

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18380008

研究課題名 (和文) イネの機能ゲノム学を推進する高機能ターゲティング

研究課題名 (英文) High performance gene targeting for functional genomics in rice.

研究代表者

寺田 理枝 (TERADA RIE)

基礎生物学研究所・分子遺伝学研究部門・助教

研究者番号：30137799

研究成果の概要：イネの遺伝子ターゲティング法を機能ゲノム学を推進する上で有効な技術として進展させることを目指して、ターゲット改変した内在遺伝子の機能を OFF から ON の状態に復帰させる、遺伝子スイッチのシステム化を、これまで遺伝子の破壊を行ってきた *Waxy* とアルコール脱水素酵素遺伝子 (*Alcohol dehydrogenase*) *Adh 1* と *Adh 2* について行い、*Waxy* と *Adh 2* については ON の状態に復帰していることを分子レベルで確認した。また、ターゲティング法の高効率化を実現した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：イネ・遺伝子ターゲティング・相同組換え・*Adh*・*Cre/loxP*・アグロバクテリウム・遺伝子スイッチ

1. 研究開始当初の背景；イネは主要穀物の単子葉モデル植物で、全ゲノム配列情報などが急速に整い、イネの機能ゲノム学が飛躍的に展開する時期を迎えつつある。高等植物ターゲティング法は、植物のポストゲノム研究の推進をめざした米国 NSF の 2010 年プロジェクトにおいて、アラビドプシスでも 2003～6 年位、日本植物生理学会の 10 年計画委員会による植物科学研究の 10 年間の予測では 2007 年頃の実現可能と予測されたが、実際

には、アラビドプシスで 3 報、イネに関しては我々のイネ *Waxy* 遺伝子の論文が唯一である。我々のターゲティング法は、強力なポジティブ・ネガティブ選抜を基盤にしているため、発現量に関わらず多くの遺伝子に適用できると考えられ、既に、*Waxy*、*Adh 1*、*Adh 2* 等複数の遺伝子改変に成功してきた。

2. 研究の目的；本課題ではターゲティング法のイネ機能ゲノム学推進に向けた実用化

を目指し、ターゲティング組換え機構の理解を進めつつ、ゲノム改変を効果的かつフレキシブルに行えるようにターゲティング法を高機能化することを目的とするため、以下のアプローチを進めた。

(1) これまでに作出した、複数系統のゲノム改変イネの相同組換えの詳細を解析して俯瞰的に比較し、イネの T-DNA 遺伝子導入に伴う相同組換え機構の理解を進め、ベクターデザイン等ターゲティングの効率化へ応用する。

(2) 我々のターゲティングでは、ターゲット挿入部位に *Cre/loxP* の部位特異的組換えのための *loxP* を含めてあり、ターゲット挿入部位の削除による機能復帰が可能であり、エストロゲン誘導型プロモーターによる *Cre* の発現制御を行い、効果的な遺伝子の ON/OFF スイッチをシステム化する。

3. 研究の方法

(1) 塩基配列の多型を含むターゲティングベクターで得られたゲノム改変個体の組換え領域の解析; *Adh1* と *Adh2* のターゲティングでは、ベクター側の相同領域に複数の塩基置換が組み込まれているため、ベクターに用いた相同領域とゲノムに既存の配列との間での組換え位置が明らかとなり、ターゲティングで生じた 2 回の相同組換えの起点を推定できる。それぞれ、植物の育成を進めつつ、サザン解析を進め、次いで、相同組換えの生じた改変領域の塩基配列の解析を行う。2 回の相同組換えの生じた起点を中心にゲノム側の配列とベクター側の配列がどのように組み変わったかについて、変異系統間のばらつきなどを含めて仕分けを行い、T-DNA の RB と LB、またターゲティング改変遺伝子のプロモーター、コード領域、5' 3' UTR などのゲノム側の配列の特徴もふまえて、相同組換えの過程を推定する。

(2) ターゲティングによる遺伝子の ON/OFF スイッチの確立; ターゲティング法の高機能化として、*Cre/loxP* の部位特異的組み換えの効率化をエストロゲン誘導型プロモーター制御下で *Cre* を発現させることで検討する。これまでに、*Waxy* と *Adh1*、*Adh2* 遺伝子のターゲティングで、挿入したポジティブマーカーと転写終止領域の両端に *loxP* 領域が配してあるため、得られた個別の系統のイネのカルスに対して、誘導型のプロモーターを付与した *Cre* 遺伝子をカナマイシン耐性のポジティブマーカーを用いて導入し、ターゲティングイネの種子胚カルスと根で、*Cre* の誘導条件を制御しながら発現させて、ターゲティング

挿入部位の削除を行い、遺伝子の機能復帰を検討ターゲット挿入部位除去を行い遺伝子の ON/OFF スイッチを確立する。

4. 研究成果

(1) *Adh2* のターゲティングでは、8 系統のターゲティング遺伝子破壊カルスを得て、再分化植物を 7 系統作出した。これらの植物の T0 および T1 分離世代でサザン解析を行った結果、すべての系統で、正確な *Adh2* の破壊改変が生じていた。標的遺伝子以外のランダム形質転換は全くないことがわかり、強力なポジティブ・ネガティブ選抜によるイネターゲティング法では、目的遺伝子のみを正確に改変でき、さらに、*Waxy* に引き続き、アルコール脱水素酵素遺伝子 (*Alcohol dehydrogenase*) *Adh1*、*Adh2* のターゲティングも可能であることが明らかになったことから、本ゲノム改変法が、イネの様々な遺伝子配列をデザインできる、極めて効果的なゲノム改変法であることが明らかとなった。

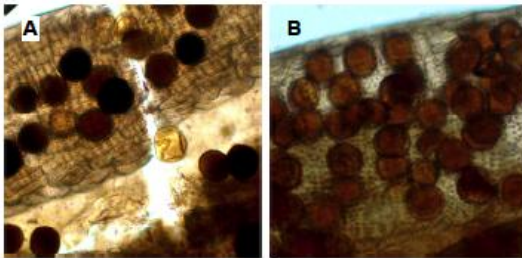
(2) *Adh2* のターゲティングで得た 7 系統の植物のサザン解析で、ベクター側の塩基置換が高効率で、イネゲノムに導入されその結果、相同組換えの 5' 側の組換え領域で、基のゲノム配列には存在しなかった *KpnI* の制限酵素のサイトが、新たに創出されたことが明らかとなった。

(3) *Adh2* のターゲティング改変体ではターゲティングベクターに 21 個の塩基配列の多型が含まれている。8 系統のターゲティング改変体について、相同組換え領域への多型の導入を塩基配列の解読により解析した。その結果、6 系統でターゲティングベクターの 5' 3' 両側の多型が検出され、2 系統でターゲティングベクターの 3' 側の多型が検出され、1 系統でターゲティングベクターの 5' 側の多型が検出された。このことから、2 回の相同組換えによるイネターゲティング法では T-DNA の 5' 3' 両側の相同領域が、安定して組み込まれる頻度が高いことが明らかとなった。また、5' あるいは 3' の相同組換えは、ベクターの中心に置かれたポジティブマーカー組み込み後に、ゲノム側の配列に乗り換える組換えが生じることも、低い頻度で生じていることが見出された。

(4) *Adh1* と *Adh2* は第 11 番染色体に約 30 kb の間隔で近在しているが、それぞれのターゲティング頻度は、互いに異なり、

Adh2 は *Waxy* ターゲティングの約 2 倍 (2%) に対して *Adh1* は約 1/6 倍 (0.15%) とかなり異なることが明らかとなった。この理由については、まだ不明な点が多いが、*Adh1* の機能欠損、*Adh1* の 5' 上流域のレトロトランスポゾンを含む配列の影響などが考えられる。イネターゲティングの効率化のための要因の一つを明らかにできる可能性があるため、今後、この理由を解明する必要があると考えられる。*Adh1* のターゲティング改変体は 3 系統得られ、すべての系統で発芽時の冠水耐性の欠損が分離 T1 世代で明確に観察された。

- (5) ターゲティングによる遺伝子の ON/OFF スイッチの確立を目指して、まず、*Waxy* 遺伝子破壊を行ったイネで、*Cre* 遺伝子を一過的に発現させることで、*Waxy* 遺伝子の第一イントロンに挿入した、ポジティブマーカーとトランスポゾン由来転写終止領域の削除を行い、再生植物での *Waxy* 遺伝子の発現を花粉で確認した。しかし、再生植物体は不稔となったため、詳しい解析には至らなかった。



- (6) 次にエストロゲン誘導型プロモーター制御下で *Cre* を発現することで、*Waxy*、*Adh2*、*Adh1* のターゲティング改変体での、破壊遺伝子の復帰を検討した。エストロゲン誘導型プロモーターを持つ *Cre* 遺伝子を、*Waxy*、*Adh2*、*Adh1* のターゲティング破壊系統から誘導したカルスに再導入後、誘導条件を検討して *Cre* の発現を行った。PCR による解析のレベルでは *Waxy*、*Adh2*、*Adh1* の遺伝子領域に挿入されたポジティブマーカーとトランスポゾン由来転写終止領域の削除が確認できたが、再分化植物の不稔の傾向が極めて高く、*Waxy*、*Adh1* の機能復帰植物は、すべて不稔となった。唯一、*Adh2* のターゲティング改変体のポジティブマーカーとトランスポゾン由来終止領域の削除改変体を複数系統得ることができ、分子レベルでの機能復帰の状態を解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yasuyo Johzuka-Hisatomi, Rie Terada, Shigeru Iida, Efficient transfer of base changes from a vector to the rice genome by homologous recombination: involvement of heteroduplex formation and mismatch correction, *Nucleic Acids Research*, Vol. 36, No. 14, 4727-4735, (2008)、査読有
- ② Rie Terada, Yasuyo Johzuka-Hisatomi, Miho Saitoh, Hisayo Asao, Shigeru Iida, Gene Targeting by Homologous Recombination as a Biotechnological Tool for Rice Functional Genomics, *Plant Physiology*, June 2007, Vol. 144, pp. 846-856, 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① Satoru Moritoh, Rie Terada, Yasuyo Johzuka-Hisatomi, Chang-Ho Eun, Katsushi Yamaguchi, Akemi Ono, and Shigeru Iida; Targeted Disruption of the *OsDRM1a* Gene, a Rice Homolog of *DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE*, by Homologous Recombination. The 55th NIBB Conference Arabidopsis Workshop (於 Okazaki Conference Center, aichi, Japan) 2008 H20.09.13-15
- ② 森藤 暁・寺田理枝・定塚(久富) 恵世・C. Eun・飯田 滋; 相同組換えを用いた遺伝子ターゲティング法によるイネ DNA メチル化酵素遺伝子 *OsDRM1a* の改変体の作出と表現型の解析第 113 回日本育種学会大会要旨集 (於 明治大学) H20.03.29
- ③ 山内卓樹・定塚(久富) 恵世・寺田理枝・中村郁郎・飯田 滋; 相同組換えによる 2 つのイネ MET1 遺伝子のノックイン改変体の作出第 113 回日本育種学会大会要旨集 (於 明治大学) H20.03.28
- ④ 寺田理枝・定塚(久富) 恵世・森藤 暁・山口勝司・山内卓貴・中村郁郎・飯田 滋; 普遍的イネ・ターゲティング法の確立と展望. 第 112 回日本育種学会大会要旨集 (於 山形大学) H19.09.23
- ⑤ 寺田理枝・定塚(久富) 恵世・森藤 暁・山口勝司・山内卓樹・姜 恭好・齋藤美保・中園幹生・齋藤美保・中園幹生・飯田 飯; ポジティブ・ネガティブ選抜を用いたイネの普遍的遺伝子ターゲティング法の確立. 第 48 回日本植物生理学会大会要旨集 (於 愛媛大学) H19.03.29

- ⑥ 定塚恵世・寺田理枝・飯田 滋; 遺伝子ターゲットングに係わる組換え過程の分子機構. 第48回日本植物生理学会大会要旨集 (於 愛媛大学) H19.03.29
- ⑦ 森藤 暁・山口勝司・定塚恵世・寺田理枝・飯田 滋; 相同組換えを用いた遺伝子ターゲットング法によるイネ DNA メチル化酵素遺伝子 OsDRM1a の破壊と解析第48回日本植物生理学会大会要旨集 (於 愛媛大学) H19.03.29
- ⑧ 山口勝司・小野明美・定塚(久富) 恵世・寺田理枝・飯田滋; 遺伝子ターゲットングによるイネ重複遺伝子の個別改変と変異体の遺伝形質の解析. 第48回日本植物生理学会大会要旨集(於 愛媛大学) H19.03.29
- ⑨ 山内卓樹・寺田理枝・定塚(久富) 恵世・森藤 暁・中村郁郎・飯田 滋; 相同組換えを介したイネの遺伝子ターゲットングによるノックイン改変体の作出と標的遺伝子の発現解析. 第48回日本植物生理学会大会要旨集 (於 愛媛大学) H19.03.29
- ⑩ R. Terada, Y. Johzuka-Hisatomi, M. Saitoh, S. Iida; Gene targeting of two closely located *Alcohol dehydrogenase (Adh)* genes in rice. ISPMB 8th International Congress of Plant Molecular Biology. (於 Adelaide Australia; ワークショップ招待講演及びポスター発表) H18.08.20-25

[図書] (計3件)

- ① 定塚(久富) 恵世, 星野 敦, 森田裕将, 山内卓樹, 朴 慶一, 寺田理枝, 森藤暁, 飯田滋, 秀潤社, 細胞工学別冊24; 細胞工学シリーズ24. 植物のエピジェネティクス. 島本功, 岡田清孝, 田畑哲之編, (2008) 共著、分担項目、第1章 3 アサガオとイネのDNAメチル化と遺伝子発現アサガオとイネのDNAメチル化と遺伝子発現. 頁36-43
- ② Y. Johzuka-Hisatomi, M. Maekawa, K. Takagi, C-H. Eun, T. Yamauchi, Z. Shimatani, N. Ahmed, H. Urawa, K. Tsugane, R. Terada, S. Iida, Springer, Rice Biology in the Genomics Era (Biotechnology in Agriculture and Forestry) H. Hirano, Y. Sano, A. Hirai, T. Sasaki (eds) (2008) 共著、分担項目、Homologous recombination-dependent gene targeting and an active DNA transposon nDart-promoted gene tagging for rice functional genomics. 頁 81-94

- ③ S. Iida, Y. Johzuka-Hisatomi, R. Terada, Springer, Rice Functional Genomics-Challenges, Progress and Prospects, N.M. Upadhyaya (ed), (2008) 共著, 分担項目 Gene targeting by homologous recombination for rice functional genomics. 頁 273-289

[その他]

- ① 寺田理枝, 朝倉書店, 植物ゲノム科学事典, 駒嶺穆, 町田泰則, 藤村達人, 田畑哲之, 三位正洋, 斉藤和季編 (2008); 共著, 分担項目名 ノックアウト変異体.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 理枝 (TERADA RIE)
基礎生物学研究所・
分子遺伝学研究部門・助教
研究者番号: 30137799