

# 植物ゲノム編集を行うための 実際の手順

農研機構 生物機能利用研究部門  
遺伝子利用基盤研究領域  
遠藤 真咲

## はじめに

ゲノム編集は標的遺伝子をピンポイントで改変する技術の総称であり、技術革新が目覚ましい今日、その方法も多岐に渡る。本稿ではもっとも一般的なゲノム編集手法である、CRISPR/Cas9 システムを用いた標的遺伝子切断の仕組み、またその修復エラーを利用した標的遺伝子破壊を行う実際の手順について説明したい。

## 1. CRISPR/Cas9 とは？

CRISPR/Cas9 とは元々はバクテリアの自己免疫システムとして見出された DNA 切断システムであり、人工制限酵素として機能するのは Cas9 nuclease と single guide RNA (sgRNA) から成る複合体である (図-1) (Jinek ら 2012)。由来するバクテリアの種類によって Cas9 の特性も異なるが、ゲノム編集のツールとして最もよく用いられている化膿連鎖球菌由来の Cas9 (SpCas9) の場合、SpCas9 自身はゲノム中の 5'-NGG-3'(N は A, T, G, C のいずれでもよい) を認識する。SpCas9 における NGG のように、Cas9 自身が認識するゲノム配列は protospacer adjacent motif (PAM) 配列と呼ばれている (Jinek ら 2012)。SpCas9 が NGG を認識した後、sgRNA が NGG の上流 20 塩基を認識し、切断すべき場所と判断した場合、NGG の手前、3 塩

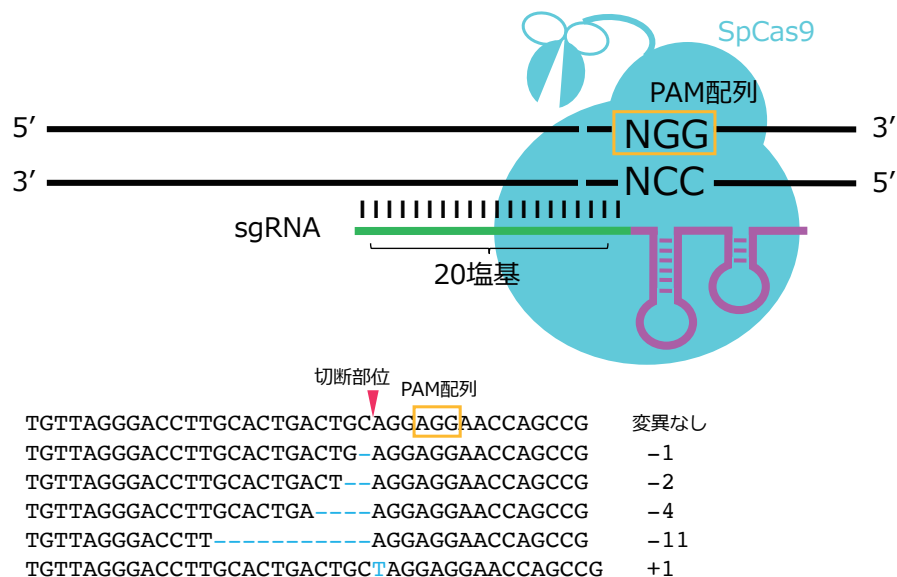


図-1 SpCas9, sgRNA を用いたゲノム編集の概要  
SpCas9 は NGG を PAM 配列として認識する。sgRNA は NGG 上流の 20 塩基を認識し、sgRNA 中の 20 塩基と一致した場合、SpCas9 は NGG の手前、3、4 塩基の間を切断する。SpCas9 による DNA 切断によって生じる変異の多くは、数塩基の欠失または 1 塩基 (特に A か T) の挿入である。

基目と 4 塩基目の間が切断される。DNA 切断および修復エラーにより塩基の欠失、挿入が生じ、フレームシフトが起こると、本来標的遺伝子がコードしているタンパク質を作れなくなる。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行う際の大まかな手順は図-2 の通りである。

## 2. 切断部位の選定

SpCas9 と sgRNA を用いた DNA 切断を行う場合、まずは標的遺伝子中の NGG を探す。NGG の上流 20 塩基を sgRNA に導入しておき、20 塩基 +NGG が一致すると、DNA 二重

鎖切断が生じる (図-1)。標的配列と相同性が高い配列が存在した場合、そちらも切断してしまう可能性があり、それにより生じる変異を off-target 変異と呼ぶ。一般的には、PAM 配列に近い部分 (12 塩基程度) が一致すると切断される可能性が高いとされている (Fu ら 2013; Hsu ら 2013; Pattanayak ら 2013)。そこで、CRISPR-direct (Naito ら 2015) 等の web site を利用して、できるだけ特異性の高い標的配列を選ぶことで off-target 変異の導入を回避する。

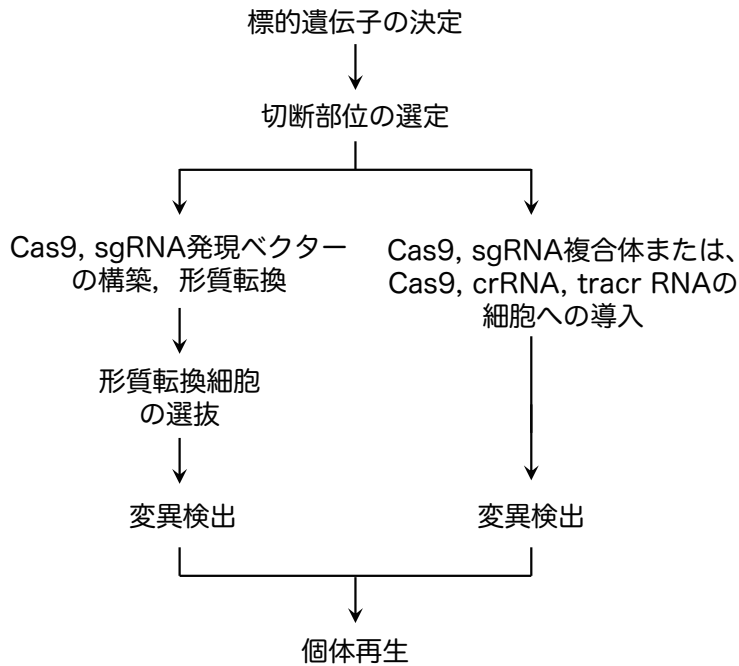


図-2 ゲノム編集植物体作成の手順

addgene.org) 等の寄託サイトから入手することも可能である。ベクターを入手した後は、標的配列となる 20 塩基を sgRNA 発現コンストラクトの promoter, scaffold (SpCas9 と結合する, sgRNA の 3' 末配列 80bp) の間に組み込む。アグロバクテリウム法で SpCas9, sgRNA 発現コンストラクトを形質転換する場合は, SpCas9, sgRNA, 選抜マーカーの 3 つの遺伝子カセットを発現する binary vector を作成し, 植物に形質転換する。選抜マーカー遺伝子に応じた薬剤により形質転換細胞を選抜し, 個体を再生させる。

### (2) SpCas9, sgRNA 複合体の直接導入

SpCas9 タンパク質は複数の試薬メーカーから販売されている。sgRNA は標的配列に相同性のある 20

## 3. SpCas9, sgRNA の発現法

最終的に人工制限酵素として機能するのは SpCas9 (タンパク質) と sgRNA の複合体だが, その供給法としては, 両者を発現コンストラクト (DNA) としてゲノムに組み込む方法, SpCas9, sgRNA 複合体そのものを細胞に導入する方法, SpCas9 をコードする mRNA と sgRNA を細胞に導入するなど, 複数の選択肢がある。今回は, 代表的な 2 つの方法について説明する。

### (1) SpCas9, sgRNA 発現コンストラクトをゲノムに組み込む方法

この方法は, 遺伝子組換え手法を利用して, SpCas9, sgRNA 発現コンストラクトをゲノムに組み込む方法である。恒常的に発現する promoter を用いることにより, SpCas9, sgRNA を供給し続けることが可能であるが, 高発現に適した発現制御領域 (promoter, terminator, translational enhancer)

や SpCas9 のコドンが植物種によって異なるため, 対象とする植物種に適した発現ベクターを利用する必要がある。我々は, SpCas9, sgRNA, 選抜マーカーのパーツをそれぞれ複数種類用意し, 対象植物によって組み合わせる方法 (図-3) を用いているが, 発現ベクターは大まかには, 双子葉用, 単子葉用に大別され, 研究目的であれば, add gene (<https://www.addgene.org>)

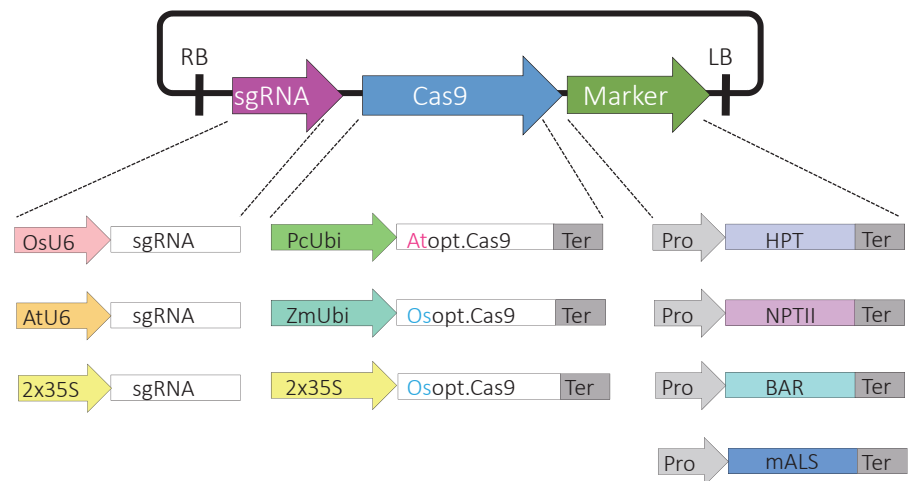


図-3 SpCas9, sgRNA 発現ベクター

SpCas9, sgRNA 発現コンストラクトを用いる場合は, 対象とする植物において高発現が期待される発現制御配列や, codon usage, 形質転換細胞の選抜に適したマーカー遺伝子を組み合わせることが望ましい。

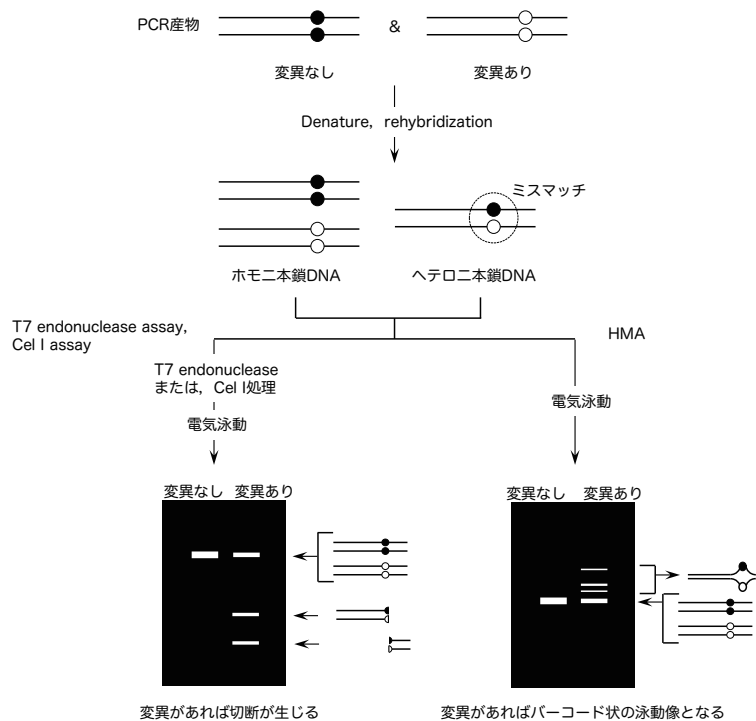


図-4 変異の検出法

T7 endonuclease および Cel I は DNA 二本鎖のミスマッチ部分を切断するため、変異の存在は、切断された PCR 産物として検出可能である (T7 endonuclease assay, Cel I assay)。一方、HMA は、変異あり/なしのヘテロ二本鎖 DNA はホモ二本鎖と電気泳動時の移動度が異なることを利用し、PCR 産物の高分解能電気泳動を行い、バーコード状の泳動像の有無を確認することで変異を検出する。

塩基と SpCas9 と結合する scaffold 配列 80 塩基からなる一本鎖 RNA であるが、これらを crRNA (標的配列を含む RNA 断片), tracrRNA (scaffold 配列を含む RNA 断片) の 2 分子に分けておくことも可能であり、いずれの RNA も外注での合成が可能である。自作する場合は、*in vitro* transcription により作成する。SpCas9-sgRNA 複合体または、SpCas9-crRNA-tracrRNA 複合体を植物細胞に導入する方法は、プロトプラストを用いた PEG またはエレクトロポレーション法、培養細胞や茎頂幹細胞にパーティクルガンで打ち込む方法がある。プロトプラストの培養系と再分化個体の再生系が確立されている植物であれば PEG 法、エレクトロポレーション法も可能であるが、単子葉植物の多くはプロトプラストからの個体再生は困難であるため、SpCas9-sgRNA 複合体の直接導入にパーティクルガン法が用いられる場合が多い (Svitashev ら 2016 ; Liang ら 2017)。いずれの場合も、SpCas9 タンパク質と sgRNA を至適塩濃度下で混合し、複合体を形成させてから、植物細胞に導入する。

#### 4. ゲノム編集の検出

SpCas9, sgRNA, 選抜マーカー遺伝子発現コンストラクトを形質転換した場合は、まず薬剤選抜マーカーを利用して形質転換細胞を選抜し、ゲノム編集の成否を確認する。SpCas9, sgRNA 複合体直接導入の場合、これ

らのゲノム編集エフェクターが導入された細胞を選抜することができないため、未選抜で培養、個体再生を行い、変異を検出することになる。変異検出の方法もいくつかあるが、以下に代表的な方法を 3 つ紹介する。

##### (1) Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) assay

SpCas9, sgRNA による DNA 切断部位が制限酵素の認識配列上にある場合、ゲノム編集が生じることで、制限酵素による切断が生じなくなるため、標的配列を含む領域を PCR により増幅し、制限酵素処理、電気泳動を行うことで変異の有無を確認することが可能である。この方法の場合、ゲノム編集イベントは PCR 産物の制限酵素処理後の切れ残りとして検出される。

##### (2) T7 endonuclease assay または Cel I assay

T7 nuclease, Cell はいずれも配列非依存的に、ヘテロ二本鎖 DNA を切断する酵素である。変異が入った DNA と変異が入っていない DNA が混在している場合、PCR 産物を denature, reannealing することでヘテロ二本鎖 DNA が生じ、それらは T7 endonuclease, Cel I により切断されるため、電気泳動を行うことで変異の有無を確認することができる (図-4)。この方法の場合、ゲノム編集イベントは PCR 産物の制限酵素処理後の切断産物として検出される。

##### (3) Heteroduplex mobility assay (HMA)

ヘテロ二本鎖 DNA はホモ二本鎖 DNA と電気泳動時の移動度が異なる

ため、PCR産物を分解能よく電気泳動することで、変異の有無を検出することができる(図-4)。DNAの泳動で一般的に用いるアガロースゲルでは分解能に限界があるため、アクリルアミドゲルを用いるか、マイクロチップ上で電気泳動を行う機械(島津製作所MultiNaなど)を用いて電気泳動を行うと、ヘテロ二本鎖DNAはホモ二本鎖DNAより高い位置のバンドとして現れる。PCR産物は200bp程度と短い方が変異の検出感度は高い。PCR産物を電気泳動するだけでよいのでコストが低く、多検体の解析に適している一方、変異が1塩基の挿入や欠失、塩基置換の場合、ホモ二本鎖DNAとヘテロ二本鎖DNAの移動度の差が小さいため、検出できない場合もある。また、全ての細胞に同じ変異が入っている場合も検出できない。

#### (4) ダイレクトシーケンス

変異細胞の割合がある程度高い場合は、PCR産物を直接シーケンスすることによっても変異の検出は可能である。DNA切断によって生じる変異のほとんどは塩基の欠失または挿入であり塩基置換は稀であるため、予想切断部位付近からシーケンスの波形が乱れていれが生じていれば、変異が生じている可能性が高い。

#### (5) PCR産物のクローニングとシーケンス

4-(1)~(4)の方法はいずれも、変異の有無とおおよその割合を知ることが

できるが、変異のパターンと正確な効率を知ることはできない。3の倍数塩基の挿入または欠失の場合、アミノ酸の欠失や付加が生じてても遺伝子破壊にはならない場合もあるので、少なくともゲノム編集システムを確立する際には、変異のパターンを確認することをお勧めする。

### 5. 個体再生とキメラ性の解消

変異が導入された細胞から個体が再生した場合、キメラ性は生じないが、組織に分化した後に変異が生じた場合、細胞によって変異の有無や変異の種類、ホモ、ヘテロの違いが生じる場合が多い。キメラ性を解消するには、世代を更新するか、変異が生じた細胞を再度脱分化させ、そこから個体を再生させる方法が考えられる。

### 6. まとめ

冒頭でも述べたが、ゲノム編集技術は日々進歩を遂げており、Cas9認識配列の制約の撤廃や、ゲノム編集酵素を用いた塩基置換の導入、DNA切断と鋳型DNAを併用するゲノム編集法の改良など、さまざまな取り組みが行われている。ゲノム編集個体作成の手順は、導入したい変異のタイプ(塩基置換なのか、塩基の挿入または欠失なのか)や、組織培養および形質転換系が確立されているか否か、遺伝学的分離による外来遺伝子の除去が可能か否

か等、事情に応じて異なってくる。植物種によってゲノム編集の困難さは異なるが、本技術の適用範囲が広がり、育種の効率化に貢献することを願っている。

なお、本稿は、内閣府 戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「スマートバイオ産業・農業基盤技術」(管理法人:農研機構 生研支援センター)によって実施した研究を基に執筆した。

#### 引用:

- Fu, Y. *et al.* 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 31, 822-826.
- Hsu, P.D. *et al.* 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31,827-832.
- Jinek, M. *et al.* 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821.
- Liang, Z. *et al.* 2017. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun.* 18,14261.
- Naito, Y. *et al.* 2015. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas9 guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics.* 31, 1120-1123.
- Pattanayak, V. *et al.* 2013. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* 31, 839-843.
- Svitashev, S. *et al.* 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun.* 7, 13274.