

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：82508

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310143

研究課題名(和文)新規部位特異的組換えシステムを基にしたゲノムエンジニアリング・テクノロジーの開発

研究課題名(英文) New site-specific recombination systems for genome engineering, VCre/VloxP and SCre/SloxP

研究代表者

中山 学 (NAKAYAMA, MANABU)

公益財団法人かずさDNA研究所・技術開発研究部・チーム長

研究者番号：30370927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円

研究成果の概要(和文)：部位特異的組み換えシステムはゲノム中の特定の領域を除去及び反転させることができるテクノロジーであり、生体内でのゲノム改変に用いられてきた。我々は従来使用されてきたCre/loxPと認識サイトが異なるために同一の細胞で用いることができる新しい部位特異的組み換え酵素システムを開発した。マウス個体においても使用できることを明らかにするためにVCreとSCre発現マウスならびレポーターマウスを作製した。更に疾患モデルマウスの作製に必要とされる緻密で複雑なゲノム改変を行うためにこれらのツールが非常に有用であることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Two popular tools used in genomic engineering are the Cre/loxP and Flp/FRT site-specific recombination systems, which are often used to develop conditional knockout mice. Alternative combinations of recombination systems, in addition to the Cre/loxP and Flp/FRT systems, can be useful tools for genetically modifying genomes. We have developed two novel site-specific recombination systems named VCre/VloxP and SCre/SloxP for genome engineering. VCre and SCre recombinases originate from *Vibrio* sp. and *Shewanella* sp. ANA-3, respectively. Because their recognition sites are different from Cre recognition sites, we can use these site-specific recombination systems simultaneously. Moreover, we have identified some additional site-specific recombination systems derived from other species. These new site-specific recombination systems can serve as powerful tools for genome engineering, especially when used to genetically modify both alleles of a single gene in mouse and human cells.

研究分野：機能ゲノム学

キーワード：バイオテクノロジー 変動物 ゲノム編集 部位特異的組み換え ゲノム操作技術 病態モデル動物 有用遺伝子探索 染色体工学 遺伝子改

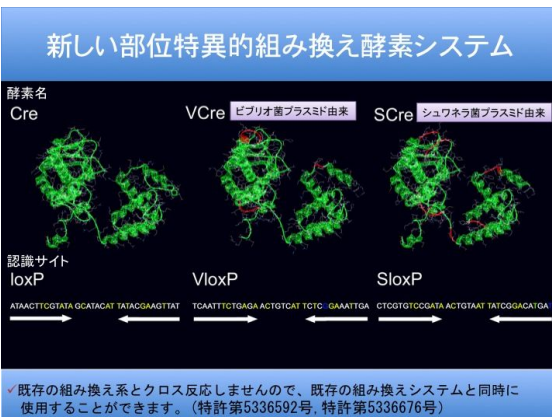
1. 研究開始当初の背景

Cre/loxP や Flp/FRT システムは、部位特異的にゲノムを改変することができる広く汎用されているテクノロジーであり、Cre や Flp 組み換え酵素依存的に 3 4 塩基の組み換えサイトに挟まれた領域を除去、反転することができる。とりわけマウスのコンディショナル KO の実験では、コアとなる技術であり Cre/loxP がエクソン除去のために、Flp/FRT が (発現を邪魔する可能性がある) 薬剤耐性遺伝子の除去のために両者のシステムが同時に用いられている。

我々が実際に様々な遺伝子改変マウスを製作し部位特異的な組み換えシステムを多用する中で、これらの 2 種類以外に認識サイトが異なる新規の部位特異的組み換えシステムが存在するならば、より緻密なゲノム改変ができる可能性に気が付くことができた。そこで、Cre/loxP と認識サイトが異なり、同一細胞内で使用することができる新しい部位特異的組み換え酵素システムを開発した。ピブリオ菌とシュワネラ菌に含まれるプラスミド由来の蛋白質は Cre 蛋白質と 30% 程度の弱い相同性を示すことに注目し、それらの特異的組み換えサイトをバイオインフォマティクスのアプローチにより同定した後、HEK293 細胞で実験的に確認することができた。研究開始当初において、このようなバイオインフォマティクスのアプローチで新規部位特異的組み換え酵素とその組み換えサイトを同定する試みは私達の知る限りにおいて全くされていなかった。

2. 研究の目的

我々が開発した新規部位特異的組み換えシステムである VCre/VloxP と SCre/SloxP が実際にマウスで有用なツールとして使用できることを実証し、ヒトゲノム解析結果から得られた知見を基にした疾患モデルマウスの作製に必要なとされる緻密で複雑なゲノム改変が行えることを明らかにする。更に、他のゲノム改変テクノロジーやバイオテクノロジーと組み合わせることにより、新たなテクノロジーの開発を目指し、VCre/VloxP と SCre/SloxP 部位特異的組み換えシステムを用いた様々なアプリケーション例を示す。



3. 研究の方法

(1) VCre と SCre 発現マウスとレポーターマウスの作製

我々は Cre/loxP と認識サイトが異なり、同一細胞内で使用することができる新しい部位特異的組み換え酵素システム、VCre/VloxP と SCre/SloxP を開発してきている。これらの VCre/VloxP と SCre/SloxP システムが実際にマウスで有用なツールとして使用できることを実証するために、VCre や SCre 発現マウス、ならびにマウス内で組み換え反応が起きたことを検出するためのレポーターマウスを作製した。VCre および SCre 発現マウスの作製のためには幾つかのアプローチを用いた。最初に試みたのはトランスジェニックマウスのアプローチである。マウスの全組織で発現させるために CAG プロモーターを用いた VCre と SCre 発現トランスジェニックマウスを複数ライン作製し、マウスの心臓、脾臓、筋肉組織を用いたウエスタン法を用いて発現を検出した。検出用の抗体としては新たに作製した VCre 蛋白質と SCre 蛋白質の C 末端部分を特異的に認識する抗体だけでなく、VCre と SCre 遺伝子の N 末端部分に付加されている FLAG タグ抗体を用いたが発現は見られなかった。そのために第 2 のアプローチとして、ROSA26 遺伝子座に VCre と SCre 遺伝子をノックインさせて、これらの部位特異的組み換え酵素蛋白質を発現させる試みを行った。プロモーターとしては同じく CAG プロモーターを用いた。ES 細胞では正しく相同組み換えが行われた陽性クローンが得られ、キメラマウスを作製している段階である。また、誘導型の発現マウスも必要であるために、タモキシフェンで誘導できる VCreERT2 マウスも作製した。

一方、レポーターマウスに関しては VCre/VloxP 反応によって STOP カセットが除かれて EGFP が発現する仕組みのコンストラクトのために 2 個の VloxP サイトで挟まれた STOP カセットが CAG プロモーターと EGFP の間に配置されたターゲティングベクターを作製し、ROSA26 遺伝子座にノックインさせて VCre 用のレポーターマウスを作製した。このレポーターマウスの検定のために 1 3 日目の胎仔マウスから初代培養細胞を作製した後、リポフェクタミン 2000 法を用いて pTurboVCre プラスミドを細胞に導入して VCre 蛋白質の一過的な発現をさせた。VCre 蛋白質の発現によりレポーターマウス由来の初代培養細胞内で部位特異的な組み換えが起こり、蛍光顕微鏡下で EGFP の蛍光が観察されることを確認できた。

SCre レポーターマウスも基本的には VCre レポーターマウスと同様に ROSA26 遺伝子座にノックインさせているが、SloxM1 サイトで STOP カセットを挟んでいる点とレポーター

として赤色蛍光蛋白質である tdTomato を用いている点で異なる。正しく相同組み換えが行われた ES 細胞の陽性クローンが得られ、キメラマウスが生まれてきている。

(2) 好熱菌を含む様々な細菌由来の新規部位特異的組み換え酵素システムの開発

In silico で組み換え酵素システムを見つける本実験手法が単に他の生物種から類似蛋白質を見つける従来の相同性検索だと誤解される可能性があるが、本実験手法の最も難しい点は候補の蛋白質が認識する認識サイトを同定する点である。30%程度のアミノ酸の類似性では、候補蛋白質が Cre タイプの酵素であるか、他の蛋白質が必要である XerD 型インテグレースタイプなのか、認識サイトが比較的長いインテグロンタイプであるのかを区別することができない。また、実際には認識サイトはプラスミド中のどこにあるのか、どのような配列かは全く分からない。しかも、loxP と同じ 13-8-13 の構造になっているかも確かではない。我々は既に VloxP と SloxP サイトを同定した経験に基いて再度他の組み換え酵素の同定を目指した。実験結果として、メタノール資化性菌であるメチロバクテリウム、常温紅色光合成細菌、ダイオキシシン類分解菌として知られているスフィンゴモナス、オレンジジュース等の高熱殺菌でも生き残ることが問題視されている高温好酸性細菌アリシクロバチルスその他、別種のビブリオ菌と 3 種類の腸内細菌由来の合計 8 種類のプラスミド由来の認識サイトを実験的に同定した。細菌が分類上近いと認識サイトも似ている傾向があるために腸内細菌由来の 3 種類の酵素は同じ腸内細菌のファージ由来である Cre や Dre とクロス反応が想定されるが、分類上遠い細菌由来の組み換え酵素は既存の組み換えシステムとクロス反応が起こらない可能性が高いと考えられる。興味深いことに 2 種類の酵素の認識サイトは 13-8-13 の構造ではないことが我々の大腸菌内での組み換え実験から示唆されている。

(3) 人工染色体(HAC)テクノロジーとの融合

次に VCre/VloxP と SCre/SloxP システムの有用性を実証するために、人工染色体(HAC)に導入して RMCE(組み換え酵素依存的な力セット交換)法を用いて、効率的に外来の遺伝子を HAC 上へ導入することができる改良型の HAC を作製した。VloxP-DsRed-SloxP あるいは VloxP-DsRed-Vlox2272 を HAC 上に導入した HEK293 細胞を作製した。この細胞は DsRed の遺伝子が発現しているために赤色の蛍光が観察される。交換用のスワップベクターは VloxP-EGFP-SloxP あるいは VloxP-EGFP-Vlox2272 を配置したものをを用いた。VCre と SCre 発現用のプラスミドと交換用のスワップベクターを導入することにより EGFP の蛍光が観察されて、DsRed の蛍光が無くなる細

胞の割合を測定した結果、約 10% の極めて高効率で外来遺伝子が導入できる系を構築することができた。

4. 研究成果

ゲノムエンジニアリング技術は基礎研究だけでなく、将来的な産業応用や治療の分野等に幅広く応用が期待されている。ノックアウトマウスの技法を用いて標的の遺伝子を欠損させた後に、マウス個体レベルでの影響を調べる手法は一般的に用いられてきているが、多様な病気のゲノム解析が進むにつれて、病態モデルマウスを作製するためには、より緻密なゲノム改変が求められるようになってきている。本研究課題では従来用いられてきた Cre/loxP と Flp/FRT とクロス反応が起きない新規部位特異的組み換え酵素システムである VCre/VloxP と SCre/SloxP システムが有用なツールであることを示すことができた。更に好熱菌を含む様々な細菌由来の新規部位特異的組み換え酵素、8 種類とそれらの認識サイトを同定することが出来た。また、人工染色体(HAC)ベクターに導入することにより、RMCE(組み換え酵素依存的な力セット交換)法を用いて、高い効率で外来遺伝子を導入することができる改良型の人工染色体(HAC)ベクターを構築することができた。VCre および SCre 発現マウスとレポーターマウスを交配させることにより、マウス個体内でもこれらの部位特異的な組み換え酵素システムが使用できることが証明できると思われるので、様々な応用が期待できる。また、BAC のように非常に大きな DNA を含むクローンに変異を導入したり、組み換えサイトを導入させたい場合には短いプラスミドで行われているような制限酵素ベースの構築は難しいことが多い。このような BAC の改変において、新規部位特異的な組み換え酵素システムは非常に有効である。大腸菌内の相同組み換えである Red/ET 組み換えの手法と組み合わせることにより、我々は日常的に VCre/VloxP と SCre/SloxP システムを使用して BAC クローンの改変やターゲティングベクターの作製を行っている。

更に変異型認識サイトである Vlox2272 や Slox2272 も我々は開発していることから、Cre/loxP の実験系で考案された様々な実験手法が VCre/VloxP と SCre/SloxP システムでも用いることが出来る。これらの新規部位特異的組み換えシステムを用いて 1 つの遺伝子の両方の染色体をそれぞれ改変し、両アレルのゲノム改変を個別に制御することができる等の幅広い応用が可能になることが期待できる。VCre/VloxP と SCre/SloxP とゲノム編集ツールとの組み合わせの技術を含めてゲノム改変技術への応用に関して様々なアプリケーションが利用可能となると考えられる。将来的にヒトゲノム解析の結果から得られるであろう複雑な病気のメカニズムを疾患モデルマウスの作製を通して明らか

にするために必要とされる緻密で複雑なゲノム改変を行うために、我々の開発した有用なツールはその手段を提供できるものと期待できる。

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 1件)

Hasegawa Y, Ishikura T, Hasegawa T, Watanabe T, Suzuki J, Nakayama M, Okamura Y, Okazaki T, Koseki H, Ohara O, Ikeno M, Masumoto H. Generating a transgenic mouse line stably expressing human MHC surface antigen from a HAC carrying multiple genomic BACs.

Chromosoma. 査読あり Vol. 124(1): 107-118. (2015) doi: 10.1007/s00412-014-0488-3.

[学会発表](計 3件)

(1)発表者: 中山 学、発表表題: 次世代シーケンサー(MiSeq)を用いた原発性免疫不全症の遺伝子解析、第8回日本免疫不全症研究会、2015年1月24日、発表場所: 東京都千代田区

(2)発表者: 中山 学、発表表題: 部位特異的組み換えシステム(VCre/VloxP・SCre/SloxP)を用いたゲノム改変技術の開発と応用、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月2日、発表場所: 兵庫県神戸市

(3)発表者: 中山 学、発表表題: 新しい部位特異的組み換えシステム(VCre/VloxP・SCre/SloxP)を用いたゲノム改変技術の開発、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月13日、発表場所: 福岡県福岡市

[その他]

ホームページ等

http://www.biosupport.kazusa.or.jp/sub_center1/ssr.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 学 (NAKAYAMA MANABU)

公益財団法人かずさDNA研究所・技術開発研究部・染色体工学チーム・チーム長

研究者番号: 30370927

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

古関明彦 (KOSEKI HARUHIKO)

理化学研究所・統合生命医科学研究センター

ー・免疫器官形成研究グループ・グループ
ディレクター

研究者番号: 4022544