

令和元年6月26日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07560

研究課題名(和文) 分子遺伝情報の育種活用を目指したマーカーフリーの迅速遺伝子編集法

研究課題名(英文) Development of a rice gene targeting with autonomous self-marker free system as a new breeding technique

研究代表者

寺田 理枝 (Terada, Rie)

名城大学・農学部・教授

研究者番号：30137799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子ターゲティング改変に連続してポジティブ選抜マーカーを改変配列から自律的に削除し、1回の形質転換で不要な人工配列を持たずに標的遺伝子改変のみを導入したイネ系統を作出する迅速育種法を確立した。イネ植物免疫で働くOsRacGEF1の疑似リン酸化(S549D)により耐病性の向上が見出されているため、Ac/Ds脱離配列内に選抜マーカーを持つベクターでOsRacGEF1-S549Dのターゲティング改変を行い、連続して選抜マーカー等の削除誘導を行い、再分化イネの次世代でOsRacGEF1-S549Dホモ型変異以外は野生型ゲノムのイネ系統を獲得し、いもち病と紋枯病への耐性強化を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネ遺伝子ターゲティング法は標的遺伝子のみを自在に改変でき既に30以上の遺伝子改変に成功した。ターゲティング遺伝子改変とAc/Dsによる自律的選抜マーカー削除による迅速育種法では、ポジティブ選抜マーカーの削除によって複数遺伝子のターゲティング改変が可能で、分子遺伝子学の最新知見を活用した複数の遺伝子編集によるゲノムデザインが可能であり、圃場展開も視野に入れた信頼性の高い実用化イネを1年弱の短期間に作り出す迅速次世代育種法として利用促進が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have developed a gene targeting (GT) system with an autonomous self-marker free as a new breeding technique. In this system the positive selection marker of homologous recombination (HR) mediated GT is placed in maize DNA transposon, Ac/Ds and by induction of Ac expression just after GT the positive selection marker is eliminated from targeted gene locus. Since pseud-phosphorylation of OsRacGEF1 was found increase the resistance to blast fungus, we modified OsRacGEF1-S549D by GT and subsequently the positive selection marker was eliminated by Ac activation. TG rice lines of OsRacGEF1-S549D homozygote without any artificial marker sequences were obtained, which revealed increased resistance to both of blast fungus and sheath blight disease.

研究分野：遺伝育種学

キーワード：ゲノム編集 ターゲティング イネ トランスポゾン OsRacGEF1 耐病性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の急速な人口増加・気候変動・物流グローバル化など農業を取り巻く状況が変動する中で、食糧自給力向上の技術開発が緊急の課題となっている。これまで遺伝子組換え作物(GMO)が用いられたが、安全性を求めてCRISPR/Cas9等人工制限酵素による標的遺伝子破壊を行うゲノム編集技術が急速に普及している。しかし、CRISPR/Cas9でも予想外の二重鎖切断(Off-targeting)やゲノム再編成も伴い、さらなる改良も求められている。また実用育種に向けて、複数変異や遺伝子削除等の組み合わせも重要なため、社会に受け入れられ易く、かつ遺伝子を自在に改変できる「遺伝子デザイン育種」の開発が必要と考えられる。

申請者らはイネを用いて、高等植物では不可能と考えられていた相同組換え遺伝子ターゲティング法を確立した()。本法は標的遺伝子やゲノム配列を自在に改変でき「遺伝子デザイン育種」の基盤となりうる()。これまでに遺伝子の機能解析を目的としたノックアウトやノックイン改変、レポーター遺伝子融合()、さらにはターゲティング改変配列に対してCre-*loxP*部位特異的組換えを利用して育種には不要となるポジティブ選抜マーカ等の配列を削除した遺伝子編集も行い()一度破壊した遺伝子を復活させるON/OFF切り替えにも成功した()。ターゲティング効率についても開発当初の10~16倍に改良し、既に30以上のイネ遺伝子の様々な改変を達成し、本法が高精度かつ汎用性の高い遺伝子編集方法であることを示してきた。

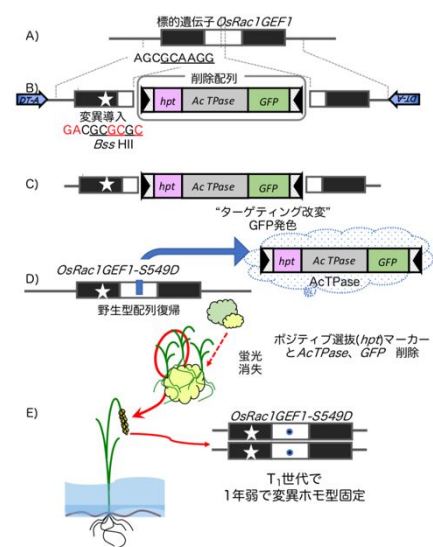
2. 研究の目的

社会に受け入れられ易い「新規組換え育種技術の開発と推進」を目指し、イネ遺伝子ターゲティング法の技術革新を進め、ターゲティング相同組換えで編集配列内に残されたポジティブ選抜マーカ等の削除改変法を開発した。選抜マーカ等はCre-*loxP*部位特異的組換え遺伝子を利用して削除できるが、Creの交配または再導入の必要があり、時間と手間がかかり、さらに脱分化によるゲノムの不安定化等、負の要因も伴う。本課題ではトウモロコシ由来DNA型トランスポゾン*Ac/Ds*の転移配列内部にポジティブ選抜マーカ等を加えたターゲティングベクターを構築し、相同組換えにより標的遺伝子の塩基配列編集を行った後に、プロモーター活性化誘導によって*Ac*トランスポゼースを発現させ、ポジティブ選抜マーカ等の自律的削除を行い、1回の形質転換で不要な人工的配列を全く含むこと無く、標的遺伝子の配列改変のみを残すことで遺伝子の機能改良等を行い、T₁世代で機能改良遺伝子をホモ型に固定し、1年弱という短期間で遺伝子編集による有用イネを作出する迅速育種法の開発を目的とした(図1)。標的遺伝子として、イネの植物免疫の分子機能解析が進んでいる()耐病性制御遺伝子*OsRacGEF1*に対してS549Dのアミノ酸置換による疑似リン酸化の改変を行って、耐病性反応を強化したイネの作出と耐病性等の解析を目指した。

3. 研究の方法

ターゲティングベクターの相同組換え配列の中央に、トランスポゾン*Ac/Ds*の脱離誘導配列に隣接したポジティブ選抜マーカ等を組み込んで、ターゲティング相同組換えが完了した直後に

図1. ターゲティングによるゲノム編集システム



継続してポジティブ選抜マーカーを削除し、ターゲティング変異配列のみを持つカルスから再分化イネを獲得する技術の確立を進めた。

(1) トウモロコシ由来のトランスポゾン *Ac/Ds* の脱離誘導を確認するため、*35S* プロモーターと *GUS* コード領域の間に *Ds* 脱離配列を挿入した検出ベクターと、イネに最適化したコドンによる *Ac* トランスポゼース遺伝子の合成を行った。次いで *Ac* トランスポゼース遺伝子にカルス再分化期の緑化組織で活性化誘導される *pLP2* プロモーターまたは高温処理で発現誘導できるヒートショック (*pHS*) プロモーターを連結した。これらの活性化誘導プロモーター制御下の *Ac* 遺伝子による *Ds* 配列の脱離効果を調べるため、イネカルスに検出ベクターと各プロモーターで発現誘導される *Ac* 遺伝子を導入した二重形質転換カルスを作成し、カルス再分化処理による緑化誘導、およびカルス 42 熱処理によるプロモーター活性化を行い、検出ベクターにおける *Ds* 脱離を介した *35S* プロモーター-*GUS* 遺伝子の発現解析を行い *Ds* 配列の脱離効率を調べた。

(2) 耐病性の標的遺伝子 *OsRacGEF1* の *S549D* (*AGC* から *GAC*) 配列改変を相同組換えで誘導するターゲティングベクターの構築を進め、*Ds* 脱離配列内部にポジティブ選抜マーカーと活性化誘導プロモーター制御下の *Ac* 遺伝子を組み込んだ。さらに *35S* プロモーター制御下の *GFP* 可視化遺伝子も組み込み、*OsRacGEF1-S549D* ターゲティング配列のポジティブ選抜マーカー削除を *GFP* 蛍光で追跡するシステムも組み込んだ。また *OsRacGEF1-S549D* 改変配列の *CAPS* 解析に向けて *S549D* 塩基置換 (*AGC* から *GAC*) の直下に *Bss* *HII* の認識配列 (*AGCGCAAGG* から *GACGCGCGC*) も組み込んだ。

(3) 上記のベクターをイネカルスに導入して、*Ac* 遺伝子を効果的に発現誘導出来るシステムを構築した上で、*OsRacGEF1-S549D* ターゲティングによる改変とトランスポゾン *Ac/Ds* の脱離を介したポジティブ選抜マーカー削除を行い、その後ポジティブ選抜マーカー削除カルスを *GFP* 蛍光の有無により選抜して再分化イネを作出し、分離次世代の *OsRacGEF1-S549D* 変異型ホモ型及び分離野生型ホモのイネの葉を用いて、いもち病および紋枯病の接種試験を行うことを計画した。

4. 研究成果

(1) *35S* プロモーターと *GUS* コード領域の間に *Ds* 脱離配列を挿入した検出ベクターを用いて、*pHS* または *pLP2* プロモーターの制御下で、イネに最適化したコドンを用いた *Ac* 遺伝子による *Ds* 脱離の効率を確認するために、検出ベクターと活性化誘導型プロモーター制御下 *Ac* 遺伝子の二重形質転換カルス系統を作出した。これらの二重形質転換カルスの再分化緑化誘導、及び 42 熱処理を 40, 60, 90 分間行うことで、プロモーター活性化誘導を行い、*Ds* 脱離によって *35S* プロモーターによる *GUS* の発現解析を行った。二重形質転換カルスでは、検出ベクターと発現誘導プロモーター制御下 *Ac* 遺伝子がランダム導入されるため、イネカルスでの *GUS* 発現にはかなりのバラツキが含まれたが、ヒートショック *pHS* プロモーター制御下 *Ac* 遺伝子を 42 処理することで、検出ベクターの *Ds* 脱離頻度が高いことが明らかとなった。

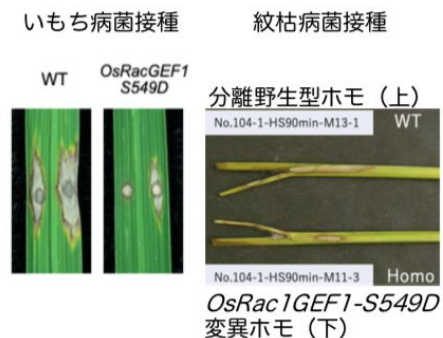
(2) この実験結果に基づき、*OsRacGEF1-S549D* 改変ターゲティングベクターのポジティブ選抜マーカーを *pHS* プロモーター制御下 *Ac* 遺伝子及び *35Sp-GFP* 蛍光遺伝子の配列と共に *Ds* 脱離配列内部に組み込んだターゲティングベクターを構築した (図 1, B)。

OsRacGEF1-S549D 改変ターゲティングベクターを用いて形質転換を2回繰り返した結果、全ての *OsRacGEF1-S549D* 改変された合計8系統のカルス系統を得た。次いで、*OsRacGEF1-S549D* 改変カルの *Ac/Ds* 脱離による選抜マーカー削除を誘導するために、42 度の熱処理を40分、60分、90分間行い、カルス増殖の観察を続けた。処理後2~3週間培養したカルス全系統で、GFP蛍光を消失し *Ds* 脱離を介した選抜マーカー削除が予測されるカルス系統の獲得に成功した。これらのカルス DNA の PCR により選抜マーカーの削除を確認すると共に、シーケンス解析により *S549D* 改変およびマーカー削除による *Ac/Ds* 脱離の痕跡配列も確認した。また、*S549D* 改変は、当該領域の PCR 産物を *Bss* HII 制限酵素で切断する CAPS 解析によっても確認した。

(3) *Ds* 脱離によって選抜マーカー等不要配列を削除した全てのカルス系統で、選抜マーカーが導入された状態のカルスと比較し、細胞増殖及び再分化の発根頻度の低下が観察された。この原因として選抜マーカー等不要配列を削除した *OsRacGEF1-S549D* 改変遺伝子が発現して *OsRacGEF1-S549D* 変異タンパク質が作られ、カルス細胞の植物ホルモンや免疫タンパク質群のバランスの変化が起きた可能性が示唆される。再分化における発根頻度の低下は見られたが、合計で3系統のイネ再分化に成功した。再分化イネでは矮化及び不稔の併発が観察された。この原因としても *OsRacGEF1-S549D* 変異タンパク質、および *Ds* 脱離による選抜マーカー削除のために変異カルスを42 度熱処理したことの影響が考えられた。

(4) 最初の形質転換実験で2系統の稔性を持つ再分化イネが得られたので、T1 分離世代で *OsRacGEF1-S549D* 変異ホモ型と分離野生型ホモを育成し、変異ホモ型イネについては根における GFP 蛍光の消失、葉 DNA の PCR による選抜マーカーの削除、シーケンス解析による *S549D* 改変および *Ac/Ds* 脱離マーカー削除の痕跡配列を確認した。さらに「いもち病」「紋枯れ病」菌糸をイネの葉に接種し耐性の耐病性検定を行った結果、「いもち病」「紋枯れ病」両方の接種試験で、*OsRacGEF1-S549D* 変異ホモ型は分離野生型と比較して、病原菌の病斑長を有意に抑制することが明らかとなった(図2)。

図2. *OsRac1GEF1-S549D* ホモ型変異イネの耐病性検定



<引用文献>

Terada R, Urawa H, Inagaki Y, Tsugane K, Iida S. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. (2002) *Nat Biotechnol.* 20: 1030-1034.
 Shimatani Z, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Toki S, Terada R. Positive-negative-selection-mediated gene targeting in rice. (2014) *Front Plant Sci.* 5: 748.
 Yamauchi T, Moritoh S, Johzuka-Hisatomi Y, Fukada-Tanaka S, Terada R, Nakamura I, Iida S. Homologous recombination-mediated knock-in targeting of the *MET1a* gene for a maintenance DNA methyltransferase reproducibly reveals dosage-dependent spatiotemporal gene expression in rice. (2009) *The Plant Journal* 60: 386-396.
 Tamaki S, Tsuji H, Matsumoto A, Fujita A, Shimatani Z, Terada R, Sakamoto T, Kurata T, Shimamoto K. FT-like proteins induce transposon silencing in the shoot apex during floral induction in rice. (2015) *Proc Natl Acad Sci USA.* 112: E901-910.

Dang TT, Shimatani Z, Kawano Y, Terada R, Shimamoto K. Gene editing a constitutively active *OsRac1* by homologous recombination based gene targeting induces immune responses in rice. (2013) *Plant Cell Physiol.* 54: 2058-2070.
Terada R, Nagahara M, Furukawa K, Shimamoto M, Yamaguchi K, Iida S. Cre-*loxP* mediated marker elimination and gene reactivation at the *waxy* locus created in a rice genome based on strong positive-negative selection. (2010)*Plant Biotech.* 27: 29-38.
Akamatsu A, Wong HL, Fujiwara M, Okuda J, Nishide K, Uno K, Imai K, Umemura K, Kawasaki T, Kawano Y, Shimamoto K. An OsCEBiP/OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 module is an essential early component of chitin-induced rice immunity. (2013) *Cell Host & Microbe*13: 465-476.

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計4件)

Terada R and Shimatani Z (2019) Rice Gene Targeting by Homologous Recombination with a Positive-Negative Selection Strategy. *Methods in Molecular Biology* 査読有 in press

Shimatani Z, Fujikura U, Ishii H, Matsui Y, Suzuki M, Ueke Y, Taoka K, Terada R, Nishida K and Kondo A. (2018) Inheritance of co-edited genes by CRISPR-based targeted nucleotide substitutions in rice. *Plant Physiology and Biochemistry* 査読有 131 : 78-83 DOI : org/10.1016/j.plaphy.2018.04.028

Shimatani Z, Fujikura U, Ishii H, Terada R, Nishida K and Kondo A (2018) Herbicide tolerance-assisted multiplex targeted nucleotide substitution in rice. *Data in Brief* 査読有 20 : 1325-1331 DOI : org/10.1016/j.plaphy.2018.04.028

島谷 善平, 小川 真奈, 幸地 健斗, 木下 雅仁, 寺田 理枝 誘導型プロモーターによるイネカルスでの Cre-*loxP* 組換え制御- イネの自律的マーカー削除遺伝子ターゲティング法の確立を目指して - (2016) 名城大学紀要 査読無 No.21 : 17-20

〔学会発表〕(計4件)

吉田英樹, 島谷善平, 鈴木寿法, 寺田理枝, 上口(田中)美弥子, 松岡信, 辻寛之 (2019) イネ bZIP 型転写因子によるブラシノステロイド関連遺伝子発現制御の解析. 第60回日本植物生理学会年会(名古屋) 2019年3月13日

松井祐介, 島谷善平, 寺田理枝 (2019) イネ遺伝子ターゲティングに基づく人工配列を残さない標的配列の精密ゲノム編集. 第60回日本植物生理学会年会(名古屋) 2019年3月13日

田岡健一郎, 島谷善平, 小川真奈, 齋藤洋美, 池田洋一, 赤司裕子, 山口公志, 寺田理枝, 川崎努, 辻寛之 (2019) 高感度な発光レポーター NanoLuc の植物細胞での利用. 第60回日本植物生理学会年会(名古屋) 2019年3月14日

肥後あすか, 才原徳子, 三浦史仁, 東陽子, 山田恵美, 玉置祥二郎, 伊藤佑, 樽谷芳明, 坂本智昭, 藤原正幸, 倉田哲也, 深尾陽一郎, 森藤暁, 寺田理枝, 伊藤隆司, 角谷徹仁, 島本功, 辻寛之 (2018) イネ茎頂分裂組織の DNA メチル化パターンの動態と制御機構の解析. 第59回日本植物生理学会年会

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：植物細胞のゲノム編集用核酸及びその用途
発明者：島谷善平，寺田理枝
権利者：国立大学法人神戸大学，学校法人名城大学
種類：特許出願

番号：C12N 15/00 A01H 1/00
出願年：2019 年
国内外の別：国内

取得状況（計 1 件）

名称：植物体に用いる組換えベクター及びその利用
発明者：寺田理枝，島谷善平
権利者：学校法人名城大学
種類：特許

番号：第 6374176 号
取得年：2018 年
国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：島谷 善平
ローマ字氏名：SHIMATANI, zenpei
研究協力者氏名：河野 洋治
ローマ字氏名：KAWANO, yoji
研究協力者氏名：荒川 征夫
ローマ字氏名：ARAKAWA, masao

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。