

## 植物ゲノム編集ツールの拡充 —改良型 Cas9 を用いた植物ゲノム編集—

試験研究計画名：ゲノム編集技術の普及と高度化

研究代表機関名：国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

### 背景とわらい：

CRISPR/Cas9 システムにおいては、Cas9 が認識する PAM 配列がゲノム編集可能な位置の制約となります。タンパク質の立体構造情報に基づいて東京大学が PAM 認識を改良した SpCas9 を植物のゲノム編集に利用し、変異導入位置の制約低減に成功しました。また、神戸大学が開発したデアミナーゼや米国で開発されたアデニンベースエディターと改良型 SpCas9 を融合させ、狙った塩基を計画通り書き換えることに成功しました。

### 特長と効果：

野生型 SpCas9 (SpCas9-WT、図 1A) は NGG を PAM 配列として認識し、配列 GG が存在する箇所の近傍を切断します。野生型 SpCas9 にアミノ酸置換を導入した改良型 SpCas9 (SpCas9-NGv1、図 1B) は、配列 G : NGA、NGT、NGC の近傍も切断できる画期的な技術 (図 2) であり、ゲノム編集可能位置の制約が大幅に低減されました。またオフターゲットの切断も SpCas9-WT よりも低く、精度も向上しました (図 3)。

さらに切断だけではなく、この改良型 SpCas9-NGv1 をニッカーゼ型にし、塩基修飾酵素を融合させたタンパク質 (図 1C) を用いることにより、NG 近傍に C から T あるいは A から G への塩基置換を導入することができます (図 4)。

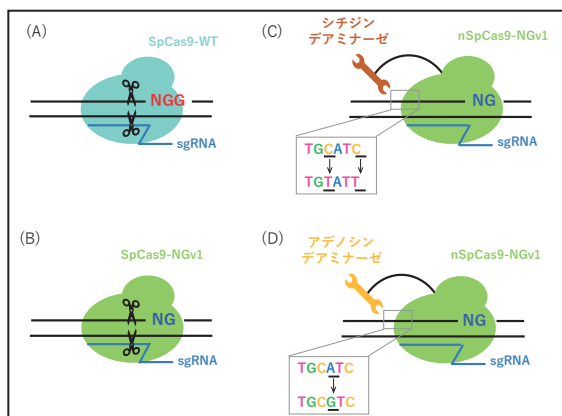


図 1 改良型 SpCas9 を用いたゲノム編集ツール

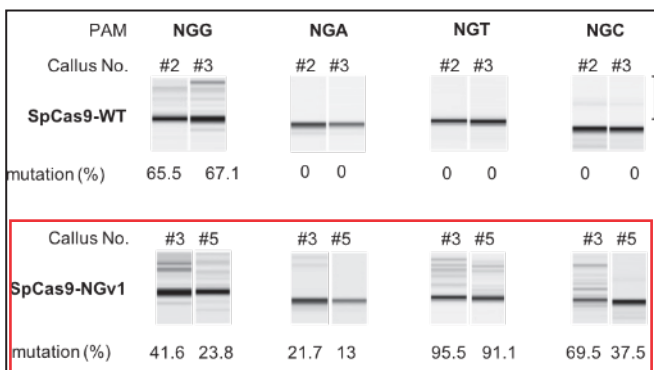


図 2 SpCas9-NGv1 によるイネへの変異導入

Locus Name	Target sequence (20-nt)	PAM	Chromosome
NGG-Off1	TAAATCCTAGCTACGCCAC	TGG	Chr.1
NGG-Off2	TAAATCCTAGCTACGCCAC	TGG	Chr.9
NGG-Off3	TTAAATCCTAGCTAAGCCAC	TGG	Chr.12

	NGG-Off1		NGG-Off2		NGG-Off3	
Callus No.	#2	#3	#2	#3	#2	#3
SpCas9-WT						
Mutation (%)	26	12.5	34.7	33.3	0	0
SpCas9-NGv1						
Mutation (%)	0	0	0	0	0	0

図 3 SpCas9-WT、SpCas9-NGv1 間の off-target 効率の比較

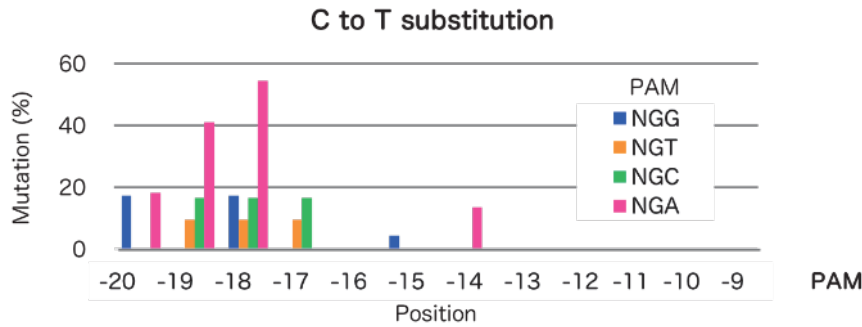


図4 SpCas9-NGv1、デアミナーゼ融合タンパク質を用いたCからTへの塩基置換

### 社会実装の対象と可能性:

機能付与型の遺伝子改変の中には、遺伝子破壊ではなく、アミノ酸置換により達成されるものも多くあります。狙った塩基をピンポイントで改変できる技術は、日持ち性の向上や、機能性成分の増加、除草剤耐性の付与など、生産者、消費者にとってメリットのある農産物の開発に有効であるため、種苗会社やバイテク関連の企業による利用が期待されます。

改良型 SpCas9 を用いれば、遺伝子破壊のみならず、特定のアミノ酸や、機能的なドメインの改変が可能となり、遺伝子やタンパク質の機能解明に役立ちます。生物の基礎研究を行っている大学等の研究機関における活用も考えられます。

### 参考文献:

- ・ 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. Biotech.* 35 (5):441-442.
- ・ Endo et al. (2019) Genome editing in plants by engineered CRISPR/Cas9 recognizing NG PAM. *Nat. Plants* 5 (1):14-17.
- ・ Negishi et al. (2019) An adenine base editor with expanded targeting scope using SpCas9-NGv1 in rice. *Plant Biotechnol. J.* 2019 Apr 8. doi: 10.1111/pbi.13120.

**研究担当機関名:** 東京大学、神戸大学、農研機構 生物機能利用研究部門、

**研究担当者:** 東京大学 西増弘志、濡木理、 神戸大学 西田敬二、島谷善平、  
農研機構 遠藤真咲、根岸克弥、賀屋秀隆、土岐精一

**問い合わせ先:** 国立研究開発法人 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  
電話: 029-838-8450 E-mail: stoki@affrc. go. jp

作成日: 2019/04