

# カルスを利用したアズキのゲノム編集技術の開発

生物資源科学専攻 植物育種科学講座 植物遺伝資源学 高橋 一平

## 1. 緒言及び目的

CRISPR/Cas9 は、標的配列に対して特異的に変異を導入することができる代表的なゲノム編集技術の一つであり、遺伝子の機能解析だけでなく育種など応用研究への利用も期待され、近年様々な植物種において研究例が報告されている。しかし、アズキにおいて CRISPR/Cas9 を含めたゲノム編集技術の報告例はない。アズキは上胚軸に由来するカルスを経由して再分化することが知られ、この上胚軸にアグロバクテリウムを感染させることにより形質転換体を得ることができる。しかし、形質転換細胞を効率的に選抜する条件には改良の余地があることから、異なる選抜条件下にあるカルスにおいて変異の誘発程度を解析することは、アズキにおけるゲノム編集技術開発の基盤を整備することに繋がると考えられる。そこで本研究は形質転換細胞の効率的な選抜条件を検討した上で、その条件においてゲノム編集ベクターの導入を試みた。さらに、ゲノム編集によって誘発された標的遺伝子の変異を解析し、培養初期段階のカルスにおいて変異誘発の程度について特徴を考察した。

## 2. 方法

*GFP* 遺伝子をアグロバクテリウム を介して国内アズキ品種「ベニダイナゴン」に形質転換し、選抜剤にカナマイシンとハイグロマイシンBを利用して効率的な形質転換を行える選抜条件を検討した。さらに、検討した選抜条件を基に、クロロフィル分解に関わる *SGR* 遺伝子およびデンプン合成に関わる *GBSS* 遺伝子のそれぞれ2つのホモログを標的として、guide RNA (gRNA) 発現プロモーターや組み込む gRNA の数が異なる合計4つのゲノム編集ベクターを構築しカルスへの導入を行うと共に、カルスにおいて CAPS 及びシークエンス解析によって変異誘発の程度を確認した。

## 3. 結果と考察

①ハイグロマイシンB 10 mg/L の選抜条件においてカルスレベルで形質転換効率が高いということがわかった。そこで、この条件においてカルスから形質転換細胞をうまく分化させることができれば、形質転換体を作出できる可能性が示唆された。

②*SGR* 遺伝子に関して、1つの gRNA で2つのホモログに変異を誘発することに成功した。*GBSSI* 遺伝子に関して、1遺伝子に対して1つの gRNA を設計し、計2つの gRNA を組み入れたベクターを利用してゲノム編集を行った結果、両ホモログに変異が誘発されたカルスは計76個中、11個体であった。また1遺伝子に対してそれぞれ2つの gRNA を設計し、計4つの gRNA を組み入れたベクターを利用した結果、両ホモログに変異が誘発されたカルス数は26個中、6個体であった。それらの変異パターンは1塩基の挿入から202塩基の欠失まで様々であった。また、1つのカルスから多数の変異アリルを有するカルスを確認した。これは、キメラ性の変異を持つ同一のカルスから植物体を再分化させることで多様な変異を持つ個体を作出する可能性が高いと言える。誘発される変異の中にはインフレーム変異もあり得るため、必ずしも機能が大きく変化するとは限らないことから、一度に多様な変異アリルを生み出せることは遺伝子機能解析に非常に有効であると言える。

## 4. 今後の展望と課題

本研究では4つのゲノム編集ベクターを構築し、培養初期段階のカルスにおいて変異の誘発に成功したことにより、アズキでのゲノム編集に利用するベクターの有用性を確認するとともに、これらの変異カルスからシュートを再分化し、ゲノム編集個体を作出できる可能性が示唆された。また、エンドウやインゲンなどの近縁のマメ科植物に先駆けてゲノム編集技術開発の基盤を整備することで、アズキを含めたマメ科植物の遺伝子機能解析技術の確立や育種への応用が期待できる。