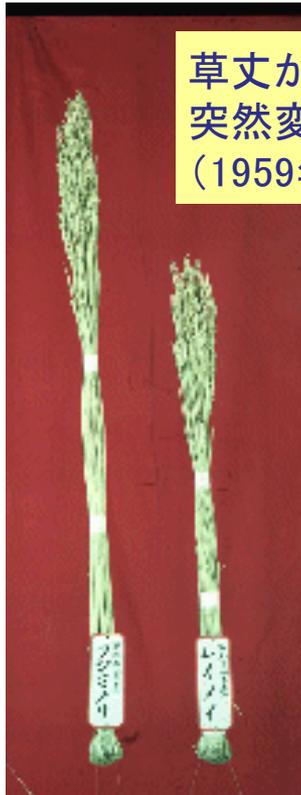


人工制限酵素等を用いた突然変異育種法

(独)農業生物資源研究所
農業生物先端ゲノム研究センター
ゲノム機能改変研究ユニット/
横浜市立大学・木原生物学研究所
土岐 精一

突然変異育種

放射線等によって人為的に誘発した突然変異を品種改良に利用
主にガンマ線を変異原として国内で200品種以上を作出



草丈が低く、耐倒伏性に優れたイネ「レイメイ」
突然変異育種による国内での実用品種第1号
(1959年)



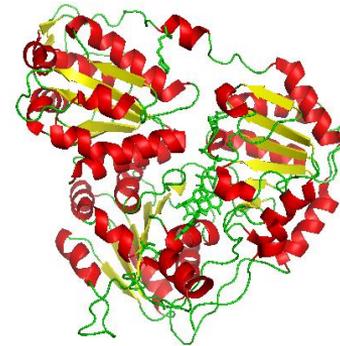
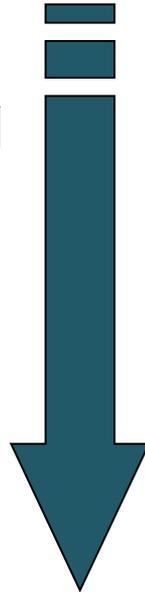
黒斑病抵抗性の「ゴールド二十世紀」
(1981年)

- ・作物のゲノム情報が塩基配列レベルで明らかにされるようになってきた。
- ・1～数塩基の多型が、農業上有用な形質を作物に付与する場合も多い。
- ・比較ゲノム・タンパク質工学の進展により、有用なタンパク質をデザインすることが可能になってきた。



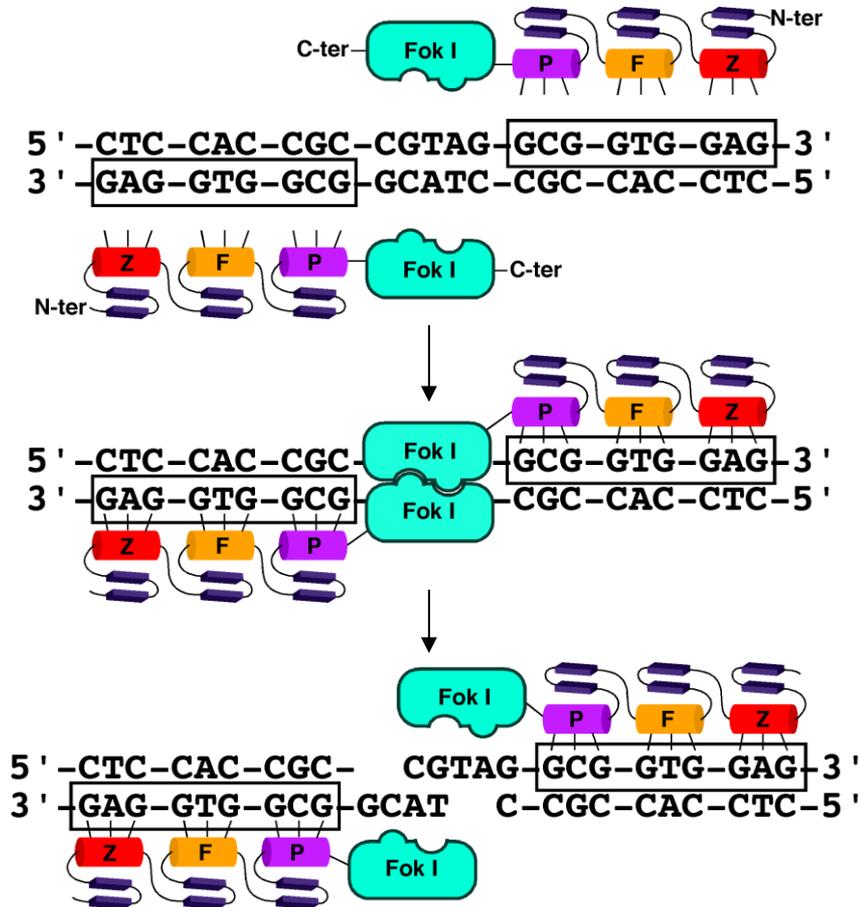
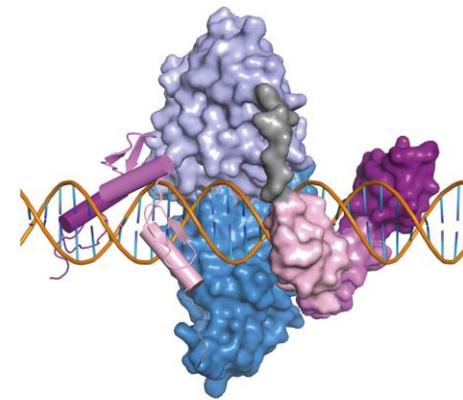
脱粒性を決める配列

日本晴	ATTTCA
カサラス	ATTGCA



ゲノム上の標的とする遺伝子に狙いを定め、塩基配列レベルで改変する技術が必要とされている。

人工制限酵素：Zinc-Finger Nucleases (ZFNs)

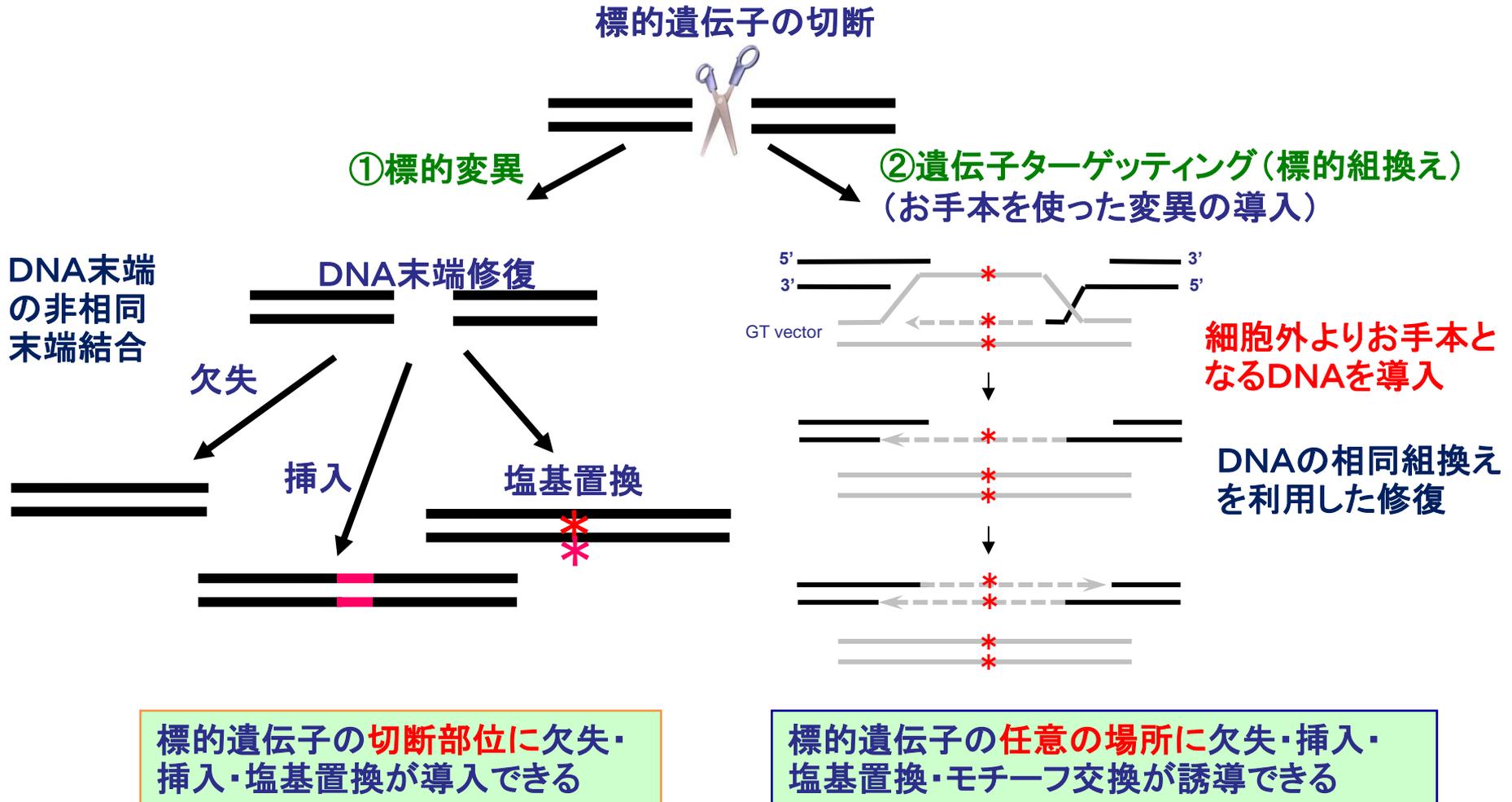


1モチーフが3塩基を認識
→18塩基を認識して切断する
制限酵素

6塩基認識の制限酵素
→平均すると約4千bpの断片に切断

18塩基認識の制限酵素
→平均すると約7億bpに一回切断
→ゲノム上の標的遺伝子のみを切断
できる

標的遺伝子特異的に変異を導入する2つの方法

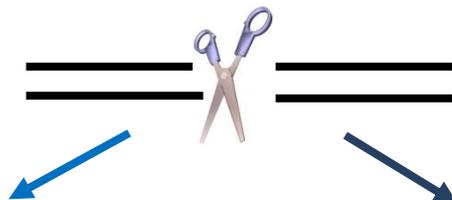


特願2010 遺伝的に改造された植物細胞の製造方法(生物研)

特願2010 遺伝的に改変された細胞を製造する方法(生物研・京大)

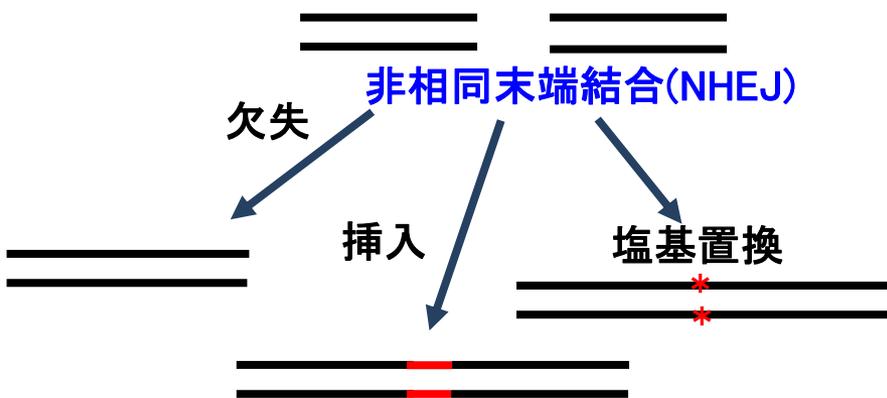
標的遺伝子特異的に変異を導入する2つの方法

標的遺伝子の切断



① 標的変異

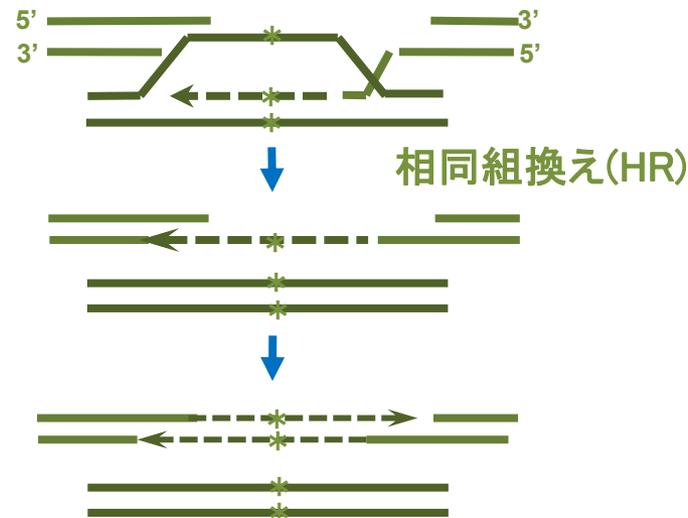
お手本を使わないDNA修復



切断部位に欠失・挿入・塩基置換が導入できる

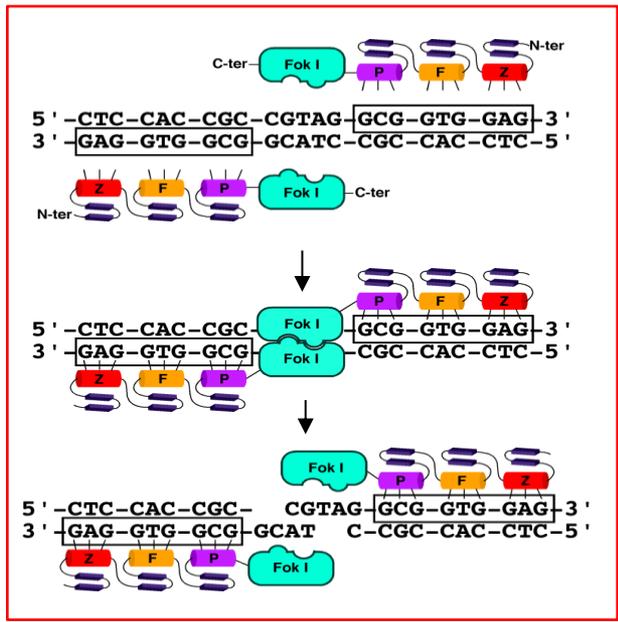
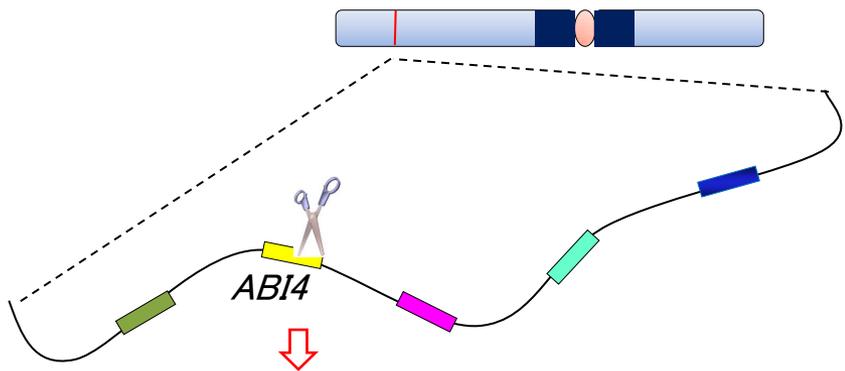
② 標的組換え

(ジーンターゲティング)
お手本を使うDNA修復



遺伝子の望むべき部位に欠失・挿入・塩基置換・モチーフ交換が誘導できる

標的遺伝子をZFNsで切断し変異を導入することに初めて成功



Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases

Keishi Osakabe^a, Yuriko Osakabe^b, and Seichi Toki^{a,1}

PNAS 2010

Site-directed mutagenesis in higher plants remains a significant technical challenge for basic research and molecular breeding. Here, we demonstrate targeted-gene inactivation for an endogenous gene in *Arabidopsis* using zinc finger nucleases (ZFNs). Engineered ZFNs for a stress-response regulator, the *ABA-INSENSITIVE4* (*ABI4*) gene, cleaved their recognition sequences specifically in vitro, and ZFN genes driven by a heat-shock promoter were introduced into the *Arabidopsis* genome. After heat-shock induction, gene mutations with deletion and substitution in the *ABI4* gene generated via ZFN-mediated cleavage were observed in somatic cells at frequencies as high as 3%. The homozygote mutant line *zfn_abi4-1-1* for *ABI4* exhibited the expected mutant phenotypes, i.e., ABA and glucose insensitivity. In addition, ZFN-mediated mutagenesis was applied to the DNA repair-deficient mutant plant, *atku80*. We found that lack of *AtKu80*, which plays a role in end-protection of dsDNA breaks, increased error-prone rejoining frequency by 2.6-fold, with increased end-degradation. These data demonstrate that an ap-

Indeed, expression of I-Sce I, a rare cutting restriction enzyme, has been shown to introduce mutations at I-Sce I cleavage sites in *Arabidopsis* and tobacco (12). Nevertheless, the use of restriction enzymes is limited to rarely occurring natural recognition sites or to artificial target sites. To overcome this problem, zinc finger nucleases (ZFNs) have been developed. ZFNs are chimeric proteins composed of a synthetic zinc finger-based DNA binding domain and a DNA cleavage domain. By modification of the zinc finger DNA binding domain, ZFNs can be specifically designed to cleave virtually any long stretch of dsDNA sequence (13, 14). An NHEJ-based targeted mutagenesis strategy was developed recently in several organisms by using synthetic ZFNs to generate DSBs at specific genomic sites (15–19). Subsequent repair of the DSBs by NHEJ frequently produces deletions and/or insertions at the joining site.

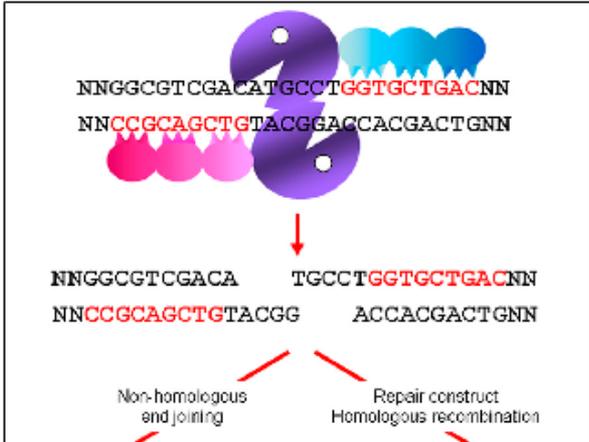
To our knowledge, two groups have successfully applied ZFNs to genetically modify the genome in zebrafish embryos by using specific

Breaking news: Plants mutate right on target

Holger Puchta^{a,1} and Barbara Hohn^{b,1}

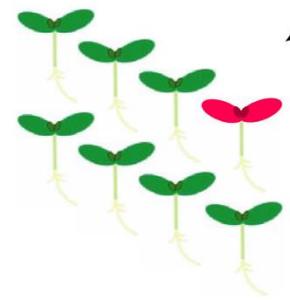
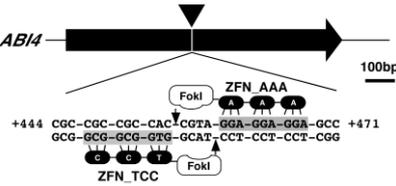
^aDepartment of Botany II, Karlsruhe Institute of Technology, D-76128 Karlsruhe, Germany; and ^bFriedrich Miescher Institute for Biomedical Research, CH-4058 Basel, Switzerland

For millennia, early human civilizations observed phenotypic changes in animals and plants and used these for domestication (1). In recent decades, scientists around the world induced random mutations, mainly in crop plants, to widen the mutation spectra to be used for extensive screening for varieties useful for agriculture and science (2). As mutagens, ethyl methanesulfonate, radiation, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated T-DNA transformation, and transposon mutagenesis have been used. Distinction between WT and mutant was dependent on the phenotype, on sequence specificity of the mutagenizing DNA (in case of transposons or T-DNA), or could be accomplished with tilling. Alternatively, gene expression could be suppressed by use of small interfering RNAs. Targeted mutagenesis in plants, however, was only recently developed, and examples of Zinc finger nuclease (ZFN)-mediated targeting of natural genes by homologous recom-



COMMENTARY

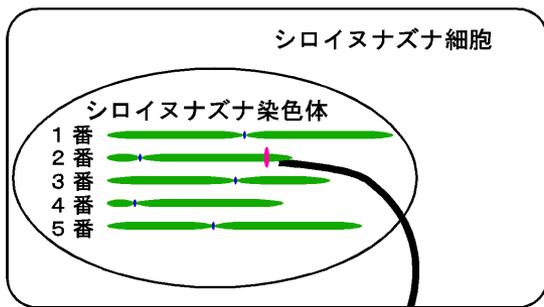
人工ヌクレアーゼ(ZFNs)を用いた計画的な変異の導入



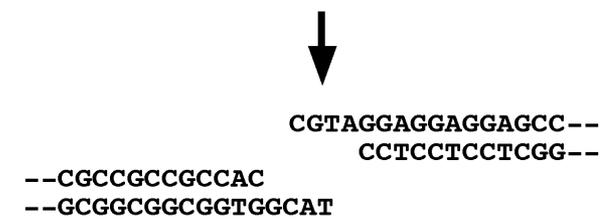
野生型 ABA非感受性
突然変異体
(*abi4*) 人工ヌクレアーゼ
で作った変異体

1.5μM
ABA





A. ZFNが染色体上の特異的な配列を切断



B. 正確なDNA修復

DNA修復の時にエラーが起こると...

C. 塩基の置き換え



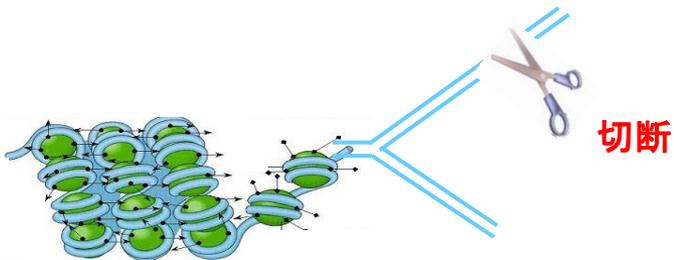
元通りの配列(変異無し)



塩基置換型変異

標的遺伝子により大きな欠失を導入出来ないだろうか？

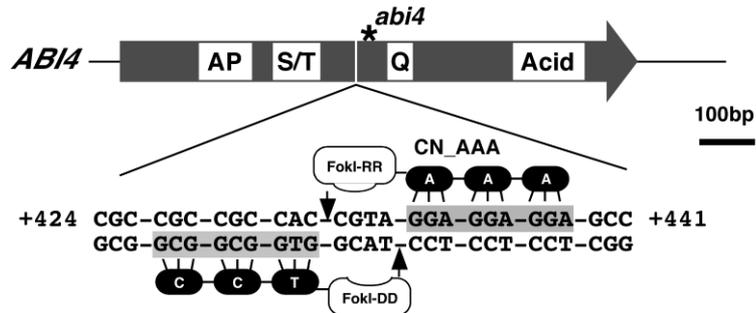
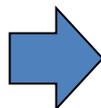
1. 標的遺伝子の特異的切断



2. DNA末端の保護



Ku70/80の欠損植物体にZFNを処理することにより、切断部位により大きな欠損を誘導できる



ABI4ゲノム遺伝子配列

CTCGCCCCGCGCCGCCACcgtAGGAGGAGGAGCCAAC TTTGG

野生型植物 (Ku80存在下) でZFN切断を行った場合

CTCGCCCCGCGCCGCCAC-gtAGGAGGAGGAGCCAAC TTTGG
 CTCGCCCCGCGCCGCCACggtAGGAGGAGGAGCCAAC TTTGG
 CTCGCCCCGCGCCGCCACagtaGGAGGAGGAGCCAAC TTTGG
 CTCGCCCCGCGCCGCCACtgtAGGAGGAGGAGCCAAC TTTGG
 CTCGCCCCGCGCCGCCACcgt--GAGGAGGAGCCAAC TTTGG
 CTCGCCCCGCGCCGCCACcgttGGAGGAGGAGCCAAC TTTGG

Ku80欠損植物を用いてZFN切断を行った場合

CTCGCCCCGCGCCG--AGGAGGAGGAGCCAAC TTTGG
 CTCGCCCCGCGCCGCC--AACTTTGG
 CTCGCCCCGCGCC--AACTTTGG
 CTCGCCCC--AACTTTGG
 CTCGCCCCGCGCCGCA--GGAGGAGGAGCCAAC TTTGG
 CTCGCCCCGCGCCGCCAC--GGAGGAGGAGCCAAC TTTGG

A. ZFNが染色体上の特異的な配列を切断

↓

```

CGTAGGAGGAGGAGCC--
--CGCCGCCGCCAC      CCTCCTCCTCGG--
--GCGGCGGCGGTGGCAT
    
```

↓

DNA修復の時にエラーが起こると...

B. 塩基の欠失

```

CGTAGGAGGAGGAGCC--
--CGCCGCCGCCAC      CCTCCTCCTCGG--
--GCGGCGGCGGTGGCAT
    
```

↓

```

--CGCCGCCGCCACGTAGGAGGAGGAGCC--
--GCGGCGGCGGTGCATCCTCCTCCTCGG--
    
```

▲

塩基欠失型変異

C. DNA修復因子Ku80が無くなると...

より多くの塩基の欠失

```

CGTAGGAGGAGGAGCC--
--CGCCGCCGCCAC      CCTCCTCCTCGG--
--GCGGCGGCGGTGGCAT
    
```

↓

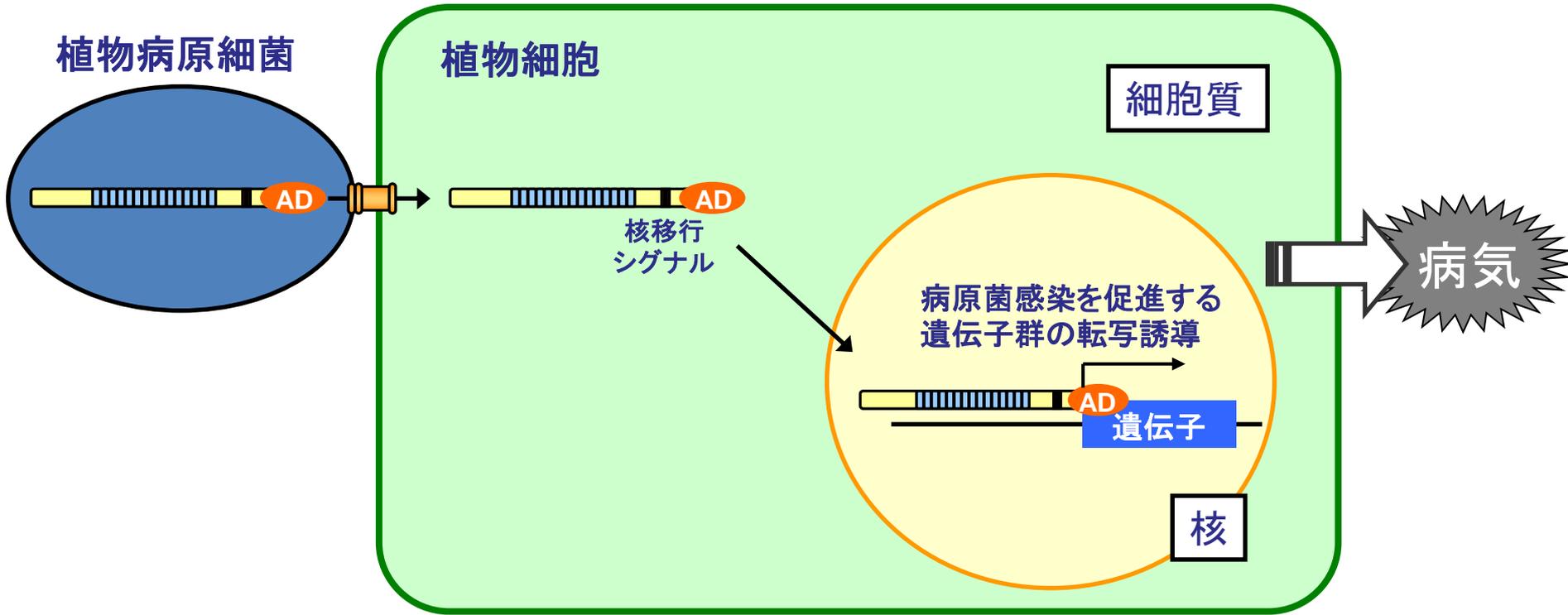
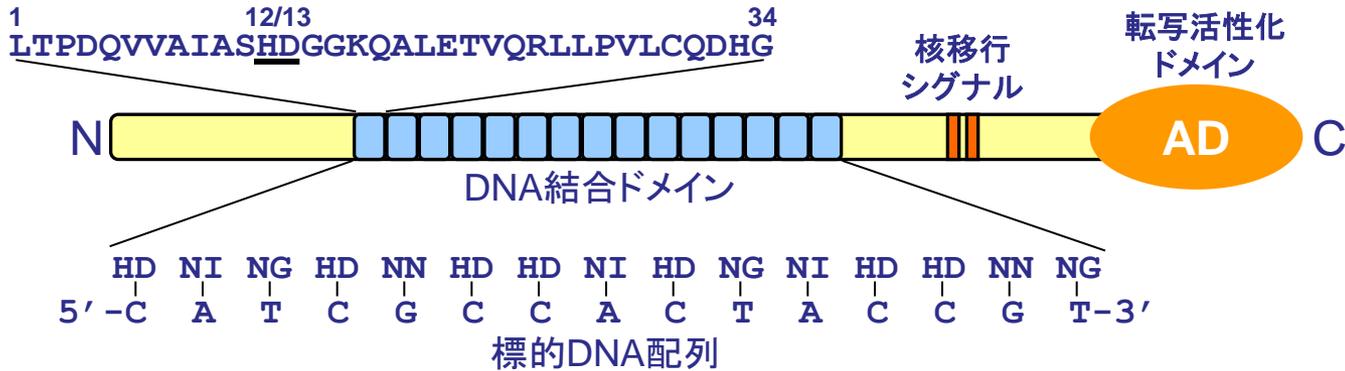
```

--CGCCGCCGAGCC--
--GCGGCGGCTCGG--
    
```

▲

より大きな塩基欠失型変異

新規人工制限酵素TALENは植物の病気の研究から生まれた



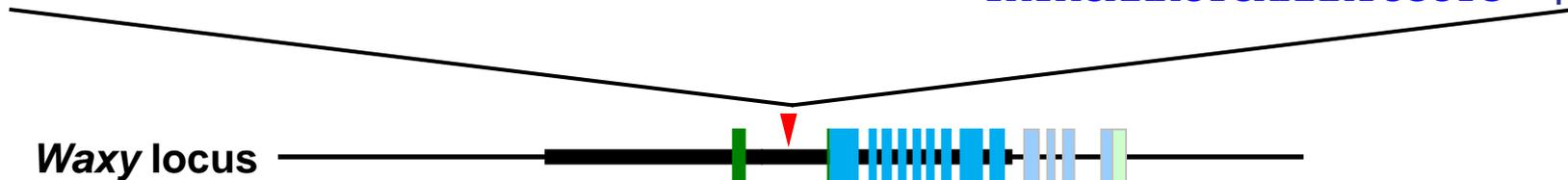
TALENsによるイネ *Waxy* 遺伝子座の切断

L5 CCTTAAGTCCTTATAAGCACAT
L4 GTCCTTAAGTCCTTATAAGCACAT
L3 CCTTAAGTCCTTATAAGCACATAT
L2 GTCCTTAAGTCCTTATAAGCACATAT
L1 CCTTATAAGCACATAT

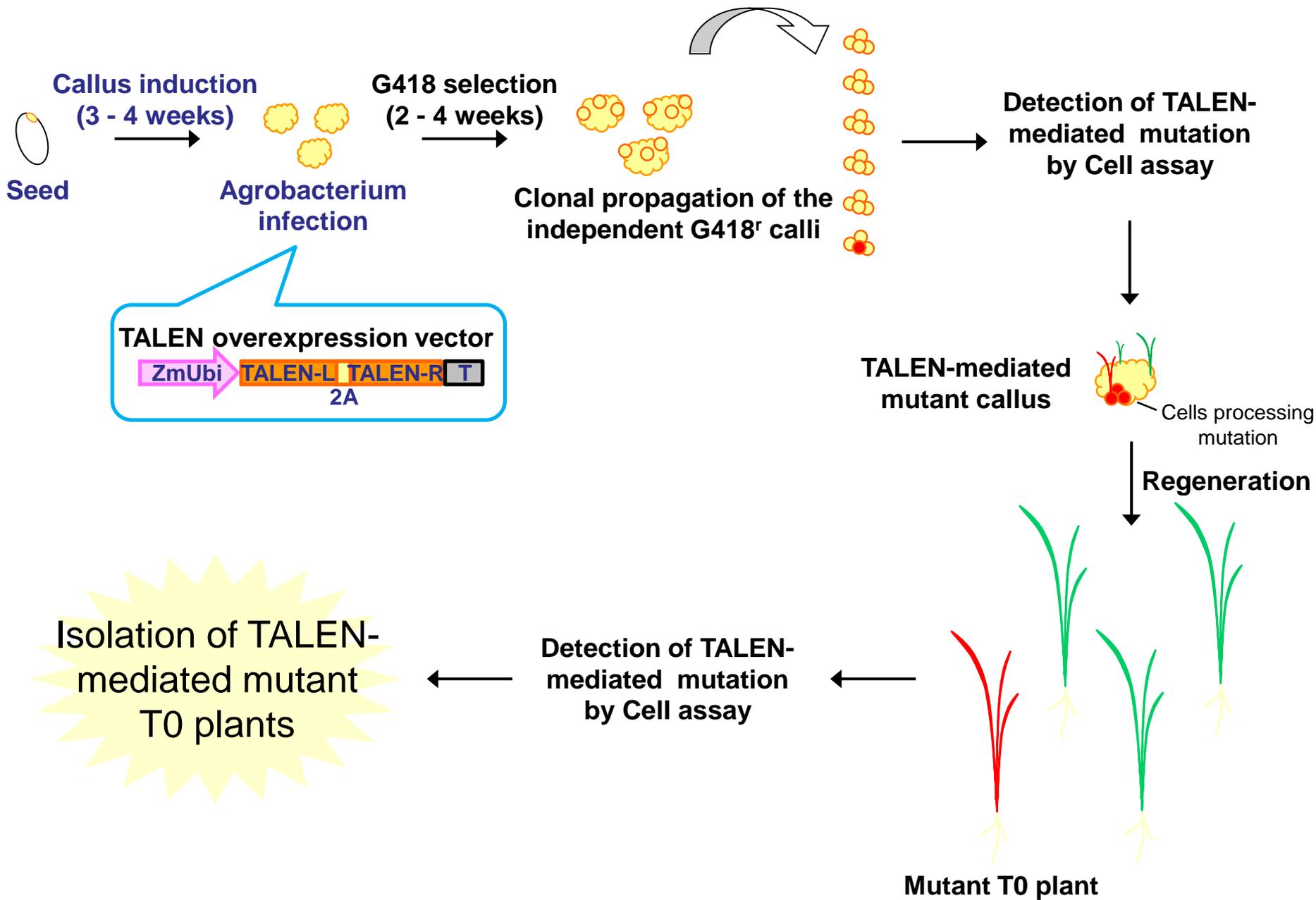
ACTGCTCCTTAAGTCCTTATAAGCACATATGGCATTGTAATATATATGTTTGAGTTTTAGCGACAATTTTT
TGACGAGGAATTCAGGAATATTCGTGTATACCGTAACATTATATA**TACAAACTCAAATCGC**TGTTAAAAA



TACAAACTCAAATCGC R1
TACAAACTCAAATCGCTG R2
TACAAACTCAAATCGC R3
TACAAACTCAAATCGCTG R4



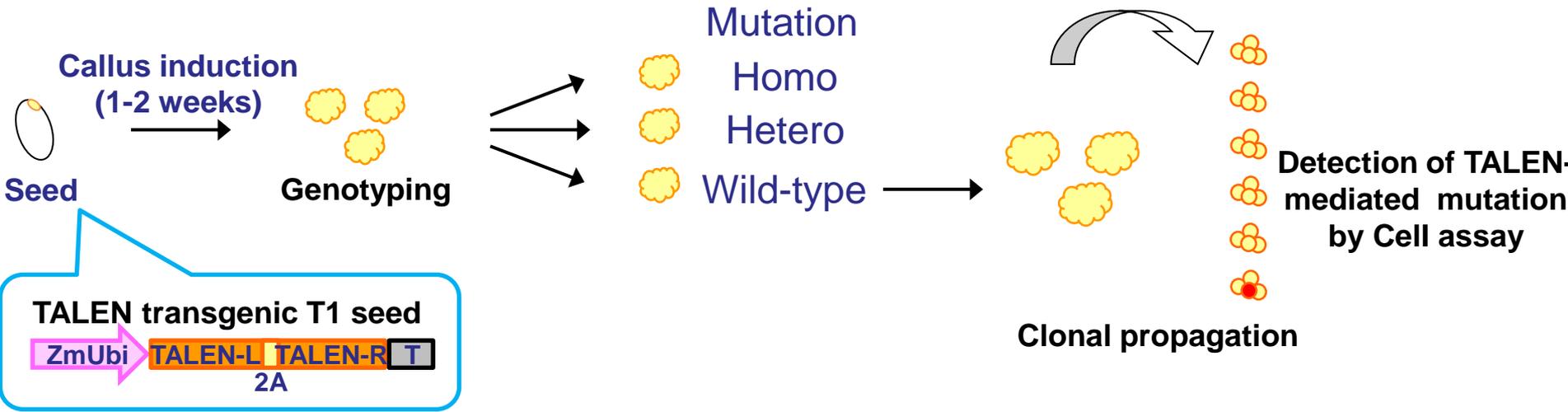
Experimental scheme for TALEN-mediated mutagenesis in rice





植物体で検出された変異が、次世代へ安定的に伝達される

再分化後は新たな変異が生じない？
TALENsによる標的の切断はカルスで生じやすい？



標的変異の頻度はイネ *lig4* 変異体において向上する

	解析した クローン数	突然変異 クローン数	突然変異 率 (%)
実験1			
コシヒカリ(+/+)	16	1	6.3
<i>lig4</i> (-/-)	23	10	43.5
実験2			
コシヒカリ(+/+)	26	2	7.7
<i>lig4</i> (-/-)	17	5	29.4

イネにおいては...

NHEJ関連因子の欠損で、TALENs誘導性の変異頻度も塩基欠損の大きさも上昇

Lig4 917G x Wx TALEN A1/B2-2

Wt TCCTTATAAGCACATATGGCATTGTAATATATATGTTTGAGTTTTAGCGACA 4/16
TCCTTATAAGCACATAT-----ATATGTTTGAGTTTTAGCGACA 12/16

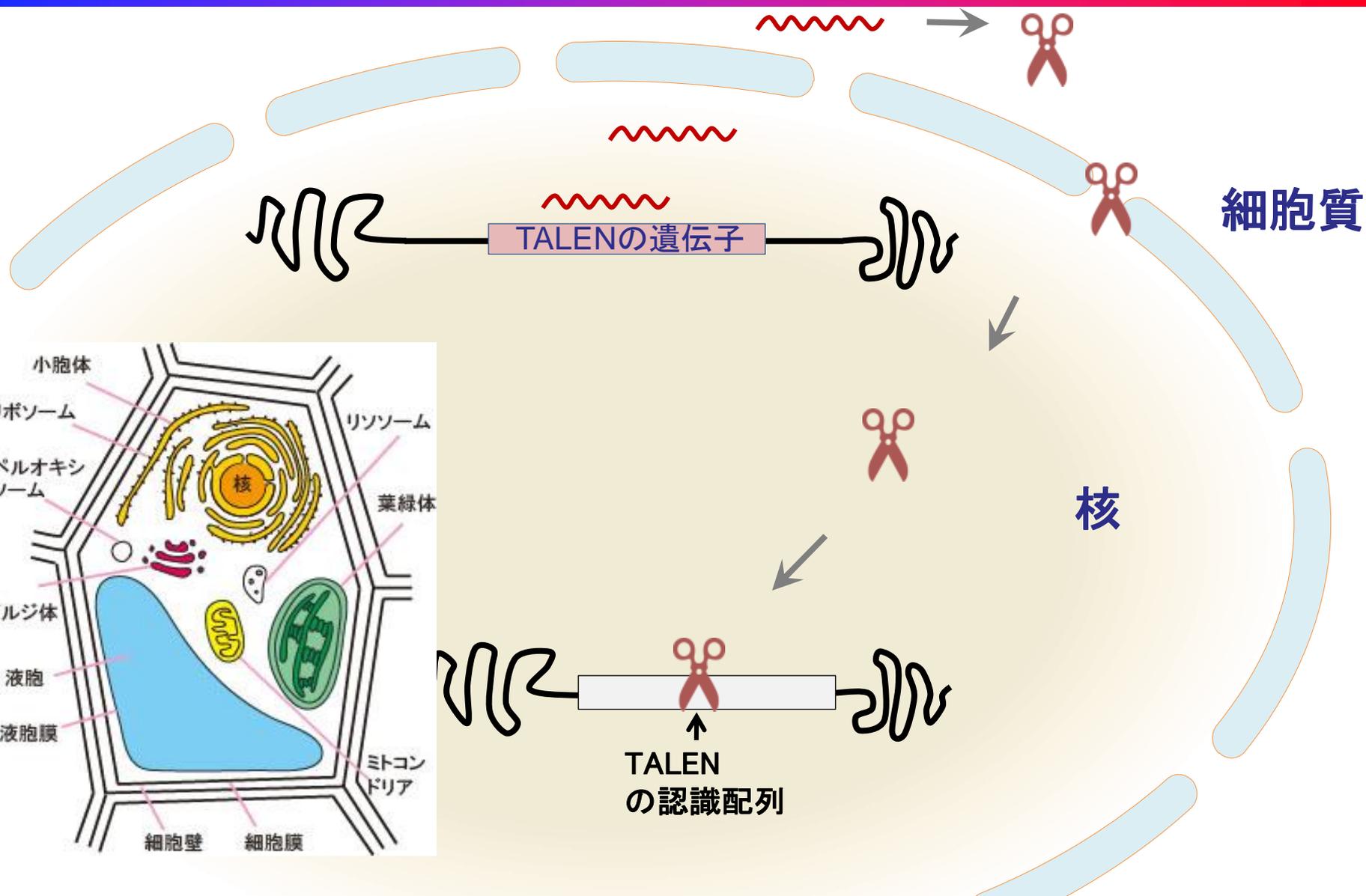
Lig4 917G x Wx TALEN A1/B2-4

Wt TCCTTATAAGCACATATGGCATTGTAATATATATGTTTGAGTTTTAGCGACA 8/14
TCCTTATAAGCACATATGGCATTGT-----TTGAGTTTTAGCGACA 3/14
TCCTTATA-----TATGTTTGAGTTTTAGCGACA 2/14
TCCTTATAAGCACATATG-----TTTGAGTTTTAGCGACA 1/14

Lig4 917G x Wx TALEN A1/B2-16

Wt TCCTTATAAGCACATATGGCATTGTAATATATATGTTTGAGTTTTAGCGACA 10/16
TCCTTATAAGCACATAT-----ATATTTTGAGTTTTAGCGACA 1/16
TCCTTATAAGCACATATGGCATTGT-----TTTAGCGACA 1/16
TCCTTATAAGCACATATG-----TTTGAGTTTTAGCGACA 1/16
TCCTTATAAGCACATAT-----ATGTTTGAGTTTTAGCGACA 1/16
-----136 bp----- 1/16
TCCTTATAAGCACATAT-----ATATGTTTGAGTTTTAGCGACA 1/16

ZFNsやTALENをRNAやタンパク質の形で植物細胞に導入することは簡単ではない



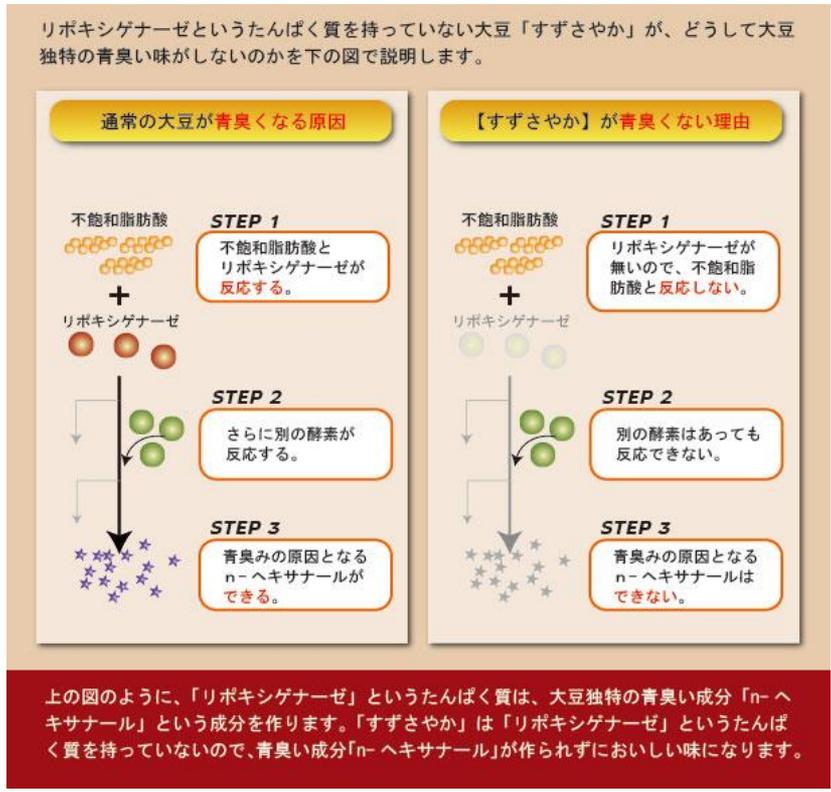
標的変異技術は育種にどう貢献するか

- ① 農業上重要な遺伝子の同定や、機能解析を促進させる。
- ② 農業上不要な遺伝子を計画的に壊せる。また**切断部位**に変異を導入しアミノ酸置換を起こせる。
- ③ 2種類の人工ヌクレアーゼを利用することにより、染色体上の不要な部分を取り除いたり、転座を起こさせることが可能である。

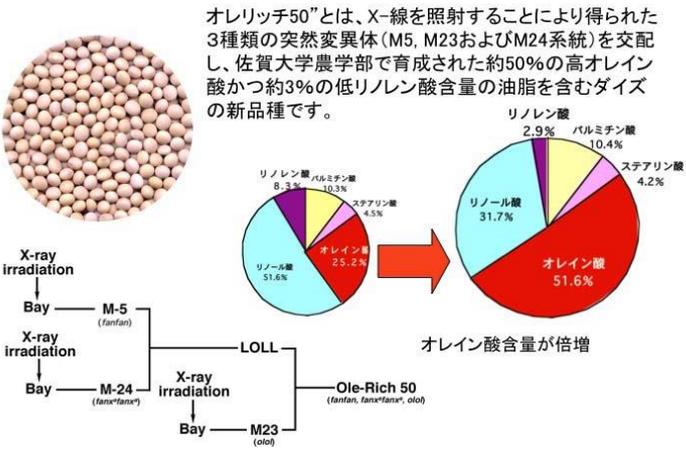
標的変異(今後の研究)

- ・人工制限酵素遺伝子をどうやって取り除くか
次世代で分離させる **トランスポゾン**の利用
- ・人工制限酵素遺伝子を染色体上に導入せず、
一過的に発現させ変異を導入する。
- ・人工制限酵素を**RNA**や**タンパク質**の形で植物細胞内に導入し変異を導入する。
- ・人工制限酵素タンパク質を**細菌**や**ウイルス**に作らせ感染によって植物細胞に導入し、変異を導入する。
- ・核酸・タンパク質ではない人工制限酵素の開発

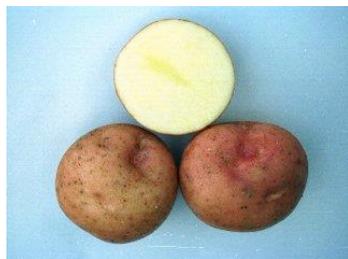
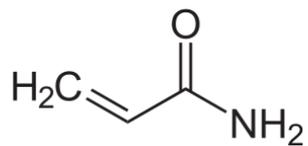
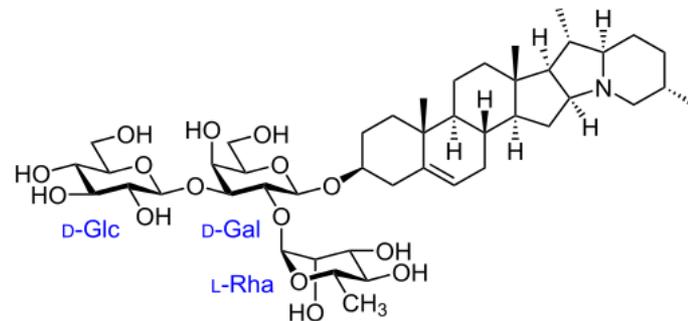
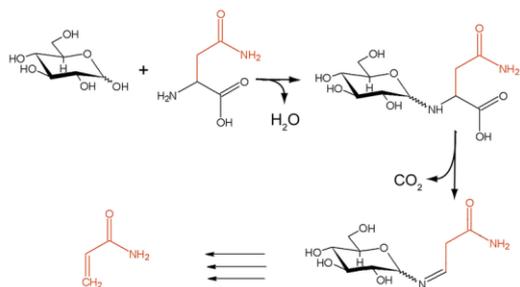
標的変異技術の活用



オレリッチ50の開発



標的変異技術の活用

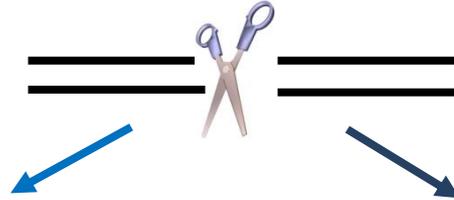


・フライドポテトにしてもアクリルアミドを作らないジャガイモの育成

・ソラニンを作らないジャガイモの育成

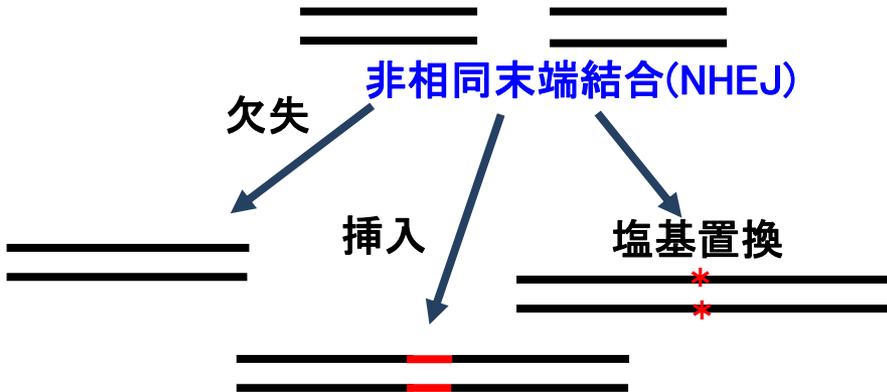
標的遺伝子特異的に変異を導入する2つの方法

標的遺伝子の切断



① 標的変異

お手本を使わないDNA修復

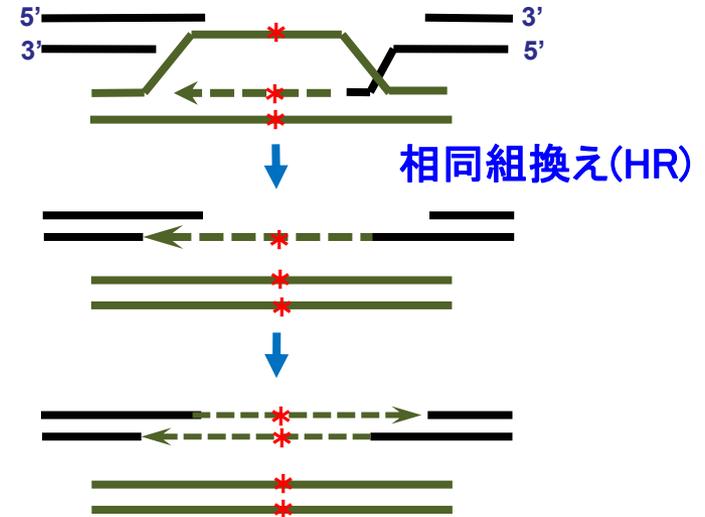


切断部位に欠失・挿入・塩基置換が導入できる

② 標的組換え

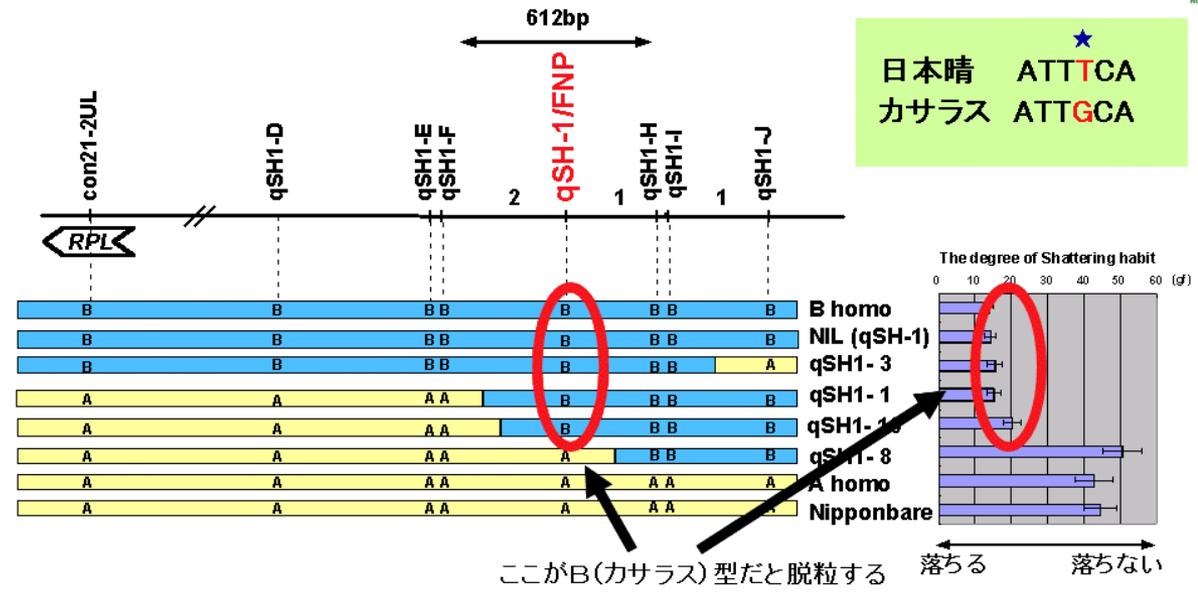
(ジーンターゲティング)

お手本を使うDNA修復



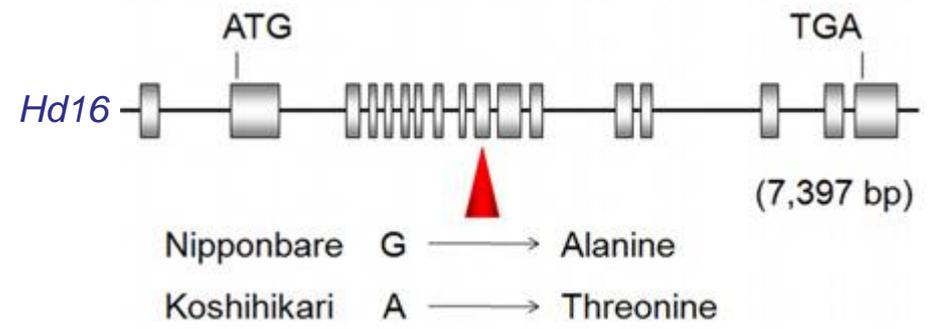
遺伝子の望むべき部位に欠失・挿入・塩基置換・モチーフ交換が誘導できる

脱粒性



イネ栽培化の鍵となった脱粒性抑制遺伝子を発見(農林水産研究成果10大トピックス Konishi et al. 2006 Science)

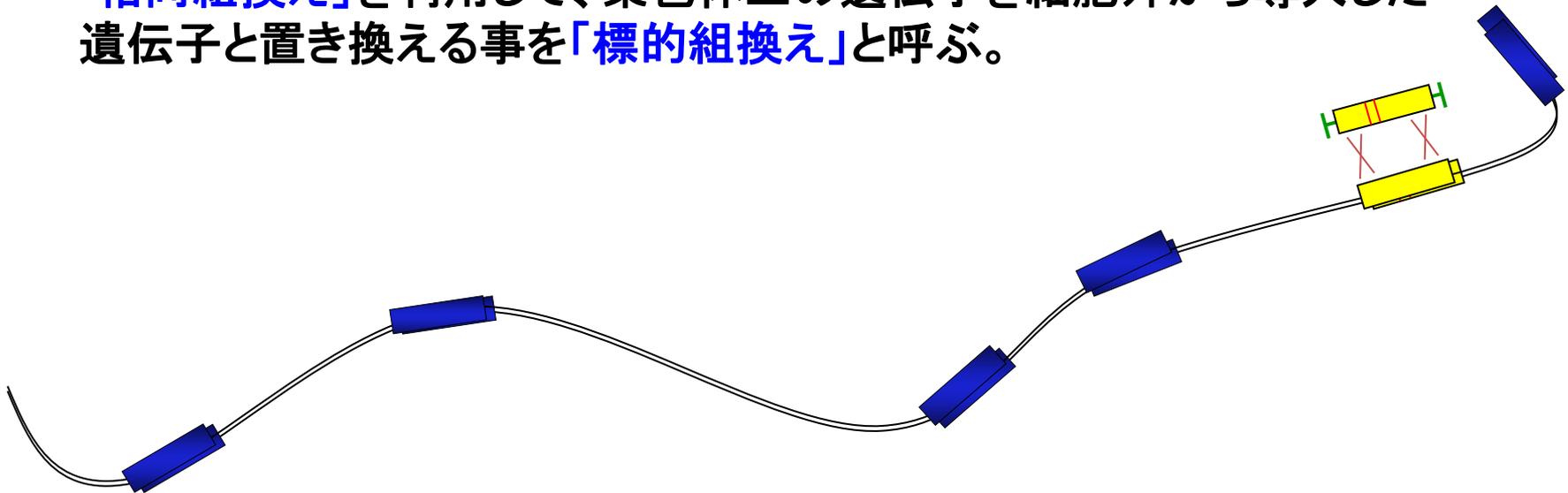
開花期調節



Hori et al. (2013) Plant J.

標的組換え (ジーンターゲティング: GT) とは

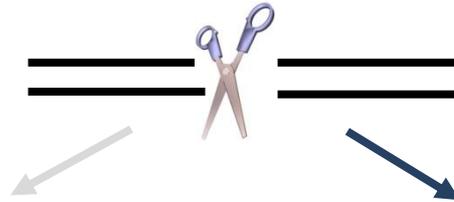
- ・DNAの塩基配列の相同性を利用して、遺伝子を組換えることを「**相同組換え**」と言う。
- ・「**相同組換え**」を利用して、染色体上の遺伝子を細胞外から導入した遺伝子と置き換える事を「**標的組換え**」と呼ぶ。



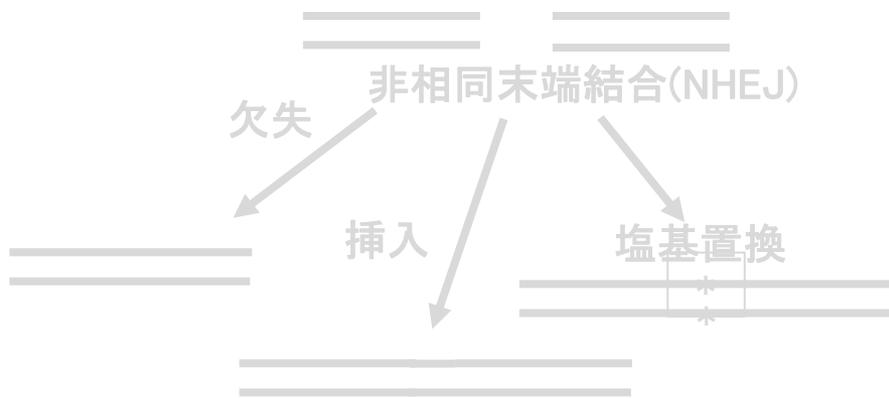
標的組換え技術により染色体上の特定の遺伝子に変異を導入したり、破壊する事ができる。

標的遺伝子特異的に変異を導入する2つの方法

標的遺伝子の切断

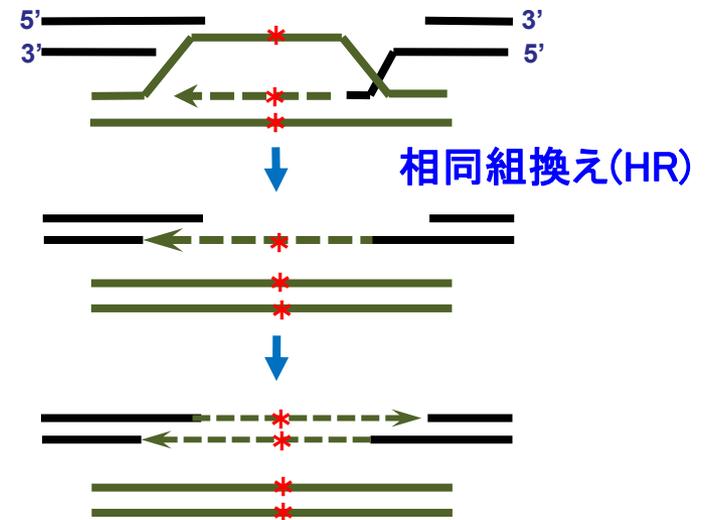


① 標的変異
お手本を使わないDNA修復



切断部位に欠失・挿入・塩基置換が導入できる

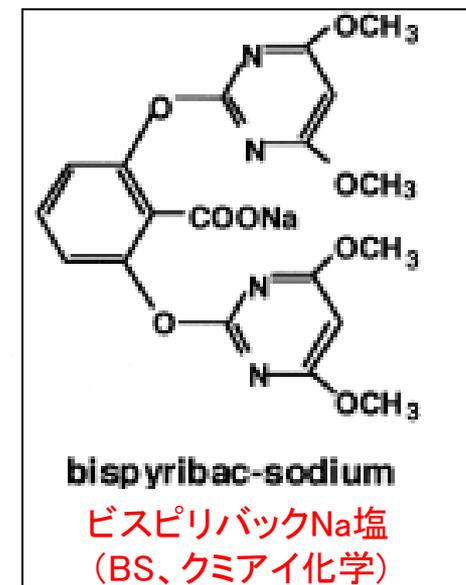
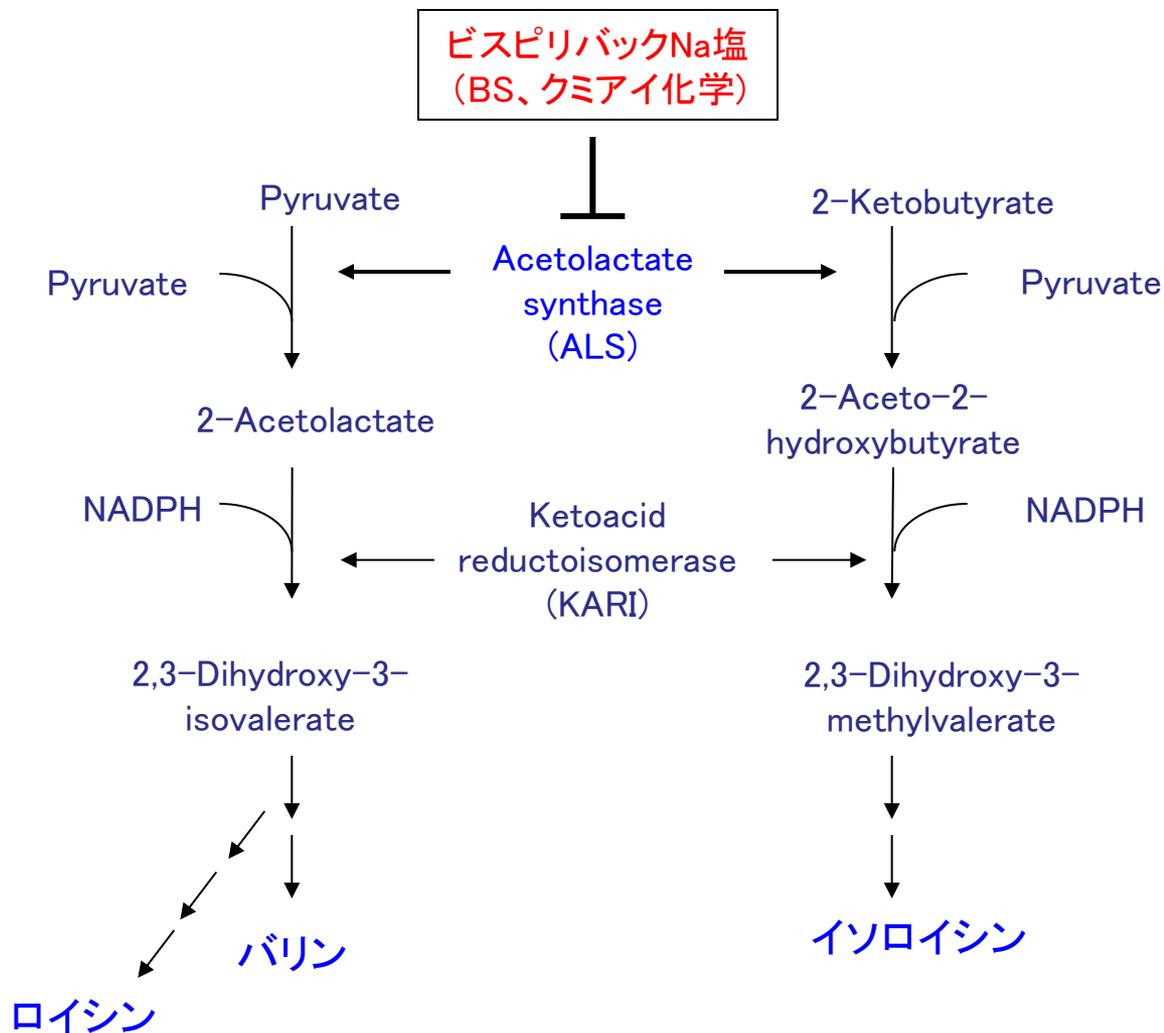
② 標的組換え
(ジーンターゲティング)
お手本を使うDNA修復



遺伝子の望むべき部位に欠失・挿入・塩基置換・モチーフ交換が誘導できる

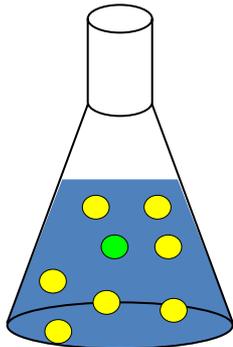
アセト乳酸合成酵素(Acetolactate synthase:ALS)

分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン BCAA)
の合成に関与

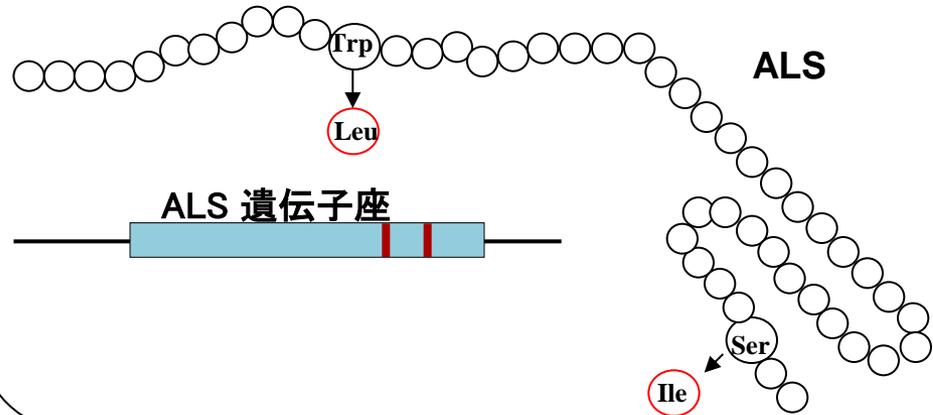


標的組換えによる除草剤耐性イネの作出 (培養系で見出された変異の植物体への計画的な導入)

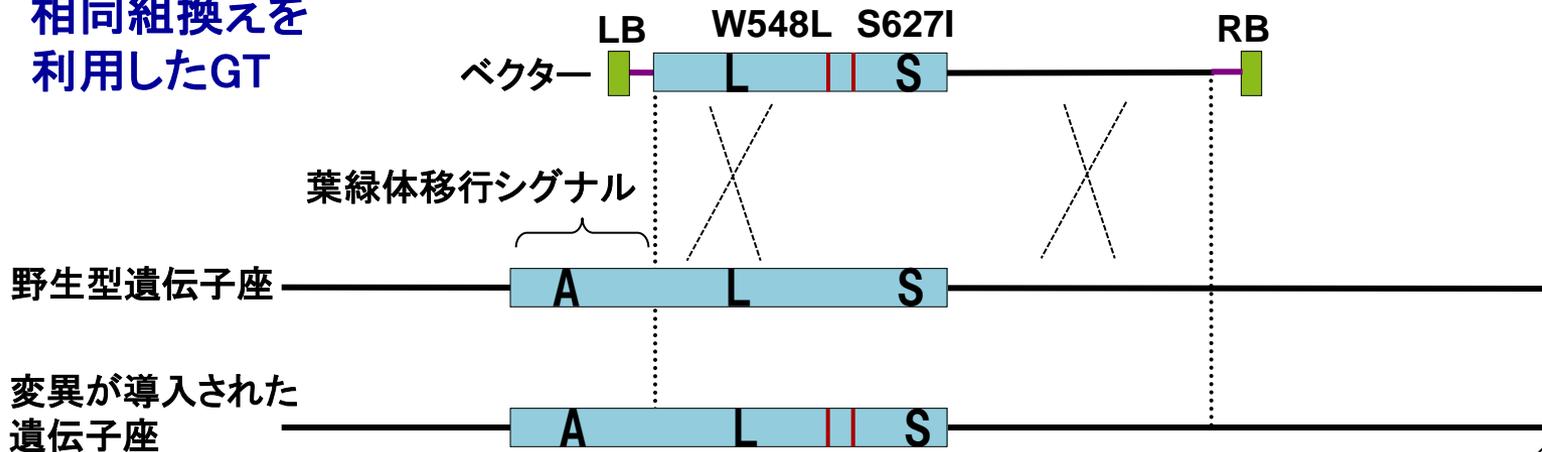
除草剤耐性イネ培養細胞
の選抜(再分化しない)



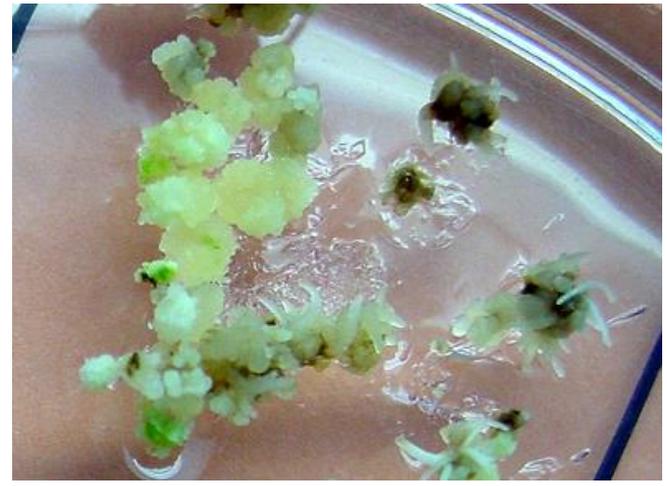
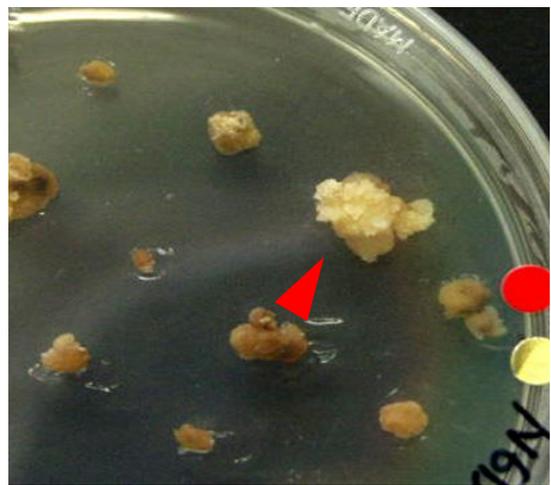
変異部位の同定



相同組換えを
利用したGT



BS耐性個体の選抜

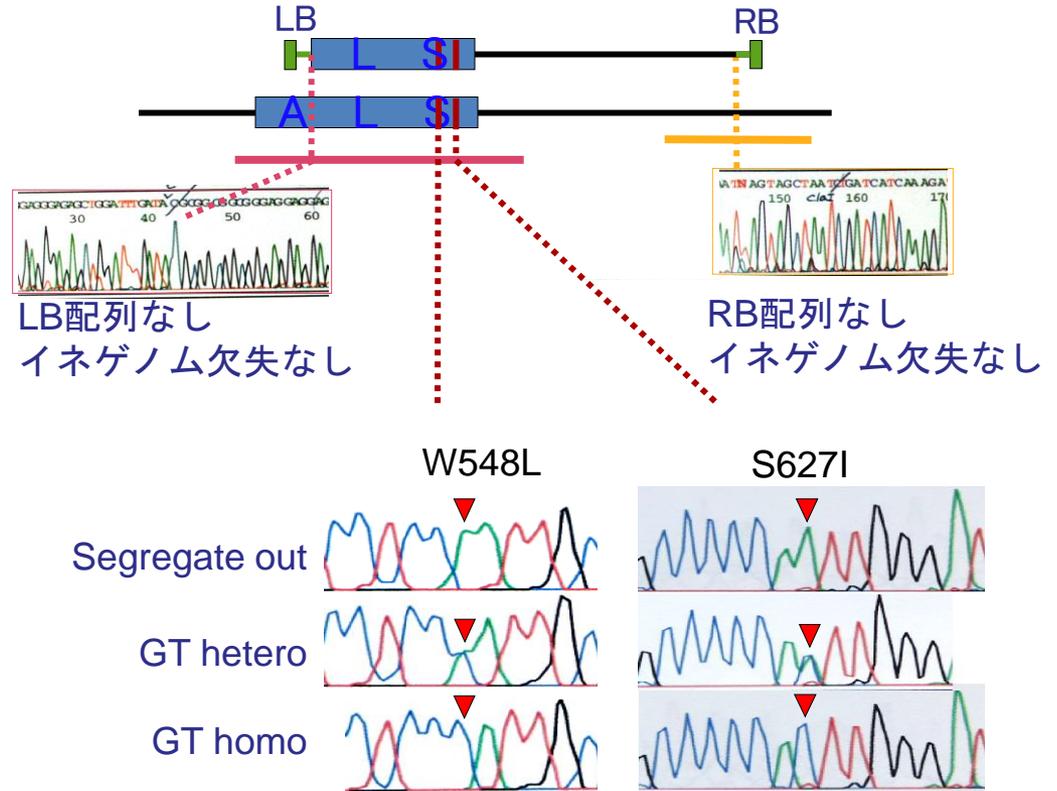


ジーンターゲットング植物体の次世代の解析

BS感受性検定



シーケンスの確認



- ・BS耐性: 感受性=3:1
- ・W548L, S627I変異は連鎖し、変異の有無 とBS耐性/感受性は対応している

ジーンターゲティングによって2つの点変異を導入したイネはBS剤に対して高度の耐性を示す



WT Hetero
 Homo

BS未処理



WT Hetero
 Homo

BS 1 kg/ha



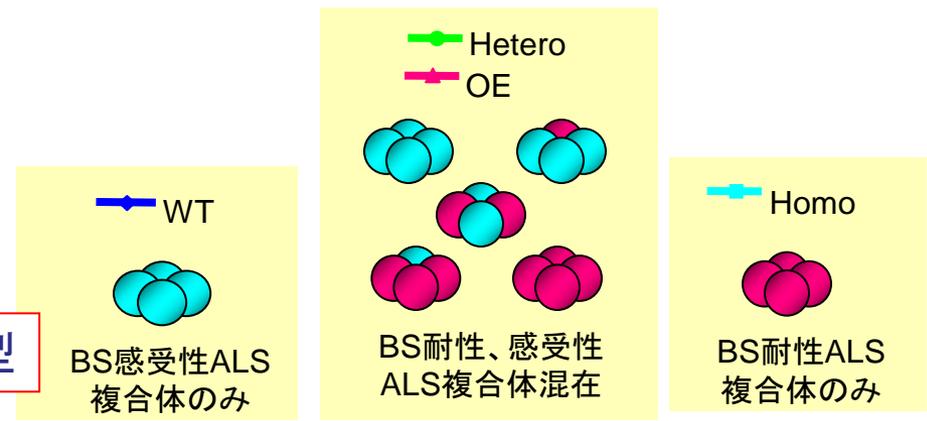
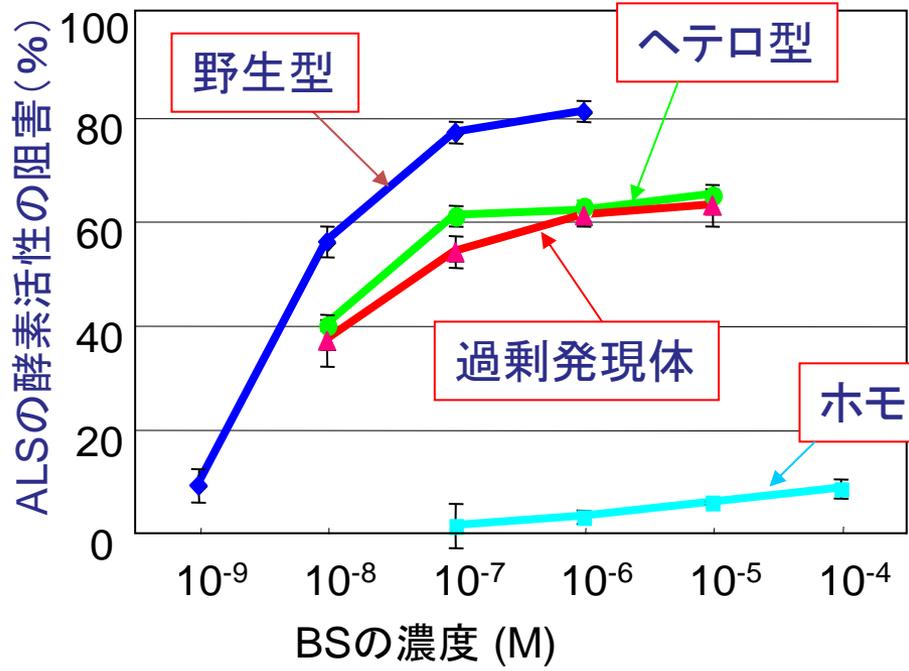
WT



Homo

BS 1 kg/ha

高レベルの除草剤耐性を付与するには野生型のALS酵素を発現させないことが重要である

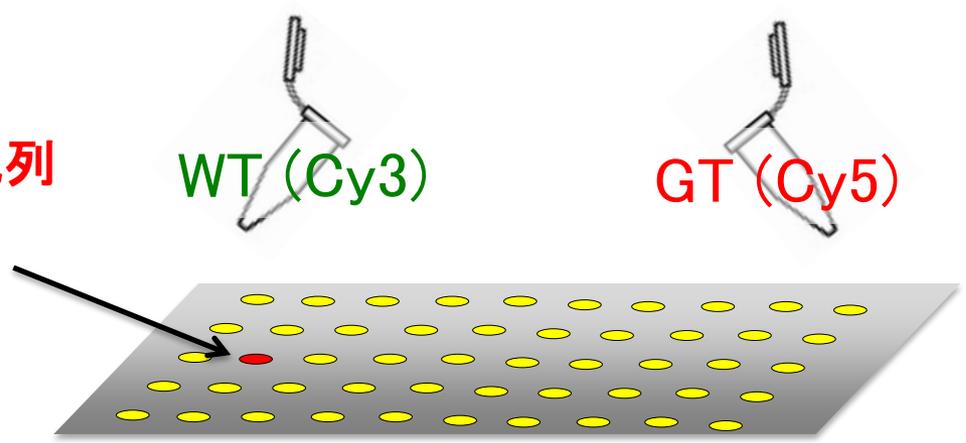
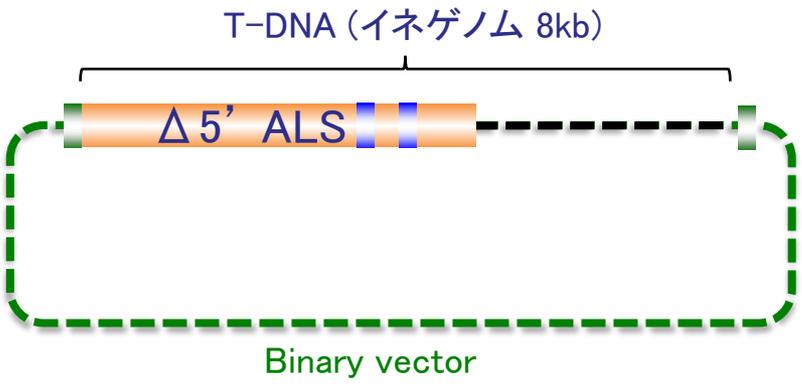


ベクター由来のDNA断片が導入されていないのか？

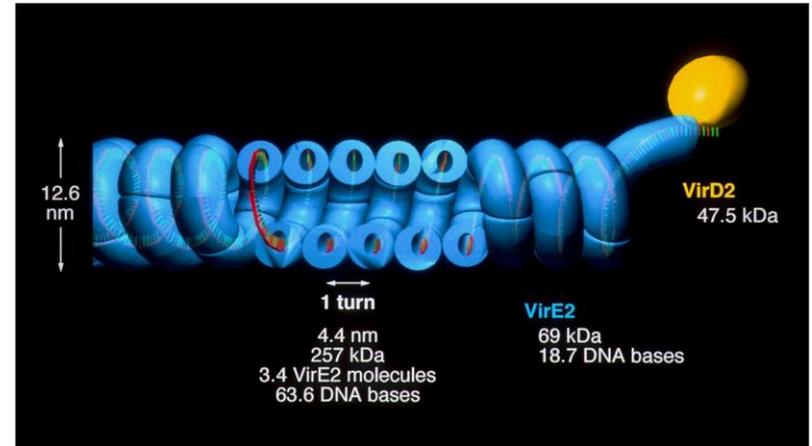
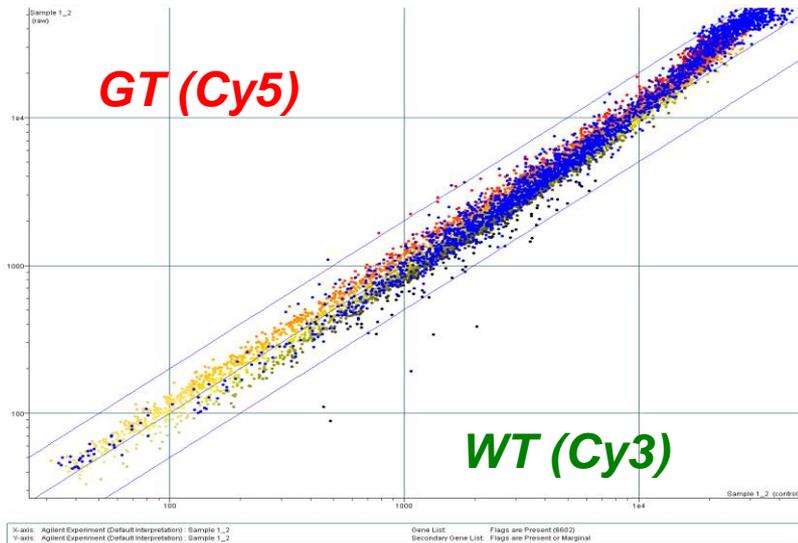
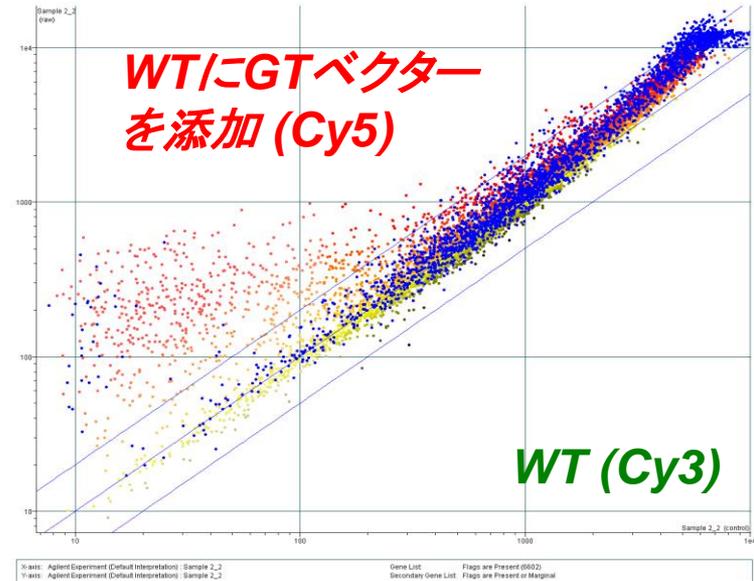
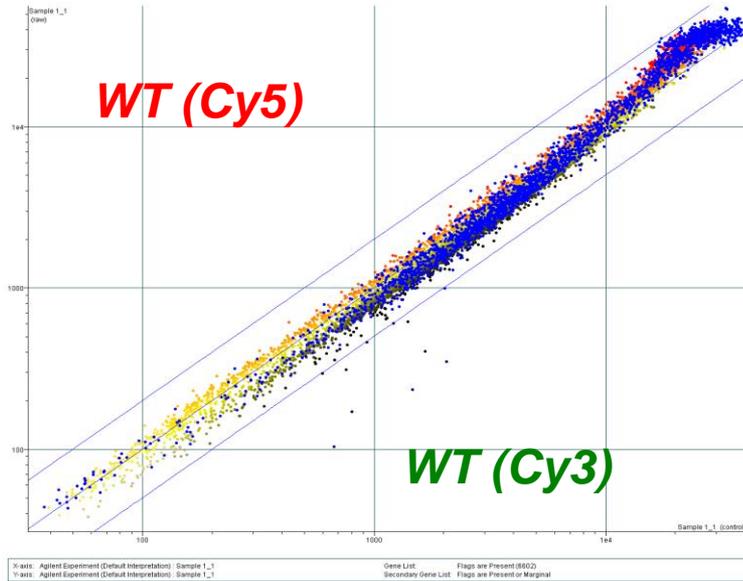
CGH (Comparative Genomic Hybridization) array

Gene targeting vectorの全配列をスポットしたアレイを作製し、異なる蛍光色素でラベリングした野生型とターゲティング個体のgenomic DNAをhybridizeさせる。

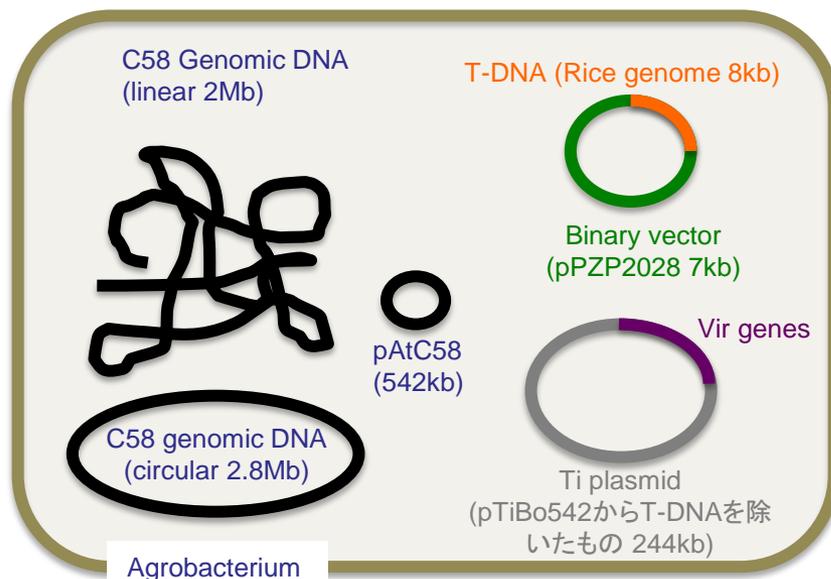
変異体にのみ挿入されている配列があればシグナル比が変化



ベクター由来のDNAの挿入は検出されなかった

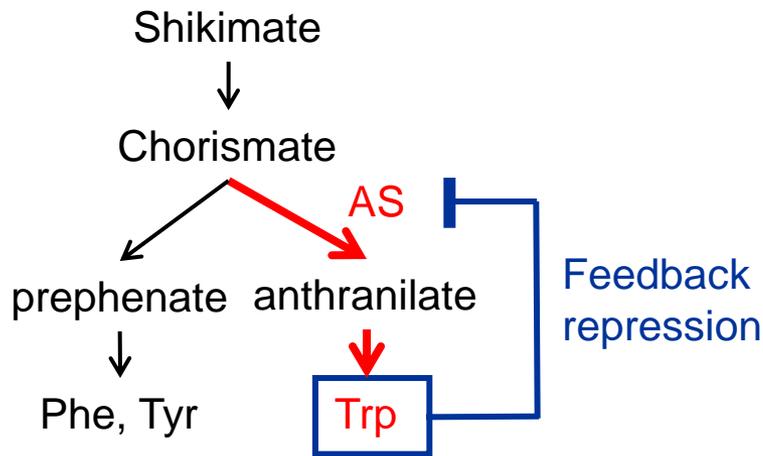


次世代シーケンサーによる解析

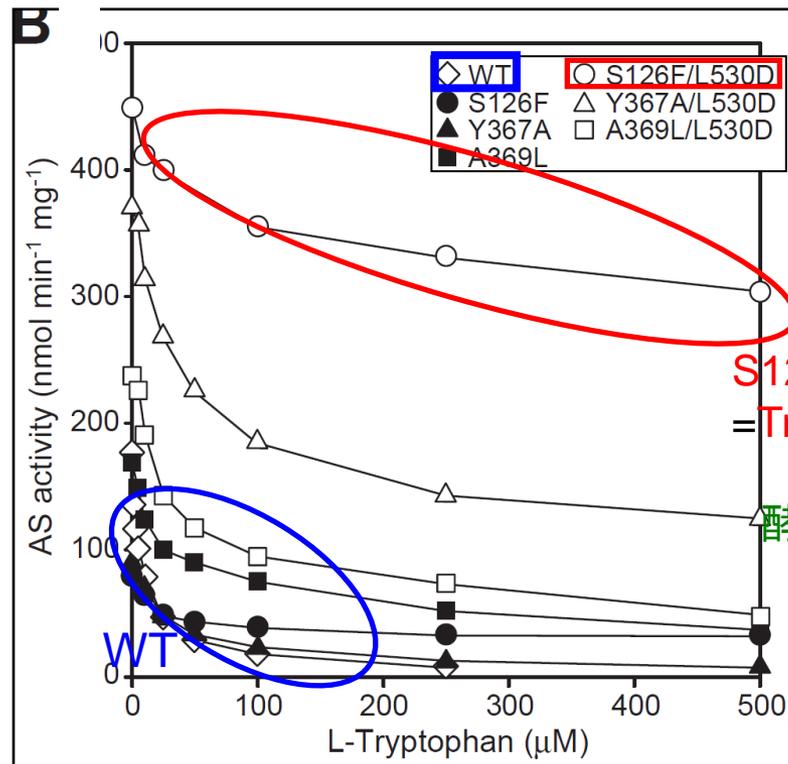


ベクター、アグロバクテリウム由来の塩基配列は検出されなかった。
自然突然変異と同等の変異体と看做せるか？

点変異の導入でお米のトリプトファン含量を増やす (タンパク質工学的知見の活用)



Anthranilate Syntase (AS) は
トリプトファンによって
フィードバック制御を受ける。



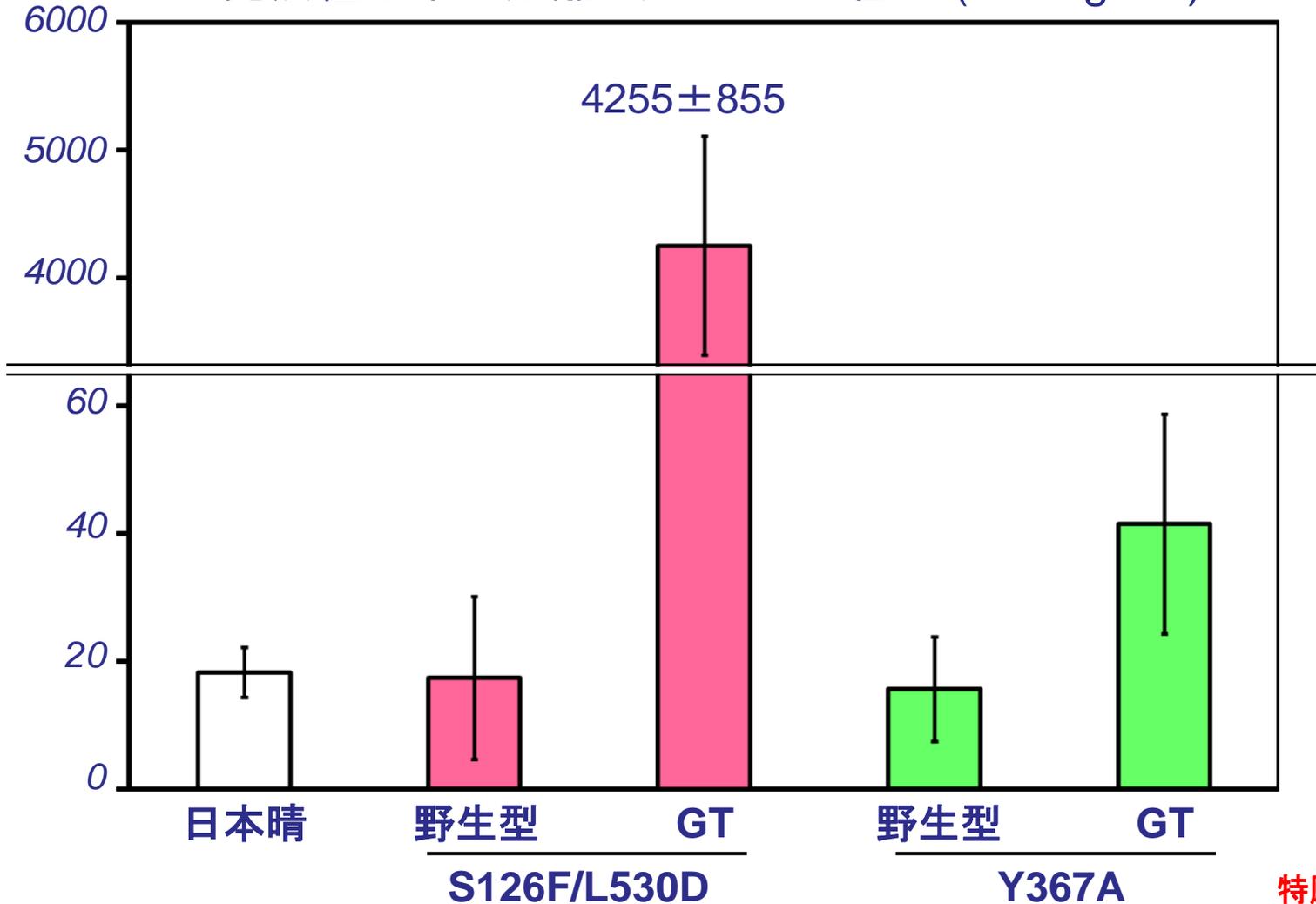
S126F / L530D
= Trp 非感受性
+
酵素活性の向上

Tozawa et al. 2007



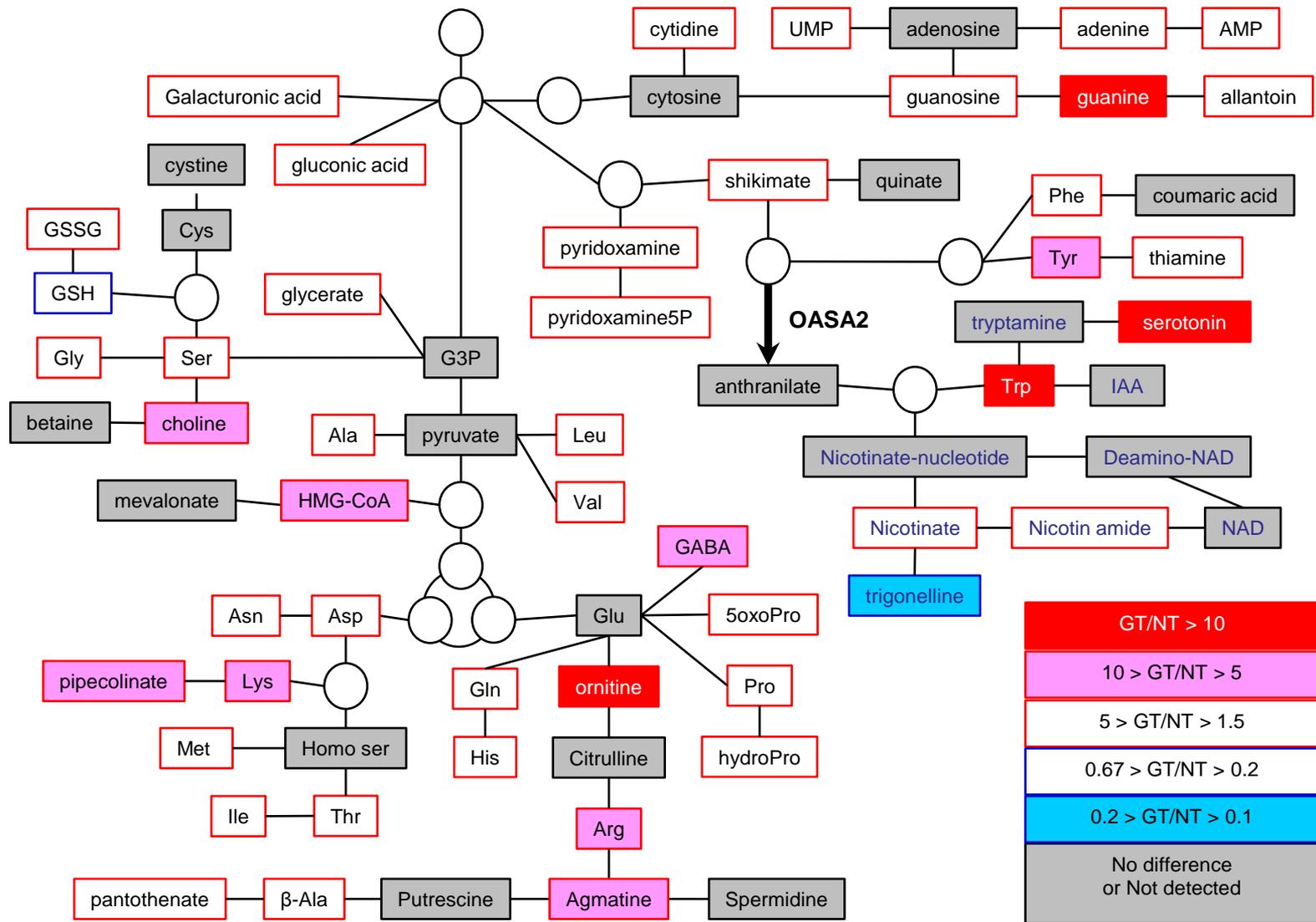
完熟種子の遊離トリプトファン含量は原系統の約230倍

完熟種子中の遊離トリプトファン含量 (nmol/gDW)

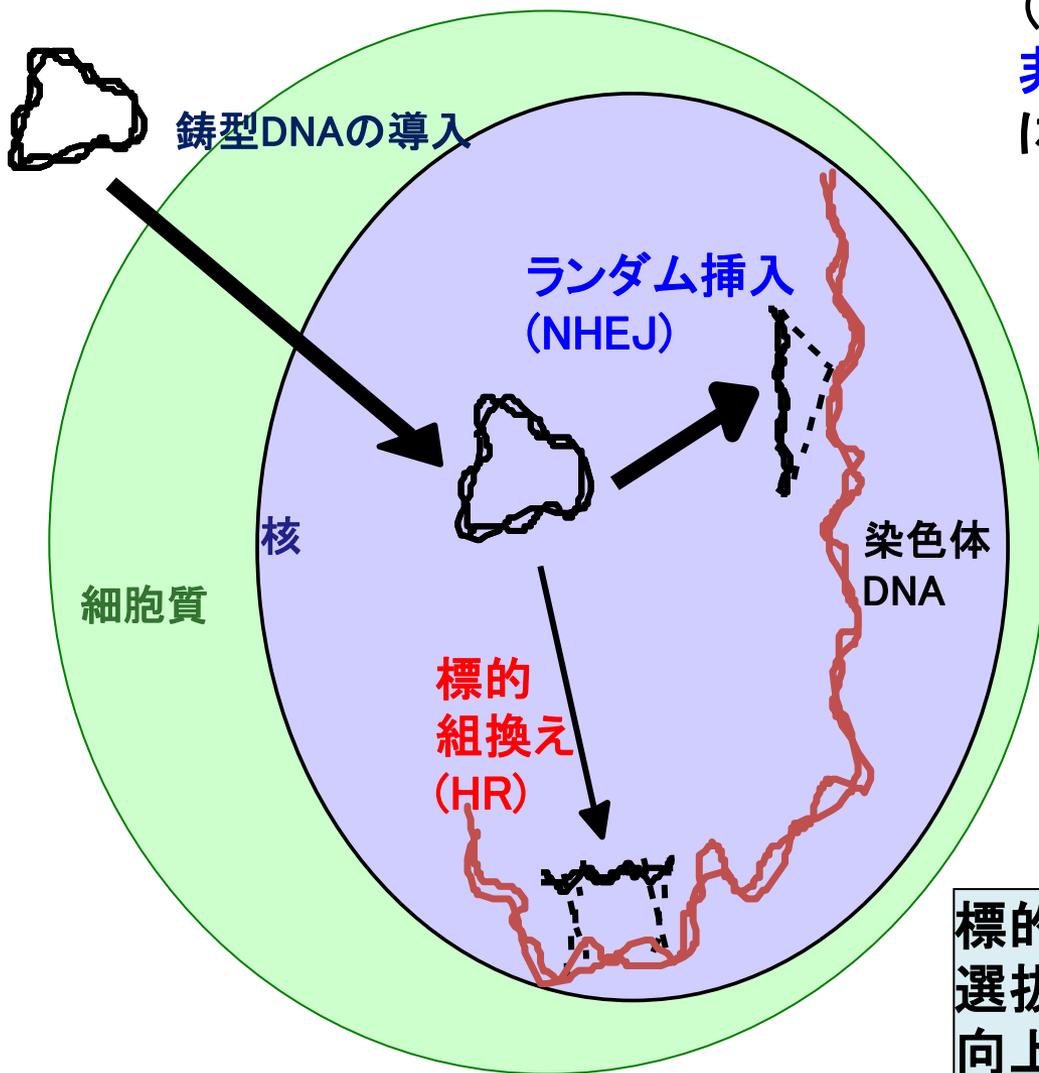


特願: 相同組換えを利用したイネアントラニル酸合成酵素の改変

2塩基の置換で代謝は変わる



高等真核生物では標的組換え(GT)頻度は極めて低い



(1) 外来DNAのランダム挿入は非相同末端結合(NHEJ)経路によって起こる。

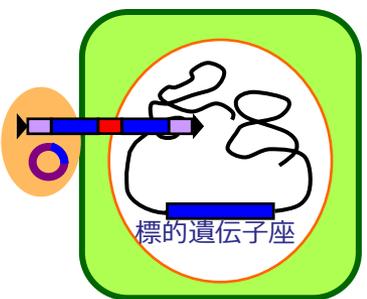
(2) 標的組換え(GT)は鑄型DNAをお手本にした相同組み換え(HR)経路によって起こる。

(3) 高等真核細胞ではランダム挿入 >> 標的組換え
 遺伝子が導入された細胞の $1/1,000 \sim 1/100,000$ が標的組換え

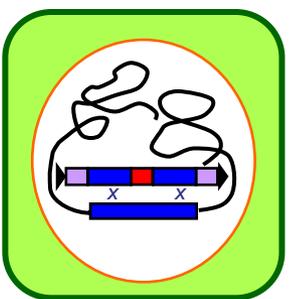
標的組換えが起きた細胞を効率的に選抜することや、相同組み換え頻度を向上させることが必要

ポジティブ・ネガティブ選抜により、標的組換えを起こした細胞を濃縮できる

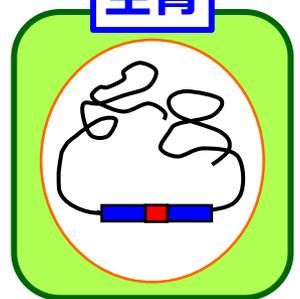
ベクターの導入



相同組換え



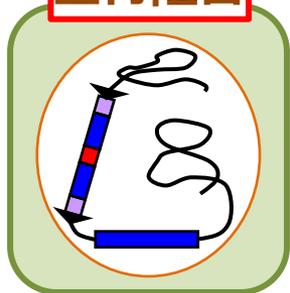
生育



標的組換え細胞



生育阻害



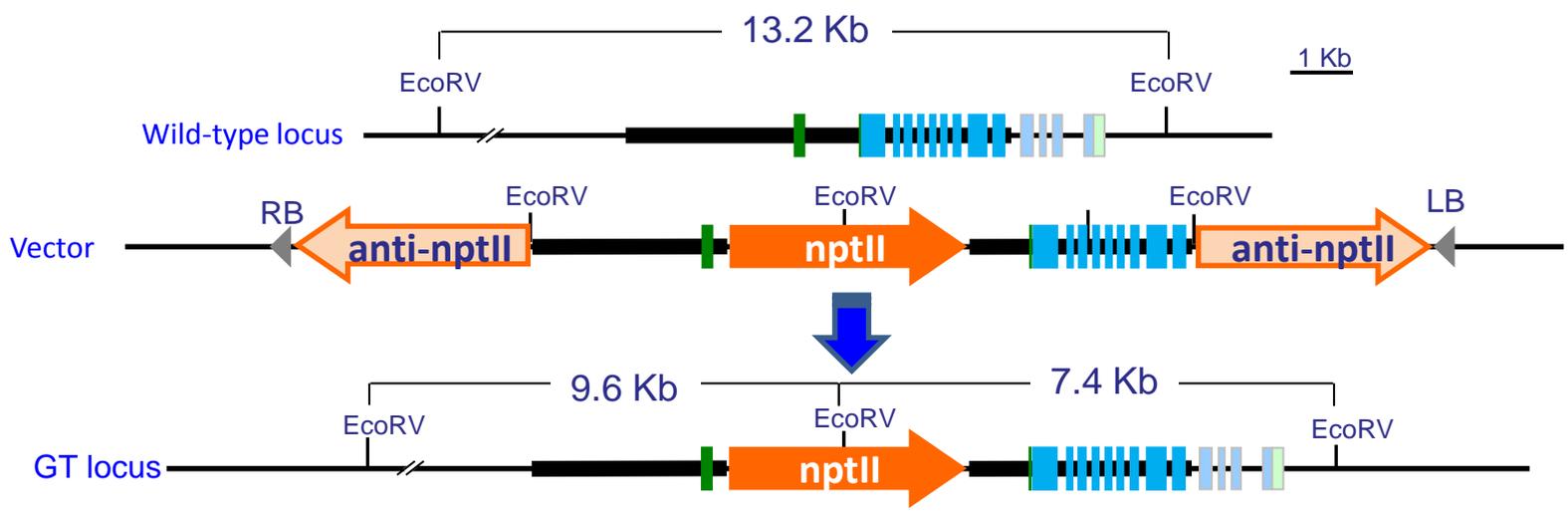
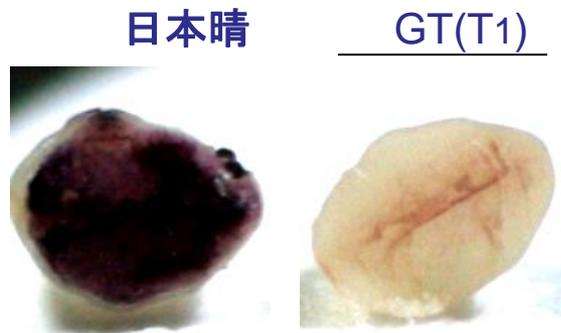
ランダムな遺伝子導入

ポジティブ選抜
マーカー遺伝子

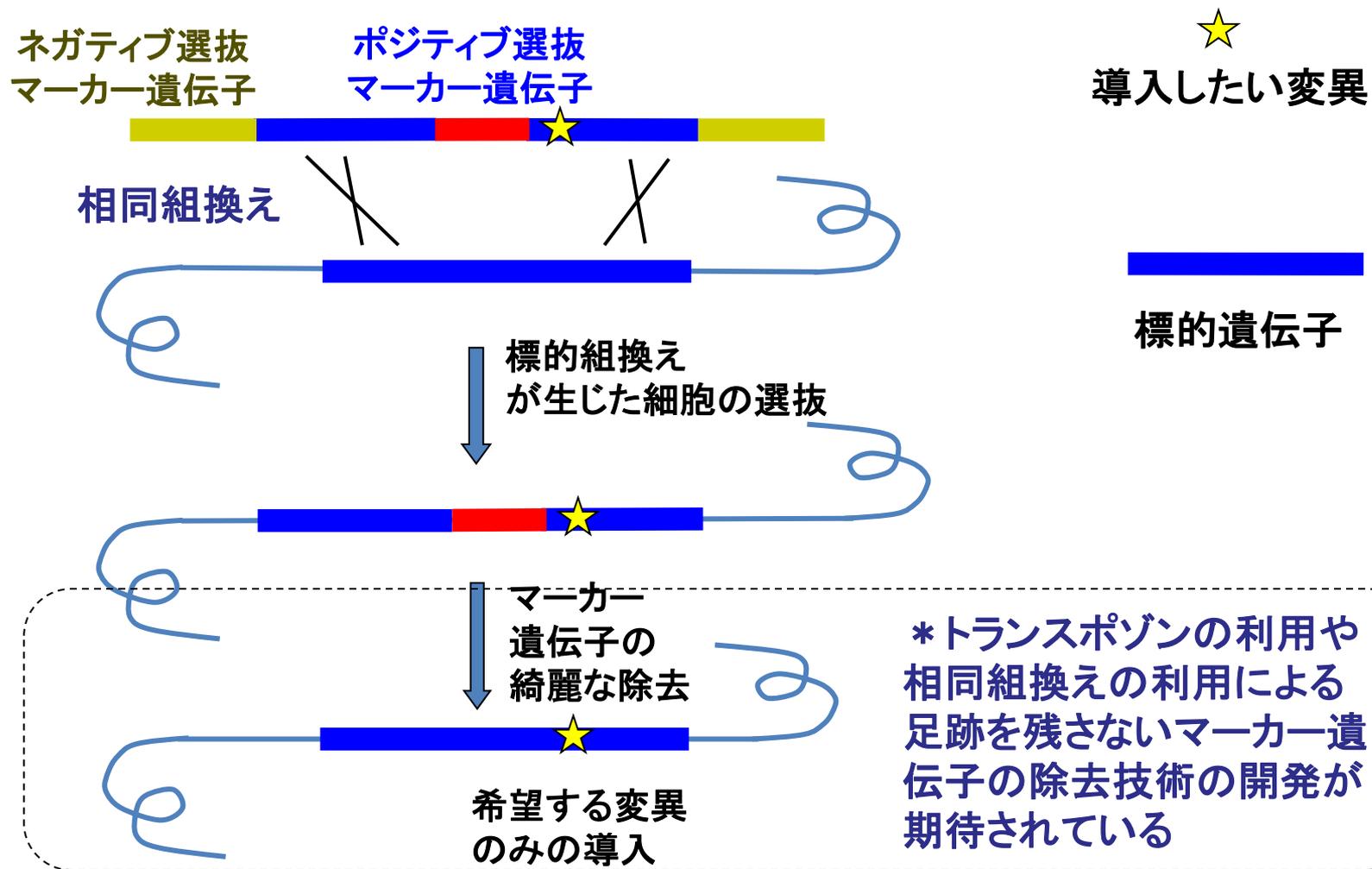
ネガティブ選抜
マーカー遺伝子



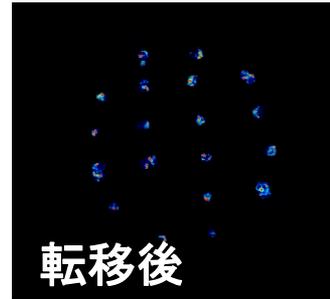
イネ *Waxy* 遺伝子の破壊による餅イネの作成



必要無くなったマーカー遺伝子をどうやって回収するか？

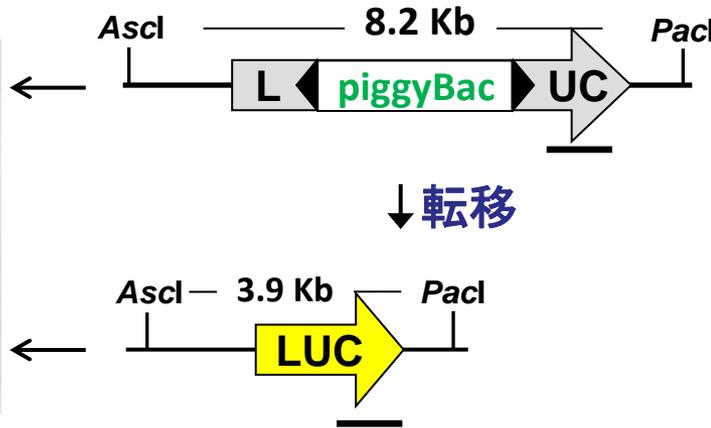
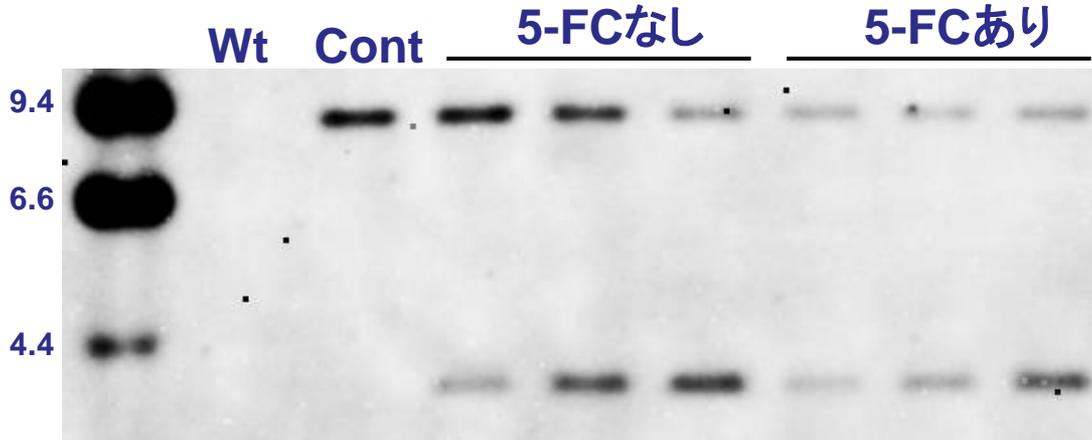


Luciferase
遺伝子の発現



動物のトランスポゾン
が植物で動くことを
発見！

転移酵素発現

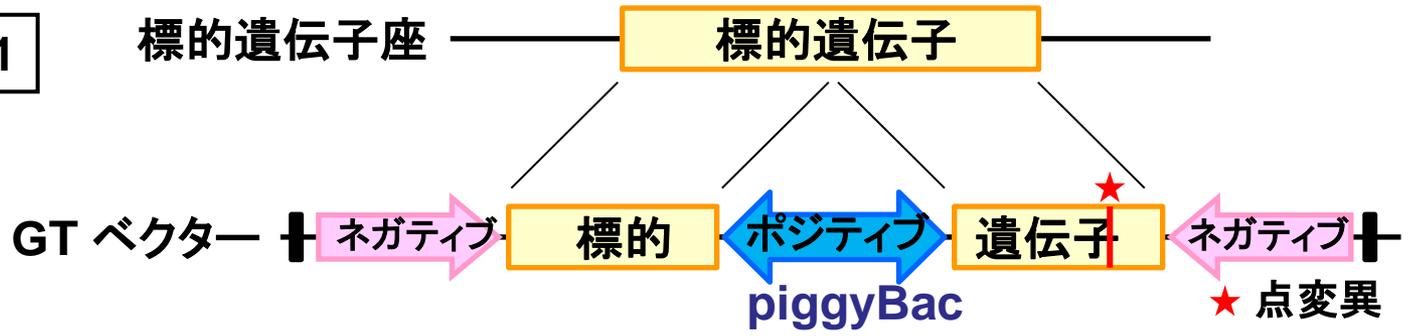


GTTAA ◀ piggyBac ▶ TTAAC

↓ 転移

GTG GTG GCC CCT GTT AAC GAG GAC TAT ATC
V V A P V N E D Y I

ステップ1



ポジティブ・ネガティブ選抜による
標的組換え細胞の選抜

ステップ2



転移酵素
の発現

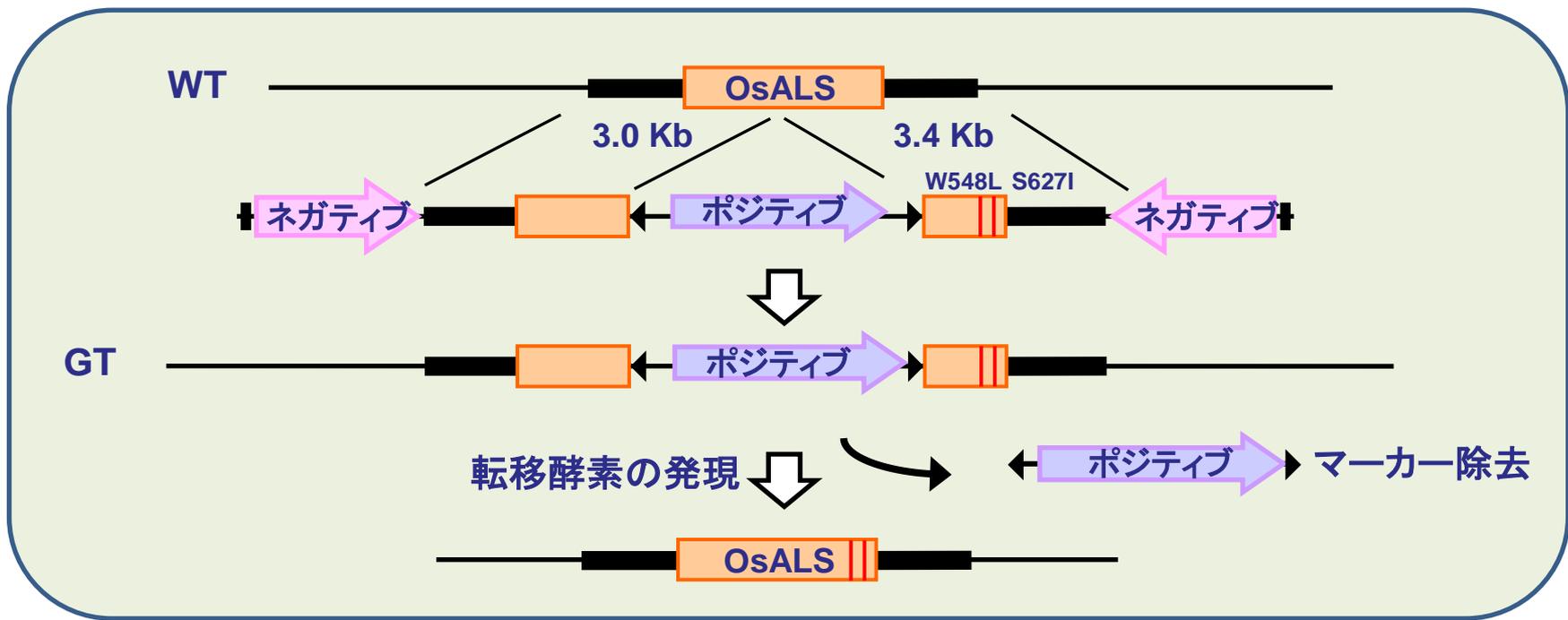
マーカー遺伝子の除去



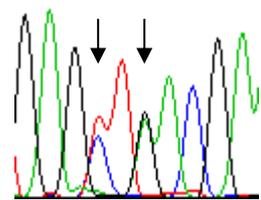
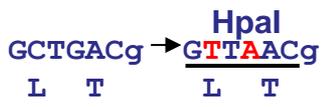
点変異の導入された
標的遺伝子座



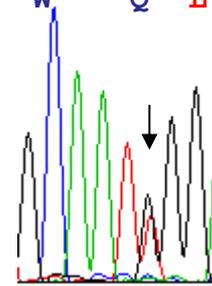
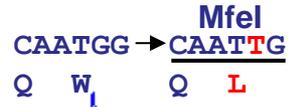
標的遺伝子に必要な変異のみを導入する技術ができた



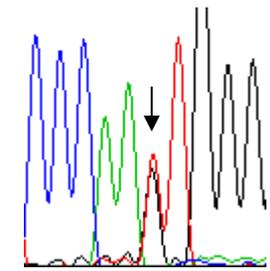
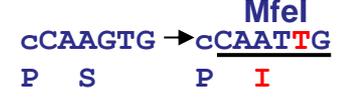
除去サイト



W548L変異



S627I変異



標的組換え技術は育種にどう貢献するか

本手法を用いることにより、**標的とする遺伝子の任意の塩基配列を正確に改変**できる。

①異種の植物・微生物・動物で見出された有用変異を対象とする作物に直接的に導入できる。

②タンパク質工学的手法により見出された有用変異を対象とする作物に直接的に導入できる。

③将来的には、減数分裂期の組換え制御も可能。

標的組換え(今後の研究)

- ・あらゆる植物に適応可能な標的組換え細胞・植物の選抜法の開発
- ・人工制限酵素と鋳型DNAをどうやって細胞に効率的に導入するか
- ・人工制限酵素の発現と鋳型DNAの導入タイミングをどうやって合わせるか
- ・相同組み換えの頻度を人工制限酵素の利用以外でどのように向上させるか
→化学物質による制御

標的組換えの活用(比較ゲノムの知見の利用)

浜ダイコン(耐塩性)



C



浜ダイコンのX遺伝子の00番目の塩基がCであることにより耐塩性が増す

キャベツ



A→C

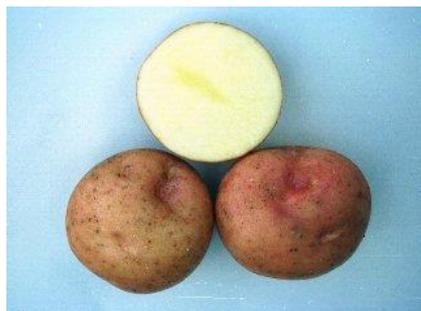


キャベツにもX遺伝子は存在し、その塩基配列は浜ダイコンとほぼ同じである。

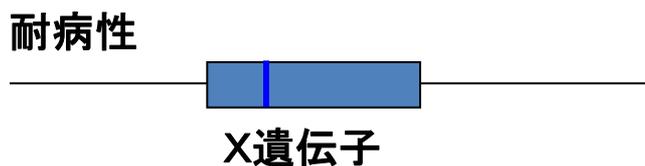
標的組換えによりキャベツのX遺伝子の00番目のAをCに置換する。

標的組換えを活用すれば、栄養繁殖性の植物の育種を効率的に行うことができる

A



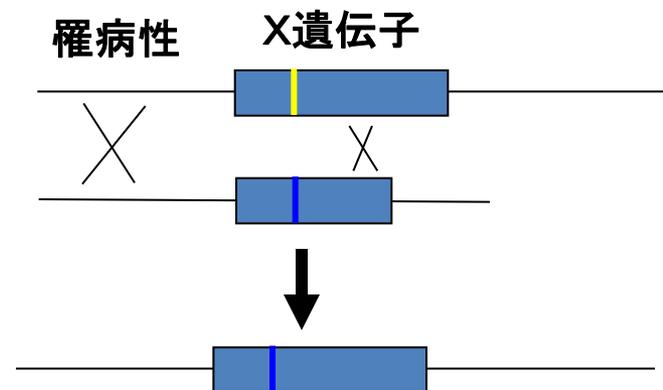
例) 病気に強いが収量は少ない



B

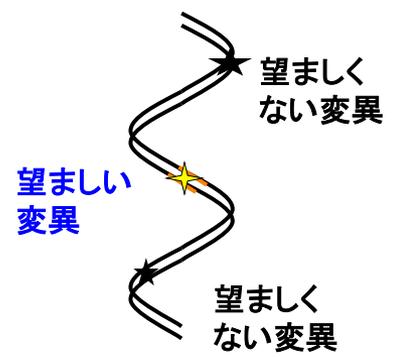
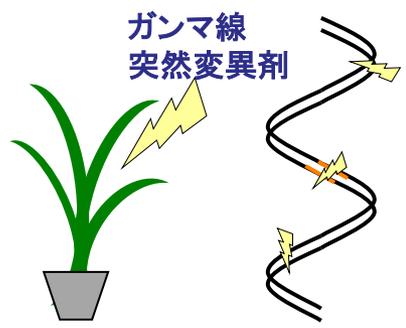


例) 病気に弱いが収量が多い

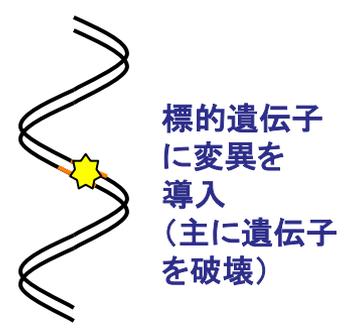
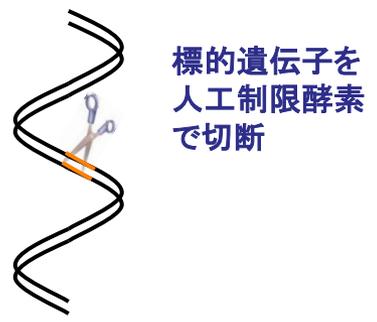


品種Aにおいて見出されている耐病性に関わる1塩基多型を、標的組換えにより品種Bに導入する

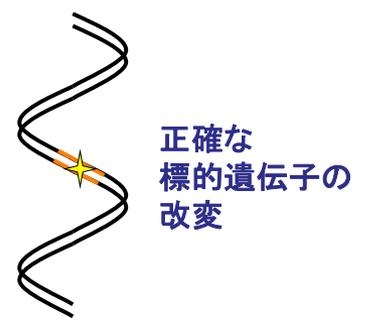
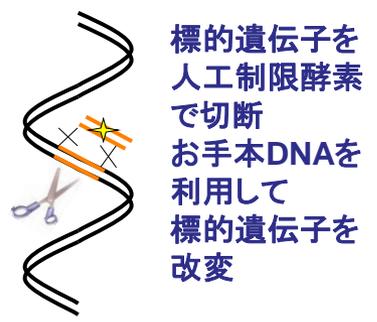
突然変異育種



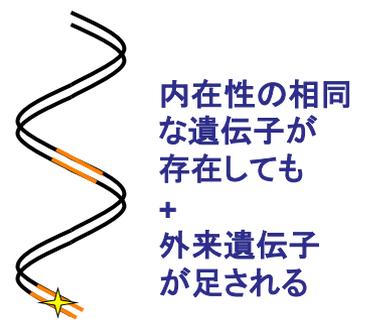
標的変異

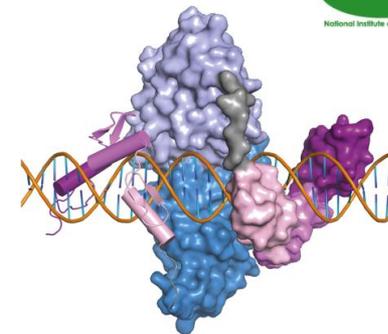
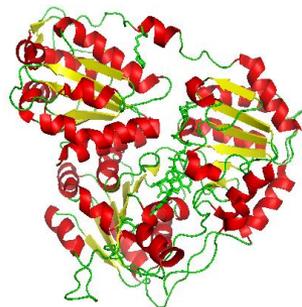


標的組換え



遺伝子導入

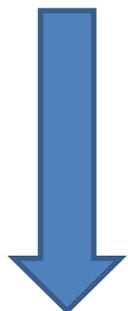




比較ゲノム

タンパク質工学

ゲノム機能改変技術



有用遺伝子・ゲノムをデザイン



ゲノム改変技術を利用した分子育種(有用形質の計画的な導入)

