

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450001

研究課題名(和文) 遺伝子置換による標的座位への遺伝子導入技術の開発

研究課題名(英文) Development of the targeted transformation technology by gene replacement

研究代表者

海老沼 宏安 (EBINUMA, Hiroyasu)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：50192513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：標的組換えタバコ系統へ遺伝子置換ベクターを感染導入し、標的遺伝子(gus)と置換遺伝子(hpt)の置換効率を調べた。220個のHygRカルス中90個はGUS活性のない白色組織を含み、PCR分析により遺伝子置換の事象を確認した。HygR選抜とGUS染色の組合せによる置換個体の効率的な選抜の可能性が示された。T-DNAベクターのコピー数を増加させるため、DNA複製の開始を制御しているtrfA領域の二箇所のアミノ酸に変異を導入した3.2Kbの最小骨格ベクターを構築した。組換え酵素による脱離を促進するため、lox認識配列34bpとRs認識配列103bpを組み合わせたベクターを構築した。

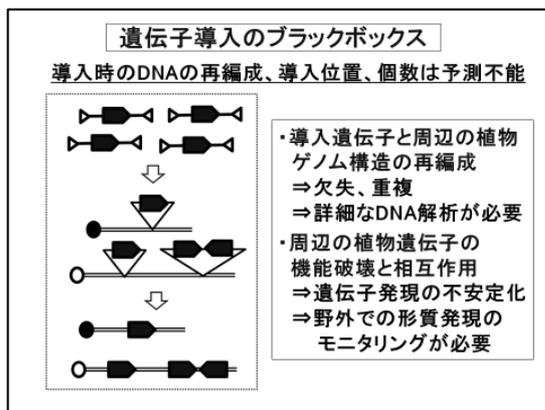
研究成果の概要(英文)：I infected Agrobacterium containing the gene replacement vector to the transgenic tobacco plants with a target gene and checked the replacement efficiency of the gus and hpt genes. I obtained 90 of 220 HygR calluses which included a white callus part without the GUS activity and confirmed the gene replacement events by PCR analysis. It showed the effectiveness of the combination of the HygR selection and GUS activity detection. I constructed the 3.2Kb frame vector by I-PCR and introduced variation into an amino acid of the trfA domain that controlled a start of the replication of DNA to increase the copy number of the T-DNA vector. I put lox recognition sequence 34bp and Rs recognition sequence 103bp together to promote the detachment of cyclized DNA with the recombinase.

研究分野：遺伝子組換え

キーワード：遺伝子組換え 遺伝子置換 部位特異的組換え 組換え酵素 認識部位

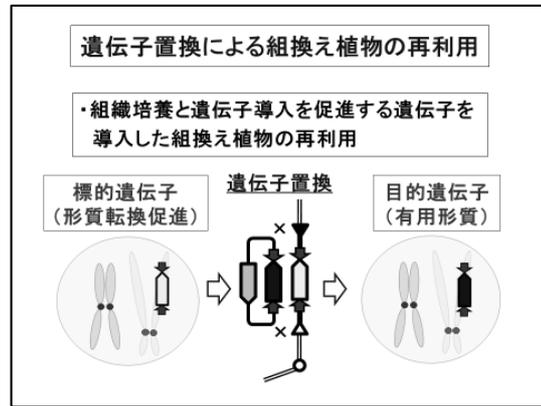
1. 研究開始当初の背景

植物への遺伝子導入には、アグロバクテリウムやパーティクルガンが広く用いられている。従来法では、図に示すように、染色体上に複数の不完全な遺伝子がランダムに組み込まれ、1個の完全な遺伝子を持つ個体の選抜が必要であった。染色体上の同じ座位に繰り返し遺伝子を導入し同じ遺伝的背景で遺伝子の発現を厳密に比較評価できなかった。遺伝子導入の再現性と信頼性の課題を克服するため、相同組換えと部位特異的組換えを用いたジーンターゲットング（標的組換え）法の開発が進められている。植物の相同組換え頻度は極めて低く、前者は染色体上の標的の遺伝子のピンポイントでの改変を、後者は、従来法に代わる標的の座位への遺伝子導入を目的としている（Ebinuma, Nanto: 2009, 2011; 南藤、海老沼: 2012; Ebinuma et al: 2012）。



2. 研究の目的

米国モンサント社の組換え大豆から未知のDNA配列の組み込みが検出され、EUでは食品の安全性管理上の重大な問題として関心を集めている。従来法の遺伝子導入過程はブラックボックスであり、欠失、重複等により導入遺伝子と周辺の植物ゲノムの構造に再編成が生じる。組換え作物の安全性評価には、遺伝子導入のイベントごとに詳細なDNA解析が求められる。遺伝子の機能性評価には、導入した遺伝子と周辺の植物遺伝子との相互作用や機能破壊による影響を調査するため、屋内、野外での長期間の形質発現のモニタリングが必要である。DNA解析により素性の明らかになった標的座位を有する組換え作物を作成し、野外での栽培試験で安定した形質発現を示す系統を選抜育成する。遺伝子置換により、各種遺伝子を導入した組換え作物を作出し、PCR分析により置換個体を同定する。発現の安定した遺伝子座位の再利用により、詳細なDNA分析が不要となり長期間の形質発現のモニタリング作業を短縮することが可能である。本研究の遺伝子置換技術は、組換え作物の安全性と遺伝子の機能性の評価作業の効率化と信頼性の向上に有効な手段である。



3. 研究の方法

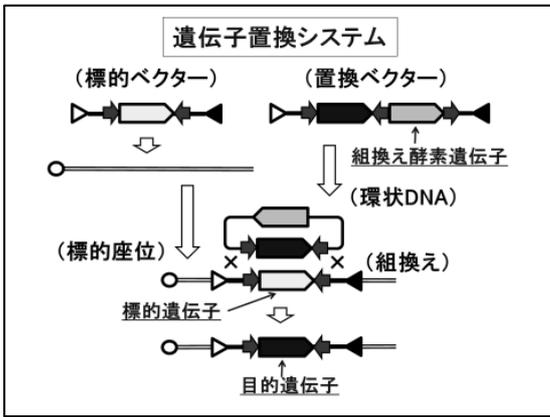
(1) 標的座位への多重連結遺伝子の導入と発現解析：標的遺伝子 (gus) を有する組換えタバコ系統の無菌苗を増殖し、葉片へのアグロバクテリウム感染条件を最適化する。多重連結したレポーター遺伝子 (luc) を有する置換ベクターを構築し遺伝子導入する。カルスの形成頻度の調査と遺伝子分析により遺伝子置換事象の比較解析を行う。

(2) 遺伝子置換に適した Ti プラスミドの開発：広域宿主ベクターの OriV からの DNA複製の開始を制御している trfA 領域への変異導入によるコピー数の増加が報告されている。T-DNA 領域の両端ボーダー配列の配置を最適化した最小骨格 Ti プラスミドを構築し、I-PCR により trfA 領域の二箇所のアミノ酸に変異を導入する。

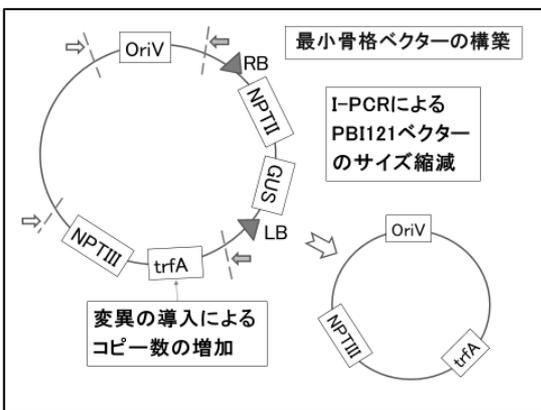
(3) 組換え酵素の認識部位の改変による置換効率の向上：組換え酵素による環状 DNA の切出しを促進するため、KOR1 イントロンを挿入した組換え酵素遺伝子 (R, Cre) と、lox 認識配列 34bp と Rs 認識配列 103bp を組み合わせたベクターを構築し作動を確認する。

4. 研究成果

(1) 標的座位への多重連結遺伝子の導入と発現解析：多重に連結した遺伝子の数と標的座位の位置の遺伝子発現への影響を解明するため、1～3個のレポーター遺伝子 (luc) を有する遺伝子置換ベクターを構築した。標的組換えタバコ系統へ遺伝子置換ベクターを感染導入し、標的遺伝子 (gus) とレポーター遺伝子 (luc) の置換効率を調べた。220個の HygR カルス中 90個は GUS 活性のない白色組織を含み、PCR 分析により遺伝子置換の事象を確認した。HygR 選抜と GUS 染色の組合せで効率的に置換個体のスクリーニングができることが示された。分割継代した白色部分の多いカルスから再分化した 14個体の PCR 分析を行った。8個体において gus 遺伝子の消失と luc 遺伝子の導入が検出され遺伝子置換個体と確認された。



(2) 遺伝子置換に適した Ti プラスミドの開発：染色体へのランダムな組み込みと遺伝子置換による標的座位への組み込みへの T-DNA 構造の影響を解明するため、T-DNA 領域の形状とサイズの改変を行った。I-PCR を 2 回繰り返して、pBI121 ベクターの T-DNA 領域を除去し、OriV、NPTIII、trfA の領域からなる 3.0Kb の最小骨格ベクターを構築した。さらにオーバードライブ配列と RB 配列、二重の LB 配列を有する T-DNA 領域を合成し組み込んだ。アグロバクテリウム内での Ti プラスミドのコピー数を増加させるため、I-PCR により OriV からの DNA 複製の開始を制御している trfA 領域に変異の導入を行った。文献上、コピー数の増加が期待される二箇所のアミノ酸に変異を有する Ti プラスミドを構築した。大腸菌とアグロバクテリウムに遺伝子導入し作動を確認した。大腸菌においてプラスミド抽出量の比較により、コピー数の増加傾向が示された。



(3) 組換え酵素の認識部位の改変による置換効率の向上：組換え酵素による遺伝子の置換効率と染色体消失個体の出現による置換個体の選抜効率への影響を解明するため、二種類の部位特異的組換え系 (R/Rs, Cre/lox) の Ti プラスミドへの組込みと作動確認を行った。RB 配列と LB 配列の内側に最小の lox 認識配列 34bp と 5 重複の右側繰り返し配列を有する Rs 認識配列 103bp を同方向に各々二個有する T-DNA 領域を DNA 合成し上記の最

小骨格ベクターに組み込んだ。KOR1 イントロンを有する組換え酵素遺伝子 (R, Cre) を DNA 合成し T-DNA 領域に組み込んだ。アグロバクテリウムに遺伝子導入し、タバコ無菌苗の葉片に感染させ MS 培地上に置床した。感染部位より DNA を抽出し、PCR 分析により脱離跡の検出を行った。組換え酵素の働きで T-DNA 領域上の同方向の二個の認識部位に挟まれた DNA 領域が切り出され、一個の認識部位だけが残存する。予想される長さの DNA 断片の増幅が検出され、組換え酵素 (R, Cre) の作動が確認された。

合成 T-DNA 領域の配列

- OverDrive24bp:(caaacaacacatacagcgactta)→
- RB25bp:(gtttaccgccaatatctctgca)→
- lox34bp:(ataactctgtata/atgtatgc/tatacgaagtat) →
- Rs103bp:(gacg/ttgatgaaagaa/tacgta/ttctttcatcaa/atcg/ttctttcatcaa/ttcg/ttctttcatcaa/atcg/ttctttcatcaa/gtcg/ttctttcatcaa/cccg) →
- LB25bp:(gtttaccgccaatatctctgca)→
- LB25bp:(gtttaccgccaatatctctgca)→

< 引用文献 >

Ebinuma, H., Nanto, K., Kasahara, S., Komamine, A.
Marker-free gene targeting by recombinase-mediated cassette exchange (RMCE).
In Dunwell J. and Wetten A. (eds) Methods in Molecular Biology 847, Transgenic Plants 2nd Edition. New York, Springer: 379-390 (2012).

南藤和也、海老沼宏安
染色体を消失させた植物細胞の作出方法
特許登録 4912890 (2012).

Nanto, K., Ebinuma, H.
Method for production of plant cell having chromosome loss.
特許登録 EP1829960B1 (2011).

Ebinuma, H., Nanto, K.
Marker-free targeted transformation.
In Mohan, J. S. and Brar, D.S. (eds.) Molecular Techniques in Crop Improvement 2nd Edition. Springer: 527-543 (2009).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)
Ebinuma, H., Nakahama, K., Nanto, K.
Enrichments of gene replacement events by Agrobacterium-mediated RMCE.
Molecular Breeding 35:82-92 (2015).

〔学会発表〕(計1件)

海老沼宏安、中村晴彦、山下紀之
遺伝子置換による形質転換促進技術の開発
第32回日本植物細胞分子生物学会(盛岡)
大会・シンポジウム講演要旨集 p85 (2014).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海老沼 宏安 (EBINUMA, Hiroyasu)
信州大学・学術研究院繊維学系・教授
研究者番号：50192513