

# 立体構造情報に基づいたゲノム編集酵素の改良により、従来の酵素では編集できない位置にも変異導入が可能に

## 1. 研究の背景と開発目標

### 研究の背景と必要性

遺伝子を正確に改変するには、特定のDNA配列を切断したり、特定の塩基を入れ替える必要があります。現在広く用いられているゲノム編集酵素、SpCas9は2塩基の連続したGを目印にその近傍を切断する特性があるため、ゲノムのあらゆる位置を切断できるわけではありません。そこで、目印となる配列が異なるゲノム編集酵素が求められています。

### 技術開発目標

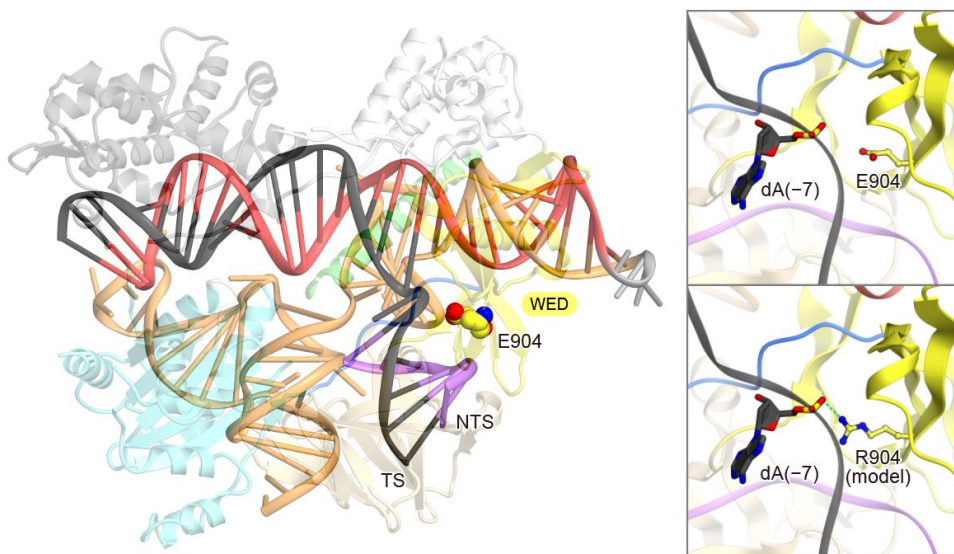
自然界にはDNAを切断するゲノム編集酵素が数多く存在しますが、個々に目印とするDNA配列が異なるため、自由自在にゲノム編集を行うには、多様な酵素を揃えておく必要があります。また、小さい酵素の方が細胞に入りやすい傾向にあるため、小型の酵素も求められています。そこで本研究では、SpCas9(1368アミノ酸)よりも小さいBCas9がDNA配列を認識するメカニズムを明らかにし、その知見に基づいた改変により、目印となる配列の制約が緩いBCas9を作ることを目指しました。

## 2. 達成した成果の概要

①土壌細菌 プレヴィバチルス属細菌がもつゲノム編集酵素、BCas9は1092アミノ酸から構成されます。BCas9とDNA複合体の立体構造を解明し、BCas9が目印とするDNA配列と、目印配列の認識に重要な役割を担うBCas9中のアミノ酸を同定しました。

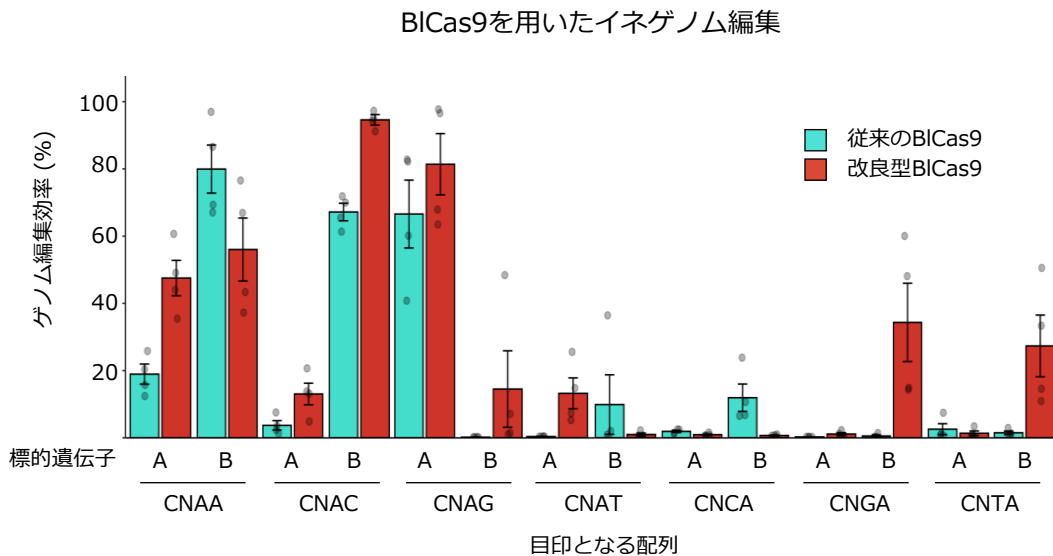
②従来のBCas9はCNDN (NはATGCいずれでもよく、DはATGのいずれか) を目印にその近傍を切断する特性を持っていました。2アミノ酸を変えた改良型BCas9では、3番目の塩基(D)による制約が緩和され、従来のBCas9では変異導入が困難であった位置にも変異を導入することができました。

### 【具体的成果】



BCas9とDNA複合体の結晶構造を高分解能で決定し、BCas9を構成するアミノ酸のうち、904番目のグルタミン酸をアルギニンに置換することでDNA切断活性が向上することがわかりました。

## 【具体的成果】（つづき）



目印配列の認識に関わる2アミノ酸を別のアミノ酸に置き換えた改良型BICas9は、従来のBICas9では編集できなかったイネゲノム中の位置にも変異を入れることができました。

### 3. 社会実装の展望と波及効果

想定されるユーザー（成果の受け渡し先）と活用方向

特定の塩基を取り除いたり入れ替えたりする技術は遺伝子を希望通りに作り変えるうえで欠かせません。本研究で開発した改良型BICas9を用いることにより、これまでは編集が困難であった場所にも変異を導入することが可能になるので、医療や農作物の改良など、幅広い分野での利用が期待されます。

社会実装の実績

特許出願済み（特願2020-512343）

今後の発展可能性と期待される波及効果

自然界に存在するゲノム編集酵素の立体構造を明らかにし、その情報に基づいて酵素を改良するアプローチの有効性を証明することができました。今後も同様のアプローチにより新たなゲノム編集酵素が開発され、さらに自由度の高いゲノム編集が可能になると期待されます。

研究課題名 : バイオ産業・農業に貢献する精密ゲノム編集基盤技術の開発  
 実施機関 : 東京大学、農研機構・生物機能利用研究部門  
 問い合わせ先 : (電話番号) 03-5841-4409 (東京大学理学系研究科  
 経理課・外部資金チーム)、  
 029-838-7419 (農研機構・生物機能利用研究部門)

# 核酸を使わずにゲノム編集を行う技術の開発に成功

## 1. 研究の背景と開発目標

### 研究の背景と必要性

ゲノム編集は農作物の社会的ニーズに迅速に対応できる画期的な品種改良技術として期待されています。しかし、これまでの技術では、ゲノム編集酵素を核酸（DNAやRNA）の形で細胞内に入れる方法が一般的であり、ゲノム編集作物の実用化には、それらの核酸を取り除くことが求められてきました。植物種にもよりますが、一度入った核酸を取り除くことは難しいのですが、最初から核酸を使用しない技術があればこの問題は解決します。

### 技術開発目標

ゲノム編集酵素の一種であるTALENsタンパク質を直接細胞に導入する方法によってゲノム編集植物の作出を目指します。この方法が成功すれば、遺伝子組換え技術を使わずに、ゲノム編集植物を作出するという画期的な方法論が確立されます。

## 2. 達成した成果の概要

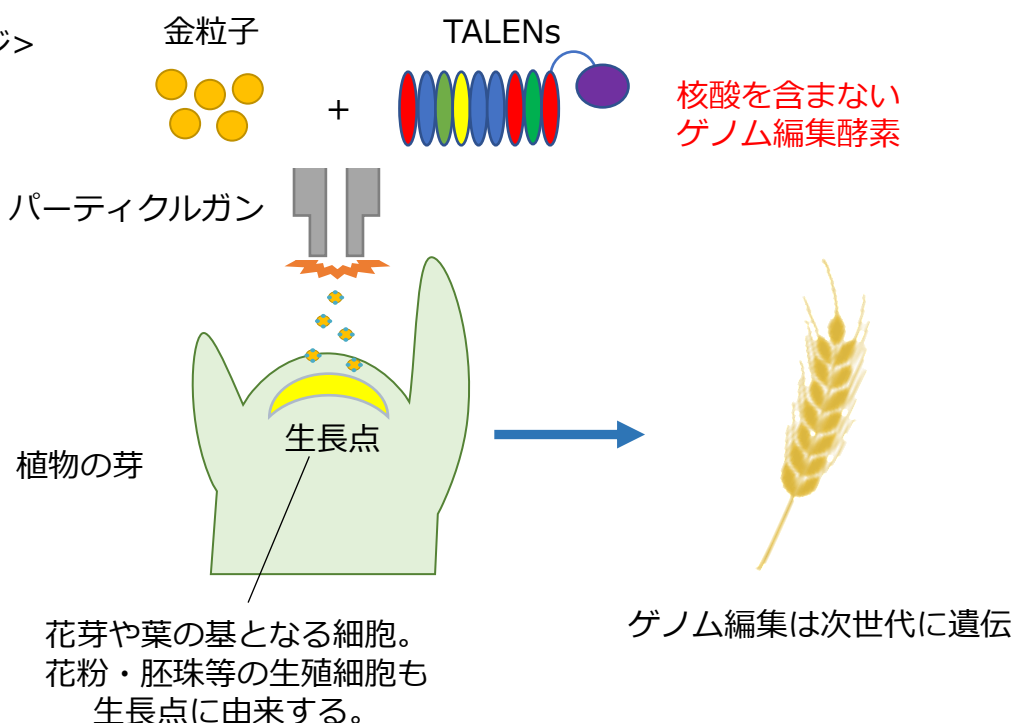
①SIP第1期において開発したゲノム編集個体作出技術in planta Particle Bombardment (iPB) 法と、核酸を含まないゲノム編集酵素のTALENsを組み合わせ、核酸を使わないゲノム編集技術iPB-TALEN法を開発しました。

②金粒子にTALENsタンパク質を付着させ、パーティクルガン装置（空気銃）を用いてコムギの花芽や葉の基となる細胞（生長点）に撃ち込みました。倒れやすさの原因となっているSD1遺伝子を編集するTALENsタンパク質を用いたところ、期待通りのゲノム編集が確認され、世界で初めてタンパク質のみを用いてゲノム編集個体を作成することに成功しました。

### 【具体的成果】

### iPB-TALEN法

<研究イメージ>

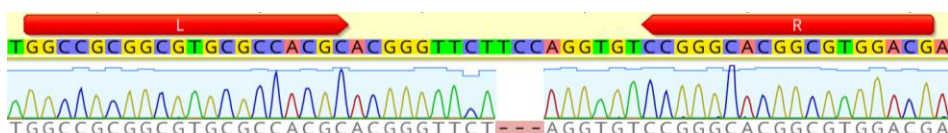


## 【具体的成果】（つづき）

## SD1遺伝子の変異解析



①の個体では3塩基の欠失が検出された



タンパク質のみからなるゲノム編集酵素、TALENsを用いて、倒れやすさに関するSD1遺伝子を改変することに成功しました。

### 3. 社会実装の展望と波及効果

想定されるユーザー（成果の受け渡し先）と活用方向

育種企業、食品、原材料メーカー等、ゲノム編集技術の育種利用、商品開発に興味がある民間セクターに対して技術提供が可能になります。また大学等の学術研究機関に対しては、遺伝子機能解明等の基礎科学研究への活用等が考えられます。

社会実装の実績

なし

今後の発展可能性と期待される波及効果

ゲノム編集作物開発の新しいプラットフォームとなり、さまざまな作物において利用拡大が期待されます。ゲノム編集作物の社会受容性を向上させる展開が期待され、これまで消極的であった食品企業等への浸透が進むと期待されます。

研究課題名 : バイオ産業・農業に貢献する精密ゲノム編集基盤技術の開発  
 実施機関 : 農研機構・生物機能利用研究部門  
 問い合わせ先 : (電話番号) 029-838-7419 (農研機構・生物機能利用研究部門)

# ウイルスベクターの接種による組織培養不要なゲノム編集法

## 1. 研究の背景と開発目標

### 研究の背景と必要性

従来の植物ゲノム編集法では、ゲノム編集酵素あるいはゲノム編集酵素をコードする遺伝子を植物細胞に導入した後、ゲノムが編集された細胞を培養し、植物個体を再生させる必要があります。しかし、組織培養により植物個体再生が可能な植物種は限られているため、ゲノム編集が適用できない植物が多く存在します。そこで、組織培養を介さずに植物のゲノム編集を行う技術が求められていました。

### 技術開発目標

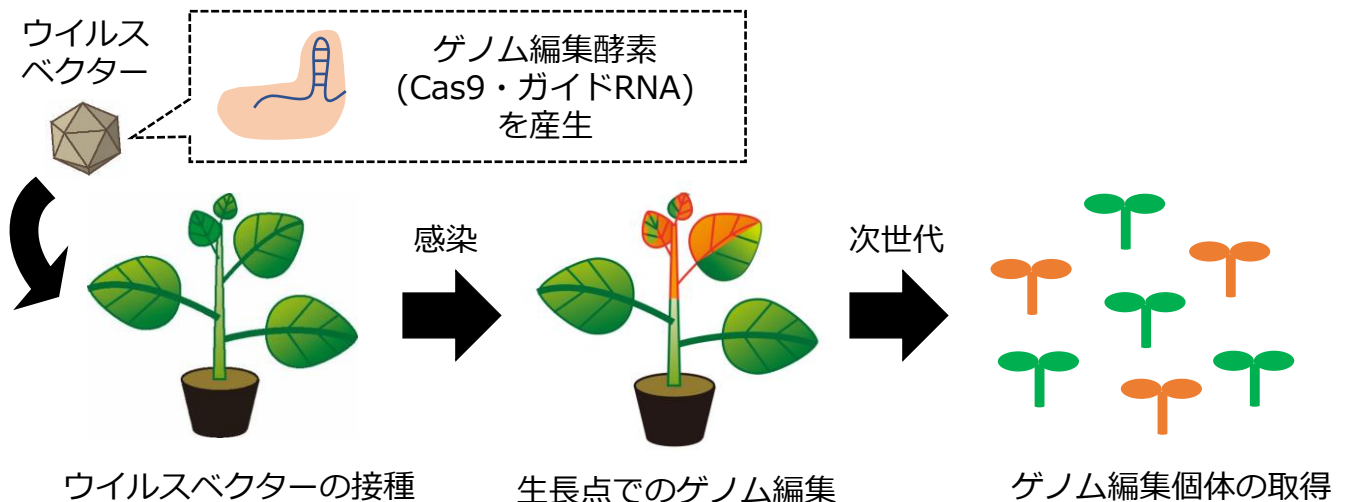
組織培養が不要なゲノム編集法の確立を目指して、植物の茎の先端にあり細胞分裂をしている組織（生長点）に侵入してゲノム編集酵素を発現するウイルスベクターの開発を試みました。

## 2. 達成した成果の概要

- ①植物ウイルスは一般に、植物の生長点には侵入できないことが知られています。このため、既存技術では、ゲノム編集酵素を発現するウイルスベクターを感染させた葉などの植物組織から組織培養により個体を再生する必要がありました。
- ②例外的に生長点に侵入可能である植物ウイルスのタバコ輪点ウイルス（TRSV）をベクターとして用いることにより、ナス科モデル植物であるベンサミアナタバコの生長点の細胞においてゲノム編集酵素の発現が可能になり、生長点のゲノム編集に成功しました。
- ③当該ウイルスベクターの接種により導入された変異は次世代個体に遺伝しました。したがって、ウイルスベクターを接種した植物から種子を得るだけで、組織培養を経ることなくゲノム編集個体を得ることができるようになりました。
- ④次世代個体において低頻度でウイルスが残存する個体が認められましたが、ウイルスフリー個体も容易に選抜することができました。

### 【具体的成果】

#### <研究イメージ>



## 【具体的成果】（つづき）



緑色色素の合成に関わる遺伝子を改変するためのウイルスベクターを接種したベンサミアナタバコの側枝から薄緑色の枝が出てきました。



ウイルスベクターを接種した植物体から得られた種を蒔いたところ、ゲノム編集によって白化した個体が得られました。

### 3. 社会実装の展望と波及効果

想定されるユーザー（成果の受け渡し先）と活用方向

現在、組織培養が困難なためにゲノム編集が適用できない植物が多く存在します。本成果はそのような植物においてゲノム編集を行いたいと考える研究者の利用が想定されます。

社会実装の実績

特許出願済み（特願2022-101150）。

今後の発展可能性と期待される波及効果

本成果はモデル植物であるベンサミアナタバコを用いたものであり、各種作物への適用に向けては条件検討が必要と考えられますが、これまでゲノム編集が適用できなかった植物のゲノム編集を可能にし得るものと期待されます。また、非常に簡便な方法であることから、組織培養を介したゲノム編集が可能な植物も含めて、植物の新たなゲノム編集法として広く利用が見込まれます。

研究課題名 : バイオ産業・農業に貢献する精密ゲノム編集基盤技術の開発

実施機関 : 農研機構・生物機能利用研究部門

問い合わせ先 : (電話番号) 029-838-7419 (農研機構・生物機能利用研究部門)

# メロンの高効率なゲノム編集に成功 ～実用形質の改良が可能に～

## 1. 研究の背景と開発目標

### 研究の背景と必要性

ゲノム編集技術を用いた作物の改良は世界中で進められていますが、メロンに関しては、従来法ではゲノム編集効率が極めて低く、汎用的なゲノム編集技術の確立には至っていませんでした。問題点の一つとして、ゲノム編集細胞から植物体を再生させる組織培養の困難さがありました。そこで本研究では、農研機構と(株)カネカが共同で開発した「花芽や葉の基となる細胞(生長点)を直接ゲノム編集する新しいゲノム編集技術(iPB法)」のメロンへの適用を試みました。

### 技術開発目標

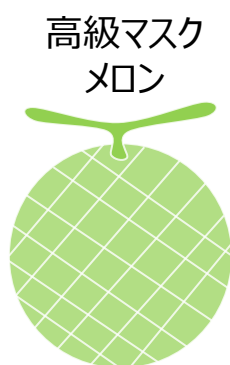
高効率なゲノム編集技術の開発と販売者ニーズの高い高日持ち性メロンの作出を目指します。

## 2. 達成した成果の概要

- ① iPB法をメロン(高級マスクメロンの標準品種「アールスフェボリット春系3号」)に適用し、ゲノム編集酵素を生長点に打ち込むことにより、従来法よりも高い効率でゲノム編集個体を得ることに開発に成功しました。
- ② 果実を成熟させる植物ホルモン(エチレン)を作る遺伝子をゲノム編集により改変したメロンでは、収穫後に果実から放出されるエチレン量が著しく減少しており、日持ち性の向上が確認されました。
- ③ 本研究の成果から、iPB法によりメロンの実用形質の改良が可能であることが明らかとなりました。

### 【具体的成果】

#### <研究イメージ>



日持ち性が短い

iPB法による  
ゲノム編集  
→  
エチレンを作る  
遺伝子を改変

エチレンガスにより、成熟時期  
をコントロールすることが可能に



日持ち性が向上

エチレン：果実を成熟させる植物ホルモン

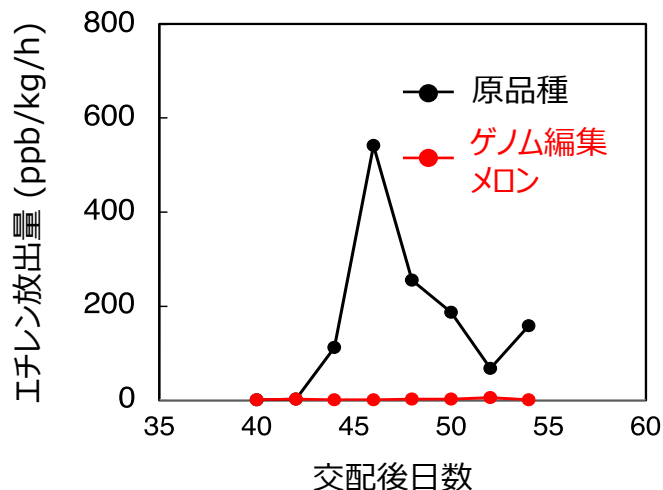
収穫後10日目の果実



原品種

ゲノム編集メロン

ゲノム編集メロンの果実は緑色の外観を維持し、日持ち性の向上が確認できました。



ゲノム編集メロンは果実を成熟させる植物ホルモンであるエチレンを放出しないことが確認できました。

### 3. 社会実装の展望と波及効果

想定されるユーザー（成果の受け渡し先）と活用方向

メロン等のウリ科作物を育種・販売する種苗会社等に対して、従来育種では困難であった形質を迅速に改良する手法を提供することが可能になります。また、社会需要性が高い品種開発への利用が期待されます。

社会実装の実績

今後、民間企業との共同開発による高日持ち性メロンの社会実装を目指します。

今後の発展可能性と期待される波及効果

本技術を用いたウリ科作物（メロン、スイカ、キュウリ、カボチャ等）の健康機能性や病害抵抗性の改良が可能となり、高付加価値化や輸出拡大への貢献が期待されます。

研究課題名 : バイオ産業・農業に貢献する精密ゲノム編集基盤技術の開発  
 実施機関 : 農研機構・生物機能利用研究部門、筑波大学  
 問い合わせ先 : (電話番号) 029-838-7419 (農研機構・生物機能利用研究部門)、  
 029-853-2542 (筑波大学つくば機能植物イノベーション研究センター)