

# 遺伝子操作による花粉不稔の誘導 ～花粉に悩める子羊たちへ～

生物資源科学部 生物生産科学科

2年 野村 麗美

2年 阿部 遥貴

2年 藤田 涼佑

2年 皆川 聖太

指導教員 学部名 学科名

助教 上田 健治

教授 我彦 広悦

## 1. はじめに

植物の花粉形成の際には多くの遺伝子が働いていることがわかってきたが、機能が明らかにされた遺伝子は限られている。イネの花粉形成に関わる遺伝子の機能が明らかになればイネ育種の推進に貢献できるだけでなく、花粉症軽減にも寄与できると考えられる。

ゲノム編集は、塩基配列を特異的に認識する DNA 切断酵素（ヌクレアーゼ）を用いて標的遺伝子を改変する技術である（遠藤 2016）。ゲノム編集で利用されるヌクレアーゼの 1 つ CRISPR/Cas9 は、細胞内でガイド鎖 RNA (gRNA) と複合体を形成し、gRNA と相補的な標的 2 重鎖 DNA を切断する。切断された DNA が非相同末端結合で修復される際に高頻度で塩基の挿入や欠失がおこり、結果的に標的遺伝子の機能が破壊される（遠藤 2016）。イネでは CRISPR/Cas9 をもちいて効率的に遺伝子破壊を誘導するベクターが開発されている（Mikami et al. 2015）。本研究では、イネの花粉形成に重要と予想される 2 つの遺伝子を機能破壊することで、花粉形成でのこれらの遺伝子の役割を明らかにすることを目的とした。

## 2. 材料と方法

### [材料]

イネのゲノム編集に用いた標的配列クローニング用ベクター pU6\_ccdB\_gRNA およびイネ形質転換用ベクター pZH\_gYSA\_PubiMMCas9 は農研機構の土岐精一博士と遠藤真咲博士から分譲された。pU6\_ccdB\_gRNA の増殖に必要な大腸菌株 ccdB Survival™ 2 T1 株は市販品を購入した。形質転換に用いたイネ品種‘台中 65 号’の種子は国立遺伝学研究所野々村賢一博士から分譲された。

### [方法]

#### ・プラスミド構築

遺伝子破壊にもちいた 20bp の標的配列は、オンラインソフト CRIPR-P 2.0 によって決定した（Liu et al. 2017）。標的配列クローニング用ベクター pU6\_ccdB\_gRNA を制限酵素 BbsI-HF で切断し、電気泳動ゲルで精製した。標的配列のオリゴ DNA を重合させた後、このベクターに挿入した。得られたプラスミドを制限酵素 PaeI と AscI で切断し、インサート

を精製した。イネ形質転換用ベクターpZH\_gYSA\_MM Cas9 を Pacl と Ascl で切断し、インサートを挿入した。プラスミドをアグロバクテリウムに導入した。

#### ・イネの形質転換

イネの形質転換は増本と宮尾（2009）の方法でおこなった。まず、殺菌した‘台中 65 号’の玄米をカルス誘導培地（N6D 寒天培地）に 1 プレート 10 粒（計 200 粒）置床して 30℃の暗所で培養した。約 3 週間後、胚盤から脱分化したカルスのうち、直径 2~3mm の淡黄色で固いものを選び、新しい N6D プレートに移して 3 日間培養した。AB 培地で 3 日間前培養したアグロバクテリウムを AAM 培地（アセトシリングンの終濃度 10mg/L）に懸濁した。約 200 個のカルスを茶こしに移してアグロの懸濁液をかけて感染させた。28℃の暗所で 3 日間共存培養した後、クラフォラン（250mg/L）とハイグロマイシン（50mg/L）を含む除菌・選抜用培地（N6D 寒天培地）で 30℃の暗所で培養した。2 週間後、カルスを再分化培地（MS 寒天培地）に移植して明所で培養して植物体を再分化させた。シュートがある程度分化した後に発根用ホルモフリー培地に移植した。植物が成長したら水を入れたポットに入れて順化させた後、組換え温室内のワグナルポットの土壌に移植した。

#### ・形質転換イネの遺伝子解析

再分化したイネの葉を採取し、Edwards ら（1991）の方法によって DNA を抽出した。標的配列を含む DNA 領域を PCR 法により増幅し、増幅した DNA 断片を pMD20 ベクターにクローニングした。大腸菌 JM109 株に形質転換して増殖したコロニーを 5~6 個選び、プラスミドを抽出して塩基配列を解読した。

### 3. 結果と考察

#### [プラスミドの構築]

標的配列に選んだ 20 塩基がベクターに挿入されていることは塩基配列の解読あるいは PCR 法によって確認した。

#### [イネの形質転換]

イネ台中 65 号の種子約 200 粒（100×2 遺伝子）から誘導したカルス約 400 個（200 個×2 遺伝子）にアグロバクテリウム法で遺伝子を導入し、薬剤選抜したのち再分化させた。遺伝子 1 では 14 系統、遺伝子 2 では 8 系統の再分化個体を得られた。

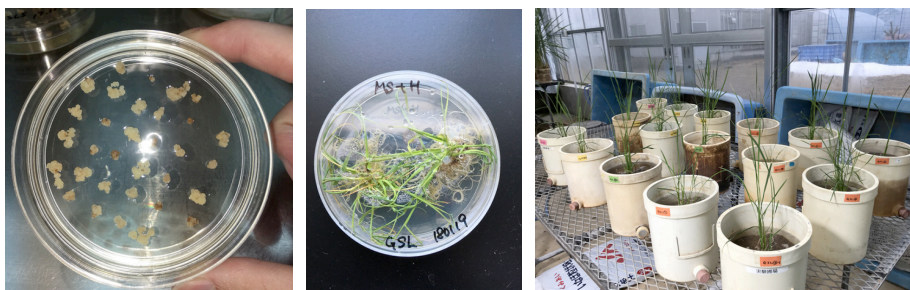


図 1. イネの形質転換

玄米の胚盤からカルスを誘導した（左）。アグロバクテリウムに感染させて遺伝子を導入した後、ハイグロマイシン耐性が付与されて再分化したイネ（中央）。馴化後に組換え温室で土壌に移植されたイネ（右）。

[ゲノム編集による遺伝子破壊]

CRISPR-Cas9 による遺伝子破壊を確認するために、それぞれの形質転換イネのうち、植物体の成長が早かった表 1 と表 2 の植物について、葉から抽出した DNA の遺伝子型を解析した。遺伝子 1 では、#1 と #8-2 の 2 系統は、調べた遺伝子すべてが正常型であったため、Cas9 による二重鎖切断の後に正常な修復が行われたと判断した。#2、#7-1、#7-2、#8-1、#9、#10 の 6 系統は A、T または G の 1 塩基挿入がおこっていた。#11 は正常に修復された遺伝子と、A が 1 塩基挿入された遺伝子の 2 種類が検出された。一方、遺伝子 2 では、#1 は、すべてで T の 1 塩基挿入が見られた。#2 では、T の 1 塩基と AAT の 3 塩基が欠失した 2 種類の遺伝子が検出された。#4-1 では A の 1 塩基の欠失が起こっていた。さらに、#6 では 3 塩基 (ATC) と 38 塩基という大きな欠失が見られた。そして、#7 では 1 塩基 (A) と 18 塩基の欠失が起こっていた。

表 1. 遺伝子 1 の塩基配列の変異

#は系統番号を示す。ins1 は一塩基挿入を示す

遺伝子1	塩基配列の変異
#1	正常
#2	ins1 (A), ins1 (T)
#7-1	ins1 (A), ins1 (T)
#7-2	ins1 (A), ins1 (T)
#8-1	ins1 (G), ins1 (T)
#8-2	正常
#9	ins1 (A), ins1 (T)
#10	ins1 (T)
#11	正常, ins1 (A)

表 2. 遺伝子 2 の塩基配列の変異

#は系統番号を示す。del1 は一塩基欠失を示す

遺伝子2	塩基配列の変異
#1	ins1 (T)
#2	del1 (T), del3 (AAT)
#4-1	del1 (A)
#6	del3 (ATC), del38
#7	del1 (A), del18

次に、ゲノム編集によって誘導された塩基配列の変異がタンパク質の変化を伴うかどうかを調べた。まず、遺伝子 1 で主におこっていた 1 塩基挿入の場合、挿入位置の下流 8 番目のアミノ酸残基がアスパラギンから終止コドンに変化していた。正常な遺伝子 1 は約 2,000 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードするが、この変異遺伝子は約半分の長さの短いタンパク質しか合成できないことが明らかになった。また、遺伝子 2 においては、1 塩基挿入や 1 塩基欠失で数残基～十数残基目のアミノ酸が終止コドンに変化していた。正常な遺伝子 2 の遺伝子破壊系統では、1 塩基挿入では 17 アミノ酸残基、1 塩基欠失では 23 アミノ酸残基からなる非常に短いタンパク質しか合成できないことが明らかになった。また、3 塩基または 18 塩基欠失した遺伝子では、アミノ酸が 1 つまたは 6 つ失われることになるが、これらは正常なタンパク質として機能する可能性がある。さらに、38 塩基を欠失した

遺伝子については、1塩基が増減した変異と同様にフレームシフトが予想されるため、正常なタンパク質は合成できないと考えられる。以上のことから、遺伝子1および遺伝子2について、ゲノム編集技術をもちいてタンパク質の機能損失をともなう遺伝子破壊を誘導することに成功した。今後は、残りの系統について遺伝子解析を継続すると共に、本実験で作出した遺伝子1の14系統および遺伝子2の8系統に関して花粉不稔が誘導されるか解析する必要がある。

#### 4. 参考文献

- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nuc Acid Res* 19: 1349
- 遠藤真咲 (2016) イネを用いたゲノム編集技術の改良と応用. *アグリバイオ* 1: 10-14
- Liu H., Ding Y., Zhou Y., Jin W., Xie K., Chen L.L. (2017) CRISPR-P 2.0: An improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants. *Mol Plant* 10: 530–532
- 増本千都、宮尾光恵 (2009) アグロバクテリウム法によるイネの形質転換. *低温科学* 67: 641-647
- Mikami M., Toki S., Endo M. (2015) Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Mol Biol* 88: 561–572

#### 5. 謝辞

ゲノム編集に用いた pU6\_ccdB\_gRNA および pZH\_gYSA\_PubiMMCas9 をご提供頂いた農研機構土岐精一博士・遠藤真咲博士、台中 65 号の種子をご提供頂いた国立遺伝学研究所野々村賢一博士に深謝する。