

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05970

研究課題名（和文）イネの根系改良を目指したゲノム編集ノックイン改変

研究課題名（英文）Knock-in Modification of Auxin signal transduction protein to improve root systems in rice

研究代表者

島谷 善平（Shimatani, Zempei）

神戸大学・先端バイオ工学研究センター・部局研究員

研究者番号：30574701

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、イネのオーキシシンシグナル伝達にて主要な働きを担うOsIAA27タンパク質に分解遅延型変異を導入し、さらに可視化することで、イネ根系形成の分子機構を解析するとともに、根系を改良した新規有用系統の作出を目指した。まず、ノックイン改変型遺伝子ターゲティングベクターを構築し、OsIAA27にEGFP遺伝子が融合したノックイン改変体改変型OsIAA27を持つイネ系統の作出に成功した。これら系統について、EGFP蛍光を指標にOsIAA27タンパク質の時空間的挙動を解析した結果、OsIAA27はイネの冠根基部の細胞核に集積することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界人口の増加に対し、世界規模での急激な気候変動により耕作可能面積の減少が進行している。そのため、環境変動に強い作物品種の開発と、その工程を迅速化する植物育種技術の開発が喫緊の課題である。近年は、新規技術により植物育種の効率化が進むが、植物体地上部の遺伝的改良が主流であり、地下部（根系）改良の成果は乏しい。その理由は、地下部組織の機能評価は可視化困難で、根系形成機構の遺伝的制御の情報が非常に少ない事にある。本研究の成果は、イネの根系形成の分子機構解明に貢献し、その成果を新規品種開発に迅速に反映できる新規技術の確立に繋がるものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we introduced and visualized a delayed degradation mutation in the OsIAA27 protein, which plays a major role in auxin signaling in rice, to analyze the molecular mechanism of rice root system formation and to generate a new useful line with an improved root system. First, we constructed a knock-in modified gene targeting vector and succeeded in generating rice lines with knock-in modified OsIAA27, in which the EGFP gene was fused to OsIAA27. The spatiotemporal behavior of OsIAA27 protein in these lines was analyzed using EGFP fluorescence as an indicator, and OsIAA27 was found to accumulate in the cell nuclei of the crown root base of rice plants.

研究分野：植物育種、ゲノム編集

キーワード：植物育種 ゲノム編集 根系形成機構 ノックイン SDN-3

1. 研究開始当初の背景

近年、世界規模での急激な気候変動が顕著化し、温暖化に伴う砂漠化や塩害等により、耕作可能面積の減少が進行している。爆発的な人口増加や環境劣化が進む中、環境変動に対応できる作物品種の開発と、その工程を迅速化する植物育種技術の開発が喫緊の課題である。一方、近年の技術革新は目覚ましく、次世代シーケンシングにより様々な作物のゲノム情報の解読と機能解析の成果が蓄積され、有用形質に関わる遺伝子を短期間で同定することが可能になった。さらにこうした情報を利用したゲノム編集技術による標的遺伝子改変で、迅速な植物育種が実現されつつある。しかし、こうした成果は植物体地上部の遺伝的改良が主流であり、地下部(根系)改良の成果は乏しい。この要因として、土中の地下部組織は可視化が困難で機能評価が難しいため、根系形成機構の遺伝的制御に関する情報は、他の器官に比べて圧倒的に少ないことがあげられる。植物は炭素以外の養水分を根から吸収するため、根系改良に基づく環境ストレス耐性の向上や生産量安定化及び多収化の推進等による、育種的改善が期待できる。イネは単子葉植物のモデル生物種であり、かつ最も育種された最重要作物の一つであるが、それでも地下部の機能に関しては大きな改善余地を残している。特に、世界の主要稲作地の多くでは、雨水のみに水分供給を依存する天水田を利用しており、干ばつ等の被害リスクが大きいため、イネの根系改良による環境ストレス耐性の向上が期待されている。

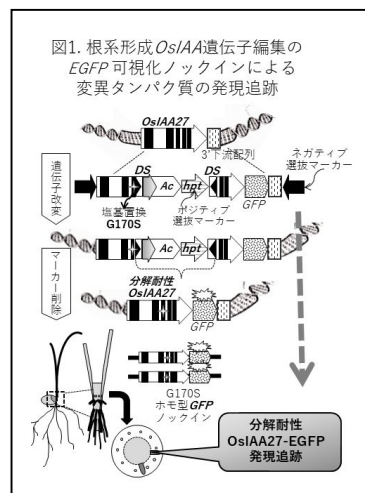
2. 研究の目的

本研究では、イネの乾燥耐性向上に関わる根系形成の分子機構の解析と、根系を改良した新規有用系統の作出を目的に、遺伝子ターゲティングを応用したゲノム編集を実施することで、根系形成に関わるタンパク質の機能を改変しつつ、時空間的挙動の可視化を試みた。具体的には、イネの根系形成におけるオーキシシン信号伝達において、主要な働きを担う遺伝子 *OsIAA27* を題材とし、非分解型変異を導入した改変体を作成して、冠根の発育抑制を試みた。これにより、冠根形成における *OsIAA27* の機能を明らかにすると共に、養水分の吸収を担う側根形成を補償的に促す可能性も検討し、植物体の耐乾燥性や低肥沃土壌への適応力が強化できれば、収量の増加や安定化が期待できる。また、EGFP をインフレームで連結するノックイン改変を実施して変異型 *OsIAA27-G170S-EGFP* 融合タンパク質を発現する遺伝子を創出し、イネ茎葉部での非分解型 *OsIAA27* タンパク質の時空間的局在を可視化することで、その機能解明を進めることとした。さらに、上記機能解析の成果をもとに、遺伝子ターゲティングにより *OsIAA27* タンパク質の機能を改変し、乾燥ストレス耐性を向上した新規イネ系統の作出を目指す。本研究の成果は、コムギやトウモロコシなどの重要穀類の根系改良にも波及するものであり、将来の食料安全保障に貢献すると期待する。

3. 研究の方法

本研究の推進には、申請者らが開発した遺伝子ターゲティング法 (Terada et al. 2002 Nat Biotech) を応用した標的遺伝子改変が有効である。この技術は、数 kb にわたるゲノム配列を自在かつ正確に改変できるため、ゲノム上の本来の遺伝子座で標的遺伝子の DNA 配列を改変し、同時にノックイン改変も実現可能である。また、申請者らは近年、ターゲティング改変に継続して、改変配列から選抜マーカー等の外来 DNA を自律的に削除できるシステムも開発し、上記技術とのオールインワン・システムとすることに成功している。

本研究では、上記の遺伝子ターゲティング技術のノウハウを活用して、*OsIAA27* タンパク質を非分解型 (G170S) に改変しつつ蛍光タンパク質遺伝子を連結することとした。これにより、*OsIAA27* タンパク質の発現、局在と分解を時系列で可視化し、イネの根系形成制御機構の解明を目指した。具体的には、図1に示す通り、*OsIAA27* と 3' 下流の配列をそれぞれ 3kb ずつ相同組換え配列として用いたゲノム編集ノックインベクターをデザインした。このターゲティングベクター「p*OsIAA27-G170S-EGFP*」は、*OsIAA27* の第四イントロンにポジティブ選抜マーカー (hpt) を挿入するとともに、5' 上流の第三エクソンに G170S 変異を引き起こす塩基置換、及び 3' 下流に EGFP のコード領域をノックイン連結するものである。同時に作製する「p*OsIAA27-EGFP*」は G170S 変異を導入せずに EGFP ノックイン改変のみを行う設計とした。さらに、自律的外来 DNA 削除機構も組み込み、改変体の作成工程の迅速化を試みた。これらのベクターを大規模形質転換法によりイネカルスに導入し、*IAA27-G170S-EGFP* 改変型または *OsIAA27-EGFP* 改変型遺伝子を持ち、他のゲノム配列は野生型



を維持した変異イネ系統を獲得した。

次いで、これら変異イネについて蛍光顕微鏡を用いた解析を実施し、EGFP シグナルに基づいて非分解型の *OsIAA27-G170S* タンパク質と分解型の野生型 *OsIAA27* タンパク質の発現と局在、および分解の過程を追跡した。

4. 研究成果

遺伝子ターゲティングベクター「*pOsIAA27-G170S-EGFP*」を用いたイネ種子胚由来カルスへの形質転換実験では、ターゲティングベクターが相同組換えを介して、*OsIAA27* 配列に組み込まれた一次改変カルスを 3 系統獲得した。これらのカルスは、*OsIAA27-G170S-EGFP* 改変配列に加えて、選抜マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hpt*)、選抜マーカーを自律的に削除するためのトランスポゾン配列、そして削除状況を可視化するための *AsRed* を持つ。これらのカルス系統に自律的に選抜マーカー削除を誘導する処理を行った後、*AsRed* のシグナル消失を指標に目視選抜することで、選抜マーカー等の不要な DNA 配列削除に成功した二次改変カルスを 2 系統得た。なお、その際の改変体カルスの観察では、*AsRed* のシグナルが消失するに伴い、EGFP が発現し始める様子を観察できた。これは、一次改変カルスでは *hpt* の挿入によりロックアウトの状態にあった *OsIAA27-G170S-EGFP* 遺伝子が、二次改変カルスにおいて *hpt* の削除に伴い発現し始めた状況を反映したものである。次いで、これらのカルスから再分化植物体を誘導し、2 系統から 6 個体ずつ、全 12 系統の再分化イネを獲得した。これらの T0 植物体について、DNA シークエンス解析により *OsIAA27* 遺伝子の構造を解析した結果、いずれも G170S 変異を持たず、野生型 *OsIAA27* に *EGFP* が連結された改変体であることが明らかとなった。その原因の一つとして、*OsIAA27-G170S* 変異が細胞致死あるいは増殖阻害を引き起こす可能性がある。この場合、遺伝子ターゲティング直後のカルスは *OsIAA27-G170S-EGFP* 遺伝子をヘテロ型で持つが、相同染色体上の正常な *OsIAA27* との相同組換えなどを経て一部の細胞が *OsIAA27-EGFP* 遺伝子を獲得し、これらが選択的に増殖したと考えることができる。しかし、事例が少なく不明点も多いため、再度 *OsIAA27-G170S-EGFP* 改変体を得るためのターゲティング形質転換を実施する予定である。

予想に反して *OsIAA27-EGFP* 改変系統を得たが、T0 植物の自殖を経て T1 集団を作製し、*OsIAA27-EGFP* ホモ型、ヘテロ型の植物体を選抜することに成功した。これら改変体の発芽種子を蛍光顕微鏡で観察し、EGFP シグナルを指標に *OsIAA27* タンパク質の挙動を解析した結果、茎葉部の冠根基部の細胞において、*OsIAA27* タンパク質が細胞核に局在する傾向を見出した。今後は、詳細な蛍光顕微鏡解析を行い、細胞内における *OsIAA27-EGFP* タンパク質の移動や分解のタイミング等を明らかにする。一方、ターゲティング形質転換を再実施し、*OsIAA27-G170S-EGFP* 改変体の作成も継続する予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Terada Rie, Shimatani Zenpei	4. 巻 2238
2. 論文標題 Rice Gene Targeting by Homologous Recombination with Positive-Negative Selection Strategy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rice Genome Engineering and Gene Editing, Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 241 ~ 257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-1068-8_16	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	寺田 理枝 (Terada Rie) (30137799)	名城大学・農学部・教授 (33919)	
研究分担者	犬飼 義明 (Yoshiaki Inukai) (20377790)	名古屋大学・農学国際教育研究センター・教授 (13901)	

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