

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05984

研究課題名（和文）倍数性作物サツマイモにおいて遺伝子機能解析を加速するゲノム編集技術の開発

研究課題名（英文）Development of genome editing technology to accelerate gene function analysis in the hexaploid sweet potato

研究代表者

門田 有希（Monden, Yuki）

岡山大学・環境生命科学学域・准教授

研究者番号：30646089

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では遺伝子解析が困難なサツマイモを対象にゲノム編集および形質転換技術を開発し、遺伝子機能解析を加速化させることを目的とした。先行研究で同定された線虫抵抗性の候補遺伝子の配列を調査した結果、抵抗性品種では機能型アレルが見つかったのに対して、感受性品種では機能欠損型アレルが見つかった。またプロモーター領域には抵抗性品種特異的にシスエレメントが検出され、機能型アレルの発現を制御している可能性が示唆された。またサツマイモ品種の中では比較的形質転換が容易であることが知られている「花らんまん」を対象に胚性カルスを誘導し、見つかった機能型・機能欠損型アレルを導入した形質転換体を作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではサツマイモの収量や外観品質に甚大な被害をもたらす有害線虫（サツマイモネコブセンチュウ）に対して、サツマイモが持つ抵抗性遺伝子の機能証明ならびに機能解析を目的とし、形質転換やゲノム編集技術の開発を試みている。サツマイモでの線虫抵抗性遺伝子はいまだに報告が無く、機能証明できれば世界初の成果となる。また本研究結果では、育種に有用なDNAマーカーも開発しており、遺伝解析の難しかったサツマイモのマーカー選抜育種（MAS）や病害抵抗性品種の育成も加速化させることが期待される。また病害抵抗性だけでなく、その他の農業形質にかかわる遺伝子の機能解析や有用品種の育成も発展させることが予測される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop gene-editing and transformation technology for sweetpotato, and to accelerate the gene function analysis of this species. In our previous study, we detected one candidate gene controlling nematode resistance in sweetpotato. Thus, we investigated the sequence of this gene using resistant and susceptible cultivars. Our results showed that the resistant cultivar 'J-Red' and the susceptible cultivar 'Choshu' have functional and non-functional alleles, respectively. Interestingly, several cis-elements were specifically detected in the promoter region of 'J-Red', which indicated that these cis-elements might regulate the expression of the functional allele in J-Red. In addition, we successfully created transformants using 'Hanaranman' cultivar by introducing functional and non-functional alleles.

研究分野：農学（遺伝育種学）

キーワード：サツマイモ 形質転換 ゲノム編集 線虫抵抗性 遺伝子機能解析

1. 研究開始当初の背景

サツマイモ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) は、世界で7番目に生産量の多い重要作物であるが、六倍体 ($2n=6x=90$) で他殖性、高ヘテロ性などの特徴を示すため遺伝的に複雑であり、そのゲノム解析や遺伝解析は極めて難しい。このため、マーカー選抜育種など遺伝情報を利用した品種育成もほとんど行われていないのが現状である。このような状況において申請者らは、遺伝解析が極めて困難とされてきたサツマイモを対象に高速シーケンサー (以下 NGS とする) を利用したゲノムワイドな遺伝解析を行い、さまざまな農業形質 (線虫・ゾウムシ抵抗性、収量性や塊根の皮色等) にかかわる遺伝子領域を同定した。さらに最近では、トランスクリプトーム解析や全ゲノムリシーケンスのデータなども組み合わせることにより、農業形質を制御する候補遺伝子を絞り込むことにも成功している。一方で、遺伝子機能を詳細に調べるためには、その遺伝子を改変した植物体を作成する必要がある。しかしながら、サツマイモの形質転換やゲノム編集は難易度が高く、遺伝子機能解析を行うことは容易ではない。そこで本研究では遺伝子機能解析を加速化させるため、サツマイモにおけるゲノム編集や形質転換技術を開発する。

2. 研究の目的

最近申請者らは、遺伝解析が極めて難しいとされたサツマイモ (6倍体、栄養繁殖性、高ヘテロ性等の遺伝的特徴を示す) において、NGS を駆使することで重要な農業形質に関わる遺伝子領域を同定した。さらに遺伝子領域だけでなく形質を制御する候補遺伝子自体も見出し、今後 NGS を活用することで重要な遺伝子が次々と見つかることが期待される。しかしながら、これら候補遺伝子は、map-based cloning ではなく、RNA-seq による発現量解析や全ゲノムリシーケンスによる多型解析で絞り込まれており、原因遺伝子であると証明されていない。よって遺伝子機能を詳細に解析し、原因遺伝子を特定する技術を新たに開発する必要がある。

そこで本研究ではサツマイモを対象にゲノム編集技術ならびに形質転換技術を確立し、候補遺伝子の導入個体の作出ならびに機能解析を行う。これにより、農業形質に関わる原因遺伝子の特定ならびに遺伝子機能の解明、さらには有用品種を効率的かつ迅速に育成する手法を確立する。

3. 研究の方法

申請者らはこれまでの研究においてサツマイモの収量や外観品質に甚大な被害をもたらすサツマイモネコブセンチュウ (Southern root-knot nematode) を対象とした遺伝解析を進めてきた。高密度連鎖地図の構築や QTL 解析、GWAS 等の解析により抵抗性を制御する遺伝子座を同定し (Sasai et al., 2019, Obata et al., 2022) さらには Iso-seq や RNA-seq 等のトランスクリプトーム解析等も組み合わせることで候補遺伝子の一つ、絞り込んでいる。そこで本研究では候補遺伝子の配列調査ならびに原因変異の探索、そして形質転換実験により機能証明ならびに機能解析を行うことを目的とした。まずは候補遺伝子の配列を明らかにするため、抵抗性品種「ジェイレッド」および感受性品種「潮州」を用い、遺伝子配列を調査した。サツマイモは六倍体でヘテロ性も高いため、遺伝子配列の決定が極めて難しい。また今回対象としている遺伝子はゲノム中にマルチコピー存在する R 遺伝子であると考えられた。そこで今回は他の R 遺伝子を増幅させないよう、候補遺伝子の近傍領域特異的に PCR プライマーを設計し、遺伝子全長配列を増幅させた後、そのアンプリコンをサンガー法によるウォーキングで配列決定した。構築された遺伝子配列については、InterPro を用いた機能ドメインの調査や MEGA による系統樹作成も行った。また、全ゲノムシーケンスのデータも取得し、変異検出に利用した。

形質転換実験については、「ジェイレッド」で見つかった機能型アレルと機能欠損型アレル、「潮州」由来の機能欠損型アレル、空ベクターという4種類のコンストラクトを導入した組換え体を作成することとした。サツマイモの形質転換は難易度が高く、品種や系統によってカルス誘導や再分化が困難である。そこで本研究ではサツマイモ品種の中では比較的形質転換が容易であることが知られている「花らんまん」を対象に形質転換実験を進めることにした。胚性カルスを誘導した後、アグロバクテリウム法による接種試験で遺伝子を導入した。ハイグロマイシンによる選抜を行い、耐性カルスから植物体を再分化させた。

4. 研究成果

「ジェイレッド」および「潮州」のゲノム DNA、cDNA を鋳型に候補遺伝子の配列を増幅させたところ、期待通りのサイズの PCR 産物が得られた。そこで得られた増幅産物をクローニングし、サンガー法によるウォーキングを行うことで全長配列を決定した。遺伝子全長配列を用いた系統樹作成や遺伝子配列の比較を行ったところ、特に第1エキソン部分において品種間で複数の変異 (非同義置換を伴う SNP など) が確認された。また「ジェイレッド」では 60bp の欠失

をもつアレルが確認された。このアレルについては3つのドメイン (Rx-CC like domain, NB-ARC domain および Leucine-rich repeat (LRR) domain superfamily) が確認され、機能型であると考えられた。一方、60bp 欠失の無いアレルについては機能ドメインの一つが検出されず、機能欠損型であると考えられた。また「潮州」においては機能欠損型アレルのみが存在していた。cDNA を用いた場合も同様の結果が得られた。以上のことから、「ジェイレッド」では機能型アレルと機能欠損型アレルの2種類、「潮州」では機能欠損型アレルのみが存在していることが示された (Izumitani et al., unpublished data)。

さらに、これまでのトランスクリプトーム解析の結果から、抵抗性品種では候補遺伝子の発現量が上昇している可能性が高いことが示されている (Ohata et al., unpublished data)。アレルの違いの他、候補遺伝子の発現量が抵抗性に寄与する可能性も考えられたため、プロモーター領域についても配列を調査した。プロモーター領域の配列調査には全ゲノムシーケンスデータを用いた。加えて、信頼性の高い情報を得るため、サンガー法でも配列変異を確認した。Illumina NovaSeq6000 を用いたシーケンスの結果、合計約 23 億のペアエンドリード (150bp) を得た。アダプター配列や低クオリティリードの除去等を行った後、サツマイモのハプロイドゲノムの参照配列 (Yang et al., 2017) にアライメントし、SNP や Indel 等の変異を検出した。候補遺伝子上流 1kb における配列変異を調査した結果、30bp の Indel (「ジェイレッド」で insertion, 「潮州」で deletion) および 5 つの SNP が同定された。興味深いことに、「ジェイレッド」特異的に複数のシスエレメントが検出された。また 30bp の Insertion 領域にも「ジェイレッド」のみで根での特異的な発現に寄与すると考えられる root motif 関連のシスエレメントが検出された。

これまでの研究から、「ジェイレッド」において機能型アレルと機能欠損型アレルの2種類が見つかっている。そこで「ジェイレッド」特異的に見つかったシスエレメントがどのアレルの上流にあるかを明らかにするため、サンガー法によるウォーキングを行った。その結果、興味深いことに「ジェイレッド」特異的に見つかった配列変異並びにシスエレメントはすべて機能型アレルの上流に存在していた (図 1)。以上のことから「ジェイレッド」の機能型アレルがいずれかのシスエレメントによる発現制御を受けている可能性が示唆された。

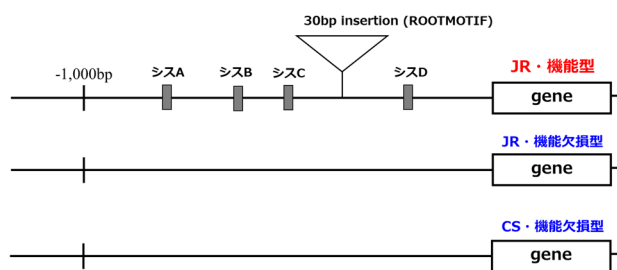


図 1. ジェイレッドおよび潮州で見つかったアレルとシスエレメントの概要図

上記の実験により、「ジェイレッド」および「潮州」における候補遺伝子の遺伝子全長配列を決定することができたため、形質転換実験用のコンストラクトを作製した。「ジェイレッド」の機能型アレル、機能欠損型アレル、「潮州」の機能欠損型アレル、そして空ベクター (対象遺伝子を導入していない) を挿入した 4 種類の過剰発現体作出用コンストラクトを作製した。「花らんまん」の胚性カルスを誘導し、アグロバクテリウム法により遺伝子導入を行った。選抜にはハウグロマイシンを用いた。選抜培地で培養を行った胚性カルスを再分化培地へ移植し、培養を継続した。再分化培地上で形成されたハイグロマイシン耐性不定胚および再分化植物体をプラントボックスに移植し、適宜、新鮮な培地に移植しながら培養を継続した。発根と根の伸長が認められた植物体は形質転換体であると考えられる。時間は要したが、すべてのコンストラクトについて「花らんまん」を用いた形質転換体の作出に成功した (図 2)。また並行して「ジェイレッド」でのゲノム編集あるいは RNAi による候補遺伝子のノックアウト (ノックダウン) 個体作出も試みたが、「ジェイレッド」での再分化が難航している。「ジェイレッド」での形質転換体作出には培地条件や植物ホルモン量などを調整する必要がある。今後は、導入された遺伝子配列の調査や遺伝子発現量解析、接種試験等を行い、遺伝子機能を詳細に解析する予定である。



図 2. 形質転換体の様子

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 Obata, N., Tabuchi, H., Kurihara, M., Yamamoto, E., Shirasawa, K. and Monden	4. 巻 13
2. 論文標題 Mapping of Nematode Resistance in Hexaploid Sweetpotato Using a Next-Generation Sequencing-Based Association Study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 858747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2022.858747	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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 泉谷真, 大畑慎一郎, 田淵宏朗, 門田有希
2. 発表標題 サツマイモネコブセンチュウ抵抗性を制御する新規候補遺伝子の同定と原因変異の探索
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉谷真・大畑慎一郎・田淵宏朗・門田有希
2. 発表標題 サツマイモネコブセンチュウ抵抗性に関する新規候補遺伝子の同定と原因変異の探索
3. 学会等名 第13回中国地域育種談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉谷真・大畑慎一郎・田淵宏朗・門田有希
2. 発表標題 サツマイモネコブセンチュウ抵抗性を制御する新規候補遺伝子の配列解析
3. 学会等名 第12回中国地域育種談話会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makoto Izumitani, Shinichiro Ohata, Hiroaki Tabuchi, Hidetaka Nishida, Kenji Kato, Yuki Monden
2. 発表標題 Searching for causal mutations in a candidate gene associated with the southern root-knot nematode resistance in sweetpotato
3. 学会等名 JSOL2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 泉谷真・大畑慎一郎・田淵宏朗・西田英隆・加藤鎌司・門田有希
2. 発表標題 サツマイモネコブセンチュウ抵抗性候補遺伝子で見出されたシスエレメント内の配列変異
3. 学会等名 日本育種学会第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門田有希
2. 発表標題 六倍体サツマイモにおける線虫抵抗性遺伝子の同定と育種基盤技術の構築
3. 学会等名 第39回植物バイオテクノロジー学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Makoto Izumitani, Shinichiro Ohata, Hiroaki Tabuchi, Hidetaka Nishida, Kenji Kato, Yuki Monden
2. 発表標題 Searching for causal mutations in a candidate gene controlling the southern root-knot nematode resistance in sweetpotato
3. 学会等名 9th International Sweetpotato Symposium & 5th Xuzhou World Sweetpotato Conference (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
研究 分担者	大谷 基泰 (Otani Motoyasu) (20223860)	石川県立大学・生物資源環境学部・准教授 (23303)	
研究 分担者	刑部 祐里子 (Osakabe Yuriko) (50444071)	東京工業大学・生命理工学院・教授 (12608)	
研究 分担者	田淵 宏朗 (Tabuchi Hiroaki) (10355571)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・上級研究員 (82111)	

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
---------	---------