

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05973

研究課題名（和文）ゲノム編集を利用したリン酸飢餓耐性を持つイネの作出と遺伝子機能の解析

研究課題名（英文）Generation of phosphate starvation tolerant rice using genome editing and analysis of gene function

研究代表者

松本 隆（Matsumoto, Takashi）

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：60370681

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）：低リン酸投入農業を実現するために、リン酸飢餓への植物の応答メカニズムを解明し、このような条件下でも生育可能な品種を作出する目的で、ゲノム編集技術を利用してイネのリン酸恒常性制御因子（OsSPX1, OsSPX3, OsNLA1）の機能変異体を作成した。変異体では、通常のリン酸条件では全体のリン酸が顕著に低減したが、低リン酸条件での栽培に対してリン酸量は変化せず、生育も悪化しないという結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SPXドメイン（植物のリン酸恒常性を保持する蛋白質等に共通に存在）を有するタンパクの機能解析は組換え体やトランスポゾン転移による突然変異体が主であり、ゲノム編集を用いるアプローチは、これまで行われていなかった。今回作出した遺伝子の機能変異体は点突然変異等の限定領域変異であり、遺伝子の変異効果が機能に与える影響を調査することができた。また得られた機能変異体は低リン酸栽培条件下でも生育し、組織内リン酸の量も野生型と変わらなかった。これらがゲノム編集体であることを考慮すると、将来低リン酸育種のための遺伝資源として利用される。

研究成果の概要（英文）：Phosphorus is essential for plant body building and energy production, but we rely on imports for the supply of phosphate fertilizers, and there are concerns about supply shortages due to world situations. In order to realize low-phosphate-input agriculture, we have to elucidate the response mechanism of plants to phosphate starvation. We generated functional mutants of phosphate homeostasis regulators (OsSPX1, OsSPX3, and OsNLA1) by CRISPR-Cas-based genome editing technology in rice (*Oryza sativa*). The resulting functional mutant grew well even under low-phosphate cultivation conditions, and the amount of phosphate in the tissue was basically the same as that of the wild type.

Since these are mutants generated by genome editing technology, they can be used as genetic resources for low-phosphate breeding.

研究分野：植物のゲノム生物学、ゲノム塩基配列解読、植物のゲノム編集

キーワード：イネ リン酸代謝 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンは植物の体作りやエネルギー生産に必須であるが、我が国はリン酸肥料の供給を輸入に頼っており、海外情勢による供給不足が懸念されている。この課題を解決するために、リン酸枯渇状態への植物の応答メカニズムを解明し、リン酸飢餓条件下でも生育可能な農業上有用な品種を作出することは重要である。イネは世界の主要作物であると同時に最もゲノム編集の研究が進んだ作物である。ゲノム編集技術を利用すれば、突然変異を狙った位置のみに生じさせ、新規な変異体を迅速に作出し、デザインされたイネの機能改変が可能であり、また画期的な育種素材として活用することが可能である。

2. 研究の目的

(1) ゲノム編集技術を用いて、イネのリン酸恒常性制御因子の機能変異体を作成する。

リン酸飢餓時に発動する遺伝子のゲノム編集は研究開始時には行なわれていなかったため、既報より、リン酸飢餓時に根からの過剰なリン酸吸収を抑制する遺伝子である OsSPX1 タンパク質及び OsNLA1 タンパク質のエキソンをターゲットとして選定し、CRISPR-Cas を用いたゲノム編集イネを作成する。OsSPX1 はリン酸飢餓によって活性化される OsPHR2 の下流に属し、フィードバック阻害によってリンの過剰吸収や過剰蓄積を抑制すると考えられている。また、OsNLA1 はユビキチン E3 リガーゼ活性に關与する RING ドメインを有しており、リン酸輸送体である OsPHT1 を分解してリン酸の吸収を阻害することが明らかになっている。

(2) イネのリン酸恒常性制御因子の機能変異体の機能解析を行う。

OsSPX1、OsNLA1 遺伝子のそれぞれのゲノム編集によって得られた変異体について、正常リン濃度およびリン酸欠乏条件において栽培し、2つの遺伝子がイネの生育やリン酸吸収に果たす役割を同定する。

3. 研究の方法

(1) Agrobacterium 法によるイネの形質転換によるゲノム編集個体の作出

OsSPX1、OsNLA1 遺伝子の第1エキソンにターゲット配列(20mer+TGG)をCRISPR-direct ソフトウェアにより設計し、Casの一部であるgRNAを発現するベクターに組み込み、大腸菌を形質転換した。続けて、gRNA発現カセットをCas/バイナリーベクターにクローニングし、このベクターコンストラクトをAgrobacterium EH101株に導入した。作成した組換えAgrobacteriumをイネ(日本晴)カルスに感染させたのち、寒天培地中で発芽・発根させ再分化個体を取得した。これらのうち目的領域に変異が生じた個体を選抜し、短日条件による開花・自家受粉によってT1種子を取得し、これを播種しT1植物を得た。

(2) OsSPX1・OsNLA1 ゲノム編集体を用いた遺伝子の機能解析

ゲノム編集体(変異体)とコントロールの野生型イネを30日間通常濃度(1.3mM Pi)のリン酸培地および低リン酸(0.03mM Pi)培地にて水耕栽培を行ない、草丈を調べるとともに、マラカイトグリーン法によって組織に含まれるリン酸量(組織中の全リン酸濃度および、組織に結合していない無機状態のリン酸濃度)を測定して、各条件におけるリン酸吸収量を比較した。イネ体内の無機リン(Pi)含量の測定はMullerの方法(Müller et al., 2004)を改良して使用した。収穫したイネ組織の表面の水分を除き、重量を測定した後、氷冷1M HClを加えて粉碎組織を洗い出し、ボルトックスで混和した後、遠心分離した(13000g, 3min, 4℃)。遠心上清をHClで適宜希釈後、マラカイトグリーン・モリブデン酸反応液(Quanti Chrom社 Phosphate Assay Kit)を加え、室温にて30分反応させ、620nmでの吸光度の変化を測定し、既知の無機リン酸溶液の検量線から試料中のリン酸濃度を測定した。また組織全体のリン酸濃度はWangらの方法(Wang et al., 2009)を改良して行なった。収穫後表面の水分を除いたイネの葉および根組織を60℃で7日間乾燥させた試料の重量を正確に測定し、Pyrex ガラスチューブに入れ、蒸留水を加え、硫酸を加えて室温でしばらく放置した後、ドラフト内で60℃に保温したブロックインキュベータにセットする。上部を解放したチューブを180℃まで加熱し、10分おきに2時間まで過酸化水素を加えて反応を加速させる。さらに30分間180℃で反応を継続させた後、室温まで冷却させ、固化した試料をHClに溶解させ、遠心で不純物を除いた後、無機リン酸と同じ方法で抽出液のリン酸濃度を計算した。

4. 研究成果

(1) OsSPX1・OsNLA1 ゲノム編集個体の育成と形質転換体の解析

OsSPX1 ゲノム編集体のT1個体の変異

SPX1 ゲノム編集体については、ゲノム編集当代(T0)から自家受粉によって得られたT1種子を栽培し、得られたT1個体の成葉から、DNAを抽出してOsSPX1遺伝子の第1エキシソンのターゲット配列を含む約200bpをシーケンス解析したところ、T1個体34個体中20個体(59%)に変異が見られた。そのうちホモ個体が12%、ヘテロ変異が47%を占めた。変異は一定ではなく様々なパターン(1塩基挿入、17塩基挿入等)が検出された。変異箇所は主にCRISPR-Casの共通認

識配列である PAM 配列の数塩基上流で生じており、一般的な Cas による二重鎖切断点と合致し、イネゲノムに挿入された CRISPR-Cas が正しく機能していることを推測させる。

OsNLA1 ゲノム編集体の T1 個体の変異

と同様に、OsNLA1 の T0 変異個体を短日条件で自家受粉させ、T1 種子を取得した。これらの種子を栽培して得られた T1 個体の葉から DNA を抽出し、OsNLA1 遺伝子の第 1 エキシソンのターゲット配列を含む約 200bp をシーケンス解析したところ、102 個の T1 個体の 40% (41 個) に変異が見られた。そのうちホモ変異は 21 個 (20%)、ヘテロ変異は 20 個 (20%) であった。ホモ変異体のほとんどは PAM 配列の直前への 1 塩基 (A) 挿入であり、同一のカルス由来である可能性が示唆された。

(2) OsSPX1・OsNLA1 の T1 ホモ変異体の組織内リン酸蓄積量の測定

T1 世代の高・低リン酸処理の実験では、同じ個体を両方の処理をすることができないため、異なる変異を持った 2 つの個体を比較することになり、結果の解釈に個体差が生じる可能性がある。そこで、株分けによって同じ変異 T1 個体を 2 つに分け、片方に通常リン処理、別の片方に低リン酸処理を行なう実験を行なった。実験の概要を図 1 に示す。

実験材料

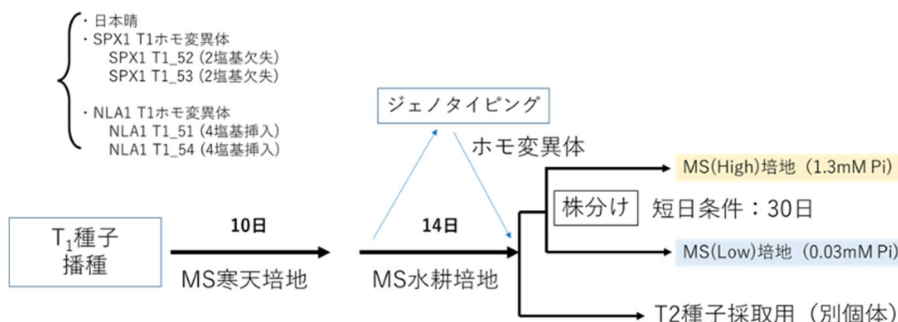


図 1 高リン・低リン培地でのリン酸蓄積量の測定法

野生型品種である日本晴と T1 ホモ遺伝子型を示す変異体の種子を播種し、寒天培地上で生育させる。草丈 10cm 程度の苗を MS 液体培地で水耕栽培し水耕期間中に葉を採取し、OsSPX1 または OsNLA1 遺伝子の改変部位の配列を解読して変異の有無、ホモ/ヘテロ変異を判定し、ホモ変異体の一部はそのまま栽培して T2 種子を採取した。残りから分けつを分離し、それぞれ MS 培地 (リン酸濃度 1.3mM) と、MS と同じ構成でリン酸のみを 0.03mM にした低リン酸培地において 30 日間育成し、地上部と根を分離した後、無機リン・全リン酸の測定を行う。ホモ変異個体は OsSPX1・OsNLA1 形質転換体についてそれぞれ 2 個体を選択した。

日本晴 5 個体についての結果の平均値は高リン条件では地上部・根とも含まれるリンの量は多く、全リン・無機リンともに高い値を示した。また、培地のリン酸濃度を下げると、組織全体のリン蓄積量が 1/8~1/10 に低下することもわかった (図 2)。また、培地のリン酸濃度の低下により、植物体の生育が著しく不良になることも観察された。

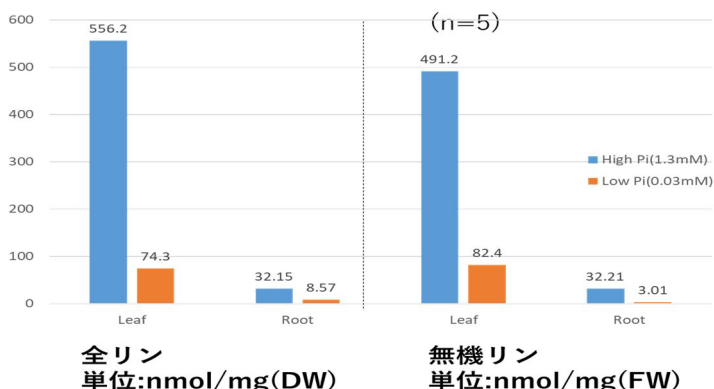


図 2 日本晴の培地リン酸濃度による植物体へのリン蓄積

図 3 には 2 つの OsSPX1 ゲノム編集体の T1 変異体 (変異体 52, 53) の結果を示す。変異体 52 の高リン条件の根については、根の新鮮重が十分でなく、リン酸測定はできなかった。高リン条件では変異体の方が、地上部・根とも含まれる全体のリンの量は低下した。しかし、無機リンの量はそれほど減少していないことから、減少したのは植物体を構成するリンではないかと考えられる。低リン条件では誤差が大きいいため断定はできないが、地上部では全リンの低下

は日本晴と比べて大きくはなく、無機リンはむしろ上昇していると思われる。根についても同様な傾向は見られるが、個体差が著しく結論は出せなかった。
また、生育(草丈)については、は日本晴と異なり、低リン酸培地で育成した方が2変異体とも良かった。

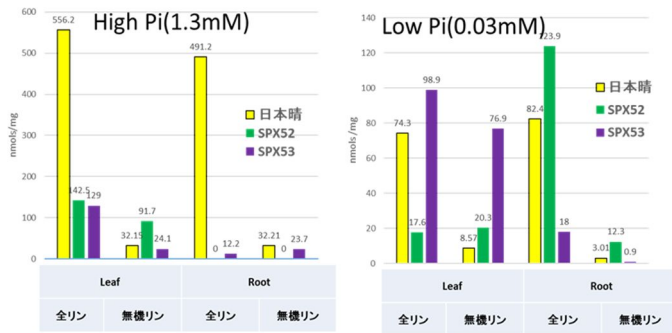


図3 SPX1 変異体(T1)の培地リン酸濃度による植物体へのリン蓄積

同様に2つのOsNLA1ゲノム編集体(変異体51,54)のT1変異体と日本晴の結果を比較した(図4)。高リン条件では、OsSPX1形質転換体における変異と同じように、地上部・根とも含まれる全体のリンの量は低下したが、無機リンの量はそれほど減少していない。
低リン条件では、地上部では全リン・無機リンとも同じように低下したが、根については、全リン・無機リンとも日本晴とそれぞれ変化は少なかった。
生育(草丈)は、高リン酸栽培の方が良かったが、低リン酸栽培でも日本晴ほど低下はしなかった。

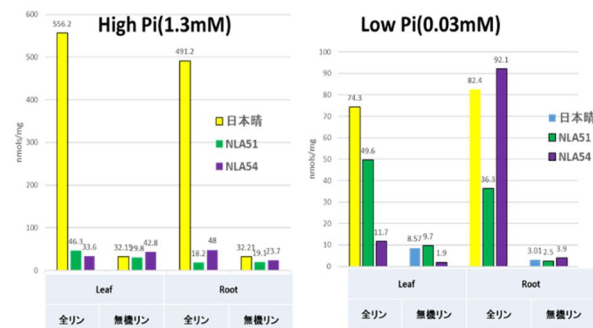


図4 NLA1 変異体(T1)の培地リン酸濃度による植物体へのリン蓄積

(3) 新たなリン酸飢餓時発現遺伝子OsSPX3のゲノム編集体の作出

過去の文献においては、様々なリン酸飢餓時発現遺伝子の過剰発現体やノックアウト変異体等の遺伝子組換え植物が作成されて来たが、そのうちのあるものは致死ではないものの通常時でも生育に著しい阻害が生じ、リン酸代謝を改変することが植物全体の生育に影響を与える可能性が考えられる。すでにOsSPX1・OsNLA1形質転換体を作成する過程において、生育不良、あるいは不稔の個体が多く観察された。植物の特にリン酸飢餓時の全体代謝経路についてはまだ解明されていないため、様々な遺伝子のゲノム編集による突然変異体の作成は、意義があるものである。さらに農学的な見地から、正常条件下で生育が可能で、リン酸飢餓時に野生型よりもリン酸蓄積量が多いイネ変異体は遺伝資源として有用である。これらの観点から、当初の計画には盛り込まれていなかったが、新たにOsSPX3遺伝子をゲノム編集のターゲットとし、形質転換体の作出を行なった。OsSPX3遺伝子はOsSPX1と同じ系統グループに属するがサブグループが異なっている。また既報により遺伝子発現場所を調べると、OsSPX3の発現はOsSPX1とは異なり、葉身(時期限定的)や胚乳で発現しており、葉や胚乳へのリン酸の取り込みに関与している可能性がある。OsSPX1・OsNLA1遺伝子のゲノム編集実験と同じように、CRISPR directソフトウェアを用いてイネ(日本晴)ゲノム配列よりOsSPX3遺伝子の第1エキソンにターゲット配列(20mer)を設計し、(gRNA)発現ベクターを構築した。制限酵素サイトを利用して、このベクターとアグロバクテリウム内で機能するバイナリーベクターとを結合させ、大腸菌を形質転換し、塩基配列・PCR・制限酵素断片サイズの3つの観点からOsSPX3ターゲット配列をgRNA配列に取り込んだ、形質転換用ベクターを作成した。このベクターDNAを精製後、エレクトロポレーションによって、Agrobacterium EH101株に導入した。このアグロバクテリウムとイネ(日本晴)カルスを共存培養することにより、イネを形質転換した。薬剤耐性によって選抜された形質転換体を薬剤抵抗性遺伝子の存在を確認後、ターゲット配列付近の約200bpをPCRにて増幅し、配列を調査したところ、形質転換当代(T0)100個体のうち13個体がヘテロ変異体であった。ホモ変異体は取得されていない。変異体の生育は、通常条件では野生型と変化がなかった。変異をヘテロにもつ個体の

うち、2塩基欠失変異を持っており、次世代で分離すればフレームシフト変異を持つ可能性のある個体を自家受粉し、出穂させてT1種子を得た。このうち14個を生育させたが、T1個体の塩基配列を調査すると、野生型ホモが10個体、また親世代ではアレルとして検出できなかった3塩基挿入ホモ型変異体が2個、多くの塩基波形が混在する複雑な個体が2個体であり、2塩基欠失ホモ変異体は検出できなかった。過去の文献ではOsSPX3のTos17やT-DNAタギング変異体が研究されていないため、OsSPX3の機能欠損型のホモ変異体はイネの生長や生殖に影響をもたらす可能性が考えられた。

(4) 研究成果の総括

イネのリン酸飢餓時に発現し、リン酸吸収を負に制御すると考えられているOsSPX1、OsNLA1、OsSPX3の3つの遺伝子に対してCRISPR-Cas法を用いたゲノム編集を行なった。OsSPX1、OsNLA1の2遺伝子に対してゲノム編集体T0(当代)を取得することができたが、OsSPX3遺伝子についてはT0世代でホモ変異個体を得ることができなかった。また、自殖によって得られたT1世代には変異型のホモ個体は出現しなかった。

一方OsSPX1、OsNLA1遺伝子のT0およびT1個体の配列を解析したところ、それぞれホモ変異が生じていた。T1個体を株分けし、低リン酸培地にて水耕栽培した上で、地上部および根の無機リン酸および全リン酸の濃度を測定した。

OsSPX1変異体は、低リン酸条件においてリン酸の葉への蓄積が増加した。一方高リン酸条件においては全体のリン量が低下した。したがってOsSPX1の機能は、通常のリン濃度においては、リン酸飢餓時に全体のリン量を安定化すると推定された。OsSPX1は過剰のリン酸が外部から蓄積した時に、細胞壁等組織に固定されるリンの量を増やすことで、植物の生育を加速化する一方、大量のリン酸による植物へのダメージを低減する機能があるのかもしれない。一方低リン酸条件においては野生型イネとリン酸濃度は変わらなかったため、リン酸飢餓時のリン吸収抑制にそれほど機能していないと推論できる。なお、生育(草丈)については、低リン酸培地で育成した方が2変異体とも大きかった。

OsNLA1変異体では低リン酸条件で全リンや無機リンの量はあまり減少しなかったが、高リン酸培地において、全リンの濃度が顕著に低下した。OsSPX1と同じくOsNLA1も過剰のリン酸が外部から蓄積した時に、細胞壁等組織に固定されるリンの量を増やすことで、植物の生育を加速化する一方、大量のリン酸による植物へのダメージを低減する機能があるのかもしれない。なお生育(草丈)は、高リン酸栽培の方が良かったが、低リン酸栽培でも日本晴ほど極端な低下は見られなかった。

本研究によってリン酸飢餓時の過剰吸収抑制に関わる2つの遺伝子、OsSPX1・OsNLA1のゲノム編集個体で変異遺伝子型がホモになった個体を得られた。この事実は両方の遺伝子がイネの生長にとって必須ではないことを示しており、これらの遺伝子の編集によって致死になってしまう可能性は低いと考えられた。

また本研究で目標にした、過剰なリン酸の吸収を許容する変異体は取得できなかった。しかし、OsSPX1、OsNLA1遺伝子の変異体とも低リン酸条件における生育は日本晴と同じか優れており、詳細なメカニズムの解析はこれからであるが、リン酸飢餓に対応する新たなイネ遺伝資源の開発につながる可能性がある

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〕

五味星空 東京農業大学修士論文 2023年3月 「ゲノム編集を用いた
リン高吸収変異体イネの作出」

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