

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	大森 真史
論文題目	Establishment of gene function evaluation system in highbush blueberry ( <i>Vaccinium corymbosum</i> 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)		
(論文内容の要旨)			
<p>ブルーベリーは<i>Vaccinium</i>属<i>cyanococcus</i>節に分類される小果樹であり，果実にアントシアニン等の機能性成分が豊富に含まれることから，世界的に生産と需要が伸び続けている．中でも，ハイブッシュブルーベリー（以下ブルーベリー）（<i>V. corymbosum</i> L.）は食味がよく，世界的に栽培面積が増加している．このような状況の中，ブルーベリーの育種のための遺伝学研究も盛んに行われており，重要形質を制御するゲノム領域が特定されてきた．しかしながら，ブルーベリーは，他の果樹類と同様に形質転換が困難であり，幼若相が長いため，遺伝子の機能解析が阻まれており，重要形質制御遺伝子の同定はほとんど達成されていない．本研究では，ブルーベリーにおける遺伝子機能評価系の確立のため，ブルーベリーにゲノム編集技術を適用して早期開花系統を作出するとともに，培養組織からの効率的な再分化系ならびに果実における一過性発現系を開発した．</p> <p>第1章ではブルーベリーにおけるゲノム編集技術の最適化を行った．倍数性の高いブルーベリーにゲノム編集技術を適用するためには変異導入効率の向上が求められる．本章では，CRISPR-Cas9ベクターの一過性発現により，gRNAとCas9の発現を駆動する6種類のプロモーター配列の有効性を検証した．その結果，ブルーベリー内在性プロモーターを使用することで，gRNAとCas9 mRNAの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を使用した改変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．</p> <p>第2章では，ブルーベリーにゲノム編集技術を適用して早期開花系統を作出した．まずターゲットとなる花成抑制遺伝子<i>VcCENTRORADIALIS</i> (<i>VcCEN</i>) および<i>VcTERMINAL FLOWER 1</i> (<i>VcTFL1</i>) の発現解析を行い，両遺伝子がブルーベリーにおいて花成を抑制することを示した．続いて，<i>VcCEN</i>を標的としブルーベリーのゲノム編集を行った．得られた形質転換体の<i>VcCEN</i>には1-10bpのindelが検出された．<i>VcCEN</i>全アレル破壊系統 (<i>cen</i>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開花までに2-3年を要したが，<i>cen</i>変異体は鉢上げから8-11ヶ月で開花した．加えて，<i>cen</i>変異体では年間を通して花芽形成が観察され3-12月にかけて連続的に開花した．変異体の早期・連続開花形質は，幼若期が長く一回開花性の果樹作物において育種の加速化や遺伝子の機能解析に非常に有用である．</p> <p>第3章ではブルーベリーの再分化能を制御する分子機構の解明を試みた．<i>in vitro</i>での植物体再生技術は遺伝子工学技術の基盤となるが，ブルーベリーにおける培養組織や培養細胞からのシュート再生メカニズムは未解明である．本章では再分化能の異なる2品種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，特にオーキシンシグナル伝達遺伝子の発現が，高再分化能品種において低再分化能品種よりも高かった．また，細胞分裂に関与する<i>CYCLIN</i>や分裂組織形成に関与する転写因子<i>VcENHANCER OF SHOOT REGENERATION</i> (<i>VcESR</i>) および<i>VcWUSCHEL</i> (<i>VcWUS</i>) の発現も高再分化能品種で高かった．オーキシン処理により<i>VcESR</i>および<i>VcWUS</i>の発現および再分化率が上昇したことから，オーキシンが<i>VcESR</i>や<i>VcWUS</i>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．<i>VcESR</i>過剰発現体を作成し，機能解析を行った結果，<i>VcESR</i>はオーキシン，サイトカイニン，および<i>CYCLIN</i>の発現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選抜</p>			

や形質転換技術の改良が期待できる。

第4章では果実における効率的な一過性過剰発現系を開発した。高レベルで外来遺伝子発現を誘導するため、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」の利用可能性を検討した。ブルーベリーを含む様々な果樹種（6科，17種，26品種）を用いて，この一過性発現系を適用したところ，16種の果実組織でGFP蛍光が検出され，本技術の汎用性の高さが示された。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示すことに成功した。さらにブルーベリーの着色に関連するとされるMYB転写因子の一過性発現により，果実の着色が促進されることを明らかにし，本システムが果実における機能解析の進展に資することを実証した。

以上，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加速化やゲノム編集育種の進展に寄与するものである。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

ブルーベリーを含む多くの果樹類は形質転換が困難であり、さらに幼若相も長く、遺伝子機能の解析に時間を要する。本研究は、ブルーベリーの遺伝子機能評価の効率化のために、ゲノム編集技術を利用して早期開花系統を作出し、また効率的な再分化系と果実における一過性発現系を確立した。評価すべき点は以下の通りである。

1. gRNAおよび*Cas9*の発現を制御するプロモーター6種を比較し、ブルーベリーのゲノム編集において最適なプロモーターを選抜した。選抜された内在性プロモーターの使用により、遺伝子編集効率が低い四倍体ハイブッシュブルーベリーにおける効率的なゲノム編集の技術基盤を整備した。
2. ゲノム編集により花成抑制遺伝子*VcCEN*の全アレル破壊系統の作出に初めて成功した。獲得した変異体は早期開花性を示し、育種や遺伝子機能評価の効率化に有効利用できることが示された。さらに果樹作物に特徴的にみられる*VcCEN*の開花に対する多面的効果を実証することにも初めて成功した。
3. ブルーベリーを含む果樹類の再分化効率には品種間差異が認められることが多いが、その機構は未解明である。本研究により、品種特異的なオーキシン代謝が再分化の品種間差異の一因であることが示された。さらに、*VcESR*を用いることで再分化および形質転換を効率化できることも示唆された。
4. 果実形質を制御する遺伝子の機能解析を行うための効率的な一過性発現系を開発した。続いてMYB転写因子遺伝子を用いた実験により、内生遺伝子の過剰発現による機能解析にこの一過性発現系が有効利用できることを実証した。さらに、この一過性発現系は、ブルーベリーを含む16種の果樹種の果実での利用が可能なことも示した。

以上のように、本研究は、多角的なアプローチから、倍数性で幼若相が長く、形質転換が困難なブルーベリーの遺伝子機能評価系を確立した。特に、世界に先駆けて有用なゲノム編集ブルーベリー個体を作出した点は高く評価できる。今回得られた知見や技術を統合することでブルーベリーの重要形質を支配する原因遺伝子の同定やその機能の迅速な評価、またゲノム編集による有用系統の作出を行うことができる。さらに、本研究は、果樹の形質転換のボトルネックとなる再分化に関する分子メカニズムについて新たな基礎知見を提供しており、果樹園芸学、育種学、植物生理学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和6年1月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 2024年 4月 1日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)