

博士学位論文

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

2015年11月

山口大学大学院 医学系研究科

応用分子生命科学系専攻

鈴木 絢子

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1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2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3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、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。

Abstract

Genetic engineering has been applied to various fields such as molecular biology, industrial protein production, agriculture, and medicine. Recently, large-scale genomic information of various organisms has been revealed through the development of DNA sequencing technology. Accordingly, genomics and proteomics, which analyze whole genes and proteins of an organism, have been rapidly evolved. These are called omics technologies. However, introduction of gene mutations and addition or deletion of DNA sequences for genetic analyses has still been manipulated in *E. coli* since 1970s. *E. coli* plasmid cloning for analytical gene construction is time-consuming and always requires verification of the clones by DNA sequencing, which makes it difficult to manipulate a lot of genes simultaneously. To solve this difficulty, I aimed to develop simple gene manipulation methods using DNA fragments amplified by polymerase chain reaction (PCR) in yeasts and mammalian cells in this thesis.

In the Introduction, background of genetic engineering and DNA manipulation technologies such as PCR and gene expression analysis were described.

In Chapter 1, oligonucleotide primer design for PCR reaction was investigated. PCR amplifies desired DNA regions from templates by using forward and reverse oligonucleotide primers. These primers can contain additional functional sequences at their 5' sides, such as restriction enzyme sites for cloning, homologous sequences for gene targeting and overlapping sequences for fusion PCR. The annealing sequences of oligonucleotide primers are usually 20-30 nucleotides long but when primers contains additional sequences, annealing reaction occurs together with the additional sequences from the third PCR cycle. Therefore, it is expected that annealing sequences can be shorter when the primers contain additional sequences. As a result, only nine nucleotide long sequences containing only G and C were developed as efficient annealing sequences when attached with additional sequences. The developed minimum annealing sequences could be used for in-frame addition of functional coding sequences to protein sequences and also used as common annealing sequences for any gene manipulations. The short annealing sequences do not only reduce primer cost but also reduce the number of primers to be designed because the same annealing sequences can be used for all genes to be manipulated.

In Chapter 2, a recombinant gene construction method using only PCR-amplified DNA was developed for real-time gene expression analysis in yeast. Gene expression analysis provides valuable information to evaluate cellular state. The existing methods for gene expression analysis usually require sample preparation at desired time points. For example, microarray and mRNA sequencing are powerful genome-wide methods but those are not real-time data of living cells. For real-time gene expression analysis in living cells, reporter gene

construction by fusing gene promoters with a fluorescence reporter gene is indispensable. Therefore, a novel cloning method that select only correctly fused DNA construct between a promoter and a reporter gene was developed based on non-homologous end joining system in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. The developed method was applied to construct various reporter genes of glycolysis pathway. Using these reporter constructs, behavior of gene expression was monitored in real-time by measuring fluorescence intensity in response to the changes of sugar conditions.

The reporter gene construction method was also applied to the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and a similar real-time expression monitoring was conducted. These real-time expression analyses provides detailed gene expression behaviors of glycolysis pathway in living yeasts.

In Chapter 3, the PCR-oriented gene manipulation method was applied to mammalian cells. Mammalian culture cells have long been used for medical analyses. For gene introduction to mammalian cells, *E. coli* plasmids are commonly used, whereas direct gene expression by the transfection of PCR-amplified DNA is rarely reported. Therefore, a gene expression method using PCR-amplified DNA in mammalian cells was developed in this study. As a result, two transfection enhancer reagents were found. The addition of these enhancers to any of the commercial transfection reagents individually and synergistically exhibited higher transfection efficiency in 96-well plate culture. Consequently, the amount of DNA for transfection was decreased and gene expression using PCR-amplified DNA was established in mammalian cells. The method was applied to a systematic deletion analysis of transcription terminator sequence, resulting in the identification of a minimum 60 bp terminator sequence. This terminator length was short enough to design in oligonucleotide primers, thus it was used for the genetic analyses of various functional sequences.

In conclusion, gene manipulation methods directly using PCR-amplified DNA were developed in this study. The methods can easily generate numerous gene constructs applicable for genetic analyses in yeasts and mammalian cells. The present study transformed *E. coli*-based genetic engineering to PCR-based engineering, which will be useful for high-throughput gene manipulations in genomic era.

目次

序論	1
第1章	
配列を付加するPCRプライマーのアニーリングに必要な最小配列の探索と解析	
1.1 はじめに	6
1.2 実験材料および実験操作	
1.2.1 PCRにおける使用プライマーと試薬類	8
1.2.2 酵母の遺伝子操作と使用培地	9
1.2.3 培養細胞の遺伝子操作	9
1.3 実験結果	
1.3.1 付加配列を含むプライマーの最小アニーリング配列	10
1.3.2 配列をインフレームに付加できる最小GC-リッチアニーリング配列の応用	
1.3.2.1 最小GC-リッチアニーリング配列によるSKLの付加	11
1.3.2.2 配列付加プライマーのユニバーサルな利用	14
1.4 考察	15
1.5 参考文献	18
第2章	
酵母におけるレポーター遺伝子構築法の開発と発現解析	
2.1 はじめに	19
2.2 実験材料および実験操作	
2.2.1 使用酵母株, 培地および核酸抽出	21
2.2.2 PCR	24
2.2.3 形質転換法	26
2.2.4 <i>ScURA3-yEmRFP</i> レポーター遺伝子の構築	27
2.2.5 <i>S. cerevisiae</i> 発現解析用ベクタープラスミドpSC570の構築	28
2.2.6 顕微鏡観察と蛍光定量測定	28
2.3 結果	
2.3.1 蛍光レポーター遺伝子の選択	30
2.3.2 <i>K. marxianus</i> におけるNHEJを利用したレポーター遺伝子の構築	31
2.3.3 糖謝系のレポーター遺伝子の構築と発現解析	34
2.3.4 リアルタイム測定による経時的発現解析	36
2.3.5 カイネティック発現解析によるプロモーター活性の評価	39
2.3.6 <i>S. cerevisiae</i> における発現解析レポーター遺伝子の構築	42

2.3.7	<i>S. cerevisiae</i> でのリアルタイム発現モニタリング	43
2.4	考察	45
2.5	参考文献	49

第3章

ヒト培養細胞におけるPCR合成DNAを利用した遺伝子操作技術の開発とそれを利用した発現解析

3.1	はじめに	52
3.2	実験材料および実験操作	
3.2.1	細胞株, プラスミド, および試薬	54
3.2.2	トランスフェクション	55
3.2.3	PCR合成DNAの調整	56
3.2.4	GLucルシフェラーゼアッセイ	57
3.2.5	ウェスタンブロット解析	58
3.2.6	顕微鏡観察	58
3.3	結果	
3.3.1	プラスミドとPCR合成DNAの発現比較	
3.3.1.1	GFPの発現	59
3.3.1.2	GLucの発現	59
3.3.2	ケミカルトランスフェクションにおけるエンハンサー物質の探索	
3.3.2.1	FuGENEトランスフェクションにおけるPEGの効果	61
3.3.2.2	FuGENEトランスフェクションにおけるRNAの効果	61
3.3.2.3	PEGとRNAの相乗効果	62
3.3.2.4	様々なトランスフェクション試薬におけるPEGとRNAの効果	63
3.3.3	PCR合成DNAでの遺伝子発現	
3.3.3.1	PCR合成DNAによるGLucの発現	65
3.3.3.2	PCR合成DNAによるGFPの発現	66
3.3.4	プラスミドDNAとPCR合成DNAのトランスフェクションにおける性質	
3.3.4.1	GLuc発現の経時変化	67
3.3.4.2	プラスミドDNAとPCR合成DNAの同時トランスフェクション	68
3.3.5	PCR合成DNAを発現するために必要な最小ターミネータ配列の解析	69
3.3.6	ヒト培養細胞での遺伝子発現ツールとしてのターミネータプライマー	72
3.4	考察	76
3.5	参考文献	79
	結論	82

謝辭 83

序論

遺伝子操作技術は生命機能の解析，有用タンパク質の工業生産，環境，農業，医療など様々な分野に応用されている。遺伝子操作は，1970年代初頭に異種間のDNAをつないだことに始まる(Jackson *et al.*, 1972)。その後，*in vitro*で結合させたDNAによる大腸菌の形質転換が報告されたことで様々な遺伝子解析が始まった(Cohen *et al.*, 1973)。当初は，ハイブリダイゼーションやプラスミドライブラリーからのスクリーニングによって目的遺伝子を取得していたため，1つの遺伝子の解析に多くの時間と労力が必要とされていたが，1980年代にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による遺伝子増幅の手法が確立したことで目的遺伝子の取得に要する時間が短縮された。こうして，現在の遺伝子操作の基礎が確立された。一方で1970年代後半にDNA配列の解読方法が確立し(Sanger *et al.*, 1977; Maxam and Gilbert, 1977)，1980年代後半には自動シーケンサーが開発されるなど，DNAシーケンス技術が急速に発達したことで様々な生物の全ゲノム配列が解読されてきた。1997年に大腸菌(Blattner *et al.*, 1997)，翌年には出芽酵母(Paulsen *et al.*, 1998)のゲノムシーケンス解読完了をはじめ，マウス(Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002)やヒト(International Human Genome Sequencing Consortium, 2004)など原核生物から動植物に至るまで，数千にもものぼる様々な生物の全ゲノム配列が次々と解読されており(Reddy *et al.*, 2014)，これ以降をポストゲノムの時代と呼ぶ。これに伴って，全遺伝子の発現を解析するマイクロアレイやmRNAシーケンスなどの大量の遺伝子やタンパク質を扱ったオミクス技術が発達してきた。ゲノム解析によって，生物種による遺伝子配列の変化や個体差で生じる一塩基多型などの存在も明らかになり，解析すべき遺伝子の数は飛躍的に増加した。しかしながら，遺伝子解析のための変異構築，配列の挿入や削除などの遺伝子操作手法は未だに1970年代に確立された大腸菌を介したクローニングが主流であり，数多くの遺伝子を次々と操作し，解析することが困難である。したがって，現在のポストゲノム時代に対応できる遺伝子操作技術の開発が求められている。

大腸菌クローニングを介した遺伝子操作は，操作が複雑で組換え遺伝子を構築して目的細胞で解析するまでに一週間程度の時間がかかる。大腸菌は1つのクローンに1種類のプラスミドしか持たないため，配列の保証が不可欠であることが遺伝子操作の大きな律速となっている。これらの理由から，数多くの遺伝子を次々と解析するためには大腸菌でのクローニングを介する手法は有用ではない。

これに対し，PCRによって目的DNAを構築する手法もある。PCR法の基本概念は1987年に報告された，温度変化によって2本のオリゴヌクレオチドプライマーで指定したプレート上の範囲を増幅するというものである(Mullis and Faloona, 1987)。PCRでは，オリゴヌクレオチドプライマーがテンプレートに結合することをアニール，結合する配列をアニーリング配列と呼ぶが，アニールしたプライマーの3'末端からDNAが伸長合成されるため，テンプレートへのアニールは3'末端の配列特異性の寄与が大きい。そのため，プライマーの

5'末端側にはテンプレートに依存しない任意配列を含んでいてもPCRによる増幅が可能であり、増幅する領域に任意の配列を付加することが可能となる。制限酵素サイトや相同組換え用配列、フュージョン配列などの任意配列を5'末端側に設計したプライマーを使ったPCRによって、合成した遺伝子配列をプラスミドベクターや染色体などの任意の場所に操作できるようになり、さらには付加配列を利用して複数のDNA断片を結合させるフュージョンPCR法が確立された(Levis, 1995; Heckman and Pease, 2007)。PCRによるDNA構築は数時間で可能であり、テンプレートとプライマー配列に依存したDNA配列を用意できるため、配列保証の必要性が低い。したがって、PCR合成DNAを直接利用した遺伝子操作系は、数多くの遺伝子の操作に適していると考えられる。

PCR合成DNAを直接導入する手法は、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*においては早くから利用されてきた。導入するDNAの両端にPCRによって染色体上の相同配列を付加することで、染色体への導入や遺伝子の破壊に利用され、約6000もの全遺伝子破壊が行われてきた(Orr-Weaver *et al.*, 1983; Baudin *et al.*, 1993; Wach *et al.*, 1994)。これにより遺伝子破壊株セットが作成され、ゲノムワイドなスクリーニング解析に利用されるなど、PCR合成DNAを直接モデル細胞への導入に用いることによって数多くの遺伝子を扱えるようになった(Winzler *et al.*, 1999; Kitagawa *et al.*, 2007)。加えて、*S. cerevisiae*ではDNA修復機構である相同組換えを利用した組換え体構築を行っており、相同組換えすることで複数の遺伝子配列を融合することも可能である。PCRによって全遺伝子の相同配列をそれぞれGFPに付加し、相同組換えによって遺伝子とGFPを融合させる遺伝子網羅的な局在解析が報告されている(Huh *et al.*, 2003)。これらの結果は、PCR操作とPCR産物の導入のみの単純な操作が網羅的な遺伝子操作に対応することができることを示しているが、この手法は相同組換え能力が高い*S. cerevisiae*にほぼ限定された技術である。そこで本論文では、PCRによる遺伝子操作性を高めること、および*S. cerevisiae*以外を宿主細胞としてPCR合成DNAを利用した組換え遺伝子の構築法の開発を目指した。

PCRにおける遺伝子操作の有用性の一つに、PCRによる配列の付加がある。プライマーにDNA配列を付加することで様々な短い配列が任意に合成できるので、付加したDNA配列の機能解析や、付加したアミノ酸配列をタグとして利用し、抗体による検出や精製なども可能にする。配列を付加するオリゴヌクレオチドプライマーは、付加する配列に加えてテンプレート由来の20~30塩基長のアニーリング配列が必須である。プライマーは長いほどコストがかさみ、プライマーとして合成できるサイズも100~150塩基が限界である。付加配列を長くするためにはアニーリング配列が短いことが望ましい。これまでに、付加配列を含むプライマーによるPCRにおいて12塩基程度の長さでさえ、合成が可能である報告がされている(Kakihara *et al.*, 2005)。しかしながら、その配列の検討や付加配列の正確性に関する検討は行われていない。一方で、DNA断片同士をつなげるフュージョンPCRにおいて、グアニン(G)とシトシン(C)で構成された人工配列を使うことで、通常のアニーリング配列より短い15塩基長でフュージョンPCRが可能であることが報告されていることから

(Cha-aim *et al.*, 2009), GとCから成る人工配列を用いて、配列を付加するPCRにおけるアニーリング配列の最小化を目指した。

PCR合成したDNAを直接遺伝子操作に利用する上で、DNA末端同士が結合する非相同末端結合(non-homologous end joining: NHEJ)は、組換え遺伝子構築にとって新たな方法を提供した。NHEJとはDNA修復機構のひとつで、損傷した二本鎖DNAをタンパクが認識し、細胞内DNAリガーゼの働きによって相同的な配列を持たないDNAの末端同士をつなぐメカニズムである(Jessica *et al.*, 2007)。このNHEJに着目して、酵母*Kluyveromyces marxianus*における新しい遺伝子操作法が開発された(Hoshida *et al.*, 2014)。この方法では、PCRで合成した目的遺伝子とマーカー遺伝子の各断片を混ぜて導入すると、NHEJ活性によって細胞内でランダムにDNA断片が結合するが、そのうち正確に結合したものだけがマーカーとして機能し選択できる。PCR断片を混ぜるだけで組換えDNAが構築できるので、数多くの遺伝子操作に有用である。この方法を応用することで数多くの遺伝子を対象とした様々な遺伝子解析を行うことができる。そこでNHEJを利用した組換えDNA構築法を用いて遺伝子発現解析を試みた。

遺伝子発現解析は、細胞状態の理解や制御される遺伝子を同定することができる有用な方法であり、様々な解析法が存在する。RNA転写量を測定するマイクロレイやmRNA次世代シーケンス技術は、網羅的ではあるがサンプリングが必要なため、経時変化を調べるのが難しい。細胞状態の変化を遺伝子発現の変化で調べるためには、生細胞におけるリアルタイムな発現解析が有用である。発酵生産制御などに利用でき、応用的にも価値が高い。生細胞におけるリアルタイムな発現を調べるには遺伝子のプロモーターの活性を蛍光タンパク質で定量化することが有用である。そのためには遺伝子プロモーターの下流に蛍光タンパク質をつなげたレポーター遺伝子の構築が必須であり、形質転換体を選択するためには形質転換マーカーを同時に導入する必要がある。そこで*Kluyveromyces marxianus*のNHEJを利用することで、レポーター遺伝子の組換え体構築系の開発と構築した株を用いた発現解析を目指した。また、*Saccharomyces cerevisiae*においても発現解析組換え体の構築とリアルタイム解析系の応用できるか検討を行った。

酵母においてPCR合成DNAを直接導入する新しい遺伝子操作法を確立できたので、ヒト培養細胞においてもPCR合成DNAを直接導入する遺伝子導入技術の開発を目指した。現在、様々な遺伝子の解析が哺乳動物細胞で行われているが、哺乳動物細胞における遺伝子操作の大半はプラスミドDNAで行われている。様々なプラスミドクローニング法や数多くのプラスミドベクターが開発されているが(Tan *et al.*, 2006; You *et al.*, 2010)、その一方でPCR合成DNAを直接利用する遺伝子操作はほとんど行われていない。哺乳動物培養細胞において、PCR合成DNAによる遺伝子操作を困難にしている原因として、PCRによって得られるDNA量の制限や、線状であるPCR合成DNAによる遺伝子発現は環状であるプラスミドDNAよりも低いことが考えられる。そこでこれらの課題を解決することで、ヒト培養細胞においてPCR合成DNAを直接導入し発現させる技術の開発を目指した。

参考文献

- Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, Lacroute F & Cullin C. (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 21, 3329-3330.
- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B & Shao Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science*, 277, 1453-1462.
- Chaim K, Fukunaga T, Hoshida H & Akada R. (2009). Reliable fusion PCR mediated by GC-rich overlap sequences. *Gene*, 434, 43-49.
- Cohen SN & Chang AC. (1973). Recircularization and Autonomous Replication of a Sheared R-Factor DNA Segment in *Escherichia coli* Transformants, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70, 1293-1297.
- Heckman KL & Pease LR. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc*, 2, 924-932.
- Hoshida H, Murakami N, Suzuki A, Tamura R, Asakawa J, Abdel-Banat BM, Nonklang S, Nakamura M & Akada R. (2014). Non-homologous end joining-mediated functional marker selection for DNA cloning in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 31, 29-46.
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS & O'Shea EK. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 425, 686-691.
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431, 931-945.
- Jackson DA, Symons RH & Berg P. (1972). Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69, 2904-2909.
- Jessica AD, Michel CN. & André N. (2007). Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature*, 447, 951-958.
- Kakihara Y, Matsuura Y, Hoshida H, Nishizawa Y, & Akada R. (2005). Cost-saving design of PCR primers containing additional sequences. *ITE Lett*, 6, 135-139.
- Kitagawa T, Hoshida H & Akada R. (2007). Genome-wide analysis of cellular response to bacterial genotoxin CdtB in yeast. *Infect Immun*, 75, 1393-1402.
- Levis R. (1995). Strategies for cloning PCR products. In: Dieffenbach CW, Dveksler GS (eds) *PCR primer: a laboratory manual*. CSH Press, 539-554.

- Maxam AM & Gilbert W. (1977). A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci U S A, 74, 560-564.
- Mouse Genome Sequencing Consortium. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature, 420, 520-562.
- Mullis KB & Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol, 155, 335-350.
- Orr-Weaver TL, Szostak JW & Rothstein RJ. (1983). Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids. Methods Enzymol, 101, 228-245.
- Paulsen IT, Sliwinski MK, Nelissen B, Goffeau A & Saier MH Jr.(1998). Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 430, 116-125.
- Reddy TB, Thomas AD, Stamatis D, Bertsch J, Isbandi M, Jansson J, Mallajosyula J, Pagani I, Lobos EA, Kyrpides NC. (2014). The Genomes OnLine Database (GOLD) v.5: a metadata management system based on a four level (meta) genome project classification. Nucleic Acids Res, 43, D1099-1106.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR. (1977). Cryogenically preserved human semen: clinical applications. Proc Natl Acad Sci U S A, 74, 5463-5467.
- Tan R, Li C, Jiang S & Ma L. (2006). A novel and simple method for construction of recombinant adenoviruses. Nucleic Acids Res, DOI:10.1093/nar/gkl449.
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R & Philippsen P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 10, 1793-1808.
- Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connolly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Lucau-Danila A, Lussier M, M'Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Véronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippsen P, Johnston M & Davis RW. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. Science, 285, 901-906.
- You LM, Luo J, Wang AP, Zhang GP, Weng HB, Guo YN, Liu YC, Li QM. & Teng M. (2010). A hybrid promoter-containing vector for direct cloning and enhanced expression of PCR-amplified ORFs in mammalian cells. Mol Biol Rep, 37, 2757-2765.

第1章

配列を付加するPCRプライマーのアニーリングに必要な最小配列の探索と解析

1.1 はじめに

PCRは特定のDNA領域を増幅する技術である。PCRでは鋳型(テンプレート)DNAに相補的な2本のオリゴヌクレオチドプライマーが使用され、通常のPCR合成においては18~30塩基の長さで設計される(Dieffenbach *et al.*, 1995)。プライマーはPCRのアニーリングステップにおいてテンプレートDNAに相補的に結合しており、大抵の場合50~60°Cで行われている。一般的にアニーリングステップの温度はプライマーに含まれる4種類の塩基配列、アデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)の数と長さに依存して、相補配列への結合能力として決定される。例えば T_m 値= $\{(G+C) \times 4^\circ C\} + \{(A+T) \times 2^\circ C\}$ のような計算式がアニーリング温度を決定するために用いられ(Suggs *et al.*, 1981)、高い値が出るほどアニーリング能力が強いことを示す。したがって、GとCの割合が高いほど結合能力が強く、アニーリングに効果的で使いやすいと考えられる。

PCRに用いるプライマーには、アニーリング配列に加えてプライマーの5'末端に付加配列を設計する場合があります。PCRによる遺伝子操作性を高めている(Levis, 1995)。5'末端に任意の付加配列を含むプライマーを用いてPCR合成することによって、合成した遺伝子配列の組換え操作や付加した配列の機能を解析することが可能となる。このような付加配列を含むPCRにおいて、1stおよび2ndのPCRサイクルでは、テンプレート配列に相補的なプライマーの3'側のみがアニールするが、合成されたPCR産物には付加配列を含めたプライマー全体の配列が含まれているため、3rd以降のサイクルでは付加配列を含めたプライマー全体がアニールすることができる(Fig. 1-1)。

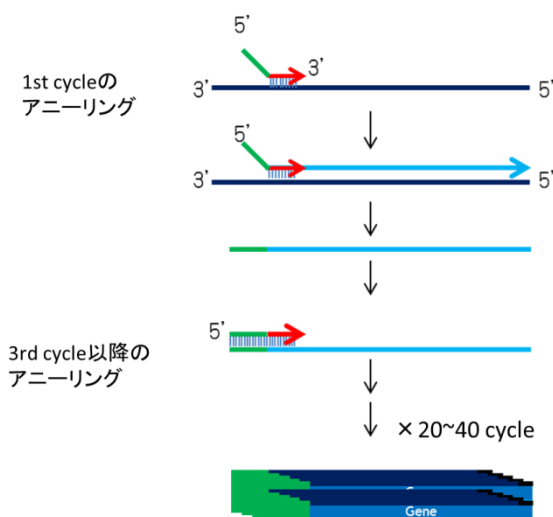


Fig. 1-1. 付加配列を含むプライマーのアニーリング

PCRの最初のサイクルでは、最初のアニーリング配列のみテンプレートに結合する。3サイクル目以降はPCR産物がテンプレートとして使われるので、プライマー全体がアニールする。

したがって、付加配列を含むプライマーにおいては最初にアニーリングする3'側のみの配列から計算したアニーリング温度は全てのPCRサイクルで適応されず、プライマー全体がアニーリングする場合の結合能力は非常に強くなる(Fig. 1-2)。このため、付加配列を含むプライマーにおいては最初のアニーリング配列をより短くすることが可能だと考えられる。一般的には、付加配列を含むPCRプライマーにおいてアニーリング配列として通常の18~30塩基が設計されることが多いが、アニーリング配列を短くできればプライマーコストの削減に貢献でき、より長い配列を付加することも実現する。

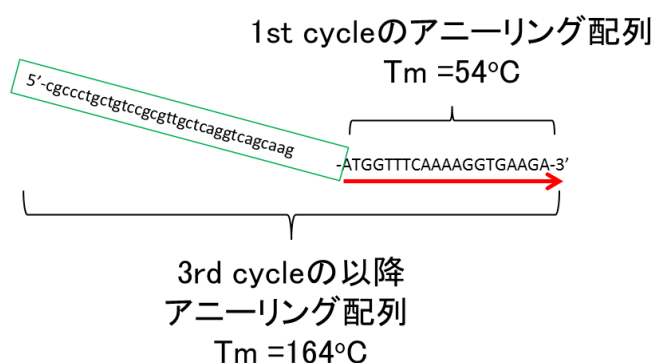


Fig. 1-2. 付加配列を含むプライマーのT_m値

1st cycleサイクルのアニーリング領域のT_m計算値は54°Cだが、プライマー全体ではT_m値は高くなる。

これまでに、配列を付加するプライマーにおいて12塩基以下でも増幅が可能であることが報告されているが(Kakihara *et al.*, 2005), 最小のサイズやどのような配列が適しているかについては解明されていない。また、付加配列を機能解析やタグの検出に利用するためには、遺伝子領域に付加した配列が遺伝子の開始コドンから正確に翻訳されるインフレームな付加が要求されるが、インフレームに配列を付加できるアニーリング配列は検討されておらず、この場合には翻訳されたアニーリング配列が付加配列の機能に影響をおよぼす可能性も含まれる。そこで第1章では、付加配列を含むPCRプライマーにおけるアニーリング配列の最小化を目指し、最小のアニーリング配列による配列付加の正確性を検証した。

1.2 実験材料および実験操作

1.2.1 PCRにおける使用プライマーと試薬類

PCRにはKOD plus polymerase(Toyobo)もしくはPrimeSTAR GXL polymerase(Takara-Bio)を使用し取扱説明書に従って合成した。10 μ L PCR反応液中に、10 μ Mプライマーを0.3 μ Lずつ、テンプレートDNAは0.1~0.5 ng使用した。PCR産物は0.7~2.0%(w/v)アガロースゲル電気泳動で調べた。DNA濃度測定には、Qubitフルオロメーター(Molecular Probes)およびQuant-iT dsDNA アッセイキット(Invitrogen)を使用した。PCR産物をテンプレートとして利用する場合、DNA濃度は0.1 ng/ μ Lに調整し、PCRミクスチャー10 μ Lの反応液にDNA産物をそれぞれ0.1 ngずつ用いた。

使用したプライマーはTable 1-1に示した。

Table 1-1. Primers used in this study

Primer	Sequence 5' to 3'
5CG12-yEGFP2+4	CCCCCGGGGCCgtctctaagggtgaagaattg
5CG9-yEGFP2+4	CCCCCGGGGgtctctaagggtgaagaattg
5CG6-yEGFP2+4	CCCCCGgtctctaagggtgaagaattg
12C-yEGFP2+4	CCCCCCCCCCCCgtctctaagggtgaagaattg
9C-yEGFP2+4	CCCCCCCCgtctctaagggtgaagaattg
6C-yEGFP2+4	CCCCCGgtctctaagggtgaagaattg
3CG12-yEGFP2+4	CCCGGGCCCCGGGgtctctaagggtgaagaattg
3CG9-yEGFP2+4	CCCGGGCCCCgtctctaagggtgaagaattg
3CG6-yEGFP2+4	CCCGGGgtctctaagggtgaagaattg
NcSu9(67-99)-5CG12	cgccctgctgtccggttctcaggtcagcaagCCCCCGGGGGCC
NcSu9(67-99)-5CG9	cgccctgctgtccggttctcaggtcagcaagCCCCCGGGG
NcSu9(67-99)-5CG6	cgccctgctgtccggttctcaggtcagcaagCCCCCG
NcSu9(67-99)-12C	cgccctgctgtccggttctcaggtcagcaagCCCCCCCCCCCC
NcSu9(67-99)-9C	cgccctgctgtccggttctcaggtcagcaagCCCCCCCC
NcSu9(67-99)-6C	cgccctgctgtccggttctcaggtcagcaagCCCCC
NcSu9(67-99)-3CG12	cgccctgctgtccggttctcaggtcagcaagCCCGGGCCCCGGG
NcSu9(67-99)-3CG9	cgccctgctgtccggttctcaggtcagcaagCCCGGGCCC
NcSu9(67-99)-3CG6	cgccctgctgtccggttctcaggtcagcaagCCCGGG
yEGFP2+720c	TTACTTGTACAATTCGTCCATACCG
SKLc-yEmRFP+687c	TTATAATTTGGAaccagttgaatgtctaccttcagc
3CG9-yEmRFP+687c	CCCGGGCCCaccagttgaatgtctaccttcagc
5CG9-yEmRFP+687c	CCCCCGGGGaccagttgaatgtctaccttcagc
9C-yEmRFP+687c	CCCCCCCCaccagttgaatgtctaccttcagc
SKLc-3CG9	ttataatttgaCCCGGGCCC
SKLc-5CG9	ttataatttgaCCCCCGGGG
SKLc-9C	ttataatttgaCCCCCCCC
ScTDH3+1000	tgaatttactttaaattcttcatt
3CG9-pEGFP+699c	CCCGGGCCCCcggagagtatcccggcgcggtc
bGloA(121-190)-eCMV-600	CTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAG TGTGTTGGAATTTTTGTgtaatcaattacgggtcat

本論文におけるオリゴヌクレオチドプライマーの命名は、オリゴヌクレオチドの特徴を表現できる命名法に従った(Cha-Aim *et al.*, 2012)。1)オリゴヌクレオチドの名前は、配列の5'から3'末端への配列の順につける。2)遺伝子に関連するオリゴヌクレオチド配列は遺伝子のATG開始コドンの'A'を'+1'として基準とし、5'末端上流側へは'-', 3'末端下流側へは'+', として、+1からの距離を数えた。例えば、yEGFP+4の配列位置はyEGFP遺伝子のATG開始コドンから4塩基3'側下流から始まるプライマーである。3)遺伝子に対して相補的な設計のオリゴヌクレオチドの場合は名前の最後に'c'を付ける。例えばyEGFP+720cは、プライマーの5'末端がyEGFP遺伝子のATGのAから720塩基3'側下流に位置し、その配列はyEGFPコーディング配列に相補的であり上流に向かう。4)名前は5'-3'に沿って組み合わせることができ、それらはハイフン'-'でつなげる。例えば、5GC12-yEGFP+4のオリゴヌクレオチドは、5'末端に5CG12, 続いてyEGFP+4の配列を含むことを示す。この命名法を利用することでプライマー配列の中身やアニーリング位置がわかるようになる。

1.2.2 酵母の遺伝子操作と使用培地

酵母株は *Kluyveromyces marxianus ura3-1*株RAK3605を使用した(Nonklang *et al.*, 2013)。酵母菌は、YPD培地[1% yeast extract(Oriental yeast), 2% pepton(Nihon pharmaceutical), 2% glucose(Sigma-aldrich)], およびSD-U培地(Hoshida *et al.*, 2014)で培養した。必要に応じて2%アガロース(Wako)を加えてオートクレーブ滅菌した。PCRテンプレートに用いる染色体DNAおよびプラスミドDNAの取得は、Nonklangらによって報告された方法を用いた(Nonklang *et al.*, 2008)。

酵母 *K. marxianus*の形質転換法はAbdel-Banatらが報告した方法を用いた(Abel-Banat *et al.*, 2010a)。簡単には、酵母菌をYPDで一晩培養し、40%(w/v)ポリエチレングリコール3350(PEG, Sigma-Aldrich), 200 mM 酢酸リチウム(LiOAc, Kishida Chemical), 100 mM ジチオスレイトール(DTT, Wako)を含む形質転換液に細胞を懸濁した。50 μ Lの細胞懸濁液に2~3 μ LのPCR産物を加え42°Cで30分間加温し、SD-U培地に播いた。30°Cで培養し、現れたコロニーは蛍光顕微鏡を用いて観察した。

1.2.3 培養細胞の遺伝子操作

培養細胞として、ヒト胎児腎臓 HEK293細胞を利用し、RPMI1640(Sigma-Aldrich)に10%(w/v)のウシ胎児血清(Gibco)と1%の抗生物質(Penicillin-Streptomyci, Sigma-Aldrich)を加えた培地で、37°C, 5%CO₂インキュベータで培養した。培養細胞のトランスフェクションには、8ウェルチャンバースライドに細胞を12000 cells/300 μ L播種して24時間培養した。100 ngのPCR産物と0.2 μ LのFuGENE HD(Promega)を混ぜ、水で20 μ Lに調整し、室温で30分間静置し混合液をチャンバースライド上の細胞に混ぜ、24~48時間後に蛍光顕微鏡を使って観察した。

1.3 実験結果

1.3.1 付加配列を含むプライマーの最小アニーリング配列

プライマーが付加配列を含む場合は、そのアニーリング配列は通常よりも短くすることが可能であり、12塩基程度でも使用できることが報告されている(Kakihara *et al.*, 2005)。一方で、グアニン(G)とシトシン(C)で構成された人工配列を使うことにより、15塩基長でフュージョンPCRが可能であることが報告されていることから(Cha-aim *et al.*, 2009)、GとCで構成される人工配列をアニーリング配列として用いることにした。付加配列を含むプライマーのアニーリング配列として最小の長さで適した配列を検討するために、12、9、6塩基と長さを変えた3パターンの人工配列としてCのみの連続配列(12C, 9C, 6C)、CとGが5塩基ずつ交互に並ぶ配列(5CG12, 5CG9, 5CG6)、CとGが3塩基ずつ交互に並ぶ配列(3CG12, 3CG9, 3CG6)をそれぞれ設計した(Table 1-2)。各配列は、付加配列を含むプライマーにおけるアニーリング配列として使用した。

Table 1-2. GC-rich sequence for annealing

Name	Sequence
12C	5'-ccccccccccc-3'
9C	5'-cccccccc-3'
6C	5'-ccccc-3'
5CG12	5'-ccccgggggcc-3'
5CG9	5'-ccccgggg-3'
5CG6	5'-ccccg-3'
3CG12	5'-cccgggccggg-3'
3CG9	5'-cccgggcc-3'
3CG6	5'-cccggg-3'

まず、GC-リッチアニーリング配列を含むテンプレートを用意するために、これらのGC-リッチ配列を持ったプライマーを用いて1st PCRを行った。yEGFP2(GenBank: LC005521.1)の配列をテンプレートに、リバースプライマーにyEGFP+720cを使用し、フォワードプライマーにはそれぞれ5CG12-yEGFP2+4, 5CG9-yEGFP2+4, 5CG6-yEGFP2+4, 12C-yEGFP2+4, 9C-yEGFP2+4, 6C-yEGFP2+4, 3CG12-yEGFP2+4, 3CG9-yEGFP2+4, 3CG6-yEGFP2+4を使用した。これにより、5'末端側にGC-リッチ配列を含んだPCR産物が得られた(Fig. 1-3, Template sequence)。1st PCRで得られたPCR産物のDNA濃度を0.5 ng/ μ Lに揃え、これをテンプレートにGC-リッチアニーリング配列と任意の付加配列を含むプライマーによって2nd PCRを行った(Fig. 1-3)。リバースプライマーは同じyEGFP2+720cとし、フォワードプライマーには NcSu9(67-99)-5CG12, NcSu9(67-99)-5CG9, NcSu9(67-99)-5CG6, NcSu9(67-99)-12C, NcSu9(67-99)-9C, NcSu9(67-99)-6C,

NcSu9(67-99)-3CG12, NcSu9(67-99)-3CG9, NcSu9(67-99)-3CG6を用いた (Fig. 1-3, Primer name and sequence)。これらのフォワードプライマーは付加配列として33塩基の配列5'-cgcctgtctgccgcttgcaggtcagcaag-3'を含む。

Primer name	Primer sequence	Template sequence	Result (0.7 kb)
NcSu9(67-99)-5CG12	33nt-CCCCCGGGGGCC	CCCCCGGGGGCC-yEGFP2	Succeeded
NcSu9(67-99)-5CG9	33nt-CCCCCGGGG	CCCCCGGGG-yEGFP2	Succeeded
NcSu9(67-99)-5CG6	33nt-CCCCCG	CCCCCG-yEGFP2	Weak
NcSu9(67-99)-12C	33nt-CCCCCCCCCCCC	CCCCCCCCCCCC-yEGFP2	Succeeded
NcSu9(67-99)-9C	33nt-CCCCCCCC	CCCCCCCC-yEGFP2	Succeeded
NcSu9(67-99)-6C	33nt-CCCCCC	CCCCCC-yEGFP2	Weak
NcSu9(67-99)-3CG12	33nt-CCCGGGCCCGGG	CCCGGGCCCGGG-yEGFP2	Failed
NcSu9(67-99)-3CG9	33nt-CCCGGGCCC	CCCGGGCCC-yEGFP2	Succeeded
NcSu9(67-99)-3CG6	33nt-CCCGGG	CCCGGG-yEGFP2	Failed

Fig. 1-3. 付加配列を含むプライマーによるPCR合成

1st PCRでyEGFP2の5'末端にGC-リッチ配列を付加し(Template sequence), 2nd PCRでは各プライマー(Primer sequence)を用いて合成した。

その結果, 6塩基長のアニーリング配列である5CG6および6Cでは合成が弱く (Fig. 1-3, Result, Weak), 3CG6では合成できていなかった。しかし, 9塩基長のアニーリング配列である5CG9, 9C, 3CG9, もしくは12塩基長のアニーリング配列である5CG12と12Cの場合は合成できた。3CG12は12塩基長であるが, 合成できていなかった。これらの結果は, 付加配列を含むプライマーにおいて, 9塩基長のGC-リッチ配列5CG9(5'-CCCCCGGGG-3'), 9C(5'-CCCCCCCC-3'), 3CG9(5'-CCCGGGCCC-3')が最小のアニーリング配列となることを示した。

1.3.2 配列をインフレームに付加できる最小GC-リッチアニーリング配列の応用

1.3.2.1 最小GC-リッチアニーリング配列によるSKLの付加

最小アニーリング配列による配列付加の正確性を調べるために, タンパク質に機能性ペプチド配列を付加することにした。機能性ペプチドはインフレームで付加されなければ機能を示さないで, 付加の正確性を調べることができる。機能性ペプチドのインフレーム付加のために, C末端ペルオキシム局在ペプチドSKL(Ser-Lys-Leu)を選択した(Monosov *et al.*, 1996)。この配列はタンパク質のC末端に存在することでペルオキシソームに局在する。そこで5CG9(5'-CCCCCGGGG-3'), 9C(5'-CCCCCCCC-3'), 3CG9(5'-CCCGGGCCC-3')の3種類の人工アニーリング配列を用いて赤色蛍光タンパク質yEmRFP(Keppler-Ross *et al.*, 2008)のC末端にSKLを付加し, 発現させた際の局在を調べることで付加配列の正確性を検討した(Fig. 1-4)。

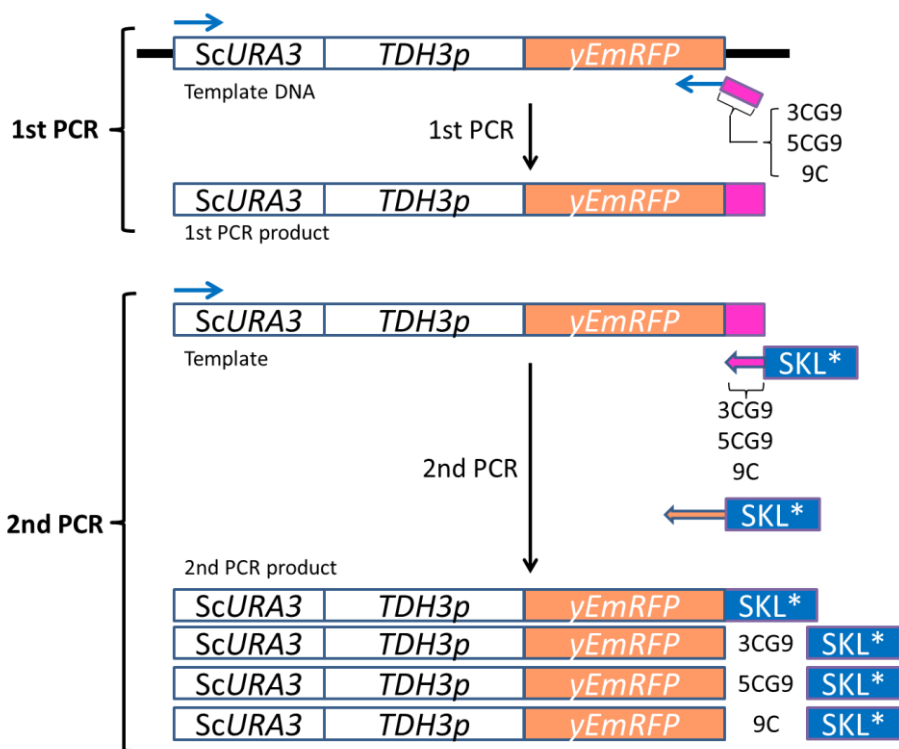


Fig. 1-4. 最小アニーリング配列を利用した付加配列の正確性検討

1st PCRで人工アニーリング配列を付加したDNA断片を合成する。1st PCR産物のC末端には3CG9, 5CG9, 9Cが含まれており, これを2nd PCRのテンプレートに用いる。2nd PCRでは最小アニーリング配列を使ってSKLを付加する。

まず, アニーリング配列を*yEmRFP*のC末端に持つ*ScURA3-ScTDH3p-yEmRFP*断片を合成した。*yEmRFP*のC末端に人工配列を付加するために, フォワードプライマーには*ScTDH3+1000*を共通して使用し, プライマーとしてそれぞれ3CG9-*yEmRFP*+687c, 5CG9-*yEmRFP*+687c, 9C-*yEmRFP*+687cを用いた。合成されたPCR産物の*yEmRFP*のC末端には, 3CG9, 5CG9, 9Cの人工配列が含まれている。このPCR産物をテンプレートとして, SKLを付加するPCRに用いた。それぞれ同じ人工配列を含むテンプレートに対してSKLc-3CG9, SKLc-5CG9, SKLc-9Cをプライマーに用いて合成した(Fig. 1-5)。その結果すべてのアニーリング配列で合成できた。したがって, 付加配列が12塩基の長さでも, 9塩基の人工アニーリング配列による配列付加が可能であることが明らかになった。



Fig. 1-5. 最小アニーリング配列3CG9, 9C, 5CG9を利用したSKL付加
アニーリング温度は55°Cを使用した。すべてのアニーリング配列はSKLを付加する合成に利用できた。

SKLを付加したPCR産物を *K. marxianus ura3-1*株RAK3605の形質転換に用い、得られた形質転換体を12株ずつ蛍光顕微鏡で観察した(Fig. 1-6, Table 1-3)。顕微鏡観察の結果、RFPが複数のドット状に局在する株、細胞質全体が光る株および光らない株が存在した。ドット状の局在を示した株と細胞質全体に局在した株の数をそれぞれTable 1-3に示した。

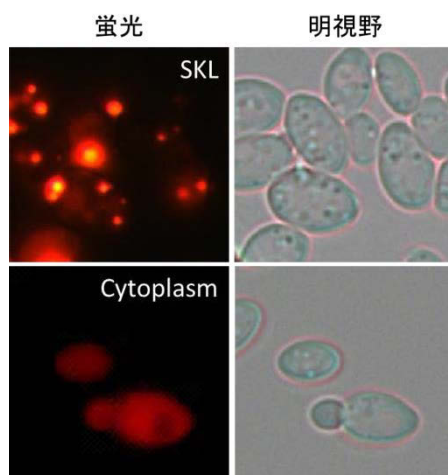


Fig. 1-6. 形質転換体の顕微鏡観察結果

SKLのペルオキシソーム局在は酵母細胞内で複数のドット状に観察された。3CG9をアニーリング配列としてSKLを付加したクローンの内、ドット状局在を示したものと細胞質が光っていた株をそれぞれ示した。

Table 1-3. 配列を付加するプライマーのアニーリング配列の正確性

Annealing sequence		Localization	
		SKL	Cytoplasm
yEmRFP C-terminus <u>S K L *</u> snuuɹwɹeɹ-C dɹɹ-əbɹɹɹɹaɹɹeɹɹ-ɹ	*1	9/12	3/12
yEmRFP- <u>G P G S K L *</u> ɹɹɹɹɹɹɹɹɹɹ-əbɹɹɹɹaɹɹeɹɹ-ɹ	3CG9	9/12	3/12
yEmRFP- <u>P R G S K L *</u> ɹɹɹɹɹɹɹɹɹɹ-əbɹɹɹɹaɹɹeɹɹ-ɹ	5CG9	7/12	5/12
yEmRFP- <u>G G G S K L *</u> ɹɹɹɹɹɹɹɹɹɹ-əbɹɹɹɹaɹɹeɹɹ-ɹ	9C	5/12	5/12

*1=accagttgaatgtctaccttcagc

形質転換体12株のうち、RFPが複数のドット状に観察されたものをSKL、細胞質全体が光っていたものをCytoplasmとした。蛍光が観察できなかった株もあった。*1はSKLを付加する場合のアニーリング配列としてyEmRFPのC末端30塩基を使用した。

ドット状の局在を示した株は、付加したSKLが正確に機能しており、インフレームに配列を付加できたことを示している。この結果は、3CG9、5CG9、9Cの配列が翻訳された場合、それぞれGPG、PRG、GGGとなるが、これらの人工アニーリング配列がSKLの局在に

影響を与えないことを示した。3CG9をアニーリング配列に用いた場合は、yEmRFPのC末端配列30塩基をアニーリング配列としてSKLを付加したDNAと同程度の確立でペルオキシソームに局在していた。したがって、配列を付加するプライマーのアニーリング配列として3CG9は正確に配列を付加できることが明らかになった。一方で、5CG9と9Cをアニーリング配列としてSKLを付加した場合は、SKLに局在していた株が3CG9より少なく、付加した配列が正確に機能できない頻度が高いことが明らかになった。

1.3.2.2 配列付加プライマーのユニバーサルな利用

酵母に導入したyEmRFP-SKLのDNA断片を合成する際、SKLを付加するために使用したSKLc-3CG9のプライマーは、3CG9を持つテンプレートならばアニーリングが可能である。そこで、3CG9の人工アニーリング配列の有用性を調べるために、ヒト培養細胞に導入するためのDNA断片CMVp-EGFP_{3CG9}SKLの合成に同じプライマーを利用した。

1st PCRではpGFP-C1をテンプレートとし、6AC-pEGFP-600をフォワードプライマーに、EGFPのC末端に3CG9配列を含むプライマー3CG9-EGFP+699cをリバースプライマーに用いてPCRを行い、CMVp-EGFP_{3CG9}を合成した。2nd PCRでは、1st PCRで合成したCMVp-EGFP_{3CG9}をテンプレートとし、bGlopA(121-190)-eCMV-600をフォワードプライマーに、RFPの合成に用いたSKL付加プライマーであるSKLc-3CG9をリバースプライマーに用いてCMVp-EGFP_{3CG9}SKLのDNA断片を合成した。合成したDNAをヒト培養細胞に導入し、EGFPの局在を観察した(Fig. 1-7)。

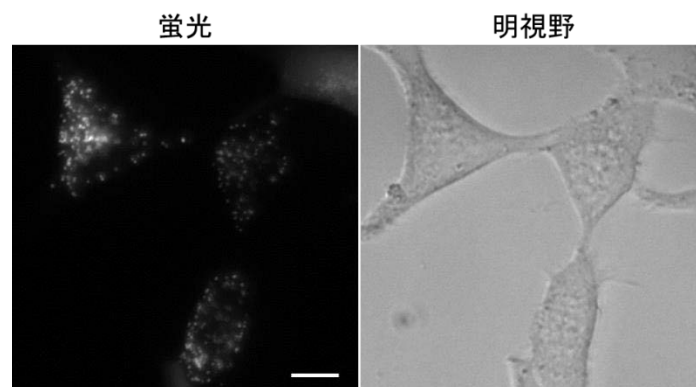


Fig. 1-7. ヒト培養細胞細胞(HEK293)における *CMVp-EGFP_{3CG9}SKL* の局在
GFPの蛍光は細胞質にドット状の分布として観察された。スケールバーは10 μ mを示す。

顕微鏡観察の結果、GFPはドット状に分散して局在していた。このことはSKL-3CG9のプライマーで付加したSKLが機能したことを示している。この結果から、SKLがヒト培養細胞においてドット状に局在することがわかった。

1.4 考察

本章では、配列を付加するPCRにおけるアニーリング配列の最小化とその有用性について検討を行った。

配列付加プライマーの最小化

本研究においてGとCで構成された人工配列をアニーリング配列として配列を付加するPCRプライマーの合成能力を検討した(Fig. 1-3)。その結果、12塩基長のアニーリング配列のうち、3CG12(5'-CCCGGGCCCGGG-3')では合成ができなかったが、この原因として3CG12自体が5'-CCCGGGとCCCGGG-3'で相補的な配列を持つため、パルンドローム構造となってアニーリングや伸長を阻害したことが考えられる。5CG9や3CG9の一部もパルンドロームと成りうる配列を含んでいるが、合成に影響がなかったことから相補的な配列が6塩基程度の長さがなければ阻害が引き起こされにくいのではないかと考えた。5CG6と6Cの6塩基長でさえ、ある程度の合成が可能であることが示されたが、増幅の程度は弱いことから付加配列によっては合成できない可能性が考えられた。一方で、5CG9(5'-CCCCCGGGG-3'), 9C(5'-CCCCCCCC-3'), 3CG9(5'-CCCGGGCCC-3')ではすべての配列で十分な合成ができたことから、配列を付加するPCRプライマーの最小配列として5CG9, 9C, 3CG9の9塩基長のGCリッチ配列が有効であるとした。

最小アニーリング配列を用いたインフレーム付加

目的に応じて、シグナル配列やタグ配列などを付加配列として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場合がある。このような場合には付加した配列が正確に機能できる必要がある。そこで、最小の人工アニーリング配列を用いた配列付加の正確性を、ペルオキシソーム局在シグナルSKLを付加することで検討した。

ストップコドンを含むSKLの配列12塩基を付加するPCRのアニーリング配列として、5CG9, 9C, 3CG9の全ての場合で合成できたことから(Fig. 1-5)、この最小アニーリング配列は、付加配列の長さを問わずに利用できることが示された。しかしながら9Cをアニーリング配列に用いた場合は、半数の形質転換体でSKLの局在が観察できなかった(Table 1-3)。9CはCのみの連続配列であり、最小化配列の検討においてアニーリング配列として6Cを用いた場合でも弱く合成されていたことから、前後にずれてもアニールすることが予想される。したがって、9Cをアニーリング配列とした場合には、合成されたDNAには数塩基ずれてアニールしたPCR産物も含まれており、タンパク質に翻訳する読み枠が変わってしまったことでSKLの機能を示さなかったと考えた。5CG9においては1塩基ずれると中央の1塩基で相補性がなくなるが、前後の8塩基の相補性があるためにアニールすることができると考えられ、9C同様に読み枠がずれる産物が含まれていたことが考えられる。

以上の結果から、機能的配列をタンパク質コーディング配列に対してインフレームに付加する場合は3CG9が適していることが明らかになった。3CG9はインフレームに融合させ

て使用するシグナル配列やタグ配列の解析に利用することができ、付加配列を設計するだけで数多くの変異配列を解析することも容易である。

人工アニーリング配列を用いたユニバーサルプライマー

Fig. 1-7において、SKLc-3CG9のひとつのプライマーを用いてyEmRFPとEGFPの2つの異なるテンプレートにSKL付加を行った。このことは、配列を付加するプライマーのアニーリング配列として人工配列を使用することにより、プライマーをユニバーサルに使いまわすことが可能であることを示している(Fig. 1-8)。正確にインフレーム付加が可能である3CG9をアニーリング配列として用いることで、シグナル配列やタグ配列のような機能性ペプチドを付加するプライマーを一本設計するだけで、複数のタンパク質コーディング領域に融合させることが可能である。

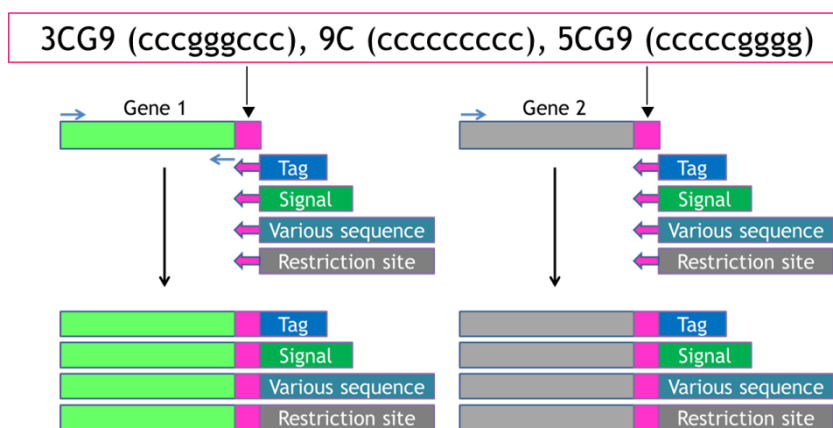


Fig. 1-8. 最小アニーリング配列のユニバーサル使用例

9塩基長の人工配列(上部矢印)を様々なDNA断片の末端に作成することで、その人工アニーリング配列には、6His親和性タグ、ペルオキシソーム局在シグナル(SKL), FLAGタグ、制限酵素サイトなど、様々な任意配列を付加する遺伝子操作ができる。これらのプライマーや他の配列付加プライマーは、共通の最小アニーリング配列を使うことで他のどんな遺伝子にも広く使うことができる。

一方で、インフレームを保証する必要がない配列付加の場合には、5CG9や9Cでも利用可能である。例えば酵母における遺伝子操作では、大抵の場合40~60塩基の相同配列を選択マーカー遺伝子の両末端に付加するが、5'末端への配列付加のアニーリングとして3CG9を、3'末端への配列付加のアニーリングとして9Cを用いるように同時に使用することも可能である(Fig. 1-9)。このプライマーは、末端に3CG9と9Cをつけた他のDNA断片に対して、同じ相同配列を付加することができる。

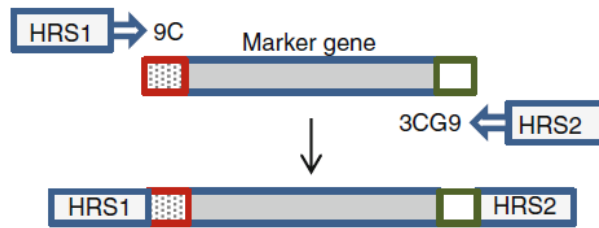


Fig. 1-9. 人工アニーリング配列の同時使用の例

最小アニーリング配列は、相同的でない限り同時に使用することも可能である。例えば、形質転換マーカー遺伝子の合成では、相同組換え配列(HRS)を含むプライマーを、9Cと3CG9のアニーリング配列を通して合成することで、酵母における遺伝子ターゲティングに利用できる。

ゲノムワイドな遺伝子操作では、数千のDNAコンストラクトを合成する場合もある。この場合、テンプレート由来の天然配列を使ってプライマーを設計するとテンプレートの数だけテンプレート由来のアニーリング配列を含む長いプライマーが必要である。しかしながら、目的のDNA増幅時に人工配列を付加することで、たった一本のプライマーで数千のテンプレートに配列を付加することも可能である。このような大量のコンストラクト作成のためのプライマーデザインにおいては、たった5~10塩基を減らすことでさえ、コスト削減の効果は莫大なものになる。さらには、人工配列を付加して増幅したテンプレートシリーズと、ユニバーサルな付加配列プライマーシリーズを組み合わせることで、同じプライマーセットを他のプロジェクトに利用することも可能である。

本章において、付加配列を含むプライマーのアニーリング配列として9塩基のGCリッチな人工配列である5CG9, 3CG9, 9Cを用いることが可能であることを示した。3CG9を使用することで、タンパク質コーディング領域へのインフレームな配列付加も正確に行える。配列を付加するプライマーサイズの最小化はコスト削減につながり、アニーリング配列に人工的な配列を用意することで、プライマーのユニバーサルな利用を実現する。本研究の成果は数多くの遺伝子を扱う上で重要な技術になるだろう。

1.6 参考文献

- Abdel-Banat BM, Nonklang S, Hoshida H & Akada R. (2010). Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 27, 29-39.
- Cha-aim K, Fukunaga T, Hoshida H & Akada R. (2009). Reliable fusion PCR mediated by GC-rich overlap sequences. *Gene*, 434, 43-49
- Cha-Aim K, Hoshida H, Fukunaga T & Akada R. (2012). Fusion PCR via novel overlap sequences. *Methods Mol Biol*, 852, 97-110
- Dieffenbach CW, Lowe TMJ, Dveksler GS (1995). General concepts for PCR primer design. In: Dieffenbach CW, Dveksler GS (eds) *PCR primer: Dieffenbach CW, Dveksler GS (eds) PCR primer: a laboratory manual*. CSH Press, 133-142.
- Hoshida H, Murakami N, Suzuki A, Tamura R, Asakawa J, Abdel-Banat BM, Nonklang S, Nakamura M & Akada R. (2014). Non-homologous end joining-mediated functional marker selection for DNA cloning in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 31, 29-46.
- Kakihara Y, Matsuura Y, Hoshida H, Nishizawa Y, & Akada R. (2005). Cost-saving design of PCR primers containing additional sequences. *ITE Lett*, 6, 135-139.
- Levis R. (1995). Strategies for cloning PCR products. In: Dieffenbach CW, Dveksler GS (eds) *PCR primer: a laboratory manual*. CSH Press, 539-554.
- Monosov EZ, Wenzel TJ, Lüers GH, Heyman JA & Subramani S. (1996). Labeling of peroxisomes with green fluorescent protein in living *P. pastoris* cells. *J Histochem Cytochem*, 44, 581-558.
- Nonklang S, Abdel-Banat BM, Cha-aim K, Moonjai N, Hoshida H, Limtong S, Yamada M & Akada R. (2008). High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl Environ Microbiol*, 74, 7514-7521.
- Suggs SV, Hirose T, Miyake EH, Kawashima MJ, Johnson KI & Wallace RB. (1981). Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. *ICN-UCLA Symp Dev Biol*, 23, 683-693

第2章

酵母におけるレポーター遺伝子構築法の開発と発現解析

2.1 はじめに

遺伝子発現は、代謝、細胞周期、形態や分化などさまざまな細胞機能を調節している。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においても遺伝子発現が研究されてきた。例えば、*ENO1* 遺伝子にコードされるエノラーゼや *CDC19* にコードされるピルビン酸キナーゼは、グルコースとラクトースのような基質の違いによって異なった転写レベルを示すことが報告されている (Moore *et al.*, 1991)。炭素源をグルコースからガラクトースに変えた場合には、*GAL1*, *GAL2*, *GAL7*, *GAL10* などのガラクトース代謝系遺伝子の発現は即座に向上する (Lohr *et al.*, 1995)。サイクリン *CLN1*, *CLN2* の発現は、細胞周期において G1 から S 期への移行を制御しており (Stuart and Wittenberg, 1994; Wittenberg, 1995), *Mata1* および *Mata2* を含む転写因子 Mcm1 コンプレックスによって *MAT* 遺伝子が厳重に制御されている (Haber *et al.*, 2012)。接合に関わる遺伝子の転写は、フェロモンシグナル伝達によって活性化された転写因子 Ste12 によって誘導されている (Oehlen *et al.*, 1994)。このように、どの遺伝子が発現しているのかを調べることで、細胞状態を理解することができる。

遺伝子の転写量を測定するために様々な手法が存在するが、大別して2種類の方法が用いられてきた。ひとつは mRNA の細胞内蓄積量を測定する方法、もうひとつがレポーター遺伝子を用いてプロモーター活性を測定する方法である。前者の測定法は、ノーザンブロットや定量逆転写 PCR (RT-PCR)、マイクロアレイ、次世代シーケンサーを使った mRNA の定量解析などが用いられる。

一方、後者のレポーター活性の測定は、遺伝子のプロモーターによってレポーター遺伝子を発現させ、酵素活性もしくは蛍光強度を定量する。プロモーター活性を正確に測定するために、ルシフェラーゼ、 β ガラクトシダーゼ、 β グルコシダーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、赤色蛍光タンパク質 (RFP) などのレポーター遺伝子が開発されてきた (Jefferson, 1989; Mount *et al.*, 1996; Cormack, 1996; Himes and Shannon, 2000)。レポーター発現解析は人工的な遺伝子コンストラクトを通して推定するため mRNA を直接測定しておらず、レポーター発現は酵素活性や蛍光量を調べる間接的な方法となる。しかしながら、レポーター遺伝子を構築し、目的細胞へ導入することができれば、RNA抽出を必要とする RNA 定量的な方法では困難な、生細胞でのリアルタイムな発現解析が可能となる。この利点から、レポーター遺伝子はシアノバクテリウムにおける長期の概日リズム解析や (Kondo *et al.*, 1993)、酵母におけるガラクトース培養条件の異なる発現解析に用いられてきた (Li *et al.*, 2000)。しかし一方で、プロモーターとレポーター遺伝子を融合させる必要があり、数多くの遺伝子解析には利用されていない。特に、遺伝子発現は代謝や発生などの過程における複数の遺伝子に影響が出るものである。したがって、複数の遺伝子を使ったリアルタイムなレポーター発現解析系は価値があるが、一般的な大腸菌を介したレポーター遺伝子構築

法では手間と時間がかかる。そのため、多数のプロモーターの組換えが可能となるレポーター遺伝子構築法の開発が必要となる。

そこで、大腸菌を介した方法ではなく、PCRを利用した新しいクローニング法functional marker selectionを利用することにした(Hoshida *et al.*, 2014)。この方法は酵母*Kluyveromyces marxianus*における非相同末端結合(NHEJ)に基づく仕組みを利用する。PCRによって、形質転換選択マーカーのC末を削除した断片を合成する。導入する目的のDNA断片は、マーカーの削除したDNA領域をプライマーの付加配列(第1章参照)として与えて合成する。この2本のPCR合成DNAを混ぜ、*K. marxianus*細胞に導入すると、2本のDNA断片はNHEJによって細胞の中で結合し、正確に結合した断片を含む細胞のみが選択培地に形質転換体を形成する。この方法は、制限酵素によるDNA末端の修飾やDNAリガーゼによる*in vitro*での組換え体構築を必要とせず、大腸菌も利用せず、PCR合成DNAを混ぜて形質転換するだけのシンプルな操作となり、2つの断片の結合にはミスはない。したがって、数多くのレポーター遺伝子構築がPCRと形質転換だけで行うことができる。

この方法が利用できる*K. marxianus*は、幅広い糖を利用できる耐熱性エタノール生産酵母である(Nonklang *et al.*, 2008)。近年、*K. marxianus*は高温でのエタノール発酵において冷却コストを抑えることができるので、注目を浴びている(Fonseca *et al.*, 2008; Abdel-Babat *et al.*, 2010a; Abdel-Babat *et al.*, 2010b)。この*K. marxianus*における解糖系やキシロース代謝を含むペントースリン酸経路の発現解析は効率的な発酵を達成させるためにも重要である。そこで、新しいクローニング法が利用できる*K. marxianus*を用いて、糖利用に関連する遺伝子群のリアルタイム発現解析を行った。

一方で現在のエタノール発酵は、お酒でもバイオエタノール生産においても酵母*Saccharomyces cerevisiae*のみが利用されている。さらに*S. cerevisiae*は全ゲノム配列の解析が早くから成されており、遺伝子破壊株セットが作成されるなど研究モデル細胞として解析に利用されている(Paulsen *et al.*, 1998; Brachmann *et al.*, 1998)。したがって、*K. marxianus*で利用できるシンプルな組換え体構築法を*S. cerevisiae*に応用し、リアルタイム発現解析系が確立できれば、基礎研究から産業分野まで利用価値が高いと考えた。そこで本章では、酵母*K. marxianus*において発現解析に利用できるレポーター遺伝子構築系と発現解析系の開発を目指した。さらにその手法を酵母*S. cerevisiae*においても適応することを目的とした。

2.2 実験材料と方法

2.2.1 使用酵母株, 培地および核酸抽出

本研究で使用した*K. marxianus*および*S. cerevisiae*は, Table 2-1に示した。プラスミド DNAとしてYEpGAPcherry(Keppler-Ross *et al.*, 2008)を用いた。

Table 2-1. Yeast strains used in this study

Name	Genotype	Reference
BY4700	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
BY4704	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>ade2Δ::hisG his3 Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
BY4714	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>his3 Δ200</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
BY4741	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>his3 Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
RAK3596	<i>K. marxianus</i> DMKU3-1042 wild type	Limtong <i>et al.</i> , 2007
RAK3605	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i>	Nonklang <i>et al.</i> , 2008
RAK8028	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Sc <i>TDH3p</i> -Sc <i>URA3</i>]	This study
RAK8726	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Sc <i>TDH3p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]	This study
RAK8730	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>PIR1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]	This study
RAK8731	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>CTR1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]	This study
RAK9226	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ADH1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9227	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ADH1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-3	This study
RAK9228	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ADH2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-3	This study
RAK9229	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ADH2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-9	This study
RAK9230	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ADH3p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study
RAK9231	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ADH3p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-8	This study
RAK9232	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ADH4p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9233	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ADH4p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study
RAK9234	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ADH6p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9235	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ADH6p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study
RAK9236	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>CDC19p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-8	This study
RAK9237	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>CDC19p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-10	This study
RAK9238	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ENO1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9239	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ENO1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-9	This study
RAK9240	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>FBA1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study
RAK9241	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>FBA1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-8	This study
RAK9242	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ALD2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9243	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ALD2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study
RAK9244	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ALD4p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9245	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ALD4p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-5	This study
RAK9246	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ALD5p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-5	This study
RAK9247	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ALD5p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-8	This study
RAK9248	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ALD6p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9249	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>ALD6p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-3	This study
RAK9252	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>GLK1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9253	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>GLK1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-8	This study
RAK9254	<i>K. marxianus</i> <i>ura3-1</i> [Km <i>GND1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study

Table 2-1. (Continued)

Name	Genotype	Reference
RAK9255	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>GND1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-6	This study
RAK9256	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>HXK1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-7	This study
RAK9257	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>HXK1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-9	This study
RAK9258	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>GPM1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-6	This study
RAK9259	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>GPM1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-10	This study
RAK9260	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>GPM2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9261	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>GPM2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study
RAK9264	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>MDH2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-3	This study
RAK9265	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>MDH2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-4	This study
RAK9266	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>PDC1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9267	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>PDC1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study
RAK9276	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>PFK1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9277	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>PFK1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-6	This study
RAK9278	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>PFK2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9279	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>PFK2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-5	This study
RAK9282	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>PCK1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-3	This study
RAK9283	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>PCK1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-7	This study
RAK9284	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>PYC1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study
RAK9285	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>PYC1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-7	This study
RAK9286	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>PGI1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9287	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>PGI1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-5	This study
RAK9288	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>RPE1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9289	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>RPE1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-3	This study
RAK9290	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>SOL1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study
RAK9291	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>SOL1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-5	This study
RAK9292	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>TAL1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study
RAK9293	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>TAL1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-4	This study
RAK9294	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>TKL1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study
RAK9295	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>TKL1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-4	This study
RAK9296	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>TPI1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9297	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>TPI1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-3	This study
RAK9298	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>XKS1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9299	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>XKS1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-5	This study
RAK9300	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>XYL1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9301	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>XYL1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-3	This study
RAK9302	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>ZWF1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9303	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>ZWF1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-6	This study
RAK9304	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>TDH1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study
RAK9305	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>TDH1p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-4	This study
RAK9306	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>TDH2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-2	This study
RAK9307	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>TDH2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-9	This study
RAK9308	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>TDH3p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-6	This study
RAK9309	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>TDH3p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-7	This study
RAK9629	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>XYL2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-1	This study
RAK9630	<i>K. marxianus ura3-1</i> [Km <i>XYL2p</i> -Sc <i>URA3:yEmRFP</i>]-6	This study

Table 2-1. (Continued)

Name	Genotype	Reference
RAK11409 (pSC570)	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>his3</i> Δ 200 YEp[ScHIS3-ScTDH3p-yEmRFP, ScURA3, 2 <i>micro ori</i> , AmpR, <i>E.coli ori</i>]	This study
RAK13422	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>his3</i> Δ 200 YEp[ScHIS3-ScHXK1p-yEmRFP, ScURA3, 2 <i>micro ori</i> , AmpR, <i>E.coli ori</i>]	This study
RAK13425	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>his3</i> Δ 200 YEp[ScHIS3-ScGLK1p-yEmRFP, ScURA3, 2 <i>micro ori</i> , AmpR, <i>E.coli ori</i>]	This study
RAK13428	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>his3</i> Δ 200 YEp[ScHIS3-ScZWF1p-yEmRFP, ScURA3, 2 <i>micro ori</i> , AmpR, <i>E.coli ori</i>]	This study
RAK13431	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>his3</i> Δ 200 YEp[ScHIS3-ScGPM1p-yEmRFP, ScURA3, 2 <i>micro ori</i> , AmpR, <i>E.coli ori</i>]	This study
RAK13434	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>his3</i> Δ 200 YEp[ScHIS3-ScCDC19p-yEmRFP, ScURA3, 2 <i>micro ori</i> , AmpR, <i>E.coli ori</i>]	This study
RAK13437	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>his3</i> Δ 200 YEp[ScHIS3- ScPDC1p-yEmRFP, ScURA3, 2 <i>micro ori</i> , AmpR, <i>E.coli ori</i>]	This study
RAK13440	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>his3</i> Δ 200 YEp[ScHIS3-ScADH1p-yEmRFP, ScURA3, 2 <i>micro ori</i> , AmpR, <i>E.coli ori</i>]	This study
RAK13443	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>his3</i> Δ 200 YEp[ScHIS3-ScPCK1p-yEmRFP, ScURA3, 2 <i>micro ori</i> , AmpR, <i>E.coli ori</i>]	This study
RAK13446	<i>S. cerevisiae</i> MATa <i>his3</i> Δ 200 YEp[ScHIS3-ScPYC1p-yEmRFP, ScURA3, 2 <i>micro ori</i> , AmpR, <i>E.coli ori</i>]	This study

酵母菌は、YP2D培地(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose), YP10D培地(1% yeast extract, 2% peptone, 10% glucose), YPX培地(1% yeast extract, 2% peptone, 5% xylose), SD-Ura(Hoshida *et al.*, 2014)およびSD-His培地(0.17% yeast nitrogen base w/o a.a., w/o a.s., 0.5% ammonium sulphate, 2% glucose, 0.06% -H a.a. mix)で、30°Cにて培養した。-H a.a. mix(uracil 80 mg/L, adenine 20 mg/L, lysine 80 mg/L, leucine 160 mg/L, tryptophan 80 mg/L, methionine 80 mg/L)は、0.6 g/Lで使用した。

PCRテンプレートに用いる染色体DNAおよびプラスミドDNAの取得は、Nonklangらによって報告された方法を用いた(Nonklang *et al.*, 2008)。

RNA抽出には、RAK9238株を各ウェルに50 μ LのYP2Dを入れた 96ウェルプレートで6時間培養後、複数ウェルから25 mL分回収した。RNA抽出はRNeasy Mini Kit(Qiagen)を用い、推奨プロトコルに従って抽出した。RNA発現解析は、北海道サイエンスに委託し、Illumina HiSeq 2000にて行った。

細胞濃度はリアルタイム測定においては蛍光プレートリーダーSynergy Mx microplate reader(Bio-Tek)により測定し、通常はGENESYS UV(Thermo Fisher Scientific)を用いて、600 nm(OD₆₀₀)で測定した。

2.2.2 PCR

PCR反応にはKOD plus(Toyobo)を使用し、推奨プロトコルに従って行った。使用したプライマーはTable 2-2に示す。

Table 2-2. Primers used in this study

Primer Name	sequence 5' to 3'
5CGC-ScTDH3-572	ccccgggggccccgctgtaaccgtacatgccaa
KmCTR1p-521	tcttgacaaaaaacgcatattgag
KmPIR1p-2000	gcaaagcccgatccggtctaa
ScTDH3-572(30)	gctgtaaccgtacatgccaaaatagggg
ScURA3+20c-KmCTR1-1c	ttatatgtagcttcgacatcttgattgtcaattgtc
ScURA3+20c-KmPIR1-1c	ttatatgtagcttcgacattgtataaatcggggtatgtgtgt
ScURA3-772-yEmRFP+4	gcatattgagaagatgcggccagcaaacgttcaaaagggaagaagataa
TDH3-572	gctgtaaccgtacatgccaa
URA3+20c-ScTDH3p25c	ttatatgtagcttcgacatttgtttgttatgtgtttatc
URA3+21	ggaacgtgctgactcatcctagt
URA3+650	atagaaccgtggatgtgtgtctc
URA3+771c	ttcccagcctgtttctgtaacgt
URA3-280c	cagtctgtgaaacatctttctac
yEmRFP+675ctaa	ttatctacctcagctctttcatattg
yEmRFP+711c	ttattatataattcatcaccaccagt
KmGLK1-1000	cagcatgtgctgtgaaaagtgtt
URA3+20c-KmGLK1-1c	ttatatgtagcttcgacatatttaagttttatgttactagt
KmGPM2-1000	tacgaagaatgtcgtgccgaatcga
URA3+20c-KmGPM2-1c	ttatatgtagcttcgacatctcaatgccttgccttagtggc
KmPYC1-1000	tcacatcccggagctcagctcagc
URA3+20c-KmPYC1-1c	ttatatgtagcttcgacatgattgtttattatattata
KmPFK1-1000	cctaattgatataattaactact
URA3+20c-KmPFK1-1c	ttatatgtagcttcgacatgctaataattatctattcttca
KmENO1-1000	caattccccaaaaacaagaagcc
URA3+20c-KmENO1-1c	ttatatgtagcttcgacattgtattgtttgtgtgtgt
KmGND1-1000	acattccgggtaacctgatcactc
URA3+20c-KmGND1-1c	ttatatgtagcttcgacatgacaaactgggggatattct
KmXYL1-1000	gtcggaaagcgggaccatcgtct
URA3+20c-KmXYL1-1c	ttatatgtagcttcgacatggtgtttctatactgtgtttg
KmALD6-1000	aggaaaagcgaatacaaaaaaagaa
URA3+20c-KmALD6-1c	ttatatgtagcttcgacattctatactattgctccaata
KmPGI1-1000	cgacgaaattgtatcgaccatagaa
URA3+20c-KmPGI1-1c	ttatatgtagcttcgacattgctgtaattgtattgtgtg
KmGPM1-1000	gcagttcgtggagatgataaccg
URA3+20c-KmGPM1-1c	ttatatgtagcttcgacattgctattgtgtgtgtgtg
KmADH4-1000	ctttcacctctgttcagccgttc
URA3+20c-KmADH4-1c	ttatatgtagcttcgacattgtgtgtttattataatagta
KmTDH3-1000	ttcctcagatttgcgtgtatctaa
URA3+20c-KmTDH3-1c	ttatatgtagcttcgacattaaagtttcaataagggcta
KmALD2-1000	tcaccaatagtaatgactagatgt
URA3+20c-KmALD2-1c	ttatatgtagcttcgacatattctactctgtatacggct

Table 2-2. (Continued)

Primer Name	sequence 5' to 3'
KmTAL1-1000	aataaatagatggatgctgctacag
URA3+20c-KmTAL1-1c	ttatatgtagctttcgacattctgtatcgtttggtggtgtt
KmADH1-1000	ggggagaccccaaaacccaaaccta
URA3+20c-KmADH1-1c	ttatatgtagctttcgacattggtgtgtatgattttgtt
KmTPI1-1000	tcgggctcgaactcttctgcgcgc
URA3+20c-KmTPI1-1c	ttatatgtagctttcgacatgtctgataggttatatatgtgt
KmTDH2-1000	acaccacaactacactcctatcgc
URA3+20c-KmTDH2-1c	ttatatgtagctttcgacatctttaaaattatctgagttga
KmADH2-1000	taacctgatctctctgcctcgta
URA3+20c-KmADH2-1c	ttatatgtagctttcgacatttctagttggtggtggttt
KmFBA1-1000	acaagggccaaacgcaatgctttg
URA3+20c-KmFBA1-1c	ttatatgtagctttcgacattttagaattattggttattg
KmALD5-1000	tgacacgtgacacacaaccggccga
URA3+20c-KmALD5-1c	ttatatgtagctttcgacattgcgaatagtcttggatgcttg
KmALD4-1000	agtttatttgtacaaattatggtta
URA3+20c-KmALD4-1c	ttatatgtagctttcgacattggttgcacgtgtgattct
KmZWF1-1000	cttatatcttccaaactaaaact
URA3+20c-KmZWF1-1c	ttatatgtagctttcgacatctgttcaaatgttcagtatta
KmRPE1-1000	ggatcgcctcaaagcaagaatcgc
URA3+20c-KmRPE1-1c	ttatatgtagctttcgacatgatatagaatctcagatgttct
KmPDC1-1000	tttccgagagaaaattaacaagac
URA3+20c-KmPDC1-1c	ttatatgtagctttcgacattgcaattattggtttgggtgt
KmCDC19-970	ctccccccccggtttgctctgtt
URA3+20c-KmCDC19-1c	ttatatgtagctttcgacattgctgacggtttttttgtgtg
KmHXX1-1000	ccgagtcctacgccagctactacac
URA3+20c-KmHXX1-1c	ttatatgtagctttcgacatttttgaagtgtgtgtttgt
KmPFK2-1000	tagagccaacaatctatgatttat
URA3+20c-KmPFK2-1c	ttatatgtagctttcgacatcctttatgattgtgtgtcgtg
KmXYL2-1000	atcttctctgctaaaacccaaaac
URA3+20c-KmXYL2-1c	ttatatgtagctttcgacatggtgataattgtattttgt
KmTDH1-1000	agacctggcactgggaggagaag
URA3+20c-KmTDH1-1c	ttatatgtagctttcgacattggtatgtgtaaagtgtgtgt
KmXKS1-1000	ggtagttcagttgctgggaaactgg
URA3+20c-KmXKS1-1c	ttatatgtagctttcgacattgctgaaatattatgagagcgg
KmTKL1-1000	ccatgggctcgtacgcaattccga
URA3+20c-KmTKL1-1c	ttatatgtagctttcgacattatgattgtttggtgtggtt
KmADH3-1000	gaatccagatagatagatacacgcg
URA3+20c-KmADH3-1c	ttatatgtagctttcgacattgttgcgtgatattttctgtgc
KmADH6-1000	cttctaggcccaagcccagaccgt
URA3+20c-KmADH6-1c	ttatatgtagctttcgacattattgactatttgctaaagt
KmPCK1-1000	tgtaaagaacacgtcctgtgaaga
URA3+20c-KmPCK1-1c	ttatatgtagctttcgacatggtgacttattattagaaa
KmMDH2-1000	tttcttctctctctctctctac
URA3+20c-KmMDH2-1c	ttatatgtagctttcgacattttgaaatctgtgctgacact
KmSOL1-1000	gactagacgttttaagcattcttt

Table 2-2. (Continued)

Primer Name	sequence 5' to 3'
URA3+20c-KmSOL1-1c	ttatatgtagctttcgacatactatccccgattttttctt
YEpGAPend-40-ScHIS3-237	gcaaaccgctctccccgcggtggccgattcattaacAACACAGTCCTTTCCCGCAATTTT
ScTDH3-681c-ScHIS3+663c	GAACTGAAAAAGCGTGTTTTTTATTCAAAAATGATTCTAACctacataagaacaccttg gtgga
YEpGAPendc	gattaatgaatcgccaacgcgcgggg
ScTDH3-720	GTTAGAATCATTGTAATAAAAAACAC
ScHIS3+643c	TGGAGGGAACATCGTTGGTACCATT
ScHIS3+614(50)-ScHXK1-1000	CGCCAATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACCAaaggtgttctatgtagTGGCGTGG GGTGGGGTGATTATCTA
ScHIS3+614(50)-ScGLK1-1000	CGCCAATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACCAaaggtgttctatgtagGGCAGTTC TAGGTCCCTCGTAATCG
ScHIS3+614(50)-ScZWF1-1000	CGCCAATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACCAaaggtgttctatgtagCGCCAGCG AGCTTTCCGGGTTTAGA
ScHIS3+614(50)-ScGPM1-1000	CGCCAATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACCAaaggtgttctatgtagTGTGGTAG AATTCAAAAAGACTATGT
ScHIS3+614(50)-ScCDC19-1000	CGCCAATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACCAaaggtgttctatgtagAATGCTAG TATTTGGAGATTAATC
ScHIS3+614(50)-ScPDC1-1000	CGCCAATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACCAaaggtgttctatgtagAAAATGAA GGCCAATCAAGCGGG
ScHIS3+614(50)-ScADH1-1000	CGCCAATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACCAaaggtgttctatgtagAAGGTGA GACGCGCATAACCGCTAG
ScHIS3+614(50)-ScPCK1-1000	CGCCAATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACCAaaggtgttctatgtagACATGTCG ACGAGTTTGTCAATCGAA
ScHIS3+614(50)-ScPYC1-1000	CGCCAATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACCAaaggtgttctatgtagCTACGTGG GGCTATTGAGCGGTACC
yEmRFP+40c-ScHXK1-1c	taataatagccatattatcttctcacctttgaaacatCTTATTTTTTCAGTATTCTAATTGA
yEmRFP+40c-ScGLK1-1c	taataatagccatattatcttctcacctttgaaacatCTTGTGTATGATAGAGTTGTATTAG
yEmRFP+40c-ScZWF1-1c	taataatagccatattatcttctcacctttgaaacatCTTGCCTTATGTGGTTTTCTATTCT
yEmRFP+40c-ScGPM1-1c	taataatagccatattatcttctcacctttgaaacatTATTGTAATATGTGTGTTTGTGG
yEmRFP+40c-ScCDC19-1c	taataatagccatattatcttctcacctttgaaacatTGTGATGATGTTTTATTTGTTTTGA
yEmRFP+40c-ScPDC1-1c	taataatagccatattatcttctcacctttgaaacatTTTGATTGATTTGACTGTGTTATTT
yEmRFP+40c-ScADH1-1c	taataatagccatattatcttctcacctttgaaacatTGTATATGAGATAGTTGATTGTATG
yEmRFP+40c-ScPCK1-1c	taataatagccatattatcttctcacctttgaaacatGTTGTTATTTTATTATGGAATAATT
yEmRFP+40c-ScPYC1-1c	taataatagccatattatcttctcacctttgaaacatTGTCTAAGAGGAAGGGGAGAGGCTG

2.2.3 形質転換法

*K. marxianus*の形質転換法には、Abdel-Banatらが報告した方法を用いた(Abel-Banat *et al.*, 2010a)。簡単には、*K. marxianus ura3-1*株RAK3605(Nonklang *et al.*, 2008)をYP2Dで18~24時間培養し、40% PEG3350(Sigma-Aldrich), 200 mM LiOAc(Kishida Chemical), 100 mM dithiothreitol(Wako)を含む形質転換液に細胞を懸濁した。PCR合成DNA断片を精製せずに、各2~3 μ Lずつ混ぜて42°Cで30分間加温し、SD-Ura培地に広げた。30°Cで2~3日間培養し、コロニーをピックしてそれぞれの実験に使用した。

*S. cerevisiae*の形質転換は、PEG-リチウム形質転換法を用いた。*S. cerevisiae*株BY4714またはBY4741(Brachmann *et al.*, 1998)を、YP2Dを3 mL入れたバツフル付250 mL三角フラスコで18時間培養した。培養液に新たにYP2Dを27 mL入れ、30°Cで4時間培養し、集菌した後滅菌水で洗浄し、再度集菌して滅菌水に懸濁した。細胞懸濁液120 μ Lに、60% PEG3350を240 μ L, 4 M LiOAcを10 μ L, 5 mg/mLサケ精巢由来DNA(Wako)を20 μ L混ぜ

てコンピテントセルとした。コンピテントセル100 μ LにPCR合成DNA断片を各2~3 μ Lずつ混ぜ、42°Cで30分間加温しSD-His培地に広げた。30°Cで2~3日間培養し、コロニーをピッキングしてそれぞれの実験に使用した。

2.2.4 ScURA3yEmRFP レポーター遺伝子の構築

KmPIR1プロモーター(KmPIR1p)に融合させたScURA3yEmRFPレポーター遺伝子(本論文では‘:’をインフレーム融合のことを表す)を構築するために、3本のDNA断片を合成した。KmPIR1プロモーターは、KmPIR1p-2000とScURA3+20c-KmPIR1-1cをプライマーに、RAK3596染色体DNAをテンプレートとして合成した(Limtong *et al.*, 2007)。N末端及びC末端を削除した0.8 kbpのScURA3(Δ NScURA3 Δ C)およびScURA3のC末端配列を与えたyEmRFP(ScURA3C:yEmRFP)は、それぞれ URA3+21/URA3+771c および ScURA3-772-yEmRFP+4/yEmRFP+711cのプライマーセットを用い、YEpGAP-Cherryをテンプレートとして合成した。これらの3本のDNA断片を混ぜてRAK3605株の形質転換に用いた。形質転換体のyEmRFPの発現は蛍光顕微鏡によって観察し、RAK8730と名付けた。

KmCTR1プロモーター(KmCTR1p)に融合させたScURA3yEmRFPレポーター遺伝子も同様に構築した。KmCTR1p-521とScURA3+20c-KmCTR1-1cでKmCTR1pを合成し、断片を混ぜて形質転換した。構築できた株をRAK8731とした。

ScTDH3p-ScURA3yEmRFPを構築するために、ScTDH3p-ScURA3は以下の様に用意した。ScTDH3pのプロモーター領域は、BY4700(Brachmann *et al.*, 1998)の染色体DNAをテンプレートとし5CGC-ScTDH3-572とURA3+20c-ScTDH3p25cをプライマーに用いて合成した。5'末端を削ったScURA3(Δ NScURA3)は、BY4704(Brachmann *et al.*, 1998)の染色体DNAをテンプレートとしURA3+21とURA3-280cのプライマーセットを用いた。これらの2本のDNA断片をRAK3605の形質転換に利用し、構築された株をRAK8028とした。次に、RAK8028の染色体DNAをテンプレートとして、ScTDH3-572とURA3+771cをプライマーに用いてScURA3のC末端を削ったScTDH3p-ScURA3 Δ Cを合成した。前述のScURA3C:yEmRFPの断片を別途用意し、これらの2本のDNA断片を混ぜてRAK3605の形質転換に利用し、ScTDH3p-ScURA3yEmRFPを作成した。形質転換体はSD-Ura培地で選択し、構築された株をRAK8726とした。

様々なプロモーターを用いたRFPレポーター遺伝子の構築のために、転写開始位置から1 kb上流領域を、KmXXX-1000とURA3+20c-KmXXX-1c(XXXはTable 2-3の遺伝子名)の組み合わせで、RAK3596の染色体DNAをテンプレートとして合成した。KmCDC19pの場合は、-1000の代わりにKmCDC19-970のプライマーを用いた。N末端を削ったScURA3yEmRFP融合遺伝子(Δ NScURA3yEmRFP)は、URA3+21とyEmRFP+711cをプライマーに用い、RAK8730の染色体DNAをテンプレートとして合成した。プロモーターDNA断片と Δ NScURA3yEmRFP断片は、混ぜてRAK3605の形質転換に利用した。形質転換体の選択にはSD-Ura培地を用いた。

2.2.5 *S. cerevisiae*発現解析用ベクタープラスミドpSC570の構築

2 μ mプラスミドYE_pGAPcherry(Keppler-Ross *et al.*, 2008)を基に、プロモーター変換のための形質転換マーカーにSc*HIS3*を利用できるベクタープラスミドを構築するため、2本のDNA断片を用意した。BY4700の染色体をテンプレートとし、プライマーとしてYE_pGAPend-40-Sc*HIS3*-237とScTDH3-681c-Sc*HIS3*+663cを用いてベクターの相同配列を付加したSc*HIS3*断片を合成した。YE_pGAPcherryをテンプレートに、YE_pGAPendcとScTDH3-720をプライマーに用いてベクターDNA断片を合成した。2本のDNA断片を混ぜてBY4741に形質転換し、SD-His培地で選択した。構築できた株をRAK11409とし、含まれるベクタープラスミドをpSC570とした。

2.2.6 顕微鏡観察と蛍光定量測定

酵母細胞はYPDプレートで一晩培養し、蛍光顕微鏡(Zeiss)およびRFPフィルターセットには43HEを使用して蛍光観察した。

蛍光定量測定には、蛍光プレートリーダー(Synergy Mx microplate reader, Bio-Tek)を利用した。レポーター株は24ウェルプレート、1 mLのYPD培地に植菌し、150 rpmで振とうしながら30°Cインキュベーターで18時間前培養した。96ウェル丸底プレート(Nunc)に新しい培地を50 μ L入れ、前培養液1 μ Lを移した。プレートは30°Cの蛍光プレートリーダーにセットし、蛍光強度とOD₆₀₀を10分ごとにリアルタイム測定した。RFPを検出するための励起波長/発光波長はEx 588 nm/Em 613 nmとし、プレートの底から検出した。

Table 2-3. Gene name used in this study

<i>K. m</i> locus_tag, a, c	Product	Gene name
KLMA_40102	alcohol dehydrogenase 1	ADH1
KLMA_40220	alcohol dehydrogenase 2	ADH2
KLMA_80306-2	alcohol dehydrogenase 3	ADH3
KLMA_20158	alcohol dehydrogenase 4	ADH4
KLMA_80339	NADP-dependent alcohol dehydrogenase 6	ADH6
KLMA_20673	aldehyde dehydrogenase (NADP(+)) ALD2	ALD2
KLMA_50012	aldehyde dehydrogenase (NADP(+)) ALD4	ALD4
KLMA_40404	aldehyde dehydrogenase 5	ALD5
KLMA_10742	magnesium-activated aldehyde dehydrogenase	ALD6
KLMA_60219	pyruvate kinase CDC19	CDC19
KLMA_70305	copper transport protein	CTR1
KLMA_10462	phosphopyruvate hydratase	ENO1
KLMA_40388	fructose-bisphosphate aldolase	FBA1
KLMA_10051	glucokinase-1	GLK1
KLMA_10468	6-phosphogluconate dehydrogenase	GND1
KLMA_20098	phosphoglycerate mutase 1	GPM1
KLMA_10182	phosphoglycerate mutase 3	GPM2
KLMA_60412	hexokinase	HXK1
KLMA_40391	malate dehydrogenase	MDH2
KLMA_30719	phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	PCK1
KLMA_60075	pyruvate decarboxylase	PDC1
KLMA_10341	6-phosphofructokinase subunit alpha	PFK1
KLMA_60461	6-phosphofructokinase subunit beta	PFK2
KLMA_10763	glucose-6-phosphate isomerase	PGI1
KLMA_50254	O-glycosylated protein	PIR1
KLMA_10253	pyruvate carboxylase 2	PYC1
KLMA_60024	ribulose-phosphate 3-epimerase	RPE1
KLMA_70192	6-phosphogluconolactonase-like protein 1	SOL1
KLMA_30634	transaldolase	TAL1
KLMA_80059	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	TDH1
KLMA_40218	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	TDH2
KLMA_20296	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	TDH3
KLMA_80302	transketolase	TKL1
KLMA_40125	triosephosphate isomerase	TPI1
KLMA_80066	xylulose kinase	XKS1
KLMA_10683	NAD(P)H-dependent D-xylulose reductase	XYL1
KLMA_70044	sorbitol dehydrogenase 1	XYL2
KLMA_50631	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	ZWF1

2.3 結果

2.3.1 蛍光レポーター遺伝子の選択

生細胞においてリアルタイムな発現をモニターするレポーター遺伝子として蛍光タンパク質が適しているが、どの蛍光タンパク質が生細胞での測定に適しているかの検討を行った。予備実験として酵母用高発現コドンに置換された、青色(yECFP)、緑色(yEGFP)および赤色(yEmRFP)の各蛍光タンパク質を発現する酵母と、蛍光タンパク質を発現しない野生株酵母を用いて蛍光波長の測定を試みた。その結果、野生株においても蛍光値が検出された。そこで励起波長を変えて野生株の蛍光スペクトルを測定し、自家蛍光がどの波長にピークを持つかを調べた(Fig. 2-1a)。

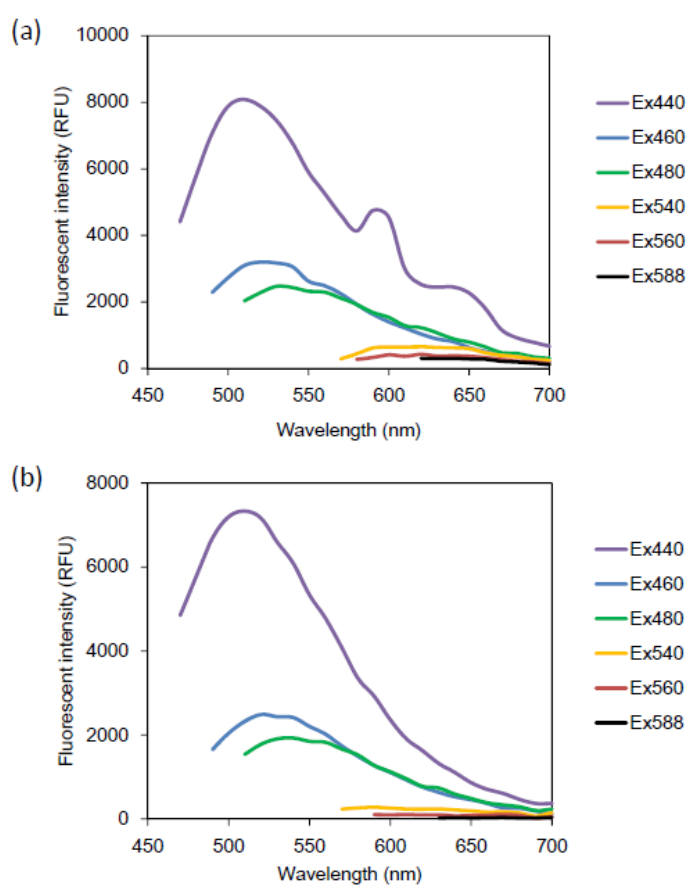


Fig. 2-1. 酵母細胞およびYP2D培地の内因性蛍光

各励起波長によって放出される蛍光スペクトルは蛍光プレートリーダーを用いて測定した。(a)*K. marxianus*野生株の細胞は細胞濁度5 OD₆₀₀で水に懸濁し96ウェルプレートに50 μ L入れて沈殿させた後に蛍光を測定した。(b)YP2Dの蛍光スペクトル。50 μ LのYP2Dを96ウェルプレートで測定した。

励起波長(Ex)に440, 460, 480 nmを用いた場合に検出された蛍光スペクトルでは、それぞれ510, 520, 540 nmにピークが顕れた。一方でEx540, 560, 588 nmの場合、ピークは検出されなかった。また、YP2D培地においても同様の蛍光スペクトルが検出された(Fig. 2-1b)。検出されたピークは青および緑の蛍光と重複することから、酵母細胞およびYP2D培地は青

および緑の蛍光と重複する内在性の蛍光を示すことが明らかになった。Ex540 nm以上では蛍光ピークが検出されなかったことから、長波長側に蛍光ピークを持つRFPが酵母生細胞での測定に利用できると考えられた。そこで、RFPを発現する酵母株と発現しない野生株の蛍光スペクトルを測定した(Fig. 2-2)。Ex540 nmによって放出される蛍光スペクトルは、RFP発現株において610 nmにピークを示したが、野生株では有意な蛍光ピークを示さなかった。

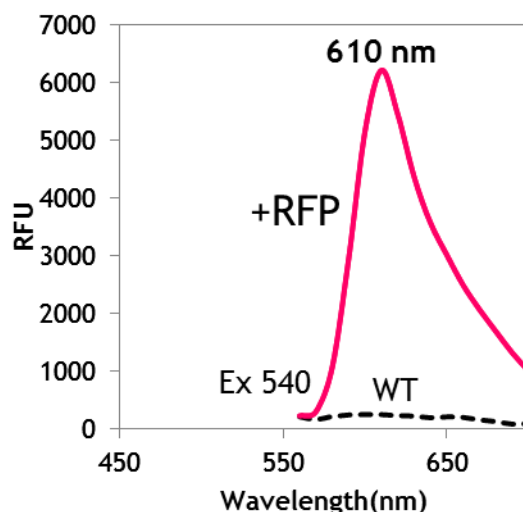


Fig. 2-2. RFP発現株(RAK8731)および野生株(WT)の蛍光スペクトル
各細胞は細胞濁度5 OD₆₀₀で水に懸濁し96ウェルプレートに50 μL入れて沈殿させた後、Ex540 nmにおける蛍光を測定した。

発現した蛍光タンパク質が酵母の自家蛍光と重複しないことが示され、酵母生細胞におけるレポーター解析にはRFPが適していることが示された。そこで本研究ではyEmRFPをレポーター遺伝子として用いることにした。

2.3.2 *K. marxianus*におけるNHEJを利用したレポーター遺伝子の構築

レポーター遺伝子の構築にfunctional marker selection法(Hoshida *et al.*, 2014)を適用するために、ScURA3とyEmRFPをインフレーム融合させた遺伝子ScURA3yEmRFPを利用した(Fig. 2-3a, 中央, RAK8730 chr.)。RAK8730をテンプレートに、URA3+21とyEmRFP+771cをプライマーに用いて、ScURA3のN末端を削除したΔNScURA3yEmRFPをPCR合成することでNHEJ選択マーカーとして用いた。プロモーター領域はKmXXX-1000と、ScURA3のN末端配列を含むURA3+20c-KmXXX-1cをプライマーに用いてプロモーター断片を合成した(Fig. 2-3a, 左)。この2つのDNA断片を混ぜ、*K. marxianus* *ura3-1*株RAK3605に形質転換した。一方で、KmPIR1pおよびKmCTR1pは、それぞれプロモーター断片、N末、C末の両末端を削除したScURA3およびScURA3のC末端配列を含むScURA3C-yEmRFPの3断片を混ぜて形質転換し、SD-Ura培地で選択した(Fig. 2-3b)。

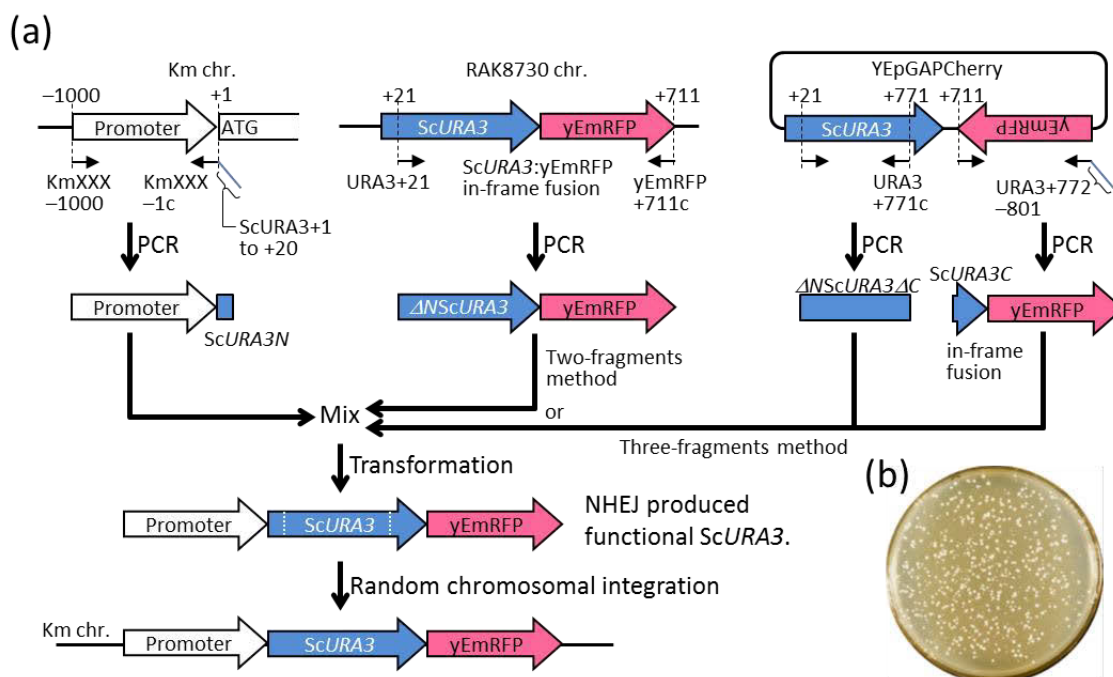


Fig. 2-3. NHEJ依存的マーカー選択によるレポーター遺伝子構築法

(a)プロモーター領域は*ScURA3*のN末端20 bpを含む1000 bpを合成した。インフレーム融合レポーター遺伝子 $\Delta NScURA3:yEmRFP$ は、*ScURA3*のN末端を削除した。この2本の断片を混ぜて*K. marxianus ura3-1*株の形質転換に使用した。一方で、プロモーター領域、両末端を切断した*ScURA3*($\Delta NScURA3\Delta C$)および*ScURA3*のC末端配列(*ScURA3C*)を含むyEmRFP断片を合成し、3本のDNA断片を混ぜて形質転換に使用した。(b)形質転換体はSD-Ura培地に白いコロニーとして生育する。

$\Delta NScURA3\Delta C$ もしくは*ScURA3C*-yEmRFPだけを導入しても形質転換体は得られなかったが、3断片を混ぜて形質転換した場合には形質転換体を得られた。導入した3本のDNAは細胞内でランダムに結合し、そのうち*Ura3*の機能を持つ株だけが生育しているはずである。そこで、導入した複数のDNA断片が正確に結合しているかをPCRによって検証した(Fig. 2-4)。URA3:yEmRFP、プロモーター-URA3:yEmRFPがそれぞれ正しいサイズで合成されたので、正確に結合していることが証明された。これらの形質転換体を顕微鏡観察すると、RFPは細胞質に局在し、蛍光の明るさは使用したプロモーターによって異なった。蛍光プレートリーダーで蛍光強度を測定すると、顕微鏡像と同様な蛍光強度の差を示した(Fig. 2-5)。

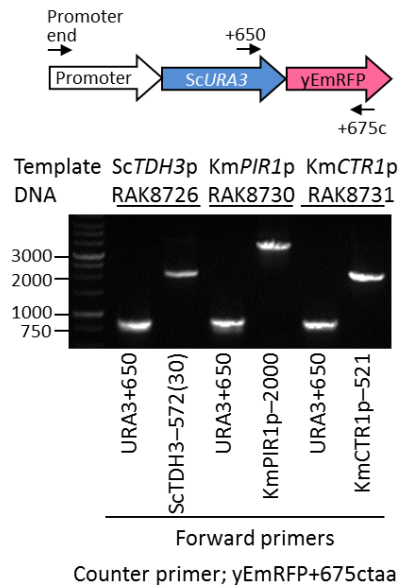


Fig. 2-4. 構築したレポーター遺伝子のPCR

ScTDH3p, *KmPIR1p*, *KmCTR1p*のレポーター組換え体をテンプレートとし、使用したプライマーは図中に示した。

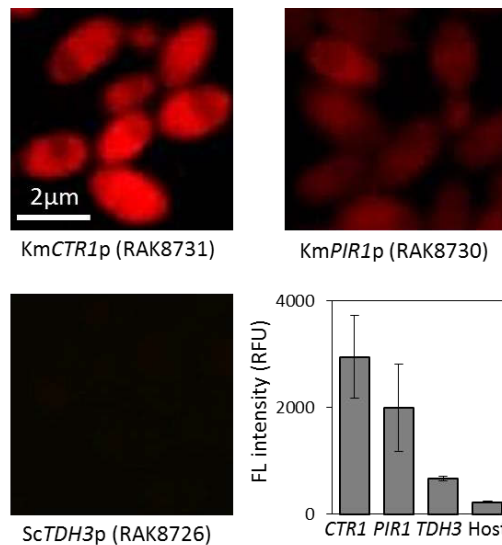


Fig. 2-5. 各レポーター組換え体の蛍光顕微鏡像と蛍光強度の定量化

各株の蛍光像は同じ条件で撮影した。蛍光強度(RFU)を測定するために、各株は96ウェルプレートで3ウェルで24時間培養し、RFP蛍光を測定した。3ウェル分の平均値および標準偏差を示した。

したがって、*ScURA3:yEmRFP*は形質転換の選択マーカーとして使用可能であり、同時にプロモーター活性を定量化するレポーター遺伝子としても利用可能であることが示された。これらの結果は、functional marker selection法がレポーター遺伝子構築にも応用可能であることを示し、ワンステップレポーター構築システムと名付けた。

2.3.3 糖代謝系のレポーター遺伝子の構築と発現解析

Sc*URA3:yEmRFP*を用いたワンステップレポーター構築システムを、糖代謝および関連経路に関わるプロモーターに応用した。解糖系に関わるKm*HXK1p*, Km*GLK1p*, Km*PGI1p*, Km*PFK1p*, Km*PFK2p*, Km*FBA1p*, Km*TPI1p*, Km*TDH1p*, Km*TDH2p*, Km*TDH3p*, Km*GPM1p*, Km*GPM2p*, Km*ENO1p*, Km*CDC19p*, エタノールおよびアセテート生産に関わるKm*PDC1p*, Km*ADH1p*, Km*ADH2p*, Km*ADH3p*, Km*ADH4p*, Km*ADH6p*, Km*ALD2p*, Km*ALD4p*, Km*ALD5p*, Km*ALD6p*, 糖新生系のKm*PYC1p*, Km*MDH2p*, Km*PCK1p*, ペントースリン酸回路の Km*ZWF1p*, Km*SOL1p*, Km*GND1p*, Km*RPE1p*, Km*TKL1p*, Km*TAL1p*, キシロース代謝のKm*XYL1p*, Km*XYL2p*, Km*XKS1p*のプロモーターを使って36のレポーター遺伝子を構築した(Fig. 2-3)。それぞれの形質転換培地から6~10の形質転換クローンをピックし、YP2D培地におけるそれらのRFP発現と増殖を、蛍光プレートリーダーを用いて経時的に測定した。Fig. 2-6にKm*PDC1p*-Sc*URA3:yEmRFP*レポーター遺伝子の形質転換体10クローンの測定結果を示す。

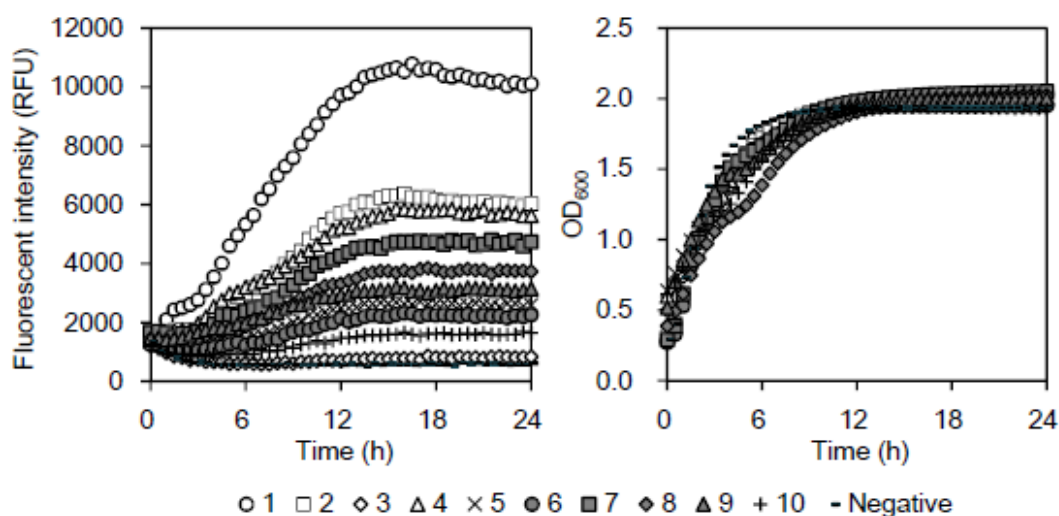


Fig. 2-6. レポーター組換え体のリアルタイム蛍光測定

YP2D培地において、Km*PDC1p*レポーター遺伝子の形質転換体10株と野生株(Negative)を用い、蛍光強度(RFU, 左)および増殖(OD₆₀₀, 右)を10分おきに24時間培養しながら測定した。データは30分ごとにプロットした。

その結果、増殖(OD₆₀₀)曲線は似通っているにもかかわらず、クローンによって蛍光強度(RFU)は異なることが明らかになった。クローンNo. 1は12時間後に10000 RFUを超えるが、クローンNo. 2では同時期に約6000 RFUを示した。このような蛍光強度の差は、他のほとんどのレポーター組換え体で観察された。クローンNo. 3の蛍光強度は野生株と同程度でほとんど蛍光がなかったが、このようなクローンは偽陽性形質転換体として考え、解析から除外した。

各レポーター組換え体のプロモーター活性を評価するために、偽陽性形質転換体を除いた6~10クローンの6時間におけるRFU値を使って平均値を算出した(Fig. 2-7)。

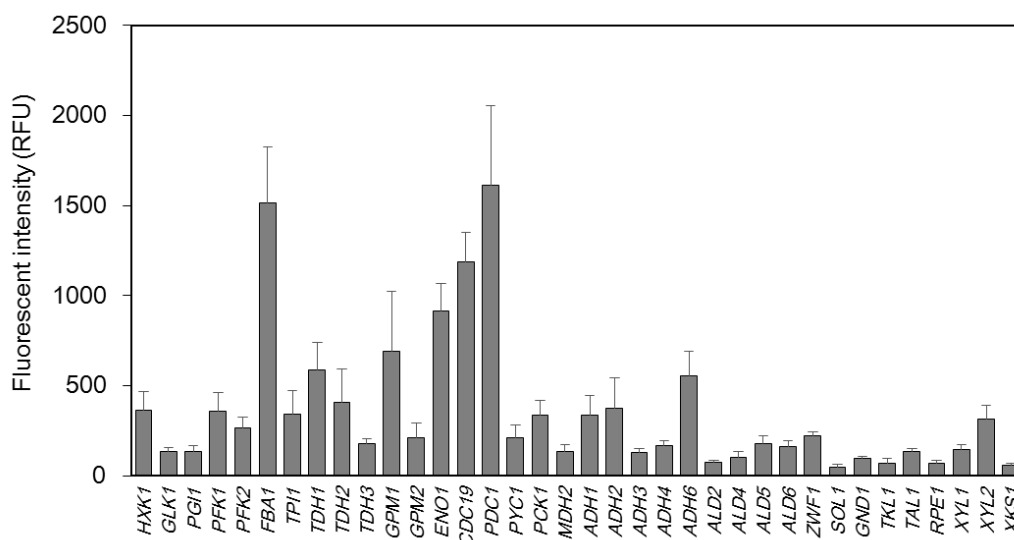


Fig. 2-7. レポーター遺伝子組換え体の蛍光強度平均値

RFU平均値と標準誤差は、偽陽性形質転換体を除いた6クローン以上の値を用いて算出した。

その結果、*KmFBA1p*, *KmGMP1p*, *KmENO1p*, *KmCDC19p*および*KmPDC1p*のような解糖系の後半の反応を触媒する遺伝子のプロモーターが高い活性を示していた。

そこで、このRFPレポーター組換え体の発現強度の平均値を評価するために、mRNA次世代シーケンス解析による転写量測定値(RPKM)と比較した(Fig. 2-8)。レポーター組換え体複数クローンの平均蛍光強度RFUと、同条件で培養したmRNA次世代シーケンス解析で得られた発現量RPKM値は、ある程度の相関を示した。この結果は、同一レポーター遺伝子組換え体のクローン間の発現量に差はあるが、その値を平均化することでおよそのプロモーター活性を評価することができることを示した。

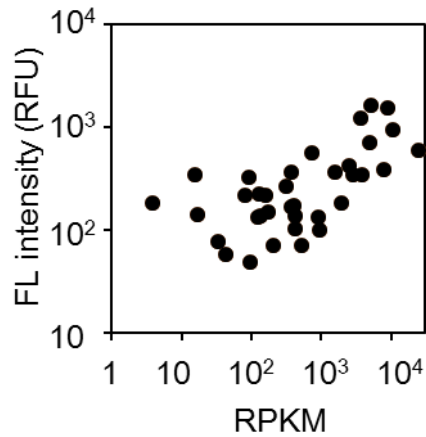


Fig. 2-8. RFU平均値とmRNA発現量の相関

各レポーター遺伝子の平均RFUを縦軸として、mRNA次世代シーケンス解析から得られた発現量RPKM(read per kb of exon per million mapped sequence reads)の値を横軸としてプロットした。相関係数は0.512 ; $p < 0.05$

2.3.4 リアルタイム測定による経時的発現解析

リアルタイムでのプロモーター活性解析を行うために、構築したレポーター組換え体の6~10クローンのうち、蛍光レベルの高い方から2クローンずつ選択し、蛍光および増殖をYP2D培地で10分ごとに24時間測定した。Fig. 2-9にKm*PFK1p*およびKm*PDC1p*のレポーター組換え体の2クローンを測定した結果を示す。

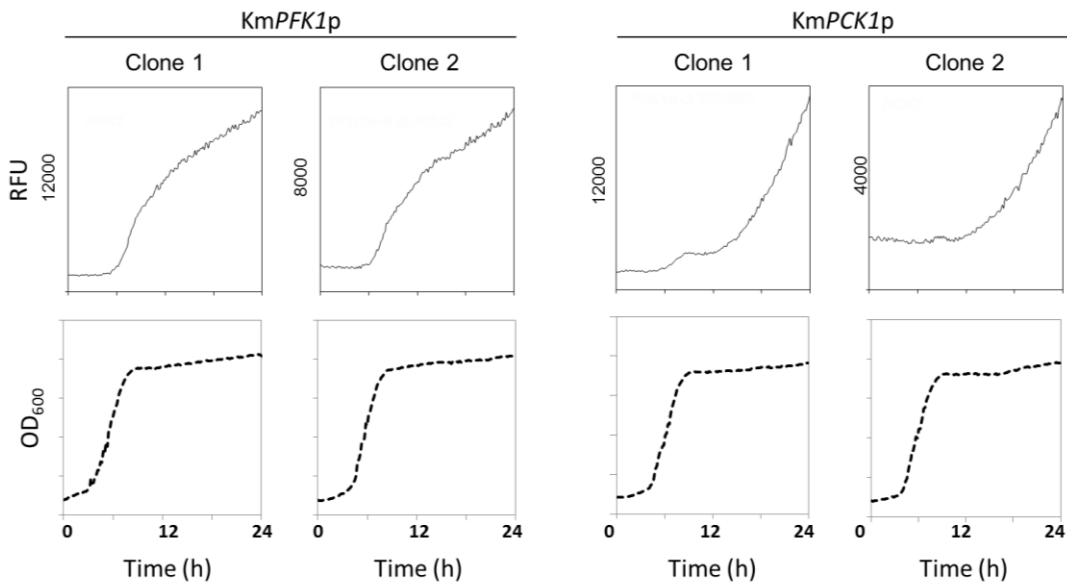


Fig. 2-9. レポーター組換え体のリアルタイム測定の例

Km*PFK1p*とKm*PDC1p*のレポーター組換え体2クローンのYP2DにおけるRFP蛍光発現および増殖を測定した。上に蛍光曲線(実線), 下に増殖曲線(点線)を示し, RFUの縦軸の最大値を各グラフに示し, OD₆₀₀の縦軸は0.5刻みで2.5まで示した。

クローン間およびプロモーター間で、増殖曲線(OD₆₀₀)に差は見られなかった。一方でクローン間の蛍光強度の最大値を比較すると、**KmPFK1p**では約4000、**KmPDC1p**では約3倍の差があった。しかしながら、縦軸の値を変えれば蛍光曲線は類似しており、発現のタイミングやその傾きは同じ挙動を示した。この結果から、リアルタイムな発現モニタリングでは発現強度に関わらず、正確に発現の挙動を解析できることが明らかになった。つまり、発現の挙動を解析する場合にはクローンの発現量を考慮せずに用いることが可能である。

そこで、本研究で構築した各レポーター組換え体の最も発現の高いクローンを用い、培地条件としてYP2D, YP10D, YPXを用いてリアルタイム蛍光測定を行った(Fig. 2-10)。各培地条件において、すべての株は似たような増殖を示したので、そのひとつの例として**KmADH2p**の増殖曲線をFig. 2-10下枠内のGrowthに示した。一方で、蛍光曲線は各レポーター株によって異なった挙動を示した。黒線で示したYP2Dにおいて、**KmGPM1p**, **KmENO1p**および**KmFBA1p**は、4時間ごろに急激に発現した。少し遅れて6時間ごろに解糖系のほとんどのプロモーターが発現するが、**KmGLK1p**, **KmTDH3p**および**KmADH3p**では発現が弱い。糖新生系のプロモーター**KmPCK1p**, **KmPYC1p**, **KmMDH2p**の発現は解糖系に比べて遅く、8~12時間ごろに発現する。ペントースリン酸、キシロース代謝、アセテート生産系に関わるプロモーターは**KmALD4p**を除き発現が弱かった。このように、リアルタイムな発現測定は、同条件における各プロモーターの発現タイミングと速度の挙動を明らかに示した。

YP10Dにおいて、YP2Dよりも増殖の遅延が見られた(Fig. 2-10, Growth)。ほとんどのプロモーターは細胞増殖に比例して蛍光強度の値が増加しており、発現の開始がYP2Dから数時間遅れていたが発現の挙動は似ていた。しかしながら一部のプロモーターは異なった挙動を示した。**KmGLK1p**はYP2Dにおいては24時間までにほとんど発現していなかったが、YP10Dでは12時間以降に高く発現した。**KmPCK1p**と**KmPYC1p**は、YP2Dでは12時間で発現したが、YP10Dでは23時間まで抑制されていた。**Pck1**および**Pyc1**は、*S. cerevisiae*において糖新生を引き起こす酵素でありグルコースの存在下では抑制されることが知られている(Brewster *et al.*, 1994; Mercado *et al.*, 1994)。この結果は、*K. marxianus*においてもグルコース存在下で**KmPCK1p**と**KmPYC1p**の発現が抑制されていることを示した。

キシロース条件(YPX)においては、グルコース条件よりも増殖の遅延が見られ(Fig. 2-10, Growth)、ほとんどのプロモーターで発現が低かった。しかしながら、キシロース代謝に関わる**KmXYL1p**および**KmXYL2p**では、グルコース条件と同程度に発現していた。**KmALD2p**と**KmSOL1p**はすべての糖条件で蛍光が弱かった。

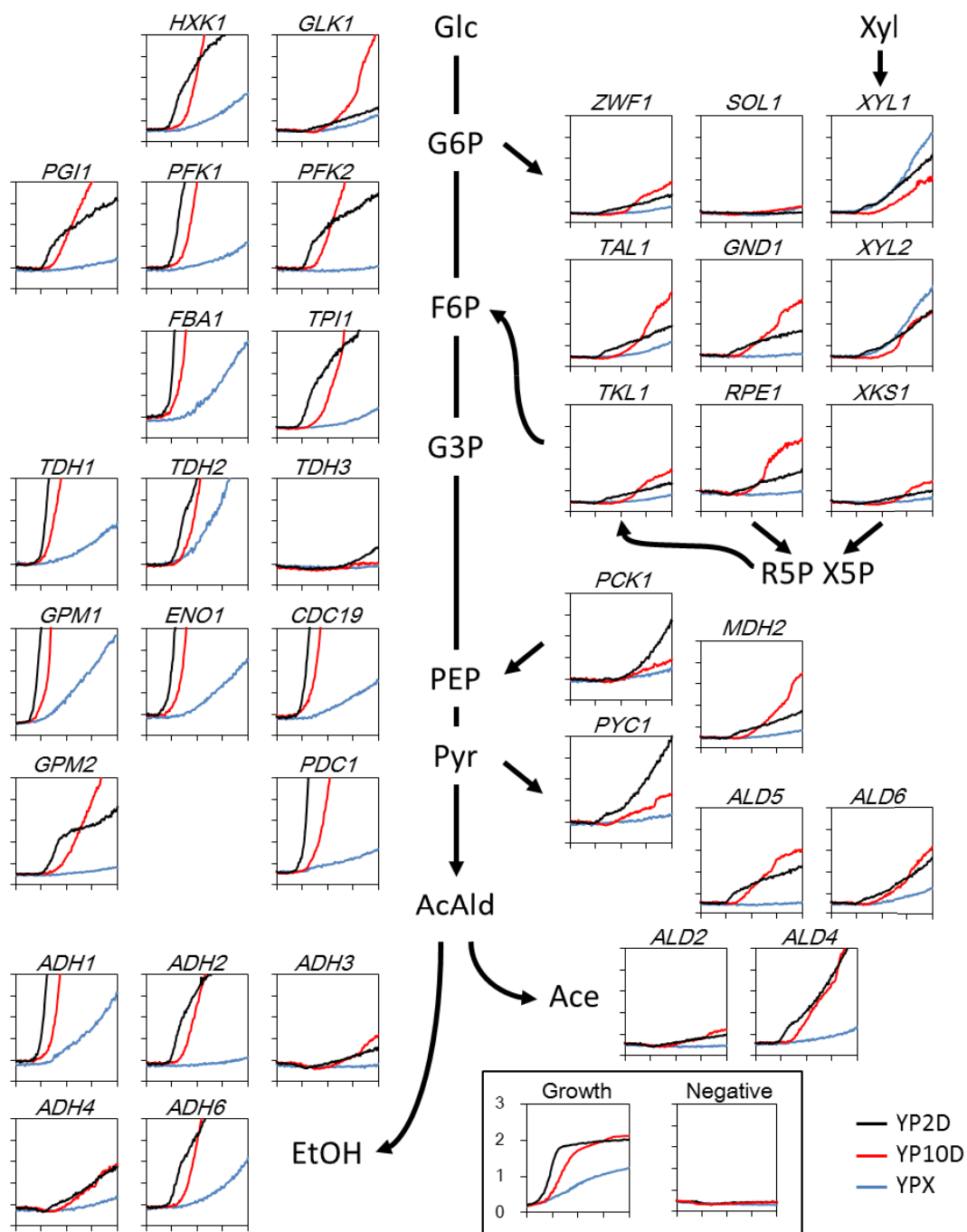


Fig. 2-10. リアルタイム発現解析

横軸の目盛りはそれぞれ0, 6, 12, 18, 24時間を示す。縦軸の目盛りは1000ごとに刻み, 5000 RFUまでを示した。増殖曲線は, RAK9228(KmADH2p-ScURA3yEmRFP)を例として示し, レポーター遺伝子を含まない細胞の蛍光曲線(Negative)を下の枠中に示した。それぞれの代謝化合物を経路に示した。各培地の発現をYP2D(黒線), YP10D(赤線), YPX(青線)でそれぞれ示した。

2.3.5 カイネティック発現解析によるプロモーター活性の評価

リアルタイムな発現測定は、培地条件を変えた場合の各レポーターの発現挙動を同時に解析することを可能にした。そこで、これらの培地条件におけるプロモーター活性を評価するために、蛍光曲線のカイネティック解析を試みた。まず、蛍光強度を各タイムポイントのOD₆₀₀の値で割った細胞あたりの発現量を時間に対してプロットした。その結果、OD₆₀₀が約0.8以下および1.5以上のプロットではリニアリティが得られず、活性評価に適応できなかった。本測定条件において1.5以上のOD₆₀₀の値は計算値と相関が低く(Data not shown), OD₆₀₀の値が低い時点では蛍光強度が弱いことから、プロットした発現量でリニアリティが得られない値は信頼性が低いと判断した。各条件において、発現量のプロットが直線上に並ぶ範囲内で算出した傾きは、細胞内にRFPを蓄積する発現速度として、その時点におけるプロモーター活性を示す。Fig. 2-11にKm*ENO1p*およびKm*XYL2p*のカイネティック解析の例を示す。

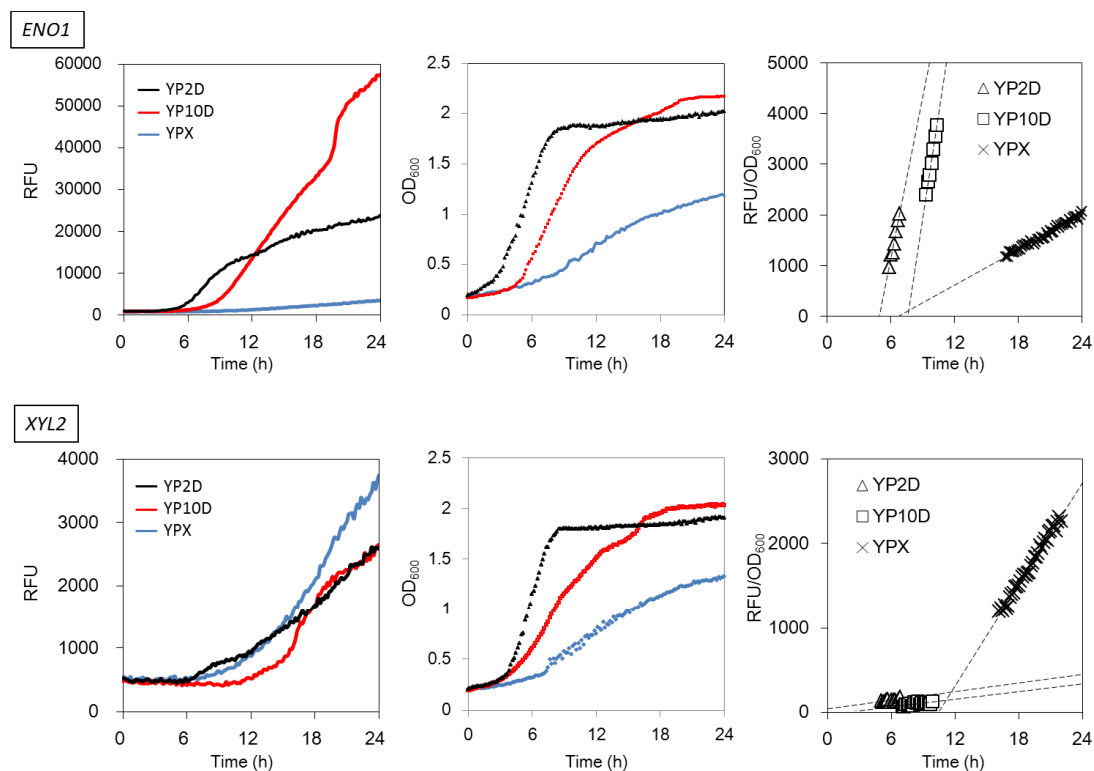


Fig. 2-11. Km*ENO1p*(上段)およびKm*XYL2p*(下段)のカイネティック発現解析

細胞増殖(中央)に対する蛍光強度(左)の値を、リニアリティがある範囲のみ各時間に対してプロットした(右)。RFUとOD₆₀₀はそれぞれYP2D(黒線), YP10D(赤線), YPX(青線)の培地条件を示し、シンボルはそれぞれYP2Dを△, YP10Dを□, YPXを×で示した。

Km*ENO1p*の場合、プロモーター活性は両方のグルコース条件において傾きが大きく、キシロース条件よりも活性が高かった。一方、Km*XYL2p*はグルコース条件では弱い活性を

示していたが、YPX場合においては強く活性を示した。それぞれの培養条件下でのプロモーター活性の違いを見るために、YP2Dに対するYP10DおよびYPXの傾き率をそれぞれ計算した。各レポーター株は2クローンずつ同様に傾きを算出して平均値を使用し、偏差として示した(Fig. 2-12)。例えばKm*ENO1p*の場合、YP2Dに対するYP10Dの傾き率は、クローン1が1379.5/1200.4(1.149)、クローン2が1452.2/1223.9(1.187)なので平均値は1.168であり、YP2Dに対するYPXの傾き率はそれぞれ104.9/1200.4(0.087)と120.7/1223.92(0.099)であり、平均値は0.092である。Km*XYL2p*の場合も同様に算出し、YP2Dに対するYP10Dの傾き率はそれぞれ9.3/15.3(0.606)、15.4/16.9(0.756)から平均値は0.759であり、YP2Dに対するYPXの傾き率はそれぞれ171.5/15.3(11.178)、163.9/16.9(9.718)であり、平均値は10.448である。平均値と偏差をFig. 2-12に示した。

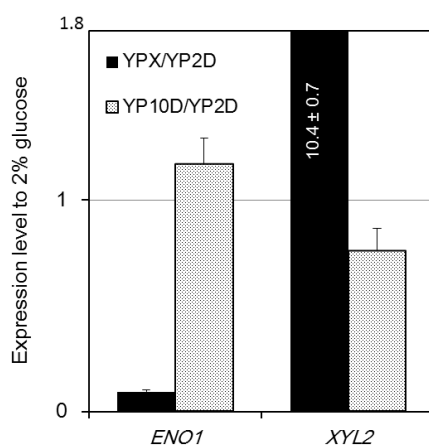


Fig. 2-12. YP2Dに対する活性

Km*ENO1p*およびKm*XYL2p*の各培地における活性を、YP2Dに対する比として算出した。それぞれYP2Dに対するYP10D(点), YP2Dに対するYPX(黒)の活性を示す。YPX条件でのKm*XYL2p*の比率は縦幅を上回り、バーの中に値を示した。

どちらのプロモーターもグルコース条件下での活性に大差はないが、キシロース条件においてはKm*ENO1p*の活性が低いことに対し、Km*XYL2p*は10倍の活性があることが示された。この解析法を用いることでプロモーター活性を評価できることがわかったので、本研究で構築した他のレポーター株を用いてカイネティック解析を行い、YP2Dに対するYP10DおよびYPXの活性を算出した(Fig. 2-13)。ただし、発現がほとんどなく値を求められなかったKm*ADH3p*やKm*GLK1p*は除外した。

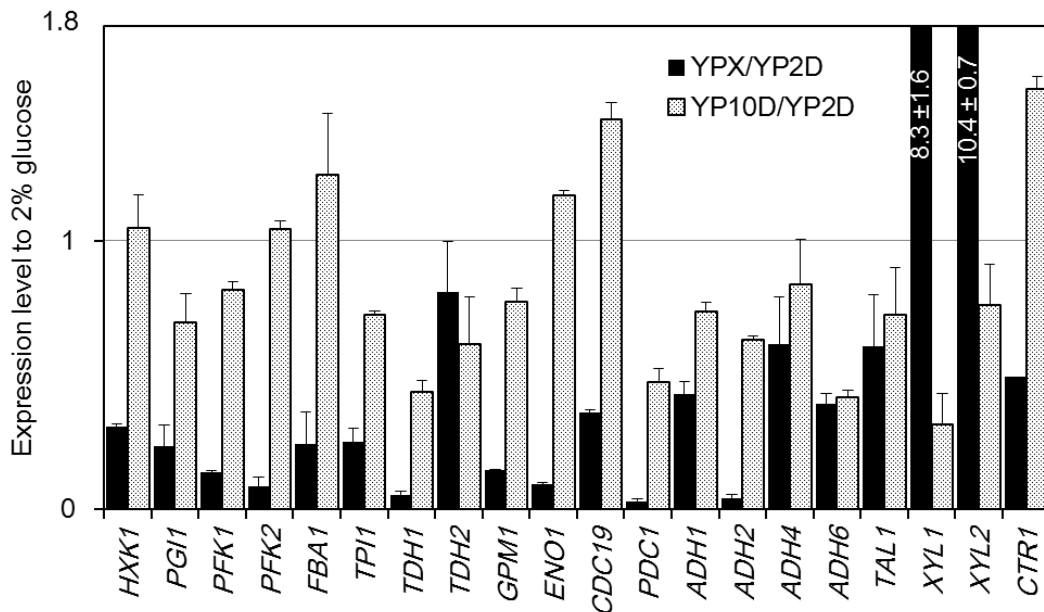


Fig. 2-13. 各プロモーターのYP2Dに対する相対的な発現レベル

各培地における活性を、YP2Dに対する比として算出した。それぞれYP2Dに対するYP10D(点), YP2Dに対するYPX(黒)の活性を示す。YPX条件でのKmXYL1pとKmXYL2pの比率はグラフ中に値を示した。

YP10Dにおいて、YP2Dと比べて大きな変化は見られなかった。一方で、KmTDH2pを除いた多くの糖代謝遺伝子はYPXにおいて強く抑制されたが、KmXYL1pとKmXYL2pの場合、グルコース条件に比べるとキシロース条件においてプロモーター活性が強く増強された。

以上の結果から、*K. marxianus*においてNHEJとfunctional marker selection法を利用したワンステップレポーター遺伝子構築システムを開発し、構築したレポーター遺伝子群を用いた生細胞でのリアルタイムな発現解析を行った。この構築システムと発現解析系が他の酵母に適応できるかを検討するために、酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いて検討を行った。

2.3.6 *S. cerevisiae*における発現解析レポーター遺伝子の構築

*S. cerevisiae*においてレポーター遺伝子の構築にfunctional marker selection法を適用するために、2 μ mプラスミドを利用した。本研究で使用しているレポーター遺伝子であるyEmRFPを含む2 μ mプラスミドYEepGAPcherry(Keppler Ross *et al.*, 2008)を基に、レポーターを発現するプロモーターの上流に形質転換選択マーカー遺伝子としてScHIS3を組込んだpSC570を構築した(Fig. 2-14)。

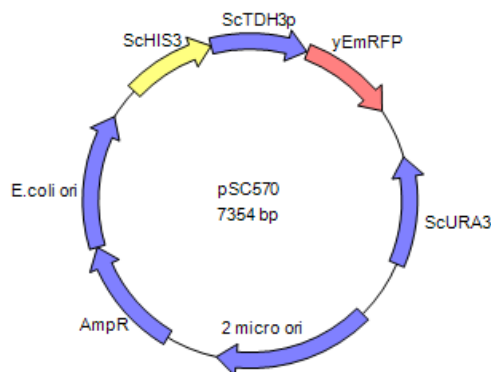


Fig. 2-14. pSC570プラスミドマップ

YEepGAPcherryのScTDH3プロモーター上流にScHIS3を組込んだ。

pSC570をテンプレートに、ScHIS3のC末端配列とyEmRFPのN末端配列をそれぞれ削除するHIS3+673cとyEmRFP+7をプライマーに用いてPCR合成し、ベクターDNA断片とした(Fig. 2-15)。ScHIS3のC末端を+643cまで削除すると完全に機能しなくなる(Hoshida *et al.*, 2013)。相同組換え(HR)を利用して機能マーカーの選択をするために、ScHIS3の切断したC末端配列と相同組換えに必要な長さ50 bpをプロモーター配列のN末端側に付加するプライマーScHIS3+614(50)-ScXXX-1000と、yEmRFPの開始コドンから相同組換えに必要な長さを付加するプライマーyEmRFP+40c-ScXXX-1cを用いて、プロモーター領域を合成した。結果として、PCR合成プロモーター断片はN末端側にScHIS3Cを、C末端側にyEmRFPNを含んでいる。ScHIS3CとyEmRFPNを含むプロモーター断片とベクター断片を混ぜ、*S. cerevisiae his3 Δ* 株BY4714の形質転換をした。相同組換えによってプロモーター断片がベクター断片上に組み込まれ、ScHIS3が機能する遺伝子になったものだけがSD-His培地で形質転換体として現れる。同時にyEmRFP側も相同組換えが起こり、環状のプラスミド状になる。したがって組み込まれたプロモーターに依存してyEmRFPの発現が誘導される。解糖系に関わるScHXK1p, ScGLK1p, ScGPM1p, ScCDC19p, エタノールおよびアセテート生産に関わるScPDC1p, ScADH1p, ペントースリン酸回路のScZWF1p, 糖新生系のScPYC1pのプロモーターを使ってレポーター遺伝子を構築し、SD-His培地で選択した。

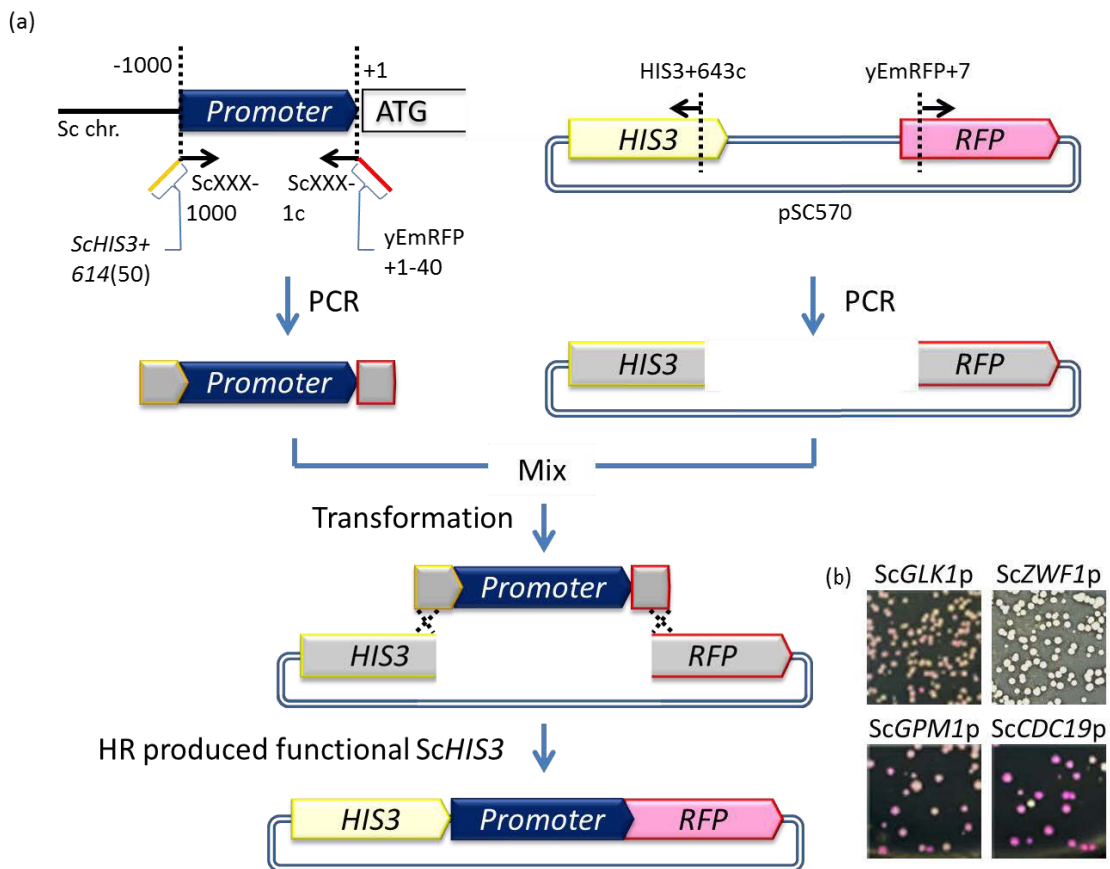


Fig. 2-15. *S. cerevisiae*におけるレポーター遺伝子構築法

(a)プロモーター領域はScHIS3のC末端配列50 bpおよびyEmRFPのN末端配列40 bpを付加し、ベクターDNAはScHIS3のC末端およびyEmRFPのN末端配列を削除して合成した。この2本の断片を混ぜて*S. cerevisiae his3Δ*株BY4714の形質転換に使用した。(b)ScGLK1p, ScGPM1p, ScZWF1p, ScCDC19pの形質転換体。

2 μ mプラスミドはマルチコピープラスミドである。RFPタンパクが蓄積されたことでコロニーの色が赤くなった。ScCDC19pのコロニーが最も赤く、次いでScGPM1pおよびScGLK1pのコロニーがピンク色、ScZWF1pのコロニーは白色だった。このように、プロモーターによってコロニーの色に差異が生じた。

2.3.7 *S. cerevisiae*でのリアルタイム発現モニタリング

作成したレポーター株のリアルタイム発現モニタリングを行った(Fig. 2-16)。YP2D培地で30°C, 30分ごとに24時間測定した。すべての株で似たような細胞増殖を示した。Fig. 2-16の枠内にScGPM1pの増殖曲線を示す。ScGPM1pおよびScCDC19pの蛍光強度は2~6時間で急速に高くなったが、ScHXX1p, ScGLK1p, ScPDC1pおよびScADH1pではその傾きが緩やかだった。YP2DにおけるGLK1pの発現は*K. marxianus*において低かったが、*S. cerevisiae*ではScHXX1pと同様に発現していた。ScZWF1pのRFUは低かった。

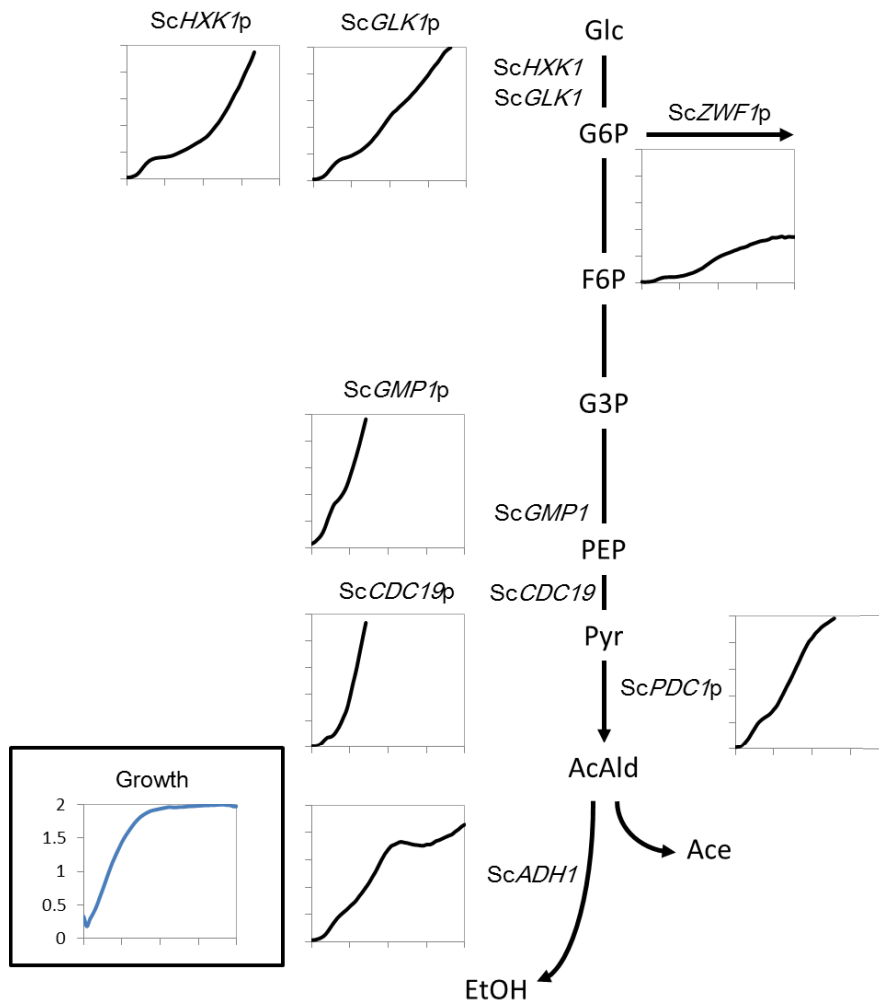


Fig. 2-16. *S. cerevisiae*におけるリアルタイム発現モニタリング

YP2D, 30°Cで、30分ごとに24時間測定した。横軸に時間を取り、目盛りはそれぞれ0, 6, 12, 18, 24時間を示す。縦軸の目盛りは2000刻みで10000 RFUまでを示した。GrowthにはScGLK1pの増殖を示す。

これらの結果から、*S. cerevisiae*においてマルチコピープラスミドを用いた場合でも、*K. marxianus*同様にその発現の時期や速度の挙動をモニタリングすることが可能であった。

2.4 考察

本章では、酵母 *Kluyveromyces marxianus* において生細胞でのリアルタイム発現解析に利用できるレポーター遺伝子構築系と発現解析系を開発し、さらにその手法を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においても適応した。

リアルタイム発現測定のためのレポーター遺伝子

蛍光タンパク質の発現検出は、細胞の処理を必要としないためにリアルタイムな発現解析に最適である。Liらは、GFPを96ウェルプレートでのリアルタイム発現解析にGFP蛍光を使用している(Li *et al.*, 2000)。一方で、*Phichia pastoris*では高いレベルのバックグラウンド緑色蛍光が観察されている(Qin *et al.*, 2011)。本研究においても、酵母は青および緑色蛍光の観察波長に自家蛍光を持つこと明らかにした(Fig. 2-1)。したがって、GFPを用いた場合には弱い発現を捉えることが難しいことが予想される。また、YP2Dにおいても酵母の自家蛍光と同様の蛍光ピークが検出されたが、これはYP2Dの組成に酵母から抽出した yeast extractが含まれていることに起因していると考えられる。したがって、yeast extractを含まない培地条件や発現が非常に高い場合にはGFPによる発現解析を行うこともできるだろう。一方でRFPは酵母およびYP2Dの自家蛍光と蛍光波長が重複しなかったことから、酵母生細胞における蛍光測定にはRFPが最適であると考え、本研究ではRFPを用いて酵母でのリアルタイム発現解析を行った。

Sc *URA3*:yEmRFPを用いたワンステップレポーター遺伝子構築

*K. marxianus*においてレポーター遺伝子の構築にあたり利用したSc *URA3*:yRmRFPのインフレーム融合遺伝子は、functional marker selection法によるプロモーター組み換え体の構築と、プロモーター依存的なレポーター遺伝子の発現を実現した(Fig. 2-5)。形質転換の選択がプロモーターの発現に依存していることから、プロモーターの活性が弱い場合には形質転換体が得られないことが予想されたが、Km *SOL1p*やKm *ALD2p*のような低い活性を示したプロモーターにおいても、レポーター株を構築できた(Fig. 2-10)。この結果から、レポーター遺伝子構築には高い活性を必要としないことが明らかになり、幅広いプロモーターに適用できることを示している。レポーター遺伝子はRFPだけでなく、ルシフェラーゼやβガラクトシダーゼのような他のレポーター遺伝子の構築にも利用できる。

*K. marxianus*におけるNHEJを利用した合成遺伝子構築の正確性は、Yarimizuらの報告では83~90%とされていた(Yarimizu *et al.*, 2015)。レポーター遺伝子構築ステップの正確性を求めるために、356形質転換体をピックしてYP2DでのRFP発現を測定したところ、38形質転換体が偽陽性であり、構築の正確性は約90%であることを予想できる。NHEJはDNA修復機構のひとつであり、他の酵母や真核生物にも保存されていることから、すべての生物への応用に期待ができる。

リアルタイム発現モニタリング

作成した株の発現をリアルタイムに測定したところ、Fig. 2-6に示したように、同一のレポーター組換え体でもクローンによって蛍光の発現レベルは異なった。形質転換によって *K. marxianus* に導入されたDNA断片は、染色体上にランダムに組み込まれる (Nonklang *et al.*, 2008)。このため、発現レベルの違いはレポーター遺伝子が組み込まれた染色体上の位置によって影響を受けていると考えられる (Thompson and Gasson, 2001)。クローン間の発現レベルを安定化させるためには、染色体上の特定の位置への挿入、もしくは安定なプラスミド上での構築が効果的だと考えられる。クローン間での発現レベルの平均値と mRNA シークエンス解析による転写レベルにはある程度の相関が見られた (Fig. 2-8)。この結果は、複数クローンの発現レベルを平均化することで、それぞれのプロモーターの活性を比較することが可能であることを示している。

しかしながら、発現レベルが異なっても蛍光曲線の挙動はほとんど同じであった (Fig. 2-9)。この結果は、リアルタイムな発現のモニタリングが、発現レベルに関わらずに発現のタイミングと RFP 蓄積速度を表現することを示している。これらは発現の挙動を示しており、生細胞におけるリアルタイムな測定の有用な特徴となる。

Fig. 2-10に示した各糖条件におけるリアルタイム発現モニタリングでは、グラフの立ち上がりが発現するタイミングを示しており、グルコース条件において *KmGPM1p* や *KmENO1p* などの解糖系下流に位置するプロモーターが最も早く発現することを明らかにした。その次にグルコース代謝の初期を担う *KmHXX1p* や他の代謝経路のプロモーターが発現を始めており、解糖系を動かすためには、下流の代謝産物を消化することでグルコースの取り込みを促進していることが考えられる。また、*KmGLK1p* は YP2D においてあまり発現していないが、YP10D では *KmHXX1p* より遅れて発現している。このことから、グルコース濃度が高い場合には *KmHXX1p* だけでは代謝が不十分であり、*KmGLK1p* はグルコース濃度をモニターして代謝の制御をしていることが考えられる。発酵生産における糖濃度は高いため、*KmGLK1p* の発現を高めることで、解糖系の亢進に期待ができる。キシロース (YPX) 条件においては *KmXYL1p* および *KmXYL2p* 以外の発現が弱く見えたが、増殖の悪さが影響している可能性が考えられた (Fig. 2-10, Growth, 青線)。

プロモーター活性のカイネティック発現解析

増殖の影響を排除し、異なる培地条件におけるプロモーター活性の比較するために、蛍光曲線のカイネティックな発現解析を行った (Fig. 2-11~2-13)。グルコース濃度が 10% の時、2% と比べて増殖開始時期や増殖速度の遅延を引き起こしていたが (Fig. 2-10, Growth), Fig. 2-13 において YP10D と YP2D の発現速度はほぼ同じであることが明らかになったため、高い糖濃度条件におけるグルコースの代謝には、解糖系以外の適応を必要としていることが考えられる。

キシロース代謝産物として、フルクトース-6-リン酸 (F6P) とグリセルアルデヒド-3-リン

酸(G3P)がペントースリン酸サイクルを経由して解糖系に入るため、*KmHXK1p*および*KmPGI1p*は直接キシロース代謝に関与しないが、他の解糖系遺伝子はキシロース代謝に必要である。YPXでは、*KmGPM1p*、*KmENO1p*、*KmPDC1p*の活性が非常に低いことが明らかになった。本研究で使用した*K. marxianus*株はキシロースからエタノールに変換ができないが、このような遺伝子の低い発現がピルビン酸もしくは他からエタノールへの代謝の流れを制限していることが考えられる。*KmXYL1*がキシロース条件で誘導されることは報告されていたが(Rodrussamee *et al.*, 2011)、本研究の結果から*KmXYL2*も同様にキシロースによって強く誘導されることを新たに示した(Fig. 2-13)。これらのプロモーターの発現はグルコース条件下で弱く、*KmXYL1*と*KmXYL2*遺伝子が糖によって直接制御されていることを示している。一方で、*KmXKS1p*の発現はキシロース条件下でさえ常に低かった。最近、*KmXYL1*と*KmXYL2*(*KmSOR1*)がキシロースによって誘導されるが、*KmXKS1*は誘導されないことが報告された(Lertwattanasakul *et al.*, 2015)。*KmXks1*によって触媒される反応は、*K. marxianus*におけるキシロース代謝の過程で律速になっている可能性がある。*KmXYL1*、*KmXYL2*および*KmXKS1*の3遺伝子の過剰発現によって、キシロース消費とエタノール生産は増強されるが(Goshima *et al.*, 2013)、一方で、*K. marxianus* NBRC1777株において*KmXKS1*の破壊はキシロースの代謝能力を完全に失わないことから、キシロース代謝におけるバイパス経路であることが示唆されている(Wang *et al.*, 2011)。本研究で使用したDMKU3-1042株においても、他の経路がキシロース代謝の主要な経路である可能性が考えられる。

***S. cerevisiae*におけるリアルタイム発現解析**

*S. cerevisiae*においては相同組換えを利用し、発現レポーター遺伝子の構築と発現モニタリングを行った。マルチコピーである2 μ mプラスミドでRFPを発現させると酵母の色が赤くなることが報告されている(Keppler-Ross *et al.*, 2008)。Fig. 2-15bでは、yEmRFPを発現させるプロモーターによって酵母の色に違いが現れており、このことは酵母の色によってプロモーター活性を比較できる可能性を示した。YP2Dにおいてリアルタイムな発現モニタリングを行うと、*K. marxianus*同様に、プロモーターによる発現の挙動が示された。全体的に*K. marxianus*と比べて発現時期が早かったが、これは増殖曲線(Growth)の立ち上がりの早さに比例していると考えた。RFPの測定値は測定限界である100,000 RFUを振り切る株が多く、*K. marxianus*よりも発現が高いことが示された。この結果は、酵母の色が変わるほどのマルチコピー能力の影響であると考えられる。*ScGLK1p*は*ScHXK1p*とほぼ同じ挙動を示したが、*KmGLK1p*はYP2Dでほとんど発現しておらず異なる挙動を示した。*S. cerevisiae*は古くからエタノール発酵に利用されてきた酵母であるため、解糖系が発達している可能性がある。2種間の発現挙動の差は、*GLK1*がエタノール発酵の制御に関わる可能性を示した。

本章において、複数の遺伝子配列を結合できるワンステップレポーター構築法を確立した。この手法は、NEHJやHRといったすべての生物が持つDNA修復機構を利用しているため、さまざまな生物種での応用に期待ができる。さらに、2種の酵母における生細胞でのリアルタイム発現解析系を確立した。生細胞でのリアルタイム蛍光測定は発現のタイミングや増強、抑制など転写の挙動を正確に検出することが可能であり、環境変化に対する細胞内の応答を明らかにすることに適している。発酵や生産など様々な条件における細胞挙動の把握に利用することができ、そのプロファイルは酵母の代謝工学においても有用なものになる。

2.5 参考文献

- Abdel-Banat BM, Hoshida H, Ano A, Nonklang S & Akada R. (2010). High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 861-867.
- Abdel-Banat BM, Nonklang S, Hoshida H & Akada R. (2010). Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 27, 29-39.
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P & Boeke JD. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14, 115-132.
- Brewster NK, Val DL, Walker ME & Wallace JC. (1994). Regulation of pyruvate carboxylase isozyme (*PYC1*, *PYC2*) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and nonfermentative growth. *Arch Biochem Biophys*, 311, 62-71.
- Cormack B. (1998). Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Curr Opin Microbiol*, 1, 406-410.
- Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, & Gombert AK, (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79, 339-354.
- Goshima T, Negi K, Tsuji M, Inoue H, Yano S, Hoshino T & Matsushika A. (2013). Ethanol fermentation from xylose by metabolically engineered strains of *Kluyveromyces marxianus*. *J Biosci Bioeng*, 116, 551-554.
- Haber JE. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191, 33-64.
- Himes SR & Shannon MF. (2000). Assays for transcriptional activity based on the luciferase reporter gene. *Methods Mol Biol*, 130, 165-174.
- Hoshida H, Murakami N, Suzuki A, Tamura R, Asakawa J, Abdel-Banat BM, Nonklang S, Nakamura M & Akada R. (2014). Non-homologous end joining-mediated functional marker selection for DNA cloning in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 31, 29-46.
- Jefferson RA. (1989). The GUS reporter gene system. *Nature*, 342, 837-838.
- Keppler-Ross S, Noffz C & Dean N. (2008). A new purple fluorescent color marker for genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Genetics*, 179, 705-710.

- Kondo T, Strayer CA, Kulkarni RD, Taylor W, Ishiura M, Golden SS & Johnson CH. (1993). Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 5672-5676.
- Lertwattanasakul N, Kosaka T, Hosoyama A, Suzuki Y, Rodrussamee N, Matsutani M, Murata M, Fujimoto N, Suprayogi, Tsuchikane K, Limtong S, Fujita N & Yamada M. (2015). Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnol Biofuels*, DOI: 10.1186/s13068-015-0227-x.
- Li J, Wang S, VanDusen WJ, Schultz LD, George HA, Herber WK, Chae HJ, Bentley WE & Rao G. (2000). Green fluorescent protein in *Saccharomyces cerevisiae*: real-time studies of the *GAL1* promoter. *Biotechnol Bioeng*, 70, 187-196.
- Limtong S, Sringiew C & Yongmanitchai W. (2007). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresour Technol*, 98, 3367-3374.
- Lohr D, Venkov P & Zlatanova J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast *GAL* gene family: a complex genetic network. *FASEB J*, 9, 777-787.
- Mercado JJ, Smith R, Sogliocco FA, Brown AJ & Gancedo JM. (1994). The levels of yeast gluconeogenic mRNAs respond to environmental factors. *Eur J Biochem*, 224, 473-481.
- Moore PA, Sogliocco FA, Wood RM & Brown AJ. (1991). Yeast glycolytic mRNAs are differentially regulated. *Mol Cell Biol*, 11, 5330-5337.
- Mount RC, Jordan BE & Hadfield C. (1996). Reporter gene systems for assaying gene expression in yeast. *Methods Mol Biol*, 53, 239-248.
- Nonklang S, Abdel-Banat BM, Cha-aim K, Moonjai N, Hoshida H, Limtong S, Yamada M & Akada R. (2008). High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl Environ Microbiol*, 74, 7514-7521.
- Oehlen B & Cross FR. (1994). Signal transduction in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Cell Biol*, 6, 836-841.
- Paulsen IT, Sliwinski MK, Nelissen B, Goffeau A & Saier MH Jr. (1998). Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 430, 116-125.
- Qin X, Qian J, Yao G, Zhuang Y, Zhang S & Chu J. (2011). *GAP* promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol*, 77, 3600-3608.
- Rodrussamee N, Lertwattanasakul N, Hirata K, Suprayogi, Limtong S, Kosaka T &

- Yamada M. (2011). Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90, 1573-1586.
- Stuart D & Wittenberg C. (1994). Cell cycle-dependent transcription of *CLN2* is conferred by multiple distinct cis-acting regulatory elements. *Mol Cell Biol*, 14, 4788-4801.
- Thompson A & Gasson MJ. (2001). Location effects of a reporter gene on expression levels and on native protein synthesis in *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 67, 3434-3439.
- Wang R, Zhang L, Wang D, Gao X & Hong J. (2011). Identification of a xylulokinase catalyzing xylulose phosphorylation in the xylose metabolic pathway of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 38, 1739-1746.
- Wittenberg C, Sugimoto K & Reed SI. (1990). G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34CDC28 protein kinase. *Cell*, 62, 225-237.
- Yarimizu T, Nakamura M, Hoshida H & Akada R. (2015). Synthetic signal sequences that enable efficient secretory protein production in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Microbial Cell Fact*, DOI: 10.1186/s12934-01.

第3章

ヒト培養細胞におけるPCR合成DNAを利用した遺伝子操作技術の開発と それを用いた発現解析

3.1 はじめに

哺乳動物細胞での遺伝子操作技術は、生命現象の解明や医薬品製造などを目的に利用されている。その目的は多岐にわたるが哺乳動物細胞で遺伝子を発現させるためには、“プロモーター-遺伝子-ターミネータ”という発現ユニットを構築する必要がある点で共通している。一般的に、哺乳動物細胞のプロモーターにはサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ヒト伸長因子elongation factor 1-alpha(EF1 α)やアクチン遺伝子(β -Act)のプロモーターが用いられる(Sugiyama *et al.*, 1988; Wilkinson *et al.*, 1992; Teschendorf *et al.*, 2002)。ターミネータにはシミアンウイルスのSV40, ウサギ β -globin, ウシ成長ホルモンBGHのターミネータが使用されている(Cab-Barrera *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 2003; Falck-Pedersen *et al.*, 1985; Petitclerc *et al.*, 1995)。また、遺伝子発現の目的に合わせて様々なタグ配列やレポーター遺伝子も利用される。発現を抗体で検出するにあたり、遺伝子のN末もしくはC末端にFLAG, MYC, HA, V5などの短いエピトープタグ配列をインフレームに融合する場合もある(Fritze *et al.*, 2000; Bell *et al.*, 2013)。タンパク質精製のためには、ポリヒスチジンやGSTタグが使われる(Zhao *et al.*, 2013)。遺伝子発現能力の検出には、ルシフェラーゼ、 β ガラクトシダーゼや β ラクタマーゼをプロモーター下流に挿入し(Naylor *et al.*, 1999; Welsh *et al.*, 2005; Prescher *et al.*, 2010), タンパク質の局在を解析するために、GFP, RFP, YFPなどの蛍光タンパク質をコードする遺伝子が用いられており(Jiang *et al.*, 2008; Chalfie *et al.*, 1993), これらは遺伝子の変異解析にも利用されている(Chen *et al.*, 1993; Grabenhorst *et al.*, 1999)。このようなレポーター遺伝子、プロモーターとターミネータなどが既に配置された様々なプラスミドが開発されているが(Tan *et al.*, 2006; You *et al.*, 2010), プロモーターとターミネータの間に遺伝子を挿入するためには時間と労力を要する大腸菌を用いなければならない。時間を短縮する様々な方法が開発されているもの(Elmleik *et al.*, 2001; Roure *et al.*, 2007; Matsumoto & Itoh, 2011; Lejard *et al.*, 2014), 大腸菌を使う方法では劇的な短縮は難しく、大腸菌を介さない新しい遺伝子操作技術が望まれている。

そこで本研究ではPCRに着目した。PCRでは同様のDNAを数時間で構築することができる。PCR技術の進歩は著しく、最近はほとんどエラーの起きない高正確性のDNAポリメラーゼが開発されている。また、PCRでは同時に多種類のDNAを合成することも可能であり、従ってPCRでDNAコンストラクトを用意することは有効な手段である。しかしながら、哺乳動物細胞における遺伝子発現実験の手法としてPCR産物はほとんど用いられていないのが現状である。その理由に、PCRではトランスフェクションに必要なDNA量を用意することが難しいことが挙げられる。大腸菌であれば、大量に培養した大腸菌からプラスミドを

精製することで数十 μg 単位でDNAを用意することができる。これに対し、PCRでは数百ng程度しか用意することが出来ない。また、PCR産物を導入する技術が確立されていない。そこで本章では、ヒト培養細胞においてPCRで合成した線状DNAを直接利用できる遺伝子導入技術の開発を目指した。

ヒト培養細胞への遺伝子導入には、ウイルス感染、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ジーンガン法など様々な方法があるが、トランスフェクション試薬を加えて遺伝子導入するケミカルトランスフェクション法は特殊な機器や設備を必要とせず、操作性が容易であるので、ケミカルトランスフェクション法が第一選択になっている。したがって、ケミカルトランスフェクション法における操作性の向上に価値がある。また、一般的にトランスフェクションでは6~24ウェルプレート上で培養した細胞に導入することが多く、推奨プロトコルではDNA 0.5~3 μg が必要である。そこで、少量のDNAでも利用可能な遺伝子導入法としての、ケミカルトランスフェクションを利用したPCR合成DNAによる遺伝子導入技術の開発を行った。

3.2 使用試薬および実験方法

3.2.1 細胞株, プラスミド, および試薬

ヒト培養細胞株には山口大学遺伝子実験施設から入手したHEK293細胞およびHeLa細胞を用いた。培地は, RPMI-1640(Sigma-Aldrich, Nacalai, Wako)に, 10%(v/v)のウシ胎児血清(Gibco, Hyclone, ThermoFisher Science)と抗生物質(Sigma-Aldrich, Nacalai, Wako)を加えたものを用い, 培養は37°C 5% CO₂-95%airのインキュベータにて行った。

本研究に使用したプライマーはTable 3-1に示す。オリゴヌクレオチドは北海道システムサイエンスとオペロンバイオテクノロジー(現ユーロフィンジェノミクス)から購入した。

Table中のSiteは, 各Fig中における表現を示した。

Table 3-1. Primer used in this study

Primer name	Sequence 5' to 3'	Site in Fig. 3-8, (Fig. 3-14), [Fig. 3-18], <Fig. 3-19>
pEGFP-600	gtaatcaattacggggtcatta	+1
GLuc+558taaC	ttagtcaccaccgcccccttg	+1215c
pCMV-Gluc+1160c	atcaagtttttggggtcgaggt	+1582c
hNeo+795c	tcagaagaactcgtcaagaaggcg	+3001c
pEGFP+1028c	taagatacattgatgagtttg	+3296c
AmpR+1808	caatacgcaaacccctctccccgc	+3559c
AmpR+1008	cgtagaaaagatcaaaggatctct	+4359c
pEGFP+798c	ttatctagatccggtggatccc	
Gluc+559(30)-EGFP+799	gacaagatcaagggggccggtggtgactaactgatcataatcagccataacc	(+1-)
Gluc+559(30)-EGFP+819	gacaagatcaagggggccggtggtgactaacacattttagaggtttac	(+21-)
Gluc+559(30)-EGFP+839	gacaagatcaagggggccggtggtgactaattgcttataaaacctccca	(+41-)
Gluc+559(30)-EGFP+859	gacaagatcaagggggccggtggtgactaacacctccccctgaacctgaa	(+61-)
Gluc+559(30)-EGFP+879	gacaagatcaagggggccggtggtgactaaacataaaatgaatgcaattg	(+81-)
Gluc+559(28)-EGFP+899	caagatcaagggggccggtggtgactaattgtgtaactgtttattgc	(+101-)
Gluc+559(28)-EGFP+919	caagatcaagggggccggtggtgactaagcagcttataatggttacaat	(+121-)
pEGFP+818c	gtatggctgattatgatcagtta	(+20)
pEGFP+868c	gggggagggtgtggagggttttt	(+70)
pEGFP+938c	ttgtaaccattataagctgcaat	(+140)
EGFP+948c	attgctttattgtaaccattat	(+150)
EGFP+958c	ttgtgatgctattgctttattg	(+160)
EGFP+968c	tttgtaaattgtgatgctat	(+170)
pEGFP+978c	aaatgctttattgtgaaattgtg	(+180)
pEGFP+988c	gcagtgaaaaaatgctttattgt	(+190)
pEGFP+998c	caactagaatgcagtgaaaaaatg	(+200)
pEGFP+1008c	ggacaaaccacaactagaatgcagt	(+210)
pEGFP+1018c	tgatgagtttgacaaaccacaact	(+220)
pEGFP+1028c	taagatacattgatgagtttg	(+230)
bGlobinA(121-140)c-hGluc+558c	ccagaagtcagatgctcaagtttagtcaccaccggcccccttgatcttg	
Not1-hgluc+2529	ttattggcccgcgagcttataatggttaciaa	
hGlucC(28)-bGlobinA+101	caagatcaagggggccggtggtgactaaatgggacatcatgaagccct	(+101-)
hGlucC(28)-bGlobinA+121	caagatcaagggggccggtggtgactaactgagcatctgactctggct	(+121-)

Table 3-1. (Continued)

Primer name	Sequence 5' to 3'	Site in Fig. 3-8, (Fig. 3-14), [Fig. 3-18], <Fig. 3-19>
hGlucC(28)-bGlobinA+131	caagatcaagggggccggtgactaatgacttctggctaataaaggaa	(+131-)
bGlobinpolyA+534c	tcaggtcgaggatctca	
bGlopA(150)c	cctttattagccagaagtcagatgc	(+150)
bGlopA(155)c	aatttcctttattagccagaagtc	(+155)
bGlopA(160)c	aaataaattcctttattagccaga	(+160)
bGlopA(165)c	aatgaaaataaattcctttattag	(+165)
bGlopA(170)c	attgcaatgaaaataaattccttt	(+170)
bGlobinA+175c	acactattgcaatgaaaataaatt	(+175)
bGlopA(180)c	ccaacacactattgcaatgaaaata	(+180)
9C-FLAGc-pEGFP+699c	cccccccccttactgtcgtcgtcctttagtgcgccgagagtgatccccggcgcggt	[FLAG]
9C-MYCc-pEGFP+699c	cccccccccttagaggtcctcctcggagatgagcttctgctcggagagtgatccccggcgcggt	<MYC>
9C-HAc-pEGFP+699c	cccccccccttacgcgtagtcggcagcgtctacgggtagccgagagtgatccccggcgcggt	<HA>
9C-7Hisc-pEGFP+699c	cccccccccttagtgatggtgatggtgatggtgcccagagagtgatccccggcgcggt	<HIS>
bGlobinA(121-190)c-9C	acaaaaaattccaacacactattgcaatgaaaataaattcctttattagccagaagtcagatgctcaagcccccccc	
SV40pA(130-220)c-9C	tgatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgtgaaattgtgatgctattgctttattgtaaccattcccccccc	

プラスミドは、遺伝子発現用プロモーターとしてサイトメガロウィルス(CMV)のプロモーターを含むpEGFP-C1(Clontech), pmCherry-C1(Clontech), pCMV-GLuc(New England Biolabs)を使用した。pCMV-GLuc-SVterは、pCMV-GLucからネオマイシン耐性遺伝子を削除することにより作成した。具体的には、pCMV-GLucをテンプレートに、NotI-hGLuc+2529とpCMV-GLuc+1160cのプライマーを用いてPCRでDNA断片を合成し、NotI制限酵素処理後セルフライゲーションし大腸菌にクローニングした。プラスミドDNAは、Genopure Plasmid Kit(Roche)のプロトコルに従って精製した。

DNA濃度は、Qubitフルオロメーター(Molecular Probes)を用いて測定した。トランスフェクションエンハンサー試薬として、ポリエチレングリコールPEGの各分子量1000(Kanto chemical), 3350(Sigma-Aldrich), 6000(Wako)を脱イオン水に50%(w/v)となるように溶解した。仔ウシtotal RNA(Sigma-Aldrich)および、酵母transfer RNA(Sigma-Aldrich)は、10 mg/mLとなるように脱イオン水に溶解した。トランスフェクション試薬は、FuGENE HD(Promega), Lipofectamin3000, Lipofectamin2000(Invitrogen), ScreenFect(Incella GmbH), TransIT2020(Takara), HilyMAX(Dojindo), TransPassD2(New England Biolabs), CarriGene(Kinovate Life Science)を用いた。

3.2.2 トランスフェクション

96ウェル平底プレート(TPP)に、2000~8000 cells/wellに調整した細胞懸濁液を200 μ L/well播種し、20~24時間前培養した。20 ng/ μ Lに調整したDNAを2.5 μ L, 0~45%(w/v)に調整したPEGを2.5 μ L, 0~1000 μ g/mLに調整したRNAを2.5 μ Lを加えて96ウェル平底プ

レートに合計25 μL となるように滅菌水で調整した。そこに0.25 μL のトランスフェクション試薬を加え15~30分室温に静置した。これを遺伝子導入液とし、各ウェルに20 μL 加えてトランスフェクションした。必要に応じて3~5ウェル分の独立した実験系にて施行し、標準偏差を算出した。詳細な条件については実験結果に記載した。

3.2.3 PCR合成DNAの調整

PCRにはC1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad)を用い、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase(Takara)を取扱説明書に従って合成した。

CMVp-GLuc DNA断片は、pCMV-GLucプラスミドDNAをテンプレートに、フォワードプライマーにはpEGFP+600を、リバープライマーにはGLuc+558taaC, pCMV-GLuc+1160c, hNeo+795c, pEGFP+1028c, AmpR+1808, AmpR+1008をそれぞれ用いて合成した。

CMVp-EGFP, CMVp-EGFP-SV40pA DNA断片はpEGFP-C1プラスミドDNAをテンプレートとして、フォワードプライマーにはpEGFP-600を、リバープライマーにはpEGFP+798cもしくはpEGFP+1018cを用いて合成した。

発現の経時変化を調べるためのCMVp-GLuc-SV40pA DNA断片は、pCMV-GLuc-SVterプラスミドDNAをテンプレートに、pEGFP-600とpEGFP+1018cをプライマーとして合成した。

最小ターミネータ配列の同定には、レポーター遺伝子としてpCMV-Glucに構成されているCMVp-GLucを使用した。CMVp-GLuc DNA断片は、pCMV-Glucをテンプレートに、pEGFP-600およびGLuc+558taaCをプライマーに用いて合成した。

SV40ターミネータの最小ターミネータ配列の同定には、pEGFP-C1に構成されているSV40ターミネータ配列を使用した。SV40ターミネータDNA断片はpEGFP-C1をテンプレートに、Gluc+559(30)-EGFP+799, Gluc+559(30)-EGFP+819, Gluc+559(30)-EGFP+839, Gluc+559(30)-EGFP+859, Gluc+559(30)-EGFP+879, Gluc+559(28)-EGFP+899, Gluc+559(28)-EGFP+919をそれぞれフォワードプライマーとし、pEGFP+1028cをリバープライマーとして合成した。各DNA断片は100 $\text{pg}/\mu\text{L}$ に希釈した。SV40ターミネータ(2 μL)とGLuc(2 μL)のDNA断片を合わせて20 μL のPCR反応液に混ぜ、pEGFP-600をフォワードプライマーとし、リバープライマーにはpEGFP+818c, pEGFP+868c, pEGFP+938c, EGFP+948c, EGFP+958c, EGFP+968c, pEGFP+978c, pEGFP+988c, pEGFP+998c, pEGFP+1008c, pEGFP+1018c, pEGFP+1028cをそれぞれ用いてフュージョンPCRを行った。この断片を直接HEK293細胞へのトランスフェクションに使用した。

β -globinターミネータの最小ターミネータ配列の同定には、pTriEx-4Hygro(Novagen)に構成されている β -globinターミネータ配列を使用した。 β -globinターミネータDNA断片は、pTriEx-4Hygroをテンプレートに、リバープライマーにbGlobinpolyA+534cを、リバープライマーにはhGlucC(28)-bglobinpA+101, hGlucC(28)-bglobinpA+121,

hGlucC(28)-bglobinA+131をそれぞれ用いて合成した。これらの β -globinターミネータDNA断片は100 pg/ μ Lに希釈し、CMVp-GLuc断片と合わせて20 μ LのPCR反応液に混ぜ、pEGFP-600をフォワードプライマーとし、リバープライマーにはbGlopA(150)c, bGlopA(155)c, bGlopA(160)c, bGlopA(165)c, bGlopA(170)c, bGlobinA+175c, bGlopA(180)cを用いてフュージョンPCRを行った。この断片をそのままHEK293細胞へのトランスフェクションに使用した。

ターミネータプライマーの機能を調べるために用意したタグ付きEGFP発現用DNA断片は、pEGFP-C1プラスミドDNAをテンプレートとし、pEGFP-600をフォワードプライマーに、リバープライマーにはそれぞれ9C-FLAGc-pEGFP+699c, 9C-MYCCc-pEGFP+699c, 9C-HAc-pEGFP+699c, 9C-7HISc-pEGFP+699cを用いて合成した。pEGFP-C1のEGFPにはマルチクローニングサイトが含まれているが、1st PCRにおいてマルチクローニングサイトを削除し、HA, Myc, HIS(7HIS)タグ配列をEGFPのC末端に付加した。合成したDNA断片は100 pg/ μ Lに調整した。これらのDNA断片をテンプレートとし、2nd PCRではpEGFP-600およびSV40pA(130-220)c-9Cをプライマーに用いて合成した。EGFPはマルチクローニングサイトを含むがEGFP:HA, EGFP:Myc, EGFP:7HISには含まれないので、長さはそれぞれ265アミノ酸残基(以下AA), 243 AA, 242 AA, 240 AAである。

β -globinターミネータをプライマーで付加するために、PCR産物であるCMVp-EGFP-FLAGをテンプレートに、pEGFP-600cをフォワードプライマー、GlobinA(121-190)c-9Cをリバープライマーとして合成した。CMVp-EGFP:FLAG(None)は、PCR産物であるCMVp-EGFP-FLAGをテンプレートに、pEGFP-600および9C-FLAGc-pEGFP+699cをプライマーに用いて合成した。

3.2.4 GLucルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼ基質液は、500 μ gのルシフェラーゼ発光基質であるセレンテラジン(Avidity)を1180 μ Lのエタノール溶媒(濃塩酸10 μ L/10 mLエタノール)に溶解し1 mMに調整しストック溶液とした。使用時に10 μ Mの濃度になるようセレンテラジンをアッセイバッファー(0.1 mM Tris-HCl pH7.0, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂)に溶解し、サンプル10 μ Lを10 μ Mセレンテラジン溶液20 μ Lと混ぜて測定した。発光検出にはCentro XS LB960(Berthold Technologies)を用いて検出時間1秒で測定した。発現の経時的変化を調べるためのサンプルとして、トランスフェクション後1, 2, 3, 6日目に、それぞれ5 μ Lずつ培養上清を分取し、45 μ Lの培地で希釈した。希釈したサンプルは活性測定まで-20°Cに保存し、活性測定時には、1, 2日目のサンプルは10 μ L, 3, 6日目のサンプルは5 μ Lを20 μ Lの10 μ Mセレンテラジン溶液と混ぜた。ルシフェラーゼ活性の平均は標準偏差とともに算出した。データ解析はスチューデントt検定およびP値<0.05として統計学的に有意差を示した。

3.2.5 ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析用には各DNAを4ウェルずつトランスフェクションし、2日間培養した。SDS-PAGEでは、各ウェルを冷PBS(Sigma-Aldrich) 200 μ Lで2回洗浄した後、25 μ Lのサンプルバッファー(50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 25 mM MgCl₂, 0.12% BPB)と混合し溶解させた。溶解した細胞をひとつのチューブに4ウェル分収集して95°Cで5分間加温し、10 μ Lのサンプルを5~20%のポリアクリルアミドこう配ゲル(Wako)に20 mA/gelで1.5時間ロードした。電気泳動後、iBlot Dry Blotting System(Invitrogen)を用いてPVDFメンブレンに転写し、1時間ブロッキングした。このメンブレンを1000倍希釈した各抗体、モノクローナル抗GFP-抗体、ポリクローナル抗Myc抗体(Santa Cruz), ポリクローナル抗FLAG抗体, ポリクローナル抗HA抗体, ポリクローナル抗Myc抗体, ポリクローナル抗HISタグ抗体(MBL)に2時間反応させた。メンブレンは洗浄の後、1000倍希釈したHRP標識抗マウスIgG抗体もしくは抗ラビットIgG抗体(Jackson ImmunoResearch Lab)に1.5時間反応させた。シグナルの検出には、ImmunoStar Zata(Wako)を説明書に従って用いた。

3.2.6 顕微鏡観察

70%エタノールで滅菌した丸いカバーグラスをPBSで2回洗浄し、0.3%ゼラチン入りPBS(Sigma-Aldrich)に浸漬してゼラチンコーティングした。コーティングしたカバーグラスを6ウェルプレートにセットし、カバーグラス上にHEK293細胞を2 mL, 20000 cells/well播種し、2日間前培養した。トランスフェクションには、20 ng/ μ L DNAを10 μ L, 50% PEG3350と625 μ g/mL tRNAを10 μ Lずつ、滅菌水70 μ Lを96ウェルプレートで調整した。これに、FuGENE HDを1 μ L加えて30分間室温に静置し遺伝子導入液とした。101 μ Lの遺伝子導入液を細胞培養液に加えてトランスフェクションした。48時間後、細胞を固定してタンパク質の発現を抗FLAG抗体により検出した。培養上清を捨て、3.7%ホルムアルデヒド-PBS溶液を1 mL加えて30分間静置し、細胞を固定した。固定後、PBS 2 mLに交換して5分間置き洗浄する操作を5回行った。抗FLAG抗体を浸透させるため、洗浄した細胞に0.1% TritonX-100-PBS溶液500 μ Lを加え15分間静置した。1 mLのPBSで4回洗浄した後、500 μ Lのブロッキングバッファー(2% goat serum, 0.1% Tween 20を含むPBS)に30分間浸漬しブロッキングした。次に、細胞を250 μ Lの抗FLAG抗体(ブロッキングバッファーで500倍希釈したClone 1E6, Wako)に1時間反応させ、PBS 1 mLに交換して5分間置き洗浄する操作を5回行った。次に、250 μ LのAlexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG(H+L) (blocking bufferで100倍希釈, Molecular Probes)に遮光条件下で1時間反応させ、SlowFade Gold antiFade Reagent(Molecular Probes)で封入した。抗体検出には共焦点レーザー顕微鏡とZen 2011ソフト(Zeiss)を用いて画像を取得し解析した。

3.3 結果

トランスフェクション試薬の中でもFuGENE HD(FuGENE, Promega)は様々な哺乳動物細胞での発現実験に利用されていることから、本研究ではFuGENEを使用した。使用するDNA量を少量にするためにトランスフェクションは96ウェルプレートで培養した細胞で行うことにした。

3.3.1 プラスミドとPCR合成DNAの発現比較

まず、96ウェルプレートで培養した細胞において、プラスミドDNAとPCR合成DNAの発現比較を行った。

3.3.1.1 GFPの発現

細胞内局在や発現解析においてGFPレポーター遺伝子が使用されている(Prasher, 1995)。そこで、プラスミドDNAとしてpEGFP-C1を用い、PCR合成DNAとしてpEGFP-C1をテンプレートにpEGFP-600とpEGFP+1018cをプライマーに用いて合成した産物を用いてHEK293細胞にトランスフェクションした(Fig. 3-1)。

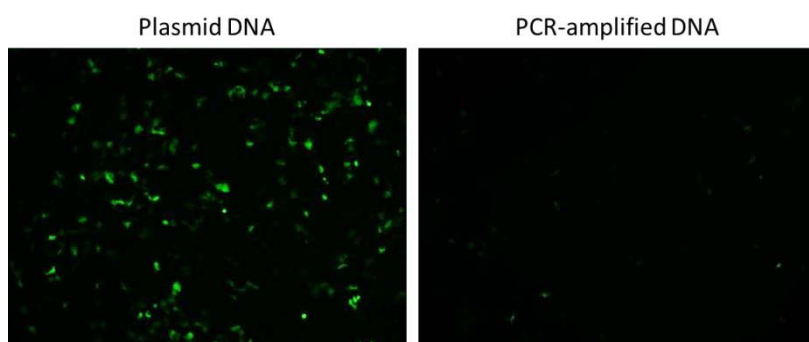


Fig. 3-1. 使用DNAによるGFP発現の比較

プラスミドDNAとしてpEGFP-C1, PCR合成DNAとしてCMVp-EGFP-SVterを使用し、それぞれ125 ngトランスフェクションした。24時間後、蛍光顕微鏡で露光時間1秒に統一して観察した。

その結果、等量のDNA量をトランスフェクションしたにも関わらず、プラスミドDNAではGFPの発現が見られたことに対し、PCR合成DNAではGFPを発現している細胞がほとんどなかった。このことから、PCR合成DNAによる遺伝子導入および発現が非常に低いことが明らかになり、DNA量以外にPCR合成DNAの導入や発現に影響を与える因子があることが示唆された。

3.3.1.2 GLucの発現

トランスフェクション条件を確立させるためには、定量的に評価出来ることが望ましい。そこで、定量評価に適しているルシフェラーゼ活性を指標とするためにGLucをレポーター

遺伝子として用いることにした。まず、プラスミドDNAとPCR合成DNAの発現を比較するために、プラスミドDNAとしてpCMV-Glucを用い、PCR合成DNAとしてpCMV-GlucをテンプレートにpEGFP-600とpCMV-Gluc+1160cをプライマーに用いて合成した産物を用いてCOS7細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後、経時的に活性を測定した(Fig. 3-2)。

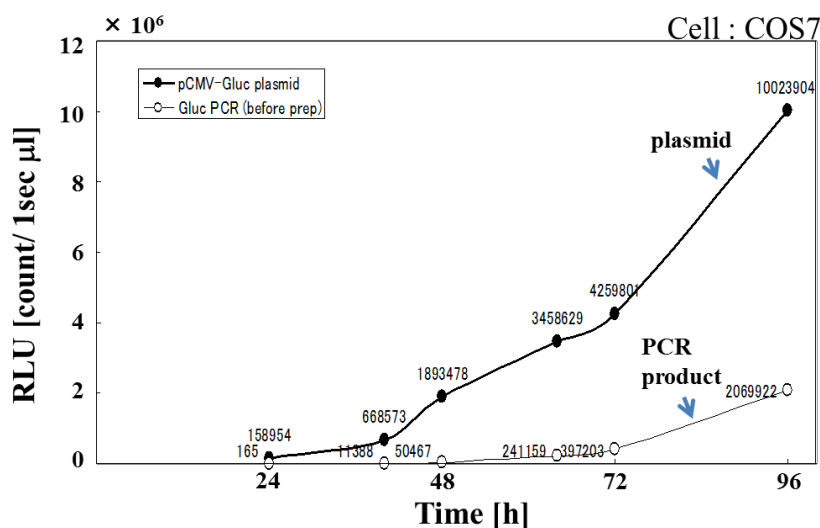


Fig. 3-2. プラスミドDNAとPCR合成DNAの発現

96ウェルプレートに播種したCOS7に、pCMV-GlucとCMVp-Glucをトランスフェクションした。プラスミドを●、PCR合成DNAを○で示す。

トランスフェクションの24時間後のGluc活性は、プラスミドDNAは約16000 RLUに対してPCR合成DNAは165 RLUであり、ほとんど活性が見られなかった(Fig. 3-2, PCR product)。経時的に測定すると共に活性値は上昇したが、PCR合成DNAからの発現が低いことは明確であった。この結果から、トランスフェクションの24時間後に活性が無いに等しいPCR合成DNAを指標にすることは困難であると考え、まずプラスミドDNAを用いたトランスフェクション効率の向上を目指した。

3.3.2 ケミカルトランスフェクションにおけるエンハンサー物質の探索

予備実験において、pCMV-GLucプラスミドDNA、制限酵素処理によって線状化したpCMV-GLuc DNA、線状化した断片をライゲーションし環状に戻したpCMV-GLucを用いてトランスフェクションした。すると、ライゲーションして環状に戻したpCMV-GLucが、pCMV-GLucプラスミドよりも高いルシフェラーゼ活性を示した(data not shown)。このことから、ライゲーションに用いたライゲーションバッファー(New England Biolabs)中に、発現を増強する物質が含まれているのではないかと考えた。そこで、バッファーの組成であるTris-HCl, MgCl₂, ジチオスレイトール, ATP, PEG6000を、それぞれ単独でトランスフェクション時に添加した。その結果、PEG6000を添加した場合にルシフェラーゼ活性

が増強されていたのでこれを調べることにした(data not shown)。

3.3.2.1 FuGENEトランスフェクションにおけるPEGの効果

pCMV-GLuc-SVterプラスミドDNAを使用し、分子量1000, 3350, 6000のPEGがトランスフェクションに与える効果を検討した。

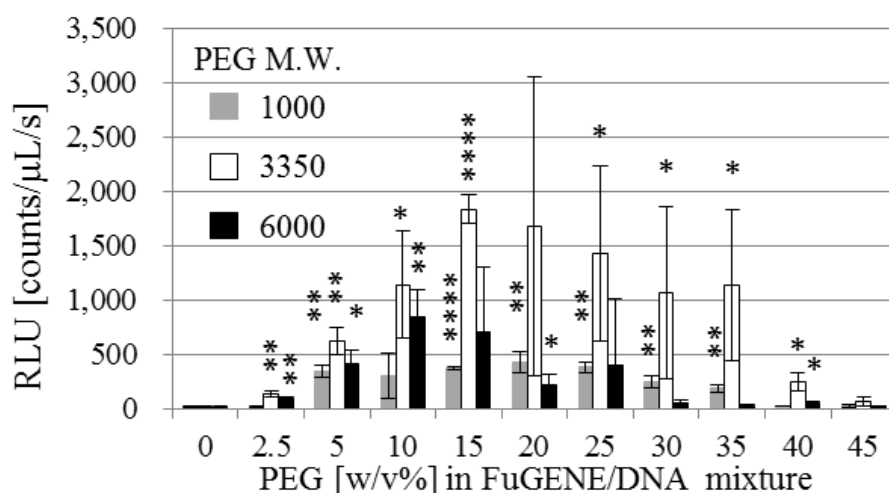


Fig. 3-3. FuGENEトランスフェクションにおけるPEGの効果

96ウェルプレートにHEK293細胞を8000 cells/wellになるように播種し、前培養した。FuGENE HD/pCMV-GLuc-SVterに、分子量1000, 3350, 6000のPEGを最終濃度0~45%(w/v)になるよう加えて合計25 μ Lの遺伝子導入液を調整した。室温で30分静置し、20 μ L/well加えトランスフェクションした。トランスフェクション後24時間の培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定した。RLUは、1秒あたりの1 μ L培養液中のルシフェラーゼ活性値を示す。(*, P -value <0.05; **, P -value <0.005; ***, P -value <0.0005, ****, P -value <0.00005)

その結果、PEGを無添加(Fig. 3-3, 横軸0)に比べてすべての場合でGLuc活性が高くなっており、PEGがトランスフェクションのエンハンサー効果を持つことがわかったが、25~45%で使用した場合には活性が増強される一方で死細胞が増加しており、高濃度のPEGを添加することは細胞に悪影響であることがわかった。分子量3350のPEGが特に顕著に活性が増強されており、PEG3350をエンハンサー物質とした。

3.3.2.2 FuGENEトランスフェクションにおけるRNAの効果

酵母において、PEG-リチウム形質転換法ではキャリアDNAやRNAが遺伝子導入効率を増強させることが知られている。そこで、これらがヒト培養細胞への遺伝子導入にも効果があるのではないかと考え、サケ精巣由来DNAとtotal RNAを用いてトランスフェクション効率への影響を調べた。その結果RNAでエンハンサー効果が見られたので、仔ウシtotal RNAと酵母transfer RNAを用いて詳細にエンハンサー効果を調べた(Fig. 3-4)。

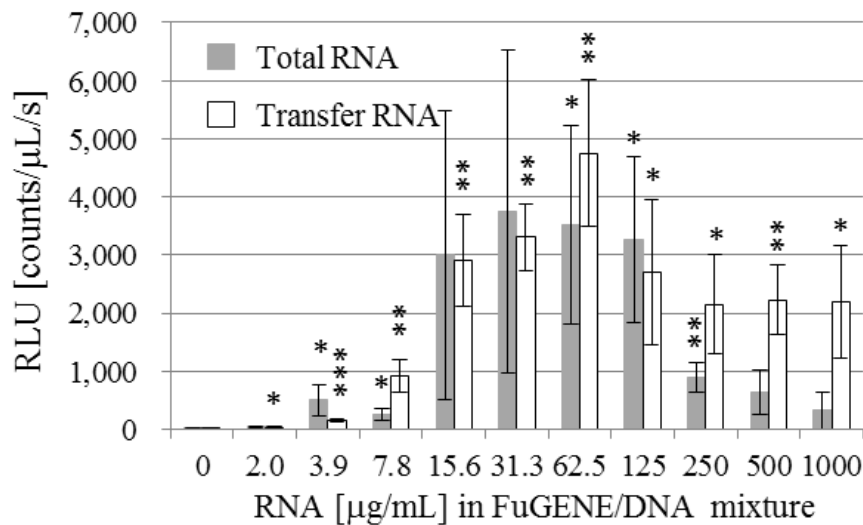


Fig. 3-4. FuGENEトランスフェクションにおけるRNAの効果

HEK293細胞は8000 cells/wellに播種した。FuGENE/pCMV-GLuc-SVterに、仔ウシ肝臓由来のtotal RNAもしくは酵母由来のtransfer RNAを最終濃度0~1000 μg/mLとなるように合計25 μLに調整し、トランスフェクションした。(*, P -value <0.05; **, P -value <0.005; ***, P -value <0.0005, ****, P -value <0.00005)

RNA無添加(Fig. 3-4, 横軸0)と比べ、total RNAおよびtransfer RNAの両方がトランスフェクションを著しく増強した(Fig. 3-4)。この結果からRNAがFuGENE HDトランスフェクションにおいてエンハンサーとなることを示した。特にtransfer RNA(tRNA)の増強が高かったため、tRNAをエンハンサー物質とした。

3.3.2.3 PEGとRNAの相乗効果

FuGENEトランスフェクションにおいて、PEGとRNAがそれぞれエンハンサー効果を持つことを発見したので、次にPEGおよびRNAの両方を加えた場合のエンハンサー効果を調べた(Fig. 3-5)。その結果、PEGとRNAを同時に加えた場合、GLuc活性はそれぞれを単独で加えた場合よりも著しく増強されていた。つまりこの結果は、FuGENEトランスフェクションにおいてPEG3350とtRNAがエンハンサーとして相乗的に効果があることを示した。そこで、トランスフェクションの増強に最も効果的なPEGとRNAの添加濃度を詳細に検討した。遺伝子導入液中に、PEG3350は5, 10, 20, 40%(w/v), tRNAは1000~7.8 μg/mLの間で段階的に倍希釈し、pCMV-GLucと混ぜて調整しトランスフェクションに使用した(Fig. 3-6)。

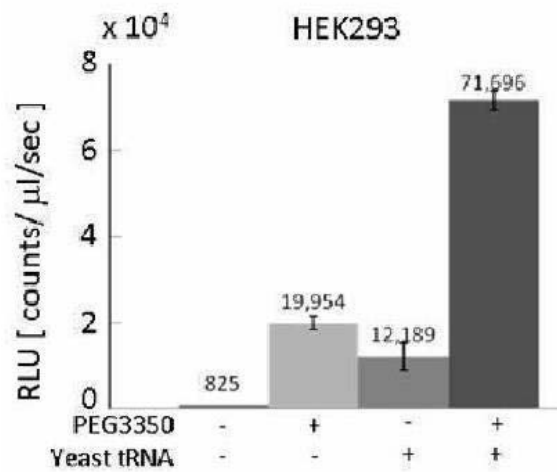


Fig. 3-5. FuGENEトランスフェクションにおけるPEGおよびRNAの相乗効果
8000 cells/wellになるように播種したHEK293細胞に、PEG3350とtRNAを単独もしくは同時に加えてpCMV-GLucをトランスフェクションした。

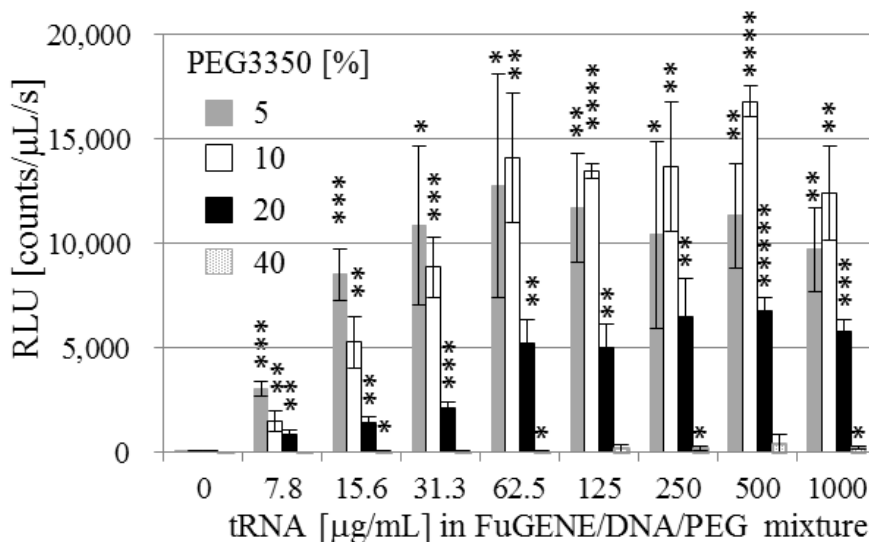


Fig. 3-6. エンハンサー濃度の最適化

8000 cells/wellになるように播種したHEK293細胞に、PEG3350とtRNAを同時に加えてpCMV-GLucをトランスフェクションした。(*, *P*-value <0.05; **, *P*-value <0.005; ***, *P*-value<0.0005, ****, *P*-value<0.00005)

その結果、遺伝子導入液中の濃度としてPEG3350は5%(w/v), tRNAは62.5 μg/mL以上でほぼ同じレベルで強いエンハンサー効果が見られたため、この濃度をエンハンサーの添加濃度として決定した。

3.3.2.4 様々なトランスフェクション試薬におけるPEGとRNAの効果

PEGとRNAがFuGENEトランスフェクションにおいて強いエンハンサー効果を示

すことが明らかになったため、様々なトランスフェクション試薬においてその効果を検討した。カチオン脂質タイプの試薬類としてLipofectamin3000, Lipofectamine2000, ScreenFect, HilyMAXを、カチオンポリマータイプの試薬類としてTransPassD2, 成分詳細は非公開のTransIT2020およびCarriGeneを用いた。HEK293細胞およびHeLa細胞は2000 cells/well播種し前培養した。遺伝子導入液はFuGENEと同様の調整法で用意した。具体的にはpCMV-GLuc, 50% PEG3350, 625 µg/mL tRNAをそれぞれ2.5 µL, 各トランスフェクション試薬は0.25 µLずつ混ぜて25 µLに調整して30分間静置し、トランスフェクションした(Fig. 3-7)。

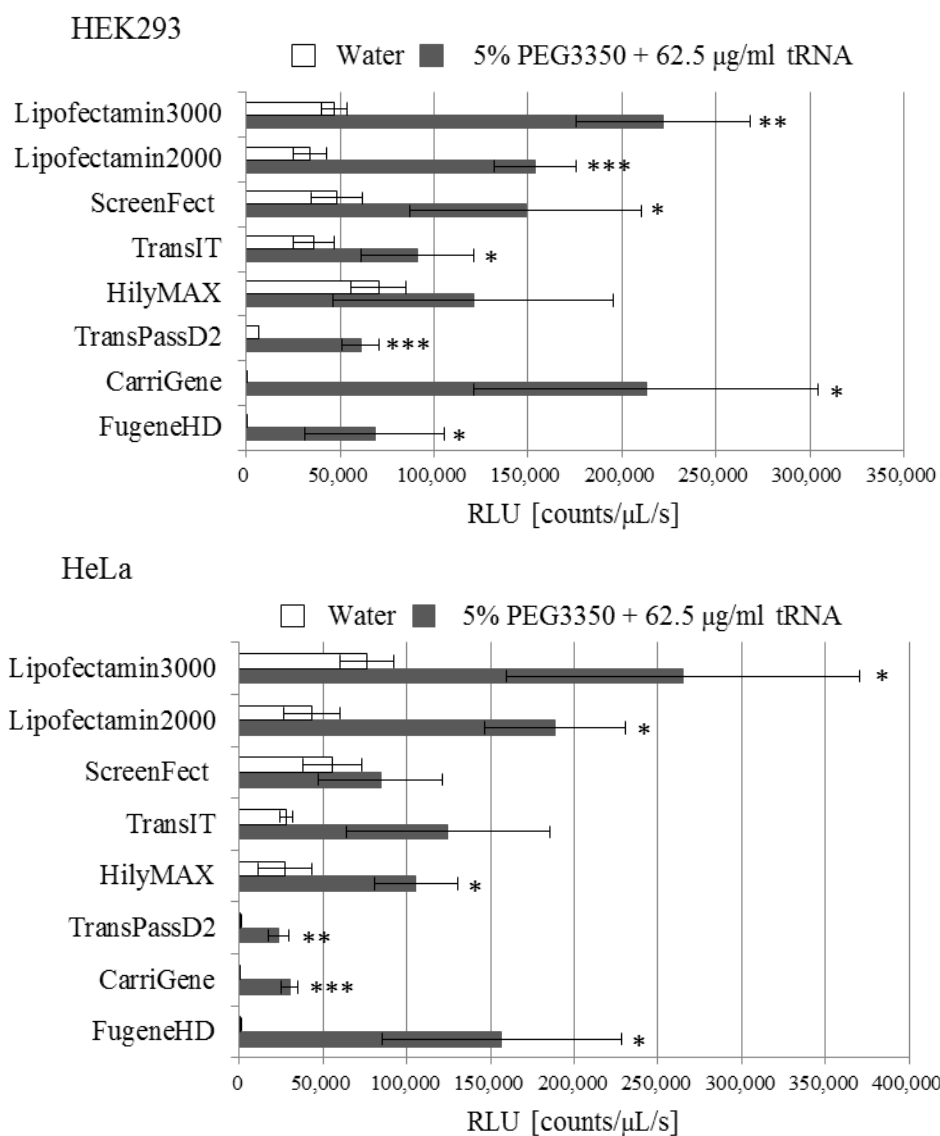


Fig. 3-7. 様々なトランスフェクション試薬に対するエンハンサーの効果

2000 cells/wellになるように播種したHEK293細胞およびHeLa細胞に、各試薬1/100量、エンハンサーの有・無の条件でpCMV-GLuc-SVter遺伝子導入液を調整しトランスフェクションした。(*, P -value < 0.05; **, P -value < 0.005; ***, P -value < 0.0005, ****, P -value < 0.00005)

その結果、HEK293細胞とHeLa細胞の両方で、すべてのトランスフェクション試薬においてエンハンサー無添加(Fig. 3-7, Water)と比べ、PEG3350/tRNAを加えた場合にルシフェラーゼ活性が強く増強された(Fig. 3-7)。したがって、PEGとtRNAの2種の試薬は、96ウェルプレートでのケミカルトランスフェクションにおいて細胞やトランスフェクション試薬に関わらずエンハンサーとして機能することを示し、新しいトランスフェクション法の開発に成功した。

3.3.3 PCR合成DNAでの遺伝子発現

3.3.3.1 PCR合成DNAによるGLucの発現

プラスミドDNAでのトランスフェクションの大幅な向上に成功したので、PCR合成DNAによる導入にも効果があるのかを検討した。開発した本方法は1ウェルあたり50 ngのプラスミドDNAしか必要とせず、このDNA量であればPCR合成でも容易に合成することができる。PCR合成DNA断片はpCMV-GLucプラスミドをテンプレートに使用して合成した(Fig. 3-8A)。最初の実験にはCMVp-GLuc(+1~+1582c)、(数字はCMVプロモーターからの塩基数)を用いたが、発現は認められなかった。そこで、それぞれ異なった長さでPCR合成した線状DNA断片をFuGENEとエンハンサーを用いてHEK293に導入した(Fig. 3-8B)。各DNAの長さは図中に示した(Fig. 3-8A)。

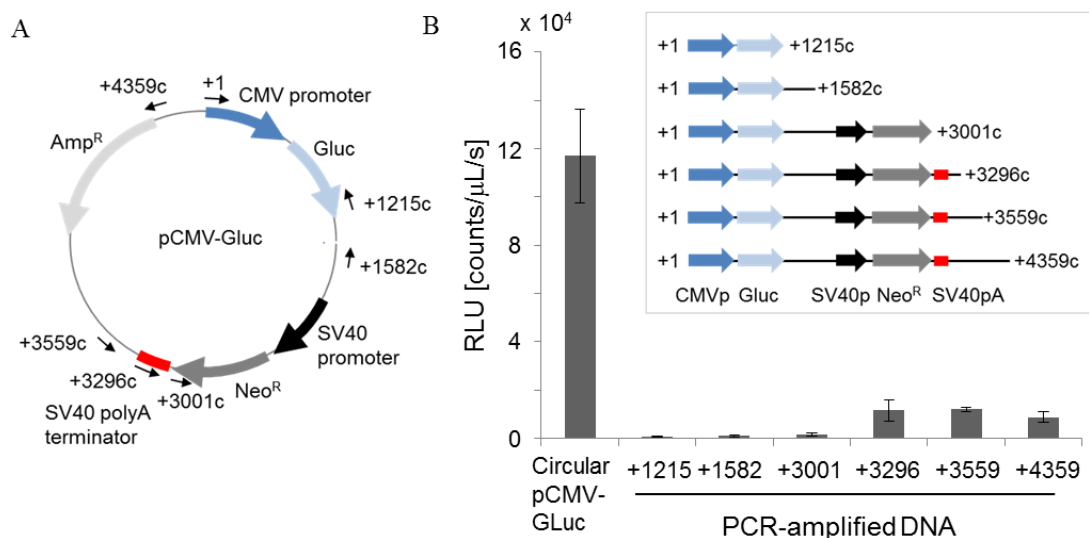


Fig. 3-8. PCR合成DNAからのGLuc発現

(A)pCMV-GLucプラスミドのマップ。フォワードプライマーの位置を+1(pEGFP-600, Table 3-1), リバースプライマーのアニーリング位置はそれぞれ矢印で示した。(B)PCR合成DNAの長さは+1からの距離で示した。96ウェルプレートにHEK293細胞を4000 cells/wellとなるよう播種し、DNAを40 ng/wellでトランスフェクションしてGLuc発現を比較した。

プラスミドDNAと比較するとルシフェラーゼ活性は低い、+1~+3296c, +3559c, +4359cの長いDNA断片ではルシフェラーゼ活性が見られた。このことから、+3001cから+3296cの間がルシフェラーゼ活性を上げるのに必要であることがわかった。そこでこの間に特徴的な配列がないかを調べた。その結果、+3206~3211および+2124~3240にmRNA安定化に関わるとされるターミネータに特徴的なポリアデニル化(polyA)配列AATAAAがあることがわかった。この結果は、DNA断片の発現にはターミネータ配列が必須であること、しかしそれは発現させる遺伝子から離れた場所に存在していても良いことを示している。+1~+1582cでは発現が見られなかったことから、pCMV-GLucのGLuc ORF下流にあったターミネータ様配列は機能していないことが明らかになった。

3.3.3.2 PCR合成DNAによるGFPの発現

PCR合成DNAを使ったトランスフェクションでGLuc活性の検出が可能であったので、GFPの発現を観察できるかを検討した。EGFP遺伝子を含むpEGFP-C1プラスミドは、EGFPの下流にSV40pAターミネータ配列を含んでいる。したがって、SV40pAターミネータを含むものと含まないDNA断片、それぞれCMVp-EGFPとCMVp-EGFP-SV40pAを合成した。HEK293細胞にpEGFP-C1プラスミド、CMVp-EGFPおよびCMVp-EGFP-SV40pAのDNA断片をトランスフェクションし、その2日後にGFPを観察した(Fig. 3-9)。

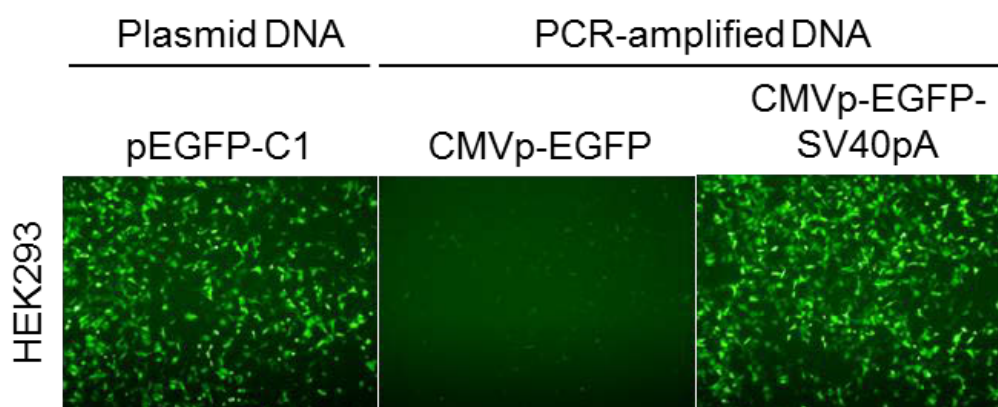


Fig. 3-9. pEGFP-C1, CMVp-EGFP-SVte, CMVp-EGFPの発現

HEK293細胞にトランスフェクションした48時間後、BioZero蛍光顕微鏡GFP-BFフィルター(Ex: 470/40, DM: 495, BA: 535/50, Keyence)を用いてEGFPの蛍光を観察した。

SV40pAターミネータを含むCMVp-EGFP-SV40pAを導入した細胞ではGFPの発現が顕微鏡観察に十分な蛍光を示した。しかしながら、ターミネータを含まないCMVp-EGFPを導入した細胞はごく弱い蛍光しか検出できなかった(Fig. 3-9)。このことから、PCR合成DNAの発現にはターミネータが重要であることがわかった。また、ウェスタンブロッティングによるGFP検出も行った(Fig. 3-10)。

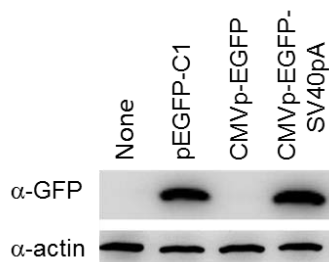


Fig. 3-10. ウェスタンブロット解析

トランスフェクション2日後に回収した細胞溶解液をそれぞれ10 μ Lずつ SDS-PAGEに展開し、ウェスタンブロッティングを行った。EGFPタンパクは、抗GFP抗体(α -GFP)で検出し、コントロールに抗アクチン抗体(α -actin)を用いた。

ターミネータ配列を含まないCMVp-EGFPは、GFP抗体による検出シグナルが得られなかった。しかしターミネータを含んだ配列では、GFP抗体による検出反応が見られた。この結果は、ヒト培養細胞でのFuGENE/エンハンサーを用いたトランスフェクションにおいて、PCR合成DNAがGFP発現などによる細胞内局在解析や抗体検出にも十分に利用可能であることを示している。

3.3.4 プラスミドDNAとPCR合成DNAのトランスフェクションにおける性質

3.3.4.1 GLuc発現の経時変化

本研究で使用しているコンストラクトにはヒト培養細胞用の複製起点やセントロメアがないため、ゲノムに組み込まれない限り一過性の発現である。そこで、プラスミドおよびPCR合成DNAの遺伝子発現を経時的に比較し、発現期間の検討を行った。pCMV-GLuc-SVterプラスミドおよびCMVp-GLuc-SV40pA断片を、FuGENE/エンハンサーを用いてトランスフェクションし、1, 2, 3, 6日目の培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定した(Fig. 3-11)。その結果、トランスフェクション1日後と比べ、2日後に活性が増加した。プラスミドDNAの活性は、6日後に減少したが、PCR合成DNAでは変わらなかった。このことから、PCR合成DNAを導入した細胞の発現は、プラスミドDNAからの発現に比べて長期間に渡ることが明らかになった。

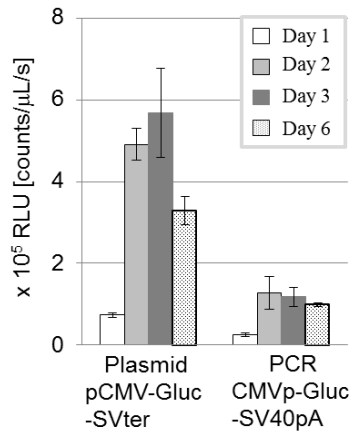


Fig. 3-11. 遺伝子発現の経時変化

pCMV-Gluc-SVterとCMVp-Gluc-SV40pAをそれぞれトランスフェクションした1, 2, 3, 6日後にそれぞれの上清を取得し、ルシフェラーゼ活性を測定した。RLUは1秒あたりの1 μ L培養上清の活性を示す。

3.3.4.2 プラスミドDNAとPCR合成DNAの同時トランスフェクション

ヒト培養細胞へのケミカルトランスフェクションにおいて、プラスミドDNAでは遺伝子導入が可能であるがPCR合成DNAでは成功しない理由として、環状のプラスミドDNAと線状のPCR合成DNAでは細胞に取り込まれるメカニズムが異なっていることを予想した。そこで、これらの2種類のDNAを同時に導入することを試みた。プラスミドDNAとして、pEGFP-C1とmCherry赤色蛍光タンパク質をコードするpmCherry-C1を、PCR合成DNAとしてCMVp-mCherry-SV40pAとCMVp-EGFP-SV40pAをそれぞれ同時に導入した。24時間後に細胞を固定し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光を観察した(Fig. 3-12)。

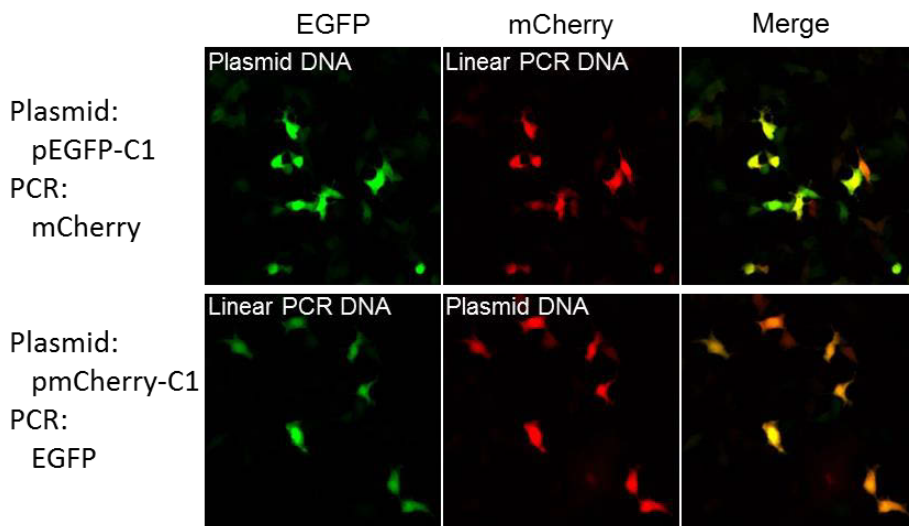


Fig. 3-12. プラスミドDNAとPCR合成DNAの同時トランスフェクション
 プラスミドDNA及びPCR合成DNAを混合し、HEK293細胞のトランスフェクションに用いた。24時間培養後、固定し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

取得した細胞の画像を重ね合わせると、緑および赤色蛍光は同一の細胞で発現していた。環状のプラスミドDNAと線状のPCR合成DNAが同一の細胞で発現していることから、ケミカルトランスフェクションにおいてこれらの2種類のDNAが導入されるメカニズムに相違がないことを示している。また、2種類のDNAを同時に発現できることも示した。

3.3.5 PCR合成DNAを発現するために必要な最小ターミネータ配列の解析

これまでの結果から、PCR合成DNAをヒト培養細胞で発現させるためにはターミネータ配列が必要であることが明らかになった(Fig. 3-8~3-10)。つまり、PCRで発現用コンストラクトを作成するためには、必ずターミネータを付加する必要がある。しかしながら、CMVp-EGFP-SV40pAの発現で使用したSV40pAターミネータ配列でさえ230 bpと長く、PCRでターミネータ配列を付加することは難しい。しかし、機能するターミネータ配列がプライマーに設計可能な100 bp以下の長さまで短くすることができれば、PCRによって簡単にターミネータを付加することが可能である。そこで、SV40pAターミネータ230 bpを用いて、PCR合成DNAをヒト培養細胞で発現させるために必要な最小のターミネータ配列を解析した。CMVp-GLuc DNA断片に段階的に削除したSV40ターミネータ配列を融合し(Fig. 3-13)、GLuc活性によって融合した配列のターミネータ能力を測定した(Fig. 3-14)。

その結果、230 bpのC末端から削除したSV40pAターミネータ+1~180は、全長である+1~230と同程度の活性を示し、+170より短くすると減少した。したがって、+170~180の領域にターミネータ機能に重要な配列があることが示された。配列を調べたところ、+169~174にはpolyA配列AATAAAが存在した(Fig. 3-14, 下線部)。一方で、N末端からの削除は、+120まで削除した+121~220でさえ、全長と同程度の活性を示した。したがって、遺伝子発現に必要なターミネータ機能を有するSV40pAの配列としては+120~220の100 bpで十分であることを示している。さらに、+121~180の60 bpでさえ、全長の半分程度ではあるが発現測定には十分な活性を示した。プライマーは、アニーリング配列を含めて通常100 b以内で設計するため、60 bpのターミネータであればオリゴヌクレオチドとして付加することが可能である。

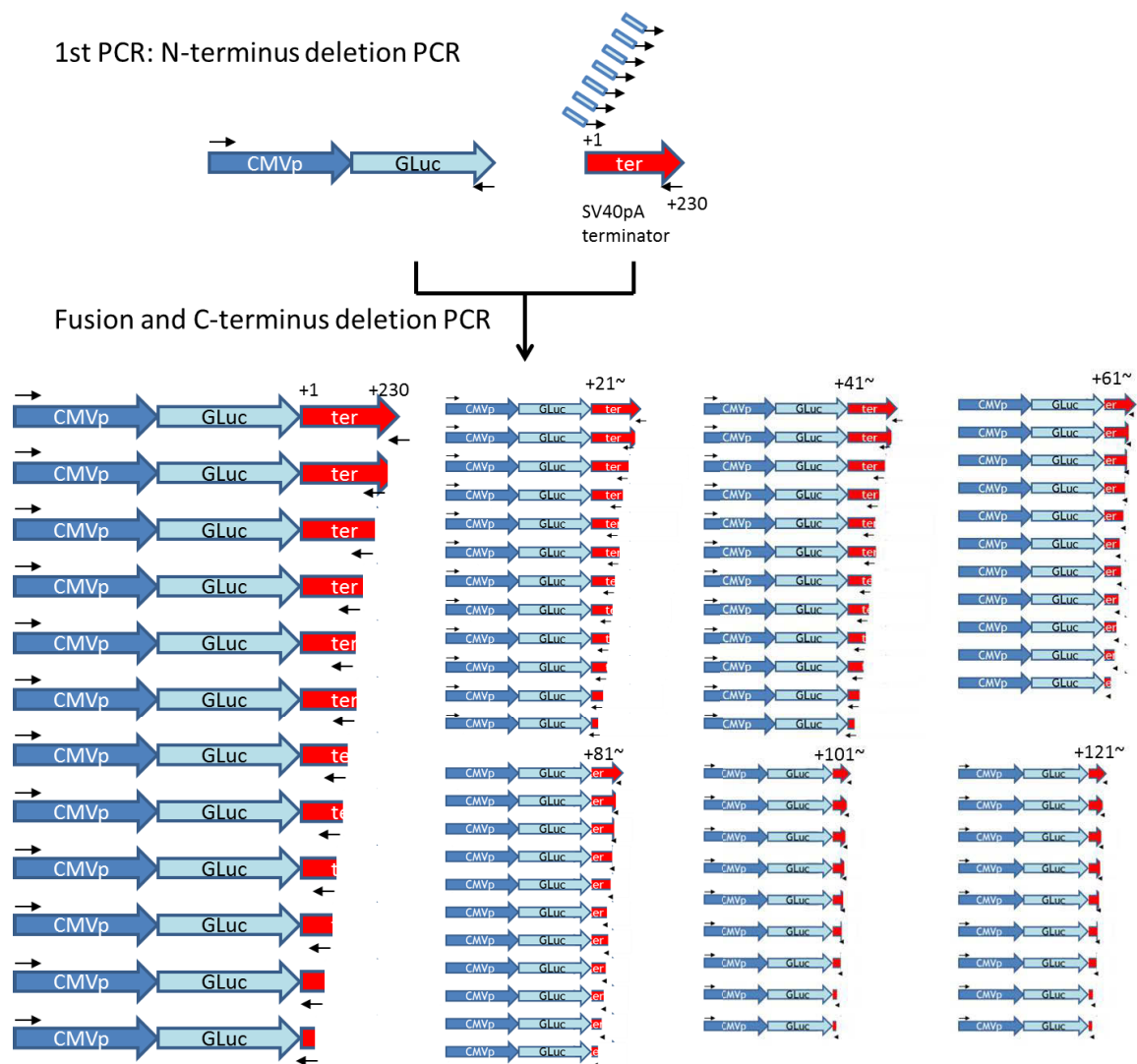


Fig. 3-13. SV40ターミネータの段階削除解析の模式図

1st PCRでSV40pAターミネータの230 bpおよびN末側を段階削除したターミネータ断片と、CMVp-GLuc断片を合成した。フュージョンPCRによって各ターミネータを融合すると同時に、C末端を段階的に削除した。

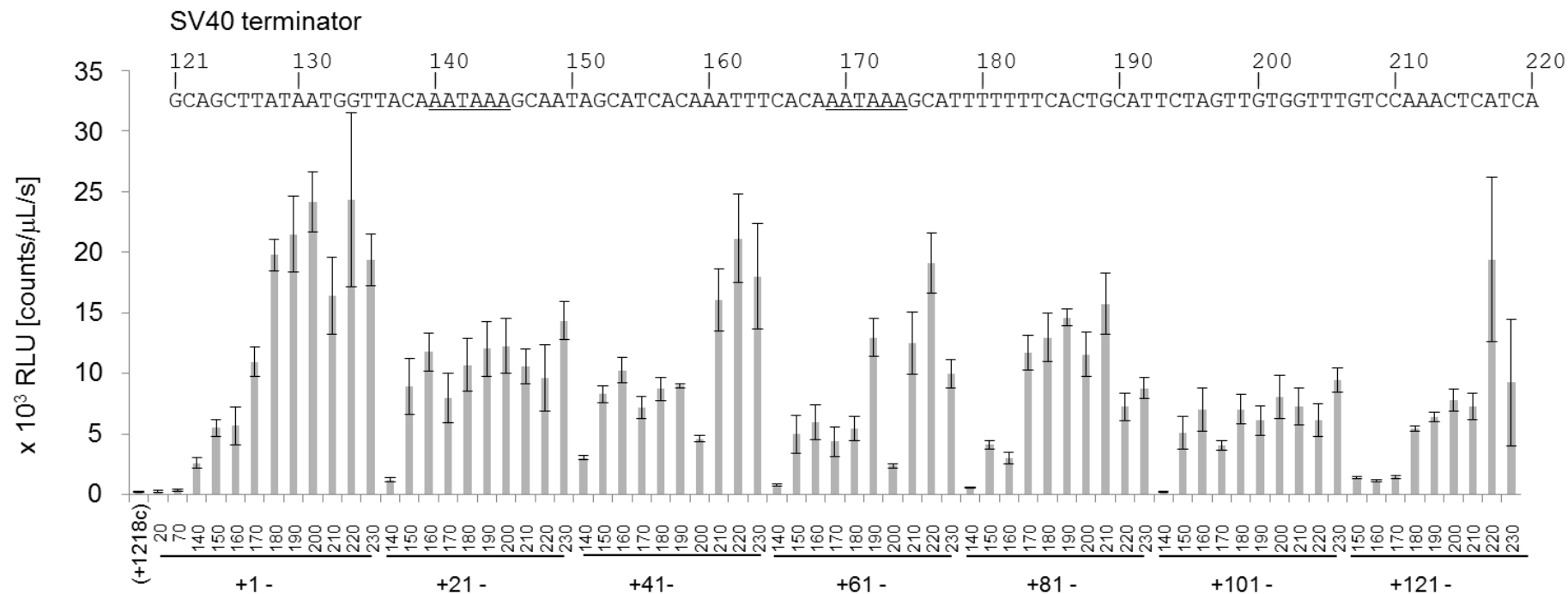


Fig. 3-14. PCR合成DNAによるGLuc発現に必要な最小SV40pAターミネータの削除解析

96ウェルプレートにHEK293細胞を4000 cells/wellとなるよう播種し、前培養した。各PCR断片の濃度は20 ng/μLに調整し、FuGENE/エンハンサーを使用して5ウェルずつトランスフェクションし、24時間後に活性を測定した。pEGFP-C1に構成されるSV40ターミネータの+121~220の配列を示し、polyAシグナルを下線で示した。

他にも一般的に利用されるターミネータとして、ウサギβグロビン遺伝子が持つβ-globin polyAターミネータがある。β-globinターミネータは、pTriEXシリーズ(Novagen), pQE-Triシステム5シリーズ(Qiagen), pSingle-tTSシリーズ(Clontech), pCAGGS(Niwa *et al.*, 1991), pCX-EGFP(Okabe *et al.*, 1997)のようなプラスミドベクターに使用されている。そこで、β-globinターミネータでも同様の削除解析を行った(Fig. 3-15)。pTriEX-4Hygroプラスミドには、534 bpのβ-globinターミネータが含まれており、polyAシグナルは+144~148に存在する(Fig. 3-15, 配列下線部)。そこで、+101~200の領域を削除解析に用いた。

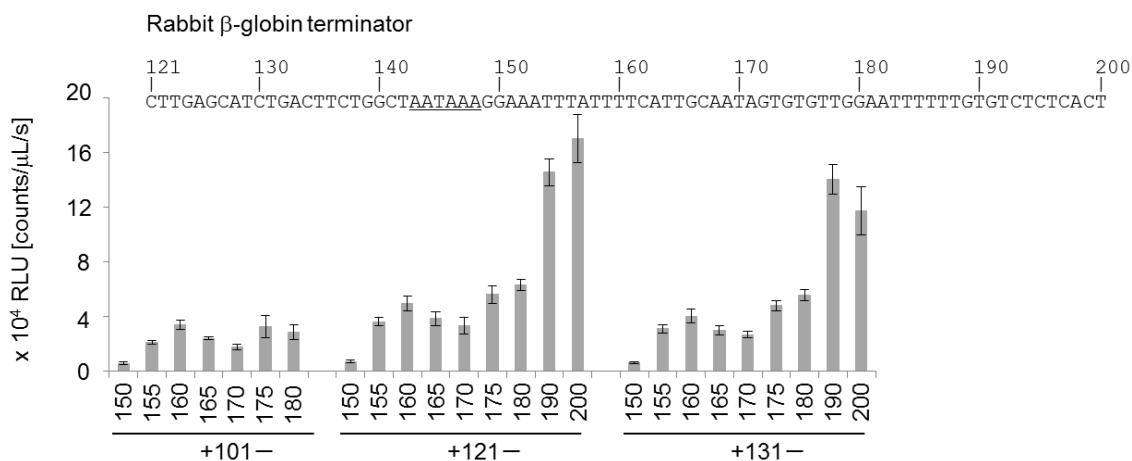


Fig. 3-15. β-globin polyAターミネータの削除解析

pTriEx-4Hygroに構成されるβ-globinターミネータの+121~200の配列を示し、ポリAシグナルを下線で示した。

その結果+121~190, +131~190では、+121~180, +131~180よりも高い活性を示しており、+180~190にはターミネータの機能に重要な配列が含まれることが示された。したがって、β-globinターミネータでは+131~190の60 bpが遺伝子発現に必要な最小の領域であることが明らかになった。

3.3.6 ヒト培養細胞における遺伝子発現ツールとしてのターミネータプライマー

SV40pA(130~220)およびbGloA(121~190)ターミネータ配列を付加配列としてプライマーに設計した、ターミネータプライマーを用意した。ヒト培養細胞での分子生物学的解析において抗体による検出がよく行われるが、遺伝子によっては抗体が入手できない場合があり、そのような場合にはFLAGやMycなどのタグ配列が使用される。そこで、EGFPにFLAGタグをインフレームで融合させたEGFP-FLAGをモデルタンパク質として、ターミネータプライマーで合成したPCR断片の発現を調べた。

まず、EGFPのC末端にFLAGタグをインフレームに融合させるために、pEGFP-C1プラスミドをテンプレートに用い、プライマーにはpEGFP-600とFLAG 9C-FLAGc-pEGFP+699cを用いて1st PCRを行った(Fig. 3-16)。合成されたDNA断片のC末端には、第1章で開発した人工アニーリング配列9C(5'-CCCCCCCC-3')配列を含んでい

るため、1st PCR産物をテンプレートとして2nd PCRを行う場合、この9C配列はアニーリング配列となる(第1章; Nakamura *et al.*, 2014)。そこで1st PCR産物をテンプレートとして用い、FLAGの下流にSV40pA最小ターミネータ配列+130~220領域をPCRによって付加した。pEGFP-600とSV40pA(130-220)c-9cのプライマーを用いて2nd PCRを行い、このDNA断片をFu GENE/エンハンサーを使ってトランスフェクションに用いた。

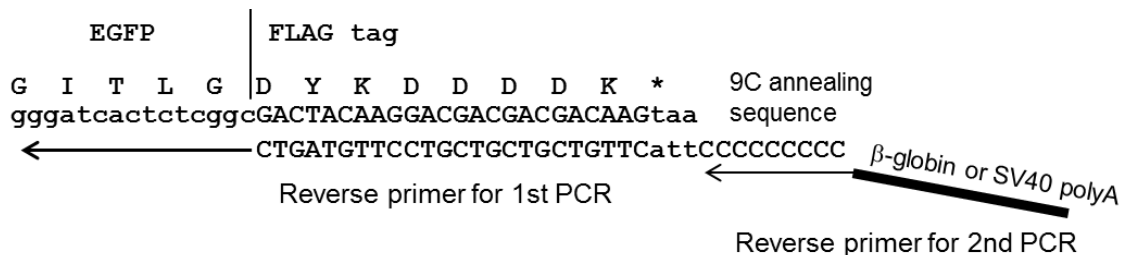


Fig. 3-16. PCRによるFLAGタグおよびターミネータの付加

EGFPへのPCRによるFLAGタグおよびターミネータ付加した。1st PCRでは、FLAGタグ配列と2nd PCRでアニーリングサイトとなる5'-CCCCCCCC-3'(9C)配列を付加した(CMVp-EGFP:FLAG_{9c})。2nd PCRでは1st PCR産物をテンプレートに、ターミネータプライマーによってβ-globinターミネータ配列を付加したCMVp-EGFP:FLAG_{9c}bGlopAを合成した。

48時間後に細胞を固定し、抗FLAG抗体を用いてGFP-FLAGタンパク質を検出した(Fig. 3-17)。抗FLAG抗体とAlexa Fluor 555の組み合わせでEGFP-FLAG発現細胞は赤色の蛍光として顕微鏡で観察が可能である。顕微鏡観察の結果、GFPの緑色蛍光とFLAG-Alexa Fluor 555の赤色蛍光の両方が同一の細胞で観察された。

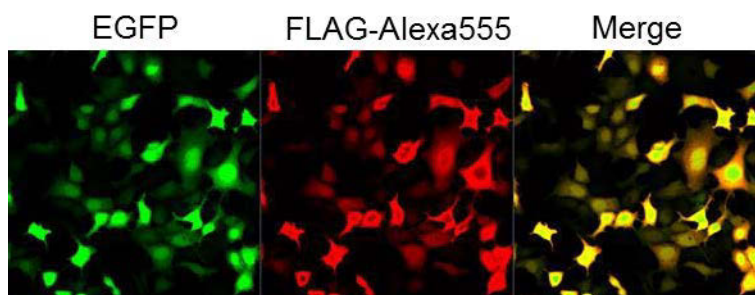


Fig. 3-17. タグおよびターミネータプライマーによる配列付加の発現

CMVp-EGFP:FLAG_{9c}bGlopAをHEK293細胞に導入し、GFPフィルターによる観察、抗FLAG抗体とAlexa Fluor 555 goatマウス抗IgG抗体染色を用いて検出した。

また、ウェスタンブロット解析も分子生物学的によく使用される方法であるので、ウェスタンブロットを用いてターミネータプライマーの検討を行った。SV40pA(+130~220), bGlopA(+121~190)ターミネータをPCRによって付加したCMVp-EGFP:FLAGをトランスフェクションし、GFP抗体とFLAG抗体を用いてウェスタンブロッティング解析を行った。抗体検出の結果、ターミネータを付加した場合は抗体検出されたが、ターミネータを含ま

ないEGFP:FLAGは検出されなかった(Fig. 3-18)。

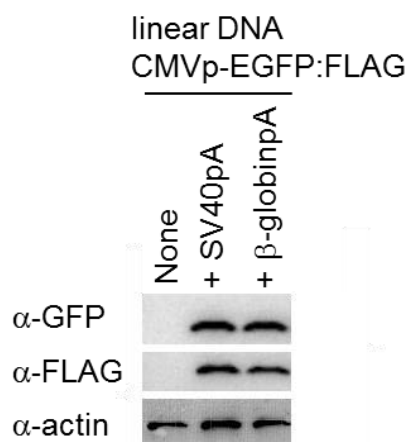


Fig. 3-18. ターミネータプライマーを利用した発現の検出

プライマーにそれぞれ SV40pA(130-220)c-9c(+SV40pA) もしくは bGlobinpA(121-190)c-9c(+β-globinpA)を用いたPCR合成DNAからの発現。抗GFP抗体および抗FLAG抗体, コントロールに抗アクチン抗体を用いてウェスタンブロットティングした。

同様に, HA, MYC, ポリヒスチジン(7His)などの他のタグ配列をEGFPに付加し, ウェスタンブロットティング解析を行った(Fig. 3-19)。1st PCRには, 9C配列をC末端に持たせるタグプライマーとして, EGFP:HA には 9C-HA-EGFP+699c, EGFP:MYC には 9C-MYC-EGFP+699c, EGFP:7HIS には 9C-7HIS-EGFP+699c をそれぞれ使用した。2nd PCRには pEGFP-600 と SV40pA(130-220)c-9c プライマーを用いて PCR を行った。1st PCR 産物は共通して C 末端に 9C のアニーリング配列を持つ。したがって, 9C をアニーリング配列とするプライマーは, すべてのテンプレートに使用することが可能である。ターミネータプライマーのアニーリング配列は 9C であり, 2nd PCR では同一のターミネータプライマーを使用してターミネータを付加した。培養二日後に, 4 ウェル分の上清を集め, 抗HA抗体, 抗Myc抗体, 抗HIS抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った。ウェスタンブロットティング解析の結果, それぞれ目的構築物のバンドを示したことから, ターミネータプライマーを用いた PCR 合成 DNA が遺伝子発現解析に利用でき, C 末端配列に任意の配列を加えることも容易であることを示した。

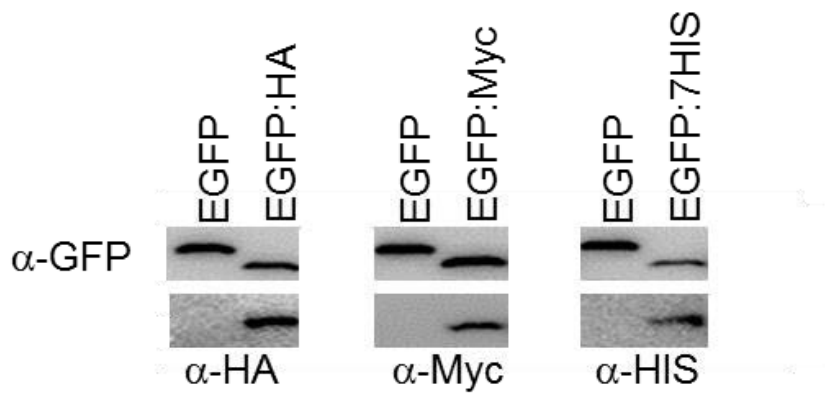


Fig. 3-19. 各タグを付加したタンパクのウェスタンブロッティング
 EGFPおよびタグを融合したEGFPを、GFPおよびそれぞれHA(α -HA), Myc(α -Myc),
 ポリヒスチジン(α -HIS)で検出した。

3.5 考察

本章では、96ウェルプレートで培養した細胞においてトランスフェクションにおけるエンハンサー試薬を特定し、使用DNA量の削減とヒト培養細胞にPCR合成DNAを直接導入し発現させることに成功した。GLucルシフェラーゼレポーター活性やGFP/RFP蛍光タンパク質の検出、およびウェスタンブロットティング法を含めたそれぞれの解析においてこの遺伝子導入法の有効性を実証した。

ケミカルトランスフェクションにおけるエンハンサーの開発

エンハンサー物質としてPEGおよびRNAを特定し、特に分子量3350のPEGと酵母transfer RNA(tRNA)の効果が高いことを示した(Fig. 3-3, 3-4)。PEGがプラスミドのリポフェクションにおいてエンハンサー効果を示すことは報告されていたが(Ross & Hui, 1999; Palmer *et al.*, 2003), 本研究では96ウェルプレートでのトランスフェクション条件において分子量3350のPEGが最適であることを明らかにし、新たにtRNAをエンハンサー物質として特定した。PEGとtRNAを同時に加えた場合にはそれぞれを単独で加えた時よりも著しいエンハンサー効果が見られ(Fig. 3-5), この効果はHEK293細胞とHeLa細胞において、様々なトランスフェクション試薬に対して有効だった(Fig. 3-7)。このことから、開発したエンハンサー試薬は他の哺乳動物細胞における遺伝子導入法としても利用できると思われる。

ケミカルトランスフェクションにおいては、カチオン性脂質およびカチオン性ポリマーがアニオン性のDNA鎖と結合し、大きなコンプレックスもしくは球体を形成してヒト培養細胞に取り込まれると考えられている。そこで、PEGは両親媒性のポリマーであるためコンプレックスの形成を補助し、一方で弱い負電荷のポリマーであるRNAはコンプレックス形成をサポートするのではないかと推測した。PEGとRNAは異なった性質を持っていながら、お互いにサポートすることで細胞に取り込まれやすいコンプレックスを生成している可能性がある。この、PEG/tRNAを添加することによって増強されるトランスフェクションのメカニズムについては、さらに研究し考察する必要がある。

現在一般的に用いられているプロトコルにおいてはPCR合成DNAを用いたトランスフェクションは困難であったため、その原因の究明も困難であった。本研究で開発した遺伝子導入法ではPCR合成DNAによるトランスフェクションを容易にし、このことは線状のPCR合成DNAがヒト培養細胞に取り込まれるメカニズムや発現システムを解明する手段となりうる。

そこで本研究においては、環状であるプラスミドDNAと線状であるPCR合成DNAのトランスフェクションにおける性質について調べた(Fig. 3-11, 3-12)。経時的なルシフェラーゼ発現解析の結果、プラスミドDNAではトランスフェクションから6日後に活性が減少したことに対し、PCR合成DNAでは発現量がほとんど減少しなかった(Fig. 3-11)。この結果から、導入したPCR合成DNAは染色体上に組み込まれて安定化したのではないかと考えた。PCR

合成DNAによる遺伝子導入を数週間継代したところ、数週間後でも発現が見られたことから(data not shown)、ヒト培養細胞への遺伝子導入は染色体状への組込みが起りやすいと考えられる。PCR合成DNAによるトランスフェクション後、有用なコンストラクトは安定発現株として取得も可能であることが示唆された。一方で、プラスミドDNAとPCR合成DNAを同時にトランスフェクションした結果、同一の細胞で両方の遺伝子発現が見られた(Fig. 3-12)。したがって、2種類のDNAが細胞内に取り込まれ、発現するメカニズムに相違はなく、トランスフェクションにおける2種類のDNAの発現の差にはDNAの形状以外の要因が含まれていることが考えられる。

近年、分子生物学においてゲノム上の多数の遺伝子や遺伝子中の系統的な変異を扱う遺伝子操作技術が求められている(Fischer *et al.*, 2001; Seng *et al.*, 2008; Burre *et al.*, 2012)。系統的なDNAの解析には、配列の付加や削除が容易なPCRによる合成DNAを利用することが望ましい。ヒト培養細胞においてPCR合成DNAを直接用いた遺伝子発現解析は一般的ではないが、これまでに6ウェルプレートや24ウェルプレートでのPCR合成DNAを用いたGFP融合遺伝子の発現が報告されていた(Xin *et al.*, 2003; Hoat *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2007)。これらの報告ではそれぞれ0.5~1 μg のPCR合成DNAが精製・濃縮過程を経て用意されており、数多くの種類の組換えDNAを十分量用意することは困難だと考えられる。一方、本研究で開発した96ウェルプレートでのエンハンサーを用いたトランスフェクションでは、精製や濃縮を必要とせずに1~2 μL のPCR産物を直接使用できることから、系統的な遺伝子解析に有用な技術となる。

遺伝子発現ツールとしてのターミネータプライマーの開発

本研究でヒト培養細胞におけるPCR合成DNAの発現には機能的なターミネータ配列が必須であることを明らかにした(Fig. 3-8~3-10)。そこで、発現用コンストラクトをPCRによって次々と作成するためにターミネータ配列をプライマーによって付加することを考え、本研究で確立した新しいトランスフェクション法によりターミネータ配列の削除解析を行った結果、mRNAの安定化に関わるとされるpolyAシグナルがターミネータ配列の機能として重要であることを明らかにした(Fig. 3-14, 3-15)。つまり、polyAシグナルによってmRNAにポリAが付加されたことが発現を向上させたと考えた。このことから、PCR合成DNAから転写されたRNAの安定性は低く、polyA修飾されなければ分解されてしまうことが予想される。polyAシグナルを含むターミネータ配列は発現させる遺伝子から離れた場所にあっても効果を示したことから(Fig. 3-8)、転写されたRNAの長さが長ければ、分解速度よりも翻訳速度が上回り、ある程度の発現を保証するのではないかと推測した。

ターミネータの削除解析の結果、ヒト培養細胞におけるPCR合成DNAの遺伝子発現には、100~60 bpで十分機能することを明らかにした(Fig. 3-14, 3-15)。60 bpであればオリゴヌクレオチドプライマーの付加配列として設計が可能である。そこでユニバーサルな人工アニーリング配列9Cを持つターミネータプライマーを開発した(第1章; Nakamura *et al.*,

2014)。開発したターミネータプライマーの機能を検証するために、PCRによって様々なタグにターミネータ配列を付加したDNA断片合成し、発現を検証した。1st PCRにおいてHA, MYC, FLAG, V5および7HISなどのタグ配列を付加するプライマーのC末端にユニバーサルなアニーリング配列9Cを付加することで、1本の共通プライマーによるターミネータ配列の付加を実現した(第1章)。合成した各DNAはすべてヒト培養細胞で発現したことから(Fig. 3-17~3-19), ターミネータプライマーを用いて合成したDNA断片による遺伝子の発現解析が可能であることを示した。2段階のPCRを行うことで配列の削除や付加が容易となり、ターミネータを任意に付加できるために任意の配列の発現解析が可能である。このように、ターミネータプライマーの利用は、ヒト培養細胞においてPCR合成DNAを直接使用した多様な遺伝子発現実験において価値があり、有用性を高める。つまり、96ウェルプレートPCR機と本研究で構築した96ウェルでのトランスフェクション法を用いることで、次々と遺伝子を発現解析することができる。

数多くの遺伝子を扱う場合における残された課題としては、発現に必須であるプロモーターの付加である。現状では、CMVプロモーターをフュージョンPCRもしくは酵母等でクローニングすることで融合させる必要がある。しかし、もしもプロモーターすらPCRによって付加し発現させることができれば、プロモーターとターミネータをそれぞれ付加する2本のプライマーセットを用いてPCR合成するだけで、どのような遺伝子の発現解析でも可能となり、PCRによる遺伝子操作性は格段に向上するだろう。

本章で開発した、96ウェルプレート培養細胞でのPCR産物を用いたシンプルな遺伝子発現実験系は、既存のプラスミドクローニングを介した遺伝子操作系を一新する、哺乳動物細胞における次世代の遺伝子操作となる。

3.5 参考文献

- Bell MR, Engleka MJ, Malik A & Strickler JE. (2013). To fuse or not to fuse: what is your purpose? *Protein Sci*, 22, 1466-1477.
- Burre J, Sharma M & Sudhof TC. (2012). Systematic mutagenesis of alpha-synuclein reveals distinct sequence requirements for physiological and pathological activities. *J Neurosci*, 32, 15227-15242.
- Cab-Barrera EL & Barrera-Saldana HA. (1988). Versatile plasmid vectors for use in studies of eukaryotic gene expression. *Gene*, 70, 411-413.
- Chalfie M. (1995). Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol*, 62, 651-656.
- Chen S, Zhou D, Swiderek KM, Kadohama N, Osawa Y & Hall, PF. (1993). Structure-function studies of human aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 44, 347-356.
- Elmleik H, Kumagai T, Berengena M, Ueda K & Sugiyama M. (2001). Use of bleomycin- and heat shock-induced calreticulin promoter for construction of a mammalian expression vector. *J Biochem*, 129, 671-674.
- Falck-Pedersen E, Logan J, Shenk T & Darnell JE. (1985). Transcription termination within the E1A gene of adenovirus induced by insertion of the mouse beta-major globin terminator element. *Cell*, 40, 897-905.
- Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S & Haas R. (2001). Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol*, 42, 1337-1348.
- Fritze CE & Anderson TR. (2000). Epitope tagging: general method for tracking recombinant proteins. *Methods Enzymol*, 327, 3-16.
- Grabenhorst E, Schlenke P, Pohl S, Nimtz M & Conradt HS. (1999). Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconj J*, 16, 81-97.
- Hoat TX., Bertin N, Ninomiya N, Fukuda S, Usui K, Kawai J, Hayashizaki Y & Suzuki, H. (2009). Development of a high-throughput method for the systematic identification of human proteins nuclear translocation potential. *BMC Cell Biol*, DOI:10.1186/1471-2121-10-69.
- Jiang T, Xing B & Rao, J. (2008). Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 25, 41-75.
- Kim D, Kim JD, Baek K, Yoon Y & Yoon J. (2003). Improved mammalian expression systems by manipulating transcriptional termination regions. *Biotechnol Prog*, 19, 1620-1622.

- Lejard V, Rebours E, Meersseman C & Rocha D. (2014). Construction and validation of a novel dual reporter vector for studying mammalian bidirectional promoters. *Plasmid*, 74, 1-8.
- Matsumoto A & Itoh TQ. (2011). Self-assembly cloning: a rapid construction method for recombinant molecules from multiple fragments. *Biotechniques*, 51, 55-56.
- Nakamura M, Suzuki A, Hoshida H & Akada, R. (2014). Minimum GC-rich sequences for overlap extension PCR and primer annealing. *Methods Mol Biol*, 1116, 165-181.
- Naylor LH. (1999). Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochem Pharmacol*, 58, 749-757.
- Niwa H, Yamamura K & Miyazaki J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108, 193-199.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T & Nishimune, Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*, 407, 313-319.
- Palmer LR, Chen T, Lam AM, Fenske DB, Wong KF, MacLachlan I & Cullis PR. (2003). Transfection properties of stabilized plasmid-lipid particles containing cationic PEG lipids. *Biochim Biophys Acta*, 1611, 204-216.
- Petitclerc D, Attal J, Theron MC, Bearzotti M, Bolifraud P, Kann G, Stinnakre MG, Pointu H, Puissant C & Houdebine LM. (1995). The effect of various introns and transcription terminators on the efficiency of expression vectors in various cultured cell lines and in the mammary gland of transgenic mice. *J Biotechnol*, 40, 169-178.
- Prasher DC. (1995). Using GFP to see the light. *Trends Genet*, 11, 320-323.
- Prescher JA. & Contag CH. (2010). Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence. *Curr Opin Chem Biol*, 14, 80-89.
- Ross PC & Hui SW. (1999). Polyethylene glycol enhances lipoplex-cell association and lipofection. *Biochim Biophys Acta*, 1421, 273-283.
- Roure A, Rothbacher U, Robin F, Kalmar E, Ferone G, Lamy C, Missero C, Mueller F & Lemaire, P. (2007). A multicassette Gateway vector set for high throughput and comparative analyses in ciona and vertebrate embryos. *PLoS One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0000916
- Seng KC & Seng CK. (2008). The success of the genome-wide association approach: a brief story of a long struggle. *Eur J Hum Genet*, 16, 554-564.
- Sugiyama H, Niwa H, Makino K & Kakunaga T. (1988). Strong transcriptional promoter in the 5' upstream region of the human beta-actin gene. *Gene*, 65, 135-139.
- Tan R, Li C, Jiang S & Ma L. (2006). A novel and simple method for construction of recombinant adenoviruses. *Nucleic Acids Res*, 34, e89.

- Teschendorf C, Warrington KH, Jr., Siemann DW & Muzyczka N. (2002). Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus. *Anticancer Res*, 22, 3325-3333
- Welsh DK & Kay SA. (2005). Bioluminescence imaging in living organisms. *Curr Opin Biotechnol*, 16, 73-78.
- Wilkinson GW & Akrigg A. (1992). Constitutive and enhanced expression from the CMV major IE promoter in a defective adenovirus vector. *Nucleic Acids Res*, 20, 2233-2239.
- Xiao JH, Xin W, Liu YJ, Murphy RW. & Huang DW. (2007). Generation of linear expression constructs by one-step PCR with vaccinia DNA topoisomerase I. *Molecular Biotechnology*, 35, 15-22.
- Xin W, Zhang YM, Xiao JH & Huang DW. (2003). Construction of linear functional expression elements with DNA fragments created by site-specific DNA nickase, N.Bpu10 I, and exonuclease III. *Biotechnol Lett*, 25, 1913-1916.
- You LM, Luo J, Wang AP, Zhang GP, Weng HB., Guo YN, Liu YC, Li QM & Teng M. (2010). A hybrid promoter-containing vector for direct cloning and enhanced expression of PCR-amplified ORFs in mammalian cells. *Mol Biol Rep*, 37, 2757-2765.
- Zhao X, Li G & Liang S. (2013). Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *J Anal Methods Chem*, DOI:10.1155/2013/581093.

結論

本論文では、酵母とヒト培養細胞において、PCR合成DNAを直接利用した遺伝子操作系を開発した。

第1章では、PCRによる遺伝子操作の有用性を高める配列を付加するオリゴヌクレオチドプライマー配列の最小化を行った。配列付加プライマーにおいては、最小9塩基長でも十分PCR合成が可能であり、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できる共通の人工配列を決定した。このことは、数多くの遺伝子を扱ううえで有用な技術である。

第2章では、酵母においてリアルタイムな発現解析を可能にする組換え遺伝子構築法の開発と発現解析を行った。PCR合成したDNA断片を混ぜて酵母に導入するだけで、正確なレポーター遺伝子組換え体を構築する手法を確立し、糖代謝関連遺伝子群の生細胞でのリアルタイムな発現モニタリングを可能にした。これにより、環境変化に対する細胞制御の挙動を明らかにすることに成功した。

第3章では、ヒト培養細胞においてPCR合成DNAを直接導入できる遺伝子操作法の開発を行った。リポフェクション試薬に添加することで導入効率が向上する2種のエンハンサー試薬を特定し、少量培養の96ウェル条件において遺伝子導入の向上に成功した。これにより、ヒト培養細胞においても発現解析に利用できる、PCR合成DNAによる遺伝子操作を実現した。この技術を用いて、ターミネータ配列のシステムティックな削除変異解析を行い、ヒト培養細胞での遺伝子発現に必要な最小ターミネータ配列を明らかにした。これらの結果は、ヒト培養細胞におけるPCR合成DNAを使った、数多くの遺伝子発現解析を可能にする。

本論文の成果はポストゲノム時代に対応できる数多くの遺伝子を対象とする遺伝子解析や変異の導入、発現解析するために有効な技術となり、遺伝子操作の基本概念を変える次世代の遺伝子操作技術となる。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、終始多くのご支援とご指導を賜りました赤田倫治教授に深く感謝しております。時に厳しく、優しく、辛抱強くご指導いただいたことは、強く心に残っております。今後とも邁進して参ります。また、審査委員として本論文をご精読いただき、的確なご意見をいただきました山本修一教授、今井剛教授、通阪栄一准教授、星田尚司准教授に深く感謝しております。様々な視点からいただいたご意見で討論できたことで、研究への理解を深めることができました。

本論文第1章ならびに第3章は、中村美紀子博士のご尽力により遂行することができました。特に第3章の執筆にあたり何度も推敲いただき、明瞭な表現にいただきました。中村博士には、本研究のみならず、日々の研究から多岐にわたってご指導、ご助言をいただきましたことを深く感謝しております。第2章のリアルタイム解析において膨大な情報の取得と解析にご尽力いただきました、星田尚司准教授ならびに本研究室修了生、藤井比呂志氏に深く感謝しております。研究の初歩から多岐にわたり叱咤激励をいただきました、北川孝雄博士に深く感謝しております。また、研究から諸務全般まで、美澄幸恵氏には多大なご協力をいただきました。ありがとうございました。

研究から日常生活まで様々な場面でほんとうに多くの方々に支えていただきました。この場を借りてお礼申し上げます。博士課程までを共に頑張ってきた同期の鎗水透博士、村上允唯博士をはじめ、先輩方、同期、後輩達と共にゲノム生命機能工学研究室で研究ができましたことを心から感謝しております。

最後になりますが、長いあいだ様々な面で支え、応援してくれた家族に深く感謝いたします。