

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2019～2022
課題番号：19K22299
研究課題名（和文）ゲノム編集による5'非翻訳領域の改変によりタンパク質発現量を増加させる技術の開発

研究課題名（英文）Development of technology to increase protein expression by modifying 5'-untranslated region by genome editing

研究代表者
尾之内 均（Onouchi, Hitoshi）

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：50322839
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）：本研究では、遺伝子組換えに該当しない範囲のゲノム編集を用いて植物の特定のタンパク質の発現量を変化させる方法の開発を行った。そのためのアプローチとして、標的遺伝子の5'非翻訳領域の開始コドン上流域をCRISPR/Cas9システムを用いて切断し、二本鎖DNA切断の自然修復に伴うランダムな変異をその周辺に生じさせた。その結果、5'非翻訳領域の開始コドン上流域に生じたランダムな変異によって、タンパク質発現量を様々なレベルに変化させられることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
遺伝子組換え作物は有用な形質を持っていても、消費者から敬遠される傾向がある。本研究で開発した方法では、外来導入DNAを残さずに特定のタンパク質の発現量の調節が可能で、多くのタンパク質の発現調節に応用できると考えられる。そのため、遺伝子組換えに該当しない範囲のゲノム編集を用いて様々なタンパク質の発現量の改変による品種改良が可能となり、作物育種への大きな波及効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this project was to develop a method to modulate the expression level of a specific protein by using genome editing without introducing foreign DNA into the genome. To achieve this, we took the approach of cutting the 5'-leader region of the target gene by the CRISPR/Cas9 system and introducing random mutations via non-homologous end joining (NHEJ) into the 5'-leader region. Our results demonstrated that the protein expression level can be altered to varying degrees by NHEJ-mediated random mutations in the 5'-leader region.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム編集 5'非翻訳領域

1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノム DNA の任意の部位に変異を導入するための技術としてゲノム編集技術が開発され、基礎研究から応用まで幅広い分野で活用されている。遺伝子組換え作物は消費者から敬遠される傾向があるが、ゲノム編集技術によって作出された作物は外来導入 DNA が残っていなければ遺伝子組換え作物に該当しない。そのため、今後ますますゲノム編集技術が作物の品種改良に活用されていくことが予想される。遺伝子組換えに該当しない範囲のゲノム編集を用いて特定の遺伝子を破壊することは容易であるため、ゲノム編集技術を利用した作物の品種改良の多くは遺伝子破壊によって行われる。しかし、特定の遺伝子を破壊するのではなく発現量を変化させることによって有用な形質を持つ作物の作出が期待できる場合も多い。発現量調節に関与するシス配列が同定されている遺伝子についてはゲノム編集技術を用いてそのシス配列を破壊することによって発現量を変化させることが可能であるが、作物の多くの遺伝子において外来導入 DNA を残さずに特定のタンパク質の発現量を変化させることは困難である。特に、遺伝子組換えに該当しない範囲のゲノム編集技術を用いて特定のタンパク質の発現量を増加させることは、多くの場合に困難である。

2. 研究の目的

本研究では、より多くの遺伝子において遺伝子組換えに該当しない範囲のゲノム編集技術を用いてタンパク質発現量を変化させることを可能にする方法の開発を目的とした。5' 非翻訳領域の開始コドン上流域の配列は多くの遺伝子においてタンパク質コード領域の発現量に影響すると考えられる。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて標的遺伝子の開始コドン上流域を切断してその周辺に変異を生じさせることによりタンパク質発現量を変化させるという方法を考えた。本研究では、この方法の有効性を検証した。

3. 研究の方法

(1) 一過的発現系を用いた解析

開始コドン上流域の変異のタンパク質発現量への影響を調べるために、一過的発現系を用いた。この解析を行うために、シロイヌナズナやイネのゲノム編集の標的遺伝子の 5' 非翻訳領域を構成的発現プロモーターとホタルルシフェラーゼ遺伝子の間に挿入したコンストラクト (レポーターコンストラクト) を作製した。シロイヌナズナの培養細胞から調製したプロトプラストに、作製したレポーターコンストラクトを含むプラスミドをポリエチレングリコール処理により導入した。その際に、構成的発現プロモーターの下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトを含むプラスミドを、内部標準プラスミドとして同時に導入した。一定時間培養後に細胞を破碎して細胞抽出液中のホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼをそれぞれ測定し、ホタルルシフェラーゼ活性をウミシイタケルシフェラーゼ活性で標準化した。

(2) シロイヌナズナにおけるゲノム編集

シロイヌナズナの遺伝子の CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集には、pK11.1R ベクター (Tsutsui H and Higashiyama 2017) を用いた。標的遺伝子の開始コドン上流域の配列と一致するガイド RNA 配列を pK11.1R の AarI 切断部位に挿入した。そのようにして作製したプラスミドをアグロバクテリウムに導入し、フローラルディップ法によりアグロバクテリウムをシロイヌナズナの花序に感染させた。アグロバクテリウムを感染させたシロイヌナズナから得られた種子をハイグロマイシン B を含むムラシゲスクーグ寒天培地に播種し、ゲノム編集用コンストラクトが導入された個体を選抜した。選抜した個体の葉から抽出したゲノム DNA を用いてヘテロ二本鎖移動度分析を行うことにより変異を検出し、シークエンス解析により変異を同定した。

(3) イネにおけるゲノム編集

イネの遺伝子の CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集には、pUCgRNA ベクターと pZH_gYSA_MMCas9 ベクター (Mikami et al. 2015) を用いた。標的遺伝子の開始コドン上流域の配列と一致するガイド RNA 配列を pUCgRNA の BbsI 切断部位に挿入した。そのプラスミドを AscI と PacI で切断し、ガイド RNA 発現カセットを含む DNA 断片を pZH_gYSA_MMCas9 の AscI-PacI 切断部位に挿入した。そのようにして作製したプラスミドをアグロバクテリウムに導入し、イネの胚から誘導したカルスにアグロバクテリウムを感染させた。カルスをハイグロマイシン B を含む選抜培地で培養し、その後さらにシュート誘導培地に移すことにより、ゲノム編集用コンストラクトが導入されたシュートを得た。再生したシュートから抽出したゲノム DNA を用いてヘテロ二本鎖移動度分析を行うことにより変異を検出し、シークエンス解析により変異を同定した。

4. 研究成果

(1) 開始コドン上流域の変異のタンパク質発現量への影響の一過的発現系を用いた解析

ゲノム編集を用いて開始コドン上流域に変異を導入する前に、まず開始コドン上流域の変異がタンパク質発現量に実際にどのような影響を及ぼすかを一過的発現系を用いて調べた。

そのためにシロイヌナズナとイネのいくつかの遺伝子の 5' 非翻訳領域を構成的発現プロモーターとレポーター (ルシフェラーゼ) 遺伝子の間に挿入したコンストラクト (レポーターコンストラクト) を作製した。また、それらの 5' 非翻訳領域の開始コドン上流域の中で CRISPR/Cas9 システムによる切断が可能であると考えられる位置に、PCR を用いた部位特異的変異導入により 1 塩基または 2 塩基の欠失変異を導入した。作製した野生型レポーターコンストラクトを含むプラスミド DNA と変異型レポーターコンストラクトをそれぞれプロトプラストに導入し、一定時間培養後に細胞を破碎してルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、解析した遺伝子のうちの多くで、開始コドン上流域の変異によるルシフェラーゼ活性の変動が見られた。この結果から、開始コドン上流域の 1 塩基または 2 塩基の欠失変異によってタンパク質発現量を変化させられることが示された。

(2) シロイヌナズナの花成抑制遺伝子の開始コドン上流域へのゲノム編集による変異導入の影響の検討

ゲノム編集を用いて開始コドン上流域に変異を生じさせることによってタンパク質発現量を変化させることができるかどうかを作物において検討する前に、まずシロイヌナズナを用いてこの方法が実際に可能であるかを調べた。

そのために、シロイヌナズナの花成抑制遺伝子の開始コドン上流域を標的としたゲノム編集を行なった。花成抑制遺伝子の開始コドン上流域の配列と一致する配列を含むガイド RNA と Cas9 を発現させるためのコンストラクトを持つ T-DNA をシロイヌナズナに導入した。T-DNA が導入された形質転換シロイヌナズナを抗生物質耐性を指標に選抜し、それらの植物の中から花成抑制遺伝子の開始コドン上流域に変異が生じたものをヘテロ二本鎖移動度分析によってさらに選抜した。シークエンス解析によってどのような変異が生じたかを調べたところ、様々な長さの欠失変異、挿入変異、塩基置換が同定された。変異が確認された個体について後代で変異をホモ接合体として持ち T-DNA が除かれた系統を確立した。

得られた変異系統の花成時期を野生型系統と比較したところ、変異系統では変異の種類によって様々な花成時期の変化が観察された。野生型系統よりも早咲きになる系統と遅咲きになる系統があったことから、花成抑制遺伝子のタンパク質発現量を減少させる変異と増加させる変異が得られたことが示唆された。それらの変異のタンパク質発現量への影響を調べるために、変異が生じた遺伝子の 5' 非翻訳領域をクローニングして構成的発現プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子の間に挿入し、ルシフェラーゼの発現に対する各変異の影響を一過的発現解析により検討した。その結果、変異のタンパク質発現量への影響と花成時期への影響にはおおむね相関が見られた。これらの結果から、シロイヌナズナにおいて、遺伝子組換えに該当しない範囲のゲノム編集を用いて開始コドン上流域に変異を導入することによりタンパク質発現量を様々なレベルに変化させられることが示された。

(3) イネの遺伝子の開始コドン上流域へのゲノム編集による変異導入のタンパク質発現量への影響の検討

イネにおいて、ゲノム編集を用いて開始コドン上流域に変異を生じさせることによってタンパク質発現量を変化させることができるかどうかを調べた。そのために、イネのある遺伝子の開始コドン上流域の配列と一致する配列を含むガイド RNA と Cas9 を発現させるためのコンストラクトを持つ T-DNA をイネに導入した。T-DNA が導入された形質転換イネの中から、ゲノム編集の標的遺伝子の開始コドン上流域に変異が生じたものをヘテロ二本鎖移動度分析によって選抜した。シークエンス解析によってどのような変異が生じたかを調べたところ、様々な長さの欠失変異、挿入変異、塩基置換が同定された。

同定された変異のタンパク質発現量への影響を調べるために、変異が生じた遺伝子の 5' 非翻訳領域をクローニングして構成的発現プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子の間に挿入し、ルシフェラーゼの発現に対する各変異の影響を一過的発現解析により検討した。その結果、変異によるルシフェラーゼ発現量の変化が観察されたが、変異の種類によってルシフェラーゼ発現量の変化の程度は多様であった。それらの変異の中にルシフェラーゼの発現量を増加させるものも見つかった。この研究により、イネにおいて、遺伝子組換えに該当しない範囲のゲノム編集を用いた開始コドン上流域に変異を導入によってタンパク質発現量を様々なレベルに変化させられることを実際に示すことができた。

References

Tsutsui H and Higashiyama T (2017) pKAMA-ITACHI Vectors for Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knockout in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 58:46-56.

Mikami M, Toki S, and Masaki Endo M (2015) Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Molecular Biology*, 88:561–572.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiragori Yuta, Takahashi Hiro, Karino Taihei, Kaido Atsushi, Hayashi Noriya, Sasaki Shun, Nakao Kodai, Motomura Taichiro, Yamashita Yui, Naito Satoshi, Onouchi Hitoshi	4. 巻 111
2. 論文標題 Genome-wide identification of Arabidopsis non-AUG-initiated upstream ORFs with evolutionarily conserved regulatory sequences that control protein expression levels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 37～55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11103-022-01309-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Hiro, Miyaki Shido, Onouchi Hitoshi, Motomura Taichiro, Idesako Nobuo, Takahashi Anna, Murase Masataka, Fukuyoshi Shuichi, Endo Toshinori, Satou Kenji, Naito Satoshi, Itoh Motoyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Exhaustive identification of conserved upstream open reading frames with potential translational regulatory functions from animal genomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-73307-6	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 該当する

1. 著者名 Takahashi Hiro, Hayashi Noriya, Hiragori Yuta, Sasaki Shun, Motomura Taichiro, Yamashita Yui, Naito Satoshi, Takahashi Anna, Fuse Kazuyuki, Satou Kenji, Endo Toshinori, Kojima Shoko, Onouchi Hitoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Comprehensive genome-wide identification of angiosperm upstream ORFs with peptide sequences conserved in various taxonomic ranges using a novel pipeline, ESUCA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12864-020-6662-5	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平郡雄太, 高橋広夫, 林憲哉, 佐々木駿, 山下由衣, 内藤哲, 尾之内均
2. 発表標題 植物間で保存され翻訳調節に関与する非AUG開始型uORFのゲノムワイドな探索
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林憲哉, 佐々木駿, 平郡雄太, Zhihang Feng, 藤原徹, 高橋広夫, 山下由依, 内藤哲, 尾之内均
2. 発表標題 上流 ORF の新生ペプチドを含む翻訳複合体が細胞内のマグネシウム濃度を感知して翻訳を制御する
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 マグネシウム耐性植物、マグネシウム耐性植物の製造方法、マグネシウム耐性植物の栽培方法、及び遺伝子	発明者 尾之内均、林憲哉、海藤篤	権利者 国立大学法人北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021-147788	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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