

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450002

研究課題名(和文)人工制限酵素を用いた高効率イネ葉緑体ゲノム編集の確立

研究課題名(英文) Establishment of highly efficient chloroplast genome editing by using synthetic custom design nucleases

研究代表者

刑部 敬史(Osakabe, Keishi)

徳島大学・農工商連携センター・特任教授

研究者番号：70450335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、葉緑体工学を推進する上で欠かせない技術となる「葉緑体ゲノム編集」を確立することを目的し、人工ヌクレアーゼによる葉緑体ゲノム切断システムの構築をおこなった。人工ヌクレアーゼとしてTALENを選び葉緑体ゲノムを特異的に切断する葉緑体移行シグナルを保持するTALEN(tp-TALEN)の合成に成功した。しかし、このTALENは葉緑体移行が出来ないことがわかったため、葉緑体移行型Cas9ヌクレアーゼ(tp-Cas9)を新規に合成し、葉緑体移行することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To establish chloroplast genome editing in order to open a frontier of chloroplast engineering, site-specific DNA cleavage system by using the synthetic custom design nuclease was designed and constructed. At first, TALEN as a synthetic custom design nuclease was chosen, and The TALEN with transit peptide (tp-TALEN) against to the target on chloroplast genome was constructed. The tp-TALEN could cut the target DNA specifically in vitro, but was failed to transport to chloroplast. Therefore, Cas9 nuclease was used instead of TALEN. Cas9 with transit peptide was successively transported to chloroplast.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：葉緑体 ゲノム編集 TALEN Cas9

1. 研究開始当初の背景

葉緑体は二酸化炭素同化をおこなう重要な細胞小器官であり、糖、アミノ酸および脂質代謝に欠かせない場である。また核ゲノムとならび、遺伝子導入を行える重要な標的ゲノムでもある。葉緑体ゲノム(cpDNA)に組込んだ外来遺伝子により、核ゲノムへの遺伝子組換えでは決して得られない程度の高生産が可能である。したがって cpDNA 遺伝子組換え技術を利用した高バイオマス、高ストレス耐性植物作出を展開することは、深刻化している食糧不足や環境悪化等の問題解決に重要な役割を果たすと考えられる。ところが、cpDNA への遺伝子導入技術は、モデル植物であるタバコを除いて、イネなどの主要農作物についてはまったく実用化に至っていないのが現状である。cpDNA への遺伝子導入は相同組換えを利用したジーンターゲットングにより行われ、相同組換えのメカニズムにより標的遺伝子上にコピーが挿入できるため、高精度な組換えが可能である。しかし高等植物の葉緑体内には、1葉緑体当たり130~150kbからなる環状DNAがおおよそ100コピー含まれ、1細胞あたりでは1万コピーに達する。このため、外来遺伝子を葉緑体に運んでもごく一部の cpDNA にしか組込むことが出来ない。これまでの方法では、組換え後の葉緑体に野生型 cpDNA と組換え型 cpDNA が混在し、導入遺伝子を効率的に働かせるためには、組換え型 cpDNA を濃縮し、選択的に残す工夫が必要であるが、それには困難が伴っていた。

2. 研究の目的

これまでに高等植物の相同組換えメカニズムの研究により、相同組換え頻度の向上には DNA 上の切断が不可欠であることを明らかとなってきた(1,2)。また、人工的にデザインした制限酵素であるジンクフィンガーヌクレアーゼや TAL エフェクターヌクレアーゼを用いて、環境ストレスに関わる転写因子、シロイヌナズナ ABA INSENSITIVE 4 遺伝子の特異的に切断することで、標的的特異的改変を行い植物ホルモンに対して非感受性を示す変異植物体作出成功した(3)。さらにはイネのポティウィルス結合タンパク質のジーンターゲットングを行い、通常のジーンターゲットング頻度のおよそ100倍の効率化に成功した(4)。以上のように、人為的に標的遺伝子配列に DNA 切断を加えることができれば、その箇所まで極めて高頻度に相同組換えを引き起こすことが可能である。そこで、人工制限酵素を利用して cpDNA 上の標的配列に DNA 切断を加えれば、ジーンターゲットングによる高頻度な遺伝子導入系が確立できるとの着想に至った。本研究は、以上の技術を葉緑体遺伝子組換えに応用することで、葉緑体におけるメタボリックエンジニアリングを可能とし、葉緑体工学を推進する上で欠かせない技術となる「葉緑体ゲノム編集」を確立することを目的とする。

「葉緑体ゲノム編集」を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ベクター構築

タバコおよびイネ由来のイソロイシン-tRNA(trnI)遺伝子とアラニン-tRNA(trnA)遺伝子間配列を標的とした遺伝子ターゲットングコンストラクトを構築と行うとともに、挿入位置に相当する箇所を切断するための人工制限酵素を合成する。人工制限酵素には TALEN を使用することとし、Golden gate cloning 法により合成を行う。人工制限酵素を葉緑体に移行させるため、合成した TALEN 遺伝子の N 末端にはシロイヌナズナルピスコ活性化タンパク質遺伝子由来の葉緑体移行シグナル配列を配置する。

TALEN に加えて、CRISPR/Cas9 システムの Cas9 ヌクレアーゼ遺伝子も利用することとし、*Streptococcus pyogenes* 由来 Cas9 (SpCas9)、*Neisseria meningitidis* 由来 Cas9 (NmCas9)、*Campylobacter jejuni* 由来 Cas9 (CjCas9) の N 末端側に、TALEN と同様に葉緑体移行シグナル配列を配置する。

(2) 人工制限酵素の切断能評価

合成した人工制限酵素切断能は、酵母組換えレポーターシステムを用いて評価する。この評価法に用いる人工制限酵素には核移行シグナルを配置する。

(3) 人工制限酵素の葉緑体導入

合成した人工制限酵素について、カリフラワーマザイクウイルス 35s 遺伝子プロモーターとシロイヌナズナ熱ショックタンパク質 18.2kDa 遺伝子ターミネーターの制御下で発現するバイナリーベクターを構築する。構築したバイナリーベクターはアグロインフィルトレーション法により一過的 T-DNA 導入を行うことにより、人工制限酵素の葉緑体移行と機能の確認を行う。DNA 切断機能の確認が行えたものについては、プロトプラスト法による遺伝子導入を行い葉緑体形質転換を行う。

4. 研究成果

葉緑体ゲノム DNA を切断する人工制限酵素として、タバコおよびイネにおけるイソロイシン-tRNA(trnI)遺伝子とアラニン-tRNA(trnA)遺伝子間配列(trnI/trnA)、メチオニン-tRNA 遺伝子/グリシン-tRNA 遺伝子連結配列(trnfM/trnG)、さらにバリン-tRNA コード遺伝子/リポソームタンパク質遺伝子連結配列(trnV/rps12)を標的とする TALEN を Golden gate cloning 法により合成した。まず酵母組換えレポーターアッセイ法(図1)により TALEN の DNA 切断能を評価した。タバコ trnI/trnA、trnfM/trnG および trnV/rps1 を切断する TALEN のペアについて、タバコ trnfM/trnG を切断する TALEN ペア

(TALEN_trnFM/trnG-L および TALEN_trnFM/trnG-R) が最も切断効率が高いと考えられた (図 2)

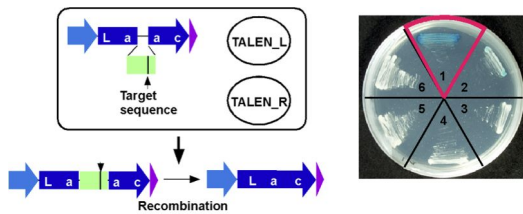


図 1 酵母組換えレポーターアッセイによるのスキーム.

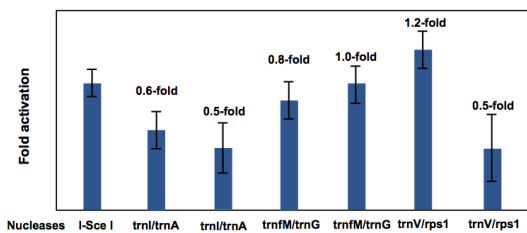


図 2 . 酵母組換えレポーターアッセイによる TALEN の DNA 切断活性評価.

TALEN_trnFM/trnG-L および TALEN_trnFM/trnG-R を葉緑体内で機能させるために、各 TALEN の N 末端に付加した核移行シグナルを除き、代わりにシロイヌナズナルピスコ活性化タンパク質遺伝子に見いだされる葉緑体移行シグナルを連結した葉緑体移行型 TALEN (tp-TALEN) を作製した。tp-TALEN をアグロインフィльтраーション法によりタバコ本葉に形質転換を行い、葉緑体移行をウエスタン法により確認した。しかし、アグロインフィльтраーション法を実施したタバコ本葉部分の葉緑体ゲノム DNA に生じる変異を、サンガーシーケンスおよび次世代シーケンスにより解析したが、tp-TALEN 切断による変異導入は認められなかった。あらためて TALEN タンパク質の葉緑体以降を確認するため、TALE+GFP レポーターを作製し葉緑体内 GFP 蛍光の観察をおこなったところ、有意な傾向は認められず、不完全な TALE タンパク質が葉緑体へと移行している可能性も考えられた。

そこで、TALEN にかわる人工制限酵素として核ゲノム編集では実績のある、CRISPR/Cas9 システムの利用を考え、葉緑体以降シグナルを保持する Cas9 ベクターを作製し、葉緑体型 CRISPR/Cas9 システム (tp-Cas9) の構築を行い、tp-Cas9+GFP 融合タンパク質が葉緑体移行することが確認した。ウエスタン法による確認においても、ほぼ正常成熟タンパク質が検出されたため、tp-Cas9 による葉緑体 DNA 切断系の確立が期待できる。

(参考文献)

1. Osakabe et al, Plant Mol. Biol., 2005;
2. Osakabe et al, Plant J., 2006
3. Osakabe et al, PNAS, 2010
4. 特願 2010-132987、2010

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 3 件)

1. Osakabe, Y., Sugano, S.S., Osakabe, K. (2016) "Genome engineering of woody plants: past, present and future." Journal of Wood Sciences, 62: 217-225. 査読有り.

2. Osakabe, Y., Osakabe, K. (2015) "Genome editing with engineered nucleases in plants." Plant Cell Physiol., 56:389-400. 査読有り

3. Osakabe, K., Nishizawa-Yokoi, A., Ohtsuki, N., Osakabe, Y., Toki, S. (2014) A mutated cytosine deaminase gene, codA (D314A), as an efficient negative selection marker for gene targeting in rice. Plant Cell Physiol., 55: 658-665. 査読有り

(学会発表) (計 6 件)

1. 菅野茂夫, 西浜竜一, 白川一, 松田頼子, 高木純平, 西村いくこ, 刑部敬史, 河内孝之. ゼニゴケにおける高効率ゲノム編集ベクターの開発、第 57 回日本植物生理学会大会、2016 年 3 月 18 日-20 日、岩手大学 (岩手県盛岡市)

2. 刑部祐里子, 菅野茂夫, 渡辺崇人, 上田梨紗, 石原諒典, 篠崎一雄, 刑部敬史. CRISPR/Cas9 によるシロイヌナズナ環境ストレス応答性遺伝子のゲノム編集、第 57 回日本植物生理学会大会、2016 年 3 月 18 日-20 日、岩手大学 (岩手県盛岡市)

3. 上田梨紗, 阿部千尋, 石原諒典, 渡辺崇人, 菅野茂夫, 宮脇克行, 野地澄晴, 刑部祐里子, 刑部敬史. 高効率 CRISPR/Cas9 による SIIAA9 ノックアウトトマトの作出、第 57 回日本植物生理学会大会、2016 年 3 月 18 日-20 日、岩手大学 (岩手県盛岡市)

4. 上田梨紗, 石原諒典, 阿部千尋, 渡辺崇人, 菅野茂夫, 宮脇克行, 野地澄晴, 刑部祐里子, 刑部敬史. CRISPR/Cas9 によるトマト IAA9 遺伝子を標的としたゲノム編集技術の確立、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日-4 日、神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

5. 刑部祐里子, 菅野茂夫, 篠崎一雄, 野地澄晴, 刑部敬史. CRISPR/Cas9 による植物ゲ

ノム編集技術開発と環境応答能の改変、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16 日 -18 日、東京農業大学（東京都世田谷区）

6. 上田梨紗、石原諒典、渡辺崇人、菅野茂夫、宮脇克行、野地澄晴、刑部祐里子、刑部敬史。CRISPR/Cas9 によるトマト IAA9 遺伝子を標的としたゲノム編集、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16 日 -18 日、東京農業大学（東京都世田谷区）

〔図書〕(計 2 件)

1. Osakabe, Y., Osakabe, K. Genome editing in higher plants. In "Targeted Genome Editing Using Engineered Nucleases: ZFNs, TALENs, and the CRISPR/Cas9 System " Ymamoto T. (ed), Springer -Verlag, Germany. 205(197-205), (2015)

2. 刑部敬史、刑部祐里子 人工エンドヌクレアーゼを利用した高等植物ゲノム改変技術の新展開 細胞工学、32 号 123(520-525)、(2013)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

刑部 敬史 (Osakabe, Keishi)

徳島大学・農工商連携センター・特任教授
研究者番号：70450335

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし