

「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」
平成24年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

梅田 正明

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科・教授

DNA 倍加誘導系の確立による高バイオマス植物の創出

§1. 研究実施体制

(1) 梅田グループ

① 研究代表者: 梅田 正明 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、教授)

② 研究項目

- 1) ポプラにおける既知因子の過剰発現または発現抑制による DNA 倍加誘導
- 2) 分解型 CDKB2 の導入によるイネの DNA 倍加誘導
- 3) ポプラで利用できる有効なプロモーターの単離

(2) 伊藤グループ

① 主たる共同研究者: 伊藤 正樹 (名古屋大学大学院生命農学研究科、准教授)

② 研究項目

- 1) イネにおける既知因子の過剰発現または発現抑制によるDNA倍加誘導
- 2) APC標的タンパク質の同定とDNA倍加への応用
- 3) エンドマイトーシス促進因子の同定とDNA倍加への応用
- 4) イネのDNA倍加変異体の単離と利用

§2. 研究実施内容

梅田グループでは、G2/M 期の CDK 活性を低下させて DNA 倍加を誘導するために、各種細胞周期因子の遺伝子操作をイネやポプラで行う。平成 24 年度はそのための準備段階としてポプラの細胞周期因子の探索を行い、それらの遺伝子を単離した。また、シロイヌナズナ等で DNA 倍加を促進することが知られている CCS52 や CDC20 について過剰発現コンストラクトを作成した。これらは平成 24 年度に形質転換系を立ち上げたポプラ T89 系統に導入中である。CDKB や R1R2R3 型 Myb を含む他の遺伝子についても、コンストラクトができ次第、順次ポプラに導入する予定である。一方、シロイヌナズナにおいて DNA 倍加時にタンパク質分解を受ける CDKB2 に関しては、イネの CDKB2 を GUS に繋いでシロイヌナズナに、またシロイヌナズナの CDKB2 を GUS に繋いでイネに導入した。今後 GUS 発現を調べることで、CDKB2 の配列中にタンパク質分解性を制御する配列があるのか、あるいはタンパク質分解系がイネとシロイヌナズナで異なるため DNA 倍加能に差が現れるのかを明らかにする。これらの研究を通して、イネやポプラで有効な DNA 倍加誘導ツールを絞り込む予定である。さらに、エンドリプリケーションの誘導に有効なポプラのプロモーターを単離するため、DNA 倍加の誘導遺伝子の発現制御に関わる転写因子 E2F/DEL をポプラで探索し、クローン化した。今後、その標的遺伝子の単離解析を進めていき、DNA 倍加の誘導に適したプロモーターの取得を目指す。

伊藤グループでは、APC 活性を操作して DNA 倍加の誘導を図る目的で、APC 活性化因子のイネ cDNA を取得し、これらを用いて過剰発現および発現抑制用のコンストラクトを作成した。APC 抑制因子についてはトランスポゾン挿入変異体をリソースから取得したので、これについて解析を進める予定である。また、エンドマイトーシスを抑制する GIG1 を利用し、その過剰発現により蓄積量が増大するタンパク質を APC の基質として同定することを試みている。平成 24 年度は質量分析を用いた iTRAQ 解析を行ったが、APC の基質であることが知られているサイクリンなどのタンパク質が検出されなかったため、今後は実験系をさらに検討する予定である。一方、*gig1* 変異体に見られるエンドマイトーシスを促進する遺伝子を同定するため、シロイヌナズナ由来の cDNA ライブラリーを *gig1* 変異体に導入し、スクリーニングに用いる T1 種子プールの準備を完成させた。すでにスクリーニングを進めており、興味深い過剰発現体も数株得られているので、今後得られた株に導入された cDNA を順次同定していく予定である。また、DNA 倍加を異所的に引き起こすイネ変異体を単離するため、平成 24 年度は二系統の変異種子プールを取得した。今後、これらを利用したスクリーニングを進める予定である。

以上のように、平成 24 年度は主に遺伝子や植物材料の準備を開始し、概ね順調に進めることができたと考えている。平成 25 年度も植物材料の準備を進めるとともに、ポプラ形質転換体やイネ変異体の解析、および DNA 倍加に適した遺伝子ツールの絞り込みを順次行っていく。