

論文の内容の要旨

論文題目 人工制限酵素を用いた遺伝子操作法の開発

氏名 堅田 仁

【緒言】

ポストゲノム時代へと突入した現在、プラスミド DNA からゲノムまで、幅広いサイズの DNA を組換える技術が必要不可欠となっている。しかしながら、既存の遺伝子組換えツールは様々な欠点があり、汎用的なツールとはなり得ていない。まず、プラスミド等の遺伝子操作に用いられる天然制限酵素には、4-8 塩基対という配列認識能の低さや、切断できる配列に限られるという問題がある。また、ゲノムの組換えに用いられる相同組換えは、細胞内での頻度が極めて低いため、薬剤などによる煩雑なセクションが必要となる。このような問題から、既存の手法の欠点を補い、いかなるサイズの DNA にも対応できる遺伝子組換えツールの開発が急務となっている。

我々はこれまでに Ce(IV)/EDTA 錯体とペプチド核酸(PNA; Peptide Nucleic Acid)を併用した人工制限酵素(Artificial Restriction DNA Cutter: ARCUT)を開発した(Fig. 1)。本手法ではまず、二本鎖 DNA 中の標的部位に二本の PNA をずらしてインバージョンさせ、部分的に一本鎖構造を形成させる。このインバージョン複合体に対し、一本鎖特異的に DNA を加水分解する Ce(IV)/EDTA を作用させることで、二本鎖 DNA の位置特異的な切断を達成する。本手法で用いる Ce(IV)/EDTA は、天然制限酵素と同じ加水分解機構により DNA を切断することから、反応後、切断産物に対して種々の修飾酵素を作用させることができる。また配列認識に用いる PNA は、Watson-Crick 塩基対形成により標的 DNA を認識するため設計が極めて容易であり、長さや配列も自由自在に変更できることから非常に汎用性が高い。これらの大きな特長から、ARCUT は次世代の遺伝子工学を担う強力なツールとなることが期待される。

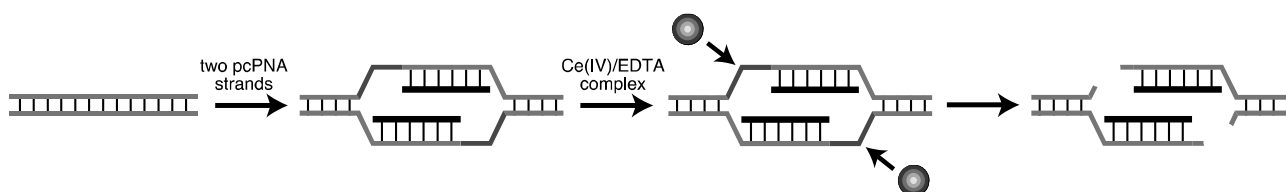


Figure 1. Schematic diagram of site-selective DNA cleavage by ARCUT.

本研究では、ARCUT をポストゲノム時代のニーズに見合った汎用的な遺伝子組換えツールへと発展させることを目的とし、以下の研究を行った。

1. ARCUT を利用したプラスミド DNA 組換え法の開発
2. ゲノムの組換えに向けた検証 (ヒトゲノムの位置特異的切断・相同組換えの促進)

【結果・考察】

1. ARCUT を利用したプラスミド DNA 組換え法の開発

前述の通り、ARCUT による切断は加水分解機構であるため、切断後にリガーゼを用いた他の DNA との結合が可能である。しかしながら、切断後の断片は長い突出末端となるため、そのまま他の断片と結合することはできない。本研究では二通りの方法を用いて異なる断片同士を結合することで、ARCUT を利用した新しい遺伝子操作法の構築を行った。

1-1. ARCUT を用いた蛍光タンパク質のセレクション(Joint を利用した断片の結合)

本実験では、青色蛍光タンパク質(BFP)の発色団を構成する 3 つのアミノ酸のうち、Ser65, His66 をコードする部位をランダム配列に置き換え、蛍光タンパク質のセレクションを行った(Fig. 2a)。Fig. 2b に示す通りまず、BFP 遺伝子をコードしたプラスミド(pQE60-BFP)の発色団の下流を ARCUT で切断し、その後上流を SpeI で切断することでベクターを調製した。ARCUT による切断後の泳動図を Fig. 2c に示す。ARCUT 切断後には 4.1 kbp の直鎖状 DNA が生成していることが確認できる(Lane 2)。また、ARCUT 切断産物をさらに XbaI で切断したところ、予想通り 1.5 kbp と 2.6 kbp の断片が生じたことから、基質プラスミドが ARCUT によって位置特異的に切断されたことを確認した(Lane 3)。一方、ランダム配列を含むインサートは、PCR で増幅し、両末端をそれぞれ BamHI、SpeI で切断することで調製した。このようにして調製したベクターとインサートの SpeI 切断末端同士は相補的であるためにそのまま結合することが可能であるが、ベクター側の ARCUT 切断末端とインサート側の BamHI 切断末端はそのままでは結合できない。そこでそれぞれの突出末端に相補的な配列を持つ Oligo^{joint} を用いることで末端を相補的にし、二つの断片を結合した(Fig. 2d)。得られたプラスミドの配列を解析したところ、3 種類の異なる発色団をもつ蛍光タンパク質が得られた。Fig. 2e に得られた配列の一例を示す。発

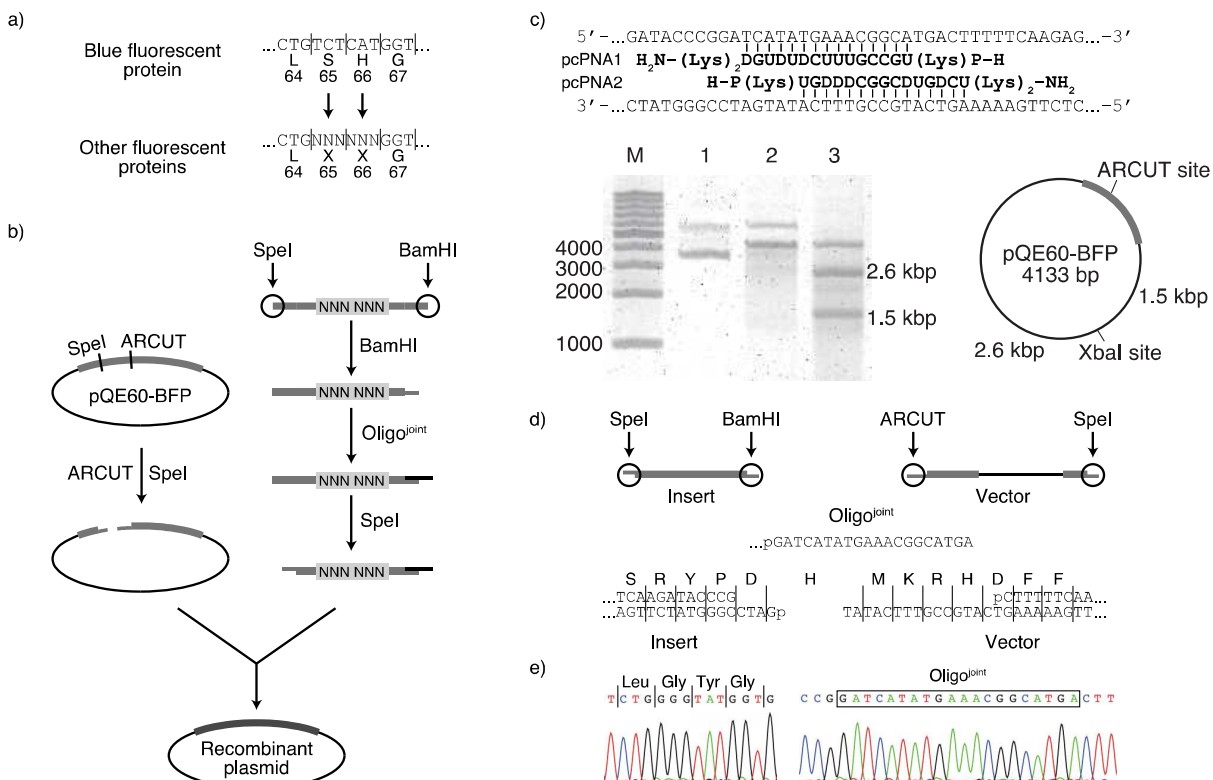


Figure 2. a) Selection of fluorescent proteins by randomizing the chromophore of BFP. The genetic sequence and amino acid residues near the chromophore are shown. b) Outline of gene recombination of BFP. c) Agarose gel electrophoresis patterns obtained from ARCUT scission. Lane M, 1 kbp ladder; lane 1, substrate BFP plasmid; lane 2, substrate BFP plasmid after ARCUT scission; lane 3, XbaI digests of lane 1. The sequences of pcPNAs used and vector map of BFP plasmid are also shown. d) Ligation of the vector with ARCUT termini to the insert with BamHI termini. e) Sequence analyses of one of the cloned recombinant vector at the mutation site (left) and Oligo^{joint} conjunction (right).

色団部位は Gly65, Tyr66 へと置換され、インサートとベクターも Oligo^{joint} を介して正しく結合されていることが確認された。

1-2. ARCUT を用いた遺伝子発現カセットの挿入(平滑化を利用した断片の結合)

本実験では ARCUT 切断後に生じる突出末端を一本鎖特異的エンドヌクレアーゼで平滑化し、そこに PCR 産物を挿入することで遺伝子組換えを行った。Fig. 3a に示すように、プラスミド(pBR322)を ARCUT を用いて一箇所ですべて切断し、一本鎖特異的エンドヌクレアーゼである Mung Bean Nuclease、および Klenow Fragment を用いて末端を平滑化し、ベクターを調製した。また、T7 プロモーターを含む緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を PCR で増幅し、インサートを調製した。両断片をリガーゼで結合し、大腸菌に導入後、得られたプラスミドの配列を Fig. 3b に示す。上流、下流ともに ARCUT 切断サイトにインサートが挿入されたことを確認した。本手法は、天然制限酵素を一切用いない遺伝子組換え法であり、ウイルスベクターなどサイズの大きなベクターを作成する際に非常に有用な手法であると考えられる。

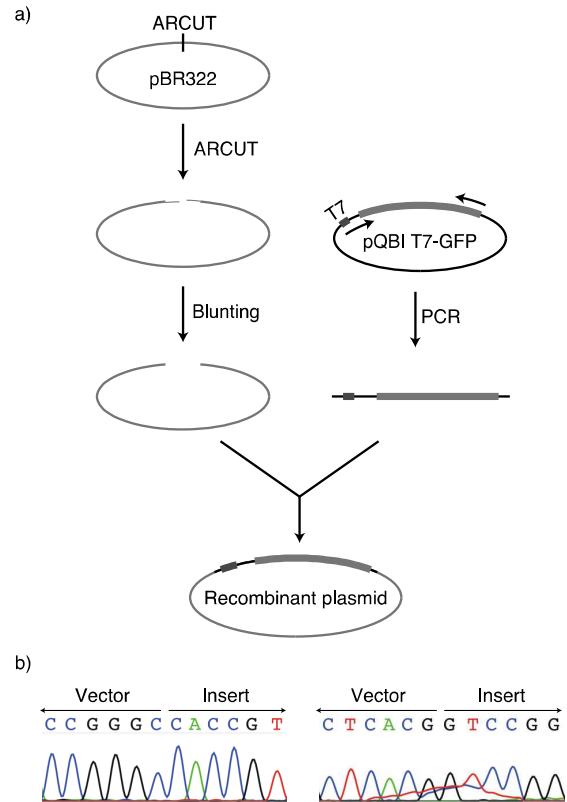


Figure 3. Gene cassette insertion into a vector prepared by ARCUT through blunt-end ligation. a) Schematic outline of the procedure. b) Sequence analysis of one of the recombinant vectors in which GFP gene was inserted into forward (left) and reverse (right) conjunction sites.

2. ゲノムの組換えに向けた検証

近年、ゲノム上の標的部近傍に二本鎖切断(DSB: double strand break)を導入し、相同組換え効率を上げる手法が注目されている。これは、DSBを導入することによって、細胞内の相同組換え修復系が働き、組換え効率があがるというものである。本手法を利用するためには、巨大なゲノム上の標的部のみならず、DSBを導入するツールが必要となるため、高い配列認識能をもつ ARCUT は有用なツールとなることが期待される。そこで、ARCUT をゲノム改変ツールとして用いることができるかどうかを検証するため、以下の二つの実験を行った。

2-1. ARCUT を用いたヒトゲノムの切断

本実験では、in vitro でのヒトゲノム切断実験を行うことで、ARCUT を用いて巨大なヒトゲノムに位置特異的な DSB を導入することができるかどうかについて検証した。実験概要を Fig. 4a に示す。切断するターゲットはヒトゲノム X 染色体上の FMR1 遺伝子とし、PNA を設計した。まずヒト培養細胞から全ゲノムを抽出し、ARCUT を用いて切断した後に、EcoRI でゲノムを断片化した。ARCUT による切断が起こると、2.9 kbp と 2.3 kbp の断片が生成する。それぞれの断片を検出するプローブ(probe 1 and probe 2)を用いてサザンブロッティングを行った結果、目的とする切断断片が検出されたことから、ARCUT によるヒトゲノムの位置特異的切断を確認した。

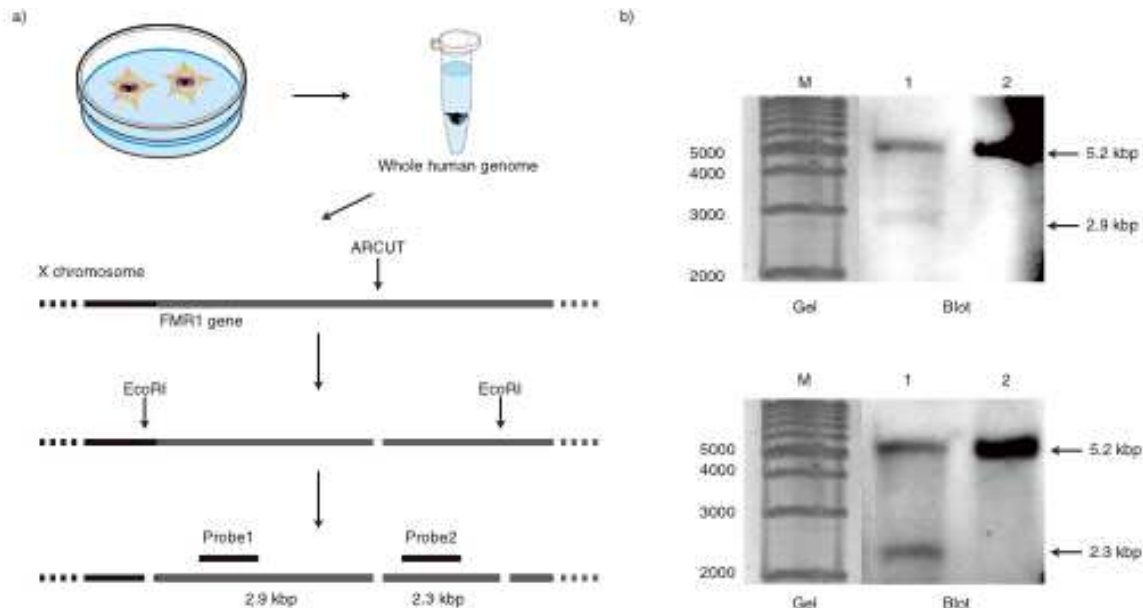


Figure 4. a) Outline of the site-selective cleavage of FMR1 gene in human genome by ARCUT. b) Southern blotting using probe 1 (upper panel) and probe 2 (lower panel), respectively. Lane M, 1 kbp DNA ladder; lane 1, ARCUT- treated genome; lane 2, control (direct digestion of the human genome by EcoRI without ARCUT).

2-2. ARCUT を利用した DSB の導入による相同組換えの促進

本実験では、ARCUT を用いて導入した特殊な形状の DSB が、ヒト細胞内の相同組換えを促進するかについて検証した。Fig. 5a に示す通り、まず ARCUT を用いてプラスミド上の BFP 遺伝子の発色団付近を切断した。その後、相同組換えの鋳型となる Donor EGFP 断片とともにヒト細胞(293T)に導入し

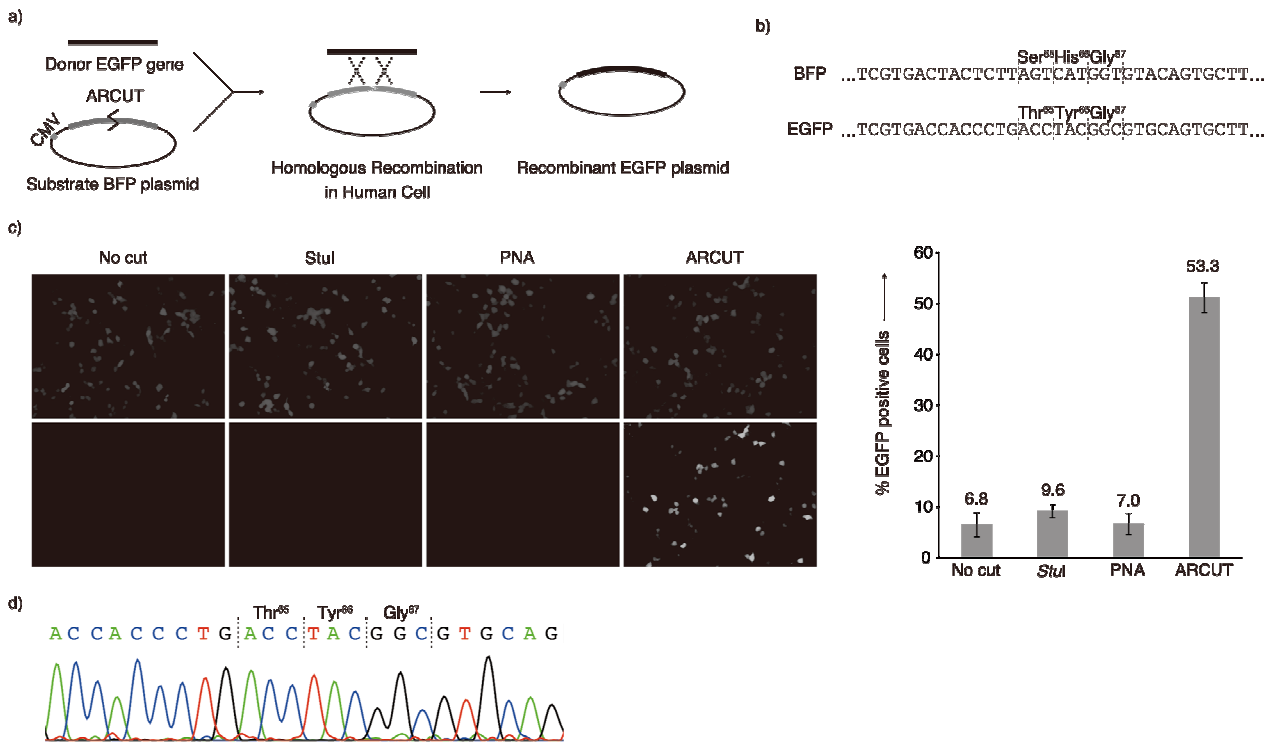


Figure 5. a) Outline of homologous recombination in human cells promoted by ARCUT. b) The DNA and amino acid sequences for the chromophores of BFP and EGFP. c) Fluorescence microscopy images of the 293T cells cultured for 48 h after transfection with the BFP plasmid and the donor EGFP fragment at the molar ratio of 1:7 (left). The upper and lower panels show blue channels (Ex: 360 nm, Em: 470 nm) and green channels (Ex: 480 nm, Em: 520 nm), respectively. In the right, the efficiency of gene recombination (defined by the fraction of green fluorescence-emitting cells in the total emitting cells) is presented. d) Sequencing analysis of the recombinant plasmid showing the successful recombination via homologous recombination.

た。Fig. 5b に示すように、BFP と EGFP は発色団付近以外が完全に相同配列である。従って、切断された BFP プラスミドが donor EGFP を鋳型とした相同組換えにより修復され、EGFP プラスミドへと変換されると、細胞から緑色蛍光が観測される設計となっている。トランスフェクション後 48 時間経過した時点での蛍光顕微鏡写真、および緑色蛍光を発する細胞の割合をグラフにしたものを Fig. 5c に示す。切断していないもの(No cut; 6.8 %)、制限酵素を用いて相同配列の外側で DSB を導入したもの(StuI; 9.6 %)、PNA をインベージョンさせただけのもの(PNA; 7.0 %)と比較して、ARCUT を用いて DSB を導入したもの(ARCUT; 53.3 %)は緑色蛍光を発する細胞の割合が劇的に上昇していることが分かる。さらに、細胞からプラスミドを抽出し配列を確認したところ、相同組換えによって遺伝子変換が起こったことが確認された(Fig. 5e)。以上の結果から、ARCUT により導入した DSB に対しヒト細胞内の相同組換え修復系が有効に機能し、相同組換えを促進することが証明された。

次に、ARCUT により導入した DSB の突出末端の方向が相同組換え高率に与える影響について検証した。ARCUT で用いる PNA は、グアニンが 3 個ないし 4 個連続する場合、合成が困難となるなど、二本の PNA をずらす方向を変えて設計することを余儀なくされる場合がある。そこで、突出末端の違いが相同組換えに与える影響を調べるため、5'突出および 3'突出末端の断片を生成する ARCUT をそれぞれ作成し(Fig. 6a)、相同組換え効率を検証した。またそれと同時に、相同配列の長さが異なる二種類の Donor(Fig. 6b)を用意し、相同配列の長さが与える影響についても検証した。先ほどと同様に、切断した BFP プラスミドと Donor EGFP 断片を 293T 細胞に導入し、48 時間後フローサイトメトリーで解析した(Fig. 6c)。その結果どちらの Donor を用いた場合でも、5'突出、3'突出に関わらず、切断していないものと比較して大きな相同組換え促進効果が確認された。また特筆すべきは、上流、下流の相同配列が共に 50 bp という短い Donor を用いた場合、切断していないものではほとんど組換えが起こらないにも関わらず(0.16 %)、ARCUT で DSB を導入すると 10 %以上の割合で相同組換えが起こる点である。この大きな相同組換え促進効果を利用すれば、短い相同配列しかもたない Donor でも効率よく相同組換えを誘起できる。つまり、従来のように overlap PCR などの煩雑な操作を必要とせず、5'末端に相同配

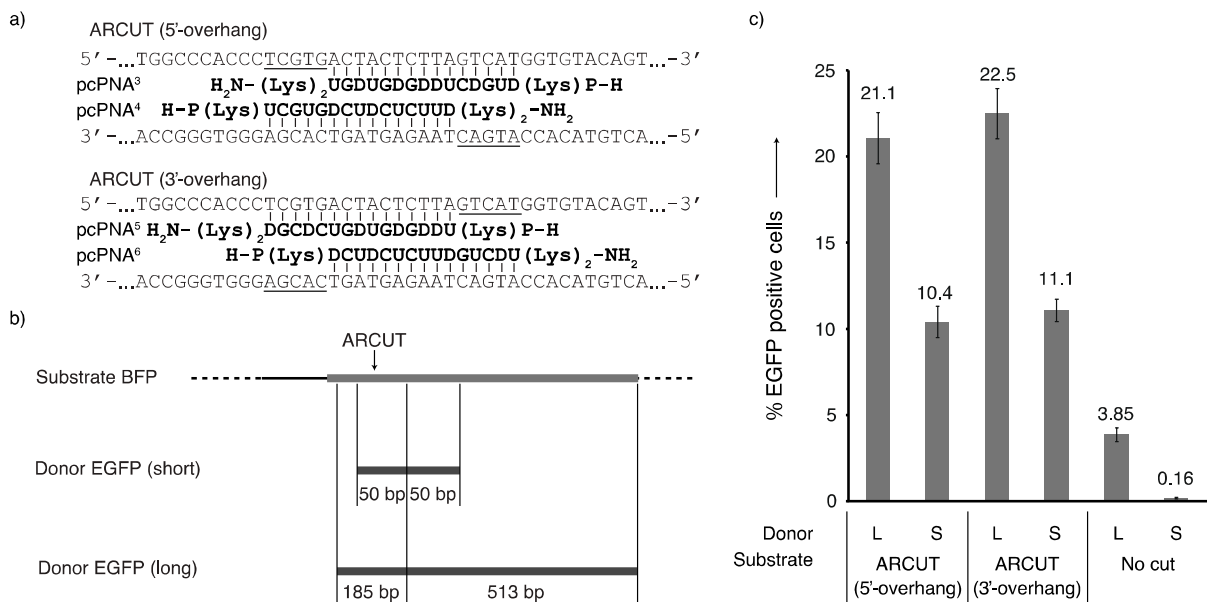


Figure 6. a) The sequences of pcPNAs used in this study. The underlined portions are selectively hydrolyzed so that each pair of pcPNAs (pcPNA³, pcPNA⁴ and pcPNA⁵, pcPNA⁶) gives the products with 5'-overhang and 3'-overhang, respectively. b) The length of homology regions between the substrate BFP and the donors used in this study. c) The efficiency of gene recombination measured by flow cytometry (defined by the fraction of green fluorescence-emitting cells in the total cells). L and S refer to the donors with long homology and short homology, respectively.

列を持つプライマーを用いて組み込みたい遺伝子を増幅するだけで相同組換えのための Donor が作成できるため、より簡便な遺伝子操作法となることが期待される。

【結論】

ARCUT を利用したプラスミド DNA 組換え法の開発では、二種類の手法を用いて ARCUT 切断断片と他の断片を結合し、新しい遺伝子組換え法を構築した。また、ゲノムの組換えに向けた検証では、*in vitro* で ARCUT を用いてヒトゲノムを位置特異的に切断することに成功した。さらに、ARCUT で導入した DSB に対し、ヒト細胞内の相同組換え修復系が有効に機能し、相同組換えを促進することを証明した。本研究では、ARCUT を用いた新たな遺伝子操作法を確立するとともに、今後ゲノムの遺伝子操作ツールとして応用する上で非常に重要な知見が得られた。