

組織培養を経ないゲノム編集方法の開発とその果菜類への適応

小林 美咲（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】

ゲノム編集とは、Cas9 などの人工ヌクレアーゼを用いて、標的とする DNA 配列に二本鎖切断 (DSB) を誘導し、切断された遺伝子の修復エラーを利用して変異を導入する技術である。

従来の育種では、エリート品種に目的の形質を導入する場合、交配した後、エリート品種の遺伝子型に戻すための戻し交配を数回繰り返す必要がある。このため、目的の形質を持った変異をもつ品種を改良するためには長い年月が必要である。しかしゲノム編集技術を用いれば特定の遺伝子に突然変異を誘導することで、エリート品種の遺伝子型を変えることなく、かつ目的の性質をもつ品種を効率的に作るができる。そのため、植物におけるゲノム編集は従来の育種に比べてはるかに短い時間で品種改良が可能になると期待されている。

アグロバクテリウム法を用いた従来のゲノム編集法を簡単に説明すると、植物体から切り出した葉片に Cas9 や gRNA を形質転換により植物体ゲノムに組み込む。その後、葉片からカルスを形成させ、組織培養を行うことで植物体まで分化・再生させることで Cas9 および gRNA をもつ形質転換植物を得る。これらが植物細胞内ではたらくことで、ゲノム編集植物体を得る。しかしこの組織培養には植物体を得るまで時間がかかること、定期的な培地の移し替えが必要であるなどの問題がある。また一番の課題は、組織培養および形質転換できる植物種が限られており、組織培養の系が確率していない植物ではゲノム編集が行えないことにある。この問題を解決するために考えられたのが、組織培養を経ずにゲノム編集を行う方法である。

Voytas らが行った研究に、植物体から分裂組織を誘導することでゲノム編集体を得たものがある。彼らはまず、Cas9 遺伝子を形質転換によって組み込んだタバコの苗を用意し、葉を 1~2 枚残して切断した。その切断部位に発生促進因子と gRNA を組み込んだアグロバクテリウムを感染させることで、感染部位でこれらを一過的に発現させた。結果として、ゲノム編集された細胞が混在するキメラ状態のシュートが感染部位から発生し、このシュートから得られた T₁ 個体にはゲノム編集によって生じた変異が引き継がれていた。この先行研究では Cas9 が組み込まれた形質転換体が用いられていたが、Cas9 も一過的に発現させることでゲノム編集を行うことができれば、野生型に対してゲノム編集を行うことが可能となると考えられる。この方法を達成するにあたり、一過的に発現させる Cas9 および gRNA の発現量が重要となる。そこで、当研究で開発された植物における一過的発現系「つくばシステム」を用いることで形質転換体を用いることなくゲノム編集を行うことを試みた。

本研究では一過的発現によって形質転換を行わないかつ、組織培養を経ないゲノム編集法を開発する、という 2 点を目的としている。これにより、より短時間でより多くの植物種に適用できるゲノム編集方法の確立を目指す。

【方法】

1. アグロバクテリウムの準備

目的タンパク質をコードする遺伝子を導入したベクターを作製し、このベクターを用いてアグロバクテリウムに形質転換を行った。

2. 植物へのインフィルトレーション

植物にバキュームとシリンジを用いてアグロバクテリウムを感染させた。

【結果と考察】

詳細は発表会にて報告する。