

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06853

研究課題名(和文)新規条件的ポジティブ・ネガティブ選抜による汎用的ジーンターゲティング系の確立

研究課題名(英文)The establishment of an universal gene targeting system with novel positive-negative selection in plants

研究代表者

横井 彩子(Nishizawa-Yokoi, Ayako)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 遺伝子利用基盤研究領域・研究員

研究者番号：10760019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規条件的ネガティブ選抜マーカーとしてキメラリプレッサー(SRD_X)によるポジティブ選抜マーカーの抑制系(SRD_X/nptII)を考案し、タバコにおいて抑制効果を検証したところ、SRD_Xの発現でカナマイシン耐性カルスの出現頻度が抑制された。従って、SRD_XはGT細胞のポジティブ・ネガティブ選抜に利用可能なことが示された。また、分泌型ペプチドであるファイトスルフォカインの発現による形質転換細胞の増殖促進効果を検討したが、優位な増殖促進効果は見られなかった。現在、SRD_X/nptIIをポジティブ・ネガティブ選抜マーカーとして利用したGTにより、タバコの内在性遺伝子の改変を試みている。

研究成果の概要(英文)：We designed novel conditional positive-negative selection system using the repression of positive selection marker via chimeric repressor (SRD_X/nptII) for isolation of GT cells. The expression of SRD_X led to decreased number of kanamycin-resistant callus from transgenic tobacco leaf under the selection conditions, suggesting that this approach would be able to be employed for the positive-negative selection of GT cells. In addition, we tested the effect of the plant peptide growth factor, phytosulfokine, on cell growth of transgenic rice calli. There was no significant difference in cell growth between phytosulfokine-expressing transgenic calli and control calli. We are trying to establish GT system with SRD_X/nptII system as a positive-negative selection in tobacco.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：ジーンターゲティング ポジティブ・ネガティブ選抜 キメラリプレッサー ファイトスルフォカイン

1. 研究開始当初の背景

ジーンターゲットング (GT) は、DNA 修復経路の一つである相同組換えを利用して外来 DNA 上の配列を内在性の標的遺伝子にコピー/ペーストして改変する技術であり、標的遺伝子を狙い通りに改変する有用な技術である。しかしながら、高等植物では相同組換えの頻度が非常に低く、GT の鑄型となる外来 DNA を細胞内に導入した場合、GT に成功する細胞の割合は形質転換細胞の 10^{-4} か 10^{-6} ほどであるとされている (総説: Puchta and Fauser, 2013; Voytas, 2013)。そこで、GT に成功した細胞を効率良く選抜するポジティブ・ネガティブ選抜法がイネにおいて適用された (Terada et al., 2002)。この方法は、ポジティブ選抜マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子発現カセットを標的遺伝子に相同な配列の内部に、ネガティブ選抜マーカーとしてジフテリア毒素 A フラグメント (DT-A) 発現カセットをその両側に配置したベクターを細胞内に導入することで、ベクターがランダムにゲノムに挿入された細胞を排除し (図 1A)、相同組換えによって GT が成立した細胞を濃縮するシステムである (図 1B)。

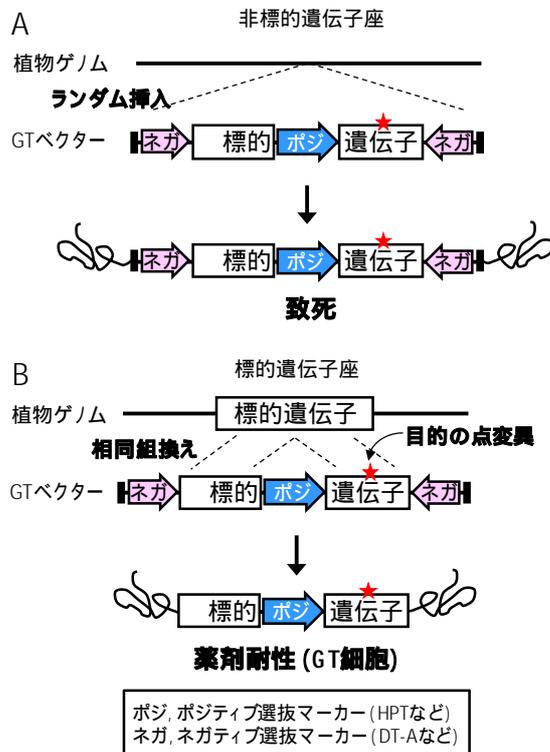


図1GT細胞のポジティブ・ネガティブ選抜法による濃縮方法

しかしながら、非常に形質転換効率の高いイネカルス (品種: 日本晴) において DT-A による強力なポジティブ・ネガティブ選抜を利用してもなお、GT に成功する細胞の割合は低いのが現状である (Nishizawa-Yokoi et al., 2015a)。さらに、形質転換効率の低いイネ品種や、イネ以外の高等植物では、シロ

イヌナズナやタバコといったモデル植物においてさえ、ポジティブ・ネガティブ選抜を利用した GT の成功例はない。

2. 研究の目的

ポジティブ・ネガティブ選抜を利用した GT 効率の低さの原因は、1) ネガティブ選抜マーカーである DT-A は、その翻訳産物そのものが毒性を持つことから、GT ベクターからの一過的発現により GT が成立した細胞をも殺してしまっている可能性、2) イネカルスの細胞は立体的に増殖するため、GT ベクターのランダム挿入が起きた大部分の細胞が死んでいく中でごく少数の GT に成功した細胞まで一緒に死んでしまう可能性、が考えられる。

そこで本研究では、上で述べた2つの原因を改善するアプローチによってイネにおける汎用的 GT 系の確立を目指し、さらには様々な植物種に適応可能な GT 系へと発展させることを試みる。

改善策 1: ネガティブ選抜のタイミング調節が可能なる条件的ネガティブ選抜マーカーの利用

これまでに申請者は、ポジティブ選抜マーカー (カナマイシン耐性遺伝子, nptII) とそのアンチセンス鎖の発現カセットを組み合わせたポジティブ・ネガティブ選抜を利用することで、GT により内在性遺伝子の改変に成功しており (Nishizawa-Yokoi et al., 2015b)、その効率は DT-A を用いた系より低い、nptII による薬剤選抜系が確立されている植物種であれば、広く適用可能な手法だと考えている。そこで、より強力にポジティブ選抜マーカーの発現を抑え込むため、キメラリプレッサーを利用したネガティブ選抜系を考案した (図 2)。キメラリプレッサーによる標的遺伝子の発現抑制効果は、様々な植物種において保存されており (光田, 高木, 2014)、イネだけでなく様々な植物種においても適用可能であると考えられる。

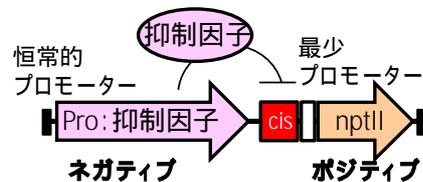


図2キメラリプレッサーによるポジティブ選抜マーカーの発現抑制効果の検討

恒常的発現プロモーター (Pro) で発現させた転写抑制因子 (キメラリプレッサー) が、そのシス配列と最少プロモーターで制御された抗生物質耐性遺伝子の発現を抑制する。

一方、DT-A の毒性を損なわずに温度依存的に毒性の有無を調節できる DT-A (DT-Ats, Bellen et al., 1992) が報告されており、これは 18 で毒性を示し、25 以上では毒性を示さないことがシロイヌナズナで報告さ

れている (Guerineau et al., 2003)。DT-Ats をネガティブ選抜マーカーに利用することで、T-DNA からの一過的発現による悪影響を回避し、T-DNA のランダム挿入が生じた細胞を排除できると考えられる。

また、無毒の 5-フルオロシトシンを毒性のある 5-フルオロウラシルに変換する活性を持つ大腸菌由来シトシンデアミナーゼ (CodA) とその改良型 CodA (CodAm) は、従来より双子葉および単子葉でネガティブ選抜マーカーとして利用されてきた (Osakabe et al., 2014)。さらに、より 5-フルオロウラシルに対する特性を高めた高特異的 CodA (CodAm3, V125A/F316C/D317G) がこれまでに開発されており、これらは様々な植物種において条件的ネガティブ選抜マーカーとして適用可能であると考えられた。これらをネガティブ選抜マーカーとして利用することを提案する。

改善策 2 : GT に成功した細胞の増殖促進

これまでに、分泌型ペプチドホルモンや細胞周期に関わる因子の過剰発現がシロイヌナズナにおいて細胞増殖を活性化することが報告されている。そこで、ポジティブ選抜マーカーと共にこれらの因子を発現させ、存在比が圧倒的に低い GT 細胞の増殖を促進させることで、ネガティブ選抜マーカーの発現により誘導される大多数の死細胞に GT 細胞が埋もれてしまうのを回避できると考えられる。

イネカルスおよびイネと同様に組織から誘導したカルスにアグロバクテリウムを介して外来遺伝子を導入するタバコの形質転換系を用いて、イネで確立したポジティブ・ネガティブ選抜法の選抜効率の評価を行い、最終的にはポジティブ・ネガティブ選抜を利用した GT 系の確立を試みる。この成果により、普遍的かつ汎用的な GT 系を確立することで、基礎研究の発展だけでなく、育種素材の迅速な開発に貢献できることが期待される。

3 . 研究の方法

課題 1 : 新規条件的ネガティブ選抜マーカーの利用

イネカルスの形質転換系を用い、キメラリプレッサーの発現によりポジティブ選抜マーカー (nptII) の発現を抑制するシステム、温度依存的 DT-A (DT-Ats)、CodA によるネガティブ選抜条件の最適化を行う。また、イネ以外の植物にポジティブ・ネガティブ選抜を利用した GT 系を適応することを目指し、タバコのリーフディスクを用いた形質転換系で、これらのネガティブ選抜効果を検証する。

課題 2 : GT に成功した細胞の増殖促進

シロイヌナズナの分泌型ペプチドホルモンや細胞周期に関わる因子の発現がイネカルスにおいても細胞増殖促進活性を示すかどうか検討する。その後、これら新規のポジ

ティブ・ネガティブ選抜マーカーを導入した GT ベクターを作出し、内在性遺伝子を GT により改変された細胞の選抜効率が従来の GT ベクターを利用した時に比べ向上するかどうかを検討する。

さらに、イネにおいて効果的であったポジティブ・ネガティブ選抜を利用した GT 系をタバコの形質転換系に応用し、GT 系を確立することを試みる。

4 . 研究成果

課題 1 : 新規条件的ネガティブ選抜マーカーの利用

温度感受性ジフテリアトキシン (DT-Ats)、シトシンデアミナーゼ (CodA)、キメラリプレッサーによるポジティブ選抜マーカーの抑制系を考案し、イネカルスおよびタバコ葉片を用いた形質転換系によりネガティブ選抜効果の評価した。

・温度感受性ジフテリアトキシン (DT-Ats)

DT-Ats は、18 以下の低温で毒性を示すことが知られていることから、単子葉および双子葉で DT-Ats を過剰発現させるベクターを構築し、イネカルスおよびタバコ葉片にアグロバクテリウムを介して形質転換した。その後、形質転換カルスおよび葉片を選抜培地に置床して 17~18 で培養した。しかしながら、DT-Ats 形質転換イネおよびタバコのいずれにおいても、低温条件下において GFP 発現カセット形質転換コントロールに比べて生育の阻害は認められなかった。また、この結果は、低温での培養期間を延長しても同様であった。一方、従来からイネにおいてネガティブ選抜マーカーとして利用されている DT-A は、タバコにおいても強力なネガティブ選抜効果を発揮した。

・改良型 CodA (D314A), 5-フルオロウラシル高特異的 CodA (V125A/F316C/D317G)

タバコ葉片に CodAm および CodAm3 過剰発現ベクターを形質転換し、種々の濃度の 5-フルオロシトシン (5-FC) を含む培地上で培養し、カルスの出現頻度からネガティブ選抜効果を検証した。

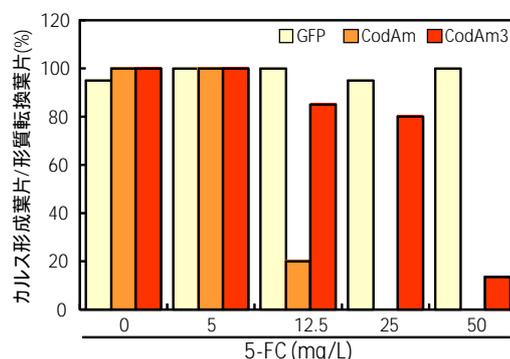


図3 種々の濃度の5-FCを含む培地上におけるタバコ葉片からのカルス形成頻度

コントロール (GFP)、CodAm、CodAm3 過剰発現ベクターをタバコ葉片に形質転換し、3週間後にカルスが形成されている葉片の割合を解析した。

その結果、コントロール(GFP)に比べて CodAm および CodAm3 の発現は、5-FC を含む培地上でネガティブ選抜効果が認められた(図3)。しかし、CodAm は CodAm3 に比べて低濃度の5-FC で強いネガティブ選抜効果を発揮した。これらの結果から、CodAm はタバコ葉片を用いた形質転換系において、25 mg/L の5-FC を含む培地上でネガティブ選抜マーカーとして有用であることが示された。

・キメラリプレッサーによるポジティブ選抜マーカーの発現抑制

キメラリプレッサーによる発現抑制効果を、*Nicotiana benthamiana* を用いたレポーター遺伝子の一過的発現系で評価した。その結果、キメラリプレッサーの発現は顕著にレポーター遺伝子の発現を抑制でき、この実験系がネガティブ選抜マーカーとして利用できることが示された(図4)。

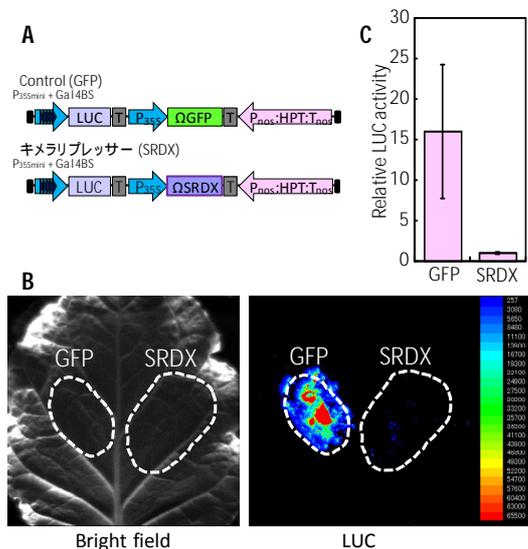


図4 *N. benthamiana* を用いた一過的発現系でのキメラリプレッサーのレポーター遺伝子発現抑制の評価
A, コントロール(上)およびキメラリプレッサー(SRDX, 下)発現レポーターコンストラクト; B, *N. benthamiana* におけるコントロール(GFP)およびSRDX発現下におけるルシフェラーゼ(LUC)遺伝子の発現; *N. benthamiana* にアグロインフィルトレーションでAのベクターを導入し、3日後にルシフェラーゼの発光を解析; C, GFPおよびSRDX発現下における相対的ルシフェラーゼ活性。

そこで、*nptII* をポジティブ選抜マーカーとして、キメラリプレッサーの発現が形質転換カルスの増殖を抑制できるかどうかを、イネおよびタバコにおいて評価した。その結果、イネカルスにおいては、キメラリプレッサーの発現による G418 耐性カルスの出現頻度に大きな違いは認められなかった。一方、タバコ葉片においては、高い濃度(100 mg/L)のカナマイシンを含む培地上で顕著なネガティブ選抜効果が認められた(図5)。これらの結果から、双子葉においては、キメラリプレッサーによるポジティブ選抜マーカーの発現抑制系はネガティブ選抜マーカーとしてGT細胞の選抜に利用できることが示された。イネにおいては、発現系などを改良する必要があると考えている。

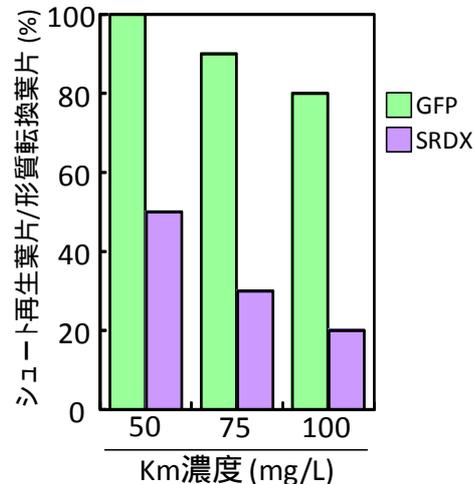


図5 タバコ葉片を用いた形質転換系によるキメラリプレッサーのネガティブ選抜効果の解析

課題2: GTに成功した細胞の増殖促進

イネカルスにおいて細胞増殖活性を示すことが報告されている分泌型ペプチドファイトスルフォカイン(PSK)をカルス誘導培地に種々の濃度(0, 0.1, 1.0 nM)で添加し、細胞増殖活性を検証した。しかし、通常の培養温度(33℃)では無添加の培地上での増殖と違いは認められなかった。そこで、様々な生育温度(18, 22, 28℃)で培養したところ、この条件においても顕著な細胞増殖活性を示さなかった。

新規条件のネガティブ選抜マーカーを利用した汎用的GT系の確立

タバコ葉片を用いた形質転換系において、ネガティブ選抜効果が認められたDT-A、CodAmおよびキメラリプレッサーによるポジティブ選抜マーカーの発現抑制系をネガティブ選抜マーカーとして、タバコ内在性遺伝子を標的としたGTベクターを構築した(図6)。

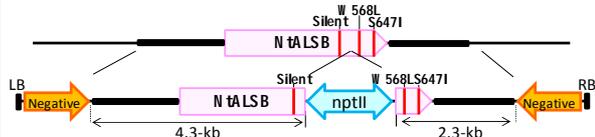


図6 タバコ内在性遺伝子を標的としたGTベクターの構築
アセチル乳酸合成酵素(ALS-B)遺伝子を標的として、ネガティブ選抜マーカー(Negative)にDT-A、CodAm、キメラリプレッサーを利用したGTベクターを構築した。

これらのGTベクターをタバコ葉片にアグロバクテリウムを介して形質転換し、各100~200個体の細分化植物体においてPCRにより解析を行ったが、現在までにGTに成功した個体は得られていない。

<引用文献>

- Puchta H, Fauser F. (2013) Gene targeting in plants: 25 years later. *Int J Dev Biol.*, 57: 629-637.
- Voytas DF. (2013) Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 64: 327-350.

Terada R, Urawa H, Inagaki Y, Tsugane K, Iida S. (2002) Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nat Biotechnol* 20: 1030-1034.

Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Ohtsuki N, Saika H, Toki S (2015a) Precision genome editing in plants via gene targeting and piggyBac-mediated marker excision. *Plant Journal* 81: 160-168

Nishizawa-Yokoi A, Nonaka S, Osakabe K, Saika H, Toki S. (2015b) A universal positive-negative selection system for gene targeting in plants combining an antibiotic resistance gene and its antisense RNA. *Plant Physiol.*, 169: 362-370.

光田展隆, 高木優. (2014) 植物の転写活性化因子を転写抑制化因子に変換するCRES-T法. *化学と生物*. 52: 438-446.

Bellen HJ, D'Evelyn D, Harvey M, Elledge SJ. (1992) Isolation of temperature-sensitive diphtheria toxins in yeast and their effects on *Drosophila* cells. *Development*, 114: 787-796.

Guerineau F, Sorensen AM, Fenby N, Scott RJ. (2003) Temperature sensitive diphtheria toxin confers conditional male-sterility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol J*. 1: 33-42.

Osakabe K, Nishizawa-Yokoi A, Ohtsuki N, Osakabe Y, Toki S (2014) A mutated cytosine deaminase gene, *codA* (D314A), as an efficient negative selection marker for gene targeting in rice. *Plant Cell Physiol* 55: 658-665.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕

なし

〔学会発表〕(計3件)

横井 彩子, 土岐 精一. ゲノム編集技術を利用した植物ゲノムのピンポイント改変. セミナー講演. 2016.11.15 佐賀大学農学部 (佐賀県・佐賀市)

Nishizawa-Yokoi A, Toki S. piggyBac-mediated reversible transgenesis in plants. *Plant Genome Stability and Change*. 2016.07.09 湘南国際村 (神奈川県・三浦郡)

Nishizawa-Yokoi A, Toki S. piggyBac-mediated gene delivery system in plants. *FASEB Genome Engineering: Cutting-Edge Research and Applications Conference*. 2016.06.05 Lisbon (Portugal).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 彩子 (NISHIZAWA-YOKOI, Ayako)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・遺伝子利用基盤研究領域・先進作物ゲノム改変ユニット・研究員

研究者番号: 10760019