

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

Platinum TALEN 作製システムの確立とツメガエルでの遺伝子改変

研究分担者	山本 卓	広島大学大学院理学研究科
研究協力者	鈴木賢一	広島大学大学院理学研究科
研究協力者	佐久間哲史	広島大学大学院理学研究科

研究要旨

本研究では、部位特異的ヌクレアーゼの1つである Transcription activator-like nuclease (TALEN)の DNA 結合モジュールを改変した高活性型 TALEN (Platinum TALEN)を開発し、その作製システム (Platinum Gate System)を確立した。このシステムを用いることによって、高活性型 TALEN の効率的な作製が可能になった。ヒト培養細胞において Platinum TALEN は効率的に目的の遺伝子に変異を導入することが示された。さらに、個体レベルでの変異導入を確認するために、アフリカツメガエル卵に Platinum TALEN を導入して変異導入効率を調べた。その結果、変異率の高い胚では 100%の変異導入が確認された。これらの結果から、Platinum TALEN は、培養細胞や動物個体でのゲノム編集に有効なツールであることが示された。

A. 研究目的

人工ヌクレアーゼなどの部位特異的ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変技術(ゲノム編集)によって、様々な生物における目的の遺伝子改変が可能となってきた。しかしながら、対象とする生物によってゲノム改変効率は大きく異なり、より安全で効率の高い部位特異的ヌクレアーゼの作成が求められている。そこで、本研究では、部位特異的ヌクレアーゼの1つである Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)を改良した高活性型 TALEN (Platinum TALEN)の開発、Platinum TALEN 作製法の標準システムの開発、モデル生物(本実験ではアフリカツメガエル)での標的遺伝子の破壊を行なった。

これまで広く利用されている Golden Gate 法で作製された TALEN (Golden TALE:ミネソタ大学 Voytas 博士が開発)の DNA 結合モジュールを改良した高活性型 TALEN の開発を行なった。TALEN の結合力を高める方法として、結合モジュールのアミノ酸配列に着目し、アミノ酸配列の改変を行なった。結合モジュールは 34 アミノ酸からなり、12 番目と 13 番目のアミノ酸は、塩基特異的な結合を担う多型配列(RVD)として知られている。自然界の TALE のアミノ酸配列を調べたところ、この RVD 以外に 4 番目と 32 番目のアミノ酸に多型のあることがわかった。そこで、この 4 番目と 32 番目の多型(non-RVD variation)を利用した新しい TALEN の作製システムの確立を試みた。

B. 研究方法

1. 高活性型 TALEN (Platinum TALEN)の開発

1) RVD の改変と Platinum TALEN の作製
Non-RVD variation をもつモジュールを化学合成によって作製し、pBSK ヘサブクローニ

ングすることによってモジュールプラスミド (p1HDp4HD, p1NG-p4NG, p1NI-p4NI, p1NN-p4NN)を作製した。また、Golden Gate 法による受け手ベクターを pFUS2 および pTALEN_v2 をベースとして作製した。これらのプラスミドを用いて、Golden Gate 法 (Sakuma et al., Genes to Cells, 2013) をベースとした Platinum TALEN の構築法を確立し、培養細胞での評価に用いた。

2) 作製した Platinum TALEN の活性評価

Single strand annealing (SSA)アッセイ

構築した TALEN の活性を SSA アッセイにより評価した。HEK293T 細胞を 10%FBS の DMEM で培養した。SSA アッセイは落合の方法 (Ochiai et al., Genes to Cells, 2012) によって行なった。50,000 細胞に 200 ng の TALEN 発現ベクターと 100 ng の SSA のレポーターベクターと 20 ng の pRL-CMV ベクターをリポフェクション法によりトランスフェクションした。24 時間後に Dual-Glo luciferase assay system (プロメガ)を用いて活性を評価した。

CelI アッセイ

Sakumaらの方法 (Genes to Cells, 2013) の方法に従ってCelIアッセイを行なった。約 30,000 のHEK293T細胞に200 ng のTALEN 発現ベクターをトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収し、ゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAを鋳型として、標的配列をはさむプライマーを作製し、KOD FX Neo (東洋紡) を用いて標的配列部分をPCR増幅した。その後、CelIヌクレアーゼによりPCR産物を反応させ、アガロースゲル電気泳動によって切断の有無を確認した。

2. Platinum TALEN を用いたツメガエルでの標的遺伝子破壊

Platinum TALEN の動物個体における効果を調べる目的で、アフリカツメガエルでの標的遺伝子破壊を試みた。本研究では、表現型を容

易に観察できる色素合成に関わるチロシナーゼ遺伝子を破壊し、その効果を観察した。

mRNA 合成とカエル卵への顕微注入

アフリカツメガエルのチロシナーゼを破壊する TALEN を上記の方法により構築し、mMessage mMachine T7 Ultra Kit(ライフテクノロジーズ)のキットを用いて、mRNA を試験管合成した。ツメガエル受精卵は、ヒト絨毛性ゴナドトロピンを投与することで採取した。卵を 2%システイン溶液で脱ゼリーし、3% Ficoll in 0.36 X Marc's modified Ringer's (MMR)へ移した。約 250 pg の TALEN mRNA をナノジェット I (Drummond, Broomall, PA, USA)を用いて顕微注入した。顕微注入卵は、ゲンタシンを含む 0.16 X MMR 中で、胞胚から遊泳オタマジャクシ幼生まで飼育した。カエルの飼育については、広島大学のガイドラインに従って行なった。

RFLP 解析

Platinum TALEN を導入したカエル胚からキアゲン社の Blood and Tissue kit を用いてゲノム DNA を抽出した。標的配列を含む領域を PCR によって増幅し、PCR 産物を制限酵素 *HinfI* で消化し、アガロースゲル電気泳動によりバンドパターンを調べた。

C. 研究結果

高活性型 TALEN (Platinum TALEN)の開発

我々は、以前 6 モジュール法によって TALEN を作製する方法を報告している (Sakuma et al., Genes to Cells, 2013)。今回、我々は、4 つのモジュールを連結する方法を採用し、この方法で non-RVD variation をもった TALEN (Platinum TALEN) の効率的な作製方法 (Platinum Gate TALEN construction system) を確立した(図 1)。基本的な方法は、既存の Golden Gate 法と同様であるが、第一段階の連結を 4 モジュールに制限することで、成功率を向上させることに成功した。オリジナルの 10 モジュール法での成功率は 10% 程度であ

ったが、4モジュールでの成功率は100%であった。

ヒト *HPRT1* 遺伝子座を切断する Platinum TALEN を作製し、SSA アッセイおよび Cell アッセイにより、活性を評価したところ、これまでの TALEN に比べて、高い活性を示した。また、ヒト ataxia telangiectasia mutated (*ATM*) と adenomatous polyposis coli (*APC*)、および *eGFP* 遺伝子に関して SSA アッセイを、*ATM* 遺伝子と *APC* 遺伝子に関しては Cell アッセイによって活性が十分高いことを確認した (図 2)。

Platinum TALEN を用いたツメガエルでの標的遺伝子破壊

Platinum TALEN の動物個体での遺伝子破壊効果を調べるために、アフリカツメガエルのチロシナーゼ遺伝子 (*tyr*) 破壊を試みた。受精卵に Platinum *tyr* TALEN を顕微注入したところ、多くのカエル胚でアルビノとなることが示された (図 3 B)。加えて、毒性も低下し、これまでの TALEN で見られたいた奇形胚は、Platinum TALEN 導入胚ではほとんど見られなかった。さらに、RFLP 解析によって、ほぼ 100% で変異導入されていることが明らかになった (図 3 D)。

D. 考察

本研究の結果から、non-RVD variation の利用によって TALEN の活性を高めることが示された。これまで、多くのグループが N 末や C 末の構造やヌクレアーゼ部分の改変を行ってきたが、DNA 結合モジュールの構造改変による活性上昇の報告は、本研究が初めての報告である。しかしながら、non-RVD variation が結合活性を上昇させる機構については明らかにされていない。今後、X線結晶解析などの構造解析によって、その原理を明らかにする必要がある。

これまで、TALEN の作製には Vytas 博士によって提供されている Golden Gate キットが

主に使われて来た。この方法は、2ステップの安定した作製システムである一方、研究室によって作製効率が大きく異なることが知られていた。その原因は、第一段階で10個のモジュールを同時に連結する成功率が、研究室によってばらつくことにあると考えられる。今回、我々は同時に4個のモジュールを連結する方法に改良したことで、多くの研究者が失敗することなく TALEN を作製できるシステムへ改良できたと考えている。作製できるモジュール数は、これまでの31モジュールから21モジュールと制限されるが、15-20モジュールの TALEN で高い特異性を確保できるので問題とはならない。

様々な生物において、部位特異的ヌクレアーゼを用いた遺伝子改変が報告されているが、生物種や細胞種によっては毒性の高いことが報告されている。これは、切断効果を高めるため、大量のヌクレアーゼを導入したことが原因である可能性が高い。本研究で開発した Platinum TALEN は、その活性の高さから、導入量を下げることが可能なことから毒性を下げることに成功した。今後は、様々な生物において、Platinum TALEN を利用し、その効果を調べる計画である。

E. 結論

本研究によって、高活性型の部位特異的ヌクレアーゼの開発と作製システムの確立に成功した。さらに、このシステムで作製した Platinum TALEN は培養細胞や動物個体において高い変異導入効果を持つことが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E and Yamamoto T. FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions. *Genes Cells*, 2014, in press

- 2) Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, Yamamoto T and Matsuura S. TALEN-mediated single-base pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 1461-1466
 - 3) Nakagawa Y, Yamamoto T, Suzuki KI, Araki K, Takeda N, Ohmuraya M and Sakuma T. Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice. *Exp Anim*, 2014, 63: 79-84
 - 4) Treen N, Yoshida K, Sakuma T, Sasaki H, Kawai N, Yamamoto T and Sasakura Y. Tissue-specific and ubiquitous gene knockouts in Ciona by electroporating TALENs provide new approaches to investigate gene functions. *Development*, 2014, 141: 481-487
 - 5) Sugi T, Sakuma T, Ohtani T and Yamamoto T. Versatile strategy for isolating TALEN-mediated knockout mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 78-85
 - 6) Sakane Y, Sakuma T, Kashiwagi K, Kashiwagi A, Yamamoto T and Suzuki K. Targeted mutagenesis of multiple and paralogous genes in *Xenopus laevis* using two pairs of TALENs. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 108-114
 - 7) Hayashi T, Sakamoto K, Sakuma T, Yokotani N, Inoue T, Kawaguchi E, Agata K, Yamamoto T and Takeuchi T. TALENs efficiently disrupt the target gene in Iberian ribbed newts (*Pleurodeles waltl*), an experimental model animal for regeneration. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 115-121
 - 8) Kondo T, Sakuma T, Wada H, Akimoto A, Yamamoto T and Hayashi S. TALEN-induced gene knock out in *Drosophila*. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 86-91
 - 9) Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S and Yamamoto T. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3379
 - 10) Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S and Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for humancell and animal applications. *Genes Cells*, 2013, *Genes Cells*, 18: 315-326
2. 学会発表
 - 1) 山本 卓, Platinum TALEN の開発と様々な動物におけるゲノム編集、理研シンポジウム「ゲノムデザイン技術と疾患モデル研究」、つくば、2013
 - 2) Yamamoto T, Targeted genome editing using highly-active TALENs、京都大学 iPS 研究所セミナー、京都、2013
 - 3) Sakuma T, Woltjen K, Hosoi S, Suzuki K, Kawahara A, Okada Y, Ochiai H, Matsuura S and Yamamoto T, Improved TALEN construction and evaluation methods for animal and human cell applications, Genome Engineering -Research & Applications, Italy, 2013
 - 4) Sakuma T and Yamamoto T, Platinum Gate TALEN: Establishment of highly-active TALEN construction system, 46th Annual Meeting for the Japanese

Society of Developmental Biologists,
Matsue, 2013

- 5) 山本 卓、鈴木賢一、相田知海、田中光一、佐久間哲史、高活性型 TALEN を用いたゲノム編集、第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ「ゲノム編集研究の新展開」、神戸、2013
- 6) 李 紅梅、藤本直子、笹川典子、白井紗矢、山本 卓、Woltjen Knut、櫻井英俊、山中伸弥、堀田秋津、TALEN や CRISPR/Cas9 を用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞のゲノム手術、第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ「ゲノム編集研究の新展開」、神戸、2013
- 7) 山本 卓、高活性型 TALEN の開発と哺乳類培養細胞および動物での標的遺伝子改変、第 65 回日本生物工学会シンポジウム「次世代植物バイオテクノロジー」、広島、2013
- 8) 山本 卓、ゲノム編集技術を利用した培養細胞および動物個体での標的遺伝子改変、奈良県立医科大学講演会、橿原、2013
- 9) 山本 卓、ゲノム編集革命-人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変技術の開発、平成 25 年度広島バイオフィォーラム「ここまで進んだゲノム科学とその活用」、広島、2013
- 10) 山本 卓、ゲノム編集技術を利用した培養細胞や動物での遺伝子改変、第 15 回京都心血管代謝セミナー、京都、2013

G. 知的財産権の出願・登録状況

TALEN の結合モジュール中の 4 番目と 32 番目の配列を改変することで、特異性の高い TALEN の作製が可能であることを、特許出願した。

出願番号：特願 2013-166768

「DNA 結合ドメインを含むポリペプチド」

出願日：平成 25 年 8 月 9 日

【資料】

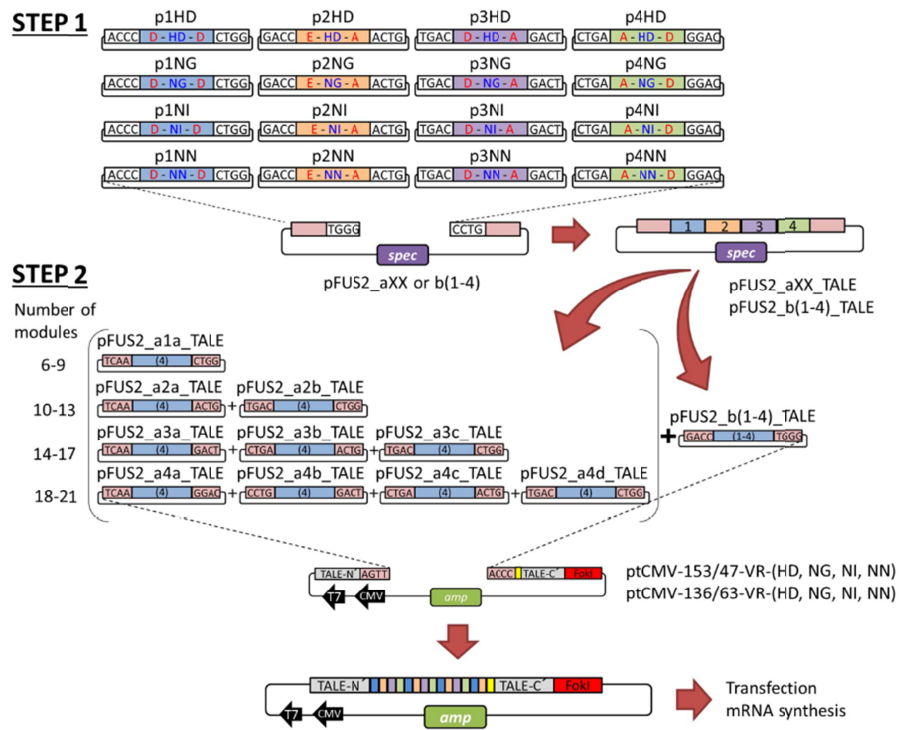


図 1 . 4 モジュール連結を基盤とした Platinum Gate TALEN 作製システム

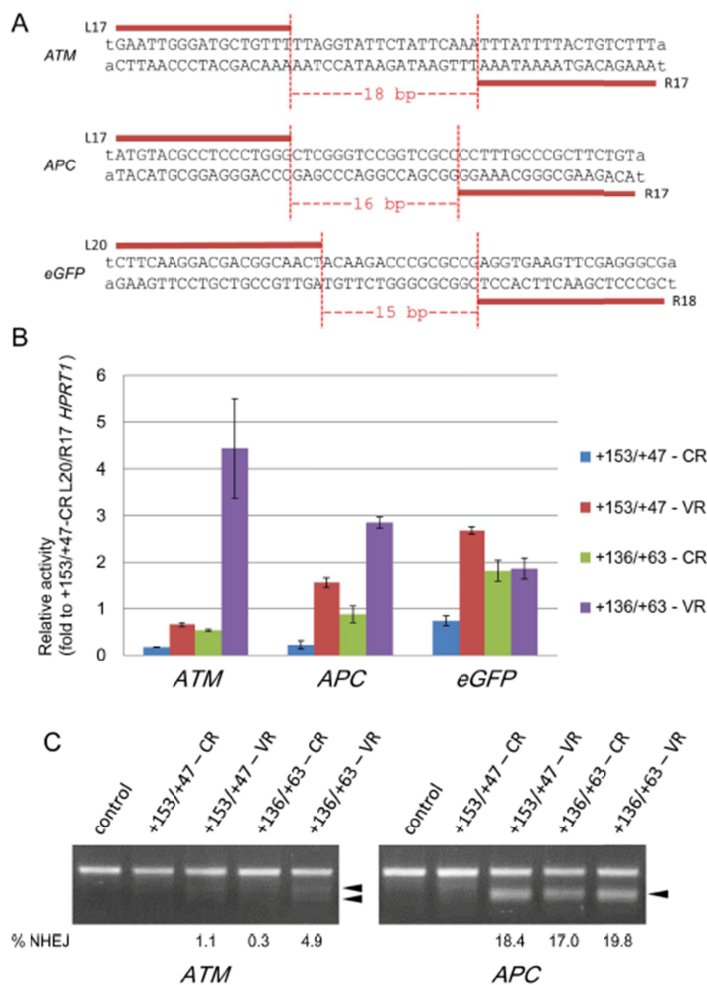


図2 . Platinum TALEN の SSA アッセイおよび CeII アッセイによる活性評価
 A: 3 種類の遺伝子の TALEN 標的配列とスペーサーの長さ
 B: Golden TALEN と Platinum TALEN の SSA 活性の比較
 C: Golden TALEN と Platinum TALEN の CeII 活性の比較
 矢印のバンドが活性の高さを示す。

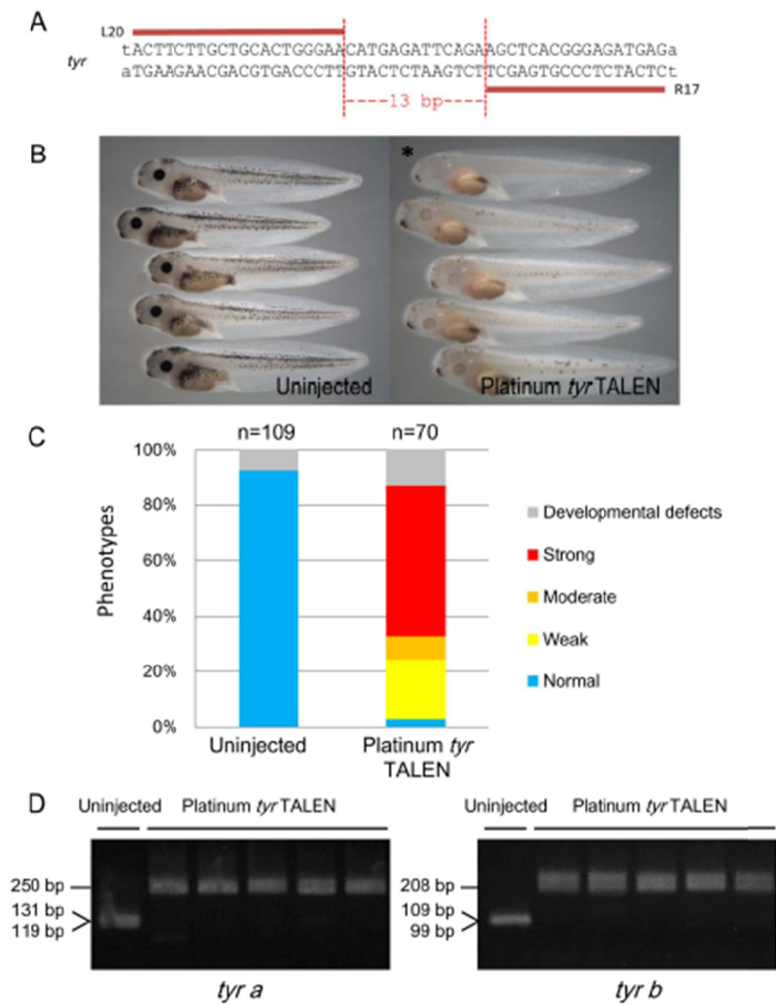


図3 . Platinum TALEN を用いたツメガエル標的遺伝子の破壊
 A: *tyr* 遺伝子の TALEN 標的配列とスペーサーの長さ
 B: *tyr* TALEN を導入した胚の写真
 C: アルビノ胚の比率
 D: RFLP による変異導入効率の解析