

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14678

研究課題名(和文)植物ゲノムを支える遺伝的冗長性を解析する技術基盤

研究課題名(英文)Development of genome editing technology for analysis of genetic redundancy in plants

研究代表者

菅野 茂夫 (Sugano, Shigeo S.)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：60726313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子重複は、生物の進化の原動力であるが、人為的な制御が困難である。特に植物では、タンDEM遺伝子重複が動物に比べて非常に多いことが分かっており、人為的制御による重複遺伝子の機能の解明が期待されている。本研究では、タンDEM遺伝子重複に着目し、特定の領域に長鎖欠失を誘導する技術を開発した。具体的には、シロイヌナズナの全タンDEM重複遺伝子のそれぞれの両端に特異的なgRNAを自動設計するソフトウェアを開発し、複数のgRNAを同時に発現させるベクター構築と組み合わせて、迅速にゲノム編集ベクターを作れるようにした。また本ベクターの導入により、分泌性ペプチドのタンDEM遺伝子重複を欠失させ、変異体を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物のゲノムに存在する遺伝子機能の解明が、人類社会の維持に必要であることは論を待たない。多くの陸上植物のゲノムにおいて、全遺伝子の10%程度はタンDEM遺伝子重複という過程を経て「遺伝子のコピー」を持っている。これらの遺伝子はコピーがあるために遺伝子機能の解明が遅れている。本研究では、シロイヌナズナを材料として、タンDEM重複遺伝子を、ゲノム編集によって取除く技術の開発に取り組んだ。実際、ターゲットとするタンDEM重複した遺伝子のみを取除くゲノム編集技術の基盤ができあがり、機能が未解明であった分泌性ペプチドの機能を調べることができた。

研究成果の概要(英文)：Gene duplication is a driving force of evolution of life. In particular, tandem gene duplication is much more common in plants than in animals, and it is expected that the function of duplicated genes can be elucidated by artificial control. In this study, we focused on tandem gene duplication and developed a technique to induce large deletions in specific regions of the genome. We developed software to automatically design specific gRNAs to both ends of each tandemly duplicated gene in Arabidopsis. We also developed the protocol of construction of vectors that simultaneously express multiple gRNAs. As a proof of concept, we deleted the tandemly duplicated gene encoding the secretory peptide and obtained the mutant showing some phenotype on the nutrient absorption.

研究分野：植物分子遺伝学、ゲノム生物学

キーワード：タンDEM遺伝子重複 CRISPR/Cas9 ゲノム編集 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

CRISPR によるゲノム編集の発明により、分子遺伝学は新しい段階に入ったといえる (Doudna 2014 Science)。CRISPR によるゲノム編集技術の本質は、多数の遺伝子座を同時に改変するコストが既存技術と比べて桁違いに低いことである。実際、動物培養細胞では、CRISPR を用いて全遺伝子をランダムに破壊する方法が確立されている (Shalem et al. 2014 Science)。一方、植物では、ゲノム編集効率の低さや、形質転換株の作出の難しさが原因となり、従来の技術でも可能なゲノム編集の実施例が多く、2-3 遺伝子を同時に破壊する段階にようやくこぎつけた状況である (Čermák et al. 2017 Plant Cell)。研究代表者は、ゼニゴケを用いることで、CRISPR によりゲノム編集された植物のクローン系統を世界で初めて作出し (Sugano et al. 2014 Plant Cell Physiol.)、共同研究において、150 以上の遺伝子座で遺伝子破壊を行った実績を持つ (菅野ら、植物学会 2016)。加えて、研究代表者は、シロイヌナズナにおいて、DNA 修復経路の変異体背景では、13 kbp の欠失が形質転換株の 25% で生じることを発見した。ゼニゴケでのゲノム編集のノウハウと、本発見が端緒となり、植物科学の歴史の中で説明が難しく、手つかずの領域の多い「タンDEM重複遺伝子群」の欠失株のライブラリが作出できると考え、本研究提案に至った。

遺伝子重複は、植物の進化に多大な影響を与えていると考えられているものの、人為的な制御が困難である。特にタンDEM重複は全ゲノム倍化と同じく植物に非常に多いことが分かっているために、解析に値する。タンDEM重複を行っている遺伝子のひとつに分泌性ペプチドがある。近年の研究で、分泌性ペプチドの機能は急速に解明されつつある (Sugano et al. 2010 Nature, Takeuchi et al., PLoS Biol. 2013., Tabata et al. 2014 Science, Nakayama et al. 2017 Science)。しかしながら、これらの研究では、遺伝的冗長性と、ゲノム操作技術の不足が原因で分泌性ペプチド遺伝子の *null* 変異株を解析できていない。研究代表者は遺伝的冗長性という古典的なテーマに対して、CRISPR 技術を発展させ、植物では困難だった「長鎖欠失の高効率な誘導」により遺伝子重複の破壊を行い、重複遺伝子の遺伝的相互作用を「因果関係」のレベルで解明できると着想した。

2. 研究の目的

シロイヌナズナのタンDEM重複遺伝子重複を欠失して抜き去る手段を開発する。具体的には、gRNA の設計ツール、多数の gRNA を同時に発現するベクターを構築する。加えて、分泌性ペプチド遺伝子を中心にロックアウト用ベクターを数十種類のオーダーで構築する。これらをシロイヌナズナヘフローラルディップ法で形質転換することにより、タンDEM重複遺伝子の変異株を作出する技術基盤を構築する。可能であれば、

3. 研究の方法

類似配列を厳密に区別した gRNA の設計：本研究提案でターゲットとするのは、重複遺伝子であるため、互いに配列が極めて類似している。そこで欠失誘導用の特異的な gRNA を設計するソフトウェアを開発する。

ゲノムの複数箇所の同時切断による欠失の誘導：欠失の誘導には、最低 2 カ所の遺伝子座を同時に切断する必要がある。gRNA はそのターゲット配列によって切断効率が全く異なるため、切断したい部位に対して、複数 gRNA を設計、発現させるとタンDEM重複遺伝子の欠失が効率的に誘導できると考えられる。タンDEM重複遺伝子を欠失させるためのベクター構築を、オリゴのアニーリング、アセンブルなどを 96 プレートで並列的にコンストラクションする方法論を確立する。

タンDEM重複遺伝子の欠失個体の作出： で自動設計、 で並列構築したベクターを次々に感染させていき、タンDEM重複遺伝子の機能を探る。特に、分泌性のシステインリッチペプチドを中心とした遺伝子を破壊してその表現型を探る。

4. 研究成果

類似配列を厳密に区別した gRNA の設計：Python と Bowtie を組み合わせることにより、プロモーター領域、遺伝子の下流領域 500 bp の gRNA ターゲット候補から、特異的な gRNA を自動的に抽出するソフトウェアを開発した。本ソフトウェアは、最も汎用的に用いられているゲノム編集ツールである SpCas9 だけでなく、Cas12a、Cas9-NG など異なる PAM 配列をもつゲノム編集ツールにも対応できるようにした。特異性の面から考えると SpCas9 を欠失のためのツールとして用いることが最適と計算された。本ソフトウェアを用いて、シロイヌナズナの全 coding 遺伝子およびトランスポゾン遺伝子について、欠失を行うための gRNA をリスト化した。本ソフトウェ

アの開発に関しては、植物生理学会で発表を行った(田井ら, 2018 年植物学会年会)。

ゲノムの複数箇所の同時切断による欠失の誘導：tRNA の細胞内でプロセッシングされる性質を活用して、複数 gRNA を同時発現させるシステム (Polycistronic tRNA gRNA system, PTGS) (Čermák et al. 2017 Plant Cell) を利用して、6 つの gRNA を同時に遺伝子発現させることに成功した。また、本ベクターを用いて、効率的に複数 2 遺伝子座を破壊できるというデータを得た。本技術を利用して、奈良先端科学技術大の山口暢俊助教に技術提供を行った。YUCCA4 遺伝子のプロモーター領域を欠失させることで、転写制御因子の結合阻害が生じたと推察されるゲノム編集個体を取得した (Yamaguchi et al., 2018 Nature Commun.)。

タンデム重複遺伝子の欠失個体の作出： で開発した技術基盤を利用して、システインリッチペプチド遺伝子の破壊を複数行った。その中でも、名古屋大学・田畑亮講師との共同で作製したペプチド (4 遺伝子タンデム重複) については、シングル変異体では表現型を示さないものの、タンデム重複遺伝子を全て欠失させると鉄欠乏条件下での表現型 (根長) の変化が見られた (田畑ら, 未発表データ)。本実験により、Proof of concept としての成果は得られたと考えている。加えて、トランスポゾンの欠失用の gRNA を設計したことを活用し、岡山理科大学・濱田博士・武井氏との共同研究を行い、シロイヌナズナにおけるトランスポゾンの欠失も試みた。実際、5 種類以上のトランスポゾンの欠失系統の作出に成功しており (武井ら, 未発表データ)、本技術基盤は、トランスポゾンの機能解析にも活用できることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1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 Yamaguchi Nobutoshi, Huang Jiangbo, Tatsumi Yoshitaka, Abe Masato, Sugano Shigeo S., Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Kiba Takatoshi, Yokoyama Ryusuke, Nishitani Kazuhiko, Sakakibara Hitoshi, Ito Toshiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Chromatin-mediated feed-forward auxin biosynthesis in floral meristem determinacy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07763-0	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 -

1. 著者名 Sugano Shigeo S., Nishihama Ryuichi, Shirakawa Makoto, Takagi Junpei, Matsuda Yoriko, Ishida Sakiko, Shimada Tomoo, Hara-Nishimura Ikuko, Osakabe Keishi, Kohchi Takayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0205117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0205117	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 Sugano Shigeo S., Nishihama Ryuichi	4. 巻 1830
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-Based Genome Editing of Transcription Factor Genes in <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8657-6_7	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田井超洋, 菅野茂夫, 景山達也, 深尾陽一朗
2. 発表標題 ヒコ科植物に対するアグロインフィルトレーション法
3. 学会等名 第61回植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田井雅人, 石野江太郎, 大和勝幸, 西浜竜一, 河内孝之, 深尾陽一朗, 菅野茂夫
2. 発表標題 ゼニゴケゲノムに対するoff targetが少ないlgRNAの網羅的な自動設計と遺伝子破壊技術の構築
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 園田みのり, 赤木剛士, 菅野茂夫, 別府賢治, 片岡郁雄, 田尾龍太郎
2. 発表標題 キウイフルーツの性決定における雄器官分化機構
3. 学会等名 園芸学会平成30年度秋季大会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------