

ニンジンを用いた新規形質転換法の開発

下津 克紀 (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】

ニンジンは世界中で広く生産されている作物であり、人類のみならず、馬や豚などの家畜も利用できる作物である。ニンジンは不定胚誘導系のモデル植物となっている。また、2016年に初めて全ゲノムの塩基配列が報告された(Massimo *et al.*, 2016)。そのため、今後ゲノム編集などを用いたさらなる研究が期待されている。

植物の形質転換を行う手法の1つとして、ゲノム編集技術の1つである CRISPR/Cas9 を用いた手法が考えられる。CRISPR/Cas9 は、近年開発されたゲノム編集技術で、標的遺伝子の任意の場所を改変できる技術である。ニンジンでは、2018年に初めてこの技術を用いてゲノム編集を行ったという論文が報告された(Magdalena *et al.*, 2018)。この論文では、ニンジンのカルスに対し、アグロバクテリウム法を用いて CRISPR/Cas9 を核内に導入し、遺伝子の不活化である Knockout を行っていた。しかし、その後の再生能の調査は行われていなかった。そこで、本研究では形質転換後の再生能力の向上のため、胚発生因子を用いた。

胚発生因子とは、種子植物発生の初期段階、胚発生・種皮形成において重要な役割を持つ因子である。先行研究により、シロイヌナズナにおいてこの因子を過剰発現させたところ、不定胚様組織が形成されたことが報告されている(Loyola *et al.*, 2016; Heringer *et al.*, 2018; Góngora *et al.*, 2018)。

アグロバクテリウム法は、標的細胞の核 DNA にランダムに遺伝子を組み込む手法で、間接的に遺伝子を導入する。本研究では、遺伝子の任意の場所に、直接的に遺伝子を組み込む手法で形質転換を試みた。その手法として、電流を流すことで細胞外から細胞内へと物質を導入するエレクトロポレーション法と、金粒子に物質を付着させ、細胞内に導入するパーティクルガン法が考えられる。

本研究では、ニンジンの核ゲノムに対して、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法を用いて CRISPR/Cas9 を導入し、Knock-in を行い、再生させることを目的とした。

【材料・方法】

ニンジン(*Daucus carota* var. *sativus*)の根茎が紫色を呈する1品種、ダークパープル(DP)を使用した。実験には播種後7日目の芽生えの胚軸と、胚軸を培養して得られたカルスを使用した。培地は以下の組成のものを使用した。

- ・不定胚誘導用培地: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid、オーグメンチンを添加した MS 培地
- ・選抜用培地: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid、カナマイシンを添加した MS 培地

CRISPR/Cas9 の標的遺伝子として、アントシアニン合成に関わる遺伝子である *Dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* を選択した。*DFR* の配列上に gRNA を 2ヶ所設計し、その部位で Cas9 による切断が生じるようにした。Knock-in 用のドナー DNA と

して、選択マーカー遺伝子を用い、相同組換えが生じるようにした。

以下の遺伝子が載ったプラスミドベクターをエレクトロポレーション法、パーティクルガン法でニンジンの細胞等に導入し、培養後に蛍光顕微鏡観察等を行った。

1. CRISPR/Cas9 用の Cas9, gRNA, マーカー遺伝子 *Venus* (蛍光タンパク質)
2. 相同組換え用の *DFR* の相同配列が両端に結合したマーカー遺伝子 *ZsGreen* (蛍光タンパク質)
3. 胚発生を促進させるための、胚発生因子であるシロイヌナズナの *WUSCHEL (WUS)*, *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)*, *BABY BOOM (BBM)*

【結果・考察】

- CRISPR/Cas9 の導入による蛍光観察
詳細は卒業研究発表会にて報告する。
- Knockout による色彩の変化
詳細は卒業研究発表会にて報告する。
- Knock-in による蛍光観察
詳細は卒業研究発表会にて報告する。

【今後の予定・展望】

形質転換後の遺伝子解析、再生能の調査を行う。

形質転換効率の上昇のため、条件検討を行う。

この手法は核以外にも応用できる可能性があるため、葉緑体形質転換、ミトコンドリア形質転換にも適用可能であると期待する。