

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05782

研究課題名(和文)大腸菌の形質転換におけるDNA取り込みメカニズムの解明

研究課題名(英文)DNA uptake mechanism of E. coli transformation

研究代表者

野崎 晋五 (Nozaki, Shingo)

立教大学・理学部・助教

研究者番号：70725481

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)：大腸菌の形質転換に関わる因子の探索を行い、envZ遺伝子の欠失により形質転換効率が上昇することを見出した。このenvZ遺伝子の欠失による形質転換効率の上昇は、外膜タンパク質の一つであるOmpAの発現量の上昇によるものであった。OmpAが形質転換において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、簡便な形質転換法の開発を試みた結果、微量試験管中のわずか0.05 mLの培養液からコンピテントセルが作製であることを見出した。このような少量の培養液からコンピテントセル作製ができるようになることで、より簡便に形質転換を行えるようになることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸菌の形質転換はDNA組換え技術において最も基本的な操作の一つである。その機構が解明されることで、形質転換効率がより向上した高性能で使い勝手の良い宿主大腸菌株や新たな形質転換法を生み出す基盤となる。また、DNAのような巨大分子の取り込み機構の解明は、細胞膜を透過しづらい抗菌剤を細胞内に浸透させるための大きな手がかりとなる。これは、多剤耐性菌が社会的な問題となっている現代において、抗菌剤を有効に活用する新たな手段の開発にもつながるものである。

研究成果の概要(英文)：Factors involved in E. coli transformation were screened and deletion of envZ gene was found to increase transformation efficiency. This increase was due to the increase in expression level of OmpA, one of the outer membrane proteins. It became clear that OmpA plays an important role in transformation. In addition, as a result of challenge to develop a simple transformation method, it was found that competent cells were prepared from 0.05 mL culture in a micro test tube. It is expected that transformation can be performed more easily by being able to prepare competent cells from such a small amount of E. coli culture.

研究分野：応用微生物学

キーワード：大腸菌 形質転換 トランスフォーメーション コンピテントセル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸菌が  $\text{Ca}^{2+}$  に依存してファージの精製 DNA を取り込むようになることは、1970 年に報告されている。その後、 $\text{CaCl}_2$  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た。それ以降、大腸菌を用いた形質転換法は DNA のクローニング等の目的で世界中で日常的に使われるようになった。

化学処理方法による形質転換では、大腸菌を冷却した  $\text{CaCl}_2$  等の塩溶液で処理し、これに DNA を加えた後に熱ショック処理を施し、DNA を取り込ませる。この形質転換の原理として、 $\text{Ca}^{2+}$  の正の電荷により、DNA 及び外膜の表面に存在するリポ多糖の負の電荷が打ち消されることで、DNA と外膜表面との間の親和性が高まり、続く熱ショックにより膜の流動性が変化して DNA が細胞内に取り込まれるという説明がなされている。事実、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下でリポ多糖と DNA が相互作用することは報告されている (Panja *et al.* Biomacromolecules 2008)。一方で、熱ショックを必要としない形質転換方法も報告されている (Chung *et al.* PNAS 1989)。従って、膜の流動性の変化だけでは DNA 取り込み機構を説明できない。

また、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いる。ただし、この装置により細胞内に取り込まれるのは線状一本鎖 DNA であり、二本鎖 DNA は取り込まれない (Maier *et al.* Nat. Struct. Mol. Biol. 2004)。また、大腸菌のゲノムにも枯草菌と同様の DNA 取り込み装置遺伝子のホモログが見つかったが、これらの遺伝子は大腸菌の形質転換には関与していない (Sun *et al.* J. Bacteriol. 2009)。従って、プラスミド DNA のような環状二本鎖 DNA の取り込みには、それとは全く別のメカニズムが必要である。そこで大腸菌におけるプラスミド DNA の取り込み機構の解明を目的として本研究に着手した。

### 2. 研究の目的

大腸菌においては、遺伝的バックグラウンドの異なる様々な菌株で形質転換効率が異なる。このことは、大腸菌の持つ遺伝子の中に形質転換に影響を及ぼすものが含まれることを意味する。そこで、本研究においては、まず形質転換効率に影響を及ぼす遺伝子を明らかとし、その機能を明らかにすることにより形質転換の機構を解明することを試みる。そして、遺伝子がどのような機構により形質転換効率に影響するのかを明らかにし、形質転換をより簡便、高効率に行える方法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

これまでの大腸菌における形質転換効率に影響を与える遺伝子群のスクリーニングにより *envZ* 遺伝子の欠失株において形質転換効率が上昇することが明らかとなった。そこで、この *envZ* 遺伝子欠失がどのようにして、形質転換効率に影響するのかの解明を試みた。*EnvZ* は大腸菌において、外膜組成に影響することが報告されていたため、*envZ* 遺伝子の欠失が大腸菌にどのような影響を及ぼしているのかについて、外膜タンパク質の組成に注目して解析を進めた。

本研究では、簡便に形質転換を行うためにポリエチレングリコールとマグネシウムを使用した改変型 TSS 法 (Nozaki and Niki. J. Bacteriol. 2019) を用いて形質転換を行った。さらにこの形質転換法を改善するべく、より小スケールの大腸菌培養液からコンピテントセルの作製が可能であるかについて検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) *envZ* 遺伝子欠失株における外膜タンパク質組成の解析を行った。大腸菌においては、主要な外膜タンパク質として、OmpA, OmpC, OmpF が知られているため、これらの遺伝子の欠失株及び、*ompC ompF ompA* 遺伝子の三重欠失株 ( $\Delta ompCFA$ ) を対照として作製した。*envZ* 欠失株から外膜を回収し、SDS-PAGE により外膜タンパク質組成について解析したところ、OmpA が増加し、OmpC が減少していた (図 1)。また *ompC* 欠失株においても同様に OmpA の増加が見られた (図 1)。

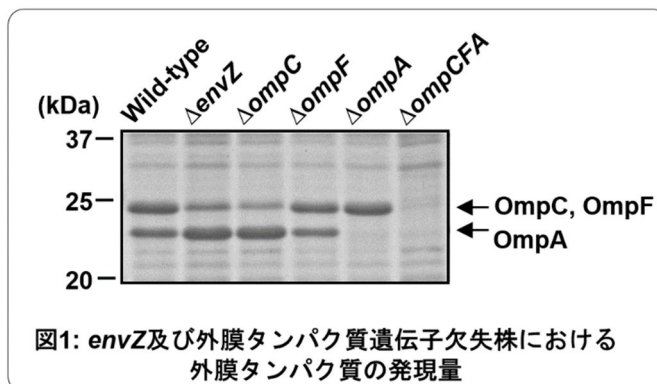
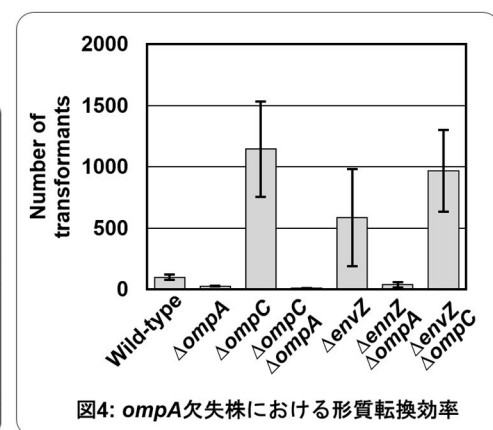
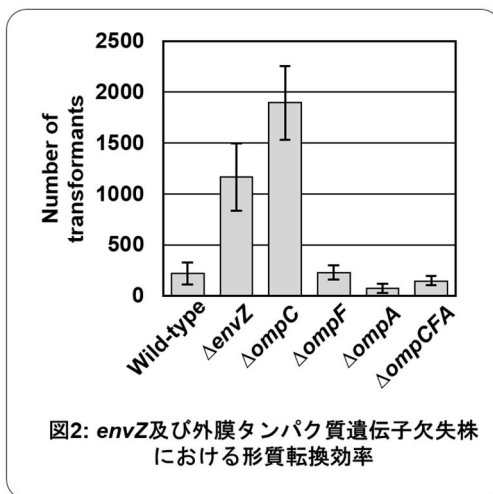
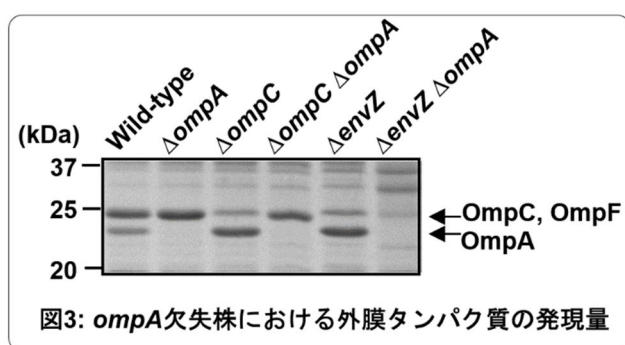


図1: *envZ*及び外膜タンパク質遺伝子欠失株における外膜タンパク質の発現量

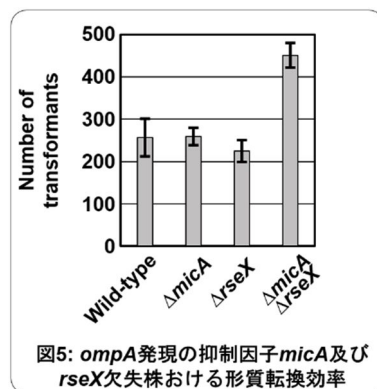
(2) ここで作製した欠失株について、3.4 kb のプラスミドを用いて改変型 TSS 法による形質転換効率を調べた。その結果、*envZ* 欠失株だけでなく、*ompC* 欠失株においても形質転換効率の上

昇が見られた(図2)。一方 *ompF*, *ompA*, *ompCFA* 欠失株では、形質転換効率の上昇は見られなかった。*envZ* 及び *ompC* 欠失株の二つに共通するのは、いずれも OmpA が多く発現していることである。このことから、OmpA の発現量の上昇が形質転換効率を向上させているのではないかと考えた。

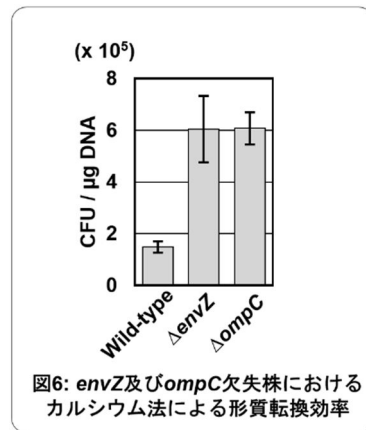
(3) *envZ* 欠失株及び *ompC* 欠失株に *ompA* 遺伝子の欠失を導入した二重欠失株の作製を行った。これらの欠失株において、外膜タンパク質組成を解析して OmpA の発現が完全に消失することを確認した(図3)。これらの菌株において形質転換効率を調べたところ、*ompC* 及び *envZ* 遺伝子単独の欠失で見られていた形質転換効率の上昇が、*ompA* との二重欠失になることで消失することが明らかになった(図4)。この結果は、*ompC* 及び *envZ* 遺伝子の欠失による形質転換効率の上昇は OmpA の発現量が上昇していたことが原因であることを示唆している。



(4) OmpA の発現量の上昇が形質転換効率を上昇させるという仮説を検証する目的で、OmpA の発現を抑制する small RNA をコードする *micA* 及び *rseX* の欠失株の作製を行った。これらの欠失株を用いて形質転換効率を解析した結果、それぞれ単独の欠失では形質転換効率の上昇は見られなかった(図5)。しかし、*micA* 及び *rseX* の両方を欠失させた二重欠失株を作製して形質転換効率を解析したところ、二重欠失株では形質転換効率が上昇することが明らかになった(図5)。この結果からも、OmpA の発現量上昇により形質転換効率が上昇することが示唆された。



(5) ここまでの結果における形質転換効率の解析は、形質転換方法として、ポリエチレングリコールとマグネシウムを用いた改変型 TSS 法を用いて行われた。改変型 TSS 法以外の形質転換法においても同様に *envZ* や *ompC* 遺伝子の欠失により形質転換効率が増加するのかわかる目的で、カルシウム法による形質転換を行い、形質転換効率の解析を行った。その結果、カルシウム法においても *envZ* や *ompC* 遺伝子の欠失により形質転換効率が増加した。このことからケミカルトランスフォーメーションにおいては、OmpA が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。



(6) 改変型 TSS 法の改善により形質転換をより簡便化することを目指し、より小スケールの大腸菌培養液からコンピテントセルの作製が可能であるかについて検討を行った。その結果、微量試験管中のわずか 50  $\mu$ L の大腸菌培養液からコンピテントセルの作製が可能であることが明らかとなった。この形質転換法についてさらなる条件検討を行うことで、これまで非常に手間のかかる作業であったコンピテントセル作製がより簡便に行えるようになることが期待される。

以上のように、本研究により OmpA の発現量を上昇させることで形質転換効率を向上させる

ことが可能であることが明らかとなった。これまで使用されてきた宿主大腸菌株に、*envZ* 遺伝子や *ompC* 遺伝子の欠失のような OmpA の発現量が上昇するような変異を導入することで、さらに高効率な宿主大腸菌株となることが期待される。大腸菌の形質転換は組換え DNA 技術における最も基本的な操作の一つである。そのような形質転換がより簡便かつ高効率で行えるようになることは生命科学の発展に大きく貢献するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野崎晋五
2. 発表標題 バクテリオファージを活用した長鎖DNAアセンブリー
3. 学会等名 第17回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shingo Nozaki
2. 発表標題 Utilization of bacteriophage toward genome synthesis
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野崎晋五
2. 発表標題 in vitro パッケージングを活用したファージゲノムスケールDNAの簡便な構築法
3. 学会等名 第16回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野崎晋五, 仁木宏典
2. 発表標題 大腸菌ゲノムより見出された形質転換に関与する遺伝子群
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 簡便なコンピテントセル製造方法及び形質転換細胞製造方法	発明者 野崎晋五	権利者 学校法人立教学院
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-192062	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 インピトロパッケージングを用いた多断片DNAの連結および細胞内導入法	発明者 野崎晋五	権利者 学校法人立教学院
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-012661	出願年 2021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
---------	---------