

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06154

研究課題名(和文) ウイルスベクターを用いた針葉樹における遺伝子ノックアウト法の開発

研究課題名(英文) Development of gene knockout method using virus vector in coniferous trees

研究代表者

小長谷 賢一 (Konagaya, Ken-ichi)

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：30582762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、スギに感染するウイルスをベクター(遺伝子の運搬体)として用い、植物体内でDNA切断酵素を発現させることで、遺伝子組換えを経ることなくゲノム編集する技術を開発することを目的とする。DNA切断酵素として制限酵素I-SceIを用い、その認識配列により不活化させた発光酵素遺伝子を標的とした実験系によりゲノム編集を評価した。その結果、ウイルスベクター接種により宿主のDNAがゲノム編集される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集植物を社会実装するためには、現在主流の遺伝子組換えを介した手法では交配等により外来遺伝子を除去する必要があるため、育種に時間を要する林木においては遺伝子組換えを介さない手法が求められている。一過的な発現が可能なウイルスベクターの利用により外来遺伝子を含まないゲノム編集林木が迅速に作出できる可能性がある。また、一過的な遺伝子発現が可能なことから、遺伝子組換えが困難な林木の遺伝子の機能解析にも活用でき、分子遺伝学的進展も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop a technology for genome editing without genetic transformation by using a virus that can infect Japanese cedar as a vector (gene carrier) and expressing a DNA-cleaving enzyme in plants. We evaluated genome editing by targeting luminescent enzyme genes that were inactivated by the target sequence using restriction enzyme I-SceI as a DNA-cleaving enzyme. The results suggest the possibility of genome editing of host DNA by inoculation with viral vectors.

研究分野：樹木分子生物学

キーワード：リンゴ小球形潜在ウイルス ルシフェラーゼ NPBT

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノム上の任意の塩基配列を切断する人工的にデザインされた DNA 切断酵素を利用し、標的遺伝子に対しノックアウト (機能欠失) 等の変異を誘導するゲノム編集技術が農作物の新しい育種法として急速に広まりつつある。現在の技術では DNA 切断酵素遺伝子を植物ゲノム内へ一旦遺伝子組換えによって導入し、植物細胞内で DNA 切断酵素を発現させることが前提条件となっている。そのため、遺伝子導入された DNA 切断酵素遺伝子を除去するためには、交配によって導入遺伝子を遺伝分離させることが必要となる。しかし、針葉樹は他殖性であるため近交弱勢により戻し交雑や自家受粉による交配はできない問題がある。さらに、針葉樹の遺伝子組換え体の作出は、交配によって得られた未成熟種子由来の不定胚形成細胞 (胚へ分化する前の細胞群を維持培養させたもの) を起源とした場合のみ可能となっており、農作物で一般的に行われている体細胞における遺伝子導入・個体再生といった技術は確立されていない。また、スギにおいては不定胚形成細胞から胚を効率よく再分化できる品種が限定されているといった種々の問題がある。従って、他家受粉による交配の経路が必須である現在の技術では、現存品種の形質を保持したままゲノム編集により形質を改良することは技術的、時間的にも困難を極めている。

これらの問題を打開するため、植物ウイルスの利用を考えた。植物に感染したウイルスは植物体全身に増殖して広がり、自身の遺伝子を発現させる。その性質を利用して、目的の遺伝子を全身で高発現させるツールとして利用されている。そこで、植物ウイルスをベクター (遺伝子の運搬体) として用いれば、組織培養や植物ゲノムの遺伝子組換えを経ることなく、植物体内で DNA 切断酵素遺伝子等の目的遺伝子を発現させることができると考えた。

最近、落葉果樹からリンゴ小球形潜在ウイルス (Apple latent spherical virus, 略称 ALSV) と呼ばれる潜在ウイルス (感染しても病気を発症しないウイルス) が単離され、落葉樹種を含めた多くの植物にベクターとして利用可能であることが報告されている (Yamagishi and Yoshikawa 2013)。筆者らは、これまでスギおよびクロマツへ ALSV の接種を試み、いずれの樹種へも品種間の差異なく ALSV が潜在感染することを確認しており、本ウイルスがベクターとして針葉樹へも利用可能であることが示された。

2. 研究の目的

本研究では ALSV をウイルスベクターとして用い、針葉樹へ感染させることで DNA 切断酵素を植物体内で一過的に発現させ、ゲノム編集により標的遺伝子に変異が導入された個体を作成するための技術開発を目的とする。スギを針葉樹のモデルとして用い、ゲノム編集の評価を効率化させるために発光酵素遺伝子を利用した評価系を構築する。

3. 研究の方法

(1) スギ等針葉樹における ALSV ベクターによる一過的発現系の検討

針葉樹における ALSV の感染性およびベクターとして使用した際の外来遺伝子の一過的発現を評価するため、ALSV ベクターに緑色蛍光タンパク質遺伝子 (GFP) を挿入させた組換え ALSV を作製し、スギおよびクロマツの種子胚に接種後、経時的に GFP 蛍光を観察する。ALSV ベクターの構築および接種法は Kirino et al. (2022) の方法により実施する。

(2) スギで使用する発光酵素遺伝子の検討

事項で述べるゲノム編集評価系に使用する発光酵素遺伝子について、ホタル由来の *Fluc* 遺伝子、ヒカリコメツキムシ由来の *Eluc* 遺伝子、トゲオキヒオドシエビ由来の *Nluc* 遺伝子のスギにおける発光活性を評価する。そのため、各遺伝子を 35S プロモーター下流に連結したプラスミド DNA をパーティクルガン法によりスギの培養細胞へ導入し、Dual-luciferase Reporter Assay System (Bio-Rad 社) により発光強度を測定する。なお、本アッセイシステムに使用する標準化遺伝子としてウミシイタケ由来の *Rluc* 遺伝子を使用する。

(3) ゲノム編集評価系の構築と ALSV ベクターによるゲノム編集

ALSV ベクターに挿入した DNA 切断酵素遺伝子が植物体内で発現し、植物ゲノム上の想定した塩基配列を切断するか定量的に評価するため、DNA 切断酵素として既存の I-SceI (18 塩基の配列: TAGGGATAACAGGGTAAT を認識する制限酵素) をモデルとして利用する。Chujo et al. (2017) の方法に従い、I-SceI 認識配列をアウトフレーム挿入して不活性化させた発光酵素遺伝子を標的遺伝子としてスギへ遺伝子導入する。この組換えスギに I-SceI 遺伝子を挿入した ALSV ベクターを接種する。発現した I-SceI によって I-SceI 認識配列が切断され、ゲノム編集による塩基挿入または欠損が生じると、インフレームとなった正常な発光酵素遺伝子が発現し、発光基質を処理することでゲノム編集された組織が発光する。この発光強度によりゲノム編集効率を定量評価する。

4. 研究成果

(1) スギ等針葉樹における ALSV ベクターによる一過的発現系の検討

GFP を挿入した ALSV をスギおよびクロマツ種子胚に接種し、24 時間ごとに GFP 蛍光を観察した結果、いずれも接種 2-4 日後に GFP 蛍光が最も強く観察された。このことから、ALSV ベクターによる種子胚での一過的発現には接種 2-4 日後が最適であることが明らかとなった。

(2) スギで使用する発光酵素遺伝子の検討

Fluc、*Eluc*、*Nluc* の各発光酵素遺伝子 (図 1A) をスギ培養細胞へ導入し発光強度を測定した結果、*Fluc* と比較して *Eluc* は約 10 倍、*Nluc* は約 220 倍の発光強度を示した (図 1B)。また、*Nluc* による発光により GFP を励起させる生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) により、さらに発光強度を高めることを目的として GFP との融合型も作製した。融合型には Frantz et al. (2015) らによる 5 アミノ酸をリンカーとした GFP-linker-*Nluc* と、I-SceI 認識配列をリンカーとした GFP-I-SceI-*Nluc* を構築し (図 1A)、GFP と融合していない *Nluc* と比較した。その結果、GFP との融合型により有意な発光強度の増強は確認されなかったが (図 1B)、本遺伝子をスギへ導入した場合、GFP 蛍光の観察によりの発現量の多い系統をスクリーニング可能であることから、この利点を生かし、以後のゲノム編集評価系試験には GFP と *Nluc* の融合型を使用した。

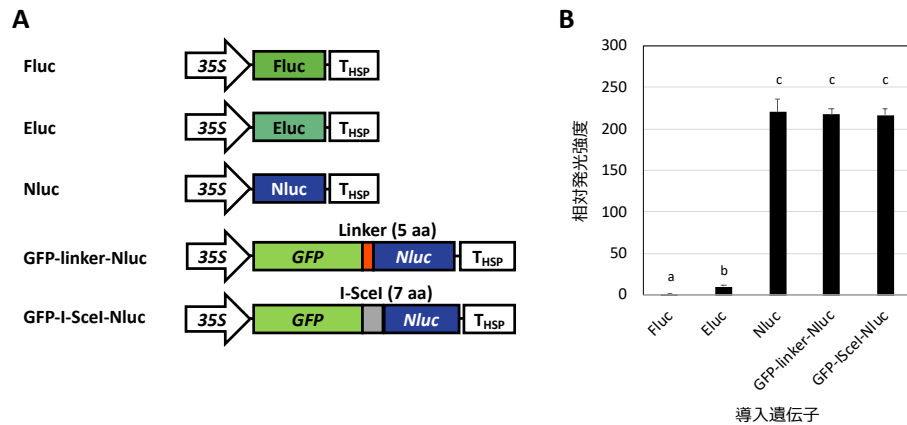


図 1 スギ培養細胞における各種発光酵素遺伝子 (A) の相対発光強度 (B) グラフの異なるアルファベット間には有意差があることを示す (TukeyHSD test, $p < 1e-08$, $n=4$)。

(3) ゲノム編集評価系の構築と ALSV ベクターによるゲノム編集

スギにおけるゲノム編集評価系を構築するため、I-SceI 認識配列をリンカーとし、下流をアウトフレームとなるよう GFP と *Nluc* を融合させたタンパク質遺伝子 (GFP-I-SceI+2-*Nluc*) を構築し、アグロバクテリウム法 (Konagaya et al. 2020) によりスギへ遺伝子導入した。得られた 15 系統のうち、GFP 蛍光の高い系統を選抜し、ALSV ベクターの接種に供試した。なお、スギへ導入する評価系遺伝子のネガティブコントロールとして *Nluc* を融合していない GFP のみを遺伝子導入した系統も作製した。次に、ALSV ベクターとして I-SceI 遺伝子を挿入した組換え ALSV (ALSV-I-SceI) を作製し、前述の評価系遺伝子を導入したスギへ接種 2 日後に発光強度を測定した。I-SceI を挿入していない野生型の ALSV (ALSV-wt) を接種したサンプルを発光測定の標準として相対発光強度を比較した結果、ネガティブコントロールである GFP を導入したスギでは ALSV-I-SceI の接種により発光強度に変化は観察されなかったが、GFP-I-SceI+2-*Nluc* を導入したスギでは ALSV-I-SceI の接種により発光強度が約 6 倍

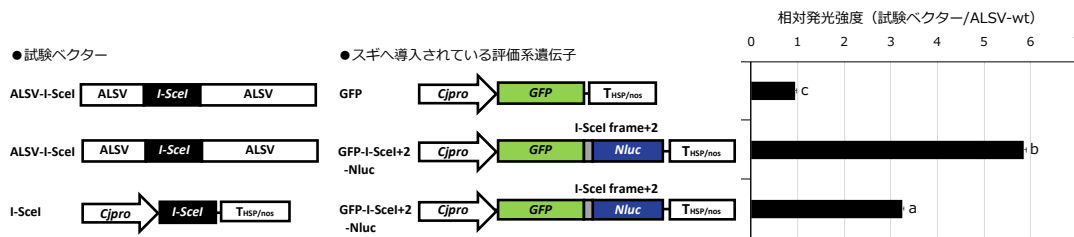


図 2 試験ベクター (左) と、接種したスギに導入されている評価用コンストラクトの模式図 (中) および試験ベクターを接種したスギにおける相対発光強度 (右) 試験ベクターの I-SceI はスギ用プロモーターによりスギゲノムから DNA 切断酵素 I-SceI が直接発現されるポジティブコントロール。評価系遺伝子の GFP は発光遺伝子 *Nluc* を保有しないネガティブコントロール。グラフの異なるアルファベット間には有意差あることを示す (TukeyHSD test, $P < 0.05$, $n=3$)。

に上昇した。さらに、ポジティブコントロールとして遺伝子組換えにより I-SceI を発現させた場合では、発光強度の上昇は約 3 倍であり、ALSV ベクターで I-SceI を発現させた方が発光強度は 2 倍高かった (図 2)。これは、遺伝子組換えの場合には I-SceI が発現できる細胞は遺伝子導入された細胞に限定されるが、ウイルスベクターの場合は感染した細胞から周囲の細胞へベクターが拡散していくため、組織全体での I-SceI の発現量が高くなったためと考えられる。以上の結果より、ウイルスベクターにより発現した DNA 切断酵素遺伝子により宿主の DNA がゲノム編集されることが示唆された。今後は評価系遺伝子のシーケンス解析により、塩基配列レベルでのゲノム編集の評価が必要である。

<引用文献 (発表論文以外) >

Chujo et al. (2017) Plant J 91:558-56

Frantz et al. (2015) Cancer Res 75:5023-5033

Yamagishi and Yoshikawa (2013) Virus-Induced Gene Silencing pp.167-181

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 3件）

1. 著者名 Konagaya Ken-ichi, Nanasato Yoshihiko, Taniguchi Toru	4. 巻 37
2. 論文標題 A protocol for <i>Agrobacterium</i>-mediated transformation of Japanese cedar, Sugi (<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don) using embryogenic tissue explants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 147 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.0131a	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 Taniguchi Toru, Konagaya Ken-ichi, Nanasato Yoshihiko	4. 巻 37
2. 論文標題 Somatic embryogenesis in artificially pollinated seed families of 2nd generation plus trees and cryopreservation of embryogenic tissue in <i>Cryptomeria japonica</i> D. Don (Sugi)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 239 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.0220a	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 Kirino Haru, Konagaya Ken-ichi, Shinya Ryoji	4. 巻 13
2. 論文標題 Novel Functional Analysis for Pathogenic Proteins of Bursaphelenchus xylophilus in Pine Seed Embryos Using a Virus Vector	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 872076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.872076	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小長谷賢一、吉川信幸、谷口亨
2. 発表標題 ウイルスベクターを用いたスギにおける花粉形成関連遺伝子のノックダウン解析
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会(京都)大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桐野巴瑠、吉本光希、小長谷 賢一、新屋良治
2. 発表標題 マツノザイセンチュウ分泌タンパク質に関するクロマツ胚を用いた機能解析
3. 学会等名 2019年度日本線虫学会第27回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 KIRINO Haru, YOSHIMOTO Kohki, KONAGAYA Ken-ichi, SHINYA Ryoji
2. 発表標題 Molecular mimicry: the parasitic strategy of the pine wood nematode <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> .
3. 学会等名 International Symposium IUFRO on Pine Wilt Disease (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 七里吉彦、小長谷賢一、上野真義、遠藤真咲、谷口亨
2. 発表標題 塩基編集技術による除草剤耐性スギ(<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don)細胞系統の作出
3. 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 編著：田部井豊、七里吉彦、三柴啓一郎、安本周平（分担著者：小長谷賢一、七里吉彦）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 国際文献社	5. 総ページ数 413
3. 書名 ひとりではじめる植物バイオテクノロジー入門 組織培養からゲノム編集まで	

〔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	七里 吉彦 (Nanasato Yoshihiko) (80461292)	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 (82105)	

	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 協力者	谷口 亨 (Taniguchi Toru) (00360470)	国立研究開発法人森林総合研究所・森林総合研究所 森林バイ オ研究センター・主任研究員 等 (82105)	

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