

pEFkベクターを用いた人工制限酵素（ジンクフィンガーヌクレアーゼ）の発現

制限酵素は、特定の塩基配列を認識しDNAの切断反応を触媒する酵素です。ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）は人工的に設計された制限酵素の一種で、ジンクフィンガードメインからなるDNA結合ドメインと制限酵素FokIのヌクレアーゼドメインを融合させたタンパク質です。二つのZFNが塩基配列を認識し、その間でFokIヌクレアーゼドメインが二量化すると二本鎖DNAの切断が起こります（図1）。特定の塩基配列に結合するジンクフィンガードメインを人工的に設計することが可能であることから、ZFNはゲノム編集技術への応用が期待されています。本実験ではpEFkベクターを用いたZFNの発現及び活性測定を行いました。

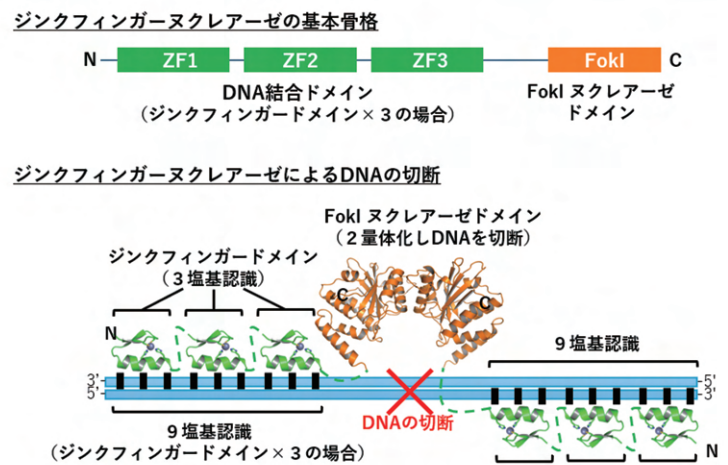


図1 ジンクフィンガーヌクレアーゼ

方法

pEFkベクターのクローニングサイトに、人工合成したZFN遺伝子（6×Hisタグ-核移行シグナル(NLS)-ヒトZIF268由来ジンクフィンガードメイン-FokIヌクレアーゼドメイン）をクローニングしました（図2）。作製した発現ベクターを用いて、タンパク質発現用大腸菌BL21(DE3)を形質転換し、ZFNの発現試験を行いました。形質転換した大腸菌は、600 nmにおける濁度が0.8になるまで37°Cで培養しました。その後、終濃度が0.1 mMになるようにIPTGを添加し、室温（25°C）で5時間培養しました。培養した菌体を破碎後、Ni-NTA樹脂を用いて精製を行いました。また精製したZFNを用いて、DNAの切断実験を行いました。

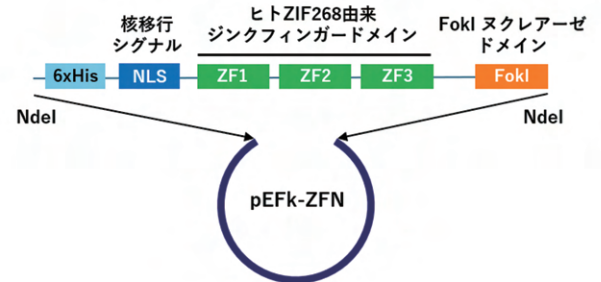


図2 ZFNの発現系

結果

pEFkベクターを用いることにより、ZFNを発現することができました（図3）。また、精製したZFNは配列特異的なDNA切断活性を示しました（図4）。一般的に、大腸菌の生育に有害なタンパク質（ヌクレアーゼ等）の発現は困難であることが知られています。pEFkベクターはハイコピープラスミドであるもののIPTGに対する応答が強く制御されているため、ZFNのようなヌクレアーゼタンパク質でも発現することができました。

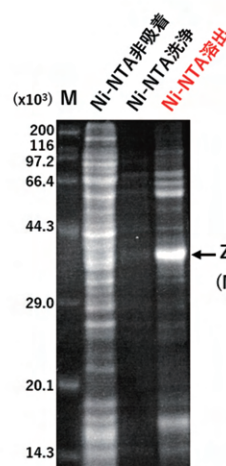


図3 ZFNの発現

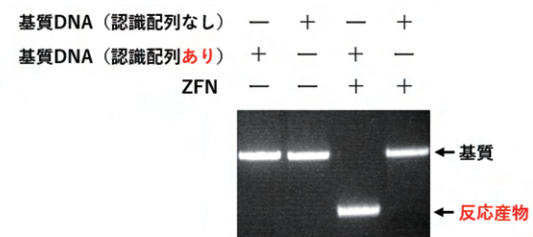


図4 ZFNの活性測定