

相同及び非相同組換えによる植物ゲノムの改変法の開発と利用
Homologous and nonhomologous recombination-mediated genome modification in plants

飯田 滋 Shigeru IIDA 生活健康科学研究科・薬学研究科分子遺伝学研究室 特任教授
Appointed Professor, Laboratory of Molecular Genetics, Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences / Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka



Profile

2009年	静岡県立大学生活健康科学・薬学研究科特任教授
1996年	基礎医学研究所/総合研究大学院大学生命科学部教授
1988年	東京理科大学基礎工学生物工学科教授
1987年	スイス連邦理工科大学(ETH)植物科学研究所上級研究員
1982年	パベルズ大学バイオセンター上級研究員
1974年	パベルズ大学バイオセンター研究員
1973年	東京大学医科学研究所助手
1973年	東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了
1967年	東京大学薬学部卒業

2009 Associate Professor, Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences /
 Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo
 1996 Professor, National Institute for Basic Biology / School of Life Science,
 The Graduate University for Advanced Studies
 1988 Professor, Department of Biological Science and Technology
 Science University of Tokyo
 1987 Senior Research Associate, Institute for Plant Science, Swiss
 Federal Institutes of Technology (ETH-Zurich)
 1982 Senior Research Associate, Biozentrum der Universität Basel
 1974 Research Associate, Biozentrum der Universität Basel, Switzerland
 1973 Ph.D., Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo
 1967 Graduate from Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

Contact

T E L 054-264-5569
+81-54-264-5569
e-mail shigiid@u-shizuoka-ken.ac.jp
U R L [http://sfns.u-shizuoka-ken.
ac.jp/molgen/](http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/molgen/)

序論

人類の主食であるイネの相同組換えによるゲノムの改変は、我々の2002年のWaxy遺伝子のノックアウト改変を嚆矢とし、2009年にはGUSレポーター遺伝子を内在性のMET1a遺伝子プロモーターにつなげたノックイン改変にも成功し、改変遺伝子のコピー数や標的遺伝子の時間的空間的発現を反映した再現性のあるGUS発現を観察できた。今回、DNAの5-methylcytosineの脱メチル化に係るROS1a遺伝子のノックイン改変を行い、null変異は次世代へ伝達できないことを明らかにした。

内性DNA型トランスポゾンを紹介した非相同組換えによるゲノム
 改変として、我々が見出したイネ*nDart1*の遺伝子タギングに係る
*nDart1*の標的選択特異性やマルバサザガの*Tip100*挿入による
 null変異で判明したメンデルの法則の特例と考えられる不完全優
 性に関する新たな知見も述べる。

成果

図1はポジティブ・ネガティブ選抜による*ROS1a*遺伝子のノックイン
 改変法の概念図である。独立に得られた6系統は、何れも一方の染
 色体だけが期待通りの改変ゲノム構造をもつヘロク改変体であり、
 GUS発現にも差異はなかった。ノックイン改変はGUS等が挿入した
 null変異であり、*ROS1a*の場合は通常の生育条件下では次世代
 には伝達せず、自殖後代は全て野生型ホモであった。父性由来の
 変異は次世代に伝わり、図2に示すように母性由来の変異をもつ
 種子は胚乳の発達異常により致死となる。それ故、このような変異は
 従来の次世代集団中から変異体を分離する変異導入法では分離
 できないタイプの変異と思われる。

イネの*nDart1*はゲノム上の遺伝子領域、特にプロモーター近傍に挿入し易いことが判明した。

マルバアサガオの *Tip100* がイントロンに挿入した花色に係わる *CHS* 遺伝子の null 変異体と *Tip100* の転移脱調による復帰変異体を用いて (図3)、分子遺伝学的に未解明であった不完全優性は、活性な *CHS* 遺伝子のコピー数に応じた遺伝子量効果により *CHS* mRNA や *CHS* タンパク、アントシアニンの蓄積がヘテロでは野生型ホモの約半分になっていた。

展望

我々のノックイン改変法は標的遺伝子の発現や変異をレポーター遺伝子の発現を指標に解析できるので、従来の手法では分離できない新たな変異の分離と解析が可能となり種々の応用が期待できる。

*nDart1*では、機能欠失型の劣性変異ばかりでなく、機能獲得型の優性変異も得られるのは、*nDart1*がプロモーター近傍に挿入したためと考えられ、組換えDNA技術によらない有益は変異導入法となる。

イネのノックイン改変の結果もマルバサガオの不完全優性も、活性な遺伝子の量的効果を示すので、メンデルの法則が成立する多くの遺伝子は1コピーで野生型の形質を賦与するに十分量を発現していることを強く示唆している。

Introduction

Primary (T0) plants, obtained by our homologous recombination-promoted modification of the rice genome, usually carry only one anticipated knock-out or knock-in allele in the heterozygous condition. We showed that the reproducible, dosage-dependent, and spatiotemporal expression of the *GUS* reporter gene fuses with the endogenous *MT1a* promoter in the selfed progenies of independently isolated knock-in-modified T0 plants. We also reproducibly obtained and characterized T0 plants bearing a knock-in modified null allele of *ROS1a* for DNA demethylation of 5-methylcytosine. For nonhomologous recombination, we characterized endogenous DNA transposons *nDart1* in rice and *Tip100* in the common morning glory (*Ibomoea purpurea*).

Results

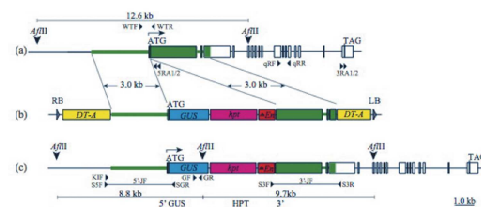
Figure 1 shows our strategy for the knock-in modification of *ROS1a* with positive-negative selection; all the knock-in lines obtained displayed the same GUS staining patterns. The knock-in null allele, *ros1a*, is non-transmittable; the maternal allele causes failure of early endosperm development resulting in incomplete embryo development (Figure 2), whereas the paternal allele cannot be transmitted to progeny. The *nDart1* elements are predominantly integrated into single-copy genic regions, particularly the promoter proximal regions. The mutable allele, caused by *Tip100* insertion into *CHS-D* for flower pigmentation, confers incomplete dominance (Figure 3). Amounts of *CHS-D* transcripts, CHS-D protein, and anthocyanin pigment in heterozygous flowers were about half those in homozygous flowers, indicating that dosage-dependent expression of *CHS-D* is the primary cause of the observed incomplete dominance.

Perspectives

Without our knock-in modification procedure, the non-transmittable *ros1a* allele would be difficult to isolate by conventional mutagenesis techniques that isolate mutants as segregants in the progeny population. It would also be difficult to characterize its transmission by tracking of spatiotemporal *ROS1a* expression.

Our findings provide an explanation for the observation that *nDart1*-insertion mutants often confer gain-of-function phenotypes.

Our findings on gene-dosage effects imply that expression of a single copy of many genes following Mendelian Laws appears to be sufficient to confer wild-type phenotypes.



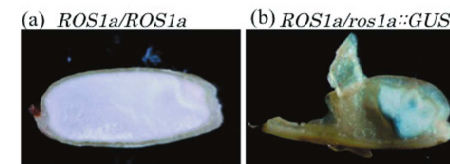
【図1】
イネROS1a遺伝子のノックイン改変法の概念図
(a)ゲノム上のROS1a遺伝子の構造、(b)用いたベクターのT-DNA領域、(c)ノックイン改変されたゲノム上のROS1a遺伝子の構造。

[Figure 1]
Strategy for knock-in modification of *ROS1a* in rice.
(a) Genomic structure of *ROS1a*. (b) T-DNA region of the targeting vector used.
(c) Genomic structure of the *ROS1a* locus targeted for knock-in.



【図3】
マルバサガオの不完全優性とCHS遺伝子の変異。大きな矢印はCHS遺伝子を、三角形はTip100の挿入を示す。

[Figure 3]
Incomplete dominance in flower pigmentation of *I. purpurea* and the structures of the wild-type and mutant *CHS* genes.
The large horizontal arrows and the triangles indicate *CHS* and *Tip100*, respectively.



【図2】
ノックイン改変変異の種子形成への影響
(a)ノックイン改変体自殖後代で得られるGUS染色されない野生型ホモの種子。(b)野生型を花粉親としてノックイン改変体との交配で得られる胚乳の発達異常とGUS染色が観察される種子。

(a) A normal-shaped seed, obtained as selfed progeny of the knock-in plant, displaying no beta-glucuronidase (GUS) staining. (b) A deformed seed containing severely underdeveloped endosperm and displaying GUS staining. We obtained the seed by crossing emasculated flowers of the knock-in plant with wild-type pollen. Note that the designation of the knock-in allele is *ros1a:GUS1*.

■ 代表的な発表論文と研究業績 / Major Publications and Achievements

1. M. Hayashi-Tsugane, M. Maekawa, H. Kobayashi, [S. Iida](#), K. Tsugane: Examination of transpositional activity of *nDartI* at different stages of rice development. *Genes Genet. Syst.*, 86, 215-219 (2011)
2. M. Hayashi-Tsugane, M. Maekawa, Q. Qian, H. Kobayashi, [S. Iida](#), K. Tsugane: A rice mutant displaying a heterochronically elongated internode carries a 100 kb deletion. *J. Genet. Genomics* 38, 123-128 (2011)
3. Y. Johzuka-Hisatomi, H. Noguchi, [S. Iida](#): The molecular basis of incomplete dominance at the A locus of *CHS-D* in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*. *J. Plant Res.*, 124, 299-304 (2011)
4. K. Takagi, M. Maekawa, K. Tsugane, [S. Iida](#): Transposition and target preferences of an active nonautonomous DNA transposon *nDartI* and its relatives belonging to the hAT superfamily in rice. *Mol. Genet. Genomics*, 284, 343-355 (2010)
5. T. Yamauchi, Y. Johzuka-Hisatomi, S. Fukada-Tanaka, R. Terada, I. Nakamura, [S. Iida](#): Homologous recombination-mediated knock-in targeting of the *MET1a* gene for a maintenance DNA methyltransferase reproducibly reveals dosage-dependent spatiotemporal gene expression in rice. *Plant J.*, 60, 386-396 (2009)