

ゲノム編集酵素の機能モジュール データ基盤構築

官民研究開発投資拡大プログラム (PRISM)

「バイオ技術領域」

令和3年度成果

令和4年3月

農林水産省

課題と目標

- (課題) • 国内外でゲノム編集技術を活用した農林水産物の開発が進み、特に、米国ではゲノム編集ダイズ油が商品化される等、ゲノム編集技術を利用したバイオ産業の国際的な競争が進む中、国内企業が利用しやすいゲノム編集技術が強く求められている。
- (目標) • 国内の民間企業等がゲノム編集技術を活用した農林水産物やバイオマテリアル、医薬品等を開発するうえで、**海外の基本特許に係る不透明な特許料や許諾条件が実用化への懸念**となっている。
 - PRISMを活用して、**海外の基本特許を回避し、国内企業等が利用しやすい新規のゲノム編集酵素の開発を目指す**。そのためには、ゲノム編集酵素を構成するパーツ(機能モジュール)の情報が必要である。まず、ゲノム編集酵素を構成する機能モジュールの構造や機能に関する情報をデータ基盤として整備する。**構造と機能を明らかにした機能モジュールを組み合わせて新規ゲノム編集酵素として開発**する。

「ゲノム編集酵素の機能モジュールデータ基盤構築」の概要

- **元施策** : 従来育種が困難な作物に有用形質を付与し、農業の競争力強化や生産者の収益向上に資する農作物の育種素材をゲノム編集技術を用いて開発(農林水産省・R1-5年度; R1 101百万円, R2 152百万円, R3 132百万円, R4 119百万円)。
- **PRISMで実施する理由** : **農林水産物の開発のみならず、ゲノム編集医療の開発等、他のバイオ産業にも貢献する新規ゲノム編集酵素を開発**するため、PRISMで実施する。
- **テーマの全体像** :
 - ゲノム編集技術は、農業分野のみならず、バイオマテリアルや医薬品の開発、医療分野への利用等、その他のバイオ産業にも広範な応用可能性があるため国際的な技術開発競争が激化しており、海外の特許に匹敵する強い技術を創出することが必要。
 - 特に、海外の基本特許を回避し、国内企業等が利用しやすい新規のゲノム編集酵素を開発するには、ゲノム編集酵素を構成する機能モジュールに関する情報が必要。

出口戦略


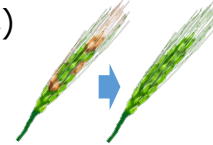


ゲノム編集技術を活用した**農林水産物品種開発**において、特許許諾に関するハードルが低下し、**社会実装の早期実現を加速化**。また、構築したデータ基盤を利用した**新規酵素技術の知財化**により、**農業分野のみならず、その他のバイオ産業にも幅広く貢献**。

民間研究開発投資誘発効果等

- 後年度の民間投資誘発効果として、
 - 民間種苗会社等における農作物開発が促進、品種開発力が強化され、主要品種の市場投入により、年間60億円程度の見込み。
 - 医療分野においても大手企業では1社あたりイニシャルフィーだけで数百億円以上といわれるCRISPR/Cas9等の基本特許の実施許諾が回避できるため、**少なくとも数百億円以上が期待**。
- 民間からの貢献額 : R3年度は50百万円の提供。

アドオン（農林水産省）：71,700千円
 元施策名：農林水産省委託プロジェクト「ゲノム編集技術を活用した農作物品種・育種素材の開発」R3年度 132,000千円

内容：ゲノム編集技術を用いて、従来育種技術では作出が困難な新たな有用形質を付与し、農業の競争力強化や生産者の収益向上に資する農作物の育種素材を開発。

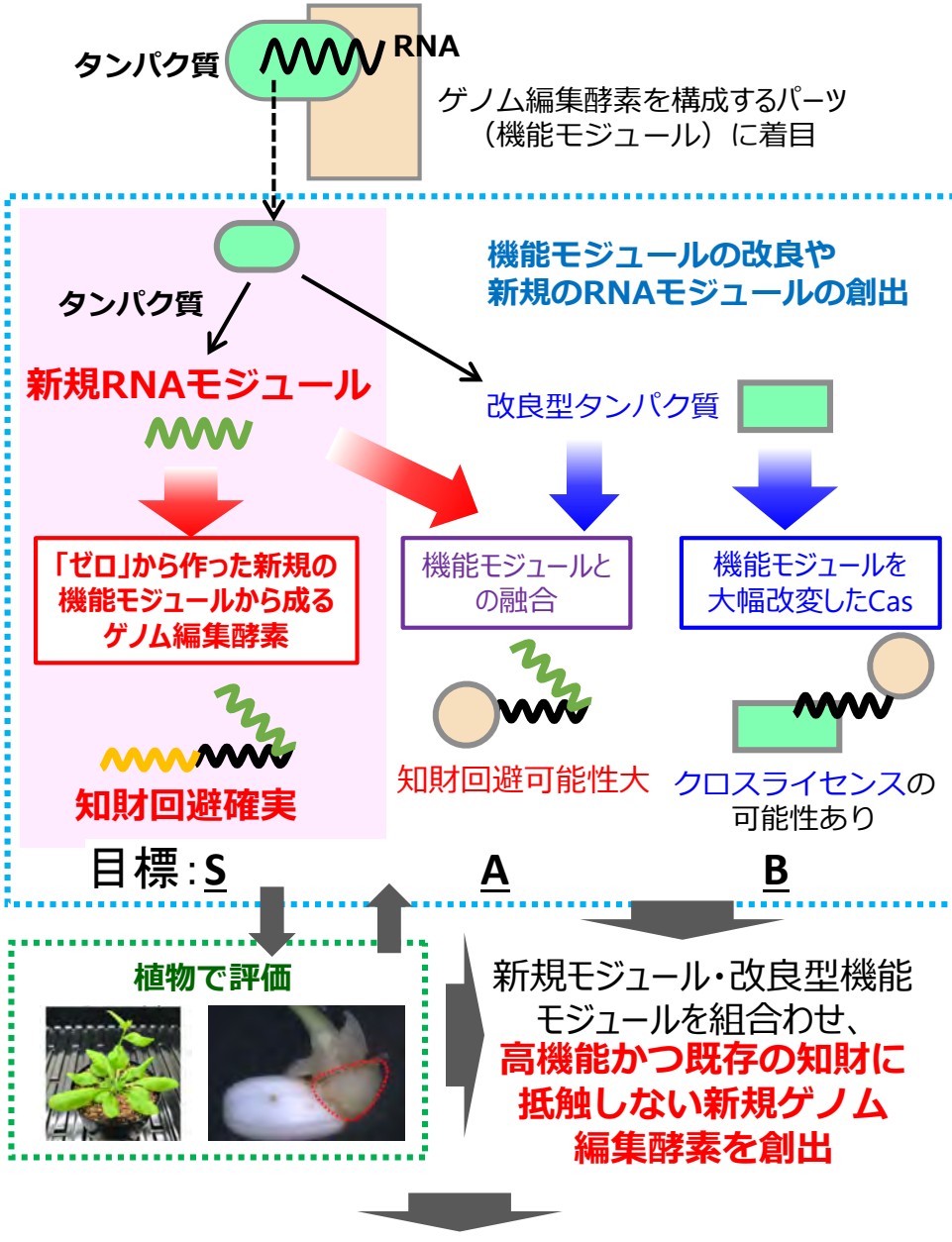
- ①保存中に芽が出ず、加工に適したバレイショ (4倍体、栄養繁殖性) 
- ②赤カビ抵抗性コムギ (6倍体) 
- ③花持ちが良く省力栽培に適した花き (ゲノム編集前例なし) 
- ④晩抽性大根 (難形質転換) 

国内の民間企業等がゲノム編集技術を活用した農林水産物を開発するうえで、海外の基本特許に係る不透明な特許料や許諾条件が実用化への懸念となっているため、国内企業が利用しやすいゲノム編集技術の開発が重要。

【PRISM】

- ・ゲノム編集酵素を構成する機能モジュール（ゲノム編集酵素を構成するパーツ）の構造や機能に関する情報をデータ基盤として整備する。
- ・構造と機能を明らかにした機能モジュールを組み合わせて新規ゲノム編集酵素として開発する。

【開発のイメージ】



資料3 「ゲノム編集酵素の機能モジュールデータ基盤構築」の目標達成状況

○施策全体の目標
 (令和3年度目標)
 新規の高機能ゲノム編集酵素の創出に向け、令和2年度に構築したゲノム編集酵素の機能モジュールデータ基盤のさらなる充実を図るとともに、機能モジュールの改良を進める。

(最終目標) ゲノム編集酵素を構成する機能モジュールを組み合わせた新規ゲノム編集酵素のプロトタイプを作出する。

事業名等 (※個別に目標を設定している場合)	当年度目標	目標の達成状況
① ゲノム編集酵素タンパク質の立体構造解析	新規ゲノム編集酵素を開発するために必要な情報を得るため、 DNA切断酵素Cas12f 、RNA編集酵素Cas13b、Cas12gについて、詳細な立体構造情報を取得し、 その機能モジュールを推定 する。また、立体構造情報に基づき ゲノム編集活性が向上した変異体を作製 する。さらに、課題②で得られる機能モジュールについて、立体構造を決定する。	各種Casの立体構造を取得し、AsCas12fのDNA切断モジュール、 Cas12c2複合体のDNA認識モジュール 、Cas9のDNA切断活性を抑制すると考えられる機能モジュールを 同定 した。また、野生型に比べて DNA切断活性を2倍以上高めた変異体AsCas12f やRNA切断の特異性と活性を向上した変異型Cas13bを 創出 する等、 重要な機能モジュールの改良に成功したこと から、 機能モジュールを大幅改変したCasの開発に見通しが立った 。 当年度目標以上の成果 が得られており、 来年度には 認識配列の自由度が向上した、最小サイズの高活性な酵素等、 機能モジュールを大幅改変したCas (目標B) を創出できる見込み 。
② 機能モジュールの候補となるRNA情報の集積	ゲノム編集酵素に必要な機能モジュールの情報を蓄積するために、 DNAを切断する新規機能モジュール や2本鎖DNAをほどこ機能モジュールを スクリーニング する。	DNAを切断するRNA機能モジュール(リボザイム)をスクリーニングする条件検討を完了した。 複数の条件下でスクリーニングを実施し、機能モジュール候補を濃縮した 。進捗はやや遅れているが、 来年度には 機能モジュール候補の更なる濃縮により、 新規のリボザイム候補を同定し 、それを用いた 新規ゲノム編集酵素のプロトタイプ (目標Aのプロトタイプ) を開発できる見込み 。
③ ゲノム編集酵素の植物への適用	ゲノム編集酵素の機能モジュールについて植物細胞内におけるDNA切断活性情報を蓄積するために、 Cas12fベクターを改良し、植物細胞内におけるDNA切断活性を再度評価 する。また、課題②で得られる機能モジュールの植物細胞内におけるDNA切断活性を評価する。	課題①の情報をもとにAsCas12f及びSpCas12f発現ベクターを改良し、 SpCas12fによるイネ培養細胞での変異導入に成功 した。シロイヌナズナではAsCas12f及びSpCas12fによる変異導入は確認できなかった。また、課題②の機能モジュールを評価する準備を進めた。進捗に問題は無く 当年度目標は達成 。 来年度には 、課題①②で開発される 改良型ゲノム編集酵素、もしくは新規ゲノム編集酵素プロトタイプについて、植物細胞内におけるDNA切断活性情報を取得 。元施策へ順次適用。

①ゲノム編集酵素タンパク質の立体構造解析

令和3年度の目標：3種類のCasタンパク質や、課題②で得られる機能モジュールについて、立体構造を決定する。

成果：**AsCas12fの立体構造を取得**(図1)。DNA切断モジュールの情報をもとに、野生型に比べて**DNA切断活性を2倍以上高めた変異体5種を創出し(図2)、それらの掛け合わせによりDNA切断活性が飛躍的に向上**させることに成功。また、Cas12c2複合体の立体構造を決定し、DNAを認識する機能モジュールを同定した(図3, Mol. Cell, in press)。核内でCas9によるDNA切断活性を抑制していると考えられる機能モジュールを推定できた。Cas13bの立体構造を決定し、RNA切断の特異性と活性を向上させる変異型機能モジュールを開発した。
→ 今年度、**重要な機能モジュールの改良に成功したことから、機能モジュールを大幅改変したCasの開発(目標B)に見通しが立った。来年度には、機能モジュールを組み合わせ、配列認識の自由度が向上した、機能拡張性が高い小型ゲノム編集酵素等を開発(目標B)できる見込み。**

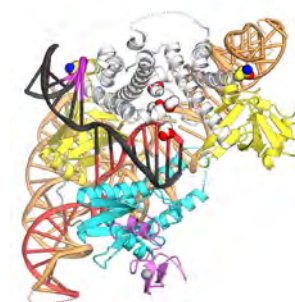


図1. AsCas12fの立体構造

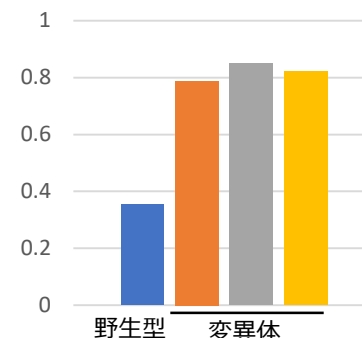


図2. AsCas12f変異体のDNA切断活性



図3. Cas12c2の立体構造

Cas12c2のDNA認識モジュールが「T」塩基を認識することにより標的DNAを切断することから、標的配列の認識自由度が高い。

②機能モジュールの候補となるRNA情報の集積

令和3年度の目標：DNAを切断する機能モジュールや2本鎖DNAをほどく機能モジュールをスクリーニングする。

成果：DNAを切断する機能モジュールをスクリーニングする条件検討を完了した。**複数の条件下でのスクリーニングを実施し、機能モジュール候補を濃縮**した(図4)。
→ **来年度には、機能モジュール候補の更なる濃縮により、新規のリボザイム候補を同定し、それをを用いた新規ゲノム編集酵素のプロトタイプ(目標Aのプロトタイプ)を開発できる見込み。**

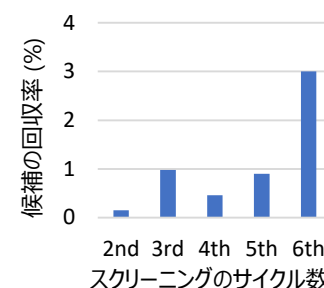


図4. スクリーニングによる機能モジュール候補の濃縮
スクリーニングを繰り返し実施することにより、機能モジュール候補を濃縮できている。

③ゲノム編集酵素の植物への適用

令和3年度の目標：Cas12fや課題②で得られる機能モジュールの植物細胞内におけるDNA切断活性を評価する。

成果：**改良型SpCas12fベクターにより、イネでの変異導入に成功**。Cas12fがイネで機能することを実証した(図5)。課題①で開発された改良型AsCas12fを植物で発現させるベクターを構築した。

→ **来年度には、課題①②で開発される改良型ゲノム編集酵素、もしくは新規ゲノム編集酵素プロトタイプの植物細胞におけるDNA切断活性情報を取得。元施策へ順次適用。**

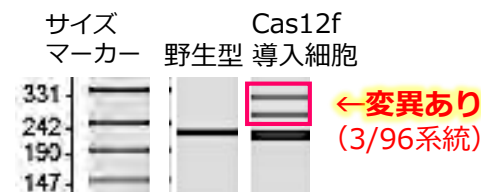


図5. SpCas12fによるイネのゲノム編集

資料5 「ゲノム編集酵素の機能モジュールデータ基盤構築」の民間からの貢献及び出口の実績

○民間からの貢献額： 3年で1億5百万円相当

ゲノム編集技術を活用した農林水産物や医薬品等の開発に向け、技術開発研究等を実施するための実験機器・施設等を整備。

当年度当初見込み	当年度実績
バイテク企業 > 人件費、機器、試薬等 50百万円 相当	民間企業2社 50百万円相当 人件費 3百万円相当 試薬・機器等 47百万円相当 ・国内大手企業や大学が本プロジェクトで開発される新規ゲノム編集酵素について強い関心を示しており、進捗について頻繁に情報交換を実施。 ・それらの企業・大学では、動物細胞での新規ゲノム編集酵素の性能を評価するためにアッセイ系を開発。また、ゲノム編集技術を活用した生物の将来的な活用に向けて、その開発に必要な機器や施設等を整備。

○出口戦略

ゲノム編集技術を活用した農林水産物品種開発において、特許許諾に関するハードルが低下し、社会実装の早期実現を加速化。また、構築したデータ基盤を利用した新規酵素技術の開発により、農業分野のみならず、その他のバイオ産業にも幅広く貢献。

当年度当初見込み	当年度実績
<ul style="list-style-type: none"> 海外の基本特許を回避し、国内企業等が利用しやすい新規のゲノム編集酵素を開発することにより、ゲノム編集品種の開発とその社会実装を促進し、民間種苗会社等による参入と投資を誘発。 機能モジュール候補を活用した新規のゲノム編集酵素を開発することにより、医療分野を含めその他のバイオ産業にも幅広く貢献でき、投資を誘発。 	<ul style="list-style-type: none"> 得られた成果を民間種苗会社を含むバイテク企業等にアピール。 9月11日 日本植物バイオテクノロジー学会シンポジウムで口頭発表 9月25日 第83回日本血液学会学術集会シンポジウムで口頭発表 10月2日 第80回日本癌学会学術総会シンポジウムで口頭発表 12月14日 種苗会社向けセミナーで口頭発表