

研究報告書

「花粉管をベクターとした遺伝子改変技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年4月～2019年3月

研究者: 水多 陽子

1. 研究のねらい

農作物の生産現場では、気候変動に伴う品質低下や病害虫の蔓延など、世界中で食糧危機に直結する多くの問題が生じている。国内においても農業従事者と耕作面積の減少、価格・嗜好の多様性など、時代背景や環境変化に合わせた農作物の作出が急務となっている。一方、かけ合わせなど従来の育成方法は、膨大な手間と時間が育種改良の障壁となっている。よって、時代や社会のニーズに合わせ狙った形質を持つ品種を簡単かつ迅速に得る方法が求められている。

近年、育種改良スピードを飛躍的に高める方法として、新植物育種技術の一つであるゲノム編集が注目を浴びている。このうち CRISPR/Cas9 システムでは、RNA 誘導型ヌクレアーゼ (Cas9) とガイド RNA (gRNA) を細胞に導入することで、狙った遺伝子の情報を書き換えることができる。植物細胞への CRISPR/Cas9 の導入は一般的にアグロバクテリウム法を用いておこなわれる。しかしこの方法には以下のような問題点がある。

- ① アグロバクテリウムの非宿主植物の場合、カルス化や再分化など組織培養が必要なことがある。組織培養の工程は手間と時間がかかり、予期せぬ突然変異が生じることもある。
- ② 植物の遺伝的背景に依存して成功率が大きく異なり、アグロバクテリウムの感染や組織培養自体が困難な植物も多い。
- ③ 作出された植物は一時的に遺伝子組換え体 (GMO) となる。わが国で得られた新品種を農作物として利用するには、カルタヘナ法や食品衛生法、飼料安全法等による規制をクリアする必要がある。

このように、植物におけるゲノム編集を用いた育種改良は、従来技術では超えられない多くの課題を抱えている。これらを解決すべく、本課題では CRISPR/Cas9 を花粉へ導入することで、狙った遺伝子を書き換えた種子を効率的に作出する新しい育種改良技術の開発をおこなった。被子植物の花粉は植物の生殖細胞、すなわち精細胞を含み、卵細胞へと運ぶ役割を持つ。つまり、花粉に CRISPR/Cas9 を導入すれば、精細胞または受精卵といった次世代へ伝わるゲノムを直接編集することができる。また、この花粉を受粉させれば、組織培養を経ずにゲノム編集個体を直接得ることができる。以上より、本課題の技術の確立により、これまで育種改良が困難であった植物において、品種改良の質とスピードを飛躍的に高めうる画期的な技術となることが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

植物細胞へ分子を導入する方法はいくつか知られている。そのうち、ボンバードメント法では微細な金属粒子に分子を付着させ、ガス圧により高速で射出する。この方法を用いること

で、固い細胞壁を持つ植物細胞にも分子を導入することが可能である。本課題ではこの方法を用いて、花粉に Cas9 と gRNA 及び蛍光タンパク質の配列を含むプラスミド DNA の導入を試みた。その結果、導入後に蛍光タンパク質の発現を指標に花粉への導入効率を評価することで、最適なプロモーターを決定することができた。また、ナス科のモデル植物の一つであるベンサミアタバコを用い、花粉への導入効率を明らかにした。導入された花粉のうち、次世代に伝わる雄原細胞への導入は約 1/6 であった。

導入された花粉におけるゲノム編集の有無を確認するため、蛍光を指標にベンサミアタバコの導入花粉管を採取し、ゲノム DNA を抽出して標的配列を調査した。その結果、標的配列内にゲノム編集によると思われる塩基挿入や欠失、置換などの変異を複数種類確認することができた。また、蛍光を指標に導入効率を簡便に評価できる方法も併せて確立した。よって、これら本技術の要となる一連の手法について出願した。

以上より、CRISPR/Cas9 を花粉に導入することで、簡便に花粉管内でゲノム編集が可能であることが明らかになった。本成果は出願済の特許を基盤に、社会実装化を見据えた技術としても注目され、企業 2 社を含む 4 件の共同研究、ならびに新たな発展型のプロジェクトの採択にも繋がっている。今後は導入効率の向上や、導入花粉によるゲノム編集個体の評価を進め、論文など成果を発表するとともに、継続して研究を進める予定である。

(2) 詳細

研究テーマ A 「花粉へのプラスミド DNA の導入方法の確立」

まず初めに、成熟花粉へ CRISPR/Cas9 を導入可能な方法を探索した。研究開始当初にベンサミアタバコ、タバコ、トマト、トウモロコシ、ソルガムならびシロイヌナズナの花粉を用いて導入方法の検討を行った。その結果、ボンバードメント法では再現性の高い花粉への導入が可能であった。よって、以降の実験はボンバードメント法を用いて行うこととした。

ボンバードメント法による花粉への導入効率は植物種によって異なり、今回用いた中ではベンサミアタバコにおいて最も効率が高く、花粉の取り扱いも容易であった。よって以降は主にベンサミアタバコを用いて実験を行った。Wang ら(2011, Nat. Protoc.)の方法などを参考に蛍光タンパク質を発現するプラスミド DNA を用いて導入条件を検証し、花粉へのダメージが最も少なく、導入花粉数が最多となる条件を決定した。その結果、一回の撃ち込みで数十～数百の花粉へ導入できる条件を見出した(永原ら, 生命科学系学会合同年次大会, 2017)。

研究テーマ B 「最適なプロモーターの選択、ならびに花粉への導入効率の評価」

花粉内で Cas9 を高発現可能なプロモーターを探索した。ウィルス、またはシロイヌナズナ由来の複数種類のプロモーター配列を用いて、蛍光タンパク質を含むプラスミドを構築し、蛍光強度を指標にプロモーター活性を評価した。その結果、安定的に高発現を示すプロモーターを選抜することができた。なお、アグロバクテリウム法による形質転換体では花粉で発現を示さないプロモーターでも、ボンバードメント法では強い発現を示すものが複数見出された。このことから、ゲノムに組み込まれた導入遺伝子と一過的に導入された遺伝子では、発現制御が異なることが示唆された(水多ら, 2018 日本植物形態学会第 30 回大会ならびに日本植物学会第 82 回大会)。

ベンサミアナタバコの花粉は内部に雄原細胞を含む。次世代に伝わるゲノムを持つのは雄原細胞であることから、ゲノム編集個体の獲得のためには雄原細胞へ CRISPR/Cas9 の分子を導入する必要がある。ベンサミアナタバコの花粉における花粉及び雄原細胞への導入数（導入効率）の報告はなかったことから、上記プロモーターを用いて一回の撃ち込みにおける花粉及び雄原細胞への導入効率について、蛍光を指標に評価した。その結果、一回の撃ち込みで約 1.2% の花粉へ導入され、そのうち 1/6 にあたる約 0.2% の花粉で雄原細胞へも導入されることが分かった（水多ら, 2018 日本植物形態学会第 30 回大会ならびに日本植物学会第 82 回大会）。併せて、植物は重複受精をおこなうため、本法によりゲノム編集個体を効率的に獲得するには、精細胞に分裂前の前駆細胞である雄原細胞を持つ種、つまり二細胞性花粉の種を用いるのがより望ましいと考えられた。

研究テーマ C 「花粉におけるゲノム編集効率の評価」

上記で確立した方法及び選抜したプロモーターを用いて、Cas9 と gRNA を含むプラスミド DNA を構築し、導入することで、花粉でゲノム編集が可能であることを調査した。標的遺伝子は *NbPDS3* 遺伝子とし、すでに実績と報告のある標的配列 (Li et al. 2013 Nat. Biotech.; Nekrasov et al. 2013 Nat. Biotech.) を用いた。ボンバードメントで導入後、ゲノム DNA を抽出し、標的配列を含む領域を PCR 増幅してクローニングした。その結果、gRNA の標的配列内にゲノム編集によるものと思われる複数の変異を確認することに成功した。なお、一連の手法ならびにゲノム編集効率を効率的に評価する方法については、特許を出願した。以上より、ボンバードメント法を用いて CRISPR/Cas9 の分子を導入することで、花粉でのゲノム編集が可能であることが示された。

3. 今後の展開

本課題の成果により、CRISPR/Cas9 の分子をボンバードメント法により簡便に花粉へ導入することで、ゲノム編集が可能であることが明らかとなった。一方、本技術を社会実装化に向けて発展させるには、花粉への導入効率を向上させ、ゲノム編集された花粉または植物体のみを効率的に選抜する手法の開発が望ましい。今後はこれらを解決する方法に注力し、引き続き研究を進める必要がある。また、本課題では主にベンサミアナタバコを用いて検討を行ったが、花粉の構造や特徴などは被子植物に共通している。本技術が他の植物にも応用可能となれば、これまで従来技術では遺伝子導入が困難であった植物において、効率的にゲノム編集植物を獲得できる画期的な方法となるかもしれない。引き続き、花粉への導入とゲノム編集が可能かなど、複数の植物を用いて調査していく予定である。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

本研究課題では、花粉へのゲノム編集分子の導入方法の確立と、導入花粉を用いた効率的かつ簡便なゲノム編集個体の作出に取り組んだ。花粉への導入方法については、研究開始年次に時間の多くを割くことになってしまったが、結果的にはナス科植物を用いて再現性があり安定した花粉への CRISPR/Cas9 システムの導入方法を確立することに成功した。また、導入花粉におけるゲノム編集も証明でき、一連の過程は特許出願にも繋がった。一方、未だ

導入花粉由来のゲノム編集個体の獲得には至っていない。それは、導入花粉数が少なく、ゲノム編集個体を効率的に選抜する方法がないためである。本技術を社会実装化に向けて発展させるには、花粉への導入効率を向上させ、ゲノム編集された花粉または植物体のみを効率的に選抜する手法が必要であると考えられる。今後はこれらを解決する方法に注力して研究を進める予定である。また、三年という期間の中では、ナス科のモデル植物以外の様々な植物へ本方法を展開・検証することはできなかった。本方法は、特に遺伝子改変が困難な非モデル植物で効果を発揮する。しかし、そのような植物は一年に一回しか花が咲かないなど世代が長いことも多く、手法を確立させるのは困難であった。今後様々な植物で本方法を検証するには、まずは本方法に適した種の選定とその植物の専門家の協力、そしてある程度の研究期間が必要であると考えられる。

【研究体制と研究費の執行について】

研究体制は研究期間全般を通じて、さきがけ研究者の水多と研究補助員1名で実験をおこなった。水多が方向性を定めて研究補助員に実験内容を指示し、研究を推し進めることで、過不足のない体制で成果に繋げることができた。研究を進めるにあたっては、ボンバードメント用の機器やサーマルサイクラー、観察に必要な蛍光顕微鏡など各種実験機器を購入した。これらの機器は高額であるが、研究を進める上で不可欠であり今後解決すべき課題も明確にすることができた。学内における研究スペースの確保や温室など、本研究に優先的に使用できる場所や体制を整えたことも、効果的に成果を得ることに繋がり、研究室の運営に関わる情報や知識も得ることができた。また、各学会やシンポジウムなどにも積極的に参加し成果を発表するとともに、本研究を推進するのに必要な情報や人脈を広げることにつながった。

【研究成果の発信について】

得られた成果を基盤として、出願や発表などを行うことで、当初は想定し得なかった多彩な分野との共同研究や産学連携プロジェクトに発展した。さきがけ期間に限定された単なるツール開発の研究に留まるのではなく、更なる発展に繋がる研究となりつつあることは、予想外の喜びである。今後も各機関、研究者、分野と連携し、より効果的な方法を確立し応用展開できるよう研究に邁進する所存である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

なし

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Yoko Mizuta, Tetsuya Higashiyama. Chemical signaling for pollen tube guidance at a glance. J. Cell Sci. 2018, 131, jcs208447.
2. Yoko Mizuta, Katsutoshi Tsuda. Three-dimensional multiphoton imaging of transcription factor by ClearSee. Springer protocols, Plant Transcription Factors, Yamaguchi Nobutoshi (Ed.), 2018, 257-268, ISBN:978-1-4939-8656-9.

3. 水多陽子、永原史織、東山哲也. 花粉のゲノム編集. 日本植物学会第 82 回大会. 2018 年 9 月 16 日.
4. 栗原 大輔, 水多 陽子. 透明化技術を用いた植物組織蛍光観察のすすめ. *Plant Morph.*, 2017, 29, 81-86.
5. 永原 史織、栗原 大輔、東山 哲也、水多 陽子. パーティクルボンバードメント法による植物生殖細胞への CRISPR/Cas9 の導入. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017). 2017 年 12 月 9 日.