

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06196

研究課題名(和文) ゲノム合成の基盤技術を自然界でのDNA水平伝播現象をもとに構築する

研究課題名(英文) Novel generic technology for genome synthesis derived from Horizontal gene transfer in nature

研究代表者

金子 真也 (KANEKO, Shinya)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：10399694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：物理的なダメージを受けやすいサイズの大きなDNAを効率良く細胞中で合成する方法として、枯草菌を用いたプロトプラスト法による形質転換で、一度に複数のコンティグDNA断片を細胞中で連結する手法を考案した。また供与菌宿主として枯草菌を溶菌させ、溶菌液を用いて抽出・精製操作を経ずに大腸菌、出芽酵母へ導入する方法も開発できた。さらに接合伝達法についても大腸菌から真核細胞の酵母へ簡便に長鎖DNAを導入できることが実証され、自然界におけるDNAの水平伝播の原理を応用したゲノム合成法の基盤技術を開発することができた。しかし動物培養細胞への導入については未だ成功しておらず、さらなる条件検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の設計図であるゲノム配列を簡単に解読できる時代に突入した。次の段階としてゲノム(長鎖DNA)を設計・合成し、細胞導入する研究が世界各国で進行している。しかしあまり認識されていないが、DNAは長くなればそれだけ物理的な衝撃に弱く扱いが難しくなる。本研究の成果は簡便に「長鎖DNAを合成する」だけでなく、合成後の「長鎖DNAを如何に目的の宿主に導入するか」を解決する上で重要な基盤技術を提供する。

研究成果の概要(英文)：Handling of DNA fragments comprising over several dozens of kb is difficult, because of their fragility when they are in solution. To avoid physical shearing in vitro, assembly of contig DNA fragments have been accomplished within *Bacillus subtilis* cell using one step protoplast transformation method. Moreover, to avoid physical shearing in the purification step, we demonstrated that large DNA plasmid over 50 kb in size can be introduced into *Escherichia coli*, or *Saccharomyces cerevisiae* using the lysate of donor *B. subtilis* cells. Conjugation protocol has also been established for transfer of large-sized DNA from *E. coli* to eukaryotic microorganisms (*S. cerevisiae*). Although transfer to animal culture cell remains, our designed horizontal transfer methods is a versatile procedure for delivery of large-sized DNAs into prokaryotic and eukaryotic microorganisms, which would be a basic platform in the synthetic genome area.

研究分野：応用ゲノム工学

キーワード：ゲノム合成 コンティグDNA 枯草菌 応用微生物 形質転換 核酸 ゲノム バイオテクノロジー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーの登場で塩基配列の解読は目覚ましい進歩を遂げ、生物の設計図であるゲノム配列は簡単に解読し解析できる時代に突入した。しかし設計図として書かれていることを完全に理解するには、ゲノム自体を独自に設計し合成する(書く;Write)作業が必要である。このコンセプトの下、2016年、ゲノム合成国際コンソーシアム(Genome Project-Write; GP-Write)が発足し、ゲノム(長鎖DNA)の合成及び細胞導入の研究が世界各国で開始された(Jef D et al., *Science* 353, p.126, 2016)。しかし一般にはあまり認識されていないが、DNAは長くなればそれだけ物理的な衝撃に弱く扱いが難しくなる。例えば100 kbを超えるサイズのDNAは溶液中でのピペッティング操作で簡単にダメージ(シエアリング)を受けてしまい、*in vitro*の操作に適さない。そこで大腸菌や酵母、枯草菌などの特殊なベクターを用いて合成する手法が提案されているが、合成後のサイズの大きなDNAをどのように目的の宿主(例えば動物培養細胞など)へ導入するかの手段についての議論はあまりされていない。如何に簡便に「長鎖DNAを合成するか」のみならず、合成後の「長鎖DNAを如何に目的の宿主に導入するか」はゲノム合成研究を推進する上で必要不可欠なテーマである。

私はこれまでに自然界でのDNA水平伝播に習って、抽出・精製操作を伴わないDNAの細胞導入(形質転換)技術の開発を行ってきた。自然界のDNA水平伝播では一般的にファージによる「形質導入」、Type IVチャネルと呼ばれる膜タンパク質を介した「接合伝達」、そして細胞外核酸による「自然形質転換」の三つの形態に大別される。特に「自然形質転換」ではドナーとなる供与菌の生死にかかわらず、DNAの安定性に依存した幅広い遺伝情報のやり取りが知られている(Lorenz & Wackernagel. *Microbiol. Rev.* 58, p.563, 1994)。これまでの研究で大腸菌を溶菌させることで培養液中に放出されたプラスミドDNAが、ある条件下で分解されず構造的に安定であることを見出し、溶菌液を直接用いる形質転換法を開発した(図1)。「溶菌法」(Cell Lysis Technology to provide transformable Extra-cellular DNA; CELyTED)と名付けたこの操作法では、100 kbを超える環状DNA(BAC; Bacterial artificial chromosome クローン)も精製せずに大腸菌から枯草菌へ導入(枯草菌の自然形質転換)できることを実証済みである(Kaneko; *J. Biochem.* 2010, *Nucleic Acids Research* 2010)。さらに「溶菌法」の形質転換対象宿主として枯草菌、高度好熱菌、シアノバクテリアだけでなく、「自然形質転換能」のない大腸菌や真核微生物である出芽酵母においても通常の形質転換法(塩化カルシウム法/大腸菌、酢酸リチウム法/出芽酵母)に対応できる条件を既に確立している(特願2015-78489)(図2)。そこで本研究では、自然界での水平伝播に習って、抽出・精製操作を伴わないゲノム(長鎖DNA)操作技術の汎用的な開発を実施する。

2. 研究の目的

本研究では、物理的なダメージを受けやすいサイズの大きなDNAを効率よく構築する方法と、DNAの抽出・精製操作を伴わない他の宿主(動物培養細胞など)へ導入法に焦点を当て、自然界におけるDNAの水平伝播の原理を応用したゲノム合成の基盤技術の開発を目的とする。DNAは長大なポリマーであるためサイズが大きくなるほど溶液中や精製過程での物理的なダメージを受けやすい。そこで図3に示したように微生物細

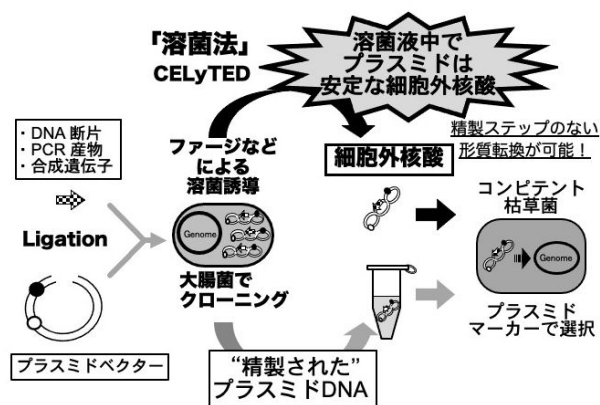


図1 水平伝播を利用した「溶菌法」の概要

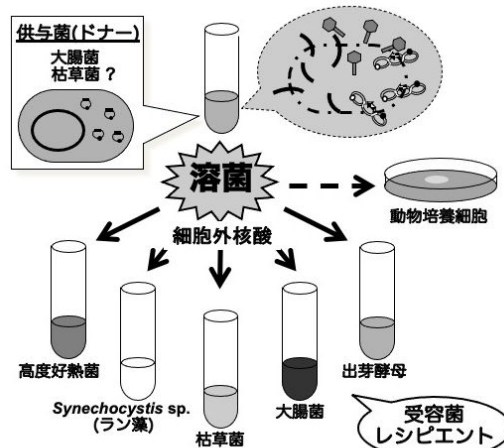


図2 目的宿主へのDNA導入; DNA精製不要

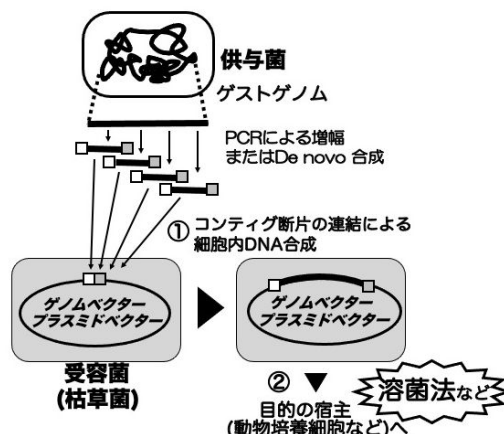


図3 水平伝播を利用したゲノム合成技術

胞中での効率的なゲノム(長鎖 DNA)合成法と 合成したゲノム(長鎖 DNA)を目的の他の宿主細胞(動物培養細胞など)へ迅速に導入する方法の開発を目指す。長鎖 DNA 合成に用いる微生物として、本研究では枯草菌に着目する。枯草菌はこれまでにシアノバクテリアゲノム 3.6 Mb の合成にも成功しており実績がある。以前は短い DNA 断片を順次形質転換で導入する方法であったが、本研究では一度に長鎖 DNA を構築できる方法の開発を目指す。では、まず枯草菌を供与菌として他の宿主に導入する方法の開発を実施する。手段として DNA のドナーとなる枯草菌を溶菌させ、溶菌液を直接用いて形質転換(DNA 導入)を行う「溶菌法」にまず着目する。「溶菌法」は宿主特異域が非常に広く、操作が単純で汎用性が広いことから、大きなサイズの DNA を扱う上での汎用的な操作法であり、これからのゲノム合成操作の基盤技術になると期待される。またその他の方法として「接合伝達法」にも着目する。広域宿主への「接合伝達」は、今のところ大腸菌やアグロバクテリウムなどで知られている。本研究では大腸菌の RP4 系の接合伝達に着目した水平伝播実験系の確立を目指す。

3. 研究の方法

微生物細胞中での効率的なゲノム(長鎖 DNA)合成法

(枯草菌で複数の DNA コンティグ断片を効率よく連結させる技術の開発)

これまで枯草菌の細胞中で長鎖 DNA を構築するには、相同領域を含むコンティグ DNA を精製し、1回1回順番に形質転換を行いながら導入する方法であった。そのため時間と労力が多分にかかる作業となっていた。本研究では複数のコンティグ DNA 領域を一度に枯草菌に導入して相同組み換えにより一気に連結させ、DNA 合成を行う操作法を開発する。まずはサイズも小さく、少数のコンティグ DNA 断片を用いて条件検討を行い、その後サイズと断片数を増やして、どれくらいのサイズを一度に構築できるか検討する。コンティグ DNA 断片としては、ヒトゲノム由来のガン関連遺伝子 MYC などのゲノム領域をオーバーラップするように分断して PCR で増幅した配列や、検出しやすい GFP を有するプラスミド DNA(図4)などを用いる。形質転換法の条件検討を行ない、迅速なゲノム合成手段を確立する。

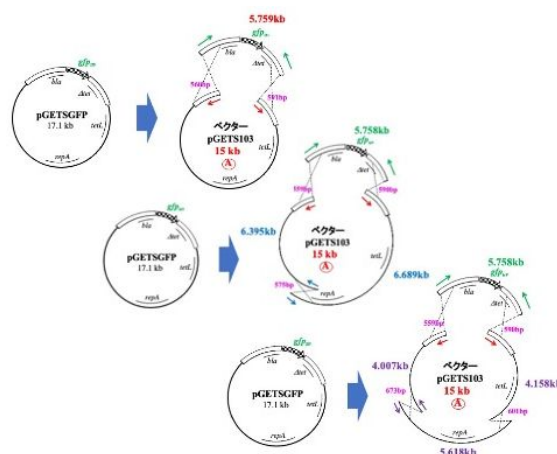


図4 分断したプラスミド断片の集積

合成したゲノム(長鎖 DNA)を目的の他の宿主細胞(動物培養細胞など)へ迅速に導入する方法の開発

枯草菌などで構築したゲノム(長鎖 DNA)を速やかに目的の宿主へ導入する方法を開発する。まずは精製ステップがない「溶菌法」に着目して他の宿主への導入実験を行う。既に大腸菌を供与菌(ドナー)宿主として枯草菌や真核微生物の出芽酵母へ「溶菌法」で DNA を導入する技術は確立されており、その条件を参考に枯草菌を供与菌(ドナー)として活用できるか条件検討する。酵母などへの導入条件を加味して動物培養細胞にも導入できるか検討する。さらに「溶菌法」以外の方法として「接合伝達法」が適用できるか検討する。

4. 研究成果

微生物細胞中での効率的なゲノム(長鎖 DNA)合成法

(枯草菌で複数の DNA コンティグ断片を効率よく連結させる技術の開発)

両端がオーバーラップする DNA 断片を、枯草菌の自然形質転換能を利用して相同組換えによって枯草菌ゲノム中に順次、導入して順番に連結させる手法は既に確立されている。本研究では DNA 断片を一度の形質転換で枯草菌細胞中に導入し枯草菌プラスミドとして構築できるか検討した。対象として、まずガン関連遺伝子 MYC のゲノム領域を両端が 500 bp~700 bp 重複するように PCR で増幅し、5 つに分割したコンティグ DNA 断片(2 kb~4 kb)を使用して形質転換を行なった。両端の領域は枯草菌プラスミド(枯草菌-大腸菌シャトルプラスミド)ベクターと 500 bp~700 bp 重複するように設計されている。枯草菌プラスミドも直鎖状にして形質転換に用いるため、5 つのコンティグ DNA 断片とベクター(計 6 断片)が連結されないと枯草菌のコロニーは形成されない。用いた枯草菌は代表的な 168TrpC2 株の誘導株で制限修飾系の遺伝子群が欠損した RM125 株である。自然形質転換法によって導入及び集積を複数回試みたが、コロニーは得られなかった。原因として、枯草菌細胞表面にある DNA を取り込む装置(チャンネルタンパク質)が 30 個程度なため、ベクター込みで 6 つの DNA を同時に端から取り込む確率が非常に低くなるからではないかと考えられた。そこで別の形質転換法を検討した。枯草菌の場合、エレクトロポレーションでは条件検討が難しいため、本研究ではプロトプラスト法による DNA 導入法に着目した。プロトプラスト法は、リゾチームによって枯草菌の細胞壁を分解し、ポリエチレングリコール(PEG)を用いて DNA 断片全体を物理的に細胞内へ導入する方法であり、自然形質転換法より多くの DNA 断片を端から端まで細胞中に導入できると予想される。しかし細胞壁をなく

してしまうため、細胞が破裂もしくは収縮しないように等張液中で穏やかに操作し、DNA 導入後には細胞壁の再生操作を行う必要がある。枯草菌でのプロトプラスト法は、現在の自然形質転換法が確立される以前に行なわれた方法であるため、本研究では文献を調べてまずプロトプラスト法の条件検討から開始した。GFP を有する大腸菌-枯草菌シャトルプラスミド(pGETSGFP; 17 kb)(図 4)を用い、リゾチームや等張液の濃度、再生条件の検討を行い、プロトプラスト法による DNA 導入法を確立することができた。続いて同プラスミドを 500 bp ほどオーバーラップするように 2 分割して PCR で増幅した DNA 断片(図 4)を用いてプロトプラスト法による DNA 導入を行なったが、コロニーは得られなかった。原因としてプロトプラスト法では DNA が導入された後、相同組換えに必要な RecA と呼ばれるタンパク質の発現誘導が起こらないため効率が悪いのではないかと考えられた。そこで枯草菌の自然形質転換用のコンピテントセルをそのままプロトプラスト化する方法を検討した。枯草菌は通常培養下では相同組み換えに必要な RecA 酵素がほとんど発現していないが、自然形質転換のコンピテントセル作成用の貧栄養培地では RecA が誘導発現されることが知られており、上記プラスミド(pGETSGFP)を用いて培養時間や再生培地の条件などを再検討した。得られた条件の下、改めて pGETSGFP プラスミドを 2 断片に分割した PCR 増幅断片を用いてプロトプラスト形質転換を行ったところ、これら 2 断片が繋がったプラスミドを保持する薬剤耐性コロニーが得られ、UV 照射下で緑に光る蛍光が確認できた(図 5)。これはコンティグ DNA 断片が枯草菌細胞中で連結できることを示すものであり、目標達成のための重要な一歩である。続いて同プラスミドを、図 4 のように 2~4 断片に分割して PCR で増幅し、これらの DNA 断片を同時にプロトプラスト法で枯草菌へ導入して連結できるか確認した。その結果、4 断片でも連結してプラスミド化することが確認できたが断片数が増えるに従い効率が低下し、5 断片以上の連結は難しいと考えられた(図 5)。そこでさらに RecA 遺伝子の発現量を増加させ、相同組み換えの効率を上げるため、誘導型の pX プロモーターの活用を試みた。pX プロモーターは枯草菌で実績のある誘導型プロモーター配列であり、培地にキシロースを添加することで発現が誘導され、キシロース非存在下ではほぼ発現されないため、想定外の組み換えも抑制できると期待される。枯草菌ゲノム上の RecA 遺伝子の上流に pX プロモーターを挿入し RecA 誘導型枯草菌株を構築し、上記 4 断片での連結実験を行った。その結果、期待通り効率の上昇が確認できた。本研究での成果は枯草菌で複数の DNA 断片を効率よく連結させるために重要なツールになると期待される。

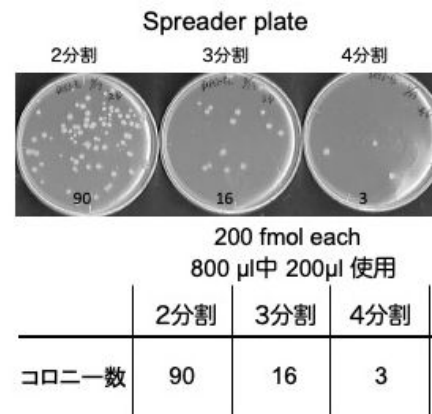


図5 枯草菌中でのDNA連結(集積)

合成したゲノム(長鎖 DNA)を目的の他の宿主細胞(動物培養細胞など)へ迅速に導入する方法の開発

これまでの実験で大腸菌を供与細胞として、枯草菌、高度好熱菌、シアノバクテリア、出芽酵母へ DNA を精製せずに導入できることを実証してきた。本研究では、枯草菌を宿主として他の宿主にサイズの大きな DNA を導入できるか、最終的に動物培養細胞へも導入できるか検討した。枯草菌は液体培地でしんとう培養後、静置すると自己溶菌することが知られている。そこでまず枯草菌の溶菌液を直接形質転換に用いることができないか検討した。受容菌として大腸菌と出芽酵母を用い、大腸菌-枯草菌-出芽酵母で複製可能なシャトルプラスミドが精製せずに枯草菌からそれぞれの形質転換法(大腸菌; 塩化カルシウム法、出芽酵母; 酢酸リチウム法)で導入できるか検討した。結果として大腸菌、出芽酵母のコロニーを得ることができ、シャトルプラスミドを精製せずに大腸菌や出芽酵母へ導入できることが実証された。続いてラムダファージの DNA の部分断片を持つシャトルプラスミドを用いて同様の実験を行なった結果、50 kb 以上のプラスミドでも適用できることが確認できた(図 6、7)。これを受けて枯草菌から動物培養細胞への導入法についても検討した。枯草菌は大腸菌と違ってエンドトキシンが生産されないため、溶菌液中からエンドトキシンを除去する必要はない。まず通常の培養細胞導入法によって構築した DNA 領域を実際にヒト培養細胞ゲノムに相同組換えで導入し、セレクションできることを GFP の発現や PCR などによって確認でき、培養細胞導入法の系を立ち上げた。その後溶菌法による枯草菌からの導入実験を行う上で条件検討を行なったが、現在の

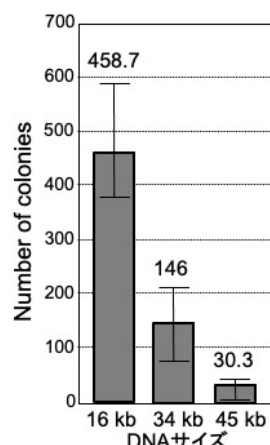


図6 枯草菌→大腸菌

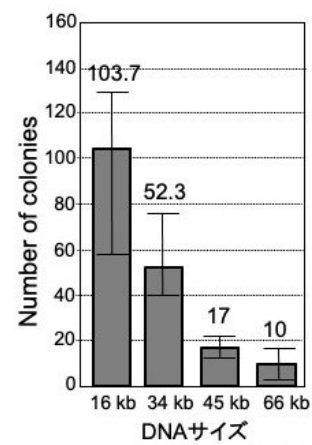


図7 枯草菌→出芽酵母

ところ枯草菌からの DNA が導入されたと思われる細胞を検出するには至っていない。

続いて「溶菌法」以外の方法として「接合伝達法」の導入も検討した。これまでの研究で広域宿主に接合伝達可能なシステムとしてはアグロバクテリウムの Ti プラスミドや大腸菌の RP4 系のシステムが知られている。本研究では病原性と関わりのない大腸菌の RP4 系の接合伝達に着目した。大腸菌をドナー宿主とする RP4 系の接合伝達プラスミド(ヘルパープラスミド)として pUB307 を用いて、真核細胞への接合伝達が可能か調べるため、出芽酵母の複製起点やゲノム相同領域を導入したプラスミドの構築を行った。約 55kb の環状プラスミドとしてサイズが非常に大きいため、プラスミド構築に苦戦したものの、構築できたプラスミドを用いて接合伝達の条件検討を行い、大腸菌から真核細胞である出芽酵母への長鎖 DNA 導入が可能であることが確認できた。さらに接合伝達プラスミド(ヘルパープラスミド)を用いた方法のみならず、接合伝達起点である *oriT* 配列のみを用いた小型のモバイルプラスミドによる細胞導入法についても検討した。50kb 以上とサイズの大きい接合伝達プラスミド(ヘルパープラスミド)を用いるより、サイズが小さく加工しやすいモバイルプラスミドを用いた方が手軽に導入用の DNA が構築可能となるはずである。*oriT* 周辺領域を長さを変えて接合伝達能(コロニー数)を解析した結果、接合伝達に必要で最適な *oriT* 配列を見い出すことができた。これによって目的の DNA のみを持つ小型モバイルプラスミドも酵母へ導入できる条件が判明した。この結果を下に動物培養細胞への接合伝達実験も実施したが、「溶菌法」同様に今のところ導入できた細胞は得られていない。この場合、大腸菌なのでエンドトキシンが影響しているのか、セクションに問題があるのか、さらに効率(条件)に問題があるのか、改めてストラテジーを練り直す必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 金子真也	4. 巻 46
2. 論文標題 ゲノム合成の基盤技術を自然界でのDNA水平伝播現象をもとに構築する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 51,54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 金子真也	4. 巻 36
2. 論文標題 ゲノムを創り、細胞に導入する；ゲノム合成技術の新展開	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 98,102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------