

## イントロンにコードされた制限酵素を利用する ラン藻の遺伝子変換

Gene conversion in cyanobacteria utilizing an intron-encoded restriction enzyme

研究代表者 熊本工業大学工学部応用微生物工学科助教授 松岡 正佳  
Assoc. Prof., Department of Applied Microbial Technology,  
Kumamoto Institute of Technology  
Masayoshi Matsuoka

共同研究者 熊本工業大学工学部応用微生物工学科教授 小川 隆平  
Prof., Department of Applied Microbial Technology, Kumamoto  
Institute of Technology  
Takahira Ogawa

We propose a method for artificial gene conversion scheme in cyanobacteria utilizing a T4 phage intron-endonuclease, *I-TevI*. The method consists of two steps of transformation procedures. The first transformation is a usual gene disruption; any previously cloned chromosomal loci could be converted to variants with insertion of antibiotic resistance gene such as kanamycin resistance (Km) gene via homologous reciprocal recombination, except for that both termini of Km gene are flanked by short synthetic DNAs which provide target sites for cleavage with *I-TevI*. In the second transformation step, the transformant obtained in the first step serves as a recipient of *in vitro* synthesized *I-TevI* protein as well as a plasmid containing a template for DNA repair. Efficient invasion of *I-TevI* protein into cyanobacterial cells could be achieved by means of an electroporation. The *I-TevI* electroporated into the cells would cause DNA double strand cleavage at the chromosomal target sites, thus facilitating a cellular DNA repair process. When the incoming template plasmid contains a significant homology on both sides of the cleavage sites, Km gene would be lost and the template gene on the plasmid would be copied to the chromosomal locus. The two step gene conversion method was tested at *psbAI* locus encoding a photosystem II D1 protein in *Synechococcus* sp. PCC7942. The *psbAI* gene-disrupted strain, *psbAI::Km* was subjected to electroporation with *I-TevI* and a plasmid containing a precise replacement of an open reading frame of the *psbAI* gene with that of one of the three *psbA* genes from a thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus vulcanus*. By these procedures, a recombinant cyanobacterium PCC7942 was in construction in which a thermophilic D1 protein was substituted for the original gene product.

### 研究目的

ラン藻は酸素発生型光合成を行なう最も原始的な原核微生物であることから、高等植物では不可能な遺伝子操作技術を

利用した光合成の研究ができる魅力をもっている。特に光化学系 II のチラコイド膜内腔で酸素発生を伴い水分子が分解される場所での反応機構の解明には、ラン

藻での遺伝子操作が有効であろう。しかし、従来の遺伝子操作方法では扱える遺伝子の数が利用可能な薬剤耐性遺伝子の数によって制約を受けることが多く、光化学系のように多種類のタンパク質が膜内で複合体を形成しているような場合には限界があった。

私達はここでこのような制約を受けない新しい遺伝子操作、2段階遺伝子変換を提案する。この方法によれば多種類の遺伝子をわずか 2-3 種類の薬剤耐性遺伝子のみを用いて遺伝子変換可能である。1つの応用として、好熱性ラン藻由来の熱に安定な光化学系 II の数種類の遺伝子産物を 中温性ラン藻細胞内で発現させ、熱安定な光化学系タンパク質複合体を容易に精製解析できる実験系を構築することを目標としている。この研究ではラン藻ゲノム中の遺伝子を、染色体に組み込んだターゲット部位と T4 ファージ由来の DNA 切断認識特異性の高いエンドヌクレアーゼを利用して遺伝子変換する技術を確立することを目的とした。

#### 研究経過

この研究では 2 段階の形質転換操作により最終的にラン藻生細胞内で遺伝子変換を効率よく誘起することを目的としているので、それに必要な材料作成を行なった。下図に示すように、遺伝子変換では①ターゲット部位を両端にもつ薬剤耐性遺伝子を挿入した遺伝子破壊プラスミド（ここでは中温性ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 の光化学系 II D1 タンパク質をコードする *psbAI* 遺伝子にカナマイシン耐性(Km)遺伝子を挿入したもの）、②染色体をまれに切断する特異性の高い制限酵素またはエンドヌクレアーゼ、そして③ターゲット部位に置換すべき目的の遺伝子（ここでは好熱性ラン藻 *Synechococcus vulcanus* 由来の *psbA* 遺伝子）が必要となる。

そこでまず *Synechococcus* sp. PCC7942 の *psbAI* 遺伝子の破壊を行なうためのプラスミドの作成を行なった。性質のよく知られているエンドヌクレアーゼとして T4 ファージ由来のイントロンエンドヌクレアーゼ I-TevI を用いることとし、その認識切断

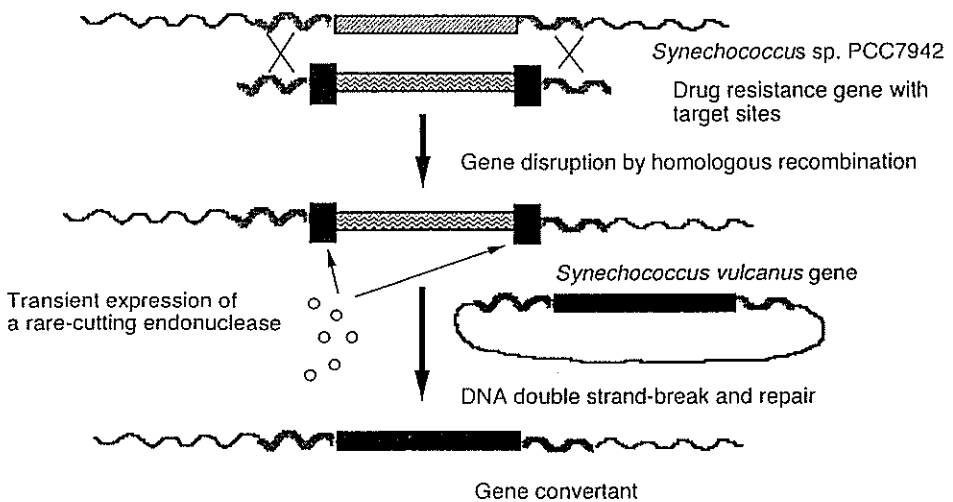


Fig.1. Gene conversion in cyanobacteria utilizing a rare-cutting endonuclease and chromosomally integrated target sites flanking a drug resistance gene

ターゲット部位を構成する 66 bp または 74 bp の 2 本鎖 DNA を合成し、大腸菌プラスミド上にクローン化した。そしてターゲット部位を両端に付加したテトラサイクリン耐性(Tc)遺伝子および Km 遺伝子を作成した。これら耐性遺伝子と両端のターゲット部位を含む DNA 断片は 8 塩基認識の制限酵素 *NotI* で切り出すことができ、適当な破壊すべき遺伝子中に移すことができる。この実験では PCC7942 株由来の *psbAI* 遺伝子を加工して、タンパク質のコード領域だけを取り除き、*NotI* 部位を挿入した *psbAI* 遺伝子断片をもつ pEXE1 プラスミドを構築した。pEXE1 は *psbAI* 遺伝子のオープンリーディングフレームの 5' と 3' 領域は保持しているため、染色体との相同組換えに必要な配列はもっている。ただし pEXE1 はラン藻内では自律複製できないため、形質転換は相同組換えによる遺伝子置換または組込みによってのみ起こる。今回の実験ではラン藻にカナマイシン耐性を付与するため、pEXE1 にターゲット部位を両端にもつ Km 遺伝子を挿入して pEXE1-*psbAI*::Km 遺伝子破壊プラスミドを作成した。

次にこの研究で鍵となる I-TevI タンパク質の調製を試みた。I-TevI は T4 ファージゲノムの *id* 遺伝子のイントロン中にコードされているので、まず I-TevI 遺伝子は大腸菌プラスミド上にクローン化して発現する試みを行なった。しかし、I-TevI タンパク質は非常に毒性が強く、大腸菌で発現させることはできなかった。そこで、I-TevI 遺伝子とその翻訳開始点上流にある RNA 二次構造を含む翻訳阻止配列を T7 プロモーター下流に連結して、大腸菌プラスミドにクローニングした。このプラスミドを鋳型として *in vitro* 転写・翻訳を行い I-TevI タンパク質を調製した。調製したタンパク質が DNA 切断活性をもっていることは、ターゲット部位をもつプラスミドを *in vitro* で切断できることで確認された。

上記の I-TevI 遺伝子のクローニングの過程で、1 つの興味ある事実が判明した。I-TevI タンパク質は 245 アミノ酸から構成され、その配列は既に報告されている。私達が T4 ファージ DNA よりクローニングした

I-TevI 遺伝子の配列を報告されているものと比較したところ、1 塩基置換が見出され、67 番目の Ala 残基が Glu 残基に変わっていた。この変異の意味については調査中であるが、Ala67 と Glu67 をもつ I-TevI タンパク質を調製して、*in vitro* でのターゲット部位切断活性を比較してみたところ、Glu67 残基をもつタンパク質の方が 2 倍以上比活性が高いことが分かった。今後 I-TevI 酵素の活性部位の構造と関連して研究する価値があるかもしれない。

3 番目の材料として、好熱性ラン藻 *Synechococcus vulcanus* の *psbA* 遺伝子配列を決定し、これを用いて *Synechococcus* sp. PCC7942 の *psbAI* 遺伝子のオープンリーディングフレームを耐熱性タンパク質をコードするものに置き換えることを計画した。現在までにラン藻の光化学系 II の D1 タンパク質をコードする *psbA* 遺伝子は重複して存在することが知られている。実際、*S. vulcanus* でも 3 種類の *psbA* 遺伝子がゲノム中に存在することが PCR 法と Southern 分析の結果明らかとなり、3 種類の *psbA1*, *psbA2*, *psbA3* 遺伝子配列を決定した。遺伝子配列から推定された D1 タンパク質の 360 残基から成るアミノ酸配列は 3 つの遺伝子でそれぞれ異なっており、他のラン藻の配列と比較して、 $\alpha$ ヘリックス領域と N 末端・C 末端領域でアミノ酸置換が多く見られた。また、*psbA1-psbA3* 遺伝子はゲノム上で隣接していた。さらに RNA の解析から、3 つの遺伝子はすべて *S. vulcanus* 細胞中で発現していた。

以上の実験材料の作成を基にして、ラン藻の *psbA* 遺伝子の遺伝子変換を行なった。まず第 1 段階として、直線化した pEXE1-*psbAI*::Km 遺伝子破壊プラスミドを用いて、PCC7942 株の形質転換を行なった。形質転換法は PCC7942 株に本来備わっている自然的 DNA の取り込みによった。カナマイシン耐性の形質転換体が得られ、そのゲノム DNA の Southern 分析と PCR 解析より、予想どおりの染色体構造をもつクローンが得られた。

第 2 段階の形質転換ではエレクトロポレーション法を用いた I-TevI タンパク質と鋳

型 DNA の同時導入を行なっている。鋳型 DNA として *S. vulcanus* の 3 つの *psbA* 遺伝子の内の一つのオープンリーディングフレームを PCR 増幅した DNA 断片を pEXE1 に挿入したものを使用する予定である。

現在までに予備的実験を行なって、Km 遺伝子の除去がどの程度の効率で起こるか検討している。第 2 段階の形質転換では、染色体上に組み込まれた Km 遺伝子の両端に *in vivo* で I-TevI による切断を入れ、その結果として誘起されるラン藻細胞内の DNA 切断の修復機構を利用した遺伝子変換を誘発する。すなわち、薬剤耐性遺伝子は一度ゲノムに組み込まれるが、I-TevI の作用により切り出されるので、再利用が可能である。そのため、Km 耐性を失ったクローンを効率よく選択できなければならない。そこで遺伝子変換効率を容易に求めるため、選択マーカーとしてストレプトマイシン耐性(Sm)遺伝子断片を pEXE1 に挿入したプラスミドを鋳型とした形質転換を行なっている。この実験ではエレクトロポレーション法を用い、I-TevI タンパク質と Sm 鋳型プラスミドを同時に導入することにより、ストレプトマイシン耐性・カナマイシン感受性コロニーの割合から遺伝子変換の効率を求めることができる。エレクトロポレーション後の生存菌の内、数%が遺伝子変換体であるような条件が必要である。

#### 研究成果

この研究で得られた研究成果をまとめると以下の 4 項目になる。

- 1) イントロンエンドヌクレアーゼ I-TevI 遺伝子を大腸菌にクローニングし、I-TevI タンパク質を *in vitro* で高発現する系を確立した。調製した I-TevI タンパク質は *in vitro* でターゲット部位を切断する活性を示した。
- 2) I-TevI のターゲット部位を両端にもつ薬剤耐性(Km, Tc)遺伝子を担うプラスミドを作成し、これを用いてラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 の遺伝子破壊を行なった。光化学系 II の D1 タンパク質をコードする *psbAI* 遺伝子を破壊したラン藻株を作成した。

- 3) D1 タンパク質を耐熱性のもので置換するため、好熱性ラン藻 *Synechococcus vulcanus* より 3 種類の *psbA* 遺伝子の配列を決定した。好熱性ラン藻由来の D1 タンパク質は中温性のものに比べて明らかにアミノ酸配列に特徴があった。
- 4) *psbAI* 遺伝子を破壊したラン藻株を用いてエレクトロポレーション法による I-TevI タンパク質の導入を行なった。遺伝子変換の効率を決定するためストレプトマイシン耐性遺伝子を *psbAI* 遺伝子のオープンリーディングフレームと置換した鋳型プラスミドを用いる系を構築した。

#### 今後の課題と発展

現在までにラン藻の遺伝子変換を効率よく行なう方法は知られていない。また、I-TevI エンドヌクレアーゼを利用した遺伝子変換技法は全く新しいものであり、ラン藻以外の生物にも等しく応用できる可能性をもっている。この研究では 2 段階遺伝子変換の最後の段階前までの実験結果しか示すことができなかったが、今後実験技術の進歩により 2 段階遺伝子変換技法が様々な遺伝子に応用できるであろう。

今後の課題について以下に述べる。

I-TevI は細胞毒性が強いので、一時的に細胞内に導入しうるエレクトロポレーション等の方法が望ましい。さらに、I-TevI を改良して、毒性を低下させることも必要であろう。

遺伝子変換技法ではゲノムに組み込まれたターゲット部位が 2 本鎖切断を受けるため、宿主の DNA 修復機構が作動する。このとき、鋳型 DNA が染色体上にコピーされるためには宿主の *recA* 等の相同組換え遺伝子が必要になる。もし、修復機構に關与する遺伝子産物が不足するときは、それらを補強する必要がある。

#### 発表論文リスト

Sakai, M., Ogawa, T., Matsuoka, M. and Fukuda, H. (1997) *J. Ferment. and Bioeng.*, **84** (in press)