

# 人工ヌクレアーゼ TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) の植物代謝工学への応用

大阪大学大学院工学研究科  
生命先端工学専攻 生物工学コース  
細胞工学領域

安本周平

## 【背景・目的】

植物が生産する特化代謝産物（二次代謝産物）の多くは生理活性を示すことが知られている。これら特化代謝産物の代謝経路を改変することによって、有用物質を大量生産する、あるいは不要な物質をほとんど生産しない植物を作り出すことができることが予想される。植物の代謝経路を人為的に改変するためには、植物のゲノム上に存在する特定の代謝酵素遺伝子に変異を導入する必要がある。しかし、植物細胞は相同組み換え頻度が低いため、効率的な標的遺伝子の改変が困難であった。近年ゲノム編集のツールとして開発された TALEN (transcription activator-like effector nuclease) は植物病原菌 *Xanthomonas* 由来の TAL effector の DNA 結合ドメインと制限酵素 *FokI* エンドヌクレアーゼの DNA 開裂化ドメインを結合した人工ヌクレアーゼである<sup>1)</sup> (図 1)。TAL effector の DNA 結合ドメインは 34 アミノ酸のリピードで構成され、1 リピードが標的 DNA の 1 塩基を認識する<sup>2)</sup>。リピード中の 12、13 番目の二アミノ酸 (repeat variable diresidue, RVD) によって標的塩基が決定されており、リピードを並び変えることで任意の配列特異性を持った DNA 結合ドメインを作製可能である。2 つ 1 組の TALEN をゲノム上の特定の配列上で向かい合うように DNA 結合ドメインを作製、細胞で発現させること

で、標的配列上で *FokI* ドメインが二量体化し、ヌクレアーゼ活性を示すようになる。TALEN によって切断されたゲノム DNA は細胞内在の非相同末端結合修復によって再結合される。その際、塩基の欠損や挿入が起これ、標的配列に変異が導入される。

TALEN を植物に適用することで、植物ゲノムの配列特異的な改変が可能となると予想されるが、TALEN を用いた植物ゲノム改変に関する報告は未だ少ない。そこで本研究では、人工ヌクレアーゼ TALEN を用いて植物の特化代謝酵素遺伝子を破壊することで植物特有の特化代謝経路が改変可能であることを示すことを目的として、シロイヌナズナのオレオノール酸生合成酵素遺伝子 (*CYP716A2*)、ジャガイモの SGA 生合成関連酵素遺伝子 *SSR2* (*sterol side chain reductase 2*) の破壊を試みた (図 2)。

1. 機能の重複した *CYP716A1*, *CYP716A2* はオレオノール酸生合成に関与する。

オレオノール酸は多くの双子葉植物が生産するトリテルペノイドの一種であり、動物細胞に対する様々な生理活性が報告されている一方で植物そのものにおける生理学的な意義については不明な点が多い化合物である。モデル植物であるシロイヌナズナはオレオノール酸の生合成に係る酵素遺伝子として *CYP716A1*, *CYP716A2* をゲノム上に保持している (図 2-a)。これらの機能が重複した遺伝子は、第 5 染色体上の近接した位置に存在しており、それぞれの一重変異体の交配によりオレオノール酸欠乏変異体と予想される二重変異体を作製することは困難である。そこで本研究では、*CYP716A2* 遺伝子を標的配列とする TALEN を *cyp716a1* 一重変異体へ導入することで、*cyp716a1* / *cyp716a2* 二重変異体を作成し、基礎的な植物生理学研究に TALEN が有用であることを示すことを目指した。

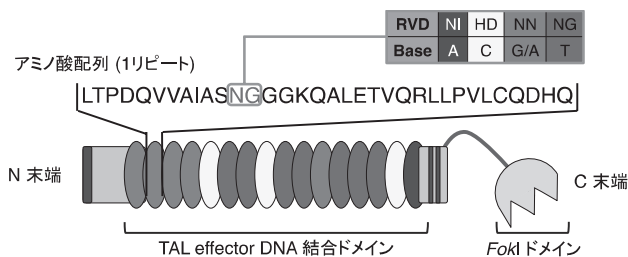


図1. TALEN タンパク質の構造

TALEN は TAL effector の DNA 結合ドメインと *FokI* エンドヌクレアーゼの DNA 開裂化ドメインを結合させた人工タンパク質である。DNA 結合ドメインのリピードを並びかえることで任意の標的塩基配列特性を持ったヌクレアーゼを作製できる。

2. SSR2 は SGA 生合成経路の鍵酵素遺伝子である

ステロイド性グリコアルカロイド (Steroidal glycoalkaloid, SGA) はナス科植物に特に多く分布する特化代謝産物である。例えば、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) が生産する主要な SGA の一つであるソラニン、ヒトや動物に対して毒性を示す。ナス科植物は多様な SGA を保持しているが、全てのステロイド性アルカロイドは共通の前駆体であるコレステロールから生合成されると考えられている。最近、組換え酵母を用いた実験によりジャガイモ由来の Sterol side chain reductase 2 (SSR2) がデスモステロールの 24 位を還元し、コレステロールを生成することが示され、SSR2 が SGA 生合成の鍵酵素遺伝子であることが示唆された (Sawai et al., unpublished)。SSR2 が触媒する反応は全てのグリコアルカロイドの生合成に共通であり、SSR2 を破壊することで、SGA 低含量のジャガイモを育種することが可能になると考えられる。そこで、本研究では TALEN を用いたジャガイモ SSR2 遺伝子の破壊による代謝改変、SGA 低含量ジャガイモのゲノム育種を目指した。

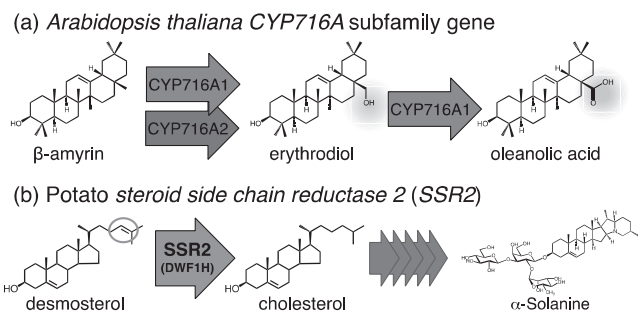


図2. TALEN 標的遺伝子が関与する植物特化代謝反応 (a) シロイヌナズナ CYP716A1, CYP716A2 は  $\beta$ -アミリンを酸化し、オレアノール酸生産活性を有する。(b) SSR2 はナス科植物においてデスモステロールを還元し、コレステロールを生産する。コレステロールは酸化やアミノ基転移、配糖化反応を経て、ソラニンなどの SGA に変換される。

### [実験結果]

1. *cyp716a1* / *cyp716a2* 二重変異体シロイヌナズナの作出

T-DNA の挿入によって *cyp716a1* が破壊されたシロイヌナズナ一重変異体に *CYP716A2* を認識する TALEN 恒常発現ベクターをアグロバクテリウム法により導入した (図 3-a)。得られた形質転換体からゲノム DNA を抽出し、PCR によって TALEN 標的配列を含む数百 bp を増幅させ、PAGE ゲルを用いて分離したところ、標的配列への変異導入を示唆するバンド

が検出された (図 3-b)。増幅産物をベクターへクローニング後、シーケンス解析によって標的配列を確認したところ、標的配列への変異導入が検出された (図 3-c)。詳しい実験内容については参考文献を参照していただきたい<sup>3)</sup>。



図3. TALEN によるシロイヌナズナ *CYP716A2* 遺伝子の破壊 (a) *CYP716A2* を標的配列とする TALEN。赤い線が左右の TALEN の認識配列を示す。(b) ゲノミック PCR による変異導入の検出。TALEN を導入したサンプルでは非形質転換体 (NT) では見られない黄色のアスタリスクで示すエクストラバンドが検出された。(c) 形質転換体シロイヌナズナより検出された TALEN 標的配列 (一部を抜粋)。

2. SSR2 が破壊されたジャガイモは SGA 蓄積量が減少する。

SSR2 を標的配列とする TALEN を作製し、エストラジオール誘導型発現ベクターをアグロバクテリウム法によりジャガイモへ導入した (図 4-a)。得られた形質転換体をエストラジオールを含む溶液に浸し TALEN の発現を誘導後生育させた。ゲノム DNA を抽出し、PCR によって TALEN 標的配列を含む数百 bp を増幅させ、PAGE ゲルを用いて分離したところ、29 個体中、2 個体において標的配列への変異導入を示唆するバンドが検出された (図 4-b)。これらの PCR 反応産物をベクターへクローニング後、シーケンス解析によって標的配列を確認したところ、変異導入が検出された (図 4-c)。そのうち 1 個体においては変異が導入されていない *SSR2* 配列が検出されなかった。いくつかの形質転換体、非形質転換体の葉に含まれる SGA 量を LC/MS 分析によって定量したところ、*SSR2* ノックアウト体においてコントロールと比較して SGA 量が大幅に減少していることが示された (Data not shown)。

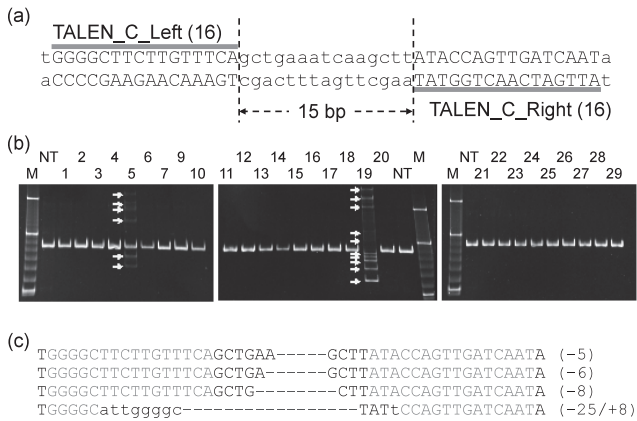


図4. TALEN によるジャガイモ *SSR2* 遺伝子の破壊  
(a) *SSR2* を標的配列とする TALEN。オレンジ色の線が左右の TALEN の認識配列を示す。(b) ゲノミック PCR による変異導入の検出。TALEN を導入したサンプルでは非形質転換体 (NT) では見られない黄色の矢印で示すエクストラバンドが検出された。(c) TALEN 導入ジャガイモより検出された TALEN 標的配列 (一部を抜粋)。

### [考察]

本研究において、人工ヌクレアーゼ TALEN を用いることでモデル植物シロイヌナズナのオレアノール酸合成関連酵素遺伝子 *CYP716A2*, ジャガイモの SGA 合成鍵酵素遺伝子 *SSR2* に変異が導入された。モデル植物であるシロイヌナズナに TALEN を用いてゲノム改変を行った研究例は幾つか知られているが<sup>4)</sup>、四倍体作物であるジャガイモに TALEN を適用し、ゲノム改変、代謝改変を行った研究は今まで報告がなかった。本研究によって人工ヌクレアーゼである TALEN が植物の基礎的な研究だけではなく、実用作物のゲノム育種においても強力なツールとなることが示唆された。

### [謝辞]

本研究を行うにあたり、ご協力をいただきました広島大学理学研究科の山本卓教授、佐久間哲史特任助教、キリンホールディングス (株) の梅基直行博士、理化学研究所の澤井学特任研究員、東京工業大学理工学研究科の大山清助教に厚く御礼申し上げます。

### [参考文献]

- 1) Christian, Michelle, et al. "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." *Genetics* 186.2 (2010) : 757-761.
- 2) Boch, Jens, et al. "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." *Science* 326.5959 (2009) : 1509-1512.
- 3) 安本周平、關光、村中俊哉 植物 (シロイヌナズナ) における TALEN を用いた遺伝子改変 山本卓 編 “実験医学別冊 最強のステップ UP シリーズ 今すぐ始めるゲノム編集 TALEN&CRISPR/Cas9 の必須知識と実験プロトコル” (2014) 羊土社
- 4) Christian, Michelle, et al. "Targeted Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* Using Engineered TAL Effector Nucleases." *G3: Genes / Genomes / Genetics* 3.10(2013): 1697-1705.



同研究室において、博士後期課程へ進学。引き続き、人工ヌクレアーゼ TALEN を用いた植物のゲノム育種・代謝改変を目指した研究に従事している。

(応生 平成 24 年卒 26 年前期 後期在学中)