

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18647

研究課題名(和文)CRISPR/Casシステムによるイネいもち病菌のゲノムワイド遺伝子破壊法の確立

研究課題名(英文)Genome editing with CRISPR/Cas system for genome-wide functional genomics in the rice blast fungus

研究代表者

荒添 貴之(Arazoe, Takayuki)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・学術研究員

研究者番号：40749975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：高効率かつ簡便な遺伝子機能解析手法の確立はポストゲノム時代において重要な課題の一つである。本研究では、糸状菌型CRISPR/Cas9システムの開発と、ゲノム編集技術をベースとしたゲノムワイドな遺伝子機能解析手法の確立をおこなった。糸状菌型CRISPR/Cas9を用いることにより、高効率での遺伝子ターゲティング、多重遺伝子破壊、点変異導入およびレポーター遺伝子ノックイン法の確立に成功した。更に、ゲノムを切らずに書き換える新規ゲノム編集技術「Target-AID」の開発に成功した。本技術はイネいもち病菌だけでなく麹菌においても有用であり、様々な糸状菌ゲノム編集ツールとして利用可能である。

研究成果の概要(英文)：Simple and efficient functional gene analysis is a one of the most important issues in the post-genomics era. In this study, we exploited a fungal CRISPR/Cas9 system and applied genome editing to genome-wide functional genomics approaches in the rice blast fungus. Using this system, we established highly efficient gene targeting, multiple gene disruption, base modification, and reporter gene knock-in methods. In addition, we developed a novel genome-editing tool, "Target-AID", which enables targeted nucleotide substitution without a DNA cleavage and donor gene by cytidine deamination. These genome-editing strategies can be used to expand various fundamental approaches and molecular breeding methods in filamentous fungi.

研究分野：植物病理学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR/Cas9 Target-AID ポストゲノム イネいもち病菌 麹菌 網羅的遺伝子破壊 AI

1. 研究開始当初の背景

イネに重要病害を引き起こすイネいもち病菌は、その重要性から植物病原糸状菌として初めて全ゲノムが解読された。本菌における基本的な実験手法は既に確立されており、無性的な生活環の中で単核・単相を維持するモデル植物病原糸状菌である。

昨今の次世代シーケンサーやバイオインフォマティクス研究の発展により、様々な遺伝子情報の抽出や比較ゲノム解析が可能となってきた。一方、得られたゲノム情報に対応した遺伝子機能解析手法については現状十分なものとは言い難い。ポストゲノム研究として、高速かつ高効率な変異体作出が可能となれば、バイオインフォマティクスとの統合により飛躍的に研究スピードを加速させることができる。

任意のゲノム配列を切断して改変するゲノム編集技術は、人工ヌクレアーゼの開発により様々な生物種でその有用性が示されてきている。これまで標的ゲノムへの変異導入が困難であった動植物においてもその成功例が挙げられるようになってきた。特に RNA 誘導型人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas システム (図 1) は標的となる領域に相補的な 20 塩基程度の配列をガイド RNA として発現させることで、Cas9 ヌクレアーゼを特定の配列にリクルートして切断する。ワンステップでのヌクレアーゼ作製が可能であることから、これまでにない網羅的な遺伝子機能解析ツールとなり得る。しかしながら、糸状菌における CRISPR/Cas システムを用いたゲノム編集技術は確立されていなかった。

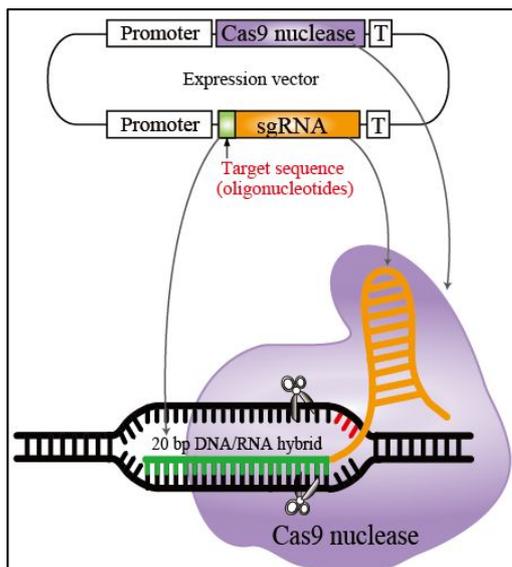


図 1 CRISPR/Cas9 system

2. 研究の目的

本研究では、糸状菌に最適化した CRISPR/Cas システムの開発とそれらをベースとしたゲノムワイドな遺伝子機能解析手法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

ゲノム編集ツールとして多くの生物種で汎用的に用いられている *Streptococcus pyogenes* の Cas9 遺伝子を糸状菌コドン使用頻度に最適化し、構成的発現プロモーター下で高発現させた。ガイド RNA の発現系として、一般的に糸状菌で用いられる polymerase II 系プロモーターと、イネいもち病菌ゲノムから取得した推定 U6 small nuclear RNA 遺伝子上流 500 bp を polymerase III 系プロモーターとして使用した。本システムの DNA 切断活性評価は遺伝子ターゲティング効率により算出し、イネいもち病菌の DNA 修復特性に基づいた様々なゲノム編集方法の確立と網羅的遺伝子機能解析手法への最適化をおこなった。

4. 研究成果

(1) 糸状菌型 CRISPR/Cas9 システムの構築と相同組換え修復を利用したゲノム編集

CRISPR/Cas9 システムに必要な Cas9 とガイド RNA の発現コンストラクトを糸状菌に最適化することで、オールインワン CRISPR/Cas9 システムを用いた糸状菌ゲノム編集に世界に先駆けて成功した。本システムを用いて標的ゲノム配列を切断することにより、相同組換え修復を有意に誘導することができ、高効率遺伝子ターゲティング (36-100%) が可能となった。また、相同組換え修復経路の一つであるシングルクロスオーバーを限定的に誘導することで、高効率標的遺伝子ノックアウト、ノックイン、塩基置換導入法の確立や一度に複数の配列を改変する多重遺伝子破壊法を確立した。

(2) 非相同末端結合修復を介したゲノム編集

(1) より相同組換えによる糸状菌の高効率ゲノム編集に成功したが、これらの手法には鋳型となる相同鎖 (ドナー) 配列がその都度必要となる。そこで、網羅的遺伝子機能解析を視野にいたした相同配列を必要としない、非相同末端結合修復の誘導による遺伝子破壊法の確立を試みた。しかしながら、イネいもち病菌ゲノムでは切断により他の生物にはみられない広域 (数 kb~) に渡る欠失が高い頻度で生じることが明らかになった。このような特性は麹菌においても同様であったことから、糸状菌ゲノム特有の現象であることが考えられた。

(3) Target-AID によるゲノム編集

上記より糸状菌ゲノムは動植物と比較して不安定であり、切断によって予期せぬ構造変異が誘導される可能性が考えられた。そこで、より正確な遺伝子改変手法として、ゲノムを切らずに書き換える「Target-AID」によるゲノム編集法の確立を試みた (図 2)。ヌクレアーゼ活性を不活化させた Cas9 (nCas9) にヤツメウナギ由来の Activation-induced

cytidine deaminase (AID) を付加することで、標的配列上のシトシンの脱アミノ化を促進した。その結果、広域欠失を抑制した点変異導入ならびに数塩基の欠失・挿入の誘導に成功した。さらに、AID の脱アミノ化後の修復機構の一つであるウラシルグリコシレーション反応を Uracil glycosylation inhibitor により阻害することで、相同鎖を用いることなく高効率にピンポイント変異を導入することができた。また本手法は麹菌においても有用であった。

確立したゲノム編集技術のベースとなる糸状菌型 CRISPR/Cas9 システムは、Golden Gate Cloning 法 (Cermak et al., 2011) によるワンステップでの標的配列特異的なベクターの効率が可能であり、網羅的な遺伝子機能解析に広く利用可能である。

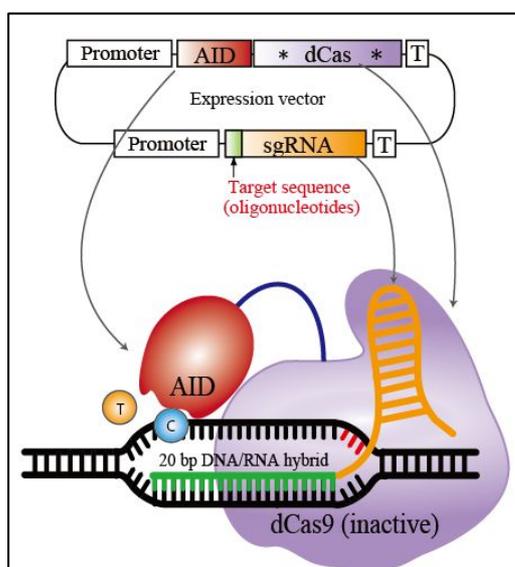


図2 Target-AID による塩基変換

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

1) Arazoe, T., Miyoshi, K., Yamato, T., Ohsato, S., Arie, T. and Kuwata, S. (2015) Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnology and Bioengineering*. 112: 2543-2549. 査読有

2) Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., Mochizuki, M., Miyabe, A., Araki, M., Hara, K., Shimatani, Z. and Kondo, A. (2016) Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune system. *Science*. aaf8729. 査読有

3) Mizutani, O., Arazoe, T., Toshida, K., Hayashi, R., Ohsato, S., Yamato, T.,

Kuwata, S. and Yamada, O. (2017) Detailed analysis of targeted gene mutations caused by the Platinum-Fungal TALENs in *Aspergillus oryzae* RIB40 strain and *ligD* disruptant. *Journal of Biotechnology and Bioengineering*. 3:287-293. 査読有

4) Shimatani, Z., Kashojiya, S., Takayama, M., Terada, R., Arazoe, T., Ishii, H., Teramura, H., Yamamoto, T., Komatsu, H., Miura, K., Ezura, H., Nishida, K., Ariizumi, T. and Kondo A. (2017) Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*. 35:441-443. 査読有

5) Wakai, S., Arazoe, T., Ogino, C. and Kondo, A. (2017) Future insights in fungal metabolic engineering. *Bioresource Technology*. doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.095. 査読有

6) Arazoe, T., Nishida, K. and Kondo, A. (2017) Targeted nucleotide substitution in mammalian cell using Target-AID. *Bioprotocol*. DOI:10.21769/BioProtoc.2339. 査読有

[学会発表](計20件)

1) 荒添貴之, 三好健之介, 大和澄, 小川哲生, 大里修一, 有江力, 桑田茂 (2015) 糸状菌型 CRISPR/Cas システムを用いたイネいもち病菌における高効率標的遺伝子ノックアウト・ノックイン・塩基置換導入法. 第15回糸状菌分子生物学コンファレンス, ルミエール府中, 府中市, 11月19日

2) Arazoe, T., Nishida, K., Kuwata, S. and Kondo, A. (2015) Genome editing in the rice blast fungus with CRISPR/Cas9 system. The 6th iBloK Asian symposium (Kobe, Japan, 7th December)

3) 大和澄, 荒添貴之, 三好健之介, 小川哲生, 大里修一, 有江力, 桑田茂 (2016) 糸状菌型 CRISPR/Cas システムの開発とイネいもち病菌における高効率標的遺伝子ノックアウト・ノックイン・塩基置換導入法. 平成28年度日本植物病理学会大会, 岡山コンベンションセンター, 岡山市, 3月22日

4) 水谷治, 荒添貴之, 利田賢次, 林梨咲, 大里修一, 佐久間哲史, 山本卓, 桑田茂, 山田修 (2015) Platinum-Fungal TALENs を用いた麹菌におけるゲノム編集. 第67回日本生物工学会大会, 城山観光ホテル, 鹿児島市, 10月26日

5) Nishida, K., Banno S., Arazoe, T.,

Shimatani, Z. and Kondo, A. (2015) Targeted base exchange-mediated genome editing. BMB2015 (Kobe, Japan, 1st December)

6) 富田成美, 小川哲生, 荒添貴之, 桑田茂, 草野好司, 大里修一 (2016) イネいもち病菌の相同組換え修復に関する SRS2 複合体の相互作用領域. 平成 28 年度日本植物病理学会関東部会, 横浜国立大学, 横浜市, 9 月 29 日

7) 西田敬二, 荒添貴之, 島谷善平, 坂野聡美 (2016) 切らないゲノム編集技術. 日本植物学会第 80 回大会, 沖縄コンベンションセンター, 宜野湾市, 9 月 16 日

8) 荒添貴之, 西田敬二, 島谷善平, 桑田茂, 近藤昭彦 (2016) 糸状菌のゲノム編集と応用~イネいもち病菌をモデルとして~. 日本植物学会第 80 回大会, 沖縄コンベンションセンター, 宜野湾市, 9 月 16 日

9) 荒添貴之, 西田敬二, 島谷善平, 坂野聡美, 近藤昭彦 (2016) ゲノムを切らずに書き換える「Target-AID」によるゲノム編集. 日本ゲノム編集学会第 1 回大会, 広島国際会議場, 広島市, 9 月 7 日

10) 水谷治, 荒添貴之, 利田賢次, 林梨咲, 大里修一, 佐久間哲史, 山本卓, 桑田茂, 山田修 (2016) 麹菌野生株及び ligD 遺伝子破壊株を宿主とした Platinum-Fungal TALENs を用いたゲノム編集. 日本ゲノム編集学会第 1 回大会, 広島国際会議場, 広島市, 9 月 7 日

11) 水谷治, 荒添貴之, 利田賢次, 林梨咲, 大里修一, 佐久間哲史, 山本卓, 桑田茂, 山田修 (2016) 非相同末端結合に関する遺伝子破壊株における麹菌の TALENs を用いたゲノム編集. 第 68 回日本生物工学会大会, 富山国際会議場, 富山市, 9 月 28 日

12) 荒添貴之 (2016) ゲノムを切らずに書き換える新規ゲノム編集技術の確立と展開. 動物生殖内分泌組織の機能制御と高度環境適応植物のデザインのための研究戦略シンポジウム, 明治大学, 川崎市, 11 月 05 日

13) 荒添貴之, 西田敬二, 田畑麻由良, 若井暁, 荻野千明, 秦洋二, 近藤昭彦 (2016) 麹菌におけるゲノムを切らずに書き換える新規ゲノム編集ツールの確立. 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 宇治市, 11 月 18 日

14) Arazoe, T., Nishida, K., Tabata, M. and Kondo, A. (2017) Targeted nucleotide editing in filamentous fungus, *Aspergillus*

oryzae. The 7th iBioP Asian Symposium (Busan, Korea, 16th December)

15) Arazoe, T., Nishida, K., Tabata, M. and Kondo, A. (2017) Targeted nucleotide editing in filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*. The 8th iBioK International Symposium (Kobe, Japan, 2nd February)

16) 伊東広哉, 松井真, 三浦愛, 荒添貴之, 熊谷俊高, 西田敬二, 玉野孝一, 町田雅之, 柴田孝 (2017) HMG-CoA reductase inhibitor FR901512 高生産への鍵遺伝子 SREBPs に関する解析. 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都女子大学, 京都市, 3 月 17 日

17) 西田敬二, 荒添貴之, 坂野聡美, 近藤昭彦 (2017) 塩基変換による切らないゲノム編集. 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都女子大学, 京都市, 3 月 17 日

18) 荒添貴之, 西田敬二, 田畑麻由良, 平岡大輝, 中馬いづみ, 土佐幸雄, 近藤昭彦 (2017) ゲノムを切らずに書き換えるイネいもち病菌における新規ゲノム編集. 平成 29 年度日本植物病理学会大会, アイーナ・いわて県情報交流センター, 盛岡市, 4 月 27 日

19) 飯田藍, 大和澄, 荒添貴之, 大里修一, 桑田茂 (2017) CRISPR/Cas9 システムを利用した相同組換えによる多重遺伝子同時改変の試み. 平成 29 年度日本植物病理学会大会, アイーナ・いわて県情報交流センター, 盛岡市, 4 月 27 日

20) 水谷治, 利田賢次, 林梨咲, 渡嘉敷直杏, 荒添貴之, 西田敬二, 和田悠作, 織田健, 岩下和裕, 山田修, 外山博英 (2017) 麹菌におけるゲノム編集ツールの違いによる大規模欠失の検討. 千里ライフサイエンスセンター

〔図書〕(計 1 件)

山本卓, 石野良純, 近藤昭彦, 西田敬二, 荒添貴之, 丹波隆介, 坂本尚昭, 秦松清人, 川原敦雄, 鈴木賢一, 宮坂佳樹, 真下知士, 安本周平, 村中俊哉, 宮本達雄, 田中伸和 (2016) 「ゲノム編集入門-ZFN・TALEN・CRISPR-Cas9-」 裳華房, 229 ページ

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ゲノム配列改変技術における変異導入効率の向上方法、及びそれに用いる分子複合体

発明者: 荒添貴之, 西田敬二, 島谷善平, 近藤昭彦

権利者: 国立大学法人神戸大学

種類：特許
番号：特願 2016-085631
出願年月日：2016 年 4 月 21 日
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織
(1)研究代表者
荒添 貴之 (Takayuki Arazoe)
神戸大学大学院・科学技術イノベーション研
究科・学術研究員
研究者番号：40749975