

掌サイズのシーケンサーを用いたゲノム編集樹木の選抜

1. ゲノム編集樹木

ゲノム編集技術はゲノムDNAの狙った場所を改変する技術として、近年樹木での応用例が増加しています。森林バイオ研究センターでは、ゲノム編集技術の一つであるCRISPR/Cas9システムの樹木への応用を進めており、これまでに無花粉スギなどのゲノム編集樹木の作製に成功しています(林木育種情報No.39)。

2. ゲノム編集樹木の作製過程の課題

現在主流となっているゲノム編集技術では狙った場所で生じる変異のパターンはランダムであるため、当初意図していなかったパターンの変異が生じることがあります。また、再生した個体が体細胞キメラ(変異パターンの異なる複数の細胞が混ざっている個体)を示すこともあります。そのため、最終的に作製したゲノム編集樹木では意図した変異パターンを有し、体細胞キメラではない変異体を選抜しなければならないという課題があります。

3. 小型の次世代シーケンサー

上記の課題を解決するために、ゲノム編集により改変されたゲノムDNAの塩基配列を効率的に決定する手法の開発が急務となっています。解決方法の一つとして、次世代シーケンサーを用いてゲノム編集を行った領域の塩基配列を決定する手法があります。森林バイオ研究センターでは、Oxford Nanopore Technologies社が販売しているナノポアシーケンサー(以降、ナノポア)を用いた手法の開発をここ数年行ってきました。ナノポアは非常に小型で持ち運び可能でありながら、数10キロ塩基以上の超長鎖DNAから数100塩基の短鎖DNAまで幅広く塩基配列の解読が可能です。当センターでは、ナノポアで最も小型の解析

用セル(フロングル)を使用しています(図1)。フロングルは20サンプル程度の小規模な解析に適しており、1セルあたり67ドル(およそ1万円)と格安であるため、手軽に利用できます。

4. ナノポアを用いたゲノム編集樹木の選抜

ナノポアを用いてゲノム編集樹木を選抜するために、まず、ゲノム編集を行ったゲノム領域をPCR法により増幅しました。その後、増幅したPCR産物をナノポアにより塩基配列を決定し、データ解析を行うことで変異パターン及びキメラ性を正確に決定しました。これらの成果から、今回開発した手法が目的とするゲノム編集樹木を選抜する手法として有用であることが実証できました。本手法は1サンプル2,000~5,000円で解析が可能であり、500メガ塩基以上の情報を1日で取得することができることから、効率的かつ安価な手法であると言えます。



図1 ナノポアシーケンサー

5. おわりに

ナノポアは日進月歩で改良が進んでおり、販売当初欠点と考えられていたエラー率の高さも改善が進んでいます。今後は、デバイスの改善に合わせ解析手法の最適化を行い、さらに効率的な手法へと改善していく予定です。

(森林バイオ研究センター 佐藤 良介)