

2 遺伝子の同時ゲノム編集による高糖度かつ高 GABA 蓄積トマトの作出

岩間 健 (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)

【背景・目的】

トマトは、日本のみならず世界的に消費量が多く、農業・経済的に非常に重要な作物の 1 つである。また、全ゲノムがすでに解読され、代表的なナス科植物として多くの研究が行われている作物でもある。トマトを用いたゲノム編集の成果としては、すでに市場販売が開始されている高 GABA 蓄積トマトの作出が挙げられる。この高 GABA トマトは、グルタミン酸から GABA の生合成を担う酵素である GAD の活性スイッチにゲノム編集により変異を起こすことで GABA の蓄積量を増加させている。GABA は近年、機能性成分として高い注目を浴びており高 GABA トマトも社会的に注目度の高い成果である。

トマトの食味は主にうまみ・酸味・甘みの 3 つの要素で構成されているとされ、特に糖度が高いことはトマトにおいて最も重要な品種的形質の 1 つである。現在栽培されている高糖度トマトでは、生育過程において与える水分量を減らす、塩類濃度の高い土壌で育てるなど通常の栽培とは異なる点があり、適切な果実収穫のためには栽培上の注意点が多いという問題点がある。

本研究では、先行研究においてトマト変異個体で GABA の高蓄積が見られた *SIGAD3* とシロイヌナズナ、トマトにおいて高糖度の形質が見られた *SIESK, SIHWS* 遺伝子を組み合わせることでゲノム編集の標的とすることで、GABA の高蓄積と高糖度という 2 つの形質を併せ持つトマトの作出を目指した。また、複数の形質を同時にゲノム編集によって改変することができるということは、今後ゲノム編集が育種分野においてより広範に利用されていくために重要な利点になりうると思われる。

【方法】

- *ESKGAD3, HWSGAD3* 編集ベクターの作製
既存の *SIGAD3* 標的ゲノム編集ベクターを制限酵素処理し、それぞれ PCR によって増幅した *SIESK, SIHWS* 標的 gRNA 発現カセットを挿入することで *SIESK, SIGAD3* と *SIHWS, SIGAD3* の 2 遺伝子を標的とするゲノム編集ベクターを作製した。
- アグロバクテリウム法によるトマトの形質転換及び再分化体の栽培
無菌播種後 7-10 日後にトマト子葉の両端を切断し、*ESKGAD3, HWSGAD3* ゲノム編集ベクターを導入したアグロバクテリウム懸濁液に 10 分間浸すことでアグロバクテリウムの感染を行った。得られた子葉切片を 3 日間共存培養した後、カナマイシンを含む培地に移し、生長段階に合わせて培地の植え替えを行い、カルス、シュート及び根の誘導を行った。発根が確認された個体は土に植え替え、栽培を行った。
- 導入遺伝子の確認及び DNA シーケンシング
再分化体から発根が確認された段階で葉からゲノム抽出を行い、外来遺伝子である *Cas9* 遺伝子の導入確認を行った。また、MultiNA を用いた変異個体の絞り込みを行い、変異がみられると考えられる結果の得られた個体において DNA シーケンシングを行うことで標的遺伝子における変異の有無を確認した。

【結果】

現在までに *ESKGAD3* の編集においては 39 個体、*HWSGAD3* においては 66 個体の再分化個体が得られた。そのうち *ESKGAD3* では 6 個体、*HWSGAD3* では 5 個体において標的遺伝子の少なくとも一方で変異が見られ、2 つの遺伝子で同時に変異が見られた個体が *ESKGAD3, HWSGAD3* でともに 2 個体ずつ得られた。また、トマトの *ESK* 遺伝子には 3 つのパラログが存在する(以降 *SIESK1, SIESK2, SIESK3* とする)が、本実験では *SIESK1* のみに変異が見られ、*SIESK2, SIESK3* には変異が見られなかった。

【考察・展望】

SIESK1 のみに変異が見られた結果から、*SIESK1, SIESK2, SIESK3* において共通の配列をターゲットとする gRNA 発現カセットを新たに追加し *ESKtarget1,2GAD3* 編集ベクターを作製した。再度実験を行い、*SIESK2* 及び *SIESK3* に対しての変異の有無や表現型について観察していく。また、今回の実験で変異がみられた個体において自殖後代を得ることで、変異が後代においても引き継がれるか、期待される高 GABA 蓄積、高糖度といった形質が見られるかという点を調べ、今後も高糖度かつ高 GABA 蓄積トマトの作出を目指す。