

様式6（第15条第1項関係）（採択年度＝平成26年度以降）

平成29年 4 月 10 日

独立行政法人
日本学術振興会理事長 殿

研究機関の設置者の所在地	〒236-0027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸22番2号	
研究機関の設置者の名称	公立大学法人 横浜市立大学	
代表者の職名・氏名	理事長 二見 良之 (記名押印)	
代表研究機関名及び機関コード	横浜市立大学	22701

平成28年度戦略的国際研究交流推進事業費補助金
実績報告書

戦略的国際研究交流推進事業費補助金取扱要領第15条第1項の規定により、実績報告書を提出します。

整理番号	S2804	補助事業の完了日	平成29年3月31日	関連研究分野 (分科細目コード)	遺伝育種科学 (7001)
------	-------	----------	------------	---------------------	------------------

補助事業名（採択年度） 我が国を拠点とした実用作物の世界最先端ゲノム編集研究国際ネットワークの構築（平成28年度）	補助金支出額（別紙のとおり） 19,998,747円
--	-------------------------------

代表研究機関以外の協力機関
農業・食品産業技術総合研究機構、理化学研究所

海外の連携機関

International Center for Tropical Agriculture, Purdue University, University of Minnesota

1. 事業実施主体

フリガナ 担当研究者氏名	所属機関	所属部局	職名	専門分野
主担当研究者 ツジ ヒロユキ 辻 寛之	横浜市立大学	木原生物学研究所	准教授	植物分子遺伝学
担当研究者 バン トモヒロ 坂 智広	横浜市立大学	木原生物学研究所	教授	植物遺伝資源科学
トキ セイイチ 土岐 精一	農研機構	生物機能利用研究部門	ユニット長	植物ゲノム編集
セキ モトアキ 関 原明	理化学研究所	環境資源科学研究センター	チームリーダー	植物ゲノム発現制御科学
ウツミ ヨシノリ 内海 好規	理化学研究所	環境資源科学研究センター	研究員	植物ゲノム発現制御科学
エンドウ マサキ 遠藤 真咲	農研機構	生物機能利用研究部門	主任研究員	植物ゲノム編集
計6名				

フリガナ 連絡担当者	所属部局・職名	連絡先（電話番号、e-mailアドレス）
アベカズヤ 安部 和哉	研究基盤課 係員	Tel:045-787-2078 E-mail:kenkyu3@yokohama-cu.ac.jp

2. 本年度の実績概要

1. キャッサバゲノム編集による花成時期の改変の研究：本研究の具体的な計画は(1)キャッサバ花成関連遺伝子の単離、(2)キャッサバ形質転換系の高度化、(3)キャッサバのゲノム編集技術の開発、から構成されており、本報告ではこの3点に整理して記述する。

(1) キャッサバ花成関連遺伝子の単離：花成促進遺伝子の候補としてフロリゲン遺伝子 *FT* を選定し、花成抑制遺伝子としてアンチフロリゲン遺伝子 *TFL1*、赤色光受容体遺伝子 *Phytochrome B*、およびフロリゲン遺伝子上流制御過程を抑制する *SVP* 遺伝子を選定した。いずれの遺伝子もこれまで調べられた全ての植物で普遍的に花成促進もしくは花成抑制の機能が示されているものであり、キャッサバにおいても同様の機能を持つと考えられる。キャッサバゲノム研究の中心地でもある共同研究機関 CIAT へ研究員を派遣し、公開されているキャッサバゲノム配列を探索したところ、4つの *FT* 遺伝子、5つの *TFL1* 遺伝子、1つの *PhyB* 遺伝子を同定した。*SVP* 遺伝子については探索対象としたのが本年度後半であったため、現在探索中である。これらの遺伝子の発現を調査するため、CIAT に派遣された研究員が 24 時間を通したサンプリングによる遺伝子発現の日周変動調査などの実験を実施した。

(2) 形質転換系の高度化：

キャッサバの形質転換法として従来より用いられてきたアグロバクテリウム法は、脱分化状態にある組織（カルス）に感染させる点がポイントである。カルスと言っても、その生理状態は様々である。組織培養の分野では昔から、細胞塊の固さから Compact Callus であるとか Friable Callus などの用語が使われて来た。キャッサバの形質転換の場合、Friable Embryogenic Callus (FEC) と呼ばれる、繁殖力の旺盛なカルスが形質転換用の組織として一般的に利用されている。しかし、FEC の誘導効率はキャッサバ系統間で異なっており、これがキャッサバの形質転換のボトルネックの一つとなっている。本年度、まず過去のキャッサバ形質転換に関する報告を整備した。その結果、キャッサバの FEC 誘導培地として、ピクロラム（オーキシンの一種）と Gresshoff and Doy 培地（GD 培地）の組み合わせが広く使用されていた。キャッサバ形質転換方法を整備した後、本プロジェクトメンバーである土岐精一ラボを訪問している Stanton B Gelvin 教授と Lan-Ying Lee 研究員との研究打ち合わせを行った。両研究者と研究内容の打ち合わせを行い、アグロバクテリウムと FEC との共存培養条件の改訂もすべきとの提案を頂いた。具体的には共存培養で使用する培地（GD 培地から AB 培地への変更）の検討とアグロバクテリウム懸濁液の濃度（600nm における濁度 0.5 が一般的に使用されるアグロバクテリウムの濁度であるが、これを下げる）についてご意見を頂いた。

(3) キャッサバにおけるゲノム編集技術の開発：ゲノム編集を効果的に実施するためのベクターを多数整備した。条件検討に要する多数のベクター開発を簡便化するため、従来の制限酵素を用いたベクター構築系よりも効率的な、*in vitro* 組換えを介したベクター

構築系を導入した。また、形質転換可能なキャッサバ系統を材料に、モデル遺伝子を標的としたゲノム編集の実験系開発に着手した。

2. キャッサバゲノム編集を促進する国際ネットワークの構築：本研究の参画機関として、国内からは花成（横浜市立大学・木原生物学研究所）、キャッサバ形質転換（理研・CSRS）及び植物ゲノム編集（農研機構）の中心的研究機関が参加し、海外共同研究機関としてはキャッサバ遺伝資源（CIAT）、植物形質転換系（Purdue 大学）及び植物ゲノム編集（Minnesota 大学）の世界的な中心研究機関が参画している。本年度はこれらの間で研究員の派遣と招聘、及び研究遂行のためのディスカッションを実施した。

キャッサバの花成研究と形質転換系の整備に向けて、横浜市立大学・木原生物学研究所から Behnam Babak 博士を CIAT ヘッドクォーター（コロンビア）へ、徳永浩樹博士をキャッサバ分子育種国際共同研究ラボの ILCMB（ベトナム；2012年にCIATとAGIが設立したキャッサバの国際共同研究ラボで理研グループは設立当初からコアグループとして参加）へ派遣し、派遣先の研究者と緊密な連携を取りながら研究を実施した。CIAT-HQ では CIAT のキャッサバ研究者との研究ネットワークを形成し、キャッサバからの花成関連遺伝子の単離及びにその発現解析のためのキャッサバ栽培技術等を習得した。ベトナム ILCMB では、現地のキャッサバ研究コミュニティとの研究ネットワークを形成し、同時に ILCMB でのキャッサバ形質転換系の整備として日本から人工気象器等と必要な試薬等を導入した。CIAT においてキャッサバの分子遺伝学研究を進める Ishitani 博士と、キャッサバ研究のリーダーである Luis Augusto 博士を日本に招へいした。ここでは両博士と国内の全参加者が参加するキックオフミーティングを開催し、並行して国内各拠点でのセミナーとディスカッション、意見交換を行った。

キャッサバの形質転換とゲノム編集技術の開発に向けて、担当研究者の一人である農研機構の土岐精一博士がミネソタ大の Voytus 博士とアメリカのサンディエゴでミーティングを行った。また、パデュー大学の Gelvin 博士と Lang-Ying Lee 博士が農研機構に滞在し、形質転換系の高度化に向けた共同研究を開始した。

3. 到達目標に対する本年度の達成度及び進捗状況

(1) ゲノム編集の標的遺伝子の同定：到達目標は花成関連遺伝子、特にフロリゲン遺伝子 *FT* とアンチフロリゲン遺伝子 *TFL1* 遺伝子の同定とした。この目標に対して、本年度はキャッサバから両遺伝子をすべて同定することができた。さらに、CIAT から招へいした研究者との議論を通して、花成抑制遺伝子のゲノム編集による破壊を通して早咲きのキャッサバを開発することが特に重要であることが明らかとなった。これを受けて、植物で普遍的に花成を抑制する *PhyB* 遺伝子の探索を開始し、これを同定することができた。従って当初目的を達成すると同時に、当初の想定以上の成果を上げることができた。

(2) 形質転換系の高度化：植物の形質転換操作は 1) カルス誘導、2) アグロバクテリウムとの共存培養、3) DNA 断片の輸送と DNA の植物の染色体への組み込み、4) カルスから植物への再生の大きく 4 ステップに区分でき、このうち、1) カルス誘導、2) アグロバクテリウムとの共存培養のステップの改訂の必要があることを特定した。

(3) ゲノム編集の高度化：キャッサバのゲノム編集用ベクターを開発することを目標とした。この目標に対して、*in vitro* の組換え系を活用して効率的な構築の可能なゲノム編集ベクター、及び複数の gRNA を同時に発現して複数の遺伝子を破壊できるベクター等を整備したことで、本研究でも使用可能な状態にした。

4. 日本側研究グループ（実施主体）の研究成果発表状況（本年度分）

①学術雑誌等（紀要・論文集等も含む）に発表した論文又は著書

論文名・著書名 等	
<p>（論文名・著書名、著者名、掲載誌名、査読の有無、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）について記入してください。）（以上の各項目が記載されていれば、項目の順序を入れ替えても可。）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・査読がある場合、印刷済及び採録決定済のものに限って記載して下さい。査読中・投稿中のものは除きます。 ・さらに数がある場合は、欄を追加して下さい。 ・著者名について、主著者に「※」印を付してください。また、主担当研究者には<u>二重下線</u>、担当研究者については<u>下線</u>、若手研究者については<u>波線</u>を付してください。 ・海外の連携機関の研究者との国際共著論文等には、番号の前に「◎」印を、また、それ以外の国際共著論文等については番号の前に「○」印を付してください。 	
1	
2	
3	
4	
5	

②学会等における発表

発表題名 等	
<p>（発表題名、発表者名、発表した学会等の名称、開催場所、口頭発表・ポスター発表の別、審査の有無、発表年月（西暦）について記入してください。）（以上の各項目が記載されていれば、項目の順序を入れ替えても可。）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・発表者名は参加研究者を含む全員の氏名を、論文等と同一の順番で記載すること。共同発表者がいる場合は、全ての発表者名を記載し、主たる発表者名は「※」印を付して下さい。発表者名について主担当研究者には<u>二重下線</u>、担当研究者については<u>下線</u>、若手研究者については<u>波線</u>を付してください。 ・口頭・ポスターの別、発表者決定のための審査の有無を区分して記載して下さい。 ・さらに数がある場合は、欄を追加して下さい。 ・海外の連携機関の研究者との国際共同発表には、番号の前に「◎」印を、また、それ以外の国際共同発表については番号の前に○印を付してください。 	
1	
2	
3	
4	
5	

5. 若手研究者の派遣実績（計画）

【海外派遣実績（計画）】

年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	合計
派遣人数	2 人	3 人 (2 人)	3 人 (3 人)	3 人

※当該年度は実績、次年度以降は計画している人数を記載

【本年度の海外派遣実績】

派遣者①の氏名・職名：Babak Behnam 横浜市立大学・木原生物学研究所・特任助教

<p>（当該若手研究者の国際共同研究における役割を含めた具体的な研究活動）</p> <p>CIAT の Manabu Ishitani の研究室へ派遣し、キャッサバ商業品種、および育種母本となる遺伝資源の栽培と形質評価を行う。派遣先はコロンビアの CIAT 本体、及びベトナムのキャッサバ分子育種の国際共同ラボ ILCMB である。ゲノム編集の標的とする花芽分化の制御遺伝子単離のために、RNA-seq とその後の情報解析を実施する。この過程で CIAT、横浜市立大学、理化学研究所の共同研究の要としての役割を果たす。</p> <p>（具体的な成果）</p> <p>キャッサバのプロリゲン遺伝子 <i>FT</i>、アンチプロリゲン遺伝子 <i>TFL1</i> 及び赤色光受容体遺伝子 <i>PhyB</i> を同定した。</p>				
派遣先 （国・地域名、機関名、部局名、受入研究者）	派遣期間			合計
	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	
国名：Colombia/Vietnam 機関名 CIAT 部局名 Agrodiversity Research Area 受け入れ研究者 Manabu Ishitani	84 日	12 0 日	120 日	324 日

※本年度の派遣者毎に作成すること。

派遣者②の氏名・職名：徳永浩樹・特別研究員

<p>（当該若手研究者の国際共同研究における役割を含めた具体的な研究活動）</p> <p>キャッサバの分子育種の主要国際研究機関である CIAT がハノイに設置した ILCMB へ派遣し、キャッサバ商業品種からゲノム編集の標的遺伝子単離、形質転換、ゲノム編集、改変作物の形質評価を実施する。キャッサバの農業上重要な形質に関わる分子メカニズム解明を目的に、開花誘導や除草剤耐性に関わる遺伝子などをゲノム編集の標的とする。標的遺伝子は RNA シークエンス解析のデータや、これまでにモデル植物で得られた知見をあわせて単離する。ゲノム編集作物の形質評価は ILCMB にある大規模温室で行う。</p> <p>（具体的な成果）</p> <p>理化学研究所は徳永浩樹研究員を 28 年度 1 月から ILCMB に派遣して、キャッサバ形質転換の立ち上げ等の研究体制の整備を始めた。来年度からグループメンバーらとゲノム編集の標的遺伝子単離、形質転換、ゲノム編集、改変作物の形質評価などを進める予定である。</p>				
派遣先 （国・地域名、機関名、部局名、受入研究者）	派遣期間			合計
	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	

国名 Vietnam/Colombia 機関名 CIAT				
部局名 Agrobiodiversity Research Area	84 日	114 日	132 日	330 日
受け入れ研究者 Manabu Ishitani				

※本年度の派遣者毎に作成すること。

6. 研究者の招へい実績（計画）

【招へい実績（計画）】

年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	合計
招へい人数	3 人	5 人 (3 人)	3 人 (3 人)	5 人

※当該年度は実績、次年度以降は計画している人数を記載

【本年度の招へい実績】

招へい者①の氏名・職名：Manabu Ishitani, Senior Scientist, CIAT

<p>（当該研究者の国際共同研究における役割を含めた具体的な研究活動）</p> <p>本国際研究ネットワークの中心となる作物のひとつであるキャッサバに関して、先進的な分子育種の研究から商業品種の栽培、経済的な位置づけまでもっとも広範な知見を有するのが本事業の連携研究者である Dr. Ishitani である。そこで、本共同研究を効果的に推進するために必要なキャッサバの具体的な扱いや研究の情報、社会的な状況に関する情報を国際研究ネットワーク内で共有するために、横浜市立大学・木原生物学研究所に招へいして情報交換を実施する。研究の進展に合わせて、毎年度の招へいを計画している。</p> <p>（具体的な成果）</p> <p>キャッサバ花成関連遺伝子の単離と発現解析のための戦略を議論した。遺伝子単離に向けたキャッサバのゲノムデータベースの取り扱いや、遺伝子発現解析のための CIAT の温室の条件、キャッサバ遺伝資源のの情報を共有した。</p>				
招へい元（機関名、部局名、国名）及び 日本側受入研究者（機関名）	招へい期間			合計
	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	
招へい元（Agrodivesity Research Area, CIAT, Colombia） 日本側受け入れ研究者 辻 寛之（横浜市立大学・木原生物学研究所）	9 日	15 日	15 日	39 日

招へい者⑥の氏名・職名：Luis Augusto Becerra, Principal Research Scientist, CIAT

<p>（当該研究者の国際共同研究における役割を含めた具体的な研究活動）</p> <p>招へい者 Luis Augusto Becerra はキャッサバのゲノムワイドな解析を通じて、キャッサバの収量性、耐病性の向上や代謝フラックス解析により Crop としての高付加価値化を目指している。しかし、キャッサバのゲノムサイズは約 760Mbp と巨大で、キャッサバのゲノムのヘテロ接合性は高いことが知られている。キャッサバゲノム解析に精通した Luis 博士を招へいし、キャッサバゲノム解析に関する情報交換を進める。</p>				
---	--	--	--	--

<p>(具体的な成果)</p> <p>キャッサバゲノム解析の最前線について、横浜市立大学と理化学研究所でセミナーを開催し、キャッサバゲノム研究の進捗状況について議論した。キャッサバの花成に関する分子メカニズムを解析する辻寛之研究代表者らと花成形成に関わるゲノムワイド関連解析の可能性について模索した。</p>				
招へい元（機関名、部局名、国名）及び 日本側受入研究者（機関名）	招へい期間			合計
	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	
招へい元（Agrodivesity Research Area, CIAT, Colombia） 日本側受け入れ研究者 関 原明（理化学研究所）	11 日	0 日	0 日	11 日

招へい者③の氏名・職名：Lan-Ying Lee, Research Scientist

<p>(当該研究者の国際共同研究における役割を含めた具体的な研究活動)</p> <p>形質転換効率、植物、アグロバクテリウム、双方の因子が関与し、両生物種間の相性も重要となってくる。Lee 博士はアグロバクテリウムの分子生物学ならびに、細胞内イメージングのエキスパートであり、Gelvin 研で行なわれている研究の多くに携わってきた。キャッサバ、コムギの形質転換におけるボトルネックを明らかにするためにはアグロバクテリウムに詳しい研究者の協力も欠かせないため、Lee 博士を招へいし、最新の情報を交換する。農研機構に滞在しつつ理化学研究所、横浜市立大学・木原生物学研究所にも訪問し、キャッサバその他の形質転換の効率向上に向けた具体的な技術情報の交換を進める。</p> <p>(具体的な成果)</p> <p>Stanton B Gelvin 教授と共にキャッサバの形質転換法を検討した。アグロバクテリウムとカルストの感染操作について確認した。</p>				
招へい元（機関名、部局名、国名）及び 日本側受入研究者（機関名）	招へい期間			合計
	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	
招へい元（Center for Genome Engineering, Univ.of Minnesota, USA） 日本側受け入れ研究者 土岐精一（農研機構）	37 日	90 日	0 日	127 日

※本年度の招へい者毎に作成すること。

7. 翌年度の補助事業の遂行に関する計画

--

※ 補助事業が完了せずに国の会計年度が終了した場合における実績報告書には、翌年度の補助事業の遂行に関する計画を附記すること。