

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19200

研究課題名(和文)果菜類作物を対象とした導入遺伝子フリーのゲノム編集技術開発

研究課題名(英文)Development of DNA-free genome editing in fruit-bearing plants

研究代表者

有泉 亨(ARIIZUMI, Tohru)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：70575381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Cas9法はCas9タンパク質とsgRNAを利用する技術であるが、既存技術はT-DNAを導入する方法に依存していた。そこで本研究はT-DNAを組み込まずに標的遺伝子を編集する技術の開発を目的とした。果菜類であるトマトを対象として、一過的なCas9ヌクレアーゼ/sgRNA発現を、アグロバクテリウム感染を介して行い、その後抗生物質を含まない培地上での再分化培養を行うことで編集個体の選抜を行った。その結果、通常のCRISPR/Cas9並びに一塩基改変を誘導するTarget-AID法を利用したいずれの場合においても、T-DNAを組み込まずに標的遺伝子を改変できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はT-DNAが組み込まれないゲノム編集技術の開発に取り組んだ。通常のCRISPR/Cas9法を植物に適応させる方法では、アグロバクテリウムを介してT-DNAを組み込ませてCas9/sgRNAを発現させる方法である。この方法では外来遺伝子の発現が保証される一方、ヌルセグメント獲得までの時間が課題であった。本研究では、培養当代でのヌルセグメント獲得を実証できた。植物育種の迅速化は地球温暖化など、気候変動が進む世界において喫緊の課題であるため、本研究で開発された技術は育種の高速化に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Genome editing technology is a technique to modify DNA within regions specified by sgRNA sequence. The CRISPR/Cas9 induces site-specific DNA modification by nuclease activity of Cas9 protein, although application of this system to plants is highly dependent on T-DNA integration. In this study, we aimed to develop a method to edit the target site without integrating T-DNA. We employed the transient expression of Cas9 nuclease/sgRNA in tomato via Agrobacterium infection, followed by regeneration of culture medium devoid of antibiotics. We succeeded to select the edited individuals in which DNA modifications were induced by CRISPR/Cas9 as well as by Target-AID, while T-DNA was not incorporated in the plants. Thus, it was demonstrated that transient expression system worked well for obtaining the DNA-edited plants without harboring T-DNA insertion.

研究分野：園芸科学

キーワード：トマト ゲノム編集技術 形質転換 DNAフリー

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術は任意の配列内で DNA を改変する技術である。ゲノム編集技術の CRISPR/Cas9 法はヌクレアーゼ活性を有する Cas9 タンパク質と、標的とする DNA 配列を指定する sgRNA を利用する技術である。植物では Cas9 と sgRNA を発現させるカセットを含んだ T-DNA 領域を、アグロバクテリウムを介して植物細胞のゲノムに組み込むことでゲノム改変を誘導する手法が一般的に利用されている。この方法では導入遺伝子が挿入されることが保証されるが、ヌルセグリガント取得までの時間がかかるのが課題である。一方、T-DNA 領域を直接ゲノムに組み込まない DNA フリーのゲノム編集技術が動物細胞で効率的に機能している。これは、精製した Cas9 タンパク質と精製 sgRNA の複合体（Ribonucleoprotein, RNP）を直接細胞内に導入する手法である。この場合、ゲノム編集の当方でヌルセグリガントを獲得できるメリットがある。高等植物の一部で DNA フリーのゲノム編集が確立しているが、種によっては難しいプロトプラストへの導入や再分化の方法が用いられており、植物種や品種の違いで適応が難しい場合がある。そのため、効率的な DNA フリーのゲノム編集技術の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、重要果菜類作物において、T-DNA 領域が植物細胞のゲノムに組み込まれずに標的部位の DNA 改変を誘導する DNA フリーのゲノム編集技術を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アグロバクテリウム感染と無選抜培地による DNA フリー個体作出

トマトの子葉に、ゲノム編集コンストラクト CRISPR/Cas9（以下 Cas9 ベクター）とコンストラクトは申請者らが独自に開発した DNA 欠失・挿入・置換を誘導する *nCas9-CDA* ベクターを使う。ベクターを保有するアグロバクテリウムを感染させて、共存培養後に抗生物質が含まない培地上でカルスを誘導させながらシュート（植物体）を再分化させることで、T-DNA 領域がトマトゲノムに組み込まれておらず、かつ標的配列のゲノム編集が誘導されている個体を選抜する。その個体が得られたらゲノム編集のパターンを調査する。

ゲノム編集の標的として、カロテノイド合成の上流遺伝子 *PHYTOENE DESATURASE* (*PDS*) を選んだ。sgRNA は *PDS* 遺伝子の第六エクソンを標的とした。ベクターの遺伝子導入は、通常トマト遺伝子組換えプロトコールに従って (Sun et al. 2006 Plant Cell Physiol)、トマトの子葉に上述のコンストラクトを持つアグロバクテリウムを感染させて実施した。通常、3 日間の共存培養の後に子葉を抗生物質が含まれる選抜培地上で培養し、カルスを誘導しながら組換え体を選抜するが、ここでは抗生物質が含まない培地で培養を続けてカルスを誘導させ、シュート（植物体）を再分化させる。出現したシュートから DNA を抽出し、

(1) PCR で標的配列が改変されており、かつ、導入コンストラクトが存在しない DNA フリーの系統を選び出す。その個体が得られたら、(2) ゲノム編集による塩基配列パターンを解読する。(3) 次世代で安定的に DNA 改変が遺伝した個体を選抜する。

(2) *nCas9-CDA* ベクターによる DNA フリー個体作出

次に、*nCas9-CDA* ベクターを (1) と同様の方法で編集に利用した。sgRNA の標的は糖度と単為結果性に関わる *HWS* 遺伝子 (Damayanti et al. 2020) のエクソン領域に設定した。

4. 研究成果

(1) アグロバクテリウム感染と無選抜培地による DNA フリー個体作出

Cas9 ベクター (図 1 A) を形質転換したアグロバクテリウムをトマト子葉に感染後、個体再分化を行なったところ、合計 134 の再分化個体を得ることができた。再分化シュートを最低でも 2 週間以上育成したところ、12 個体で組織の一部が白化した個体を得ることができた (図 1 B)。これらはいずれも葉、あるいは茎の一部あるいは全てに白化がみられ、*PDS* 遺伝子の機能破壊が誘導されたことが示唆された。12 個体のうち、7 個体はほぼ全組織に白化が見られた。一方、その他の系統では組織の一部で白化が見られた。

次に、これらの個体で導入遺伝子の有無を確認した。白化した組織からゲノム DNA をまず抽出した。次に、この DNA を利用して

PCR でカナマイシン耐性遺伝子の一部を増幅させたところ、11 個体で導入遺伝子が確認された一方、1 個体 (*e1* 系統) では増幅しなかった。このため、11 個体は通常の遺伝子組換えにより *PDS* 遺伝子が破壊された一方、*e1* 系統では T-DNA が組み込まれることなく体細胞で編集が施されたと考えられた。次に、標的遺伝子のゲノム編集を PCR で確認した。PCR は標的とした第六エクソンの領域を含んだ断片が増幅するように、設計した。その結果、*e2* と *g1* の二系統で明らかなバンドの変化が見られた。次に、*g1* 系統と *NPTII* 遺伝子が増幅しなかった *e1* 系統において、サンガー法で編集の有無を調査した。その結果、*e1* 系統では 1bp の挿入と 8 塩基の欠失のパターンが存在した。*g1* 系統では 3 塩基欠失が存在した。

以上の結果より、一過的に *Cas9* と sgRNA を発現させることで、T-DNA 領域を挿入させずに標的に遺伝子を改変できることを証明した。

(2) *nCas9-CDA* ベクターによる DNA フリー個体作出

次に、*nCas9-CDA* ベクターを利用して (1) と同様の方法で編集パターンを調査した。その結果、少なくとも 10 パターンの塩基置換パターンを見出すことができた (図 2)。以上の結果より、*Cas9* ベクター同様に一塩基レベルでも一過的に発現させることでゲノム編集が可能であることを示した。

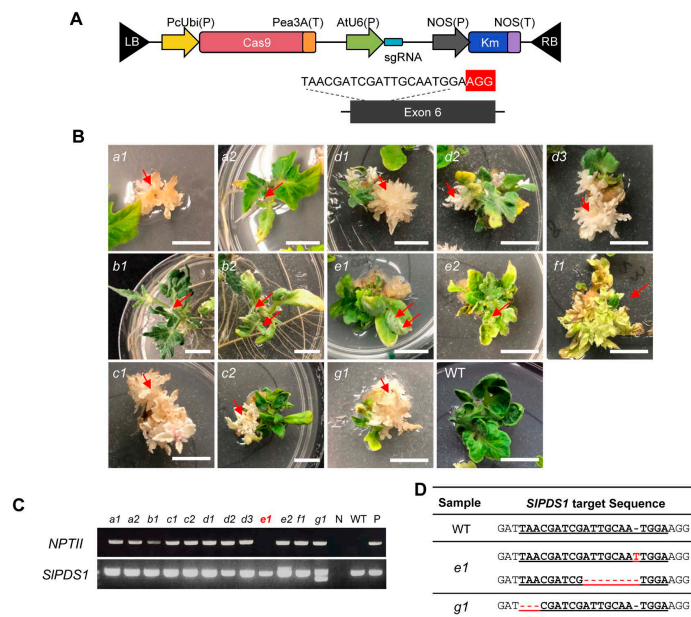


図1. *Cas9*ベクターの一過的発現によるヌルセグリガントの選抜
A, 導入した*Cas9*ベクター。sgRNAは*PDS*遺伝子の第六エクソンを標的とした。**B**, *Cas9*ベクターの一過的発現後に再分化した白化個体。白化した13個体を得ることができた。**C**, 白化個体の導入遺伝子チェックとゲノム編集チェック。上段はカナマイシン耐性遺伝子 (*NPTII*) 遺伝子の存在をPCRで調査した結果。系統*e1*のみ増幅が確認されなかった。下段はターゲット領域を含むDNA領域をPCRで増幅させた結果。N; ネガティブコントロール, WT; 野生株, P; ポジティブコントロール。**D**, ゲノム編集系統*e1*と*g1*における編集パターンをサンガー法で確認した結果。

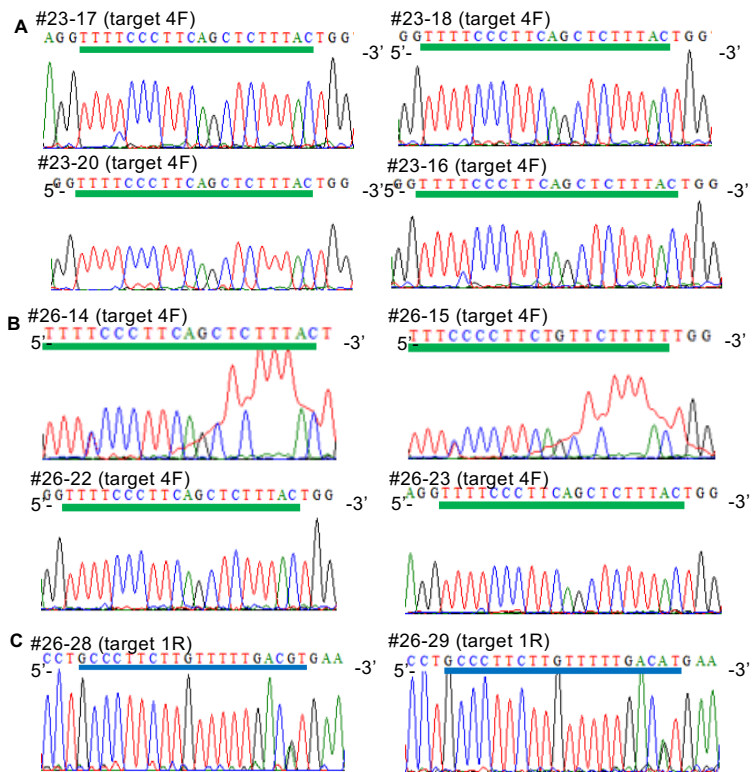


図2. nCas9-CDAベクターの一過的発現によるヌルセグリガントの選抜
 T0世代のゲノム編集システムにおける編集パターンをサンガー法で確認した結果。少なくとも10パターンの編集が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroki KOMATSU, Islam M. Y. ABDELLATIF, Shaoze YUAN, Misaki ONO, Satoko NONAKA, Hiroshi EZURA, Tohru ARIIZUMI, Kenji MIURA	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome editing in PDS genes of tomatoes by non-selection method and of Nicotiana benthamiana by one single guide RNA to edit two orthologs.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） -	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0件

〔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
研究 分担者	三浦 謙治 (MIURA Kenji) (00507949)	筑波大学・生命環境系・教授 (12102)	
研究 協力者	西田 敬二 (NISHIDA Keiji) (10620338)	神戸大学・先端バイオ工学研究センター・教授 (14501)	