

最新のゲノム編集技術が拓く新たな微生物育種への道

笹野 佑

最近、さまざまな生物種でゲノム編集が可能となってきた。ゲノム編集とはあたかもワードプロセッサで文字を加えたり消したりするように、遺伝子配列を改変させる技術のことである。代表的なゲノム編集技術として、Zinc Finger Nuclease (ZFN) や Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) などの人工ヌクレアーゼを利用したものがある。これらの技術は、ターゲット配列を特異的に認識し切断するような人工ヌクレアーゼをデザインし、それを細胞に導入することでターゲット部位を切断する。切断部位の修復過程において起こる塩基の欠失や挿入、外来DNAの取込みなどにより、標的遺伝子の破壊・改変を行うことができる。これらの技術を用いたゲノム改変の報告が多数なされている。そのような中、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) システムを利用した、さらに画期的なゲノム編集技術が発表された^{1,2)}。CRISPR/Cas システムは、真正細菌や古細菌に見られる細胞防御機構の一種であり、細胞内に侵入した外来DNAを自身のゲノム内のCRISPR領域に取り込み、その配列から転写・プロセシングされた短鎖RNA分子が外来DNAと相補的に結合し、Casと呼ばれるヌクレアーゼがこの部分を認識し切断する。つまり本来、CRISPR/Cas システムは外来DNAの侵入に対する獲得免疫機構であると考えられる。このCRISPR/Cas システムがゲノム編集に応用された。その概要は以下の通りである。切断したいターゲット部位と相同な配列を持つGuide RNAを細胞内で発現させることで、ターゲット部位に相補的に結合させ、同時に *Streptococcus* 属細菌由来のCas9ヌクレアーゼを発現させておけば、Cas9がこの部分を認識しDNA二重鎖切断を引き起こす。CRISPR/Cas システムを応用した本法ではターゲット配列と相同な配列を持つGuide RNAを細胞内で発現させるだけで良く、ZFNやTALENのようにターゲット配列を特異的に認識・切断する人工ヌクレアーゼをデザインする必要がないので、非常に手軽にゲノム編集を行うことが可能となった。

一方、微生物育種において、高温耐性やエタノール耐性などの有用形質は多くの遺伝子による制御を受けていることが明らかとなってきた。したがって、従来のような一つないし数個の遺伝子を対象とした菌株育種では限界があり、多数の遺伝子、あるいはさらに高次の染色体・ゲノムスケールでの改変技術が求められている。では微

生物の菌株育種にCRISPR/Cas システムによるゲノム編集技術を応用することはできないだろうか？ CRISPR/Cas システムによるゲノム編集は、出芽酵母や大腸菌などの産業上有用な微生物でも機能することがすでに報告されている^{3,4)}。たとえば出芽酵母は相同組換え修復活性が非常に強い微生物であり、CRISPR/Cas システムによりターゲット部位にDNA二重鎖切断を誘導した場合、誘導しない場合と比較して100倍以上もDNA組換え効率が向上した。このことを利用すれば、複数遺伝子の同時改変が可能となるだけでなく、その多くを相同組換え機構に立脚している染色体工学技術やゲノム工学技術のハイスループット化が期待できる。さらに最近、変異型Cas9を用いた遺伝子特異的発現抑制技術、CRISPRi システムが報告された⁵⁾。dCas9はターゲット配列への結合能は保持しているがヌクレアーゼ活性は失った変異型Cas9で、標的部位に係留することで、ターゲット遺伝子の転写抑制を引き起こす。また、転写活性化ドメインをdCas9に融合することで転写活性化を引き起こすこともできる。これらの派生技術をも巧みに応用することで、多様な染色体組成を持った細胞集団の造成や、複数の遺伝子の発現量を同時に制御することが可能となり、従来では作製がほぼ不可能だった菌株の育種が可能となるだろう。

CRISPR/Cas システムによるゲノム編集技術は報告されてからまだ間もない技術であり、細胞毒性などに関する知見も充分でない。哺乳類細胞では目的とは異なる配列も切断してしまうoff-target効果も報告されている⁶⁾。また、今回詳しくは述べなかったが、Cas9ヌクレアーゼが働くためにはターゲット配列の下流にNGGという配列 (PAM配列) が存在する必要がある。完全にゲノムワイドなゲノム編集ができるわけではない。しかし、これらの欠点もじきに改善されるであろうし、用途を菌株育種に限った場合にはそこまでの厳密性が要求されるわけではない。以上で述べてきたように、CRISPR/Cas システムによるゲノム編集技術は菌株育種に新たなブレークスルーをもたらす可能性を大いに秘めている。

- 1) Cong, L. *et al.*: *Science*, **339**, 819 (2013).
- 2) Mali, P. *et al.*: *Science*, **339**, 823 (2013).
- 3) Dicarlo, J. E. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **41**, 4336 (2013).
- 4) Jiang, W. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **31**, 233 (2013).
- 5) Gilbert, L. A. *et al.*: *Cell*, **154**, 442 (2013).
- 6) Carroll, D.: *Nat. Biotechnol.*, **31**, 807 (2013).