

研究終了報告書

「ボトルシップ法による人工細菌の創出」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：野崎 晋五

1. 研究のねらい

微生物を利用した発酵食品等の物作りは古くから行われている。近年では、バイオ燃料や、食糧、家畜の飼料等のほか、環境汚染の除去への微生物利用の応用が進められている。これらに用いられる微生物は基本的には自然界にいるもの、またはそれらを遺伝的に改変したものが使用されている。もしも、利用用途に特化したような生物を自在に創出できるようになれば、エネルギー問題、食料問題、環境問題を解決する一助となる。本研究では、自在にデザインしたゲノムの構築法及び、構築したゲノムの細菌細胞内への導入法を開発することで、前述のような利用用途に特化したような人工細菌を自在に生み出すことを目指した。

大きな DNA を細菌細胞へと導入する装置として、バクテリオファージに注目した。バクテリオファージは細菌に感染するウイルスであり、種類にもよるが数十 kb から数百 kb までの DNA を細菌細胞へと注入することができる。特に 48.5 kb のゲノムを持つ λ ファージは試験管内でのパッケージングシステムがすでに確立しており、扱いやすい。そこでこの λ ファージを活用して DNA を細菌細胞へと導入していく方法の開発を行なった。

また、DNA の導入法としては、大腸菌ではケミカル法としてカルシウムイオン等の 2 価の陽イオンで処理することで DNA を細胞内へと取り込ませることが可能であることが知られている。この方法での DNA 導入においてはコンピテントセルの作製に手間がかかる。細菌細胞内へと順次 DNA を導入していき、徐々に細胞内で大きなゲノムを構築するという手法をとる場合ではコンピテントセル作製は簡便であるほど良い。特に多数の菌株で同時にコンピテントセルを作製するという場面においては既存の方法は現実的ではない。そこでより簡便にコンピテントセル作製及び形質転換を行う方法の開発も行なった。

さらに、DNA を受け入れる側の器となる細胞シャーシも重要となる。もし細胞シャーシ内に宿主細胞のゲノムが存在した場合、導入した人工ゲノムと組換えを起こしてしまい、設計した配列とは異なる配列の人工合成ゲノムを持った大腸菌が生まれてしまう恐れがある。そのため、あらかじめ宿主ゲノムを失った無核細胞を細胞シャーシとして用いて、そこへ DNA を導入していく方法の開発を行なった。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究課題では試験管内で作成したゲノム DNA を細胞へと導入して、人工的な細菌を生み出すことを目指している。そのためにまず、大きな DNA を構築する方法及び、構築した DNA を細菌細胞内へと導入する方法についての研究を進めた。その結果、大きな DNA の構築と細胞内への導入を同時に行える新規の DNA 構築法である iPac (*in vitro*)

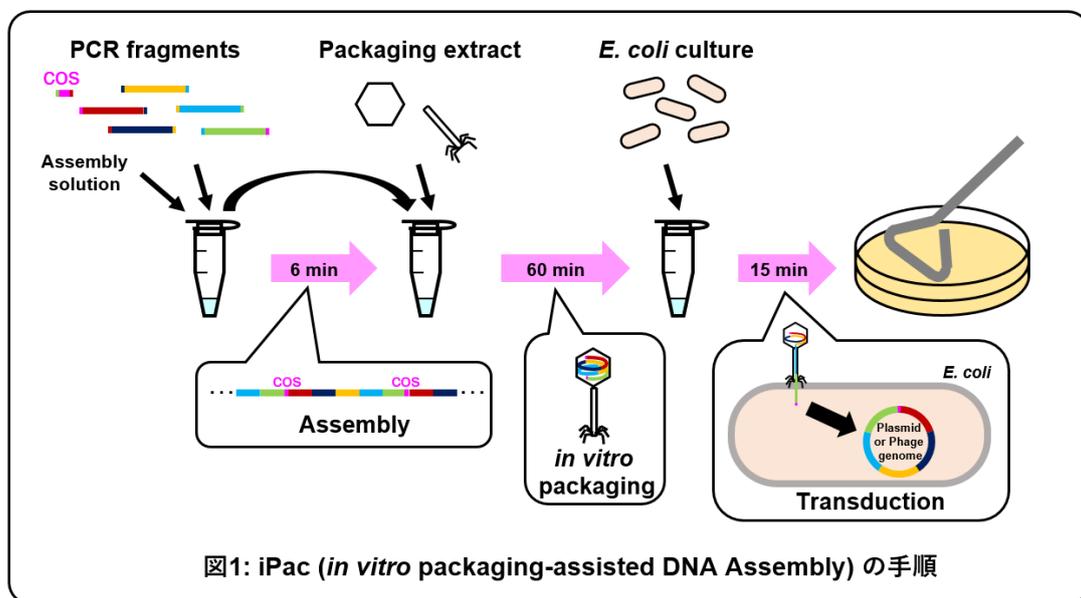
Packaging assisted DNA assembly) 法の開発を行なった。iPac 法ではトータル 50 kb 程度までの複数の DNA 断片を試験管内で簡易的に連結させた状態でファージ粒子へとパッケージングを行い、それを大腸菌細胞内へと導入することで完全に連結された状態の長鎖 DNA を得ることができる。これにより、簡便・迅速・正確・低コストで 50 kb 程度までのプラスミドやファージゲノムといった長鎖 DNA を構築可能となった。iPac 法は入手が容易な材料のみで実行可能であるため、長鎖 DNA を用いる遺伝子回路や代謝経路の構築などを含む合成生物学研究へ多くの研究者が参入可能となる。

また、より簡便な細菌細胞への DNA の導入方法として、微量チューブ内の 50 μ L 程度の非常に少量の培養液で培養するだけで大腸菌の形質転換を可能とする新規のコンピテントセル作製方法の開発も行なった。この方法により、これまで大きな負担となっていた大腸菌へのプラスミド導入の際の手間やコストが大幅に削減されることが期待される。

さらに、ホストゲノムを失った大腸菌細胞を作り出し、そのような細胞を外部から DNA を導入して起動させるための細胞シャーシとして用いる研究も進めた。ホストゲノムを分解させるために、大腸菌細胞内で制限酵素を発現させて、ゲノムを切断しそこからゲノム分解を促すことで作製した細胞シャーシに、ファージを用いて複数の DNA を導入し、導入した DNA 上にコードされるタンパク質の発現を可能とする系を開発した。今後はこれら技術を活用することにより、細胞シャーシへ順次 DNA を導入していき、それを細胞シャーシ内部で大きく組み上げていくことで、巨大なゲノムを構築していく技術の確立への発展が期待される。

(2) 詳細

1. インビトロパッケージングを利用した迅速かつ正確な DNA 構築法の開発



長鎖 DNA 構築及び大腸菌細胞への導入法として iPac 法(図 1, 論文 1, 特許 1)の開発を行なった。iPac 法ではまず、両末端に隣り合う配列とオーバーラップする 40 – 50 bp 程度の配列を持たせた PCR 断片を用意する。このオーバーラップ部分で、エキソヌクレアーゼ処理により一本鎖 DNA を露出させ、露出した相補的な配列でアニーリングさせることにより、仮組みを行う。それらを入ファージの *in vitro* パッケージングシステムを用いてファージの殻にパッケージ

ングを行う。パッケージング後の仮組みした DNA を包有するファージ粒子は、その DNA を大腸菌細胞内へと注入する能力を保有する。この DNA の細胞内への注入は、ファージ粒子と大腸菌細胞の懸濁液と混合するだけで簡便に実行可能である。細胞内に導入された DNA は粘着末端となっている cos 配列同士がアニーリングすることで環状化し、環状プラスミドあるいはファージゲノムが完成する。

この方法により、5-10 断片の DNA からの 48.5 kb のゲノムを持つ λ ファージを効率よく構築することができた。10 断片であっても十分実用的な効率でアセンブリーが可能であった。

また、 λ ファージ以外のファージとして、T1, T3, T7, ϕ 80 ファージも簡便かつ迅速に構築できた。ファージゲノムの改変が簡便に可能であることから、ファージセラピー等への応用が期待される。

次に、iPac 法により 6 断片の PCR 産物から約 50 kb のプラスミドの構築を行った。その結果、ファージゲノムだけでなく、極めて高い正確性で、50 kb 程度までのプラスミドの作製も可能であった (図 5)。この高い正確性は、 λ ファージの殻にパッケージングされる DNA のサイズが 38 - 52 kb 程度であることが必要であることに起因すると考えられる。通常、複数断片の DNA アセンブリーにおいては、ミスアセンブリーにより長さの異なる DNA が生じるが、iPac においてはミスアセンブリーにより生じた短すぎる、あるいは長すぎる DNA がパッケージングされることはないというサイズセレクションが働く。これにより、目的サイズの DNA のみがパッケージングされ、正確かつ効率の良いプラスミド構築が可能となる。

iPac 法は、一反応あたり 700 円程度のコストで行える、非常に低コストかつ簡便な DNA 構築法である。iPac 法で用いられる最も高価な試薬は *in vitro* パッケージングを行うためのパッケージングエキストラクトであるが、このパッケージングエキストラクトは自作が可能である。パッケージングエキストラクトは、一種類の大腸菌株を培養して破砕するだけで簡便に自作が可能である。この場合一反応あたりのコストはなんと 10 円以下にまで下がる。本研究において作製したパッケージングエキストラクト自作用の大腸菌株はナショナルバイオリソースプロジェクト大腸菌 (遺伝研) に寄託済みである。iPac 法が普及することで、誰でも簡便に数十 kb の DNA の構築が可能となり、そのような大きな DNA を扱う研究が広く行われるようになることが期待される。

2. 簡便な大腸菌形質 転換法の開発

より簡便に大腸菌細胞内に DNA 導入可能とする方法の検討を行ない、微量チューブ内のわずか 50 μ L の形質転換培地中で一晩培養を行なった培養液にプラスミドを加えるだけで形質転換を行う方法

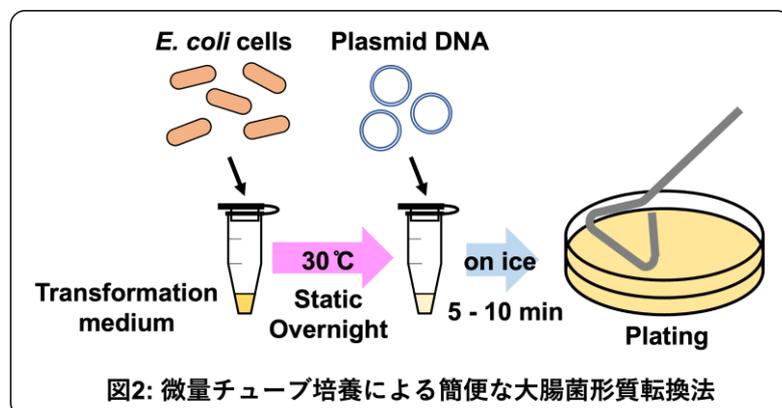


図2: 微量チューブ培養による簡便な大腸菌形質転換法

の開発を行なった (図 2, 特許 2)。通常の大腸菌の形質転換のためのコンピテントセルを作製は、対数増殖期の培養液を得るための複数回の濁度の測定や、菌体の洗浄のための複数回

の遠心操作が必要となり、多大な手間がかかる操作である。本研究では微量チューブ内で培養するだけでコンピテントセル作製が可能となり、特に複数の大腸菌株のコンピテントセルを作製する際の労力を大幅に低減することが可能である。

3. 今後の展開

本さがけ研究を発展させる研究として、人工ファージを用いてバクテリアゲノムの狙った領域を大規模に改変可能とする技術開発へと繋げたい。また、本研究では 50 kb 程度までの比較的大きな DNA を簡便にアセンブリーする技術を開発したが、さらに大きな 100 kb を超える様な DNA アセンブリー法や、大腸菌以外のバクテリアのファージへの応用へと展開していきたい。

4. 自己評価

当初目標としていた人工細菌を生み出すところまでは研究が進まなかったことはマイナス評価であると考え。しかしながら、本研究で開発した iPac 法は 50 kb 程度の DNA を簡便な操作及び低コストで迅速かつ正確に構築可能なものである。50 kb の DNA を外注した場合の費用は、例えば GenScript の場合では約 500 万円である。この費用の中には遺伝子合成の費用、約 300 万円が含まれており、残り 200 万円程度がアセンブリーの費用と見積もれる。iPac 法での 50 kb の DNA 構築にかかる費用は市販のパッケージングキットを用いた場合で 700 円程度、パッケージングエキストラクトを自作した場合には 10 円程度にまで低下する。つまり iPac 法により 1 回 50 kb の DNA 構築が成功すれば約 200 万円がまるまる浮く計算になる。私に与えられた研究費が 3,500 万円であることから、世の中の誰かが iPac 法で 20 回成功するだけで、この研究費分以上の経済効果となる。すでに iPac 法は論文発表済みであり、多くの研究者が容易に入手可能な材料のみで実行可能であるため、20 回という数字は 1 年立たないうちに、あるいはもう既に達成されているかもしれない。そのため、この研究を行う価値が十分にあったと考える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:1件

1. Shingo Nozaki, Rapid and accurate assembly of large DNA assisted by in vitro packaging of bacteriophage. ACS Synthetic Biology. Accepted on 11/11/2022

この研究ではエキソヌクレアーゼ処理によって生成されたオーバーラップする一本鎖 DNA 末端のアニーリングによってのみ組み立てられた DNA をファージ粒子へとパッケージングし、細菌細胞へ導入可能であることを示した。これに基づき、バクテリオファージの in vitro パッケージングシステムを用いて多断片の PCR 産物から約 40-50 kb の長い DNA を迅速、正確かつ簡便に構築可能とする方法を開発した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:3 件(特許公開前のもも含む)

1	発 明 者	野崎 晋五
	発 明 の 名 称	インビトロパッケージングを用いた他断片 DNA の連結及び細胞内導入方法
	出 願 人	立教大学
	出 願 日	2021/1/29
	出 願 番 号	特願 2021-012661
	概 要	ファージのインビトロパッケージングを用いて 50 kb までの DNA を複数の DNA 断片から迅速かつ正確に構築する方法。

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

バクテリオファージを利用した長鎖 DNA アセンブリー (第 17 回 21 世紀大腸菌研究会)

Utilization of bacteriophage toward genome synthesis (第 44 回日本分子生物学会年会)

in vitro パッケージングを活用したファージゲノムスケール DNA の簡便な構築法 (第 16 回ゲノム微生物学会年会)

チューブ内で培養するだけの手間いらずの大腸菌形質転換法(第 45 回日本分子生物学会年会)