

文献紹介

2023年5月
バイオテック情報普及会

作物改良と将来の農業のためのゲノム工学

文献情報

論文名： **Genome engineering for crop improvement and future agriculture**

著者： Caixia Gao

ジャーナル： *Cell VOLUME 184, ISSUE 6, P1621-1635, MARCH 18, 2021*

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.005>

概要

増え続ける人口を養うことは、気候条件が急速に変化する中で大きな課題となっている。ゲノム編集は、植物育種に革命をもたらし、世界の食料供給の確保に貢献する可能性がある。本論文では、植物におけるゲノム編集ツールの開発と応用について概説し、新たに開発された技術に焦点を当て、ゲノム編集に基づく新しい植物育種戦略について説明する。

作物育種の背景

遺伝的変異は農業改良の基礎となるものであり、植物育種は遺伝的変異を作り出し、利用することである。植物育種において、交雑育種、突然変異育種、遺伝子組換え及びゲノム編集による育種の4種類が主要な技術として用いられてきた。従来は植物育種（交配育種）は、望ましい形質を組み合わせるために交配するもので、コムギやイネに半矮性を導入することにより、高収量品種を育成するなど重要な役割を果たしてきた（緑の革命）。突然変異育種では、ゲノム全体にランダムな変異を誘発し、遺伝的変異を大きく拡大してきた。しかし、大規模な変異集団から、希望する形質を保有する稀な個体を特定することは、労力と時間がかかる。植物育種における重要なブレークスルーは遺伝子組換え技術であり、これにより収量の増加、農薬の使用量の減少、栄養状態の改善が可能になったが、政府の厳しい規制や安全性に対する世論により、これまでに利用された遺伝子組換え作物はわずかである。ゲノム編集技術は、希望する形質を得るために植物に正確かつ予測可能なゲノム改変を導入することが可能な最先端のシステムの一つとして登場した。

植物ゲノム編集の一般的な手順

植物のゲノム編集は、一般的に以下の6つのステップになる：(1) 標的配列に応じて適切なヌクレアーゼを選択し、(2) ゲノム編集ベクターを構築し、(3) プロトプラストを用いてベクターの活性を検証し、(4) ゲノム編集ツールを植物細胞に導入し、(5) 組織培養によりゲノム編集細胞を植物体に再生し、(6) 得られたゲノム編集植物のスクリーニングと遺

伝子型決定を行う。ゲノム編集ツールの細胞への導入や個体再生には植物に特有の側面がある。ゲノム編集ベクター (DNA) を従来法 (アグロバクテリウム法) で植物細胞へ導入する場合、遺伝子組換え植物を選択し、遺伝子組換え・ゲノム編集変異体が生成されると、自殖または交配によってゲノム編集変異体から、ゲノム編集ベクター (DNA) を除くことが必要になる。一過性 DNA 発現法やリボ核タンパク質 (RNP) を導入して外来遺伝子が導入されなければ、遺伝分離の工程を必要としないゲノム編集個体が得られる。

植物におけるゲノム編集で作出する遺伝子改変について

二本鎖切断 (DSB) を介したゲノム編集: ZFN と TALEN に加えて、CRISPR-Cas システムの導入は、植物ゲノム編集の発展を加速させた。現在まで、ゲノム編集は (1) 小さなランダム挿入/欠失 (インデル)、(2) 点突然変異またはヌクレオチド置換、(3) DNA 断片挿入、(4) DNA 断片欠失、(5) 標的染色体再配列などを含む多様で遺伝的なゲノム修飾を植物に生成するために使用されている。CRISPR-Cas システムと、ベースエディターおよびプライムエディターなどの新しく開発されたツールは、その潜在的な適用範囲を大きく拡大した。

ベースエディター: CRISPR-Cas 由来のベースエディターは、シトシンベースエディター (CBE) とアデニンベースエディター (ABE) の 2 つがある。現在のベースエディターは、塩基転移 (C・G から T・A、A・T から G・C) に限定されており、DNA 塩基転移やあらかじめ定義された DNA の挿入・欠失は作製できない。しかし、プライム編集により、12 種類すべての塩基置換と小さな DNA の挿入・欠失を作り出すことができるようになった。

プライム編集: プライム編集は、Cas9 ニッカーゼ (H840A) + 逆転写酵素 (RT) の融合タンパク質とプライム編集ガイド RNA (pegRNA) で構成される。Cas9 ニッカーゼ (H840A) は標的部位を認識し、非標的 DNA 鎖に切れ目を入れて一本鎖 DNA を放出し、プライマー結合部位と対になって RT 用プライマーとして機能する。逆転写により、pegRNA にコードされた変異が非標的 DNA 鎖に転写される。プライム編集は植物細胞での使用に急速に適応され、プライム編集されたイネやトウモロコシの再生に成功しているが、植物ゲノムのほとんどの標的部位においてプライム編集効率は、現在ベースエディターよりはるかに低い。

植物における相同組換え (HDR) を介した DNA 挿入頻度は低いいため、ドナー DNA の末端に短い相同染色体セグメントを追加して、DSB 周辺配列と適合する末端またはマイクロホモロジーを生成する方法も示されている。また、ターゲット DNA の欠失は、プログラム可能な配列特異的ヌクレアーゼ (SSN) を使用して 2 つの別々の DSB を誘導することで得られ、さらに正確な DNA 欠失は、新しく開発された APOBEC-Cas9 融合誘導欠失システム (AFID) によって生成できる。さらに、一対の DSB が同じ染色体に同時に導入されると、2 つの切断の間に欠失や逆位が生じ得ることが示されており、DSB を誘導することで、遺伝的連鎖の切断や固定に有用な標的化された染色体再配列も達成できる。

ゲノム編集を含む次世代植物育種

予想可能な指向性をもった変異誘発により、作物への希望する形質の導入が容易になり、大規模な交配や後代の遺伝型の差異を確認する必要性が大幅に減少する。それとともに、ゲノム編集の植物育種への大きな貢献は、有用な形質の発現を抑制している有害な遺伝子の除去を可能にした点にある。例えば、植物の菌類いもち病抵抗性のネガティブレギュレーターである **OsERF922** のノックアウトにより「いもち病抵抗性イネ」の開発につながった。同様に、オオムギで発見された **MILDEW RESISTANCE LOCUS (MLO)** を不活化することにより、うどんこ病抵抗性を付与できる。**MLO** はオオムギだけでなく他の作物にも共通した遺伝子であり、**MLO** を不活化することで、コムギ、トマト、ブドウなど種を超えて耐病性の改変が可能である。

望ましい遺伝子座と望ましくない遺伝子座が連鎖して遺伝するリンケージドラッグは育種において問題になる。ゲノム編集は不要な遺伝子を直接編集または削除することを可能にし、さらに、前述したとおり **DSB** により相互の染色体転座や染色体内逆位ができれば、リンケージドラッグの解消も可能となる。

ゲノム編集の大きな利点は複数の標的部位を同時に編集できることである。パンコムギやジャガイモなどの農業上重要な多くの作物は高次倍数性であり、同一の機能遺伝子を複数有するが、これらの同時改変が行われている。また、量的形質は表現型への寄与が低いものの複数の遺伝子が影響しながら表現型を決めている。今後、**QTL** マッピングや **GWAS** により、**QTL** に関連する **SNP** や構造変化 (**SV**) が明らかになれば、それらの複数の遺伝子座もゲノム編集により同時に改変可能になると思われる。

多くの作物は、栽培化の過程で高収量性等を獲得した反面、遺伝的多様性が小さくなり、ストレス耐性などの形質を失うなどの問題もある。そこでトマト野生種 (***Solanum pimpinellifolium***) を、ストレス耐性を保持したまま栽培化のための遺伝子の多重編集を行い、実験的に栽培作物化に成功した。

また、育種過程において遺伝的な固定は重要なプロセスになるが、通常は複数回の戻し交雑や自殖を繰り返す必要がある。ゲノム編集により雄性配偶子特異的な遺伝子を破壊することで、イネやトウモロコシ、コムギで卵細胞由来の特徴な表現型をもつ個体が得られている。また、アポミクシスによって無性的に種子が増殖される植物種が数多く確認されているが、アポミクシスを起こさない植物種に対して、減数分裂に関連する遺伝子 (**REC8** など) を破壊することで、イネでアポミクシスが誘導された。

課題と今後の展望

植物ゲノム編集の技術進歩にもかかわらず、希望する全ての改変 (標的塩基置換、遺伝子挿入・欠失、遺伝子置換) を発生させることはまだ不可能である。また、作物の形質改良における正確なゲノム編集技術の確立が急務である。また、ゲノム編集におけるオフターゲットの発生は大きな懸念事項の 1 つである。全ゲノム塩基配列解析により、イネやワタでは

頻度は少ないものの sgRNA 配列に依存するオフターゲットが生じることが示唆されている。植物ゲノム編集において、ゲノム編集ツールを分裂組織、葉、種子のような特定の組織に直接適用することが理想的である。現在のデリバリー方法には、パーティクルボンバードメントやアグロバクテリウム法があるが、編集された植物を得るために、その後の組織培養と植物再生が必要となる。しかしながら、この再生ステップはほとんどの作物において極めて困難であるため、シュート頂端分裂組織に送り込むことができれば、組織培養が不要のゲノム編集が実現する可能性がある。

今後、合成生物学は、新しい農学的形質の開発を加速させるために用いられる新しい戦略である。例えば、Rubisco を再設計することで植物の光合成効率とバイオマスを向上させることができると考えられているように、CRISPR-Cas システムは、植物設計と合成生物学を改善するための大きな可能性を秘めている。また、植物とマイクロバイオームの有益な相互作用は、植物の成長を改善したり、病原体を制御できる。将来的には、マイクロバイオームを改変する新しいアプローチにより、作物の成長促進や病害虫に対する抵抗性が改善されるかもしれない。

ゲノム編集植物の規制と社会的受容は、新しい育種技術とその派生作物や製品の開発にとって極めて重要であり、外来遺伝子を含まないゲノム編集生物のために、合理的かつ容易に行えるものでなければならない。

結論

ゲノム編集による効率的で正確な標的変異誘発は、農業の未来に革命をもたらす多くの次世代育種戦略の基礎を築いた。植物のゲノム編集の可能性を最大限に引き出すには、あらゆるアプローチを検討する必要がある。このような学際的なアプローチにより、植物育種は、刻々と変化する気候条件のもとで急増する世界人口の食糧需要を満たすために、第二の緑の革命を実現するための一助となると思われる。