

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380008

研究課題名(和文) 分子遺伝学情報を活用したイネターゲットング育種法の確立と実用品種の作出

研究課題名(英文) Establishment of a new breeding procedure based on rice gene targeting using information of molecular genetics and attempt to generate a new variety.

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) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：強力ポジティブ・ネガティブ選抜法に基づくイネ・ターゲットング法の改良を進め、OsRac1遺伝子の耐病性機構に基づいて、いもち病等耐性遺伝子改変イネの作成を行った。まず、塩基置換を介したOsRac1アミノ酸置換改変をターゲットングによって行い、次いでOsRac1に導入されたポジティブ選抜マーカーをCre-loxP部位特異的組換えによって削除した。これらのカルスからイネを再分化し、アミノ酸置換のホモ型分離世代を得た。このイネの耐病性を調査した結果、葉の細胞で耐病性が認められた。しかし植物全体の成育不良の形質も現れた。土壌ヒ素浄化機能のPvACR遺伝子をイネに導入し独立の16系統のイネを作出した。

研究成果の概要(英文)：For generation of a rice new variety by gene targeting (GT) procedure, the OsRac1 was modified by GT based on positive-negative selection to generate blast fungus resistance rice. Since the G19V substitution in OsRac1 had shown the effective immunity in random transgenic rice, the same modification at the original OsRac1 locus was examined. Following to GT for G19V substitution positive-marker remained in the OsRac1 locus was removed by Cre-loxP mediated marker free system. The OsRac1 activation was detected in the gene-modified rice plants of segregated homozygous lines for the G to T alternation in the exon 1, however, unexpected growth inhibition in the plants was also associated. For generation of arsenic resistant rice, the 16 of rice plant lines having PvACR were obtained.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物分子育種学 遺伝子ターゲットング イネ ポジティブ・ネガティブ選抜

1. 研究開始当初の背景

トウモロコシ、ナタネ、ダイズ、ワタなどの遺伝子組換え農作物の利用が世界規模で普及しつつあり、さらに近年の異常気象や急速な人口増加の状況下での食糧確保の懸念も強い。そのため組換え農作物の信頼性を更に向上させた新規の育種技術が強く求められている。課題提案者は、重要な主要穀物で分子遺伝学の研究モデルでもあるイネを用い、強力ポジティブ・ネガティブ選抜法に基づくターゲティング法開発に成功し、技術の再現性・汎用性を確認した (Terada et al [2002] *Nat. Biotechnol.* 20:1030)。ターゲティング改変による変異については、遺伝子破壊のみならず、1)点変異の導入、2)標的遺伝子のプロモーターに GUS コード領域を結合して遺伝子本来の位置でプロモーター解析が可能なロックイン改変 3)ターゲティング改変を行った後に部位特異的組換えによる再改変で不要な選抜マーカー削除や、一度破壊した遺伝子の機能復帰改変など、遺伝子を様々なデザインして改変することにも成功した。

一方、分子遺伝学では植物の様々な機能に対して分子機構解明が進んでいる。とくに本課題では奈良先端技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・島本研究室と共同研究を通して、イネ耐病性の分子機構の知見に基づいた機能遺伝子の塩基置換変異ターゲティングによるアミノ酸改変法の開発を目指す。イネの遺伝子機能改変を実現できれば、交配育種へと繋げることで品種改良へと展開できる可能性が高い。既にターゲティング改変遺伝子領域で Cre-*loxP* 部位特異的組換えを用いてターゲティング破壊 *Waxy* の復帰も (Terada et al [2010] *Plant Biotechnology* 27:29) 可能となったため、遺伝子ターゲティング改変後に不要となるマーカー削除を行うことで理想的な機能遺伝子変異イネを創出でき、多様な遺伝子デザインによりイネの分子育種学、分子遺伝学を格段にレベルアップできる画期的な研究基盤を創出できると確信した。

2. 研究の目的

奈良先端技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・島本研究室ではイネ “いもち病耐性” の分子機構の解析において、病原菌感染に対してイネでは「ディフェンソーム」複合体が作られ感染細胞の過敏感細胞死を誘導して感染拡大を防御する主要遺伝子 *OsRac1* が報告されている。さらに *OsRac1* のリン酸化部位のアミノ酸改変により耐病性強化が観察されたことを報告している (Ono et al [2001] *PNAS* 98:759)。本課題ではこの報告に基づき、*OsRac1* の塩基置換ターゲティングによりリン酸化部位の改変を行い、その後改変遺伝子領域からポジティブ選抜マーカーを自律的に削除する “ターゲティングセルフマーカーフリー” のシステム構築を目指す。また、米国パデュー大学との共同研究によっ

て、イノモトソウから “土壌ヒ素の浄化または耐性機能” を持つ可能性のある *PvACR* 遺伝子の単離に成功したため、イネにおいて *PvACR* 遺伝子が発現できるように、選抜マーカー等を改良した後にイネに導入して形質転換イネを作成し、土壌ヒ素の浄化または耐性に関する機能解析を進める。これらの実験で有用形質を付与したイネを得て、優良品種と交配し実用品種の作出を検討する。

3. 研究の方法

1) “ターゲティング遺伝子改変後自律的マーカー削除システム” を確立するため、種々の条件で活性化が報告されているプロモーター (-estradiol、*LP2*、ヒートショック、トランスポゾン) に *Cre* 遺伝子を連結する。次いで恒常的に発現する 35S プロモーターと GUS コード領域の間に上記の誘導型 Cre-*loxP* カセットを構築する。それぞれのカセットを形質転換したイネを作成し、*Cre* 遺伝子を最適に発現誘導するため、-estradiol、*LP2*、ヒートショックプロモーターに対して -estradiol の濃度、培養照度、培養温度の条件を検討したうえで、GUS 発現活性を調べることで、ターゲティング遺伝子改変後に自律的マーカー削除を行う上で、最適なプロモーターの選択と活性化誘導条件を決定する。

2) *OsRac1* 遺伝子第 1 エキソンの 1 塩基置換により *OsRac1*-G19V 変異を引き起こし、その後 *OsRac1* 遺伝子に挿入されたポジティブマーカーの自律的削除を誘導する NCre-*loxP* 組み換えシステムも組み込んだ “*OsRac1* ターゲティング・マーカーフリーベクター” を構築する。次いでこのベクターを用いて *OsRac1* 遺伝子 1 塩基置換ターゲティング形質転換を行い、ターゲティングの生じたカルスに対してマーカー削除誘導を行い、*OsRac1*-G19V 変異イネを作成する。

3) ヒ素耐性遺伝子 *PvACR3* のベクターのプロモーターと *nptII* 選抜マーカー部分をイネの形質転換用にするため、それぞれ、ユビキチンプロモーター及び *hpt* 選抜マーカーに交換することで改良する。次いでイネへの形質転換を行う。形質転換カルスを選抜して再分化植物を育成し、系統別に種子を集める。

4) ポジティブ・ネガティブ選抜法において *Diphtheria toxin A-chain (DT-A)* によるネガティブ・マーカーの改良のため *Bacillus amyloliquefaciens* 由来の改変 *Barnase* 遺伝子入手し、新規のポジティブ・ネガティブ選抜ベクターを構築し、イネカルスに形質転換することでネガティブ選抜効果を調査する。

4. 研究成果

1) “ターゲティング遺伝子改変後自律的マーカー削除システム” で Cre-*loxP* 組換えを行う為、Cre-*loxP* 組換えが生じると GUS のコ

ード領域に 35S プロモーターが連結して、イネのカルスが X-gulc 染色で青色発色する解析により -estradiol、LP2、ヒートショックプロモーターの誘導条件を調べた。その結果、-estradiol 誘導型プロモーターは 50 μM -estradiol で 1 週間処理すること、ヒートショックプロモーターは 42 度 90 分処理すること、LP2 プロモーターは再分化不定芽と不定根の発生段階になることで GUS 発現が高頻度に観察された。この結果から、-estradiol、LP2、ヒートショックプロモーターそれぞれのプロモーターによって Cre-loxP 組換えシステムの活性化誘導が可能であることが判った。しかし、すべてのシステムでプロモーターの誘導が無い場合にも Cre-loxP 組換えの抑制が不十分であることも明らかとなった。即ち、-estradiol 無し、あるいは高温無し、再分化が起きない条件であっても、多くのカルスで GUS の発現が認められた。また、これらの発現はネガティブ・コントロールの形質転換イネカルスでは認められないことから、誘導型プロモーター-Cre 遺伝子では、形質転換直後の一過的遺伝子発現によって、Cre が発現機能していることが示唆された。GUS 発現の青色を示したカルスの DNA を PCR 解析することでも、Cre-loxP 組換えのフットプリントのバンドが検出された。そのため、-estradiol、LP2、ヒートショックプロモーターの誘導型プロモーター-Cre をターゲティング遺伝子改変後自律的マーカー削除システムに用いるにはさらに改良が必要であることが判った。

2) ポジティブ・ネガティブ選抜に基づくターゲティングによってもち病耐病性の主要な機能遺伝子である *OsRac1* に G19V 変異を導入した変異イネカルスの作出に成功した。ターゲティング効率は極めて高頻度で、200 個ほどポジティブ・ネガティブ選抜生存カルスを PCR 解析することで、12 系統のターゲティング変異カルス系統を選抜できた。しかし、G19V 変異の導入効率は 70% 程で最終的に 7 系統の *OsRac1*-G19V 変異カルス系統を得た。次いで *OsRac1*-G19V の配列に挿入された *hpt* ポジティブ選抜遺伝子を削除するために、-estradiol 誘導型プロモーターに Cre 組換え遺伝子を持つベクターを再導入した。Cre 組換え遺伝子が導入された *OsRac1*-G19V 変異カルスを選抜して、-estradiol によって Cre 組換え遺伝子の発現を誘導した後にカルスを再分化させて、G19V 変異を持ってポジティブマーカー削除の生じた 7 系統の G19V 変異イネを得た。これらのイネを育成して、次世代分離植物 2 系統を得た。奈良先端技術大学院大学・島本研究室で G19V 変異イネ耐病性検定を行い細胞レベルで耐病性を確認できたが、イネの成育に問題が生じたため交雑育種を進めることは困難と判断した。島本研究室が行ったランダム形質転換イネでは *OsRac1*-G19V 変異でいもち病耐病性の向上が

認められたが、イネは不稔となった。ターゲティングによる *OsRac1* 遺伝子位置での G19V 変異ではやや矮性で正常稔性のイネが得られ、耐病性の形質も次世代に遺伝した。しかし、イネの葉における *OsRac1*-G19V 変異の発現量がタンパク質レベルで抑制されてしまうことが明らかとなった。

3) パデュー大学よりヒ素耐性遺伝子 *PvACR3* ベクターを入手した。このベクターはシロイヌナズナの形質転換に用いられたものであったため、イネで効果的な発現を誘導するために *PvACR3* のプロモーターをトウモロコシ由来のユビキチンプロモーターに変更した。さらに組換え体の選抜マーカーを *hpt* 遺伝子に変更した。このベクターを用いてイネへの形質転換を行った。その結果、*PvACR3* が導入された独立の 16 系統のイネを得て育成を進めた。それぞれの系統から 100 以上の種子を得た。これらの種子はパデュー大学及び、共同研究者である Aberdeen 大学、David E Salt 博士に送付し、ヒ素耐性の検定を進める予定である。

4) ポジティブ・ネガティブ選抜基本ベクターを改良するため *Bacillus amyloliquefaciens* 由来 *Barnase* 遺伝子を入手した。更に *Barnase* の配列領域を単離して、ポジティブ・ネガティブ選抜ベクターを構築した。このベクターを 100 個のイネ・カルスに形質転換した後に、致死効果を解析した。三回の実験を行った結果、カルス致死誘導効果を見出した。しかし、カルス致死の誘導時期は DT-A と比較すると遅く、現状のポジティブ・ネガティブ選抜ベクターと同等の選抜効果を付与するため、さらに改良を追加する予定である。

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 4 件)

Yamauchi T, Johzuka-Hisatomi Y, Terada R, Nakamura I, Iida S. The *MET1b* gene encoding a maintenance DNA methyltransferase is indispensable for normal development in rice. (2014) *Plant Mol Biol in press*
10.1007/s11103-014-0178-9

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 Physiology* 54:2058-2070
10.1093/pcp/pct147

Ono, A., Yamaguchi, K., Fukada-Tanaka, S., Terada, R., Mitsui, T., Iida, S. A null mutation of *ROS1a* for DNA demethylation in rice is not transmittable to progeny. (2012)*The Plant Journal* 71:564-574
10.1111/j.1365-313X.2012.05009.x

Moritoh, S., Eun, C-H, Ono, A., Asao, H., Okano, Y., Yamaguchi, K., Shimatani, Z., Koizumi, A. and Terada R. Targeted disruption of an orthologue of *DOMAINS REARRANGED METHYLASE2*, *OsDRM2*, impairs the growth of rice plants by abnormal DNA methylation. (2012)*The Plant Journal* 71:85-98
10.1111/j.1365-313X.2012.04974.x

〔学会発表〕(計 3件)

島谷 善平, 寺田 理枝, Thu Thi Dang, 河野 洋治, 辻 寛之, 田岡 健一郎, 島本 功; 植物ゲノム編集技術としての遺伝子ターゲティング: 技術の現状とイネ耐病性関連遺伝子 *OsRac1* の恒常活性化改変(日本育種学会第 125 回講演会; 平成 26 年春季大会 2014 年 3 月 21 日、東北大学)

松本彩奈、島谷善平、辻寛之、寺田理枝、島本功ジーンターゲティングにより作成した *OsMADS15-mOrange* トランスジェニックイネの解析 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

島谷善平・寺田理枝日遺伝子機能解析と分子育種を推進するイネの遺伝子ターゲティング: 相同組換えが作り出す様々な変異イネ 日本遺伝学会第83回大会ワークショップ 2011年9月24 京都大学

〔図書〕(計 1件)

土岐精一・寺田理枝・島谷善平・横井彩子・刑部敬史 (2012)バイオサイエンス アドバンスドマニュアルシリーズ「形質転換プロトコル(植物編)」トピックス; イネのターゲッティング・プロトコル 化学同人 364-371

〔産業財産権〕

出願状況(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: 特願 2014-25910号

番号:

出願年月日: 2014年2月13日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 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