

プロジェクト名：

植物における新たな遺伝子組換え作物作製技術の確立に向けての研究

プロジェクト代表者： 田中 秀逸（理工研 生命科学・准教授）

## 1 研究の背景・目的

標的塩基配列特異的に導入DNA断片を挿入する遺伝子ターゲティングは、DNA二重鎖切断 (DSB) 修復機構の「相同組換え」が働く事で起こる。一方、この時、DSB修復のもう一つ別の経路「非相同末端結合」が働くと、導入断片はゲノム上にランダムに挿入される。我々は、非相同末端結合に関わる遺伝子を欠損させたアカパンカビ株を用いることで、ゲノム内に遺伝子が挿入されたすべての株で遺伝子ターゲティングが起こる系を確立した (Ninomiya et al., 2004, Ishibashi et al., 2006. 共に*PNAS*誌)。この結果をベースに植物へも研究範囲を広げ、H21-22の科研費「挑戦的萌芽研究」ではシロイヌナズナのカルス細胞でもこの遺伝子ターゲティング法が有効であることが明らかにした (Tanaka et al., *BBRC*, 2010)。本研究では、植物育種におけるこの技術の汎用性の確認と実用化に向けた取り組みとして、他の非相同末端結合関連遺伝子破壊株、他の標的遺伝子についての解析をめざした。

## 2 研究結果

### 実験1 *AtKU70*, *AtKU80* 遺伝子破壊株における遺伝子ターゲティング効率の解析

T-DNA insertion によって *AtKU70*, *AtKU80* 遺伝子が破壊されていると予想される株から得た種子を播種し、子葉段階まで育てたところで葉を採取してカルス誘導培地に移した。採取した葉から mRNA、カルスから DNA を抽出して *KU* 遺伝子発現を調べた。ここで *KU* 遺伝子の発現が確認できない株を選択し、培養した後 *AGAMOUS* 遺伝子をターゲットとし *bialaphos* 耐性遺伝子を遺伝子挿入の選択マーカーとしたコンストラクトをパーティクルガン法で導入し、導入後は選択培地 (9 µg/ml *bialaphos* 含) でカルス状態での培養を継続し、2週間ごとの培地交換時にカルスの色、大きさを基に増殖可能となった細胞を選択する。*AtKU70* 破壊株は得られなかったことから、ネガティブコントロール株として導入を試みた。*bialaphos* 耐性遺伝子が導入され大きく成長しているカルスから順に DNA を抽出し、*bialaphos* 耐性遺伝子の挿入を PCR 法により調べたところ、形質転換は生じているが、予想された通り遺伝子のターゲティングには至っていないことがわかった。また、*AtKU80* 株については抑制株が同定されたので、WT と抑制株に対してパーティクルガンによる遺伝子導入を行い、陽性株の選別を試みたが、選別の途中でカビ類のコンタミを起こしてしまい結果を出せなかった。現在、実験再開の準備中である。

### 実験2 WT における *AtKU70* 遺伝子に対する RNAi 効率の解析

*AtKU70* に関しカルス誘導した株の内、*AtKU70* 遺伝子の発現が確認できた株を WT とし、これらのカルスに対して *AtKU70* 遺伝子に対して RNA interference を引き起こす配列及び、*hygromycin* 耐性遺伝子を遺伝子挿入の選択マーカーとして持つコンストラクトをパーティクルガン法で導入した。導入後、2種の選択培地 (15 µg/ml または 20 µg/ml *hygromycin* 含) でカルス誘導を継続した。しかしながら、導入後2カ月間培養を継続したが、カルスの成長が観察できなかった。こちらについても、実験再開の準備中である。

## 3 結論・考察

### 遺伝子ターゲティング実験について

まず結果として、非相同末端結合能が正常な株で形質転換が生じたカルスは全てランダムな挿入によるもので、

遺伝子ターゲティングは生じていなかった。これはこれまでの報告にある通り、野生株における遺伝子ターゲティング効率が非常に低いことを示している。*ku80* に関し形質転換に用いた株は、*ku80* mRNA の発現は無いことが確認できたが、T-DNA の挿入は確認することができなかった。したがって、*AtKU80* 遺伝子の完全な破壊株かどうかを確実にしてから遺伝子を導入する株を決定することが望ましかった。この問題の解決には、T-DNA のレフトボーダーの配列を鋳型にしたプライマーを新たに作成するか、PCR 法以外の方法で発現を確認することが考えられる。

パーティクルガンによる遺伝子導入は導入法の中でも比較的効率が悪いとされている。本実験では約 800 粒のカルスに対してパーティクルガンを行い、培養を続けた結果成長したのは 80 粒程度であった。成長したカルス全てに対して *Bar* 遺伝子導入の有無を確認したのではないが、仮に全てのカルスで形質転換が起っていた場合、パーティクルガンの効率は 10%程だと言える。

### RNAi 実験について

RNAi 実験では、パーティクルガンによる撃ち込み後、ハイグロマイシン含有培地で培養を続けたが、ほぼ全ての株で成長が見られなかった。前記したように、仮にパーティクルガンの効率が 10%の場合、こちらのカルスも同様の数が成長すると考えられる。成長しなかった原因としては、あらかじめ作製した *hygromycin* 耐性遺伝子を含むコンストラクトが正常に機能しなかった、または、培地に加えたハイグロマイシンの濃度が高かったことが挙げられる。今回 15 $\mu$ g/ml と 20  $\mu$ g/ml の 2 種類の培地を用いたが、そのどちらでも成長していなかったことを考えると、濃度を低く(例えば 10  $\mu$ g/ml)して行えば成長するカルスが現れるかもしれない。導入に用いたコンストラクトの実際の塩基配列を、シーケンス解析により確かめることも必要かもしれない。

### 最後に

平成 24 年度分の科研費申請において、本研究をさらに発展させる内容で基盤研究 (C) に申請を行い、採択された。本研究では残念ながら形に残るものとしての研究の成果は得られなかったが、「外部資金獲得」に結びついたことは確かで、その意味では十分な目的を果たせたと考えたい。