

ゲノム編集技術に関わる知財と植物分野における対応について

農研機構 生物機能利用研究部門
先進作物ゲノム改変ユニット
廣瀬 咲子

特許業務法人 セントクレスト国際特許事務所
橋本 一憲

はじめに

ゲノム編集技術は、ゲノム上の狙った配列をピンポイントで改変することができる画期的な技術であり、ライフサイエンス分野で幅広く活用可能な技術として注目されている。

ゲノム編集技術の基本特許は、すでに米国、中国等から多数出願され、次々と成立しているため、わが国で主な基盤技術を産業利用しようとする場合は海外特許の権利を侵害する恐れがある(橋本・廣瀬 2017)。そこで、海外の基本特許に対して強みを持つ改良技術や基本特許の権利範囲外となる国産のゲノム編集技術の開発が求められており、2014年から始まった内閣府主導の戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「次世代農林水産業創造技術」では知財調査と戦略に基づいた、ゲノム編集の基盤技術および農作物への応用技術の開発を各分野のエキスパートを結集して進めてきた。本稿ではCRISPR/Cas9をはじめとするゲノム編集技術の基本特許の動向の概要を説明するとともに、それを踏まえてSIPで開発を進めてきた国産の植物ゲノム編集技術(基盤技術及び導入法などの応用技術)について紹介する。

1. ゲノム編集技術の基本特許の動向

CRISPR/Cas9については、誰が、最初にCRISPR/Cas9を発明したのか

について、特許の世界でも激しい争いが生じている。そして、その主役は、Jennifer Doudna 率いるカリフォルニア大学と、Feng Zhang 率いるブロード研究所である。

カリフォルニア大学の特許は、標的化RNAとtracrRNAを介在配列を挟んで結合させた「一分子ガイドRNA」を構成要素とするCRISPR/Cas9系の利用に関して広範な権利範囲を主張しており、一方、ブロード研究所の特許は、「真核細胞」におけるCRISPR/Cas9系の利用に関して広範な権利範囲を主張している。

世界に先駆け、米国でいち早く基本特許を成立させたのはブロード研究所(米国特許8,697,359号など、優先日2012年12月12日、共同出願人：マサチューセッツ工科大学)であるが、カリフォルニア大学の出願(米国出願13/842859号、優先日2012年5月25日、共同出願人：ウィーン大学, Emmanuelle Charpentier)も米国の特許審査過程で特許性が認定されたことから、この両者間で、いずれが早く発明したのかについての特許紛争が2016年1月に開始された。この争いは、米国特許商標庁での審決を経て、米国連邦巡回控訴裁判所にまで持ち込まれ、一旦、両者の特許は抵触しないというブロード研究所側の主張を認めた判決で幕を閉じた。この判決を受けて、カリフォルニア大学の特許も成立したが(米国特許10,266,850号)、最近(2019年6月)になって、両者の基本特許を巡り、2回目の特許

紛争が始まった(カリフォルニア大学側は、1回目の争いの対象となった特許の継続出願を対象としており、当該出願の権利請求は、一分子ガイドRNAという点に加えて、ブロード研究所と同様に真核細胞である点も、限定されている)。

両者の特許は、多くの主要国に出願されており、いずれも米国以外に、日本、欧州などで特許が成立している。

この両者の争いばかりが注目を集めてきたが、CRISPR/Cas9の基本特許の獲得競争に関しては、ブロード研究所の対抗馬として、ツールジェン社(米国出願14/438098号など、優先日2012年10月23日)とシグマアルドリッチ社の存在がある(米国出願14/649777号、優先日2012年12月6日)。これら2社の特許出願の優先日は、ブロード研究所よりも早く、しかも、当初の出願から真核細胞におけるCRISPR/Cas9の利用に関する実施例が含まれていたことから、真核細胞でのプライオリティーを主張するブロード研究所の基本特許の優位性を脅かしている。実際、米国で現在進行中の2回目のインターフェアレンスにおいて、カリフォルニア大学は、これら2社の特許出願に照らしたブロード研究所の基本特許の無効を争点の一つとして主張している。日本や欧州においても、ブロード研究所の特許出願のいくつかは、シグマアルドリッチ社やツールジェン社の出願を引用されて拒絶され、あるいは権利範囲が減縮されている。

対照的に、カリフォルニア大学については、日本国において、一分子ガイド RNA か二分子ガイド RNA かを問わず、真核細胞における CRISPR/Cas9 の利用を非常に広範に支配する基本特許を成立させており（日本特許第 6692856 号）、米国においても、二分子ガイド RNA の形態をも権利範囲に含む最適化ガイド RNA を利用した CRISPR/Cas9 の特許を成立させている（米国特許 10,000,772 号など）。

なお、上記いずれのプレイヤーよりも早い出願日（米国出願 14/385241 号など、優先日 2012 年 3 月 20 日）を持つリトアニアのヴィリニウス大学の存在もあるが、当初の出願に真核細胞での実施例がなかったことなどから、特許が成立した日米欧において、権利範囲がインビトロ系に限定されている。

CRISPR/Cas9 に関する特許の領土分割については、大枠では、一分子ガイド RNA を用いた態様についてカリフォルニア大学が、真核細胞における利用についてブロード研究所が、インビトロにおける利用についてヴィリニウス大学が、それぞれ獲得するという構図が見えてきているが、真核細胞への適用におけるパイオニアとしてのブロード研究所の位置づけが、日欧を中心に揺らぎ始めている一方、カリフォルニア大学が二分子ガイド RNA を利用する形態についても特許の領土を拡張させ始めている。

上記 3 者の基本特許の実施権については、農作物では、ダウ・デュポン

社から分離したコルテバ・アグリサイエンス (Corteva agriscience) 社を通じて一括で獲得することができる。このため CRISPR/Cas9 を利用して SIP において開発された農作物の一部については、既に、同社を介したライセンス交渉を行っている。

一方、CRISPR/Cas9 より一世代前の TALENs については、マルティン・ルター大学ハレ・ヴィッテンベルクの Ulla Bonas ら個人（米国特許 8,470,973 号など、優先日 2009 年 1 月 12 日）と、Daniel Voytas らを発明者とするミネソタ大学（米国特許 8,586,363 号など、優先日 2009 年 12 月 10 日、共同出願人：アイオワ州立大）がそれぞれ基本特許を所有している。両者の基本特許は、日本を含む主要国で成立しており、国により多少の広狭があるものの、現在主流となっている TALE ドメインに FokI を融合させた形態を含む広範な権利範囲を形成している。TALENs の基本特許の実施権については、実施権者間の合意により、その産業応用分野によって領土分割が行われており、農作物については、セレクティス社の子会社のカリクスト (Calyxt) 社から獲得することができる。農業分野を出口とする SIP でも、TALENs を利用して開発された農作物の産業化を行う場合、同社を介してライセンスインを行う予定である。

2. SIP におけるゲノム編集基盤技術開発

以上に述べてきたとおり、ゲノム編集の基盤技術については、現段階では海外基本特許の実施権を得ることで、SIP 成果作物を実用化に進めることが現実的になっている。一方で、これら基本特許の許諾料は農業分野では法外な額ではないと言われているものの、海外基本特許に対して強みがあり、ライセンス交渉を有利に進める材料となるような国産のゲノム編集基盤技術や作物への応用技術の開発が期待されている。以下に、SIP で開発を進めてきた国産の技術開発研究について紹介する。

現在、ゲノム編集のツールとして最も人気の高い CRISPR/Cas9 は、標的配列を完全に自由に選択できるわけではなく、ガイド RNA の配列の隣に PAM と呼ばれる、DNA 認識の目印が必要となる。例えば SpCas9 の場合、標的配列をゲノムの中から選択する時に、その隣に“NGG”という 3 塩基の PAM 配列が必要となるという制約があり、これは、便利・容易が強みの CRISPR/Cas9 システムに共通の大きな弱点となっている。東京大学の瀧木教授らのグループは、様々な Cas9 タンパク質-RNA-DNA 複合体の立体構造解析を行い、PAM の認識機構を解き、Cas9 タンパク質中の PAM 認識に関わると予想されるアミノ酸を変化させた多くの改変型 SpCas9 を

作成して切断活性を調べた。この知見の蓄積から、PAMのNGGをNG、即ちG一文字としてガイドRNAをデザインできるようにSpCas9を改良し(SpCas9-NG)、デザインの制約を大幅に軽減することに成功した(Nishimasu *et al.* 2018)。

神戸大学の西田教授らのグループでは、ヤツメウナギ由来のデアミナーゼ(塩基修飾酵素)と切断活性を失わせたCas9を組み合わせて利用し、標的配列の狙った1塩基を置換することに成功し、DNAを切らずにゲノム編集を行うTargetAIDを構築し(Nishida *et al.* 2016)、イネやトマトで標的部位の塩基置換を成功させた(Shimatani *et al.* 2017)。これまで、ゲノムを切断して狙った遺伝子の機能破壊を目的としてきた多くのゲノム編集に対して、この技術は狙ったアミノ酸を置換することで、タンパク質を改変し新たな遺伝子機能を付加できる可能性を提案している。

農業・食品産業技術総合研究機構(以下「農研機構」とする)の土岐ユニット長らのグループは東京大学が改良したSpCas9-NGと神戸大学のTargetAIDを組み合わせて、ゲノム上のG一文字をPAMとし、そこから上流16~20番目付近のCをTに変換することに成功した(Endo *et al.* 2018)。同様に米国で開発されたアデニンベースエディターとSpCas9-NGとの組み合わせで特定のAをGに変換できることも示した(Negishi *et al.* 2019)。このように日本で開発された

ゲノム編集基盤技術の効果的な組み合わせにより、ゲノム上の狙った位置の塩基を書き換えるといったこれまではできなかった精密なゲノム編集技術を確立し、実際にイネ等の植物で実証した。

一方、これまで海外で基本特許が押さえられてきた一連の技術とは全く異なるタンパク質を用いて、国産の新たなゲノム編集基盤技術として、九州大学の中村准教授らのグループはPPR技術の開発を行っている。PPR(Pentatricopeptide repeat)は植物由来のタンパク質で、RNAあるいはDNAに特異的に結合する性質を持つことがわかっている。結合のしくみはTALENsと同様にPPRタンパク質の特定のアミノ酸がDNAの各塩基を特異的に認識することによるもので、標的とするDNA配列に結合するよう、各塩基に結合するPPRタンパク質モチーフを標的塩基配列通りに並べて繋げ、FokIなどのヌクレアーゼとの融合タンパク質として働かせることでゲノム編集が可能となる。中村らはPPRタンパク質の改良を重ねることで特定のDNA塩基の認識能を高め、標的配列を狙った位置で切断するモデル実験系を構築し、現在植物でのゲノム編集の立証実験を行っている。PPRはこのようにゲノム編集酵素として利用できる他、RNA標的配列にも結合する性質を持つので、この国産技術が確立すれば、応用の幅が広がることも期待される。

3. ゲノム編集の農作物への適用技術

植物のゲノム編集では、CRISPR/Cas9やTALENsなどの人工制限酵素を有効な形で植物組織・細胞内へ導入する方法の開発が重要課題である。現在はCas9、ガイドRNA等を載せた遺伝子発現ベクターを用い、アグロバクテリウムを介した遺伝子導入によりゲノム編集を行う方法が主流である。この場合、予定した変異挿入を確認した後、後代で人工制限酵素等の外来遺伝子が分離除去された個体を選抜することで外来遺伝子を含まないゲノム編集植物を得ることができる。しかし、栄養繁殖性の作物や果樹のように次世代は同じ品種ではなくなる、などの場合には、分離による外来遺伝子の除去が困難である。あるいは組織培養や形質転換が難しい植物では現状のゲノム編集技術が適用できない。そこで、ゲノム編集酵素遺伝子などをゲノムに組み込まずに植物細胞内で働かせる方法を開発する必要が生じ、SIPではこのような植物に特有の課題に取り組む研究開発も進めてきた。

農研機構の石橋主任研究員らは2種類のRNAウイルスベクターに2分割した小型のSaCas9タンパク質遺伝子とガイドRNA遺伝子を載せてタバコ葉に感染させ、外来の遺伝子をゲノムに組み込むことなく、植物をゲノム編集することに初めて成功した(Ishibashi *et al.* 2018)。また、農研機

構の今井主席研究員らとカネカの田岡リーダーらのグループはDNAやタンパク質-RNA複合体をパーティクルガンでコムギの茎頂組織に直接導入し、外来遺伝子を含まず、組織培養も経ないゲノム編集に成功した (Hamada *et al.* 2017, 2018)。この他、低温プラズマ (Yanagawa ら 2017) や電気穿孔法等によるタンパク質/DNA/RNAの植物組織への物理的導入法、細菌のタンパク質分泌装置などの生物学的導入法で、ゲノム編集酵素を直接植物組織に導入しゲノム編集を行う技術の開発に取り組んできた。このような応用技術を汎用的に農作物に適用するためには、それぞれの作物・品種に最適な方法を見つける必要があり、植物への各種導入法は今後、開発研究を加速させて選択の幅を広げていく必要がある。

4. SIP 成果知財カタログの作成

ここで述べてきた SIP 次世代農林水産創造技術で開発された技術については、その多くが特許出願された。一

つの技術だけでは一連のゲノム編集作物の作製は完了できないが、複数の技術を組み合わせ、個々の作物に応じた技術として適用することで培養の難しい作物のゲノム編集や我が国の規制に対応可能なゲノム編集作物の実用化を実現する道が拓けてくると考えられる。そこで、SIP 成果の知財概要を一つにまとめた「知財カタログ」; http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/brain/sip/sip1_topix_2-1-01.pdf を作成した。ご興味のある方は著者にお問い合わせいただければ幸いです。

なお、本稿で紹介した調査、技術開発研究は、内閣府 戦略的イノベーション創造プログラム (SIP) 「次世代農林水産業創造技術」「スマートバイオ産業・農業基盤技術」(管理人: 農研機構 生研支援センター) によって実施された。

引用文献

Endo *et al.* 2019. Genome editing in plants with engineered SpCas9 using NG-PAM. *Nat. Plants.* 5(1), 14-17.
Ishibashir *et al.* 2018. 植物ウイルスベク

ターを利用したゲノム編集植物の生産方法. PCT/JP2018/005085.

Hamada *et al.* 2017. An in planta biolistic method for stable wheat transformation. *Sci Rep.* 7(1), 11443.

Hamada *et al.* 2018. Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Sci Rep.* 8(1), 14422.

橋本一憲・廣瀬咲子 2017. ゲノム編集技術の基本特許を巡る国際的動向及び研究開発への影響と対策. *知財管理* 67, 542-559.

Negishi *et al.* 2019. An adenine base editor with expanded targeting scope using SpCas9-NGv1 in rice. *Plant Biotechnol.J.* 17(8), 1476-1478.

Nishida *et al.* 2016. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science.* 353(6305), aaf8729.

Nishimasu *et al.* 2018. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science* 361(6408), 1259-1262.

Shimatani *et al.* 2017. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol* 35(5), 441-443.

Yanagawa *et al.* 2017. Direct protein introduction into plant cells using a multi-gas plasma jet. *PLoS ONE* 12, e0171942.