

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22320

研究課題名（和文）指向性進化と次世代ゲノム編集による最適転写因子の分子選抜と機能実証

研究課題名（英文）Molecular selection of the optimized transcription factor using directed evolution and next-generation genome editing techniques

研究代表者

吉田 均（YOSHIDA, Hitoshi）

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・研究領域長

研究者番号：30355565

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）：アレリックなイネ変異体spw1-cls1およびspw1-cls2は、鱗被と雄蕊のアイデンティティを決定するSPW1のアミノ酸置換変異によって閉花受粉性を示すが、それぞれ、低温下での開花、稔実率の低下を生じる。このトレードオフを克服するため、酵母ツーハイブリッド（Y2H）法での機能評価によって新規有望変異を同定した。塩基置換型ゲノム編集酵素を用い、32種類のアミノ酸置換変異アリルの作出に成功し、3系統で閉花性を確認した。閉花性の指標となる鱗被長は変異部位によって多様であり、Y2H法の結果やAIによる推定分子構造と一定の相関が見られた。本手法によって農業形質の精密調整が可能であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実用的な新品種作成のためには、微妙な強度を持つアリルの創出が必要であるが、本研究では、試験管内での評価によって膨大な対象アリルの中から有望変異候補を同定し、進捗著しいゲノム編集技術を用いて短期間で目的の形質を持つ変異体を創出することに成功した。閉花性以外の形質についても、原因遺伝子と分子機構が解明されていれば、同様のアプローチで画期的な新品種を短期間で開発することが可能となると期待される。

研究成果の概要（英文）：Allelic rice mutants, spw1-cls1 and spw1-cls2, show cleistogamy (fertilization without flower opening) based on the missense mutations of the SPW1 gene that specify identity of lodicule and stamen. However, they show flower opening under low temperature condition, and decrease of fertility, respectively. To dissolve this trade-off problem, we pursued functional evaluation of the SPW1 mutations using yeast two-hybrid (Y2H) method and identified novel hopeful mutations. We developed 32 genome-edited alleles with missense mutations using NG-PAM base editors, and at least, three of them show cleistogamy. Lodicule length, which is one of indicators of severity of cleistogamy phenotype, varies among the mutant alleles, and is associated with the results from Y2H and also the molecular structures predicted with the AlphaFold2 program.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：閉花受粉性 ゲノム編集 変異創成 ベースエディター アミノ酸置換 花器官 転写因子 イネ

1. 研究開始当初の背景

開花時期に花を開かず受粉する閉花受粉性は、品種の純度維持や遺伝子拡散の抑制などに有効な形質である。イネにおいてはこれまでに、開花時に穎花の内外穎が開閉するための動力源となる鱗被（花卉に相当するイネ科植物固有の花器官）の形態に異常を示す *spw1-cla1* と *spw1-cla2* の2つの閉花受粉性突然変異体が報告されている（図1）。これら変異体の原因遺伝子はいずれも、鱗被の形態形成を制御する MADS-box 型の転写因子 *SPW1* の変異によるものである。

SPW1 タンパク質は、同じく MADS-box 型の転写因子である *MADS2* などとヘテロ二量体を形成し機能することが知られているが、*spw1-cla1* では MADS ドメイン内のアミノ酸置換変異（I45T 変異）により *SPW1* の *MADS2* への結合能が低下し、機能が抑制されるために閉花性となる。*spw1-cla1* は、閉花性以外の農業形質に影響を示さないことから、育種素材として有用な変異であるものの、低温な気候では *SPW1*-*MADS2* のヘテロ二量体形成が復帰することで閉花性が打破されてしまうという弱点がある。一方、*spw1-cla2* では、MADS ドメイン内における *spw1-cla1* とは別位のアミノ酸置換変異により、*SPW1* と *MADS2* の結合能は維持しつつも、同ヘテロ二量体と標的 DNA 配列の結合能が著しく低下することで、*spw1-cla1* よりも強く機能が抑制されると考えられる。*spw1-cla2* は *spw1-cla1* よりもやや強いアレルであると考えられることから、*spw1-cla1* のような温度感受性はなく安定な閉花性を示すものの、一方で稔実率が低下してしまうという欠点をもつ。このことから、温度感受性がなく、稔実率の低下していない最適アレルの取得が望まれていた。そこで、図2に示す分子モデルに基づき、温度感受性のない閉花受粉性を持つ最適アレルの開発を検討した。



通常のイネ *spw1-cla1*

図1. *spw1-cla1*の表現型

*spw1-cla1*は雄しべを抽出しないため、花粉を飛散しない。

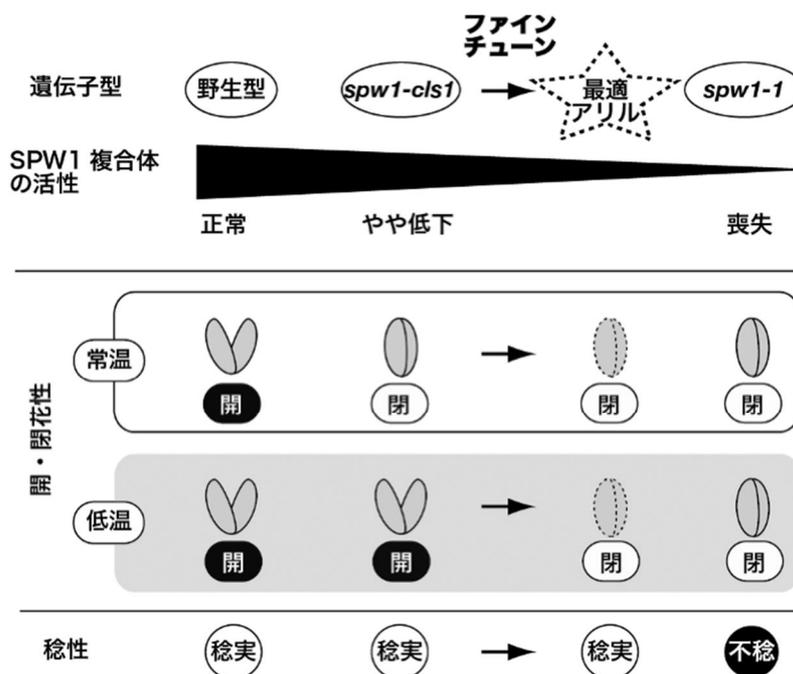


図2. 閉花性と稔性との間のトレードオフの分子機構と *SPW1* の改変による安定的閉花性アレルの作出

既報にて、SPW1-MADS2 間の結合能を低下させる 9 種類の変異を同定し、機能欠損型変異を持つ *spw1-1* 変異体に変異型ゲノム DNA を導入することで、変異の効果を一定程度評価することに成功していた (Lombardo et al., 2017)。この解析では、低温条件で開花してしまう *spw1-cls1* 株よりもシビアな鱗被の表現型を示す形質転換体を得られたが、一方で *spw1-cls2* よりもさらに稔実率が低下していた。つまり、SPW1 遺伝子のアリル強度がシビアになるに従って、低温条件でも開花しなくなるものの、トレードオフとして稔性が低下していくため、閉花性と稔性のトレードオフを打開するにはきわめて狭いレンジの活性強度値を持つ変異型 SPW1-MADS2 複合体の創成が必要と考え、近年注目を集めている指向性進化法と塩基置換を可能とする次世代型ゲノム編集技術を組み合わせた新規変異体取得を試みることにした。

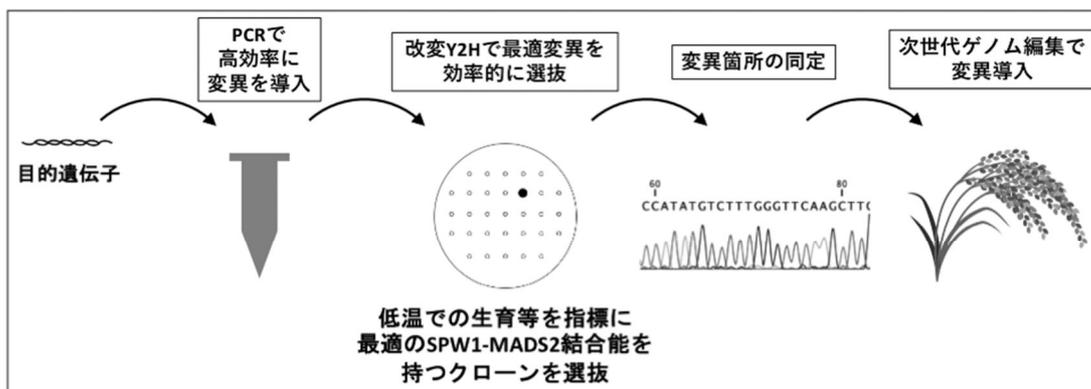


図 3. 指向性進化による最適変異型転写因子の選抜とイネへの変異導入

2. 研究の目的

作物の実用形質の多くは、キー遺伝子の「マイルドな変異」によってもたらされるため、画期的な実用品種を作出するためには、多様な変異群の創出と最適変異の選抜の効率化が重要である。2018 年のノーベル化学賞受賞でも注目を集めた指向性進化は、試験管内でのランダムな変異の創出と有用アリルの選抜によって最適変異を取得する手法であるが、これを進捗著しい次世代ゲノム編集技術と組み合わせることによって、これまでにない画期的な作物の創出が期待される。

図 3 に示すように、本研究では提案者らが見出したイネ閉花受粉性の改良をモデルとして、原因転写因子の指向性進化を行い、最適活性を持つ変異を選抜する。さらに、ジーンターゲットイングやさまざまな改良型 Cas9 酵素等の次世代ゲノム編集技術を駆使してこの変異をイネに導入し、形質の最適化について実証する。本研究により、転写因子の強度最適化法が確立されれば、ゲノム編集などにより、さまざまな実用形質をファインチューニング(精密調整)することが可能となる。

3. 研究の方法

【ランダム変異導入】

ヌクレオチドの比率をアンバランスにすることによりエラーを誘発するエラープロードン PCR によるランダムミュータジェネシス法を改良し、SPW1 cDNA にノンバイアスかつ高効率に変異を導入した。4 種類の各ヌクレオチドの濃度を過剰にした条件での反応を独立に行い、これらを混合することによってノンバイアスかつ効率的なアミノ酸置換変異を誘発し、MADS2 cDNA とともに酵母細胞に導入した。

【酵母ツーハイブリッド】

レポーターの β -ガラクトシダーゼ活性を指標とした酵母ツーハイブリッド(Y2H)法により、SPW1 と MADS2 の結合能を評価し、1)で作成した変異型 SPW1 cDNA 集団の中から特徴的な結合能を示すものを選抜した。先行研究において、2 種類の SPW1 有望変異候補を同定していたが、本研究においてさらなる選抜を行った。

【ゲノム編集】

塩基置換型ゲノム編集酵素である Cytidine Base Editor (CBE)および Adenine Base Editor (ABE)を適用し、2)で選定した有望変異をイネに導入し、形質を評価した。

4. 研究成果

【ランダム変異導入と Y2H による選抜】

SPW1 の M-I-K ドメインをコードする部分 cDNA を鋳型として、過剰量の各ヌクレオチド (3.4mM) 及び Mg イオン (9.4mM)、Mn イオン (0.5mM) を含む条件下でエラープローン PCR を行い、1 クローン当たり 1 ~ 2 個の変異が導入されることを確認した。4 種類のヌクレオチドのそれぞれを過剰の条件で作成した変異型 cDNA を Y2H 用 Prey ベクターにクローニングし、酵母 Y187 株に導入した。一方、SPW1 の結合パートナーである MADS2 の M-I-K ドメインをコードする cDNA を Y2H 用 Bait ベクターにクローニングし、Y2HGold 株に導入した。これらの株を接合させることによって、2 つのプラスミドを持つライブラリーを作成した。低温条件でも SPW1 と MADS2 の結合能が野生型よりも低下しながらも、弱く結合能を有し機能するようなマイルドな塩基置換変異を、 β -ガラクトシダーゼ活性を指標としてスクリーニングした。約 4 万 7 千クローンから呈色反応で一次スクリーニング後、約 120 クローンのアミノ酸置換変異を同定し、さらに MADS2 との結合能に特徴的な変化を示すものを 18 種類選抜した。

【ゲノム編集による変異導入と隣被形態の解析】

まず、Y2H を用いた過去のスクリーニングで得られた 9 種類の有望変異のうち 2 種類 (L35F 変異および W80R 変異) を、ゲノム編集によってイネに導入し、形質の変化を調査した。Y2H における β -ガラクトシダーゼ活性を I45T (*spw1-cls1* 型変異) と比較した場合、L35F は 90%、W80R は 45% 程度の活性と評価されていた。

L35F については、コドンを CTC から TTC に変化させることによって実現できるため、この部位を標的とした CBE ベクター (C>T または G>A の塩基置換) を用いることによって、目的の変異を得ることに成功した (図 4)。一方、W80R については、ABE ベクター (A>G または T>C の塩基置換) によってコドンを TGG から CGG に変換し、変異型個体を作成した。また、Base Editor は目的塩基周辺の同種塩基も変異させる活性があるため、W80R を得る過程で L79P (CTT>CCT) 変異体も得られたため、これも解析に用いることとした。従来の塩基置換酵素は、隣接する「PAM 配列」が「NGG」である部位にしか変異を導入することができなかったが、本研究では NG-PAM 型の塩基置換酵素を用いることによって、幅広い部位への変異導入が可能となった (Endo et al., 2019; Negishi et al., 2019)。

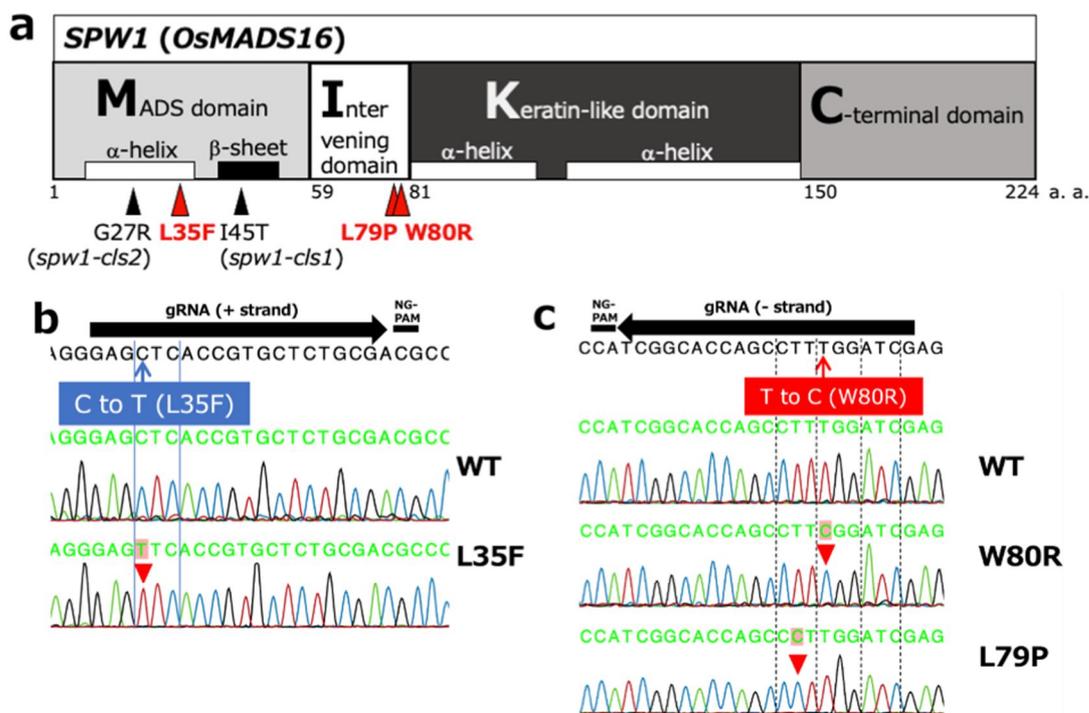


図 4. 塩基置換型ゲノム編集酵素を用いたイネへの変異導入

a. SPW1 タンパク質のドメイン構造と変異アレルにおけるアミノ酸置換パターン。

b, c. 変異アレルの塩基配列解析 (b. L35F, c. W80R と L79P)

得られた変異体の自殖種子から、各変異のホモ系統を選抜し、鱗被形態を観察した(図5)。L35F 変異体の鱗被は伸長したものの、基部がやや肥大しており、膨潤能を有することが示唆された。実際に L35F は出穂時に葯の抽出が観察され、閉花性とはならなかった。W80R を作出する過程で得られた L79P 変異体では鱗被は伸長せず、開花が見られた。一方、W80R 変異体の鱗被は顕著に伸長するとともに基部は肥大せず、内穎周縁部に近いアイデンティティを有することが示唆された。鱗被のこの特徴は、*spw1-1* や *spw1-cls2* などの比較的強いアレルのものと同様であり、出穂後にも開花はまったく見られなかったが、稔実率は著しく低かった。

L35F と W80R の表現型は、Y2H における MADS2 との結合の強さを概ね反映しており、アプローチの有効性を示唆するものであった。

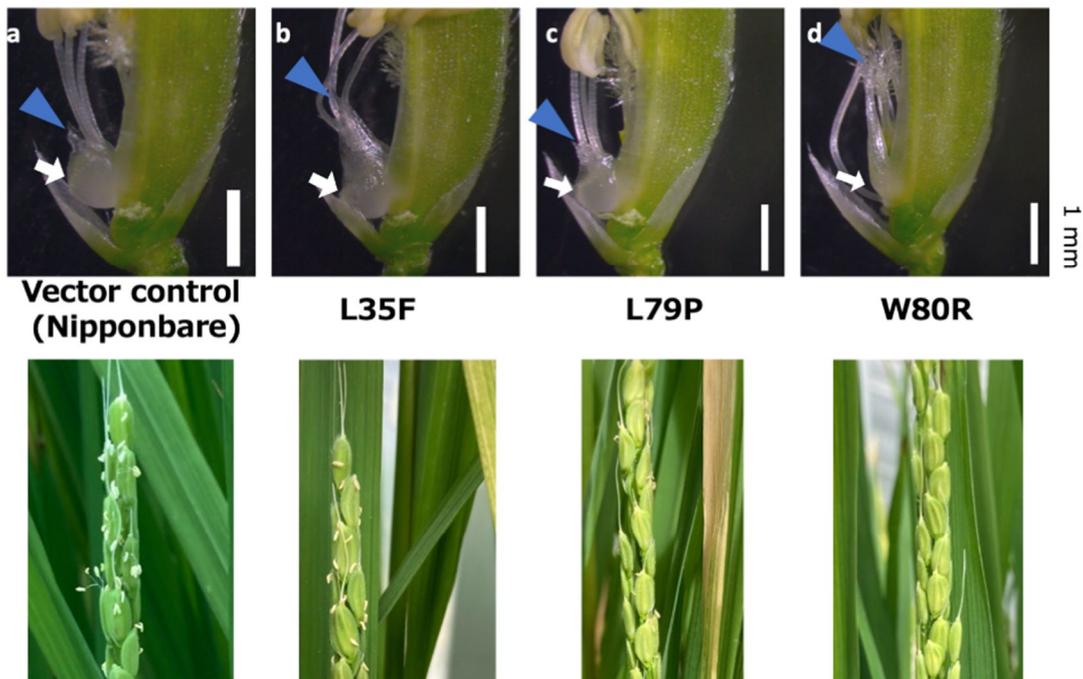


図5. ゲノム編集によるアミノ酸置換イネ系統の表現型
矢尻、矢印はそれぞれ鱗被先端部、鱗被基部を示す。

そこで、本研究における新たな Y2H スクリーニングによって同定したアミノ酸置換変異のうちいくつかを、塩基置換型のゲノム編集技術により直接イネに導入することで、目的のアミノ酸置換を導入した変異体を作成した。現在までに 18 箇所のアミノ酸を標的としてゲノム編集を行ったところ、合計 32 種類の変異型アレルを取得した。今後、それらの変異型アレルについて鱗被形態および閉花性の調査を行う予定である。

【参考文献】

- Lombardo et al., (2017) *Plant Biotechnol. J.* **15**: 91-106
 Endo et al., (2019) *Nat. Plants* **5**:14-17.
 Negishi et al., (2019) *Plant Biotechnol. J.* **17**:1476-1478

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 Namie Ohtsuki, Keiko Kizawa, Akiko Mori, Ayako Nishizawa-Yokoi, Takao Komatsuda, Hitoshi Yoshida, Katsuyuki Hayakawa, Seiichi Toki and Hiroaki Saika	4. 巻 2
2. 論文標題 Precise Genome Editing in miRNA Target Site via Gene Targeting and Subsequent Single-Strand-Annealing-Mediated Excision of the Marker Gene in Plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Genome Editing	6. 最初と最後の頁 617713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgeed.2020.617713	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒羽 剛、ロンバルド ファビエン、大森 伸之介、秋山 高、チェェトカ スベトラーナ、吉田 均
2. 発表標題 ゲノム再編成が生じたイネ閉花受粉性突然変異体H193mt における原因遺伝子の同定と機能解析
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒羽 剛
2. 発表標題 イネの遺伝子機能の理解とその先に向けて
3. 学会等名 農学中手の会 第5回研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野坂 亮仁、黒羽 剛、木水 真由美、Svetlana Chechetka、吉田 均
2. 発表標題 ゲノム編集技術による新規閉花受粉性イネの開発
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木水 真由美、黒羽 剛、吉田 均
2. 発表標題 イネ開花性変異体cis3にみられる鱗被膨潤の不全
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2022年

〔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	黒羽 剛 (KUROHA Takeshi) (50415155)	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・研究員 (82111)	

	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
研究協力者	横井 彩子 (NISHIZAWA-YOKOI Ayako) (10760019)	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・上級研究員 (82111)	

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
---------	---------