

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24年 6月 1日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780038

研究課題名（和文）いもち病菌における高頻度遺伝子ターゲティング法の開発

研究課題名（英文）Development of a high-frequency gene targeting method in *Magnaporthe oryzae*

研究代表者

大里 修一（OHSATO SHUICHI）

明治大学・農学部・講師

研究者番号：30533228

研究成果の概要（和文）：

遺伝子の機能を知るには機能未知の遺伝子をマーカー遺伝子などで破壊した変異株を得ることが最も確実な方法である。遺伝子ターゲティングは内生遺伝子と外来遺伝子間の相同組換えによって引き起こされるが、イネいもち病菌における遺伝子ターゲティング効率は低い。そこで、本研究ではイネいもち病菌において相同組換えを検出するマーカー系を構築して、他の生物で用いられている Zinc fingerヌクレアーゼ等を用いた標的遺伝子の二本鎖切断を導入して、相同組換え効率の向上条件とヌクレアーゼの最適化について検討した。

研究成果の概要（英文）：

For investigation of gene functions, several strategies have been established. Of these, gene targeting is generally thought to be the most powerful method. Gene targeting is achieved through the homologous recombination between endogenous genome and foreign marker. However, the frequency of homologous recombination in *Magnaporthe oryzae* is low. To raise the frequency of homologous recombination, we applied double-strand DNA breaks in target gene using some nucleases that are used in other organisms. Here, we constructed a detection marker system of homologous recombination in *M. oryzae*. We also revealed that treatment of nucleases increase efficiency of homologous recombination and established on optimal condition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：イネいもち病菌・相同組換え・遺伝子ターゲティング

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代に入り、イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) の研究は新しい局面を迎えている。ゲノム解析により多くの遺伝子

が明らかとなったが、機能解析は十分でなくこれら未知遺伝子の変異体作出、場合によっては多重変異体作出による解析が求められている。機能解析のために、特定領域に変異を

導入する方法として、遺伝子ターゲティングがあるが、これは生物が本来有する相同組換え機構、特に遺伝子変換 (gene conversion) を利用して変異を導入する手法である。遺伝子ターゲティングを成功させるには、(1) 如何にゲノム上の標的遺伝子に効率的な二本鎖切断を誘導できるか、(2) その時、どのようにクロマチン構造の弛緩を行うかの2点が重要であること、また、one step disruptionの系が可能な糸状菌に対し、ヌクレアーゼやZinc finger nuclease (ZFNs) を用いた例はないことから、二本鎖切断 (DSBs) による遺伝子ターゲティング (GT) 法およびその最適条件の検討を試みた。

2. 研究の目的

イネいもち病菌に供与 DNA とエンドヌクレアーゼ遺伝子またはその酵素のみを共導入して、ゲノム上に二本鎖切断を導入することで、その切断点を起点とした相同組換えを誘導し、同時に相同組換えを促進する手法を組み合わせた高頻度ターゲティング法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 相同組換え検出株の樹立

イネいもち病菌において、二本鎖切断により誘導された相同組換えを検出するために、YFP 遺伝子とプラスタサイジン耐性遺伝子を融合した蛍光薬剤選抜マーカー遺伝子を鋳型として用い、2つのプラスミド (pTG, pRS) からなる相同組換え検出系 (TG-RS) を構築する (図1)。本検出系を PEG 法によりイネいもち病菌に導入し、ゲノム中の各検出マーカー配列のコピー数をサザン解析により調査した後、相同組換え頻度に与える諸条件の洗い出しを行う。

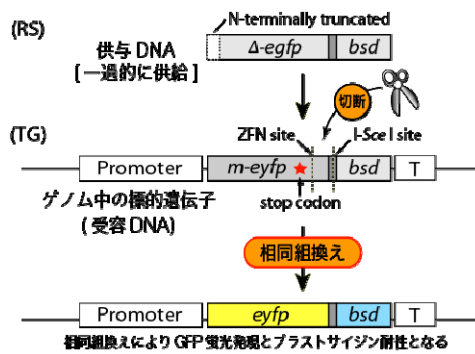


図1. イネいもち病菌における相同組換え検出系 (TG-RS) の模式図

(2) PEG 法によるヌクレアーゼ導入方法の検討

相同組換え検出系を導入したイネいもち病菌より作製したプロトプラストへ、低出現頻度の制限酵素 I-Sce I をゲノム挿入型、プラスミド DNA 発現型またはタンパク質として

それぞれ PEG 法より導入する。その時、供与体 DNA の条件 (DNA 長, DNA 量, 必要な相同性など) についても検討する

(3) ZFN の設計と導入方法の検討

遺伝子ターゲティングの基礎研究において実績のある ZFEB の DNA 結合領域と Fok I ヌクレアーゼ領域を融合したものを作製し、(1), (2) の検討課題で得られた最適条件にて TG-RS 系統あるいは TG 系統に導入し、YFP 蛍光形質転換体の出現率を I-Sce I のデータと比較してその効率を評価する。

4. 研究成果

(1) 相同組換えの検出と組換え頻度に与える諸条件

YFP 遺伝子とプラスタサイジン耐性遺伝子を融合した *EYFP::BSD* 配列を元に、二本鎖切断により誘導された相同組換えをモニターできる TG-RS マーカー系を導入したイネいもち病菌株を取得した。本菌株をゲノム損傷試薬 (methyl methane sulfonate や methyl vilogogen) にて処理すると相同組換えが生じ、非破壊のモニター系として機能することを確認した。相同組換えを誘発する条件として、ストレス (一次または二次代謝経路阻害剤, ヒートショック, 酸化ストレス誘導試薬など) を与えた場合についても YFP 蛍光が生じ、相同組換え効率の向上が確認された。その時、供与 DNA である RS のコピー数が多いほど、相同組換えが生じ易いことが示唆された。最終的に 6 系統の高感度検出系統を樹立した。TG-RS マーカー系の導入により本菌の感染力が低下あるいは喪失していないことを確かめるために、イネ品種日本晴へ接種試験を行ったところ、感染力に影響は認められなかった。この実験の過程において、イネいもち病菌の感染過程における相同組換え頻度の向上が認められ、非病原性遺伝子の変異機構に関する研究のシーズを得た。

(2) PEG 法によるヌクレアーゼ導入方法の検討

低出現頻度の制限酵素 I-Sce I 遺伝子は酵母ミトコンドリア DNA より取得し、TG-RS マーカー株より作製したプロトプラスヘゲノム挿入型として導入した。ところが、期待した活性が得られなかったため、糸状菌のコードン利用頻度への最適化と核移行シグナルの付加を行ったところ、高頻度の相同組換えが確認された。I-Sce I 遺伝子を大腸菌内で発現させ、His タグ精製を行った。I-Sce I 認識配列をもつ DNA 断片を用いて、*in vitro* 活性評価を行ったところ、市販の制限酵素 I-Sce I とほぼ同等の切断活性をもつタンパク質が得られた。TG-RS マーカー株より作製したプロトプラストに対し、精製した I-Sce I をタンパク質として供試したところ、遺伝子によらない二本鎖切断により相同組換えを

誘導することに成功した。本系における最適条件の確立については継続検討中である。

(3) ZFN の設計と導入方法の検討

遺伝子ターゲティングの基礎研究において実績のある *ZFEB* の DNA 結合領域を糸状菌のコドン利用頻度に最適化し、Fok I スクレアーゼ領域と融合したものを構築し、相同組換え誘導と ZFNs 活性、およびその促進条件について検討した。また、TG-RS マーカー内の YFP 遺伝子領域内に結合する ZFNs を 3 種類デザインし、ZFNs 活性を評価したところ、イネいもち病菌において、ZFNs を用いて二本鎖切断を導入する遺伝子ターゲティング法が可能であること、またその最適条件が明らかとなった。

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 2 件)

1. F. Kobayashi, H. Ikeura, S. Ohsato, T. Goto, M. Tamaki Disinfection using ozone microbubbles to inactivate *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Crop protection 30:1514-1518 (2011) 査読有り
2. Maeda K, Kurahashi Y, Ohsato S, and Yoneyama K Appearance of a new leaf rot disease on common ice plant. Journal of General Plant Pathology, 76:303-309 (2010) 査読有り

[学会発表] (計 15 件)

1. 用之丸哲也, 荒添貴之, 大里修一, 有江力, 桑田茂, 米山勝美 イネいもち病菌におけるジंकフィンガーヌクレアーゼによる相同組換えの誘導 平成24年度日本植物病理学会大会, 2012. 3. 29, 福岡国際会議場
2. 荒添貴之, 大里修一, 有江力, 米山勝美, 桑田茂 DNA二本鎖切断はイネいもち病菌における遺伝的多様性を誘導する 平成24年度日本植物病理学会大会, 2012. 3. 30, 福岡国際会議場
3. 真籠洋, 藤枝俊介, 花田篤志, 大里修一, 神谷勇治, 山口信次郎 いもち病菌感染イネのジベレリン分析 平成24年度日本植物病理学会大会, 2012. 3. 28, 福岡国際会議場
4. 前田一行, 富永直樹, 兵藤 壮一郎, 大里修一, 鎌倉高志, 米山勝美, 吉田稔, 木村真 赤かび病菌のトリコテセン系かび毒の後期生合成機構 日本農芸化学会2012年度, 2012. 3. 25, 京都女子大学

5. 前田一行, 富永直樹, 兵藤壮一郎, 大里修一, 鎌倉高志, 米山勝美, 吉田稔, 木村真 分泌性リパーゼの進化により生じるトリコテセン系かび毒の側鎖多様性-Tri104 遺伝子の同定と側鎖脱アセチル化酵素の性質 日本マイコトキシン学会 第70回学術講演会, 2012. 1. 6, タワーホール船堀
6. 荒添貴之, 大里修一, 有江力, 米山勝美, 桑田茂 イネいもち病菌における人為的DNA二本鎖切断誘導と相同組換え修復 第11回糸状菌分子生物コンファレンス, 2011. 11. 16, 東京大学農学部, 弥生講堂
7. 藤枝俊介, 大里修一, 有江力, 米山勝美 GFP遺伝子を導入したカーブラリア葉枯病菌の侵入観察 芝草学会, 秋期大会, 2011. 10. 22, 信州大学農学部
8. 荒添貴之, 大里修一, 有江力, 米山勝美, 桑田茂 相同組換えマーカー系を用いたイネいもち病菌の相同組換え機構の解析 日本植物病理学会関東部会, 2011. 9. 16, 文部科学省研究交流センター2階 国際会議場
9. K. Maeda, T. Tokai, M. Sato, S. Hyodo, N. Takahashi-Ando, S. Ohsato, M. Fujimura, T. Kamakura, K. Yoneyama, M. Yoshida, M. Kimura. Identification of deacetylase genes that determine the side-chain modification patterns of trichothecenes in the late biosynthetic grid of type B trichothecenes International Union of Microbiological Societies 2011 Congress_XIII, International Congress of Mycology, 2011. 9. 10, 札幌, 札幌コンベンションセンター/札幌市産業振興センター
10. 杉崎彰, 大里修一, 佐久間美子, 近藤聡, 村本伸彦, 杉本広樹, 米山勝美, 光川典宏, 大音徳, 太田邦史 ゲノム再編誘発技術の開発に向けたイネ相同組換え検出系の構築 日本分子細胞生物学会(第29回), 2011. 9. 7, 九州大学箱崎キャンパス
11. 荒添貴之, 大里修一, 倉橋良雄, 有江力, 米山勝美 ストレスおよび感染過程において誘導されるイネいもち病菌の体細胞相同組換えによる非病原性遺伝子(Avirulence gene)変異 平成23年度日本植物病理学会大会, 2011. 3. 29, 東京農工大学府中キャンパス
12. 藤枝俊介, 大里修一, 有江力, 米山勝美 *Curvularia*属菌の侵入観察に向けたカーブラリア葉枯病菌の形質転換法の確立 平成23年度日本植物病理学会大会, 2011. 3. 27, 東京農工大学府中キャンパス

13. 荒添貴之, 大里修一, 有江力, 倉橋良雄, 米山勝美 イネいもち病菌における体細胞相同組換えの検出とその特色 第10回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2010. 11. 18, 広島大学東広島キャンパス
14. 永富史子, 大里修一, 米山勝美 芝草病害のLAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法による簡易診断について 2010年度日本芝草学会春期大会, 2010. 6. 13, 千葉大学西千葉キャンパス
15. 荒添貴之, 大里修一, 倉橋良雄, 有江力, 米山勝美 イネいもち病菌の相同組換え率に及ぼす化学ストレスの影響 日本農薬学会第35回大会, 2010. 5. 30, 北海道大学学術交流会館

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 変異体植物、その製造方法及び遺伝的組換え頻度を上昇させる方法

発明者: 近藤聡, 大音徳, 太田邦史, 大里修一, 光川典宏, 村本伸彦, 杉本広樹

種類: 特許

番号: 特願 2010-007220

出願年月日: 平成23年1月13日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大里修一 (SHUICHI OHSATO)

明治大学・農学部・講師

研究者番号: 30533228