

シロイヌナズナのオルガネラゲノムの標的一塩基置換

Targeted base editing in the organellar genomes of *Arabidopsis thaliana*

中里一星（東京大学大学院 農学生命科学研究科）

植物細胞は、核ゲノムの他に葉緑体とミトコンドリアにも遺伝情報（オルガネラゲノム）を有する。光合成やエネルギー生産に関わる遺伝子を保持するオルガネラゲノムの改変によって作物の収量が向上する可能性があるため、植物オルガネラゲノムの改変手法の発展は、基礎研究と作物育種の両方にとって重要である。葉緑体ゲノム改変の中心技術である遺伝子導入法（葉緑体形質転換法）は、ゲノムの標的箇所に遺伝子を導入でき、また目的遺伝子をタンパク質レベルで高蓄積させられる等の利点があるが、モデル植物シロイヌナズナやイネを含む多くの植物種への適用が難しく、また作出された個体が遺伝子組換え生物（GMO）となり実用上の障壁があるという難点もある。一方、陸上植物のミトコンドリアゲノムは、遺伝可能な形での遺伝子導入は難しいが、標的配列の安定改変は所属研究室を含むチームによって 2019 年に報告された。この方法 [ミトコンドリアに局在する人工制限酵素 TALEN (mitoTALEN) による標的配列切断] は、一細胞に数十から約百個あるミトコンドリアゲノムの全てで標的配列を切断でき、また改変型のゲノムが子孫に安定遺伝するという利点があるが、標的配列周辺で数百～数千塩基対が欠失する、遺伝子の並び順が変わる等のゲノム構造の変化を伴うという難点もある。発表者らはゲノム編集技術を応用し、上記の難点を避けつつシロイヌナズナのオルガネラゲノムの改変を試みた。

本研究では、葉緑体またはミトコンドリアに局在する標的一塩基置換酵素 ptpTALECD と mitoTALECD を用いて、オルガネラゲノム上の標的 C:G 対の T:A 対への置換を試みた [1, 2]。一对の ptpTALECD (または mitoTALECD) 分子をコードする単一のベクターを作製し、これをシロイヌナズナの核ゲノムにフローラルディップ法により導入した。形質転換 T₁ または T₂ 世代から抽出した DNA を鋳型にして標的領域を含む配列を PCR で増幅し、精製 PCR 産物の塩基配列をサンガー法で解読することで、塩基置換の有無を調べた。

葉緑体ゲノムの標的一塩基置換

T₁ 世代 82 個体中、標的配列の C:G が全葉緑体ゲノムで完全置換したと見られる 35 個体が得られた。これら 35 個体中 17 個体の葉緑体ゲノム配列を次世代シーケンサー (NGS) で解読したところ、10 個体で標的塩基がアレル頻度 100% で置換された一方で、アレル頻度 10% 以上の off-target 変異は検出されず、正確な標的一塩基置換の達成が確認された。置換型の塩基は T₂ 世代に安定遺伝し、そ

の中には核ゲノムに外来遺伝子を持たない可能性の高い個体も含まれた。外来遺伝子を持たないゲノム編集個体は日本では GMO として扱われず、担当省庁への適切な情報提供後に開放系での生育が可能であるため、実用上の利点がある。また、T₂世代 1 系統 3 個体で葉緑体ゲノム配列を解読したところ、全個体で標的塩基が 100%置換された一方で、明確な off-target 変異は検出されなかった。以上より、ptpTALECD を用いて、細胞内の葉緑体ゲノムコピーの全てで標的 C:G のみが T:A に置換されたシロイヌナズナ植物体を作成できることが示された [1]。

発表者らは最近、高活性型の塩基置換ドメインを持つ ptpTALECD_v2 (以後 v2) を作製した。v2 は ptpTALECD (以後 v1) と比べて塩基置換頻度が高く、v1 が置換しにくい G や C の 3'側の C を比較的容易に置換することができるため、葉緑体ゲノムのより多くの C:G 対を置換できると期待される [3]。

ミトコンドリアゲノムの標的塩基置換

T₁世代 78 個体中、標的塩基が全ミトコンドリアゲノムで完全置換されたと見られる 33 個体が得られた。PCR 産物の配列を NGS で解読したところ、サンガー法で完全置換されたように見えた塩基 51 個中 44 個がアレル頻度 99.90%以上の割合で置換されたことが明らかとなった (野生型個体の当該塩基のアレル頻度は最大 0.07%)。置換型の塩基は T₂世代に安定遺伝し、その中には核ゲノムに外来遺伝子を持たない可能性の高い個体も含まれた。標的塩基が細胞内のミトコンドリアゲノムの全てで置換された T₂世代 4 系統 8 個体のミトコンドリアゲノム全体の配列を解読したところ、8 個体中 6 個体でアレル頻度 5%を超える off-target 変異が検出されず、また mitoTALEN 法で見られたようなゲノム構造の変化はどの個体でも検出されなかった。以上より、mitoTALECD を用いて精緻なミトコンドリアゲノム改変を達成できたことが明らかとなった [2]。

本手法の適用は核ゲノムの形質転換が可能な植物種に限られるが、葉緑体形質転換法と比べて広範な植物種の葉緑体ゲノムを改変できることが期待される。本手法は、多様なアミノ酸置換、未成熟終止コドンの導入、遺伝子発現調節領域の改変が可能であるため、植物オルガネラゲノムの基礎研究の高速化に寄与し得る。また、本手法は現在のところ情報の乏しい、作物の形質に影響する塩基多型を同定するための貴重な手段になる可能性があり、ひいてはオルガネラゲノムを利用した作物育種を実現するための基盤技術になることが期待される。

[1] I. Nakazato *et al.*, *Nature Plants*, 7, 906-913 (2021). [2] I. Nakazato *et al.*, *PNAS*, 119 (20), e2121177119 (2022). [3] I. Nakazato *et al.*, *Plant Journal*, published online (2023) <https://doi.org/10.1111/tbj.16311>