

生きた細胞のゲノムを切り貼りする

安部 公博

制限酵素とDNA ligaseは、その発見から今日に至るまで、遺伝子工学におけるハサミとノリとして、試験管内での組換えDNAの作製に広く利用されてきた。近年、遺伝子工学の分野では、CRISPR/Cas9系やCre-*loxP*系のように、生きた細胞内のDNAを操作し、効率的な変異導入や条件的遺伝子欠損を行う技術が注目されている。

さて、新たなゲノム工学ツールとして本稿で紹介したいのは、bacteriophage (以下、phage) に由来するlarge serine recombinase (LSR) である。この酵素は、細菌に感染したphageが自身のDNAを宿主ゲノムに挿入するためのintegraseの一種であり、phage DNAと宿主ゲノムの特定の部位間 (phage and bacterial attachment site; *attP* と *attB*) でのDNA組換え反応を触媒する¹⁾。一般的な *attP* は、50～60塩基のimperfect inverted repeat配列から成り、*attB* は、中央に数塩基の *attP* との共通配列を含む40塩基程度のDNA配列である。DNA組換えというと、相同組換えのような反応様式を想像しがちである。しかし、実際の作用機序は、4量体のLSRに保持される *attP* と *attB* の中央部が切断されて2塩基の突出末端を生じ、DNA鎖交換の後に突出塩基のアニリングを介して再連結されるといった、制限酵素とDNA ligaseによる切り貼りのイメージに近い (図1, TT/AA塩基突出の例)。反応後には、*attP* と *attB* が半分ずつ入り混じった *attL* および *attR* が生じるが、LSR単独では *attL* と *attR* 間でのDNA組換え反応 (つまり、挿入されたphage DNAの切除) を触媒することはできない (これを行うためには、LSRの他にもう一つのphage因子が必要となる)。一方、1分子のDNA上に同じ向きで並んだ *attP* と *attB* 間でDNA組換え反応が起こると、*attP-attB* 間に介在するDNA配列が切除され、また、*attP* と *attB* の片方が逆向きであると、介在配列の反転 (逆位) が起こる²⁾。

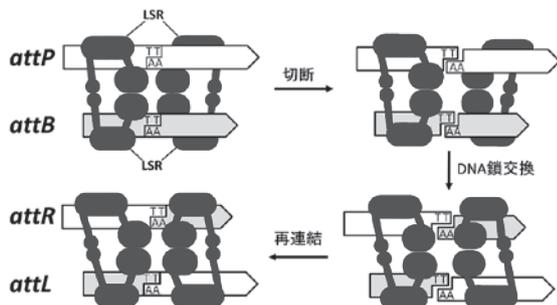


図1. LSRによるDNA組換え反応. Smithのモデル図りを参考に作成。

したがって、LSRは、標的配列の配置次第で、DNAの挿入/切除/逆位を触媒できる。

LSRの特徴は、標的配列への特異性が高いこと、他の因子を必要としないため、細菌だけでなく真核細胞や試験管内でも機能すること、そしてDNA組換え反応が不可逆的なことである。LSRと同じくDNA組換えを利用したCre-*loxP*系では、Cre recombinaseが二つの同一な *loxP* 配列を標的とするため、DNA組換え反応が挿入・切り出しの両方に進む。一方、LSRは、DNA組換え反応が不可逆的であるので、生物のゲノムに外来遺伝子を安定に導入することが可能である³⁾。また、興味のある遺伝子を *attP* と *attB* で挟み込んでおき、任意の時期にLSRを発現誘導することで、その遺伝子領域をゲノムから切り出して (あるいは逆位させて) 条件的に不活性化させるといったこともできる²⁾。さらに、LSRによるDNA組換え時に突出末端となる中央の2塩基は、別の塩基に置換可能である³⁾。精製したLSRと、異なる塩基置換を導入した複数の *attP* と *attB* を試験管内に混在させると、同じ2塩基変異をもった *attP* と *attB* 間でのみDNA組換えが起こる^{2,3)}。中央2塩基への変異導入により、標的配列のパリエーションを増やして生物のゲノムに導入すれば、1種類のLSRを用いるだけで同時に複数箇所のゲノム操作ができるようになるだろう。今のところ、*in vivo* では単純な遺伝子導入・欠失しか行われていないのが現状であるが、今後、ゲノム中に散在する遺伝子を1か所に集めたり、ゲノム内の複数の領域を同時に欠損や逆位させたりするなどといった、生きた細胞の大規模なゲノム改変にもLSRが利用できると期待される。

LSRによるDNA組換え機構はシンプルであることから、生化学的に詳細に研究されていない新規のものであっても、その遺伝子と標的配列が取得できれば、すぐにゲノム工学に利用できるだろう。公共データベースに登録された細菌ゲノム中には、非常に多数のLSRが見つかる。また、その標的配列は、細菌ゲノム内のphage領域末端の配列から比較的容易に同定できる。今後、LSRの有用性が広く知られてくれば、各研究者が手持ちの細菌から得たLSR遺伝子や標的配列をオリジナルのゲノム工学ツールとして利用する日が来るのかもしれない。

- 1) Smith, M.: *Microbiol. Spectr.*, **3**, 1 (2015).
- 2) Stark, W. M.: *Curr. Opin. Microbiol.*, **38**, 130 (2017).
- 3) 平野展孝, 春木 満: *生化学*, **85**, 345 (2013).