

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07856

研究課題名（和文）樹木のゲノム編集とその生物学的影響の解明-ポプラの花芽形成を標的として-

研究課題名（英文）Analysis of flowering and other biological effects of genome editing on poplar trees

研究代表者

西口 満 (NISHIGUCHI, Mitsuru)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：80353796

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：樹木におけるゲノム編集の影響を明らかにするため、花芽形成（花成）抑制遺伝子をゲノム編集したポプラの成長特性、花成、窒素代謝、光合成、遺伝子発現を調べた。ゲノム編集ポプラは短日条件から長日条件に変えると約8週間で花成したが、普通のポプラは花成しなかった。この花成の性質は安定に3年間維持されていた。普通のポプラと比較してゲノム編集ポプラでは、茎や葉の乾燥重量の減少、葉中のアミノ酸含量の増加傾向が見られたが、二酸化炭素吸収速度は変わらなかった。ゲノム編集ポプラでは花芽分裂組織決定遺伝子と予想されるAPETALA1-2遺伝子の発現が増加傾向にあり、花成の引き金となっている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集技術は、生物学的基礎研究のみならず、医療、創薬、品種改良などへの応用が期待されている。しかし、日本国内における樹木のゲノム編集技術に関する研究は、遺伝子組換え実験など特殊な技術及び施設を必要とすることから、非常に少ないのが現状である。本研究では、ゲノム編集ポプラの花成など様々な性質を調べ、ゲノム編集の影響を明らかにした。得られた成果は、樹木のゲノム編集技術の開発を進めていくために参考となる知見である。また、ゲノム編集技術の高度化は、花粉形成関連遺伝子のゲノム編集による花粉発生量の軽減など林業・林産業に関連する社会的な要請を解決するための一助となる可能性を持っている。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the effects of genome editing on trees, we analyzed growth, flowering, nitrogen metabolism, photosynthesis, and gene expression of genome editing *Populus nigra* trees (GE poplars), which were mutated in flowering repressor genes. GE poplars blossomed at about eight weeks after the change of long day conditions, while non-transgenic poplars (NT poplars) never did. The flowering property of GE poplars has been stably kept for 3 years. GE poplars showed the trends of decreased dry weight of their stems and leaves and of the increased amino acid content in leaves, while they showed the same absorption of carbon dioxide as NT poplars. The gene expression of APETALA1-2, which were predicted to be a floral meristem-identity gene in *P. nigra*, tended to increase in GE poplars. This result raises the possibility that APETALA1-2 is a trigger for flowering of GE poplars.

研究分野：樹木分子生物学

キーワード：CRISPR/Cas9 DNA *Populus nigra* 変異 花成 成長 アミノ酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) これまでの遺伝子組換え技術

遺伝子組換え技術は、遺伝子の機能解明や有用物質の生産などに、また、植物においては、病虫害耐性や除草剤耐性など新たな形質を持つ作物を育種するために使われてきた。2014年には、世界中の遺伝子組換え作物の栽培面積は、1.8億ヘクタールに達している。樹木では、遺伝子研究のほか、高成長、低リグニン、病虫害や環境ストレス耐性などの林業的応用を目指して、遺伝子組換え樹木の研究が進められてきた。しかし、遺伝子組換え樹木は、細菌由来の薬剤耐性遺伝子など外来遺伝子を含むため、生物多様性への影響が心配され、社会的な理解も得られにくい。中国など一部の国を除き、遺伝子組換え樹木の商業栽培は進んでいない。

#### (2) 遺伝子組換えを超えるゲノム編集技術

ゲノム編集は、新たな遺伝子組換え技術として生まれ、モデル植物のシロイヌナズナや、イネ、トウモロコシ、樹木ではポプラで成功例が報告されている。ゲノム編集の特徴の一つは、従来の遺伝子組換えでは不可能だった、特定の遺伝子を狙って改変できることである。そのため、ゲノム編集は、標的になる遺伝子の機能解明から遺伝子育種まで広く利用できるとして注目されている。もう一つの特徴は、標的遺伝子を改変する時に使う薬剤耐性遺伝子などの外来遺伝子を、後で交配により取り除く、または、外来遺伝子を使わずに標的遺伝子を改変する可能性が示されていることである。外来遺伝子を含まないゲノム編集した植物は、これまでの放射線や薬剤による突然変異で育種された植物と同じと考えることもでき、遺伝子組換え作物のような厳しい法的規制が不要になるのではないかと、議論が進められてきた。そういった議論の参考となるデータを提供し、ゲノム編集した樹木の利活用を進めていくためには、ゲノム編集の樹木への影響を十分に調べていくことが重要であった。

### 2. 研究の目的

ゲノム編集は、植物の遺伝子組換え技術ではほとんど不可能だった「標的遺伝子の直接改変」を可能にする新しい技術であり、基礎研究ならびに育種などの応用分野への有用性が示されつつある。我々は、花芽形成（花成）にかかわる標的遺伝子 PnTFL1 をゲノム編集したポプラを作ることに成功した。このポプラでは、PnTFL1 遺伝子に変異が起こっていることを明らかにしたが、花成、およびその他の影響について、詳細は不明であった。本研究では、ゲノム編集したポプラの成長特性、花成、光合成、窒素代謝、遺伝子発現などを解析し、新技術であるゲノム編集の樹木への影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 材料

ポプラ (*Populus nigra*) の花成抑制遺伝子と推定される PnTFL1 遺伝子および PnFTL3 遺伝子を CRISPR/Cas9 法でゲノム編集し、変異が生じた複数系統のゲノム編集ポプラを材料に用いた。それらのゲノム編集ポプラはアグロバクテリウム法による遺伝子組換えによって作られたものである。実験の対照として、遺伝子組換えに使用したポプラと同じクローンである非組換えポプラを用いた。

#### (2) 成長量の測定および花成の誘導

ゲノム編集ポプラおよび非組換えポプラは、挿し木によって増殖し、1/10000 ワグネルポットに鉢植えとした。育成には人工気象室を利用し、温度は 25℃、メタルハライドランプ下の光合成有効光量子束密度は約 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  とした。長日条件は明期 16 時間：暗期 8 時間、短日条件は明期 9 時間：暗期 15 時間とした。短日条件で育成したポプラを長日条件に移し、花成を誘導した。長日条件に移した後の樹高、ならびに 16 週後の葉および茎の乾燥重量を測定した。

#### (3) アミノ酸分析

長日条件でゲノム編集ポプラが開花している状態の葉から 0.5cm<sup>2</sup> のリーフディスクを切り出し、破碎してアミノ酸を溶媒抽出した。抽出液を o-フタルアルデヒド (OPA) とクロロギ酸 9-フルオレニルメチル (FMOC) で誘導体化処理した後、アミノ酸分析用 HPLC カラムクロマトグラフィーを用いて 20 種類の必須アミノ酸を分離し定量した。

#### (4) 光合成の測定

長日条件でゲノム編集ポプラが開花している状態で、植物光合成総合解析システム LI-6400 (LI-COR 社) を用い、葉の二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) 吸収速度を計測した。測定条件は、気温 28℃、照射光強度 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、CO<sub>2</sub> 濃度 400 ppm とした。

#### (5) 遺伝子発現

長日条件でゲノム編集ポプラが開花している状態の葉を採取し、臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 法と SV Total RNA Isolation System (Promega 社) を組み合わせた方法を用いて全 RNA を抽出した。RNA を逆転写した後、SYBR Green による定量 PCR 法 (Stratagene 社) を用いて LEAFY 遺伝子 (LFY)、APETALA1 遺伝子 (AP1-1、AP1-2) の発現量を定量した。

## (6) 統計解析

非組換えポプラとゲノム編集ポプラの測定値の多重比較は、Dunnnett 法を用いた。試料数(標本サイズ、 $n$ )は3である。

## 4. 研究成果

### (1) ゲノム編集ポプラの成長特性

材料に使用しているポプラは挿し木で容易に増やすことができる。ゲノム編集ポプラも挿し木で増殖を行うことができ、ほとんど全ての挿し枝が発根したことから、挿し木特性にゲノム編集の影響はないと考えられた。

ゲノム編集ポプラの成長特性を明らかにするため、長日条件で2週間ごとに樹高を測定した。しかし、後述する花成による茎頂の伸長遅延および萌芽枝の伸長のため、ゲノム編集ポプラおよび非組換えポプラの樹高の測定値は極めて雑多であり、定量的な比較は困難であった(図1)。短日条件下では、ゲノム編集ポプラおよび非組換えポプラの両者とも、樹高が数十 cm まで成長した後、頂芽から葉が展開しなくなり、樹高成長は停止した。そこで、短日条件で育成中のポプラを長日条件に変え、16 週間育成した後に茎と葉を分けて収穫し、乾燥重量を測定した。ゲノム編集ポプラの各系統は非組換えポプラよりも、茎および葉の乾燥重量が小さい傾向にあった(図2)。特に、葉の乾燥重量は非組換えポプラと比較して、4 系統全てに有意な差が認められた。茎および葉の乾燥重量が小さい理由は、花成により茎の伸長や葉の大きさが抑制されたためと考えられた。



図1 花成したゲノム編集ポプラ  
#666、#695：ゲノム編集ポプラ。WT:非組換えポプラ。

### (2) 花成

通常、ポプラは発芽後あるいは挿し木後に最初の花成が起こるまで、5年から10年以上かかる。これまで、挿し木で増殖した非組換えポプラを、人工気象室において短日条件や長日条件で育成しても花成は起こらなかった。しかし、ゲノム編集ポプラを短日条件で育成した後、長日条件に変え、約8週間後から花芽を形成し、開花した(図1、図3)。調べた13系統のゲノム編集ポプラのすべてが長日条件下で花成することが分かった。ゲノム編集ポプラは毎年挿し木を行って系統を維持したが、研究期間の2017年~2019年の3年間、毎年花成が起こり、ゲノム編集による開花の性質が安定的に維持されていた。

### (3) アミノ酸組成

花成に必要な条件として、窒素代謝の関与が示唆されている。ゲノム編集ポプラと非組換えポプラにおいて窒素代謝に差があるかどうかを明らかにするため、葉中の20種類の必須アミノ酸量を測定した。その内、量が多いグルタミン酸、ア

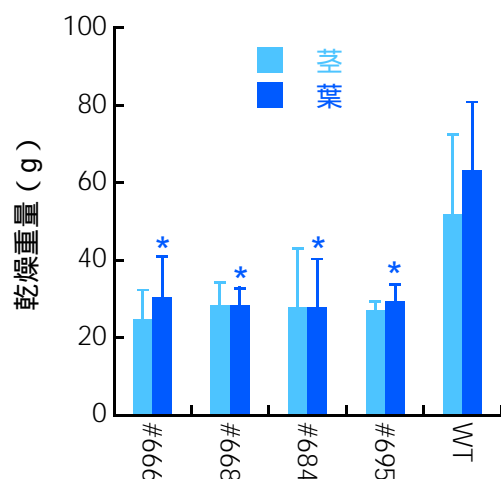


図2 ゲノム編集ポプラおよび非組換えポプラの乾燥重量  
#666~#695：ゲノム編集ポプラ。WT:非組換えポプラ。\* $p < 0.05$ 。

スパラギン酸、アラニン、セリンについて、葉面積あたりの含量を表1に示す。非組換えポプラと比べて、ゲノム編集ポプラのアミノ酸含量は高い傾向を示したが、有意に差が認められたのは#684系統のアラニンおよびセリンのみであった。

#### (4) 光合成

光合成は植物の基本的なエネルギー代謝機構であり、生命維持にとって重要な機能である。ゲノム編集ポプラと非組換えポプラにおいて光合成能力に差があるかどうかを明らかにするため、葉のCO<sub>2</sub>吸収速度を測定した。非組換えポプラのCO<sub>2</sub>吸収速度は約15.8 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>であった。ゲノム編集ポプラのCO<sub>2</sub>吸収速度は、非組換えポプラと比較して有意差があるとは言えなかった(図4)

#### (5) 遺伝子発現

ゲノム編集によってPnTFL1遺伝子に変異が生じるとポプラに花成が起る(図3)ことから、PnTFL1の機能は花成の進行を抑えるための花成抑制遺伝子と推測される。シロイヌナズナなど

草本植物の花成では、LEAFY遺伝子(LFY)とAPETALA1遺伝子(AP1)の発現が花成の引き金となる。そのため、LFYとAP1は花芽分裂組織決定遺伝子と呼ばれている。シロイヌナズナのTFL1遺伝子はLFYとAP1の発現を抑制し、必要時以外は花成が起らない状態にしている。ポプラの花成制御機構もシロイヌナズナと似ている可能性があることから、ゲノム編集ポプラにおけるLFYとAP1の遺伝子発現を調べた。花成しているゲノム編集ポプラと非組換えポプラの葉からRNAを抽出し、定量PCR法で遺伝子発現量を比較した。LFYの発現量は検出不可能なレベルだったが、これは葉を材料にしたためと考えられた。今後、花芽になる少し前の頂芽からRNAを抽出して、発現量を調べる必要がある。また、ポプラはAP1遺伝子を2種類(AP1-1、AP1-2)持っている。非組換えポプラとゲノム編集ポプラで、AP1-1の発現量に有意差は認められなかった(図5)。一方、有意な差があるとは言えないものの、非組換えポプラに比べてゲノム編集ポプラのAP1-2の発現量は数十倍から百倍以上高いものがあった(図5)。従って、ゲノム編集ポプラの花成にはAP1-2遺伝子の発現増加が影響している可能性が示された。

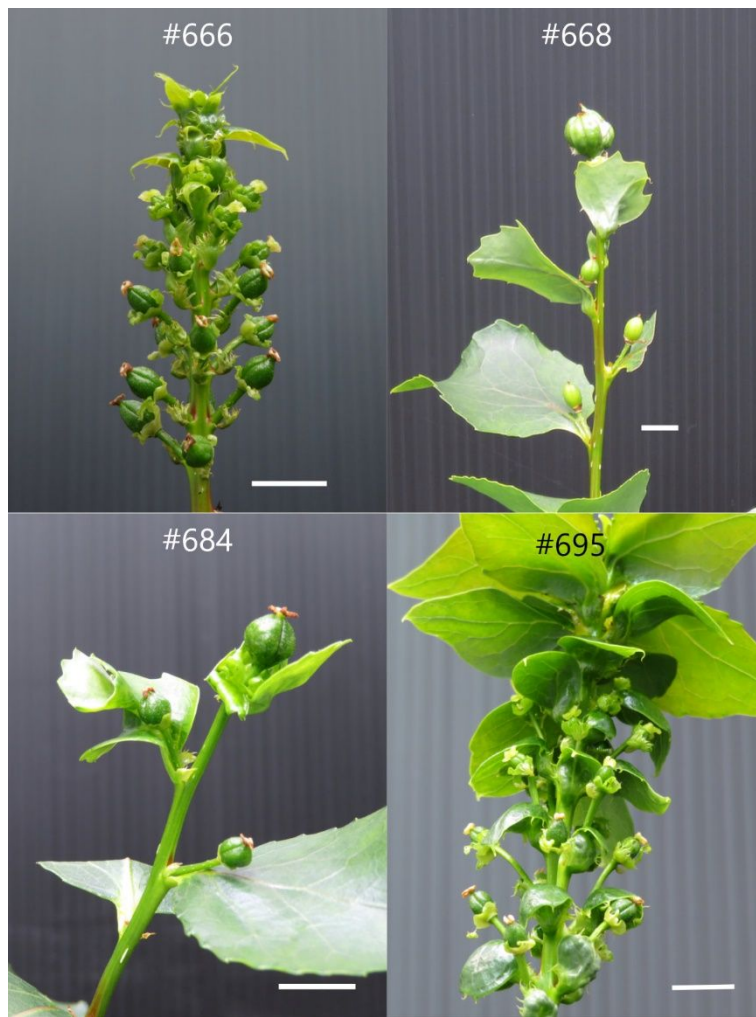


図3 ゲノム編集ポプラの花

表1 葉中のアミノ酸含量

系統	葉面積当たりのアミノ酸含量 (μmol m <sup>-2</sup> 、平均値 ± 標準偏差)			
	グルタミン酸	アスパラギン酸	アラニン	セリン
非組換えポプラ	566.3 ± 51.2	188.4 ± 51.2	32.3 ± 8.7	25.9 ± 4.2
ゲノム編集ポプラ				
#666	788.8 ± 83.4	256.2 ± 84.2	68.8 ± 28.6	68.7 ± 19.4
#668	735.4 ± 296.5	205.1 ± 122.1	79.4 ± 43.1	54.9 ± 30.1
#684	721.6 ± 125.1	206.1 ± 56.1	*113.1 ± 42.0	*86.0 ± 24.4
#695	643.4 ± 268.6	163.5 ± 39.0	69.2 ± 15.5	36.2 ± 16.1

(\*p < 0.05)

## (6) 結論と考察

本研究では、ポプラの PnTFL1 遺伝子をゲノム編集し変異を導入することにより、花成、成長特性、アミノ酸代謝、遺伝子発現の変化といった複数の影響を示すことが分かった。ゲノム編集ポプラの花成が1年以下に短縮されることは非常に興味深い。野生のポプラの花成が数年以上かかるという現象と PnTFL1 遺伝子の花成抑制機能との関係が推定される。一方、早期の花成は育種の面からは有用であるが、ゲノム編集によって強制的に引き起こされる花成は、ポプラの成長や形態を大きく変えてしまうため、成長量が抑えられるなど負の側面が大きく、産業的に利用する場合には大きな問題となる。花成についてのみ言うならば、単純にゲノム編集で花成を早めるだけでなく、花成の時期を人為的に制御できる技術開発が望ましい。本研究では、ゲノム編集ポプラにおいて、花芽分裂組織決定遺伝子と推測される AP1-2 遺伝子の発現が増加している可能性が示された。AP1-2 遺伝子が花成の直接の引き金となると仮定すれば、AP1-2 遺伝子の発現量を必要に応じて増加または減少させることにより、花成を自由自在に制御できる可能性もある。

ゲノム編集ポプラでは、葉中のアミノ酸量が増加しているように見える。この原因については、現在よく分からない。花成あるいは成長の抑制の原因に関わるのか、それともそれらの現象の結果なのかどうかも不明なため、アミノ酸量の変化の解明については残された課題である。

一方、光合成能力のようにゲノム編集によって影響を受けなかった生物現象もある。影響を受ける生物現象と影響を受けない生物現象の違い、つまり形質の違いはゲノム編集の標的遺伝子の機能から推測できるものもあるが、推測の範囲を超える形質も多数存在すると考えられる。ゲノム編集によって表現化する個別の形質については、本研究課題のように具体的に解析を行うことが必要である。

今回の研究は、ポプラ自体への影響評価に限定されており、外部環境への影響については調べていない。遺伝子組換え生物については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルタヘナ法)により、拡散防止措置を執らない第一種使用を行う場合に、生物多様性影響の評価が必須となっている。研究期間中に、カルタヘナ法によって規制を受けない、すなわち遺伝子組換え生物等に該当しないゲノム編集生物の取扱いに関する環境省通知(2019年2月8日)が発出されたが、この通知においても生物多様性影響が生ずる可能性に関する考察等の情報提供が推奨されている。今後展開する研究において、ゲノム編集樹木が外部環境の生物種に与える影響を明らかにし、生物多様性や生態系に対する安全性を立証していくことが、ゲノム編集樹木の利用を普及していくために重要である。

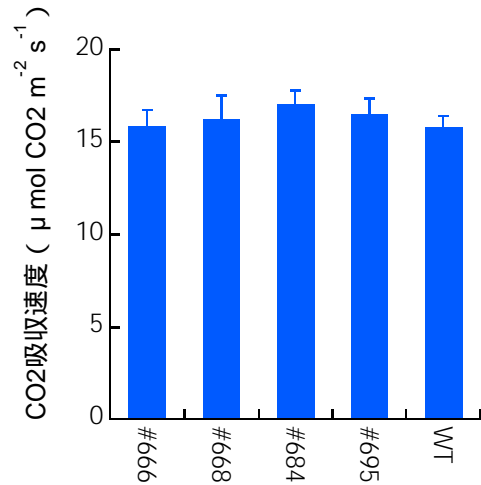


図4 ゲノム編集ポプラおよび非組換えポプラの光合成能力  
#666 ~ #695: ゲノム編集ポプラ。WT: 非組換えポプラ。葉面積当たりの二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) 吸収速度を示している。

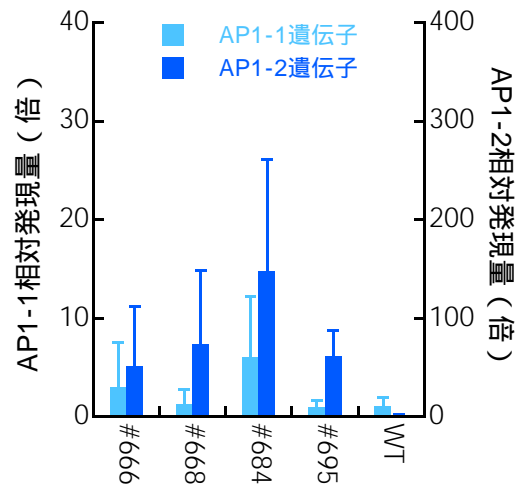


図5 APETALA1 遺伝子の発現量の比較  
#666 ~ #695: ゲノム編集ポプラ。WT: 非組換えポプラ。WT の遺伝子発現量を1とした相対発現量を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西口満、遠藤真咲、三上雅史、土岐精一
2. 発表標題 ゲノム編集によるポプラの花成抑制遺伝子の変異と早期花成
3. 学会等名 第129回日本森林学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西口満、宮澤真一
2. 発表標題 ゲノム編集により花成抑制遺伝子を改変したポプラの諸特性
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020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
研究分担者	宮澤 真一  (MIYAZAWA Shin-Ichi)  (10578438)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等    (82105)	