

新しいDNAクローニング技術の開発

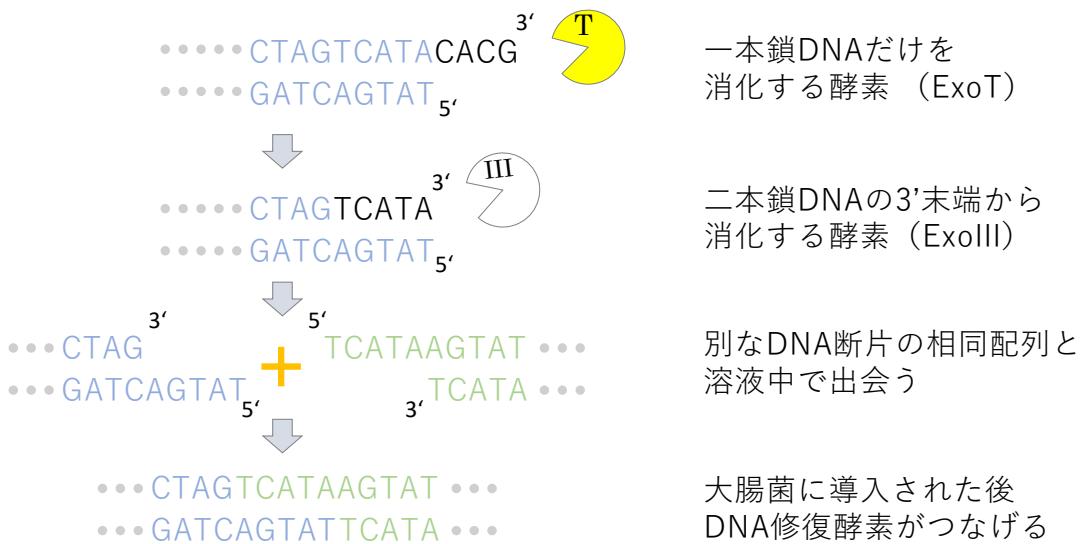
—京大学部生研究チームの発見が契機に—

概要

「DNAクローニング」は、分子生物学の基幹技術です。長い間、この技術のためにはDNAを切る「はさみ」や「のり」を使った複雑な工程が必要でした。最近になって「相同組換え」を利用したシンプルな方法が使われるようになっていますが、高価な試薬が必要なため多くの研究室の予算を圧迫していました。

学部生による研究チーム iGEM Kyoto のメンバー、Alexander Y. Liu、吉賀大翔、合屋智尋の3名は、チームの予算が少ないとから高価な試薬を買うことをためらい、「自分たちで新たな反応液を作れないか」と考えて研究を開始しました。高価な試薬を使わずとも、大腸菌から特別な方法で抽出した溶液「SLiCE」を使えば「相同組換え」ができるという報告に着目し、北畠真 医学生物学研究所 助教と共同で「SLiCE」の有効成分の特定に挑戦しました。研究の結果、2つの酵素が活性を担っていることがわかりました。これらの酵素のカクテルは高価な試薬の数千分の一のコストで作成することができ、市販のものと同等の性能を示したのです。この成果は世界中で行われるDNAクローニングのコストを大幅に削減させることにつながると期待されます。

本研究成果は、2023年5月3日に、国際学術誌「*Genes to Cells*」にオンライン掲載されました。



2つの酵素によるDNAクローニングの仕組み

1. 背景

DNA クローニング^{*1}は、遺伝子をあつかうほとんどすべての研究室で使われる基幹技術です。近年ではこの技術のための優秀なキットが市販され、多くの研究者に受け入れられています。これらのキットを使う場合、直鎖状の DNA 断片の末端部分に「オーバーラップした領域」が 20 塩基ほどあれば、相同組換え反応^{*2}により効率的に 2 断片の連結を行うことができます。この 20 塩基はどのような配列でもよく、作業も簡単で、これらの方を使えば失敗することなく確実に組換え遺伝子を作成することが可能です。唯一の問題点はこれらのキットがどれも大変高価であることです。キットの製造に多種の酵素が必要だったり、調製が困難な成分が含まれていたりすることがその原因と考えられます。

今回の研究の契機となった iGEM Kyoto チームは、京都大学の学部生による研究団体です。iGEM^{*3}という国際大会が毎年ボストンで行われています。この大会は合成生物学の教育を目的にしており、世界から集まる 400 大学以上のチームの学部生たちが自分たちの作成した遺伝子組換え生物（多くの場合は大腸菌）を披露し、その成果を競います。iGEM Kyoto はその大会への参加を目指して、自分たちで独自に資金を集め、協力研究者を募り、夏休みに学生実習室を借りて自分たちのアイディアで実験を行っています。他の 400 以上の大学のチームと同様、このチームもいつも資金不足に悩まされています。しかし遺伝子組換え実験をするためには、高価な「相同組換え反応」キットを購入する必要がありました。そんな中、メンバーから数名が立ち上がり、「お金がなくてもできる、実験設備がなくても作れる新しい反応液を開発しよう」と声をあげました。

2. 研究手法・成果

当時すでに、「大腸菌を培養して特定の界面活性剤で処理し、そこから得られた抽出液（SLiCE^{*4}）を用いれば相同組換え反応の活性が得られる」という論文が報告されていました。SLiCE を取り寄せて試用してみたところ、たしかに効率よく DNA クローニングができることが再現できました。しかし問題は、この SLiCE が大腸菌のさまざまなタンパク質の混合物であったということです。保存しておいた SLiCE は短い期間に活性が低下してしまい、作成にも何日も時間がかかります。また、「反応の原理が分かっていない」ことも大きな不安材料でした。作成するたびに、効率のよい SLiCE ができたり、あまりよくない溶液ができたり安定しないのも問題でした。そこで、この SLiCE の原理を解明することで、より簡単に効率的な反応液の作成が可能になるのではないか、と狙いをつけました。

それまでに知られていた、大腸菌の「相同組換え」経路の遺伝子を洗い直し、SLiCE の有効成分の候補リストを作りました。最終的に合計 7 つの遺伝子について、それぞれ遺伝子破壊を行った大腸菌を NBRP E.coli Strain^{*5} から入手しました。これらの株を培養して SLiCE を作成し、その「相同組換え」活性を比較したところ、ほとんどの株からは活性のある SLiCE が作成できてもかかわらず、「エキソヌクレアーゼ III (ExoIII)」という酵素の遺伝子を欠いた大腸菌から作られた SLiCE には、活性がまったくありませんでした。

市販されている ExoIII を購入し、希釀した酵素溶液を SLiCE のかわりに使って相同組換え実験を行ったところ、ごく少量の酵素だけで十分な活性が得られることが確かめられました。このことからこの酵素は SLiCE 反応に必要であると同時に十分な要素であることが示されました。この酵素についてこれまで知られていた性質から、DNA 断片の末端に配置されている 20 塩基の「オーバーラップ」配列が、3'-5' 方向に ExoIII によって消化され、5' 末端が突出した一本鎖 DNA として露出することが組換え反応の原理であると考えられました。ExoIII は 3' 末端が突出した一本鎖 DNA を消化することができない弱点があります。この弱点を補強するために、そのような一本鎖 DNA を消化する（しかし 5' 末端が突出した一本鎖 DNA や、突出のない二本鎖 DNA は消化しない）酵素の探索も行いました。その結果、エキソヌクレアーゼ T (ExoT) という酵素を混合すること

でこの弱点は消えることが明らかになりました。

このように、たった2つの酵素を混ぜるだけで、無数のタンパク質が溶け込んだ SLiCE の活性を完全再現することに成功しました。主な活性を担う ExoIII は市販のものを購入しましたが、希釀して使用するため、一円の試薬を買うと 80 万回もの組換え反応をすることができます（市販のキットは1回反応あたり 1,500 円程度です）。高価なキットに匹敵するカクテルを、非常に廉価に作成することが可能になったのです。

3. 波及効果、今後の予定

作成したカクテルは、非常に安定した条件で保存することができ、長期間保存しても活性が低下することはありませんでした。したがってどの研究室でも市販のキットをこのカクテルで置き換えることが可能になると期待されます。

研究に使用する予算には限りがあります。廉価で安定的な試薬を使うことで、高価でかつ使用頻度の高いキットの購入費を削減すれば、残った予算でさらなる確認実験を行ったり、応用研究を進めていくことが可能になるでしょう。また、iGEM チームのように予算に大きな制約のある学生研究団体においても、このカクテルを使うことで今後はより安価に簡単に遺伝子組換え実験を進めることができます。新しい学生研究チームがさらに世界中で生まれる契機になるかもしれません。このように、多くの分野で研究時間の大きな部分を占める DNA クローニングを安価にし、使いやすくすることは、生命科学研究の広い範囲に波及効果をもたらすと考えられます。

これまでに試作品のカクテルを配布してきたすべての研究室からは高評価のフィードバックをいただいており、当面解決すべき問題は見当たりません。今後より多くの研究室で利用されることで、特定の配列では ExoIII の消化が阻害される、などの予期しないトラブルが見つかってくる可能性も考えられます。ユーザーの意見を集め、より使いやすいカクテルに改善していきたいと考えています。

4. 研究プロジェクトについて

関連研究団体 : iGEM Kyoto <<https://igemkyoto.github.io/>>

本研究は科学研究費補助金(19K06487 および 22K06080)、武田科学振興財団、発酵研究所(G-2020-2-083)の支援を受けています。また、京都大学医生物学研究所の LiMe Office of Director's Research Grants Programの一環として行われました。

<用語解説>

※1 DNA クローニング：目的遺伝子のコピーを大量に増幅して扱いやすくするための技術。大腸菌の中で複製するプラスミド（環状 DNA）を切断して直線状にし、切り口部分に目的の遺伝子断片を挿入する。環状に修復した上で大腸菌内部に導入し、目的遺伝子を持つプラスミドを大腸菌内で増幅させる。

※2 相同組換え反応：細胞の中で傷ついた DNA が修復される経路のひとつ。複数の酵素が協力し、ゲノムから「同じ配列」の部分を探ってきて物理的に並べて、それぞれの配列の間で「組換え」を行う。ここでは、プラスミドの切断末端の配列と、目的遺伝子の末端の配列に 20 塩基程度の「同じ配列」を用意しておき、「組換え」を誘導することで目的遺伝子とプラスミドを物理的に連結させる反応を意味している。

※3 iGEM : International Genetically Engineered Machine competition の略。毎年ボストンで開かれる大会には400以上の大学から学生チームが参加している。大会では「合成生物学（遺伝子組換えで新しい製品を作ること）で世界をよりよい場所に」を合言葉に、学生たちの研究成果が発表される。大会では具体的な評価基準が定められており、教育的な効果が得られる仕組みになっている。基準には「印象的な組換え遺伝子を設計し実現する」「利害関係者に聞き取り調査を行い、プロジェクトを改善する」「遺伝子組換え生物やその生産物の挙動を数理モデルとして解析し、プロジェクトの改善をする」など、高度なものが含まれる。

※4 SLiCE : Seamless Ligation Cloning Extract の略。大腸菌を培養し、界面活性剤で処理することで成分を抽出したもの。相同組換え反応を誘導する溶液として報告された。安価に入手できることから多くの研究者が作成し使用してきたが、さまざまなタンパク質の混合物のため、保存性が悪く、冷凍保存していても次第に活性が失われてくるという問題があった。さらに培養から作成まで2-3日の時間がかかるなど、入手に不安定な点があった。このため SLiCE を作らずに高額なキットを購入する研究室も非常に多かった。

※5 NBRP E.coli Strain : 国立遺伝学研究所のナショナルバイオリソースプロジェクト。重要な遺伝資源としての大腸菌変異体を多数保存している。上記の遺伝子破壊株だけでなく、過去の研究で使用された大腸菌変異体の多くをコレクションにおさめてあり、配布している。

<研究者のコメント>

遺伝子組換え実験には自分も学生の頃から苦労してきました。研究者になってからは便利なキットが販売されたので操作は楽になりましたが、今度はそれを買うための予算の確保に苦労することになりました。優秀で志の高い学生たちの取組みで今回のような成果が出たことは非常に嬉しいです。日本には優れた若者がたくさんいると勇気づけられました。余裕のある方は iGEM Kyoto の活動を支援してあげてほしいです。（北畠）

<論文タイトルと著者>

タイトル : Quick and affordable DNA cloning by reconstitution of Seamless Ligation Cloning Extract using defined factors (SLiCE 反応液の再構成による迅速で安価な DNA クローニング法の開発)

著 者 : Alexander Y. Liu¹、古賀大翔²、合屋智尋³、北畠真⁴

1 京都大学理学部 4回生（現 iPS 細胞研究所 技術補佐員 今秋より UC San Diego 大学院）

2 京都大学理学部 3回生（現 4回生）

3 京都大学医学部医学科 3回生（現 4回生）

4 京都大学医生物学研究所 RNA システム分野助教（現所属 医生物学研究所 RNA ウィルス分野）

掲載誌 : *Genes to Cells*

DOI : 10.1111/gtc.13034

<参考図表>

新たなDNAクローニング法開発の背景

	市販のキット	SLiCE溶液 ※
価格	高い >>	安い
労力	小 <<	大

※ SLiCE：大腸菌を培養して界面活性剤処理により成分を抽出した溶液。作成に3日間必要。

お金をかけずに、簡単に使える溶液を作れないか？



1. SLiCEの原理を解明 (2つの酵素)
2. 2つの酵素を混ぜるだけでSLiCEが再現できた