

長鎖DNAの合成と合成生物学での活用

板谷 光泰^{1,2*}・柘植 謙爾¹

微生物での生合成による化合物合成

微生物の生合成経路を活用して産業上有用な化合物を大規模に生産する画期的な手法が切望されている。生合成経路がすべて判明している場合、つまり酵素反応と酵素がすべてのステップで判明している場合には、酵素をコードする遺伝子をすべてそろえて生合成反応の最適化が行われる。すべてがそろわない場合、あるいは非天然の化合物を生合成させたい場合には、既存の合成経路の情報に基づいて、遺伝子予測、遺伝子改変、発現強化が行われる。このような代謝工学的な操作法には、最近では合成生物学的なアプローチが頻繁に取りこまれている¹⁾。

細胞や生命を「眺めて解析する生物学」から「つくって解析する・利用する生物学」を志向する上での合成生物学的手法はまだ発展段階にある^{2,3)}。しかし代謝経路に関していえば、新たな遺伝子回路の設計や、多種の生物由来の遺伝子を多数組合わせた生合成経路設計など、従来とは異なる攻め口で有用物質の大量生産に向けた明確な方向性が強く志向されている。

長鎖遺伝子クラスター

方法論はともかくとして、有用化合物の構造が複雑になればなるほどその生合成には、多段階の酵素反応が必要となる。すなわち、多数の遺伝子を同時に微生物に導入する必要が生じる。多数の遺伝子導入には、複数のベクタープラスミドを用意して逐次的に導入するか、すべ

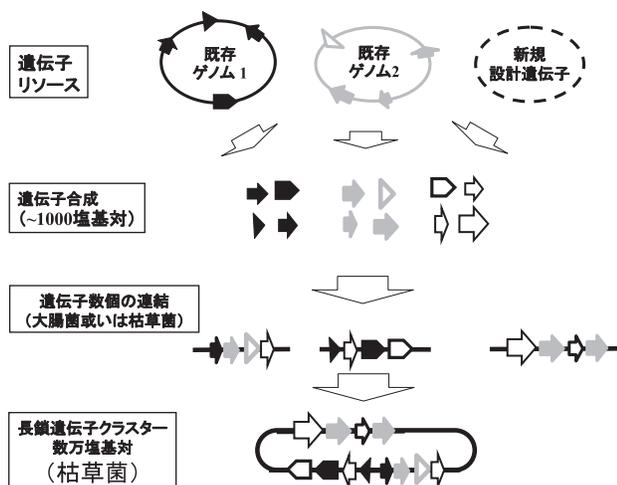


図1. 遺伝子クラスター合成の現状DNA

ての遺伝子をひとまとめにして（遺伝子クラスター化すると称する）1個のベクタープラスミドに載せて一度で導入するかの選択がある（図1参照）。モデル微生物では複数のベクタープラスミドの利用が可能であるが、産業微生物では必ずしも複数用意できるとは限らず実践的ではない。したがって1種類の導入ベクタープラスミドですべての遺伝子を組込める工夫が重要である。また遺伝子のリソースは必ずしも既存の生物の遺伝子に限る必要はなく、まったく新規に設計されることも今後は頻繁に行われるであろう。必要な遺伝子をすべてクラスター化したDNAを合成する手法は、大腸菌を利用する既存のDNAを対象とするクローニング技術とはまったく様相が異なる。

長鎖DNAと遺伝子クラスター構築

遺伝子合成は、オリゴDNAから出発して*in vitro*で調製し、大腸菌でクローン化して最終的に配列決定して得られる。現在の合成技術では、100塩基対程度のオリゴDNAを化学合成し、それらをつなぎ合わせるためにPCR反応で増幅を行う。したがって、PCR増幅過程とそれに続く大腸菌でのクローニング過程でのエラー導入を除くために、目的クローンの塩基配列決定作業は必須である。

塩基配列のエラー導入はDNAが長くなればなるほど高くなるので、設計通りの配列のDNAを高効率で得ること、長いDNAを得ることとはトレードオフの関係にあり、たかだか数千塩基対のDNA合成でも目的のDNAを得るには相当の時間とコストがかかる。数万塩基対のDNA（本稿では長鎖遺伝子クラスターと称する）の完全合成は特別注文に限定されているようで誰でも簡単に入手するのは困難である。DNAサイズで見ると、微生物由来の遺伝子は平均1000塩基対程度であり、数万塩基対のDNAは数十の遺伝子をひとまとめにすることを可能とする。これだけの遺伝子を含むDNAが安価に、効率よく入手できればおよそどのような生合成経路でも一度の操作で微生物に導入できる展望が開ける。

しかしながら、数万塩基対のDNAを*in vitro*だけで調製するのは別の困難さが伴う。長鎖DNA分子は溶液中では物理的に脆弱になり擦り切れやすくなってしまい、収率が極端に低下することである。長い直鎖高分子としての逃れられない物性なので、確実な調製には*in vivo*宿主が必要である。したがって、長鎖遺伝子クラス

著者紹介 ¹慶應義塾大学先端生命科学研究所（教授） E-mail: mita2001@sfc.keio.ac.jp

²慶應義塾大学環境情報学部

ターの完全合成には短鎖DNAを地道に連結してゆくの
が常法であろう。だからといって大腸菌を利用する現在の
遺伝子連結技術では一度に連結できる遺伝子数は少なく、
大腸菌だけで数万塩基に達するDNAを迅速に得る
ことは困難である。したがって、設計された遺伝子クラ
スターを①高い信頼性で、迅速に連結する技術、②溶液
で脆弱な長鎖DNAでも安定に保持し、③対象とする宿
主微生物に簡便に組み込むプロセス、を含めた一貫した
手法の開発が必要である。

本稿では、大腸菌での従来技術の改善、改良ではなく、
枯草菌を宿主とする新しい遺伝子連結手法を紹介する。
また枯草菌を用いる一貫した手法の将来性として自動合
成にも触れてみたい。

枯草菌のなせる匠の技その1

上述のように長鎖DNAの合成は*in vitro*ではほぼ不可
能であり、大腸菌だけでも相当困難なので、巨大なDNA
の取扱いに一定の実績がある枯草菌を宿主とする我々
独自の手法を紹介したい。一般的な枯草菌ではなく、実
験室株として利用される枯草菌マールブルグ168株
(*Bacillus subtilis* Marburg 168)を用いる。この株の利
点は、培養の後期に遺伝的な制御によりDNAを取り込
める状態、つまり自然にコンピテント状態 (Natural
competent) になることである⁴⁾。枯草菌168株の最大
の利点ともいべきこの性質は一般の認知度が大変低い
ようなのでここでスペースをとって説明しておきたい。

プラスミドベクターへのクローニングを完成するに
は、まず*in vitro*でライゲーションするステップを踏む。
大腸菌にDNAをとりこませてクローンを得るには、よく
知られているように*in vitro*で環状DNAを作製しな
ければならない。「環状」は大変重要なキーワードなの
で強調しておきたい。*In vitro*で環状化したプラスミド
を大腸菌に導入するには、細胞表面を生化学的に処理し
て人工的にコンピテント状態にする(ケミカルコンピテ
ントセル)か、電気刺激を与えて強制的に押し込む(エ
レクトロポレーション)手法が開発されている。

一方、枯草菌にDNAを導入する場合には、大腸菌が
悲鳴をあげそうなこのような野蛮な取扱いをしなくても
よい。枯草菌にはDNAを積極的に取込む固有の遺伝シ
ステムが備わっているからである。図2に示されたよう
に、細胞外のDNAを取りこむためのタンパク質複合体
が細胞表面に安定に形成される。*com*で始まる枯草菌特
有の遺伝子群にコードされたタンパク質群は「遺伝的に」
制御され細胞膜中に巨大なタンパク質複合体を形成す
る。Natural competentと称されるこの分子機序では外
液に加えられた2本鎖DNAはランダムに切断され、そ
の部分から片側の1本鎖だけが枯草菌体内に能動的に取
込まれる⁴⁾。

枯草菌で機能するDNA複製開始点を有する場合は修復

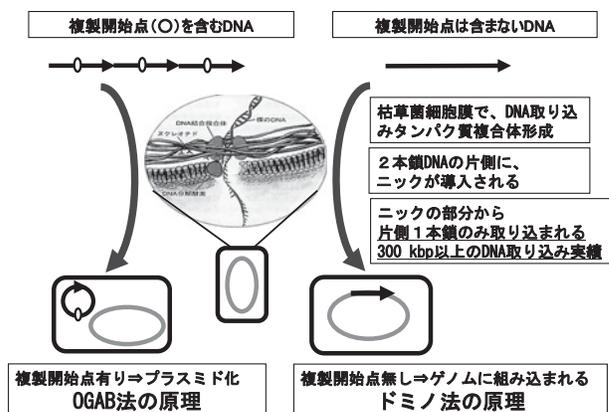


図2. 枯草菌のユニークなDNA取り込み機構

されプラスミドとして確立する(図2左側)。一方開始点
を持たないDNA分子は*recA*依存的相同組換え系により、
ゲノム中の相同塩基配列を検索して組み込まれる(図2
右側)²⁾。詳細は我々の文献を参照していただきたい^{3,4)}。

遺伝子連結に直結するのは図2の左側ルートなので少
し詳しく説明する。複製開始点を持つプラスミドDNA
は、取り込みプロセスでDNAが切断され、さらに1本
鎖DNAを経由するので最終的に菌体内で2本鎖の環状
DNAに修復される必要がある。したがって通常のプラス
ミドの形質転換は困難である。しかしプラスミドの長さ
が2単位以上タンデムに連結されている構造のDNAで
あれば、菌体内の分子内の相同組換えにより容易に環状
化する。すなわち、環状のDNAはまったく必要なく、
直線状のタンデムリピートDNAを用意しさえすればよい。

この枯草菌独特のDNA取り込み様式は、多数のDNA
断片を連結して長鎖DNAを合成するには計り知れない
長所である。多数の遺伝子断片と複製開始点を有するベ
クターを、すべての遺伝子断片のモル数を等しくして*in
vitro*でライゲーションすると、それらが一列に連結し
たユニットが繰り返したタンデムにつながった長鎖DNA
が得られる。この連結は、DNA濃度が高ければ高いほ
ど簡単に起こる。あとはこれで枯草菌を形質転換するだ
けで、多数の遺伝子断片が集積した環状プラスミドが得
られる⁵⁾。一方、大腸菌へのプラスミド導入では「環状」
DNAが必須である。多数のDNA断片を連結すると必
然的にDNAが長くなるが、*in vitro*でのDNA環状化は
DNAが長くなればなるほどDNAの濃度を下げる必要
がある。したがって、多数のDNA断片の連結と、最終
的な環状化を一回のライゲーション操作で完結させるの
は原理的に無理なのである。

連結する対象のDNA断片の末端に3塩基程度の突出
配列を用意し、この突出配列の相補性により連結する断
片の順序と向きを指定すれば、得られた連結産物を枯草
菌に直線状のまま加えれば目的の連結体が正確に高頻度

で環状プラスミドとして得られる。実際、十数個の遺伝子でも順序、方向、遺伝子間の配列などを指定してつなぎ合わせ、ひとつながりの長鎖DNAとして得られる。この手法は我々慶応大学のグループがOGAB (Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis*) 法としてすでに報告している⁵⁻⁹⁾。

枯草菌のなせる匠の技その2

一方、複製開始点を持たないDNA断片は菌体内に取り込まれた後、*recA* 依存の相同組換えシステムに乗ってゲノムに組込まれる。あらかじめ枯草菌ゲノム中に一部相同な領域を用意しておけばその場所に正確に組込まれる。すでにゲノムに組込んだDNAと一部相同領域を持つDNAを新たに加えると相同組換えで連結される。この相同領域を利用する原理を繰返して長鎖DNAを得る手法の概略は図3に示した。目的とする長鎖DNAは小さなDNA断片（ドミノと呼称する）に分割して調整する。ドミノ断片は両隣のドミノと一部重複するように設計されており、枯草菌固有の*recA* 依存的相同組換え経路で連結させる。そのため、隣のドミノとの相同領域は最低500 bp以上が必要である。また連結を確実にを行うためにドミノごとに選択マーカーを変えて逐次導入する必要がある。一度のライゲーション反応で完結するOGAB法に比べると迅速性では譲るものの、ゲノム中に組込まれるおかげで数万塩基を越える長鎖DNAの構築ではドミノ法に優る手法はない¹⁰⁾。多様な配列を持つ長鎖遺伝子クラスターの構築は「枯草菌」ならOGAB法とドミノ法を併用すればどのようなサイズでも確実に対応できる。

OGAB法のメリットは、(i) 1度のライゲーションですべての断片を連結できる、つまり迅速であること、(ii) 断片の両端の3塩基突出を設計することにより遺伝子クラスター内での位置、方向を一義的に設計できる、つまり設計どおりの配列を持つ長鎖DNAを実際に作り出すことができること、(iii) 枯草菌での形質転換では塩基

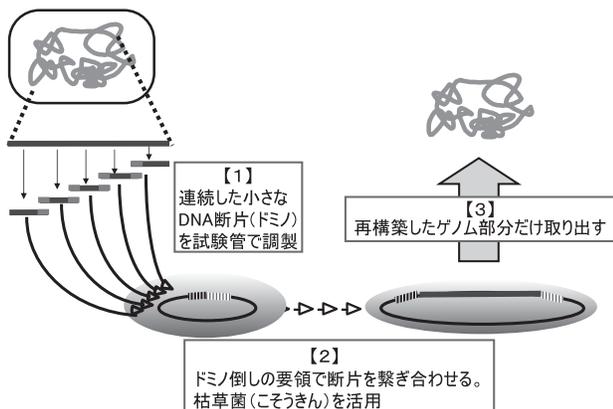


図3. 枯草菌ゲノム中での遺伝子連結

配列のエラーは生じていない、つまり正確な長鎖DNAが得られることであり、長鎖DNA合成宿主としては枯草菌以上の宿主はいない。(iii) の特徴について特に言及しておきたい。図1で示したように、配列まで正確に決定された遺伝子は容易に用意できる。PCRによる増幅、クローニングでも、遺伝子合成カンパニーに注文してもこのレベルでの塩基配列の確認は当然の作業である。枯草菌OGAB法での連結はPCRは使用しないので、塩基配列エラーが生じるとすれば枯草菌内で複製後のことである。我々のデータによればOGAB法による十個程度の遺伝子断片の連結では塩基配列のエラーは観察されていない。この点はOGAB法の汎用化にとって朗報である。

汎用化への検討項目

長鎖の遺伝子クラスター作製後に有用宿主に速やかに導入するには、OGAB法での連結を枯草菌と対象宿主とのシャトルプラスミドベクターで用意すればよい。枯草菌、大腸菌や酵母では巨大なDNAでも形質転換、形質導入、接合伝達で送りこむ技術が適用できるが、一般の有用微生物では個別の遺伝子導入手法を開発しなければならない。大変重要な開発項目ではあるが、スペースがなくなったので別の機会に譲りたい。

本稿で説明した枯草菌を宿主とする遺伝子連結手法¹¹⁾は、もし自動化できれば迅速で汎用的な長鎖遺伝子クラスター創出が達成できる。OGAB法は、*in vitro*で遺伝子断片の「モル数」を揃えてライゲーション反応するのがキーのステップである。そのため、現在手作業で行っているこのステップは自動化できる可能性が高い。一方、ドミノ法では図3に示すように、遺伝子クラスターをゲノムから環状、線状で回収する手法が必須である。いくつかの手法がすでに適用されている⁶⁾ので、こちらの自動化の可能性も別の機会に考えてみたい。

文 献

- 1) Keasling, J. D.: *Metab. Eng.*, **14**, 189 (2012).
- 2) Nandagopal, N. and Elowitz, MB.: *Science*, **333**, 1244 (2011).
- 3) <http://www.syn-biol.com/index.html>
- 4) Chen, I., et al.: *Science*, **310**, 1456 (2005).
- 5) Tsuge, K. et al.: *Nucleic Acid Res.*, **31**, e133 (2003).
- 6) Itaya, M. and Tsuge, K.: *Methods Enzymol.*, **498**, 427 (2011).
- 7) Tsuge, K. et al.: *J. Biotech.*, **129**, 592 (2007).
- 8) Nishizaki, T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1355 (2007).
- 9) Hiroe, A. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3177 (2012).
- 10) Itaya M. et al.: *Nat. Methods*, **5**, 41 (2008).
- 11) 柘植謙爾, 板谷光泰: 合成生物学の隆起—有用物質の新たな生産法構築をめざして—, p.1, シーエムシー出版 (2012).