

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660005

研究課題名(和文)人工制限酵素の外部投与によるイネ標的遺伝子破壊への挑戦

研究課題名(英文) Trial of creating regenerated plants that have mutation of target gene by treatment of TALEN from the outside

研究代表者

犬飼 義明 (Inukai, Yoshiaki)

名古屋大学・農学国際教育協力研究センター・准教授

研究者番号：20377790

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)：本応募課題では、これまでに我々が作出・選抜し、原因遺伝子を単離してきたイネの根の突然変異体を有効に活用し、人工制限酵素(TALEN)のイネのカルスや根への外部投与により、標的遺伝子の破壊を試みた。その結果、TALEN:GFP融合タンパク質の核への導入には成功したが、標的遺伝子への変異挿入個体を得ることはできなかった。今後はカルス培養条件を検討し、解析する必要がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to create regenerated plants that have mutation of target gene by treatment of TALEN from the outside of callus or root tips. However, we have not been able to get those plants, yet. Henceforth, we have to reconsider about condition of callus induction that can make TALEN work much more effectively.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：イネ ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

これまでに、作物育種に活用されてきた遺伝子組換え技術は 21 世紀に入ってから多様な技術が次々に開発され、基礎・応用・実用研究の面で活用されている。すなわち、従来の遺伝子組換えの痕跡が残る技術から、最終産物である品種のゲノムには痕跡が残らない(導入遺伝子が残らない)技術が開発されてきた。New Plant Breeding Techniques (NBT) と呼ばれるこれらの手法の 1 つに人工制限酵素による標的遺伝子の改変技術があげられる。この人工制限酵素の配列をゲノムに組み込み植物体内で発現させ、標的遺伝子を改変した後、自殖後代で導入配列をもつ染色体を保持しない個体を選抜すれば、最終産物には遺伝子組換えの痕跡が全く残らないこととなる。しかし、作成途中の段階でゲノムに組み込んでいることから、最終産物を“非”形質転換体として扱うことに関して国際的な議論が活発化している。

2. 研究の目的

そこで本応募課題では、これまでに我々が作出・選抜し、原因遺伝子を単離してきたイネの根の突然変異体を有効に活用し、最終的に人工制限酵素 (TALEN) のイネの根への外部投与により、標的遺伝子の破壊が可能であることの証明を目指した。

3. 研究の方法

1) TALEN コンストラクトの導入による標的遺伝子の破壊

ゲノム編集コンソーシアムより分譲された Golden Gate TALEN assembly により、各標的遺伝子を切断する人工制限酵素 (TALEN) コンストラクトを構築し、イネの wild type カルスへ導入する。次にこれらカルス由来の再分化個体の DNA を抽出し、対象配列を解析することにより、実際にこれら標的遺伝子内に

変異を導入できることを確認する。その際、TALEN の N 末、および C 末側の長さの改変や、各標的遺伝子のホモログ(off-target sites) への影響等も精査し、効率的かつ標的配列特異的な変異系統作出法を確立する。

2) TALEN:GFP 融合タンパク質のイネのカルスおよび根系への外部投与

各 TALEN に GFP を連結させたタンパク質を合成し、アルギニンリッチペプチドとともにイネカルスおよび根へ投与し、実際に核内へ到達することを GFP の分布をもとに実証する。その際、ペプチドと TALEN:GFP 融合タンパク質の混合割合、濃度、処理時間等を詳細に検討し、最適値を決定する。

3) TALEN タンパク質のカルスおよび根系への外部投与による標的遺伝子破壊候補系統の作出および選抜

上記により各種条件設定が終了した後に、TALEN タンパク質とアルギニンリッチペプチドを供試材料のカルスおよび根へ投与する。その後、カルス誘導培地で培養し、カルスの増殖、および根からのカルスの誘導を行う。その際、経時的にカルスをサンプリングし、DNA の抽出、および DNA 配列の決定により標的遺伝子破壊候補系統の作出および選抜を試みる。

4. 研究成果

1) TALEN コンストラクトの導入による標的遺伝子の破壊

はじめに、Golden Gate TALEN assembly により各標的遺伝子を切断する人工制限酵素 (TALEN) を構築し、イネの wild type カルスへアグロバクテリウムを介して導入した。次に、選抜培地上で活発な細胞増殖が認められたカルスを対象に、DNA を抽出して以下のように標的遺伝子の破壊の有無を確認した。

TALEN の標的領域中に制限酵素サイトが存在するように設計したため、当該領域を

PCRにより増幅した後に、各制限酵素で処理し、標的遺伝子の破壊の有無を調査した。その結果、制限酵素で切断されなかったカルス系統を複数得ることに成功した。

次に、これらのカルス系統由来のDNAを対象に、標的領域の塩基配列を決定した。その結果、標的遺伝子に数ベースのDNAのデリレーションが認められる個体を得ることに成功した。このことは、導入した遺伝子が発現した人工制限酵素がDNAを確かに切断し、最終的に変異を導入できたことを示している。

加えて、この実験において制限酵素で切断されたカルス由来のDNAについても同様に配列を決定することで変異挿入の有無を確認した。その結果、これらの中にも変異挿入系統を見出すことに成功した。興味深いことに、これらの中にはTALENの結合配列よりも外側に変異が挿入されたカルスが見出された。カルス誘導を伴っているため、これらの変異が必ずしもTALENによるものか否かについては現時点では確証は得られない。しかし、標的サイトの極めて近傍であることを考えると、TALENによる切断後に挿入された可能性がある。もしそうであれば、これらの人工制限酵素による変異挿入のメカニズムに関してはまだまだ未解明の部分が多く残されていることになり、今回得られたそれぞれの変異パターンを精査していくことは、本手法の今後の利用展開に向けて極めて重要な情報を提供できるものと期待される。

変異挿入が認められたこれらのカルスを再分化培地へ移植し、再分化個体を取得した。最終的に、これらの個体由来のDNAを解析することで、得られた再分化個体では確かに標的遺伝子が破壊されていることを確認した。

標的遺伝子はファミリーを形成しているため、他のファミリー遺伝子にもTALENによる変異挿入が認められるかどうかと検討した。TALENの結合配列に相同性の高い領域について配列を決定した結果、いずれのファミリー遺伝子にも変異の挿入は認められなかった。このことは、TALENによる標的遺伝子への変

異挿入は非常に特異性が高い状態で進行していると考えられる。しかし、品種育成の観点からは、全く他の遺伝子に影響しないかが非常に重要になってくるため、今後は解析するカルス由来のDNA数をさらに増やすことや、培養期間の違いによる影響もしっかり把握しつつ、オフターゲットへの作用の有無を精査していく予定である。

2) TALEN:GFP 融合タンパク質のイネのカルスおよび根系への外部投与

各TALENにGFPを連結させたタンパク質を合成し、アルギニンリッチペプチドとともにイネカルスおよび根へ投与した結果、実際に核内へ到達することをGFPの分布をもとに実証した。その際、ペプチドとTALEN:GFP融合タンパク質の混合割合、濃度、処理時間等を詳細に検討し、最適値を決定した。

3) TALEN タンパク質のカルスおよび根系への外部投与による標的遺伝子破壊候補系統の作出および選抜

上記1)にてDNAの切断能力が実証されたTALENをイネの根、およびカルスへ外部投与することで、標的DNAへの変異挿入を試みた。しかし、当該領域のPCR増幅産物への各制限酵素処理、および標的領域の塩基配列の解読を行ったが、実際に変異が挿入されたカルスを獲得することはできなかった。

外部投与ではTALENにより切断・変異挿入が生じる細胞数が著しく少ないことが想定される。そこで、これらのカルス由来の再分化個体を取得し、これらのDNAの標的配列を決定したが、得られた再分化個体においても当該領域への変異挿入は認められなかった。

これに関して、通常のアグロバクテリウムによるTALEN導入時では、導入後のカルス培養期間が長いほど、TALENによる変異挿入の効率が高まることが報告されている。このことは、活発に細胞増殖が進行しているときにTALENによる切断・変異挿入のタイミングであることを示唆している。このため、今後は液体振とう培養を行うなど、カルスの増

殖を著しく高めることで、TALEN の作用力を最大限に発揮させる等の改善が重要と考えられる。

研究者番号：20377790

(2)研究分担者

()

研究者番号：

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)

(3)連携研究者

()

研究者番号：

〔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)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://iccae.agr.nagoya-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

犬飼 義明 (INUKAI Yoshiaki)