

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21302

研究課題名(和文) 組織培養を経ないゲノム編集技術の開発と果菜類への適用

研究課題名(英文) Development of genome editing technology without tissue culture and application to fruits and vegetables

研究代表者

三浦 謙治 (Miura, Kenji)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00507949

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)：ゲノム編集を植物にて適用するには、Cas9およびsgRNAを発現させる形質転換植物を作製する方法を行っていた。本研究では、形質転換を経ない方法として、トマト子葉に一過的にCas9、sgRNAを発現させて、再分化培養を行い、次世代まで安定的に遺伝する塩基編集個体を作成することを実証した。また、組織培養を経ない方法として、トマト本葉1枚を残し、切り口にCas9、sgRNA、iptを発現させることで、iptにより切り口から新たなシュートを形成させ、そのシュートにゲノム編集を行った。1塩基欠失個体が得られたが効率が非常に悪かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、一過的発現系を用いたゲノム編集技術の開発を行った。形質転換を経ないことで、ヌルセグレガント個体を迅速に獲得できるという利点があり、このことは、気候変動やニーズの多様化といった育種技術のスピードアップに大いに貢献すると思われる。また、植物体への一過的発現系については改良の必要があるが、この方法は難組織培養の植物に適応できる可能性があり、様々な植物にゲノム編集を適用できることにつながる。

研究成果の概要(英文)：To apply genome editing to plants, generally transformed plants that express Cas9 and sgRNA are generated. In this study, we demonstrated that Cas9 and sgRNA can be transiently expressed in tomato cotyledons and regenerated in culture to produce base-edited plants that can be stably inherited by the next generation. As a method that does not use tissue culture, Cas9, sgRNA, and ipt were expressed in the cut end with one tomato leaf, a new shoot was formed from the cut end by ipt, and genome editing was performed on the shoot. The efficiency of genome editing was very low.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ゲノム編集 トマト 一過的発現システム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術はターゲットとする配列において DNA を改変する技術である。ゲノム編集では、CRISPR/Cas9 法が広く使われているが、これは、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。植物においてゲノム編集個体を作成する場合、sgRNA、Cas9 遺伝子を発現させるカセットを組み込んだ T-DNA 領域を植物ゲノム内に挿入した形質転換植物を作成し、その形質転換植物において、標的 DNA 配列に改変がおきているものを選抜するという方法が一般的に利用されている。但し、この方法だと、形質転換ができない植物や、組織培養による植物の再生法が確立されていない植物では適用できない。一方で、ゲノム編集による DNA 配列の改変がおきた後は、CRISPR/Cas9 は不要である。そこで、一過的に sgRNA および Cas9 タンパク質を発現させ、そのまま植物体を栽培すれば、形質転換を経ないゲノム編集植物体を得られる可能性がある。また、組織培養を経ない方法が確立できれば、組織培養にかかる時間を、大幅に縮めることができる。特に、植物における組織培養では、少なくとも半年から 1 年で再生された植物体を得ることができることから、この期間短縮がなされれば、ゲノム編集個体の簡便な作出および、汎用的な方法になり得る。特に、今後の気候変動時代や食の多様性時代に突入することから、迅速な品種改良が求められることに対応できるものである。

2. 研究の目的

本研究では、植物におけるゲノム編集を行うにあたり、形質転換を経ない方法でゲノム編集植物を得ること、また、その延長で、組織培養をも経ない方法でのゲノム編集植物を得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形質転換を経ないゲノム編集法

一過的に Cas9, sgRNA を植物にて発現させる方法として、当研究室で開発したつくばシステムを用いた。つくばシステムとは植物での一過的発現を行う方法で、多くのタンパク質を生産させることができるシステムである。つくばシステムに nCas9-CDA (塩基編集を行うためのニック ゼ Cas9 にシチジンデアミナーゼを融合させたもの) および sgRNA を発現させるカセットを挿入した。このベクターを保有するアグロバクテリウムを、トマトの子葉に感染させ、共存培養後に抗生物質を含まない培地でカルスを誘導した。カルス誘導後は、抗生物質を含まない培地でシュート (植物体) を再分化させた。その個体から次世代種子を採種した。それぞれの個体からゲノムを抽出し、ターゲット周辺を PCR で増幅したのち、シーケンスを行い、変異が導入されたかを確認した。ゲノム編集のターゲットとして、トマトにおいて糖度蓄積が認められている *HAWAIIAN SKIRT (HWS)* 遺伝子 (Demayanti et al., 2019 *Front Plant Sci*) とした。

(2) 植物体への一過的発現によるゲノム編集法

組織培養を経ない方法として、Voytas らのグループで開発された方法 (Maher et al., 2020 *Nat Biotechnol*) を変更して行った。この方法では、Cas9 遺伝子が形質転換されたタバコ植物体から、本葉を 1 枚だけ残して切り口をつくり、そこに sgRNA および細胞増殖促進

因子を一過的に発現させるという方法で行われている。ただ、この方法だと、Cas9 遺伝子が形質転換された植物体が必要である。本研究では、本葉 1 枚だけ残した切り口に、Cas9, sgRNA, ipt (細胞増殖促進因子の 1 つ) を発現させた。切り口から再生したシュートからゲノムを抽出し、ターゲット周辺のシーケンスを確認した。

4. 研究成果

(1) 無選抜培地による形質転換を経ないゲノム編集法

つくばシステムにて *nCas9-CDA* および *HWS* 遺伝子をターゲットとする sgRNA を発現させるベクターを構築した (図 1A)。トマト子葉に一過的に発現させた後、無選抜でカルスを誘導、シュートを再生させた。それらの植物体からゲノムを抽出し、シーケンスを行い、塩基編集が行われているかを調べたところ、14% の割合でゲノム改変が行われていた。感染させた当代 (T0) であるため、キメラな状態 (変異をもつ細胞と野生型の細胞が混在した状態) であると考えられた。

キメラな状態から次世代 (T1) を選抜すれば、変異をもつものと野生型を分けることが可能である。そこで、ゲノム改変が見られた個体から T1 種子を栽培し、その変異が遺伝されているかどうかを調べた。18% の割合で T1 世代において変異が遺伝していることが明らかとなった。T1 世代のシーケンスを調べたところ、C から T へ塩基編集が行われた個体や C と T のヘテロ変異 (片方の染色体のみ変異が入った) をもつ個体が見出された (図 1B)。このことから、一過的発現系を用いた方法でも塩基編集が達成できることが明らかとなった。また、T1 世代において変異をもつ植物体で挿入遺伝子が残っていないものは 71% であった (図 1C)。このことから、一過的発現系を用いることで、T-DNA が組み込まれず、塩基編集を達成できることが明らかとなった。

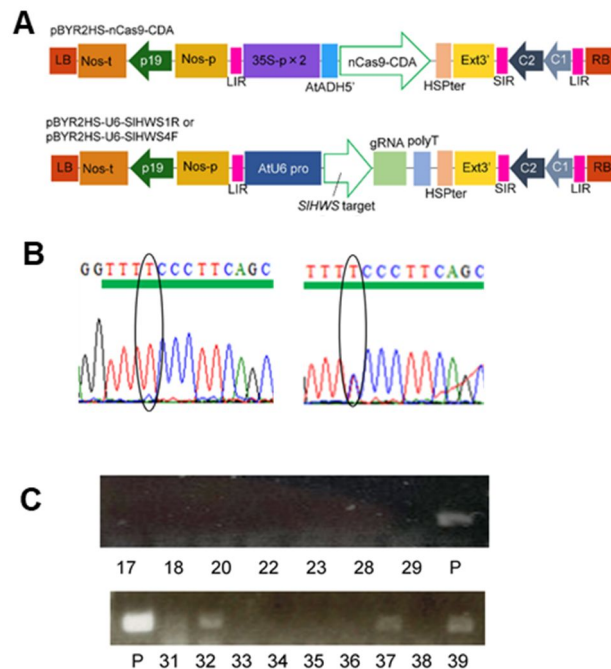


図 1、一過的発現系によるトマト塩基編集。

A. 一過的発現系で用いたベクターの概要。つくばシステムに *nCas9-CDA* を組み込んだベクターと、*HWS* 遺伝子をターゲットとする sgRNA を発現させるベクター。

B. T1 世代における変異状況のシーケンス解析。野生型では○で囲んだ塩基が C であったが、塩基編集により T に置換したもの (左) と、C と T が混在しヘテロ変異であるもの (右)。

C. 一過的発現に用いたベクターが組み込まれていないかを調べた結果、多くの植物でバンドが見えておらず、ベクターが組み込まれていないことを示している。

(2) 植物体への一過的発現によるゲノム編集法

トマト本葉を 1 枚だけ残して、その切断面に Cas9, sgRNA, ipt をつくばシステムにて一過的に発現させることでゲノム編集を行うことを目的するが、まず、切断面においてつくばシステムによるタンパク質発現が出来ていることを明らかにする必要があった。そこで、

ipt を発現させ、切り口から新しくシュートが形成されるかを確かめた。ipt を切り口にて高発現させると新たなシュートが大量に形成されることを確認した(図 2A)。このことから、つくばシステムにより、切り口にてタンパク質が適切に作られていることが示された。次に、Cas9, sgRNA, ipt を切り口に一過的に発現させてゲノム編集が可能であるかを調べた。ターゲットとしては GABA 蓄積が認められる *GAD3* 遺伝子とした。新たに出てきたシュートからゲノムを抽出し、シーケンスを行ったところ、非常に低い確率ではあるものの、1塩基欠失した植物が得られた。しかし、キメラな状態で、キメラ率も低い(12%)であったため、次世代に遺伝した個体を得ることが出来なかった。一過的発現によりゲノム編集ができる可能性があるが、キメラ率を上昇させないと、次世代に遺伝した個体をとることが難しいことが示唆された。

A



図 2、一過的発現系によるトマトゲノム編集。
A.本葉 1 枚を残した切り口につくばシステムにて ipt を発現させた植物体。新しいシュートが多数見受けられた。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuan Shaoze, Kawasaki Shunsuke, Abdellatif Islam M. Y., Nishida Keiji, Kondo Akihiko, Ariizumi Tohru, Ezura Hiroshi, Miura Kenji	4. 巻 40
2. 論文標題 Efficient base editing in tomato using a highly expressed transient system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 667 ~ 676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00299-021-02662-z	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 Abdellatif Islam M. Y., Yuan Shaoze, Na Renhu, Yoshihara Shizue, Hamada Haruyasu, Suzaki Takuya, Ezura Hiroshi, Miura Kenji	4. 巻 23
2. 論文標題 Functional Characterization of Tomato Phytochrome A and B1B2 Mutants in Response to Heat Stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1681 ~ 1681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23031681	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 Nosaki Shohei, Hoshikawa Ken, Ezura Hiroshi, Miura Kenji	4. 巻 38
2. 論文標題 Transient protein expression systems in plants and their applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 297 ~ 304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.0610a	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shaoze Yuan, Shunsuke Kawasaki, Islam Abdellatif, Keiji Nishida, Akihiko Kondo, Tohru Ariizumi, Hiroshi Ezura, Kenji Miura
2. 発表標題 Efficient base editing in tomato using a highly expressed transient system
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 Islam Abdellatif, Shaoze Yuan, Na Renhu, Kenji Miura
2. 発表標題 Enhancement of heat and drought tolerance by tomato phytochrome A mutation
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 Islam Abdellatif; 袁少澤; Na Renhu; 吉原静恵; 濱田晴康; 壽崎拓哉; 江面 浩; 三浦 謙治
2. 発表標題 Functional Characterization of Tomato Phytochromes A and B1B2 Mutants in Response to Heat Stress
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦謙治
2. 発表標題 "Tsukuba system" as a transient protein expression system in plants
3. 学会等名 RIKEN Seminar (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学 植物分子細胞生物学研究室
<https://sites.google.com/view/tsukubapmcb>

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	有泉 亨 (Ariizumi Tohru) (70575381)	筑波大学・生命環境系・准教授 (12102)	

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