

TALENを用いたゲノム編集による植物代謝改変

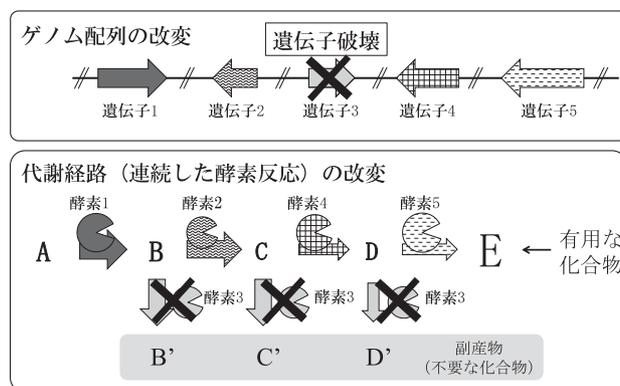
安本 周平・關 光・村中 俊哉*

植物は、多種多様な特化代謝（二次代謝）産物を産生する。その数20万種から100万種にも及ぶと言われ、医薬品、機能性食品、香料、工業原料などとして利用されている。その一方で、毒物、麻薬など、ヒトの健康を蝕むものも含まれる（図1）。そのため、特化代謝物を有効利用するために、特化代謝物の代謝をいかに制御するかが重要である。近年、ゲノミクス、メタボロミクス技術の発展に伴い、その生合成を包括的に理解し、改変する技術が急速に展開してきた¹⁾。目的とする特化代謝物を増産させたい場合、その生合成に関わる酵素遺伝子を過剰発現させることにより、目的産物を増加させることが原理的に可能である。一方、ある特化代謝物の生体内での機能を調べるため、あるいは、毒性物質生産を回避し有用物質生産するためには、その代謝経路を「遮断」する必要がある（図2）。しかしながら、高等植物の場合、特定の遺伝子をターゲットして破壊することは、これまで実質上不可能であった。ところが、ここ数年、ゲノム編集技術が急速に進み、TALEN, CRISPR/Casなどのゲノム編集ツールが生まれてきた²⁾。ここでは、これら新しいゲノム編集技術を植物の代謝改変に適用する私たちの試みについて紹介する。

人工ヌクレアーゼTALENによるゲノム改変

Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) は植物病原菌 *Xanthomonas* spp. が生産する TAL effector のDNA結合ドメインと *FokI* ヌクレアーゼのDNA切断

ドメインを融合した人工ヌクレアーゼである。DNA結合ドメインは34アミノ酸の繰り返し配列からなり、1リピートが標的DNAの1塩基を認識する。繰り返し配列中の12, 13番目のアミノ酸はrepeat variable di-residues (RVD) と呼ばれ、この配列によって標的塩基が決定される。このリピートを並び替えることで任意の標的配列に結合可能なDNA結合ドメインを作製できる。図3のように二組のTALEN分子がゲノム上の特定の配列上に向き合うように設計することで、標的配列上で *FokI* ドメインが二量体化しヌクレアーゼ活性を示す。切断されたDNA二重鎖は細胞内在の機構によって修復されるが、そ



ゲノム上の「遺伝子3」を破壊することで、副産物 (B', C', D') を生産せず、目的化合物 (E) を大量に生産させることが可能。

図2. ゲノム配列の改変による代謝経路の「遮断」

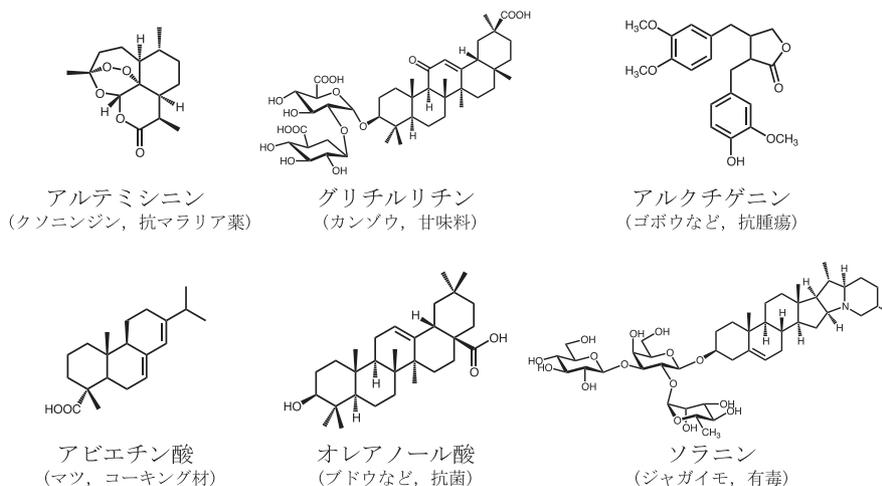


図1. 植物が生産する特化代謝産物

* 著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 (教授) E-mail: muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

の際標的配列上に欠損や挿入などの変異が導入される³⁾。

TALENの利用による重複した遺伝子破壊

モデル植物であるシロイヌナズナは、初めて全ゲノム配列が解読された高等植物であり、世代時間が短く、*Agrobacterium*を用いた形質転換系が確立されているため、植物の生理学的研究において実験材料として広く利用されている。植物は通常条件では相同組換えの頻度が低く、導入された外来遺伝子はゲノム上にランダムに挿入されるため、特定遺伝子の破壊が困難であるが、モデル植物であるシロイヌナズナはT-DNAやトランスポゾンなどの外来遺伝子の挿入によって特定の遺伝子機能が破壊された変異体をバイオリソースから得ることが可能である。

植物のゲノム上には機能重複が予想される多数の相同遺伝子が見られる。これらの相同遺伝子の機能を推定するためには、すべての相同遺伝子を破壊した多重変異体を一重変異体の掛け合わせなどによって作出する必要がある。しかし、これらの相同遺伝子が同一染色体上の近接した位置に存在する場合、一重変異体の掛け合わせによって、目的の多重変異体を得ることはかなり困難である。

CYP716ファミリーに属する一部のシトクロムP450酵素タンパク質は、植物界に広く存在するオレオノール酸の生産に関与することが知られている⁴⁻⁶⁾。オレオノール酸は抗炎症、抗がん作用など多様な生理活性を示すことが知られているトリテルペノイドであるが、植物内での機能についてはほとんど明らかとなっていない。

シロイヌナズナは第5染色体上の近接した位置に二つのCYP716Aサブファミリー酵素遺伝子、CYP716A1、CYP716A2を保持している。モデル植物であるシロイヌナズナ内でのCYP716Aサブファミリー酵素遺伝子、ならびに、オレオノール酸の植物内での機能を検証するためにはCYP716A1、CYP716A2両遺伝子が破壊された二

重変異体を作成することが必要となることが予想される。そこで私たちは、T-DNA挿入により作出された*cyp716a1*変異体にCYP716A2遺伝子を標的配列とするTALEN発現ベクターを導入し、*cyp716a1/cyp716a2*二重変異体の作出を試みた。現時点では、一ラインの*cyp716a1/cyp716a2*二重変異体を得られており、現在さらに多くの変異体の作出を進めている(図4、詳細は文献2の14章「植物(シロイヌナズナ)におけるTALENを用いた遺伝子改変」を参照していただきたい)。

作物ゲノム育種へのTALENの利用

人工ヌクレアーゼであるTALENは植物ゲノム上の特定の遺伝子を破壊することが可能であり、これまで困難であった作物の特定遺伝子の破壊が可能となりつつある。実際に、病原菌への耐性を向上させたイネや、脂肪酸組成を改変したダイズなどがTALENの利用によって作出されている^{7,8)}。

私たちの研究グループはナス科に多く含まれるステロイドグリコアルカロイド(SGA)の生合成に関与する酵素遺伝子群の探索・機能解析を行ってきた。ジャガイモの*Sterol side chain reductase 2*(SSR2)はSGA生合成の出発物質であるコレステロール生合成に関与する酵素遺伝子として同定された⁹⁾。SGAはヒトに対して毒

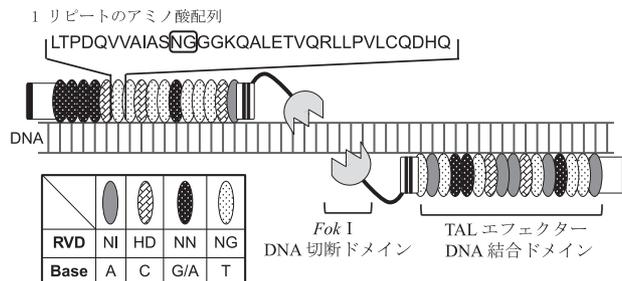


図3. TALENによる標的配列の認識

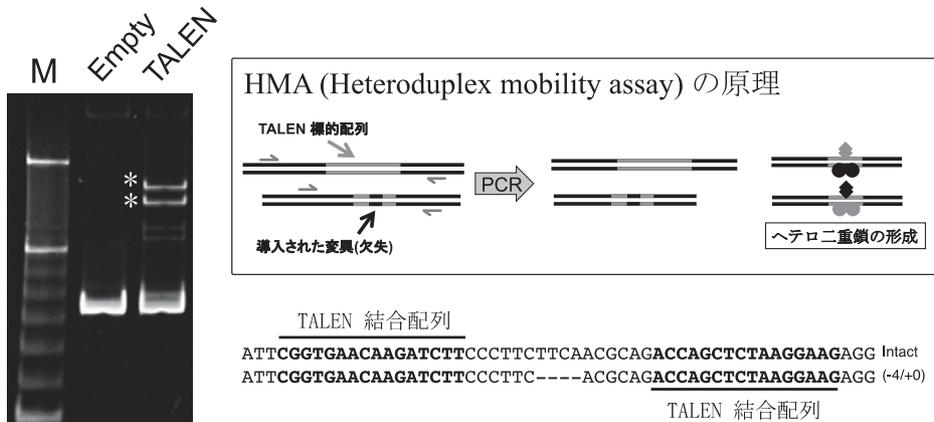


図4. シロイヌナズナ標的遺伝子(CYP716A2)への変異導入の確認。TALENを導入した個体(T1)において標的配列への変異(欠損)導入が確認された。

性を示す特化代謝物であり、ジャガイモ中のSGA含量を低減させることは食品安全上重要である。そこで私たちは、TALENによるSSR2遺伝子の破壊による低SGAジャガイモの育種を目指した。

現在栽培されているジャガイモの多くは四倍体であり、ゲノム上に標的遺伝子であるSSR2遺伝子を4アレル保持しているため、SGAを低減させたジャガイモを作出するためには、すべてのSSR2アレルを破壊する必要がある。重イオンビームやEMSなどの変異原を用いることでゲノム上にランダムに変異を導入し、一つのSSR2アレルに変異を導入することは可能であるが、四つすべてのアレルに変異を導入することは困難である。また、ジャガイモはSSR2と高い相同性を示し、植物の生長に必須な植物ステロールの生合成に関与すると予想されるSSR1遺伝子を保持しており、SSR2の破壊過程においてSSR1が破壊された場合、植物体の成長に悪影響が予想される。そのため、SSR1に影響を与えず、SSR2を特異的に破壊するためには、高い認識配列特異性をもった人工ヌクレアーゼが必要となる。

まず、SSR2遺伝子を認識・切断可能なTALENを設計し、エストラジオール誘導型プロモーターによるTALEN発現バイナリーベクターを作製し、このTALEN発現ベクターを*Agrobacterium*法によってジャガイモへ導入した。得られた形質転換体をエストラジオールで処理後、ゲノムDNAを抽出しPCRによりTALEN標的配列を含む領域を増幅させた。PCR産物をポリアクリルアミドゲルにより分離したところ、いくつかの形質転換体において変異導入によって生じるヘテロ二重鎖を示唆するエクストラバンドが検出された。これらのPCR産物についてベクターヘクローニング後、配列を確認したところ、TALEN標的配列への変異導入が確認された。そのほとんどは数塩基から数十塩基の欠損であった。そのうちの一つの形質転換体からは変異が導入されていないSSR2遺伝子が検出されず、すべてのSSR2アレルへの変異導入が示唆された。一方、TALEN標的配列と高い相同性を示すSSR1には変異導入は検出されなかった。さらに、このTALEN形質転換体についてSGA含量を測定したところ、非形質転換体と比較してSGA含量が大幅に減少していることを示すデータが得られた⁹⁾。以上のことから、四倍体作物であるジャガ

イモにおいて人工ヌクレアーゼTALENによる標的遺伝子の選択的な破壊ならびに代謝改変が可能であることが示された。

今後の展望

以上のように人工ヌクレアーゼTALENはモデル植物の基礎的な生理学研究から、実用作物の代謝改変まで幅広く応用することが可能である。現時点ではゲノム改変したジャガイモ植物体は選抜マーカーやTALEN発現カセットなどの外来遺伝子を保持している遺伝子組換え植物である。しかし、交配などによって外来遺伝子を持たないが標的配列に変異が導入された個体を選抜することで、目的の形質を保持した非組換え体を得ることが可能となると予想される(図5)。また、標的配列の認識にDNA結合ドメイン(タンパク質)を用いるTALENとは異なり、ガイドRNAによって標的配列が指定されるCRISPR/Casシステムの利用が爆発的に広がっている。このシステムは発現ベクターの作製が容易である一方、非標的配列にも変異が導入される頻度が高いことが知られており、今後植物のゲノム改変を行う際はTALEN、CRISPR/Casなどそれぞれの特性を理解した上で最適なシステムを選択していく必要がある。

謝 辞

共同研究者である広島大学・山本卓教授、佐久間哲史特任助教、理化学研究所環境資源科学研究センター・斉藤和季副センター長、澤井学研究員、東京工業大学・大山清助教、キリン株式会社基盤技術研究所・梅基直博士に感謝致します。

文 献

- 1) Muranaka, T. and Saito, K.: *Plant Cell Physiol.*, **54**, 645 (2013).
- 2) 山本 卓編集:今すぐ始めるゲノム編集, 羊土社(2014).
- 3) Christian, M. *et al.*: *Genetics*, **186**, 757 (2010).
- 4) Fukushima, E. O. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **52**, 2050 (2011).
- 5) Huang, L. *et al.*: *Planta*, **236**, 1571 (2012).
- 6) Han, J. Y. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **54**, 2034 (2013).
- 7) Li, T. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **30**, 390 (2012).
- 8) Haun, W. *et al.*: *Plant Biotechnol. J.*, DOI: 10.1111/pbi.12201 (2014).
- 9) Sawai, S., Ohyama, K. *et al.*: *Plant Cell*, DOI: 10.1105/tpc.114.130096 (2014).

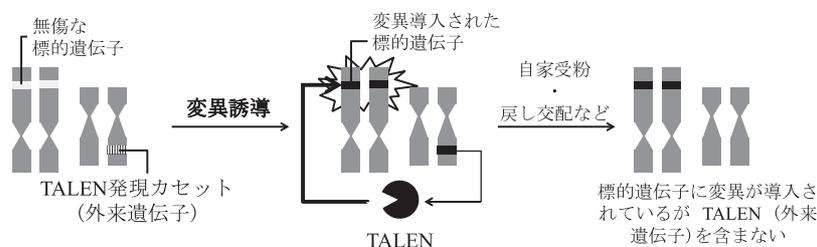


図5. TALENを用いた外来遺伝子を持たない遺伝子改変植物の作製