

令和 2 年 11 月 28 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19249

研究課題名（和文）遺伝子組換えを使わない作物ゲノム編集技術の開発

研究課題名（英文）Development of a non-GM method for crop genome editing

研究代表者

今井 亮三（IMAI, Ryozo）

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・主席研究員

研究者番号：90291913

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：コムギにおいてCRISPR/Cas9システムを茎頂生殖系列細胞に直接導入する手法を開発した。金粒子にCRISPR/Cas9 RNPをコートし、パーティクルガンを用いて種子胚茎頂にボンバードした。本手法により、培養を経ることなく作出された植物体は、変異を次世代に遺伝することが示された。本手法を用いてイネの緑の革命遺伝子のコムギオルソログに変異導入することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集は新しい作物育種技術として注目されている。しかし、作物のゲノム編集では、一般的に外来遺伝子を染色体に一度組み込み、それを後代の交配等で分離除去する過程を経る。この過程は複雑であり、社会受容の面からは障壁となり得る。そこで、本研究ではDNAを用いないゲノム編集系を作物で開発し、外来遺伝子を染色体に組み込まないゲノム編集技術を開発することを目的とした。本研究で開発された手法により、コムギ実用品種の農業形質を改変することが可能になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：we have developed a novel methodology to deliver the CRISPR/Cas9 system directly into germ cells within the Shoot Apical Meristems (SAMs) of wheat. The plants created with the method, which requires no tissue culture steps, inherited mutations to the next generation. We have successfully introduced a mutation in a wheat ortholog of the rice green revolution gene.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR DNAフリー ジベレリン 緑の革命 短稈

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの作物で遺伝子組換え(形質転換)技術が確立されているが、実用品種においては依然困難な作物が殆どである。この理由は、形質転換のプロセスにおいてカルス等の培養を必要としているため、再分化能の低い実用品種には適用できないからである。我々は、吸水直後のコムギ種子胚茎頂にパーティクルボンバードメントにより DNA をデリバリーすると、次世代に遺伝する形質転換体を作出できることを見出した(濱田ら,特願 2016-97464)。本手法(*in planta* particle bombardment, iPB 法)では、茎頂に存在する L2 細胞層において、生殖細胞がその中の細胞に由来することを利用し、生殖系列細胞への DNA 導入 染色体組換え 次世代への安定遺伝が、確率は低いものの(0.5%), 确实、安定的に起こっていることを明かにした。また、想定していた通り、品種間に効率の差異は殆ど見られなかった。そこでこの手法を、遺伝子組換えを使わないゲノム編集に利用することを着想した。動物では、ゲノム編集は一過的発現や、編集酵素の直接導入によって十分に起こる(Gaj et al. Nature Method 2012)。iPB 法を用いた場合も、一過発現であれば、染色体への安定組換えの数倍以上の頻度で起こっているものと推定される。これらの経緯を踏まえて、iPB 法の原理に基づき、ゲノム編集酵素を L2 層細胞に一過的に存在させることで、ゲノム編集を起こすことができるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

作物を使ったゲノム編集の報告は急速に増加している。コムギにおいても Wang らがゲノム編集によりうどん粉病抵抗性を付与したコムギの作出を報告している(Wang et al. Nature Biotechnol. 2014)。しかし、ゲノム編集酵素遺伝子を一端染色体に組換えた場合、交配等での遺伝子を除く作業が必要であり、除去できた場合も、プロセスベースでは組換え作物(GMO)として取り扱われることになる。また、作物育種への応用を考えた場合、実用品種でゲノム編集が可能となる技術が求められている。本研究では、iPB 法を用いることで、培養を用いないゲノム編集酵素直接導入法を世界に先駆けて確立することを目指している。

3. 研究の方法

(1) 材料調整

本研究では、春播きコムギ「春よ恋」を用いた。吸水 2 日後の種子から、実顕微鏡下で胚より鞘葉、第 1~第 3 葉を切り取り、茎頂部を露出させた。種子より胚全体を切り出し、プレート上に半径 1 cm の円周となるように並べた。

(2) ボンバードメントサンプルの調整

組換え Sp Cas9 タンパク質は大腸菌より精製されたものを用いた(農研機構・加藤悦子博士からの提供)。sgRNA は GeneArt™ Precision gRNA synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて *in vitro* 転写法により合成した。12 µg Cas9 と sgRNA 5µg, RNase Inhibitor 40U を 10x Cut smart buffer 中で 10 分間常温で放置し、RNP を構成させた。0.6 µm 金粒子(InBio Gold) 270µg を加え、表面に RNP を吸着させ、15 分間風乾した。

(3) パーティクルボンバードメント

パーティクルボンバードメントはバイオラッド PDS-1000/He™ を用いて、対物距離 6.0cm, 印加圧 1350 psi の条件で行った。

(4) ゲノム編集個体の選抜

ボンバードメント後の胚は、そのままプレート上で成長させ、土に移植した。第 5 葉期において、葉組織より DNA を抽出し、gPCR により変異の有無を CAPS 解析した。変異バンドが検出された個体については、次世代の種子を取り T1 植物についてそれぞれ CAPS 解析及び DNA 配列解析により genotyping を行った。

(5) 変異体の形質評価

A,B,D の全てのゲノムに変異が導入された変異体については T2, および T3 世代において、稈長、収量性、その他表現型を解析した。

4. 研究成果

(1) ターゲット遺伝子の同定

ゲノム編集ターゲットとしてイネの OsGA20ox-2 遺伝子のオルソログを選定した。GA20ox-2 はジベレリンの生合成遺伝子であり、その機能喪失は稈長の半矮性化をもたらすことが期待される。OsGA20ox-2 と相同性を示すコムギ遺伝子をデータベース検索した所 A,B,D ゲノムに相当する 3 つの遺伝子が同定された 図 1。これらの遺伝子 *TaSD1A-TaSD1D* を共通に切断する CRISPR/Cas9 gRNA をデザインした。

(2) 変異体の作出

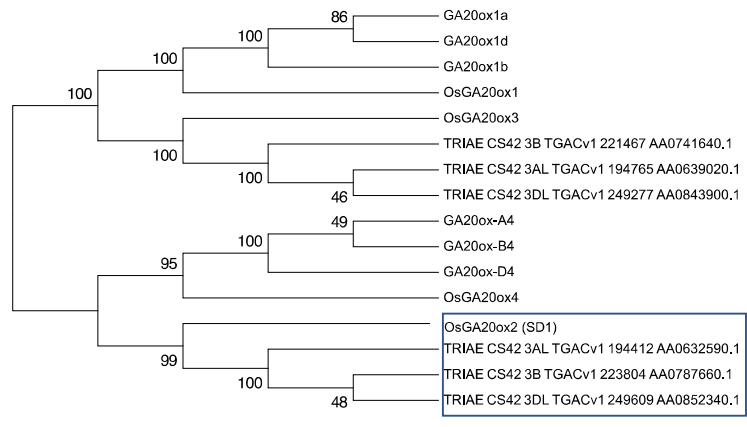


図1. コムギにおけるGA20oxidase2オルソログの同定

国産主要春播き品種「春よ恋」の完熟種子を吸水後、鞘葉および葉原基を取り除き、茎頂分裂組織を露出させた。この胚を切り取り、プレートに並べたものを作製した。変異導入遺伝子としては、イネにおいて稈長を制御する GA 生合成遺伝子 GA20ox-2 (SD1) のオルソログである TaSD1 を選択し、これをターゲットとした gRNA を *in vitro* 合成した。精製した Cas9 タンパク質と複合体を形成させ、金粒子にコートしてパーティクルガンを用いてプレート上の茎頂に導入した。胚より植物体を成長させ、止葉において CAPS 解析を行った。ボンバードした 232 個の胚から生育させた植物個体のうち、16 個体 (6.5%) で目的部位に変異が検出された (図 2)。そのうち 2 個体 (0.9%) で次世代 (T1) への変異の遺伝が観察され、更に 1 個体は遺伝分離後の T1 世代において、A, B, D ゲノムの全 TaSD1 遺伝子に変異した完全ノックアウト個体となった。これらの結果から、iPB-RNP 法を用いることで、コムギ実用品種に適用可能な DNA フリーゲノム編集が可能であることが示された。

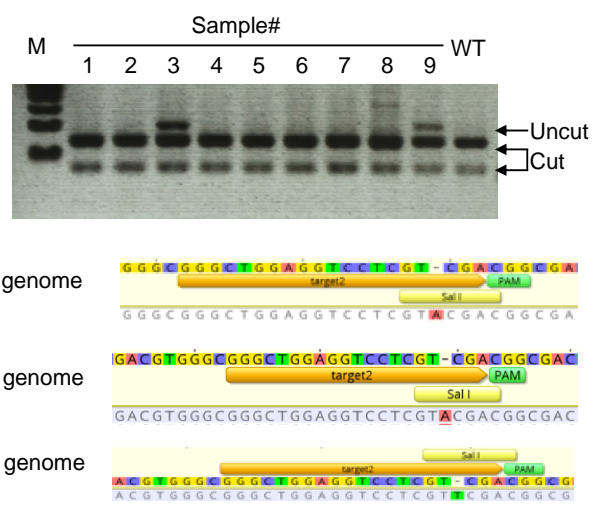


図2. T0第5葉におけるCAPSスクリーニング (A) CAPS解析による非切断バンドの検出. (B) #3サンプルの非切断バンドの配列

(3) 変異体の形質

T3 世代種子を用いて野生株と *sd1* 変異体 (完全ノックアウト) の形質を比較した。稈長については野生株の平均値が 75.6 cm であるのに対して、変異体の平均は 60.7 cm であり、約 20% の稈長の減少が観察された (図 3)。この時の収量の違いについて粒数と千粒重で評価したが、野生株と変異株では有意な差は見られなかった。*SD1* 遺伝子の変異体は「イネの緑の革命」遺伝子として知られており、短稈化により、肥料の投入によっても徒長せずに収量を増加させることが可能になることが知られている。コムギの栽培品種は元々本来の「緑の革命」遺伝子 *Rht1* を持っているが、本研究により「イネの緑の革命」遺伝子を併せ持つことにより更なる短稈化が可能であることが初めて示された。

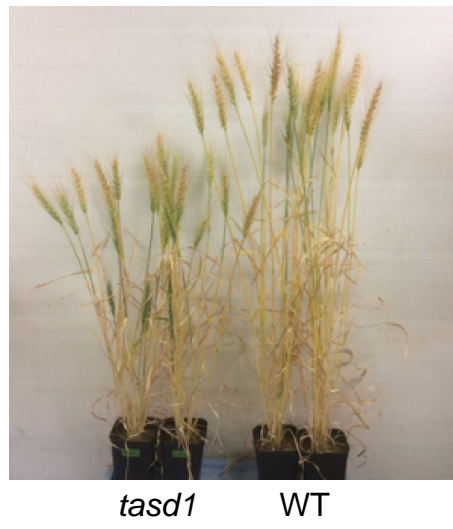


図3. SD1完全ノックアウト変異体 (*tasd1*) の表現型

茎頂メリステムをターゲットとした汎用性のあるゲノム編集技術の開発

濱田晴康、柳楽洋三、今井亮三

化学と生物 56(4) 288-293 2018年4月

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。