

植物ゲノムの標的遺伝子改変における人工制限酵素の利用

遠藤 真咲・土岐 精一*

近年、全ゲノムシーケンスをはじめとした分子生物学的手法の進展により、農業上有用な形質を支配する変異がDNAの塩基配列レベルで同定できるようになってきた。また、タンパク質の構造解析および構造予測技術も発展し、改良型タンパク質およびその遺伝子をデザインすることも可能になりつつある。このような知見を植物育種に活用するには、特定の遺伝子をピンポイントで改変する遺伝子改変技術が必要となってくる。そこで我々は、高等植物において、標的遺伝を狙って破壊または改変する技術の効率化および、汎用化を目指した研究を行っている。本稿では、近年、発展が著しい人工制限酵素の利用を中心に、標的遺伝子改変技術の現状と展望について解説する。

人工制限酵素による標的遺伝子切断

突然変異による塩基置換や塩基の欠失/挿入は古くから作物の品種改良法として利用されており、さらに放射線や特定の化学物質を処理することで変異頻度を向上させる誘発突然変異は育種のスピードを向上させてきた。一方、これらの方法で生じる変異はランダムにおきることから、目的の変異や、目的とする形質を有する個体を選抜するには多大な時間と労力を必要とする。また、遺伝子の機能解析を行う場合、対象とする遺伝子のみを破壊または改変し、表現型を野生型と比較することが望ましい。これらの理由から、標的遺伝子をピンポイントで破壊または改変する技術は植物育種、基礎研究の両面において待望されてきた。

こうした状況のなか、任意の塩基配列を切断できる人工制限酵素が開発され、変異誘導剤として大きな期待が寄せられている。代表的な人工制限酵素として、Zinc Finger Nucleases (ZFNs) や、Transcription Activator-Like (TAL) Effector Nucleases (TALENs) があげられる。両者ともに、DNAに結合するドメインと、制限酵素 Fok I のDNA切断ドメインを連結させたキメラタンパク質であるが、ZFNsはZinc finger型転写因子のDNA結合ドメインを用いており、TALENsは植物病原細菌が有する転写活性化因子のDNA結合モチーフを用いている。両者共に、標的とするDNA配列に応じてDNA結合モチーフをデザインすることで、任意の配列を切断す

ることが可能となる。ZFNsは一つのDNA結合モチーフで3塩基を認識するので、あらゆる塩基配列を認識する為には64種のモチーフが必要になる。一方、TALENsは1つのDNA結合モチーフで1塩基を認識し、4種類の塩基すべてと、メチル化されたシトシンを認識するモチーフが開発されているため、理論的にはすべての標的配列に応じたTALENを設計することが可能である。TALENsでは、同じ塩基数を認識するために必要なモチーフ数がZFNsの3倍であるため、発現させるタンパク質が大きくなってしまいが、結合配列の自由度が高いことや、モチーフのアッセムブリーシステムが確立されており、構築が容易であるといったメリットがある。一方、2013年に入り、細菌の免疫応答システムの一つであるCRISPR/Casを応用したRNA-guidedヌクレアーゼによるDNA切断の成功例がほ乳類を中心に相次いで報告されている¹⁻³⁾。この系では、切断酵素であるCas9と切断部位を規定するguide-RNAを独立に発現させればよく、標的配列に応じて変更が必要なのはguide-RNA中の約20 bpであることから、ベクター作製も非常に容易である。植物におけるRNA-guidedヌクレアーゼの利用は2013年4月現在まだ報告がないが、ZFNsやTALENsに次ぐ標的遺伝子切断技術として注目されている。

標的遺伝子の切断によるジーンターゲティング(GT) 効率の向上

DNA二重鎖切断のほとんどは、非相同末端結合と呼ばれる機構により修復され、塩基の置換や欠失はこの修復時に生じる変異である(図1左)。一方、頻度は低いが、相同組換えと呼ばれる機構(図1右)で修復される場合もある。相同組換え修復では、切断末端が相同性のある配列(組換えの鋳型)を認識し、欠損部位をコピーすることで正確な修復を行う。この相同組換え修復機構を利用して標的遺伝子を改変する技術がジーンターゲティング(GT)である。GTでは、組換えの鋳型上の相同配列中に変異を入れておき、標的遺伝子と相同組換えが起きることで、目的の変異を目的の位置に導入できる。GTは正確かつ多様な変異を導入できる魅力的な標的遺伝子改変システムであるが、高等植物においては、ゲノ

* 著者紹介 独立行政法人農業生物資源研究所農業生物先端ゲノム研究センターゲノム機能改変研究ユニット(ユニット長)
E-mail: stoki@affrc.go.jp

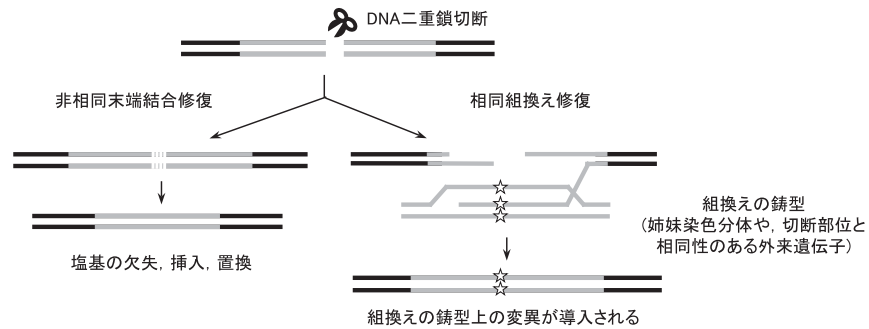


図1. DNA二重鎖切断修復機構。DNA二重鎖切断は、非相同末端結合または、相同組換えにより修復される。相同組換え修復は鋳型を利用して欠損部位を補う。ジーンターゲティングは、組換えの鋳型として、切断部位と相同性のある外来遺伝子を利用することで、鋳型上の変異を標的遺伝子中に導入する遺伝子操作技術である。

ムと相同性のあるDNAを形質転換した場合であっても、相同組換えが生じる頻度は $10^{-4} \sim 10^{-6}$ と言われており、効率の向上が課題である。

相同組換えは本来、DNA二重鎖切断修復機構であるため、標的配列をピンポイントで切断できる人工制限酵素がGT効率にもたらす効果は大きく、ほ乳類や魚類では人工制限酵素の利用によりGT効率が飛躍的に向上することが多数報告されている^{4,5)}。高等植物においても、トウモロコシやタバコにおいて、ZFNsを用いることでGT効率が向上したとの報告がある^{6,7)}。

また我々は、非相同末端結合の抑制⁸⁾や、切断末端における一本鎖DNA突出の形成促進が相同組換えを促進することを確認しており⁹⁾、人工制限酵素の利用と、DNA修復系因子の発現制御を組み合わせることでGT効率をさらに高めることができると考えている。

選抜マーカー遺伝子の除去

GTによって導入する変異が選抜形質を付与しない場合、選抜マーカー遺伝子を利用してGTが生じた細胞を選抜する必要がある。そこでもっともよく使われるのが、ポジティブ・ネガティブ選抜法と呼ばれる方法（図2）である。この方法では、相同配列を二分する形でポジティブ選抜マーカー遺伝子を、相同領域の外側にネガティブ選抜マーカー遺伝子を配置したGTベクターを形質転換する。標的遺伝子とGTベクター間で相同組換えが生じると、ポジティブ選抜マーカーは植物ゲノム中の標的遺伝子内に組み込まれるが、ネガティブ選抜マーカーは相同組換え時に排除されるので、GTベクターの形質転換後、ポジティブ・ネガティブ選抜を行うことでGTが生じた細胞を濃縮することが可能である。この系を用いることで目的の変異を目的の位置に導入することが可能であるが、このままでは、ポジティブ選抜マーカーも植物

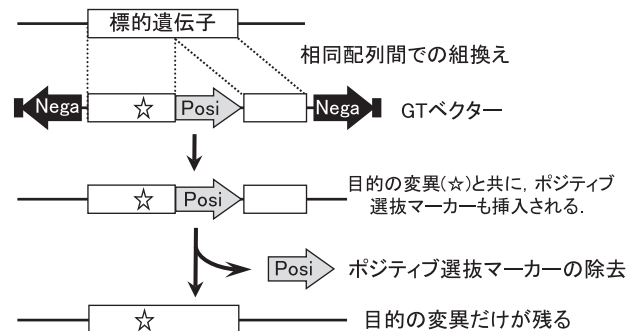


図2. ポジティブ・ネガティブ選抜法とマーカー除去。標的遺伝子との相同配列間にポジティブ選抜マーカー、相同配列の外側にネガティブ選抜マーカーを配したGTベクターを形質転換する。形質転換されていない細胞はポジティブ選抜により排除され、ランダムな挿入はネガティブ選抜により排除されるため、両選抜によりGT細胞の濃縮が可能である。GT後にポジティブ選抜マーカーを除くことで目的の変異のみが残る。

ゲノム中に残ってしまう。最終的に必要な点変異のみを残したい場合、このような不要配列を跡形なく除去する必要がある。不要配列を除去する際にも人工制限酵素の利用は有効である。現在我々が試みている方法は、ポジティブ選抜マーカーの両端にメガヌクレースI-SceIの認識配列18 bpを配しておき、GT細胞において、I-SceIを発現させることでポジティブ選抜マーカーを切り出す方法である。この方法ではI-SceIの認識配列が残るので、それすら残したくない場合には、I-SceIの外側の相同配列を重複した形にしておき、I-SceIを発現させてポジティブ選抜マーカーを切り出した後に、切断末端での相同組換えまたは単鎖アニーリングを生じさせるなどの工夫が必要である。

また我々は、切断と相同組換えによってポジティブ選抜マーカーを除く方法以外に、転移時にフットプリントを残さないトランスポゾンであるpiggyBacを用いた不

要配列の除去技術にも着目している。piggyBacは本来昆虫のトランスポゾンであるが、マウスやヒトのiPS細胞において痕跡を残さずに選抜マーカーを排除する際に利用されている¹⁰⁾。我々は、piggyBacがイネにおいても転移活性を持ち、不要配列を痕跡なく除去できることを確認している¹¹⁾。ポジティブ・ネガティブ選抜法によりGT細胞を選抜した後、切断および相同組換え、またはpiggyBacトランスポゾンを用いてポジティブ選抜マーカーをきれいに除去することで、目的の点変異のみを導入できる汎用的なGT系が構築できるはずである。

組換えの鋳型をゲノムから切り出す ジーンターゲットティング法

これまで植物で行われているGT実験のほとんどは、組換えの鋳型となるGTベクターを物理的手法またはアグロバクテリウム法によって細胞に導入する方法をとっている。しかし、効率的な形質転換系が確立されている植物種は限られており、核内にGTベクターが入った場合であっても、相同組換えが生じる確率は1/10,000以下であることを考えると、形質転換効率が低い植物種でGTを行うことは容易ではない。

この問題を解決する方法として、2012年に*in planta* GTという新規のGTシステムが発表された¹²⁾。*in planta* GTは、GTベクターをあらかじめ植物ゲノム内にランダム挿入しておき、標的遺伝子の切断と同時に、GTベクターをゲノムから切り出すGT法である(図3)。この方法では、GTベクターを導入した植物が1個体でも獲得できれば、種子増殖を行った後、GTベクターの切り出し誘導をかけることができるので、形質転換効率が低い植物にも適用可能なGT系であるといえる。Fauserらがシロイヌナズナを用いて行った*in planta* GT実験では、標的遺伝子内および、ゲノム中に挿入したGTベクターの両端にI-SceIの認識配列を持つ植物体を作成し、I-SceIを恒常発現する植物体と交配することにより、次世代でGT個体を得ることに成功している。

我々も、I-SceI誘導発現系を用いた*in planta* GT系を構築し、任意の時期、組織において標的遺伝子の切断ならびに、GTベクターの切り出しが行えること、I-SceIの発現依存的にGTが生じることを確認している¹³⁾。また、同じ標的遺伝子、同じGTベクターを用いて、アグロバクテリウムを介してGTベクターを導入する従来法と、*in planta* GT法でのGT効率の比較を行ったところ、*in planta* GT法の方が約10倍効率が高いという結果を得た。その理由としては、アグロバクテリウム法では、すべての細胞にGTベクターが供給されるわけではない

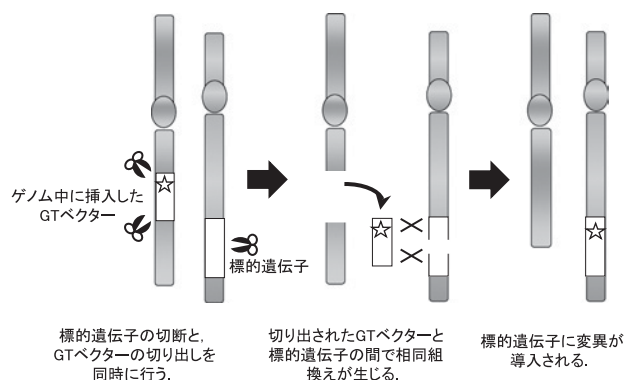


図3. *in planta* GT系. GTベクターをゲノム内に挿入しておき、標的遺伝子切断と同時にゲノムから切り出すことで相同組換えの鋳型とするGT法。

ことに加え、アグロバクテリウムの植物への感染、一本鎖DNAの核への移行、二本鎖への変換、植物ゲノム内への挿入が連続的に起こるため、GTベクターが二本鎖DNAとして存在するタイミングと、標的遺伝子切断のタイミングをあわせることが困難であることが考えられる。これに対し、*in planta* GTでは、GTベクターは全細胞のゲノム内に二重鎖DNAの形であらかじめ入っていることに加え、標的遺伝子切断とGTベクターを切り出すタイミングを合わせることも容易であり、両者のGT効率に大きな差が生じたと考えられた。

in planta GTでは、GTベクターを事前に植物ゲノムに挿入するため、前述のポジティブ・ネガティブ選抜法をそのまま用いることはできない。しかし、薬剤処理を行うことで初めて効果が現れる条件的致死遺伝子をネガティブ選抜マーカーに用いることや、GTにより標的遺伝子配列とつながった時にのみ効果が現れるように選抜可能なポジティブ選抜マーカーに仕掛けを施すことで汎用的な系の構築も可能であると考えている。

標的遺伝子改変植物における“ゲノムのきれいさ”の検証

標的遺伝子改変のメリットは、ピンポイントで狙った遺伝子を改変できる点にあるが、人工制限酵素を用いる場合、結合認識の特異性が低い、標的配列がゲノム中に複数存在するなどの理由で、標的遺伝子以外の場所を切断している可能性も否定できない。また、培養細胞を用いて標的遺伝子改変を行った後に植物体を再生した場合、目的の変異に加えて培養変異も生じていることが予想される。また、標的遺伝子を改変した植物の実用化を目指す場合、これら目的以外の変異に加えて、人工制限酵素をコードする遺伝子や、GTベクターの残存がないことを確認する必要があることから、標的遺伝子の改変

に成功した植物体の詳細なゲノム解析を行うことも重要である。筆者らは、アグロバクテリウムを介してGTベクターを形質転換し、イネのアセト乳酸合成酵素(ALS)遺伝子に2塩基置換を導入することで除草剤耐性を付与したイネ¹⁴⁾の全ゲノムシーケンスならびに、genome CGH array解析を行い、GTベクターおよびアグロバクテリウム由来の配列の挿入は生じていないこと、培養変異は約1000個生じており、そのうちタンパク質の発現量や機能に影響を与える可能性のある変異は約20個であることを明らかにした¹⁵⁾。培養変異は標的遺伝子座近傍に集中することはなく、イネゲノム全体に分散していたことから、そのほとんどは、戻し交雑により取り除けると考えられる。標的遺伝子以外の改変は許されない遺伝子治療とは異なり、標的遺伝子改変に付随して生じた変異を戻し交雑によって取り除ける点は植物のアドバンテージでもあるので、標的遺伝子改変技術が新たな植物分子育種法として実用化されることに期待したい。

標的遺伝子改変技術の展望

GTにより内在ALS遺伝子に除草剤耐性変異を導入したイネは、同じ変異を持つALS遺伝子を過剰発現させたイネを大きく上回る除草剤耐性を示した¹⁴⁾。これは、除草剤感受性型のALSを、耐性型に完全置換することにより、除草剤が結合できるALSがなくなった結果であると考えられる。この例のように、標的遺伝子の直接改変は、目的タンパク質のすべてを改変型にすることができ、改変型遺伝子を追加導入する従来の遺伝子組換え法よりも高い効果をもたらすことができる場合もある。

また、標的遺伝子に直接変異を入れるメリットとしては、遺伝子のコピー数は変化せず、ポジションエフェクトも生じないため、本来の発現特性を維持できることや、外来遺伝子の挿入が、周囲の遺伝子の発現に及ぼす影響

を心配する必要がないことなどがあげられる。導入した変異が点変異のみであれば、自然界でも偶発的に生じる変異を、人為的かつ効率的に導入する最小の遺伝子改変といえる。標的遺伝子改変を含め、植物ゲノムに組み込まれないウイルスベクターの利用や、遺伝子組換え台木と非遺伝子組換え穂木の接ぎ木技術など、育種効率を高めるために遺伝子組換え技術を用いるものの、最終的に出来上がった品種には外来遺伝子が残存しない新たな育種技術(NBT)も次々と報告されている。遺伝子操作技術の高度化、多様化が進むにつれて、その産物についても一元的な取扱いが難しくなってきたり、遺伝子組換えの定義も含めて議論しようという動きが国際的に広がっている。

今後、調和のとれた議論が進み、これら新たなゲノム改変技術が国内外の農業・産業の発展に大きく貢献することを期待している。

文献

- 1) Jinek, M. *et al.*: *Science*, **337**, 816 (2012).
- 2) Cong, L. *et al.*: *Science*, **339**, 819 (2013).
- 3) Mali, P. *et al.*: *Science*, **339**, 823 (2013).
- 4) Bedell, V. M. *et al.*: *Nature*, **491**, 114 (2012).
- 5) Zu, Y. *et al.*: *Nat. Methods*, **10**, 329 (2013).
- 6) Shukla, V. K. *et al.*: *Nature*, **459**, 437 (2009).
- 7) Townsend J. A. *et al.*: *Nature*, **459**, 442 (2009).
- 8) Nishizawa-Yokoi, A. *et al.*: *New Phytol.*, **196**, 1048 (2012).
- 9) Kwon Y. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **53**, 2142 (2013).
- 10) Yusa, L. *et al.*: *Nature*, **478**, 391 (2011).
- 11) 横井彩子, 土岐精一: 育種学研究, **15** (別1), 172 (2013).
- 12) Fauser, F. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7535 (2012).
- 13) 遠藤真咲ら: 育種学研究, **15** (別1), 129 (2013).
- 14) Endo, M. *et al.*: *Plant J.*, **52**, 157 (2007).
- 15) 遠藤真咲ら: 第54回日本植物生理学会年会要旨集, p.299 (2013).