

新育種技術による 低温難糖化性ジャガイモの作出

弘前大学 農学生命科学部 生物資源学科 研究機関研究員

葛西 厚史

1 はじめに

DNA塩基配列は変化しないまま、DNAの性質が長期的あるいは恒久的に変化することで遺伝子の働きが制御される現象を「エピジェネティック」と称する。近年、この現象に関する研究が動植物を問わず精力的に取り組まれた結果、多くの生命現象にエピジェネティックが関与している実態が見えてきた。植物においては、ある遺伝子に関わるエピジェネティック状態が数世代にわたって続いている事例もあり、その状態の安定維持（遺伝）が明らかにされてきた。

著者らが開発した弘前大学の特許「特許6024901号 植物の形質転換個体の取得方法¹⁾」は、接ぎ木を利用して特定DNA配列領域にエピジェネティックな編集を施し、その組織から植物体を獲得することによる新奇の品種改良法である²⁾。ゲノム編集を設計図の“書き換えや書きたし”とするならば、「エピゲノム編集」と称する我々の技術は設計図の“マスキングや読み飛ばし”といったイメージでとらえることができると思われる。本稿ではこの接ぎ木を利用した新育種技術による低温難糖化性ジャガイモの品種改良体作出に向けた取り組みについて紹介する。

2 エピジェネティック状態の変化

エピジェネティック状態の改変、例えば遺伝子プロモーター領域へのDNAメチル化誘導は転写因子などに対する物理的障壁となり、その遺伝子の転写活性の抑制につながる。この分子機構を理解していただくために、RNA依存性DNAメチル化（RdDM；RNA-directed DNA methylation）について説明する。

エピジェネティックな変化の第一段階であるDNAシトシンのメチル化は、植物では全ての配列タイプ（CG, CHG, CHH; H = A, T or C）で起こり、それぞれ特異的なDNAメチル基転移酵素によって実行されている。RdDM現象に直接関わっているのはDRM2（DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE2）であり、さらに非CGメチル化の維持をCMT3（CHROMOMETHYLASE3）と重複して行っている³⁾。DRM2の働く領域を決めているのが24塩基のsiRNA（small interfering RNA）である。24塩基配列に相補的なDNA配列がターゲットとして認識され、その近傍領域のシトシンメチル化が誘導される。ヘテロクロマチン化したりピート領域やトランスポゾン由来からのsiRNAが数多く検出されている。シロイヌナズナではこれらの領域からRNAポリ

メラゼIV (Pol IV) がlong non-coding RNA (lncRNA) を転写しており、相互作用しているRNA依存性RNA ポリメラーゼ (RDR 2) により転写産物は2本鎖RNA (dsRNA) となり、直ちにRNA分解酵素 IIIの一種であるDicer様タンパク質 3 (DCL 3) によって24塩基のsiRNAへと切断される。このプロセスは人工の遺伝子を用いても引き起こすことが可能である。すなわち、標的としたい配列の2本鎖RNAを形成する構造 (もっとも一般的なのは繰り返し逆向き) を転写させることで、目的とする24塩基siRNAが産生できる。

24 塩基siRNAはAGO 4 (Argonaute 4) などと複合体 (RISC ; RNA induced silencing complex) を形成し、siRNA塩基配列がRNAポリメラーゼV (Pol V) 由来lncRNAとの相補性を認識することで足場が構築され、*de novo*メチル基転移酵素 DRM 2やヒストンメチル基転移酵素KYP (KRYPTONITE) などのクロマチンリモデリング因子タンパク質が誘引されて、DNAシトシンのメチル化と同時にヒストンの修飾が起こる (図1)。さらに、このヘテロクロマチン化とDNAメチル化の間には、お互いを増強する自己強化システム

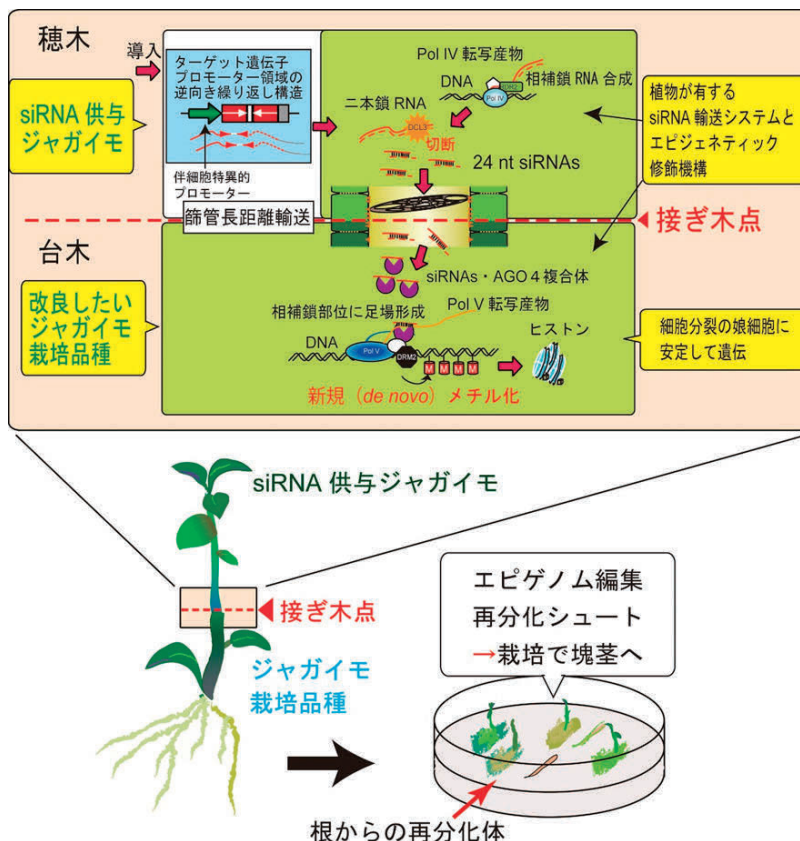


図1 接ぎ木を利用したエピゲノム編集ジャガイモ獲得法モデル図。標的配列の逆向き繰り返し構造を伴細胞特異的に発現するコンストラクトを導入した組換え体を穂木として接ぎ木する。篩管輸送により台木にsiRNAが輸送され、篩管周辺細胞にRNA依存性DNAメチル化 (RdDM) が起こる。この周辺細胞の根鞘細胞 (根の幹細胞) からの側根は*de novo*生成されることから、台木の側根より再分化個体を得ることで、導入遺伝子を持たないエピゲノム編集体が獲得できる。

が存在している。

3 接ぎ木を利用したエピジェネティック状態の改変

高等植物の篩管は根からの養分や葉の光合成産物を輸送するが、特定のタンパク質やRNAも長距離輸送しており、輸送先でそれらを機能させて器官間における調和的生長が実行されている。そこで、任意のsiRNAをよりの確に輸送できるシステムを組み込んだ植物を作出し、この組換え体に接ぎ木を行うことで、その接ぎ木相手に目的のsiRNAを輸送させることが可能となる。すなわち、siRNAの篩管輸送システムを活用して接ぎ木の穂木で人工的に特定のsiRNAを産生させ、その台木にsiRNAを輸送し、輸送先の細胞にてsiRNA配列に相同配列のDNA領域にエピジェネティックな変化を誘導（エピゲノム編集）する。エピジェネティック状態は娘細胞に伝達維持されるため、その細胞から獲得した植物はエピゲノム編集体となる⁴⁾。これを栄養繁殖することで特定遺伝子の働きが抑制された品種を獲得できる（図1）。

この技術の特徴は、既存の栽培品種をRNA輸送システム導入個体に接ぎ木するだけで改良できること、また改良個体には導入DNAが存在しないことから従来の組換え体には該当しなく、花粉飛散による組換え遺伝子の漏出問題をクリアできる。遺伝子破壊系であるゲノム編集技術は遺伝子の働きを1から0にすることが可能であるが、例えば0.5や0.2という抑制レベルの達成は困難である。RdDMではメチル化度に応じて遺伝子発現の抑制程度が異なるこ

とから、理想となる抑制レベルを表す系統を作出することが可能と考えられる⁵⁾。

接ぎ木による接ぎ木相手のエピジェネティック状態の変化はモデル植物のアラビドプシスにおける研究にとどまらず、トマトとナスの接ぎ木でも明らかにされている⁶⁾。さらに、雑種強勢（ヘテロシス）現象にはエピジェネティックが関与している事実が判明しているが、ある特殊な技法で作出したヘテロシスは接ぎ木によっても台木から穂木に伝達されることがトマトやダイズで報告されている⁷⁾。このように、エピジェネティックと接ぎ木を組み合わせた研究結果から接ぎ木雑種の再考も議論されてきた。また、エピジェネティック育種という用語も生まれている。

4 低温難糖化性ジャガイモの作出について

ジャガイモ塊茎を低温にて貯蔵すると還元糖が蓄積し、いわゆる低温糖化と呼ばれる現象がジャガイモ加工産業において問題となっている。すなわち、ポテトチップやフレンチフライの加工過程において、還元糖（主にグルコースとフルクトース）と遊離アミノ酸（例：アスパラギン）とが反応し褐色物質を生成するメイラード反応が起こる。この反応が高かったものは加工品の廃棄に加え、神経毒性や発癌性を持つと疑われるアクリルアミドが生じることから食品安全の観点からも問題視されている。低温糖化における還元糖の蓄積は、いくつかの代謝反応（デンプン合成、分解、解糖、ヘキソジェネシス、ミトコンドリア呼吸）に影響を受ける。スクロースの一部は還元糖合成のために遍在性の酵素インベルター

ゼファミリーにより分断される。インペルターゼは、溶解性・細胞内局在性・最適pH・等電点により3タイプ(細胞壁結合型・中性型・液胞型)に分類される。このうち酸性液胞型インペルターゼ遺伝子(*Vacuolar acid invertase; Vinv*)は液胞に局在し、低温貯蔵中塊茎での発現が還元糖蓄積の律速酵素となっている。この遺伝子のRNA干渉形質転換ジャガイモによる発現抑制やゲノム編集技術(TALENs: Transcription activator-like effector nucleases)による遺伝子破壊の商業品種が開発されており、両者とも低温糖化が抑制できたと報告されている^{8,9)}。

そこで著者らは、ジャガイモ栽培品種「ワセシロ」の*Vinv*の全長塩基配列情報をもと

にして、RdDMの標的領域を決定した(図2 A、B)。siRNAを産生する構築遺伝子を篩管に隣接する伴細胞特異的強力プロモーターで転写させることで、*Vinv*遺伝子の標的領域siRNAドナージャガイモを作出した。この個体を穂木、ジャガイモ栽培品種「ワセシロ」を台木として接ぎ木を行った(図2 C)。接ぎ木によって輸送されるsiRNAとRdDMの働きによって、標的配列である*Vinv*遺伝子5'隣接領域がDNAメチル化修飾を受ける。その結果として*Vinv*遺伝子のプロモーター機能が抑制される。そのような組織から有意にメチル化が上昇した再分化体(*StVinv*エピゲノム編集ジャガイモ)を獲得した(図2 D・E)。

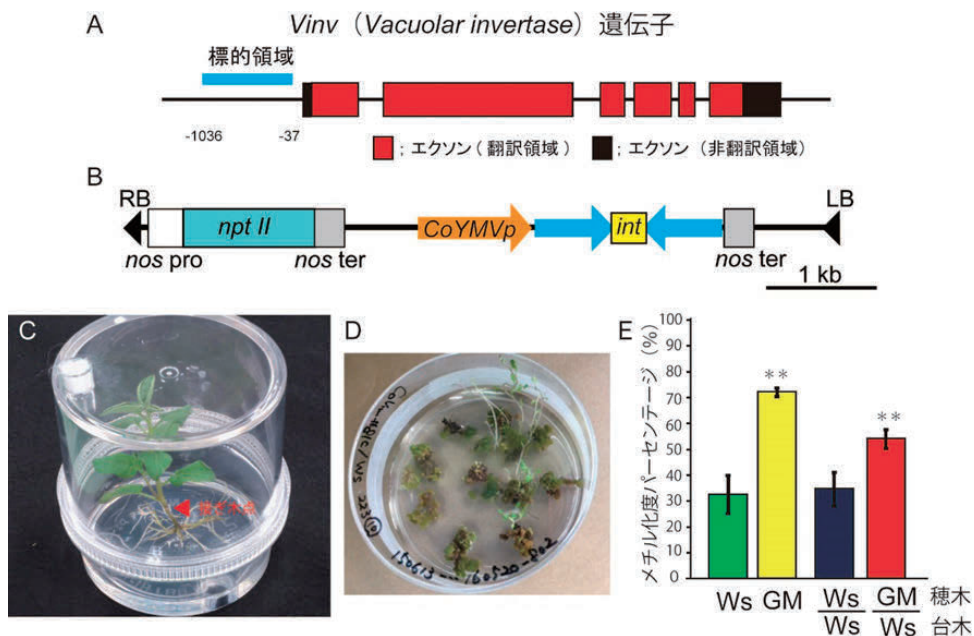


図2 エピゲノム編集ジャガイモ系統の作出。A；ジャガイモの*StVinv*遺伝子のゲノム領域。メチル化標的領域を青棒にて示した。B；siRNA供与体としての形質転換体に導入したコンストラクト。C；ジャガイモ培養体間での接ぎ木写真。D；側根からの再分化写真。E；siRNA供与ジャガイモ／栽培品種「ワセシロ」接ぎ木個体の側根からの再分化個体におけるメチル化度比較。Ws：「ワセシロ」、GM：siRNA供与ジャガイモ、siRNA供与ジャガイモとの接ぎ木個体 (GM / Ws) から得られた系統においてメチル化度が高い。(**； $P < 0.01$)

5 野外栽培試験の開始

2016年1月、弘前大学より文部科学省及び環境省に、エピゲノム編集ジャガイモの野外栽培試験が遺伝子組換え実験に該当するか、また生物多様性への影響が生ずるおそれがあるかについての問い合わせを行った。この案件は、同年2月2日に開催されたカルタヘナ法研究第一種使用申請に係る学術経験者からの意見聴取会合において検討された。外来遺伝子の導入が認められないことや同様の変異体があることなどから遺伝子組換え実験には該当しない可能性があるものの、世界初のケースであることから、第一種使用申請に準じた生物多様性影響評価書の充実と隔離ほ場相当の管理された環境における栽培が必要との見解が示された。

これを受け、評価書ではsiRNA供与体由来のsiRNAの残存性や他感物質などに関するデータを追加し、競合における優位性、有害物質の産生性、交雑性等に関する記載や隔離ほ場相当の設備として農研機構

における第一種使用相当の施設を用いることを盛り込んだ新たな使用規程案を作成し、2016年12月27日付けの事務連として再提出した。この使用規程案については、2017年2月13日に開催された意見聴取会合を経たうえ、3月10日にその内容が妥当であると、文部科学省研究振興局ライフサイエンス課及び環境省自然環境局野生生物課から回答された。そこで、弘前大研究グループは、農研機構生物機能利用研究部門との共同研究により、同機構のほ場における野外栽培試験を4月26日から開始するに至った(図3)¹⁰⁾。

おわりに

エピゲノム編集は、最近話題となっているゲノム編集¹¹⁾と同様、これまでの組換え体技術とは全く異なる新育種法であり、作物の改良を飛躍的に進める良機が到来している。これらの育種法の優れた特徴を正しくご理解いただき、実用化への事業等にご支持、ご支援を賜れば幸いです。



図3 エピゲノム編集ジャガイモ系統の野外栽培試験。元品種「ワセシロ」、接ぎ木コントロール系統および *Vinv* エピゲノム編集系統を野外にて栽培した。

謝辞

弘前大学と農研機構が中心となる共同研究で行われた。本研究の一部は、「平成29年度 地域産学バリュープログラム」、「平成30年度 イノベーション創出強化研究推進事業」及び交付金によって実施された。

引用文献

- 1) 原田竹雄、葛西厚史ら 登録 6024901 (平28.10.21) 国立大学法人弘前大学
- 2) Kasai, A et al. (2016) PLoS ONE **11**: e0161729. doi:10.1371/journal.pone.0161729
- 3) Springer, NM and Schmitz, RJ (2017) *Nature Reviews Genetics* **18**: 563-575
- 4) Bai, S et al. (2011) *J. Experimental Botany* **62**: 4561-4570
- 5) 葛西厚史、原田竹雄 (2014) 遺伝 生物と科学 3月号: 140-144
- 6) Wu, R. et al. (2013) *PLoS ONE* **8**: e61995
- 7) Raju, SKK et al. (2018) *Plant Biotechnology J.* **16**: 1836-1847
- 8) Bhaskar, PB et al. (2010) *Plant Physiol.* **154**: 939-948
- 9) Clasen, BM et al. (2016) *Plant Biotechnology J.* **14**: 169-176
- 10) 弘前大学 プレスリリース 新育種技術による改良ジャガイモ：野外栽培試験の開始 <https://www.hirosaki-u.ac.jp/26901.html>
- 11) 梅基直行 (2018) いも類振興情報 **136**: 8-13