

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02932

研究課題名(和文)植物DNA修復選択システムを利用した低モザイクゲノム編集育種技術の構築

研究課題名(英文) Establishment of low-mosaic genome editing technology using plant DNA repair selection systems

研究代表者

刑部 敬史 (OSAKABE, Keishi)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・教授

研究者番号：70450335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物におけるCRISPR-Cas9によるモザイク変異の導入を抑制するために、DNA二本鎖切断修復因子の欠損または過剰発現とマルチプレックスgRNAを用いた変異誘発法を組み合わせ、その効果を検討した。また、ジェミニウイルスベクター法と組み合わせたハプロイドインデューサーを介したゲノム編集を確立するために、CENH3遺伝子の変異誘発を実施した。CENH3ノックアウトシステムはまだ確立されていないが、CENH3遺伝子に変異があることを確認した。また、ジェミニウイルスベクターシステムを用いたmultiplex gRNA法により、導入遺伝子をゲノムに組み込まずに変異導入することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モザイク性変異は、体細胞の標的ゲノム配列上に様々な変異配列タイプが不均一に混在する変異であり、目的とする変異のみを持つ個体を得るためには数世代の交配と選抜を行なう必要があるため、モザイク性変異を回避した一世代での変異固定を行う方法の確立は、迅速な分子育種技術を確立する上で重要である。また、植物細胞に導入したゲノム編集ツールをゲノムに組み込まずに作用させる手法は社会受容性の高い系統作出に必要である。ジェミニウイルスベクターを用いることで、導入遺伝子をゲノムに組み込まずに変異導入することが可能となり、社会受容性の高いゲノム編集ツールの導入基盤を示す事ができた。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of loss or over-expression of DNA double-strand break repair factors coupled with a mutagenesis technique using multiplex gRNAs to reduce the introduction of mosaic mutations by CRISPR-Cas9 in plants. We also performed the mutagenesis of the CENH3 gene to establish haploid inducer-mediated genome editing combined with the geminivirus vector method. We confirmed the mutation in the CENH3 gene, although the CENH3 knock-out lines were not established yet. In addition, we succeeded in mutagenesis without incorporating the transgene into the genome by the multiplex gRNA method using the geminivirus vector System.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：ゲノム編集 DNA二重鎖切断修復 CRISPR-Cas9 ジェミニウイルスベクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

任意の標的遺伝子を特異的に切断することができる人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集は、広範な生物で利用されてきている。特に CRISPR-Cas9 の開発により、植物ではモデル植物だけでなく様々な農作物や樹木での変異導入例が報告されてきた。ゲノム情報が明らかとなっていれば、その配列をもとに標的遺伝子特異的なゲノム改変が可能であることから、従来育種に要する期間や労力を短縮した新育種法として期待されていた。我々は、様々な植物種での高効率ゲノム編集技術基盤構築を進め、アブラナ科、ナス科やバラ科植物などに最適化した高効率ゲノム編集ツールを開発し、ゲノム編集による迅速な育種基盤技術の確立を行ってきた。しかし、従来の遺伝子導入システムによる CRISPR-Cas9 システムを用いた変異導入には、モザイク性変異（ゲノム編集個体中の体細胞における標的ゲノム配列上に様々な変異配列が混在する変異様式）があり、有用形質を作出する上で、目的の変異のみをホモ系統として固定するための障害となる。そのため、低モザイク性の変異導入が可能なゲノム編集が望まれていた。我々は、CRISPR-Cas9 の Cas9 発現を様々なプロモーターの制御で行なうことで、低モザイク性の変異を高頻度に導入できることを見出し、この技術をさらに発展させるとともに、背景にあるメカニズムを明らかにすることで、ゲノム編集による迅速な育種技術が確立できると考えた。

2. 研究の目的

DNA 二本鎖切断修復因子の欠損あるいは過剰発現によって DNA 二本鎖切断修復機構が変化した細胞において、我々が開発したマルチプレックス gRNA を用いた変異誘発法を働かせることによって、モザイク性変異導入を低減する効果の検討を行った。また、モザイク性変異が導入された場合、次世代以降で速やかに一種の変異に固定された系統を作出するため、半数体誘導技術の確立のためにトマトにおけるセントロメアヒストン H3 (CENH3) 遺伝子のノックアウト作出を試みた。さらには、目的とする変異が導入された植物系統において、ゲノム編集ツールを含む外来遺伝子をゲノムに組み込まない作出法として、ジェミニウイルスベクターを用いたマルチプレックス gRNA 変異誘発法の確立を行った。

3. 研究の方法

(1) DNA 二本鎖切断修復因子の欠損または過剰発現がモザイク変異に及ぼす効果の検討

高等植物においては、鋳型 DNA を必要としない NHEJ 経路がゲノム編集による DNA 二重鎖切断修復の主要経路である。NHEJ 経路には Ku タンパク質依存的な NHEJ 経路 (Ku-NHEJ 経路) と Ku タンパク質非依存的な NHEJ 経路 (マイクロホモロジー依存性 NHEJ 経路; MMEJ 経路) が存在するが、我々が見出した正確な DNA 修復による変異導入 Ku-NHEJ 経路および MMEJ 経路のいずれによるのかを明らかにするために、それぞれの経路の鍵酵素遺伝子を欠損あるいは過剰発現させることで Ku-NHEJ 経路あるいは MMEJ 経路を改変させた植物細胞における変異様式と導入効率を解析した。Ku-NHEJ 経路の因子として、Ku70 あるいは Ku80 の CRISPR-Cas9 による KO 植物あるいはアンチセンス RNA 植物を作出し、それら系統に対してマルチプレックス gRNA 変異誘発法の効率を解析した。また、MMEJ 経路を亢進させる因子として CtIP 遺伝子に着目し、Cas9 および CtIP の融合遺伝子を用いたマルチプレックス gRNA 変異誘発法を行い、変異導入効率の解析を行った。

(2) 半数体技術基盤の構築

トマトにおける半数体技術を構築するため、トマトにおける *CENH3* 遺伝子を同定し、*CENH3* 変異導入植物系統の作出を行った。

(3) 外来遺伝子をゲノムに組み込まないゲノム編集技術の確立

外来遺伝子をゲノムに組み込まないゲノム編集ツールの植物細胞への導入技術として、ジェミニウィルスベクターシステムに着目した。アグロバクテリウムを介した T-DNA の導入によってジェミニウィルスが植物細胞核内で複製するために必要な遺伝子配列を構築し、マルチプレックス gRNA 発現に必要な CRISPR-Cas9 遺伝子発現カセットを合わせ持つバイナリーベクターを構築した。標的遺伝子にはトマト *IAA 9* 遺伝子とし、2 箇所の標的 gRNA を設計した。構築したバイナリーベクターを保持するアグロバクテリウムを用いてトマト細胞を感染させ、ジェミニウィルスが複製し、かつ導入した T-DNA 領域がゲノムに組み込まれていないトマト細胞を選抜し、変異解析を行った。

4. 研究成果

(1) DNA 二本鎖切断修復因子の欠損または過剰発現がモザイク変異に及ぼす効果の検討

Ku-NHEJ 経路の因子の欠損変異株の作出を目的として、トマト *Ku70* および *Ku80* 相同遺伝子を同定し、それぞれの第 1 エクソンあるいは第 2 エクソン上に標的 gRNA を設計し、変異導入を行った。その結果、標的箇所に変異導入が認められ KO 系統の作出には成功したが、生育阻害が起きたため、マルチプレックス gRNA 変異導入法の検討には用いることができなかった。そこで、*Ku80* アンチセンス RNA 発現カセットとマルチプレックス gRNA による CRISPR-Cas9 発現カセットを同時に発現させるバイナリーベクターを用いて、*Ku80* 発現抑制系統における変異様式を解析した。その結果、*Ku80* の発現が抑制された系統では、2 つの gRNA 切断部位で連結された正確な変異様式（正確な非相同末端結合; precise-NHEJ）は低下し、それぞれの標的箇所から数十塩基程度の欠失が優位に起きておりモザイク性変異も増加していた。また、MMEJ 経路を亢進させる因子として *CtIP* 遺伝子に着目し、Cas9 および *CtIP* の融合遺伝子を用いたマルチプレックス gRNA 変異誘発法を行ったところ、Cas9 のみを使用した場合に比べ、体細胞変異導入効率が 1.2-1.5 倍程度上昇が認められ、precise-NHEJ の効率は Cas9 のみを発現させた場合と同等であったが、モザイク性変異は減少していた。これらのことから、*CtIP* の過剰発現が、正確性の高いモザイク性変異を低減させるシステムの基盤になることが示唆された。

(2) 半数体技術基盤の構築

トマトにおける半数体技術を構築するため、トマトにおける *CENH3* 遺伝子を同定し、*CENH3* 遺伝子上に標的 gRNA を設計し CRISPR-Cas9 による変異導入植物系統の作出を、予備実験として行った。形質転換当代において、標的箇所への変異導入が確認され、次世代では KO 個体が不稔性を示すことが確認できたため、引き続き、*CENH3* の標的 gRNA を含む CRISPR-Cas9 発現カセットとトマト *CENH3* の機能を相補するシロイヌナズナ由来の半数体誘導型 *CENH3* カセットを同時に発現させた。予備実験時と同様に、標的箇所への変異導入が確認されたが、次世代においてトマト由来 *CENH3* が欠損した変異系統は得られず、トマトにおける半数体作出技術には、他植物の例と異なり、シロイヌナズナ由来の半数体誘導型 *CENH3* カセットが利用できない可能性が考えられた。引き続き、他植物種由来の *CENH3* を改変し、トマトにおける半数体誘導技術の開発を継続したいと考えている。

(3) 外来遺伝子をゲノムに組み込まないゲノム編集技術の確立

外来遺伝子をゲノムに組み込まないゲノム編集ツールの植物細胞への導入技術として、ジェミニウィルスベクターシステムに着目し、マルチプレックス gRNA 発現カセット、Cas9 発現カセット、ジェミニウィルスベクターの複製に必要な long intergenic region (LIR)、small intergenic region (SIR) および複製因子 *repA* を含むバイナリーベクターを構築した。また、作製したベクターによって薬剤選抜が可能となるように、複製領域内にカナマイシン耐性遺伝子発現カセットを連結させた。作製したバイナリーベクターをアグロバクテリウムを介してトマト細胞を感染させたところ、カナマイシン耐性を示すトマトカルス細胞が得られ、これらの中には標的とした配列箇所に precise-NHEJ 由来と考えられる変異が検出された。得られた変異カルス系統の中には、導入遺伝子がゲノムに組み込まれた系統も見出されたが、2/3 以上のカルス系統でゲノムへの組み込みは認められなかった。さらには、カルス系統をカナマイシンを含まない培地で維持し、再生シュートを得たところ、ジェミニウィルスベクターが脱落した変異シュートも得られたことから、本研究で確立した導入法によって迅速な外来遺伝子の非組み込み型ゲノム編集植物の作出が可能であると考えられた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Wada N, Ueta R, Osakabe Y, Osakabe K	4. 巻 20-234
2. 論文標題 Precision genome editing in plants: state-of-the-art in CRISPR/Cas9-based genome engineering.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Plant Biology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12870-020-02385-5	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 Miyamoto T, Takada R, Tobimatsu Y, Suzuki S, Yamamura M, Osakabe K, Osakabe Y, Sakamoto M, Umezawa T	4. 巻 296-110466
2. 論文標題 Double knockout of OsWRKY36 and OsWRKY102 boosts lignification with altering culm morphology of rice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plantsci.2020.110466	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 Abe-Hara C, Yamada K, Wada N, Ueta R, Hashimoto, R, Osakabe K, Osakabe Y	4. 巻 20
2. 論文標題 Effects of the sliaa9 Mutation on Shoot Elongation Growth of Tomato Cultivars.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.627832	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8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田梨紗、吉良望、原千尋、宮地朋子、和田直樹、刑部敬史、刑部祐里子
2. 発表標題 in planta-regeneration法におけるdCas9-転写活性化ベクターを用いた遺伝子発現制御システムの開発
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田勝久、原千尋、刑部祐里子、刑部敬史
2. 発表標題 トマト栽培品種におけるジェミニウイルスベクターを利用したゲノム編集システムの構築
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 刑部敬史
2. 発表標題 新しいゲノム編集酵素を用いた植物のゲノム編集技術
3. 学会等名 プロジェクト横断型公開シンポジウム「植物のゲノム編集基盤技術開発の現状と展望」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉良望、高柳栄子、渡邊崇人、坂本秀樹、原(阿部)千尋、橋本諒典、上田梨紗、刑部祐里子、刑部敬史
2. 発表標題 トマトゲノム編集のためのin planta-regeneration法の開発
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 刑部敬史
2. 発表標題 高等植物におけるゲノム編集技術の活用と展望
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会ワークショップ「CRISPRをはじめとしたゲノム編集技術の現状と課題、将来性」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原千尋, 山田勝久, 上田梨紗, 橋本諒典, 刑部祐里子, 刑部敬史
2. 発表標題 CRISPR/Cas9による栽培品種トマトにおける変異体作製およびヌルセグリガント単離法の構築
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田梨紗, 吉良望, 吉岡里香, 宮地朋子, 和田直樹, 刑部祐里子, 刑部敬史
2. 発表標題 CRISPR/dCas9を利用した植物遺伝子発現制御システムの開発
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 刑部敬史
2. 発表標題 新規ゲノム編集技術が貢献するバイオエコノミーの未来
3. 学会等名 第38回 日本植物バイオテクノロジー学会(つくば)大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 刑部敬史、和田直樹(分担執筆)、田部井豊編	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 10
3. 書名 「ゲノム編集食品 ~農林水産分野への応用と持続的社会的実現~」第2章DNA編集技術、1. CRISPR-Casによるゲノム編集技術-総論	

1. 著者名 刑部祐里子、原千尋、橋本諒典、宮地朋子、刑部敬史	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 386
3. 書名 完全版 ゲノム編集実験スタンダード「第2章17 植物でのゲノム編集」	

〔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
---------	---------