

平成29年8月30日

報道関係者各位

国立大学法人 筑波大学
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

アサガオのゲノム編集に世界で初めて成功 —850年かかった白花の変異体作出を1年で達成—

研究成果のポイント

1. ゲノム編集技術の1つであるCRISPR/Cas9^{※1)}を用いてアサガオのゲノム編集に世界で初めて成功しました。
2. アサガオの花や茎の色素であるアントシアニンを合成する酵素の遺伝子(*DFR-B*)を、ゲノム編集により不活化し、花や茎にアントシアニンを含まないアサガオ作出了しました。
3. ゲノム編集技術が、アサガオなどの花きの遺伝子機能の解析や新品種作出技術として有効であることが示されました

国立大学法人筑波大学生命環境系 小野道之准教授、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構(農研機構) 生物機能利用研究部門 遺伝子利用基盤研究領域 先進作物ゲノム改変ユニット 土岐精一ユニット長の研究グループは、ゲノム編集技術の一つであるCRISPR/Cas9を用いてアサガオのゲノム編集に世界で初めて成功しました。

本研究では、アントシアニンという色素を蓄積することにより花や茎が紫色となるアサガオ品種ムラサキに対して、アントシアニンを合成する酵素の遺伝子にゲノム編集を行いました。ゲノム編集には、ゲノム編集技術の一つであるCRISPR/Cas9を用いました。その結果、花が白色、茎が緑色へと変化したアサガオを得ることに成功しました。

本研究成果は、ゲノム編集技術がアサガオなどの花きの遺伝子機能の解析や新品種作出技術として有効であることを示すものです。

アサガオは、国民に広く親しまれた園芸植物でもあることから、ゲノム編集技術を考える上で良い材料になるものと考えます。

本研究の成果は、2017年8月30日(日本時間同日午後6時)にScientific Reports誌オンライン版で公開されます。

※本研究の一部は、筑波大学遺伝子実験センター“形質転換植物デザイン研究拠点”及び、内閣府 戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「次世代農林水産業創造技術」(管理法人:生研支援センター)によって実施されました。

研究の背景

近年、急速な発展を遂げているゲノム編集技術は、部位特異的DNA切断酵素を利用してゲノム中の特定の遺伝子を切断することで、遺伝子に変異を導入する革新的な技術です。植物でも、遺伝子の機能を解析したり、新たな形質を持つ品種を作出するための手段として用いられるようになりました。CRISPR/Cas9はゲノム編集技術の一つであり、実験デザインの容易さと編集効率の高さから、様々な生物種への適用が進んでいます。この手法では、標的とした遺伝子配列以外の遺伝子にも変異を導入してしまう、オフターゲット効果が生じることも知られています。

アサガオは日本のナショナルバイオリソース(NBRP)に選定された伝統的な園芸植物であり、豊富な遺伝資源をもつ花きのモデル植物です。アサガオは、奈良時代に当初は生薬として中国を経由して伝来したと考えられています。しかし日本では、園芸植物として栽培されるようになり、江戸時代には様々な色や形を持つ品種が作出されて園芸ブームが起きました。その一部の品種は現在も大切に維持されています。アサガオは、初等教育で広く用いられる他、花の色や形、花を咲かせる仕組み、花弁の老化、トランスポゾン、重力屈性など様々な分野における重要な研究材料にもなっています。近年、アサガオの全ゲノムの塩基配列が解読されて、研究の進展が期待されています。研究グループは、そのアサガオを用いたゲノム編集技術開発のためのモデル実験を試みました。

研究内容と成果

実験植物としては、植物色素アントシアニンを含むことで紫色の茎と花を持つ、アサガオ品種ムラサキを用いました。ゲノム編集の標的遺伝子としては、花が咲く前にも視覚的な選抜ができるように、アントシアニンの合成酵素遺伝子である *dihydroflavonol 4 reductase-B* (*DFR-B*) を選びました。ゲノム編集に成功したアサガオはアントシアニンを含まなくなるため、茎は緑に、花は白くなることが期待されます。アサガオには、同様の自然突然変異を起こした品種が存在していますが、本実験はゲノム編集技術開発の効果を調べるためのモデル実験という位置づけとなります。

アサガオには *DFR-B* と類似性の高い *DFR-A*、*-C* という2つの遺伝子がありますが、今回の研究では茎や花の色に関わる *DFR-B* のみを選択的に編集するように設計しました。

植物のゲノム編集では、CRISPR/Cas9は形質転換によって遺伝子を導入するケースが多く、本研究でもアサガオの未熟胚培養細胞に遺伝子導入しました。そしてさらに抗生物質による選抜などを経て、形質転換植物を作出しました。アサガオの形質転換の方法は、小野らが2000年に世界で初めて報告したものです。

CRISPR/Cas9等を遺伝子導入した結果、アントシアニンを合成する遺伝子 *DFR-B* がゲノム編集されて働かなくなり、茎と花にアントシアニンを含まないアサガオが75%という高い割合で得られました(図1)。ゲノム編集された部位のDNA塩基配列を調べた結果、*DFR-B* 遺伝子内に塩基配列の変異が確認できました。1塩基の挿入または2塩基以上の欠失が、標的配列を中心に見られました(図2)。3塩基の欠失では、*DFR-B* のタンパク質としては1アミノ酸が欠失するだけですが、それでも白花になりました。そのため、欠失したアミノ酸が *DFR-B* の酵素の機能のために重要であることがわかりました。

アサガオは二倍体であることから、2セットあるゲノムの片方だけの編集であった場合(ヘテロ株)には、茎や花の色は変化しませんでした。しかし、その自殖後代(自身の花粉で結実した種子が発芽したもの)の中には、メンデルの遺伝法則に従って白花(劣性ホモ)が出現しました。

植物の地上部の細胞分裂組織は3層からなっており、最も外側の層からL1、L2、L3と呼ばれています。本研究では、1つの層だけがゲノム編集を受けたもの(周縁キメラ)が2例だけ生じました。最外層のL1は表皮を構成して花弁に色をつけ、L2は茎の着色と配偶子(卵細胞や花粉)を生じます。L1だけ編集されたキメラでは、花弁の大部分が白くなりますが、茎は着色したままであり(L2に色素があるため)、ゲノム編集された遺伝子は自殖後代には伝わらず(配偶子を生じるL2がゲノム編集されていないため)、白花にはなりません。L2だけ編集したと思われるキメラでは、花弁は着色しますが、茎は緑色であり、自殖後代は全て白花になりました。これらの周縁キメラの遺伝

子型と着色の関係は、トランスポゾンの挿入変異体を用いた復帰変異の研究結果が報告されていましたが、本研究では、ゲノム編集による機能喪失という逆の方向でこれを再現しました。

また、オフターゲット効果による編集を受ける可能性のある塩基配列について、全ゲノム情報と解析プログラムを用いて予測し、該当部分の塩基配列を解析しましたが、変異はありませんでした。

さらに、緑茎で白花以外の性質は、編集前のアサガオと異なる点はなく、自殖後代となる種子ができました。この種子からは、緑茎で白花のアサガオが育ちました。この次世代の中には、遺伝子導入されていたCRISPR/Cas9等の組換え遺伝子を持たないものがあり、これらは自然に生じた突然変異と生物学的には区別ができません。これらは、作出の過程(プロセス)で遺伝子組換え技術を使いましたが、結果としての植物体には組換え遺伝子が残っていない、いわゆる、「プロセスベース」での遺伝子組換え植物ということになります。プロセスベースでの遺伝子組換え生物に関しては、これを遺伝子組換え生物扱いをしないという国もありますが、日本でどのような扱いをするかは検討中です。そのため、筑波大学の遺伝子組換え安全委員会としては、これを遺伝子組換え植物と同等の扱いとして、安全に管理しています。

中南米原産のアサガオは、元々は野生型の水色の花を持つものが導入されたといわれます。色変わりのアサガオの最古の記録は1631年の狩野山楽・山雪の筆になる京都・天球院の襖絵に描かれた白花と考えられており、自然突然変異が出現するまでに伝来から約850年の年月を要したことになります。本研究では一年で白花を得ることに成功したことから、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術が遺伝子機能の解析や品種改良のために有効なツールであることが確認されました。

今後の展開

アサガオの多くの遺伝子について、ゲノム編集技術を用いた機能解析を展開する計画です。また、本手法を発展させて、複数の遺伝子の同時編集や、新たな DNA 配列の挿入なども試みる計画です。これにより、アサガオのさまざまな性質を、遺伝子レベルでより深く理解できるようになるものと期待します。

参考図

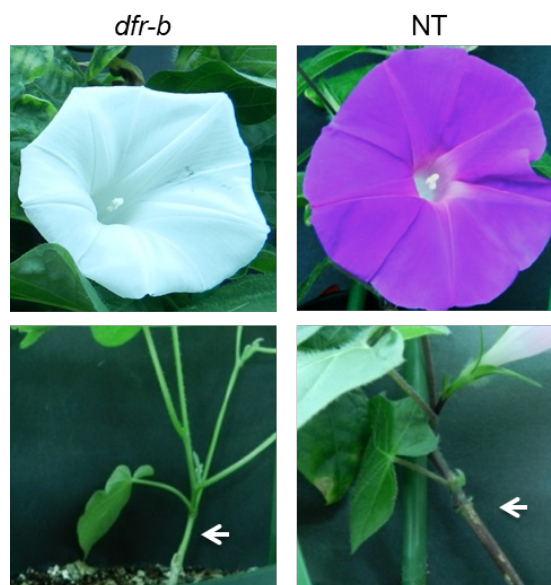


図 1. ゲノム編集したアサガオ (*dfr-b*) と編集前のアサガオ (NT) の花および茎の色の違い

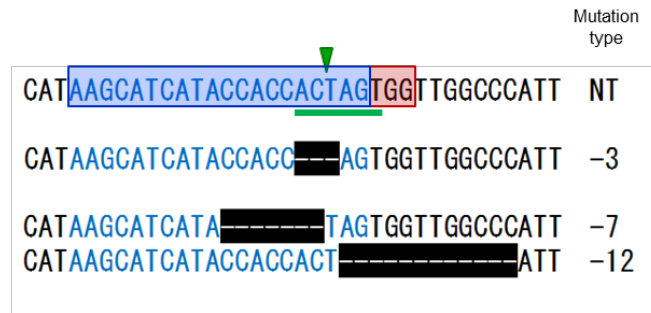


図 2. ゲノム編集の標的配列(紫)と得られた変異体の DNA 配列の例(3、7 または 12 塩基の欠失)

用語解説

注1) CRISPR/Cas9 : Clustered regulated interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 の略称で、RNA とタンパク質の複合体からなる人工的に作成された部位特異的核酸分解酵素(人工制限酵素)。ゲノム編集技術において、CRISPR/Cas9 はゲノム上の標的塩基配列を切断するハサミの役割を果たす。CRISPR/Cas9 等の一式を未熟胚培養細胞に遺伝子導入するにあたっては、アグロバクテリウムなどを用いる。

掲載論文

【題名】 CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *dihydroflavonol-4-reductase-B (DFR-B)* locus in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil*.

(アサガオ *DFR-B* 遺伝子座における CRISPR/Cas9 を用いた変異体の作出)

【著者名】 Kenta Watanabe、Anna Kobayashi、Masaki Endo、Kimiyo Sage-Ono、Seiichi Toki、Michiyuki Ono.

【掲載誌】 Scientific Reports

Doi:10.1038/s41598-017-10715-1

問合わせ先

小野 道之(おの みちゆき)

筑波大学 生命環境系 准教授 (つくば機能植物イノベーション研究センターT-PIRC 遺伝子実験センター)