

ニンジンストレス不定胚誘導系を用いた新たなゲノム編集手法の開発

崔 リベカ (筑波大学 生物学類) 指導教員: 菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

ニンジンは不定胚誘導系が確立されており、古くから種子胚発生研究のモデル材料として用いられてきた。一方、シロイヌナズナでは突然変異体を用いた胚発生の研究が進んでおり、胚発生に重要である遺伝子がいくつか明らかになっている。これらの遺伝子のオーソログがニンジンでも見つかったり、全てのオーソログが見つかったりではなく、対応する遺伝子が存在していない可能性など、ニンジンの胚発生に関わる分子種はシロイヌナズナとは完全に一致しないことが考えられる。

これまで、植物では標的遺伝子をノックアウトすることが難しかったため、ニンジンで発見された胚発生関連遺伝子をノックアウトし、これらの遺伝子がニンジンの胚発生においてどのような機能を持つのかを明確にした研究はまだ報告されていない。そこで、近年開発された標的遺伝子の DNA 配列を自在に改変することができる CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用い、ニンジンの胚発生関連遺伝子をノックアウトしてニンジン胚発生におけるそれらの機能を解明することを目指すこととした。

植物でゲノム編集を行う際、CRISPR/Cas9 といったゲノム編集ツールがコードされた配列を植物のゲノムに組み込む方法が主に用いられる。しかし、一般的なニンジンの形質転換系を利用すると、合成オーキシンである 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) を用いることから、残留している 2,4-D が不定胚形成過程に影響を及ぼす事が考えられる。また、カルスから不定胚を誘導するため、編集を受けなかった細胞を含むキメラ個体ができるなどといった問題が生じる。一方、ニンジンでは、2,4-D などの植物ホルモンを用いず、かつ、カルスを経ずに不定胚を誘導できるストレス不定胚誘導系があり、この系を用いた形質転換系を確立することができるのであれば、前述の問題は解決できると考えられる。

そこで本研究では、ニンジンのストレス不定胚誘導系を用いたゲノム編集個体の作成を目指し、まず、ストレス不定胚誘導系を利用した形質転換系を開発することとした。

【方法】

ニンジン (*Daucus carota* 品種: US-harumakigosun) の播種後 9 日目の芽生えの茎頂部を用いた。導入遺伝子は、胚的組織特異的プロモーター制御下の GFP 遺伝子とし、アグロバクテリウム法での導入を試みた。

茎頂片をアグロバクテリウム培養液につけた後、0.7M スクロースを含む MS 培地でストレス処理を行った。6 週間のストレス処理後、ストレス物質を含まない MS 培地に茎頂片を移植し、4 週間後に GFP の蛍光観察を行った。また、アグロバクテリウムの感染効率を高めるために、ストレス処理前に 1 日ほど非ストレス条件での共存培養を行う実験系も試みた。一方、形質転換効率の比較を目的として、一般的なニンジンの形質転換法を用いての形質転換もあわせて行った。

【結果・考察】

現在のところ、ストレス不定胚誘導系を利用した実験系では GFP 蛍光を示す不定胚は観察されていない。また、アグロバクテリウムの感染によって不定胚形成率が著しく低下したが、ストレス処理前にアグロバクテリウムとの共存培養をさせることによって不定胚形成率が少し回復した。

GFP を発現する不定胚を得るためには、さらに不定胚形成率を高める、もしくは遺伝子導入効率を高めることが必要であると考えられる。

一般的な形質転換法で行った形質転換では、GFP 蛍光を示す胚性カルスが得られた。現在は不定胚を誘導し、GFP 蛍光を示す不定胚の観察を行うとともに、再分化体を培養・維持している。

【今後の予定】

- ・アグロバクテリウムによる遺伝子導入効率を向上させる化合物である Chloroxylinil をストレス処理前の共存培養用の培地に加え、引き続き新たな形質転換系を開発を行う。
- ・一般的な手法で得られた形質転換体を用い、ストレス不定胚誘導系を介して、導入した GFP 遺伝子を破壊するゲノム編集を行う。

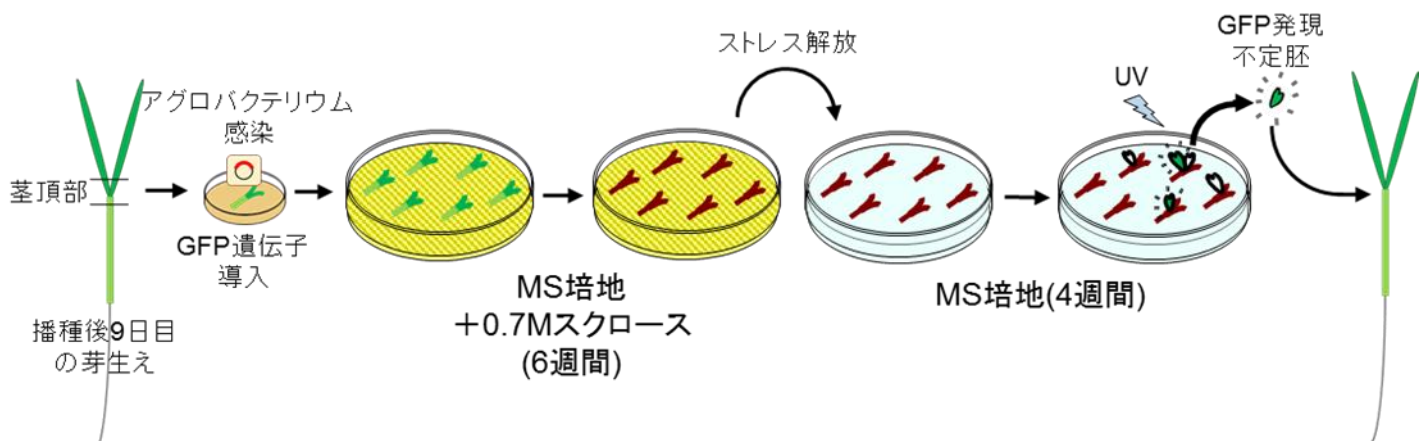


図. ニンジンのストレス不定胚誘導系を利用した新たな形質転換系開発のための実験系の概略図