

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14657

研究課題名(和文) 化学修飾DNAを用いた新規枯草菌形質転換法の確立

研究課題名(英文) Development of a new transformation method of *Bacillus subtilis* with chemically modified DNA

研究代表者

柘植 謙爾 (Tsuge, Kenji)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命准教授

研究者番号：70399690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：枯草菌の長鎖DNAの形質転換頻度の向上を目的に、化学修飾DNAを利用した形質転換系の構築を試みた。枯草菌の形質転換系遺伝子群に、化学修飾した塩基を認識するタンパク質ユニットを様々な場所に挿入した株を作成し、これらの枯草菌の化学修飾塩基の認識性を調べたが、化学修飾DNAと天然型のDNAも同程度取り込むものしか得られず、化学修飾DNAを選択的に枯草菌が取り込んでいる証拠を研究期間内に得られなかった。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of increasing transformation efficiency of *Bacillus subtilis* for long DNA, we tried to develop a new transformation system that uses chemically modified DNA. We constructed and tested *B. subtilis* strains that are inserted protein unit that recognizes chemically modified DNA into genes responsible for natural transformation. The resulted strains, however, showed same transformation efficiency for chemically modified DNA with that for natural DNA. Thus we couldn't get evidence that indicates our developed strains are able to specifically incorporate chemically modified DNA within this study period.

研究分野：ゲノムデザイン

キーワード：化学修飾DNA 枯草菌 形質転換

1. 研究開始当初の背景

枯草菌は、培養条件により能動的に DNA を形質転換することが可能なコンピテントセルに分化する。枯草菌コンピテントセル表面に出現した DNA 結合タンパク質がランダムに二本鎖 DNA を捕捉の後切断し、その切断点より一本鎖 DNA を菌体内部に取り込む。その後、細胞内の相同領域に組み込むという過程を経る。この機構による一本鎖 DNA は非常に組換え能に優れているため、大腸菌では困難な長鎖 DNA の相同組換えが可能である。我々は、この能力に注目して世界で初めて 2 つのゲノムを有するバクテリア (枯草菌ゲノム (4,200 kbp) 中にラン藻の全ゲノム (3,500 kbp) をクローニング Itaya, M., Tsuge, K., et al., PNAS, 102, 15971-15976 (2005)) を構築に成功したことを報告した。一方、米国ペンタ研究所はバクテリアゲノムの化学合成 DNA からの再構築に成功するなど、合成生物学の進展により、従来よりも長い (例えば 100 kbp 以上) 長鎖 DNA を高効率で形質転換する系が求められる状況となってきた。

枯草菌のコンピテントセル表面に現れる DNA 結合タンパク質は、配列特異性がない、即ちランダムに結合することが知られており、結果として基質 DNA はランダムな場所で切断される。基質 DNA がゲノム相同領域に相同組換えにより導入されるためには、組み込みたい配列の両末端に例えば 500 bp 以上の十分長い足場 DNA 配列が必要であるが、少なくとも組み込みたい DNA の内部で DNA が切断されると、その DNA はもはや基質 DNA とは成り得ないが、長鎖 DNA になればなるほど内部での切断の危険性が高くなる。これが原因で長鎖 DNA の形質転換は、使用する DNA 量あたりの効率が悪い。そこで、長鎖 DNA のランダムな切断を回避して DNA を末端から取り込むように、DNA 取り込み開始位置の指定を行うことが可能かどうかを検証したいと考えた。この取り込み開始位置の指定のために、化学修飾した基質 DNA を用いることと、これを認識することが可能な枯草菌株を構築することにより、長鎖 DNA の形質転換効率の改善を図ろうとすること試したいと考えた。

本実験が成功すれば、従来困難であった長鎖 DNA の構築に大きな道を開くことになる。申請者は、枯草菌の形質転換系を利用して、現在世界で最も数の多い 50 以上の DNA 断片を指定した順序と向きに一度に連結可能な遺伝子集積法の OGAB 法 (Tsuge, K., et al., Sci. Rep. 5, 10655 (2015)) を開発したが、本技術と組み合わせることにより、バクテリアゲノムレベルの長鎖 DNA を現在よりも簡便に作成可能となることが期待された。

2. 研究の目的

化学修飾した DNA を用いて枯草菌を形質転換することにより、従来困難であった長鎖 DNA

(~100 kb) の形質転換効率の大幅な向上を目的とする。枯草菌の形質転換関連遺伝子を操作して、特定の化学修飾塩基を認識する新規枯草菌株を作成する。これを宿主に用いた能動的 DNA 取り込み機構による形質転換において、基質 DNA の一部に人工的な核酸を導入したものをを用いることで、基質 DNA の細胞内への取り込み開始位置を指定することにより、従来問題であった基質 DNA のランダムな切断を防ぎ、長鎖 DNA の形質転換頻度の向上が可能かどうかを検証する。これにより新規長鎖 DNA 形質転換法を確立する。

3. 研究の方法

化学修飾 DNA の形質転換系の確立を、宿主枯草菌の改変と、化学修飾 DNA の準備という 2 つの方向性から準備した。

まず、宿主の改変については、細胞表面に出現する DNA 取り込み装置タンパク質に、化学修飾残基を結合するタンパク質ドメインを融合した組換え株を構築した。また、あるいは同タンパク質ドメインをトランスポゾン中に導入し、ランダム変異ライブラリー株集団を作製した。

化学修飾 DNA の準備と形質転換については、これらのコンピテントセルに、2 つのゲノム相同組換え用の足場配列間に薬剤耐性遺伝子を挿入し化学修飾した評価用 DNA を形質転換することで、薬剤耐性を獲得した枯草菌を選択し、化学修飾残基の結合ドメインの融合標的となる枯草菌タンパク質を同定する。このタンパク質さらに改良した宿主を構築して、新規形質転換系を確立を目指した。具体的には以下の(1)-(4)に示す方法で行った。

(1) 宿主枯草菌の ComEA タンパク質の改変
DNA 末端に化学修飾をした基質 DNA を特異的に取り込む系の開発を行った。まず、宿主枯草菌の DNA 取り込み装置タンパク質の一つである ComEA に着目した (図 1)。ComEA は、細胞外の裸の二重らせん DNA をランダムに結合することに関与していることが知られているので、この ComEA タンパク質の DNA 結合ドメインを除去し、代わりに単量体アビジンタンパク質を融合した改変 ComEA を有する組換え枯草菌を作製した。この枯草菌に、抗生物質耐性遺伝子を枯草菌ゲノムに形質転換することを目的とした評価用 DNA 断片 (即ち薬剤耐性遺伝子の両末端に、枯草菌ゲノム DNA の相同配列を連結した DNA) を準備した。これを形質転換しても、ComEA の DNA 結合ドメインの欠損により、宿主が DNA を捕捉することができず、形質転換できないため、抗生物質で選択しても何も生えないはずであるので、これを確認した。

(2) 末端をビオチン化した基質 DNA の形質転換

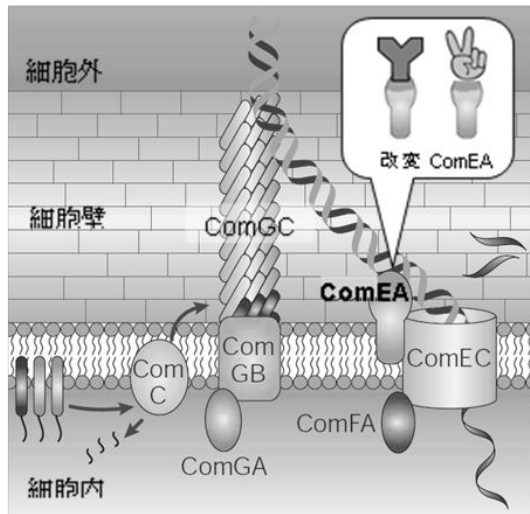


図1 枯草菌のコンピテントセル形質転換装置の概略と ComEA の改変例 (Chen, I., and Dubnau, D. Nature Rev. Microbiol., 2, 241-249 (2004)から転載・改変)

上述の評価用 DNA の末端をビオチン修飾する。これをコンピテントセルに与えることで、改変 ComEA のアビジンドメインにビオチン修飾した DNA が捕捉されることで形質転換が進み、薬剤耐性を持つ形質転換体を得ることが可能かどうかを検証した。DNA 塩基へのビオチン修飾の方法としては、5' 末端 TEG スペース、3' 末端 TEG スペースなど、様々な修飾位置、スペース長さのものを検証した。

(3)他の DNA 取り込み装置タンパク質の改変
DNA 取り込み装置のモデル図(図1)からは、ComEA 以外に、ComEC、ComGC など基質 DNA に近接している可能性があるため、これらのタンパク質についても、単量体アビジンタンパク質を連結した融合タンパク質を構築し、コンピテントセル内で発現させることにより、DNA 取り込みが可能となるかどうかを検証した。

(4)トランスポゾン変異処理によるランダムなアビジンドメイン挿入ライブラリーの構築

枯草菌内タンパク質とアビジンドメインの組み合わせによる新規融合タンパク質がビオチン修飾 DNA の取り込みを効率よく行う可能性を期待して融合タンパク質のランダムライブラリーの構築を行った。単量体アビジンドメインを IS (Insertion Sequence) 間に導入した DNA を準備し、これを枯草菌に導入することでランダムに単量体アビジンドメインが挿入されたライブラリーを構築し、上述のビオチン修飾した評価用 DNA 断片を形質転換して、薬剤耐性を獲得した枯草菌株を取得した。その後、どの遺伝子にトランスポゾンが導入されたのかを調べることで、アビジンドメイン融合の候補タンパク質のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

枯草菌の形質転換系に関わる遺伝子群は、図1に示すように、*comEA*、*comEB*、*comEC* などの *comE* オペロン一群や、*comGA*、*comGB*、*comGC*、*comGD*、*comGE*、*comGF*、*comGG* などの *comG* オペロン一群などの様々な遺伝子が関わっていることが知られている。そのなかで ComEA は、DNA を切断するヌクレアーゼモチーフを有することから、このタンパク質が枯草菌の DNA 取り込みにおいて主要な役割を果たしていると考え、まず、このタンパク質に注目して枯草菌の改変を行うことにした。

まず、枯草菌ゲノム中の野生型の *comEA* 遺伝子を欠損することを目的に、*comEA* 遺伝子を含む 1.2 kb の領域を PCR で増幅し、大腸菌プラスミド DNA にクローニングすることにより *comEA* 遺伝子操作の足場となる DNA を調達した。この DNA 断片には、*comEA* 遺伝子と *comEB* 遺伝子の境界が含まれることから、この境界の遺伝子コード間領域にクロラムフェニコール耐性遺伝子を挿入し、これを用いて枯草菌 RM125 株派生株の BEST7003 株を形質転換することにより、*comEA* 遺伝子の下流にクロラムフェニコール耐性遺伝子を導入した。この薬剤耐性遺伝子の導入により、*comEB* 遺伝子のプロモーター領域が破壊されるが、得られた株は、元の野生株と同程度の形質転換頻度を示し、*comEB* のプロモーター領域の破壊は、形質転換に影響のないことを確認した。

次に、この領域に改変した *comEA* 遺伝子を薬剤マーカーレスに導入するために、先に導入したクロラムフェニコール耐性遺伝子に置換して、CI リプレッサー遺伝子をプラストサイジン S 耐性と連結して導入した。BEST7003 株には、ラムダファージの Pr プロモーターで駆動されるネオマイシン耐性遺伝子が *com* 遺伝子群以外の領域に事前に埋め込まれていて、このネオマイシン耐性遺伝子は、通常の状態ではネオマイシン耐性を示すが、ひとたび菌体内に CI リプレッサー遺伝子が導入されると、CI リプレッサータンパク質が発現すると、ゲノム中の Pr プロモーターに結合することで、ネオマイシン耐性遺伝子の発現を抑制するため、ネオマイシン感受性となる。このように導入された CI リプレッサー遺伝子が、後から導入する遺伝子断片(今回の場合は、*comEA* などの遺伝子群)により置換し、菌体内から消失すると、ネオマイシン耐性遺伝子が発現するようになり、目的遺伝子が導入された株をマーカーレスに選択することが可能となる。このシステムを用いて、ComEA タンパク質遺伝子中のヌクレアーゼ活性化部位を除去する形で、ストレプトアビジンのユニットをタンパク質の読み枠がずれないように連結した ComEA-ストレプトアビジン融合タンパク質を構築し、マーカーレス導入が可能な枯草菌に導入した。得ら

れた ComEA-ストレプトアビジン融合タンパク質遺伝子を持つ枯草菌を形質転換用に培養し、まず、天然型の DNA を用いて形質転換を行ったが、当初の期待通りに全く形質転換体が得られなくなり、ComEA タンパク質の本来の機能である、天然型の二本鎖 DNA を認識し、切断して菌体内に取り込むという能力が失われたことを確認し、標的としている遺伝子が妥当であることを認識した。そこで、次に、この枯草菌に、薬剤耐性遺伝子の両末端に 1 kb のゲノム組み込みのための足場を設けた DNA 断片を、TEG リンカーを介して 5' の位置にピオチンを連結した化学修飾プライマーを用いて PCR により増幅することにより、5' 末端ピオチン化 PCR 産物（化学修飾 DNA）を調達し、これを用いて、この枯草菌の形質転換を行った。しかしながらこの化学修飾 DNA 断片を用いた形質転換では数回実験を繰り返したにも関わらず全く形質転換体が得られなかった。このピオチン化 PCR 産物をもって ComEA を改変していない野生株枯草菌を形質転換すると、天然型の DNA となる通常の PCR 産物をもって形質添加したときの効率と変わらない効率で形質転換体が得られることから、基質 DNA に問題がないことは確認された。また、3' 末端をピオチン化した PCR 産物をもってこの枯草菌を形質転換しても一切形質転換体は得られなかった。

そこで、ストレプトアビジンユニットの ComEA タンパク質での融合場所が適切でない可能性が考えられたため、ストレプトアビジンユニットを ComEA に対してランダムに導入することにした。ComEA の全長を有する前述のプラスミドに、ストレプトアビジン遺伝子と薬剤耐性遺伝子を連結した DNA 断片の両末端にトランスポゾン配列を付加した断片を、ランダムに試験管内で *comEA* 遺伝子内に導入し、トランスポゾンの導入されたプラスミドを大腸菌に導入し薬剤で選択することにより、トランスポゾンが導入されたプラスミドだけを濃縮し、これを用いて前述の *comEA* 操作枯草菌を形質転換することにより、約 100 株の *comEA* 遺伝子内にランダムにストレプトアビジンユニットが挿入された枯草菌ライブラリーを得た。なおこのトランスポゾン挿入では、コード鎖と非コード鎖の区別、及び 3 つ可能な読み枠の区別をせず挿入されるため、確率的には *comEA* 遺伝子とストレプトアビジン遺伝子が有効な融合タンパク質となる可能性は、出現した形質転換体の 1 / 6 程度しか期待できないが、ここではそれを区別せず、得られた約 100 株全てを混合し、枯草菌形質転換用培地で培養し、前述のピオチン化 PCR 産物の形質転換を行った。形質転換能を示すクローンが 10 個程度出現したが、これらの全てが天然型 DNA でも同様の形質転換効率を示したため、ピオチンとストレプトアビジンの結合の関係性により形質転換されているわけではないと考えられた。

そこで、ComEA を改変標的することをあき

らめて、次に *comG* 遺伝子群（図 1）を改変標的とした。特に ComGG や ComGC タンパク質は枯草菌の細胞表面で一番早く基質 DNA に触れている可能性が高いことから、この部分にストレプトアビジンユニットが挿入されれば、外部に露出したストレプトアビジンユニットによりピオチン化 DNA が補足され、枯草菌に選択的に形質転換されることが期待された。

comEA と同様に、*comGA-GG* までの約 4 kb の領域および上流と下流 1kb を含む 6 kb の領域を PCR で増幅し、大腸菌プラスミド DNA にクローニングした。このプラスミドに前述の Tn5 によるランダムなトランスポゾン挿入を試験管内で行い、大腸菌で薬剤選択することにより、ストレプトアビジンユニットが *comGA-GG* のオペロン内のどこかに挿入されたプラスミドをもつ大腸菌を 16,000 株程度得て、この集団から得られたプラスミドを枯草菌野生株に導入することにより、*comGA-GG* オペロン内のどこかにストレプトアビジンユニットが挿入された枯草菌形質転換体を 12,000 株程度得た。なおこの株についても、望ましい融合タンパク質遺伝子となるものの割合は、約 1 / 6 である。この 12,000 株を前述通り区別せず混合し形質転換用培地に植菌し、末端がピオチン化された PCR 産物に替えて、DNA 鎖内のチミン残基の 1 / 4 程度という極めて高い効率でピオチン化されている PCR 断片を形質転換したところ、形質転換可能な株が 20 株ほど得られた。この株に再度異なる種類のピオチン化した薬剤耐性 DNA 断片を形質転換したが、同時に行った天然型 PCR 産物と同程度の形質転換効率しか得られず、化学修飾 DNA が選択的に取り込まれている証拠は得られなかった。

使用しているストレプトアビジンは、本来 4 量体でピオチンを認識するが、ここでは単量体でもある程度ピオチンと結合することが知られている遺伝子を用いたが、形質転換に必要な結合力が得られていない可能性が考えられた。そこで、ストレプトアビジンに替えて特定の配列を認識をするリプレッサータンパク質を *comEA* 遺伝子内に提示させ、リプレッサー認識配列を利用して形質転換される可能性について検証した。具体的には、CI リプレッサーを提示し、Pr プロモーターを持つ DNA が選択的に形質転換されるかどうかを検証したが、一切形質転換体が得られなかった。

これらの結果から当初期待していた化学修飾 DNA を形質転換に利用することは研究期間内に実現することはできなかった。枯草菌の形質転換メカニズムはまだ謎が多いため、今後これらの解明により、有効な手法が見出され、化学修飾 DNA により長鎖 DNA が効率よく形質転換されることが実現されることを期待したい。

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

柘植 謙爾、板谷 光泰、ゲノム再編集のための遺伝子クラスター単位の構築、生物と化学、査読なし、54巻、2016、740-746
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.54.740

〔学会発表〕(計 3件)

柘植 謙爾、OGAB法による遺伝子集積の自動化、2017年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、2017

柘植 謙爾、デザイン生命工学 異種細胞間・異種階層間のコミュニケーションのデザインを目指して、ConBio2017、2017

高橋 俊介、柘植 謙爾、近藤 昭彦、第二世代 OGAB法に適した、新規二本鎖 DNA 調達方法の開発、ConBio2017、2017

〔図書〕(計 1件)

柘植 謙爾、高橋 俊介、近藤 昭彦、2 OGAB法による長鎖 DNA 合成技術、シーエムシー出版、2018 (印刷中)

〔その他〕

ホームページ等

http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/research_inv.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柘植 謙爾 (TSUGE, Kenji)
神戸大学・大学院科学技術イノベーション研究科・特命准教授
研究者番号: 70399690

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし