

令和元年6月5日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19255

研究課題名(和文) DNAフリーのゲノム編集を展開するためのイネにおけるES細胞培養系の開発

研究課題名(英文) An approach toward developing embryogenic stem cells in rice for transgene-free genome editing

研究代表者

鳥山 欽哉 (TORIYAMA, KINYA)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：20183882

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)：CRISPR/Cas9を利用した動物のゲノム編集では卵細胞にCas9タンパク質とガイドRNAの複合体(RNP)を導入することで、標的遺伝子改変が可能となる。組換えDNA分子は宿主ゲノムに組み込まれない(DNAフリー)。本研究では、イネの培養細胞を動物のES細胞に見立て、DNAフリーゲノム編集植物の開発を目指した。培養細胞にRNP導入を試みたが、ゲノム編集植物を得ることはできなかった。催芽種子の茎頂分裂組織(SAM)にパーティクルガン法でGFPをコードするDNAの導入が可能であることを実証できたので、SAMにRNPを導入した方が、簡単にDNAフリーゲノム編集植物を得られると期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集を使って作られた食品について、新たに組み込んだ遺伝子が残存していない場合、国への届け出だけで販売できるようになる見通しが、2019年3月に厚生労働省の専門家会議により示された。遺伝子の変異は自然界でも起きていて、従来品種改良の技術で作られたものとゲノム編集で作られたものは技術的に区別することができない。本研究成果は、遺伝子が組み込まれることなくゲノム編集イネを作出できる技術開発を可能にするものである。収穫量が多いイネなど、農林水産業の分野で新しい品種を作り出す技術として注目される。

研究成果の概要(英文)：CRISPR/Cas 9 is a powerful technique for genome editing. Transgene-free genome-edited animals can be produced by introduction of ribonucleoprotein (RNP) of Cas 9 nuclease and guide RNA. In this study, we aimed to develop DNA-free genome-editing plants by using cultured rice cells as ES cells for animals. Although we tried to introduce RNP into cultured rice cells, we could not obtain genome-edited plants. As we have been demonstrated that it is possible to introduce the DNA encoding GFP into the shoot apical meristem (SAM) of a germinated seed by the method of particle bombardment, it is expected to be easier to obtain DNA-free genome editing plants if RNP is introduced to SAM.

研究分野：植物分子遺伝育種学

キーワード：育種学 遺伝学 ゲノム バイオテクノロジー 植物

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術では CRISPR/Cas9 などの部位特異的なヌクレアーゼを用いて標的遺伝子を自在に改変することが可能である。マウスやゼブラフィッシュなどの動物では、受精卵細胞に Cas9 (DNA 切断酵素) をコードする RNA または Cas9 タンパク質、および、標的遺伝子を探し出すためのガイド RNA を導入することで、標的遺伝子改変が可能となる (図 1)。組換え DNA 分子が宿主ゲノムに組み込まれることはない (DNA フリー)。

イネを含む植物では、Cas9 タンパク質とガイド RNA を発現させるバイナリーベクターをアグロバクテリウムを用いて宿主ゲノムに組み込ませ、形質転換細胞を抗生物質などで選抜して植物体を再分化させる方法が主流である (図 2)。植物のプロトプラストを用いる方法もあるが、1 個のプロトプラストを培養するのは極めて困難なため、多数のプロトプラストから形質転換細胞を抗生物質などで選抜するステップが必要であり、この時、宿主ゲノムへ選抜マーカー遺伝子が組み込まれる。

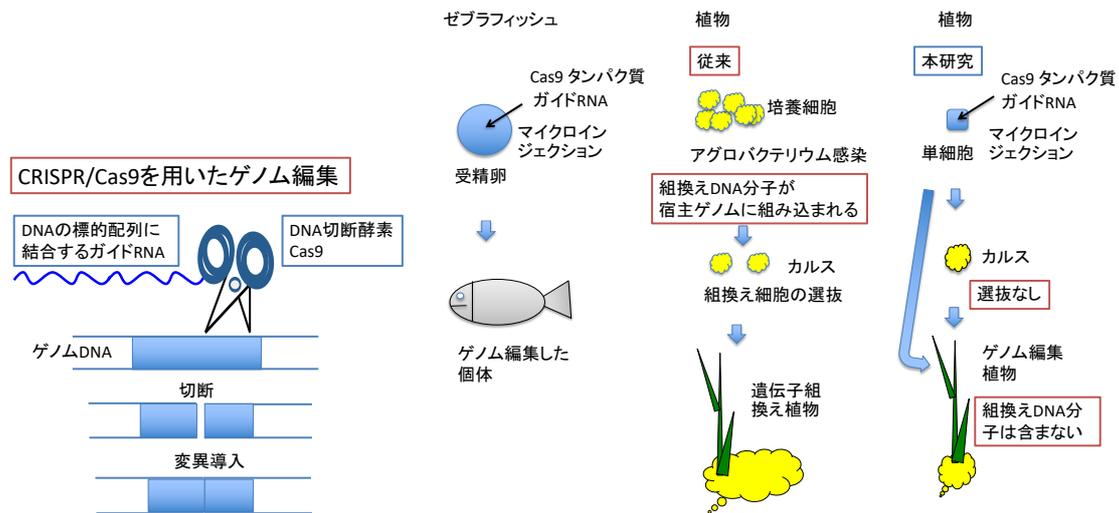


図 1 CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集

図 2 本研究の背景と目的

植物の卵細胞は胚珠と子房に覆われているため、動物の受精卵操作のように直接マイクロマニピュレーションすることはできない。他方、植物の細胞は分化全能性を持ち、体細胞の単細胞から植物体を再分化させることができる。そこで、植物の単細胞を動物の ES 細胞 (Embryonic Stem Cell) に見立て、動物の卵細胞と同じ実験を行えるのではないかと考えた (図 2)。

植物で単細胞を得る場合、プロトプラストを思いつく。しかし、イネのプロトプラスト培養は素人には困難である。卵細胞の代わりとして使えるイネ単細胞を得る方法として、私が開発した以下の方法が使えるのではないかと考えた。

私は、イネの組織培養を行う際、与える窒素源によって、カルスの形状と再分化のしやすさが異なることを報告した (Toriyama and Hinata 1985)。窒素源としてアンモニア態窒素と硝酸態窒素を除き、代わりに、グルタミン、アスパラギン酸、アルギニンおよびグリシンを窒素源として与える (アミノ酸培地; AA 培地) と、細かくバラバラになりやすい細胞が得られる。さらに、窒素源として、硝酸態窒素を与えると、緻密な大きな塊のカルスが得られ、再分化しやすい。

申請者は、AA 培地で培養したサスペンションセルからプロトプラストを単離し、エレクトロポレーション法で、抗生物質耐性の遺伝子を導入して遺伝子組み換えイネを再分化させることに成功した (Toriyama et al. 1988)。この経験を踏まえ、AA 培地で培養して得られる単細胞を動物の卵細胞に見立て、ゲノム編集を行うことを思いついた。

<ユニークなセールスポイント>

「数で勝負」から「一人っ子の子育て充実支援」へ

従来の植物培養法では多数の培養細胞の中から遺伝子改変した細胞を選抜する必要があった。本研究では、選抜なしに 1 個の細胞を丁寧に培養して植物体を再生させることを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、イネにおいて宿主ゲノムへ組換え DNA 分子の組み込みがない (DNA フリー) ゲノム編集植物を得る方法を開発することを目的とした。イネの培養細胞を用い、動物の卵細胞と同じように、Cas9 タンパク質とガイド RNA のみを導入して、その細胞を選抜なしにそのまま培養して植物体に再生させるシステムを開発することに挑戦することとした (図 2)。当初はマイクロマニピュレーターを用いる予定であったが、当初の計画通り進まないときの対応策として計画していたパーティクルガン法も用いることとした。

また、研究実施中に、コムギにおいて、発芽種子から胚の部分のみを切り出し、茎頂分裂組織

3日後に、ゲノム編集の有無をCAPS解析により調査した。ターゲット配列には制限酵素 *Pst* I の認識配列があり、ゲノム編集が起こって変異が導入されると *Pst* I で切断されなくなると期待される (図5)。

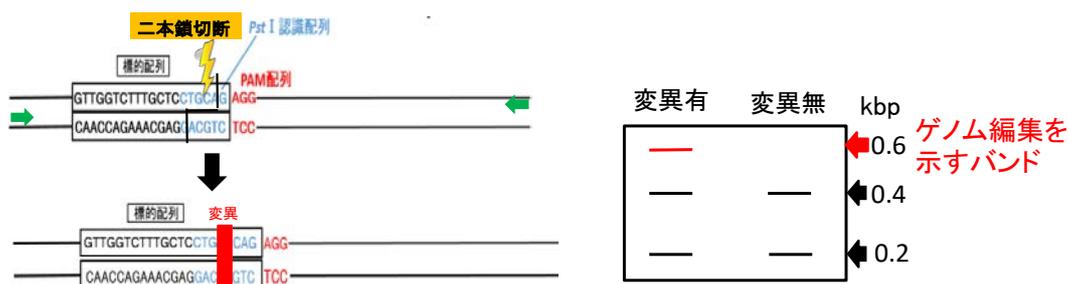


図5 ゲノム編集の有無の検出方法

DNeasy Plant Mini Kit を用いて抽出したゲノム DNA をテンプレートとし、標的配列を含む 578 bp の配列を特異的に増幅させるプライマーを用いて PCR を行った。プライマーは以下のものを用いた。PCR 産物を *Pst* I で消化し、バンドの大きさからゲノム編集の有無を調査した。

PDS F: 5' -TAGGCAACATGTCACTTGGCTCTAGAG-3'
 PDS R: 5' -CTCCACTACAGACTGAGCACAAAGCTTC-3'

(3) 茎頂分裂組織 (SAM) への導入実験

イネ品種である「金のいぶき」を 30°C、暗条件で発芽させ、実体顕微鏡下において、胚を胚乳につけた状態のまま、上記の発芽種子の胚部分の鞘葉及び第 1 葉原基から第 3 葉原基を針の先端を用いて除去した。茎頂分裂組織を露出させた種子を 10 個/プレートとなるように MS-maltose 培地に円形に置床し、パーティクルガン法により DNA や RNP を導入した。

4. 研究成果

(1) AA 培地を用いた単細胞獲得の試み

LDR のサスペンションセルを AA 培地で培養し、75 μm のふるいで裏ごしした細胞を図 6 に示した。数個の細胞塊からなるものもあり、マイクロインジェクションに適していると考えられた。細胞の直径は 10~15 μm であった。そのため、マイクロインジェクション用には極細のインジェクションピペットが必要であることがわかった。

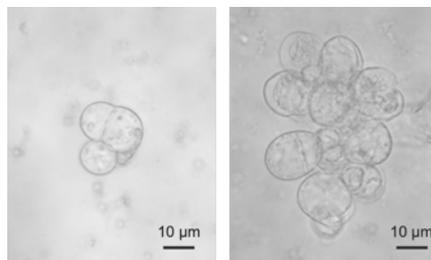


図6 サスペンションセル

(2) マイクロインジェクションの検討

マイクロマニピュレーターを用いて、細胞にマイクロインジェクションするために、インジェクションピペットの検討を行った。その結果、KITAZATO 社製、Micro Tools for ICSI Injection (カタログ番号 7100 Code MT-INJ30) が適していた。インジェクションピペットの直径は外径 6 μm 内径 4 μm である。0c 細胞に対して、マイクロインジェクションを試みている様子を図 7 に示す。しかし、当研究室保有のマイクロマニピュレーターは 30 年ほど前の装置であり (図 8)、インジェクターが思うように作動せず細胞の中にインジェクすることができなかった。



図7 マイクロインジェクションの試み



図8 マイクロマニピュレーター

(3) Cas9 タンパク質とガイド RNA の複合体(RNP)の導入

サスペンションセル (0c 細胞) にパーティクルガン法を用いて、Cas9 タンパク質とガイド RNA の複合体を導入し、ゲノム編集の有無を調査した。0c 細胞の両方から DNA を抽出し、*Pst*I 切断による CAPS 解析により変異の検出を試みたが、いずれの試料からも *Pst*I で切断されなかったバンド(=ゲノム編集が行われたことを示すバンド)を観察することはできなかった(図 9)。検出できなかった理由として、RNP の導入効率が低かったこと、また、変異が起こっていたとしても、変異が起きた細胞の割合が、導入されていない細胞に対して圧倒的に少ないということが考えられた。

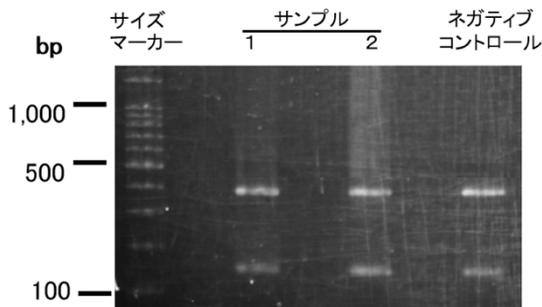


図 9 CAPS 解析によるゲノム編集有無の調査

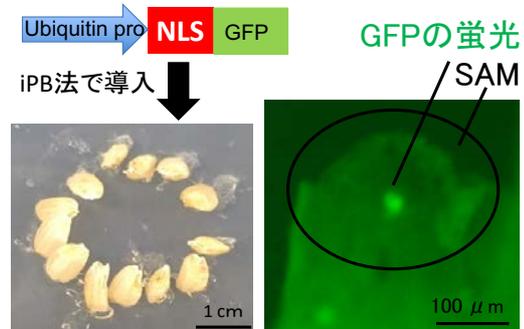


図 10 茎頂分裂組織への GFP の導入

(4) 催芽種子の茎頂分裂組織を用いた実験

前述したサスペンションセルを用いた実験では、植物体を再生させるに至っていない。より簡単に植物体を再生させるために、催芽種子の茎頂分裂組織(SAM)に Cas9 タンパク質とガイド RNA の複合体を導入するという最終目標を達成するための予備実験として、GFP をコードする DNA の導入が可能かどうかを調査した。その結果、露出させた SAM において、GFP の蛍光を示す種子を観察することができ、GFP の一過的発現を確認することができた(図 10)。その効率は、最大 33.3%であった。コムギに比べて胚が小さなイネにおいても、SAM へ遺伝子導入を行うことが可能であることが示唆された。

(5) 今後の展望

当初の計画では、培養細胞を用いてゲノム編集を行って植物体を再生させる計画であったが、茎頂分裂組織への遺伝子導入が可能であることを示すことができたので、茎頂分裂組織に RNP を導入した方が、簡単にゲノム編集植物を得ることができると期待される。茎頂分裂組織の外側から 2 層目にあたる L2 層の細胞は、将来生殖細胞へ分化し、組換え遺伝子が安定的に後代に遺伝していくことも示されている(Hamada et al. 2017)。今後、L2 層の細胞へ RNP を導入する条件、および、露出させた茎頂分裂組織の培養条件を最適化すれば、外来 DNA フリーのゲノム編集植物を作出することができるだろう。

<引用文献>

Baba, A., Hasezawa, S. and Syōno, K. (1986) Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *Plant Cell Physiol* 27: 463-471.

Hamada, H., Linghu, Q., Nagira, Y., Miki, R., Taoka, N., Imai, R. (2017) An in planta biolistic method for stable wheat transformation. *Sci Rep* 7: 11443.

Hamada, H., Liu, Y., Nagira, Y., Miki, R., Taoka, N., Imai, R. (2018) Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Sci Rep* 8: 14422.

濱田晴康, 柳楽洋三, 三木隆二, 田岡直明, 今井亮三. (2017) 植物のゲノム編集方法. 国際公開番号 WO 2017/195906 A1. 2017-11-16.

Liang, Z., Chen, K., Li, T., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, Q., Liu, J., Zhang, H., Liu, C., Ran, Y., Gao, C. (2016) Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Comm* 8: 14261

Liang, Z., Chen, K., Zhang, Y., Liu, J., Yin, K., Qiu, J., Gao, C. (2018) Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 in vitro transcripts or ribonucleoproteins. *Nat Protocol* 13: 413-430.

Svitashev, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J., Cigan, A. (2016) Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat Comm 7: 13274.

Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchimiya, H., Hinata, K. (1988) Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. Bio/technology 6: 1072-1074.

Toriyama, K., Hinata, K. (1985) Cell suspension and protoplast culture in rice. Plant Sci 41: 179-1838.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

- (1) 阿部瑞希・風間智彦・鳥山欽哉「イネ培養細胞を用いたミトコンドリア形質転換系開発の試み」日本育種学会第133回講演会 2018年

〔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〕

アウトリーチ活動

- (1) 鳥山欽哉「東北大学農学部オープンキャンパスにおける研究紹介」2018年

- (2) 鳥山欽哉「よくわかる遺伝子組換えとゲノム編集植物」夢ナビ講義ライブ 2018年 (夢メッセみやぎ仙台)

- (3) 鳥山欽哉「よくわかる遺伝子組換え植物」青森県立弘前高等学校出前講義 2018年 (青森県立弘前高等学校)

- (4) 鳥山欽哉「東北大学農学部オープンキャンパスにおける研究紹介」2017年

- (5) 鳥山欽哉

「よくわかる遺伝子組換え植物」全国高等学校総合文化祭模擬講義 2017年 (東北大学農学部)

6. 研究組織

- (1) 研究分担者 無し

- (2) 研究協力者

研究協力者氏名：風間 智彦

ローマ字氏名：KAZAMA TOMOHIKO