

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850002

研究課題名(和文) イネ遺伝子ターゲティング法を発展させた次世代育種技術の確立

研究課題名(英文) Development of a homologous recombination-based plant breeding technique in rice

研究代表者

島谷 善平(Shimatani, Zenpei)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号：30574701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、強力ポジティブ・ネガティブ選抜法によるイネ・遺伝子ターゲティング法を基に、遺伝子組換えの痕跡が残らない次世代植物育種技術(NBT)の開発を進める。トウモロコシ由来のDNA型トランスポゾンAc/Dsを改変利用して、人為配列を一切残さないポジティブマーカー遺伝子削除機構の構築に成功したため、一回の実験プロセスで遺伝子ターゲティングとポジティブマーカー遺伝子削除が順次進行するシステムを構築した。次いで、それを用いてイネゲノム上の耐病性遺伝子OsRacGEF1の機能向上を試みた。得られた改変体は恒常活性化型OsRacGEF1を発現し、耐病性形質が向上すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Homologous recombination-based gene targeting in rice is a precise and reproducible technique to modify endogenous genes into diverse forms such as knock out, knock-in, creating fusion gene and introducing nucleotide substitution. It is also a promising strategy to develop a "New plant breeding technique (NBT)" if it was combined with a positive selection marker elimination system that leaves no footprints on the targeted gene. In this study, modified plant DNA transposon family was chosen for the system. The codon of a hyper active derivative of the transposase gene was optimized to rice, and its function as a marker gene elimination system was confirmed in rice genome. Then the system was integrated into the gene targeting vector which was designed to introduce two nucleotide substitution to endogenous OsRacGEF1 gene. The modified rice plant is assumed to express constitutive active OsRacGEF1 and show enhanced immune response against to rice blast fungus.

研究分野：植物育種

キーワード：次世代植物育種技術 イネ ゲノム編集 遺伝子ターゲティング 形質転換

1. 研究開始当初の背景

(1)世界人口は今後 50 年間に 90 億人に達すると予測され、さらに天候変動や耕地面積減少など、食糧問題は深刻さを増している。そうした中、遺伝子組換え等の植物育種技術の発展は、食糧増産および環境改善等を可能とし、未来社会を切り開くキーテクノロジーとなる。近年 GM 作物の利用は世界規模で普及しつつあるが、これらはゲノム中に遺伝子組換えの痕跡となる人工的な配列を残すため、社会的受け入れにさらなる改善の余地を残す。一方この数年間で、欧米を中心にゲノム中に人工的な外来配列を残すこと無く、自然変異体とほぼ同等と判断できる改変体の作製を可能とする”次世代植物育種技術”の開発研究が活発となっている。

(2)イネは世界人口の約半数の人々の主食となる基幹作物で、育種学的・生理学的情報の蓄積が豊富である。また、穀類ゲノム研究のモデル生物として全ゲノム配列が解明され、各種データベースの整備など研究環境が充実し、花成、耐病性、環境ストレス耐性等有用形質に関わる遺伝子機能が急速に解明されつつある。さらにイネでは、高等植物にて初めて再現性・汎用性に優れた遺伝子ターゲティング法が確立されている。申請者は、島本功 教授、河野洋治 助教 (奈良先端大 植物分子遺伝学研究室)、寺田理枝 教授 (名城大 農学部) とともに、遺伝子ターゲティングによりイネゲノム上の”いもち病”抵抗性遺伝子 *OsRac1* に点変異を導入し、次いで *Cre-loxP* 部位特異的組換えによりポジティブ選抜マーカー等不要配列を削除し、アミノ酸置換を介し恒常的活性型 *OsRac1* (CA-*OsRac1*)を発現させることに成功した。この成果は、本技術による精密な塩基配列改変を通し、イネの遺伝子機能改良が可能であると実証した。さらに、“標的遺伝子のターゲティング改変”と“マーカー遺伝子削除”の組み合わせにより、実用的な”次世代植物育種技術”創出の可能性が示唆された。

2. 研究の目的

遺伝子ターゲティング法を“次世代植物育種技術”へと応用するには、マーカー遺伝子を削除する二次改変機構との併用が必要となる。これまでは、マーカー遺伝子削除に *Cre-loxP* 組換えシステムを用いており、改変イネのゲノム中に Bacteriophage P1 由来の *loxP* 34 塩基が残され、“次世代植物育種技術”としての展開には問題があった。そこで、本研究課題では、マーカー遺伝子の削除に植物由来の DNA 型トランスポゾンの応用を検討し、技術改良を図る。また、より迅速かつ簡便な“次世代植物育種技術”の開発を目指し、一回の実験操作にて、遺

伝子ターゲティング法による標的遺伝子改変 (一次改変) と DNA 型トランスポゾンによるマーカー遺伝子削除 (二次改変) が順次完了する技術の確立を進める。さらに、上記技術改良と平行し、奈良先端大の植物分子遺伝学研究室の知見をもとに、イネの“いもち病”耐病形質を制御する遺伝子 (*OsRacGEF1*) へ恒常活性化型変異を導入し、耐病性形質を向上した改変系統の作出も狙う。

3. 研究の方法

(1) DNA 型トランスポゾンを利用した自律的マーカー遺伝子削除機構の構築：本課題開始当初は、マーカー遺伝子削除機構にイネ内在性の DNA 型トランスポゾン *Dart/nDart* を利用する予定であった。しかし、トウモロコシ由来の *Ac/Ds* の転移酵素 *AcTPase* に 4 アミノ酸置換を導入した *AcTPase_{4x}* を用いることで、*Ds* の脱離効率が 100 倍以上に上昇するとの報告 (Lazarow et al. 2012, *Genetics*) を元に、より効率的なマーカー遺伝子削除機構を構築するため、改変型 *Ac/Ds* を利用することとした。はじめに、*Ac* の強化型転移酵素遺伝子配列 (Lazarow et al. 2012, *Genetics*) を元に、諸条件をイネに最適化した人工合成遺伝子 (*AcTPase_{4x}*) を作製し、イネ内在性のヒートショック誘導型プロモーター (*pHSP*) と転写終止領域 (*tNOS*) と連結する。また、*AcTPase_{4x}* の標的配列間に転写終止領域 ($\Delta En/Spm$) を組み込んだ非自律性因子 (*Ds*) を合成する。次いで、これら因子による自律的マーカー遺伝子削除機構の機能と効率をレポーター遺伝子 (*GUSPlus*) を利用して評価するため、*pZEN30NC* および *pZEN31E* を作製する (図 1)。

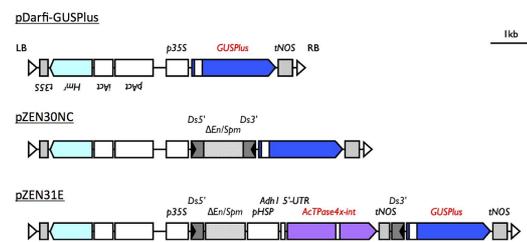


図 1. 改変型 *Ac/Ds* 評価用ベクター

(2) 自律的マーカー遺伝子削除機構の評価：pZEN30NC、pZEN31E をイネカルスに導入し、PCR および *GUSPlus* レポーターの発現解析の結果をもとに *AcTPase_{4x}* による *Ds* 削除の成否を評価する。さらに、高温誘導型プロモーターによる *AcTPase_{4x}* の発現制御を評価するため、pZEN31E を導入したカルスを高温処理 (42°C, 90 分間) し、それによる *GUSPlus* レポーターの発現頻度の変化を解析する。

(3) 痕跡配列の解析: pZEN31E を導入したカルスでは、AcTPase_{4x} により *Ds* が削除された場合、PCR 解析により 650bp 程度の DNA フラグメントが検出されると予測される。そのため、DNA フラグメントをクローニングして塩基配列を解読し、各クローンにおける *Ds* 削除後の痕跡配列を確認する。

(4) 遺伝子ターゲティングと新規自律的マーカー削除機構を利用した遺伝子編集の実施: 上記解析により AcTPase_{4x} による *Ds* 削除が確認された場合、遺伝子ターゲティング改変体からマーカー遺伝子を削除するための二次改変機構として利用する。具体的には、ポジティブ・ネガティブ選抜法に用いるベクターを改変し、*Ds* 内部にポジティブマーカー遺伝子 (*hpt*, ハイグロマイシン耐性遺伝子) と高温誘導型 AcTPase_{4x} を組み込んだ基本ベクターを作製する。さらに、イネゲノム上の耐病性制御遺伝子 OsRacGEF1 へ 2 塩基置換を導入することで、1 アミノ酸置換 (S549D) により恒常活性化型に改変する「自律的マーカー削除遺伝子ターゲティングベクター」を構築し、遺伝子編集技術としての実証と新規有用系統の作出の両立を狙う。

4. 研究成果

(1) AcTPase_{4x} は、人工合成遺伝子として作製し、イネ内在性ヒートショックタンパク質遺伝子のプロモーター領域 (*pHSP*)、アグロバクテリウムノパリン合成遺伝子の転写終止領域 (*tNOS*) と連結した形にした。*Ds* も同様に人工合成遺伝子として作製し、転写終止領域 ($\Delta En/Spm$) を AcTPase の認識・結合配列が存在する *Ac* の両端領域の間に組み込む形とした。続いて、これら因子を利用した自律的マーカー遺伝子削除機構の予備試験用ベクターとして、pZEN30NC および pZEN31E を作製した (図 1)。pZEN30NC を導入したイネ培養細胞では、*Ds* 中の *En/Spm* により GUSPlus の発現が抑制される一方、pZEN31E を導入した細胞では、高温処理にて発現した転移酵素 (AcTPase_{4x}) により *Ds* が削除され、GUSPlus が発現回復する設計とした。

(2) 自律的マーカー遺伝子削除機構の評価: pZEN30NC および pZEN31E をアグロバクテリウム法によりイネカルスに導入し、それぞれ 74 系統および 196 系統の独立遺伝子組換えカルス系統を作製した。さらに、GUSPlus レポーター解析におけるポジティブコントロールとして、pDarfi-GUSPlus を導入したイネカルスを約 50 系統作製した。次いで、pZEN30NC および pZEN31E を導入したカルスについて、AcTPase_{4x} による *Ds* の削除を評価するため、通常条件下 (室温 31.5°C) で培養した各組換えカルス系統

からゲノム DNA を抽出して PCR 解析を行った。その結果、pZEN30NC を導入した 74 系統のカルスでは *Ds* の削除が検出されなかったのに対し、pZEN31E を導入したカルスでは 159 系統 (81.1%) で *Ds* の削除を示す約 650bp の DNA フラグメントの増幅が検出された。これにより改良型 *Ac/Ds* の機能、すなわち人工合成遺伝子 AcTPase_{4x} が機能する転移酵素 (AcTPase_{4x}) を発現し、かつ人工合成された *Ds* が AcTPase_{4x} の標的配列として機能することが実証された。また、X-Gluc 染色による GUSPlus レポーター発現解析の結果、pDarfi-GUSPlus を導入したカルスでは、ほぼ全ての系統でカルス全体に広がる青いシグナルが検出されたが、pZEN30NC を導入した 74 系統のカルスでは、シグナルが検出されたのは 4 系統 (5.4%) にとどまり、*Ds* による GUSPlus の発現抑制が確認された。それに対し、pZEN31E を導入した 196 系統のカルスでは 92.9% (182 系統) でシグナルが検出され、PCR 解析に引き続き、改良型 *Ac/Ds* の機能が実証された。また、pZEN31E を導入したカルスにおける GUSPlus レポーターの発現状況を評価した結果、シグナルの大半がスポットまたはセクターの形状であり、AcTPase_{4x} による *Ds* 削除は、カルス細胞増殖後期に集中する傾向が示された。次に、*pHSP* による AcTPase_{4x} の発現制御の評価を目的として、pZEN31E を導入したカルス 196 系統をそれぞれ 2 つの処理区に分け、*Ds* の削除頻度を比較した。その結果、通常条件下 (31.5°C) で培養したカルス 196 系統のうち、PCR 解析では 159 系統 (81.1%)、レポーター発現解析では 182 系統 (92.9%) で *Ds* の削除が検出された。一方、高温処理 (42°C, 90 分間) を経たカルスでは、PCR 解析により 187 系統 (95.1%)、レポーター発現解析では 191 系統 (97.4%) で *Ds* の削除が検出された。これにより、通常条件下で培養するカルスでは、*pHSP* による AcTPase_{4x} の発現抑制が難しい一方、高温処理による発現誘導は有効である事が示された。

(3) 痕跡配列の解析: AcTPase_{4x} による *Ds* 削除をより詳細に検証するため、pZEN31E を導入したカルスの PCR 解析により得られた DNA フラグメントをクローニングし、DNA 配列を解析した。その結果、解析した 44 クローンのいずれに於いても *Ds* の削除が確認され、さらに *Ac/Ds* 脱離後に特徴的な痕跡配列が確認された。以上より、改変型 *Ac/Ds* を利用したマーカー遺伝子削除機構が構築可能であると判断した。

(4) 遺伝子ターゲティングと新規自律的マーカー削除機構を利用した遺伝子編集の実施: 自律的マーカー削除遺伝子ターゲティングベクター、pOsRacGEF1 S549D を構築

した。本ベクターは、アグロバクテリウム法によりイネカルスへ導入すると、相同組み換えを介した標的遺伝子改変（一次改変）にて、マーカー遺伝子の挿入と共にイネゲノム上の耐病性制御遺伝子 *OsRacGEF1* へ二塩基置換を導入し、その後改変型 *Ac/Ds* により自律的にマーカー遺伝子が削除される（二次改変）設計とした。本課題では、p*OsRacGEF1* を品種“金南風”へ導入し、200以上の独立形質転換カルス系統を得た。今後、T₀改変体についてPCRおよびDNA配列解析を行い、標的遺伝子改変およびマーカー遺伝子削除の確認を進める。期待通りのT₀改変体が得られた場合は、自殖T₁世代を展開し、改変遺伝子ホモ型やヘテロ型植物における遺伝子発現解析やいもち病菌接種試験により、耐病性形質を評価する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Tamaki S, Tsuji H, Matsumoto A, Fujita A, Shimatani Z, Terada R, Sakamoto T, Kurata T, Shimamoto K. **FT-like proteins induce transposon silencing in the shoot apex during floral induction in rice.** (2015) *Proc Natl Acad Sci USA*. 112: E901-910. doi: 10.1073/pnas.1417623112 (査読有)

Dang TT, Shimatani Z, Kawano Y, Terada R, Shimamoto K. **Gene editing a constitutively active *OsRac1* by homologous recombination-based gene targeting induces immune responses in rice.** (2013) *Plant Cell Physiol*. 54: 2058-2070. doi: 10.1093/pcp/pct147 (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

島谷 善平, 寺田 理枝, Dang TT, 河野 洋治, 辻 寛之, 田岡 健一郎, 島本 功. **植物ゲノム編集技術としての遺伝子ターゲティング: 技術の現状とイネ耐病性関連遺伝子 *OsRac1* の恒常活性化改変.** (日本育種学会第125回講演会; 2014年3月21日-22日, 東北大学, 宮城県仙台市)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:「植物体に用いる組み換えベクター及びその利用」

発明者: 寺田理枝・島谷善平

権利者: 学校法人 名城大学

種類: 特許

番号: 特願2014-25910号

出願年月日: 2014年2月13日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

島谷 善平 (SHIMATANI, Zenpei)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ

エンス研究科・研究員

研究者番号: 30574701