

植物ゲノム編集とオフターゲットの関連性

文献情報

論文名： **Plant Genome Editing and the Relevance of Off-Target Changes**
著者： Nathaniel Graham, Gunvant B. Patil, David M. Bubeck, Raymond C. Dobert, Kevin C. Glenn, Annie T. Gutsche, Sandeep Kumar, John A. Lindbo, Luis Maas, Gregory D. May, Miguel E. Vega-Sanchez, Robert M. Stupar, Peter L. Morrell
ジャーナル： Plant Physiology, Volume 183, Issue 4, August 2020, Pages 1453–1471,
<https://doi.org/10.1104/pp.19.01194>

はじめに

ゲノム編集に用いられる部位特異的ヌクレアーゼ (SDN) は、正確な遺伝子改変を導入するための強力な新ツールである。交配育種や突然変異育種などの従来の育種と同様に、作物の収穫量等を改善することを目的としている。しかし、ゲノム編集に伴い、目的とする塩基配列と類似している部位で発生する、意図しない変異導入を「オフターゲット」といい、懸念されている。本論文は、一般的に生じる作物集団における一塩基多型や自然発生的な突然変異、さらに化学処理や放射線等による人為的変異誘導を比較し、ゲノム編集によるオフターゲット発生率を比較し、さらに、オフターゲットの軽減や育種過程における選抜により、ゲノム編集作物などの安全性が確保されていることを紹介している。

植物の遺伝的多様性

分子生物学的な解析が行われる前は、作物育種は形質による選抜を行ってきた。塩基解読技術が劇的に進歩したことから、単一塩基の変異からゲノム構造の変化やゲノムの重複などの遺伝的多様性に関して、これまでになく理解が得られている。変異には、一塩基変異 (SNV)、一塩基多型 (SNP)、塩基の挿入や欠失による変化 (インデル)、トランスポゾン (TE) の変動、大きな塩基配列の存在-不在変動 (PAV)、遺伝子のコピー数の変動 (CNV) などがある。イネの水没耐性、ヒマワリ油の高オレイン酸含量、ダイズのシスト線虫抵抗性や種皮色素形成など、PAV や CNV が農学的形質に影響を与えている例は数多くある。

自然突然変異は、主に DNA 複製プロセス (NHEJ および HR) のエラーから生じる。シロイヌナズナの変異蓄積株の全ゲノム配列解析では、有性世代ごとに 7×10^9 個の塩基置換が行われるという変異率が推定されており、単子葉植物の系統的分岐から、1年間

にゲノムあたり 5.9×10^9 個の塩基置換が発生する突然変異速度の推定値と一致している。SNP だけでなく、1~3 bp のインデル変異はゲノムあたり 4.0×10^{10} 個/世代で発生し、3 bp 以上の欠失は 0.5×10^9 個/世代の割合で発生している。イネにおける同様の研究でも、突然変異率は2倍体ゲノムあたり 5.4×10^9 と推定されている。このように、自然状態であっても、遺伝子は常に変異していることが報告されている。

植物における変異誘導

化学物質や放射線などによって変異を誘導することができ、自然突然変異に比べ高い発生率とされている。この変異はゲノム全体で発生し、望ましくない表現型を起こさない変異体の誘導は困難である。これまで、人為的な突然変異により 3,200 以上の品種が 210 の植物種で育成され、70 カ国以上で商業利用されている。組織培養によっても変異が効率的に導入できる。シロイヌナズナの根から再生した植物では、平均して約 30 個の新しい配列が確認され、その変異率は 4×10^{-7} ~ 24×10^{-7} であった。組織培養によって再生したイネの変異率が 1.86×10^{-7} と報告された。これらの値は、種子から育った植物で生じる変異率に比べ2桁近く高かった。体細胞変異も有力な植物の変異誘導手法であり、この方法で得られた変異体から、55 種の植物（園芸作物、穀物、豆類、薬用植物、芳香植物など）で、200 種近くの商業品種が得られている。

変異誘導のためのゲノム編集技術

近年、急速に開発が進んでいるゲノム編集技術は、目的の塩基配列に絞って正確な変異を導入する技術である。SDN は DNA の二本鎖切断（DSB）を誘導して、修復エラーによる標的遺伝子の改変を可能にする。ゲノム編集の部位特異性を高めるために、オフターゲットの可能性が高い類似配列を特定し回避することも行われている。オフターゲットを評価するために、ハイスループットの全ゲノム再解読（WGRS）により、イネ、ワタ、およびトウモロコシでゲノム編集された個体を調べた研究では、観察された変異のほぼすべてが組織培養または自然変動に起因し、ゲノム編集に起因しないことが報告されている（表 5）。トウモロコシにおいて、ゲノム編集ツールをアグロバクテリウム法やボンバードメント法等の異なった手法でゲノム編集ツールを植物に導入しても、ガイド RNA の設計が適切なら、オフターゲットは検出不可能であったと報告されている。

変異のタイプ	育種法				
	交配	自殖	突然変異誘導	組織培養	ゲノム編集
一塩基変異	2×10^6	23	43	114	0
塩基の欠損・挿入	$>5 \times 10^3$	18	48	36	1
導入された全変異数	$>2 \times 10^6$	41	91	150	1

* 原著論文の Table 5 を翻訳して転載。原著論文に合わせ表 5 とした。

結論

植物におけるゲノム編集に伴うオフターゲットの可能性とその影響については、作物の自然発生的な変異と、植物育種の過程で誘発・導入された変異との関連で考える必要がある。実際のところ、作物の分野におけるゲノム編集に伴うオフターゲット編集は、従来の品種改良や突然変異育種など現在の作物改良方法で生じる変異に比べて頻度は低く（表 1）、ゲノム編集によって開発された品種は、他の遺伝的変異原を用いて開発された改良品種と同様のスクリーニングと選抜が行われる。

その上で、現在のゲノム編集技術は、他の育種法や分子生物学的アプローチでは実現が困難であった望ましい変異や植物の新品種の効率的な創出を可能にしている。