

ゲノム編集によるダイズ帯化の原因遺伝子の特定および

アレルゲン遺伝子のノックアウトに関する研究

生物資源科学専攻 植物育種科学講座 植物遺伝資源学 安達康平

1. はじめに

ゲノム編集は標的とする生物ゲノム上の任意の DNA 配列に変異を誘発する技術であり、目的の遺伝子のみのノックアウトが可能である。そのため、遺伝子の機能解析および意図する遺伝子の機能喪失に利用することができる。本研究では、ダイズの帯化の原因候補遺伝子 (①) およびアレルゲン遺伝子 (②) を対象に CRISPR/Cas9 を介したゲノム編集でノックアウト個体を作出した。① 先行研究によって、ダイズの帯化の原因遺伝子は 2 個にまで絞られているため、ゲノム編集により両方あるいはそれぞれをノックアウトした個体を作出し、それらの形質を比較することでダイズの帯化の原因遺伝子を特定することを目的とした。② ダイズのアレルゲン Gly m Bd 30K をコードする遺伝子 (以下、30K 遺伝子) をノックアウトした個体を作出し、種子におけるアレルゲン Gly m Bd 30K タンパク質の蓄積をなくすことで、アレルゲン性の低下を目的とした。

2. 方法

① ダイズの帯化の原因候補遺伝子の両方あるいはそれぞれ片方を標的とする gRNA と Cas9 タンパクを発現する 3 種類のベクターを作製し、アグロバクテリウム法により国内品種「カリユタカ」に形質転換した。得られた T₀ 世代から T₂ 世代までの個体に対して、PCR による外来遺伝子導入の確認および CAPS 解析とシーケンス解析による標的遺伝子における変異誘発の確認をした。② ダイズの 30K 遺伝子を標的とする gRNA と Cas9 タンパクを発現するベクターをパーティクルボンバードメント法により米国品種「Jack」の不定胚に形質転換した。世代を更新して得られた外来遺伝子を持たずに変異が固定された T₂ 植物および T₃ 種子を用いて、形態の比較および SDS-PAGE とウエスタンブロッティングによるタンパク解析、元素分析をした。

3. 結果と考察

① T₀ 植物の葉において外来遺伝子が導入され、変異が生じたことを確認した。しかし、変異型の割合が低く、1 個体の中で 3 種類以上の変異スペクトラムが見られたことから、誘導された変異はキメラ性が高い状態であると考えられた。また、T₁ 世代以降では、Cas9 遺伝子は導入されていたが、変異は検出できなかった。T₀ 世代で変異が生じている個体もあるので、Cas9 タンパクと gRNA をコードする遺伝子が完全に導入されていないこと、あるいは機能していないことが考えられた。② 3 系統においてフレームシフト変異を確認した。これらの T₃ 種子においてウエスタンブロット解析を行ったところ、Gly m Bd 30K の蓄積が大きく減少していることを認めた。一方、これらの変異体は野生型と比較して形態に大きな差異は認められなかった。

4. まとめ

本研究では、帯化の原因遺伝子を特定することはできなかったが、ゲノム編集によって外来遺伝子を持たず、かつアレルゲン遺伝子ノックアウト個体を作出することができ、ダイズにおいて特定の遺伝子のみのノックアウトが可能であり、ゲノム編集が実用的であることを示した。