

論文内容要旨

報告番号	甲 先 第 357 号	氏 名	上田梨紗
学位論文題目	植物におけるCRISPR/Cas9を利用したゲノム編集技術・標的遺伝子発現制御システムの確立		
<p>内容要旨</p> <p>標的遺伝子の特異的に改変する技術であるゲノム編集技術は、様々な有用作物の新育種技術として利用が期待され世界的に急速に発展しつつある。CRISPR/Cas9 は現在最も広く利用されるゲノム編集技術である。しかし、植物において確実な変異系統を獲得するためには植物種によって高い効率で変異導入を可能とする最適なシステム構築が重要であることが明らかになってきた。さらに、Cas9 の切断活性を不活化させた dCas9 を利用した様々なツールが開発されている。しかし、標的遺伝子の転写活性化の植物における報告例は、シロイヌナズナやタバコなどのモデル植物のみであり、生物種によってもシステムの種類による転写活性化の効果が異なることが示唆されている。そこで本研究では、モデル植物のトマトにおける高効率かつ正確な変異導入を可能とする CRISPR/Cas9 システムの構築および植物において転写活性化を可能とする CRISPR/dCas9 転写活性化ベクターの構築を目的とした。</p> <p>第 I 章では、トマトにおいて CRISPR/Cas9 ベクターの最適化を行い、高効率かつ正確な変異導入を可能とするシステムの構築を行った。標的遺伝子として、トマトの着果に関わるオーキシシンシグナル経路の転写抑制因子として働く <i>SLIAA9</i> 遺伝子を標的とした。gRNA 標的配列の長さ、gRNA および Cas9 のプロモーターの種類、植物のコドンに合わせ改変した Cas9、形質転換トマト作製に使用する薬剤耐性マーカー遺伝子を種々変化させた発現ベクターを構築しトマトに導入した。得られたカルスから再生した成熟個体までの各段階において変異をそれぞれ評価した結果、高い効率でかつ体細胞レベルで 100%変異を持つ <i>IAA9</i> ノックアウトトマトを作出することに成功した。また、体細胞レベルでの変異導入効率が高い CRISPR/Cas9 導入個体の次世代個体において、変異が伝搬されていることを示し、CRISPR/Cas9 カセットが抜けた”ヌルセグリガント”候補の個体の作出に成功した。</p> <p>第 II 章では、植物において転写活性化を可能とする複数の種類の dCas9-転写活性化ベクターを構築し、植物組織内で構築した dCas9-転写活性化ベクターによる標的遺伝子発現の評価を行った。レポーターアッセイによる標的遺伝子の一過的発現解析の結果、本研究で標的とした遺伝子において転写活性化効率の良い gRNA および最適な dCas9-転写活性化ベクターが明らかとなった。さらに、当研究室で開発された新しい植物形質転換方法である”<i>in planta</i>-regeneration”法において、遺伝子制御に関与する遺伝子群の探索を行った。さらにこの技術を応用して、より高い効率で変異導入個体を獲得するために、シュート再生に機能する候補遺伝子の転写活性化を試みた。</p> <p>本研究で、トマトにおいて高い効率で変異導入が可能な CRISPR/Cas9 発現ベクターの構築に成功し、有用な形質の獲得に成功した。また、植物において標的遺伝子の転写活性化を可能とする dCas9-転写活性化ベクターの構築に成功した。また、<i>in planta</i>-regeneration に機能する遺伝子群を明らかにした。</p>			