

## 2 遺伝子同時ゲノム編集による枝垂れ・花卉老化遅延アサガオの作出

山内 花菜 (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】

アサガオ(*Ipomoea nil*)は日本独自に発展してきた園芸植物である。奈良時代に渡来後しばらくして観賞用の植物として人々に楽しまれるようになり、自然突然変異体の選抜や自然交配を経て、今日に至るまでに多彩な色や形を持つアサガオが生まれてきた。現代でもアサガオは市民の暮らしを彩り、夏の風物詩としてうらわや浴衣の柄などにも広く親しまれる。さらに、多種多様なアサガオの遺伝子の突然変異系統は変化に富み、貴重な遺伝資源として遺伝学や生理学的研究にも用いられている。

アサガオの変異体の中で、*we2* (*weeping2*)という自然突然変異体は、近年、新たに発見された(Kitazawa *et al.* 2008)。この変異体は、つるが支柱に巻き付かず、上向きにも伸びず、ただ重力に従って真っ直ぐ枝垂れる。これは、転写因子をコードする *SHORTROOT1* (*SHR1*)遺伝子に一塩基置換が生じることにより、茎の重力感知に関わる細胞層が欠落して重力応答能が失われていることによる。通常のアサガオよりも素直なつるは世話が簡単で仕立てやすいとも評される。

一方、最近、長い期間をかけて育種や品種改良を行うことなく、科学技術を用いて新しい形質をもつアサガオをより迅速に作り出すことが可能となってきた。先行研究では、花が開いている時間が通常の約12時間からおよそ倍の24時間程度まで長くなる、二日咲の形質を示すアサガオが作出された(Shibuya *et al.* 2018)。これは CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、プログラム細胞死による花卉老化を促進する転写因子をコードする *EPHEMERAL1* (*EPH1*)遺伝子をノックアウトすることで生じたものである。この試みは現在までに実験系統において成功しており、次なる目標として異なる遺伝的背景をもつ園芸品種への応用が期待されている。

以上を踏まえ、本研究では伝統的なアサガオ園芸品種において CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、*EPH1* と *SHR1* の2遺伝子を同時にノックアウトし、花の二日咲と枝垂れという2つの形質を個性豊かなアサガオ品種それぞれの独自の色や形を失うことなく迅速に付与することを目的とする。これにより得られるゲノム編集体は、二日咲形質によって花を觀賞できる時間が長くなり、一日目と二日目で色が異なる花が同時に存在する様子を観ることができるとともに、枝垂れ形質によって藤棚や暖簾のように上から垂れるアサガオを觀賞する新たな展示方法を可能とするなどの、觀賞価値の向上が期待される。また、これらのアサガオの觀賞を楽しむことで、ゲノム編集という先進的な科学技術に対する人々の理解が深まることを期待する。

### 【材料・方法】

植物材料として、アサガオ(*Ipomoea nil*) 生理実験系統 Violet のほか、園芸品種である東娘、桃三夏、暁の光、万博の霞、浅黄の園、青雅、日本晴、団十郎、黒王を用いた。これらの品種から、種子になる前段階の未熟胚を開花後2週間程度で取り出し、不定胚形成の誘導培地で3~4週間培養した。得られた不定胚に対

し、ゲノム編集に必要な配列である、Cas9 タンパク質をコードする遺伝子、標的遺伝子内の標的配列の相補配列を含む gRNA を発現する遺伝子、これらの目的遺伝子が導入された場合に植物細胞にカナマイシン耐性を付与する遺伝子、のすべてを搭載したオールインワンベクターを導入したアグロバクテリウムを感染させた。アグロバクテリウムには、オールインワンベクターに加えて胚発生を促進する因子も導入した。gRNA 配列は *SHR1*、*EPH1* それぞれを標的として各2箇所、計4箇所に設計し、1つのベクターですべて同時に導入した。感染後のアサガオ不定胚はアグロバクテリウムと2-3日共存培地で培養した後、カナマイシンを含む選択培地に移して選抜を行った。その後、カナマイシン選択培地でも生育する二次不定胚をシュート誘導培地に移した。遺伝子導入の有無は、カナマイシン耐性遺伝子を標的とするプライマーによるPCR解析によって確認した。

### 【結果・考察】

詳細は発表会にて報告する。

### 【展望】

得られたゲノム編集体の表現型の解析を行い、期待通り茎の枝垂れと花の二日咲の形質が付与されているかを確認する。そのうえで、既存の自然突然変異体 *we2* の表現型とゲノム編集体の表現型の比較を行い、ゲノム編集により自然突然変異による形質の変化が再現されているかどうかを調べる。また、ゲノム編集体の標的遺伝子の塩基配列を解析し、変異箇所の特異性とノックアウトの原因を明らかにする。同時に、アサガオの実験系統と園芸品種における *EPH1* 遺伝子のノックアウト効率の差異に関する知見を得る。さらに、ゲノム編集した花卉として日本で初めて実験室外での栽培の承認を得るため、ゲノム編集体の後代からヌルセグリガント個体を選び、全ゲノムシーケンシングにより遺伝子導入した核酸(オールインワンベクターの配列)が残存しないことを証明する。

伝統的な色や形を保持しながら新しい形質をもつようになったアサガオ品種を、科学、文化の両面で親しまれ、役立てられる存在とすることを目指す。

### 【謝辞】

本研究の一部は、内閣府、戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「スマートバイオ産業・農業基盤技術」(管理法人:農研機構生研支援センター)によって実施されました。形質転換用ベクターをご提供いただいた土岐精一博士・遠藤真咲博士(農研機構)、*eph1* ノックアウト系統の種子をご提供いただいた渋谷健市博士(農研機構)、全ゲノムシーケンシングを実施していただいた中嶋信美博士(国立環境研)と小野公代博士に感謝いたします。アサガオ種子を提供していただいた石黒和昭氏(変化朝顔研究会)と NBRP「アサガオ」の仁田坂英二博士(九州大学)に感謝いたします。