

氏名	鈴木 絢子
授与学位	博士(生命科学)
学位記番号	医博乙第1075号
学位授与年月日	平成27年11月11日
学位授与の要件	学位規則第4条2項
研究科, 専攻の名称	医学系研究科(博士後期課程) 応用分子生命科学系専攻
学位論文題目	酵母とヒト培養細胞における PCR 合成 DNA を利用した遺伝子操作系の開発と発現解析
論文審査委員	主査 山口大学 教授 赤田 倫治 山口大学 教授 山本 修一 山口大学 教授 今井 剛 山口大学 准教授 通阪 栄一 山口大学 准教授 星田 尚司

## 【学位論文内容の要旨】

遺伝子工学は、生命機能の解析、有用タンパク質の工業生産、農業、および創薬など様々な分野に応用されている。近年の DNA シークエンス技術の発達によって、様々な生物種の大量のゲノム情報が解読されてきた。これに伴い、ゲノミクスやプロテオミクスなどの遺伝子を網羅的に解析するオミクス技術が急速に発展してきた。しかしながら、遺伝子解析のための変異導入、配列の挿入や削除などの操作は、1970年代に確立された大腸菌でのプラスミドクローニングを介した手法が主流である。そのため、たくさんの遺伝子を次々に操作することは未だに困難である。そこで本論文では、酵母とヒト培養細胞において、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で合成した DNA を直接利用することにより、数多くの遺伝子を扱うことができる新しい遺伝子操作法の開発を目指し、その成果についてまとめたものである。

序論では、酵母と哺乳動物細胞における遺伝子操作技術の発展の背景、PCR 技術、発現解析の現状について述べた。

第一章では、配列を付加する PCR におけるプライマー設計について検討した。PCR は、2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて任意の DNA 領域の合成を行う。プライマーはテンプレートに結合するためのアニーリング配列を持つが、アニーリング配列の 5'側には任意の DNA 配列を付加できる。例えばクローニング用制限酵素配列や遺伝子破壊用相同配列、フュージョン PCR 用の配列を設計することが可能であり、PCR の有用性を高めている。PCR においてプライマーが付加配列を含む場合には付加配列もアニーリングに寄与することになる。プライマーの長さは通常 20~30 塩基長であるが、付加配列を有する場合はプライマーのアニーリング配列をより短くすることができると考えられる。結果として、付加配列を含むプライマーにおいて、グアニンとシトシンのみで構成される 9 塩基長が最小のアニーリング配列として有効であることを明らかにした。決定した最小のアニーリング配列は、機能的配列をタンパク質コーディング配列にインフレームで融合させることも可能であり、人工配列を持たせたテンプレートに対する共通のプライマーとしても利用することもできる。配列を付加するプライマーの最小化は、設計上もコスト的にも有利であり、特にゲノムワイドな遺伝子工学において有用な技術となる。

第二章では、酵母において多数の遺伝子のリアルタイムな発現解析を可能にする、PCR 合成 DNA を直接利用した組換え遺伝子構築法の開発を行った。遺伝子発現解析は、細胞状態の制御機構を理解するために重要である。次世代シーケンサーを利用したマイクロアレイや mRNA シークエンスなどの遺伝子発現解析は、網羅的な解析が可能であるが、サンプリングが必要でありリアルタイムな解析が困難である。もし生細胞での

リアルタイムな遺伝子発現解析を行えたならば、環境変化に対する細胞応答を明らかにするために有用である。そのためには、プロモーターと蛍光レポーター遺伝子を融合したレポーター遺伝子の構築が不可欠であり、同時に多数の遺伝子発現を調べるためにはその組換え遺伝子構築法を確立する必要がある。そこで、まず耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* の非相同末端結合を利用し、プロモーターとレポーター遺伝子が正確に結合したものだけを選択できる遺伝子操作法の開発を行った。

確立した手法を用いて糖代謝系の様々な遺伝子プロモーター組換え体を構築し、これら株の蛍光強度をリアルタイムに測定することで、糖条件を変えた場合の代謝系遺伝子群の発現挙動を解析した。また、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においても同様のリアルタイム発現モニタリングを行った。2種の酵母のリアルタイムな発現解析を行った結果、複数の糖条件における遺伝子発現を同時に比較することができ、環境によって遺伝子の発現時期と発現速度が異なることを明らかにした。既存の手法では明らかにできなかった生細胞における遺伝子発現の挙動を示す結果となった。

第三章では、酵母で確立した PCR による遺伝子操作法をヒト培養細胞に適応することを目指した。現在、哺乳動物細胞への遺伝子導入方法の大半は大腸菌プラスミドを介しており、PCR 合成 DNA を直接利用した遺伝子発現はほとんど行われていない。そこで第三章では、ヒト培養細胞において PCR 合成 DNA を直接導入することが可能な遺伝子発現方法の開発を試みた。その結果、添加することでトランスフェクション効率が向上する2種類のエンハンサー試薬を特定し、遺伝子導入の相乗的な効果を示した。これにより、ヒト培養細胞において PCR 合成 DNA を用いた 96 ウェルの培養条件での遺伝子発現解析を実現させた。開発した手法を用いて、ターミネータ配列の変異解析を行い、ヒト培養細胞での遺伝子発現に必要な 60 塩基長の最小ターミネータ配列を決定した。この配列はプライマーに設計可能な長さであり、ターミネータを付加するプライマーを利用することで、配列削除、挿入、置換などの遺伝子操作が容易になる。

本論文では PCR 合成 DNA を利用した新しい遺伝子操作技術を開発した。本論文の成果は、酵母とヒト培養細胞において数多くの遺伝子や変異配列を次々と解析するために有効な技術であり、ポストゲノム時代に適したハイスループットな遺伝子操作が可能な技術となる。

## 【論文審査結果の要旨】

遺伝子操作は、生命機能の解析や工業、農業、医療など様々な分野に応用されている。近年、生物の持つ全遺伝情報であるゲノム DNA 配列が解読できるようになり、微生物からヒトまでの様々な生物の遺伝子情報が大量に手に入るポストゲノム時代となった。このように、解析できる遺伝子数は飛躍的に増加したが、現在の遺伝子操作は、遺伝子工学が始まった時代に確立された大腸菌でのプラスミド構築を介した操作がいまだに主流である。大腸菌でのプラスミドクローニングは、その操作が煩雑な上に、取得した大腸菌クローンの遺伝子配列が正しいかどうかをシーケンシングにより検証する過程が必要なので時間もかかる。したがって、大腸菌を利用した方法では、次々に遺伝子进行操作することは難しい。もし、様々な遺伝子を簡便に利用、解析することができるようになれば、有用遺伝子の取得や遺伝子解析が、これまで以上に容易となる。そこで本論文では、酵母とヒト培養細胞を対象に、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で合成した DNA を直接利用することで、数多くの遺伝子をより簡単に操作できる遺伝子操作系の開発を行っている。

第一章では、PCR におけるプライマー設計において、有用配列を付加した場合のアニーリング配列の最小化を試み、9 塩基からなるアニーリング配列を報告している。PCR におけるプライマーは、DNA 合成の起点となる配列であるが、その配列には、鋳型 DNA に結合する通常 18~30 塩基のアニーリング配列が必須である。このアニーリング配列の 5' 上流側に任意のオリゴヌクレオチド配列を付加して設計することで、PCR 合成 DNA の端に、任意の配列を付加することができる。この付加配列は制限酵素サイトや相同組換え配列などの遺伝子操作に有用な配列となる。付加配列がある場合は、一回目の PCR 反応はアニーリング配列のみで反応が起こるが、それ以降は、付加配列が付加された合成 DNA も鋳型となるので、付加配列とアニーリング配列を合わせた配列がアニーリング反応に寄与する。そこで、付加配列を含むプライマーの 1 次アニーリング配列を短くしてみるとグアニンとシトシンだけでできた配列では、9 塩基の短い配列でも充分

に PCR 反応が可能であることがわかった。付加配列をつけたプライマー設計において 9 塩基長のアニーリング配列は PCR 条件の特殊な設定を必要とせずに信頼性高く利用できることがわかった。この短い配列により、ゲノム上の全遺伝子を対象としたような網羅的解析において、今までの長いアニーリング配列設計よりも格段のコスト削減が期待できることが結論された。

第二章では、PCR 産物を直接利用した遺伝子発現解析法を開発している。生物の機能調節は、転写レベルで行われることが多く、遺伝子発現量の変化が頻繁に調べられている。転写された mRNA 量を測定するノーザンブロット法や全遺伝子の発現を調べるマイクロアレイ法などがあるが、RNA を抽出する操作が必要となり、生きた細胞でのリアルタイム測定はできていない。そこで、蛍光タンパク質をレポーター遺伝子としたリアルタイム遺伝子発現解析を可能にする PCR 合成 DNA を直接利用した方法を開発している。まず、蛍光タンパク質としては緑よりも赤色蛍光タンパク質 RFP が有効であることを示し、次に RFP と形質転換選択マーカーと融合させた形質転換と遺伝子発現測定ができる組換え DNA を作製した。耐熱性酵母では、バイオエタノール生産が期待できるので、耐熱性酵母の非相同末端結合能力を利用し、PCR 合成したプロモータ配列と上記の組換え DNA を混合し、形質転換を行った。細胞内で形質転換マーカーと正確に結合したものが増殖し、しかも、形質転換マーカーにレポーター遺伝子が融合しているので、プロモータ活性をそのレポーター遺伝子でリアルタイム測定ができるようになる。この方法で、エタノール発酵に関与する様々な代謝系遺伝子のレポーターアッセイ用形質転換酵母を取得し、発現挙動が解析された。リアルタイム解析により、数時間の違いでも発現挙動の差が検出されるので、商用プラントなどでの実用的な発酵生産時の発酵モニタリングにも利用できる方法となった。

第三章では、微生物である酵母では PCR 合成 DNA が容易に利用できるようになったが、ヒト培養細胞においてはプラスミド DNA での遺伝子導入が主流で、PCR 合成 DNA を直接導入した遺伝子解析はほとんど行われていなかった。PCR では少量の DNA しか合成できないので、培養細胞への効率的な遺伝子導入系の開発が望まれていた。そこで、遺伝子導入試薬と混合することで導入効率が上昇するエンハンサー試薬の探索を行い、ポリエチレングリコールと RNA にエンハンサー効果があることを見出した。そこで、このエンハンサー試薬を利用し、PCR 合成 DNA を直接培養細胞へ導入すると、遺伝子発現が可能となることがわかった。PCR 合成 DNA では変異や削除解析が容易なので、ターミネータ配列の最小化を行い、プライマーサイズの 100 塩基長以下のターミネータを開発した。この研究により、ヒト培養細胞において PCR 合成 DNA による遺伝子導入と発現を実現した。

以上のように、本研究において、PCR 法における新しいプライマー設計法、酵母における PCR 合成 DNA を利用した発現解析、さらに、ヒト培養細胞における PCR 合成 DNA を直接利用した遺伝子操作法の開発が行われた。今後、本研究の成果は、発酵工業や医療の分野に応用することが期待できる。

公聴会には、多数の参加があり、活発な質疑がなされた。公聴会における主な質問は以下の通りである。

1) 非相同末端結合は、他の生物に応用できるのか。他の生物に応用する場合に、相同組換え反応との違いをどのように調節するのか。2) 開発された短いアニーリング配列は高いアニーリング温度でも利用可能なのか。3) 解糖経路の遺伝子発現を解析した結果で何か明らかになったのか。特に、グルコース代謝の初期の酵素の遺伝子発現が、経路後期の遺伝子発現よりも低いのはなぜか。4) エンハンサー試薬においてポリエチレングリコールの分子量はなぜ 3000 程度がよかったのか。5) RNA がなぜエンハンサー効果を示すのか。なぜポリエチレングリコールとで相乗効果がでるのか。6) エンハンサー試薬には毒性はあるのか。7) 酵母において DNA が非相同末端結合でランダムに入るが、ヒト培養細胞ではどのようにすると予想できるのか、などである。

これらの質問に対して、発表者より、具体的で明確な回答がなされた。また、本学位論文における PCR 合成 DNA を直接利用する遺伝子操作の有用性に関して議論された。

以上より、本論文は独創性、信頼性、有効性、実用性ともに非常に優れており、博士としての学位論文に十分に値するものと判断した。

論文内容および、審査会、公聴会での質疑に対する応答などから、最終試験は、合格とした。

なお、関連論文の発表状況は下記の通りである。(関連論文 計4編)

- (1) Mikiko Nakamura, Ayako Suzuki, Junko Akada, Tohru Yarimizu, Ryo Iwakiri, Hisashi Hoshida, Rinji Akada. A novel terminator primer and enhancer reagents for direct expression of PCR-amplified gene in mammalian cells. *Molecular Biotechnology*. 2015, 57:767-780.
- (2) Ayako Suzuki, Hiroshi Fujii, Hisashi Hoshida, Rinji Akada. Gene expression analysis using strains constructed by NHEJ-mediated one-step promoter cloning in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Yeast Research*. 2015, 15: DOI 10.1093/femsyr/fov059.
- (3) Ayako Suzuki, Hiroshi Fujii, Hisashi Hoshida, Rinji Akada. Systematic construction of fusion reporter gene for real-time gene expression monitoring in yeast. The 3rd Genetics and Genomics Conference, 2014, Dec. 26-28, Suzhou, China.
- (4) Mikiko Nakamura, Ayako Suzuki, Hisashi Hoshida, Rinji Akada. Minimum GC-rich sequences for overlap extension PCR and primer annealing. *DNA Cloning and Assembly Methods*, 2014, 165-181.