

研究終了報告書

「ショウジョウバエ染色体工学による超巨大 DNA や大規模遺伝子回路の構築法」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：近藤 周

1. 研究のねらい

ヒトゲノムの解読が完了して 20 年が経過した。現代生物学における次の大目標の一つは、ヒトゲノムの人工合成である。しかしながら、個々のヒト染色体の長さは 100 Mb を優に超える超巨大分子であり、その完全合成は現代のバイオテクノロジー技術を用いて達成することは不可能である。過去 10 年の間に、大腸菌や酵母などの数 Mb 程度の小さなゲノムの合成は達成されている。これらの研究において、化学合成されたオリゴ DNA を最初のパーツとして、最終的に 100 kb 程度の DNA 断片にまで組み上げる手法は十分に確立された。従って、1,000 個の 100 kb 断片をいかにして組み合わせるかが、技術的なブレイクスルーを必要とする次の課題である。申請者のさきがけ研究では、この問題に対する直接的な回答となる「ショウジョウバエ遺伝子工学による階層的 DNA 構築法」の開発に取り組んだ。この方法論は、組み合わせたい DNA 断片をあらかじめショウジョウバエ染色体の特定の遺伝子座に組み込んだトランスジェニック系統を樹立した後、それらの交配により多数の DNA 断片を階層的に組み合わせ、同一染色体に整列するというものである。各階層を同時並行で行うことにより、 n 回の実験操作で $2n$ 個の断片を連結することができる。各階層の組合せ作業は 1ヶ月で完了するため、理論上 1 年間で 100 Mb の配列を構築することができる。さきがけ研究の期間において方法論を確立し、実証実験を行ったので、ここに報告する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究で開発した「階層的 DNA 構築法」は、ショウジョウバエ染色体に導入した外来 DNA を段階的に組み合わせ、メガベース DNA を合成するという、新しい巨大 DNA 構築法である。この方法ではまず、組み合わせる外来 DNA それぞれについて、染色体の特定の位置に挿入したトランスジェニック系統を樹立する。次に、2 つの異なる外来 DNA を持つ系統を交配し、ヘテロ接合体を得る。この個体内で A の右側と B の左側で染色体間組み換え(不等交差)を誘導すると、同一染色体上に A と B が隣り合うように並ぶ。組み合わせた物同士をさらに組み合わせると、 n 回の繰り返しで $2n$ 個の DNA を一列に並べることができる。この方法を実現するためには、特定の部位で染色体組み換えを誘導する必要があるが、本研究ではファージ由来の配列特異的 DNA 組み換え酵素であるセリンリコンビナーゼを活用する。3 種類のリコンビナーゼを用いることにより、理論上は無制限回の組み合わせが可能になる。異なるファージに由来する 24 種類のリコンビナーゼを *in vivo* アッセイによりスクリーニングし、ショウジョウバエの中で高い活性をもち、しかも正確な組換えを起こすことのできるものを 3 種類同定した。この 3 種類のリコンビナーゼを発現するショウジョウバエ系統と、リコンビナーゼ認識サイトを持つプラスミドベクターのシリーズを作成し、発現ベクターや BAC クローンを

無制限に組み合わせることを可能にするシステムを実現することに成功した。現在この技術を利用して、大規模な代謝経路の改変とメガベース級の人工染色体配列合成に挑戦している。

(2) 詳細

高活性セリンリコンビナーゼの同定

多くのリコンビナーゼの中から、活性の高い物を選定するため、ショウジョウバエ生体内でのリコンビナーゼ活性を測定する実験系を構築した。リコンビナーゼには標的配列 (attB/attP) 間で不可逆的に組替えを誘導するファージ由来のセリンリコンビナーゼを用いた。生殖細胞特異的 *nanos* プロモーターの下流にリコンビナーゼを融合した発現ベクター、リコンビナーゼ認識配列 attB/attP の間に GFP を挿入したレポーター遺伝子ベクターを作成した。ベクターをハエ・ゲノムに導入し、発現系統・レポーター系統を樹立した。両者を交配すると、リコンビナーゼにより GFP が生殖細胞で除去され、次の世代において GFP 陰性のハエの割合としてリコンビナーゼの活性を定量することができる。

上記の方法は、同一染色体上の極めて近傍の部位での組換え活性を測定するものである。実際の DNA 構築実験では、物理的に遠い距離にある異なる染色体間での組換えが必要になり、ハードルが一段高い。二次スクリーニングとして染色体間組換えを定量するレポーター系を確立した(図 1B)。この方法では、二本の相同染色体の同一遺伝子座に、それぞれ GFP-attB と attP-RFP を導入する。ここでリコンビナーゼが組換えを起こすと、次の世代で GFP/RFP ダブル・ポジティブもしくはダブル・ネガティブの個体が現れるので、これを定量する。

構築したレポーター系を用いて、24 種のセリンリコンビナーゼの活性を比較した。excision アッセイでは、その内 9 個が 100%近い GFP 除去効率を示した。これら 9 個について、さらに相同染色体間の組換え活性を測定したところ、4 つがコンスタントに高頻度で染色体間組換えを誘導することがわかり、そのうちの 3 つ (REC1, REC2, REC3 と呼ぶ) を用いて DNA 構築法の開発へと進んだ。

階層的 DNA 構築法のためのツールキットの完成

繰り返し DNA 組換えを誘導するためには、3 つのリコンビナーゼ全てを発現するトランスジェニックシステムを作成し、そのジェネティック・バックグラウンドにおいて順次トランスジーンを交配により組み合わせていく方法が最も合理的である。3 種のリコンビナーゼの同時発現を可能にするため、3 種全てを発現する単一トランスジーンを構築した(図 3)。このトランスジーンでは、3 つのリコンビナーゼの ORF をタンデムに並べ、ORF の間に自己切断配列 T2A を配置することにより、同一プロモーターから 3 種類のタンパク質が独立に合成されるように設計されている。発現誘導には *nanos* プロモーターを用いることにより、生殖細胞特異的な高発現を可能にした。

このトランスジーンを phiC31 システムによる部位特異的挿入法により、X 染色体上に挿入した。このトランスジーンと、並べたい DNA 断片を常染色体上に持つトランスジェニック系統は、単純に掛け合わせるだけで、染色体間組換えが誘導され、隣り合うように整列させる

ことができる。染色体不等交差の検出には、組合せるトランスジーンと attB/P 配列の左右に異なる可視マーカーを配置し、組換えると可視マーカーの組み合わせが変化するようにデザインした。

実際に 3 種のリコンビナーゼの attP/B 配列を持つ UAS ベクターを 2 番染色体に導入し、染色体の左右に蛍光マーカーを用配置した系統を樹立した。これを用いたパイロット実験においても、蛍光マーカーの組合せを指標として高効率の組み換えが確認でき、さらに組み合わせを無制限に繰り返すことができることを確認した。

3. 今後の展開

さきがけ研究期間内で DNA 断片を無制限に連結し巨大 DNA を合成するためのプラットフォームは確立することができた。今後はこの方法を用いた応用研究を進めていく。主に 2 つの方向性を計画している。

1) 外来遺伝子の大量導入による大規模な代謝改変

階層的 DNA 構築法を用いて大量の遺伝子をショウジョウバエに導入し、新しい機能を持った昆虫細胞の創出を目指す。具体的には、ヒトの N-Glycosylation 経路を構成する遺伝子群と、ハエのリボソームタンパク質サブユニット 80 個を過剰発現するショウジョウバエを作成する。この個体から培養細胞株を樹立し、ヒト型糖鎖修飾をするタンパク質を大量に合成する細胞を開発したい。現在、昆虫培養細胞はコロナウイルスのワクチン候補の合成にも使用されるなど、安価で安全なタンパク質合成系として注目されている。本計画の改変細胞が開発されれば、更なる低価格化とヒトの体内で活性を持つタンパク質の大量生産が可能になる。すでに発現ベクターの構築は完了し、トランスジェニックの作製を進めている。

2) 動物染色体の完全合成

さきがけ・CREST の大目標である「ゲノム合成」分野も、階層的 DNA 構築法を使って先進的な研究を進めていきたい。最初の実証実験として、ショウジョウバエ 4 番染色体の再構築にトライする。4 番染色体はユークロマチン領域が 1.4 Mb のミニ染色体である。まず、約 1.4 Mb を平均 70 kb の DNA 断片 18 個に分割し、リコンビナーゼ認識配列を含むハエ形質転換用 BAC ベクターにクローニングする。BAC ベクターは 2 番染色体の特定部位に挿入し、階層的構築法により再連結を行う。作成した人工 4 番染色体配列の確認は、ハエ・ゲノムの全配列を次世代シーケンサーにより取得する方法により行う。現在 BAC クローンとトランスジェニックの作製が半分完了している。今後 2 年間で 4 番染色体の再構築を完成させ、その後の 1 年で人工的に構築された染色体配列の機能性を検討したい。より大きなタイムスパンでは、1,000 個の BAC から哺乳類の染色体 1 本を完全合成することを、今後 5~10 年で達成すべき長期目標として見据えている。

4. 自己評価

研究目的の達成状況

本研究の最大の目的は、大量の DNA 断片をリコンビナーゼとショウジョウバエ遺伝学を活

用して連結し、巨大 DNA を構築するための方法論を開発することであった。効率よく組換えを起こすリコンビナーゼの同定、それを用いた一連のツールキットの開発、さらにそれを用いた DNA 構築の実証実験まで行うことができたので、当初の目標を十分に達成することができた。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)、

本研究の大部分が行われた国立遺伝学研究所・無脊椎動物遺伝研究室はショウジョウバエ研究を行うための環境が整備されており、追加の設備投資をすることなくスムーズに研究課題を進めることができた。また、雇用した研究補助員にベクター構築やトランスジェニック作製を手伝ってもらうことで、研究のスピードが大幅に加速した。人件費・物品費ともに最大限の効果が得られる使い方ができたと考えている。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果、

ヒト染色体のような巨大 DNA を合成する方法はまだ誰も開発することができていない。私が開発した方法は、理論上ヒト染色体の合成をも可能にするテクノロジーであることから、合成生物学において大きなインパクトを持つ研究成果であると考えている。さらに、染色体の完全合成まで行かなくとも、メガベース級の巨大な配列を人工的に構築できる系は、染色体の3次元構造やエピジェネティクス解析などの染色体生物学分野において、幅広い応用が期待できる。さらに、現在私が進めている大規模な代謝改変昆虫の作製が成功すれば、タンパク質医薬品を含む様々な有用物質を安価に合成することのできる系に発展する可能性を秘めており、最終的に社会実装まで持っていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 32件

1. **Kondo S**, Takahashi T, Yamagata N, Imanishi Y, Katow H, Hiramatsu S, Lynn K, Abe A, Kumaraswamy A, Tanimoto H. Neurochemical Organization of the Drosophila Brain Visualized by Endogenously Tagged Neurotransmitter Receptors. Cell Rep. 2020;30(1):284–297.e5.

本研究では、近藤が開発したゲノム編集技術を用いて、内在性の神経伝達物質受容体遺伝子座に T2A-GAL4 レポーター遺伝子をノックインし、脳内での発現パターンを可視化するリソースを開発した。さきがけ研究で使用しているセリンリコンビナーゼを用いて、T2A-GAL4 レポーター遺伝子は他のレポーター遺伝子と入れ替えるなど、リソースの汎用性を高める様々な付随技術も開発した。

2. Katow H, Takahashi T, Saito K, Tanimoto H, **Kondo S**. Tango knock-ins visualize endogenous activity of G protein-coupled receptors in Drosophila. J. Neurogenet. 2019;33(2):44–51.

本研究では、近藤が開発したゲノム編集技術を活用して、生体内での G タンパク質共役型受

容体 (GPCR) シグナルを可視化する技術を開発した。GPCR の C 末端にシグナル依存的に切断される LexA 転写因子を融合し、GPCR が活性化した組織で GFP が発現するレポーターシステムを開発した。さきがけ研究で使用しているセリンリコンビナーゼを用いた技術が使われている。

3. Pop S, Chen CL, Sproston CJ, **Kondo S**, Ramdya P, Williams DW. Extensive and diverse patterns of cell death sculpt neural networks in insects. *Elife*. 2020;9:e59566.

本研究はさきがけ研究課題とは直接関係ないが、近藤が長年親交のある King's College London の Darren Williams 博士との共同研究である。近藤が新たに開発した生体内でカスパーゼの活性化を可視化するプローブを用いて、神経系の発生においてアポトーシスが起る細胞集団を同定し、ハエの祖先では存在した神経が進化に伴ってアポトーシスによって除去されていることを明らかにした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

2021 年 12 月 第 44 回日本分子生物学会年会 “A genetic method for construction of megabase-sized DNA”

2019 年 12 月 第 42 回日本分子生物学会年会 “Genome-scale mutant resources for studying gene function in Drosophila.”

2019 年 9 月 26th European Drosophila Research Conference. “An unbiased genome-scale CRISPR mutant collection.”