

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：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660011

研究課題名(和文)人工キメラリプレッサーによる汎用的な新規植物ジーンサイレンシング技術の開発

研究課題名(英文) Development of new comprehensive gene-silencing technology by using artificial chimeric repressor in plant

研究代表者

光田 展隆 (Mitsuda, Nobutaka)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：80450667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：まず標的のどの部位にキメラリプレッサーが結合すれば効果的に転写抑制を引き起こせるかを検証するため、ルシフェラーゼ遺伝子領域の途中にGAL4結合領域を挿入したレポーターを作成し、アッセイを行った。しかし、実験系の成立が困難な程にルシフェラーゼ活性が低下することがわかった。そこで、CRISPER-Cas9を利用することにし、DNA切断活性のないCas9変異体にSRDXを融合した遺伝子をガイドRNAと共発現するベクターを構築した。テスト実験として35Sプロモーターによってルシフェラーゼが発現するプラスミドの各所にガイドRNAを設計し、効果を検証したが抑制効果は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：To determine which region is most effective to suppress expression of target gene by chimeric repressor, repeated GAL4 binding sequence was inserted into LUC gene. However, it was found that LUC activity becomes much reduced even without any effector in that case. We therefore decided to employ CRISPR-Cas9 system for our purpose. We prepared vector that expresses gRNA and mutated CAS9 (D10A H840A) fused with SRDX which doesn't digest DNA. As a test experiment, we designed several gRNAs for the reporter construct 35S:GAL4UASx5:TATA:LUC, however, we didn't see any repression of the reporter when we expressed these gRNAs and mutated CAS9 fused with SRDX together at least in the level of transient assay.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：CRES-T 転写抑制 転写因子 CRISPR

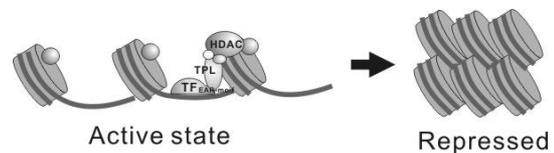
1. 研究開始当初の背景

特定の遺伝子(群)の発現を著しく低下させたり(ジーンサイレンシング)、遺伝子座(群)そのものを破壊したりする(ジーンノックアウト)技術は、遺伝子の基礎研究、応用研究を問わずきわめて重要である。植物分野において、前者の代表例は RNAi 技術であり広く使われているが、標的遺伝子、標的配列によって効果が大きく変わることや、複数遺伝子の発現を同時に抑制するのが困難であったり、逆に、意図しない遺伝子の発現低下を引き起こしたりすることが問題であった。これに対して近年急速に発達してきた後者の代表例が、任意の十数塩基に結合する人工モジュラール TAL にヌクレアーゼを連結して発現させ、標的遺伝子座に変異などを起こさせる技術である。しかし、まだ高効率であるとは言えずしかもノックアウトは不可逆的な変異であり、遺伝子発現を自在にコントロールする目的には使用できない。そこで、発現を低下させたい遺伝子のプロモーター領域に結合する、TAL ベースの人工 DNA 結合タンパク質に、植物特異的な転写抑制ペプチド(ドメイン)である EAR-motif(実際はそれを改良した SRDX ペプチド配列)を融合させた人工キメラリプレッサーを発現させる技法が登場しつつある(Mahfouz et al., 2012)。しかしファミリー遺伝子間におけるプロモーター領域の保存性の低さを考えると、本法は特定の 1 遺伝子の発現を低下させる技術と想定され、あくまで RNAi の代替技術であり、RNAi 技術にくらべて大きなメリットがあるとはいえない。また、現状では発現低下が十分ではなく、技術的改良の余地があると考えられる。このような状況を総合すると、配列が類似した複数の遺伝子発現を同時に、しかも精度良く抑制する技術は確立されていないと言える。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、転写因子がプロモーター領域に結合するという常識にとらわれずプロモーター領域や、コーディング領域、下流領域を含めた遺伝子全体のどの部分にキメラリプレッサーが結合するともっとも効果的であるかなどをあらためて検証したうえで、実際に特定の遺伝子(群)を標的にした TAL 型人工キメラリプレッサーを作成し、新しいジーンサイレンシング技術の確立を目指す。EAR-motif(SRDX 配列)は co-repressor であるとされる TOPLESS(TPL)タンパク質およびその近縁タンパク群(TPRs)と相互作用

することが知られており、また、TPL/TPRs タンパク質は間接的にヒストン脱アセチル化酵素をリクルートしてくる考えられている(Long et al., 2006)。つまり、EAR-motif(SRDX 配列)を持つキメラリプレッサーは結合した領域周辺のヒストン脱アセチル化を引き起こして転写を抑制すると考えられ、必ずしもプロモーター領域に結合しなくても当該遺伝子の発現を抑制する可能性がある(図 1)。ファミリー遺伝子間において保存性の高いエクソン領域の十数塩基に人工キメラリプレッサーを結合させて、当該遺伝子および近縁遺伝子の発現を抑制できるならば、RNAi よりも優れた新しいジーンサイレンシング技術となりえる。また、誘導プロモーターなどを利用して一過的に発現させることも可能である。



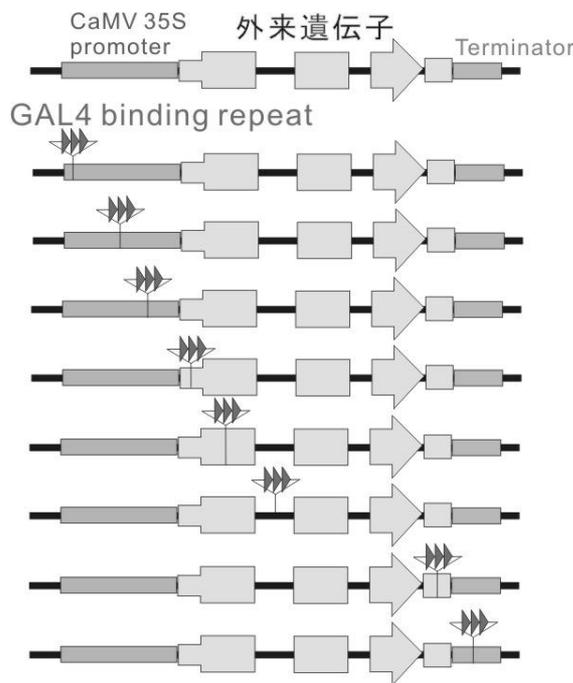
(図 1)キメラリプレッサーは TPL を介して周辺領域のヒストン脱アセチル化を引き起こすと考えられている

3. 研究の方法

(1) 標的遺伝子の発現を抑制するのに最適なキメラリプレッサー結合部位の探索

これまでの研究では、あくまで標的遺伝子のプロモーター領域の中においてどこにキメラリプレッサーが結合するとその効果を発揮できるかについてしか検討してこなかった。EAR-motif リプレッションドメイン(SRDX)が TPL/TOPLESS RELATED PROTEINS (TPRs)を介してヒストン脱アセチル化酵素をリクルートし、周辺領域も含めてヒストンの脱アセチル化を誘導していることが定説となりつつある今日、EAR-motif をもつ転写抑制因子は必ずしもプロモーター領域に結合しなくてもよいのではないかという疑念が生じてくる。実際 EAR-motif をもつ転写抑制因子について、そのような視点から直接結合部位を詳細に検討した例はなく今後の研究が待たれる。本研究ではそのような視点から、トランジェントアッセイおよび組換え植物を使用して、プロモーター領域、5' UTR 領域、コーディング領域(エクソン、イントロン)、3' UTR 領域、下流領域のどこにキメラリプレッサーが結合するともっとも転写抑制効果を発揮できるかを検

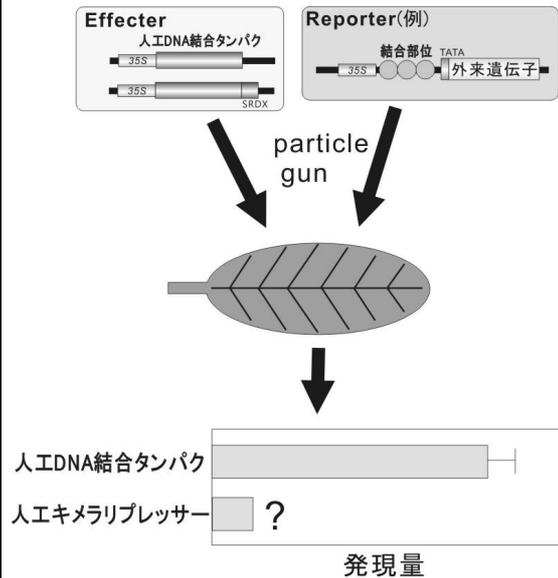
証する。具体的には「CaMV35S プロモーター:外来遺伝子:ターミネーター」コンストラクト中のさまざまな場所に酵母の GAL4 転写因子結合部位を挿入し、「CaMV35S プロモーター:GAL4-SRDX」を共発現させたときの外来遺伝子の転写量(mRNA 発現量)を定量する(図 2)。この実験はシロイヌナズナ のロゼット葉を用いたトランジエントアッセイと、シロイヌナズナ組換え体を作成することによって行う。また、SRDX を複数回繰り返して融合させた場合の効果についても調査し、もっとも標的遺伝子の発現を抑制できる条件を検討する。



(図2)さまざまな位置に GAL4 結合部位を挿入したコンストラクトを作成し、GAL4-SRDX が最も外来遺伝子の発現を抑制する挿入位置を調べる

(2)人工キメラリプレッサー遺伝子の作成前項にて遺伝子中のどの部位にキメラリプレッサーが結合するともっとも効果が発揮できるかを明らかにしたのち、実際のシロイヌナズナ内在遺伝子を 3~4 遺伝子程度異なる染色体から選んで、各々に対して2~5種類程度人工キメラリプレッサー遺伝子を作成する。3~4 遺伝子中 2 遺伝子程度はノックアウトによって明確に表現型が現れるものを選定する。前項の結果にもよるが、エキソンなどの保存領域でも効果が認められた場合、ファミリー遺伝子も含めて 3 遺伝子程度を同時にノックダウンできるよう設計する。ターゲット配列長は 12 塩基程度を想定している。

TAL 型人工キメラリプレッサーの作成にあたっては 2 塩基を認識するモジュールを 6~7 連結する手法をとる。今後任意の塩基配列に結合する人工転写因子を容易に作成できるように、キット化しておく計画である。作成した人工キメラリプレッサーは大腸菌で発現させた後に DNA との親和性を確認するためゲルシフト解析を行うか、シロイヌナズナロゼット葉を用いたトランジエントレポーターエフェクターアッセイによってその効果を事前検証する(図 3)。

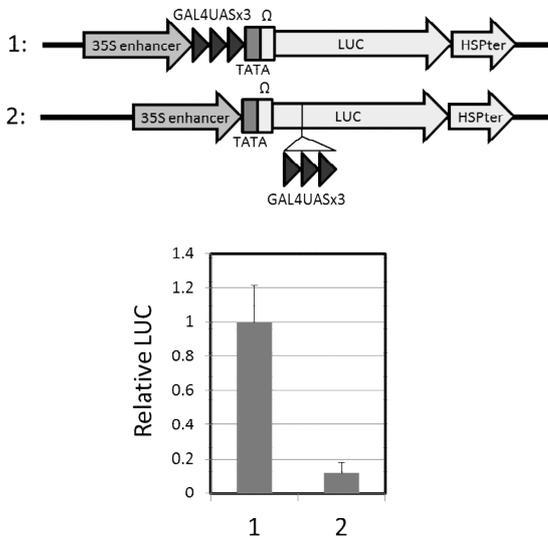


(図 3)人工キメラリプレッサーが適切に機能するか(少なくとも標的配列に結合するか)はトランジエントアッセイで確認できる。

4. 研究成果

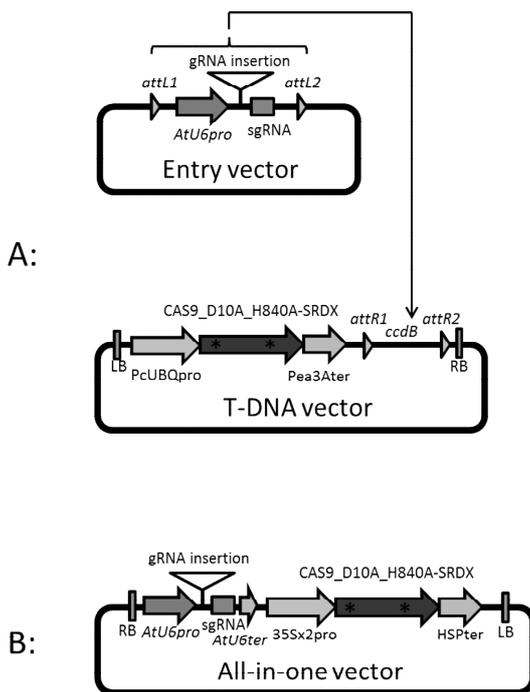
(1)キメラリプレッサー結合位置によるレポーター遺伝子発現抑制の効果について

まず標的遺伝子のどの部位にキメラリプレッサーが結合すればもっとも効果的に転写抑制を引き起こせるかを検証するため、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として使い、コード領域の途中に読み枠がずれないように配慮しつつ酵母転写因子である GAL4 の結合領域を挿入したレポーターコンストラクトを作成し、GAL4-SRDX エフェクターと同時にシロイヌナズナプロトプラストに導入してレポーターアッセイを行った。しかし、GAL4 結合領域をルシフェラーゼ遺伝子の途中に挿入すると、エフェクターなしでも実験系自体の成立が困難な程にルシフェラーゼの活性が大幅に低下することがわかった(図 4)。



(図4) GAL4 結合配列をレポーター内に挿入するとレポーター活性が大幅に低下する。データはエフェクターなしのときのレポーター活性。

そこで、思いきって最新のトレンドを鑑み、デザインや作成に手間のかかる TAL ではなく、CRISPER-Cas9 システムを利用することにした。すなわち、ガイド RNA に誘導されて DNA に結合することはできるが、DNA を切断する活性のない Cas9 変異体 (CAS9 D10A H840A) に SRDX を融合した遺伝子を作成し、ガイド RNA と共発現するベクターを 2 種類用意した (図 5)。

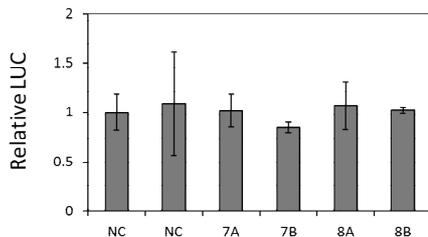
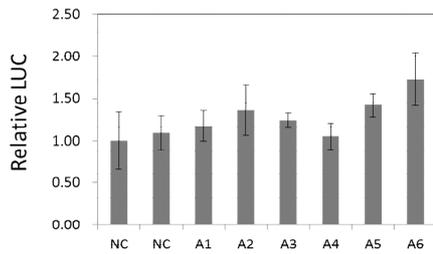
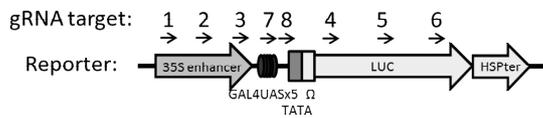


(図 5) 用意した CAS9 D10A H840A SRDX 発現用ベクター 2 種類

A タイプはいったん gRNA をエントリーベクターにクローニングしてから、CAS9 D10A H840A SRDX を発現する T-DNA ベクターに移しかえて使用する。Puchta 博士提供のベクターを改変して作成した。B タイプは最初から gRNA を CAS9 D10A H840A SRDX が載った T-DNA ベクターにクローニングする。刑部祐里子博士らとの共同研究。

これらのうち、まず A タイプを用い、35S:GAL4UASx5:TATA:LUC レポーターの 35S エンハンサー部位や LUC 遺伝子部位を標的とした gRNA を計 6 種類設計して、CAS9 D10A H840A SRDX がレポーター遺伝子の発現を抑制しうるかをシロイヌナズナの葉肉細胞プロトプラストでのトランジェントアッセイにより調べた (図 6)。しかしいずれの部位を標的としてもレポーター遺伝子の発現抑制効果は見られなかった。そこで、次に A, B 両方のタイプのベクターを用い、GAL4 結合部位や TATAbox 上流部位を標的として gRNA を発現させ、レポーター遺伝子の発現抑制効果を調べたが、いずれも効果がないか非常に小さいと判断された (図 6)。

このような結果から、少なくともトランジェントアッセイのレベルでは CAS9 D10A H840A SRDX は期待したとおりに機能しないことが示唆された。これは、そもそも転写因子と CAS9 では DNA 結合様式が大きく異なるからであるかもしれない。しかし、CRISPR-CAS9 実験系は非常に簡便であることから、今回の研究結果であきらめるには惜しく、今後もより安定な結果が期待できる組換え体での実験などを行って、本当にこの実験系が成り立たないのかを慎重に検討していきたい。



(図6) CAS9 D10A H840A SRDX による遺伝子発現抑制効果の検証
 35S:GAL4UASx5:TATA:LUC レポーターの 35S 部位(1-3)、GAL4UAS 部位(7)、TATA 上流部位(8)、LUC 部位(4-6) に対して gRNA を設計し、図5のA、B二種類のベクターを使用して、レポーター遺伝子発現の抑制効果を調べた。下のグラフにおいて、NCは無関係のgRNAをクローニングしたネガティブコントロール、A1等の表記はベクターの種類(A、B)とgRNAの組合せを示す。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光田 展隆 (MITSUDA, Nobutaka)
 国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：80450667

(2) 研究分担者

加藤 義雄 (KATO, Yoshio)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：20415657

(3) 連携研究者

なし

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし