

## 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 5 月 31 日現在

機関番号：23803  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22570049  
 研究課題名 高等植物の相同組換えによる遺伝子ターゲティングの頻度を向上させる組換え系の開発  
 研究課題名 Application of gene targeting by homologous recombination as a biotechnological tool for rice functional genomics.  
 研究代表者  
 定塚 恵世（久富 恵世）（Johzuka Yasuyo, Hisatomi Yasuyo）  
 静岡県立大学 融合科学研究科（研究院）博士研究員  
 研究者番号：60517887

## 研究成果の概要（和文）：

ゲノム配列を自在に改変できる遺伝子ターゲティングは、ゲノム配列が明らかとなった生物で早急に求められている手法であるにも関わらず、高等植物では特に遅れており、相同組換えを用いたゲノム改変法の確立と普及が急務である。そこで本研究課題では、高等植物のターゲティングの汎用化を目指し、ターゲティング時の正確な組換え機構を理解し、適切な組換え酵素（ $\lambda$  Red 系）を一過的に発現させてターゲティング頻度を飛躍的に増加させることを目的とする。さらに、ターゲティング頻度を簡便に測定するためのアッセイ用ベクターも構築し、ターゲティング頻度をさらに向上させることが可能な最適ベクターの構築も試みた。

## 研究成果の概要（英文）：

Rice, an important food, is the staple grain for one-half of the world's population. We have succeeded in the development of a gene-targeting method which involves the genetic modification of rice DNA. Aiming at wide use of targeting of a higher plant, we developed making suitable recombination enzyme ( $\lambda$  Red system), and making targeting frequency increase. The vectors for assay for measuring targeting frequency were also developed.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物 生理学

キーワード：遺伝子ターゲティング、相同組換え、変異導入、植物、イネ、形質転換、バイオテクノロジー、遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子ターゲティングとは、相同組換えを利用してゲノム上の任意に選んだ標的(target)部

位を予めデザインした配列に変換する方法である。ゲノム配列が明らかになっている生物では、ゲノム配列を目的通りに改変し得るターゲティン

グは必須の技術となっている。しかしながら、特に高等植物ではゲノム配列が明らかになっても、相同組換えによる確実に再現性のあるゲノム改変法が確立されておらず、他の生物種と比較しても極端に遅れていた。申請者を含むグループでは、強力なポジティブ・ネガティブ(ポジ・ネガ)選抜により世界に先駆けて穀物のモデル植物であるイネで遺伝子ターゲティングによるゲノム改変に成功した。さらに、現在までに 13 もの遺伝子を改変し、遺伝子の機能を破壊したノックアウト改変だけでなく、遺伝子の機能解析にも有用なノックイン改変も行うことができたので、高等植物のゲノムを改変する手法は確立した。同時にこれらの研究を通じて、他の生物種のターゲティングと比較し、形質転換法の特徴や相同組換えの機構について違いがあること、さらには我々のターゲティング法に残された克服すべき問題点があることが明らかとなった。我々のイネのターゲティングの大きな特徴は、核までは一本鎖DNA(ssDNA)として運ばれる T-DNA を用いて、T-DNA のボーダー配列のすぐ内側に強力なネガティブマーカーを配して、非常に高効率の T-DNA のランダム挿入を効果的に排除している点にある。それにより任意の配列の変換が可能になったが、一方で大規模な実験系と長大で複雑なバイナリーベクターが必要となり、それ故、「ターゲティング実験は困難なもの」と考えられており、他の研究者がゲノム改変法として遺伝子ターゲティングを選択しない要因となっている。言い換えれば、高等植物のターゲティングでは我々の独壇場ではあるが、技術が普及し究極の変異導入法もしくは究極の育種法となるためには、ターゲティング頻度の向上が不可欠である。

体細胞での相同組換えは、DNA 上の損傷を修復するために必須で、特に細胞に致死的なダメージを与え得る、DNA 二重鎖切断(DSB:double strand break)を解消するための

生物が持つ非常に重要な手段である。ターゲティングはこの機構を利用して、外来の DNA を相同組換えにより導入しようとする技法である。それゆえ高等植物では、ターゲティング頻度の向上の為に、相同組換えの研究が進んでいてターゲティング頻度が例外的に高い酵母(*S.cerevisiae*)をモデルとして、酵母の相同組換えに関わる酵素を過剰発現させて、ターゲティング頻度を高める試みが世界中で行われているが、染色体間の相同組換えの頻度は高まるものの、必ずしもターゲティング頻度の向上には至っていない。このことは、染色体間の相同組換えが T-DNA を用いたターゲティングと異なる組換え機構で生じている可能性を示唆しているだけでなく、従来の相同組換えのモデルを追従してターゲティング頻度を上げることの限界も示している。申請者は相同領域に 21 カ所の点変異を導入したベクターを用いてターゲティングを行い、得られた組換え体のゲノム上での点変異の分布を調べて、相同組換えの乗り換え点を解析したところ、4~7kb にもわたる長いヘテロ二重鎖が生じてミスマッチ修復されたことを強く示唆する結果が得られた。酵母などの場合は通常 0.1~0.3kb 位の極めて短いヘテロ二重鎖しか観察されていないので、従来の二重鎖切断修復モデル(DSBR :double strand break repair モデル)では説明できないことが分かった。そこで、広い領域で ssDNA がゲノム DNA とアニーリングを起こしていること、ゲノム DNA 上の DSB の生成とは無関係に相同組換えが開始される可能性、の2点を示唆した従来まで提唱されていた組換え過程とは異なる、新たなモデルを提唱した。そこで申請者は、この反応に必要と考えられる新たな組換え系を探索し、 $\lambda$ ファージがコードする組換え系  $\lambda$  Red 系が利用可能であることに着目した。 $\lambda$  Red 系は3つの酵素からなり、 $\lambda$ ファージゲノムが大腸菌ゲノムへ組

み込まれるときの組換え系である。大腸菌の主要な相同組換え酵素は RecA であるが、RecA 酵素の過剰発現体では、大腸菌のゲノムのターゲティング頻度が向上することはない。しかしながら、RecA-条件下で  $\lambda$  Red を導入することで、大腸菌のターゲティング頻度は飛躍的に上昇し、また 50bp 程度の相同領域しか必要としないので、大腸菌のゲノム改変が非常に容易になった実績がある。 $\lambda$  Red 系の最大の特徴は ssDNA でも反応が可能であるので oligo DNA を用いることができること、さらに想定されている組換え機構が single strand annealing モデルであるため、RecA の機能に依存しないことである。さらに申請者は  $\lambda$  Red 系の組換えの特徴とイネターゲティング時の組換えの特徴との類似点を多数見だし、この系がイネのターゲティング組換えを促進して頻度を向上させる可能性を追求したいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の主眼は、イネでのポジ・ネガ選抜による遺伝子ターゲティングの頻度を向上させることである。申請者は  $\lambda$  Red 系とイネターゲティングの相同組換えの共通点を多数見だしたので、以下の2つの戦略を用いてイネ遺伝子ターゲティングの頻度を飛躍的に向上させることを目指す。

(1) ターゲティング頻度の向上を目指した  $\lambda$  Red 組換え系の利用

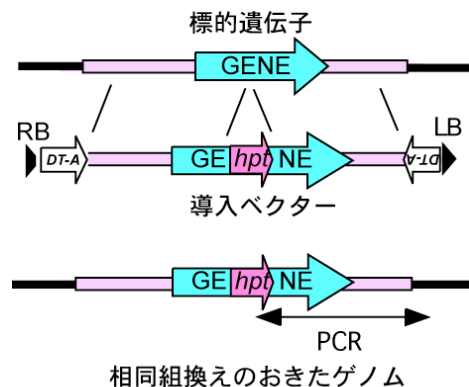
(2) ターゲティング頻度を迅速に測定するためのアッセイ系と最適化ベクターの構築

(1)ではターゲティング時に  $\lambda$  Red 酵素をイネカルス内で発現させ、single strand annealing を強固なものとし、ターゲティング頻度の向上を図る。(2)では頻度測定のための迅速で容易なポジ・ネガ選抜アッセイ系の開発と、ssDNA が組換えの中間体である

と考えられるので、T-DNA ボーダー配列の方向を変えて ssDNA の方向性を検討したり、相同領域の長さを変えたベクターを作成してターゲティング頻度を測定し、最適なベクターを構築する。

## 3. 研究の方法

申請者らのターゲティング法は、アグロバチア法による大規模な形質転換系と強力なポジティブ・ネガティブ選抜法を組合せてランダムな T-DNA の挿入の中に僅かに生じたターゲットされた形質転換体を先ず濃縮し、次いで PCR を用いてスクリーニング (PCR 選別) を行い、目的とする標的遺伝子が改変されたトランスジェニック・イネを作成する手法である (図)。このポジ・ネガ選抜法は、ポジティブ選抜マーカーにハイグロマイシン耐性 *hpt* 遺伝子を用い、導入 T-DNA の相同組換え領域と両端のボーダー配列 (RB と LB) の間にネガティブ選抜マーカーであるジフテリア毒素の A 断片をコードする *DT-A* 遺伝子を組込んで、T-DNA のランダムな挿入を効果



的に排除している。最終的に目的の遺伝子改変体はポジ・ネガ選抜で生き残ったカルスの約 1% 程度であり、PCR 選別は不可欠である。それゆえ、大量のカルスを準備し、通常の T-DNA ランダム挿入による形質転換体を作成する場合の 50 から 100 倍程度の規模で形質転換実験を行う必要がある。さらに、一般的には相同領域が長いほど組換え効率が高いと考えられているので、

ポジティブマーカーの両側に長い相同領域 DNA を配置すると、PCR 選別の条件設定やバイナリーベクターの構築が非常に困難になる。これらの条件設定の煩雑さが高等植物の研究者による本方法の利用を妨げる一因となっており、申請者はターゲティング頻度を向上させてこれらの問題点を打破すべく、(1)適切な組換え酵素を供給してターゲティング頻度を上げる、(2)迅速に頻度を測定できるアッセイ系ベクターを構築する、2つの面から研究を進める。

#### 4. 研究成果

$\lambda$  Red 系は3つの酵素、exo、bet、gamよりなり、大腸菌内では RecA や RecBCD などの他の組換え酵素の活性は必要としない。それぞれの酵素は exonuclease や ssDNA 結合、外来 DNA の安定化などの活性を持つ。大腸菌ターゲティングでは  $\lambda$  Red 酵素を過剰に長期間発現させると、ターゲティングの頻度が低下し、場合によっては細胞が致死性を示すことが知られている。それゆえ、 $\lambda$  Red 系遺伝子導入トランスジェニックイネが致死性を示した場合は、誘導性プロモーター制御下で一過的に発現させて効率を高めても検討した。申請者はすでに過剰発現すると致死性を示す部位特異的組換え酵素 Cre の発現をエストラジオール誘導性プロモーターで制御して一過的発現を行い、部位特異的組換えを成功させた実績があるので、 $\lambda$  Red 系の遺伝子の発現誘導にも同様のプロモーターを検討した。さらに、原核生物の酵素を確実にイネの核へ運ぶためにそれぞれの遺伝子に SV40 の nuclear localization signal を付加した。完成したバイナリーベクターをイネへ導入したところ、複数の形質転換体を作成することに成功した。得られた形質転換体(T0)の生育状況を調査したところ、稔性など異常が無く、生育にほとんど影響は無かった。

アッセイ系ベクターの作出には、イネ内在性遺伝子であるアセト乳酸合成酵素 ALS

(*acetolactatesynthase*) 遺伝子内に2点の変異が導入されると、除草剤の一種である bispyribac-sodium (BS) 耐性になることを利用することとした。ゲノム上のあらゆる遺伝子や領域を自在に改変するためには、ポジ・ネガ選抜と PCR 選別が欠かせない。実際に、イネ ALS 遺伝子に特定の点変異が導入すると、除草剤耐性になることを指標にターゲティング改変個体を選別した例もあるが、この方法は他の遺伝子のターゲティングには応用できない。前述の方法では、ポジ・ネガ選抜後に生き残ったすべてのカルスからゲノム DNA を抽出して long PCR により選別を行う必要があり、測定すべきターゲティング頻度は PCR 選別で得られる値であり、ターゲティング改変個体が得られる割合は1%程度であることを考えると、様々な条件でターゲティング頻度を測定するためには、PCR 選別は適していない。そこで、イネの ALS 遺伝子に点変異を導入して除草剤耐性が付与された個体を選別することで、PCR 選別を必要としない頻度測定に特化したアッセイ用ベクターを構築するには ALS 遺伝子が最適である。このとき、ネガティブマーカーは両方のボーダー配列の内側に配置して、ネガティブ選抜は従来通り行った。このアッセイ用ベクターにより、任意の遺伝子の改変を可能にするポジ・ネガ選抜を行いつつ、簡便にターゲティング頻度を測定することが可能となる。

そこで、ALS 遺伝子が座するイネ第2染色体の BAC クローンを入手し、BS 耐性になるための2つの点変異とマーカーとしての制限酵素部位を  $\lambda$  Red 法によって導入した。我々は  $\lambda$  Red 法により、大腸菌内での相同組換えを利用して *in vivo* でのクローニングにも成功した。長大な BAC クローン内にわずか2点の点変異をスムーズに導入できたことは画期的な成果である。申請者

はこの方法を駆使して、5種類の長さのALS遺伝子をもつ、ターゲティングベクターを作成した。

完成したトランスジェニックイネと様々な長さの異なるターゲティングベクターを用いて遺伝子ターゲティングの頻度を検討中である。

#### 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)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

定塚 恵世 (久富 恵世) (Johzuka Yasuyo, Hisatomi Yasuyo)

静岡県立大学 融合科学研究科 (研究院)  
博士研究員

研究者番号：60517887

##### (2) 研究分担者

野口 博司 (Noguchi Hiroshi)

静岡県立大学 薬学部 教授

研究者番号：60126141

##### (3) 連携研究者

飯田 滋 (Iida Shigeru)

静岡県立大学 大学院生活科学健康科・薬学研究科 特任教授

研究者番号：30012777