

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25660007

研究課題名(和文) 四型分泌機構を利用した革新的植物ゲノム改変技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel plant genome modification technology using bacterial Type4 Secretion System

研究代表者

守口 和基 (Moriguchi, Kazuki)

広島大学・理学研究科・講師

研究者番号：30294523

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)：我々は、RP4プラスミドの持つRP4-T4SSが酵母細胞内にssDNAを挿入した後に挿入DNAが正確に再環状化する現象を発見したことから、植物細胞のジーンターゲティング技術として応用することを目指した。

大腸菌から植物細胞へのRP4-T4SSを介した遺伝子導入は十分な移行効率ではなかった為、アグロバクテリアのVirB/D4-T4SSによるDNA移行を試みた結果、高効率で移行し植物細胞内で再環状化するプラスミドを見出した。このプラスミドを骨格にベクターを作成し、加えて組換え効率を上昇させる遺伝子を保持したヘルパープラスミドを作成し、ジーンターゲティングを試みたが、形質転換体の検出には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：RP4 plasmid transfers itself into eukaryotic cells by a Type4 Secretion System (RP4-T4SS), which is encoded in the plasmid. We found that the transferred linear ssDNA re-circularized exactly in yeast, and based on this finding, we intended to establish a gene-targeting method in plants.

We could not improve its transfer efficiency to the level, which is sufficient for applying to gene-targeting. Instead, we found a plasmid, which transfers and re-circularized in plant cells by $\text{\textit{Ti}}$ plasmid encoded Type 4 Secretion System (VirB/D4-T4SS). By using the plasmid, we constructed targeting vectors and helper plasmids, which possessed genes for enhancing homologous recombination. In spite of combining these vectors and helper plasmids, we have not detected the gene-targeting phenomenon in plant cells.

研究分野：ゲノム応用科学

キーワード：四型分泌系 ジーンターゲティング 遺伝子水平伝達

1. 研究開始当初の背景

バクテリアの T4SS による接合システムは長鎖 DNA を移行させることができる。研究代表者は本研究開始の前年に、この接合システムを利用して高等植物細胞へ遺伝子を導入することに成功した。この手法は、供与細胞となる大腸菌にベクターを持たせておけば DNA 抽出やアグロバクテリアへの導入をおこなわずに、直接真核細胞への遺伝子導入ができるものである。出芽酵母では 1000 細胞に 1 個の形質転換体を得られる簡便・高効率な手法として確立する事に成功した。一方、組換え植物作製において、ジーンターゲット法による遺伝子置換技術は、相同組換え効率が低い為に、数多く得られる非同相組換えによる組換え体の中からのスクリーニングに手間がかかるのが現状である。バクテリアの遺伝学においては、一般的な手法による遺伝子導入効率が低く、かつ相同組換え効率が低い生物の場合は、接合による遺伝子導入系を用いて 2 回の組換えを 2 ステップに分けることにより、ターゲットされた形質転換体を得る手法が用いられる。最近我々は、出芽酵母を用いた生物界間接合では環状 ssDNA の形態で核移行する事を発見し、これを高等植物に利用すれば標的遺伝子への結合効率を高める事ができ、環状 DNA である為にポジティブ選抜マーカーとネガティブマーカー選抜を組み合わせた 2 ステップ型の相同組換えによるジーンターゲットが可能になるとの着想に至った。

2. 研究の目的

接合伝達による真核生物への遺伝子導入のメカニズムの解析を通じ、植物細胞への遺伝子導入効率を高め、安定形質転換体を得る技術を確立することが本研究の第一の目標である。複数の植物細胞種で安定形質転換体を得る。その後、長鎖 DNA の導入が可能であること、環状 ssDNA の移行が起こることといった本遺伝子導入法の特質を生かした課題であるジーンターゲットの実現に挑戦する。

3. 研究の方法

(1)-(7)は「研究成果」(1)-(7)の区分に対応する。

- (1) 酵母への遺伝子導入ツールとして成功した RP4 プラスミド (RK2 プラスミドとも呼ばれる) の保持する四型分泌系 (以下 RP4-T4SS と記す) を用いて生物界間接合反応を行い、安定形質転換体の単離を試みる。先行研究 (課題番号: 21510209) 結果を受けた検討項目として、
 - ① 先行研究で作成した植物細胞に対し弱毒性の大腸菌株を用いる。
 - ② バクテリアと混合することにより誘導される植物細胞のプログラム細胞死を抑えるために pH を安定化させる、

H₂O₂ 吸着剤を添加する。

- ③ 主材料として想定したイネ 0c 細胞だけでなくタバコ BY-2 細胞も試す。を挙げて研究を進めた。
- (2) 研究成果欄で後述する通り (1) の実施による安定形質転換体の単離はできなかったため他の四型分泌系と接合ベクターを検討することとした。T-DNA 輸送系で機能し、RP4-T4SS より植物細胞への親和性が高いと予想されるアグロバクテリアの T4SS (以下 VirB/D4-T4SS と記す) を利用して接合伝達が可能か検討を行った。
- (3) (2) で植物細胞への移行が確認されたベクターについて移行様式の詳しい解析を行った。環状 DNA の移行が確認されたもの (以降 pCir ベクターとする) を以降のジーンターゲット研究に採用した。
- (4) pCir ベクターを骨格としたターゲットベクターの作成及びジーンターゲット検出用 BY-2 細胞の作成。これらを用いてジーンターゲットの検出を試みた。
- (5) ジーンターゲット効率を上昇させるためのヘルパープラスミドを作成した。ヘルパープラスミドには相同組み換え効率を高める遺伝子を組み込み、T-DNA 移行を利用して一過的に発現させることによりジーンターゲットの検出を試みた。
- (6) 相同組換え頻度を上昇させるために植物ウイルスの複製領域及び複製関連遺伝子をターゲットベクターに組み込むことにより植物細胞内でのコピー数を増加させ、ジーンターゲットの検出を試みた。
- (7) VirB/D4-T4SS と並行して、初期の RP4-T4SS に立ち返った。供与体としての大腸菌が、真核細胞に対する細胞毒性だけではなく、RP4-T4SS による DNA の移行能力にも菌株間で違いを示すのではないかと仮説に立ち、高移行能を示す菌株を育種できるかどうか可能性を調べるために、大腸菌-出芽酵母間の生物界間接合系を用いて菌株間比較を行った。

4. 研究成果

(1)-(7)は「研究の方法」(1)-(7)の区分に対応する。

- (1) **RP4-T4SS による DNA 移行は植物細胞への遺伝子導入系としては不向きである。**
大腸菌による植物細胞への細胞毒性を低下させる方策として、供与体として弱毒性菌株 DH10B Δ (*ubiG*), pH 安定化のために MES 緩衝液, H₂O₂ 吸着のために Amberlite XAD4, イネ 0c 細胞より耐性の高いことがわかったタバコ BY-2 細胞を受容体とする、といった方策を組み合

わせて遺伝子導入実験を行ったが、安定形質転換体の単離には至らなかった。更に、植物細胞への親和性の高いアグロバクテリアを供与体として用いて RP4-T4SS による遺伝子導入を試みたが、やはり安定形質転換体の単離には至らなかった。これらの結果から、大腸菌と RP4-T4SS を用いた生物界間接合において、アグロバクテリア並みに細胞毒性を抑えることができたとしても、遺伝子導入系として十分用いることが可能な形質転換公立の確保は難しいとの結論に至った。

(2) **VirB/D4-T4SS によって可動化プラスミドは植物細胞へ伝達する。**

(1)の結論を受け、次の方策としてアグロバクテリア VirB/D4-T4SS による可動化プラスミドの移行を検討することにした。可動化プラスミドとして、過去に VirB/D4-T4SS による植物細胞への移行が報告されている RSF1010 プラスミドと今回新たに pBBR1 プラスミドをバックボーンに、植物への遺伝子導入用ベクターをそれぞれ作成し、検出を試みた。その結果、双方とも植物細胞への移行能を示し、その効率は T-DNA 移行と比較して 1/10-1/6 に達したことから、遺伝子導入系として利用可能であると判断した。

(3) **pCir ベクターの完成。**

植物細胞への移行が確認されても、本研究のジーンターゲットングに応用するためには、RP4-T4SS による RP4 型プラスミドの出芽酵母への移行に見られるような「移行したベクターの再環状化」が必須である。そこでそれぞれのベクターを導入して得られた形質転換 BY-2 クローンを解析した。

作成したベクターはエピソームとして植物細胞内では維持できない。従って形質転換体では、ベクターは染色体へ挿入されている。挿入様式を PCR マッピングによって解析した結果、pBBR1 型プラスミドベクターの方が欠失の割合が低いことが明らかになった。更に移行開始起点 (*oriT*) 周辺の配列を含むクローンが得られることから、pBBR1 型プラスミドベクターの移行時に、① *oriT* 以外の配列が VirD2 により移行開始起点として認識されている。② *oriT* を起点として植物細胞へ移行した後に再環状化している。の2つの可能性が考えられた。

②であることを確認するために、ベクターの *oriT* 領域に変異を導入したコンストラクトで移行実験を行なった結果、移行はブロックされた。この結果から、pBBR1 型プラスミドベクターは植物細胞内で再環状化すると結論づけることができ、pCir ベクターの完成とした。

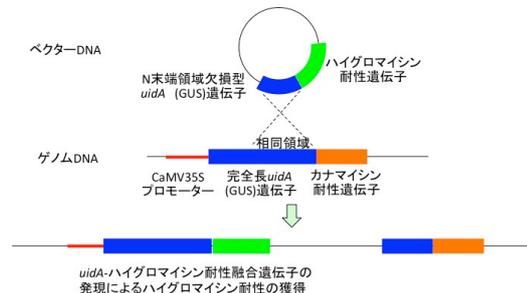
更に移行様式の解析を進めた結果、pBBR1 型プラスミドベクターは RSF1010

型プラスミドベクターと異なり、T-DNA 移行と競合せず、並行導入が可能であることを見出した。

(4) **ターゲットングベクター単独導入でのターゲットングは検出限界以下である。**

pCir ベクターを骨格としたターゲットングベクターの作成及びジーンターゲットング検出用 BY-2 細胞の作成を行なった。これらを用いたジーンターゲットングの検出の原理は下図に示す通りである。完成したコンストラクトを用いてジーンターゲットングの検出を試みたが、ターゲットングの検出には至らなかった。

図:実施したターゲットング検出システム



(5) **ヘルパープラスミドを用いたターゲットングも検出限界以下である。**

(4)の結果を受け、相同組換え頻度を上昇させるために、植物で相同組み換え効率を上昇させたとの報告がある出芽酵母 *yRAD54* 遺伝子を CaMV35S プロモーター下流に組み込んだ T-DNA 移行型ヘルパープラスミドを作成し、ターゲットングベクターと同時導入させてジーンターゲットングの検出を試みたが、検出には至らなかった。

次に、CRISPR/CAS9 システムを導入したヘルパープラスミドを作成し、ターゲットングベクターとの同時導入により標的となる C 末端領域欠損型 *uidA* 遺伝子 DNA に損傷を入れ、ターゲットングベクターとの相同組換え型修復を促すことによりジーンターゲットングの検出を試みることにした。当初設計した2ヶ所の標的領域に対するベクターはアグロバクテリア内で毒性を示し、変異の入った gRNA 遺伝子をもつクローンしか得られなかった。これは野生型 CAS9、ニック挿入型変異 CAS9 のいずれを発現するヘルパープラスミドでも同様であった。さらに追加作成した3ヶ所目の標的に対するヘルパープラスミドでは、ニック挿入型変異 CAS9 を保持するヘルパープラスミドのみ、成長は遅いものの変異が入っていないクローンが得られた。このクローンを用いてジーンターゲットングの検出を試みたが、やはり検出には至ら

なかった。

(6) **植物細胞内増幅型コピー型ターゲティングベクター導入によるターゲティングは検出限界以下である。**

さらなる工夫として、TYLCV ウイルスの複製領域及び複製関連遺伝子をターゲティングベクターに組み込んだ。BY-2 植物細胞内でのコピー数を一過的に増加させセルことに成功したものの、ジーンターゲティングの検出には至らなかった。

一連の遺伝子ターゲティング実験結果より明らかなことは、高等植物細胞-少なくともタバコ BY-2 細胞は、本研究のアイデアにより改善される相同組換え効率の上昇を遥かに下回る組換え効率であるということである。興味深いことに、標的配列を持つ BY-2 細胞は、完全長 *uidA::hyg^r* 発現カセットを保持するランダムインテグレーション検出用ポジティブコントロールにおいても著しい形質転換効率の低下をもたらし、一方で標的配列を持たない T-DNA 移行型ベクターによる形質転換効率は正常であった。

(7) **RP4-T4SS における供与大腸菌には酵母への供与能に多様性がある。**

VirB/D4-T4SS と並行して、初期の RP4-T4SS に立ち返った。これまで出芽酵母への生物界間接合に用いてきた HB101 株に加え、K-12 株由来の DH10B, S17-1 λ *pir*, BW25113 を、更に B 株由来の BL21 (DE3) を供与体として用いてベクターの移行効率を比較した。その結果、遺伝型はほとんど同じと推測される K-12 株由来の株間でも移行効率に 1 桁以上の開きが観察された。一方、B 株由来の BL21 (DE3) では、調べた菌株中で最も強力な凝集反応が観察され、供与体-受容体間の強力な結合が推測されたものの、形質転換体を検出することはできなかった。

この解析の過程で大腸菌から出芽酵母への迅速簡便な遺伝子導入法を確立し、更に導入効率を簡便な薬剤処理により上昇させることが可能であることを明らかにし、これらの手法を使って実用酵母株に多い遺伝子導入効率の低い菌株でも迅速導入が可能であることを示した。これらの結果を論文としてまとめ、公表した。

本研究課題の総括としては、植物のジーンターゲティング技術の確立という初期目標を達成することはできなかったものの、なぜ植物ではターゲティングが難しいのかを説明できる可能性がある現象を発見したこと、受容体に対する細胞毒性の減衰以外にも移送能力の増進という観点からの供与体育種の可能性が示されたこと、研究過程で得られたサイドデータより論文化ができたことな

どから、リスクある課題の中で次のステップに繋がる良い研究ができたと考えている。本報告書には間に合わなかったものの、関連論文を作成中である。

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 2 件)

① Kazuki Moriguchi, Shinji Yamamoto, Yuta Ohmine, Katsunori Suzuki, A fast and practical yeast transformation method mediated by *Escherichia coli* based on a trans-kingdom conjugal transfer system: just mix two cultures and wait one hour, PLOS ONE, 査読有, 11(2), 2016, e0148989 DOI:10.1371/journal.pone.0148989

② Katsunori Suzuki, Kazuki Moriguchi, Shinji Yamamoto, Horizontal DNA transfer from bacteria to eukaryotes and a lesson from experimental transfers, Research in Microbiology, 査読有, 166(10), 2015, 753-763 DOI:10.1016/j.resmic.2015.08.011

[学会発表] (計 2 件)

① 守口 和基, 培養液を混合するだけ: 生物界間接合を利用した迅速・簡便な出芽酵母形質転換法の確立、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜 (横浜)

② 井上 万莉野、アグロバクテリア VirB/D4 システムによる植物細胞への拘縮首位木型プラスミドの移行、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜 (横浜)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/koutiku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守口 和基 (MORIGUCHI KAZUKI)

広島大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：30294523

(2) 研究分担者 該当なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()

研究者番号：