

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 31 年 4 月 4 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 30 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 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 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。

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) 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遺伝子ターゲティング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、相同組換え (HR) が関与する遺伝子ターゲティングによるゲノム改変の効率が上昇するかを解析する。

遺伝子ターゲティングの効率は、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。

7. 共同利用研究の成果

申請者らは、平成 29 年度末までに構築したコンストラクトをアグロバクテリウムに導入し、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行った。その結果、*ku80* 欠損株に遺伝子導入を行った株のおよそ半数で、核における GFP 蛍光が観察された。

そこで平成 30 年度は、遺伝子導入株の遺伝子解析を行った。まず核内で GFP 蛍光がみられた *ku80* 欠損株においてターゲティングの成否を確認する PCR を実施したが、すべての株で増幅が見られず、ターゲティングが成功していないことが示された。そこで、遺伝子導入株の T-DNA 挿入部分をアダプター PCR により解析したところ、*ku80* 欠損株において T-DNA が遺伝子のコード領域から外れた 500 bp 以内に挿入された株が多く得られた (表 1)。このことから *ku80* 欠損株において核内

表1. T-DNA挿入部位

遺伝子からの距離	遺伝子内	<500 bp	≥500 bp
野生型バックグラウンド	13 (76.5)	0 (0.0)	4 (23.5)
<i>ku80</i> 欠損バックグラウンド	6 (37.5)	7 (43.8)	3 (18.8)

()内は各項目の割合を示す。

GFP 蛍光が見られる株が多く得られた原因は、ゲノム内に存在するプロモーターの下流にコンストラクトのヒストン H1-GFP が挿入されたことによるものと考えられる。さらなる解析から

申請者らは、*ku80* 欠損株において T-DNA 挿入部位に存在するマイクロホモロジー (MH) が長くなる傾向を見出したが (図 1)、T-DNA の挿入部位に MH が見られる頻度は、野生株と *ku80* 欠損株間で差は見られなかった。これらのことから、アグロバクテリウムによるシロイヌナズナのゲノム DNA への T-DNA 挿入に対する HR と NHEJ の関与は小さく、alternative end-joining (alt-EJ) が主たる経路であることが示唆された。また、*ku80* 欠損株で見られた T-DNA 挿入部位やマイクロホモロジーの長さ

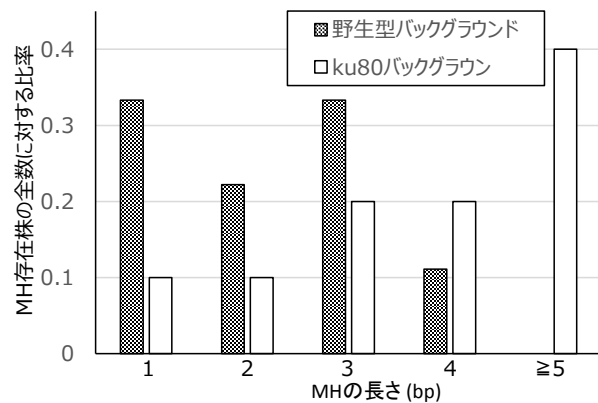


図1. マイクロホモロジー(MH)の長さとその内訳

の違いは、Ku80 の直接的な関与よりも変異株のゲノム不安定性などが影響していると申請者らは現在考えている。本研究から、植物におけるアグロバクテリウムを用いた遺伝子ターゲティング効率化のためには、NHEJ の抑制よりも alt-EJ 経路のマイクロホモロジー検索の効率化が重要であると考えられる。

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