

In planta ゲノム編集法による青臭みを抑えたダイズの作出

五十嵐 咲季 (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】

ダイズ (*Glycine max*) は経済的価値の高い作物であり、人間の食糧、家畜の飼料、工業用材料として世界中で広く利用されている。したがって、時間やコストを省いた新品種作出法を開発することは、ダイズ生産に大きな利益をもたらす。従来は品種同士の掛け合わせにより新品種を獲得していたが、ゲノム編集技術を利用することにより大幅な効率性の向上が見込まれる。本研究で用いているゲノム編集技術は、CRISPR/Cas9 システムである。CRISPR/Cas9 システムとは、人工ヌクレアーゼである Cas9 と DNA 配列の標的部位を特異的に認識する gRNA によって二本鎖切断 (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、ダイズのゲノム編集は組織培養により形質転換体を得ることで行われてきた。半分に切断したダイズ種子にアグロバクテリウムを感染させることで、Cas9 や gRNA 遺伝子を植物ゲノム内に組み込む。これを植物体まで分化・再生させることで、形質転換体を高効率で獲得できる。しかし、組織培養は適用品種に限られることに加え、植物体獲得までに長い時間を要すること、滅菌環境下における頻繁な培地交換により労力やコストがかかること、カビやバクテリアなどのコンタミネーションによる植物体の枯死など、多くの課題を抱えている。そこで本研究では、より簡便かつ多様な品種に適用できるゲノム編集法として、*In planta* ゲノム編集法を利用する。*In planta* ゲノム編集法とは、組織培養を行わず、植物体に直接ゲノム編集による変異を導入する方法である。本研究では、この方法と一過的タンパク質発現系「つくばシステム」を組み合わせたゲノム編集を行なっている。これにより、形質転換体を作成することなく Cas9 や gRNA の一過的発現が可能であるため、時間やコストを削減できる。また、形質転換体を用いる場合、サイレンシングなどの抑制機構ははたらくが、一過的発現によりサイレンシングサプレッサーも共発現させているため、サイレンシングを防ぐことが可能である。

本研究において変異を導入する目的遺伝子は、*GmFAD2* と *GmFAD6* である。これらの遺伝子は、脂肪酸であるオレイン酸からリノール酸への変換で必要となる触媒酵素をコードしている。リノール酸は、ダイズの青臭みの原因となるヘキサナール生合成経路の出発物質である。そこで、出発物質であるリノール酸を減少させることで、ダイズの青臭みを抑えることができる。ダイズは私たちの身近な食品に多く利用され、近年では代替肉の主な原材料として注目されている。代替肉や豆乳製品の開発において、ダイズ特有の青臭みを抑えることは商業的に求められている形質である。

本研究では、ダイズにおける簡便で編集効率の高いゲノム編集方法 (*In planta* ゲノム編集法) を確立するとともに、この方法を用いた青臭みを抑えたダイズの作出を目的としている。ダイズにおいて確立されたゲノム編集方法は、他のマメ科植物への適用が期待される。

【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
播種後約 1~2 週間の野生型ダイズ植物に対し、バキュームとシリンジを用いてアグロバクテリウムの感染を行った。
3. 植物からのゲノム抽出
感染部位において新たに発生したシュートから 1 cm 四方の葉片を切り出し、ゲノム抽出に用いた。

【結果と考察】

In planta 法を用いることにより、組織培養よりも約 3 ヶ月早く次世代の種子を得られることが明らかとなった。組織培養の場合、カルスの形成や再分化など約 3 ヶ月が必要である。一方、*In planta* 法では、種を非滅菌環境下で土にまき、約 1~2 週間育てた後にアグロバクテリウムの感染を行う。その後、約 3 ヶ月間で次世代の種子を得ることができる。しかし、ゲノム編集効率は組織培養よりも低いため、感染方法の検討が必要である。

本研究では、2 種類の成長段階の野生型ダイズ植物を対象とした。いずれの方法においても感染部位で GFP の蛍光が観察されたため、これらの方法を *GmFAD2* と *GmFAD6* をターゲットとした感染に適用した。播種後約 2 週間の茎頂分裂組織にアグロバクテリウムの感染を行なった場合、新たに発生したシュートのうち複数のシュートにおいてターゲット配列上に変異が見られた。播種後約 1 週間の苗に対して子葉を 1 枚残して切断し、剥き出しになった分裂組織に感染を行なった場合も、新たに発生したシュートにおいてターゲット配列上に変異が見られており、早い成長段階における感染の方が高い編集効率を示した。これは、切断処理によりアグロバクテリウムが感染しやすい状態であることに加え、若い植物体は細胞分裂がより活発であるためだと考えられる。一方で、苗を用いた感染の場合は、植物体が弱く感染後に枯れてしまうことが多い。これを改善するためには、真空浸潤の時間や回数を減らす、シリンジによるアグロバクテリウムの注入回数を減らすなどを検討する必要がある。また、感染後には液体肥料を与え成長を促進させるといった対処法も考えられる。

今後は、感染方法を改善しながら、苗を対象とした感染を続けることでゲノム編集効率の向上を図る。また、現在 T₁ 種子を獲得した段階であるため、T₁ 世代の変異率を調べていきたいと考えている。