

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Hafizur Rahman
審査委員	主査 小林 括平 副査 別府 賢治 副査 羽生 剛 副査 大西 浩平 副査 賀屋 秀隆

論文名

Development of genome editing technologies in plants

(植物におけるゲノム編集技術の開発)

審査結果の要旨

近年、ゲノム編集は多様な作物種に適用されてきている。アグロバクテリウム法や直接遺伝子導入法を用いた遺伝子形質転換による従来の遺伝子操作とは異なり、ゲノム編集技術では既存の作物ゲノムに微細な変更を加えることが可能であることから、この技術は作物育種における多様なニーズに対応可能であると期待される。多様な細菌種から Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) -associated protein 9 (CRISPR/Cas9) が発見され、特に *Streptococcus pyogenes* に由来するもの (SpCas9) は、植物ゲノムの改変する目的で広く用いられてきた。本研究では、カンキツ生産の台木として広く使用されているカラタチ、およびモデル植物を材料とし、SpCas9 を用いたゲノム編集技術の効率化や将来的な社会受容の向上に資する技術開発に取り組んだ。

1. ほぼクローナルなゲノム編集カラタチ集団を作出する技術の開発

これまでにいくつかのカンキツ品種においてゲノム編集技術の適用が報告されているが、我が国においてカンキツ生産の台木として広く用いられているカラタチについては報告がない。そこで SpCas9 を用いたカラタチのゲノム編集技術の確立に取り組んだ。標的遺伝子としては、多様な植物種のゲノム編集技術開発において標的とされるフィトエン脱水素酵素遺伝子 (*PDS1*) と、シロイヌナズナの *MULTIPLE ANTIBIOTICS RESISTANCE 1 (MAR1)* のカラタチホモログ (*PtMAR1*) を選択した。*PDS1* については次項で述べられている。*PtMAR1* 遺伝子上に 3 種類の異なる標的配列を設計し、アグロバクテリウム法によってカラタチ上胚軸切片を形質転換した。形質転換カルスの解析から、3 種類の標的配列においてそれぞれ 4 系統、22 系統、および 4 系統の変異カルス系統が同定され、アンプリコンシーケンス法によってゲノム編集カラタチカルスにおける変異率は、0.21~40.09%、8.57~99.96%、および 73.36~99.96%の範囲であることが示された。以上の結果は、標的配列に依存はするものの、SpCas9 によってカラタチゲノムを効率的に編集できることを示している。しかしながら当初参考にしたカラタチの形質転換法においては、ゲノム編集カラタチカルスからシュートを再生することができなかった。そこで、組織培養によるカラタチシュートの大量生産を目的に開発された手法を組み合わせることによって、ゲノム編集カラタチカルス系統から多数のシュートを誘導することに成功した。高い突然変異率を示したカルス系統から再生されたシュートの大多数は、高率で両アレルに突然変異を有し、クローンに

近い集団を形成したことが示された。本研究で確立されたゲノム編集カラタチカルスから複数のシュート誘導してさらに増殖させる手法は、ゲノム編集カラタチにおける形質評価の信頼性向上に資するものであると期待される。

2. カラタチのシュート再生および生育における *PDS* 遺伝子の重要性

上述の方法でカラタチの *PDS1* 遺伝子 (*PtPDS1*) の編集にも取り組んだ。*PDS1* はカロテノイド生合成に関与し、その遺伝子破壊株はアルビノ表現型を示すため、表現型の検証が容易である。*PtPDS1* 上に5つの標的領域を設計し、*PtPDS1* の遺伝子破壊を試みた。195個のハイグロマイシン耐性カルスを解析し、2種類の標的においてそれぞれ7系統ずつのゲノム編集カラタチカルス系統が同定された。それらのうち、変異率が95%であった3系統からシュート形成を試み、一系統において得られたシュートは野生型のみであったが、他の一系統から再生された153本のシュートのうち33本が変異を有していた。しかし、*PtMARI* 編集カラタチシュートとは異なり、*PtPDS1* 編集カラタチシュートはキメラ性が高く、野生型アレルの割合は低かったものの、完全なアルビノ表現型を示したものはなかった。すなわち、*PtMARI* 編集カラタチにおいて多数の遺伝子破壊株を取得できた手法を用いたにもかかわらず、*PtPDS1* 編集カラタチでは遺伝子破壊株は取得できなかった。この結果は、カラタチでは他の植物とは異なり、*PtPDS1* がシュートの再生または成長に重要な役割を果たすことを示唆する。

3. タバコにおける *MARI* 相同遺伝子の破壊による抗生物質抵抗性付与は限定的である

遺伝子組換え植物に対する忌避感根強く、ゲノム編集作物においてもCRISPR/Cas9-シングルガイドRNA (sgRNA) リボ核タンパク質複合体 (RNP) の直接導入によるDNAフリーゲノム編集が期待されている。*MARI* 遺伝子の破壊は、劣性陽性選択マーカーとしてDNAフリーゲノム編集の効率化に貢献しうる。このことを確認する目的で、四倍体タバコの *MARI* 相同遺伝子 (*NtMARIS* および *NtMARIT*) をアグロバクテリウムを用いた形質転換法によって破壊した。形質転換当代の葉切片培養では、95%以上の変異率を示した系統においてもカナマイシン等の抗生物質存在下ではシュート形成は認められなかった。一方、次世代の実生のうち、低濃度のカナマイシンに対して限定的な抵抗性を示した系統では、*NtMARIS* および *NtMARIT* の両方において両アレルにフレームシフト変異が認められた。これらの結果は、タバコにおいてもシロイヌナズナと同様に *MARI* タンパク質がアミノグリコシド系抗生物質に対する植物の感受性に寄与していること、タバコのアミノグリコシド感受性に他の因子が関与していること、およびタバコでは *MARI* 相同遺伝子がゲノム編集細胞の選抜には適さないことを示唆する。

4. シロイヌナズナにおけるゲノム編集効率を向上させる手法の開発

シロイヌナズナでは、フローラルディップ法によって *SpCas9* 等を導入し、後代種子集団から変異体をスクリーニングすることによってゲノム編集が行われている。この方法におけるゲノム編集効率の向上を目指し、形質転換後代の実生を *SpCas9* の至適温度である37°Cで1日間培養した。その結果、この処理が *SpCas9* の発現上昇を伴うことなく、変異率を有意に向上させること、導入された変異が体細胞に限定されず、次世代に受け継がれることが明らかになった。この処理がこれまでに提唱された高温処理よりも低侵襲的であることから、本法は植物ゲノム編集の効率化に広く適用されることが期待される。

本論文の公開審査会は令和4年2月3日にリモートシステムを利用して開催された。申請者が論文内容について発表した後、質疑応答が行われた。同日引き続いて論文審査委員会をあらためて開催し、審査を行った。これらの結果から本論文は博士（農学）の学位を授与するに値すると審査委員全員一致して判定した。