

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04942

研究課題名(和文) ゲノム編集によるスギの新たな育種技術の基盤の構築

研究課題名(英文) Development of New Breeding Technology platform by Genome editing in *Cryptomeria japonica*, Sugi

研究代表者

谷口 亨 (Taniguchi, Toru)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等

研究者番号：00360470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集は狙った遺伝子の塩基欠失などにより有用な形質を付与する新しい育種技術である。本研究ではCRISPR/Cas9システムによるスギのゲノム編集技術を開発し、その効率を評価した。また、スギを無花粉にするためのターゲット遺伝子を選定し、それら遺伝子をゲノム編集したスギを作製した。さらには、優良なスギを無花粉にするために、スギのエリートツリーの種子から誘導した個体再生能のある細胞を液体窒素保存したバイオリソースを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果であるスギのゲノム編集技術開発は、未だ未解明な部分が多いスギ等の針葉樹の遺伝子の機能解析を可能にする有力なツールとなり、学術的意義がある。また、日本で最も重要な造林樹種であるスギの花粉症は国民病と言われる社会問題である。本研究によりスギの新たな育種技術の基盤を構築できたことは成長等に優れる優良なスギに花粉を出さない形質を付与することを可能とするため、社会的な意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Genome editing is a new breeding technology that imparts useful traits by deleting bases of targeted genes. In this study, we developed a genome editing technology of *Cryptomeria japonica* using the CRISPR/Cas9 system and evaluated its efficiency. In addition, we selected target genes for pollen-free *C. japonica*, and prepared *C. japonica* whose target genes were edited. Furthermore, in order to make elite tree of *C. japonica* pollen-free, we constructed a bioresource in which cells capable of plant regeneration by somatic embryogenesis were stored in liquid nitrogen.

研究分野：森林科学

キーワード：スギ ゲノム編集 無花粉化

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。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

スギなどの樹木は成育期間が長く、樹体が大きいが故に、交配による育種には長い年月が必要であり、成長に加え、花粉症への対策形質（花粉が無い又は少ないこと）や強度形質など、複数の優良形質を同時に併せ持つスギを作ることは困難と言わざるを得ない。一方、近年、ゲノム編集と言われる遺伝子の配列を改変する技術が注目されている。そのなかでも CRISPR/Cas9 システムは、標的型突然変異と言われ、任意の標的遺伝子を精度よくノックアウトする。遺伝子のノックアウトにより、望ましい形質を発現させることができ、医療、水産業、農業など様々な分野で研究が精力的に行われている。このような背景のもと、ゲノム編集により従来型育種で作製されたスギのエリートツリーなどに花粉抑制や強度増強形質を付与するためには、ゲノム編集によるスギの育種技術の基盤の構築を行う必要がある。

### 2. 研究の目的

ゲノム編集によるスギの新たな育種技術の基盤を構築するため、スギのゲノム編集技術の確立、無花粉化のための標的遺伝子の同定と標的遺伝子のゲノム編集を行う。また、スギをゲノム編集するためには不定胚形成細胞と呼ばれる胚形成能力を有する細胞が必要となる。そこで、スギのエリートツリー等の優良なスギから誘導した不定胚形成細胞を液体窒素で保存する培養細胞リソースの作製を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) スギのゲノム編集技術の確立

植物のゲノム編集において標準的な手法である遺伝子組換えを介したゲノム編集技術のスギでの確立を目指した。具体的には、ゲノム編集遺伝子の発現ベクターをアグロバクテリウムを介してスギのゲノム DNA に挿入することで、細胞内にゲノム編集遺伝子（ここでは人工制限酵素 Cas9 と標的領域を認識する gRNA からなる CRISPR/Cas9 システム）を発現させ、標的領域の改変を誘導する。本研究では、CRISPR/Cas9 発現ベクターの構成成分、つまりプロモーター、ターミネーター、そして遺伝子のコドン頻度をスギに最適化することで、ゲノム編集効率の向上を試みた。スギの形質転換方法の改良も併せて行い、効率向上を目指した (Konagaya *et al.* Plant Biotechnol. in print)。スギにおけるゲノム編集効率を見積もるため、標的遺伝子として、葉緑体生合成に関与するマグネシウムキラターゼ (*CjCh11*) を選択した。ゲノム編集により *CjCh11* 遺伝子が破壊されると葉の白化が目で判断できるため、短期間での機能評価が可能となる。

#### (2) 標的遺伝子の選抜

シロイヌナズナ等のモデル植物において花粉壁形成に関与し、遺伝子変異により雄性不稔型となることが知られている遺伝子について、スギのオーソログを単離し、花粉形成初期で発現する遺伝子を選抜した。

#### (3) 標的遺伝子のゲノム編集と表現型の調査

(2) により選抜した花粉壁形成に関与する遺伝子について、TAIL-PCR 法を用いてゲノム構造を解析した。続いて、各遺伝子においてタンパク質コード領域の 5' 側の領域から標的配列を選定した。DNA の切断効率は標的配列により異なり、現時点でその効率を正確に予測することは不可能なため、各遺伝子につき 3 つの標的領域を選抜した。遺伝子組換えにより CRISPR/Cas9 発現ベクターを導入し、標的領域が破壊された系統の個体再生を試みた。標的領域が破壊された個体については、特定網室でジベレリン処理により雄花を誘導し、雄花の稔性を調査した。

#### (4) スギの培養細胞リソースの開発

2016 年は 4 種子親、4 花粉親の 16 組み合わせ、2017 年は 3 種子親、3 花粉親の 9 組み合わせ、2018 年は 4 種子親、4 花粉親の 16 組み合わせ（3 年間で合計 41 組み合わせである。組み合わせのことを交配家系と呼ぶ。）のスギのエリートツリーの人工交配を 3 月に実施した。7 月上旬に採取した未熟種子から不定胚形成細胞を誘導した。次に不定胚形成細胞を不定胚誘導培地で培

#### 1. 液体窒素中での凍結保存

- (1) 固形培地で 1 週間継代培養した不定胚形成細胞
- (2) 不定胚形成細胞を LSP 液に懸濁 (500 mg flesh weight cells per ml of LSP)
- (3) 室温で 90 分 (60 rpm の往復振盪)
- (4) 細胞懸濁液 (≥ 0.9 ml) を 2 ml クライオバイアルに入れ、PTFE テープでシール
- (5) バイアルを EPS チューブコンテナ (マルエム、SD-14) に入れ、-30 °C で 6 時間予備凍結
- (6) 液体窒素にバイアルを入れ、凍結保存

#### 2. 融解と再培養

- (1) 40 °C の温水にバイアルを入れ、2 分間で融解
- (2) 固形培地上のろ紙 (2 枚重ね) にバイアル中の細胞懸濁液を滴下し、一昼夜培養
- (3) 懸濁細胞 (上のろ紙) を新鮮培地に移動し、25 °C・暗所で培養

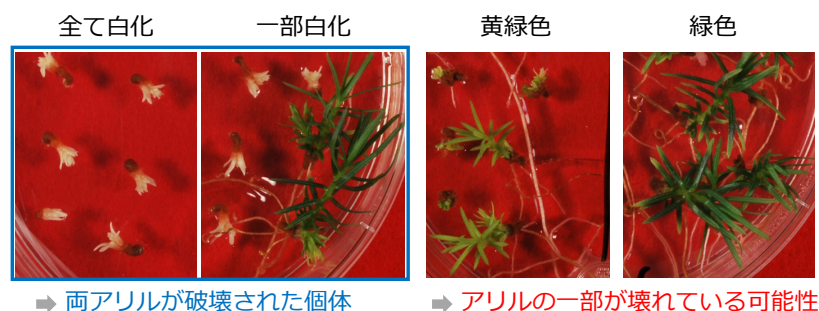
図1 スギの不定胚形成細胞の凍結保存と再培養の方法

養して不定胚を効率よく誘導する細胞系統を選抜した。選抜した細胞は図1の方法 (Taniguchi *et al.* Plant Biotechnol. in print) に従い、液体室素中に保存した。なお、図1に示す方法で28系統の細胞を保存し再培養したところ、27系統(96%)で再増殖することを確認している。

#### 4. 研究成果

##### (1) スギのゲノム編集技術の確立

ゲノム編集効率を向上させるためには、CRISPR/Cas9の発現量を増やすことが重要である。そこで、これまでによく用いられてきた既知のプロモーター配列6種類、スギの細胞から新規に単離したもの1種類、合計7種類について、プロモーター活性をDual Luc法により解析した。その結果、パセリ由来のコビキチンプロモーター(PcUbi)が最も活性が高かったため、以降は本プロモーターをCas9発現に用いた。また、Cas9のコードン頻度をスギに最適化したベクターを導入し*CjChII*の破壊を試みた。両アリルがともに破壊されたことにより葉が白化した個体(図2)の取得効率が従来型Cas9のベクターでは18~33%であったのに対して、最適化ベクターでは46~82%と著しく向上した。以上のことから、CRISPR/Cas9発現ベクターのスギへの最適化がゲノム編集効率の向上に貢献したと判断した。



**図2 CRISPR/Cas9による*CjChII*遺伝子の破壊**

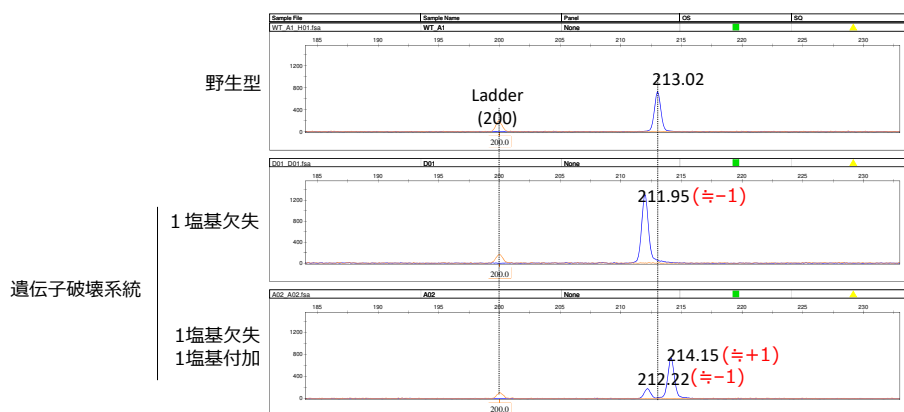
ゲノム編集により*CjChII*遺伝子の破壊が両アリルで起きた系統からは葉が白化した個体が取得できた。一方、一部分の破壊に留まった系統については黄緑色、または野生型と区別が付かない個体が得られた。

##### (2) 標的遺伝子の選抜

モデル植物における花粉壁形成関連遺伝子のスギのオーソログについて、定量RT-PCRによる発現解析によりスギ雄花で特異的に発現し、花粉形成初期である四分子期および小孢子期で発現する遺伝子を5つ(Cj#3, Cj#4, Cj#5/6, Cj#8, Cj#13)選抜した。これらをゲノム編集の標的遺伝子として供試した。

##### (3) 標的遺伝子のゲノム編集と表現型の調査

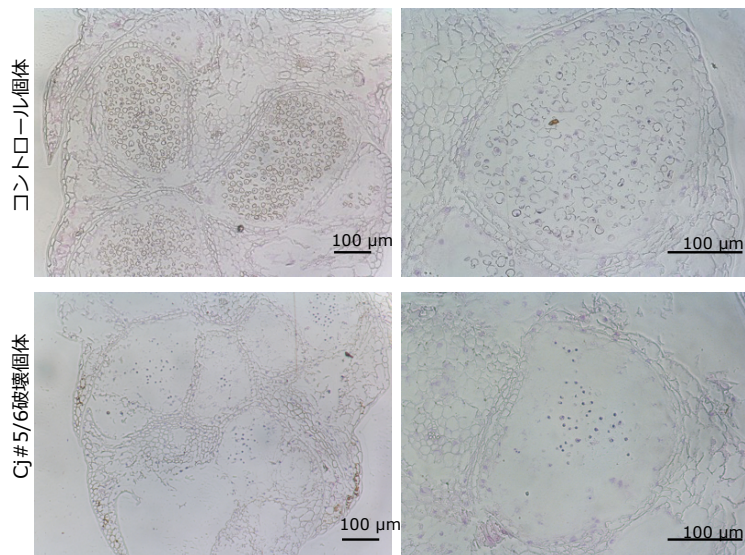
スギの無花粉化のために、花粉壁形成に関与する候補遺伝子をゲノム編集により破壊した系統の作出を試みた。標的遺伝子としては上記のCj#3, Cj#4, Cj#5/6, Cj#8, Cj#13の5つを選定し、それらゲノム構造を解析した後に3箇所(標的領域)をそれぞれ設定した。これらの標的領域を切断するベクターを構築し、スギへ遺伝子導入後、蛍光標識プライマーを用いた



**図3 *Cj#8\_t1*をゲノム編集により破壊した系統におけるフラグメント解析例**

フラグメント解析により遺伝子破壊の様式が判別可能となる。中段に示す系統は両アリルの*Cj#8\_t1*領域付近でそれぞれ1塩基欠失、下段の系統はアリルの片方は1塩基欠失、もう片方は一塩基が付加していることがそれぞれ判別出来る。

PCR産物のフラグメント解析を行うことで遺伝子の破壊を検出した(図3)。野生型と比較して数塩基の欠損や挿入が確認され、両アレルがともに破壊された系統の獲得効率は0~63.6%と、標的配列の違いによる効率の差異が顕著に現れた。破壊系統が全く得られない標的配列もあったが、特定の遺伝子に対し複数の標的配列を設定し、獲得率が低い危険を補償することで、全ての遺伝子について破壊系統を獲得することに成功した。これらの遺伝子破壊系統は特定網室で栽培しており、花粉稔性について調査した。その結果、Cj#5/6の破壊系統などから花粉形成が抑制された系統が確認された(図4)。現時点では個体サイズが小さいため、次年度も確認のための再調査を行う予定であるが、これら遺伝子はゲノム編集による無花粉スギ系統作出のための候補遺伝子として有望であると考えられる。



**図4 Cj#5/6破壊系統の雄花切片**  
Cj#5/6破壊系統において、花粉の形成が抑制されたことが切片の観察から明らかとなった。

#### (4) スギの培養細胞リソースの開発

2016年から2018年にかけて41交配家系で合計1857個の未熟種子外植体(コンタミにより廃棄した外植体を除く)を培養し、661個(35.6%)の外植体から不定胚形成細胞を誘導した。誘導効率は交配家系により異なり、3.3~86.0%(平均38.4%)であった。661個の外植体から誘導した細胞系統すべてを不定胚誘導培地で培養したところ321系統(48.6%)で不定胚を形成した。1枚のシャーレあたりの不定胚形成数(不定胚の形成効率)の平均値は8.1であり、細胞系統により形成効率に差が見られた(図5)。不定胚形成効率の高い54系統の細胞を液体窒素で保存してスギのエリートツリー培養細胞のバイオリソースとした。これらバイオリソースを用いることで、スギのエリートツリーをゲノム編集して無花粉などの優良形質を付与することができる。

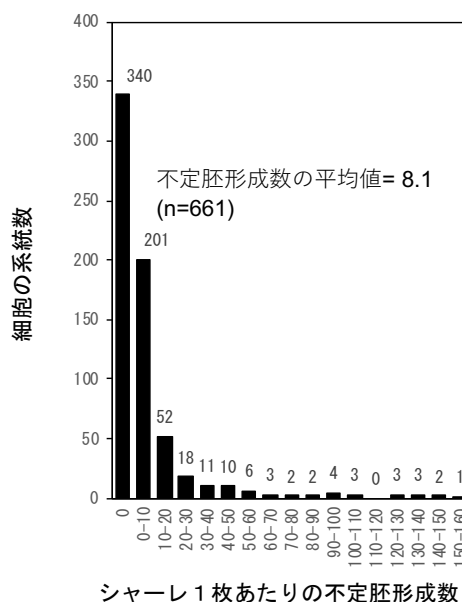


図5 スギの細胞系統別の不定胚形成数の頻度分布

#### <引用文献>

- ① Konagaya K, Nanasato Y, Taniguchi T, A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of Japanese cedar, Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) using embryogenic tissue explants, Plant Biotechnol. in print
- ② Taniguchi T, Konagaya K, Nanasato Y, Somatic embryogenesis in artificially pollinated seed families of 2<sup>nd</sup> generation plus trees and cryopreservation of embryogenic tissue in *Cryptomeria japonica* D. Don (Sugi), Plant Biotechnol. in print

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Toru Taniguchi, Ken-ichi Konagaya, Yoshihiko Nanasato  | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Somatic embryogenesis in artificially pollinated seed families of 2nd generation plus trees and cryopreservation of embryogenic tissue in <i>Cryptomeria japonica</i> D. Don (Sugi) | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Plant Biotechnology  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Ken-ichi Konagaya, Yoshihiko Nanasato, Toru Taniguchi   | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>A protocol for <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation of Japanese cedar, Sugi ( <i>Cryptomeria japonica</i> D. Don) using embryogenic tissue explants | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Plant Biotechnology   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>七里吉彦、谷口亨                       | 4. 巻<br>62          |
| 2. 論文標題<br>ゲノム編集技術 - 林木育種への利用における現状と課題 - | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>北海道の林木育種                       | 6. 最初と最後の頁<br>36-40 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし            | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>七里吉彦、三上雅史、大宮泰徳、二村典宏、遠藤真咲、西口満、高田直樹、小長谷賢一、谷口亨      |
| 2. 発表標題<br>CRISPR/Cas9を利用したスギのゲノム編集-再生個体のモザイク性と内在性遺伝子のゲノム編集 |
| 3. 学会等名<br>日本ゲノム編集学会第3回大会                                   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>七里吉彦、三上雅史、大宮泰徳、二村典宏、遠藤真咲、西口満、高田直樹、小長谷賢一、谷口亨                          |
| 2. 発表標題<br>スギ ( <i>Cryptomeria japonica</i> D. Don) におけるゲノム編集系の構築と再生個体のモザイク性の解析 |
| 3. 学会等名<br>第36回日本植物細胞分子生物学会(金沢)大会   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>七里吉彦、三上雅史、大宮泰徳、二村典宏、遠藤真咲、西口満、小長谷賢一、谷口亨                          |
| 2. 発表標題<br>CRISPR/Cas9システムによるスギ( <i>Cryptomeria japonica</i> D. Don)のゲノム編集 |
| 3. 学会等名<br>第35回日本植物細胞分子生物学会(さいたま)大会  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>七里吉彦、三上雅史、大宮泰徳、二村典宏、遠藤真咲、西口満、小長谷賢一、谷口亨                    |
| 2. 発表標題<br>スギ( <i>Cryptomeria japonica</i> D. Don)におけるゲノム編集の最適化条件の探索 |
| 3. 学会等名<br>日本ゲノム編集学会第2回大会  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>NANASATO Yoshihiko、MIKAMI Masafumi、ENDO Masaki、KONAGAYA Ken-ichi、TANIGUCHI Toru                         |
| 2. 発表標題<br>Development of an efficient foreign gene expression system in <i>Cryptomeria japonica</i> D. Don (Sugi) |
| 3. 学会等名<br>IUFRO Tree Biotechnology Conference 2017 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>谷口亨                             |
| 2. 発表標題<br>スギの不定胚培養系、形質転換系及び超低温保存方法の開発について |
| 3. 学会等名<br>日本植物細胞分子生物学会(さいたま)大会(招待講演)      |
| 4. 発表年<br>2017年                            |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>七里吉彦、小長谷賢一、三上雅史、遠藤真咲、谷口亨 |
| 2. 発表標題<br>スギにおける高発現プロモーターの単離及び機能解析 |
| 3. 学会等名<br>日本植物細胞分子生物学会             |
| 4. 発表年<br>2016年                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小長谷賢一、谷口亨                        |
| 2. 発表標題<br>RNA-seqによるスギ雌性生殖器官の遺伝子発現プロファイリング |
| 3. 学会等名<br>日本植物細胞分子生物学会                     |
| 4. 発表年<br>2016年                             |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)  | 備考 |
|-----------|---|--|----|
| 研究<br>分担者 | 七里 吉彦<br><br>(Nanasato Yoshihiko)<br><br>(80461292) | 国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 森林<br>バイオ研究センター・主任研究員 等<br><br>(82105) |    |

## 6. 研究組織（つづき）

|                   | 氏名<br>(研究者番号)                                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)  | 備考 |
|-------------------|---|--|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 小長谷 賢一<br><br>(Konagaya Ken-ichi)<br><br>(30582762) | 国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 森林<br>バイオ研究センター・主任研究員 等<br><br><br><br>(82105) |    |