

研究終了報告書

「ジーンターゲティングを向上させるエフェクターのデリバリーのための *piggyBac* シヤトルベクターの開発」

研究期間：2016年10月～2021年3月（中断期間：2017年7月～2018年3月；コロナ支援による延長：2021年1月～3月）

研究者：横井 彩子

1. 研究のねらい

ゲノム編集技術の一つである標的変異は、標的遺伝子上に DNA 二重鎖切断(DSBs)を生じさせ、その修復過程で欠損や挿入などの変異を導入する技術であり、CRISPR/Cas9 が開発されて以降、様々な作物種において機能欠損型変異体を作成するための汎用的技術になりつつある。一方、ジーンターゲティング(GT)は、DSBs 修復経路の一つである相同組換え(HR)により鋳型 DNA 上の配列をコピー／ペーストにより標的遺伝子上に導入することから、欠損や挿入だけでなく塩基置換やドメイン交換のような任意の改変を正確に行うことができ、機能獲得型変異体作出には不可欠な技術である。しかし、高等真核生物では一般的に HR 効率は低く、GT 効率は非常に低いと考えられているため、GT の効率化を目指した研究が高等植物を含めた様々な生物種において行われてきた。その中で、ポジティブ・ネガティブ選抜という GT に成功した細胞を効率良く選抜する方法がイネに適用され、再現性の高い GT 系として様々な内在性遺伝子の改変に用いられてきた。しかしながら、この選抜法を用いてもなお GT 効率は満足できるものではなく、かつイネ以外の植物種において再現性の高い GT 系は確立されていない。

そこで本課題では、まずはイネにおいて高効率 GT 系を確立し、その実験系を他の植物種にも適用させ、最終的にはあらゆる植物種において精密なゲノム編集技術を利用可能にすることを目標とする。これまでの研究から、標的遺伝子上に特異的に DSBs を誘導することで GT 効率が 100 倍向上すること、また、HR 関連因子の過剰発現、あるいは、HR と拮抗して機能している非同源末端結合(NHEJ)経路関連因子の発現抑制は、HR 効率を向上させることが明らかとなっていることから、これらのアプローチを用いて高効率 GT 系を確立することを目指した。さらに、高効率 GT 系をより実用的技術へと発展させることを目標に、CRISPR/Cas9 やエフェクター発現カセットなどを *piggyBac* トランスポゾンにより出し入れする「一時的導入系」も合わせて確立することも試みた。これらの技術を統合することで、栄養繁殖性の植物種にも適用可能な精密ゲノム編集技術確立の可能性を示す。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、まずイネにおいて CRISPR/Cas9 による標的切断誘導的 GT 系を確立した。この実験系は、CRISPR/Cas9 発現カセット、GT 鋳型配列、選抜マーカーを一つの T-DNA 上に配置した all-in-one ベクターを用い、形質転換細胞の選抜過程で標的切断とベクター上の鋳型配列を利用した GT を誘導する(図 1)。また、動物細胞で HR 効率を向上させることが知られている Rad51 活性化剤(Rad51-stimulatory compound 1, RS-1)処理との併用により高効率 GT 系の確立を試みた。イネ内在性 Acetolactate synthase *ALS* 遺伝子へ点変異

を導入する GT 実験を行ったところ、RS-1 処理区において 0.2%の頻度で GT 細胞を得た。この GT 系により、イネおよびタバコの複数の内在性遺伝子の改変に成功した。

さらに高効率な GT 系へ発展させるため、標的切断誘導的 GT 系を利用して内在性遺伝子にレポーター(GFP)をノックインする簡便な GT 効率評価系を確立した。この評価系を利用して、HR 関連因子の過剰発現の効果を評価したが、GT 効率の促進は見られなかった。一方、NHEJ 関連因子は、イネにおいてその機能が明らかにされていないものが多く、個々の因子の機能解析から着手した。その中で、イネ DNA polymerase θ ($pol\theta$) の T-DNA 挿入における役割を報告した。また、動物細胞において HR 効率向上効果を示す薬剤について GT 効率を評価したところ、未だ予備的な結果ではあるが、ある薬剤処理で 4~5 倍程度 GT 効率を向上できることを明らかにした。さらに、鑄型 DNA のデリバリー法の工夫により GT 効率をさらに向上させる可能性を見出した。将来的には栄養繁殖性の植物種に適用することを見据え、CRISPR/Cas9 発現カセットを T-DNA から *piggyBac* を転移させて形質転換する実験系を開発し、*piggyBac* トランスポゾンにより all-in-one GT ベクターを出し入れする「一時的導入系」確立への道筋を示した。

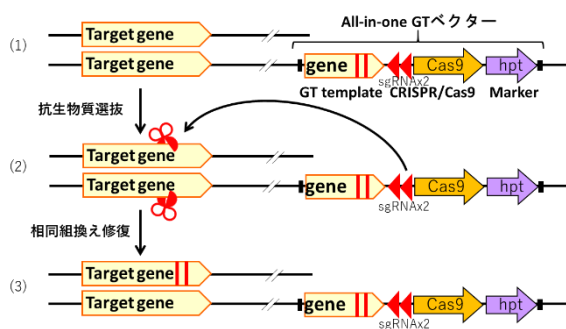


図1 All-in-oneベクターを用いたCRISPR/Cas9による標的切断誘導的GTのストラテジー

(1) GT template, CRISPR/Cas9および選抜マーカ発現カセットを1つのT-DNA上に配置したAll-in-oneベクターをアグロバクテリウムを介してゲノムに導入する。(2) CRISPRにより標的遺伝子上にDSBsが生じる。(3) HRによりGT templateを用いて修復された細胞に任意の変異が導入される。

(2) 詳細

研究テーマ A 「標的切断誘導と DNA 修復経路の調節による高効率 GT 系の確立」

・CRISPR/Cas9 による標的切断誘導的 GT 系の確立

標的遺伝子における DSBs の誘導は、自然発生的に生じる DSBs を利用した場合の 100 倍程度 GT 効率を向上させると考えられている。そこで、イネにおいて CRISPR/Cas9 による標的切断を利用した GT 系を確立した。この GT 系は、CRISPR/Cas9 発現カセット、GT 鑄型配列、選抜マーカを一つの T-DNA 上に配置した all-in-one ベクターを用い、形質転換細胞の選抜過程で標的切断とベクター上の鑄型配列を利用した GT を誘導する(図 1)。この標的切断誘導的 GT 系と動物細胞で HR 効率を向上させることが知られている Rad51 活性化剤(Rad51-stimulatory compound 1, RS-1)処理の併用により、高効率 GT 系の確立を試みた。イネ内在性 Acetolactate synthase (*ALS*) 遺伝子へ点変異を導入する GT 実験を行ったところ、コントロール区では GT 細胞は得られなかったが、RS-1 処理区において 0.2%の頻度で GT 細胞を得た。RS-1 処理による GT 効率向上の効果は限定的であるが、このアプローチを用いて、イネ内在性遺伝子の様々な改変(複数の不連続な塩基置換の挿入、タグやレポーターのノックイン)に成功した(Nishizawa-Yokoi et al., 2020 Front. Genome Ed.)。

・DNA 修復経路の調節が GT 効率に及ぼす影響の評価

CRISPR/Cas9 による標的切断と RS-1 処理を併用した GT 系を確立したが、その効率は満足できるものではない。そこで、より高効率な GT 系を確立するため、内在性遺伝子へのレポーターノックインによる GT 効率評価系を確立した(図 2)。この評価系を用いて、HR 関連因子の過剰発現が GT 効率に及ぼす影響を解析するため、HR 関連因子(OsExo1, OsCtIP, OsRad51A2, OsRad52-2A, OsBRCA1, OsRecQ14)の過剰発現カセットを all-in-one ベクター上に配置してイネカルスに導入した。その結果、GT 効率を大きく向上させる因子の同定には至らなかった。

一方、NHEJ 関連因子 DNA ligase 6, PARP1, NBS1, pol θ のイネにおける機能は不明である。そこでこれらの因子が DSBs 修復に関与することを確認するため、昨年度までに CRISPR/Cas9 により作出したノックアウトイネ nbs1, lig6, pol θ 、parp1 において、これらの因子の欠損が DNA 損傷感受性と DSBs 修復様式に及ぼす影響を解析した。その結果、全ての変異体が DNA 損傷感受性を示し、DSB の修復様式が altNHEJ から他の修復経路へシフトする傾向が認められた(論文発表準備中)。

また、これらの変異体におけるアグロバクテリウムを介した形質転換効率を評価したところ、pol θ 変異体においてのみ著しく減少することを明らかにしたが、pol θ 変異体においても形質転換能は完全には欠損しなかったことから、T-DNA のゲノムへの挿入は複数の DNA 修復経路を介して行われていることを明らかにした(Nishizawa-Yokoi et al., 2021 New Phytol.)。

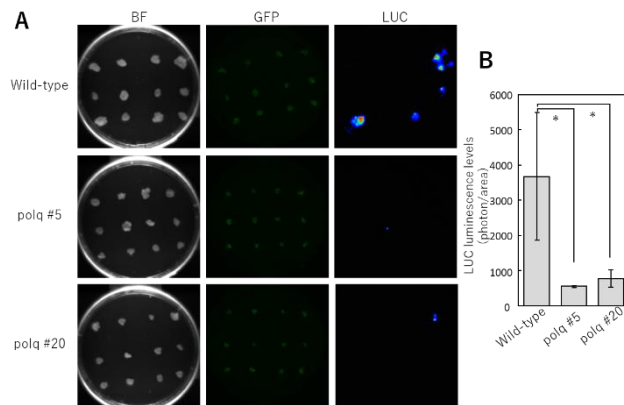


図2 イネpol θ 変異体におけるT-DNA挿入頻度(形質転換効率)の解析
A, イネカルスにおけるレポーターコンストラクトを用いた一過的および安定的T-DNA挿入頻度の解析。BF, 明視野像; GFP, 形質転換後3日のGFPの一過的発現; LUC, 形質転換後10日のゲノムに挿入されたベクターからの安定的なLUC発現。B, 野生株およびpol θ 変異体における相対的LUC発現レベル。

研究テーマ B 「イネ以外の植物における GT 系の確立」

これまでにタバコやトマトなどでは、CRISPR/Cas9 や GT の鑄型配列を Geminivirus ベクター上に配置して細胞内で複製させる実験系により、GT による内在性遺伝子の改変例が報告されている。しかしながらその効率の低さゆえ、これらの報告のほとんどが GT が生じた細胞を濃縮できる(除草剤耐性や色素蓄積など)形質を付与する改変の導入のみに限られてきた。そこで、本課題においてイネで確立できた All-in-one ベクターを用いた GT 系によってタバコの内在性遺伝子の改変を試みた。GT 実験のモデル遺伝子である *NtALS* 遺伝子に 2 点変異を導入する GT 実験を行ったところ、コントロール区では GT 細胞は得られなかったものの、RS-1 処理区では形質転換カルスの約 0.2%の割合で GT カルス系統が得られた。また、この GT 系を用いて別の遺伝子座の改変にも成功した(Nishizawa-Yokoi et al., 2020 Front. Genome Ed.)。

研究テーマ C 「piggyBac トランスポゾンによるエフェクターカセットのデリバリーシステムの

確立」

本課題で確立できた all-in-one ベクターを利用した CRISPR/Cas9 による標的切断誘導的 GT 系をより実用的技術へと発展させるため、痕跡を残さずに転移する *piggyBac* トランスポゾンを用いて all-in-one GT カセットをゲノムに出し入れする実験系の開発も試みた。Proof-of-concept の実験として、イネにおいて T-DNA からの転移酵素の一過的発現によりレポーター遺伝子あるいは CRISPR/Cas9 発現カセットを *piggyBac* の転移によりゲノムへ導入する実験を行った(図 3)。その結果、1%の割合で T-DNA の挿入ではなく *piggyBac* の転移で外来 DNA が挿入されていた。また、その系統に転移酵素を再発現させたところ、外来 DNA 発現カセットを痕跡なく取り除くことに成功した(Nishizawa-Yokoi and Toki, Plant Biotechnol. J. 2021)。

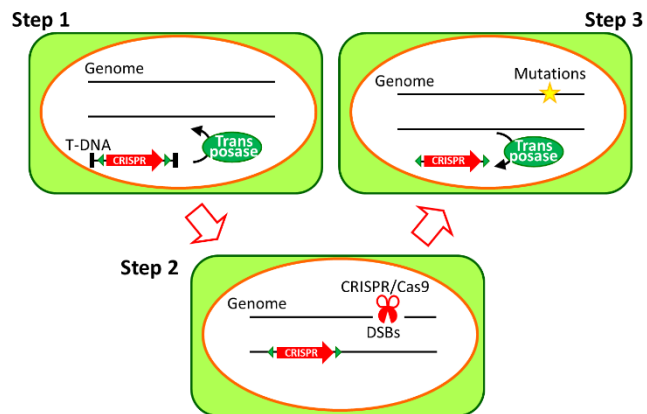


図3 *piggyBac* トランスポゾンを用いた CRISPR/Cas9 発現カセットデリバリーシステム
Step 1, CRISPR/Cas9 発現カセットをアグロバクテリウムを介して細胞に導入し、*piggyBac* 転移酵素の一過的発現により *piggyBac* を T-DNA から転移させてゲノムに挿入されたものを選択する。Step 2, Cas9 と gRNA の発現により、標的遺伝子切断と変異の導入を誘発する。Step 3, 変異の導入後、転移酵素の発現により *piggyBac* を転移させて CRISPR/Cas9 発現カセットを痕跡なく取り除く。

3. 今後の展開

本課題では、カルス培養を経た形質転換系が確立されているイネおよびタバコにおいて、CRISPR/Cas9 による標的切断誘導的 GT 系を確立した。薬剤処理による GT 効率の促進は、他の植物種で確立されている異なる形質転換系 (floral dip、プロトプラスト、組織への biolistic transformation など) への適用が可能だと考えられることから、今後、様々な植物種において利用可能な GT 系を確立したい。また、栄養繁殖性の植物種では、CRISPR/Cas9 発現カセットや GT 鋳型配列を含む all-in-one ベクターをゲノム中に組み込むと次世代において分離させることができない。一方、発現カセットをゲノムに組み込ませずに CRISPR/Cas9 の一過的発現で標的切断の誘導と標的組換えを生じさせることも可能だが、その効率は非常に低い。そこで、*piggyBac* トランスポゾンによる all-in-one GT ベクターの「一時的導入系」を完成させ、栄養繁殖性の植物種においても GT による精密で自由自在なゲノム編集が可能となると考えられる。

4. 自己評価

さきがけ研究期間中に産前産後・育児休暇を取得し、それに伴いさきがけ研究期間も延長していただいた。復帰後は育児と研究の両立に悪戦苦闘の毎日であったが、本研究費で雇用していた優秀な研究補助員 2 名や研究室のメンバーから多大な協力を得て、大きな計画の遅れもなく研究を遂行することができたと考えている。課題提案時にデザインしていた標的切断を伴わない GT 系を用いた効率の評価は、研究開始早々に行き詰ってしまった。しかし、領域会議でのアドバイザーの先生方やさきがけ研究者のメンバーにアドバイスをいただき、CRISPR/Cas9 による標的切断誘導的な GT 系と化合物処理による効率化に方向転換し、それを用いた評価系を開発することで、簡便で再現性の高い高効率 GT 系を確立できたと考えている。この成果により、これまで難易度の高かった GT ベクターの構築と大規模な培養実験を伴う GT 実験の

ハードルを下げたユーザーフレンドリーな GT 系を確立することができ、全ての植物研究者が簡単に取り組めるような GT 系が少なくともイネやタバコなどのモデル植物においては確立できたと確信している。また自身においても、この GT 系の確立によって、さきがけ内外の研究者との共同研究において様々な遺伝子を GT により改変する研究に携わることができており、新たなプロジェクトの始動に発展しつつある。GT で作出した作物はカルタヘナ法での取り扱いルールにおいて、SDN-2 あるいは-3 に分類され規制の対象となる方針であることから社会実装へのハードルは高いが、GT で実現される精密なゲノム編集は植物科学の発展だけでなく、作物育種の加速化に貢献することは間違いない。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:原著論文 3件、総説・書籍など 4件

1. Nishizawa-Yokoi A., Saika H., Hara N., Lee L.Y., Toki S., and Gelvin S.B. (2021) <i>Agrobacterium</i> T-DNA integration in somatic cells does not require the activity of DNA polymerase theta. <i>New Phytol.</i> 229: 2859-2872.
これまでに、シロイヌナズナでは DNA polymerase theta がアグロバクテリウムを介した形質転換機構の必須因子だと考えられてきた。しかし本研究では、シロイヌナズナおよびイネの pol theta mutant においても形質転換能は完全には無くならないことを示し、複数の経路が T-DNA 挿入に関わっていることを証明した。
2. Nishizawa-Yokoi A., Mikami M., and Toki S. (2020) A universal system of CRISPR/Cas9-mediated gene targeting using all-in-one vector in plants. <i>Front. Genome Edi.</i> 2: 604289.
本発表では、CRISPR/Cas9、選抜マーカー、GT テンプレートを一つの T-DNA 上に配置した all-in-one ベクターを利用した GT 系により、イネおよびタバコにおいて内在性遺伝子改変の成功例を示す。また、Rad51 活性化剤 RS-1 処理が GT 効率に及ぼす影響についても評価した。
3. Nishizawa-Yokoi A., and Toki S. (2021) <i>piggyBac</i> -mediated transgenesis system for the temporary expression of CRISPR/Cas9 in rice. <i>Plant Biotechnol. J.</i> 19: 1386-1395.
本論文では、人工制限酵素などの外来遺伝子を一時的にゲノムに挿入して安定的に発現させる形質転換系を確立することを目的として、 <i>piggyBac</i> トランスポゾンを利用した外来遺伝子の形質転換系をイネにおいて確立した。

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件(特許公開前のものも含む)

(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. Nishizawa-Yokoi A, Toki S. Accurate genome editing by homologous-recombination-mediated gene targeting. 16th International Symposium on Rice Functional Genomics, 2018 年 9 月, 東京(招待講演)
2. Nishizawa-Yokoi A., Toki S. Precise genome engineering by homologous-recombination-mediated gene targeting in plants. The 4th Trilateral research association of plant

biotechnology symposium, 2019 年 7 月, 中国 (招待講演)

3. Nishizawa-Yokoi A. Gene targeting via CRISPR/Cas9-induced DSB repair in plants. International Symposium on the Future Direction of Plant Science by Young Researchers, 2019 年 12 月, 静岡
4. 横井 彩子、土岐 精一 相同組換えを利用した正確なゲノム編集技術の開発 プロジェクト横断型公開シンポジウム「植物のゲノム編集基盤技術開発の現状と展望」2020 年 2 月, 東京, (招待講演)
5. 横井彩子, 土岐精一. 植物における相同組換えを利用したジーンターゲットングによる精密なゲノム編集技術. ゲノム編集食品～農林水産分野への応用と持続的社会的実現～監修: 田部井 豊, (株)NTS, (2021 年 2 月出版)pp. 39-45.