

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18624

研究課題名(和文)GrIGSシステムによるジャガイモの高品質化

研究課題名(英文)Qualitative improvement of potato by GrIGS system

研究代表者

葛西 厚史(Kasai, Atsushi)

弘前大学・農学生命科学部・研究員

研究者番号：80633982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：“接ぎ木”栽培技法と“RNAの篩管長距離輸送性”を活用した革新的品種改良技術GrIGS(Graft-induced Gene Silencing)システムを開発してきた。本研究課題では栄養繁殖性作物のジャガイモに対しGrIGSシステムを適用させ、エピゲノム編集の獲得を試みた。外生遺伝子を用いたモデル実験によりジャガイモ固有の方法を確立し、実用化に向けて内生遺伝子をターゲットとする有用形質の付与(低温糖化抑制とアミロース含量低下)へと展開し、少なくとも次代の塊茎においてもメチル化が維持されることを明らかにした。さらに、スタックや強メチル化誘導法など応用技術についても検討した。

研究成果の概要(英文)：Novel plant breeding technique named as GrIGS (Graft-induced Gene silencing) system, which fully utilize grafting and phloem long-distance transportability of RNA, has been developed. In this study, I tried to apply the GrIGS system to a vegetative propagation crop potato and to obtain epigenome editing plants.

In model experiment using transgene (35S:GFP), specific method of potato was established by modification of GrIGS system. Then I developed this system to endogenous genes to give additional useful trait (suppression of cold-induced sweetening and degradation of amylose contents) for practical use. At least next generation tubers maintained higher methylation level induced by GrIGS system.

Furthermore, I examined the stack, which was achieved by re-grafting with other siRNA donor to target multiple genes and the high methylation level induction method (the second), with same one to increase the methylation level.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：エピゲノム編集 新育種技術(NPBT) 接ぎ木 篩管長距離輸送性RNA

1. 研究開始当初の背景

近年の技術革新により従来の遺伝子組換え技術とは異なる新しい育種技術 (NPBT; New Plant Breeding Techniques) が開発されてきた。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 GrIGS (Graft-induced gene silencing) システムを開発した。すなわち、接ぎ木相手のゲノム DNA の標的領域にエピジェ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 (TGS; Transcriptional gene silencing) を実行し、そのエピジェネティックに修飾されたゲノムを有する組織・細胞から再分化体を得ることで、標的遺伝子のみ転写抑制されたエピゲノム編集体を獲得するものである。本システムも NBT の一つに分類されるが、ゲノム DNA の塩基配列を改変しないという点で他の NBT とは一線を画す手法である (引用文献)。

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、土壌病害の回避、収量性の向上さらに矮化栽培など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。

そこで本システムは植物の本来の能力である RNA 輸送システムを人為的に制御して、特定の RNA を輸送させることにより、接ぎ木相手に機能させ標的遺伝子を抑制させる仕組みを品種改良に利用するものである。輸送 RNA は、21 ~ 24 nt の siRNAs (small interfering RNAs) であり、非常に短いサイズにもかかわらずその塩基配列特異的に遺伝子発現を抑制する機能因子である。

Small RNAs による抑制様式は、転写後型遺伝子抑制 (PTGS; Post-transcriptional gene silencing) と転写型遺伝子抑制 (TGS) に分類でき、申請者はそれぞれの篩管輸送とその機能性について検証を行ってきた (引用文献 ~)。後者の TGS は、24 nt siRNAs と相同な DNA 領域へ *de novo* メチル化を引き起こす現象 RdDM (RNA-directed DNA methylation) を利用し、プロモーター領域などに RdDM を誘導することで転写自体を抑制するものである。この TGS タイプについて、モデル実験として外来遺伝子 35S:GFP を導入したタバコ (*Nicotiana benthamiana* 16C 系統) とその 35S プロモーターをターゲットとして 35S pro siRNAs を伴細胞で特異的に産生するタバコ (*NbCo35SIR*; *CoYMV:35SIR*) との接ぎ木実験を行った結果、

TGS 発動が表現型として観察できた。また、上 (穂木側) から下 (台木側) への TGS 発動がより効率的であった。その理由として側根形成が篩部組織と接する 2 個の内鞘細胞 (側根始原細胞) に起源していることであると考察された。すなわち、ドナー側から長距離輸送された siRNAs により接ぎ木相手の内鞘細胞で標的 DNA 領域にエピジェネティックな修飾が誘導され、この内鞘細胞が RAM (root apical meristem) も含め側根を形成する。この側根からの再分化個体は、エピジェネティックな状態が維持されており、さらには世代を超えても維持されることが判明した (引用文献)。申請者らは、上記の研究成果から **GrIGS システム** による新品種改良技術を発表した (図 1, 特許第 6024901 号; 国際特許出願中 WO2012/077664)。

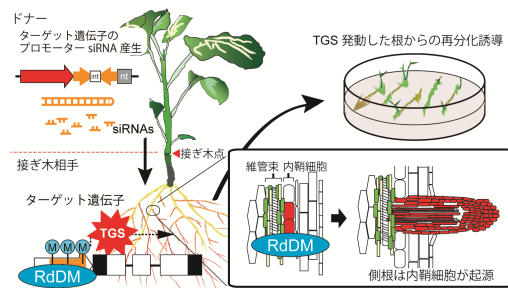


図 1 GrIGS システムによるエピ変異体作出モデル

2. 研究の目的

申請者らの開発したイノベーション育種技術 **GrIGS (Graft-induced Gene Silencing) システム** の実用化にあたり、減数分裂時にメチル化状態が変化すると報告もあるため、本研究では栄養繁殖性作物の **ジャガイモ** (*Solanum tuberosum*) に対し、**GrIGS システム** を適用させ、ジャガイモの品種改良としてエピゲノム編集体獲得の可能性について下記 2 課題について検討した。

(1) 外来遺伝子をターゲットとする実験系の確立とその安定性

外来遺伝子 (35S:GFP) を用いたモデル実験を通して、本システムのジャガイモへの適用性を確認し、ジャガイモにおけるエピゲノム編集体獲得法を構築する。

(2) 内生遺伝子をターゲットとする品種改良

デンプン組成に関わる *StGBSSI* 遺伝子について

ジャガイモデンプンは食料としてだけでなく片栗粉などの工業的にも利用される重要な加工素材である。デンプンの粘着性はアミロペクチンとアミロース含量によって決定され、一般的なジャガイモ品種は 3 割程度のアミロースを含んでおり、アミロペクチンのみのデンプンを生成する品種の開発は、さらなる用途の多様化、需要の拡大が

見込まれている。アミロースの生合成には、デンプン粒結合型デンプン合成酵素 (GBSS: granule-bound starch synthase) が関わっており、この遺伝子の TGS 発動コンストラクト導入形質転換体では、アミロペクチンのみのジャガイモ系統が得られていた(引用文献)。

低温糖化現象に関わる *StVinv* 遺伝子について

ジャガイモ塊茎を低温貯蔵することでデンプンが糖化する低温糖化現象がある。油で揚げるなどの調理により、糖は遊離アミノ酸と反応し発癌性のアクリルアミドを生成する。このアクリルアミドのリスクについて 2014 年 10 月 3 日に内閣府食品安全委員会は「遺伝毒性をもつ発癌物質」と評価したことから、食品加工業界ではアクリルアミド低減策が強く求められており、アクリルアミド低減可能な方策が望まれる。これに関して近年、糖の転化酵素である *Vinv* (vacuolar acid invertase) を PTGS により抑制することで低温糖化現象が阻害されることが報告された(引用文献)。

3. 研究の方法

(1) 外来遺伝子をターゲットとする実験系の確立とその安定性

栄養繁殖性作物ジャガイモ(栽培品種‘ワセシロ’)に外来遺伝子 35S:*GFP* を導入した系統を実験材料として用いたモデル実験を行った。35S pro siRNA 供与タバコとのヘテロ接ぎ木によるジャガイモへの GrIGS システムの適用とその根からの再分化により作出したエピゲノム編集体について表現型および DNA メチル化解析など分子遺伝学的解析から評価した。また、その安定的維持性については、MT(マイクロチューバー)もしくは塊茎を作出し、その表現型ならびにエピジェネティックな状態について解析を行った。この過程を繰り返し塊茎の増殖過程での安定性を評価した。

(2) 内生遺伝子をターゲットとする品種改良

内生遺伝子をターゲットにするにあたり、再現性および TGS 発動可能かどうかを評価する必要があるため、各プロモーター領域由来の siRNAs を産生する形質転換ジャガイモを作出し、分子遺伝学的解析によりエピジェネティックな修飾により転写抑制および表現型の改変が生じるか確認した。

外来遺伝子同様に、それぞれの遺伝子ターゲット領域の siRNA 供与タバコを作出し、ヘテロ接ぎ木による GrIGS システムを適用し、エピゲノム編集体獲得を行った。得られたエピゲノム編集体のエピジェネティックな状態の安定性につい

て調査するために隔離温室内で塊茎を作出し、その塊茎での DNA メチル化状態などを分子遺伝学的解析により評価した。この過程を繰り返し、クローン増殖した塊茎での形質を評価した。

ターゲット配列の DNA メチル化程度の強弱とターゲット遺伝子の抑制には相関性が示唆されているため、ターゲット遺伝子によってはより強力な DNA のメチル化誘導が必要と思われた。これまでの接ぎ木実験での経験から切り戻しなどを行いシンクソースの単純化により輸送される siRNAs 量を増やすことで対処できると思われた。また、得られたエピゲノム編集体と siRNA 供与タバコと再度ヘテロ接ぎ木を行うなど複数回誘導する手法も考えられた。これは、一つの品種に複数のエピゲノム編集誘導を行う形質付与法として発展しうる方法であるため、こちらについても取り組んだ。現在は、形質転換容易なタバコをドナーとして利用しているが、実用化にあたり世間に対するタバコのイメージからジャガイモ同士の接ぎ木(ホモ接ぎ木)による GrIGS システムが望ましく、これについても実験を進めた。

4. 研究成果

(1) 外来遺伝子をターゲットとする実験系の確立とその安定性

タバコ(*N. benthamiana*)における GrIGS システム構築の際用いた TGS スタータータバコ(CoYMV:35SIR; 伴細胞特異的に 35S プロモーターの逆向き繰り返し構造の mRNA を転写する。植物内において 35S pro 2 本鎖 RNA を形成し、siRNA へと分断され、一部が複合体を形成し抑制因子となる。)および PTGS スタータータバコ(CoYMV:GFPIR; *GFP* 遺伝子のコード領域の siRNA を産生する。)と 35S:*GFP* 導入ジャガイモ(品種‘ワセシロ’)とをそれぞれ接ぎ木した。その結果、側根における標的の 35S プロモーター領域へのメチル化および *GFP* mRNA 量の減少が示され、ジャガイモにおいても GrIGS システムによるエピゲノム編集誘導可能であることが示唆された。そこで、側根からの再分化を進めエピゲノム編集体の獲得を行った。さらに、当初予期していなかったが、直接小塊茎(MT; マイクロチューバー)としてエピゲノム編集体を獲得することも可能であった(図 2・3)。ヘテロ接ぎ木による PTGS 発動個体と同様、*GFP* 蛍光は微弱化しており、*GFP* mRNA 量の減少が確認されるものの、TGS スターターとの接ぎ木個体由来の MT では、標的の 35S プロモーター領域へのメチル化度も上昇していた(図 3)。さらに、これら MT からの次代の塊茎についても調査したところ、PTGS 誘導系統では *GFP* 蛍光および mRNA 量がコントロ

ール程度に回復したのに対し、TGS 発動システムでは、複数の塊茎においても GFP 蛍光の微弱化及び高メチル化度が維持されていた(発表論文)。したがって、ヘテロ接ぎ木により獲得した MT においても、ほぼ均一のメチル化状態の細胞に由来して形成されることが示唆された。そこで、ジャガイモでは、2種類(根の再分化および MT 誘導)の方法でエピゲノム編集体の獲得を行うこととした。

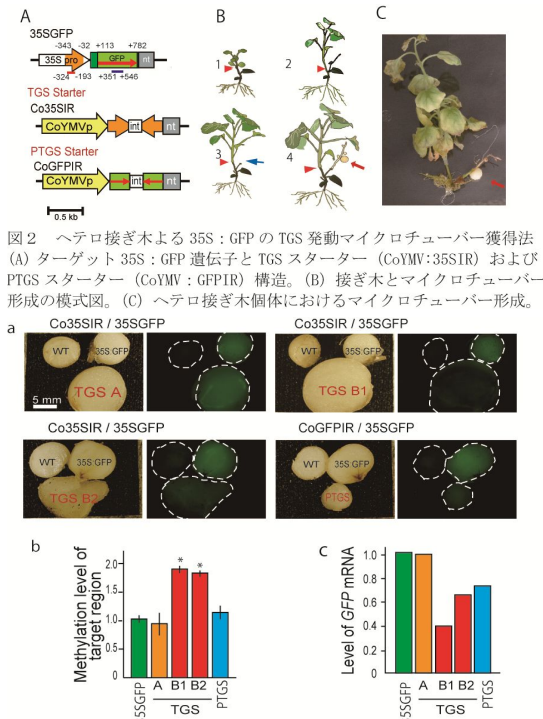


図2 ヘテロ接ぎ木による 35S : GFP の TGS 発動マイクロチューバー獲得法 (A) ターゲット 35S : GFP 遺伝子と TGS スターター (CoYMV:35SIR) および PTGS スターター (CoYMV : GFP:IR) 構造。 (B) 接ぎ木とマイクロチューバー形成の模式図。 (C) ヘテロ接ぎ木個体におけるマイクロチューバー形成。

(2) 内生遺伝子をターゲットとする品種改良 デンプン組成に関わる *StGBSSI* 遺伝子について

既報(引用文献)を基に、最も抑制効率が高いとされた *StGBSSI* 遺伝子の 5'隣接領域(-537 ~ +202)を栽培品種'ワセシロ'にて単離し、配列を決定した。逆向き繰り返し配列を構築し、恒常的発現 35S プロモーターおよび伴細胞特異的 CoYMV プロモーターでそれぞれ連結したコンストラクト (35S : *StGBSSI*IR · CoYMV : *StGBSSI*IR)を構築した。それぞれ、ジャガイモおよびタバコに導入した形質転換体を作出した。35S : *StGBSSI*IR 導入ジャガイモの解析から、'ワセシロ'においてもメチル化の誘導による *StGBSSI* mRNA 量の減少及びアミロース含量の減少が確認された。そこで、*StGBSSI* pro siRNA 産生タバコを供与体として'ワセシロ'とのヘテロ接ぎ木を行い、2 ~ 3カ月後に2種類の方法によりエピゲノム編集体の獲得を行った。その結果、内生遺伝子の *StGBSSI* においてもメチル化度が

上昇した MT が獲得できた。さらに、側根からの再分化によってもメチル化度の上昇した系統を獲得することが出来た。得られたエピゲノム編集システムにおいて外来遺伝子の挿入を PCR 法により確認したものの、外来遺伝子の挿入は確認できなかった。さらに、メチル化度の安定性についても、次代の塊茎からの萌芽体におけるメチル化度を調査したところ、複数の個体で同程度の高メチル化度を維持していることが判明した(図4)。このことから、少なくとも管理された環境中ではメチル化度は、安定的に維持されていくことが判明し、育種の利用にも光明をもたらすものであった。

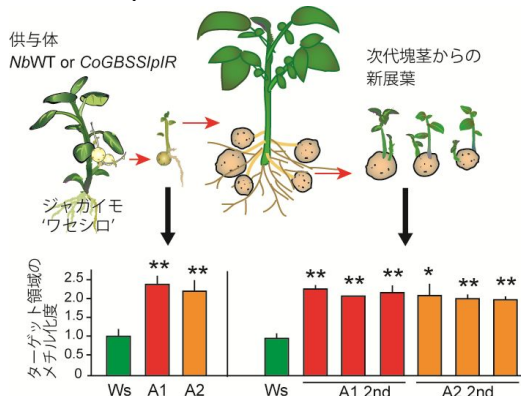


図4 内生遺伝子におけるエピゲノム編集体のメチル化度とその安定性。獲得した塊茎および次代塊茎それぞれの新展葉におけるターゲット領域のメチル化度を比較したもので、元品種 'WS' を1とする相対値で示した。

低温糖化現象に関わる *StVinv* 遺伝子について

TGS による発現抑制可能か調査するため、栽培品種'ワセシロ'における *StVinv* 遺伝子のプロモーター領域を単離し、塩基配列を決定し、およそ 1 kb (-1036 ~ -37)を標的として逆向き繰り返し配列とした (*Vinv*IR)。 *StGBSSI* 遺伝子と同様に、形質転換体を作出した。その結果、35S : *StVinv*IR 導入ジャガイモにおいて標的領域の高メチル化が誘導され、低温貯蔵した塊茎における *Vinv* mRNA 量の減少が示された。次に、35S : *StVinv*IR 導入ジャガイモを供与体とするホモ接ぎ木および CoYMV : *StVinv*IR 導入タバコとのヘテロ接ぎ木によるエピゲノム編集体の獲得を行った。その結果、それぞれの接ぎ木方法から、メチル化度が上昇した系統が複数得られてきた。しかしながら、標的とする領域内にトランスポゾン様配列が存在するため元品種においてもメチル化度が高く、より強度のメチル化を誘導する必要がでてきた。そこで、得られたエピゲノム編集システムに対し、再度 siRNA 供与体との接ぎ木を行う(セカンドと命名)ことにより、強メチル化システムの獲得についても検討を行った。その結果、

元のエピゲノム編集システムよりもさらにメチル化度の高い系統が獲得できた。このような方法から、メチル化程度の異なる系統を獲得し、目的に沿って最適なメチル化程度の系統の利用が可能となると考えられた。

さらに、複数の遺伝子に対してメチル化誘導可能かという課題についても、既に獲得したエピゲノム編集システム (StVinv エピシステム) に対してもう一方の siRNA 供与体 (CoYMV:StGBSSI_pIR 供与タバコ) との接ぎ木を行った。その結果、もう一方の標的に対してもメチル化度の上昇した系統 (スタック) を獲得できた。

GrIGS システムによりジャガイモの内生遺伝子に対してもメチル化度の上昇を誘導することが可能であり、外来遺伝子の導入も確認されず、メチル化度の異なる系統を獲得することあるいは複数の遺伝子を標的とした系統を獲得することができると判明した。したがって、ジャガイモにおけるイノベーション育種技術としての利用が期待される結果となった。圃場試験によりメチル化度の安定性や元品種との栽培性の違いについて調査を進めていきたいと考えている。さらに、GrIGS システムの適用範囲の拡張やシステムの更新・最適化等を行い、多くの栄養繁殖性作物でのイノベーション育種技術としての確立を行いたいと考えている。

<引用文献>

葛西厚史、原田竹雄、植物におけるエピゲノム編集: その原理と接ぎ木における誘導、生物の科学 遺伝、3 巻、2014、140-144

Kasai A. et al. Graft-transmitted siRNA signal from root induces visual manifestation of endogenous post transcriptional gene silencing activity in companion cells. PLOS ONE Vol. 6 2011 e16895

Bai S. et al. Mobile signal transported over a long distance induces systemic transcriptional gene silencing in a grafted partner. J Exp Bot Vol. 62 2011 4561-4570

Kasai A. et al. Scion on a stock producing siRNAs of potato spindle tuber viroid (PSTVd) attenuates accumulation of the viroid. Vol. 8 PLOS ONE 2013 e57736

Heilersig HJB et al. Efficiency of transcriptional gene silencing of GBSSI in potato depends on the promoter region that is used in an inverted repeat. Vol. 275 Mol Gen Genomics 2006 437-449

Bhaskar PB et al. Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato. Vol. 154 Plant Physiol 2010 939-948

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

葛西厚史、原田竹雄、接ぎ木によるエピゲノム編集作物の作出、バイオサイエンスとインダストリー、査読無し、75 巻、2017、238-239

Atsushi Kasai, Hatsune Hojo, Songling Bai, Takeo Harada, Epigenome editing of potato by grafting using transgenic tobacco as siRNA donor. PLOS ONE, 査読有, Vol. 11, 2016, DOI : 10.1371/journal.pone.0161729

Charith Raj Adkar-Purushothama, Atsushi Kasai, Kohei Sugawara, Hideki Yamamoto, Yuto Yamazaki, Ying-Hong He, Nobuyuki Takada, Hideki Goto, Sahori Shindo, Takeo Harada, Teruo Sano, RNAi mediated inhibition of viroid infection in transgenic plants expressing viroid-specific small RNAs derived from various functional domains. Scientific reports, 査読有, Vol. 5, 2015, 17949, DOI : 10.1038/srep17949

Atsushi Kasai, Takeo Harada, Epimutant induction as a new plant breeding technology. JARQ, 査読有, Vol. 49, 2015, 301-305, DOI : 10.6090/jarq.49.301

[学会発表](計2件)

Atsushi Kasai, Takeo Harada, Epigenome editing in plants by grafting. 10th international symposium exploring the global sustainability -Advances in plant biotechnology for agriculture in semi-arid land- 2017年3月14~15日 大阪大学

葛西厚史、北條初音、原田竹雄、接ぎ木を利用したエピゲノム編集によるジャガイモの高品質化 日本育種学会 第129回講演会 日本育種学会優秀発表賞受賞 2016年3月21~22日 横浜市立大学 八景キャンパス

[その他]

ホームページ等

接ぎ木による育種と栽培法のイノベーション AGSプロジェクト

<http://www.ags-p.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

葛西 厚史 (KASAI, Atsushi)

弘前大学・農学生命科学部・研究員

研究者番号 : 80633982