

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651216

研究課題名(和文)シロイヌナズナ汎用ジーンターゲティング技術の開発

研究課題名(英文)Development of a gene-targeting technique for Arabidopsis thaliana

研究代表者

中島 敬二(Nakajima, Keiji)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：80273853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ジーンターゲティング(GT)は、ゲノム上の狙った遺伝子を意図的に破壊あるいは改変する技術であり、基礎・応用研究の両方に有用である。しかし高等植物では相同組換え効率が極めて低いことにより、GT技術が確立していない。本研究では高効率な形質転換系のホストとなるシロイヌナズナ初期化培養細胞株を確立した。またシロイヌナズナで使用可能なGTベクターを構築した。一方でシロイヌナズナ初期化培養細胞の形質転換効率は予想外に低く、形質転換方法の詳細な検討が必要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Gene-targeting (GT) is a technology to either disrupt or modify specific gene(s) on the genome, and a power tool to study gene functions in the field of basic research, as well as to improve crop species in application. In higher plants, however, GT technology is not widely used, due to the fact that plants generally have low rate of homologous recombination. In this study, I established a cell culture of reprogrammed Arabidopsis cells to be used as a host for high-efficiency transformation, and constructed GT-vectors for Arabidopsis. After several transformation trials, it was found that the transformation efficiency is not high enough for GT experiments, and that further investigation is necessary to achieve the GT technique.

研究分野：植物発生生物学

キーワード：ゲノム編集 初期化 シロイヌナズナ 相同組換え

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の生物学的機能を検証するためには、破壊株の解析が不可欠である。シロイヌナズナにおいては、T-DNA の偶発的な挿入で得られたラインが破壊株として利用されている。しかし挿入株が存在しない遺伝子が存在する上、機能重複した遺伝子がゲノム上にタンデムに並んでいる場合には、二重変異体を得ることは事実上不可能である。また、最近マイクロ RNA やペプチドホルモンに注目が集まっているが、これらの小さな遺伝子については T-DNA 挿入株が存在しないものが多い。このような場合には RNA 干渉や人工マイクロ RNA などでロックダウンする方法がとられるが、発現量をゼロにできず、また表現型が安定しないといった問題が生じる。

ジーンターゲティング(GT)は、ゲノム上の狙った遺伝子を意図的に破壊あるいは改変する技術であり、基礎研究における遺伝子の機能解析や、応用研究における遺伝子の機能強化に強力な威力を発揮する。GT が汎用技術として確立しているのは、酵母やショウジョウバエなどごく一部の生物種に限られる。GT は外来 DNA によってゲノム上の相同配列を置換することで達成されるため、生物種による GT の可否は、その種が DNA 二重鎖切断を相同組み換え (homologous recombination = HR) で修復するか、非相同性末端結合 (non-homologous end-joining = NHEJ) で修復するかに依存する。

種子植物では NHEJ の頻度が HR よりも数十万倍高いため、GT は非常に困難である (Britt and May, 2003)。Terada らは、ジフテリア毒素断片遺伝子 (DT-A) を用いたネガティブセレクションにより、イネカルス由来の形質転換シュートから、約 1% の効率で GT 個体を作製することに成功した (Terada et al. 2002)。この方法は HR の効率を上げるというよりも、HR 個体の選別効率を工夫したも

のである。この方法では、イネから大量にカルスを誘導して、それらを形質転換・選別する必要があり、1つの遺伝子を破壊するのにも多大な労力と時間を要する。一方、イスラエルの Levy らのグループは、HR の促進因子である酵母 RAD54 を過剰発現したシロイヌナズナで、HR の効率が数十倍上昇することを報告した (Shaked et al. 2005)。しかし、それでも HR の効率は NHEJ の数千分の 1 であり、未だに植物の研究者が、自分の興味ある遺伝子について個々に GT を行える状況にはない。

HR によるジーンターゲティングと異なる方法としては、配列特異的な人工ヌクレアーゼ遺伝子を過剰発現させることで、ゲノム上の標的部位に塩基の欠損を誘発することが試みられている (Weinthal et al. 2010; Adam et al. 2011)。この方法では標的配列ごとにヌクレアーゼ遺伝子を作製する必要がある上、最終的に得られるのは塩基の欠損であり、タグ配列の挿入など高度なゲノム編集を行うことはできない。

2. 研究の目的

GT により植物ゲノムの任意の遺伝子を破壊できるようになれば、植物科学全体にとって大きなブレイクスルーとなる。また GT は遺伝子破壊だけでなく、ゲノム上でのタンパク質の機能改変やタグ配列の付加、あるいはゲノム文脈上でのレポーター解析が可能となるので、基礎研究と応用研究の両者においてそのインパクトは非常に大きい。

我々はシロイヌナズナの *RKD4* 遺伝子を用いることで、初期胚の性質を持つ細胞を体細胞から誘導できることを報告している (Waki et al., 2011)。このような「初期化細胞」は、初期胚の状態を保ったまま増殖させることが可能であり、また *RKD4* の過剰発現を止めることで、胚発生に移行させることもできる。

初期化細胞は、GT のホストとして優れた

性質をもっていることが期待される。1 つめは体細胞から均質な細胞を調製できることである。2 つめは、胚を経由して植物個体を容易に再生できることである。この2つの性質により、簡単な操作で大量の形質転換ラインを作製してHR 個体を選別し、そこから個体を再生する系を実現できる。3 つめは、この細胞が「胚性」を持っていることである。マウスではES 細胞における高いHR 活性がノックアウトマウス、すなわちGT 個体の作製を可能にした。*RKD4*の過剰発現で誘導されるシロイヌナズナの初期化細胞も胚性を有しており、これをホストに用いることで、高等植物のGT を汎用技術に高められる可能性がある

そこで本研究課題では、シロイヌナズナの初期化細胞を用い、ゲノム上の任意の遺伝子をGT により改変する技術の開発を目指すことにした。

3 . 研究の方法

(1) 形質転換に適したシロイヌナズナ初期化細胞の誘導

RKD4 過剰発現株からの初期化培養細胞系の確立には、我々が確立した DEX 誘導型 *RKD4* 過剰発現シロイヌナズナ株 (Waki et al. 2011)を用いた。種子を次亜塩素酸ナトリウムで滅菌し、それらを DEX を含む液体培地中で発芽させ、16h8D の明暗周期条件下、110rpm 程度で振とう培養することで、液体初期化培養株を作製した。滅菌した金属フィルターで培養液をろ過し、微細な細胞塊だけを含む液体培養細胞株を確立した。

形質転換に適した抗生物質による選抜を可能にするため、抗生物質耐性遺伝子をカナマイシンとピアラフォス (バスタ) に変更した過剰発現コンストラクトを作製した。これらのコンストラクトから得られた新たな *RKD4* 過剰発現株については、形質転換初代 (T1 世代) で 100 以上の独立したラインを作製し、それら各個体の根を 1 つずつ DEX

を含む培地に並べて観察することで、初期化能の強い株を選抜した。選抜したラインを土に移して成育させ、次世代 (T2 世代) で単一遺伝子座に挿入されているラインを選抜した。さらに世代をまわしてホモ挿入ラインを確立した。これらの株から、上記の方法により、初期化液体培養細胞株を確立した。

(2) ジーンターゲティングベクターの構築
ターゲティングベクターはpBIプラスミドをバックボーンとして構築した。DT-A は奈良先端科学技術大学院大学の石田靖雅博士から分与されたものを用いた。コンストラクションは各 DNA の PCR 断片を、制限酵素によりつなぎ合わせることで作製した。

(3) 初期化細胞の形質転換実験

アグロバクテリウムによる初期化培養細胞の形質転換は、シロイヌナズナ液体培養細胞で用いられている方法を参考にして行った (Ogawa et al., 2008)。まず、ターゲティングベクターを含むアグロバクテリウムを LB 液体培地で振とう培養した。遠心により集菌し、MS 液体培地に懸濁した。これを初期化培養細胞のフラスコに少量投入し、16h8D の明暗周期条件下、110rpm 程度で 1-2 日間共培養した。

初期化細胞を回収し、液体培地で数回洗浄した。これを DEX 含まない B5 寒天培地上に均一に広げた。これらを 16h8D の明暗周期条件下で静置培養した。

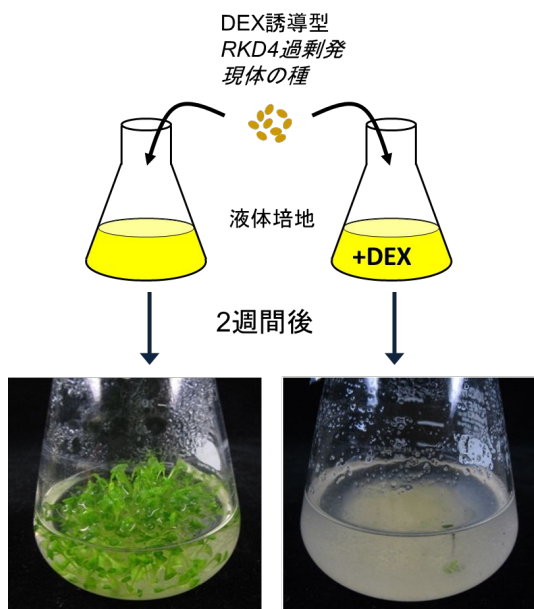
4 . 研究成果

(1) 形質転換に適したシロイヌナズナ初期化細胞の誘導

我々は、*RKD4* の誘導型過剰発現体から初期化細胞を得ることに成功している。しかし、この細胞を形質転換のホストに用いることは想定外であったため、当初の株は 35S-GVG 遺伝子のカナマイシン耐性と

UAS-RKD4 遺伝子のハイグロマイシン耐性の2つの耐性を持っていた。そこで2つのコンストラクトを、UAS-RKD4-35-GVG という1つの遺伝子コンストラクトにまとめ、除草剤であるバスタに対する耐性遺伝子をもつベクター上にコンストラクションした。得られた形質転換体の T1 世代において、初期化細胞を誘導することが出来たものの、後代において導入遺伝子がサイレンシングして、徐々に初期化が起こらなくなるという問題が生じた。

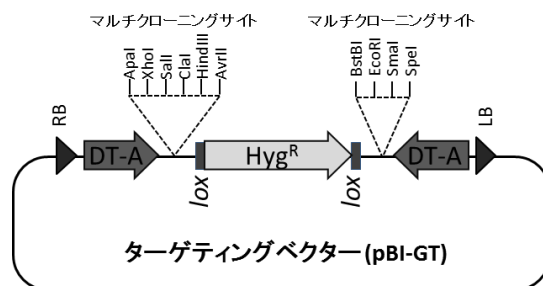
そこで既存の 35S-GVG 株（カナマイシン耐性）に、新たに作成したバスタ耐性の UAS-RKD4 コンストラクトを導入し、得られた形質転換植物の中から強い初期化を示すラインを得ることに成功した。さらに培養方法と培地の組成を工夫することにより、種子から効率的に液体培養株を得る方法を見出した（下図）。



(2) ジーンターゲティングベクターの構築

初期化細胞への遺伝子導入にはアグロバクテリウム法を用いるため、バイナリーベクターをバックボーンとして作製した。Teradaらがイネで用いた方法を参考にして、T-DNA領域の LB と RB の内側に、ネガティブセ

クションマーカであるジフテリア毒素 A 断片(DT-A)を配置した (Terada et al. 2002)。DT-A とポジティブセレクションマーカの間には、標的ゲノム領域と置換する DNA 断片を挿入しやすいように、マルチクローニングサイトを挿入した。さらにポジティブセレクションマーカをハイグロマイシン耐性遺伝子に置き換え、上記で作製したカナマイシン耐性とバスタ耐性をもつ初期化細胞株背景で形質転換体を選抜できるようにした。



(3) 初期化細胞の形質転換実験

DT-A によるネガティブセレクションが期待通り機能するかを、シロイヌナズナ植物の形質転換により検証した。このベクターを、DT-A の発現に必要な GVG 転写因子を持たない野生型背景に導入したところ、期待通り多くの形質転換体を得られた。一方ステロイドホルモン DEX 誘導的に GVG を発現する植物の背景では、非誘導条件下でもごく少数の形質転換体しか得られなかった。これは非誘導条件でわずかに発現している GVG により DT-A が作られ、それが既に致死性を賦与することを示している。以上より、DT-A によるネガティブセレクションが非常に効率的に働くことが示唆された。

一方、上記の(2)で作成されたシロイヌナズナの初期化細胞を、アグロバクテリウムで形質転換することを試みたが、抗生物質耐性の細胞が得られなかった。これは DT-A を持たないベクターでも同様であり、初期化細胞が未知の理由によりアグロバクテリウムによる感染に耐性になっている可能性が考

えられた。これは初期化細胞の性質そのものに起因する問題と考えられ、今後は様々なアグロバクテリウム株や感染条件を検討する必要がある。

<引用文献>

Adam et al. 2011 *Science* 333: 1843-1846.

Britt & May 2003 *Trends Plant Sci.* **8**: 90-95.

Ogawa et al., 2008, *Plant Cell Physiol.* **49**: 242-50.

Shaked et al. 2005, *PNAS* **102**: 12265-12269.

Terada et al. 2002, *Nat. Biotechnol.* **20**: 1030-1034.

Waki et al. 2011 *Curr. Biol.* **21**: 1277-1281.

Weinthal et al. 2010 *Trends Plant Sci.* **15**: 308-321.

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1件)

中島敬二、植物細胞を初期化する RKD 遺伝子の発見 - 発生研究による鍵遺伝子の同定と応用展開の可能性、化学と生物、査読有、51 巻、2013、789-791

[学会発表](計2件)

厚井聡、久永哲也、嶋村正樹、石崎公庸、河内孝之、中島敬二、ゼニゴケの生殖における RWP-RK ファミリー遺伝子 MpRKD の機能、第 56 回日本植物生理学会年会 2015.3.16-18 東京農業大学(東京都、世田谷区)

Keiji Nakajima, Comparable studies of female gametogenesis in land plants. Marchantia Workshop, 2014.12.8-10. Kobe Univ.(兵庫県、神戸市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 敬二(NAKAJIMA Keiji)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号： 80273853