

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430190

研究課題名(和文) ゲノム編集による植物環境応答制御因子の機能改変

研究課題名(英文) Genome Editing to Improve Abiotic Stress Responses in Plants

研究代表者

刑部 祐里子 (Osakabe, Yuriko)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部(連携)・特任准教授

研究者番号：50444071

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、植物の環境応答能向上を目的としてシロイヌナズナ気孔開口に機能するプロトンポンプを標的としてCRISPR/Cas9によるゲノム編集を行った。Cas9を配偶子および茎頂特異的強発現プロモーターで制御した場合、off-target変異の無いbi-allelic変異が高効率で得られ、新規のシロイヌナズナ変異体を作製した。新規変異体は野生型より高い葉面温度を示し、植物ホルモンアブシジン酸(ABA)に対する気孔の閉鎖能および葉の水分損失速度が高まっていた。以上のことから、CRISPR/Cas9による新規プロトンポンプ変異体は水分ストレス応答が向上していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Genome editing is now widely utilized to modify various plant genomes. Using a truncated gRNA (tru-gRNA)/Cas9, we generated new alleles for OST2, a proton pump in Arabidopsis, with no off-target effects. Newly generated mutations in CRISPR/Cas9 transgenic plants were detected with the average mutation rates of 32.8% using a constitutive promoter for Cas9 expression. The reducing nuclear localization signals (NLS) in Cas9 decreased the mutation rates. The tru-gRNA/Cas9 driven by the meristematic- and reproductive tissue-specific promoters increased the heritable mutation rate in Arabidopsis, showing that high expression in the germ line can produce bi-allelic mutations with high mutation efficiency. Finally, we generated the new mutant alleles for OST2, and the mutants exhibited altered stomatal closing in response to stress conditions. The results suggest further applications in molecular breeding to improve plant function using optimized CRISPR/Cas9.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：ゲノム編集 環境ストレス イオン輸送体

1. 研究開始当初の背景

現代の世界的な環境悪化の中、高収量や高機能を持つ作物の開発が重要な課題となっている。人類は植物を遺伝的に改良し新品種を作り出してきたが、基本的な育種技術は交配育種によるものであった。様々な植物種のゲノムが解読されたことで、植物に機能的形質をもたらす有用遺伝子が単離同定されつつあるが、単離された遺伝子情報を育種に活用できることは限られていた。このような中、ゲノム上の任意の標的塩基配列をピンポイントで改変できるゲノム編集技術¹⁾が開発された。

ゲノム編集は、人工ヌクレアーゼにより生じた二重鎖切断上での DNA 修復過程で生じるエラーを変異として利用する技術である。これまで、ジンクフィンガードメインを DNA 結合に用いる ZF ヌクレアーゼ (ZFN)、キサントモナス属細菌由来の転写因子 TALE を DNA 結合ドメインとして用いる TALEN、gRNA により DNA 認識をガイドする CRISPR/Cas9 の 3 種の技術が開発されてきた。先の 2 種の方法は、標的とした塩基配列を特異的に結合する DNA 結合ドメインと、その塩基配列上に DNA 二重鎖切断を生じさせるヌクレアーゼドメインを人工的に融合させたキメラタンパク質を用いるが、CRISPR/Cas9 では RNA-DNA 認識を用いるため、gRNA 配列を改変することで様々な標的を設計できる容易な技術として広く用いられてきた。申請者は、これまで植物において、ZFN を用いて標的遺伝子上のゲノム配列に欠失変異を生じさせ、次世代にいたる新しい変異系統を得ることに成功した²⁾。乾燥や高塩ストレス応答に重要な植物ホルモン、アブシジン酸 (ABA) 応答を制御するシロイヌナズナ転写因子 *ABA INSENSITIVE4* (*ABI4*) 遺伝子の翻訳開始コドンから約

ンプは逆に抑制される (図 2)。本研究は、植物高効率ゲノム編集技術により、植物の環境応答を制御する遺伝子群に変異を導入することで、植物の機能性を向上させることを試

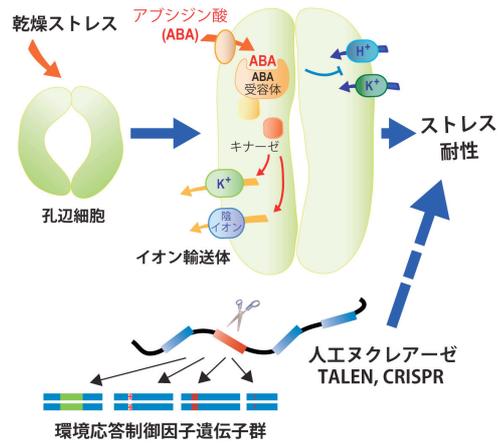


図 2. 環境応答制御因子のゲノム改変

みた。

¹⁾ Osakabe, Y., Osakabe K. (2015) *Plant Cell Physiol.*, 56, 389.

²⁾ Osakabe, K., Osakabe Y., Toki, S. (2010) *PNAS*, 107, 12034.

³⁾ Osakabe, Y., et al. (2013) *Plant Cell*, 25, 609.

⁴⁾ Osakabe, Y., et al. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 9190.

⁵⁾ Osakabe, Y., et al. (2013) *J. Exp. Bot.*, 64, 445.

2. 研究の目的

本研究では、(1) 気孔閉鎖やストレス時に働く重要因子の中でも、特に細胞膜局在性プロトポンプ OST2/AHA1 をターゲットとし、ゲノム編集を用いてその機能を改変する。(2) 植物細胞において高い効率を持つ CRISPR/Cas9 技術を開発する。CRISPR/Cas9 は認識配列の長さが短いため、非特異的な結合と切断が生じる (off-target) 問題があることが、ヒトの細胞で既に示されている。植物ゲノムには重複性遺伝子や相同性遺伝子が数多く存在し構成されているため、off-target 効果の抑制は重要である。本研究において植物における効率的な CRISPR/Cas9 技術の開発および改良、off-target 効果について検討を行う。以上から、植物高効率 CRISPR/Cas9 システムを構築し、環境応答に関わる有用遺伝子のゲノム編集を効率的に行い、新分子育種法の基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

植物におけるゲノム編集技術を用いた環境ストレス耐性に重要な膜輸送体の機能改変を目的とし、以下の実験を行った。

(1) 高効率 CRISPR/Cas9 技術 (図 3) の開発 CRISPR/Cas9 を植物細胞で効果的に機能させるために、Cas9 の翻訳コドンの最適化、核移行シグナルの数、Cas9 のプロモーターを変化させ、最適な組み合わせについて検討した。

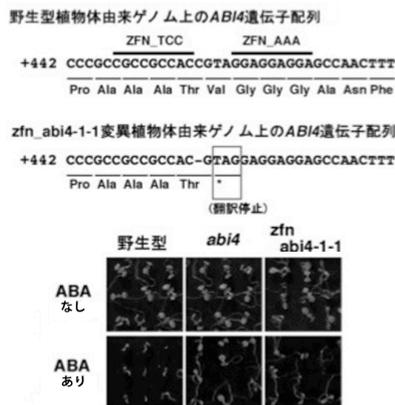


図 1. ZFN による *ABI4* 遺伝子への変異導入

450bp 下流付近を標的とした ZFN をデザインし、*ABI4* 欠損の表現型である ABA 非感受性を示す新規変異体を作製した²⁾ (図 1)。

これまで乾燥や高塩ストレスに重要な機能を持つ遺伝子群が明らかになっている³⁻⁵⁾。乾燥ストレス時には、カリウムイオン排出体や陰イオン輸送体が孔辺細胞で働き気孔閉鎖が誘導され⁴⁾、気孔開口に働くプロトンポ

さらに Cas9 の発現をモニタリングするために、Cas9 の下流に GFP を自己開裂ペプチド 2A により連結するカセットを構築した。狙っていない箇所での非特異的な結合・切断による変異が導入される off-target 効果を検討するために、まず、*in silico* 解析によるターゲット配列の探索と決定法の開発を進めた。CRISPR/Cas9 では、ゲノム上の Protospacer adaptor motif (PAM) (5'-NGG-3') から上流 20bp が gRNA によって認識され、PAM より 3bp 上流の箇所において、特異的に切断および変異導入されることが示されている。これまで、短い gRNA (truncated-gRNA; tru-gRNA) は、動物細胞内で off-target 効果を減少させる機能が報告されていたが、植物細胞では評価されていなかった。そこで、tru-gRNA について変異導入の効果および off-target 効果を解析した。以上により、植物における CRISPR/Cas9 の改良および最適化を行い植物高効率 CRISPR/Cas9 の構築を行った。

(2) 気孔閉鎖に機能する細胞膜局在性プロトポンプ OST2/AHA1 上の配列を標的として上述の高効率 CRISPR/Cas9 を用いて変異導入し、得られた新規変異体の気孔閉鎖や水分損失速度などの乾燥ストレスに対する生理応答を解析した。

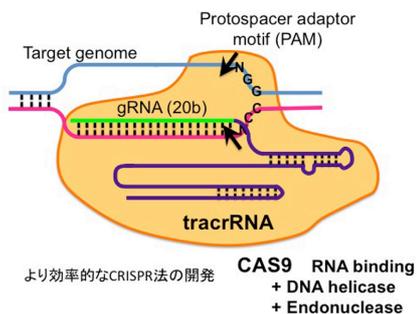


図 3. ゲノム編集ツール CRISPR の基本構造

4. 研究成果

シロイヌナズナのシグナル伝達や環境応答に関わる複数の遺伝子を標的として CRISPR/Cas9 システムの構築を行った。OST2/AHA1、ABI4、GL1 遺伝子上の複数の箇所を標的とし、それぞれの箇所において off-target の可能性を排除して選択した gRNA 配列および、構成的発現プロモーター制御化でコドンを植物に最適化した Cas9 を用いて CRISPR/Cas9 ベクターを構築し、シロイヌナズナに形質転換した。gRNA の設計については、off-target 効果の判定手法の一つである CasOT⁶ および、gRNA 活性の判定に利用できる on-target_score⁷ の 2 つの gRNA デザイン用アルゴリズムを実装した web ツールを構築し、focas (<http://focas.ayanel.com/>) と名付け、フリーに利用可能とした。本研究では、tru-gRNA が植物細胞で有効であるかを

確認するために、18b および 17b の長さの配列を gRNA として用いた。

CRISPR/Cas9 ベクターを形質転換したシロイヌナズナ T1 世代の植物体を解析した結果、通常長さの gRNA と同じく gRNA の配列によって変異効率は 12.5-60% と大きく変化したが、植物細胞で変異を誘導できることが明らかになった。また、Cas9 に付加した核移行シグナルを 2 個から 1 個に変換した場合では変異効率が減少した。変異を生じさせた gRNA を導入した場合に、GFP 蛍光を持つ個体全てにおいて変異が検出され、GFP による選抜が有効に働いていることがわかった。次に、次世代シーケンサーを用いて tru-gRNA を用いた変異植物体における off-target 効果について解析したところ、off-target はほぼ 0% であり、off-target 効果の減少に tru-gRNA は植物細胞でも有効であることが明らかになった (図 4)。

次に、次世代シーケンサーを用いて植物のさまざまな発達段階での変異効率を解析した結果、変異効率は、Cas9 の発現制御に用いたプロモーターの発現部位と植物の発達段階によって大きく変化した。CaMV35S プロモーターで Cas9 の発現を制御した場合には、花や実において変異効率は低いことが明らかになった。そこで茎頂および花芽組織、配偶子に特異的に強発現する AtEF1 プロモーターで Cas9 の発現を制御した結果、同一の gRNA を用いた場合に変異効率が大きく上昇し、OST2 遺伝子を標的とした CRISPR/Cas9 ベクターでは、T2 世代において、bi-allelic 変異体が 20% の効率で単離されることが明らかになった。この変異体よりメンデル遺伝により変異が伝搬された次世代植物において、OST2 遺伝子を欠失した新規のホモ変異体の作出が高効率で可能となった。新規に得られた OST2 変異体は、葉面温度が上昇し植物の蒸散に重要な気孔の閉鎖が増強し、乾燥ストレスに重要な植物ホルモン ABA の気孔閉鎖に対する影響も強まっていた (図 5)。本研究において確立した方法により、植物のゲノム編集の効率化や最適化を行い、最適化された高効率 CRISPR/Cas9 により、植物の乾燥ストレスなどの環境応答能の改変が可能となった。今後、構築した高効率 CRISPR/Cas9 システムを用いることで、植物の環境応答や生長などを制御する様々な重要因子の機能向上を目指した分子育種に役立てる。

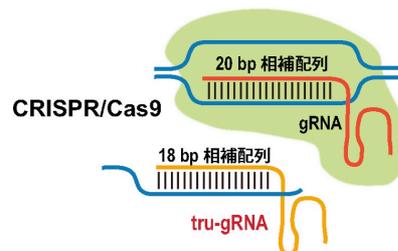


図 4. tru-gRNA による植物 CRISPR/Cas9 技術の確立。

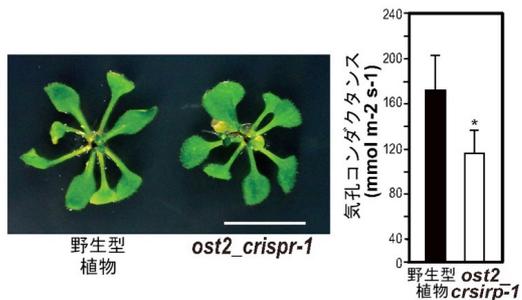


図 5. tru-gRNA を用いた CRISPR/Cas9 によるシロイヌナズナ *OST2* 遺伝子新規変異体の作出。tru-gRNA と組織特異的に Cas9 を発現させる高効率 CRISPR/Cas9 システムにより、乾燥ストレス応答に重要な気孔閉鎖が強まる表現型を示す新規変異体を作成した。

⁶Xiao, et al. (2014) *Bioinformatics* 30, 1180–1182.

⁷Doench, et al. (2014) *Nat. Biotech.* 32, 1262–1267.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① T. Nomura, T. Sakurai, Yuriko Osakabe, K. Osakabe and H. Sakakibara: Efficient and heritable targeted mutagenesis in mosses using the CRISPR/Cas9 system, *Plant & Cell Physiology*, Vol. 57, No. 12, pp. 2600–2610, 2016.

② C. Nishitani, N. Hirai, S. Komori, M. Wada, Kazuma Okada, Keishi Osakabe, T. Yamamoto and Yuriko Osakabe: Efficient Genome Editing in Apple Using a CRISPR/Cas9 system., *Scientific Reports*, Vol. 6, p. 31481, 2016.

③ Yuriko Osakabe, Y. Watanabe, S.S. Sugano, R. Ueta, R. Ishihara, K. Shinozaki and K. Osakabe : Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants., *Scientific Reports*, Vol. 6, No. 26685, 2016.

[学会発表] (計 14 件)

① 刑部祐里子: CRISPR/Cas9 による植物ゲノム編集技術の開発, 第 58 回日本植物生理学会年会シンポジウム「植物機能の解明を目指すゲノム編集技術」(招待講演), 2017 年 3 月 17 日鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

② 島田佳南里, 井内聖, 井内敦子, 坂本秀樹, 山田晃嗣, 刑部敬史, 刑部祐里子「根毛形成に異常を示すシロイヌナズナ変異体の原因遺伝子の同定」第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 16 日鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

③ 阿部千尋, 上田梨紗, 橋本諒典, 渡辺崇人, 菅野茂夫, 刑部祐里子, 刑部敬史「栽培品種トマト Ailsa Craig の CRISPR/Cas9 システムを用いた新育種技術開発」第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 18 日鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

④ 上田梨紗, 阿部千尋, 石原諒典, 渡辺崇人, 菅野茂夫, 刑部祐里子, 刑部敬史「CRISPR/Cas9 による単為結実トマトの迅速な育種技術の確立」第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 17 日鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

⑤ 山田晃嗣, 刑部敬史, 刑部祐里子「防御応答活性化時における植物の糖吸収制御」第 3 回日本生物工学会西日本支部講演会, 2016 年 12 月 10 日. 徳島大学(徳島県徳島市)

⑥ 阿部千尋, 上田梨紗, 橋本諒典, 渡辺崇人, 菅野茂夫, 刑部祐里子, 刑部敬史「栽培品種トマト Ailsa Craig の CRISPR/Cas9 システムを用いた新育種技術開発」日本生物工学会西日本支部第 3 回講演会, 2016 年 12 月 10 日徳島大学(徳島県徳島市)

⑦ 上田梨紗, 阿部千尋, 橋下諒典, 渡辺崇人, 菅野茂夫, 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 3 回日本生物工学会西日本支部講演会, 2016 年 12 月 10 日徳島大学(徳島県徳島市)

⑧ Yuriko Osakabe “Genome editing technology to improve plant environmental response” Latest Advances in Plant Development and Environmental Response 2016, Cold Spring Harbor-Asia Meeting, Dec 1st 2016. ウェスティンホテル淡路(兵庫県淡路市)

⑨ Risa Ueta, Chihiro Abe, Ryosuke Ishihara, Takahito Watanabe, Sigeo Sugano, Yuriko Osakabe and Keishi Osakabe “Site-directed mutagenesis of the tomato IAA9 gene by using the CRISPR/Cas9 system” Latest Advances in Plant Development and Environmental Response 2016, CSH - Asia Meetings, Dec 1st 2016. ウェスティンホテル淡路(兵庫県淡路市)

⑩ 西谷千佳子, 平井徳美, 小森貞男, 和田雅人, 岡田和馬, 刑部敬史, 山本俊哉, 刑部祐里子「リンゴゲノムの多様性とゲノム編集による改変」日本植物学会第 80 回大会シンポジウム「植物から菌まで多様な生命の謎を探り生かす Genome Editing」(招待講演), 2016 年 9 月 18 日沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

⑪ 上田梨紗, 阿部千尋, 石原諒典, 渡辺崇人, 菅野茂夫, 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」日本植物学会第 80 回大会, 2016 年 9 月 18 日 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

⑫ 刑部祐里子, 渡辺崇人, 菅野茂夫, 上田梨紗, 石原諒典, 篠崎一雄, 刑部敬史「ゲノム編集技術による植物環境応答能の改変」日本ゲノム編集学会第 1 回大会, 2016 年 9 月 6 日-7 日. 広島国際会議場 (広島県広島市)

⑬ 阿部千尋, 上田梨紗, 橋本諒典, 渡辺崇人, 菅野茂夫, 刑部祐里子, 刑部敬史「栽培品種トマト Ailsa Craig の CRISPR/Cas9 システムを用いた新育種技術開発」日本ゲノム編集学会第 1 回大会, 2016 年 9 月 6 日-7 日. 広島国際会議場 (広島県広島市)

⑭ 上田梨紗, 阿部千尋, 石原諒典, 渡辺崇人, 菅野茂夫, 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」日本ゲノム編集学会第 1 回大会, 2016 年 9 月 6 日-7 日. 広島国際会議場 (広島県広島市)

[図書] (計 1 件)

① 刑部祐里子, 刑部敬史 : 植物でのゲノム編集—分子育種の新技術をめざした最新展開, 実験医学増刊「All About ゲノム編集」真下知士, 山本卓/編, Vol. 34, No. 20, 104~110 頁, 2016 年 12 月. 羊土社 総頁数 233 頁.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.plantbio.bb.tokushima-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

刑部 祐里子 (OSAKABE, Yuriko)

徳島大学・大学院生物資源産業学部 (連携)・

特任准教授

研究者番号 : 50444071