

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14650

研究課題名(和文) 幼樹開花性を利用したCRISPR/Cas9システムの果樹での展開および評価

研究課題名(英文) An attempt to evaluate the applicability of CRISPR/Cas9-mediated genome editing system for fruit tree breeding by utilizing precocious flowering strains

研究代表者

山根 久代 (Yamane, Hisayo)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80335306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、近年急速に研究開発が進んできたCRISPR/Cas9を利用したゲノム編集技術を応用して、幼樹開花性をもつカンキツや年複数回開花性をもつブルーベリーなど開花サイクルの早い果樹品種を利用して果樹におけるNBT実証研究のモデルケースを早急に確立することである。本研究ではまずこれら果樹における開花サイクルをさらに加速化させる技術開発をおこなった。さらにブルーベリーにおいて実際にゲノム編集個体の作出が可能であることを示す結果を得た。しかしながら、形質転換体の表現型には変化がみられずゲノム編集による新形質の獲得には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、研究開始当初未報告であった果樹におけるゲノム編集を実施することを目的とした。世代更新の加速化が期待できる年複数回開花性ブルーベリーにおいて、CRISPR/Cas9を利用したゲノム編集の有効性を示すことができた。果樹を含む様々な作物において、有用形質をもち、かつ遺伝子組換えの痕跡を残さないゲノム編集個体の作出に関する研究がおこなわれている。本研究で示した開花促進技術とゲノム編集技術を応用することで、果樹におけるゲノム編集技術の実証研究の加速化が期待される。

研究成果の概要(英文)：Genetic transformation and genome editing would have possibility to accelerate breeding process for many fruit crops. CRISPR/Cas9 is a genome editing system, which enables us to modify the site-specific genomic region. The objective of this study is to assess the applicability of CRISPR/Cas9 system in fruit trees by using easy-flowering genotypes of two fruit tree species. In this study, we first developed the method to promote early-flowering in citrus and characterized genetic system of easy-flowering in blueberry. Then, we successfully induced mutation in easy-flowering blueberry genotype by using CRISPR/Cas9 through the modification of efficient transformation and regeneration system. Although no phenotype changes have been observed so far in these mutants, future molecular characterization on these mutants will be effectively used to evaluate the genome editing performance in fruit tree species.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：ゲノム編集 果樹 花成

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

1. 研究開始当初の背景

近年、新たな植物育種技術 (new plant breeding techniques; NBT) が開発され、注目を集めている。NBT とは具体的には、人工ヌクレアーゼを使ったゲノム編集技術、RNA 依存性 DNA メチル化技術、遺伝子組換え台木への接ぎ木による遺伝子制御技術などをさす。NBT によって作り出される新作物は、育種の過程で遺伝子組換え技術を利用するが、最終産物の段階では遺伝子組換え技術を使用した痕跡が残らないとされている。そのため、NBT により開発された新植物に対して、カルタヘナ議定書を適用することの是非について、我が国のみならず欧米諸国でも議論が続けられている。一方、NBT により開発された新植物は、マーカー遺伝子など外来遺伝子の導入もなく、導入される変異は自然条件下での突然変異と変わらない。すなわち、遺伝子組み換え作物 (GM 作物) の社会的受容拡大を妨げる懸念事項のいくつかを排除できることから、NBT により社会的重要度の高い新作物を実際に開発できれば、NBT 作物が社会に容認される可能性も高い。しかしながら研究開始当初は、NBT の実証研究はモデル植物を利用した仮説証明実験にとどまっておき、作物を対象とした新品種開発事例は報告されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、近年急速に研究開発が進んできた CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集技術を応用して、幼樹開花性をもつカンキツや年複数回開花性をもつブルーベリーなど開花サイクルの早い果樹品種を利用して果樹における NBT 実証研究のモデルケースを早急に確立することで、今後の NBT 作物開発にむけた先駆的研究を展開することである。

果樹における NBT の実証研究にあたっては、長い幼木相は研究進展を妨げる要因である。そこで、カンキツの一種であり幼樹開花性を有するグレープフルーツ (*Citrus x paradise*) 'マーシュシードレス' を研究に用いる。グレープフルーツは胚軸を利用した形質転換成功例が報告されており (Yang ら, 2000)、播種後 1 年で開花がみられることは古くからよく知られている (岩政・大庭, 1975)。一方、ハイブッシュブルーベリー (*Vaccinium corymbosum*) の 'Blue Muffin' は年複数回開花性を示すことが知られており (Scalzo ら, 2008; Miller ら, 2011)、京都市の自然条件下においても、夏から晩秋にかけて連続的に開花する。これらの果樹種を対象に CRISPR/Cas9 システムを用いた変異導入と世代更新の加速化を試みる。交配を介して導入遺伝子を排除することで、組換えの痕跡を残さない果樹新品種の開発をめざす。本研究では、*TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* あるいは *CENTRORADIALIS (CEN)* などの花成抑制遺伝子をターゲット遺伝子とする (Kobayashi ら, 1999; Huang ら, 2012)。これにより、さらに花成促進をはかり世代更新を早めることで研究期間内の新品種作出をめざす。新品種が得られれば、分子生物学的分析によって、他のゲノム部位での遺伝子変異 (オフターゲット) についても確認し、NBT による新果樹品種創出のためのモデルケースとして研究を進めることを考えた。

3. 研究の方法

(実験 1) 低温とジベレリン複合処理によるグレープフルーツ実生の幼樹開花率の促進

市販されているグレープフルーツ 'マーシュシードレス' 果実より採取した多胚種子を供試した。種皮を剥皮し、25℃ 暗黒下で 10 日間静置後、発芽してきた珠心胚を分離し直径 8cm の小ポットに 6 月に播種した。播種後は京都大学大学院農学研究科附属農場で慣行にしたがって育成し、第 7 葉出葉まで成長した個体を用いて 9 月より処理を開始した。低温処理 (最高気温 15℃ 以下) は、9 月から 11 月までの区と 9 月から 3 月までの 2 処理区とし、ジベレリン処理 (100ppm, GA3, ナカライテスク) は、9 月、11 月あるいは 3 月に行った。それぞれの単独処理区と低温およびジベレリンの複合処理区を設けた。各処理区につき 9 から 19 個体を供試した。低温障害の発生を避けるため、冬季 (12 月から 3 月) にはすべての個体を加温温室 (最低気温 10℃ 以上) に移設した。播種翌年の 2 月から 5 月に開花個体数を記録し、開花率を算出した。

(実験 2) ブルーベリーにおける花成関連遺伝子の解析

京都大学大学院農学研究科附属農場に植栽されている 3-5 年生のハイブッシュブルーベリー 'ブルーマフィン'、サザンハイブッシュブルーベリー 'オニール'、'サンシャインブルー' ならびにノーザンハイブッシュブルーベリー 'ブルークロップ' を供試した。2016-2017 年は 5 月から 10 月に、2017-2018 年は 5, 7, 9, 11 月に毎月 1 回サンプリングを行った。もっとも頂端に近い芽あるいは頂端近くの葉を採取した。

採取した器官より RNeasy Plant Mini kit (キアゲン) を用いて RNA を抽出した。逆転写後に得られた cDNA を用いて、*VcFT* (Song ら, 2013)、*VcTFL1* (Gaire・Wilde, 2016) ならびに *VcCEN* (Yamane ら, 印刷中) 特異的プライマーによって定量 PCR をおこない、各遺伝子の発現量を算出した。リファレンスには *VcUBC28* を用いた (Yamane ら, 印刷中)。

(実験 3) ブルーベリーにおける再分化系向上技術の開発

ブルーベリー 'ブルーマフィン' ならびに 'オニール' を供試した。各個体の休眠芽より初代培養体を確立した。葉あるいは茎切片から不定芽再生における最適培地組成の検討をおこな

った。

(実験4) CRISPR/Cas9によるブルーベリー花成抑制遺伝子 *CEN* ノックアウト個体の作出

CRISPR/Cas9 バイナリーベクター (Ueta ら, 2017) を徳島大学生物資源産業学部刑部敬史教授ならびに刑部佑里子准教授より分譲いただいた。Focas (Osakabe ら, 2016) により *VcCEN* 遺伝子内で切断効率が高く、オフターゲットの危険性が低いと予想されるターゲット配列を4種類選定し、ベクターに挿入した。'ブルーマフィン'ならびに'オニール'よりリーフディスクを作製し、アグロバクテリウム法により遺伝子導入を試みた。GFP 発現およびカナマイシン耐性により形質転換体を選抜した。T7E1 アッセイあるいはサンガーシーケンス法によるシーケンス解析により変異の有無を調査した。

4. 研究成果

(実験1)

実験結果を第1表に示した。処理区によって幼樹開花率は28-76%となった。低温処理(9月から11月)とジベレリン11月処理の複合処理区において幼樹開花率は最大となった。秋の低温処理により開花期の前進がみられた。低温処理による開花促進効果は以前の報告を支持した(岩政・大庭, 1975; Hield ら, 1967)。一方、ジベレリン単独処理は11月処理をのぞき、開花を阻害した。Nesumi ら (1992) はジベレリン処理は処理時期によってグレープフルーツの幼樹開花率を促進あるいは阻害したと報告している。今回の実験条件下においては、秋季あるいは冬季の低温処理直後のジベレリン処理により、いずれの処理区においても幼樹開花が促進された。

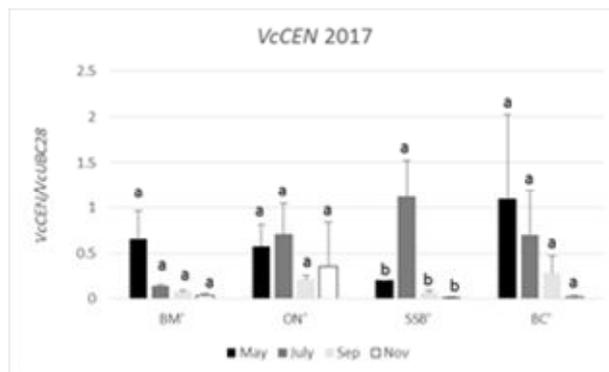
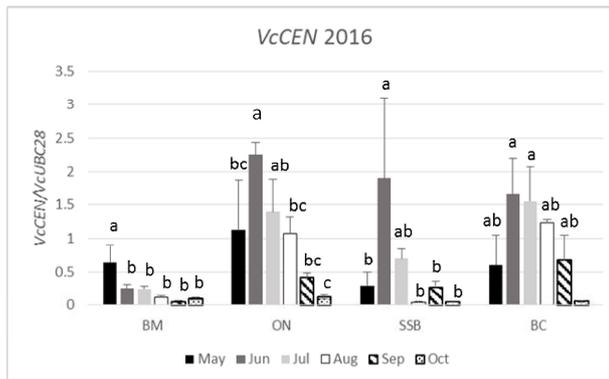
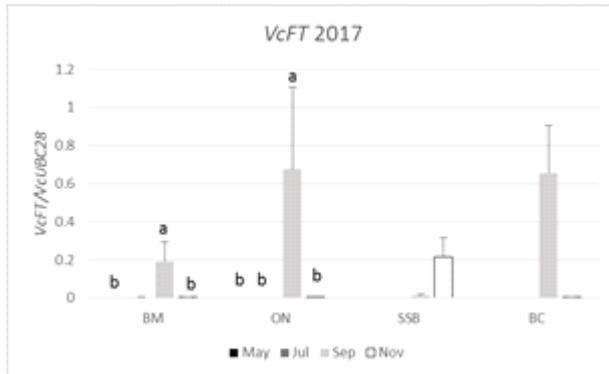
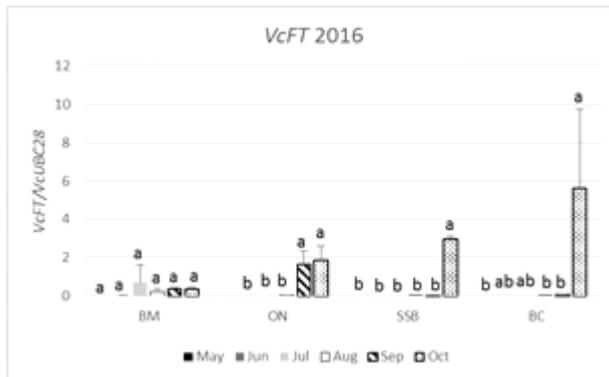
第1表 低温あるいはジベレリン処理がグレープフルーツ実生の幼樹開花率に与える影響

Treatment name	Cool temp. treatment period	GA3 treatment time	No. of seedlings that showed precocious flowering				Precocious flowering rate (%)
			Feb.	Mar.	Apr.	May	
Cool1-GA3	From Sep. to Nov.	Nov.	5	8	6	0	53/67 (79%)
Cool1	From Sep. to Nov.	-	2	7	6	0	53/67 (79%)
Cool2+GA3	From Sep. to Mar.	Mar.	5	0	3	7	50/65 (77%)
Cool2	From Sep. to Mar.	-	0	0	5	1	67/93 (72%)
Cool3+GA3	From Nov. to Mar.	Mar.	5	0	3	1	49/64 (76%)
Cool3	From Nov. to Mar.	-	0	0	2	0	34/62 (55%)
GA3 Sep.	-	Sep.	0	0	0	0	0/67 (0%)
GA3 Nov.	-	Nov.	0	2	3	0	7/63 (11%)
GA3 Mar.	-	Mar.	0	0	0	0	0/77 (0%)
Control	-	-	0	0	1	1	50/65 (77%)

以上より、グレープフルーツ実生の幼樹開花は環境条件により変化することから、最適条件で育成することで、世代促進を加速化可能であることが示された。今後、カンキツの幼樹開花性を利用したゲノム編集技術検証の加速化に応用できると考えられた。

(実験2)

VcTFL1 については解析が困難であったため、*VcFT* と *VcCEN* についての発現解析結果を第2図に示した。年複数回開花性を示す'ブルーマフィン'と年1回開花性を示す'ブルークロップ'を比較すると、'ブルーマフィン'において夏から秋において *VcFT* ならびに *VcCEN* の発現は低く推移した。特に、供試した4品種のうち'ブルーマフィン'のみで花成がおきる7月において、'ブルーマフィン'における *VcCEN* 発現量の低下が顕著であった。一般的に、ブルーベリーは短日によって花成が促進される (Spann ら, 2003)。長日条件においても花成が促進される'ブルーマフィン'では日長反応性に何らかの変異が生じたと考えられる。よって、今回示された長日条件における *VcCEN* の'ブルーマフィン'に特異な発現低下は、'ブルーマフィン'の年複数回開花性と何らかの関連が示唆された。また、ブルーベリーの花成制御において、*VcCEN* が重要な役割を果たしていることも示唆された。実験4では、*VcCEN* のゲノム編集(ノックアウト)による世代促進加速化を目的としているが、本実験結果はその妥当性を支持するものと思われた。



(実験3)

‘ブルーマフィン’と比較して‘オニール’は再分化効率が悪かったため、‘オニール’において、再分化誘導培地組成が不定芽細分化率に与える影響を調査した結果、MS培地に TDZ 1 μM と NAA 0.5 μM を添加した培地において最も高い再分化率が得られた。今後、この条件で培養することで形質転換効率の向上が期待できると考えられた。

(実験4)

‘ブルーマフィン’ならびに‘オニール’において計 3000 枚のリーフディスクを供して、アグロバクテリウム法により形質転換体の作出を試みた。カナマイシン耐性ならびに GFP 蛍光強度により前スクリーニングをおこない、抽出した DNA を用いた PCR により外来遺伝子の

導入の有無を確認した結果、13系統の形質転換体を獲得した。T7E1アッセイによりそのうち7系統でターゲット領域に変異が検出された。シーケンス解析をおこなったところ、いくつかの系統ではターゲット配列に1塩基欠損がみとめられた。しかしながら変異導入効率は1/10以下であり、研究期間内において、顕著な表現型の変化は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Yamane, H., S. Mimura and R. Tao. 2018. Precocious flowering of Citrus seedlings and expression analysis of *FT/TFL1* family genes and *miR156/172* involved in vegetative phase transition. *Acta Hort.* 1208: 25-30.
2. Omori, M., H. Yamane, K-T. Li, R. Matsuzaki, S. Ebihara, T-S. Li and R. Tao. 2019. Expressional analysis of *FT* and *CEN* genes in a continuously flowering highbush blueberry 'Blue Muffin'. *Acta Hort.* (in press)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 松崎隆介*・森本拓也・山根久代・田尾 龍太郎．自然条件下で連続開花性を示すサザンハイブッシュブルーベリー 'ブルーマフィン' の品種特性．園芸学会平成 28 年度春季大会. 2016.
2. 松崎隆介*・森本拓也・山根久代・田尾龍太郎．自然条件下で連続開花性を示すサザンハイブッシュブルーベリー 'ブルーマフィン' の花成様式．園芸学会平成 28 年度秋季大会 2016.
3. Yamane* H., S. Mimura, and R. Tao. Precocious flowering of Citrus seedlings and expression analysis *FT/TFL1* family genes and *miR156/172* involved in vegetative phase transition. The Second Asian Horticultural Congress. 2016.
4. 松崎隆介*・山根久代・海老原脩・田尾龍太郎．自然条件下で連続開花性を示すサザンハイブッシュブルーベリー 'ブルーマフィン' の花成関連遺伝子の発現解析 園芸学会平成 29 年度秋季大会. 2017.
5. Omori*, M. Studies on the establishment of transformation system for 'Blue Muffin', a continuously flowering blueberry cultivar. Kyoto Univ. & National Taiwan Univ. Workshop (Mei-Fong Forum 2017) 2017.
6. Yamane*, H., K-T. Li, R. Matsuzaki, S. Ebihara, T-S. Li, M. Omori and R. Tao. Comparative observations of phenological characters of continuously flowering high-bush blueberry 'Blue Muffin' in temperate and subtropical climates. The 30th International Horticulture Congress. 2018.
7. Omori*, M. Promotion of flowering by CRISPR/Cas9-mediated genome editing in blueberry. HZAU-NTU-KU Joint Horticulture Symposium. 2018.
8. Li*, T., H. Yamane, M. Tomiyama and R. Tao. Characterization of continuous flowering blueberry 'Blue Muffin' and the distinctive effect of hydrogen cyanamide on flowering. The 6th Plant dormancy symposium. 2018.

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：三村 昌太郎

ローマ字氏名：MIMURA SHOTARO

研究協力者氏名：松崎 隆介

ローマ字氏名：MATSUZAKI RYUSUKE

研究協力者氏名：大森 真史

ローマ字氏名：OMORI MASAFUMI

研究協力者氏名：李 泰山

ローマ字氏名：LI TAISHAN

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。