

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12608
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K05972
 研究課題名(和文) イチゴ属の環境応答と生長を制御する植物ホルモン受容体のゲノム編集による機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of the Strigolactone receptor that regulates environmental responses and growth in strawberry using the knockout mutants generated by genome editing

研究代表者
 刑部 祐里子 (Osakabe, Yuriko)
 東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：50444071
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クローナル植物イチゴの栄養繁殖と環境応答のクロストークを明らかにするために、CRISPR/Cas9により二倍体イチゴ *Fragaria vesca* のストリゴラクトン(SL)受容体 DWARF14 (D14) 変異体を作製し解析した。fvd14変異体は器官サイズと数の間で成長におけるトレードオフが見られ、気孔開口度が増大し高いCO₂吸収能とバイオマス生産量を示した。一方、fvD14の表現型は水分ストレス耐性に重要なアブシジン酸非依存的な経路を制御されていることが示唆された。変異体のトランスクリプトーム解析から、FvD14は種々の植物ホルモン応答や代謝経路など多くの下流遺伝子を制御することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物の繁殖様式と環境因子との関わりを分子レベルで解明するため、クローナル植物のモデルとしてのイチゴ属において、植物ホルモンストリゴラクトン(SL)受容体D14の欠損変異体をゲノム編集で作製し、その表現型を解析した。本研究により、クローナル植物であるイチゴ属の栄養繁殖と環境適応に関わる様々なプロセスにおいてSLが中心的な役割を持つということと、そのクロストークの詳細が初めて明らかにされた。環境に対する植物の適応メカニズムの解明だけでなく育種や生態学に重要な知見をもたらすと期待できる。さらにイチゴにおける新しい品種改良を目指したゲノム編集基盤として応用技術への波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Strigolactone (SL) regulates plant development and environmental responses, however, how SLs activate the downstream crosstalk pathway between growth and environmental adaptation in clonal plants remains unknown. We focus on SL function in *Fragaria* as model for clonal plants and generated the *F. vesca* mutants for DWARF14 (D14), a SL receptor, by CRISPR/Cas9. The fvd14 knockout exhibited trade-off in growth responses between organ sizes and numbers during vegetative growth. The mutants also exhibited the increased stomatal aperture, however, it was regulated by the abscisic acid (ABA)-independent pathway. Transcriptome analysis indicated FvD14 controls many downstream genes including plant hormone responses and several metabolic pathways. These findings reveal a comprehensive cross-talks of plant development and environmental responses, in which SL perception acts a central role in the clonal plant, *Fragaria*.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ストリゴラクトン 栄養繁殖 ゲノム編集 イチゴ 環境応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の永続的かつ旺盛な器官成長は多様な環境変化に应答し制御されている。進化の過程で植物が環境に適応しつつどのように形態形成を調節することで繁栄できるかについて、その詳細な機構の解明は重要である。植物の生長は環境ストレスにより負に制御されるが、発達段階やストレスに応じた複雑なシグナル伝達が存在すると考えられる。顕花植物の多くは有性生殖と無性生殖の2つの生殖様式を持っており、生産様式としてトレードオフあるいは拮抗するの関係として制御されている。栄養成長は最も一般的な無性生殖の一つとして利用され、クローナル生長とも呼ばれている。2つの生殖様式の制御は植物種において適切に保存され、植物体内において植物ホルモンを介した制御だけでなく環境因子によって影響を受けることも示されている。栄養繁殖植物の繁殖様式と環境因子との関わりを分子レベルで明らかにすることで、植物の環境に対する適応メカニズムの重要な機構の一つ解明が期待できるだけでなく、育種や生態学にとって重要な知見をもたらすと期待できる。

本研究は、過酷な環境下での植物の環境適応と生態を明らかにするために、これまで未解明であったバラ科植物イチゴ (*Fragaria*) 属の生態に着目した。*Fragaria* 属は二倍体 ($2n=14$) から八倍体 ($2n=56$) まで、倍数性の異なる多様な野生種系統が北半球に広く分布しており、独自の生態をもつ多様な野生種の存在や様々な栽培品種が開発されている。*Fragaria* 属の主要な繁殖器官として、親株の腋芽から分化した細長いシュートである匍匐枝 (ランナー) がある。ランナーが伸長し着床した新しい土壌では新規に子株 (ラメット = 栄養繁殖体) が形成され、新しい環境に適応する固有のメカニズムが発達していると考えられる。*Fragaria vesca* は二倍体であり全ゲノムが解読された。その一方で、*Fragaria* 属の環境応答や生長分化における分子レベルでの解明は遅延しており、固有の環境適応戦略や生態の解明や、環境応答制御に関わる因子はいまだ未解明である。さらに、*Fragaria* が属するバラ科は地球上で最も繁栄する植物の科の一つである一方で、リンゴやモモなどその多くが木本植物であるため、実験材料としての利用が難しく、バラ科植物の基礎的な知見は少なかった。

ストリゴラクトン (SL) は植物の枝分かれと寄生植物との相互作用を制御する植物ホルモンである。SL は植物の分枝に重要な役割を果たし、SL 生合成変異体やシグナル伝達変異体では、分枝の表現型が増強されることが示されている (Umehara et al., 2008; Gomez-Roldan et al., 2008)。SL 受容体 DWARF14 (D14) は枝分かれ抑制因子であり、SL 存在下で下流の制御因子 D53 に結合することで、D53 のプロテアソーム系による分解を誘導し、SL の応答反応 (枝分かれ抑制) が引き起こされる。植物の成長や環境応答における SL の分子機構は、主にシロイヌナズナ、イネなど主要なモデル植物で解明されてきた。様々な植物種の固有の環境適応における SL の役割は未解明であった。さらに、SL がクローナル生長においてどのように下流の経路を活性化するかなどの詳細は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

近年、シロイヌナズナの水分ストレス応答に SL が正の制御因子として機能することが明らかにされた (Ha et al., 2014)。植物ホルモン、アブシジン酸 (ABA) シグナル伝達経路は、水分ストレス応答と耐性に重要な役割を持つ (Osakabe et al., 2014) が、栄養繁殖性の植物における SL と ABA の協調的な役割や、SL が制御する水分ストレス応答と形態形成との関わりを明らかにすることで、以上のような環境適応とクローナル生長の制御に関わる分子制御機構の解明が期待できると考えられた。本研究は、二倍体イチゴである *F. vesca* において SL の初期シグナル伝達機構とその環境適応における機能を明らかにすることを試みた。CRISPR/Cas9 を用いて *F. vesca d14* 変異体を作成し、変異体の表現型と水不足ストレスに対する応答を解析することで、環境ストレス下における植物の生存戦略に関わる新規シグナル伝達機構の解明を目指し、環境応答と生長分化の分子メカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

データベースに公開されている *FvD14* の遺伝子配列より、*FvD14* のゲノム上の2箇所を標的として gRNA (gRNA1 および gRNA2) を設計し、それぞれの標的配列をすでに構築済みの双子葉植物に最適化させた高効率 CRISPR-Cas9 ベクターへ導入した。*F. vesca* のリーフディスクを用いアグロバクテリウムを介して CRISPR-Cas9 を形質転換し、組織培養系において植物体を再生させた。それぞれ形質転換当代 (T0 世代) において、体細胞レベルでバイアレリック変異 (100% 変異体) を示すノックアウト体を複数得てランナーによる株分けを行い、これらの変異系統において栄養繁殖性および水分環境に対する応答性に関わる表現型を解析した。次に、*F. vesca* における *FvD14* 遺伝子欠損の影響を分子レベルで明らかにするために、通常生育条件および水分損失環境条件下で、野生型および *fvd14* 変異体の RNA シーケンスを行い、発現する遺伝子について網羅的に解析し、栄養繁殖と環境適応に関わるトランスクリプトームを明らかにした。

4. 研究成果

F. vesca SL シグナル伝達因子の同定および高効率ゲノム編集技術による変異体作製
二倍体イチゴ *F. vesca* ゲノムに対し、データベースより SL 受容体 *DWARF14* (*D14*) および、

D14 の相同性遺伝子である発芽誘導物質カリキシン受容体 *KARRIKIN-INSENSITIVE2* (*KAI2*) を検索した結果、*F. vesca* ゲノムにそれぞれ 1 種の遺伝子を同定した。

Fvd14 の第 1 エクソン上の 2 箇所を標的として gRNA (gRNA1 および gRNA2) を設計し、それぞれの標的配列導入した高効率 CRISPR-Cas9 ベクター (Ueta et al., 2017) をリーフディスク法により無菌的に培養した *F. vesca* Hawaii 4 へ形質転換した。長期培養期間を経て得られた gRNA1 および gRNA2 のそれぞれの CRISPR-Cas9 ベクターを導入して得られた再生シュート系統において変異解析を行ったところ、形質転換当代にてターゲットゲノムに 100% の効率で変異を導入する系統が複数系統得られたことが明らかになった (図 1)。*Fvd14* 遺伝子上の標的として形質転換当代において bi-allelic 変異が検出され、*Fvd14* 欠損変異系統が単離された。

SL シグナル伝達機能欠損株における形態形成および水分ストレス応答の解析

ゲノム編集により作製した *Fvd14* 欠損変異体系統の表現型の詳細解析を行った。*fvd14* は、ロゼット葉、ランナー、および腋芽数などの栄養繁殖に関わる形態形成について、野生型に比べいずれも大きく増大していることが示された。特に、生殖器官である花芽の数よりも、ロゼット葉・ランナー・腋芽数の増大率が非常に大きく、*Fragaria* 属の SL により栄養繁殖性が強く制御されることが明らかになった。一方、器官の大きさは野生型より小さく、*fvd14* では極端に増大した栄養成長器官の数を相殺するように器官生長が制御されることが示唆された。

次に、環境要因に対する応答を明らかにするために、*fvd14* の気孔閉口に関する表現型を解析した。遠赤外線カメラによる葉面温度は気孔開度を非破壊で計測することが可能である (図 2)。遠赤外線カメラにより *fvd14* の葉面温度を計測した結果、野生型より低い温度が示され、気孔開度が通常条件で増大していることが示唆された。そこで、次に、*fvd14* の気孔閉口度の低下における ABA・水分ストレスシグナル伝達の関わりを明らかにするために、ABA 誘導性の気孔閉鎖に対する表現型を解析した (図 2)。その結果、*fvd14* の気孔開度は通常の育成条件下で野生型よりも 1.5 倍程度大きく (図 3)、より高い CO₂ 吸収能を示すことが明らかになった。*fvd14* はこれらのことから、通常環境条件下では、栄養繁殖の増大により、より高い CO₂ 吸収能とバイオマス生産量を示すことが明らかになった。一方で、アブジシン酸 (ABA) による気孔閉口は野生型と同程度の応答性を示し、葉の水分損失速度は変異体が高い傾向があったが、水分ストレス耐性には大きな差がみられなかった。

SL シグナル伝達機能欠損株における形態形成および水分ストレス応答に関わるトランスクリプトームの解明

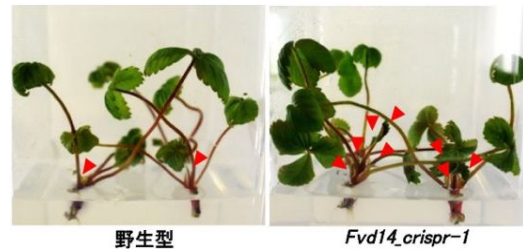
Fragaria 属における *D14* 遺伝子欠損の影響を分子レベルで明らかにするために、通常生育条件および水分損失環境条件下で、野生型および *fvd14* 変異体の RNA シーケンスを行い、それぞれの条件下で特異的に発現変動する遺伝子群を網羅的に解析した。その結果、*fvd14* 変異体の通常生育条件下では、野生型よりも多くの遺伝子群の発現変動が生じており、特に、様々な植物ホルモン関連遺伝子群の発現変動が生じており、SL 受容体シグナル伝達経路の下流で植物ホルモンのクロストークが制御されていることが明らかになった。特にジベレリンやオーキシン応答に関わる遺伝子群の変動が見られた一方で、ABA 応答性遺伝子の発現には大きな差は見られなかった。また様々な代謝経路やストレス応答に関わる因子の発現変動が生じており、野生型で水分損失ストレス時に変動する遺伝子群と大きく重複性が見られた。*Fragaria* 属において SL シグナルにより様々な遺伝子発現が制御されることが明らかになった。

今後は、*D14* 制御下で *Fragaria* 属における高い栄養繁殖性を制御する重要因子群および、環境応答のクロストークに関わる因子群の制御機構について詳細解析し、栄養繁殖性植物における環境適応の分子機構を解明する予定である。

< 文献 >

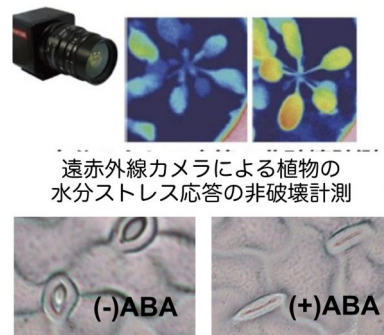
Gomez-Roldan, V. et al. (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455, 189.

Ha, C-V. et al. (2014) Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress.



Fvd14_crispr-1 line#1 解析クローン数
 5'・CGCCTCCATT-CGCCGCCCGAGCTTTTCTC・3' WT 0/28
 5'・CGCCTCCATT-CGCCGCCCGAGCTTTTCTC・3' -1 12/28
 5'・CGCCTCCATTTCGCCGCCCGAGCTTTTCTC・3' +1 16/28

図 1. CRISPR/Cas9 により作製された *F. vesca* ストリゴラクトン受容体 *D14* 変異体の変異配列および表現型解析



遠赤外線カメラによる植物の水分ストレス応答の非破壊計測

ABAによるイチゴ気孔の開鎖誘導実験

図 2. ストリゴラクトン変異体における水分ストレスおよび ABA 応答性に関わる表現型の解析

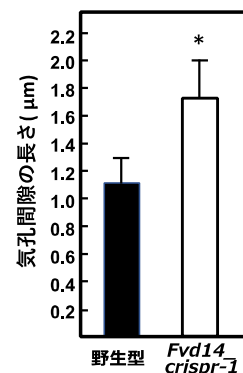


図 3. *F. vesca* *D14* 欠損変異体における通常生育条件下での気孔開度

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111, 851.

Osakabe, Y. *et al.* (2014) Response of plants to water stress. *Front. in Plant Sci.*, 5, 86.

Umehara, M. *et al.* (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455, 195.

Ueta, R. *et al.* (2017) Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* 7, 1.

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Li, W., Nguyen, K., Chu, H., Watanabe, Y., Osakabe, Y., Sato, M., Toyooka, K., Seo, M., Tian, L., Tian, C., Yamaguchi, S., Tanaka, M., Seki, M., Tran, L.-S.	4. 巻 103
2. 論文標題 Comparative functional analyses of DWARF14 and KARRIKIN INSENSITIVE2 in drought adaptation of <i>Arabidopsis thaliana</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Journal	6. 最初と最後の頁 111-127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.14712	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 Wakabayashi, T., Hamana, M., Mori, A., Akiyama, R., Ueno, K., Osakabe, K., Osakabe, Y., Suzuki, H., Takikawa, H., Mizutani, M., Sugimoto, Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 Direct conversion of carlactonoic acid to orobanchol by cytochrome P450 CYP722C in strigolactone biosynthesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	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） 10.1126/sciadv.aax9067	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7件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 刑部祐里子
2. 発表標題 植物ゲノム編集の最先端ツール、導入、再生-植物の機能を生かすゲノム編集技術と植物再生テクノロジー
3. 学会等名 バイオインダストリー協会、植物バイオ研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 刑部祐里子
2. 発表標題 新しいゲノム編集ツールと植物再生法による遺伝子改変技術
3. 学会等名 第62回植物生理学会年会シンポジウム「ゲノム編集アップデート 最新技術植物編 目指せ植物科学への貢献」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 刑部祐里子
2. 発表標題 植物のエネルギー代謝制御による環境耐性の獲得
3. 学会等名 植物環境応答ワークショップー生物の環境応答のメカニズム解明を目指して（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 刑部祐里子
2. 発表標題 植物の機能を生かすゲノム編集技術研究
3. 学会等名 第2回明治大学科学技術研究所公開講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮地朋子、田上翔也、坂口航平、島田佳南里、中嶋英子、藤井秀輝、篠原啓子、原田陽子、刑部敬史、刑部祐里子
2. 発表標題 CRISPR/Cas9によるFragaria vescaストリゴラクトン受容体D14ノックアウト体の表現型解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoko Miyaij, Shoya Tagami, Kohei Sakaguchi, Kanari Shimada, Eiko Nakashima, Syuki Fujii, Keiko Shinohara, Yoko Harada, Keishi Osakabe, Yuriko Osakabe
2. 発表標題 Genome editing of the model strawberry “Fragaria vesca” using plant-optimized CRISPR/Cas9 system
3. 学会等名 Frontiers in Genome Engineering 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮地朋子, 田上翔也, 坂口航平, 島田佳南里, 中嶋英子, 藤井秀輝, 篠原啓子, 原田陽子, 刑部敬史, 刑部祐里子
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いて作製したストリゴラクトン受容体D14変異体の形態および乾燥応答能に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 刑部祐里子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 実教出版	5. 総ページ数 4
3. 書名 家庭科資料64号	

1. 著者名 宮地朋子、刑部祐里子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 11
3. 書名 ゲノム編集食品 農林水産分野への応用と持続的社会的の実現, 第3章 導入技術の進歩	

1. 著者名 和田直樹、刑部祐里子、刑部敬史	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー	5. 総ページ数 8
3. 書名 最新のゲノム編集技術と用途展開	

1. 著者名 刑部祐里子、原千尋、橋本諒典、宮地朋子、刑部敬史	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 14
3. 書名 完全版ゲノム編集実験スタンダード (実験医学別冊)	

〔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
---------	---------