

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658012

研究課題名（和文）

ケミカルバイオロジーによる高効率遺伝子ターゲティング技術の構築

研究課題名（英文）

Chemical biology for establishment of high efficient gene targeting system

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

研究成果の概要（和文）：高等植物における相同組換えを利用した遺伝子ターゲティングの高効率化をめざし、相同組換えを活性化する化学物質を探索した。相同組換え頻度を計測することができるシロイヌナズナのモデル実験系を用いて237種類の化学物質を評価した結果、相同組換え頻度を向上させると考えられる化学物質が15種類選抜された。また、DNAの二重鎖切断（DSBs）処理で顕著な発現誘導を受けることが知られている *Rad51* 遺伝子の発現解析の結果、特に効果が高いと思われる3種類の化学物質はDSBsを誘導しない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：For the establishment of a high efficient gene targeting system via homologous recombination (HR) in higher plants, chemicals that can increase HR frequency were screened. Among 237 kinds of chemicals, 15 chemicals that can increase HR frequency were successfully selected using model system to estimate HR frequency in Arabidopsis plants. The expression analysis of *Rad51* gene, which is reported to be induced by DNA double strand breaks (DSBs) showed that 3 chemicals can enhance HR frequency without further inducing DSBs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：育種学、遺伝子、ゲノム、植物、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

相同組換え (homologous recombination, HR) を利用した遺伝子ターゲティング (gene targeting, GT) は標的遺伝子を計画的に改変することができる遺伝子組換え技術である。我々の研究グループでは、GTによる点変異導入技術を利用し、新規の除草剤耐性イネや高栄養米を作出することに成功している (Endo et al. (2007) *Plant J* 52:157, Saika et al. (2011) *Plant Physiol* 156:1269)。しかし、高等植物においては、GT効率は未だ低いため、汎用的かつ一般的な技術として確立されているとは言えないの

が現状である。

GT効率を支配する主要因は、鋳型となる外来DNA配列のデリバリー効率、ゲノムと鋳型DNAとのHR効率、GTに成功した細胞の濃縮効率であると考えられるが (Saika and Toki (2009) *JARQ* 43:81)、最も大きな要因はHR効率である。HRはDNAの二重鎖切断 (double strand breaks, DSB) を修復する機構であることから、標的遺伝子座近傍でDSBを生じさせることにより、HR頻度を部位特異的に向上させることが可能である。これまでに、高等植物においても、標的遺伝子を特異的に切断する人工制限酵素である zinc finger

nucleases (ZFNs) を利用することで、標的部
位での HR を活性化し GT 効率の向上に成功
したことが報告されている (Shukla et al.
(2009) *Nature* 459:437, Townsend et al.
(2009) *Nature* 459:442)。この方法は様々な
生物で利用されている有効な方法であるが、
標的遺伝子ごとに人工制限酵素をデザイン
し、構築する必要があるため、手間がかか
ることが欠点である。また、DNA 修復因子の発
現調節により HR 活性を向上させることが可
能であることが報告されている
(Nishizawa-Yokoi et al. (2012) *New Phytol*
196:1048) が、この方法では常に HR 活性が向
上しており、ゲノムの安定性が低下している
可能性が考えられる。

2. 研究の目的

汎用性が高く、必要に応じて、簡便な方法
で HR 頻度を向上させることができれば、様
々な植物種に適用できる GT システムを構築
することが可能であると考えられる。そこで、
我々は作用の ON/OFF の制御が容易であるこ
と、植物種を問わず汎用的な利用が期待で
ることなどから、化学物質に着目した。本課
題においては、化学物質を利用した高効率かつ
簡便な GT システムを構築することを目標
とし、HR 効率を向上させる化学物質を探索
することを目的とする。

3. 研究の方法

化学物質ライブラリーとして、
International Drug Collection 320 品目
(MicroSource 社) を利用した。化学物質の
スクリーニングには、HR 頻度を測定すること
ができるシロイヌナズナのモデル系統 (1406、
1415、図 1) を用いた。播種後 1 週間のシロ
イヌナズナを、 $1\mu\text{M}$ の化学物質が含まれる液
体 MS 培地に移した。処理後 1 週間のシロイ
ヌナズナは GUS 染色を行い、個体ごとに青い
スポット数を計測した。

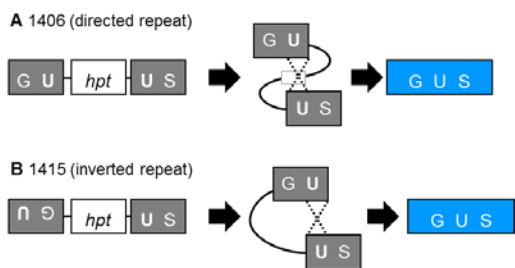


図1 本研究で使用したHR頻度計測システム

本研究では、GUS遺伝子を分断し、重複を持たせたコンストラクト
が導入されたシロイヌナズナを利用した。分子内HRが生じることで
機能的なGUS遺伝子が発現するため、HR頻度を可視的に計測す
ることが可能である。

選抜された化学物質のうち、特に効果が高
いと考えられた化学物質 A、B、C について、
処理 6、24 時間後のシロイヌナズナから RNA
を抽出し、Rad51 遺伝子の定量的 RT-PCR を行

った。解析に用いたプライマーは、Endo et al.
(2006, *EMBO J* 25:5579) に記載されているも
のを使用した。

4. 研究成果

237 種類の化学物質について、シロイヌナ
ズナのモデル実験システムを利用して HR 頻度
を調査した結果、HR 頻度を向上させるような化
学物質を 15 種類選抜することに成功した(表
1)。

表1 1次スクリーニングの結果

図1で示したシロイヌナズナのシステムを利用し、各化学物質を
処理した時のHR頻度を調査した。調査した化学物質の約2割で、
GUS遺伝子が発現したことによって生じる青い細胞が未処理区と
比較して有意に増加、または減少していることが分かった。

	植物 材料	化学物質数	HR頻度が変化した化学物質数	
			増加	減少
実験1	1406	7	0	4
実験2		33	0	5
実験3		26	3	0
実験4		62	11	0
実験5		33	2	0
実験6		35	0	5
実験7	1415	41	12	1
合計		237	28	15

特に、HR 頻度を向上させる効果が高かった
3 種類の化学物質 A、B、C については、その
再現性を確認した (図 2)。また、これらの化
学物質については、図 1 に示す 1406 及び 1415
ともに HR 頻度の上昇が確認されたことから、

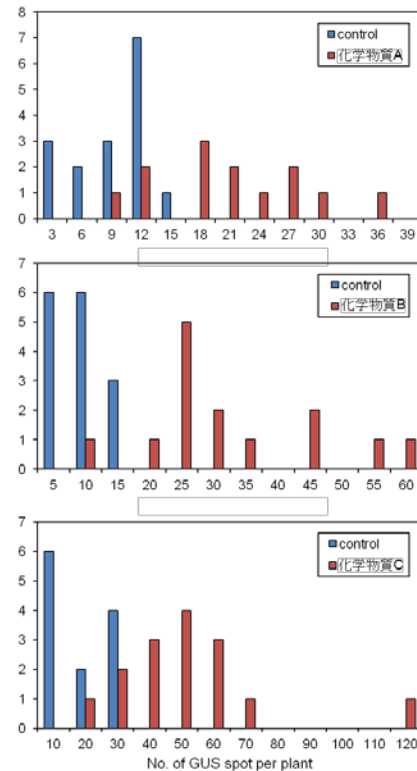


図2 HR頻度が増加した化学物質の例

表1に示した化学物質のうち、特にHR頻度を向上させる効果が
高いと考えられた3種類の化学物質A、B、Cについて、スクリー
ニングの結果を示した。グラフは横軸に植物個体あたりのGUSスポ
ット数、縦軸に個体数を示したヒストグラムである。また、青、赤の
バーは、それぞれ未処理、化学物質処理の結果を示している。

相同配列の方向性に依存せずに HR 頻度を向上させることが可能であることが示された。

これらの化学物質について、植物細胞に及ぼす影響についてさらに解析を行うために、発現解析を行った。HR 機構の中で削り込みによって生じた 5' 突出構造に結合する *Rad51* 遺伝子に着目した。*Rad51* 遺伝子は、DNA 損傷によって誘導されることが知られている。発現解析の結果、化学物質 A、B、C 処理によって、*Rad51* 遺伝子 mRNA 蓄積量に変化は見られなかった。現在、発現解析の再現性を確認しているところであるが、この結果から、化学物質 A、B、C は直接的に DNA 損傷を与えるような働きはしていない可能性が示された。

以上の結果から、これらの化学物質を GT システムに適用することで、高効率 GT システムを構築できる可能性が示された。また、分子内 HR によるマーカー除去システムが微生物等で報告されており、そのシステムにもこの化学物質が利用できるのではないかと期待される。

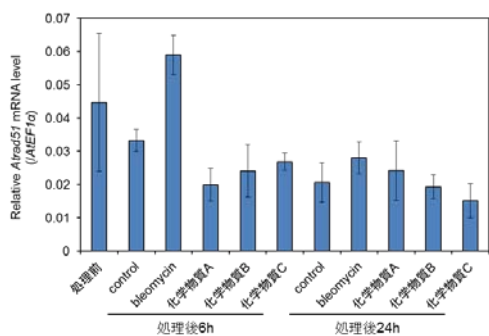


図3 化学物質処理時の*Rad51*遺伝子のmRNA量
1μMの化学物質A、B、C及びDNAのDSBを誘導する1mg/L bleomycinを処理し、6時間、24時間後のシロイヌナズナ植物体における*Rad51*遺伝子のmRNA量。各サンプルの*Rad51*遺伝子のmRNA量は、*EFla*遺伝子のmRNA量で補正した相対値で示している。

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5件)

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

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

(3) 土岐精一, 従来技術と GM 技術を繋ぐ新

しい育種技術, JATAFF newsletter, 査読無, 23 巻, 2012, 5

(4) 雑賀啓明, 土岐精一, 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, 査読無, 71 巻, 2013, 275-278

(5) 遠藤真咲, 土岐精一, 植物ゲノムの標的遺伝子改変における人工制限酵素の利用, 生物工学会誌, 査読無, 掲載予定

[学会発表] (計9件)

(1) 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, 理化学研究所

(2) 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, 新潟大学

(3) 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ティング効率の評価, 第53回日本植物生理学会年会, 京都産業大学

(4) Osakabe K, Kwon Y-I, Abe K, Saika H, Endo M, Ohtsuka N, Nishizawa-Yokoi A, Takeda S, Toki S, Stimulation of DSB-induced gene targeting by enhanced resection of DSB sites, EMBO Workshop 'Genetic Stability & Change: Genome Maintenance Mechanisms in Plants', フランス

(5) 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, 奈良先端科学技術大学院大学

(6) 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講演, 奈良先端科学技術大学院大学

(7) 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, 韓国

(8) 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, 韓国

(9) 雑賀啓明, 効率的なイネの遺伝子ターゲティングを目指して, 第54回日本植物生理学会年会講演, 岡山大学

〔図書〕（計2件）

(1) Osakabe K, Saika H, Okuzaki A, Toki S、CABI、Plant Mutation Breeding and Biotechnology、2012、609

(2) Osakabe K, Endo M, Toki S、CABI、Plant Mutation Breeding and Biotechnology、2012、609

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土岐 精一 (TOKI SEIICHI)

農業生物資源研究所・その他部局等・その他

研究者番号：80212067

(2) 研究分担者

雑賀 啓明 (SAIKA HIROAKI)

農業生物資源研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20435613

(3) 連携研究者

なし