

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310142

研究課題名(和文) 高等植物における標的遺伝子特異的な変異導入技術の開発

研究課題名(英文) Establishment of targeted mutagenesis system in higher plants

研究代表者

土岐 精一 (Toki, Seiichi)

独立行政法人農業生物資源研究所・ゲノム機能改変研究ユニット・ユニット長

研究者番号：80212067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物における標的変異技術の高度化を目指し、以下の実験を行った。植物病原細菌のエフェクタータンパク質を利用した人工制限酵素であるTALENsをイネに形質転換し、変異スペクトラムを解析したところ、導入される変異は欠失が多いこと、非相同末端結合因子を欠損したイネでは切断部位の削り込みが大きくなることが明らかとなった。TALENsによる標的変異では、変異のパリエーションが大きく、新たな遺伝子アレルの創出法として極めて有用な技術であることが示された。CRISPR/Casシステムについてもイネへの適応を試み、TALENsに比べて小さい変異が多い、塩基置換が生じ易い等の特徴があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：DNA double strand breaks induced by TAL effector nucleases (TALENs) are often imprecisely repaired by non-homologous end joining (NHEJ) and subsequently lead to mutations at repaired site. Here, we investigated whether the lack of DNA ligase 4 (Lig4); one of the key factor of NHEJ pathway; affected the fidelity and efficiency of NHEJ repair after induction of DSBs by TALENs in rice cells. We found an enhanced mutation frequency in Lig4 mutant. For establishing an efficient and universal CRISPR/Cas mediated mutagenesis system in rice, we compared different Cas9 expression constructs and found that mutation frequency varied greatly depending on the Cas9 expression constructs. We also revealed that expression level of Cas9, culture period of calli transformed with Cas9 and guide RNA affected mutation frequency.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：変異導入 人工制限酵素 植物 ゲノム改変 非相同末端結合

1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷因子などの非生物学的要因や DNA 修復時の生物学的要因によって切断された DNA は、相同組換え (homologous recombination, HR) や非同相末端結合 (non-homologous end joining, NHEJ) などの DNA 二重鎖切断修復機構によって修復される。その修復過程でエラーが生じた場合、標的配列に変異が導入される。従来の放射線や変異原などを利用した突然変異育種では、DNA 二重鎖切断を誘導することはできるが、標的遺伝子を狙って切断することはできなかった。

人工制限酵素は、人工制限酵素はゲノム上の標的配列を特異的に切断することができる酵素である。研究開始当初 (2010 年) は、メガヌクレアーゼ (meganucleases)、ZFNs (zinc finger nucleases)、TALENs (transcription activator-like effector nucleases) といった 3 種類の人工制限酵素について研究が報告されていた。また、2012 年に入り、新しい人工制限酵素として CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR-associated) が報告された。このような人工制限酵素を利用した標的遺伝子への変異導入技術を標的変異と呼び、新たな変異導入技術として注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、高等植物における標的変異技術の高度化を目的とした。特に、イネにおける変異導入の構築、及び、導入される変異のスペクトルを改変することに注目し、研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、人工制限酵素のうち、TALENs と CRISPR/Cas に着目した。これらの人工制限酵素を発現させるバイナリーベクターを作成し、イネカルスにアグロバクテリウム法によって導入した。また、標的遺伝子に変異が導入されているかは、TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) 法によって解析するとともに、標的遺伝子の塩基配列を解読することによって導入された変異を決定した。

4. 研究成果

(1) TALEN による標的変異技術の開発

イネの酵素遺伝子 A を標的とし、それを切断するための TALENs を 3 種類 (TALEN-1~3) 作製した。まず、これらの TALENs について、酵母を用いて標的配列の切断活性を評価した。その結果、TALEN-3、TALEN-2、TALEN-1 の順で切断活性が高いことが分かった。そこで、TALEN-1~3 について、CaMV の 35S プロモーターによって発現させるベクターを構築し、イネに形質転換した。獲得した再分化個体から T₁ 種子を獲得し、T₁ 個体における変異導入を TILLING 法により解析した。しかし

ながら、標的遺伝子に変異が導入されている T₁ 個体は見つけれなかった。

人工制限酵素の発現量と活性は、標的変異効率に大きく影響する。そこで、TALENs 自身や TALENs 発現ベクターの改良を行った。これまでに、TALENs の N 末端配列や C 末端配列の一部を欠損させることにより、TALENs 活性を向上させるとともに、TALENs タンパク質を安定化させることができることが報告されている。そこで、今回構築した TALEN-1~3 についても、N 末端配列や C 末端配列の一部を欠損させた truncated 型の TALENs に変更した。さらに、TALENs を大量に発現させるためにトウモロコシのコピキチンプロモーターに変更したベクターを構築した。一方、我々は、シロイヌナズナにおける ZFNs を用いた標的変異実験から、DNA 二重鎖切断部位に集積し、NHEJ 経路に関与する Ku80 を欠損させることで、切断部位の削り込みが大きくなることを示している。さらに、NHEJ 経路の欠損は標的変異頻度を上げることができると期待される。そこで、NHEJ 経路の最終酵素であり、切断された DNA を結合する Ligase 4 (Lig4) を欠損させたイネを用いて、標的変異実験を行った。その結果、改良型 TALEN-1 発現ベクターを形質転換した Lig4 欠損イネカルス及び再分化個体において、標的遺伝子に変異が生じていることが明らかとなった (表 1)。しかしながら、TALEN-2 や TALEN-3 では、変異が導入されてカルスを検出することができなかった。以上の結果から、酵母での TALENs 切断効率と、植物体における TALENs による変異導入効率に相関は認められなかった。TALEN-1 によって導入された変異を調べたところ、そのほとんどが欠失であった。興味深いことに、複雑な変異が生じている系統もわずかであるが確認することができた。例えば、大きな欠失変異が生じているがその内部に小さな由来不明の塩基が挿入されたような入れ子状の変異や、標的配列の欠失に加えてその近傍にわずかな欠失が生じているような変異などが確認された。以上の結果から、人工制限酵素による標的変異技術においては、変異スペクトラムにパリエーションがあるため、新たな遺伝子アレルを創出するために極めて有用な技術であることが示された。

表1 TALEN導入実験のまとめ

TALEN	TALEN導入カルス数	変異検出カルス数	再分化個体数	変異検出再分化個体数
1	15	8	45 個体 (3系統のカルス由来)	33 個体 (14種類の変異)
2	11	0	-	-
3	11	0	-	-

(2) CRISPR/Cas システムを用いた標的変異

イネにおいて変異導入効率に影響を及ぼす要因を明らかにする為、Cas9, guide RNA コンストラクトの比較、形質転換カルスの培養期間が変異導入効率に及ぼす影響、

off-target site 変異の有無について解析を行った。標的配列を統一し、Cas9 遺伝子およびそのプロモーター、guide RNA のプロモーターの組み合わせが異なるコンストラクトを複数用意し、標的変異効率を比較したところ、コンストラクトの違いによって数十倍の差があることが明らかとなった。また、Cas9, guide RNA を恒常的に発現させるコンストラクトをイネカルスに導入し、形質転換1ヶ月、2ヶ月後のカルスにおける標的変異効率を比較した結果、形質転換2ヶ月目のカルスでは1ヶ月目と比較して、変異細胞の割合が増加しており、また変異のバリエーションも増加していることが明らかとなった。一方、guide RNA 中に組み込んだ標的配列20bpと相同性のある off-target site における変異を解析したところ、複数の off-target site において変異が検出され、変異効率は、標的配列とのミスマッチの数および位置によって大きく異なることが明らかとなった。

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13件)

雑賀啓明、土岐精一 (2013) 植物における新ゲノム改変技術の開発と応用 バイオサイエンスとインダストリー 71:275-278 査読無

Kwon Y-I, Abe K, Endo M, Osakabe K, Ohtsuki N, Nishizawa-Yokoi A, Tagiri A, Saika H, Toki S (2013) DNA replication arrest leads to enhanced homologous recombination and cell death in meristems of rice OsRecQ14 mutants. BMC Plant Biol. 13: 62 (10.1186/1471-2229-13-62) 査読有

Kwon Y-I, Abe K, Osakabe K, Endo M, Nishizawa-Yokoi A, Saika H, Shimada H, Toki S (2012) Overexpression of OsRecQ14 and/or OsExo1 enhances DSB-induced homologous recombination in rice. Plant Cell Physiol. 53: 2142-2152 (10.1093/pcp/pcs155) 査読有

Nishizawa-Yokoi A, Nonaka S, Saika H, Kwon YI, Osakabe K, Toki S (2012) Suppression of Ku70/80 or Lig4 leads to decreased stable transformation and enhanced homologous recombination in rice. New Phytol. 196: 1048-1059 (10.1111/j.1469-8137.2012.04350.x) 査読有

刑部敬史, 刑部祐里子, 土岐精一 (2011) 高等植物において特定の遺伝子を標的として改変する技術 化学と生物 49: 592-594 査読無

刑部敬史, 土岐精一, 刑部祐里子 (2011) 人工制限酵素を利用した高等植物における標的遺伝子改変技術の開発 バイオインダストリー 28: 53-57 査読無

〔学会発表〕(計24件)

横井彩子、土岐精一 New Plant Breeding Techniques (NBT) の実際～人工制限酵素を用いた targeted mutagenesis 及び gene targeting 技術を用いた植物ゲノムのピンポイント改変～ 園芸学会平成26年度春季大会 2014年3月28日 筑波大学

三上雅史、遠藤真咲、土岐精一 イネにおける CRISPR/Cas システムを用いた変異導入 日本育種学会第125回講演会 2014年3月22日 東北大学

横井彩子、星野友紀、杉本和彦、Voytas D. F., 土岐精一 イネにおける人工制限酵素 TALENs における標的変異技術 日本育種学会第125回講演会 2014年3月22日東北大学

遠藤真咲、三上雅史、土岐精一 CRISPR/Cas システムを利用したイネの標的変異 第55回日本植物生理学会 2014年3月20日 富山大学

横井彩子、星野友紀、杉本和彦、ボイタスダニエル、土岐精一 NHEJ 欠損が人工制限酵素 TALENs 誘導性の変異様式に及ぼす影響 第55回日本植物生理学会 2014年3月20日富山大学

刑部敬史, 横井彩子, 権容益, 大槻並枝, 遠藤真咲, 雑賀啓明, 土岐精一 配列特異的な人為的改変を可能にする遺伝子操作技術の開発と利用 第30回日本植物細胞分子生物学会 2012年8月3日 奈良先端科学技術大学院大学

横井彩子, 刑部敬史, 雑賀啓明, 土岐精一 イネにおける標的遺伝子改変技術の展望 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ2012 2012年7月5日 奈良先端科学技術大学院大学

Kwon Y-I, Abe K, Osakabe K, Endo M, Nishizawa-Yokoi A, Saika H, Toki S. Stimulation of homologous recombination in rice by enhanced resection of DSBs with OsRecQ14 and/or Exo1. 10th International Congress on Plant Molecular Biology 2012年10月21日~26日 韓国

Nishizawa-Yokoi A, Nonaka S, Saika H, Osakabe K, Toki S. Suppression of Ku70/80 or Lig4 leads to decreased T-DNA integration and enhanced homologous

recombination in rice. 10th International
Congress on Plant Molecular Biology 2012
年 10 月 21 日 ~ 26 日 韓国

横井彩子, 野中聡子, 雑賀啓明, 刑部
敬史, 土岐精一 NHEJ 機構抑制イネにおけ
る相同組換え頻度とジーンターゲッティ
ング効率の評価 第 53 回日本植物生理学会
2012 年 3 月 16 日 京都産業大学

土岐精一 標的遺伝子特異的改変によ
る植物の分子育種 第 1 回植物育種セミナー
2011 年 11 月 26 日 新潟大学

土岐精一 標的遺伝子特異的改変によ
る植物の分子育種 第 7 回よこはまバイオマ
ス研究会 2011 年 5 月 31 日 理化学研究所
(鶴見キャンパス)

〔図書〕(計 3 件)

Osakabe K, Endo M, Toki S. CABI, Plant
Mutation Breeding and Biotechnology, 2012,
608

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土岐 精一 (TOKI, Seiichi)
独立行政法人農業生物資源研究所・ゲノム
機能改変研究ユニット・ユニット長
研究者番号: 80212067

(2) 研究分担者

雑賀 啓明 (SAIKA, Hiroaki)
独立行政法人農業生物資源研究所・ゲノム
機能改変研究ユニット・主任研究員
研究者番号: 20435613

遠藤 真咲 (ENDO, Masaki)
独立行政法人農業生物資源研究所・ゲノム
機能改変研究ユニット・研究員
研究者番号: 40546371