

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07253

研究課題名(和文)人工制限酵素CRISPR/Cas9を利用した アミノ酪酸高蓄積トマトの育種

研究課題名(英文)Utilization of CRISPR/Cas9 for breeding of High GABA content tomato

研究代表者

野中 聡子(NONAKA, Satoko)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：50580825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酪酸(GABA)はは血圧抑制効果が期待でき、健康機能性成分として注目を集めている。GABAの代謝経路に関する研究が多数なされており、GABA合成酵素(GAD)およびGABA分解酵素GABAアミノ基転移酵素(GABA-T)が見出されてきた。GADはC末端に自己阻害ドメインを持ち、その切除の過剰発現によりGABAが高蓄積することも知られている。そこで、本研究では、ゲノム編集技術CRISPR/Cas9を用いて、GADのC末端を切除し、GABAが高蓄積するトマトを作出した。また、作出した系統のF1育種の親としての利用の可能性も評価した。

研究成果の概要(英文)：Gamma aminobutyric acid (GABA) exists in animals, microorganisms and plants. GABA is effective on blood pressure suppressing effect can be expected. Many studies ave been identified the GABA synthetase (GAD) and GABA degrading enzyme (GABA-T). Although Tomato has high GABA content among vegetables, the concentration is not enough for the suppression of hypertension. Therefore, further high GABA content is required. From the previous studies, five GADs and three GABA-T were found in tomato. GAD has an autoinhibitory domain at the C-terminus, and the excision increased the activity, and high GABA accumulation. Therefore, in this study, using the CRISPR / Cas9, the C-terminus was excised. GABA increased about 15 times higher than control. We also evaluated the possibility of utilization as parents of F1 breeding. It also showed that GABA accumulation increased by 2-3 times in the strains produced and was useful as a parent of F1.

研究分野：植物分子育種

キーワード：GABA ゲノム編集技術 トマト

1. 研究開始当初の背景

アミノ酪酸(Gamma Amino Butyric Acid, GABA)は、4つの炭素骨格からなる非タンパク質構成アミノ酸である。動物においては抑制性の神経伝達物質として知られており、ストレス緩和や血圧上昇抑制など、健康機能性成分として注目されている。WHOによれば、高血圧症に苦しむ人は世界中に10億人以上いるとされ、中でも高血圧症予備群とされる軽症高血圧者や通常高血圧者への予防策は喫緊の課題となっている。軽症高血圧者や通常高血圧者へは投薬治療よりも“食”を通じた対策が有効と考えられている。GABAは食品に多く含まれることから、“食”を通じた血圧上昇抑制効果が期待できる。このため、関連する研究がこれまでに数多くなされてきた。GABA代謝経路についても詳細な研究がなされており、その経路が明らかにされつつある(図1)。

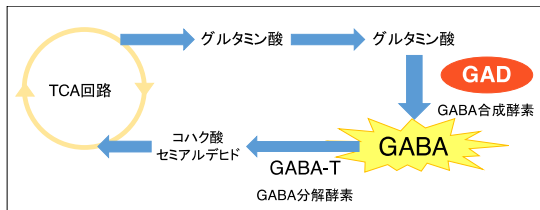


図1. GABA 生合成経路図

これまでの食品を通じたGABAの血圧上昇抑制作用に着目した研究の対象はイネ、チャ、発酵食品(発酵乳、発酵大豆、醤油)などのローカルフードが中心であった。世界中に存在する高血症予備軍に対応するためには、ローカルフードではなく世界中で広く食される食品での研究が必要であった。トマトは、世界的に生産量と消費量共に多い野菜の一つである。また、GABA含有量は他の食品と比較して2-50倍と高いことが知られている。しかしながら、現状では健康機能効果が得られるのに十分な蓄積量に達してはいない。一方で栽培環境によりGABA量が2-4倍増減することも報告さ

れており、トマトにおいてGABAを安定的に高蓄積化することが求められていた。

トマトにおいては、5つのGABA生合成酵素(*SIGAD1-5*)遺伝子、3つのGABA分解酵素(*SIGABA-T1-3*)遺伝子が見出されていた。特に*SIGAD2*及び*SIGAD3*が果実のGABA生合成に関連することが明らかにされていた。GABAの高蓄積のためにGADの活性上昇かGABA-Tの抑制が有効であると考えられるが、これまでの研究からGABA-Tの発現抑制は、GABA蓄積の向上が認めれたものの、形態異常や矮化、不稔を引き起こすことが知られていた。GADは、バクテリア、動物、植物において広く保存されているが、植物のGADだけがC末端領域が長い構造をしていた。植物の末端領域の機能に関する研究がなされており、ペチュニアやイネを用いた研究から、植物のGADはC末端領域に自己阻害領域を持つことが明らかにされた。植物細胞内において、カルシウムイオンが過剰な条件下で、カルシウムカルモデュリン複合体を形成する。カルシウムカルモデュリン複合体は、GADのC末端領域へ結合し、自己阻害機構を解除する。また、細胞内のpHの低下によっても自己阻害機構が解除される。植物のGABAの生合成は、C末端に存在する自己阻害機構により精緻に制御することが知られている。

自己阻害領域を含むC末端領域を切除したGAD遺伝子を遺伝子組換え技術を用いてタバコやイネで過剰発現させたところ、GABAが高蓄積することが知られている。トマトでも同様にGABAが高蓄積した。これらの結果を受けて、GABA高蓄積トマトの作出のために、*SIGAD*のC末端領域へ変異を導入し、C末端領域の直前にストップコドンが挿入され、自己阻害領域が切除された*SIGAD*を持つトマトの作出を計画した。ゲノム上の標的配列にのみ変

異を導入するには、ゲノム編集技術の利用が有効であると考え、これを利用することとした。

ゲノム編集技術とは、ゲノム上の標的とする遺伝子のみを改変することを可能にする技術である。ゲノム編集による遺伝子の改変は、まずゲノムの標的とする部分を切断することから始まる。植物をはじめ、生物はゲノムが切断されたままだと、生命活動をうまく維持できません。そこで、生物は切断されたゲノムを修復する様々な仕組みを獲得してきました。生物は多くの場合、切断されたゲノムを素早く修復できる非同末端結合修復機構を利用して修復する。この修復機構は、切断されたゲノムを素早く修復できる一方で、間違いが起りやすいため、間違いがちな修復機構とも言えます。生物がゲノムを“間違えて修復”した場合に遺伝子の改変が誘発される。

これまで遺伝子へ変異を導入する際は、放射線や化学物質などを変異源としてゲノム上にランダムに導入される。数万系統を作出し、有用な形質を示す系統を選抜し育種へ利用されている。ゲノム編集技術は理論上、ゲノム上の標的とする遺伝子の変異を導入することが可能な技術であり、この技術を育種へ応用することができれば、従来の方法に比べ選抜に割く労力を大幅に省くことができると期待されている。

CRISPR/Cas9(Clustered regulated interspaced short paridnormic repeats/CRISPR-associated protein 9)は 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)である。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。Zinc Finger Nuclease (ZFN), Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN)

など他の人工制限酵素がタンパク質と DNA の相互作用を利用し、特定の標的塩基配列を認識し DNA の二重鎖切断を引き起こすのに対し、CRISPR/Cas9 は、ガイド RNA(gRNA)と DNA の塩基対形成で 20 塩基程度の標的塩基を認識し DNA の二重鎖切断を引き起こす。標的配列には、その 3'側に PAM と呼ばれる配列を必要とする。現在広く用いられている化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)の Cas9 が認識する PAM 配列は 5'-NGG-3'(N は任意の塩基)であり、ZFN や TALEN と比較して標的配列の選択について自由度が大きい。このため ZFN や TALEN よりも汎用性が高いとされている。

CRISPR/Cas9 は元来、真正細菌や古細菌が有する仕組みで、ファージ(細菌に感染するウイルス)感染の防御機構である。ファージは真正細菌や古細菌へ遺伝子を導入し感染する。これを防御するために、真正細菌や古細菌はファージによって導入された遺伝子を CRISPR/Cas システムにより切断します。植物でゲノム編集を行う際は、真正細菌や古細菌が持つ遺伝子を切る CRISPR/Cas を改良し使用している。CRISPR/Cas9 の育種への利用の可能性については未知数である。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集技術を用い、*SIGAD2* 及び *SIGAD3* の C 末端領域の自己阻害領域の直前を標的とし改変をくわける。自己疎外領域の直前の領域へ CRISPR/Cas9 システムにより二重鎖切断を誘発し、その修復の際に塩基置換、塩基挿入、塩基欠損が誘発された個体を選抜する。自己阻害領域の直前に STOP コドンが挿入されたを改変し GABA を高蓄積するトマトの開発に取り組むことを目的とした。また、CRISPR/Cas9 の育種への利用の可

能性についても検討する。

3. 研究の方法

ゲノム編集部位の決定後、CRISPR/Cas9 発現ベクターを構築し、実験品種 'Micro-Tom' へ形質転換した。T₀ 世代において、SIGAD2 及び SIGAD3 への変異導入と C 末端領域の切除を確認した。また、赤熟果実における GABA 含量を測定し、有効な系統を選抜した。T₀ で選抜した有効な系統の T₁ 世代を獲得し、ジェノタイプと変異型の調査と形質調査を実施した。ゲノム編集により GABA 高蓄積した 'Micro-Tom' と大玉品種愛知ファーストを交雑し、ゲノム編集系統が GABA 高蓄積トマトの F₁ の親としての有効性について検証した。

4. 研究成果

SIGAD2 および SIGAD3 の C 末端をターゲットにする CRISPR/Cas9 ベクターを構築した。SIGAD2 はストップコドンから 48 アミノ酸残基または、30 アミノ酸残基を標的とした。また、SIGAD3 はストップコドンから 37 アミノ酸残基を標的とし、それぞれ CRISPR/Cas9 ベクターを構築した。合計で 3 種類の CRISPR/Cas9 ベクターを構築後、アグロバクテリウム法により実験矮性品種トマト 'Micro-Tom' へ導入した。SIGAD2 C30, SIGAD2 C48, SIGAD3 C37 の形質転換個体はそれぞれ 16, 14, 35 個体であった。これらすべての系統について標的配列をサンガー法により確認した。この結果、SIGAD2 C30, SIGAD2 C48, SIGAD3 C37 の形質転換個体のうち 10, 9, 32 個体で標的配列に変異が導入されていることが確認された。赤熟果実における GABA 含量を測定した。野生型と比較して赤熟果実において GABA 含量が 10 倍上昇した変異導入系統を見出した。続いて、T₁ 世代については SIGAD2 及び SIGAD3

の変異導入ホモ系統を得て解析した。SIGAD2 変異導入ホモ系統に関して、T₁ 世代では生育異常があり、測定に十分なだけの果実を収穫できなかった。一方で、SIGAD3 変異体については生育異常は認められなかった。この SIGAD3 変異体における、赤熟果実の GABA 含量は、野生型と比較して 15 倍上昇しており、蓄積量は 125mg/100gFW に達していた(図 2)。GABA の経口摂取により、血圧上昇抑制

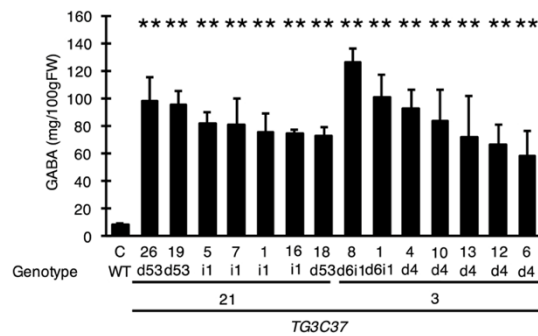


図 2. 赤熟果実における GABA 含量(T₁ 世代) 効果が得られる量は、1 日あたり 10-20mg である。これらのことから、本研究で得られた変異遺伝子座を食用品種へ導入し、同程度の GABA 蓄積量を実現することができれば、くし形切りトマトを 1 日 1 食おらずに添えるだけで、軽度高血圧や正常高血圧の改善につながると期待できる。

そこで、変異遺伝子座を食用大玉品種へ交配により導入することを試みた。また、ゲノム編集により作出した系統が F₁ 育種親に利用可能かについても同時に検証した。実験用矮性品種 'Micro-Tom' を用いて作出したゲノム編集系統と食用大玉品種を交配し F₁ 世代を得て形質評価をしたところ、GABA 含有量を健康機能効果が期待できるほど十分に増加させることに成功した。また、GABA 含有量以外に形質に大きな差が出なかった。これらの結果は、本研究で得られた SIGAD3 の C 末端へ導入した変異が食用大玉品種においても GABA 高蓄積形質を付与することが可能

であること、ヘテロで機能することを示す。F₁ 育種へ利用する際には両親へゲノム編集をおこなう必要はなく、片親だけで十分であることも明らかになった。ゲノム編集技術を利用することにより、形質によってはこれまでに10年かかるとされてきた育種の期間を大幅に短縮することが可能である。また、本研究で対象とした形質のように部位得意的に変異を導入し有用形質を付与するためのツールとしてはかなり有効であることが明らかになった。しかしながら、当然複数の遺伝子の組み合わせにより現れる形質などはゲノム編集技術だけでは難しい部分もある。将来的には従来育種法とゲノム編集技術をうまく組み合わせながら利用し、得たい形質に合わせて利用する育種ツールの選択肢の一つに位置付けられることが望ましいと考えられる。

10.1038/s41598-017-06400-y. (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 聡子 (NONAKA, Satoko)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：50580825

(2) 研究分担者

松倉 千昭 (MATSUKURA, Chiaki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60361309

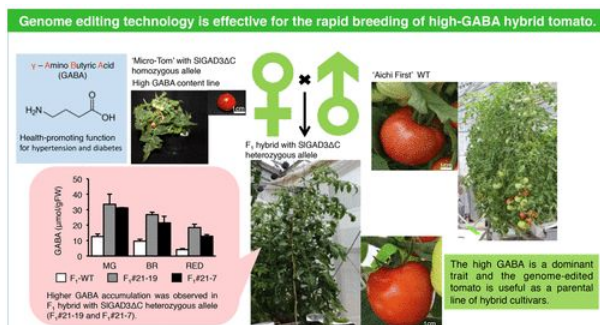


図3 F₁ 雑種とその形態観察

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) Lee J, Nonaka S, Takayama M, Ezura H. (2018) Utilization of a genome-edited Tomato (*Solanum lycopersicum*) with High Gamma aminobutyric acid content in hybrid breeding. *J Agric Food Chem.* 2018 66: 963-971(査読有)
- (2) Nonaka S, Arai C, Takayama M, Matsukura C, Ezura H. (2017) Efficient increase of γ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Sci Rep.* 2017 7:7057. doi: