

## 精密ゲノム編集の現状と展望

雑賀 啓明<sup>1\*</sup>・土岐 精一<sup>1,2</sup>

CRISPR/Cas9などの人工ヌクレアーゼ技術が発展したことにより、さまざまな生物においてゲノム編集による遺伝子改変が可能になった。特に、人工ヌクレアーゼによって標的配列を切断することで変異を誘導するゲノム編集、すなわち標的変異法は、切断部位に塩基挿入や欠失が生じるため、フレームシフトによる遺伝子ノックアウトに広く利用されている。一方で、遺伝子をノックアウトせずに、遺伝子やタンパク質の機能を改変する技術も開発されている。本稿では、そのような「精密ゲノム編集」技術のうち、塩基置換導入技術に焦点を当て、技術の現状とその展望について紹介したい。

## ゲノム編集技術の概要

**標的変異と標的組換え** ゲノム編集は、標的変異(SDN-1)と標的組換え(SDN-2, 3)の2種類の技術に大別される。

標的変異では、人工ヌクレアーゼによって切断された標的遺伝子を宿主生物が修復する際、時折生じるDNA修復のエラーの結果、切断部位に変異が導入される。筆者らのグループでも、シロイヌナズナやイネにおいて、人工ヌクレアーゼであるZFNs, TALENsやCRISPR/Cas9を利用した標的変異に成功している<sup>1-4)</sup>。中でも、現在広く利用されている *Streptococcus pyogenes* 由来のSpCas9を利用した標的変異では、大部分に1～数塩基の欠失、または挿入が生じるため、フレームシフトにより標的遺伝子を容易にノックアウトできる。そのため、農作物を含むさまざまな植物で、標的変異を利用した遺伝子破壊、および遺伝子破壊系統における遺伝子機能や表現型などの解析について多数の報告がなされている。また最近、base editor (BE) による塩基置換導入技術の開発も進み、塩基置換による遺伝子改変も可能になってきた。

一方、標的組換えは、標的遺伝子と相同な配列を有する鋳型DNAを利用することで、標的遺伝子と鋳型DNAとの相同組換えにより、鋳型DNAが有する変異を標的遺伝子に導入する技術である。標的組換え技術では、標的遺伝子に目的とする変異を正確に導入することが可能である。イネにおいては、2002年にポジティブ・ネガティブ選抜法を利用した汎用的な標的組換えの成功

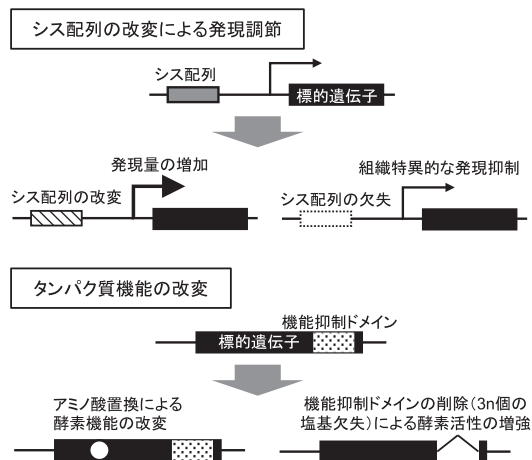


図1. 精密ゲノム編集による遺伝子機能改変の例

例が報告されて以降、10以上の遺伝子座で標的組換えによる改変が報告されている<sup>5-6)</sup>。しかしながら、標的組換えの頻度は未だ非常に低く、イネ以外の植物においては、汎用的な標的組換え系が確立されていないのが現状である。

**精密ゲノム編集** 遺伝子の機能をノックアウトすることにより、その個体の表現型が劇的に変わることが多い。一方、遺伝子やタンパク質の機能をノックアウトではなく、マイルドに低下させる、もしくは機能を増強する、または付加することにより、個体の表現型をより高度に改変し、必要とする形質を付与することができると期待される。そのためには、標的遺伝子の正確な改変、すなわち精密ゲノム編集技術が不可欠である。図1に精密ゲノム編集を利用した遺伝子機能改変の可能性について例をあげる。以降、精密ゲノム編集技術のうち、塩基置換を導入する技術に注目し、技術の現状と今後の展望を紹介する。

## BEを利用した塩基置換導入技術

**BEの種類** 2016年、Cas9に二つ存在するニックドメインのうち、片方を不活化したnickase Cas9(nCas9)とシチジンを脱アミノ化する塩基修飾酵素cytidine deaminaseとを融合した人工酵素を利用することにより、標的部位にCからTへの置換を導入することに成功した

著者紹介 <sup>1</sup> 農研機構 生物機能利用研究部門 先進作物ゲノム改変ユニット(上級研究員) E-mail: saika@affrc.go.jp

<sup>2</sup> 横浜市立大学 木原生物学研究所

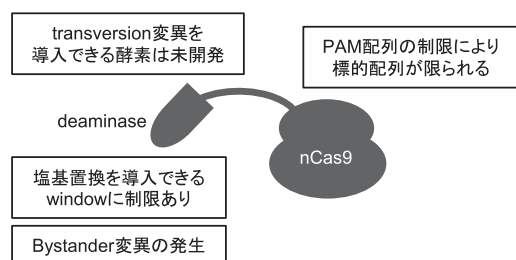


図2. BEで改良が求められているポイント

ことが報告された<sup>7-8)</sup>。また、翌年には大腸菌のtRNA adenosine deaminaseを改良することにより、同様のストラテジーでAからGへの置換に成功したことが報告された<sup>9)</sup>。これらは、すでに植物においても利用できることが報告されている。たとえば、イネやトマトの標的遺伝子にCからTへの置換を導入することにより、除草剤耐性の付与や葉の形態変化などに成功したことが報告されている<sup>10)</sup>。

BEによる塩基置換導入法は、遺伝子機能を改変するには非常に有用なツールであるが、まだ万能な技術であるとは言えない(図2)。たとえば、BEによる塩基置換導入部位(window)に制限があること、また、Cas9による標的配列認識に制限があることから、狙ったすべての塩基を置換の対象にできるわけではない。また、window内にCやAが連続して存在する場合、目的とするCまたはA以外の塩基も置換される(bystander変異)ことが知られている。さらに、現状の塩基置換酵素では、transition変異(C/GからT/A、A/TからG/C)しか導入することができない。これらの課題を解決するための技術開発の例として、主に改変型Cas9を利用したBEについて紹介する。

**Protospacer adjacent motif (PAM) 配列の認識能を改変したCas9の利用** Cas9タンパク質が機能するためには、Cas9が標的配列に隣接するPAM配列を認識する必要がある。たとえば、SpCas9は5'-NGG-3'をPAM配列として認識する必要があり、PAM配列認識がCas9による標的配列の自由度を制限する一つの要因となっている。これを回避する一つの方法は、*Streptococcus pyogenes*以外の生物由来のCas9、もしくはCas9以外のCasヌクレアーゼタンパク質を利用することである。筆者らは、これまでに表1に示すCasタンパク質がイネ、シロイヌナズナやタバコなどのモデル植物で機能することを示している<sup>2,11-12)</sup>。これ以外にも、さまざまな生物に由来する多くのCasタンパク質について、標的変異への利用が報告されている<sup>13)</sup>。しかしながら、これまで標的変異への利用が報告されているCasタンパク質のう

表1. 当グループで標的変異に成功したCas

Casの種類	PAM配列	引用文献
SpCas9	5'-NGG-3'	Mikami <i>et al.</i> (2015)
SaCas9	5'-NNGRRRT-3'	Kaya <i>et al.</i> (2016)
FnCas12a	5'-TTN-3'	Endo <i>et al.</i> (2016)
NmCas9	5'-NNNNGAAT-3'	Kaya <i>et al.</i> (投稿準備中)

ち、*Streptococcus canis*由来のScCas9以外はすべて2塩基以上をPAM配列として要求する。

もう一つの方法は、異なるPAM配列を認識できるような改変型Casタンパク質を創出することである。たとえば、これまでに5'-NGA-3'、5'-NGAG-3'、5'-NGCG-3'をPAM配列として認識できる改変型SpCas9が報告されている<sup>14)</sup>。SaCas9においても、5'-NNHRRT-3'(H=A, T, C)をPAM配列として認識できる3アミノ酸置換が導入された改変型SaCas9が開発されている<sup>15)</sup>。また、これらを利用したBEについても報告されており、標的配列設定の制限を軽減することに成功している<sup>16)</sup>。

2018年、東京大学のグループから5'-NG-3'をPAM配列として認識できる改変型SpCas9(SpCas9-NG)が報告された<sup>17)</sup>。また、SpCas9-NGとcytidine deaminaseとの併用により、CからTへの塩基置換が導入できることも報告された<sup>17)</sup>。筆者らのグループでも、SpCas9-NGのプロトタイプ(SpCas9-NGv1, SpCas9-NGとは1アミノ酸のみ異なる)を用いて、イネにおいてcytidine deaminaseやadenosine deaminaseによる塩基置換が可能であることを報告した<sup>18,19)</sup>。一方、人工進化的な手法を利用して、SpCas9-NGと同様に5'-NG-3'をPAM配列として認識できるxCas9が同時期に発表された<sup>20)</sup>が、SpCas9-NGと比較して、*in vitro*<sup>17)</sup>、動物細胞<sup>17,21)</sup>、イネ<sup>22)</sup>のいずれにおいても変異導入効率は低いことが報告されている。

**塩基置換パターンの拡大** 塩基置換の方向性を拡大することも重要な課題の一つである。これまでの方法ではtransition変異しか誘導できないため、transversion変異を導入できる技術が求められている。ごく最近発表された総説では、DNAポリメラーゼの一つであるRev1を利用してCからGの置換を導入する方法について提案されている<sup>23)</sup>が、その方法が機能するかはまだ実証されていない。また、塩基を除去するglycosylaseを利用する方法や、校正機能が低い、いわゆる「誤りがちな」DNAポリメラーゼを利用する方法<sup>24)</sup>を利用して塩基置換を導入する技術も報告されている。しかしながら、これらの方法では導入できる塩基置換の方向性がランダムであるため、正確に塩基置換を導入するためには、更なる改良が求められる。

標的組換えによる塩基置換導入

**ポジティブ・ネガティブ選抜法とマーカー除去** ポジティブ・ネガティブ選抜を利用した標的組換えは、形質転換に成功した細胞に薬剤耐性などを付与するポジティブ選抜マーカーと、鋳型DNAが標的以外の部分に挿入した細胞の生育を抑制するネガティブ選抜マーカーの2種類の選抜マーカーを利用することで、ポジティブ選抜マーカーが標的的部位に挿入した細胞を濃縮する技術である。原理的にはどのような遺伝子にも適用可能な汎用的技術であると言える。この方法では、ポジティブ選抜マーカーを挿入すると同時に、その近傍に塩基置換などの変異を導入することも可能であるため、標的組換え後に不要になった選抜マーカー遺伝子を除去することができれば、目的の点変異だけを残すことが可能である(図3)。この場合、目的の塩基置換と選抜マーカーは強く連鎖しているため、これらを遺伝学的に分離することは困難である。これまでに、イネにおいては、部位特異的組換え酵素Cre recombinase<sup>25-26)</sup>やトランスポゾンpiggyBac<sup>27)</sup>、DNA修復機構の一つである単鎖アニリング(SSA)<sup>28)</sup>を利用して選抜マーカー遺伝子をゲノムから除去することにより、目的の塩基置換導入を達成したことが報告されている。Cre recombinaseは順向きに重複した34塩基のloxP配列を認識して部位特異的に相同組換えを誘導し、その内部を脱離させる。結果として、loxP配列が一つゲノム中に残ってしまうため、タンパク質のコード領域内にloxP配列が残ると遺伝子がノックアウトされる恐れがある。そのため、遺伝子間領域やイントロンなど、タンパク質のコード領域以外の部分にポジティブ選抜マーカー遺伝子を挿入する必要がある。一方、piggyBacやSSAを利用する方法では、ゲノム中に痕跡を残すことなく、ポジティブ選抜マーカー遺伝子を除去することが可能である。piggyBacによるマーカー除去の場合、ポジティブ選抜マーカーを「TTAA」とな

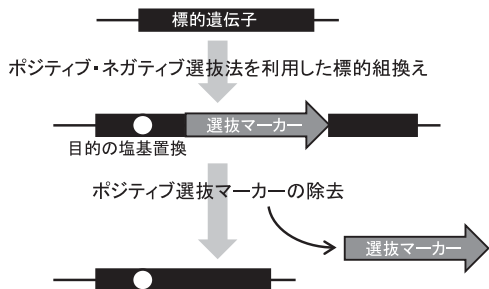


図3. 標的組換えを利用した塩基置換技術

る部位に挿入する必要があるが、マーカー除去効率がほぼ100%であるため、非常に強力なマーカー除去ツールである。

**さまざまな標的組換え法** 標的組換え効率は非常に低いため、その改善が最重要課題である。これまでに、さまざまなアプローチで標的組換え法の高効率化に関する研究がなされてきた。ここでは、新しい技術を利用した標的組換え法の例を紹介する。

植物ウイルスは、宿主植物で外来遺伝子を大量発現させるベクターとして利用されてきた。中でもジェミニウイルス由来のベクターは、ウイルス由来のレプリコンが宿主核内で大量に増幅するため、レプリコン内に外来遺伝子発現カセットを挿入することにより、外来遺伝子を大量発現させることができる。2014年、ジェミニウイルス由来のレプリコンを利用して標的組換えを誘導する方法(図4)が報告された<sup>29)</sup>。また、その翌年、トマトにおいて、ジェミニウイルス由来のレプリコンを利用してアントシアニン合成に関わる転写因子のプロモーターに強力な外来性のプロモーターをノックインできたことが報告された<sup>30)</sup>。この報告では、標的組換え効率が従来法より10倍近く高いことが示された。鋳型DNAを含むレプリコンが大量に増幅するため、標的組換えの鋳型DNAや人工ヌクレアーゼを効率良く供給できること、また、ウイルス由来のRepやRepAが発現することにより相同組換えを活性化することなどにより、レプリコンが標的組換えに有利に働くと考えられている。これまでにトマト<sup>30-31)</sup>やジャガイモ<sup>32)</sup>、キャッサバ<sup>33)</sup>などの双子葉類、イネ<sup>34)</sup>やコムギ<sup>35)</sup>でその適用例が報告されている。

また、シロイヌナズナでは、鋳型となる外来DNAを一度ゲノムに挿入したのち、任意のステージで制限酵素

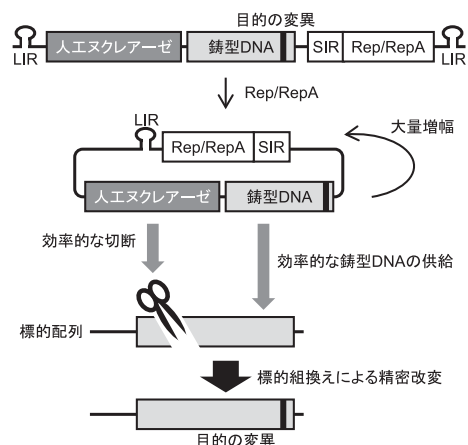


図4. レプリコンを利用した標的組換え



などを発現させて鋳型DNAを切り出し、標的組換えを誘導する *in planta* GT法が報告されている<sup>36)</sup>。これは、鋳型DNAを必要に応じて常に供給できるという利点がある。さらに、卵細胞や初期胚特異的にCRISPR/Cas9を発現させて標的遺伝子を切断することにより、鋳型DNAを切り出さなくても標的組換えを誘導できる方法が報告されている<sup>37)</sup>。これらも効率的な標的組換え技術の一つであり、今後の展開が期待される。

一方、イネにおいて、標的配列に目的の変異を導入したRNAを発現させる、もしくは標的配列を連結したgRNAを発現させることにより、RNAを鋳型として標的遺伝子に塩基置換を導入することに成功した論文が報告された<sup>38,39)</sup>。また、酵母やヒト細胞において、RNA逆転写酵素を融合したニッカーゼ型Cas9と標的配列に目的の変異を導入したRNAを共発現させることにより、標的遺伝子に変異を導入できることも示された<sup>40)</sup>。汎用性や変異導入効率などは更なる検証が必要であるが、これらも新たな変異導入法として利用されることを期待したい。

#### 将来展望

ゲノム編集技術の急激な進展により、遺伝子を自在かつ容易に改変し、作物を改良することが可能となった。すでに筆者らのグループでは、塩基置換導入法などのゲノム編集技術を応用し、ゲノム情報や酵素タンパク質の構造情報といった既知の情報を基に、そこから得られた有用な変異を実際にイネに導入することで、新たな形質を有する系統を作出することに成功している<sup>41-44)</sup>。一方で、ゲノムやタンパク質、代謝産物などのオミクス情報などのビッグデータは今後も大量に蓄積するであろう。これらのビッグデータの解析などから、想像もできなかったような新たな遺伝子の改変情報もたらされるかもしれない。今後も、精密ゲノム編集を含め、ゲノムを必要に応じて自在に改変する技術を開発していくことが求められるであろう。

#### 文 献

- 1) Osakabe, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12034 (2010).
- 2) Mikami, M. *et al.*: *Plant Cell Reports*, **34**, 1807 (2015).
- 3) Mikami, M. *et al.*: *Plant Mol. Biol.*, **88**, 561 (2015).
- 4) Nishizawa-Yokoi, A. *et al.*: *Plant Physiol.*, **169**, 362 (2015).
- 5) Terada, R. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1030 (2002).
- 6) Shimatani, Z. *et al.*: *Front. Plant Sci.*, **5**, 748 (2015).
- 7) Komor, A. C. *et al.*: *Nature*, **533**, 420 (2016).
- 8) Nishida, K. *et al.*: *Science*, **353**, aaf8729 (2016).
- 9) Gaudelli, N. M. *et al.*: *Nature*, **551**, 464 (2017).
- 10) Shimatani, Z. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **35**, 441 (2017).
- 11) Endo, A. *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 38169 (2016).
- 12) Kaya, H. *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 26871 (2016).
- 13) Zhang, Y. *et al.*: *Nat. Plants*, **5**, 778 (2019).
- 14) Kleinstiver, B. P. *et al.*: *Nature*, **523**, 481 (2015).
- 15) Kleinstiver, B. P. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **33**, 1293 (2015).
- 16) Molla, K. A. and Yang, Y.: *Trends Biotechnol.*, (2019).
- 17) Nishimasu, H. *et al.*: *Science*, **361**, 1259 (2018).
- 18) Endo, M. *et al.*: *Nat. Plants*, **5**, 14 (2019).
- 19) Negishi, K. *et al.*: *Plant Biotechnol. J.*, **17**, 1476 (2019).
- 20) Hu, J. H. *et al.*: *Nature*, **556**, 57 (2018).
- 21) Huang, T. P. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **37**, 626 (2019).
- 22) Zhong, Z. *et al.*: *Mol. Plant*, **12**, 1027 (2019).
- 23) Gajula, K. S.: *Trends Biochem. Sci.*, **44**, 91 (2019).
- 24) Halperin, S. O. *et al.*: *Nature*, **560**, 248 (2018).
- 25) Terada, R. *et al.*: *Plant Biotechnology*, **27**, 29 (2010).
- 26) Dang, T. T. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **54**, 2058 (2013).
- 27) Nishizawa-Yokoi, A. *et al.*: *Plant J.*, **81**, 160 (2015).
- 28) 雑賀啓明: JATAFF ジャーナル, **4**, 59 (2016).
- 29) Baltes, N. J. *et al.*: *Plant Cell*, **26**, 151 (2014).
- 30) Cermak, T. *et al.*: *Genome Biol.*, **16**, 232 (2015).
- 31) Dahan-Meir, T. *et al.*: *Plant J.*, **95**, 5 (2018).
- 32) Butler, N. M. *et al.*: *Frontiers in Plant Science*, **7**, (2016).
- 33) Hummel, A. W. *et al.*: *Plant Biotechnol. J.*, **16**, 1275 (2018).
- 34) Wang, M. *et al.*: *Mol. Plant*, **10**, 1007 (2017).
- 35) Gil-Humanes, J. *et al.*: *Plant J.*, **89**, 1251 (2017).
- 36) Fauser, F. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7535 (2012).
- 37) Miki, D. *et al.*: *Nat. Commun.*, **9**, 1967 (2018).
- 38) Butt, H. *et al.*: *Front. Plant Sci.*, **8**, 1441 (2017).
- 39) Li, S. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **37**, 445 (2019).
- 40) Anzalone, A. V. *et al.*: *Nature*, DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4 (2019).
- 41) Endo, M. *et al.*: *Plant J.*, **52**, 157 (2007).
- 42) Saika, H. *et al.*: *Plant Physiol.*, **156**, 1269 (2011).
- 43) Abe, K. *et al.*: *Plant Physiol. Biochem.*, **131**, 58 (2018).
- 44) Endo, A. *et al.*: *Rice*, **12**, 81 (2019).