

枯草菌による遺伝子集積法の OGAB法による長鎖DNA合成

柘植 謙爾*・板谷 光泰

長鎖DNA合成技術は何をもたらすか？

近年、医薬・創薬の分野のみならず、農業、工業、環境のあらゆる分野で、生物のゲノムに新規遺伝情報を導入することによる、物質・エネルギー生産系の効率化や、環境負荷が少ない、あるいはまったく新規な化合物を生産するといった新規バイオプロセスの構築に関心が高まっている。特に最近急速に注目を集める、ゲノム編集技術により、長大なゲノム塩基配列中の任意の場所への遺伝子の挿入が現実のものとなった¹⁾。

生物に物質生産をさせるには、バイオプロセスに関わる一連の遺伝子をすべて導入する必要がある。ゲノム編集技術を用いても1個ずつ遺伝子を導入することでは対応が難しい。単純に操作回数が増えるだけでなく多種類の選択マーカーが必要である。また、遺伝子の導入順序によっては致死性の中間代謝物質が蓄積するために目的の改変体が得られない、あるいはゲノム中のどの場所を指定するかなど、扱う遺伝子の数が増加するほどに困難

さは増大する(図1)。我々は導入する遺伝子群をすべて1つのDNA分子中に連結することでこれらの問題が大幅に改善されると考えた。すなわち対象とする遺伝子群、たとえば長い代謝経路の場合構成するすべての遺伝子を一括して取り扱う方法を実践、確立することにより出した。

多数のDNA断片をひとつながりにする技術(遺伝子集積手法)によって構築される長いDNAをここでは長鎖DNAと呼び、我々が開発した技術を紹介したい。

バイオプロセス構築のための遺伝子集積法

新しいDNA情報を書き込むためには、DNAの化学合成が必要である。以前よりも化学合成技術は着実に進んでいるが、それでも現在のところ200塩基程度が限界といわれている²⁾。大腸菌の標準的な遺伝子の大きさ(約1 kb)から見ても、1/5程度の大きさしかないので、これらをDNAポリメラーゼやDNAリガーゼを用いて、試験管内で連結して、初めて1~3 kb程度の遺伝子サイズのDNA断片の合成が可能となった。しかしながら、バイオプロセスに関わる一連の遺伝子を一括して扱うには、これらの断片をさらに多数つなぎ合わせる、遺伝子集積が必要となる。一度に集積できるDNA断片の数が多いほど、長鎖DNAの作製を短期間に行うことが可能となることから、数を増やすためにさまざまな方法が考案されている。いずれの方法も、集積対象のDNA断片の末端に連結相手の断片を指定するための塩基から80塩基程度ののりしろと呼ばれる配列を持つ断片を準備し、これを利用してすべてのDNA断片を指定した順序と向きに連結することは共通である。これらの中身の断片に宿主で複製するプラスミドベクターの配列を加えて、最終的に環状プラスミドDNAを得る。宿主としては大腸菌か出芽酵母が用いられるが、DNA断片の連結の仕方は宿主ごとに異なる。出芽酵母の場合は、試験管内での事前のDNA断片の連結の必要がなく、細胞内で80塩基程度ののりしろを用いて一度に25断片のDNAを連結することが可能である³⁾。これらの技術を用いて、マイコプラズマゲノムの化学合成DNAを出発材料として再構築することに成功したことは記憶に新しい⁴⁾。欠点として、大腸菌や枯草菌に比較して増殖が遅いという問題がある。

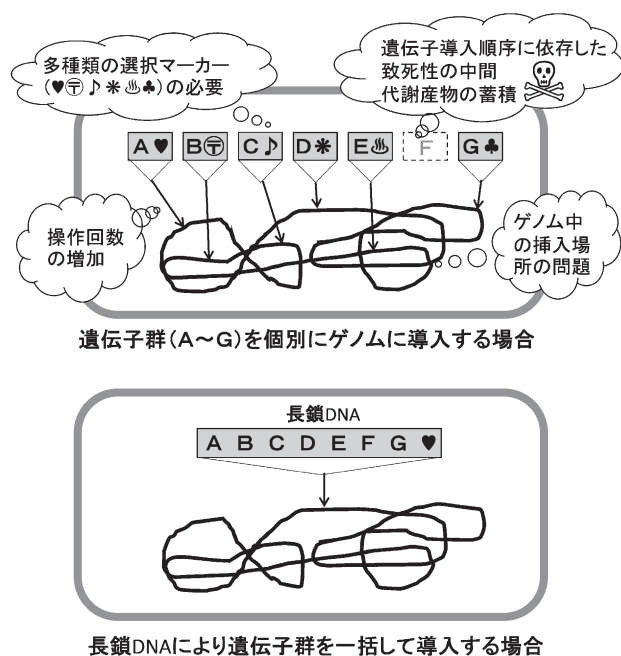


図1. 長鎖DNAによるバイオプロセス遺伝子群の一括導入のメリット

*著者紹介 慶應義塾大学先端生命科学研究所（特任講師） E-mail: ktsuge@ttck.keio.ac.jp

広く普及する遺伝子集積法： Golden Gate法とGibson Assembly法

増殖が速くて取り扱いやすいことで、大腸菌を用いた遺伝子集積がもっとも広く用いられている。大腸菌の場合は、試験管内で環状のプラスミドDNAを構築する必要があるが、通常環状DNAの作成は断片の種類が多いほど困難となる。これを克服するため、DNA断片の連結が進むにしたがって、制限酵素やエキソヌクレアーゼに対する基質DNAがなくなっていくことを利用して連結効率を高めている場合が多い。特に最近よく用いられているのが、Golden Gate法^{5,6)}と、Gibson Assembly法⁷⁾だろう。これらの2つについて紹介したい。

Golden Gate法 制限酵素とDNAリガーゼを同時に加えて行う集積方法である。集積対象となるDNA断片の末端に、TypeIISと呼ばれる左右非対称の認識部位の外側のどちらかの一方を切断する制限酵素のうち切断の末端が突出断片になるようなものの認識部位を導入する(図2)。認識部位の外側を切断する関係で、この酵素により生成される突出末端は、任意の配列を指定することが可能となる。2つのDNA断片の末端間に相補な突出末端を生成するように事前に設計しておけば、これらの2つのDNA断片は、DNAリガーゼにより連結することが可能となる。TypeIIS制限酵素により生成する2つのDNAの末端は、認識部位を含む側の末端と、含まない側の末端とに分けることができる。認識部位を含む側の末端は、DNAリガーゼにより連結されても、共存する制限酵素により再度切断される。一方、どちらの断片も認識部位を含まないものどうしが連結された場合、以降TypeIIS制限酵素で切断されることはない。すなわち、

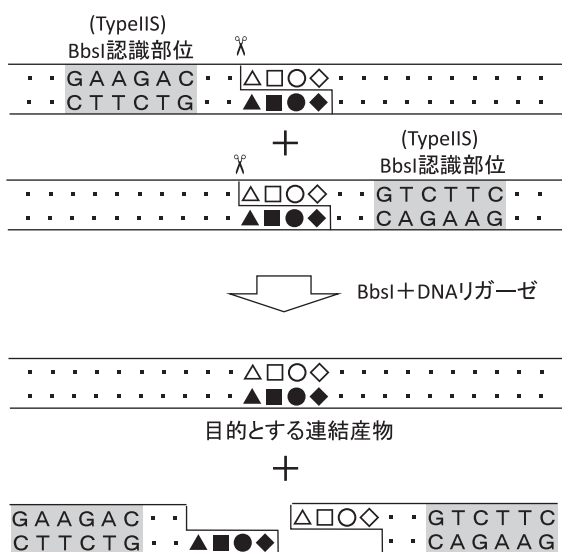


図2. TypeIIS制限酵素の認識部位とGolden Gate法。白ヌキと黒のシンボルは、任意の塩基配列とその相補配列を示す。

どちらの断片も認識部位を含まないものどうしが連結されるものを望ましい連結とすれば、そのDNAが制限酵素で切断されなくなるまで連結を継続すればおのずと指定した向きと順序に遺伝子を集積した断片が形成されるという方法である(図2)。この方法は、10断片程度の遺伝子集積が可能であるが、集積対象のDNA断片の内部にそのTypeIIS制限酵素の認識配列を一切含むことができないという制約がある。

Gibson Assembly法 試験管内で酵素により連結する方法である。5'エキソヌクレアーゼの作用により生成した一本鎖DNA末端をハイブリダイゼーションにより指定の断片を仮連結し、その後、DNAポリメラーゼとDNAリガーゼにより完全連結を行う集積法である。ポイントは、DNA断片が正しく連結されると、5'エキソヌクレアーゼの基質となるDNA末端が消失し、結果として、DNA分解が進まなくなることである。完全に末端がなくなる状態、すなわち環状の状態になる方向性に進むことになる。最大で20断片程度の集積が可能で、100 kb程度の非常に大きなDNAに対しては、有効な方法である。

筆者らによって開発された遺伝子集積法：OGAB法

枯草菌のプラスミド形質転換系を利用した多重DNA断片連結法である。連結の各材料となるDNA断片を、TypeIIS(図2)などの制限酵素を用いて3~4塩基の特異的な突出末端を持つように準備し、その突出末端の相補性を利用して、連結するDNA断片の順序や向きを指定して連結し、最終的に環状プラスミドDNAとして連結したDNAを得る方法である⁸⁾。Golden Gate法やGibson Assembly法と異なり、試験管内での環状のプラスミドDNA分子の準備は必要ない。OGAB法の最大の特徴は、プラスミドの1単位を複数個同一方向に連結した構造を持ち、プラスミドの構成要素が周期的に現れるDNA、いわゆるタンデムリピート状のプラスミドDNAを準備することである。本方法は15個程度のDNA断片の連結が可能であり、開発当時は他に類似の手法がない独自技術で多数の遺伝子を一括して扱う分野で画期的なブレイクが期待された。しかしながら、本方法は、Golden Gate法やGibson Assembly法よりも3~4年以上も前の2003年に発表したにもかかわらず、世界の潮流となる技術にはまだなっていない。その原因の一つとして、この方法に必要なタンデムリピート状DNAの作製には、集積に用いる各DNA断片が等モル混入している溶液を作成する必要があるこれが面倒であると思われることであろう。

一度に50断片以上を集積可能な第二世代OGAB法

等モル混合物の調製はOGAB法の必須工程であるの

で、これを回避することはできない。しかし仮にこの工程を簡単にかつ精度よく行うことができるようになれば、上述の酵母による遺伝子集積、Golden Gate法、Gibson Assembly法を凌駕するような、多数のDNA断片を一度に集積する方法の流れを枯草菌がつくりだすことになるだろう。そう考えてOGAB法の改良を行った。従来のOGAB法（第一世代法）の問題点は、材料となるDNA断片の長さが異なることである。遺伝子やプロモーター、制御領域などの長さが異なる機能単位をそのままDNA断片として用いるために、長鎖DNAの構成を把握しやすいメリットはあるものの、すべてのDNA断片を等モルに揃えることが技術的に困難である。しかし、化学合成DNAを出発材料にする前提に立てば、わざわざ材料の長さを異なる大きさにする必要はなく、同じ長さに揃えてしまえばよいことに気がついた。このアイデアに基づく、新しいOGAB法（第二世代法）では、まず目的とする最終の長鎖DNAの配列を基に、コンピューターシミュレーションにより、連結に必要な各材料

DNA断片の突出配列が特異的であるという条件を満たしつつも、各DNA断片の長さが可能な限り等しくなるように材料DNA断片を設計することで、等モルにより調製しやすいようにした⁹⁾ (図3)。これは、第一世代法ではDNA断片の長さが異なるために個別に行わなければならない、制限酵素によるDNA断片の調製と続く不要なプラスミド断片の除去の工程を、第二世代法では材料を混合してまとめた状態で行うという合理化も同時にもたらした(図3)。その結果、第一世代法では、混合後の各DNA断片のモル数のばらつきの変動係数を20%以下にすることが困難であったのに対し、第二世代法では7%以下に抑えることが可能となった。これにより、効率的にタンデムリピート状プラスミドDNAが準備できるようになった。平均970 bpのDNA断片を50個連結して全長48.5 kbのラムダファージのゲノムDNAを再構成し、平均108 bpのDNA断片を55個連結して6 kbの人工オペロンを作成するなど、前例のない一回の連結操作で50個以上のDNA断片を指定の向きと順序に連結することが可能なことを示した。多数の断片の集積法としてよく使われる酵母による遺伝子集積法と比較しても、我々の第二世代OGAB法は、断片数で倍以上、しかも短期間で確実に集積ができる。50 kb程度の長鎖DNAならまったく新規に設計した塩基配列でも短期間で確実に構築できる時代に入ったのである。

おわりに

第二世代のOGAB法により50個以上のDNA断片の連結によりバイオプロセスレベルの一括集積が可能となった。しかしながら一方では、膨大な種類の材料DNAを一つの誤りもなく準備しなければならないなど、人手作業の限界を窺う状況になりつつある。第二世代のOGAB法の普及の焦点は、誰もが利用可能な状態にできるかどうかにかかっていることに間違いはない。この点を念頭に筆者らは現在、これらの工程の機械化・自動化の可能性について検討を行っている。

文 献

- 1) 科学技術振興機構研究開発戦略センター 調査報告書 ゲノム編集技術
<http://www.jst.go.jp/crds/pdf/2014/RR/CRDS-FY2014-RR-06.pdf>
- 2) Ma, S. *et al.*: *J. Curr. Opin. Chem. Biol.*, **16**, 260 (2012).
- 3) Gibson, D. G. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 20404 (2008).
- 4) Gibson, D. G. *et al.*: *Science*, **329**, 52 (2010).
- 5) Engler, C. *et al.*: *PLoS ONE*, **3**, e3647 (2008).
- 6) Engler, C., *et al.*: *PLoS ONE*, **4**, e5553 (2009).
- 7) Gibson, D. G. *et al.*: *Nat. Methods*, **6**, 343 (2009).
- 8) Tsuge, K. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **31**, e133 (2003).
- 9) Tsuge, K., *et al.*: *Sci. Rep.*, **5**, 10655 (2015).

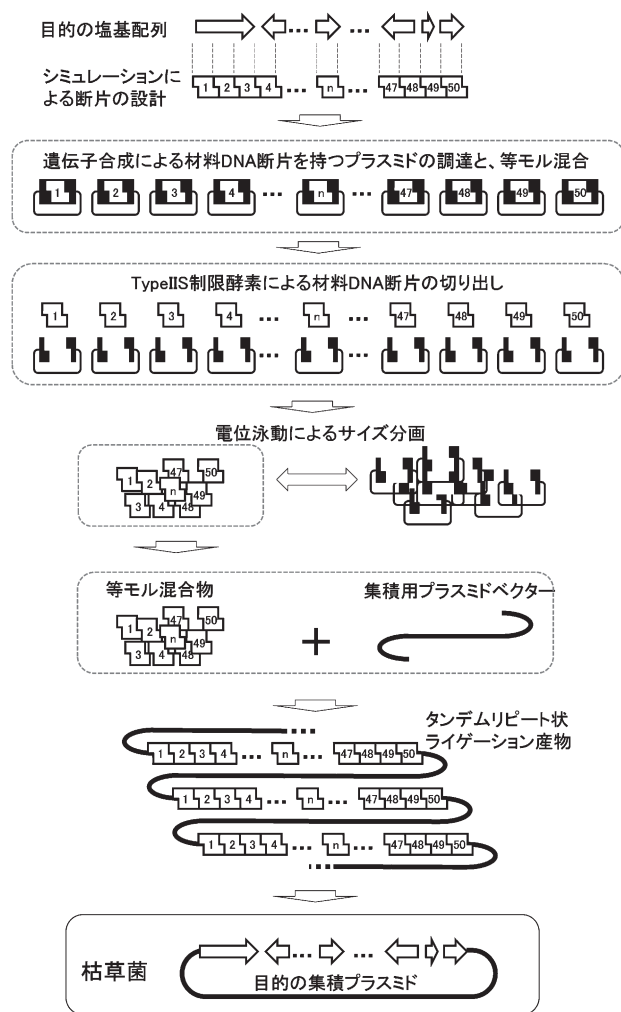


図3. 第二世代OGAB法の全体像