

## 精密ゲノム編集ジーンターゲットングで可能となるデザイン育種

横井 彩子

2019年10月1日からゲノム編集食品の届け出制度が開始され、ゲノム編集作物が食卓に並ぶことが現実味を帯びてきた。それらのほとんどは、「第3世代の人工制限酵素」とも呼ばれる Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) で狙った遺伝子を破壊させることにより作出されてきた。いわば、機能欠失型変異体である。しかしながら、農業上有用な形質は機能欠失型変異に起因するものばかりではなく、機能獲得型変異に由来するものも多い。そこで今回は、機能獲得型変異の導入を可能にするジーンターゲットング (GT) を用いた植物の精密ゲノム編集技術の開発状況と展望について紹介したい。なお、技術の詳細については本号の特集を参照されたい<sup>1)</sup>。

ゲノム編集は、標的遺伝子上に CRISPR/Cas9 など DNA 二重鎖切断 (DSBs) を生じさせ、その修復過程で標的遺伝子に変異を導入する技術である。DSBs の修復経路には、DNA 末端を再結合して修復する非同源末端結合 (NHEJ) 経路と、お手本 (鋳型 DNA) をコピー/ペーストして正確に修復する相同組換え (HR) 経路の二つが存在する。高等植物では、DSBs のほとんどは NHEJ 経路で即座に再結合され、その際の修復エラーにより欠損や挿入が生じる。したがって、CRISPR/Cas9 による機能欠失型変異は比較的高効率で導入することができる。一方 GT は、標的遺伝子上の DSBs が HR 経路で修復される際に利用される鋳型 DNA (標的遺伝子に相同な配列) に任意の変異を導入しておくことで、その任意の変異をそのまま標的遺伝子に導入することができる。すなわち、標的遺伝子を望み通りに改変できる技術である。しかしながら、高等植物では HR 効率が非常に低く、汎用的 GT 系を確立するのは困難であった。

その中でブレイクスルーをもたらしたのが、GT が生じた細胞を効率良く選抜する方法の開発である。Terada ら<sup>2)</sup>は、動物において確立されていたポジティブ・ネガティブ選抜法をイネに適用し、植物で初めて汎用的 GT 系を確立することに成功した。この方法は、一つのベクター上にポジティブ選抜マーカー (薬剤耐性遺伝子など) とネガティブ選抜マーカー (致死遺伝子など) の両方を配置し、ベクターがランダムにゲノムに挿入された細胞はネガティブ選抜マーカーの発現により排除され、HR

でポジティブ選抜マーカーが標的遺伝子に挿入された細胞はネガティブ選抜マーカーがゲノム組み込まれないため、ポジティブ選抜マーカーの発現により濃縮される選抜法である。また Nishizawa-Yokoi ら<sup>3)</sup>は、昆虫由来の piggyBac トランスポゾンを用いたポジティブ・ネガティブ選抜後のポジティブ選抜マーカーの除去に利用することにより、標的遺伝子上に目的の変異のみを残すことに成功した。これら技術の確立により、イネにおいてはあらゆる遺伝子を狙い通りに改変することができるようになった。一方、他の植物種では培養系の最適化や形質転換効率の低さなどから、長年ポジティブ・ネガティブ選抜法の適用は困難で、汎用的 GT 系は確立されていなかった。

前述の通り、GT は DNA 修復経路の一つである HR を利用することから、標的遺伝子上に DSB を効率良く生じさせることが GT 効率向上の鍵となる。Fauser ら<sup>4)</sup>は、人工制限酵素により標的遺伝子上に DSB を誘発すると同時に、ゲノムにあらかじめ組み込んだ鋳型 DNA を切り出し、より HR に利用されやすい形でお手本を供給する in planta GT 系をシロイヌナズナで確立した。また Voytas らのグループ<sup>5)</sup>は、植物ウイルスである Gemini virus 由来のベクターを利用し、宿主の細胞内でベクターを複製させることで CRISPR/Cas9 発現カセットと鋳型 DNA を大量に供給し、モデル植物だけでなく、トマトやコムギなどの作物にも GT 系を適応させた。これらの例のように、GT による精密ゲノム編集をさまざまな作物の育種に利用できる日が近づいてきている。

近年、ゲノム解析技術の進歩によるさまざまな作物種のゲノム情報の蓄積とそれらを利用した比較ゲノム研究により、優良な農業形質を持つスーパー作物をデザインできるようになってきた。今回紹介した GT 技術は、望み通りの改変を可能にするゲノム編集技術であり、消費者や生産者のニーズに合わせた作物のオンデマンド育種を可能にする技術となるだろう。

- 1) 雑賀啓明, 土岐精一: 生物工学, **97**, 728 (2019).
- 2) Terada, R. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1030 (2002).
- 3) Nishizawa-Yokoi, A. *et al.*: *Plant J.*, **81**, 160 (2015).
- 4) Fauser, F. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7535 (2012).
- 5) Baltes, N. J. *et al.*: *Plant Cell*, **26**, 151 (2014).