

氏名（本籍）	おのてら ひとみ 小野寺 瞳（岩手県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 1032 号
学位授与の日付	2019 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	<b>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</b>

論文審査委員	（主査）教授 島田 浩章
	教授 田村 浩二      教授 西山 千春
	准教授 有村源一郎      准教授 清水 公德
	教授 松永 幸大

## 論文内容の要旨

### 1 章. 序論.

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 が用いられている。これらはいずれも標的とするゲノム配列のみに作用する人工的に作製されたヌクレアーゼを使用する。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。ゲノム編集には、標的配列を挟む 2 ヶ所に結合することのできる一対の TALEN を用いる。それぞれの DNA 切断ドメインがダイマーを形成し、標的配列で 2 本鎖 DNA 切断（Double Strand Break; DSB）を誘発する。

TALEN の DNA 結合ドメインは標的部位の塩基配列を認識するモジュール構造をとる。それぞれの塩基に対応した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。これまでに各モジュールの連結法の簡便化が図られており、最大で 21 塩基の標的配列に対応できる Platinum Gate system が作られている。

植物のゲノム編集には、アグロバクテリウム法が用いられる。このため、人工ヌクレアーゼ遺

伝子を植物細胞に導入するためのバイナリーベクターに入れる必要がある。バイナリーベクターは 20 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であるため、2 つの *TALEN* 遺伝子を連結してプラスミドにクローニングすることは容易ではない。

TALEN は CRISPR/Cas9 がない大きな利点を有する。CRISPR/Cas9 は標的配列の末端部分に PAM 配列と呼ばれる 3 塩基が含まれなければならない。TALEN にはこのような制限がなく、任意の標的配列を設定することができる。また、TALEN は CRISPR/Cas9 と異なり、標的配列の長さに制限がない。このことから、TALEN は自由度が大きい。さらに、近傍の配列を認識する 2 つの TALEN が対で機能するため、標的部位における認識配列が必然的に長くなる。部位特異性が高く、標的配列以外のヌクレアーゼ切断が起こらないため、標的部位以外での変異は誘発されず、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 変異が起こらない。

## 2 章. 植物用 TALEN の簡便な構築法の確立.

まず、TALEN 構築法の簡略化を試みた。新たに開発した TALEN 構築法である Emerald Gateway TALEN system では、3 つの行程で、任意の塩基配列に対応する一対の TALEN をバイナリーベクターにクローニングすることができるようになった。最初の手順では、Platinum Gate system を利用して標的配列に対応した各モジュールを連結し、次の手順で、これらのモジュールを植物用に開発したエンタリーベクターに組み込む。3 番目の手順で、新たに作製した pDual35SGw1301 と名付けたディスティネーションベクターに LR 反応を利用して CaMV-35S プロモーターの下流に TALEN を導入する。これにより一対の *TALEN* 遺伝子を有するバイナリープラスミドが構築できる。

本システムを用いてイネのプロテアーゼ遺伝子 (*Os01g0833500*) の第 5 エキソンにある *KpnI* 制限酵素切断部位を含む領域を標的とした TALEN を設定し、この標的部位に対応する一対の TALEN を構築した。これを用いてイネカサの形質転換を行い、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。TALEN の標的部位には *KpnI* 切断部位があるため、この部位で変異が生じてこの配列が消失すると *KpnI* で切断されなくなる。そこで、それぞれの形質転換カルスから抽出した DNA を用いてこの標的配列を含むゲノム配列を PCR で増幅し、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。その結果、形質転換カルスの 23.4% で *KpnI* で切断されない断片が検出された。また、ゲノム中の 2 つの遺伝子アレルの両方に変異が生じていると考えられた形質転換カルスは、16.8% で生じていた。

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

Emerald Gateway TALEN system の完成により、植物用の TALEN を作製することが容易になった。一方で、TALEN を多くの植物種に応用するためには、さらに変異効率を向上させる必要があると考えられる。そこで、TALEN による変異体の作出効率を向上させることが次に解決すべき課題であると考えられた。

TALEN による変異の誘発率を高めるためには、標的配列と相互作用する TALEN の数を増やすことが必要であると考えた。翻訳エンハンサーである dMac3 は mRNA あたりの翻訳量を高める機能を有する。すなわち dMac3 は、イネの *OsMac3* 遺伝子の 5'UTR に由来する RNA 配列であるが、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。そこで、TALEN 遺伝子の 5'非翻訳領域に dMac3 を付加することにより TALEN の翻訳量を高め、これにより細胞内の生産される TALEN の量を増やすことにした。Emerald Gateway TALEN system のディスティネーションベクターの pDual35SGw1301 の TALEN 導入部位の上流に dMac3 を挿入し、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 Emerald Gateway TALEN system と同様の手順で、前項と同じ標的部位に対応する 5'非翻訳領域に dMac3 が組み込まれた TALEN 遺伝子の構築を行なったところ、目的とする TALEN 遺伝子を有するバイナリーベクターを速やかに構築することができた。この TALEN 構築システムを、Emerald Gateway dx-TALEN system と名付けた。

次に、dMac3 を TALEN 遺伝子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。前項と同様の手順で変異が生じた形質転換カルス割合を調べた。その結果、その結果、dMac3 を含む TALEN を用いて作出した形質転換カルスでは、41.8%で *KpnI* で切断されない断片が検出された。また、ゲノム中の 2 つの遺伝子アレルの両方に変異が生じていると考えられた形質転換カルスは、dMac3 を含む TALEN を用いた場合では 21.8%で生じていた。この結果は、TALEN 遺伝子に dMac3 を付加することで、形質転換カルスでの標的部位での変異の誘発効率が上昇したことを示している。おそらく、細胞内で産生される TALEN の量が増加し、標的配列での DSB の誘発率が増加したことに起因すると考えられる。

これらの形質転換カルスを再分化させて、植物体を得た。これらの再分化個体について変異型遺伝子が含まれるかどうかを調べた。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。22 個体について解析したところ、1 つの遺伝子のみに変異を生じた 1 アレル変異体が 7 個体、2 つの遺伝子の両方に変異が生じた 2 アレル変異体が 7 個体見つかった。そこで、これらの再分化個体のいくつかについて、TALEN の標的配列を含むゲノム領域をクローニングして、この塩基配列を調べた。その結果、これらの

植物体では標的部周りで置換・挿入・欠失などの多様な変異が生じていることが分かった。これらの結果から、dMac3 で翻訳量が増強された TALEN を用いることで、変異体植物を作出する効率を高めることが可能であることが明らかになった。

#### 4 章. 条件発現性プロモーターを利用した TALEN の構築法の開発とその評価.

前項では、TALEN の翻訳を促進することで、従来法よりも高いゲノム編集効率が得られることが分かった。すなわち、TALEN による変異の誘発率を高めるためには、植物細胞内における TALEN の量を高めることが重要であることが分かった。Emerald Gateway dx-TALEN system で作製した TALEN 遺伝子は dMac3 の翻訳促進機能により mRNA あたりの翻訳量が高まる。一方、強いプロモーターを用いて発現量を高めることで TALEN の産生量を増加させることも効果的であると考えられた。そこで、TALEN 遺伝子の発現量を増やす方法を検討した。

グルココルチコイドに応答する条件発現性プロモーター (iPromoter) は、植物細胞で強い発現をすることが報告されている。このプロモーターはグルココルチコイドを投与した時に特異的に強い発現をする。そこで、TALEN 遺伝子のプロモーターを iPromoter に置換し、dMac3 と iPromoter との併用により、TALEN の mRNA 量の増強と、mRNA からの翻訳の促進を行い、これらにより植物細胞内で産生される TALEN の量を増やすことを試みた。そこで、ディステーションベクターである 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、Emerald Gateway dx-TALEN system と同様の手順で前項と同じ標的部に対応する一対の TALEN の構築を行なったところ、目的とする TALEN 遺伝子を有するバイナリーベクターを速やかに構築することができた。pDualiPro-dxGw1301 を用いて TALEN 遺伝子を作製することができるこの TALEN 構築システムを、Emerald Gateway dx-TALEN premium system と名付けた。

次に、イネ培養細胞を用いて、このシステムで作られた TALEN 遺伝子がグルココルチコイドの投与に応答して発現誘導され、ゲノム編集に至るかどうかについて検討した。構築した TALEN 遺伝子を用いてイネカルスを形質転換し、得られた形質転換カルスを 2 つに分け、一方にグルココルチコイドの投与を行なった。その後、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、グルココルチコイド処理をしたカルスでは TALEN 遺伝子に対応する転写産物が検出された。一方、処理しなかったカルスではこの転写産物は検出されなかった。このことから、構築した TALEN 遺伝子はグルココルチコイドの投与に応答して発現することが分かった。

この TALEN 遺伝子を用いた場合にゲノム編集効率がどのように変化するかを検討した。前

項と同様の手順で変異が生じた形質転換カルの割合を調べた。その結果、形質転換時にグルココルチコイドを共存させた場合には、60.4%の形質転換カルで変異が検出された。この値は、CaMV-35S プロモーターで発現させた *TALEN* 遺伝子による変異誘発の割合を大きく上回るものであった。一方、グルココルチコイドを添加しない実験区では標的部位の変異は全く検出されなかった。この結果は、プロモーターを *iPromoter* に置換した *TALEN* 遺伝子がグルココルチコイド投与により強く発現し、さらに *dMac3* の翻訳促進効果によって大量の *TALEN* が植物細胞内で産生されたことを示唆する。これによって、標的配列で変異が強く誘発されたものと考えられた。

グルココルチコイドの処理によって得られた変異体形質転換カルよりゲノム 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、この形質転換カルでは、標的部位周辺で欠失・挿入などの多様な変異が生じていることが分かった。これらの結果から、グルココルチコイドの投与にตอบสนองして発現誘導される強いプロモーターを用いることで、ゲノム編集効率がより高まることが明らかになった。

## 5 章. 総括.

ゲノム編集で用いられる *TALEN* は、標的配列の設定に自由度が高く、部位特異性が高いため *off-target* 変異が起こらない利点がある。しかし、*TALEN* は分子量が大きく、これを植物で機能させるためのバイナリーベクターも 20kb を超えるため、プラスミド構築が困難であるという欠点がある。そこで、植物用 *TALEN* の簡便な構築法を開発した。これにより、目的とする *TALEN* 遺伝子を有するバイナリーベクター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、翻訳エンハンサーである *dMac3* を用いて *TALEN* の翻訳量の増強と、強力なプロモーターを用いた *TALEN* 遺伝子の転写量の増強を図った。この構築法で作製した *TALEN* 遺伝子を用いてゲノム編集を行なったところ、従来法よりも大幅な変異効率の向上が認められた。これらの結果から、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。

## 論文審査の結果の要旨

ゲノム編集で用いられる *TALEN* や *CRISPR/Cas9* は、標的とするゲノム配列に作用する人工的に作製されたヌクレアーゼである。これらはゲノム中の特定の領域に作用し、人為的な変異を生じさせる。

*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。*TALEN* は任意の部位に対する任意の長さの標

的配列を設定することができ、また、部位特異性が高く、標的配列以外のヌクレアーゼ切断が起こらない。このため、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集の場合に問題となる off-target 変異が起こらない。

TALEN の DNA 結合ドメインは標的部位のそれぞれの塩基配列を認識するモジュールを連結して構築される。モジュールの連結は容易でないが、これまでにこの簡便化が図られており、21 塩基の標的配列の連結に対応した Platinum Gate system が作られている。しかし、植物のゲノム編集はアグロバクテリウム法を用いるために TALEN 遺伝子を有するバイナリーベクターを構築する必要がある。

バイナリーベクターは 20 kb を超える大きなプラスミドであり、TALEN も分子量 100 kDa を超える巨大タンパク質であるため、一对の TALEN 遺伝子をこのプラスミドにクローニングすることは容易ではない。そこで、TALEN 構築法の簡略化を試みられた。新たに開発された Emerald Gateway TALEN system では、任意の塩基配列に対応する一对の TALEN を 3 つの行程でバイナリーベクターにクローニングすることができるようになった。これにより、植物用に開発したエントリーベクターに組み込まれた TALEN 遺伝子は、LR 反応を利用して、新たに作製されたディスティネーションベクターに容易に導入できるようになった。

本システムを用いてイネのプロテアーゼ遺伝子 (*Os01g0833500*) の第 5 エキソンにある *KpnI* 制限酵素切断部位を含む領域を標的とした TALEN を設定し、この標的部位に対応する一对の TALEN が構築された。これを用いてイネカルスの形質転換を行い、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結果、変異体が得られたため、本システムが植物細胞で正常に機能することがわかった。

次に、TALEN による変異体の作出効率を向上させるべく、Emerald Gateway TALEN system の高度化が図られた。標的配列と相互作用する TALEN の数を増やすために翻訳エンハンサーである dMac3 が導入されている。dMac3 はイネの *OsMac3* 遺伝子の 5'UTR に由来する RNA 配列であるが、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。そこで、TALEN 遺伝子の 5'非翻訳領域に dMac3 を付加することにより TALEN の翻訳量を高め、これにより細胞内の生産される TALEN の量を増やすことを行っている。前項と同じ標的部位に対応する 5'非翻訳領域に dMac3 が組み込まれた TALEN 遺伝子の構築を行なったところ、目的とする TALEN 遺伝子を有するバイナリーベクターを速やかに構築することができた。この TALEN 構築システムを、Emerald Gateway dx-TALEN system と名付けられた。

dMac3 を TALEN 遺伝子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。前項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を含むTALENを用いて作出した形質転換カルスでは、41.8%で変異体断片が検出された。また、ゲノム中の2つの遺伝子アリの両方に変異が生じていると考えられた形質転換カルスは、dMac3を含むTALENを用いた場合には21.8%であった。これらの形質転換カルスを再分化させ、再分化個体のゲノムDNAにおける標的配列上の塩基配列の変化を調べた結果、これらでは標的部位周辺で置換・挿入・欠失などの多様な変異が生じていることが分かった。この結果から、dMac3で翻訳量が増強されたTALENを用いることで、変異体植物を作出する効率を高めることが可能であることが明らかになった。

グルココルチコイドに応答する条件発現性のプロモーター (iPromoter) は、植物細胞で強い発現をすることが報告されている。このプロモーターはグルココルチコイドを投与した時に特異的に強い発現をする。そこで、TALEN遺伝子のプロモーターをiPromoterに置換し、dMac3とiPromoterとの併用により、TALENのmRNA量の増強と、mRNAからの翻訳の促進を行い、これらにより植物細胞内で産生されるTALENの量を増やすことを試みた。プロモーターをiPromoterに置換し、新たなディスティネーションベクターを構築した。このベクターを用いて、Emerald Gateway dx-TALEN systemと同様の手順で前項と同じ標的部位に対応する一対のTALENの構築を行なったところ、目的とするTALEN遺伝子を有するバイナリーベクターを速やかに構築することができた。このTALEN構築システムはEmerald Gateway dx-TALEN premium systemと名付けられた。

このシステムで構築されたTALEN遺伝子を用いた場合にゲノム編集効率がどのように変化するかを調べたところ、グルココルチコイドを共存させた場合には、60.4%の形質転換カルスで変異が検出された。この値は、これまでの方法による変異誘発の割合を大きく上回るものであった。一方、グルココルチコイドを添加しない場合には変異は全く検出されなかった。この結果は、プロモーターをiPromoterに置換することでグルココルチコイド投与によりTALEN遺伝子が強く発現し、dMac3の翻訳促進効果によって大量のTALENが植物細胞内で産生されたことを示唆する。

本研究では、ゲノム編集で用いられる植物用TALENの簡便な構築法の開発に成功している。これにより、目的とするTALEN遺伝子を有するバイナリーベクターを速やかに作製することができるようになった。さらに、翻訳エンハンサーであるdMac3を用いてTALENの翻訳量の増強と、強力なプロモーターを用いたTALEN遺伝子の転写量の増強を図った。この構築法で作製したTALEN遺伝子を用いてゲノム編集を行なったところ、従来法よりも大幅な変異効率の向上が認められた。これらの結果から、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。

今回得られた結果は、ゲノム編集における基礎的な技術開発に関するものであるが、この成果はゲノム編集による植物育種への新たな道を拓いた応用的価値の高い重要な研究成果であるといえる。したがって本論文は博士（工学）の学位論文として充分価値のあるものと認められる。