

トウモロコシの標的変異誘発における CRISPR/Cas9 と Cas12a の活性と特異性

文献情報

論文名： **Activities and specificities of CRISPR/Cas9 and Cas12a nucleases for targeted mutagenesis in maize**

著者： Keunsub Lee, Yingxiao Zhang, Benjamin P. Kleinstiver, Jimmy A. Guo, Martin J. Aryee, Jonah Miller, Aimee Malzahn, Scott Zarecor, Carolyn J. Lawrence-Dill, J. Keith Joung, Yiping Qi, Kan Wang

ジャーナル： *Plant Biotechnology Journal* (2019) 17, pp. 362–372

doi: 10.1111/pbi.12982

概要

CRISPR/Cas9 および Cas12a (Cpf1) ヌクレアーゼは、植物における最も強力なゲノム編集ツールの一つである。本研究では、トウモロコシの *glossy2* 遺伝子領域を標的として、両ヌクレアーゼが認識する配列が重複するように設計したガイド RNA を用いて、両者の活性とオフターゲットの発生について比較した。

結果及び考察

幼葉のクチクラ外ワックス形成に関わる *glossy2* 遺伝子に、zCas9-guide RNA (gRNA) と LbCas12a-CRISPR RNA (crRNA) の標的部位としてそれぞれ 2 ヶ所の標的部位を設定し、合計 4 種類のコンストラクト (zCas9+gRNA1、zCas9+gRNA2、LbCas12a+crRNA1、LbCas12a+crRNA2) を作成した。アグロバクテリウム法によりトウモロコシ近交系 B104 の胚に導入した。標的部位への変異解析の結果、zCas9 で編集された T₀ 植物の 90%~100% が挿入または欠失 (インデル) 変異を持ち、そのうち 63%~77% がホモ接合または両アレルの変異体であった。一方、LbCas12a+crRNA1 で編集した T₀ 植物で 60% の効率で変異体を獲得したが、LbCas12a+crRNA2 では変異体が得られなかった。crRNA2 は、CINDEL スコアと CRISPR-DT スコアのいずれも低かったことから、変異効率が低いことが予想された。さらに、crRNA2 の立体構造が安定性していると推定され、この安定性が効率を下げていると考えられた。

オフターゲット変異については、Cas-OFFinder webtool と Circularization for *in vitro* Reporting of Cleavage Effects by sequencing (CIRCLE-seq) を用いて予測した。次いで、

CIRCLE-seq による *in vitro* 解析により、zCas9+gRNA1 で 18、zCas9+gRNA2 で 67 の潜在的オフターゲットが同定された。Tracking of Indels by DEcomposition (TIDE) を使用して、CIRCLE-seq によって同定された潜在的なオフターゲット変異が実際に起こっているかを、T₁ トウモロコシ個体を用いておいて確認した。ただし、CIRCLE-seq で示されたオフターゲット候補のうち、ゲノムの反復領域内に存在するため評価できないものもあったため、zCas9+gRNA1 の潜在的オフターゲットの 18 のうち 15、zCas9+gRNA2 では 67 のうち 18 を解析した。さらに、Cas-OFFinder で同定されたオフターゲット候補配列について、それぞれ 2 ヶ所の配列を追加して解析した。

その結果、ベクター配列を有する系統及びベクター配列を有しない系統のいずれにおいても検出可能なレベルの indel 変異はなく、これらの潜在的オフターゲット部位に生殖細胞系列伝達性の変異がないことが示唆された。

結論

Cas9 及び Cas12a のヌクレアーゼにより、*glossy2* 遺伝子の 2 つの部位に標的インデル変異を導入し、1 世代以内に *glossy2* 変異体の表現型を生成することができたことから、ゲノム編集システムの有用性が示唆された。本研究で用いた CRISPR/Cas9 システムは、高効率かつ特異的に変異導入できることが示された。一方、crRNA2 の二次構造の安定性が編集効率に影響を与えることから、CRISPR/Cas12a の編集効率を高めるために、ターゲット領域の潜在的に安定した二次構造を回避することなど、さらなる最適化が必要であることが示唆された。