

氏名(本籍)	えん どう ま さき (千葉県) 遠藤真咲(千葉県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第4329号		
学位授与年月日	平成19年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Analysis of the Parameters Determining the Efficiency of Gene Targeting in Higher Plants (高等植物におけるジーンターゲティング効率制御要因の解析)		
主査	筑波大学教授	農学博士	半田裕一
副査	筑波大学教授	農学博士	西村繁夫
副査	筑波大学教授	農学博士	江面浩
副査	筑波大学教授	農学博士	弦間洋
副査	農業生物資源研究所研究ユニット長	農学博士	土岐精一

論文の内容の要旨

遺伝子相同組み換え (HR) 機構を利用したジーンターゲティング (GT) は標的遺伝子のノックアウトのみならず、標的遺伝子がコードするタンパク質の機能性モチーフやアミノ酸の改変を可能にする精度の高い遺伝子操作技術であり、その確立は今後の植物科学の進展や植物分子育種にとって重要な課題である。しかし、高等植物における内在性遺伝子の GT による改変例は数例にとどまっている。そこで、本研究では、効率的な双子葉及び単子葉植物における内在性遺伝子 GT 系の構築と、GT 効率向上を目的とした HR 効率の制御要因の解析を行った。

分岐鎖アミノ酸の合成に関与する Acetolactate synthase (ALS) は、各種除草剤の標的である。一方、これらの除草剤に対して耐性を付与するアミノ酸置換も複数知られている。そこで、GT による ALS 遺伝子への除草剤 (IM) 耐性点変異の導入および GT 個体の選抜系の構築を試みた。IM 耐性を付与する塩基置換を持つが、葉緑体移行シグナルを含む N 末端を欠損しているために非機能型の ALS 遺伝子断片を、IM 感受性の野生型シロイヌナズナに導入した。IM 耐性個体の選抜を行い、約 78 万粒の形質転換処理種子から IM 耐性を示す 2 個体を得た。詳細な解析の結果、1 個体では GT が、残りの 1 個体では ectopic GT が生じている事が明らかとなった。Ectopic GT は、GT による改変遺伝子が本来のゲノム中の位置とは異なる部位に挿入されている現象であるが、詳細な解析はこれまでなされていなかった。本研究では、塩基配列レベルでその証明を行い、ectopic GT 産物の構造とその生成メカニズムを明らかにした。

シロイヌナズナにおける GT 系と同様に、ALS を標的遺伝子として、イネへの GT を試みた。シロイヌナズナの場合とほぼ同様に、除草剤 (BS) 耐性変異を含むが N 末欠損により非機能型の ALS 遺伝子断片を BS 感受性の野生型イネカルスに形質転換し、BS 耐性カルスの選抜を行った。形質転換に用いた約 1500 塊のカルスから、独立した 72 の BS 耐性個体を獲得し、そのうち 66 個体で GT 産物の存在を確認した。GT により作出された BS 耐性植物体の解析の結果、点変異の導入以外のゲノム改変は生じていない事が確認された。また、酵素化学的解析の結果、GT ホモ個体では高濃度の BS に対しても ALS 酵素活性の阻害はほと

んど見られず、BS 耐性型 ALS 遺伝子の過剰発現体を上回る強い BS 耐性を獲得したことが明らかとなった。この結果は、ALS 阻害型除草剤に対する耐性強化には除草剤感受性の野生型 ALS 遺伝子の排除が重要であることを示すと同時に、このような遺伝子改変を可能にする GT の有効性を証明した。

高等植物で、GT の基本となる遺伝子相同組み換え (HR) が抑制されている要因の一つとして、高度に凝集した染色体構造が考えられる。クロマチン構造をオープンにすることで HR 効率向上の可能性があると考え、複製後の DNA 鎖上へヒストンを運搬する役割を担う CAF-1 欠損株の解析を行った。染色体内で HR が生じると GUS が発現するレポーターシステムを用いて HR 効率を評価した結果、CAF-1 欠損株では HR 効率が野生型の約 40 倍に上昇していることが明らかとなった。また、CAF-1 欠損株では形質転換効率も向上しており、染色体高次構造を制御することにより GT 効率を向上させることが可能なことを示した。また、CAF-1 欠損株では G2 期の遅延や DNA 損傷の増加が生じていることも明らかとなり、CAF-1 欠損株における著しい HR 効率の上昇は、クロマチン構造再構成の遅れがもたらすオープンなクロマチン構造に加え、複製後の DNA 損傷の増加による修復機構の活性化、HR 修復機構が選択されやすい S-G2 期の延長の複合的な効果であると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

ジーンターゲットング (GT) システムは、選抜マーカーや T-DNA のボーダー配列といった外来遺伝子を導入せずに、内在性遺伝子のみを改変することができる技術であり、今後の植物科学の進展や植物の分子育種において重要な研究基盤・技術として期待されている。本論文は、高等植物における効率的なジーンターゲットング (GT) システムの構築と、その効率化のための要因解析を試みたものである。本研究の開始時点において、高等植物における再現性のある内在性遺伝子 GT の成功例はなかったが、著者は双子葉、単子葉それぞれのモデル植物であるシロイヌナズナとイネで GT による除草剤耐性付与に成功した。特にイネへの除草剤耐性付与は、GT による有用形質付与の最初の成功例であり、今後の農学的展開も期待できる。また、シロイヌナズナ CAF-1 欠損株の解析から、染色体構造を制御することによって HR 効率を上昇させ、結果として GT をより効率的に行える可能性を示した。本研究の成果は、植物の基礎生物学として重要な知見を提供したばかりでなく、今後の農作物の分子育種への高い応用性も期待することができ、博士学位論文として高く評価することができる。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。