

	リ 737
氏 名	李 芙蓉
本 籍（国 籍）	中華人民共和国
学 位 の 種 類	博士（農学）
学 位 記 番 号	連研第 861 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 2 2 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
学位論文題目	Study on release of chimeras and efficient selection of editing mutants by CRISPR/ Cas9-mediated gene editing in apple （リンゴにおける CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集個体の効率的な選抜方法とキメラ解除に関する研究）
学位審査委員	主査 岩手大学教授 小森 貞男 副査 岩手大学准教授 川原田 泰之 副査 弘前大学准教授 田中 紀充 副査 山形大学准教授 渋谷 知暉

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

Gene editing is a technology that precisely modifies genes by targeting specific gene sequences and is expected to be applied to breeding that imparts new gene functions. To make genome editing a practical breeding technique for apple, it is essential to select mutants in the T<sub>0</sub> generation through transient expression. In this thesis, the CRISPR/Cas9 system was used to investigate the gene editing process targeting the visual marker gene phytoene desaturase (*PDS*) via *Agrobacterium*, using the apple cultivar Greensleeves.

In the experiment, transgenic plant “GS-1” was observed and analyzed. In the fifth month after the infection, mutant sequences were detected in green-transformed plants. *PDS* mutants were obtained from the sixth month after the infection. Mutant plants were obtained with an albino phenotype, and a pale green or variegated chimeric phenotype. Sequencing results showed that chimeric plants had a mixture of wild-type and mutant cells while albinos consist only of mutant cells. These chimeras can be released by 2-3 times of subculture. In the whole process of subculture, all mutant plants were detected with same mutation types, consistent with the mutations detected in the fifth month, no new mutations were detected.

An “Additional regeneration” step was performed on green transgenic plants that had been cultured for 12 months. During the “Additional regeneration” of green leaves, high frequency (89.8%) of mutant (albinos and chimera) plants were obtained, and new mutations were detected from the regenerated mutants that suggest the regeneration step may be a favorable factor for promoting NHEJ pathway-mediated mutations in gene editing.

The results of this study indicate the following possibilities. The “Additional regeneration” method can be used to obtain chimera-free genome-edited individuals efficiently in a short period of time,

even in the case of transient expression by the direct transfection method without using marker genes for cell selection. This finding promotes the practical application of genome editing in apple breeding.

(和訳)

ゲノム編集とは、特定の遺伝子配列をターゲットとして遺伝子を精密に改変する技術であり、新たな遺伝子機能を付与する育種への応用が期待されている。ゲノム編集をリンゴの育種技術として実用化するためには、一過性発現によって  $T_0$  世代で突然変異体を選抜することが不可欠である。そこで本論文では、CRISPR/Cas9 システムを用い、アグロバクテリウムを介して視覚マーカー遺伝子であるフィトエンデサチュラーゼ (*PDS*) を標的とした遺伝子編集プロセスを、リンゴ品種「グリーンスリーブス」を用いて調査した。

実験では、トランスジェニック植物 “GS-1” を観察し、分析した。感染後 5 ヶ月目に、変異配列が緑色形質転換植物から検出された。*PDS* 突然変異体は感染後 6 ヶ月目に得られた。変異個体はアルビノ表現型、淡緑色または多彩なキメラ表現型で得られた。シークエンシングの結果、キメラ植物は野生型と変異型の細胞が混在しているのに対し、アルビノは変異型細胞のみで構成されていた。これらのキメラは 2-3 回の継代培養によって解除することができた。継代培養の全過程において、すべての変異植物は同じ変異型で検出され、5 ヶ月目に検出された変異と一致し、新たな変異は検出されなかった。

12 ヶ月間培養した緑色トランスジェニック植物に “Additional regeneration” を行った。緑葉の “Additional regeneration” により、高い頻度 (89.8%) で変異体 (アルビノとキメラ) が得られ、再生された変異体から新たな変異が検出された。このことは、再生ステップが遺伝子編集において NHEJ 経路を介した変異を促進するのに有利な因子である可能性を示唆している。

この研究の結果から、細胞選抜用のマーカー遺伝子を用いない直接導入法による一過的な発現の場合でも、“Additional regeneration” 法を用いることで、効率よくキメラが解除されたゲノム編集個体を短期間で獲得できることが示唆された。この知見はリンゴ育種におけるゲノム編集の実用化を推進すると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

CRISPR/Cas9 等を用いたゲノム編集技術は特定の遺伝子配列を標的として正確に遺伝子の改変を行う技術であり、ゲノム中に DNA 配列を挿入せずに遺伝子の改変が行える手法で、果樹においても研究が進められている。遺伝的に雑駁なリンゴ等の果樹でゲノム編集を実用的な育種技術とするためには直接導入法による一過的な発現で変異体を獲得することが必須となる。そこで本研究では、リンゴ栽培品種 ‘Greensleeves’ (‘James Grieve’ × ‘Golden Delicious’) を用いて、視覚マーカーとして有効なフィトエンデサチュラーゼ (*PDS*) を標的として *Agrobacterium* 法を経由した CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を実施した。この実験ではゲノム編集個体の出現過程を詳細に調査し、効率的な変異細胞の選抜方法およびキメラ解除の方法を確立し、ゲノム編集の育種への実用化を促進することを目的とした。

実験の結果、*PDS* 遺伝子が改変されたアルビノシュートは形質転換開始後の 6 か月目に株元から出現した。アルビノ個体以外にも斑入りや pale green のシュートも出現した。シークエンスの結果、斑入りの個体は変異細胞 (-1bp、-2bp) と野生型細胞の区分キメラ、pale green

個体は変異細胞（-1bp、-2bp）と野生型細胞のモザイクであることが推察された。この-1bp および-2bp について染色体上の SNPs を用いて由来を確認したところ、-1bp は‘James Grieve’、-2bp は‘Golden Delicious’に由来する染色体上に生じた変異であることが判明した。この-1bp、-2bp は 26 か月の継代後も確認され、継代では新規の変異は発生しないことが推察された。

緑色の形質転換シュートから葉切片を採取し、培養によりシュートを誘導する“Additional regeneration”法を実施したところ、約 90%の高頻度でアルビノシュートが出現した。カナマイシン無添加培地でも優先的にゲノム編集個体が発生することから、選抜マーカーを用いない直接導入法でもキメラが解除されたゲノム編集個体が効率よく獲得できる可能性が示された。また、獲得したシュートの *PDS* 遺伝子部位をシーケンスした結果、既存の-1bp、-2bp 変異以外の-3bp、-7bp、-8bp 変異が確認された。このことから、葉切片からシュートが形成される過程でゲノム編集が誘導されることが推察された。

研究の結果から直接導入法による一過的な発現によってキメラ状のシュートを誘導したのちに“Additional regeneration”法でシュートを誘導すればキメラ解除されたゲノム編集個体を短期間で獲得できる可能性がある。“Additional regeneration”法の開発により、ゲノム編集技術の育種への実用化が促進されたと考えられる。

以上より、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

- 1 . Li, F., N. Kawato, H. Sato, Y. Kawaharada, M. Henmi, A. Shinoda, T. Hasunuma, C. Nishitani, Y. Osakabe, K. Osakabe, M. Wada, N. Tanaka, M. Watanabe, C. Zhang, S. Deng and S. Komori (2023).

Release of chimeras and efficient selection of editing mutants by CRISPR/Cas9-mediated gene editing in apple. *Scientia Horticulturae* 316: 112011