

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06038

研究課題名(和文) リンドウにおける外来遺伝子フリーのゲノム編集技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of foreign-gene-free genome editing technology in Japanese gentian

研究代表者

高橋 重一 (Takahashi, Shigekazu)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究員

研究者番号：10600033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集は操作が簡便なことから爆発的に普及が進んでいる。一般に植物のゲノム編集体は外来遺伝子を保持するが、実用化には外来遺伝子フリーであることが求められる。さらに、栄養繁殖植物やヘテロシス性の高い園芸作物においては当代で外来遺伝子フリーのゲノム編集体を取得することが重要となる。そこでリンドウおよびタバコを材料にアグロバクテリウム法を様々な条件下で行い、当代での外来遺伝子フリーのゲノム編集体の取得を試みた。結果、再分化初期のシュートでゲノム編集のシグナルを検出したが成長に伴い本シグナルは消失し、当代での外来遺伝子フリーのゲノム編集体の取得には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により当代での外来遺伝子フリーのゲノム編集体の取得において問題となる複数の課題をあぶり出すことができた。本知見をフィードバックすることで、今後の当該分野の研究の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：CRISPR / Cas9, one of the genome editing technologies, is widely used in the world because it is easy to operate. Generally, genome-edited plants carry foreign genes, however it is required genome edited plants with no foreign gene for practical use. Furthermore, in vegetative propagation plants and horticultural crops with high heterosis, it is important to obtain foreign gene-free genome edited lines in the present generation. Therefore, we performed the Agrobacterium method using Japanese gentian and tobacco as materials under various conditions, and tried to obtain foreign gene-free genome edited lines in the present generation. As a result, several signals for genome editing were detected in the shoots in the early stage of redifferentiation, however these signals disappeared with growth, and it was not possible to obtain genome edited plants with no foreign gene in the present generation.

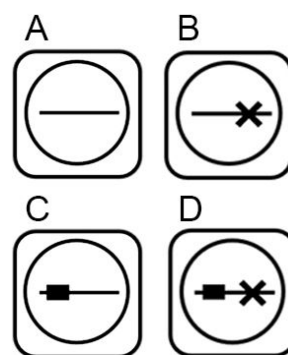
研究分野：分子生物学

キーワード：CRISPR/Cas9 Gentian Genome editing

1. 研究開始当初の背景

最近ゲノム編集技術が大きな発展をみせており、これまでに第1世代のZFNに続いて第2世代のTALEN、第3世代のCRISPR/Cas9が開発されている。特にCRISPR/Cas9は簡便かつ効率的にゲノム編集を行うことが可能であるため様々な生物種に適用され、植物での利用も急速に進んでいる。ゲノム編集は任意のゲノム配列を改変できることから、放射線や突然変異誘発剤に比べて品種改良および育種素材開発のスループットを著しく向上できる可能性を持つ。ところが現在植物で行われている一般的なゲノム編集では、アグロバクテリウムを介してCRISPR/Cas9システムと選抜用の薬剤耐性遺伝子を対象の植物ゲノムに組み込んで実施している。すなわち、この手法により得られるゲノム編集体(その細胞は図1Dに相当)は遺伝子組換え体に該当するため、カルタヘナ法の規制を受けることから実用化は極めて困難である。一方、外来遺伝子フリーのゲノム編集体であればカルタヘナ法の規制対象外となる方針案が示されていることから、実用を考えた場合、外来遺伝子フリーのゲノム編集体(その細胞は図1Bに相当)を取得することが極めて重要となる。シロイヌナズナのように世代サイクルが早く純系が利用できる植物種においては、交配によって外来遺伝子を除去することで後代においてnull-segregantを得ることも可能であるが、交配に時間を要する樹木や栄養繁殖植物、ヘテロシス性が高く形質や特質が交配により失われやすい園芸作物にこの手法を適用することはできない。また、

CRISPR/Cas9では、guide RNA (gRNA)とCas9の複合体のみで標的DNA配列を切断できるため、Cas9リボヌクレオタンパク質をプロトプラストに直接導入するDNAフリーのゲノム編集も試みられているが効率の低さやソマクローマル変異などの問題がある。これらの諸問題を克服するためには当代で外来遺伝子組み込みフリーの効率的なゲノム編集体を作成する必要があるが、その手法は未だ確立されていない。アグロバクテリウムを介して植物細胞T-DNAを導入する際、植物細胞は図1に示すように4種類に大別することができる。ここで図1Bに示すように、T-DNAが植物ゲノムに導入されることなく、これにコードされたCRISPR/Cas9システムが一過的に発現することによってゲノム編集された細胞を選抜・再分化させることで、当代での外来遺伝子フリーのゲノム編集体を取得することができると考えられる。その実現にはgRNAおよびCas9の一過的な発現によるゲノム編集の高効率化、T-DNAのゲノムへの組込み抑制、ゲノム編集体の選抜の高効率化が求められる。



× ゲノム編集
■ T-DNA

図1. アグロバクテリウム感染後の植物細胞におけるゲノム構造の分類。外来遺伝子(T-DNA)およびゲノム編集の有無により4種類に大別される。

2. 研究の目的

実用の園芸作物としてリンドウを、また再分化が早くモデル植物でもあるタバコを対象に、これらの植物ゲノムへCRISPR/Cas9等の外来遺伝子を組み込むことなく、ゲノム編集を行えるアグロバクテリウム法の確立を目指すことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 致死性および耐熱性向上遺伝子を用いたゲノム編集の高効率化の検討

シロイヌナズナ由来の致死性遺伝子(シロイヌナズナ由来の *KISS-OF-DEATH (KOD)*)および Heat stress transcription factor A-1d をコードし耐熱性を向上させることが知られている遺伝子(*HSFA1D*)をCRISPR/Cas9システムと一過的に共発現させ、培養条件を変化させることで選抜薬剤フリーの条件下においてゲノム編集の高効率化の検討を行った。

(2) リンドウのゲノム編集の有無を簡便に判定する基盤整備とその活用

上記の解析から、ゲノム編集の有無とその高効率化を判定するためには可視的に簡便にゲノム編集の有無を判定できる実験系が重要であることが示された。そこでGFP過剰発現リンドウに対してGFP遺伝子を標的とするgRNAを設計し、これを用いてゲノム編集が起きることを確認した。また、本スクリーニング系を用いて熱処理によるゲノム編集の効率化の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 致死性および耐熱性向上遺伝子を用いたゲノム編集の高効率化の検討

PDS 遺伝子は破壊されると白化表現型を示すためゲノム編集の有無を簡便に視覚的に判定することができることから標的遺伝子としてよく利用される。そこで本研究では先ず再分化が早いタバコを材料に選抜薬剤フリーの条件下で当該遺伝子を標的にしたゲノム編集を試みた。その際、T-DNAが植物ゲノムに組込まれた細胞を効率的に除去するために *KOD* を共発現させた。

結果、実験を繰り返しても白色のカルスを取得するには至らなかった。従来の *PDS* 遺伝子を対象とした一般的なゲノム編集を行う場合は選抜薬剤を用いるため遺伝子組換えが起きていない細胞は強制的に除去される。しかしながら、選抜薬剤フリーの条件下では遺伝子組換えの起きていない細胞は除去されず、またこの細胞は十分な光合成活性を持つことから、*PDS* 遺伝子が破壊された光合成能を持たないゲノム編集細胞は成長に伴って押し負けてしまい、結果として白色のカルスが得られないと考えられた。また、一過的な発現であっても *KOD* による負の影響が重大であることも考えられた。よって、ゲノム編集の効率化の検討を行うにあたり、*PDS* 遺伝子は標的として不適であるとの結論に至った。

PDS 遺伝子がゲノム編集の標的として不適であったことから、タバコにおいて既にゲノム編集実績のある *NtF3H* 遺伝子を標的にした。また、CRISPR/Cas9 の切断活性を上昇させるために、一過的な高温処理に耐えることができるよう、*HSEAID* を共発現させ培養条件について検討を行った。結果、アグロバクテリウムの感染後共存を 2 日行った後、35 を 3 時間、25 を 1 時間、50 を 3 時間連続して処理を行った場合、その後選抜フリーの条件下で生育させ取得したカルスからゲノム編集が起きているシグナルをサンガーシーケンスにて検出した(図 2)。得られたカルスから再分化させたシュートについて、再度サンガーシーケンスを実施したところ、ゲノム編集のシグナルが消失していた。得られた全てのシュートについても同様の結果であったことから、*PDS* 遺伝子同様に *NtF3H* が破壊されると生育の過程で周辺の WT の細胞に押し負けてしまうことが考えられた。ゲノム編集されたカルス細胞の維持とその後の外来遺伝子フリーの確認については今後の課題である。

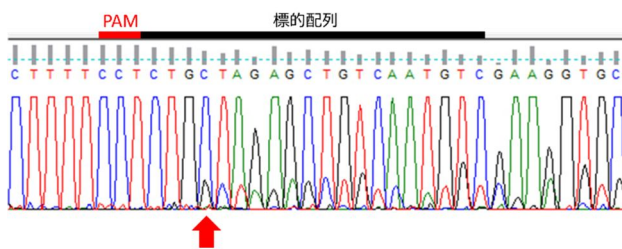


図 2. *NtF3H* のサンガーシーケンスによる波形 PAM から 4 bp 離れた位置でゲノム編集による変異が起きており、その後の波形の乱れが確認できる。

(2) リンドウのゲノム編集の有無を簡便に判定する基盤整備とその活用

リンドウにおいてもタバコ同様に *PDS* 遺伝子を指標とする選抜フリーの条件下でのゲノム編集の効率化の検討はできなかった。そこで、我々の研究グループですでに構築してあるリンドウの GFP 過剰発現株を材料にゲノム編集により *GFP* 遺伝子を破壊し、それを GFP の消光で検出するスクリーニング系を確立することとした。まず、*GFP* 遺伝子を標的とする gRNA を設計し選抜薬剤存在下で薬剤耐性株を取得し、GFP 蛍光が消失しているシュートにおいて *GFP* 遺伝子のゲノム編集が起きていることをサンガーシーケンスで確認した。このことから今回設計を行った gRNA が機能するといえる。次いで選抜フリーの条件下で、感染条件を変化させながら GFP 消光が起きるカルスの選抜を進めたが、現段階までにその取得には至っていない。今後はタバコで活用した *HSEAID* など共発現させ熱処理をかけることにより、効率化できないか検討を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|