

令和 3 年 10 月 12 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07854

研究課題名(和文) 有用針葉樹種における遺伝子組換えを伴わないゲノム編集技術の確立

研究課題名(英文) Development of a gene recombination technique-free genome editing system in coniferous species

研究代表者

七里 吉彦 (Nanasato, Yoshihiko)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 森林バイオ研究センター・主任研究員 等

研究者番号：80461292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：狙ったゲノムDNA配列を自在に改変する「ゲノム編集技術」について、植物では、遺伝子組換えによりゲノム編集発現遺伝子を一旦導入し、続いて導入遺伝子を除去するための交配と後代選抜が必要なため、成育期間の長い樹木では実用的とはいえない。

本研究では、スギ細胞を用いて遺伝子組換えを伴わないゲノム編集方法の確立を目指した。具体的には、膜透過性ペプチドであるポリヒスチジンペプチドを介して、ゲノム編集要素を細胞に一過的に導入して標的領域の改変を試みた。研究期間全体を通じて、1) スギ細胞への効率良いタンパク質導入方法を確立し、2) ゲノム編集要素Cas9の導入とそれに伴う標的領域の塩基欠損が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物におけるゲノム編集は現状では遺伝子組換えと交配、後代選抜の工程が前提となっており、適用できる植物種が非常に限定されている。タンパク質を一過的に導入する直接導入は上記の工程を全て省略可能であるため魅力的な方法ではあるが、細胞壁に覆われている植物細胞に有効な直接導入法は現在まで確立されていなかった。本法は特殊な機器も不要であるため、様々な植物種で適応が期待でき、植物科学全体の発展に貢献する技術といえる。

研究成果の概要(英文)：Genome editing, to modify target DNA sequences at specific locations, has been explosively spreading to many species by the development of the CRISPR/Cas9 system. Because programmable nucleases are usually integrated into the genome in plant species, crossing is indispensable to obtain transgene-free null segregant lines. However, removal of transgenes requires over 10 years in coniferous tree species, and genome editing via transgenic techniques is not practical for tree species. In this study, we established a genome editing method without using transgenic techniques in *Cryptomeria japonica*. We tried to use a novel cell penetrating peptide, polyhistidine peptides, to introduce CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins into embryogenic tissues derived from *C. japonica*. We succeeded in introducing various proteins into the cells. Also, we succeeded in introducing CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins in the cells, and confirmed the deletion of bases in the target region due to targeted mutagenesis.

研究分野：森林科学

キーワード：ゲノム編集 直接導入 スギ

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

人工制限酵素を用いて狙ったゲノム DNA 配列を自在に改変する「ゲノム編集」は、現在様々な生物種において基礎科学から医療、育種にまで広範囲に利用が広がっている。植物でゲノム編集システムを作出する定法は、遺伝子組換えによりゲノム編集に必要な要素を遺伝子発現カセットの形でゲノム DNA に導入する方法である。この方法では、導入した外来遺伝子を除去するために、交配と後代選抜という工程がとられる。しかし、幼若期間の長い樹木において、これらの作業は 10 年単位の期間が必要であるため、実用利用は困難であるといえる。そのため、樹木でゲノム編集技術を実用化するためには、遺伝子組換えを伴わないゲノム編集技術の確立が必要である。

2. 研究の目的

スギの不定胚形成細胞（以下、スギ細胞）を樹木細胞のモデルとし、遺伝子組換えを伴わないゲノム編集技術確立を目指した。我々はその手法として、ゲノム編集の要素をタンパク質の形で一過的に細胞に導入する「直接導入」に注目した。直接導入には遺伝子銃やエレクトロポレーターといった特殊機器を利用した例が報告されていたが、本研究では汎用性の観点から、細胞膜透過性ペプチド（以下、CPP）の利用を試みた。即ち、CPP とタンパク質を融合する、または混合するなどしてスギ細胞へタンパク質を導入する方法を採用した。ゲノム編集のシステムとして、植物での利用例が多く、効率が良い CRISPR/Cas9 システムを選択した。このシステムでは、人工制限酵素として Cas9 タンパク質、標的部位の認識分子として gRNA がそれぞれ用いられる。

3. 研究の方法

(1) CPP 融合赤色蛍光タンパク質の導入

アミノ酸の一種であるヒスチジンが連続したポリヒスチジンペプチド（Kimura et al., 2017、以下、PHPs）は、スギ細胞に効率良く透過することから（図 1）、PHPs がタンパク質の直接導入に有用と推測した。ゲノム編集の要素を直接導入する前段階の試験として、分子量が 27 kDa と比較的小さく、蛍光観察により細胞内での局在が容易に判別可能な赤色蛍光タンパク質（RFP）を選定し、PHPs を介した直接導入を試みた。ヒスチジンが 8~20 個連続した PHPs をそれぞれ RFP の 3'末端に融合したりコンビナントタンパク質をスギ細胞にそれぞれ導入し、PHPs の種類による RFP 導入効率への影響を検証した。蛍光顕微鏡にて細胞内に移行した RFP を観察した。さらに細胞内に移行した RFP 量を定量化するため、RFP 導入試験後の細胞の細胞壁を除去し（プロトプラスト化）、細胞の外側に付着した RFP を取り除いてから、蛍光プレートリーダーにて細胞内に移行した RFP 量を数値化した。

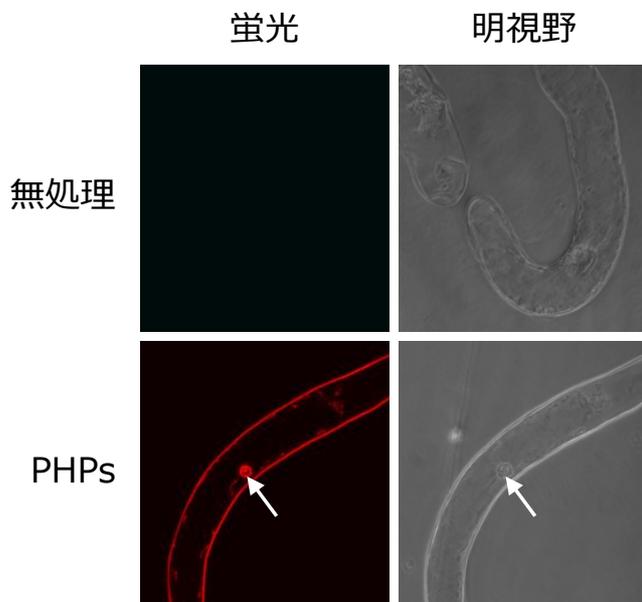


図 1 スギ細胞へのポリヒスチジンペプチド（PHPs）の取り込み

スギ細胞に蛍光色素 TAMRA で標識した PHPs を添加し、25°C で 12 時間共存培養した。細胞内に移行した PHPs を赤色蛍光で観察した。PHPs の一部が白矢印で示した核に蓄積していることが確認できる。

(2) バイオアッセイによるタンパク質の導入の定量化

細胞に移行したタンパク質量を生化学的な方法で定量化する目的で、アデニル酸シクラーゼ（以下、CyaA）の導入を試みた。本酵素は細胞内でカルモジュリンと結合し、細胞内の ATP を cAMP とピルビン酸に変換する。この反応は生細胞にのみ起こるもので、直接導入の効率が正確に定量化できることが期待できる。RFP-CyaA-PHPs にマルトース結合タンパク質を連結したりコンビナントタンパク質（分子量 102 kDa）を大腸菌で発現させ、スギ細胞への導入を試みた。導入条件は、タンパク質濃度 5 μ M、室温（25~27°C）にて 24 時間の共存培養とした。タンパク質導入後の細胞について、ELISA 法により cAMP 量を定量化すると共に、上述（1）の方法で RFP 量を数値化し、各試験区におけるタンパク質導入効率を定量化した。

(3) CPP 融合 Cas9 タンパク質の効率的な調製方法

Cas9 に PHPs を連結したリコンビナントタンパク質の調製方法を検討した。大腸菌をリコンビナントタンパク質の発現宿主として選び、ベクター構造や培養温度、タンパク質の精製方法などを検討して最適化した。

(4) Cas9 の直接導入によるゲノム編集の誘導

Cas9-PHPs 融合タンパク質と、葉緑体生成に関与する遺伝子 Cj#1 を標的とした gRNA を室温で 30 分間共存することで、Cas9-gRNA 複合体を調製した。その後、Cas9-gRNA 複合体とスギ細胞を 24 時間共存させた。標的領域付近の DNA 配列を PCR で増幅し、その断片長をフラグメント解析に供することで、ゲノム編集による標的領域の改変の有無を判定した。クローニングにより塩基配列を調査し、ゲノム編集の様式を解析した。

4. 研究成果

(1) CPP 融合赤色蛍光タンパク質の導入

ヒスチジンが 8~20 連続した PHP を RFP に連結したリコンビナントタンパク質を調製し、スギ細胞と 24 時間共存させた。その結果、細胞内に移行した RFP-PHPs はヒスチジン数が 12 以上のものによって顕著に増大することが判明した (図 2a)。また、RFP 導入細胞の生死判定をするために fluorescein diacetate (FDA) 染色を行ったところ、RFP が導入された細胞においても生細胞を示す緑色蛍光が観察されたことから (図 2b)、RFP 導入細胞において生細胞が一定数存在することが明らかとなった。しかし一方で、タンパク質の純度が悪い、導入タンパク質濃度が一定以上の濃さであった場合については、死細胞の割合が増加する傾向がみられた。

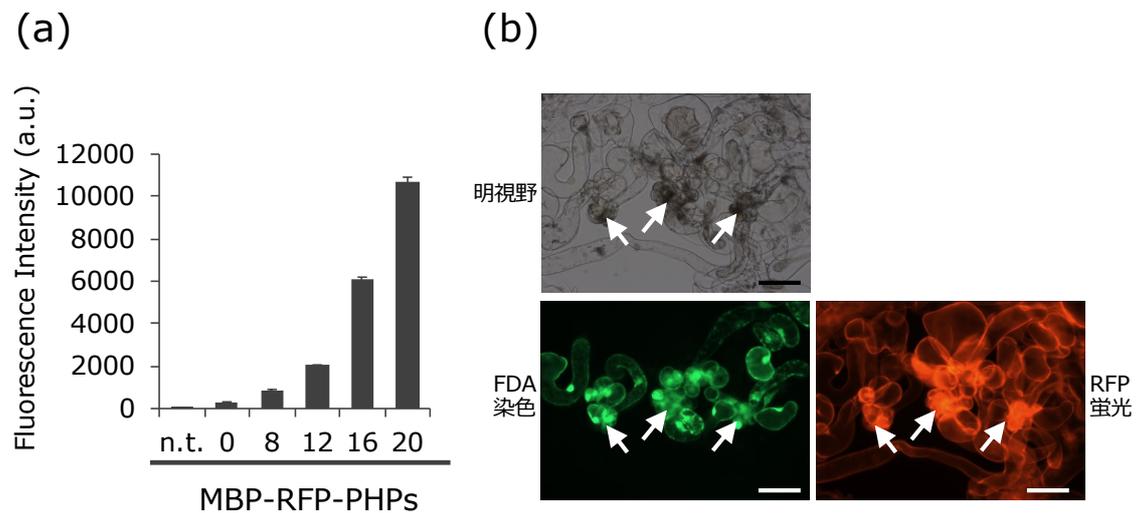


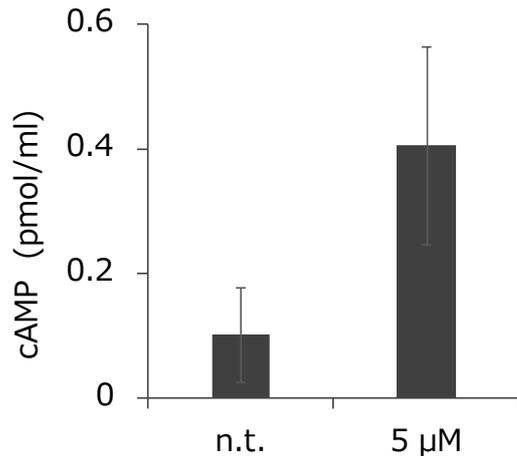
図 2 スギ細胞への RFP-PHPs 融合タンパク質の取り込み

- 8-20 個のヒスチジンを連結した PHPs を融合したリコンビナントタンパク質を 5 μM の濃度にてスギ細胞と 24 時間共存させ、細胞内の RFP 取り込み量を蛍光プレートリーダーにて定量した。
- RFP 取り込み処理後の細胞について FDA 染色による生死判定を行った。RFP が取り込まれた胚性細胞 (白矢印) において、生細胞を示す FDA 蛍光が顕著に観察された。スケールバー、100 μm 。

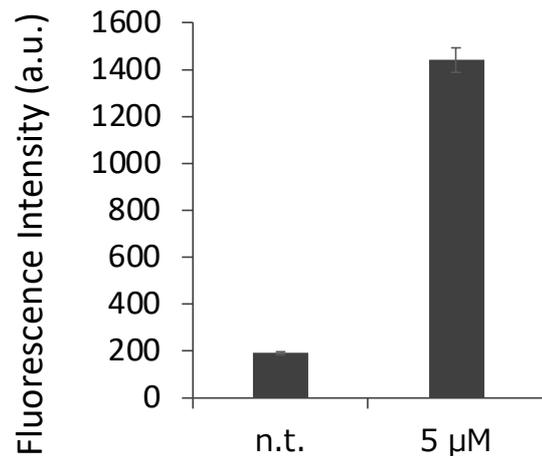
(2) バイオアッセイによるタンパク質の導入の定量化

RFP-CyaA-PHPs にマルトース結合タンパク質を連結した融合タンパク質 (分子量 102 kDa) を 1~20 μM の濃度でスギ細胞と 24 時間共存させた。共存培養時の CyaA 融合タンパク質の濃度が高い時 (5 μM 以上)、細胞の凝集や死細胞の数が顕著に多くなること等が見受けられ、CyaA タンパク質は細胞への悪影響が大きいものと判断した。そこで、CyaA タンパク質濃度 5 μM の濃度にて取り込み試験を行った。ELISA キットにて cAMP 量を定量するとともに、細胞内の RFP 蛍光を上述 (1) の方法で測定した。CyaA 5 μM 添加時に cAMP 量の増大が見られた (図 3a)。また、細胞内へ取り込まれた RFP 量も同様に増大した (図 3b)。前述のとおり CyaA は細胞に対して毒性を示したが、cAMP への変換は生細胞でのみ起こる反応であることから、CyaA の導入量に比例して生細胞で変換される cAMP 量が増大していると推察された。

(a) CyaA酵素活性



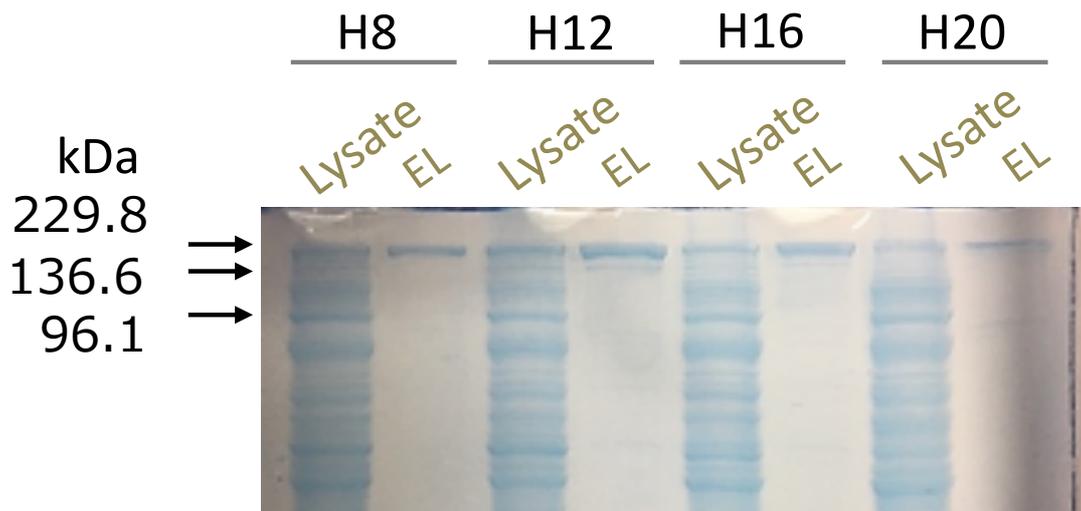
(b) RFP蛍光

**図3 スギ細胞への CyaA-PHPs 融合タンパク質の取り込み**

MBP-RFP-CyaA-PHPs リコンビナントタンパク質を 5 μM の濃度にてスギ細胞と 24 時間共存させ、CyaA 酵素活性により細胞内にて変換された cAMP 量 (a)、及び RFP 量 (b) をそれぞれ定量した。ここで使用した PHPs はヒスチジン数 20 のものである。MBP, マルトース結合タンパク質。

(3) CPP 融合 Cas9 タンパク質の効率的な調製方法

Cas9 と CPP を連結したリコンビナントタンパク質 (160 kDa) を大腸菌にて発現させた。CPP として PHPs を用いる際には、"His タグ"としての役割も持ち、ニッケルイオンなどの金属イオンが固定化された担体によりアフィニティー精製が可能となる。そこで定法 (宿主大腸菌株: BL21(DE3)、発現ベクター: pMal-c2x、IPTG 誘導濃度: 0.1 mM、培養条件: 20°C x 16 時間) により発現させ、ニッケルイオン固定化カラムによる精製を試みたが、収量・純度ともに非常に低かった。ゲノム編集試験の条件検討には定期的に純度の良い Cas9-PHP リコンビナントタンパク質の調製が必要であることから、宿主となる大腸菌の系統、培養条件、精製方法などを包括的に検討した。その結果、宿主大腸菌株: Rosetta(DE3)、発現ベクター: pET24b、IPTG 誘導濃度: 1 mM、培養条件: 20°C x 16 時間の条件において高発現が認められ、コバルトイオン固定化カラム (TALON カラム) を用いることで、常時 mg/mL オーダーの高純度の Cas9-PHP タンパク質の調製が可能となった (図 4)

**図4 PHPs 融合 Cas9 リコンビナントタンパク質の発現系の構築**

大腸菌で発現させた Cas9-PHPs リコンビナントタンパク質を TALON カラムで精製した。発現ベクターや培養条件、精製方法を改良することで、ヒスチジン数 8 (H8) から 20 (H20) の PHPs を融合した Cas9 タンパク質において、効率良く調製できている。EL, TALON カラムにて精製したタンパク質画分。

(4) Cas9 の直接導入によるゲノム編集の誘導

Cas9-PHPs タンパク質と gRNA の複合体とスギ細胞を 24 時間共存培養し、Cas9-gRNA 複合体の細胞内への導入、及び Cj#1 遺伝子の標的領域の改変を試みた。標的領域は 5'末端付近で 3 カ所選定した。24 時間培養後の細胞からゲノム DNA を抽出し、フラグメント解析により標的領域周辺の塩基長を解析したところ、いくつかの試験区において野生型の塩基長とは異なる長さの塩基長が検出された(図 5)。同試験区の PCR 増副産物をクローニングして塩基配列を解析したところ、標的領域の欠失が確認された。この欠失は野生型では確認できなかったことから、一部の細胞については Cas9 によるゲノム編集が起きていると判断した。現在 Cas9-PHPs を導入した細胞から個体再生を試みている

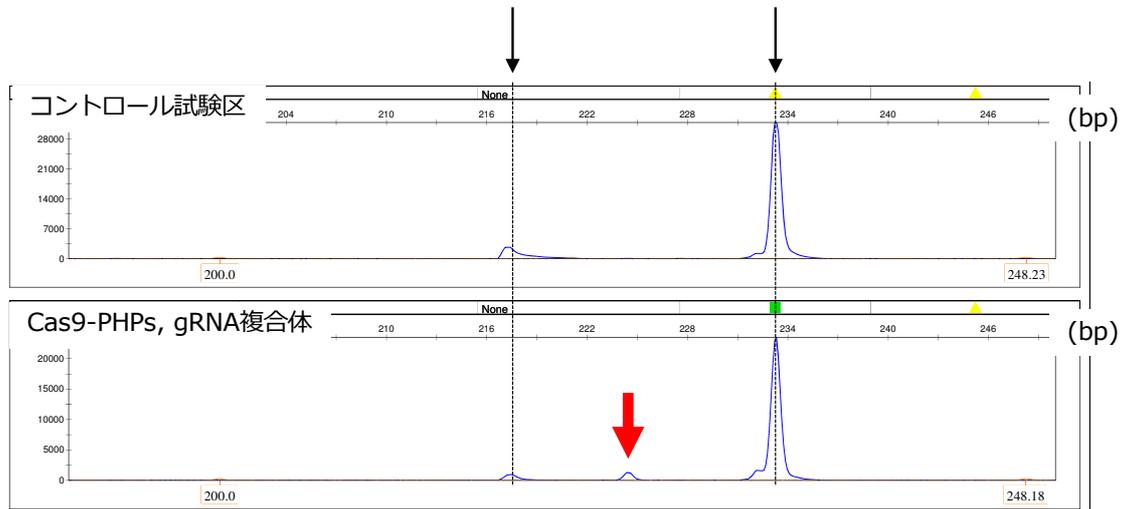


図 5 Cas9-PHP の直接導入によるゲノム編集試験

スギ細胞と Cas9-PHPs,gRNA 複合体を共存培養後スギ細胞からゲノム DNA を抽出した。続いて、フラグメント解析により標的領域周辺の塩基長を解析した。黒の矢印は未処理細胞で検出されるフラグメントである。一方、Cas9-PHPs,gRNA 複合体を共存させた細胞からは赤矢印で示したような新たなフラグメントが検出された。本結果より、Cas9-PHPs,gRNA 複合体が細胞内に取り込まれ、標的領域付近の塩基欠失が誘導されたことが示唆される。

【引用文献】

Kimura, S., Kawano, T., and Iwasaki, T. (2017). Short polyhistidine peptides penetrate effectively into *Nicotiana tabacum* -cultured cells and *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81, 112–118. doi:10.1080/09168451.2016.1234925.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 七里吉彦、谷口亨	4. 巻 62
2. 論文標題 ゲノム編集技術－林木育種への利用における現状と課題－	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 北海道の林木育種	6. 最初と最後の頁 36-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yoshino, Nanasato Yoshihiko, Omura Kousei, Endoh Keita, Kawano Tsuyoshi, Iwasaki Takashi	4. 巻 85
2. 論文標題 Direct protein delivery into intact plant cells using polyhistidine peptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1405 ~ 1414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nanasato Yoshihiko, Mikami Masafumi, Futamura Norihiro, Endo Masaki, Nishiguchi Mitsuru, Ohmiya Yasunori, Konagaya Ken-ichi, Taniguchi Toru	4. 巻 11
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-95547-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大村昂誠、七里吉彦、遠藤圭太、河野強、岩崎崇
2. 発表標題 Poly-Hisペプチドを利用したモデル/非モデル植物細胞へのタンパク質直接導入
3. 学会等名 日本農芸化学会福岡大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 OMURA Kousei, NANASATO Yoshihiko, IWASAKI Takashi
2. 発表標題 Direct delivery of proteins into plant cells with cell wall using polyhistidine peptides.
3. 学会等名 ERATO International Symposium Chemistry and Plant Biology
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩崎 崇 (Iwasaki Takashi) (30585584)	鳥取大学・農学部・准教授 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------