

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07256

研究課題名(和文) ゲノム編集を用いた半数体作出法の開発

研究課題名(英文) Development of haploid production method using genome editing

研究代表者

長岐 清孝 (NAGAKI, Kiyotaka)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：70305481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「簡便で汎用性のある半数体作出法の確立」を目的とする。「半数体作出とその倍加」による「半数体育種法」は、純系を得る為の時間を大幅に短縮することができる。しかし、これまで半数体は花粉培養や異種交配により作出され、これらの方法を利用できる種はごく僅かであった。本研究では、イネ、シロイヌナズナ、トマト、ミヤコグサにおいて、動原体タンパク質やDNA配列をゲノム編集により改変して、その機能を低下させ、この機能低下した動原体をもつ配偶子と正常な動原体をもつ配偶子を交配することにより、受精胚中で選択的に片親由来の染色体セットを脱落させ、半数体を効率的に作出することを目指した。

研究成果の概要(英文)：In this research, I aim to establish "a simple and versatile haploid production method". The "Haploid breeding" by "Haploid Production and Its Doubling" can greatly shorten the time to obtain the pure line. However, so far haploids have been produced by pollen cultivation or crossbreeding, and only a few species can utilize these methods. In this study, kinetochore proteins and centromeric DNA sequences were modified by genome editing in rice, Arabidopsis thaliana, tomato, and Lotus japonicus to decrease its function, and crossing the gametes having this low-functional centromere and the normal centromere will cause selectively eliminate chromosome sets derived from one parent in fertilized embryos and efficiently produce haploid.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：動原体 半数体

1. 研究開始当初の背景

イネなどの自殖性作物の育種では、耐病性など野生種のもつ有用形質を既存の作物品種に導入するために、(1)F1 雑種の作出、(2)F1 雑種の自殖によるF2の作出、(3)F2集団における有用形質をもつ個体の選抜、(4)有用形質を固定し純系を作るための、選抜系統の8世代程度の自殖が行われる。つまり、有用形質を導入した純系の育種には、一年生植物の場合でも約10年、発芽から結実までに数年の生育期間を必要とする多年生植物の場合は、その期間の10倍を必要とする。

このような長期の育種期間を短縮する方法のひとつとして、「半数体作出とその倍加」による「半数体育種法」がある。この方法ではF1から純系を作出するまでの期間を1年までに短縮できるため、この方法は品種の育成に加えて遺伝地図作製やQTL解析等の育種の基礎研究および遺伝子単離に大きく貢献してきた。これまでの半数体作出法には、(1)花粉や葯を培養して半数体を得る「培養法」や(2)特殊な交雑によるゲノム脱落を利用した「交雑法」が用いられてきた。しかし、「培養法」では、(1)花粉培養の条件設定が難しく汎用的でないこと、(2)培養過程でソーマクローナル変異が生じてしまうことが問題点となっている。一方で、「交雑法」では、ゲノム脱落が生じる交雑は非常に希で、オオムギのバルボサム法やコムギのトウモロコシ法等の交雑に限定されることが問題点である。しかし、「交雑法」は、「培養法」と異なり異数性が生じにくく、ゲノム単位での脱落による半数体を得やすいという利点をもつ。

近年、この「交雑法」に汎用性をもたせるための新しい手法がシロイヌナズナで報告された(Ravi & Chan 2010)。この方法ではまず、動原体タンパク質のひとつである「動原体特異的ヒストン H3 (CENH3 と略す)」の欠失変異体に、GFP と連結した CENH3 (GFP-CENH3 と略す) を導入して機能の低い動原体をもつ「動原体機能低下系統」を作り出した。次に、この系統と野生型を交配すると、GFP-CENH3 による動原体機能の部分的阻害により「動原体機能低下系統」由来染色体の伝達が不安定化し、野生型由来の染色体のみをもつ半数体が得られた。この方法の利点としては、(1)CENH3 は必須タンパク質であり他の植物種においても同法が利用可能であること、(2)「半数体」として残る側のゲノム提供親には改変の必要がないこと、(3)1種類の「動原体機能低下系統」を作出すれば、交配可能な全ての種の育種材料として利用できることなどが挙げられる。しかし、必須タンパク質であるCENH3の変異型ホモ個体は胚致死となり、ヘテロ個体は表現型を示さないため、CENH3 変異体を得るためには変異体のプールからTILLING等を用いて大規模なスクリーニングを行う必要があり、これがCENH3変異体単離の障壁となっていた。

この問題点を克服するために、私はRNA干渉(RNAi)を利用し「動原体機能低下系統」の作出に取り組んできたが、内在性のCENH3の発現

を完全に抑制することはできなかった。内在性のCENH3の発現の抑制が不完全な理由として、導入したGFP融合CENH3遺伝子の発現に影響を与えずにRNAiを行うには、内在性CENH3遺伝子のUTRを利用するしかなく、RNAiを引き起こす為に十分なサイズの配列を確保できなかったことが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、「簡便で汎用性のある半数体作出法の確立」を目的とする。

3. 研究の方法

(1)「動原体機能低下系統」による半数体作出

本研究では、4種のモデル植物(イネ、シロイヌナズナ、トマト、ミヤコグサ)において、「ゲノム編集法」により「動原体機能低下系統」を作出し、それを用いて半数体作出法を開発することとした。ゲノム編集法でターゲット認識に必要とされるのは20-40bpの配列であり、イントロンとエクソンの境界部分も利用可能な為、ゲノム編集法はRNAiに比べてきわめて自由度が高い。

GFP-CENH3 または Tail-swap 系統の作出

GFP-CENH3 を発現する系統は、イネ、シロイヌナズナ、トマトにおいて既に作出済みであったので、ミヤコグサにおいて新たに GFP-CENH3 を発現する系統をアグロバクテリウムを用いた形質転換により作出を試みた。

Ravi & Chan (2010, Nature 464: 615-619) の報告では、野生型のCENH3の代わりにCENH3のヒストンフォールドドメイン(HFDと略す)と通常型ヒストンH3のアミノ末端(N末端と略す)からなるキメラタンパク質(Tail-swap系統)をGFP融合タンパク質として利用することにより半数体の作出効率が向上した。このキメラタンパク質をもつ系統もイネ、シロイヌナズナ、トマトにおいて既に作出済みであったので、ミヤコグサについて作出を試みた。

ゲノム編集による野生型 CENH3 欠失系統の作出

GFP-CENH3 または Tail-swap を形質転換した系統内で内在性の野生型 CENH3 のみを選択的に破壊するために、内在性のCENH3遺伝子のイントロンとエクソンの境界部分に標的配列を設計したTALLENおよびCRISPR/Cas9コンストラクトにより、イネ、シロイヌナズナ、トマトおよびミヤコグサの内在性CENH3の破壊を試みた。

(2)近縁種の CENH3 を利用した動原体機能低下系統の作出

我々の解析により、導入した異種CENH3の動原体局在性は内在性CENH3との相同性と相関があることがわかっている(Nagaki et al. 2010)。つまり、異種CENH3は、GFP-CENH3と同様に動原体機能を部分的に阻害できる可能性があり、多数の異種CENH3があるので、その効果も多様である可能性が高い。

本研究では、タバコのCENH3をもつシロイヌ

ナスナおよびトマトの作出を試みた。

(3) CENH3 以外の動原体タンパク質を利用した動原体機能低下系統の作出

我々はタグ付き CENP-C を強発現するシロイヌナズナ植物体が成長異常を示すことを見出した(未発表)。この結果を踏まえて、本研究では CENH3 以外の動原体構成タンパク質(CENP-C および Mis12)についても同様な実験を試みた。

シロイヌナズナおよびトマトにおいて、GFP 融合 CENP-C および GFP 融合 Mis12 を発現する系統を作出し、内在性の CENP-C および Mis12 遺伝子のイントロンとエクソンの境界部分に標的配列を設計した TALEN コンストラクトにより、内在性 CENP-C または Mis12 の破壊を試みた。

(4) 「無動原体花粉形成系統」を用いた半数体作出

花粉中の染色体から動原体 DNA 配列をターゲットにしたゲノム編集により動原体 DNA 配列を取り除くことにより、「動原体機能低下系統」と同様な効果をもつ「無動原体花粉形成系統」の作出も試みた。パイロット実験として、シロイヌナズナの動原体配列である 180 bp ファミリー配列を標的にした TALEN コンストラクトを作成し、「無動原体花粉形成系統」の作出を試みた。

(5) 「GFP-CENH3 または Tail-swap 過剰発現系統」を用いた半数体作出

花粉中で GFP-CENH3 または Tail-swap 過剰発現することができれば(1)の「動原体機能低下系統」と類似したものが作成できると考え、アルコール誘導により GFP-CENH3 および Tail-swap を過剰発現できるシロイヌナズナ系統を作成し、これらと野生型系統を交配することにより、半数体が作出可能であるかどうかを確かめた。

4. 研究成果

(1) 「動原体機能低下系統」による半数体作出

シロイヌナズナ、トマト、イネ、に TALEN コンストラクトを形質転換し、ゲノム編集の有無を PCR および PCR 産物の塩基配列確認により調べたが、すべての TALEN 系統において、ゲノム編集の痕跡を確認することはできなかった。

上記の結果を受けて、もう一つのゲノム編集法である CRISPR/Cas9 法を試みた。ベクターには複数箇所を同時にゲノム編集可能な pYLCRISPR/Cas9 シリーズを用いた。シロイヌナズナおよびトマトに対しては、35S プロモーターで Cas9 が誘導される pYLCRISPR/Cas9P35s-H をイネに対してはユビキチンプロモーターで Cas9 が誘導される pYLCRISPR/Cas9Pubi-H を用いて形質転換を行った。得られた形質転換体を PCR および PCR 産物の塩基配列確認により調べたところ、イネにおいてのみゲノム編集の痕跡が確認された。

上記実験において、ゲノム編集の痕跡が確認できなかったシロイヌナズナおよびトマトに対して、新たに RPS5A プロモーターをもつ

CRISPR/Cas9 コンストラクトを pKIR1.1 ベクターを用いて作成したところ、両種においてもゲノム編集の痕跡が確認された。

現在、これらの系統と野生種を交配することにより半数体が作出可能かどうかを確認中である。

ミヤコグサについては、GFP-CENH3 および Tail-swap 系統と CRISPR/Cas9 系統を別々に形質転換し、得られた形質転換体を交配して半数体誘導系統を作出することとし、現在、それぞれの形質転換体候補の確認を行っている。

(2) 近縁種の CENH3 を利用した動原体機能低下系統の作出

タバコの CENH3 をもつシロイヌナズナおよびトマトを作出した。今後、これらの系統についても(1)でゲノム編集ができることが確認されたコンストラクトを形質転換していく。

(3) CENH3 以外の動原体タンパク質を利用した動原体機能低下系統の作出

CENP-C および Mis12 遺伝子に対して TALEN コンストラクトを作成したが、(1)において TALEN が機能しなかったため、TALEN によるゲノム編集を中止した。今後は、CRISPR/Cas9 コンストラクトを作成し、これらの遺伝子に対するゲノム編集を行っていく。

(4) 「無動原体花粉形成系統」を用いた半数体作出

シロイヌナズナにおいて動原体配列である 180 bp ファミリー配列を標的にした TALEN コンストラクトを作成し、形質転換体を得た。この系統と野生型系統を交配した後代の核型を確認したが、野生型と変わりがなかった。今後は、CRISPR/Cas9 コンストラクトを作成し、ゲノム編集を行っていく。

(5) 「GFP-CENH3 または Tail-swap 過剰発現系統」を用いた半数体作出

アルコール誘導により GFP-CENH3 を過剰発現できるシロイヌナズナ系統を作成し、この系統と野生型系統を交配した。得られた後代の核型を確認したが、野生型と変わりがなかった。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

(1) 長岐清孝、動原体改変による半数体作出、一般社団法人日本育種学会 第 130 回講演会、2016 年 9 月 24 日、鳥取市

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岐 清孝 (NAGAKI, Kiyotaka)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号: 70305481