

## 論文の要約

報告番号	① 乙	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>標的遺伝子を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の利用が期待され、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、植物種や植物組織によって高い効率で変異導入を可能とする最適なベクターシステムの構築が重要であることが明らかになってきた。そこで本研究では、主要農作物の一つである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システムの構築を目的とした。まず、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の発現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%変異個体を作成し、期待された単為結果性を示す <i>SLIAA9</i> ノックアウトトマトを作成できることが明らかとなった。さらに、CRISPR/Cas9導入個体の次世代個体において、変異の固定された個体を高効率に作出し、かつCRISPR/Cas9カセットをゲノム中に保持しない”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。まず、植物において転写活性化を可能とする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、dCas9転写活性化ベクターによって標的遺伝子の転写活性化が可能であることが明らかとなった。さらに、当研究室で開発された新しい植物形質転換法である <i>in planta</i>-regeneration法(特願2017-248388)に、dCas9-転写活性化ベクターを利用し、トマト <i>in planta</i>-regeneration法における植物体再生効率を向上させることを目指した。<i>in planta</i>-regeneration法において、植物体再生過程での遺伝子制御に関与する遺伝子群の探索を行い、<i>in planta</i>-regeneration法における茎頂組織からの植物体再生促進のための重要因子を同定した。同定した遺伝子をdCas9-転写活性化ベクターにより転写活性化を行うため、レポーターアッセイによって最適なgRNA候補を選抜し、<i>in planta</i>-regeneration法により茎頂組織に導入した。標的gRNAを含むdCas9-転写活性化ベクターを導入した茎頂組織からの植物体再生への効果を観察した結果、植物体再生の増強が観察された。</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を構築し、<i>in planta</i>-regeneration法において植物体再生の増強を可能とした。</p>				