



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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15756号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91946
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SIM_Jaechol_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 沈 載哲

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)

ダイズの収量は、種子重や種子数、植物体の大きさ、分枝数、莢数、莢あたりの種子数など様々な要因によって決定されることが知られている。さらに、気温や降水量、病害虫などの外的要因への反応によって生育が変化し収量に関連した様々な遺伝子の発現との複合的作用の影響で収量が決定される。これらのことから収量に関する遺伝的要因の実態をとらえることは極めて難しいことがわかる。一方、分子生物学の発展に伴いモデル植物だけで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。その一つとして、ダイズにおける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、近年ではゲノム編集技術を介して遺伝子の微細なチューニングも可能になってきた。本研究は、収量構成要素の内、種子の大きさと種子の数の改変を目的として、細胞分裂の制御に関わる転写因子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た。さらに、これらのゲノム編集個体の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た。

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

タルウマゴヤシやケツルアズキにおいて *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*) を CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集処理個体から標的領域に変異を有する個体を選定した。その結果、解析した全ての個体において *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、*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、*GmPPD2* 遺伝子座にフレームシフト変異を有する個体を *ppd2* 変異体として選定した。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。これらの変異体について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くなることが明らかになった。葉における細胞観察から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明らかになった。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総重量は野生型と同程度なり、これまでに報告事例のある種子重と種子数の間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、トランスクリプトームおよび個別の遺伝子発現解析から細胞分裂に関わる SPIRAL1-LIKE 5 (*GmSPIL5*) 遺伝子の発現が極端に抑制されることを明らかにした。また、トランスクリプトーム解析および遺伝子の機能予測解析からは関連遺伝子を特定することはできなかったが、*ppd-KO* 変異体は栄養成長期間が野生型および *ppd1* および *ppd2* 変異体よりも有意に長くなることが明らかになった。さらに、*ppd-KO* 変異体は老化時も退緑が起こらない stay-green 形質を示すことも明らかになった。

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、ゲノム編集技術を介してダイズにおける *GmBIL7* 遺伝子の発現を抑制する個体の作出を試みた。具体的には、発現制御に重要と考えられるプロモーター領域上に存在するシスエレメントの 1 つである G-BOX の欠失を目的にゲノム編集個体を作成した。*GmBIL7* 遺伝子の G-BOX を挟み込むように 2 種類の gRNA を設計し、CRISPR/Cas9 システムによる同時切断を試みた。作出したゲノム編集個体における変異アレルを解析したところ G-BOX 領域を完全に欠失したゲノム編集個体を得ることが出来た。そこで、得たゲノム編集個体の初生葉において *GmBIL7* 遺伝子の発現解析を行った。その結果、ゲノム編集個体は対照個体に比べ *GmBIL7* 遺伝子の発現を有意に低下していることを明らかにした。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。その結果、1 粒重は変化しないものの個体あたりの種子数が増加した。さらに、個体あたりの種子総重量も野生型に比べ有意に増加することが明らかになった。収量構成要素について評価したところ、ゲノム編集個体の主茎に着く莢数が野生型に比べ、有意に増加することが明らかになった。*GmBIL7* 遺伝子の発現低下と着莢数の増加を結びつける分子生物学的な根拠を見出すことはできなかったが、*GmBIL7* 遺伝子の発現制御によって多収化が期待できる可能性が考えられた。