

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001 - 218588

(P 2 0 0 1 - 2 1 8 5 8 8 A)

(43)公開日 平成13年 8月14日 (2001.8.14)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C12N 15/09	ZNA	A01K 67/027	4B024
A01K 67/027		C12N 9/12	4B050
C12N 5/10		15/00	ZNA A 4B065
9/12		5/00	B

審査請求 未請求 請求項の数22 O L (全13頁)

(21)出願番号 特願2000 - 109033(P 2000 - 109033)
(22)出願日 平成12年 4月11日(2000.4.11)
(31)優先権主張番号 特願平11 - 345508
(32)優先日 平成11年12月 3日(1999.12.3)
(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 396020800
科学技術振興事業団
埼玉県川口市本町 4丁目 1番 8号
(72)発明者 川上 浩一
千葉県印旛郡白井町桜台 2 - 6 - 9 - 103
(74)代理人 100102668
弁理士 佐伯 憲生
Fターム(参考) 4B024 AA01 AA07 AA10 BA10 CA02
CA12 DA02 EA04 GA12 HA17
4B050 CC01 CC03 DD11 LL01 LL10
4B065 AA90X AA90Y AB01 BA04
CA29 CA44 CA60

(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)【要約】 (修正有)

【課題】 メダカトランスポゾン様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の提供。また、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、それによる細胞機能を改変する方法、及びその細胞の提供。さらに、遺伝子の転移に必要なシスエレメント構造を解明、提供する。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列、又はその類似アミノ酸配列を有するトランスポザゼ様活性を有する蛋白質、前記の蛋白質からなるトランスポゾン転移酵素。また、前記の蛋白質をコードする特定の塩基配列を有する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。さらに、当該蛋白質又はこれを産生し得る核酸の存在下で、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。

【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、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ゼ様活性を有する蛋白質。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の蛋白質からなるトランスポゾン転移酵素。

【請求項 3】 請求項 1 に記載の蛋白質をコードする核酸。

【請求項 4】 核酸が、配列表の配列番号 1 に示される塩基配列を有する DNA、又は当該 DNA にハイブリダイズし得る DNA である請求項 3 に記載の核酸。

【請求項 5】 核酸が RNA である請求項 3 又は 4 に記載の核酸。

【請求項 6】 請求項 1 に記載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。

【請求項 7】 当該蛋白質を産生し得る核酸が、mRNA である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 細胞が脊椎動物の細胞である請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 9】 細胞内の遺伝子が、プラスミドである請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】 プラスミドが、その細胞の外来遺伝子を含有するものである請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 遺伝子構造を改変させる方法が、細胞内の遺伝子の一部を切り出すことからなる請求項 6 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】 切り出された遺伝子の一部が、他の遺伝子に挿入される請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】 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を含む塩基配列を有する請求項 11 又は 12 に記載の方法。

【請求項 14】 遺伝子構造を改変させられる遺伝子が、シスエレメントとして少なくとも 1 回の逆方向反復配列を含む塩基配列を有する請求項 6 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】 請求項 6 ~ 14 のいずれかに記載の方法を用いて、細胞の遺伝子に外来遺伝子を導入する方法。

【請求項 16】 請求項 6 ~ 14 のいずれか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 17】 請求項 16 に記載の方法により機能が改変された細胞。

【請求項 18】 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。

【請求項 19】 プラスミドが、請求項 1 の記載の蛋白質又は当該蛋白質を産生し得る核酸の存在下で、そのな

かの一部の DNA が切り出されるためのものである請求項 18 に記載のプラスミド。

【請求項 20】 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、当該トランスポザゼの活性を用いて他の遺伝子を挿入する方法。

【請求項 21】 他の遺伝子が請求項 13 ~ 14 の特徴を有する T o l 2 エレメントである請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】 脊椎動物が、魚類である請求項 20 又は 21 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、トランスポザ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。

【0002】

【従来の技術】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 *h o b o*、トウモロコシの実の *A c* やキンギョソウの *T a m 3* などの *h A T* ファミリーのトランスポゾンのトランスポザゼ (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、T o l 2 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。チロシナーゼの遺伝子座に存在した T o l 2 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 P C R により示された (Koga 等、1996)。

【0003】

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 (Takeuchi, 1996 ; Yamamoto, 1967 ; Streisinger 等、1981)。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 (Driever 等、1996 ; Haffter 等、1996)、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 (Line 等、1994 ; Gaiano 等、1996 ; Amsterdam 等、1997)。

また、エンハンサートラップ及び遺伝子トラップスクリーニング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 / mariner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 (Ivics等、1997 ; Raz等、1997 ; Fadool等、1998)。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。

【0004】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 (Kawakami等、(1998) Gene 225, 17-22)。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。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】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。

【0006】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。

【0007】

【課題を解決するための手段】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。

【0008】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エレメントであり、脊椎動物が、魚類である前記方法に関する。

【0009】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ーゼ活性をコード化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。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' - ATGTTTCATTGGCTCTTTGGA - 3'、

50 Tol2f4 ; 5' - ATAGCTGAAGCTGCTCTGATC - 3'

と

T o l 2 f 5 ; 5' - CTGCTCTGATCATGAAACAG - 3'、

T o l 2 f 8 ; 5' - GCTTAATAAAGAAATATCGGCC - 3'と

T o l 2 f 9 ; 5' - AATATCGGCCTTCAAAGTTTCG - 3'、並びに

T o l 2 f 1 2 ; 5' - CTGTAATCAGAGAGTGTATGTGTA - 3'と

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

【0010】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' - CTCATATGCTTCCTTAGG - 3'と

T o l 2 r 5 ; 5' - CTTCTTAGGTTTGATGGCG - 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)。

【0011】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 - tyr)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(Angel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。図1の下から1段目と2段目は、欠失変異株の(T o l 2 - tyr) RV及び(T o l 2 - tyr) in1 RVの構造を示している。

【0012】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プライムアクセプター(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。T o l 2エレメント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エレメント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エレメント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。

【0013】図2に本発明の蛋白質のアミノ酸配列及び公知のhATファミリーのトランスポゾンのトランスポザ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。

【0014】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を確認を行った。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エレメントのEcoRV切断部位の間の塩基を欠失させた、(T o l 2 - tyr) RV(図1参照)を含む(T o l 2 - tyr) RV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を抽出し、T o l 2エレメントの外側の配列に基づいて調製されたプライマー-tyr-ex4f及びtyr-ex5r

tyr-ex4f : 5'-GCTACTACATGGTGCCATTCCT-3'
tyr-ex5r : 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一を示す。

【0015】(T o l 2 - tyr) RVプラスミドからT o l 2エレメント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 - tyr) RV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、hAT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ゼ活性に依存することを示している。

【0016】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 (Tol2 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 (Tol2-tyr) RV プラスミドは切り出しに必須のシスエレメントの配列を含むことを示している。

【0017】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 tyr-ex4f 及び tyr-ex5r を用いた PCR 産物を、下段はプライマー Tol2f1 及び Tol2r3 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 (Tol2-tyr) RV プラスミドと Tol2 の mRNA と共にインジェクションした場合を、レーン11-20は (Tol2-tyr) RV 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 (Tol2-tyr) RV 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。Tol2 配列を肉太活字で示し、Tol2 エレメントの外側の 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。

【0018】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 Tol2 エレメント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。

【0019】Tol2 エレメント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 Angel エレメントの逆方向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ものである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 (Tol2-tyr) in1 RV (図1の下段参照) を含有する (Tol2-tyr) in1 RV プラスミドを構築し、その活性を Tol2 の mRNA 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。

【0020】図4のDの上段は、プライマー tyr-ex4f 及び tyr-ex5r を用いた PCR 産物を、下段はプライマー Tol2f1 及び Tol2r3 を用いた PCR 産物を示す、図面に代わる写真である。レーン1-8はゼブラフィッシュ胚に、(Tol2-tyr) in1 RV プラスミドと Tol2 の mRNA とをイン

ジェクションした場合を示し、レーン9-12は (Tol2-tyr) RV プラスミドと Tol2 の mRNA とをインジェクションした場合を示し、レーン13-16は (Tol2-tyr) in1 RV 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10pgの (Tol2-tyr) in1 RV プラスミド DNA の PCR 産物を示す。

【0021】レーン9-12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 PCR 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 (16個のうち0個、図4D、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、RV 欠失を修復し、(Tol2-tyr) RV プラスミドとほぼ同じ大きさの (Tol2-tyr) in1、即ち Tol2 エレメントの 644~2163 番目の塩基のみを欠失させたものを含有する (Tol2-tyr) in1 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 PCR 産物は得られなかった (16個のうち0個、データは示さず)。

【0022】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の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 Angel 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。

【0023】このように、Tol2 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、Tol2 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。また、Tc1/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 RNA 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、Tol2 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ツ (Raz) らの方法と同様に行われていることから、Tc1/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、Tol2

12 エlement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。

【0024】そこで本発明者らは、Tol2 エlement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Tol2 エlementは存在しないことが知られている。Tol2 エlement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Tol2 cDNAを用いてインビトロで転写したRNA、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(Tol2-tyr) RV Elementを有するプラスミドDNAを、コインジェクトした。これらの(Tol2-tyr) RVプラスミド及びTol2 DNAの構造を図5に示す。3'及び5'は転写の方向を示す。

【0025】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Tol2 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、Tol2 配列を見出すことができた。この2匹の魚をff-1 (founder fish-1) 及びff-7 (founder fish-7) と名付けた。ff-1からの68匹のF₁のうちの2匹がTol2 配列を持っていた。これらの2匹の魚は、Tol2 配列と同様にプラスミド配列も持っていた。また、ff-7からの50匹のF₁のうち25匹はTol2 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、ff-1、ff-7からのF₁の尾ひれから調製したDNAを制限酵素EcoRV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。ff-1からの2匹は同じパターンを示したが、ff-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。

【0026】次に、ff-1、ff-7からのF₁のPCR分析を行った。図5にPCR1、PCR2及びPCR3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DNA(G)、及びゲノムDNAと(Tol2-tyr) RVプラスミドDNA(G+P)を用いた。ff-7からのF₁では、PCR2及びPCR3におけるPCR産物を増幅することはできなかった。即ち、ff-7からの子孫は、ff-1からの子孫とは異なりTol2の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。

【0027】ff-7の子孫におけるTol2 配列を含むDNAフラグメント及びその近傍領域をインバースPCR (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Tol2 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8bpの繰り返し配列がみられた。Tol2 配列の両端における8bpの繰り返しは、hATファミリーのトランスポゼースによる挿入に特徴的なものであり、トランスポゼースによってTol2 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Tol2 は、Tol2 の配列を示している。Aでは、Tol2 配列の両端に「CTCAACTG」の繰り返し、Bでは、Tol2 配列の両端に「TATAGAGA」の繰り返し、Cでは、Tol2 配列の両端に「GTTTTTCAG」の繰り返しが見られた。

【0028】脊椎動物の培養細胞や生殖細胞において、Tc1/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Tc3 (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Element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ゼ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、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。

【0029】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ゼース活性又は当該活性と類似する活性(これらを併せて、トランスポゼース様活性という。)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Tol2 Element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。

【0030】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はいれる番号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ент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。

【0031】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有する遺伝子、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。前記の転移させたい遺伝子を含有する遺伝子としては、転移させたい外来遺伝子を含有する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。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。

【0032】また、本発明は、前記してきた改変方法を

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：

T o l 2 f 2 ; 5' - TTGGTCAGACATGTTTCATTG - 3' と

T o l 2 f 3 ; 5' - ATGTTTCATTGGTCCTTTGGA - 3'、

T o l 2 f 4 ; 5' - ATAGCTGAAGCTGCTCTGATC - 3' と

T o l 2 f 5 ; 5' - CTGCTCTGATCATGAAACAG - 3'、

T o l 2 f 8 ; 5' - GCTTAATAAAGAAATATCGGCC - 3' と

T o l 2 f 9 ; 5' - AATATCGGCCTTCAAAGTTTCG - 3'、及び

T o l 2 f 1 2 ; 5' - CTGTAATCAGAGAGTGTATGTGTA - 3' と

T o l 2 f 1 3 ; 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：

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

T o l 2 r 5 ; 5' - CTCCTTAGGTTTGATGGCG - 3' である。

3' RACE 及び 5' RACE 産物をゲル抽出し、TOPOTA 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、T o l 2 エレメントの 5' 末端

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。

【0033】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。

【0034】

20 【実施例】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。

【0035】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、(T o l 2 - t y r) 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 3 μ g の全 RNA を、各々次の 3' RACE 法及び 5' RACE 法に用いた。

30

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。

【0036】実施例 2 ((T o l 2 - t y r) i n 1 RV プラスミドの構築)

(T o l 2 - t y r) i n 1 RV プラスミドは、まず (T o l 2 - t y r) プラスミドの Nru I - Ns

p 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。

【0037】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、pBluescript 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。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 μ l (~ 25 ng / μ l のプラスミド DNA) を mRNA (~ 5 ng / μ l の Tol2 の mRNA) と共に、又は単独で注入し、28 にて ~ 8 時間インキュベートした。各々の胚を、50 μ l の 10 mM EDTA、10 mM Tris - HCl (pH 8.0)、200 μ g / ml のプロテイナーゼ K に浸し、さらに 50 にて 3 時間インキュベートした。

【0038】次いで、1 μ l の溶解した胚を、tyr - ex4f 及び tyr - ex5r プライマーを用いて PCR (94 30 秒、55 30 秒、及び 72 30 秒を 35 サイクル) に使用した (Kawakami 等、1998)。PCR 産物を 2 % のアガロースゲル電気泳動にて分析した。

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation
 <120> Transposon transpher factor and alternation method for a gene
 <130> PC901482
 <160> 2
 <210> 1
 <211> 2156
 <212> DNA
 <213> Oryzias latipes
 <400> 1

```

acgtcatgtc acatctatta ccacaatgca cagcaccttg acctggaaat tagggaatt    60
ataacagtca atcagtgga gaaaatggag gaagtatgtg attcatcagc agctgcgagc    120
agcacagtcc aaaatcagcc acaggatcaa gagcaccctg ggccgtatct tcgccaattc    180
ttttcttaa gtggtgtaa taaagattca ttcaagatga aatgtgtcct ctgtctcccg    240
cttaataaag aaatatcggc cttaaaaagt tcgcatcaa acctaaggaa gcatattgag    300
agaatgcacc caaattacct caaaaactac tctaaattga cagcacagaa gagaaagatc    360
gggacctcca cccatgctc cagcagtaag caactgaaag ttgactcagt ttcccagtc    420
aaacatgtgt ctccagtcac tgtgaacaaa gctatattaa ggtacatcat tcaaggactt    480
catcctttca gcaactgtga tctgccatca tttaaagagc tgattagtag actgcagcct    540
ggcattttctg tcattacaag gcctacttta cgctccaaga tagctgaagc tgctctgatc    600
atgaaacaga aagtgactgc tgccatgagt gaagttgaat ggattgcaac cacaacggat    660
tgttgactg cacgtagaaa gtcattcatt ggtgtaactg ctactggat caaccctgga    720

```

結果を図 4 に示す。DNA 配列分析用には、PCR 産物をゲル抽出し、TOPO TA Cloning (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、Tol2f1 (5' -TCCACCCATGCTTCCAGCAGTA - 3') 及び Tol2r3 (5' -CGTTGTGGTTGCAATCCATTCAAC - 3') プライマーを用いた PCR (94 30 秒、55 30 秒、及び 72 30 秒を 25 サイクル) により確かめた。

10 【0039】

【発明の効果】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。

20 【0040】

【配列表】

15	16	
agtcttga	gacattccgc	780
gaggtactgg	ccagtgccat	840
gattgcacaa	ccacagacag	900
gaaaacaatg	atcgcgagac	960
ggctgtgg	aggaagtga	1020
gacgatggct	tcgaattcca	1080
ctagtctcaa	gcgttgatgc	1140
agatctgtct	ttggcaaatg	1200
gctgaagctg	ttgaatcaga	1260
aattcaactt	ttatggctgt	1320
gcacttcgga	atatatgcac	1380
ttcttgacag	agtgggccaa	1440
gcggaacga	atacacagct	1500
cttcagcgac	tccaccattc	1560
ggaatccaaa	cacgattcaa	1620
cttctcccta	aatttcggac	1680
gactacatca	gagtgcattc	1740
tctgatgatg	aagatTTTT	1800
ttggatggat	atctggcctg	1860
atttgcagcc	tctctatcaa	1920
cttttcagca	ctgcaggatt	1980
tttgagaatc	agcttctact	2040
ctggcattag	attgtctgtc	2100
ataaaacctt	gtagcattt	2156
<210>	2	
<211>	649	
<212>	PRT	
<213>	Oryzias latipes	
<400>	2	
Met	Glu	15
Gln	Asn	30
Glu	Phe	45
Lys	Cys	60
Lys	Ser	75
Pro	Asn	90
Lys	Ile	105
Val	Asp	120
Asn	Lys	135
Ser	Thr	150
Gln	Pro	165
Ile	Ala	180
Met	Ser	195
Ala	Arg	210
Pro	Gly	225
Leu	Met	240
Asp	Ile	255
Thr	Thr	270
Gly	Val	285

Ser Asp Asp Thr Asp Ser Glu Gly Cys Gly Glu Gly Ser Asp Gly	300
Val Glu Phe Gln Asp Ala Ser Arg Val Leu Asp Gln Asp Asp Gly	315
Phe Glu Phe Gln Leu Pro Lys His Gln Lys Cys Ala Cys His Leu	330
Leu Asn Leu Val Ser Ser Val Asp Ala Gln Lys Ala Leu Ser Asn	345
Glu His Tyr Lys Lys Leu Tyr Arg Ser Val Phe Gly Lys Cys Gln	360
Ala Leu Trp Asn Lys Ser Ser Arg Ser Ala Leu Ala Ala Glu Ala	375
Val Glu Ser Glu Ser Arg Leu Gln Leu Leu Arg Pro Asn Gln Thr	390
Arg Trp Asn Ser Thr Phe Met Ala Val Asp Arg Ile Leu Gln Ile	405
Cys Lys Glu Ala Gly Glu Gly Ala Leu Arg Asn Ile Cys Thr Ser	420
Leu Glu Val Pro Met Phe Asn Pro Ala Glu Met Leu Phe Leu Thr	435
Glu Trp Ala Asn Thr Met Arg Pro Val Ala Lys Val Leu Asp Ile	450
Leu Gln Ala Glu Thr Asn Thr Gln Leu Gly Trp Leu Leu Pro Ser	465
Val His Gln Leu Ser Leu Lys Leu Gln Arg Leu His His Ser Leu	480
Arg Tyr Cys Asp Pro Leu Val Asp Ala Leu Gln Gln Gly Ile Gln	495
Thr Arg Phe Lys His Met Phe Glu Asp Pro Glu Ile Ile Ala Ala	510
Ala Ile Leu Leu Pro Lys Phe Arg Thr Ser Trp Thr Asn Asp Glu	525
Thr Ile Ile Lys Arg Gly Met Asp Tyr Ile Arg Val His Leu Glu	540
Pro Leu Asp His Lys Lys Glu Leu Ala Asn Ser Ser Ser Asp Asp	555
Glu Asp Phe Phe Ala Ser Leu Lys Pro Thr Thr His Glu Ala Ser	570
Lys Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Ala Cys Val Ser Asp Thr Arg Glu	585
Ser Leu Leu Thr Phe Pro Ala Ile Cys Ser Leu Ser Ile Lys Thr	600
Asn Thr Pro Leu Pro Ala Ser Ala Ala Cys Glu Arg Leu Phe Ser	615
Thr Ala Gly Leu Leu Phe Ser Pro Lys Arg Ala Arg Leu Asp Thr	630
Asn Asn Phe Glu Asn Gln Leu Leu Leu Lys Leu Asn Leu Arg Phe	645
Tyr Asn Phe Glu	649

【図面の簡単な説明】

【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エレメント)と、本発明

30

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。

【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

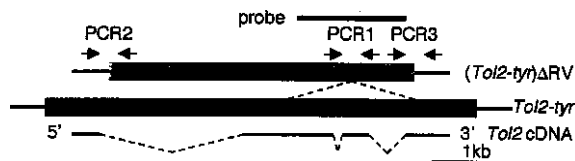
真である。

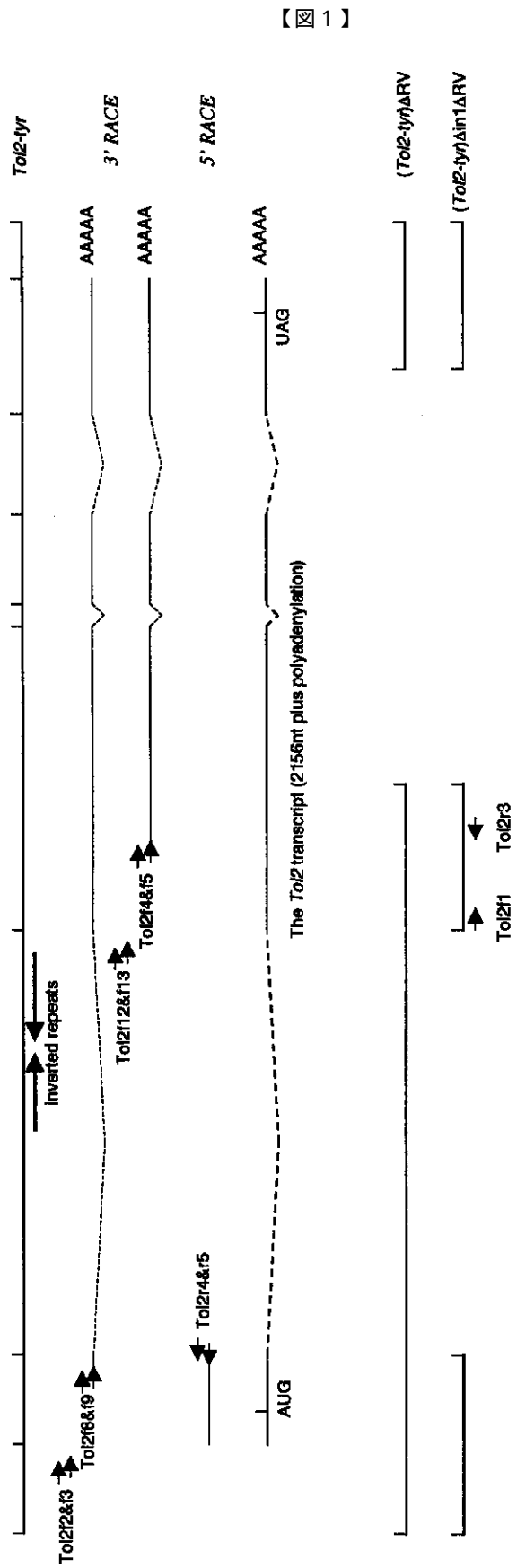
【図5】図5は、Tol2エレメントをゲノムに転移させるための(Tol2-tyr)RVプラスミド、(Tol2-tyr)及びTol2cDNAの構造を示す。図5上部の黒線はサザンプロット分析に使用するプローブ部分を示す。

【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。

【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。

【図5】





【 図 1 】

【 図 2 】

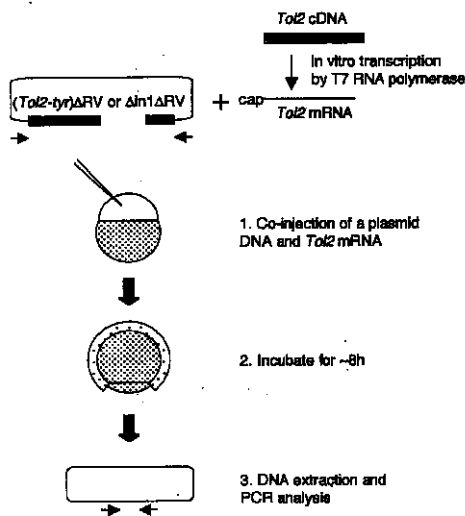
To12 : 106 VDSVFPVKHVSPVTVNKAILRYIIQGLHPFSTVDLPSFKELISTLQPGISVITRPTLRSK 165
 ++ + P K+ V++ K L II +PF+ V+ F E + +L+P + +R T R
 Ac : 216 INLIEPYKYDEVVSLKHLHLA-IIMHEYPFNIWEHEYFVEFVKSLRPHFPIKSRVTARKY 273

To12 : 166 IAEAALIMKQKVTAAMSEVE-WIATTTDCWTA-RRKSFIVTAHWINPG-SLERHSAALA 222
 I + L K+K+ + +V+ +TT D WT+ + KS++ VT HWI+ L++
 Ac : 274 IMDLYLEEKELYGKLDVQSRFSTTMDMWTSCQNKSYMCVTIHWIDDDWCLQKRIVGFF 333

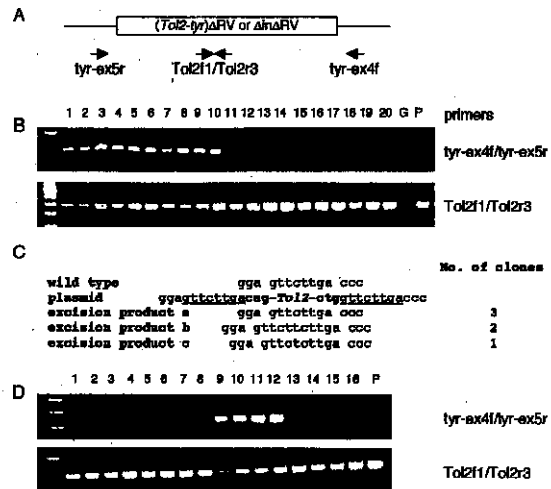
To12 : 223 CKRLMGSHTFEVLASAMNDIHSEYEIROKVVCTTDSGSNFMKAFRVFGVENNDIETEAR 282
 + G HT + L+ I ++ I K+ + D+ S N++
 Ac : 334 -HVEGRHTGQRLSQFTTAIMVKWNIKLFALSNDAS- - - - -ANEVAVHDI 379

To12 : 283 RCESDDTDSEGGEGSDGVFQDASRVLDQDDGFEFQLPKHQKCACHLLNLVS 335
 + DTDS DG F H +CACH+LNLV+
 Ac : 380 IEDLQDTDSNLV-CDGAFF- - - - -HVRCACHILNLVA 410

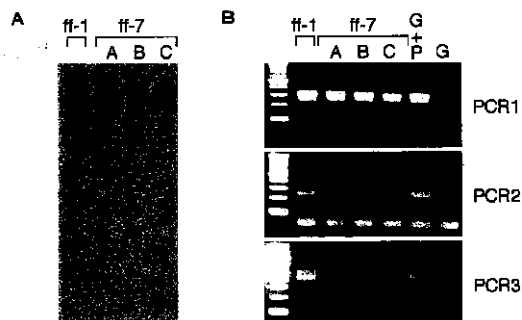
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 6 】



【 図 7 】

A GTTTTTTTTTACATCTCAACTG-To12-CTCAACTGATAGTCTAATCACAC
B CGCTGAGCTCTCTTATATAGAGA-To12-TATAGAGATGGCTGTTATACGAG
C AAGTGACGTCAATGTGTTTTTCAG-To12-GTTTTTCAGCTCATCTGTTCATT