

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871134

研究課題名(和文) 効率的遺伝子変異導入の為に改良型人工ヌクレアーゼTALENの開発

研究課題名(英文) Investigation of super-active TALEN in vitro

研究代表者

伊藤 陽子 (Ito, Yoko)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・特別研究員

研究者番号：60584571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでTALENをはじめ人工ヌクレアーゼの活性評価としては、培養細胞や受精卵を用いた *in vivo* アッセイが広く用いられてきた。しかし、*in vivo* アッセイのみではTALENタンパク質の性質を十分理解するのは困難である。そこでまず、活性のある組換えTALEN・TALEタンパク質を調整し、*in vitro*でのTALEN活性評価系を確立し、super-active TALENはDNA結合活性が高いことを明らかにした。更に、構造生物学的実験も行い、TALEタンパク質の高活性化機構を詳細に調べた。このような*in vitro*での活性評価は、更なる人工ヌクレアーゼ応用研究に貢献できると思われる。

研究成果の概要(英文)：Gene editing *in vivo* has become possible by the development of artificial nucleases that can be designed to cut the genome DNA selectively at the target site. TALENs are highly specific artificial nucleases. However in mammalian cells and embryos, TALENs often show poor activity. Recently we have developed "super-active" TALEN and demonstrated that which can mediate efficient genome editing in mouse embryos. To evaluate how our "super-active" mutations actually affect enzymatic properties, we have produced active TALEN proteins and measured their activities *in vitro*. Our data suggested that super-active TALEN has high-affinity DNA-binding, which might cause high activity. In addition, structural biological approaches indicated the structural differences between super-active and conventional TALE. Our *in vitro* based approaches provide us a new insight for further improvement of TALEN techniques.

研究分野：構造生物学

キーワード：TALEN ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

現在のゲノム編集における問題点

相同組換えによる遺伝子操作が手法として確立しているのは、マウス ES 細胞などごく限られた系であり、iPS 細胞での遺伝子改変効率は低いのが現状であった。近年、人工ヌクレアーゼの開発により、“ゲノム編集”が可能となり注目を集めているが、第一世代の人工ヌクレアーゼ Zinc Finger Nuclease は設計が困難であった。

TALEN の利点と欠点

その後、植物病原菌 *Xanthomonas* の TALE (transcription activator-like effector) (図 1) を基に、第二世代人工ヌクレアーゼ TALEN(TALE + FokI Nuclease) (図 2) が開発された。TALE の標的 DNA への結合ドメイン (リピートドメイン) は、よく保存された 33~34 アミノ酸配列の繰り返しで構成され、この繰り返し配列 1 個が標的 DNA の 1 塩基に結合する。任意の標的 DNA 配列に対する TALEN 設計の容易さと、標的配列以外への変異導入 (オフターゲット作用) が極めて低いことから急速に実施例が増加していたが、変異導入効率は細胞種・標的遺伝子によって大きく異なるという欠点があった。

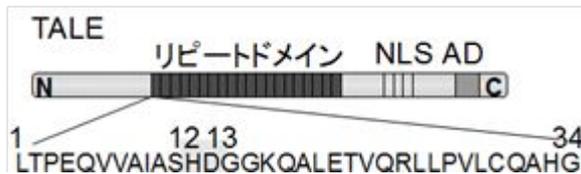


図 1. TALE の概要図
(NLS:核移行シグナル, AD:アクチベーションドメイン)

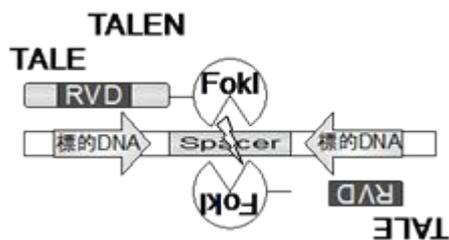


図 2. TALEN の概要図

2. 研究の目的

これまで TALEN をはじめ人工ヌクレアーゼの活性評価としては、培養細胞や受精卵を用いた *in vivo* アッセイが広く用いられてきた。しかし、*in vivo* アッセイのみでは TALEN タンパク質の性質を十分理解し、その欠点を克服するのは困難である。そこで本研究では、新しい *in vitro* での TALEN および TALE タ

ンパク質活性評価系を構築することで、TALEN を用いた高効率な変異導入方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TALEN および TALE タンパク質大量発現

安定した *in vitro* 活性評価系確立のために、まず大腸菌を用いて、活性のある TALEN および TALE タンパク質、その変異体タンパク質を大量発現し、精製した。

(2) TALEN・TALE の *in vitro* 活性評価

大量発現・精製した TALEN タンパク質を用いて *in vitro* での標的 DNA 切断活性、TALE タンパク質を用いて標的 DNA 結合活性の評価系を確立した。

(3) 生理学的溶液条件下での TALE タンパク質の構造生物学的解析

円二色性(CD)測定、動的分散(DLS)測定、X 線小角散乱(SAXS)測定を行い、生理学的溶液条件下での構造の違いを調べた。

4. 研究成果

(1) TALEN・TALE タンパク質大量発現

低温で培養を行うことで、活性のある TALEN・TALE タンパク質を大量に得た(図 3)。

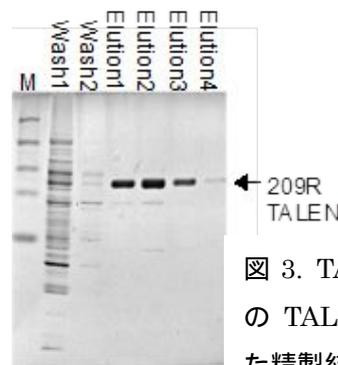


図 3. TALEN タンパク質の TALON レジンを用いた精製結果(SDS-PAGE)

(2) TALEN および TALE の *in vitro* 活性評価

TALEN の標的 DNA 切断活性評価: 精製した TALEN タンパク質と、標的 DNA 配列を反応させて、アガロースゲル電気泳動で分離し EtBr 染色により検出した(図 4)。その際、下記の実験から判明した、TALE の標的 DNA への結合親和性が高いということを考慮して、基質 DNA 濃度を十分低くする点を工夫した。

TALE の標的 DNA 結合活性評価: BIAcore を用いて、標的 DNA を固定したセンサーチップに、精製した TALE タンパク質を流して、結合・解離を検出した。その際、TALE タンパク質のセンサーチップや流路系への非特

異的吸着を無くすように注意した。

これにより、我々の研究室で開発に成功した改良型高活性TALEN(Super-active TALEN)の活性評価が可能となり、Super-active TALENはDNA結合活性が高いことを明らかにした。

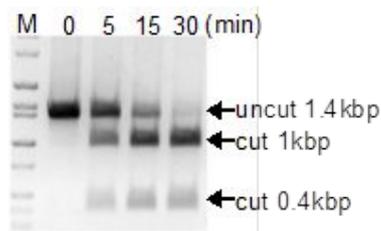


図4. TALENの標的DNA切断活性評価

(3) 生理学的溶液条件下でのTALEタンパク質の構造生物学的解析

更に、構造生物学的実験も行い、TALEタンパク質の高活性化機構を詳細に調べた。その結果、*in vitro*での各種実験においてケアの必要だったTALEタンパク質の一部ドメインは、天然変性状態にあり、DNA結合によって構造変化することが示唆され、溶液中での構造動態の違いが高活性化に寄与している可能性が示された(図5)。

このような*in vitro*での詳細な活性評価系は、更なる人工ヌクレアーゼ応用研究(更なる高活性化人工ヌクレアーゼの開発や、汎用的なDNA結合プローブとしての利用)に貢献できると思われる。

また、Crisper/Cas9を含めこれまでのゲノム編集人工ヌクレアーゼは、すべて米国が知財権を有しているが、我が国における人工ヌクレアーゼ研究の進展にも貢献できると思われる。

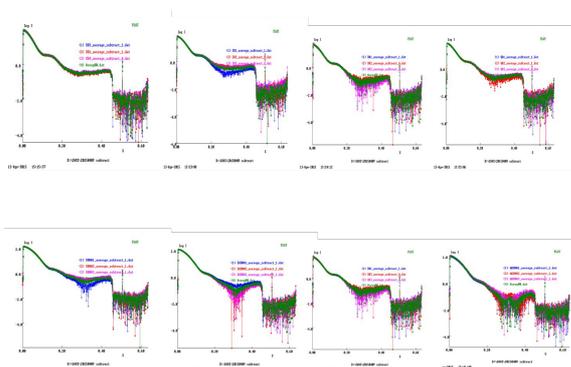


図5. TALEおよび変異体タンパク質のSmall-angle X-ray Scattering profile

なお、BIAcore装置は大阪大学生命機能研究科プロトニックナノマシン研究室、CD測定は大阪大学工学部 内山教授・丸野博士、

SAXS測定はSpring-8引間博士、本研究全般については研究代表者の所属研究室でSuper-active TALENを開発した池田博士のご助言・ご協力の下で行った。

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 2 件)

寺原(伊藤)陽子、池田一穂、宮下尚之、岡田康志、*In vitro* analysis of thermo stabilized super-active TALEN、2015年3月21日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)、第120回日本解剖学会

寺原(伊藤)陽子、池田一穂、宮下尚之、岡田康志、高活性改良型TALENの高活性化機構の解析、2015年7月2日、タワーホール船堀(東京都)、第67回日本細胞生物学会

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺原(伊藤)陽子 (TERAHARA-ITO, Yoko)
理化学研究所・生命システム研究センター・特別研究員
研究者番号：60584571

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：