

植物・作物を対象とした遺伝子操作

楠見, 健介
九州大学大学院理学研究院

<https://hdl.handle.net/2324/7236545>

出版情報 : Journal of Japanese Scientists. 59 (3), pp.13-18, 2024. The Japan Scientists' Association

バージョン :

権利関係 :



●特集● 遺伝子操作の生物学とその社会的実装

植物・作物を対象とした遺伝子操作

作物の遺伝子操作は、従来の遺伝子組換え法に加えて、近年新たに開発されたゲノム編集技術が急速に広がり、多様化している。一方、それらの理解には専門知識を要するため、消費者側には食品としてそれらを受け入れることについて漠然とした不安があると考えられる。本稿では植物における遺伝子操作技術の現状を概説し、作物育種への適用についてその利点と問題点を整理する。

楠見健介

はじめに

遺伝子組換え作物は1980年代から開発が始まり、2019年の統計では、主要作物であるトウモロコシ、ダイズ、ワタ、ナタネをはじめ、多くの遺伝子組換え作物が、世界29カ国の合計1億9000万ha以上の農地で栽培されている¹⁾。我が国では遺伝子組換え作物は研究用以外にはほとんど栽培されていない。しかし海外で生産された遺伝子組換え作物は大量に輸入されており、例えば上記の4種の作物については輸入されるものの大部分が遺伝子組換え品種である。一方、従来の遺伝子組換えは「染色体に、新たな遺伝子を埋め込む」という手法だったが、最近「生物の染色体DNAを直接改変する」ゲノム編集の技術が開発された。植物の形質転換において基礎研究分野を中心にこの技術の利用が

急速に広がり、現在では作物開発の主流技術の一つとなっている。

このように作物を含む植物の遺伝子操作技術が進歩する中で、一般の消費者には遺伝子組換え作物に対する食品としての安全性や環境への影響についての懸念が常にあると思われる。作物の生産と消費において、遺伝子組換え作物やゲノム編集作物のメリットを享受するのは、どちらかという生産者であることが多く、消費者への利点は見えにくい。そのため消費者に対する情報提供は、発信元の立場（普及させたい側か、抑制したい側か）によって偏ることが多く、その結果消費者の不安感が増幅され、また漠然としたものになりがちである。本稿では、作物開発に用いられている遺伝子操作技術とその問題点を整理して概説する。正しい知識を身につけることで、遺伝子操作した作物のメリット・デメリットを冷静に評価する、その一助となれば幸いである。

●くすみ・けんすけ●

1968年生まれ。九州大学大学院理学研究院修了。博士(理学)。所属：九州大学大学院理学研究院。専門：植物生理学。

キーワード：遺伝子組換え植物 (genetically modified plant)、ゲノム編集 (genome editing)、品種改良 (crop breeding)
著者連絡先：kusumi.kensuke.239@m.kyushu-u.ac.jp

1 従来の遺伝子組換え法

(1) アグロバクテリウム法

現在普及している、遺伝子操作された作物の多くは、いわゆる「遺伝子組換え (GM)」の技術により作られたものである。遺伝子組換えにはいくつかの手法があり、表 1 に主要なものを示す。研究目的の遺伝子組換えも含めると、最も普及しているのがアグロバクテリウム法である。

アグロバクテリウム法の原理：アグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter*, 以前は *Agrobacterium tumefaciens* と命名されていた) は植物に感染する寄生細菌であり、自然界では感染部位に虫こぶ様の腫瘍を形成する。アグロバクテリウムは感染すると宿主植物の染色体 DNA に自身が持つ遺伝子をコピーし、宿主細胞に発現・活性化させることにより腫瘍を形成する。この「植物の染色体 DNA に自身が持つ遺伝子をコピーする」という性質を利用するのがアグロバクテリウム法で、本来コピーされるアグロバクテリウムの DNA 領域を、導入したい遺伝子の配列に人為的に入れ替える。そのアグロバクテリウムを植物に感染させると、あとはその能力により植物のゲノムに遺伝子が導入される。

アグロバクテリウム法の操作：アグロバクテリウム法は生物が進化的に発達させてきたしくみを利用するスマートな手法で遺伝子導入効率も高いが、遺伝子組換え植物の作出にあたってはいくつかのハードルがある。まず、

感染部位の細胞のゲノムにしか遺伝子が導入されないため、次世代に引き継ぐことが困難であることがあげられる。生殖細胞に直接アグロバクテリウムを感染させる手法もあるが、高い技術を要し一般化していない。この問題を解決するために、一般的には培養細胞系が用いられる。植物は高い再生能力を持ち、植物ホルモンを含む培地で植物体の一部を培養することによって、初期化された細胞塊 (カルス) を作り、さらに培養を進めて植物個体にまで再生できる。この培養細胞系を利用して、アグロバクテリウム法ではカルスにアグロバクテリウムを感染させ、その後植物体に再生する。その際、遺伝子が導入された細胞から確実に再生するために、選抜用の遺伝子を含めておく。最も広く用いられているのが抗生物質など通常の細胞を殺す薬剤に対する耐性遺伝子で、この遺伝子が導入された細胞は、薬剤入りの培地でも生存できるため、感染後しばらくカルスを増殖させ、遺伝子が未導入の細胞が死滅したあと植物体に再生させれば、遺伝子が導入された細胞のみで構成された植物体となる。

(2) その他の遺伝子組換え法

アグロバクテリウム法は、アグロバクテリウムが感染できる植物種にしか適用できない。そのためその他の植物種への遺伝子導入法が検討された。パーティクルガン法 (ジーンガン法) は DNA を塗布した微粒子を細胞に直接打ち込む方法である (表 1)。装置は原理的には空気銃と同じしくみで、弾丸に相当す

表 1 植物で用いられる主な遺伝子組み換え法

	原理	長所	短所
アグロバクテリウム法	植物の病原菌であるアグロバクテリウムが持つ性質を利用して DNA を導入する	・特別な装置や技術が不要 ・形質転換植物の作出効率が高い	・アグロバクテリウムが感染できる植物種以外には適用できない
パーティクルガン法 (ジーンガン法)	DNA を塗布した粒子を、音速以上に加速して細胞に打ち込む	・アグロバクテリウムが感染しない植物種にも適用できる	・導入遺伝子の断片化や結合、発現抑制が起こる可能性がある ・形質転換植物の作出効率が低い ・専用装置が高価
エレクトロポレーション法 PEG 法	電気ショックや薬剤により細胞膜の透過性を上げて DNA を取り込ませる	・アグロバクテリウムが感染しない植物種にも適用できる	・複雑な細胞培養系と再分化系が必要 ・形質転換植物の作出効率が低い ・エレクトロポレーション法は専用装置が必要

る微粒子には、直径1ミクロン程度の金やタングステンの球が使われる。打ち込む対象は培養細胞系を用いることが多いが、生殖細胞や、茎の先端の分裂組織に直接打ち込む方法も開発されている。パーティクルガン法の欠点として導入装置が高額である事や、遺伝子の導入数（コピー数）が多くなり、発現抑制（サイレンシング）が起こることなどが挙げられる。その他に、培養細胞系を用いて電気ショックや薬剤により細胞膜の透過性を上げてDNAを取り込ませるエレクトロポレーション法やPEG法が開発されている（表1）。しかし導入効率の低さなどから使用例は少ない。

(3) 従来の遺伝子組換え法の問題点

従来の遺伝子組換え法で作製した作物には、原理的に避けられない問題がいくつかある。

外来遺伝子の存在：まず、その植物が本来持たない遺伝子（外来遺伝子）を除去できない場合がある。前項で説明したように、培養細胞系を利用した遺伝子組換えでは、目的遺伝子以外に、遺伝子導入細胞を選抜するための薬剤耐性遺伝子などを同時に導入する必要がある。目的遺伝子と選抜用遺伝子は基本的には接続された状態で植物体染色体DNA上に挿入されるため、分離は困難である。外来遺伝子はその植物が本来持たないものであるため、植物体内で想定外の作用を引き起こす可能性がある。特に作物の場合、食用にした場合の安全性を厳密に証明する必要があり、食品として流通させる場合には「組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続」²⁾に従い、安全性審査を受ける必要がある。また、「遺伝子組換え生物」として「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（カルタヘナ法）の規制対象となる。さらに環境への影響も無視できない。例えばナタネなど他家交配しやすい植物種の場合、遺伝子組換えでない

同種の植物や、近縁の植物と交配し、生態系に広がる可能性がある。

既存の遺伝子への影響：また、導入遺伝子が染色体DNA中に挿入される位置はランダムであるため、挿入位置にあった遺伝子の機能を破壊したり、周辺の遺伝子の影響を受けて発現場所や発現量などの特性が変わったりするという問題がある。そのため系統化に際しては、交配によりコピー数を減らし、染色体ペア両方の同じ場所に遺伝子が入った状態（ホモ接合化）にしたうえで、挿入位置周辺の遺伝子に対する影響を検証する必要がある。

2 ゲノム編集

新たな遺伝子操作法として近年急速に広がったのが、ゲノム上のDNA配列を直接改変するゲノム編集である。ゲノム上の狙った箇所にピンポイントで変異を入れることができ、作製過程で必要な外来遺伝子を残さない。変異の導入効率も高く、従来の遺伝子組換え法が持つ問題点のほとんどを克服している。

(1) ゲノム編集の原理

技術的背景：ゲノム編集技術の原理は「切断されたDNAの修復機構」という、生物の細胞がもともと持っているしくみを利用している。自然界では紫外線や環境放射線によりゲノムDNAは常に損傷を受けている。DNAは生物の設計図であり、その損傷は生命活動と種の保存に重大な影響をおよぼすことから、生物はDNA損傷を回復するしくみである「DNA修復機構」を何重にも発達させ、DNAを正常な状態に保っている。例えばヒトにおいては、寿命に影響を及ぼすと見られる遺伝子の多くがDNA修復に関連している。しかし、嚴重なDNA修復機構でも回復しきれず、DNAの塩基配列が変わった部分がある程度の頻度で生じ、「突然変異」として定着する。生物の進化を促しているゲノムの変化は、とりもなおさずこの突然変異の蓄

積であり、長期的に見ると進化の一部といえる。また従来の作物育種は、有用な形質（表現型）を引き起こす突然変異を持つ植物体を圃場で選抜するものである。ゲノム編集はこの突然変異の生成を人為的に行う技術である。

人工ヌクレアーゼの開発：ゲノム編集において、紫外線や環境放射線の代わりに DNA の切断を行うのが、人工的に開発された DNA 切断酵素（人工ヌクレアーゼ）である。開発された順に ZFN, TALEN, CRISPR-Cas9 の 3 種類が知られている。ZFN と TALEN は、制限酵素と呼ばれる細菌のヌクレアーゼから作られた。制限酵素はもともと 4～6 塩基程度の DNA 配列を認識し切断する性質を持つが、この程度の塩基数ではゲノム DNA 上の多くの箇所を切断してしまう。ZFN と TALEN は制限酵素のタンパク質の構造を改変して認識配列の塩基数を増やし、特異性を高めている。ただしその設計と合成にはかなりの手間がかかる。

CRISPR-Cas9 の開発：このような技術的な困難を克服したのが 2012 年に発表された CRISPR-Cas9 である³⁾。ヌクレアーゼの本体が Cas9 で、もともとは細菌の免疫系において、ファージなどの侵入者に対抗して、その DNA を断片化する際に使われる Cas ヌクレアーゼの一種である。細菌は Cas と共に、過去に侵入されたときに獲得した侵入者特異的な DNA 配列情報（CRISPR）をもとに、侵入者の DNA に結合する RNA（crRNA）を合成し、Cas-crRNA 複合体を生成する。それにより Cas-crRNA 複合体は侵入者の DNA を判別し、断片化し撃退する。CRISPR-Cas9 で

はこのしくみを利用して、標的とする DNA 配列に合わせて設計した RNA（ガイド RNA, gRNA）を crRNA と置き換える。gRNA の設計と合成は容易で、技術的なハードルはタンパク質の改変が必要な ZFN/TALEN よりも格段に低い。

動物のゲノム編集では、合成した Cas9 タンパク質と gRNA を受精卵などの細胞に直接導入することが多い。しかし植物では、導入効率の問題から、従来の遺伝子組み換えの手法でいったん Cas9 と gRNA 合成のための遺伝子（以下 CRISPR-Cas9 遺伝子と呼ぶ）をゲノムに組み込み、細胞内で Cas9 タンパク質と gRNA を合成させることが一般的である。つまり CRISPR-Cas9 遺伝子を導入し植物体を得たあと、標的部位付近の DNA 配列を確認し、変異が入っている個体を選抜する。この場合、従来の遺伝子組み換え法と同様に、CRISPR-Cas9 遺伝子が外来遺伝子として植物のゲノム上に残存するという問題が発生する。しかしゲノム上の標的配列の位置と CRISPR-Cas9 遺伝子の挿入位置は異なるため、交配により後代で取り除くことが可能である。

ゲノム編集された植物の法的扱い：原理的には、ゲノム編集により作製された植物体は自然突然変異による変異体と区別がつかない。現在日本では、CRISPR-Cas9 等の人工ヌクレアーゼ遺伝子が取り除かれたゲノム編集植物はカルタヘナ法の規制対象外となっており、所轄官庁への情報提供だけが求められる。健康被害などのリスクも従来の品種改良による植物品種と同程度とみなされており、遺伝子組換え食品で必要となる審査は不必要で届け

表 2 従来の遺伝子組み換えとゲノム編集の比較

	特徴	長所	短所
従来の遺伝子組換え	他の生物由来の遺伝子や人為的に作成した遺伝子をゲノム上に挿入する	・大きな遺伝子の導入が可能	・ゲノム上の挿入位置を指定できない ・薬剤耐性遺伝子などの外来遺伝子を除去できない場合がある
ゲノム編集	その植物自身のゲノム上の遺伝子を直接書き換える	・ゲノム上の変異の導入位置、書き換え位置を指定できる ・操作過程で導入する薬剤耐性遺伝子などの外来遺伝子は最終的に除去できる	・大きな遺伝子(配列)の挿入は難しい* ・アミノ酸置換など精密な配列改変はできない* ・ゲノム上の別の箇所の似た配列を改変する可能性がある(オフターゲット)

* 可能になりつつある

出のみ求められる。ただし、海外では EU や ニュージーランドなど遺伝子組換え食品と同様の規制を受ける国がある。

また、後述のように、最近ではゲノム編集においても遺伝子全体の挿入が可能になりつつあり、外来遺伝子を挿入する場合はカルタヘナ法の規制対象となる。

(2) ゲノム編集の問題点

ゲノム編集は、従来の遺伝子組換え法が持っていた問題点を解決する画期的な技術である。しかし、なおいくつかの問題点がある。

オフターゲット効果：ゲノム上に標的部位とよく似た配列がある場合、人工ヌクレアーゼがそちらを認識し切断してしまう「オフターゲット効果」が起こる。生物には、互いによく似た DNA 配列を持つ遺伝子が多数存在する。そのような遺伝子の一つを標的とした場合オフターゲット効果が起こり、想定外の変化が植物体内で引き起こされる可能性がある。そのため、設計時に標的部位と似た配列を持つ遺伝子の有無を確認しておき、植物体ができあがった後にそれらの DNA 配列を確認する。ただし最近ではオフターゲット効果の少ないタイプの CRISPR-Cas を用いるなど、その低減化技術が開発されつつある⁴⁾。また、自然突然変異も含めて非特異的な DNA の切断は自然状態でもある程度は起こるものであり、外来遺伝子の導入時のような、本来その植物で合成されない物質が作り出される事態は考えにくいとされ、安全性という点ではそれほど問題視されていない。

不安定な編集パターン：ゲノム編集において DNA の切断は人工ヌクレアーゼが行うが、その後の DNA 修復は細胞が本来持つシステムに依存しており、編集のパターンは一定ではない。全く同じ CRISPR-Cas9 遺伝子を導入しても塩基対の欠失や挿入など様々な変異パターンが起こる。そのため、遺伝子の働きを止めたり抑制したりすることは容易だ

が、塩基を別の塩基に置換するなどの精密な編集は、次項で述べる技術改良が進むまで困難だった。

(3) ゲノム編集の技術改良

ゲノム編集は幅広い分野への応用が期待できるため、世界中の研究者が改良技術の開発にしのぎを削っている。以下にそのいくつかを紹介する。

相同組換え：相同組換えとは2つの DNA の間で、よく似た配列を持つ部位（相同部位）が互いに入れ代わるしくみである。生物は DNA 修復機構の一つとして相同組み換えを用いており、DNA の損傷部分を、非損傷 DNA の相当部分と組み換えて修復する。ゲノム編集では人工ヌクレアーゼとともに、人為的に作製した DNA 断片を鋳型として取り込ませ相同組み換えを起こす。この手法により、1～数塩基の範囲での塩基の入れ替えから、遺伝子全体の挿入・除去などが可能となった。ただ、細胞内にヌクレアーゼタンパク質や DNA 断片を直接注入できる動物では広く普及しているが、植物では鋳型 DNA の同時導入が難しく、培養細胞系を利用可能な植物を中心に利用が進んでいる⁵⁾。

プライム編集：CRISPR-Cas9 システムを基に、二本鎖 DNA を切断する Cas9 ヌクレアーゼに代わって、片側の DNA のみを切断する Cas9 ニッカーゼという酵素を用いるプライム編集という手法が開発された。DNA を片側のみ切断し、同時に導入した RNA と逆転写酵素遺伝子により、修復に用いる鋳型 DNA を細胞内で合成させる。これにより1塩基から数十塩基の範囲で、DNA 配列の置換・挿入・欠失を精密に行うことができる。イネを始め作物でも成功例があるが効率は低い⁶⁾。

直接導入法：動物のゲノム編集では一般的な、細胞へ人工ヌクレアーゼタンパク質や gRNA を直接導入する方法も開発されている。

今のところ、遺伝子組換え法で用いられてきたパーティクルガン法や培養細胞系を用いた導入法が、レタスやコムギなどで成功しており⁷⁾、形質転換が難しい植物種のゲノム編集や、編集効率の向上に用いられている。

葉緑体・ミトコンドリアのゲノム編集：植物は細胞核以外に葉緑体とミトコンドリアにもゲノムを持つが、それらのゲノム編集も実用化されつつある。これは人工ヌクレアーゼにTALENを用いて、移送シグナル領域を付加することで可能になった^{8,9)}。核ゲノムに導入されて発現したTALENは葉緑体やミトコンドリアに移送され、それぞれのゲノムを切断する。交配により核ゲノム上からTALEN遺伝子を除去しても編集結果は維持されるため、最終的に葉緑体やミトコンドリアゲノムのみが変化した形質転換植物を作出できる。葉緑体やミトコンドリアのゲノム上には光合成や呼吸の調節にかかわる重要遺伝子がコードされており、今後はゲノム編集によりこれらの機能を強化した作物の開発が期待される。

おわりに

ゲノム編集技術の進歩と共に、植物においてもゲノム情報を自由に改変できる日が近づいている。一方で、技術の進歩があまりに急速なため、現時点で予想できないことが将来引き起こされる懸念がある。ゲノム編集の開発当初は、あくまで自然突然変異で起こりうる変化を人為的に起こす技術として楽観視されていた面がある。1カ所の編集だと確かにその通りだが、現在では多くの箇所を同時に、

しかも複雑に編集することが可能であり、通常の進化過程では起こりえない急激な変化を植物に引き起こすことは充分考えられる。また、そのような状況に対して政府をはじめとする公共部門の認識と制度設計が追いついていない。例えばある植物がゲノム編集されたものかどうかの判断は難しいため、これまでの規制や知的財産などの制度では対応できていない面がある。気候変動が地球規模で進行するなか、遺伝子操作技術の進歩は安定した作物生産の強力な手段だが、今後は消費者の不安を払拭するための、受け入れ体勢の構築が課題となると考える。

注および引用文献

- 1) ISAAA: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2019: Biotech Crops Drive SocioEconomic Development and Sustainable Environment in the New Frontier. *ISAAA Brief, No. 55*, ISAAA, Ithaca, NY, (2019).
- 2) 厚生労働省 Web サイト: 『遺伝子組換え食品』, https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/bio/idenshi/index.html (最終閲覧日: 2023年11月24日).
- 3) Jinek, M. et al.: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821 (2012).
- 4) Osakabe, K. et al.: Genome editing in mammalian cells using the CRISPR type I-D nuclease. *Nucleic Acids Res* **49**, 6347-6363 (2021).
- 5) 横井 彩子: 「植物における相同組換えを介した精密ゲノム編集ジーンターゲットング技術の展開」『化学と生物』**61**, 281-287 (2023).
- 6) Anzalone, A. V. et al.: Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* **576**, 149-157 (2019).
- 7) 濱田 晴康, 柳楽 洋三, 今井 亮三: 「茎頂メリステムをターゲットとした汎用性のあるゲノム編集技術の開発」『化学と生物』**56**, 287-293 (2018).
- 8) Arimura, S. I. et al.: Targeted gene disruption of ATP synthases 6-1 and 6-2 in the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* by mitoTALENs. *Plant J* **104**, 1459-1471 (2020).
- 9) Nakazato, I. et al.: Targeted base editing in the plastid genome of *Arabidopsis thaliana*. *Nat Plants* **7**, 906-913 (2021).