

氏名	李 貞恩
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 乙 第 2 8 7 5 号
学位授与年月日	平成 3 0 年 4 月 3 0 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Utilization of High GABA Tomato via CRISPR/Cas9 for Hybrid Breeding (CRISPR/Cas9により得られたGABA高蓄積トマトの育種利用に関する研究)
主査	筑波大学 教授 博士 (農学) 江面 浩
副査	筑波大学 教授 博士 (農学) 松倉 千昭
副査	筑波大学 准教授 博士 (理学) 小野 道之
副査	筑波大学 准教授 博士 (農学) 福田 直也

論 文 の 要 旨

審査対象論文は、ゲノム編集技術の一代雑種育種への応用の可能性を検証し、育種学分野への波及効果について考察を行うものである。

先行研究では、ゲノム編集技術を利用してγ-アミノ酪酸（GABA）高蓄積を示す 4 つの独立した系統が実験用矮性品種 ‘Micro-Tom’にて作出されていた（遺伝型：1 塩基挿入型、53 塩基欠損型、4 塩基欠損型、6 塩基欠損 1 塩基挿入型）。著者は、これら 4 つの系統が一代雑種の育種親として利用可能であるか検証した。一代雑種の育種親として利用する場合、ゲノム編集技術により創出した変異が遺伝的に安定であること、および優性形質として発現することが重要である。そこで、審査対象論文の第一章ではゲノム編集技術で創出した変異の育種利用に関する課題を俯瞰し、第二章で創出変異の遺伝的安定性を検証し、第三章で優性形質として発現するかを実証した。

著者は、先行研究において作出された 4 つの系統の遺伝型をゲノム編集後第 2 世代とゲノム編集後第 3 世代について dCAPS 法とシーケンサー法を用いて解析した。その結果、2 世代にわたり変異が安定して維持されていることが示された。次に、第 2 世代における緑熟果実の GABA 合成遺伝子の発現と緑熟果実と赤熟果実の GABA 含量を調査した。その結果、野生型よりも遺伝子発現が低下する傾向にある一方で、GABA 含量は増加していたことが示された。続いて、第 3 世代の赤熟果実における GABA 含量も測定した。その結果、野生型よりも GABA 含量が上昇することが示された。最後に、果実の縦径、横径、新鮮重と植物個体の高さを調査した。第 2 世代と第 3 世代の 1 塩基挿入型、53 塩基欠損型において、野生型よりも果実の横径と新鮮重がわずかに減少する傾向であったが、果実の縦径および植物個体の高さには有意な差がないことが示された。4 塩基欠損型、6 塩基欠損 1 塩基挿入型を持つ系統においては、いずれの形質についても野生型と同程度であったことが示された。先行研究の結果と本研究の結果を合わせて、著者はゲノム編集後第 3 世代まで変異が安定的に遺伝し、GABA 高蓄積の表現型は安定的に現れると評価した。

著者は GABA 合成遺伝子へ導入した変異による形質が優性であるかについて実証試験した。ゲノム編集第 3 世代で GABA 蓄積が安定していた ‘Micro-Tom’ 系統（1 塩基挿入型、53 塩基欠損型）と食用大型品

種‘愛知ファースト’（野生型）と交雑し F₁ 系統を作出し、評価した（F₁-野生型、F₁-1 塩基挿入型、F₁-53 塩基欠損）。dCAPS 解析法とシーケンス法により、作出した全ての F₁ 系統において変異がヘテロで導入されていることが示された。次に、GABA 合成遺伝子の発現を調査した。その結果、GABA 合成遺伝子の発現は緑熟期で最も高く、催色期、成熟期と徐々に低下することが観察された。全ての系統で同じ傾向が観察されたが、緑熟期において、F₁-1 塩基挿入型の GABA 合成遺伝子の発現が F₁-野生型よりも有意に低いことが示された。続いて、GABA 合成酵素の活性を調査した。その結果、変異導入型の GABA 合成酵素活性は、野生型よりも 2 倍程度有意に上昇していたことが示された。さらに、緑熟期、催色期、赤熟期それぞれの GABA 含量を計測した。その結果、緑熟期においては、F₁-野生型よりも 2.1 倍から 2.3 倍の上昇が、催色期では、2.1 倍から 2.5 倍の上昇が、赤熟期では、3.0 倍から 3.6 倍の上昇が認められた。最後に、果実の縦径、横径、新鮮重、着色、遊離アミノ酸含量、ベータカロテン含量、リコペン含量、総可溶性固形物含量および滴定酸度を測定した。その結果、総可溶性固形物含量については、変異挿入型は野生型よりもわずかに低く、滴定酸度については、F₁-53 塩基欠損型は F₁-1 塩基挿入型と F₁-野生型よりも高いことが示された。総可溶性固形物含量および滴定酸度以外については、変異導入型と野生型の間で差は示されなかった。以上の結果から、GABA 高蓄積は優性形質であることが明らかとなった。また、GABA 合成遺伝子へ導入した変異は GABA 蓄積以外の形質への影響が極めて低いことが明らかになった。

以上の著者による研究結果から、GABA 高蓄積の形質についてはゲノム編集技術を用いて作出した系統が育種親として利用可能であることが明らかとなった。これまでのトマトの一代雑種育種では、親系統を作出し F₁ の評価を行うまで概ね 3 年程度かかるとされていたが、ゲノム編集技術を用いれば、それが 1 年程度まで短縮できると期待された。したがって、ゲノム編集技術の利用は、これまで得られなかった新たな変異を育種親として短期間に提供できる可能性を示すと著者は結論した。

審 査 の 要 旨

著者は、ゲノム編集技術により内在遺伝子に変異を導入して作成した GABA 高蓄積トマトの一代雑種親としての育種利用に関する研究に取り組んだ。その結果、導入した変異が 3 世代に渡って安定して遺伝すること、変異によって付与された GABA 高蓄積形質が優性形質として発現すること、その他の形質に対する影響も少ないことを示し、ゲノム編集技術が GABA 高蓄積作物の分子育種技術として効果的であることを実験的に検証した。ゲノム編集技術は、迅速育種技術となる可能性が高いことから、世界的に注目を集めている。そのような状況の中、著者の研究はゲノム編集技術で開発された系統が育種親として有効なことを示した世界的にも先駆的な研究であり、学術研究として意義のある研究であると判断された。また本論文の成果は、ヒトの健康改善に寄与できる機能性成分として社会的注目度が向上している GABA を高蓄積する育種親がゲノム編集技術で迅速に開発できることを実証したことから、技術開発研究としても高く評価できる研究であると判断された。

平成30年2月8日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び学力の確認を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。