

巨大 DNA を接合伝達で伝播する枯草菌ベクターの開発

政策・メディア研究科 博士課程 2 年 一之瀬太郎

Introduction

遺伝子組み換え技術は分子生物学研究において必須の技術である。しかし、ゲノムサイズの巨大な DNA を大腸菌の遺伝子工学的手法で取り扱うには制限がある。慶應大学の板谷らにおけるゲノムデザイングループでは、DNA 相同組換えの頻度と効率に優れる枯草菌を利用することで、枯草菌のゲノムを巨大 DNA 構築の場とするゲノムデザイン技術の確立に取り組んでいる。枯草菌での巨大 DNA 再構築に用いる DNA の導入技術は、形質転換の手法に依存している。巨大な DNA をより効率良く枯草菌に導入する為には、断片化しやすい *In vitro* での抽出操作と、裸の DNA を用いる形質転換を避けた技術が望まれる。この為、枯草菌で報告された接合伝達の系 (4) を汎用的な巨大 DNA 導入手段へと応用する事を試みている。先行研究では *Bacillus subtilis* (*natto*) より単離された接合伝達 plasmid, pLS20 を枯草菌に導入する事で、液体培地による対数増殖条件下で枯草菌間に接合伝達を誘導する実験系が構築されている (2, 3)。この系では Chloramphenicol (Cm) の耐性遺伝子でマークした pLS20, pLS20*cat* を導入した枯草菌 (接合伝達ドナー) の株から、pLS20 を持たない枯草菌 (接合伝達レシピエント) に対して生じる接合伝達とそれに伴う pLS20*cat* の輸送を、Cm 耐性の有無で確かめる事が可能となっている (Figure 1A)。この薬剤選択の手法によって、接合伝達の結果生じるトランスピエントの枯草菌を選別する事が出来るとともに、得られたトランスピエントの数から接合伝達の効率を定量的に比較可能である。今期はこの接合伝達実験系を、枯草菌で汎用的に使える巨大な DNA 移動の技術として確立する事を目的として、二つのテーマで研究を行った。

- 1) この実験系における枯草菌の接合伝達に必要な因子を特定し、自然界では接合伝達の起こらない型の plasmid ベクターにこの因子を導入して、ベクターを接合伝達で移動させる事が可能か試みた。
 - 2) 先行研究によって用いられてきた接合伝達の実験株 (2) とは異なった遺伝背景の枯草菌をドナー、レシピエントに用いて接合伝達を行うことで、枯草菌の遺伝背景が接合伝達効率に与える影響を調べた。
- 1) については、現在論文執筆中の為にその詳細は割愛させていただくが、結果として枯草菌の接合伝達で移動する新たな plasmid を作製する事に成功した。2) では、これまでのドナー、レシピエント各 1 種類ずつの実験系に新しく 1 種ずつドナー、レシピエントを導入して、相互の組み合わせにおける効率の違いを定量的に比較した。

Methods

実験に使用した枯草菌株、Plasmid の詳細は Table の項に記載した。

枯草菌 168 株の接合伝達ドナーへの転換

枯草菌 168 株を接合伝達ドナーへと転換する為に、168 株に pLS20*cat* を導入した。pLS20*cat* の導入は、先行研究から用いている BEST40401 からの接合伝達によって行った。接合伝達の誘導は、2006 年に慶應大学の板谷ら

が発表した実験方法を用いた (2)。ドナー株 (BEST40401) とレシピエント株 (168) は 37 °C の LB によって 16 時間終夜培養し、それぞれを 1:20 の割合で 37 °C の LB に希釈して培養を開始した。(Total 20 ml / 100 ml flask, shaken at 120 rpm with 37 °C.) 培養開始から 2 時間経過した時点で、それぞれの培養液から 300 µl を分取して 2 つを混合し、37 °C で 15 min 静置した。混合液の 200 µl を 5 µg /ml Cm, 0.1 mM Tryptophan を添加した Spizizen plate に撒き 30 °C で 2 晩培養する事で、pLS20cat を持った 168 株を選択した。こうして得られたトランシピエント、BEST21704 株がドナー株 (BEST40401: Leu, Arg 要求性) でなく、レシピエント由来の株 (168: Trp 要求性) である事を、アミノ酸要求性の種類によって確認している。

pLS20cat 接合伝達アッセイ

作製した 168 (BEST21704) ドナーを使用して、前述の条件で接合伝達を誘導して、伝達の効率を既存のドナー BEST40401 と比較した。接合伝達のレシピエントには 168 由来である BEST2125 株と RM125 由来の BEST6006 株の 2 種類を使用した。両株は染色体ゲノムの *proB* 配列が pBR-Tc 配列で置換されている為に、Tetracycline (Tc) 耐性である。レシピエントに pLS20cat が移動したトランシピエントの細胞は、この Tc 耐性と pLS20cat の Cm 耐性を組み合わせる事によって選択した。ドナー株とレシピエント株を 37 °C の LB によって 16 時間終夜培養し、1:20 の割合で 37 °C の LB に希釈した。培養開始から 2 時間で 各 300 µl を分取して混合し、37 °C で 15 min 静置した後に、混合液の 200 µl を Cm +Tc plate (LB plate with 5 µg /ml Cm and 10 µg /ml Tc) に塗布した。37 °C で 1 晩培養して得られたトランシピエントの数を測定することで、撒いた混合液 1 ml 当たりの接合伝達の効率を算出した。

Results and perspectives

接合伝達しないベクターを改変して移動させる試みについての結果は割愛する。

枯草菌の遺伝背景が接合伝達効率に与える影響を調べる為に、これまでとは異なる遺伝背景のドナー・レシピエント株を新しく用意した。先行研究における実験系で使用されているドナー、BEST40401 は枯草菌の RM125 株由来であり、レシピエント BEST2125 は 168 由来の株である。168 が制限修飾系の遺伝子を有するのに対して、RM125 はそれらを持っていない点が 2 株間の大きな違いである。先行研究によって、接合伝達の効率に対して制限修飾系が影響を及ぼす事が示唆されていることより (4)、168 由来のドナー、RM125 由来のレシピエント株を用いて接合伝達を行い、効率がどのように変動するかを評価した (Figure 2)。結果、以下の傾向が見られた。

- 1) ドナーが RM125 由来 (BEST40401) 株の場合、レシピエントには 168 由来の株 (BEST2125) よりも RM125 由来の株 (BEST6006) を用いると、効率が 10 倍以上 (先行研究で報告された効率と比較した場合、10 倍) 高くなった。
- 2) ドナーが 168 由来 (BEST21704) 株の場合も、RM125 由来のレシピエントの方が 168 由来のレシピエントよりも数倍効率が良いが、168 のレシピエントの効率 (15.2×10^4 /ml) は、BEST40401 ドナーと BEST6006 レシピエントの組み合わせの効率 (25.4×10^4 /ml) に匹敵するほど高かった。

この結果はレシピエントの持つ制限修飾系が接合伝達効率に負の影響を与えると仮定する事で説明できる。

RM125 株のドナーから 168 株のレシピエントに pLS20 の DNA 配列が伝達した場合は制限系によって DNA が攻撃され (効率が落ちる) が、その他の組み合わせでは DNA が修飾されている、又はレシピエントが制限系を持たない事によって DNA が攻撃を免れ、結果効率が高くなったと考えられる。

結論として、接合伝達しないベクターを改変して移動させる試みが成功した事によって、ベクターを接合伝達で移動可能なものへ改変する為の因子を明らかにすることが出来た。今後はさらに複数のベクターを同様の手法で改変して、この手法の有効性を実証するとともに、移動する DNA (ベクター) の大きさが効率に与える影響につ

いて知見を得る事を予定している。

また、既存の枯草菌間における接合伝達の実験系を 168 由来のドナー, RM125 由来のレシピエントを用いて再現する事で、この系の汎用性について確認した。移動させる対象の DNA が大きくなるほど、それが完全に起こる効率は下がると予想される為、接合伝達の実験系の効率は高い方が望ましいと考えている。ゲノムサイズの巨大な DNA の移動を安定的に行う際に要求される効率は具体的に明らかでないが、今回得られた効率の良い組み合わせに対しての知見は、巨大 DNA のより安定な移動系に生かせると考えられる。今後はこれらの成果を組み合わせ、より大きな DNA が高い効率で移動できる実験系の条件を確立したいと考える。

Table and figures

| Strains | Relevant genotypes | Amino acid requirement | Source |
|---------|------------------------------|------------------------|-----------|
| 168 | <i>trpC2</i> | Trp | BGSC |
| RM125 | <i>leuB8 arg15 hsmM hrsM</i> | Leu Arg | T. Uozumi |

Plasmid

| Strains | Antibiotic marker | References |
|------------------|-------------------|------------|
| pLS20 <i>cat</i> | Cm ^R | (2) |

| Strains | Genetic backgrounds | Plasmid | Antibiotic marker | References or source |
|-----------|--------------------------|------------------|-------------------|----------------------|
| BEST40401 | RM125 | pLS20 <i>cat</i> | Cm ^R | (2) |
| BEST21704 | 168 | pLS20 <i>cat</i> | Cm ^R | This study |
| BEST2125 | 168 <i>proB::pBRTc</i> | | Tc ^R | (2) |
| BEST6006 | RM125 <i>proB::pBRTc</i> | | Tc ^R | M, Itaya |

Table. 実験に使用した枯草菌株と plasmid

BGSC: Bacillus Genome Stock Center.

Cm^R: Chloramphenicol resistance, Tc^R: Tetracycline resistance.

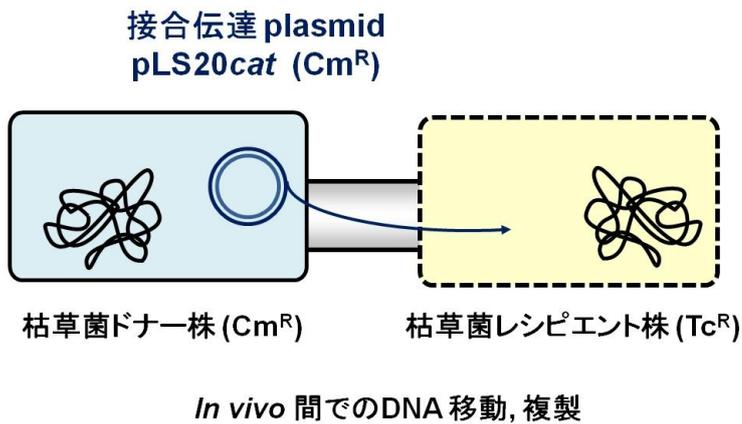


Figure 1. 枯草菌の接合伝達を DNA の安定な輸送手段に応用する試み

接合伝達は多くのバクテリアで見られる DNA の移動現象であり、送り手側 (ドナー) から受け手側 (レシピエント) の細胞へと DNA が移動して増える。細胞外を介さない為巨大な DNA 分子を安定に輸送できることから、枯草菌の接合伝達を DNA 移動の手段として応用する事を試みている。

| | | Conjugational recipients | |
|--------|-----------------|--------------------------|-------------------|
| | | BEST2125 168 | BEST6006 RM125 |
| Donors | BEST40401 RM125 | 0.51 ±0.04 | 25.4 ±6.13 |
| | BEST21704 168 | 15.2 ±5.09 | 76.1 ±18.1 |

Figure 2. 2 種類の遺伝背景 (168, RM125) のレシピエントにおける接合伝達効率の一覧

接合伝達の効率は 37 °C の Cm +Tc plate で 1 晩培養した際に得られるトランシピエントの数を元にして (撒いた Culture 1 ml 当たりの数 (*10⁴))。既存のドナー・レシピエントの組み合わせ BEST40401 - BEST2125 に対し、それ以外の 3 組み合わせ (BEST40401 - BEST6006, BEST21704 - BEST2125, BEST21704 - BEST6006) では既存の効率を上回る効率を示した。

Acknowledgments

本研究において研究の手法から具体的な方法にわたり、一からご教授して下さった慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科教授の板谷 光泰氏に心より深謝を申し上げます。また、先行研究で枯草菌の接合伝達の実験系を確立し、今回の研究に必要な手法と実験株を提供して下さった東京工業大学助教である金子 真也氏と、慶應義塾大学助教の大谷 直人氏 そして佐藤 満氏、そして実験に欠かせないご助力と有益な討論の場を提供していただいたゲノムデザイングループの人たちにこの場をお借りして感謝を申し上げます。最後に、この様な素晴らしい

研究環境を与えていただいている慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科教授の富田 勝氏に深くお礼申し上げます。

References

1. Itaya,M., Fujita,K., Kuroki,A., and Tsuge,K. (2008) Bottom-up genome assembly using the *Bacillus subtilis* genome vector. *Nat Methods* **5**:41-43.
2. Itaya,M., Sakaya,N., Matsunaga,S., Fujita,K., and Kaneko,S. (2006) Conjugational Transfer Kinetics of pLS20 between *Bacillus subtilis* in Liquid Medium. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**:740-742.
3. Kuroki,A., Ohtani,N., Tsuge,K., Tomita,M., and Itaya,M. (2007) Conjugational transfer system to shuttle giant DNA cloned by *Bacillus subtilis* genome (BGM) vector. *Gene* **399**:72-80.
4. Ohtani,N., Sato,M., Tomita,M., Itaya,M. (2008) Restriction on Conjugational Transfer of pLS20 in *Bacillus subtilis* 168. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**:2472-2475.