

iPB 法の開発とゲノム編集技術への適用

ー 外来 DNA フリーで細胞培養が不要なゲノム編集 ー

試験研究計画名：ゲノム編集技術の普及と高度化

研究代表機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

背景とわらい：

一般的な植物ゲノム編集では、ゲノム編集酵素をコードする遺伝子を細胞に導入し、組織培養を経て、ゲノム編集が生じた個体を獲得する方法が用いられています。しかし、作物の実用品種の多くは、培養を経た個体再生の効率が極めて低く、ゲノム編集個体獲得の障害となっていました。そこで、本研究では、植物の生長点に直接ゲノム編集酵素（DNA またはタンパク質/RNA 複合体）を打ち込み、培養過程を経ることなくゲノム編集個体を獲得することを目指しました。

特長と効果：

植物の生長点に DNA、RNA、タンパク質を直接導入する技術を開発し、iPB (*in planta* Particle Bombardment) 法と命名しました。コムギ種子胚を用いた iPB 法では、顕微鏡下、微細針を使って露出させた完熟種子の茎頂組織に、金粒子にコートした DNA、RNA、タンパク質をパーティクルボンバードメント法により打ち込み、L2 層の細胞に DNA や RNA、タンパク質を導入します（図 1、2）。L2 層から生殖細胞が分化することから、iPB 法により Cas9、sgRNA 複合体を導入したコムギの次世代において、キメラ性のないゲノム編集コムギ個体が得られました（図 3）。本手法を難培養性の植物種、品種に適用することにより、遺伝子組換えやゲノム編集が幅広い植物で可能となります。また外来 DNA を用いないゲノム編集が可能になることで、外来遺伝子の遺伝学的分離が困難な栄養繁殖性植物においても、ゲノム編集を利用した有用品種の開発が加速することが期待されます。

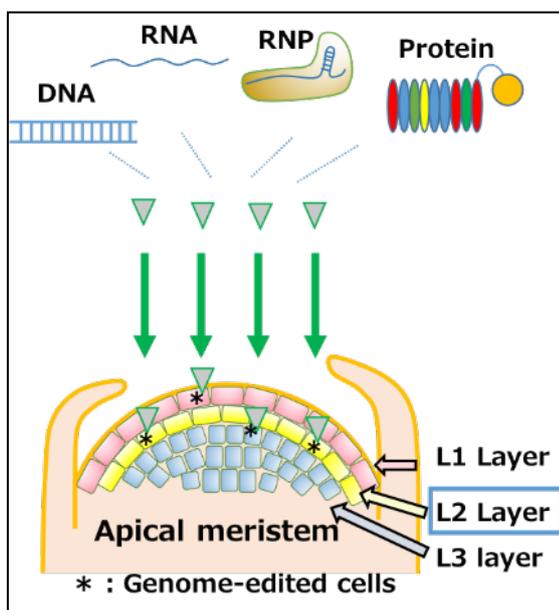


図 1 iPB 法の概要

DNA や RNA、タンパク質、タンパク質/RNA 複合体を金粒子にコーティングし、生殖細胞となる茎頂 L2 層に打ち込む。

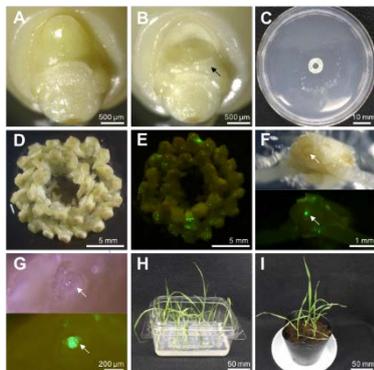


図2 iPB 法の手順

吸水させた種子胚 (A) より顕微鏡下で茎頂を露出させる。胚盤より切り取りプレート上に並べて (B, C), パーティクルガンで金粒子にコートした遺伝子 (本例では GFP 遺伝子) を撃ち込む (D-G)。胚から植物体を成長させて (H, I) 次世代種子を得る。

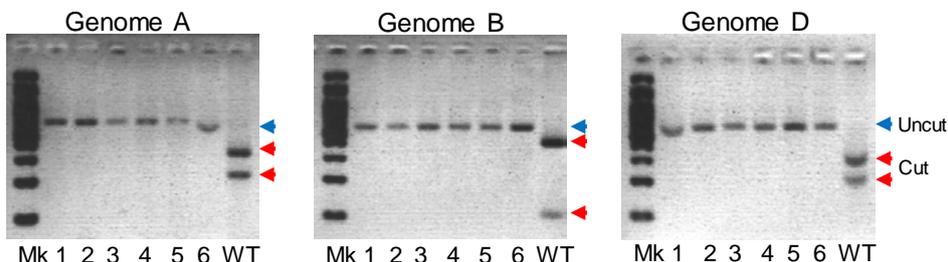


図3 iPB-RNP 法によりコムギ6倍体の全ゲノム遺伝子に変異が導入された例
青矢印の位置のバンドがゲノムに変異導入されていることを示す。

社会実装の対象と可能性:

本手法により、コムギ、ダイズ、トウモロコシ等の作物における有用品種の開発を劇的に加速することが期待されます。食用の農産物に加え、飼料用作物や、加工食品、工業利用を目的とした植物原料の改良等、本技術の利用範囲は広く、種苗会社や原料メーカーへの技術移転が考えられます。また、ゲノム編集農作物の規制検討も進められている中、DNAを導入しないゲノム編集は、カルタヘナ法で規制される「遺伝子組換え生物等」に該当しないゲノム編集生物の作成技術として大きな注目を集めており、国内外を問わず、多くの企業、研究機関が本技術を利用することが期待されます。

参考文献:

- ・ Hamada et al. (2017) An in planta biolistic method for stable wheat transformation. *Sci. Rep.* 7 (1), 11443.
- ・ Hamada et al. (2018) Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Sci. Rep.* 8 (1), 14422.

研究担当機関名: 農研機構 生物機能利用研究部門、株式会社カネカ

研究担当者: 農研機構 今井亮三、Linghu Qianya、株式会社カネカ 濱田 晴康、柳楽 洋三、三木隆二、田岡直明

問い合わせ先: 国立研究開発法人農研機構生物機能利用研究部門
組換え作物技術開発ユニット
電話: 029-838-8694 E-mail: rzi@affrc. go. jp

作成日: 2019/04