

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		植物における新規遺伝子ターゲティング法の開発			
研究テーマ (欧文) AZ		Novel method for gene targeting in plants			
研究氏 代表名 者	カタカナ CC	姓) ミキ	名) ダイスケ	研究期間 B	2016 ~ 2018 年
	漢字 CB	三木	大介	報告年度 YR	2018 年
	ローマ字 CZ	Miki	Daisuke	研究機関名	中国科学院
研究代表者 CD 所属機関・職名		中国科学院 上海生命科学研究院 副研究員 (Associate Professor)			
概要 EA (600字~800字程度にまとめてください。)					
<p>任意の配列を改変するゲノム編集技術のひとつである CRISPR/Cas9 が発表された 2012 年以降、劇的なスピードで技術開発が進行し、さまざまな生物種において基礎研究から応用まで広い分野へ展開されている。さらに、動物を含む多くの生物種では、CRISPR/Cas9 をはじめとする配列特異的ヌクレアーゼとドナー配列の組み合わせにより、相同組み換えに依存した遺伝子ターゲティング効率を飛躍的に上昇させた。同様の試みは、植物においても国内外における多くの研究グループが挑戦しており、いくつかの報告例はあるが、どのような研究者でも簡便にゲノム編集を行えるというレベルにはなく、未だにハードルの高い技術のひとつであった。</p> <p>最近、申請者らは、モデル植物のひとつであるシロイヌナズナを用い、簡便且つ正確、ターゲット領域に選択マーカを含まない、非常に効率の高い遺伝子ターゲティング技術を開発した。申請者らが開発した技術の特徴は、他の細胞と比較しゲノムの相同組み換え効率が高い母親の卵細胞および受精後の初期胚特異的プロモーターにより Cas9 を発現させたこと (DD45pro::Cas9)、そして連続形質転換法を用いたことで、5.3~8.3%という非常に高い効率での遺伝子ターゲティングに成功した。この遺伝子ターゲティング技術を用いて、申請者らは、能動的 DNA 脱メチル化酵素である ROS1 にインフレームで GFP および Luc をノックイン、さらに同じ能動的 DNA 脱メチル化酵素ファミリー遺伝子である DME のアミノ酸置換が可能であることを報告した。申請者らが開発した遺伝子ターゲティング技術は、少なくともシロイヌナズナの研究を、今後飛躍的に発展させることができると考えている。</p>					
キーワード FA	CRISPR/Cas9	遺伝子ターゲッティ ング	シロイヌナズナ		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	Efficient Generation of diRNAs Requires Components in the Posttranscriptional Gene Silencing Pathway							
	著者名 ^{GA}	Daisuke Miki	雑誌名 ^{GC}	Scientific Reports					
	ページ ^{GF}	301～	発行年 ^{GE}	2	0	1	7	巻号 ^{GD}	7(1)
雑誌	論文標題 ^{GB}	CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in Arabidopsis using sequential transformation							
	著者名 ^{GA}	Daisuke Miki	雑誌名 ^{GC}	Nature Communications					
	ページ ^{GF}	1967～	発行年 ^{GE}	2	0	1	8	巻号 ^{GD}	9(1)
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

Homologous recombination-based gene targeting is a powerful tool for precise genome modification and has been widely used in organisms ranging from yeast to higher organisms such as *Drosophila* and mouse. However, gene targeting in higher plants, including the most widely used model plant *Arabidopsis thaliana*, remains challenging. Here we report a sequential transformation method for gene targeting in *Arabidopsis*. We find that parental lines expressing the bacterial endonuclease Cas9 from the egg cell- and early embryo-specific DD45 gene promoter can improve the frequency of single-guide RNA-targeted gene knock-ins and sequence replacements via homologous recombination at several endogenous sites in the *Arabidopsis* genome. These heritable gene targeting can be identified by regular PCR. Our approach enables routine and fine manipulation of the *Arabidopsis* genome.