

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21日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658004

研究課題名（和文）育種上重要な遺伝子機能解明のための新たな変異創成法の開発

研究課題名（英文）New mutagenesis approaches to study gene function in crop

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）：育種上重要な遺伝子機能の効果的解明のため、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の逆遺伝学的変異導入法の関連手法の開発を試みた。遺伝子ターゲティング関連ではコンディショナル・ノックアウト法や subtle 変異導入法の開発を試み、内在性 DNA トランスポゾン *nDart1* を利用したタギングの最適化を念頭に転移活性の制御機構解明を図り、さらに得られた変異体の解析も行った。

研究成果の概要（英文）：To characterize gene function effectively, we tried to develop reverse genetic approaches, namely conditional knock-out and generation of subtle mutations by homologous recombination-mediated gene targeting and gene tagging employing endogenous *nDart1*-related DNA transposons. We also characterized insertion mutants isolated 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	1,500,000円	0円	1,500,000円
2011年度	800,000円	240,000円	1,040,000円
2012年度	800,000円	240,000円	1,040,000円
年度			
年度			
総計	3,100,000円	480,000円	3,580,000円

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

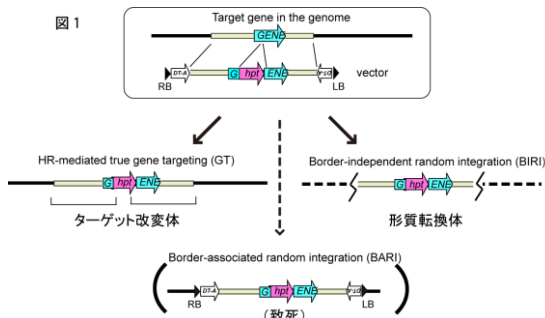
キーワード：植物、突然変異、育種学、逆遺伝学、バイオテクノロジー、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

本研究で扱う新たな変異創成法とは、逆遺伝学的変異導入法に関連する手法のことである。逆遺伝学的変異導入法とは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生体内に於ける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手法であり、先ず変異体を分離して原因遺伝子を同定する手法とは逆の手順を踏んでいることから、逆遺伝学的手法と呼ばれ、相同組換えによる遺伝子ターゲティングやト

ンスポゾンを用いた挿入変異などが含まれる。我々は、ハイグロマイシン耐性遺伝子 *hpt* をポジティブ選抜に、発現した細胞だけを殺す *DT-A* 遺伝子をネガティブ選抜として、アグロバクテリアを介した形質転換のための T-DNA の両端のボーダー配列の直ぐ内側に入れて、T-DNA のランダムな挿入による形質転換体を効率よく除くポジティブ・ネガティブ選抜法を開発し、複数の遺伝子で得られた形質転換体中の約1%の頻度で目的遺伝子のターゲティング改変体を分離できた。こ

れは図1に示すように、T-DNAのボーダー配列による効率よいゲノムへの挿入経路(BARI)が効果的に除かれたため、ボーダー



一配列によらない挿入経路(BIRI)で生じた形質転換中のターゲット改変体(TG)を相対的に濃縮した結果、既に手法が確立しているマウスの場合と同程度の頻度でターゲット改変体を得られるようになり、しかも単に遺伝子を破壊したノックアウト改変体だけでなく、内在性のプロモーターにレポーター遺伝子を繋げて、目的の遺伝子の発現をモニターできるノックイン・ノックアウト改変体の作出にも成功した。

しかしながら、得られた改変変異体が致死的なために遺伝子機能を詳細に解析できない場合なども観察されたので、育種上重要な遺伝子機能の解明には、遺伝子破壊によるnull変異の導入だけでは充分ではなく、育成中に標的遺伝子の発現をOffからOn、もしくはOnからOffへ変換できるコンディショナル・ノックアウトの開発や、外来性のポジティブ選抜遺伝子がゲノム中に残らず、目的とする点変異だけをピンポイントで導入する大変クリーンなsubtle変異導入法を開発し、必要に応じてleaky変異を分離して解析することも、遺伝子機能の分子遺伝学的解析ばかりでなく、育種学の観点からも重要であると考えられる。

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育種を視野に入れた最適化と汎用化のためにも*nDart1*の転移活性を制御する機構の解明は有益であると考えられた。さらに、分離されたイネの挿入変異体に係る遺伝子機能の解明も必要と思われる。

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。

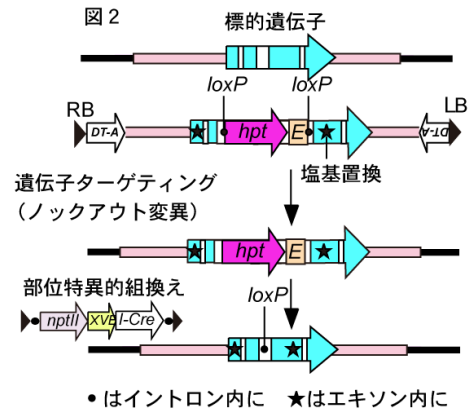
- (1) 部位特異的組換え系を用いたコンディショナル・ノックアウト系及びsubtle変異導入法の開発
- (2) 遺伝子タギングに係わるDNAトランスポゾン*nDart1*の転移活性制御の解析
- (3) 遺伝子ターゲットングやトランスポゾンの挿入による変異に係わる遺伝子機能の解

明

3. 研究の方法

(1) 部位特異的組換え系を用いたコンディショナル・ノックアウト系及びsubtle変異導入法の開発

P1ファージ由来の部位特異的組換え系である*loxP-Cre*を用いて、先ずOffからOnへ変換できるコンディショナル・ノックアウトの開発と同時に、目的とする点変異だけをピンポイントで導入するsubtle変異導入法の開発を目指して、図2の模式図に示すよう



に、先ず遺伝子ターゲットングにより*loxP*配列で挟まれたポジティブ選抜遺伝子*hpt*が標的遺伝子内のイントロンなどの非翻訳領域に組込まれ、さらに翻訳領域内に点変異を導入した遺伝子破壊体を得てカルスを誘導し、エストラジオール処理により誘導可能な*Cre*遺伝子や選抜遺伝子が共に*loxP*配列で挟まれたベクターを導入し、*Cre*遺伝子を一過的に誘導発現させて、標的遺伝子内のポジティブ選抜遺伝子*hpt*と共に再導入した*Cre*遺伝子や選抜遺伝子を同時に除き、相同組換えにより翻訳領域内に導入した点変異と非翻訳領域に34bpの*loxP*配列だけをゲノム上に残した改変体の作出を試みた。なお、ポジティブ選抜遺伝子*hpt*の3'領域にはトウモロコシのトランスポゾン*En/Spm*の3'末端の転写終止領域が組込まれていて、標的遺伝子の転写を効率的に止めるので、この*hpt*遺伝子がイントロン内などの非翻訳領域内に組込まれた標的遺伝子はOff状態にあり、*Cre*遺伝子の一過的発現により*hpt*遺伝子を除けばOn状態となる。

(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、0.4kb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3.7kb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。この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。

(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、イネで多重遺伝子族を形成し、DNA 脱メチル化に係わると考えられる *ROS1a* 遺伝子の機能解明を試みた。また、育種上重要と思われる形質を賦与する考えられる *nDart1* の挿入変異に係わる遺伝子の機能解明を試みた。

4. 研究成果

(1) 部位特異的組換え系を用いたコンディショナル・ノックアウト系及び *subtle* 変異導入法の開発

図2の模式図が示すような *loxP* 配列で挟まれたポジティブ選抜遺伝子 *hpt* が標的遺伝子内の非翻訳領域に組込まれ、さらに翻訳領域内には点変異を導入した遺伝子破壊体のカルスに、エストラジオール処理により誘導可能な *Cre* 遺伝子や選抜遺伝子が共に *loxP* 配列で挟まれたベクターを導入し、*Cre* 遺伝子を一過的に誘導発現させて、標的遺伝子内のポジティブ選抜遺伝子 *hpt* と共に再導入した *Cre* 遺伝子や選抜遺伝子を同時に除き、相同組換えにより翻訳領域内に導入した点変異と非翻訳領域に 34 bp の *loxP* 配列だけをゲノム上に残した改変体の作出に成功し、標的遺伝子の発現が Off から On へと変換されたことも確認した。しかしながら、この方法では点変異導入後に *Cre* 遺伝子により *hpt* 遺伝子を削除すると、*hpt* 遺伝子が組込まれていた場所に 1 コピーの *loxP* 配列が外来性の配列として残ってしまう。この *loxP* 配列を標的遺伝子のイントロンなどの非翻訳領域内に入れて遺伝子発現に対する影響を最小限にすることは可能だとしても、点変異だけを標的遺伝子内に入れて、余計な外来性の *loxP* 配列が残らない方が、よりクリーンな *subtle* 変異導入法であり、標的遺伝子が intronless の場合や GMO の観点からも望ましい。

標的遺伝子内の標的遺伝子内のポジティブ選抜遺伝子 *hpt* の除去は、*loxP-Cre* のような部位特異的組換え系である必要は無く、トランスポゾンを用いることも可能である。昆虫由来のトランスポゾン *piggyBac* は TTAA 配列に挿入し、転移脱離する際も小さな DNA 再編成である footprint を生ぜずに precise excision を起こし、しかもトウモロコシでの転移能も報告されているので、標的遺伝子内の TTAA 配列に組込まれるようにデザインして遺伝子ターゲティングを行い、*piggyBac* の転移酵素を一過的に発現させて標的遺伝子内のポジティブ選抜遺伝子 *hpt* の除去を行えば、余計な外来性の *loxP* のような配列が

全く残らない大変クリーンな *subtle* 変異導入法の開発も可能であろう。

(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、特定の因子だけが高頻度で全ゲノム領域に転移挿入し得るが、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 1 つであるが、この自律性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。

(3) 挿入変異に係わる遺伝子の機能解明

イネは DNA 脱メチル化に係わる 4 つの *ROS1* 遺伝子の内の 1 つ *ROS1a* 遺伝子のノックイン・ターゲティ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判明した。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と考えられる結果を得た。

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 *TWAI1* 遺伝子が不活性化され、穂の粒数が増加することを明らかに出来た。

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 6 件)

1) 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. Kyozuka (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

2) 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.1365-313X.2012.05009.x

3) 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

- 4) 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

- 5) 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 7 件)

- 1) 榎根一夫、Eun Chang-Ho、高木恭子、榎根美佳、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)
- 2) 西村秀希、氷見英子、飯田滋、榎根一夫、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)
- 3) 榎根(林)美佳、前川雅彦、飯田滋、榎根一夫：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)
- 4) 前川雅彦、西村秀希、氷見英子、飯田滋、榎根一夫：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)
- 5) 西村秀希、氷見英子、飯田滋、榎根一夫、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)
- 6) 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)
- 7) 榎根一夫、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)

[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) 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

定塚(久富) 恵世 (JOHZUKA-HISATOMI

YASUYO)

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