

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月23日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370001

研究課題名（和文）逆遺伝学的変異導入の最適化と相同組換えの分子機構

研究課題名（英文）Reverse genetics and recombination

研究代表者

飯田 滋（IIDA SHIGERU）

静岡県立大学・大学院食品栄養環境科学研究所・客員教授

研究者番号：30012777

研究成果の概要（和文）：逆遺伝学的変異導入には、相同組換えによる遺伝子ターゲティングやトランスポゾンを用いた遺伝子タギングなどが含まれる。我々が開発したポジティブ・ネガティブ選抜によるターゲティングや内在性の DNA トランスポゾンを利用したタギングの最適化をめざして、関連する組換え機構とその制御機構を解明し、さらに得られたターゲティングによるポジティブ選抜遺伝子の挿入やトランスポゾンの挿入に係わる遺伝子の機能解明も行った。

研究成果の概要（英文）：To facilitate reverse genetic approaches, which include homologous recombination-mediated gene targeting using positive-negative selection and gene tagging employing endogenous *nDart1* related DNA transposons, we were attempting to elucidate recombination mechanisms and their regulation mechanisms associated with gene targeting and tagging. We also characterized the functions of the genes identified by gene targeting and tagging.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-------------|------------|-------------|
| 2010年度 | 7,700,000円 | 2,310,000円 | 10,010,000円 |
| 2011年度 | 3,400,000円 | 1,020,000円 | 4,420,000円 |
| 2012年度 | 3,400,000円 | 1,020,000円 | 4,420,000円 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,500,000円 | 4,350,000円 | 18,850,000円 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：植物、分子遺伝、逆遺伝学、遺伝子、突然変異、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

塩基配列が明らかにされた生物に於いて、目的とする遺伝子の機能を解析するために、目的遺伝子内に選択的に変異を導入する逆遺伝学的変異導入法には、相同組換えによる遺伝子ターゲティングやトランスポゾンを用いた挿入変異などの手法が含まれる。我々はポジティブ選抜マーカースとネガティブ選抜マーカースを用いて、世界に先駆けて逆遺伝学的変異導入に係わるイネの相同組換えによる遺伝子ターゲティングに成功し、挿入ポ

ジティブ選抜マーカース（ノックイン・ターゲティングの場合は選抜マーカースとレポーター遺伝子）の両端で相同組換えが起った結果、予測通りのゲノム構造の遺伝子破壊体を複数の得ることができたが、多くの研究者が容易かつ普遍的にこれらの手法を活用するためには、先ず第一に体細胞相同組換え及びその制御機構や副反応として起り得る好ましくない非相同組換えの機構などを解明して遺伝子ターゲティングの最適化や汎用化を

図る必要があると考えられた。また、我々が開発した、培養変異を惹き起し得ないイネの内在性 DNA トランスポゾン *nDart1* の挿入によるタギングの最適化と汎用化にも *nDart1* の転移活性を制御する機構の解明が有益であると考えられた。さらに、本研究は私の研究歴も終りに近づきつつあるため従来の研究の集大成とも思われるので、挿入変異体として得られたイネ遺伝子の機能解明を試みると共に従来からライフワークとして行っていたアサガオのトランスポゾン挿入による自然突然変異の解析もある程度できればとも考えていた。

2. 研究の目的

本研究の目標は大別して以下の通りである。

- (1) 遺伝子ターゲティングに係わる相同組換えや非同組換えの機構の解明
- (2) 遺伝子タギングに係わる DNA トランスポゾン *nDart1* の転移活性制御の解析
- (3) 遺伝子ターゲティングやトランスポゾンの挿入による変異に係わる遺伝子の機能解明

なお、当初は上記の目標の中で最も力点が置かれたのが (1) で、次が (2) であったが、最近になって、ZNFs や TALENs など (2013 年には CRISPR/Cas も) を用いてゲノムに 2 重鎖切断を導入して遺伝子ターゲティングを行う Genome editing の手法が広く用いられる状況になってきたこともあり、また本研究が私の研究の集大成になるとも考えられたので、途中から (2) や (3) にもかなりの努力を傾注した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子ターゲティングに係わる組換えの機構の解明

イネの遺伝子ターゲティングに用いる導入ベクターや培養系など係わる種々のパラメーターや稀に起る非同組換えを解析して体細胞組換え機構を解明し、さらにポジティブ選抜マーカーとネガティブ選抜マーカーを用いた遺伝子ターゲティング法の普遍化を目指して、イネばかりでなく、コケ植物であるゼニゴケへの応用も試みた。この際、プロモーター等はゼニゴケ用の配列を用いるなどの改変をした導入ベクターを構築して形質転換を行った。

(2) DNA トランスポゾン *nDart1* の転移活性とその制御の解析

DNA トランスポゾン *nDart1* は、0.4 kb の非自律性因子で、イネゲノム中に多数の関連因子が存在する。活性な自律性因子をもたないイネのゲノム中にも構造上は約 3.7 kb の自律性因子となり得る *Dart1* 配列も複数見出され、活性な自律性因子をもつ場合でも複数の *Dart1* 配列の内の 1 つだけが活性な

自律性因子である。まず活性な自律性因子の存在下で、transposon display 法などによりどの非自律性因子が転移活性のあるのかを検討し、活性な非自律性因子の転移挿入部位の配列上の特徴についても解析を行った。さらに転移活性の相違をトランスポゾン排列の DNA メチル化との関連から解析した。また *nDart1* の転移活性を制御し得る因子の探索も試みた。

(3) 挿入変異に係わる遺伝子の機能解明

遺伝子ターゲティングによる挿入変異に係わる遺伝子として、イネの DNA メチル化及び脱メチル化関連の多重遺伝子族を形成する各遺伝子の機能を個別に解析し、必要に応じて交雑により 2 重変異体等も分離して、各遺伝子の役割分担の解明を図った。トランスポゾンによる挿入変異と考えられる変異体については、遺伝形質に影響を与える変異体に関して、変異遺伝子の構造解析と変異形質に係わる種々の分子遺伝学的技法を駆使して、目的とする遺伝子の機能解明を試みた。

4. 研究成果

(1) 遺伝子ターゲティングに係わる組換えの機構の解明

遺伝子ターゲティングに係わる体細胞相同組換えの最適化を目指して、相同領域の長さや標的遺伝子と導入ベクターの相対的な方向などのパラメーターを解析するために、一連の導入ベクターの構築を終了し、体細胞変異に関するパラメーターについて解析中である。また、稀に起る非同組換えを解析して体細胞組換え機構の一端を探るべく、挿入ポジティブ選抜マーカーの両端で体細胞相同組換えが起らず、一端では相同組換えが他端では非同組換えが起した遺伝子破戒体も得られたので、その構造を解析したところ、非同組換え領域には標的遺伝子 DNA 断片の重複が観察された。このことは、我々のポジティブ・ネガティブ選抜による体細胞相同組換えが、標的領域の DNA の複製中に起り得ることを示唆している可能性があると思われる。さらに培養系に関しても、従来は完熟種子由来のカルスを用いて形質転換を行っていたが、未熟胚を用いた形質転換の方が効率は良いとの報告もあるので、最終年度に未熟胚を用いた形質転換を行う準備を開始した。

我々のポジティブ・ネガティブ選抜による遺伝子ターゲティングの普遍化を目指して、イネばかりでなく、コケ植物であるゼニゴケへの応用を試み、*NOPI* 遺伝子を標的としたターゲティングにも成功した。また、挿入ポジティブ選抜マーカーの両端の相同領域の長さや遺伝子ターゲティングの効率との関係を検討した所、両端の相同領域が 1 kb の場合には相同組換え体は得られず、2 kb の場合

は得られたが、3 kb の場合の方が遺伝子ターゲットング効率は明らかに良い結果を得た。

(2) DNA トランスポゾン *nDart1* の転移活性とその制御の解析

DNA トランスポゾン *nDart1* 関連の 0.4 kb の多くの非自律性因子の中で、*nDart1-0* と *nDart1-3* が高頻度で転移する因子であり、これらの因子は全ゲノムに渡って広く挿入し、特に単一コピー領域中のコード領域と思われる **genic region** に転移挿入し易いことが明らかになったので、このトランスポゾンは遺伝子タギングに相応しい性質を持つものと思われる。また転移活性の高い非自律性因子は、対応する転移活性のない非自律性因子と比較して DNA が低メチル化状態にあることも明らかになった。活性な自律性因子をもつ系統では、複数の *Dart1* 配列の内で活性な自律性因子は *Dart1-27* であるが、この因子の転移酵素遺伝子のプロモーター領域は他の不活性な自律性因子と比べると低メチル化状態にあった。さらに、活性な自律性因子をもたない系統に脱メチル化剤の 5-AzaC 処理を行うと転移酵素遺伝子が再活性化されて *nDart1-0* や *nDart1-3* の転移も観察されるが、この場合の主要な転移酵素遺伝子の mRNA は *Dart1-34* 因子に由来していた。

我々はアフリカ稲のゲノム中に *nDart1* の転移能を抑制する因子が存在することを見出し、**Dart-canceller** と名付けた。

(3) 挿入変異に係わる遺伝子の機能解明

イネは DNA メチル化に係わる *MET1* 遺伝子を 2 つもっており、両者の発現部位は変わらないが、*MET1a* よりも *MET1b* の方が強く発現する。ノックイン・ターゲットングによる挿入変異として分離した *MET1a* の挿入破戒体は何ら明白な表現型を示さず DNA メチル化の低下も観察されなかったが、*MET1b* 破戒体はヘテロ個体でも DNA メチル化の低下や内在性トランスポゾンの活性化が観察され、ホモ個体は種子成熟過程で致死となった。DNA メチル化関連のクロマチンリモデリング遺伝子 *DDM1* も 2 つあり、*DDM1a* 破戒ホモ個体ではゲノム反復配列の低メチル化は観察されなかったが、*DDM1b* 破戒ホモ個体では観察できた。さらに両者の 2 重変異体では、*DDM1b* 破戒体よりも強く低メチル化したので、*DDM1a* は *DDM1b* と協調的に DNA メチル化に関与しているものと思われる。イネは DNA 脱メチル化に係わる *ROS1* 遺伝子を 4 つもっており、その内の 1 つ *ROS1a* 遺伝子のノックイン・ターゲットングによる挿入破戒はヘテロ個体では栄養成長期には何ら遺伝形質に影響を与えないが、変異自体は次世代に伝達し得ないことが明らかになった。即ち父方由来の変異は次世代に伝達出来ず、母方由来の変異は早期に胚乳の発達不全を惹起して正常な胚発生を阻害

するため、変異をヘテロにもつ個体は育成し得ない。

トランスポゾンによる挿入変異体としては、イネの内在性 DNA トランスポゾン *nDart1* の挿入により *TWAI* が不活性化され、穂の粒数が増加することや、高校の教科書にも記載されているマルバアサガオの内在性 DNA トランスポゾン *Tip100* が *CHS-D* 遺伝子内に挿入して白色花を咲かせる変異が不完全優性を示すのは、*CHS-D* 遺伝子の遺伝子量効果ためであることも明らかに出来た。

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 14 件)

- 1) K. Ishizaki, Y. Johzuka-Hisatomi, S. Ishida, S. Iida and T. Kohchi (2013) Homologous recombination-mediated gene targeting in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Sci. Rep.* **3**, 1532. (査読有)
DOI: 10.1038/srep04532 (2013)
- 2) A. Yoshida, M. Sasao, N. Yasuno, K. Takagi, Y. Daimon, R. Chen, R. Yamazaki, H. Tokunaga, Y. Kitaguchi, Y. Sato, Y. Nagamura, T. Ushijima, T. Kumamaru, S. Iida, M. Maekawa and J. Kyojima (2013) *TAWAWAI*, a regulator of rice inflorescence architecture, function through the suppression of meristem phase transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 767-772. (査読有)
DOI: 10.1073/pnas.1216151110
- 3) A. Ono, K. Yamaguchi, S. Fukada-Tanaka, R. Terada, T. Mitsui and S. Iida (2012) A null mutation of *ROS1a* for DNA demethylation in rice is not transmittable to progeny. *Plant J.* **71**, 564-574. (査読有)
DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2012.05009.x
- 4) C.-H. Eun, K. Takagi, K.-I. Park, M. Maekawa, S. Iida and K. Tsugane (2012) Activation and epigenetic regulation of DNA transposon *nDart1* in rice. *Plant Cell Physiol.* **53**, 857-868. (査読有)
DOI: 10.1093/pcp/pcs060
- 5) T. Ly, H. Fukuoka, A. Otaka, A. Hoshino, S. Iida, E. Nitasaka, N. Watanabe and T. Kuboyama (2012) Development of EST-SSR markers of *Ipomoea nil*. *Breed. Sci.* **62**, 99-104. (査読有)
DOI: 10.1270/jsbbs.62.99
- 6) Y. Johzuka-Hisatomi, H. Noguchi and S. Iida (2011) The molecular basis of incomplete dominance at the *A* locus of

- CHS-D* in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*. *J. Plant Res.* **124**, 299-304. (査読有)
DOI: 10.1007/s10295-010-0369-7
- 7) M. Hayashi-Tsugane, M. Maekawa, H. Kobayashi, S. Iida and K. Tsugane (2011) Examination of transpositional activity of *nDart1* at different stages of rice development. *Genes Genet. Syst.* **86**, 215-219. (査読有)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs/86/3/86_3_215/_article
- 8) S. Ohno, M. Hosokawa, A. Hoshino, Y. Kitamura, Y. Morita, K.-I. Park, A. Nakashima, A. Deguchi, F. Tatsuzawa, M. Doi, S. Iida and S. Yazawa (2011) A bHLH transcription factor, *DvIVS*, is involved in regulation of anthocyanin synthesis in dahlia (*Dahlia variabilis*). *J. Exp. Bot.* **62**, 5105-5116. (査読有)
DOI: 10.1093/jxb/err216
- 9) N. Saito, F. Tatsuzawa, A. Hoshino, Y. Abe, M. Ichimura, M. Yokoi, K. Toki, Y. Morita, S. Iida and T. Honda (2011) Anthocyanin pigmentation controlled by *speckled* and *c-1* mutations of Japanese morning glory. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* **80**, 452-460. (査読有)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjshs/180/4/80_4_452/_article
- 10) Y. Higuchi, K. Sage-Ono, R. Sasaki, N. Ohtsuki, A. Hoshino, S. Iida, H. Kamada and M. Ono (2011) Constitutive expression of the *GIGANTEA* ortholog affects circadian rhythms and suppresses one-shot induction of flowering in *Pharbitis nil*, a typical short-day plant. *Plant Cell Physiol.* **52**, 638-650. (査読有)
DOI: 10.1093/pcp/pcr023
- 11) M. Hayashi-Tsugane, M. Maekawa, Q. Qian, H. Kobayashi, S. Iida and K. Tsugane (2011) A rice mutant displaying a heterochronically elongated internode carries a 100 kb deletion. *J. Genet. Genomics* **38**, 123-128. (査読有)
DOI: 10.1016/j.jgg.2011.02.004
- 12) 定塚(久富)恵世、山内卓樹、飯田滋、(2011) メンデルの法則における不完全優性と植物の遺伝子量効果、生化学、**83**, 638-642. (査読有)
<http://www.jbsoc.or.jp/event/magazine/pdf/83-07-09.pdf>
- 13) K. Takagi, M. Maekawa, K. Tsugane and S. Iida (2010) Transposition and target preferences of an active nonautonomous DNA transposon *nDart1* and its relatives belonging to the *hAT* superfamily in rice. *Mol. Genet. Genomics* **284**, 343-355. (査読有)
DOI: 10.1007/s00438-010-0569-9
- 14) R. Terada, M. Nagahara, K. Furukawa, M. Shimamoto, K. Yamaguchi and S. Iida (2010) Cre-*loxP* mediated marker elimination and gene reactivation at the *waxy* locus created in rice genome based on strong positive-negative selection. *Plant Biotechnol.* **27**, 29-37. (査読有)
http://www.wdc-jp.biz/pdf_store/jspcmb/pdf/pb27_1/27_29.pdf
- [学会発表] (計 29 件)
- 1) K. Tsugane, H. Nishimura, M. Hayashi-Tsugane, S. Iida and M. Maekawa: A transposon suppressor *Dart-canceller* in the wild rice. 第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 (岡山)
- 2) M. Hayashi-Tsugane, H. Takahara, N. Ahmed, E. Himi, K. Takagi, S. Iida, M. Maekawa and K. Tsugane: Identification of the transposon-tagged gene essential for chloroplast biogenesis in rice. 第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 (岡山)
- 3) 伊東拓朗、奥野堇、勝山弘章、森山拳斗、仁田坂英二、星野敦、飯田滋、福岡浩之、磯部祥子、佐藤修正、渡部信義、久保山勉: EST-SSR と EST-SNP を用いたアサガオ連鎖地図の作成、日本育種学会第 123 回講演会、2013 年 3 月 (東京)
- 4) 梅根一夫、Eun Chang-Ho、高木恭子、梅根美佳、飯田滋: イネ内在性 DNA トランスポゾン *nDart1* のエピジェネティックな転移活性の制御、日本育種学会第 122 回講演会、2012 年 9 月 (京都)
- 5) 西村秀希、氷見英子、飯田滋、梅根一夫、前川雅彦: コシヒカリ *nDart1-0* タグラインの育成、日本育種学会第 122 回講演会、2012 年 9 月 (京都)
- 6) 梅根一夫、梅根美佳、飯田滋、前川雅彦: 野生イネゲノム中の栽培イネトランスポゾンを抑制する新規因子、日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 9 月 (福岡)
- 7) 星野敦、朴慶一、飯田滋: アサガオの模様にもみるエピジェネティックな遺伝子発現制御の獲得機構、日本進化学会第 14 回東京大会、2012 年 8 月 (東京)
- 8) A. Hoshino, K.-I. Park and S. Iida: Epigenetic regulation of flower variegation in *Ipomoea tricolor*. 第 8 回生物学国際高等コンファレンス (OBC8) "Speciation and Adaptation II" - Environment and Epigenetics - 2012 年 3 月 (岡崎)

- 9) 森田裕将、星野敦、飯田滋：アサガオの模様を生み出す small RNA の機能と制御、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 (京都)
- 10) 梅根(林)美佳、前川雅彦、飯田滋、梅根一夫：DNA トランスポゾン *nDart1* 挿入により生じたイネ半優性矮化多分げつ変異体の解析、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 (横浜)
- 11) 前川雅彦、西村秀希、氷見英子、飯田滋、梅根一夫：イオンビーム処理によるイネの DNA トランスポゾン *Dart* の活性化、日本育種学会第 122 回講演会、2011 年 9 月 (福井)
- 12) 西村秀希、氷見英子、飯田滋、梅根一夫、前川雅彦：アザシチジン処理で活性化した自律性因子 *Dart* の特定、第 122 回日本育種学会講演会、2011 年 9 月 (福井)
- 13) 森田裕将、星野敦、飯田滋：アサガオの模様から RNA サイレncing の制御と機能を探る、日本遺伝学会第 83 回大会、2011 年 9 月 (京都)
- 14) 星野敦、朴慶一、崔丁斗、飯田滋：ソライロアサガオの模様に係わるエピジェネティクス、第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 (仙台)
- 15) 梅根一夫、高木恭子、梅根(林)美佳、前川雅彦、飯田滋：イネ DNA トランスポゾン *nDart1* の挿入領域の特徴と利用、日本育種学会第 121 回講演会、2011 年 3 月 (横浜)
- 16) A. Ono, K. Yamaguchi, Y. Johtsuka-Hisatomi, T. Mitsui, R. Terada and S. Iida: Functional analysis of *OsROS1a* by homologous recombination-promoted gene targeting. 第 33 回日本分子生物学会年会及び第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 (神戸)
- 17) 梅根美佳、前川雅彦、Qian Qian、小林裕和、飯田滋、梅根一夫：大規模欠失によるイネ節間伸張異常変異体の遺伝学的解析、第 33 回日本分子生物学会年会及び第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 (神戸)
- 18) リートン、福岡浩之、星野敦、飯田滋、仁田坂英二、久保山勉：mRNA の網羅的塩基配列解読によるアサガオ SNP マーカーの作出、日本育種学会第 118 回講演会、2010 年 9 月 (秋田)
- 19) 梅根一夫、高木恭子、前川雅彦、飯田滋：イネ内在性 DNA トランスポゾン *nDart* の挿入部位指向性と遺伝子タギングへの応用、イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2010、2010 年 7 月 (つくば)

ほか国内学会等での発表 10 件

[図書] (計 1 件)

- 1) M. Maekawa, K. Tsugane and S. Iida (2011) Effective contribution of the *nDart* transposon-tagging system to rice functional genomics. K. V. Urbano ed., *Advances in Genetics Research* 4, pp.259-272, Nova Science Publishers Inc., New York.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 滋 (IIDA SHIGERU)
静岡県立大学・大学院食品栄養環境科学研究
院・客員教授
研究者番号：30012777

(2) 研究分担者

定塚(久富) 恵世 (JOHZUKA-HISATOMI
YASUYO) [2010~2011 年度]
静岡県立大学・大学院薬学研究科・博士研
究員
研究者番号：60517887

木下 哲 (KINOSHITA TETSU) [2012 年度]
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・研究チーム長
研究者番号：60342630

石崎 公庸 (ISHIZAKI KIMITSUNE) [2012
年度]
京都大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：00452293

(3) 連携研究者

小林 裕和 (KOBAYASHI HIROKAZU)
静岡県立大学・大学院食品栄養環境科学研
究院・教授
研究者番号：80170348

野口 博司 (NOGUCHI HIROSHI)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号：60126141

渡辺 賢二 (WATANABE KENJI)
静岡県立大学・薬学部・准教授
研究者番号：50360938

定塚(久富) 恵世 (JOHZUKA-HISATOMI
YASUYO) [2012 年度]
静岡県立大学・大学院食品栄養環境科学研
究院・客員研究員
研究者番号：60517887