

サイエンス・プラザ

夢の育種技術・ゲノム編集技術による新品種創生の迅速化

国立大学法人筑波大学・生命環境系・准教授
有泉 亨

1. はじめに

2017年現在、地球上では75億人が存在し、2050年には90億人を超えると予想されているが、90億人の人類を賄うためには、2010年に生産された食料の1.6倍量が必要と試算されている。人類の生命を賄う食料を確保する課題、即ち世界の食料安全保障の課題は至急取り組まなくてはならない課題である。しかし、人類の社会活動の副産物であるCO₂の排出過多に起因する地球温暖化や砂漠地域の拡大、化学肥料の過剰使用による耕作地の塩害化など農業を取り巻く問題も地域によって顕在化しつつあるが、この情勢の中で食料を安定的に供給する農業技術の革新が求められる。食料の増産を達成する有効な手段の1つは、不良環境でも安定的な生産が見込める優秀な作物品種を開発することであるが、一般的に作物の新品種の開発には時間がかかる。また、農業の問題は国や地域毎に局所化しているため、生産地が抱える課題毎に適した品種を如何に迅速に開発するかが

食料安全保障を達成させる鍵の1つと言える。

現在、作物の新品種開発においては、交配によって遺伝子を伝搬させる交雑育種と呼ばれる育種技術が利用されている。また、自然界では起こり得ないDNAの直接導入を可能する遺伝子組換え技術が1980年代に開発され、今ではトウモロコシ、ダイズなど主要作物の安定的生産に欠かせない育種技術として活用されている。近年、内在遺伝子の機能を効率的に改変するゲノム編集技術が登場し、この技術の適応が作物育種だけではなく、動物育種、水産魚育種、再生医療、並びに創薬を含むライフサイエンスの幅広い分野で爆発的な勢いで進んでいる。今後、ゲノム編集技術が果たす役割が大きくなるのは火を見るよりも明らかである。本概説では、既存の育種技術に加え、新たな育種技術として登場したゲノム編集技術の原理と適応例を紹介し、その育種技術としての可能性について言及したい。

◆ も く じ ◆

サイエンス・プラザ 夢の育種技術・ゲノム編集技術による 新品種創生の迅速化……………	1
カッシーニ・ホイヘンス探査機を 振り返る……………	12

性器を取り替えちゃった昆虫 トリカヘチャタテ……………	18
高校生へ私が選んだ1冊の本 重力波は歌う……………	24

2. 作物品種を開発する育種技術・交雑育種について

地球上に存在する生物が持つ遺伝情報の本体はゲノムあるいは全 DNA である。DNA はアデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、チミン (T) の4つのいずれかの塩基が結合した分子であるが、塩基は永続的に不変ではなく、自然的に変化する場合がある。この DNA 塩基の変化こそ個体特有の形態や特性の変化の本体である。即ち、生物の遺伝的形質の差異は DNA の塩基の違いに起因する。この違いは「多型 (たけい)」あるいは「変異 (へんい)」と呼ばれる。DNA の多型・変異は、例えば、細胞分裂で核酸が複製される際に発生する。真核生物などでは一世代の一細胞のゲノムあたりで数十から数百塩基程度が変化する。DNA の変化は時に生物の生存にとって不利益になる場合があるが、DNA 多型・変異が蓄積することで多様性が高まり、生物が環境適応性を高める源となった。一方、人類はこの DNA の多様性を活用することで多様な作物の品種を創り出してきた。例えば、同じトマトの中でも異なる形質を示す品種が多数存在する。果実の大きな品種や小さな果実をつける品種、赤い果実の品種やオレンジ色の品種も存在する。また、病気に強い品種もあれば、弱い品種も存在する。これらの遺伝的に支配される形質の違いも DNA 多型・変異に起因している。そのため、有用な形質に関連する DNA の多型・変異をいかに見出して利用するかが作物育種の成否を決める大きな要因となる。

作物の育種における品種改良とは、優れた形質に関連する遺伝子型を集積させることで、ある形質がより優れた作物集団を作り上げることである。即ち、収量性や環境ストレス耐性の向上、あるいは栄養価の改良等の目標に対して、既存の品種よりも優れた形質の品種を開発する作業を言う。育種技術として、2つの異なる個体間の交配（一方の花粉を他方の雌しべに受粉させて次世代を得る手法）による交雑育種が長きに渡り利用されている（図1）。これは、交配可能な野生に自生する近縁種や同一種（栽培種）の異なる個体を持っている優れた性能に関連する遺伝子（あるいは遺伝子群）を、交配によりもう片方の親系統に導入す

る育種法である。交雑育種は両親間の交配後に得られた次世代を評価し、その中から良いものを選抜して、最初の交配で用いた片方の親系統で再度交配させる作業（戻し交雑）が必要である。この作業を繰り返すことで、有能な形質に関する遺伝子のみが原品種に導入された新しい系統が作出される。この手法の課題として複数回の戻し交雑（連続戻し交雑）が必要な点である。これは作物種にもよるが、4～8年の年月がかかるのが一般的であり（果樹では数十年）、また、実際には数十から数百、時には数千もの次世代個体を評価しながら有望な系統を選抜するため、新品種を作り上げるまでの時間と労力がかかるのが課題である。また、交雑育種は両親間で交配が可能であり、その後種子が得られることが前提条件であり、交配ができない両親間の遺伝子の伝搬はできない。そのため、交雑育種で利用できる遺伝資源は作物に

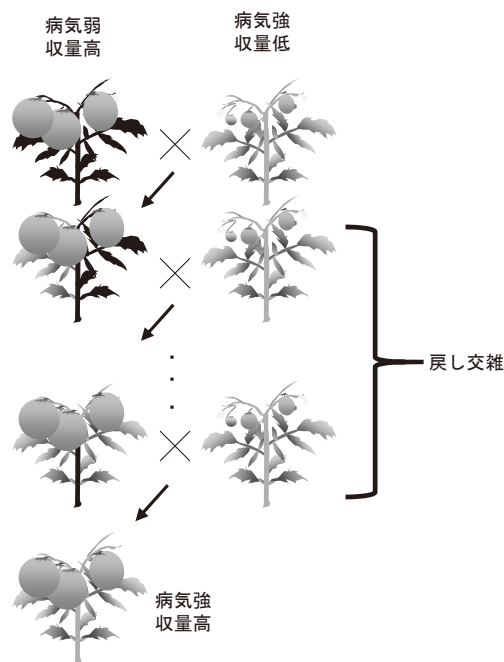


図1. 交雑育種の模式図

例えば病気に強いが収量が低い品種（右）に、高収量性の形質を導入したい場合、まずその形質を持つ品種（左：ただし、病気に弱い形質を持つとする）と交配する。その後、後代世代の形質評価を行いながら、新たな形質を導入したい親品種（この場合は右の品種）と連続的に交配を行う（戻し交雑）。これを4～8回程度繰り返し（作物によるが、大凡4～8年かかる）、両方の形質（病気強・収量高）が付与された系統を作出する。

よっては著しく限られる場合がある。また、有用な形質に関連する遺伝子座が染色体上のどこに座乗しているかを明らかにしなければ、効率的に交雑育種に活用できない。交雑育種においては上記の制限があるものの、現存する作物品種のほとんどはこの育種法によって作り出されたものであり、最も信頼のおける育種技術と言える。1960年代には自然発生で得られた耐倒伏性（強雨風下でも倒れにくい）に寄与する半矮性化を促す遺伝子変異を交雑育種でイネやコムギに導入することで半矮性品種が開発され、単位面積あたりの増収に寄与した歴史がある。

3. 遺伝子変異誘発を利用する突然変異育種

交雑育種でより優れた性能の品種を作り出す鍵の1つは、如何に優れた遺伝資源を入手するかである。しかし、作物によって既存の遺伝資源が限られる場合がある。そこで、植物の種子や成長点に化学物質処理や放射線照射でDNAにランダムな変異を誘発してゲノム中に変異が散在する集団（変異体集団）を作出する突然変異育種と呼ばれる変異創生技術が利用されている（図2）。変異原はランダムに変異を誘発するため、変異のパターンは変異原を処理された個体毎に異なる。つまり、現品種は同じでも個体毎に異なる遺伝子型を持つ集団を作り上げることができる。そして、この変異体集団の中から原品種が示さなかった有

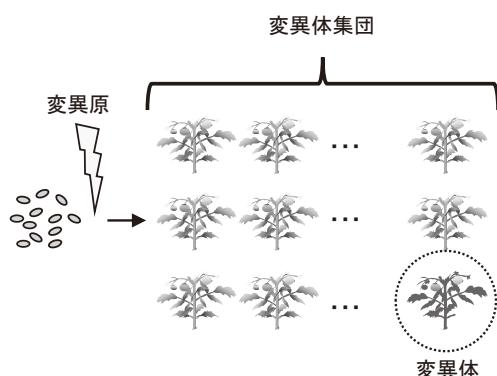


図2. 突然変異育種の概要

突然変異育種は、作物の種子に変異原を施して作物のDNAの塩基配列の変化を促すことに始まる。変異原が処理された種子からは内在DNAの塩基配列が変化したことにより元の個体が示さなかった形質を示す変異体（丸で囲まれた個体）が得られる。有用な形質を示す変異体を選抜し、それを交雑育種に利用することができる。

有用な形質を持つ変異体を選抜し、交雑育種に利用することができる。この手法の利点は、遺伝子変異を効率的に誘発することで、自然界ではまだ見つからない有用な遺伝子変異を得ることができる点である。また、変異体集団を作出し続けることで永続的に遺伝子変異を創出することができるため、特に交雑育種に利用する遺伝資源が限られている作物に有効な手法と言える。一方、変異体集団は大規模に作出してその中から有用な個体を探す作業となるため、大規模な変異体集団の育成と維持にかかるコスト・労力が課題である。また、有能な個体を見逃さずに探し出す育種家としての経験や能力も必要である。さらに、変異原はランダムに変異を誘発するため、有用変異体を選抜の後、原品種で何回か戻し交雑を行い有用形質に関係する変異以外の変異を取り除く作業が必要である。我が国では主要作物のイネやダイズの他にも、リンゴや梨などの果樹類やキク、バラなどの花卉類においてもこの育種法によって新品種が開発されている。なお、この育種法は外来遺伝子を人為的に改変・導入するものではないため遺伝子組換え技術には該当しない。

4. 遺伝子組換え技術を利用する育種

遺伝子組換え技術は自然界では遺伝子交換が不可能な生物間において遺伝子の交換を可能にする技術である。1982年に大腸菌で初めてゲノム改変に成功したことに始まり、翌年1983年に初めて形質転換植物（タバコ）が開発された¹⁾。現在汎用される植物の遺伝子組換え技術の手法は次の通りである。

- (1) 宿主植物に組み込みたい外来遺伝子をベクターと呼ばれる環状のDNAの中に組み込む。通常、ベクターには植物細胞が抗生物質や除草剤に対して耐性を獲得するためのマーカー遺伝子が含まれる。
- (2) ベクターを植物細胞に直接導入する物理的方法や土壌細菌アグロバクテリムを活用した間接的手法により宿主植物のDNAに外来遺伝子を組み込む。
- (3) 抗生物質や除草剤が含まれる寒天培地で植物細胞を培養して、外来遺伝子が導入された個

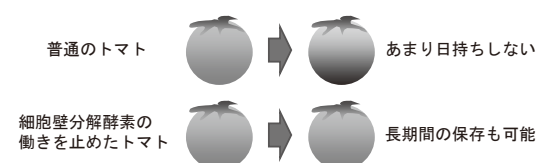


図3. 遺伝子組み換え技術によって作出されたトマト品種“フレーバーセイバー”

普通のトマトは登熟後は細胞壁の分解が起こり腐りやすいが、細胞壁の分解を促す遺伝子の機能を遺伝子組換え技術で低下させると、細胞壁の分解が遅れて日持ちするようになる。その結果、輸送時でも腐らず、香りのいいトマトの長期間の販売が可能となった。

体を選抜する。この際、外来遺伝子が含まれない植物細胞は抗生物質や除草剤の影響で死滅する。

この手順は植物において種に限らずほぼ同様であり、多くの作物においてこの手順で遺伝子組換え個体（あるいは形質転換体とも呼ばれる）が作出されている。

遺伝子組換え生物の定義は、「2003年に締結された遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」にて、「細胞外において核酸を加工する技術（主務省令で定めるもの）の利用や、異なる分類学上の科に属する生物の細胞を融合する技術（主務省令で定めるもの）の利用により得られた核酸

又はその複製物を有する生物」と定められている。即ち、カルタヘナでは分類学上の「科」を超える生物間で核酸が移動した生物を規制の対象としている。ただし、「科」を超える核酸の交換でも自然界で発生しうる現象はカルタヘナの規制対象にはならず、遺伝子組換え植物とは定義づけられない。例えば、自然界ではアグロバクテリウム（土壌細菌）の遺伝子が植物細胞の核酸に組み込まれる現象が知られ、人類に食されているサツマイモにもアグロバクテリウム由来の複数の遺伝子が組み込まれていることが証明されている²⁾。しかし、自然発生した現象であるためカルタヘナ法の規制外とされる。

遺伝子組換え技術は、今でも遺伝子の機能解明に利用される場面が多いが、1994年に日持ちするトマト“フレーバーセイバー”が遺伝子組換え作物として初めて商業販売された例に続き、現在ではダイズ、トウモロコシ、カノーラ、ワタ、パパイヤ等で新しい形質が付与された新品種開発の育種技術として現在でも活用されている。

組換え作物の例を3つ紹介する。まず、上記に述べた“フレーバーセイバー”である（図3）。トマトは生産現場から市場に輸送する際、果実が軟化・劣化することが課題であった。そこで、果

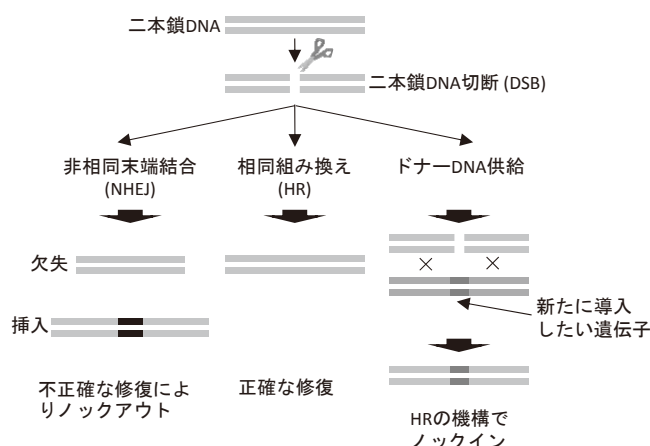


図4. ゲノム編集技術の基本原則

ゲノム編集技術の基本原則は二本鎖DNAをヌクレアーゼで切断することである。切断後、非相同末端結合の修復機構で修復されると修復エラーが発生し、遺伝子のノックアウトが可能である。一方、相同組み換えの機構で修復されるとDNAは正確に修復される。DSB後、新たに導入したい遺伝子を含むドナーDNAを供給することで遺伝子のノックインが可能である。

DSB, double strand break（二本鎖DNA切断）

NHEJ, non homologous end joining（非相同末端結合）

HR, homologous recombination（相同組み換え）。

実の細胞壁の構成要素であるペクチンを分解するポリガラクトリノナーゼと呼ばれる酵素の遺伝子発現を遺伝子組換え技術で低下させることで、果肉の細胞壁が分解せず、長い間腐らず日持ちさせることに成功した。

次に、“ラウンドアップレディー”である。通常、作物と雑草が近くで生育すると両方で生育に必要な日光量や栄養の競合が起こり、作物の生産性が低下する問題が発生する。一方、植物はグリホサート（製品名ラウンドアップ）と呼ばれる除草剤が散布されると、生育に必須なアミノ酸合成に関わる植物内在性の酵素遺伝子が不活性化されるため生存できなくなることが発見された。そこで、グリホサートで不活性化されないバクテリア由来の同じ機能を有する遺伝子を宿主植物に組み込むことで、グリホサート処理でも生育できる組換え作物（製品名“ラウンドアップレディー”）が開発された。グリホサートを散布することで雑草のみを効率的に死滅させることができるため、作物に十分な栄養と日光を施与させることが可能になり、安定生産に大きく寄与した。“ラウンドアップレディー”は大豆、トウモロコシなどで適応されており、現在では最も生産される遺伝子組換え作物の1つとなっている。

3つめの例は、パパイアの“レインボー”である。1993年に世界的生産地であるハワイでパパイアリングスポットウイルス病が大量発生し、壊滅的な影響を受けた。そこで、抵抗性品種の開発が求められたが、当時そのウイルスに抵抗を示す

品種の存在は知られていなかった。一方、ウイルスの形状を作っている外皮タンパク質の遺伝子を植物細胞内で発現させると、そのウイルスに対する抵抗性を獲得する場合があることが1980年代に明らかになったことから、この技術を応用してウイルスに耐性を示す遺伝子組換えパパイア品種“レインボー”が開発された。その“レインボー”が1998年に生産現場に導入されたことにより、わずか数年以内に従来に近い生産量にまで急回復することができた。このパパイアの例は組換え技術の功績により迅速に課題を解決した好例と言える。

遺伝子組換え作物の利用については潜在的なリスクより慎重な論議も必要であるが、2016年の遺伝子組換え作物の世界の作付け面積は日本の国土を超える1億8510万ヘクタールと報告されており³⁾、遺伝子組換え技術は世界の作物生産上、極めて重要な役割を担っていると言える。

5. ゲノム編集技術の原理

ゲノム編集技術は任意の配列内でDNAを改変する技術であり、従来の遺伝子組換え技術よりも正確にDNAに変異を導入することができる技術として近年、世界中で注目を浴びている（図4）。この技術の基本原理は、まず標的となるDNA配列を認識し、その近傍で二本鎖DNAをヌクレアーゼにより切断すること（Double Strand Breaks, DSB）である。切断されたDNAは生物が持つ修復機構により修復される。DNAの修復

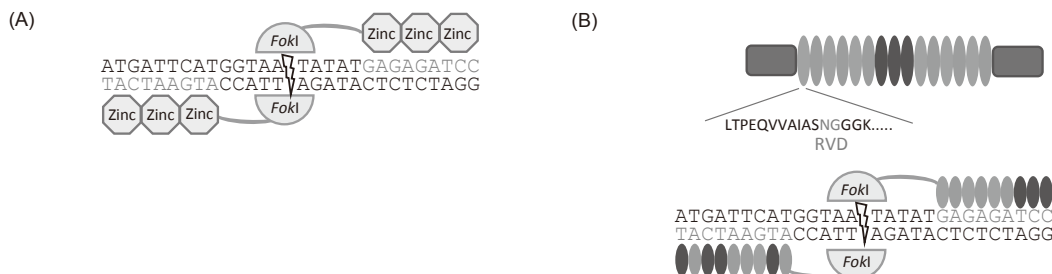


図5. ゲノム編集技術による標的配列の認識機構

(A) ZFNの基本構造。3つのZinc Fingerに単量体のFokIを連結した人工キメラ遺伝子を標的配列に対になるように設計する。FokIが二量体になるとそこでDSBが誘導される。

(B) TALENの基本構造。上図は、TALEの構造。大凡20の反復配列を含み、1つの反復配列内の12、13番目のアミノ酸をRVDと呼ぶ。これが1つのDNAを認識する。下図は、TALENの構造。TALEにFokIを連結する人工キメラ遺伝子を用いる。DSB誘導の原理はZFNと同じである。

TALE, Transcription Activator-like Effector

RVD, Repeat Variable Diresidues

機構は2つ存在し、1つは相同組換え (Homologous Recombination, HR) と呼ばれる機構で、切断された染色体とは別の、無傷の染色体を鋳型として切断された染色体を正確に複製する機構である。もう一つは、切断面を直接修復する非相同末端結合 (Non Homologous End Joining, NHEJ) である。この機構で修復される場合、切断面の連結時に修復のエラーが入りやすい特徴がある。特にDNAの欠失や短いDNAの挿入が生じることがあり、その結果、元の塩基配列とは異なる配列に変化することで遺伝子機能が改変される。特にDNAの欠失や挿入はフレームシフトを引き起こし、標的遺伝子の機能をほぼ確実に破壊することができる。代表的なゲノム編集技術として、Zinc Finger Nuclease (ZFN), Transcription Activator-like (TAL) Effector Nuclease (TALEN), 並びに Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas9) が知られるが、いずれも標的配列を認識し、ヌクレアーゼによるDSB誘導とNHEJの修復機構を介して変異誘発する原理を利用した手法である。以下にそれぞれの技術の原理について概説する。

6. 第一世代のゲノム編集技術：Zinc Finger Nuclease (ZFN) の登場

ゲノム編集技術の第一世代として2005年に登場したのがZFNである⁴⁾。ZFNはDNAに結合する性質があるZinc Fingerと呼ばれるDNA結合タンパク質と、*FokI* と呼ばれる二本鎖DNAを切断するヌクレアーゼを組み合わせる手法である (図5A)。1つのZinc Fingerタンパク質は3つの塩基を認識することができるため、Zinc Fingerタンパク質を3つ並べることで特異的な9塩基の認識が可能である。この3つを連続的に並べたZinc Fingerタンパク質の下流に*FokI* を2つに分割した単量体を連結させた人工キメラ遺伝子を作成する。次に、人工キメラ遺伝子を切断したい領域に対して、人工キメラ遺伝子をセンス鎖とアンチセンス鎖のDNAに結合するように設計することで、合計18塩基程度の認識が可能に

した人工キメラ遺伝子を作成する。対にした人工キメラ遺伝子の先端にある*FokI* 同士が合わさり2量体を形成するとヌクレアーゼとして機能する性質があるため、対にした人工キメラ遺伝子の中央でDSBが誘導される。DSB誘導後はNHEJのDNA修復機構を介して修復されることで、遺伝子機能が改変される。ZFNは最初アフリカツメガエルで成功例が報告され、その後ショウジョウバエ、あるいはごく一部の植物においても報告されたが、人工キメラ遺伝子の構築が極めて煩雑なことから現在は広く利用されるに至っていない。

7. 第二世代のゲノム編集技術：TALEN の登場

2010年、ZFNに続きゲノム編集技術の第二世代としてTALENが開発された⁵⁾。この技術は標的配列の認識にTALE (Transcription Activator-Like Effector) と呼ばれるDNA結合タンパク質を利用する。TALEは元来植物に感染する病原菌 *Xanthomonas* 属の多くが保有するタンパク質であり、*Xanthomonas* が植物に感染する際に植物細胞に注入され、罹病性を促進する

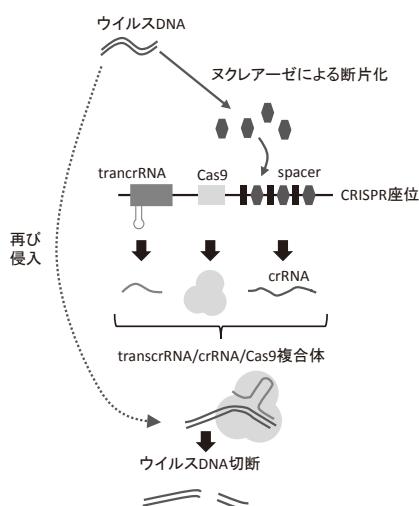


図6. CRISPR/Cas9による獲得免疫システム
ウイルスDNAが侵入すると、ヌクレアーゼによりDNAが断片化されてCRISPR座位のスペーサー領域に組み込まれてゲノムに記憶として残る。
もう一度同じウイルスDNAが取り込まれた際に、CRISPR座位のtranscrRNA, Cas9, crRNAがいずれも転写されて複合体を形成する。crRNAに存在するスペーサーDNAの塩基配列の相同性を利用してウイルスを認識し、ヌクレアーゼ活性を有するCas9タンパク質の作用によりウイルスDNAが切断される。

遺伝子上流の DNA 配列に結合してその遺伝子を活性化させる性質がある。TALE には 20 程度の反復配列構造があり、それぞれの反復配列は大体 33 ～ 35 アミノ酸から構成される (図 5 B)。その 1 つの反復配列の中の 12 番目と 13 番目のアミノ酸は多型に富む領域であり、Repeat Variable Diresidues (RVD) と呼ばれる。この RVD の 2 アミノ酸の配列が 1 つの DNA との結合特異性を決定する。つまり、TALE の反復配列内のそれぞれの RVD 配列を標的配列と結合するように設計することで、狙った部位に結合する TALE を人工的に合成することができる。この TALE を単量体の *FokI* と結合させた人工キメラ遺伝子を ZFN と同様に、DSB を誘導したい領域で対になるようにセンス鎖とアンチセンス鎖の両方に設計することで、標的部位で DSB を誘導することができる。DSB 誘導後は、NHEJ の修復経路を介することで遺伝子機能を改変することができる。基本原理は ZFN と類似しているが、人工キメラ遺伝子の構築は ZFN と比べて比較的簡易なことから、様々な動物から植物まで適応が進められている⁶⁾。しかし、ベクター構築がやはり煩雑であることから、幅広い分野の研究者に一般的に利用されるまでに至っていない。

8. 第三世代のゲノム編集技術：CRISPR/Cas9 の登場

TALEN の発明から間もなく、CRISPR/Cas9 法が開発された。これは真性細菌や枯草菌の外來性ウイルスへの獲得免疫反応の原理を利用している (図 6)。まず、この原理を説明する。上述の細菌は外來性ウイルスなどの侵入を受けた際、そのウイルス DNA の proto-spacer adjacent motif (PAM) と呼ばれる 3 つの塩基配列 (NGG, N はどの塩基でも構わない) を認識して、その上流部位をヌクレアーゼで切断後、切断したゲノムの一部を CRISPR 座位と呼ばれる遺伝子座に取り込む機能を持っている。次に、同じウイルスが再侵入した際に、取り込んだ DNA 配列が鋳型となり crRNA (crRNA) が転写される。この crRNA は Cas9 ヌクレアーゼの足場として機能するトランス活性化型 crsRNA (tracrRNA)

と複合体を形成し、この複合体に Cas9 ヌクレアーゼが呼び寄せられ、crRNA-tracrRNA-Cas9 の複合体が形成される。そして、この複合体が侵入 DNA へと配向され、crRNA 上の塩基配列と相補的な DNA の塩基配列と結合して、Cas9 ヌクレアーゼにより PAM 配列の上流で DSB が誘導される。この原理は一度侵入を受けた DNA を記憶することで再侵入を防ぐ機構であり、crRNA, tracrRNA および Cas9 の 3 つが標的配列を切断する複合体として機能する。

一方、CRISPR/Cas9 はこの原理を転用し、ヌクレアーゼ活性を有する Cas9 タンパク質と、crRNA と tracrRNA を 1 つにした sgRNA (single guide RNA) を利用する技術である⁷⁾ (図 7)。作用原理は上記とほぼ同様であり、sgRNA がゲノムの標的となる部位 (20 塩基) を指定し、Cas9 が指定領域内の PAM 配列の上流部位で DSB を誘導する。DSB 後は、ZFN と TALEN と同様に NHEJ を介した修復機構により、標的部位の塩基配列を改変することができる。この技術の利点は sgRNA の標的配列である特異な 20 塩基を変えるだけで、任意の DNA 領域を標的とすることができることである。そのため、CRISPR/Cas9 のベクター構築も極めて簡易であり、現在最も利用されるゲノム編集技術となっている。なお、植物では一般的に Cas9 と sgRNA を発現させる DNA 領域を含んだ T-DNA 領域を、アグロバクテリウムを介して植物細胞のゲノムに組み込んだ後にゲノム編集を誘導する手法が広く利用されている。

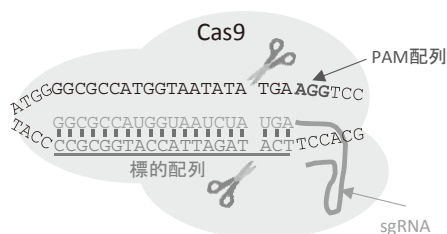


図 7. CRISPR/Cas9 の基本構造

PAM 配列から上流 20bp を認識する sgRNA を設計する。sgRNA が標的配列を認識すると、Cas9 が配向されて DSB を誘導する。

9. ゲノム編集技術を利用して遺伝子を導入する ノックイン技術について

ゲノム編集技術は、標的遺伝子のフレームシフトを伴うのでいずれも遺伝子破壊（ノックアウト）として利用される場合がほとんどであるが、新たな遺伝子を導入するノックインの技術も開発されている。この基本原理は、まず ZFN, TALEN あるいは CRISPR/Cas9 法により、指定される標的部位内で DSB を誘導することである。この際、自分が新たに導入したい DNA 断片を含むドナーテンプレートの DNA（ドナー DNA）を供給することで、相同組換えの修復機構（HR）を介して目的の DNA 断片を DSB 誘導部位に直接組み込むことができる（図 4）。この技術を利用することで狙った部位に遺伝子や遺伝子変異などを含む DNA 断片と入れ替えることが可能である。植物においては、トマトにおいて約 2kb の DNA 断片を、DSB 誘導部位に導入した例が報告されている⁸⁾。植物においてノックイン技術はノックアウト技術に比べて効率が低く手法が煩雑であるため、今後、技術改良により汎用的に利用される技術になることが期待される。

10. 一塩基置換を誘導するゲノム編集技術 Target-AID

CRISPR/Cas9 はベクター構築の容易さも相まって、様々な生物で適応されている。しかし、CRISPR/Cas9 は ZFN, TALEN と同様に DSB 後の NHEJ を誘導するため、標的部位の DNA 欠失・挿入変異誘導による標的遺伝子の破壊に適し

ている一方、1 塩基置換などマイルドな変異を効率的に誘発する技術ではない。とりわけ作物の有育種形質や人間の遺伝疾患の多くは一塩基置換によって引き起こされるため、遺伝子機能を完全に破壊せずに機能を微妙に改変させたい場合があるが、既存のゲノム編集技術では効率的に成し得なかった。上述のノックイン技術で一塩基変異を含むドナー DNA を導入することも可能であるが、とりわけ植物においてはノックインの効率は低いのが課題とされていた。

2016 年、活性化シチジンデアミナーゼ（Activation Induced cytidine Deaminase, AID）と呼ばれる塩基修飾酵素を活用することでヒト細胞や酵母のゲノムの一塩基編集を可能にした技術（Target-AID 法）が開発された（図 8）⁹⁾。活性化シチジンデアミナーゼはシトシンの脱アミノ化反応を促進し、ウラシルへの転換を促す酵素である。その後、ウラシルは DNA 複製の過程でチミンへ置き換わるため、結果的にシトシン（C）からチミン（T）への変換が誘発される。一方、Cas9 は 2 つの DNA 鎖（センス鎖、アンチセンス鎖）を切断する 2 つのヌクレアーゼドメインを有するが、ヌクレアーゼドメインを 1 つあるいは 2 つとも不活性化させて DSB を誘導しない nickase Cas9（nCas9、一本鎖 DNA 切断）あるいは dead Cas9（dCas9、DNA 未切断）を作成し、これらと AID を連結させた人工キメラ遺伝子を細胞に導入することで、sgRNA で指定された領域内において AID の作用により一塩基置換を誘導できることが証明された。筆者らはこのシステ



図 8. 一塩基置換変換技術 Target-AID の原理

Cas9 は 2 つのヌクレアーゼを保有するが、1 つあるいは 2 つのヌクレアーゼを不活性化させた Cas9（それぞれ、nCas9, dCas9）に活性化シチジンデアミナーゼ酵素遺伝子（CDA）を連結させた融合タンパク質を細胞内で発現させることで、sgRNA で指定された領域内の C を T に改変することができる。ただ、実際には T 以外の塩基への置換も誘導されることがある。なお、通常の CRISPR/Cas9 法では欠失が主に引き起こされるが、置換はほぼ起きない。

ムをイネやトマトで適応させ、sgRNAで指定される領域内で効率的に塩基を置換することに成功した¹⁰⁾。同時期にトウモロコシとコムギにおいても同様の技術により一塩基置換が可能であることが証明されている¹¹⁾。

11. ゲノム編集技術を利用した作物開発の試みについて

これらのゲノム編集技術の利点として、形質を導入したい品種に対して直接ゲノム編集技術を実施することで、交雑育種に必要な戻し交雑が不要になることが挙げられる。そのため、交雑育種と比べて迅速に新品種を開発できる。また、ゲノム編集技術はランダムに変異を誘発する突然変異育種とは異なり、標的遺伝子内で効率的に変異を誘発できるため、狙った遺伝子内に変異が存在する遺伝資源の集団の効率的な創出が可能であり、その集団から最も優れた性能の個体を選抜することができる。加えて、CRISPR/Cas9においては異なる標的配列をターゲットとしたsgRNAを複数、同時に発現させることで、異なる遺伝子を一代で同時に編集することも可能である。また、高次ゲノムを有する植物、例えば、3つのゲノムのセットを保有する六倍体コムギ（Aゲノム、Bゲノム、Dゲノム）において3つのゲノムの同一遺伝子座を同時に編集することも可能である。このように既存の交雑育種や突然変異育種では効率的に成し得なかったことが、ゲノム編集技術を用いることで可能になっている。

近年、ゲノム編集技術を活用して新しい作物品種を創出する試みが開始されている（図9）。例えば、TALENにより病原菌の罹病を促進する遺伝子をノックアウトすることで、その病原菌に対して耐性を示すイネや小麦が開発されている¹²⁾。また、健康に悪いとされる不飽和脂肪酸であるリノレン酸合成を触媒するFAD遺伝子をノックアウトすることで、リノレン酸を減少させたダイズや¹³⁾、糖を加水分解するインペルターゼをノックアウトすることで調理時に発がん性のアクリルアミドの発生を低下させたジャガイモが開発されている¹⁴⁾。トマトにおいても、CRISPR/Cas9を利用して機能性成分が高蓄積したトマトが開発さ

れている¹⁵⁾。

12. ゲノム編集技術により得られたヌルセグリガントの規制について

これまでに紹介したゲノム編集技術の特徴として、開発の過程で遺伝子組換え技術を利用し、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9のスクレアーゼ遺伝子を植物ゲノムに導入して標的部位を改変した後に、スクレアーゼ遺伝子を取り除くことができる。植物を例にすると、スクレアーゼ遺伝子をまず植物細胞に遺伝子組換え技術で組み込み、標的部位の改変を誘導する。次に、自殖あるいは野生株と交配すると、その後代世代で標的部位が改変されて、かつベクターが除かれた個体が分離して出現する（図10A）。このようなベクターフリーのゲノム編集個体は“ヌルセグリガント”と呼ばれる。ヌルセグリガントは外来遺伝子（ここではスクレアーゼ遺伝子）を含まないため、遺伝子組換え技術を利用した痕跡が残らない個体であり、自然発生する突然変異や化学変異原を用いた変異創生技術との見分けが付かない可能性がある。

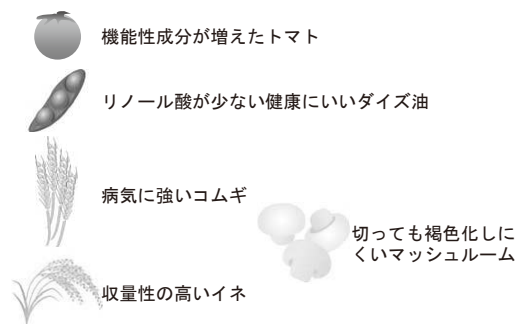


図9. ゲノム編集技術によって作出された新しい作物の例。ゲノム編集技術を活用し、様々な作物で新たな形質が付与された新しい育種素材あるいは品種が開発されている。

ヌルセグリガントを遺伝子組換えの規制の範疇で扱うべきなのか、あるいは外来遺伝子を含まないため規制の範疇では扱わないのか、という議論が各国で進められている。米国ではCRISPR/Cas9法で作出されたマッシュルームのヌルセグリガントを遺伝子組換えとしての規制から外すことが決定されたが¹⁶⁾、我が国をはじめ多くの国ではヌルセグリガントの扱いが定まっていない。ゲノム編集技術の適応が急速に展開されているた

め、ヌルセグリガントの規制に関して、十分な議論の上に成り立つルール作りが求められる。

近年、Cas9 遺伝子と sgRNA を発現する DNA 領域を作物のゲノムに導入するのではなく、精製した Cas9 タンパク質と人工合成した sgRNA の混合溶液を作成し、それをパーティクルガンで直接植物細胞に導入することで、外来 DNA をゲノムに組み込まずに標的配列を編集する手法がタバコ、レタス、イネ、トウモロコシ並びにコムギで適応可能であることが示された^{16) 17) 18)}。この手法によって得られた個体も原理的には外来 DNA は含まないため、組換え体の定義に該当するのか、そうでないのかのルール作りが求められる。

規制に関し、プロダクトベースとプロセスベースの2つの考えがある。前者は、最終的に開発されたプロダクトに主眼を置き、ヌルセグリガントが外来遺伝子を含まないなら、それは遺伝子組換え作物ではないという考え方である。一方、後者はその個体が開発された経緯に主眼を置き、たと

えヌルセグリガントが外来遺伝子を含まないことを証明できても、その作出過程で組換え技術を利用したら遺伝子組換え作物として定義づけるという考えである。前者の場合、どのようにして外来遺伝子を含まないと証明するのか、という課題が残っており、後者の場合、開発者が規制当局に正しい情報を提供しない限り、実際に組換え技術を利用したのかを判定するのは事実上不可能になる課題がある。そのため、開発者から規制当局に正確な情報を提供することを義務づけることも重要になる。また、食料は国を超えて移動するため、世界各国で共通したルール作りも求められる。

13. ゲノム編集技術は未来を救う技術になりえるか

近年、CRISPR/Cas9 法は爆発的な勢いで技術が高度化し、あらゆる生物に適応が進んでいる。ここで紹介した作物のみならず、筋肉量が増えた牛や体が大きくなった魚（マダイ）も開発され、

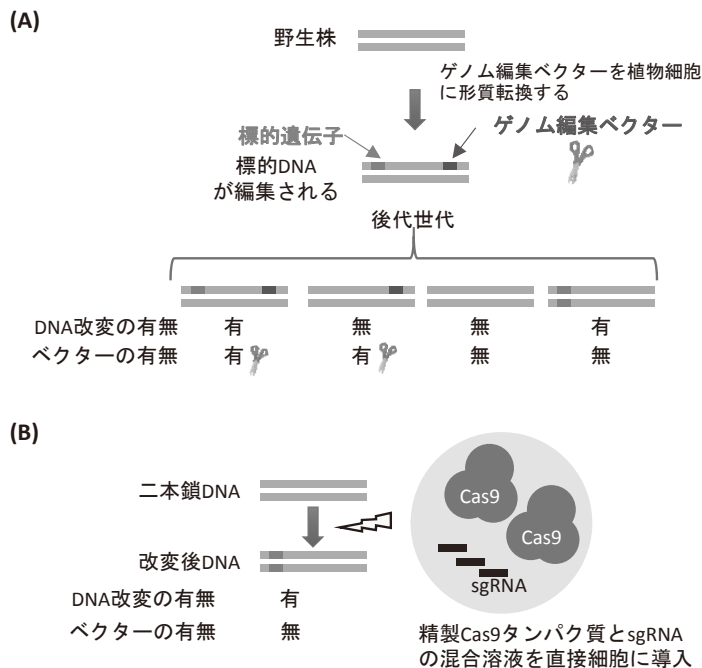


図 10. 外来遺伝子 (DNA) を含まないゲノム編集個体の作出方法

(A) 植物における一般的なゲノム編集技術の手法を図示した。まずゲノム編集ベクターを植物細胞に形質転換し標的遺伝子を改変させる。その個体を自殖すると、後代世代で DNA が改変されてベクターが分離して抜け落ちた個体（ヌルセグリガント、一番右の個体）が現れる。

(B) ゲノム編集ベクターを植物細胞に形質転換しない方法を図示した。精製した Cas9 タンパク質と sgRNA を混合させた溶液を直接植物細胞に導入することでゲノム編集を誘導することができる。この際、外来 DNA を組み込むことなしに目的の配列を改変できる。

さらに医療分野においても遺伝病の治療にこの技術が利用されつつあり、人類社会のあらゆる場面で貢献が期待される。一方、人間の生殖細胞へのゲノム編集も技術的には可能であることが証明されているものの、予期せぬ副作用や解決すべき倫理的な問題点もある。一方、ゲノム編集技術は農業を含むあらゆるライフサイエンスの分野において、人類が抱える課題を迅速に解決するためのツールになり得ることも事実である。特に、世界の食料安全保障の課題を達成するために、今後、如何に省労力で効率的に十分な農水産物を確保するかが重要な課題になるため、迅速な品種開発が可能なゲノム編集技術が不可欠な育種技術として活用される時代が到来するかもしれない。一方で、得られた生物の扱いに関する規制が未だ多くの国で定まっていないため、環境や人体への影響を評価するシステムを早急に構築する必要がある。さらに、ゲノム編集技術によって得られた作物が社会的に受容されるかは別の課題であるため、本技術の意義について社会的議論を深めて社会における認知度を向上させることも不可欠である。

<引用文献>

- 1) Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders RP, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi G, Goldberg S, Hoffmann N and Woo S (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 4803-4807.
- 2) Kyndt T, Quispe D, Zhai H, Jarret R, Ghislain M, Liu Q, Gheysen G and Kreuze JF (2015) The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**: 5844-5849.
- 3) ISAAA (2016) Global Status of Commercialized Biotech/ GM Crops: 2016. *ISAAA briefs* **52**.
- 4) Porteus MH and Carroll D (2005) Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **23**: 967-973.
- 5) Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ and Voytas DF (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**: 757-761.
- 6) Joung JK and Sander JD (2013) TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 49-55.
- 7) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**: 816-821.
- 8) Čermák T, Baltes NJ, Čegan R, Zhang Y and Voytas DF (2015) High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol.* **16**: 232.
- 9) Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z and Kondo A (2016) Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, **353**: 63: aaf8729.
- 10) Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, Terada R, Arazoe T, Ishii H, Teramura H, Yamamoto T, Komatsu H, Miura K, Ezura H, Nishida K, Ariizumi T and Kondo A (2017) Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* **35**: 441-443.
- 11) Zong Y, Wang Y, Li C, Zhang R, Chen K, Ran Y, Qiu JL, Wang D and Gao C (2017) Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* **35**: 438-440.
- 12) Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP and Yang B (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat. Biotechnol.* **30**: 390-392.
- 13) Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F, Mathis L, Voytas DF and Zhang F (2014) Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol. J.* **12**: 934-940.
- 14) Clasen BM, Stoddard TJ, Luo S, Demorest ZL, Li J, Cedrone F, Tibebu R, Davison S, Ray EE, Daulhac A, Coffman A, Yabandith A, Retterath A, Haun W, Baltes NJ, Mathis L, Voytas DF and Zhang F (2016) Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol. J.* **14**: 169-176.
- 15) Nonaka S, Arai C, Takayama M, Matsukura C and Ezura H (2017) Efficient increase of γ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Sci. Rep.* **7**: 7057.
- 16) Waltz E (2016) Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, **532**, 293.
- 17) Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S and Kim JS (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein. *Nat. Biotechnol.* **33**: 1162-1164.
- 18) Svitashv S, Schwartz C, Lenderts B, Young JK and Cigan MA (2016) Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* **2016** **16**: 13274.
- 19) Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y and Gao C (2017) Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* **18**: 14261.