

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：16301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06010・19K21150

研究課題名(和文)DNAフリーゲノム編集柑橘作出ための基盤技術開発

研究課題名(英文)Development of DNA-free genome editing technology for producing a new breed of citrus

研究代表者

賀屋 秀隆 (Kaya, Hidetaka)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80398825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNAフリーゲノム編集技術を用いたカンキツの新品種開発技術基盤を開発することを目的として研究をおこなってきた。まず、標的遺伝子としたカラタチのPDS遺伝子の配列を確認し、sgRNAを複製、in vitroでの機能を確認した。次に、カラタチのカルスにパーティクルボンバードメント法を適応するための条件検討をおこなった。GUS遺伝子を用いて形質導入効率を確認した上で、RNP (Ribonucleoprotein) を射出し、CAPS解析をおこなった。しかしこれまでのところ、ゲノム編集による変異は確認できなかった。現在、パーティクルボンバードメントに用いるパーティクルについても検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAフリー・ゲノム編集技術を柑橘類において確立することで、遺伝子組換え体の規制の対象外となるゲノム編集柑橘品種を作出できる。愛媛大学では、愛媛県オリジナル柑橘品種のゲノム解析が進められており、各品種における果実特性に関するゲノム情報が明らかになりつつある。DNAフリー・ゲノム編集技術を柑橘を適用することで、ゲノム情報と果実特性の関連性を検証し、圃場での特性評価実験も可能になる。本研究により柑橘類の機能ゲノム研究が進むことで、新品種や機能性柑橘の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have been researching for the purpose of developing a technology base for developing new citrus cultivars using DNA-free genome editing technology. First, we confirmed the sequence of the PDS gene of Poncirus trifoliata as the target gene, prepared sgRNA, and confirmed its function in vitro. Next, we examined the conditions for applying the particle bombardment method to the callus of P. trifoliata. After confirming the transduction efficiency using the GUS gene, RNP (Ribonucleoprotein) was injected and CAPS analysis was performed. However, so far no mutations due to genome editing have been confirmed. At present, we are also studying particles used in particle bombardment.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：ゲノム編集 カンキツ カラタチ DNAフリー Cas9

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術は、農業をはじめとする様々な分野への応用や産業利用に向け、急速に発展しているが、ゲノム編集農作物の農業利用には様々な問題がある。最大の問題は、ゲノム編集によって作出された個体に対する法規制が定まっていないということである。日本では、現在のところ、ゲノム編集個体は遺伝子組換え体に準じた扱いとなっている。米国では、ケースバイケースであるが、アクリルアミド産生低減ジャガイモ、高オレイン酸大豆などの null-segregant (交配により外来遺伝子を取り除いた系統) が既に規制対象外とされている。日本においても、外来 DNA をゲノムに含まない null-segregant は規制の対象外と判断されているが、その基準が未定のため適応できていない。この様に日米では、プロダクトベースで規制対象か対象外かを判断する。欧州では、(申請当時)現在のところ、プロセスベースで判断されるため null-segregant も遺伝子組換え体として扱われると考えられる。しかし、今後、欧州を含め、日本政府がゲノム編集個体の取り扱いについて、どのような方針を出すのかが待たれる。(2019年秋、日本では、ゲノム編集作物は、事前に届け出ることで市場での流通が可能になった。)

2. 研究の目的

本研究では、愛媛県の最重要作物である柑橘類において DNA を用いないゲノム編集 (DNA フリー・ゲノム編集) 技術を確立することを最終目標とし、まずはその端緒として、ゲノム編集酵素複合体 (Cas9 タンパク質+guide RNA) を柑橘細胞内に直接導入する方法を確立する。ゲノム編集で重要なことの一つは、ゲノム編集酵素を核内に効率よく導入することである。これまで植物ではアグロバクテリウム法により核移行シグナルを付加した *Cas9* 遺伝子と guide RNA 遺伝子をゲノムに組み込ませ、過剰発現させてきた。しかし、この方法では外来 DNA をゲノムに組み込むために遺伝子組換え体として扱われ作物育種における障壁となりうる。DNA フリー・ゲノム編集技術は、将来、遺伝子組み換え生物の規制対象外となる可能性があり、革新的な育種技術となることが期待される。また、ヘテロ性の高い品種が多い柑橘など果樹類における遺伝子機能解析を加速させることができる。柑橘品種の遺伝的特性を踏まえつつ、上述のゲノム編集個体に関する規制の問題をクリアするために、まずは DNA を用いない DNA フリー・ゲノム編集技術を柑橘類において確立することを目的とする。この技術により、将来的には、遺伝子組換え体の規制の対象外となるゲノム編集柑橘品種を作出できると考えている。また、愛媛大学では、愛媛県オリジナル柑橘品種のゲノム解析が進められており、各品種における果実特性に関するゲノム情報が明らかになりつつある。しかし、ゲノム情報と果実特性の関連性を検証するには遺伝子改変個体の圃場での特性評価が必要である。DNA フリー・ゲノム編集技術によって作出した柑橘類が、遺伝子組換え体の規制対象外になれば、遺伝子改変体の圃場での特性評価実験が可能になる。本研究により柑橘類の機能ゲノム研究が進むことで、新品種や機能性柑橘の開発につながると期待される。

3. 研究の方法

(1) カラタチからのカルス誘導及びカルスからの個体再生

暗黒下でカラタチの種子を発芽させ、1ヶ月後に5–10 mmの上胚軸切片をカルス誘導培地に置床し、カルス形成を誘導した。2–3週間後にシュート誘導培地に移植し、シュート形成を誘導した。シュートが確認できたものは、発根誘導培地に移植し、発根を誘導した。シュート誘導培地では、添加する植物ホルモンの濃度を、1-ナフトレン酢酸 (NAA) は 約2–10.0 mg/L, 6-ベンジルアミノプリン (BAP) は、約 1.0–2.0 mg/L の範囲で検討した。

(2) パーティクルボンバードメント法による、カラタチへの *GUS* 遺伝子導入

カルス形成を誘導したカラタチの上胚軸に対して、パーティクルボンバードメント法により、*GUS* 遺伝子を搭載した plasmid を形質導入した。*GPF* 遺伝子では蛍光観察時の back ground が高いのに対して、*GUS* 染色では back ground は、ほぼないという利点がある。また、遺伝子導入において下記で実施する Cas9 タンパク質-guide RNA 複合体 (RNP: Ribonucleoprotein) の導入の条件と同一にするためにトランスフェクション試薬 (TransIT[®]-2020 Reagent, TaKaRa) を用いておこなった。

(3) sgRNA の作製および *in vitro* cleavage assay による sgRNA の評価

ゲノム編集の対象遺伝子として、ゲノム編集を表現形として可視化できる *PHYTOENE DESATURASE (PDS)* 遺伝子を選択した。公開されているカンキツ類の遺伝子データベースから *PDS* 遺伝子ホモログを探索し、カラタチの *PDS* 遺伝子を推測した。推測した遺伝子配列情報に基づき、PCR クローニングにより、カラタチの *PDS* 遺伝子の配列を確定した。確定した配列情報を基に、SpCas9 用の sgRNA を複数設計し、*in vitro* cleavage assay により各 sgRNA の性能を評価した。

(4) パーティクルボンバードメント法によるカラタチカルスへの Cas9 タンパク質

カラタチのカルスにパーティクルボンバードメント法により、RNP を直接導入し、ゲノム編集を誘導した。この際、金粒子を RNP でコーティングする条件や、パーティクルボンバードメントにおける、He 圧、減圧、射出口からサンプルまでの距離、射出時間、射出回数等の条件を検討した。

(5) カラタチカルスからの genome DNA 抽出及び CAPS 解析

パーティクルボンバードメントから数日後、ゲノム編集を確認するために Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) 解析をおこなった。並行して、パーティクルボンバードメントを施したカルスからシュートを誘導し、*PDS* 遺伝子の変異による表現形 (白色化) の観察を試みた。

(6) カラタチのゲノム解析

ゲノム編集時の問題の一つに off target 変異がある。この off target 変異解析をおこなう際に、高精細なゲノム情報は欠かせない。本研究で材料として使用しているカラタチのゲノム情報を得るために、次世代シーケンス解析 (PacBio によるロングリードとショートリードの組み合わせ) をおこなった。

4. 研究成果

(1) カラタチからのカルス誘導及びカルスからの個体再生

植物ホルモン濃度の検討の結果、効率的なカルス誘導、カルス増殖方法、カルスからのシュート再生が可能になった。これにより、DNA フリーゲノム編集を施したカルスから個体作出までの道程が確立できた。



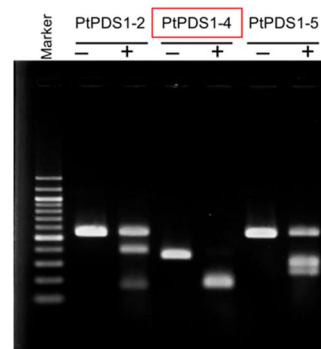
カラタチの上胚軸に形成されたカルス

(2) パーティクルボンバードメント法による、カラタチへの *GUS* 遺伝子導入

パーティクルボンバードメント法による *GUS* 遺伝子導入後、*GUS* 染色をおこなひ、複数の *GUS* 染色スポットを観察した。この結果、TransIT®-2020 を用いても、カラタチのカルス細胞内に *GUS* 遺伝子を導入できることを確認した。

(3) sgRNA の作製および *in vitro* cleavage assay による sgRNA の評価

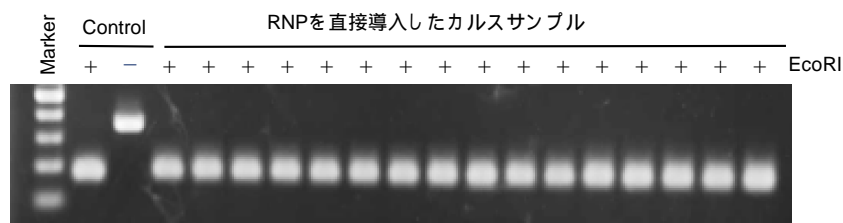
これまでに 5 つの sgRNA を設計し、性能を評価した結果、いずれの sgRNA も標的となるカラタチの *PDS* 遺伝子を切断できることを確認した。その中で最も切断効率の高い sgRNA の PtPDS1-4 を優先的に、下記のパーティクルボンバードメント法に用いた。



PtPDS1-4 >> PtPDS1-2 = PtPDS1-5

(4) カラタチカルスからの genome DNA 抽出及び CAPS 解析

パーティクルボンバードメントにおいて上述の様々な条件で実施し、それぞれのサンプルから genome DNA を抽出し、CAPS 解析をおこなってきた。しかし、これまでに 100 以上のカルスについて調べたが、ゲノム編集による標的配列への変異は確認できなかった(下図は一例)。また、誘導したシュートにおいても白色化した個体は観察できなかった。



解析したすべてのサンプルにおいてゲノム編集による変異は確認できなかった。

sgRNA: PtPDS1-4

(5) カラタチのゲノム解析

実験に使用しているカラタチの次世代シーケンス解析をおこなった。得られたデータは、今後の off target 変異解析、Digeome sequence 解析に加えて、新たな sgRNA の作製用のデータとして活用する。

(6) 今後について

上述より、設計した sgRNA に問題はないことが確認できていることから、パーティクルボンバードメント法における各種設定条件が適切でないと考えられる。また、パーティクルとして用いている金粒子にも問題があるかもしれない。金粒子の代わりにメソポーラスシリカ等の使用も検討し、できるだけ近い間にカンキツの DNA フリーゲノム編集技術を確立したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----