

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02930

研究課題名（和文）オオムギにおける形質転換適性の制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on the regulation mechanism of transformation amenability in barley

研究代表者

久野 裕 (HISANO, Hiroshi)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：70415454

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：オオムギの遺伝子組換え効率に関わる主要な形質座（TFA）の絞り込みを目的として、形質転換できる品種とできない品種の交雑集団を用いて遺伝学実験を行った。その結果、TFA3と呼ばれる領域にカルスの誘導・増殖に寄与している遺伝子の存在を明らかにした。さらに、網羅的遺伝子発現解析により、形質転換できる品種とできない品種の間で発現に差のある遺伝子を網羅的に明らかにした。発現変動のあった1つの遺伝子についてクローニングを行いオオムギに導入したが、カルス誘導の効率向上は見られなかった。一方、TFA選抜オオムギ系統を用いてゲノム編集実験を行った結果、目的遺伝子に変異を持つ個体を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、遺伝子組換え技術は限られた品種のみに効率よく適用できたが、他の多くの品種は適用が不可能であった。さらに、オオムギの形質転換効率が低いのが問題であった。本研究で得られた成果は、オオムギの組織培養、遺伝子組換えおよびゲノム編集技術の効率向上に寄与し、品種改良の加速化に貢献する。また、これらの成果を利用することにより、より多くの品種において遺伝子組換えやゲノム編集が可能になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to fine map of the three TFA loci involved in the efficiency of genetic transformation of barley, the genetic experiments were conducted using two populations derived from a cross between transformable and non-transformable cultivars. The results revealed the presence of genes contributing to callus induction and differentiation in a region called TFA3. In addition, RNA-seq analysis revealed genes with differential expression between transformable and non-transformable cultivars. One gene with significant expression was cloned and introduced into barley, but no improvement in callus induction efficiency was observed. On the other hand, a genome editing experiment using a TFA-selected barley line succeeded in obtaining individuals with mutations in the target gene.

研究分野：植物育種学

キーワード：オオムギ 組織培養 形質転換 ゲノム編集 カルス化 再分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

個体を構成する器官や組織のあらゆる細胞が何れにも分化することができる能力は「分化全能性」と呼ばれる。植物は、動物に比べて分化全能性が高く、培地組成などの培養条件を変えることで脱分化(カルス化)や再分化が容易に出来る。この能力は、植物のクローン化技術、遺伝子組換え(形質転換)技術およびゲノム編集技術等に利用されている。

植物のカルス化および再分化能は系統間差が大きく、それらの適性が高い系統はごく少数である。イネ科作物の例を挙げると、イネの「Nipponbare」、トウモロコシの「A188」、コムギの「Fielder」およびオオムギの「Golden Promise」はカルス化および再分化能が優れており形質転換適性も高いが、その他の多くの系統では形質転換が困難である。このようにカルス化および再分化能は遺伝的要因によって制御されていることが明らかであり、その要因を同定および制御することで難培養・難形質転換系統の形質転換効率の向上が期待できる。

近年、双子葉植物におけるカルス化および再分化メカニズムは遺伝子レベルでの理解が進みつつあるが、イネ科植物の研究は緒についたばかりである(Ikeuchi et al. 2016)。これまでに、イネ科植物の培養適性に関する QTL が複数同定されているが(Salvo et al. 2018, Mano et al. 1996 など)、再分化に寄与するイネの窒素代謝関連遺伝子(ferredoxin-nitrite reductase: NiR, Nishimura et al. 2005)が唯一の培養適性関連遺伝子の単離例である。

一方、研究代表者は重要イネ科作物のひとつであるオオムギのアグロバクテリウム法による形質転換効率に関わる 3 つの遺伝子座(*Transformation amenability: TFA*)を同定した(Hisano and Sato 2016, Hisano et al. 2017)。同法により形質転換植物を得るには、『アグロバクテリウムの感染と T-DNA の挿入』、『カルス誘導と増殖』および『緑色シュートならびに根の再分化』が重要となる。*TFA* の中には、これらの形質に関わる遺伝子群が存在しているものと考えられる。オオムギの形質転換効率を向上させるためには、これらの遺伝子を全て制御する必要があると考えられる。しかしながら、アグロバクテリウムとの親和性、カルス化および再分化を支配する遺伝子は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

TFA 同定の過程で、オオムギの多くの系統はアグロバクテリウムの感染が可能であることが明らかとなっている(山根ら、未発表)。そこで本研究では、オオムギの形質転換適性要因の中でも組織培養の鍵となる『カルス化』ならびに『再分化』に焦点を絞り、それらの制御メカニズムを解明することを目的とした。それらに関わる遺伝因子を制御することにより、系統に依存しないオオムギの形質転換やゲノム編集を実現し、目的とする品種への効率的な遺伝変異の導入と分子育種の基礎技術を開発することが本研究の最終目標であった。本申究では下記の ~ の項目に分けて、オオムギのカルス化および再分化に関わる遺伝子や物質の同定を試みた。

- 「オオムギ *TFA* に存在する形質転換効率関連遺伝子の同定」
- 「オオムギカルスにおける幹細胞の可視化とその周辺細胞の遺伝子解析」
- 「オオムギのカルス化および再分化を制御する化学物質の同定」

前述の通り、イネ科植物の組織培養適性に関連する分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。上記 においては、これまで研究代表者が進めてきたオオムギの形質転換効率に関する遺伝学的研究を進展させ、*TFA* に存在する主要遺伝子の絞り込みを行った。すなわちオオムギのカルス化および再分化に関連する遺伝子の単離および同定が の目的である。

上記 では、既知の幹細胞化制御因子と蛍光タンパク質を用いて、オオムギカルスの幹細胞(本研究では再分化が始まる分裂組織と定義する)を可視化する。さらに、幹細胞ならびにその周辺細胞を単離および解析することにより、再分化に必要な遺伝子を同定することが の目的である。本目的を達すれば、再分化過程の遺伝子発現のみならず植物ホルモンなどの物質動態も明らかにすることが期待出来る。

これまでのところ、ケミカルスクリーニングによる植物のカルス化誘導物質は同定されているが(Nakano et al. 2018)、再分化関連の物質については報告されていない。 においては、再分化を誘導する新規物質を明らかにし、培地添加物として利用することが目的である。既知の植物ホルモンに代わる新規の培地添加物を開発できれば、簡便にカルス化や再分化の効率を改善できる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究では、下の ~ に示す具体的な内容に沿って、オオムギの組織培養適性に関する遺伝的因子および分子メカニズムを明らかにしようとした。

TFA に関するオオムギの準同質遺伝子系統を用いた *TFA* 原因遺伝子の遺伝学的実験による絞り込みと遺伝子発現解析(RNA-seq)による同定

既知の幹細胞化関連遺伝子プロモーターを用いたオオムギカルスにおける幹細胞の可視化とその周辺細胞の遺伝子発現および代謝産物の解析

オオムギのカルス化および再分化を誘導する化学物質のスクリーニング

では、「Golden Promise」(GP)と「Haruna Nijo」(HN)または「Full Pint」(FP)の交雑に由来する *TFA* の準同質遺伝子系統を用いて、形質転換実験を含む組織培養形質データを基に遺伝学的に候補遺伝子の絞り込みを行った。本研究では、「候補遺伝子の詳細な発現解析」および「SNPsと組織培養適性の連鎖解析」の結果を統合し原因遺伝子の絞り込みを行った。

では、既知の幹細胞化関連遺伝子 (Baby boom 遺伝子および *Wuschel2* 遺伝子) のオオムギホモログのプロモーターを単離し、GFP レポーター遺伝子を発現制御するコンストラクトを作成した。そのコンストラクトを用いて形質転換オオムギカルスを作成し、幹細胞の可視化を目指した。

では、名古屋大学の化合物ライブラリ (プレスクリーニング用 800+ 化合物) を用いて、再分化誘導を主とした組織培養形質に影響を与える物質の探索を行った。各物質を含んだ培地を作成し、オオムギ HN の未熟胚由来のカルスを培養して、再分化シュート、緑色細胞、根の再生および生長点形成等を評価した。

4. 研究成果

(1) オオムギの形質転換効率に関する *Transformation amenability (TFA)* 座の絞り込み

オオムギの形質転換効率に関わる 3 つの主要な *TFA* 座の絞り込みを目的として、形質転換できる品種「Golden Promise」(GP)とできない品種「Haruna Nijo」(HN)または「Full Pint」(FP)の交雑集団を用いて、アグロバクテリウム法による形質転換実験を行った。

FP×GP の F2 未熟胚から得られた形質転換体 16 個体を解析したところ、2H 染色体長腕の約 30Mbp の領域に GP アレルの集積が見られた。この領域には GP 由来の *TFA3* 座が存在すると推定された (図 1)。さらに FP×GP の準同質遺伝子系統を用いて *TFA3* を精密マップした結果、1.2Mbp の領域に原因遺伝子が存在し、その遺伝子はカルスの誘導または増殖に寄与していることを明らかにした (投稿準備中)。

一方、HN と GP のゲノム情報を取得し、PCR 産物をキャピラリー電気泳動で多型判別できる InDel マーカーを整備した。HN×GP の準同質遺伝子系統を作成した。このことにより、*TFA1* ~ *TFA3* の選抜が容易となった。オオムギ 3H 染色体上の *TFA1* が分離する個体を用いて 20 以上の形質転換体を作成し分析したが、*TFA1* の絞り込みには至っていない。

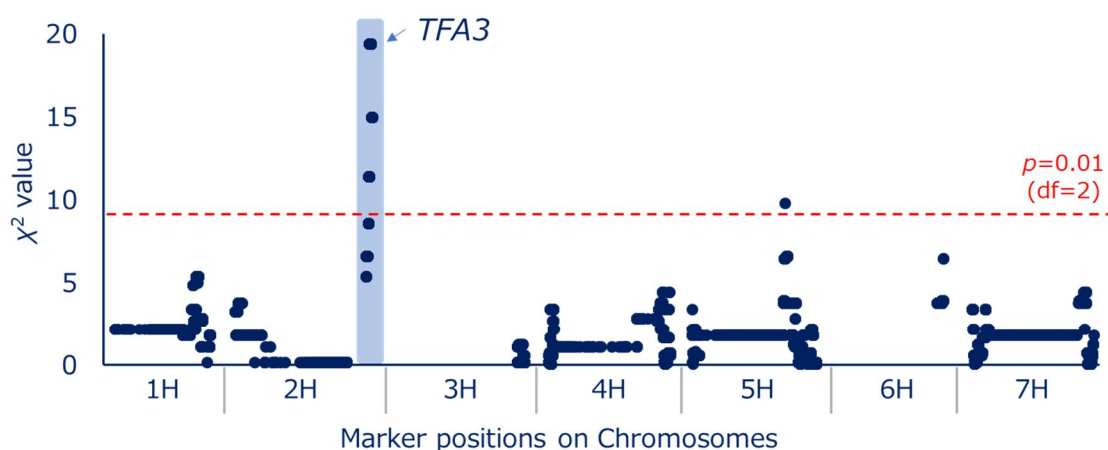


図1 *TFA3*の精密マッピング。 FP×GPのF2未熟胚から得られた16個体の形質転換体について、7071 SNPsアレイでジェノタイプングした。横軸は多型マーカーの染色体上の位置 (1H染色体短腕～7H染色体長腕) を示し、縦軸にマーカー分離のカイ二乗値を示す。2H染色体長腕で優位なマーカー分離の歪み (1%水準) が見られた。その領域では、16個体全てがGP型またはヘテロ型となっており、FP由来は見られなかった。この領域は*TFA3*座であると推定される。

(2) *TFA* 座に存在する遺伝子の発現変動解析による遺伝子の絞り込みと機能解析

FP と GP の未熟胚およびカルス誘導過程の培養未熟胚を用いた RNA-seq 解析により、品種間で発現に差のある遺伝子を網羅的に明らかにした (表 1)。オオムギ 2H 染色体の *TFA3* の領域のうち、発現変動のあった 1 つの遺伝子についてクローニングを行った。この遺伝子は、再分化または ABA 感受性に関わる既知の転写因子と相同であった。カルス誘導効率の向上を期待して FP および GP にこの遺伝子を導入した結果、いずれもカルス誘導の効率向上は見られなかった。GP においては当該遺伝子の過剰発現個体が得られたので、今後、表現型を確認する予定である。

表1 TFA3の原因遺伝子単離に向けてFPおよびGPの未熟胚を用いたRNA-seq解析の概要		
TFA3内の推定遺伝子数		1470
	FP>GP	FP<GP
未熟胚において発現量の差が2倍以上の遺伝子数	79	23
3日間カルス誘導培養した未熟胚において発現量の差が2倍以上の遺伝子数	28	32
7日間カルス誘導培養した未熟胚において発現量の差が2倍以上の遺伝子数	139	26

(3) 重要遺伝子の機能解析への応用

オオムギの形質転換効率に関わる遺伝子の同定と並行して、オオムギの形質転換効率の向上への取り組みを行った。その結果、オオムギのカドミウム輸送に関わる遺伝子(Lei et al. 2020)、茎伸長に関わる遺伝子(Nagai et al. 2020)、花と葉の形態に関わる遺伝子(Yoshikawa et al. 2022)などの重要遺伝子機能の解明を果たすことができた。

(4) ゲノム編集の応用

本研究を開始した当初は、オオムギのゲノム編集の効率が低かったため、「Golden Promise」以外の系統での実施は不可能であった。研究期間内にベクターの改良を行い、その効率を高め、種子休眠性遺伝子やミネラルトランスポーター遺伝子への変異導入に成功した(Hisano et al. 2022, Gu et al. 2022)。一方、TFAを利用して選抜したFPxGPの交雑後代を用いてオオムギの皮裸性遺伝子のゲノム編集実験を行った。その結果、目的の表現型を持つゲノム編集個体を得ることに成功した(図2、論文準備中)。このことから、TFAによる選抜によりゲノム編集も可能であることが明らかとなった。また、オオムギを含む穀類のゲノム編集について、Hisano et al. (2021)に総説として取りまとめた。



図2 TFAマーカーで選抜したオオムギ系統へのCRISPR/Cas9法による変異導入。FP x GPに由来する倍加半数体集団の中からTFAマーカーによって形質転換可能な系統を抽出した。次に、オオムギ穀粒の皮裸性遺伝子を標的として、CRISPR/Cas9法による変異導入を行った。その結果、目的の箇所に変異を導入することができ、図のように皮麦から裸麦へと表現型が変異した。

(5) オオムギ幹細胞のライブイメージング解析

オオムギ幹細胞のライブイメージングを目的として、既知の幹細胞化関連遺伝子(*Baby boom* 遺伝子および *Muschel2* 遺伝子)のオオムギホモログのプロモーターを単離した。それらを用いてGFPレポーター遺伝子を発現制御する形質転換オオムギを作成し、それぞれ形質転換後代種子(T1)を得た。導入遺伝子が固定された形質転換第二世代種子(T2)を得た。幹細胞のライブイメージングについては今後の課題である。

(6) オオムギ培養カルスを用いたケミカルスクリーニング

再分化等の培養適性に関わる物質の探索を目的として、名古屋大学から分譲された化合物ライブラリ(プレスクリーニング用 800+ 化合物)の各物質を含んだ培地を作成し、HNの未熟胚由来のカルスを培養した(図3)。再分化シュート、緑色細胞、根の再生および生長点形成等の評価を行った。HNの再分化効率率はGPの半分程度のため、化学物質による再分化誘導に適している品種である。これまで、約1000の化学物質のスクリーニングを終え、主にカルス増殖に関わる物質が見いだされた。再分化したカルスも見られたが、反復間での合致は見られなかった。

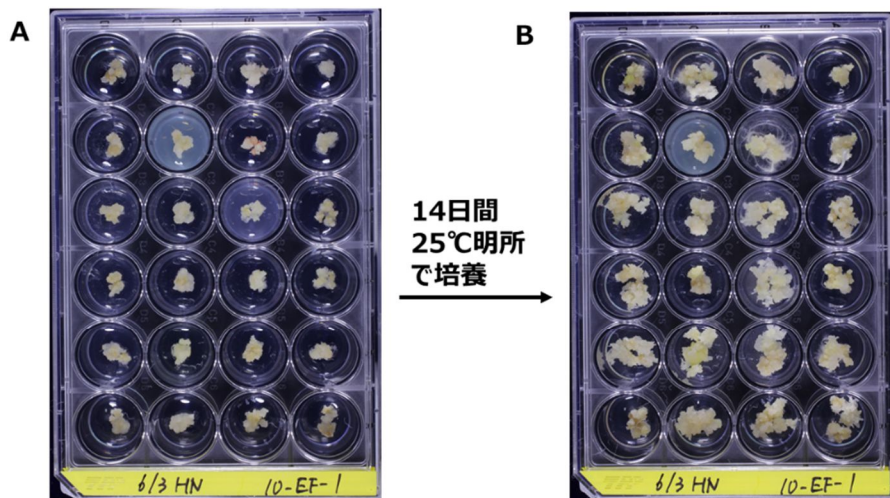


図3 オオムギカスを用いた培養適性ケミカルスクリーニング。 HNカスを用いて、名古屋大学から分譲された化合物ライブラリーのケミカルスクリーニングを行った。Aは化合物を含む培地で培養開始直後、Bは14日間25℃の名所で培養した後のカスの様子。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Lei Gui Jie, Fujii-Kashino Miho, Wu De Zhi, Hisano Hiroshi, Saisho Daisuke, Deng Fenglin, Yamaji Naoki, Sato Kazuhiro, Zhao Fang-Jie, Ma Jian Feng	4. 巻 1
2. 論文標題 Breeding for low cadmium barley by introgression of a Sukkula-like transposable element	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Food	6. 最初と最後の頁 489 ~ 499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43016-020-0130-x	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 Nagai K., Mori Y., Ishikawa S., Furuta T., Gamuyao R., Niimi Y., Hobo T., Fukuda M., Kojima M., Takebayashi Y., Fukushima A., Himuro Y., Kobayashi M., Ackley W., Hisano H., Sato K., Yoshida A., Wu J., Sakakibara H., Sato Y., Tsuji H., Akagi T., Ashikari M.	4. 巻 584
2. 論文標題 Antagonistic regulation of the gibberellic acid response during stem growth in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 109 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-2501-8	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 Gu Mian, Huang Hengliang, Hisano Hiroshi, Ding Guangda, Huang Sheng, Mitani Ueno Namiki, Yokosho Kengo, Sato Kazuhiro, Yamaji Naoki, Ma Jian Feng	4. 巻 234
2. 論文標題 A crucial role for a node localized transporter, HvSPDT, in loading phosphorus into barley grains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1249 ~ 1261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18057	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 Hisano Hiroshi, Hoffie Robert E., Abe Fumitaka, Munemori Hiromi, Matsuura Takakazu, Endo Masaki, Mikami Masafumi, Nakamura Shingo, Kumlehn Jochen, Sato Kazuhiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Regulation of germination by targeted mutagenesis of grain dormancy genes in barley	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 37 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pbi.13692	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 Hisano Hiroshi, Abe Fumitaka, Hoffie Robert E., Kumlehn Jochen	4. 巻 71
2. 論文標題 Targeted genome modifications in cereal crops	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 405 ~ 416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.21019	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 Yoshikawa Takanori, Hisano Hiroshi, Hibara Ken-Ichiro, Nie Jilu, Tanaka Yuki, Itoh Jun-Ichi, Taketa Shin	4. 巻 14
2. 論文標題 A <i>bifurcated palea</i> mutant infers functional differentiation of <i>WOX3</i> genes in flower and leaf morphogenesis of barley	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 AoB PLANTS	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/aobpla/plac019	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 久野裕・Robert Hoffie・安倍史高・宗森広美・松浦恭和・遠藤真咲・三上 雅史・中村信吾・Jochen Kumlehn・佐藤 和広
2. 発表標題 オオムギ種子休眠遺伝子の標的変異導入による発芽の制御
3. 学会等名 第38回日本バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久野裕・Robert Hoffie・安倍史高・宗森広美・松浦恭和・遠藤真咲・三上 雅史・中村信吾・Jochen Kumlehn・佐藤 和広
2. 発表標題 オオムギ種子休眠遺伝子の標的変異導入による発芽制御
3. 学会等名 育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久野裕・松島良・佐藤和広
2. 発表標題 遺伝子改変能を付与した低澱粉オオムギ変異系統の開発
3. 学会等名 第16回ムギ類研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久野 裕・宗森 広美・佐藤 和広
2. 発表標題 オオムギ2H染色体に座乗する形質転換効率に関わるTFA3遺伝子座の機能
3. 学会等名 第15回ムギ類研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久野 裕・宗森 広美・佐藤 和広
2. 発表標題 オオムギ2H染色体に座乗する形質転換感受性に関わる遺伝子座TFA3の特性
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久野 裕, 宗森 広美, 山地 奈美, 佐藤 和広
2. 発表標題 オオムギ2H染色体に座乗する形質転換効率に関わるTFA遺伝子座のマッピング
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Robert Eric Hoffie, Ingrid Otto, Hiroshi Hisano, Jochen Kumlehn (分担)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 312
3. 書名 "Site-Directed Mutagenesis in Barley Using RNA-Guided Cas Endonucleases During Microspore-Derived Generation of Doubled Haploids" in Doubled Haploid Technology (ed. Jose M. Segui-Simarro)	

1. 著者名 久野裕 (分担) (編集: 田部井豊、七里吉彦、三柴啓一郎、安本周平)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 国際文献社	5. 総ページ数 413
3. 書名 「オオムギの形質転換およびゲノム編集」ひとりではじめる植物バイオテクノロジー入門 組織培養からゲノム編集まで	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 イネ科植物及びその作製方法	発明者 松島良・久野裕・佐藤和広	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-169225	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	三谷 奈見季 (MITANI Namiki) (40581020)	岡山大学・資源植物科学研究所・准教授 (15301)	
研究分担者	松島 良 (MATSUSHIMA Ryo) (80403476)	岡山大学・資源植物科学研究所・准教授 (15301)	

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			
ドイツ	IPK			