

ゲノム編集技術を利用した花粉発現遺伝子の解析

上田健治

秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科

被子植物の花粉形成の際に非常に多くの遺伝子が働くが、機能が明らかにされている遺伝子は限られている。本研究では、イネの花粉形成で発現する遺伝子 *pollen-expressed gene1~7* (*OsPEX1~7*) について、ゲノム編集技術の一つである人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 を利用して機能喪失を誘導し、遺伝子変異が花粉形成に与える影響を調べた。その結果、7つのうち *OsPEX7* は遺伝子変異系統が得られなかったが、残り *OsPEX1~6* 遺伝子の機能喪失変異系統が得られた。これらの系統の開花期の花粉を観察したところ、*OsPEX2* と *OsPEX4* の遺伝子変異は花粉形成に影響しなかった。一方、*OsPEX1* の機能喪失変異系統は花粉管発芽ができなくなっていた。また、*OsPEX3* の機能喪失変異系統は、精細胞の前駆細胞である雄原細胞が精細胞へ分化できなくなっていた。従って、これら2つの遺伝子はイネの花粉の機能およびその成熟に必須であることが明らかになった。

キーワード：花粉，ゲノム編集，CRISPR/Cas9，イネ，雄原細胞分化，花粉管発芽

被子植物の花粉形成は若い葯の内部で胞原細胞が花粉母細胞へ分化することで始まる（図1）。花粉母細胞は減数分裂をおこない染色体数が半減した花粉四分分子を生じる。四分分子は四つの細胞に分離して、若い花粉（小胞子）となる。小胞子の核は細胞の一端に移動して不均等なサイズの細胞を生み出す細胞分裂（小胞子分裂）をおこなう。この分裂で生じる大細胞が栄養細胞（花粉管細胞ともいう）で、小細胞が雄原細胞とよばれる。やがて、雄原細胞は栄養細胞質中に遊離して、入れ子の状態になり花粉は成熟していく。被子植物の最終的な雄性配偶子は、雄原細胞の分裂で形成される2つの精細胞である。成

熟した花粉は開花後に雌蕊の柱頭に付着し、花粉管を発芽・伸長していく。イネ科やアブラナ科など約30%の植物種は開花時に精細胞が形成されているのに対し、ユリ科やナス科など残り70%の植物種は花粉管中で精細胞が形成される。雌蕊の付け根にある子房内にある胚のうに花粉管の先端が到達すると、胚のう内に精細胞が放出される。放出された二つの精細胞のうち、一つは卵細胞と受精し、もう一つは中央細胞と受精し、それぞれの接合子は、将来、胚と胚乳となる（上田，2017）。最近の網羅的な遺伝子発現解析によって、イネやシロイヌナズナの花粉形成過程では、それぞれ少なくとも10,000以上の遺伝

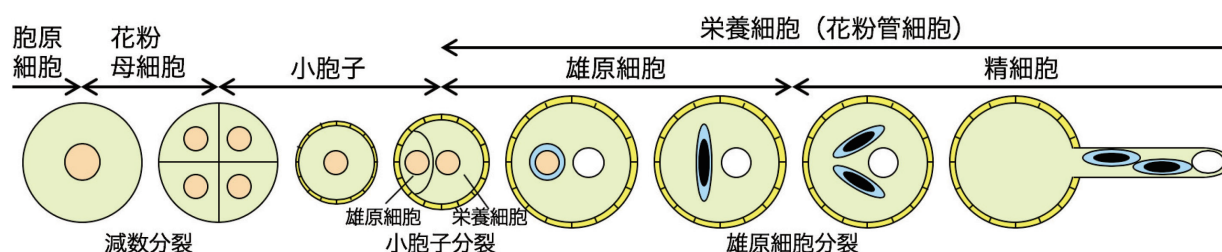


図1 被子植物の花粉形成

子が葯や花粉で発現していることが見積もられている (Ueda et al., 2013). しかし、それらのうち突然変異体や RNAi 法などを利用して機能が明らかにされたイネの遺伝子は 1%程度である (Nonomura et al., 2018).

ゲノム編集は、塩基配列を特異的に認識する人工 DNA 切断酵素 (ヌクレアーゼ) を用いて標的遺伝子を改変する革新的な技術である (遠藤, 2016). ゲノム編集で利用される人工ヌクレアーゼの 1 つ CRISPR/Cas9 は、細胞内でガイド鎖 RNA (gRNA) と複合体を形成し、gRNA と相補的な標的 2 重鎖 DNA を切断する。細胞はこの切断された DNA を相同組換え修復、または、非相同末端結合修復のどちらかによって修復する。このうち、相同組換え修復による場合は鋳型 DNA となる姉妹染色分体が必要なため、細胞周期の S 期から G2 期にかけてしかおこらない。一方、非相同末端結合による修復の場合は、まず、切断末端に Ku とよばれる DNA 結合タンパク質が結合して末端を保護する。切断面には酵素による再連結が可能な末端に加工するため DNA を除去する酵素や合成する酵素が働き、最終的にノリの役目をする酵素が DNA を再結合する (Lieber, 2010). このような非相同末端結合では高頻度に塩基の挿入あるいは欠失がおこり、塩基配列が変化した遺伝子からは正常なタンパク質が合成できなくなる。これを遺伝子の機能喪失あるいは遺伝子破壊などよんでいる。

本研究では、イネの花粉形成過程で発現する遺伝子 *pollen-expressed gene* (*OsPEX*) 1~7 についてゲノム編集技術による遺伝子の機能喪失を誘導し、遺伝子変異が花粉形成に与える影響について調べた。また、ゲノム編集による花粉以外での効果を確認するため、*Drooping Leaf* (*DL*) 遺伝子の機能喪失変異体も作出して、その形態を調べた。

材料と方法

材料

イネのゲノム編集に用いた標的配列配列クローニング用ベクター pU6_ccaB_gRNA およびイネ形質転換用ベクター pZH_gYSA_PubiMMCas9 は農研機構

の土岐精一博士と遠藤真咲博士から分譲された。形質転換に用いたイネ品種‘台中 65 号’は国立遺伝学研究所の野々村賢一博士から分譲された。

方法

プラスミド構築

OsPEX1~7 の遺伝子破壊にもちいた 20bp の標的配列は、オンラインソフト CRISPR-P v2.0 によって決定した (Liu et al., 2017). pU6_ccaB_gRNA を制限酵素 *Bbs* I -HF で切断し、ベクターに相当する DNA 断片を電気泳動により分離・精製した。標的配列のオリゴ DNA を重合させた後、精製したベクターに挿入した。続いて、標的配列が挿入されたプラスミドを制限酵素 *Pac* I と *Asc* I で切断し、インサートとなる DNA 断片を電気泳動により分離・精製した。精製したインサートは、pZH_gYSA_MM Cas9 を *Pac* I と *Asc* I で切断したベクターに挿入した。得られたプラスミドの配列を確認した後、これをアグロバクテリウム EHA101 株に導入した。

イネの形質転換

イネの形質転換は増本と宮尾 (2009) の方法でおこなった。まず、‘台中 65 号’の玄米をカルス誘導培地で培養し、形成された胚盤由来のカルスにアグロバクテリウムを感染させた。アグロバクテリウムの感染によって遺伝子が導入されたイネ細胞は、培地に混合した抗生物質ハイグロマイシンで選抜された。ハイグロマイシン耐性カルスを再分化培地に移してイネ植物を再分化させた。再分化した幼植物は馴化したのちに、組換え温室で栽培した。

形質転換イネの遺伝子型解析

再分化したイネの葉を採取し、Edwards ら (1991) の方法によって DNA を抽出した。標的配列を含む DNA 領域を PCR 法により増幅し、ダイレクトシーケンシング法で、あるいは増幅した DNA 断片を pMD20 ベクターにクローニングして塩基配列を決定した。

イネ花粉の観察と花粉管発芽試験

開花期の穂を収穫し、エタノールと氷酢酸を体積比 3 : 1 に混合した溶液で固定した。スライドグラス上に最終濃度が 2% となるように DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解した核染色溶液中で、固定した葯を破碎して花粉を露出させて 2 時間染色した。染色した花粉の核は蛍光顕微鏡で観察した。

スライドグラス上で花粉管発芽培地 (シヨ糖 17.5%, H₃BO₄ 0.01%, CaCl₂ · H₂O 0.05%, KH₂PO₄ 0.01%, agarose 0.7%) を固化させて、その上に開花直後の花粉を散布した。1 時間後に培地上に固定溶液 (ホルマリン 1%, シヨ糖 17.5%) を垂らして固定した。寒天培地にアニリンブルー染色溶液 (0.005% アニリンブルー, 0.15M K₂HPO₄) を垂らして 30 分後に観察した。

結果と考察

Drooping Leaf (DL) 遺伝子の機能喪失

イネの *DL* 遺伝子 (Os03g0215200) は、7 つのエキソンで構成された 196 アミノ酸残基からなる YABBY ファミリー転写因子とよばれるタンパク質をコードする。花においては心皮 (雌蕊) を決定するとともに、葉においては中肋 (中央脈) の形成を促進することが知られており、*DL* 遺伝子の機能喪失

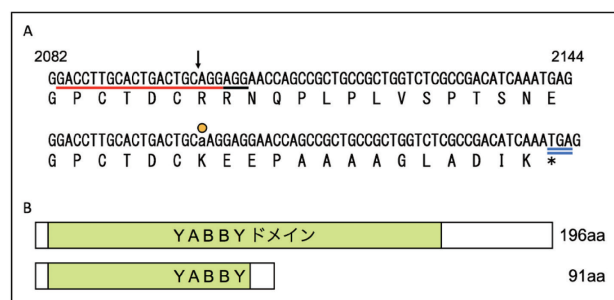


図2 *DL* 遺伝子の構造と機能喪失変異

A: CRISPR/Cas9 により 20 塩基 (赤線) に続く NGG 配列 (黒線) が認識され、矢印の位置で切断がおこる。修復エラーにより一塩基 (a) が挿入されると、フレームシフト変異により終始コドン (アステリクス) が出現する。

B: 約半分の長さの変異タンパク質しか合成されない。

によってイネは垂れ葉となる (Mikami et al., 2015 ; Nagasawa et al., 2003)。*DL* 遺伝子の変異の誘導には、開始メチオニン ATG の A を一番目の塩基として 2,083 番目から 2,102 番目の 20 塩基を標的配列とした (図 2A)。このコンストラクトによって #1 から #6 までの 6 系統の再分化イネが得られた (表 1)。これ

表 1 *DL* 遺伝子の遺伝子型

DL 遺伝子の再分化系統の番号と塩基配列の変異を示す。挿入1は一塩基挿入を、欠失3は三塩基欠失を示す。

系統	塩基配列の変異
#1	挿入1
#2	欠失3, 挿入2
#3	挿入1
#4	挿入1
#5	正常
#6	挿入1

ら再分化したイネの遺伝子型を調べたところ、#5 は正常型と同じ塩基配列だったが、残りの 5 系統のイネは塩基の異常が誘発されていた。すなわち、#1, #3, #4, #6 の 4 系統では一塩基挿入が起こっており、これらは相同染色体の両方の遺伝子に変異した機能喪失変異 (正常な遺伝子産物を全く産出しない) であることがわかった。これらの植物の葉は全て垂れ葉を示していた (図 3)。一塩基挿入が誘発された遺

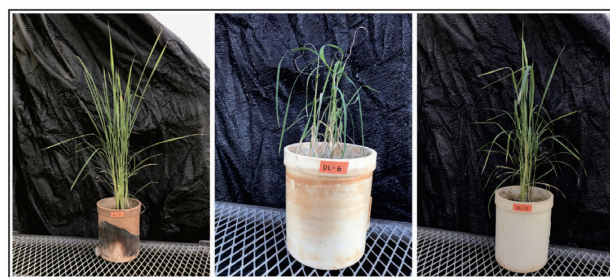


図3 *DL* 遺伝子の機能喪失による垂れ葉

遺伝子型が正常であった系統#5 は草姿も正常であったが、一塩基挿入による機能喪失した系統#6 は垂れ葉を示した。系統#2の草姿は正常であった。

伝子では、開始メチオニンから 77 残基目のシステインまでは正常なアミノ酸配列であるが、フレームシフトにより 78 番目以降のアミノ酸配列が変化していた。さらに、92 番目のアミノ酸に対応するはずの

コドンが終始コドン TGA に変化し、正常の半分以下のアミノ酸残基数の変異タンパク質しか合成できないと予想された (図 1A, B). 一方, #2 は三塩基欠失と二塩基挿入の二つの遺伝子型が検出されたことから, ヘテロ型であると判定された. #2 の草姿は正常型と区別がつかなかったことから, この位置での三塩基欠失による一アミノ酸の欠失はタンパク質の機能に影響を与えないと判断された.

イネ花粉発現遺伝子 *OsPEX1*~*OsPEX7* の機能喪失

イネの花粉発現遺伝子 *OsPEX1*~*OsPEX7* のゲノム編集では, それぞれ 2~12 系統のイネが再分化した. 得られた全ての再分化イネは, 草姿や分蘖 (ぶんげつ) 数などの栄養生長だけでなく, 開花期や花の形態などに関しても野生型イネと同じであった. これらの遺伝子型解析の結果, *OsPEX7* を除いて 6 遺伝子で機能喪失変異体が得られた (表 2). *OsPEX7* 遺

表 2 *OsPEX* 遺伝子の遺伝子型

OsPEX 遺伝子の再分化系統の遺伝子型を示す. 数字は系統数を示す. 正常型遺伝子と機能喪失した遺伝子の 2 つをもつ系統はヘテロ型, 機能喪失した遺伝子のみをもつ系統は機能喪失型とした. キメラなどの可能性がある系統はその他に分類した.

遺伝子名	正常型	ヘテロ型	機能喪失型	その他
<i>OsPEX1</i>	2	2	6	0
<i>OsPEX2</i>	0	0	3	2
<i>OsPEX3</i>	2	0	8	2
<i>OsPEX4</i>	2	0	4	0
<i>OsPEX5</i>	0	2	4	1
<i>OsPEX6</i>	0	0	4	0
<i>OsPEX7</i>	2	0	0	0

伝子はタンパク質合成に関与するタンパク質遺伝子であり, トランスポゾンの挿入による変異体解析では, 自然交配ではホモ接合体が分離しない (Ueda et al., 未発表). 従って, 標的となった相同染色体の両方の遺伝子に変異したため, 再分化できなくなった可能性が考えられる. 残り 6 つの遺伝子のうち, *OsPEX2* と *OsPEX4* は全ての系統で正常な花粉を形成していた. 従って, これら二つの遺伝子は関連する他の未知遺伝子と機能重複しており, それらの未知遺伝子が *OsPEX2* や *OsPEX4* の変異を相補していることが示唆される. 一方, *OsPEX1* 遺伝子の機能喪失変異体 *ospex1* の花粉は正常型イネのそれらと全く区別がつかなかったが, *ospex1* 花粉は人工培地上

で全く花粉管発芽ができなかった. また, ヘテロ型であった 2 系統は, 半数の花粉が発芽していたが, 残り半数は花粉管発芽できていなかった. これらの結果は, ヘテロ接合体が減数分裂する際に正常な *OsPEX1* 遺伝子が座乗する染色体を受け継いだ花粉は発芽できたが, 変異した遺伝子が座乗する染色体を受け継いだ花粉は発芽できなかったと予想できるため, *OsPEX1* が花粉で発現する遺伝子であることを強く示唆している. *OsPEX1* は細胞壁合成に関わる酵素遺伝子であるため, この遺伝子は花粉で発現し, 花粉管発芽に先立つ細胞壁成分の合成に必須で

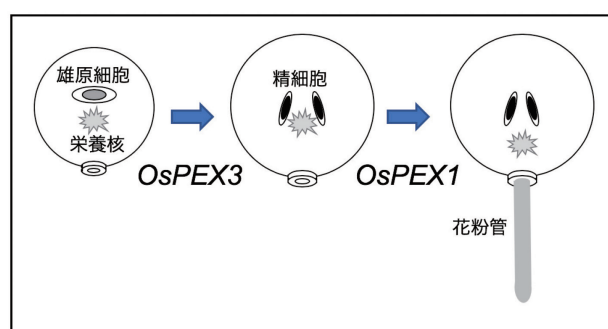


図 4 *OsPEX3* と *OsPEX1* の役割

OsPEX3 はイネの雄原細胞から精細胞への細胞分化に, *OsPEX1* は花粉管発芽に必須の遺伝子である

あることが明らかになった (図 4). また, 正常型のイネは三細胞性花粉であるため, 開花期の花粉内には二つの精細胞核と一つの栄養細胞核が観察されるところが, *OsPEX3* 遺伝子の機能喪失変異体 *ospex3* の成熟期の花粉は, 雄原細胞核と栄養細胞核の二つの核しか観察されなかった. 従って, *OsPEX3* 遺伝子は雄原細胞の細胞分化に必須な役割を持つことが強く示唆された (図 4). 現在, *OsPEX3* 遺伝子の遺伝子発現を解析するとともに, *OsPEX3* タンパク質に対する特異抗体を作製して細胞内での局在について解析中である. また, 残り *OsPEX5* と *OsPEX6* の機能喪失変異体 *ospex5* と *ospex6* の花粉の形態観察についても進行中である.

ゲノム編集による遺伝子の変異導入は, T-DNA やトランスポゾン挿入による突然変異体とは異なり, 当代で表現型が検出できるのが利点である. 特に花粉研究においては, *OsPEX1* の実験のように, 機能

喪失型とヘテロ型が得られた場合は、花粉で発現する遺伝子かどうかの推定も容易である。ただし、*OsPEX1* と *OsPEX3* の機能喪失型系統は全ての花粉が異常になったため、いずれも種子不稔であった。そのため、これらの系統から種子を得るためには花粉を提供する野生型株を同時に栽培する必要がある。

おわりに

昨今の遺伝子の機能解析には、機能喪失の実験データが必要不可欠になっており、ゲノム編集による遺伝子改変は T-DNA やトランスポゾンの挿入変異体などと共に重要なツールになっている。植物の場合は動物と異なり、細胞壁が存在するため、現在はアグロバクテリウムなどを利用した遺伝子組換え法によって CRISPR/Cas9 の遺伝子を細胞内へ導入する手法が主流である。その一方で、人工ヌクレアーゼを直接導入した花粉を介して種子を得ることで、遺伝子組換えを使わないゲノム編集技術の開発も試みられている（水多ら，2018）。

大学等研究機関でのゲノム編集の普及に対応して、カルタヘナ法の所管 6 省のうち、環境省から 2019 年 2 月 8 日付けで環境省自然環境局長通知として〈ゲノム編集技術の利用により得られた生物であってカルタヘナ法に規定された「遺伝子組換え生物等」に該当しない生物の取扱いについて〉が出された（環境省 HP，2019）。これによると、細胞外で加工した核酸を移入した生物は遺伝子組換え生物等に該当するが、戻し交配などにより移入した核酸やその複製物が遺伝子を除去したことが確認できた生物は遺伝子組換え生物等に該当しないとされた。ただし、移入した遺伝子が残存しないことを確認する作業はそれほど容易でないものの、今後も、ゲノム編集技術が実用研究や開発研究にも幅広く利用されていくことは疑いがない。

謝辞

本研究は平成 30 年度学長プロジェクトの助成を受けたものであり、本プロジェクトに加えて平成 29 年度および平成 30 年度学生自主研究、本学生物資源

科学部植物遺伝・育種グループの卒業研究の成果の一部である。これらの研究に参加してくれた学生諸君に感謝する。

引用文献

- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nuc. Acid Res.* 19, 1349.
- 遠藤真咲 (2016). 「イネを用いたゲノム編集技術の改良と応用」『アグリバイオ』1 (1), 10–14.
- 環境省 HP (2019). ゲノム編集技術の利用により得られた生物であってカルタヘナ法に規定された「遺伝子組換え生物等」に該当しない生物の取扱いについて、
<https://www.env.go.jp/press/106439.html>
- Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by thenonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 181–211.
- Liu, H., Ding, Y., Zhou, Y., Jin, W., Xie, K., Chen, L.L. (2017). CRISPR-P 2.0: An improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants. *Mol. Plant* 10, 530–532.
- 増本千都，宮尾光恵 (2009). 「アグロバクテリウム法によるイネの形質転換」『低温科学』67, 641–647.
- Mikami, M., Toki, S., Endo, M. (2015). Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Mol. Biol.* 88, 561–572.
- 水多陽子，永原史織，東山哲也 (2018). 「花粉のゲノム編集」『日本植物学会第 82 回大会研究発表記録』256.
- Nagasawa, N., Miyoshi, M., Sano, Y., Satoh, H., Hirano, H.-Y., Sakai, H. Nagato, Y. (2003). *SUPERWOMAN 1* and *DROOPING LEAF* genes control floral organ identity in rice. *Development* 130, 705–718.
- Nonomura, K., Ono, S., Ueda, K. (2018). Molecular regulation of meiotic fate decision and gametophyte

specification in rice. *Rice Genomics, Genetics and Breeding* (Sasaki, T., Ashikari, M. eds.), pp.69–95, Springer-Nature

Ueda, K., Yoshimura, F., Miyao, A., Hirochika, H., Nonomura, K., Wabiko, H. (2013). *Collapsed abnormal pollen1 gene encoding the Arabinokinase-like protein is involved in pollen development in rice. Plant Physiol.* 162, 858–871.

上田健治 (2017). 「イネの花粉形成の分子基盤」『横浜市立大学論叢自然科学系列』65 (1-3), 73–92.

〔 2019年6月30日受付
2019年7月9日受理 〕

Characterization of pollen-expressed genes in rice using genome editing

Kenji Ueda

¹ *Department of Biological Production, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University*

In recent studies using microarrays of rice, more than 10,000 genes were expressed in anthers or pollen grains during rice pollen development, but the functions of only about one hundred genes have been identified by mutant analysis. In this study, we generated loss-of-function mutants of the pollen-expressed genes (*OsPEX1-7*) in rice using CRISPR/Cas9 genome editing, and observed the mutants' mature pollen grains. As a result, we obtained only normal genotype plants of *OsPEX7* gene, but successfully produced mutants of *OsPEX1-6* genes. Pollen grains from knockout mutant plants *ospex2* and *ospex4* were morphologically normal, just like those of wild-type rice plants. However, pollen grains from *ospex1* and *ospex4* were defective in pollen germination and in generative cell differentiation, respectively. These results suggest that *OsPEX2* and *OsPEX4* genes have a redundant function as unknown genes, and that the *OsPEX1* and *OsPEX3* genes are required for pollen function and pollen development, respectively, in rice.

Keywords: pollen, genome editing, CRISPR/Cas9, *Oryza sativa*, generative cell differentiation, pollen germination