

## 次世代シーケンシング時代の植物育種におけるゲノム編集の意義

富田 因則

21世紀半ばに90億に達しようとする世界規模での人口増加と地球温暖化により、食糧不足が懸念されている。これに対処する作物を育種するためには、適応性、草姿、多収性などの形質を支配する遺伝子が、ゲノムのどの位置にあり、どのような機能をもつかを知り、それら遺伝子を集積していく必要がある。次世代シーケンシング Next Generation Sequencing (NGS) が出現するまでは、DNA マーカーを用いた連鎖解析によって形質支配遺伝子をゲノム上に位置づけてきた<sup>1)</sup>。すなわち、形質支配遺伝子を持つ系統と持たない系統の間で交雑して得られた雑種第2世代の多数の個体で、系統間で差異を示すDNA マーカーと目的形質の存在が一致した場合、そのマーカーの近傍に形質支配遺伝子が位置づけられる。さらに、遺伝地図が作製されたDNA マーカーの配列を手掛かりにして、全ゲノムのDNA 断片を染色体上に張りつけた物理地図が作製され、全DNA が解読された。このようにしてゲノムが解読された生物については、今やNGSの出現により、変異系統のゲノム断片の配列をリファレンス配列にマッピングすれば、変異遺伝子が検出できる。DNA マーカーがゲノム上の点を検査するのに対して、NGSでは線状にくまなく検査でき、形質とDNAの変異を対応づけるゲノムワイド解析が可能となった。このようにNGSによって農業上有用な遺伝子のDNA配列が効果的に解明されつつある。

しかしながら、形質支配遺伝子のDNAがわかっていても、遺伝子組換え植物のパブリックアクセスが進んでいないわが国では、戻し交雑という人工交配を繰り返す方法で遺伝子を導入している。たとえば、コシヒカリの背が高く倒れやすいという形質を改良したい場合、導入したい短稈遺伝子を持つ系統と交配し、得られた子の中から背が低いという形質を発現する個体を選んで元の品種コシヒカリと掛け合わせ、さらにこれを8回程繰り返す。最終的に導入遺伝子以外はコシヒカリのDNA配列の系統を得る。この方法で短稈遺伝子以外99.8%コシヒカリと同じゲノムを持ち、食味はコシヒカリと同等で倒伏が少ない品種「ヒカリ新世紀」が開発された<sup>2)</sup>。従来、戻し交雑の進捗の測定には、導入遺伝子はもとよりゲノム全域のDNAマーカーを検査していたが、NGSの出現により、目的遺伝子が入っているかどうか、その他の配列が元の品種と同じかどうかは、全ゲノムを読めば一目瞭然となった。しかし、戻し交雑という個人技に依存する労力や時間はなお膨大であり、NGS解析に則した新しい育種技術が待望される。

近年、人工制限酵素を利用してゲノム上の標的遺伝子だけを改変するゲノム編集が、新時代の遺伝子改変技術 (New Plant Breeding Techniques, NBT)<sup>3)</sup>として注目されている。最初に登場した人工制限酵素 Zinc finger nuclease (ZFN) は、標的配列ごとに作製したDNA結合ドメインでゲノム内の特異的なDNA配列に

結合し、配列非依存的な制限酵素で近傍のDNAを二重鎖切断 (DSB) する。これに対して、後発の人工制限酵素 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)/Cas9では、バクテリアが異種DNAを排除する免疫獲得機構における Guided-RNA (gRNA) を利用して相補鎖DNAを認識し、切断する。つまりgRNA中に標的配列と相補的な塩基配列を作るだけで配列特異的な人工制限酵素になるので、ZFNより設計・構築が容易である。以上のような人工制限酵素によって生じたDSBが、非相同末端結合により修復された場合、まったく同じDNAに戻ることもあれば、修復エラーにより塩基の欠失や挿入が起きることがあり、後者の場合はフレームシフトによって遺伝子が破壊される。他方、相同組換え修復では、姉妹染色分体などの相同配列を鋳型としてDSBは修復されるが、人工制限酵素とともに標的配列の相同配列を両端に持つ鋳型配列を導入することにより、塩基 (アミノ酸) 置換や外来遺伝子の挿入も可能である。従来の育種法における放射線やトランスポゾンで誘発される突然変異は偶発的で、特定遺伝子の改変はできなかったが、配列特異的な人工制限酵素により、農業上不利益な遺伝子 (例: 背が高い) をノックアウトしたり、ピンポイントで改変できるようになった。

ゲノム編集を植物育種で行うには、まず、人工制限酵素遺伝子をアグロバクテリウム法などでゲノムに導入し、その発現により目的遺伝子を改変させる。次に、元の品種に1回戻し交雑して次の世代で人工制限酵素遺伝子がないものを選べば、ゲノム編集による塩基の欠損、挿入、置換しか残らない。すなわち、外来遺伝子を最終産物に残さずに、自然界で起きる突然変異と変わらない遺伝子改変ができる<sup>4)</sup>。しかし、ゲノム編集による変異体を我国で栽培するには、カルタヘナ法の対象から外す必要がある。EUでは20 bp以下の変異は自然突然変異と同じとみなして対象外にする20 bpルールが提案されている。EUには、同種植物の遺伝子DNAの配列を変化させずにパーティクルガン法で同種に導入するシスジェネシスについて、交配と変わらないとして対象外とする見解さえある<sup>5)</sup>。NGSで同定された遺伝子のゲノム編集やシスジェネシスが規制外になれば、交雑という個人技に頼る現状より一段とスピードアップする。新技術の科学的理解に基づく法整備が望まれる。

- 1) 高木正道監修、池田友久編: 新バイオの扉 - 未来を拓く生物工学の世界 -, p. 69, 裳華房 (2013).
- 2) Tomita, M.: *Field Crops Res.*, **114**, 173 (2009).
- 3) Lusser, M. et al.: New plant breeding techniques, JRC European Commission (2011).
- 4) EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO): *EFSA Journal*, **10**, 2943 (2012).
- 5) EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO): *EFSA Journal*, **10**, 2561 (2012).