

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658283

研究課題名(和文) TALEを利用した配列特異的な遺伝子発現抑制法及び欠失変異導入法の確立

研究課題名(英文) Establishment of an efficient TALE-mediated genome editing in plants

研究代表者

竹田 篤史 (Takeda, Atsushi)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：60560779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物で効率よく働くTranscription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN)の作成系を構築した。はじめに、*Arabidopsis thaliana*のコドン頻度に最適化したTALE作成系を構築した。この系は、既報のTALE作成系の様々な問題点を改善したものである。また、作成したTALEが植物細胞内で標的DNA配列に結合するかどうかを確認するために、一過的ルシフェラーゼアッセイ系を構築した。この系によって、植物を形質転換する前に、構築したTALENが核内で標的DNA配列に結合する効率を判断することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) system, which efficiently functions in plants. We first generated a TALE backbone and repeats in the TALE DNA binding domain according to the codon usage of a model plant, *Arabidopsis thaliana*. Our TALE system has several advantages compared to other plant TALEN systems previously reported. In addition, we developed a transient Luciferase (Luc) assay system, in which we are able to evaluate the efficiency of the binding ability of the assembled TALEs with the target DNA sequences in plants. By using this Luc assay system, we confirmed the abilities of the assembled TALENs before we start to generate transgenic plants. We successfully introduced deletion mutations by using our TALEN system in plants. The systems we developed in this study help contribute to the advances in plant research in future.

研究分野：植物遺伝子工学

キーワード：ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術の確立は重要な課題である。確立された場合、基礎研究に役立つだけでなく、遺伝子治療や作物育種に活かすことも可能となるであろう。

Xanthomonas属の植物病原細菌は、AvrBs3型のタイプIIIエフェクターをもつ。この型のエフェクターは、Transcription Activator-Like Effector (TALE)と呼ばれており、植物細胞内で転写を活性化することで細菌の感染を助ける。AvrBs3タンパク質のドメインのうち、注目すべきはDNA結合領域である。AvrBs3では34アミノ酸からなる配列が17.5回繰り返されている。34アミノ酸からなる各Repeat配列は、12、13番目のアミノ酸以外が非常に良く保存されている。Science 2009, 326, 1509-12の論文で、1 Repeatが1塩基を認識しており、12、13番目のアミノ酸配列が塩基特異性を決めている事が示された。この結果、TALEのDNA結合ドメインを改変する事で任意のDNA配列と特異的に結合するタンパク質の作出が可能となった。実際、FokIのDNA切断ドメインを付加したTALE nuclease (TALEN)によってヒトの培養細胞や植物細胞でDNA欠失変異を誘導した例が報告されている(Nat. Biotechnol. 2011, 29, 143-8; Nucl. Acids Res. 2011, doi: 10.1093/nar/gkr597; Nucl. Acids Res. 2011, 39, e82)。TALEは、これまで主流だったZinc-finger nuclease (ZFN)と比べて簡便な構築性と高い配列特異性が予想されている。しかし、TALEによる植物体での遺伝子破壊の報告例は無く、欠失変異導入過程の至適化の余地も残っている。また、欠失変異導入以外へのTALEの応用例の報告も無い。申請者は、過去10年動植物でRNAiに関する研究を行ってきた。RNAiによる遺伝子発現制御の応用に限界を感じていた中で、TALEの存在を知り、TALENを用いればRNAiで解決出来なかった問題点が解決できると思ったのが、本研究開始の着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

RNAiが広く普及したのは、配列特異的かつ簡便な遺伝子発現抑制が可能だからである。しかし、RNAiでは遺伝子発現を完全に無くすることはできず、低温やウイルスによって抑制が解除されたり、植物や線虫ではシグナルが移行して望まない部位でもRNAiが起こる等の問題が存在する。そこで、配列特異的かつ簡便であり、これらの問題も解決できる系が望まれている。本研究の目的は、植物病原細菌で発見された Transcription Activator-Like Effector (TALE)を利用して、RNAiの諸問題を解決した遺伝子発現制御・破壊系を構築し、その有用性を示す事である。ここでは、簡便なTALE作製系を構築した後、モデル植物 *Arabidopsis thaliana* の植物体を用いて、部位特異的な欠失変異導入の成功を目指す。

3. 研究の方法

近年開発されたTALENは、植物ゲノム上での配列特異的な遺伝子破壊を可能にした。しかし、既存の系は細菌由来のTALEを大きく改変することなく利用されており、植物での発現に最適化されていない。そこで、本研究では、植物での発現に適したTALE系を構築することで、植物での安定的なTALENの発現を目指した。本研究の方法は以下の通りである。

モデル植物 *A. thaliana* のコドン頻度に合わせて最適化したTALEベクター骨格と Repeat-variable di-residue (RVD) シリーズを構築する。

TALEベクター骨格に関しては、植物体内でのTALE発現量を増加させるためにイントロンの挿入を行い、クローニング時のバックグラウンドを下げるために ccdB 遺伝子を挿入する工夫を行う。

RVD シリーズに関しては、Golden gate cloningの際に、末端にパリンドロームが生じないように工夫することで、同時に10個のRVDを効率よく連結できるようにする。

6番目と10番目のRVDについては、異なるコドンを使用した複数のRVDシリーズを作成することで、TALE完成後でもリピート領域全体をシーケンス出来るようにする。

本研究課題の申請段階では報告されていなかったGを特異的に認識するNH-RVDも作成する。

以上の工夫を加え、植物での発現を目的としたTALENを効率よく作成出来る系の構築を行う。

4. 研究成果

本研究では、植物で効率よく働くTALENの系を構築した。本研究の成果は以下の(1)~(3)の通りである。

(1) *A. thaliana* のコドン頻度に最適化したTALE骨格を構築した。我々が構築した系は、「異なるエピトープタグの付加により各TALENの検出が容易」、「イントロンの挿入によるアグロバクテリウム内での異所発現の防止」、「ヘテロダイマー型のFokI-DNA切断ドメインの利用によるOff-target効果の低減」、「各Repeat variable di-residuesユニットへのサイレント変異導入により、連結後のTALEN全長のシーケンス解析が可能」、「G認識のためのNH-RVDの導入」などの特徴を持つ。

(2) 構築したTALEが植物細胞内で標的のDNA配列に結合するかどうかを確認するために、*Nicotiana benthamiana* を用いた一過的ルシフェラーゼアッセイ系を構築した。この系では、連結したTALEのDNA結合ドメインにAvrBs3遺伝子の転写活性化ドメインを付加したものをを用いた。この系により、植物を形質転換する前段階で、構築したTALENが核内で標的のDNA領域に結合するかどうかを判断することが可能となった。我々の構

築した TALE 系を転写活性化研究に用いることも可能となった。

(3)構築した TALEN の系を用いて、*A. thaliana* と *N. benthamiana* のゲノム編集を行った。*N. benthamiana* の TOM1/TOM3 遺伝子、*A. thaliana* の MIRNA 遺伝子座を標的に、欠失変異体の単離を試みた。PCR とシーケンス解析によって欠失変異の導入を確認したが、劣性ホモ植物の選抜までは完了しなかった。研究期間は終了したが、これらの変異体植物の解析を進めた後、成果を発表したいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

1. Garcia-Ruiz H., Carbonell A., Hoyer S. J., Fahlgren N., Gilbert K. B., Takeda A., Giampetruzzi A., Garcia-Ruiz M. T., McGinn M. G., Lowery N., Baladejo M. T. M. and Carrington J. C. (2015) Roles and programming of Arabidopsis ARGONAUTE proteins during Turnip mosaic virus infection. *PLoS Pathogens* 11, e1004755. 査読有 DOI: 10.1371/journal.ppat.1004755
2. Kishi-Kaboshi M., Muto H., Takeda A., Murata T., Hasebe M. and Watanabe Y. (2014) Localization of tobacco germin-like protein 1 in leaf intercellular space. *Plant Physiology and Biochemistry* 85, 1–8. 査読有 DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.10.005
3. Takeda A. (2014) Studies on molecular mechanisms of RNA silencing-mediated anti-virus defense in plants and RNA silencing suppression by plant viruses. *Journal of General Plant Pathology* 80, 527–528. 査読無 DOI: 10.1007/s10327-014-0548-9
4. 竹田篤史, (2014) 「RNA サイレンシングによるウイルス抵抗性機構及びウイルスによる RNA サイレンシング抑制機構に関する研究」、日本植物病理学会報、80, 22. 査読無
5. Tsuzuki M., Takeda A. and Watanabe Y. (2014) Recovery of *dicer-like 1*-late flowering phenotype by miR172 expressed by the non-canonical DCL4-dependent biogenesis pathway. *RNA* 20, 1320–1327. 査読有 DOI: 10.1261/rna.044966.114
6. Carbonell A., Takeda A., Fahlgren N., Johnson S. C., Cuperus J. T. and Carrington J. C. (2014). New generation of artificial microRNA and synthetic *trans*-acting small interfering RNA vectors for efficient gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 16, 15–29. 査読有 DOI: 10.1104/pp.113.234989
7. Kumakura N., Otsuki H., Tsuzuki M., Takeda A. and Watanabe Y. (2013) *Arabidopsis* AtRRP44A is the functional homolog of Rrp44/Dis3, an exosome component, is essential for viability and is required for RNA processing and degradation. *PLOS One* 8, e79219. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0079219
8. Hayashi M., Nanba C., Saito M., Kondo M., Takeda A., Watanabe Y., and Nishimura M. (2012) Loss of XRN4 Function can trigger cosuppression in a sequence-dependent manner. *Plant and Cell Physiology* 53, 1310–1321. 査読有 DOI: 10.1093/pcp/pcs078
9. Motomura K., Le Q., Kumakura N., Fukaya T., Takeda A., and Watanabe Y. (2012) The role of decapping proteins in the miRNA accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *RNA Biology* 9, 644–652. 査読有 DOI: 10.4161/rna.19877

[学会発表](計13件)

1. 唐戸俊介、白谷公孝、都筑正行、渡邊雄一郎、竹田篤史「AGO1-ウイルス由来 siRNA の標的遺伝子予測を目指して」、第 100 回日本植物病理学会、2015 年 3 月 29 日、明治大学、東京都千代田区
2. 都筑正行、竹田篤史、渡邊雄一郎「miR172 強制発現によるシロイヌナズナ Dicer-like 1 変異体の部分相補」、第 78 回日本植物学会、2014 年 9 月 12–14 日、明治大学、神奈川県川崎市
3. 唐戸俊介、都筑正行、白谷公孝、渡邊雄一郎、竹田篤史「植物 microRNA の特異性に関する研究」、第 78 回日本植物学会、2014 年 9 月 12–14 日、明治大学、神奈川県川崎市
4. Kumakura N., Otsuki H., Takeda A. and Watanabe Y. "Analyses of Arabidopsis RRP44A, a catalytic center of RNA exosome." 第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 19 日、富山大学、富山県富山市
5. 唐戸俊介、都筑正行、竹田篤史、渡邊雄一郎「植物 microRNA による遺伝子発現抑制の特異性に関する研究」、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 日、富山大学、富山県富山市
6. Tsuzuki M., Takeda A. and Watanabe Y. Construction of microRNA expression system independent of Dicer-like 1 in *Arabidopsis*. Keystone Symposia: RNA Silencing, 2014 年 2 月 3 日、Seattle, USA.
7. Kumakura N., Otsuki H., Takeda A. and Watanabe Y. *Arabidopsis* AtRRP44A is the functional homolog of Rrp44/Dis3, an exosome component, is essential for viability and is required for RNA processing and degradation. 第 36 回日本分子生物学

- 会年会、2013年12月5日、神戸ポートピアホテル、兵庫県神戸市
8. 都筑正行、竹田篤史、渡邊雄一郎「シロイヌナズナにおける Dicer-like 1 非依存的な microRNA 発現系の構築」、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸ポートピアホテル、兵庫県神戸市
 9. 都筑正行、竹田篤史、渡邊雄一郎「植物の次世代への移行に必要な microRNA の探索」、第5回日本 RNAi 研究会、2013年8月30日、グランドプリンスホテル広島、広島県広島市
 10. Kumakura N., Otsuki H., Takeda A. and Watanabe Y. A putative exosome component is essential for female gametophyte development. "Post-transcriptional gene regulation in plants" A satellite meeting of plant biology 2013, 2013年7月25日、Providence, USA.
 11. 熊倉直祐、大月陽路香、竹田篤史、渡邊雄一郎「ウイルス抵抗性機構としての RNA exosome 解析」、第98回日本植物病理学会、2013年3月28日、岐阜大学、岐阜県岐阜市
 12. 都筑正行、竹田篤史、渡邊雄一郎「シロイヌナズナにおける DCL1 に依存しない microRNA の発現系の構築」、第30回日本植物細胞分子生物学会、2012年8月4日、奈良先端科学技術大学院大学、奈良県生駒市
 13. Kumakura N., Takeda A. and Watanabe Y. Assessment of RNA exosome as a viral resistance factor. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012年8月1日、Kyoto International Conference Center、Kyoto, Japan.

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹田 篤史 (TAKEDA ATSUSHI)

立命館大学・生命科学部

・准教授

研究者番号：60560779