

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 30 年 4 月 11 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 29 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 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 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	アグロバクテリウムによる遺伝子導入 植物育成	
(分担研究者) 境 賢也 田中 秀逸	埼玉大学 理学部 埼玉大学大学院 理工学研究科	大学院生 教授	植物育成・遺伝子解析 植物育成	
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 変改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) を欠損したシロイヌナズナにおいて、パーティクルガンによる遺伝子導入によりターゲティングによるゲノム変改効率が上昇することが示されている。本研究では、アグロバクテリウムにより NHEJ 欠損シロイヌナズナ (*ku80* 欠損株) に遺伝子導入を行うことで、ゲノム変改の効率が上昇するかを解析する。

ゲノム変改の効率は、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] 遺伝子導入コンストラクトの作製 (埼玉大学)

[2] *ku80* 欠損株への遺伝子導入および選抜 (・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

申請者らは、アグロバクテリウムによる遺伝子導入を行うためのコンストラクト pAH1GB-GT2 を構築し (図 1)、これを感染用アグロバクテリウムに導入した。このアグロバクテリウムを用いて、floral dip 法により野生型および *ku80* 欠損シロイヌナズナに遺伝子導入を試みた。

野生株と *ku80* 欠損株の形質転換効率を比較すると、*ku80* 欠損株では、効率がやや低い傾向が見られた。このことから、アグロバクテリウムによる遺伝子導入に NHEJ が部分的に関与していることが示唆された。

得られたピアラホス耐性個体の中から、野生株由来を 11 個体、*ku80* 欠損株由来を 12 個体無菌播種し、発芽した個体の根端細胞の GFP 蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、野生株由来には GFP 蛍光を発する個体は含まれていなかったが、*ku80* 欠損株由来の中に、核に GFP 蛍光が観察された個体が 5 個体存在した (図 2)。

今後、これらの個体の遺伝子変改を DNA レベルで確認するとともに、さらなる遺伝子導入と蛍光観察を行うことで、本技術の有用性を評価する。また、ターゲティング効率をより上昇させるために、相同組換えの促進やベクターの改良などにも取り組む。

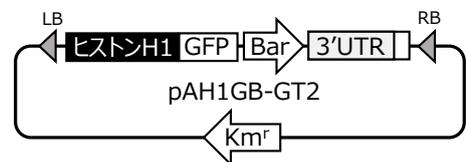


図1. 遺伝子導入用コンストラクト

ヒストンH1遺伝子の終始コドンの上流 (ヒストンH1) と、その下流の相同配列 (3'UTR) の2領域がゲノムDNAと相同組換えを起こす。これにより、GFPとピアラホス耐性遺伝子 (Bar) がゲノム上のヒストンH1の下流に挿入される。

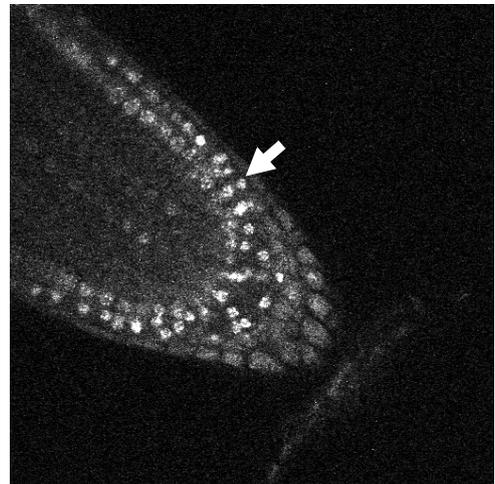


図2. 根端のGFP蛍光画像

ku80 欠損株に遺伝子導入を行って得られた形質転換株のうち、約45%の個体の核でGFP蛍光が見られた。

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