

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：85403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871247

研究課題名(和文) 部位特異的組換え酵素の細胞内直接導入メカニズムの解明と人工ヌクレアーゼへの応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of Cre-loxP recombination by direct introduction of Cre recombinase and application to artificial nuclease (TALENs) in *Aspergillus oryzae*

研究代表者

水谷 治 (Mizutani, Osamu)

独立行政法人酒類総合研究所・研究部門・主任研究員

研究者番号：10443996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：部位特異的組換え酵素(Cre酵素)を、核酸(DNA)を酵素キャリアとして麹菌核内に直接導入し、高効率でゲノム上のマーカー遺伝子を除去する技術を開発した。このメカニズムを解明することで、ゲノム編集に関わる酵素(TALEN)に応用できないか取り組んだ。酵素キャリアに関しては、DNAだけでなくRNAやヘパリンでも代替が可能であった。また、導入酵素の電荷を上げる事や酵素濃度を上げる事で酵素キャリアを利用せずに直接導入が可能であることを示した。一方、TALENでは、麹菌で一過性発現によりゲノム編集が可能であることを確認し、精製酵素の準備を行った。今後、精製酵素を用いて麹菌に直接導入を試みる。

研究成果の概要(英文)：We developed a simple method to use the Cre-loxP recombination system for marker gene rescue in *A. oryzae* by direct introduction of Cre into protoplasts using DNA as a carrier for the enzyme. To apply the simple method to artificial nucleases (TALEN) for genome editing, we examined kinds of the carrier and conditions of Cre without the carrier for direct introduction. In the carrier, RNA and heparin as well as DNA were available for the carrier. We showed that to raise the electric charge and the concentration of Cre was available for the direct introduction without using the carrier. In addition, because the genome editing of *A. oryzae* via the error of nonhomologous end-joining repair by a transient expression of TALENs was confirmed, the recombinant TALENs were purified. Hence, we will perform the direct introduction for the genome editing of *A. oryzae* using the purified TALENs.

研究分野：農学

キーワード：遺伝子工学 麹菌 マーカーリサイクリング Cre/loxP システム 人工ヌクレアーゼ (TALEN)

1. 研究開始当初の背景

(1) 部位特異的組換え酵素とそのターゲット配列を用いた遺伝子組換え技術は、多くの生物において幅広く用いられている。特に Cre-loxP システムは非常に研究が進んでおり、糸状菌においてもマーカー遺伝子回収技術の一つとして利用されている。Cre-loxP システムとは、P1 ファージ由来のリコンビナーゼ Cre と 34 bp からなる loxP 配列を用いた 2 成分の組換え反応系である。Cre 酵素は同一 DNA 上に 2 つの loxP サイトが存在する場合、同一方向で切除反応、逆方向で反転反応を触媒する。また、異なる DNA 間で loxP サイトが存在する場合は、挿入反応を触媒する。このシステムの切除反応を利用したマーカー遺伝子回収では、一般的に loxP 配列を有したターゲット株内に Cre 発現プラスミドを導入し、誘導条件において Cre を発現させ、マーカー遺伝子回収株を選抜後、プラスミドを脱落させるといった多くの行程が必要となっている (図 1 の左図)。このような煩雑な行程を解消するために、申請者は Cre 酵素そのものを細胞の外部から細胞の内部に導入する事が出来れば、極めて効率的になると考え、Cre 酵素の細胞内直接導入法を検討した。その結果、核酸を酵素キャリアとして Cre 酵素タンパク質を細胞へ導入する事で、Cre 酵素タンパク質を効率良く核内に導入しうる事を見出し、簡便、且つ迅速に Cre-loxP システムを利用できる方法を開発した (図 1 の右図)。

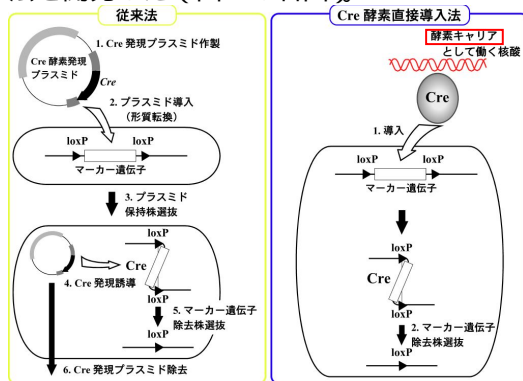


図1:従来法と Cre 酵素直接導入法の比較概略図

(2) Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) は、植物病原菌キサントモナス属が有する任意の塩基配列を認識する DNA 結合ドメイン (TAL effector) に、2 量体時に DNA 切断活性を示す酵素 Fok I のヌクレアーゼドメインを融合させた人工キメラタンパク質であり、人工ヌクレアーゼとも呼ばれている。TAL effector タンパク質は、34 アミノ酸が繰り返した構造部分を持ち、この繰り返し構造の 1 つ 1 つがそれぞれ DNA のひとつの塩基を認識する。DNA には 4 種の塩基 (A,T,G,C) があるが、TAL effector の繰り返し構造の 13 番目と 14 番目の 2 つのアミノ酸によって、DNA 配列の結合特異性

が決定される。つまり、各繰り返し構造の 13-14 番目のアミノ酸を選択する事で、人工的に TAL effector を好きな DNA 領域に結合させることが出来る。切断された DNA は、相同組換え (Homologous recombination; HR) 又は非相同組換え (Nonhomologous end joining; NHEJ) により修復されるが、この時に目的の遺伝子を改変することが可能となる。即ち、NHEJ 修復エラー (修復時の削り込み等) やドナー DNA を導入することで HR による目的遺伝子の改変、ノックアウトが可能となる。また、申請書提出後の翌年に、真正細菌や古細菌が有する獲得免疫 (外来 DNA の排除機構) である CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein) システムの一部を応用したゲノム編集ツール CRISPR/Cas9 が報告された。

2. 研究の目的

申請者が開発した Cre 酵素直接導入法における Cre-loxP システムを用いた部位特異的遺伝子組換え技術は、市販 Cre 酵素、酵素キャリアとなる核酸、PEG 溶液をプロトプラスト化した麹菌細胞と混合し、以後の操作は形質転換法 (プロトプラスト・PEG 法) を模した形で行われる。しかしながら、Cre 酵素を細胞外から導入する際に、なぜ核酸の共存が必要か、酵素のみで直接導入するにはどのような条件が必要か等については、明らかにされていない。本現象は今回初めて見出されたものであり、本研究では、このメカニズムを明らかにする事を目的とする。このメカニズムが解明されれば、細胞内 (核内) に導入されやすい酵素の作成や核酸以外のキャリアの開発を行う事が出来る。また、これら技術開発を人工ヌクレアーゼ (TALENs) に応用できれば、遺伝子を導入しない、即ち遺伝子組換え体でない有用菌株の造成が可能になるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

(1) loxP を搭載した *sC* マーカー遺伝子を麹菌染色体上の *ligD* 遺伝子と置換することで酵素キャリアの検討に必要な株を造成した。*sC* マーカー遺伝子は、硫酸塩資化に必要な ATP sulfurylase をコードし、その欠損は、セレン酸に対して耐性を示す。この株を用いて、酵素キャリアの種類、リコンビナント His-tag 体 Cre 酵素の検討、リコンビナント Cre 酵素を用いた酵素量の検討を行った。Cre 酵素直接導入の効率、*sC* マーカー遺伝子の除去率、即ち、セレン酸耐性株数と PCR にて実際にマーカー遺伝子が除去されたかにより確認した。

(2) リコンビナント Cre 酵素の発現精製は、大腸菌用発現ベクター pColdI を用いて、IPTG と低温シフトによる誘導にて発現を行った。His タグ体のリコンビナント Cre 酵素

の精製は、コバルトカラム及びヘパリンカラムを用い、リコンビナント Cre 酵素の精製は、イオン交換クロマトグラフィー及びヘパリンカラムを用いて行った。

(3) 麹菌において、TALEN を用いてゲノム編集が可能かを検証した。TALs の設計は TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 を用いた。TALEN の麹菌への直接導入を行うために、リコンビナント TALEN の発現精製を行った。Cre 酵素と同様に大腸菌用発現ベクター pColdI を用いて、IPTG と低温シフトによる誘導にて発現を行った。精製は、コバルトカラム及び Flag アフィニティゲルを用いて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 酵素キャリアの検討

酵素キャリアとして働く核酸と Cre 酵素の関係性を調べるために、市販 Cre 酵素と DNA (pUC18 等) を混合し、アガロース電気泳動に供した。その結果、DNA のバンドがシフトしたことから、Cre 酵素は、loxP 配列を含まなくとも DNA と相互作用していることが示唆された。続いて、酵素キャリアが核酸の場合、麹菌ゲノム上に非相同で導入される可能性や最終目標である酵素直接導入による遺伝子導入のない有用菌株の造成に向けて、核酸以外の酵素キャリアが存在するかの検討を行った。検討の結果、rRNA や核酸との親和性が高いヘパリンも酵素キャリアとして機能することを見出した (Table 1)。

Table 1 酵素キャリアの検討

Carrier	No. of colonies with sC marker removed (%)	No. of selenate-resistant colonies	
		Tested	Obtained
DNA (pUC18 plasmid)	103 (100%)	103	234
DNase treated 16S, 23S rRNA from <i>E. coli</i>	50 (100%)	50	50
Heparin	47 (94.0%)	50	180
None (Only Cre enzyme)	8 (50%)	16	16*

\*: 5 回試行の平均値

##### (2) Cre 酵素単独導入の高効率化

酵素キャリア検討時に、酵素キャリアを用いた時と比べて効率はかなり低くなるが、Cre 酵素単独でもマーカー遺伝子の回収が可能であることが明らかとなった (表 1)。そこで Cre 酵素単独で、より効率よく導入できる方法を探索した。まず始めに、Cre 酵素 (pI: 9.6) のタンパク質表面電荷をよりプラスにする His タグ付きの Cre 酵素 (pI: 9.66) の準備を行い、マイナスに電荷している麹菌プロトプラスト細胞膜と Cre 酵素との相互作用の増加に伴い、効率が上昇するかを調べた。その結果、His タグ体のリコンビナント Cre 酵素では、市販 Cre 酵素と比較して得られるマーカー遺伝子除去候補株は約 4 倍に増加

し、候補株に占めるマーカー遺伝子除去株の比率も 20% 程度上昇した。これは Cre 酵素に付加した正電荷に富む His タグにより負電荷に富む細胞膜表面との静電的相互作用が増した結果、取り込まれる量が増えたと示唆された。続いて、導入する酵素量の検討を行った結果、リコンビナント Cre 酵素量、酵素キャリアを用いる場合の酵素量の 16 倍にすると、酵素キャリアを用いた時とほぼ同程度のマーカー遺伝子除去効率が観察された (Table 2)。

Table 2 Cre 酵素量の検討

rCre w/o His conc.	No. of colonies with sC marker removed (%)	No. of selenate-resistant colonies	
		Tested	Obtained
1×	3 (50%)	6	6
16×	50 (100%)	50	>700

##### (3) 麹菌における TALEN を用いたゲノム編集

Cre 酵素直接導入法が人工ヌクレアーゼ (TALEN) での応用が可能かに取り組む上で、麹菌で TALEN がうまく機能するか不明であった。そこでまず始めに、麹菌において TALEN を用いて、ゲノム編集が可能かを調べた。RIB40 株を宿主に用い、sC 遺伝子をターゲット遺伝子とし、非相同末端結合 (NHEJ) による修復エラーを引き起こすコンストラクトで、糸状菌コドン使用頻度に最適化された高活性型 Platinum-Fungal TALENs を用いてゲノム編集を行った。麹菌への導入は、2 つの TALEN 発現カセットを染色体に組み込むことなく、一過性的に TALEN を発現させた。sC 遺伝子が破壊されると、セレン酸耐性になることを利用してセレクションを行い、得られた株の 95% 以上で切断活性があることが示唆された。更に、欠失が見られた株の約半分の割合で 1 ~ 5 kb もの大規模欠失が引き起こされていることが観察された。このような大規模欠失は、酵母や高等生物ではほとんど見られず、糸状菌特有の現象と思われた。

##### (4) リコンビナント TALEN の精製と直接導入

麹菌において、TALEN を用いたゲノム編集が可能であることが明らかにされたので、大腸菌を用いて同ターゲット領域を認識するリコンビナント TALEN の発現・精製を行った。その結果、微量であるが、精製 TALENs を得ることが出来た。そこで、精製 TALEN 単独及び核酸等のキャリアを用いて、麹菌に直接導入実験を行った。その結果、残念ながらゲノム編集株を見出すことが出来なかった。今後は、Cre で得られたデータを元に、精製 TALEN 量を増加させる、または、市販 Cas9 を用いて、CRISPR/Cas9 による直接導

入によるゲノム編集が行えるかを検討して  
いきたい。

## 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 3 件)

水谷 治、荒添貴之、利田賢次、林 梨咲、大里 修一、佐久間哲史、山本 卓、桑田 茂、山田 修、TALEN を用いた麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるゲノム編集、第 4 回 ゲノム編集研究会、2014 年 10 月 6-7 日、広島

水谷 治、荒添貴之、利田賢次、林梨咲、大里修一、佐久間哲史、山本 卓、桑田茂、山田 修、Platinum-Fungal TALENs を用いた麹菌におけるゲノム編集、第 67 回日本生物工学会大会、2015 年 10 月 26 - 28 日、鹿児島

利田 賢次、林 梨咲、五味 勝也、山田 修、水谷 治、麹菌の Cre 組換え酵素直接導入法における応用開発、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 27-30 日、札幌

〔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

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

水谷 治 (MIZUTANI OSAMU)

独立行政法人酒類総合研究所・研究部門・  
主任研究員

研究者番号：10443996