

選択マーカを用いない新しい染色体改変法の作製

岸 努 日大工・生命

【緒言】 染色体の改変は相同組み換えを用いて行われる。この時、相同組換え部位、改変部位および選択マーカを持つ DNA 断片を作製し細胞を形質転換する。しかし選択マーカは、その種類が限られているので、一つの細胞に複数の遺伝子改変を導入することは技術的に困難である。そこで本研究では、選択マーカを染色体に残さない改変法の作製した。C-末端にトリプル HA (3×HA) エピトープを挿入する 3×HA タギングをモデルケースとした。作成した方法の特徴は以下の通りである。

【作製した方法の特徴】 (1) 相同組み換えで用いる DNA 断片を PCR で調製することができる。新たに作製した pMN-12 (図 1 上: PCR で増幅するカセットのみ記載) を鋳型とする。この時、フォ

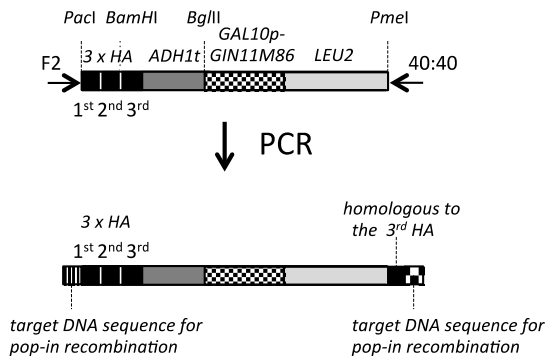


図1 pMN-12にクローン化されたPCRモジュールとPCRにより増幅する相同組換え用DNA断片

TAC CCA TAC GAT GTT CCT GAC TAT GCG GGC
1st HA
TAT CCC TAT GAC GTC CCG GAC TAT GCA GGA TTC
2nd HA
TAT CCA TAT GAC GTT CCA GAT TAC GCT GCT CAG TGC TGA
3rd HA

図2 3×HA 配列
3番目のHA配列を太字で示す。

ワードプライマーとして、終止コドン直前の DNA 配列 40 塩基と pMN-12 に特異的な配列 20 塩基を含む 60 塩基のプライマー (図 1-F2) を用いる。またリバースプライマーとして、終止コドン直後の DNA 配列 40 塩基、3×HA の 3 番目の HA 配列 40 塩基 (図 2) および pMN-12 に特異的な配列 40 塩基を含む 100 塩基のプライマー (図 1-40:40) を用いる。これにより、組換え部位である目的遺伝子の終止コドン直前の DNA 配列と直後の DNA 配列の間に、3×HA、ADH1 ターミネーター、GAL10p-GIN11M86、選択マーカである LEU2、1×HA (3×HA の 3 番目の HA 配列と同一配列: 図 2) を含む DNA 断片を調製することができる。

(2) 作製した 3×HA タギング法は pop-in recombination と pop-out recombination を組み合わせた 2 段階からなる (図 3)。

まず第一段階では、相同組換え (pop-in recombination) を用いて、(1)の方法で調製した DNA 断片を用いて酵母を形質転換する (図 3 上)。pop-in 組換え体は、ロイシン非要求性クローンを選択することにより分離することができる (図 3 : pop-in)。第二段階では、挿入した 3×HA の 3 番目の HA 配列と 1×HA 配列の間での相同組換え (pop-out recombination) により、ADH1 ターミネーター、GAL10p-GIN11M86 および LEU2 を欠失する (図 3 : pop-out)。欠失したクローンの選択は、GIN11M86 配列を用いる。GIN11M86 はガラクトースで誘導可能な GAL10 プロモーターから過剰発現すると酵母の増殖を阻害する遺伝子である。このため、pop-out 組換え体は、ガラクトースを含む培地で生育するクローンを選択することにより分離できる。

(3) この 2 段階法により、3×HA 以外に外来性

の DNA を全く含まない遺伝子改変が可能となる。実際、この方法で作製した 16 クローンの *SWI5-3 × HA* 株のゲノムシーケンシングを行った結果、全てのクローンで意図した *HA* 配列部位で pop-out recombination が起こっており、第一段階で挿入した *ADHI* ターミネーター、*GAL10p-GIN11M86*、選択マーカーである *LEU2* を完全に染色体上から消去することができた。

【結論】 *3 × HA* 配列のみを目的遺伝子に挿入する効率の良い新しい遺伝子改変法を構築した。1 回の PCR、1 回の pop-in recombination と 1 回の pop-out recombination のみが必要な簡便な系である。同様な方法により、他のエピトープの挿入や突然変異の導入も可能であり、応用性が高い。

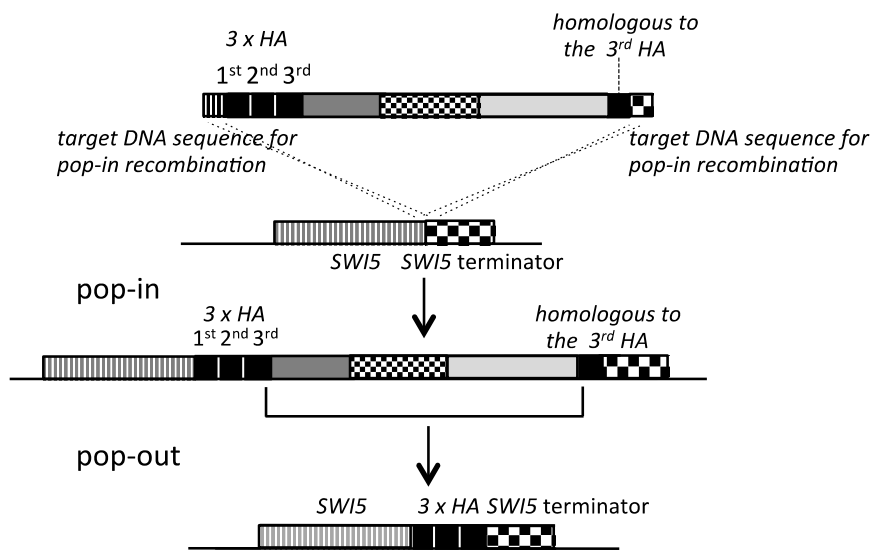


図3 *3 × HA*配列のみを目的遺伝子に挿入する新しい二段階遺伝子改変法
 第一段階: 図1で作製した相同組換え用DNA断片を用いて酵母を形質転換することによりpop-in 組換え体を選択する。
 第二段階: カウンターセッレクションマーカー*GAL101p-GIN11M86*を用いることによりpop-out 組換え体を選択する。