

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651205

研究課題名(和文)ホーミングエンドヌクレアーゼ遺伝子を利用した集団規模遺伝子操作ベクターの実現

研究課題名(英文)Development of vectors self-spreading into population by utilization of a homing endonuclease

研究代表者

従二 直人(Juni, Naoto)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90572199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子導入によって病害虫などの自然生物集団の繁殖力や病原性をコントロールすることを想定したベクターの開発を試みた。遺伝子導入は限られた個体数にしかおこなえないので、集団中に広く行きわたらせることができない。本研究では、生殖を通じて集団内での頻度を自ら上昇させ、少数個体に導入されれば集団中に広まっていく利己的遺伝因子の性質をもつベクター系の構築をめざした。本研究では、酵母の利己的遺伝因子であるホーミングエンドヌクレアーゼを利用したベクターを構築しこれをショウジョウバエ導入したモデル系の作製を試みたが、期間内では期待どおりに作動する系を得ることはかなわなかった。

研究成果の概要(英文)：We attempted to develop a vector system self-expanding into insect populations that might be applicable to pest control in future. Self-expanding vectors should enable population-wide genetic manipulation by introducing a transgene into only a small fraction of population. To confer such property, we considered utilizing naturally occurring "selfish genetic elements", which gradually increase their own genetic frequency in population by generations. In this study, we designed and constructed several versions of model vectors comprising a homing endonuclease gene from yeast, which is one of the natural selfish genetic elements, introduced them into *Drosophila* and observed their behavior. Unfortunately, no successful self-expanding vector has been obtained so far.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：集団規模遺伝子操作 ベクター開発 利己的遺伝子 ホーミングエンドヌクレアーゼ ショウジョウバエ

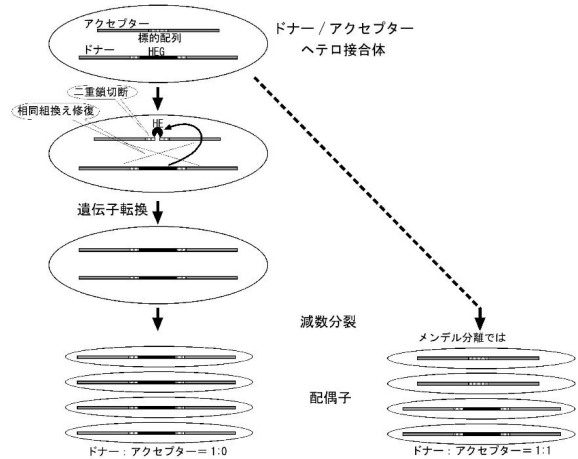
1. 研究開始当初の背景
 害虫などの自然生物集団の規模縮小や病原性コントロールを遺伝子操作によって行おうという研究は数多くなされているが、実現するための障壁の一つは、いかにして集団規模での遺伝子操作を可能にするかである。この問題の解決策となりうるのが、生物界に存在する多種多様な利己的遺伝因子 (selfish genetic elements: SGE) をベクターに応用することである。SGE は少数個体に導入されるだけで、世代を経るにつれ集団内で遺伝子頻度が上昇し広く浸透していく。しかし当時、実験的に成功した SGE ベクターの例は、コクヌストモドキ *Medea* タイプの人工 SGE ベクターをショウジョウバエに導入したモデル実験のほかはなかった。SGE ベクターの可能性を拡張するためには、広範な生物種に適用可能で作用原理も多様な SGE ベクターの開発が待たれていた。私たちは、SGE の一種である ホーミングエンドヌクレアーゼ遺伝子が作用機序の単純さから SGE ベクターの駆動力として有望であると考えた。

2. 研究の目的
 ホーミングエンドヌクレアーゼ遺伝子 (homing endonuclease gene: HEG) を応用して、少数個体に導入するだけで標的集団全体に人為的な遺伝子操作を浸透させることが出来るベクター系と方法論を確立し、害虫などの自然生物集団を遺伝子改変技術でコントロールする手段の実現をめざす。

3. 研究の方法
 酵母の HEG である I-SceI をコードする遺伝子とその認識配列を、それぞれ染色体の相同部位に導入したモデル系を作出することを試みた。
 酵母 HEG である I-SceI 遺伝子は 18 塩基対の特異的標的配列を認識して切断するエンドヌクレアーゼをコードする。I-SceI 遺伝子は、標的配列の切断点に挿入した形になっている。HEG 遺伝子を持つアリル (ドナーとする) と、それを持たず認識配列が残っているアリル (アクセプターとする) がヘテロ接合となると、ドナーが発現するホーミングエンドヌクレアーゼ (HE) がアクセプターに作用し二重鎖切断を生じる。こうして出来た二重鎖切断はある頻度をもってドナー側の配列で相同組換え修復されるため、アクセプターアリルがドナーにアリル転換する。このため、ヘテロ接合体から生じるドナー配偶子とアクセプター配偶子は、メンデル分離に従った 1:1 にはならず、相同組換え修復によ

ってアリル転換が生じた頻度に応じてドナー配偶子の方が多くなる。自由交配で世代を重ねるごとに集団中のドナー遺伝子の頻度が高くなっていく (図 1)。この系を利用して利己的に遺伝子頻度が上昇していくベクターのモデル系の構築を意図した。

(図1) 遺伝子転換によって HEG 頻度が増すしくみ



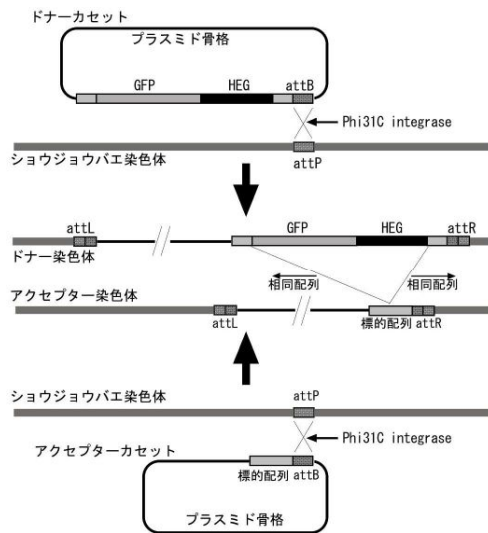
このために、I-SecI 遺伝子とドナーベクターの存在を示すマーカー遺伝子 (緑色蛍光タンパク質 GFP 遺伝子、ショウジョウバエ眼色遺伝子 *white* など) を I-SecI によって切断される標的配列の間に組み込んだ構造を含むドナーカセットベクターと、I-SecI の標的配列を含むアクセプターカセットベクターを設計・構築した。モデル宿主としては、遺伝子操作がしやすいキイロショウジョウバエを選んだ。

これら二者のベクターをキイロショウジョウバエゲノムの相同位置に挿入した系統を作成した。このために、配列特異的組換えを利用した遺伝子導入法である PhiC31 インテグラーゼを利用した系を利用した。これは、あらかじめ染色体の特定部位に PhiC31 インテグラーゼの標的配列である attP が挿入され、さらに PhiC31 インテグラーゼ遺伝子が導入された系統を用いる。ベクターには attP 配列と対になって組換えを起こす標的配列である attB を組み込んだベクターを導入しておく。このベクターを上記ショウジョウバエ系統の胚に微小注射すると、ある頻度で生殖細胞で attP と attB の間の組換えによってベクターがゲノムに組み込まれた系統を得ることができる。このようにして、ドナーカセットベク

ーとアクセプターカセットベクターをそれぞれ、染色体の相同部位に組み込んだショウジョウバエ系統を作製することを試みた。(図2)。

このような系統が確立すれば、両者を交雑系統の集団継代飼育を行い、HEを含むドナーベクターの遺伝子頻度を継代的に追跡し、導入ベクターの遺伝子頻度が上昇していくことを実証することを意図した。

(図2) 外来性HEGモデル系構築の概略



4. 研究成果

病害虫など自然生物集団の規模縮小や病原性コントロールを、遺伝子導入、遺伝子改変という手段でおこなうというアイデアは、社会的な受容という面はさておき、技術的には様々な手段で実現可能なところに来ている。しかしながら、自然生物集団という大規模な個体群にたいして、いちいち遺伝子導入、遺伝子改変をおこなうという事は現実的ではないために、いかにして標的集団に遺伝子改変をゆきわたらせるかということは、技術的なネックとなっていた。

人為的に操作された遺伝子を標的集団に広める方法論として、利己的遺伝因子 (selfish genetic elements: SGE) をベクターに応用するということについて、理論面からの可能性は数多く論じられてきた。しかし、外来性SGEを応用したベクターの実験的な検証や人工的SGEベクターの成功例はこれまでほとんどなかった。これは、ひとつにはSGEが種特異的に進化してきたため他種に適用したり、人工的な改変を加えることが難しいという側

面があると考えた。また人工的SGEベクター系の試みとして、天然のSGEからの改変ではなく、RNAiを利用した全くの人工的な系も既報があったが、ベクターの動作機序がやや複雑で、ベクターの設計も容易でなかった。

本研究は、この問題に取り組む試みとして意義があったと考える。二重鎖切断とその修復という汎生物的な機構によって人工的SGEベクターを実現出来れば、実用化は現実味を帯びる。モデル系として、酵母由来ホーミングエンドヌクレアーゼ遺伝子 (homing endonuclease gene: HEG) を駆動力とするベクターを作成し、これを異種宿主であるキロショウジョウバエで動作させるという着眼点は悪くなかったのではないかと考えている。

研究の実際では、まずドナーカセットベクターとアクセプターカセットベクターの構築をおこなった。素材となる配列を、他のベクターからPCRなどで増幅すること、あるいはオリゴDNA合成によって得て、これをプラスミド骨格の上に構築した。

このようにして構築されたベクターをキロショウジョウバエに導入するという段階でかなり難航し、ベクター導入体が容易に得られなかった。これは、ベクターの設計で、サイズや要素の配置上の問題があったと思われるため、ベクターに改変を加えていき順次、宿主に導入することを試みた。結局、ベクター導入効率の低さの原因は突き止められず、効率を改善することはできなかった。遺伝子導入技術の未熟さがあったのではないかと反省している。

また、ようやく得られたベクター遺伝子導入個体では、継代飼育によって遺伝子頻度の上昇を示す結果は得られなかった。検討の結果、ベクターの設計などに問題があった可能性のほか、遺伝子導入の時に不正な組換えが起こって、ベクターの構造に欠陥が生じた可能性が示唆された。原因の解明と改善策は今後の課題である。

残念ながら、結局、本研究の期間中に、目指していた人工的SGEベクターのモデル系の作出には成功できなかった。この間、本研究とほぼ同様のアイデアによるHEGを利用した人工的SGEベクター系のモデル実験の報告が、複数の海外研究グループによって出版された。いま一步、出遅れた感がある。今後の展開としては、天然の標的配列とHEGの特定の組合せを用いたモデル系ではなく、任意の標的配列とそれを切断する人工酵素を用いた、汎用性や実用性の高い系の開発に力点をおくべ

きであろう。

5．主な発表論文等

6．研究組織

(1)研究代表者

從二 直人 (JUNI, Naoto)

京都大学・大学院工学研究科・研究員

研究者番号：90572199

(2)研究分担者

梅田 真郷 (UMEDA, Masato)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：10185069