

植物ゲノム編集の汎用化・高度化を推進する基盤技術の開発

遠藤真咲（農業・食品技術総合研究機構 生物機能利用研究部門）

mendo@affrc.go.jp

ゲノム編集技術の進展は目覚ましく、人工制限酵素を用いた標的遺伝子の破壊は多くの生物種で一般的な技術となりつつある。植物科学においても、遺伝子機能の同定や農業形質の改良など、ゲノム編集技術の有用性は基礎から応用まで幅広い。演者は大学院在学中から植物ゲノムの精緻な改変技術の確立を目指した研究を行っており、高等植物における DNA 修復機構の理解や、細胞周期と DNA 修復の関係性の解明、donor DNA を用いた標的組み換え系の確立など、多様なアプローチを行ってきた。また近年は、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas)を植物のゲノム編集に利用するためのツールの構築や、各種要素技術を組み合わせた標的組み換え実験を行ってきた。本講演では、それらの取り組みについてご紹介したい。

はじめに

DNA 切断による高等植物の遺伝子改変は放射線育種等により古くから行われていたが、切断が生じる位置はランダムであり、任意の遺伝子をデザイン通りに改変することは不可能であった。近年、Zinc finger nucleases (ZFNs)、Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)、CRISPR/Cas9 といった標的配列特異的に DNA を切断する人工制限酵素が開発され、特定の遺伝子に変異を導入することが可能となった。一方、切断およびその修復エラーにより導入される変異は塩基の欠失や挿入が主であるため（図 1A）、フレームシフト等による任意の変異を導入するには十分であるが、任意の配列の挿入や連続した塩基置換など、より精緻なゲノム編集を行うには、鋳型 DNA を用いた標的組み換え系（図 1B）の確立も重要であると考えている。

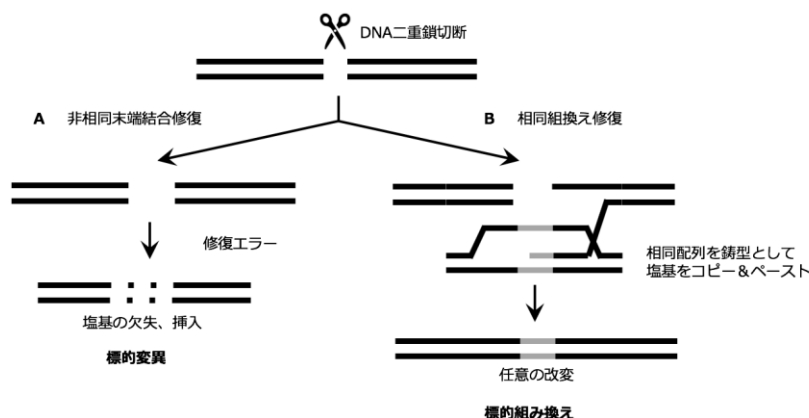


図 1 DNA 二重鎖切断による変異導入

植物における CRISPR/Cas9 発現ベクターの整備と拡充

CRISPR/Cas9 はヌクレアーゼである Cas9 と切断部位を規定する single guide RNA (sgRNA)から構成される人工制限酵素であり（図 2）、変異率の高さと発現コンストラクト構築の容易さから、現在はゲノム編集の主要ツールとなっている。受賞者らは、2013 年に動物細胞における CRISPR/Cas9 を用

いたゲノム編集の報告が発表された直後から高等植物に CRISPR/Cas9 を適用するための実験に着手した。イネやタバコにおいては、比較的早い段階でゲノム編集の成功を示す論文が発表されたが、用いている発現コンストラクトや標的遺伝子、変異効率の評価法は論文間で異なっていたため、結果の相互比較を行うことはできず、また変異導入効率に関わる要因も明らかになっていなかった。そこで、受賞者らは、イネの同一配列を標的として、異なる Cas9 発現コンストラクトと異なる sgRNA 発現コンストラクトを組み合わせた際の標的変異効率を比較し、イネに適した Cas9、sgRNA 発現コンストラクトを決定した¹⁾。また、変異導入効率と Cas9 および sgRNA の発現量には相関があること²⁾、イネの場合は形質転換カルスの培養期間を長くすると変異効率も高くなることを明らかにした²⁾。形質転換細胞の選抜に適したマーカー遺伝子も植物種によって異なるため、Cas9、sgRNA ならびに選抜マーカーカセットの組み合わせを複数用意し、多様な植物種で利用可能な Cas9、sgRNA 発現ベクターシリーズを整備した。これらのベクターは国内外 100 を超える研究室で利用されている。

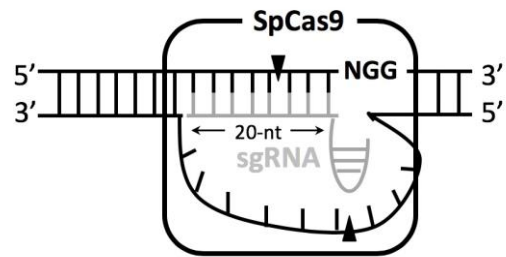


図2 CRISPR/Cas9によるDNA二重鎖切断
SpCas9を用いる場合、NGGの手前、3,4塩基の間に二重鎖切断が生じる。

改変型 SpCas9 を利用した変異導入位置の自由度拡大

CRISPR/Cas9 システムにおいて DNA 二重鎖切断の導入が可能な位置は、PAM 配列と呼ばれる、Cas9 が認識する配列による制約を受ける。CRISPR/Cas9 は微生物の獲得免疫システムを応用した人工制限酵素であり、由来生物が異なる Cas9 は PAM 配列も異なる。ゲノム編集に最も広く利用されている Cas9 は化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来の SpCas9 であり、SpCas9 の PAM 配列は NGG である。よって SpCas9 を利用して変異を導入できる位置は二塩基連続した G の近傍に限定される (図2)。東大 濡木らのグループは、SpCas9 の構造解析から得られた知見を元に、SpCas9 に7アミノ酸置換を導入することで PAM 配列を NGG から NG に変更できることを見出した³⁾。受賞者らはこの改変型 SpCas9 が高等植物においても G の近傍に変異を導入できること、また、野生型の SpCas9 に比べて off-target 変異導入のリスクが低いことを明らかにした⁴⁾。

フレームシフト変異により遺伝子をノックアウトする場合、変異導入位置はそれほど厳密である必要はないが、塩基置換を導入する場合、位置および塩基置換の方向性が重要となる。受賞者らは、NG を PAM 配列として認識する改変型 SpCas9 に D10A 変異を導入し、nickase 型に改変した後、cytidine deaminase を融合させた base editor (図3A) を作成し、G の近傍に C から T への塩基置換を導入することも確認した (図3B)。1塩基を PAM 配列として認識する改変型 Cas9 と C から T, A から G への塩基置換を導入する、cytidine および adenosine deaminase を融合することで、CRISPR/Cas9 を利用した塩基置換導入系の有用性も拡大すると考えられる。

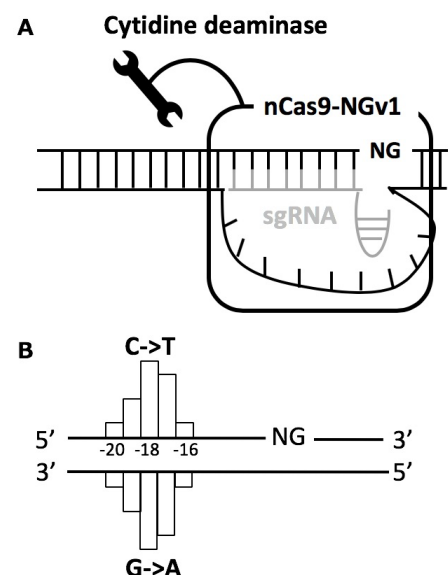


図3 改変型 SpCas9 を用いた塩基置換導入
Nickase タイプの改変型 SpCas9 (nCas9-NGv1) と cytidine deaminase を融合させたタンパク質と sgRNA (A) を利用することにより、NG の近傍に C から T への塩基置換を導入することができる (B)。

相同組換え修復効率に影響を及ぼす要因の解明

Donor DNA を用いた標的組み換えはあらゆる任意の変異を導入できるため、人工制限酵素の使用だけでは不可能なゲノム編集も可能にする。しかし、高等植物においては非相同末端結合修復が優勢であるため、標的遺伝子を切断すると同時に donor DNA を導入するだけでは、未選抜で標的組み換え植物体を獲得することは難しい。そこで、相同組換え効率を上げる方法についても検討してきた。

相同組換え修復は非相同末端結合修復に比べて関与する因子も多く、また相同性のある DNA 配列が接近する必要もあるため、高度に凝集したクロマチン構造は相同組換え修復に対して抑制的な効果を及ぼしているのではないかと考えた。この仮説を

実証するため、DNA 複製後のヒストンアッセムブリに関わる Chromatin assembly factor 1 (CAF-1) を欠損したシロイヌナズナ *fas1, fas2* 変異体における相同組換え効率を解析したところ、野生型と比較して約 50 倍相同組換え効率が高いことが明らかとなった⁵⁾

(図 4)。また、*fas1, fas2* 変異体では DNA 損傷そのものも増加と、相同組換え関連因子の発現上昇も観察され、オープンなクロマチン構造は DNA 損傷の増加と相同組換え修復機構の活性化の両方を介して結果的に相同組換え効率を向上させると考えられた。

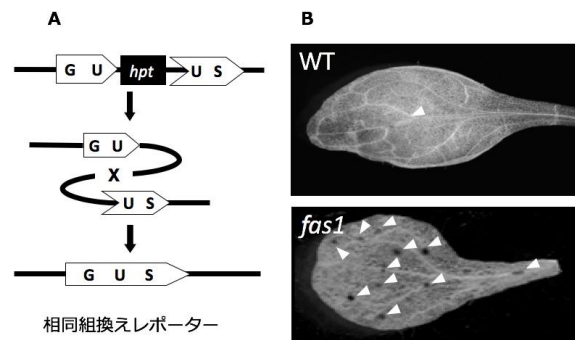


図 4 レポーターを用いた、シロイヌナズナ CAF-1 欠損株における相同組み換え効率の評価
A GUS 遺伝子を利用した相同組換えレポーター。B 野生型 (WT)、CAF-1 欠損株 (*fas1*) における GUS スポットの検出。矢頭は GUS スポットの位置を示す。

標的遺伝子切断、非相同末端結合の抑制を組み合わせた標的組み換え系と biallelic 標的組み換え個体の獲得

標的組み換え細胞または個体を効率的に獲得するには、1. 標的遺伝子の切断、2. donor DNA の核内への供給、3. 相同組換え修復と拮抗する非相同末端結合修復の抑制、4. 取りこぼしのない標的組み換え細胞選抜系を組み合わせることが有効であると考え、1-4 を組み合わせた標的組み換え実験を試みた (図 5A)。標的組み換えのターゲット

は、除草剤により塩基置換が導入された細胞を選抜可能なイネアセト乳酸合成酵素

(ALS) 遺伝子とした。まずはじめに、野生型イネカルスに Cas9 および非相同末端結合の主要因子である DNA ligase 4 (Lig4) を標的とする sgRNA 発現コンストラクトを形質転換し、Lig4 遺伝子が破壊されたイネカルスを作成した。次に、この Lig4 KO カルスに対して、donor DNA (塩基置換を有する ALS 遺伝子断片) および、ALS 遺伝子を標的とする 2 つの sgRNA 発現コンストラクトを有する標的組み換えベクターを形質転換し、ALS 阻害型

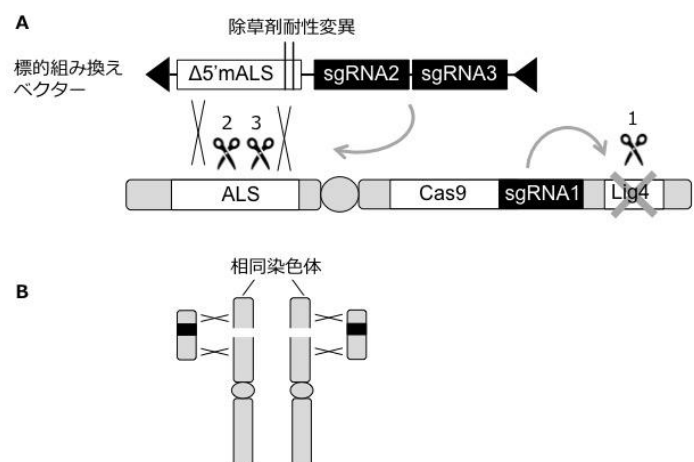


図 5 CRISPR/Cas9, Lig4 KO を組み合わせた標的組み換え実験
A 標的組み換え実験の概念図。B 相同染色体上の ALS 遺伝子に標的組み換えが生じた biallelic 改変個体のイメージ図。

除草剤耐性を指標に標的組み換えが生じた細胞を選抜した。その結果、Cas9 および Lig4 を標的とする sgRNA を形質転換したイネカルスでは、Cas9 のみを形質転換したイネカルスに比べて 4 倍程度標的組み換え効率が高いことが明らかになった⁶⁾。また、標的組み換えが生じた個体の中には、2 コピーある ALS 遺伝子の両方が同時に改変された個体もあった⁶⁾ (図 5B)。これらの結果は、Donor DNA の供給とタイミングを合わせた標的遺伝子切断ならびに、非相同末端結合の抑制が標的組み換え効率の向上に有効であることを示している。

おわりに

人工制限酵素の登場により標的配列の切断が可能となり、また標的組み換え効率の向上に効果のある方法も明らかになりつつある。CAF-1 や DNA ligase 4 の欠損が相同組み換え効率の向上に効果があることは前述した通りであるが、予期せぬ変異の増加や生育障害等、負の影響が生じる可能性を考えると、今後はこれらの因子の一過的発現抑制や、類似の効果が期待できる化学物質の探索など、農作物の改良に適した手法の開発も重要であると考えている。今後はゲノム情報もますます充実し、AI 等による理想的な遺伝子型の予測が可能になる日もそう遠くないと考えている。ゲノム編集技術開発は競争が激しい分野であるが、より使いやすく、今後の農業に貢献できる成果が出せるよう、今後も研究に励んでいきたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、大学院在籍中から現在まで、長きに渡りご指導いただいている、農研機構・生物機能利用研究部門 先進作物ゲノム開発ユニット 土岐精一ユニット長に深甚なる感謝を申し上げます。CRISPR/Cas9 に関する研究に関しては、東京大学の濡木理教授ならびに、西増弘志助教をはじめ、戦略的イノベーション創造プログラム (SIP) にて共同研究を行った多くの方々にお世話になりました。本賞の受賞にあたり、推薦していただいた農研機構・生物機能利用研究部門 朝岡潔部門長をはじめ、日頃の研究遂行で大変お世話になっている研究所、研究室の方々にも、この場を借りてお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Mikami M, Toki S, Endo M (2015) *Plant Molecular Biology* 88 (6): 561-572.
- 2) Mikami M, Toki S, Endo M (2015) *Plant Cell Reports* 34 (10): 1807-1815.
- 3) Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, Noda T, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Mori H, Oura S, Holmes B, Tanaka M, Seki M, Hirano H, Aburatani H, Ishitani R, Ikawa M, Yachie N, Zhang F, Nureki O (2018) *Science* 361 (6408): 1259-1262.
- 4) Endo M, Mikami M, Endo A, Kaya H, Itoh T, Nishimasu H, Nureki O, Toki S. (2018) *Nature Plants* *in press*
- 5) Endo M, Ishikawa Y, Osakabe K, Nakayama S, Kaya H, Araki T, Shibahara K, Abe K, Ichikawa H, Valentine L, Hohn B, Toki S (2006) *EMBO Journal* 25 (23): 5579-5590.
- 6) Endo M, Mikami M, Toki S (2016) *Plant Physiology* 170 (2): 667-677.