

機関番号：82112

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21880054

研究課題名（和文） 細胞周期制御による高等植物のジーンターゲティング効率の向上

研究課題名（英文） Enhancement of gene targeting via cell cycle regulation in higher plants

研究代表者 遠藤 真咲 (ENDO MASAKI)

独立行政法人農業生物資源研究所 遺伝子組換え技術研究ユニット
任期付研究員

研究者番号：40546371

研究成果の概要（和文）：

遺伝子相同組換えは、生物の遺伝子を外から入れた遺伝子で置き換える際に必要な仕組みであるが、植物においてはその効率が低く、遺伝子の置き換えは困難である。相同組換えは、細胞分裂の過程において、DNA が複製する S 期から、複製した DNA が二つに別れる前の G2 期の間にその効率が高いと考えられていることから、本研究では、細胞周期を制御する因子の変異体を作成し、相同組換え効率に違いが見られるかを解析した。その結果、S 期の進行が進まないシロイヌナズナでは相同組換え効率が下がることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Gene targeting is achieved through the homologous recombination between endogenous genome and foreign DNA, which has homology to endogenous genome. Homologous recombination is one of the DNA double strand break repair mechanism. In contrast to prokaryotes and lower eukaryotes, gene targeting is infrequent in higher plants and foreign DNA integrates into plant genome mainly via non-homologous end joining because of low homologous recombination frequency. Depend on the cell cycle phase, the choice of one of the DNA repair pathway over the other will secure genome stability maintenance and homologous recombination is an efficient way to maintain genome stability at a post-replication stage. In this study, we analyzed the *Arabidopsis* mutants of cell cycle regulation factors and revealed that the mutant, which lacks positive regulator of G1/S transition showed low homologous recombination frequency.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,040,000	312,000	1,352,000
2010 年度	940,000	282,000	1,222,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,980,000	594,000	2,574,000

研究分野：植物分子育種

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物、ジーンターゲティング、相同組換え

1. 研究開始当初の背景

ジーンターゲティング(GT)による遺伝子改変は、特定の位置への遺伝子導入や内在遺伝子のピンポイントでの改変にする精度

の高い分子育種法であり、可能改変形質の安定性の確保や、ランダムな遺伝子導入の際に生じる二次的な影響を最小限に抑えることが可能である。また、近年、微生物において

はタンパク質工学的的手法による酵素の改良等が盛んに行われているが、高等植物においてGTによる遺伝子改変が実用可能となれば、目的のタンパク質をコードする遺伝子を改変することで、特定のアミノ酸やモチーフが改変されたタンパク質そのものを植物に生産させることができるようになると期待される。標的遺伝子を正確かつ必要最小限改変した作物は、消費者からも受け入れられやすいと考えられることから、植物において効率的かつ汎用性のあるGT系を確立することは、植物ゲノム研究の成果を実社会で活かすうえでも有効な手段である。しかし、高等植物における相同組換え(HR)効率は極めて低く、標的遺伝子と相同性のある配列を核内に導入してもそのほとんどはランダムな挿入となるため、GTを実用的な技術とするためには、HR効率を向上させる必要がある。研究開始当初、HR効率が向上する条件として、(1) 標的遺伝子の切断、(2) オープンなクロマチン構造、(3) HR関連因子の過剰発現等が報告されていた。一方、HRは本来、DNA二重鎖切断が生じた際に相同性の高いDNA鎖を鋳型として欠損部位を再合成する反応であるため、鋳型に最適な姉妹染色分体が存在する細胞周期S-G2期にその効率が高いことが予想された。また、S期は一過的にゲノム全体がオープンなクロマチン構造をとること、HR関連因子の発現はS-G2期に高いことから、S-G2の延長は、(2)および(3)の条件も満たすと考えた。そこで、本研究では、細胞周期制御によるHRおよびGT効率の向上を試みることにした。

2. 研究の目的

HR効率の向上に有効な細胞周期制御条件を見出し、高等植物における効率的なGT系の構築に応用することを最終目的とする。具体的には、オープンなクロマチン構造や姉妹染色分体の存在がHRに有利であること、HR関連因子の発現が細胞周期S-G2期に高いことから、S-G2期にある細胞の割合を高めることでHRならびにGT効率が向上すると予想し、G1/S期の移行促進や、G2/M期移行抑制がHR効率の向上に及ぼす影響を評価する。

3. 研究の方法

細胞周期制御因子の数は生物種によって大きく異なり、また、植物独自の因子も多数存在するため、酵母や動物の知見をそのまま植物に応用することは難しい。そこで、シロイヌナズナおよびイネを材料に、細胞周期制御因子を改変し、S-G2期にある細胞の割合が高め、HR効率およびGT効率の評価を行う。具

体的には以下の(1)~(3)の実験を行う。

(1) G1/S 期の移行促進

G1/S期の移行促進には、CDKAやE2Fの活性化が有効であると考えられる。そこで、CDKAの活性化促進を促す変異体として、CycD、CAKの過剰発現体を作成する。また、E2Fならびに、E2Fの活性化因子であるRepAの過剰発現体を作成し、HR効率の評価や細胞周期の変化を解析する。HR効率の評価はシロイヌナズナにて行い、染色体内で相同組換えが生じると機能的なGUSが発現するレポーターシステム(図1)を用いる。

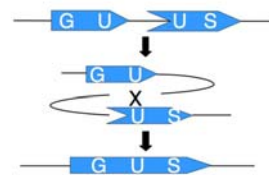


図1 相同組換え評価システム
染色体内で相同組換えが生じると機能的なGUSが発現する。

(2) G2/M 期の移行抑制

植物特異的に存在するCDKB2はlateS-G2期特異的に発現し、G2/M期の移行に重要な働きを担うことが知られている。また、近年、シロイヌナズナにおいてはDNA損傷が生じるとCDKB2が分解され、G2/M期の移行を抑制することでDNA修復が完了するまで分裂を生じさせないチェックポイント機構が存在することが明らかとなっている。そこで、CDKB2の発現を抑制することでG2/M期の移行を抑制できると考え、シロイヌナズナ、イネにおけるCDKB2発現抑制変異体を作成し、HR効率を評価する。

(3) I-Sce I、Luciferase を利用した GT 効率評価系の構築

(1)および(2)においてHR効率に変化が見られた変異体についてGT効率の評価を行う。報告者はこれまでに、シロイヌナズナおよびイネにおいて、GTにより、アセト乳酸合成酵素(ALS)遺伝子に除草剤耐性を導入する系を構築している(Endo et al., 2006, 2007)。これらの系を用いてGT効率を評価することも可能であるが、GTの評価には、除草剤耐性細胞の増殖を待つ必要があるため、その評価にはある程度時間を要するうえに、細胞の増殖速度に影響がある変異体の場合、除草剤耐性であっても増殖速度が遅い細胞を見落とし、てしまう恐れがある。そこで、迅速かつ正確

に GT 効率を評価するためのモデル GT 系の構築を行う。

4. 研究成果

(1) G1/S 期の移行促進

G1/S 期の移行に働き、かつ HR 関連因子のリン酸化にも関与すると考えられる CAK (CDK activating kinase; CDKF;1, CDKD;2, CDKD;3) のノックアウト、過剰発現シロイヌナズナの解析を行なった。その結果、CAK ノックアウト株における HR 効率は野生型と同程度であったが、DNA 損傷処理時の HR 効率は野生型と比較して低く(図 2)、DNA 損傷感受性も高いことが明らかとなった。一方、CAK 過剰発現体では、DNA 損傷未処理および、細胞周期非依存的に DNA 二重鎖切断を誘導するブレオマイシン処理条件下において、野生型との間に HR 効率の違いは見られなかった。これらの結果は、CAK は DNA 損傷時の HR 修復に関与する一方、CAK の発現量は HR 効率の律速ではないことを示している。今後は CAK1 ノックアウトおよび過剰発現が細胞周期に及ぼす影響を解析するとともに、S-G2 期特異的に DNA 損傷を与えた際の HR 効率についても評価する予定である。

また、近年の酵母や動物細胞を用いた研究から、CDKA のリン酸化のターゲットの一つが、HR の初期反応である、DNA 二重鎖切断部位の削り込みに働く CtIP であることが明らかとなっている。シロイヌナズナ CtIP は DNA 損傷により著しい転写上昇が見られること、DNA 損傷が細胞周期を停止させ、その時期に応じた修復機構を選択することは酵母や高等植物に共通すること考えると、高等植物においても、CtIP の細胞周期または DNA 損傷依存的なリン酸化が HR 効率に影響を及ぼす可能性がある。そこで、活性化に関わるリン酸を受けると予想されるアミノ酸を置換した疑似リン酸化 CtIP 過剰発現体を作成した。今後、HR 効率を評価する予定である。

イネにおいては G1/S 期の移行促進のため、wheat dwarf virus 由来の RepA 過剰発現体を作成した。RepA はウイルス感染細胞において、G1/S 期の進行抑制に働く E2F-Rb の結合を解消することで、S 期進行を促進することが報告されている。目的遺伝子産物が発現している事を確認したが、Splicing variant も存在していることが判明したので、イントロンのスプライシングを防ぐ変異を入れ、目的産物を効率的に発現する形質転換体を作成した。

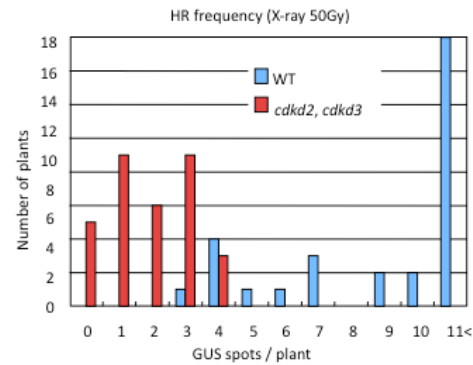


図 2 cdkd2, cdkd3 二重変異体における相同組換え効率
cdkd2, cdkd3 二重変異体では、X 照射による相同組換え効率の上昇が生じない。

(2) G2/M 期の移行抑制

G2/M 期の移行に働く CDKB2 の発現を抑制すべく CDKB2 RNAi を導入したシロイヌナズナを作成し、HR 効率を評価したが、野生型との間に顕著な違いは見られなかった。シロイヌナズナにおける CDKB2 の著しい発現抑制は G2/M 期の移行を抑制すると同時に、mitotic cycle から endocycle への移行を促進することが報告されており、Endocycle に入った細胞では、細胞分裂を伴わずに DNA 複製を繰り返す為、GT が生じたとしても、その細胞から植物体を再生させることはできない。そこで、胚乳以外の組織では endoreduplication が生じないとされているイネを対象を切り替えて CDKB2 の発現抑制を試みた。CDKB2RNAi を導入したイネカルスを作成し、核相を測定した結果、4C/2C 比の増加が観察され、S-G2 期にある細胞が増加していることが示された。また、意外なことに、一部の系統ではカルスにおいても 8C や 16C といった高次倍数性の細胞も確認された(図 3)。しかし、シロイヌナズナとは異なり、高次倍数性の細胞の割合が高いカルスも増殖を続けていたことから、イネにおける CDKB2 の発現抑制は endoreduplication ではなく endomitosis を誘導していると予想された。そこで、両者を区別するため、染色体の観察を行ったところ、イネ CDKB2RNAi カルスでは染色体数が倍加した細胞が観察され(図 4)、endomitosis が生じていることが証明された。イネにおいては、胚乳以外の組織で染色体の高次倍数化が見られた報告は前例がなく、一遺伝子の発現抑制のみで核相が変化することは注目すべき結果である。植物は果実の肥大時等、急速な組織の成長を必要とする際、細胞当たりの DNA 含量を増大させる事が知られているが、その過程を制御するメカニズムについては明らかとなっていない。本来 DNA 量が増加しないイネにおいて DNA 量

を倍加できたことにより、両者の比較解析から得られる知見は、イネ以外の植物における DNA 含量増加のメカニズム解明にも役立つと考えられる。また、本来の目的である、G2/M 期の移行抑制と HR 効果の評価については、endomitosis の影響を排除することが好ましいため、XVE システムを用いた誘導的 CDKB2RNAi コンストラクトを作製し、形質転換体を作出した。β-estradiol 処理による CDKB2RNAi の発現誘導により、4C/2C 比を制御できることが確認されたことから、今後は、CDKB2 誘導的 RNAi を用いて G2/M 期の移行抑制を行い、HR 効率を評価する予定である。

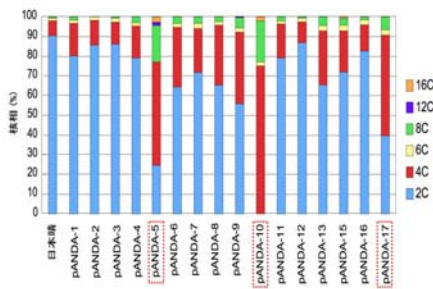


図3 OsCDKB2 RNAi 導入カルスにおける核相野生型(日本晴)および、OsCDKB2 恒常的 RNAi (pANDA)を導入したイネカルスにおける核相を測定。pANDAD-5, 10, 17では4Cの割合が増加しているだけでなく、8Cや16Cを示す細胞も出現して

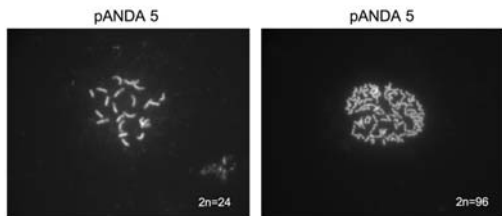


図4 核相が増加していた系統における染色体の観察核相が増加していた系統(pANDA-5, 10, 17)のカルスでは、染色体数が増加している細胞が観察された。

(1)においては、細胞周期制御因子である CAK を欠損した変異体では DNA 損傷処理による HR 効率の上昇が生じないことが明らかとなり、細胞周期そのもの、または、細胞周期制御因子が HR 効率に影響を与えるという研究の方向性が正しいことが示唆された。一方、(2)では、G2/M 期の進行阻害による S-G2 期の延長を期待したが、イネにおける CDKB2 の発現抑制は endomitosis を誘導するという予想外の結果が得られ、また、シロ

イヌナズナにおいては、DNA 損傷処理や CDKB2 の発現抑制が endoreduplication を促進することが報告されていることから、細 DNA 損傷と修復機構の選択、細胞周期制御は互いに関連していると考えられた。現在のところ、HR 効率が顕著に上昇する細胞周期制御因子変異体の発見には至っていないが、細胞周期の特定の時期に DNA 損傷生じさせることや、endomitosis や endoreduplication の抑制と組み合わせることにより、HR 効率の向上に有効な方法を見出せると考えている。

(3)I-Sce I、Luciferase を利用した GT 効率評価系の構築

Meganuclease である I-Sce I の認識配列をコード領域内に挿入することにより不活性型となった luciferase 遺伝子と、誘導的 I-SceI 発現カセットを導入したイネ、およびシロイヌナズナを作出した (図5 GT acceptor)。次に、I-SceI の発現誘導とともに、レポーター遺伝子上の luciferase 遺伝子を相補する GT ベクター(図5 GT donor)を形質転換し、機能的な luciferase の発現によって GT が生じた細胞の検出が可能であることを確認した。

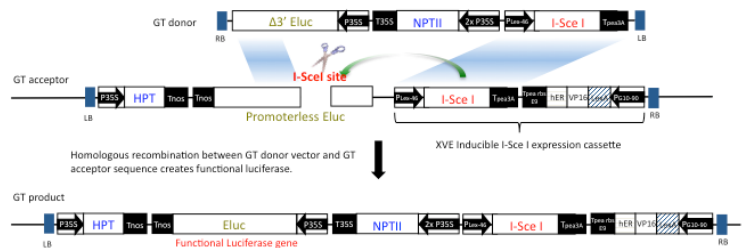


図5 I-Sce I, Luc を利用した GT 検出系

GT のアクセプターサイトとして、I-Sce I 認識配列および終止コードの挿入により、機能的なタンパク質をコードしない luciferase 遺伝子と、I-Sce I 発現誘導カセットをシロイヌナズナに導入する(GT acceptor)。この植物体に対して、β-estradiol 処理を行い、I-Sce I の発現を誘導すると同時に、相同組換えによってのみ luciferase の機能を補完できる GT donor ベクターを形質転換し、luciferase の発光を検出することによりジーンターゲット効率を評価する。

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 雑賀啓明, 遠藤真咲, 土岐精一 (2010) 遺伝子ターゲット技術を利用したBS耐性イネの分子育種 日本農薬学会誌

35(2):172-175

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① Endo, M. Delivery of T-DNA to DNA double stranded breaks; Mechanism and application. 31th International Crown Gall Conference. 2010 年 11 月 6 日 UC Berkeley, CA.
- ② Abe, K. Characterization of CAF-1 mutants in rice 2nd International Meeting on Plant DNA Repair and Recombination 2010 年 3 月 2 日 アシロマ, カリフォルニア
- ③ 遠藤真咲 シロイヌナズナにおける細胞周期制御因子の改変と遺伝子相同組換えへの影響 第 32 回日本分子生物学会 2009 年 12 月 9 日 横浜
- ④ Abe, K. Application possibility of CAF-1 mutant for gene targeting in rice 第 32 回日本分子生物学会 2009 年 12 月 9 日 横浜
- ⑤ Toki, S. Homologous recombination and gene targeting in rice. 9th International Plant Molecular Biology (IPMB) Congress. 2009 年 10 月 29 日 セントルイス
- ⑥ Endo, M. OsCDKB2 knockdown induces endomitosis in rice. 9th International Plant Molecular Biology (IPMB) Congress. 2009 年 10 月 27 日 セントルイス
- ⑦ 遠藤真咲 植物の DNA2 重鎖切断修復の細胞周期による制御 日本植物学会第 74 回大会 2010 年 9 月 10 日 中部大学

〔図書〕（計 2 件）

- ① Osakabe, K., Abe, K., Endo, M., Toki, S. Springer. Regulatory mechanisms of homologous recombination in higher plants- Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives Volume 2, (2010) 4(19):371-391
- ② Osakabe, K., Abe, K., Endo, M., Toki, S. Springer. Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspective Vol.2 – Regulation of Mechanisms of Homologous Recombination in Higher Plants. (2010) 371-386.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：イネ科植物の核内の染色体数を倍加させる薬剤及びその利用
発明者：遠藤真咲、雑賀啓明、中山繁樹、梅田正明、土岐精一
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2009/007243
出願年月日：2009 年 12 月 25 日

国内外の別：国外

○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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 真咲 (ENDO MASAKI)
独立行政法人 農業生物資源研究所
遺伝子組換え技術研究ユニット
任期付研究員
研究者番号：4 0 5 4 6 3 7 1

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：