

農林水産研究推進事業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3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3年度 農林水産研究推進事業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されていた。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。加えて、試験予定の多くの形質について評価方法が確立されつつあり、ゲノム編集によって目的の形質が改変された作物が順次作出・評価されている。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

閉花性については標的塩基置換用のベクターを、短葯とかび毒低減については標的変異導入用のベクターを改良し、閉花性、短葯、かび毒低減の3つの候補遺伝子において、ゲノム編集イベントを獲得した。また、*TaNFXL1*遺伝子については、他所で作成された研究材料ではあるが、確立した評価系を用いて目的とした表現型が確認できた。

3. 花持ちが良く、省力栽培に適した花き

ユーストマの雄ずい形成あるいはエチレン感受性を抑制する7種類のゲノム編集用ベクターを構築して複数のF1種子親系統に導入し、EgAP2TおよびEgETR1b導入系統で両アレルまたは片アレルのターゲット配列が完全に変異した複数の変異系統を取得した。

日持ちの良いユリの開発では、ユリにおいて高効率に変異を導入できるゲノム編集技術を確立した。

4. 単為結果によりタネのない果菜類

単為結果性と思わしき変異体を得ることができたが、ゲノム編集による目的遺伝子への変異によるものかが、まだ明らかに出来ていない。*In planta*ゲノム編集法では確率が低いものの変異がおきている可能性が示された。令和2年度に確立したピーマンの品種「昌介」の形質転換系を用いて、ゲノム編集用ベクターの検討を行ったが、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収量性向上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、収量性への効果を検証するため、野外栽培実験を開始した。

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Gly m 4の遺伝子のエキソン領域を標的にしたゲノム編集個体をアグロバクテリウムを介する方法で作出した。外来遺伝子を分離除去したヌルセグリガントを1系統取得した。抗体を用い、このゲノム編集個体における当該タンパク質の欠失を確認した。また、ダイズアレルギー患者の血清を用いてシラカンバの花粉症に対して交差反応する当該タンパク質の特性を評価した。さらに、一部の個体においてダイズアレルギー患者の血清を用い低アレルギー化を例証した。これらの一連の成果は研究全体の60%程度の達成度となっており、当初予定していた目的に向けて順調に進んでいると考える。

7. 晩抽性ダイコンの開発

2つのミロシナーゼ遺伝子を編集するベクターが導入された複数系統のうち2系統に両遺伝子にホモで変異があることが明らかとなった。晩抽性付与に関与する*FLC*遺伝子については、その発現調節様式が明らかになり、また、*FLC*ゲノム編集ベクター導入を開始、標的部位に変異が導入された系統が得られた。普通ダイコンの形質転換については、GFPを指標とした遺伝子導入をカルスレベルで達成できた。以上のことから、本年度の目標がほぼ達成したと考えた。

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にくい」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、LFS酵素活性の低下が期待されるE0個体が得られつつある。また、後者に関しては、gRNAのタンデム化が有効であることを明らかにし、こちらについてもLFS活性の低下が期待されるT0個体が得られつつある。

9. サポートラボ

RNP複合体直接導入のproximal-CRISPR法に利用するdCas9タンパク質を合成した。イネにおいて、外来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。

双子葉植物のモデルとしてタバコに対して CRISPR-Cas3 によるゲノム編集を試みているが、染色体に組み込まれたレポーターへの変異導入を示唆する結果が得られた。動物培養細胞やイネで得られた結果をもとに、タバコにおいて Cas3 システムの最適化を引き続き進めていく。

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)

Cas13b-gRNA-標的RNA複合体、およびCas12c-gRNA複合体の構造を決定し、Cas13bについてはその標的RNAの認識・切断機構を明らかにした。機能モジュールを付加したガイドRNA-リボザイムライブラリーおよびスクリーニング実験系の構築を完了した。イネカルスにおいて、SpCas12fを利用した標的変異導入に成功した。