

# 核酸分解酵素の組合せによる迅速なゲノム合成手法

板谷 光泰

## はじめに

生物（細胞）はゲノムなしでは生きられない。ゲノムは長らく「調べて学ぶ」対象であった。革新的なゲノム編集技術の登場によりゲノムの構造改変は細胞の種類を問わず可能になりつつあり、ゲノムは「作って学ぶ」時代に入っている。ゲノム編集は既存のゲノムを対象にしている段階であるが、「作って学ぶ」究極はゲノム合成であろう。具体的には、枯草菌をベースにしたゲノム丸ごとクローニング<sup>1)</sup>、酵母染色体を人工ゲノムで改良する<sup>2)</sup>、酵母でゲノムを丸ごと合成する<sup>3)</sup>など、技術レベルは完成の域に達していると思う。別の言葉でまとめると、ゲノム合成は、塩基配列情報さえ提示されれば鋳型DNAつまりPCRを経由しなくても可能な時代に入っているといえる。鋳型が不要な大きなDNA（長鎖DNA）の合成は可能である<sup>4)</sup>が、コストがまだ高いために普及が遅れている。大きなゲノムを「合成」するのに「分解」酵素が必要との表題には戸惑われる方々がおられるかもしれない。枯草菌ゲノムを利用する筆者らの研究開発では避けて通れないことなので、本稿ではゲノム再構築に有用、必須な核酸分解酵素の利用法、ならびに今後の見通しをまとめてみたい。

## 枯草菌を利用するゲノム再構築システム

ゲノムは数百から数千の遺伝子を含むDNA高分子であり、そのサイズは微生物でも優に500 kbpを超える。これだけ巨大になると溶液中での取り扱いが困難になり、いわゆる通常の遺伝子クローニング技術は適用できない。実際、熟練した技術者でも200 kbpを超えると100%無傷な溶液DNAの調製は無理である。ではなぜ500 kbpを超えるゲノムの構築が報告されているのか<sup>1-3)</sup>。答えは簡単で、ゲノムを分割して200 kbp以下のサイズのDNAを個別に調製し、それらをつなぎ合わせて行う。枯草菌での実践を図1に示したが、この原理で丸ごとクローニングできる宿主は枯草菌<sup>1)</sup>と酵母<sup>2)</sup>に限られる。広く利用される大腸菌では残念ながらこのつなぎ合わせるステップに制限があり、ゲノム丸ごと合成の報告はない。

ではなぜ枯草菌なのか。枯草菌は外部のDNAを取り

込む能力（コンピテンス）が高く<sup>5)</sup>、100 kbp以上のDNAを取り込み、枯草菌ゲノム中に相同な塩基配列を準備しておく、組換えが生じて取り込まれる<sup>1,6,7)</sup>。すでに組み込んだDNAと少しかけオーバーラップするDNAを新たに準備してコンピテンス経路で取り込ませると、組み込まれたDNAは連結できる。取り込ませる性質が残っている限り繰り返し利用でき、オーバーラップのあるDNAをドミノと総称して、ゲノムを完全にカバーするドミノが準備できればドミノ倒しのイメージで対象ゲノムを枯草菌ゲノム中に再構築できた<sup>1,6,7)</sup>。一つのだミノとオーバーラップの長さは自由に選べるが、筆者らは100 kbp程度ドミノサイズ、5~10 kbp程度のオーバーラップサイズで快適に適用している。

図2に100 kbp程度の操作で延長した長鎖DNAの例を示した。この操作法の開発を支えたのが後述するように核酸分解酵素なのである。ドミノ法を支える性質は枯草菌が突出している<sup>1,6,7)</sup>、しかも、もっとも重要な点であるが、コンピテンス経路での組み込みでは塩基配列の変異は生じない<sup>8)</sup>。

近未来では、次世代シーケンサーは通常の研究室に常備され、洗練化されるオミックス解析技術と組み合わせ、細胞の生き様を1細胞レベルで調べられるだろう。新しい細胞を構築したら、ゲノムリシーケンスは必須になっている。しかしながら、ゲノム全体構造の確認とゲノム再構築の結果確認にはやはり古典的な核酸分解酵素はまだ必要と考える理由とシナリオを以下に述べる。

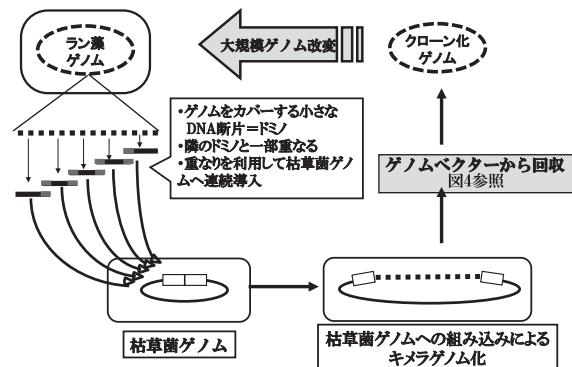


図1. ゲノム合成の枯草菌プラットフォーム。ドミノ法を適用して枯草菌ゲノム中で延長できた結果の例は図2に示す。詳細は文献1, 9参照。

シアノバクテリアゲノムの再起動：  
シアノバチルスからの試み

現存のゲノムを丸ごと取り扱うだけでなく、新たに有用なゲノムを設計してそれを完全合成できる時代になっている。図3に酵母と枯草菌でのゲノム丸ごとクローニングの比較を示す。シアノバチルスについては生物（細胞）の生き様そのものを計画的に予測し設定することが可能になった。丸ごとクローニング、ゲノム合成の手段は通常の遺伝子クローニング技術と異なることが多い。

ここでは筆者らが適用した配列依存的な核酸分解酵素に絞る。シアノバチルスが再起動して光合成できるバチルスシアノ（仮想細胞）に持っていく試みはすべてネガティブだった(図3)。筆者らが頻繁に使用する type II 制

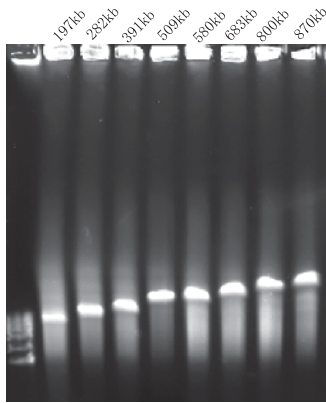


図2. ドミノ法でシアノバクテリアゲノムを100 kbpずつ延長。I-PpoIで枯草菌ゲノムから切り出し、パルスフィールドゲル電気泳動装置で解析。パルス2 min, 固定電圧150 V, 温度14°C, 泳動時間17時間の条件で確認。ゲノムのサイズ197 kbp～870 kbpに関しては文献1参照。

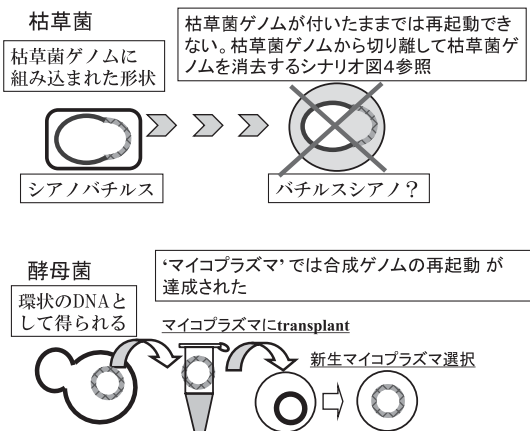


図3. 酵母と枯草菌のゲノム丸ごとクローニングと再起動。シアノバチルスとはシアノバクテリア（ゲノムサイズ3500 kbp）と枯草菌ゲノム（同4200 kbp）のゲノムキメラ細胞。詳細は文献1, 7参照。

限酵素とホーミングエンドヌクレアーゼ（HO）とその認識部位を示す。

type II 制限酵素としては

SfiI: GGCCNNNNNGGCC

NotI: GCGGCCGC

Sse8387I: CCTGCAGG

ホーミングエンドヌクレアーゼ（HO）としては

I-SceI: 5'-TAGGGATAACAGGGTAAT-3'

I-CeuI: 5'-TAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGA-3'

I-PpoI: 5'-ATGACTCTCTTAAGGTAGCCAAA-3'

type II 制限酵素は枯草菌ゲノム中に26, 88, 33個同定されており、ゲノム構造解析とゲノム編集に伝統的に用いている。一方でHOの認識配列は枯草菌ゲノム中にも、丸ごとクローニング対象のゲノムにもない。これらは意図的なゲノム解析とゲノム操作、ゲノム工学に利用しており、I-PpoIのゲノム解析への利用は図2に示した。他のHOであるI-SceIは以下で紹介する。またI-CeuIについては、過去の使用例<sup>9)</sup>以外の新たな利用法は、今回は省略する。

シアノバチルスからバチルスシアノ（仮想細胞）を誘導する手法に過去10年以上の歳月を費やした。光合成するバチルスシアノの誘導はできておらず、膨大な未発表データにより、シアノバチルスが自然にバチルスシアノに変身することはないといえる。これに対して図3で示す酵母では、合成されたマイコプラズマゲノムは環状で異なるマイコプラズマ細胞に導入できた<sup>2)</sup>。シアノバクテリアのゲノムが枯草菌ゲノムとキメラ状態につながったままのこれまでの取組みから一歩進めて、丸ごとクローニングされたシアノバクテリアゲノムを環状のまま切り離すシナリオを図4に示す。シアノバクテリア細

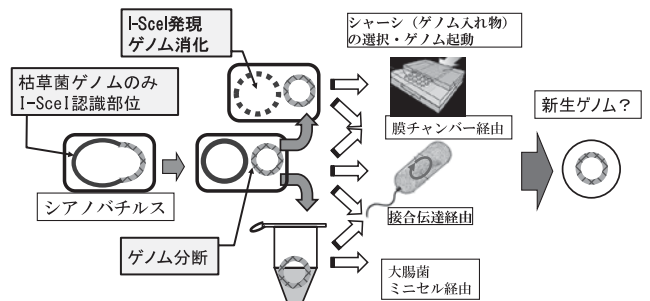


図4. ゲノム再起動シナリオ。枯草菌での丸ごとクローニングを経由する合成ゲノム起動への夢。シアノバチルス(図3で表示)にゲノム分断法<sup>10)</sup>を適用して、残った枯草菌ゲノムのみ特異的に消化する。そのために枯草菌ゲノム中のSse8387I部位にHOであるI-SceI認識部位を組み込んだ株を構築<sup>11)</sup>して準備を進めている。

胞への巨大な長鎖DNAの導入法は確立されていないので、枯草菌ゲノムだけを消化するシナリオを考えた。そのために枯草菌ゲノム中のSse8387I部位にHOであるI-SceI認識部位を組み込んだ株を構築<sup>11)</sup>して準備を進めている。

### ゲノム合成の近未来

「核酸合成」のために「核酸分解酵素」を使用するという一見パラドックスに見える例に絞って紹介した。紙面の都合で省いたが、ゲノム合成に必須な長鎖DNA合成にはtypeIIS制限酵素の活用が必須であるとの<sup>4,12,13)</sup>例も参照していただきたい。単なる構造改変を飛び越えて、もはやゲノムの完全合成すら可能であることが明白にされている。先行研究のない前代未聞の成果も期待できている。ゲノム編集技術の登場でゲノム合成の対象は、単細胞微生物から動物、植物まで一気に拡大する動きを見せている。ゲノム編集技術も核酸分解酵素の細胞内導入に基づく革新技術である<sup>14)</sup>。この合成生物学の潮流ともいえる必然をまともに取り込む動きとして2016年6月に、ゲノム合成国際コンソーシアム(Genome Project-Write, GP-Write)が発足した<sup>15)</sup>。2017年5月にニューヨークゲノムセンターで開催されたGP-Write会議には、日本を含む世界10か国から250名以上の研究者、企業、出資団体、プレス関係者などが参集した。クローズドな会議ではあったが、ゲノム合成のpilot研究の現状と未来が多方面の参加者で熱く語られた。巨大DNA合成では大腸菌と酵母の活用は報告されたが、枯草菌はまだまだツールとしては認識されていない。逆に今後の展開次第では世界標準になる可能性は大いにあると感じた。巨大DNA合成には個人的には、鋳型を必要としないで合成できる新規DNA合成酵素が必要だと考えている。たとえばモノヌクレオチド取り込みを、照射する4種類の波長依存的に制御可能な酵素が開発できないだろうか。また原料のモノヌクレオチドを化学合成でなく代謝工学的にため込む宿主の創製とからめれば*in vivo*で、設計どおりの長鎖DNAを合成するシステムはできないだろうか。アイデア勝負の時代でもある。

### おわりに

ゲノムは合成できるが、枯草菌経路で合成したゲノムの再起動はこれからであろう。酵母経路での<sup>2)</sup>合成されたゲノムの再起動はマイコプラズマに限定されているようであり、また最近報告された酵母染色体Sc2.0は、合成したDNAで酵母の既存染色体を置き換える作業であり、まったく新規なゲノム合成ではない<sup>3)</sup>。枯草菌でのバクテリアゲノム丸ごとクローニングは、真正細菌同士のキメラ化で遺伝子発現のぶつかり合いという種の確立と浮動、そして、翻訳と転写のどちらが種を決めるのかなど深い問題を数多く提起したままである<sup>1,7,16,17)</sup>。図4のシナリオがブレイクに向けた一歩になるべく精進している。

繰り返しになるが、我々はゲノム全塩基配列が判明していることが前提の時代にいる。この生物はこの遺伝子(塩基配列)を保持している(あるいは保持していない)ことを前提とする時代である。「眺めて驚く学問から、作って調べさらに役立つ学問へ」を標榜し続けたいと思っている。

### 文 献

- 1) Itaya, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15971 (2005).
- 2) Hutchison, C. A. *et al.*: *Science*, **351**, aad6253 (2016).
- 3) Richardson, S. M. *et al.*: *Science*, **355**, 1040 (2017).
- 4) Tsume, K. *et al.*: *Sci. Reports*, **5**, 10655 (2015).
- 5) Chen, I. and Dubnau, D.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 241 (2004).
- 6) Itaya, M. *et al.*: *Nat. Methods*, **5**, 41 (2008).
- 7) 板谷光泰ら: 蛋白質核酸酵素, **51**, 61 (2006).
- 8) Watanabe, S. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **194**, 7007 (2012).
- 9) Toda, T. and Itaya, M.: *Microbiology*, **141**, 1937 (1995).
- 10) Itaya, M. and Tanaka, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5378 (1997).
- 11) Itaya, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 180 (2012).
- 12) 板谷光泰, 柘植謙爾: 生物工程, **91**, 319 (2013).
- 13) 柘植謙爾, 板谷光泰: 化学と生物, **54**, 740 (2016).
- 14) 石野良純: 生物工程, **95**, 377 (2017).
- 15) Boeke, J. D. *et al.*: *Science*, **353**, 126 (2016).
- 16) 浅島 誠ら編, 柳川弘志ら著: 現代生物科学入門9 合成生物学, p. 35, 岩波書店 (2010).
- 17) 田口精一編: 生命システム工学—進化分子工学から進化的生命工学へ, p. 131, 化学同人 (2012).