクロース: 10 g/l, MES: 0.5 g/l, hygromycin B: 50 mg/l, carbenicillin sodium salt: 100 mg/l, 寒天: 8 g/l) に播種し、4℃, 2日間休眠打破を行った後、23℃, 16時間日長の人工気象器内で発芽させた。遺伝子組換えされたものについては、子葉が出てきて根も伸長したものから、非遺伝子組換え体と生育に差が出たものを選抜して通常と同様にメトロミックスとパーミュキュライト (体積比1:1) に鉢上げを行った。

#### 4. DNAの抽出とPCR

選抜した植物の中からT<sub>1</sub> 植物はすべてを、T<sub>2</sub> 植物以降は無作為に選んだものを用いてそれぞれDNAの抽出を行った。抽出はDNAミニプレップ法 (後藤 2005) を用いた。PCRはASG-1の遺伝子配列をもとに作成した特異的なプライマー (S1: ATGGCATTTCGTGATGGGA, S2: GGGTAAAACCTTCCCCATG, S3: GTTCTAGCCCCGTCGATTC, A1: CCTCTTGCCAAAGATCACG, A2: ATCGACGAGGCTAGAACCT, A3: AGGTTTTACCCTCGAGCACA) (図3) とhygromycin B耐性遺伝子をもとに設計したプライマー (HM-L: CGCAAGGAA-TCGGTCAATAC, HM-R: TTTGTGTACGCCCGACAGT) の全8種類で位置関係をもとに組み合わせを行い、双方向からPCRによる増幅を行った。なおPCRは94℃, 1分; 94℃, 30秒; 51℃, 30秒; 72℃, 1分; の35サイクルで行い、72℃, 5分で伸長し、4℃で保持した。PCR産物は2.0%アガロースゲルで電気泳動を行い、ASG-1遺伝子の特異的なバンドの確認を行った。

#### 5. ヒートショック処理によるGFP蛍光発現及びその時間経過ごとの発光強度の調査

##### 1) 材料

##### (1) 根

非組換え植物体をコントロールとし、コントロールとT<sub>2</sub>~T<sub>3</sub> 種子を抗生物質入りMS培地 (前出) に無菌播種し、発芽したものを6cmシャーレに移植後、根をまっすぐ伸長させるためにシャーレを立てて培養し、2~5日後にヒートショック処理を行った。

##### (2) 非組換え体植物およびT<sub>1</sub>~T<sub>3</sub> 植物

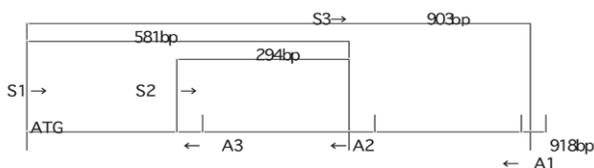


図3. ASG-1をもとに設計されたプライマーの位置関係

開花後、十分に生育した植物を用いてポットごとヒートショック処理を行った。おしべ、めしべ、胚珠、花粉はいずれも開花当日のものを用いて観察を行った (有村・堤 2006; 長谷 2006)。

#### 2) 方法

それぞれのサンプルを37℃, 3時間インキュベーター内に静置してヒートショック処理を行った。ヒートショック直後の非組換え体および組換え体を基準として、蛍光が見られない最小の露光時間をもとに1時間ごとに5時間まで、その後は1日ごとにLeica社製DMI600Bで、蛍光フィルターブロックI3, L5の2種類を用いてGFP発現の観察を行った。おしべやめしべの部分は、自家蛍光が強いために、ロングパスフィルターであるI3も併用し、GFP発光部分を確認しながら調査を行った。

### 結果および考察

#### 1. 組換え植物の選抜

T<sub>1</sub> 種子を抗生物質入りのMS培地に播種後、23℃, 16時間日長で培養を行った。前回行った異なるベクター (西村ら2013) では、ほとんどの種子で発芽後、子葉までは生長するものの、その後は根の萎縮が見られ、1週間前後で非組換え体と組換え体の生育に差がみられた。今回用いたベクターでは、発芽率が低く、組換え体のみが発芽、生育がみられた。また、今回当初は36株感染を行ったものの、T<sub>1</sub> 植物をわずか9株しか得られず、その後さらに18株感染を行って全体で36株の組換え体を得た。

#### 2. ASG-1遺伝子のPCRによる確認

GFPの発現を確認する前に、T<sub>1</sub>~T<sub>3</sub> 植物のDNAを抽出し、ASG-1遺伝子の塩基配列をもとに設計した特異的なプライマー6種類と、hygromycin B耐性遺伝子をもとに設計されたプライマー2種類を用いて、双方向からPCRによる増幅を行った。電気泳動の結果、5種類の組み合わせにおいて必ずいずれかの組み合わせでASG-1の特異的なバンドが認められた (図4)。従って、様々な領域に部分的にASG-1遺伝子が導入されたと考えられる。

#### 3. ヒートショック処理によるGFP蛍光発現

ヒートショック処理は、非組換え体をコントロールとし、組換え体と同時にヒートショック処理を行い、時間経過ごとのGFP発現について観察を行った。根は、ヒートショック処理後、2時間経過後に徐々に蛍光が認められた。その後は継続して蛍光発現が認められたものの、4日後には根の側根部分の伸長によって、観察が困難となった。花の部分は、ヒートショック処理後すぐに蛍光が認められたが、非形質転換体も同様に蛍光が認められたため、蛍光が認められる最小露光時間について調査を行った。その結果、ヒートショック処理後2~3時間で組換え植物においてより強い蛍光が認められた (図5 A~D)。特に、花粉はコントロールとして用いた非組換え体の露光時間を基にして蛍光

を比べてみた結果、より強い蛍光発現が認められた。その後は5時間を境に蛍光が弱くなり、2日後には非組換え体との蛍光の差が認められなくなった。今回用いたプロモーターはGFPの発現部位は全身であるため、ASG-1遺伝子が特異的に発現する部位について確認することは困難であったものの、めしべの柱頭、おしべ、花粉の中では、花粉が露光時間による比較においてGFP蛍光がもっとも強く認められた(図6)。

### 6. 各部位でのヒートショック処理による蛍光発現 (GFP, ロングパス)

図6は組換え植物における各部位でのヒートショック処理による蛍光発現を示す。根の部分は自家蛍光による赤い発光がみられないため、GFPの蛍光の観察が容易であったが(図7B)、種子の部分、根の部分、胚軸の部分で発光する波長の違いが見られた(図7C~F)。そのためロングパスフィルターを併用しながら、GFPの発現を確認した。おしべは葯の部分のみでGFP発光が多く見られたが、一部について全体的にGFP発現が見られたものがあり(図7G~J)、ASG-1の発現量に個体間で違いがあると考えられた。また、胚珠は全体的にGFP発光が弱いものの、GFP発現を確認することができた(図7K, L)。

以上の結果から、本研究では、HSP::ASG-1::GFP遺伝子を用いて改善したFloral dip法を応用して初めて遺伝子組換えシロイヌナズナの作出に成功した。その上、その遺伝子発現について、初めて蛍光発現によって遺伝子の発現をリアルタイム的に観察することができ

た。それと並行してASG-1遺伝子をもとに設計したプライマーと抗生物質であるhygromycin Bへの耐性を付与する(HPT)の配列をもとに設計したプライマーを組み合わせたPCR法によるASG-1遺伝子の検出もできた。このように、ASG-1遺伝子の組換えシロイヌナズナが作出できたことで、今後、これらの組換え植物を用いて各部位での形態的な発現、特に子房内で変化を、細胞学的に観察し、アポミクシス性特異的遺伝子であるASG-1の機能解析を行いたい。

### 要 約

植物のアポミクシス(apomixis)は無配偶生殖とよばれ、卵細胞が受精せず種子を形成する。このユニークな形質はF<sub>1</sub>の固定や育種年限の短縮など様々な面で期待されている。本研究ではアポミクシス性特異的遺伝子(ASG-1)の機能を解析するため、シロイヌナズナヒストンH2BとsGFP融合たんぱく質発現ユニットにASG-1を再構築し、シロイヌナズナにfloral dip法で遺伝子導入を行った。ASG-1遺伝子をもとに設計された特異的プライマーとhygromycin B耐性遺伝子をもとに設計されたプライマーでASG-1遺伝子導入について得られた組換え体の確認を行った結果、いずれかの組み合わせで必ず特異的なバンドが認められ、ASG-1遺伝子導入が確認できた。T<sub>2</sub>~T<sub>3</sub>植物およびコントロールとして用いた非組換え体のシロイヌナズナを37℃、3時間ヒートショック処理し、GFP発現の観察を行った結果、根は2時間でGFP発現が認められた。開花当日のおしべ、

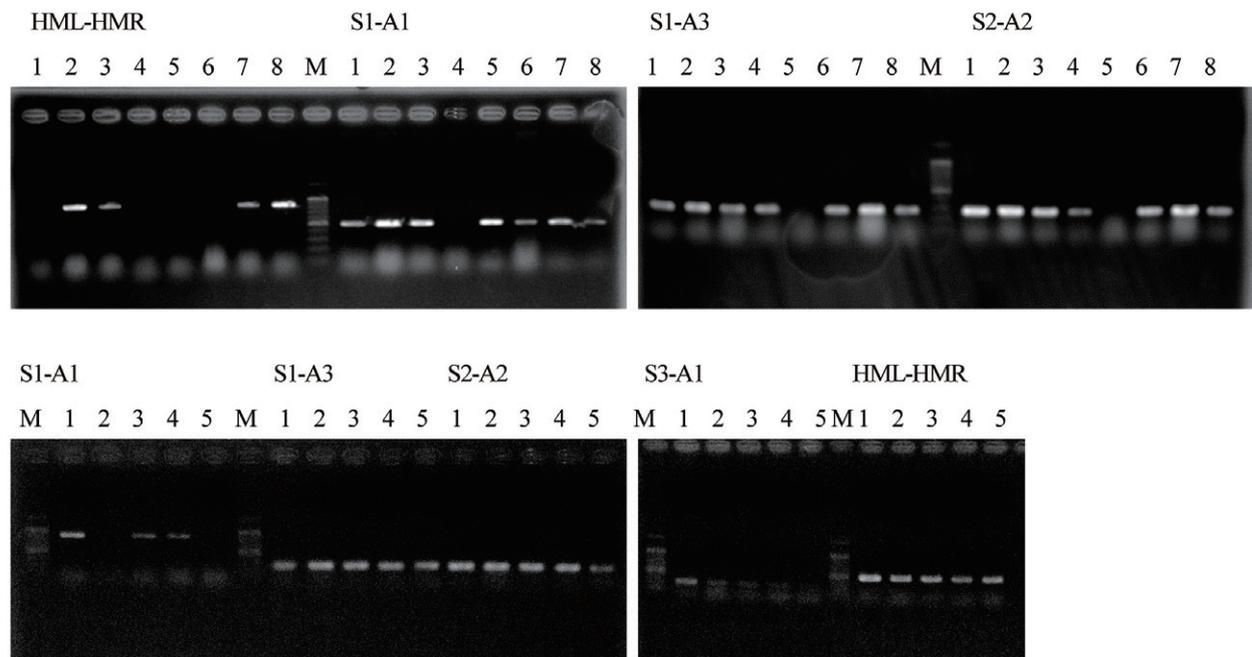


図 4. T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> 植物における PCR による ASG-1 遺伝子の検出

A: プライマーの HML-HMR, S1-A1; B: プライマーの S1-A3, S2-A2. いずれも M: 100bp, 1: pgwb42-1, 2: pGWB4 4-1, 3: pGWB4 4-2, 4: pGWB4 6-1, 5: pGWB4 8-1, 6: pGWB4 21-1, 7: pGWB4 21-2 8: pGWB4 25-1 (T<sub>1</sub> plants), C: プライマーの S1-A1, S1-A3, S2-A2. D: プライマーの S3-A1, HML-HMR. いずれも M: 100bp, 1: pGWB4 4-1-1, 2: pGWB4 4-1-2, 3: pGWB4 4-3-1, 4: pGWB4 4-3-2, 5: pGWB4 4-3-3 (T<sub>2</sub> plants)

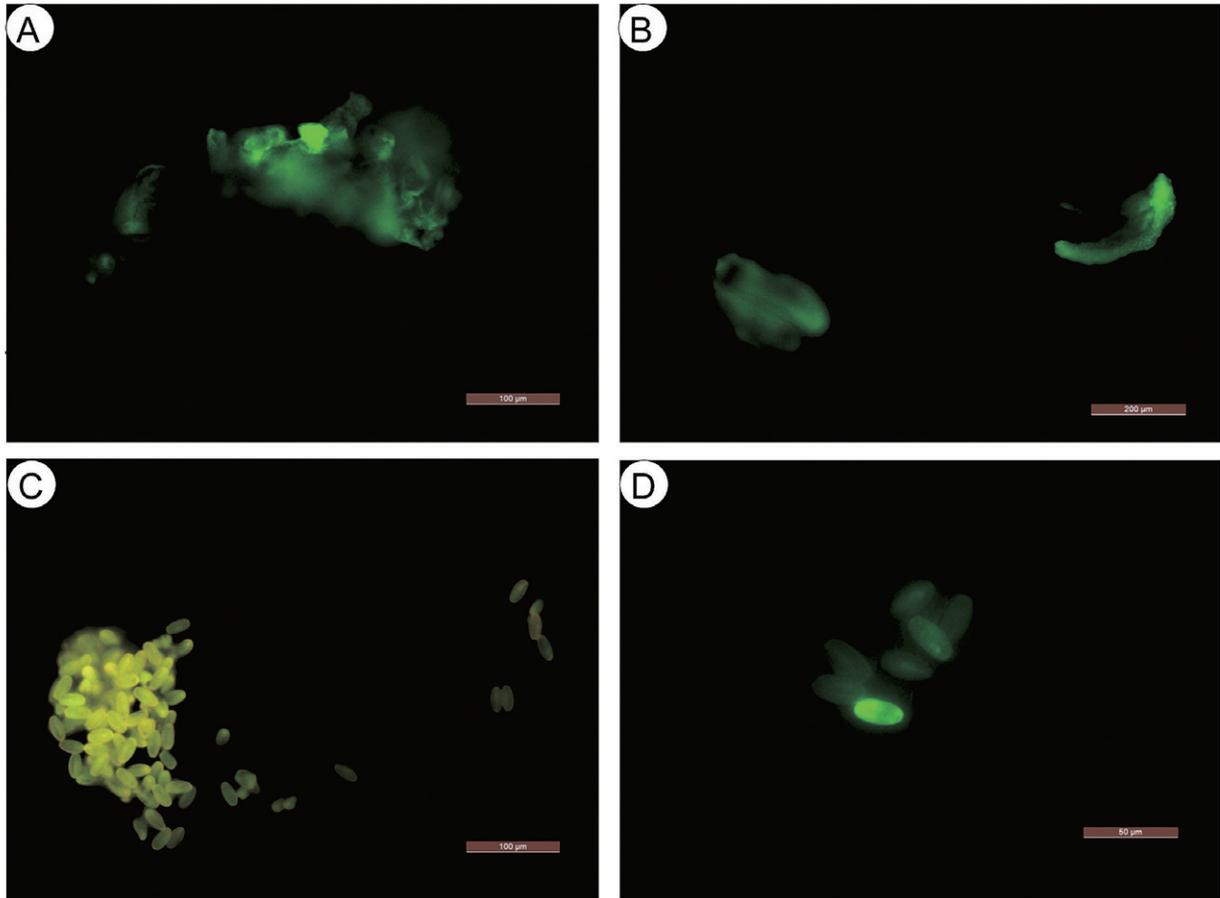


図 5. コントロールの露光時間を最小にした場合の組換えシロイヌナズナの蛍光発現

A: めしべ, B: おしべ, C: 花粉の集合体 (I3), D: 強い発現を示した花粉

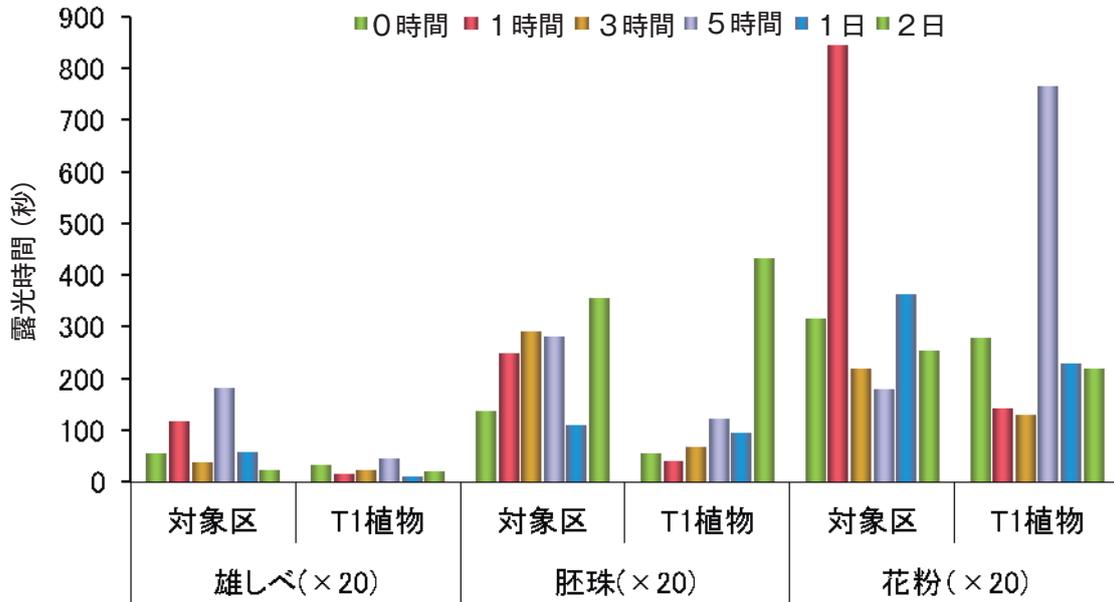


図 6. ヒートショック処理後のシロイヌナズナの各部位における GFP 発現の最小値の推移

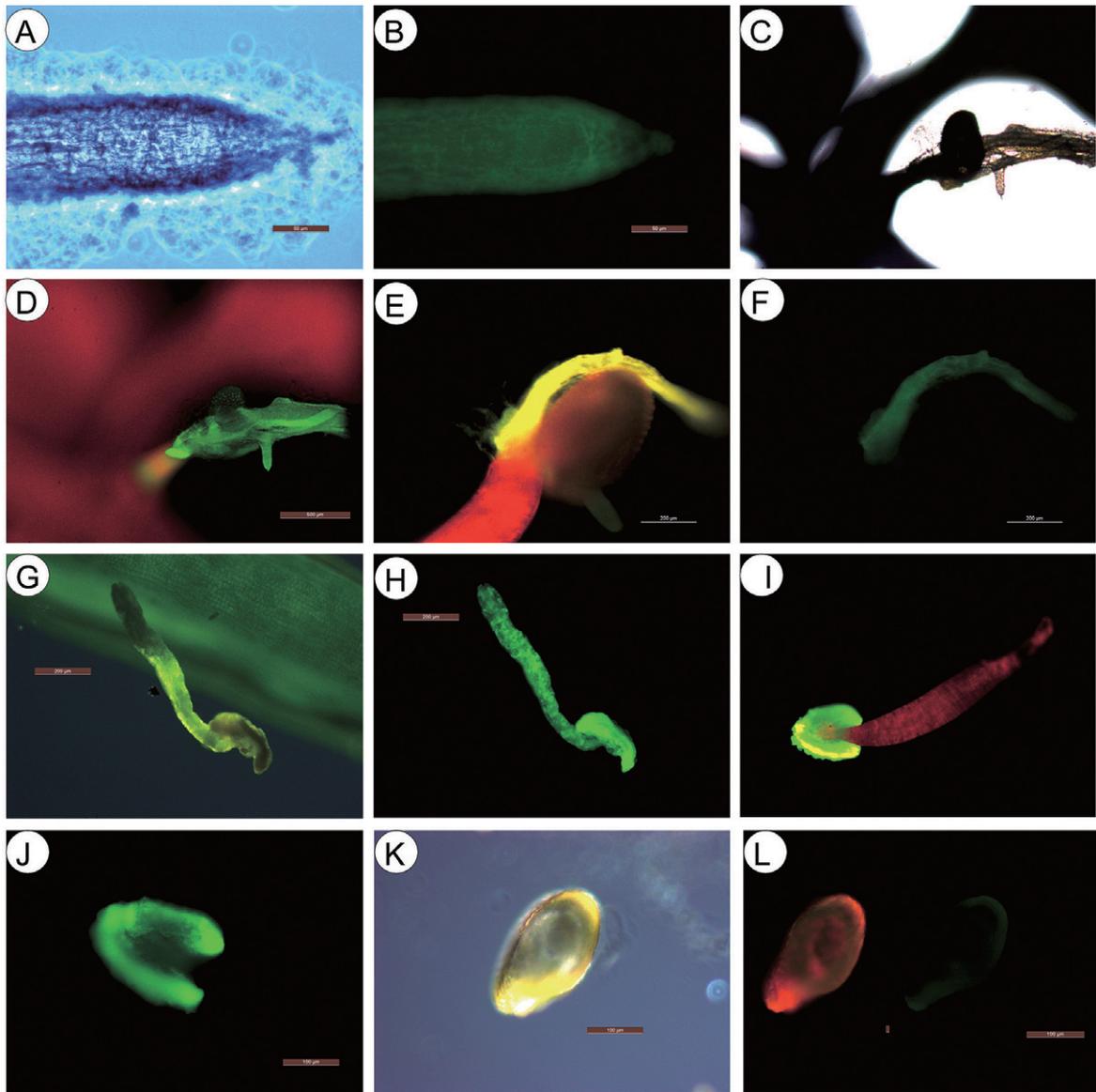


図7. ヒートショック処理後のシロイヌナズナの各部位における GFP 発現

A: 明視野の根, B: 根の GFP の蛍光発現, C: 種子の部分の発現, D: 根の部分の発現, E: 胚軸部分での発現, F: T<sub>2</sub> 植物の根と種子 (GFP), G: T<sub>2</sub> おしべ (明視野), H: T<sub>2</sub> おしべ (GFP), I: T<sub>3</sub> おしべ (long pass), J: T<sub>3</sub> おしべ (GFP), K: T<sub>2</sub> 胚珠 (明視野), L: T<sub>2</sub> 胚珠 (long pass と GFP)

めしべ, 胚珠, 花粉の各部分でも同様 GFP 発現の観察を行った. 小花の部分は自家蛍光が強いためロングパスフィルターを併用して GFP 発現部分の確認を行った. GFP 発現はいずれの部分でも認められた. 特に花粉に強く GFP の発現が認められた. 以上の結果から, GFP 発現を伴う *ASG-1* 遺伝子組み換えシロイヌナズナを作出できたことが認められた. 今後, アポミクシス性特異的遺伝子 *ASG-1* 遺伝子の機能解析を進めるために, 本研究で得られた組換え植物体を用いて各部位の形態的な調査, 特に子房内で変化を, 細胞学的に観察し, アポミクシス性特異的遺伝子である *ASG-1* の機能解析を行いたい.

## 謝 辞

なお, 本研究は科学研究費 23380009 によるものである. また本研究に関わるベクターを提供してくださった島根大学の中川氏に御礼を申し上げる.

## 参考文献

- 1) 有村慎一, 堤伸浩 (2006) 2-1 蛍光観察法「植物の細胞を観る実験プロトコル (顕微鏡観察の基本から最新バイオイメージング技術まで)」新版 福田裕穂, 西村幹夫, 中野明彦監修 pp144-148 秀

- 潤社.
- 2) Chen LZ, Guan LM, Seo MK, Hoffmann F, Adachi T. (2005) Developmental expression of *ASG-1* during gametogenesis in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). *Journal of Plant Physiology* **162**: 1141-1148.
  - 3) Chen, L.Z. and T. Kozono. (1994a) Cytology and quantitative analysis of aposporous embryo sac development in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Cytologia* **59**: 253-260.
  - 4) Chen, L.Z. and T. Kozono. (1994b) Cytological evidence of seed-forming embryo development in polyembryonic ovules of facultatively apomictic guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Cytologia* **59**: 351-359.
  - 5) Chen LZ, Miyazaki C, Kojima A, Saito A, Adachi T. (1999) Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). *Journal of Plant Physiology* **154**: 55-62.
  - 6) 大門靖史, 阿部光知, 荒木崇 (2005) 4-4減圧浸潤法及び花序浸し法によるシロイヌナズナの形質転換「モデル植物の実験プロトコール (イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編)」改訂3版 島本功, 岡田清孝, 田畑哲之監修 pp149-154 秀潤社.
  - 7) 後藤弘爾 (2005) 3-1-2 シロイヌナズナのDNA・RNA単離法「モデル植物の実験プロトコール (イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編)」改訂3版 島本功, 岡田清孝, 田畑哲之監修 pp 90-92 秀潤社.
  - 8) 長谷あきら (2006) 3-1 核局在タンパク質「植物の細胞を観る実験プロトコール (顕微鏡観察の基本から最新バイオイメージング技術まで)」新版 福田裕穂, 西村幹夫, 中野明彦監修 pp144-148 秀潤社.
  - 9) 鹿内利治 (2009) 5.シロイヌナズナの形質転換「低温科学」Vo1.67 北海道大学学術成果コレクション pp 615-616.
  - 10) Narusaka M., Shirashi T., Iwabuchi M., Narusaka Y. (2010) The floral inoculating protocol: a simplified *Arabidopsis thaliana* transformation method modified from floral dipping. *Plant Biotechnology* **27**: 349-351.
  - 11) 西村佳子, 鉄村琢哉, 濱田卓郎, 杉田亘, 市川裕章, 吉田薫, 徐成体, 陳蘭莊 (庄) (2013) アポミクシス性特異的遺伝子の機能解析—Floral dip法による*ASG-1*遺伝子導入と組換えシロイヌナズナの作出—南九州大学研報 **43A**: 33-39.
  - 12) Steven JC., Andrew FB. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant Journal* **16**(6): 735-743.