

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19193

研究課題名(和文)長鎖DNAのin vitroクローニングを可能にする高機能大腸菌宿主株の作成

研究課題名(英文)Improvement in a E. coli host cell for DNA cloning of long DNA fragments.

研究代表者

仁木 宏典(NIKI, Hironori)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・教授

研究者番号：70208122

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文): in vivoクローニング(iVEC)法では相同配列を持ったベクターDNAとクローン化DNAを大腸菌変異株に形質転換するだけで、目的の組換え体クローンが得られる。この技術は、簡便なシームレスクローニングである。in vivoクローニングの分子メカニズムの遺伝学的な解明を行い、さらに、この活性を向上させるため高形質転換効率の大腸菌株の開発を目指した。高形質転換効率に関連する遺伝子の探索では形質転換に関わる遺伝子を見出した。形質転換効率を向上させる変異の遺伝子の候補としてrpoZ遺伝子を見出し、この遺伝子によりその発現制御を受けている遺伝子群が形質転換に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

in vivoクローニング(iVEC)法の分子メカニズムの遺伝学的な解明を行った。in vivoクローニングの分子メカニズムには3'-5'エンドヌクレアーゼXthAが必須であった。XthAはDNAの3'末端から二本鎖DNAを一本鎖DNAが露出し、相同な一本鎖DNA同士がアニーリングをさせる活性であることを明らかにした。これを元により高効率な方法への改善が期待され、形質転換の向上を同時に進めることでさらなる組換えDNA技術の発展が見込まれる。

研究成果の概要(英文): In the in vivo cloning (iVEC) method, a recombinant clone can be obtained simply by transforming the vector DNA and the cloned DNA, which are PCR products with homologous sequences, into an Escherichia coli cell. This technique has the advantage that seamless cloning can be performed inexpensively and quickly. We conducted a genetic elucidation of the molecular mechanism of the in vivo cloning and aimed to develop an Escherichia coli strain with high transformation efficiency to improve this activity. In the search for genes related to high transformation efficiency, genes involved in transformation were found. We found the rpoZ gene as a candidate gene that improves transformation efficiency. The rpoZ gene regulates gene groups whose expression is involved in transformation efficiency.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：形質転換体 クローニング オメガ因子 RNAポリメラーゼ iVEC

1. 研究開始当初の背景

大腸菌が Ca^{2+} に依存してファージ DNA を取り込むようになることは、1970 年に報告されている (Mandel and Higa, *J. Mol. Biol.* 1970)。その後、 CaCl_2 溶液で処理した大腸菌のプラスミド DNA による形質転換法 (カルシウム法) が Cohen らによって確立されて以降 (Cohen *et al.* *PNAS* 1972)、大腸菌を用いた形質転換は遺伝子のプラスミドへのクローニング等の目的で、世界中で広く日常的に使われるようになり現在に至っている。この方法は、大腸菌をまず冷却した CaCl_2 などの塩溶液で処理しプラスミド DNA を加えた後にヒートショック処理を施し、プラスミド DNA を取り込ませるというものである。この形質転換の原理として、 Ca^{2+} の正の電荷により、DNA と大腸菌外膜の表面に存在するリポ多糖の双方の負の電荷を打ち消し、外膜表面と DNA の親和性が高め、続くヒートショックによる膜の流動性の変化により DNA を細胞内に取り込むという説明がなされている。事実、 Ca^{2+} 存在下でリポ多糖と DNA が相互作用すると報告されている (Panja *et al.* *Biomacromolecules* 2008)。しかし、その一方でヒートショックを必要としない形質転換方法も報告されており (Chung *et al.* *PNAS* 1989)、膜の流動性の変化だけでは細胞内への DNA 取り込みのメカニズムを完全には説明できない。エレクトロポレーションのような物理的に細胞膜に穴を開ける方法であれば、その穴から DNA が取り込まれると容易に説明できる。しかし、カルシウム法等のケミカルでの形質転換において、例えば、5kb のプラスミドであれば分子量は 330 万にも及ぶが、このような巨大分子がどのように細胞内に取り込まれるのかを説明するのは困難である。

枯草菌等の一部のバクテリアでは、積極的に DNA を取り込む分子装置の存在が知られており、この装置によって DNA が細胞内に取り込まれる (Maier *et al.* *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004)。大腸菌にもこのような DNA 取り込み装置のホモログが存在しているが、このホモログは形質転換に関与していない (Sun *et al.* *J. Bacteriol.* 2009)。

では、一体どのようにして大腸菌は分子量が数百万にも及ぶプラスミド DNA のような巨大分子を外膜、ペプチドグリカン層、そして内膜を通過させて細胞内に取り込むのであろうか？ 細胞内への DNA の取り込みを積極的に促すような因子は存在するのか？ 逆に DNA の取り込みを阻害するような因子はあるのか？ DNA は細胞のどの部分から取り込まれるのか？ これらは長らく未解明のままである。

2. 研究の目的

大腸菌における形質転換のメカニズムを解明することを目的としているが、その成果を元に形質転換効率の向上した高性能の組換え DNA 用宿主大腸菌株の開発が可能になると期待できる。これにより生命科学分野のみならず、大腸菌を用いた物質生産をめざす応用工学や農学等の異分野の研究者でも、より簡単に DNA を扱う研究が可能となることが期待される。現在の大腸菌宿主では取り込み可能な DNA の長さに限界があり、この制限を克服できれば、合成生物学などで取り組まれている巨大ゲノムの作製の研究分野に貢献できる。

3 . 研究の方法

大腸菌の網羅的遺伝子欠失株ライブラリーである Keio コレクションを用いた大規模なスクリーニング実験により形質転換効率に顕著な影響を与える変異株を見出し、さらに形質転換のどのステップに影響しているか調べ、DNA の取り込みに直接影響する遺伝子について、その DNA の取り込み過程での機能を明らかにする。また、逆に形質転換効率が顕著に上昇するような欠失株も得られている。これらの遺伝子の組み合わせで、形質転換効率を向上させることができるか調べる。そのため、新たに DNA の取り込みを細胞学的に検出するシステムを構築する。

4 . 研究成果

in vivo クローニングの分子メカニズムとしては、従来言われていた RecA, RecET 依存の組換え反応ではなく、3'-5'エンドヌクレアーゼ XthA があった。XthA は DNA の 3'末端から二本鎖 DNA を一本鎖 DNA が露出し、相同な一本鎖 DNA 同士がアニーリングをさせる活性であることを明らかにした。さらに、この活性を向上させるため高形質転換効率の大腸菌株の開発を目指した。大腸菌の網羅的遺伝子破壊変異ライブラリーを使い、高形質転換効率に関連する遺伝子の探索を行った。その結果、まず形質転換効率の低下した遺伝子の中にリポ多糖合成 に関するものが複数見出され、細胞膜表面のリポ多糖が DNA 取り込み効率に関係していることが明らかになった。おそらく、細胞表面に DNA を吸着させる活性に関与している。他方、形質転換 効率を向上させる変異の遺伝子の候補として rpoZ 遺伝子を見出した。rpoZ 遺伝子は RNA ポリメラーゼの構成因子であり、多くの遺伝子はその発現制御を受けている。したがって、RNA ポリメラーゼの制御下にある遺伝子の中に形質転換効率に影響するものがあることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nozaki Shingo, Niki Hironori	4. 巻 201
2. 論文標題 Exonuclease III (XthA) Enforces In Vivo DNA Cloning of Escherichia coli To Create Cohesive Ends	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00660-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Niki, Hironori
2. 発表標題 Exonuclease III promotes in vivo DNA cloning of Escherichia coli due to production of cohesive ends
3. 学会等名 DNA Transactions and Physical and Molecular Biology of Chromosomes Workshop 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 インビボクローニング可能な細胞株をスクリーニングするための方法、インビボクローニング可能な細胞株の製造方法、細胞株、インビボクローニング方法、及びインビボクローニングを行うためのキット	発明者 仁木宏典、野崎晋五	権利者 情報・システム研究機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-087164	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------