

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570004

研究課題名(和文)植物における遺伝子機能研究への標的領域特異的な高効率遺伝子改変技術の導入

研究課題名(英文)High throughput gene-targeting with NHEJ deficient cells in plant

研究代表者

田中 秀逸(TANAKA, Shuuitsu)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：90202431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題の目的は、我々が開発した非相同末端結合能欠損株を用いた植物細胞における高効率遺伝子ターゲティング法に関して、遺伝子機能解析や育種への応用への有効性を示すことであった。

特定の蛋白質へのタグ付けを行うための遺伝子導入用コンストラクトを作製したが、耐性を獲得したカルスは得られていない。RNAiによりKU70量を抑制した野生型細胞の作製を試みたが、形質転換カルスが得られないでいる。得られ次第ターゲティング実験を行う。T-DNAによる高効率な細胞内への遺伝子導入法との共用の検討はできなかった。本研究で使用したカルスは、培地の植物ホルモン組成を変えることでシュート形成することを確認した。

研究成果の概要(英文)：In the research, we will show the sure availability of a new system, which we had published in 2010, of gene targeting with NHEJ deficient cells in plant for analysis of gene function and plant breeding.

We had tried that a target gene tagged with GFP gene is expressed from LIG4 deficient *A. thaliana*, and gene targeting is performed in either KU80 deficient or KU70 knocked-down plants. Because of problems, may be, from either condition of calli culture or constructs for gene manipulation, neither their transformed plants nor results have not yet been obtained. But, we observed shoot formation from our cultured calli. These experiments will do continuously after addition of both some checks and modifications.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：遺伝子ターゲティング 植物 バイオテクノロジー 育種学

1. 研究開始当初の背景

標的塩基配列特異的に導入DNA断片を挿入する遺伝子ターゲティングは、DNA二重鎖切断修復機構の「相同組換え(HR)」が働く事で起こる。一方、その修復にはもう一つ別の「非相同末端結合(NHEJ)」の経路も働き、この時導入断片はゲノム上にランダムに挿入される。我々は、NHEJに関わる遺伝子を欠損させたアカパンカビ株を宿主に用いることで、ゲノム内に遺伝子が挿入されたすべての株で遺伝子ターゲティングが起こる系を確立した{(Ninomiya *et al.*, *Pros. Nati. Acad. Sci. USA*, **101**:12248-1253 (2004); Ishibashi *et al.*, *Pros. Nati. Acad. Sci. USA*, **103**:14871-14876 (2006))。さらに、この方法は、少なくとも子の菌類では同様に有効であることが示された{東北大・阿部啓悦教授との共同研究: Mizutani *et al.*, *Fungal Genet. Biol.*, **45**:878-889 (2008); Krappmann *et al.*, *Eukaryot. Cell*, **5**: 212-215 (2006) 他}。また、動物細胞においてもこの応用で遺伝子変換効率が上がる事が報告された{Fattah *et al.*, *Pros. Nati. Acad. Sci. USA*, **105**: 8703- 8708 (2008)}。これまで植物では、主にT-DNAを用いた遺伝子導入法が用いられてきたが、遺伝子ターゲティング効率は極めて低く、我が国でもその効率を少しでも上げる為の研究が行われてきた(基礎生物学研究所-静岡県立大, 飯田ら; 農業生物資源研究所, 土岐ら)。このような中で我々は、NHEJ能欠損が植物細胞においても遺伝子ターゲット率を向上させることが可能か調べてきた。その結果、*lig4*遺伝子を欠損したシロイヌナズナ植物のカルス細胞においてAGAMOUS遺伝子を標的とした遺伝子ターゲティングが効率的に起こることが判り、論文発表に至った{Tanaka *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **396**: 289-293 (2010)}。

2. 研究の目的

我々がアカパンカビで見いだした高効率の遺伝子ターゲティング法が、モデ

ル植物であるシロイヌナズナのカルス細胞でも有効であることが明らかになった(Tanaka *et al.*, 2010)。本研究では、この技術を利用した遺伝子改変による、植物における遺伝子機能の解析に向けて、さらなる形質転換実験とその後の植物体再生を試みた。

具体的には、*lig4*遺伝子破壊株を用いて、遺伝子破壊でなくタグ(*GFP*遺伝子)付きで発現するように内在性の遺伝子を置き換えることを試みた。また、*lig4*遺伝子とは別なNHEJに必須な遺伝子である *ku70*および*ku80*遺伝子の破壊株について遺伝子ターゲティング率を調べようとした。遺伝子破壊と同様の効果が*ku70*遺伝子のRNAiによる発現抑制によっても見られるかどうかの検討を進めた。以上に加え、T-DNA法との併用の効果も考えた。これらにより、植物におけるNHEJ能の欠損を利用した高効率で安定した標的塩基配列特異的な遺伝子改変法を確立させることを目指した。

3. 研究の方法

(1) *lig4* 遺伝子破壊株のカルス化

SALK 研究所から入手した、二本の染色体のうちの片方の *LIG4* のコード領域に T-DNA が挿入されている変異体 SALK-095962 の種を播種し、*LIG4* を発現していない個体からカルスを誘導した(図1)。

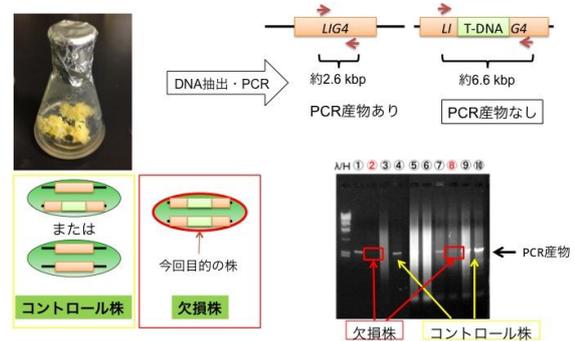


図1. *lig4* 欠損株のカルス取得

(2) *GFP* タグ付き *ku70* 遺伝子の作製

KU70 遺伝子の終止コドンの前後約 1.5 kbp の配列をそれぞれクローニングし、ベクターにつないだ。終止コドン直前に *GFP* 遺伝子の配列をつなげた。そして、ピアラホスで選抜できるようにピアラホス耐性遺伝子を *GFP* のターミネーター配列の下流につなぎ、*KU70* 染色体下流の配列で挟み込んだ(図 2、3)。この配列を導入用断片としてエレクトロポレーション法によりカルスへ導入した(図 4)。

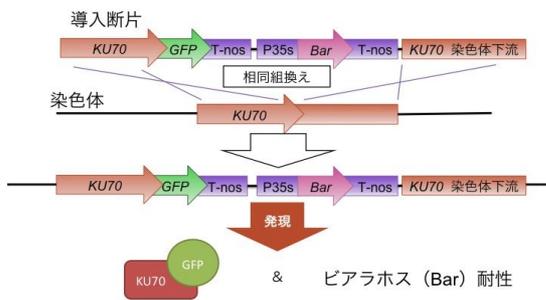


図 2 . *GFP* タグ付き *ku70* 遺伝子導入

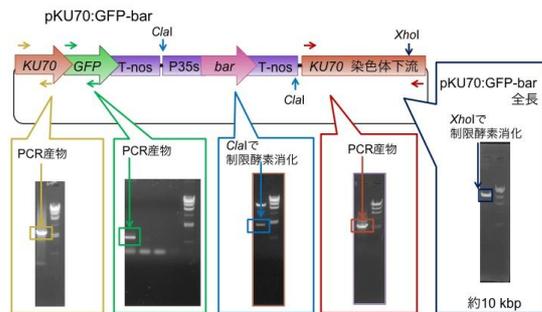


図 3 . *GFP* タグ付き導入断片の確認

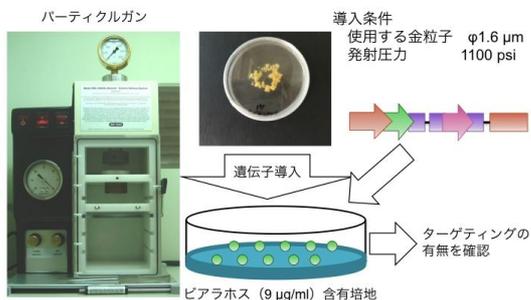


図 4 . エレクトロポレーション

(3) *ku80* 欠損株カルスにおける遺伝子ターゲティング

LIG4 とは異なる NHEJ 関連遺伝子として、*KU80* 遺伝子の欠損によっても、遺伝子ターゲティング効率が向上するか調べるために、SALK-096962 から得られた種子を用いて欠損株のカルスを得た。*AGAMOUS* 遺伝子のターゲティング用導入断片 (Tanaka et al., 2010) を用いて遺伝子導入を行った(図 5)。

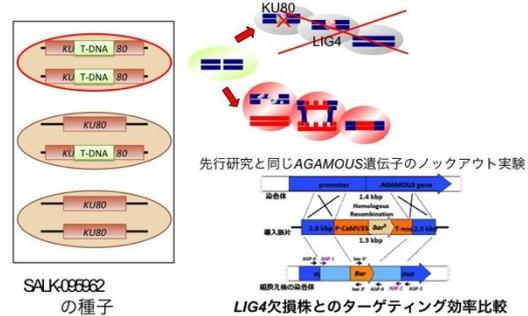


図 5 . *ku80* 欠損株での遺伝子ターゲティング

(4) *KU70* 遺伝子の RNAi による遺伝子発現抑制株での遺伝子ターゲティング

KU70 遺伝子の第 1 エキソン部の塩基配列に関し、転写されるとステムループを形成するような配列を持たせたフラグメントを形質転換用ベクターに組み込み、野生型株のカルスへ遺伝子導入を行った(図 6)。

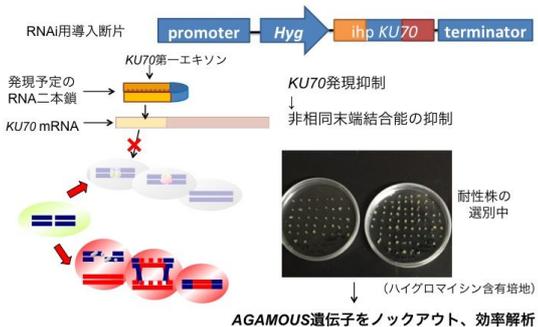


図 6 . RNAi による NHEJ 能抑制による遺伝子ターゲティング効率化の検討

ハイグロマイシン耐性を獲得したカルスを選別し、その細胞内の *ku70* mRNA 発現量を調べ、発現抑制効果が確かめられれば、*AGAMOUS* 遺伝子ターゲティング用断片を用いて遺伝子導入効率を調べる予定である。

4. 研究成果

「遺伝子ターゲティングされた株の蓄積」に関しては、ターゲティングにより、「遺伝子破壊」ではなく、「発現する蛋白質へのタグ付け」を行い、本技術の遺伝子機能解析への有用性を示すことにした。*KU70*遺伝子に*GFP*のタグが付くとともにピアラフォス (Bar) 耐性で選択できる様にするための遺伝子導入用コンストラクトを作製した。エレクトロポレーション法を用いて、*lig4*欠損株のカルスにそのDNA断片の導入を行っているが、耐性を獲得したカルス細胞は得られていない。導入断片は、相同配列で挟まれた間にBar耐性遺伝子も含む3 kbp程の本来の配列に無い配列を持たせている。これが、組換えの効率を下げってしまうのかもしれないと考えている。「RNAiにより*KU70*量を抑制した野生型細胞を用いたターゲティング実験」に関しては、野生型株から得られたカルス細胞に*KU70*遺伝子の最上流コード領域に対してRNAi用mRNAを発現させることを進めた。導入株はハイグロマイシン(Hyg) 耐性を獲得することで判別できるようにした。現在のところ耐性を獲得したカルス細胞は得られていない。ここで用いている導入断片は、Hyg耐性遺伝子とRNAi用のmRNAが一本のmRNAとして転写されるようにした。Hyg耐性遺伝子の発現には影響しないと考えていたが、再検討の必要があるのかもしれない。

「T-DNAによる高効率な細胞内への遺伝子導入法との共用」については、実験を行うことはできなかった。一方、「カル

スからの植物体への再生」については、カルス培養の培地の植物ホルモン組成を変えることで、シュート形成を誘導できることを確認した。

申請した研究期間は修了するが、本課題について十分な成果が得られるまで引き続き実験を継続する。

5. 主な発表論文等

残念ながら、発表できるところまでは至らなかった。

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

・埼玉大学理学部生体制御学科遺伝学研究室
ホームページ

(<http://genet.seitai.saitama-u.ac.jp/>)

・埼玉大学大学院理工学研究科 研究紹介
“ 遺伝子を 100% 狙い撃ちする技術 ”
(http://www.saitama-u.ac.jp/rikougaku/jp/kenkyushoukai_inoue.pdf)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 秀逸 (TANAKA, Shuuitsu)
埼玉大学・理工学研究科・教授
研究者番号：90202431

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し