

CRISPR/Cas9 を用いたシクラメンの完全八重咲品種の作出

度會 千智 (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】

花の色や形は観賞用花卉にとって重要な特性であり、魅力的な色や形であることはその価値を高めることになる。したがって、新規形質花卉の作出は観賞用花卉の商業的価値を高める方法のひとつになっている。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おり、ゲノムに直接的に変異を起こすことによる分子育種は従来の育種よりも効率的に新規形質を獲得することができる。

花器官の形態形成の制御にはABCモデルが提唱されており、クラスA、クラスB、クラスCの遺伝子の発現によって、萼、花弁、雄蕊、雌蕊の形成が制御される。クラスC遺伝子は雄蕊、雌蕊の形成に関わっており、シロイヌナズナのクラスC遺伝子であるAGAMOS (AG) の変異体は雄蕊と雌蕊を欠損した八重咲の花になる。

本研究の材料であるシクラメン (*Cyclamen persicum*) は地中海沿岸原産のサクラソウ科の多年草で、特徴的な5枚の花弁を持つ。また、花の少ない冬季に開花し、開花期が長いことなどから人気の高い鉢花である。シクラメンは2つのクラスC遺伝子を持っており、CpAG1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遺伝子は茎頂分裂組織における増殖を停止する働きが知られている。先行研究ではCRES-T法を用いて、シクラメンの2つのクラスC遺伝子産物(転写因子)の機能を抑制型に変えることにより、50枚以上の花弁を持つ完全八重咲のシクラメンが作出されている(Tanaka *et al.* 2013)。従って、CRISPR/Cas9を用いてシクラメンの2つのクラスC遺伝子を共にノックアウトすることにより50枚を超える花弁を持つ完全八重咲のシクラメンが作出できると期待される。

シクラメンにはCRISPR/Cas9を用いてゲノム編集を行った報告はない。本研究はシクラメンのCRISPR/Cas9を用いた分子育種法を開発すると共に、ゲノム編集による完全八重咲シクラメンを作出することを目的として行う。先行研究では、シクラメンの切片に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、シクラメンのゲノム編集が行われてきたが、標的配列は低頻度での変異にとどまっている。そこで、シクラメンに熱処理を加えることによりゲノム編集頻度の向上も目指す。

【材料・方法】

形質転換体系統の培養

植物材料としてシクラメン「ワインレッド」と「はる香」の2品種を用いた。ワインレッド(WR)は *Cyclamen persicum* 由来の栽培品種であり、はる香(HK)は *Cyclamen persicum* の四倍体性栽培品種と *C. purpurascens* (芳香種) との種間雑種である。これら2品種のシクラメンに、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(ZsGreen)、カナマイシン耐性の各遺伝子を含むCRISPR/Cas9 gRNA 一体型ベクターを導入することで作出された形質転換体系統を用いた。形質転換体系統は20°Cでカルス増殖を行い、25°Cで不定芽形成、個体再生を行った。熱処

理は、不定芽の誘導・育成中の系統を用いて、37°Cに24時間、48時間、168時間のいずれかの時間で処理を行った。

標的遺伝子配列の解析

シクラメン形質転換体系統の蛍光を放つ不定芽からDNAを抽出し、サンガーシーケンスにより標的遺伝子の塩基配列の解析を行った。

【結果・考察】

これまでに、20°Cで培養中の不定芽からは標的配列への変異は確認されなかった(WR: 0/1 系統, HK: 0/14 系統)。

25°C培養中の不定芽からは、WRのCpAG1は29.4%(5/17 系統)で標的配列への変異が確認され、CpAG2の変異は確認できていない(0/17 系統)。HKのCpAG1は1.7%(1/58 系統)、CpAG2は3.4%(2/58 系統)の標的配列への変異が確認された。また、標的配列への変異が確認された系統すべてに野生型(未編集)の対立遺伝子が存在していることから、完全八重咲の表現型を示す系統はまだ作出できていない可能性が高い。

37°Cで熱処理を行った系統の標的配列への変異については発表会にて報告する。

【展望】

得られたゲノム編集体の培養を続け、表現型の解析を行い、期待通りの完全八重咲の表現型を示すかを確認する。また、野生型配列と変異型配列のヘテロのゲノム編集体を用いて交配を行い、後代から外来のDNAを含まない個体を選抜する。この外来のDNAを含まないゲノム編集シクラメンの栽培・鑑賞を通して、遺伝子組換えやゲノム編集植物を身近にすることで、遺伝子組換えやゲノム編集に対する国民的な親しみや理解が深まることに期待する。また、本研究で得た技術は観賞価値を高めると同時に、遺伝子の拡散を防止することから、花卉の遺伝子組換え育種の定法となる可能性がある。この技術を、新しい色や形、香りを付与した遺伝子組換え植物の不稔化に応用することにも期待する。

【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、はる香)を提供して頂いたインプラントイノベーションズ(株)、CRISPR/Cas9 gRNA 一体型ベクターを提供して頂いた遠藤真咲博士と土岐精一博士(農研機構)に深く御礼を申し上げます。また、実験手順等ご指導いただきました小野公代博士に深く御礼を申し上げます。