

学位申請論文

TALEN を用いた
植物ゲノム編集システムの開発とその高度化

平成 31 年 3 月

小野寺 瞳

要約

本論文では、TALENを用いた植物のゲノム編集を容易にすることを目的とし、そのために行なった各種システム開発およびその機能評価について報告する。

ゲノム編集は、ゲノム中の特定の領域に作用する特異的なヌクレアーゼを用いて、この領域に人為的な変異を生じさせる技術である。ゲノム編集では、一般的に TALEN や CRISPR/Cas9 が用いられる。ヌクレアーゼによって切断されたゲノム DNA は細胞が持つ修復機構によって修復がなされるが、この際にしばしば変異が誘発される。

TALENはDNA結合ドメインとDNA切断ドメインを人工的に繋いで構築されたヌクレアーゼである。1対のTALENが標的配列を挟む2ヶ所に結合し、DNA切断ドメインがダイマーを形成した時に標的配列を切断する。CRISPR/Cas9は、標的配列の末端部にPAM配列と呼ばれる3塩基を要するが、TALENにはこのような制限がなく、標的配列の設定における自由度が高い。また、TALENは配列認識の特異性が高く、標的部位以外での変異がほとんど起こらないとされる。

植物のゲノム編集では、アグロバクテリウム法を用いてTALENやCRISPR/Cas9を導入する手法が広く用いられている。この手法では、16 kbを超えるバイナリーベクターを使用する。TALENは分子量100 kDaを超える巨大なタンパク質である。2つのTALEN遺伝子をバイナリーベクターに挿入することは容易ではない。このために、まずはこれらの操作の簡便化を図った。

本研究では、従来のTALEN遺伝子の構築システムであるPlatinum Gate systemを植物向けに適用するためのシステム開発を行なった。また、Gateway組換えシステムを用いて植物用のTALEN遺伝子の構築の簡略化を行なった。これにより、植物用TALEN構築システムとしてEmerald Gateway TALEN systemを構築した。このシステムでは、最短1週間で、標的配列に対応する1対のTALEN遺伝子を有するバイナリープラスミドを構築できる。このため、アグロバクテリウム法に供する植物用TALENを速やかに構築できるようになった。

このシステムで構築されたTALENが植物細胞で機能するかを、イネ培養細胞を用いて調べた。イネのプロテアーゼ遺伝子(*Os01g0833500*)の*KpnI*切断部位を含む領域を標的としたTALENを設定し、この領域に対応する1対のTALEN遺伝子を構築した。これをイネカルスに導入し、得られた形質転換カルスについてゲノム編集の効率を評価した。その結果、標的部位に変異を生じた変異体

カルスを複数得ることができた。また、これらの形質転換カルスを再分化したところ、標的配列に変異が誘発された変異体植物を得ることに成功した。このため、本システムが植物で機能できる TALEN を構築するためのツールとして利用できることが示された。

しかし、この手法で作製された TALEN によるゲノム編集の効率は、2 割程度と高いものではなかったため、この効率を高めることが次の課題であると考えられた。導入された TALEN 遺伝子は、転写・翻訳を経て植物細胞内に TALEN を産生する。この TALEN の分子数を増やすことで、TALEN が標的部位と相互作用する頻度が増え、結果として変異の誘発率を高めることができると考えた。

イネの *OsMac3* 遺伝子の 5'UTR に由来する RNA 配列 (dMac3) は、mRNA あたりの翻訳量を高める翻訳エンハンサーとして機能する。dMac3 は、これを結合した下流 ORF の翻訳量を数倍から数十倍に高める促進活性を示す。本研究では、TALEN 遺伝子の 5'UTR に dMac3 を組み込むことで TALEN の産生能を強化し、ゲノム編集の効率化を図った。そのために、Emerald Gateway TALEN system で用いるディスティネーションベクターの TALEN 導入部位の上流に dMac3 を組み込み、新たなディスティネーションベクター (pDual35S-dxGw1301) を構築した。このベクターを用いて 5'UTR に dMac3 が組み込まれた TALEN 遺伝子を構築できる一連の手法を「Emerald Gateway dx-TALEN system」と名付けた。

次に、dMac3 を TALEN 遺伝子の 5'UTR に付加することで、ゲノム編集効率がどの程度向上するかを評価した。前述した手法と同様の手順で変異が生じた形質転換カルスの割合を調べた。その結果、dMac3 を有する TALEN 遺伝子を用いたゲノム編集では、従来法で構築した TALEN を用いた場合よりも変異体を得られる割合が 2 倍ほど高まった。このため、TALEN を用いたゲノム編集に dMac3 の利用が有効であることが明らかとなった。また、これらの形質転換カルスを再分化したところ、複数の個体で標的部位周辺に置換・挿入・欠失などの多様な変異が生じていた。このため、本システムが高い効率で標的配列に変異を誘発でき、多数の変異体植物を得るために有用なツールであることが示された。

標的とする遺伝子配列の改変を目的とするゲノム編集の操作では、標的配列に変異が生じた後は導入したヌクレアーゼが働き続ける必要はない。また、非特異的な部位での変異の誘発を避けるため、必要な時にのみ導入した TALEN 遺伝子を発現させるためのシステム開発が次の課題であると考えられた。

グルココルチコイドの投与で一過的に強い発現をもたらす条件発現性のプロ

モーター (iPromoter) は、植物細胞で強力に機能することが知られている。本研究では、iPromoter と dMac3 を併用することで、誘導的発現が可能かつ高いゲノム編集効率を示す TALEN 構築システムの開発を図った。そこで、pDual35S-dxGw1301 に含まれるプロモーターを iPromoter に置換し、新たなディステーションベクター (pDualiPro-dxGw1301) を構築した。このベクターを用いて iPromoter と dMac3 が組み込まれた TALEN 遺伝子を構築できる一連の手法を「Emerald Gateway dx-TALEN premium system」と名付けた。

次に、このシステムで作られた TALEN 遺伝子がグルコシルチコイドの投与に反応して発現誘導され、ゲノム編集に至るかどうかを調べた。構築した TALEN 遺伝子をイネカルスに導入し、得られた形質転換カルスを 2 つに分け、一方にグルコシルチコイドの投与を行なった。それぞれのカルスより RNA を抽出し、RT-PCR により TALEN 遺伝子の発現の有無を調べた。その結果、グルコシルチコイド処理したカルスでのみ、TALEN 遺伝子に対応する転写産物が検出された。また、前述した手法と同様の手順で変異が生じた形質転換カルスの割合を調べたところ、形質転換時にグルコシルチコイドを共存させた場合でのみ、6 割ほどの割合で変異体を得られた。この変異体カルスの標的部位では、欠失・挿入などの多様な変異が生じていた。このため、本システムがグルコシルチコイド依存的に機能し、TALEN 遺伝子の一過的な発現により標的配列に変異を高効率で導入できる強力なツールであることが示された。

一方で、この TALEN 遺伝子の一過的発現系では、グルコシルチコイド処理の条件検討はまだ十分に成されていない。このため、本システムはさらなる改善の余地を残しているものと考えられる。

また、本研究ではイネ培養細胞を用いてゲノム編集効率の評価を行った。今後は、本研究で開発されたシステムを利用したゲノム編集を多様な植物種で試み、変異効率の知見を蓄積することで、将来的に本技術を育種への応用に繋げていけるものと考えている。

本研究では、植物用 TALEN の簡便な構築法を開発し、目的とする TALEN 遺伝子を有するバイナリープラスミドを速やかに作製できるようになった。この構築法をベースに、翻訳エンハンサー dMac3 および条件発現性プロモーター iPromoter を組み込んだ TALEN 構築法を構築した。これにより、標的配列に高い効率で変異を誘発できる強力なゲノム編集ツールを構築でき、植物ゲノム編集が身近な技術として利用できるようになったと考えられる。

目次

| | |
|--|----|
| 要約 | 2 |
| 目次 | 5 |
| 1 章. 序論 | 7 |
| 2 章. 植物用 TALEN の簡便な構築法の構築とその評価 | 10 |
| 2.1. 結果 | 10 |
| 2.1.1. 植物用 TALEN 構築システムの構築 | 10 |
| 2.1.2. 標的部位における変異効率の評価 | 11 |
| 2.1.3. 形質転換植物における標的変異の検出 | 12 |
| 2.2. 考察 | 13 |
| 3 章. 翻訳エンハンサーを利用した TALEN (dx-TALEN) の構築法の開発とその評価 | 14 |
| 3.1. 結果 | 14 |
| 3.1.1. 高機能型 TALEN 構築システムの構築 | 14 |
| 3.1.2. 翻訳エンハンサー dMac3 を有する TALEN を用いた ゲノム編集と変異の誘導効率の検定 | 15 |
| 3.1.3. 形質転換植物における標的変異の検出 | 16 |
| 3.2. 考察 | 17 |
| 4 章. 条件発現性プロモーターを利用した TALEN (dx-TALEN premium) の構築法の開発とその評価 | 18 |
| 4.1. 結果 | 18 |
| 4.1.1. 条件発現型 TALEN 構築システムの構築 | 18 |
| 4.1.2. グルココルチコイド誘導型 TALEN 遺伝子の作製と 誘導発現の検定 | 19 |
| 4.1.3. 誘導発現型 TALEN 遺伝子を利用したゲノム編集の評価 | 20 |
| 4.1.4. 形質転換イネカルスにおける変異の検出 | 20 |
| 4.2. 考察 | 21 |
| 5 章. 総合考察 | 23 |
| 6 章. 材料と方法 | 28 |
| 6.1. プラスミドの構築 | 28 |
| 6.2. TALEN の設計と構築 | 28 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 6.3. アグロバクテリウム法を用いた形質転換イネの作製 | 29 |
| 6.4. グルココルチコイド処理の条件 | 29 |
| 6.5. 変異の検出 | 29 |
| 6.6. Real Time RT-PCR と RT-PCR | 30 |
| 7 章. 表 | 32 |
| 8 章. 図 | 36 |
| 参考文献 | 61 |
| 謝辞 | 66 |

1 章. 序論

我々が利用する作物は、年月をかけて育種されたものである。突然変異や交雑により有用な形質のものを選びすぐりする作物育種は、人類が農業を始めたおよそ 1 万年前頃から行なわれている。従来育種法では、有用な形質を持つ個体を見つけて、これを系統化する。また、異なる形質を有する個体を掛け合わせ、有用な形質を集積する交雑育種法もよく用いられる。変異原となる薬剤や放射線などを利用して突然変異を誘発する手法（変異体育種）も一般的に行なわれている。しかし、これらの手法では偶然性に左右されるため、目的の形質を有する個体を得るためには多くの労力と長い年月を要する。

近年は、新しい育種法としてゲノム中の特定の部位を狙い撃ちして人為的に突然変異を誘発する技術であるゲノム編集技術を利用した変異体育種が注目されている。ゲノム編集技術は、外来遺伝子をゲノム上に組込む遺伝子組換え技術とは異なる技術である。ゲノム編集技術による育種では、植物が持っている遺伝子に変異を誘発することで望ましい形質を獲得させる (Osakabe and Osakabe 2014)。

ゲノム編集は、ゲノム中の特定の領域に作用する特異的な人工ヌクレアーゼを用いて、この領域に変異を生じさせる。ゲノム編集技術には TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) や CRISPR/Cas9 などの人工ヌクレアーゼが一般的に用いられる。これらのヌクレアーゼは標的となる部位を切断するが、切断されたゲノム DNA は、細胞が持つ非相同末端修復 (Nonhomologous End Joining; NHEJ) などの修復経路による修復機構が働いて修復がなされる。この際しばしば修復ミスが生じて変異が誘発される (Lee et al 2016)。

TALEN と CRISPR/Cas9 は、いずれも標的配列に変異を誘発するが、その仕組みは異なる。TALEN は *Xanthomonas* 属細菌由来の TAL effector (TALE) の DNA 結合ドメインと 3 型制限酵素である *FokI* の DNA 切断ドメインを人工的に融合させた人工ヌクレアーゼである (図 1) (Christian et al 2010)。TALEN を用いたゲノム編集 (図 2) では、標的配列を挟む 2 ヶ所に結合することのできる 1 対の TALEN を用いる。それぞれの TALEN の DNA 切断ドメインがダイマーを形成することで、標的配列で 2 本鎖 DNA 切断 (Double Strand DNA Break; DSB) を誘発する (Aouida et al 2014)。切断された DNA は、NHEJ などの修復プロセス

を受ける (Osakabe and Osakabe 2014) が、この際に、標的配列に塩基の欠損・挿入・置換などの変異を生じることがある (Sprink et al 2016)。ダイマーを形成した時にのみ切断活性が生じるため、TALEN は必然的に標的配列に対する特異性が高くなる。(Boch et al 2009、Christian et al 2010)。このため、TALEN によるゲノム編集では予期せぬ部位での DNA 切断による非特異的な変異 (off-target 変異) をほとんど生じない (Bogdanove et al 2011)。

TALEN の DNA 結合ドメインは標的部位の塩基を認識するモジュール構造をもっている (図 1)。それぞれのモジュールは 34 アミノ酸からなるユニットであり、それぞれが 1 つの塩基を認識する。ユニットを構成するアミノ酸配列のうち、12 番目と 13 番目のアミノ酸残基が DNA 結合の特異性を決める (Boch et al 2009、Moscou et al 2009)。このアミノ酸残基が NI の場合はアデニン、NG の場合はチミン、HD の場合はシトシン、NN の場合はグアニンに対してそれぞれ特異性を示す (Streubel et al 2012、Jankele and Svoboda 2014)。このため、それぞれのモジュールを連結することで、任意の塩基配列に対応することができる。これまでに任意の塩基配列に対応する TALEN を構築するために、各モジュールの連結の簡便化が図られており、Platinum Gate system では最大で 21 塩基の標的配列に対応できるようになっている (Sakuma et al 2013)。

一方、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集 (図 3) では、ガイド RNA が標的配列末端の NGG 配列を認識し、Cas9ヌクレアーゼを標的配列上に呼び込む。これにより、Cas9ヌクレアーゼが標的 DNA を切断し、標的配列上に変異が生じる (Jinek et al 2012)。標的配列末端の NGG 配列は protospacer adjacent motif (PAM) 配列と呼ばれ、これがガイド RNA が認識する配列の特異性を決める (Kuscu et al 2014)。しかしながら、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集では off-target 変異の発生頻度が高く、目的の配列以外に変異を生じるリスクが大きいことが指摘されている (Zhang et al 2015)。これは、実際に機能しているガイド RNA の認識配列が短いことと、RNA が標的配列を認識するという性質に起因する (Maehara 2017)。

TALEN は 2 つの大きな特徴を有する。1 つ目は、標的配列の設定における自由度が高いという点である。TALEN の標的配列には PAM 配列のような制限がないため、任意の塩基配列に対応することができる。2 つ目は、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集の場合に大きな問題となる off-target 変異をほとんど生じないという点である。ゲノム編集を行なうためには、これらの TALEN の特徴はメリ

ットが大きい。

この研究では、TALEN が有するこれらの長所を植物のゲノム編集に活かすため、システム構築を行なった。植物ゲノム編集における TALEN の利便性を高めるために、植物用 TALEN の簡便な構築法の構築、翻訳エンハンサーを利用した TALEN の構築法の開発、条件発現性プロモーターを利用した TALEN の構築法の開発に取り組んだ。本論文では、これらのシステム開発およびその機能評価について報告する。

2 章. 植物用 TALEN の簡便な構築法の構築とその評価

植物のゲノム編集では、アグロバクテリウム法 (Li et al 2012, Yokoi et al 2016) やパーティクルボンバードメント法 (Shan et al 2014)、ジェミニウィルスを用いた手法 (Butler et al 2016) などが利用される。この中で、アグロバクテリウム法を用いて TALEN や CRISPR/Cas9 を導入する手法は広く用いられる (Nemudryi 2014)。アグロバクテリウム法ではバイナリーベクターを使用する。バイナリーベクター上の Right border (RB) および Left border (LB) 配列の間の配列が、アグロバクテリウムを介して植物ゲノムに組込まれる (Zambryski et al 1983)。植物で TALEN を用いたゲノム編集を行なうためには、バイナリーベクターの RB および LB 配列の間に対となる 2 つの TALEN 遺伝子を挿入する必要がある。バイナリーベクターは 16 kb を超える大きなプラスミドであり、TALEN は分子量 100 kDa を超える巨大タンパク質 (Strauß et al 2013) である。そのため 2 つの TALEN 遺伝子をバイナリーベクターに挿入することは容易ではない。TALEN を用いた植物のゲノム編集を行なうためには、これらの操作の簡便化を行なう必要があった。

標的配列に対応した TALEN を構築できるシステムとして、Platinum Gate system が開発されている (Sakuma et al 2013)。このシステムでは、それぞれの DNA 結合モジュールは *BsaI* および *Esp3I* 制限酵素による切断と断片の結合操作により連結することができ、比較的簡便に TALEN の構築が可能である。この研究では、Platinum Gate system を利用して連結した DNA 結合モジュールをバイナリーベクターに組込む過程の簡略化を図った。また、このシステムの評価を行なった。

2.1. 結果

2.1.1. 植物用 TALEN 構築システムの構築

Platinum Gate system (Sakuma et al 2013) によって構築された TALEN 遺伝子をバイナリーベクターに挿入する操作の簡便化を図った。そのために Gateway システムの利用を考え、LR clonase による組換え反応 (LR 反応) (Hartley et al 2000) を利用するシステムの構築を行なった。

Gateway システムはエントリーベクターとディステイネーションベクターで

構成されるため、TALEN を構築するための一次ベクターを Gateway システムのエントリーベクターにする必要がある。また、アグロバクテリウムに組込むバイナリーベクターをディスティネーションベクターとする必要がある。そこでまず、Platinum Gate system で構築する TALEN 遺伝子のためのベクターをエントリーベクターに変換することを行い、植物用の TALEN 遺伝子構築用のエントリーベクターを作製した。このプラスミドは選抜マーカーとした耐性遺伝子が異なる複数のもので作製し、それぞれを pPlatA および pPlatC と命名した (図 4)。

次に、エントリーベクターの受入先となるディスティネーションベクターを構築した。TALEN 遺伝子を発現させるための CaMV-35S プロモーターの下流に TALEN 遺伝子を組込むための LR 反応の組換え部位を導入し、Gateway システムでディスティネーションベクターとして機能するプラスミド pDual35SGw1301 を作製した (図 5)。このプラスミドでは 2 つの TALEN 遺伝子を同時に導入できるように 2 組の組換え部位を挿入した。

これらのプラスミドを用いて TALEN の構築を試みた。そのために、イネのプロテアーゼ遺伝子 (*Os01g0833500*; acc. No. AK073320) の第 5 エキソンにある *KpnI* 切断部位を標的とした TALEN を設計した。標的部位は、TALEN の性能評価を容易にするために、*KpnI* 切断部位を有する配列を配した (図 6A)。

標的配列に対応する DNA 結合ドメインを、Platinum Gate TALEN kit の手順に従って pPlat プラスミドに挿入し、TALEN 遺伝子を構築した (図 7A-C)。得られた 2 つの TALEN 遺伝子 (pPlatA-TALENa、pPlatC-TALENb) を、LR clonase II を用いた LR 反応により、pDual35SGw1301 の組換え部位に組込んだ (図 7C-E)。これにより、2 つの CaMV-35S プロモーターの下流にそれぞれの TALEN 遺伝子が組み込まれたバイナリープラスミドが完成した (pTALENsAB) (図 7E)。この結果より、バイナリーベクターへの 1 対の TALEN 遺伝子の組み込み操作が簡便化されることが明らかになった。そこで、バイナリープラスミド上に TALEN 遺伝子を構築するこの一連の手法を「Emerald Gateway TALEN system」と名付けた (図 7)。

2.1.2. 標的部位における変異効率の評価

本システムで構築した TALEN を用いたゲノム編集の効率を評価した。pTALENsAB (図 6B) をイネのカルスに導入し、得られた形質転換カルスについて変異の有無を検定した。ハイグロマイシンを含む N6D 寒天培地上で 4 週間

培養し、生育してきたカルスを形質転換カルスとして選抜し、これよりゲノム DNA を抽出した。TALEN の標的部位には *KpnI* 切断部位がある (図 6A)。この部位で変異が生じた場合にはこの配列が変化し、*KpnI* 切断部位が消失した場合には変異が生じたと判断できる。そこで、形質転換カルスから抽出した DNA を鋳型とした PCR によりこの標的配列を含むゲノム配列を増幅し、これを *KpnI* で処理することで *KpnI* 切断部位の存在の有無を調べた (図 8A)。イネの染色体は同質 2 倍体であるため、2 つのアリルの遺伝子を有する。1 つのアリルに変異が生じた場合は *KpnI* で切断されない断片と切断された断片が生じる。2 つのアリルの両方に変異が生じた場合には *KpnI* で切断されない断片のみが検出されると予想される (図 8B)。

形質転換カルスから DNA を抽出し、これを鋳型とした PCR により標的配列近傍の約 0.7 kb の配列を増幅した。これらの増幅断片を *KpnI* で消化し、アガロースゲル電気泳動により分析した。変異が生じていない遺伝子には *KpnI* 切断部位が存在するため、0.25 kb および 0.45 kb の断片に切断されると予想された (図 6A)。pTALENsAB を導入した 167 株の形質転換カルスで標的部位における *KpnI* 切断部位の存在の有無を調べたところ、39 株 (23.4%) で *KpnI* 切断部位が失われた変異体を得られた。このうち、11 株 (6.6%) で *KpnI* で切断されない断片と切断される断片が検出された。これらの形質転換は 1 アリル変異体と予想された。一方、28 株 (16.8%) では、*KpnI* で切断される断片は検出されなかった。これらの形質転換体は 2 アリル変異体と予想された (表 1、図 9)。

2.1.3. 形質転換植物における標的変異の検出

pTALENsAB を導入した形質転換カルスから 6 個体の形質転換植物が得られた。この再分化個体を育成し、緑葉よりゲノム DNA を抽出し、これらの植物体における標的配列上の塩基配列の変化を調べた。これらの形質転換体について、変異の有無を調べたところ、1 アリル変異体と考えられる個体が 3 個体、2 アリル変異体と考えられる個体が 3 個体見つかった (表 2、図 10)。これらの再分化個体に含まれる TALEN の標的配列を含むゲノム領域の塩基配列を調べたところ、*KpnI* 切断部位の近傍に変異が生じた 10 種類の異なる塩基配列を検出した。これらの塩基配列では、7 塩基以下の小規模な欠損から最大 230 塩基の大規模な欠損、1 塩基の挿入、1 塩基の置換などの変異が生じていることが分かった (図 11)。78 塩基の欠損と 28 塩基の挿入の変異が生じたと思われる個体 (#161) も

得られた。検出された各変異の詳細は表 3 に示す。また、一部の個体(#2-1、#160)からは 3 種以上の配列パターンが検出された (表 3)。これらの個体は、遺伝的なキメラ個体であることが示唆された。これらの結果から、本研究で構築した *TALEN* 遺伝子により、標的配列に多様な変異を導入できることが示唆された。

2.2. 考察

本研究では、Platinum Gate *TALEN* kit を利用した植物用の *TALEN* 構築システム Emerald Gateway *TALEN* system を開発した (図 7)。このシステムは、新たに作製した植物用 *TALEN* を構築するためのエントリーベクター (pPlat プラスミド) (図 4) と、2 つの *TALEN* 遺伝子を発現させるためのディスティネーションベクター (pDual35SGw1301) (図 5) を用いる。pPlat プラスミドに作られた *TALEN* 遺伝子は、Gateway システムを用いた LR 組換え反応により pDual35SGw1301 の CaMV-35S プロモーターの下流に挿入される。このプラスミドは *LacZ* 遺伝子発現とカナマイシン・クロラムフェニコール・アンピシリン耐性遺伝子を利用して選抜できる。

本システムを用いることで、最短 1 週間で植物用の *TALEN* 遺伝子を構築できる。このため、本システムの完成により植物ゲノム編集を行なうための *TALEN* 構築にかかる時間を大幅に短縮できると私は考えている。本システムによる *TALEN* 遺伝子の構築のためのプロトコールはオンライン上 (<https://www.nature.com/articles/srep30234>) で公開されており、一般に利用可能となっている (Kusano et al 2016)。

本システムで構築された *TALEN* が植物細胞で正常に機能するかをイネ培養細胞を用いて調べたところ、複数の変異体を得ることができた (図 9)。塩基配列の解析により、標的配列の近傍に多様な変異 (欠損・挿入・置換など) が検出された (表 3、図 11)。これらの変異の一部は、フレームシフトによる終止コードンの発生や、タンパク質の二次構造の変化などに起因する遺伝子機能の破壊をもたらすものと予想される。これらの変異体では、導入した *TALEN* が正常に機能し、標的配列で変異を誘発したと考えられる。これらの結果は、本システムが植物で機能できる *TALEN* を構築するためのツールとして利用できることを示している。

3 章. 翻訳エンハンサーを利用した TALEN (dx-TALEN) の構築法の開発とその評価

Emerald Gateway TALEN system を用いることで、植物用 TALEN の構築の簡略化に成功することができた。しかし、従来法で作製した TALEN を用いたゲノム編集の効率、高いものではなかった。このため、TALEN を育種に応用し、幅広い植物種で効率よく変異体を作製するためには、従来の手法よりも高い効率で標的配列に変異を導入できるような強力なツールが必要になる。このため、TALEN を用いたゲノム編集の効率を高めることが次の課題であると考えられた。

植物細胞に導入された TALEN 遺伝子は発現して転写・翻訳を経て植物細胞で TALEN が産生され、核移行シグナルによって核に移行し、標的となる DNA 部位に結合して変異を誘発する (Boch et al 2009、Mussolino et al 2011)。細胞内の TALEN の分子数を増やすことで、TALEN と標的配列との相互作用の頻度が増え、その結果、変異の誘発率を高めることができると期待した。

イネの *OsMac3* 遺伝子の mRNA の 5'非翻訳領域 (5'UTR) は、下流 ORF の翻訳効率を有意に高めることが分かっている (Aoki et al 2014)。この 5'UTR の後半領域の 161 塩基 (dMac3) は、強い翻訳エンハンサーとして働くことが分かっている (Kusano et al 2018)。この研究では、翻訳エンハンサー dMac3 を TALEN 遺伝子に組み込むことで TALEN の産生能を強化し、ゲノム編集の効率の向上を図った。そのために、Emerald Gateway TALEN system の改良を行った。さらに、このシステムを用いて作製した TALEN 遺伝子を用いたゲノム編集を行ない、変異が生じる効率の増加が起こるかどうかの評価を行なった。

3.1. 結果

3.1.1. 高機能型 TALEN 構築システムの構築

前述の Emerald Gateway TALEN system で用いるディステーションベクター pDual35SGw1301 を改変し、この中に組み込まれる TALEN 遺伝子の 5'UTR 領域に翻訳エンハンサー dMac3 を付加する方法を開発した。

まず、プラスミド構築の成否の判断をしやすくするための選抜マーカー *LacZ* 遺伝子と翻訳エンハンサー dMac3 の配列を連結した遺伝子断片を化学合成した。この時、*LacZ* 遺伝子と dMac3 の間に CaMV-35S プロモーターを挿入するための

XhoI および *SpeI* 切断部位を配した (図 12A)。また、*TALEN* 遺伝子に *dMac3* の翻訳促進効果を付与するために、*dMac3* 配列の直下に開始コドン (ATG 配列) を配置した (図 13)。この遺伝子断片の *XhoI* および *SpeI* 切断部位を利用して、*LacZ* 遺伝子と *dMac3* 配列の間に *CaMV-35S* プロモーターを挿入した遺伝子構築を行なった (図 12B)。この遺伝子断片の内部に含まれる *KpnI* および *XhoI* 切断部位を利用して *CaMV-35S* プロモーターと *dMac3* が連結された遺伝子領域を、*Sall* および *XbaI* 切断部位を利用して *LacZ* 遺伝子・*CaMV-35S* プロモーター・*dMac3* が連結された遺伝子領域をそれぞれ切り出した (図 12C)。*XhoI* と *Sall* の切断末端は一部で相同な配列を有するため繋ぐことができるため、この性質を利用してこれらの遺伝子断片を繋ぐことで *LacZ* 遺伝子の両端に *CaMV-35S* プロモーターと *dMac3* を結合した遺伝子断片を構築した (図 12D)。次に、*pDual35SGw1301* を *XbaI* および *KpnI* で切断して *CaMV-35S* プロモーター配列を除去し、この部位にこの断片を挿入して *CaMV-35S* プロモーターの下流に *dMac3* を組込んだ (図 12E-F)。これにより、*TALEN* 遺伝子の 5'UTR 領域に *dMac3* を付加できる新しいディスティネーションベクターを作製した。このプラスミドを *pDula35S-dxGw1301* と命名した (図 12F)。このプラスミドを Emerald Gateway *TALEN* system で用いるディスティネーションベクターに置き換え、新たな *TALEN* 構築システムを作製した。このシステムを「Emerald Gateway dx-*TALEN* system」と名付けた (図 14)。

次に、このシステムを利用して *dMac3* を組込んだ *TALEN* 遺伝子を作製した。*TALEN* の標的部位は、前章と同じく *Os01g0833500* 遺伝子の第 5 エキソンにある *KpnI* 切断部位を含む領域を標的とした (図 6B)。これにより、*dMac3* が組込まれた *TALEN* 遺伝子を有するバイナリープラスミドを作製した (*pdxTALENsAB*) (図 14E)。

3.1.2. 翻訳エンハンサー*dMac3* を有する *TALEN* を用いた ゲノム編集と変異の誘導効率の検定

dMac3 を組込んだ *TALEN* 遺伝子を用いたゲノム編集を試み、イネカルスでの変異効率を検定した。*pdxTALENsAB* (図 6B) をイネカルスに導入し、4 週間培養した形質転換カルスについて、標的部位での変異の有無を検定した。

形質転換カルスから DNA を抽出し、これを鋳型とした PCR により標的配列近傍の約 0.7 kb の配列を増幅した。これらの増幅断片を *KpnI* で消化し、アガロ

ースゲル電気泳動により分析した。pdxTALENsAB を導入した 170 株の形質転換カルスで標的部位における *KpnI* 切断部位の存在の有無を調べたところ、71 株 (41.8%) で *KpnI* 切断部位が失われたと思われる変異体が得られた。このうち、34 株 (20.0%) で *KpnI* で切断されない断片と切断される断片が検出された。これらの形質転換体は 1 アリル変異体と予想された。一方、37 株 (21.8%) では、*KpnI* で切断される断片は検出されなかった。これらの形質転換体は 2 アリル変異体と予想された (表 1、図 9)。dMac3 を組み込んでいない *TALEN* 遺伝子である pTALENsAB を用いた場合に変異体が生じた割合は 23.4%であった (図 9)。

pTALENsAB および pdxTALENsAB を導入した形質転換カルスから RNA を抽出し、これを鋳型として Real-Time RT-PCR を行い、導入された *TALEN* 遺伝子の発現量を調べた。pTALENsAB および pdxTALENsAB の形質転換カルスでは、いずれにおいても *TALEN* 遺伝子の発現に由来する転写産物が検出された。これらの形質転換カルスの間に有意差はなく、*TALEN* 遺伝子に dMac3 を組み込んだことによる発現量の差はないことが示唆された。一方、非形質転換体 (NT; Non-Transformant) では、*TALEN* 遺伝子の発現は検出されなかった (図 15)。

3.1.3. 形質転換植物における標的変異の検出

pdxTALENsAB を導入した形質転換カルスから 22 個体の形質転換体植物が得られた。この再分化個体を育成し、緑葉よりゲノム DNA を抽出し、これらの植物体における標的配列上の塩基配列の変化を調べた。これらの形質転換体について、標的部位での変異の有無を調べたところ、7 個体は 1 アリル変異体と考えられ、7 個体は 2 アリル変異体と考えられた (表 2、図 16)。これらの再分化個体について *TALEN* の標的配列を含むゲノム領域の塩基配列を調べたところ、*KpnI* 切断部位の近傍に変異が生じた 22 種類の異なる塩基配列を検出した。これらの塩基配列では、8 塩基以下の小規模な欠損から最大 423 塩基の大規模な欠損、1~3 塩基の挿入、1~2 塩基の置換などの変異が生じていた (図 17)。185 塩基にかけて全く異なる塩基配列に再編成 (rearrangement) されたと思われる変異が検出された個体も得られた (#77-2)。検出された各変異の詳細は表 4 に示す。また、一部の個体 (#39-2、#39-3、#77-1) では 3 種以上の塩基配列が得られた (表 4)。このことから、これらの個体は遺伝的なキメラ個体であることが示唆された。これらの結果から、本研究で構築した *TALEN* 遺伝子を用いることで、標的配列に多様な変異を誘発できることが示唆された。

3.2. 考察

CRISPR/Cas9 system の *Cas9* 遺伝子に dMac3 を付加することで、ジャガイモ細胞でゲノム編集効率が高まることが報告されている (Kusano et al 2018)。TALEN を用いたゲノム編集においても dMac3 を利用することで変異が生じる効率が增加することを期待した。そこで、本研究では Emerald Gateway TALEN system の ディスティネーションベクターを改変し、植物で強力に機能する翻訳エンハンサー dMac3 を *TALEN* 遺伝子の 5'UTR に組込んだ高機能型 TALEN 構築システム Emerald Gateway dx-TALEN system を開発した (図 14)。このシステムでは、CaMV-35S プロモーターの下流に dMac3 を組込むためのディスティネーションベクター (pDual35S-dxGw1301) を用い (図 12)、Emerald Gateway TALEN system と同じプロトコルを用いて、*TALEN* 遺伝子の 5'UTR に dMac3 が付加されたバイナリープラスミドを構築する。

本システムで構築された TALEN が植物細胞で正常に機能するか、また、dMac3 の付加がゲノム編集効率にどのように影響を与えるかをイネ培養細胞を用いて調べた。本システムで構築された dMac3 を有する TALEN を用いた場合は、dMac3 を有さない TALEN を用いた場合よりも得られた変異体の割合が 2 倍程度に増加していた (図 9)。このことから、dMac3 の有無が TALEN によるゲノム編集の効率を大きく高めることが示唆された。

pTALENsAB および pdxTALENsAB を導入した形質転換カルスでは、*TALEN* 遺伝子の発現量に有意な差は認められなかった (図 15)。このことから、dMac3 の有無は *TALEN* 遺伝子の発現量には影響を与えていないことが分かった。dMac3 は翻訳エンハンサーである。そのため、*TALEN* 遺伝子の発現量は変化することなく、TALEN の翻訳量を増加させているものと推測された。

再分化個体では、標的配列の近傍に多様な変異 (欠損・挿入・置換など) が起こっていた (表 4、図 17)。これらの変異体では、導入した TALEN が機能して標的配列で変異を誘発したと考えられた。これらの変異には遺伝子機能の喪失をもたらすものが存在する。

これらの結果から、TALEN によるゲノム編集の効率を高めるために、翻訳エンハンサー dMac3 の利用が有効な手段であることが強く示唆された。本システムは植物で機能する強力な TALEN を構築するために利用できると思われる。

4 章. 条件発現性プロモーターを利用した TALEN (dx-TALEN premium) の 構築法の開発とその評価

標的とする遺伝子配列の改変を目的とするゲノム編集の操作では、標的配列に変異が生じた後は導入した人工ヌクレアーゼが働き続ける必要はない。また、非特異的な部位での変異の誘発を避けるために、必要な時にのみに導入した *TALEN* 遺伝子を発現させる、誘導的発現が可能な *TALEN* 遺伝子の開発を試みた。

これまでに、植物細胞で薬剤投与による発現誘導が可能なプロモーターが開発されている (Aoyama and Chua 1997)。この発現では、グルココルチコイドの投与により活性化された GVG 転写因子 (酵母の転写因子 GAL4 およびヘルペスウイルスの転写因子 VP16、グルココルチコイド受容体 GR のキメラ因子) が条件発現性のプロモーター (iPromoter) に結合して活性化し、これにより遺伝子の転写が起こる。この誘導発現システムを Emerald Gateway dx-TALEN system に組込むことで、*TALEN* 遺伝子をグルココルチコイドの投与により一過的に発現させることができると考えた (図 18)。本章では、Emerald Gateway dx-TALEN system のプロモーターを iPromoter に置換し、dMac3 を付加した *TALEN* 遺伝子を誘導的に一過的な発現させるベクターシステムの構築と、これを用いたゲノム編集システムの評価を行なった。

4.1. 結果

4.1.1. 条件発現型 TALEN 構築システムの構築

Emerald Gateway dx-TALEN system のディステーションベクターに含まれるプロモーターを誘導型の iPromoter に置換し、投与したグルココルチコイドに応答して発現する *TALEN* 遺伝子を構築する手法の開発を行なった。

まず、pTA7002 (Aoyama and Chua 1997) を利用して、iPromoter の活性化に必要な GVG 転写因子群 (CaMV-35S プロモーター、GVG 転写因子、E9 ターミネーターから構成されるカセット) の遺伝子構築を行なった。この遺伝子断片に選抜マーカーとして *LacZ* 遺伝子を繋ぎ、バイナリープラスミド構築の成否の判断をしやすくした (図 19A)。この遺伝子断片を pBlueScript SK+ (Agilent) の *XhoI* と *ApaI* 切断部位の間に挿入して、両端に *XbaI* および *KpnI* 切断部位を配した (図

19B)。次に、iPromoter と dMac3 の配列を連結した遺伝子断片を化学合成した (図 19C)。この時、iPromoter では Aoyama and Chua (1997) より報告されている配列上に存在する *KpnI* および *XbaI* 切断部位を取り除くため、3 つの塩基を置換 (G→A、T→A、C→T) した。また、*TALEN* 遺伝子に dMac3 の翻訳促進効果を付与するために、iPromoter 下流の dMac3 配列の直下に開始コドン配置した (図 20)。GVG 転写因子群と *LacZ* 遺伝子を繋いだ断片の両端に、この化学合成した iPromoter および dMac3 の遺伝子断片を繋いだ (図 19D)。この断片の末端には *XbaI* および *KpnI* 切断部位があるため、Emerald Gateway dx-TALEN system に含まれる pDual35S-dxGw1301 を *XbaI* および *KpnI* で切断し、このプロモーターカセットを除去した後、上記の断片と置換した (図 19E-F)。これによりプロモーター領域が iPromoter を含む領域に置換された新しいディスティネーションベクターを作製した。このプラスミドを pDualiPro-dxGw1301 と命名した (図 19F)。また、iPromoter が組込まれた *TALEN* 遺伝子を構築するこのシステムを「Emerald Gateway dx-TALEN premium system」と名付けた (図 21)。

4.1.2. グルココルチコイド誘導型 *TALEN* 遺伝子の作製と誘導発現の検定

Emerald Gateway dx-TALEN premium system を用いて、*TALEN* の構築を試みた。*TALEN* の標的部位は、2 章および 3 章において記述した *TALEN* の標的部位と同じ配列を設定した (図 6A)。ディスティネーションベクターに pDualiPro-dxGw1301 を用いて *TALEN* 遺伝子を構築した。これにより、iPromoter および dMac3 の直下に *TALEN* 遺伝子が組込まれたバイナリープラスミドが完成した (piProdxTALENsAB) (図 21E)。

次に、構築した *TALEN* 遺伝子がグルココルチコイドに応答して発現するかを調べた。piProdxTALENsAB (図 6B) をイネカルスに導入し、60 mM のグルココルチコイドと 50 mg/L のハイグロマイシンを含む N6D 寒天培地上で 2 日間培養し、褐変しなかったカルスを選抜した。また、対照としてグルココルチコイドを添加していない実験区を設定した。それぞれの実験区の形質転換カルスから RNA を抽出して RT-PCR を行い、導入された *TALEN* 遺伝子の転写産物の検出を試みたところ、グルココルチコイド処理をした実験区では、*TALEN* 遺伝子の転写産物に対応する断片が検出された。一方、グルココルチコイド処理をしていない実験区では、転写産物に対応する断片は検出されなかった (図 22A)。これ

らの形質転換カルスでは、グルココルチコイドを投与した場合にのみに *TALEN* 遺伝子が転写されることが示唆された。このため、本システムで構築した piProdxTALENsAB を導入した植物細胞では、グルココルチコイド処理により必要な時にのみ *TALEN* 遺伝子を誘導的に発現させることができると期待された。

4.1.3. 誘導発現型 *TALEN* 遺伝子を利用したゲノム編集の評価

iPromoter により誘導発現する *TALEN* 遺伝子を導入した形質転換カルスにおいて、変異誘導の効率を調べた。piProdxTALENsAB を導入したカルスをハイグロマイシンを含む N6D 寒天培地上で 5 日間培養し、褐変しなかったカルスにおける標的部位での変異の有無を検定した。この時、形質転換時と選抜時に培地にグルココルチコイドを添加した実験区と、添加しない実験区を設定した。その結果、グルココルチコイド処理をした実験区では、106 株の形質転換カルスのうち 64 株 (60.4%) で *KpnI* で切断されない断片が検出された。これらのカルスでは *KpnI* で切断された断片も検出されたため、いずれも 1 アリル変異体と推測された。一方、グルココルチコイド処理をしていない実験区では、96 株のカルスの全てにおいて PCR 増幅断片は *KpnI* で切断された (表 5、図 22B)。これらの形質転換カルスでは、グルココルチコイド処理をした場合にのみ標的配列に変異が生じることが示唆された。本研究で検出された変異はいずれも 1 アリル変異であったが、この割合は dx-TALEN よりも高い値を示した。いずれのカルスにおいても、グルココルチコイドの添加の有無による生育状態の差は認められなかった。

4.1.4. 形質転換イネカルスにおける変異の検出

グルココルチコイド処理した実験区の形質転換カルスからゲノム DNA を抽出し、*TALEN* の標的配列を含むゲノム領域の塩基配列を調べた。その結果、*KpnI* 切断部位の近傍に変異が生じた 10 種類の異なる配列を検出した。このうち、6 つでは 1~9 塩基欠失の変異を、2 つでは 1 塩基挿入の変異を、1 つでは 1 塩基挿入と 1 塩基欠失の変異を、1 つでは 288 塩基の大規模な欠失の変異を生じていることが分かった (図 23)。このため、本研究で構築した *TALEN* 遺伝子を導入した形質転換カルスにグルココルチコイド処理することで、標的配列に多様な変異を誘発できることが示唆された。

4.2. 考察

ここで用いた誘導発現系は、グルココルチコイドによって活性化される GVG 転写因子と、これの結合領域 (6xGAL4 UAS) および TATA box を有する条件発現性プロモーター (iPromoter) からなる (Aoyama and Chua 1997)。このプロモーターシステムをゲノム編集に適用することで、グルココルチコイドを投与した時にのみ *TALEN* 遺伝子が発現して標的配列に変異を誘発する手法の構築を試みた (図 18)。そこで、dMac3 が組込まれた高効率な *TALEN* 遺伝子の構築が可能な Emerald Gateway dx-*TALEN* system のディスティネーションベクターを改変し、これに含まれる 35S プロモーターを、グルココルチコイドに応答して標的配列に変異を誘発させることができる iPromoter に置換した。これにより、条件発現型 *TALEN* を構築することができる Emerald Gateway dx-*TALEN* premium system を開発した (図 21)。このシステムでは、Emerald Gateway dx-*TALEN* system と同じく、Emerald Gateway *TALEN* system と同じプロトコールで植物用の *TALEN* 遺伝子を簡便に構築することができた。

本システムで構築された *TALEN* 遺伝子がグルココルチコイドに応答して発現できるかをイネ培養細胞を用いて調べたところ、グルココルチコイド処理を行なった場合のみで、*TALEN* 遺伝子に対応する転写産物が検出された (図 22A)。このことから、本システムで構築された *TALEN* 遺伝子はグルココルチコイドに応答して特異的な発現をすることが強く示唆された。また、このシステムで使用したディスティネーションベクターは予想通りに機能し、これにより、目的とする *TALEN* 遺伝子の作製に成功したと言える。

この *TALEN* が植物細胞で機能して標的配列に変異を誘発できるか、また、iPromoter を利用することが植物のゲノム編集の効率にどのような影響を与えるかを調べた。このシステムを用いて構築した *TALEN* 遺伝子を有するバイナリープラスミドである piProdxTALENsAB をイネカルスに導入し、得られた形質転換カルスを用いて変異の誘発率を調べたところ、グルココルチコイド処理を行なった実験区でのみ、高い割合で変異体を得られた (図 22B)。また、この実験区のカルスでは、標的配列の近傍に欠失・挿入などの多様な変異が生じていることが明らかとなった (図 23)。これらの結果から、導入した *TALEN* 遺伝子が投与したグルココルチコイドに応答して一過的に発現して *TALEN* 分子が合成され、これが機能して標的配列での変異を誘発したものと考えられた。この割合

は dx-TALEN と同等以上の値を示していたことから、*TALEN* 遺伝子の 5'UTR への dMac3 の付加による TALEN の翻訳促進効果との相乗効果が現れたのではないかと考えられる。

これらの結果から、TALEN を一過的に機能させて標的配列に変異を導入するために、条件発現性プロモーター*iPromoter* と翻訳エンハンサーdMac3 の併用が有効な手段であることが強く示唆された。本システムは、植物でグルコシルチコイドに応答して機能する強力な TALEN を構築するために利用できると思われる。

5 章. 総合考察

ゲノム編集技術の 1 つである TALEN は、標的配列の設定の自由度が高く、部位特異性が高いため off-target 変異はほとんど生じないと考えられている (Mussolino et al 2011、Mussolino and Cathomen 2011、Li et al 2012、Kim et al 2013)。しかし、植物で TALEN を扱うためのプラスミドの構築は容易ではない。そのため、植物のゲノム編集に TALEN の長所を活かすため、まず植物用 TALEN 構築のシステム開発とその改良を行なった。これにより TALEN 作製法の簡略化とゲノム編集効率の向上を図った。

本研究では、広島大学の Sakuma らによって開発された Platinum Gate system 法 (2013) を植物の TALEN 遺伝子の構築に適用するためのシステム開発を行なった。また、Gateway 組換えシステム (Hartley et al 2000) を利用した植物用 TALEN 遺伝子の構築の簡便化を図った。これにより、植物用 TALEN 構築システムである Emerald Gateway TALEN system を完成させた (図 7)。このシステムでは、標的配列に対応する 1 対の TALEN 遺伝子を、1 回の LR 反応により、植物で機能するバイナリープラスミドに導入できる。最短 1 週間で TALEN 構築のための一連の操作が完了するため、植物用 TALEN 構築にかかる時間は従来の手法より短縮されたものと考えられた。

次に、このシステムで構築した TALEN 遺伝子 (pTALENsAB) をイネ培養細胞に導入し、ゲノム編集の効率を評価した。ゲノム編集の効率を評価するにあたり、標的配列上に生じた変異の有無の判断を容易にするため、本研究では、制限酵素の切断部位を有する領域を TALEN の標的部位として選定した。このために、イネのプロテアーゼ遺伝子 (*Os01g0833500*) の第 5 エキソンに存在する *KpnI* 切断部位を含む領域を、TALEN の標的部位として設定した (図 6A)。この部位で配列が変化して *KpnI* 切断部位が消失した場合、TALEN が作用したことにより変異が生じたと判断できる。本研究では、PCR により標的部位を含む近傍の配列を増幅し、この増幅断片を *KpnI* で消化することで *KpnI* 切断部位の有無を調べる手法を用いた (図 8)。pTALENsAB を導入した形質転換カルスから DNA を抽出し、標的配列上の *KpnI* 切断部位の有無を調べたところ、この部位を標的とする TALEN 遺伝子を用いた場合には 2 割程度の割合で変異体を得ることが分かった。イネの染色体は同質 2 倍体であるが、この 1 つのアリルに変異が生じた 1 アリル変異、2 つのアリルに変異が生じた 2 アリル変異のいずれも得られることが明らかとなった (表 1、図 9)。また、pTALENsAB 形質転換カ

ルスを再分化することで、標的配列上に1アリルないし2アリル変異を生じた6個体の変異体植物を得ることもできた(表3、図11)。このため、本システムが植物のゲノム編集に適したTALENを構築するためのツールとして利用できることが示された。

しかしながら、TALENを育種に応用するためには、従来の手法よりも高い効率で標的配列に変異を導入する必要があると考えられたため、この効率を高める方策を検討した。このために、翻訳エンハンサーdMac3をEmerald Gateway TALEN systemに組み込み、ゲノム編集の効率の向上を図った。その結果、Emerald Gateway dx-TALEN systemの開発に成功した(図13)。このシステムを用いることで、5'UTRにdMac3が組み込まれたTALEN遺伝子がバイナリープラスミドに導入される。すなわち、植物内で強力に機能するTALEN(dx-TALEN)が、このシステムを用いることで簡便に構築できるようになった。

このシステムで構築したTALEN遺伝子(pdxTALENsAB)を導入した植物細胞では、dMac3の翻訳促進効果を受けたTALEN遺伝子から大量のTALENが産生され、これによりTALENが標的配列に変異を誘発する作用が強まることが期待された。実際に、pdxTALENsABをイネ培養細胞に導入したところ、dMac3を有さない従来法のゲノム編集よりも2倍ほど高い効率で、変異体を得ることができた。1つのアリルに変異が生じた1アリル変異と、2つのアリルに変異が生じた2アリル変異いずれの割合も、従来法より増加していた(表1、図9)。

本研究では、TALEN遺伝子の翻訳促進およびゲノム編集効率の向上を期待して、イネの*OsMac3*遺伝子由来の翻訳エンハンサーdMac3を用いた。特定のmRNAの5'UTRは、下流ORFによってコードされるタンパク質の産生を大幅に強化させる翻訳エンハンサーとして作用することが知られている(Roy and von Arnim 2013)。植物では、遺伝子の発現に焦点をあてた様々な研究において、アルコールデヒドロゲナーゼ(*ADH*)遺伝子由来の翻訳エンハンサーADHが一般的に用いられる(Satoh et al 2004、Shinmyo 2007)。CRISPR/Cas9 systemでは、*Cas9*遺伝子の上流に翻訳エンハンサーADHないしdMac3を付加した際に変異効率を上げることができるという知見が得られているが、特にdMac3を用いた際に顕著に変異効率が上がることが報告されている(Kusano et al 2018)。本研究においても、TALEN遺伝子の上流にdMac3を付加することでゲノム編集効率の向上が認められた(表1、図9)。このため、これらの知見の一致から、ヌクレアーゼ遺伝子の5'UTRに翻訳エンハンサーdMac3を装着することがゲノム編集

の効率を高めるために有効な手段の1つであることが明らかとなった。

さらに、本システムで構築した *TALEN* 遺伝子を導入した形質転換カルスを再分化したところ、1 アリル変異および2 アリル変異を有した 14 個体の変異体植物を得ることに成功した (表 2、図 16)。また、これらの変異体の標的部位には、挿入や置換、1 塩基の小規模な欠損から最大 423 塩基の大規模な欠損などの多様な変異が生じていた (表 2、表 4、図 17)。これらの結果から、本システムが標的配列に高い効率で変異を導入し、1 アリルないし2 アリル変異を有する多数の変異体植物を得るために有用なツールであることが示された。

ゲノム編集の操作は標的とする遺伝子配列の改変を目的とする。標的配列に変異が生じた後は導入した人工ヌクレアーゼが働き続ける必要はないため、必要な時にのみ導入した *TALEN* 遺伝子を働かせる方策を検討した。このために、グルココルチコイドの投与により活性化される条件発現性プロモーター *iPromoter* (Aoyama and Chua 1997) を Emerald Gateway dx-*TALEN* system に組み込み、*TALEN* 遺伝子の一過的な誘導発現によるゲノム編集を図った。その結果、Emerald Gateway dx-*TALEN* premium system の開発に成功した (図 20)。このシステムを用いることで、上流に *iPromoter* と *dMac3* が組み込まれた *TALEN* 遺伝子がバイナリープラスミドに導入される。すなわち、グルココルチコイドに応答して一過的に植物内で強力に機能する *TALEN* (dx-*TALEN* premium) を簡便に構築できるようになった。

このシステムで構築した *TALEN* 遺伝子 (*piProdxTALENsAB*) を導入した植物では、グルココルチコイドに応答して *TALEN* 遺伝子が一過的に強発現し、必要な時にのみ *TALEN* を標的配列に作用させることができると考えられた。さらに、*iPromoter* 下流に付与された *dMac3* により、dx-*TALEN* と同様にゲノム編集の効率が高まることも期待された。実際に、*piProdxTALENsAB* をイネ培養細胞に導入したところ、グルココルチコイド処理した実験区の形質転換カルスでのみ、*TALEN* 遺伝子の発現が認められた (図 22A)。また、この実験区では6割程度の効率で1 アリル変異体を得られ、dx-*TALEN* と同等以上の割合で変異体を得ることができた (表 5、図 22B)。さらに、この変異体に含まれる標的部位近傍の配列を調べたところ、1 塩基の挿入、1 塩基の小規模な欠損から最大 288 塩基の大規模な欠損などの多様な変異が生じていた (図 23)。このため、標的配列に高い効率で変異を導入するための手段の1つとして、条件発現性プロモーター *iPromoter* と翻訳エンハンサー *dMac3* の併用が有効であることが明らかとなった。

また、本研究では、グルココルチコイド処理していない実験区のカルスでは変異が検出されなかった（表 5、図 22B）。このことから本システムは、グルココルチコイド処理した時、すなわち必要な時にのみ *TALEN* 遺伝子を一過的に発現させて標的配列に高い効率で変異を導入できる、強力なツールであることが示された。

しかしながら、*dx-TALEN premium* では従来型および *dx-TALEN* で得られていた 2 アリル変異体は得られていない（図 9、図 22）。カルスの増殖期は、ヌクレアーゼによるゲノムの改変が起こりやすい時期と考えられている（Osakabe et al 2016）。本研究ではこの時期にグルココルチコイドを投与し、導入した *TALEN* 遺伝子の発現誘導を行なった。しかし、グルココルチコイド処理に供する濃度や、作用期間・タイミング、投与の方法などの諸条件は未検討であるため、本システムはさらなる改善の余地を残していると考えられた。形質転換の当代で 2 アリル変異体を得るためにも、ゲノム編集に適したグルココルチコイド処理の最適条件を明らかにすることが、このシステムの今後の課題であると考えられる。

なお、イネの染色体は一般的に 2 倍体であるが、従来法および *dx-TALEN* を用いたゲノム編集では、3 種以上の塩基配列の多型の存在が示唆された変異体植物が得られている（表 3-4、図 11、図 16）。これらの変異体は遺伝的なキメラ個体であると推察された。これらの個体については、単一の細胞である生殖細胞を介して後代にあたる種子を得ることで、遺伝子型を固定できるものと考えられる。

本研究ではイネ培養細胞を用いて各システムにおけるゲノム編集の効率評価を行なった。一方で、他の植物種における変異効率の知見はほとんど得られていない。今後の展望として、シロイヌナズナやトマト、ジャガイモなどの多様な植物種でゲノム編集の効率評価を行い、植物種ごとの知見を蓄積することで、将来的に本技術を育種への応用に繋げていくことができると考えられる。

本研究では、翻訳エンハンサー *dMac3* と条件発現性プロモーター *iPromoter* の利用により、標的配列に高い効率で変異を誘発できる強力な植物ゲノム編集ツールを構築することができた。特に、*dx-TALEN* と *dx-TALEN premium* はプロモーターの違いから実験用途によって使い分けることができ、植物ゲノム編集における *TALEN* の利便性はこれまでよりも高まったと私は考えている。本研究により、*TALEN* を植物のゲノム編集に活かすことはこれまでよりも容易になり、

身近な技術として利用できるようになった。ゲノム編集技術の発展は、多くの植物種の育種を容易にできる可能性を有している。私は、本研究で開発されたゲノム編集ツールが、将来的に有用な形質を有した新品種を創り出すための育種に貢献できると期待している。

6 章. 材料と方法

6.1. プラスミドの構築

大腸菌 NEB stable #Stay Blue 株と ccdB survival 株 (A10460, Thermo Fisher Scientific) を用いた。NEB Stable #Stay Blue は、市販の NEB (R) stable を培養したところ複数の遺伝子型を持つ菌株の混合物であったため、この中から正しい遺伝子型の菌株を分離して得られたものである。(この菌株を NEB stable 株と呼ぶこととする)。大腸菌からのプラスミド DNA の抽出には、Fast Gene Plasmid Mini kit (日本ジェネティクス) を用いた。

Emerald Gateway TALEN system に関する pPlat プラスミド (図 4) および pDual35SGw1301 (図 5) は、草野博彰氏らによって pENTR (invitrogen) および pGWB1 (Nakagawa et al 2009) より作製されたものを用いた。pDual35S-dxGw1301 (図 12) の CaMV-35S プロモーターおよび dMac3 を含む塩基配列を図 13 に、pDualiPro-dxGw1301 (図 19) の iPromoter および dMac3 を含む塩基配列を図 20 に示す。iPromoter では、Aoyama and Chua (1997) により報告された配列から内部の制限酵素部位を取り除くため、3 つの塩基を置換 (G→A、T→A、C→T) した。図 20 において赤色の文字で示した箇所がこれに該当する。

6.2. TALEN の設計と構築

Cornell University のウェブサイト上で利用できる TAL Effector-Nucleotide Targeter 2.0 software (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>) (Doyle et al 2012) を用いて、*Os01g0833500* 遺伝子の配列の中から、TALEN の標的となる 1 対の配列 (TALENa および TALENb) を選定した。TALENa および TALENb を有するバイナリープラスミド pTALENsAB は、Emerald Gateway TALEN system により構築した。pdxTALENsAB は、Emerald Gateway dx-TALEN system を用いて pDual355S-dxGw1301 に *TALEN* 遺伝子を導入することで作製した。piProdxTALENsAB は、Emerald Gateway dx-TALEN premium system を用いて pDualiPro-dxGw1301 に *TALEN* 遺伝子を導入することで作製した。

6.3. アグロバクテリウム法を用いた形質転換イネの作製

Toki et al 2006 の手順に従って、イネのカルスに *TALEN* 遺伝子 (pTALENsAB、pdxTALENsAB、piProdxTALENsAB) を導入して形質転換体を作製した。形質転換には、スーパーアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Hood et al 1993) +pBBR-AcdS) (筑波大学より入手) を用いた。pTALENsAB および pdxTALENsAB の形質転換カルスは、クラフォラン (Sanofi Aventis) とハイグロマイシン (和光純薬工業) を含む N6D 寒天培地 (Chu et al 1975) 上で 28°C 明所にて 4 週間培養することで選抜を行なった。形質転換の概略を図 24 に示す。再分化植物体は、MS 寒天培地 (Murashige and Skoog 1962) 上で、28°C に保たれた室内において連続明期条件で育成した。草丈が 10 cm 以上になった個体を鉢上げし、25~30°C の自然日照環境の温室で栽培した。

6.4. グルココルチコイド処理の条件

グルココルチコイド投与による条件発現性プロモーター (iPromoter) の活性化は以下の方法で行なった。エタノールを用いて終濃度 30 mM になるように溶解したグルココルチコイド (Sigma-Aldrich) 溶液を、終濃度 60 μ M となるようにハイグロマイシンを含む N6D 寒天培地に添加した。この N6D 寒天培地上に piProdxTALENsAB の形質転換カルスを静置し、2 日間または 5 日間培養した。対照区としてグルココルチコイドを添加しない実験区を設け、同様の操作を行なった。実験の概略を図 25 に示す。

6.5. 変異の検出

形質転換カルスおよび再分化個体の緑葉からゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA の抽出は、QIAshredder と RLT Lysis buffer (QIAGEN) を用いた。抽出された DNA を鋳型とした PCR により、TALEN の標的配列周辺の塩基配列を増幅した。変異効率の検定に用いる遺伝子断片の増幅には *Os01g0833500* 遺伝子の第 5 エキソンの *KpnI* 切断部位の近傍の配列に対応する 5'-GCCCTGATTTACCATGATTC-3' および 5'-GTCAAGAGGGTGATCTAAG-3' のプライマーセットを用いた。反応には KOD FX neo DNA polymerase (Toyobo) と

GeneAmp PCR System (Applied Biosystems) を用いた。増幅した断片を *KpnI* (Toyobo) で消化し、1%アガロース電気泳動で分離し、切断の有無を検定した。標的変異の検出に用いる遺伝子断片の増幅には、*Os01g0833500* 遺伝子の第 5 エキシソンの *KpnI* 切断部位の近傍の配列に対応する 5'-CCTGTTGGGCCCATGAGTACAGGGAGTTCTACATTGC-3' および 5'-ATGGCCGAATTCGCAGTCCTCCCAAGCCAAGTTTG-3' のプライマーセットを用いた。この増幅した断片の両端には *Apal* および *EcoRI* 切断部位を付加した。この断片を *Apal* (Takara) と *EcoRI* (Toyobo)、*KpnI* で消化し、pDONR207 (Invitrogen) にクローニングした。得られたプラスミドを用いて標的配列近傍のシーケンス解析 (外部注文：株式会社ファスマック) を行い、標的配列に生じた変異を検出した。

6.6. Real Time RT-PCR と RT-PCR

選抜培地に移植してから 4 週間目の pTALENsAB および pdxTALENsAB 形質転換カルスを使用した。また、選抜培地に移植してから 2 日目の piProdxTALENsAB 形質転換カルスを使用した。全 RNA は、形質転換カルスから RNeasy Plant mini kit (QIAGEN) を用いて抽出した。このうちの 3 mg の全 RNA を用いて、オリゴ dT (20) プライマーと ReverTra-Ace cDNA synthesis kit (Toyobo) により cDNA を合成した。この cDNA を用いて、Real Time RT-PCR により *TALEN* 遺伝子に対応する転写物量を定量した。また、RT-PCR により *TALEN* 遺伝子に対応する転写産物を検出した。いずれも、データ標準化のために *actin1* (acc. No. AB047313) 遺伝子の転写産物を対照として用いた。Real Time RT-PCR に用いる遺伝子断片の増幅には、*TALEN* 遺伝子の DNA 切断ドメインのコード領域の配列に対応する 5'-GAACTCGACTCAAGACAGAATCC-3' および 5'-GATCACTCCGTAATCAATCGG-3' と、*actin1* 遺伝子上の配列に対応する 5'-CCCTCCTGAAAGGAAGTACAGTGT-3' および 5'-GTCCGAAGAATTAGAAGCATTTC-3' のプライマーセットを用いた。反応には Thunderbird SYBR qPCR mix (Toyobo) と QuantStudio3 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。RT-PCR に用いる遺伝子断片の増幅には *TALEN* 遺伝子の DNA 切断ドメインのコード領域の配列に対応する 5'-CTCGACTCAAGACAGAATCC-3' および 5'-GACTTCTTCCAGTGTCAG-3' と、*actin1* 遺伝子上の配列に対応する 5'-AGCTTCCTGATGGACAGGTT-3' および

5'-GTCCGAAGAATTAGAAGCATTTCC-3'のプライマーセットを用いた。反応にはKOD FX neo DNA polymerase (Toyobo) と GeneAmp PCR System (Applied Biosystems) を用いた。増幅した断片を 1%アガロース電気泳動で分離し、転写産物の有無を検定した。

7 章. 表

表 1. pTALENsAB および pdxTALENsAB 形質転換カルスにおける変異体の割合

| dMac3 | 1 アリル変異体 | 2 アリル変異体 | WT | 合計 |
|-----------------|---------------|---------------|-----|-----|
| -* ¹ | 11 (6.6%) | 28 (16.8%) | 128 | 167 |
| +* ² | 34 (20.0%) | 37 (21.8%) | 99 | 170 |

*¹ pTALENsAB を導入した形質転換カルスを示す。

*² pdxTALENsAB を導入した形質転換カルスを示す。

表 2. pTALENsAB および pdxTALENsAB 形質転換植物における変異体の数

| dMac3 | 1 アリル変異体 | 2 アリル変異体 | WT | 合計 |
|-----------------|----------|----------|----|----|
| -* ¹ | 3 | 3 | 0 | 6 |
| +* ² | 7 | 7 | 8 | 22 |

*¹ pTALENsAB を導入した形質転換植物を示す。

*² pdxTALENsAB を導入した形質転換植物を示す。

表 3. pTALENsAB 形質転換植物体から検出された変異

| 個体番号 | 検出された変異 | 検出回数 | フレームシフト変異 |
|----------------------|-------------------|------|-----------|
| #2-1* ^{2,3} | 18 nt 欠損 | 4 | - |
| | 230 nt 欠損 | 1 | + |
| | WT | 1 | none |
| #2-2* ¹ | 18 nt 欠損 | 3 | - |
| | WT | 4 | none |
| #121* ¹ | 4 nt 欠損 | 5 | + |
| | WT | 3 | none |
| #160* ^{1,3} | 4 nt 欠損 | 3 | + |
| | 2 nt 欠損 | 2 | + |
| | 1 nt 欠損 | 1 | + |
| | WT | 1 | none |
| #161* ² | 1 nt 置換 | 1 | - |
| | 78 nt 欠損、28 nt 挿入 | 1 | + |
| #217* ² | 7 nt 欠損 | 7 | + |
| | 1 nt 挿入 | 1 | + |

*¹ アリル変異体と考えられる個体を示す。

*² アリル変異体と考えられる個体を示す。

*³ 遺伝的なキメラ個体と考えられる個体を示す。

表 4. pdxTALENsAB 形質転換植物体から検出された変異

| 個体番号 | 検出された変異 | 検出回数 | フレームシフト変異 |
|-----------------------|----------------------|------|-----------|
| #11* ² | 4 nt 欠損、1 nt 置換 | 4 | + |
| | 8 nt 欠損、1 nt 置換 | 4 | + |
| #39-1* ² | 29 nt 欠損 | 3 | + |
| | 1 nt 置換、45 nt 挿入 | 1 | - |
| #39-2* ^{1,3} | 29 nt 欠損 | 1 | + |
| | 1 nt 置換、42 nt 挿入 | 2 | - |
| | 2 nt 置換、42 nt 挿入 | 1 | - |
| | WT | 1 | none |
| #39-3* ^{1,3} | 2 nt 欠損 | 1 | + |
| | 1 nt 挿入、30 nt 欠損 | 1 | + |
| | 17 nt 挿入、304 nt 欠損 | 1 | + |
| | 423 nt 欠損 | 1 | + |
| | WT | 4 | none |
| #70* ² | 5 nt 欠損 | 4 | + |
| | 2nt 置換 | 2 | - |
| #77-1* ^{2,3} | 3 nt 挿入、1 nt 欠損 | 5 | + |
| | 2 nt 挿入、1 nt 欠損 | 1 | + |
| | 1 nt 挿入、1 nt 欠損 | 1 | - |
| | 5 nt 欠損 | 1 | + |
| | 5 nt 欠損 | 1 | + |
| #77-2* ² | 5 nt 欠損 | 5 | + |
| | 185 nt rearrangement | 3 | - |
| #170* ² | 6 nt 欠損 | 4 | - |
| | 15 nt 欠損 | 4 | - |
| #188-1* ² | 4 nt 欠損 | 3 | + |
| #188-3* ¹ | 4 nt 欠損 | 2 | + |
| | WT | 2 | none |
| #188-4* ¹ | 4 nt 欠損 | 3 | + |
| | WT | 1 | none |
| #188-5* ¹ | 4 nt 欠損 | 2 | + |
| | 5 nt 欠損 | 1 | + |

*¹ 1 アリル変異体と考えられる個体を示す。

*² 2 アリル変異体と考えられる個体を示す。

*³ 遺伝的なキメラ個体と考えられる個体を示す。

表 5. piProdxTALENsAB 形質転換体カルのゲノム編集効率

| グルコシルチコイド | 1 アリル変異体 | 2 アリル変異体 | WT | 合計 |
|-----------------|---------------|----------|----|-----|
| -* ¹ | 0 | 0 | 96 | 96 |
| +* ² | 64 (60.4%) | 0 | 42 | 106 |

*¹ グルコシルチコイドを投与していない実験区の形質転換カルの数を示す。

*² グルコシルチコイドを投与した実験区の形質転換カルの数を示す。

8章. 図

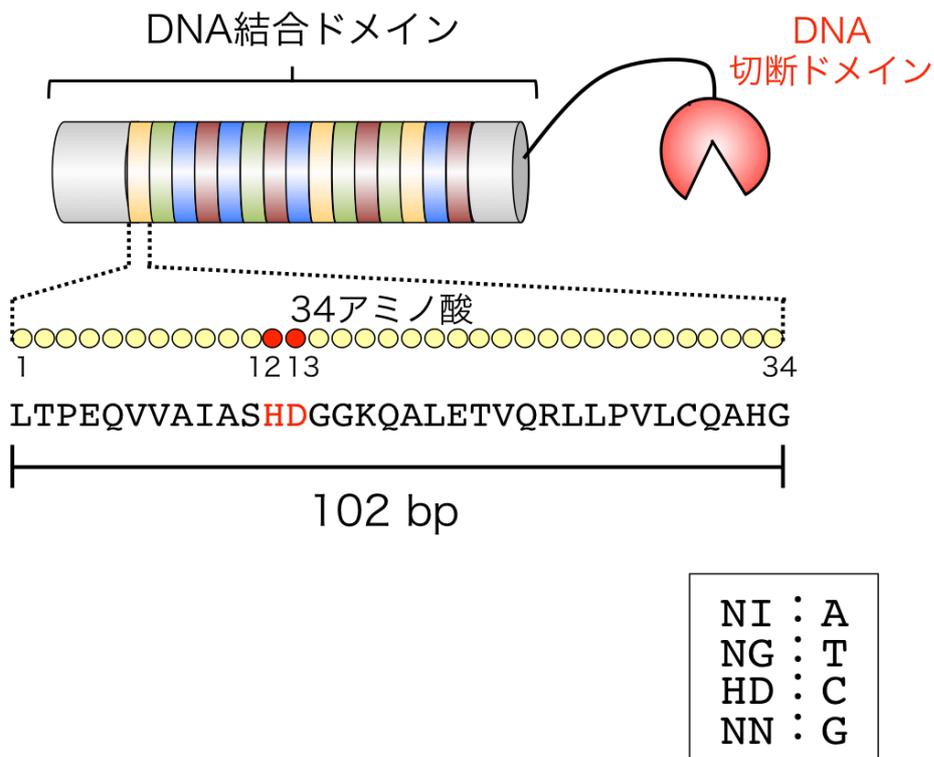


図1. TALENの構造

TALENはDNA結合ドメインとDNA切断ドメインを人工的に融合させた人工ヌクレアーゼである。DNA結合ドメインは、標的部位の塩基を認識するモジュール構造をもつ。それぞれのモジュールは34アミノ酸からなるユニットである。ユニットを構成するアミノ酸配列のうち、12番目と13番目のアミノ酸残基がDNA結合の特異性を決める。このアミノ酸残基がNIであればアデニン、NGであればチミン、HDであればシトシン、NNであればグアニンを認識する。各モジュールに対応する塩基を右下のボックスに示す。

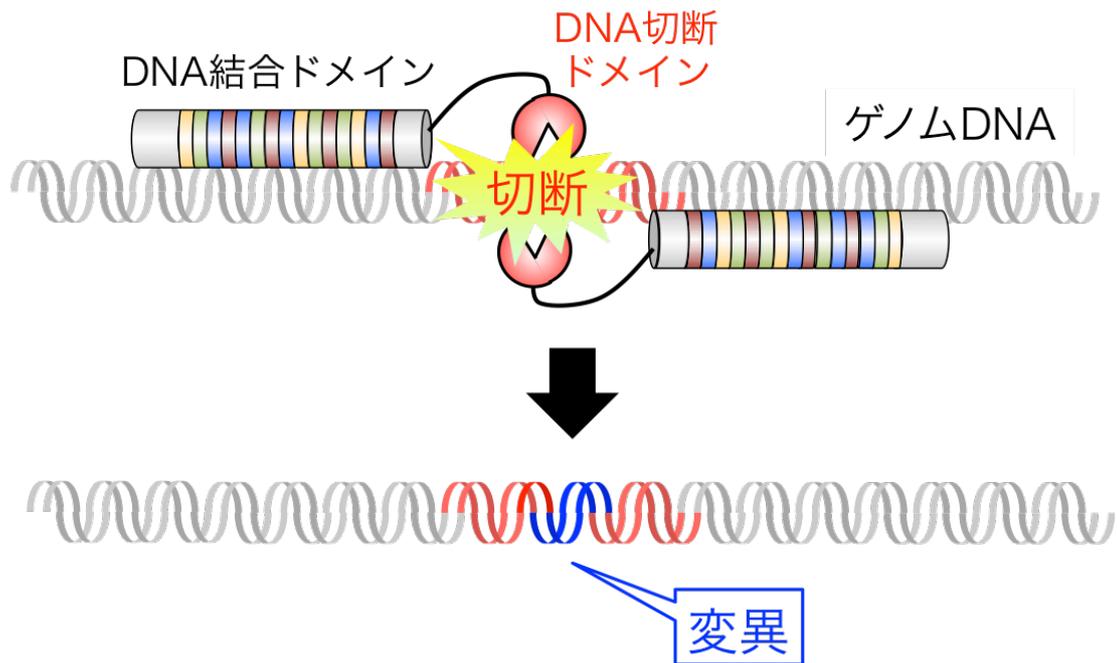


図2. TALENを用いたゲノム編集

1対のTALENが標的配列を挟む2ヶ所に結合し、それぞれのTALENのDNA切断ドメインがダイマーを形成することで、標的のDNAを切断する。切断されたDNAが修復される際、しばしば修復ミスが生じて標的配列に欠損・挿入・置換などの変異が誘発される。ゲノムDNAの赤色の箇所は標的配列、青色の箇所は変異が生じた配列を示す。

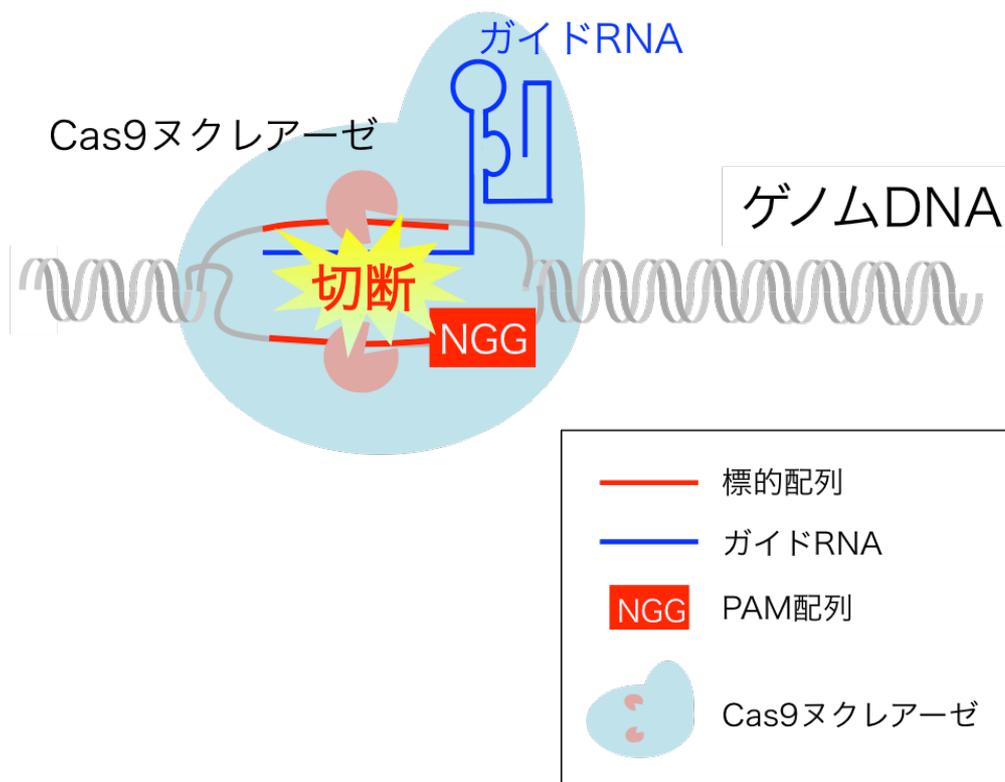
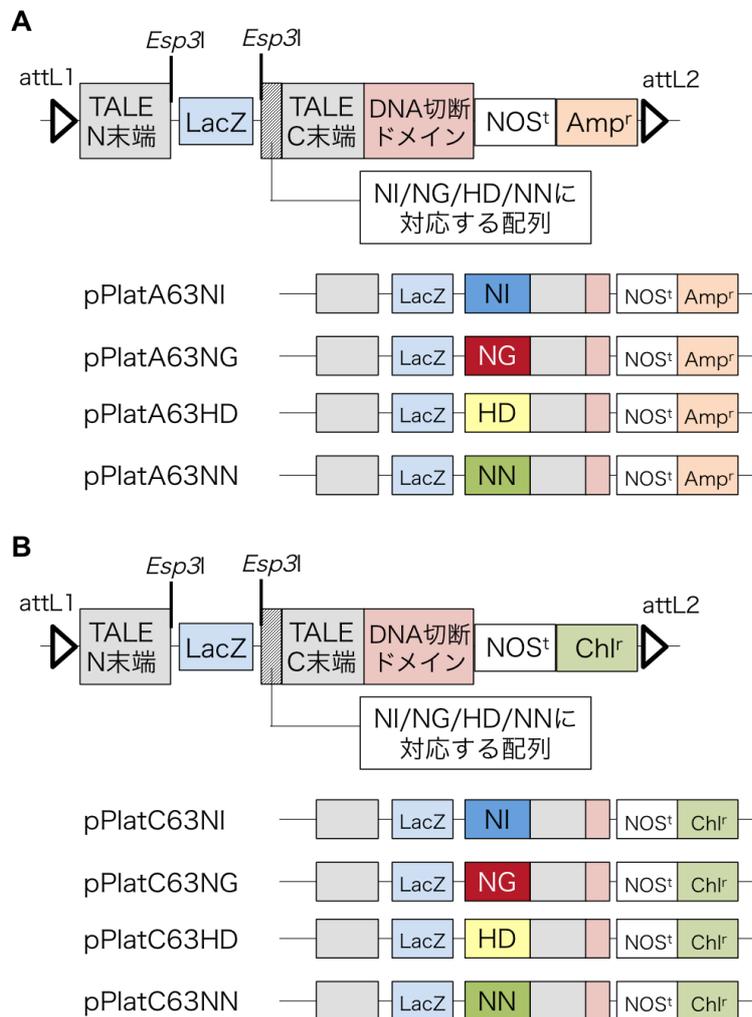


図3. CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集

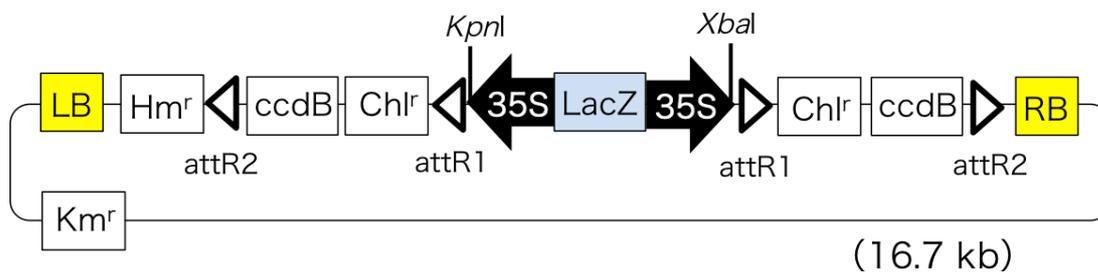
ガイドRNAが標的配列末端のNGG配列（PAM配列）を認識する。その後、Cas9ヌクレアーゼが標的部位に結合し、標的DNAを切断する。これにより、標的配列に変異が誘発される。CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集では、PAM配列がガイドRNAが認識する配列の特異性を決める。各オブジェクトの説明を右下のボックスに示す。



| | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| TALE N末端：TALEのN末端ドメイン | Chl ^r ：クロラムフェニコール耐性遺伝子 |
| TALE C末端：TALEのC末端ドメイン | NI/NG/HD/NN：DNA結合ドメインの各モジュールに対応する配列 |
| LacZ：LacZ pro:: <i>LacZ</i> 遺伝子 | attL1、attL2：LR反応のためのattL1およびattL2配列 |
| NOS ^t ：NOSターミネーター | <i>Esp31</i> ： <i>Esp31</i> の切断部位 |
| Amp ^r ：アンピシリン耐性遺伝子 | |

図4. pPlatプラスミドの構造

pPlatプラスミドはEmerald Gateway TALEN systemで用いる植物用のTALEN遺伝子構築用のエントリーベクターである。選抜マーカーとした耐性遺伝子が異なるものを作製し、それぞれpPlatAおよびpPlatCと命名した。A. pPlatAの構造。TALE C末端の上流に各DNA結合ドメインに対応する配列をもち、どのモジュールに対応するかでpPlatA63NI、pPlatA63NG、pPlatA63HD、pPlatA63NNとそれぞれ命名した。B. pPlatCの構造。pPlatAと同様に、TALE C末端の上流の配列がどのモジュールに対応するかでpPlatC63NI、pPlatC63NG、pPlatC63HD、pPlatC63NNと命名した。各オブジェクトの説明を下部のボックスに示す。



Hmr : ハイグロマイシン耐性遺伝子
 Kmr : カナマイシン耐性遺伝子
 Chlr : クロラムフェニコール耐性遺伝子
 ccdB : ccdB毒素遺伝子
 35S : CaMV-35Sプロモーター
 LB : T-DNA left border
 RB : T-DNA right border
 attR1、attR2 : LR反応のためのattR1およびattR2配列
 KpnI、XbaI : KpnIおよびXbaIの切断部位

図5. pDual35SGw1301の構造

pDual35SGw1301は、Emerald Gateway TALEN systemにおいてエン
 トリーベクターpPlatプラスミドの受入先となるディスティネーションベク
 ターである。TALEN遺伝子を発現させるためのCaMV-35Sプロモーターの
 下流にTALEN遺伝子を組込むためのLR反応の組換え部位を導入している。
 本項目で新たに登場した各オブジェクトの説明を下部のボックスに示す。

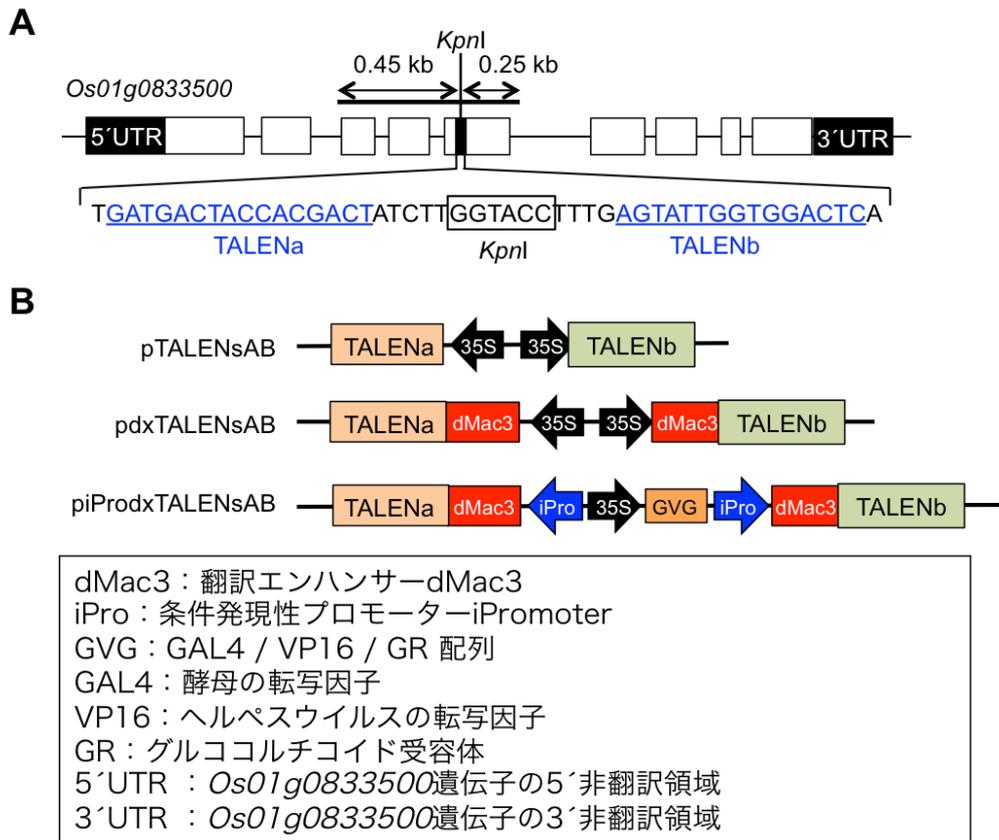


図6. TALEN遺伝子の構造

A. 本研究で用いたTALENの標的部位。イネのプロテアーゼ遺伝子 (*Os01g083350*, acc. No. AK073320) の構造の下部に、標的として設定した配列を示す。TALENaとTALENbの結合配列を下線および青字で示す。エクソン領域を白色のボックス、*KpnI*切断部位を黒色のボックスで示す。変異検出のためのPCRによる増幅領域を、遺伝子の構造上部に示す。矢印は増幅断片を*KpnI*で切断した際のサイズを示す。B. Emerald Gateway TALEN (pTALENsAB)、dx-TALEN (pdxTALENsAB)およびdx-TALEN premium (piProTALENsAB)に基づくTALEN遺伝子の構造。本項目で新たに登場した各オブジェクトの説明を下部のボックスに示す。

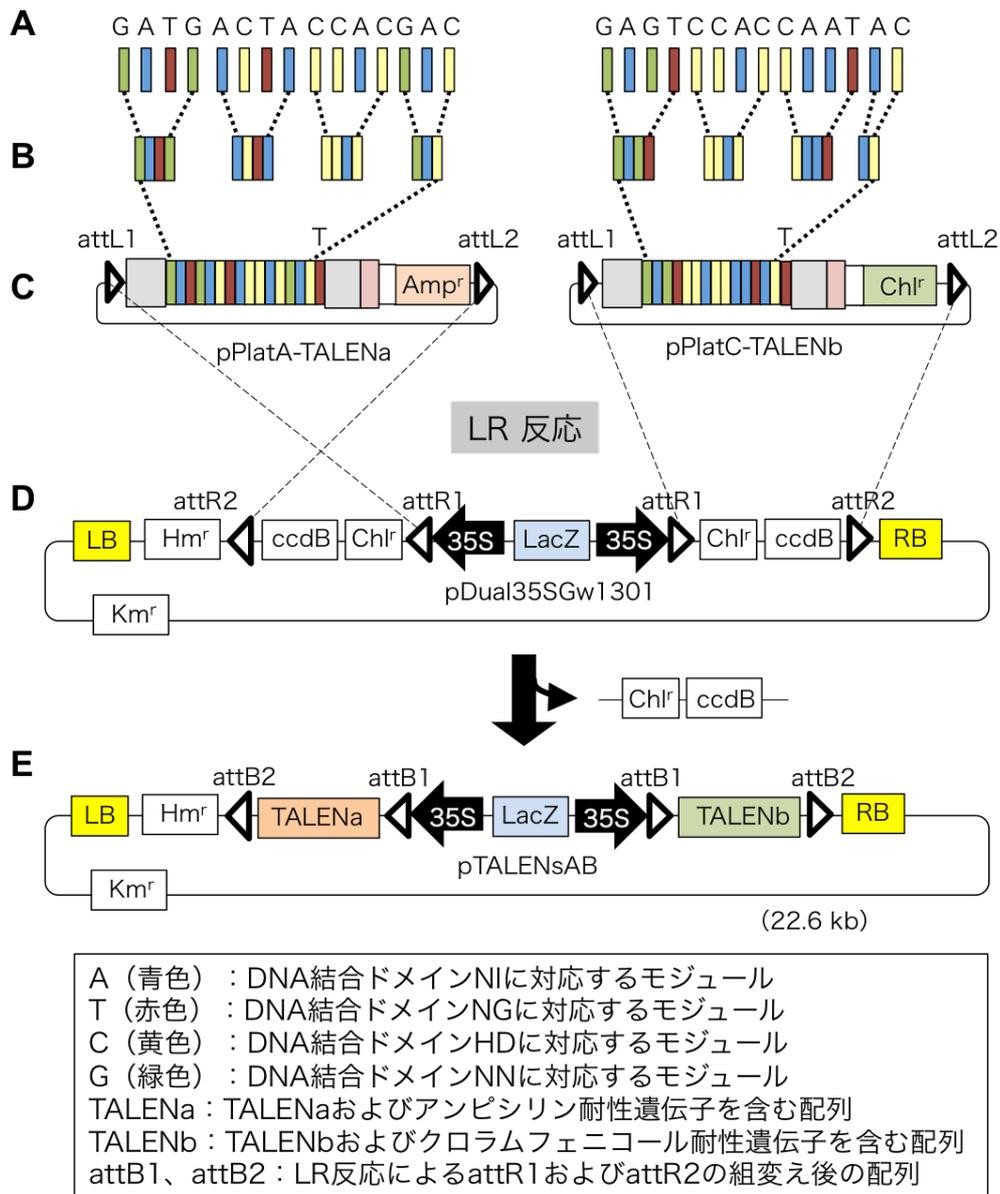


図7. Emerald Gateway TALEN system

Emerald Gateway TALEN systemを用いたTALEN構築の概要。A. 標的配列に対応するモジュールを選択する。B. これらのモジュールをPlatinum Gate systemを利用して連結する。C. 連結した各モジュールを、標的配列に対応したpPlatAおよびpPlatCプラスミドに挿入する（pPlatA-TALENaおよびpPlatC-TALENb）。D. Gatewayシステムを用いたLR組換え反応によりpPlatA-TALENaとpPlatC-TALENbをpDual35SGw1301のCaMV-35Sプロモーターの下流に挿入する。E. 1対のTALENを有するバイナリープラスミドが完成する（pTALENsAB）。pTALENsABはLacZ遺伝子の発現とカナマイシン・クロラムフェニコール・アンピシリン耐性遺伝子を利用して選抜できる。本項目で新たに登場した各オブジェクトの説明を下部のボックスに示す。

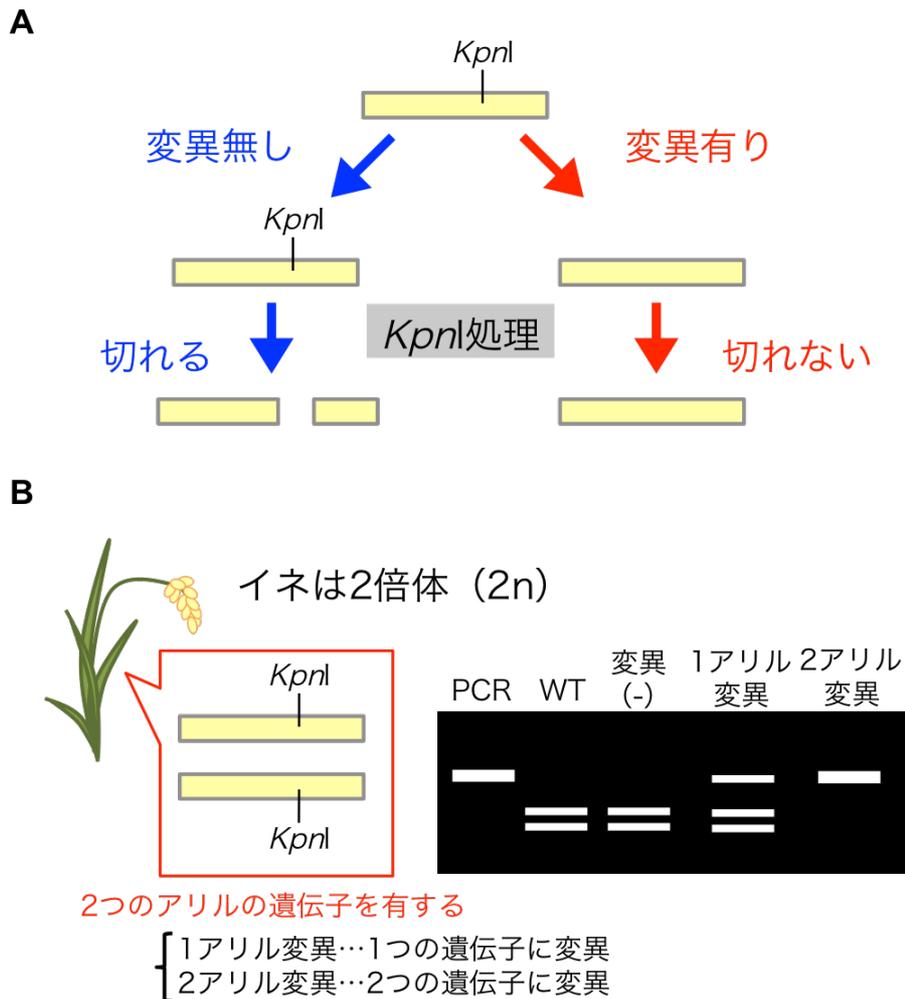


図8. 変異を検出するために行なった手法の概要

A. 本研究ではPCRにより標的部位の近傍の配列を増幅し、この断片を*KpnI*で消化した。本研究で用いるTALENの標的部位には*KpnI*切断部位があるため、*KpnI*切断部位が存在する場合はこの断片は切断される。変異が生じて*KpnI*切断部位が失われた場合はこの断片は切断されない。この違いに伴う遺伝子断片の変化から、変異の有無を判断した。B. イネの染色体は同質2倍体であるため、2つのアリルの遺伝子を有する。1つの遺伝子に変異が生じた場合、*KpnI*で切断されない断片と切断された断片の両方が検出される（1アリル変異）。2つの遺伝子に変異が生じた場合、*KpnI*で切断されない断片のみが検出される（2アリル変異）。

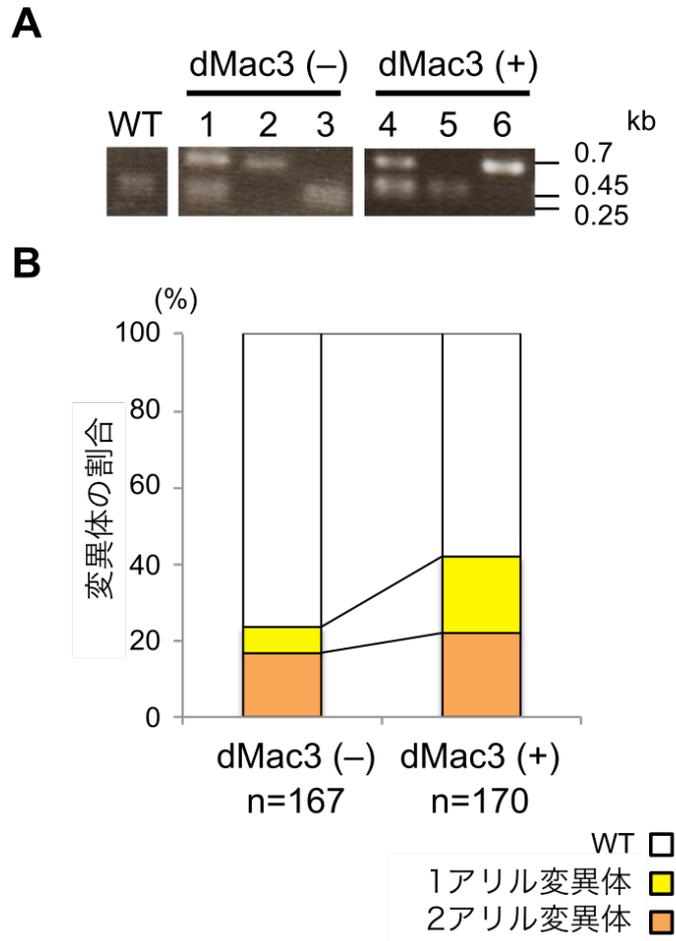


図9. pTALENsABおよびpdxTALENsAB形質転換カルスにおける変異体の割合

A. *KpnI*切断部位を利用した標的配列における変異の有無の検出。形質転換カルス塊の一部をサンプリングしてDNAを抽出し、これを鋳型としたPCRにより*KpnI*切断部位を含む標的部近傍の配列を増幅し、この断片を*KpnI*で消化した。WT：野生型、dMac3 (-)：dMac3を含まないpTALENsABを導入した形質転換体カルス、dMac3 (+)：dMac3を含むpdxTALENsABを導入した形質転換体カルス。レーン1、4：1アリル変異、レーン2、6：2アリル変異、レーン3、5：変異なし (WT) を示す。*KpnI*で切断されない遺伝子断片は0.7 kb、*KpnI*で切断された遺伝子断片は0.45および0.25 kbを示す。遺伝子断片のサイズを泳動像の右に示す。

B. pTALENsABおよびpdxTALENsAB形質転換カルスにおける変異体の割合のグラフ。解析に用いた各個体数をグラフ下部に示す (n)。

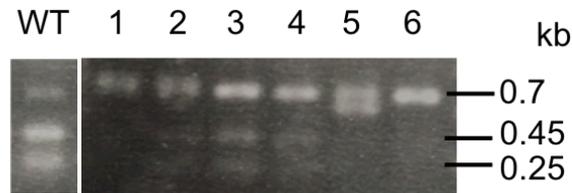


図10. pTALENsAB形質転換植物体の標的配列における変異の有無

再分化個体の緑葉から抽出したDNAを鋳型としたPCRにより標的部位を含む断片を増幅し、*KpnI*で消化した。WT：野生型、レーン1：#2-1、2：#2-2、3：#121、4：#160、5：#161、6：#217を示す。レーン1、5、6は2アリル変異、レーン2、3、4は1アリル変異を示す。*KpnI*で切断されない遺伝子断片は0.7 kb、*KpnI*で切断された遺伝子断片は0.45および0.25 kbを示す。遺伝子断片のサイズを泳動像の右に示す。

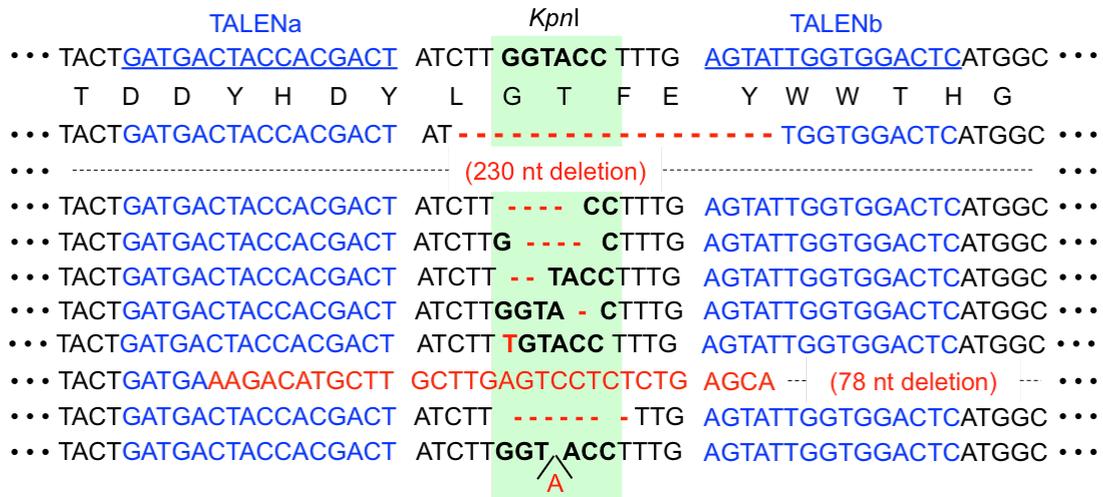


図11. pTALENsAB形質転換植物から検出した標的配列上における変異
 pTALENsABを導入した形質転換植物体の緑葉からDNAを抽出し、標的
 部位近傍の塩基配列を調べることで変異を検出した。野生型の塩基配列お
 よび、推定されるアミノ酸配列を図の上部に示す。下線および青字は
 TALENaおよびTALENbの結合配列を示す。緑色の背景領域はKpnI切断部
 位を示す。ギャップは各変異体における塩基の欠失を示し、塩基の挿入は
 配列下部に示される。塩基の欠失、挿入および置換を赤字で示す。

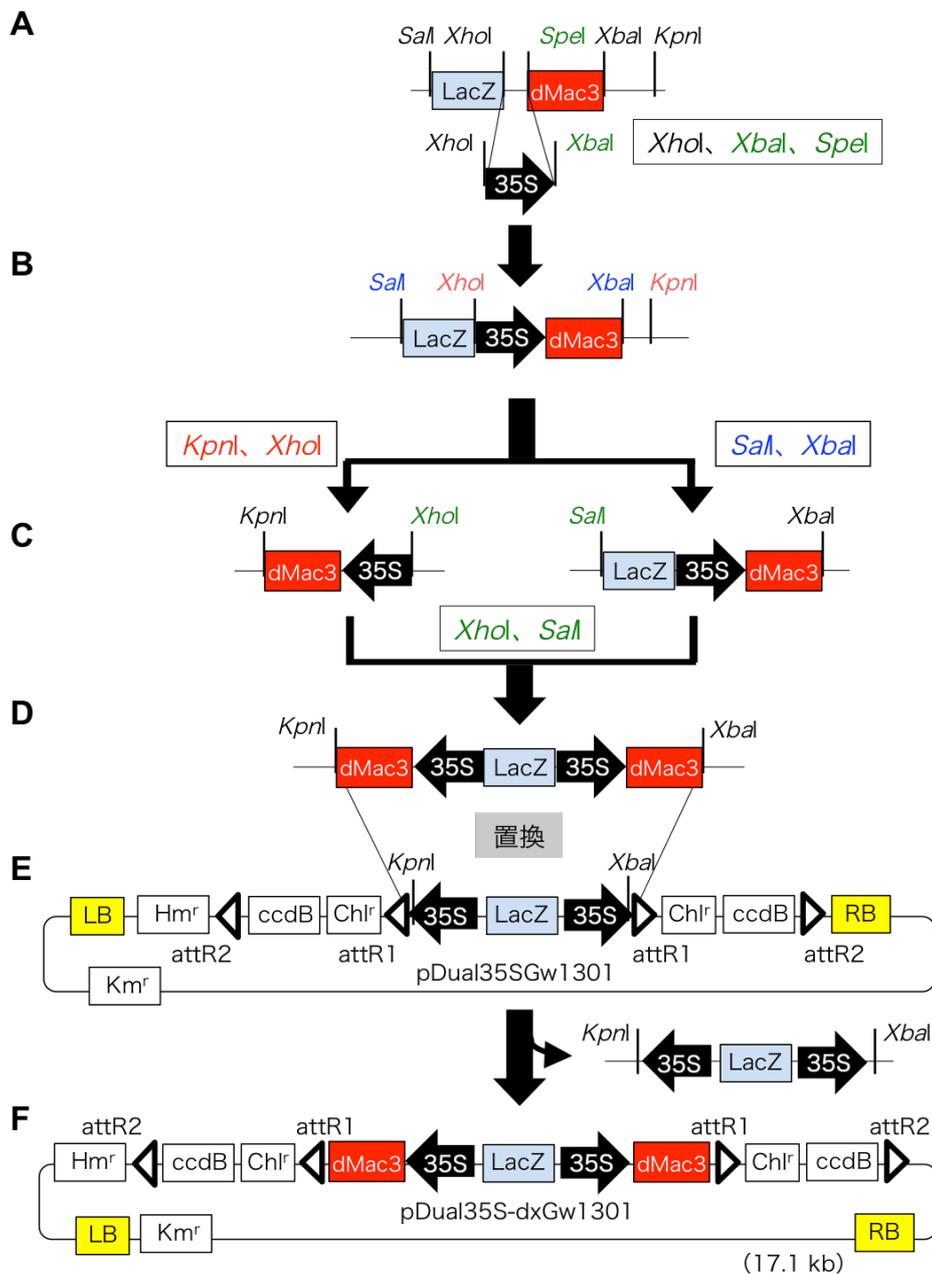
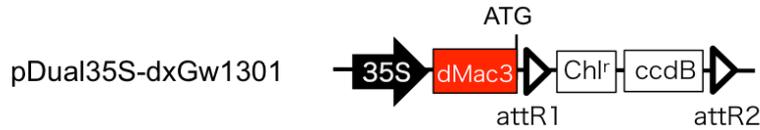


図12. pDual35S-dxGw1301構築の概略

pDual35S-dxGw1301はこのような手順で構築した。A. *LacZ*遺伝子と翻訳エンハンサーdMac3を連結した遺伝子断片を化学合成した。B. *LacZ*遺伝子とdMac3の間にCaMV-35Sプロモーターを挿入した。C. 各切断部位を利用してCaMV-35SプロモーターとdMac3が連結された遺伝子領域と、*LacZ*遺伝子・CaMV-35Sプロモーター・dMac3が連結された遺伝子断片をそれぞれ切り出した。D. Cで切り出した遺伝子断片を繋いで、*LacZ*遺伝子の両端にCaMV-35SプロモーターとdMac3を結合した遺伝子断片を構築した。E-F. pDual35SGw1301のプロモーター領域をDの断片と置換し、pDual35S-dxGw1301を構築した。*SpeI*と*XbaI*および*XhoI*と*SalI*の切断面は一部で相同な配列を有するため、繋ぐことができる。このような切断部位の組合せを緑字で示す。

A



B

CaMV-35S promoter

CATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCG
 CCGTAAAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTCTCTTACGA
 CTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCA
 CGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCT
 CAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTA
 ATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTG
 TCACTTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCT
 ACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAA
 GATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACC
 CACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGT
 CTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTA
 AGGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGACCCTTC
 CTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGAACACGGG
 GGACTCTTGACCTCTAGT**AAGACTAAAGAGAGCTTTTTTCAT**
ACCAAAGAAGTACAACAAAAGATTTGCTCCTCATTTTTCTGA
ATCCTGGGACTCTCTAGCCTGTAGAAGAAGAAAGGCAGGAA
TTTCAGCTCAAGAGAACAGATCACAATATTTACCCACGGCA
CTGTCTCGCAATATG**AGATCTGGTCTAGAGTTATCAACAAG**
TTTGTACAAAAAAGCTGAACGAGAAACGTAAAATGATATAA
ATATCAATATATTAATTAGATTTTGCATAAAAAACAGACT
ACATAATACTGTAAAACACAACATATCCAGTCACTATGCAT

dMac3

attR1

開始コドン

図13. pDual35S-dxGw1301のCaMV-35SプロモーターおよびdMac3の配列

A. pDual35S-dxGw1301のプロモーター付近の領域。B. pDual35S-dxGw1301のプロモーター領域の配列。CaMV-35Sプロモーター、dMac3、attR1領域の配列を示す。LR組換え反応により挿入されるTALEN遺伝子にdMac3の翻訳促進効果を付与するために、dMac3配列の直下に開始コドン（ATG配列）を配置した。dMac3配列を赤字および赤枠で示す。下線部はattR1配列を示す。図中に開始コドンを示す。

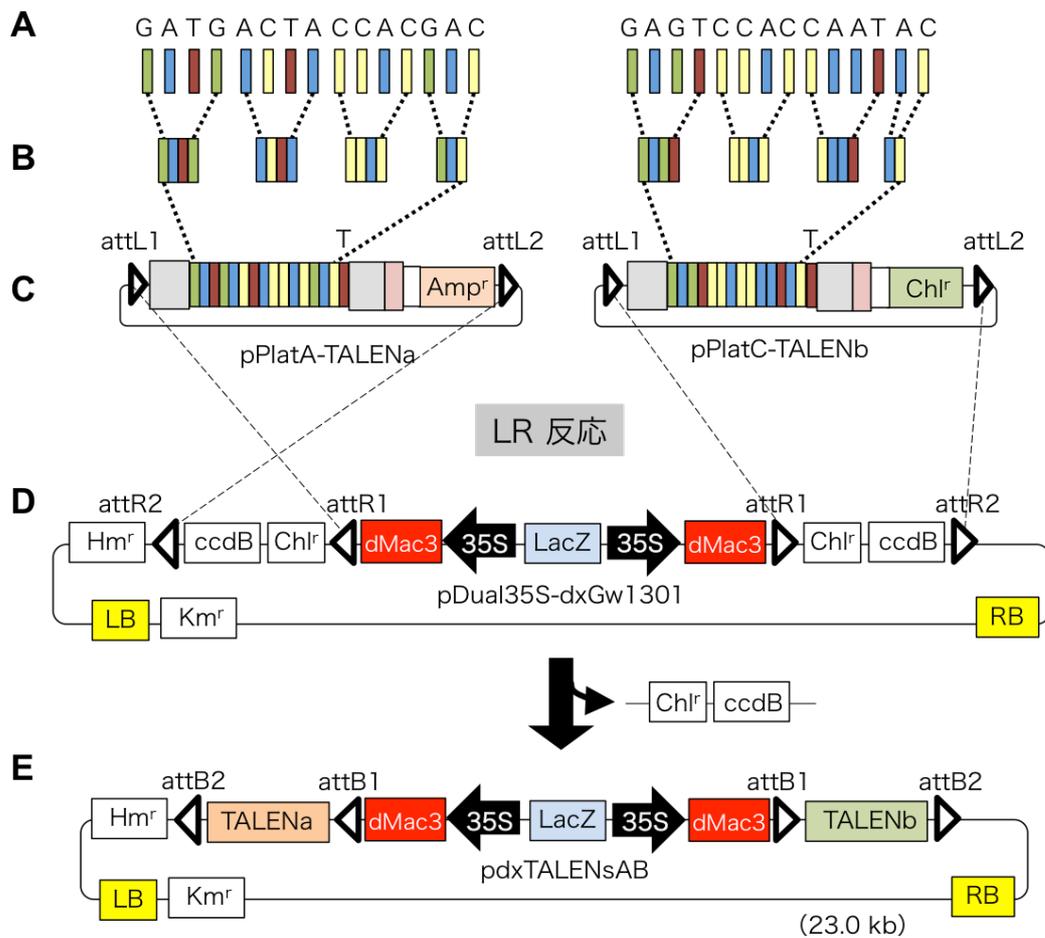


図14. Emerald Gateway dx-TALEN system

Emerald Gateway dx-TALEN systemを用いたTALEN構築の概要。ディスティネーションベクターとしてpDual35S-dxGw1301を用いる。これにより、植物で強力に機能する翻訳エンハンサーdMac3が5'UTRに組み込まれたTALEN遺伝子を構築できる (pdxTALENsAB)。A-E. Emerald Gateway TALEN systemと同じプロトコールを用いて、TALEN遺伝子の5'UTRにdMac3が付加されたバイナリープラスミドを構築する。

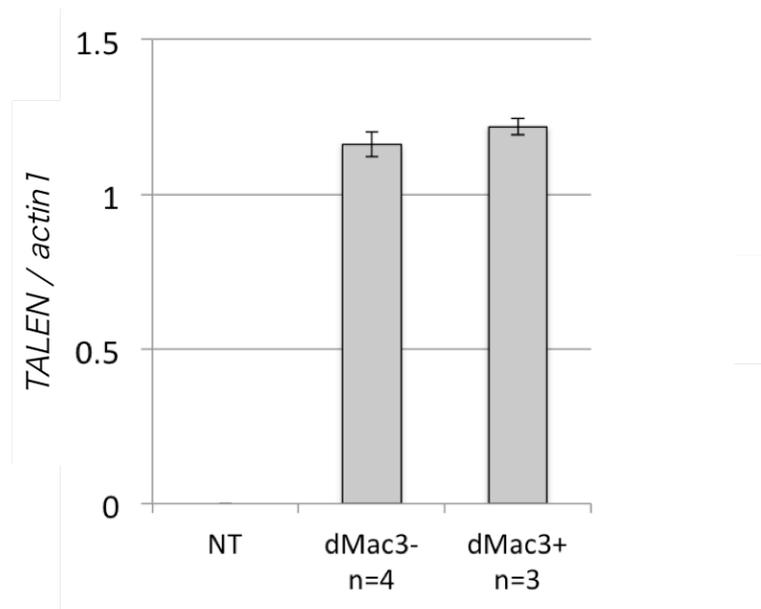


図15. Real Time RT-PCRによるTALEN遺伝子の発現量の調査

50 mg/Lのハイグロマイシンを含むN6D寒天培地に移植してから4週間目のpTALENsABおよびpdxTALENsAB形質転換カルス塊の一部をサンプリングして全RNAを抽出し、これを鋳型に合成したcDNAを用いてReal-Time RT-PCRを行い、導入されたTALEN遺伝子の発現量を調べた。縦軸は内部標準として*actin1* (acc. No. AB047313) 遺伝子に対する相対量を示す。NT：Non-Transformant (非形質転換体)、dMac3-：dMac3を有さないpTALENsAB形質転換体、dMac3+：dMac3を有するpdxTALENsAB形質転換体。エラーバーは標準偏差を示す。解析に用いた各個体数をグラフ下部に示す (n)。



図16. pdxTALENsAB形質転換植物体の標的配列における変異の有無
 再分化個体の緑葉から抽出したDNAを鋳型としたPCRにより標的部位を含む断片を増幅し、*KpnI*で消化した。WT：野生型、レーン1：#11、2：#39-1、3：#39-2、4：#39-3、5：#70、6：#77-1、7：#77-2、8：#170、9：#188-1、10：#188-2、11：#188-3、12：#188-4、13：#188-5、14：#192-1、15：#192-2、16：#236-1、17：#236-2、18：#236-3、19：#236-4、20：#236-5、21：#236-6、22：#236-7を示す。レーン1、2、5、6、7、8、9は2アリル変異、レーン3、4、10、11、12、13、14は1アリル変異、レーン15、16、17、18、19、20、21、22は変異なしを示す。*KpnI*で切断されない遺伝子断片は0.7 kb、*KpnI*で切断された遺伝子断片は0.45および0.25 kbを示す。遺伝子断片のサイズを泳動像の右に示す。



図17. pdxTALENsAB形質転換植物体から検出した標的配列上における変異

pdxTALENsAB形質転換植物体の緑葉からDNAを抽出し、標的部近傍の塩基配列を調べることで変異を検出した。野生型の塩基配列および推定されるアミノ酸配列を図の上部に示す。下線および青字はTALeNaおよびTALeNbの結合配列を示す。緑色の背景領域は*KpnI*切断部位を示す。ギャップは各変異体における塩基の欠失を示し、塩基の挿入は配列下部に示される。塩基の欠失、挿入、置換およびrearrangement配列を赤字で示す。

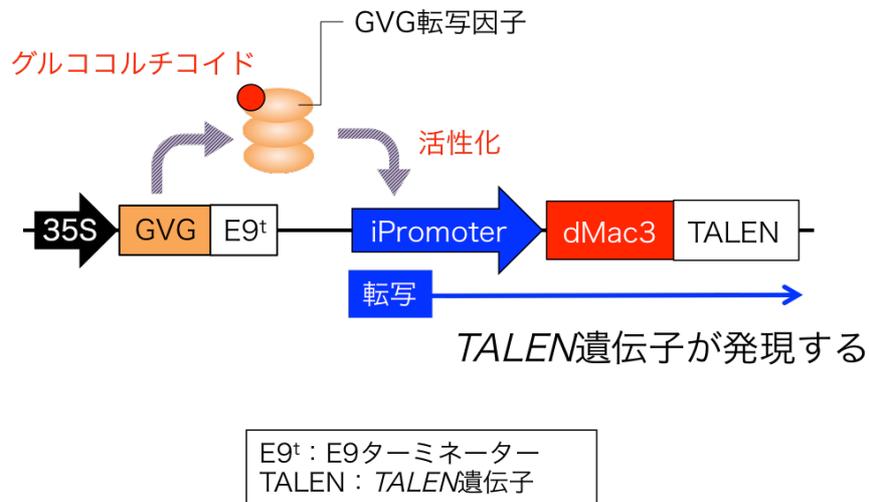


図18. グルココルチコイド応答性の条件発現性プロモーターiPromoterを用いた TALEN遺伝子の誘導発現

Aoyama and Chua (1997) により報告された誘導発現システム的作用機序に従って、TALEN遺伝子が発現する。グルココルチコイドの投与により活性化されたGVG転写因子（酵母の転写因子GAL4およびヘルペスウィルスの転写因子VP16、グルココルチコイド受容体GRのキメラ因子）が条件発現性のプロモーターiPromoterに結合して活性化し、これによりTALEN遺伝子の転写が起こる。本項目で新たに登場した各オブジェクトの説明を下部のボックスに示す。

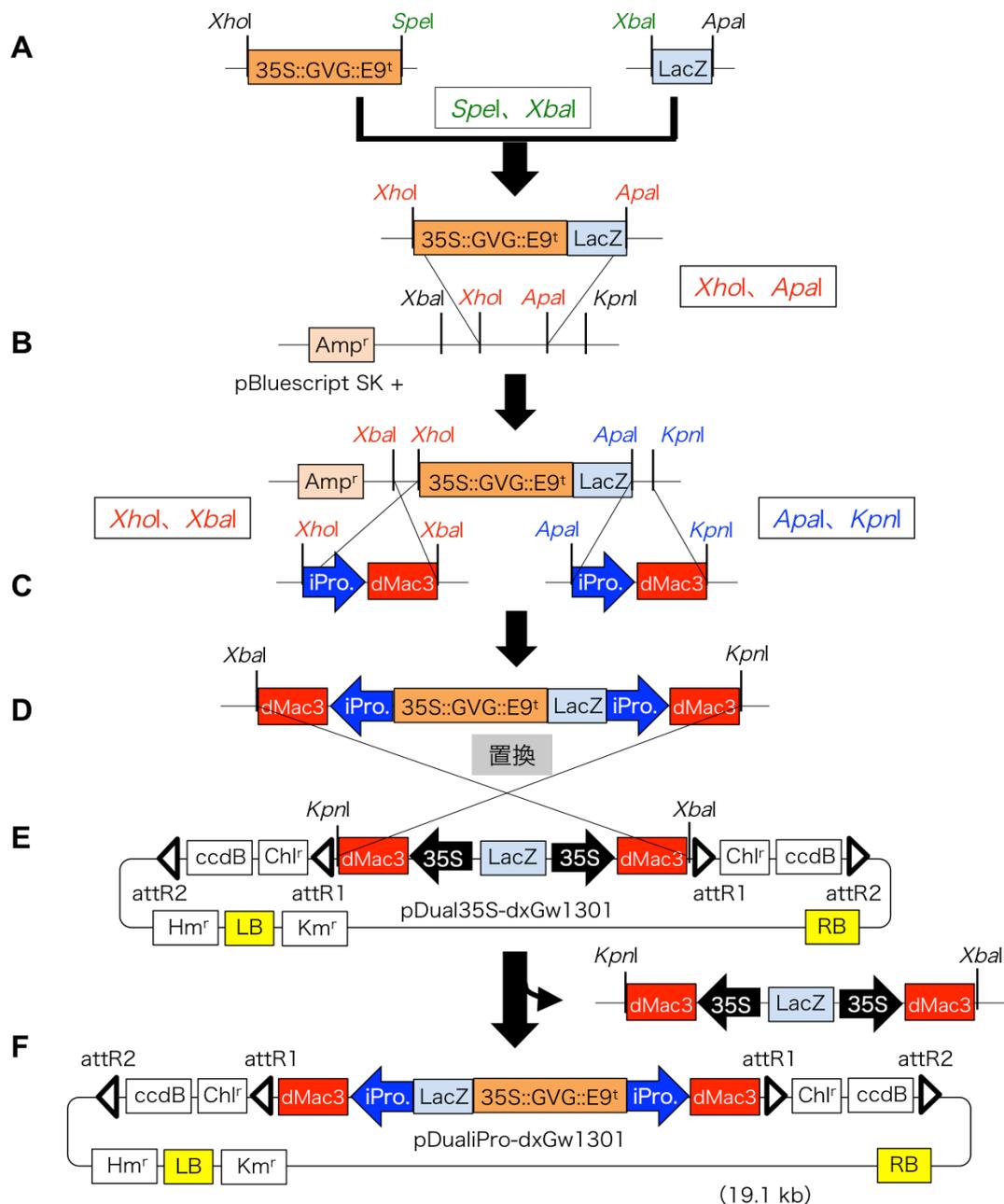


図19. pDualiPro-dxGw1301構築の概略

pDualiPro-dxGw1301はこのような手順で構築した。A. pTA7002 (Aoyama and Chua 1997) からiPromoterの活性化に必要なGVG転写因子群 (CaMV-35Sプロモーター、GVG転写因子、E9ターミネーターから構成されるカセット) の遺伝子構築をし、これにLacZ遺伝子を繋いだ。B. pBlueScript SK+のXhoIとApaI切断部位の間にこの遺伝子断片を挿入した。C. iPromoterとdMac3の配列を連結し、両端に異なる切断部位を配したた遺伝子断片を化学合成した。D. GVG転写因子群とLacZ遺伝子を繋いだ断片の両端にiPromoterとdMac3を結合した断片を構築した。E-F. pDual35S-dxGw1301のプロモーター領域をDの断片と置換し、pDualiPro-dxGw1301を構築した。SpeIとXbaIの切断面は一部で相同な配列を有するため、繋ぐことができる。このような部位の組合せを緑字で示す。

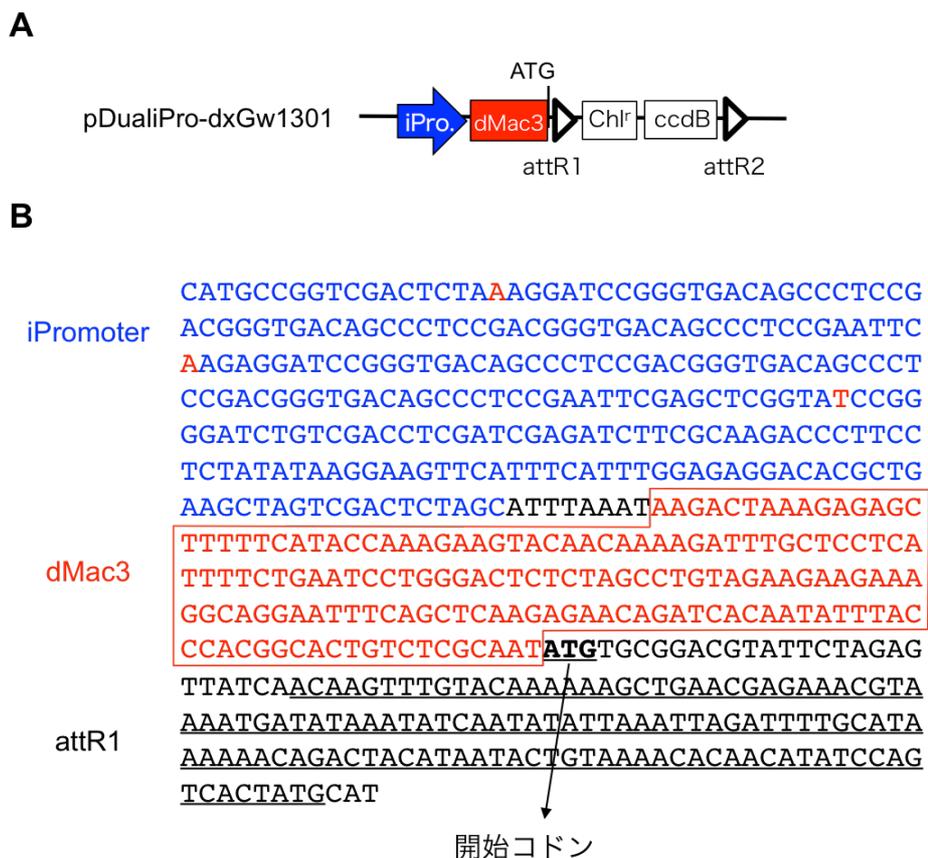


図20. pDualiPro-dxGw1301のiPromoterおよびdMac3の配列

A. pDualiPro-dxGw1301のプロモーター付近の領域。B. pDualiPro-dxGw1301のプロモーター領域の配列。iPromoter、dMac3、attR1領域の配列を示す。iPromoterにおいて、Aoyama and Chua (1997) により報告された配列上に存在する*KpnI*および*XbaI*切断部位を取り除くために置換した3つの塩基を赤色の文字 (G→A、T→A、C→T) で示す。LR組換え反応により挿入されるTALFN遺伝子にdMac3の翻訳促進効果を付与するために、dMac3配列の直下に開始コドン (ATG配列) を配置した。dMac3配列を赤字および赤枠で示す。下線部はattR1配列を示す。図中に開始コドンを示す。

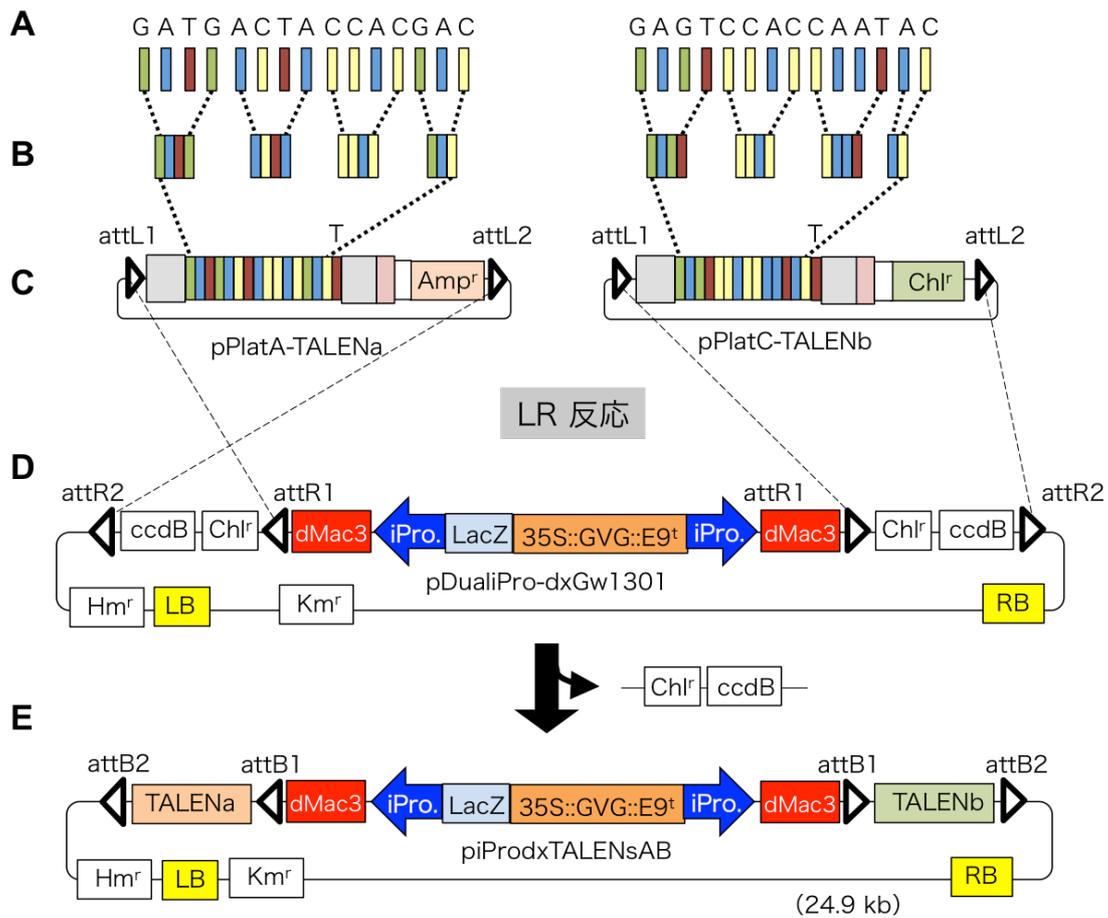


図21. Emerald Gateway dx-TALEN premium system

Emerald Gateway dx-TALEN premium systemを用いたTALEN構築の概要。ディスティネーションベクターとしてpDualiPro-dxGw1301を用いる。これにより、iPromoterが組み込まれたTALEN遺伝子を構築できる(piProdxTALENsAB)。A-E. Emerald Gateway TALEN systemと同じプロトコルを用いて、iPromoterおよびdMac3の直下にTALEN遺伝子が組み込まれたバイナリープラスミドを構築する。

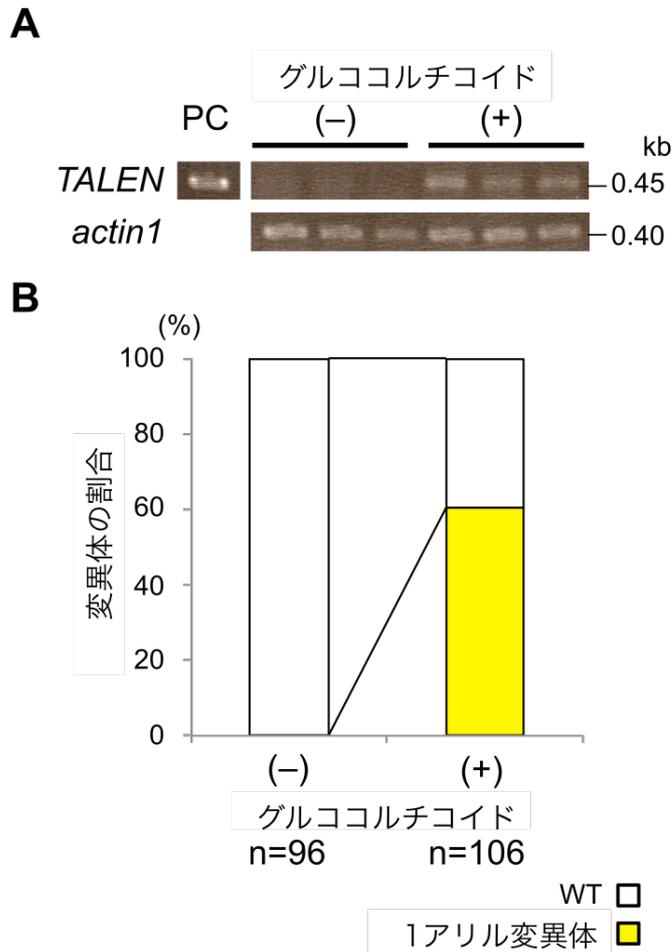


図22. piProdxTALENsAB形質転換カルスにおける変異体の割合

A. 60 μ Mのグルココルチコイドと50 mg/Lのハイグロマイシンを含むN6D寒天培地上で2日間培養したpiProdxTALENsAB形質転換カルス塊を1つ丸ごとサンプリングして全RNAを抽出し、これを鋳型に合成したcDNAを用いてRT-PCRを行ない、導入されたTALEN遺伝子の発現を検出した。内部データの標準化には*actin1*遺伝子を用いた。PG: Positive Control、グルココルチコイド (-) および (+) : グルココルチコイド処理していない/した実験区のpiProdxTALENsAB形質転換体カルス。遺伝子断片のサイズを泳動像の右に示す。B. piProdxTALENsAB形質転換カルスにおける変異体の割合のグラフ。解析に用いた各個体数をグラフ下部に示す (n)。

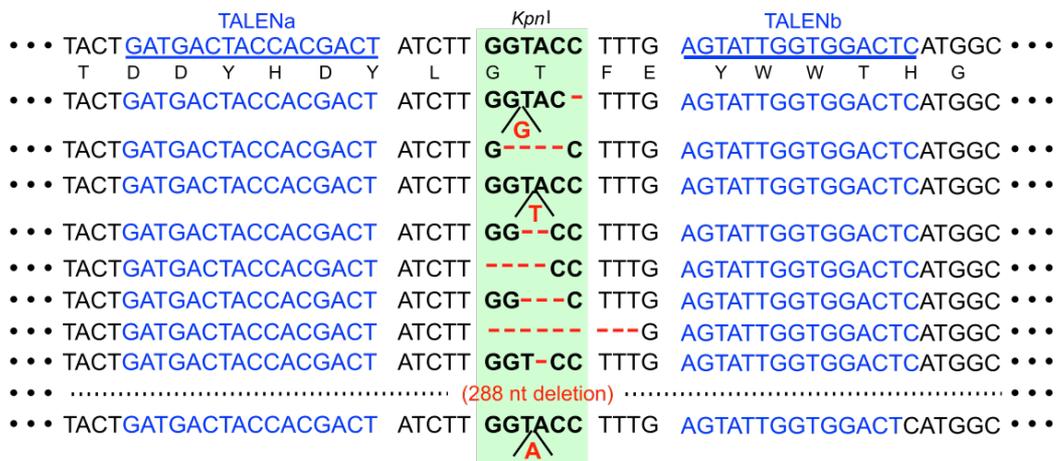


図23. piProdxTALENsAB形質転換カルスから検出した標的配列上における変異

グルココルチコイド処理したpiProdxTALENsAB形質転換植物体からDNAを抽出し、標的部近傍の塩基配列を調べることで変異を検出した。野生型の塩基配列および、推定されるアミノ酸配列を図の上部に示す。下線および青字はTALeNaおよびTALeNbの結合配列を示す。緑色の背景領域はKpnI切断部位を示す。ギャップは各変異体における塩基の欠損を示し、塩基の挿入は塩基配列下部に示される。塩基の欠失、挿入を赤字で示す。

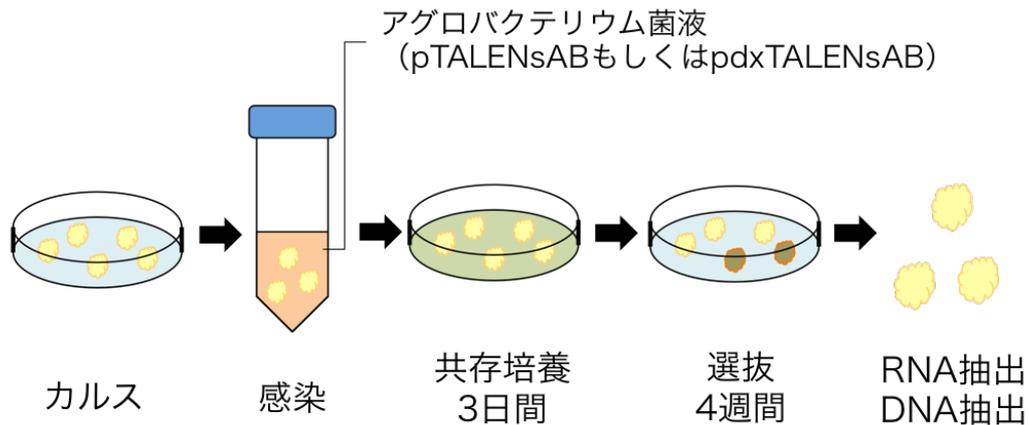
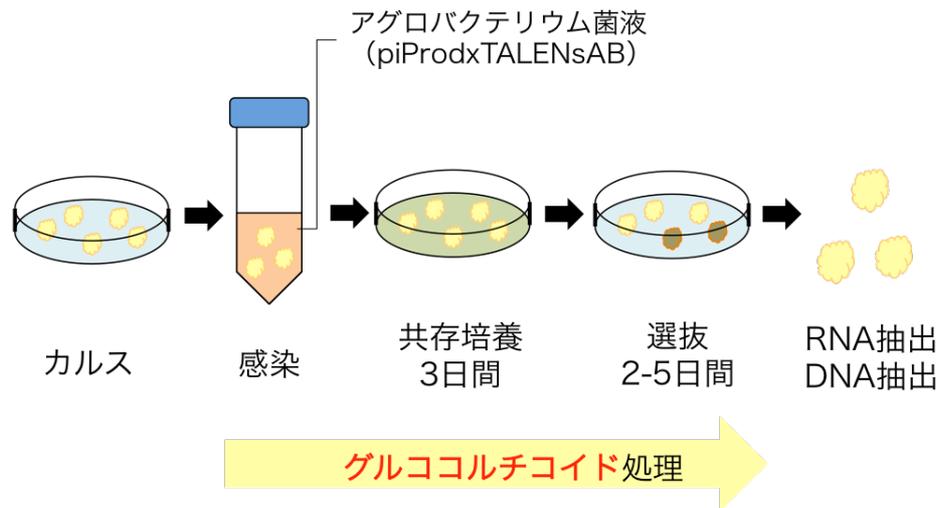


図24. アグロバクテリウム法を用いた

pTALENsABおよびpdxTALENsAB形質転換イネの作製

本研究で行なったイネカルスの形質転換の概略を示す。形質転換に伴う一連の操作は、Toki et al (2006) により報告された手法に従って行なった。形質転換には、スーパーアグロバクテリウムを用いた。イネカルスをアグロバクテリウム (pTALENsABまたはpdxTALENsABを有する) 菌液に浸して感染処理を行なった。3日間アグロバクテリウムと共存培養し、その後、500 mg/Lのクラフォランと50 mg/Lのハイグロマイシンを含むN6D寒天培地上にカルスを静置し、28°C明所にて4週間培養することで選抜を行なった。褐色化せずに正常に生育したカルスを形質転換カルスと判断し、このカルス塊の一部をサンプリングしてRNAおよびDNA抽出に供した。



**図25. アグロバクテリウム法を用いたpiProdxTALENsAB形質転換イネの作製
およびグルココルチコイド処理の条件**

本研究で行なったイネカルスの形質転換およびグルココルチコイド処理の概略を示す。イネカルスの形質転換は、pTALENsABおよびpdxTALENsAB形質転換カルスの作製と同様の操作により実施した。本研究では、アグロバクテリウム菌液に終濃度60 μM となるようにグルココルチコイドを添加し、感染操作に用いた。また、共存培養および選抜の際にも、終濃度60 μM となるように各N6D寒天培地にグルココルチコイドを添加した。対象区としてグルココルチコイドを添加しない実験区を設け、同様の操作を行なった。褐色化せず正常に生育したカルスを形質転換カルスと判断し、1つのカルス塊を丸ごとサンプリングしてRNAおよびDNA抽出に供した。RNA抽出には2日間選抜した形質転換カルスを、DNA抽出には5日間選抜した形質転換カルスを仕様した。

参考文献

Aoki H, Teramura H, Schepetinikov M, Ryabova LA, Kusano H, Shimada H. Enhanced translation of the downstream ORF attributed to a long 5' untranslated region in the *OsMac1* gene family members, *OsMac2* and *OsMac3*. *Plant Biotechnol.* 2014; 31: 221–228. doi: 10.5511/plantbiotechnology.14.0512a

Aouida M, Piatek MJ, Bangarusamy DK, Mahfouz MM. Activities and specificities of homodimeric TALENs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 2014; 60: 61–74. doi: 10.1007/s00294-013-0412-z

Aoyama T, Chua NH. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* 1997; 11: 605–612. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11030605.x

Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* 2009; 326: 1509–1512. doi: 10.1126/science.1178811

Bogdanove AJ, Voytas DF, TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting. *Science.* 2011; 333: 1843–1846. doi: 10.1126/science.1204094

Butler NM, Baltes NJ, Voytas DF, Douches DS, Geminivirus-Mediated Genome Editing in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Using Sequence-Specific Nucleases. *Front Plant Sci.* 2016; 7: 1045. doi: 10.3389/fpls.2016.01045

Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF, Targeted DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics.* 2010; 186: 757–761. doi: 10.1534/genetics.110.120717

Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, et al. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen. *Scientica Sinica.* 1975; 18: 659–668.

Doyle EL, Booher NJ, Standage DS, Voytas DF, Brendel VP, VanDyk JK, et al. TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: W117–W122. doi: 10.1093/nar/gks608

Hartley JL, Temple GF, Brasch MA, DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* 2000; 10: 1788–1795. doi: 10.1101/gr.143000

Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 1993; 2: 208–218. doi: 10.1007/BF01977351

Jankele R, Svoboda P, TAL effectors: tools for DNA targeting. *Brief Funct Genomics.* 2014; 13:409–419. doi: 10.1093/bfgp/elu013

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012; 337: 816–821. doi: 10.1126/science.1225829

Kim Y, Kweon J, Kim A, Chon JK, Yoo JY, Kim HJ, et al. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31:251–258. doi: 10.1038/nbt.2517

Kusano H, Onodera H, Kihira M, Aoki H, Matsuzaki H, Shimada H. A simple Gateway-assisted construction system of TALEN genes for plant genome editing. *Sci. Rep.* 2016; 6: 30234. doi: 10.1038/srep30234

Kusano H, Ohnuma M, Mutsuro-Aoki H, Asahi T, Ichinosawa D, Onodera H, et al. Establishment of a modified CRISPR/Cas9 system with increased mutagenesis frequency using the translational enhancer dMac3 and multiple guide RNA in potato. *Sci. Rep.* 2018; 8: 13753. doi: 10.1038/s41598-018-32049-2

Kuscu C, Arslan S, Singh R, Thorpe J, Adli M. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32: 677–683. doi: 10.1038/nbt.2916

Lee J, Chung JH, Kim HM, Kim DW, Kim H. Designed nucleases for targeted genome editing. *Plant Biotechnol. J.* 2016;14: 448–462. doi: 10.1111/pbi.12465

Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B, High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30: 390–392. doi: 10.1038/nbt.2199

Maehara K, A versatile technology for targeted genome editing has an impact on our lives. *畿央大学紀要.* 2017; 14: 1–8.

Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science.* 2009; 326: 1501. doi: 10.1126/science.1178817

Murashige T, Skoog F, A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 1962; 15: 473–497 doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: 9283–9293. doi: 10.1093/nar/gkr597

Mussolino C, Cathomen T, On target? Tracing zinc-finger-nuclease specificity. *Nat. Methods.* 2011; 8: 725–726. doi: 10.1038/nmeth.1680

Nakagawa T, Ishiguro S, Kimura T, Gateway vectors for plant transformation. *Plant Biotechnol.* 2009; 26; 275–284. doi: 10.5511/plantbiotechnology.26.275

Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakian SM, TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae.* 2014; 6: 19–40.

Nishizawa-Yokoi A, Cermak T, Hoshino T, Sugimoto K, Saika H, Mori A, et al. A Defect in DNA Ligase4 Enhances the Frequency of TALEN-Mediated Targeted Mutagenesis in Rice. *Plant Physiol.* 2016; 170: 653–666. doi: 10.1104/pp.15.01542

Osakabe Y, Osakabe K, Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant Cell Physiol.* 2015; 56: 389–400. doi: 10.1093/pcp/pcu170

Osakabe Y, Watanabe T, Sugano SS, Ueta R, Ishihara R, Shinozaki K, et al. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plant. *Sci. Rep.* 2016; 6: 26685. doi: 10.1038/srep26685

Roy B, von Arnim AG, Translational Regulation of Cytoplasmic mRNAs. *Arabidopsis Book.* 2013; 11: e0165. doi: 10.1199/tab.0165

Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Suzuki K, et al. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci. Rep.* 2013; 3: 3379. doi: 10.1038/srep03379

Satoh J, Kato K, Shinmyo A, The 5′-untranslated region of the tobacco alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant. *J. Biosci. Bioeng.* 2004; 98: 1–8. doi: 10.1016/S1389-1723(04)70234-0

Shan Q, Wang Y, Li J, Gao C, Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat. Protoc.* 2014; 9: 2395–2410. doi: 10.1038/nprot.2014.157

Shinmyo A, Basic Study on Plant Science and Biotechnological Application of plant Function. *生物工学会誌.* 2007; 85: 2–11.

Sprink T, Eriksson D, Schiemann J, Hartung F, Regulatory hurdles for genome editing: process-vs. product-based approaches in different regulatory contexts. *Plant Cell Rep.* 2016. 35; 1493–1506. doi: 10.1007/s00299-016-1990-2

Strauß A, Lahaye T, Zing fingers, TAL effectors, or Cas9-based DNA binding proteins: what's best for targeting desired genome loci? *Mol. Plant*. 2013; 6: 1384–1387. doi: 10.1093/mp/sst075

Streubel J, Blücher C, Landgraf A, Boch J, TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nat. Biotechnol*. 2012; 30: 593–595. doi: 10.1038/nbt.2304

Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, et al. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J*. 2006; 47: 969–976. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02836.x

Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemans J, Montagu MV, Schell J, Ti Plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J*. 1983; 2: 2143–2150. doi: 10.1002/j.1460-2075.1983.tb01715.x

Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol. Therapy Nucleic Acids*. 2015; 4: e264. doi: 10.1038/mtna.2015.37

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご指導とご鞭撻をいただきました東京理科大学 基礎工学部生物工学科 島田浩章 教授に深く感謝いたします。

各システム開発を共に行ないました、草野博彰 博士、紀平望帆 博士、堀江峻晃 氏に深く感謝いたします。

研究を行なう中で多くのご助言をいただきました、寺村浩 博士、今村智弘 博士、無津呂（青木）裕美 博士、大沼万里子 氏に深く感謝いたします。

ゲノム編集の効率評価に供するカルスを分譲していただきました、新宮沙絵子 氏をはじめ、多岐にわたるサポートをしていただきました、島田研究室の方々に深く感謝いたします。

イネの形質転換およびゲノム編集の知識をご教示いただきました、農研機構 生物機能利用研究部門の土岐精一 博士、横井彩子 博士に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたって大変お世話になりました皆様方に、この場を借りて深く御礼申し上げます。