

## 3-6

# 遺伝子ターゲティングの容易な ヒメツリガネゴケ

ヒメツリガネゴケは酵母と同程度の相同組換え率をもち、遺伝子ターゲティングが容易である。また、オーキシンとサイトカイニンに対する応答が顕著で、これらのホルモンの作用機作を研究するのに適している。さらに、形態が単純で、植物の発生研究の良い材料になりうる。また、EST、ジーントラップ、エンハンサートラップライン、cDNAのアクティベーション系の整備が進んでいる。

## はじめに

遺伝子ターゲティングは、相同組換え\*1を利用してゲノムを自由に改変する技術であり、遺伝子の機能解析にたいへん有用な技術である<sup>1)</sup>。実際に、酵母、マウス、ラン藻などのモデル生物において、遺伝子ターゲティングは必要不可欠な技術となっている。しかし、植物では、これらのモデル生物に比べ相同組換え率が低いことから、従来、遺伝子ターゲティングが困難であった\*2。しかし、コケ植物のヒメツリガネゴケでは相同組換えが高頻度で起こり、遺伝子ターゲティングが容易であることが1990年代後半に発見され<sup>2)</sup>、さまざまな分野の研究者が実験材料として注目しはじめている<sup>3)</sup>。

### \*1 相同組換え

DNAの相同な塩基配列間で起こる組換えである。通常は、減数分裂時に起こるが、体細胞でも低い頻度で起こる。

\*2 このため、植物ではタグラインを用いた遺伝子破壊体の探索、コサプレッション、アンチセンスRNAの過剰発現、RNAi法などを用いて遺伝子発現を抑制して表現形を解析する手法が主であった。しかし、これらの方法では、遺伝子破壊すると致死になるような遺伝子の解析や、遺伝子の一部分を改変し表現型の変化をみるなどのより詳細な遺伝子機能解析が困難である。

## 1. ヒメツリガネゴケとは

図1に示したように、陸上植物はコケ植物、シダ植物、裸子植物、被子植物から構成され、シロイヌナズナやイネは被子植物に属している。コケ植物は、陸上植物のなかで最も古くに分岐した群であり、セン類、タイ類、ツノゴケ類の3つのグループから構成されている。ヒメツリガネゴケはセン類、ゼニゴケはタイ類に属する。これら3つのグループがどのような類縁関係にあるかはまだわかっていないが、それぞれが約4億3千年前にはすでに分かれていたことは確かであろう。したがって、同じコケとはいっても、ヒメツリガネゴケとゼニゴケは、たかだか2億年前に分化したシロイヌナズナとイネどころではない、互いに異なった歴史を背負った植物である。ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. subsp. *patens* Tan はヨーロッパ、北米に広く分布し、従来より実験材料として用いられてきた\*1。

\*1 現在、世界で広く用いられている野生株は英国の Gransden Wood Huntingdonshire で1962年に採取されたもので、1胞子由来の系統である。日本には、亜種にあたるニセツリガネゴケ *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. subsp. *californica* (Crum & Anderson) Tan が分布している。

## 2. ヒメツリガネゴケの生活環

図2にヒメツリガネゴケの生活環を示した。ヒメツリガネゴケは胞子から発芽後、菌糸様のクロロネマを形成する。しばらく成長を続けると、クロロネマはカウロネマへと分化する。クロロネマ細胞は、細胞内に丸く大きな葉緑体を密にも

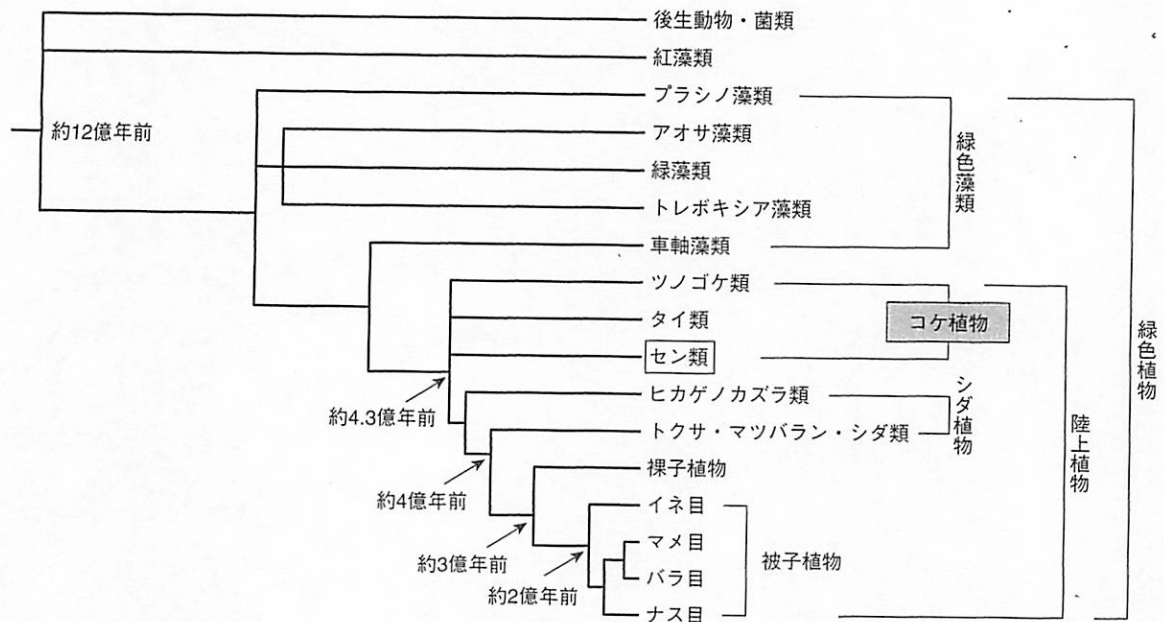


図1 ゲノム解析に関わる生物の系統関係

後生動物と菌類は単系統だと考えられている。後生動物・菌類、紅藻類、および緑色植物が分かれたのは約12億年前だと推定されている。分岐点におおよその年代を記した。緑色藻類の各グループがいつごろ分岐したかはわかっていない。スサビノリは紅藻類、クラミドモナスは緑藻類、ゼニゴケはタイ類、ヒメツリガネゴケはセン類、スギは裸子植物、イネとオオムギはイネ目、ミヤコグサとダイズはマメ目、シロイヌナズナはバラ目、アサガオはナス目に属する。

ち、隣接する細胞同士を隔てる細胞壁(隔壁)が細胞の長軸に対して垂直に形成される。一方、カウロネマ細胞は、細胞内に紡錘体型の葉緑体をまばらにもち、隔壁は細胞の長軸に対して斜めに形成される。外生的にオーキシンを与えるとクロロネマからカウロネマが分化すること、オーキシン含量の減った突然変異体でクロロネマからカウロネマへの分化が抑制されることから、クロロネマからカウロネマへの分化にはオーキシンが必要であると考えられている。クロロネマ、カウロネマを総称して原糸体(プロトネマ)とよぶ。カウロネマの一部からは芽(bud)とよばれる細胞塊が分化する。外生的にサイトカイニンを追加すると芽への分化が促進されること、サイトカイニン含量の減った突然変異体では芽形成が抑制されることから、カウロネマから芽への分化にはサイトカイニンが必要であると考えられている。オーキシン、サイトカイニンに対する反応が明確であることから、植物ホルモン研究のよい材料であると考えられている。

芽は規則正しく細胞分裂を繰り返し、被子植物の茎、葉に似た器官をもつ茎葉体を形成する\*1。葉の基部の茎を抱く部分から、リゾイド(図2)とよばれるカウロネマに似ているがより液胞に富んだ茶色の細胞が形成される\*2。

低温処理により、茎葉体の先端に造卵器と造精器が形成される。造精器から精子が放出され、造卵器内の卵細胞と受精する。受精卵は孢子体を形成するが、孢子体のほとんどの部分は孢子嚢で、この袋状器官の中で減数分裂により孢子が形成される。

\*1 被子植物の茎葉とは独立に進化した器官であるが、機能はよく似ている。茎の中には、水輸送を担うハイドロイドと同化産物などの輸送をするレプトイドが分化する。葉は中肋部分を除き1細胞層であり、規則正しい細胞分裂により形成される。

\*2 ヒメツリガネゴケは再生能が高く、葉や茎を切って培養するといたる所から原糸体が発生してくる。

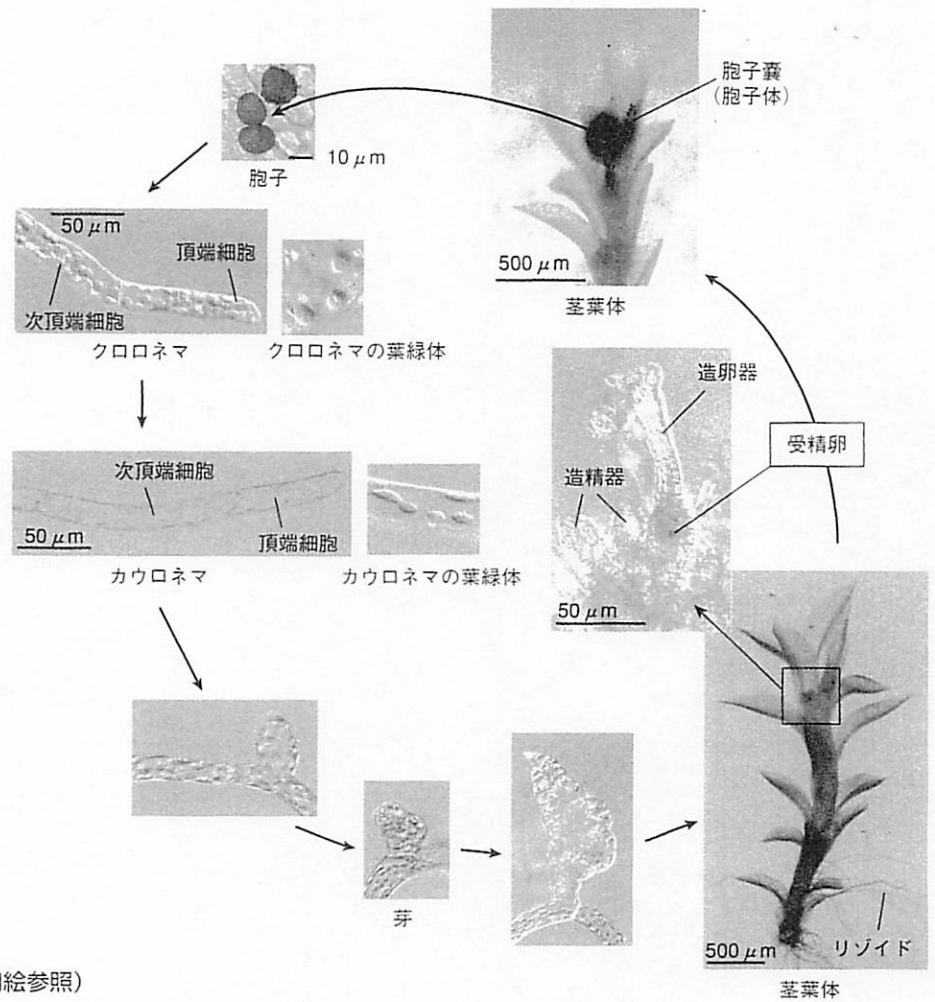


図2 ヒメツリガネゴケの生活環 (口絵参照)

### 3. 培養法および遺伝子機能解析法

培養方法および遺伝子機能解析法は、筆者らの研究室のウェブページ (<http://www.nibb.ac.jp/~mhasebe/>) に最新の方法が掲載されているのでここでは概略のみ説明する。

#### ▶ 1. 培養

筆者らの実験室では、ヒメツリガネゴケを18時間明6時間暗周期で培養しているが、25℃で24時間光照射条件下でも培養可能である。光条件はシロイヌナズナの培養と同条件でよい。培養には大腸菌の培養で使用するシャーレを用いるが、長期間培養して茎葉体を大きく育てるときは厚めのものを用いる。寒天培地の上にオートクレーブしたセロハンを敷き、その上にコケを植えると回収に便利である。液体培養も可能であり、光照射したファーメンターを用いれば大量培養も可能である。

通常、栄養繁殖には原糸体や茎葉体をピンセットでつまんで新しい培地に植えれば2週間ほどで直径2cm程度のコロニーを形成する。大量に増やすときは、ポリトロンで原糸体を滅菌水中で細断し培地上に播いておくと、2週間ほどでクロロネマが一面を被うようになる。継代、移植などは、通常の無菌操作を行う。

茎葉体を25℃で2～3週間培養育成し、葉が10～15枚程度出た茎葉体を15℃で2週間程度培養すると、茎葉体の先端に造精器が形成される\*1。その後、1週間ほどで造卵器が形成される。造卵器が形成されていることを確認したら、滅菌水を茎葉体が先端まで浸かる程度入れてすぐに捨てる。そうすると、造卵器、造精器のついている茎葉体の先端部に水滴が残る。この水滴を利用して、造精器から精子が泳ぎだし、受精が起こる。そのまま、15℃で2週間ほどおいておくと、茎葉体の先端に袋状の胞子嚢が形成される。通常、1シャーレあたり数個～数100個の胞子体形成される。胞子体は、はじける前にハサミで茎葉体から切り離し、マイクロチューブに2～3個入れる。この状態のまま、4℃で半永久的に保存可能である。1つの胞子嚢には数千個の胞子が入っている。

\*1 肉眼で探すのは熟練が必要だが、シャーレの上から実体顕微鏡で観察すればすぐわかる。

## ▶ 2. 遺伝子の単離

DNA、RNAの抽出方法は、基本的にはシロイヌナズナやイネとほぼ同じである\*2。

\*2 植物細胞工学シリーズ7「新版 植物のPCR実験プロトコル」第2部参照。

## ▶ 3. 形質転換

原糸体をドリセララーゼでプロトプラスト化し、DNAとポリエチレングリコールとともに混合・静置することにより容易に形質転換できる。形質転換プロトプラストを選択培地で約3週間培養し、生えてきた形質転換体を薬剤を含まない非選択培地で約1週間培養する。これを再び選択培地で約1週間培養する\*3。

\*3 この操作は、形質転換体中にはコケゲノムに外来DNAが組み込まれた安定形質転換体とそうでない不安定形質転換体があり、前者を選択するためである。

## ▶ 4. 遺伝子機能解析

遺伝子を破壊するには、破壊したい遺伝子中に薬剤耐性遺伝子を挿入したコンストラクトを大腸菌を用いて作製し、ヒメツリガネゴケに導入して相同組換えにより野生型遺伝子と置換する。また、エクソンに突然変異を導入し、イントロンなどに薬剤耐性遺伝子を挿入しておけば、さまざまな変異体を作出できる。相同組換えに必要なヒメツリガネゴケDNA長は数百bpであるが、1kb以上あったほうが効率が良い。シャーレ1枚分の原糸体と供与DNA 30 μgあれば、ほぼ確実に遺伝子ターゲティングが行える。

過剰発現プロモーターとして被子植物で用いられるCaMV35Sプロモーターは、ヒメツリガネゴケでは弱い活性しかもたない。しかし、薬剤耐性遺伝子のプロモーターとしては十分である。過剰発現実験にはイネアクチンプロモーター<sup>4)</sup>が用いられる。グルコシルチコイドを用いたタンパク質機能誘導系<sup>5)</sup>はヒメツリガネゴケでも利用できる。

whole mount *in situ* hybridizationによって、原糸体におけるタンパク質の局在を調べることができる<sup>6)</sup>。しかし、茎葉体の細胞には抗体が浸透しにくく、これまで成功例はない。相同組換えを利用して、遺伝子末端にレポーター遺伝子を挿入して目的遺伝子とレポーター遺伝子の融合タンパク質の発現部位を解析することは容易である。

Cre組換え酵素は、34塩基対からなるloxP配列間の組換えを配列特異的に引き起こす。Cre組換え酵素遺伝子を誘導プロモーターによって一過的に発現させることにより、好きな時期に特定の領域を欠失させ遺伝子を破壊することができる。ヒメツリガネゴケでもこのシステムが利用できる。

## 4. ゲノム解析の現状

ヒメツリガネゴケは、前述したように植物ホルモンの作用機作を研究するうえで優れた材料であるとともに、体制が単純で、植物のさまざまな発生様式の基本的分子機構を解明するうえで優れたモデルになりうる。さらにシロイヌナズナやイネのような被子植物と、クラミドモナスのような単細胞緑藻の中間に位置するため、植物ゲノムの進化を知るうえで橋渡しの役割を果たすことが期待される。したがって、ヒメツリガネゴケの全ゲノム解析は植物科学の進展に大きな貢献をもたらすと考えられる。しかし、ヒメツリガネゴケは染色体数が $n=27$ 、半数体ゲノムサイズが約400Mbでイネと同程度に大きいことから、現時点では全ゲノムを決定しようというプロジェクトは軌道に乗っていない。

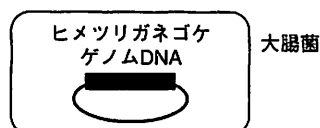
イギリス Leeds 大学とアメリカ Washington 大学共同の EST プロジェクトにより、すでに7,000のESTが公開されている (<http://www.moss.leeds.ac.uk/>) \*1。また、ドイツのフライベルグ大学とドイツの薬品会社がすでに12,000ESTを決定し、順次、遺伝子破壊による遺伝子機能解析を進めている\*2。

1980年代からヒメツリガネゴケのさまざまな突然変異体が解析されてきたが、ゲノムサイズが大きく交配も難しいことから、マップベースで遺伝子を単離

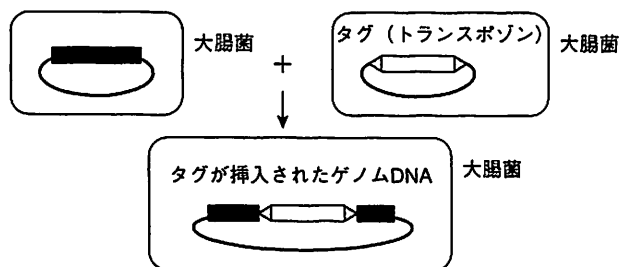
\*1 通常、培地で培養した原糸体と茎葉体、オーキシン処理やサイトカイニン処理をした原糸体から作られた4種類のcDNAライブラリーを用いて、今後数年間で3万のESTが公開される予定である。

\*2 このデータは非公開である。

### ①大腸菌内でのヒメツリガネゴケゲノムDNAライブラリーの作成



### ②大腸菌を用いたヒメツリガネゴケゲノムDNAへのタグ (トランスポゾン) の挿入



### ③タグ挿入ゲノムDNAのヒメツリガネゴケへの導入

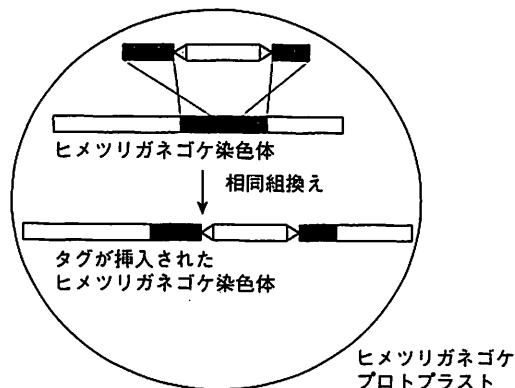


図3 シャトルミュータジェネシス法の概略



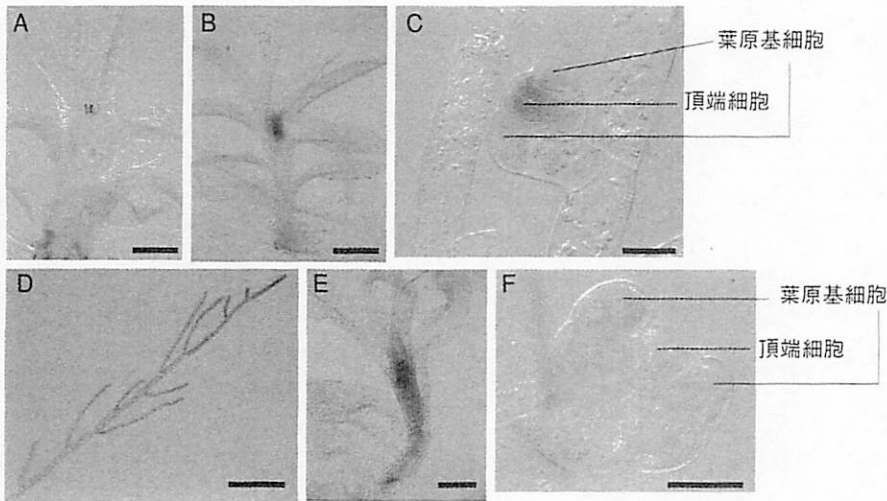


図4 ヒメツリガネゴケジーントラップラインの例  
(口絵参照)

A: 茎葉体頂端付近の腋毛, B: 茎葉体頂端部分, C: 芽の頂端細胞, D: 原糸体頂端側の細胞, E: 茎葉体の茎, F: 芽の葉原基細胞, それぞれGUS活性が認められる. スケールバーはA, Eが $200\ \mu\text{m}$ , Bが $400\ \mu\text{m}$ , C, Fが $20\ \mu\text{m}$ , Dが $100\ \mu\text{m}$ .

することが困難だった. そこで, 筆者らはタグ付き突然変異体ライブラリーを作成した<sup>7)</sup>. ヒメツリガネゴケは, 相同的組換え率が非相同的組換え率の10倍程度ある. したがって, 非相同的組換えによってランダムにタグを挿入するよりも, 相同的組換えを使ってタグを挿入したほうが10倍効率よくタグ付き突然変異体を単離できることになる. そこで, ヒメツリガネゴケと同様に相同組換え率の高い酵母で用いられているシャトルミュータジェネシス法を応用した. この方法は, 以下の3つのステップからなる(図3). ①大腸菌内でヒメツリガネゴケゲノムDNAライブラリーを作成する, ②大腸菌内でヒメツリガネゴケゲノムDNA断片上にタグ(トランスポゾン)を挿入する, ③タグが挿入されたヒメツリガネゴケゲノムDNA断片を, 相同組換えによりヒメツリガネゴケに導入する. タグにレポーター遺伝子をあらかじめ組み込んであるのでジーントラップも兼ねている. これまでに筆者らの研究室で1万ラインのタグ付き変異体が単離され, 300以上のジーントラップラインが得られている(図4)<sup>\*3)</sup>. また, 現在, 全長cDNAライブラリーを作成し, ESTデータに従ってカタログ化し順次過剰発現させ, 変異体ラインを作成するプロジェクトも進行している.

\*3 ジーントラップラインから原因遺伝子を単離するには, レポーター遺伝子の配列に対応するプライマーを用いて5'RACE法を用いなければならない. この方法でいくつかの遺伝子が実際に単離されている. 一方, 特定の表現型を引き起こしている原因遺伝子の特定はこれまで成功していない. これはタグが複数挿入されているためで, 今後, 改善の必要がある.

#### ◆参考文献

- 1) Sedivy, J.M. & Joyner, A.L.: 遺伝子ターゲティング, 化学同人 (1994)
- 2) Schaefer, D. & Zryd, J.-P.: Efficient gene targeting in the moss, *Physcomitrella patens*, Plant J. 11, 1195-1206 (1997)
- 3) Reski, R.: Development, genetics and molecular biology of mosses, Bot. Acta 111, 1-15 (1998)
- 4) McElory, D., Zhang, W., Cao, J. et al.: Isolation of an efficient action promoter for use in rice transformation, Plant Cell 2, 163-171 (1990)
- 5) Aoyama, T. & Chua, N.-H.: A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants, Plant J. 11, 605-612 (1997)
- 6) Doonan, J.H., Cove, D.J. & Lloyd, C.W.: Immunofluorescence microscopy of microtubules in intact cell lineages of the moss, *Physcomitrella patens*, I. Normal and CIPC-treated tip cells, J. Cell Sci. 75, 131-147 (1985)
- 7) Nishiyama, T., Hiwatashi, Y., Sakakibara, K. et al.: Tagged mutagenesis and gene-trap in the moss, *Physcomitrella patens* by shuttle mutagenesis, DNA Res. 7, 1-9 (2000)

長谷部光泰<sup>†</sup>・日渡祐二・西山智明 岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所 種分化機構第2研究部門

<sup>†</sup> E-mail: mhasebe@nibb.ac.jp