

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 29 年 4 月 17 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 埼玉大学大学院 理工学研究科
 職 名 助教
 研究代表者名 吉原亮平

下記のとおり平成 28 年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:282002)

| | | | | |
|------------------|--|----------------------------|-------------------------|------|
| 1. 共同利用研究 課題名 | 植物を用いたゲノム改変技術の効率化に関する研究 | | | |
| 2. 共同利用研究 目的 | 植物ゲノム DNA 改変のための遺伝子導入およびゲノム改変された遺伝子導入体の DNA 解析 | | | |
| 3. 共同利用研究 期間 | 平成 28 年 7 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日 | | | |
| 4. 共同利用研究組織 | | | | |
| 氏 名 | 所属部局等 | 職名等 | 役 割 分 担 | |
| (研究代表者) 吉原 亮平 | 埼玉大学大学院 理工学研究科 | 助教 | 遺伝子コンストラクト作製 植物細胞の培養 | |
| (分担研究者) 田中 秀逸 | 埼玉大学大学院 理工学研究科 | 教授 | 遺伝子解析 | |
| 5. センター内受入研究者 | 研究部門・ 分野名 | シグナル分子応答研究部門 環境物質応答研究分野 | 氏 名 | 乾 秀之 |

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:282002)

6. 共同利用研究計画

本共同研究は、遺伝子ターゲティングによる植物ゲノム DNA 改変の効率化を目的としている。これまでに、DNA 二本鎖切断修復機構である非相同末端結合 (NHEJ) に関わる *lig4* 遺伝子を欠損したシロイヌナズナにおいて、遺伝子ターゲティングによるゲノム改変効率が上昇することが示されている。本研究では、*Lig4* 遺伝子よりも上位で機能する *Ku80* 遺伝子を欠損したシロイヌナズナを用いた際に、ゲノム改変の効率が上昇するかを解析する。

ゲノム改変の効率は、ヒストン H1 遺伝子下流に GFP 遺伝子を直接挿入し、ヒストン H1-GFP 融合タンパク質を発現する株の得られる頻度により評価する。研究の流れを以下に示す。

[1]ゲノム改変用コンストラクトの作製 (埼玉大学)

[2] *ku80* または *lig4* 欠損株へのパーティクルガンによるコンストラクト導入および遺伝子導入株の選抜 (神戸大学・埼玉大学)

[3] 遺伝子導入株の解析 (神戸大学・埼玉大学)

7. 共同利用研究の成果

まず初めに申請者は、*lig4* 欠損株および *ku80* 欠損株をそれぞれ自家受粉させて種子を回収し、*lig4* および *ku80* ホモ欠損株を取得した。そして、Valvekens (1988)らの手法¹⁾を参考にし、遺伝子導入を行わない条件下において、シロイヌナズナの野生株、*lig4* 欠損株、*ku80* 欠損株の根外植片から植物体を再生させるための条件を決めた。さらに、遺伝子導入用のコンストラクトも構築した。

実際に遺伝子ターゲティング効率の評価を行うために、シロイヌナズナ野生株、*lig4* 欠損株、*ku80* 欠損株の根外植片に対し、構築したコンストラクトをパーティクルガンにより導入した。その結果、ピアラホスを含む選抜培地上で少数の緑色カルスの小塊が確認でき、野生株から3系統、そして *ku80* 欠損株から1系統の再分化シュートを得ることに成功した。現在は、発根誘導培地上で根の誘導を行っている。今後、これら再分化個体の遺伝子解析を行うことで、遺伝子ターゲティングの有無を確認する。また、引き続き遺伝子導入実験を行い、再分化個体をさらに取得し、遺伝子ターゲティング効率を評価する予定である。

Reference 1) Valvekens et al., (1988) Proc Natl Acad Sci USA, 85(15):5536-5540.

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

該当なし

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

該当なし