

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05567

研究課題名(和文) 接ぎ木を利用した人為的「枝変わり」作出法の発展応用

研究課題名(英文) Updating of the artificial 'sports' breeding techniques using grafting

研究代表者

葛西 厚史 (Kasai, Atsushi)

弘前大学・農学生命科学部・研究機関研究員

研究者番号：80633982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： エピゲノム編集の効率化。DNAメチル化誘導への関与が知られている24 nt siRNAsを優先的に産生する(元のsiRNA供与体と比べおよそ1.5倍程度増)改良siRNA (small interference RNA) 供与体を作成した。また、モデル系からエピゲノム編集を発動させるには、穂木・台木の太さを統一するなど接ぎ木を効率的に行う必要があると判明した。

汎用的活用化。既存のジャガイモ栽培品種5種類について根からの再分化体を獲得できた。  
適用植物種の拡張 - リンゴへの応用 - リンゴでの根からの再分化及び培養を経ず植物体の根から直接「ひこばえ」を誘導する技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らが開発した世界初のイノベーション育種技術「接ぎ木を利用したエピゲノム編集体獲得法」の実用化に向け、効率化、汎用性および対象作物種の範囲拡張について調査したことにより、栄養繁殖作物における革新的な品種改良技術となりうるか検討できた。今後さらなる研究を実施することにより育種期間の長い果樹などの品種改良を通して多くの関連産業(種苗・生産・加工・製造・輸送など)の発展に貢献するものと思われる。

研究成果の概要(英文)： In this study, I examined three subjects to improve the technique 'acquisition of Epigenome editing plants using grafting'.

1. Efficiency of epigenome editing technique. Transgenic improved donor lines producing preferential 24 nt siRNAs (increased about 1.5 fold in comparison with the original donor line) were produced. I clarified that it's necessary to carry out grafting effectively, ex. preparing thickness of the scion-stock, to act epigenome editing. 2. Generic application. In five potato cultivars, regeneration from roots was carried out successfully. 3. Extension of applied plants -application to apple-. Techniques which were regeneration from roots in apple and direct induction of a root sucker in cultivated plant roots without tissue cultures were established.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：接ぎ木 エピゲノム編集 RdDM

1. 研究開始当初の背景

接ぎ木は古くから行われてきた栽培技法であり、栄養体増殖に加え病虫害の回避、収量性の向上さらに矮化栽培を目的として園芸作物では広く活用されている。一方で、高等植物は多様な環境変動への応答や器官・組織間の協調的な成長・分化の実行にあたり、特定のタンパク質や RNA 分子を維管束を通して運び、その運搬先で機能する情報因子として利用していることが明らかとなってきた。そこで自然界で行われている“RNA 篩管長距離輸送システム”を“接ぎ木”との組み合わせにより人為的に制御して、品種改良に利用できないかとの着想に至ったものである。

近年の技術革新により従来の品種改良や遺伝子組換え技術とは異なる新しい育種技術(NPBT)が開発されてきている。当該システムもNPBTの一翼を担う手法であり、かつゲノムDNAの塩基配列を改変しないため他の手法とは一線を画す存在でもある。近年になり、当該システムの基盤メカニズムであるエピジェネティックスの作物改良への応用が論じられるようになってきているが、モデル植物での基礎研究報告がほとんどであり、作物への応用を報告している例は申請者らのグループを含めて少数あるのみである。したがって、フロントランナーとして当該システムを利用した品種作出技術に関する学術的知見を集積することは重要な課題・使命でもある。

2. 研究の目的

申請者らは“接ぎ木”栽培技法と“RNA の篩管長距離輸送性”を活用した世界初のイノベーション育種技術「接ぎ木を利用したエピゲノム編集体獲得法」を開発した。本システムの特徴は、古くからの栽培技法である“接ぎ木”と“RNA の篩管長距離輸送性”を活用したものであり、接ぎ木相手のゲノム DNA の標的領域のみにエピ

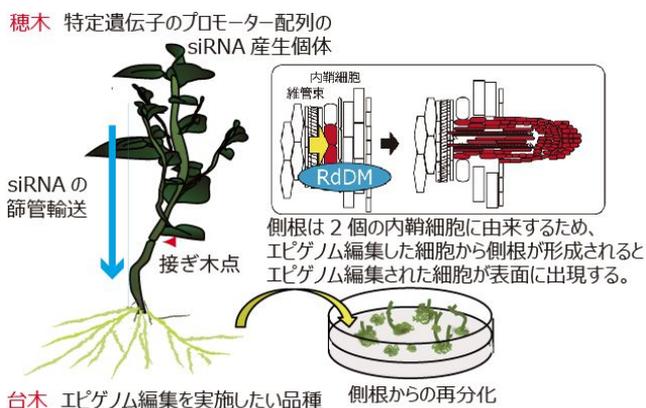


図1 接ぎ木によるエピゲノム編集体作出法モデル図

エネティックな修飾を施すことで、目的とする遺伝子の転写型遺伝子抑制を実行するものである。転写型遺伝子抑制を発動した組織から再分化体を得ることで標的遺伝子のみが抑制されたエピゲノム編集体いわば「人為的枝変わり系統」を作出することが可能となる[図1、国内特許取得 特許第6024901号、Bai et al. 2011 J Exp Bot. Kasai et al. 2016 PLOS ONE]。これまで、本技術を栄養繁殖性作物ジャガイモに適用し、内生遺伝子を標的として高品質化に向けた品種改良に取り組んできた[Kasai et al. 2016 PLOS ONE]。しかしながら、世界初の技術であるため実用化に向けて様々な検証及び技術改良の余地が残されている。そこで、本申請課題では、本技術の改良に向けて3課題について検討し、より実用的な技術へと昇華することを目的とする。すなわち、**エピジェネティック修飾に関わる因子の抑制などによる**エピゲノム編集の効率化**、同一 siRNA 供与体システムを利用し複数品種での**エピゲノム編集体**の獲得による**汎用的活用化**、果樹であるリンゴでの**エピゲノム編集体**の獲得を進め**適用植物種の拡張**を試みる。**

本研究課題による技術の効率化および対象作物種の範囲拡張の実践により、世界初の栄養繁殖作物における革新的な品種改良技術としてさらなる展開が可能となり、特に育種期間の長い果樹などの品種改良を通して多くの関連産業(種苗・生産・加工・製造・輸送など)の発展に貢献できるものと思われる。

### 3. 研究の方法

「接ぎ木を利用したエピゲノム編集体獲得法」の発展・応用に向けて以下の3課題について検討する。

#### (1) エピゲノム編集の効率化

RNA サイレンシング現象およびエピジェネティクスに関する知見が集積しており、植物においても数多くの関連因子の機能同定が進められている [Borges and Martienssen 2015]。そこで本項目では、メチル化の誘導には 24 nt siRNAs が関与しており、優先的に 24 nt siRNAs を産生するシロイヌナズナ変異体との接ぎ木においてレシピエント側ではコントロールと比較して高メチル化が誘導されるとの報告がされた [Bond and Baulcombe 2015]。申請者の別の研究課題 (基盤研究 (B) 分担) において作出したコンストラクト (DCL2/4 RNAi) 導入トマトにおいて 24 nt siRNA の有意な産生上昇が確認されている [Suzuki et al. 2019]。本研究課題でもこの成果を活用し、ジャガイモの DCL2 及び 4 (*StDCL2*・*DCL4*) の抑制コンストラクトをさらに導入した高 24 nt siRNA 産生供与体を作成し、効率的にエピゲノム編集体を獲得できるか検討を進めた。また、を基本として、最も直接的なメチル化解析法であるパイサルファイトシーケンス (BS) 解析を基本とした。

さらに、35S: *GUS* 導入ジャガイモ及び 35S プロモーターを標的とする siRNA 供与体を用いたモデル実験系を利用して、再分化に時間がかかる側根以外の組織からエピゲノム編集体を獲得できないか調査した。

#### (2) 汎用的活用化

一つの siRNA 供与体を作製することで複数の品種に対してメチル化度の上昇を誘導するという汎用性については、栽培品種「男爵薯」や「トヨシロ」など新たに複数の品種を用いて同様に人為的「枝変わり」ジャガイモ系統を作成すべく根からの再分化体獲得及び標的配列の塩基配列情報の取得を行った。

#### (3) 適用植物種の拡張 - リンゴへの応用 -

「接ぎ木を利用したエピゲノム編集体獲得法」の適用植物種を拡張することにより、汎用性の高い技術へと展開する。本課題として、青森県において材料が手に入りやすく助言を受けやすい木本植物の果樹リンゴ (*Malus x domestica*) への応用を試みた。リンゴ培養体での接ぎ木条件および「ひこばえ」の獲得技術などの改良及び外来遺伝子 (35S: *GFP*) およびアントシアニン色素合成系 (標的: 転写因子 *MdMYB10* 遺伝子) を用いたモデル実験系を実施すべく形質転換体の作出を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) エピゲノム編集の効率化

新規の DNA メチル化に関わる 24 nt siRNA をより多く産生させるため、二本鎖 RNA から siRNA を生成する酵素 DCL (Dicer like タンパク質) のうち主に 21・22 nt を産生する *DCL2* 及び *DCL4* 遺伝子を転写後

型遺伝子サイレンシング (PTGS) で抑制するコンストラクトの構築を進めた。まずは、ジャガイモの *DCL2* 及び *DCL4* (*StDCL2* 及び *StDCL4*) 遺伝子の配列をジャガイモデータベースより取得し、栽培品種「ワセシロ」での塩基配列を獲得・決定した。既報 [Suzuki et al. 2019] のトマトで使用した領域と同じ領域を人工的に融合し逆向き繰り返し構造に配置し恒常的発現プロモーター (CaMV35S) で連結したコンストラクト (35S: *StartDCL2/4IR*) を構築した (図 2)。

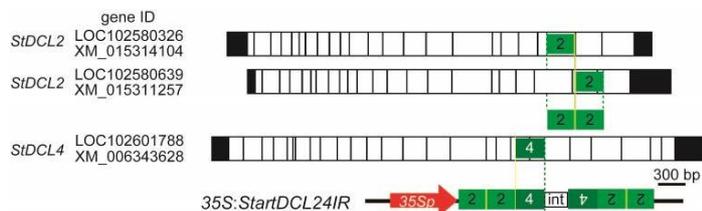


図 2 ジャガイモ *DCL2* 及び *DCL4* 遺伝子の転写後型遺伝子サイレンシングを発動させるコンストラクト

本技術の適用のため内生遺伝子である低温貯蔵時に特異的に発現する酸性液胞型インベルターゼ (*Vinv*: *Vacuolar Acid Invertase*) 遺伝子を標的とする CoYMV:VinvpIR「ワセシロ」穂木系統 (WS-Vinv-donor-t71) を作出していた。そこでこの系統 (t71) に、さらに構築したコンストラクトを形質転換により導入し、新しい改良穂木系統 (WS-Vinv-donor-Ent71) を作出した。改良穂木系統 (Ent71) は、small RNA seq 解析から元の系統 (t71) より約 1.5 倍量の 24 nt siRNA が産生されていた (図3A)。また、これらの穂木系統及び組換えエピゲノム編集系統 (WS-Vinv-Epi-t89) における標的領域のメチル化度を調査したところ、改良供与体系系統 Ent71 は、元の供与体系系統 t71 より高メチル化を示し、組換えエピゲノム編集系統と同等のメチル化度となっていた (図3B)。

したがって、既に作出していた siRNA 供与体系系統にさらに形質転換することでより有望な穂木として利用することが期待された。さらに、

35S:StDCL24IR を導入した組換えジャガイモ系統も同時に作出したため、新たに標的とする遺伝子のコンストラクトを作出し、導入することですぐに改良穂木系統を作出できるようにもなった。

より効率的なエピゲノム編集系統作出法を検討するためモデル系を利用した。すなわち、35S プロモーターにより恒常的に *GUS* 遺伝子を発現している組換え「ワセシロ」(35S:*GUS*) を台木、35S プロモーター配列を標的とする siRNA を産生する供与体系系統「ワセシロ」(CoYMV:35Sp-IR) を穂木として接ぎ木を行った。まず、接ぎ木点直下の茎組織の *GUS* 染色を行った結果、供与体系

系統を穂木とした接ぎ木体の場合では茎組織が *GUS* 染色される個体とされない個体が見られ、染色されない個体の切断面を共有する茎組織での BS 解析においては標的配列の明らかなメチル化上昇が見られたことから、標的配列 (35S プロモーター) へのメチル化誘導による *GUS* の発現抑制が判

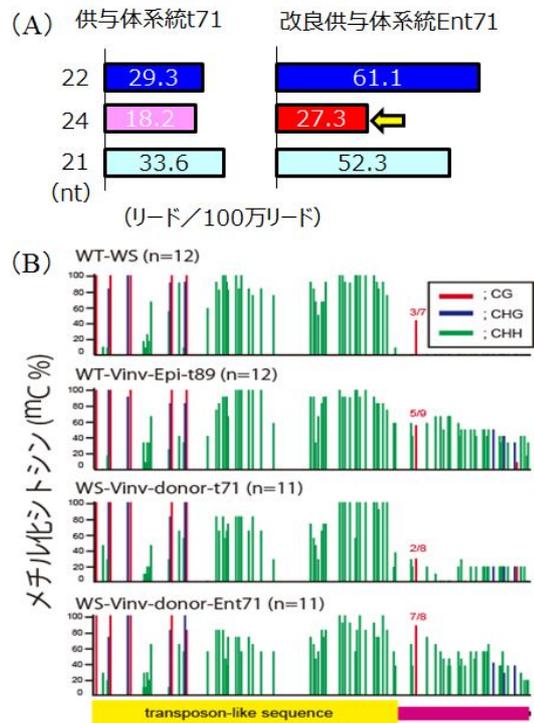


図3 siRNA 供与体系系統(t71)と改良 siRNA 供与体系系統(Ent71)の比較 (A)各系統における *Vinv* 標的 siRNA リード数。(B)各系統における標的 3' 側領域のメチル化度。

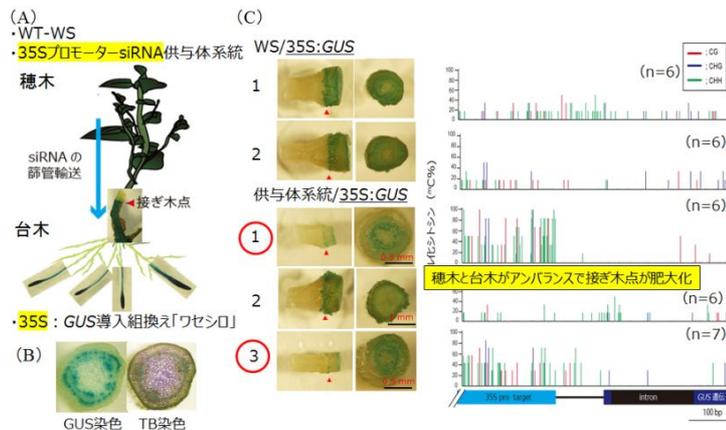


図4 モデル実験による検証。(A) 台木 35S: *GUS* 導入組み換えジャガイモ「ワセシロ」系統と 35S プロモーターを標的とした供与体系系統及び野生型「ワセシロ」(WT-WS) を穂木とする接ぎ木モデル。(B) ジャガイモ茎横断面。伴細胞特異的に発現する組換え系統の茎の *GUS* 染色 (左) 及びトルイジンブルー (TB) 染色した茎横断面 (右)。(C) 接ぎ木点直下の茎組織での *GUS* 染色と BS 解析。コントロール (WS/35S: *GUS*) 2 個体と供与体系系統を穂木とした接ぎ木体 3 個体について、それぞれ接ぎ木点を含む茎組織を *GUS* 染色し、染色面を共有する台木茎組織でのメチル化度を比較した。

明した。GUS 染色やメチル化誘導について接ぎ木点に着目すると、接ぎ木点がかきれいにつながっているものは GUS の抑制及びメチル化誘導が強く、接ぎ木点にカルスを形成し肥大化している場合は GUS の抑制が弱く、メチル化誘導も不十分であった(図4)。さらに、このエピゲノム編集は維管束(特に外篩部)においてより顕著に発動することが判明した(図5)。このことから接ぎ木を上手く行うことが重要であり、接ぎ木点を観察することで、より高確率に有望な接ぎ木体を選抜することが可能であることが判明した。

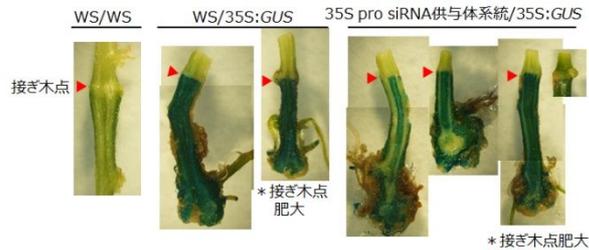


図5 モデル実験における接ぎ木点直下から基部までの GUS 染色程度の比較 野生型「ワセシロ」同士(WS/WS) (左)、コントロール(WS/35S:GUS) (中央)及び供与体系統を穂木とする接ぎ木体(右)の縦断切片の GUS 染色を実施した。\*は接ぎ木点肥大していた個体を示す。

## (2) 汎用的活用化

これまで実施していた栽培品種「ワセシロ」に加え「男爵薯」・「ベニアカリ」・「トヨシロ」及び「ぼろしり」の全5品種について、根からの再分化を実施した。既報[Kasai et al. 2016]の「ワセシロ」での培養条件を他品種に導入したところ、培養時間は異なるものの全ての品種において根からの再分化体を獲得できた。また、品種間における標的配列の塩基多型情報を獲得し、大規模な多型は確認されなかった。このことから、一つの siRNA 供与体を作成することで十分にエピゲノム編集の発動は可能であると考えられた。

## (3) 適用植物種の拡張 - リンゴへの応用 -

「ひこばえ」の獲得技術の応用として、培養を経ずに直接獲得できないか検討した。すなわち、リンゴ培養体を順化し、丈が 20cm 以上に達した時点で、コントロールとして液肥のみを与える処理、実験群として Root sucker 液体培地を与える処理を行った。処理開始から3か月後、根を観察したところ、Root sucker 液体培地を処理した場合、根の一部が肥大し、肥大した部位から Root sucker 形成が観察された。これは、主根及び側根の両方から確認されたが、部位による偏りは見られなかった。対照群では根の形態変化や Root sucker 形成は一切見られなかった(図6)。リンゴにおける根の再分化体誘導は長期間必要であり、野生種マルバカイドウでも5か月を要し再分化効率は13.8%と高くないため、本課題による Root sucker 誘導法は短期間で簡便な方法と考えられる。しかしながら、リンゴにおける形質転換体作出に時間がかかり、かつコンストラクト導入個体が得られたものの siRNA の産生が確認されなかったなど問題が生じたため、実際の接ぎ木個体での試験は実施できなかったものの、今後これらの応用技術によりリンゴにも本技術を適用できるものと考えている。



図6 リンゴ品種「王林」栽培体における Root sucker 誘導 コントロール(左)と Root sucker 誘導(右)個体における根全体と赤枠の拡大写真を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅野あゆみ 葛西厚史 原田寿晴 原田朋子 羽場佳菜湖 原田竹雄 野呂治 赤田辰治
2. 発表標題 新育種技術（接ぎ木を利用したRdDM）によるリンゴ品種改良に向けた研究
3. 学会等名 日本育種学会 第135回講演会
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------