

# 28K-pm07S

分子進化法を用いた 5' 末塩基非選択性 TALE タンパク質の創製

○辻 将吾<sup>1</sup>, 今西 未来<sup>1</sup>, 二木 史朗<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京大化研)

【目的】 Transcription activator-like effectors (TALEs) は植物病原菌 *Xanthomonas* 由来のタンパク質で配列特異的に DNA に結合する。TALEs はデザインの容易さと結合特異性の高さから、ゲノムの部位特異的な編集技術において注目されている。しかし、ほとんどの TALEs は結合配列 5' 末塩基が T でなければならないという制限を有する。本研究では、この 5'-T の制限を取り除くことを目指した。

【方法】 TALEs のひとつとして知られる dHax3 タンパク質を用い、まず、dHax3 の 5'-T 要求性に関して、ルシフェラーゼアッセイにより評価した。続いて、TALEs の結晶構造から、5'-T 認識への関与が示唆されていたリピート-1 ループ構造部分に位置する W232 の点変異体を作製し、それらの DNA 結合性を調べた。さらに、リピート-1 ループ部分に相当する 230 番目から 233 番目の 4 アミノ酸 (230KQWS233) をランダム化した。このランダム化ライブラリーの中から 5'-T 以外の配列に対して結合性を示す変異体を Bacterial one-hybrid screening により選出した。得られた変異体の DNA 結合能をルシフェラーゼアッセイにより評価した。

【結果および考察】 W232 点変異体においては 5'-T 配列への結合力が低下した。このことから W232 が 5' 末塩基認識に重要な役割を担うことが示唆される。しかしながら、いずれの置換体においても、5' 末がチミン以外である配列への結合性の上昇は見られなかった。一方で、リピート-1 ライブラリーのスクリーニングより得られた変異体においては、いずれにおいても 5'-T 以外の配列に対する結合性の有意な上昇が見られた。すなわち、5' 末塩基の選択性が除かれたといえる。本研究で創製した結合配列 5' 末塩基に制限をもたない TALEs を用いれば、これまで標的にできなかった T 塩基の存在しない DNA 領域も標的とすることができる。このため、ゲノム編集技術など様々な用途での応用が期待される。