

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4629162号
(P4629162)

(45) 発行日 平成23年2月9日(2011.2.9)

(24) 登録日 平成22年11月19日(2010.11.19)

(51) Int.Cl.		F 1		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 O 2
C 1 2 N	9/12	(2006.01)	C 1 2 N	9/12

請求項の数 4 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2010-198322 (P2010-198322)	(73) 特許権者	503360115
(22) 出願日	平成22年9月3日(2010.9.3)		独立行政法人科学技術振興機構
(62) 分割の表示	特願2000-109033 (P2000-109033)		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
	の分割	(74) 代理人	100102668
原出願日	平成12年4月11日(2000.4.11)		弁理士 佐伯 憲生
(65) 公開番号	特開2010-263925 (P2010-263925A)	(72) 発明者	川上 浩一
(43) 公開日	平成22年11月25日(2010.11.25)		千葉県印旛郡白井町桜台2-6-9-103
審査請求日	平成22年9月3日(2010.9.3)		
(31) 優先権主張番号	特願平11-345508	審査官	清水 晋治
(32) 優先日	平成11年12月3日(1999.12.3)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

特許法第30条第1項適用 平成11年12月22日
株式会社秀潤社発行の「細胞工学 (Vol. 19 No. 1 2000)」に発表

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスポゾン転移酵素および遺伝子改変方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるトランスポザーゼ活性を有する蛋白質又は当該蛋白質を産生し得る核酸を存在させて、細胞内のゲノム中の両端に1対の繰り返し配列を含む遺伝子を切り出す方法。

【請求項2】

切り出された遺伝子が、他の遺伝子に挿入される請求項1に記載の方法。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の方法を用いて、細胞の遺伝子の発現に基づく機能を改変する方法。

【請求項4】

請求項3に記載の方法により機能が改変された細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、トランスポザーゼ様活性を有する新規な蛋白質、当該蛋白質からなるトランスポゾン転移酵素、これを用いた細胞内の遺伝子の遺伝子構造を改変させる方法、この方法による細胞の機能を改変させる方法、この方法による遺伝子の導入方法、このためのプラスミド、及びこの方法により機能が改変された細胞に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

メダカ (*Oryzias latipes*) は東アジアに生息する魚であり、脊椎動物の遺伝の研究に使用されてきた。メダカの *i* 遺伝子座の変異は、メラニン欠乏症及び赤目を生じさせる。この *i* 遺伝子座はチロシナーゼの遺伝子をコードしていることが知られている。この *i* 遺伝子座のアレル変異体のひとつである *i*⁴ から約 4.7 kb の DNA がクローニングされ、トランスポゾン様の配列を有しているとされていた。即ち、ショウジョウバエの *hobo*、トウモロコシの実の *Ac* やキンギョソウの *Tam3* などの *hAT* ファミリーのトランスポゾンのトランスポザーゼ (transposases) に類似したオープンリーディングフレームや短い逆転した配列の繰り返し (terminal inverted repeats) を有していた。メダカのこのエレメントは、*Tol2* と命名された。実験室で使用されるメダカは、一倍体 (haploid) のゲノム当たり約 10 コピー有している。

10

チロシナーゼの遺伝子座に存在した *Tol2* エレメントは、*i*⁴ 変異体の魚では胚発生の間に標的遺伝子座から切り出されることが PCR により示された (非特許文献 1 参照)。

【 0 0 0 3 】

一方、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) もメダカ (*Oryzias latipes*) と同様に小型の硬骨魚であり、脊椎動物の遺伝現象及び発生の研究のためのモデル動物として開発されてきた (非特許文献 2 ~ 4 参照)。ゼブラフィッシュにおいては、大量の化学的突然変異誘発スクリーンが行なわれ (非特許文献 5 ~ 6 参照)、突然変異した遺伝子のクローニングを容易にするため、シュードタイプ (pseudotyped) のレトロウィルスを用いた挿入突然変異誘発法が開発され実行されてきた (非特許文献 7 ~ 9 参照)。また、エンハンサーラップ及び遺伝子トラップスクリーンが行なわれるようにするトランスポゾン技術の開発の試みの中で、魚類における *Tcl/marinier* ファミリーのトランスポゾンの転位が調べられ、明らかにされてきた (非特許文献 10 ~ 12 参照)。これらの結果は励みになるものではあるが、トランスポゾンを用いた非常に効率のよいトランスジェネシス又は挿入突然変異誘発法はまだ開発されていない。

20

【 0 0 0 4 】

本発明者らは、*Tol2* 因子を用いた新規なトランスポゾン技術の開発に興味をもってきた。この目標に向かう最初のステップとして、本発明者らはゼブラフィッシュ胚を用いて、ゼブラフィッシュの受精卵に、*Tol2* 因子を含んでいるプラスミド DNA を注入する一過性胚エクシジョンアッセイを開発し、注入されたプラスミドから *Tol2* 因子を切り出すことができることを示し、*Tol2* 因子が自律的なメンバーでありかつゼブラフィッシュにおいても活性があることを示した (非特許文献 13 参照)。*Tol2* 因子の DNA 配列は *hAT* ファミリーのトランスポゾンのトランスポザーゼと類似しているが、活性のあるトランスに機能することができる酵素も、切り出し反応に必須なシスエレメントも同定されていない。*Tol2* 因子をトランスジェネシス及び挿入突然変異誘発に有用な道具とするためには、シス及びトランスの必要条件を細かく調べ、特性を明らかにしなければならない。*Tol2* 因子によってコードされている活性のあるトランスポザーゼはまだ同定されていない。

30

【 先行技術文献 】

40

【 非特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【 非特許文献 1 】 Koga, et al., Nature, 383, 30 (1996).

【 非特許文献 2 】 Takeuchi, Nature, 211, 866-867 (1996).

【 非特許文献 3 】 Yamamoto, Genetics, 55, 329-336 (1967).

【 非特許文献 4 】 Streisinger, et al., Nature, 291, 293-296 (1981).

【 非特許文献 5 】 Driever, et al., Development, 123, 37-46 (1996).

【 非特許文献 6 】 Haffter, et al., Development, 123, 1-36 (1996).

【 非特許文献 7 】 Lin, et al., Science, 265, 666-669 (1994).

【 非特許文献 8 】 Gaiano, et al., Nature, 383, 829-832 (1996).

50

【非特許文献 9】 Amsterdam, et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 62, 437-450 (1997).

【非特許文献 10】 Ivics, et al., Cell, 91, 501-510 (1997).

【非特許文献 11】 Raz, et al., Curr. Biol., 8, 82-88 (1997).

【非特許文献 12】 Fadool, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5182-5186 (1998).

【非特許文献 13】 Kawakami, et al., Gene, 225, 17-22 (1998).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、第一にゼブラフィッシュ胚に注入された Tol2 因子から転写された mRNA を同定することを目的とする。次いで、この転写物が活性のある酵素をコード化しているかどうかを調べるため、ゼブラフィッシュ受精卵に、Tol2 cDNA を鋳型として用いて試験管内で合成された RNA と、トランスポザーゼをコード化している領域に欠失をもつ非自律的 Tol2 因子を含んでいるプラスミド DNA とをコインジェクトする新規な分析法を開発する。

また、本発明は、ゼブラフィッシュにおける Tol2 因子の切り出しに機能する、活性のあるトランス因子及び必須なシスエレメントを同定する。

【0007】

したがって、本発明は、Tol2 因子にコードされている新規な蛋白質、それをコードするポリヌクレオチドを提供するものである。また、本発明は、当該蛋白質を用いて細胞、好ましくは脊椎動物の遺伝子構造を改変する方法、遺伝子構造の改変による細胞機能を改変する方法、これらの方法により機能が改変された細胞を提供するものである。さらに、本発明は遺伝子の転移に必要なシスエレメント構造を解明し、これを提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、又はそのアミノ酸の一部が置換され若しくは欠失し、又は他のアミノ酸が付加していてもよいアミノ酸配列を有するトランスポザーゼ様活性を有する蛋白質に関する。また、前記の蛋白質からなるトランスポゾン転移酵素に関する。

また、本発明は、前記の蛋白質をコードする核酸、好ましくは配列表の配列番号 1 に示される塩基配列を有する DNA 若しくは当該 DNA にハイブリダイズし得る DNA、又は対応する RNA に関する。

【0009】

本発明は、前記の蛋白質がトランスポゾンを転移させるトランスポザーゼ様活性を有していること明らかにし、当該蛋白質又は当該蛋白質を産生し得る核酸の存在下で、細胞内、好ましくは脊椎動物の細胞内の遺伝子の一部を切り出し又は切り出して他の箇所に挿入することからなる遺伝子構造を改変させる方法に関する。当該切り出される遺伝子の一部の塩基配列の上流に、少なくとも 1 回の逆方向反復配列 (inverted repeats (Angel エレメント)) を含む塩基配列を有する遺伝子であることが好ましい。

また、本発明は、前記の方法を用いて、細胞の遺伝子に外来遺伝子を導入する方法、及び細胞の遺伝子の発現に基づく機能を改変する方法に関し、さらに本発明は、これらの方法により機能が改変された細胞に関する。

そして、本発明は、これらの方法に使用されるプラスミド、より詳細には塩基配列の上流に、少なくとも 1 回の逆方向反復配列を含む塩基配列を有する DNA を含有してなるプラスミドにも関する。

さらに、本発明は、脊椎動物のゲノム DNA 中に、他の遺伝子を挿入する方法において、トランスポザーゼを用いて自律的に当該挿入を行うことを特徴とする脊椎動物のゲノム DNA 中に他の遺伝子を挿入する方法、好ましくは他の遺伝子が Tol2 エレメントであ

10

20

30

40

50

り、脊椎動物が、魚類である前記方法に関する。

【発明の効果】

【0010】

本発明は、遺伝子の転移酵素活性を有する新規な蛋白質及びそれをコードする核酸を提供するものである。

また、本発明は、脊椎細胞において異なるファミリーの遺伝子転移酵素が、遺伝子を転移させ得る活性を発現することができることを開示するものであり、脊椎動物における遺伝子の転移や転移による変異に関する技術の発展に大きく寄与するものである。一方、最近の遺伝子工学が個々の細胞の形質転換から生体の形質転換へと発展していることから、本発明の細胞レベルの遺伝子の転移技術が単に細胞の形質転換のみに制限されるものではなく、生体における形質転換の手段の一つとして、哺乳動物の遺伝子構造や機能を改変するための医学や農学の分野への応用が期待される技術である。とりわけ、遺伝子治療、魚類の品種改良においては有力な手段となることが期待される。

10

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、Tol2プラスミド及びその転写物の構造、及び本発明のcDNAの構造を示すものである。破線部分はイントロンを示す。一番目のイントロンにある逆方向反復配列(Angel Element)と、本発明で用いたプライマーの位置とを矢印で示す。

【図2】図2は、本発明のTol2及びAcトランスポザラーゼのアミノ酸配列の比較を示す。

20

【図3】図3は、本発明のコインジェクションによる一過性胚エクシジョンアッセイの概要を示したものである。切り出し産物(tyr-ex4f及びtyr-ex5r)の検出に用いたプライマーを矢印で示す。

【図4】図4は、ゼブラフィッシュ胚における本発明の切り出し反応のPCR分析の結果を示す図面に代わる写真である。

【図5】図5は、Tol2エレメントをゲノムに転移させるための(Tol2-tyr)RVプラスミド、(Tol2-tyr)及びTol2cDNAの構造を示す。図5上部の黒線はサザンプロット分析に使用するプローブ部分を示す。

【図6】図6は、Tol2エレメントの存在が確認された親(ff-1及びff-7)のそれぞれの子孫F₁のサザンプロット分析の結果(図6のA)、及びPCR分析の結果(図6のB)を示す、図面に代わる写真である。

30

【図7】図7は、ff-7の子孫F₁のA、B及びCの3種における、ゲノム中に挿入されたTol2エレメントの周囲の塩基配列を示すものである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

先に本発明者らは、チロシナーゼ遺伝子座からクローン化したTol2因子を含んでいるプラスミドであるTol2-tyrプラスミドをゼブラフィッシュ受精卵に注入し、注入したプラスミドDNAからTol2因子を切り出すことができることを示した(Kawakami等、1998)。推定上のトランスポザラーゼ活性をコードしている転写物を同定するため、Tol2-tyrプラスミドを注入した胚から全RNAを調製した。筆者等はまず、Tol2配列の別の部分とアニールする、重なりのある4対のプライマーを用いて3'RACEを行なった。

40

3'RACEを行なうために用いられたとなり同士の前向きのプライマーは：

Tol2f2 ; 5' - TTGGTCAGACATGTTTCATTG - 3'と
 Tol2f3 ; 5' - ATGTTTCATTGGTCCTTTGGA - 3'、
 Tol2f4 ; 5' - ATAGCTGAAGCTGCTCTGATC - 3'と
 Tol2f5 ; 5' - CTGCTCTGATCATGAAACAG - 3'、
 Tol2f8 ; 5' - GCTTAATAAAGAAATATCGGCC - 3'と
 Tol2f9 ; 5' - AATATCGGCCTTCAAAAGTTTCG - 3'、並びに
 Tol2f12 ; 5' - CTGTAATCAGAGAGTGTATGTGTA - 3'と

50

T o l 2 f 1 3 ; 5' - ATTGTTACATTTATTGCATACAAT - 3'である。

【 0 0 1 3 】

ポリアデニル化されたcDNAはT o l 2 f 8とT o l 2 f 9、及びT o l 2 f 4とT o l 2 f 5を用いた3' RACEではうまく増幅されたが、T o l 2 f 2とT o l 2 f 3、及びT o l 2 f 1 2とT o l 2 f 1 3を用いた3' RACEではそうではなかった。

次いで、5' RACEを行なうために用いられた重なりのある逆向きの次のプライマー：

T o l 2 r 4 ; 5' - CTCAATATGCTTCCTTAGG - 3'と

T o l 2 r 5 ; 5' - CTCCTTAGGTTTGATGGCG - 3'

を用いた5' RACEを行ない、2156個のヌクレオチドから成る完全な長さのT o l 2 転写物を同定した(図1)。

10

【 0 0 1 4 】

得られたcDNAの塩基配列を配列表の配列番号1に示す。

図1は、T o l 2 プラスミド及びその転写物の構造を示す。図1の最上段は完全な長さのT o l 2 因子(T o l 2 - t y r)である。図の破線部分は、イントロンである。一番目のイントロンにある逆向きの反復(A n g e l 因子)と、前記したプライマーの位置とを矢印で示す。その下の段は、3' RACEの結果を示し、その下の段は5' RACEの結果を示す。いずれの場合も、イントロン部分は破線で示されている。

その下の段にこれらの結果から得られた全長のmRNAの構造を示す。翻訳領域は、配列番号1のcDNAの塩基配列の85番目(ATG)から2032(TAG)に相当している。

20

図1の下から1段目と2段目は、欠失変異株の(T o l 2 - t y r) R V及び(T o l 2 - t y r) i n 1 R Vの構造を示している。

【 0 0 1 5 】

5' RACE分析では、プラスミド配列からスタートし、T o l 2 因子の一番目のエクソン内の通常では機能しないスプライスアクセプター(cryptic spliceacceptor)部位へジャンプした異常な転写物も見つかった(データは示さず)。これらの転写物についてはそれ以上は調べなかった。

cDNAのDNA配列決定によりT o l 2 因子のエクソン-イントロン構造(すなわち、4つのエクソンと3つのイントロン)が明らかにされた(図1の最上段参照)。このcDNAは649個のアミノ酸から成るタンパク質をコード化している。この蛋白質のアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示す。

30

T o l 2 エlementがトランスポゾン様配列であることは知られていたが、本発明は、T o l 2 エlementが蛋白質をコードし、当該蛋白質の発現による作用であることを初めて確認したものである。即ち、本発明は、T o l 2 エlementにおいてコードされている新規な蛋白質を提供するものであり、また、当該蛋白質をコードするポリヌクレオチドを提供するものである。

【 0 0 1 6 】

図2に本発明の蛋白質のアミノ酸配列及び公知のh A Tファミリーのトランスポゾンのトランスポザーゼ類のアミノ酸配列を比較した図を示す。この比較から、これらの蛋白質は特に中央部のアミノ酸配列が類似していることがわかる(図2参照)。しかし、NH₂-及びCOOH-末端のアミノ酸配列にはやや多様性があった。

40

【 0 0 1 7 】

同定された本発明の蛋白質(T o l 2 転写物)が、活性のある酵素をコードしているかどうかを決定するため、コインジェクションによる新規な一過性の胚エクシジョンアッセイを開発し、これによる酵素活性の確認を行った。

ゼブラフィッシュの受精卵に、配列番号1に示すcDNAを鋳型として用いて試験管内で合成したmRNAと、T o l 2 エlementのE c o R V切断部位の間の塩基を欠失させた、(T o l 2 - t y r) R V(図1参照)を含む(T o l 2 - t y r) R Vプラスミドとをコインジェクトした。コインジェクションの約8時間後、各々の胚よりDNAを

50

抽出し、T o l 2 エLEMENTの外側の配列に基づいて調製されたプライマー t y r - e x 4 f 及び t y r - e x 5 r

t y r - e x 4 f : 5'-GCTACTACATGGTGCCATTCCT-3'

t y r - e x 5 r : 5'-CACTGCCAGATCTGCTGGGCTT-3'

を用いてPCR法により分析した。図3にこの方法の概要を示し、図4のAにこれらのプライマーにーを示す。

【0018】

(T o l 2 - t y r) R V プラスミドからT o l 2 エLEMENTの部分が切り出された場合に生成すると考えられる約250bpのPCR産物が、調べた全ての胚において増幅されていた(56個中56個、図4Bのレーン1-10参照)。このPCR産物は(T o l 2 - t y r) R V プラスミドDNAのみを注入した胚からは決して検出されなかった(50個より多い中で0個、図4Bのレーン11-20参照)。

6個の異なる胚からのPCR産物をクローン化し、配列決定した。それらのうちの3個は、野性型のメダカチロシナーゼ遺伝子の配列(図4C、切り出し産物a)を有し、正確な切り出しを示しており、他の3個は、h A Tファミリーのトランスポゾンの切り出しに特徴的な(Pohlman等、1984; Sutton等、1984; Koga等、1996; Kawakami等、1998)、少数のヌクレオチドが付加したほぼ野性型の配列(図4C、切り出し産物b及びc)を有しており、この実験における切り出しという事象がトランスポザーゼ活性に依存することを示している。

【0019】

これらの結果、即ち、本発明の配列番号1に示す塩基配列を有するmRNAと共にインジェクションした場合には、トランスポゾンの切り出しに特徴的なPCR産物が得られ、これをインジェクションしない場合にはこのようなPCR産物が得られないということは、本発明の蛋白質(T o l 2 転写物)が、切り出しを触媒する活性のあるトランスポザーゼをコードしており、しかも(T o l 2 - t y r) R V プラスミドは切り出しに必須のシスELEMENTの配列を含むことを示している。

【0020】

図4は、この実験の結果を示すものであり、図4Aは、この分析に用いたプライマーの位置及び方向を矢印で示している。図4Bの上段は、プライマーt y r - e x 4 f 及び t y r - e x 5 r を用いたPCR産物を、下段はプライマーT o l 2 f 1 及びT o l 2 r 3 を用いたPCR産物を示す、図面に代わる写真である。レーン1-10はゼブラフィッシュ胚に(T o l 2 - t y r) R V プラスミドとT o l 2 のmRNAと共にインジェクションした場合を、レーン11-20は(T o l 2 - t y r) R V プラスミドのみを単独でインジェクションした場合を、レーンG及びPは50ngのゼブラフィッシュゲノムDNAと、10pgの(T o l 2 - t y r) R V プラスミドDNAとからのPCR産物である。図4のCは、上記の実験で得られた切り出し産物のDNA配列を示している。T o l 2 配列を肉太活字で示し、T o l 2 エLEMENTの外側の8bpの同方向のプライマーの配列部分に下線をつけてある。

【0021】

この実験では、切り出し産物は一回のPCR増幅の後に検出可能であったが、試験管内で調製したmRNAに代えて全長のT o l 2 エLEMENTを含有するプラスミドDNAを単独で受精卵に注入した分析法では、二回のPCRが必要であったことが注目された。ここで観察された効率のより高い切り出し反応は、DNA注入によって供給されるよりも多くのトランスポザーゼがRNA注入によって供給されたためとして説明することができる。

【0022】

T o l 2 エLEMENTの一番目のイントロンは約300bpの大きな逆方向反復配列(inverted repeats)を含んでおり、最近A n g e l エLEMENTの逆向きの重複として同定された(Izsvak等、1999)(図1参照)。このイントロン部分の配列が切り出しに必要なかどうかを検討するために、一番目のイントロンの配列をも完全に欠いている(T o l

10

20

30

40

50

2 - t y r) i n 1 R V (図 1 の下段参照) を含有する (T o l 2 - t y r) i n 1 R V プラスミドを構築し、その活性を T o l 2 の m R N A とのコインジェクションにより前記の実験と同様に分析した。この結果を図 4 の D に示す。

【 0 0 2 3 】

図 4 の D の上段は、プライマー t y r - e x 4 f 及び t y r - e x 5 r を用いた P C R 産物を、下段はプライマー T o l 2 f 1 及び T o l 2 r 3 を用いた P C R 産物を示す、図面に代わる写真である。レーン 1 - 8 はゼブラフィッシュ胚に、(T o l 2 - t y r) i n 1 R V プラスミドと T o l 2 の m R N A とをインジェクションした場合を示し、レーン 9 - 1 2 は (T o l 2 - t y r) R V プラスミドと T o l 2 の m R N A とをインジェクションした場合を示し、レーン 1 3 - 1 6 は (T o l 2 - t y r) i n 1 R V プラスミドのみを単独でインジェクションした場合を示す。レーン P は 1 0 p g の (T o l 2 - t y r) i n 1 R V プラスミド D N A の P C R 産物を示す。

10

【 0 0 2 4 】

レーン 9 - 1 2 は先ほどの実験を対照としておこなったものであり、切り出しを示す P C R 産物を確認することができたが、イントロン部分を欠失させたプラスミドを用いたレーン 1 - 8 のものでは、切り出し産物は検出することができず (1 6 個のうち 0 個、図 4 D、レーン 1 - 8 参照)、一番目のイントロンが切り出しに必須のシスエレメントを含んでいることが示された。

また、R V 欠失を修復し、(T o l 2 - t y r) R V プラスミドとほぼ同じ大きさの (T o l 2 - t y r) i n 1、即ち T o l 2 エレメントの 6 4 4 ~ 2 1 6 3 番目の塩基のみを欠失させたものを含有する (T o l 2 - t y r) i n 1 プラスミドもコインジェクションアッセイによって調べたが、切り出しを示す P C R 産物は得られなかった (1 6 個のうち 0 個、データは示さず) 。

20

【 0 0 2 5 】

切り出しに必須のシスエレメントを正確に特定するためには、一番目のイントロン内より小さい欠失及び点突然変異を用いたさらなる分析が必要であろうが、これらの結果からイントロン部分が切り出しに必要であり、かつ当該イントロン部分には A n g e l エレメントが逆方向反復配列として含まれていることから、当該逆方向反復配列が本発明の切り出しに必要な配列と考えることもできる。

【 0 0 2 6 】

このように、T o l 2 エレメントによってコードされていた転写物 (本発明の蛋白質) 及びこの蛋白質のトランスポザーゼ活性と、転移に必須のシスエレメントとを初めて同定することに成功した。これらの発見は、T o l 2 トランスポザーゼの生化学的な特徴づけにつながるものであろう。

30

また、T c 1 / mariner ファミリーに属するトランスポゾンのゼブラフィッシュゲノムへの転位が報告されている (Raz 等、1997 ; Fadool 等、1998) 。この報告の実験では、ゼブラフィッシュの一細胞期の胚に、インビトロで転写したトランスポザーゼ R N A と必須のシスエレメントをもつトランスポゾンベクターとがコインジェクトされた。

異なるファミリーに属するトランスポゾンが、ゲノムへの組込みに関して異なる特異性及び効率を有するかもしれないが、T o l 2 エレメントを用いた魚類における新規なトランスポゾン技術を開発した本発明の方法によれば、遺伝子の切り出しが前記したラツ (Raz) らの方法と同様に行われていることから、T c 1 / mariner ファミリーのトランスポゾンにおいて行なわれたものと類似の方法で、T o l 2 エレメントなどの遺伝子をゲノム内にトランスポートすることができることになるであろう。

40

【 0 0 2 7 】

そこで本発明者らは、T o l 2 エレメントを転位によりゼブラフィッシュのゲノムに導入することができるかどうかを検討した。ゼブラフィッシュのゲノムには T o l 2 エレメントは存在しないことが知られている。

T o l 2 エレメントがトランスポジションを活性化することができるトランスポゼースをコードしているかどうかを試験するために、ゼブラフィッシュの受精卵に、トランスポ

50

ゼースをコードしていると考えられるテンプレートとしてのT o l 2 c D N Aを用いてインヴィトロで転写したR N A、及びトランスポゼースをコードしていると考えられる領域を欠失させている(T o l 2 - t y r) R Vエレメントを有するプラスミドD N Aを、コインジェクトした。

これらの(T o l 2 - t y r) R Vプラスミド及びT o l 2 D N Aの構造を図5に示す。3'及び5'は転写の方向を示す。

【0028】

インジェクトした卵を成魚に生長させて、インジェクトしていない成魚とつがいにした。そして、その子孫にT o l 2配列が存在するか否かを分析した。

インジェクトした8匹の魚のうちの2匹からの子孫に、T o l 2配列を見出すことができた。この2匹の魚をf f - 1 (founder fish-1)及びf f - 7 (founder fish-7)と名付けた。

f f - 1からの68匹のF₁のうちの2匹がT o l 2配列を持っていた。これらの2匹の魚は、T o l 2配列と同様にプラスミド配列も持っていた。また、f f - 7からの50匹のF₁のうち25匹はT o l 2配列を持っていた。これらの25匹の魚はプラスミド配列をもっておらず、図6のAに示すサザンプロットの結果からA、B及びCの3種類に分類された。このうちAは7匹で、Bは3匹で、Cは15匹であった。

図6のAは、f f - 1、f f - 7からのF₁の尾ひれから調製したD N Aを制限酵素E c o R Vで消化し、これを図5に示すプローブを用いてサザンプロット分析した結果を示す、図面に代わる写真である。f f - 1からの2匹は同じパターンを示したが、f f - 7からのものはA、B及びCの3種類のパターンを示した。

【0029】

次に、f f - 1、f f - 7からのF₁のP C R分析を行った。図5にP C R 1、P C R 2及びP C R 3として示される位置のプライマーを用いた。対照として、ゼブラフィッシュのゲノムD N A (G)、及びゲノムD N Aと(T o l 2 - t y r) R VプラスミドD N A (G + P)を用いた。f f - 7からのF₁では、P C R 2及びP C R 3におけるP C R産物を増幅することはできなかった。即ち、f f - 7からの子孫は、f f - 1からの子孫とは異なりT o l 2のフランキング配列となるプラスミド配列を持っていなかった。

【0030】

f f - 7の子孫におけるT o l 2配列を含むD N Aフラグメント及びその近傍領域をインバースP C R (inverse PCR)によりクローニングして、その配列を決定した。A、B及びCの3種類のいずれの場合もT o l 2配列はゼブラフィッシュのゲノム配列の中であり、その両端には8 b pの繰り返し配列がみられた。T o l 2配列の両端における8 b pの繰り返しは、h A Tファミリーのトランスポザースによる挿入に特徴的なものであり、トランスポザースによってT o l 2配列の挿入が行われたことを示すものである。

図7にA、B及びCの3種類の決定された塩基配列を示す。図7中のT o l 2は、T o l 2の配列を示している。Aでは、T o l 2配列の両端に「C T C A A C T G」の繰り返しだが、Bでは、T o l 2配列の両端に「T A T A G A G A」の繰り返しだが、Cでは、T o l 2配列の両端に「G T T T T C A G」の繰り返しが見られた。

【0031】

脊椎動物の培養細胞や生殖細胞において、T c 1 / マリナー (mariner) ファミリーに属する、人工的に再構築され活性化されたスリーピングビューティー (sleeping beauty) (Ivics, Z., et al., Cell, 91, 501-510 (1997))、線虫のT c 3 (Raz, E., et al., Current Biology, 8, 82-88 (1997))、ショウジョウバエのマリナー因子 (mariner) (Fadool, J.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5182-5186 (1998)) についてトランスポジション活性が報告されている。しかし、脊椎動物ゲノムに存在する自律的なトランスポゾン活性は未だ報告されていない。

本発明は、脊椎動物からの自律的なエレメントを同定した最初の報告であり、脊椎動物における機能的なトランスポザース活性を最初に報告するものである。

即ち、本発明は、脊椎動物において自律的に遺伝子を切り出す方法に関するのみならず

10

20

30

40

50

、遺伝子を切り出し、きりだされた遺伝子をゲノムなどの他の遺伝子の中に挿入する方法にも関するものである。

【 0 0 3 2 】

本発明の蛋白質は、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有するものであるが、必ずしもこの中の全てのアミノ酸を必須とするものではなく、本発明のトランスポザゼ活性又は当該活性と類似する活性（これらを併せて、トランスポザゼ様活性という。）を有していればよく、その一部のアミノ酸が置換され若しくは欠失し、又は他のアミノ酸が付加したアミノ酸配列を有するものであってもよい。そして、好ましくは T o l 2 エlement に由来するアミノ酸配列を有するものである。また、本発明の蛋白質は、配列表の配列番号 1 に示される塩基配列に相当する塩基配列を有する mRNA から産生されることを特徴とするものでもある。

10

【 0 0 3 3 】

本発明の核酸は、前記した本発明の蛋白質からなるアミノ酸配列をコードするものであり、好ましくは配列表の配列番号 1 で示される配列を有するポリヌクレオチドなどが挙げられる。本発明の核酸は前記の塩基配列を有するもののみならず、これらの塩基配列にハイブリダイズ、好ましくはストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列も包含される。

【 0 0 3 4 】

本発明の蛋白質又は当該蛋白質を産生し得る核酸の存在下で、細胞内の遺伝子の遺伝子構造を改変させる方法としては、細胞に本発明の前記した蛋白質又はその mRNA などの当該蛋白質を産生し得る核酸を導入し、同時に転移させたい遺伝子を含む遺伝子、例えばプラスミドなどを導入して、本発明の蛋白質による酵素作用により細胞内の遺伝子構造を改変することができる。本発明の改変は、好ましくは自律的な転移を起こすものである。細胞としては、動物細胞が好ましく、より好ましくは脊椎動物の細胞、さらに好ましくは魚類の細胞、具体的にはゼブラフィッシュなどの魚類の細胞などが挙げられる。

20

前記の転移させたい遺伝子を含む遺伝子としては、転移させたい外来遺伝子を含むプラスミドのような天然の細胞内に存在しないものであってもよいが、天然の細胞内に存在する遺伝子であってもよい。この場合に転移に必要なシスエレメントを必要に応じて付加することもできる。転移させたい遺伝子としては、トランスポゾンが好ましいが、場合によっては各種の遺伝子異常による疾患を有する細胞に正常な遺伝子を導入するための遺伝子であってもよい。

30

また、本発明の改変方法は、導入されたプラスミドなどの細胞内の遺伝子の一部を切り出すことのみからなるものであってもよいが、この方法により切り出された遺伝子の全部又は一部が、他の遺伝子に挿入されることを包含するものであってもよい。

本発明の改変方法における切り出される遺伝子は、その塩基配列の上流に、少なくとも 1 回の逆方向反復配列を含む塩基配列を有することが好ましい。このような逆方向反復配列は、遺伝子の転移におけるシスエレメント、又はシスエレメントの一部と考えられるからである。

【 0 0 3 5 】

また、本発明は、前記してきた改変方法を用いて、細胞の遺伝子に外来遺伝子を導入する方法、及び細胞の遺伝子の発現に基づく機能を改変する方法に関する。前記してきた方法によれば、例えば、プラスミド中の外来遺伝子を細胞のゲノム中に転移させることができ、細胞に当該細胞が本来有していない新たな遺伝子を導入することができる。また、このようなあらたに導入された遺伝子を発現させることにより、当該細胞の機能を改変することも可能となる。さらに、本発明はこのような方法により細胞の機能が改変された細胞を提供することができる。この方法における細胞としても、前記した細胞が好ましい。

40

【 0 0 3 6 】

本発明の塩基配列の上流に、少なくとも 1 回の逆方向反復配列を含む塩基配列を有する DNA を含有してなるプラスミドとしては、逆方向反復配列の下流にある遺伝子を転移させるためのものであり、少なくとも 1 回の逆方向反復配列を含む塩基配列を有する部分と

50

その下流に転移させたい遺伝子を含有し、細胞に容易に導入することができるものであればよい。

【0037】

次に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

本発明の実験においては、Teubingen、TL及びbrass系統のゼブラフィッシュを用いて注入用の卵を得、以下の実験にはこれを使用した。

【実施例1】

【0038】

実施例1 (cDNAのクローニング)

ゼブラフィッシュの受精卵に、(Tol2-tyr)プラスミドを注入し、注入の9時間後に50個のゼブラフィッシュ胚より、Tri Zol Reagent (Life Technologies社)を用いて全RNAを抽出し、得られた約3µgの全RNAを、各々次の3'RACE法及び5'RACE法に用いた。

3'RACEを行なうために用いられたとなり同士の前向きプライマーは：

Tol2f2 ; 5' - TTGGTCAGACATGTTTCATTG - 3'と

Tol2f3 ; 5' - ATGTTTCATTGGTCCTTTGGA - 3'、

Tol2f4 ; 5' - ATAGCTGAAGCTGCTCTGATC - 3'と

Tol2f5 ; 5' - CTGCTCTGATCATGAAACAG - 3'、

Tol2f8 ; 5' - GCTTAATAAAGAAATATCGGCC - 3'と

Tol2f9 ; 5' - AATATCGGCCTTCAAAAGTTTCG - 3'、及び

Tol2f12 ; 5' - CTGTAATCAGAGAGTGTATGTGTA - 3'と

Tol2f13 ; 5' - ATTGTTACATTTATTGCATACAAT - 3'である。

5'RACEを行なうために用いられた重なりのある逆向きのプライマーは：

Tol2r4 ; 5' - CTCAATATGCTTCCTTAGG - 3'と

Tol2r5 ; 5' - CTCCTTAGGTTTGATGGCG - 3'である。

3'RACE及び5'RACE産物をゲル抽出し、TOPO TA クローニングキット (Invitrogen社)を用いてクローン化し、さらにABI PRISM 310 Genetic Analyzerを用いて配列決定した。

決定された塩基配列を配列表の配列番号1に示し、その翻訳領域のアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示す。

また、その概要を図1に示す。括弧内の数字は、Tol2エレメントの5'末端からのbpである。cDNA配列のDDBJ/EMBL/Genbank受け入れ番号はAB032244である。

【実施例2】

【0039】

実施例2 ((Tol2-tyr) in1 RVプラスミドの構築)

(Tol2-tyr) in1 RVプラスミドは、まず(Tol2-tyr)プラスミドのNru I-Nsp Vを、cDNAのNru I-Nsp Vフラグメントで置換し、さらにその結果得られたプラスミドをEcoRVで消化し、自己連結させることによって構築した。

【実施例3】

【0040】

実施例3 (mRNA合成、胚への注入、及びPCR分析)

推定上のトランスポザーゼのコード領域全体をコード化しているcDNAを、pBlue script SK⁺ (Stratagene)においてクローン化し、直鎖化し、プロテイナーゼKを用いて消化し、さらにフェノール/クロロフォルム抽出した。mRNAは、T7 RNAポリメラーゼ及びmCAP mRNA Cappingキット (Stratagene)を用いた試験管内の転写により生成した。転写物の濃度及び大きさは、アガロースゲル電気泳動で調べた。

10

20

30

40

50

ゼブラフィッシュ受精卵に、前記で得られたDNA溶液の1 - 2 n l (~ 2 5 n g / μ l のプラスミドDNA) を mRNA (~ 5 n g / μ l の T o l 2 の mRNA) と共に、又は単独で注入し、2 8 ° C にて ~ 8 時間インキュベートした。各々の胚を、5 0 μ l の 1 0 m M E D T A 、 1 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) 、 2 0 0 μ g / m l のプロテイナーゼKに浸し、さらに5 0 ° C にて3 時間インキュベートした。

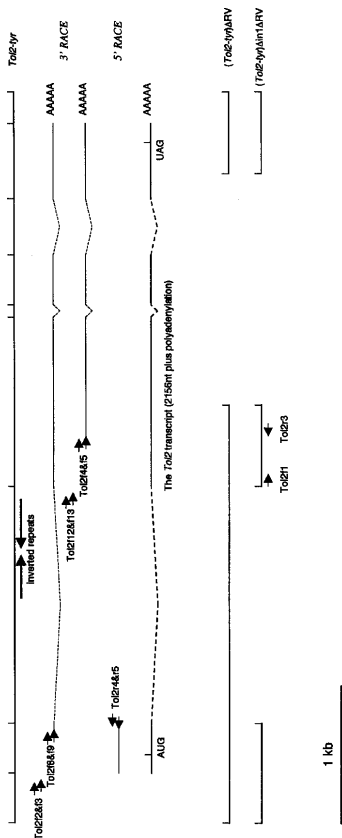
【 0 0 4 1 】

次いで、1 μ l の溶解した胚を、 t y r - e x 4 f 及び t y r - e x 5 r プライマーを用いて P C R (9 4 ° C 3 0 秒、 5 5 ° C 3 0 秒、及び 7 2 ° C 3 0 秒を 3 5 サイクル) に使用した (Kawakami 等、 1998) 。 P C R 産物を 2 % のアガロースゲル電気泳動にて分析した。結果を図 4 に示す。

10

D N A 配列分析用には、 P C R 産物をゲル抽出し、 T O P O T A C l o n i n g (Invitrogen) を用いてクローン化し、配列決定した。各々のサンプル中の注入されたプラスミドDNAの存在を、 T o l 2 f 1 (5 ' - T C C A C C C A T G C T T C C A G C A G T A - 3 ') 及び T o l 2 r 3 (5 ' - C G T T G T G G T T G C A A T C C A T T C A A C - 3 ') プライマーを用いた P C R (9 4 ° C 3 0 秒、 5 5 ° C 3 0 秒、及び 7 2 ° C 3 0 秒を 2 5 サイクル) により確かめた。

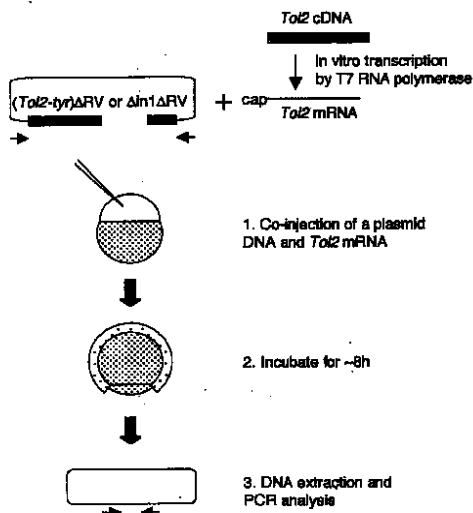
【 図 1 】



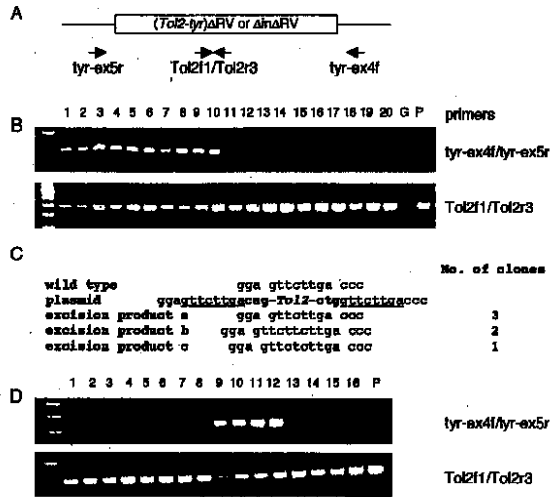
【 図 2 】

Tol2 : 106 VDSVFPVKHVSPTVYNAILRYIIQGLHPFSTMDLPSFKELISTLQPGISVITRPTLRSK 166
 ++ P K + V + K L I I + P P + V + F E + + L P + + R T R
 Ac : 216 INLIEPYKYDEVSLKLLHLA-IIMHEYPFNIVEHEYVEFKSLRPHFPEKSRVTARKY 273
 Tol2 : 166 IAEALINKQKVTAAHSEVE-WIATTTDQWTA-RRKSFIGVTAHWINGP-SLERISAALA 222
 I + L K + K + + V + + T T D W T + + K S + + V T H R I + L +
 Ac : 274 IMDLYEKEKLYGKLDVQSRFSITMDHWTSQNKSYMCVTHWTDQWCLQRIVGFF 333
 Tol2 : 223 CKRLMGSHTFEVLASAMNDIHSEYEIRDKVYVCTTTDSSGNFNKAFRVFGVENNDIETEAR 282
 + G H T + L + I + + I K + + D + S N + +
 Ac : 334 -INTEGRITGQRLSQTFATIMKWNIEKLLFALSLDNAS- ANEVAVHDI 379
 Tol2 : 283 RCESDDTSEGGEGSDGEVQDASRVLDQDDGFEFQLPKHKCACHLLNLVS 335
 + DTDS DG F H + CACHLLNLV +
 Ac : 380 IEDLQDTSNLV-CDGAFF- HVCACHILNLVA 410

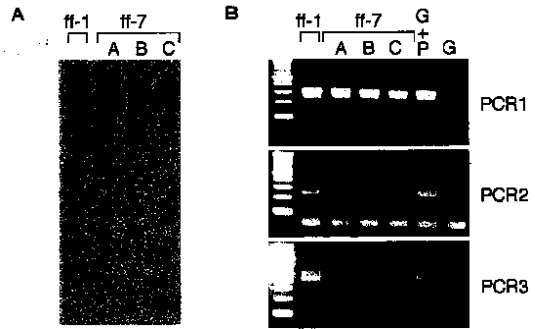
【 図 3 】



【 図 4 】



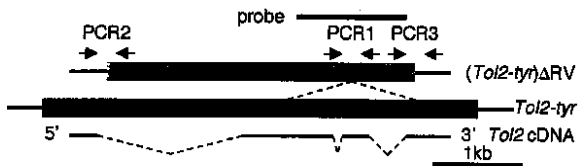
【 図 6 】



【 図 7 】

A GTTTTTTTTTTACATCTCAACTG-Tol2-CTCAACTGATAGTCTAATCACAC
 B CGCTGAGCTCCTTATATAGAGA-Tol2-TATAGAGATGGCTGTTATACGAG
 C AAGTGACGTCAATGTGTTTCAG-Tol2-GTTTCAGCTCATCTGTTCAATA

【 図 5 】



【 配列表 】

0004629162000001.app

フロントページの続き

早期審査対象出願

- (56)参考文献 Gene. 1999 Nov 15, Vol.240, No.1, p.239-244
Oryzias latipes mRNA for Tol2 transposase, complete cds. [online]. 26-NOV-1999. NCBI Entrez Nucleotide
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999 Feb, Vol.96, No.1
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998, Vol.95, No.18
Current opinion in biotechnology. 1992, Vol.3, No.3, p.227-231
FEBS letters. 1999 Nov 19, Vol.461, No.3, p.295-298
Gene. 1998, Vol.225, No.1-2, p.17-22
Biochemistry and cell biology. 1997, Vol.75, No.5, p.507-523
The EMBO journal. 1987, Vol.6, No.6, p.1555-1563
Journal of Molecular Evolution. 1999, Vol.48, No.1, p.13-21

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/00 - 19/00

PubMed

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq