

CRISPR/Cas9 を介したダイズゲノム編集における遺伝変異誘発の特徴

生物資源科学専攻 植物育種科学講座 植物遺伝資源学 金刺佑平

1. 緒言及び目的

激変する環境への適応や品質などのニーズに対し、遺伝的改良に更なるスピードアップが求められているのが作物育種の現状である。CRISPR/Cas9 は任意の塩基配列に対して遺伝変異をもたらすゲノム編集技術の一つであり、有望な遺伝変異の既存品種への直接的な誘導が期待される。世界規模で栽培されるダイズは、本技術による変異個体の作出は海外で3件報告されているが、日本国内では成功例は無い。加えて、自殖性作物であるダイズでは次世代へ変異が伝達できることが肝要であるが、個体内及び世代間で生じる変異誘導の時空間的な特徴については未知である。本研究ではダイズゲノム編集個体の作出を試みると共に、複数の葉位を用いた個体内での変異誘導の様相の確認とその後代での変異導入効率及び変異スペクトラムを確認し、ダイズにおけるCRISPR/Cas9による変異導入の特徴について考察した。また本技術による変異導入の標的として、植物体の形態的な変化に関わる *GmPPD* 遺伝子を対象として、機能欠損変異体の表現型についても併せて考察した。

2. 方法

GmPPD の2つのホモログである *GmPPD1* 及び *GmPPD2* を特異的に認識する gRNA 及び *Cas9* を発現するベクターを構築し、アグロバクテリウム法によって国内ダイズ品種「カリユタカ」に形質転換した。得られた形質転換第一世代 (T_1) とその後代 (T_2) において CAPS 及びシーケンス解析による *GmPPD1* 及び *GmPPD2* への変異導入の確認、また T_2 植物体での表現型の評価を行った。

3. 結果及び考察

① T_1 植物体の複数の葉位とその後の T_2 種子で同一の変異が検出された個体と、 T_1 植物体の複数の葉位で異なる変異が検出され T_2 種子では新たな変異が確認された個体の2種類の変異誘導パターンが確認された。以上からダイズにおけるCRISPR/Cas9を用いた遺伝改変では形質転換当代 (T_1) において誘導された変異と T_1 植物体において新たに誘導される変異が生じることが明らかとなった。

② 11の T_1 個体由来の T_2 種子 224粒のCAPS解析の結果から *GmPPD1* は111粒、*GmPPD2* は154粒で野生型のバンドが検出されない変異型であった。 T_1 植物体では解析した25個体のうち *GmPPD1* では2個体、*GmPPD2* では6個体の変異型であり、変異体の数は次世代において増加したことが示唆された。

③ *GmPPD1* 及び *GmPPD2* が機能欠損した変異体では、葉の湾曲化などの著しい形態的变化、開花始の遅れ、葉緑素量の減少、種子数の減少が確認された。一方、*GmPPD2* のみが機能欠損した個体では、これらの著しい形態変化は確認されなかった。このことから両遺伝子座の機能欠損が植物体の器官形成能に著しく影響を与え、特に種子の形成については致命的な障害を与える事が示唆された。

4. 今後の展望

本研究ではCRISPR/Cas9による変異誘発の特徴について考察を行った。また複数種の変異スペクトラムを持った変異体を作成し、*GmPPD* の機能について新たな知見を得る事に成功した。ダイズゲノムは古倍数性に由来する遺伝子の重複化が起こっており、複雑な遺伝子ネットワークを有する。本研究で示したようにCRISPR/Cas9により生じる変異の多様化が、重複する遺伝子間における機能分化を含め様々な遺伝子に対して新たな知見をもたらすことが期待される。