

植物における CRISPR/Cas の新規応用：プライムエディターから染色体工学へ

文献情報

論文名： **Novel CRISPR/Cas applications in plants: from prime editing to chromosome engineering**

著者： Teng-Kuei Huang and Holger Puchta

ジャーナル： Transgenic Res (2021) 30:529–549

<https://doi.org/10.1007/s11248-021-00238-x>

概要

CRISPR/Cas を介したゲノム編集ツールについて、PAM の制限やオフサイド効果、温度感受性を最小化するなど、新たな CRISPR/Casヌクレアーゼの開発が進んでいる。CRISPR/Cas を用いた植物へ応用できる技術として、相同組換えによる遺伝子ターゲティングや塩基編集、プライム編集などがあり、新しい応用例として、逆位や転座といった染色体の再配列が報告されている。さらに、組織培養を必要としないゲノム編集戦略も開発されており、多くの作物のゲノム編集において形質転換が必要とされるボトルネックを克服するのに役立つと思われる。

ゲノム編集のための人工的な CRISPR/Cas の開発

植物育種家が新品種を作出するために、放射線や化学物質等により人為的に突然変異を誘発してきた。これらは、ランダムに複数のゲノム DNA の二本鎖切断 (DSB) を誘発する。一方、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) や転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、さらに CRISPR/Cas システムが開発され、ゲノム内の目的とする位置で切断できるようになった。

植物で最も広く利用されている CRISPR/Cas は、タイプ II 系の SpCas9 と SaCas9、タイプ V 系の LbCas12a (LbCpf1 と呼ばれる) の 3 種類である。LbCas12a の PAM は、TTTV で AT リッチなゲノム領域を標的とし、切断後の一本鎖末端が突出しているため、Cas9 よりも大きな欠失を引き起こすことが多い。Cas タンパク質の HNH ドメインと RuvC ドメインの両方に不活性化変異を導入することで、ヌクレアーゼ活性を持たないが DNA 結合活性を持つタンパク質 dCas9 を得ることができる。一方、ヌクレアーゼドメインの 1 つだけを不活性化すると、ニッカーゼ活性を持つタンパク質 nCas9 となる。

また、2 つの改変された SpCas9ヌクレアーゼ (SpCas9-NG および xCas9) は、ヒト細胞において NG PAM に標的化することが実証された。両酵素の適用により、植物ゲノ

ムの潜在的な標的部位の数が劇的に増加した。このほかにも、編集効率に影響を及ぼすとされる要因は数多くある。重要な例として温度感受性が挙げられる。また、D156R の点変異を持つ LbCas12a (ttLbCas12a) は、植物において野生型酵素と比較して著しく高い編集効率を示した。

ベースエディット (BE) 技術の進歩

BE は、CRISPR/Cas DNA 結合モジュールとヌクレオチド塩基編集酵素の組み合わせに基づいており、単一または少数の希望する塩基交換を実現する。塩基編集酵素には、C から T に変換するシトシン塩基編集酵素 (CBE) と A から G に変換するアデニン塩基編集酵素 (ABE) があり、それぞれシトシンまたはアデノシンデアミナーゼを使用する。

新たな展開として、効率的に C→G へ塩基転換する新種の BE が注目されている。これは、C を脱アミノ化した後に生じた U が宿主因子によってゲノム DNA から排除され、abasic 部位 (塩基が欠如した部位) が残るという現象があり、DNA の複製過程で、この abasic 部位の反対側に C を鋳型のない重合で取り込むと、この C が鋳型となり G が付加される。これまでワタとイネの研究において、C から G への塩基転換の発生が報告されている。

ジーンターゲット (GT) の改良

精密なゲノム編集の最も古い形態は内因性 HR 修復機構を用いた GT である。GT の効率が極めて低いため植物における実用的な応用が数十年にもわたり妨げられていた。部位特異的 DSB が GT の頻度を桁違いに高めることが実証され、この問題の解決策が見えてきた。

効率向上に成功した 2 つの例として卵細胞への直接的な DSB 誘導がある。1 つは、卵細胞プロモーターで駆動された SaCas9、sgRNA 発現カセット、GT ドナーを含むオールインワン構築物を *Arabidopsis* に形質転換して T₂ 子孫を解析した結果、最大 5% の GT 効率を持つ個々の系統が得られた。別のアプローチは、SaCas9 のみを高発現する形質転換個体に、sgRNA カセットを形質転換することにより、GT 効率が 5-10% となった。効率の向上には、Cas の高発現と Cas の種類が重要と思われ、いくつかの研究で、LbCas12 の効率が SpCas9 を上回ることが示された。

プライムエディティング (PE) : 批判的評価

PE は、PE ガイド RNA (pegRNA) と逆転写酵素と融合した Cas9 ニッカーゼ (H840 A) からなる新規の CRISPR/Cas9 複合体に依存する。この革新的で新しいゲノム編集技術である PE が初めて導入されたとき期待が高まった。

多くの研究により、PE は植物プロトプラストだけでなく安定した系統でもゲノム改変を達成できることが実証されたが、効率は低いものであった。これらの研究は、主にイネで行われたが、トマト、ジャガイモ、トウモロコシでも行われた。その編集効率は、逆転写酵素の性質、熱条件、テンプレートの長さ、PBS の長さ、第 2 のニックの必要性など、いくつ

かの異なる要因が影響した。また植物における PE の主な欠点は、遺伝子座によって効率が大きく異なることと、副産物として不要な Indel が生成されることである。

PE はいくつかの植物種で効果が実証されているものの、BE や GT に取って代わるかといえば、現時点ではあまりにも非効率的でそうとは考えられない。しかし、将来的に特別な利用において有望なツールになる可能性を秘めている。

染色体工学

育種の中心的な目的は、作物種の遺伝子プールから農学的に最良の形質を組み合わせ、エリート品種から有害な形質を排除することである。これは目的とする遺伝子が、有害な特性を示す遺伝子と近接していなければ可能であるが、一般的に分離が不可能なケースが多い。その遺伝子間の連鎖を断ち切る技術として、トランスロケーション、クロスオーバー (CO)、転位などがある。

染色体間の遺伝的交換を実現する最も直接的な方法は、それぞれの領域における相同遺伝子間のクロスオーバー (CO) の誘発である。原理的には CRISPR/Cas を用いることで実現可能なはずであり、標的 DSB が相同染色体を鋳型として相同組換えを誘導できることが実証されている。また、2 つの DSB を同時に誘導すると、その領域が欠失するだけでなく、低い効率であるが反転することが証明されている。さらに、非同相染色体上に 2 か所の DSB を同時に起こすと相互転座を誘導することができる。これまで不可能であった相互転座は、遺伝的連鎖を断ち切る新しい方法である。

細胞培養不要のゲノム編集

植物におけるゲノム編集の限界を設けている一つの要因は、形質転換プロセスである。多くの作物では、体細胞から植物を再生させるために組織培養が必要である。この工程は時間がかかり、多くの植物にとって大きなボトルネックとなっており、培養変異やエピジェネティックな変異を引き起こす可能性もある。最近、組織培養を用いない 2 つのアプローチが開発された。一つは、ゲノム編集ツールとともに、Wus2、STM、ipt の 3 つの成長制御因子を過剰に発現させることにより新たな生長点を誘導するものであり、もう一つは、Cas を恒常的に発現している植物に、FT の mRNA と、これに融合した移動性 sgRNA レプリコンを全身感染させることで、ゲノム編集を実行し開花を促すことで、ゲノム編集された次世代を獲得するものである。

結論

CRISPR/Cas を介したゲノム編集ツールの開発には大きな進展があり、様々な天然および人工のヌクレアーゼが確立されたことで、植物ゲノム上のほぼすべての配列を高い効率で、1 塩基対から Mbps までのゲノム変化を引き起こすことができるようになった。