

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06902

研究課題名 (和文) モデル生物ゼニゴケにおけるマイクロインジェクションを用いたゲノム編集技術の開発

研究課題名 (英文) Genome editing by microinjection in the model organism *Marchantia polymorpha*

研究代表者

大和 勝幸 (Yamato, Katsuyuki)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：50293915

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要 (和文) : 本研究では、ゼニゴケをモデルとする遺伝子機能解析を促進するため、CRISPR RNAおよびCas9タンパク質の複合体のマイクロインジェクションによるゲノム編集法の開発を目指した。標的とする遺伝子として、気室形成制御因子NOPPERABO1 (NOP1) を選択した。NOP1が欠失すると、葉状体に気室が形成されず、葉状体表面の緑色が薄くなるとともに表面が滑らかになるので、変異表現型を容易に観察できる。NOP1遺伝子を標的とするCRISPR/Cas9複合体を導入したところ、*nopl*変異表現型を示す株を得た。この株の標的配列中に5塩基対の欠失が認められ、ゲノム編集を確認した。

研究成果の概要 (英文) : DNA-free genome editing allows target-specific manipulation of a given genome. CRISPR RNA and Cas9 protein can be directly introduced into target cells and lead to genome-editing. We have successfully performed DNA-free genome editing mediated by microinjection of CRISPR/Cas9 complex in the liverwort *Marchantia polymorpha*. NOPPERABO1 (NOP1), of which loss-of-function mutation causes impaired air-chamber formation and thus can be found readily, was selected as a target gene. Custom gRNA and commercially available Cas9 protein were first allowed to form RNA-protein complex and then injected into single-cell sporelings by a laser thermal microinjector. One of the thalli grown from microinjected sporelings formed a sector that showed the *nopl* mutant phenotype, and DNA isolated from the sector showed 5-bp deletion in the target coding sequence. This is the first demonstration of DNA-free genome-editing by microinjection in plants.

研究分野 : plant molecular genetics

キーワード : RNA-protein complex CRISPR/Cas9 microinjection

1. 研究開始当初の背景

ゼニゴケを含むコケ植物は、約5億年前に植物が陸上進出してから最初に分岐したと考えられ、基部陸上植物を構成している。実際、ゼニゴケには陸上植物に共通する基本的なしくみの多くが、より単純なかたちで保存されている。半数体であるとともに、遺伝子重複が少ないため、変異体作成や遺伝子機能解析に有利であり、形質転換系なども整備されていることから、モデル植物としての利用が拡大している。

ゲノムが明らかになっているモデル生物において、目的の遺伝子のみを不活化する遺伝子破壊技術は、遺伝子の機能解析に極めて有効な手法である。現在、相同組換えに基づく遺伝子破壊法が酵母からマウスにいたるまで多くのモデル生物において利用されている。ゼニゴケにおいても、イネのベクターを改変したもので遺伝子破壊が可能となり (Ishizaki et al. *Sci. Rep.* 3:1532, 2013), 多数の遺伝子について実績がある。

より高い効率と自由度を求めて zinc-fingerヌクレアーゼ (ZFN) や TAL エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) による二本鎖 DNA 切断 (DSB) を利用した遺伝子破壊法が開発された (Gaj et al. *Trends Biotechnol.* 31:397-405, 2013)。しかし、これらの手法では標的配列認識ドメインの設計の利便性や DSB の再現性などの点で問題が指摘されていた。これを受けて開発されたのが、細菌がもつ防御システム CRISPR/Cas による遺伝子破壊である (Cong et al. *Science* 339:819-823, 2013 など)。これは標的配列をもつガイド RNA (sgRNA) およびガイド RNA が認識した DNA を切断するエンドヌクレアーゼ (Cas9) からなるシンプルなシステムである。CRISPR/Cas による遺伝子破壊の成功例は、様々な生物種において報告されている (Li et al. *Nat. Biotech.* 31:681-683, 2013 など)。植物では、sgRNA 遺伝子および Cas9 遺伝子をパーティクルガン法もしくはアグロバクテリウム法で導入し、形質転換体を選抜した上で遺伝子破壊株を単離している (Shan et al. *Nat. Biotech.* 31:686-688, 2013 など)。

これに対し、ほ乳類では、*in vitro* で合成した sgRNA および Cas9 mRNA あるいはタンパク質をマイクロインジェクションで受精卵細胞質に導入して良好な結果が得られている (Wang et al. *Cell* 153:910-918, 2013) (注: 2015 年に PEG を用いて植物のプロトプラストに sgRNA/Cas9 複合体を直接導入する方法が発表された-Woo et al. *Nat. Biotech.* 33:1162-1164)。

近年モデル植物として注目されているゼニゴケは (Ishizaki et al. *Plant Cell Physiol.* 57:262-270, 2016), 有性生殖によって 1 細胞からなる胞子を形成する。胞子は吸水すると、細胞分裂を繰り返して葉状体へと生長する。申請者らは、最初に細胞分裂が起こる前の発

生段階に着目し、1 細胞のうちに sgRNA および Cas9 mRNA を十分量導入できれば、確実に遺伝的に均一な遺伝子破壊株を得ることができると考えた。

2. 研究の目的

ゼニゴケ胞子由来細胞へのマイクロインジェクション法を確立し、sgRNA および Cas9 mRNA あるいはタンパク質の導入による遺伝子の破壊。

3. 研究の方法

マイクロインジェクションに適した細胞を得るため、以下の項目について検討した。

①胞子の培養条件

培地の成分および形状 (液体/固体)、光 (強度および光質)、温度、培養期間について検討した。例えば、ゼニゴケ胞子を弱青色光下で培養すると、1 細胞からなる原糸体が光の方向へと先端成長する。この時、伸長する原糸体先端部の細胞壁は比較的薄いと考えられ、穿刺しやすいと期待した。

②胞子以外の細胞の検討

胞子から良好な標的細胞が得られない場合、無性芽や葉状体由来する細胞の使用を検討した。

インジェクション操作を最適化するため、ニードルの形状、穿刺操作、穿刺部位等を検討した。また、mRNA のインジェクションによる蛍光タンパク質の一過的発現を試みた。なおマイクロインジェクションにはレーザー熱膨張式インジェクタ (LTM-1000、ネッパジーン社) を用いた。

受託合成サービスによる sgRNA および市販 Cas9 タンパク質を用いて、マイクロインジェクションによるゲノム編集を実施した。

4. 研究成果

まず、マイクロインジェクションに適した比較的大きく、かつ穿刺可能な単細胞を調製する方法を確立した。

本実験では、個体への再生能力をもつ一細胞が求められ、その候補として胞子を検討した。しかし、胞子そのものは極めて堅く、吸水後でも報告者らが作成したキャピラリーでは穿刺不可能であった。そこで、ゼニゴケ胞子が弱青色光下で細胞分裂を行わずに伸長することに着目した。ゼニゴケ胞子に弱青色光を一方向から照射すると、細胞は分裂することなく光源に向かって伸長する。その際、葉緑体も伸長している末端に集合する。植物細胞の大部分は液胞で占められることが多く、マイクロインジェクションの際に問題となる。しかし、伸長細胞の光源側の末端には葉緑体が集合しているため、液胞の占める割合は低いと期待された。また、核も伸長末端側に移動している。これらの理由から、弱青色光照射によって伸長させた細胞の光源側の末端に試料を注入することとした (図 1)。



図1 伸長細胞へのマイクロインジェクション
ゼニゴケ胞子を弱青色光下で4日間培養すると、細胞分裂せずに伸長する。光源は図の右側に位置する。細胞は光源側に伸長し、葉緑体も光源側に集合している。穿刺は光源側の先端部に行った。細胞の長さは約300 μm。

胞子を発芽、分裂させて得られた細胞はプロトプラスト化しやすく、かつ1細胞からの再生能も高い。そこでプロトプラストに対して穿刺を試みたが、プロトプラストの細胞膜は穿刺に脆弱であることが判明した。プロトプラスト化後、細胞壁の部分的な回復を待って穿刺を試みたものの、キャピラリは貫通するが細胞は破壊されない程度の強度をもった細胞を調製するに至っていない。葉状体の切断面から再生する細胞の利用も検討したが、穿刺した細胞の追跡が容易ではないので不採用とした。

穿刺用のキャピラリ作成のパラメータも改良し、マイクロインジェクション作業をルーチン化できた。なお、試料が細胞内に注入されたことを確認するために、当初蛍光色素としてFITC-Dextranを用いていたが(図2)、FITC-Dextran そのものがゼニゴケに対して細胞毒性をもつことが判明した。また、コンスタントに穿刺できるようになったため、FITC-Dextranの使用を中止した。キャピラリから細胞内へのインジェクションは、試料の注入による細胞のわずかな肥大や内部の細胞小器官の動きを観察して確認した。

図2 FITC-Dextran の注入

伸長細胞に FITC-Dextran を▲で示す部位から注入した。赤色および緑色の部分はそれぞれ葉緑体の自家蛍光および FITC-Dextran の蛍光を示す。

次に、注入する試料が細胞内で機能することを確認するため、まず改変緑色蛍光タンパク質 EGFP 遺伝子の mRNA (市販品) を注入した。注入後3日以内に強い緑色蛍光が観察された(図3)。これはインジェクションにより、mRNA が細胞内の適切な部位(=細胞質ゾル)に導入され、かつ正常に機能することを示している。



図3 mRNA 注入による EGFP の蛍光
伸長細胞に市販品の EGFP mRNA を注入した。処理後2日で強い EGFP 蛍光が観察された。

次に、CRISPR RNA および Cas9 タンパク質の複合体をゼニゴケ細胞に導入し、ゲノム編集を試みた。標的とする遺伝子として、気室形成制御因子 *NOPPERABO1* (*NOPI*; Ishizaki et al. Plant Cell 25:4075-4084) を選択した。この遺伝子が欠失すると、葉状体に気室が形成されなくなり、葉状体表面の緑色が薄くなるとともに表面構造が滑らかになるので、*nop1* 変異表現型を容易に観察できる。*NOPI* 遺伝子を標的とする CRISPR/Cas9 複合体を導入したところ、*nop1* 変異表現型を示す株を得た。この株の標的ゲノム領域を調べたところ、標的配列中に5塩基対の欠失が認められ、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を確認した。はマイクロインジェクションによる植物細胞のゲノム編集はこれが初めての例である。今後は効率を高めるために細胞、注入試薬および操作の最適化を実施し、DNA断片を同時に注入することでノックインにも応用する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

Bowman JL, Kohchi T, Yamato KT et al. (2017) Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. Cell 171:287-304.

[学会発表] (計 1件)

Aso S, Takeuchi T, Yajima K, Nishiyama T, Takikawa Y, Sugano SS, Komatsu A, Yamaoka S, Nishihama R, Kohchi T, Yamato KT. DNA-free genome-editing by microinjection in *Marchantia*

polymorpha. EMBO Workshop “New shores in land plant evolution”, 20-23 June, 2018, Lisbon, Portugal.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大和 勝幸 (YAMATO, Katsuyuki)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：50293915

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

河内 孝之 (KOHCHI, Takayuki)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：40202056

石崎 公庸 (ISHIZAKI, Kimitsune)

神戸大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：00452293

瀧川 義浩 (TAKIKAWA, Yoshihiro)

近畿大学・先端技術総合研究所・准教授

研究者番号：60446010

(4) 研究協力者

なし