マイクロニードルアレイを用いたCas9輸送による植物のゲノム編集

（産総研細胞分子工学[1]・東農工大学院・工・生命工[2]・産総研バイオメディカル[3]・産総研センシングシステム[4]・静大学院・光医工[5]・高健大・農[6]）◯星 柾充[1,2]・宮澤 幸乃[1]・田中 知子[1]・山岸 彩奈[1]・古旗 祐一[3]・加藤 義雄[3]・牧本 なつみ[4]・竹下 俊弘[4]・小林 健[4]・岩田 太[5]・木村 光宏[6]・吉積 毅[6]・中村 史[1,2]

Plant genome-editing by direct delivery of Cas9 protein using microneedle array ([1]*Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST*, [2]*Dept. Biotechnol. & Life sci., Grad. Sch. Eng., TUAT*, [3]*Biomed. Res. Inst., AIST*, [4]*Sensing system Res. Inst., AIST*, [5]*Grad. Sch. Med. Photonics, Shizuoka Univ.* [6]*Fac. Agric., UHW*) ◯Masamichi Hoshi,[1.2] Yukino Miyazawa,[1] Tomoko Tanaka,[1] Ayana Yamagishi,[1] Yuichi Furuhata,[3] Yoshio Kato,[3] Natsumi Makimoto,[4] Toshihiro Takeshita,[4] Takeshi Kobayashi, [4] Futoshi Iwata,[5] Mitsuhiro Kimura, [6] Takeshi Yoshizumi,[6] Chikashi Nakamura[1.2]

In this study, we attempted to introduce Cas9 protein into Arabidopsis leaf tissue and soybean meristem tissue for genome editing using microneedle array (MNA) made by silicon microfabrication. Elastic modulus of the surface of both *Arabidopsis thaliana* and soybean tissues were evaluated using AFM. The results were approximately 2.2 and 4.9 MPa, respectively, which were more than 100 times higher than the surface modulus of animal cells. Next, MNA with needles of 40 ~ 100 μm in length and 1 ~ 2 μm in width was inserted into the tissues to investigate the shape of needle that can be inserted without buckling. As a result, an MNA with a needle of 60 μm in length and 2 μm in width was successfully inserted without buckling. Next, in the genome editing using Cas9, a reporter *Arabidopsis* was used, in whichβ-glucuronidase (GUS) gene expresses when the digestion of PDS3 fragment occurs. The Cas9/gRNA complex was introduced by inserting the MNA into the tissue and retracting it after incubation for 1 min in the tissue. The success of the genome editing was estimated with GUS staining of the leaf tissue and NGS analysis to evaluate indel efficiency.

Keywords：Protein delivery, Microneedle array, Plant tissue, Genome-editing, Cas9

本研究では、植物組織のゲノム編集を目的として、シリコンの微細加工により作製した角柱状マイクロニードルが 1 次元に配列したアレイ（MNA）を用いて、シロイヌナズナ葉組織、ダイズ茎頂分裂組織に対する Cas9 タンパク質の導入を試みた。まず、AFM を用いてナズナ・ダイズ両組織表面の弾性率を評価した結果、それぞれ約 2.2、4.9 MPa であり、動物細胞の表面弾性率と比較して 100 倍以上高い弾性率であった。そこで、長さ 40～100 μm、幅 1～2 μm の針を持つ MNA を用いて座屈せず挿入可能な針形状を検討した結果、長さ 60 μm、幅 2 μm の針を持つ MNA が、ナズナ・ダイズ両組織で座屈せずに挿入可能であることが確認された。Cas9 を用いたゲノム編集では、PDS3 遺伝子の部分配列の切断によりβ-glucuronidase（GUS）遺伝子が発現するシロイヌナズナレポーター植物を用いた。MNA 表面に Cas9/gRNA 複合体を吸着させ、組織に挿入後 1 分間停留し抜去することで、複合体を導入した。このナズナ葉組織を用いた GUS 染色によりゲノム編集の成否を判定し、また NGS 解析により indel 導入効率を算出した。

© The Chemical Society of Japan