

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660289

研究課題名(和文) 合成ゲノムベクターを用いた次世代ゲノム工学技術の確立

研究課題名(英文) Development of Bacillus subtilis genome vector-based complete manipulation and reconstruction of genomic DNA

研究代表者

廣田 順二 (Hirota, Junji)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号：60405339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、BGMベクター上での挿入・欠失・逆位・連結(伸張)の全遺伝子操作が可能であることを実証し、従来法では困難であった逆向きに挿入されたクローン同士の連結によるゲノムDNAの再構築を達成した。また再構築ゲノムDNAを用いた BGMトランスジェネシス法の確立し、ゲノム上最大の単一遺伝子クラスターを形成するクラス1嗅覚受容体遺伝子のエンハンサー領域の同定に世界で初めて成功した。さらにクローニングしたDNAをより安定に保持できる新規BGMベクターiREX (inducible RecA expression BGM vector)を構築し、その有用性を実証した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a complete genetic modification method for the BGM vector system, including insertion, deletion, inversion and fusion, to engineer genomic DNA fragments without any trace of modifications. In addition, we demonstrated that this system can be used for mouse transgenesis. Thus, the BGM vector system can be an alternative platform for engineering large DNA fragments in addition to conventional systems such as bacterial and yeast artificial chromosomes. Using this system, we provided the first experimental evidence of a cis-acting element for a class I OR gene. In addition, to manipulate large DNA fragments more stably than the conventional BGM vector, we developed a novel BGM vector with inducible recA expression system, iREX. We demonstrated that the iREX can be applied to handling the DNA, which has several homologous sequences, such as multiple-reporter expression cassettes.

研究分野：分子神経科学

キーワード：ゲノム工学 人工ゲノム トランスジェネシス マウス遺伝子工学

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA の機能解析のためには、巨大 DNA 操作技術をはじめとしたゲノム工学技術の発展が必要不可欠である。BAC、YAC ベクターは、これまでゲノムライブラリーの構築やトランスジェニック動物の作製など、ゲノム DNA の機能解析に大きな役割を果たしてきた。一方で、これらの既存システムには以下に挙げる問題点も存在する。

- ・ 遺伝子操作の簡便性：遺伝子改変操作が複雑で、変異導入の繰り返しが困難である。
- ・ DNA の不安定性：クローニングした DNA の欠失・重複・キメラ化が起こる。
- ・ クローニングサイズの限界：クローニングできる DNA は BAC で ~300kb、YAC で ~1,000kb である。

本研究課題では、上記問題を解決できる新たなゲノム工学プラットフォームとして BGM ベクターを用いた巨大 DNA 操作技術の確立と応用技術の開発を行う。BGM ベクターは、枯草菌ゲノムそのものをベクターとして利用するユニークなシステムであり、相同組換え酵素 RecA を利用した簡便な遺伝子改変操作が可能であること、細胞あたり 1 コピーのゲノムに直接クローニングするために DNA の安定性が高いこと、メガベース (Mb) 以上の巨大 DNA をクローニングが可能なることから、次世代ゲノム工学ツールとしての応用が期待されている。

2. 研究の目的

細菌人工染色体 (BAC) や酵母人工染色体 (YAC) に代表される既存の巨大 DNA クローニングシステムには、遺伝子操作の簡便性・DNA の不安定性・クローニングサイズの限界など解決するべき問題点が存在する。本研究課題では、従来法の問題点を解決する新たなクローニングシステムとして枯草菌ゲノム (BGM) ベクターを用いた革新的な遺伝子改変技術の確立を行う。具体的には、従来法では困難だったゲノム DNA の再構築を達成し、Mb オーダーのトランスジーン構築に挑戦する。さらにメガトランスジェニック作製を試み、本法の有用性を実証する。一連の巨大 DNA 操作技術とその応用技術を確立することで、次世代ゲノム工学プラットフォームを提供する。

本研究では具体的に以下の課題を達成することとした。

巨大 DNA 操作技術の確立：

挿入・欠失・逆位・伸長 (連結) の全ての遺伝子改変操作を一つのベクター上で行えるシステムは無い。BGM ベクターを用い、これら全遺伝子操作を可能にする基盤技術を確立する。さらに、一連の技術を駆使し、これまで困難であったゲノム DNA の再構築を行い、Mb 超のトランスジーン構築とメガトランスジェニックマウスの作製に挑戦する。

RecA 誘導型 BGM ベクターの開発：

確実に安定した遺伝子操作を可能にする新たな BGM システムの構築：BGM システムの問題点として YAC と同様に恒常的相同組換え酵素 RecA 活性による不必要な組換えがある。より確実に安定な遺伝子改変技術を達成するために、新たに誘導型 RecA 枯草菌株を構築する。

3. 研究の方法

研究の方法は以下の通りである。

巨大遺伝子操作技術の確立：

マウス BAC ライブラリーを操作対象とし、BAC クローンの BGM ベクターへの簡便な移行、遺伝子改変、そしてゲノム DNA 再構築 (Mb クローニング) と一連の基盤技術を確立する。特に従来法で達成されていない逆位法を新たに確立する。これによりランダムにクローニングされる BAC インサートの方向性を揃えることができ、連結操作によるゲノム DNA 再構築が可能となる。

さらに、ゲノム DNA の重複領域を利用した連結操作によってゲノム DNA の再構築を行い、従来法の限界を超える 1Mb 超のメガトランスジーン構築に挑戦し、メガトランスジェニックマウスの作製を試みる。

具体的には、マウス水棲型嗅覚受容体 (OR) 遺伝子クラスター (全長約 3 Mb) をカバーする BAC クローン (計 24 個) を BGM ゲノムベクターへ各々クローニングする。クローニングは、BAC インサートに隣接する BAC プラスミド配列を BGM ベクター上に組込んだ BEST6258 株 (Kaneko et al. 2009) を用いて行う。OR 遺伝子発現の下流にレポーター遺伝子として *IRES-tauEGFP* を挿入する。

次に、それぞれのマウスゲノムの重複領域を利用してゲノムベクター上で BAC クローンを連結し、ゲノム領域を再構築する。トランスジーンを拡張していくことで Mb スケールの巨大な“連結型”メガトランスジーンを構築する (図 2)。連結操作では、BAC インサートの方向が逆方向のクローンは連結できない。そこで本計画では、逆位操作法をインサートに対して適用し、連結するマウスゲノム領域の向きを揃える技術を確立する。具体的には逆位させる領域の両端に不完全テトラサイクリン Tet (5' 欠失、3' 欠失) を挿入し、Tet の重複領域を利用した相同組換えによる機能的 Tet を再構築 (復活) させることで逆位操作を達成する。

BGM ベクターのインサート領域の両端には、23 bp 認識配列を持つホーミングエンドヌクレアーゼ *I-PpoI* の認識部位が組み込まれている。トランスジーンを含む BGM ベクターを低融点アガロースを用いたアガロースプラグ法により精製し、*I-PpoI* によりトランスジーンをゲノムベクターから切り出して回収・精製する。マウス受精卵へマイクロインジェクションし、トラ

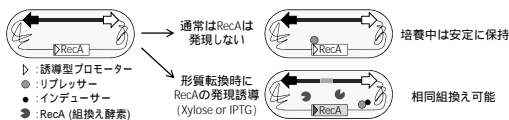
ンスジェニックマウスを作製する。レポーター遺伝子 *IRES-tauEGFP* は OR と同時に発現されるため、この発現を指標にしてトランスジェニックマウスを解析する。トランスジーン構築からマウス遺伝子改変までの一連の操作を通して BGM ベクターの有用性を実証する。

RecA 誘導型 BGM ベクターの開発：

確実に安定的な遺伝子操作を可能にする新たなシステムの構築を目指し、誘導型組換え系システムを組み込んだ新たな BGM ベクターを構築する。

具体的な実験方法は次の通りである。枯草菌の *recA* 遺伝子をキシロースおよび IPTG 誘導型プロモーターの下流へクローニングする。これらの誘導型プロモーターカセットを有するプラスミドにあらかじめ組み込まれている相同領域を利用して、BGM ベクターの *amyE* 遺伝子座へ *recA* 誘導カセットを挿入する。最後に薬剤耐性遺伝子で内在性の *recA* 遺伝子座を欠損させ、RecA が誘導型プロモーターによってのみ発現される BGM ベクターを構築する（下図）。

誘導型組換え酵素 RecA の発現はウエスタンブロットにより確認する。インデューサーの濃度や誘導時間を検討することによって、組換え操作を行える条件を見だし、誘導型相同組換えによる確実な遺伝子改変技術を確立する。インデューサーがない場合の発現の漏れや発現誘導時の形質転換効率を通常の BGM ベクターシステムと比較する。



4. 研究成果

巨大遺伝子操作技術および新たなトランスジェネシス法の確立：

本課題では、BGM ベクター上での挿入・欠失・逆位・連結（伸張）の全遺伝子操作が可能であることを実証し、従来法では困難であった逆向きに挿入されたクローン同士の連結によるゲノム DNA の再構築に成功しました。さらに再構築ゲノム DNA を用いた BGM トランスジェネシス法を確立し、ゲノム上最大の単一遺伝子クラスターを形成するクラス 1 嗅覚受容体遺伝子のエンハンサー領域の同定に世界で初めて成功した。連結による Mb 超のゲノム領域再構成については、計画どおりには進んでいないが、挿入の部分的欠失などの問題点が生じることがわかり、の課題で作成した改良型 BGM ベクターを用い、その有用性を検証する必要がある。従来、挿入・欠失・逆位・伸長（連結）の全ての遺伝子改変操作を一つのベクタ

ー上で行えるシステムは無く、また BAC や YAC では困難であった連結操作によるゲノム構造の再構築に成功しており、画期的な成果といえる。さらに BGM トランスジェネシス法の確立によって、BGM ベクターが BAC・YAC に次ぐ新たなゲノム工学ツールとして有用であることを実証しました。今後 BGM ベクター特徴を活かしたメガベーススケールでのゲノム DNA 工学への発展が期待できる。

RecA 誘導型 BGM ベクターの開発：

課題においてクローニングした DNA 断片に複数の相同領域が存在する場合、その部分を介した相同組換えによって DNA 領域の欠失が起こりうるということが明らかになった。そこで、本実験では、クローニングした DNA をより安定に保持できる BGM ベクターの開発をおこない、遺伝子操作をおこなうときのみ *recA* を誘導発現する新規 BGM ベクター、iREX (inducible RecA expression BGM vector) の構築に成功した。

ウエスタンブロット解析の結果、キシロース添加時のみ RecA が誘導され、キシロース非存在下では *recA* の発現は抑制されていた。またキシロース存在下でのみ DNA のクローニング操作が可能であり、既存の BGM ベクター同様巨大 DNA のクローニングを行うことができることを実証した。クローニングした DNA の安定性は、従来の BGM ベクターに比べて大幅に改善していた。さらに、iREX における挿入 DNA の安定性を利用して挿入 DNA 内に 1.9 kb 複数の相同配列を含むトランスジーン構築に成功した。今後 iREX をトランスジェネシスに応用することで、巨大トランスジーンを有するトランスジェニックマウスの作成が可能になると考えられる。

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 2 件)

Tetsuo Iwata, Shinya Kaneko, Yuh Shiwa, Takayuki Enomoto, Hirofumi Yoshikawa, Junji Hirota, *Bacillus subtilis* genome vector-based complete manipulation and reconstruction of genomic DNA for mouse transgenesis, *BMC Genomics* (2013) 14:300, DOI:10.1186/1471-2164-14-300

Takafumi Ogawa, Tetsuo Iwata, Shinya Kaneko, Mitsuhiro Itaya, Junji Hirota, An inducible *recA* expression *Bacillus subtilis* genome vector for stable manipulation of large DNA fragments, *BMC Genomics* (2015) 16:209, DOI: 10.1186/s12864-015-1425-4

〔学会発表〕(計 5 件)

岩田哲郎、金子真也、志波優、榎本孝幸、吉川博文、廣田順二、枯草菌ゲノムベクターを用いたマウス水棲型嗅覚受容体遺伝子の発現制御領域の解析、日本味と匂学会第47回大会、仙台市（2013）

小河貴郁、岩田哲郎、金子真也、廣田順二、RecA 誘導型枯草菌ゲノムベクターシステムの開発、第36回日本分子生物学会年会、神戸市（2013）

岩田哲郎、廣田順二、マウス Class I 嗅覚受容体遺伝子の発現制御領域の探索、第1回ケモビ研究会、箱根（2014）

小河貴郁、岩田哲郎、金子真也、廣田順二、Development of an inducible *recA* expressing BGM vector system and its application to transgenesis、第37回日本分子生物学会年会、横浜市（2014）

岩田哲郎、廣田順二、マウス Class I 嗅覚受容体遺伝子の発現制御領域の解析、第2回ケモビ研究会、箱根（2015）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕
出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.hirota.bio.titech.ac.jp/cn8/bgm.html#>

<http://www.hirota.bio.titech.ac.jp/cn8/irex.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

廣田 順二 (HIROTA, Junji)
東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授
研究者番号：60405339

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
金子 真也 (KANEKO, Shinya)
東京工業大学・生命理工学研究科・助教
研究者番号：10399694