

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658005

研究課題名(和文) 高効率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-efficient gene targeting technique

研究代表者

村田 稔 (MURATA, MINORU)

岡山大学・その他部局等・教授

研究者番号：20166292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物において相同組換えを高頻度で誘発できる系の確立を目指し、環状化T-DNA分子の創出と形質転換効率の関係を調査した。これには、二種類のコンストラクト(ターゲティングコンストラクトとCreリコンビナーゼ過剰発現コンストラクト)を作成した後、シロイヌナズナの実生に共感染させ、Creリコンビナーゼによって、LoxP間の組換えが誘発されるかを調べた。その結果、LoxP間の組換えによって、T-DNAが環状化し一部は染色体に挿入されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To aim at establishing a high-efficient homologous recombination system in higher plants, we investigated a relationship between occurrence of circularized T-DNA and transformation efficiency. A co-infection with a target construct and a Cre-expressing construct to Arabidopsis seedlings was found to be effective in the circularization of T-DNA and integration into chromosomes.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：遺伝子ターゲティング 染色体工学 Cre/LoxP

1. 研究開始当初の背景

相同組換えによって、特定の DNA 配列を、ゲノム中の特定箇所に挿入することは、すでに酵母などで広く行われており、極めて強力なツールとなっている。特に、遺伝子の破壊や発現調節には欠くことのできない手法であり、酵母で様々な研究が先行している一因ともなっている。それ故、相同組換えによる遺伝子ターゲティングは、植物科学分野においても、最も要望される技術である。これまで、イネ等で、飯田らによる先駆的な研究成果があり (Terada et al. 2002, Iida & Terada 2005)、最近では、ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いたターゲティングが報告されている (Lyoid et al. 2005, Wright et al. 2005, Shukla et al. 2009, Townsend et al. 2009)。しかしながら、これら TALEN などのゲノム編集の植物での成功例は限られており、微生物や動物に比べて、必ずしも効率的かつ汎用性の高い方法ではない。我々はこれまでの研究から、Cre リコンビナーゼを植物細胞内で強制発現させると、形質転換効率が 20 倍以上高まることを発見した。このことは、Cre リコンビナーゼによって、環状化した T-DNA がゲノム DNA に高頻度で挿入されることを示唆する (Srivastava and Ow 2004)。しかし、このことは逆に、Cre リコンビナーゼの配列特異性と矛盾する結果となっている。何故なら、Cre リコンビナーゼは、34 塩基対からなる LoxP 間の組換えを特異的に触媒するが、LoxP と同じ配列がゲノム DNA 上に現れる確率は、4 の 34 乗となり、約 3×10^{20} 塩基対 (3×10^{11} Gb) に 1 回しかないためである。そこで、本研究では、人工的に T-DNA を環状化し、その T-DNA がより効率的に挿入されるかを調べることにした。

2. 研究の目的

本研究では、植物ではこれまで低頻度でしか起こらなかった相同組換えを高頻度で誘発し、効率的な遺伝子ターゲティング法の確立を目指した。相同組換えは、酵母やマウスでは一般的な現象であるが、植物ではヒメツリガネゴケ以外その頻度が極めて低いことが知られている。そのため、これまでにもいろいろなターゲティング法が開発されてきたが、時間と労力を要するものが多く、その利用は限定的であった。そこで、本研究では、まず植物において相同組換えを高頻度で誘発できる系の確立を目的とした。本研究で開発しようとする方法は、広く利用されているアグロバクテリウム形質転換法に基づくものであり、確立できれば汎用性が高く効率的な方法となることが期待された。

3. 研究の方法

Cre リコンビナーゼ発現個体において、高頻度の形質転換が起こる事象については、環状化した T-DNA の生成が必須である可能性がある。これを確認するため、本研究では、二

種類の形質転換用コンストラクトを作成した。一つは、ターゲティングコンストラクトで、バイナリーベクター pBI121 (Jefferson et al. 1987) を改変し、両ボーダー配列 (RB と LB) のすぐ内側にそれぞれ LoxP を配置したものである。これには、マーカー遺伝子として GFP (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子を、CaMV35S プロモーターと切り離して配置し、LoxP 間の組換えにより、GFP が発現するよう工夫した (図 1)。また、NOS プロモーターでドライブされた NPTII 遺伝子と GFP 遺伝子間にクローニングサイト (NotI) を組み込み、ターゲットとするゲノム配列や特定遺伝子を挿入できるようにした。二つめは、Cre リコンビナーゼの過剰発現コンストラクトであり、核移行シグナルを N 末側に持ち、CaMV の 35S プロモーターと要素にドライブされ過剰発現するようデザインした (Holtorf et al. 1995)。さらに、GFP 遺伝子を、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT) と置き換えたコンストラクト pB2Lx も作成した。

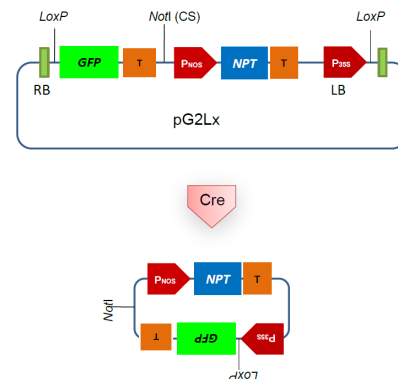


図 1. ターゲティングコンストラクト pG2Lx. この派生型 pB2Lx には、GFP の代わりに HPT (Hygromycin Phosphotransferase) 遺伝子が組み込まれている。

T-DNA に含まれる DNA 配列が、相同組換えに必要なかを調べるために、シロイヌナズナの BAC ライブラリーをサーチし、セントロメア特異的 180-bp ファミリーを含むクローンを複数選定した。それらから、2 種 (F13J5、F13C19) を選び、インサートの一部をコンストラクト pB2Lx (pG2Lx の GFP をハイグロマイシン耐性遺伝子と置換したもの、図 1) の NotI サイトに挿入した。この縦列型反復配列を含むターゲティングコンストラクトと Cre 発現コンストラクトをアグロバクテリウムを介して共感染させ、形質転

換の有無と挿入位置を調べた。形質転換はアグロバクテリウムを介して行い、フローラルディップ法 (Clough and Bent 1998) または根培養法 (Valvekens et al. 1988) によった。前者の場合は、採取した自殖種子 (T1) をカナマイシンまたはハイグロマイシン B を 50 µg/ml 加えた MS 培地上に播種し選抜した。根から再生した形質転換植物からはその自殖種子を採集し、同様の培地に播種し選抜した。

4. 研究成果

本研究では最初に、一過的に発現した Cre リコンビナーゼによって、T-DNA が環状化されるかを検証した。ターゲットコンストラクト pG2Lx と Cre 発現コンストラクトを FAST (Fast Agrobacterium-mediated Seedling Transformation) 法によりシロイヌナズナの実生に共感染させ、GFP の発現を調べた。その結果、子葉の一部に GFP のシグナルが観察されたことから、LoxP 間の組換えが誘発されたことが示唆された (図 2)。しかしこの場合、T-DNA が縦列して染色体に挿入されたことも考えられたため、PCR により、この領域を増幅し、塩基配列を調べたところ、LoxP 間での組換えが間違いなく起っていることが明らかとなった。組換えを起こした T-DNA が子葉細胞内でどのような挙動を取っているかについては、現在調査中であるが、環状化し核内にとどまっていることが推定された。

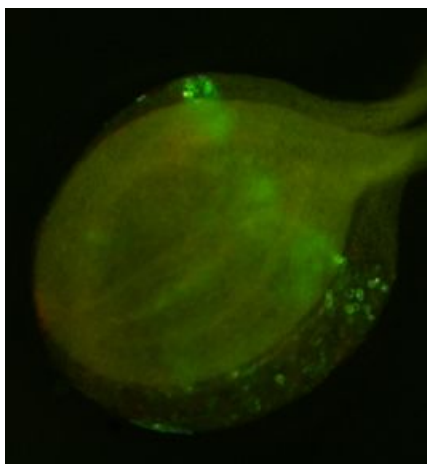


図 2. FAST 共感染によって誘発された GFP シグナル。

次に、縦列型の反復配列 (シロイヌナズナのセントロメア特異的 180-bp ファミリー) をターゲットコンストラクト pB2Lx の NotI に挿入し、Cre 植物発現ベクターと共に、アグロバクテリウム を介して共形質転換した。ハイグロマイシン耐性を指標に選抜を行った結果、複数の形質転換体を得られた。PCR による解析の結果、いずれもターゲットコンストラクトの配列は含むが、Cre 遺伝子を含まないものが多かった。一部の形質転

換体については、ハイグロマイシン耐性が LoxP の組換えによるものではなく、T-DNA がタンデムに挿入されたことにより、得られたものであることが明らかになったが、LoxP 間の組換えによりハイグロマイシン耐性を獲得しているものも確認された。

得られた形質転換体について、T-DNA の挿入位置を FISH (蛍光 in situ ハイブリダイゼーション) 法により調べたところ、セントロメア以外の場所に挿入されているものが多く認められた。しかし、その挿入位置に 180bp 反復配列は確認されなかった。もし全長が挿入されていれば、F13J5 の場合約 15kb、F3C19 の場合約 54kb の 180bp 配列のクラスターが挿入されると考えられるため、検出できないのはいずれかの段階でコピー数が顕著に減少したためであると推定された。そこで、アグロバクテリウム中での反復配列の安定性を調べた。まず、形質転換したアグロバクテリウムを培養後、プラスミド DNA を抽出した。これを NotI で切断後、FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis) に供した。このゲルをサザンブロットング後、180-bp をプローブとしてインサートの長さを推定した。その結果、様々な長さのクラスターを含むアグロバクテリウムクローンが得られたが、いずれの菌株においても反復配列がすべて消失してしまうようなクローンは確認できなかった。一方で、ほぼ全長のインサートをもつクローンが得られ、それらは継代培養しても比較的安定であった。そこで、これら安定なアグロバクテリウムクローンを用いて形質転換を行ったが、形質転換の結果には大きな違いは生じなかった。

以上のように、Cre リコンビナーゼを一過的に発現させた場合、反復配列を含む T-DNA の形質転換効率を上昇させることはできなかった。しかし、染色体に挿入された T-DNA には反復配列が含まれないことから、何らかのメカニズムによって植物細胞内に導入された反復配列が除去される可能性が示唆された。その一つとして、内在性のセントロメアに、外来の 180-bp クラスターが相同組み換えで移入されることも考えられた。今後は、これら現象の解明を目指す。

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)

Murata, M. Minichromosomes and artificial chromosomes in Arabidopsis. Chromosome Res. (On-line first)

〔学会発表〕(計 2 件)

村田稔・柴田洋・藤本聡・長岐清孝、シロイヌナズナにおける染色体再編成の誘発とゲノム安定性、日本遺伝学会第 84 回大会、2012.9.24-26、福岡市

村田稔・横田悦子・柴田洋・金谷麻加・藤本聡・柏原壹成・長岐清孝、シロイヌナズナにおけるミト染色体への遺伝子導入、染色体学会第 64 回年会、2013.11.8-10、富山市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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〕

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/nucleus/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 稔 (MURATA MINORU)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：20166292

(2) 連携研究者

柏原 壹成 (KASHIHARA KAZUNARI)

岡山大学・資源植物科学研究所・技術専門

職員

研究者番号：60379807