



2015年5月21日

報道関係者各位

慶應義塾大学先端生命科学研究所

## 一度に50個以上のDNA断片を連結する遺伝子集積法を開発

慶應義塾大学先端生命科学研究所（所長 富田勝）の柘植謙爾特任講師、板谷光泰教授のグループは、枯草菌（こそうきん）を用いることにより50個以上のDNA断片を一回の連結操作だけで指定の向きや順番に連結できる遺伝子集積法を開発しました。この方法により、多数の遺伝子を設計どおりに迅速に構築することが可能となりました。多数の遺伝子を一括して細胞に導入する技術に弾みがつき、医薬品等の有用物質の生産や環境負荷の少ない物質生産系の開発など、多様な目的の研究開発を促進すると期待されます。

本研究内容は、5月20日午前10時（ロンドン現地時間）英国のオンライン科学雑誌 Scientific Reports(DOI: 10.1038/srep10655)に発表されました。

### 1. 研究の背景と概要

医薬・創薬の分野のみならず、農業、工業のあらゆる分野において、生物に新規のDNA情報を書き込むことで、物質・エネルギーの生産効率を従来よりも高める方法、あるいは全く新しい物質を生産させる方法が模索されています。

新規のDNA情報を書き込むためには、まず試験管内でDNAを合成する必要があります。現在、DNA化学合成法とPCR法を組み合わせ、1,000~3,000塩基対程度（大腸菌の平均的な遺伝子の大きさと1~3個分に相当）のDNA断片を構築できます。更に多数の遺伝子をまとめて扱う場合にはこれらのDNA断片を連結する必要があります。現在までに、酵母（こうぼ）を宿主として用いると一度に最大25個程度のDNA断片を指定の順序や向きに連結する遺伝子集積法が報告されています(1)。

慶應義塾大学先端生命科学研究所のグループでは、さらに多くのDNA断片を一度に連結する方法の開発をめざして、枯草菌（こそうきん）という宿主のプラスミドによる形質転換を利用した遺伝子集積法であるOGAB法(2)を改良しました。その結果、一度に50個以上のDNA断片の連結を可能とする遺伝子集積法を開発しました(図1)。

### 2. 研究の詳細

OGAB法は、試験管内で長いタンデムリピート状プラスミドDNAを構築する必要がありますが、そのためには、材料となる各DNA断片が等しい分子数ずつ含まれる溶液を準備する必要があります(図2)。しかし、DNA断片の長さ（塩基対数）が大きく異なる場合、大量のDNA断片を等しい分子数に揃えることは技術的に困難でした。このため、材料のDNA断片の大きさが異なっていた従来のOGAB法では、15個程度のDNA断片の連結が限界でした。

そこで、新しい方法では、コンピューターシミュレーションによりDNA断片の長さを可能な限り等しくなるように設計し、分子数を厳密に制御することを試みました(図3)。これは、従来の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かった制限酵素による切断と続く不要なDNAの除去の工程から、材料を混合してまとめた状態で行うという合理化をもたらすことになりました(図3)。その結果、従来の方法では、各DNA断片の分子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、新しい方法では7%以下に抑えることが可能となりました。この新しい方法により、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りました。平均970塩基対のDNA断片を50個連結して全長48,500塩基対(大腸菌の平均的な遺伝子の大きさとおよそ50個分に相当)の長鎖DNAを作成することや、平均108塩基対のDNA断片の55個連結して約6千塩基対のDNAを作成するなど、世界で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であることを示しました。

### 3. 研究の成果

新しい遺伝子集積法を用いることで、50 個程度の DNA 断片を連結した長鎖 DNA として一度に得ることが可能になりました。また、既存の酵母を宿主とした遺伝子集積 (~9 日) と比較し、本方法は、連結できる DNA 断片は倍以上の数を得ることができるにもかかわらず、短期間 (~5 日) に連結が完了することが可能です。これにより、設計した 50,000 塩基対程度の長鎖 DNA 断片を迅速に構築することが可能となりました。

枯草菌を用いる多数の遺伝子集積技術は慶應義塾大学だけが開発に取り組む世界でもユニークな技術であり、更なる迅速化を目指しています。

#### 用語解説

**枯草菌** グラム陽性の細菌で、納豆菌の近縁種。人畜無害。培養条件により、自発的に DNA を取り込む状態の細胞 (コンピテント細胞) が現れこれを遺伝子工学に用います。

**遺伝子集積** 短い DNA 断片を指定した向きと順序に複数個連結することで長い DNA 断片を作成する操作。遺伝子集積には様々な方法がありますが、各 DNA 断片の末端に連結相手の断片を指定するために働く数塩基から数十塩基の “ のりしろ ” 配列を持つように準備し、これを利用して連結する点は共通しています。これらの DNA 断片に宿主生物で独立して複製するのに必要な DNA 断片 (プラスミドベクター) を加えて連結します。連結方法には大きく分けて 2 つあり、大腸菌や枯草菌を宿主とする場合、事前に DNA 断片を試験管内で酵素を用いて連結し、導入します。一方、出芽酵母を宿主とする場合は、単に DNA 断片を加えれば細胞内で連結します。

**OGAB 法** 枯草菌のプラスミド形質転換系を利用した遺伝子集積法。連結の各材料となる DNA 断片を 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連結します。最終的には、環状プラスミド DNA として連結した DNA を得ることができます。上記、突出の生成には、制限酵素を用います。一般的に用いられる大腸菌プラスミド多重 DNA 連結とは異なり、試験管内での環状プラスミドを準備する必要はありませんが、いわゆるタンデムリピート状のプラスミド DNA を準備する必要があります (後述)。特許第 4479199 号 (出願人 三菱化学)

**タンデムリピート状プラスミド DNA** 環状のプラスミドの 1 単位を複数個同一方向に連結したような構造を持つ、プラスミドの構成要素が周期的に現れる人為的に作成された DNA。多数の DNA 分子を連結する場合、タンデムリピート状のプラスミド DNA を作成することは、環状プラスミド DNA を作成するよりもはるかに容易となります。

#### 参考文献

- (1) Gibson, D. G. *et al.* One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20404–20409 (2008).
- (2) Tsuge, K., Matsui, K. & Itaya, M. One step assembly of multiple DNA fragments with a designed order and orientation in *Bacillus subtilis* plasmid. *Nucleic Acids Res.* **31**, e133 (2003).

#### 掲載論文情報

##### 掲載論文タイトル

Method of preparing an equimolar DNA mixture for one-step DNA assembly of over 50 fragments (和訳 50 個以上の DNA 断片を一度に集積するための等モル混合物の準備法)

##### 著者名と所属

柘植謙爾\*、佐藤紫、小林有香、権藤麻衣子、長谷部雅子、富樫貴、富田勝、板谷光泰 (\*責任著者) 慶應義塾大学先端生命科学研究所

##### 掲載雑誌名・巻・ページ

Scientific Reports 5 巻 10655 ページ (DOI: 10.1038/srep10655)

### この研究に関する支援制度

本研究は、経済産業省委託事業「革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発」、および文部科学省科研費新学術領域研究「合成生物学」(23119004)の支援を受けて行われました。

図

図1 新しい遺伝子集積法の概略

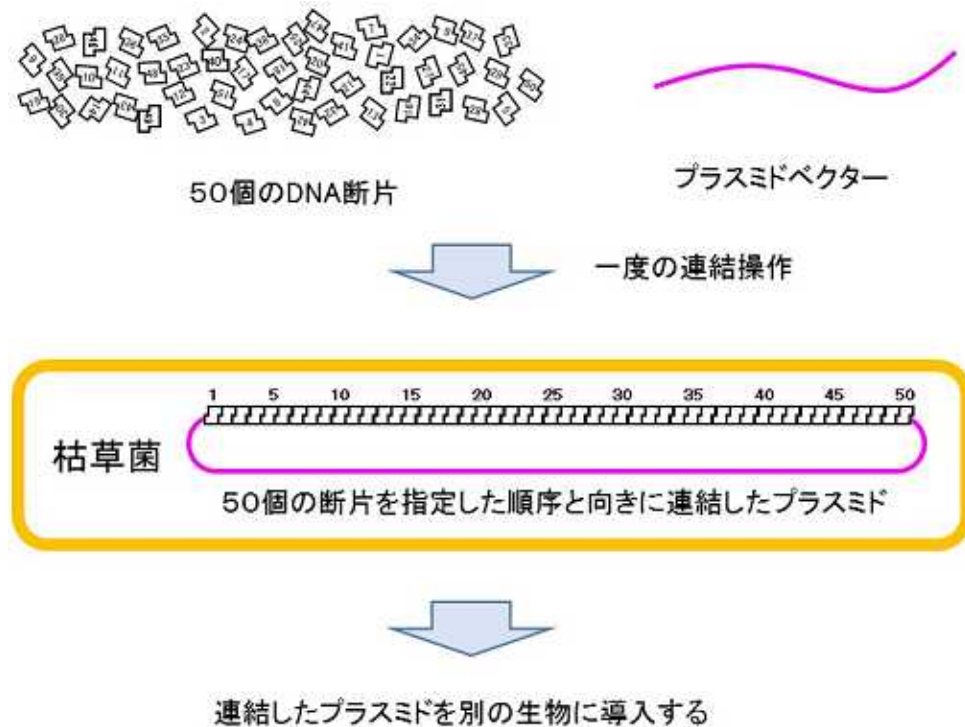


図2 枯草菌のプラスミド形質転換の特徴と、材料のDNA断片の分子数のばらつきが試験管内連結産物の形状に与える影響。

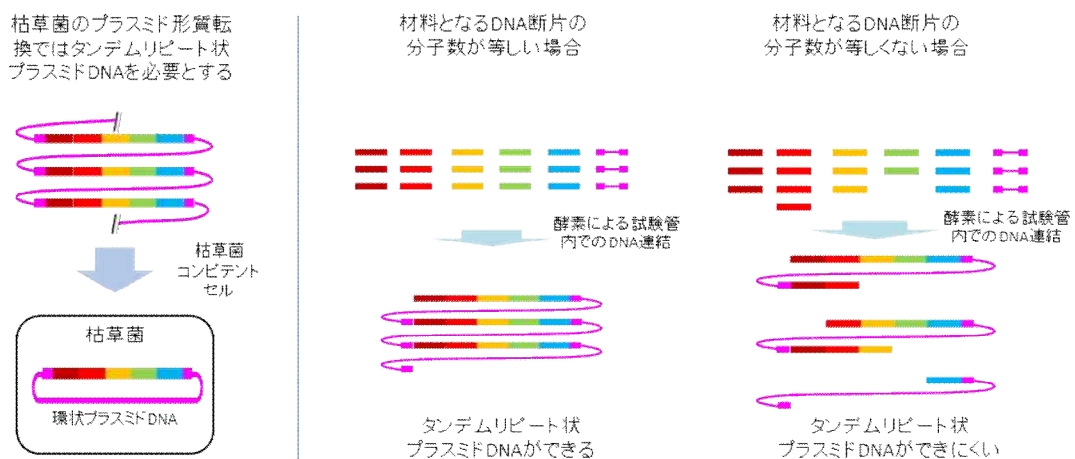
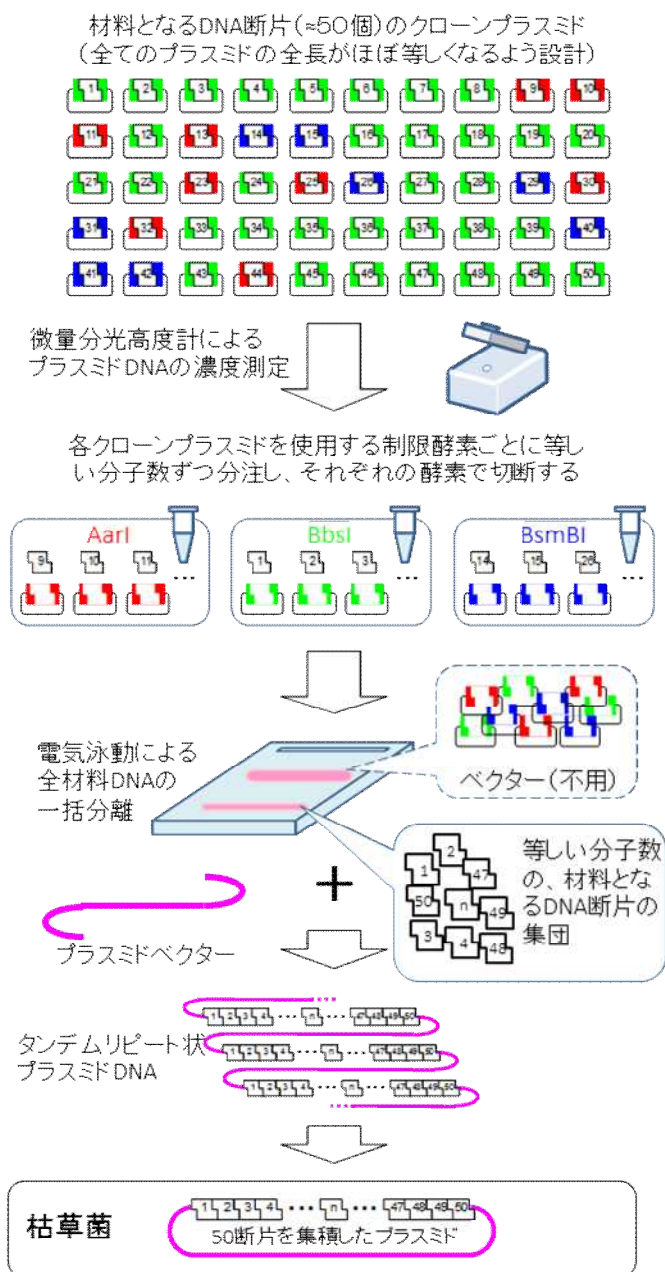


図3 今回開発した技術の全体像 この例では、DNA断片をクローンプラスミドから制限酵素で切り出す際に3種類の制限酵素(AarI、BbsI、BsmBI)を用いている。集積対象の配列によっては、より少ない種類の制限酵素を使用することも可能。



本発表資料のお問い合わせ先

慶應義塾大学先端生命科学研究所 渉外担当 塩澤、佐藤明子

TEL 0235-29-0802 FAX 0235-29-0809

Email [office@ttck.keio.ac.jp](mailto:office@ttck.keio.ac.jp)

<http://www.iab.keio.ac.jp/>