

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430197

研究課題名(和文) 水平伝播を利用した細胞間ダイレクトクローニング技術の開発

研究課題名(英文) Cell-to-cell direct cloning by designed horizontal transfer using extra-cellular DNA

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：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「細胞間ダイレクトクローニング技術」の開発において、プラスミドDNAを保持する大腸菌をビルレントファージによって溶菌させ、溶菌液を直接用いて枯草菌を形質転換させる詳細な条件検討を行い、効率良くプラスミドDNAを大腸菌から枯草菌へ送り込む最適条件を確立することができた。連続的に用いることで枯草菌のゲノム中に外来のDNAを再構築させる実践的な活用法も開発した。さらに大腸菌 シアノバクテリアでも実施可能であり、汎用性の広い技術として今後広く活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)： Cell-to-cell direct cloning technology has established by designed horizontal transfer using extra-cellular DNA without purified DNAs. The purified DNAs in a test tube have been generally required to introduce into the host cell for molecular cloning technology in laboratory. In the natural environment, extra-cellular DNAs without purified step contribute to the gene delivery during horizontal gene transfer (HGT) dependent on the stability of DNA released from donor cells. Under such a concept we have developed that DNA delivery procedure using lysate of *Escherichia coli* lysed by virulent bacteriophage into competent *Bacillus subtilis* cells. The direct cloning technology has been applied for the DNA synthesis by fragment assembly within the *B. subtilis* genome. Furthermore we showed the transfer of plasmid DNAs from lysing *E. coli* into cyanobacteria, which is suggests the procedure is useful for general use.

研究分野：応用ゲノム科学

キーワード：ダイレクトクローニング 大腸菌 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

1. 研究開始当初の背景

自然界において個体間での DNA の移動、いわゆる水平伝播は意外にも頻繁に生じていることが明らかになっている。形態としてファージによる「形質導入」、「接合伝達」、「自然形質転換」の三つが挙げられるが、前二者は一般に宿主特異域が狭く制限が多い。一方自然形質転換で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水平伝播が可能である(1)。研究代表者はこれまでの研究で、大腸菌にラムダファージを感染させ、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、自然形質転換能を持つ枯草菌に取り込ませる技術を開発した(2-4; 図 1)。自然形質転換能を持つ微生物は自然界で数多く見出されており、一般的な形質転換でもコンピテントセルのように培養条件で自然形質転換に近い性質を付与できることから(5-7)、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技術を開発できるとの着想に至った。

近年、次世代型シーケンサーの登場で様々な塩基配列情報が明らかになるに伴い、実際の DNA を用いた複合的な遺伝子群の産業利用やゲノム自体の解析がますます盛んになると予想される。しかし塩基配列を解読することと解読した生の高分子 DNA を実際に取り扱うこととは大きな隔たりがある。通常プラスミドとして扱えるサイズは数 10kb までであり、大腸菌や酵母の特殊なベクターを用いて 100kb 以上の巨大 DNA を構築することは可能であるが、その後目的の細胞に導入する場合、通常これらの DNA を一度 *in vitro* で精製する必要がある。100kb 以上の巨大 DNA はシェアリングなど物理的ダメージを受けやすく、専用キット等を用いても精製効率が悪いのが現状である。本研究で提案する「水平伝播を利用した細胞間ダイレクトクローニング技術の開発」は、DNA の精製を行わず目的の菌株に直接巨大 DNA を送り込むことが可能であり、ポストゲノム時代、合成生物学・合成ゲノム技術の有用なツールになると期待さ

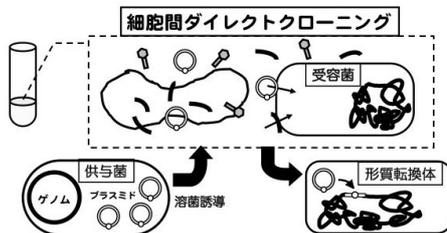


図1 水平伝播を利用したダイレクトクローニング

れる。

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「cell-to-cell direct cloning 技術」の開発を目的とする。

具体的には多くの微生物が持つ自然形質転換能を利用して大腸菌などで構築したプラスミド DNA を他の宿主に迅速かつ簡便に移行させる技術の開発を行なう。DNA の精製を伴わないため迅速でハイスループットの活用が可能となり、特に精製の際ダメージを受けやすい巨大 DNA を扱う上で有効な手段となりうる。当該技術は合成ゲノム時代において複数の有用遺伝子や巨大ゲノム領域を扱い、有用菌株を構築するための重要な基盤技術になると期待される。

3. 研究の方法

特定の供与菌(一般的な実験で用いる大腸菌)と受容菌(自然形質転換能を持つ代表的な枯草菌)によるモデル実験系での条件検討を下に様々な宿主へのダイレクトクローニングを試みる。以前の研究で、ビルレントファージによる溶菌誘導の結果 100kb までの巨大プラスミド DNA を、精製過程を経ずに一定の確率で受容菌へ導入させることに成功した(2-4)。さらに操作の過程でヌクレアーゼ阻害剤や、エキソヌクレアーゼが極めて有効であることも明らかになった。本研究では高効率化を目指し、以下に示した条件検討を行なった。

- ・ 供与菌の溶菌誘導(ビルレントファージ)の濃度とタイミング)
- ・ 受容菌の形質転換効率の向上、凍結保存による供給システムの構築
- ・ 形質転換を促進するヌクレアーゼ阻害剤とエキソヌクレアーゼの条件検討
- ・ 形質転換体選択方法の改良

また枯草菌以外の宿主へのダイレクトクローニング(図 2)や複数の DNA コンティグ断片を効率よくクローニングする技術(図 3)を実施した。

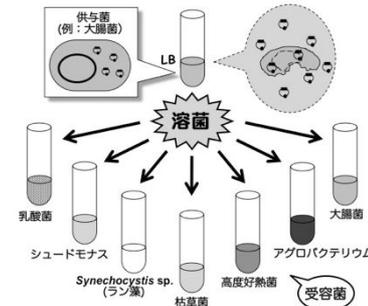


図2 目的宿主(受容菌)へのDNA導入; DNA精製不要

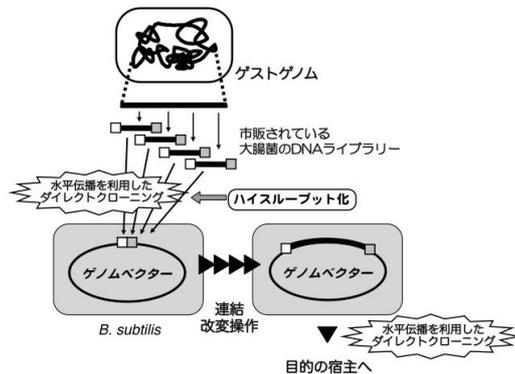


図3 ダイレクトクローニングのハイスループット化

#### 4. 研究成果

##### (1) ビルレントファージによる大腸菌から枯草菌への細胞間ダイレクトクロニングの条件検討

モデル実験系として、ビルレントファージによる大腸菌から枯草菌への細胞間ダイレクトクロニングについて詳細な条件検討を行った。供与菌として大腸菌株は、DH5、DH10B、HB101などを用い、受容菌は自然形質転換能を有する代表的な枯草菌株 168*trpC2* 株またはその誘導株で制限修飾系酵素を欠損した RM125 株を用いて実施した。DNA としては、受容菌でのみ発現する GFP 遺伝子を有するシャトルプラスミド pGETSGFP(17.1kb) と、GFP 遺伝子を有し、供与菌でのみ複製可能な大腸菌プラスミド pSHINE2121(6.6kb) を用いた。形質転換体は抗生物質と GFP の発現によりスクリーニングした。結果としてビルレントファージ gt10 を供与菌の植菌時に MOI 4.0 で感染させ、一晚培養することで十分溶菌を誘導できることを確認した(図 4-1、4-2)。受容菌は凍結保存することで高品質で大量供給できることを実証した。さらに受容菌のコンピテントセルを濃縮することで高

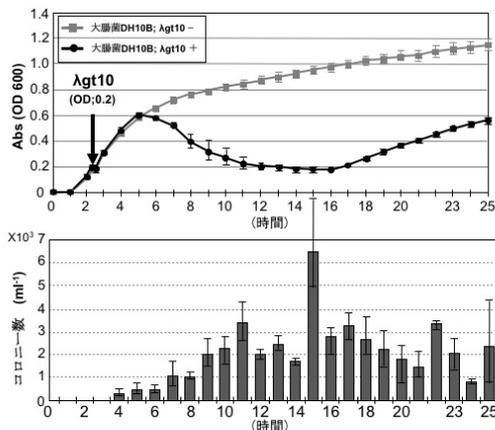


図4-1. pGETSGFPをプラスミドとして用い、大腸菌DH10BをAgt10で溶菌し、枯草菌 168*trpC2*へ形質転換した時の経時変化(大腸菌数、形質転換数)

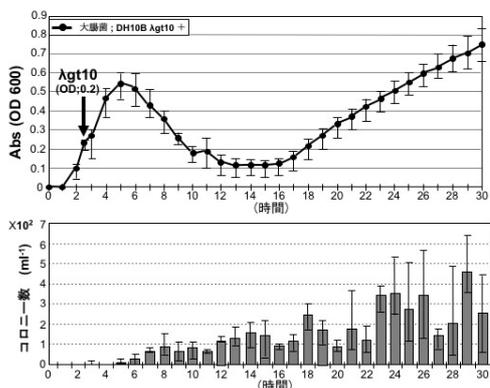


図4-2. pSHINE2121をプラスミドとして用い、大腸菌DH10BをAgt10で溶菌し、枯草菌 RM125誘導株へ形質転換した時の経時変化(大腸菌数、形質転換数)

効率で形質転換できることが確認された。形質転換体の選択方法に関して、当該モデル実験で用いた pGETSGFP と pSHINE2121 に関しては大腸菌、枯草菌それぞれで働く抗生物質により充分スクリーニングすることが可能であった。

供与菌として大腸菌の代表的なエンドヌクレアーゼ(*endA1*)を欠損した DH5、DH10B では溶菌後 20 時間後でも安定して形質転換体が得られたが(図 4-1、4-2、5)、*endA1* を有する HB101 株ではほとんどコロニーが得られなかった(図 5)。そこでヌクレアーゼ阻害剤としてアウリントリカルボン酸(ATA)を適量加えることで、HB101 株を用いた場合でも安定してコロニーが得られることを確認した。ATA は宿主の生育も阻害するため添加しすぎも逆効果だったが、最終濃度 0.35mg/mL の添加が最も効果的であった(図 5)。同様の結果は HB101 株以外に *endA1* を有する JA221 株などにおいても確認された。

また以前の研究で溶菌液には大量の大腸菌ゲノム DNA も含まれることから、競合阻害が生じることがわかっていった。そこで

サイズが大きくダメージの入りやすいゲノム DNA を分解する目的で、エキソヌクレアーゼ(Exonuclease I または Exonuclease III)を溶菌液に加えることで形質転換効率が上昇することを見出した。Exonuclease I の場合、添加量 5unit により、平均してコロニー数が 1.5 倍程上昇することが示された。ただし 5unit 以上添加しても 1.5 倍以上の上昇は得られなかった(図 6-1)。Exonuclease III の場合は、1000unit 添加することで平均してコロニー数が 1.5 倍弱上昇することが示された。しかし 2000unit 添加しても有意な効果は見

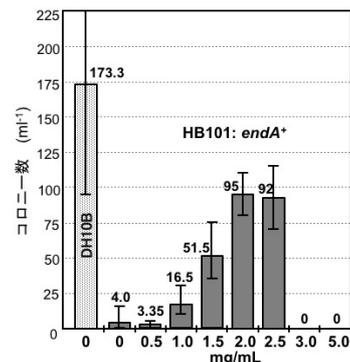


図5. 供与菌として大腸菌DH10Bを用いた場合に比べ、HB101では形質転換体数が激減した。ヌクレアーゼ阻害剤としてATAを適量添加することで形質転換体が回復することが示された。

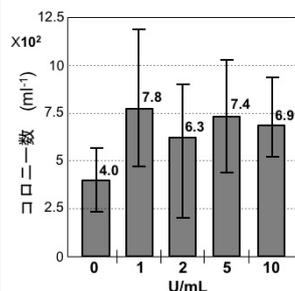


図6-1. エキソヌクレアーゼ(ExoI)の効果  
供与菌; 大腸菌DH10B、  
受容菌; 枯草菌 RM125誘導株、  
プラスミド; pSHINE2121

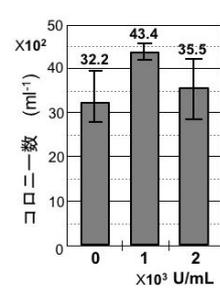


図6-2. エキソヌクレアーゼ(ExoIII)の効果  
供与菌; 大腸菌DH10B、  
受容菌; 枯草菌 RM125誘導株、  
プラスミド; pSHINE2121

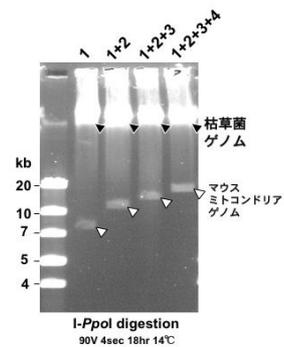
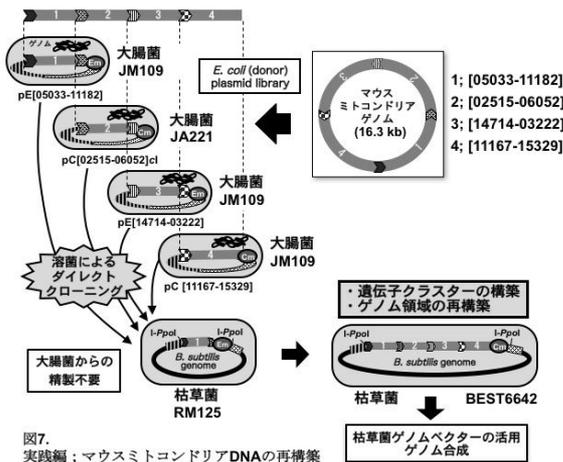
られなかった(図 6-2)。

以上のことから細胞間ダイレクトクロニングを行う上での基本条件が確立した。

##### (2) 複数の DNA コンティグ断片を効率よくダ

## イレクトクロニングする技術(マウスミトコンドリアゲノムの再構築)

以前の研究で使用したマウスのミトコンドリア(mt)DNA のコンティグクローンを用い、これらを保持する別々の大腸菌株を供与菌として使用し、受容菌である枯草菌のゲノム中に相同組み換えを利用して組み込み、コンティグクローン同士を枯草菌ゲノム中で連結させることが可能か検証した。これらマウス mtDNA のコンティグクローンは4断片からなり、両端が数百 bp オーバーラップした構造となっているので、溶菌液を順次受容菌細胞に混合するだけで、マウス mt ゲノムを枯草菌のゲノム中に再構築させることが可能で

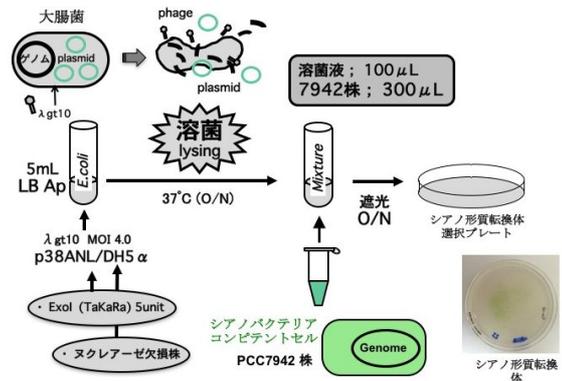


ある(図7)。結果として、プラスミド DNA を生化学的手法による精製操作を経ずに、迅速に枯草菌ゲノム中に導入できることを実証した(図8)。ビルレントファージ(  $\lambda$ gt10)を効果的に活用し、エキソヌクレアーゼやヌクレアーゼ阻害剤としてアウリントリカルボン酸(ATA)を適量(0.35mg/mL)使用することにより、*endA1* 株(JM109)はもちろん *endA1* を有する JA221 株をドナーとした場合も問題なく実施可能であることが確認された。しかし1カ所の相同組替えによる Cambell type でゲノムに組み込まれる確率が高く予想外に効率はあまり良くなかった。これは、当該技術における溶菌液中でのプラスミド DNA が、生化学的精製操作と比べて予想以上にダメージを受けないことを示すものであり、当該技術が、精製時に物理的ダメージを受けやすい100kb以上の巨大なDNAに対して非常に効果

的であることを示唆している。今後、スクリーニング操作の改良を施す必要はあるが、新規のクロニング技術として実践可能であることが確認できた。

### (3) 大腸菌 枯草菌以外の宿主への適用

受容菌として枯草菌以外の宿主へのダイレクトクロニングを試みた。対象としてシアノバクテリア 7942 株へのダイレクトクロニングを実施した。シアノバクテリア 7942 株も自然形質転換能を有する微生物として知られている。導入する DNA として大腸菌とシアノバクテリア双方で複製可能なシャトルプラスミド p38ANL を使用し、供与菌(ドナー)として大腸菌 DH5 株を用いた。大腸菌 DH5 株の溶菌液はこれまでと同じビルレントファージ  $\lambda$ gt10 を感染させて行い、溶菌液を直接用いてシアノバクテリア 7942 株の形質転換を行った。抗生物質及びシアノバクテリア用の培地にプレティングして光照射下で培養したところ、100 個前後のコロニーを得ることができた(図9)。この結果から「水平伝播を利用した細胞間ダイレクトクロニング技術」が「大腸菌 枯草菌」以外にも適用できることが確認され、当該技術が汎用性広く利用できると期待される。今回「大腸菌 大腸菌」及び「出芽酵母 培養細胞 (HeLa)」も試みたが、セクション法(抗生物質または栄養要求性)がうまく機能せず確



認できなかった。しかしながら当該技術は汎用性が広いだけでなく、プラスミド DNA の抽出・精製操作を含まないことから簡便・迅速で精製過程でダメージを受けやすい長鎖 DNA に有効であり、将来的にゲノム合成などの要素技術としてますます活用され得ることが期待される。

### 【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.

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 1 件)  
著者名 金子真也、板谷光泰  
論文標題 合成生物学を意識した、拡散改変技術の現状と-展望4 細胞外核酸を利用した簡便で迅速な形質転換系の確立  
雑誌名 化学と生物 セミナー室  
査読の有無 無  
巻 54巻  
発行年 2016  
最初と最後の頁 668~673  
掲載論文の DOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.54.668  
0002-8231(199601)47:1<23:TDOMT  
T>2.0TX:2-2

〔学会発表〕(計 2 件)  
発表者名; 金子真也、板谷光泰  
発表標題; 水平伝播を利用した簡便で迅速な形質転換法の活用 Gene delivery system from *Escherichia coli* by designed horizontal transfer  
学会等名; 日本農芸化学会2016年度(平成28年度)大会[札幌] 一般講演(ポスター) 4F193  
発表年月日; 2016年3月30日(水)  
発表場所; SORA 札幌コンベンションセンター (北海道)

発表者名; 金子真也、中濱みさ子、板谷光泰  
発表標題; ゲノム合成を意識した溶菌法(CELyTED)の活用 Application of CELyTED for Genome Project-Write(GP-Write)  
学会等名; 日本農芸化学会2017年度(平成29年度)大会[京都] 一般講演(口頭発表) 3C20a05  
発表年月日; 2017年3月19日(日)  
発表場所; 京都女子大学 (京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔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・生命理工学院・助教  
研究者番号: 10399694

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし