

令和3年8月24日
愛媛大学

植物の品種改良向上に関する新技術

～簡便な加温処理によりゲノム編集による変異導入効率を向上させる技術開発～

愛媛大学大学院農学研究科の賀屋秀隆 准教授、黒河柊太(本学卒業生)、Hafizur Rahman(本学連合農学研究科博士課程)らのグループは、CRISPR/Cas9 システムによるシロイヌナズナのゲノム編集において、簡便な方法で変異導入効率を向上させる技術を開発しました。シロイヌナズナの栽培温度は通常 21～22 度ですが、これをたった一回だけ 37 度で 24 時間処理することで、変異導入効率が劇的に上昇することを明らかにしました。現在のゲノム編集技術で最も汎用されている CRISPR/Cas9 システムは、イネ・トマト・ジャガイモ・リンゴ・柑橘などの多くの作物の品種改良に利用されています。本研究成果はこれらに適用可能で、今後のゲノム編集技術による効率的な品種改良に繋がると期待されます。なお、本研究成果は、2021 年 8 月 4 日(水)に Plant & Cell Physiology の電子版で公表されました。

つきましては、是非、取材くださいますようお願いいたします。

記

掲載誌: Plant and Cell Physiology

(Impact factor: 4.93, 5 year impact factor: 5.52)

題名: A Simple Heat Treatment Increases SpCas9-Mediated Mutation Efficiency in Arabidopsis

著者: 黒河 柊太*, Hafizur Rahman*, 山中 直至, 石崎 千理, Shaikhul Islam, 相磯 豪志, 平田 峻也, 山本 真結香, 小林 括平, 賀屋 秀隆†

*共同筆頭著者 †責任著者

論文 URL: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab123>

DOI: 10.1093/pcp/pcab123

※送付資料 6 枚(本紙を含む)

本件に関する問い合わせ先

国立大学法人愛媛大学 大学院農学研究科

食料生産学専攻 農業生産学コース 分子生物資源学

准教授 賀屋 秀隆(かや ひでたか)

TEL: 089-946-9206

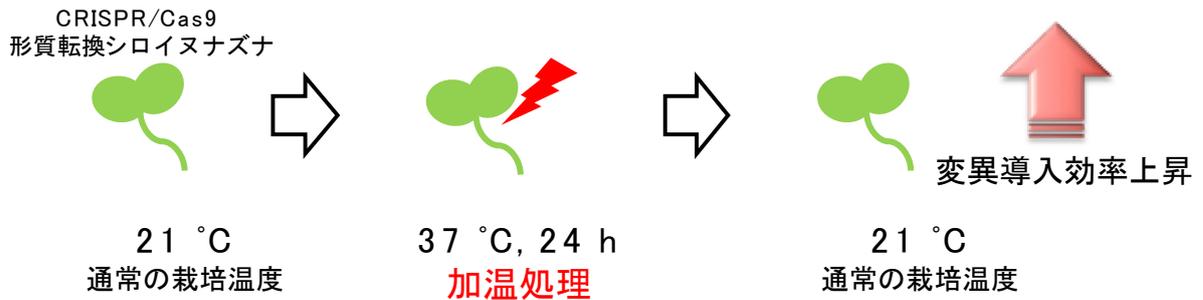
Mail: kaya.hidetaka.hu@ehime-u.ac.jp

植物の品種改良向上に関する新技術

簡便な加温処理により ゲノム編集による変異導入効率を向上させる技術開発

ポイント

- 37 °C で 24 時間, たった 1 回の処理で, 劇的に変異導入効率を向上させることができる。
- 本研究成果は, CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いた品種改良に適用可能, これにより様々な作物の品種改良の迅速化に貢献できる。



研究内容

2020年ノーベル化学賞を受賞したゲノム編集技術は、農産物の品種改良を迅速化できる技術として注目されている。中でもCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術は、高効率で標的遺伝子に変異を導入することができる。これまでに、シロイヌナズナの他に、イネ・トマト・大豆など様々な植物に適用されている。シロイヌナズナのゲノム編集では、Cas9遺伝子とガイドRNA遺伝子をシロイヌナズナのゲノムに形質導入し、この形質転換体の中から標的遺伝子に変異を持つ個体を単離するのが一般的である。本研究では、簡便な加温処理をおこなうことで変異導入効率を向上させることができることを明らかにした。これまでも加温処理により変異導入効率が上昇するという報告があったが、その方法は、ポットで栽培しているシロイヌナズナを10日間の間に37°C、30時間の処理を4回繰り返すというものであった(LeBlanc *et al.*, 2018)。本研究では、シャーレで栽培している5日目のシロイヌナズナを通常の栽培温度である21°Cの場所から、37°Cの場所に移動させ、24時間の加温処理をただ一度だけおこなった。これにより、変異導入効率は最大2.5%から42.0%へと上昇した(図1)。シャーレで栽培中のシロイヌナズナを加温処理することで、スペースはもちろん、労力も大幅に削減される。変異導入効率の上昇に伴いオフターゲット変異も増加している可能性が考えられた。実際、LeBlancらの方法では、オフターゲット変異も上昇していた。本研究の加温処理条件下、オフターゲット変異の変異導入効率を調べたところ、4つのオフターゲット候補サイトでの変異導入効率は上昇していなかった(図2)。

以上の解析から、37°Cで24時間1回という簡便な処理により、CRISPR/Cas9による変異導入効率を効果的に向上できることを明らかにした。

引用文献

LeBlanc, C., Zhang, F., Mendez, J., Lozano, Y., Chatpar, K., Irish, V.F., et al. (2018) Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress. *The Plant Journal* 93: 377-386.

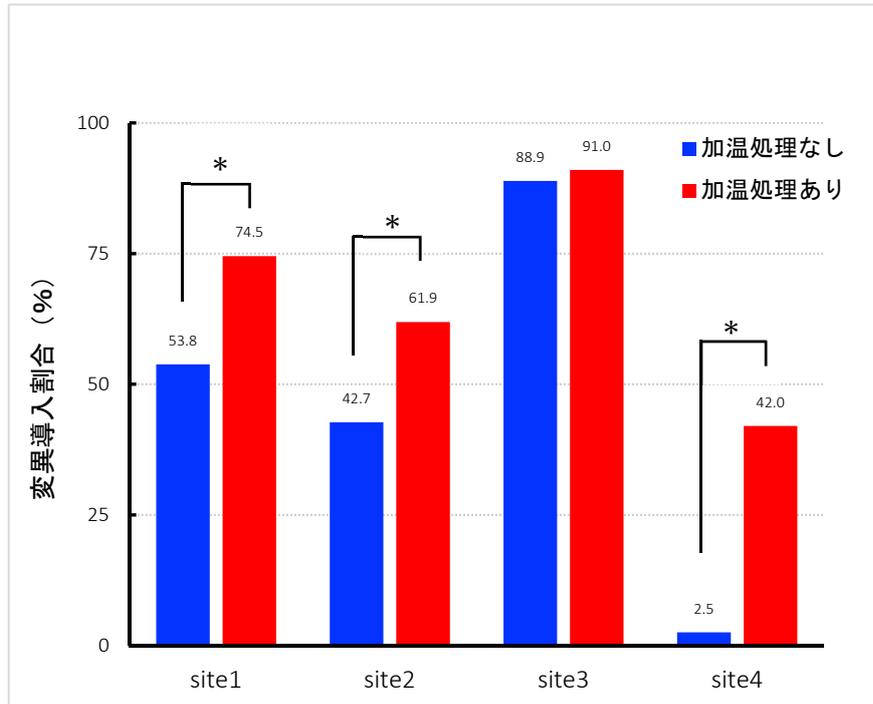


図 1. 標的での変異導入率の比較

各標的における変異導入効率を比較した。棒グラフの上の数字は、それぞれの変異導入率を示している。t検定*: $p < 0.01$

オフターゲット候補	加温処理なし 変異導入効率	加温処理あり 変異導入効率
off_site1	0% (0/89)	0% (0/96)
off_site2	0% (0/64)	0% (0/96)
off_site3	0% (0/96)	0% (0/96)
off_site4	0% (0/96)	0% (0/96)

図 2. off target 変異の比較

加温処理なしと加温処理ありでのオフターゲット変異の割合を比較した。加温処理により、オフターゲット変異が増加していなかった。

｜用語説明

【ゲノム】

生物が生きていく上で必要な遺伝子の1セット。ゲノム (genome) とは、遺伝子 (gene) と全体 (ome) が組み合わされた造語で、遺伝子全体という意味。遺伝子とは、タンパク質などを作るための情報をもつ DNA の領域。DNA とは、デオキシリボ核酸の意味で、化合物の名前。魂ではない。DNA は、リン酸と糖 (デオキシリボース) と塩基から構成される。塩基には、アデニン A, シトシン C, グアニン G, チミン T の4種類がある。この4種類の塩基をもつ DNA が長く繋がってゲノムを構成している。

【ゲノム編集】

ゲノムの狙った位置に突然変異を導入することが出来る技術。これまでの品種改良では、変異原処理によりランダムかつ多数の位置に突然変異を導入してきた。一方、ゲノム編集技術では、狙った位置に突然変異を導入することができるので、効率的に品種改良をおこなうことができる。

【ゲノム編集におけるオフターゲット変異】

ゲノム編集では、オフターゲット変異 (狙っていない位置での突然変異) が問題視されている一方、これまでに品種改良に利用されてきた放射線照射や化学物質による変異原処理ではオフターゲット変異は起こらない。なぜなら、そもそも標的を狙うことができない従来の変異原処理では、オフターゲット変異という概念自体がないからである。医療分野でのゲノム編集技術の適用において、オフターゲット変異によるリスクは低くない。医療での失敗は、取り返しがつかないからである。しかし、農業分野では、オフターゲット変異によるリスクは、ほとんどない。もし、オフターゲット変異を起こした個体があれば、それを取り除くことができるからである。

【ゲノム編集作物】

日本では、2020年12月筑波大学とサナテックシード (筑波大学発ベンチャー企業) より、ゲノム編集トマト (ハイギャバトマト) の販売・流通について、厚生労働省・農林水産省に届けられた。これにより、ゲノム編集作物の販売・流通が可能になった第一号となった。このトマトは血圧上昇を抑える働きがある GABA (アミノ酸の一つ) の成分を通常より5倍多く含む。ゲノム編集作物は、成分検査が実施されており、ゲノム編集トマトではゲノム編集作物であることを示す表示もおこなわれている。トマトの他に、マッスルマダイ (肉厚の鯛)、低アレルゲン卵、高成長トラフグ、毒 (ソラニン) を合成できないジャガイモなどがゲノム編集技術により開発されつつある。

【CRISPR/Cas9】

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)/ CRISPR associated protein 9 の略。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集は、2020年ノーベル化学賞を受賞した (ジェニファー・ダウドナ博士とエマニュエル・シャルパンティエ博士)。CRISPR/Cas9 以外に、ZFNs, TALENs がある。これら3つの中で、最も汎用されているのが CRISPR/Cas9 である。なぜなら、ガイド RNA を交換するだけで、ゲノム編集の標的を変更できるため、最も使い易いからであ

る。CRISPR/Cas9 では、Cas9 タンパク質が標的の DNA を切断する。多くの微生物が Cas9 を持っているが *Streptococcus pyogenes* 由来の Cas9 (SpCas9) が最も広く利用されている。理由は、変異導入効率が高く、PAM 配列が 5'-NGG-3'の 3 塩基と小さいからである。

【遺伝子組換え】

ある生物種の遺伝子 (DNA 断片) を別の生物種のゲノムに組み入れること。この遺伝子を組み入れられた生物は、遺伝子組換え体となる。遺伝子組換え技術は、ゲノム編集技術と混同されることがよくあるが、全く異なる技術である。

【シロイヌナズナ】

植物の遺伝子の単離・機能解析は、シロイヌナズナなしには語れない。植物の遺伝子解析においては、絶対王者と言っても過言ではない。植物界の「No.1 モデル植物」である。学名 *Arabidopsis thaliana* (アラビドプシス タリアーナ), 「アラビ」という呼称は正確ではない。同じく「ナズナ」も正確でなく、正しくはアラビドプシスでありシロイヌナズナである。30 cm 程の草丈で、白い花を咲かせる一年生草本。食べたことはないが、多分おいしくない (おいしいかもしれない)。