

# 研究報告書

## 「組み換え遺伝子を利用しない新奇植物ゲノム編集法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 菅野 茂夫

### 1. 研究のねらい

遺伝子を改変する遺伝子組換え技術をフィールドへ適用する場合、最も大きな障壁に「組換え遺伝子を有している作物をフィールドに持ち込む際に、長期間の精査が必要」という、法的・倫理的問題がある。分子遺伝学的な技術を用いた育種を考えると、新しい育種技術の開発のためには、現在世界でし烈な研究開発競争が行われている CRISPR/Cas9 法の改良を行い「DNA フリーなゲノム編集を行う」アプローチがもっとも優れていると考えられるが、CRISPR/Cas9 法は、動作原理として核酸(guide RNA)を用いているため、パブリックアクセプタンスに問題が残る。より短期間で、植物ゲノムに改変を加えた品種をフィールドへ適用するためには、「核酸(組換え遺伝子)」も「植物防疫的課題を抱える手段(ウィルス・アグロバクテリア)」も利用しない、植物ゲノムへの配列選択的な操作技術を開発する必要がある。

そこで、本研究では、「化合物によるゲノム編集法」のアプローチを採用した。「核酸以外の化合物」を用いて植物のゲノム DNA を自在に操作できれば、遺伝子組換えには該当しないあたらしい育種の基盤技術になりうる。そのような化合物がフィールドにおいて種に非依存的に処理できる点を活かし、最終的には、作物のゲノム、エピゲノム状態を屋外で化合物処理により制御して、開花時期や高温応答・乾燥耐性を変化させる植物調整剤・あるいは育種用の変異源の開発を目指す。本研究領域の歴史は古く、植物育種に最適化された変異源としては「EMS (ethyl methanesulfonate)」が知られている。今まで、EMS 処理によってさまざまな有用品種がフィールドで単離されてきた。しかしながら、EMS が可能なのは植物ゲノムに対するランダムな変異の導入である。本研究では、EMS とは異なる、配列特異的な変異導入化合物の開発を目指す。

また、本研究提案では、新奇植物ゲノム編集技術の発明だけでなく、既存の CRISPR/Cas9 システムのフィールドに向けた最適化も行う。作物のゲノム編集は、組織培養を利用して行うが、その際にゲノム編集の際の off target 変異と共に、「培養変異」が大量に入ることが予想される。培養変異が多い場合、短時間培養で変異を導入できる条件や、DNA 修復系を制御することにより、培養変異を抑える手段を探索する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、配列特異的な変異源の開発のために、DNA 配列特異的に結合する化合物、植物ゲノム DNA に損傷を与える化合物、植物細胞の核に分子を導入するための化合物といった複数の化合物を組み合わせるアプローチをとった。特に、DNA のマイナーグルーヴに結合する Pyrrole-Imidazole-Polyamide(以下 PI-Polyamide)は「DNA 配列特異的に結合する化合物」の筆頭候補に挙げられた。シロイヌナズナの根の細胞への PI-Polyamide の導入を行ったとこ

る、一部の細胞で導入がみられた。導入効率を上げるために様々な条件を検討し、「植物細胞の核に分子を導入するための化合物」として、キャリアペプチドを併用すれば、植物細胞への導入が再現よくみられることが明らかになったが、細胞へのダメージが大きく、PI-Polyamide 処理によってトランスクリプトームを変動させるには至らなかった。PI-Polyamide のような特殊な化合物を植物細胞へ導入するためには、植物細胞をプロトプラスト化して PEG で導入する系が最も安定すると結論し、プロトプラストを用いて一過的に PI-Polyamide のライブラリーを導入する系を確立した。分子の導入系を調べていく中で、新規の物理原理の利用にも着手した。

次に、植物ゲノム DNA に損傷を与える化合物の選抜を行い、その結果、シロイヌナズナ芽生えに対して浸透性が高く、INDEL を高頻度で誘導させる化合物を発見した。興味深いことに、本化合物を処理した植物では TATA という配列の近傍で INDEL が誘導されていることが多かった。すなわち、本化合物はゆるやかな塩基配列選択性を有していると考えられた。以上により、植物の変異源として、EMS のような塩基置換を誘導する化合物以外の選択肢があり、特定の配列に変異を誘導する確率をあげることもできる、という可能性を示した。

並行して、シロイヌナズナのカルスを利用して、培養変異の定量化を行った。組織培養技術の不足から、シュート誘導後のシロイヌナズナの分析はできなかったが、70x 以上の深さで増幅フリーな全ゲノムシーケンスを行ってシロイヌナズナのカルスの培養変異を定量化した。培養変異は、EMS 処理に比べれば、ごくごく低頻度であることが明らかになった。カルスの培養変異を抑える手段としては DNA 修復経路に摂動を加えることが考えられる。本研究の副産物として、DNA 修復変異株を利用することで、13 kbp を 1/4 程度の効率で欠失させられることを見出した。本実験系については、領域内外に技術提供した。

## (2) 詳細

### ◆テーマ A: 化合物による新奇植物ゲノム編集技術の開発

まず、最初に DNA の配列選択的に結合する化合物 PI-Polyamide の植物への適用を検討した。PI-Polyamide とは、Pyrrole と Imidazole がアミド結合した分子で、その配列の組み合わせによって、異なる塩基配列を認識する性質をもつ、DNA のマイナーグルーヴに結合する分子である。本分子が植物細胞に導入できれば「配列特異的変異源」の確立に大きな期待が持てる。本研究において、PI-Polyamide の合成は京都大学杉山弘教授、板東俊和准教授、河本祐介博士、橋谷かおりさんのご協力によって行われた。感謝申し上げます。

#### ・ Pyrrole-Imidazole-Polyamide の植物細胞への導入

PI-Polyamide の植物への導入効率を評価するために、蛍光分子 FITC または TAMRA でラベルした PI-Polyamide をシロイヌナズナ芽生えの根に対して導入する実験を行った。溶媒に何も加えない場合、根の細胞に対して PI-Polyamide の導入はわずかしかおこらなかったが、溶媒中の DMSO の濃度を上昇させる、EDTA を微量に加える、膜透過性ペプチド(キャリアペプチド)を加える、などの方法によって分子の導入が再現性良く観察された。特に、R9 ペプチド(キャリアペプチドの一種)を利用した場合、PI-Polyamide に対して膜透過性ペプチドのモル比が 1:10 となるような比率であれば、十分にモノマーヘアピン型 PI-Polyamide 分子の導入がみられることが明らかになった(図1)。

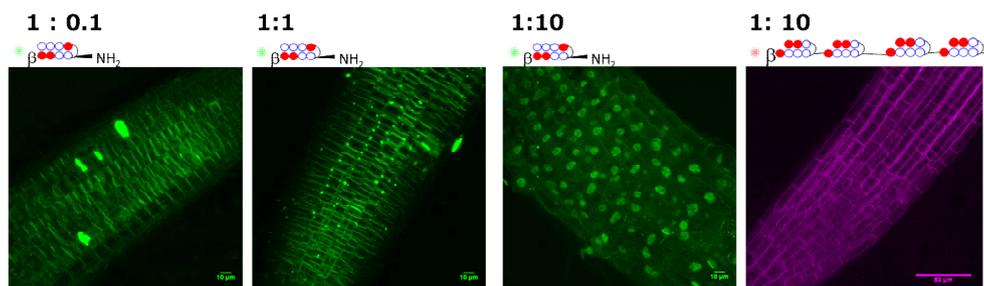


図1: PI-Polyamide とキャリアペプチド(R9)の比率を変化させた際の、シロイヌナズナの根に対する分子の送達具合。写真上部の概念図は PI-Polyamide の構造。

本条件では、EDTA などを加える破壊的な手段に比べて、RNA の分解も抑えられていたため、トランスクリプトーム解析を行った。利用可能な PI-Polyamide のうち、植物に導入した場合に変異導入および遺伝子発現変動が期待される、PI-Polyamide に indole-*sec*-CBI を結合させた化合物を導入したところ、無処理区に比べて、ごく少数の遺伝子に発現変動が見られた。発現変動がみられた遺伝子は低酸素応答の遺伝子群であり、PI-Polyamide 処理というよりは、シロイヌナズナ芽生えを溶媒で処理したことに起因すると疑われた。同一の反復実験を行い、qPCR などで発現変動を調べたが、再現性が見られなかった。R9 ペプチドを処理した植物細胞を観察すると生長の抑制が観察された。したがって、キャリアペプチドを利用した方法は、顕微鏡を用いた評価方法においては、PI-Polyamide の導入の効率をあげるものの、植物細胞を健全な形で維持できないのではないかと考えられた。研究当初は、キャリアペプチド、そして DMSO などの濃度変更により分子導入を行う予定であったが、上述のように、細胞に大きなダメージを与える形でしか PI-Polyamide の導入ができなかったため、異なる手段による分子導入の手法を複数検討した。

#### ・電界誘起気泡による植物への分子の導入

本研究では植物個体を対象にして、フィールドで植物ゲノムを操作することを最終目標としているので、植物個体まるごとを扱える分子導入技術の利用が望ましい。そこで、さきがけ「細胞機能の構成的な理解と制御」研究領域の山西陽子研究者と共同研究を行った。具体的には、電界誘起気泡という新しい物理原理を利用して、微細な気泡を植物細胞の近辺で生じさせて、そのバブルが破断する衝撃によって、細胞に微小な穴をあけて分子を液体に溶解したまま導入する技術の利用を試みた。その結果、シロイヌナズナの芽生えの葉に GFP タンパク質の導入が見られた。本技術は、PI-Polyamide を導入して表現型を改変するためには導入できる細胞数が不十分であったが、植物細胞への「分子を液体に溶解させたまま」導入する例はマイクロインジェクション以外に類を見ないため、新しい分子導入技術として発展するポテンシャルを秘めている。

#### ・プロトプラストを利用した PI-Polyamide ライブラリーの導入

植物細胞で PI-Polyamide が実際に遺伝子発現変動を起こすか否かを確認するため、植物培養細胞 MM2D、タバコ培養細胞 BY2 を利用して PEG 法を用いて PI-Polyamide の植物生細胞への効果を評価することに注力した。プロトプラストを用いた場合、PEG 処理により細胞が死ぬものの、十分な数の植物細胞に PI-Polyamide の導入がみられた。PEG 処理を行った

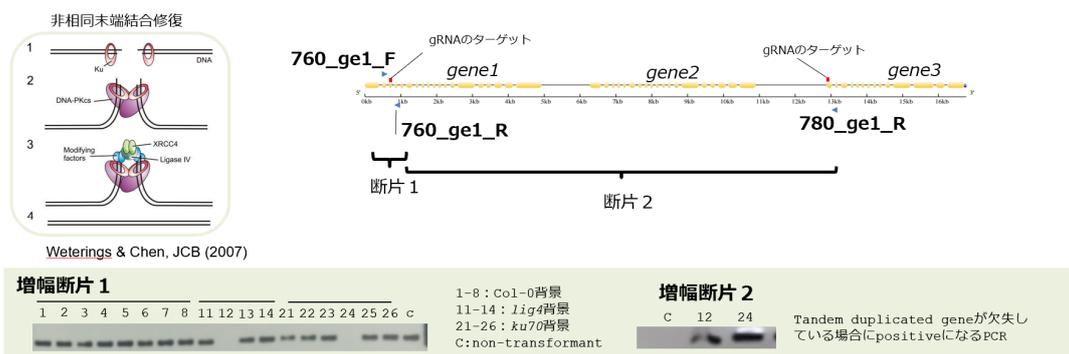
PI-Polyamide のライブラリー21 種類の中から、遺伝子発現変動を起こす PI-Polyamide を見出した。

・植物ゲノムに対する新しい変異導入化合物の探索

植物ゲノム DNA に変異を入れる新しい化合物であり且つ修飾しやすい分子を探索した。その過程で、PI-Polyamide に結合が可能という文献が存在する化合物が、興味深い性質を示した。本化合物を芽生えに処理したシロイヌナズナ (M1 plants) を花芽形成期まで育て、その植物体の地上部から DNA を抽出して Whole genome sequencing を行ったところ、本化合物を処理したシロイヌナズナゲノムでは、顕著に INDEL 数が増加しており、また、その INDEL の近傍では、ATAT が交互に繰り返す配列が多かった。本結果は、この化合物が植物において、EMS とは異なるタイプの変異を誘導しており、わずかながら塩基選択性を持つことを示している。

◆テーマ B: 培養変異の定量化

組織培養を用いて CRISPR/Cas9 法によりゲノム編集を行った場合、培養中にどの程度培養変異が入るのかを定量化することを目的に、シロイヌナズナをカルス誘導後 2 週間、1 ヶ月間、2 ヶ月間培養しそれぞれで増幅無しの全ゲノムシーケンスを行った。その結果、2 週間～1 ヶ月の間では培養変異が蓄積するが、それ以降では変異の数が増えなかった。一方、見られた培養変異は、EMS での変異誘導に比べれば、変異数は 1 桁以上少なかった。今後、シュート誘導を行い”T1”に相当する植物体の変異を解析し、比較する必要がある。培養変異が起こるのは、DNA 修復系に異常が起こるからである。DNA 修復系の変異体での培養変異を定量化するために準備したシロイヌナズナ *lig4* 変異株、*ku70* 変異株において、興味深い現象を確認した(図 2)。すなわち、これらの遺伝子型背景の下では、CRISPR/Cas9 法でゲノム上の2か所を切断すると、シロイヌナズナでは取得頻度が低い 13 kbp というサイズの欠失株も 1/4 程度の頻度で取得できることが分かった。本技術を利用することで、タンDEM重複遺伝子の破壊などが高速化できると考えられたので、共同研究を通して領域内外の多くの研究者に技術提供した。



非相対末端結合(NHEJ) に必要な遺伝子を破壊した株(*ku70*, *lig4*)を用いた場合、large deletionの取得効率が上がった。

図2: シロイヌナズナにおける DNA 修復系変異株を利用した効率的長鎖欠失誘導

3. 今後の展開

本研究において、EMS 以外の変異源が、植物において配列に指向性を持つ形で INDEL を

誘導するという知見が得られた。INDELを誘導しやすいということは、他の塩基置換誘導を行う変異源に比べてフレームシフトを誘導しやすいということに他ならない。また、誘導されたINDELの近傍の配列がATリッチであったことから、特にATリッチなプロモーター領域のcis領域への変異の導入が期待される。今後、本化合物に対して、その有効性を実用品種において調べていく。本化合物の誘導体に関しても、植物に透過性が高く、DNAに変異を誘導できることが明らかになってきている。そこで、本化合物を中心として様々な化合物を結合させていくことで、より塩基配列特異性を高めていくような発展が期待される。配列選択的にDNAに結合する化合物のライブラリーから遺伝子発現変動を示す分子のスクリーニング条件も整ってきている。それに加えて、植物細胞に分子を導入する新しい手段にも着手した。今後3~5年のスパンで、植物への効率的な分子導入、移行浸透性の高い配列選択的変異源の開発を目指していくつもりである。

研究テーマBにおいて確立したシロイヌナズナにおける長鎖欠失誘導系は、少ない労力で多くの長鎖欠失株を多数取得できる。本技術を用いて、長鎖欠失株の作出を大規模に行っていくことは、ゲノム中の全遺伝子の10%以上がタンDEM重複しているという植物ゲノムの特徴を解明していくツールとなるとともに、植物研究におけるひとつのリソースを提供できると考えている。

#### 4. 自己評価

本さがけ研究のメインである研究テーマAにおいて、当初の計画では、新奇化合物により配列選択的に変異を誘導することを目指していたが、残念ながら、期間中に達成することはできなかった。分子の移行浸透性に対する見通しが甘く、実現にいたるための証拠集めも不十分な状態で研究期間が終了することが悔やまれる。今後の解析で詳細に明らかにしていきたい。後述の領域内外での共同研究も鑑みると、研究補助者をより多く雇用するべきだったと考えている。本研究の副産物として、植物に移行浸透性の高い変異源に着目して化合物を選抜し、INDELを誘導しやすい化合物を発見した。本化合物は、動物ではすでに作用が詳細に調べられており、臨床応用も試みられている。ヒトを含む副作用に関する知見が出そろっており、「ドラッグリポジショニング」を狙えて、応用可能性が高いと考えている。本化合物には弱いながら塩基配列選択性も認められることから、本化合物を起点として、さまざまな分子を結合させていくことで、DNA配列選択的なゲノム操作技術が作れるのではないかと期待している。また、PI-Polyamideの可能性を感じさせるデータや、分子導入技術に対する新たな展開に関する萌芽的データはいくつも取得することができた。本研究で得た知見と、領域内共同研究者との連携により、引き続き「化合物によるゲノム編集」を追求していこうと考えている。

研究テーマBの延長で確立した長鎖欠失の誘導および複数遺伝子の破壊技術は、研究機関の異動などにより一時的な停滞があったものの、多くの共同研究の提案をいただき、微力ながら領域に貢献できたのではと考えている。領域内外でのコラボレーションは、自分の価値観を広げた。また、安定に編集株を提供するうえで自分の不十分な点を痛感でき、得難い経験であった。今後は、植物科学分野において研究材料を提供してきた実績のある研究機関に異動する予定であり、より正確性と速度感のあるゲノム編集技術基盤を、コミュニティに提供していければと考えている。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. <u>Shigeo S. Sugano</u> , Ryuichi Nishihama, Makoto Shirakawa, Junpei Takagi, Yoriko Matsuda, Sakiko Ishida, Tomoo Shimada, Ikuko Hara-Nishimura, Keishi Osakabe, Takayuki Kohchi Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in <i>Marchantia polymorpha</i> . <b><i>PLoS ONE</i></b> , 2018, 13(10): e0205117.
2. Shun Sawatsubashi, Yudai Joko, Seiji Fukumoto, Toshio Matsumoto, <u>Shigeo S. Sugano</u> . Development of versatile non-homologous end joining-based knock-in module for genome editing. <b><i>Scientific Reports</i></b> , 2018, 12:8(1): 593.
3. <u>Shigeo S. Sugano</u> , Hiroko Suzuki, Eisuke Shimokita, Hirofumi Chiba, Sumihare Noji, Yuriko Osakabe & Keishi Osakabe Genome editing in the mushroom-forming basidiomycete <i>Coprinopsis cinerea</i> , optimized by a high-throughput transformation system <b><i>Scientific Reports</i></b> , 2017, 28:7(1): 1260.
4. Yumiko Sakai, <u>Shigeo S. Sugano</u> , Takashi Kawase, Makoto Shirakawa, Yu Imai, Yusuke Kawamoto, Hiroshi Sugiyama, Tsuyoshi Nakagawa, Ikuko Hara-Nishimura, Tomoo Shimada. The chemical compound bubblin induces stomatal mispatterning in <i>Arabidopsis</i> by disrupting the intrinsic polarity of stomatal lineage cells. <b><i>Development</i></b> , 2017, 144: 499–506.
5. Satoru Fujimoto, <u>Shigeo S. Sugano</u> , Keiko Kuwata, Keishi Osakabe and Sachihiko Matsunaga Visualization of specific repetitive genomic sequences with fluorescent TALEs in <i>Arabidopsis thaliana</i> <b><i>Journal of Experimental Botany</i></b> , 2016, 67: 6101–6110.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 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. <u>菅野茂夫</u> , 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 High throughput genome editing in a haploid dominant species, <i>Marchantia polymorpha</i> 日本植物学会第 80 回年会, 沖縄コンベンションセンター, 2016 年 9 月 18 日
2. <u>菅野茂夫</u> 半数体生物のゲノム編集—ゼニゴケとウシグソヒトヨタケを例に— 第 58 回日本植物生理学会年会シンポジウム, 鹿児島大学郡元キャンパス 2017 年 3 月 17 日
3. <u>菅野茂夫</u> ゲノム編集を利用した植物のハイスループット遺伝学に向けた技術基盤

生物資源研究センターアカデミックセミナー, 立命館大学びわこくさつキャンパス 2018 年  
7 月 21 日

4. 菅野茂夫 簡便・高効率なゲノム編集細胞作製技術とゲノム編集のホットトピックス  
第 91 回生化学会大会 バイオインダストリーセミナー 2018 年 9 月 25 日

5. Shigeo S. Sugano, Ryuichi Nishihama  
CRISPR/Cas9-Based Genome Editing of Transcription Factor Genes in *Marchantia polymorpha*.  
*Methods Mol Biol.* 1830, 109–126 (2018).