

遺伝子加工技術について

佐々 美里、上野 和美、松川 茂（福井医科大学 医学部附属実験実習機器センター）

SASSA Misato, UENO Kazumi, MATSUKAWA Shigeru : The gene manufacturing technology

We describe some examples of new gene manufacturing technologies using PCR(polymerase chain reaction) and PLR(polymerase linear reaction) . Most of these technologies do not utilize conventional DNA modifying enzymes such as DNA polymerase, restriction enzymes, and DNA ligase etc.. It was easy to insert a gene of interest, delete target DNA sequence, and introduce maximally three point mutations in target positions of dsDNA vector bearing insert DNA sequence by PLR using two synthetic primers or complementary megaprimer set which was generated by PCR with combination of synthetic primers. Each mutant clone obtained by E.coli transformation with manufactured and DpnI-digested plasmid DNA was confirmed to have the identical sequence to predicted one.

1 . 目的

分離精製を目的とした Tag 配列や局在化シグナル、特定のドメイン構造を対象遺伝子の希望する位置に附加したり、それらを対象遺伝子から欠失させたり、プロモーター部位を欠失、修飾したり、アミノ酸置換を目的として希望部位に点変異を導入することが自由にできれば、格段に遺伝子加工デザインの幅が広がる。従来のような修飾酵素（制限酵素や接続酵素）を用いる方法では目的遺伝子を自由に加工するには多大の時間と経費を要する。PCR と増幅を伴わない PLR (polymerase linear reaction) 技術を基盤とした自由度の高い遺伝子加工技術を検討した。

2 . 方法

Clontech 社 pEGFP-N3 を対象として、希望変異を入れた Primer で PCR と PLR により変異導入する。その Primer は

- 1) 1 点以上の変異導入は、変異を Primer のほぼ中央に設計する。（変異導入）
- 2) 目的位置の後に挿入したい配列をつけた Primer を設計する。（挿入）
- 3) 欠失したい塩基配列の両側に Primer を設計する。（欠失）

3 . 1 点変異導入

核移行シグナル（NLS）を導入した pEGFP-N3 ベクターの EGFP コード領域に変異を導入する。対象塩基を中央にした 30mer 前後の相補的な Primer を設計する (1)。PLR により Primer を伸長させる (2)。制限酵素 DpnI 処理により親 Plasmid を切断 (3)。1 点変異導入 Plasmid で大腸菌を Transformation する (4)。(図 1)

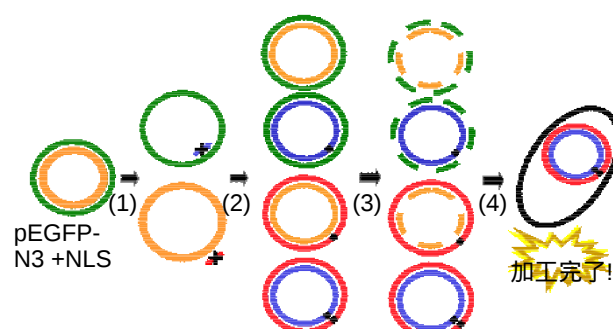


図 1. 1 点変異導入 (TAC → CAC)
(Tyr⁶⁶ → His⁶⁶)

4 . 2 点変異導入

標的 DNA の、変異を導入する塩基を中央にした 30mer 前後の Primer を設計し、PCR をする (1)。PCR product を精製し megaprimer として PLR をする (2)。DpnI 処理により親 Plasmid を切断 (3)。(図 2)

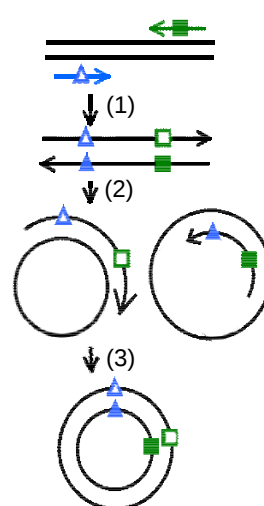
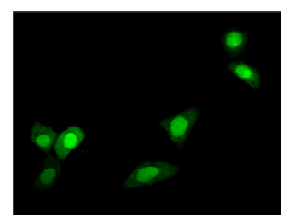
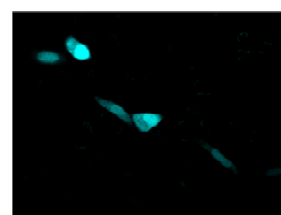


図 2. 2 点変異導入
(TAC → CAC, TAC → TTC)
(Tyr⁶⁶ → His⁶⁶, Tyr¹⁴⁵ → Phe¹⁴⁵)



(A) pEGFP-N3 plasmid を CHO 細胞へ Transfection 23h 後



(B) 2 点変異導入した後の pEGFP-N3 plasmid を CHO 細胞へ Transfection 23h 後

(A) → (B): 緑色の蛍光が青色の蛍光へ変化

5. 3点変異導入

2点変異の導入と同様に Primer を設計する。3点のうち、2点目の Primer は相補鎖となるようにし、合計4本の Primer を設計する。1点目と2点目、2点目と3点目の組み合わせでPCRする(1)。2種のPCR product を精製し、mix して伸長、PCR をする(2)。PCR product を精製し megaprimer として PLR をする(3)。DpnI 処理により親 Plasmid を切断(4)。(図3) シークエンスにより3点変異の導入を確認した。

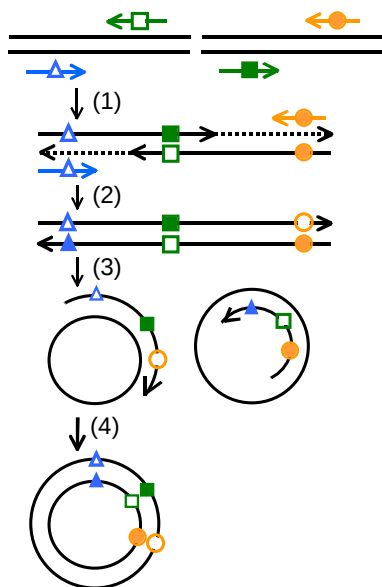


図3. 3点変異導入

(TAC → CAC, TAC → TTC, ACC → TAC)

(Tyr⁶⁶ → His⁶⁶, Tyr¹⁴⁵ → Phe¹⁴⁵, Thr²⁰³ → Tyr²⁰³)

アミノ酸変異が蛍光特性に影響しないサイレント変異

6. 欠失

欠失したい配列の外側で Primer を設計し、5' 末端をリン酸化する。PCR により図4のように、Plasmid から配列を含まない PCR product ができる。DpnI 処理で親 Plasmid を切断してから、Ligation をする。(図4)

シークエンスにより配列の欠失を確認した。約2kbpの配列を欠失することができた。

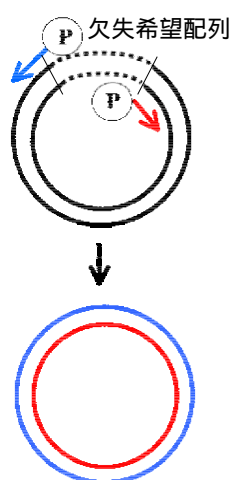


図4. 欠失

7. 挿入

挿入したい箇所の両側の配列を PCR できるように Primer を設計する。その際に、挿入箇所のすぐ横に作る Primer の5' 末端には挿入したい配列（今回は HisTag）をつけて設計する。2種のPCR は別々にする(1)。2種のPCR product を精製し、mix して伸長、PCR をする(2)。2種のPCR product を精製し、megaprimer として PLR をする(3)。DpnI 処理により親 Plasmid を切断(4)。(図5)

シークエンスにより HisTag が挿入されたことを確認した。

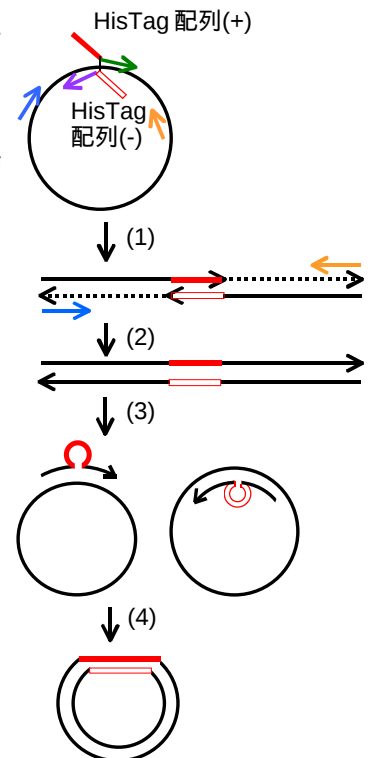


図5. 挿入

4. 結果と考察

Primer の設計を工夫することにより、PCR と PLR 法で簡単に遺伝子加工を行うことができた。従来の修飾酵素による方法よりも能率がよく、自由度も高いことがわかった。さらに、現在以下のことを検討中である。

- 1) 広範囲での点変異、及び4点以上の点変異を目的とした megaprimer について
- 2) 今回、挿入の例として HisTag を蛋白発現 plasmid に挿入したが、他の Tag（例えば、epitopeTag）について
- 3) 広範囲の配列を欠失せずに目的の配列へと組換えする方法について
- 4) 各種 GFP 融合蛋白の創生ベクターの合成について