

1S-Dp03 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変異導入

○山本 卓
(広島大院・理)
tybig@hiroshima-u.ac.jp

これまで多くの動物において、細胞内あるいは生物個体内において目的の遺伝子のみを改変（遺伝子ノックアウトあるいは遺伝子ノックイン）する技術は確立していなかった。マウスでは ES 細胞を用いて目的の遺伝子を改変し、改変した ES 細胞を利用した個体作製法が確立しているが、他の動物ではこの方法が困難なため化学変異原やトランスポゾンでゲノム遺伝子にランダムに変異を導入する方法が用いられてきた。しかしながら、ランダムな変異を導入された集団から目的の遺伝子を改変した変異体を選別する作業は多大な労力を必要とするため、遺伝子改変は飼育が容易で変異体スクリーニングが可能な限られた動物を中心に行われてきた。このような状況の中、任意の配列に対して設計可能な人工制限酵素（人工ヌクレアーゼ）の Zinc-finger nuclease (ZFN) や Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いた遺伝子改変技術（ゲノム編集技術）が開発され、基礎から応用までの広い分野での利用が期待されている。さらに、本年はじめに第三世代のゲノム編集技術として CRISPR/Cas システムが報告され、その簡便さに多くの研究者が驚かされた。このようにゲノム編集技術は、人工ヌクレアーゼを細胞や受精卵に導入するだけで可能なこと、原理的に全ての生物に利用可能であることから、次世代の遺伝子改変技術と期待されている。

本講演では、TALEN を基盤とするゲノム編集技術を用いた様々な動物や培養細胞での遺伝子改変の現状と可能性について紹介する。2010 年に TALEN が初めて報告されて以来、様々な動物（ゼブラフィッシュ、メダカ、カエル、コオロギなど）での遺伝子ノックアウトが成功する一方、マウスやラットでは期待される効率での変異導入が実現していなかった。そこで我々は、Voytas ラボの Golden Gate 法を改良し、TALE の N 末端と C 末端を欠失させた TALEN (TALEN-NC) の効率的な作製方法（6 モジュール法）の開発と培養細胞での評価方法を確立してきた（Sakuma et al., 2013）。さらに、京都大学の真下らは、TALEN-NC と Exonuclease I との共導入によってラットでの変異導入に成功した（Mashimo et al., 2013）。しかしながら、TALEN-NC のみのインジェクションでラット個体への変異導入を確認できず、さらなる改良が必要と考えられた。今回、TALEN の DNA 結合モジュールに改良を加えた Platinum Gate 法を確立し、高活性型の Platinum TALEN を用いて培養細胞およびカエル、マウスでの変異導入効率を調べたので、その結果について紹介する。Platinum TALEN は培養細胞の SSA 活性評価において、これまでの Voytas TALEN の 1.5~2.5 倍の高い活性を有し、培養細胞および個体においても高い変異導入を示すことが明らかになった。特にカエルにおいては F0 において完全な遺伝子破壊個体を得ることに成功したので（Suzuki et al., 2013）、その結果について紹介する。

Development of highly-active TALENs (Platinum TALENs) and targeted mutagenesis in mammalian cells and animals.

○Takashi Yamamoto
(Grad. Sch. Sci., Hiroshima Univ.)

Key words Genome editing, genome engineering, mutagenesis, gene knockout

1S-Dp04 ジーンターゲティング技術を汎用的技術に

遠藤 真咲¹, 横井 彩子¹, 大槻 並枝¹, 刑部 敬史^{1,2}, 雑賀 啓明¹,
○土岐 精一^{1,3}
(¹農業生物資源研究所, ²埼玉大・工, ³横浜市大・木原生研)
stoki@affrc.go.jp

人工ヌクレアーゼでゲノム上の標的遺伝子を切断すること（標的遺伝子切断）により、高等真核生物において、標的遺伝子特異的に変異を導入すること（標的変異）が可能になって来た。また標的遺伝子切断により相同組換えを介したジーンターゲティング（標的組換え）の頻度も大きく向上できる様になってきた。

しかしながら、高等植物における適用例は未だモデル植物に限られており、応用研究の報告も少ない。これは、この分野に参入している研究者数が未だ少ないことが一番の原因であるが、現在の実験系が高頻度の形質転換系や組織培養系に依存しているため、農業上・産業上有用な多くの植物への適用が直ちに行えないことが、研究人口の増加と研究の発展を阻んでいると思われる。

我々はシロイヌナズナとイネを実験材料に研究を行ってきたが、本講演ではこれらの植物への標的変異や標的組換えの実験系の開発で得られた知見の中で、普遍的に使える要素技術についてその特長と問題点に解説すると共に、多くの植物において適用可能なユニバーサルな技術に発展させるために、我々が現在取り組んでいる挑戦について紹介したい。

Towards the development of an universal gene targeting system in plants

Masaki Endo¹, Ayako Yokoi¹, Namie Ohtsuki¹, Keishi Osakabe^{1,2}, Hiroaki Saika¹,
○Seiichi Toki^{1,3}
(¹NIAS, ²Fac. Eng., Saitama Univ., ³Kihara Inst. Biol. Res., Yokohama City Univ.)

Key words genome engineering, gene conversion, gene disruption, transgenic plant