

イネにおけるヒストンアセチル化酵素OsGCN5を介した窒素によるRubisco遺伝子の発現制御

Shicheng Feng¹⁾, Fumiya Miyamoto¹⁾, Xiru Yuan¹⁾, Kazuyuki Saitou²⁾

1) Graduate School of Bioresource and Bioenvironment Sciences, Kyushu University, 744 Motooka Nishi-ku, Fukuoka city, 819-0395, Japan

2) Faculty of Agriculture (Graduate school), Kyushu University, 744 Motooka Nishi-ku, Fukuoka city, 819-0395, Japan

1 導入

窒素肥料は植物の産量や農産品の品質を上昇させ、光合成などの様々な生理活動を制御する効果があり、植物の生長にとってはとても重要です。窒素濃度が低くすると、光合成で植物体必要分のエネルギーを提供できません。窒素の低利用率は長い間で改善目標となっています。そのため、低窒素環境でも光合成効率を維持できる方法を探したいです。

Rubiscoはカルビン回路で二酸化炭素の固定と光呼吸の触媒で、光合成を律速しています。イネのゲノムで同定された5つのRubisco小サブユニット(RBCS)遺伝子は、OsRBCS1,2,3,4および5と呼ばれています。イネではOsRBCS1転写産物は検出されませんでした。この研究では、GNATタイプのヒストンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子GCN5とRBCS遺伝子の発現量の相関関係を調べました。

2 材料と方法

イネ (*Oryza sativa* L, cv. Nipponbare):

1. 野生型WT
2. 35SプロモーターによるGCN5過剰発現体(35S-GCN5)
3. UBILプロモーターによるGCN5過剰発現体(UBIL-GCN5)
4. RNAiによる発現抑制体(RNAi-GCN5)

以上の形質転換体系統はすべてアグロバクテリウム法で作成した。形質転換体は室温25°C、湿度70%の実験室で栽培した。

ゲノムDNA抽出

ゲノムDNAはPlant DNA Isolation Reagent(Takara)キットで抽出した。

mRNAの抽出と逆転写

mRNAはNucleoSpin® RNA Plant (MACHEREY-NAGEL)で抽出した。ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)で逆転写した。

リアルタイムPCR

Green® Premix DimerEraser™ (Perfect Real Time)(TaKaRa)でリアルタイムPCRした。Actin1はコントロール遺伝子として使用した。

4 今後の展望

①RNAi-GCN5のノックダウンの効果は弱いと考慮し、CRISPR-Cas9システムでゲノム編集し、GCN5遺伝子をノックアウトする系統を作る。

②今までの実験はOsGCN5とOsRBCS2及びOsRBCS3の相関関係がわかった。しかしそのRBCS遺伝子の発現量上昇の原因はGCN5のヒストンアセチル作用なのかはいまだにまだわかっていない。今後の実験はChIP法(クロマチン免疫沈降法)でGCN5がOsRBCS2及びOsRBCS3のヒストンのアセチル化し、転写を増やすことを検証する予定。

3 結果

表1. T0世代Hygromycin耐性遺伝子のコピー数 表2. T1世代Hygromycin耐性遺伝子のコピー数

Transformant	Hyg/OsActin1	Copy Number
RNAi-GCN5-7	4.603	1.0
RNAi-GCN5-11	7.766	1.7
RNAi-GCN5-12	6.79	1.5
RNAi-GCN5-14	7.902	1.7
RNAi-GCN5-15	5.077	1.1
35S-GCN5-6	8.839	2.3

Transformant	Hyg/OsActin1	Copy Number
35S-GCN5-6	12.074	2.3
35S-GCN5-6-1	25.407	4.8
RNAi-GCN5-11	5.889	1.7
RNAi-GCN5-11-1	10.695	3.1
RNAi-GCN5-11-2	15.251	4.4
RNAi-GCN5-15	9.09	1.1
RNAi-GCN5-15-3	14.666	1.8

アグロバクテリウム法でT0世代を得られた。Hygromycin耐性遺伝子をマーカー遺伝子としてコピー数を調査した。

T1世代とT0世代のコピー数を比べて、T1世代はその親より2倍のコピー数が出した個体をホモ個体とする。

6系統のコピー数が低いT0世代個体を選んだ。4つのT1世代のホモ系統を得られた。

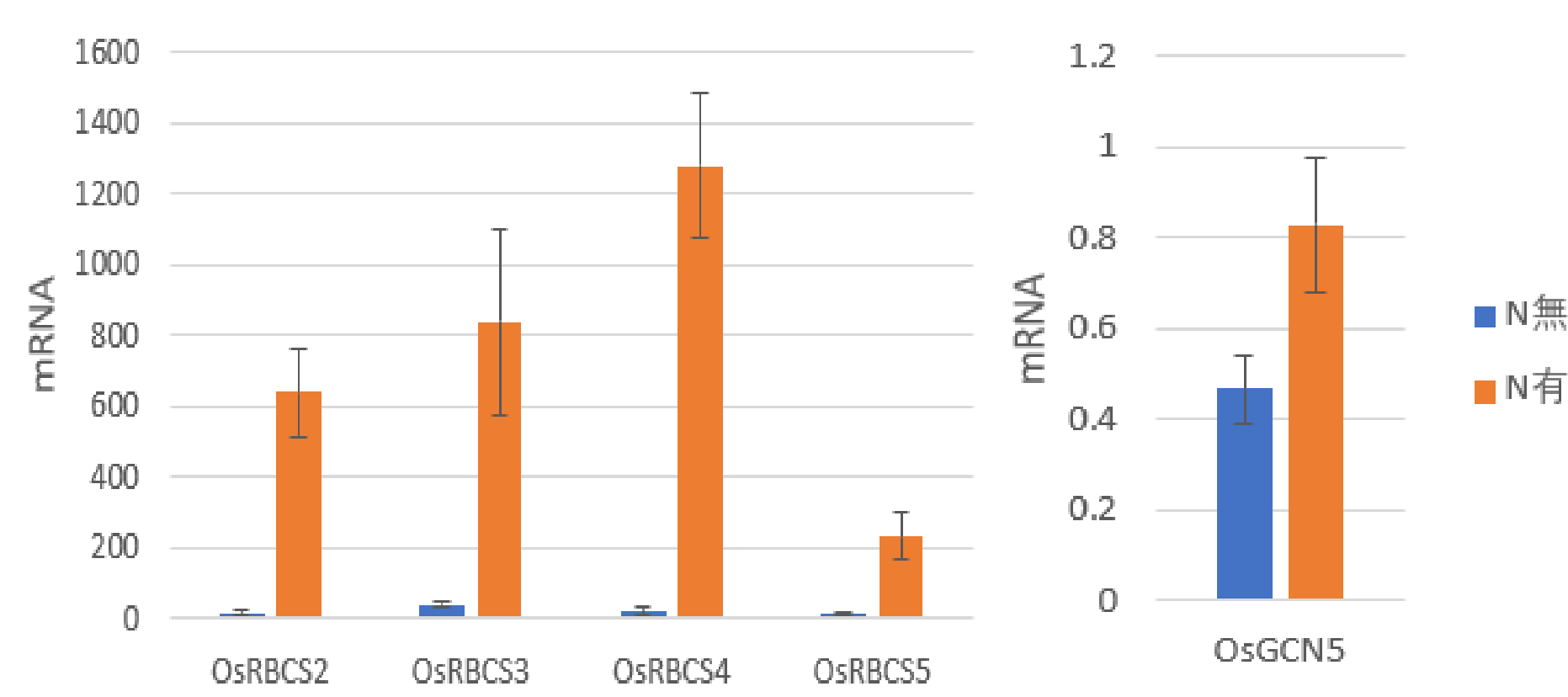


図3. 窒素によるOsGCN5とRBCSの発現量変化

窒素濃度が増加すると、OsGCN5の発現量が増加した。

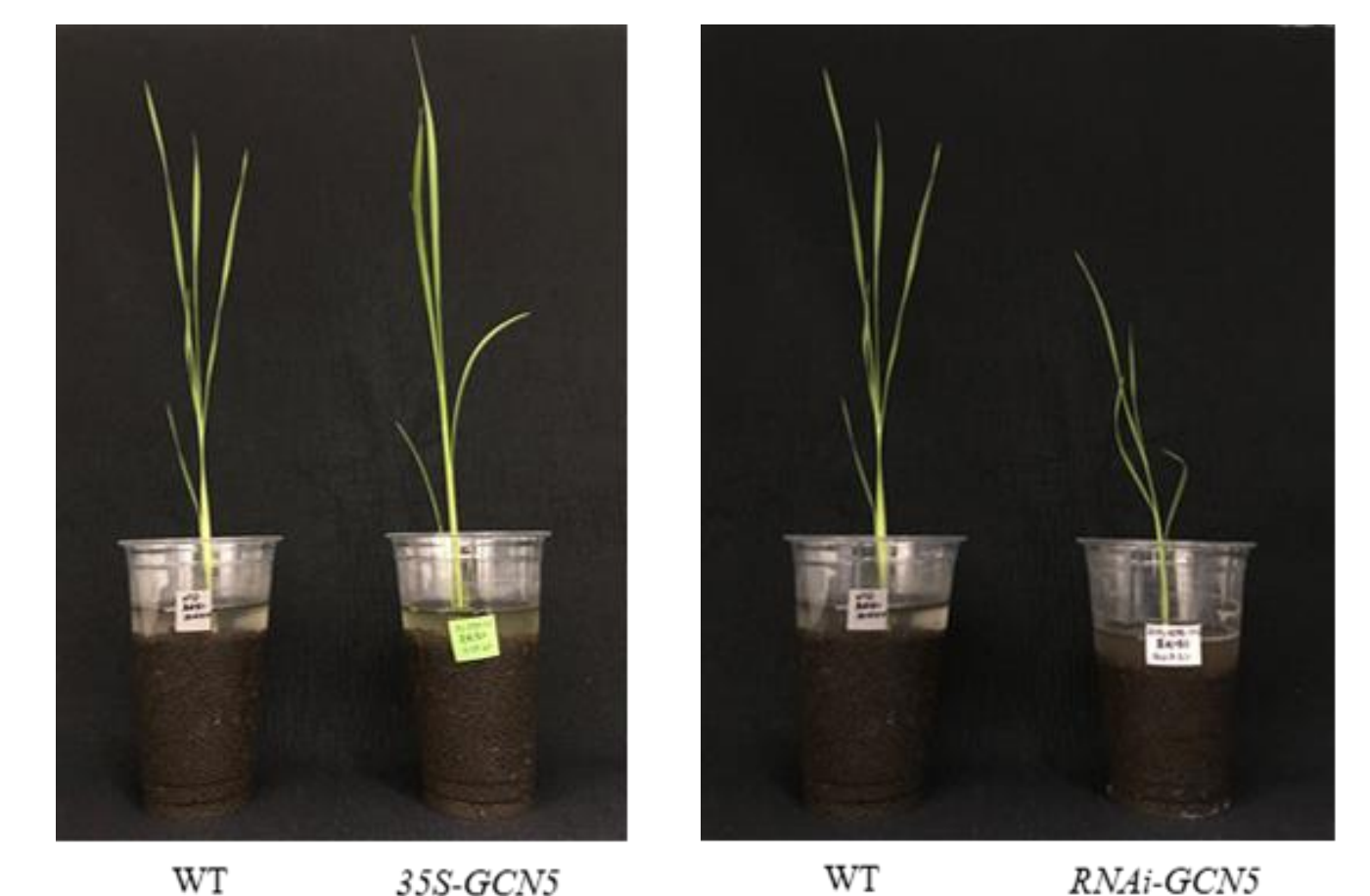


図4. 3週間後のWTと形質転換体の表現型

35S-GCN5はWTと同じぐらいの表現型を表れた。RNAi-GCN5はWTより背丈が低かった。それはGCN5がRubiscoの転写の制御を示唆した。

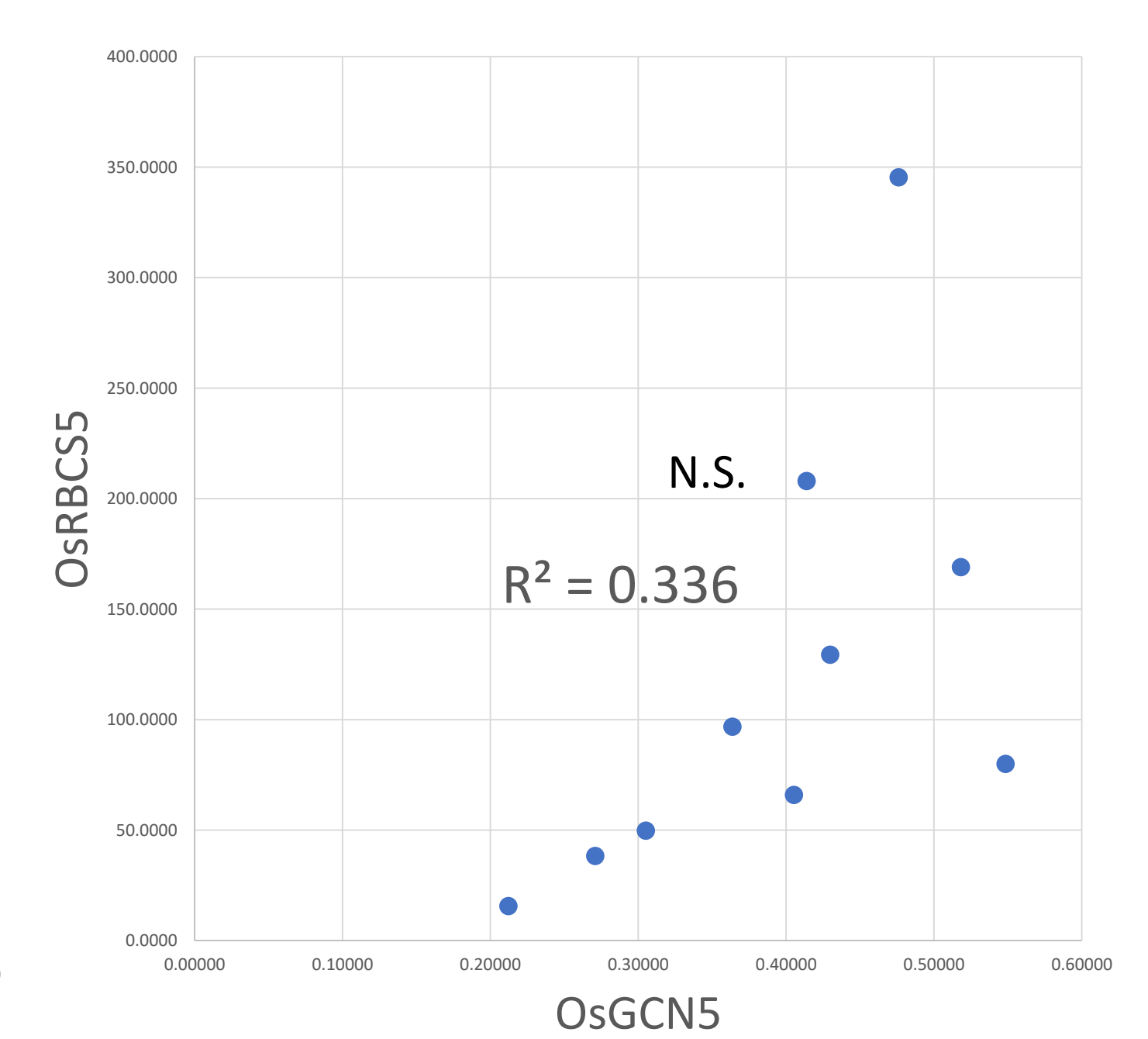
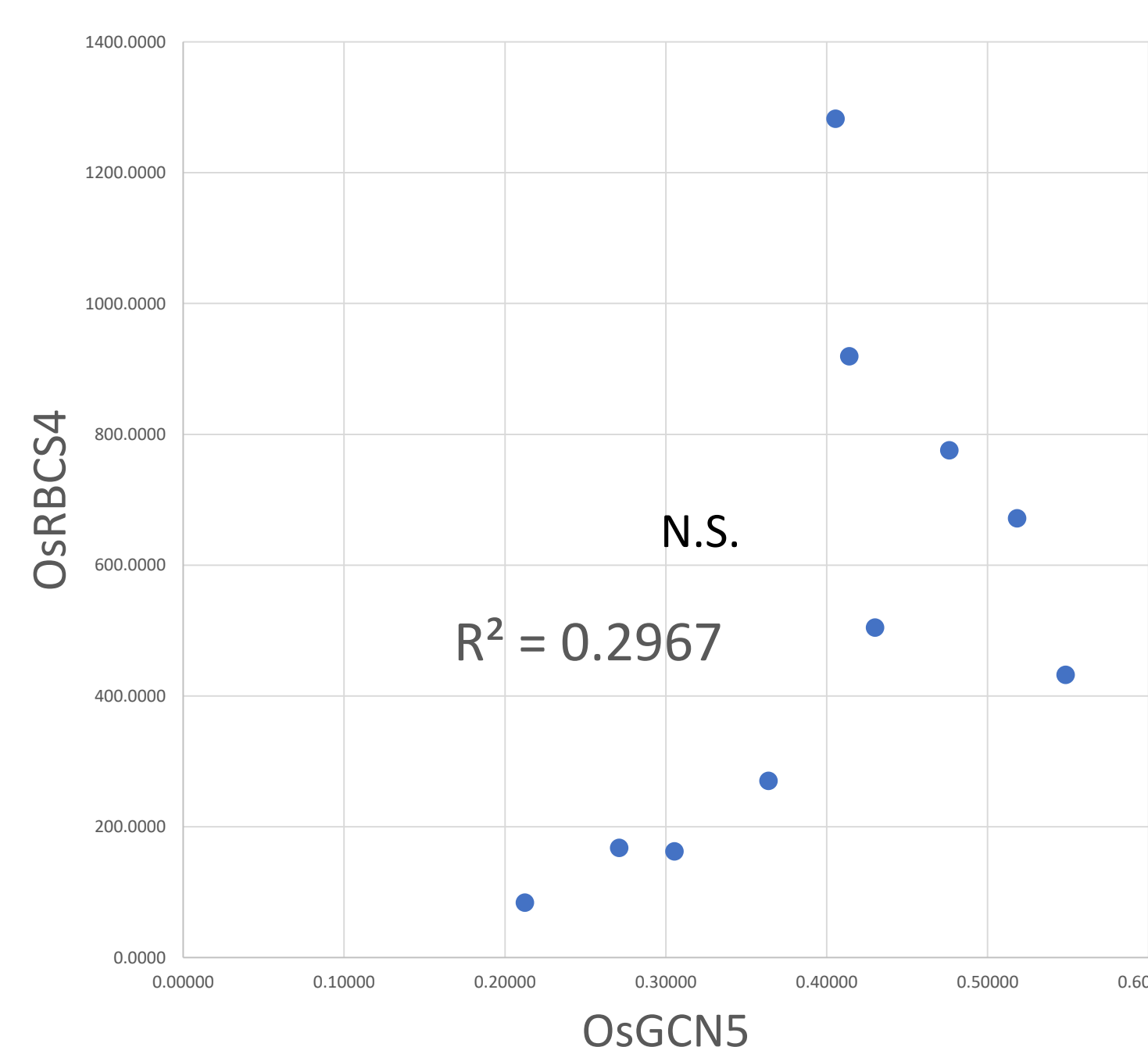
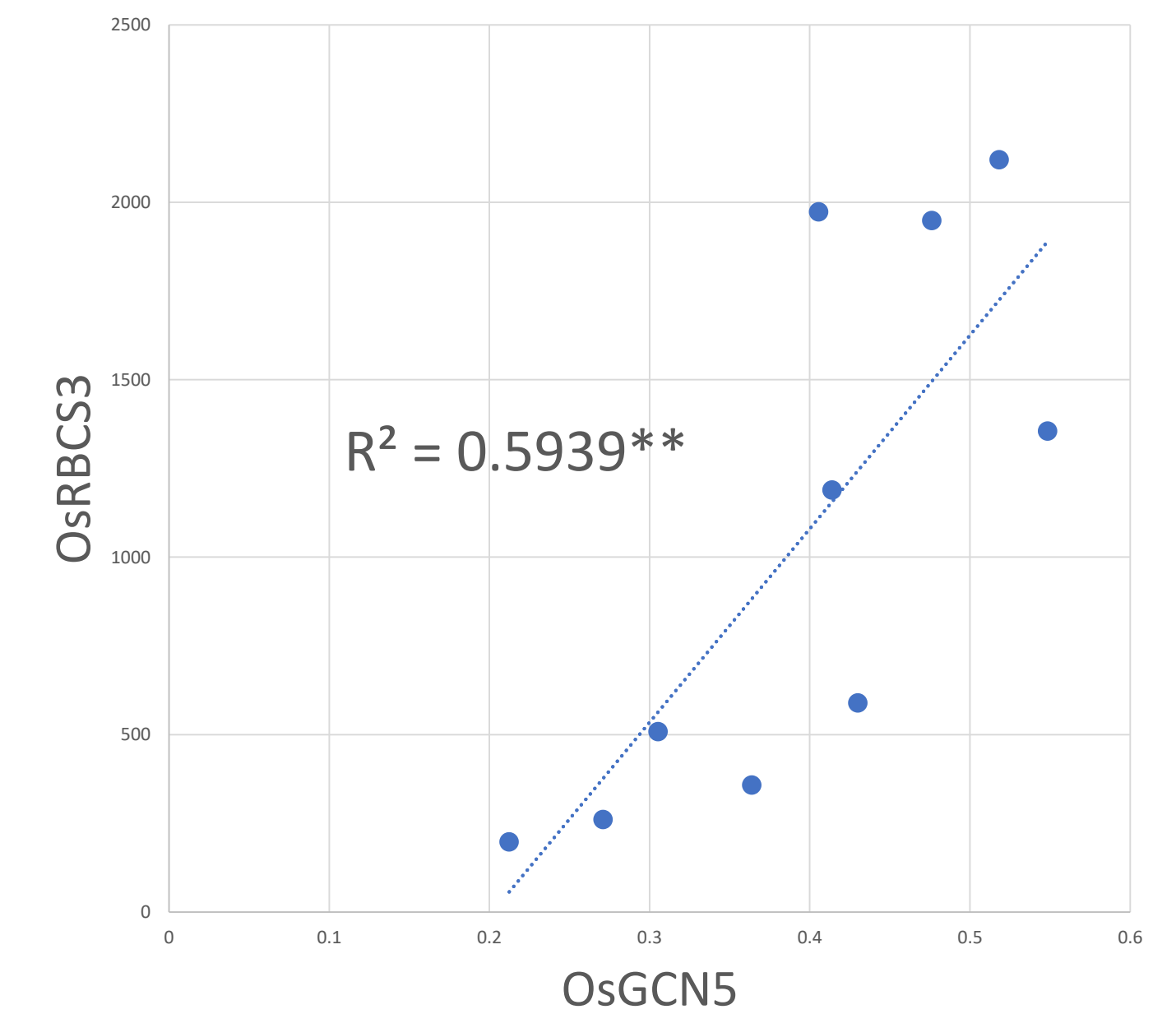
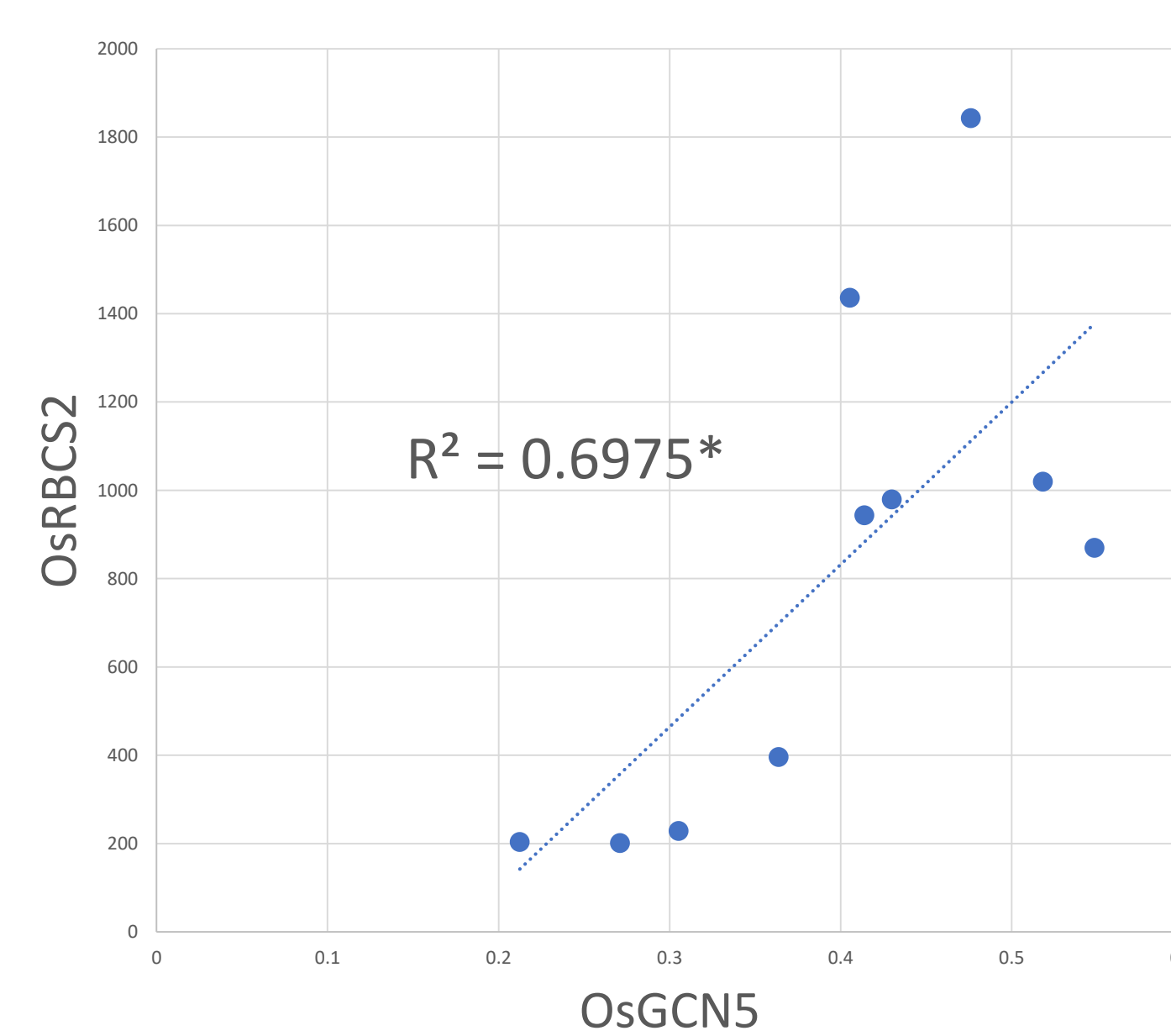


図5. OsGCN5とRubisco各サブユニット遺伝子の相関関係

OsGCN5はOsRBCS2とOsRBCS3が正の相関を観察した。その中OsRBCS3との強い相関を表れた。OsRBCS4とOsRBCS5の相関を見られなかった。