

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06233

研究課題名（和文）新奇ゲノム編集技術によるシロイヌナズナFT遺伝子のcis-element解析

研究課題名（英文）Analyses of the cis-element of the Arabidopsis FT gene using a novel genome editing technique.

研究代表者

賀屋 秀隆（KAYA, Hidetaka）

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80398825

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）：本研究では、シロイヌナズナの花成制御遺伝子FTの発現制御メカニズムの解明をおこないました。ゲノム編集技術を用いて、FT遺伝子の発現を調節するcis-elementに変異を導入することに成功しました。単離した変異体を解析した結果、特にFTの翻訳開始点から5.3kb上流にあるCCAAT1配列が重要な役割を果たしていることを明らかにしました。この研究は他の作物にも応用可能で、将来は栽培品種の花成時期を調整する技術につながると期待されます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FT遺伝子は植物が適切な時期に花を咲かせることにおいて機能する重要な遺伝子です。その為、FT遺伝子の発現のタイミング・場所・量は精密に調整されています。最新のゲノム編集技術を用いて、ゲノム上にあるFT遺伝子のcis-elementを直接編集し、解析しました。結果、FTの翻訳開始点から5.3kb上流にあるCCAAT1配列が花成制御に重要な役割を果たしていることが明らかになりました。この研究成果は、将来、農業において作物の花成時期を調整する技術の開発につながり、作物の栽培効率向上や収穫時期の最適化に寄与することが期待されます。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the regulatory mechanism of the flowering gene FT in Arabidopsis. By using genome editing technology, we succeeded in introducing mutations directly into the cis-elements that regulate the expression of the FT gene. Analysis of the isolated mutants revealed that the CCAAT1 sequence, located 5.3 kb upstream of the FT gene, plays an important role. This research has potential for application to other crops and is expected to lead to future technology for regulating the flowering time of cultivated varieties.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：ゲノム編集 cis-element 遺伝子発現 花成 FT

1. 研究開始当初の背景

FT 遺伝子による花成制御は、種子を次の世に確実に託すという植物における重要な役割を担っている。*FT* 遺伝子は花成制御以外にも多様な発生・生理現象に関与しており、*FT* 遺伝子の発現制御システムが *FT* の機能分担を可能にさせていると考えられる。これまでも、*FT* 遺伝子の発現制御を理解するために *cis*-element の機能解析は多数おこなわれてきた (Liu *et al.*, Nature comm. 2014; Cao *et al.*, Plant Cell, 2014; Gnesutta *et al.*, Plant Cell, 2017, Bao *et al.*, Dev. Cell, 2019 等)。近年も *FT* 遺伝子の発現制御機構の解析は精力的になされている (Luo *et al.*, Plant J., 2018; Zicola *et al.*, Nature Plants, 2019)。これまでの *cis*-element 解析の多くは *promoter::GUS* or *ORF* 等を用いた transgene による解析である。しかし、transgene での解析では、コピー数・挿入された位置・クロマチン構造など、native な状態との違いが原因となり、本来の遺伝子発現とは発現のタイミング・場所・量などが異なっているかもしれないという問題がある。そのため、transgene を用いた解析だけでは *cis*-element の機能を正しく推測することは難しかった。ところが、最新のゲノム編集技術を適用することで、これまで不可能であった内在の *cis*-element に直接変異を導入することが可能となってきた。この新技术を適用し、これまでの知見の検証と新たな知見を加えることで *FT* 遺伝子発現制御における *cis*-element の真の役割が解明できると考えている。

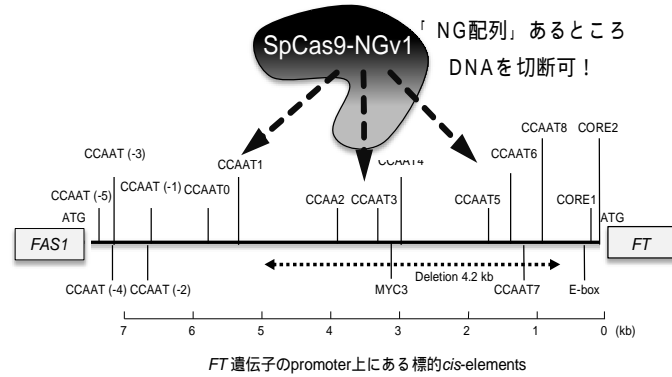
2. 研究の目的

シロイヌナズナ *FT* 遺伝子発現制御機構について、新奇ゲノム編集技術を適用することで、本来のゲノム上での *cis*-element の機能解析・エピジェネティック発現制御機構の解明を目的とする。シロイヌナズナの *FT* 遺伝子は、花成制御だけでなく、分枝・塊茎形成等広範な生理作用に関与する。このことは、*FT* 遺伝子の発現が「タイミング・場所・量」において精密に制御されていることを示唆する。この遺伝子発現制御において重要な役割を果たすのが、*cis*-element やエピジェネティック情報である。本研究では、まず、新奇ゲノム編集技術を用いて *FT* 遺伝子のゲノム上の *cis*-element を直接編集しその機能の解明をおこなう。

3. 研究の方法

FT promoter 上の *cis*-element として 9 つの CCAAT0-8, 2 つの CORE, 1 つの E-box, 1 つの

MYC3 をそれぞれ標的とした (右図). これらの単独変異体作製用 sgRNA (single guide RNA), 二重・三重突然変異体作製用 sgRNA と SpCas9-NGv1 とを搭載した binary vector を作製した. 各形質転換体を選抜し, T₁ 世代において標的配列での



変異を確認. ゲノム編集による変異は, HMA (ヘテロ二本鎖移動度分析) により検出した. T₁ 世代では, 変異が mono-allelic かつキメラになっている場合が多いので, T₂ 世代のゲノム DNA を sequencing 解析し変異体を同定した. 並行して, FT 遺伝子の発現 enhancer として機能する 5.3kb 上流の CCAAT を 1 つを残した 4.2 kb の deletion, さらに natural variation が見られる領域 (Liu *et al.*, Nat. commun. 2014) の deletion 変異体も試みた.

cis-element の変異体が得られたものから, 順次 FT 遺伝子の発現解析, 花成測定をおこなった.

4. 研究成果

本研究では, ゲノム編集技術を用いて FT 遺伝子の *cis-element* を直接編集し, その機能を native 状態で解明してきた. FT の翻訳開始点から 5.3kb 上流に位置する CCAAT 配列 (CCAAT1) に変異を導入することに成功した. さらに, CCAAT1 より 500bp 上流にある CCAAT0, 2kb, 2.3kb, 4.2kb 下流に位置する CCAAT3, CCAAT4, CCAAT8 への変異導入にも成功した. また, E-box や CONSTANS 結合 *cis-element* である CORE1, CORE2 への変異導入にも成功した. さらには, CCAAT1;CORE1 の二重変異体, CCAAT1;CORE1;CORE2 三重変異体の単離にも成功した. これら *cis-elements* 変異体の accession は全て Columbia (Col) であるが, CCAAT1 に関しては L. *er*, Ws, C24 での *cis-elements* 変異体にも単離これら単離した. Col の FT promoter には, 他の accessions (L. *er*, WS, C24 など) には見られない約 1kb の付加配列が存在する. この付加配列は, CCAAT1 と CORE1 または CORE2 との距離に影響する. 今後, accession 間, あるいは CCAAT1 と CORE, CORE2 との距離が花成にどの様に影響するのかについても比較検討することができる. 次に, 単離した *cis-element* 変異体を用いて, FT 遺伝子の発現解析・花成測定をおこなった. 注目すべき点は, FT の翻訳開始点から 5.3kb 上流に位置する CCAAT1 変異体では顕著な花成遅延が観察されたことである. CCAAT1 が FT 遺伝子の発現制御において重要な役割を果たしていることが示された. 一方で, CCAAT1 近傍の CCAAT0, 転写開始点から約 3.0kb 上流にある CCAAT4 では, 花成への影響は観察されなかった. この結果から, 同じ CCAAT 配列であっても特定の転写因子が CCAAT1 には相互作用する一方, 他の CCAAT 配列とは相互作用しないという特異性が示唆

された．単独の変異では花成へのおおきな影響は観察されなかったが CORE1 と CORE2 の二重変異体では，*FT* 遺伝子の発現量の低下と顕著な花成遅延が見られた．今後，CCAAT1;CORE1，CCAAT1;CORE2、さらには CCAAT1;CORE1;CORE2 の三重変異体を解析することで、それぞれの *cis*-element がどの程度花成制御に寄与しているかを明らかにする．*FT* 遺伝子はシロイヌナズナだけでなく，他の植物の花成制御にも普遍的に機能することが知られている．本研究で明らかにされた *FT* 遺伝子の発現制御メカニズムは、植物種間で保存されている可能性が高い．本研究成果を発展させることで、今後身近な栽培品種で花成を微調整することが可能になると期待している．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大野奈津美, 三木葵葉, 山本真結香, 吉田晟人, 根岸克弥, 遠藤真咲, 小林正樹, 小林括平, 土岐精一, 阿部光知, 賀屋秀隆
2. 発表標題 内在cis-elementへの直接変異導入によるシロイヌナズナFT遺伝子の発現制御メカニズムの解明
3. 学会等名 中国四国植物学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 賀屋秀隆
2. 発表標題 植物における外来DNAフリー・ゲノム編集について
3. 学会等名 日本育種学会 四国談話会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平田峻也, 池田陽子, 西村泰介, 小林括平, 賀屋秀隆
2. 発表標題 DNAメチル化酵素を用いたシロイヌナズナにおけるde novo DNAメチル化編集技術の試み
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平田 峻也, 池田 陽子, 西村 泰介, 小林 括平, 賀屋 秀隆
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いたシロイヌナズナにおけるde novo DNA メチル化編集技術の開発
3. 学会等名 日本バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平田峻也, 大河優奈*, 池田陽子, 西村泰介, 小林括平, 賀屋秀隆
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるCRISPR/Cas9システムを用いたde novo DNAメチル化技術の開発
3. 学会等名 中国四国植物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山中直至, 清水木乃葉, 高橋美優, 坂本遼嘉, 遠藤 真咲, 中川綾哉, 小林括平, 濡木理, 土岐精一, 賀屋秀隆
2. 発表標題 Genome Editing with CjCas9 and enCjCas9 derived from <i>Campylobacter jejuni</i> in plant
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大野奈津美, 三木葵葉, 山本真結香, 吉田晟人, 根岸克弥, 遠藤真咲, 小林正樹, 小林括平, 土岐精一, 阿部光知, 賀屋秀隆
2. 発表標題 シロイヌナズナFT遺伝子の発現制御に関わるcis-element解析
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大野奈津美, 三木葵葉, 山本真結香, 吉田晟人, 根岸克弥, 遠藤真咲, 小林正樹, 小林括平, 土岐精一, 阿部光知, 賀屋秀隆
2. 発表標題 内在cis-elementへの直接変異導入によるシロイヌナズナFT遺伝子の発現制御メカニズムの解明
3. 学会等名 中国四国植物学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大野奈津美, 山本真結香, 吉田晟人, 根岸克弥, 遠藤真咲, 小林括平, 土岐精一, 阿部光知, 賀屋秀隆
2. 発表標題 シロイヌナズナFT遺伝子のATGから約5kb上流にあるcis-elementでの1塩基挿入が花成に及ぼす影響について
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平田 峻也, 大河 優奈, 池田 陽子, 高橋 広夫, 町田 千代子, 西村 泰介, 小林 括平, 賀屋 秀隆,
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるDNA脱メチル化編集技術開発の試み
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平田 峻也, 大河 優奈, 池田 陽子, 西村 泰介, 小林 括平, 賀屋 秀隆
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるde novo DNAメチル化技術の開発
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本真結香・吉田晟人・根岸克弥・大野奈津美・阿部光知・土岐精一・小林括平・賀屋秀隆
2. 発表標題 新奇SpCas9-NGv1を用いたシロイヌナズナFT遺伝子の発現制御に関わる内在cis-element解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 原 奈穂、雑賀 啓明、土岐 精一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 192
3. 書名 植物のゲノム編集 実験プロトコール	

〔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	小林 括平 (Kobayashi Kappei) (40244587)	愛媛大学・農学研究科・教授 (16301)	

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