

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14832

研究課題名（和文）世界の10億人を養う熱帯作物キャッサバにおけるゲノム編集基盤技術の確立

研究課題名（英文）Establishment of genome editing technology in a tropical crop, cassava, that feeds 1 billion people worldwide

研究代表者

関 原明（Seki, Motoaki）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：80281624

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：キャッサバは世界の10億人の、食糧安全保障上そして貧農の生活改善上重要な役割を果たしている熱帯のデンプン資源作物である。キャッサバにおけるゲノム編集技術の基盤確立を目指して、CRISPR/Cas9システム（DNA二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入することができる画期的な遺伝子改変技術）を導入し、澱粉枝作り酵素遺伝子に対象を絞って研究を進めた。作出系統について解析したところ、ゲノム編集パターンと澱粉枝作り酵素活性との間に相関性が認められ、澱粉枝作り酵素遺伝子がゲノム編集されていることを確認した。本研究の実施により、キャッサバにおけるゲノム編集システムの基盤を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キャッサバは世界の10億人の、食糧安全保障上そして貧農の生活改善上重要な役割を果たしている熱帯のデンプン資源作物である。本研究では、CRISPR/Cas9システム（DNA二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入することができる画期的な新しい遺伝子改変技術）をキャッサバに導入し澱粉枝作り酵素遺伝子に対象を絞って研究を進め、キャッサバにおける植物ゲノム編集システムの基盤を確立した。今後、キャッサバにおいてゲノム編集技術の活用により基礎研究および応用研究の発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：Cassava is a tropical starch crop that plays an important role in food security and improving the livelihood of poor farmers in the world's 1 billion people. In this study, we have targeted the starch branching enzyme gene by the introduction of the CRISPR/Cas9 system for establishing the basis of genome editing technology in cassava. A correlation between the genome editing pattern and the activity of the starch branching enzyme was observed in the plants produced by genome editing, showing the successful genome editing in the starch branching enzyme gene of cassava. In the future, the development of basic and applied research in cassava is expected by the use of the genome editing technology.

研究分野：植物ゲノム発現制御

キーワード：キャッサバ ゲノム編集 澱粉枝作り酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CRISPR/Cas9 システムは、DNA 二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入することができる画期的な新しい遺伝子改変技術で、ヌクレアーゼである Cas9 と、切断したい標的認識配列を含む guide RNA から構成されている。CRISPR/Cas9 システムを用いて様々な生物種において標的変異導入の成功例が報告されている。連携研究者の土岐らはシロイヌナズナやイネなどのモデル植物に最適化させた CRISPR/Cas9 システムを構築している (Endo et al. 2015)。植物に CRISPR/Cas9 システムを導入するためには、高効率な形質転換系の開発が重要である。キャッサバの形質転換に関して、これまで有用遺伝子を用いた過剰発現や RNAi 干渉に関する報告例は多くあるが、CRISPR/Cas9 の利用による植物ゲノム編集法に関わる報告例は皆無である。植物を用いた CRISPR/Cas9 システムに関する報告例はほとんどの場合シロイヌナズナやイネ等のモデル植物に限定されており、キャッサバなど有用バイオマス資源作物におけるシステムの有効性はこれまで報告されていない。その理由の 1 つとして、キャッサバの形質転換系が安定に動いているラボは国際的にも数少ない(わが国では本申請代表者のグループのみ)点がある。

キャッサバにおいて、標的遺伝子に有効に変異を導入するシステムが開発されると、キャッサバの有用遺伝子(塊根収量増産、デンプンの量的・質的改良などに関与する遺伝子)の単離・同定、それら遺伝子の形質転換による有用キャッサバの開発・育種の飛躍的な推進が期待される。多くの日系バイオ企業がキャッサバデンプンを利用して種々の食料、産業用原材料(バイオエタノール、バイオプラスチック、アミノ酸など)を生産しているため、食・バイオ資源の安定確保を通して持続可能な社会の構築、ASEAN 諸国(タイ、ベトナム)などとの科学技術外交への貢献も将来期待される。

2. 研究の目的

キャッサバは世界の 10 億人(特にアフリカ、東南アジア、ラテンアメリカなどの熱帯地域)の、食糧安全保障上そして貧農の生活改善上重要な役割を果たしている熱帯のデンプン資源作物である。本研究では、CRISPR/Cas9 システム(DNA 二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入することができる画期的な新しい遺伝子改変技術)を熱帯作物キャッサバに導入し、キャッサバにおける植物ゲノム編集システムの基盤確立を目指す。本研究は、キャッサバ形質転換技術を確立した研究者と植物の CRISPR/Cas9 システムに関して経験・ノウハウを有する研究者による斬新な着想や方法論に帰する稀な共同研究である。

3. 研究の方法

本研究で、CRISPR/Cas9 システムを熱帯作物キャッサバに導入し、キャッサバにおける植物ゲノム編集システムの基盤確立を目指す。標的遺伝子として澱粉枝作り酵素を用いて(この遺伝子が破壊されても致死にはならず、また破壊により生じる澱粉品質の解析により形質を評価しやすい)、種々のプロモーターを用いたベクターを構築し、キャッサバへ導入しトランスジェニックキャッサバ植物を作出する。得られたトランスジェニック植物系統を解析(標的遺伝子の配列が改変されたか、澱粉枝作り酵素の酵素活性やデンプンの解析など)し、どのベクターを用いて形質転換をするのがいいか評価する。解析を通してキャッサバにおける植物ゲノム編集システムの基盤を確立する。

4. 研究成果

標的遺伝子を澱粉枝作り酵素にして研究を進めた。guide RNA を 35S プロモーター(pCaMV35S:gRNA)で発現させる融合遺伝子断片と Cas9 ヌクレアーゼ遺伝子をパセリのユビキチン遺伝子プロモーターで発現させる融合遺伝子断片(pCaMV35S:gRNA-pPcUbi:Cas9)を導入したトランスジェニックキャッサバ 48 個体、また pCaMV35S:gRNA と Cas9 ヌクレアーゼ遺伝子を 35S プロモーターで発現させる融合遺伝子断片(pCaMV35S:gRNA-pCaMV35S:Cas9)を導入したトランスジェニックキャッサバ 96 個体を得た。当初、Pol II 遺伝子プロモーターで Cas9 と guide RNA を一つの mRNA として転写させ、ribozyme 配列を用いて guide RNA を切り出すベクターの構築も計画していたが、キャッサバ由来の Pol II プロモーターの単離に関して、phytozome データベースの BLAST 解析の結果から複数個の遺伝子の存在が示唆され、遺伝子同定が困難であるためベクター構築を断念した。

トランスジェニックキャッサバの葉からゲノム DNA を抽出し、それを鋳型に用いて PCR を行った。ダイレクトシーケンス法による波形パターンの変化または制限酵素処理による制限酵素反応部位の欠失をもとに澱粉枝作り酵素遺伝子上のゲノム配列が編集されたか確認した。pCaMV35S:gRNA-pPcUbi:Cas9 の 48 系統の内 29 系統でゲノム編集を確認でき、pCaMV35S:gRNA-pCaMV35S:Cas9 の 96 系統の内 12 系統でゲノム編集を確認できた。pCaMV35S:gRNA-pPcUbi:Cas9 の組み合わせでより高い編集効率を得ることができた。ゲノム編集ラインについて解析したと

ころ、ゲノム編集パターンと澱粉枝作り酵素活性との間に相関性が認められ、澱粉枝作り酵素遺伝子がゲノム編集されていることを確認した。ゲノム編集ラインの塊根から澱粉を抽出後、アミロペクチン鎖長分布解析を行った結果、アミロペクチンの A 鎖、B1 鎖に相当するグルコース重合度 24 以下の割合に変化が観察された。本研究の実施により、キャッサバにおけるゲノム編集システムの基盤を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Seki M, Tokunaga H, Utsumi C, Okamoto Y, Moriya E, Vu TA, Sakamoto A, Takei Y, Sakurai T, Endo M, Mikami M, Toki S, Tsuji H, Narangajavana J, Triwitayakorn K, Sojikul P, Nguyen AH, Do QTN, Nguyen DV, Nguyen VA, Le HH, Pham NT, Nguyen HH, Touch B, Srean P, Wongtiem P, Ishitani M and Utsumi Y	4. 巻 Theme 10
2. 論文標題 Advancement of Asian Cassava Molecular Breeding towards SDGs.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the 18th Science Council of Asia (SCA) Conference "Role of Science for Society: Strategies towards SDGs in Asia", Dec. 5-7, 2018, Tokyo, Japan	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Utsumi, Y., Utsumi, C., Tanaka, M., Ha, T.V., Matsui, A., Takahashi, S. and Seki, M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Formation of Friable Embryogenic Callus in Cassava is Enhanced under Conditions of Reduced Nitrate, Potassium and Phosphate	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0180736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0180736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 内海好規, 徳永浩樹, 内海雅佳子, 櫻井哲也, Dong Van Nguyen, Vu Anh Nguyen, Jarunya Narangajavana, Ham Huy Le, 石谷学, 関原明	4. 巻 7
2. 論文標題 東南アジア諸国との連携による澱粉作物キャッサバの分子育種	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 応用糖質科学	6. 最初と最後の頁 143-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Patanun, O., Ueda, M., Itouga, M., Kato, Y., Utsumi, Y., Matsui, A., Tanaka, M., Utsumi, C., Sakakibara, H., Yoshida, M., Narangajavana, J., and Seki, M.	4. 巻 7
2. 論文標題 The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid alleviates salinity stress in cassava.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 2039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2016.02039.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Seki M, Tokunaga H, Utsumi C, Okamoto Y, Moriya E, Vu TA, Sakamoto A, Takei Y, Sakurai T, Endo M, Mikami M, Toki S, Tsuji H, Narangajavana J, Triwitayakorn K, Sojikul P, Nguyen AH, Do QTN, Nguyen DV, Nguyen VA, Le HH, Pham NT, Nguyen HH, Touch B, Srean P, Wongtiem P, Ishitani M and Utsumi Y
2. 発表標題 Advancement of Asian Cassava Molecular Breeding towards SDGs.
3. 学会等名 The 18th Science Council of Asia (SCA) Conference "Role of Science for Society: Strategies towards SDGs in Asia" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Utsumi, Y., Tokunaga, H., Utsumi, C., Endo, M., Saika, H., Toki, S., Ishitani, M., Tsuji, H. and Seki, M.
2. 発表標題 Advancement of Asian Cassava Molecular Breeding by the use of genome editing technologies towards SDGs
3. 学会等名 Inter-project Joint Open Seminar - New prospect of agriculture and bioindustry using genome editing technology - (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seki, M.
2. 発表標題 Overview of RIKEN Cassava Project and Application of Genome Editing Technology to Cassava Research
3. 学会等名 The International Symposium on "Current Advances of Genome Editing Technology and its Application in Crop Improvement" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内海好規, 内海稚佳子, 武井良郎, 平野智也, 阿部知子, 石谷学, 櫻井哲也, Dong Van Nguyen, Vu Anh Nguyen, Kanokporn Triwitayakorn, Jarunya Narangajavana, Ham Huy Le, 関原明
2. 発表標題 東南アジア諸国との連携による澱粉作物キャッサバの分子育種
3. 学会等名 第5回応用糖質フレッシュシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 内海好規, 内海稚佳子, 田中真帆, 藤田直子, 中村保典, 関原明
2. 発表標題 キャッサバ (Manihoto esculenta) の澱粉枝作り酵素 (Starch Branching Enzyme, SBE) の機能解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成28年度大会 (第65回)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立研究開発法人理化学研究所環境資源科学研究センター植物ゲノム発現研究チームホームページ http://www.csr.s.riken.jp/jp/labs/pgnrt/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	内海 好規 (Utsumi Yoshinori) (80510221)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員 (82401)	
連携研究者	土岐 精一 (Toki Seiichi) (80212067)	国立研究開発法人農業生物資源研究所・農業生物先端ゲノム研究センター・ユニット長 (82112)	