

## CRISPR/Cas9 を用いたニンジン不定胚のゲノム編集

高田 一成 (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】

ニンジン (*Daucus carota* var. *sativus*) は、世界中で広く食用として生産されている作物である。また、胚発生研究のモデル生物としても知られている。2016 年に全ゲノムが解読されており (Massimo *et al.*, 2016)、ゲノム編集や遺伝子組換えを用いた研究の発展が期待されている。

ゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 は、gRNA がゲノム上の標的配列に結合し、Cas9 が DNA を切断する。ニンジンに対して CRISPR/Cas9 を用いた論文は、これまでに 3 報報告されている (Magdalena *et al.*, 2018; Xu, Feng & Xiong 2019; Tomasz *et al.*, 2021)。これらの論文では、いずれもカルスに対して CRISPR/Cas9 を細胞内に導入していたが、その後の個体再生は行われていなかった。また、いずれも単一の遺伝子を不活化する Knock out を行っていたが、部位特異的に遺伝子を導入する技術である Knock-in は行われていなかった。

ゲノム編集技術を細胞に導入する方法として、アグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などが挙げられる。アグロバクテリウム法は、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) を感染させることで、アグロバクテリウムが持つプラスミド DNA の一部 (T-DNA 領域) を細胞の核 DNA にランダムに組み込む手法である。エレクトロポレーション法は、電流を流すことで細胞膜や細胞壁に穴を開けることで直接 DNA やタンパク質等を導入する手法である。パーティクルガン法は、DNA やタンパク質等を付着させた微細な金粒子を細胞に撃ち込むことにより直接導入する手法である。アグロバクテリウム法では組換え体であるアグロバクテリウムの完全な除去が必要であるが、エレクトロポレーション法やパーティクルガン法ではその必要がない。先に挙げた 3 つの報告では、いずれもアグロバクテリウム法により遺伝子を導入している。

本研究では、ニンジン不定胚に対してエレクトロポレーション法、パーティクルガン法を用いて CRISPR/Cas9 を導入し、Knock-in を行い、植物体を再生させることを目的とした。

## 【材料】

実験には、ニンジン (*Daucus carota* var. *sativus*) の根茎が紫色を呈するダークパープル (DP) を主に用いた。

## 【方法】

## (1) sgRNA の作製

CRISPR/Cas9 の標的遺伝子は、アントシアニン合成酵素遺伝子の一つである *Dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* とした。DFR より下流に位置するアントシアニンから紫色を呈色するため、この遺伝子が不活化すると白色化して、視覚的な選抜が可能になるものと考えた。DFR の配列上の 4 箇所 gRNA を設計し、Guide-it sgRNA *In Vitro* Transcription Kit (Takara Bio) を用いて sgRNA1-4 を作製した。DP から抽出した核 DNA の標的配列を含む DNA 断片を PCR で増幅後にゲル回収し、sgRNA と Cas9 タンパク質と混合して 37°C で 1 時間インキュベートすることで、*in vitro* で DNA を切断できるか確認した。

## (2) ドナーDNA の作製

設計した gRNA の標的配列の組み合わせにより、2 種類のドナー DNA を作製した。どちらのドナー DNA も両端に DFR の相同組換え配列を持ち、その間にカナマイシン耐性遺伝子である *NPTII*、緑色蛍光タンパク質遺伝子である *ZsGreen* を持つ。

ドナー DNA は Guide-it Long ssDNA Production System v2 (Takara Bio) を用いて、一本鎖 DNA (ssDNA) とした。

## (3) エレクトロポレーション法によるニンジン不定胚への導入

播種後 7 日目の DP の胚軸を 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) を添加した MS 固形培地で培養し、胚性カルス (EC) が得られた後に 2,4-D を添加した MS 液体培地で培養し 2 か月程度経ったものから、27-63  $\mu\text{m}$  の EC を得た。EC は、エレクトロポレーション法によってドナー DNA、sgRNA、Cas9 タンパク質を導入し、その後 MS 液体培地で培養した。

## 【結果・考察】

## (1) sgRNA の作製

電気泳動により、設計した gRNA が標的配列を認識し、DNA を切断できることを確認した (図 1)。

## (2) ドナーDNA の作製

電気泳動により、一本鎖ドナー DNA が作製できていることを確認した。

## (3) エレクトロポレーション法によるニンジン不定胚への導入

詳細は卒業研究発表会にて報告する。

## 【展望】

形質転換後の個体再生を継続し、また、遺伝子型解析を行う。

パーティクルガン法を用いた形質転換も試みて、エレクトロポレーション法と形質転換効率を比較する。

US 春蒔五寸 (US)、矮性品種であるベビーキャロット (BC) に対しても同様な Knock-in を行う。

導入遺伝子を変更し、食べるワクチンの開発を目指す。

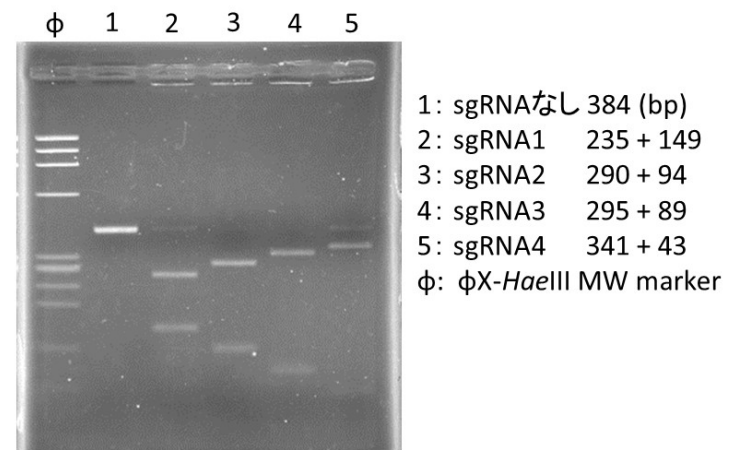


図 1. sgRNA と Cas9 タンパク質による DNA の切断

作製した sgRNA、Cas9 タンパク質と標的配列を含む DNA 断片をインキュベートした後、3.0%アガロースゲルを用いて、100 V 40 min で電気泳動を行った。その後、EtBr で 15 min 染色した。