

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：15301  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2014～2015  
課題番号：26850004  
研究課題名(和文)TALEN法によるオオムギの標的遺伝子への変異挿入  
  
研究課題名(英文)TALEN-based mutagenesis for target genes in barley  
  
研究代表者  
久野 裕 (Hisano, Hiroshi)  
  
岡山大学・その他部局等・助教  
  
研究者番号：70415454  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：アントシアニン合成に関与するCHS遺伝子ならびにDFR遺伝子を標的としたTALENベクターをそれぞれ構築し、オオムギに導入した。形質転換体を作製することができたが、いずれの個体においても標的遺伝子に変異を挿入できなかった。

一方、ゲノム編集での利用を目的として、オオムギのカルス特異的プロモーターを4つ単離した。これらをEGFP遺伝子につなげて、発現解析を行った。全てのプロモーターにおいてカルスでの一過的EGFP発現が観察された。さらに、形質転換カルスにおいて、2つのプロモーターで安定したEGFPの発現が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-vectors targeting for the genes encoding chalcone synthase (CHS) and dihydroflavonol 4-reductase (DFR) which were both involved in anthocyanin biosynthesis were constructed and applied to barley transformation. Although transgenic barley plants were obtained, any mutation was detected in target genes of these plants.

On the other hand, 4 promoters regulating callus-specific gene expression were isolated in barley. For expression analysis, these promoters were cloned into expression vector of the gene encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP). The transient expression of EGFP in callus was observed by all the promoters. In addition, 2 of 4 promoters showed stable expression of EGFP in transgenic callus in barley.

研究分野：農学

キーワード：植物分子育種 オオムギ 形質転換 ゲノム編集 TALEN

## 1. 研究開始当初の背景

Transcription Activator-Like Effectors Nuclease (TALEN)法は、人工制限酵素を用いて標的遺伝子に変異を挿入する「ゲノム編集」技術のひとつである。TALEN は、開発が先行していた Zinc Finger Nuclease (ZFN) に比べて標的配列選択の自由度が高く、作製が簡便であることから、動物を中心とする多様な生物種・培養細胞で利用されている (Carmak *et al.* 2011)。植物では、アメリカ合衆国の Voytas 博士の研究グループが中心となり、TALEN 法によるゲノム編集技術の開発が進められている (Zhang *et al.* 2013, Shan *et al.* 2013, Wendt *et al.* 2013)。しかしながら、限られた植物種にのみ適応されていること、形質転換後代が解析されていないことなどから、植物育種への効果は未知である。TALEN 法を広く植物育種に適用するには、「標的遺伝子への変異挿入条件の最適化」ならびに「外来遺伝子の完全除去」を軸とした基盤整備が必要である。

オオムギは、イネ、コムギ、トウモロコシに次ぐ主要なイネ科作物のひとつで、cDNA やゲノム概要配列などのゲノムリソースが整備されている。筆者が所属する研究室は、そのゲノム情報利用の一環として、形質遺伝子の機能解析を目的とするオオムギの形質転換を行っており、これまでにミネラルストレス耐性遺伝子の機能を明らかにしている (Zheng *et al.* 2011, Fujii *et al.* 2012)。

一方、真核生物の遺伝子発現は、主に各々の上流に存在するプロモーター配列によって、組織や環境ストレス応答などの条件特異的に制御されている (Porto *et al.* 2014)。イネ科植物に外来遺伝子を導入する場合、一般にはカリフラワーウイルス 35S (CaMV35S) やトウモロコシユビキチン (ZmUbi) などの恒常的発現プロモーターを用いる。イネ科植物の形質転換は、概してカルス誘導と再分化を通じて成立するが、これまでカルス特異的

プロモーターの報告例は無い。

## 2. 研究の目的

オオムギは、ゲノム情報が整備され、形質転換系が確立しているが、効率的なゲノム編集系は確立されていない。本研究では、TALEN 法によるオオムギ遺伝子への変異挿入を試み、ロックアウト個体を作出することを目的とする。標的遺伝子のモデルとして、本研究では、赤色素であるアントシアニン合成に関わる chalcone synthase (CHS) 遺伝子ならびに dihydroflavonol 4-reductase (DFR) 遺伝子に着目した。

一方、カルス特異的プロモーターは、カルスでは働くが再分化後の植物ではほとんど活性が無いと考えられるので、選抜マーカー遺伝子やゲノム編集における人工制限酵素遺伝子への適用が期待できる。本研究では、オオムギゲノム編集での利用を目的として、オオムギのカルス特異的プロモーターの単離を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) アントシアニン合成遺伝子を標的とする TALEN の構築とオオムギへの導入

本研究では、まず始めに CHS 遺伝子ならびに DFR 遺伝子を標的とした TALEN を構築した。その最適条件を調査するために標的位置や長さ (DNA 結合ドメインの長さ) が異なる複数組を設計した。構築した TALEN 遺伝子は、発現ベクターに組み込み、アグロバクテリウム法 (Zheng *et al.* 2011, Fujii *et al.* 2012) によって、形質転換可能なオオムギ品種「Golden Promise」に導入した。ベクターには、オオムギ由来ユビキチンプロモーターによって 2 つの遺伝子を同時に発現できる pPZP2-HvUbi12 を利用した (図 1)。

形質転換体における標的遺伝子への変異挿入を確認するため、PCR ならびにそのシーケンス解析を行った。

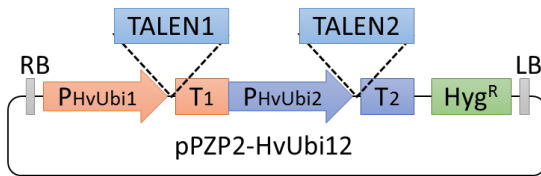


図1. 本研究で用いたTALEN用発現ベクター  
 Hyg<sup>R</sup>: ハイグロマイシン耐性遺伝子  
 LB, RB: T-DNAボーダー領域  
 PhvUbi(1と2): オオムギユビキチン遺伝子プロモーター  
 T(1と2): オオムギユビキチン遺伝子ターミネーター  
 TALEN(1と2): 標的配列に特異的なTALEN遺伝子

## (2) カルス特異的プロモーターの単離

オオムギ品種「Golden Promise」と「はるな二条」の未熟胚からカルスを誘導し、増殖培地に継代したカルス(CI)と再分化を誘導したカルス(RG)を採取した。それぞれのカルスからRNAを抽出し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。得られた情報を基に、CIでシグナルが強かったプローブを抽出し、その中からCI/RGの比率が5倍以上のものを選抜した。選抜したプローブに付随するゲノム情報からプロモーター領域を推定し、PCRにて1,500 bp程度のDNA断片をクローニングした。得られた領域は、EGFP発現ベクターのプロモーター部分に組み込み、アグロバクテリウム法で「Golden Promise」に導入した。

## 4. 研究成果

### (1) アントシアニン合成酵素遺伝子を標的とするTALENの構築とオオムギへの導入

アントシアニン合成に関与するCHS遺伝子ならびにDFR遺伝子を標的として、それぞれ4組ならびに3組のTALEN遺伝子を構築した(CHS-TALならびにDFR-TAL、図2)。それらのTALEN遺伝子ペアを、オオムギ由来ユビキチンプロモーターによって両遺伝子を同時に発現できるバイナリベクターpPZP2-HvUbi12(図1)に挿入した。これらをアグロバクテリウム法によって形質転換可能なオオムギ品種「Golden Promise」に導入した。その結果、61のCHS-TAL導入個体ならびに14のDFR-TAL導入個体を作製できた。PCRと

シーケンス解析により、標的遺伝子の配列確認を行ったが、いずれの個体においても標的遺伝子に変異を挿入できなかった。

```
>CHS1-orf
ATGGCGGCGACGATGACGGTGGAGGAGGTGAGGAACGCGCAGCGGGCGGA
GGGCCCCGGCCACCCTGCTCGCCATCGGCACGGCGACGGCCCAACTGCG
TGTACCAGGCGGACTACCCCGACTACTACTCAAGATCACCAAGAGGAC
CACATGGCTGACCACAAGGAGAAGTTCAAAGGATGTGT/GACAAGTCGG
AGATCAGGAAGAGGTATATGCACCTAACGGAGGAGATCCTTGAGGAGAAC
CCCACATGTGGCCATCATGGCCCGTCCCTGGACGGCGCCGACGACAT
CGTCGTGTGAGGTCACCAAGCTCCGCAAGCGCCTCATGATGTACCAAGGCTT
TCAAGGAGTGGGGCCAGCCGGTCCAAAGATCACCCACTCGTCTTCTGC
ACCACCTCCGGCGTCGACATGCCGGGGCCGACTACCAGCTCACCAAGAT
GCTTGGCCCTGCCCCCTCCGTCAGCGCCTCATGATGTACCAAGGAGGCTT
GCTTCGCGGGCGGACCCGTGCTCCGCTCGCCAAAGCACTCGCCGAGAAC
AACCGGGCGCGCGTGTCTGCTGCTGCTCCGAGATCACCCGGTTCAC
CTTCCGTGGCCCGCACGAGTCCCACCTCGACTCGTGTGGTGGCCAGGCGC
TCTTCGGCGACGGCGCGCCGGTGTATCATCGGCGCCGACCCCGACTTG
TCCGTGGAGCGTCCCTGTTCACGCTGGTGTCCGCGACCGACGATCTTC
GCCGACTCGGAGGGCGCCATCGACGGCCACTCCGGGAGGTGCGACTCA
CCTTCCACTTCTCAAGGACGTGCCGGGGCTCATCTCAAGAACATCGAG
CGTGCCCTAGAGGAGGCTTCAAGCGCTGGGATCGACGACTGGAATCTC
CGTCTTCTGGATAGCGACCCAGGCGGGCCGGCATCTCGACATGGTTCG
AGGCCAAGTTAACTGAACAAGGAGCGGATCGCGCAACAGGACATGTC
CTCTCCGAGTACGGCAACATGTCCAGTCACTGTGTCTTCATCATGGA
CGAGATGCGCAAGCGCTCTGCCGAGGATGGCCACGCCAACCCGGCGAGG
GAATGGACTGGGGCTTCTTTCGGCTTCGGCCCGGCGCTCACGGTGGAG
ACCGTCTCTCCACAGCTCCCATCAGCGCCGGCGCCACCCGGCTAG
```

```
>CHS2-orf
ATGGCGGCGACGATGACGGTGGAGGAGGTGAGGAACGCGCAGCGGGCGGA
GGGCCCCGGCCACCCTGCTCGCCATCGGCACGGCGACGGCCCAACTGCG
TGTACCAGGCGGACTACCCCGACTACTACTCAAGATCACCAAGAGGAC
CACATGGCTGACCACAAGGAGAAGTTCAAAGGATGTGTGACAAGTCCGA
GATCAGGAAGAGGTATATGCACCTAACGGAGGAGATCCTTGAGGAGAAC
CCCACATGTGGCCATACATGGCCCGTCCCTGGACGGCGCCGAGGACAT
GTCGTGTGAGGTCACCAAGCTCCGCAAGGCGCGCCGACGAGAGGCCAT
CAAGGAGTGGGGCCAGCCGGTCCAAAGATCACCCACTCGTCTTCTGCA
CCACTCCGGCTGACATGCGGGGGCGGACTTCCAGCTCACCAAGATG
CTCGCCCTGCCCCCTCCGTCAGCGCCTCATGATGTACCAAGGAGGCTG
CTTCCGGCGCGGACCCGTGCTCCGCTCGCCAAAGGACCTCGCCGAGAAC
AACCGGGCGCGCGTGTCTGCTGCTGCTTCCGAGATCACCCGGTTCACC
TTCGTTGGCCCGCACGAGTCCCACCTCGACTCGTGTGGTGGCCAGGCGCT
CTTCCGGCAGCGCGCGGCGGGTGTATCATCGGCGCCGACCCCGAGTGT
CGTCGAGGCGGCGGCTGTTCAGCTGGTGTCCGCGAGCCAGACAAATCTG
CCAGACTCGGAGGGCCCATCGACGGCCACTTCTGAGGTTGGACTCAC
CTTCCACTCTCAAGGATGTGCCGGGCTCATCTCAAGAACATCGAGC
GCGCCCTAGAGGACGCTTCAAGCCATGGGATCGATGACTTGGAACTCC
GTCTTTTGGATAGCGCACCCCGGGCGGCAAGCAATCTTGCATGGTGG
GGCCAAAGTTAACTGAACAAGGAGGATGCCGCCACCAGGATGTC
CTCCGAATATGGCAACATGTCGAGCGCCTGCGTGTCTTTCATCATGGAC
GAAATGCGCAACCGTCCGCTGAGGATGGCCACCCAGGACTGGCGAGGG
AATGGACTGGGGCGTCTCTTTCGGCTTCGGCCCGGCGCTTACCCTGGAGA
CGGTCTTCTCCATAGCGTCCCATCAGCTACTGCTAG
```

```
>DFR-orf
ATGGACGGGAACAAAGGGCGGTGGTGGTACCGGAGCGTCGGGTTTCGT
AGGTCGTGGCTCGTATGAGCTCCTCCAGGCGGGGTACACCGTCCGGG
CAACCTCCGCGACCCGG/CCAACGTCGAGGAGACAAGCCATTGCTGGA
GCTTCCCGGAGCCAGGAGCGGCTGTCCATCTGGAAGGCCGACTGAGCG
AGGATGGCAGCTTCAACGAGGCGCATCGCGGGTGCACCGGGCTCTCCAC
TGCGCCACGCCCATGGACTTCGACTCCCAAGACCCCGAG/AACGAGGTGA
TCAAGCCGACGGTGGAAAGGATGTTGAGCATCATGAGGCGATGCAAGGAG
GCCGGCACCGTGAACCGCATCGTCTTCCACTCCTCCGCGGGCAGTGTCAA
CATCGAGGAGCGGGCGAGGCCAGCCTACGACAGGACAACCTGGAGCGACA
TCCACTACTGCGCCCGCTCAAGATGACAGGATGG/ATGTACTTCGTGT
CAAGGCGCCGGCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TGGACTTTCATCAGCATCATCCCCACGCTCGTGTGGGCGGCTTCTCAGC
GCCGGCATGCCGCCAGCCTGGTCAACCGCCTCGGCTCATCACGGGGAA
CGAAGCCCACTACTCGATCCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
ACCTCTGCGACGCCATGACTTTCCTCTTCCGAGCACCCGGAGGCCAACGGC
CGTACATCTGCTTCCACGAGCCACCATCCAGCGCTCGCCAGGATG
GCTCCAGGACAGGTTCCCGGAGTACGACATCCCGCAGAAAGTTCCGGGGG
TCGACGACAACCTTCCAGCCATCCACTTCTCTCAAGAGGCTCTAGAG
CACGGCTTACTTCCGGTACACCACCGAGGACATGTTCCACCGCCCAT
CCACCATGCAAGGACAAGGGCCTCATTCGCTGGGAGACGCTCCCGGAC
CTGACGCGCGCGCAAGCTGGGACTCTGCTGGGGGAGGCGCAAGCC
ATTGGTGCAGAGACTAA
```

図2. CHS遺伝子とDFR遺伝子のORF配列とTALENの標的位置  
 青色はCHS1特異的、黄色はCHS2特異的、赤色はDFR特異的、そして緑色はCHS1とCHS2の両方を標的とするTALENsのDNA結合位置を示す。

形質転換後代において、変異挿入の有無を確認したが、変異挿入は見られなかった。

## (2) カルス特異的プロモーターの単離

(1) の個体において変異挿入に至らなかった理由の一つとして、オオムギ由来ユビキチンプロモーターによる TALEN 発現が適当では無かった可能性がある。それを克服するために、カルス誘導型の遺伝子発現領域の単離を試みた。マイクロアレイの結果、CI でシグナルが強い 20 のプローブを抽出し、そのうち CI/RG の比率が平均 5 倍以上の 6 つのプローブを選抜した。アノテーションが明確な 4 つのプローブについて、プロモーター領域を単離し(表 1) レポーターアッセイを行った。その結果、4 つ全てのプロモーターにおいてカルスでの EGFP 発現が観察された(図 3)。このことから、これらのプロモーターがカルスで活性を持つことが確認できた。

表1. マイクロアレイ解析で抽出した候補プロモーター

プローブ名	プロモーター番号	シグナル強度の比 (CI/RG)		アノテーション
		GP	HN	
A_13_P593574	プロモーター	5.87	15.29	Extensin
A_13_P176020	プロモーター	12.01	5.02	Peroxidase 12
A_13_P107350	プロモーター	65.54	30.26	Root cap protein
A_13_P463623	プロモーター	10.65	15.66	alpha-glucosidase

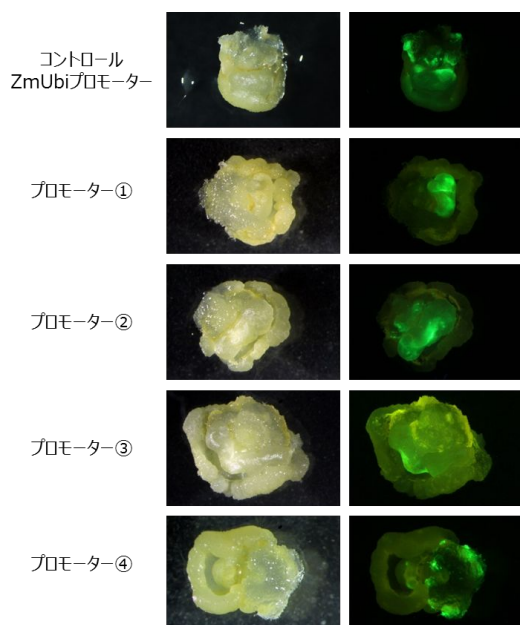


図3. EGFPによる一過的プロモーター解析  
左側は白色灯下、右側は青色励起光下・GFPフィルターでのカルスの様子を示す。

さらに、アグロバクテリウム感染から1ヶ月後のハイグロマイシン耐性カルスを用いて、ルミノイメージアナライザーによる蛍光量分析を行った(図4)。その結果、EGFPが高発現しているカルスが認められたが、トウモロコシユビキチンプロモーターに比べて発現量にばらつきが見られた。

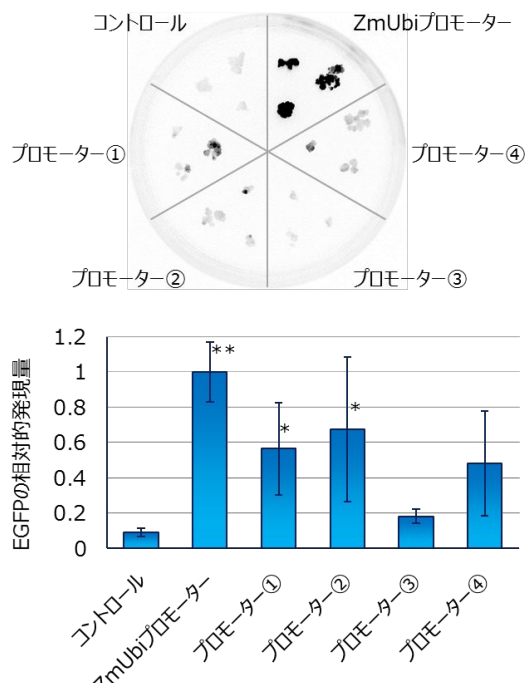


図4. 形質転換カルスにおけるプロモーター解析

上図はルミノイメージアナライザーによるEGFP発現量分析、下図はイメージから解析したEGFPの相対的発現量をそれぞれ示す。\*および\*\*は、コントロールに対し、それぞれ5%ならびに1%水準で統計的に有意差があることを示す。

今後、カルスでの EGFP 発現解析を詳細に行うとともに、形質転換植物体を作製し、EGFP がカルスのみで発現することを確認する予定である。

本研究では、残念ながら、TALEN 法による標的遺伝子への変異挿入はできなかった。しかしながら、ゲノム編集に利用できるカルス特異的プロモーターを単離することができた。今後、これらのプロモーターを利用したゲノム編集系を確立する予定である。

## 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1件)

Hisano, H. (研究代表者), Matsuura, T.,  
Mori, I.C., Yamane, M. and Sato, K. (2016)  
Endogenous hormone levels affect the  
regeneration ability of callus derived  
from different organs in barley. Plant  
Physiology and Biochemistry 99, 66-72.

〔学会発表〕(計2件)

久野裕 (研究代表者) 「植物ゲノム編集の  
現状とオオムギの形質転換」 第10回ムギ  
類研究会、2015年12月11日 - 12日、伊勢  
市観光文化会館 (招待講演)

久野裕 (研究代表者)、安東広美、佐藤和広  
「オオムギにおけるカルス特異的発現遺伝  
子のプロモーター単離」 日本育種学会第  
129回講演会、2016年3月21日 - 22日、横  
浜市立大学 (ポスター発表)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

久野 裕 (HISANO, Hiroshi)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：70415454