

令和 6 年 10 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19127

研究課題名（和文）ゲノムデザインと自由な書き換えによる高収量コムギの創出

研究課題名（英文）Development of a high yield wheat via genome design and free rewriting

研究代表者

今井 亮三（Imai, Ryozo）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・エグゼクティブリサーチャー

研究者番号：90291913

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）：小麦の胚乳特異的なSUS3に四重変異を導入した変異酵素を作出し、酵素活性を比較したところ、四重変異酵素ではUDPに対する見かけのkcat/Kmは野生型酵素の1/400であったのに対し、ADPに対する見かけのkcat/Kmは野生型酵素の23倍になり、変異導入によりSUS3のUDP特異性をADP特異性へと改変できた。小麦DゲノムSUS3にゲノム編集で同様の四重変異を導入した。ゲノム編集系統のうち1つを使った収量調査を進めている、これまでに得られた結果からは、変異導入系統において、1個体あたりの総収量の増加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

将来の食糧危機に備えるため作物の持つ修了ポテンシャルを高める遺伝改変が期待されている。従来型の育種の限界を超えて収量増を達成するためにはゲノム編集による遺伝改変も必要である。自由な遺伝改変が可能になるノックイン型ゲノム編集技術を用いて種子収量に関わる酵素の活性を変えるような遺伝子の書き換えに成功し、収量増へのポテンシャルが見出された。今後はさらに生育調査等を行い、品種育成につながっていくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：A quadruple mutation into the wheat endosperm-specific SUS3 and their enzyme activities showed that the apparent kcat/Km for UDP of the quadruplex mutant enzyme was 1/400 of that of the wild-type enzyme, while the apparent kcat/Km for ADP was 23 times that of the wild-type enzyme. The same quadruple mutation was introduced into the wheat D genome SUS3 by genome editing. The results of a yield study using one of the genome-edited lines are being tested but current data suggested that the yield per plant was unchanged.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：genome-editing starch biosynthesis knock-in gene targeting wheat

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来の作物育種は、自然変異(野生資源や突然変異)や人工変異(化学変異源,放射線)から目的とする形質を選抜する。この方法論の限界を突破するためには、*de novo* 設計による遺伝改変をゲノム上で行うことが必要である。ゲノム編集技術により、ゲノム配列の改変が可能になったが、完全な自由度を持つゲノム改変には、相同組換えを利用したノックイン技術の達成が必要である。我々は、植物体をゲノム編集酵素を使って直接編集する画期的な技術(*in planta* particle bombardment, iPB 法)を開発した。本法の原理は、植物の芽の先端部(茎頂組織)に将来生殖細胞に分化する細胞層(L2)があり、パーティクルボンバードメントにより金粒子を撃ち込むことにより、L2細胞にゲノム編集酵素を送達し、ゲノム編集が起きたL2細胞から花粉/胚のう細胞、そして次世代種子が形成されるというものである。iPB法では、金粒子を導入支持体とするため、*Agrobacterium*を介した従来法では困難であったゲノム編集酵素と鋳型DNAの同時導入が可能である。この点に着目し、検討を重ねた結果、遂に相同組換えを介したノックイン型ゲノム編集を実用レベル(処理個体当たり0.2%の頻度)で達成可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、iPB 技術を使って、酵素の分子デザインとノックイン技術を組み合わせ、全く新しいアプローチによる多収性コムギ創出の可能性に挑戦する。コムギのショ糖合成酵素 SUS3 は胚乳細胞質でショ糖から UDP-Glucose を生成するが、これを構造モデリングを用いて ADP-glucose 生成型酵素に改変する。この遺伝情報を、ノックイン型ゲノム編集技術により、ゲノム上に書き換える。デンプン合成の基質である ADP-glucose を、SUS により供給するという大胆な計画である。デンプン生合成の強化により子実収量が大きく増大することが期待される(図1)

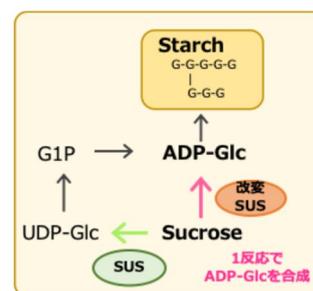


図1. 研究のストラテジー

3. 研究の方法

組織ごとの遺伝子発現解析

コムギ品種「農林61号」を用いた。栽培は長日条件(22°C, 16h 明期/16°C, 8h 暗期)に設定した人工気象室で行った。根、葉鞘、および葉身の組織は発芽後14日の植物からサンプリングした。茎および止葉の組織は開花後7日の植物からサンプリングした。胚乳の組織は開花後7日、14日、および21日の植物からサンプリングした。各組織からRNAを抽出し、cDNAを合成した。RT-qPCRによりコムギのSucrose synthaseファミリー遺伝子群の発現量を解析した。

SUS3発現プラスミドの調製

組換えSUS3を大腸菌により生産するための発現プラスミドを構築した。pCR-BluntII-TOPOプラスミドにクローニングされたWSUS3 cDNAを鋳型とし、増幅されたSUS3 cDNAのDNA断片をpET-23aプラスミドに挿入してWSUS3発現プラスミドとした。組換え酵素のC末端にヒスチジンタグが付加されるように設計した。各変異酵素の発現プラスミドについては、オーバーラップエクステンションPCRにより部位特異的変異を導入した。

組換えSUS3の調製

SUS3発現プラスミドにより形質転換した大腸菌BL21(DE3)を宿主として組換えSUS3を生産した。0.1 mM IPTG存在下にて18、24時間の誘導培養を行い、組換えタンパク質の生産を誘導した。培地には100 μg/mL アンピシリンを含むLB培地1 Lを用いた。得られた菌体から超音波処理により無細胞抽出液を調製し、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより組換えSUS3を精製した。

反応速度の測定

酵素、0.1 M MES-NaOH 緩衝液(pH 6.5)、1 mM 塩化マグネシウム、125 mM スクロースおよび0.1-2 mM UDP/ADPを含む反応液50 μLを30℃に10分間保持し、80℃、3分間の加熱により反応を停止した。フルクトース定量キットを用いて生成d-フルクトース濃度を求め、反応速度を算出した。各UDP/ADP濃度における反応速度をミカエリスメンテン式に非線形近似により回帰して速度パラメータを求めた。

組織ごとの遺伝子発現解析

コムギ品種「農林61号」を用いた。栽培は長日条件(22°C, 16h 明期/16°C, 8h 暗期)に設定した人工気象室で行った。根、葉鞘、および葉身の組織は発芽後14日の植物からサンプリングした。茎および止葉の組織は開花後7日の植物からサンプリングした。胚乳の組織は開花後7日、14日、および21日の植物からサンプリングした。各組織からRNAを抽出し、cDNAを合成し

た。RT-qPCRによりコムギの Sucrose synthase ファミリー遺伝子群の発現量を解析した。

コムギの茎頂分裂組織の調製

コムギ品種「農林 61 号」を用いた。ナノニードルを用いて、吸水種子の胚から子葉鞘および第 1~3 葉を取り除き、茎頂分裂組織を露出させた。茎頂分裂組織を含む胚を切り出し、MS 培地上に置床した。この時 20~30 個の胚を直径 1 cm の円周上に配置した。

リボヌクレオタンパク質およびドナーDNAの細胞導入

CRISPR/Cas9 リボヌクレオタンパク質 (RNP) は、組換え spCas9 と sgRNA(Integrated DNA Technologies, USA)を室温で 10 分間反応させることで調製した。RNP を含む溶液にドナーDNA (Integrated DNA Technologies, USA) と 0.6 μm 金粒子を添加し、室温で 10 分間静置した。RNP とドナーDNA が吸着した金粒子をマクロキャリア上に塗り広げ、乾燥させたのちパーティクルガンを用いて MS 培地上の茎頂サンプルに発射した。

ゲノム編集個体の選抜と系統の固定

RNP およびドナーDNA を導入した個体を第 5 葉期まで生育させ、ゲノム PCR あるいは CAPS による遺伝子型解析を実施した。ノックイン型ゲノム編集に成功した個体を選抜し次世代種子を取得した。次世代種子 (E1 個体) を展開し、同様の遺伝子型解析を実施した。ノックイン型ゲノム編集が確認された E1 個体を継代し、変異をホモ接合体で持つ系統を取得した。

収量試験

野生型株および変異株を、長日条件 (22°C, 16 h 明期/16°C, 8 h 暗期) に設定した人工気象室で栽培した。1 個体あたりの収量および種子数を測定した。1 種子あたりの重量は収量と種子数から算出した。

4. 研究成果

組換え SUS3 の酵素化学的諸性質

組換え SUS3 を 1 L スケールにて大腸菌により生産し、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した。本精製により、精製酵素約 3 mg を得た。組換え WSUS3 は pH 6.5 にて最大活性を示し、pH 6.1-8.6 (4, 24 時間), 35 以下 (pH 7.0, 15 分間) の条件で安定であった。5 mM UDP 存在下で測定したスクロースに対する見かけの k_{cat} は $1.46 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$, K_{m} は $0.0271 \pm 0.0025 \text{ mM}$ であり、125 mM スクロース存在下で測定した UDP に対する見かけの k_{cat} は $2.19 \pm 0.10 \text{ s}^{-1}$, K_{m} は $45.5 \pm 3.2 \text{ mM}$ であった。本酵素は ADP も糖受容体とし、同様に測定した ADP に対する見かけの k_{cat} は $0.246 \pm 0.014 \text{ s}^{-1}$, K_{m} は $0.631 \pm 0.075 \text{ mM}$ であった。本酵素は UDP に対して ADP の 138 倍の見かけの $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ を示した。

NDP 結合部位変異酵素の UDP/ADP 特異性の評価

NDP 結合部位の変異酵素を調製して UDP と ADP に対する見かけの速度パラメータを求めた。UDP と ADP に対する見かけの $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ の比率をとると、野生型酵素の 138 に対して 4 重変異型では 0.0147 であり、多重変異酵素では ADP に高い特異性を示した。4 重変異酵素の UDP に対する見かけの $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ は野生型酵素の 1/400 であったのに対し、この変異酵素の ADP に対する見かけの $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ は野生型酵素の 23 倍であった。以上のことより、NDP 結合部位への変異により WSUS3 の UDP 特異性を ADP 特異性へと劇的に改変できることが確認された。

胚乳特異的に発現する Sucrose synthase の探索

コムギは異質六倍体であり、Sucrose synthase(SUS)遺伝子を 21 個 (7 対) 持つ。ゲノム編集の標的となり得る、胚乳特異的な SUS を RT-qPCR により探索した。SUS3 と命名した遺伝子の胚乳 (開花後 14 日) での相対発現量は、栄養成長組織の 203~4053 倍であり、他の SUS には見られない胚乳特異的な発現パターンを示した。この結果から SUS3 をゲノム編集の標的遺伝子とした。

iPB 法によるノックイン型ゲノム編集個体の作出

酵素解析により示された 4 重アミノ酸置換を、ノックイン型ゲノム編集によりコムギゲノムに導入した。SUS3 の NDP 結合部位に変異コドン改変したドナーDNA を、RNP とともに茎頂分裂組織に導入した。ドナーDNA には一本鎖 DNA あるいは両 3' 末端が突出したオーバーハング二本鎖 DNA を用い、長さはそれぞれ 195 塩基と 300 塩基とした。一本鎖ドナーDNA を用いた実験では、iPB 当代 698 個体の解析から D ゲノムに目的の変異を持つ 1 個体を取得することに成功した。オーバーハングドナーDNA を用いた実験では、iPB 当代 278 個体の解析から A ゲノムに目的の変異を持つ 1 個体を取得することに成功した。得られた 2 つの変異個体から次世代種子を採種し、ゲノム編集変異の遺伝を解析したところ、両個体から変異の遺伝が確認された。各個体に由来するゲノム編集系統を #201 および #701 とした。

ゲノム編集系統の収量試験

先行して得られた #201 系統について、人工気象室での収量試験を実施した。野生型株および #201

系統を長日条件に設定した人工気象室で栽培し収量を解析した。1 個体あたりの収量は野生型株が 34.5g , #201 系統が 34.7g であり有意な差は見られなかった。収量には、光量等の環境要因が影響すると考えられる。現在、種々の条件での栽培を行っており、収量性への変異の影響が今後明確になっていくと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	佐分利 亘 (Saburi Wataru) (00598089)	北海道大学・農学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	手塚 大介 (Tezuka Daisuke) (80964600)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・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