

2021年8月31日

国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所 森林バイオ研究センター  
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門



国立研究開発法人 森林研究・整備機構

森林総合研究所 森林バイオ研究センター

Forest Bio-Research Center



農研機構

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

## 世界初 スギのゲノム編集技術を開発

### —針葉樹の品種改良の期間を大幅に短縮する新技術として期待—

#### ポイント

- ・ 主要林業樹種である針葉樹において、狙った遺伝子領域だけを特異的に改変するゲノム編集技術を世界で初めて開発しました。
- ・ ゲノム編集の手法として、2020年度のノーベル化学賞に選ばれたCRISPR/Cas9システムをスギへ適用しました。
- ・ スギに導入した蛍光タンパク質遺伝子を標的としたゲノム編集を行い、「蛍光の消失」を指標としてCRISPR/Cas9システムの最適化を行いました。
- ・ スギの葉緑素合成に関わる内在遺伝子を標的にゲノム編集を行うことで、「葉が白くなる」という期待通りの形質改変を起こすことに成功しました。
- ・ 今後、ゲノム編集技術によるスギ等針葉樹の品種改良期間の大幅な短縮が期待されます。

#### 概要

林木の品種改良には交配と優良系統の選抜からなる地道な作業が必要で、世代の更新（次世代化）に10年単位の時間を要します。一方、人工DNA切断酵素を利用して、狙った遺伝子領域だけを特異的に改変する「ゲノム編集技術」は、育種期間を大幅に短縮する新技術として注目されてきましたが、針葉樹での利用はこれまでに報告されていませんでした。森林総合研究所森林バイオ研究センターは、森林総合研究所、農研機構、横浜市立大学と共同で、CRISPR/Cas9システムをスギに最適化することで、世界で初めて針葉樹のゲノム編集に成功しました。

本研究成果は、国際科学雑誌『Scientific Reports』オンライン版（8月10日付）に掲載されました。

#### お問い合わせ先

##### 【研究に関するお問い合わせ】

研究担当者：	森林総合研究所森林バイオ研究センター	主任研究員	七里吉彦
	森林総合研究所	室長	西口満
	農研機構生物機能利用研究部門	上級研究員	遠藤真咲

##### 【報道に関するお問い合わせ】

広報担当者： 森林総合研究所林木育種センター 育種企画課 課長補佐 橋本光司  
Tel: 0294-39-7002 E-mail: [ikusyukikakug@ffpri.affrc.go.jp](mailto:ikusyukikakug@ffpri.affrc.go.jp)

本資料は、林政記者クラブ、農林記者会、農政クラブ、茨城県政記者クラブ、日立市役所記者クラブ、農業技術クラブ、筑波研究学園都市記者会に配布しています。

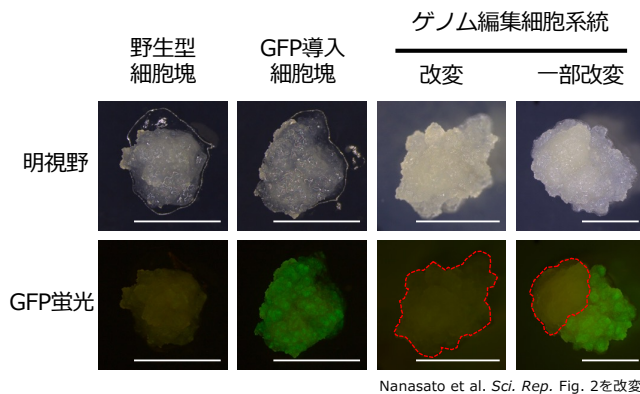
## 背景

林木育種は交配と優良個体の選抜を一連とする作業ですが、世代の更新（次世代化）には10年以上の長い歳月と多大な労力を必要とします。林木育種の期間を短縮するために、DNA マーカーを用いた優良系統の早期選抜など、ゲノム情報に基づいた新育種技術も開発されてきました。しかし、有用な形質（例えば、無花粉かつ初期成長量や材質がよいなど）を複数兼ね備えた系統を直接得るためには、新たな技術開発が必要となります。

DNA の狙った領域のみをピンポイントに改変するゲノム編集技術は、2012年に発表された CRISPR/Cas9 システム<sup>[1]</sup>により様々な生物へ爆発的に広まりました。そして、ゲノム編集は育種期間を大幅に短縮し、さらに複数の形質を同時に改変した系統を創出する革新的な技術として、林木への利用が期待されてきました。2015年には広葉樹のモデルであるポプラにおいてゲノム編集が報告されましたが、針葉樹においては報告がありませんでした。そこで研究チームは、我が国の主要な針葉樹であるスギにおいてゲノム編集を試みました。

## 成果

植物で一般的に用いられているアグロバクテリウム法<sup>[2]</sup>にて、CRISPR/Cas9 遺伝子ベクター<sup>[3]</sup>をスギ不定胚形成細胞<sup>[4]</sup>（以下、「細胞」とします）へ導入しました。その際、CRISPR/Cas9 システムがスギで効率的に機能するように、ベクター構造の最適化を試みました。最適化の検証方法として、あらかじめ緑色蛍光タンパク質（GFP）<sup>[5]</sup>を導入し蛍光を有するスギの遺伝子組換え細胞系統を用意し、GFP 遺伝子を標的としたゲノム編集による改変効率を調査する方法をとりました。GFP 遺伝子が改変されると蛍光が消えた細胞系統が得られます（図1）。ベクター構造を改良した結果、最大41.4%の効率で GFP 蛍光が消えた細胞系統が得られました。

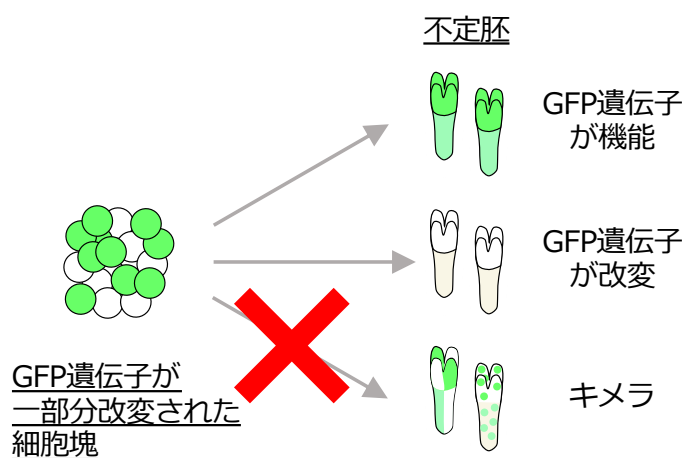
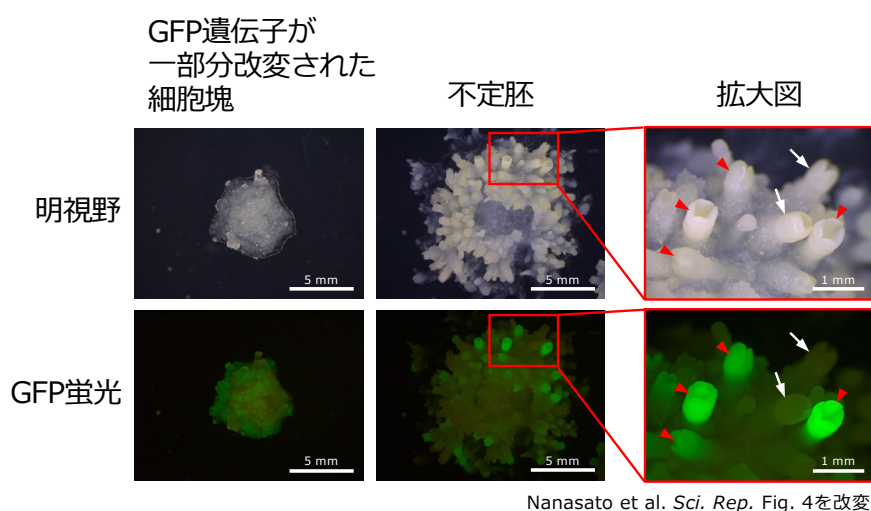


**図1 GFP導入細胞のゲノム編集**

赤破線で囲んだ部分はゲノム編集によりGFP遺伝子が改変し、蛍光を失った部分を示す。スケールバー：5 mm。

この調査から、ゲノム編集に成功した細胞系統において、(i) 全ての細胞でゲノム編集に成功して細胞塊全体から GFP 蛍光が消えている系統と、(ii) 細胞塊の一部のみでゲノム編集が起き、GFP 蛍光の消失が細胞塊の一部で見られる系統、という2つのパターンに分かれることがわかりました。もし、(ii) の細胞塊から個体再生をした個体が、ゲノム編集されている細胞とされていない細胞が混じった「キメラ」<sup>[6]</sup>であるならば、林木育

種への利用は難しくなります。そこで、細胞の一部でのみゲノム編集が起きている 6 つの細胞系統から不定胚<sup>[7]</sup>を誘導し、個々の GFP 遺伝子の塩基配列を解析しました。その結果、計 102 の胚のうちひとつを除いた 101 について単一の塩基配列を示すことが明らかとなりました。これは、一部分でのみゲノム編集が起きている細胞系統であっても、「キメラ」個体ができる確率は非常に低いことを示しています (図 2)。



**図2 ゲノム編集により細胞塊の一部のGFP遺伝子が改変された細胞系統から誘導した不定胚の調査**

GFP遺伝子が一部分改変された細胞塊から誘導した不定胚は、「GFP遺伝子が機能しているもの」と「GFP遺伝子が改変された(蛍光が消失した)もの」に分離し、GFP遺伝子が一部分で機能する「キメラ」が得られる割合は非常に低い(約1%)ことが明らかとなった。赤矢尻：GFP蛍光を発する不定胚、白矢印：GFP蛍光が消えた不定胚。

続いて、ゲノム編集がスギの内在遺伝子の改変にも利用できるかを検証するために、葉緑素の合成に関与するマグネシウムキラターゼ遺伝子を標的としたゲノム編集を試みました。本遺伝子を改変すると葉緑素の合成が阻害され白化した個体が得られるため、ゲノム編集の成否が容易に判別できます。その結果、白化個体を創り出すことに成功すると共に、標的領域の塩基配列が改変されていることも明らかとなりました（図 3）。本成果は針葉樹であるスギでゲノム編集に成功した世界初の成果となります。



系統	葉の表現型	標的領域(5'-3')	改変パターン
野生型	緑	GTGATTGACCCAAAAATTGGAGGGTTATGATAATGGGTGACCGTGG	-
#32-3_1	白	GTGATTGACC-----GTGG GTGATTGACCCAAAAATTG-AGGGTTATGATAATGGGTGACCGTGG	33塩基欠失 1塩基欠失
#11_1	白	GTGATTGACCCAAAAATTGGAG-----TGG GTGATTGACCCAAAAATTGGAGGGTTATGATAATG-----TGG	22塩基欠失 8塩基欠失
#6-2_1	白	GTGATTGACCCAAAAATTGGGAGGGTTATGATAATGGGTGACCGTG	1塩基挿入

Nanasato et al. *Sci. Rep.* Fig. 6を改変

**図3 ゲノム編集によりマグネシウムキラターゼ遺伝子を改変したスギ個体**  
 培地に置床して231日育成させた植物体。ゲノム編集に成功した個体の葉は白化し、成育に著しい遅延が生じた。また、標的領域において様々な塩基欠失や塩基挿入が見られた。  
 スケールバー：1 cm。

### 今後の展望

本研究により、CRISPR/Cas9システムによる針葉樹のゲノム編集が可能であることが示されました。ゲノム編集により意図したとおりの遺伝子改変ができたことは、優良系統に無花粉化の形質を付加するなど、ピンポイントかつ効率的に望ましい形質を付与できる可能性を示しています。今後、ゲノム編集技術は、スギの品種改良技術の選択肢のひとつとして利用が期待されます。現在、本手法を利用したスギの無花粉化、ゲノム編集効率をさらに良くする改良法の開発、そしてスギ以外の主要樹種へのゲノム編集技術を応用する研究を進めています。

## 用語の解説

- [1] CRISPR/Cas9システム：アーキア（古細菌）や真正細菌が持つ生体防御システムを利用したゲノム編集技術のひとつ。人工制限酵素として利用する化膿レンサ球菌由来の Cas9 と、標的 DNA を認識する分子としてガイド RNA と呼ばれる 100 bp ほどの短い RNA からなる。Cas9 とガイド RNA は複合体を形成し、標的 DNA 配列だけを特異的に切断することで、標的の遺伝子のみに変化を加えることができる。
- [2] アグロバクテリウム法：土壌細菌アグロバクテリウム（学名 *Rhizobium radiobacter*、旧学名 *Agrobacterium tumefaciens*）は植物細胞に感染して、自身が有する Ti プラスミドの一部、T-DNA と呼ばれる DNA 領域を植物細胞のゲノム DNA に挿入する性質がある。この性質を利用して、植物細胞へ任意の外来遺伝子を導入する方法をさす。
- [3] ベクター：「遺伝子の運び屋」という意味を持ち、ここではアグロバクテリウムに保持させる「バイナリーベクター」といわれる人工環状 DNA をさす。このバイナリーベクターには上記[2]の T-DNA 領域を含み、任意の遺伝子を T-DNA 上に連結させることで、アグロバクテリウムを介した植物への遺伝子導入が可能となる。
- [4] 不定胚形成細胞：未熟種子胚由来の培養細胞の一種。スギは本細胞から不定胚形成を経た個体再生が可能。また、不定胚形成細胞の形質転換技術も当センターで開発されている。
- [5] GFP：オワンクラゲから単離された緑色蛍光タンパク質（Green fluorescent protein）をさす。青色の光を照射すると緑色の蛍光を発する。
- [6] キメラ：同一の個体において遺伝的に異なる細胞が混じっている生物。ここでは、GFP 蛍光を有する細胞と GFP 蛍光が見られない細胞が混じっている状態をさす。
- [7] 不定胚：種子中にある胚と類似構造をもち、組織培養により人工的に発生させた胚をさす。スギを含む多くの針葉樹においては、上記[4]の不定胚形成細胞からのみ誘導が可能である。

## 論文情報

Yoshihiko Nanasato, Masafumi Mikami, Norihiro Futamura, Masaki Endo, Mitsuru Nishiguchi, Yasunori Ohmiya, Ken-ichi Konagaya, Toru Taniguchi "CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don)" *Scientific Reports*, (<https://doi.org/10.1038/s41598-021-95547-w>).

## 研究支援

本研究は、以下の支援を受けて行われました。

日本学術振興会 科学研究費 基盤 B (JP16H04942)、基盤 C (JP17K07854)