

《様式B》

研究テーマ	世界市場に向けた香気成分増強「茶」の原料となるゲノム編集茶樹の育成			
研究責任者	所属機関名	株式会社グリーン・インサイト		
	官職又は役職	代表取締役		
	氏 名	小林裕和	メールアドレス	kobayashi@ginsight-jpn.com
共同研究者	所属機関名	静岡県立大学・大学院食品栄養環境科学研究所		
	官職又は役職	准教授		
	氏 名	田村謙太郎		
	官職又は役職	茶学総合研究センター長		
	氏 名	中村順行		

(令和5年度募集) 第36回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)

※ 産業技術として社会実装の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

実施内容および成果

植物のゲノム編集では、培養細胞へのゲノム編集コンストラクトの導入とその再分化と言う方法論が一般的である。しかしながら、チャの再分化は極めて困難であり、茶樹への再分化にまで至っているゲノム編集の成功例はない。また、カテキンなどの抗菌成分がアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 法の適用を困難にする。したがって、腋芽や発芽種子の茎頂分裂組織を標的とする *in planta* 法を採用し、DNA 導入にはパーティクルガン法を用いた。しかしながら、茎頂分裂組織における分裂細胞は内層のため DNA の送達が難しい。そこで、細胞内で自己増殖するジェミニウイルスに注目した。このウイルスの再生能を削除し、自律的 DNA 複製およびその隣接細胞への移動能を維持したジェミニウイルス脱構築型ゲノム・ベクターを作製した。一連の方法論を「*in planta* ウイルス脱構築ベクター法」と命名し、DNA の導入とその発現の確認において、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP) を用いて極めて良好な結果を得た。

本助成研究においては、茶香気成分糖体から香気を発生するグリコシダーゼであるプリメベロシダーゼ (PD) に注目し、その遺伝子をゲノム編集によりノックアウト (KO) する。ゲノム編集においては、編集箇所の作案および想定外編集 (off-targets) の確認作業に正確なゲノム情報が不可欠となる。チャの核ゲノムは、ハプロイド (一倍体) で 3.1 Gb (3.1×10^9 塩基) と報告されている。日本におけるチャ栽培面積の約 70% を占める主要品種「やぶきた」については、ゲノムの詳細が解明されていない。そこで、最新鋭の次世代シーケンサー PacBio Revio による塩基配列決定、*de novo* アセンブリ、染色体への scaffolding を実施した。チャは他家受粉のためその種子胚は「やぶきた」とその近隣他品種とのヘテロ接合となっている。「*in planta* ウイルス脱構築ベクター法」は発芽種子の茎頂分裂組織にも適用するため、近隣他品種のゲノム解析も行い品種間多型を解明した。併せて、発現遺伝子を特定するために RNA-seq を行った。これらの結果、PD 遺伝子の KO 作出に対しては、1 遺伝子座に注目すればよいことが明らかと

なり、それに従いゲノム編集を推進している。

出願準備中

発明者: 小林裕和, 関 理紗, 田村謙太郎, 中村順行

発明の名称: 難形質転換農作物のゲノム編集

出願人: 株式会社グリーン・インサイト, 静岡県立大学

概要: 「*in planta* ウイルス脱構築ベクター法」により難形質転換農作物のゲノム編集を可能とする。

今後予想される効果

チャの「*in planta* ウイルス脱構築ベクター法」は、PD 遺伝子の KO による香気成分封じ込めに留まらず、以下の遺伝子の KO により様々な形質のチャへの付与が可能となる。

カフェイン合成経路酵素 (CS, MXT) → 低カフェイン
カフェイン脱メチル化酵素 (NDMs) → 高カフェイン
グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) → 高 GABA
カテキングレート化酵素 (ECGT) → 免疫増強
脱緑化制御タンパク質 (SUGs) → 成長・糖分増強
アブシジン酸非感受性 (ABIs) → 乾燥耐性

2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で 5 ページ以内)

背景・概要

茶の世界市場は 9 兆円と見積もられるが、日本の生産量はその 1.3%に過ぎずさらに減少傾向にある。東海地域には茶所が多いが、これらは山間地を中心としており、摘採の機械化は難しい。すなわち、価格競争において勝ち目は少なく、品質や機能性などにおいて差別化を図るべきである。しかしながら、急須は世界的に馴染まず、またティーバッグ煎茶は美味しさに欠ける。そこで、ワイン感覚の高級ボトル茶が世界に向けた主力商品になり得る。(1) 茶の香気成分は、糖と香気成分の結合体 (配糖体) として茶葉に閉じ込められており、香気成分と糖の結合を切断する酵素グリコシダーゼの働きにより発生する (図 1)。(2) この酵素の生葉における機能を停止させることにより、より多くの香気成分を配糖体として閉じ込めることができる (図 1：工程 1)。(3) 香気成分配糖体は、製茶工程を通して残存するため、ボトル詰め前にこの種のグリコシダーゼを添加すれば、より高濃度の香気成分が放出される (図 1：工程 2)。酵素添加については、食品添加物の承認を受けたグリコシダーゼを用いる。したがって、香気成分配糖体を高含有する茶葉の生産「工程 1」が新規な研究開発課題となる。

2019 年より日本において、ノックアウト (KO) 型ゲノム編集作物は、厚生労働省への届出のみで生産・販売が可能となった。香気成分配糖体高蓄積チャの作出にこの技術を活用する。KO の対象として、茶香気成分配糖体のグリコシダーゼであるプリメベロシダーゼ (PD) 遺伝子に注目した。チャにおいてゲノム編集の成功例はなく、これまでチャへの遺伝子導入は不定胚 (組織培養により生じた未分化細胞) に行われているが、この再分化は容易ではない。そこで、本助成研究においては、発芽分裂組織 (メリステム) に KO 型ゲノム編集 DNA 配列 (コンストラクト) を導入し、Cas9 やガイド RNA (gRNA) を一過性発現させるゲノム編集技術を開発した。

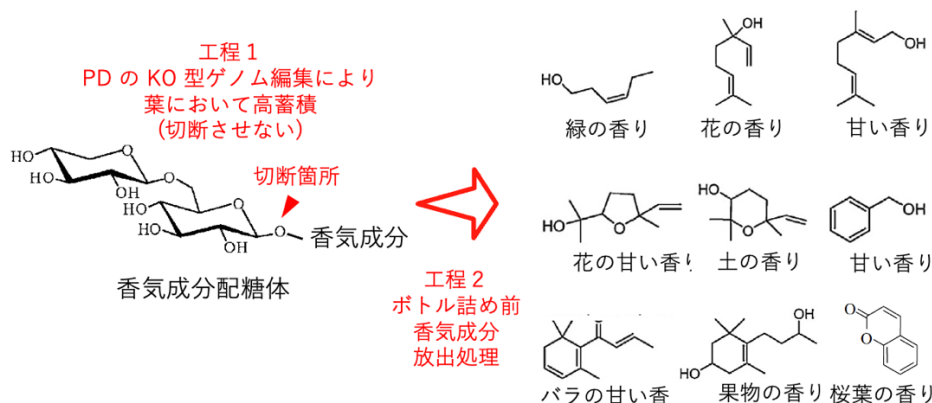


図 1 香気成分に特化した高級ボトル茶の製造工程

「工程 1」が新規な技術となる。これを茶樹のゲノム編集により実施する。

難形質転換植物であるチャのゲノム編集を可能に

農作物には、生産性、病虫害抵抗性、環境耐性などの形質に加えて、可食部の機能性や香味性など高い商品価値が求められる。これらの形質は、変異誘導、交雑、および選抜による品種改良によりもたらされてきた。2012 年に CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術が発表され、各生物の全遺伝情報 (ゲノム) 上の意図した部位 (遺伝子座) の改変が可能になった。この過程において、gRNA-Cas9 コンストラクト DNA の細胞内への送達が必要となる。引き続き、ゲノム編集が付された細胞を増殖させて、新しい植物体を再生しなければならない。したがって、この技術には形質転換が不可欠となる。言い換えると、この技術は形質転換が困難なチャ、コーヒー、およびカカオなどの嗜好料木本および果樹 (柑橘類、モモ、サクランボなど) への適用が難しい (図 2)。嗜好料木本を用いた細胞レベルのゲノム編集の報告例はあるものの、植物体への再生までの観察結果は見出せない。そこで、腋芽 (脇芽) や発芽種子の茎頂分裂組織への *in planta* DNA 送達とその解決手段となると考えた。これには、パーティクルガン法およびアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 法が挙げられるが (図 2)、チャの茎頂分裂組織は 2 層の外鞘細胞で覆われており、パーティクルガンによる分裂組織への DNA 送達の障害となる (図 3)。また、チャにおいては、内在性のカテキン類やカフェインが抗菌性を示し、アグロバクテリウムの感染を阻害する。したがって、アグロバクテリウムによる DNA 送達も容易とはいえない。安定形質転換においては、導入した gRNA-Cas9 コンストラクト DNA が細胞内の染色体 DNA (ゲノム) に

取り込まれ、そのゲノムが子孫に受け継がれる場合は遺伝子組換え農作物に該当する。本法においては、*in planta* 法でDNAを導入するが、導入されたコンストラクトは子孫に引き継がれず、一過性発現となる (図2)。これらの利点を生かし、さらに改良を加えて、「*in planta* ウイルス脱構築ベクター法」を開発した。

安定形質転換可能植物

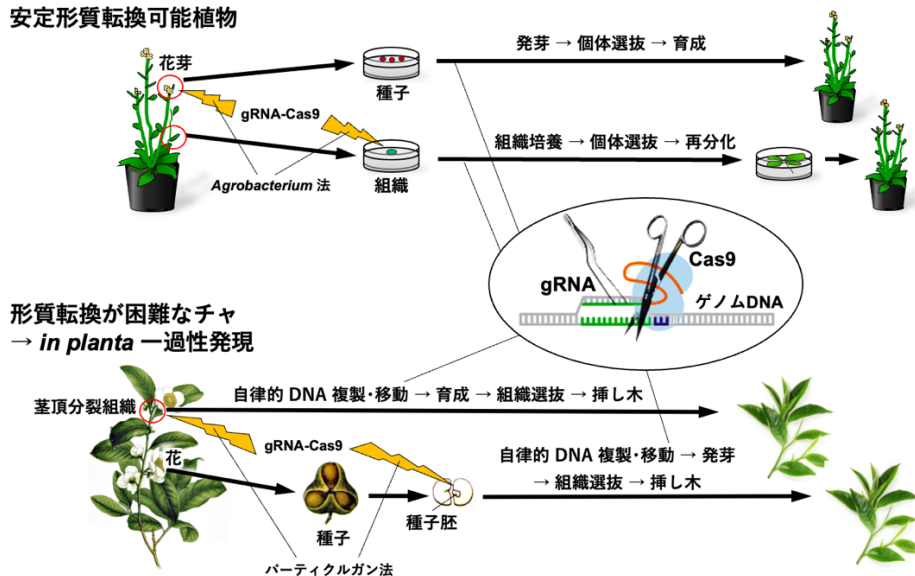
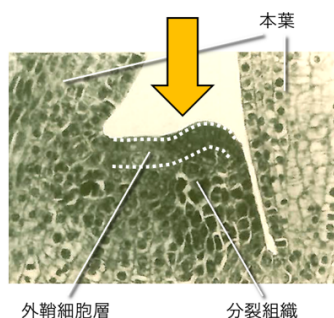


図2 ゲノム編集の方法論

安定形質転換が困難な植物に対しては、CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集コンストラクト (gRNA-Cas9) を腋芽や発芽種子の茎頂分裂組織に導入し (*in planta*)、これらの一過性発現によりゲノム編集を実施する。

A チャの茎頂分裂組織の構造



B パーティクルガン (Biolistic PDS-1000)

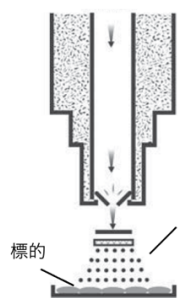
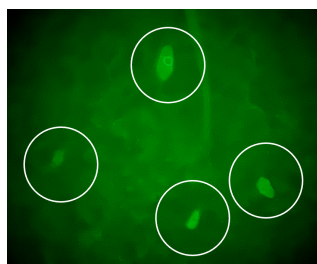


図3 パーティクルガンの限界

2層の外鞘細胞⁽¹⁾ が分裂組織へのパーティクル (金粒子) の送達の障壁となる。

上記の問題を克服するために、ジェミニウイルスに注目した。これは DNA ウイルスであり、植物病原ウイルスの多数派である RNA ウイルスに比べて、遺伝子工学的手法において扱いやすい。また、ジェミニウイルスにはチャと同じ *Camellia* 属のツバキに感染するものがあり (*Camellia* 属萎黄矮性病因ジェミニウイルス: CaCDaV⁽²⁾)、この感染性が DNA の宿主細胞内への送達、細胞内での増殖、隣接細胞への移行に活用できると考えた。そこで、この感染性や増殖性は保持し、ウイルスの自己再生能を除去した脱構築型ゲノムを完全 DNA 合成により作製した。この系を「ジェミニウイルス脱構築型ゲノムを用いた細胞内 DNA 自立的複製・移動・一過性発現系 (略称: ウイルス脱構築ベクター法)」と呼ぶことにし、全体を「*in planta* ウイルス脱構築ベクター法」と命名した。これに gRNA-Cas9 コンストラクトを乗せ、パーティクルガン法 (図2) により分裂組織表層 (外鞘細胞) に導入する。導入された DNA は表層細胞にて複製し、増殖した DNA はさらに隣接する分裂組織細胞に移行する。そして、そこで gRNA や Cas9 を発現しゲノム編集が進行する。この方法論を独自に開発した。なお、ゲノム上の目的部位以外への変異導入 (off-target) を防ぐ各種 Cas が発表されているが、これらはゲノム編集効率を低下させるため、本助成研究においては除外した。DNA の導入とその発現を確認する目的で、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP) を用い、「*in planta* ウイルス脱構築ベクター法」により、極めて良好な結果を得た (図4)。

図4 「*in planta* ウイルス脱構築ベクター法」による自律的 DNA 複製・遺伝子発現



パーティクルガンにより GFP 連結ウイルス脱構築ベクターを導入後、4 日目に蛍光顕微鏡にて観察した。GFP が発現し、ER を含め細胞内膜系への局在が認められる。4 日目以降に発現が強くなることから、自律的 DNA 複製が作動していると考えられる。脱構築 CaCDaV ゲノムを用いない場合は、GFP 蛍光は全く観察されなかった。

R. Seki, K. Tamura, Y. Nakamura, S. Sugano, and H. Kobayashi: Unlocking efficient transgene expression in *Camellia sinensis* via a deconstructed *Camellia* geminivirus. 投稿準備中

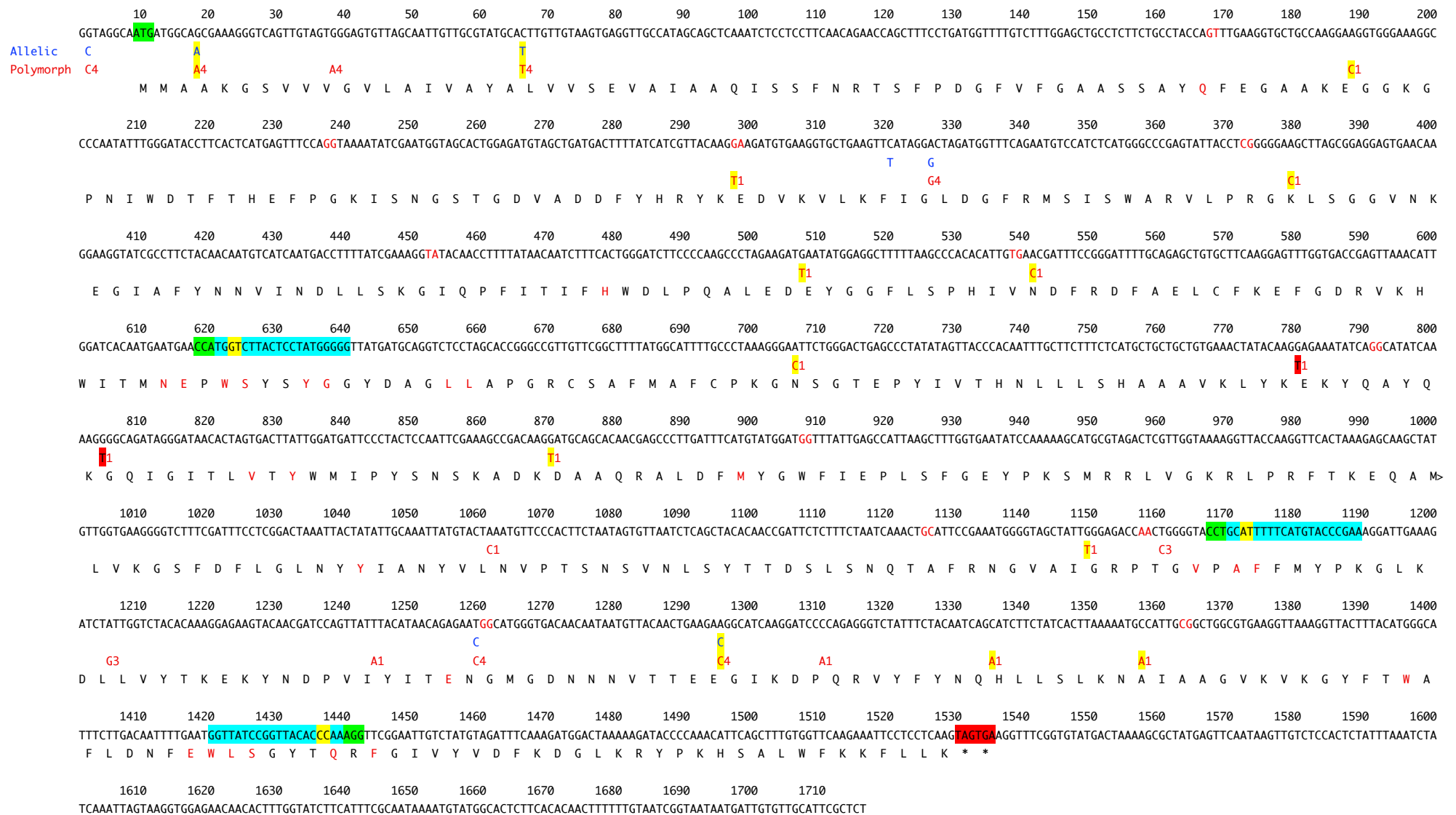
モデル植物より大きく複雑なチャのゲノム

核ハプロイド (一倍体) ゲノムは、モデル植物として研究が進んでいるシロイヌナズナが 125 Mb (1.25×10^8 塩基)、およびイネが 400 Mb (4×10^8 塩基) である。これらに対し、チャは 3.1 Gb (3.1×10^9 塩基) と 1 桁大きく。さらに、シロイヌナズナやイネがホモ接合であるのに対し、チャはヘテロ接合であり、これらの観点からチャ・ゲノムはヒト・ゲノムと酷似するが、染色体は 15 対である。

ゲノム編集においては、3.1 Gb のゲノム上の 1 点を狙って変異を導入する。すなわち、(1) 類似配列を標的 (off-target) としないこと、(2) ゲノム編集後に off-targets がないかの確認が求められる。これらのためには、3.1 Gb のゲノム情報を正確に把握しておかなければならない。日本におけるチャ栽培面積の約 70% を占める主要品種「やぶきた」については、ゲノム情報の全貌が解明されていなかった。ゲノム編集においては、発芽種子茎頂分裂組織も処理対象とし、チャは他家受粉のため分裂組織の基となる種子胚は他品種との雑種である。そこで、「やぶきた」に加えて近隣茶畑の代表的な 4 品種「つゆひかり」、「さやまかおり」、「さえみどり」、および在来品種のゲノムも解析した。「やぶきた」については、最新鋭の次世代シーケンサー PacBio Revio により 71 Gb のデータを取得した (深度: $71 / 3.1 = 22.9$)。その他の品種については、Illumina NovaSeq 6000 により 155 Gb のデータを取得した (深度: $155 / 3.1 / 4 = 12.5$)。形質改良においては酵素を含むタンパク質に注目するが、その中で香気成分の封じ込めには香気成分糖化酵素プリメベロシダーゼ (PD) に着目する。1 つの酵素に対して複数の遺伝子 (パラログ) が存在する場合は、どのパラログが発現しているかの情報が必要となる。したがって、発現解析 (RNA-seq) も実施した。RNA-seq では「やぶきた」を対象にし、MGI Tech DNBSEQ-T7 により 7,400 万ペアリードを得た。解析には、Apple M2 チップ (8 コア CPU、24 GB メモリー) を搭載した Macintosh および遺伝学研究所スーパーコンピュータを用いた。後者では、ノード当たり CPU 8 コア、メモリー 128 GB の計算資源を最大 8 ノード用いて並列計算を行った。Macintosh 上では Geneious Prime (version 2026.0.2) および UNIX コマンドライン環境、スーパーコンピュータ上では Linux コマンドライン環境を使用した。

チャ PD 遺伝子は第 3 染色体の遺伝子番号 03g17878 にコードされていた。また、ゲノム上で 1 遺伝子が発現しており、他に機能しているパラログは存在しなかった。この遺伝子の特徴は、タンパク質コード領域が 33 kb に渡り 13 エクソンに分散していた。転写産物はポリ A テールを除き 1,716 塩基であり、573 アミノ酸をコードしていた。転写産物において、対立遺伝子間での多型は 7 箇所であり、そのうち 4 箇所がサイレント変異、3 箇所がミスセンス変異であった。4 品種に対するこの遺伝子座の品種間多型は 24 箇所存在し、9 箇所がサイレント変異、13 箇所がミスセンス変異、2 箇所がナンセンス変異であった。2 箇所のナンセンス変異は 1 品種のみであり、しかも対立遺伝子の片方のみの変異であると推定された。

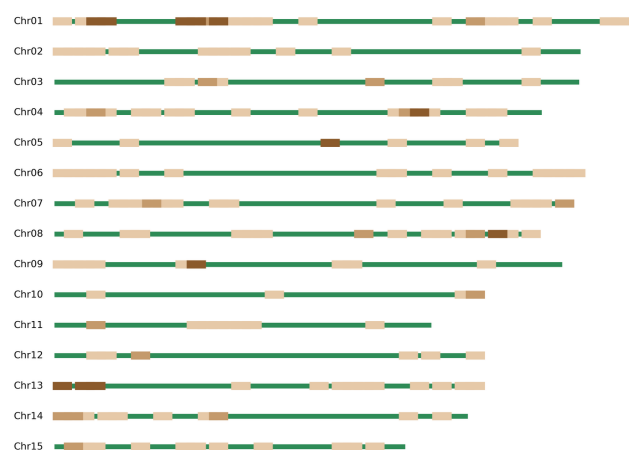
PD の X 線回折による 3D 構造⁽³⁾ から導かれる酵素反応中心のアミノ酸の情報を用い、さらに PD 転写領域の解析結果および Doench 活性⁽⁴⁾ から、CRISPR/Cas9 ゲノム編集導入箇所を設計した。加えて、これら導入候補箇所塩基配列をチャ品種「やぶきた」の全ゲノム情報に参照 (blastn) し、NGG (PAM 配列) 隣接箇所の off-target risk を計算した。これらの解析に基づき PD 遺伝子内のゲノム編集導入箇所を特定した (図 5)。



「やぶきた」の香気成分生成遺伝資源はアッサム品種由来

本助成研究は「やぶきた」の香気成分を封じ込め、飲用時に発散させる技術の開発にある。「やぶきた」は、旨味と渋みのバランスに加えて「爽やかな香り」が売りであり、その人気は高く日本の最広域栽培品種の地位を得た。現在では、「やぶきた」を親とする交配品種が多数育成されているが、「爽やかな香り」の源として、紅茶に用いるアッサム品種の血統が入っているのではないかと疑った。GenBank (NCBI: National Center for Biotechnology Information) に加え、China National Center for Bioinformation (CNCB) および Tea Plant Information Archive (TPIA) にアッサム品種のゲノム情報を求めた。その中に、高いフレーバーを持つことで知られている品種 ATK-1 のゲノム情報が見つかり、これとの相同性を minimap2⁽⁵⁾ (version 2.26) により解析した。5 Mb bin (区間) で比較した場合、「やぶきた」には、基準品種よりもアッサム品種 ATK-1 と高い相同性を有する染色体領域があることを見出した (図6)。「やぶきた」に残る ATK-1 との 100%相同領域がゲノムの約 1%に存在した。“やぶきた × アッサム” 後、後世代ではアッサムとは交雑しなかったとすると、1 世代でアッサム由来の遺伝資源は 50%ずつ減っていくため、1%に至るのは 6.64 世代目となる。すなわち、6~7 世代前にアッサム品種の血統が入っている。杉山彦三郎による「やぶきた」の選抜は 1908 年とされている⁽⁶⁾。一方、アッサム品種を含む多くのチャ品種が、杉山と交流があった多田元吉により 1876 年に日本に導入されている⁽⁶⁾。したがって、6~7 世代前のアッサム品種との交雑は、日本への導入以前に各品種が混在している雲南・インド境界域において進んだと考えるのが素直である。

A アッサム品種：ATK-1



B 基準品種：蜀茶早 (Shuchazao)

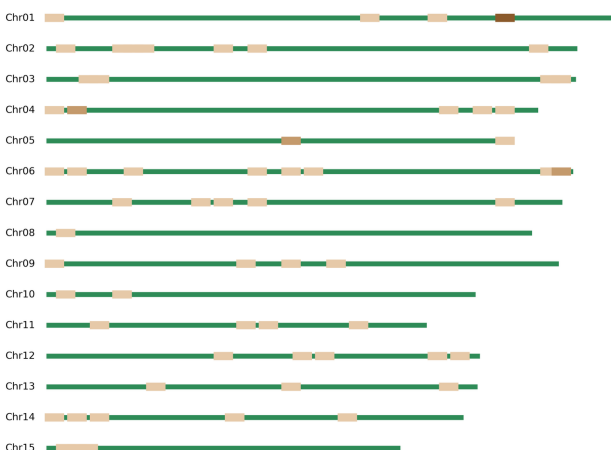


図6 「やぶきた」染色体における他品種由来領域

「やぶきた」の 15 本の染色体 (Chr01~Chr15) を示す。緑色、濃茶色、茶色、薄茶色は、それぞれ、「やぶきた」と 50~60%相同、60~65%相同、65%以上相同の領域に対応する。この解析では 5 Mb (百万塩基) 単位で相同性を評価しており、このように長い領域で比べると、「やぶきた」は基準群よりアッサム品種に近い。このことは、比較的近い過去にアッサム品種との交雑が生じたことを物語る。

H. Kobayashi, R. Seki, Y. Nakamura, and K. Tamura: Allelic polymorphisms and chromosomal lineages of the major Japanese tea (*Camellia sinensis*) cultivar Yabukita. 投稿準備中

引用文献

1. 中山 仰: チャの形態. 茶の栽培と利用加工 (編: 岩浅 潔), 養賢堂, pp. 19-36, 1994
2. S. Zhang, P. Shen, M. Li, X. Tian, C. Zhou, and M. Cao: Discovery of a novel geminivirus associated with *Camellia* chlorotic dwarf disease. *Arch. Virol.*, 163, 1709–1712, 2018. doi:10.1007/s00705-018-3780-3
3. H. Saino, T. Shimizu, J. Hiratake, T. Nakatsu, H. Kato, and K. Sakat, and M. Mizutani: Crystal structures of β -primeverosidase in complex with disaccharide amidine inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 289, 16826–16834, 2014. doi:10.1074/jbc.M114.553271
4. J.G Doench, E. Hartenian, D.B Graham, Z. Tothova, M. Hegde, I. Smith, M. Sullender, B.L Ebert, R.J Xavier, and D.E Root: Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat. Biotechnol.*, 32, 1262–1267, 2014. doi:10.1038/nbt.3026
5. H. Li: New strategies to improve minimap2 alignment accuracy. *Bioinform.*, 37, 4572–4574, 2021. doi:10.1093/bioinformatics/btab705
6. 中村順行: 「やぶきた」はミステリアス. やぶきたのすべて (編: 静岡産業大学 O-CHA 学研究センター). 共立印刷, p. 87-105, 2007.