

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658011

研究課題名(和文) ジーンターゲティングによる汎用的点変異導入システムの開発

研究課題名(英文) Establishment of universal site-directed mutagenesis system via gene targeting

研究代表者

雑賀 啓明 (Saika, Hiroaki)

独立行政法人農業生物資源研究所・農業生物先端ゲノム研究センター ゲノム機能改変研究ユニット・主任研究員

研究者番号：20435613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ジーンターゲティング(GT)は標的遺伝子に目的の変異を導入することができる遺伝子組換え技術である。本研究では、DNA修復機構の1つである単鎖アニーリング(SSA)を利用してGT細胞の選抜に用いたマーカー遺伝子を不要な配列を残さずに除去する技術の高度化を目的とした。そこで、SSAが生じた細胞に薬剤耐性を付与するための選抜マーカーを構築した。それを利用することでマーカー除去に成功した細胞を効率よく濃縮することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Gene targeting (GT) can introduce desirable mutations into a targeted gene as expected. In this study, we aimed to advance site-directed mutagenesis technology in which GT and subsequent marker elimination via DNA repair system, single strand annealing (SSA). We succeeded in the enrichment of marker-free cells by means of conferring a herbicide tolerance to cells in which SSA events occurred.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：ジーンターゲティング 変異導入 マーカー除去

1. 研究開始当初の背景

相同組換えを利用したジーンターゲティング (gene targeting, GT) は、ゲノム中のランダムな位置に外来 DNA が挿入される従来の遺伝子組換え技術とは異なり、内在性の標的遺伝子に目的の変異を導入することができる技術である。イネにおける一般的な GT ベクターは、形質転換に成功した細胞に薬剤耐性を付与するポジティブ選抜マーカーと GT ベクターがゲノムのランダムな位置に挿入した細胞を殺すネガティブ選抜マーカーの 2 種類のマーカー遺伝子を利用している。この実験系では、標的遺伝子にポジティブ選抜マーカーが挿入されるが、その近傍に塩基置換や小さい欠失等の変異を同時に導入することも可能である。よって、ゲノムに挿入されたポジティブ選抜マーカーを不要な配列を残さずに除去することができれば、標的遺伝子に目的の変異だけを導入することが可能である。このような GT による標的遺伝子への点変異導入技術は、遺伝子破壊のみならず遺伝子や遺伝子産物の機能を様々に改変できるため、実験系統や育種素材の開発に非常に有効である。

2. 研究の目的

GT のポジティブ選抜マーカーを除去する方法として、DNA 二重鎖切断修復機構の 1 つである単鎖アニーリング (single strand annealing, SSA) を利用する方法が挙げられる (図 1)。しかし、DNA 二重鎖切断修復経路は複数存在し、SSA が主要な修復経路ではないため、選抜マーカーの除去に成功した細胞を効率よく選抜することは困難であった。本研究では、標的遺伝子に点変異だけを導入する技術の高度化を目指し、SSA が生じた細胞を効率よく濃縮する新規選抜マーカー遺伝子の開発を行った。

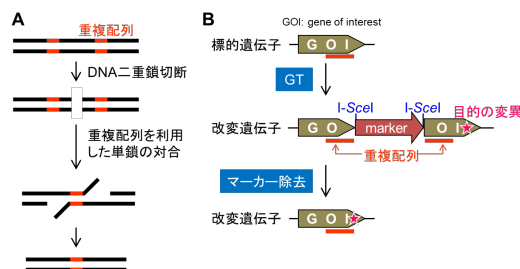


図1. GTとSSAによるマーカー除去を組み合わせた標的遺伝子改変技術
A. SSAによるDNA二重鎖切断修復の流れ。B. GTとSSAによるマーカー除去のスキーム。GTによって、ポジティブ選抜マーカーの両外側に重複配列を持たせるとともに、必要とする目的変異を導入する。次いで、制限酵素I-SceIを発現させることで、ポジティブ選抜マーカーの両端を切断し、SSAを誘導する。これにより、標的遺伝子に必要な変異だけを残すことが可能である。

3. 研究の方法

ビスピリバックナトリウム (BS) はアセト乳酸合成酵素 (ALS) を標的とする除草剤である。また、W548L/S627I 変異を有する ALS はイネの細胞に BS 耐性を付与する。そこで、SSA が生じた細胞に BS 耐性を付与することを目指し、AL-LS マーカーを構築した (図 2)。AL-LS マーカーは、BS 耐性型 ALS 遺伝子を 1kb の重複を持たせて二分し、その間に制限酵素

I-SceI の認識配列を両側にもつ *nptII* 遺伝子を挿入することにより作製した。

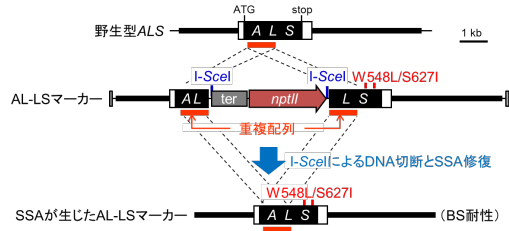


図2. AL-LSマーカーの模式図
AL-LSマーカーには、除草剤BS耐性型変異 (W548L/S627I) を有するALS遺伝子のコード領域に、両端にI-SceI認識配列を付加したnptII発現カセットが挿入されている。さらに、nptII発現カセットの両外側は、ALS遺伝子配列を1kb重複させている(オレンジ色の部分)。AL-LSマーカーは機能的なALS遺伝子として発現しないが、SSAによって修復を受けた場合のみBS耐性型ALS遺伝子として機能することが期待される。

材料として、SSA によって修復された場合に機能的な GUS 遺伝子が発現し、SSA イベントを可視的にモニタリングできる GU-US マーカーコンストラクト、及び エストラジオール依存的に DNA 二重鎖切断を誘導するための制限酵素 I-SceI 発現コンストラクトを導入したイネを用いた (図 3A)。この形質転換カルスに対し、上記の AL-LS マーカーコンストラクトをアグロバクテリウム法により導入し、再分化個体を得た。この T1 種子からカルスを誘導し、エストラジオール処理を施した。処理カルスは BS を含む選抜培地で培養し、BS 耐性カルスを得た。

4. 研究成果

まず、エストラジオール処理を施して I-SceI の発現を誘導した時に、カルスに GUS 遺伝子の発現による青色の呈色が見られるかを確認した。その結果、コントロールの DMSO 処理ではカルス 100mg あたり 8.0 個の青色スポットが検出されたのに対し、エストラジオール処理では 55.7 個の青色スポットが検出された。このことから、エストラジオール処理依存的に I-SceI が発現し、GU-US マーカーが機能的な GUS 遺伝子に修復されていることを確認した。

次に、エストラジオール処理によって I-SceI の発現を誘導したカルスを、BS を含む選抜培地に置床した。その結果、DMSO 処理を施したカルスからは BS 耐性細胞がほとんど得られなかったのに対し、エストラジ

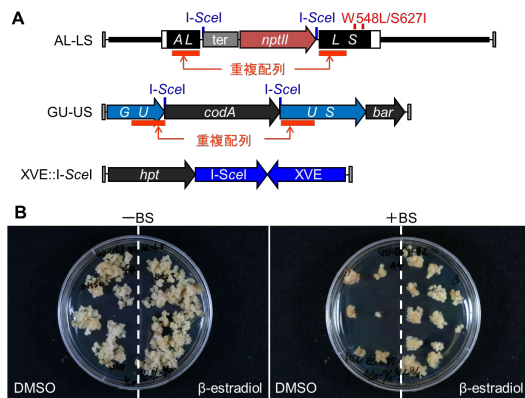


図3. βエストラジオール処理を施したカルスにおけるBS選抜
A. 本研究で使用したイネカルスに導入している3種類のベクターコンストラクト。B. βエストラジオール処理を施したカルスについて、BSを含まない選抜培地、もしくは0.75 μM BSを含む選抜培地で培養した。

ール処理を施したカルスからは BS 耐性細胞が得られた。この結果から、I-SceI の発現依存的に、AL-LS マーカーが SSA によって修復された可能性が示された (図 3B)。

BS 耐性を示したカルスをサンプリングし、GUS 染色を行った。その結果、DMSO 処理を施し BS 選抜を行わなかったカルス、エストラジオール処理を施し BS 選抜を行わなかったカルス、エストラジオール処理を施し BS 選抜を行ったカルスの順に、より多くの細胞で青色呈色が観察された。さらに、GU-US マーカー、AL-LS マーカーにおいてサザンブロット解析を行った結果、いずれのマーカーにおいても、SSA によって修復されたことを示すバンドが検出された (図 4)。また、そのバンドの強度は GUS 染色による結果と一致していた。したがって、AL-LS マーカーを利用することで、AL-LS マーカーと、それとは異なる位置に座乗する GU-US 遺伝子がともに SSA によって修復された細胞を効率よく濃縮できることが示された。一方、DNA 二重鎖切断は、SSA のみならず非同相末端結合 (NHEJ) によっても修復される。サザンブロット解析の結果、GU-US マーカーでは NHEJ によって修復されたことを示すバンドが検出されたのに対し、AL-LS マーカーでは検出されなかった (図 4)。この結果は、SSA イベントが直接選抜されていないことに起因すると考えられる。

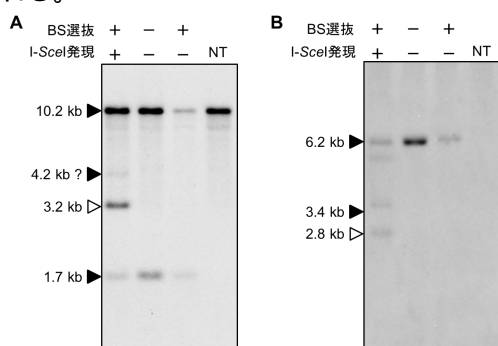


図4. AL-LSマーカー、GU-USマーカーにおけるサザンブロット解析
A. AL-LSマーカーにおけるサザンブロット解析。ゲノムDNAをSpeI/MfeIで切断後、ALS遺伝子のコーディング領域を認識するプローブを用いて検出した。内在性ALS遺伝子は10.2kbのバンドとして検出される。また、AL-LSマーカーは1.7kb、SSAによって修復されたAL-LSマーカーは3.2kb、NHEJによって修復され、nptIIマーカーが除去されたAL-LSマーカーは4.2kbのバンドとして検出される。B. GU-USマーカーにおけるサザンブロット解析。ゲノムDNAをEcoRI/HindIIIで切断後、GUS遺伝子のコーディング領域を認識するプローブを用いて検出した。GU-USマーカーは6.2kb、SSAによって修復されたGU-USマーカーは2.8kb、NHEJによって修復され、codA遺伝子が除去されたGU-USマーカーは3.4kbのバンドとして検出される。NT: 非形質転換体

以上の結果から、AL-LS マーカーを利用することで SSA が生じた細胞を濃縮できることが実証された。この結果は、AL-LS マーカーを利用することで、SSA によって GT のポジティブ選抜マーカーを除去できた細胞が濃縮できたことを示している。また、SSA/NHEJ のバランスを改変することで、SSA によるマーカー除去細胞をより高効率に選抜できる可能性が考えられた。

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 3 件)

(1) Saika H, Nishizawa-Yokoi A, Toki S (2014) The non-homologous end-joining pathway is involved in stable transformation in rice. *Front.Plant Sci.* 5:560 査読有
doi: 10.3389/fpls.2014.00560.

(2) 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

(3) Saika H, Nonaka S, Osakabe K, Toki S (2012) Sequential monitoring of transgene expression following *Agrobacterium*-mediated transformation of rice. *Plant Cell Physiol.* 53: 1974-1983 査読有
doi: 10.1093/pcp/pcs135

〔学会発表〕(計 13 件)

(1) 雑賀啓明, 森明子, 土岐精一 マーカー遺伝子が除去されたイネ細胞を濃縮する技術の開発 日本育種学会第 127 回講演会 2015 年 3 月 22 日 玉川大学 (東京都・町田市)

(2) 雑賀啓明, 土岐精一 植物ゲノム編集研究の現状と展望 平成 26 年度岡山大学資源植物科学研究所 共同研究拠点ワークショップ「植物ゲノム編集ワークショップ」 2014 年 11 月 4 日 倉敷市芸文館アイシアター (岡山県・倉敷市)

(3) 雑賀啓明, 森明子, 土岐精一 形質転換技術を利用したイネゲノムの人為的改変 第 32 回日本植物細胞分子生物学会 2014 年 8 月 22 日 アイーナ (いわて県情報交流センター) (岩手県・盛岡市)

(4) Saika H, Mori A, Endo M, Osakabe K, Toki S. Site-directed mutagenesis in rice by a combination of gene targeting and marker elimination. *International Association for Plant Biotechnology Congress 2014* 2014 年 8 月 11 日 メルボルン (オーストラリア)

(5) Saika H, Osakabe K, Yokoi-Nishizawa A, Kwon Y-I, Ohtsuki N, Mori A, Endo M, Toki S. Gene-targeting-mediated mutagenesis in rice. 11th International Symposium on Rice Functional Genomics 2013 年 11 月 22 日 ニューデリー (インド)

(6) 雑賀啓明, 森明子, Kwon Yong-Ik, 遠藤真咲, 刑部敬史, 土岐精一 DNA 二重鎖切断を利用したマーカー除去系開発の試み 2013 年 10 月 13 日 日本育種学会第 124 回講演会

(7) Saika H, Osakabe K, Yokoi-Nishizawa A, Kwon Y-I, Ohtsuki N, Mori A, Endo M, Toki S. Precision genome engineering in rice. 8th Joint Korea-Japan Plant Biotech Workshop -New Biotechnology-based Plant Breeding Techniques- 2013年9月9日 北海道大学(北海道・札幌市)

(8) 雑賀啓明 効率的なイネの遺伝子ターゲットングを目指して 第54回日本植物生理学会年会 2013年3月23日 岡山大学(岡山県・岡山市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

雑賀 啓明 (SAIKA HIROAKI)

農業生物資源研究所・農業生物先端ゲノム研究センター ゲノム機能改変研究ユニット・主任研究員

研究者番号：20435613

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし