

CRISPR/Cas9 によるアサガオのゲノム編集

小林 安那 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

ゲノム編集とは、ゲノム中の特定の遺伝子を切断し、任意の配列を置換、挿入、削除する技術である。この技術は、多様な種のゲノムを編集できるため、食品や医療への応用が期待されている。Clustered regularly interspaced short palindromic repeat-associated endonuclease 9 (CRISPR/Cas9)は部位特異的ヌクレアーゼであり、ゲノム編集技術に応用されている。CRISPR/Cas9 システムでは、標的遺伝子と相補的な 20 塩基分の配列を含む single-guide RNA (sgRNA)が標的 DNA 配列を認識し、バクテリア由来の DNA 二本鎖切断酵素の Cas9 タンパク質が DNA を切断する。切断された二本鎖 DNA が修復する際に、塩基の挿入や欠失が起こり、標的遺伝子が破壊される。特異的な sgRNA の設計だけで標的遺伝子を選べるため、従来の技術よりも容易である。そのため、ゲノム編集技術として 2013 年に報告されて以来、注目を集めている。

アサガオ *Ipomoea nil* はナショナルバイオリソースプロジェクトで整備がすすむ実験植物 9 種の 1 つに選定されている。形態形成・花の彩色とパターン・トランスポゾン・光周性花成・重力屈性などの遺伝学・生理学のモデル植物である。既存の形質転換系、EST、BAC と合わせ、今後のゲノム編集技術の確立によりさらなる展開が期待されている。

本研究ではアサガオのゲノム編集に CRISPR/Cas9 を用いることができるのかを検証した。標的遺伝子として、その機能や欠失による効果が明らかであるアントシアニン合成酵素遺伝子 *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* と、アサガオにおける機能が未知であるカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子 *carotenoid cleavage dioxygenase (CCD)* を選んだ。

アサガオの花弁や茎の着色はアントシアニンによるものであり、赤や青、紫を示す。アントシアニンの合成経路に DFR が存在し、この変異体 (*I. nil* cv. AK77) は白花、青花になることが知られている。DFR をゲノム編集で破壊して白色の花弁のアサガオを作出することで、アサガオにおけるゲノム編集の可否を遺伝子型だけでなく表現型としても検証した。

CCD は黄色や橙を示す色素であるカロテノイドの酸化開裂酵素である。先行研究により、アサガオではカロテノイド合成酵素遺伝子の発現量を増加させても花弁に黄色の呈色がないことが報告されており、その原因はカロテノイドの分解や蓄積に問題があるためだと考察されている。本研究では CRISPR/Cas9 によるゲノム編集の応用として、花弁におけるカロテノイド分解を抑制するために CCD をゲノム編集で破壊する。これにより、アサガオにおける CCD 相同遺伝子の機能を調べるとともに、黄色い花弁をもつアサガオの作出を試みた。

材料・方法

植物材料は *Ipomoea nil* cv. Violet (DFR 標的)、*I. nil* cv. AK77 (CCD1, CCD4 標的) を用いた。Cas9、sgRNA 発現コンストラクトをアグロバクテリウム法によりアサガオ不定胚へ導入した。sgRNA は DFR では 2 種類、CCD1 は 2 種類、CCD4 は 3 種類を設計してそれぞれ導入した。

CRISPR/Cas9 のゲノム編集領域に制限酵素サイトを含むように設計した。そのため、本来ならば制限酵素により切断されるゲノムがゲノム編集されていると、切断されなくなる。ゲノム編集領域を含むように設計したプライマーで PCR 増幅し、制限酵素処理を行い、電気泳動で切断の有無を確認した。

制限酵素によってゲノム編集が確認されたものに関しては、ウェスタンブロットティングによる Cas9 タンパク質の発現量の解析と塩基配列のシーケンスを行った。

結果・考察

DFR 標的は 27 本、CCD1 標的は 3 本、CCD4 標的は 7 本を再分化し、順化させた。順化させた個体のゲノム DNA を PCR 増幅後、制限酵素処理し電気泳動にかけた。DFR 標的において両方切断されていない個体が 3 系統あった。また、片方のみが制限酵素で切断されない個体が 4 系統あった。これらのシーケンスによって CRISPR/Cas9 の標的領域におけるゲノム編集が確認された。また、ウェスタンブロットティングにおいても Cas9 タンパク質の発現が見られた。これらのゲノム編集された系統は予想通り青花になり、白花を咲かせた。

一方 CCD1 標的、CCD4 標的では、制限酵素処理によるゲノム編集の有無を確認したが、これまでのところ編集された系統は得られていない。DFR 標的では、27 系統のうち、7 系統でゲノム編集されていた。そのため CCD 標的に関しては、さらに系統数を増やすことでゲノム編集個体が得られるものと考えている。

結論

本研究では、CRISPR/Cas9 によるアサガオのゲノム編集が可能であることを明らかにした。今後、同様の方法で、まだ作出されていない黄色の花弁の個体の完成や他の標的遺伝子の編集が期待される。

謝辞

Cas9、sgRNA 発現ベクターをご提供頂いた国立研究開発法人農業生物資源研究所 土岐精一博士、遠藤真咲博士に深謝する。