

報道機関 各位

熊本大学

## 植物の重要な機能を担う「ペプチドホルモン」の 解明に役立つ遺伝研究材料コレクションを作成

### (概要説明)

ペプチドホルモンは多くの生物で様々な役割を持つ重要な物質です。しかし、このペプチドホルモンを作る遺伝子は非常に扱いにくく、研究が難しい代表的な遺伝子でした。

今回、熊本大学国際先端科学技術研究機構の石田喬志助教、大学院先端科学研究部の澤進一郎教授らの研究グループは、ゲノム編集技術を用いて、ペプチドホルモンの一種である「CLEペプチド」を網羅的に破壊した遺伝資源コレクションを作成しました。さらに、このコレクションを用いて一つの未知の遺伝子の機能を明らかにしました。今後、このコレクションはペプチドホルモンが植物の生体内でどのように働いているかを研究するために役立つことが見込まれます。そのために世界中の研究者に向けてコレクションを公開する予定で、世界中で植物のペプチドホルモン研究が大きく加速することが期待されます。

### (説明)

- ペプチドホルモンは動物・植物を通じて重要な役割を担うと予想されているが、その多くは機能が解明されていない。
- ゲノム編集技術を使って植物ペプチドホルモン遺伝子の研究用遺伝資源を作成・公開した。
- 新たに確立した遺伝子破壊システムの突然変異体を使って一つの未知の遺伝子の機能を解明した。
- ペプチドホルモン研究に役立つ研究材料を公開したことに加え、今回の研究法が今後のペプチドホルモン研究のモデルケースとなることが期待される。

### 研究の背景と内容

今回、本研究グループは、モデル植物であるシロイヌナズナにおいて、ゲノム編集技術を活用したペプチドホルモンの網羅的遺伝子破壊を行い、今後の研究に活用される遺伝資源コレクションを作成しました。

近年、ゲノム編集と呼ばれる、特定の遺伝子を狙って破壊や書き換えを行う技術が注目を浴びています。中でも、CRISPR/Cas9（クリスパー・キャス9）という手法は2013年に確立されて以来、動物や酵母、植物と多くの生物種で成功例が報告されるようになってきています。以前からゲノム編集に使われてきた手法には手順が複雑なものが多く、多数の遺伝子を対象とした研究にはあまり向いていませんでした。しかし、CRISPR/Cas9は比較的簡単な手順で狙った遺伝子を破壊できるという大きなメリットがあります。この特性により、これまでは扱うことが難しかった遺伝子を破壊することで、生物個体や細胞にどのような影響が表れるのかといった研究を行うことができるようになってきました。

ペプチドホルモンは多くの生物の体内で様々な役割を持つ重要な物質です。近年の植物科学研究の発展により、ペプチドホルモンは細胞の数や組織の大きさの決定、受粉の制御、気候変動への応答、害虫や病気への対応など、非常に多くの場面で働いていることが明らかとなってきました。こういった植物ペプチドホルモンの研究は特に日本の研究機関から多数の論文が発表されており、日本のお家芸と言える分野の一つです。植物のゲノムにはまだ多くの機能未知なペプチドホルモンが眠っていると考えられており、多くの研究者がこういった遺伝子の研究に挑んでいます。しかし、このペプチドホルモンを作る遺伝子は非常に取り扱いが難しい代表的な遺伝子であり、今後の研究の発展のためにも更なる遺伝資源（研究材料）の充実が期待されていました。

このような背景を踏まえ、研究グループは発展著しいCRISPR/Cas9を活用すればペプチドホルモン研究を加速できるのではないかと考えました。植物研究のモデル植物であるシロイヌナズナには、ペプチドホルモンの一種である「CLEペプチド」を作る遺伝子が32種類存在します。これらの遺伝子を標的に1対1で対応する遺伝子破壊ツールを作成して植物に導入し、遺伝子破壊システムを確立しました。この遺伝子破壊システムから育てたシロイヌナズナ（突然変異体）は、それぞれ32種類の遺伝子が破壊されているため、1つ1つの遺伝子の機能を調べるのが可能です。

続けて、研究グループは作成した突然変異体の観察を行い、実際に遺伝子破壊を行ったことによる影響を調査しました。CLEペプチドの1つであるCLV3は、双子葉植物の双葉の間にある成長点の細胞の数を抑制的にコントロールする役割を持つことが知られています。本研究で作成されたCLV3遺伝子が破壊されたシロイヌナズナでは、予想通りに細胞の数が大幅に増加し、果実の形がいびつになることを観察しました。

さらに、今回作成した突然変異体を用いて、CLE44遺伝子の機能をはじめて明らかにしました。CLE44は維管束を構成する細胞の数をコントロールすると予想されていましたが、実証的な研究は行われていませんでした。今回作成した突然変異体を観察したところ、実際に維管束細胞が減少していることが確認できました。これにより、CLE44が本当に維管束を制御する役割を

持つことが示されました。さらに、今回の成果からは、CLE44 だけにとどまらず、私たちが作成した遺伝資源コレクションが未知のペプチドホルモンの研究に役立つ可能性を示唆していることができます。

本研究の成果は植物科学の専門誌「Plant and Cell physiology」に平成 29 年 9 月 25 日に掲載されました。

#### 論文名

A collection of mutants for CLE-peptide-encoding genes in Arabidopsis generated by CRISPR/Cas9 mediated gene targeting

(訳) CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊法を用いて作成された、シロイヌナズナの CLE ペプチド遺伝子の突然変異体コレクション

#### 論文著者・所属

Yasuka L. Yamaguchi<sup>1\*†</sup>, Takashi Ishida<sup>2\*\*</sup>, Mika Yoshimura<sup>2</sup>, Yuko Imamura<sup>1</sup>, Shinichiro Sawa<sup>1</sup>

1 Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, Kumamoto, Kumamoto, Japan

2 International Research Organization for Advanced Science and Technology, Kumamoto University, Kumamoto, Kumamoto, Japan

#### 雑誌名

Plant and Cell physiology

doi: doi.org/10.1093/pcp/pcx139

URL :

<https://academic.oup.com/pcp/article/4222595/A-collection-of-mutants-for-CLE-peptide-encoding>

#### 【お問い合わせ先】

熊本大学国際先端科学技術研究機構

担当：石田喬志 助教

電話：096-342-3436

e-mail: ishida-takashi@kumamoto-u.ac.jp

- ① 遺伝子破壊ベクターの作成
- ② 遺伝子破壊ベクターを植物に導入
- ③ 第一世代植物の選抜
- ④ ゲノム編集効率のチェック
- ⑤ 第一世代の植物内で多数のゲノム編集イベントが起きる
- ⑥ 第二世代植物の中からゲノム編集ツールを持たないものを選抜する  
(以降の予測できないゲノム編集を予防するため)
- ⑦ 選抜された植物の中からさらに  
標的の遺伝子が破壊されている個体を選抜
- ⑧ 遺伝子破壊系統の確立  
コレクションとして公開

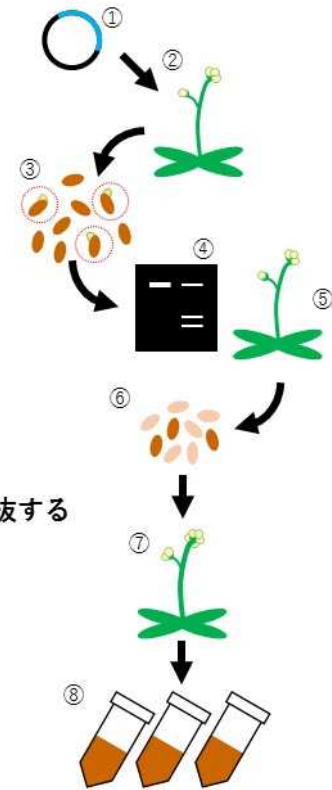
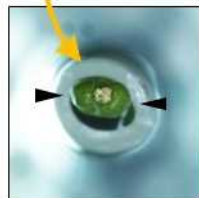
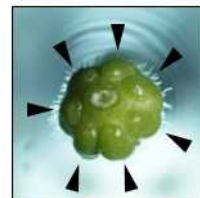


図 1 : 本研究における遺伝子破壊系統の作成手順

普通のシロイヌナズナ  
(果実)



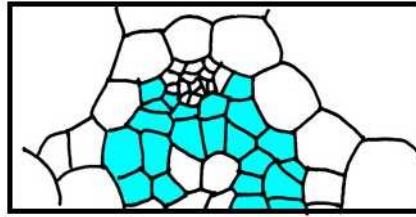
CLV3ペプチド遺伝子の  
突然変異体



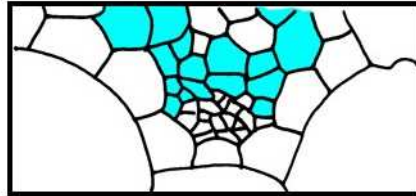
果実を上から見た写真。突然変異体では果実を構成する組織の数が増えている

図 2 : 作成した突然変異体で、特定の遺伝子の機能が破壊されていることを確認

普通のシロイヌナズナ



CLE44ペプチド遺伝子の  
突然変異体



CLE44が制御する前形成層細胞を水色で示す。  
CLE44突然変異体では細胞の数が減っている。

図 3 : CLE44 突然変異体を用いて、CLE44 遺伝子の機能を実証