

大規模な全ゲノムシーケンス解析によりイネでは Cas9 と Cpf1 (Cas12a) の両方のヌクレアーゼによる極めてターゲット特異的なゲノム編集が行われていることが明らかになった

### 文献情報

論文名： **A large-scale whole-genome sequencing analysis reveals highly specific genome editing by both Cas9 and Cpf1 (Cas12a) nucleases in rice**

著者： Xu Tang, Guanqing Liu, Jianping Zhou, Qiurong Ren, Qi You, Li Tian, Xuhui Xin, Zhaohui Zhong, Binglin Liu, Xuelian Zheng, Dengwei Zhang, Aimee Malzahn, Zhiyun Gong, Yiping Qi, Tao Zhang and Yong Zhang

ジャーナル： Genome Biology (2018) 19:84,  
<https://doi.org/10.1186/s13059-018-1458-5>

### 背景

ゲノム編集システムを機能的ゲノミクス、精密医療、植物育種に応用する上で、オフターゲットに対する懸念がひとつの障壁となっていた。植物では、全ゲノム配列解析 (WGS) を用いた Cas9 のオフターゲットを検証した研究は限られている。また、確認された多くの変異の原因について論争の的となっている。このような状況において、Cas9 編集マウスを用いた WGS 研究では対照的な結果が報告されており、ある研究ではオフターゲット変異はほとんど見られないとされながら、一方で、多くの変異が見られたとの報告もある。そこでゲノム編集された動物や植物において WGS を用いたオフターゲット変異の包括的で厳密な解析が急務となった。

### 結果及び考察

イネを用いて、Cas9 による 34 個体のゲノム編集個体と、Cpf1 による 15 個体の編集個体、および対照区として、組織培養のみ由来、アグロバクテリウムを感染させた組織由来、シングルガイド RNA (sgRNA) を含まない Cas9 をアグロバクテリウムで感染した組織由来、CRISPR RNA (crRNA) を含まない Cpf1 をアグロバクテリウムで形質転換した組織由来などの 20 種類の多様な対照植物を WGS 解析した。

組織培養は、体細胞やクローンの変異を引き起こす変異原性があることが知られている。組織培養のみのサンプルでは、平均 114 個の一塩基変異 (SNV) と 36 個の挿入/欠失 (インデル) が含まれており、その結果、バックグラウンドの突然変異率は  $1.86 \times 10^{-7}$  で、これまでにイネで発表された頻度 ( $1.7\text{-}3.3 \times 10^{-7}$ ) とほぼ同じである。さらに、

アグロバクテリウムを感染させた植物や Cas9/Cpf1 バックボーンを導入した植物からも同様の数の SNV が観察されているが、単なる組織培養のみのサンプルと比較して、15～41 個ほど多くのインデルを生成した。このことから、アグロバクテリウムの感染は、インデルを優先的に導入する変異原性があると考えられた。ゲノム編集された植物のほとんどの変異は組織培養の過程で生じており、1 株あたり約 102～148 個の SNV と約 32～83 個のインデルが生じていることが明らかになった。

WGS で評価した 12 種類の Cas9 sgRNA と 3 種類の Cpf1 crRNA のうち、コンピュータプログラムで予測された部位に T0 株で確かなオフターゲット変異が生じたのは、Cas9 sgRNA の 1 種類のみであった。ここで重要なことは、このオフターゲット部位は、CRISPOR や Cas-OFFinder などのソフトウェアで正確に予測された部位であったことである。

T0 植物の解析では、ほぼオフターゲット変異が検出されなかったことから、ガイド RNA の特異性によるものと考えられたが、Cas9 や Cpf1 の発現量や活性が低いことが原因である可能性もある。この場合、次世代までゲノム編集遺伝子（ガイド RNA とヌクレアーゼ遺伝子）を発現させ続けると、新たなオフターゲット変異が発生する可能性があり、その点を確認することも重要である。ゲノム編集遺伝子を有する T1 世代においてオフターゲットを検討したところ、T0 世代で確認された SNV やインデルが固定される傾向にあり、変異についてはゲノム編集してない野生株で見られる自然発生的な変異と一致していた。この結果は、ガイド RNA の特異性が十分に設計されていれば、活性が異なるゲノム編集遺伝子が植物に存在し続けても、オフターゲット変異は起こらないことを示唆しており、数世代にわたってゲノム編集遺伝子が発現させる必要があるような育種において、Cas9 や Cpf1 の使用を促すものである。

## 結論

複数のゲノム編集イネ等の WGS データを包括的かつ厳密に解析した結果、Cas9 と Cpf1 の両ヌクレアーゼは、標的とする DNA 配列に変異を導入する際に非常に特異的であり、高い特異性を持つガイド RNA を設計することでオフターゲットを回避できることが示唆された。

これらの知見は、植物研究者や規制当局、消費者にとって重要な参考資料になると考えられるとともに、「ゲノム編集技術そのものではなく、ゲノム編集された製品を規制せよ」という報告を支持するものである。