

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710239

研究課題名(和文) 水平伝播を利用した次世代型クローニング技術の開発

研究課題名(英文) A Nobel cloning tool using the designed horizontal gene-transfer system by natural transformation

研究代表者

金子 真也 (KANEKO, Shinya)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：10399694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：水平伝播を利用した次世代型クローニング技術開発に向けて、供与菌(大腸菌)と受容菌(枯草菌)の適切な培養条件を確立するとともに、安定なDNAの移行操作についての菌株の種類やヌクレアーゼ阻害剤の効果を明らかにすることができた。特にビルレントファージ(λ gt10)による溶菌システムを開発したことで、プラスミドを保持する既存の大腸菌株(ライブラリー)を手軽に使用することが可能となった。さらにエキソヌクレアーゼが高効率化のための促進剤として効果的であることも判明した。以上本研究によりDNAを精製せずに簡便に他の宿主に移行させる「水平伝播を利用したクローニングシステム」の基盤技術を確立できた。

研究成果の概要(英文)：A designed horizontal gene-transfer system by natural transformation has been developed as novel cloning tool to introduce plasmid DNA into the objective cells without purification. Each culture condition for donor and recipient cells has been decided in this study. The bacteriolysis induction of donor cells by virulent phage is very important for universal use. Furthermore it was revealed that each aurintricarboxylic acid as nuclease inhibitor and exonuclease I as accelerator is effective for the DNA transfer by mixing it appropriately. In this condition it was found that the DNA transfer was extended to successful size increase up to 100 kb. The damage-free handling of DNA larger than 100 kb in test tubes is increasingly difficult. The designed transfer system named as Culture Mix Method (CMM) can apply various plasmid DNAs simply and conveniently, which should facilitate development of experimental tools to mobilize giant DNAs for genomic syntheses in synthetic biology.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学 応用ゲノム科学

キーワード：応用微生物 核酸 ゲノム バイオテクノロジー 形質転換

1. 研究開始当初の背景

自然界において微生物間で行われる DNA の水平伝播はファージによる「形質導入」、「接合伝達」、「自然形質転換」の三つに大別される。前2者は一般に宿主特異域が狭く制限が多い。一方細胞外核酸を介して行われる自然形質転換は供与菌の生死を問わず、放出された DNA の安定性に依存して幅広い遺伝情報 (DNA) の移動が可能となる現象である(1)。これまでの研究で大腸菌ラムダ溶原株の溶菌に伴い、ある条件下で培養液中に放出されたプラスミド DNA が意外にも分解されず構造的に安定であり、自然形質転換能を持つ他の宿主に取り込まれる現象を見出し(2-4)。近年自然形質転換能を持つ微生物が自然界で数多く見出されており、また種々の微生物は培養条件によって自然形質転換に近い性質を付与できるとの報告(5-7)から、水平伝播を利用して目的の菌株へ DNA の抽出・精製を伴わず簡便で迅速なクローニングを可能とする技術を開発できるとの着想に至った。

2. 研究の目的

微生物間における DNA の水平伝播を模して、DNA を抽出・精製することなく、迅速かつ簡便に他の宿主に移行する第二世代のクローニング技術の開発を目的とする。本研究においてこの手法を「水平伝播型クローニング法; Culture Mix Method (CMM)」と表記する。具体的には特定の供与菌と受容菌に注目し、自然形質転換を利用した水平伝播型クローニングの基盤技術を確立する。これまでにラムダファージ溶原性的大腸菌から放出されたプラスミド DNA が、ある条件のもと一定の確率で自然形質転換能を持つ枯草菌へ移行することを確認済みである(2-4)。本研究ではこの着想に基づきモデル実験系を構築し、培養条件や DNA の安定性、競合阻害等の詳細なメカニズムを解析するとともに最適条件を検討し、100kb 以上の巨大 DNA でも効率よく適用できる汎用性の高い簡便なクローニング技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

供与菌として大腸菌(温度感受性ラムダ溶原株)、受容菌として枯草菌(自然形質転換能を有する代表的なグラム陽性菌)を使用したモデル実験系(図1、図2)により、以下の様々な条件検討を行なった。

- ・ 供与菌の培養条件(溶菌誘導する温度やタイミング)
- ・ 受容菌の培養条件(培養温度、経過時間における効率を分析し、改善する)
- ・ 溶液中に放出されたプラスミド DNA の時間経過に伴う安定性
- ・ 受容菌が DNA を取り込む時の競合阻害の影響

この他、供与菌、受容菌で用いる菌株の種類や溶菌方法の検討、さらに安定して DNA を移行させるために必要なあらゆる条件検討を

行なった。なお、菌株間の移行に用いる DNA は供与菌と大腸菌両方で複製可能なシャトルプラスミド(pGETSGFP; 17.1kb)(図3)(2,4)と供与菌でのみ複製可能なプラスミド(pSHINE2121; 6.6kb)(図4)(3,4)の2種類を用いた。これにより受容菌でプラスミドとして保持させる場合と、ゲノムに組み込む場合(受容菌ゲノムには組み込み用の足場配列をあらかじめ挿入)の影響を分析した。プラスミド DNA にはそれぞれ供与菌、受容菌での選択に必要な抗生物質耐性マーカーの他、受容菌で発現する GFP (Green Fluorescence Protein) 遺伝子を有しているため供与菌から受容菌の DNA 移行を UV によって簡単にモニターすることができる。

さらに巨大 DNA に対する実施例として 110kb のマウスゲノムを保持する BAC (Bacterial Artificial Chromosome) クローン(図8)を用い、「水平伝播型クローニング法」を試みた。供与菌は市販の大腸菌株であり、受容菌はゲノム中に BAC ベクター領域を組み換えの足場として保持する枯草菌を用いた。

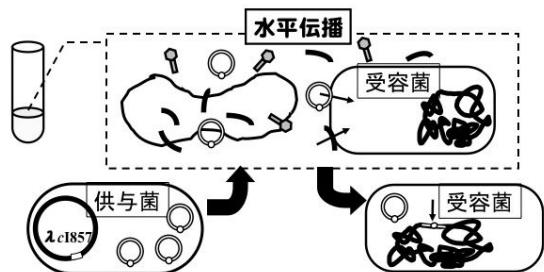


図1 自然形質転換による水平伝播実験系

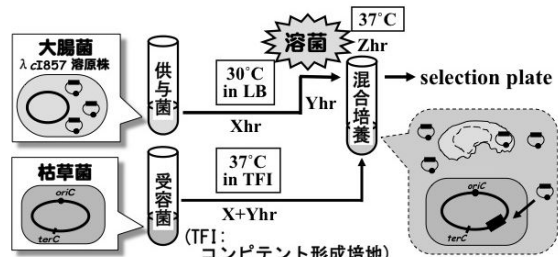
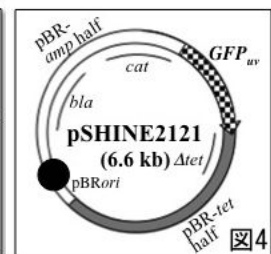
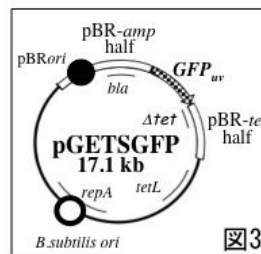


図2 水平伝播モデル実験系



4. 研究成果

(1) 温度感受性ラムダ溶原菌による水平伝播
最初に温度感受性ラムダ溶原性的大腸菌を供与菌として用いた場合の溶菌条件の検討を行った。まず溶菌温度を37 以上で検討した結果、42 における溶菌が最も完全に溶菌し、放出されるプラスミド DNA も最大になること

が判明した。一方受容菌として用いた枯草菌はコンピテント形成培地(貧栄養培地)で培養することで、外来のDNAを能動的に取り込む自然形質転換能を保持するようになるが(2)、最も効率よくコンピテントセルを形成でき、再現性の良い条件を再検討した。菌株や振等速度、温度にもよるが、37℃の場合、培養開始後4~5時間でピークに達し、その後急速に低下する。安定した水平伝播実験を行うために、同一条件下で大量の高効率コンピテントセルを作成、凍結保存し、以下本研究に用いることとした。

GFP遺伝子を有するpGETSGFP(図3)とpSHINE211(図4)を用いたモデル実験の結果、供与菌として大腸菌LE392株を用いた場合、溶菌開始後1~2時間での水平伝播が最も効率の高いことが示された(図5)。続いて供与菌をエンドヌクレアーゼ遺伝子(*endA1*)欠損株であるDH10Bのラムダ溶原菌を用いた場合は、コロニー数は減少するものの30時間後でも安定して水平伝播が行なわれることが示された(図5)。これは溶菌液中に放出されたプラスミドDNAの安定性に依存する結果であり、溶菌液のDNAを超遠心法などで直接精製し、ゲル電気泳動を行なった解析結果などからも裏付けられた。この結果はプラスミドとしてDNAを移行させる場合(pGETSGFP)も供与菌のゲノムへ組込ませる場合(pSHINE2121)も同様であった。面白いことに80~100(ボイル)による溶菌では、コロニーがほとんど得られず、受容菌へのDNAの移行(水平伝播)にはラムダによる溶菌が重要であることが明らかになった。当初モデル実験系では、DNA組換え酵素であるRecA保持株(RecA+)のLE392株を用いていたが、一般に大腸菌宿主として用いられている株はRecA欠損株(RecA-)であることから、代表的なDH5やDH10Bについても試してみたところ、供与菌として問題なく有効であることが判明した。従って今後一般的な大腸菌株を用いたDNAのクローニング技術として本技術を利用することができ、想定外の組み換え反応を防げるという意味で汎用性拡大、安定なDNA構造の維持に繋がる成果が得られた。

一方、受容菌としては枯草菌の代表株である1A1(=168 *trpC2*)以外に、168 *trpC2*から制限

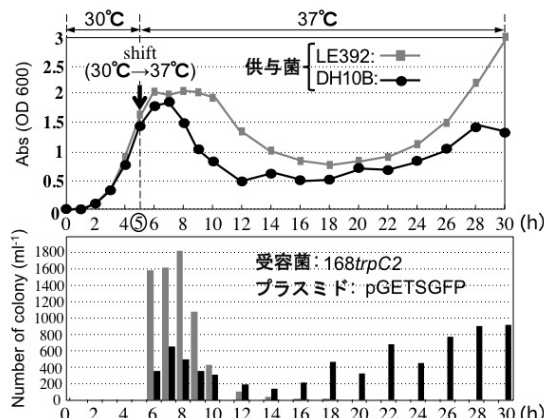


図5 供与菌の溶菌と水平伝播効率(コロニー数)

修飾酵素を欠損したRM125株(8)由来の菌株も上記「水平伝播型クローニング法」に適用できることが示された。枯草菌168 *trpC2*は*XhoI*の制限修飾酵素を保持しており、同サイトを有するDNAの取り込みに制限が生じることが知られている(9)。しかしRM125株を使用することが可能であることから、移行させるDNAの配列によらず、巨大DNAにも対応した汎用性ツールとして利用可能であると期待される。

(2) ビルレントファージ(virulent phage)による溶菌システムの構築

初期のモデル実験系では、供与菌としてラムダ溶原性の大腸菌株を用いていたため、市販の大腸菌ライブラリーを直接使用することができなかった。そこでビルレントファージ(virulent phage)である *λgt10*を用いた溶菌システムの構築を試みた。まず感染させるファージの量と大腸菌の培養条件を調整することで、効率よく供与菌を溶菌させる条件を検討した。結果としてMOI(ファージ/大腸菌)が2~4で感染させると約2時間で溶菌が生じ、プラスミドDNAを効率よく溶液中に放出できることを確認した。これにより培養温度を一定(37℃)として供与菌(大腸菌)から受容菌(枯草菌)へ簡単にDNAを水平伝播させることが可能となった。ビルレントファージを用いた場合においても、様々な大腸菌株で枯草菌への水平伝播実験を行った結果、エンドヌクレアーゼ(*endA1*)欠損株(例としてDH10B)を用いることで、溶液中に放出されたプラスミドDNAが30時間後でも安定して枯草菌へ移行できる

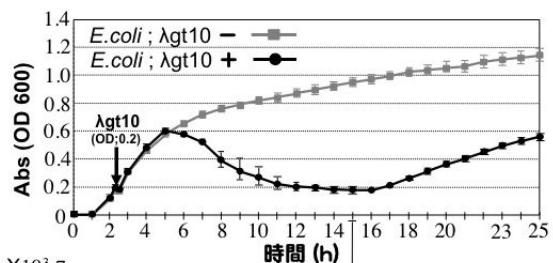


図6 *λgt10*を用いた水平伝播効率

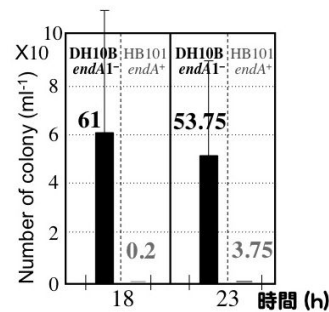


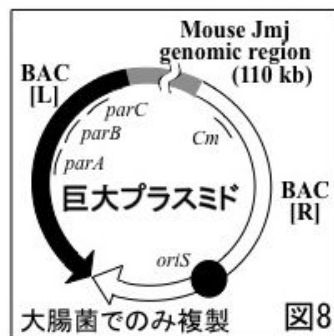
図7 *endA1*欠損株の有効性

ことを見出した(図6)。図7で示したように、エンドヌクレアーゼ(*endA1*)保持株である大腸菌HB101を供与菌として使用した場合、前述のLE392株同様に一晚経過後(供与菌の培養開始後18時間後または23時間後)では、水平伝播効率の著しい低下が見られた。実際には通常使用されている大腸菌株は*endA1*欠損株であることが多いので、「水平伝播型クローニング法」は、一般の大腸菌DNAライブラリーにおいて適用でき、また*endA1*欠損株であれば、図6と7で示されているように非常に安定的に運用することができる。

(3) 巨大DNAへの適用

以上の各操作条件を確立した上で、本システムの特長を生かした巨大DNAに対しての有効性の検証を試みた。実施例として、BAC(Bacterial Artificial Chromosome)ライブラリーを保持する市販の大腸菌(DH10B)を供与菌として用い、BACクローンを精製することなく受容菌である枯草菌ゲノムへのクローニング(組込む)操作を試みた。以前の研究で既に大腸菌から200kbに及ぶBACクローンをキットや超遠心などを用いて精製し、枯草菌ゲノムへ組込む操作は行なっている(8)(10)。しかしDNAは長大なポリマーである故、脆弱で物理的な衝撃に弱い100kb、特に200kbのサイズを超えるBACクローンに関しては、ダメージを与えない大腸菌からの精製操作は非常に困難である(10)。一方「水平伝播型クローニング法」では、移行させるDNAの精製操作がないため、このような巨大DNAに対しては非常に有効であると期待される。

検証実験に用いたBACクローンは、以前の研究で使用したマウスゲノム110kbを有する環状DNAである(図8)(8)(10)。受容菌である枯草菌は制限酵素が欠損



したRM125株由来で、ゲノム中に組み込み用の足場となるBACの部分配列と、マーカの無いDNAを組み込むためのポジティブセレクションを可能にする仕掛けを施した菌株を使用した。これは図8に示したように、市販のBACクローンには大腸菌でのみ複製し、選択するための複製起点(*oriS*)と抗生物質耐性マーカー(*Cm*)しか有していないためである(8)(10)。pSHINE2121の時と同様の条件で大腸菌から枯草菌への「水平伝播型クローニング法」を試みた結果、予想通り枯草菌ゲノムにマウスゲノム110kbを含むBACクローンを組込んだ枯草菌を得ることは出来たものの、バックグラウンドが非常に高く、効率が極めて低い結果となってしまった。原因としては、pSHINE2121

に比べ、サイズの大きさもさることながら、供与菌である大腸菌でのコピー数が少ないこと(BACクローンは1細胞辺り1~2コピーなので、溶菌液中に放出されるBAC-DNA量も少なくなる)、また枯草菌のポジティブセレクション自体のバックグラウンドの高さも目的のDNA領域が組込まれた受容菌(枯草菌)株を検出するために支障をきたしたと考えられる。今後本システムを汎用性の高い、有用な手法にするために、更なる改善点が必要であるが、本研究を通じて、100kbを越える巨大DNAにも対応できることは確認できた。

(4) 安定した水平伝播と高効率化へ向けて

以上の結果から「水平伝播型クローニング法」について、安定な水平伝播と更なる効率改善が必要であると考えられた。安定して効率よく水平伝播を生じさせるためには、上述(1)で述べたように供与菌(大腸菌)が持つヌクレアーゼ(*endA1*)が欠損している必要がある。すなわち溶菌液中のDNAをより安定に保持させる必要がある。そこで溶菌液中にヌクレアーゼ阻害剤を加えることで、より安定な水平伝播を可能にできるか検討した。ヌクレアーゼ阻害剤として、DNaseI抗体やネトロプシン二塩酸塩、ジエチルピロカルボネート(DEPC)、オーリントリカルボン酸(ATA)をそれぞれ用いて水平伝播効率を検証した。その結果、DNaseI抗体やネトロプシン二塩酸塩、DEPCはまったく効果が得られなかったものの、エンドヌクレアーゼ阻害剤の一つであるオーリントリカルボン酸(ATA)を加えることで*endA1*保持株でも大腸菌から枯草菌への安定な水平伝播が可能であることが判明した。しかしながら同試薬は過剰量を加えると菌体の生育そのものを阻害してしまうため調整が必要である。前述のBACライブラリーは*endA1*を保持する大腸菌HB101を宿主として市販されている場合もあるので、ATAを用いることで、大腸菌の菌株に依存することなく本システムの使用が可能となった。

次に水平伝播自体の効率を上げるための改良を試みた。モデル実験系での検証で、供与

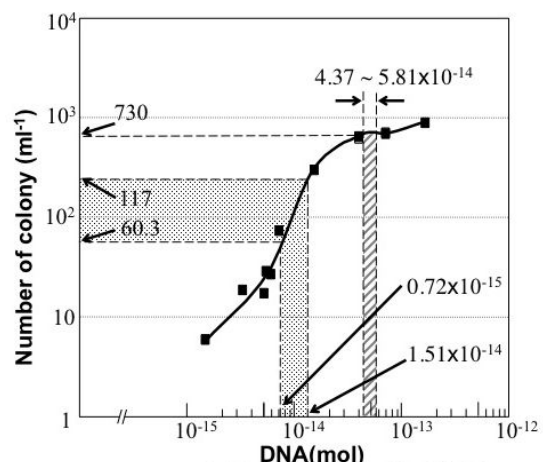


図9 DNA量と形質転換体数

菌と枯草菌の混合率を変化させた場合、予想に反して得られる形質転換体数(コロニー数)に大きな変化が生じないことを見出していた。そこで溶菌液中に放出されるDNA量と受容菌(枯草菌)が取り込むDNA量の相関関係について解析を行った。図9で示したように溶菌した菌体数とプラスミドDNAのコピー数から推定した溶菌液中のDNA量はおよそ $4.37 \sim 5.81 \times 10^{-14}$ mol。この量のDNAを用いた場合、通常(精製したプラスミドDNAを用いた場合)において枯草菌の形質転換体数(コロニー数)は730個/mL程度得られるはずである。しかし本システムでは60~117個/mLのコロニー数しか得られなかった。溶菌液中にはプラスミドDNA以外に大腸菌の宿主ゲノムも放出されているはずであり、プラスミドDNAに対する競合阻害が生じている可能性が示唆された。そこで分子量が大きくダメージを受けやすいゲノムDNAを優先的に除外(分解)させるため、エキソヌクレアーゼの使用を考案した。エキソヌクレアーゼとしては、入手しやすい市販のエキソヌクレアーゼIとエキソヌクレアーゼIIを用いた。それぞれ1 μ Lと5 μ Lを溶菌液中に添加し、これに受容菌を混合して形成されるコロニー数を比較した。その結果、エキソヌクレアーゼの種類と添加量による大きな違いは認められなかったが、エキソヌクレアーゼを加えることでコロニー形成率が2~10倍に増加し、水平伝播効率が上昇することが確認された。

以上のことから溶菌液中のヌクレアーゼ阻害剤としてオーリントリカルボン酸(ATA)が有効であり、また競合阻害の原因となる供与菌ゲノムを除去し、プラスミド(環状)DNAの水平伝播効率を促進する試薬としてエキソヌクレアーゼ(エキソヌクレアーゼIが単価も安く購入しやすい)が有効であることが明らかになった。

(5)まとめ、今後の展開

以上3年間の研究を通じて、汎用性の拡大、安定な水平伝播システムの構築、高効率化の各種条件など、「水平伝播を利用したクローニング法」の基盤技術を確認することができた。本研究結果は、従来のクローニング技術の簡略化、迅速化に繋がる成果であり、遺伝子集積、ゲノム合成を効率的に行なう上で次世代を担うクローニング技術として今後ますます注目すべき技術だと期待される。巨大DNA(110kb)を用いた実験では、現時点での受容菌における選択法の問題から効率は低かったものの、本技術によりDNA精製なしで目的の受容菌(枯草菌)ゲノムへ組み込める結果を得ることができ、本技術の重要性を確認することができた。受容菌の選択方法については、2つのclリプレッサー遺伝子を用いたポジティブセレクションが有効であるが、更なる選択法の改善が今後必要であると思われる。この選択法の改善においては複数の供与菌を同時に混合して連続的なクローニングを行なう

上でも重要であり、残念ながら本研究においては、思うような結果が得られず、実現することができなかった。今後これらの点を改善しつつ、より実用的なクローニング技術として確立させて行きたい。また本研究においては、モデル実験系での宿主間の水平伝播を基盤としたため、大腸菌-枯草菌以外の組み合わせを詳細に解析することができなかった。しかしながら自然界には多くの自然形質転換能を有する微生物が存在するので、宿主域を拡大させることでより柔軟に目的のDNAを目的の細胞へ導入できる技術として発展させて行くことができればと考えている。

[参考文献]

- (1) Lorenz M.G. and Wackernagel W. (1994) *Microbiol. Rev.* **58**: 563-602.
- (2) Kaneko S. and Itaya M. (2010) *J. Biochem.* **147**: 819-822.
- (3) Itaya M. and Kaneko S. (2010) *Nucleic Acids Research* **38**: 2551-2557.
- (4) Kaneko S. and Itaya M. (2010) *Nucleic Acids and Molecular Biology* **25**:39-53 (Springer).
- (5) de Vries J. and Wackernagel W. (2004) *Plant and soil* **266**: 91-104.
- (6) Baur B. et al. (1996) *Appl Environ Microbiol* **62**: 3673-3678.
- (7) Demanéche S. et al. (2001) *Appl Environ Microbiol* **67**: 2617-2621.
- (8) Kaneko S. et al. (2005) *J. Mol. Biol.* **349**: 1036-1044.
- (9) Ohtani N. et al. (2008) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 2472-2475.
- (10) Kaneko S. et al. (2009) *J Biotech* **139**: 211-213.

5. 主な発表論文等

(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 0件)

[学会発表](計 3件)

金子真也、板谷光泰 水平伝播を利用したクローニングシステム(CMM)の汎用性 A versatile designed horizontal gene-transfer system by natural transformation, named as Culture Mix Method (CMM) for genomic syntheses. 日本農芸化学会2014年度(平成26年度)大会 [東京] 2014年3月30日 明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)
金子真也、板谷光泰 細胞外核酸による水平伝播システム(CMM)を用いたゲノム合成 A designed horizontal gene-transfer system by natural transformation, named as Culture Mix Method (CMM) for genomic syntheses. 第35回日本分子生物学会年会 ワークショップ 3W3111-1 セッションタイトル; 「ゲノムを作り、種を越えて

動かす：合成生物学的観点から見る水平伝播」(招待講演)2012年12月13日 福岡国際会議場 4F 小会議室 (福岡県)
板谷光泰、金子真也 細胞外核酸の水平伝播を介するゲノム合成 Genome synthesis via horizontal transfer of stable extra-cellular DNA 第84回日本生化学会大会 シンポジウム「細胞外核酸の動態：医科学環境科学での新しい観点からの研究、応用展開」2011年9月24日 京都国際会館(京都府)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 真也 (KANEKO Shinya)
東京工業大学
大学院生命理工学研究科・助教
研究者番号：10399694

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし