

発出日時：3月14日（火）13:00  
報道解禁日時：別紙2-1～2-4に記載の通り



## 日本育種学会第143回講演会における注目課題

育種学は作物の品種改良の技術基盤とその理論を追究する学問領域です。一般社団法人日本育種学会（会員約1,600名）は、育種に関する研究・技術の進歩、研究者の交流と協力、育種の知識の普及をはかることを目的として活動しています。

本会は、3月17・18日（金・土）に静岡大学にて第143回講演会（2023年春季大会、別紙1）を行います。本プレスリリースは、この講演会の合計192題の講演課題の中から、特に新規性・重要性が高いと考えられるものとして選定された7課題・4トピックの内容についてご説明するためのものです。3月3日（金）に類似のプレスリリースを行わせていただきましたが、これに3課題・2トピックが追加されております。

報道機関の皆様には、上述の講演会の全講演の要旨集を無料で配布させていただき、講演会に無料でご参加いただくことが可能です。ご希望の場合には下記の問い合わせ先にご連絡ください。何卒よろしくお願いたします。

### 注目課題・トピック

- (1) メロンの高効率なゲノム編集技術の開発に成功 ～ゲノム編集を使ってメロンの実用形質の改変が可能に～（課題126、別紙2-1）
- (2) 三大穀物間における遺伝資源の相互利用が可能に：イネコムギおよびトウモロコシコムギの創生（課題403・404、別紙2-2）
- (3) DNAの導入を伴うことなく低アレルゲンダイズゲノム編集個体を作成（課題117・119、別紙2-3）
- (4) ワサビの辛味 そのルーツに迫る ～気候変動がもたらした多様性と危機～（課題319・320、別紙2-4）

### 問い合わせ先

津釜 大侑（東京大学 大学院農学生命科学研究科附属アジア生物資源環境研究センター）

電話：070-1070-1431

E-mail: [tsugama@g.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:tsugama@g.ecc.u-tokyo.ac.jp)

一般社団法人日本育種学会 第143回講演会プログラム  
2023年春季 静岡大学

		受付8:30開始(共通教育A棟2階)					
		第1会場	第2会場	第3会場	第4会場	第5会場	第6会場
		共通教育棟B501	共通教育棟B401	共通教育棟B301	共通教育棟A201	共通教育棟A301	共通教育棟A302
3月17日 (金)	午前	遺伝子機能 101-112 9:00-12:00	ゲノム解析・ ゲノム育種 201-212 9:00-12:00	抵抗性・耐性 301-304 9:00-10:00  ゲノム解析・ ゲノム育種 305-311 10:00-11:45  オミクス・データベース 312 11:45-12:00	増殖・生殖 401-410 9:00-12:00	抵抗性・耐性 501-510 9:00-12:00	収量・品質 601-608 9:00-11:00  発生・生理 609-612 11:00-12:00
	午後	○株式会社ジーンベイ ランチョンセミナー 12:30-13:20 (会場:共通教育棟B301・B401) 「アワの作物進化研究へのNGSの応用」 講演演者: 福永健二(県立広島大学 生物資源科学部) 講演演者: 上村泰央(株式会社ジーンベイ)					
		総会 13:45-14:45 (会場:人文社会科学部大講義室)		学会賞受賞講演 14:55-17:55 (会場:人文社会科学部大講義室)			
		受賞者紹介 14:55-15:05					
		学会賞 15:05-15:40	◎イネ高緯度地域適応戦略に関する遺伝・育種学的研究 藤野 賢治(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構)				
			15:45-16:20 ◎重イオンビームによる育種技術の開発 理研仁科センター重イオンビーム育種技術開発グループ(代表:阿部 知子)				
		奨励賞 16:30-16:55	◎イネの形態形成を制御する発生遺伝学的研究 田中 若奈(広島大学大学院統合生命科学研究科)				
			17:00-17:25 ◎データ科学と統計・分子遺伝学的手法による果樹の効率的な育種基盤の開発 南川 舞(千葉大学国際高等研究基幹)				
			17:30-17:55 ◎植物の機械的ストレス応答の基礎研究から作物研究への展開 津釜 大侑(東京大学大学院農学生命科学研究科附属アジア生物資源環境研究センター)				
3月18日 (土)	午前	遺伝子機能 113-124 9:00-12:00	ゲノム解析・ ゲノム育種 213-224 9:00-12:00	ゲノム解析・ゲノム育種 313-314 9:00-9:30  品種育成・ 遺伝資源 315-324 9:30-12:00	増殖・生殖 413-416 9:00-10:00  育種法・ 育種技術 417-424 10:00-12:00	抵抗性・耐性 513-524 9:00-12:00	発生・生理 613-620 9:00-11:00  収量・品質 621-624 11:00-12:00
	午後	○トミーデジタルバイオロジー株式会社 12:30-13:20 (会場:共通教育棟B301・B401) 「みんなでカタバミプロジェクト with かずさ ～あなたの街では何色ですか～」 講演演者: 白澤 健太(かずさDNA研究所 先端研究開発部 植物ゲノム・遺伝学研究室) 「PacBio HiFi × Dovetail Omni-Cによるゲノムアセンブリ」 講演演者: 越後 輝敦(トミーデジタルバイオロジー株式会社 アプリケーションスペシャリスト アライアンスプロダクト)					
		第1会場	第2会場	第3会場	第4会場	第5会場	第6会場
		共通教育棟B501	共通教育棟B401	共通教育棟B301	共通教育棟A201	共通教育棟A301	共通教育棟A302
		遺伝子機能 125-127 13:45-14:30	ゲノム解析・ ゲノム育種 225-232 13:45-15:45	品種育成・ 遺伝資源 325-332 13:45-15:45	育種法・ 育種技術 425-432 13:45-15:45	抵抗性・耐性 525-532 13:45-15:45	発生・生理 625-632 13:45-15:45
		育種法・育種技術 128 14:30-14:45					
		オミクス・データベース 129-131 14:45-15:30					
		ゲノム解析・ゲノム育種 132 15:30-15:45					

## メロンの高効率なゲノム編集技術の開発に成功

～ゲノム編集を使ってメロンの実用形質の改変が可能に～

- ゲノム編集は、作物の有用形質を迅速かつピンポイントに改変できるため、新たな育種技術として注目され、世界中で精力的に研究が行われています。
- メロンについては、従来の組織培養を用いたゲノム編集の効率が極めて低いため、汎用的なゲノム編集技術の開発には至っていません。
- 農研機構とカネカ（株）が開発した、組織培養不要のゲノム編集技術（iPB 法）をメロンに適用することにより、高効率なゲノム編集技術の開発に成功しました。iPB 法を用いて作出したエチレン<sup>(注1)</sup>合成関連遺伝子のゲノム編集システムでは、果実から放出されるエチレン量が著しく減少しており、日持ち性の向上が確認されました（図）。
- 本研究の成果から、麦類で実績のある iPB 法がメロンにも適用可能であることが明らかとなりました。今後、本技術を用いたメロンの健康機能性や病害抵抗性の改良が期待されます。

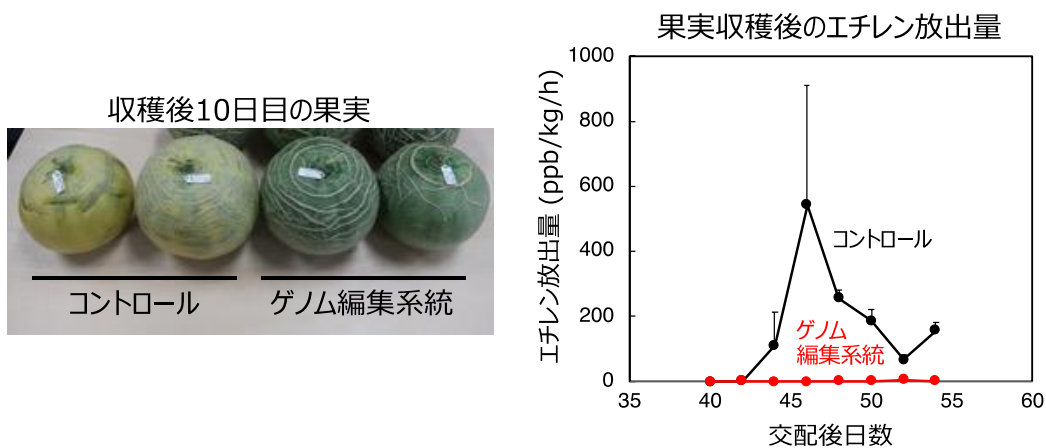


図 ゲノム編集システムの果実日持ち性の評価

<お問い合わせ>

農研機構生物機能利用研究部門 研究推進部研究推進室

電話：029-838-6005、 E-mail: nias-koho@ml.affrc.go.jp

## <演題情報>

演題名：*in planta* Particle Bombardment (iPB) 法を用いた高効率メロンゲノム編集系の開発と日持ち性を高めた実用システムの創出

発表者：佐々木健太郎<sup>1</sup>，耳田直純<sup>2</sup>，野中聡子<sup>3</sup>，江面浩<sup>3</sup>，今井亮三<sup>1,3</sup>（1. 農研機構生物研，2. サナテックシード（株），3. 筑波大生命環境系）

### 1. 研究背景

CRISPR/Cas9<sup>(注2)</sup>などを用いたゲノム編集は様々な作物に適用され、商業利用に向けた作物開発は世界中で進められています。しかしメロンについては、従来法ではゲノム編集の効率が極めて低く、汎用的なゲノム編集技術の開発には至っていません。我々は、植物体の茎頂生殖系列細胞<sup>(注3)</sup>にゲノム編集酵素を直接導入する手法、*in planta* Particle Bombardment (iPB) 法を開発し、ゲノム編集が困難な麦類実用品種のゲノム編集に成功しています。そこで本研究では、iPB 法をメロンに適用させることにより、メロンの高効率なゲノム編集技術の開発と販売者ニーズの高い高日持ち性メロンの作出を試みました。

### 2. 研究成果

高級マスクメロンの標準品種「アールスフェボリット春系3号」を材料としました。ゲノム編集のターゲット遺伝子は、変異によるエチレンの減少により果実の日持ち性向上が期待されるエチレン合成関連遺伝子を選択しました。iPB 法によるゲノム編集を実施するため、吸水種子から片方の子葉を取り除いて茎頂組織を露出させ、CRISPR/Cas9 リボヌクレオタンパク質<sup>(注4)</sup>を、iPB 法を用いて茎頂組織に導入しました。iPB 法導入当代 (E<sub>0</sub> 世代) 79 個体の遺伝子解析から、標的遺伝子に変異が検出される4 個体を選抜しました。iPB 法では E<sub>0</sub> 世代はキメラ<sup>(注5)</sup>であるため、次世代に変異が遺伝することで変異が固定されます。そこで、選抜したゲノム編集 E<sub>0</sub> 候補個体について変異の遺伝を調査した結果、1 個体で変異の遺伝 (1 塩基挿入) が確認されました。次に、得られたゲノム編集系統を生育させ、収穫後の果実のエチレン放出量を測定した結果、エチレン量の著しい減少が確認されました。さらに、果実の日持ち性の向上も観察されました。以上の結果より、メロンに iPB 法を適用することにより、高効率でゲノム編集個体が取得できること、並びに日持ち性のような実用形質の改変が可能であることが実証されました。

### 3. 研究の波及効果

- メロンの健康機能性や病害抵抗性等の有用形質の迅速な改良が可能となります。
- 本研究で開発したメロンのゲノム編集技術は、メロンと同じウリ科作物であるキュウリ、スイカ、カボチャ等のゲノム編集に利用できる可能性があります。

#### 4. 研究支援

本研究は、戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）第2期の助成を受けて行われました。

#### 5. 参考資料

なし

#### 6. 用語解説

(注1) 植物ホルモンの一種で果実の成熟を促進させる効果をもつ。

(注2) ゲノム配列上の指定された配列を切断し、ゲノム編集を行うツール。発明者はノーベル賞を受賞。

(注3) 茎の先端（茎頂）に存在する多分化能を持つ細胞。乾燥種子にも含まれる。

(注4) タンパク質と RNA からなる複合体。

(注5) 個体の中に異なる遺伝情報を持つ細胞が混在している状態。iPB 法の導入当代ではゲノム編集された細胞とされていない細胞が同一個体に存在する。

## 1. 話題

三大穀物間における遺伝資源の相互利用が可能に：イネコムギおよびトウモロコシコムギの創生

## 2. 講演タイトル

403 顕微授精法で作成したイネコムギ (Oryzawheat) のゲノム組成

404 顕微授精法を用いたトウモロコシコムギ (Zeawheat) およびパールミレットコムギ (Cenchruswheat) 交雑植物の創生

## 3. 発表者

403 マリエンティ テティ<sup>1</sup>, 越水 静<sup>2</sup>, 石井 孝佳<sup>3</sup>, 矢野 健太郎<sup>4</sup>, 岡本 龍史<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>都立大・理学研究科, <sup>2</sup>遺伝研・情報研究系, <sup>3</sup>鳥取大・乾燥地研究センター, <sup>4</sup>明治大・農・生命科学)

404 恩田 伸乃佳<sup>1</sup>, テティ マリエンティ<sup>1</sup>, 石井 孝佳<sup>2</sup>, 岡本 龍史<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>都立大・理・生命科学, <sup>2</sup>鳥取大学・乾燥地研究センター)

## 4. 発表概要

三大穀物であるコムギ、イネ、トウモロコシは世界の穀物生産の9割以上を占めていますが、その主な理由として、これはこれら作物の農業上の遺伝的特性が他の作物（植物）に比べて特に秀でていることが挙げられます。さらには、農業形質に加えて、トウモロコシは高温・乾燥耐性、コムギは低温耐性、イネは高温・高湿耐性などがあり、環境に対する耐性能も大きく異なります。これらのことから、三大穀物の遺伝資源を相互活用した新作物を作出できれば世界の食糧問題に大きく貢献できると考えられます。しかし、イネ、コムギ、トウモロコシはイネ科作物であるものの、異なる亜科（イネ：エールハルタ亜科、コムギ：イチゴツナギ亜科、トウモロコシ：

キビ亜科）に属することから一般的に行われている交配による遺伝資源の導入はこれまで不可能でした。そのような中、我々の研究グループは顕微授精法を用いることで、イネとコムギの遺伝資源を合わせ持つ交雑植物（イネコムギ）の作出に成功し、新たな穀物の創生への技術基盤を確立しつつあります（図1）。本講演会では、このイネコムギ

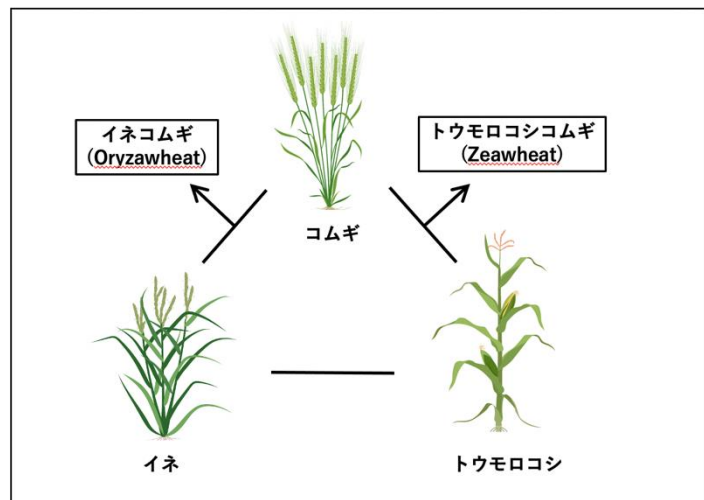


図1. 三大作物間の交雑植物：イネコムギとトウモロコシコムギ

の作出法およびゲノム組成に加えて、トウモロコシとコムギの交雑植物（トウモロコシコムギ）などの作出に関して報告する。

## 5. 発表内容

### 5.1. イネコムギの作出

イネ卵細胞 (Rice egg, Re) とコムギ精細胞 (Wheat sperm, Ws) を融合させて ReWs 交雑受精卵を作出し培養すると、その交雑受精卵は分裂・初期発生を進めるが、球状様胚のステージで発生が停止してしまいます (図 2 A)。この ReWs 初期胚細胞中におけるコムギおよびイネゲノムの存在状態を FISH 解析により調べたところ、雑種胚発生の極初期の細胞中ではイネ染色体のほとんどが脱落し、コムギの染色体は安定的に維持されていることが示されました。このことから、ReWs 初期胚の細胞はコムギの核ゲノムとイネの細胞質ゲノムからなる「異種の核-細胞質の組み合わせ」を保持していることが示唆され (図 2 A)、ReWs 胚の交雑 (発生) 不全は核-細胞質相互作用機構における異種間不全に起因すると考えられました。このことから、ReWs 受精卵にコムギ卵細胞 (We) をさらに融合させてコムギ細胞質を ReWs 受精卵に付与することで核-細胞質相互作用機構の異種間不全を回避できると考え、ReWsWe 受精卵を作出し、その交雑受精卵を培養したところ、胚および植物体へと発生・再分化しました (図 2 B)。また、この再分化植物体は基本的にコムギの形態を示し、稔実能も有しており、核ゲノム量はコムギと同様でした。これらの結果は、ReWsWe 受精卵由来の植物体のゲノム組成は、核ゲノムが「コムギ」で細胞質ゲノムが「イネ+コムギ」となっていることを強く示唆します (図 2 B)。

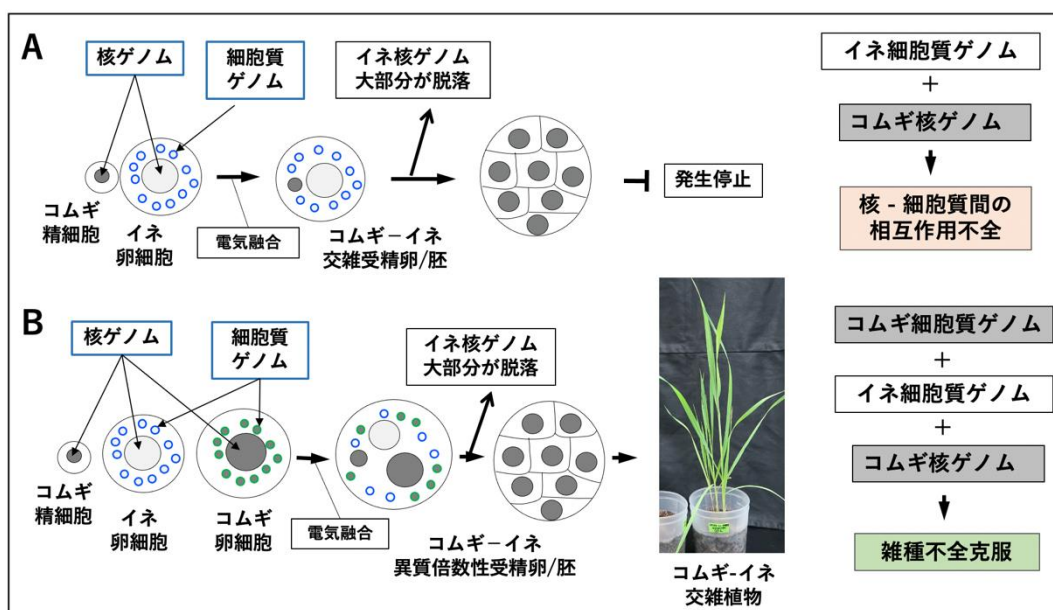


図 2. コムギ-イネ間における発生不全の克服

コムギ核-イネ細胞質の相互作用不全の回避、およびイネ細胞質のコムギへの導入

## 5.2. イネコムギのゲノム組成

5.1 で作出したコムギ-イネ交雑植物（7 系統）から調製したゲノム DNA のショートリード解析を行ったところ、解析した 7 系統のイネコムギのうちの 6 系統において、コムギの核・細胞質ゲノムに加えて、イネミトコンドリアゲノムが保持されていることが示唆されました。イネミトコンドリアの残存率は 11-47% でした。さらにロングリード解析により、それらイネミトコンドリア DNA に由来する DNA 領域はコムギミトコンドリアゲノム内に挿入されていることが示されました。また、FISH 解析によってもイネコムギのミトコンドリアが雑種ミトコンドリアであることが確認されました。

これらの結果から、今回作出した交雑植物はコムギにイネ細胞質の遺伝資源が付加された新たな植物、イネコムギ(Oryzawheat)、であることが示されました。

## 5.3. トウモロコシコムギの作出

トウモロコシ花粉のコムギ雌蕊への人工授粉によって生じたトウモロコシ-コムギ交雑受精卵の発生過程では、トウモロコシゲノムが脱落して残存した雌親由来のコムギゲノムのみをもつ初期胚が発生し半数体植物となります。このコムギゲノムが残存し相手側（トウモロコシ）ゲノムが脱落するという現象は、イネコムギ受精卵の発生過程で生じる「コムギ+イネ」核からのイネゲノム脱落と共通しています。このことから、トウモロコシ卵細胞、コムギ精細胞、およびコムギ卵細胞の 3 種の配偶子を融合することで、核ゲノムとして「コムギ」ゲノムを、細胞質ゲノムとして「トウモロコシ+コムギ」ゲノムをもつトウモロコシ-コムギ交雑植物が作出できるのではと考え研究を進めたところ、トウモロコシ-コムギ受精卵は分裂・発生を進め、植物体を得ることができました（図 3）。この交雑植物も基本的にコムギの形態を示し、稔実能も有しており、核ゲノム量はコムギと同様であったことから、当該植物はトウモロコシとコムギの細胞質ゲノムを合わせ持つトウモロコシコムギ (Zeawheat) であることが強く示唆されました。

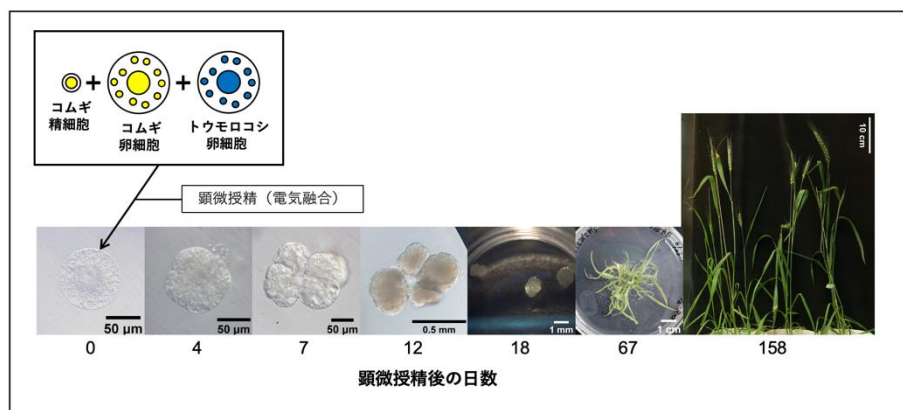


図 3. トウモロコシコムギの作出

コムギ精細胞、コムギ卵細胞、トウモロコシ卵細胞を融合させたのち、作出した交雑受精卵を培養することで胚および交雑植物体（トウモロコシコムギ）へと発生・再分化する。



#### 5.4. 顕微授精法により作出されたイネコムギ・トウモロコシコムギなどの交雑作物に関する今後の研究展開

- ・植物では、細胞質オルガネラであるプラスチドやミトコンドリアが環境変化に対するセンサーとして働いている可能性が強く示唆されており、乾燥、低温、病原菌などの非生物学的および生物学的ストレスに対する適応・耐性能はプラスチドやミトコンドリアからなる細胞質の機能に依存しています。このことから、イネの細胞質ゲノムを有するイネコムギは、コムギが有していない新奇形質を獲得している可能性が高いと考え、現在、鳥取大学乾燥地研究センターにおいてイネコムギの形質評価を進めています。これまでに、出穂日に系統間差異が確認され、また、葉長、葉幅、茎直径がコムギより大きくなる系統も確認されています。
- ・顕微授精法で作出したイネコムギおよびトウモロコシコムギはイネ科内における雑種であることから遺伝子組換え体には相当せず、また、既存の遺伝子組換えの国際法においては国内外の通常圃場での栽培が可能です。このことから、これら新作物はすみやかに国内外の一般圃場で展開することが可能であり、短期間で農業生産に大きなインパクトを与える事が予想されます。
- ・作物として重要な植物の多くはイネ科に属しています。また、イネ科植物は他科の植物に比べて子房が大きいことから卵細胞が単離しやすいという特徴があります。実際、コムギ、イネ、トウモロコシ以外にも、オオムギ、パールミレット、サトウキビ、エリアンサスなど様々なイネ科植物から卵細胞の単離が可能です(図5)。このことは、多様なイネ科作物の遺伝資源を筆者らが開発した顕微授精法を用いることによって、相互利用できる可能性を示しています。今後、多様なイネ科作物の配偶子を組み合わせる事により、様々な交雑受精卵の作出・解析を進めてゆく予定です。顕微授精による作物の改良方法を確立し、人類が直面している食料問題などに貢献したいと考えています。

#### 6. 発表雑誌

イネコムギの作出：Maryenti et al., (2021) *New Phytologist* 232: 2369-2383.

イネコムギのゲノム組成：投稿準備中

トウモロコシコムギの作出：投稿準備中

#### 7. 注意事項

本研究は、科研費(19H04868, 19K15817, 20K21317, 22H02315, 22K05572)、JST 未来社会創造事業(21472251)、JST 創発的研究支援事業(JPMJFR 2001)、ムーンショット型研究開発事業(地球環境再生に向けた持続可能な資源循環を実現/遺伝子最適化・超遠縁ハイブリッド・微生物共生の統合で生み出す次世代CO<sub>2</sub>資源化植物の開発)、鳥取大学乾燥地研究センター共同研究(31A2002, 04B2020)による助成を一部受けたものである。

## 8. 問い合わせ先

〒192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1

東京都立大学大学院・理学研究科・生命科学専攻

植物発生生理学研究室

岡本龍史

E-mail: [okamoto-takashi@tmu.ac.jp](mailto:okamoto-takashi@tmu.ac.jp)

Tel: 042-677-2566

## 9. 用語解説

### [1] 顕微授精 (IVF) 法

植物の花器官から卵細胞と精細胞をそれぞれ単離し、それら配偶子を電氣的に融合させて受精卵を作出する手法。In vitro fertilization (IVF) 法ともいう。作出した受精卵を培養することで、植物体にまで発生・再分化させることができる。

### [2] 三大穀物

コムギ、イネおよびトウモロコシの3種のイネ科作物を指す。世界の穀物生産の94%をこれら3種の作物が占めている (2018年 FAO 報告)。

### [3] 交雑不全

種が異なると交配を行っても受精が生じない、あるいは、交雑胚が正常に発生しないことにより次世代の個体が得られないこと。特に亜科間および属間雑種などの遠縁の種間の交配 (交雑) においては、ほとんど場合で交雑不全が生じる。

### [4] 染色体脱落

同種間、異種間交雑した雑種細胞内部から特定の染色体が脱落していく現象。これまでに動植物を含む様々な生物種で報告されている。

### [5] FISH 法

Fluorescence in situ hybridization 法の略称。蛍光物質をつけたプローブ (標的とするゲノム配列と相補的な塩基配列を有するDNA配列) を標的細胞中の染色体と結合させ、蛍光顕微鏡下で目的の染色体部位を可視化する手法。

1. 話題

DNA の導入を伴うことなく低アレルゲンダイズゲノム編集個体を作成

2. 講演タイトル

演題番号 117 「iPB-RNP 法によるダイズのゲノム編集」

演題番号 119 「iPB-RNP 法を用いた低アレルゲンダイズの作出」

3. 発表者

演題番号 117

桑原 慎子<sup>1</sup>, 三木 隆二<sup>2</sup>, 丸山 伸之<sup>3</sup>, 濱田 晴康<sup>2</sup>, 柳楽 洋三<sup>2</sup>, 今井 亮三<sup>4</sup>, 田岡 直明<sup>2</sup>, 山田 哲也<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>北大・院農, <sup>2</sup>(株)カネカ, <sup>3</sup>京大・院農, <sup>4</sup>農研機構・生物機能利用)

演題番号 119

茶谷 信哉<sup>1</sup>, 桑原 慎子<sup>2</sup>, 檜原 美樹<sup>2</sup>, 丸山 伸之<sup>3</sup>, 山田 哲也<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>北大・農, <sup>2</sup>北大・院農, <sup>3</sup>京大・院農)

4. 発表概要

ダイズは日本をはじめとする東アジアの食文化を支える主要な作物であり、その用途は豆腐・豆乳・納豆・味噌・醤油・エダマメやミートアナログなど多岐にわたります。ダイズは種子中に乾燥重量当たり約 40%ものタンパク質を含んでおり、この豊富なタンパク質が様々な用途を生み出す理由の 1つと考えています。一方、これらのタンパク質の中にはアレルゲン<sup>(注1)</sup>となるものも少なくありません。ダイズのアレルギーは比較的軽い症状が多いと言われていますが、幼児期の発症やシラカバなどカバノキ科の花粉症との交差反応による併発時には重篤な症状が起こる可能性もあります。納豆や味噌では発酵過程においてダイズアレルゲンの大部分が分解されると考えられていますが、豆腐・豆乳・エダマメのように発酵過程を経ない食品においてもアレルゲンを低減することが望まれています。これまで品種改良において、ダイズ遺伝資源の中から特定のアレルゲンが少ないもしくは、欠失しているものを利用し交雑することで低アレルゲン性を集積した実績例があります。しかしながら、常に新しい品種の育成が行われる中、より効率的にアレルゲンを低減できる遺伝的改良方法の開発が求められています。また、アレルゲンによっては現存する遺伝資源で十分対応できないものも存在します。

私たちはこれまでゲノム編集技術<sup>(注2)</sup>の 1つである CRISPR/Cas9<sup>(注3)</sup>のシステムを利用して、国内のダイズ品種においてアレルゲン遺伝子に変異誘発することで対象とするアレルゲンタンパク質の低減を試みてきました。その結果、いくつかのアレルゲン

についてゲノム編集を通して低減することに成功しました。しかしながら、ダイズをはじめとする多くの作物におけるゲノム編集研究では、先に述べた CRISPR/Cas9 が細胞の中で安定的に働くよう予め遺伝子組換えを通して、ダイズゲノムに CRISPR/Cas9 に関する遺伝子を導入する必要があります。そのため、ゲノム編集個体の実用化を図るためにはゲノム編集個体作出後、CRISPR/Cas9 に関する遺伝子を取り除く必要があります。そこで、我々はアレルゲン遺伝子を対象に gRNA と Cas9 タンパク質からなるリボヌクレオタンパク質(RNP)<sup>(注4)</sup>を直接ダイズの細胞へ導入することで後から遺伝子を取り除く必要のないダイズゲノム編集個体の作出を検討しました。その結果、目的とするアレルゲンタンパク質を欠失したダイズゲノム編集個体の作出に成功しました。

## 5. 発表内容

本研究ではダイズ品種ユキホマレを用いて RNP の導入を試みました。これまでアグロバクテリウム法<sup>(注5)</sup>およびパーティクルボンバードメント法<sup>(注6)</sup>の両遺伝子組換え方法においてゲノム編集個体の作出に成功しているアレルゲン Gly m Bd 30K 遺伝子(以下、30K 遺伝子と記す)を対象に gRNA を合成しました。さらに、この gRNA と Cas9 タンパク質を利用して RNP を調整し、ダイズの生長点(SAM)へパーティクルパーティクルガンにより導入しました。なお、本法はコムギにおいて DNA の導入を伴わないインプラントパーティクルボンバードメント-RNP 法(以下、iPB-RNP 法と記す)として報告されています。ダイズの完熟種子を滅菌水によって膨潤したものを利用し、実体顕微鏡下でメスを用いて胚軸の SAM をむき出しにしました。さらに、RNP を塗布した金粒子をパーティクルガンにより SAM へ導入しました。その後、胚軸から幼植物体を養成し、葉から抽出した DNA を用いて 30K 遺伝子における変異の誘発を確認しました。ゲノム編集当代(以下、E<sub>0</sub> 世代と記す)において変異が確認された個体の中から次世代にあたる E<sub>1</sub> 種子においても変異が確認されたものについて種子を増殖し、アレルゲンタンパク質に対するウエスタンブロット解析<sup>(注7)</sup>を行いました。この結果、ゲノム編集種子においてアレルゲンタンパク質の欠失を確認しました。さらに、ダイズ品種エンレイやフクユタカにおいても E<sub>0</sub> から E<sub>1</sub> 世代に変異を伝達できるゲノム編集個体を得ることに成功しました。これら一連の研究について、図 1 に iPB-RNP の操作手順そして表 1 では iPB-RNP 法と従来のダイズにおけるゲノム編集方法の特徴を示しました。

引き続き、他のアレルゲンについてもゲノム編集個体の作出を試みました。Gly m 4 タンパク質はシラカバ花粉症と交差反応<sup>(注8)</sup>するアレルゲンとして知られています。本研究ではこのタンパク質をコードする Gly m 4 遺伝子(以下、m4 遺伝子と記す)を対象に m4 遺伝子座全体を取り除けるよう二種類の gRNA を設計し、先に述べた iPB-RNP 法を介してゲノム編集個体の作出を行いました。その結果、m4 遺伝子領域を完全に取り除いたゲノム編集個体の作出に成功しました。また、Gly m Bd 30K と同様ウエ

スタンプロット解析により目的タンパク質の欠失も確認することが出来ました。このことから iPB-RNP を介したダイズのゲノム編集において、2 種類の gRNA を用いた同時切断も可能であることを明らかにしました。本研究の成果は、低アレルゲンダイズを作出することで、従来のゲノム編集方法とは大きく異なる特徴を持つ iPB-RNP 法においてダイズのゲノム編集が可能であることを例証しました。

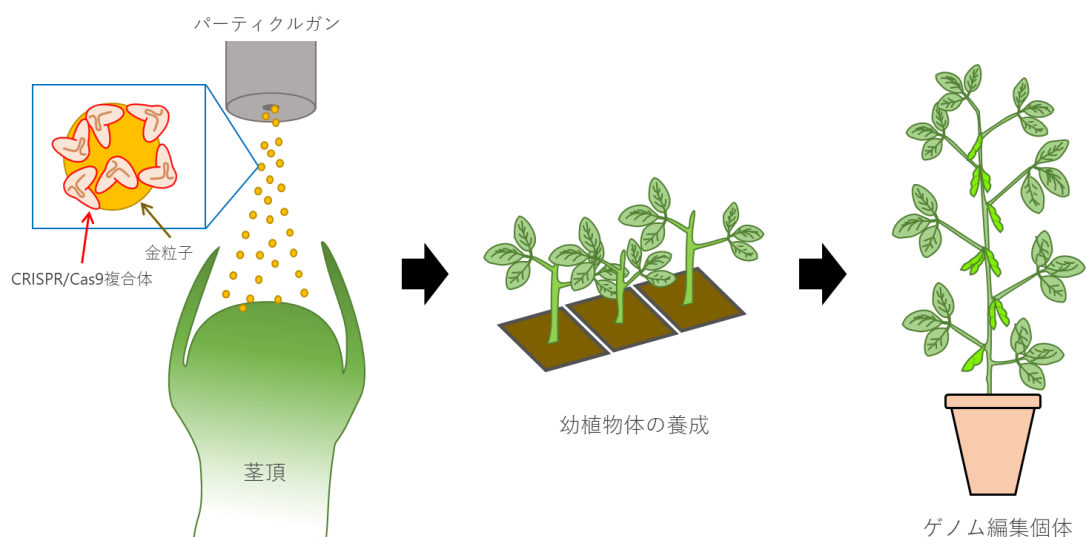


図 1. iPB-RNP 法におけるダイズゲノム編集個体作出の手順

表 1. iPB-RNP 法と従来のダイズゲノム編集方法の比較

	iPB-RNP法	従来のゲノム編集方法
利用する組織	・発芽させた胚軸	・発芽させた子葉節 ・不定胚
DNAの導入	必要なし	必要
組織培養の有無	必要なし	必要
導入遺伝子の除去	必要なし	必要
ゲノム編集効率	約1%程度	2~3%程度
ゲノム編集個体獲得までの期間	3カ月~	6~12カ月
利用できる品種や系統の制限	なし	制限あり

6. 発表雑誌  
未定

## 7. 注意事項

本研究の一部は、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・育種素材の開発によって実施されました。

## 8. 問い合わせ先

山田哲也

北海道大学大学院農学研究院 植物遺伝資源学研究室

Tel: 011-706-4186、 Fax: 011-706-4933、 E-mail: [tetsuyay@agr.hokudai.ac.jp](mailto:tetsuyay@agr.hokudai.ac.jp)

## 9. 用語解説

### (注1) アレルゲン

アレルギーの原因となる抗原性物質(タンパク質)のことを指し、ダイズ種子にはこれまで十数種類程度のアレルゲンが知られています。

### (注2) ゲノム編集技術

形態や色など生物の様々な性質は遺伝子によって決定されています。遺伝子は生物における設計図のようなものであると言えます。ゲノム編集技術とはこのゲノム内に存在する任意の遺伝子を書き換えることで生物の性質に新たな組み合わせを生み出す技術です。ゲノム編集技術による遺伝子を書き換えには、いくつかの機構が存在しますが最もよく利用されているのは、はさみの役割をするタンパク質を用いて遺伝子の任意の場所を切断する方法です。遺伝子は切断されると設計図としての役割を遂行できなくなるため生物は切断部分を修復しなければなりません。多くは切断部分を直接繋ぎ合わせる方法で修復されますが、この修復機構は繋ぎ合わせの際にエラーが起こり、切断部分の近傍が元の遺伝子とは異なるものになり働きが変化することがあります。ゲノム編集はこのエラーを利用して遺伝子を書き換えを行い生物の性質を変化させることができます。

### (注3) CRISPR/Cas9

現在、各生物において最もよく利用されるゲノム編集方法の一つです。遺伝子を切断するはさみの役割を持つタンパク質と任意の遺伝子配列を認識するパーツの組み合わせから成ります。はさみとして利用するタンパク質は本来、細菌の免疫機構に利用されるタンパク質ですが、ゲノム編集を行う生物で効率よく機能させるために改良したものが用いられます。

### (注4) リボヌクレオタンパク質(RNP)

RNA とタンパク質から成る複合体のことを指し、上述にある CRISPR/Cas9 システムの場合、はさみの役割を持つ Cas9 タンパク質と任意の配列を認識する gRNA から成る複合体のことを意味します。

(注 5) アグロバクテリウム法

植物に感染する土壌微生物のアグロバクテリウムが元来持つ遺伝子組換え能力を利用した植物における代表的な遺伝子組換え方法の 1 つになります。アグロバクテリウムのもつプラスミド DNA の一部 (T-DNA と呼ばれる領域) が切り離され, 感染した植物ゲノムの中に組み込まれます。この T-DNA 領域に目的の遺伝子を予め挿入しておくことにより植物ゲノムに目的の遺伝子を送り込むことが出来ます。

(注 6) パーティクルボンバードメント法

金の微粒子(0.6~1.6 $\mu\text{m}$ )に目的の遺伝子をコーティングし, 高压ガスの力で植物細胞に打ち込むことにより遺伝子をゲノムに導入する方法です。

(注 7) ウェスタンブロット解析

様々な種類のタンパク質の混合物から特定のタンパク質を検出する方法です。目的のタンパク質だけに特異的に結合する抗体とさらにその抗体に結合する標識された抗体を用いることで混合液中に含まれる微量なタンパク質でも検出することが可能になります。

(注 8) 交差反応

体内にアレルゲン(抗原)が侵入すると免疫反応によって抗体がつくられます。この抗体がつけられる元となった抗原とは別の類似するタンパク質と結合することを交差反応といいます。本研究ではシラカバ花粉に対する抗体がダイズ由来の Gly m 4 タンパク質と結合することを指しています。

## 1. 話題

ワサビの辛味 そのルーツに迫る ～気候変動がもたらした多様性と危機～

発表者：山根 京子（岐阜大学応用生物科学部）

## 2. 講演タイトル

319 野生および栽培ワサビにおける辛味成分アリルイソチオシアネートおよびスルフィニル含有量の多様性

320 日本のワサビ属植物における辛味関連成分グルコシノレートのプロファイリング

## 3. 発表者

◎山根 京子<sup>1</sup>, 加藤 朋恵<sup>2</sup>, 羽賀 夏子<sup>1</sup>, 石田 佳織<sup>2</sup>, 村山 誠治<sup>3</sup>, 小林 恵子<sup>1</sup>, 奥西 勲<sup>2</sup> (1. 岐大・応生, 2. 金印株, 3. 礼文町高山植物培養センター)

◎恒川 麗奈<sup>1</sup>, 羽賀 夏子<sup>1</sup>, 平海 水緒<sup>1</sup>, 森田 真菜<sup>1</sup>, 小林 恵子<sup>1</sup>, 高島 茂雄<sup>2</sup>, 山根 京子<sup>1</sup> (1. 岐大・応生, 2. 東海国立大学機構・名大・岐大・糖鎖生命コア研究所)

## 4. 発表概要

ワサビの鼻にツンとくる独特の辛味や香り、風味はどのようにしてうまれたのでしょうか。今回、辛味の本体である生理活性物質イソチオシアネート（ITC）と前駆体物質グルコシノレート（GSL）の成分分析を行いました。本研究では、①日本のワサビが辛くなった要因を検証するとともに、②GSL成分多様性のルーツを明らかにすることを目的としました。地理的分布を網羅するように供試した豊富な材料を用いて分析したところ、①に関しては、少なくとも栽培ワサビにおいては、ミロシナーゼという酵素の活性が高まることで、辛味が強くなったことが示唆されました。②に関しては、氷河期時代の大陸の近縁野生種の移入と、その後の遺伝子浸透により、日本のワサビ属植物に特徴的なGSLがもたらされた可能性が示されました。以上の結果から、日本列島には、約100万年の気候変動によってもたらされた貴重な遺伝資源が残されていることが明らかとなりました。ところが、気候データを用いたMaxentによる種分布モデルシミュレーションの結果、温暖化対策に対して政策的な緩和策を行わなかった場合、2081~2100年には、ワサビ集団はほぼ壊滅すると予測が得られました。今回、機能性成分としても注目される辛味関連成分に関しては、日本のワサビ属植物は他のアブラナ科植物に比べても多様性に富むことがわかりました。こうして約100万年の進化の末に培われた貴重な植物資源が、たった100年で失われる危機にさらされていることを意味しています。

なお、今回は講演番号318「ワサビゲノム解読の現状」に関しまして、東京工業大学、岐阜大学、国立遺伝学研究所、明治大学による共同研究により、**染色体レベルでワサ**



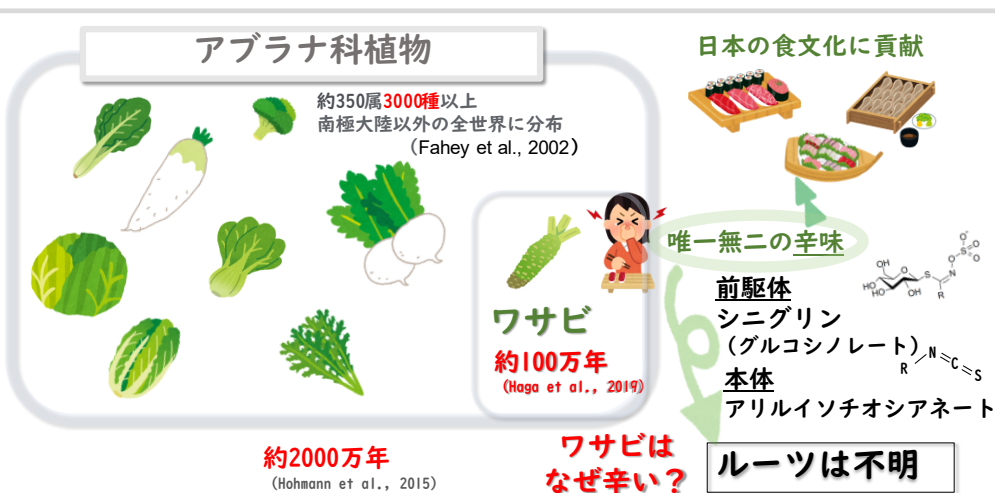
ピゲノムは解読が完了し、現在、国際誌に論文を投稿中であることを報告させていただきます。現在、ゲノムデータを活用し、ワサビの辛味成分の成立機構の解明を試みています。

## 5. 発表内容

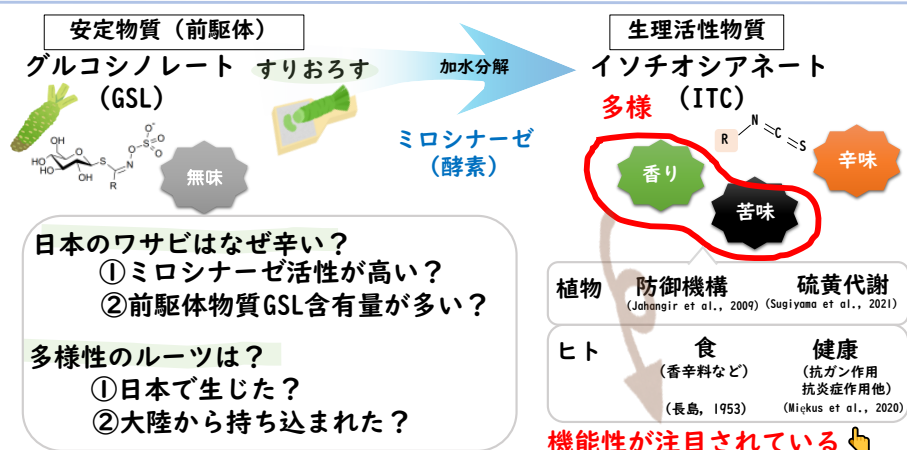
### 【背景】

ワサビの辛味の本体は揮発性物質の「アリルイソチオシアネート（以下AITC）」であり、香りや風味などは、同じITCのなかでも、炭素数や化学的修飾が異なる成分によりうみ出されます。これらの成分は、香辛料としてのワサビを和食の名脇役の地位まで高めただけでなく、抗がん作用や抗炎症作用など、近年は機能性成分として注目されています。一方、植物はこれらの物質を外的防御や硫黄、窒素代謝に利用しており、とくにアブラナ科植物の進化上重要な役割を果たしてきたことが推定されていました。これらの成分の前駆体を総称して、グルコシノレート（GSL，カラシ油配糖体）とよび、アブラナ科植物（約350属3000種以上）では約130種類が報告されています（下図参照）。

### 辛味関連成分グルコシノレートはアブラナ科植物に共通する二次代謝産物



### 辛味成分の生合成はアブラナ科植物で保存されたシステムである



本研究では、日本のワサビはなぜ辛いのか、その要因を調べるとともに、辛味関連成分の多様性のルーツを明らかにすることを目的としました。

【材料および方法】

- ・グルコシノレート分析

**材料** 日本のワサビ属植物3種 合計343系統 地理的分布を網羅

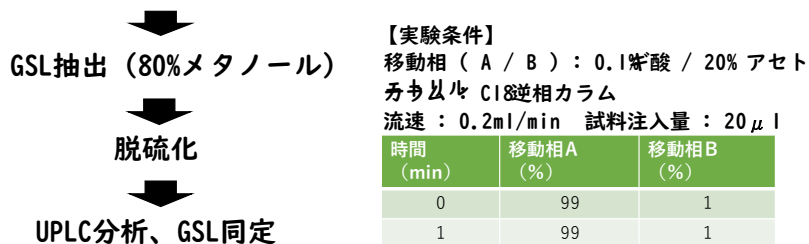
ワサビ (227系統)      ユリワサビ(85)      オオユリワサビ(31)

今回、GSLは全系統の約3分の1 (計140系統 219個体) を分析した

図. 山根により収集された日本全国のワサビ属植物の地理的分布 (2005年～)

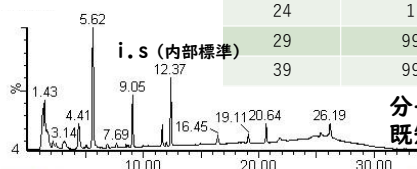
**方法** 超高速液体クロマトグラフィー (UPLC)によるグルコシノレート分析

葉・根茎の凍結乾燥および粉碎



【実験条件】  
移動相 ( A / B ) : 0.1%酸 / 20% アセト  
ナトリウム C18逆相カラム  
流速 : 0.2ml/min 試料注入量 : 20 μl

時間 (min)	移動相A (%)	移動相B (%)
0	99	1
1	99	1
21	1	99
24	1	99
29	99	1
39	99	1



分子イオンの質量数と既知の溶出順序をもとに同定

- ・ Maxentによる種分布モデルシミュレーション

地理的分布の位置情報とGISデータを使用した気候予測モデルに基づく種分布モデルシミュレーションを実施し、2081~2100年における種分布変動に伴うGSL多様性の未来予測

を行った。

### 【結果および考察】

ガスクロマトグラフィーを用いて解析したところ、以下のとおり、栽培化にともなうミロシナーゼ活性の増大により最終産物であるイソチオシアネート含有量が高まったことが示唆されました（下図参照）。

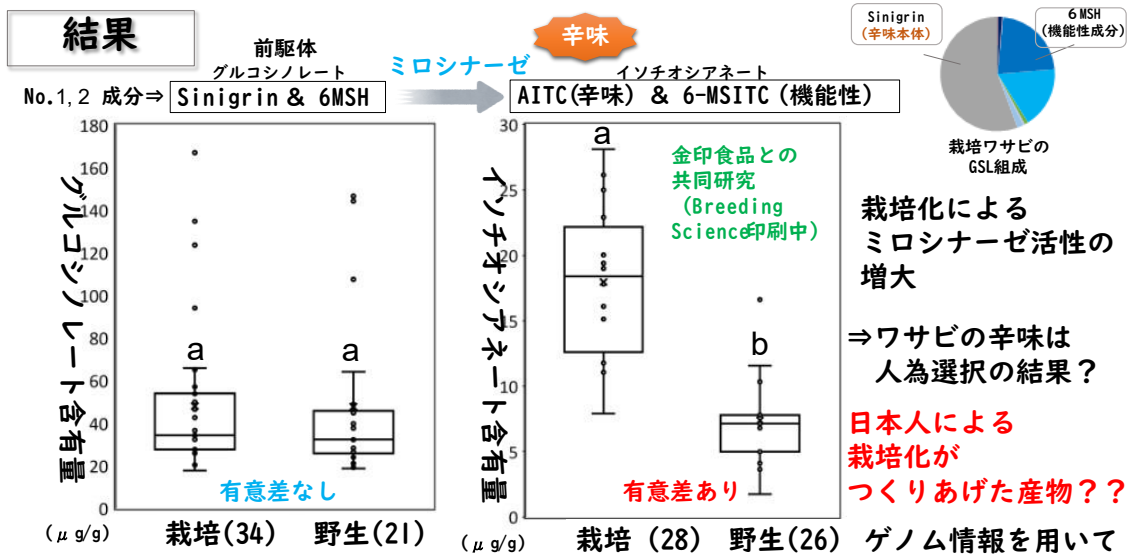
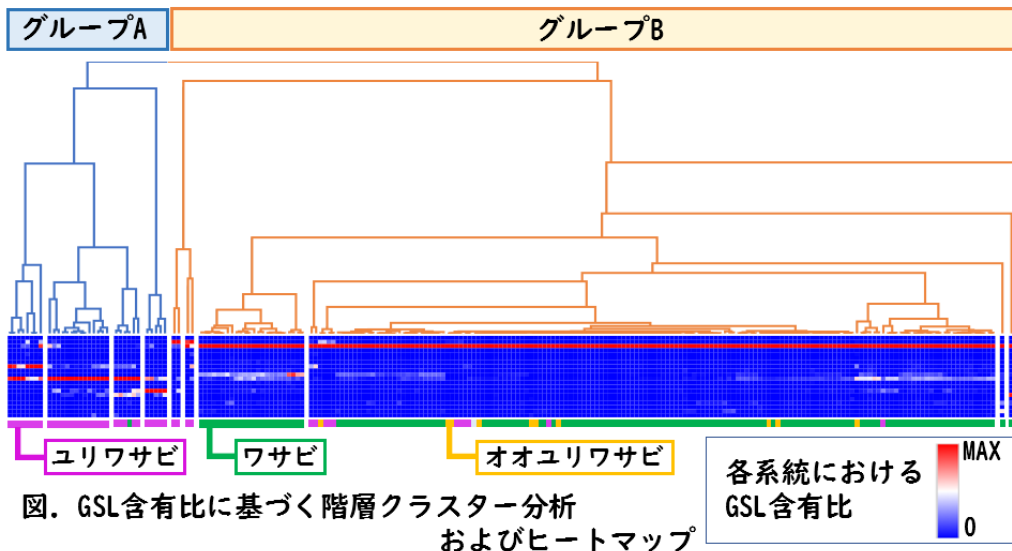


図. 開花期ワサビの根茎に含まれる辛味関連成分含有量比較  
カッコ内は系統数

現在はゲノムデータを用いて遺伝子の解析を試みています。

一方、日本のワサビ属植物では、20種類のGSLが検出され、短鎖から長鎖まで、多様なGLSの存在が明らかになりました。種類による種間の違いはみられませんでした。以下の図のとおり、含有比に基づく階層クラスター分析では、種によって顕著な違いがみられました。GSLのプロファイリングを行ったところ、種間の違いや多様性のうまれた背景において、ごく少数の遺伝子座による制御の存在が示唆されました。



長鎖GSLの高い含有量において、地理的分布の一致が種間でみられた

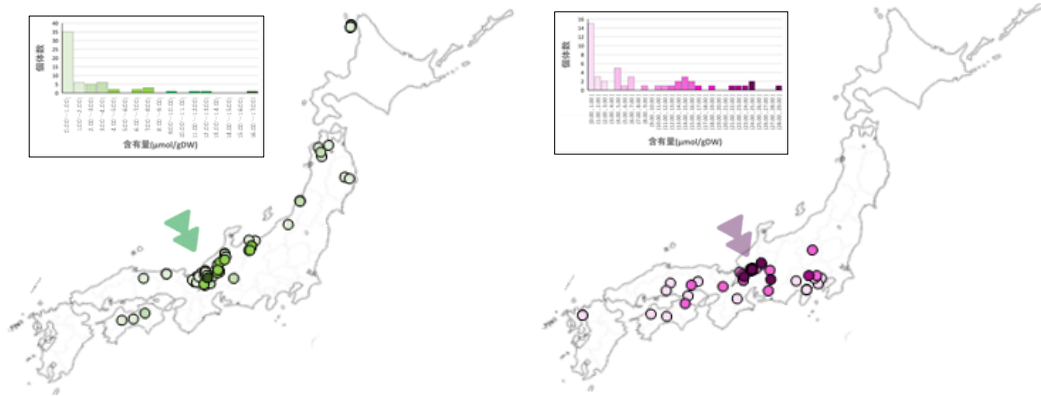
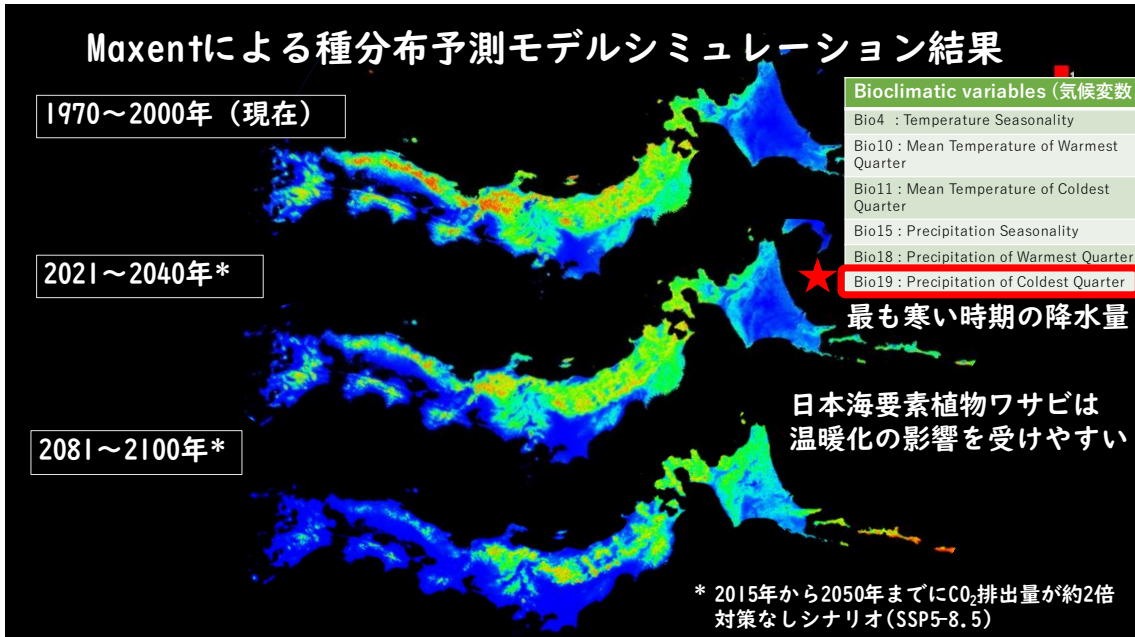


図. 野生ワサビ (左) とユリワサビ (右) における長鎖GSL ( $C \geq 5$ )含有量ヒストグラムと地理的分布

機能性成分として注目されている長鎖GSLに関しては、最も遅い時期に大陸の共通祖先から分岐し、氷河期による陸橋で大陸から移入した集団からの遺伝子浸透によると推定されました。こうして約100万年の間に得られた多様性も、種分布シミュレーションにより危機的な状況にあることがわかりました。



気候データを用いたMaxentによる種分布モデルシミュレーションの結果、温暖化対策に対して政策的な緩和策を行わなかった場合、2081~2100年には、ワサビ集団はほぼ壊滅すると予測されました（上図参照）。今回、機能性成分としても注目される辛味関連成分に関して、日本のワサビ属植物は多様性に富むことがわかりました。今回の結果は、約100万年の進化時間に気候変動によってもたらされた貴重な遺伝資源が、温暖化に対して何の対策も施さなかった場合には、100年という短い時間で喪失の危機あることを示しました。

なお、今回は講演番号318ワサビゲノム解読の現状に関して、東京工業大学、岐阜大学、国立遺伝学研究所、明治大学による共同研究により、**染色体レベルでワサビゲノムは解読が完了し、現在国際誌に論文を投稿中であることを報告させていただきます。** 今後は、ゲノムデータを活用し、ワサビの辛味成分の成立機構の解明を目指します。

## 6. 発表雑誌

No. 318 ワサビのゲノム解読成功：投稿中

No. 319 栽培化による辛味の進化：Breeding Science（印刷中）

No. 320 辛味関連の多様性と気候変動の影響：投稿準備中

## 7. 注意事項

本研究（の一部）は、科学研究費基盤（C）「日本原産種ワサビにおける辛味成分の成立機構の解明」（課題番号「18K05616」）の支援を受けて実施しました。また、ゲノムの解読は、先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム、先進ゲノム支援（第1期）の支援を受けて実施しました。

## 8. 問い合わせ先

〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸1番1

岐阜大学応用生物科学部 生産環境科学課程 応用植物科学コース

遺伝育種学研究室

TEL：（058）293-2846

山根 京子 kyamane@gifu-u.ac.jp