# みどりの食料システム戦略実現技術開発・実証事業のうち 農林水産研究の推進(委託プロジェクト研究)

# アグリバイオ研究

# ゲノム編集技術を活用した農作物品種・育種素材の開発(個別) 令和5年度 最終年度報告書

課題番号	19190722
研究実施期間	令和元度~令和5年度(5年間)
代表機関	公益財団法人岩手生物工学研究センター
研究開発責任者	西原 昌宏
	TEL : 0197-68-2911
研究開発責任者 連絡先	FAX : 0197-68-3881
	E-mail: mnishiha@ibrc.or.jp
	岩手県農業研究センター
      共同研究機関	
共间ឃ丸城割 	
普及・実用化	
支援組織	

# <別紙様式3>最終年度報告書

I - 1. 年次計画

研究課題		研	究年	度		担当研究機	関・研究室	研究担当者
<b>圳九珠</b> 趣	1	2	3	4	5	機関	研究室	(注1)
研究開発責任者						岩手生工研	園芸資源研究部	◎西原昌宏
<ul><li>1 リンドウにおける ゲノム編集の高度化技 術の開発と利用</li></ul>	0	0	0	0	0	岩手生工研	園芸資源研究部	○西原昌宏
1-1 迅速・高効率 なゲノム編集手法の開 発	0	0	0	0	0	岩手生工研	園芸資源研究部	△西原昌宏 根本圭一郎 前任者 高橋 重一 (2020.4 ~2022.6)
1-2 ゲノム編集系 統の NGS 解析	0	0	0	0	0	岩手生工研	園芸資源研究部、 ゲノム育種研究部	△阿部陽 西原昌宏
2 リンドウ新規育種 素材の開発と利用						岩手農研	園芸技術研究部 花き研究室	○内藤善美
2-1 ゲノム編集用素材の作出	0	0	0	0	0	岩手農研	園芸技術研究部 花き研究室	△小田島雅 前任者佐々木 忍 (2020.4- 2021.3)後任者 中里 崇 (2021.4~) 内藤善美 小澤傑
2-2 ゲノム編集個体の特性評価				0	0	岩手農研	園芸技術研究部 花き研究室	△内藤善美 小田島雅 前任者佐々木 忍 (2020.4- 2021.3)後任者 中里 崇 (2021.4~) 小澤傑

<sup>(</sup>注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付してください。

#### I-2. 研究目的

リンドウは日本独自の花き品目であり、初夏から晩秋にかけて切り花や鉢花として広く利用されている。自殖弱勢が強く遺伝的に不均一であるため、有用形質の導入や固定に時間がかかり、通常育種では1品種の開発に10年以上の期間を要する。また、育種資源も限られており、開花まで通常2年を要する多年生植物であることも品種開発に多大な労力とコストがかかる要因となっている。これまで、最も汎用性が高く、様々な作物に適用が進んでいるCRISPR/Cas9システムを用いて、遺伝子の機能解析を主な目的として研究を進め、八重咲き、花色、開花期等の改変に成功している。これらのゲノム編集個体を素材として利用するにあたって、さらなる効率化や外来遺伝子フリーの系統の作出を目指した研究開発を進める必要がある。

# このため、本研究では、

- 1. リンドウにおけるゲノム編集の高度化技術の開発と利用
- 2. リンドウ新規育種素材の開発と利用

により、リンドウにおけるゲノム編集技術の効率化、迅速な編集個体作出を可能とする基盤技術を確立する。また、得られたゲノム編集個体を母本として、後代を育成し、外来遺伝子の存在していない系統を獲得する。NGS(次世代シーケンシング)解析等により、外来遺伝子フリーであることを確認した系統については、実際に栽培試験等により特性評価を行い、リンドウの新規育種素材として利用可能とすることを目標とする。その際、包括課題で対象とするリンドウ以外の花き品目(ユーストマ、ユリ)との情報交換を密に行うことにより花きへのゲノム編集技術の適用を促進する。

#### その結果、

- 1. リンドウにおける効率的なゲノム編集技術が確立され、新規育種素材の開発に応用できる。
- 2. 花持ちが良く、省力栽培に繋がる育種素材が作出され、リンドウの需要拡大に繋がる品種の開発が可能となる。
- 3. 実用形質のゲノム編集体が複数作出されることにより、他の花き作物におけるゲノム編集技術の活用促進に繋がる。

ことが期待される。

# 研究開発の達成目標

ゲノム編集による花持ちの良い、省力栽培に適したリンドウ育種素材の開発を最終目標とする。リンドウで花持ちが良くなることがわかっている八重咲き形質に着目し、八重咲き×省力栽培に適した形質を有するリンドウ育種素材を2系統以上作出する。

技術的成果としては、

- 1) 花き作物 (リンドウ等) のゲノム編集技術の効率化
- 2) 花き作物の外来遺伝子フリーのゲノム編集育種素材の作出

# I-3. 研究方法

# (1) リンドウにおけるゲノム編集の高度化技術の開発と利用

岩手生工研ではCRISPR/Cas9系によるゲノム編集技術の効率化を行う。具体的にはプロモーターの改変、Cas9、ガイド RNA改良、複数遺伝子をターゲットとした編集技術の開発を実施する。その際、包括提案型課題のサポートラボ(農研機構、大阪大学)の支援を受けて、新規ツールの利用などにも取り組む。ターゲットとする遺伝子は、包括提案型課題でも実施予定のAGAMOUS遺伝子(リンドウで八重咲きに関与)、NAC転写因子遺伝子(アサガオ等で花持ちに関与、リンドウでも同定済み)とする。また、耐病性、開花期、花色等、省力化・遺伝資源の拡大に繋がる形質の改変も実施する。最終的に、迅速且つ効率的なゲノム編集手法として確立する。既に得られているゲノム編集系統を岩手農研が提供予定の省力性形質を有する素材系統や純系リンドウと交配し、後代を育成する。最終的に外来遺伝子が存在せず変異のみを有する系統を獲得し、特性評価を行う。本個体をPCR、NGS解析等に供試し、外来遺伝子が存在していないことを確認する。

## (2) リンドウ新規育種素材の開発と利用

岩手農研では、多数のリンドウ育種素材を保持し、その特性を記録している。今回の育種目標の一つである花持ちの良さについては、葯が花弁化した八重咲きリンドウが優れることがわかっている。また、省力化については、リンドウの最重要病害である葉枯病の発生が葉面の気孔数の少ない系統で明らかに抑制されることがわかっているので(Tateda et al. 2019 MPMI)、これらの系統を素材とすれば防除の省力化が期待できる。春には株仕立て作業により1株から多数発生している茎数を通常10本程度に間引くが、遺伝的に茎数が少ない系統を素材とすれば株仕立ての省力化が期待できる。この他、CMV・SWBVウイルス耐性等を含む各種素材を岩手生工研に提供し、ゲノム編集や交配の素材とするとともに、八重咲きリンドウ等の純系化(ホモ化)によるヘテロ性の解消を図る。

岩手生工研で作出された外来遺伝子の存在しないゲノム編集有望個体については、開放系における使用に向けた文部科学省への届け出(以後、届け出)が完了した場合、岩手農研の蓄積された経験に基づき、適切に栽培し、特性評価を行う。

# I-4. 研究結果

# (1) リンドウにおけるゲノム編集の高度化技術の開発と利用

本課題では、リンドウのAGAMOUS遺伝子(AGI)、NAC転写因子であるEPH1L遺伝子編集用のCRISPR/Cas9ベクターを構築し、リンドウに感染させ、多数のbiallelic編集系統を獲得した。即ち、プロモーターやマーカー遺伝子の改良を行い、リンドウの改変ALS遺伝子とCmYLCV(Cestrum yellow leaf curlingウイルス)プロモーターによるtRNA-processingシステムを用いたタンデムガイド RNAを用いることにより、最大、70%以上の個体でbiallelic編集体が獲得可能であることが示された。また、これら個体を馴化育成し、閉鎖系温室で栽培、特性評価を行ったところ、ゲノム編集当代において、AGIのbialleic編集体では全ての系統で八重咲きとなった。さらに、EPH1L編集体についても閉鎖系温室で鉢栽培したゲノム編集当代3系統の個体の脱離花を用いて、擬似的な暗所老化誘導条件で花持ちを評価したところ、EPH1L編集体では外見上の花の老化が遅延することが確認された。EPH1L編集体ではゲノムEPH1L編集体ではが月上の花の分解と老化の指標遺伝子であるEPH1L編集体ではゲノムEPH1L編集体ではゲノムEPH1L編集体ではか月上の花の会化が遅延することが確認された。EPH1L編集体ではゲノムEPH1L編集体ではゲノムEPH1L

いう結果が得られた。1系統について、閉鎖系温室の3年株を用いて鉢栽培による花持ち を評価したところ、導入元品種に比較して花持ちがよくなる傾向が認められた。さらに、 ヌルセグリガント作出については、既存の花色編集系統(F3H、5GT + F3'5'H等)と岩手農 研提供の野生型 (WT) を交配することにより $F_1$ 個体を作出し、その自殖により、 $F_2$ 個体 を作出したところ、当代の変異系統と同じ花色を示し、変異表現型が遺伝することが確認 された。また、薄青花色を示すF3H編集系統と新たに本研究で作出した八重咲き系統 (AGI編集) については、F1世代を用いて、PCRとNGS解析(kmer法)により外来遺伝子 フリー(ヌルセグリガント)であることの確認を行った。さらに、オフターゲットの有無 についてNGS(k-mer法)による解析により検証を行った結果、元品種と比較して、取得さ れた配列は編集配列以外、同様な結果であり、オフターゲット配列は認められなかった。 さらに、花型や開花期等に関わる遺伝子のゲノム編集体の作出をとり進め、一部について は多弁咲きの表現型が確認されるなど、リンドウの遺伝資源の拡大に繋がる新規素材の作 出にゲノム編集技術が有効であることが示された。F3H遺伝子編集体の $F_1$ ヌルセグリガ ントについて、届け出用のデータの取得が完了した。なお、AG1編集体の後代 $F_2$ におい て、八重咲き形質が遺伝することも確認しており、育種素材としての活用が期待される。 本研究において最終的にEPH1L編集体5系統、AG1編集体14系統が有望な編集体として 作出され、さらにヌルセグリガントもAG1、F3H等において、多数作出されており、目 標数以上の育種素材が得られた。

#### (2) リンドウ新規育種素材の開発と利用

本課題の育種目標を踏まえた素材の提供は、岩手生工研での解析用に、花弁の老化遺伝子解析用に3系統、フローラルディップ用に2系統、ヌルセグリガント作出用に2系統のリンドウを提供した。

また、植物ウイルス(CMV・SWBV)は、葉のモザイク様症状や壊死などリンドウの 品質低下をもたらすことから、令和元年に岩手生工研と共同で66系統のウイルス抵抗性 を検定した。その結果、CMV抵抗性系統は得られなかったが、部分抵抗性系統が10系統 確認され、SWBV抵抗性系統は8系統あり、部分抵抗性系統は17系統であった。令和2年 以降も検定を継続し、最終的に5系統のCMV抵抗性系統を得た。

検定結果を踏まえ、岩手生工研で作出した編集体から、ヌルセグリガントを得るために、CMV抵抗性系統および作業の省力化が見込める茎数が少ない系統、それぞれ1系統の野生型の花粉を交配した。

そして、未受精胚珠培養による純系化の効率向上のために、他の植物でカルス誘導時に 添加される硫酸銅に着目した。

未受精胚珠培養用培地の硫酸銅濃度を変えて検討したところ、いずれの供試系統においても1 μMで慣行と同等以上に胚様体を獲得できたことから、広く適用できる濃度であると判断した。

更に、硫酸銅添加した未受精胚珠培養用培地の好適な培養条件を検討した。その結果、4系統のうち1系統は慣行条件(23℃暗条件)で、他の3系統は26℃暗条件で胚様体獲得数が最も多くなった。特に、慣行条件(23℃暗条件)では難培養性であった2系統は、26℃暗条件とすると獲得効率が向上した。

そのほかに、胚様体から植物体を得る工程における植物体への分化率を高めるための培地条件について検討した。その結果、慣行区と比較してGA 2ppm添加区、GA 1ppm・

CuSO<sub>4</sub> 1μM区およびGA 2ppm・CuSO<sub>4</sub> 1μM区で分化率が同等以上になり、特にGA 1ppm・CuSO<sub>4</sub> 1μM区では、慣行区よりも15%以上分化率が高かった。

試験の過程で得られた植物体を生長させ、倍数性を確認したところ、半数体が205個体、 2倍体が191個体得られた。

上述の研究を進めるにあたり、包括課題の花き品目(ユーストマ、ユリ)との情報交換を年2回程度実施した。ユーストマではAGI編集による八重咲き化、ユリではEPHI編集による花持ち改善を実施しており、リンドウにおける編集体作出の参考とした。また、 $CuSO_4$ 添加によるユーストマの形質転換効率向上の情報をリンドウの胚様体からの植物体再生に適用し、研究を推進した。

「八重咲き×省力栽培に適した形質を有するリンドウ育種素材を2系統以上作出する。」に対しては、八重咲き(花形と花持ちの改善系統)×省力栽培(葉枯病抵抗性)に適した形質を有するリンドウ育種素材を19系統作出し、目標としていた2系統以上の作出を達成した。

- 1) 花き作物 (リンドウ等) のゲノム編集技術の効率化 これまでリンドウのゲノム編集効率には大きなばらつき (0~60%) があったが、改良ベクターによりゲノム編集体の獲得効率が向上 (21-75%) し、安定して編集体が得られるようになり、目標としていた効率化を達成した。
- 2) 花き作物の外来遺伝子フリーのゲノム編集育種素材の作出 ゲノム編集個体[花色遺伝子(F3H)編集、八重咲き遺伝子(AG) 編集)]を野生型花粉と 交配し、 $F_1$ 個体を作出した。また、自殖により $F_2$ 世代を育成し、ゲノム編集による形質 の遺伝及び外来遺伝子フリーであることを確認した。このことより、目標としていた花き 作物の外来遺伝子フリーのゲノム編集育種素材の作成を達成した。

## I-5. 今後の課題

リンドウにおいて効率的なゲノム編集技術を確立し、有望なゲノム編集系統が多数作出された。閉鎖系温室においてこれら編集系統の特性評価を進め、育種素材としての有効性を検証してきたが、実用利用に向けての特性の正確な把握には一般温室や圃場での評価が必要である。さらに、リンドウにおいて交配によるヌルセグリガントの作出が可能であることを初めて示し、解析手法も概ね確立できた。ただし、届け出はオフターゲットに関する情報が必要であり、ゲノム情報が整備されていないリンドウのような作物の事例はないため、取扱いについて検討する必要がある。今後、育種素材としての活用を進めるには、届け出が完了し、一般的な栽培条件下での評価が必須である。また、CRISPR/Cas9の特許許諾についても課題が残されており、有用な形質を示すゲノム編集体の実用化については、今後、県庁や関係機関と協議し、ゲノム編集作物の社会実装に向けて進める必要がある。

小課題番号	1	小課題 研究期間	令和元~5年度			
小課題名	リンドウにおけるゲノム編集の高度化技術の開発と利用					
小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	公財) 岩手生物工学研究 西原昌宏、根本圭一郎、 阿部陽					
共同研究機関・研究室・研究者 名等						

#### Ⅱ. 実行課題ごとの研究目的等

#### 1)研究目的

リンドウにおいて効率的なゲノム編集技術を確立するために、CRISPR/Cas9システムの至適化を行う。具体的にはプロモーターの改変、ガイドRNA改良、複数遺伝子をターゲットとした編集等により効率的かつ迅速な形質転換手法の開発を行う。また、ゲノム編集系統を親にした交配や未受精胚珠培養によりヌルセグリガントを育成し、ゲノム解析に供試し、外来遺伝子フリーであることを確認するための素材育成を進める。その際、NGSも用いて解析を実施する。

#### 2) 研究方法

リンドウのAGAMOUS(AGI)遺伝子とEPH1L遺伝子のゲノム編集用にCRISPR/Cas9ベクターを改良し、アグロバクテリウム法により品種アルビレオの形質転換を行う。ベクターの改良は、選抜マーカー遺伝子、ガイドRNA発現用プロモーター、タンデムガイドRNAを検討する。得られた耐性シュートのサンガーシークエンス解析により、biallelic編集体を得る。さらに、得られたbiallelicゲノム編集系統を馴化、育成し、花型や花持ちを確認することにより特性評価を行う。さらに、ゲノム編集系統(AGI編集(八重咲き)、既存の花色編集体(白花、薄赤紫花、薄青花等)を用いて、岩手農研から提供された省力性系統の花粉の交配により、ヌルセグリガント個体( $F_1$ )を作出する。その際、胚珠培養を活用し、世代促進を行うことにより早期の獲得を目指す。さらに、 $F_1$ 個体の自殖により、 $F_2$ 個体を作出し、栽培特性評価を行う。ヌルセグリガントの確認は、T-DNAを網羅するように設計したプライマー組合せを用いて、PCR解析により実施する。NGS解析により、k-mer解析やオフターゲットの解析を実施し、届け出用データを取得する。

## 3)研究結果

CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集を行うためのバイナリーベクターを構築した。 八 重 咲き AG1用に 3 種類(pSpcobar2-GenAG1t3t4、pSALS-GenAG1t3t4、pSpcobar2-CmYLCVGenAG1t3t4)、NAC2用に 1 種類(pSALS-NAC2t1t2)、NAC3用に 1 種類(pSALS-NAC3t1t2)、NAC2+NAC3同時編集用に 1 種類(pcobar2-NAC2t1NAC3t1)、計6種類のベクターを有するアグロバクテリウム法を感染させ、耐性シュートの選抜を行った。サンガーシークエンス解析により、編集個体の選抜を行った結果を表1に示す。 いずれも biallelic編集系統が複数確認された。 1遺伝子についての biallelic編集体の獲得効率は 16.6-75.0% であった。 特に、 AGI編集においては、リンドウ

変異ALS遺伝子による選抜マーカーと、CmYLCVプロモーター、t-RNAプロセッシングシステムを用いたタンデムガイドRNAの発現により、12系統中9系統(75%)の個体でbiallelic編集系統が獲得され、高効率のゲノム編集技術が確立された(参考文献1、2)。

表1 リンドウゲノム編集系統の作出状況

ベクター名	ターゲット 遺伝子	解析シュー ト数	biallelic 編集系統数
pSpcobar2-35SpCas9, AtU6pGenAG1t3t4	GtAG1	9	4
pSpcobar2- CmYLCVpCas9,AtU6p GenAG1t3t4	GtAG1	12	2
pSALS-35SpCas9, CmYLCVpGenAG1t3t4	GtAG1	12	9
pSALS-35SpCas9, CmYLCVpNAC2t1t2	GtNAC2 (EPH1L)	28	6
pSALS-35SpCas9, CmYLCVpNAC3t1t2	GtNAC3	15	4
pSpcobar2-35SpCas9- AtU6pNAC2t1NAC3t1	GtNAC2, GtNAC3	32	2

得られたAG1のbiallelicゲノム編集系統を馴化育成し、閉鎖系温室で栽培したところ、予想通り全ての個体で雄蕊が花弁化した八重咲きの花型となった。代表的な花を図1に示す。

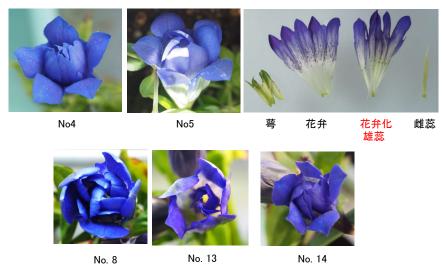


図1 リンドウ*AG1*編集体 (pSALS-35SpCas9, CmYLCVpGenAG1t3t4) の 代表的な花 biallelic編集系統は全て八重咲きとなった。

NAC編集体についてはNAC2編集体を6系統、NAC3編集体を4系統、NAC2,NAC3二重編集体を2系統獲得した。NAC3編集体およびNAC2、NAC3二重編集体は編集系統間で草姿や開花期が大きく異なり開花率もバラつきが多かったため、NAC3は花持ちの改善のためのゲノム編集の対象として不適であることが示された。一方、NAC2編集体ではいずれの系統においても草姿等に特段の変化は認められなかった。分子系統解析から、

NAC2遺伝子がアサガオで花の老化に関わることが示されている EPHEMERAL1 (EPHI) 遺伝子に最もホモロジーが高かった。そこで、NAC2遺伝子が老化に関わる遺伝子として有望であると考え、EPHILと改名し、以後、研究を実施した。各 EPHIL編集系統の花持ちについて、開花直後の花のみを切り出して水に浮かべ、脱離花を暗所下でインキュベートすることにより、老化の確認を簡易に安定的に行う系を構築し、評価したところ、いずれの系統においても花持ちの改善が認められた。また、老化の遺伝子マーカーである SAG12遺伝子の発現レベルの経時変化をQRT-PCRで解析したところ、WTに比べ誘導時期が遅れることが示された。 3系統の結果を図2に示す。また、これらEPHIL編集系統ではゲノムDNAの分解も遅れるという結果であった(参考文献3)。

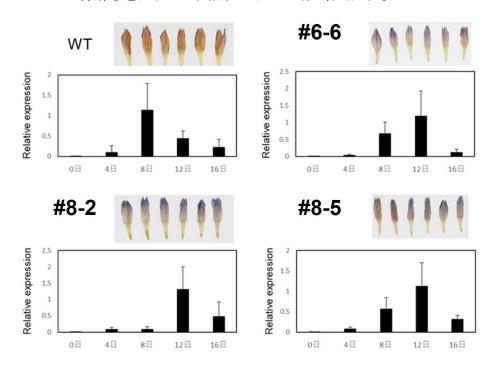


図2 *EPH1Lゲノム*編集体の暗所誘導による擬似老化処理による花持ちの評価 暗所処理後20日目の花の形態を上段に、0から16日目までの4日ごとの*SAG12*遺伝 子の相対的な発現レベルを下段に示す。内部標準として*Actin*遺伝子を用いた。3 系統の結果を示す。

これら3系統のうち、揃いのよかった系統#6-6について、閉鎖系温室で3年株を用いて 鉢栽培での花持ちの評価を行ったところ、導入元品種に比較して花持ちが若干よくなる傾 向が認められた。ただし、個体間でのバラつきも大きく、正確な花持ちの把握には、届け 出後、一般温室等での詳細な評価が必要と考えられた。

交配によるヌルセグリガント作出については、既存の花色編集個体のうち、閉鎖系温室の鉢栽培で生育のよかったF3H編集体(薄青花)及び5GT+F3'5'H同時編集体(薄赤紫花)について、岩手農研センターから供与された花粉(エゾ系(YRy II)、ササ系(TO))を交配させ、未受精胚珠培養、胚珠培養、通常の採種の3種類の方法により後代の育成を行った。その結果、未受精胚珠培養では再生個体は得られなかったが、胚珠培養、通常の採種において後代が得られた。特に、胚珠培養では通常の採種に比較して早く実生が生育した(図3左)。そこで、実生の葉の一部からCrude DNAを抽出し、PCR解析を実施した。Cas9遺伝子のPCRの代表的な例を示す。後代個体では、バンドの増幅が見ら

れない個体(ヌルセグリガント)が獲得された。分離比はほぼ1:1の系統が多く見られ、 メンデルの遺伝様式に従うことが確認された。

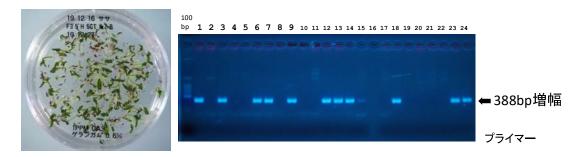


図3 胚珠培養により得られた後代実生 $F_1$ (左図)とゲノムPCRによるCas9 遺伝子の確認(右図)

編集個体の交配後代24個体の例を示す。*Cas9*の部分断片を増幅するプライマーでPCRによる増幅が認められない個体が得られた。リンドウにおいてもヌルセグリガントの作出が可能であることが初めて確認された。

また、同様に、AGI編集系統についても岩手農研センター提供の野生型系統の花粉を用いて交配を実施し、Cas9、CaMV35Sプロモーターの4箇所のPCRにより外来遺PCR解析により外来遺伝子の増幅しないヌルセグリガントと考えられる $F_1$ 個体が得られた。これらヌルセグリガントと考えられる $F_1$ 個体について、馴化、育成し、自家受粉を行った。花色遺伝子編集体と同様に、胚珠培養により世代促進を行い、得られた $F_2$ 実生についてサンガーシークエンス解析を実施した結果、変異アリルをホモに持つヌルセグリガントが複数獲得された。得られた $F_2$ 個体の一部について、温室での栽培に供試した結果、いずれの遺伝子編集系統でも当代と同様の変異花色を示すヌルセグリガント個体が獲得された。F3H編集体(薄青色)、DFR編集体(白色)、5GT+F3'5'H(薄桃色)。このことよりリンドウにおいてもゲノム編集した形質が後代への遺伝することが確認された。

さらに、ササリンドウ系統(To)に野生型の花粉を交配したF3H編集系統の $F_1$  1個体について、T-DNA領域をカバーするPCRによる解析を行った結果、元品種アルビレオと編集当代No.6ではバンドの増幅が認められたが、 $F_1$ 個体についてはバンドが増幅されず、外来遺伝子が存在しないヌルセグリガントであると考えられた。またAG1八重咲き編集系統の $F_1$ 個体についても同様に、岩手農研提供のWT花粉と交配を行い、 $F_1$ 、 $F_2$ 個体を作出した。 $F_1$ 個体についてPCRによる解析を行った結果、同様の結果が得られ、外来遺伝子はゲノムに残存していないと考えられた(図4)。

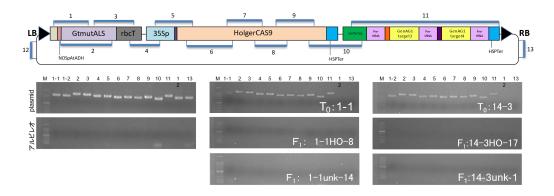


図4 AGI編集八重咲き後代F<sub>1</sub>のPCRによる外来遺伝子存在の有無の確認 数字はプライマーの組合せを示す。

T<sub>0</sub>世代においてのみT-DNA領域のPCRが認められた。

F3Hの $F_1$ 個体について、NGS (k-mer法)による解析を実施した結果、外来遺伝子(T-DNA)に有意な検出は認められなかった。

さらに*DFR*編集系統を用いてナデシコ目特有の黄色色素であるベタキサンチンをリンドウ花弁特異的に蓄積させることにより黄花リンドウの作出に成功した(参考文献4)。また、開花や越冬関連遺伝子のゲノム編集リンドウも作出し、開花期や越冬に関わる遺伝子の機能解析を行った(参考文献5)。リンドウのゲノム編集について、プロトコール集、総説に取りまとめた(参考文献6、7)。

AGI編集系統の $F_2$  個体についても閉鎖系温室で特性評価を行い、bialleic編集個体は八重咲きとなることが確認され、ヌルセグリガント八重咲き育種素材として有効であることが示された。また、F3H編集体の1系統についてk-mer解析に用いたシークエンスリードを用いて、予備的にオフターゲット検出プログラム(農研機構 宮尾安藝雄、坂井寛章、安倍史高氏開発)による解析を実施した結果、野生型と同様の結果が得られ、オフターゲットは生じていない可能性が示唆された。

リンドウのゲノム解析については、NanoPoreテクノロジーによるロングリードのシークエンスリードのベースコールの再実施、プログラムの変更等により、エゾリンドウDH 系統においてドラフトゲノム情報のさらなる精度向上を実施した。

なお、リンドウのフローラルディップ法の開発、ベースエディターの適用については、 実施したが、有効な結果得られなかった。

## 4) 成果活用における留意点

ゲノム編集リンドウの作出においては遺伝子ごとに効率に差が認められるため、今回、構築した改良型ベクターを用いた場合でも効率が悪い場合は複数のターゲット領域を選定し、ゲノム編集体の作出を行う必要がある。また、ヌルセグリガント作出の際の交配花粉親系統の選定について、純系リンドウを利用するなどゲノム編集体の実用利用を進める際に留意する必要がある。未受精胚珠培養による純系リンドウの作出については、培養受験を改良することにより効率の向上が認められており、これら知見を利用することで今後の品種改良を加速できると考えられる。*EPH1L、AG1*編集による花持ち改善向上や八重咲き化が認められたが、実際の圃場や温室栽培での評価が必要である。

# 5) 今後の課題

リンドウにおいてAG1とEPH1L編集体を作出し、八重咲き化や花持ちが向上したと考

えられる系統が作出された。これら編集体の特性評価は閉鎖系温室での鉢栽培や暗所擬似的老化条件下によるものであり、正確な特性把握が育種素材として活用するためには必要である。本研究では交配によるヌルセグリガントの作出にも成功し、PCRとNGS解析手法を用いて、届け出用のデータも取得したが、社会需要を見据えて届け出については慎重に検討する必要がある。最終的に実用化にあたっては、特許許諾についても課題が残されている。今後、当代ヌルセグリガント作出手法の開発や塩基編集技術等の精微な編集技術の適用、CRISPR/Cas9以外のゲノム編集ツールの利用等もゲノム編集リンドウの実用化を促進するためには必要な課題である。

# <引用文献>

- 1. Nishihara, M., Hirabuchi, A., Goto, F., Watanabe, A., Yoshida, C., Washiashi, R., Odashima, M., Nemoto, K. Efficient double-flowered gentian plant production using the CRISPR/Cas9 system. Plant Biotechnology 40: 229-236 (2023)
- 2. Nishihara, M. and Muranaka, T. Preface to the special issue "Current Status and Future Prospects for the Development of Crop Varieties and Breeding Materials Using Genome Editing Technology". Plant Biotechnology 40:181-184 (2023)
- 3. Takahashi, S., Yoshida, C., Takahashi, H., Nishihara, M. Isolation and functional analysis of *EPHEMERAL1-LIKE (EPH1L)* genes involved in flower senescence in cultivated Japanese gentians. International Journal of Molecular Sciences 23, 5608 (2022)
- 4. Nishihara, M., Hirabuchi, A., Goto, F., Nishizaki, Y., Uesugi, S., Watanabe, A., Tasaki, K., Washiashi, R., Sasaki, N. Production of yellow-flowered gentian plants by genetic engineering of betaxanthin pigments. N New Phytologist 240: 1177-1188(2023)
- 5. Takahashi, H., Nishihara, M., Yoshida, C., Itoh, K. Gentian *FLOWERING LOCUS T* orthologs regulate phase transitions: floral induction and endodormancy release. Plant Physiology 188: 1887-1899 (2022)
- 6. 西原昌宏、ひとりではじめる 植物バイオテクノロジー入門 〜組織培養からゲノム編集まで〜「リンドウの形質転換およびゲノム編集」pp212-223 国際文献社 2022年
- 7. 西原昌宏「日本園芸リンドウにおけるゲノム編集技術の利用の現状と展望」 ゲノム編集作物: 花卉の開発と新展開 月刊アグリバイオ増刊号2022年8月号 北隆館
- 8. Tateda, C., Obara, K., Abe, Y., Sekine, R., Nekozuka, S., Hikage, T., Nishihara, M., Sekine, K., Fujisaki, K. The host stomatal density determines resistance to *Septoria gentianae* in Japanese gentian. Molecular Plant-Microbe Interactions 32: 428-436 (2019)

小課題番号	2	小課題 研究期間	令和元~5年度
小課題名	   リンドウ新規育種素材の 	の開発と利用	
小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	(公財) 岩手生物工学码 西原昌宏、根本圭一郎		
共同研究機関・研究室・研究者 名等			

## Ⅱ. 実行課題ごとの研究目的等

#### 1)研究目的

岩手農研では、多数の育種素材を保持し、その特性を記録している。今回の育種目標の一つである花持ちの良さについては、葯が花弁化した八重咲きリンドウが優れることが分かっている。また、省力化については、リンドウの最重要病害である葉枯病の発生が葉面の気孔数の少ない系統で明らかに抑制されることが、岩手生工研の研究により分かっているので、これらの系統を育種素材とすれば防除の省力化が期待できる。また、春には株仕立て作業により1株から多数発生している茎数を通常10本程度に間引くが、遺伝的に茎数が少ない系統を素材とすれば株仕立ての省力化が期待できる。この他、CMV・SWBVウイルス耐性等を含む各種の素材を岩手生工研に提供するとともに、八重咲きリンドウ等の純系化によるヘテロシスの解消を図る。

#### 2) 研究方法

ア 本課題の育種目標を踏まえた素材の提供

岩手生工研でリンドウの新規形質転換法として取り組むフローラルディップ法に供 試する系統を提供する。また、外来遺伝子を持たないヌルセグリガント作出のための 交配用花粉を提供する。

あわせて、苗に対するCMV・SWBVのウイルス接種試験により、抵抗性系統の判別を行い、有望な形質を持つ系統を提供する。花持ち性評価に必要なサンプルを提供する。

# イ 未受精胚珠培養による純系化の効率向上

リンドウのヘテロシス性を解消して純系化を進めるうえで、未受精胚珠培養は有効な手段であるが、植物体が得られる効率が低いことが課題であり、培養工程の条件を検討し、効率を向上させる。

#### ウ ゲノム編集系統の特性評価

岩手生工研で得られたゲノム編集系統を温室で栽培し、特性を評価する。

#### 3)研究結果

ア 本課題の育種目標を踏まえた素材の提供

岩手生工研での解析用に、花弁の老化遺伝子解析用に3系統、フローラルディップ用に 2系統、ヌルセグリガント作出用に2系統のリンドウを提供した。

また、植物ウイルス(CMV・SWBV)は、葉のモザイク様症状や壊死などリンドウ

の品質低下をもたらすことから、令和元年に岩手生工研と共同で66系統のウイルス抵抗性を検定した。その結果、CMV抵抗性系統は得られなかったが、部分抵抗性系統が10系統確認され、SWBV抵抗性系統は8系統あり、部分抵抗性系統は17系統であった(表1)。

表1 ウイルス抵抗性の判別結果(令和元年)

抵抗性/感受性	CMV	SWBV
抵抗性	0系統	8系統
部分抵抗性	10系統	17系統
感受性・局部壊死	56系統	41系統

令和2年以降も検定を継続し、最終的に5系統のCMV抵抗性系統を得た。

検定結果を踏まえ、岩手生工研で作出した編集体から、ヌルセグリガントを得るために、CMV抵抗性および作業の省力化が見込める茎数が少ない系統のそれぞれ1系統の野生型の花粉を交配した。

## イ 未受精胚珠培養による純系化の効率向上

育種目標に合致する系統について純系化するべく未受精胚珠培養を行った。当初は従来の工程に液体振とう培養を組み合わせたが、効率向上につながらず、アプローチ方法を変更し、他の植物のカルス誘導時に添加される硫酸銅に着目した。

未受精胚珠培養用培地の硫酸銅濃度を変えて検討したところ、いずれの供試系統においても $1\mu$ Mで慣行と同等以上に胚様体を獲得できたことから、広く適用できる濃度であると判断した。

更に、硫酸銅添加した未受精胚珠培養用培地の培養条件を検討するため、慣行(23℃ 暗条件)と、光条件を比較するための23℃明条件、温度条件を比較するための20℃暗条件及び26℃暗条件を設定した。その結果、4系統のうち1系統は慣行条件(23℃暗条件)での胚様体獲得数が多かったが、他の3系統は26℃暗条件での獲得数が最も多くなった。特に、慣行条件(23℃暗条件)では難培養性の系統が、26℃暗条件とすることで獲得効率が向上した。

そして、胚様体から植物体を得る工程における植物体への分化率を高めるための培地条件について検討した。慣行区(GA1ppm添加区)と、GA量を増やした区(GA2ppm添加区)、硫酸銅を添加した区(GA1ppm・CuSO41 $\mu$ M区)、GA増量と硫酸銅を組み合わせた区(GA2ppm・CuSO41 $\mu$ M区)を設定し、植物体への分化率を調査した。その結果、慣行区と比較してGA2ppm添加区、GA1ppm・CuSO41 $\mu$ M区で分化率が同等以上になり、特にGA1ppm・CuSO41 $\mu$ M区では、3系統ともに慣行区よりも15%以上分化率が高かった。

植物体を生長させ、倍数性を確認したところ、令和 5 年度までに半数体 (n) が 205 個体、2 倍体 (2n) は 191 個体得られた (表2)。

表2 得られた植物体の倍数性(個体)

	n	2n	3n	4n	その他	合計
調査年度						
令和2年度	31	21	2	2	0	56
令和3年度	42	58	5	4	11	120
令和4年度	93	76	15	9	1	194
令和5年度	39	36	4	1	16	96
期間合計	205	191	26	16	28	466

# 4) 成果活用における留意点

特になし。

# 5) 今後の課題

岩手生工研では、届け出をゲノム編集作物の社会受容を見て判断することとしている。 届け出次第、岩手農研がゲノム編集系統の特性評価を2~3年実施し、実用的に問題となる形質がなければ、達成できる見込みである。

# Ⅲ 研究成果一覧【公表可】

個別課題番号 19190722

課題名 ゲノム編集技術を活用した農作物品種・育種素材の開発(個別)

成果等の集計数

課題	学術論文		学術論文 学会等発表(口頭またはポスター)		出版	国内特許権等		国際特許権等		PCT	報道件	普及しうる成果	発表会の主催(シンポ	アウト リーチ活
番号	和文	欧文	国内	国際	図書	出願	取得	出願	取得	出願	<b>数</b>	<b>る</b> 成果   	ジウム・ セミナー 等)	動
19190722	0	7	13	0	3	0	0	0	0	0	1	2	0	11

(1)学術論文 区分:①原著論文、②その他論文

整理番	区分	タイトル	著者	機関名	掲載誌	掲載論文のDOI	発行	発行	巻	掲載、
号	-/-	71177		1222 1	1 -3 +34 HrD.	)	年	月	(号)	ページ
1	1	Effects of knocking out three anthocyanin modification genes on the blue pigmentation of gentian flowers	Tasaki Kồ	岩手生工研	Scientific Reports	https://doi.org/1 0.1038/s41598- 019-51808-3	2019	11	9	15831
2	1	Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in Japanese gentian with the CRISPR/Cas9 system	Tasaki Кら	岩手生工研	BMC Plant Biology	https://doi.org/1 0.1186/s12870- 020-02565-3	2020	8	20	370
3	1	Gentian FLOWERING LOCUS T orthologs regulate phase transitions: floral induction and endodormancy release	Takahashi Hồ	岩手生工研	Plant Physiology	https://doi.org/1 0.1093/plphys/ki ac007	2022	1	188	1887- 1899
4	1)	Isolation and functional analysis of EPHEMERAL1- LIKE (EPH1L) gene involved in flower senescence in Japanese cultivated gentian	Takahashi Hồ	岩手生工研	International Journal of Molecular Sciences	https://doi.org/1 0.3390/ijms2310 5608	2022	5	23	5608
5	1)	Preface to the special issue "Current Status and Future Prospects for the Development of Crop Varieties and Breeding Materials Using Genome Editing Technology"	Nishihara Mら	岩手生工研	Plant Biotechnology	https://doi.org/1 0.5511/plantbiot echnology.23.000 <u>Op</u>	2023	9	40	181–184

6	1	Efficient double-flowered gentian plant production using the CRISPR/Cas9 system	Nishihara Mら	岩手生工研、岩手農研	Plant Biotechnology	https://doi.org/1 0.5511/plantbiot echnology.23.000 0p		9	40	229-236
7	1	Production of yellow-flowered gentian plants by genetic engineering of betaxanthin pigments	Nishihara Mら	岩手生工研	New Phytologist	https://doi.org/1 0.1111/nph.1921 <u>8</u>	2023	11	240	1177- 1188

(2)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行 年	発行月
1	ゲノム編集技術のリンドウへの適用	西原 昌宏、根本 圭一郎	岩手生工研	第37回日本植物細胞分子生物 学会大会)	2019	9
2	イオンビームとゲノム編集によるリンドウの花色改変	西原 昌宏	岩手生工研	第8回植物二次代謝フロンティア研究会	2019	10
3	代謝工学によるリンドウの花色改変 一黄や赤花を目指して一	西原 昌宏	岩手生工研	日本大学生物資源科学部 令和元年度 第1回生命科学研究所シンポジウム『植物機能化学:現在から未来へ』	2020	1
4	園芸作物リンドウにおけるゲノム編集技術の適用と展望 Applications and perspectives of genome editing in Japanese cultivated gentians	西原昌宏, 高橋重一、根本圭一郎,阿部陽, 小田島雅,佐々 木忍,小澤傑,内藤善美		日本生物工学会 生物工学 Webシンポジウム2020	2020	9
5	外来遺伝子を有しないゲノム編集リンドウ(ヌルセグリガント)の 作出 Production of transgene-free genome-edited plants (null segregants) in Japanese cultivated gentians	西原昌宏, 高橋重一、根本圭一郎,阿部陽, 小田島雅,佐々木忍,小澤傑,内藤善美		第62回日本植物生理学会年会	2021	3
6	CRISPR/Cas9システムによる八重咲きリンドウの作出	西原昌宏, 高橋重一、根本圭一郎,阿部陽, 小田島雅,佐々 木忍,小澤傑,内藤善美	岩手生工研、岩手農研	第38回日本植物バイオテクノロ ジー 学会大会	2021	9
7	リンドウFTの機能分化による成長および休眠相転換機構の解明	高橋秀行, 西原昌宏, 吉田 千春, 伊藤紀美子	岩手生工研、岩手農研	第38回日本植物バイオテクノロ ジー 学会大会	2021	9

8	Mutagenesis of Japanese cultivated gentian by ion beam irradiation and genome editing	西原昌宏	岩手生工研	第38回日本植物バイオテクノロジー 学会大会 日韓中三ヶ国シンポジウム	2021	9
9	リンドウの成長と形態形成におけるゲンチオビオース産生酵素 Gen3Aの役割	高橋秀行,吉田千春,西原 昌宏	岩手生工研	園芸学会令和3年度秋季大会	2021	9
10	リンドウにおけるNAC型転写遺伝子のゲノム編集による花持ちの改善	高橋重一, 吉田千春, 高橋 秀行, 西原昌宏	岩手生工研	日本育種学会第141回講演会	2022	3
11	ゲノム編集リンドウからのヌルセグリガント個体の作出と解析	西原昌宏, 高橋重一、根本圭一郎,阿部陽, 小田島雅,中里崇,小澤傑,内藤善美		第39回日本植物バイオテクノロ ジー 学会大会	2022	9
12	りんどう未受精胚珠培養の改良	小田島雅	岩手農研	令和4年度岩手県農業研究センター試験研究推進会議第2回外部検討会議	2023	1
13	りんどう未受精胚珠培養の改良	小田島雅	岩手農研	令和4年度新技術・普及活動 検討会(花き部門)	2023	1

# (3)出版図書

\_\_\_\_ 区分:①出版著書、②雑誌(学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行 年	発行月
1	1	ひとりではじめる 植物バイオテクノロジー入門 〜組織培養からゲノム編集まで〜「リンドウの形質転換およびゲノム編集」	西原 昌宏	岩手生工研	国際文献 社	2022	3
2	2	月刊「アグリバイオ」 ゲノム編集作物・花卉の開発と新展開 「日本園芸リンドウにおけるゲノム編集技術の利用の現状と展望」」	西原 昌宏	岩手生工研	北隆館	2022	8
3	(5)	狙った遺伝子を切断(ゲノム編集)し、新しいリンドウを開発! 岩手生工研の挑戦30周年記念誌	西原 昌宏	岩手生工研	公益財団 法人岩手 生物工学 研究セン ター	2023	7

# (4)国内特許権等

区分:①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番 号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	出願番号	出願年月日	取得年月 日
		該当無し						

# (5)国際特許権等

区分:①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	機関名  出願番号		取得年月 日	出願国
		該当無し							

# (6)報道等

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

整理番号	区分	記事等の名称	機関名	掲載紙•放送社名 等	掲載 年月日	備考
1	4	ゲノム編集によるリンドウの花色改変		研究所ホームページ		https://drive.google.com/file/d/1mXNYLSDJIjW H0S6LviEZJuLLRibWYqaZ/view?usp=sharing

# (7)普及に移しうる成果

区分:①普及に移されたもの・製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、

③主要成果として外部評価を受けたもの(複数選択可)。

整理番 号	区分	成果の名称	機関名	普及( <sup>1</sup> 年		主な利用場面	普及状況
1	2	リンドウにおける高効率のゲノム編集技術	岩手生工研	2024		リンドウのゲノム編集体の作出、遺伝 子ノックアウトによる遺伝子機能の解 析に利用	大学、研究機関等
1	2	リンドウの未受精胚珠培養の効率化	岩手農研	2024	1	純系リンドウの作出に利用、育種素材としての活用	りんどう育種研究機関等

# (8)発表会の主催(シンポジウム・セミナー等)の状況

整理番号	発表会の名称	機関名	開催場所	年月日	参加者 数	備考
	該当無し					

# (9)アウトリーチ活動の状況

区分: ①一般市民向けのシンポジウム・講演会及び公開講座・サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展・大学及び研究所等の一般公開への参画、 ③その他(子供向け出前授業、民間企業への訪問による情報提供等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	機関名	開催場所	年月日	参加者 数	主な参加者	備考
1	2	岩手生物工学研究センター 公開デー ー のぞいてみよう いわてバイオ研究最前 線ー	岩手生工研	岩手生工研(岩手 県北上市)	2019/9/7	400	一般市民	岩手県農業研究センター参観デーと同時 開催
2	2	岩手生物工学研究センター 公開デー ー 探ってみよう いわてバイオ研究最前線ー	岩手生工研	岩手生工研(岩手 県北上市)	2020/9/5	300	一般市民	岩手県農業研究センター参観デーと同時 開催
3	3	植物バイテクの今、昔	岩手生工研	盛岡市立乙部中学校(岩手県盛岡市)	2020/11/13	300	中学生、保護者	出前授業
4	2	ゲノム編集によるリンドウの花色改変	岩手生工研	農水省 北別館1 階 (東京都霞ヶ 関)	2021/11/8 -12	331	一般市民	農林水産省 消費者の部屋特別展示 バイオテクノロジーで何ができる?~品種 開発の歴史から最新技術まで~ でポス ターを展示

5	1	岩手生工研の花き研究開発について 令和3年度普及指導員調査研究活動(花き) 成果検討会(岩手県農林水産部農業普及 技術課主催)	岩手生工研	岩手農研 (岩手 県北上市)	2022/3/4	30	参集範囲 農業の 農業の 農業 大学係 と 大学 に 大学	リンドウのバイテク育種についての発表、 情報交換
6	3	リンドウのバイテク研究の紹介	岩手生工研	岩手生工研(岩手 県北上市)	2022/6/22	10	高校3年生及び教 員	岩手県立花巻農業高等学校の生徒と教員 を対象に、リンドウのゲノム編集技術を紹介。実験室室、培養室の見学も実施。
7	2	岩手生物工学研究センター 公開デー	岩手生工研	岩手生工研(岩手 県北上市)	2022/9/3	300	一般市民	岩手県農業研究センター参観デーと同時 開催
8	1)	岩手生物工学研究センター研究業務開始 30周年記念講演会 「岩手生工研の成果 と今後の展望」	岩手生工研	ブランニュー北上 (岩手県北上市)	2023/7/14	100	一般市民	
9	2	リンドウのバイテク研究の紹介	岩手生工研	岩手大学農学部 (岩手県盛岡市)	2023/8/25	50	研究者、生産者、 学生	岩手県園芸育種研究会りんどう部会、岩 手育種談話会(AFR)、岩手生工研 共催
10	3	岩手生物工学研究センター 公開デー	岩手生工研	岩手生工研(岩手 県北上市)	2023/9/2	400	一般市民	岩手県農業研究センター参観デーと同時 開催
11	1	日本植物バイオテクノロジー学会 第5回 産学官協力セミナーリンドウの研究からみ えてきたこと ーゲノム編集技術への期待	岩手生工研	サントリーメモリア ルホール(大坂大 学水キャンパス、 大坂府吹田市)	2023/11/27	100	一般市民	主催 日本植物バイオテクノロジー学会 共催 ゲノム編集育種素材開発コンソーシ アム、大阪大学大学院工学研究科