



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Modification of soybean yield components using genome editing technology [an abstract of entire text]
Author(s)	沈, 載哲
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/91949
Type	doctoral thesis
File Information	SIM_Jaechol_summary.pdf



博士論文の要約

博士の専攻分野の名称：博士（農学）氏名 沈 載哲

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)

General introduction

ダイズ (*Glycine max* (L.) Merrill) は世界中で栽培されている主要作物のひとつであり、食用油や食用タンパク質の材料、家畜飼料などさまざまな目的に広く利用されている。1960年代から世界規模で食肉需要の増加に伴いダイズの需要量も大きく増加している。当然ながらこの需要に対応するためには、十分量のダイズ種子の生産が必要となり、収量増産はダイズ育種において最も重要な目標の一つとなる。一方、ダイズの収量は極めて幅広い遺伝的および環境的要因の影響を受けることが知られている。中でも主要な収量構成要素のなりうる種子重量と種子数を規定する遺伝子についての分子生物学的および生理学的特性は十分に解明されていない。

形質転換技術は遺伝子の発現を目的に合わせて調節することが出来るため遺伝子の機能解析に利用されることも多い。加えてアグロバクテリウムを介した形質転換やパーティクルガンなどの物理的形質転換は従来育種の課題を克服する応用研究にも役立っている。さらに、これらの技術は CRISPR/Cas9 やその他のシステムを介したゲノム編集のプラットフォームとしても利用される。

ダイズのゲノム編集は標的遺伝子の変異誘発に有用で、先行研究にて細胞分裂の制御に関わる PEAPOD (*PPD*)や Kinase-Inducible Domain Interacting 8-1 のような遺伝子を標的としてゲノム編集を行う事で種子サイズを増大した成功事例がある。これらの技術は先述にあるダイズの種子重量や種子数を規定する遺伝子の機構を理解する上でも極めて重要になる。

本研究は *PPD* およびブラシノステロイドシグナル遺伝子の 1 つ *BIL7* の遺伝子を対象にゲノム編集を行うことで種子重量や種子数への影響を精査し、ダイズの収量増産への可能性を検討した。

Morphological and molecular biological characterization of *GmPPD* gene loss-of-function mutants in soybean

植物器官の拡大によるバイオマスの増加は細胞数や細胞膨張によって制御されている。細胞増殖を制御することが知られている *PPD* 遺伝子の変異は植物器官の巨大化につながる。シロイヌナズナの *ppd* 変異体では細胞分裂の増大により葉が巨大化することなどが知られている。

PPD ホモログの機能喪失変異は *Medicago truncatula* や *Vigna mungo* などのマメ科植物種においても種子や葉の大型化することが報告されている。ダイズゲノムには *GmPPD1* と *GmPPD2* 二つのホモログが存在し、これらの遺伝子をノックダウンすることによって上述のマメ科植物の変異体に類似する表現型が示された。これらの表現型は器官の発達に重要な関連遺伝子として知られている *GROWTH-REGULATING FACTOR 5 (GRF)*、*GRF-INTERACTING FACTOR 1 (GIF1)*、*CYCLIND* などの遺伝子の発現レベルが上昇することが知られている。

ダイズでは *CRISPR/Cas9* を用いた *GmPPD1* と *GmPPD2* の変異誘発系統では莢と種子が巨大化するものの他、葉や莢がねじれる個体も出現することが報告された。後者は *GmPPD* のフレームシフト変異から生じたものの、組織巨大化や葉や莢に異常をきたす分子メカニズムは不明であった。

本研究では先述にある *GmPPD* ノックアウト変異ダイズの表現型の特徴とトランスクリプトーム解析を行う事でダイズの組織発達における *GmPPD* 遺伝子の役割について新たな知見を得ることを目的に研究を行った。

本研究はダイズ品種「カリユタカ」を対象にアグロバクテリウムによる形質転換プラットフォームを活用した *GmPPD1* と *GmPPD2* 遺伝子の *CRISPR/Cas9* システムによるゲノム編集個体を用いて *PPD* の機能喪失がもたらす影響を詳細に解析した。その結果、先行研究と同様に種子が巨大化する個体とねじれた莢と葉を持ちながら種子収量が激減する個体に分離したため、それぞれの個体について *GmPPD1* と *GmPPD2* 遺伝子の変異アレルをシーケンシングで確認した。さらに、形態的特性および生理的な特性を把握するため、これらのゲノム編集系統における葉における細胞の大きさ、花粉稔性、葉の大きさ、葉の *SPAD* 値および生育期間を計測した。また、葉や未熟な莢におけるトランスクリプトーム解析およびリアルタイム *PCR* を通して遺伝子の発現解析を行った。

GmPPD 遺伝子の変異アレルを解析した結果、種子が巨大化する個体とねじれた莢と葉を持ちながら種子収量が激減する個体は変異アレルの組み合わせによって生じることが明らかになった。ねじれた莢と葉を持ちながら種子収量が激減する表現型は

GmPPD1 と *GmPPD2* 両遺伝子にフレームシフト変異を有することが明らかになった(以降この個体を *ppd-KO* と記す)。一方、*GmPPD1* にフレームシフト変異、*GmPPD2* にインフレーム変異(以降この個体を *ppd1* と記す)を有する系統もしくは *GmPPD1* にインフレーム変異、*GmPPD2* にフレームシフト変異(以降この個体を *ppd2* と記す)を有する個体では葉組織と種子の巨大化が確認された。

ppd1 個体は対照象個体より 21% 大きな種子を生産したが、種子数は 42% 少なかった。結果的に個体あたりの種子総重量は対照象個体と比べ変化はなかった。また、ほとんど結実することはなかった *ppd-KO* 個体は *ppd1* や *ppd2* 個体とは異なり、栄養成長期間が長くなり結果的に開花期の遅延が認められた。さらに本系統はクロロフィルの分解が抑制され stay-green 形質を示す生理特性を有することも明らかになった。

花粉稔性および未熟胚の観察から *ppd-KO* 系統はいずれも正常であることが明らかになった。また、対照個体と *ppd-KO* 個体の未熟莢においてトランスクリプトーム解析を行った結果、128 個の発現の異なる遺伝子が同定された。特に、*ppd-KO* 個体では *GIF1* と *SPIRAL1-LIKE 5 (SPIL5)* の発現レベルが有意に変化した。これらの遺伝子は細胞分裂や器官の肥大に関連していると知られおり、このことから遺伝子発現パターンと観察された形態形質との関連性が示唆された。

ppd1 および *ppd2* 個体は *GmPPD* ノックダウン変異体と同様に種子重量や葉のサイズの増加などの器官の巨大化を示した。これは *GmPPD1* と *GmPPD2* 遺伝子座の両方に変異を有していたが、片方の遺伝子座についてはインフレーム変異によって特定のアミノ酸残基が欠損していたが、PPD タンパク質の機能のある程度補足していることを示唆する結果となった。一方、両遺伝子に対してフレームシフト変異を持つ *ppd-KO* 個体では莢と葉がねじれるなどの深刻な異常が見られた。これはダイズの器官形成において *PPD* が完全に機構喪失することで器官形成に関して重大な影響を及ぼすことが示唆された。

ppd-KO 変異体では極端に種子が少なかった。その原因は花粉の稔性障害によるものではなく莢のねじれによる物理的制約により胚の肥大を妨げられていることを示唆していた。そのため、わずかではあるがこれらの変異をホモに持つ種子を得られる場合があった。さらに、*ppd-KO* 変異体は特に栄養成長段階が遅れ、これまで PPD 変異体では観察されなかった stay-green の表現型を示した。しかしながら、トランスクリプトーム解析からは *PPD* 遺伝子の機能欠失によってもたらされる発現変動した遺伝子から、これらの表現型を説明できるような遺伝子を見出すことはできなかった。

PPD の機能喪失は成長と発育に重要な役割を果たす *GIF1* 遺伝子と *SPIL5* 遺伝子の発現の変化と関連していることを明らかになった。*SPIL5* の発現量の低下はねじれた莢の表現型と相関していた。この結果は、*GmPPD* 遺伝子への変異誘発はある程度機

能を残存させることが出来れば組織の巨大化が可能であることを示している。一方、これらの遺伝子の完全な機能欠失を起こした場合は植物の正常な発育を妨害し、栄養成長の遅延や胚の発育不全を起こし生育全般に様々な影響を与えることが明らかになった。

Modification of brassinosteroid signaling pathways in soybean using promoter genome editing system

植物におけるゲノム編集の対象はタンパク質をコードする配列だけでなく、遺伝子発現を制御するプロモーターの制御エレメントを包含する領域にまで及んでいる。遺伝子のプロモーター配列上に変異を有することで作物の収量を増加させるなど、農学形質を劇的に変化させる有望な結果もこれまでに示されている。例えば、トウモロコシの分裂組織遺伝子である Embryo Surrounding Region-related 7 (*ZmCLE7*)や Fon2-Like CLE protein 1 (*ZmFCPI*)遺伝子のプロモーター配列の一部を改変して発現を低下させることで穀粒の列数が増加させることに成功している。また、イネでは Dwarf 18 (*OsDI8*) 遺伝子のプロモーターを編集することで、野生型の個体よりも多くの子房を持つ矮性系統が作出された。

ブラシノステロイドは植物のシグナル伝達分子であり、細胞の拡大、分裂、ストレス抵抗性などのプロセスに関与している。シロイヌナズナでは、シグナル伝達経路がよく理解されている。細胞膜に存在するロイシンリッチリピート-RLK ファミリータンパク質の一種である Brassinosteroid-Insensitive1 (BRI1)と BRI1 Associated Receptor Kinase 1 (BAK1)は複合体として働き、ブラシノステロイドのシグナル伝達を開始することが知られている。ブラシノステロイドを受け取ったこの複合体はキナーゼの1つである Brassinosteroid-Insensitive 2 (BIN2)を間接的に制御する。また、Brassinazol-Resistant 1 (BRZ1)はブラシノステロイドのシグナル伝達を広く制御するマスター転写因子であり、先のキナーゼ BIN2 と相互作用する。リン酸化された BZR1 はプロテアソームで分解される一方、脱リン酸化されたものが BIL7 タンパク質と結合することで速やかに核への移行が起こりブラシノステロイド関連遺伝子の制御因子として働くことが可能になる。

先行研究でシロイヌナズナのブラシノステロイド生合成に関する変異体スクリーニングの過程において *BIL7* 遺伝子の発現が増加し、種子のサイズは大きくなるが、長角果あたりの種子の数は減少する特徴を有する *bil7-1D* 変異体が単離された。このことは *BIL7* 遺伝子のプロモーターゲノム編集によって当該遺伝子の発現を制御することによってダイズの収量へ影響を与えることが可能であることを示唆していた。

そこで本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いてダイズの *BIL7* オルソログのプ

ロモーターエレメントを欠失させる事で遺伝子発現を調節した個体を作成し、その遺伝子の発現量と組織形態学的形質を網羅し、プロモーターゲノム編集によるダイズの収量への影響を精査した。

ダイズのゲノムデータベースを利用してシロイヌナズナ *BIL7* 遺伝子のオルソログをアミノ酸配列に基づき検索した結果、多数の類似遺伝子を見出した。その中から発現部位およびその発現程度の特徴から、Glyma.05G209100（以下 5G と記す）と Glyma.08G015800（以下 8G と記す）の遺伝子を本実験におけるプロモーターゲノム編集の対象とした。G-Box (CACGTG)は様々な植物種でプロモーター領域におけるシスエレメントとして高度に保存されている。そこで、本研究ではこの G-Box およびその周辺領域を変異が誘発できるような gRNA を設計した。また、5G および 8G の両遺伝子を対象にゲノム編集できるベクターを構築した。このベクターを用いダイズ品種カリユタカにおいてアグロバクテリウムを介してゲノム編集を行った。

PCR を介した変異解析の結果目的とする領域およびその周辺領域に変異を誘発したゲノム編集個体の作出に成功した。得られた変異体については、自殖を繰り返す中で変異アレルを確認するとともに外来遺伝子が分離によって除去されたヌルセグリガントを選抜し、その後のこれらを解析材料として利用した。

さらに、qRT-PCR を実施し 5G および 8G 遺伝子の発現量の変化とプロモーター領域におけるゲノム編集効果を検証し、発現に有意な変化がある変異体を中心に形態学および生理学的形質を評価した。また、生物学的反復は設けなかったものの RNA-seq による花におけるトランスクリプトーム解析結果をダイズリファレンスゲノムにマッピングし発現量の異なる遺伝子を選定した。

13 個の T1 個体においてプロモーター領域の変異が確認した。さらに、qRT-PCR によりこれらゲノム編集個体の 5G と 8G の発現量を解析した。T1 個体 19-1 の後代個体において両遺伝子変異が誘発されかつ、05 遺伝子では G-Box が完全に欠失した個体もしくは G-box 周辺部にのみ変異が誘発された両個体を確立した。これらの個体の 8G 遺伝子は G-box の周辺部にのみ変異が認められた。発現解析結果、これらの個体では 5G 遺伝子の発現を増加し、8G 遺伝子の発現が増加もしくは減少を確認した。一方、T1 個体 43-1 の後代では 05 遺伝子に変異はなく 8G 遺伝子について G-Box が完全に欠失した個体もしくは G-box 周辺部にのみ変異が誘発された両個体を確立した。43-1 の後代の 1 つである G-Box が完全に欠失した個体では莢と種子の数が増加し、平均種子重量は減少したものの、1 株あたりの種子重量は対照個体に比べ有意に高かった。

形態学的には、43-1 の後代で G-Box が完全に欠失した個体は分枝が長くなるものの、莢数は主茎で有意に増加した。さらに、発芽から R3 生殖期までの生育ステージ

の日数は当該変異体と対照個体との間に差は見られなかったが、発育初期段階の胚軸は変異体が対照個体に比べ短い特徴を示した。また、当該変異体の RNA-seq によるトランスクリプトーム解析の結果、5887 個の発現量の異なる遺伝子が浮き彫りになり、その中で *Branched 1 (GmBRC1)* の発現が減少していた。

GmBIL7 遺伝子のプロモーター領域に存在する G-Box モチーフを編集する事で当該遺伝子の発現が変化したものの、G-Box の欠失とは関係なく変化する事を確認した。さらに、変異体によっては種子重が減少するものの、種子数が増加する事で 1 株当たり種子重が増加したものが存在した。

1 株当たり種子重が増加した変異体ではより多くの分枝が認められた。RNA-Seq の結果から分枝と花成を抑制すると知られている *GmBRC1* の発現が減少した。この事から *GmBIL7* 遺伝子発現の低下と *GmBRC1* 遺伝子の発現の低下に関する要因を明らかにすることはできなかったものの、*GmBIL7* 遺伝子の発現を改変することで収量増加が示唆された。このことから、プロモーターゲノム編集を介したダイズの収量増産のための潜在的な可能性を示すことができた。

General Discussion

GmPPD 遺伝子の変異個体の内、インフレーション変異を有し PPD の機能が部分的に残存するときのみ種子重量の増加が観察されるとともに葉面積の増加も認められた。これは *GmPPD1* 遺伝子が種子重量の制御に関与していることが示唆し、当該変異体における種子重量の増加は細胞数の増加によるものである可能性が高い事を示唆した。*ppd-KO* 系統における *GmGIF1* ファミリー遺伝子の発現レベルは増加した。組織の巨大化を示す *Medicago truncatula* の *big seeds1* 変異体では *GIF1* オルソログの発現レベルが上昇していたことから、ダイズの組織巨大化は *GIF1* の発現量増加による細胞分裂の増加による可能性を示唆された。一方、RNA-Seq および qRT-PCR 解析の結果、*ppd-KO* 変異体の 1cm のさやで *GmSPIL5* 遺伝子の発現レベルが極端に低下していた。このことは、*ppd-KO* 変異体の莢における *GmSPIL5* の発現低下により異方性細胞増殖が正常に行われなくなった結果、莢が異常に形成された可能性を示唆している。

BIL7 はブラシノステロイドシグナル伝達経路の転写因子の一つである *BZR1* の核内転位を誘導することが知られている。本研究で作出した変異体における葉の qRT-PCR の結果、変異体ではシスエレメントモチーフである G-Box の欠失の有無にかかわらず 5G および 8G 遺伝子の発現レベルが変化していた。また、組織形態学的特徴から、8G 遺伝子について G-Box が完全に欠失した個体の主茎に着生した莢の数が増加していることが明らかになった。また、RNA-Seq の結果 *GmBRC1* の発現も減少し

ていた。当該個体においては分枝の伸長も併せて観察された。したがって、当該個体では、*GmBRC1* の発現が低下することにより分枝の伸長が起こる可能性が示唆された。

本研究ではダイズの収量構成要素を遺伝子の機能喪失、あるいはプロモーター配列の人為的変異による遺伝子発現を制御することによって変化させることに成功した。特にプロモーターゲノム編集は標的遺伝子の発現を制御することで収量向上に劇的な効果をもたらす可能性がある。極めて精度の高い遺伝子発現予測技術の進歩とプロモーターゲノム編集技術を用いる事で遺伝子発現の精密な制御が可能になる事でダイズだけでなく、様々な植物の収量向上につながる可能性が考えられた。