

外来 DNA を用いないゲノム編集にダイズで初めて成功

～ダイズの迅速かつ的確な品種改良への貢献に期待～

ポイント

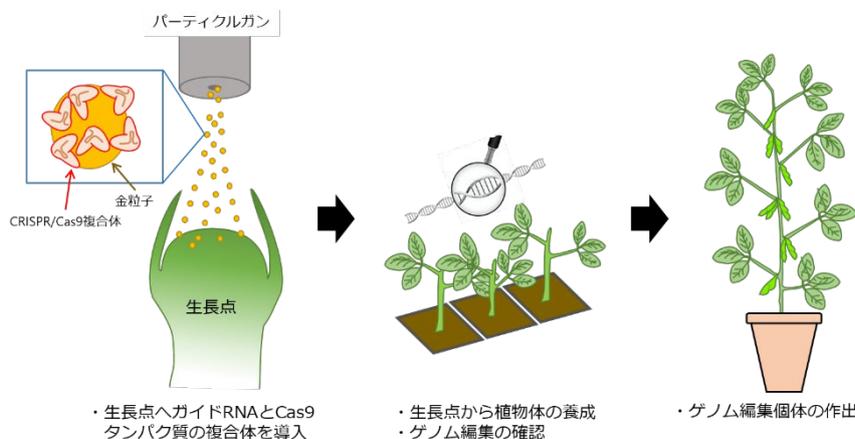
- ・ 外来 DNA を導入せずにダイズのゲノム編集を行うことに世界で初めて成功。
- ・ 複数のダイズ品種においてアレルゲン遺伝子を対象にしたゲノム編集に成功。
- ・ 本研究で開発した技術は、作物の迅速な品種改良に貢献できると考えられる。

概要

北海道大学大学院農学研究院の山田哲也講師、株式会社カネカ 食糧生産支援 Strategic Unit、京都大学大学院農学研究科の丸山伸之教授、農研機構 生物機能利用研究部門の今井亮三エグゼクティブリサーチャーらの研究グループは、iPB-RNP 法^{*1}を利用することで、外来 DNA を導入しないダイズのゲノム編集に世界で初めて成功しました。CRISPR/Cas9 システム^{*2}を用いてゲノム編集植物を作成する場合、外来 DNA を植物のゲノムに導入し、ゲノム編集酵素であるガイド RNA と Cas9 タンパク質を植物の細胞内で産生させた後、ゲノム編集が生じた細胞から植物体を再生させる方法が一般的です。しかし、外来 DNA の導入や、植物体の再生が非常に困難なダイズ品種もあります。さらに、ゲノム編集個体の実用化を考慮した場合、最終的に導入した外来 DNA を取り除く必要があります。そのため、外来 DNA の導入と組織培養を伴わないダイズゲノム編集法の確立が強く求められていました。

本研究では、ダイズの複数品種を対象に外来 DNA を導入することなく、胚軸の生長点にガイド RNA と Cas9 タンパク質の複合体を物理的に導入してゲノム編集個体を作出しました。日本のダイズ品種「ユキホマレ」、「エンレイ」や「フクユタカ」を用いて、アレルゲンタンパク質^{*3}の一つである Gly m Bd 30K と呼ばれるタンパク質を作らないゲノム編集個体を作出しました。この方法を利用すれば、これまでゲノム編集が難しかった品種についてもゲノム編集を行うことができ、新たな品種改良方法としての利用が期待されます。

なお、本研究成果は、2024 年 9 月 23 日（月）公開の Plant Physiology 誌にオンライン掲載されました。



DNA を用いないダイズのゲノム編集方法のイメージ。
外来 DNA を導入することなくゲノム編集個体を作出できる。

【背景】

ゲノム編集は新しい品種改良法の一つとして注目されています。ダイズをはじめとする農作物では CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集研究が世界中で行われています。これまでダイズのゲノム編集研究は、外来 DNA を植物のゲノムに導入し、ゲノム編集酵素であるガイド RNA と Cas9 タンパク質を植物の細胞内で産生させる必要があったため、遺伝子組換え体を作る必要がありました。この方法では、遺伝子組換えが生じた細胞から植物体を再生させる必要がありますが、細胞から植物体を再生する能力はダイズ品種によって大きく異なるため、ゲノム編集個体を作成できる品種は限られていました。また、ゲノム編集個体の実用化には外来 DNA が取り除かれていることを明らかにする必要がありました。このように、実用化に耐えうるダイズゲノム編集個体を得るにはいくつもの障壁を乗り越える必要がありました。そのため、外来 DNA を利用せず、かつ、組織培養による植物体の再生を経ないゲノム編集方法の開発が強く求められていました。

【研究手法】

本研究では、単子葉植物のコムギで開発された外来 DNA を用いないゲノム編集技術 iPB-RNP 法をダイズに適用するための技術開発を行いました。標的としたのは、アレルゲン遺伝子の一つ Gly m Bd 30K（以下、30K 遺伝子と記す）を含む 3 遺伝子座です。図 1 に示すように、ダイズの発芽種子から胚軸を取り出し、その先端に位置する生長点をメスでむき出しにします。ガイド RNA と Cas9 タンパク質の複合体を付着させた金の微粒子をパーティクルボンバードメント法^{*4}によって、この生長点に導入しました。その後、胚軸を養成することで植物体を得て、それらの個体の中から標的となる遺伝子がゲノム編集されたものを選抜しました。さらに、これらのゲノム編集個体の種子を用いた解析を行い、30K 遺伝子に対するゲノム編集では Gly m Bd 30K タンパク質の有無を確認しました。

【研究成果】

DNA の配列解析を行ったところ、ゲノム編集個体の多くで、標的とした遺伝子配列の一部が欠失していることが明らかになりました。結果的に、三つの遺伝子座いずれにおいても供試した胚軸について約 1%の効率でゲノム編集された個体を得ることができました。30K 遺伝子のゲノム編集に関しては種子タンパク質を用いた解析を行いました。ゲノム編集個体はアレルゲンとなる Gly m Bd 30K タンパク質は検出されませんでした。また、供試した日本のダイズ品種「ユキホマレ」、「エンレイ」及び「フクユタカ」の全ての品種において、対象とした 30K 遺伝子に関するゲノム編集個体を作成することができました（図 2）。特に、従来のゲノム編集方法では達成することができなかった「ユキホマレ」と「フクユタカ」のゲノム編集は iPB-RNP 法を利用することで初めて可能になりました。iPB-RNP 法を利用したダイズのゲノム編集が遺伝子組換えを用いた従来法と比べ異なる点を表 1 にまとめました。

【今後への期待】

日本におけるダイズの用途は、豆腐・豆乳・納豆・味噌・醤油・エダマメや代替肉など多岐にわたります。ダイズに含まれるタンパク質の中には、今回対象とした Gly m Bd 30K 以外にもアレルゲンが含まれており、これまで育成されたダイズの品種や系統の中にはアレルゲンが少ないものもありますが、従来の品種や系統では削減が困難なアレルゲンタンパク質も存在します。そのため、本法と従来の品種改良法を上手く組み合わせることで、よりアレルギー性が低下したダイズを効率的に育成できると考えています。

【謝辞】

本研究は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」、内閣府戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「次世代農林水産業創造技術」(管理人：農研機構生研支援センター)の助成を受けたものです。

論文情報

論文名 A DNA-free and genotype-independent CRISPR/Cas9 system in soybean (ダイズにおける DNA を使用せずかつ遺伝子型に依存しない CRISPR/Cas9 システム)

著者名 桑原慎子¹、三木隆二²、丸山伸之³、安井雅範⁴、濱田晴康²、柳楽洋三²、平山裕美子⁵、アキリ亘⁵、李 鋒⁵、今井亮三⁵、田岡直明²、山田哲也¹ (¹北海道大学大学院農学研究院、²株式会社カネカ、³京都大学大学院農学研究科、⁴北海道大学農学部、⁵農研機構)

雑誌名 Plant Physiology (植物生理学の専門誌)

DOI 10.1093/plphys/kiae491

公表日 2024年9月23日(月)(オンライン公開)

【参考図】

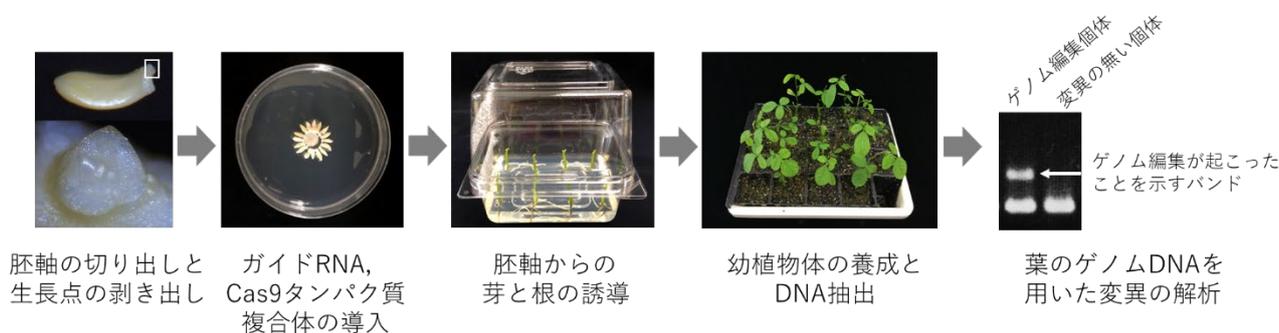


図 1. iPB-RNP 法を用いたダイズゲノム編集個体作出の手順



図 2. iPB-RNP 法を用いて作出された低アレルゲンゲノム編集ダイズ
元品種ユキホマレ (左)、ゲノム編集ダイズ (右)
外観に違いはないが、ゲノム編集体では Gly m Bd 30K タンパク質は作られない。

	アグロバクテリウム法 パーティクルボンバードメント法	iPB-RNP法
利用する組織	子葉節・不定胚	生長点
組織培養による 植物体の再生	必要	不要
外来遺伝子の導入	必要	不要
導入遺伝子の除去	必要	不要
利用可能な品種	限定的	広範囲
ゲノム編集効率	2~4 % (アグロバクテリウムの場合)	0.9 %~

表 1. ダイズゲノム編集方法の特徴

(アグロバクテリウム法*5、パーティクルボンバードメント法、iPB-RNP 法)

【用語解説】

- *1 iPB-RNP 法 … *in planta* Particle Bombardment-ribonucleoprotein 法のこと。金の微粒子 (0.6~1.6 μm) に、ゲノム編集酵素である Cas9 タンパク質とガイド RNA の複合体を付着させ、ガス圧を利用して植物の生長点の細胞内へ金粒子を打ち込むことで、細胞内にゲノム編集酵素を導入する方法。カネカと農研機構で特許を取得している。(特許第 7236121 号、特許第 7321477 号)
- *2 CRISPR/Cas9 システム … 各生物において最もよく利用されるゲノム編集方法の一つで、遺伝子を切断するはさみの役割を持つタンパク質 (Cas9 タンパク質) と任意の遺伝子配列を認識する RNA (ガイド RNA) の組み合わせから成るゲノム編集システムのこと。
- *3 アレルゲンタンパク質 … アレルギーの原因となる抗原性物質 (タンパク質) のことを指し、ダイズ種子ではこれまで 10 種類以上のアレルゲンが知られている。
- *4 パーティクルボンバードメント法 … 金の微粒子 (0.6~1.6 μm) に DNA をコーティングし、高圧ガスの力で植物細胞に打ち込むことにより、外来 DNA をゲノムに挿入する方法。
- *5 アグロバクテリウム法 … 植物に感染する土壌微生物のアグロバクテリウムが元来持つ遺伝子組換え能力を利用した植物における代表的な遺伝子組換え方法の一つのこと。アグロバクテリウムの持つ DNA の一部 (T-DNA と呼ばれる領域) が切り離され、感染した植物ゲノムの中に組み込まれる。この T-DNA 領域に目的の遺伝子を予め挿入しておくことにより、植物ゲノムに目的の遺伝子を送り込むことができる。