

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22302

研究課題名（和文）新規自家不和合性遺伝子のゲノム編集によるばれいしょ育種法の革新

研究課題名（英文）Genome editing of a new self-incompatibility gene of potato

研究代表者

佐々 英徳（SASSA, Hidenori）

千葉大学・大学院園芸学研究院・教授

研究者番号：50295507

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ジャガイモにおいて純系を用いたF1育種体系の確立を目標とし、二倍体ジャガイモのゲノム編集による自家和合性系統の作出を試みた。S遺伝子をゲノム編集の標的とした場合、S遺伝子座は動原体近傍に座乗するため、近傍に有害遺伝子が存在した場合、組換えによる除去が極めて困難である。このため本研究では、我々がペチュニアで見出した新規の自家不和合性非S因子のジャガイモホモログをゲノム編集の標的とした。目的遺伝子にパイアレリックな形で変異を導入したゲノム編集個体を複数得ることができた。ジャガイモは開花制御が容易ではないが、今後自家不和合性形質の変化の有無を解析予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジャガイモは四倍体の栄養繁殖性作物であることを反映し、'男爵'など100年以上前の品種が現在でも広く栽培されているなど、同じナス科のトマトなどと比べて育種が進んでいない。純系の一代雑種を利用するF1品種の育種体系がジャガイモで確立できれば画期的な新品种が生まれ期待されている。しかしながら二倍体ジャガイモは強い自家不和合性を示し、純系の育成が困難である。本研究では自家不和合性非S因子を標的とした二倍体ジャガイモのゲノム編集個体を複数得ることができた。これらの系統が自家和合性を示せば、ジャガイモF1育種体系の確立に向けた重要な一歩となる。

研究成果の概要（英文）：Breakdown of self-incompatibility (SI) of diploid potato is an promising way to establish the F1 breeding system in potato. In this study, we targeted potato homolog of newly discovered non-S-specific factor of petunia for production of self-compatible diploid potato by CRISPR/Cas9 genome editing. Several independent potato lines with bi-allelic mutations in the target gene were produced. SI phenotype of the genome-edited lines will be analyzed.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：ジャガイモ 自家不和合性 F1育種 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

ジャガイモは四倍体の栄養繁殖性作物であることを反映し、現在でも‘男爵’など100年以上前の品種が広く栽培されているなど、トマトなど他のナス科作物と比べ育種が進んでいない。トマトなどのように、純系同士の雑種第一代を利用するF1育種体系がジャガイモでも確立できれば画期的な新品種が育成できると期待されている。しかしながら二倍体ジャガイモは強い自家不和合性を示し、純系の育成が困難であった。

2018年に、自家不和合性雌ずい側決定因子であるS-RNase遺伝子のゲノム編集による自家和合性二倍体ジャガイモの作出がNature Plants誌に掲載され、ジャガイモF1育種体系の確立に向けた重大な成果として注目された(Ye et al. (2018))。一方で、S-RNase遺伝子のゲノム編集による自家和合性化には重大な懸念も感じられた。ナス科の自家不和合性(S)遺伝子座は動原体近傍の組換え抑制領域に座乗するため、近傍に有害遺伝子が存在した場合、組換えによる除去が極めて困難であるためである。組換え抑制領域ではない領域に存在する遺伝子のゲノム編集によって、自家和合性二倍体ジャガイモを育成することが重要と考えられた。

我々はナス科・ペチュニアにおいて、新規の自家不和合性非S因子を見出しており、ゲノム情報によればこの遺伝子のジャガイモホモログは、染色体の末端付近に座乗しており、万一有害遺伝子が近傍に存在した場合でも、交配により組換えで容易に有害遺伝子を除去できるため、ゲノム編集の標的として有用と考えられた。

2. 研究の目的

我々がペチュニアで見出した新規の自家不和合性非S因子のジャガイモホモログを標的としたCRISPR/Cas9によるゲノム編集により、非S因子のゲノム編集二倍体ジャガイモ系統を作出する。作出した個体の配列解析によりゲノム編集の有無を確認するとともに、開花に至れば自家受粉と花粉管伸長観察を行い、自家不和合性表現型の変化の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

我々がペチュニアで見出した新規の自家不和合性非 S 因子のジャガイモホモログを標的とした CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行うため、標的遺伝子の配列からガイド RNA として適当な領域を選択し、ゲノム編集用のバイナリーベクターを構築する。バイナリーベクターはアグロバクテリウムに導入し、得られたアグロバクテリウムを無菌化した二倍体ジャガイモの組織に感染、培養することで、再分化個体を得る。再分化個体は PCR によって形質転換体であることを確認する。さらにジャガイモは組織培養によって高頻度で染色体倍加個体が出現することが知られているため、フローサイトメトリーにより二倍体個体を選抜する。選抜された二倍体の形質転換体について、標的遺伝子の配列解析により、変異の有無を判定する。相同染色体の療法に変異が入ったバイアレリックな変異体を得られれば、開花させ、自家受粉と花粉管伸長観察を行い、自家不和合性表現型の解析を行う。

4 . 研究成果

新規の自家不和合性非 S 因子のジャガイモホモログを標的とした CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行ったところ、バイアレリックな変異をもつ二倍体ジャガイモ系統を複数得ることができた。研究の過程で、二倍体ジャガイモの再分化効率には系統間差が大きく、再分化の比較的容易な系統を選抜できたことが成果につながった。また再分化個体のいくつかは四倍体など染色体倍加が見られ、ジャガイモではフローサイトメトリーで二倍体を選抜することの重要性も再確認された。ジャガイモでは開花制御が容易ではないが、開花に至れば今後順次自家不和合性表現型の解析を行う予定である。自家不和合性個体を得られれば、自家受精によりゲノム編集外来遺伝子を持たず、標的遺伝子はゲノム編集された null-segregant 個体を選抜し、二倍体純系ジャガイモ育成のための育種母本候補とする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sassa, H. and Ikebe, K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Rapid, effective and low-cost purification of dideoxy-sequencing reactions by home-made magnetic beads suspension and magnetic separator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 e0279432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0279432	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hidenori Sassa, Hiroki Azuma, Miwako Shimizu, Mana Komori, Daiki Horigome, Hiroyuki Kakui, Mai F. Minamikawa, Shinji Kikuchi, Takato Koba
2. 発表標題 A novel non-S-specific self-incompatibility factor of Petunia
3. 学会等名 26th International Conference on Sexual Plant Reproduction（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kota Ikebe, Hidenori Sassa
2. 発表標題 Knock out of a novel non-S-specific self-incompatibility factor of Petunia
3. 学会等名 26th International Conference on Sexual Plant Reproduction（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------