



平成28年8月18日
内閣府
政策統括官（科学技術・イノベーション担当）

世界で初めてリンゴの高効率ゲノム編集に成功

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」において、徳島大学生物資源産業学部 刑部祐里子准教授、農研機構（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構）果樹茶業研究部門 西谷千佳子主任研究員、岩手大学農学部 小森貞男教授らのグループは、世界で初めてリンゴのゲノム編集技術の確立に成功し、リンゴ遺伝子に対して高い効率で変異導入することを可能にしました。

これまでさまざまな植物種において、遺伝子機能の解明や育種への応用を目的として、CRISPR/Cas9（クリスパー・キャスナイン）を用いたゲノム編集が可能であることが示されてきましたが、リンゴなどの果樹での成功例は報告されていませんでした。本研究では、リンゴ品種「JM2」において、カロテノイド生合成酵素である *PDS*（フィトエン不飽和化酵素；phytoene desaturase）遺伝子をターゲットとして CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を試み、高い効率で変異導入が可能であることを示しました。本研究において確立できたリンゴゲノム編集技術は、リンゴにおいて様々な遺伝子機能の解析に役立つと期待できます。

この研究成果は、8月17日（日本時間）に「Scientific Reports」にオンライン掲載されました。

論文掲載先：
Scientific Reports

掲載論文：
"Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system."

著者：
Chikako Nishitani, Hirai, N., Komori, S., Wada, M., Okada, K.,
Osakabe, K., Yamamoto, T., Osakabe, Y.

研究助成：
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」



PDS遺伝子変異体

図：リンゴ *PDS* 遺伝子 CRISPR/Cas9 変異体
CRISPR/Cas9 による *PDS* 遺伝子抑制により、全身が白化したリンゴ再生植物が得られた。白矢印は白化植物体の全 DNA に変異が導入された個体。

（内閣府問合せ先）
政策統括官（科学技術・イノベーション担当）付
産業技術・ナノテクノロジーグループ 木澤
電 話：03-6257-1334（直通）
FAX：03-3581-9969



研究成果「世界で初めてリンゴの高効率ゲノム編集に成功」

・研究の背景

近年、CRISPR/Cas9(クリスパー・キャスナイン)を用いたゲノム編集により、様々な生物でゲノムに変異導入する技術が発展してきました。CRISPR/Cas9 は、Cas9ヌクレアーゼとそれをゲノムの標的にガイドするgRNA(ガイドRNA)によって、ゲノムDNAの狙った部位を切断し、その部位でのDNA修復によって変異をおこす技術です。これまでさまざまな植物種において、遺伝子機能の解明や育種への応用を目的としてゲノム編集が可能であることが示されてきましたが、ゲノム編集された植物個体が獲得できた研究は未だ多くなく、また、世界的にも重要なリンゴなどの果樹での成功例は報告されていませんでした。この度、徳島大学生物資源産業学部 刑部祐里子准教授、農研機構(国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構)果樹茶業研究部門 西谷千佳子主任研究員、岩手大学農学部 小森貞男教授らのグループは、世界で初めてリンゴのゲノム編集技術の確立に成功し、リンゴ遺伝子に対して高い効率で変異導入することを可能にしました。

・研究の内容と成果

私たちは、リンゴ品種「JM2」において、植物のカロテノイド(*1)生合成酵素である *PDS*(フィトエン不飽和化酵素; phytoene desaturase) 遺伝子をターゲットとし、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を試みました。*PDS* 遺伝子に変異が導入されると、カロテノイド生合成が抑制され過剰な光によりクロロフィルが光酸化されるため植物細胞は白化します。これによりゲノム編集による変異を視覚的に解析できます(モデルターゲット)。私たちはまず、リンゴのゲノム編集系を確立するために、リンゴ *PDS* 遺伝子をクローニングし、そのDNA配列を詳細に解析しました。その結果、2種類の *PDS* 遺伝子型が存在しており、異なる対立遺伝子(アليل)(*2)であると考えられました。(図1)。

次に、リンゴ *PDS* 遺伝子についてゲノム編集を試みるために、どちらのアリルも同一の塩基配列の箇所で、*in silico* 解析でオフターゲット効果(*3)が低いと予測される配列をCRISPR/Cas9の標的として3種類選び、高効率リンゴCRISPR/Cas9ベクターを開発しました。これらのベクターをアグロバクテリウム法によってそれぞれリンゴに導入し、組織培養によってCRISPR/Cas9形質転換個体を再生させた結果、3種のgRNAすべてにおいて変異が誘導されました。特に効率のよいgRNAでは、全細胞で変異が導入され完全な白化個体となり(図2)、このような全身白化変異体はすべての形質転換体のうち、14%という高い効率に達しました。全身白化した変異

個体のゲノム配列を調べた結果、体細胞に含まれるすべての DNA が変異型 *PDS* 遺伝子配列を示すことが明らかとなり、その変異率は 100%でした(図 1)。以上のことは、リンゴにおいて高効率のゲノム編集系が確立できたことを示しています。

さらに、アリルごとに DNA シーケンスを調べると、興味深いことに、一方のアリルの主要な変異配列と、もう一方のアリルの副次的な変異配列が同一である場合が多く見られることを発見しました(図 1)。これは、CRISPR/Cas9 により誘導された DNA 切断の修復に、もう一方のアリルを鋳型としてコピーする機構の存在が考えられ、リンゴにおいて DNA 修復が NHEJ(非相同末端結合)経路のほかに HR(相同組換え)経路(*4)も同時に機能している可能性を示唆しています。さらに、本研究では、一般的に gRNA に用いる 20bp より短い gRNA(tru-gRNA)を用いても、リンゴで変異体を得られることが分かりました。これまで tru-RNA を用いてオフターゲットを抑制できるという知見があることから、リンゴでも同様にオフターゲットを抑えられる可能性があります。

以上から、世界で初めてリンゴにおいて実用的な高い効率でゲノム編集が可能であることと、その修復機構が明らかにされました。本研究において確立できたリンゴゲノム編集技術は、リンゴにおいて様々な遺伝子機能の解析に役立つと期待できます。

本研究は、内閣府戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)の支援により行われました。



図 1. リンゴ *PDS* 遺伝子 CRISPR/Cas9 ターゲット領域の塩基配列.

野生型 *PDS* 遺伝子は 2 つのアレルからなる(赤字および青字)が、同一の DNA 配列からなる領域を CRISPR/Cas9 のターゲット(アンダーライン)とした。全身が白化した CRISPR/Cas9 変異体の配列は、2 つのアレル由来と思われる配列がそれぞれ 2 種類あり、主要な変異タイプと副次的な変異タイプに分かれていた。変異配列はそれぞれのアレルの逆のタイプと同一の配列を持っていた。緑字; PAM, 四角; 変異により新たに生成したストップコドン, 右側の数字; それぞれの変異のタイプ x シーケンス解析で得られたクローン数, 太字が主要な変異タイプ, 矢印; アレル間の一塩基変異



図 2. リンゴ *PDS* 遺伝子 CRISPR/Cas9 変異体.

CRISPR/Cas9 による *PDS* 遺伝子抑制により、全身が白化したリンゴ再生植物が得られた。白矢印は白化植物体の全 DNA に変異が導入された個体（100%変異効率）。

・用語解説

(*1) カロテノイド；植物に主に黄色を示す色素。光合成の補助色素であり、酸化障害から組織や細胞を保護する機能を持つ。

(*2) 対立遺伝子（アレル）；ヒトなどの2倍体生物は、両親の配偶子からそれぞれ1セットのゲノムを受け取って、合わせて2セットのゲノムから成る。このとき、各遺伝子について2つのコピーが存在している。この1つの遺伝子座を占める2つの対になる遺伝子を対立遺伝子と呼ぶ。

(*3) オフターゲット効果；gRNAが本来の標的とは異なる無関係な標的に結合し、ゲノム編集が行われる効果。

(*4) NHEJ（非相同末端結合；non-homologous-end-joining）および HR（相同組換え；homologous recombination）；どちらも DNA 二重鎖切断の DNA 修復メカニズムである。HR は同じ遺伝情報を持つ鋳型をコピーすることで DNA 二重鎖切断を正確に修復する経路。NHEJ は切断された DNA 末端において、損傷部位の除去とヌクレオチド挿入が行われてそのまま結合する反応であるため変異が生じやすい。

・ 論文情報

Chikako Nishitani, Hirai, N., Komori, S., Wada, M., Okada, K.,
Osakabe, K., Yamamoto, T., Osakabe, Y.

“Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system.”
Scientific Reports *in press*.

お問い合わせ先

部局名 徳島大学生物資源産業学部

責任者 准教授 刑部祐里子

電話番号 088-656-9310

Fax 番号 088-656-9310

メールアドレス : osakabe.yuriko@tokushima-u.ac.jp

部局名 農研機構果樹茶業研究部門

研究担当者 主任研究員 西谷千佳子

電話番号 029-838-6474

広報担当者 果樹連携調整役 和田雅人

電話番号 029-838-6451

メールアドレス : kaju-koho@ml.affrc.go.jp

部局名 岩手大学農学部

研究担当者 教授 小森貞男

電話番号 019-621-6119

Fax 番号 019-621-6119

メールアドレス : komoris@iwate-u.ac.jp