

相同組換えやトランスポゾンを活用した新規植物ゲノム工学手法の開発

Development of novel plant genome engineering using homologous recombination and transposon

横井 彩子

農研機構 生物機能利用研究部門

作物ゲノム編集研究領域 ゲノム編集技術グループ

ゲノム編集技術は、標的遺伝子をピンポイントに改変できる技術であり、基礎研究はもとより農作物の品種改良を加速させる重要なツールとなりつつある。実際、CRISPR/Cas9 を用いた標的変異（ノックアウト）技術（図 1A）は様々な作物の育種に取り入れられ、2021 年にはこの技術で作出されたトマトの販売が始まった。しかし、難形質転換植物や栄養繁殖性植物への適用には、人工制限酵素のデリバリー法の確立など課題が残されている。

一方、相同組換えを介した精密ゲノム編集技術である標的組換え（ジーンターゲティング、GT）（図 1B）は効率が低く、未だチャレンジングな技術である。そこで本研究では、人工制限酵素発現カセットの新規デリバリー法と汎用的な GT 系の確立を目的として以下の研究に取り組んできた。

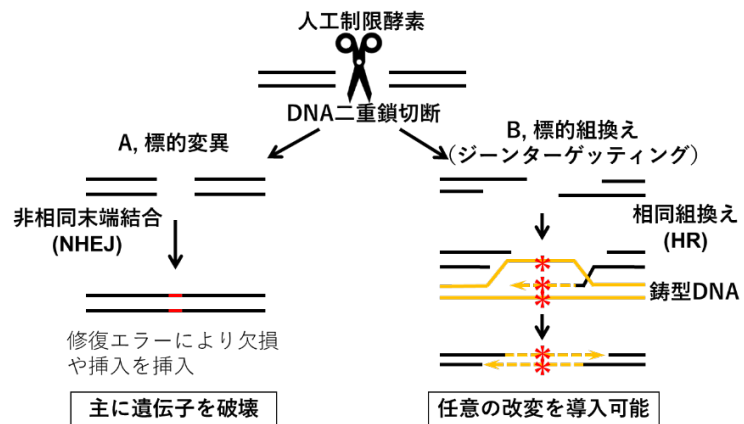


図1 主な2つのゲノム編集技術の概要

A, 人工制限酵素で生じたDNA二重鎖切断を非相同末端結合経路で修復する過程で生じるエラーを利用して標的遺伝子を主に破壊する技術。B, 任意の変異 (*) を導入した鋳型DNAを細胞外から導入し、相同組換え修復により鋳型配列をコピーペーストして標的遺伝子を修復する技術。

① *piggyBac* トランスポゾンを利用した人工制限酵素発現カセットの一時的導入系の開発

前述のとおり、標的変異技術は既に様々な作物種に適用されつつあるが、実用化に向けては人工制限酵素を外来 DNA で導入しない、あるいは、導入した後に綺麗に取り除くことが重要である。しかし、栄養繁殖性植物の場合、一旦ゲノムに導入した外来 DNA を遺伝的に分離することは難しい。そこで本研究では、フットプリントを残さずに転移する昆虫由来の *piggyBac* トランスポゾンを利用し、外来 DNA の一時的導入系を開発した。この実験系の開発により、形質転換当代で人工制限酵素発現カセットをゲノムに出し入れすることが可能となった¹。

② ポジティブ・ネガティブ選抜を利用した GT と *piggyBac* トランスポゾンによるマーカー除去を組み合わせた精密改変技術の確立

高等植物では、相同組換え頻度が低いためGT効率が非常に低いのが問題点である。従って、レアなGT細胞を効率良く濃縮するポジティブ・ネガティブ選抜法が確立されてきた。この選抜法を利用したGT系はイネでは再現性が高いが、ポジティブ選抜マーカーが標的遺伝子座に挿入されるため、目的の変異のみを標的遺伝子座に残したい場合は、マーカー遺伝子を痕跡無く除去する必要がある。そこで

piggyBac トランスポゾンを用いた²。ポジティブ・ネガティブ選抜を利用したGTと*piggyBac* トランスポゾンの転移によるマーカー除去を組み合わせ、イネにおいては内在性遺伝子を狙い通りに改変することに成功した(図2)³。また、より広範

な植物種への展開を目指して、新規ポジティブ・ネガティブ選抜系⁴やCRISPR/Cas9による標的遺伝子切断を誘導するGT系⁵も開発した。

今後も様々なアプローチから研究を重ね、GTを含めた精密ゲノム編集技術を広範な作物種に適用できるように効率化を図り、基礎研究だけでなく作物の品種開発にも貢献したい。

本研究を進めるにあたり、ご指導賜りました先生方、ご協力いただいた共同研究者の皆様、ご助言をくださった研究所の皆様、支援してくださった研究室のスタッフの皆様、全ての方々に厚く御礼申し上げます。

【引用文献】

1. Nishizawa-Yokoi A, Toki S. (2021) A *piggyBac*-mediated transgenesis system for the temporary expression of CRISPR/Cas9 in rice. *Plant Biotechnol. J.* 19: 1386-1395
2. Nishizawa-Yokoi A, et al. (2014) Precise marker excision system using an animal-derived *piggyBac* transposon in plants. *Plant J.* 77: 454-463
3. Nishizawa-Yokoi A, et al. (2015a) Precision genome editing in plants via gene targeting and *piggyBac*-mediated marker excision. *Plant J.* 81: 160-168
4. Nishizawa-Yokoi A et al. (2015b) A universal positive-negative selection system for gene targeting in plants combining an antibiotic resistance gene and its antisense RNA. *Plant Physiol.* 169: 362-370
5. Nishizawa-Yokoi A et al. (2020) A universal system of CRISPR/Cas9-mediated gene targeting using all-in-one vector in plants. *Front. Genome Ed.* 2: 14

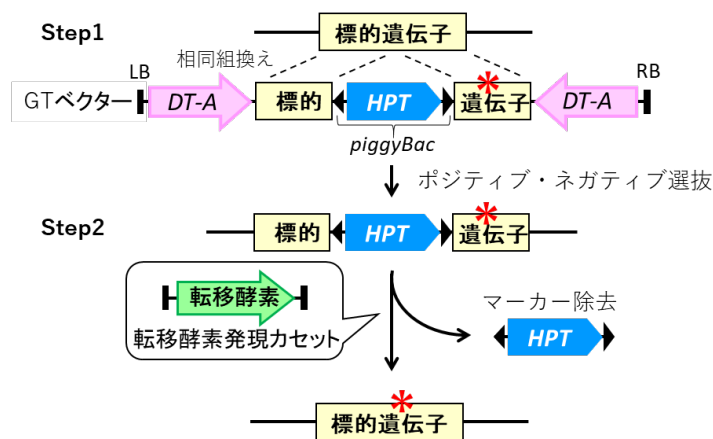


図2 ポジティブ・ネガティブ選抜を利用したGTと*piggyBac* トランスポゾンの転移による標的遺伝子座の精密改変

Step1, ポジティブ・ネガティブ選抜を利用したGTにより、標的遺伝子座に*piggyBac* トランスポゾン(黒三角)内に配置したポジティブ選抜マーカー発現カセット(HPT)と任意の改変(*)を導入する。Step2, *piggyBac* トランスポゾン転移酵素発現カセットをGTカルスに導入し、転移により標的遺伝子座からマーカーを痕跡無く除去する。