

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19115

研究課題名（和文）冷凍保存可能な花粉を活用した新奇ゲノム編集技術の開発

研究課題名（英文）Development of novel genome editing technology using pearl millet frozen pollen

研究代表者

吉田 健太郎（Yoshida, Kentaro）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：40570750

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、花粉を冷凍保存できるパールミレットとコムギの亜科間交雑による染色体脱落現象を利用し、コムギでのゲノム編集を可能にする技術開発を目的に研究を実施した。その結果、パールミレットの完熟種子から再分化可能なカルスを効率的に得るための最適な培地と条件を確立した。カルスから再分化に必要な条件や培地を明らかにし、パールミレットの組織培養に寄与する成果を得た。更にin planta particle bombardment法によるパールミレット形質転換に成功した。本技術により亜科間交雑によるコムギゲノム編集に必要なgRNAやCas9タンパク質を発現するパールミレット花粉を得ることが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パールミレットの完熟種子からの脱分化、再分化可能な良質なカルスを獲得するのに必要な培養条件、カルスからの再分化の条件について新たな知見が本研究によって得られた。また、iPB法によるパールミレットの形質転換技術を確立することができた。これらの技術的な成果は、気候変動による乾燥地域及び高温地域の拡大から、発達した根圏をもち、作物の中でも優れた耐乾燥性と耐暑性を持つパールミレットの組織培養の発展並びに難形質転換パールミレットのゲノム編集技術へと道を開くものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a novel genome editing method for wheat by exploiting the phenomenon of chromosome elimination through hybridization with frost-tolerant pearl millet pollen and embryo of wheat. We established optimal media and conditions for efficiently obtaining calli from mature pearl millet seeds. We also identified the conditions and media necessary for regeneration from calli, contributing to tissue culture in pearl millet. Furthermore, pearl millet transformation was achieved using in planta particle bombardment. This method allows for obtaining pearl millet pollen carrying gRNA and Cas9 protein necessary for genome editing of wheat.

研究分野：遺伝育種

キーワード：パールミレット 染色体脱落 ゲノム編集 倍加半数体 コムギ 形質転換 花粉 植物培養

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

単子葉植物の形質転換では、完熟種子もしくは未熟胚由来のカルスを用いたアグロバクテリウム法による形質転換、パーティクルガンを利用した遺伝子導入法による形質転換体の作出が一般的に行われている。しかし、コムギにおいては、このような既存の形質転換技術は世界中でも数品種でしか使えず、実験手法の域を脱していなかった。特にコムギの野生近縁種、野生近縁種との異種間交雑で作出した合成コムギにおいては、形質転換体の作出について手付かずの領域であった。一方で、ゲノム解析技術の進歩により、様々な品種、近縁野生種の変異体集団、交配集団から遺伝学的に遺伝子の染色体の座乗位置が高精度に同定され、候補遺伝子が絞り込まれつつあった。コムギのいかなる系統でも、自由自在に遺伝子を破壊できる技術開発が必要不可欠な状況にあった。

2. 研究の目的

パールミレットはアジアやアフリカの乾燥地帯を中心に分布する穀物であり、高温耐性と乾燥ストレス耐性を有する。コムギとの亜科間交雑では、受精後に続く体細胞分裂においてパールミレット由来の染色体が選択的に脱落する。その結果、コムギの半数体を得ることが知られている。本研究は、このパールミレットとコムギの亜科間交雑による倍加半数体技術と CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を融合することで、コムギにおいて 1 世代でゲノム編集個体を獲得する新技術開発が目的である。パールミレットは、大量の花粉を生産し、キビ亜科の中でも花粉の寿命が長く、乾燥にも強い、冷凍保存が可能という特異な特徴がある。そのため、乾燥に強く、冷凍保存できるパールミレット花粉の特徴を生かした本研究の成果は、花粉を利用したゲノム編集試薬の創出への発展が期待される。一般的な方法では、ゲノム編集個体は、T₀ 世代ではキメラ化し、T₁、T₂ 世代で多数の個体からノックアウト個体を選ぶ必要があるため、時間と労力がかかる。選択マーカー等の外来遺伝子を除去しなければ、品種としても使えない。染色体脱落による外来遺伝子の除去と倍加半数体技術を使えば、上記の問題を一挙に解決することができる。本提案技術によって、世界的最重要穀類の一つでありながら、難形質転換作物であるコムギにおいて、いかなる系統においても、ゲノム編集された遺伝子をホモに持つ個体を 1 世代で、作り出すことが可能になる。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 と gRNA を発現したパールミレット花粉をコムギ (雌) に亜科間交雑をすると、パールミレット由来の染色体は、胚発生の過程で脱落し、コムギ染色体だけが残る。未熟種子より胚を抽出、胚培養し、コルヒチン処理することで染色体を倍加させ、倍加半数体コムギを作出する。この遠縁交雑の受精時に花粉由来の Cas9 タンパク質とコムギを標的とする gRNA の RNP が、コムギの標的遺伝子のゲノムを編集する。種子親 (コムギ) の形質転換を回避することができ、形質転換フリーのコムギゲノム編集技術を確立することができる。そのため、CRISPR/Cas9 と gRNA を発現したパールミレット花粉を得るために、パーティクルガン法による花粉への RNP やプラスミド DNA を導入する。RNP やプラスミド DNA が導入された花粉だけを磁力により選抜する。そのため、受精能力のある花粉が得られる磁力選抜の溶媒を選定する。パーティクルガン法による花粉への RNP やプラスミド DNA の直接導入が難しい場合を考え、Cas9 を発現した安定形質転換体の作成も実施する。安定形質転換体を得る方法として、アグロバクテリウムによるパールミレットの形質転換、*in planta* particle bombardment (iPB) 法によるパールミレットの形質転換を実施する。アグロバクテリウムによるパールミレット形質転換においては、未熟種子と完熟種子からの脱分化 (カルス化) の条件検討、アグロバクテリウムの感染効率の検討、再分化の条件検討をする。iPB 法においては、茎頂を露出させてパーティクルガンによりプラスミド DNA や RNP を導入する。そのため、パーティクルガンによる損傷を受けた状態でも胚からの個体発生が可能な系統を選抜する必要がある。そのため、パールミレット品種から再生能力の高い品種を選抜する。そして、iPB 法による形質転換法を確立する。

4. 研究成果

(1) パーティクルガン法による花粉への RNP やプラスミド DNA の直接導入と導入花粉の磁力選抜

コムギが持つ遺伝子を標的とした gRNA と Cas9 をコードする遺伝子を導入したパールミレット花粉を得るために、Particle bombardment による遺伝子導入花粉を磁力選抜する手法について検証した。Particle bombardment による遺伝子導入花粉の磁力選抜法の確立では、花粉を有機溶媒で処理する。そこで、花粉伸長能力への影響が少ない有機溶媒を調べた結果、キシレンが有効であることが分かった。そこで、キシレン処理時間と花粉伸長率の相関性を調べた。その結果、磁力選抜を行う短時間 (15 分程度) の処理では花粉管伸長率は変化しないことが判明した。しか

し、乾燥・凍結処理を行った花粉の管伸長率はキシレン処理の有無に関わらず、穂から採取した直後の新鮮な花粉の約10万分の1と低かった。

磁性ビーズを用いて *turboGFP* 遺伝子を Particle bombardment によって花粉へ導入した。しかしながら *turboGFP* による緑色蛍光を観察することはできなかった。また、磁性ビーズでの Particle bombardment 後の花粉を有機溶媒中で磁力によって選抜されたものとされなかったものに分けてそれぞれ DNA を抽出し、リアルタイム PCR で検出される導入した遺伝子の濃度に基づいて、磁力選抜の有効性を検討した。Particle bombardment を行った花粉が塊状になり磁力による分離がうまくできなかったため、沈殿が含まれたサンプルでは *turboGFP* の増幅率が高いという結果が出た。これを踏まえて、磁性ビーズが花粉に与える影響を調べた結果、Particle bombardment を行わないサンプルで磁力ビーズによって花粉同士が接着する様子が確認できた。

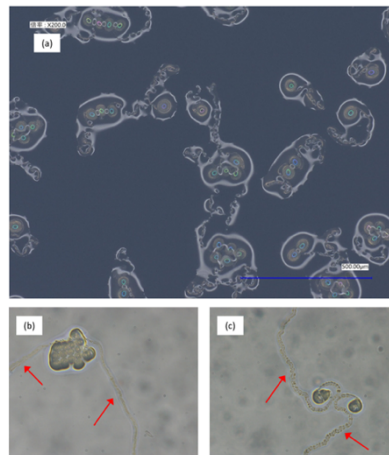


図1 有機溶媒処理後の花粉管の発芽 (a)培地上の花粉。(b)キシレン処理した発芽花粉。(c)DMF処理した発芽花粉。赤い矢印は、花粉管を示す。

(2) アプロバクテリウム法によるパールミレットの形質転換技術の確立

① 未熟胚からの脱分化

IP17596 系統の未熟胚からの脱分化条件を検討した。白色カルスとガラス状のカルスが得られた (図2)。そのうち白色カルスに再分化能があるが、ガラス状のカルスは、再分化能はなく、35日後には、褐色上のカルスになり、分裂を止める。植物ホルモンの組合せ、銅イオンの添加の有無を検討した結果、脱分化率は、2.0 mg/L の 2,4-D を添加した MS 培地上で最も高い脱分化率 (白色カルスのみ) 13.5%を示した。

② 成熟種子胚を用いた脱分化

スクロースまたはソルビトール、アスコルビン酸、植物ホルモンオーキシシン 2,4-D、サイトカイニン Benzylaminopurine (BA) もしくはカイネチンの添加組合せや濃度を変えた種々の MS 培地を用いて、パールミレットの成熟種子胚から白色カルスへと脱分化させる最も最適な培地を探索した。その結果、15 g/L スクロース、15 g/L ソルビトール、5 mg/L 2,4-D を加えた MS 培地において、最大の白色カルスへの脱分化率 17.2%を得られた。一方で、100 mg/L のアスコルビン酸を加えた培地では、白色カルスへの脱分化率は、0%であり、アスコルビン酸の添加は白色カルスへの脱分化を妨げることが分かった。スクロースとソルビトールの添加が脱分化に及ぼす影響を評価したところ、15 g/L スクロースと 15 g/L ソルビトールを加えた培地の方が、30 g/L スクロースと 30 g/L ソルビトールを加えた培地より白色カルスへの脱分化率が高かった。BA やカイネチンの添加は、白色カルスへの脱分化を妨げたことから、サイトカイニンの添加は、脱分化に悪影響を与えることが分かった。また、凝固剤にゲルライトの代わりにアガーを用いたところ、白色カルスへの脱分化率が 26.5%となり、ゲルライトの 17.2%からおおよそ 10%向上した。

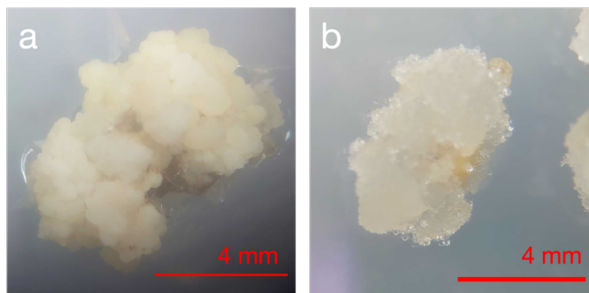


図2 パールミレットカルスの形態 (a)白色カルス (b)ガラス状カルス

③ 成熟種子胚の置き方の違いによる脱分化率への影響

更なる脱分化率の向上を目的に、成熟種子胚の置き方を検討した。異なる培地条件で、5通りの置き方 (図3) について検討した。その結果、置き方 c で 15 g/L スクロースと 15 g/L ソルビトール、5.0 mg/L の 2,4-D を添加した MS 培地 (凝固剤にアガーを使用) で最大の白色カルス脱分化率 47.2%を得ることができた。白色カルスへの脱分化率は、培地への胚の置き方によって異なった (a の位置で 0~26.5%、b の位置で 13.3~40.0%、c の位置で 10.0~47.1%、d の位置で 8.89~37.5%、e の位置で 6.67~42.9%)。白色カルスは、胚軸側を上にし

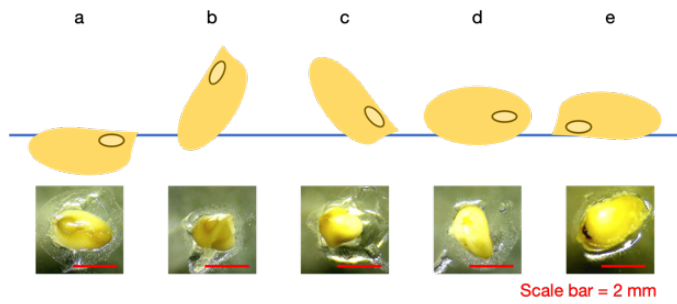


図3 成熟種子胚の置き方の違いによる白色カルスへの脱分化効率の違いの評価
aからeの置き方について検討した。

りも、すべての置き方において良好な白色カルスへの脱分化を示した。加えて、全ての置き方において、凝固剤にゲルライトの使用よりアガーを使用した方が、パールミレットの白色カルス脱分化率の成績が良かった。

④ カルスからの再分化

パールミレットの白色カルスからの再分化条件について検討した(図4)。サイトカイニンに BA、thidiazuron (TDZ)、カイネチン、オーキシニンに 2,4-D、糖にスクロースとソルビトール、凝固剤にゲルライト、アガーの組合せおよび濃度を変えて、最適な再分化培地を探索した。3%のスクロース、0.2 mg/L BA と 0.2 mg/L TDZ を加えた培地で IP17956 系統の白色カルスから最大の再分化率を得られた。一方、0.2 mg/L TDZ だけを加えた培地では、再分化個体を得ることはできなかった。凝固剤にアガー培地を用いた場合、銅イオンを添加した場合、12.5 から 25%の割合でアルビノ個体を得られた。

⑤ アグロバクテリウム形質転換

アグロバクテリウム株 LBA4404 と EHA101、ベクター、アグロバクテリウム接種液の濃度、共培養培地、共培養時間の異なる組み合わせにして 15 種類の条件を検討した。ユビキチンプロモーター下で *turboGFP* を発現するベクターを導入すると、カルスで *turboGFP* の蛍光が検出された(図3)。ユビキチンプロモーター下で発現する *RUBY* 遺伝子を含むベクターをカルスに導入した場合、いずれのカルスもベタレインの赤色を示さなかった。アグロバクテリウムに感染したカルスからは、再分化個体を得ることができなかった。

(3) iPB 法によるパールミレットの形質転換技術の確立

① iPB 法を用いるのに適した系統の選抜

2017年、浜田ら、DOI: 10.1038/s41598-017-11936-0 を参考にし、12系統のパールミレットの完熟種子から胚を取り出し、茎頂組織を露出したパールミレットにおける iPB 法の確立を目指した(図5)。12系統のパールミレットの遺伝的多様性の中には茎頂を露出した際に植物体まで成長する系統と、成長しにくい系統が存在することが明らかになった(図6)。よって、iPB 法を用いるのに適している系統が存在することがわかった。以降、茎頂を露出しても死にくい系統を実験に使った。

② iPB 法によるパールミレットの形質転換

iPB 法に適したパールミレット系統を用いて iPB 法を行った結果、T0 へのプラスミッド DNA の形質転換および、T1 個体へのプラスミッド DNA の遺伝が確認された(図7)。パールミレットにおいて本申請で世界で初めてパールミレットへの iPB 法による簡易な形質転換手法の確立ができた。本研究で確立した手法およびノウハウを用いて、今後は RNP タンパク質などをパールミレットの茎頂に送達し、ゲノム編集をタンパク質で行う実験系の確立も

て胚盤側を下にして培地に置いた場合に、最も白色カルスへの脱分化率が低かった。培地中の 2,4-D 濃度については、5.0 mg/L 2,4-D を含む培地の方が、2.0 mg/L 2,4-D を含む培地よりも白色カルスへの脱分化率が高かった。また、培地中の糖含量を変えて試験した。15g/L のスクロースと 15g/L のソルビトールを含む培地は、30g/L のスクロースを含む培地よりも、すべての置き方において良好なカルス誘導を示した。BA を含まない培地は、0.2g/L の BA を含む培地よ

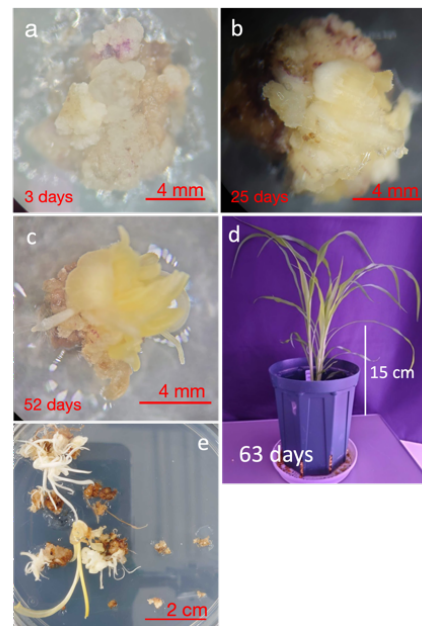


図4 パールミレットの白色カルスから再分化個体までの経過
IP17956 系統の白色カルスを再生培地に置床後 (a) 3日、(b) 25日 (c) 52日のカルス。(d)カルスを再生培地に置き始めてから 63 日後の再分化個体。(e)銅イオンを添加したアガー培地に置床した時に観察された再分化個体。

見えた。

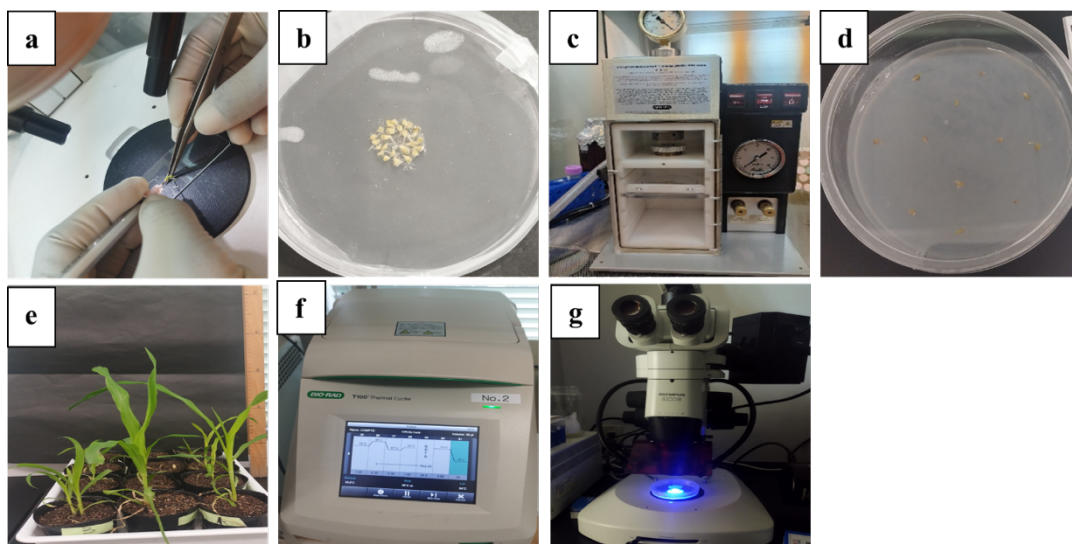


図5 パールミレットにおける iPB 法の確立に向けて
 (a)パールミレット完熟種子からの完熟胚の取り出し。(b)実体顕微鏡下で茎頂組織を露出。(c)遺伝子銃により打ち込む。(d)培養を行う。(e)植物体を土に植えて順化させる。(f)PCR による T0 植物の選抜。(g)T0 もしくは T1 植物を蛍光顕微鏡による GFP の観察。

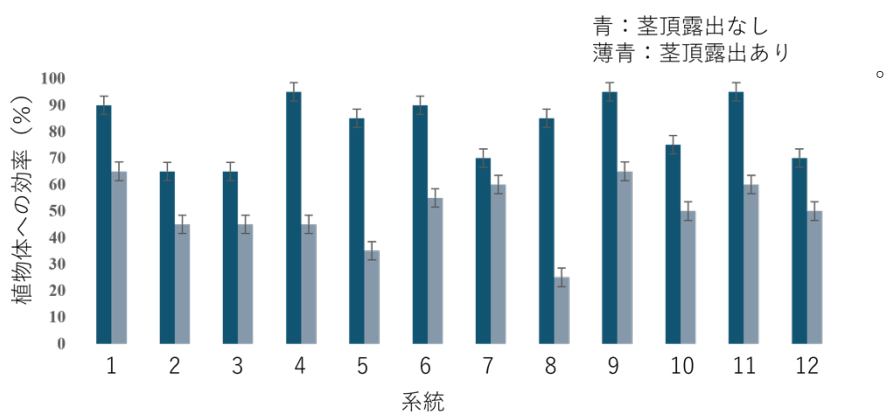


図6 パールミレット 12 系統の茎頂の露出の有無による植物体への成長率の差
 茎頂を露出した後も高いもので 70%ほど植物体への成長をする系統から、茎頂を露出すると 20%ほどしか植物体へ成長しない系統まであった。

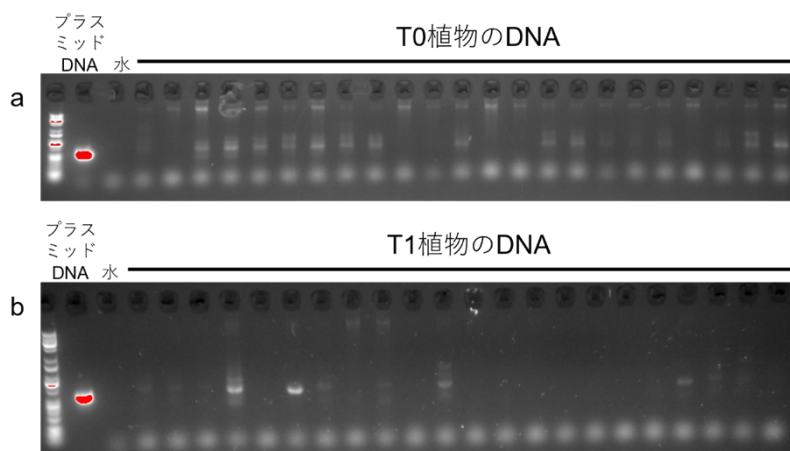


図7 パールミレットに対してプラスミッド DNA を iPB 法によって形質転換した T0, T1 個体への PCR による形質転換有無の確認
 (a)T0 植物へのプラスミッドの形質転換が確認された。(b)T0 植物から T1 植物へのプラスミッドの遺伝も確認された

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 Maryenti Tety, Ishii Takayoshi, Okamoto Takashi	4. 巻 232
2. 論文標題 Development and regeneration of wheat-rice hybrid zygotes produced by in vitro fertilization system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 2369 ~ 2383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.17747	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Arikpo, G., Ubi, B., and Ishii, T.
2. 発表標題 Establishment of easy gene editing protocol in cowpea and pearl millet
3. 学会等名 第14回 中国地区育種談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木亮磨・石井孝佳・吉田健太郎
2. 発表標題 コムギ育種への利用に向けたパールミレットの形質転換系の構築
3. 学会等名 第17回 ムギ類研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木亮磨、石井孝佳、松岡由浩、吉田健太郎
2. 発表標題 亜科間交雑で発生する染色体脱落を利用したコムギゲノム編集技術の確立
3. 学会等名 第16回ムギ類研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木亮磨・石井孝佳・吉田健太郎
2. 発表標題 パールミレット完熟種子を用いたアグロバクテリウム形質転換法の構築
3. 学会等名 日本育種学会第144回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青木亮磨・石井孝佳・吉田健太郎
2. 発表標題 パールミレット完熟種子を用いたアグロバクテリウム形質転換法の開発
3. 学会等名 第18回ムギ類研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Arikpo G., Ishii T.
2. 発表標題 Establishment of an in-Planta Particle Bombardment Gene Editing method in Pearl Millet.
3. 学会等名 第15回中国地区育種談話会
4. 発表年 2023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	石井 孝佳	鳥取大学・乾燥地研究センター・准教授	
	(Ishii Takayoshi)		
	(80823880)	(15101)	

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