

Establishment of gene function evaluation system in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) (ハイブッシュブルーベリーにおける遺伝子機能評価系の確立)

果樹園芸学分野 大森真史

ブルーベリーは *Vaccinium* 属 *cyanococcus* 節に分類される小果樹であり、アントシアニン等の機能性成分が豊富なことから、需要は伸び続けている。中でも、ハイブッシュブルーベリー（以下ブルーベリー）（*V. corymbosum* L.）は食味が良く、世界的に栽培面積が増加している。近年、遺伝解析技術の進展によりブルーベリーにおいても重要形質を制御するゲノム領域が特定されているが、原因遺伝子の同定は進んでいない。また、いくつかの園芸作物でゲノム編集育種が実用化されているのに対し、ブルーベリーでの応用例は報告されていない。一般に、ブルーベリーなど果樹類は形質転換が困難であり、幼若相が長く機能解析に時間を要する。そこで本研究では、ゲノム編集技術をブルーベリーに適用し迅速な機能解析を可能にする早期開花系統の作出、また、効率的な再分化系・一過性発現系技術を開発することで、ブルーベリーにおける遺伝子機能評価系の確立を目指した。

第1章 ブルーベリーにおけるゲノム編集技術の最適化

CRISPR-Cas9 に代表されるゲノム編集技術は特定のゲノム領域を改変でき、様々な植物種へ応用されてきたが、ブルーベリーでは報告がない。さらに倍数性の高いブルーベリーに適用するには変異導入効率の向上が求められる。本章では、ブルーベリー‘O’Neal’（‘ON’）葉を用いた CRISPR-Cas9 ベクターの一過性発現により、ブルーベリーにおいてもゲノム編集が可能であることを明らかにした。次いで、gRNA と Cas9 の発現を駆動する 6 種のプロモーター配列の有効性を検証した。ブルーベリー内在性の *VcU6-7* および *VcUBIQUITIN3b* プロモーター配列を用いることで、gRNA と Cas9 発現量が飛躍的に上昇することを明らかにした。また、これらのプロモーター配列に置換した改変 CRISPR-Cas9 ベクターを用いることで、変異効率が向上することも明らかにした。

第2章 ゲノム編集によるブルーベリー早期開花系統の作出

本章ではゲノム編集によるブルーベリー早期開花系統の作出を目指した。まず、ターゲットとなる花成抑制遺伝子 *VcCENTRORADIALIS* (*VcCEN*) および *VcTERMINAL FLOWER 1* (*VcTFL1*) の発現解析を行った。両遺伝子は花芽形成期（7-10 月）に茎頂での発現が減少しており、また、不時的開花品種において発現が減少していたため、ブルーベリーにおいて花成を抑制することが示唆された。続いて、*VcCEN* を標的としブルーベリー‘Blue Muffin’（‘BM’）においてゲノム編集を行った。形質転換体では 1-10 bp の indel が検出され、*cen* 変異体は野生型と比較して栄養生長が抑制されていた。野生型では鉢上げから最初の開花までに 2-3 年を要したが、*cen* 変異体は鉢上げから 8-11 ヶ月後に最初の開花が観察された。野生型では 1 つの花芽に 10 前後の小花が形成されるが、変異体ではシュートの先端 1-2 芽に 1-2 の小花が形成され、休眠に入ることなく開花した。花成誘導に不適な長日高温条件（16 h 日長, 28°C）においては、野生型では開花は見られなかったが、変異体ではシュートの伸長と花発生が同時に生じ、栄養成長から生殖成長への急速な切り替わりが示唆された。草丈を 40 cm 以下に保つと、野生型、変異体ともに開花は見られなかった。花芽は野生型、変異体に関わらず約 60 cm 以上のシュートにのみ着生したことから、樹がある程度の大きさに達することが開花の必要条件であると考えられる。以上より、ブルーベリーにおける *VcCEN* の機能を明らかにするとともに、ゲノム編集によりブルーベリー早期開花系統の作出に成功した。この早期開花形質は、幼若相が長い果樹作物において育種サイクルの高速化や遺伝子の機能解析に非常に有用である。

第3章 ブルーベリー再分化能を制御する分子機構解明

in vitro における植物体再生システムの確立は、植物の遺伝子工学技術における最も重要な要素の1つである。しかし、多くの植物種において再分化効率は遺伝子型に依存しており、シュート再生能力を決定する重要な因子は未だ未解明である。ブルーベリーの外植片はサイトカイニンを含む培地で培養すると、顕著なカルス形成を伴わずに直接シュートが形成される。本現象を利用することで培養中に発生する体細胞突然変異を最小限に抑え、迅速に再分化個体を獲得できる可能性がある。本章ではハイブッシュブルーベリーのシュート再生メカニズムを解明するため、再分化能の異なる2品種（低再分化能‘ON’と高再分化能‘BM’）を材料に比較トランスクリプトーム解析を行った。その結果、オーキシン関連遺伝子の多くが品種間で発現変動しており、特にオーキシニングナル伝達遺伝子の発現が‘BM’で‘ON’よりも高かった。加えて、再分化関連遺伝子である *VcENHANCER OF SHOOT REGENERATION* (*VcESR*) および *VcWUSCHEL* (*VcWUS*) の発現は、外生オーキシンおよびオーキシン阻害剤の処理によりそれぞれ増加および減少した。このことから、オーキシンが *VcESR* や *VcWUS* の発現上昇を介して再分化を促進することが示唆された。一方、サイトカイニン関連遺伝子の発現は品種間で一貫した傾向は見られなかった。品種間で発現変動が認められた遺伝子の中には、細胞分裂に関与する *CYCLIN* 遺伝子や分裂組織形成に関与する転写因子 (*VcESR* および *VcWUS*) も存在した。‘BM’で高発現していた *VcESR* を過剰発現させたブルーベリーでは、外生植物ホルモン非存在条件で再分化が見られた。野生型と過剰発現体の発現比較により *VcESR* はオーキシンおよびサイトカイニン関連遺伝子を制御することで再分化を促進することが示唆された。今後、得られた知見を利用することで、再分化に適した品種の同定や *VcESR* 等を用いた植物体再生および形質転換技術の改良が期待できると考えられた。

第4章 果実における効率的な一過性過剰発現系の開発

果樹には開花結実しない長い幼若相が存在するため、果実形質に関与する遺伝子の機能評価には長い時間がかかる。本章では、収穫後の果実を用いた効率的な一過性発現系を確立した。まず、ブルーベリー果実をモデルとして、果実における一過性発現への適用性を検討した。ジェミニウイルス由来の複製系とダブルターミネーターを含むベクター「つくばシステム」を用いることで、果実における高レベルの外来遺伝子発現を誘導できた。pTKB3-EGFP ベクターをブルーベリー果実にアグロインフィルトレーションにより導入すると、4-6日目に GFP の一過性発現がピークに達した。アグロバクテリウム懸濁液は成熟果実に注入しやすく、GFP 蛍光は強かったが、未熟果実は果肉が密で硬いためアグロバクテリウム懸濁液が浸透せず、GFP はほとんど検出されなかった。次に、様々な果樹種（6科、17種、26品種）への一過性発現系の適用性を検証した結果、一部の果樹を除き多くの樹種の果実組織で GFP 蛍光が検出された。GFP 発現部位は果実種で異なっており、果実の内部構造が関連していると考えられた。また、様々な種や条件を比較することで一過性発現の成否を決定する要因を体系的に考察した。

本研究はブルーベリーにおいて遺伝子の迅速な評価システム構築のための技術基盤を提供した。第1, 2章ではゲノム編集技術を初めてブルーベリーに適用し、*VcCEN* 遺伝子への全アレル変異導入により、育種や機能解析に有用な早期開花を示すゲノム編集個体の作出に成功した。第3章では植物の形質転換におけるボトルネックとなる再分化について、分子メカニズムの解明を進め、品種特異的なオーキシン代謝制御がブルーベリーの再分化能に関連する可能性を示した。第4章では、農業上有用な果実形質に関与する遺伝子の機能解析を想定し、様々な果実における一過性発現系を確立した。本研究で得られた知見や開発した技術は、ブルーベリーの遺伝子機能評価の迅速化やゲノム編集育種の進展に寄与するものである。