

特別賞

ジャガイモ塊茎デンプンの代謝工学に向けた
高効率ゲノム編集技術の開発

～有用品種の開発への新戦略～

東京理科大学 先進工学研究科 生命システム工学専攻
修士課程2年

竹内 亜美

1. 緒 言

ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) は全世界で年間3億トン以上生産される世界第4位の主要穀物である(2019年) [1]。ジャガイモ塊茎のデンプンは、20~30% のアミロースと70~80% のアミロペクチンから構成される [2]。アミロースは、グルコースが α -1,4グリコシド結合によって直鎖状に重合した高分子であり、アミロペクチンは、 α -1,4グリコシド結合のグルコース鎖に α -1,6結合による分岐鎖をもつ高分子である(図1)。一般に、デンプンに含まれるアミロース含量が低い場合、粘性の強いデンプン形質を示す。また、デンプンのグルコース鎖はリン酸化による架橋により構造的に安定化されている [3]。デンプンに含まれるリン酸基は水分を保持する効果があり、リン酸含量が少ないデンプンは含水量が減少し、冷凍による離水が少なく加工特性がよくなる [4]。ジャガイモは食用となるだけでなく、工業用途での使用量も多い。それゆえ、塊茎デンプンの品質・性状の改良が求められており、新たなデンプン形質を持つジャガイモを育成することで、新たな需要が生まれると期待される。

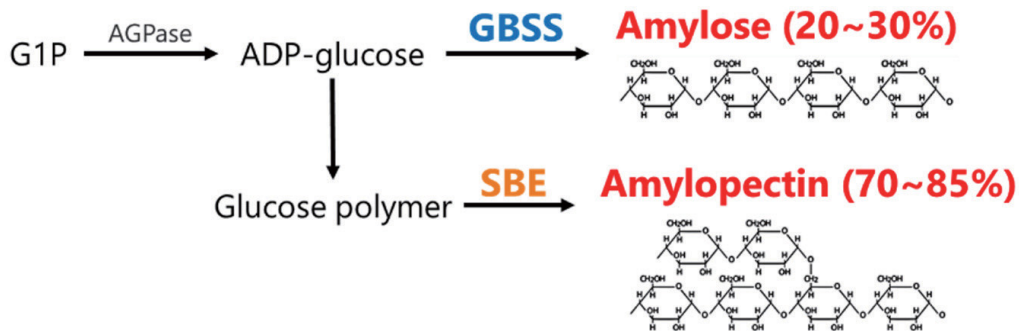


図1. デンプン構造 ジャガイモ塊茎におけるアミロースとアミロペクチンの構成比とその構造。

栽培種のジャガイモは栄養生殖性が強く、同質4倍体ゲノムをもつ。このため、従来の交配育種法で新たな品種を作出することは容易でない。このような栄養生殖性の強い作物の育種において、近年着目されている技術がゲノム編集である。ゲノム編集は特定の遺伝子を標的とする配列特異的な人工ヌクレアーゼを利用して、この塩基配列を改変する技術である [5]。そこで本研究では、ゲノム編集技術を用いることで、新たな形質を有するジャガイモ品種の作出を目指した。

ジャガイモの変異体を得るためには、4倍体ゲノムの4つの対立遺伝子(アレル)のすべてに変異を導入する必要がある。このためには、非常に強力なゲノム編集ツールが必要である。そのために、共同研究者により従来のゲノム編集システムを高度化した CRISPR/dMac3-Cas9 システム (図2) が開発されている [6]。これにより、ゲノム編集によるアミロースの合成に関わるデンプン顆粒結合型デンプン合成酵素 *GBSS* 遺伝子の変異体作出に成功している [6]。この変異体は塊茎デンプンのアミロース含量が減少している [6]。そこで、同様の手法によりデンプンの形質に関わる遺伝子を標的としたゲノム編集を行い、さまざまな形質を有する変異体の作出を試みた。本研究では、アミロペクチンの生合成に関わるデンプン枝付け酵素 *starch-branching-enzyme 3 (SBE3)* 遺伝子と、デンプンのリン酸化に関わる *glucan-water-dikinase 1 (GWD1)* 遺伝子のゲノム編集を行った。これらの変異体の表現型を観察す

ることで、塊茎デンプンの形成におけるこれらの遺伝子の生理機能を考察した。

ゲノム編集によって得られた変異体には、多くの場合、CRISPR/Cas9などのゲノム編集遺伝子が残存しており、実用化のためには交配によってこれらの遺伝子を除去したヌルセグリガント個体を獲得することが求められている。そこで本研究では、ヌルセグリガント個体を効率的に得るため、接ぎ木手法を利用した新規なジャガイモの交配法を開発した。

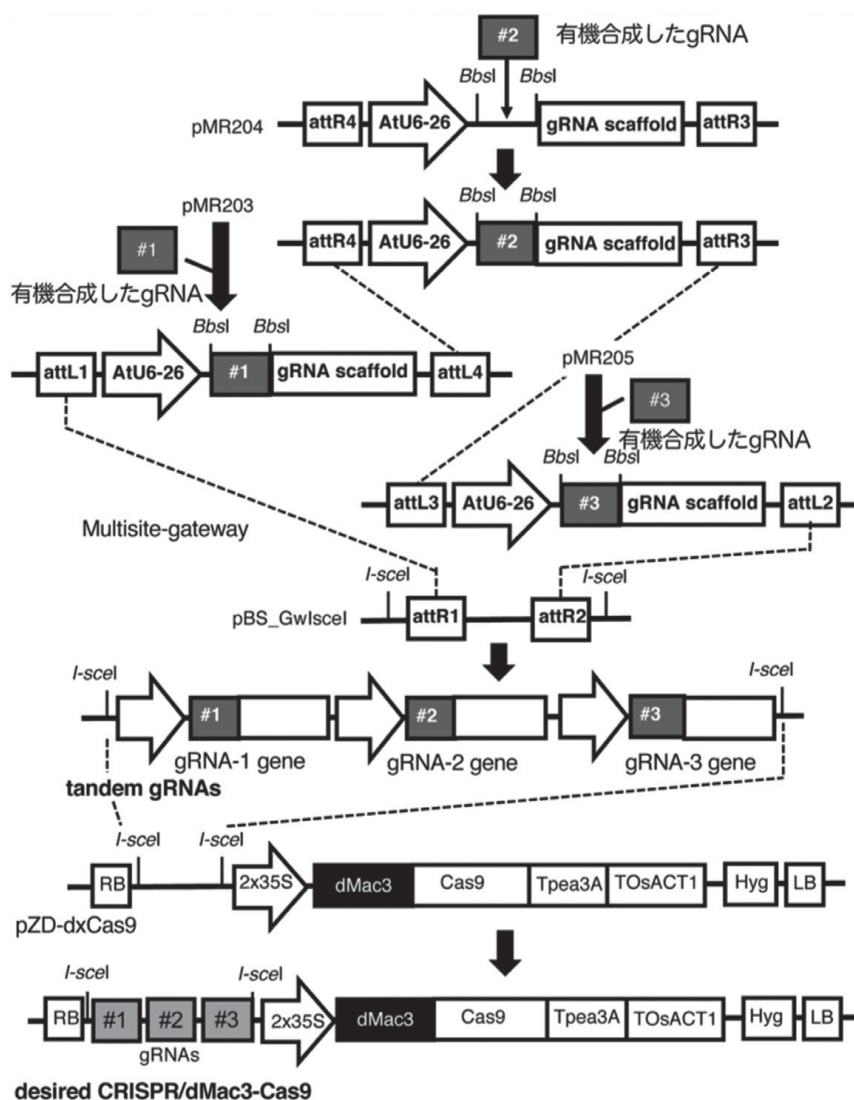


図2. CRISPR/dMac3-Cas9構築の概略 有機合成した3つの gRNA を pMR プラスミドの AtU6 プロモーターの下流の BbsI 部位に挿入した。次に、これらを Gateway LR 反応でタンデムに連結させた。この gRNA 遺伝子カセットを I-sceI で切り出し pZD-dxCas9 に挿入して、SBE3 遺伝子と GWD1 遺伝子を標的とするゲノム編集プラスミド pZD-StSBE3-dxCas9 と pZD-StGWD1-dxCas9 をそれぞれ構築した。[7]

2. デンプンのアミロース含量を変化させた *sbe3* 変異体の作出

先行研究では、アミロース生合成に関わる *GBSS* 遺伝子の変異体が得られている。この変異体はデンプンに含まれるアミロース含量が10～17%に減少しており、野生型(25%)に比べて低アミロースの形質を示すことが分かった(図3)。

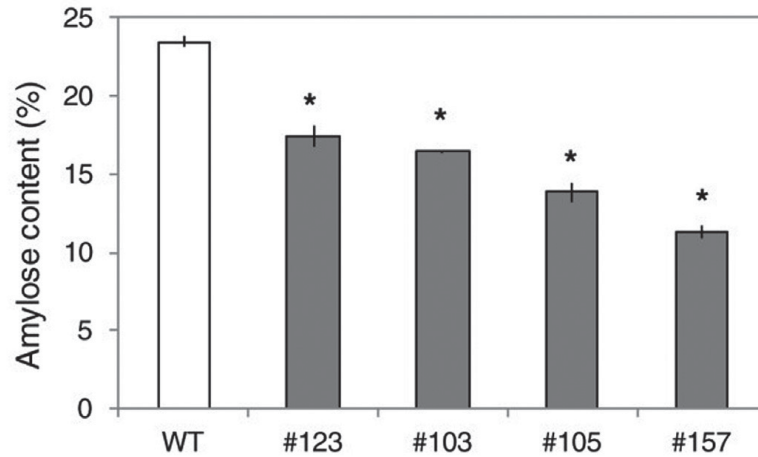


図3. *gbss* 変異体の塊茎デンプンのアミロース含量 *gbss* 変異体の4アリル変異体の塊茎デンプンに含まれるアミロース含量の測定結果を示す。エラーバーは標準偏差を示す(n = 3)。*はDunnett's testによってそれぞれの変異体のアミロース含量を野生型さやか(WT)と比較し、有意差があったことを示す(p<0.05)。[6]

一方、アミロペクチンの生合成には複数の遺伝子に関わっている。このうち、*SBE2* 遺伝子の変異体のデンプンはアミロース鎖が延びたアミロース・エクステンダーの形質を示すことが知られている[8]。しかし、もう1つの重要な遺伝子である *SBE3* 遺伝子の変異体は報告がない。そこで、データベースに登録されている *Solanum phureja* の塩基配列をもとに、*SBE3* 遺伝子のゲノム編集に用いる3つの標的部位を決定し(図4A)、CRISPR/dMac3-Cas9 システムを利用してゲノム編集プラスミド pZD-StSBE3-dxCas9 を構築した(図2)。

ゲノム編集には形質転換が可能なジャガイモ品種「さやか」を用いた。さやかのゲノム DNA の塩基配列を調べたところ、さやかの *SBE3* 遺伝子は *S. phureja* の塩基配列と一部が異なっていた。また、1塩基多型による WT-A、WT-B、WT-C の3つの遺伝子アリルが見つかった(図4A)。標的部位の一部で多型が存在したが、CRISPR の認識に必要な領域は相同性があり、CRISPR/Cas9 として機能することが予想されたため、これらを用いてゲノム編集を行うことにした。

SBE3 遺伝子を標的とする pZD-StSBE3-dxCas9 を、アグロバクテリウム法によりジャガイモに導入した。これにより得られた125個の形質転換体について、*SBE3* 遺伝子の標的部位の変異の有無に関する検定を行った。標的配列の近傍に制限酵素 *Bam*HI サイトが存在するため、ゲノム編集によりこの塩基配列に変異が生じた場合、この制限酵素切断部位が消失する。そこで、標的部位を含む1,000bp のゲノム領域を PCR により増幅し、*Bam*HI による切断の有無によりこの部位の変異を検出した。その結果、88個(70%)で *SBE3* 遺伝子に変異が見つかった。このうち10個(8%)は、4つの遺伝子が全て変異した4アリル変異体であった(表1)。

表1. *SBE3* 遺伝子のゲノム編集により得られた形質転換体の変異アリル数
CAPS 解析により検出された多型により判定した推定変異アリル数を示す。

推定変異アリル数	形質転換体	
	変異体(個)	作出効率(%)
0	37	30
1	25	20
2	34	27
3	19	15
4	10	8
total	125	100

代表的な変異体系統について、標的部位の標的配列を解析した。その結果、変異体 #19、#30、#31、#86、#99では4つの異なる塩基配列が検出され、これらの系統では WT の塩基配列は検出されなかった(図4B)。変異体 #53では、4つの変異配列に加えて、WT-B(野生型)の塩基配列が検出された(図4B)。また、変異体 #115では8つの変異型の塩基配列が検出された(図4B)。

ゲノム編集して得られた *sbe3* 変異体を人工的な環境で栽培した。その結果、これらの変異体は正常に生育し、野生型と外観上の差異は認められなかった(図5A)。また、生じた塊茎も正常な形態を示した(図5B)。変異体系統の #19、#31、#86と野生型(さやか)の塊茎についてヨウ素デンプン反応を行ったところ、これらは野生型よりもヨウ素の染色度合いが強くなった(図5C)。このことから、*sbe3* 変異体のデンプン形質に何らかの変化が生じたことが予測された。そこで、変異体の塊茎デンプンのアミロース含量を測定した。その結果、*sbe3* 変異体のアミロース含量は野生型よりも減少していることが分かった(図5D)。

ジャガイモ *SBE3* はイネ *BE1* のホモログである。*BE1* はアミロペクチンの中鎖鎖の分岐を作り出す活性を有するため、*BE1* の機能欠損変異体 (*rbe1* 変異体) ではアミロペクチンの長鎖が減少し、短鎖が著しく増加する。しかしながら、見かけのアミロース含量に有意差は現れない[9]。

本研究で得られた *sbe3* 変異体のデンプン形質は、*rbe1* 変異体のデンプン形質と類似性があると考えられる。このことから、*sbe3* 変異体はアミロースに似た構造を持つアミロペクチンを多く含有するため、見かけ上のアミロース含量が減少するにも関わらずヨウ素に強く染まったものと考えられた。

続いて、得られた *sbe3* 変異体の塊茎中の *SBE3* の検出を試みた。ジャガイモ *SBE3* は、イネ *BE1* のホモログとみなされる。そこで、*sbe3* 変異体系統の塊茎から粗タンパク質画分を調製し、イネ *BE1* に対するウサギ抗血清を用いてウエスタンブロット分析を行った。その結果、4アリル変異体ではタンパク質が検出されなかった(図5E)。このことから、これらの変異体では *SBE3* 遺伝子が欠損しており、*SBE3* タンパク質の産生を欠いていることが示唆された。

一般に、分岐鎖の少ないデンプンは分解されにくく、血糖値上昇の抑制やダイエットスー

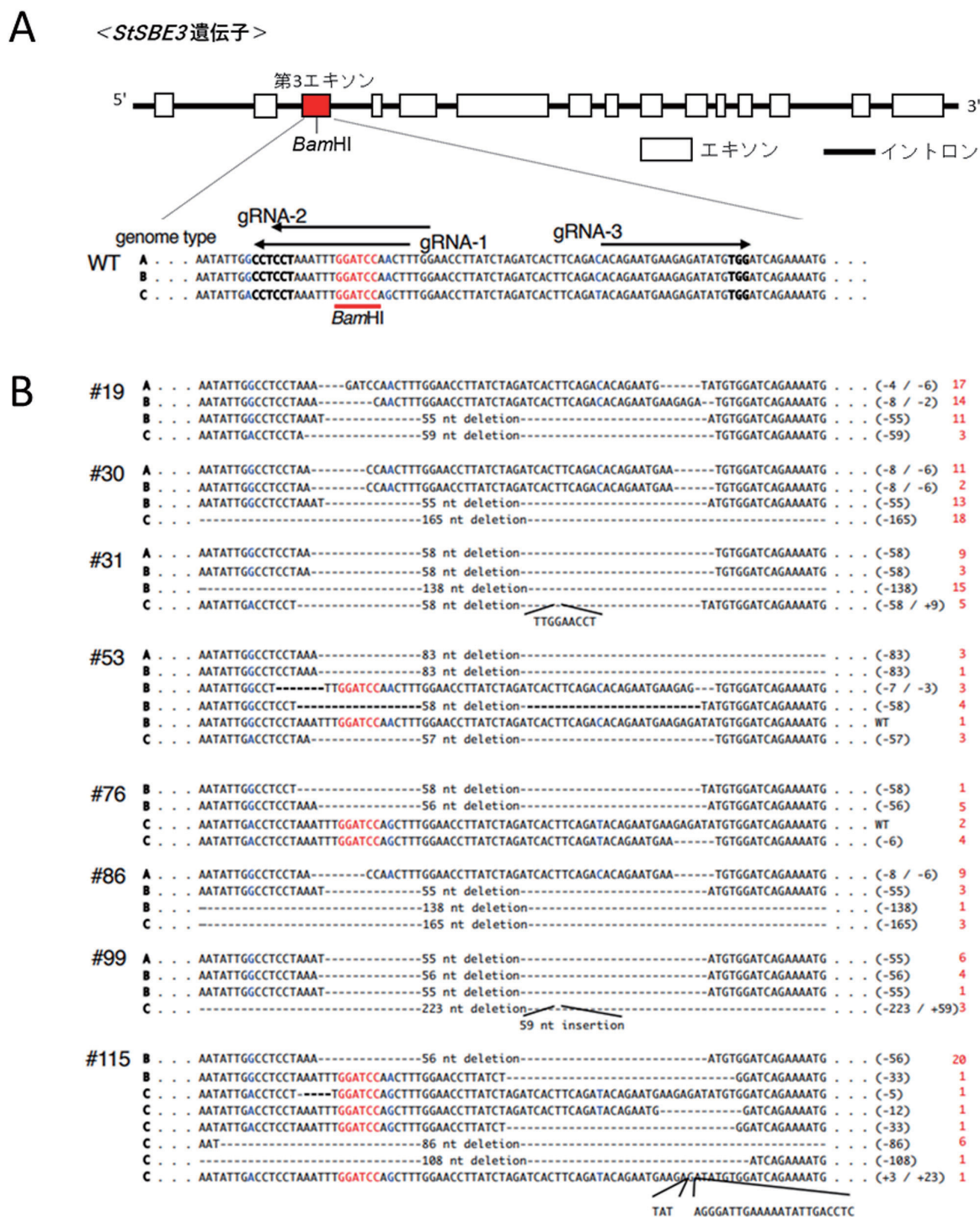


図4. *SBE3* 遺伝子の CRISPR/Cas9 の標的部位とその周辺の塩基配列 (A) *SBE3* 遺伝子の構造の概略図と CRISPR/Cas9 の標的部位を示す。gRNA-1、gRNA-2、gRNA-3 はそれぞれの遺伝子における CRISPR/Cas9 による3つの標的部位を示す。genome type A、B、C は、それぞれ野生型遺伝子アリル WT-A、WT-B、WT-C を示す。塩基配列中の赤文字は *Bam*HI サイト、青文字は3つのゲノム間の SNP を示す。(B) 代表的な *sbe3* の4アリル変異体の標的部位周辺の塩基配列の解析結果を示す。ギャップは、塩基の欠損を、行外にある塩基配列は塩基の挿入を示す。右側の()内の数字は、塩基の欠損・挿入数を示す。右側の赤い数字は、塩基配列解析により検出されたクローン数を示す。

チとしての応用が期待されている [10]。本研究で得られた *sbe3* 変異体の塊茎デンプンはこのような形質を有しており、ダイエットスターチとして機能性食品としての用途が期待される。

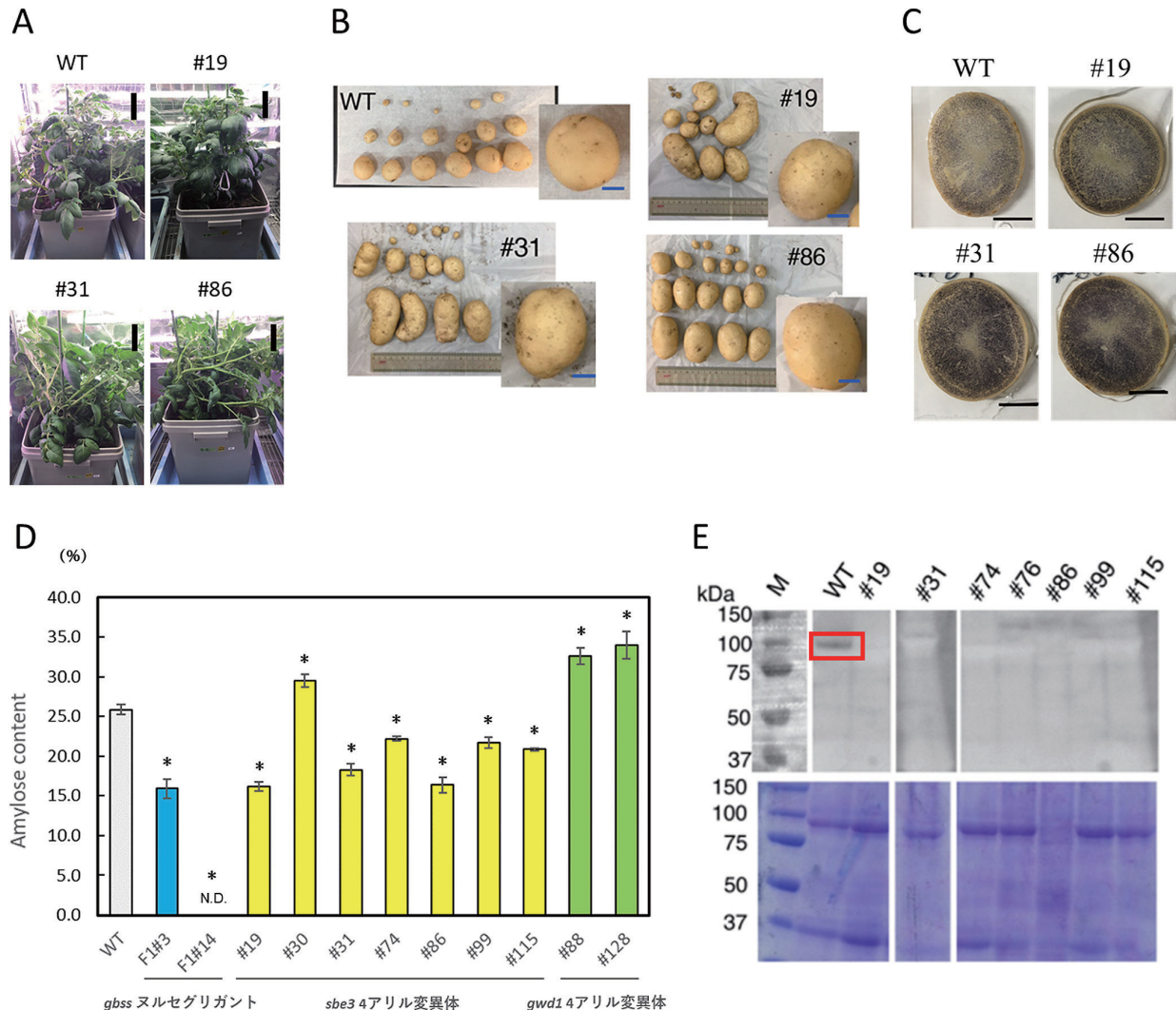


図5. *sbe3* 変異体の形質 (A) 代表的な4アリル変異体を人工環境下で栽培した2ヵ月目の様子。変異体は栄養成長期から生殖成長期において、概ね健全に生育した (Bars = 20cm)。 (B) 収穫した変異体の塊茎 (Bars = 2cm)。塊茎の形態異常は見られなかった。 (C) 代表的な4アリル変異体の塊茎を1~3mm程度の厚さにスライスし、ヨウ素デンプン反応を行った (Bars = 2cm)。ヨウ素デンプン反応では、アミロース含量が多いほど青紫色の呈色が強くなる。 (D) *gbss* 変異体のヌルセグリガント後代と *sbe3* の4アリル変異体、*gwd1* の4アリル変異体の塊茎から調製したデンプンに含まれるアミロース含量の測定結果を示す。エラーバーは標準偏差を示す (n = 3)。N.D. は検出限界以下であることを示す。*は Dunnett's test によってそれぞれの変異体のアミロース含量を野生型 (さやか) と比較し、有意差があったことを示す (p < 0.01)。 (E) 変異体の塊茎から得た総タンパク質に対してウエスタン分析を行った。総タンパク質は SDS-PAGE によって分離し、イネ BE1 抗体を使用したウエスタン分析によって SBE3 タンパク質を検出した。□で囲った部分は、約 100kDa の SBE3 タンパク質のバンドを示す。下段は SBE3 タンパク質検出後のメンブレンを CBB 染色した様子。(M: サイズマーカー、WT: 野生型)。

3. デンプンのリン酸含量を変化させた変異体の作出

デンプンのリン酸化の鍵酵素は Glucan dikinase 1 (GWD1) である。ゲノム編集に用いた「さやか」の *GWD1* 遺伝子の塩基配列を解析したところ、1塩多型による WT-A、WT-B、WT-C、WT-D の対立遺伝子が存在することがわかった。

GWD1 遺伝子を標的としたゲノム編集を試みるため、データベースに登録されている *GWD1* 遺伝子の第7エキソンにある *HindIII* サイトの近傍領域を標的とした3つの gRNA を設定し、CRISPR/dMac3-Cas9を利用して pZD-StGWD1-dxCas9を構築した(図2、6)。これを用いてジャガイモを形質転換し、得られた93個の形質転換体を CAPS 解析したところ、2個体の *GWD1* 遺伝子の4アレル変異体が見つかった(表2)。

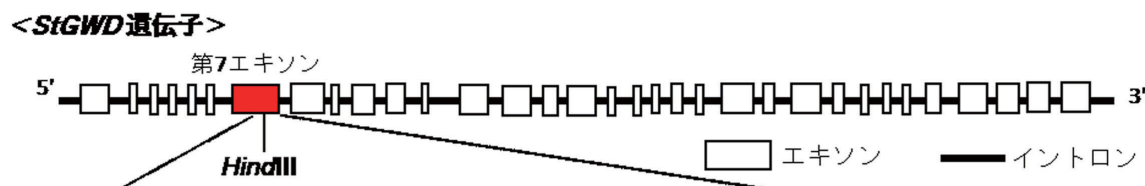
表2. *GWD1* 遺伝子のゲノム編集により得られた形質転換体の変異アレル数
CAPS 解析により検出された多型により判定した推定変異アレル数を示す。

推定変異アレル数	形質転換体	
	変異体(個)	作出効率(%)
0	26	28
1	35	38
2	20	21
3	10	11
4	2	2
total	93	100

4アレル変異体と考えられる2つの系統 #88と #128の塩基配列解析を行った。変異体 #88では、*GWD1* 遺伝子の3つのアレルはフレームシフトを起こす欠損変異であり、1つのアレルは CAPS 解析に利用した *HindIII* サイトの AAGCTT が AAACCTT に変異したものであった。これにより、コードされるアミノ酸残基が Ala から Thr に変化していた(図7)。一方、変異体 #128では4つのアレルの全てでフレームシフト変異が生じていた(図8)。

人工的な環境での栽培の結果、*gwd1* 変異体(#88、#128)は野生型(さやか)と同等の生育を示したが、塊茎は野生型と異なる形態を示した。#128の塊茎は全体的に小型なものが多く、しわが多く、水分が抜けたような見た目が異常な塊茎が得られた。一方、#88の塊茎は、野生型と同等の大きさで外観上の大きな変化は見られなかったが、野生型よりも柔らかいものが多かった(図9A)。

GWD1はデンプンのリン酸基による修飾に関わる酵素である[11]。そこで、*gwd1* 変異体の塊茎デンプンに含まれるリン含量を測定した。その結果、これらの変異体はいずれも野生型よりも減少していることが分かった(図9B)。*gbss* 変異体や *sbe3* 変異体ではリン含量の減少が認められなかったことから、*GWD1* 遺伝子の変異により、塊茎中の総リン量の減少が生じていることが示唆された。塊茎中のリンの多くはリン酸としてデンプンに結合していると考えられるため、デンプン中のリン酸含量が低下していると思われる。リン酸は保水成分として機能するため[3]、塊茎のデンプン中のリン酸含量が減少することで、含水量の少



genome type	Fw-Primer										
WT	A	g	t	t	g	c	t	g	c	t	3618
	B	g	t	t	g	c	t	g	c	t	3618
	C	g	t	t	g	c	t	g	c	t	3618
	D	g	t	t	g	c	t	g	c	t	3618
	A	a	c	a	c	t	t	c	t	g	3678
	B	a	c	a	c	t	t	c	t	g	3678
	C	a	c	a	c	t	t	c	t	g	3678
	D	a	c	a	c	t	t	c	t	g	3678
	A	A	G	G	C	T	G	C	T	C	3738
	B	A	G	G	C	T	G	C	T	C	3738
	C	A	G	G	C	T	G	C	T	C	3738
	D	A	G	G	C	T	G	C	T	C	3738
	A	G	A	G	A	G	C	C	T	T	3798
	B	G	A	G	A	G	C	C	T	T	3798
	C	G	A	G	A	G	C	C	T	T	3798
	D	G	A	G	A	G	C	C	T	T	3798
	A	C	A	A	G	A	G	C	C	T	3858
	B	C	A	A	G	A	G	C	C	T	3858
	C	C	A	A	G	A	G	C	C	T	3858
	D	C	A	A	G	A	G	C	C	T	3858
	A	C	A	G	A	G	C	C	T	T	3918
	B	C	A	G	A	G	C	C	T	T	3918
	C	C	A	G	A	G	C	C	T	T	3918
	D	C	A	G	A	G	C	C	T	T	3918
	A	t	t	t	g	t	a	g	t	g	3978
	B	t	t	t	g	t	a	g	t	g	3978
	C	t	t	t	g	t	a	g	t	g	3978
	D	t	t	t	g	t	a	g	t	g	3978
	A	t	g	a	c	t	t	g	a	a	4038
	B	t	g	a	c	t	t	g	a	a	4038
	C	t	g	a	c	t	t	g	a	a	4038
	D	t	g	a	c	t	t	g	a	a	4038
	A	t	t	g	a	c	t	t	g	a	4098
	B	t	t	g	a	c	t	t	g	a	4098
	C	t	t	g	a	c	t	t	g	a	4098
	D	t	t	g	a	c	t	t	g	a	4098

図6. *GWD1* 遺伝子の CRISPR/Cas9 の標的部局周辺の塩基配列 *GWD1* 遺伝子の構造の概略図と野生型の *GWD1* 遺伝子の標的部局周辺の塩基配列の解析結果を示す。gRNA-1、gRNA-2、gRNA-3はそれぞれの遺伝子における CRISPR/Cas9 による3つの標的部局を示す。genome type A、B、C、Dは、それぞれ野生型遺伝子アレル WT-A、WT-B、WT-C、WT-Dを示す。塩基配列中の緑文字は *Hind*III サイト、赤文字は3つのゲノム間の SNP を示す。

ないデンプンを持つジャガイモの作出に成功した可能性が高い。含水量の少ないデンプンは冷凍による離水が少なく、加工特性がよくなる[4]。ジャガイモのデンプンは蒲鉾などの練り物の添加剤として多く使用されており、低含水デンプンを用いた練り物は保水性や食味の向上に貢献すると期待される。

genome type									
#88	A	gttgctgcta	ctcagatata	ttcttttcctt	atttgggata	tcatcctcca	cttccgtag	3618	(-124/+20) 1
	B	gttgctgcta	ctcagatata	ttcttttcctt	atttgggata	tcatcctcca	cttccgtag	3618	(-439/+55) 8
	C	gttgctgcta	ctcagatata	ttcttttcctt	atttgggata	tcatcctcca	cttccgtag	3618	(G→A) 1
	D	gttgctgcta	ctcagatata	ttcttttcctt	atttgggata	tcatcctcca	cttccgtag	3618	(-26/+1) 24
	A	acacttctgt	tatctactta	gttacggata	ctgtcagttg	tgtatttcag	GAGGAATATG	3678	
	B	ac-----	-----	-----	-----	-----	-----	3678	
	C	acacttctgt	tatctactta	gttactgata	ctgtcagttg	tgtatttcag	GTTGAATATG	3678	
	D	acacttctgt	tatctactta	gttactgata	ctgtcagttg	tgtatttcag	GTTGAATATG	3678	
	A	AGGCTGCTCG	AACTGAGCTA	CAGGAGGAAA	TAGCT-----	-----	-----	3738	
	B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3738	
	C	AGGCTGCTCG	AACTGAGCTA	CAGGAGGAAA	TAGCTCGTGG	TGCTTCCATA	CAGGACATTC	3738	
	D	AGGCTGCTCG	AACTGAGCTA	CAGGAGGAAA	TAGCTCGTGG	TGCTTCCATA	CAGGACATTC	3738	
	A	--tttgtaaa	tgctgaactt	tt(-124 + 20nt insertion)	-----	-----	-----	3798	
	B	--gacgacta	cgcgctaggg	ggataagacg	agcaaaaagc	ttgttaattc	gcgctag---	3798	
	C	GAGCAAGGCT	AACCAAAACT	AATGATAAAA	GTCAAAGCAA	AGAAGAGCCT	CTTCATGTAA	3798	
	D	GAGCAAGGCT	AACCAAAACT	AATGATAAAA	GTCAAAGCAA	AGAAGAGCCT	CTTCATGTAA	3798	
	A	-----	-----	-----	-----	C TTACATTAGG	TGGGAGAAAG	3858	
	B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3858	
	C	CAAAGAGTGA	TATACCTGAT	GACCTTTCCC	AAGCACAAAC	TTACATTAGG	TGGGAGAAAG	3858	
	D	CAAAGAGTGA	TATACCTGAT	--(-26+1)	-----	-----TAGG	TGGGAGAAAG	3858	
	A	CAGGAAAGCC	GAACATATCCT	CCAGAAAAGC	AAATTgtaaa	tgctgaactt	ttcttacagt	3918	
	B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3918	
	C	CAGGAAAGCC	GAACATATCCT	CCAGAAAAGC	AAATTgtaaa	tgctgaacct	ttcttacagt	3918	
	D	CAGGAAAGCC	GAACATATCCT	CCAGAAAAGC	AAATTgtaaa	tgctgaacct	ttcttacagt	3918	
	A	ttttgtagt	tggtgtatatg	tctaggcgca	taaaactctggg	tattctgtct	tctatagatg	3978	
	B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3978	
	C	ttttgtagt	tggtgtatatc	tcaggcgca	taaagctggg	tatgctgtct	tctatagatg	3978	
	D	ttttgtagt	tggtgtatatc	tcaggcgca	taaagctggg	tatgctgtct	tctatagatg	3978	
	A	tgagactttg	atcaagcatt	gttttattaa	cagGAAGAAC	TCGAAGAAGC	AAGAAGAGAA	4038	
	B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	4038	
	C	tgagactttg	atcaagcatt	gttttattaa	cagGAAGAAC	TCGAAGAAGC	AAGAAGAGAA	4038	
	D	tgagactttg	atcaagcatt	gttttattaa	cagGAAGAAC	TCGAAGAAGC	AAGAAGAGAA	4038	
	A	TTGCAACTTG	AGCTTGAGAA	AGGCATTACC	CTTGATGAGT	TGCGGAAAAA	GATTACAAAA	4098	
	B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	4098	
	C	TTGCAACTTG	AGCTTGAGAA	AGGCATTACC	CTTGATGAGT	TGCGGAAAAA	GATTACAAAA	4098	
	D	TTGCAACTTG	AGCTTGAGAA	AGGCATTACC	CTTGATGAGT	TGCGGAAAAA	GATTACAAAA	4098	

図7. *GWD1* 遺伝子の CRISPR/Cas9 の標的部局周辺の塩基配列 *gwd1* の4アレル変異体 #88 の標的部局周辺の塩基配列の解析結果を示す。genome type A、B、C、D は、それぞれ野生型遺伝子アレル WT-A、WT-B、WT-C、WT-D を示す。塩基配列中の緑文字は *HindIII* サイト、赤文字は3つのゲノム間の SNP を示す。ギャップは、塩基の欠損を、ギャップ間にある連続した青文字の塩基配列は塩基の挿入を示す。右側の()内の数字は、塩基の欠損・挿入数を示す。()より右側の赤い数字は、塩基配列解析により検出されたクローン数を示す。

genome type

#128

A	gttgctgcta	ctcagatata	ttcttttcctt	atttgggata	tcatcctcca	ctGcTgttag	3618	(-7/+63)	3
B	gttgctgcta	ctcagatata	ttcttttcctt	atttgggata	tcatcctcca	ctGcTgttag	3618	(-199/+190)	10
C	gttgctgcta	ctcagatata	ttcttttcctt	atttgggata	tcatcctcca	ctGcTgttag	3618	(-116)	33
D	gttgctgcta	ctcagatata	ttcttttcctt	atttgggata	tcatcctcca	ctGcTgttag	3618	(-118/+70)	2
A	acacttctgt	tatctactta	gttacggata	ctgtcagttg	tgtatttcag	GAGGAATATG	3678		
B	acacttctgt	tatctactta	gttacggata	-----	-----	-----	3678		
C	acacttctgt	tatctactta	gttacggata	ctgtcagttg	tgtatttcag	GTTGAATATG	3678		
D	acacttctgt	tatctactta	gttacggata	ctgtcagttg	tgtatttcag	GTTGAATATG	3678		
A	AGGCTGCTCG	AACTGAGCTA	CAGGAGGAAA	TAGCTCGTGG	TGCTTCCATA	CAGGA-(-7)	3738		
B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3738		
C	AGGCTGCTCG	AACTGAGCTA	CAGGAGGAAA	TAGCTCGTGG	TGCTTCCATA	CAGGACATTC	3738		
D	AGGCTGCTCG	AACTGAGCTA	CAGGAGGAAA	TAGCTCGTGG	TGCTTCCATA	CAGGACATTC	3738		
A	--GCAAGGCT	AACCAAAACT	AATGATAAAA	GTCAAAGCAA	AGAAGAGCCT	CTTCATGTAA	3798		
B	-----	--(-199)--	-(long insertion-2)--	-----	-----	-----	3798		
C	G-----	--(-116)--	-----	-----	-----	-----	3798		
D	GA-----	-AGCAGGAAA	GCCGAACAT	CCTCCAGAAA	AGCAAATTGT	AAATGCTGAA	3798		
				<i>HindIII</i>					
A	CAAAGAGTGA	AATACC----	-----	-(long insertion-1)--	-----	-----	3858		
B	-----	-----	-----	-----TAGG	TGGGAGAAAG	-----	3858		
C	-----	-----	-----	-----	-----AAG	-----	3858		
D	CCTTCTTAC	AGTTTATGTA	G(70 nt)--	-----	-----	-----	3858		
				gRNA-2		gRNA-3			
A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3918		
B	CAGGAAAGCC	GAACATATCCT	CCAGAAAAGC	AAATTgtaaa	tgctgaac	ttcttacagt	3918		
C	CAGGAAAGCC	GAACATATCCT	CCAGAAAAGC	AAATTgtaaa	tgctgaac	ttcttacagt	3918		
D	CAGGAAAGCC	GAACATATCCT	CCAGAAAAGC	AAATTgtaaa	tgctgaac	ttcttacagt	3918		
A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3978		
B	tttagtagtg	tgtgtatatg	tcaggcgca	taaa	ctgtgg	tattctgtct	tctatagatg	3978	
C	ttttgtagtg	tgtgtatatc	tcaggcgca	taaagctggg	tatgctgtct	tctatagatg	3978		
D	-----	tgtgtatatc	tcaggcgca	taaagctggg	tatgctgtct	tctatagatg	3978		
A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	4038		
B	tgagactttg	atcaagcatt	gttttattaa	cagGAAGAAC	TCGAAGAAGC	AAGAAGAGAA	4038		
C	tgagactttg	atcaagcatt	gttttattaa	cagGAAGAAC	TCGAAGAAGC	AAGAAGAGAA	4038		
D	tgagactttg	atcaagcatt	gttttattaa	cagGAAGAAC	TCGAAGAAGC	AAGAAGAGAA	4038		
long insertion in mutant-1 (63 nt)									
GTAAGTAAAGT AGATAACAGA AGTGTCTAAC AGCAGTGGAG GATAGGCGGC CGCTTTTTTC									
CTTAgtagtattg ggaattcctg cagcccgagg gatccactag ttctagagcg gccgccaccg									
long insertion in mutant-2 (190 nt)									
tttcactcct ttgtacatga agaggctcct ctttgctttg acttttatca ttagtttttg									
ttagccttgc tcctgtatgg aagcaccacg agctatttcc tcctgtagct cagttcgagc									
agcctcatat tcctcctgaa atacacaaca gacagtatcc gtaactaagt agataccacg									
atttcctatc									

図8. *GWD1* 遺伝子の CRISPR/Cas9 の標的部位周辺の塩基配列 *gwd1* の4アリル変異体 #128 の標的部位周辺の塩基配列の解析結果を示す。genome type A、B、C、D は、それぞれ野生型遺伝子アリル WT-A、WT-B、WT-C、WT-D を示す。塩基配列中の緑文字は *Hind*III サイト、赤文字は3つのゲノム間の SNP を示す。ギャップは、塩基の欠損を、ギャップ間にある連続した青文字の塩基配列は塩基の挿入を示す。右側の () 内の数字は、塩基の欠損・挿入数を示す。() より右側の赤い数字は、塩基配列解析により検出されたクローン数を示す。

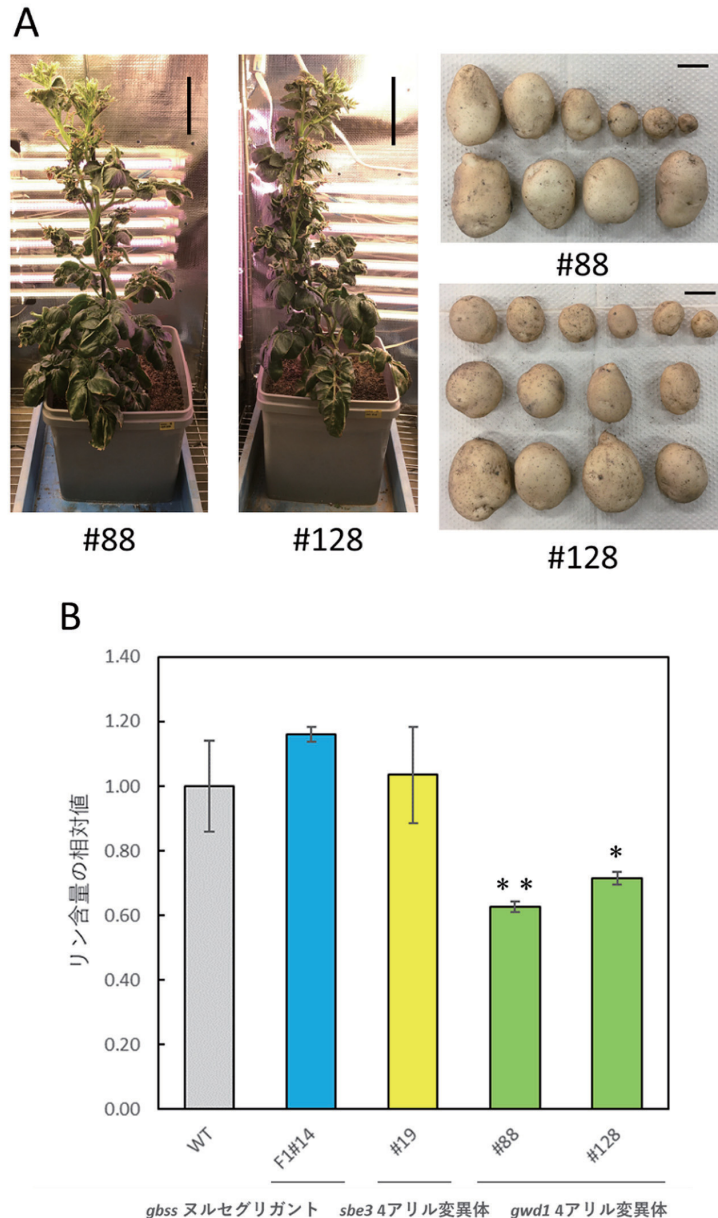


図9. *gwd1*変異体の形質 (A) 代表的な4アリル変異体を人工環境下で栽培した2ヵ月目の様子 (Bars = 20cm) と収穫した変異体塊茎 (Bar = 2cm)。変異体は栄養成長期から生殖成長期において、概ね健全に生育した。#88の塊茎は、野生型と同等の大きさで外観上の大きな変化は見られなかったが、野生型よりも柔らかいものが多かった。また、#128の塊茎は全体的に小型なものが多く、しわが多く、水分が抜けたような見た目が異常な塊茎が得られた。WTは野生型を示す。(B) *gbss* 変異体のヌルセグリガント後代(F₁#14)と*sbe3*の4アリル変異体(#19)、*gwd1*の4アリル変異体(#88と#128)の塊茎から調製したデンプン中に含まれるリン含量の測定結果を示す。数値はWTの平均値を1としたときの相対値で示している。エラーバーは標準偏差を示す(n = 3)。*はDunnett's testによってそれぞれの変異体のリン含量を野生型(さやか)と比較し、有意差があったことを示す(*p<0.05、**p<0.01)。

4. 接ぎ木を利用した高効率な交配法の確立とヌルセグリガント後代の取得

ゲノム編集によって作出された変異体には、*CRISPR/Cas9* 遺伝子が残存する。栽培品種として実用化するためには、変異体を交配することでゲノム編集に用いた *CRISPR/Cas9* が消失したヌルセグリガント変異体である方が望ましい。

一般に、ジャガイモは種子稔性が非常に低く、交配により後代植物を得ることが困難である。また、ジャガイモは開花時期と塊茎形成期が重複するため、ジャガイモに塊茎を形成させないことで果実の形成率が高まると考えた。そこで本研究では、変異体ジャガイモを穂木、塊茎を形成しないトマトを台木とした接ぎ木をし、これを交配に用いた(図10)。

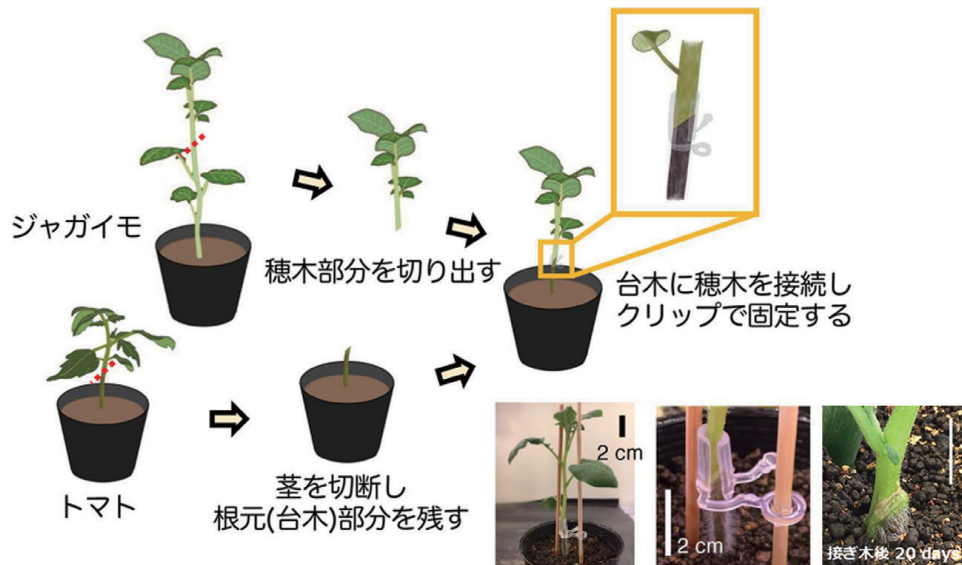


図10. 接ぎ木の手順 トマト(タキイ種苗のフルティカ)を台木に、変異体ジャガイモを穂木として接ぎ木を行った。両者の植物体の茎の太さが2~3mm となったら、トマトは地面から2~3cm の高さで葉を含まないように茎を接ぎ木ガイドカッターで切断した。一方、ジャガイモは茎頂部を葉が数枚含まれるように接ぎ木ガイドカッターで切断した。その後、両者を接ぎ木し、接ぎ木クリップを用いて固定した。固定後、植物体は23℃の環境で湿度90% 以上、明期(400~500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)16時間、暗期8時間の条件で1週間程度養生した。[12]

sbe3 変異体をトマトに接ぎ木したところ、接ぎ木個体の作成に成功した。そこで、接ぎ木した *sbe3* 変異体ジャガイモを用いて交配を行ったところ、11個の果実が得られた。接ぎ木をしていないジャガイモ変異体同士の交配での稔実率が平均0.9% だったのに対し、接ぎ木をした場合では25.4% であった(表3)。この結果から、トマトに接ぎ木をすることによって稔実率が大幅に向上することが分かった。このことから、ジャガイモの交配を容易にする交配システムの確立に成功したといえる。この技術は実用的なゲノム編集変異体の創出に繋がるだけでなく、交配による従来のジャガイモ育種においても重要な技術となり、新品種育成の促進にも貢献できることが期待される。

表3. 交配に用いた変異体の接ぎ木の有無による稔実率の違い 実験 A[13]、実験 B[14]、実験 C と D[15]は先行研究で行われた交配結果である。*gbss* と *sbe3*はゲノム編集により作出された *gbss* 変異体と *sbe3*変異体を示す。「/tomato」はトマトに接ぎ木された変異体であることを示す。[12]

実験	交配回数(回)	稔実数(個)	稔実率(%)	親(♀×♂)
A	182	5	2.7	<i>gbss</i> × <i>gbss</i>
B	30	0	0	
C	50	0	0	
D	17	6	35.3	<i>gbss</i> /tomato × <i>gbss</i> /tomato
E	58	11	19.0	<i>sbe3</i> /tomato × <i>sbe3</i> /tomato
F	50	11	22.0	<i>sbe3</i> /tomato × <i>sbe3</i> /tomato

gbss 変異体同士を交配して得られた種子を播種して得られた後代植物を調べたところ、5個体では *CRISPR/Cas9* 遺伝子発現カセットが検出されず、これが脱落したヌルセグリガント個体である可能性が強く示唆された。これらの個体に含まれる *GBSS* 遺伝子領域の塩基配列を調べたところ、すべての遺伝子に変異型であった(図11)。

これらの *gbss* 変異体のヌルセグリガント個体のうち、2系統(F_1 #3と F_1 #14)を栽培した。

WT	HindIII ... AATGGTTTAA GGGCTGTTAA CAAGCTTGAT GGGCTCCAAT CAAGAACTAA TACTAAGGTA ACACCCAAGA TGGCA... gRNA-1gRNA-2gRNA-3									
#105	... AATGGTTTAA GGGCTGTTAA CAA ---TGAT GGGCTCCAAT CAAGAACTAA TACTAAGGTA ACACCCAAGA TGGCA... (-3) ... AATGGTTTAA GGGCTGTTAA CA ---TGAT GGGCTCCAAT CAAGAACTAA TACTAAGGTA ACACCCAAGA TGGCA... (-4) ... ----- CCAAGA TGGCA... (-96) ... (re-arrangement)									
#156	... AATGGTTTAA GGGCTGTTAA CAAGCTT GAT GGGCTCCAAT CAAGAACTAA TACTAAGGTA ACACCCAAGA TGGCA... (WT) ... AATGGTTTAA GGGC----- GGGCTCCAAT CAAGAACTAA TACTAAGGTA ACACCCAAGA TGGCA... (-16) ... AATGGTTTAA GGGCTGTTAA CAAG ---AT GGGCTCCAAT CAAGAACTAA TACTAAGGTA ACACCCAAGA TGGCA... (-4) ... AATGGTTTAA GGGCTGTTAA CAAG ---AT GGGCTCCAAT CAAGAACTAA TACTAAGGTA -----GA TGGCA... (-4/-8) ... AATGGTTTAA GGGCTGTTAA CAAGCTT GAT GGGCTCCAAT CAAGAACTAA TACTAAGGT-----AAGA TGGCA... (-7) ... AATGGTTTAA GGGCTGTTAA-----GGCTCCAAT CAAGAACTAA TACTAAGGTA ACACCCAAGA TGGCA... (-12) ... AATGGTTTAA GGGCTGTTAA C----- AACTAA TACTAAGGTA ACACCCAAGA TGGCA... (-23)									
F_1 #52	... AATGGTTTAA GGGCTGTTAA CAA ---TGAT GGGCTCCAAT CAAGAACTAA TACTAAGGTA ACACCCAAGA TGGCA... (-3) 7 #105由来 ... AATGGTTTAA GGGCTGTTAA CAAG ---AT GGGCTCCAAT CAAGAACTAA TACTAAGGTA ACACCCAAGA TGGCA... (-4) 11 #156由来 ... AATGGTTTAA GGG-----AT GGGCTCCAAT CAAGAACTAA TACTAAGGTA ACACCCAAGA TGGCA... (-15) 3 由来不明									
F_1 #54	... AATGGTTTAA GGGCTGTTAA CAAG ---AT GGGCTCCAAT CAAGAACTAA TACTAAGGTA ACACCCAAGA TGGCA... (-4) 17 #156由来 ... ----- CCAAGA TGGCA... (-96) 9 #105由来									

図11. *gbss* 変異体のヌルセグリガント個体の *GBSS* 遺伝子標的部位周辺の塩基配列

gbss のヌルセグリガント後代の標的部位周辺の塩基配列の解析結果を示す。塩基配列中の緑文字は *HindIII* サイトを示す。ギャップは塩基の欠損を示す。右側の()内の数字は、塩基の欠損・挿入数を示す。()より右側の赤い数字は、塩基配列解析により検出されたクローン数を示す。(WT: 野生型)

その結果、これらは正常に生育し、野生型と同じ形態の塊茎が得られた。これらの塊茎のデンプンはヨウ素デンプン反応での染色度合いが顕著に低下していた[14, 15]。また、これらの個体のアミロース含量を測定したところ、野生型(さやか)よりも明らかにアミロース含量が減少していた(図5D)。このうち、F₁#3の塊茎デンプンはアミロースが検出されず、モチ性のデンプンとなっていることが示唆された。低アミロースの塊茎は、食用としたときにモチモチした食感となり美味であると思われる。また、モチ性デンプンを工業用として用いた場合には、粘り気の高い接着剤としての利用価値が高まる。このことから得られた変異体は新規な用途開発が期待されるものである。

5. まとめと今後の展望

ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) は、世界において非常に有用な作物である。ジャガイモのような栄養生殖性の強い作物は、従来の育種法で目的の形質を持った品種を作出することは容易でなく、長い期間を要する。そのため、ゲノム編集技術は新たなジャガイモ品種の作出を促進する技術として期待される。本研究では、ゲノム編集システムによりジャガイモのデンプン形質の代謝工学的な改変を試み、GBSS 遺伝子、SBE3 遺伝子、GWD1 遺伝子の4アレル変異体の作出に成功した。いずれの遺伝子の場合でも、我々が用いたCRISPR/dMac3-Cas9システムは高効率で標的配列特異的な変異を誘発している。この結果は、この手法を用いることで任意の遺伝子の変異体が容易に作出できることを示す。これにより、ジャガイモ塊茎デンプンの代謝工学的な改変が可能となった。また、これらの変異体は、塊茎デ

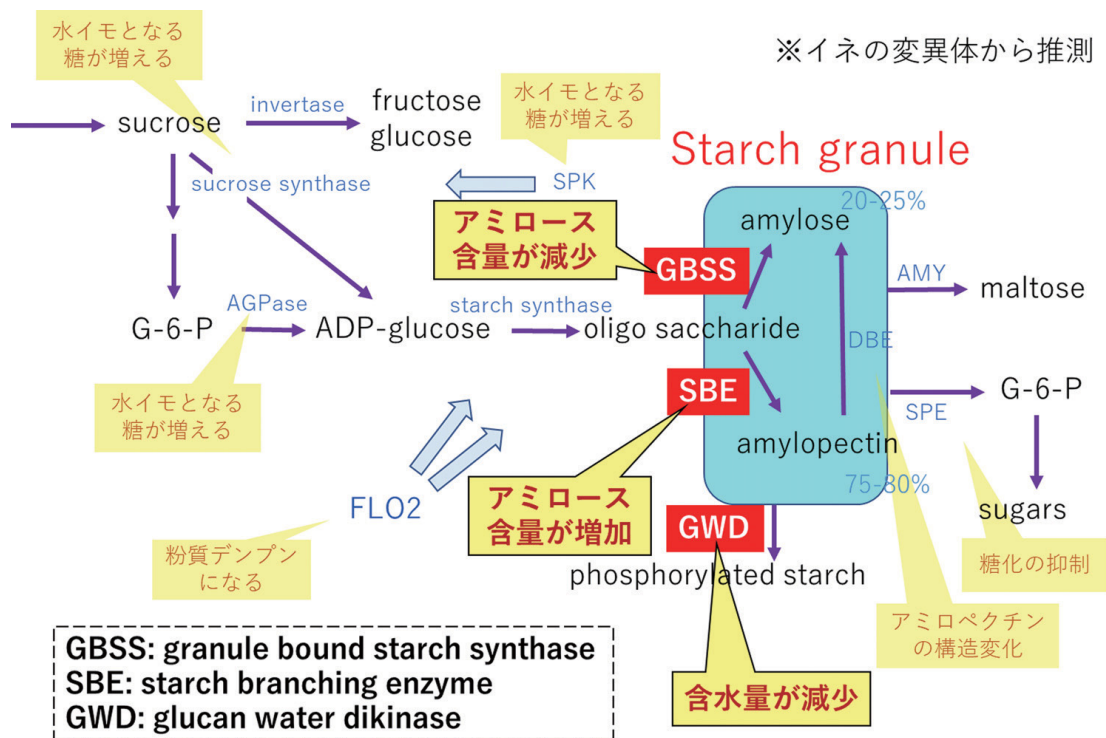


図12. デンプン生合成に関わる代謝経路と遺伝子機能 ジャガイモ塊茎のデンプンの生合成には様々な遺伝子が関与する。それぞれの変異体は異なる形質を持つ塊茎が生じると予想される。

ンブンのアミロース含量やリン含量に変化があったことから、新たなデンプン形質を持つジャガイモの新品種育成に繋がると期待される。また、これらの変異体はそれぞれの遺伝子機能が欠損した新規な変異体であることが明らかとなった。これらは新品種の開発に貢献するものと期待される(図12)。

ところで、ゲノム編集により作出された変異体では、植物のゲノム中に残存する *CRISPR/Cas9* 遺伝子などのゲノム編集ツールは不要な外来遺伝子であり、変異の導入後は何らかの方法で除去することが望まれる。交配によって得られた後代植物では、一定の割合でこのような外来遺伝子が脱落したヌルセグリガントが現れる。また、細胞のキメラ性もこの操作により除去することができる。しかし、ジャガイモは栄養生殖性が強く、塊茎で増殖するため、交配によって後代種子を得ることは容易ではない。また、花粉の稔性や花の結実率が低い品種が多い。

本研究ではこの問題を解決するために、トマトを台木とした接ぎ木個体同士を交配する方法を確立した。これにより、効率的に後代の種子が得られるようになった。また、*gbss* 変異体のヌルセグリガント後代を獲得することにも成功した。*gbss* 変異体のヌルセグリガント個体は、一定の条件をクリアすれば屋外での栽培が可能になる。また、このほかの変異体においても、実用的な品種として育成するためにはヌルセグリガント個体の取得が望まれる。今後は、屋外の広い圃場でこれらを用いた栽培試験を行い、収量性や栽培特性、収穫した塊茎の品質特性などを明らかにすることが必要であると考えられる。

CRISPR/dMac3-Cas9 システムや接ぎ木個体を用いた交配システムは、ジャガイモ品種だけでなく、栄養生殖性の強い作物や多倍数体作物にも適用可能であると考えられる。すなわち、これらの技術は、新品種開発の促進など、農作物の育種に革新をもたらすものと期待される。

6. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なご指導を賜りました東京理科大学先進工学部生命システム工学科の田村浩二教授、島田浩章教授、高橋史憲准教授に心より感謝申し上げます。

ジャガイモの分譲および塊茎デンプン中のアミロース含量の測定を行って下さった農研機構北海道農業研究センターの浅野賢治博士、野田高弘博士、*CRISPR/dMac3-Cas9* 用の元ベクターを分譲していただきました農研機構生物機能利用研究部門の土岐精一博士、遠藤真咲博士、ジャガイモの塊茎デンプン中のリン含量の測定を行って下さった東京電機大学工学部応用化学科の保倉明子教授、東京電機大学大学院工学研究科物質工学専攻の渡辺光氏に厚く御礼申し上げます。

また、本論文の一部は原著論文として既に報告しております(参考文献[7]、[12])。

7. 参考文献

1. 農地局地域作物課(2021) いも・でん粉に関する資料。農林水産省。
<<https://www.maff.go.jp/j/seisan/tokusan/imo/r2shiryou.html>> (参照 2021.12.23)
2. 檜作進(1994) 米澱粉の特質について。日本醸造協会誌 **89** (2), 94-99. doi: 10.6013/jbrewsocjapan1988.89.94

3. Noda, T., Tsuda, S., Mori, M., Takizawa, S., Matsuura-Endo, C., Hashimoto, N., Yamauchi, H. (2004) Properties of starches from potato varieties grown in Hokkaido. *J. Appl. Glycosci.* **51** (3), 241-246. DOI: 10.5458/jag.51.241
4. 池谷聡、大波正寿、千田圭一、伊藤武(2000) 高品質でん粉原料用ばれいしょの育種 : 1. 個体選抜世代におけるでん粉のリン含量、離水率、でん粉価の頻度分布。日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報 **41**, 81-82.
5. Osakabe, Y., Osakabe, K. (2015) Genome Editing with Engineered Nucleases in Plants. *Plants Cell Physiol.* **56**, 389-400. DOI: 10.1093/pcp/pcu170
6. Kusano, H., Ohnuma, M., Mutsuro-Aoki, H., Asahi, T., Ichinosawa, D., Onodera, H., Asano, K., Noda, T., Horie, T., Fukumoto, K., Kihira, M., Teramura, H., Yazaki, K., Umemoto, N., Muranaka, T., Shimada, H. (2018) Establishment of a modified CRISPR/Cas9 system with increased mutagenesis frequency using the translational enhancer dMac3 and multiple guide RNAs in potato. *Scientific Reports* **8** (1), 13753. DOI: 10.1038/s41598-018-32049-2
7. **Takeuchi, A.**, Ohnuma, M., Teramura, H., Asano, K., Noda, T., Kusano, H., Tamura, K., Shimada, H. (2021) Creation of a potato mutant lacking the starch branching enzyme gene StSBE3 that was generated by genome editing using the CRISPR/dMac3-Cas9 system. *Plant Biotechnol.* **38**, 345-353. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.21.0727a
8. Tuncel, A., Corbin, K.R., Ahn-Jarvis, J., Harris, S., Hawkins, E., Smedley, M.A., Harwood, W., Warren, F.J., Patron, N.J., Smith, A.M. (2019) Cas9-mediated mutagenesis of potato starch-branching enzymes generates a range of tuber starch phenotypes. *Plant Biotechnol. J.* **17**: 2259-2271. DOI: 10.1111/pbi.13137
9. Satoh, H., Nishi, A., Yamashita, K., Takemoto, Y., Tanaka, Y., Hosaka, Y., Sakurai, A., Fujita, N., Nakamura, Y. (2003) Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm. *Plant Physiol.* **133** (3), 1111-1121. DOI: 10.1104/pp.103.021527
10. 海老原清 (2014) レジスタントスターチの栄養・生理機能、日本調理科学会誌 **47** (1), 49-52. DOI: 10.11402/cookeryscience.47.49
11. Mahlow, S., Orzechowski, S., Fettke, J. (2016) Starch phosphorylation: insights and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* **73** (14), 2753-2764. DOI: 10.1007/s00018-016-2248-4.
12. **Takeuchi, A.**, Akatsu, Y., Asahi, T., Okubo, Y., Ohnuma, M., Teramura, H., Tamura, K., Shimada, H. (2022) Procedure for the efficient acquisition of progeny seeds from crossed potato plants grafted onto tomato. *Plant Biotechnol.* (in press) DOI: 10.5511/plantbiotechnology.21.1119a
13. 朝日貴大 (2020) ジャガイモ・ヌルセグリガント変異体の取得。東京理科大学大学院修士論文
14. 大久保雪乃 (2021) *gbss4* アリル変異体ジャガイモのヌルセグリガント体の取得。東京理科大学大学院修士論文
15. 赤津優菜 (2021) 低アミロースジャガイモのヌルセグリガント変異体の作出。東京理科大学卒業論文