

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650095

研究課題名(和文)ゲノム編集技術による陸上植物転写制御システムの解明

研究課題名(英文) Genomic studies of transcription factors and experimental analysis of their functions by genome editing in *Marchantia polymorpha*

研究代表者

河内 孝之 (Kohchi, Takayuki)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：40202056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：陸上植物は進化の過程で環境と発生プロセスを調和させる制御系を発達させ、成長を最適化するプログラムを確立した。なかでも転写制御は重要な役割を果たす。新たなモデル生物として注目されている基部陸上植物苔類ゼニゴケのゲノム情報を利用して全転写因子を抽出した。遺伝子機能を解析するには変異体の利用が有効であり、CRISPR/Cas9によるゲノム編集は簡便で効率的な手法である。コドンの最適化によってゼニゴケのゲノム編集効率が向上し、極めて効率よく変異体が分離できるようになった。転写因子を標的として系統的にゲノム編集による変異導入を行うことによって、陸上植物の転写ネットワークが明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Land plants acquired a system to coordinate developmental program with environment during evolution. Transcriptional regulation is one of the major mechanisms for the adaptive growth and development in plants. As a basal land plant, the liverwort *Marchantia polymorpha* is an attractive model organism with haploid-dominant life cycle. In addition, sophisticated experimental systems such as efficient genetic transformation and genome information have been developed in *M. polymorpha*. We deduced the entire set of genes for transcription factors from the draft genome sequences of *M. polymorpha*. To experimentally analyze gene function efficiently, the CRISPR/Cas9-mediated genome editing is a simple and straightforward method to disrupt genes of interest. We significantly improved the efficiency of genome editing by optimizing Cas9 expression and CRISPR design. Simple, rapid and efficient mutagenesis by CRISPR/Cas9 enabled systematic analysis of transcription factors in *M. polymorpha*.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：植物発生学 植物環境応答 ゼニゴケ ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

地球上に 30 万種存在するとされる陸上植物は今から約 4.7 億年前に陸上進出を果たした祖先を起源とする単系統とされる。分子遺伝学的な解析が進んでいるシロイヌナズナに加えて、陸上植物進化に基部に位置づけられる分類群を解析して比較することで、陸上植物の生存戦略の共通原理と多様性が浮かび上がることが期待される(ただし、現生の植物が祖先であるわけではないことには常に注意が必要である)。我々はこのようなアプローチのためのモデル生物として苔類ゼニゴケに注目している。ゼニゴケは生活環の大半を配偶体世代 (n) として過ごすため、遺伝解析に有利である。また、有性生殖と無性生殖により増殖が可能であり、実験室環境で旺盛に繁殖する。ゲノム解析からは染色体レベルでの遺伝子重複を経験しておらず、遺伝的冗長性が低いことがわかってきた。ゼニゴケを研究に利用することによって、植物研究に新たな展開が期待された。そこで、我々はゼニゴケを植物の陸上化進化および分子遺伝学研究のモデル生物として提唱し、これまでに遺伝子の導入系や機能解析の実験系を開発し、分子遺伝学研究の実験基盤を整備してきた。

植物は陸上進出や陸上での進化の過程で、成長を最適化させる仕組みとして、環境応答と発生プログラムを高度に調和させるネットワークを発達させた。その背景にはゲノム重複による遺伝的冗長性と遺伝子の機能分化がある。転写制御因子は、被子植物のシロイヌナズナでは約 2000、陸上植物進化の基部に位置する苔類に属するゼニゴケでは 400 の遺伝子にコードされ、進化とともに制御ネットワークが複雑化したと予想される。しかしながら、ゼニゴケの転写因子は総数では約 6 分の 1 であるが、シロイヌナズナと同規模の 38 ファミリーから構成される。このことは転写制御系の原形はすでに植物が陸上化したときに成立していたことを示唆している。つまり、苔類ゼニゴケをモデルとすることで陸上植物の転写制御系の全貌を理解することが比較的容易であることが期待された。

2013 年に CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) と呼ばれるガイド RNA と Cas9 (CRISPR-associated protein 9) と呼ばれるエンドヌクレアーゼを利用し簡便で高い特異性を持つゲノム編集技術が報告された。これは生体内で染色体上の任意の位置において二本鎖 DNA を切断し、その修復過程で変異を導入するという技術である。我々は、本研究の開始時に既に動物用に開発された CRISPR/Cas9 を応用し、ゼニゴケでゲノム編集が可能であることを示していた。これは、標的遺伝子のモデルケースとして選んだオーキシン応答転写因子遺伝子が増殖すると、ゼニゴケがオーキシン非感受性となり、高濃度のオーキシン含有培地で枯死しないという形質を利用したものであ

る。ゼニゴケ個体でゲノム編集が可能であることを示すことはできていたが、効率は悪く、選択圧なしに変異体を取得するには、ゲノム編集の効率向上が必須であった。これらを背景にゲノム編集技術を改良し、これを活用して陸上植物転写制御システムを解明する研究を着想した。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーの登場に代表される画期的な技術革新を背景にゲノムの配列情報を比較的容易に入手できるようになった。しかしながら得られた配列情報から生物学的な知識を引き出すには地道な実験による機能解析を実施することが必要である。植物の陸上進出と環境適応をもたらした遺伝的な制御系の実体と原理を明らかにするために、基部陸上植物のモデル生物である苔類ゼニゴケを材料として、ゲノム情報より転写因子遺伝子を抽出し、ファミリーごとの分布を明らかにする。また、ゲノム情報が判明している緑藻類、車軸藻類、コケ植物、シダ植物、裸子植物、被子植物との比較解析を進め、陸上化に伴う転写因子遺伝子の変化を明らかにする。この解析を通じて陸上植物の転写レベルでの制御系の理解が深まることが期待できる。

また、本研究では、単なるゲノム情報の比較に基づく推論に留まらず、実験生物学的な研究の推進を目指す。このために、ゲノム比較で明らかになった遺伝子に対する遺伝子破壊実験をデザインし、遺伝子の機能解析実験に利用する実験系を立ち上げる。このために、研究開始時に使われていた CRISPR/Cas9 の実験系の問題点を抽出し改良を試みる。これには、エンドヌクレアーゼをコードする CRISPR の効率の発現が重要である。発現に利用するプロモーターや発現する遺伝子のコドン改変、ガイド RNA をコードする CRISPR のガイド部分の長さや配列の最適化や発現プロモーターの選択などの最適化を試みる。また、配偶体世代が優先的で高い再生能力をもち無性生殖も可能であるというゼニゴケの細胞や組織、成長様式を最大限に活用した効率的な突然変異体作成法を開発する。最終的には、ゼニゴケがもつ制御因子の冗長性の低さといった利点を活用して、制御因子のネットワーク構造や階層性を明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

(1)ゲノム編集効率改良

ゲノム編集には、CRISPR と Cas9 を用いる方法が簡便であり汎用性や応用の可能性も高い。そこで、これまでにゼニゴケ植物体で機能することを見出した CRISPR や Cas9 の発現系をもとに改良を試みる。最終的なゴールは変異効率の向上である。ゼニゴケを用いる

利点は、形質転換の効率のよさ、半数体であるための表現型評価の容易さ、増殖の旺盛さ、無性芽を用いた純系作成系といった *in vivo* での解析にある。系の改良の評価についても、一過的あるいは安定的な RNA やタンパク質の発現レベルの検出といった詳細な分子的な解析を行うことよりも、ゼニゴケの表現型を指標に変異効率を直接検出することによって行う。

遺伝子特異的なガイド RNA を生成する CRISPR の発現に関しては、これまでゼニゴケ U6-1 プロモーターを利用している。そこで他の U6 プロモーターや RNA ポリメラーゼ II で識別される汎用プロモーターの利用を検討する。また、gRNA として利用する標的配列の領域の長さや配列についても検討する。標的遺伝子との相補領域を 16-22 ヌクレオチドまで設計して効率を計算する。また、連続するチミンヌクレオチド (RNA に転写された場合はウラシルヌクレオチド) が転写を減衰させる可能性についても検討する。

ガイド RNA の設計には、ゲノムレベルでの相同性の有無が問題となる。遺伝子破壊を計画する目的の遺伝子に対して、自動的に PAM 配列をもとに候補領域を抽出し、最新のゼニゴケのドラフトゲノム内にオフターゲットが存在するかを判別するシステムを構築する。また、*in vitro* や動物での知見をもとに効率的なゲノム編集が期待される配列候補を提示する機能も盛り込む。

エンドヌクレアーゼをコードする Cas9 については、これまではヒトのコドン使用頻度を基にした合成遺伝子を利用していた。このコドン使用はゼニゴケには最適でない可能性が高い。これまでにシロイヌナズナでのコドン使用頻度をもとに発現を最適化した合成遺伝子はゼニゴケでも機能することが経験的にわかっている。そこで、シロイヌナズナにコドン使用頻度を最適化した合成 Cas9 遺伝子を利用して、Cas9 発現を調べる。必要であればゼニゴケでのコドン使用頻度に完全にマッチする合成遺伝子も作成する。Cas9 を発現させるプロモーターは細胞分裂の盛んな部位で発現が高い Elongation Factor I (EF1) 遺伝子のプロモーターを利用する。

植物体内でのゲノム編集効率を測定するためには、変異が容易に可視化できる遺伝子の利用が望ましい。そこで、ゲノム編集により目的の遺伝子に起こった場合にのみ生存するような遺伝子である Mp *ARF1* (*AUXIN RESPONSE FACTOR1*)、あるいはゲノム編集による変異が生存に有利ではないが表現型が簡便に可視化できる遺伝子 Mp *NOPI* (*NOPPERABO1*) をモデルとする実験系を採用することとした。

(2)ゼニゴケ転写因子遺伝子の抽出

これまでにゼニゴケゲノムの解析は米国 JGI との共同研究で進めており、現在ドラフトゲノムが完成している。植物に限らず原生動物、菌類、動物も含めて生物を横断的に解

析した転写因子のリスト (Weirauch et al., Cell 158, 1431-1443, 2014) をもとにゼニゴケの転写因子を BLAST 相同性検索や HMMER ドメイン検索により抽出した。更に、NCBI Conserved Domain Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) と PROSITE (<http://prosite.expasy.org>) を利用してドメイン構成を評価し、ゼニゴケのゲノムにコードされる転写因子の全体像を明らかにした。

(3)ゼニゴケ転写因子の系統的な機能解析
上記(1)で作成したゲノム編集実験系を(2)で抽出した転写因子遺伝子に応用して、転写因子の機能解析を系統的に進める系を構築する。

4. 研究成果

(1)ゲノム編集法の改良

ゼニゴケのコドン使用頻度は、被子植物シロイヌナズナのコドン使用頻度とは似ているが、動物のコドン使用頻度とは異なる。これまでに Cas9 遺伝子は主として動物用 (主としてヒトを対象) に開発され、コドン使用頻度もヒトに最適化されていた (hCas9)。そこでシロイヌナズナに合わせるよう Cas9 のコドン使用頻度を改変した AtcoCas9 を用いた。Cas9 は分裂の盛んな部位で転写活性の強い *EF1* プロモーターを用いた。標的遺伝子は *ARF1* を用いることとし、*ARF1* 特異的なガイド RNA を設計し CRISPR ベクターを構築し、AtcoCas9 とともにゼニゴケへふたつのコンストラクトを同時に導入した。*ARF1* 遺伝子は変異をするとオーキシン感受性を失い、高濃度のオーキシン存在下でも生存することができる。そこでオーキシン存在下で形質転換体を選択したところ、コドンを最適化していないベクターでの出現頻度とは比較できないくらい多数のオーキシン耐性ゼニゴケが得られた。次に変異誘導の効率を測定するために、オーキシンを含まない培地で形質転換体を選抜し、その無性芽を用いてオーキシン感受性や DNA への変異導入を調べることにした。その結果、75% の T1 植物が変異を有することがわかった (16 個体のうちの 12 個体)。また、従来シロイヌナズナなどの被子植物で報告されている変異よりも比較的大きな欠失を伴う変異体が見出される傾向にあった。これは、突然変異の誘発には有利な性質である。また、ゼニゴケと被子植物との DNA 修復の特性の違いを反映している可能性がある。

次に変異誘発を時空間的に捕らえるため、*NOPI* 遺伝子を標的としたゲノム編集を行った。*NOPI* 遺伝子は、ゼニゴケの気室発生に必須の遺伝子で、膜局在のコピキチンリガーゼをコードする。特に気室発生の初期に生じる細胞間隙形成に機能する遺伝子である。気室の発生しないゼニゴケは、葉緑体に富む繊維細胞を欠くため植物体の色が薄く、変異体

の識別が容易である。その一方で、培養室での栽培条件では生存に影響はなく、遺伝子欠損が不利に働くことはない。そこで変異を検出するために *NOPI* を標的として gRNA を設計した。その結果、*ARF1* のときと基本的に同様の頻度で変異体を得られた。変異体のなかには、葉状体がモザイク状に *nopl* 変異表現型を示す個体が見出された。これは、変異誘発とその後の発生過程における細胞系譜を反映していると予想される。その結果、突然変異が初期に誘発されたものは個体全体に表現型が現れるが、初期に変異が誘発されなかったものも成長中に突然変異が誘発されるというものである。安定した変異系統を確立するときの指針として利用できるものである。ゼニゴケは栄養繁殖の1形態として無性芽を発生させる。無性芽は杯状体の底部の1細胞に由来するため純系の確立に適している。ゼニゴケでゲノム編集系統を確立するには、遺伝子型を判別するのに利用した葉状体部分と起源を一にする無性芽を用いて純系を確立することで、迅速に安定した変異系統を確立できることがわかった。

上記のように、変異誘導率の点からはゼニゴケにおけるゲノム編集の効率化と変異系統の迅速な確立法は達成された。そこで、次にゲノム編集ベクターの改良を行った。これまでは、CRISPR を発現するコンストラクトと Cas9 を発現するコンストラクトは別々に作成していた。多くの実験の場合は、CRISPR のみを改変することで変異誘導コンストラクトの作成は完了するはずである。そこで、遺伝子特異的な合成オリゴヌクレオチドを簡便にクローン化できるエンターベクターを作成し、Gateway 化された Cas9 発現バイナリーベクターを Destination ベクターとする形を構築した。遺伝子特異的なガイド RNA 設計からゲノム編集ベクターの作成までが比較的短時間に行えるようになった。

次に、ガイド RNA 設計の最適化を行った。鎖長が短いほどオフターゲットが低くなる可能性が議論されていたため、鎖長の短いガイド RNA を設計し、鎖長と変異の誘発率を検討した。その結果、17bp のガイド RNA では効率が低下するものの 18bp 以上の鎖長では変異誘導は効率的であることがわかった。また、ガイド RNA とオフターゲットの関連を調べた。配列からオフターゲット可能性が考えら得るローカスの塩基配列を解析したが変異は観察されなかった。

ガイド RNA の設計を支援するプログラムを導入した。与えた遺伝子領域から PAM 配列を検出し、ガイド RNA として提示させ、更にゼニゴケゲノムに対して、オフターゲットの可能性を検証するというものである。これを用いて、簡便にガイド RNA が設計できるようになった。以上のように、標準的な二本鎖切断と修復時の変異導入といったゲノム編集の効率的な実験法が確立した。

(2) ゼニゴケの転写因子

ゼニゴケゲノムは、JGI とゼニゴケのゲノムポータルサイト marchantia.info で公開されているゼニゴケゲノム v3.1 を対象として、DNA 配列特異的な転写制御が予想される転写因子を抽出した。その結果、ゼニゴケゲノムには、少なくとも 355 の転写因子遺伝子が存在することが明らかになった。ゲノムにコードされる遺伝子総数のうち、1.8% が転写因子であった。転写因子総数 355 というのはシロイヌナズナ転写因子遺伝子数に比べて著しく少ない。しかしながら、これらの遺伝子がコードするタンパク質は 38 の転写因子ファミリーに分類された。これらのファミリーはこれまでに解析された被子植物シロイヌナズナ、小葉植物イヌカタヒバ、蘚類ヒメツリガネゴケと基本的に共通であった。一方でこれまでに原生動物や菌類で知られているが陸上植物では報告のなかった遺伝子ファミリーに属するものを見出すことはできなかった。このことは、植物は陸上へ進出したときに既に基本的な遺伝子ファミリーをセットとして保持していたことを意味する。38 のファミリーは更にサブクレードに分類が可能である。例えば、bHLH 転写因子はゼニゴケで 51 個、シロイヌナズナで 146 個存在する。コケ特異的あるいは被子植物特異的なクレードもわずかに存在したが、基本的にサブクレードレベルで共有しているものが多く、植物が陸上化した時点である程度の機能分化が進んでいたことが予想された。一方で、MADS ボックス転写因子のようにゼニゴケでは 2 つしか存在しないものが被子植物では 100 以上に増えているといった具合に陸上植物進化のなかで著しく増加しているものもあった。基本的には、植物が陸上化時点で獲得していた転写因子を進化の過程で増加させ、複雑な多細胞体制における制御を可能にしたことを意味しているのであろう。

(3) ゲノム編集手法を利用した転写制御ネットワークの解析

ゲノム編集による突然変異誘導が簡便に行えるようになった。これまでに、オーキシン応答、光応答、成長相転換に関与する複数の転写因子遺伝子に対してガイド RNA を設計し、効率的に変異が誘導されることがわかった。今後、全転写因子を対象にガイド RNA を設計することで、システムティックに転写因子に絞ったスクリーニングが可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Sugano, S. S., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Shimada, T., Hara-Nishimura, I. and Kohchi, T. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L., *Plant Cell Physiol.*, 55, 475-481 (2014).

DOI: 10.1093/pcp/pcu014

Kato, H., Ishizaki, K., Kouno, M., Shirakawa, M., Bowman, J. L., Nishihama, R., and Kohchi, T. Auxin-mediated transcriptional system with a minimal set of components is critical for morphogenesis through the life cycle in *Marchantia polymorpha*, *PLOS Genet.*, 11, e1005084 (2015).

DOI: 10.1371/journal.pgen.1005084

Nishihama, R., Ishizaki, K., Hosaka, M., Matsuda, Y., Kubota, A., and Kohchi, T. Phytochrome-mediated regulation of cell division and growth during regeneration and sporeling development in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J. Plant Res.*, 128, 407-421 (2015).

DOI: 10.1007/s10265-015-0724-9

Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K. T., and Kohchi, T. Molecular genetic tools and techniques for *Marchantia polymorpha* research *Plant Cell Physiol.*, 57, 262-270 (2016).

DOI: 10.1093/pcp/pcv097

Nishihama, R., Ishida, S., Urawa, H., Kamei, Y., and Kohchi, T. Conditional gene expression/deletion systems for *Marchantia polymorpha* using its own heat-shock promoter and the Cre/loxP-mediated site-specific recombination. *Plant Cell Physiol.*, 57, 271-280 (2016).

DOI: 10.1093/pcp/pcv102

〔学会発表〕(計 7 件)

加藤大貴、神埜勝、白川一、石崎公庸、西浜竜一、河内孝之、苔類ゼニゴケにおけるオーキシン信号伝達因子 ARF の機能分化、日本植物化学調節学会年会、京都大学、2014 年 10 月 18 日

西浜竜一、石田咲子、河内孝之、細胞板形成に必須なゼニゴケ NACK オーソログの機能解析、日本植物学会年会、明治大学(川崎市)、2014 年 9 月 14 日

加藤大貴、鈴木秀政、山岡尚平、西浜竜一、石崎公庸、河内孝之、Transcriptional activities and protein interactions of AUXIN RESPONSE FACTORS from *Marchantia polymorpha*、日本発生物学会年会、つくば会議場(つくば市)、2015 年 6 月 3 日

河内孝之、基部陸上植物ゼニゴケのゲノムとゲノム編集、第 15 回名古屋大学遺伝子実験施設公開セミナー「植物のゲノム編集技術で人類の未来を広げる」、名古屋大学、2015 年 12 月 11 日

水谷未耶、石崎公庸、深尾陽一朗、藤原正幸、増田晃秀、西浜竜一、河内孝之、タンパク質質量分析と CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いたゼニゴケ離生細胞間隙形成制御因子の探索、日本植物生理学会年会、岩手大学(盛岡市)、2016 年 3 月 18 日

永山啓太郎、吉竹良洋、久保田茜、西浜竜一、山岡尚平、河内孝之、苔類ゼニゴケにおいて遺伝的に保存された GI-FKF-CDF 経路

は光周期性成長相転換を決定する、日本植物生理学会年会、岩手大学(盛岡市)、2016 年 3 月 19 日

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、ゼニゴケにおける高効率ゲノム編集ベクターの開発、日本植物生理学会年会、岩手大学(盛岡市)、2016 年 3 月 20 日

〔図書〕(計 2 件)

河内孝之、西浜竜一、基部陸上植物モデル 苔類ゼニゴケ 植物の生長調節 50, 96-102 (2015)

Bowman, J. L., Araki, T. and Kohchi, T. *Marchantia*: Past, Present and Future. *Plant Cell Physiol.*, 57, 205-209 (2016).

DOI: 10.1093/pcp/pcw023

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.plantmb.lif.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

河内 孝之 (KOHCHI, Takayuki)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号: 40202056

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

西浜 竜一 (NISHIHAMA, Ryuichi)
京都大学・大学院生命科学研究科・講師
研究者番号: 70283445

山岡 尚平 (YAMAOKA, Shohei)
京都大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号: 00378770

石崎 公庸 (ISHIZAKI, Kimitsune)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 00452293

菅野 茂夫 (SUGANO, Shigeo)
京都大学・大学院理学研究科・研究員
研究者番号: 60726313