

CRISPR/Cas9 を用いたシクラメンのゲノム編集

川端 信太郎 (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】

シクラメン(*Cyclamen persicum*)は世界で広く愛されている地中海沿岸原産の鉢花で、特長的な花卉を有し、花の少ない冬季に開花し、開花期が長いことなどから日本でもとても人気の高い花である。近年、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集が様々な高等植物において行われるようになってきている。ゲノムを直接的に編集することによる分子育種は従来型の育種よりも効率的に新規形質を付与することができる。

本研究でゲノム編集の標的とした遺伝子は、花の形態形成を制御する ABC モデルにおけるクラス C の遺伝子である。シクラメンにはクラス C の遺伝子が 2 つあり、*CpAG(AGAMOUS)1* は雄蕊の、*CpAG2* は雌蕊の器官分化を決定することが知られている。また、クラス C の遺伝子のもう一つの働きとして、茎頂分裂組織における増殖を停止させる働きがある。これらより、シクラメンの 2 つのクラス C の遺伝子を CRISPR/Cas9 を用いて共にノックアウトすることで茎頂分裂組織における分裂が終わらなくなり、無限に花卉を作り続けるようになることが期待される。最終的に花卉の枚数が 50-60 枚程度になる、完全八重咲きシクラメンが作成できるはずである。

シクラメンにおいては CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集はまだ行われていない。そこで、シクラメンにおいて CRISPR/Cas9 を用いた分子育種法を開発すると共に世界初のシクラメンのゲノム編集を行い、ゲノム編集による完全八重咲きシクラメンを作成することを目指す。

【材料・方法】

材料として、「ワインレッド」と「はる香」の 2 品種を用いた。無菌状態で培養を続けているシクラメンから葉と葉柄を採取し、さらに 5 mm 角に切り分けて 1 週間 20 °C 暗所で前培養した。アグロバクテリウム法により、CRISPR/Cas9 gRNA 一体型ベクターを導入した。CRISPR/Cas9 gRNA 一体型ベクターには、Cas9 タンパク質、標的遺伝子に対する gRNA 配列、蛍光タンパク質、カナマイシン耐性、の各遺伝子を搭載した。アグロバクテリウムと 3 日間 20 °C 暗所で共存培養したのち、洗浄し、抗生物質カナマイシンを含む選択培地に移植し選抜を行った。その後、2 週間~1 ヶ月おきにカナマイシンの濃度を上昇させながら植え替えを行った。培養を続ける中で不定芽の形成が見られると、次回以降の植え替え時にポットに移植し、25 °C、16L/8D(16 時間明期 8 時間暗期)条件で培養した。根の形成が見られ、個体の十分な成長が確認できると植木鉢に順化した。

【結果】

報告会にて詳細を報告する。

【展望】

得られたゲノム編集体の標的遺伝子の塩基配列を PCR、ゲノムシークエンスによって解析する。また、培養を続け、表現型の解析を行い、期待通り完全八重咲きの形質が付与されているかを確認する。

また、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集においては設定した部位以外で編集が起きてしまうオフターゲット変異が起こる可能性がある。これを確認するためには全ゲノム塩基配列が必須ではないが、重要になる。しかし、シクラメンは全ゲノム塩基配列が未だ解読されていない植物のうちの一つであるため、その解読を進めている最中である。さらにゲノム編集体を交配し、後代からヌルセグリカント個体を選び、導入した遺伝子配列が残存しない個体を選抜する。

本研究を通してゲノム編集植物を身近にしていくことで、ゲノム編集植物に対する国民的な理解を深めていくことを目指す。

【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」によって実施されました。シクラメンの 2 品種「ワインレッド」と「はる香」を提供していただいたインプラントイノベーションズ(株)に感謝いたします。CRISPR/Cas9 gRNA 一体型ベクターを提供していただいた遠藤真咲博士と土岐精一博士(農研機構)に感謝いたします。また、実験の手順等を教えていただいた小野公代博士に感謝いたします。