

## BREEDIT：トウモロコシの複雑な量的形質を改良するための多重ゲノム編集戦略

### 文献情報

論文名：BREEDIT: a multiplex genome editing strategy to improve complex quantitative traits in maize

著者：Christian Damian Lorenzo, Kevin Debray, Denia Herwegh, Ward Develtere *et al.*

ジャーナル：Plant Cell 2023, 35, 218-238. 訂正: Plant Cell 2023, 35, 1160

<https://doi.org/10.1093/plcell/koac243>

### 概要

気候変動に適応しながら、増え続ける世界人口の食糧安全保障を確保することは、21世紀の農業の主要課題である。この問題に取り組むために、これまでも新しい技術が応用されてきたが、従来の育種による作物の改良は頭打ちになりつつある。最近のCRISPR/Cas9を介した遺伝子工学の進歩は、食糧増産という需要の増加に対応するため、植物育種を加速させる道を開いた。しかし、多くの形質は複雑な相互作用ネットワークの中で働く複数の影響の小さい遺伝子によって支配されている。本報告では、遺伝子ファミリー全体の多重ゲノム編集と交配スキームを組み合わせ、収量や耐乾燥性などの複雑な形質を改良する遺伝子の探索パイプラインである「BREEDIT」を紹介する。これは、育種 (breeding) と遺伝子編集 (gene editing) を組み合わせた造語である。トウモロコシ (*Zea mays*) をモデルに、成長に関連する48個の遺伝子をCRISPR/Cas9を用いてノックアウトしたシステムを作出し、1,000を超えるゲノム編集植物のコレクションを作成した。編集された個体群は、対照区と比較して、葉の長さが (平均して) 5%~10%増加し、葉の幅が最大20%増加した。各遺伝子ファミリーの多重ゲノム編集は、量的形質の向上に関連づけられる成果を示す可能性がある。さらに、BREEDITは育種プログラムにとって有望な遺伝子改変を決定するための多様な変異体コレクションを迅速に作製できる。

### 方法

最初にCas9を発現しているシステム (EDITORシステムと呼ぶ) を作出する。次いで対象種における成長関連遺伝子 (GRG) 候補48種を、文献や社内の知見、他のモデル生物であるシロイヌナズナやイネの情報に基づいて決定した。特に、不活性化により成長にプラスの効果をもたらす可能性が高い負の成長調節因子は適切な候補遺伝子となる。次に、これらのGRGを標的とするガイドRNA (gRNA) を設計し、多重遺伝子編集ベクター (SCRIPTと呼ぶ) にクローニングした。12個のgRNAを含むベクターがEDITORシステムに形質転換され、Cas9と12個のgRNAを含むSCRIPTの両方を保有する形質転換システムを得た。

## 結果

BREEDITパイプラインは、HiPlexアンプリコンシーケンスとスタックマッピングアンカーポイント (SMAP) ハプロタイプ・ウィンドウバイオインフォマティクスワークフローを組み合わせ、gRNA切断部位の遺伝子編集を連続的にモニタリングする。高深度でのアンプリコン配列決定により、ハプロタイプ配列とそれぞれの頻度を決定できる。この2種類の情報は、コードされたタンパク質の機能または活性に対する変異の影響を評価し、特定の遺伝子座を遺伝子型に割り当てるために使用できる。

トウモロコシ近交系B104の遺伝的背景を持つ系統に、Cas9タンパク質を構成的に発現する3つの独立したホモ接合体 (EDITOR1~3とする) を作成し、EDITOR1と3に、SCRIPT1を形質転換して標的とする遺伝子座のゲノム編集を実行した。さらにEDITOR1に残りの3つのSCRIPTベクターを導入して、形質転換した。SCRIPT1と同様に、HiPlexアンプリコンシーケンシングを用いて、T<sub>0</sub>植物とそれに続くすべての世代におけるゲノム編集をモニタリングした。それぞれのSCRIPTを導入したゲノム編集植物を作製した後、各SCRIPTのT<sub>0</sub>自殖に由来するT<sub>1</sub>トウモロコシ実生の第3葉が完全に展開した時期 (V3) ステージで表現型解析することにより、植物成長に対するゲノム編集された遺伝子の影響を調べた。複数の集団のハイスループットな表現型解析を容易にするため、最終的な葉の長さ (それぞれFLL3とFLW3) のような測定が容易なパラメータと、十分に灌水した区 (WW) と水不足 (WD) の条件下で生育した植物の新鮮重 (FW)、乾燥重 (DW)、水分含量 (M) のような統合的なパラメータをスコア化した。

この遺伝子型から表現型への関連研究から得られたデータを用いて、すべての単一遺伝子の影響と、測定されたさまざまな形質に対するそれらの影響を統合した推定制御ネットワークを構築した (図)。このネットワークでは、中心的な遺伝子 (*ZmCKX4B*, *ZmCKX48*, *ZmCKX4G*, *ZmTCP9*, *ZmTCP10*, *ZmTCP22*, *ZmTCP42*など) がいくつかの形質に接続された接点として機能し、制御におけるより広範な役割の可能性を示唆している。ネットワークの端に位置する遺伝子 (*ZmGRF10*, *ZmGRF4*, *ZmCKX3*, *ZmTCP8*など) は、1つか2つの形質に接続し、より明確な役割を果たしている可能性がある。また、*D8*, *SLRL2*, *Ga2ox5*のように、機能損失により葉長を強く増加させ、同時に葉幅を強く減少させるような特異的なパターンを示す遺伝子もあった。

## 論議

複雑な農耕形質は大きなネットワークによって支配されている。このような複雑性を理解することは、システム生物学の中心的な目標である。ここでは複雑な量的形質に影響を与える遺伝子ネットワークを研究するために、BREEDITと名付けた実験的アプローチを開発した。BREEDITのもう一つの重要な成果は、最大限の表現型効果を誘導するために必要な機能を喪失した遺伝子の最小セットを定義することであり、ランク付けされた遺伝子の大規模なセットをスクリーニングできる可能性である。

スコア化された表現型は、制御された栽培室で栽培された植物で観察された。苗や葉の成長に関わる特性は、温室の結果が圃場の結果と関連するが、高次突然変異に起因する好ましくない表現型、例えば雄性

不稔形質は、より後の発育段階で観察される可能性がある。理想的には、多重ゲノム編集植物の大規模な個体群を圃場条件下で評価すべきであるが、少なくともヨーロッパでは、非常に制限の多い法律が圃場等における分析を妨げている。

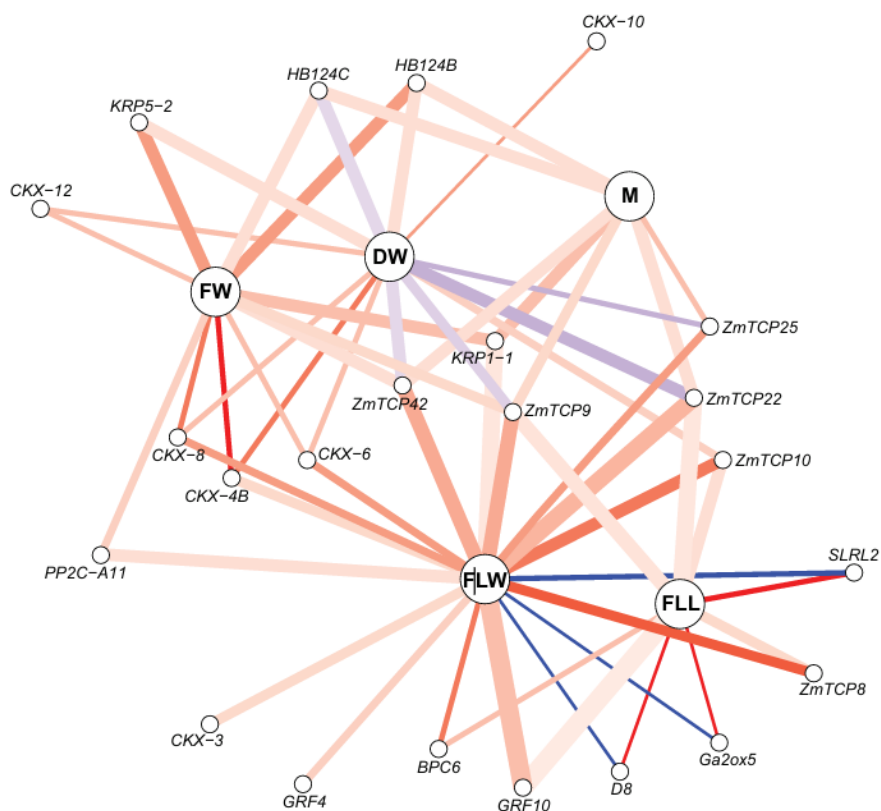


図 成長関連形質に対する単一遺伝子効果のネットワーク表現

形質は太字で表示（FLL：最終葉長、FLW：最終葉幅、M：水分含量、DW：乾燥重、FW：新鮮重）。形質と少なくとも一度は関連する遺伝子が表示されている。線は遺伝子と形質の関連を示す。線幅は異なる実験および／または個体群における遺伝子 KO（ノックアウト）と形質関連を検出するための基礎となるデータセットが、統計的に十分なデータを含んでいた回数に比例する。線の色は、十分なデータポイントがあったために遺伝子 KO-形質相関が観察された可能性のある回数に対して、プラス（重み：+1、赤が濃い）またはマイナス（重み：-1、青みが強い）のいずれかで、EDITOR1 コントロールを 10%有意に上回った遺伝子 KO と形質相関の重み付けされた割合を表す（ANOVA 検定； $P < 5\%$ ）。