

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780010

研究課題名(和文)DSB誘導実験系を用いたジーンターゲティング効率向上因子のスクリーニング

研究課題名(英文)Screening of factors affecting gene targeting efficiency.

研究代表者

遠藤 真咲(Endo, Masaki)

独立行政法人農業生物資源研究所・ゲノム機能改変研究ユニット・研究員

研究者番号：40546371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム中の特定の部位に任意のタイミングでDNA二重鎖切断を導入する為、誘導型I-SceI発現カセットならびに、I-SceI認識配列を内部に有するLuciferase遺伝子を形質転換したシロイヌナズナを作出し、標的遺伝子切断がジーンターゲティング効率に及ぼす影響を評価した。その結果、相同組換えの鑄型を形質転換する際、同時に標的遺伝子切断を行うことでジーンターゲティング効率が5-10倍上昇することが明らかとなった。またプロトプラストにおけるタンパク質の一過的発現系とDNA二重鎖切断誘導を組み合わせ、ChIP法によって発現タンパク質とDNA二重鎖切断部位との結合を評価する系を構築した。

研究成果の概要(英文)：Arabidopsis tester lines possessing an I-SceI recognition site and an inducible I-SceI expression system were established for monitoring protein attachment at DNA double strand break (DSB) site and for monitoring gene targeting events. By using this experimental material, it was revealed that gene targeting efficiency was increased by a factor of 5-10 by DSB induction during transformation of gene targeting vector.

It is known that T-DNAs preferentially integrate at DNA DSB sites. Previous studies show that VirD2, which is one of the key Agrobacterium tumefaciens proteins involved in T-DNA processing and transfer is important for efficient T-DNA integration in to the plant genome. However there is no direct evidence to show the role of VirD2 in T-DNA integration step. For detecting in vivo VirD2 attachment at DSB sites, I established chromatin immunoprecipitation assay using protoplast of this Arabidopsis tester line with transfection of VirD2 expression cassette and DSB induction.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：形質転換 ジーンターゲティング 植物 アグロバクテリウム DNA二重鎖切断

1. 研究開始当初の背景

研究開発当初、標的配列を任意に切断できる人工制限酵素として ZFNs や TALENs が利用されていたが、切断活性が不十分である場合や、切断可能な配列に制約がある場合も多く、ゲノム編集のツールとしての人工制限酵素の改良が進められていた。高等動物においては、人工制限酵素をコードする RNA と組換えの鋳型を併用することでジーンターゲティング効率が有意に向上することが報告されていた一方、高等植物においては、RNA の直接導入が困難である為、人工制限酵素の発現量を十分量確保することが難しく、また、アグロバクテリウム経由で組換えの鋳型を形質転換する場合、標的遺伝子切断と鋳型が存在するタイミングをあわせることも困難であり、人工制限酵素の利用によるジーンターゲティング効率向上の報告はなかった。このような状況において、人工制限酵素の改良を進めることはもちろんのこと、ジーンターゲティングの周辺技術の整備として、標的遺伝子切断と併用することでジーンターゲティングの効率をさらに向上させる要因の解明は重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、高等植物における効率的かつ汎用性のあるジーンターゲティング系の構築を目指し、ジーンターゲティング効率の向上に有効な標的遺伝子の切断法や、組換えの鋳型となるジーンターゲティングベクターを効率的に核内および、標的遺伝子切断部位にリクルートする方法について知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 任意のタイミングでゲノム中に DNA 二重鎖切断を誘導でき、かつジーンターゲティングイベントを可視化できるシロイヌナズナ形質転換体を作製した。

(2) (1)で作製したシロイヌナズナからプロトプラストを調製し、PEG 法によってアグロバクテリウム由来の VirD2 発現ベクターを形質転換した。VirD2 が発現するタイミングに合わせて DNA 二重鎖切断を誘導し、ChIP assay によって VirD2 と DNA 二重鎖切断部位との結合を解析した。

(3) (1)で作製したシロイヌナズナを材料に、標的遺伝子の切断誘導あり/なしの条件下で組換えの鋳型の形質転換を行い、ジーンターゲティング効率を比較した。

4. 研究成果

(1) I-SceI 切断を伴うモデルジーンターゲティング植物体の作製
プロモーター配列を持たない Luciferase (Luc) 遺伝子中に I-SceI 認識配列 18bp を組

み込み、 β -estradiol 誘導型 I-SceI 発現カセットと並べたコンストラクト(図 1)をシロイヌナズナに形質転換した。この形質転換体では Luc の発現は生じないことを確認した後、約 100 系統の形質転換体の中から、外来遺伝子を 1 コピー有し、 β -estradiol 処理によって I-SceI site における DNA 二重鎖切断誘導が生じる系統(#1044-19, 42)を選抜した。両系統では、 β -estradiol 処理後 16 時間において、約 40%の細胞において I-SceI site に切断が生じていることが確認できた。

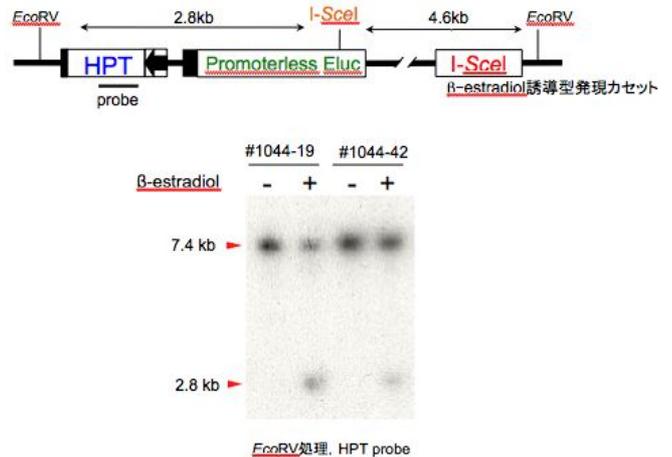


図 1 I-SceI site および、誘導型 I-SceI 発現カセットを有する形質転換シロイヌナズナを作製

I-SceI site はプロモーター配列を持たない Luciferase 遺伝子 (Promoterless Eluc)中に存在する。この形質転換体に β -estradiol を処理すると、I-SceI の発現が誘導され、I-SceI site に DNA 二重鎖切断が生じる。

(2)Chromatin immunoprecipitation(ChIP)による DNA 二重鎖切断部位結合タンパク質抽出系の構築

アグロバクテリウム経由で植物核内に運ばれる transfer DNA (T-DNA)は DNA 二重鎖切断部位に挿入され易いことが知られている。また、VirD2 に変異を有するアグロバクテリウムでは、T-DNA のゲノムへの挿入効率が著しく低下することも知られている。VirD2 は T-DNA と共に核内に移行することが確認されている一方、VirD2 が T-DNA の植物ゲノムへの挿入に直接関わっている証拠はない。そこで、T-DNA の DNA 二重鎖切断部位への挿入に VirD2 が関わっているかを明らかにするために、(1)で作製したシロイヌナズナを材料に、ChIP assay によって VirD2 と植物ゲノム中の DNA 二重鎖切断部位との結合を評価する系を構築した。(1)で作出したシロイヌナズナからプロトプラストを調製し、VirD2-YFP 融合タンパク質発現ベクターを PEG 法により形質転換した。その後、プロトプラストに β -estradiol 処理を行い、I-SceI site における DNA 二重鎖切断を誘導した。形質転換およ

び β -estradiol 処理開始後 16 時間のプロトプラストを回収し、架橋、GFP 抗体を用いた免疫沈降を行った後、脱架橋を行い、VirD2-YFP 融合タンパク質と共沈してきた DNA を回収した。この DNA を鋳型に、I-SceI site 近傍および、異なる染色体上の領域の増幅を PCR により増幅し、増幅産物の量を定量した。その結果、 β -estradiol 処理区では、I-SceI site 近傍の配列が VirD2 と共沈しやすい傾向にあったが、 β -estradiol 処理、未処理区における差は顕著であるとは言い難かった為、今後追試を行い、再現性を確認する予定である。

(3) 標的遺伝子切断を伴うジーンターゲッティング効率評価システムの構築

(1) で導入した I-SceI site を有する Luc 遺伝子をジーンターゲッティングのアクセプターサイトとし、相同組換えによってこのアクセプターサイト内の Luc 遺伝子上流にプロモーター配列を付与するジーンターゲッティングベクターをアグロバクテリウム法により形質転換した。アグロバクテリウム懸濁液ならびに、共存培地に β -estradiol を添加することで、ジーンターゲッティングベクターの導入と標的遺伝子の切断誘導を同時に行った。その結果、共存培養中に DNA 二重鎖切断誘導処理を行った区では、 β -estradiol 非添加区と比較して Luc の発現を示す根断片の割合が顕著に増加し、DNA 二重鎖切断未処理時に比べて約 10 倍ジーンターゲッティング効率が高いことが明らかとなった(図 2)。

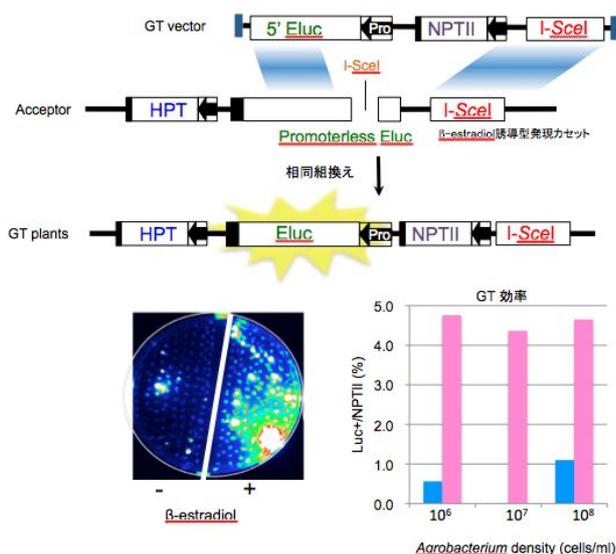


図 2 I-SceI 切断を伴うジーンターゲッティング(GT)検出系の構築
GT アクセプターサイトを有するシロイヌナズナに対して GT ベクターを形質転換する際、 β -estradiol を処理することで GT 効率が上昇する。

また、ジーンターゲッティングベクターを一旦ゲノム中に挿入しておき、標的遺伝子切断と同時にベクターを切り出すジーンターゲッティング法 (*in planta* gene targeting) の成功例がシロイヌナズナにおいて報告されている (Fauser et al. 2012)。この方法では、ジーンターゲッティングベクターをゲノム内に有する細胞株樹立後、標的遺伝子切断およびジーンターゲッティングベクターの切り出しを行うことでジーンターゲッティングを誘導できるため、個々の細胞にジーンターゲッティングベクターを形質転換する必要がなく、形質転換効率が低い植物種においても適用可能なジーンターゲッティング系であると言える。

アグロバクテリウム経路で導入したジーンターゲッティングベクターの両端に I-SceI site を付加したベクターを構築し、(1) で作製した、ジーンターゲッティングのアクセプターサイトを有するシロイヌナズナに形質転換した。アクセプターサイト、ジーンターゲッティングベクターの双方を有する植物体に β -estradiol 処理を行い、Luc の観察を行ったところ、アグロバクテリウム経路でジーンターゲッティングベクターを形質転換する場合と比較して、 β -estradiol 処理区で約 10 倍程度ジーンターゲッティング効率が上がることが明らかになった(図 3)。

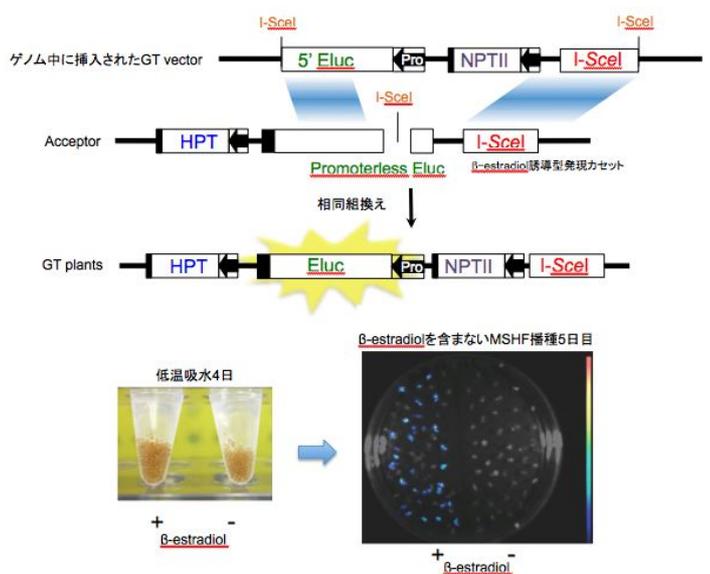


図 3 ジーンターゲッティング(GT)ベクターをゲノム内から供給する GT 法

Acceptor, GT vector の両方をゲノム内に有するシロイヌナズナに β -estradiol 処理を行うことで、標的遺伝子の切断および GT ベクターの切り出しが誘導され、GT が促進される。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

1. 遠藤真咲、土岐精一 (2014) 植物におけるゲノム編集 遺伝 68(2):135-139
2. 遠藤真咲、土岐精一 (2013) 植物ゲノムの標的遺伝子改変における人工制限酵素の利用 植物工学 91:448-451.

〔学会発表〕(計3件)

1. 遠藤真咲、三上雅史、土岐精一 組換えの鋳型をゲノムから切り出す標的組換えシステム 日本植物細胞分子生物学会 第31回講演会 2013年9月10日 北海道大学
2. 遠藤真咲、Stanton B Gelvin, 土岐精一 鋳型をゲノムから切り出すジーンターゲットイング法 日本育種学会第123回講演会 2013年3月27日 東京農業大学
3. Endo M, Gelvin S, Toki S. DNA double strand breaks and targeted T-DNA integration in Arabidopsis. 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月13日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠藤 真咲 (ENDO, Masaki)

独立行政法人農業生物資源研究所・ゲノム機能改変研究ユニット・研究員

研究者番号：40546371

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし