

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07661

研究課題名(和文) ゲノム編集による四倍体ブドウ「巨峰」の果皮着色の安定化技術の開発

研究課題名(英文) Creation of tetraploid 'Kyoho' grape having stable- and enhanced-skin coloration through genome editing technique.

研究代表者

中島 育子 (Nakajima, Ikuko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・上級研究員

研究者番号：80355362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：温暖化により果皮の着色不良が問題となっている四倍体ブドウ「巨峰」は、着色制御に関連するMYB転写因子が4個ある。2個は活性があり、活性のない2個にはプロモーター中にレトロトランスポゾン(Gret1)が存在する。活性のあるMYB転写因子数は着色に影響するため、ゲノム編集技術でGret1を切り出すことで、着色安定化を目指した。エンブリオジェニックカルスを誘導・増殖し、Gret1のLTR領域に設計したguideとCRISPR/Cas9との一体型ベクターを持つアグロバクテリウムを感染させた。得られた12個体の形質転換植物体をマルチプレックスPCRで解析したが、Gret1欠失は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

形質転換可能な二倍体品種「ネオ・マスカット」ではPDS遺伝子のゲノム編集に我々は成功している。しかしながら四倍体品種である「巨峰」について、これまでゲノム編集を行った例はない。「巨峰」の形質転換は「ネオ・マスカット」よりも難しく、また標的としたGret1が約8.8kbと長かった。そのため、Gret1の欠失を狙うためには「巨峰」の形質転換の効率化と、ゲノム編集の際のさらなる切断効率の改良の必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Poor/less coloration in 'Kyoho' grape skin is a big problem, which can be frequently seen by global warming. 'Kyoho' has four MYB transcription factors (MYB-TFs), two of which are active types, but the other two are inactive ones, because a retrotransposon (Gret1) is inserted in the promoter of these inactive MYB-TFs. It has been known that the extent of grape skin coloration depends on the number of an active MYB-TF. Thus, we planned to delete Gret1 using genome editing, which cause reactivation of MYB-TFs, which would result in the stabilization of the skin color of 'Kyoho'. Target sequence of guide RNA was selected in the LTR region. Then binary vectors harboring Cas9, and sgRNA were transformed to 'Kyoho' embryogenic calli (EC). Twelve transgenic plants obtained were analyzed by multiplex PCR to confirm Gret1 deletion. The results showed that no genome edited plants were unfortunately obtained.

研究分野：果樹園芸

キーワード：ブドウ ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国におけるブドウの農業生産額は、果樹ではミカン、リンゴに続いて第3位であり、重要な作物である。我が国では、ブドウの品種の中では「巨峰」の栽培面積が最も広く、ブドウ全栽培面積の1/3を占めている(平成25年産特産果樹生産動態等調査)が、近年温暖化によって着色不良が問題となっている。

ブドウの着色にはMYB転写因子が関与しており、その活性はプロモーター部分の配列によって影響を受けている。黄緑色ブドウはプロモーター部にレトロトランスポゾン(Gret1)が挿入されており、MYB転写因子が活性を持っていないため着色しない。四倍体である「巨峰」にはこの活性を持たないMYB転写因子が2個と、プロモーター部にレトロトランスポゾンが挿入されていない活性のある転写因子が2個存在している。着色は活性を持つMYB転写因子の数が多いほど安定することが報告されている(Azuma et al. 2011)。

食味などの品質のよい品種の特性を損なうことなく、望む形質のみを改良する方法の1つとして、これまで形質転換系の開発が進められてきたが、導入遺伝子のゲノム中に入る場所は決めることができない。また、形質転換によって望むようなものができても、外来遺伝子の除去については、果樹は遺伝的にヘテロであるため、世代を回すと他の形質が分離してしまうという問題がある。一方、近年飛躍的に進歩しているゲノム編集では、形質を制御している遺伝子配列が分かれば望んだ位置に突然変異を誘発することが可能となる。また、究極的には、人工制限酵素をタンパクの形で導入できれば、形質転換の痕跡無く自然に起きた突然変異と同じものを得ることも可能となる。ゲノム編集技術は、シロイヌナズナやタバコなどの実験植物から実用的な植物へと応用範囲が広がってきている。人工制限酵素としてTALENやCRISPR/Cas9システムが用いられている。植物のゲノム編集では、アグロバクテリウムなどにより人工制限酵素の発現ベクターを導入することが広く行われており、組織培養系が確立されていることが不可欠である。我々はこれまでに形質転換系を確立した二倍体品種「ネオ・マスカット」において、CRISPR/Cas9システムをアグロバクテリウム法により導入することで、フィトエン不飽和酵素遺伝子(PDS遺伝子: 遺伝子に変異すると植物がカロテノイドを合成できなくなり、葉緑素の分解を伴って白化症状を呈して死に至る)への変異導入に成功した(中島ら、2016)。また、これまでに「巨峰」のエンブリオジェニックカルス(EC)誘導系およびECへのアグロバクテリウム感染による形質転換系を開発している(Nakajima et al. 2000、Nakajima et al. 2006)。

2. 研究の目的

「巨峰」の形質転換系を用いてCRISPR/Cas9システムを導入し、「巨峰」においてゲノム編集が起こることをPDS遺伝子への変異導入により明らかにする。また、MYB転写因子の働きを抑えているGret1をCRISPR/Cas9システムにより切り出すことができるか明らかにする。人工制限酵素を用いた植物におけるこれまでのゲノム編集研究では1~十数bpの変

異導入が多く報告されているが、Gret1 は両側にある LTR 領域を含めると 10kb 程度あり、欠失させたい配列が長い。しかも LTR 配列は 5'側と 3'側では 4 塩基が異なるのみで、他の配列は相同である。そのため、guide となる標的配列を 1 つ決めることで 2 つの LTR 領域の同じ配列箇所を切断できると考えられる。プロモーター部に LTR 領域が 1 つ残った MYB 転写因子は自然突然変異でも生じ、着色能を有することが報告されている(Kobayashi et al. 2004)。したがって、ゲノム編集により LTR 領域を残して Gret1 を欠失させることで、着色能が回復すると考えられる。本研究では 1 つの guide で、「巨峰」の 2 つの活性を持たない MYB 転写因子に存在する Gret1 を 2 つ同時に欠失させることができるのか、また欠失できた場合にはどのように欠失できたのかについても明らかにする。

3 . 研究の方法

4°Cで保存していた「巨峰」の休眠枝を 2 芽ずつで切り、ロックウールに挿して、22°C16 時間日長 8 時間暗黒下で発芽（発蕾）を促した。蕾が出てきたものは、成育が進んで蕾同士が離れ始めた頃に有効塩素 1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で滅菌し、滅菌水で 2 回洗った。実体顕微鏡下で蕾の中から未受精胚珠や花糸を取り出し、1 μM 2,4-D、1 μM TDZ と 30g/L シュークロースを含んだ 1/2MS 液体培地に置床した。26°C暗黒条件下において 60rpm で振盪培養を行った。得られたエンブリオジェニックカルス(EC)は 1 μM 2,4-D、50g/L マルトースおよび 3%寒天を含んだ 1/2MS 培地で継代、増殖を行った。PDS 遺伝子の配列の中から、CRISPR/Cas9 システムで切断でき、かつ変異が導入されると制限酵素で切断できなくなる配列を選び、guide 配列とした。このようにすることで、変異が導入された場合に CAPS 解析が可能となる。また、Gret1 の欠失を狙って Gret1 の 5'および 3'LTR 領域に設計した。遺伝子組換え細胞（再分化植物）の選抜にはカナマイシンが有効であるため、カナマイシン耐性遺伝子を用いた。Cas9 と guide RNA（およびカナマイシン耐性遺伝子）一体型のベクターを作成し、アグロバクテリウム LBA4404 へ導入した。EC に PDS 遺伝子あるいは Gret1 を標的とした CRISPR/Cas9 ベクターを持つアグロバクテリウムを感染させた。形質転換個体を再分化させ、ゲノム編集が起こったかを CAPS 解析あるいはマルチプレックス PCR によって確認した。

4 . 研究成果

CRISPR/Cas9 システムを導入するため「巨峰」の EC を誘導・増殖した。休眠枝をインキュベーター内で育てて出てきた蕾を用いることで、圃場の材料を用いる場合のように 1 年に一度きりではなく、実験計画に対応して EC を誘導することが可能となった。しかしながら、アグロバクテリウムの感染に適した調子のよい EC の継代・増殖は非常に難しく、また再分化植物体が得られるのに 1 年程度かかるため、アグロバクテリウムの感染実験回数に限られた。当初 PDS 遺伝子についても計画していたが、PDS（あるいは Gret1）の guide を持つアグロバクテリウムの感染条件が悪く失敗したため、次に GFP をコントロールとしてアグロバクテリウム感染方法を確認しつつ Gret1 の欠失を狙うこととした。

これまでに「シャインマスカット」において Gret1 の欠失を狙って Gret1 の 5'および 3'LTR 領域に設計した guide 配列の 5 種類の中から、Gret1 の欠失の認められる guide 配列を明らかにしている。「巨峰」においても guide 部分のシーケンスを確認したところ、「シャインマスカット」と同じであった。そのため、同じ guide を用いて CRISPR/Cas9 との一体型ベクターを持つアグロバクテリウムを「巨峰」の EC に感染させた。

その結果、Gret1 の欠失を目標とする形質転換候補不定胚が 94 個得られ、そこから植物体となったのは 14 個であった。成育のよかった 12 個体について形質転換体であるかを PCR で確認したところ、全て形質転換体であった。アグロバクテリウムは完全に除菌されていた。その 12 個体について、Gret1 が欠失した際に solo LTR のバンドが検出できるように設計したマルチプレックス PCR (常にバンドの出るコントロールは PDS 遺伝子を用いた) によって Gret1 の欠失の確認を行ったが、12 個体全てで Gret1 の欠失は認められなかった。guide 配列部分の小さな変異については今後検討を行う。Gret1 は約 8.8kb と長いため、Gret1 の欠失を狙うには「巨峰」の形質転換系をさらに効率化し、形質転換体をより多く獲得すること、およびさらなる切断効率の改良の必要性が示唆された。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakajima Ikuko, Endo Masaki, Haji Takashi, Moriguchi Takaya, Yamamoto Toshiya	4. 巻 37
2. 論文標題 Embryogenic callus induction and Agrobacterium-mediated genetic transformation of 'Shine Muscat' grape	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.0527a	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 I Nakajima, Y Ban, A Azuma, N Onoue, T Moriguchi, T. Yamamoto, S Toki, M Endo	4. 巻 12(5)
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0177966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0177966	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島育子、西谷千佳子、山本俊哉、土岐精一、遠藤真咲、今井亮三
2. 発表標題 ブドウにおける形質転換に依らないゲノム編集技術の開発に向けて
3. 学会等名 令和元年度果樹バイテク研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 育子、西谷 千佳子、東 暁史、今井 剛、土師 岳、山本 俊哉、土岐 精一、遠藤 真咲
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いたブドウ果皮着色に関連するレトロトランスポゾン欠失植物体の作出
3. 学会等名 第37回 日本植物細胞分子生物学会(京都)大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島育子, 伴雄介, 東暁史, 尾上典之, 西谷千佳子, 土師岳, 山本俊哉, 土岐精一, 遠藤真咲
2. 発表標題 ブドウでのゲノム編集技術による果皮色に関連するレトロトランスポソンを欠失したカルスおよび再分化植物体の作出
3. 学会等名 平成30年度果樹バイテク研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島 育子, 伴 雄介, 東 暁史, 尾上 典之, 土師 岳, 山本 俊哉, 土岐 精一, 遠藤 真咲
2. 発表標題 ブドウ‘シャインマスカット’におけるCRISPR/Cas9を用いたレトロトランスポソン欠失の試み
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島 育子, 東 暁史, 伴 雄介, 尾上 典之, 土師 岳, 山本 俊哉, 土岐 精一, 遠藤 真咲
2. 発表標題 ブドウにおけるゲノム編集技術の確立と着色制御の試み
3. 学会等名 果樹バイテク研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中島育子 (田部井豊監修)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 NTS	5. 総ページ数 325 うち該当部分169-174
3. 書名 ゲノム編集食品 第2章5 ブドウを中心とした果樹のゲノム編集	

〔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
---------	---------