

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18472

研究課題名(和文)ゼニゴケにおける性染色体の網羅的欠失スクリーニングの確立と性決定遺伝子の同定

研究課題名(英文)Development of screening method using large deletion in Marchantia polymorpha

研究代表者

菅野 茂夫 (Sugano, Shigeo)

立命館大学・立命館グローバル・イノベーション研究機構・助教

研究者番号：60726313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゼニゴケ(*M. polymorpha*)のゲノムに対して網羅的に長鎖欠失を誘導するためのベクターを作製した。これらのベクターを用いた場合、4.5 kbpまでの欠失であれば、25%程度の効率で誘導できることも実験的に確認した。本ベクターを寄託し、そのベクターの実験結果を含む高効率ゲノム編集ベクターに関する論文を、プレプリントサーバにて公開した。さらに、*M. polymorpha*において性染色体上の遺伝子を含むすべての遺伝子に、オフターゲットの少ないgRNAを複数自動的に設計するソフトウェアを開発した。ソフトウェアに関するプレゼンテーションは国際会議で行った。

研究成果の概要(英文)：Genome editing vectors for large deletion in *Marchantia polymorpha* were constructed. Using these vectors, the transformants harboring the 4.5 kbp deletion were obtained at the rate of 25% of the T1 transformants. The vectors were deposited and the research paper about the efficient genome editing in *M. polymorpha* was open at preprint server. In addition, we implemented the software that can automatically design gRNAs for all the gene, including sex chromosomes, in *M. polymorpha*. The presentation about the software was done at the international meeting.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* ゲノム編集 染色体

1. 研究開始当初の背景

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集は、gRNA の配列にしたがって、ゲノム DNA 上の特定の位置を指定し、ゲノムを操作する技術である (Doudna et al. 2014)。CRISPR/Cas9 は gRNA の配列の設計次第で多数の遺伝子座を同時かつ並列に操作できる特徴をもつので、DNA 合成技術との相性がよい。実際に、ヒトやマウスの培養細胞では、全遺伝子を対象としたゲノムワイドな遺伝子破壊スクリーニング系が実現している (Shalem et al. 2014, Wei et al. 2014 など)。しかし、細胞ではなく「個体」レベルでは、形質転換個体の取得を数万遺伝子に対して行うのは現実的とはいえず、ゲノムワイドスクリーニングはひとつの研究室で行う規模とは言えない。「個体」レベルで CRISPR/Cas9 による網羅的な遺伝子破壊を行うためには、ゲノム編集系との相性の良いモデル生物を選ぶ必要がある。

基部有胚植物のモデル、ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) は、多細胞から構築された三次元的に発達した形態をもつ。加えて、性染色体を有しており、雌雄性を持つ植物としては画期的なモデルであると言える。Ishizaki et al. 2008 で確立された技術によれば、アグロバクテリアを発芽した胞子に感染させると、胞子嚢あたり数百株程度の形質転換個体を取得できる。ゼニゴケにおいて、胞子嚢を数十個程度(見積もりでは数万形質転換個体分の胞子が存在する)準備することは可能である。そこで、たとえば、性染色体に限定すれば、網羅的な遺伝子破壊スクリーニングが可能であると考えられた。ゼニゴケは、半数体優占の生活環を持ち、無性生殖でクローナルな個体が取得可能なうえ、シグナル遺伝子に関しては、遺伝子重複が非常に少ないことが明らかになってきている (大和ら, 河内ら 2012 BSJ Review および Chen et al. 2016, Bowman et al. 2017 Cell)。研究者は、ゼニゴケにおいて、CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集個体の作出に世界に先駆けて成功した (Sugano et al. 2014) さらに、形質転換個体のうち 70% 以上がゲノム編集株であるような、改良型の高効率ゲノム編集ベクターの作製にも成功しており、国内外の 20 以上の研究室で利用されている。本研究では、研究者の確立した高効率ゲノム編集ベクターを利用すれば、ゼニゴケの性染色体遺伝子の網羅的遺伝子破壊系が構築できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ゼニゴケにおいて CRISPR/Cas9 を利用した新しい逆遺伝学的スクリーニング手法を確立する。研究者が確立した高効率なゲノム編集系と、バイオインフォマティクスを組み合わせることで、性染色体の遺伝子の網羅的破壊あるいは欠失を起こすスクリー

ーニング系を構築する。そのスクリーニング系を用いてゼニゴケの「雌化遺伝子」「雄化遺伝子」を同定し、植物性決定・性染色体の進化の分子機構の一端を解明する。

3. 研究の方法

【gRNA 設計】まず、CRISPR/Cas9 法においては、ゼニゴケのゲノム (Bowman et al. 2017 Cell, 研究開始当時は非公開、連携研究者大和博士、河内博士により情報を提供) に対してゲノム編集のための gRNA を網羅的に設計する必要がある。そこで、自作のソフトウェアツールを開発する。gRNA の候補配列の前集合のうち、特異性の高いものを抽出し、ゲノム編集のための gRNA とする。具体的には、既に報告がされている複数の gRNA デザインアルゴリズム (CasFinder, sgRNA Designer, CasOT) を組み合わせる手段により、off target が少ない gRNA の配列を、各遺伝子座に少なくとも 3 つ設計する。性染色体は、特に rDNA リピート領域やトランスポゾンが多いことが知られている (Yamato et al. 2007 PNAS)。そこで、性染色体の位置情報に基づき、リピートを含む領域はあらかじめマスクして計算量を減らす。特にこの工夫は、欠失誘導用のライブラリの設計において有用と考えられる。

【スクリーニング用のベクター構築と形質転換】デザインした gRNA は、カスタムオリゴヌクレオチドプールとして合成し、Gibson assembly 法を用いて、高効率ゲノム編集ベクターに導入後、アグロバクテリウムに導入する。アグロバクテリウムの感染効率は、染色体上の破壊する遺伝子数、誘導する欠失の大きさに影響を与える。アセトシリソンの濃度や感染タイミングの条件を検討し、感染効率を制御し、変異株中の T-DNA 挿入本数の平均を調べる。T-DNA が入る平均本数から、スクリーニングする形質転換体数を算出する。

【スクリーニング】ゲノム編集用ベクターのプールが完成したら、性決定遺伝子のスクリーニングに移る。雌株 Tak-2 に対して、切断面法でアグロバクテリウムを用いた形質転換を行い、ゲノム編集を行っていく。赤外線生殖分化の誘導をかけ、生殖器に異常がみられる株、特に雌器床の形状が変化し、雄器床に変化する株を獲得し、その原因遺伝子を gRNA の配列から推測する。X 染色体に座上しており、破壊が起こると、雌器床が雄器床に変化するという遺伝子は性決定遺伝子である可能性が高い。そこで、その性決定遺伝子候補の機能解析、進化遺伝学的な解析を行う。研究に余力があれば、雄株 Tak-1 を利用して、同様の要領で雄化遺伝子のスクリーニングを行う。

4. 研究成果

【gRNA 設計】まず，gRNA の設計ソフトの改良を行った．具体的には，オフターゲット探索を高速に処理できるように，いままでのオフターゲット検索ソフトに bowtie を組み込んだ．加えて，python を利用して，ゼニゴケゲノム DNA 情報(JGI3.1)とアノテーションファイル(GFF3)から「ゼニゴケの遺伝子の CDS の中心部にオフターゲットの少ない gRNA を 6 本設計する」という機能を持ったソフトウェアを作成した．性染色体の遺伝子だけではなく，全遺伝子に対して gRNA を設計し，ゼニゴケ国際ミーティングで発表した(Tai et al., 65th NIBB conference)．X 染色体に関しては，遺伝子間領域についても BLAST 検索を行い，JGI のアノテーションには含まれない複数の遺伝子候補を同定した．これらの遺伝子領域についても，手動で GFF フォーマットのファイルを作成し，gRNA を設計した．

CDS の中心部を破壊するように設計された gRNA により，indel が生じたとしても，CDS の上流部分は機能的である．完全な機能欠損変異株を作出するためには，長鎖欠失を誘導し，遺伝子領域全てを欠失させる必要がある．そこで，長鎖欠失を誘導させるために，ゼニゴケの遺伝子の coding 領域の両端にオフターゲットの少ない gRNA を 6 本設計するプログラムも作成した．Ong et al. 2017 によれば，6 本の gRNA を利用すれば，その遺伝子座の破壊確率は 99% を超える．そこで，6 本 gRNA を設計できる場合に「特異的な gRNA を持つ」設計できない場合を「特異的な gRNA を持たない」と定義して，両者のプログラムそれぞれで，設計できる割合を比較した(図 1)．その結果，ゼニゴケの全遺伝子の 92.4% で特異的な gRNA を設計できることが分かった．

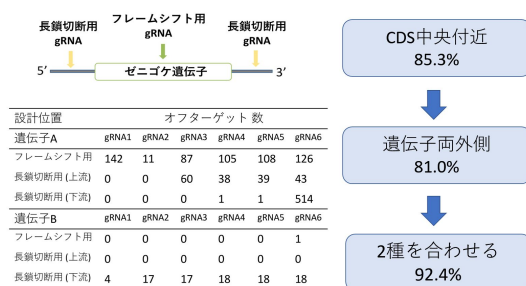


図 1 自動設計した gRNA の評価
全遺伝子における特異的な gRNA を設計できた遺伝子の割合(右)と，CDS 中央付近に設計した場合と，長鎖欠失用(遺伝子の両側)に設

計した場合のそれぞれの場合で特異的となる遺伝子座の典型的な例(左)

特に，X 染色体に関しては，全遺伝子に対して 3 本の gRNA であれば，ほとんどの遺伝子で特異的な gRNA を設計できたので，これらの gRNA のオリゴを 384 プレートフォーマットで合成した．

【スクリーニング用のベクター構築】
合成した gRNA を利用してスクリーニングを行うために，ハイスループットに gRNA のオリゴの導入が可能なゲノム編集ベクターを作製した(図 2)．植物体を選抜するマーカーとしては，ハイグロマイシン耐性のものとクロロスルフロン耐性のものを作製した．

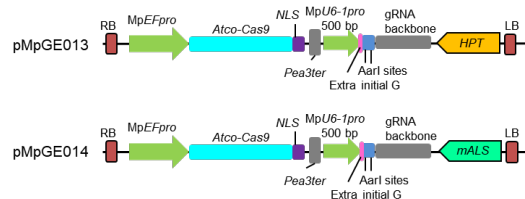


図 2 簡便にベクター構築が可能なゲノム編集ベクター(pMpGE013 がハイグロマイシン耐性，pMpGE014 がクロロスルフロン耐性)

本ベクターでは，今までに作製した Gateway システムではなく，Type II-S 制限酵素を利用できる．そのため，Golden Gate cloning 法が構築利用できる．また，pMpGE013 と pMpGE014 それぞれに異なる gRNA 配列をクローニングし，同時にゼニゴケに感染させて，二種類の薬剤で同時に選抜した場合，複数の gRNA を同時に発現させることが可能である．ベクターの機能を調べるために，MpNOP1 遺伝子をターゲットとしてゲノム編集実験を行った．まず，二種類のアグロバクテリウムを共感染させ，一種類の薬剤で選抜した場合，20 系統選抜しても，数 kbp 欠失するような形質転換ゼニゴケは取得できなかった．一方，異なる二種類のゲノム編集ベクターの共感染株のみ取得できるように，二種類の gRNA カセットをそれぞれ別の薬剤耐性マーカーを含むゲノム編集ベクターに導入し，二種類の薬剤で選抜した場合は，数系統に 1 個体は，4.5kbp を欠失するような株を取得できた(図 3)．

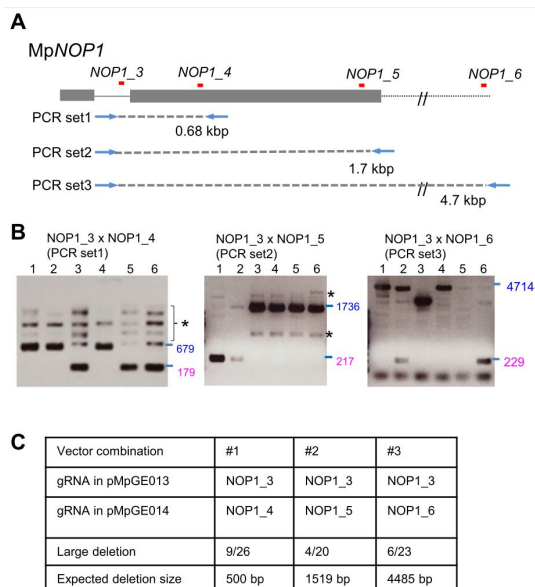


図3 MpNOP1 遺伝子座を利用した、長鎖欠失の誘導と、その効率。(A)実験設計、赤色で示したのが設計したgRNA (B)共感染させて選抜したT1個体のゲノムDNAのPCRによる分析。青色がゲノムDNAの欠失が起きなかった場合のDNAのサイズ、マゼンタが欠失が起きた場合のDNAのサイズ。アスタリスクは非特異的増幅を示す。(C)条件のまとめ。Large deletionの行が、それぞれのgRNAの組み合わせでの、ゲノム編集効率を示す。

長鎖欠失がどの程度の頻度で生じるのか確認したところ、その欠失効率は、長さに大きくは依存しておらず、形質転換株の20%ほどで4.5 kbの欠失が安定に生じていた。本実験と、既に証明した高効率ゲノム編集ベクターに関して、論文を執筆し、プレプリントサーバー bioRxiv にて公開した (<https://doi.org/10.1101/277350>)。さらに、長鎖欠失を起こすためのベクターpMpGE013, pMpGE014 を addgene に寄託した(plasmid # 108681, 108682)。

【screening】研究計画当初の予定、および研究方法においては、これらのベクターを雌株のゼニゴケ Tak-2 に形質転換しスクリーニングを行う予定を記載した。しかし、研究代表者の異動に伴い、ゼニゴケの形質転換系がうまく動作しなくなったため、スクリーニングには至っていない。ゼニゴケの形質転換効率を上げるために新しくアガートラップ法を利用して形質転換系を立ち上げた。本研究課題の期間は終了しているが、引き続き、スクリーニングを続けていく予定である。

【その他】本ゲノム編集ベクターは、研究課題の期間の間に、国内外の数十の研究室に提供し、多くの分子遺伝学的研究に貢献している。これらの研究室からのフィードバックを

もとに、ゼニゴケのゲノム編集手段に関して、Methods in Molecular Biology 誌にプロトコールを書き、投稿した(受理済み)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Sugano SS, Nishihama R, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Ishida Sakiko, Shimada T, Hara-Nishimura I, Osakabe K, Kohchi T.

Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha* bioRxiv, 2018 年 (査読無, プレプリントサーバーへのアップロードのため巻数, ページ数は存在せず)

doi: 10.1101/277350

Ueta R, Abe C, Watanabe T, Sugano SS, Ishihara R, Ezura H, Osakabe Y, Osakabe K. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9.

Scientific Reports, 2017 年 7 巻, 507 (査読有)

doi: 10.1038/s41598-017-00501-4

Sakai Y, Sugano SS, Kawase T, Shirakawa M, Imai Y, Kawamoto Y, Sugiyama H, Nakagawa T, Hara-Nishimura I, Shimada T

The chemical compound bubblin induces stomatal mispatterning in *Arabidopsis* by disrupting the intrinsic polarity of stomatal lineage cells.

Development, 2017, 144 巻, 499-506 (査読有)

doi: 10.1242/dev.145458

Fujimoto S, Sugano SS, Kuwata K, Osakabe K, Matsunaga S.

Visualization of specific repetitive genomic sequences with fluorescent TALEs in *Arabidopsis thaliana*.

Journal of Experimental Botany, 2017, 67 巻, 6101-6110 (査読有)

doi: 10.1093/jxb/erw371

Osakabe Y, Watanabe T, Sugano SS, Ueta R, Ishihara R, Shinozaki K, Osakabe K.

Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants.

Scientific Reports, 2016 年, 6 巻, 26685

〔学会発表〕(計 4 件)

Sugano SS, Koumoto Y, Nishihama R, Matsuda Y, Shirakawa M, Takagi J, Hara-Nishimura I, Osakabe K, Shimada T, Kohchi T.
Highly Efficient Genome Editing Vectors to Induce Targeted Mutagenesis and Long Deletions in *Marchantia polymorpha*
65th NIBB conference: Renaissance of *Marchantia polymorpha* (国際学会)
2017 年

Tai M, Ishino K, Yamato KT, Nishihama R, Kohchi T, Fukao Y, Sugano SS
Development of the genome-wide gRNA design program which extracts gRNAs with reduced off targets in *Marchantia*
65th NIBB conference: Renaissance of *Marchantia polymorpha* (国際学会)
2017 年

菅野茂夫
半数体生物のゲノム編集-ゼニゴケとウシグソヒトヨタケを例に-
第 58 回 日本植物生理学会年会(招待講演)
2017 年

菅野茂夫、西浜 竜一、白川 一、松田 頼子、高木 純平、西村 いくこ、刑部 敬史、河内 孝之
High throughput genome editing in a haploid dominant species, *Marchantia polymorpha*.
日本植物学会 第 80 回大会(招待講演) 2016 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅野茂夫 (Shigeo S. Sugano)
立命館大学・立命館グローバルイノベーション研究機構・助教
研究者番号：60726313

(2)連携研究者

河内 孝之 (Takayuki Kohchi)
京都大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：40202056
大和 勝幸 (Katsuyuki Yamato)
近畿大学・生物理工学部 生物工学科・教授
研究者番号：50293915

(3)研究協力者

河本 恭子 (Yasuko Koumoto)