

高精度・制御可能な改良型ゲノム編集技術について

1. はじめにーゲノム編集技術の欠点ー

狙った領域の塩基配列だけを改変する「ゲノム編集技術」の原理は、狙った領域の2本鎖DNAを人工制限酵素で切断し、その修復時に起きるエラーにより、塩基の欠失・付加・置換を引き起こすものです(詳細は林木育種情報No.20をご参照ください)。ここで問題となるのは、標的領域の改変様式が制御できず、どのような改変が起きるのかは「運任せ」であるということです。その結果、標的領域以外の重要な塩基配列まで欠失してしまうといった、後の利用に支障がでる大規模改変もまれに起きてしまいます。今回は、そのような欠点を克服した高精度・制御可能な改良型ゲノム編集技術について紹介します。

2. DNA2本鎖を“切らない”塩基置換技術

この改変様式の不確定さはDNA2本鎖の切断が引き起こすものであるため、DNA2本鎖を切らないゲノム編集技術が必要となります。去る2016年、米国・日本でDNA2本鎖を切らない塩基置換技術が相次いで発表されました。ここでは日本で開発された「Target-AID」(Nishida *et al.*, *Science* 353, aaf8729 (2016)) について紹介します。Target-AIDは従来のCRISPR/Cas9を基盤とし、DNA切断活性を弱めたCas9、塩基を置換する脱アミノ化酵素(シチジンデアミナーゼ)、そして脱アミノ化された塩基が修復されるのを阻害するウラシルDNAグリコシラーゼ阻害剤(UGI)を融合したもので構成されています(図1)。標的領域の認識にはCRISPR/Cas9と同じくガイドRNAがその役割を担います。シチジンデアミナーゼにより標的シトシンは一旦ウラシルに変換された後、チミンに置換されます。変換された塩基は通常元の塩基に修復されますが、UGIにより阻害されます。

3. Target-AIDを利用したスギの塩基置換技術の構築

我々はTarget-AIDに着目し、スギへの適用を試みました。標的遺伝子として、塩基置換により除草剤耐性が付与されるアセト乳酸合成酵素(ALS)を選びました。ALSの塩基置換に成功すると、除草剤が存在していても枯死し

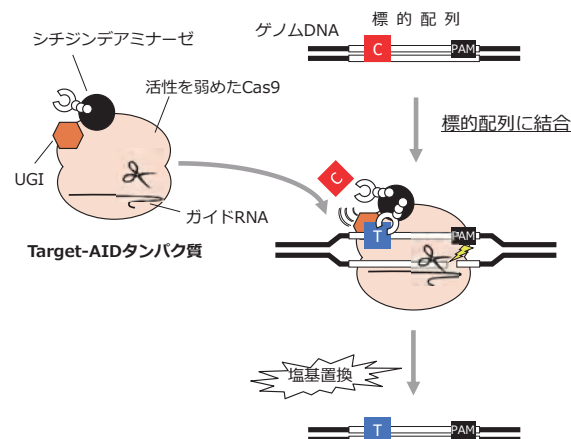


図1 Target-AIDによる標的配列の塩基置換

ガイドRNAにより標的配列に誘導されたTarget-AIDタンパク質は、標的シトシン(C)をチミン(T)に変換する。本図は七里(2022)森林遺伝育種11:181-186を一部改変した。

ないため、塩基置換の成否が目視により確認できます。遺伝子組換えにより、Target-AID発現遺伝子をスギに導入したところ、除草剤耐性を示す系統が複数得られました(図2)。塩基配列解析の結果、期待通りALS遺伝子において狙った塩基置換が起きていました。このことから、スギにおいても塩基置換による点変異の導入が可能であることがわかりました。



図2 塩基置換幼苗の除草剤耐性能

4. 今後の課題および展望

今回スギ遺伝子の塩基置換に成功したものの、効率の低さという課題が残りました。効率向上のため、現在発現遺伝子の改良や、他の塩基置換システムの利用により、スギでの効率的な精密ゲノム編集系の確立を目指しています。

本研究の一部は農林水産研究推進事業委託プロジェクト研究「炭素貯留能力に優れた造林樹種の効率的育種プロジェクト」の支援のもと実施しました。

(森林バイオ研究センター 七里 吉彦)