

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658057

研究課題名(和文) piggyBac 転移酵素の改変による配列特異的遺伝子組換え手法の開発

研究課題名(英文) Modification of piggyBac transposase gene on its sequence specificity

研究代表者

小島 桂 (Kojima, Katsura)

独立行政法人農業生物資源研究所・新機能素材研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号：40370655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カイコの遺伝子組換えに利用するpiggyBac転移酵素遺伝子を改変し、配列特異的な遺伝子挿入の実現を試みた。

piggyBac転移酵素遺伝子のN末端にジンクフィンガー-DNA結合タンパク質を融合させた改変piggyBac転移酵素を用い、培養細胞およびカイコ受精卵で転移活性を調べたが、改変により転移活性に変化は無く、挿入位置についても改変による特異性は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：To improve transposase activity of piggyBac transposase on its target sequence specificity, the gene encoding piggyBac transposase was modified by adding specific DNA binding domain on its N-terminus and its transposase activity was analyzed.

Transposase activity was analyzed by transfection and microinjection of modified piggyBac transposase in BmN cells and silkworm eggs, and inserted sequence were cloned along with surrounding genomic sequence. By sequencing of these cloned DNA fragments indicates (A) modified piggyBac retains its transposase activity, but (B) no specific insertion event were detected.

研究分野：昆虫機能利用 蚕糸

キーワード：遺伝子組換えカイコ piggyBac DNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

トランスポゾン *piggyBac* を用いたカイコの遺伝子組換え技術が2000年に開発され(文献¹)で以来、提案者をはじめ国内外の研究者によってカイコの遺伝子組換え技術を利用した研究が数多く進められている。*piggyBac* が“TTAA”の4塩基をターゲットに自身を挿入する機能を利用した *piggyBac* ベクター外来遺伝子導入システムでは、ゲノム上の“TTAA”配列に**目的遺伝子をランダムに挿入**する。そのため、*piggyBac* ベクターを用いた遺伝子導入は効率はよいが、組換え遺伝子の挿入部位は制御不能で、**ゲノム上の特定位置への目的遺伝子導入は、事実上不可能**である。このことが遺伝子組換えカイコの機能利用におけるさらなる発展を妨げる要因となっている。今後カイコの遺伝子組換えを利用して研究や産業化を進めていくためには、「遺伝子のノックアウト」や、「外来遺伝子のノックイン」等の**配列特異的な遺伝子導入技術の確立**が不可欠である。配列特異的な遺伝子導入法として、相同組換えを利用した手法がいくつか考案されている(文献²)が、効率はきわめて低く現時点では実用的ではないと考えられている。

一方、DNA 配列特異的に結合する人工タンパク質としてZnフィンガーヌクレアーゼ(文献³)や、TALEN(文献⁴)が知られており、これらでは、人工的に改変したDNA結合ドメインを用いることで、任意のDNA配列に対して結合活性を持つタンパク質ドメインを作製できる。

そこで *piggyBac* 転移酵素の外来遺伝子挿入活性と、人工DNA結合ドメインの配列特異的な結合活性とを組み合わせることで、高い組換え効率を維持したまま配列特異的な遺伝子導入ができるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

piggyBac を用いた遺伝子組換え手法を拡張し、配列特異的な遺伝子導入を実現する。最終的に、カイコ・フィブロイン遺伝子領域特異的に組換え遺伝子を導入し、同遺伝子のノックアウトおよびカイコ絹糸への外来遺伝子の効率的発現を実現する。本研究課題では、そのうち配列特異的に外来遺伝子を導入することができる、改変型トランスポゾンの開発を行なう。*piggyBac* 転移酵素に配列特異的なDNA結合ドメインを融合することで、任意の配列への遺伝子組換えを実現する。

3. 研究の方法

改変 *piggyBac* 転移酵素遺伝子は、文献4で遺伝子ノックアウトできたと報告があるZnフィンガーヌクレアーゼのDNA結合ドメイン(ターゲット1:“GCA GAT CTA”, ターゲット2:“GGT GAT CGC”)について、それぞれ *piggyBac* 転移酵素のN-末端にDNA結合ドメインを融合させた改変 *piggyBac* 転移酵素遺伝子を設計し、発現ベクター上に組換え遺伝子を構築する。DNA結合ドメインと、*piggyBac* 転移酵素の間には、フレキシブルなリンカー配列((GPGGA)_n)を挿入し、安定化を図る。

配列特異的な遺伝子導入活性の検定は、改変 *piggyBac* 転移酵素の発現ベクターと、ドナーベクターをカイコ培養細胞(BmN)にトランスフェクションして行なう。培養細胞では、組換え遺伝子の挿入が高頻度で生じると予想されるので、ゲノムDNAを回収し、カセットPCR法により挿入遺伝子近傍配列を網羅的に回収して配列情報を得ることで、挿入部位近傍のターゲット配列に類似した配列の有無を検証し改変 *piggyBac* 転移酵素の選定を行なう。

4. 研究成果

piggyBac 転移酵素に配列特異性を付与する試みとして以下の研究を行なった。まず、カイコで機能することが既知で、特異的 DNA 配列に結合すると考えられる、2 種類のジンクフィンガー-DNA 結合ドメイン (ZF-DNA-BD) を、*piggyBac* 転移酵素の N 末端に融合させた人工転移酵素 2 種の遺伝子を構築した。この際、ZF-DNA-BD と *piggyBac* 転移酵素との間にはフレキシブルリンカーとして、バネ状の配列 (GPGGA)₂ 配列を挿入し、これらの改変 *piggyBac* 転移酵素および、非改変 *piggyBac* 転移酵素遺伝子を、それぞれカイコ培養細胞 BmN で発現させるための発現ベクターに組込んだ。

次に、これらの *piggyBac* 転移酵素発現ベクターをそれぞれ組換え用トランスファーベクターとともに、BmN 細胞にコトランスフェクションした。組換え用トランスファーベクターとしては、カイコでの実績があるベクターを用いた。トランスフェクションののち、1~2 週間後にゲノム DNA を抽出し、インバース PCR 法により挿入位置近傍の配列を増幅し(図 1)増幅断片をクローニングして配列を解析した。(表 1)

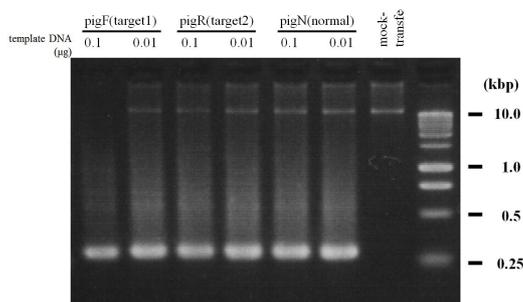


図 1 インバース PCR 結果

piggyBac 転移があるサンプルでのみ、0.3kbp-10kbp の間で増幅が認められる。

解析の結果、改変 *piggyBac* 転移酵素

(*pigF*, *pigN*)においても転移活性が認められた事で、*piggyBac* 転移酵素の改変自体には問題が無いことが確認された。一方で、転移位置の近傍配列にはターゲット配列 (“GCA GAT CTA”, “GGT GAT CGC”) は出現しておらず、配列特異的な転移活性は認められなかった。

表 1 挿入位置近傍配列

		annotation
> <i>pigN</i> -Rarm7	TTAAAAATCGGTCGGTAAATGAAATGCATA	chr7:2324801-2324610
> <i>pigN</i> -Rarm4	TTAAATCTTTAAACTACGCAACGGATTTT	chr19:9972731-9972399
> <i>pigN</i> -Rarm2	TAAAAATCAGGTGGAGTATAAATGTGTA	chr21:14499552-14498765
> <i>pigN</i> -Larm4	TTAAAAAAGATTTGGCGTTTACTCGACCTA	Bm_scaf8934_contig54144
> <i>pigN</i> -Larm6	TTAAAAAAGATTTGGCGTTTACTCGACCTA	no-hits
> <i>pigN</i> -Larm8	TAAAAATGTGTGCaCTCGGAAGTGTaTT	chr19:11081059-11081258
> <i>pigN</i> -Larm7	TTAATTAATTTTTTTAGAAAACAGATTTT	chr25:11750781-11750602
> <i>pigN</i> -Larm3	TTaATAAATAGAACAGTATGTATACATACA	chr6:2849827-2850176
> <i>pigN</i> -Larm2	TTAATTAATTAATCGCAAAATGTTCCAGAT	chr7:1744673-1745135
> <i>pigF</i> -Larm5	TTAAAAAAGATTTGGCGTTTACTCGACCTA	no-hits
> <i>pigF</i> -Larm4	TTAAAAATATAAGTGTATGTTTCGGTCCAT	Bm_scaf293
> <i>pigR</i> -Rarm8	TTAATATTCCTATCCTTCACTTAATTCCTA	chr12:2012870-2013280
> <i>pigR</i> -Rarm4	TTAATAATACATTAATAATAAAGAAAAC	chr19:7902945-7903136
> <i>pigR</i> -Rarm2	TTAAAAAGTACTAATTAATAAAGAAATTTA	chr28:8832689-8832323
> <i>pigR</i> -Larm8	TTAaCAATGTTTTTAAaCAAAACTCTTTTC	no-hits
> <i>pigR</i> -Larm5	TTAATATAAATAAACCCTTGTCTTACTT	chr25:11750889-11750603
> <i>pigR</i> -Larm1	TTAATTAATTTTTTTAGAAAACAGATTTT	chr25:11750781-11750602

各 *piggyBac* 転移酵素により転移した組換え遺伝子の末端部分 (TTAA 配列) から外側の配列を示す。

pigN:非改変 *piggyBac*,
pigF:改変 *piggyBac*(Target1),
pigR:改変 *piggyBac*(target2)

次に、カイコの受精卵を用いて同様の転移活性検定を行なった。カイコ受精卵に改変 *piggyBac* 転移酵素発現プラスミドと、トランスファーベクターをマイクロインジェクションし、1-3 日後に DNA を回収して転移した近傍配列を PCR により増幅・クローニングして配列を決定した(表 2)。ここでも、転移した近傍配列においてターゲット配列およびその類似配列は認められず、配列特異的な転移活性の付与は検出できなかった。今回試みた方法では、*piggyBac* 転移酵素に配列特異性を付与することが困難であることが示唆される。

一方で、通常 *piggyBac* による転移では、TTAA 配列をターゲットとした転移が行なわれるのに対し、改変 *piggyBac* 転移酵素における転移部位では、TTAA 配列を伴

わない転移と思われる事例が複数存在した。改変により転移活性が変化した可能性もあり、今後のさらなる解析が重要と考える。

表2 カイコ受精卵における挿入近傍配列

		annotation
pigN-Larm04	TTAATAAAGATTGGCGTTTACTCGACCTA	inter plasmid
pigN-Larm05	TTAAATAAATGAATTCATTGATTAATTGAT	plasmid (p)F6H+CTD-3UTR(挿入)
pigN-Larm06	TTAAAAAAGATTGGCGTTTACTCGACCTA	inter plasmid
pigN-Larm08	TTAAAAAAGATTGGCGTTTACTCGACCTA	inter plasmid
pigN-Larm09	TTAAAAAAGATTGGCGTTTACTCGACCTA	inter plasmid
pigN-Larm15	TTAAAAAAGATTGGCGTTTACTCGACCTA	inter plasmid
pigN-Larm16	TTAAAAATATAAAGTAAGCAATAAGAT	FbH promoter
pigN-Larm22	TTAAGAAAAAATTGTAACATTGTTTCAG	FbH ist intron
pigN-Rarm05	TTAATAAATGCACTGACACGTTGGCCGAC	BmNPV T3, Dnhsp70 promoter
pigN-Rarm11	TTAAGCAAGTAAAACCTTACAAAATTGGG	inter plasmid
pigF-Larm10	TTAAAAAAGATTGGCGTTTACTCGACCAAC	inter plasmid
pigF-Larm11	TTAAAAAAGATTGGCGTTTACTCGACCTA	inter plasmid
pigF-Larm12	GAACAAGCGCTGGCCCTAACGGCAAA	Bm genomic Ch21 他
pigF-Larm13	TTAAAAAAGATTGGCGTTTACTCGACCGAA	inter plasmid
pigF-Larm15	TTAAAAAAGATTGGCGTTTACTCGACCTA	inter plasmid
pigF-Larm20	GACGGGCTGGCCCTAACGGCAAAAG	Bm genomic Ch21 他
pigR-Larm03	CACTGATGACCTCATCTATAAAG	inter plasmid
pigR-Larm07	TTAAAAAAGATTGGCGTTTACTCGACCTA	inter plasmid
pigR-Larm08	TTAAAAAAGATTGGCGTTTACTCGACCTA	inter plasmid
pigR-Larm09	TTAAAAAAGATTGGCGTTTACTCGACCTA	inter plasmid
pigR-Larm10	TTAAAAAAGATTGGCGTTTACTCGACCTA	inter plasmid
pigR-Larm12	ATTACTATCGCTTACTCGCCTTAA	inter plasmid
pigR-Larm13	TTAAAAAAGATTGGCGTTTACTCGACCTAA	inter plasmid
pigR-Larm14	TCGCTCGACGCTCATCTGACTTAC	inter plasmid
pigR-Larm16	TTTCTAGGGTTTCATCTTCACTTACGTGAT	
pigR-Rarm03	TTTCTCGGCTAATCTTCTTGACAGCACA	NO HOMOLOGU
pigR-Rarm10	ATCCTCTTCGGGCTTAAAGCTTAG	NO HOMOLOGU
pigR-Rarm19	TTTACTCGACCTAAACTTTAAACAGC	inter plasmid

各 piggyBac 転移酵素により転移した組換え遺伝子の末端部分 (TTAA 配列) から外側の配列を示す。斜線配列は、TTAA 配列を欠く。

表記は表1に同じ

近年では、配列特異的 DNA 結合タンパク質として TALE が盛んに利用されている。本研究課題では、当時用いられていた ZincFinger DNA binding domain を用いたが、TALE を用いることでより選択性が高い DNA 結合ドメインを構築することが出来ると考えられるため、今後は TALE の利用を推進する事が望ましいと考える。

[参考文献]

1 Tamura, T., et al. *Nat Biotechnol* **18**: 81-4. (2000)

2 Takasu Y et al *Insect Biochem Mol Biol.* 40(10):759-65 (2010)

3 Mandell, J.G., Barbas 3rd, C.F., *Nucleic Acids Res.* 34, W516eW523 (2006).

4 Christian, M., et al. *Genetics* 186: 757-761

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権] 出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他] ホームページ等

6. 研究組織 (1)研究代表者 小島 桂 (KOJIMA, Katsura)

研究者番号: 40370655