

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850004

研究課題名(和文)ゲノム編集技術を用いた高効率な新規の植物育種法の開発

研究課題名(英文)Examination of genome editing for effective plant breeding

研究代表者

宮脇 克行(MIYAWAKI, KATSUYUKI)

徳島大学・農工商連携センター・准教授

研究者番号：80380111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物における突然変異育種法は、放射線による突然変異体から目的の特性を示すものを探すため、新品種を同定するまでに長い年月が必要となる。その長い期間を大幅に短縮するためには、正確な突然変異を目的遺伝子だけに誘導できることが必要である。本研究は、TALENおよびCRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術を利用し、トマトやイチゴの新しい育種法への応用を図ることを目的として行った。その結果、トマトにおいて、1～3塩基の欠損変異が導入されたカルスおよびシュートが観察された。また、イチゴにおいては、RNAi法を用いることにより、MYB10およびMYB1が花托の着色に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the plant breeding by mutation, it is necessary to identify new interest plant cultivars for a long period, because the phenotype of interest was selected from various mutants caused by the radiation. To shorten the period, it is required that exact mutation can induce on targeted gene only. In this study, we examined to apply TALEN and CRISPR/Cas9 system to a new method of breeding plant in tomato and strawberry. As a result, the mutations that loss of the 1-3 bases on the target genome region were observed in tomato calli by using TALEN or CRISPR/Cas9 system. In addition, MYB10 and MYB1 were involved in coloration of receptacle by Agrobacterium-mediated RNAi in strawberry.

研究分野：農学

キーワード：遺伝子導入 変異作出

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な生物種について目的の遺伝子を改変する技術として、『ゲノム編集』が注目されている。特に、人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集は、幅広い生物種における標的遺伝子の破壊（ノックアウト）や外来遺伝子の付加（ノックイン）が可能になってきていることから、次世代の遺伝子改変技術として注目されている。植物ではシロイヌナズナにおいて、Znフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）というZnフィンガーをモチーフとしたDNA認識領域とDNAを切断するヌクレアーゼが融合した人工ヌクレアーゼを用いることにより、ゲノム上の標的遺伝子を特異的に切断し、誤りがちなDNA修復系である非相同組換え修復（NHEJ）を利用し、切断部位周辺に塩基の欠失や置換を導入することにより標的遺伝子を改変する手法が報告された（Osakabe et al., 2010 *PNAS*）。しかしながら、標的配列に特異的に結合するZFNの構築過程が煩雑であり、機能的なZFNを作製することが難しいのが欠点であった。しかし、植物病原細菌キサントモナスより見つかったDNA認識システムを利用することにより、ZFNのDNA認識領域が改良された人工ヌクレアーゼ（transcription activator-like effector nuclease, TALEN）が開発され、ZFNよりも標的配列選択の自由度が高くなった。そのTALENを用いることにより、植物においてはイネ、動物においてはゼブラフィッシュやラット、培養細胞においてはES細胞やiPS細胞でのゲノム編集が相次いで報告されてきている。世界的に注目されている新しい技術であり、非モデル生物への応用が期待されている。そこで、我々はTALENなどの人工ヌクレアーゼを独自で作製できるシステムを確立した（Watanabe et al., 2012

Nature Communications）。さらに最近、細菌の獲得免疫システム（CRISPR-Cas system）の中でRNAの働きによってDNAを切断するためのメカニズムが研究され、人工的RNA（RNA chimera）によって標的DNAを認識する新しい人工ヌクレアーゼが提案されているが（Jinek et al., 2012 *Science*; Barrangou R, 2012 *Nature Biotechnology*）、これについてはまだ報告例はなかった。

2. 研究の目的

植物における突然変異育種法は、放射線によるゲノム変異導入による偶然の突然変異体から目的の特性を示すものを探すため、新品種を同定するまでに長い年月が必要となる。しかし、正確に遺伝子を破壊したり特定領域に組み込んだりすることが可能になれば、その期間の大幅な短縮が期待できる。本研究は、TALENおよびCRISPR/Cas9システムによる正確なゲノム編集技術を利用し、トマトやイチゴの新しい育種法への応用を図ることを目的として行った。

3. 研究の方法

（1）GFPを発現する形質転換体の作製
現在、イチゴ（ヘビイチゴ、サチノカ）とトマト（マイクロトム）において、リーフディスク法を用いたアグロバクテリウムによるGFP遺伝子の形質転換体を作製する。具体的には、葉片にアグロバクテリウム（LBA4404株、GV2260株、EHA105株）を感染させ、その後、カナマイシン培地などにより形質転換体を選抜する。トマト（マイクロトム）およびイチゴ（さちのか）のリーフディスク法において、GFP陽性の形質転換体が効率よく得られる条件を検討する。

(2) TALEN、CRISPR/Cas9 システムの構築およびトマトにおける IAA9 遺伝子を標的としたゲノム編集技術の確立

EMS により誘発した変異体トマト (マイクロトム) の中から、葉の形態が変わり、さらに受粉なしで結実 (単為結実) する個体が見つかった (Saito et al., *Plant Cell Physiol.* 2010)。この変異体では、IAA9 遺伝子の第 2 エクソンからの機能ドメインが大きく欠損していることがわかった。しかし、*SHIAA9* 遺伝子座を簡便に破壊し、単為結実品種を作製する技術は、報告されていない。そこで、TALEN または CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術により、単為結実性を示す変異体を同じように作製することができる可能性があるのか否かを検討するために、IAA9 のエクソン 1 およびエクソン 2 の配列から TALEN の DNA 結合領域およびガイド RNA をそれぞれ 3 種類ずつ設計し、バイナリーベクターに導入する。TALEN は、golden gate 法にて作製する。

(3) イチゴにおけるアントシアニン合成に関与する遺伝子群の機能解析

イチゴ (さちのか) の花托において、アントシアニン合成に関与する *CHS* 遺伝子の機能を解析するために、収穫した花托に直接アグロバクテリウムをインジェクションすることにより感染させ、花托の細胞内でヘアピン RNA を発現させることにより標的遺伝子の発現を抑制する AmRNAi 法を開発した (Miyawaki et al. *Plant biotech.* 2012)。この簡易的な機能解析法を用い、アントシアニン合成に重要な転写因子の機能を解析することにより、栽培品種イチゴのゲノム編集技術の標的遺伝子の候補を決定する。

4. 研究成果

トマトにおける IAA9 遺伝子を標的としたゲ

ノム編集技術の確立するために、TALEN および CRISPR/Cas9 システムを利用し、*SHIAA9* ノックアウトトマトの作製を試みた。TALEN は、N 末側の開始コドン周辺と C 末側の機能ドメインの塩基配列からそれぞれ設計し、SRISPR/Cas9 システムにおいては、*SHIAA9* ゲノムのエクソン 1 において、3 つの標的箇所を設計したものをを用いた。それぞれ構築した TALEN または CRISPR/Cas9 発現コンストラクトをアグロバクテリウム法によりゲノムに導入した。得られた形質転換カルスからゲノム DNA を抽出し、体細胞レベルでの変異を Cel-1 アッセイにより解析したところ、TALEN においては、4~6 塩基の欠損と 1 塩基置換が生じていた。また、CRISPR/Cas9 システムにおいては、2 つの標的箇所での変異が検出され、形質転換カルスのゲノム DNA を同様に解析した結果、1 塩基または 5 塩基欠失がそれぞれ生じていた。以上より、トマトにおいて、TALEN および CRISPR/Cas9 システムを用いることにより、ゲノム上の標的遺伝子に対する変異導入が可能であることが明らかとなった。最近、CRISPR/Cas9 システムを用いたモデル植物におけるゲノム編集が相次いで報告されてきていることから、今後、栽培品種の育種への応用が大いに期待される。

また、栽培品種イチゴにおけるゲノム編集技術の標的遺伝子の候補を決定するために、アントシアニン合成に関与する遺伝子群の機能解析を行った。アントシアニンは赤~紫~青色を呈する植物性色素であり、シアニン系、ペラルゴニン系、デルフィニン系の 3 種類にわけることができる。イチゴは花托と呼ばれる部分にアントシアニンを蓄積することによって、花托の形成初期はシアニジンの含有率が高いが、成熟するにつれてペラルゴニンが増加することにより独特の

赤みを呈しているが、デルフィニジンは合成されないことがわかっている。そこで、イチゴ花托における2つの転写因子 *FaMYB1* および *FaMYB10* の機能解析を行った。アグロバクテリウムを介した RNAi により *FaMYB10* の発現を抑制すると、アントシアニン合成量は減少し、過剰発現させるとアントシアニン合成量は増加した。一方、*FaMYB1* においては、RNAi により発現を抑制するとアントシアニン合成量は増加し、過剰発現させるとアントシアニン合成量は減少した。これらの結果より、*FaMYB10* はアントシアニン合成を正に制御し *FaMYB1* はアントシアニン合成を負に制御していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

- (1) Kadomura-Ishikawa Y, Miyawaki K, Takahashi A, Masuda T, Noji S. Light and abscisic acid independently regulated *FaMYB10* in *Fragaria x ananassa* fruit. *Planta* 241, 953-965, 2015.
(doi: 10.1007/s00425-014-2228-6.)
- (2) Kadomura-Ishikawa Y, Miyawaki K, Noji S, Takahashi A. *Phototropin 2* is involved in blue light-induced anthocyanin accumulation in *Fragaria x ananassa* fruits. *J. Plant Res.* 126, 847-857, 2013.
(doi: 10.1007/s10265-013-0582-2.)

[学会発表](計5件)

- (1) 上田梨紗, 石原諒典, 渡辺崇人, 菅野茂夫, 宮脇克行, 野地澄晴, 刑部祐里子, 刑部敬史. Establishment of the genome editing technology that targeted tomato *IAA9* gene by CRISPR/Cas9 system. 第56回日本植物生理学会、2015年3月18日、東京農業大学(東京都世田谷区)
- (2) 宮脇克行, 石川寧子, 刑部敬史, 野地澄晴. Functional analyses of R2R3 MYB transcription factors in anthocyanin

biosynthesis pathway of the strawberry. 第56回日本植物生理学会、2015年3月18日、東京農業大学(東京都世田谷区)

- (3) 宮脇克行, 平田翔悟, 石川寧子, 三戸太郎, 刑部敬史, 野地澄晴. アグロインフイルトレーション法を用いた *F3'5'H* 過剰発現によるイチゴ花托の着色への影響. 第32回日本植物細胞分子生物学会、2014年8月22日、いわて県民情報交流センター(岩手県盛岡市)
- (4) 平田翔悟, 上田梨紗, 渡辺崇人, 宮脇克行, 三戸太郎, 野地澄晴. Transcription Activator-Like Effector Nucleases による *IAA9* ノックアウトトマト作製の試み. 第36回日本分子生物学会、2013年12月5日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
- (5) 戸田彩香, 渡辺崇人, 宮脇克行, 三戸太郎, 山本卓, 野地澄晴. イチゴにおける高効率な遺伝子導入法の検討. 第36回日本分子生物学会、2013年12月5日、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮脇 克行(MIYAWAKI Katsuyuki)
徳島大学・農工商連携センター・准教授
研究者番号:80380111

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし