HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Modification of soybean yield components using genome editing technology [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	沈, 載哲
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第15756号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91946
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	SIM_Jaechol_review.pdf (審査の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　審　査　の　要　旨

博士の専攻分野の名称　　博　士（農学）　　氏名　　沈　載　哲

審査担当者　　主　査　　教　授　　金　澤　　章
　　副　査　　教　授　　藤　野　介　延
　　副　査　　講　師　　山　田　哲　也
　　副　査　　助　教　　Maria Stefanie Dwiyanti

学　位　論　文　題　名

Modification of soybean yield components using genome editing technology
（ダイズのゲノム編集技術を活用した収量構成要素の改変）

本論文は図 20 および表 6 を含む 4 章からなる総頁数 78 の英語論文であり，別に参考論文 2 編が添えられている。

ダイズの収量は，種子重，種子数，植物体の大きさ，分枝数，莢数，莢あたりの種子数を含む様々な要因によって決定されることが知られている。一般に収量は，気温や気候，病害虫などの外的要因への反応によって生育状態が変化することを介して，多数の遺伝子の発現の複合的作用の影響を受ける。これらのことから収量に影響する遺伝的要因の実態をとらえることは極めて難しい。一方，分子生物学の発展に伴い，モデル植物だけではなくダイズにおいても遺伝子機能の確認や推測を極めて正確に行える環境が整ってきた。とりわけ組織培養技術の発展と形質転換プラットフォームの構築により，遺伝子の機能を直接ダイズ植物体で評価できるようになった。さらに，近年ゲノム編集技術を介して遺伝子の微細な改変も可能になってきた。本研究では，収量構成要素の改変を目的として，細胞分裂の制御に関わる転写因子をコードする遺伝子およびブラシノステロイドのシグナル伝達に関わる遺伝子を対象にゲノム編集個体を作出し，これらのゲノム編集個体の各種特性解析を通して当該遺伝子の変異がもたらす多収化への可能性を考察している。得られた結果は以下のように要約される。

1. 細胞分裂の制御に関わる転写因子遺伝子 PEAPOD (*PPD*)のゲノム編集個体における特性解析

マメ科植物において *PPD* 遺伝子の変異が組織の肥大化をもたらすことが知られている。そこで，ダイズゲノム中に存在する *PPD* 遺伝子のホモログ(*GmPPD1* および *GmPPD2*)に関して CRISPR/Cas9 システムを用いゲノム編集を行った個体を解析し，*GmPPD1* および *GmPPD2* の両遺伝子座に変異の誘発を確認した。このうち，*GmPPD1* 遺伝子座に機能欠失を伴うと考えられるフレームシフト変異を有し，*GmPPD2* 遺伝子座に機能保持を伴うと考えられるインフレーム変異を有する個体を *ppd1* 変異体として選定した。また，*GmPPD1* 遺伝子座にインフレームシフト変異を有し，*GmPPD2* 遺伝子座にフレームシフト変異を有する個体を *ppd2* 変異

体，さらに，両遺伝子座に対してフレームシフト変異を有する個体を *ppd-KO* 変異体として選定した。初生葉の大きさを比較したところ，*ppd1* および *ppd2* 変異体は野生型と比べ有意に大きかった。葉における細胞観察ではこれらの変異体と野生型の間における大きさに変化がなかったことから，細胞数の増加が葉の肥大化をもたらしたことが示唆された。また，*ppd1* 変異体に関しては種子の 1 粒重が野生型と比べ有意に大きくなることが明らかになった。しかしながら，個体あたりの種子数は野生型に比べ減少し，結果的に個体あたりの種子重量は野生型と同程度となり，種子重と種子数におけるトレードオフの関係性を例証する形となった。一方，*ppd-KO* 変異体は葉が極端に湾曲し，莢は大きくねじれ，種子をほとんどつけない表現型を示した。この要因を明らかにするため，遺伝子発現に関する解析を行い，細胞分裂に関わる SPIRAL1-LIKE 5 (*GmSP1L5*)遺伝子の発現が極端に抑制されることを明らかにした。

2. ブラシノステロイドのシグナル伝達に関わる遺伝子(*GmBIL7*)におけるプロモーターゲノム編集個体の作出とその特性解析

BIL7 タンパク質はブラシノステロイドのシグナル伝達経路に関わる転写因子 BIL1/BZR1 の核移行因子として働くことが知られている。シロイヌナズナでは *BIL7* 遺伝子が過剰に発現する変異体において個体あたりの種子数が減り，種子重が増えることが報告されている。そこで，本研究では *BIL7* 遺伝子の発現を抑制することで種子数を増やすことが出来ると考え，ダイズにおける *GmBIL7* 遺伝子の発現を抑制するゲノム編集個体の作出を試みた。プロモーター領域に存在する G-BOX 領域には多数の転写因子が結合することが知られている。そこで， *GmBIL7* 遺伝子を対象に 2 種類の gRNA を設計し，CRISPR/Cas9 システムによる G-BOX を欠失させたゲノム編集個体の作出を試みた。作出したゲノム編集個体を解析したところ，G-BOX 領域を完全に欠失したアレルを持つ個体が見出された。得られたゲノム編集個体の葉組織において *GmBIL7* 遺伝子の発現解析を行った結果，当該ゲノム編集個体は対照個体に比べ *GmBIL7* 遺伝子の発現量が有意に低下していることが明らかになった。さらにゲノム編集個体と対照個体を養成し特性解析を行ったところ，生育期間に大きな違いは認められなかったものの，当該ゲノム編集個体は対照個体に比べ，第 1 および第 2 節において分枝が伸長すること，主茎において莢数が有意に増加すること，ならびに，個体あたりの種子総重量が増加することが明らかとなった。また，このゲノム編集個体では分枝の伸長を抑制する *BRC1* の遺伝子発現が低下していることも明らかとなった。

以上，沈 載哲はゲノム編集技術を駆使し，ダイズの収量構成要素に関わる遺伝子がもたらす新たな事象を見出した。得られた結果を基に，遺伝子の発現機序に依拠した遺伝的改変によるダイズの収量増加の可能性を考察している。これらの成果は，ダイズの収量性の改良に関する新たな知見を与えた点で学術上高く評価できる。よって，審査委員一同は，沈 載哲が博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。