

ゲノム編集技術を用いた有毒ステロイドグリコアルカロイド (SGA) 低減ジャガイモの開発

澤井 学¹⁾、安齋 寛²⁾

1) 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター

2) 日本大学 生物資源科学部 暮らしの生物学科 特任教授

1. SSR2遺伝子を標的としたTALENによるゲノム編集ジャガイモの作出

ジャガイモ(=パレイショ)は三大穀物(トウモロコシ、コムギ、イネ)に次いで世界で多く生産されている食用作物である¹⁾。そんな主要食用作物であるジャガイモによる食中毒が日本だけでもほぼ毎年の様に発生している²⁾。これはジャガイモを含むナス科植物にしばしば生成蓄積する有毒なステロイドグリコアルカロイド (SGA) に起因する。SGAはコリンエステラーゼ阻害作用があり、副交感神経を亢進させて、下痢や腹痛の症状を引き起こす³⁾。ジャガイモでは α -ソラニン、 α -チャコニンが主なSGAで(図1)、芽や緑色になった皮に比較的多く含まれる。SGAはコレステロールを生合成中間体とすることが知られていたが、動物の主要なステロールであるコレステロールは、植物一般ではマイナーなステロールであり、植物におけるコレステロールの生合成経路は明らかではなかった。高等植物ではカンペステロール、スチグマステロール、 β -シトステロールを代表とする24-アルキルステロールが主なステロールであり、カンペステロールは植物ホルモンであるブラシノライドの生合成中間体である。アブラナ科シロイヌナズナのDwf1遺伝子は24-アルキルステロール生合成に関わる還元酵素をコードしていると考えられており、動物

におけるホモログはコレステロール生合成に関わる還元酵素をコードしていることが知られている。筆者らはナス科植物であるジャガイモ、トマトのexpressed sequence tag (EST) データベースにはそれぞれ2つのDwf1ホモログ遺伝子cDNAがあることに気が付き、Sterol Side chain Reductase (SSR) と名付けた。酵母異種発現系を用いたSSR酵素活性試験、RNAiによるSSR遺伝子発現抑制ジャガイモの作出とその成分分析から、2つのSSRの内、主にSSR1が24-アルキルステロール生合成に寄与し、SSR2がコレステロールならびにその代謝物であるSGA生合成に寄与していることが明らかとなった。そこで、TALENを用いたゲノム編集によるSSR2遺伝子破壊ジャガイモを試作した(図2)。試作されたジャガイモは、見かけはもとのジャガイモと変わらなかったが、SGA含量がもとのジャガイモの約1/10の濃度にまで減少していた(図3)⁴⁾。なお、この試作当時は、CRISPR-Cas9が発表されて間もなかったこともあってゲノム編集ツールとしてTALENを用いた。TALENのターゲット配列の設計にはTAL Effector-Nucleotide Targeter 2.0 website (<https://tale-nt.cac.cornell.edu>)⁵⁾ を利用した。また、TALENの構築にはミネソタ大学VoytasのグループのCermakらによるType IIS制限酵素を用いたDNA断片のアセンブル法であるGolden Gate法^{6,7)} を応用した手法⁸⁾ が

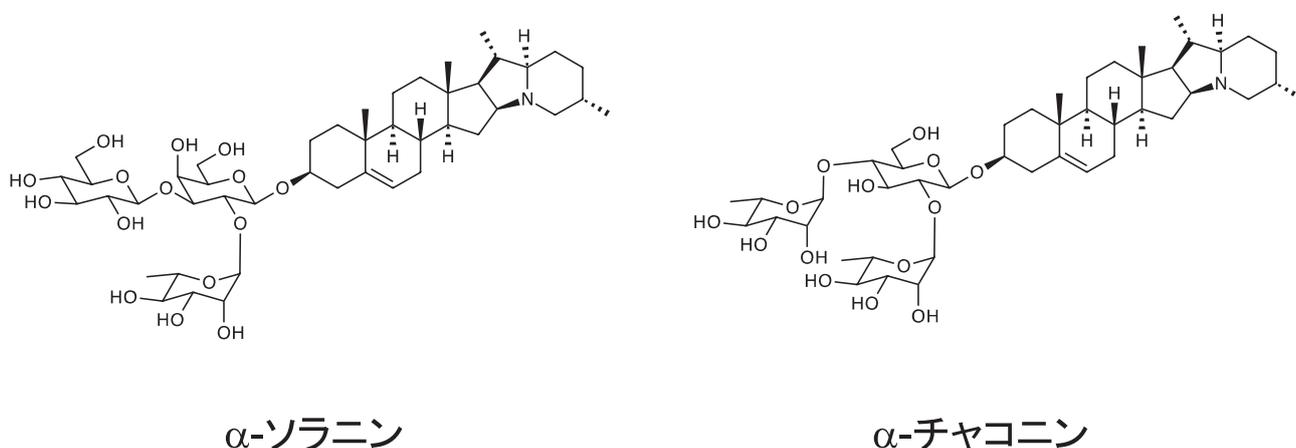
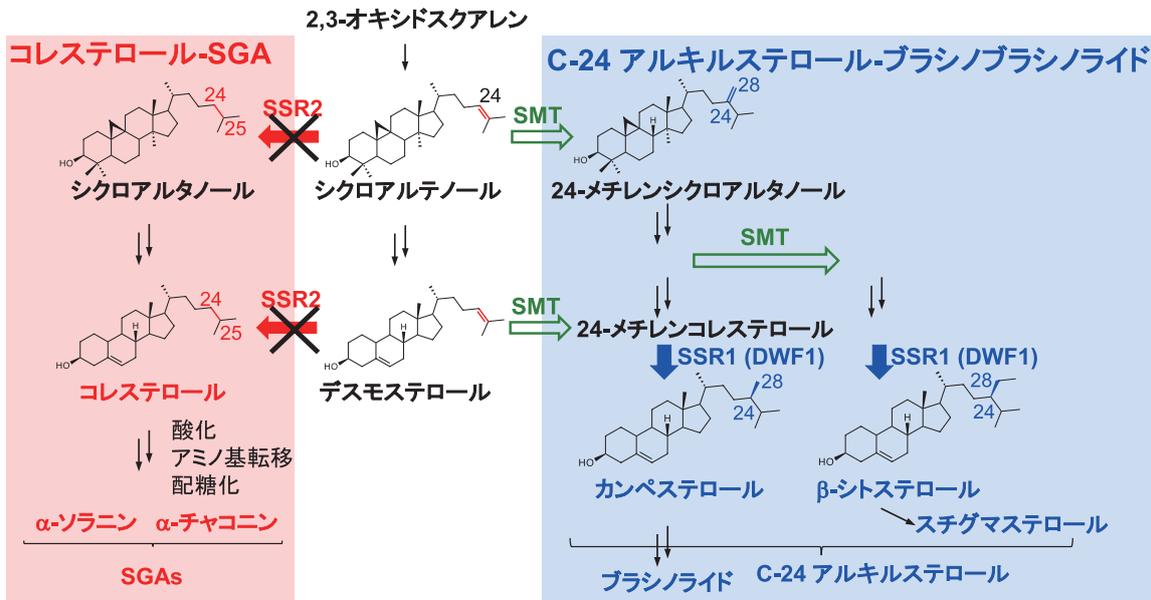
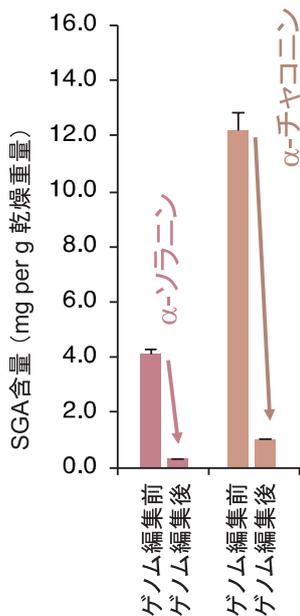


図1 ジャガイモ有毒SGAの構造



Sawai, Ohyama et al., (2014)⁴⁾の図をもとに作図

図2 24-アルキルステロール合成とSGA合成経路の概略図



Sawai, Ohyama et al., (2014)⁴⁾の図をもとに作図

図3 ゲノム編集によるジャガイモのSGA低減効果

頻用されており、筆者らは共著者である広島大学の山本卓、佐久間哲史らによる改良法⁹⁾を用いた。

2. ジャガイモゲノム編集作業の概要

さて、ゲノム編集による有毒SGA低減ジャガイモの試作について述べたが、ここでジャガイモをゲノム編集する作業の概要を紹介する。ジャガイモに限らず一般に植物のゲノム編集ではZFN、TALEN、CRISPR-Cas9などゲノム編集

のためのツールが植物細胞内で働くことで、ゲノムDNAが編集される。つまり、何らかの手段でゲノム編集のためのツールを植物細胞内で機能させる必要があり、それには遺伝子組換え技術がよく利用される。遺伝子組換え技術を用いてゲノム編集ツールを構成する遺伝子ら（以下ゲノム編集カセットと記載）をゲノムDNAに導入すると、導入されたゲノム編集カセットによってゲノム編集ツールが構成され、ゲノム上のターゲット遺伝子部分でゲノム編集が起こり、ゲノム編集植物が得られる。ジャガイモの遺伝子組換えではカルス化、再分化を伴うアグロバクテリウム法がよく用いられる。材料として利用できるジャガイモの部位はいくつかあるが、無菌培養でのカルス化、再分化を行うため、殺菌された材料を用いる。図4では無菌培養された植物体の茎を材料にしている^{10,11)}。まず無菌培養されたジャガイモ植物体の調製は、ジャガイモ塊茎を室温に置いて出芽させ（図4A）、切り取った芽を70%エタノール、界面活性剤を加えた次亜塩素酸ナトリウム水溶液で殺菌し、滅菌水で繰り返しよくすすぎ、適切な植物組織培養用固形培地に植え付けることで比較的容易に得ることができる（ただし、ウイルスフリーにするにはさらに成長点培養が必要である）。植え付けた芽は伸長して茎となり、葉が展開し、発根する（図4B）。頂芽を含む部分を切り取り、新しい培地に植え付けると茎の切り口付近から発根し、生長する。ただ、頂芽部分は1個体に1つであり、頂芽部分だけを新しい培地に植え付けては、個体数は増加しない。腋芽を含む茎も新しい培地に植え付けると（図4C）、

頂芽が無く頂芽優勢が起こらないため腋芽が生長し、新たな個体となり、植え付けた数だけ個体数が増加することになる。これを繰り返すことで無菌培養のジャガイモ植物体を維持、増殖でき、いつでもアグロバクテリウム法による遺伝子組換えに利用できる。さて、必要な数の無菌植物体が用意できたら、腋芽を含まない様に茎の節間を切り出し（図4D）、ゲノム編集カセットを含む植物形質転換用ベクターが導入されたアグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter*; 以下アグロバクテリウムと記載) の懸濁液を附着させ、余分な菌液を滅菌したろ紙などで取り除いてから抗生物質を含まない共存培地に静置する（図4E）。カルス化用植物ホルモンならびにアグロバクテリウム除菌用抗生物質（カルベニシリン、セフトキシム、メロベネムなど）の入った培地に静置する。茎切片の一部が脱分化（＝カルス化）後、カルス付き茎切片をシュート誘導用植物ホルモンならびにアグロバクテリウム除菌用の抗生物質の入った培地へ移す。カルスが再分化し、シュートが見られたら（図4F）、カルス（茎切片）からシュートを切り出し、植物ホルモン無添加（必要なら発根誘導用植物ホルモン入り）、アグロバクテリウム除菌用の抗生物質入り培地に植え付ける（図4G）。しばらくすると発根、生長し、再分化植物体が得られる（図4H）。ゲノム編集されているか再分化植物体のゲノムDNAのゲノム編集でターゲットにした遺伝子領域を調べる。ゲノム編集されたジャガイモが得られたら、多湿で無菌な*in vitro*の培養環境から外の環境に徐々に慣らしてから（＝馴化）、通常の栽培に移行する。ただし、この時点ではゲノム編集カセットが導入された遺伝子組換えジャガイモである可能性から、第二種使用等の遺伝子組換えジャガイモとして取り扱う。なお、ジャガイモの品種によって最適な各培地の組成、植物ホルモンの種類、濃度は異なるため、事前に調査、検討することをすすめる。また、一般的に対象とする植物の種類により、適したアグロバクテリウムの菌株が異なることもあり、除菌に使用する抗生物質もアグロバクテリウムの株ごとに適した種類、濃度があるため、こちらも事前に調査、検討が必要となる。

3. 非遺伝子組換えゲノム編集ジャガイモを得るための1つの方法

上述のカルス化、再分化を伴うアグロバクテリウム法といった遺伝子組換え技術を用いてゲノムDNAに導入すると、導入された遺伝子らはゲノム編集ツールを構成し、ゲノム上のターゲット遺伝子部分でゲノム編集が起こり、ゲノム編集植物が得られる。ただし、この段階ではゲノム編

集ツールが導入された遺伝子組換え植物でもある。ここで、ゲノム編集カセットとゲノム編集を受けたターゲット遺伝子が異なる染色体に存在し、連鎖しなければ、メンデルの法則に従い、減数分裂でそれぞれ独立して配偶子に含まれ、受精によって得られる種子の中には、ターゲット遺伝子はゲノム編集されているがゲノム編集カセットを含まない種子が存在する。すなわち遺伝子組換えではないゲノム編集植物が得られることが期待できる（図5）。しかし、ジャガイモの場合、塊茎で増殖するため普段は気に留めないが、男爵をはじめ雄性不稔な品種が多く、種子を得るのが困難なことが多い。また、自家受粉ができて種子が得られたとしても、そもそもジャガイモの品種はゲノムを構成する遺伝子全てが必ずしもホモでなくヘテロ、すなわち純系ではなく雑種なことが多く、男爵の子供は男爵では無いことが多いに起こり得る。これではゲノム編集できても元の品種のジャガイモとして優れた特性を維持できない可能性がある。さらに、図5は簡略化のため二倍体で両相同染色体にゲノム編集が起こったことを想定して描いたが、男爵をはじめ多くのジャガイモ品種は四倍体であるため、事態はより複雑である。そこで遺伝子組換えを回避する一つの手法を考案した。

アグロバクテリウム法による遺伝子組換えでは、アグロバクテリウム感染からゲノムDNAに遺伝子導入が起こるまでにタイムラグがあり、その間に導入する遺伝子が機能する「一過的発現」が起こることが知られている。この一過的発現によって目的とするゲノム編集が起これば、これ以降、ゲノム編集ツールは不要なため、ゲノムDNAにゲノム編集カセットが導入される必要はない。植物の遺伝子組換えでは導入したい遺伝子と共に選択マーカーとして抗生物質耐性遺伝子を導入することが多い。培地に抗生物質を添加し、抗生物質への耐性を指標に導入したい遺伝子と共に抗生物質耐性遺伝子がゲノムDNAに導入された遺伝子組換え植物細胞を選抜する。これらのことを逆手に取って、筆者らは、抗生物質による積極的な選抜を行わなければ、一過的発現によって目的とするゲノム編集は起こっているが、ゲノム編集カセットがゲノムDNAには導入されていないジャガイモが得られる可能性が高まることを期待し、遺伝子組換え植物細胞を選抜するための抗生物質を用いずに遺伝子解析でゲノム編集ジャガイモを選抜した。その結果、ゲノム編集されているがゲノム編集カセットが検出されない、つまり、遺伝子組換えにあたらないことが期待されるジャガイモを得ることに成功した¹¹⁾。残念ながら筆者らの論文が発表される前に、他のグループが別の植物を用いた同様なアイデアの研究論文を発表していたため、

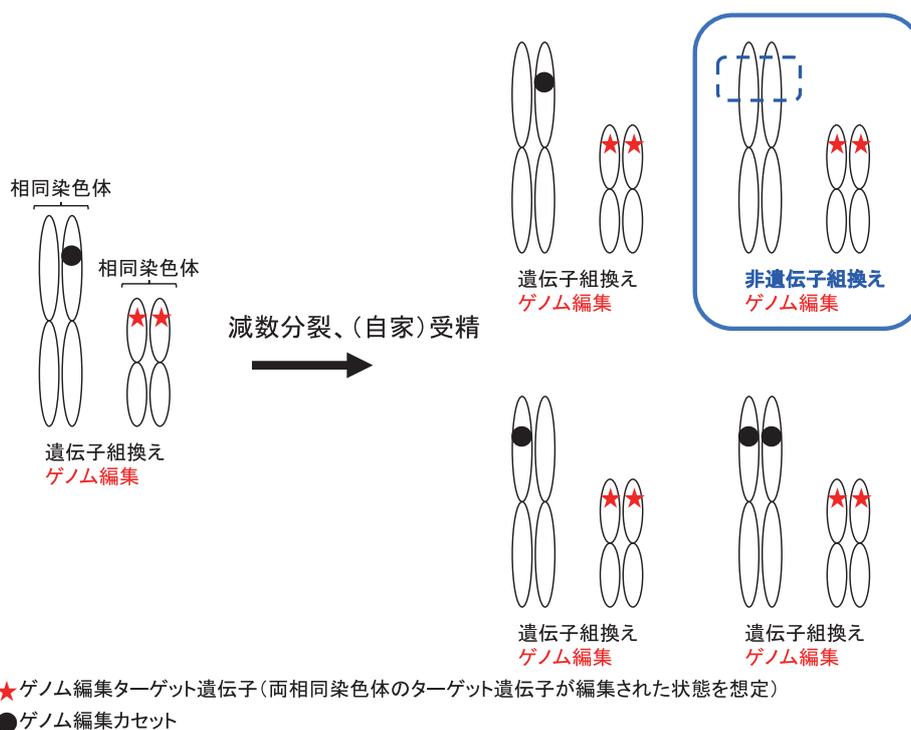


図5 ゲノム編集カセットの除去

世界初の試みにはならなかった¹²⁾。なお、先の論文⁴⁾の共著者である理研の梅基直行、斉藤和季は、イソペンテニルトランスフェラーゼ (ipt) 遺伝子を用いてゲノムへの挿入が起こった場合、形態異常が発生する仕掛けを組み込んだ手法を開発している¹³⁾。現在、SSR2遺伝子破壊ジャガイモは国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の隔離圃場にて栽培試験が行われている¹⁴⁾。

まとめ

昨今話題のゲノム編集技術であるが、それを用いたゲノム編集作物を作出するには、しばしば植物遺伝子組換え技術が用いられ、伝統的な植物組織培養技術がその基盤となっている。植物組織培養では、扱う植物種はもちろん、品種、使用する部位、目的によって培地組成をはじめとする培養条件が異なり、難易度もそれぞれで試行錯誤することとなる。近年ゲノム編集技術が広まったことをきっかけに、筆者ら植物科学者の中で植物組織培養技術の重要性が再認識された。また、このことを意識し、植物組織培養をテーマとしたシンポジウムも関連学会で開催されている。

参考文献等

- 1) Food and Agriculture Organization (FAO) FAOSTAT 2020年データ (<https://www.fao.org/faostat/en/#home>) (2022年10月30日閲覧)
- 2) 厚生労働省HP, 自然毒のリスクプロファイル：高等植

物：ジャガイモ (<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000082078.html>) (2022年10月30日閲覧)

- 3) Friedman, M. (2006). Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 8655–8681.
- 4) Sawai, S., Ohyama, K., Yasumoto, S., Seki, H., Sakuma, T., Yamamoto, T., Takebayashi, Y., Kojima, M., Sakakibara, H., Aoki, T., Muranaka, T., Saito, K., and Umemoto, N. (2014). Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato. *Plant Cell* **26**: 3763–3774.
- 5) Doyle, E.L., Booher, N.J., Standage, D.S., Voytas, D.F., Brendel, V.P., Vandyk, J.K., and Bogdanove, A.J. (2012). TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Res.* **40**: W117–W122.
- 6) Engler, C., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS One*, **3**: e3647.
- 7) Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2009). Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PloS One*, **4**: e5553.
- 8) Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang,

- Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J., & Voytas, D.F. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* **39**: e82.
- 9) Sakuma, T., Hosoi, S., Woltjen, K., Suzuki, K., Kashiwagi, K., Wada, H., Ochiai, H., Miyamoto, T., Kawai, N., Sasakura, Y., Matsuura, S., Okada, Y., Kawahara, A., Hayashi, S., and Yamamoto, T. (2013). Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes to Cells* **18**: 315–326.
- 10) 新屋智崇, 松永悦子, ジャガイモの形質転換方法, 特願 2009-168257 (特開2011-19459)
- 11) Yasumoto, S., Sawai, S., Lee, H.J., Mizutani, M., Saito, K., Umemoto, N., and Muranaka, T. (2020). Targeted genome editing in tetraploid potato through transient TALEN expression by *Agrobacterium* infection. *Plant Biotech.* **37**: 205–211.
- 12) Chen, L., Li, W., Katin-Grazzini, L., Ding, J., Gu, X., Li, Y., Gu, T., Wang, R., Lin, X., Deng, Z., McAvoy, R.J., Gmitter, F.G. Jr., Deng, Z., Zhao, Y., and Li, Y. (2018). A method for the production and expedient screening of CRISPR/Cas9-mediated non-transgenic mutant plants. *Hortic. Res.* **5**: 13.
- 13) 梅基直行, 齊藤和季, ゲノム編集植物の生産方法, 特願 2017-226643 (WO2019/103034)
- 14) 農研機構HP, 令和4年度ステロイドグリコアルカロイド低生産性バレイショ(ジャガイモ)の栽培状況(植え付け(2回目)の様子、8月30日、観音台第3事業場組換え植物隔離ほ場 (https://www.naro.go.jp/project/research_activities/laboratory/nias/154715.html) (2022年10月30日閲覧)

◆著者紹介

澤井 学 Satoru Sawai

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター 研究員

日本大学生物資源科学部非常勤講師
大阪大学招聘研究員(大学院工学研究科)

学歴

2007年 日本大学大学院生物資源科学研究科応用生命科学専攻博士課程修了
博士(生物資源科学)

職歴

2013年 独立行政法人 理化学研究所 環境資源科学研究センター 研究員

2015年 国立大学法人 大阪大学大学院工学研究科 特任研究員(常勤)
などを経て

2021年 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター 研究員(現在に至る)

2019年 日本大学生物資源科学部非常勤講師(現在に至る)

2021年 大阪大学招聘研究員(大学院工学研究科)(現在に至る)

職務内容

- ・～2021年 医薬品、食品添加物原料などとして用いられるマメ科カンゾウの有用成分であるグリチルリチンの生合成遺伝子探索やジャガイモ有毒ステロイドグリコアルカロイドの生合成遺伝子探索ならびにそれを標的としたゲノム編集による毒の少ないジャガイモの作出等に従事。
- ・2021年～ 薬用植物資源の収集、保全、栽培試験、育種等に従事。

所属学会/その他

- ・日本植物バイオテクノロジー学会会員
- ・日本生薬学会会員
- ・日本植物細胞分子生物学会学生奨励賞受賞(2007年)
- ・TERPNET 2009 (9th International Meeting: Biosynthesis and Function of Isoprenoids in Plants, Microorganisms and Parasites), Good Presentation Award 受賞(2009年)
- ・第6回理研研究奨励賞(RIKEN The 6th Research Incentive Award) 受賞(2015年)

安齋 寛 Anzai Hiroshi

日本大学生物資源科学部くらしの生物学
科 くらしのバイオ研究室 特任教授**学歴**東北大学1984大学院 農学研究科農芸化学
学博士後期単位取得満期退学

農学博士（東北大学）

経歴

1984年日本大学農獣医学部水産学科助手

2004年日本大学短期大学部農学科（生物
資源学科）教授2015日本大学生物資源科学部くらしの生
物学科くらしのバイオ研究室 教授

2021から、同 特任教授

この間、2000年から日本大学大学院生物
資源科学研究科生物資源利用科学専攻の
講師、教授を経て現在、特任教授を兼任
生物有機化学、生物工学、くらしのバイ
オテクノロジー、バイオサイエンス実験
等を担当**所属学協会/その他**日本農芸化学会、日本生物工学会、日本
生化学会、日本糖質学会、日本応用糖質
科学会、セルロース学会、マリンバイオ
テクノロジー学会、日本水産学会、日本
水産増殖学会、日本生物教育学会、日本
バイオ技術教育学会、日本環境動物昆虫学会、日本応用動物昆虫学会、日本昆虫
学会、日本微生物生態学会2006年 NPO法人日本バイオ技術教育学
会理事に就任、副理事長を経て2019年か
ら理事長**コメント**日本大学農獣医学部水産学科の卒論で西
澤一俊先生に師事し、多核性緑藻類オオ
ハネモのグルタミン酸脱水素酵素の研究
を行い、その後、東北大学農学部農芸化
学科農産利用学研究室で松田和雄先生に
師事。軟体動物タツナミガイのセルラー
ゼの研究で学位を取得した。日本大学着
任後、日本大学短期大学部農学科の楠元
守教授に師事し「植物細胞工学」と「植
物細胞工学実験」を担当して、様々な植
物の組織培養に関する経験を積む。2002
年からスタートした21世紀COEプログ
ラム（統括責任者 別府輝彦教授 2022年
度文化勲章受章）において、カブトムシ
幼虫の腸内細菌叢の研究をスタートさせ
る。この時、共著者の澤井 学氏とは同
じプロジェクトで研究をすることになっ
た。様々な研究テーマに取り組んだこと
が、日本バイオ技術教育学会の仕事に役
立っている。