

平成28年5月27日

「植物の環境応答を向上させるゲノム編集技術の確立」～環境ストレスに強い作物の開発を目指したゲノム編集の効率化と最適化～

・研究の背景

人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術は、目的とする遺伝子のゲノム DNA 配列を任意の部位で改変する技術です。微生物の免疫システムを利用した CRISPR/Cas9 (クリスパーキャスナイン) は、医学や生物学の研究分野でその簡便性や正確性から革命的な新技術とされ、近年広く発展してきました。植物における CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集では、植物細胞内でゲノム編集に必要な Cas9 タンパク質と gRNA (ガイド RNA) を構成的に発現させて働かせるので、正確なゲノム編集のためには、植物細胞に最適な方法を選ぶ必要がありました。近年、様々な植物種で CRISPR/Cas9 によるゲノム編集が可能であることがわかってきました。一方で、Cas9 をどのような植物細胞で発現させたら良いかや、ガイド RNA の類似配列切断 (off-target; オフターゲット) を低下させるための種々の技術といった、より正確で効率の高い CRISPR/Cas9 技術の開発と、その評価法の確立が遅れていました。この度、徳島大学生物資源産業学部刑部祐里子准教授と理化学研究所環境資源科学研究センター篠崎一雄センター長らのグループは、植物でのゲノム編集ツールの最適化・効率化を行い環境応答能の改変に成功しました。

・研究の内容と成果

これまで、長さの短い gRNA (truncated-gRNA; tru-gRNA) は、動物細胞内でオフターゲット効果を減少させる働きがあることは知られていましたが、植物細胞では評価されていませんでした。本研究は、まず tru-gRNA が植物細胞で有効であるかを確認しました。その結果、これまで用いられてきた通常の長さの gRNA と同じく gRNA の配列によって変異効率は大きく変化しましたが、tru-gRNA が植物細胞で効率良く働くことがわかりました。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オフターゲット効果について解析したところ、オフターゲットはほぼ 0% であり、オフターゲット効果の減少に tru-gRNA は植物細胞でも有効であることが明らかになりました。さらに、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すると、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も大きく変化することがわかりました。

私たちは、この tru-gRNA を用いて、花芽組織に特異的に発現するプロモーターの制御下で Cas9 を働かせ、シロイヌナズナの環境応答に重要な

OST2 遺伝子を標的に変異を誘導しました。その結果、CRISPR/Cas9 を導入した植物の第二世代において、メンデル遺伝により *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りました。新規に得られた *OST2* 変異体は、植物の蒸散に重要な気孔の閉鎖が強まっており、以上のような最適化された高効率 CRISPR/Cas9 システムにより、植物の乾燥ストレスなどの環境応答能の改変可能となりました。

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ができました。シロイヌナズナはこれまで植物の基礎研究で広く用いられてきたモデル植物です。本研究によるゲノム編集技術をシロイヌナズナに用いることで、さまざまな研究目的にゲノム編集した植物を利用することが可能となり、農業生産や環境制御などの広い分野に役立つと期待できます。

本研究は、内閣府戦略的イノベーション創造プログラム (SIP)、新学術領域研究「植物細胞壁の情報処理システム」、科学研究費補助金、および株式会社大塚製薬工場の支援により行われました。

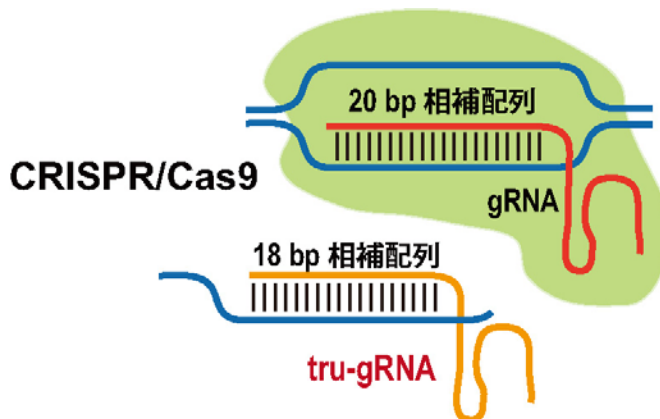


図1. 長さの短い gRNA (truncated-gRNA; tru-gRNA) による植物の CRISPR/Cas9 技術の確立.

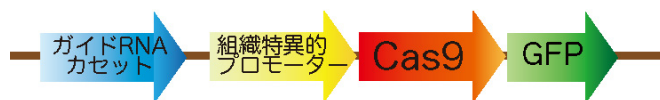


図2. 組織特異的プロモーターによる CRISPR/Cas9 発現ベクター.

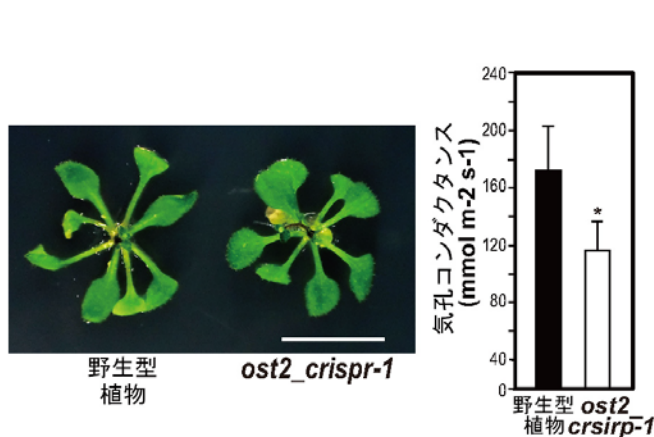


図3. tru-gRNA を用いた CRISPR/Cas9 による新規シロイヌナズナ変異体の作出. tru-gRNA と組織特異的に Cas9 を発現させる高効率 CRISPR/Cas9 システムにより、乾燥ストレス応答に重要な気孔閉鎖が強まる表現型を示す新規変異体の作出に成功した。

・論文情報

Osakabe, Yuriko, Watanabe, T., Sugano, S.S., Ueta, R., Ishihara, R., Shinozaki, K., Osakabe K. “Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants.”

Scientific Reports, doi:10.1038/srep26685

お問い合わせ先

部局名 生物資源産業学部

責任者 准教授 刑部祐里子

電話番号 088-656-9310

Fax 番号 088-656-9310

メールアドレス osakabe.yuriko@tokushima-u.ac.jp