

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05535

研究課題名（和文）植物における精密ゲノム編集技術ジーンターゲティングの効率化

研究課題名（英文）The establishment of efficient gene targeting system by fine-tuning the DNA repair pathway and the delivery system of template in plants

研究代表者

横井 彩子（Nishizawa-Yokoi, Ayako）

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

研究者番号：10760019

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ジーンターゲティング（GT）はDNA修復の一つの経路である相同組換えを介して生じることから、標的遺伝子を狙い通りに改変できる精密なゲノム編集技術である。しかし、ほとんどの植物で効率が低いことが課題である。本研究では、DNA修復経路の制御と相同組換えの鋳型となる配列のデリバリー法の改良によりGT効率を向上させる方法を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GTは望み通りに標的遺伝子を改変できることから、交配育種や突然変異育種だけでは叶わなかった様々な形質を作物に付与することが可能である。しかしながら、イネ以外の作物種で汎用的なGT系は確立されておらず、本研究で得た知見は広範な作物種に適用可能なGT系確立への道筋を示し、精密なゲノム編集技術を利用した育種素材開発を促進すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Homologous recombination-mediated gene targeting (GT) is a precise genome editing technique that allows for modifying target genes as desired. However, its efficiency is quite low in most plant species. In this study, we explored ways to improve GT efficiency by controlling the DNA repair pathway and improving the delivery method of the template sequences for homologous recombination.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ゲノム編集 DNA修復 相同組換え テロメア イネ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年、植物の基礎研究や作物の育種において、ゲノム編集は不可欠な技術になりつつある。ゲノム編集には大きく分けて2つの技術があり、一つは、人工制限酵素 (CRISPR/Cas9 など) で標的遺伝子上に DNA 二重鎖切断 (DSBs) を誘発し、DNA 末端が再結合される修復 (非同末端結合, NHEJ) の過程で生じるエラーを利用して標的遺伝子に挿入・欠損変異などを導入する標的変異技術である (図 1A)。この技術は非常に効率が高く、既に様々な植物種に適用されている。一方、もう一つのゲノム編集技術であるジーンターゲットング (GT, 図 1B) は、標的遺伝子上に DSBs が生じる際に相同組換え (HR) 修復に必要な鋳型 DNA を細胞内に導入し、鋳型 DNA 上の任意の変異をコピー・ペーストして標的遺伝子を改変する。つまり、機能獲得型変異体の作出には不可欠な技術であるが、高等真核生物では一般的に相同組換え効率が非常に低いのが問題点であった。

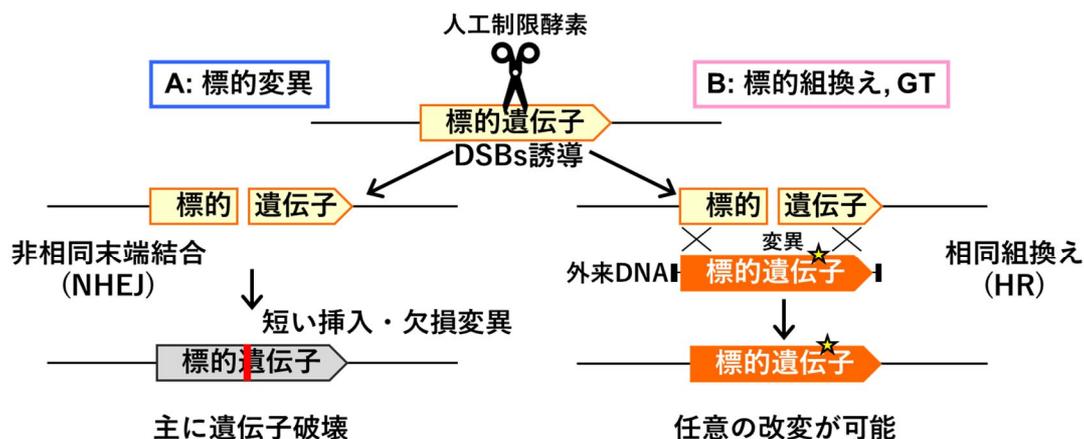


図1. DNA二重鎖切断を介した2つのゲノム編集技術の概要

そこで申請者はこれまでに、ポジティブ・ネガティブ選抜法という GT 細胞を効率良く濃縮する選抜法と、*piggyBac* トランスポゾンによって痕跡を残さずに選抜マーカーを除去する方法の組み合わせにより、標的遺伝子上に目的の変異のみを導入する GT 系をイネで確立してきた。また、CRISPR/Cas9 により標的遺伝子を切断することで HR 効率を向上させ、再現性のある GT 系が確立されていないタバコにおいても GT による内在性遺伝子の改変に成功した。しかし、より広範な作物種で利用可能な GT 系を確立するためには効率をさらに向上させることが必須である。これまでの申請者の研究から、NHEJ 経路の抑制や GT の鋳型配列を高コピー供給することが GT 効率の向上に有効であることが示唆されてきた。そこで、CRISPR/Cas9 と GT の鋳型配列を一つの T-DNA 上に配置した一体型ベクターを利用し、レポーター遺伝子を内在性遺伝子にノックインして GT 効率を簡単に評価する実験系をイネにおいて構築し、GT の効率化に有効な条件を検討してきた。その中で、Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害剤処理と GT ベクターの改良 [一体型 (図 2A) から分割型 T-DNA (図 2B) へ] により、GT 効率を 5~10 倍向上させることに成功した。しかしながら、これらのアプローチがなぜ GT 効率を向上させるのかは明らかになっていない。また、実用化を目指した研究においては、更なる効率向上および鋳型 DNA 配列をゲノムに挿入させない実験系の確立が重要であると考え、本課題を提案した。

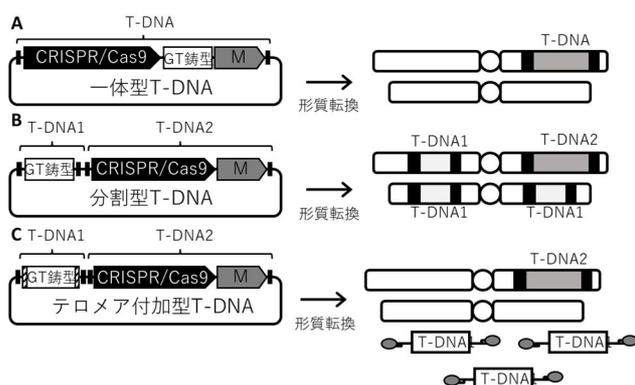


図2 一体型および分割型T-DNAを用いたCRISPR/Cas9による標的切断誘導的GT系の概要

A, 一体型T-DNAを用いたCRISPR/Cas9による標的切断誘導的GT系のベクター構造(左)と細胞内に導入されるT-DNAのコピー数(右)。高分子T-DNAは高コピー導入されにくいと考えられる。B, 分割型T-DNAを用いたCRISPR/Cas9による標的切断誘導的GT系のベクター構造(左)と細胞内に導入されるT-DNAのコピー数(右)。黒四角はT-DNAのボーダー配列を示す。低分子T-DNAとして導入されたGT鋳型配列は、細胞内に高コピー導入されると考えられる。C, テロメア付加型T-DNAを用いたCRISPR/Cas9による標的切断誘導的GT系のベクター構造(左)と細胞内に導入されるT-DNAのコピー数と形状(右)。分割型T-DNAを用いて低分子のT-DNAとしてGT鋳型配列を細胞内に高コピー導入し、かつ、ゲノムに組み込まれずに染色体外で安定的に維持させることで、相同組換えの鋳型として利用されやすいと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記 および のアプローチにより GT 効率が向上するメカニズムを解明し、その知見を利用して GT の鋳型 DNA をデリバリーするベクターや形質転換系をファインチューニングすることで更に高効率かつ実用的な GT 系を確立することを目的とする。

高等植物における PARP タンパクはホモログとしてゲノムにコードされており (イネにおいては OsPARP1, OsPARP2A, OsPARP2B, OsPARP3), 各タンパクの機能分化については不明な部分が多い。上記 の阻害剤は PARP ホモログの活性をまとめて阻害すると考えられるが、全ての活性を

阻害すると細胞毒性など負の影響も大きいと予想される。従って、GT の効率化にはどの PARP ホモログの活性を阻害すべきか、また、PARP が関わるどの代謝経路を抑制すべきかを明確にすることで、より効果的な阻害の標的を特定することができる。実際に動物細胞を用いた研究では、PARP1 や PARP2 活性を選択的に抑制する阻害剤が開発されており、植物においても特異的な阻害剤を用いることで選択的阻害が可能であると考えられる。

また、これまでの知見から GT の鋳型 DNA 配列を高コピー導入することが GT 効率向上に有効と考えられるが、高コピーの T-DNA がゲノムに挿入されていれば次世代で null segregant を得ることが難しく、実用化を目指した研究においては不都合である。このことから、のアプローチが実際に高コピーの鋳型配列をデリバリーしているか、また、その鋳型配列がゲノムに挿入されているかを明らかにした上で、細胞内に高コピーの T-DNA をデリバリーしつつも、それらをゲノムに挿入させない工夫が重要となる。

### 3. 研究の方法

#### (1) PARP 抑制による GT 効率向上機構の解明

PARP 阻害剤処理による GT 効率向上の機構を明らかにすることを目的として、CRISPR/Cas9 システムにより作製した OsPARP のノックアウトイネを作成し、それらのイネカルスをを用いて T-DNA ランダム挿入頻度および相同組換え効率を評価する。また、GT 効率の向上が認められた PARP 阻害剤処理においても、T-DNA ランダム挿入頻度および相同組換え効率を評価し、GT 効率向上の原因を明らかにすることを試みる。

#### (2) 分割型 T-DNA の利用による GT 効率向上機構の解明

分割型 T-DNA による鋳型デリバリーが GT 効率を向上させる機構を明らかにするため、分離型および一体型 GT ベクターを用いて作成した GT 個体を用いて Droplet Digital PCR (ddPCR) により鋳型コピー数の解析を行う。

#### (3) GT ベクターの改良

真核生物の染色体の末端はテロメアと呼ばれる構造で保護されており、シロイヌナズナやイネにおいてもテロメア配列が同定されている。またテロメア配列は、動物や植物のミニ染色体の構築などのゲノム工学技術や、微生物における一過的発現などの遺伝子工学にも利用されている。特に、ペアのテロメア配列を持たせたベクター（テロメアベクター）が、抗生物質などの選抜条件下では染色体外で安定に維持される一方、無選抜条件下では迅速に欠落することが糸状菌（*Botrytis cinerea*）において示されているため、この技術の利用に注目した。最近ではこのテロメアベクターによる一過的選抜系は、CRISPR/Cas9 の ribonucleoprotein complexes (RNPs) で標的切断された系統を選抜マーカーフリーで効率良く濃縮することにも利用されている。本研究では、末端にテロメア配列を持つ T-DNA ベクターを構築し（ 2C）、植物細胞へのデリバリー効率やゲノムへの挿入効率をレポーターシステムを用いて検討する。最終的には、テロメアベクターを利用して GT の鋳型配列をデリバリーする GT 系を構築する。

### 4. 研究成果

#### (1) PARP 抑制による GT 効率向上機構の解明

機能欠損によって GT 効率向上につながる PARP ホモログを特定するため、恒常的に発現しており特に重要な機能を持つことが予想される OsPARP1 と DNA 損傷に応答して発現が顕著に誘導される OsPARP2A を CRISPR/Cas9 によってノックアウトしたイネ系統を作成した。これらのイネカルスをを用いて、T-DNA 挿入が生じたことをレポーターの発現としてモニターできるレポーターコンストラクト（ 3A）を形質転換することで T-DNA 挿入頻度を評価した。その結果、野生株とこれらの変異体における T-DNA 挿入頻度に大きな違いは認められなかった（ 3B）。また、野生型イネカルスを PARP 阻害剤処理することによっても T-DNA 挿入の抑制は見られなかった（ 3C）。このことから、PARP 阻害剤処理による GT 効率の向上は T-DNA のランダム挿入の抑制によるものではないことが示唆された。そこで、PARP 阻害剤による GT 効率向上が相同組換え効率の向上に起因するかどうかを評価するため、相同組換え効率評価系ベクターを構築し、PARP 阻害剤処理および PARP 欠損が相同組換え効率に及ぼす影響を現在解析している。

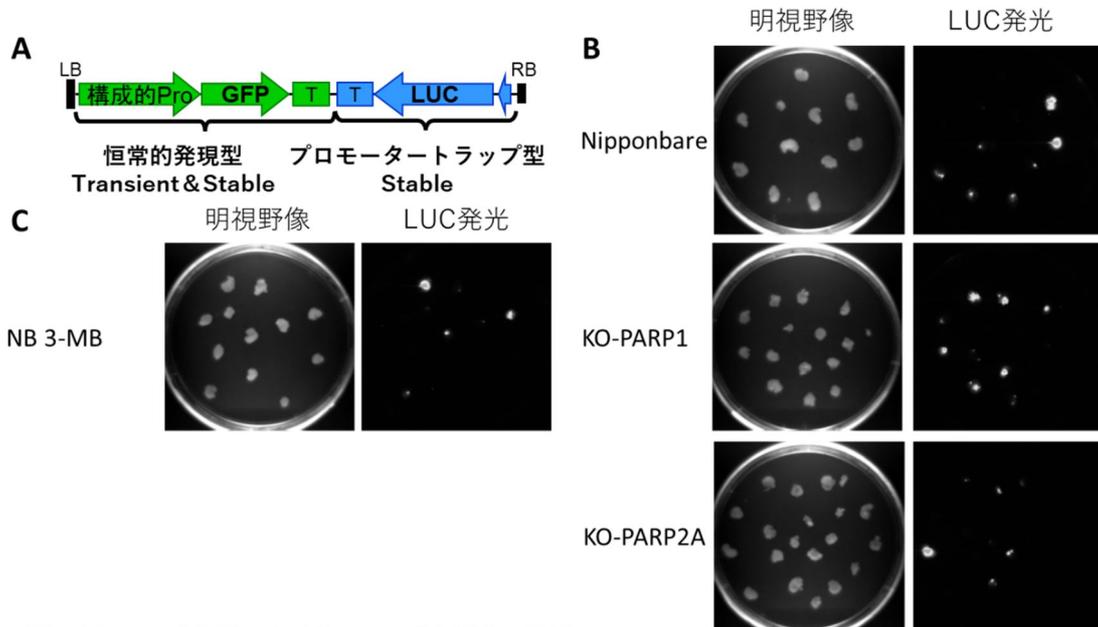


図3 イネPARP変異体におけるT-DNA挿入頻度の解析

A, T-DNAのランダム挿入頻度をルシフェラーゼの発光でモニターできるレポーターコンストラクトの構造. B, 日本晴, OsPARP1およびOsPARP2A変異体におけるT-DNA挿入頻度の解析. C, 野生型(日本晴)イネカルスにおけるPARP阻害剤(3-MB 1 mM)処理がT-DNA挿入頻度に及ぼす影響の解析.

### (2) 分割型 T-DNA の利用による GT 効率向上機構の解明

分割型T-DNAによる鋳型デリバリーがGT効率を向上させる機構を明らかにするため、分離型および一体型GTベクターを用いて作出したGT個体においてゲノムに挿入されている鋳型のコピー数をddPCRにより解析した。その結果、一体型ベクターは鋳型配列もそれ以外の領域と同じコピー数しかゲノムに挿入されていないのに対して、分離型ベクターは鋳型配列を載せたT-DNAがもう一方のT-DNAより高コピーでゲノムに挿入されていることが明らかとなった。この結果から、分離型ベクターの利用でGTの鋳型配列を高コピーでデリバリーできることを証明できた(図4)。

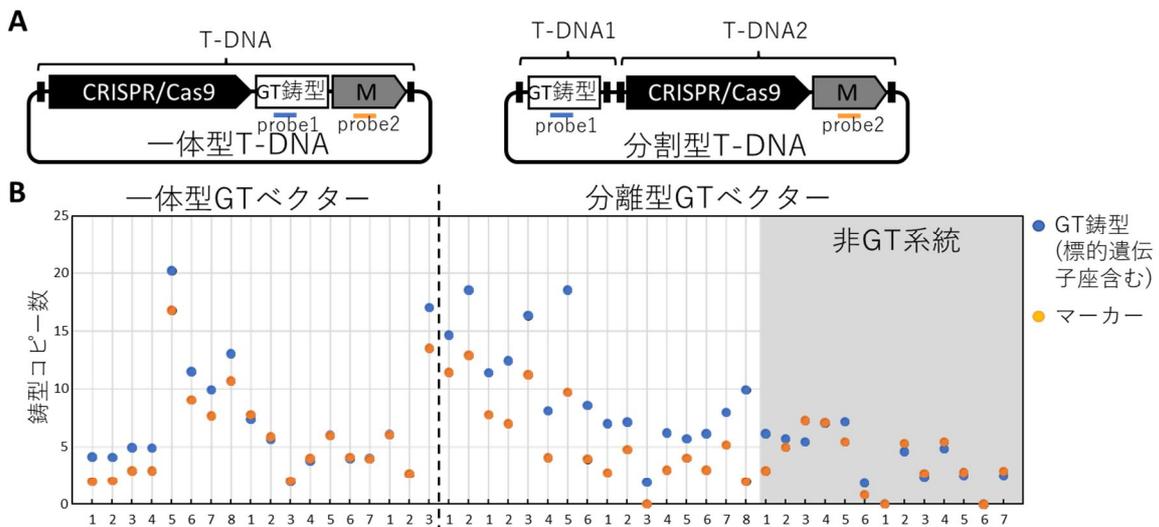


図4 Droplet Digital PCR (ddPCR)によるGT鋳型配列コピー数の解析

A, 一体型(左)および分離型ベクター(右)の構造とddPCRの解析に用いたプローブの位置. Probe1でGT鋳型配列、Probe2でマーカー遺伝子のコピー数を内在遺伝子(Actin)のコピー数を2として評価した. B, ddPCRによって解析したGT個体におけるGT鋳型配列とマーカー遺伝子のコピー数. 点線より左側が一体型GTベクターを使用して作出したGT個体、右側が分離型ベクターを使用して作出したGT個体の解析結果を示す. また、灰色の網掛部分は非GT系統(GTベクターの形質転換系統)を示す.

### (3) GT ベクターの改良

より実効性のあるGT系の確立のためには、細胞内に高コピーのT-DNAをデリバリーしつつも、それらをゲノムに挿入させない工夫が重要となる。そこで、ペアのテロメア配列をT-DNAの末端に付加したテロメアベクターに選抜マーカー遺伝子およびレポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子を配置したテロメアベクターの構築に取り組んだが、その高度な繰り返し配列のためにベクター構築ができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ayako Nishizawa-Yokoi, Hiroaki Saika, Naho Hara, Lan-Ying Lee, Seiichi Toki, Stanton B. Gelvin
2. 発表標題 The mechanism of Agrobacterium T-DNA integration via DNA repair pathways in plants
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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