

タバコレトロトランスポゾン *Tto1* 発現に及ぼすキュウリモザイクウイルス 2b タンパク質の影響

植物育種科学講座 細胞工学分野
佐藤純子

【背景と目的】

植物ゲノムの主要な構成要素の1つであるトランスポズンは、転移による遺伝子破壊回避の為に通常はシトシンのメチル化を介したエピジェネティックなサイレンシングをうけている。しかしいくつかのトランスポズンはストレス条件下において活性化される。ウイルスベクターを用いた外来性遺伝子のプロモーター配列をターゲットにした TGS の誘導と比較して、内在性遺伝子のプロモーター配列をターゲットにした TGS の誘導は難しいとされている。そこで、メチル化による制御をうけているトランスポズンでは、DNA のメチル化誘導が容易ではないかと考え、キュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 改変ベクターを用いて、タバコ BY2 培養細胞で活性化されているタバコレトロトランスポゾン *Tto1* のプロモーター配列をターゲットに TGS の誘導を目的とした。

【結果及び考察】

ウイルスベクターは CMV RNA2 を改変した A1、H1 ベクターを用いた。A1 ベクターは 2b タンパク質の ORF 領域を 3 分の 1 程度削りクローニングサイトが設けられている。H1 ベクターは 2b タンパク質の ORF 領域をすべて削りクローニングサイトが設けられている。*Nicotiana tabacum* のレトロトランスポゾン *Tto1* のプロモーター配列の一部を CMV ベクターに挿入したコンストラクト A1:*Tto1*pro、H1:*Tto1*pro を作成し、BY2 プロトプラストに接種した結果、A1:*Tto1*pro 接種個体において、*Tto1* の発現量が上昇した。また、H1:*Tto1*pro 接種個体では、発現量にほとんど変化はみられなかった。また、A1 空ベクター接種個体でも *Tto1* の発現量は上昇したが、A1:*Tto1*pro 接種個体のほうが発現量の上昇が大きかった。また、接種後の培養時間を長くしても発現量の上昇パターンに変化はなかった。これらの事から、2b タンパク質の存在により *Tto1* の発現が上昇することが示唆された。

タバコ BY2 培養細胞の野生株 (WT) と CMV の 2b タンパク質を発現する形質転換細胞を用いて解析した。Real-time RT-PCR とノーザンハイブリダイゼーションにより *Tto1*、2b の mRNA 蓄積量を調べた。その結果 *Tto1* と 2b の転写量に相関関係があり、2b の転写量が高いほど *Tto1* の転写量も高くなることが示された。また、bisulfite sequence 法により *Tto1* のメチル化解析を行った結果、WT と 2b 発現形質転換細胞との間でメチル化頻度に明確な差は認められなかった。つまり、メチル化頻度に変化がなくても転写量が増加していたことが示された。さらに、トランスポズンは転写と転移に相関関係がある為、サザンハイブリダイゼーションにより *Tto1* のコピー数の変化を調べたところ、WT と 2b 発現体との間でほとんどコピー数に差が無いことが示された。

以上の結果から、2b タンパク質はタバコ BY2 培養細胞において *Tto1* のメチル化頻度を変化させることなく転写量を増加させ、また *Tto1* の転移を阻害している可能性が示唆された。今後、植物体においても同様の事が観察されるのかを検証予定である。