

nCas9-CDA を用いた高糖度トマト作出における T<sub>1</sub> 世代の解析

米田 晴菜 (筑波大学 生物学類)

指導教員：三浦 謙治 (筑波大学 生命環境系/医学医療系)

## [背景]

トマトは世界の生産量で 11 番目に多い主要な作物の 1 つであり (FAO, 2016)、近年高 GABA 含量トマトや高糖度トマトといった高付加価値トマトが注目を集めている。高糖度トマトは、塩分などを含む土壌でトマトを栽培し、植物の根からの吸水を制限し、果実の水分を減少させることで果実内の糖類が濃縮され果実の糖度が上昇する。しかし、管理が難しく労力がかかるといった問題の他に、トマトの果実サイズが減少するといった問題がある。高糖度化と果実サイズの維持、また栽培する際の労力、コストの削減が今後の課題である。共同研究先で大規模変異集団の高糖度を示すトマトのスクリーニングによって X 変異体が単離された。この X 変異体では目的遺伝子の塩基置換によって、果実サイズに影響を与えず糖度の上昇がみられることが明らかとなった。同様の変異を栽培品種へ導入することができれば、栽培品種においても高糖度トマトを得ることができると考え、ゲノム編集による変異の導入を試みた。

ゲノム編集では通常、Cas9 を発現させ、non-homologous end joining (NHEJ) による DNA の欠損や挿入を行うことが多いが、よりマイルドで自然界でも良くおこり得る 1 塩基置換を誘導することとした。1 塩基置換を誘導するために、二本鎖切断をひきおこす Cas9 の D10A 置換により、片鎖のみを切断するニックアーゼ活性を有する nCas9 にシチジンデアミナーゼ (CDA, C から T へ置換する酵素) を連結させた nCas9-CDA (Nishida et al. 2016) を用いて、目的遺伝子のゲノム編集を行った。但し、nCas9-CDA は Cas9 と同様 PAM 配列 (NGG) を認識して塩基置換を行うため、上記 X 変異体と同様の塩基置換を設計することが出来なかったため、その近傍である Target1472 をターゲット領域として、先行研究にてゲノム編集を行った (上村 2018 修士論文)。通常植物におけるゲノム編集では、ゲノム編集を行った当代 (T<sub>0</sub> 世代) では、植物体一様にゲノム編集がおきず、ランダムに変異がおきて、キメラな状態になっている。キメラに存在する細胞のうち、生殖細胞に編集された DNA が存在する場合、次世代 (T<sub>1</sub> 世代) にゲノム編集が遺伝される。

本研究では、先行研究により作出された T<sub>0</sub> 世代から種子を採取し、T<sub>1</sub> 世代において変異が遺伝しているかを明らかにすることを目的とした。また、編集された個体が得られた場合、その糖度を測定することで、ゲノム編集により、ほかの品種の高糖度化に適応できるかを明らかにすることを目的とした。

## [方法]

T<sub>0</sub> 世代の赤く熟したトマトから種子を取り出した。種子が浸るくらいの 1% 塩酸を加え 15 分間攪拌し、種子を回収したらキムワイプの上に置き十分乾燥させた。

十分に乾燥させた種子をトレイに水をはり水分を含ませたロックウールに植え栽培した。子葉が展開し本葉が数ミリ伸びた播種後 10 日前後の子葉からゲノムを抽出した。ゲノムをテンプレートとして、目的遺伝子を PCR によって増幅し、シーケンスを行った。

## [結果]

nCas9-CDA により導入した変異は T<sub>1</sub> 世代では検出できなかった

栽培品種 E-1 から得られた次世代種子 40 ケ、E2 から 48 ケ、B 品種#26 から 60 ケをロックウールにて栽培を行った。そのうち、E1 から 27 ケ、E2 から 32 ケ、#26 から 20 ケ発芽した。これらの植物からゲノムを抽出して、目的の遺伝子を増幅後、シーケンスにて塩基置換がおきているかを調べた。シーケンス解析が行えた E1 の 6 個体、E-2 の 6 個体、B 品種#26 の 5 個体の T<sub>1</sub> 植物において、その全てにおいて野生型の塩基配列が見られ、変異の遺伝は見られなかった。

別の栽培品種で、変異が見られ、次世代に変異が導入されているトマト (江面研にて作製) が得られた。このトマト 25 ケを特定網室にて栽培中である。

## [考察]

T<sub>0</sub> 個体で変異の導入が確認された系統用いて、T<sub>1</sub> 世代で変異の遺伝が起こっているか調査した結果、調査したすべての系統で変異の遺伝が見られなかった。

上村 2018 によると T<sub>0</sub> 世代において E1 で 10/22、E2 で 12/24、#26 で 1/24 の割合で変異をもつ細胞が存在していると考えられる。同様の割合で生殖細胞に変異をもつものが存在すると考えると、#26 では 24 個体以上のゲノムを解析する必要がある。E1、E2 では T<sub>0</sub> 世代で約半分の細胞に変異があるという計算になるが、6 個体全てで変異が見られなかったことから、上記と同様の割合よりも低い割合で、次世代に変異が遺伝すると考えられる。このことから、それぞれ 5~6 個体をシーケンスにより解析するだけでは量が少なく、数十個体は解析する必要があると考えられる。

## [今後の展望]

栽培品種で変異が導入されているトマト (江面研にて作成) を温室にて栽培し、果実の糖度を測定する。