

## [最近のトピックス]

## ねらった遺伝子をKOする人工ヌクレアーゼTALENの有望なタレント

田隈 泰信, 設楽 彰子, 荒川 俊哉

北海道医療大学歯学部口腔生物学系生化学分野

Taishin TAKUMA, Akiko SHITARA, Toshiya ARAKAWA

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

## 1. 人工ヌクレアーゼTALEN

遺伝子KOマウスの作製は、「相同組換え」という高等生物では極めてまれにしか起こらない現象に依存しているため、高度な専門技術または高額な費用、加えて長い時間を必要とする。しかし、最近、相同組換えを必要としない「人工ヌクレアーゼ」による遺伝子改変技術が開発され、比較的容易に、これまで作製が困難とされてきたマウス以外の動物や培養細胞の遺伝子KOが実施可能となった。今回とりあげるTALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) は、キサントモナス属の植物病原性細菌が、植物細胞の遺伝子発現を攪乱するために用いるTALEタンパク質 (DNA結合ドメイン) と制限酵素ForkI (DNA切断ドメイン) を融合した人工ヌクレアーゼである。図に示すようにTALENのDNA結合ドメインは「芋虫の体節」に似た繰り返し構造をもつ。各体節は34アミノ酸残基からなり、その12番目と13番目のアミノ酸はDNAの4種類の塩基を認識し結合する「足」の役割をはたす。例えば、アスパラギン (N)、イソロイシン (I) の足 (NI) はアデニンを認識し結合する。この「芋虫の体節」を任意の組合せで造るコンピューター制御のDNA合成ロボットは既に完成しており、目的の遺伝子をKOする「人工ヌクレアーゼ発現ベクター」の供給が、商業・非商業ベースで始まっている。

## 2. siRNAからTALENへ

我々はこれまで、HeLa細胞に様々なSNAREタンパク質のsiRNAを導入し、構成的分泌におけるSNAREタンパク質の役割を調べてきたが、SNAP23の遺伝子発現を90%抑制しても構成的分泌は全く阻害されなかった(1, 2)。ところが最近、SNAP23の遺伝子KOマウスが胎生3.5日目 (胚盤胞期) に死滅することが明らかとなった(3)。遺伝子KO細胞が得られていないため、発生停止が分泌の破綻によるものか、因果関係は解析されてい

ない。siRNA実験の限界 (遺伝子発現を100%抑制できない) と遺伝子KOマウスの限界 (発生の初期に死滅すると機能解析が困難、また解析が超複雑) の狭間を埋める研究方法として、我々はTALENによる細胞レベルでの遺伝子KO実験に着目し、現在各種SNARE遺伝子KO用TALENを作製中である。今後TALEN法の広範な導入により、siRNA実験の曖昧な結果が、遺伝子KOによるクリアな結論へと置換されて行くことが想像される(4)。

## 文献

1. SNAP-23 is not essential for constitutive exocytosis in HeLa cells. Okayama M, Arakawa T, Mizoguchi I, Tajima Y, Takuma T. FEBS Lett. 581(24): 4583-4588, 2007
2. SNARE proteins are not excessive for the formation of post-Golgi SNARE complexes in HeLa cells. Okayama M, Shitara A, Arakawa T, Tajima Y, Mizoguchi I, Takuma T. Mol Cell Biochem. 366: 159-168, 2012
3. Deletion of SNAP23 results in pre-implantation embryonic lethality in mice. Suh YH, et. al. PLoS One 6(3): e18444, 2011
4. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. Kim Y, et. al. Nature biotech. doi: 10. 1038/nbt. 2517, 2013

