



植物の DNA を生きたまま観察できる手法を開発

～ゲノム編集のハサミをランプに替えることで作物のゲノム育種に貢献～

東京理科大学

京都大学

名古屋大学

徳島大学

東京理科大学理工学部応用生物科学科 松永 幸大 教授、藤本 聡 研究員、京都大学大学院理学研究科 菅野 茂夫 研究員、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (ITbM) 桑田 啓子 特任助教、徳島大学生物資源産業学部 刑部 敬史 教授の研究グループは、ゲノム編集技術を利用して、植物の DNA を生きたまま解析する TALE-FP 法の開発に成功しました。

植物の DNA を解析するためには、植物細胞を破碎して、細胞核から DNA を抽出する必要がありました。また、植物の染色体の解析には蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法という手法が主に用いられていましたが、細胞を固定する必要があるため、生きた植物の DNA をリアルタイムで解析する手段はありませんでした。近年、DNA の細胞核の中での 3 次元的位置が読み取られる頻度に影響を及ぼすことが分かってきていますが、時々刻々と変わる位置情報を観察する手法に限られるため、新たな手法の開発が急務でした。

今回、本研究グループは、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、植物の DNA を生きた植物の組織や器官で検出する TALE-FP 法を開発しました。ゲノム編集技術で用いられているキサントモナス菌由来の Transcription activator like effector (TALE) の DNA 結合ドメインに蛍光タンパク質を連結させた TALE-FP を植物体内で発現させました。TALE-FP を検出することで、特定の DNA 配列の動態を植物の様々な組織や器官で解析することに成功しました。これにより、特定の分裂組織から染色体標本作製することなく、DNA 配列の位置や分布を検出することが可能になりました。

本成果は、ゲノム育種により作成された品種選抜の高速化、植物における染色体異常の検出の簡便化など、農作物研究に大きく貢献することが期待されます。

※本研究成果は平成 28 年 10 月 7 日に英国オックスフォード大学出版の科学雑誌 *Journal of Experimental Botany* 電子版に掲載されました。

背 景

DNA は高度に凝縮されて細胞核に格納されています。最近、細胞核の 3 次元的位置によって DNA の情報が読み取られる頻度が変化することがわかってきました。このため、抽出した 2 次元の DNA の塩基配列情報だけでなく、DNA が細胞核における 3 次元的位置情報を知ることが重要となってきました。さらに、DNA の 3 次元的位置は生物の発生・分化に伴い変化するほか、環境刺激や薬物によっても変化することが知られていますが、詳しいメカニズムは分かっていません。そのため、成長や外部環境の変化に伴う植物の DNA 動態メカニズムの解明が期待されていました。

ブドウ、ジャガイモ、サツマイモ、パニコムギなどの有用な作物の育種では、ゲノムを倍数化することで、果実、芋、種子の品質が優れた種の選抜が行われてきました。このような育種の研究現場では、染色体標本作製し、染色体の本数や形態を解析することで倍数化を確認する作業が必要です。その解析には、特定のゲノム領域に繰り返し存在する DNA 配列を用いて染色体を区別する蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH 法) が用いられてきました。FISH 法では、植物の分裂組織から細胞壁を溶かして染色体標本作製する必要があります。植物の細胞壁の種類や状態に合うように、細胞壁溶解酵素の種類・活性・反応時間を調整する必要があるために、サンプル間のばらつきの大きさが問題になっていました。また、DNA 配列に蛍光標識した蛍光プローブを、熱変性した染色体標本にハイブリダイゼーション (DNA 分子が相補的に結合する) することで、染色体上の DNA 配列の分布を検出しますので、ハイブリダイゼーションの条件検討に時間を要する他、検出にも 2-3 日の実験時間が必要でした。そこで、染色体標本の作製やハイブリダイゼーションを行うことなく、生きた植物の組織や器官で、DNA を検出する方法の開発が期待されていました。

内 容

本研究グループは、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、生きたまま DNA を検出できる TALE-FP 法を開発しました。Transcription activator like effector (TALE) はキサントモナス菌由来のタンパク質で、DNA 配列に特異的に結合する DNA 結合タンパク質です。この TALE に DNA 分解酵素を結合することで、特定の DNA 配列を切断して変異を挿入するゲノム編集は活発に研究が進んでいます。DNA 分解酵素 (ハサミ) の代わりに蛍光タンパク質 (ランプ) を

TALE に連結させて、DNA を切断することなく、狙った DNA 配列に蛍光タンパク質を配置する方法は、動物の培養細胞において報告がありました。しかし、動物細胞で用いられていた TALE 結合型・蛍光タンパク質を用いても、植物では安定的な形質転換体を取得することが困難でした。そこで、私達は、植物用のプロモーターを使用し、蛍光タンパク質のみを 3 量体にしてシグナル/ノイズ比を改善することで、安定的に DNA を検出できる TALE-FP を作成することに成功しました。

染色体の中間部分に存在するセントロメア配列、染色体の末端部分に存在するテロメア配列、タンパク質合成に関与するリボソーム DNA 配列を認識する TALE を設計し、緑色蛍光タンパク質(GFP)、黄色蛍光タンパク質(Venus)、赤色蛍光タンパク質(tdTomato)に連結して、植物体内で発現させました (図 1)。その結果、花弁、めしべ、茎、葉、根などのあらゆる器官や組織の細胞核で、特定の DNA 配列の蛍光シグナルを生きた細胞中に観察することができました (図 2)。そして、DNA 配列は細胞核内を動き回っていることを検出することができました。同じ DNA 配列であっても染色体の位置によって動き回る範囲が異なることもわかりました (図 3)。

このことは、植物の DNA は空間的な位置が固定されているのではなく、空間的な位置が移動しながら、遺伝子発現のスイッチの ON/OFF を繰り返していることを示しています。今後、この TALE-FP を用いて植物 DNA の空間的配置を制御する分子メカニズムを解明していく予定です。

本研究の社会的貢献

本研究成果により、植物の DNA をあらゆる組織で生きたまま解析することができるようになりました。染色体標本を作製することなく、DNA の分布を解析できることから、ゲノム育種の研究現場における染色体解析や倍数性解析の効率化を図ることが可能になります。本法に用いた TALE は無毒化されており、どの植物にも導入可能なタンパク質であるため、今後、有用作物の DNA 解析にも応用可能であると考えられます。また、植物の細胞核内における DNA の 3 次元的位置の解析や動態研究が飛躍的に進むことが期待されます。本成果により、従来法で解析することが困難であった、発生分化や環境刺激による DNA の 3 次元的位置の変化のタイミングやスピードが明らかになります。最近、DNA の 3 次元的位置にはエピゲノム制御が関与することが示唆されています。従って、

DNA の配列を操作することなく DNA の細胞核における位置を変えることで、遺伝子発現のスイッチの ON/OFF を可能とするエピゲノム制御による育種にも貢献することが期待されます。

本研究は、東京理科大学において、文部科学省・新学術領域・科学研究費「植物の成長可塑性を支える環境認識と記憶の自律分散型統御システム」および国立研究開発法人 科学技術振興機構（JST） 戦略的創造研究推進事業 チーム型研究（CREST）「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」（研究総括：磯貝 彰 奈良先端科学技術大学院大学 名誉教授）（研究課題名「エピゲノム制御ネットワークの理解に基づく環境ストレス適応力強化および有用バイオマス産生」、研究代表者：関 原明（理化学研究所 環境資源科学研究センター チームリーダー）の助成を受けて実施した研究成果です。



図1 TALE-FP の分子構造

先端に核内移行配列を持つ、中央部分のドメインは DNA 配列特異的に結合する。末端に蛍光タンパク質を持つ。

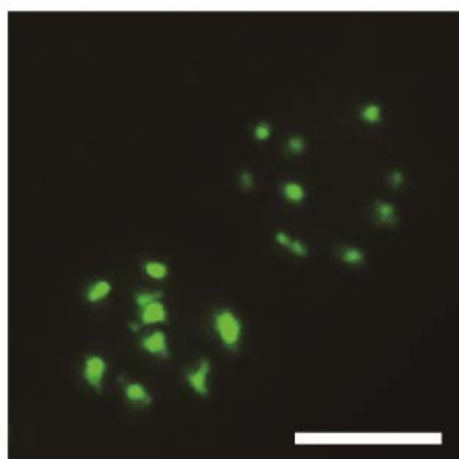


図2 セントロメアに結合した TALE-FP の蛍光写真。2つの細胞核中に TALE-FP の輝点が見える。

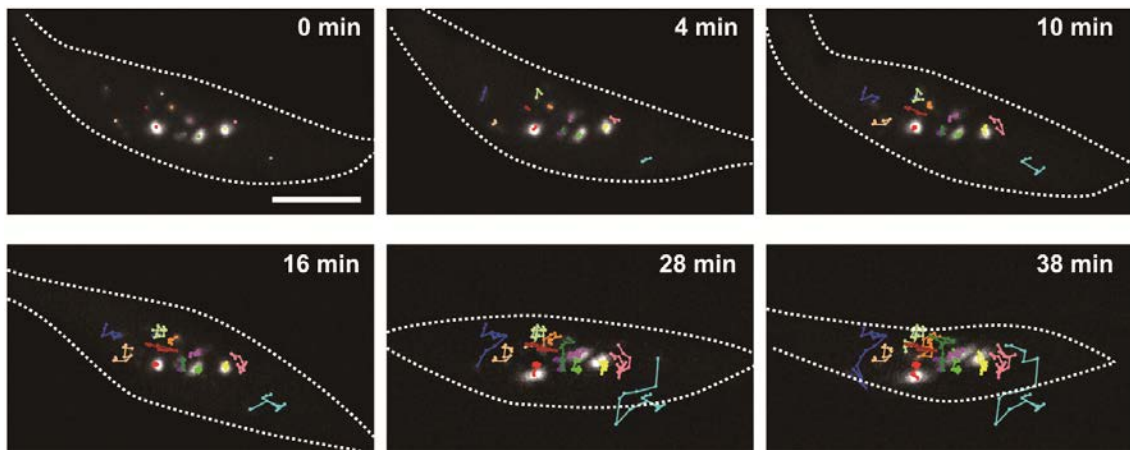


図3 細胞内を動き回る TALE-FP。白い点線は細胞核を示す。細胞核内をテロメアを認識する TALE-FP が動き回っていることがわかる。TALE-FP のそれぞれの輝点をトラッキングしたラインを示している。

論文情報

論文題名 : Visualization of specific repetitive genomic sequences with fluorescent TALEs in *Arabidopsis thaliana*

論文著者 : Satoru Fujimoto, Shigeo S. Sugano, Keiko Kuwata, Keishi Osakabe and Sachihiro Matsunaga* (責任著者 松永幸大)