

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19277

研究課題名(和文)人工制限酵素を利用した減数分裂組換え位置の人為的改変技術の開発

研究課題名(英文)Regulation of meiotic recombination via sequence-specific nucleases

研究代表者

雑賀 啓明(Saika, Hiroaki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：20435613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CRISPR/Cas9を利用した減数分裂組換えの位置を人為的に改変する技術の開発を目指し、その基礎的知見を得ることを目的とした。イネやシロイヌナズナにおいて、減数分裂組換えイベントを可視化できるシステムを構築するため、その素材を作成した。また、減数分裂期にCRISPR/Cas9を発現させるため、減数分裂期に強く発現している3つの遺伝子に着目した。これら遺伝子上流約3kbをプロモーターとしてCas9遺伝子を発現させるコンストラクトを作成し、イネに形質転換した。しかしながら、T1個体において標的遺伝子に変異は導入されていなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を発展させることで、交配育種による新品種作出をより簡便に低労力で行うことが可能になる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I attempted to develop the technology for the regulation of the recombination spots mediated by CRISPR/Cas9 in meiosis. First, transgenic plants were produced as a material for monitoring meiotic recombination events visually in rice and Arabidopsis. Besides, to express CRISPR/Cas9 during meiosis, 3-kb of upstream regions in 3 genes that strongly express in meiosis were isolated. Transformed rice harboring CRISPR/Cas9 driven by these promoters were produced. However, there were no targeted mutagenesis events in these plants in the T1 generation.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：育種学 バイオテクノロジー 遺伝学 ゲノム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

減数分裂では、DNA が切断されることにより両親由来の相同染色体間で組換えが誘導され、遺伝的多様性が創出される。交配育種では、このような遺伝的多様性を持つ集団から目的の形質を有する系統を選抜する。近年、DNA マーカー選抜技術の進歩により、望むべき遺伝子領域を有する個体を効率的に選抜する方法が確立され、育種年限が大きく短縮された。一方、現状では、染色体組換えがランダムに生じた交配後代の系統を多数準備し、目的の遺伝的背景を有する個体を選抜する必要があるため、系統の準備と選抜に多大な労力を要する。また、減数分裂組換えの生じやすさは染色体上の位置によって異なるのみならず、染色体当たりの組換え回数は限られているため、隣接した遺伝子の連鎖が解消される頻度は極めて低い。これまでのところ、染色体の組換え頻度や組換え位置を人為的に制御する汎用的な技術は開発されていない。

減数分裂における相同染色体組換えの最初のステップは、ヌクレアーゼ Spo11 による DNA 切断である。酵母では、Spo11 に転写因子の DNA 結合部位を融合したキメラ酵素を減数分裂期に発現させることにより、標的部位において減数分裂期組換えを誘導する研究が行われている。高等植物でも同様の試みは行われているものの、成功例は報告されていない。一方、近年、人工ヌクレアーゼの開発研究が急速に進展したことにより、標的遺伝子の DNA 切断を高効率に誘導できるようになった。特に、CRISPR/Cas9 は標的遺伝子を破壊する非常に有用で汎用性の高いツールであり、イネ等の農作物を含む様々な生物で広く利用されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、減数分裂期に CRISPR/Cas9 を発現させることで減数分裂組換えの位置を人為的に改変することが可能か検証し、技術開発に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。そのため、(1) 可視的かつ簡便に減数分裂組換えイベントを検出できるシステムの構築、及び(2) 減数分裂期に CRISPR/Cas9 を発現させるシステムの開発について、研究を実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 可視的かつ簡便に減数分裂組換えイベントを検出できるシステムの構築

アグロバクテリウム法によって、イネ(日本晴)及びシロイヌナズナ(Col-0)に *ELuc* 遺伝子を発現させるベクターを形質転換した。形質転換個体から DNA を抽出し、サザンブロット解析により T-DNA のコピー数を推定した。T-DNA が1コピー挿入されていると考えられた系統について、サブレーション PCR 法により T-DNA の挿入位置を調べた。また、それらの系統について、*ELuc* 遺伝子を標的とした CRISPR/Cas9 ベクターを形質転換し、*ELuc* 遺伝子が破壊されて発光が見られなくなった系統を作成した。一部の系統については、CRISPR/Cas9 によって *ELuc* 遺伝子に導入された変異の塩基配列を決定した。

#### (2) 減数分裂期に CRISPR/Cas9 を発現させるシステムの開発

減数分裂期に高発現すると期待される遺伝子に着目し、遺伝子上流 3kb 程度をクローニングした。これらのプロモーターを用いて *Cas9* 遺伝子とガイド RNA、もしくは *GUS* 遺伝子を発現させるバイナリーベクターを構築し、イネ(cv.日本晴)に形質転換を行った。得られた T<sub>1</sub> 個体について、標的変異が導入されているかを調べるために CAPS 解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 可視的かつ簡便に減数分裂組換えイベントを検出できるシステムの構築

まず、イネを材料に、減数分裂組換えイベントを可視化するシステムの開発を行った。

イネカルスに *ELuc* 発現ベクター(図 1A、Saika et al. (2012) Plant Cell Physiol) を形質転換した。得られた 36 系統の形質転換カルスにおいて、ルシフェリン処理によって発光を確認するとともに、サザンブロット解析により T-DNA が1コピーであると考えられる系統を3系統選抜した(図 1B #2, #5, #24)。

*ELuc* 遺伝子を標的とする CRISPR/Cas9 発現ベクターを構築し、*ELuc* 遺伝子を形質転換したカルスに導入した。これらの形質転換カルスにおいて、ルシフェリン存在下でも発光が見られなくなった細

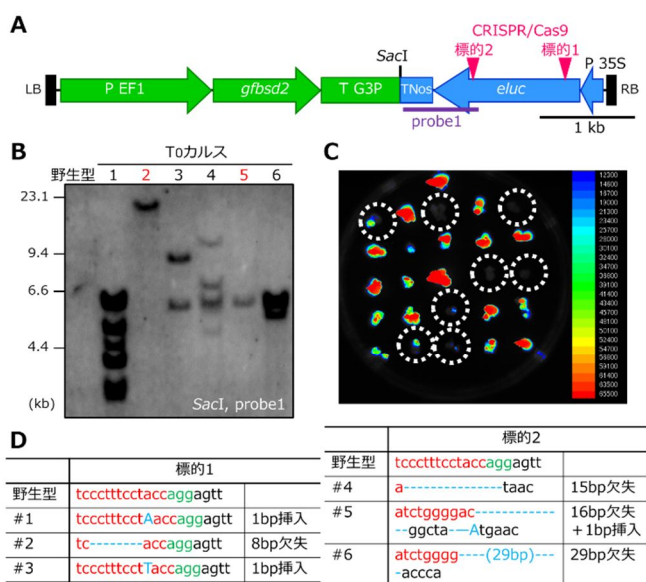


図1. イネにおける減数分裂組換えイベントのモニターシステムの構築 (A) *ELuc* 遺伝子の発現ベクターの構造。(B) 形質転換イネ (T<sub>0</sub>カルス) におけるサザンブロット解析。(C) *ELuc* 遺伝子を切断する CRISPR/Cas9 を形質転換したカルス (#2) における発光の消失 (点線囲み)。(D) *ELuc* 遺伝子に導入されていた変異の例 (#2)。

胞を確認することができた(図1C)。それらのカルスから再分化個体を獲得し、*ELuc* 遺伝子の塩基配列を決定したところ、塩基欠失や挿入等が導入されていることが確認できた(図1D)。しかしながら、標的2を破壊した系統では不稔が確認されたため、再度形質転換実験を行い、再分化個体を得たところである。また、これらの系統について、サプレッションPCRによって遺伝子の導入位置を調べた結果、#2ではT-DNAの挿入位置を決定することができなかったが、#5は2番染色体、#24は10番染色体上にT-DNAが挿入している可能性が示された。

次に、シロイヌナズナにおいても、イネと同様の戦略で減数分裂組換えイベントを検出できるシステムの開発を行った。シロイヌナズナでは、55系統の形質転換個体から、導入遺伝子が1コピーであると考えられる系統を13系統選抜した。これらの系統について、サプレッションPCRによって遺伝子の導入位置を調べるとともに、上述のCRISPR/Cas9発現ベクターを形質転換した。

いずれに植物においても、標的1または標的2に変異が生じた結果 *ELuc* 遺伝子が破壊された系統間で交配することにより、F<sub>1</sub>個体を今後の解析に利用することが可能である。

## (2) 減数分裂期にCRISPR/Cas9を発現させるシステムの開発

小野らの論文を参考に、減数分裂期に発現が高いと予想される遺伝子として、LOC\_Os04g38840、LOC\_Os11g10890、LOC\_Os03g26650に着目した(Ono et al. (2018) PLOS Genet.)。これらの遺伝子上流領域約3kbを減数分裂期プロモーターの候補としてクローニングし、その下流に *GUS* 遺伝子を連結したベクターを構築した(図2A)。これらの発現ベクターを形質転換したイネカルスを用いて *GUS* 染色を行ったところ、ほとんどのカルスで呈色が見られない、もしくはわずかに呈色する程度であった(図2B)。また、ドロップレットデジタルPCRを用いてこれらの遺伝子のmRNA量を調べたところ、LOC\_Os04g38840を除き、カルスでの発現量は非常に低いことが示された(図2C)。このことから、これらのプロモーターを利用することで、カルスでは標的変異頻度を低く抑えつつ、減数分裂期に標的変異を効率よく誘導できると期待された。

次に、これらのプロモーターの下流に *Cas9* 遺伝子及びガイドRNAを連結したベクターを構築し(図2D)イネに形質転換を行った。カルスまたは幼苗で標的配列に変異が導入されていない個体を選抜し、T<sub>1</sub>種子を得た。これらT<sub>1</sub>個体の幼苗を用いて、標的変異が生じているか解析を行ったところ、調べたいいずれの系統でも標的遺伝子に変異は導入されていなかった(図2E、F)。今回、ガイドRNAとCas9を同時に発現させることを期待して、リボザイムを用いてCas9と同じプロモーター下でガイドRNAを発現させるベクターを構築した(Mikami et al. (2017) Plant Cell Physiol)。しかしながら、リボザイムを用いることによって標的変異頻度が低下した可能性が考えられた。そこで、減数分裂期プロモーターでCas9を、イネのU6プロモーターでgRNAを発現させるベクターを構築し、イネに形質転換を行った。今後はこれらの系統を調べることで、3種類のプロモーターが減数分裂期にCas9をさせることに有効であるかを検証したい。

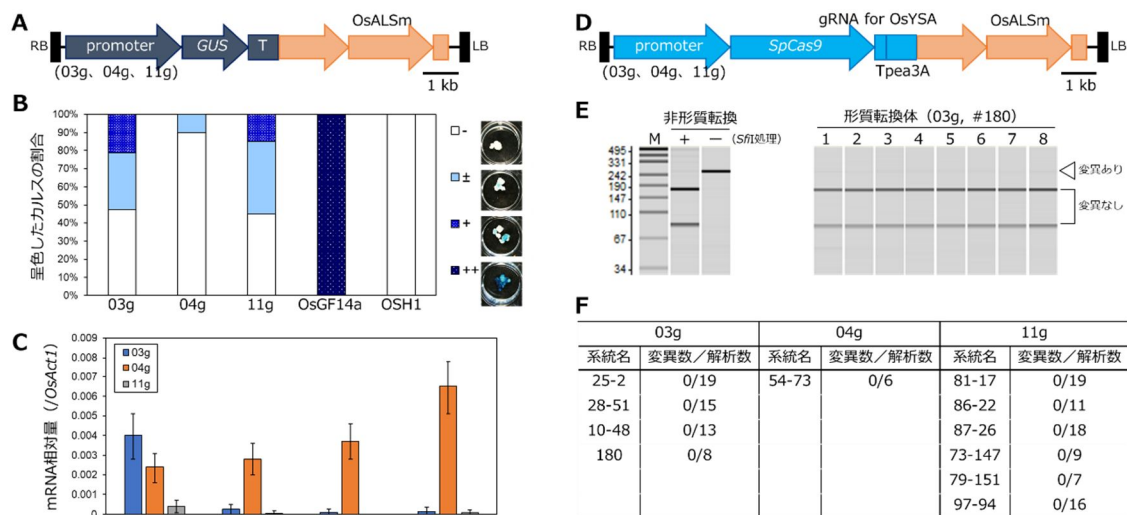


図2. 減数分裂期プロモーターを利用した標的変異実験

(A) *GUS* 遺伝子の発現ベクターの構造。LOC\_Os03g26650、LOC\_Os04g38840、LOC\_Os11g10890のプロモーターをそれぞれ03g、04g、11gと示す。(B) 形質転換カルスにおける*GUS*染色の程度と割合。OsGF14aプロモーターを用いた場合は*GUS*遺伝子がカルスで強く発現するが、OSH1プロモーターでは発現が見られない。(C) デジタルドロップレットPCRによる各種遺伝子の定量RT-PCR。各遺伝子のmRNA量は*OsAct1*遺伝子のmRNA量で補正した。(D) *SpCas9* 遺伝子の発現ベクターの構造。OsYSA遺伝子を標的とするgRNAはリボザイム配列を介してCas9遺伝子と連結した(Mikami et al. (2017) Plant Cell Physiol)。(E) OsYSA遺伝子におけるCAPS解析の例。いずれの個体も変異導入は見られなかった。(F) CAPS解析のまとめ。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 雑賀啓明、土岐精一	4. 巻 55
2. 論文標題 イネのゲノム編集 その動向と展望	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 676-683
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.55.676	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 雑賀啓明、土岐精一	4. 巻 97
2. 論文標題 精密ゲノム編集の現状と展望	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物工学	6. 最初と最後の頁 728-731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hiroaki Saika, Akiko Mori, Seiichi Toki
2. 発表標題 Precise mutagenesis and its application in rice
3. 学会等名 2nd International Conference "Plant Genome Editing & Genome Engineering"（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 雑賀啓明、根岸克弥、廣瀬咲子、横井彩子、遠藤真咲、土岐精一
2. 発表標題 イネの精密ゲノム編集
3. 学会等名 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Saika, Katsuya Negishi, Sakiko Hirose, Ayako Nishizawa-Yokoi, Masaki Endo, Seiichi Toki
2. 発表標題 Precise genome editing in rice
3. 学会等名 2019 KRIBB Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Saika, Akiko Mori, Masaki Endo, Seiichi Toki
2. 発表標題 Targeted deletion of rice retrotransposon
3. 学会等名 Frontiers in Genome Engineering 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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