

令和5年1月17日

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（包括）」

令和4年度 研究実績報告書

課題番号	19191192
研究実施期間	令和元年度～令和5年度（5年間）
代表機関	国立大学法人大阪大学 大学院工学研究科
研究開発責任者	村中 俊哉
研究開発責任者 連絡先	TEL : 06-6879-7423
	FAX : 06-6879-7426
	E-mail : muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp
共同研究機関	国立大学法人大阪大学大学院工学研究科
	国立研究開発法人理化学研究所
	国立大学法人神戸大学
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター
	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
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 次世代作物開発研究センター
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 高度解析センター
	学校法人東京理科大学
	国立大学法人高知大学
	株式会社カネカ
	国立大学法人岡山大学
	国立大学法人金沢大学
	京都府公立大学法人
	株式会社ミヨシ
	株式会社インプラントイノベーションズ
	新潟県農業総合研究所
	国立大学法人筑波大学
	国立大学法人北海道大学
	国立大学法人京都大学
	学校法人玉川学園 玉川大学
	学校法人東京農業大学
	ハウス食品グループ本社株式会社
	国立大学法人東京大学
カルビーポテト株式会社	
普及・実用化 支援組織	株式会社カネカ
	株式会社ミヨシ
	株式会社インプラントイノベーションズ
	新潟県農業総合研究所
	サナテックシード株式会社
	カルビーポテト株式会社

## ＜別紙様式2＞研究実績報告書

令和4年度 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）  
「ゲノム編集技術を活用した農作物品種・育種素材の開発（包括）」  
研究実績報告書

### I. 研究の進捗状況等

昨年度までにゲノム編集の標的とする遺伝子の推定、ゲノム編集ベクターの構築がほぼ終了し、多くの課題でゲノム編集実験が開始・継続されている。本年度は各小課題において、ゲノム編集ベクターが導入された形質転換体、ゲノム編集体の取得・目的形質の解析が進んでいる。また、難培養性の作物において遺伝子導入法、直接ゲノム編集法が開発されている。作物によるゲノム編集の難易度から、進捗の差はあるものの、各課題が当初予定していた計画に沿って、研究は概ね順調に進行している。

#### 1. 保存中に芽が出ず、加工に適したばれいしょ

ゲノム編集による遺伝子破壊によって保存性の向上、デンプン形質の改変、病害抵抗性の付与が期待されるばれいしょ遺伝子について、ゲノム編集に着手し、複数の形質転換体、ゲノム編集系統が得られている。また、上記形質を簡便に評価できる評価系について予備的な評価系の構築に成功している。加えて、ゲノム編集適用可能な品種を広げるゲノム編集法の開発にも着手しており、研究計画に沿って順調に進捗している。

#### 2. 赤かび病に耐性を有するコムギ

オオムギの閉花性遺伝子ならびにかび毒低減遺伝子、およびイネの短葯遺伝子のコムギ相同遺伝子に対するゲノム編集用ベクターのコムギへの形質転換を実施してきており、4つの全ての候補遺伝子についてのゲノム編集イベントを獲得できて、編集アレルのホモ固定と赤かび病に対する形質評価を進めた。既に効果の確認された*NFXL1*遺伝子に加えて、短葯に関わる*SAM*遺伝子についても赤かび病に対する効果が確認されつつある。

#### 3. 花持ちが良く、省力栽培に適した花き

ユーストマの組織培養・形質転換系を効率化し、F1品種の種子親を用いて雄ずい形成あるいはエチレン感受性を抑制するゲノム編集系統を複数作出した。

ユリでは、花被の老化を制御する遺伝子に変異を導入した植物体を複数獲得した。

#### 4. 単為結果によりタネのない果菜類

単為結果と思わしき#25系統（カリフォルニアワンダー由来）では、オフターゲット部位に変異が導入されて、それが遺伝していることが明らかとなった。*In planta*ゲノム編集法の改良（intronized Cas9および再分化促進因子PLT5）によりカリフォルニアワンダーへの変異導入の確率が上昇した。ピーマンの品種「昌介」の形質転換系を確立し、この系を用いて複数のゲノム編集用ベクターを導入した個体を作成したが、ゲノム編集個体を得るには至っていない。

## 5. 登熟・転流を高めた超多収イネ

登熟期の節間(茎)や葉鞘でのデンプン蓄積を回避させることによる転流・登熟能向上や、ソースキャパシティに見合ったシンク容量向上を目指し、ゲノム編集技術による育種素材を創出する。これまでに得られた*AGPL1*、*AGPS1*、*CRCT* 各遺伝子に対する変異固定系統について、節間、葉鞘でのデンプン含量の低減および転流糖の増加を確認した。また *OsCKX2* に対する塩基置換(アミノ酸置換)変異固定系統について、収量性および収量構成要素への効果を検証するため、2回目の野外栽培実験を実施した。

## 6. アレルゲン成分を低減した作物

ダイズの主要なアレルゲンの一つとして問題となっているGly m 4タンパク質をコードする遺伝子を対象にゲノム編集個体の作出を進めた。カリユタカを用いアグロバクテリウムを介した形質転換によってゲノム編集個体を作成したところ対象遺伝子にフレームシフト変異を有する変異体を作成した。当該タンパク質の抗体を作製し解析したところ、対象タンパク質の欠失を認めた。さらに、アレルギー患者の血清を利用した低アレルギー性の評価も行った。また、社会実装を意識した応用研究として実用品種ユキホマレを対象にiPB法によるゲノム編集個体の作出も併せて着手した。なお、本年度までの研究は最終的な目標に対して80%程度に達している。

## 7. 晩抽性ダイコンの開発

ハツカダイコンの主要な2つのミロシナーゼ遺伝子に導入した変異が後代に遺伝し、また、ヌルセグリガントラインの同定できた。また、ミロシナーゼ活性の測定法も確立し、次年度に形質評価が可能であると思われる。一方、晩抽生を付与するために*FLC2*遺伝子イントロンに変異を導入した系統を複数作出したが、晩抽生付与に関わるシスエレメントの欠失には至っていない。青首ダイコンについては、ゲノム編集個体の作出に成功した。ただし、培養特性のさらなる改良は必要であることが示唆された。

## 8. 香味成分を増加させるために、LFS(催涙因子合成酵素)を抑制したタマネギの研究開発

「タマネギではゲノム編集が起き難い」という問題を解決するため、酵素の直接導入法の活用と、形質転換タマネギのゲノム編集を効率化する検討に取り組んだ。前者に関しては、gRNAとCas9タンパク質(RNP)の打ち込みにより標的遺伝子に変異が生じた事をE0植物体で確認し、LFS酵素活性の低下が期待されるE1種子を取得した。また、後者に関しては、gRNAのタンデム化で変異導入効率を高め、現在はLFS酵素活性の低下が期待されるT1種子を得るために、T0バルブの肥大培養を検討している。

## 9. サポートラボ

RNP複合体直接導入のproximal-CRISPR法に利用するCas12fタンパク質を合成した。イネにおいて、内在性遺伝子を標的としたCRISPR-Cas3によるゲノム編集に成功した。

双子葉植物における CRISPR-Cas3 システムについては、ゲノム編集を示唆する結果が得られていないが、イネで得られた知見を基に、改良を進めている。

## 10. ゲノム編集酵素の機能モジュールデータ基盤の構築 (PRISM課題)

SpCas9より1.2-2倍活性が高いAsCas12f改変体を創出するとともに、Cas12m、TnpB

の立体構造を決定し、機能モジュール情報を取得した。RNA単独でDNA切断活性を有するリボザイムの探索スキームを改良し、問題となっていたfalse-positiveの回収を抑えることに成功した。イネカルスにおいて、改変型AsCas12fを利用した標的変異導入に成功した。