プラズマ処理によるタバコカルスへの Cas9 導入によるゲノム編集

Genome editing with discharge plasma by introducing Cas9 into tobacco callus

愛媛大院理工 [1]，パール工業 [2]，アイジーン [3]，愛媛大院農 [4]
°(M2) 宮本　聡一朗 [1],池田　善久 [1]，木戸　祐吾 [1,2]，佐藤　晋 [1,3]，賀屋　秀隆 [4],神野　雅文 [1,3]
Ehime Univ. [1,4], Pearl Kogyo Co. Ltd.[2], i-Gene Corp.[3]
°Soichiroh Miyamoto[1], Yoshihisa Ikeda[1], Yugo Kido[1,2], Susumu Satoh[1,3], Hidetaka Kaya[4], Masafumi Jinno[1,3]
E-mail: yikeda@mayu.ee.ehime-u.ac.jp

1. 序論　近年、遺伝子組み換えに代わる植物の育種技術として、ゲノム編集が期待されている。我々は動物細胞に対して確立したプラズマ分子導入を植物に用いてゲノム編集を可能にすることを目的として、タバコカルスを標的にゲノム編集を試み、成功したので報告する。

2. 実験方法　図1 に実験の概略図を示す。標的にはタバコのカルス細胞を用い、導入物質はNLS-SpCas9とsgRNAの複合体(RNP)を用いた。用いたタバコカルスは形質転換体であり、ゲノム編集により特定の塩基配列を欠失することで、GFPを発現する。そのため、プラズマ処理により緑色蛍光を確認出来るとプラズマによるゲノム編集に成功したと言える。

プラズマ処理条件として周波数20 kHzの正弦波を用いた。また印加電圧は18 kV、印加時間は20 msとした。タバコカルスを3.5 cmディッシュに静置し、電極先端からカルスまでの距離を1 mm としてプラズマ処理を行った。処理後、RNP溶液を照射部位に10 μl滴下し、一定時間静置した後に培地に移し、1日経過後、顕微鏡にて蛍光観察を行った。

3. 結果と考察　図2にプラズマ処理後のカルスの蛍光観察結果を示す。左図より他の細胞より明るく緑色に蛍光する細胞を確認した。自家蛍光の緑色蛍光も確認されたため、蛍光強度をカラーイメージングにより比較した結果を右図に示す。明るく蛍光している細胞は他の細胞より2倍の蛍光強度がある。このような強い蛍光は、プラズマ未処理の細胞や、RNP溶液を滴下していないサンプルでは観察されなかった。ことから、この強い蛍光は自家蛍光では無くゲノム編集により発現したGFPの蛍光であると言える。従って、RNPが核内に導入され、ゲノム編集が行われ、GFPを発現したと結論できる。

4. 結論　プラズマ処理によりタバコカルスのゲノム編集を試みた。その結果、細胞のGFP蛍光とみられる蛍光を確認した。特定の塩基配列がゲノム編集により欠失することでGFP蛍光が発現するので、プラズマ処理によりCas9タンパクが細胞内に導入されゲノム編集がなされることが示された。

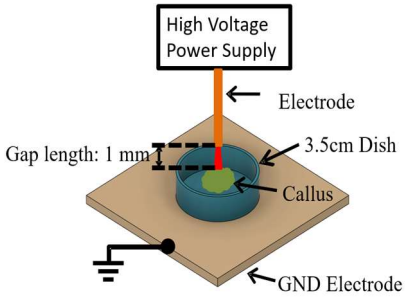

Fig.1 Schematics of surface discharge treatment.

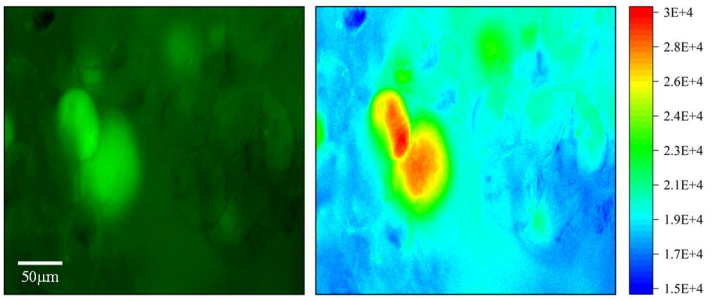

Fig. 2 Fluorescence observation results of RNP. Left: Dark field, Right: Color mapping image of brightness intensity.

謝辞　本研究の一部は JSPS 科研費 (17H01068, 15H00896, 25108509)、愛媛大学リサーチユニットの支援を受け実施されたものです。本研究に用いた NLS-SpCas9 は国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構から提供を受けたものです。