



相同組換えで色々できちゃう DNA クローニング

永野 幸生^{1*}・飯笹 英一²

ここでは特定のDNA領域を、プラスミドベクターに組み込むことをDNAクローニングと定義する。厳密な定義ではないけれども、研究や開発の現場では、この意味で使われていることが多いであろう。本手法は生命科学研究の基盤技術であるので、読者の中には、日常的にDNAクローニングを行っている人が多いはずである。さて、DNAクローニングにはさまざまな手法がある。制限酵素とリガーゼを使う手法は、古典的であるけれども、もっとも利用者が多いはずである。それ以外にも、さまざまな試験管内DNA連結反応系があり、それらを使っている読者も多いことであろう。特に、部位特異的組換え酵素を使う Gateway 法は、モデル生物に関する cDNA のリソースが整備されている点で、一日の長がある。

さて、ここでは、相同組換えによる DNA クローニング技術についてのよもやま話を繰り広げる。本技術は、細胞内で DNA 連結する点が、さまざまな試験管内 DNA 連結反応系と異なる。試験管内 DNA 連結反応系には複数の種類があるが、どれにおいても DNA 連結のための実験戦略の立て方はきわめて類似している。一方で、相同組換えによる DNA クローニング技術では、その戦略さえ違うところに注目して読んで頂きたい。ところで、操作手順に関しては、ウェブ上の英文記事¹⁾、あるいは、岡山大学の守屋らの和文記事²⁾がある。前者は、特殊な実験手順を写真入りで紹介しており、後者は、実験原理の説明が詳しい。

相同組換えとは

相同組換えとは、相同な DNA 配列同士が組換わって連結する反応である。メカニズムの詳細は定番の教科書³⁾などを参照してほしい。相同組換えは、減数分裂時の交叉や、DNA 二本鎖切断修復に関わっている。相同組換えを活用した DNA クローニングでは、後者の DNA 二本鎖切断の修復反応を利用している。さて、本来の DNA 二本鎖切断修復では、相同組換えと非相同末端結合 (DNA 切断端を連結するのみの反応) の二つのメカニズムが作動する。クローニングに応用する際には非相同末端結合を防ぎつつ、相同組換えを活用すれば、目的とする相同な DNA 配列同士の連結が行える。

DNA 二本鎖切断修復時の相同組換えは、通常、姉妹染色分体間で起こる。母系由来染色体と父系由来染色体の間で起こる反応と誤解されることもあるが、これでは DNA が修復できるとは限らず、むしろヘテロ接合性が喪失する原因、つまり片方のアリルだけになる原因になる。このヘテロ接合性喪失はがん抑制遺伝子の機能喪失とも深く関係している⁴⁾。近年、ヘテロ接合性喪失の遺伝的分化における役割は、生物学系の研究者が大好きな産業生物でも注目されており、清酒酵母では育種上の重要性が指摘されている⁵⁾。また、筆者の一人の永野らは、無性生殖することが多いカンキツの遺伝的分化機構として、このヘテロ接合性喪失を提唱している⁶⁾。さて、姉妹染色分体の DNA 配列の代わりに、相同配列を持つ外来の DNA を細胞に導入すれば、DNA 二本鎖切断修復時の相同組換え反応が起こり、外来 DNA が染色体に組み込まれることが容易に想像できるであろう。外来 DNA の相同組換えによる染色体への導入は、遺伝子ノックアウト技術としても活用されており、特に近年では、ゲノム編集技術と組み合わせて使用されている。同様に、外来 DNA にプラスミドと相同な配列を持たせることで、相同組換えは、外来 DNA をクローニングする技術として活用できるわけである。ただし、遺伝子ノックアウトが可能な宿主であっても、より難度が高い技術である「相同組換えによる DNA クローニング」が可能とは限らない。

相同組換えによる DNA クローニング技術

相同組換えによる DNA クローニングにもっとも適した宿主は、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) である。「非相同末端結合を防ぎつつ、相同組換えを活用すれば、目的とする相同な DNA 配列同士の連結が行える」と上述したが、パン酵母は、非相同末端結合の活性が低く、相同組換えの活性が高い。さらに、パン酵母には、細胞内に導入する直鎖状 DNA を分解してしまうエキソヌクレアーゼ活性が低く、かつ、形質転換効率が高いなどの利点もある。DNA クローニングのためには、まず、直鎖状のプラスミド DNA を用意する (図 1A)。このプラスミドは酵母用の複製起点と選択マーカーを持つ必要が

著者紹介 ¹⁾ 佐賀大学 総合分析実験センター (准教授) E-mail: nagano@cc.saga-u.ac.jp

²⁾ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 (助教) E-mail: eiizasa@m.kufm.kagoshima-u.ac.jp

ある。それらを必要としない方法については、後で記す。直鎖状プラスミドは、制限酵素で切断したのもでも良いし、PCRで調製したのもでも良い。直鎖状のプラスミドは細胞内では複製できないが、DNAクローニングの過程で、相同な配列同士が連結して環状になったもののみが複製できる。次に、プラスミドにクローニングしたいDNAを用意する。通常は、PCR反応によって、これにプラスミドと相同な30 bp前後のDNA配列を付加する。PCR産物の精製は必要ない。この付加する配列は、プラスミドの末端と相同な配列でなくても良い。組換え反応の結果、プラスミドの複製起点や選択マーカーが失われない位置であれば、プラスミド上のどこでも良い。また、多断片連結が容易にできるので、多数の互いに相同なDNA断片を用意しても良い(図1B)。また、連結したいDNAおよびプラスミドDNAの両者と相同性があるオリゴDNAを用意しても良い(図1C)。オリゴDNAは一本鎖でも二本鎖でも良いし、一本鎖の場合、向きはどちらでも良い。図1Cの挿入する二本鎖DNAがゲノムDNAでも構わないので、ゲノムDNAから特定領域を取り出すことも可能である⁷⁾。また、多断片連結法の応用となるが互いに相同な多数のオリゴDNAでも良い(図1D)⁸⁾。注意しなければならないのは、ヘテロ接合性の検体からPCRを行った場合、PCR産物間で

組換えが起こり、母系由来染色体と父系由来染色体由来するDNA配列が混ざり合った産物が生まれる場合があることである。また、大腸菌と違って、プラスミドの不和合性がないため、大腸菌に導入し直さない限り、細胞内に複数種類の産物が存在する可能性が否定できない。つまり、単一のクローンが得られるとは限らないのである。この文章の冒頭で、DNAクローニングという言葉を選んだのは、この理由による。とにかく連結したいDNAを用意したら、後はそれらを酵母に形質転換するだけでよい。酵母内で相同組換えが起こり、狙った環状プラスミドを得ることができる。

相同組換えによるDNAクローニング技術を有名にしたのは、クレイグ・ヴェンター研究所による偉大な研究「マイコプラズマの全ゲノム再構築」によるところが大きい⁹⁾。各々1 kbのDNA断片を連結し10 kbのDNA断片を作り、その各々10 kbのDNA断片を連結し100 kbのDNA断片を作り、さらにその各々100 kbのDNA断片を連結し約1 Mbのゲノムを作るのに、パン酵母を宿主としたDNA多断片連結が用いられた。

パン酵母がもっとも適した宿主であるとしたが、他の宿主はどうであろうか。分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)に関しては、相同組換えによるDNAクローニングが可能であることを、前述の守屋のグループ¹⁰⁾や、鳥根大学の松尾ら¹¹⁾が示している。この松尾は、筆者の一人である飯笹の佐賀大学農学部・農学研究科の同級生でもある。飯笹の影響を受けた研究であることはおそらく間違いないであろう。周りの同級生の研究に興味を持たない学生は見習ってほしい。また、ピキア酵母(メタノール資化性酵母)に関しては、京都大学の水谷らが報告している¹²⁾。水谷は、相同組換えによるDNAクローニング技術に関する優れた英文総説を書いている¹³⁾。膜タンパク質研究への本技術の応用が、水谷の総説では詳しい。

では、組換えDNA操作の際のもっとも代表的な宿主である大腸菌はどうであろうか。守屋らの和文記事では、報告があるが再現性が悪いと記しているが、私たちは再現さえできていない。大腸菌で効率的にDNAクローニングができるとする最新の報告¹⁴⁾があるが、これについては、まだ私たちは検証していない。後述する、パン酵母を宿主とした場合の特長をこの大腸菌の系が有するのかが興味を持たれるところである。

本技術の特長

本技術の優れた点は、なんと言っても、多断片を容易にクローニングできる点であろう。多数箇所の変異導入

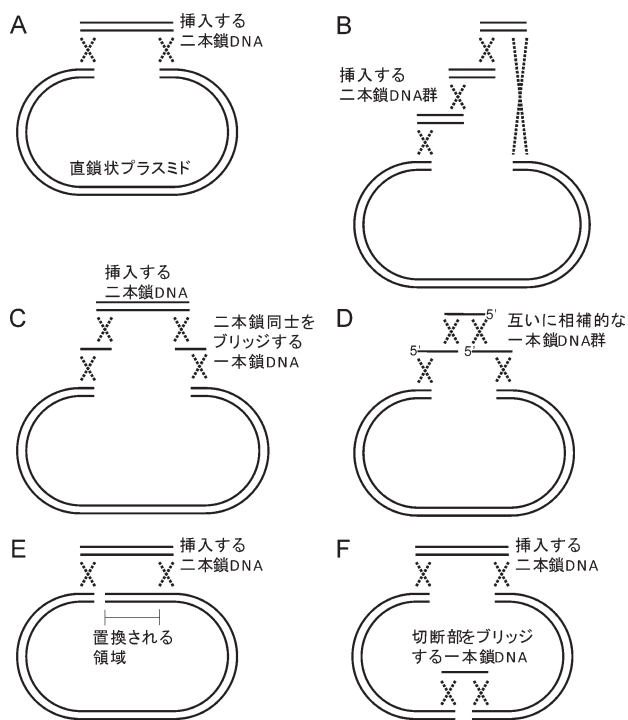


図1. 相同組換えによるDNA連結の概要。二本鎖DNAを二本の実線、一本鎖DNAを一本の実線、組換え反応が起こり結合する部分、つまり互いに相同な部分を交叉する点線で示した。

に多断片DNA連結法は活用できるが、これについても守屋による和文記事²⁾を参照されたい。10 kbを越えるDNA断片をクローニングしたい場合、10 kbを越える一つのPCR断片をクローニングするよりも、数kbのPCR断片を多断片連結した方が、クローニング効率が低いことを経験している。これはPCR反応中の副産物の影響を受けるからであろう。ヴェンター研究所の合成ゲノム研究においては、2008年の論文¹⁵⁾では後にGibsonアセンブリー¹⁶⁾と呼ばれる試験管内多断片DNA連結法を併用しているけれども、最終的に全ゲノム再構築を実証した2010年の論文では、上述のように酵母による多断片DNA連結法を用いている。しかし、試験管内の多断片DNA連結を可能にした点でGibsonアセンブリーは意義深く、方法が公開されているので試薬を比較的安価に自作できる点が良い。また、これもすでに触れたが、相同組換えは、PCR産物などのDNA断片だけでなく、多数のオリゴDNAの連結に活用することもできる⁸⁾。Gibsonアセンブリーの開発者による単著論文に詳細は記載されているが、この方法はGibsonアセンブリーとは言わないので、注意されたい。近年、人工合成遺伝子の受託価格が著しく低下しているため、本技術による多数のオリゴDNAの連結法の出番は少ないと思う。また、人工合成遺伝子の作製技術として、本技術が用いられているわけではない。しかし、構築済みのプラスミドベクターに100 bp程度またはそれ以上のDNA配列を付加したいときに、多数のオリゴDNAの導入法は重宝する。

また、DNA連結効率がDNAの大きさに影響を受けないことも本技術の優れた点の一つである。本技術で大きなDNAが扱えることは、ヴェンター研究所による研究からも自明であろう。植物形質転換用ベクターに関しては、プラスミドサイズが巨大なために、クローニングに苦勞することが多々あるが、本技術を使えば苦勞することはない¹⁷⁾。

さらに忘れてはならない本技術の大きな利点は、組換え部位の自由度の高さである。本技術は、実験戦略の立て方が、試験管内DNA連結反応系とは異なると前述した。試験管内DNA連結反応系では、連結反応が起こる場所は、多くの場合、DNAの末端である。Gateway法などは例外であるが、DNA上の特定の場所であることに変わりはない。一方、本技術では、連結反応が起こる場所はDNA末端などの特定の場所ではない。図1Eで示した置換反応がわかりやすい例であろう。特定のDNA領域を、その領域を試験管内の操作で除くことなく、他の領域に置換することができるのである。これについて

も守屋による和文記事に良い実験例が紹介されている²⁾。一般的なクローニングではマルチクローニングサイトにDNA断片を連結するのが通常であるが、本技術においては、直鎖状のプラスミドを調製するのにマルチクローニングサイトが有用であるという認識だけで良い。

また、試験管内DNA連結反応系では、マルチクローニングサイト以外が切断されると困ってしまう。このような場合、本技術では、切断する部位をブリッジするオリゴDNA、PCR産物、あるいは、他の制限酵素で切断したプラスミドDNAの切断物を一緒に混ぜるだけで、切断部位を連結することができる(図1F)。

このように、試験管内DNA連結反応系とは、実験戦略の立て方が違うということを入念に入れて、実験を行う必要がある。また、本技術は高価な酵素をあまり使わないため、安価である。

本技術の一般的なプラスミドベクターへの応用

本技術には大きな問題がある。パン酵母内でプラスミドを増幅、選抜するためには、酵母の複製起点と選択マーカーのカセットが必要である。しかし、一般的なプラスミドベクターにはそれが無いため、本技術は、日常的に行うDNAクローニングには使用できない。しかし、筆者の一人である飯笹が佐賀大学農学部四年生の時に、本技術を一般的なベクターのDNAクローニングに容易に適用する方法を提案した。当時、飯笹は、植物の受容体タンパク質を網羅的に発現させる実験を行っていた。最初は、酵母をその発現宿主に用いていたため、発現ベクター構築に、簡便な本技術を用いていた。そのおかげで、研究室に入りたてで、実験技術がおぼつかなかった彼でも、難なく10個程度の受容体遺伝子を発現ベクターにクローニングすることができた。色々コツを要する制限酵素トリガーゼの方法と違い、誰にでも比較的容易にできることも本技術の特長である。しかし、肝心のタンパク質の発現の方が芳しくなかったため、続いて、大腸菌での発現を検討することにした。ところが、今度は、制限酵素トリガーゼで発現ベクターの構築を試みたところ、なかなか上手く行かず、彼は筆者のもう一人である永野からプレッシャー(叱咤激励?)をかけられながら、毎日試行錯誤していた。しかし、彼がある時、昔の実験ノートにあった酵母発現ベクターとその時に使っていた大腸菌発現ベクターのマップを見て、それらにファージのfl複製起点と大腸菌のpUC/pBR複製起点の二つの共通配列があり、その配列で相同組換えが起これば、酵母複製起点と酵母選択マーカーのカセットが大腸菌ベクターに組み込まれることに気付いた。さらに、その二つ

のベクターとともに、相同な配列を付加した目的の遺伝子配列を酵母に導入すれば、本技術を用いて、大腸菌ベクターを大腸菌-酵母シャトルベクターに変換すると同時に、そこに目的遺伝子をワンステップでクローニングできると直感した。早速この方法を試してみたところ、あっという間に、今まで苦労していた受容体遺伝子の大腸菌発現用のベクターが作製できた。さらに、永野が、f1複製起点ではなく、多くのpUC系プラスミドが有するpUC/pBR複製起点とAmp^rの配列で組換えを起こす図2のようなヘルパープラスミドを開発すれば、汎用性が高いことを発案し、本方法が完成した次第である¹⁸⁾。本方法の原理は、これまで文章を読んでいただいた方には、図を見ればわかるであろう。植物形質転換用ベクターはアンピシリン抵抗性遺伝子を持たないので、植物用のシステムも開発している¹⁷⁾。なお、通常のプラスミドベクターを酵母ベクターに変換するためのDNA “GeneArt® High-Order Vector Conversion Cassette” が市販されているが、本方法と同様のシステムであるにもかかわらず、酵母ベクターへの変換に本技術を用いていないのは驚くべきことである。なお、飯笹の当初の目的であった植物受容体研究は、結局、パン酵母発現系により実を結び、すでにGoogle Scholarベースで100件以上の引用がある論文となった¹⁹⁾。

後に、非相同末端結合などによるさまざまな副産物を排除することで、さらにDNA連結効率をほぼ100%にまで高めたultra-low background DNA cloning system

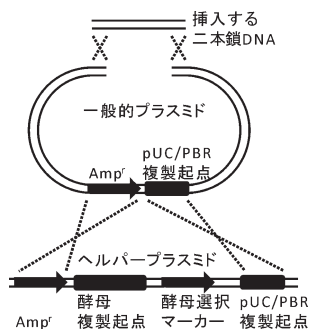


図2. 酵母用ではない一般的プラスミドに本技術を適用する方法

も開発した²⁰⁾。トランスポゾンの挿入や、宿主の変異が効率低下に寄与するような、きわめて効率が高いシステムである。効率を99%から99.8%にあげるために、大学院生の後藤に一年くらい苦労させた。

おわりに

本技術は、いくつかあるDNAクローニング法の一つである。前述のように、数ある方法の中で、部位特異的組換え酵素を使うGateway法は、モデル生物に関するcDNAのリソースが整備されている点で、一日の長がある。しかし、次世代シーケンサーやゲノム編集技術の登場で、モデル生物以外でも研究がしやすくなったと思っている方々が多いのではなかろうか。そのような方々に、ゲノム編集の際のターゲティングベクターなど複雑なベクターを作製する際に、柔軟性に富む本技術に興味を持っていただけたら幸いである。

文 献

- 1) <http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=874>
- 2) 守屋史朗, 蒔苗浩司: 実験医学, **32**, 2145 (2014).
- 3) ワトソンら: ワトソン遺伝子の分子生物学, p. 283, 東京電機大学出版局 (2010).
- 4) Weinberg, R. A.: *The Biology of Cancer*, p. 231, Garland Science (2013).
- 5) 赤尾 健: 化学と生物, **52**, 223 (2014).
- 6) Tshering Penjor *et al.*: *Sci. Rep.*, **4**, 4853 (2014).
- 7) Kouprina, N. and Larionov, V.: *Nat. Protoc.*, **3**, 371 (2008).
- 8) Gibson, D. G.: *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6984 (2009).
- 9) Gibson, D. G. *et al.*: *Science*, **329**, 52 (2010).
- 10) Chino, A. *et al.*: *PLoS One*, **5**, e79652 (2010).
- 11) Matsuo, Y. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 685 (2010).
- 12) Mizutani, K. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **77**, 1 (2011).
- 13) Mizutani, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 1 (2015).
- 14) Fu, J. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **30**, 440 (2012).
- 15) Gibson, D. G. *et al.*: *Science*, **319**, 1215 (2008).
- 16) Gibson, D. G. *et al.*: *Nat. Methods*, **6**, 343 (2009).
- 17) Nagano, Y. *et al.*: *Plant Cell Rep.*, **26**, 2111 (2007).
- 18) Iizasa, E. and Nagano, Y.: *Biotechniques*, **40**, 79 (2006).
- 19) Iizasa, E. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **285**, 2996 (2010).
- 20) Goto, K. and Nagano, Y.: *PLoS One*, **8**, e56530 (2013).