

3番目のDNA連結反応NHEJ：なんとほんとにeasyじゃん

赤田 倫治^{1*}・中村美紀子²・星田 尚司¹

生化学者と遺伝学者は、時々おかしな話をする。生化学者は、「変異遺伝子や遺伝子過剰発現なんかは生物のネイティブな状態ではないから、遺伝学ってアーティファクトじゃないの？」一方、遺伝学者は、「生物をすりつぶして試験管内で反応をみても、生きていないから生化学では生命の本当の姿はわからないじゃないの？」生命の本質を探るどちらの営みも、実験という人工的な世界を構築して、わかりやすくしながら導きだす。どちらがいいということではなく、アーティファクトっぽい世界こそが、本質に肉薄できる気がする。

100年以上前、すりつぶして死んだ酵母でも発酵が起こるといって、ブフナーの無細胞発酵の発見から生化学が始まり、一方で、メンデル遺伝から、ショウジョウバエ、ファージ、カビ、酵母、大腸菌、マウスなどの遺伝学が発展して、今や遺伝子やゲノムを自由自在に書き換えるようになった遺伝子工学とともに、生命の本質的理解を、病気や健康、食糧や環境に応用している。遺伝子工学を究極まで追及すれば、ありとあらゆる遺伝子の全配列をそれぞれ、頭からしっぽまで一つずつ別の配列に変えた変異遺伝子を調べられたらなああと夢見るようになる。でも、それはお金と人が豊富な研究室だけの世界であって、そんなことはできないよ、っていじけていた頃もあった。しかし、これを読めば、こんな夢みたいな遺伝子操作があなたにもできるようになるでしょう。

遺伝子クローニングや部位特異的な変異遺伝子構築は、遺伝子操作の根幹。必要なDNAを切って、組み換えて、ベクターにつないで、宿主に入れるプロセスである。開発された順に説明しよう。

3つのDNA連結反応

1番目のDNA連結反応 組換えDNA技術は、DNAを準備し、試験管内で制限酵素を使って切断し、DNAリガーゼという酵素で、切断されたDNAを連結させ、組み換わったDNAを大腸菌に導入する方法から始まった¹⁾。本誌「続・生物工学基礎講座 バイオよもやま話(バイオよもやま話)」¹⁾では、これ以外の試験管内酵素反応も取り上げられているので、In-FusionやGibson assemblyを使っている研究室も多いのかもしれない。

ただ、大腸菌にクローニングした時点で、宿主を変える前にはシーケンス確認が必要となるので煩雑さはつきまとう。

2番目のDNA連結反応 2番目のDNA連結反応が相同組換え法である。バイオよもやま話²⁾でも詳しく説明されている。生物には遺伝子の本体であるDNAが切れたり配列間違いが起こったりしたときには、修復するしくみが用意してある^{3,4)}。その一つが相同組換えで、同じDNA配列を持っていたら、一方が切れても、同じ配列を元にして正しく修復することができる(図1)。多くの生物は2本ずつ相同染色体を持つが、2本あるから安心なのである。

相同組換え法を駆使できるのが*Saccharomyces cerevisiae*(Sc酵母)で、プラスミドクローニングや染色体への遺伝子操作も相同組換えでやすやすと行うことができる²⁾。遺伝子配列を短いオリゴヌクレオチド数十本で2本鎖を設計し、全部のオリゴヌクレオチドを単に混ぜてベクターDNAとSc酵母へ形質転換するだけで、相同組換えにより遺伝子全合成ができたときには驚いたものだった。今では学部の学生実験レベルでも利用されている。

3番目のDNA連結反応 さて、DNA切断の修復方法には、相同組換えではないしくみもある。これを非相同末端結合non-homologous end joining(NHEJ)と呼ぶ。その名の通り、相同ではない配列の末端同士でも、連結させてしまうしくみである(図1)。1番目の連結反応のDNAリガーゼは試験管内で利用していたが、NHEJで

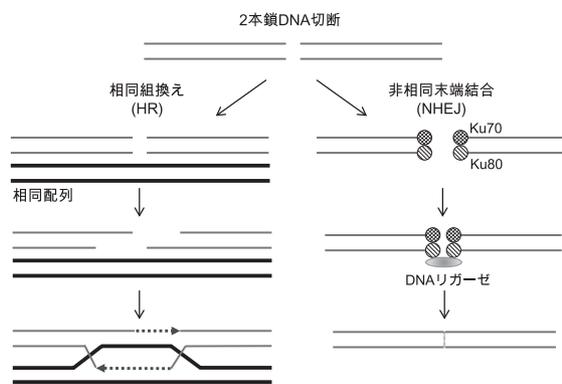


図1. 2種類のDNA切断修復機構

*著者紹介 山口大学工学部応用化学科(教授) E-mail: rinji@yamaguchi-u.ac.jp
¹山口大学工学部応用化学科, ²信州大学基盤研究支援センター

は細胞内でDNAリガーゼが働いて末端を結合している。もともと細胞内に持っていたDNAリガーゼの反応をそのまま素直に使っているのが、NHEJなのである。真核生物のDNA2本鎖切断は、相同組換えか、NHEJのどちらかで修復されると覚えておこう。あまりなじみがないと思うが、3番目のDNA連結反応はNHEJを利用する方法である。

相同組換えとNHEJ

バクテリアでのNHEJの存在を筆者らは知らないのですが、真核生物ではごく一般的で、例外的にNHEJ能力の低い生物がいる。それが、前述のSc酵母なのである。ある意味、研究モデル生物であるSc酵母は⁵⁾、NHEJ能力が非常に低いという欠陥があったおかげで相同組換えを利用した手法の開発が進んだともいえる。ある方向に半端ないやつは、別の方向には弱みがある。なんでもできるやつを羨む必要はないってことである。Sc酵母では、早くから遺伝子破壊やターゲティングが進み、ゲノム時代にいち早く全遺伝子6000個すべてをそれぞれ破壊した破壊株セットが用意できた。このスーパー酵母は、低いNHEJ能力しかなかった。だから、このモデル生物では、NHEJを利用する遺伝子操作方法を、誰も開発しなかったのである。

出会いが人を変える、NHEJは形質転換を変える

長い間スーパーSc酵母を研究していたが、ある時、近縁の酵母 *Kluyveromyces marxianus* (Km酵母) と出会うことになった。49°Cでも増殖できる耐熱性酵母でバイオエタノールの高温発酵プロジェクト用であった。遺伝子操作法を開発しようとしていたが、どうせ、スーパーSc酵母には勝てないでしょうね、と半ばあきらめ気味に研究を進めていくと、当時タイの留学生が不思議な結果を出した。

細胞への遺伝子導入法を作り上げるには、通常、選択マーカー遺伝子を用意し、選択マーカー遺伝子が細胞内に入ったなら、それらの細胞だけが選択培地で増殖する、つまり、増殖した細胞には遺伝子が導入されたとわかる工夫を構築する。さらに、染色体へマーカー遺伝子が入る率は低いので、高い形質転換率が得られるプラスミドを開発するために、その生物での自律複製起点 (autonomously replicating sequence : ARS) を探し出して用意するのも定番である。しかし、新しいKm酵母では、こんな報告も、方法の蓄積もなく、何もなし。Km酵母で栄養要求性変異株をスクリーニングしてみると、ウラシル合成遺伝子 *URA3* の変異株は取得できた。この

変異株はウラシル欠損培地で生えないので、*URA3* 遺伝子を選択マーカー遺伝子として導入すれば、ウラシル欠損培地で生えたコロニーが、形質転換体となる。しかし、当時、Km酵母のゲノム配列もなく、Km*URA3* 遺伝子が準備もできない。一方、Sc酵母のSc*URA3* 遺伝子とScARSを持つプラスミドが手元にあった。Sc酵母ではなんでも用意されているのである⁶⁾。こうなったら、えいっと、これをKm酵母に形質転換してみた。あてずっぽうは外れて、コロニーは0個。そこで、なんとなく、このプラスミドを制限酵素で1か所切断して直鎖状にして形質転換してみた。そうすると、なんと90個のコロニーが現れた。プロモータも変換していないSc*URA3* 遺伝子をそのまま使ったの結果である。この結果が出ると先の0個のデータも意味を持ち、ScARSはKm酵母では機能しないが、Sc*URA3*はKm酵母でそのまま働くという解釈ができる。0個の価値を学生に教えるのにこのデータを使っている。0でもあきらめるなということである。

さて、次に、Sc*URA3* 遺伝子のPCR産物を形質転換してみた。驚いたことに、今度は、DNA 1 µgあたりで4000個以上の形質転換体が出てしまった⁷⁾。最終的に、形質転換条件を調整すると、PCR合成したSc*URA3*断片が10⁵コロニー/µgで形質転換できることがわかった(図2)⁸⁾。いろいろ調べると、Sc*URA3*はランダムにKm染色体上のさまざまな箇所に入っていた。これがNHEJ機能によるものかどうかを調べるために、NHEJに必須のKu70遺伝子を破壊してみると、形質転換ができなくなった。NHEJによる形質転換はKm酵母では高頻度の染色体挿入に使われているということである^{7,8)}。ARSもKm*URA3*の準備もいらなくなったというお話である。Km酵母との出会いは研究材料を広げる価値を教えてください。我々を変えてくれたし、NHEJは形質転換の概念を変えてくれた。

PCRと形質転換で研究するプラスミドなし生活

Sc酵母ではNHEJを利用した芸当はできない。そこが楽しくなって、Km酵母で栄養要求性変異株を数多く

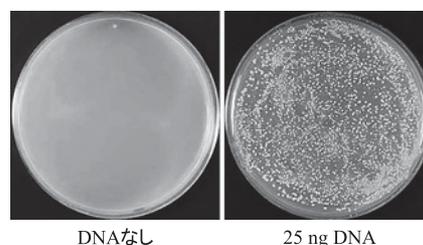


図2. Km酵母へのPCR合成したSc*URA3*DNA産物の形質転換 (~10⁵コロニー/µg DNA)

取得して、それらの変異遺伝子を同定するために、Sc酵母の栄養要求性関連遺伝子を片っ端からPCR合成してKm酵母の要求性変異株を形質転換してみた。その結果、次々に形質転換体が得られ、変異遺伝子を同定することができた⁹⁾。つまり、ほとんどのSc要求性関連遺伝子は、Km酵母でそのまま働いてしまうのである。やったことは、PCR産物の形質転換だけである。

非相同配列のDNAが染色体へ挿入するメカニズムは次のように想像している。PCR合成した直鎖状のDNA断片は、両端のDNAが切断されているのと同じ状態である。それが細胞内に入ってくるとDNA末端を修復しないとイケない。しかし、与えたのはScURA3などの異種のDNAなのでKm酵母には同じ配列がない非相同配列である。それならばと、非相同末端を結合させるNHEJによってDNA末端を染色体のどこかに入れ込んで修復してやろうというしくみが働いたのだろう。たまたま染色体が切れた場所があったからそこに入ったのか、それともDNA断片を抱えて、しかたなしに、どこかの染色体を自分で切って入れたのかは、まだよくわかっていない。

Km酵母でNHEJが、Sc酵母で相同組換えが強力なわけ

なぜ、Km酵母ではNHEJが、Sc酵母では相同組換えが強力に働いているのだろうか。ヒントは、その生活にあった。野外からSc酵母を取得すると2倍体である。減数分裂を誘導して胞子形成させ、1倍体にするとすぐに接合して2倍体になりたがる性質を持つ。Sc酵母では胞子形成率もそれほど高くなく、あまり1倍体にはなりたがらないと見うけられる。つまり、2倍体であることが好きな酵母なのである¹⁰⁾。

一方、Km酵母は野外から採取すると大抵1倍体である。2倍体を作ろうとしても、特定の条件を与えないと接合しないし、接合率も低い。一方で、2倍体になっただけで胞子形成をしてしまう。通常の液体培養後に、ほとんどが胞子になっていて、顕微鏡観察でてっきりコンタミしたと間違えたほどである。つまり、1倍体好き酵母なのである。

2倍体好きでは、いつも相同染色体が2本あるので、1本が切れても、相同染色体で修復ができる相同組換えを発達させた。1倍体好きでは、相同染色体が日頃はないので、1倍体の時期にDNAが切れてしまうと相同組換えでは修復できない。そこで、NHEJがあれば、相同配列がなくても修復できるというわけである。それで、Km酵母はNHEJを発達させたという仮説はいかがだろうか。読者は1倍体好き、それとも2倍体好き？

分断遺伝子断片とNHEJ

これほどNHEJ能力が高いなら、もしかすると遺伝子をまん中でぶった切って、2つの断片を同時に形質転換してもNHEJで正しく結合したものが機能回復して、正常遺伝子になってしまうんじゃないかと考えた。ちょっと大胆だと思ったが、ScURA3を2断片になるように、ただし末端が結合したら正しいフレームになるようにPCR産物を2本つくり、N末端側断片とC末端側断片を混ぜて形質転換してみた。すると、2つが正しく組み合わせられて、形質転換体が現れた。断片のつながり方には、図3aのように4種類あるし、N末端側同士やC末端側同士の結合だって起こり得る。それでも形質転換体がでるということは、かなりの頻度で断片をNHEJで結合させており、正しく組み合わせられた遺伝子が構築されるということである¹¹⁾。

それなら、ScURA3遺伝子のC末端側で切断するように考えるとこんなしくみが構築できる(図3b)。C末端には余裕があって、数アミノ酸削っても機能するが、あるところで機能がなくなる。機能がなくなる場所で切断するようにしたら、C末端側にほんの数アミノ酸を足すだけでURA3機能が回復する。C末端の数アミノ酸をコードする配列はオリゴヌクレオチドで設計できるので、PCRプライマー配列の5'側に設計して配置し、アニーリング配列で目的遺伝子を合成したら、ScURA3のN末端断片とC末端配列を持つ目的遺伝子のPCR合成断片の2つを混ぜて形質転換するだけで、URA3断片が修復され、URA3にNHEJで結合した目的遺伝子がKm酵母にクローニングできるようになる。PCR産物をC末端が欠けたScURA3断片と混ぜて形質転換するだけのクローニング法となった¹¹⁾。NHEJでは簡単にかかなりの数のクローニングができるので、網羅的解析に応用した例もある^{12,13)}。

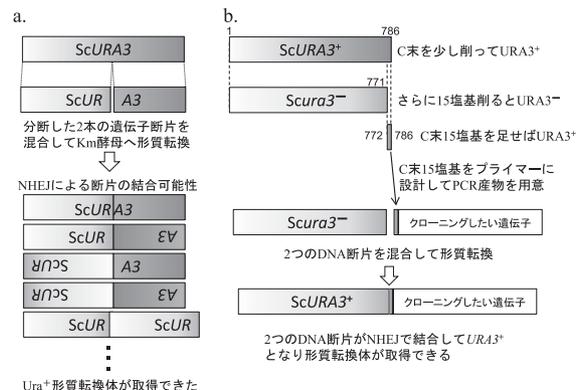


図3. DNA断片を混合するだけのNHEJクローニング法

哺乳類培養細胞への遺伝子導入

そんなこんなでKm酵母の形質転換系を開発していた頃、研究室では材料を広げようとHEK293（ヒト）とかNIH3T3（マウス）などの培養細胞を扱い始めた。いかにも唐突だが、実際Km酵母の開発とはまったく関係のない研究計画であった。培養細胞への一過的な遺伝子導入をトランスフェクションと呼ぶが、培養細胞の生えている培養液にDNAとトランスフェクション試薬を混ぜて入れるだけで、翌日には培養細胞内に遺伝子が発現するという方法である。コロニーを取るとか、選択する操作がないので、至ってシンプルである。96ウェルという直径7mm程度のウェルの中に2000細胞程度いたらそのほとんどにDNAが入って発現するので、微生物に比べると導入効率は非常に高い。入れるDNAにARSや選択マーカーはないのが普通で、遺伝子発現用のプロモータと目的遺伝子とターミネータがあれば数日間発現してくれる。

この培養細胞のトランスフェクションは、大腸菌で作製した環状のプラスミドDNAが使われ、PCR産物を使っている例はほとんどない。実際、プロモータと目的配列とターミネータ領域をPCR合成してトランスフェクションしても発現が著しく低かったので、PCR産物が使えないことがわかった。そこで、開発したのが遺伝子導入エンハンサー試薬2種で、市販のトランスフェクション試薬と混ぜると格段に導入発現率が高くなる試薬を見つけて特許取得した。このエンハンサー試薬はPCR産物に利用しても働いたので、ついに誰もできなかったPCR産物での培養細胞トランスフェクションと発現ができるようになった¹⁴⁾。

これができるようになると、DNAの削除解析はあっという間にできるようになり、プロモータやターミネータの最少領域が同定できた。おもしろいことに、PCR断片での発現には、ターミネータが必須で、これがなければまったく発現しないことがわかった¹⁴⁾。この読者はターミネータが必要なことなど当たり前だと思われるだろうが、環状DNAであるプラスミドを使うとDNAはつながっているのだから、実は遠くにあるターミネータを使っていることも起こり得る。ターミネータ解析は、余計な配列を含む大腸菌由来のプラスミドでは意外と正確な結果を出しにくいということである。その結果を出してしばらくしたころ、研究室の学生が変な結果を持って来た。

ターミネータがプロモータの上流にある～？！

学生は、完全にクローニングの設計を間違えて、ター

ミネータがプロモータの上流に配置しているDNAを作っていて、それに気づかなかったのである。それに気づかないまま、PCR産物を合成してトランスフェクションしてみたら、なんと発現していた。実際は、順番が逆で、トランスフェクションして発現を観察していたら、ある時、学生の構築した組換えDNAの配置がおかしいことに気づいて、あの大事なターミネータがプロモータの前に存在しているのではないかと、こんなものは発現するはずがないと、結果を見ると、発現していた。何が起きているのか、すぐには気づかなかった。

長い前置きで申し訳なかったが、ここで、Km酵母でのNHEJ能力と結びつくのである。研究室で、Km酵母と培養細胞を同時に扱っている幸運に感謝した。つまり、培養細胞でもDNA断片のトランスフェクション後に、NHEJが起こって、ターミネータが上流にあるDNA断片でも末端同士が結合して、環状となり、それが発現したと考えることができた。事実、トランスフェクション後の培養細胞内でのNHEJを、時間を追って調べると、30分後にはすでにNHEJが起こっていることがわかった¹⁵⁾。NHEJ-mediated DNA cloningの培養細胞版であるが、これはびっくりするほどパワフルな解析系となってきた。

培養細胞でのNHEJ遺伝子操作

ターミネータを上流に配置した断片をフロントターミネータ、プロモータを下流に配置した断片をエンドプロモータ断片と呼ぶ(図4)。目的遺伝子のC末端にタグ配列を付けたかったら、フロントターミネータの前か目的配列C末端にタグをプライマーで付けてPCRしてトランスフェクションするだけで発現できるし、エンドプロモータなら、N末端側にタグを付けることができるし、目的遺伝子を異種のプロモータ下流に配置させたプラスミドを構築して、大腸菌や酵母で発現解析をしておいて、そのプラスミドをPCR合成するだけで、培養細胞で発現させることもできる。自由自在に目的遺伝子の削除や短い配列の付加ができるようになった。ただし、我々が使っている細胞はHEK293細胞で、この株が他の株に比べて高いNHEJ能力を持っている可能性もある。他の株でも調べたい。

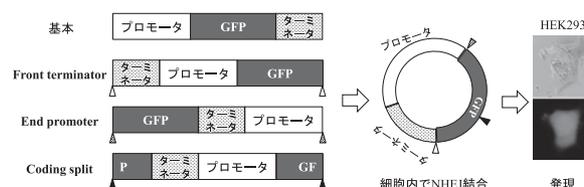


図4. 直鎖状PCR産物は動物細胞内でNHEJにより環状となる

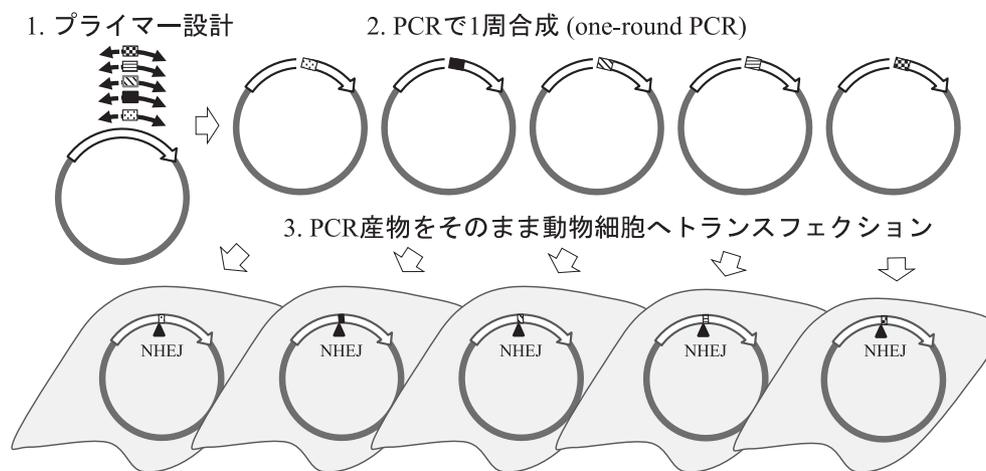


図5. 変異プライマーのPCRで構築できるNHEJによる網羅的変異遺伝子

とことんアーティフィシャルな変異遺伝子構築

NHEJ 遺伝子操作の真骨頂を説明しよう。現在、注力していることが、変異解析である。部位特異的変異法は、従来なら大腸菌でプラスミドに変異を与え、クローニングしてシーケンスを確認して培養細胞に導入するのが一般的であろう。NHEJを使うと図5のようになる。培養細胞で発現できるコンストラクトを持つ大腸菌プラスミドを用意し、PCRプライマーを、変異を与えたいコーディング配列上に設計する。変異プライマーで、プラスミド一周をPCRで合成 (one-round PCRと呼んでいる) して培養細胞に導入するとNHEJで末端同士が結合して発現する。つまり、変異遺伝子発現を1回のPCR産物作製で次々に行うことができるのである。

シーケンス解析しなくてよいのか、とよく聞かれる。PCR産物のテンプレートは確実なシーケンスを持っている。PCRで変異は入るが、PCR合成産物は、変異を含む集団であるが、大半は正しい配列である。つまり、ここでは、クローニングという操作がなくなっていることがミソである。大腸菌などで1クローンを取得したら、そのクローンに間違いがあったらそれ以降の結果は無駄になるが、DNA断片の集団を扱うなら、メジャーな集団の結果を観察しているということになる。

タンパク質のN末端からC末端までのアミノ酸全部を次々に変異させることができたなら知りたい機能は必ず明らかになるのに、そんなことが簡単にできたらいいなと夢見ていた。夢って実現するんだ、たとえ目指してなくても、という今日この頃である。

おわりに

ひょんなことから、Km酵母というタイからきた酵母と、たまたま同時期に培養細胞を始めたことから、NHEJを酵母とヒト細胞で扱うことができるようになった。こんな経験をしてみると、なんでもかんでもやってみるもんだなというのが感想である。セレンディピティとは結局は、未知の繋がりをつけただけで、そのチャンスは、prepared mindと数多くの異なる事象や異なる生物を扱う雑多さの中に存在するように思うのである。NHEJを利用したクローニングの現在地、なんと(N)ほんとに(H) Easy (E) じゃん(J) をご堪能いただけたら幸いである。

文 献

- 1) 本橋 健：生物学, **96**, 20 (2018).
- 2) 永野幸生, 飯笹英一：生物学, **93**, 623 (2015).
- 3) 真木寿治：生物学, **95**, 77 (2017).
- 4) 花田克浩：生物学, **94**, 420 (2016).
- 5) 大嶋泰治：生物学, **89**, 491 (2011).
- 6) 大橋貴生：生物学, **95**, 16 (2017).
- 7) Nonklang, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 7514 (2008).
- 8) Abdel-Banat, B. M. A. *et al.*: *Yeast*, **27**, 29 (2010).
- 9) Yarimizu, T. *et al.*: *Yeast*, **30**, 485 (2013).
- 10) 赤田倫治ら：酵母菌・麹菌・乳酸菌の産業応用展開 (五味勝也, 阿部敬悦 監修), p. 24, シーエムシー出版 (2018).
- 11) Hoshida, H. *et al.*: *Yeast*, **31**, 29 (2014).
- 12) Suzuki, A. *et al.*: *FEMS Yeast Res.*, **15**, fov059 (2015).
- 13) Yarimizu, T. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **14**, 20 (2015).
- 14) Nakamura, M. *et al.*: *Mol. Biotechnol.*, **57**, 767 (2015).
- 15) Nakamura, M. *et al.*: *Mol. Biotechnol.*, **57**, 1018 (2015).