

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07636

研究課題名（和文）ゲノム改変効率化のためのリンゴ小孢子培養系の確立

研究課題名（英文）Establishing microspore culture for efficient genome editing in apple.

研究代表者

小森 貞男（KOMORI, Sadao）

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：00333758

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：リンゴのゲノム編集の効率化を目的として小孢子培養、葯培養、成長点および珠心細胞に由来するカルスからのシュート再分化実験を行った。小孢子培養では‘ふじ’等の4品種でカルスの形成および心臓型胚の形成に成功した。倍加半数体品種の‘95P6’は葯培養において他品種より胚様体形成率およびシュート形成率が高く、実験材料として好適であることが判明した。

‘ふじ’、‘王林’等のカルスを用いた実験では、成長点に由来するカルスからはシュートが直接再分化し、開花後30日と40日の珠心細胞からは不定胚が形成された。この実験によりカルスからの直接シュート再分化と不定胚経由でシュートを形成する二つの系の作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集技術の発展には様々な培養系の確立が必須であるが、これまでリンゴで形質転換実験・ゲノム編集実験に適用できる培養系は葉切片からの直接再分化系のみであった。今回の研究成果によってアグロバクテリウム法などの形質転換によらないゲノム編集の実現に一步近いた。ゲノム編集技術の発展は、リンゴ育種の効率化を通してリンゴ生産者および消費者の利益につながり、学術的には研究の国際競争力の向上に資するものである。

研究成果の概要（英文）：Microspore culture, anther culture, and experiments of shoot regeneration from calli derived from apical meristem and nucellar cells were conducted to achieve efficient genome editing in apple. For microspore culture, four cultivars included ‘Fuji’ formed callus and/or a heart-shaped embryo. From anther culture, ‘95P6’, which is doubled haploid cultivar, showed a higher embryo formation rate and a higher shoot regeneration rate than those of other cultivars. Results suggest ‘95P6’ as suitable for experiments such as genome editing.

In experiments using calli in ‘Fuji’ and other cultivars, the calli derived from apical meristem formed shoots directly. The calli derived from nucellar cells excised from seeds at 30-40 days after anthesis formed adventitious embryos. From results of these experiments, we established two cultural systems: direct shoot regeneration from calli and shoot regeneration from calli via nucellar cells.

研究分野：農学

キーワード：果樹園芸学 リンゴ 小孢子培養 葯培養 カルス 成長点 珠心細胞 シュート再分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者はCRISPR/Cas9技術を用いて世界で初めてリンゴのゲノム編集に成功したが (Nishitani et al., 2016)、この方法ではアグロバクテリウムを用いてリンゴゲノム内にCRISPR/Cas9構造を組み込んでおり交雑により挿入配列を除去する必要がある。リンゴでゲノム編集をより効率的に行い、育種に適用できる技術にするためには、ゲノム内にCRISPR/Cas9構造を挿入せず (アグロバクテリウム法を用いず) にCRISPR/Cas9等をリンゴの培養組織に外生処理するなどの新たな技術開発が必要である。

(2) 外生処理の効果を最大限に発揮させる培養系は1細胞由来のシュート再分化系であるが、リンゴはカルス経由のシュート再分化が確立されていないうえ、系の確立は困難が予想される。そこで、申請者が既に確立しているリンゴの薬培養技術 (Zhang et al., 2013; 2017) をさらに発展させた小胞子培養系をゲノム編集技術に適用することを着想した。

2. 研究の目的

(1) リンゴは葉切片を用いたゲノム編集が可能になったが、編集効率向上のためには1細胞由来のシュート再分化系の構築が必要である。リンゴで確立されている1細胞由来の再分化系は薬培養と小胞子培養系のみで、小胞子培養の成功例は1例のみである。花粉粒由来の倍加半数体(DH)の遺伝的背景は斉一ではなく実験の再現性に問題がある。そこで、稔性を有するDHの花蕾を用いて培養を行うことで遺伝的に斉一な再現性のある1細胞由来の再分化系を作出する。

(2) リンゴのゲノム編集はアグロバクテリウムを用いてリンゴゲノム内にCRISPR/Cas9構造を組み込んでおり交雑により挿入配列を除去する必要がある。交雑で挿入配列を除去すると本来の品種と遺伝子組成が異なってしまうため、DH等の培養組織に外生処理を行い再分化シュートを誘導するための新たな培養技術の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) リンゴにおける小胞子培養系の確立：リンゴで小胞子培養に唯一成功しているHöferら (1999)およびHöfer (2004)による実験系を日本の主力品種等を用いて再現する。薬培養では胚様体誘導培地に置床する前の花蕾の低温処理期間が胚様体形成率に大きく影響することから、小胞子培養で花蕾の低温処理方法を検討する。小胞子培養には液体培地を使用し(Höfer,2004)、液体培地中の小胞子密度が小胞子からの再分化に大きな影響を及ぼすとされている。したがって、リンゴの小胞子培養に最適な小胞子密度を決定する。また、DH品種('95P6')等の薬培養、小胞子培養による個体再生実験を行う。

(2) 本来の品種と遺伝子組成を維持したカルス由来の再分化系の開発：アグロバクテリウム法を用いない一過的発現によるゲノム編集を実現するために、成長点や珠心細胞等を利用したカルス経由のシュート再分化系の開発を行う。

4. 研究成果

(1) リンゴの小胞子培養

Höfer ら (1999)および Höfer (2004)の方法を用いて 'Alkmene'、'American Summer Pearmain'、'ふじ'、'Gala'、'Reka'、'Remo'、'世界一'、'千秋'、'Starking Delicious'、'95P6' の10品種の小胞子培養を行った。中心花紅蕾期の花蕾を採取し、4°Cで3日間および10日間の低温処理を行った。小胞子密度は 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 の4区を設定した。実験結果を表1に示した。

品種間差

'American Summer Pearmain'、'Reka'、'世界一'、'千秋'、'Starking Delicious'、'95P6'の6品種は小胞子のままでカルスを形成しなかった。残りの4品種はカルスを形成し、少数ながら心臓型胚に至ったカルスもあった。カルスを形成した4品種について、得られたすべてのデータを用いて品種間差を調査したところカルス形成率は'Remo' 11.83%、'Alkmene' 10.97%、'Gala' 7.59%、'ふじ' 4.05%の順であった。有意差は認められなかった。

低温処理日数

低温処理を3日間行った場合のカルス形成率は10.76%、10日間の場合は8.33%で有意な差は無かった。

表1 小胞子培養によるカルス形成率

品種	反復数	カルス形成率 (%)		
		Mean	SD	
Alkmene	25	10.972	± 12.729	NS
Remo	23	11.829	± 7.787	
Gala	10	7.586	± 7.644	
Fuji	3	4.050	± 0.420	
低温処理日数				NS
3	52	10.758	± 10.369	
10	9	8.331	± 7.713	
小胞子密度				
10^4	5	25.224	± 5.402	a
10^5	17	13.068	± 11.032	b
10^6	36	7.779	± 8.039	b
10^7	3	2.023	± 0.645	b

異なるアルファベットは5%水準で有意 (Tukey-Kramer HSD検定)
NS: 有意差なし

小孢子密度

小孢子密度が 10^4 の場合、カルス形成率は 25.22%、以下 10^5 の場合は 13.07%、 10^6 では 7.78%、 10^7 は 2.02% であった。小孢子密度が 10^4 とそれ以外の区に 5% 水準で有意な差が認められた。Höfer ら (1999) および Höfer (2004) は 10^6 が最適と報告しているが今回の実験ではより密度が低い 10^4 が効果的である可能性が示された。

以上の結果から、Höfer らが小孢子培養に成功した 'Remo'、'Alkmene' 以外にも 'Gala' および 'ふじ' で小孢子培養により再分化個体を獲得できる可能性があることが明らかになった。DH の '95P6' はカルスを形成しなかった。薬培養では 'American Summer Pearmain'、'世界一'、'千秋'、'Starking Delicious'、'95P6' が個体を再生しやすいが、小孢子培養ではこの 5 品種はカルス形成が確認できなかった。このことから小孢子培養を行いやすい品種と薬培養による胚様体形成およびシュート再生が可能な品種とは異なることが推察された。今後も小孢子培養、薬培養を行い知見を蓄積する必要がある。

'95P6'等の薬培養

DH 個体の薬培養による再分化系を確立する目的で '千秋' の薬培養によって作出された '95P6' の花粉を用いて薬培養を行った。培養方法は Zhang ら (2013; 2016) と同様である。供試品種は 'American Summer Pearmain'、'ふじ'、'千秋'、'Starking Delicious' および '95P6'、各品種 5000 から 10000 個の薬を用いて培養を行った。

2019 年の薬培養は、サンプリング前の気温経過が花粉発達に不適だったことから '95P6' 以外の 4 品種はほとんど胚様体を形成しなかった。一方、'95P6' は 2.40% の胚様体形成率を示した。さらに置床薬数を母数にした場合 0.18% (胚様体を母数にした場合 7.54%) のシュート形成率を示した。'95P6' の薬培養に関する過去のデータは無いため花叢採取までの好適な積算温度・日数は不明であるが、一度薬培養を経て作出された品種は薬培養に不適な気温経過であっても高い胚様体形成能およびシュート形成能を示すことが推察された。以上の結果から、DH 個体は遺伝的に固定されており薬培養による個体再生が比較的容易と推察されるため、実験材料として好適であると考えられた。

(2) 成長点に由来するカルスからのシュート再分化系

リンゴにおけるカルスからの再分化実験に成功している Saito・Suzuki (1999) および Caboni et al. (2000) (以下 Caboni) が実験で使用したシュート増殖培地、カルス誘導培地、カルス液体増殖培地、シュート誘導培地を組み合わせ、成長点由来カルスからの再分化に有効な培養手順の調査を行った。なお、シュート増殖培地には 1001 培地 (伊藤ら, 1997; 小森ら, 1997) および 1001 培地から IBA を除いた 1000 培地の 2 種類を加えた。材料には継代で維持している 'ふじ' を使用した。設定した手順および実験結果を表 2 に示した。

最もシュート分化率が高く、カルス当たりのシュート本数が多かった培養手順は No.1-1 であった。すなわち成長点切り出しまでの増殖培地は 1001 培地で行い、カルス誘導培地は Caboni、カルス増殖液体培地は使用せず、カルス誘導培地から直接 Caboni のシュート誘導培地に置床する手順であった。カルス当たりのシュート本数が 2.11 本と少ないが、カルスからのシュート再分化には成功した。今後、増殖培地での光条件や初代培養後の期間を検討することでシュートマスを実現する培養条件と再分化能を維持するためのカルス増殖・維持条件を確定する必要がある。

表2 'ふじ'の成長点由来のカルスからのシュート誘導

全培養 手順	培養手順				シュート再分化率 (%)				シュート本数			
	シュート 増殖培地	カルス 誘導培地	カルス 増殖液体培地	シュート 誘導培地	反復	平均値	± 標準偏差	カルス数	平均値	± 標準偏差		
No.1-1	1001	Caboni	無	Caboni	6	94.44	± 13.64	a	36	2.11	± 0.75	a
No.1-2	1001	Caboni	無	Saito	6	35.55	± 35.00	b	39	0.69	± 0.57	b
No.1-3	1001	Caboni	Saito	Saito	6	0.00	± 0.00	c	90	0.00	± 0.00	d
No.2-1	1001	Saito	無	Caboni	10	0.00	± 0.00	c	150	0.00	± 0.00	d
No.2-2	1001	Saito	Saito	Saito	7	0.00	± 0.00	c	105	0.00	± 0.00	d
No.3-1	Caboni	Caboni	無	Caboni	3	33.37	± 23.09	bc	45	0.47	± 0.76	b
No.3-2	Caboni	Caboni	無	Saito	3	11.10	± 19.23	c	45	0.16	± 0.47	cd
No.3-3	Caboni	Caboni	Saito	Saito	4	0.00	± 0.00	c	60	0.00	± 0.00	d
No.4-1	Caboni	Saito	無	Caboni	3	0.00	± 0.00	c	44	0.00	± 0.00	d
No.4-2	Caboni	Saito	Saito	Saito	3	0.00	± 0.00	c	45	0.00	± 0.00	d
No.5-1	1000	Caboni	無	Caboni	3	32.23	± 27.96	bc	32	0.38	± 0.71	bc
No.5-2	1000	Caboni	無	Saito	3	8.90	± 15.42	c	32	0.16	± 0.45	cd
No.5-3	1000	Caboni	Saito	Saito	4	0.00	± 0.00	c	56	0.00	± 0.00	d
No.6-1	1000	Saito	無	Caboni	3	0.00	± 0.00	c	32	0.00	± 0.00	d
No.6-2	1000	Saito	Saito	Saito	3	0.00	± 0.00	c	32	0.00	± 0.00	d

異なるアルファベットは 5% 水準で有意 (Tukey-Kramer HSD検定)

(3) 珠心細胞に由来する細胞からのシュート再分化系

岩手大学農学部下台圃場で採取した開花後 30 日の 'ふじ'、'王林' の果実、および岩手大学農学

部付属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター滝沢農場で採取した開花後 30 日、40 日、50 日の‘ふじ’、‘王林’、‘千秋’の果実から種子を採取し、洗浄した種子を縦半分に切断し、外種皮と胚嚢を取り除いた。内種皮はつけたままとし、切断面が下になるように、カルス誘導培地(Saito et al.,1989)に置床した。1 シャーレあたり 10 の種子片（種子 5 粒分）で 1 処理 10 シャーレ作成し、1 処理あたり 100 の種子片（種子 50 粒分）とした。珠心は 25 の暗所で 60 日間培養をした。カルスを不定胚誘導培地(Saito et al.,1989)に移植する前にカルスの形成率を求めた。培養開始後 60 日目にすべての種子片を不定胚誘導培地に移植し、25°Cの暗所で 60~90 日間培養を行った。

珠心細胞からのカルスの形成数と形成率、不定胚の形成数と形成率を表 3 に示した。開花後 20 日では種子が小さく珠心の取り出しが困難であった。カルスは 3 品種とも 30 日、40 日、50 日のいずれにおいても形成された。不定胚は‘ふじ’、‘王林’の 30 日と 40 日、‘千秋’では 40 日でのみ形成された。50 日では不定胚形成は認められなかった。以上のように珠心細胞から胚形成能を持つカルスの作出に成功した。不定胚形成能を持つ珠心細胞は開花後 30~40 日の果実から採取することが有効と判明した。今後、胚形成能を維持する珠心カルスの維持・増殖方法を確立する必要がある。

表3 珠心細胞からのカルスおよび不定胚誘導

品種	採取圃場	開花後日数	置床種子数	カルス		不定胚 ^z	
				形成数	形成率 (%)	形成数	形成率 (%)
‘ふじ’	西下台	30	100	57	57.0	4	4.0
	滝沢農場	30	100	5	5.0	0	0.0
	滝沢農場	40	100	77	77.0	1	1.0
	滝沢農場	50	100	25	25.0	0	0.0
‘王林’	西下台	30	100	58	58.0	1	1.0
	滝沢農場	30	100	21	21.0	0	0.0
	滝沢農場	40	100	53	53.0	7	7.0
	滝沢農場	50	100	31	31.0	0	0.0
‘千秋’	滝沢農場	30	100	58	58.0	0	0.0
	滝沢農場	40	100	50	50.0	2	2.0
	滝沢農場	50	100	13	13.0	0	0.0

(4) 総合考察

本研究の実施期間中にゲノム編集個体を獲得する過程でキメラが解除される現象を発見したことから（敦賀,2019）、ゲノム編集個体を作成するために必ずしも 1 細胞にこだわる必要がなくなり、CRISPR/Cas9 等を用いた一過的発現によってキメラ状態のシュートが得られれば目的とする個体を作成できる目途がついた。今後は小孢子由来の再分化にこだわらず、カルスからのシュート再分化系、胚形成能を有するカルス、胚(様体)の作出とそれらの材料にゲノム編集を行う方法を開発することが、効率的なゲノム編集の実現のために現実的な選択になると考えられる。

<引用文献>

- Caboni, E., Lauri, P., and D’Angeli, S. 2000. In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Rep.* 19:755-760.
- Höfer, M., Touraev, A., and Heberle-Bors, E. 1999. Induction of embryogenesis from isolation apple microspores. *Plant Cell Rep.* 18: 1012-1017.
- Höfer, M. 2004. In vitro androgenesis in apple - improvement of the induction phase. *Plant Cell Rep.* 22:365-370.
- 伊藤祐司, 小森貞男, 大村三男, 金山喜則, 山木昭平, 副島淳一. 1997. ソルビトール合成酵素遺伝子を増幅した形質転換リンゴの作出. *育雑.* 47(別 1): 157.
- 小森貞男, 伊藤祐司, 西澤洋子, 副島淳一. 1997. キチナーゼ遺伝子を増幅した形質転換リンゴの作出. *育雑.* 47(別 1): 158.
- Nishitani, C., Hirai, N., Komori, S., Wada, M., Okada, K., Osakabe, K., Yamamoto, T. and Osakabe, Y. 2016. Efficient Genome Editing in Apple Using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 6:31481 (DOI: 10.1038/srep31481)
- Saito, A. and Suzuki, M. 1999. Plant regeneration from meristem - derived callus protoplasts of apple (*Malus × domestica* cv. ‘Fuji’). *Plant Cell Rep.* 18:549-553.
- Saito, A. Niizeki, M. and Saito. K. 1989. Organ formation from calli and protoplast isolation, culture, and fusion in apple, *Malus pumila* Mill. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 58:483-490. (doi.org/10.2503/jjshs.58.483)
- Zhang, C., Sato, A., Tsukuni, T., Ikeda, M., Sato, M., Okada, H., Ohashi, Y., Matsuno, H., Yamamoto, T., Wada, M., Yoshikawa, N., Matsumoto, S., Li, J., Mimida, N., Watanabe, M., Suzuki, A. and Komori, S.

2013. Effects of the microspore development stage and cold pre-treatment of flower buds on embryo induction in apple (*Malus × domestica* Borkh.) anther culture. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 82: 114–124. (doi.org/10.2503/jjshs1.82.114)

Zhang, C., Sato, A., Tsukuni, T., Sato, M., Okada, H., Yamamoto, T., Wada, M., Matsumoto, S., Yoshikawa, N., Mimida, N., Takagishi, K., Watanabe, M., Cao, Q. and Komori, S. 2017. Elucidating cultivar differences in plant regeneration ability in apple anther culture. *Hort. J.* 86:1-10. (doi: 10.2503/hortj.MI-094)

敦賀圭朗,2019. アグロバクテリウム法を用いたリンゴのゲノム編集に関する研究. 岩手大学大学院総合科学研究科修士論文.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wada, M., Oshino, H., Tanaka, N., Mimida, N., Tanaka-Moriya, Y., Honda, C., Hanada, T., Iwanami, H. and Komori, S.	4. 巻 35
2. 論文標題 Expression and functional analysis of apple MdMADS13 on flower and fruit formation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 207-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.18.0510a	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 -

1. 著者名 Kunihisa M., Takita, Y., Yamaguchi, N., Okada, H., Sato, M., Komori, S., Nishitani, C., Terakami, S. and Yamamoto T.	4. 巻 69
2. 論文標題 The use of a fertile doubled haploid apple line for QTL analysis of fruit traits.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 410-419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.18197	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 敦賀圭朗, 西谷千佳子, 刑部敬史, 刑部祐里子, 平井徳美, 山本俊哉, 和田雅人, 川原田泰之, 小森貞男
2. 発表標題 アグロバクテリウム法を用いたリンゴのゲノム編集に関する研究.
3. 学会等名 園芸学会平成29年度秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 桜田穂奈美, 西谷千佳子, 平井徳美, 和田雅人, 山本俊哉, 刑部祐里子, 刑部敬史, 山形 拓, 小森貞男
2. 発表標題 リンゴ品種‘ふじ’のシュート再分化に培地成分が及ぼす影響.
3. 学会等名 園芸学会平成29年度秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 優, 森田 泉, 佐々木真人, 佐藤善政, 守谷(田中)友紀, 榎 悠介, 渡邊 学, 小森貞男
2. 発表標題 リンゴ薬培養における胚様体形成率の年次変動要因の解明
3. 学会等名 園芸学会平成29年度秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小森貞男
2. 発表標題 日本のリンゴ育種のこれまでとこれから
3. 学会等名 日本育種学会第132回講演会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小森貞男
2. 発表標題 果樹の育種技術と今後の方向性
3. 学会等名 岩手県園芸育種研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤幹人, 間瀬誠子, 岡田初彦, 西谷千佳子, 國久美由紀, 佐藤善政, 渡邊 学, 小森貞男
2. 発表標題 リンゴ倍加半数体 '95P6' 等の薬培養に関する研究
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤晴香, 松田隆希, 西谷千佳子, 渡邊 学, 小森貞男
2. 発表標題 リンゴにおけるカルスからのシュート再分化系の作出
3. 学会等名 園芸学会東北支部令和元年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小森貞男, 佐藤 優, 佐藤善政, 渡邊 学
2. 発表標題 リンゴ薬培養における胚様体形成率の年 次変動に関する研究
3. 学会等名 園芸学会東北支部令和元年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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