

CRISPR/Cas9 システムを介したゲノム編集による

ダイズアレルギー遺伝子の変異誘発

生物資源科学専攻 植物育種科学講座 植物遺伝資源学 菅野 奨太

1. 緒言及び目的

ダイズアレルギー患者は推定 10 万人以上いるとされる。ダイズアレルギーの症状はアトピー性皮膚炎、喘息の他重篤な場合は呼吸困難を引き起こす。そのため、ダイズのアレルギー性を低減することは食の安全性という観点からとても重要であると考えられる。そのため手段の一つとしてゲノム編集技術が期待されている。ダイズにおいてゲノム編集個体作出の例は5件報告されているが、複数の遺伝子をターゲットに複数の gRNA を用いた例は無い。本研究は、ダイズ既存品種の低アレルギー化を最終目標とし、ゲノム編集技術を介して Gly m Bd 28K および Gly m Bd 30K とよばれる2種類のアレルゲンをコードする遺伝子（以下 28K 遺伝子, 30K 遺伝子と記す）の変異誘発を試みた。具体的には、ダイズ品種「エンレイ」および「カリユタカ」についてゲノム編集個体の作出を試みた。また、作出したゲノム編集個体からヌルセグリガント（標的遺伝子に変異が誘発され、且つ導入遺伝子が分離除去されている個体）を獲得し、対象となるアレルゲンタンパク質の蓄積程度をウェスタンブロット分析を通して評価した。

2. 方法

Gly m Bd 28K 及び Gly m Bd 30K をコードする遺伝子である 28K 遺伝子及び 30K 遺伝子の特異的に認識する 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ダイズ品種「エンレイ」および「カリユタカ」の形質転換を行った。得られた形質転換第一世代(T₁)とその後代(T₂)において CAPS 及びシーケンス解析による 28K 遺伝子及び 30K 遺伝子への変異導入の確認をした。また T₃世代において各アレルゲンタンパク質の蓄積程度をウェスタンブロット分析を通して評価した。

3. 結果と考察

① 「エンレイ」において、T₃種子でヌルセグリガントを得ることができた。一方カリユタカに関しては T₂種子でヌルセグリガントを得ることができた。これらの種子をシーケンス解析した結果、両遺伝子座について9つの異なるハプロタイプを確認した。

② 「エンレイ」, 「カリユタカ」共に Gly m Bd 28K 及び Gly m Bd 30K の蓄積が低減しているヌルセグリガントを確認した。変異遺伝子の配列から想定されるアミノ酸配列において、一部のエピトープが残っていると考えられるものもあり、アレルギー性の低減の有無に関しては、患者の血清を使った実験を行う必要もあると考えられた。

4. まとめと展望

本研究において、既存品種に対して2年という短期間でアレルゲンタンパク質を低減できることを示した。本研究で対象としたアレルゲン遺伝子は2種類であるが、対象遺伝子をさらに増やしたゲノム編集を行うことで、より多くの種類のアレルゲンタンパク質を低減できると考えられる。