

異質四倍体アブラナ科植物におけるマルチコピー型ミロシナーゼ遺伝子ファミリーの標的変異誘発は、環境条件を超えて生葉の辛味を減少させる

文献情報

論文名 : Targeted Mutagenesis of the Multicopy *Myrosinase* Gene Family in Allotetraploid *Brassica juncea* Reduces Pungency in Fresh Leaves across Environments

著者 : Dale Karlson, Julius P. Mojica *et al.*

ジャーナル : Plants 2022, 11, 2494.

<https://doi.org/10.3390/plants11192494>

要旨

アブラナ科植物の最近の育種の成果は、バイオ燃料、バイオ工業用途、特殊脂肪酸、動物飼料用の油糧種子及び飼料粕生産用の低グルコシノレートレベルの新しい油糧種子原料作物に集中している。我々は、栄養価の高い新鮮な葉菜類を食用として利用できる新たな機会を見出した。具体的には葉菜類を咀嚼した際に発する不快な風味や臭いの主な原因となる「マスタード爆弾」反応を、CRISPR-Cas12a を用いたゲノム編集技術により、解除する有効性を実証した。

1 はじめに

野菜は、食糧および栄養の安全保障にとって極めて重要である。緑の葉菜類は、ビタミン、ミネラル、フェノール化合物の優れた供給源である。ミネラルの栄養素（カルシウムや鉄など）は、カロリー摂取の大部分を占める主食の穀類よりも、葉物野菜に多く含まれている。米国疾病予防管理センター（CDC）は、近年、成人の10人に1人しか果物と野菜の1日摂取推奨量を満たしていないと報告した。最も栄養価の高い葉菜類のひとつであるカラシナ（*B. juncea*）は、葉の色、大きさ、質感、頭部形態などの形質が異なり、種内多様性が特徴である。しかし、生で食べると辛味があり、これは、咀嚼によってミロシナーゼ酵素とその基質であるグルコシノレートとの反応によって生じる「マスタード爆弾」として知られており、消費の低迷の一因を思われる。そこで、前述の「マスタード爆弾」反応を低減し、風味や臭いの辛味を低減した葉菜類を生産できれば、新鮮で栄養価の高い葉菜類をより広く消費できるようになる。CRISPR、ベースエディター、プライムエディターなどの精密育種技術の登場により、多様な、栄養価の高い食品を迅速に開発することが可能になった。

2 結果

バイオインフォマティクス分析の結果、*B. juncea*において、シロイヌナズナのI型ミロシナーゼと最も近縁な酵素として、機能的で発現しているミロシナーゼ遺伝子が合計17個同定された。これらの遺伝子は、AゲノムとBゲノムのそれぞれ7本の染色体に分布していた。予測される活性部位残基が同定され、エクソンVIを標的として活性部位を破壊するようにcrRNAスペーサーが設計された。7つのcrRNAを発現させることによって、ミロシナーゼ遺伝子間のDNA配列のばらつきを回避し、各遺伝子が少なくとも1つのcrRNAスペーサーの標的なるようにした。

ゲノム編集を行った結果、機能的で発現している17個のミロシナーゼ遺伝子すべてに変異が導入された。これらのうち、7か所は小さな欠失（25 bp以下）であり、5か所は大きな欠失（101から3,781 bp）となり、残りは大きな構造変異を示した。構造変異はBゲノム第4染色体上の6つのミロシナーゼ遺伝子が存在するクラスターに見いだされた。さらにグルコース放出アッセイ（GRA）によりミロシナーゼ活性を評価することで、間接的に辛み成分を評価した。

ゲノム編集された当代植物（E₀、第1世代）は管理された温室で栽培し、抽苔の兆候が見られたらプラスチック製の受粉袋で株全体を覆うことで、交雑を避け確実に自殖させ、種子収穫まで受粉袋の中で生育させた。E₀-E₃世代は制御された環境下での同じ生育条件を用いて、播種から120日後に収穫した。外来DNAを含まない非遺伝子組換えE₃種子（第4世代）は、米国ワシントン州モーゼスレイクで種子生産の純度を確保するため、隔離条件を有する圃場に移植した。ミロシナーゼ遺伝子に変異を導入した*B. juncea*は、USDA Am I Regulated process によって遺伝子組換え作物として規制されないと判断された。

ゲノム編集され変異がホモ接合体となった*B. juncea*は、非刺激性形質の安定性を評価するために、Pairwise（米国 ノースカロライナ州ダーラム）施設内の温室条件下、サリナス（米国カリフォルニア州）およびユマ（米国アリゾナ州）の異なる環境条件下で栽培された。

以下のすべての評価において、葉のサンプルは収穫したものから無作為に選んだ。子葉は平均葉長10cm、葉幅5cm、成熟葉は平均葉長25cm、葉幅20cmと定義した。辛味に加え、葉の大きさ、形、植物体の構造などの形態学的属性についてもゲノム編集システムを評価し、ゲノム編集していない対照との類似性を確認した。

試験項目は、a)ミロシナーゼ酵素の活性を間接的に測定するGRA、b)訓練された内部パネルによる葉サンプルの辛味の官能評価、とした。

複数の環境で生育させたゲノム編集システムと対照システムでは、各環境の収穫ステージで生育条件が異なり、GRA吸光度の値が異なっていたが、環境と収穫段階の間の有意な交互作用（p値<0.001）に基づく分析で、システム間の効果は収穫期や場所とは独立であると判断された。すなわち、ゲノム編集システムと対照システムの差異は、栽培場所や生育ステージが異なっても同じ傾向であり、ゲノム編集システムが低いと結論付けられる。

選択されたE₃株は対照株よりも有意に低いGRAを示したことから、ミロシナーゼ活性が損なわれてい

ることが示唆された。官能分析により、E₃株系統は試験されたすべての環境及び成長段階にわたって味覚評価で一貫して辛味がなかった（ゲノム編集系統のスコアが1に対して対象系統のスコアは3.7）。E₄世代系統の後代において、複数の環境条件により生育させたゲノム編集系統の辛味成分低減の安定性を評価したところ、ゲノム編集された系統の子葉および成葉は、編集されていない対照系統と常に差異が認められた。

3 結論

CRISPR技術の進歩は、農作物における目的とする変異体の利用拡大に道を開いた。本論文において、*B. juncea*の17個のミロシナーゼ遺伝子の標的変異により、I型ミロシナーゼ活性をほぼ完全に除去し、その結果、新鮮な葉から辛味が消失されることを示した。わずか2世代で、この栄養価の高い葉物野菜から辛味を除去するために使用された外来DNAも分離・除去された。従来の育種に比べ、価値ある形質を提供する効率が高まったことで、農家や消費者にとって有益な表現型の変異体の利用が早まるだろう。