

シームレスクロニング法 ～古典的な制限酵素とDNAリガーゼを用いないクロニング～

本橋 健

はじめに～DNAクロニングの今昔～

生命科学分野におけるDNAクロニングは、日常的に使う手法の一つであろう。このDNAクロニング技術については、最近10年ほどでずいぶんと変化した。それまではベクターに存在する制限酵素認識部位に合わせて挿入DNA断片を設計し、制限酵素切断したDNA断片同士をDNAリガーゼで結合させる、ということ Okayama & Berg法¹⁾以来、約30年間続けてきた。筆者が学生だった20年程前は、研究室にさまざまな制限酵素が揃えられており、代表的な制限酵素認識配列のパリンドローム（回文構造）のいくつかは、覚えてしまうほど頻繁に使用していた。

ところが、制限酵素とDNAリガーゼを用いたDNAクロニング法に代わり、最近は多くのシームレスクロニング法が開発されている。ここで紹介するシームレスクロニング法とは、制限酵素部位に依存することなく自由自在にプラスミドを構築できる方法のことである。また、シームレスクロニング法では、一つのDNA断片を効率的にクロニングするのは当たり前であり、複数断片を同時にベクターへクロニングできる方法もある。それまで、DNAワークが研究を進めるうえでの律速段階となり、必要なプラスミドを作製するのに、多くの時間を費やし、これが研究の進展を妨げることもあった。しかし、シームレスクロニング法を使用すると、DNAワークに必要な時間が格段に減り、その先の研究に時間を割くことができる。その意味では、やっと本来の研究テーマにしっかりと向き合える時代がやって来たと言えるのかもしれない。

この解説では、近年急速に普及しているシームレスクロニング法について、導入する際の利点や注意点を紹介することを目的としている。なお、今回は、クロニングの際にDNA配列を完全に自由設計できるシステムのみを対象とするので、両端に特定配列が必要となるGatewayシステム²⁾などについては、扱わないことにする。

シームレスクロニング法の開発

初期のシームレスクロニング法としては、Type IIS制限酵素を用いる方法³⁾と sequence- and ligation-independent cloning (SLIC) 法⁴⁾の二つが、よく知られているように思う。

Type IIS制限酵素は、制限酵素のDNA配列認識部位と切断部位が異なる(図1)。この特徴を利用して、DNA切断部位に一本鎖突出端を自由に設計できる。Type IIS制限酵素のDNA認識部位をプラスミドベクターの切断部位内側に設計しておけば、DNA切断時にType IIS酵素のDNA認識部位が消失するため、Type IIS制限酵素を用いたクロニングでは、できあがるプラスミドベクターは余計な配列を含まず完全にシームレスに作製できる。しかし、使用するベクターには、あらかじめType IIS制限酵素認識部位を導入しておかなければならないのが弱点である。ただし、一度そのようなベクターを用意すれば便利に使用できるため、Type IIS制限酵素を用いた方法は、Golden Gate法⁵⁾、GoldenBraid法⁶⁾、MoClo法⁷⁾などの複数断片のカセット入れ替え型クロニング法に発展し(図2)、合成生物学などの分野で使われている。

一方、SLIC法は、二本鎖DNAの両端部分に一本鎖突出端を持つDNAを生成し、二つの一本鎖突出端DNAをアニーリングすることで、DNAリガーゼに依存

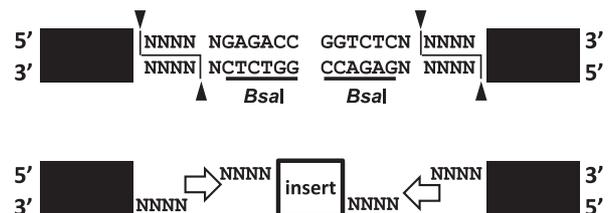


図1. Type IIS 制限酵素 (*BsaI*) を使用したシームレスクロニング。Type IIS 制限酵素である *BsaI* は、DNA 認識部位 (GAGACC) と切断部位 (▼) が異なる。ベクター上の Type IIS 制限酵素の DNA 認識部位は、切断により切り取られ、クロニング後の完成したプラスミド上に Type IIS 制限酵素の DNA 認識配列は残らない。

著者紹介 京都産業大学総合生命科学部生命資源環境学科 (教授), 京都産業大学生態進化発生学研究センター
 E-mail: motohas@cc.kyoto-su.ac.jp

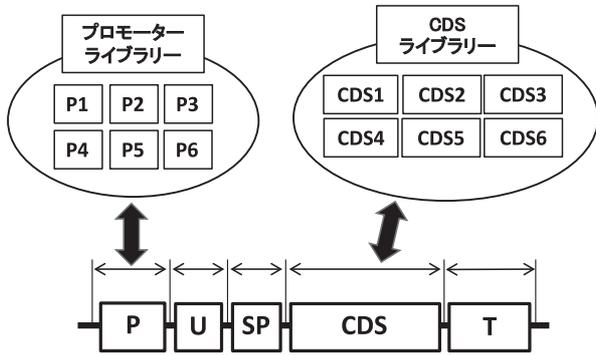


図2. カセット入れ替え型ベクターシステム概念. カセット入れ替え型ベクターシステムでは、Type IIS制限酵素を使用することにより、各ユニットライブラリーから自由に各ユニットをシームレスに入れ替えることができる。P:プロモーター、U:5'-UTR、SP:シグナルペプチド、CDS:翻訳領域、T:ターミネーター。

さまざまなシームレスクロニング法

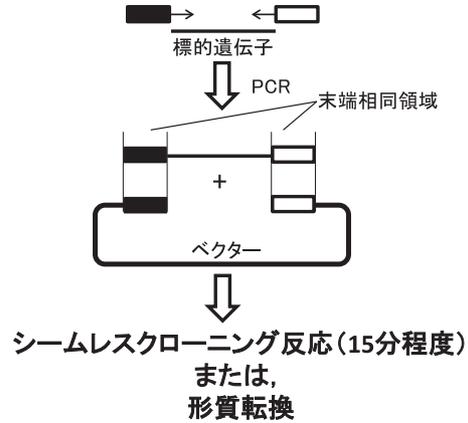


図4. 一般的なシームレスクロニング. 末端相同領域の最適長は、各方法により異なる(15-50 bp). 詳細は、本文参照。

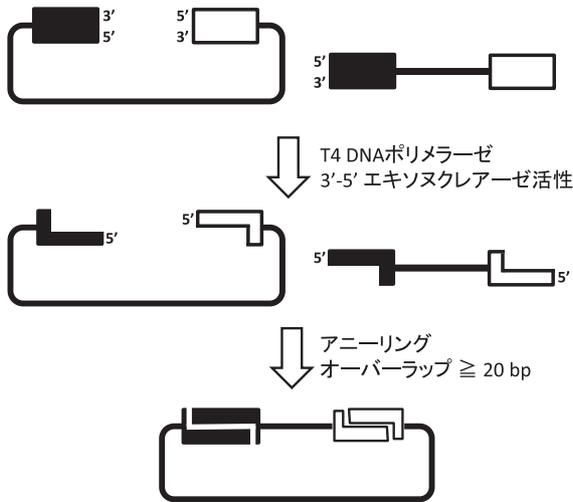


図3. SLIC法の原理. DNAの末端にある■部分と□部分は、二つのDNA断片の相同領域を示している。

せずに二つのDNAをつなぐ技術である⁴⁾。この方法では、T4 DNAポリメラーゼの3'→5'エクソヌクレアーゼ活性を利用し、DNA末端に5'突出末端の一本鎖DNAを生成し、二つのDNA間でアニール後、大腸菌を形質転換する(図3)。大腸菌内に取りこまれたDNAにはニックやギャップが残されているが、大腸菌の持つシステムにより修復され、目的のDNA断片を挿入したプラスミドを回収できる。後に紹介するシームレスクロニング法のいくつかは、このSLIC法の考え方を基にし、いくつかの工夫をこらして、効率や使いやすさを改良している。

シームレスクロニング法導入の利点と注意点

現在用いられている一般的なシームレスクロニング法の概略を示した(図4)。図のように、二本鎖DNA断

片の末端領域に相同塩基配列を持つDNA断片を用意し、それをクロニングに用いる。末端DNA相同領域の長さは、各方法により異なっている。現在、普及しているシームレスクロニング法の多くは、15~50 bp程度の末端DNA相同領域を持たせることで二つのDNAを特殊なベクターを使用することなく連結できる。制限酵素部位に依存せず自由自在にプラスミドを設計できることに加え、効率が良いため2断片や3断片を同時にクロニングできることも強みである。一見良いことづくめのシームレスクロニング法だが、ここではそれを導入する際の利点だけでなく、利点に隠れて忘れがちな注意点を述べておきたい。シームレスクロニング法を導入する際の利点をまとめると、以下の三つだろう。

1. 制限酵素部位に依存せずにベクターを自由に設計できる。
2. 2断片,3断片などの複数DNA断片でも同時にクロニングできる。
3. PCRで増幅した二本鎖DNA断片を制限酵素処理する必要がない。

これら三つの特徴により、これまで多くの時間を要したプラスミド構築も、短時間で終わることができるようになった。また、最近では数百~数千bpの二本鎖DNA断片を人工遺伝子合成することが身近になっている。シームレスクロニング法は、この人工遺伝子合成とも非常に相性が良い。合成DNA断片が到着したら、制限酵素処理などを一切行うことなく、直鎖化したベクターと混合し、シームレスクロニング反応を行うだけで、すぐに大腸菌の形質転換に持っていくことができるので、大変便利である。

一方、注意点としては、結合させる末端DNA相同領

域部分に繰り返し配列がある場合に、正確にDNAを連結できなかつたり、効率が落ちたりすることがあげられる。ただし、繰り返し配列の問題については、DNA連結部の設計を工夫することで回避できる。たとえば、DNAの連結部分を単純にずらしたり、アミノ酸の翻訳領域であればコドンを変更したりするなどの方法が有効である。

さまざまなシームレスクローニング法

では、実際のシームレスクローニング法にはどのようなものがあるのだろうか。現在でも新しい方法が次々と開発されているが、すべてを紹介することはできない。ここでは、市販品としてよく知られている二つの方法と、これらとは異なる特徴を持つ三つの方法を紹介したい。

1. ギブソンアッセムブリー この方法では、T5エクソヌクレアーゼ、Phusion DNAポリメラーゼ、Taq DNAリガーゼの三つの酵素の働きを用いて、シームレスクローニングを行う⁸⁾。まず、T5エクソヌクレアーゼの5'→3'エクソヌクレアーゼ活性により、DNA断片の末端領域を一本鎖DNAにする。ついで、その末端が他のDNA断片とアニールしたところをPhusion DNAポリメラーゼとTaq DNAリガーゼにより、*in vitro*でギャップを埋め、ニックをつなぐ。メーカーからは、末端相同領域として15–20 bpが推奨されている。反応条件は50°Cで15–60分間である。反応温度が50°Cであるため、T5ヌクレアーゼは徐々に失活し、必要以上にDNAが分解されないように工夫されている。これに対して、DNA合成は熱安定性の高いPhusion DNAポリメラーゼを使用しているため、この温度で失活せず働きつづける。実に巧妙なシステムである。

2. In-Fusion PoxvirusのDNAポリメラーゼは、Mg²⁺と低濃度dNTPs存在下で二本鎖DNAに対して3'→5'エクソヌクレアーゼ活性を示し、生成した一本鎖DNAは、他のDNA断片の相補する一本鎖DNA領域とアニールする。ギャップを含む二本鎖DNAは、大腸菌を形質転換後、菌体内のシステムで修復される。In-Fusionの原理は、SLiC法とほぼ同様であるが、poxvirus DNAポリメラーゼでは、挿入断片がアニールしたギャップを含む二本鎖DNAに対してポリメラーゼの親和性が低く、必要以上にヌクレアーゼ活性が働かないところがポイントのようだ^{9,10)}。In-Fusionキットの場合、末端相同領域は15 bpで、反応条件は50°C、15分間が推奨されている。

3. Seamless ligation cloning extract (SLiCE)

この方法は、大腸菌の粗抽出液を使用するだけで、シ-

ムレスクローニングを行う方法である。オリジナルのSLiCE法では、大腸菌にファージのRed組換えシステムを発現させ、その粗抽出液を調製すると、シームレスクローニング試薬として使うことができる¹¹⁾。しかし、この方法はファージのRed組換えシステムを発現するPPY株という特殊な大腸菌株を必要とした。その後、SLiCE法は改良され、通常研究室で使用している大腸菌株から調製した粗抽出液でもシームレスクローニングできるようになった¹²⁾。2015年に発表されたこの方法は、論文の記述通りに一般的な大腸菌株を培養し、抽出緩衝液で大腸菌を可溶化後、上清を回収するだけで効率の良いシームレスクローニング試薬を調製できる^{13,14)}。必要な試薬は、大腸菌液体培地、細胞破碎液(市販品、またはTris/Triton緩衝液)、ミリQ水、80%グリセロールの四つだけである。末端相同領域は15–19 bpで、反応は37°C、15分間で十分な効率を示す¹³⁾。ただし、このSLiCE法の作用メカニズムは明らかになっていない¹⁵⁾。

4. Gap-repair cloning これまで紹介した三つの方法は、複数のDNA断片を*in vitro*でシームレスクローニング反応させることでDNAを連結させる。これに対して、これから紹介する二つの方法は、二つの直鎖DNA断片を混合した後、直接細胞へ導入し、*in vivo*の相同組換え活性を利用する方法である。Gap-repair cloning法は、二つのDNA断片を酵母に導入し、酵母の相同組換え活性を使用し、*in vivo*でDNAを連結する¹⁶⁾。*In vitro*でのDNA連結反応が必要ないため、二つのDNAを単純に混ぜ合わせて細胞に導入するだけでよい。ただし、DNA断片の末端相同領域の長さは、25–30 bp程度必要である^{16,17)}。*In vivo*でDNAの連結反応を行う分、必要となる相同領域が多少長いのかかもしれない。この方法は、永野らにより詳しく解説されている¹⁷⁾。

5. In vivo E. coli cloning (iVEC) Gap-repair cloning法は酵母細胞の*in vivo*相同組換え活性を用いてシームレスクローニングを行うが、これと同様なことを大腸菌で行うのが、iVEC法である。大腸菌を使用した*in vivo*クローニング法は、かなり昔に報告されていたが^{18,19)}、あまり普及しているとは言えない。これは、酵母と比較すると、大腸菌の*in vivo*相同組換え活性が低いことに原因があるようだ。ただし、最近はこの方法も注目されるようになっており、その理由については後述する。

シームレスクローニング法の選択

～「できる」と「使える」は大違い～

数多くあるシームレスクローニング法であるが、どの

方法を導入するのが良いのだろうか。実際に導入を考える際に注意する点をいくつか指摘しておきたい。重要なメッセージとしては、「できる」と「使える」は大違い、ということである。現在、シームレスクローニング法に関する論文が数多く出版されているが、その多くが「できる」ことは証明している、「使える（または、使いやすい）」ことを示しているわけではない。導入を検討する際には、クローニングの効率がどの程度か、また使いやすさ（省ける手間・コスト）はどの程度か、という二つの観点から検討していただきたい。また、一般にクローニング効率を評価する際には、スクリーニングしたクローンの陽性率を気にすることが多い。しかし、それと同程度に大切だが忘れがちな点として、一定量のDNAを形質転換したときに出現するコロニー数がある。シームレスクローニング法を開発したという論文が発表されても、クローンの陽性率は示されているが、出現するコロニー数が市販品と比較して多いのか、少ないのか、を示していない論文も多い。クローンの陽性率がいくら高くとも、そもそも出現するコロニー数が少なくても、効率の良いクローニングはできない。出版された論文の手法のなかには、シームレスクローニングができないわけではないが、決して使いやすくない、という方法もあるので注意していただきたい。

シームレスクローニング法を導入する際に検討すべき点をまとめると、以下のようになる。

- ①クローニング効率（出現コロニー数と陽性率）
- ②準備や反応にかかる時間と手間
- ③反応コスト

市販品を用いれば、③は高くつくが、①、②については考える必要がない。そのため、多くの研究費を稼ぐのが一番手っ取り早い（学生なら、研究費の潤沢なラボを選ぶのが良い）。しかし、近年は研究費事情も厳しいため、各研究室の懐事情と相談のうえ、①～③のバランスで方法を選択することになるだろう。その際に参考となりそうな情報をいくつか提供したい。今回紹介したシームレスクローニング法のおよそのコストは以下のようなものである。市販品であるギブソンアッセムブリー、In-Fusionは、約1,800–2,000円/反応である。ギブソンアッセムブリーについては、オリジナル論文を参照すると、自分自身でマスターミックスを調製できる²⁰⁾。その際の反応コストは約400円/反応程度であるので、だいぶ経済的だ。ただし、3種の精製酵素を使うため、初期投資として約4万円が必要となる。

これに対して、大腸菌の粗抽出液を使用するSLiCE法は、培地、反応緩衝液に用いる試薬、細胞溶解に用い

る抽出液などすべて含めても、0.4円/反応である²¹⁾。この方法は、市販品のシームレスクローニングキットと効率の比較も行われており、その結果によれば、市販品のIn-Fusionほど高くはないが、代替法として十分に使用できる効率であった²¹⁾。SLiCEの調製に使用できる大腸菌株は、DH5α, JM109などの一般的な菌株をはじめとして、研究室で通常使用する多くの菌株を使うことができる¹²⁾。これらの菌株のうち、一つくらいは研究室にストックがあるのではないだろうか。また、研究室で日常使用している大腸菌株から粗抽出液を調製すれば良く、50 mL培地からSLiCEを一度調製すると、SLiCE反応を2,000反応以上行うことができる。調製したSLiCEは、-80°Cで長期保存することができ、5年前に調製したものでも十分に使用できる²²⁾。

酵母を使用したgap-repair cloning法や大腸菌のiVEC法は、挿入DNA断片とベクターDNA断片を酵母や大腸菌に直接導入するだけなので、*in vitro*でのDNA連結反応が必要なく、SLiCEよりさらに安価である。また、二つのDNA断片を混合して酵母（または大腸菌）へ導入するだけなので、他の方法と比較すると格段に作業工程が少ない。

Gap-repair cloning法については、研究室で酵母の取扱いになれているならば、良い方法だろう。この方法の難点は酵母用のベクターが必要なことだったが、最近では、酵母用ベクターを使用せずにヘルパープラスミドを使うシステムも開発されている²³⁾。手順としては、二本鎖DNA断片を酵母に遺伝子導入したのちにプラスミドを回収し、そのプラスミドを大腸菌に形質転換して最終的なプラスミドを得る。このように、作業は少なく済むがプラスミドが完成するまでには4～5日間を要する¹⁶⁾。

Gap-repair cloning法が酵母の持つ内在性のDNA相同組換え活性を用いているのに対して、大腸菌の持つ同様の活性を利用したのがiVEC法である。遺伝子組換え実験をしている研究室なら、どこでも使用している大腸菌を使用し、二つのDNA断片を混合して形質転換するだけでシームレスクローニングできるため、この方法は大変簡単である。意外に思われるかもしれないが、iVEC法はかなり昔から知られていた方法¹⁹⁾であるにも関わらずあまり普及していない。しかし、最近、DNAの末端相同領域を30–50 bp程度に設定し、効率の高いエレクトロコンピテントセルを使用することで、複数断片を同時にクローニングできることが示された²⁴⁾。使用するプライマーが長くなってもかまわない、コンピテントセルも10⁹ (CFU/μg DNA) 程度の効率の高いものを準備できるが、DNAの結合に手間をかけたくない、という

方々には良い方法であろう。しかし、SLiCE法とiVEC法のクローニング効率を同じ条件下で比較した報告では、効率自体はSLiCE法の方が遙かに高かった²⁵⁾。また、JC8679 (AQ3625) 株と言われる相同組換え因子RecE, RecTを高発現した大腸菌を使用したiVEC法も古くから知られている¹⁸⁾。この株を用いたiVEC法は、通常の大腸菌株を使用したiVEC法よりクローニング効率は高いのだが、それでもSLiCE法より効率は低かった²⁵⁾。これに加えて、JC8679株はTSS法²⁶⁾と呼ばれる特殊な方法でコンピテントセルを調製する必要がある。また、得られるプラスミドがマルチマー化する問題もある。プラスミドのマルチマー化はタンパク質発現などに支障はないが、モノマー分子に揃えたい時には、通常の大腸菌株に再度形質転換し、プラスミドをモノマー化する必要がある。これらもこの方法の弱点かもしれない。ただし、二つのDNA断片を混合し、形質転換するだけでシームレスクローニングできるのはたいへん魅力的ではある。

おわりに

これまで、急速に普及しているシームレスクローニング法のいくつかを紹介してきた。研究室でシームレスクローニング法を導入する際には、その方法の利点と弱点を良く考慮したうえで、自分たちの状況に合った手法を選択することが大切である。また、今後も新たなシームレスクローニング法が開発されてくるであろう。その際には、クローニングの効率だけでなく、それによって省ける手間、節約できる費用などを総合的に考え、導入を決定して欲しい。

文 献

- 1) Okayama, H. and Berg, P.: *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 161 (1982).
- 2) Walhout, A. J. *et al.*: *Methods Enzymol.*, **328**, 575 (2000).
- 3) Engler, C. *et al.*: *PLoS ONE*, **3**, e3647 (2008).
- 4) Li, M. Z. and Elledge, S. J.: *Nat. Methods*, **4**, 251 (2007).
- 5) Engler, C. and Marillonnet, S.: *Methods Mol. Biol.*, **1116**, 119 (2014).
- 6) Sarrion-Perdigones, A. *et al.*: *Plant Physiol.*, **162**, 1618 (2013).
- 7) Weber, E. *et al.*: *PLoS ONE*, **6**, e16765 (2011).
- 8) Gibson, D. G. *et al.*: *Nat. Methods*, **6**, 343 (2009).
- 9) Zhu, B. *et al.*: *Biotechniques*, **43**, 354 (2007).
- 10) Irwin, C. R. *et al.*: *Methods Mol. Biol.*, **890**, 23 (2012).
- 11) Zhang, Y. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **40**, e55 (2012).
- 12) Motohashi, K.: *BMC Biotechnol.*, **15**, 47 (2015).
- 13) 本橋 健: *実験医学*, **34**, 2349 (2016).
- 14) Motohashi, K.: *Methods Mol. Biol.*, **1498**, 349 (2017).
- 15) Okegawa, Y. and Motohashi, K.: *Anal. Biochem.*, **486**, 51 (2015).
- 16) 守屋央朗, 蒔苗浩司: *実験医学*, **32**, 2145 (2014).
- 17) 永野幸生, 飯笹英一: *生物工学*, **93**, 623 (2015).
- 18) Oliner, J. D. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5192 (1993).
- 19) Bubeck, P. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3601 (1993).
- 20) Gibson, D. G.: *Methods Enzymol.*, **498**, 349 (2011).
- 21) Okegawa, Y. and Motohashi, K.: *Biochem. Biophys. Rep.*, **4**, 148 (2015).
- 22) 京都産業大学総合生命科学部植物生理学研究室: http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~motos/motohas/motohashi_lab/index.html/ (2018/1/1).
- 23) Goto, K. and Nagano, Y.: *PLoS ONE*, **8**, e56530 (2013).
- 24) Kostylev, M. *et al.*: *PLoS ONE*, **10**, e0137466 (2015).
- 25) Motohashi, K.: *Biochem. Biophys. Rep.*, **9**, 310 (2017).
- 26) Chung, C. T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2172 (1989).