

2023年9月7日

報道解禁制限あり【9月7日18時解禁】

国立研究開発法人 産業技術総合研究所／凸版印刷株式会社／株式会社インプラントイノベーションズ

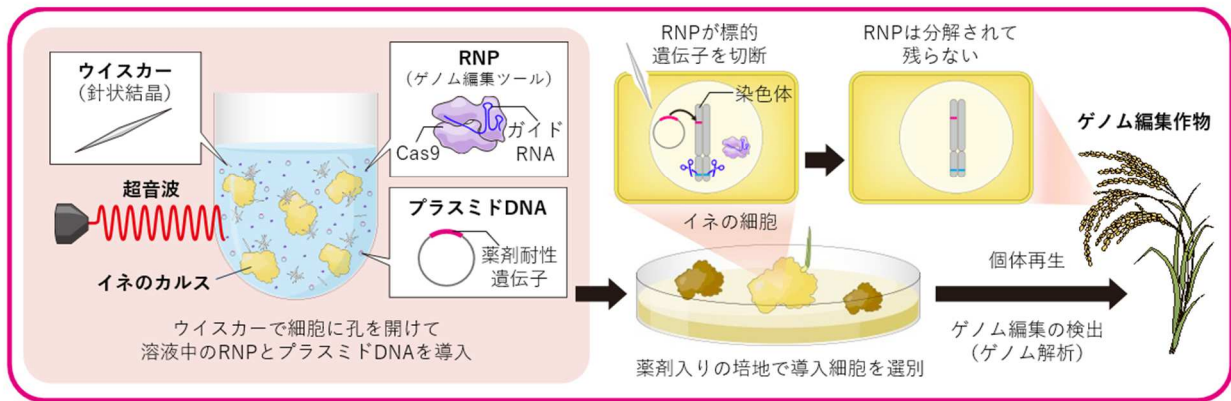
## 植物における新しいゲノム編集技術の開発に成功

針状結晶「ウイスキー」を用いた新しい分子導入技術でゲノム編集作物のより効率的な作製を可能に

### ポイント

- 針状結晶を超音波で振動させ植物細胞に孔をあけてゲノム編集ツールを導入、ウイスキー超音波 RNP 法と命名
- 生育環境変化によるストレスに強い作物や付加価値の高い作物の開発に貢献する技術
- 外来 DNA を使わない植物ゲノム編集技術への新たな一歩

### ウイスキー超音波RNP法



開発したウイスキー超音波 RNP 法の概要図

### 概要

国立研究開発法人 産業技術総合研究所（以下「産総研」という）生物プロセス研究部門 植物機能制御研究グループの中村彰良および菅野茂夫の両主任研究員らは、凸版印刷株式会社（以下「凸版印刷」という）と株式会社インプラントイノベーションズ（以下「インプラント」という）と共同で、チタン酸カリウムからなる針状結晶（ウイスキー）と超音波を活用して、ゲノム編集ツールである CRISPR-Cas9 のリボヌクレオタンパク質（RNP）を植物へ導入する新しいゲノム編集手段として、ウイスキー超音波 RNP 法を開発しました。

いままでの研究で、マイクロサイズのウイスキーという「針」を用いて、植物細胞に孔を直接開け、DNA を導入する技術は知られていました。しかし、ゲノム編集ツールの RNP を導入可能かは明らかになっていませんでした。本研究では、RNP を導入できる条件を見だし、ゲノム編集イネを作成しました。ウイスキーによるゲノム編集ツールの植物への導入手法は、細菌を利用した遺伝子導入手法に比べて、植物の生物学的特性に依存する度合いが低いため、さまざまな植物種において、RNP を用いてゲノム編集の実施が可能になります。ウイスキー超音波 RNP 法を用いると、DNA を全く用いずにイネ細胞のゲノム編集ができることも明らかになりました。

本編集技術は、一般的に形質転換が難しい植物に対して、DNA を全く用いないでゲノム編集を行う基盤を構築する新たな一歩です。

なお、この技術の詳細は、2023年9月7日（日本時間）に「*Scientific Reports*」に掲載されます。

下線部は【用語解説】参照

## 開発の社会的背景

地球温暖化や食糧問題が注目される中、持続可能な社会の実現には、これまで以上に植物の力を活用することが必要です。そこで、植物を改良するためのゲノム編集技術に、期待が集まっています。植物におけるゲノム編集では、植物に感染性をもつ細菌であるアグロバクテリウムを使用して、編集対象を指定するガイド RNAやゲノム編集ツール Cas9 を細胞内で発現させる DNA を細胞に導入することが一般的でした。しかし、アグロバクテリウムを用いる場合、植物のゲノムに DNA を組み込むため、植物に対して予期しない問題を引き起こす可能性があります。また、社会的リスクの観点から、植物感染性の細菌を使用することは、一部の国では制限されています。このような背景から、できるだけ DNA を使わず、アグロバクテリウムも使わない植物のゲノム編集技術が求められています。いままでは、いくつかの手法が考案されてきましたが、これらは高度な技術の蓄積を必要とするため、本格的な普及には至っていません。

## 研究の経緯

産総研は、植物の機能を改良する研究開発において、遺伝子組み換えにより、もともと植物が持っている遺伝子の機能を制御することを主な実現手段としています。例えば、おしべやめしべを作る遺伝子の機能を抑えることによる多弁咲シクラメン（2010年3月16日 産総研プレス発表）、葉の表面にある気孔の開閉を制御してオゾン耐性のある植物（2016年3月29日 産総研プレス発表）などを開発してきました。

上記の成果を社会実装するには、遺伝子組み換えだけでなく、ゲノム編集技術が有効です。その結果、植物における新たなゲノム編集技術である超音波ウイスキー-RNP 法を開発するに至りました。

## 研究の内容

2005年に開発されたウイスキー超音波法（Terakawa et al., 2005）は、直接的に DNA を植物細胞内に届ける技術であり、ダイズやイネ、トウモロコシ、ゴム、トレニアなどさまざまな植物種に適用可能です。本手法は、イネの胚などに由来する細胞の塊を対象として、細長い針状結晶であるウイスキーを使い、細胞に孔をあけて遺伝子を導入します（ポイント概要図）。ウイスキーと細胞の塊を混ぜ合わせる際に、超音波をかけることで、遺伝子導入の効率が上がります。本手法は、アグロバクテリウム法（生物的手法）とは異なり、直接的に細胞に孔をあけるため、さまざまな植物に適用できるのが特徴です。しかし、今までの事例では遺伝子（DNA）の導入のみが行われており、タンパク質やその他の分子を植物に導入できるかは分かっていませんでした。

産総研と凸版印刷、インプラントは、イネを研究材料として、まず初めにウイスキー超音波法がタンパク質と RNA から構成されるゲノム編集ツールの導入に適用可能かを検証しました。産総研が所有するタンパク質および RNA の大量調製技術によって、イネ PDS 遺伝子を破壊するように設計したガイド RNA および Cas9 タンパク質を準備しました。これらからリボヌクレオタンパク質（RNP）を作製後、インプラントが実績を有するウイスキー超音波法で RNP の植物細胞への導入が可能かを調べました（ポイント概要図）。薬剤耐性遺伝子をもつプラスミド DNA と

RNP を同時にイネの胚由来の細胞塊へ導入し、RNP が導入された細胞を薬剤により選抜しました。さまざまな RNP 濃度を調製し、薬剤で選抜されたイネの細胞を調べたところ、ある濃度でゲノム編集効率が上がり、アグロバクテリウム法と同程度の効率でゲノム編集イネを作出できることがわかりました。RNP 濃度を最適化したこのゲノム編集方法を“ウイスキー超音波 RNP 法”と命名しました。

次に、ウイスキー超音波 RNP 法が今までゲノム編集が試みられていない遺伝子においても適用可能かを調べるために、カロテノイド合成系遺伝子であるイネ LCYB 遺伝子のゲノム編集による破壊を実施しました (図1)。ウイスキー超音波 RNP 法を用いて、RNP および薬剤耐性遺伝子発現プラスミド DNA を同時に導入した細胞では、ゲノム編集が見られるとともに、リコピンの蓄積量が増え、赤色の色素が沈着していることがわかりました。本結果は、イネ LCYB 遺伝子がゲノム編集により破壊された場合に、イネでリコピンが蓄積することを示した初めての例になります。イネ LCYB 遺伝子は、リコピンから  $\beta$  カロテンを合成する際に必要な遺伝子と考えられており、その実証ができたと言えます。



図1 ウイスキー超音波 RNP 法を使用して作製したイネ LCYB 変異体とその色素沈着の様子

※原論文の図を引用・改変したものを使用しています。

最後に、薬剤耐性遺伝子プラスミド DNA を同時導入せず、ウイスキー超音波 RNP 法によりゲノム編集ができるかを調べました。イネ PDS 遺伝子を対象としたガイド RNA を含む RNP のみをウイスキー超音波 RNP 法によって導入し、凸版印刷提案の次世代シーケンスでゲノムを調べたところ、低効率 (0.3%程度) ではあるものの、ゲノム編集が検出されました。この結果は、ウイスキー超音波 RNP 法を用いると、DNA を全く導入せずに、植物のゲノム編集を実施できる可能性を示しています。今後、薬剤耐性分子を RNP と同時に加えるなどの方法によって、効率の改善が期待できます。DNA を全く用いないゲノム編集は、植物のゲノムに対して予期せぬ遺伝子組み換えが起こる可能性を最小化するため、社会受容性が高い技術として注目を集めています。本研究成果は、DNA を使わない植物ゲノム編集技術への新たな一歩です。

## 今後の予定

ウイスキー超音波法は、さまざまな植物種に適用可能なことが知られています。したがって、ウイスキー超音波 RNP 法も多くの植物種におけるゲノム編集技術となり得ます。

今後は、ウイスキー超音波 RNP 法によるゲノム編集をダイズやムギ、トウモロコシなどの穀類および牧草や各種樹木などのゲノム編集が困難な品種に適用し、遺伝子機能の解明に貢献します。また、DNA を全く用いないゲノム編集の効率を高めることで、社会にとって安心・安全なゲノム編集品種の作製のための技術基盤を提供します。

## 論文情報

掲載誌： *Scientific Reports*

論文タイトル：The sonication-assisted whisker method enables CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery to induce genome editing in rice

著者：Akiyoshi Nakamura, Tsubasa Yano, Nobutaka Mitsuda, Maiko Furubayashi, Seiichiro Ito, Shigeo S. Sugano, Teruhiko Terakawa

DOI： 10.1038/s41598-023-40433-w

## 関連特許

「植物のゲノムを編集する方法、それを用いてゲノム編集された植物体及び植物種子、並びにそれらの製造方法」

国際出願番号：PCT/JP2022/043204

出願日：2022年11月22日

## 用語解説

### ウイスキー

細長い針状結晶で、植物細胞に「刺して」孔をあけるために使われる。直径数マイクロメートル、長さ 100 マイクロメートル程度の大きさで、炭化ケイ素やチタン酸カリウムなどの素材が用いられる。本研究では、チタン酸カリウムのウイスキーを用いた。

### CRISPR-Cas9 (クリスパーキャスナイン)

ゲノム編集因子の中で最もよく用いられている因子。ゲノムを切断する Cas9 タンパク質と切断箇所を指定するガイド RNA が複合体を形成して機能する。

### リボヌクレオタンパク質 (RNP)

RNA とタンパク質の複合体の総称。本稿では、CRISPR-Cas9 の Cas9 タンパク質・ガイド RNA の複合体を RNP と記す。

### アグロバクテリウム

植物に感染し、自分の保持する DNA の一部を感染した植物のゲノムに組み込む能力のある土壌細菌。遺伝子組み換え操作によく用いられる。通常の植物ゲノム編集では、アグロバクテリウムを用いて、CRISPR-Cas9 を発現する DNA を植物のゲノムに組み込み、ゲノム編集を実施する。植物感染性細菌の使用は、米国などでは制限されている。

### ガイド RNA

Cas9 タンパク質と複合体を形成して、切断対象の DNA 配列を指定する RNA。

### 胚

種子に含まれる植物の個体となる部分。胚に由来する細胞の塊は分裂活性が高く、植物の個体を再生するために都合のよい性質を持っていることが多い。

### **イネ *PDS***

イネが持つフィトエン不飽和化酵素 (*PHYTOENE DESATURASE*) 遺伝子の略号。色素合成の中核的な経路で働く酵素をコードしている遺伝子で、遺伝子機能が不全になると、植物は色素を作れなくなるために白色化する。

### **プラスミド DNA**

人為的に設計した遺伝子を搭載した環状の DNA。ウイスキー超音波法で DNA を植物細胞に導入される際に用いられる。

### **カロテノイド**

植物などが合成する黄・橙・赤色などを示す色素の一群。植物の細胞の中では、光合成をはじめとしてさまざまな反応に使用される。代表例は、トマトの果実に蓄積する赤色色素リコピン。

### **イネ *LCYB***

イネが持つリコピン環化酵素ベータ (*LYCOPENE CYCLASE BETA*) 遺伝子の略号。色素合成の中核的な経路で働く酵素をコードしている遺伝子で、リコピンからβカロテンを合成するステップを触媒する酵素と考えられているが、イネではその破壊株の表現型は報告されていなかった。

### **次世代シーケンス**

大量の DNA 配列を同時に決定するシーケンス技術。分析した DNA のうち、ゲノム編集された細胞由来の DNA の割合を正確に調べることができる。

## 本件に関する問い合わせ先

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

生物プロセス研究部門 植物機能制御研究グループ

主任研究員 菅野 茂夫

〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6

029-861-2641 shigeo.sugano@aist.go.jp

株式会社インプラントイノベーションズ

代表取締役社長 寺川 輝彦

〒230-0052 神奈川県横浜市鶴見区生麦 4-5-11

045-500-0538 terakawa@inplanta.jp

## 機関情報

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

<https://www.aist.go.jp/>

ブランディング・広報部 報道室 hodo-ml@aist.go.jp

凸版印刷株式会社

<https://www.toppan.co.jp/>

広報本部 kouhou@toppan.co.jp

株式会社インプラントイノベーションズ

<https://inplanta.jp/index.html>

管理部 in3@inplanta.jp

## 配布先

経済産業記者会 | 経済産業省ベンクラブ | 中小企業庁ベンクラブ | 資源記者クラブ | 文部科学記者会 | 科学記者会 | 筑波研究学園都市記者会 | PR TIMES