



ゲノム工学ツールとしてのセリタイプ・インテグラーゼ

1. はじめに

細胞ゲノムの構造を操作改変するゲノム工学技術は、有用物質生産を目的とした育種に限らず、近年発展の著しい合成生物学の分野においても重要な技術である。中でも、多数の遺伝子産物が反応に関与する代謝・生合成系の人工的な構築と、その異種細胞への付与を目指す場合、長大な遺伝子クラスターの迅速な構築技術と、異種細胞ゲノムへの長鎖 DNA 導入技術が重要となる。この目的に対し、近年、ファージゲノムの宿主ゲノムへの組込みを触媒する溶原性バクテリオファージの部位特異的組換え酵素（インテグラーゼ）が注目されている。

細胞内ゲノム工学技術において、よく用いられる大腸菌 P1 ファージの Cre リコンビナーゼは、同一配列 (*loxP*) 間での部位特異的組換え反応を触媒し、異種細胞内でも効率良く機能することが示されているが、両方向の組換え反応を触媒するため、遺伝子導入よりも主に遺伝子欠失株の作製に用いられる。このことから、細胞ゲノムへの高効率な遺伝子導入を目的とするゲノム工学には、異なる配列間でのみ部位特異的組換え反応を触媒し、逆反応が酵素単独では起こらない溶原性ファージのインテグラーゼが適していると考えられる。本稿では、組換え反応に宿主細菌由来タンパク質を必要としないため異種細胞内での遺伝子組換えに対して高い汎用性を示す、活性部位にセリン残基を持つインテグラーゼを用いたゲノム工学技術について紹介する。

2. ファージ・インテグラーゼ

ファージ・インテグラーゼは、溶原性ファージが宿主細菌への感染時、自己ゲノムを宿主ゲノムへ組込む際に、

ファージゲノム上のアタッチメント・サイト (*attP* 部位) と宿主ゲノム上のアタッチメント・サイト (*attB* 部位) 間で部位特異的組換え反応を触媒する酵素である (図 1A)¹⁾。この部位特異的組換え反応の結果、基質配列 (*attP* & *attB*) 中央の相同なコア配列で組換わった組換え産物 (*attL* & *attR*) が生じ、宿主ゲノム上の *attL-attR* 配列間にファージゲノムが組込まれる。逆に、溶原性ファージの増殖の際には、切り出し因子 (Xis) の補助によって、*attL-attR* 配列間でファージゲノムの切り出し反応が起こり、組換え配列は元の *attP* & *attB* 配列に戻る。

ファージ・インテグラーゼは、触媒残基の違いによって 2 種類のグループがあり、活性部位にチロシン残基を持つチロシタイプ・インテグラーゼと、セリン残基を持つセリタイプ・インテグラーゼに分けられる (図 1B)^{2,3)}。チロシタイプは、組換え反応の中間体としてホリデイジャンクション (Holliday junction, 十字構造) を形成するのに対し、セリタイプは *attP* & *attB* 配列の双方を二重鎖切断後、片側の DNA 鎖を 180° 回転して再結合することで組換え反応を完了する。両者は、立体構造・触媒機構ともに全く異なるが、感染時におけるファージゲノムの宿主ゲノムへの組込みを触媒するという点で同一の機能を果たす。ゲノム工学利用の観点からみた両者の特筆すべき違いは、大腸菌 λ ファージ・インテグラーゼに代表されるチロシタイプが、その効率的な反応進行に宿主細菌由来タンパク質を必要とするのに対し、放線菌 *phiC31* ファージ・インテグラーゼに代表されるセリタイプは、反応進行に宿主由来因子を必要としない点にある。当然、異種細胞内での組換え活性が重要なゲノム工学では、後者の方が適していると容易に想像できる。実際、 λ ファージや HK022 ファージなどのチロシタイプを異種細胞内で作用させた場合、大腸菌内では厳密な一方を示す反応性が失われ、両方向の組換え反応が起こることが知られている^{2,3)}。一方、セリタイプは、ヒト培養細胞を含む様々な細胞種で、一方の部位特異的組換え反応が可能である^{3,4)}。

3. 異種微生物ゲノムへの部位特異的遺伝子導入

筆者らは、有用代謝・生合成経路の異種微生物への付与を目的として、セリタイプの一種である放線菌 TG1 ファージ・インテグラーゼを用いて、微生物ゲノムへの部位特異的遺伝子導入法の開発に取り組んできた^{5,6)}。TG1 ファージの本来の宿主である放線菌を含む Actinobacteria, 及び Alphaproteobacteria ゲノムには、TG1 インテグラーゼの *attB* 部位 (40 bp 前後の逆反復配列) に相同な塩基配列

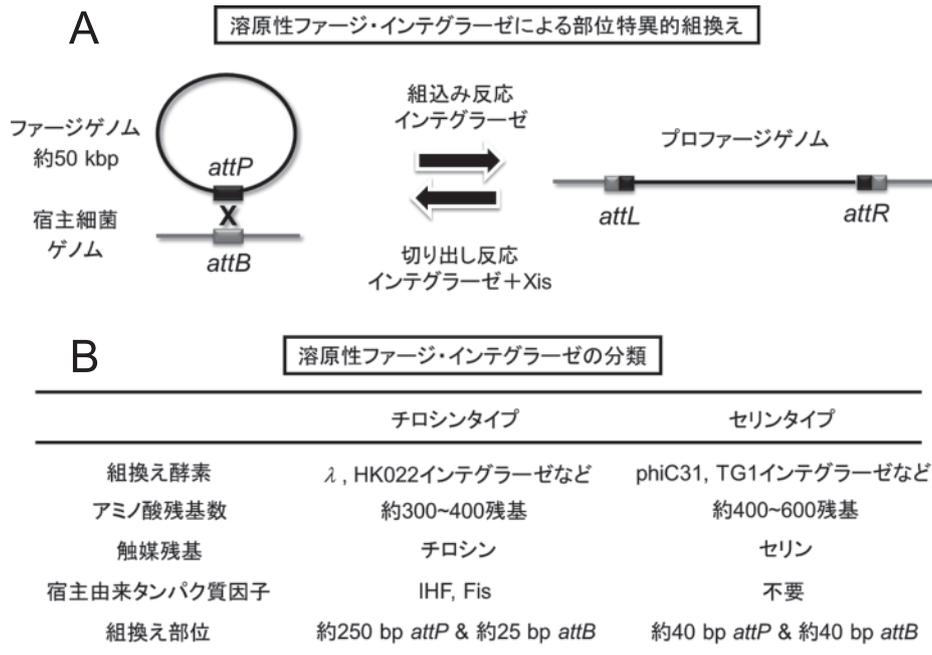


図1 溶源性ファージ・インテグラーゼ

- (A) 溶源性ファージ・インテグラーゼはファージゲノム上の *attP* 配列と宿主ゲノム上の *attB* 間で部位特異的組換えを触媒し、組換え産物である *attL* & *attR* 配列を生成する。その結果、宿主ゲノム上の *attL-attR* 配列間にファージゲノムが組込まれる¹⁾。
- (B) 溶源性ファージ・インテグラーゼは活性部位のアミノ酸残基によって2種類のグループ(チロシンタイプとセリンタイプ)に分けられる^{2,3)}。

が存在するが⁷⁾、大腸菌を始めとするその他の微生物ゲノムには相同な塩基配列は見られない。そこでまず、広範な微生物種に対して遺伝子挿入が可能な Tn5 トランスポソーム (transposome) 法⁸⁾によって、TG1 インテグラーゼの組換え部位を大腸菌ゲノムへランダムに挿入し、次にそれらの挿入組換え部位を標的として、TG1 インテグラーゼによる部位特異的遺伝子導入を行った (図2A)^{5,6)}。

その結果、本来宿主細菌ゲノムに存在している *attB* 部位よりも、ファージゲノムに存在する *attP* 部位を大腸菌ゲノムへ挿入した方が、高い遺伝子導入効率を示す挿入株を取得しやすい結果を得た (図2B)。本手法では、大腸菌と放線菌という宿主細菌の違いもさることながら、インテグラーゼ発現プラスミドが導入済みの細胞に対して遺伝子導入を行っている点で、インテグラーゼが存在していないファージ感染時の本来の細胞状態とは異なる。しかし、ゲノム上の同一部位に挿入された *att* 部位を標的とした場合、*attP* 部位に対して高い遺伝子導入効率を示す結果は、他の放線菌ファージのセリンタイプ・インテグラーゼ (phiC31 や R4) によるヒト培養細胞への遺伝子導入実験

においても得られている^{9,10)}。また、大腸菌ゲノム上へ挿入された *attP* 部位の中でも、複製起点 *oriC* 近傍に挿入された *attP* 部位が高い遺伝子導入効率を示した (図2B)。複製起点近傍は、大腸菌の染色体分配時に細胞両極へ移動することが知られているため¹¹⁾、細胞へ導入された外来DNAが、ゲノム上のその他の領域と比較してアクセスしやすい環境にあると推測される。また、ゲノムDNAと比べてよりアクセスしやすい環境にあると考えられるプラスミドDNA上の組換え部位を標的とした場合、ゲノムDNAを標的とした際に生じる *attP* 部位と *attB* 部位に対する遺伝子導入効率の違いが現れないことから^{5,6)}、外来DNAの標的部位へのアクセスのしやすさが、異種細胞ゲノムへの遺伝子導入効率を左右する重要な因子になっているのではないかと考えている。

4. 遺伝子クラスターの試験管内構築

ゲノム工学分野においては、異種細胞ゲノムへの長鎖DNAの導入技術と同じく、導入する複数の遺伝子を整列化した遺伝子クラスターを迅速に構築する技術も重要であ

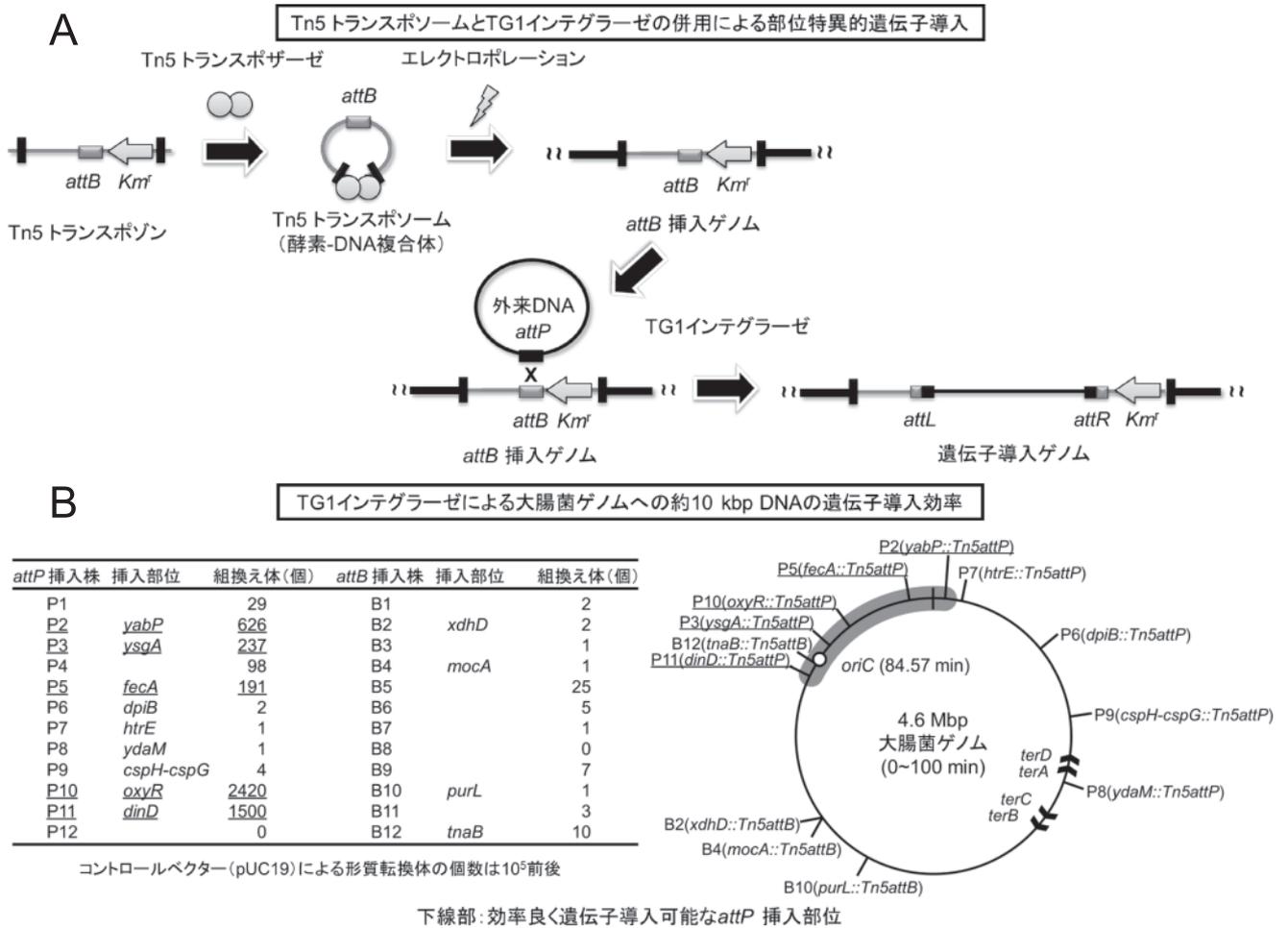


図2 微生物ゲノムへの部位特異的遺伝子導入

- (A) 広範な微生物種に適用可能な Tn5 トランスポソーム法⁸⁾を用いて, TG1 インテグララーゼの att 部位をゲノム上にランダムに挿入し, 次に TG1 インテグララーゼによって部位特異的遺伝子導入を行った^{5,6)}.
- (B) attP 部位を大腸菌ゲノムへ挿入する方が, attB 部位を挿入するよりも, 高い遺伝子導入効率を示す挿入株が得やすく, 複製起点 oriC 近傍に挿入された attP 部位は高い遺伝子導入効率を示した⁶⁾.

る。試験管内における DNA アセンブリー技術としては, DNA 鎖末端の相同領域を用いる Isothermal assembly 法¹²⁾ や, チロシントイプの入フェージ・インテグララーゼを用いた Gateway multisite cloning 法¹³⁾ など, 既に様々な手法が開発されているが, セリントイプ・インテグララーゼを用いた遺伝子クラスター構築技術も開発されている¹⁴⁾。

セリントイプ・インテグララーゼによる部位特異的組換え反応では, 二重鎖切断によってコア配列に生じる 2 塩基の突出末端の相補性が, 再結合の成否と組換え産物の方向性を決定している (図 3A)¹⁵⁾。単純に組換え可能なコア配列 2 塩基の組み合わせは 16 (=4×4) 通りであるが, 複数遺伝子を一方向に整列化するためには, 逆方向に連結された

組換え産物を生じさせない必要があるため, 同時に使用可能なコア配列は理論的に 6 通りになる。パンドロームなコア配列 (例: 5'-AT-3' や 5'-GC-3' など, 図 3B) や, アンチパラレルなコア配列同士 (例: 5'-AA-3' & 5'-TT-3' や 5'-AG-3' & 5'-CT-3' など, 図 3C) の使用は遺伝子方向の保存性が失われる。

セリントイプの一種である放線菌 phiBT1 フェージ・インテグララーゼを用いた研究では, 本原理を用いて, サイズの大きな非リボソーム型ペプチド合成酵素やポリケチド合成酵素を含む 6 個 (*epoA*~*epoF*) の遺伝子群から構成される抗がん剤エポチロン生合成遺伝子クラスター (56 kbp) のワンステップ整列化に成功している (図 3D)¹⁴⁾。

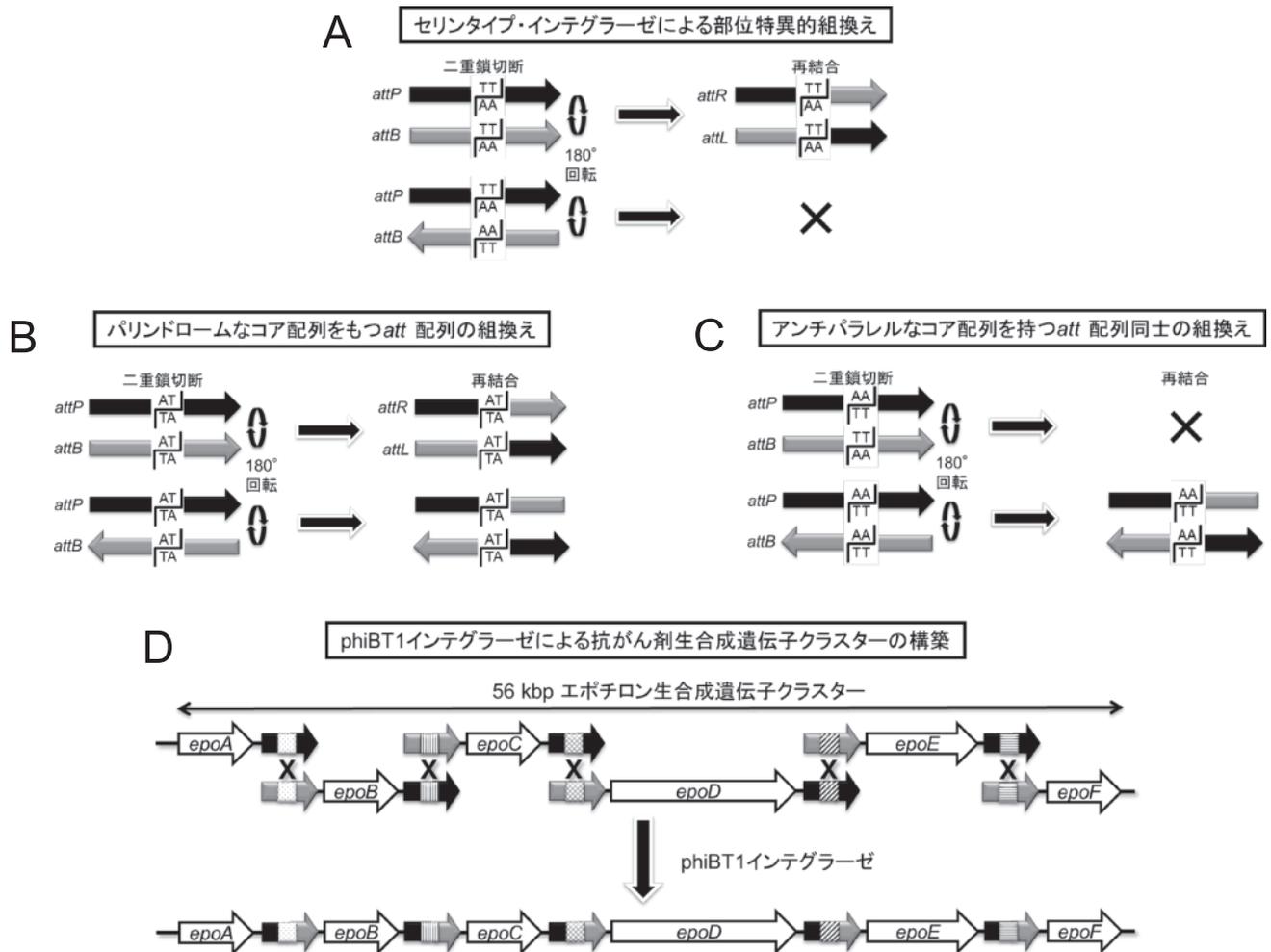


図3 試験管内における遺伝子クラスターの構築

- (A) セリンタイプ・インテグラーゼは、*attP* & *attB* 配列の双方をコア配列で二重鎖切断後、片側の DNA 鎖を 180° 回転・再結合することにより組換え反応を完了する²⁻⁴⁾。再結合の成否と組換え産物の方向性はコア配列 2 塩基の相補性によって決定される¹⁵⁾。
- (B) パリンドロームなコア配列をもつ *att* 配列の組換えは、遺伝子の方向性が保存された *attL* & *attR* 配列と、方向性が逆になった組換え産物を生成する¹⁵⁾。
- (C) アンチパラレルなコア配列をもつ *att* 配列同士の組換えは、遺伝子の方向性が逆になった組換え産物を生成する¹⁵⁾。
- (D) 選択的組換えが可能なコア配列をもつ *attP* & *attB* 配列ペアを用いて、非リボソーム型ペプチド合成酵素やポリケチド合成酵素を含む 6 個 (*epoA*~*epoF*) の遺伝子から構成される抗がん剤エポチロン合成遺伝子クラスター (56 kbp) がワンストップで構築された¹⁴⁾。

コア配列の組み合わせにより、選択的組換えが可能な *attP* & *attB* 配列ペアを構築する手法は、同じく試験管内において酵素単独で効率良く作用するセリンタイプ・インテグラーゼ全般に適用可能な手法である。他方、本原理を細胞内ゲノム工学に用いることは一概には難しいと予想される。コア配列の組み合わせによる選択的組換えは、組換え産物の再結合ができないだけで、インテグラーゼによる二重鎖切断、及び DNA 鎖の回転は起こる¹⁵⁾。そのため、

ゲノム上にコア配列が異なる *attP* & *attB* 配列ペアが複数存在する場合、その配列を認識するインテグラーゼ存在下ではゲノム DNA が不安定化する恐れがある。

5. おわりに

λ インテグラーゼに代表されるチロシンタイプ・インテグラーゼの歴史は古いが、本稿で紹介したセリンタイプ・インテグラーゼの一群は、90 年代初頭から相次いで発見

された比較的歴史の浅い組換え酵素である。バクテリオファージの部位特異的組換え酵素を用いる組換え DNA 技術は、Cre リコンビナーゼや λ ファージ・インテグラーゼなど、チロシンタイプを用いる手法が主流であるが、近年、セリンタイプ・インテグラーゼを用いたゲノム工学技術も相当進歩している。チロシンタイプと比較した際のセリンタイプの利点は、酵素単独で効率良く反応が進行するため異種細胞内で機能させることが比較的容易な点にある。また、本稿で紹介した放線菌ファージ・インテグラーゼは、それぞれ固有の *att* 配列を認識することから、複数のインテグラーゼの *att* 配列と酵素を用いることで、異種細胞ゲノムへの段階的なドミノ式遺伝子導入や、複数のゲノム上特定部位への遺伝子導入が可能になる。セリンタイプ・インテグラーゼを用いた試験管内における遺伝子クラスター構築技術と、対象細胞種を限定しないゲノム上遺伝子導入技術を組み合わせることで、人工的な代謝・生合成系の構築と、その異種細胞への付与を目指す合成生物学的研究への応用が期待される。

謝辞

日本大学生物資源科学部において、本研究を始める機会を与えて下さいました高橋秀夫先生、並びに共同研究者の皆様へ深く感謝申し上げます。

- 1) Campbell, A. (1962) *Adv. Genet.*, **11**, 101–145.
- 2) Groth, A.C. & Calos, M.P. (2004) *J. Mol. Biol.*, **335**, 667–678.
- 3) Hirano, N., Muroi, T., Takahashi, H., & Haruki, M. (2011) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92**, 227–239.
- 4) Brown, W.R., Lee, N.C., Xu, Z., & Smith, M.C. (2011) *Methods*, **53**, 372–379.
- 5) Hirano, N., Muroi, T., Kihara, Y., Kobayashi, R., Takahashi, H., & Haruki, M. (2011) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 1877–1884.
- 6) Muroi, T., Kokuzawa, T., Kihara, Y., Kobayashi, R., Hirano, N., Takahashi, H., & Haruki, M. (2012) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, doi:10.1007/s00253-012-4491-4.
- 7) Morita, K., Morimura, K., Fusada, N., Komatsu, M., Ikeda, H., Hirano, N., & Takahashi, H. (2012) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 295–304.
- 8) Goryshin, I.Y., Jendrisak, J., Hoffman, L.M., Meis, R., & Reznikoff, W.S. (2000) *Nat. Biotechnol.*, **18**, 97–100.
- 9) Thyagarajan, B., Olivares, E.C., Hollis, R.P., Ginsburg, D.S., & Calos, M.P. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 3926–3934.
- 10) Olivares, E.C., Hollis, R.P., & Calos, M.P. (2001) *Gene*, **278**, 167–176.
- 11) Yamaichi, Y. & Niki, H. (2004) *EMBO J.*, **23**, 221–233.
- 12) Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., III, & Smith, H.O. (2009) *Nat. Methods*, **6**, 343–345.

- 13) Petersen, L.K. & Stowers, R.S. (2011) *PLoS ONE*, **6**, e24531.
- 14) Zhang, L., Zhao, G., & Ding, X. (2011) *Sci. Rep.*, **1**, 141.
- 15) Smith, M.C.A., Till, R., & Smith, M.C.M. (2004) *Mol. Microbiol.*, **51**, 1719–1728.

平野 展孝^{1,2}, 春木 満¹

(¹日本大学工学部生命応用化学科, ²JST さきがけ)

Serine-Type integrases as tools for genome engineering
Nobutaka Hirano^{1,2} and Mitsuru Haruki¹ (¹Department of Chemical Biology & Applied Chemistry, College of Engineering, Nihon University, 1 Azanagakawara, Tokusada, Tamura-machi, Koriyama, Fukushima 963-8642, Japan, ²JST, PRESTO, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan)

細菌の形態形成における細胞壁造形機構

1. はじめに

単細胞生物である細菌では、周囲の環境の変化に対応しつつ増殖するために、その細胞表層構造がとても重要になる。大腸菌に代表されるグラム陰性菌の表層は3層構造であり、内膜（細胞質膜）と外膜の二つの膜とその内外膜に挟まれた薄い細胞壁（ペプチドグリカン）から構築される（図1A）。枯草菌に代表されるグラム陽性菌の表層は2層構造で、細胞質膜と厚いペプチドグリカンからなる（図1A）。ペプチドグリカンは1細胞につき1分子存在し、内膜を覆いつくすことにより、菌体の内圧に対抗し、溶菌を防ぐ。さらに、ペプチドグリカンは細菌の形態形成にも必要であり、それ自体細菌と同じ形をしている（図1C, D）。細菌増殖時、細胞の形態が変わるに連れて、ペプチドグリカンもその形を変える。ペプチドグリカン形成には、合成酵素はもちろん必要であるが、分解酵素も重要な役割を果たしていることが知られている。この合成と分解のバランスが失われると、ペプチドグリカンは欠損し、溶菌する。このバランスを維持するために、これらの酵素の活性は厳密に制御されていると考えられている。近年、ペプチドグリカン形成に FtsZ や MreB などの細胞骨格因子が関与していることがわかってきた。しかしながら、どのように細胞骨格因子が酵素活性を制御し、ペプチドグリカン形成に関与するのか、ほとんど明らかにされていない。このミニレビューでは、細菌の形態形成と密接に関わるペプチドグ