

トマトの形質転換と組織培養が不要なゲノム編集導入法の開発とその適応

渡邊 温太（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】

生物は遺伝情報を保存する物質として DNA をもつ。DNA が構成する塩基配列が遺伝情報となり、それらが生物の体内で RNA へ転写、タンパク質に翻訳され、その個体の形質としてあらわれる。

ゲノム編集とは特定のターゲットとなる塩基配列で DNA の二本鎖切断を誘導し、切断面の修復の際に起こるエラーによって DNA の塩基配列に変異を導入する技術である。CRISPR/Cas9 タンパクや TALEN のような人工ヌクレアーゼはそのターゲットとなる塩基配列を認識して DNA と結合し、DNA を二本鎖切断する活性をもっている。人工ヌクレアーゼを用いてゲノム編集を行うことで標的の塩基配列に変異を導入することが可能である。

ゲノム編集を行うメリットは、ゲノム編集によって狙った塩基配列に変異を導入することで生物の形質を変化させられることである。例えば、トマトにおいて有用物質である GABA の含有量を5倍に引き上げることができた (Nagamine and Ezura, 2022)。このようにゲノム編集を利用することで作物の商品価値を高めたり、有用物質の収量を増加させたりすることができる。ゲノム編集が一般に広がる以前の作物の品種改良は、交配や、放射線や化学物質によるランダムな変異導入によって行われていた。それぞれ有用な形質を持つ品種どうしを掛け合わせてお互いの有用な形質を併せもつ子孫を得ることで作物の価値を高めることができる。しかし、こうした交配による品種改良は多くの手間と長い年月がかかり、目的の形質だけを狙って改良することができないなどの難点がある。ゲノム編集技術は交配と異なり、目的の遺伝子を狙って変異を導入させることができるため、品種改良にかかる時間を大幅に短縮することができる。現在は様々な作物においてゲノム編集を利用した品種改良や研究が行われている。

一般的なゲノム編集方法としてアグロバクテリウムを介した形質転換法がある。この法ではアグロバクテリウムの感染、形質転換、組織培養の主に3つのステップから成る。まず、CRISPR/Cas9などのゲノム編集タンパク質を発現させるベクターをもったアグロバクテリウムを作製する。次に、植物から植物断片を切り出し、アグロバクテリウムを感染させる。感染したアグロバクテリウムにより、ベクターに存在する T-DNA 領域が植物細胞の核ゲノムへ挿入されて、形質転換される。その後、植物断片を組織培養してカルスの形成・再分化を経て形質転換植物を得る。そして、その形質転換体がゲノム編集タンパクを発現し、ターゲットとなる配列に変異を導入することでゲノム編集体を獲得することができる。

しかし、現在広く使われているアグロバクテリウムを用いた形質転換法によるゲノム編集方法では大きく2つのステップで課題がある。一つ目は形質転換のステップである。アグロバクテリウムを用いて形質転換を行っているが、形質転換ができない植物には適用できないこと、ゲノム編集体から編集のために導入した外来遺伝子を除去する必要があることなどが課題として挙げられる。二つ目は組織培養のステップである。組織培養も適用可能な植物が限られていること、オーキシンやサイトカイニンといった植物

ホルモンの添加や、再生までに時間がかかることなどが課題として挙げられる。

従来のアグロバクテリウムを用いた形質転換法の課題点を解決するために、本研究では一過的発現とインプラント法を用いたゲノム編集法の開発を目指す。植物にゲノム編集にかかわる遺伝子を形質転換するのではなく、一過的にゲノム編集にかかわるタンパク質を発現させることで形質転換によるデメリットを解消する。先行研究によると一過的発現を用いても GFP タンパクを高発現させることが可能であることがわかっている。(Hoshikawa et al., 2018) また、他の先行研究から果実にアグロバクテリウムを感染させることによって編集体が得られることが知られている。(Yasmeen et al., 2008) これらの先行研究を踏まえて形質転換と組織培養が不要なゲノム編集導入法の開発を目指す。

【方法】

1 アグロバクテリウムの用意

アグロバクテリウム GV2260 に CRISPR/Cas9 の遺伝子と gRNA を含むベクターとスーパーアグロバクテリウムのベクターを形質転換した。

2 アグロバクテリウム感染液の作製

作製したアグロバクテリウムを培養して OD 調製し、感染液を作製した。

3 トマト栽培

16 時間明期の栽培室でトマト種子を播種した。およそ3か月後にトマト果実を得た。

4 トマトからの種子の回収および播種

果実が熟したタイミングで収穫し、種子を回収した。その後播種して生育した。

5 T₀ 世代の DNA 配列の解析とゲノム編集率の算出

生育した個体からゲノムを抽出して標的領域を PCR で増幅し、シーケンス解析を行った。

【結果と考察】

詳細は発表会にて報告する。

【出典】

Nagamine and Ezura (2022) “Genome Editing for Improving Crop Nutrition”

Hoshikawa et al. (2018) “Efficient transient protein expression in tomato cultivars and wild species using agroinfiltration-mediated high expression system”

Yasmeen et al. (2008) “In Planta Transformation of Tomato”