

# 植物における微小範囲での遺伝子発現制御 ～植物発生・形態形成の理解を目指して～

野田光希 (大阪大学 理学部)

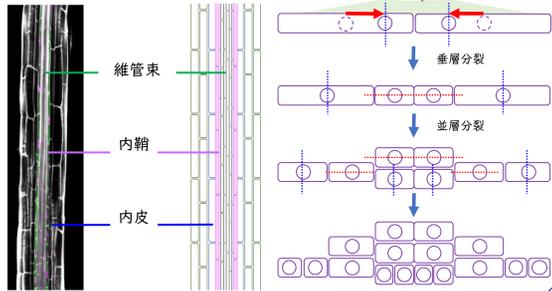
## 要旨

生物の発生・形態形成において、一様な性質を持った細胞の集まりの中で自律的なパターンが形成されて特定の組織機能が形成される自己組織化が起こる。これらの仕組みは非常に面白いが、その時に発現するタンパク質のうちどのタンパク質がどのような機能を持つかは明らかでないことが多い。本研究ではSplit-Cas9を用いて、パターンの形成や維持において重要な機能を持つタンパクの機能を変異体を用いて明らかにすることを目標にする

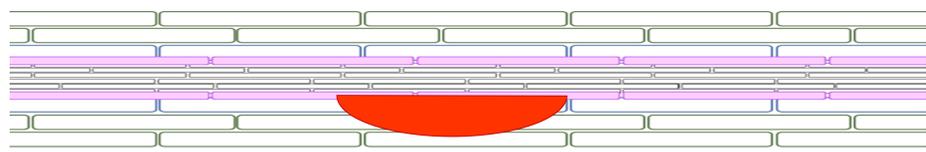
## 私の研究 側根原基は内鞘細胞から形成され、分裂を繰り返して側根へ成長する

### 原基形成

Stage1 オーキシンによる非対称分裂  
Stage2 並層分裂をして2層になる (SCRの発現)  
Stage3 3層  
側根



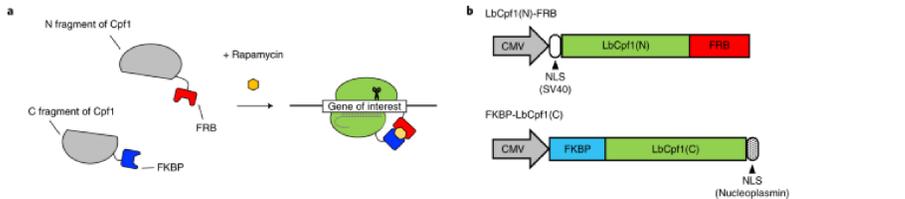
## 目的 植物の自己組織化を理解するための遺伝子発現制御法の確立



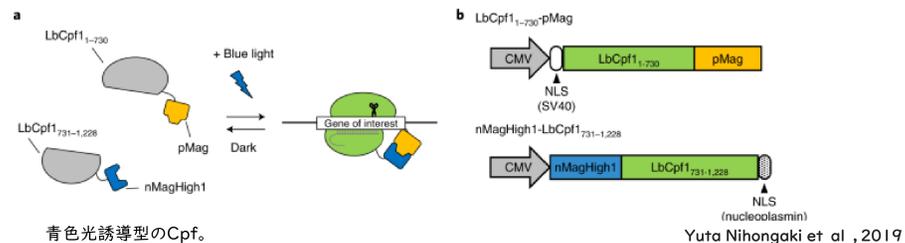
自己組織化: ランダムな状態の組織において自律的なパターンが形成されて、特定の部分が分化し、新たな組織を形成する。  
変異体の作成によって、機能を知らないタンパク質がない状態で何画起きるかを知らることが出来る。また、組織特異的な分子のプロモーターを用いてある組織において遺伝子の発現を制御できる。

機能の知りたい数細胞レベルでの変異体を作成する  
↓  
その部分でのたんぱく質の機能を明らかに!

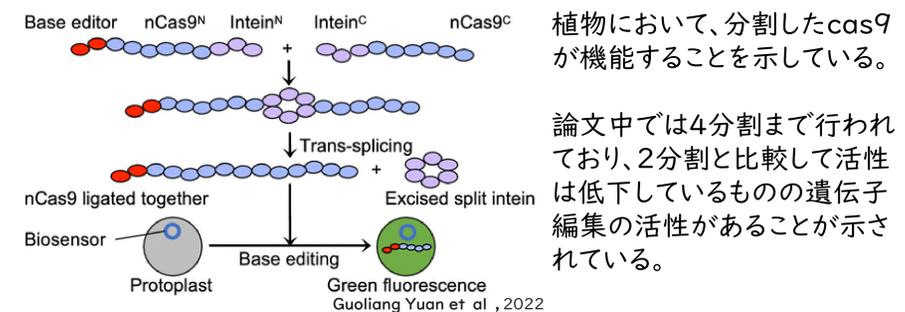
## 先行研究 自己組織化のパターン形成を追うのは難しい



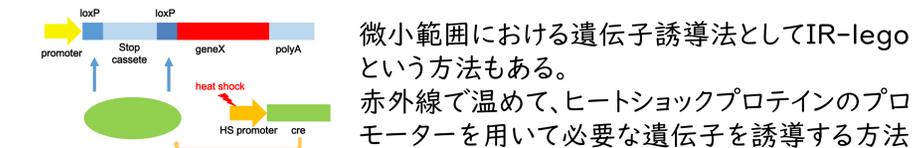
ラパマイシン誘導型のCpf(Cas9同様に遺伝子編集できる酵素)。別の研究では200nMのラパマイシンで十分な遺伝子編集が可能であったことが示されている。(Bernd Zetsche et al, 2015)



いずれも哺乳動物においてこのような遺伝子編集が可能である可能性が示唆されている。一方で、植物における例は調べる限りでは見られない。



トランススプライシングによってエクソン同士が結合されるため誘導型ではない実際に発生における遺伝子編集をしているわけではない。

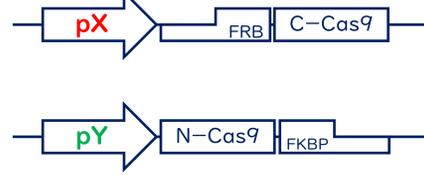


自己組織化においてパターン形成以前に特定組織になる位置を見つけ光を当てるのは困難

## 条件検討

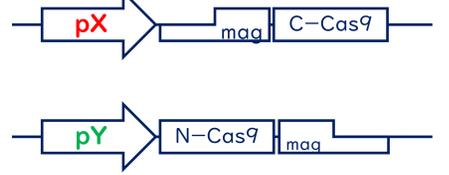
植物においてラパマイシン、青色光どちらでの誘導が適切か

### ラパマイシン(薬剤)での誘導



哺乳動物同様に200nMで誘導がかかるかどうか。  
どの程度の濃度が適切か

### 青色光での誘導



光毒性の検討  
どの程度の強度の光を当てるか  
どの程度の時間光を当てるか

対象とする範囲の分裂活性や細胞伸長に影響がないか  
対象としない範囲において顕著な成長の抑制が起きていないか



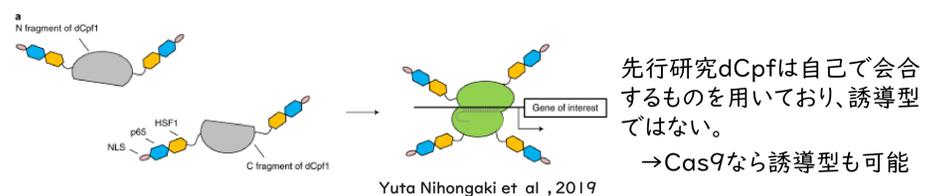
## 植物においてどのくらいの効率でCas9が働くか

植物全体で恒常的にGFPが発現しておくようにしてSplit-Cas9を一部の細胞で作用させる。

例えば...  
左の写真の膨らんだ構造でSplit-Cas9を作用  
→成功: 水色の枠で囲んだところだけ光が消える

## 応用

変異体背景でSplit-dCas9-VP64を用いた遺伝子発現活性化



先行研究dCpfは自己で会合するものを用いており、誘導型ではない。  
→Cas9なら誘導型も可能

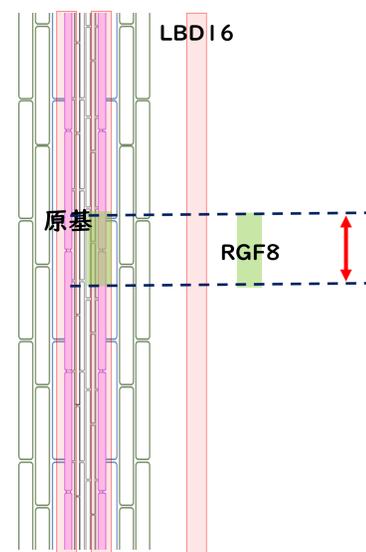
ヌクレアーゼ活性のない変異型のcas9を用いて、微小範囲における遺伝子の活性化を行う。

ある組織の形成が抑制される変異体において人工的にパターン形成を起こす  
変異体で見られた表現型が回復するかどうかの観察

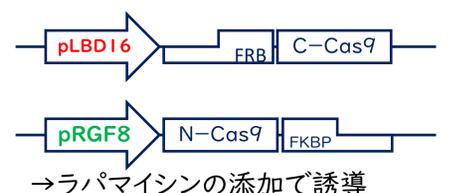
## まとめ

- 先行研究において哺乳動物で確立されたSplit-Cas9を植物に導入する。
- 植物においてSplit-Cas9の誘導方法が適切かどうかを検討する
- dCas9への応用等も行い植物の発生・形態形成の理解へ

## 考えられるモデル



LBD16 : 内鞘細胞で広く  
RGF8 : 根端および原基



→ラパマイシンの添加で誘導

側根原基で  
LBD16とRGF8が重なり  
そこでCas9が働く

## 参考文献

- Yuta Nihongaki, 2019. A split CRISPR-Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation, <https://www.nature.com/articles/s41589-019-0338-y>
- Guoliang Yuan, 2022. An Intein-Mediated Split-nCas9 System for Base Editing in Plants,
- Bernd Zetsche, 2015. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation, <https://www.nature.com/articles/nbt.3149>