

組換え体の選抜法の開発と
微生物ゲノム編集の高速化に関する研究

2015年1月

千葉大学大学院工学研究科
共生応用化学専攻 共生応用化学コース

富永 将大

(千葉大学審査学位論文)

組換え体の選抜法の開発と
微生物ゲノム編集の高速化に関する研究

2015年1月

千葉大学大学院工学研究科
共生応用化学専攻 共生応用化学コース

富永 将大

目次

図および表のリスト	・・・v
第一章 序論	
1.1. 順遺伝学と逆遺伝学	・・・1
1.2. ハイスループット化/大規模化	・・・3
1.2.1. ミニマルゲノムプロジェクト	
1.2.2. ゲノム融合	
1.2.3. 微生物生産のためのコンビナトリアルゲノム工学	
1.2.4. ゲノムリコーディング	
1.2.5. 全ゲノムの人工合成	
1.3. 大規模ゲノム工学を可能にするゲノム工学手法	・・・6
1.3.1. Bottom-up型の大規模ゲノム工学	
1.3.2. Top-down型の大規模ゲノム工学	
1.3.3. Bottom-up型ゲノム改変法の種類と特徴	
1.3.4. トランスポゾンを用いるゲノム改変法	
1.3.5. 部位特異的リコンビナーゼ/インテグラーゼを用いる法	
1.3.6. エンドヌクレアーゼを用いるゲノム改変法	
1.3.7. Lambda-REDリコンビニアリング法	
1.3.8. Multiplex Automatable Genome Engineering (MAGE:多重ゲノム工学法)	
1.3.9. 2ステップ-リコンビニアリング法	
1.4. 本論文の概要	・・・16
引用文献	・・・19

第二章 ヌクレオシドキナーゼを用いたネガティブ選択法

概要	・・・ 25
2.1. 緒言	・・・ 26
2.2. 結果	・・・ 30
2.2.1. dP キナーゼ遺伝子のスクリーニング	
2.2.2. <i>hsvTK</i> のゲノムへの導入	
2.2.3. シングルコピー <i>hsvTK</i> のdPキナーゼ活性	
2.2.4. <i>hsvTK</i> /dPを用いたゲノム組換え体のネガティブ選択	
2.2.5. dPセレクションに要する時間	
2.2.6. <i>hsvTK</i> /dPを用いたネガティブ選択法による遺伝子変異の増加	
2.2.7. 選択カセット中の <i>hsvTK</i> 遺伝子上に起こるPCRエラー由来の失活変異	
2.2.8. <i>hsvTK</i> の変異失活による非組換え株（偽陽性）の発生	
2.3. 考察	・・・ 44
2.3.1. <i>hsvTK</i> /dPを用いた液操作のみによるゲノム組換え体のネガティブ選択の実現	
2.3.2. セレクションエスケープは全てon-site (<i>hsvTK</i>) 上の遺伝子変異が原因であった	
2.3.3. dPによって組換え体にも変異が導入されるリスク	
2.4. 実験項	・・・ 46
引用文献	・・・ 48

第三章 ネガティブ選択におけるセレクションエスケープの低減

概要	・・・ 53
3.1. 緒言	・・・ 54
3.2. 結果	・・・ 58
3.2.1. <i>hsvTK</i> のチミジンキナーゼ活性を用いたポジティブ選択（dTセレクション）	
3.2.2. dTセレクションによるセレクションエスケープの低減	
3.2.3. <i>hsvTK</i> とポジティブ選択マーカーの融合による <i>hsvTK</i> のデュアル選択マーカー化	
3.2.4. 融合マーカーを用いたネガティブ選択	

3.2.5. 融合マーカーを用いたポジティブ選択	
3.2.6. APHカセットとの融合化によるセレクションエスケープの低減	
3.2.7. <i>hsvTK</i> の直列重複によるセレクションエスケープの低減	
3.2.8. <i>hsvTK</i> の入れ子型重複によるセレクションエスケープの低減	
3.3. 考察	・・・72
3.4. 実験項	・・・73
引用文献	・・・76

第四章 微生物ゲノムの多段階かつ連続な改変法

概要	・・・79
4.1. 緒言	・・・80
4.2. 結果	・・・82
4.2.1. 細胞数の調節によるPCR由来変異の除去	
4.2.2. セレクションエスケープの発生によるゲノム組換えスキームの破綻	
4.2.3. ネガティブ選択マーカー重複型の選択カセットを用いたゲノム組換えの連続実施	
4.2.4. <i>mrfp</i> 遺伝子の連続組換え	
4.3. 考察	・・・91
4.3.1. 組換え操作の連続実施における細胞数の調節の重要性	
4.3.2. 本手法の適用限界 (1): 繰返し回数の上限	
4.3.3. 本手法の適用限界 (2): ゲノム改変の種類	
4.4. 実験項	・・・93
引用文献	・・・96

第五章 イソプレノイド増産を目指した多段階かつ並列なゲノム編集

概要	・・・99
5.1. 緒言	・・・100
5.2. 結果	・・・103
5.2.1. イソプレノイド増産を目指した4ラウンドの連続ゲノム編集	

5.2.2. 組換え株によるリコペン生産	
5.2.3. 1-kbpを超える遺伝子の置換の試み	
5.3. 考察	・・・108
5.4. 実験項	・・・109
引用文献	・・・112
第六章 結論	
6.1. 本研究の成果	・・・116
6.1.1. ヌクレオシドキナーゼと人工ヌクレオシドを用いたネガティブ選択法のゲノム工学への適用	
6.1.2. 液体操作のみで実施可能な多段階のゲノム工学法の確立	
6.2. 展望	・・・118
6.2.1. さらなるハイスループット化を目指して：長鎖DNAの挿入への対応	
6.2.2. ミニマムゲノムプロジェクトの高速化	
6.2.3. 微生物ゲノムの”まるごと書き換え”の可能性	
6.2.4. “書き方（手法）”よりも”何を書くか（配列設計）”が問題である	
引用文献	・・・122

付録

1. 本研究で用いたプライマーのまとめ
2. hsvTKとポジティブ選択マーカの融合とその安定化

図および表のリスト

第一章

- Fig. 1.1 プラスミドの形質転換と選択マーカーを使った形質転換体の選択操作
Fig. 1.2 ミニマムゲノムプロジェクトで作製された3つの欠損株のゲノム構成
Fig. 1.3 遺伝子のコドン表
Fig. 1.4 トランスポゾンを用いたゲノム改変法
Fig. 1.5 リコンビナーゼ/インテグラーゼを介したゲノム改変法
Fig. 1.6 Lambda-REDを介した組換えの推定メカニズム
Fig. 1.7 MAGEサイクル
Fig. 1.8 2ステップ-リコンビニアリング法の概要
Fig. 1.9 本論文の構成
Table 1.1 大規模ゲノム欠損の例

第二章

- Fig. 2.1 遺伝子治療のために合成された合成ヌクレオシド
Fig. 2.2 P塩基が形成する擬似ワトソン・クリック塩基対
Fig. 2.3 dPキナーゼを用いたネガティブ選択（dPセクション）機構
Fig. 2.4 さまざまなヌクレオシドキナーゼを発現する細胞のdP感受性
Fig. 2.5 *lacZ*座位への*hsvTK-cat*カセットの導入
Fig. 2.6 *hsvTK/dP*が誘導する細胞死のdP濃度依存性
Fig. 2.7 *hsvTK/dP*を用いた固体培地上でのゲノム組換え体のネガティブ選択
Fig. 2.8 *hsvTK/dP*システムの細胞死の速度
Fig. 2.9 *hsvTK/dP*を用いた液体操作のみによるゲノム組換え体のネガティブ選択
Fig. 2.10 dPが大腸菌株MG1655の遺伝子変異頻度に与える影響
Fig. 2.11 セレクションエスケープクローンで同定された*hsvTK*上の変異が移植された大腸菌MG1655株のdP感受性

Table 2.1 既存のネガティブ選択マーカーとその特徴
Table 2.2 *hsvTK*発現が細胞の遺伝子変異頻度に与える影響
Table 2.3 HCカセット導入後に現れたdP耐性クローン（Figure 2.4B）の*hsvTK*遺伝子の配列解析
Table 2.4 HCカセット導入後に生じるdP耐性クローンの頻度のPCR酵素依存性
Table 2.5 ネガティブ選択におけるセレクションエスケープのクローンの*hsvTK*配列解析
Table 2.6 本章で使用したプラスミド

第三章

- Fig. 3.1 セレクションエスケープに由来する偽陽性の発生
Fig. 3.2 SDS排出活性に対するポジティブ選択によるTolC不活性変異体の除去
Fig. 3.3 ネガティブ選択マーカの重複によるセレクションエスケープの低減
Fig. 3.4 hsvTKのチミジンキナーゼ活性に対するポジティブ選択機構
Fig. 3.5 dTキナーゼ活性に対するポジティブ選択によるhsvTK失活変異体の除去
Fig. 3.6 dT選択によるhsvTK発現細胞の選択的な増殖
Fig. 3.7 dT選択の有無がセレクションエスケープ頻度に与える影響
Fig. 3.8 hsvTKと様々なポジティブ選択マーカとの融合デザイン
Fig. 3.9 融合マーカのネガティブ選択マーカとしての性能
Fig. 3.10 融合マーカのポジティブ選択マーカとしての性能
Fig. 3.11 カナマイシンセレクションの有無がhsvTK::Km^rの融合マーカのセレクションエスケープ発生頻度に与える影響
Fig. 3.12 *hsvTK*の直列重複がセレクションエスケープの頻度に与える影響
Fig. 3.13 野生型*hsvTK*遺伝子とそのコドン修正型との配列アライメント
Fig. 3.14 MG1655Δ*lacZ*::HHKカセット株から生じたセレクションエスケープの配列解析
Fig. 3.15 *hsvTK*の入れ子型の重複がセレクションエスケープの頻度に与える影響

Table 3.1. 既存のネガティブ選択マーカとセレクションエスケープの頻度

Table 3.2. Table 3.2. 本章で使用したプラスミド

Table 3.3. 本章で使用した大腸菌株

第四章

- Fig. 4.1 多段階のリコンビニアリング操作
Fig. 4.2 2ラウンドの連続組換えの実験ワークフロー
Fig. 4.3 *pT7-mrfp* をコードする DNA 断片による連続ゲノム組換え
Fig. 4.4 それぞれのラウンドの細胞集団(Figure 4.3)の4つの異なる座位に関する遺伝型解析
Fig. 4.5 ラウンド4の細胞集団(Figure 4.3)から単離されたクローンの4つの異なる座位に関する遺伝型解析

Table 4.1. 組換え体集団の表現型/遺伝型の解析

Table 4.2. 第一ラウンドのリコンビニアリングでみられた無蛍光クローンの遺伝型

Table 4.3. 本章で用いたプラスミド

第五章

- Fig. 5. 1 イソプレノイド（リコペン）生成経路の概略
- Fig. 5. 2 各単一欠損株のリコペン生産量評価
- Fig. 5. 3 リコペン増産のための4ラウンドの連続ゲノム編集
- Fig. 5. 4 得られた組換え株（Figure 5.3）によるリコペン生産
- Fig. 5. 5 *fdhF*座位と*pT5-ispDF*カセットとの置換

Table 5.1 イソプレノイド増産に資する既知の遺伝型

Table 5.2 本章で使用したプラスミド

第六章

- Fig. 6. 1 I-SceIを用いた改良型のゲノム編集法
- Fig. 6. 2 大規模ゲノム編集工程の例

第一章

序論

1.1. 順遺伝学と逆遺伝学

ゲノムは、生物の性質に関する全ての情報を含む。つまり、ゲノムの配列の変化（塩基置換や欠失、挿入など）は、そのまま生物の性質（遺伝子によって決まる性質は、形質と呼ばれる）の変化を引き起こす。分子遺伝学は、生物の形質と遺伝子の対応付けを目指す学問分野である。生物種によって遺伝子の数は様々であるが、最も研究の進んでいる大腸菌であっても、4,600ほどの遺伝子のうちおよそ半数については、いまだ機能が同定されていない(1)。

分子遺伝子学では、古くは、UV照射(2)や Chemical mutagenesis (3)によって、ゲノム上に突然変異を起こし、表現型の変化した細胞について、（主に配列解析によって）変異部位を調べる、という手法がとられていた。こうしたやり方は、“**順遺伝学**”と呼ばれる。微生物のゲノム改変の多くは、1) 工学的な目的：望む”表現型”、すなわちバイオ燃料生産能などの機能を持つ細胞を作りだす為、あるいは2) 理学的な目的：平たく言えば、表現型の変化をもたらす遺伝子の探索、の為に行なわれてきた。

1972年に、Jacksonらが、異なる生物が持つDNAどうしが結合された”組換えDNA”を作ることに初めて成功した(4)。ここでは、SV40と呼ばれるウイルスが持つDNAと、大腸菌が持つDNAを、まず1) 試験管内（～細胞の外～*in vitro*）でDNA切断酵素によって切断し、2) 次にこれらを混合し、DNAリガーゼを加えることで、二つのDNA間に共有結合を形成させた。翌1973年には、Cohenらによって、*in vitro*で合成された”プラスミドDNA”を、大腸菌に導入することによって、大腸菌の性質（形質、あるいは表現型と呼ばれる）を変える（形質転換～transform）うることに成功した(5)。ここでは、プラスミドと呼ばれる環状DNAに、EcoRIという制限酵素（DNA切断酵素）で処理されたDNA断片を結合（ライゲーション）し、大腸菌にこのプラスミドを取込ませている（形質転換, **Figure 1.1**）。

形質転換が起こる頻度は低い（ 10^{-2} - 10^{-4} /cell）。Cohenらは、同論文中で、プラスミドが導入された大腸菌（形質転換体）だけを、プラスミドにコードされる薬剤耐性遺伝子（ポジティブ選択マーカー）の機能を用いて、“**選択（セレクション）**”できる、ことを示した。この手法は、抗生物質を含む寒天培地に、形質転換の操作を行なった細胞集団（そのうち 10^{-2} - 10^{-4} が薬剤耐性を示す形質転換体）を塗布する。非形質転換体はこの培地上で増殖できないのに対して、形質転換体（プラスミドを導入された細胞）はその抗生物質を分解/排出で

きるため、増殖できる。こうして、形質転換したものだけ選択的にコロニー形成させる (Figure 1.1)。

この発見以後、「対象の遺伝子、すなわち DNA を、試験管内で編集し、大腸菌などの宿主に導入して、その生物機能を解析する」というやり方が、急速に普及した。特に、「低頻度で生じる組換え体を、薬剤に対する耐性を利用して、選択的に培養する」という方法は、遺伝学の基本手法となった。一方で、特定の遺伝子に標的を絞って、その遺伝子が改変された (変異を起こしたり、遺伝子そのものを欠損させたりする、など) 生物を作出し、それが持つ形質の変化を調べるやり方は、「逆遺伝学」と呼ばれる。

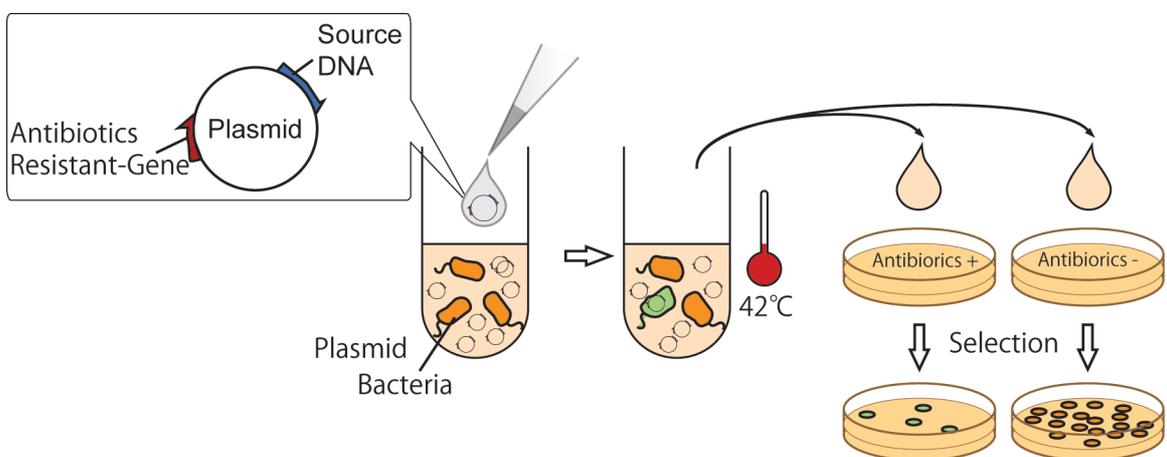


Figure 1.1. プラスミドの形質転換と選択マーカーを使った形質転換体の選択操作

“逆遺伝学”は、ゲノムプロジェクトによって大腸菌や他の微生物の全ゲノム配列が決定(6,7)されたことを受けて、またゲノム改変技術が改良されていったことにより、その対象が急速に大規模化している(8)。2006年には、大腸菌の全遺伝子の欠損株 (3,985 遺伝子、全 4,288 遺伝子のうち 1/3) が、馬場らによって作製された(9,10)。酵母においても、Winzelerらによって、遺伝欠損株のコレクション (2,026 遺伝子、全遺伝子~6,000 のうち 3 分の 1) が作製されている(11)。このような組織的な遺伝子欠損によって、微生物の必須遺伝子/非必須遺伝子が決定されてきた。最近では、大腸菌では、森らのグループと Wanner らのグループが共同で、二重遺伝子欠損株作製の準備を進めている(12,13)。酵母ではすでに、約 2000 x 4000 遺伝子の網羅的組合せによる解析が報告されている(14)。さらに原島らのグループが、単独では生命の維持に“非必須”な遺伝子を、“同時に欠損させた”ときに、初めて致死性となる“synthetic Lethality”の探索を試みている(15)。このような、逆遺伝学のハイスループット化/大規模化について 1.2 節で、そのための手法について 1.3 節で述べる。

1.2. ハイスループット化/大規模化

1.2.1. ミニマルゲノムプロジェクト

大腸菌をなどの微生物ゲノムの全配列が決定されるにともない、そのゲノム配列は互いに比較され、遺伝子の重複や、機能を果たしていない遺伝子群を除くと、真に必須な遺伝子は10-30%程度であるという推定がなされた(16)。そこで、微生物を構成する遺伝子の、最小数を調べるために、微生物ゲノムから数十数百という遺伝子を欠損させ、最小遺伝子数から成る微生物を作製しようという試みが、2000年前半から盛んに行なわれた (Table 1.1) (17)。まず、Goryshin らは、Tn5 トランスポゾンを使った遺伝子のランダム欠損法(後述; cf. 1.3.4~トランスポゾンと呼ばれる塩基配列が、ゲノムにランダムに挿入される)を用いて、100-262 kbp のゲノム欠損を起こしてみせた(18)。Yu らも同様の手法で、313 kbp の領域を欠損した大腸菌の作製に成功している(19)。

ゲノム工学手法の改良に伴い、ゲノム欠損の規模も大きくなっていった。2006 年には、Posfai らが、大腸菌ゲノム中の非必須領域を一つずつ欠損していくことで、大腸菌ゲノムからその 15%を欠失してみせた(20)。次いで、さらに欠損領域を広げ、現在までに、最大~30%を欠損した大腸菌が報告されている(21)。ゲノムの大規模欠損は、生命の最小要件を探るという目的の他に、代謝工学的な目的にも有用である。北里大学の池田らのグループは、放線菌 (*S. avermitilis*) において、その線状ゲノムの 15% (1.5 Mbp) を欠失させた(22)。こうすることによって、放線菌特有の二次代謝産物の生産を止め、代わりに、異種生物由来の二次代謝産物を、特異的に生産させることに成功している。

Table 1.1. 大規模ゲノム欠損の例

Organism	Deletion size [kbp]	Reference
<i>E. coli</i>	780 (15%)* ¹	(20)
<i>E. coli</i>	1300 (30%)	(23)
<i>B. subtilis</i>	874 (20%)	(21)
<i>B. subtilis</i>	134 (8%)	(24)
<i>S. avermitilis</i>	1400 (15%)	(22)
<i>C. glutamicum</i> R	67 (2%)	(25)
<i>C. glutamicum</i> R	190 (6%)	(26)

*1: 括弧内の数字は全ゲノムサイズに対する欠損サイズの割合を示す。

一回のゲノム改変操作で欠損できる最大長さは、Fukiya らが報告した 117 と 165 kbp というオーダーである。また、必須遺伝子の欠損を避けるために、ゲノム配列をいくつかに分割しながら欠損しなければならない。このような制約から、Mbp オーダーのゲノム欠損のためには、遺伝子欠損が数 10 回繰り返されることが多い (Figure 1.2)。ゆえに、多数の組換え操作を、いかにスループット高く繰り返すか、という方法論が注目を集めている(27)。

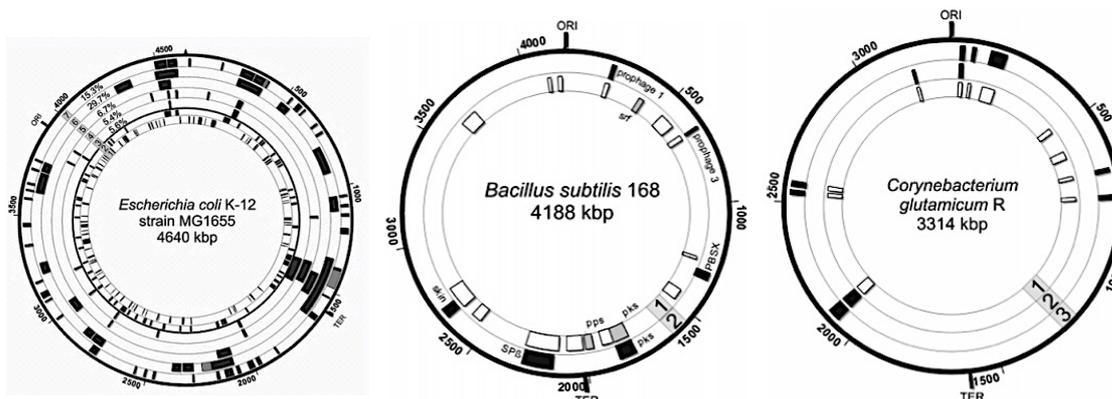


Figure 1.2. ミニマムゲノムプロジェクトで作製された 3 つの欠損株のゲノム構成
文献(17)より引用。黒い box 部分が欠損された部位を示す。

1.2.2. ゲノム融合

異種の全ゲノムを、まるごと融合してしまう試みも行なわれている。慶応大学の板谷らのグループでは、枯草菌に、3.5 Mbp におよぶラン藻ゲノム全体を複数に断片化して導入することに成功している(28)。この成果によって、ラン藻の 1) 増殖がおそい、2) 形質転換系が確立されていない、などの問題を回避しながら、枯草菌のなかでその遺伝子機能を調べることが可能になった。

1.2.3. 微生物生産のためのコンビナトリアルゲノム工学

工学的な見地からも、大規模ゲノムの需要は増しており、2007 年頃にはステファノポラスらのグループが、イソプレノイドの増産を目指した、遺伝子欠損/導入のコンビネーションを試すために、直列に最大 3-step のゲノム工学を行い、合計 40 種の大腸菌株のなかから、最もイソプレノイド生産量の高い株を探索している(29)。最も典型的な例として、Wang らは 2009 年に“Multiplex Automatable Genome Engineering (MAGE, 後述, 1.3.8 項)”という手法を開発し、イソプレノイド経路に関わる 24 もの遺伝子の発現量調節因子を、同時に書き換えた(30)。また、MAGE を改良した CoS-MAGE という手法で、Carr らは、20 bp の塩基配列の挿入の頻度を数十%にまで高め、プロモータサイズの塩基配列の同時挿入に対応した(31)。こ

の手法を用いて、Wang らは、indigo pathway における 12 個の酵素遺伝子のプロモータをそれぞれ T7 化した株をコンビナトリアルに作製し、作製された株のプールから、インディゴ色素の生産量が野生型より 4 倍向上した株を見いだしている(32)。

1.2.4. ゲノムリコーディング

大規模ゲノム工学の典型的な例のひとつとして、大腸菌ゲノムの”リコーディング”が挙げられる。F. J. Isaacs らは、まず、遺伝子暗号のなかから、翻訳終結コドン（終止コドン）の縮退を解くことに成功した (33)。終止コドンには、アンバー（TGA）、オパール（TAG）、そしてオーカー（TAA）と呼ばれる三つが存在する（Figure 1.3）。このうち、TAG コドンは、大腸菌全ゲノム（4500 個の遺伝子を含む(6)）において、314 の遺伝子に使用されている。F. J. Isaacs らは、MAGE および CAGE と呼ばれる新しいゲノム改変技術（後述）を用いて、この 314 もある TAG コドンすべてを、TAA コドンに変更した。現在は、他のアミノ酸についても、そのコドンを書き換え、いまとは全く別の遺伝子暗号を持つ大腸菌を作り出そう、という試みがなされている(34)。

		Second Position					
		T	C	A	G		
First Position	T	TTT Phe	TCT Ser	TAT Tyr	TGT Cys	T	Third Position
	T	TTC Phe	TCC Ser	TAC Tyr	TGC Cys	C	
	T	TTA Leu	TCA Ser	TAA Stop	TGA Stop	A	
	T	TTG Leu	TCG Ser	TAG Stop	TGG Trp	G	
	C	CTT Leu	CCT Pro	CAT His	CGT Arg	T	
	C	CTC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C	
	C	CTA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CCA Arg	A	
	C	CTG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G	
	A	ATT Ile	ACT Thr	AAT Asn	AGT Ser	T	
	A	ATC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C	
	A	ATA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A	
	A	ATG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G	
	G	GTT Val	GCT Ala	GAT Asp	GGT Gly	T	
	G	GTC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C	
	G	GTA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A	
	G	GTG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G	

Figure 1.3. 遺伝子のコドン表

終止コドンを赤字でハイライトしている。

1.2.5. 全ゲノムの人工合成

2003年に、Venterらのグループ (35)が、初めて化学合成されたオリゴDNAを用いて、phiX174 bacteriophageのゲノム (5386 bp) を全合成することに成功した。次いで2005年には、D. Endyらのグループ(36)によってT7ファージのゲノムが、化学合成されるだけでなく、T7ファージの機能(性質)を損なうことなく、全く異なるゲノム配列で再現された。さらにVenterらのグループは、*M. genitalium*ゲノム(583-kb) (37)および *M. mycoides*ゲノム (1.09 Mbp)(38)を、完全に人工的に、すなわち化学合成で作上げた。最近では、Annaluruらが、酵母細胞においても、染色体の一つを完全に人工合成されたそれに置き換えることに成功している(39)。

1.3. 大規模ゲノム工学を可能にするゲノム工学手法

ゲノム工学のやり方には、大きく二つある；一つは Venter らのグループが行なったような、"De novo 合成法"である (Bottom-up 型)。ここでは、数百万塩基対にもおよぶ、生物ゲノム一個分を、化学合成する。もう一つは、既にあるゲノム配列~各種生物が持っているゲノム~を、書き換えて行く方法である (Top-down 型)。古典的な遺伝学、あるいは遺伝子工学がこれに該当し、近年その規模が急増しているのは上で述べた通りである。まずは、二つのゲノム工学法それぞれの長所・短所について述べる。

1.3.1. Bottom-up 型の大規模ゲノム工学

Bottom-up 型の大規模ゲノム工学法は、主に、化学合成によってゲノム DNA を、人工的に、そして一から (*De novo* で) 調製する方法を指す。このような方法の最大の長所は、その設計自由度にある。研究者の思い描いた配列を、化学合成するところまでは、どんな塩基配列でも合成することができる。一方で、時間/コストがかかりすぎるという問題がある。DNA 合成は、¥50/bp までそのコストが低減されているとはいえ、例えば JC Venter らが世界で初めて人工合成した、最も小さい(~塩基数の少ない)と言われている *M. genitalium* の ゲノム(0.5 Mbp) の合成であっても、単純に計算して $¥50 \times 5 \times 10^5 = 5$ 億円がかかる。これに DNA 合成中のエラー(間違った塩基が含まれること)を、逐次取り除く過程も考慮に加えれば、ゲノムの *De novo* 合成のコストは、国家プロジェクトレベルにふくれあがる。事実、Venter らが初めてゲノム合成に成功するまでに、実際に"200-person year (40 人の研究体制で 5 年)"という時間がかかったと言われている(40)。

この方法には、もう一つ欠点がある；それは、合成した DNA 配列が細胞内で適切に機能するかどうか、細胞に導入する前にはわからないことである。いかなる DNA 合成エラーや、配列の細かな変更も、細胞に導入してみても初めて、それがゲノム機能の不全をもたらす、すなわち、そのゲノムを導入しても、細胞が生育しないか、あるいは重篤な増殖不全が

起こる場合がありえる。実際に、Venter らがはじめに合成した *M. genitalium* のゲノムは、*dnaA* 遺伝子のたった 1 塩基の変異のために、細胞内に導入されても、“健全な”、すなわち、細胞の生命機能を維持するためのゲノムとして機能しなかった(37)。そのために、既にあるゲノム配列を、1 塩基の間違ひもないようにコピーするか、あるいはゲノムの機能に影響しないわずかな変異だけを導入することが求められ、このことが未だ大きな技術的課題である。

1.3.2. Top-down 型の大規模ゲノム工学

Bottom-up 型に対して、Top-down 型は、すでにある生物のゲノムを、逐次書き換えていく方法である。ゲノム配列の変化は、常に細胞の中で起こるため、その変化が細胞の生命機能に与える影響を、“その場で”観察することができ、かつそれに対処できる、という利点がある。もし、配列改変によって、増殖不全が引き起こされる、あるいは、目的の表現型、例えば物質生産能が低下することがあれば、その変更計画は、ただちに是正され得る。そのような理由から Bottom-up 型の大規模ゲノム工学は、現段階では、Top-down 型の大規模ゲノム法に比べて、強力な手段である。しかしながら、ゲノム改変を大規模に行なうためには、1) 1 回あたりのゲノム改変領域を大きくするか、あるいは 2) ゲノム改変操作を何度も繰り返す必要がある。そこで、次節では Bottom-up 型のゲノム工学法について、スループットの観点から概説する。

1.3.3. Bottom-up 型ゲノム改変法の種類と特徴

Bottom-up 型のゲノム書き換え法には、大きくわけて次の 3 種類の方法がある；1) 伝搬因子（トランスポゾン）を用いる方法、2) 部位特異的リコンビナーゼ/インテグラーゼを用いる方法、3) エンドヌクレアーゼを用いる方法、そして 4) ファージ由来のリコンビネーションシステムを用いる方法である。これらの手法の性能は、ゲノム書き換えの様式、例えば欠損なのか遺伝子導入なのか、あるいは遺伝子の置換なのか、また、その規模（すなわち塩基数）によって、さまざまである。ここでは特に、組換え体を得るためのスループットに注目して概説する。

1.3.4. トランスポゾンを用いるゲノム改変法

トランスポゾンと呼ばれる DNA 配列は、構成遺伝子~例えば大腸菌の Tn5 型をベースにしたトランスポゾンでは、カナマイシン耐性遺伝子 (Km^r) と、クロラムフェニコール耐性遺伝子 (Cm^r) がコードされている~とトランスポゼース（転移酵素）をコードする遺伝子、それからその上下流を、逆反復配列が挟む、という構成をしている(18)。トランスポゼーゼは逆反復配列を認識してトランスポゾンゲノム配列から切り出し、そしてトランスポゼーゼは

適当なゲノム配列に再度トランスポゾン挿入する (**Figure 1.4**)。このゲノム配列への挿入は、完全にランダムな部位に起こるため、ゲノムの正確な編集には不向きであるが、欠損可能な領域の網羅的な探索などに便利である。ここでは、トランスポゾンが挿入された細胞で、かつ生育するということは、欠損可能な領域にトランスポゾンが挿入されたことを示すので、挿入された部位を特定すればよい。

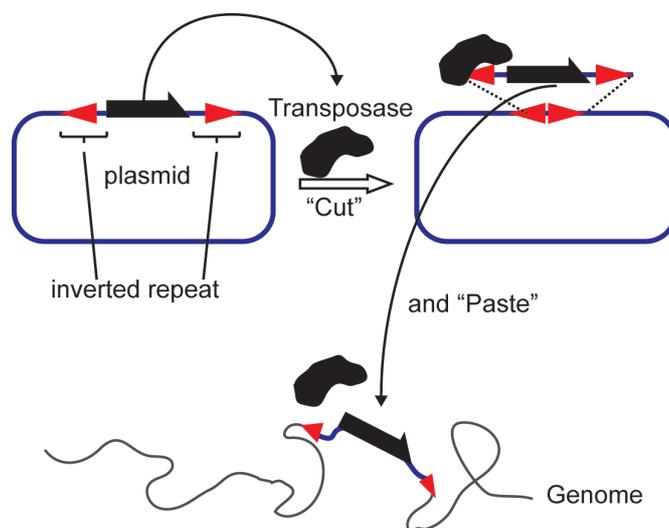


Figure 1.4. トランスポゾンを用いたゲノム改変法

1.3.5. 部位特異的リコンビナーゼ/インテグラーゼを用いるゲノム改変法

大規模ゲノム組換えにおいては、巨大な（すなわち長い）塩基配列を、ゲノムに導入することは重要である。リコンビナーゼ/インテグラーゼは、DNA に結合し、特異的かつ効率よく DNA を切り出す酵素である (**Figure 1.5**)。ファージ由来のリコンビナーゼ/インテグラーゼと呼ばれる酵素は、*attP* で挟まれた配列を、不可逆的に *attB* というサイトに導入することが知られている。さらに、インテグラーゼとよばれる酵素は、同様の反応を、種を問わず、広範な生物で行なうことが明らかにされている(41,42)。

リコンビナーゼ/インテグラーゼ型のゲノム工学法の最大の利点は、比較的大きな断片（数 kbp~数 100 kbp）を、一回のゲノム組換え操作で導入することができる点である。この性質を生かして、異種生物に由来する”遺伝子クラスター”（ある化合物を生合成するための経路遺伝子が並んだ DNA 配列）を、大腸菌に導入するとき有効である。これまでに、異種

由来のアルギニン代謝の経路遺伝子 (34 kbp) を、一度にゲノム導入した例が知られている (43)。最近では、完全人工の (化学合成した) DNA 配列 Cre-loxP というレコンビナーゼを用いて、54 kb の完全人工の (化学合成した) DNA 配列を、一度に導入した報告がある(44)。

この手法の欠点は、組換えのために導入された attB/P サイト (attL および attR サイトと呼ばれる (Figure 1.5)) は、操作完了後もゲノムに残存する。同じ株に対してもう一度レコンビナーゼ/インテグラーゼを使って DNA の挿入を行なう際に、残存した組換えが起こりえるため、ゲノム工学者は、別の手法、例えば 2 ステップリコンビニアリング法 (後述; cf. 1.3.7) を用いて、attL/R サイトを除去している。これが、レコンビナーゼ/インテグラーゼを用いた手法のスループットを下げている。現在では、配列特性の異なるレコンビナーゼが知られており、組み合わせるなどの工夫も可能になりつつある(45)。

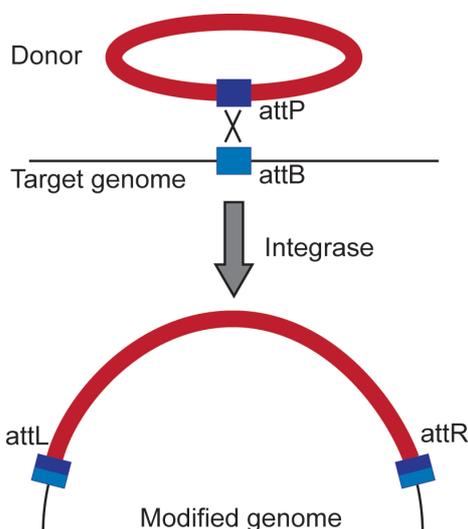


Figure 1.5. リコンビナーゼ/インテグラーゼを介したゲノム改変法; 文献(8)より引用

1.3.6. エンドヌクラーゼを用いるゲノム改変法

エンドヌクラーゼ (DNA 分子を途中で切断する酵素, Cf: エキソヌクラーゼ: DNA を末端から消化する) を用いたゲノム編集は、ヌクラーゼによってゲノム DNA を切断すると、切断部位で DNA の修復反応が引き起こされることを利用している。その修復過程で、標的部位を切断すると、切断部位の修復過程で、塩基の欠失や、挿入が起こる。外来配列を加えておけば、これとの置換も起こる。

1996 年に、Kim らが、Zinc Finger タンパク質を、FokI エンドヌクラーゼの DNA 切断ドメインと”繋ぐ”ことによって (Zinc Finger Nuclease: ZFN), DNA 結合特異性を Zinc

Finger タンパク質によって規定し、任意の配列を切断させることに成功した(46)。Zinc Finger タンパク質の DNA 結合特異性はよく調べられており(47-49) (50)、塩基レベルの解像度で切断部位を設計できる。ZFN による切断と、その後の切断部位における相同組換え反応は、塩基配列の挿入を 1-15%という高い効率で誘起する (51)。

“エンドヌクレアーゼタンパク質を、標的部位へと誘導する”というアイデアは、ZFN だけではなく、他の DNA 認識タンパク質でも検討されている。Transcriptional-Activator Like Effector Nuclease (TALEN)も、設計指針は ZFN と同様である(52)。Zinc Finger タンパク質の代わりに、転写活性化因子様タンパク質が、ヌクレアーゼに”繋がれて”いる。Clustered Regularly Inter-spaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)システム(53)は、エンドヌクレアーゼを標的部位へと誘導する担い手が、タンパク質ではなく RNA であるため、上述の二つの仕組みよりも、より設計自由度があると考えられ、広く普及しつつある。

ZFN, TALEN, CRISPR システムに共通する問題として、その毒性が挙げられる。その DNA 認識特異性は、高いとはいえ、非特異的な DNA 切断を引き起こし、細胞毒性を引き起こしたり、あるいは、設計とは無関係な変異を導入したり (OFF-target)、という問題がある。特異性をいかに高めるかが重要な問題であり、CRISPR システムでは、特異性を飛躍的に（現在、最大 5000 倍）高める工学が盛んに行なわれている。

1.3.7. Lambda-RED リコンビニアリング法

Lambda-RED システム (54,55) は 3 つのファージ由来タンパク質、Gam, Exo, および Beta を用いる。これら 3 つのタンパク質発現している大腸菌に、外来の二本鎖 DNA を導入すると、以下のメカニズムで組換えが起こると考えられている(56) (**Figure 1.6**)。まず、Gam は、大腸菌のもつ RecBCD や SbcCD というヌクレアーゼを阻害し、大腸菌に導入された線状の二本鎖 DNA が分解されることを防ぐ。次に、Exo (Exonuclease)が、外来の線状二本鎖 DNA のうち片側の鎖を、5'から 3'の方向に分解して、一本鎖の DNA を生成する。この一本鎖 DNA に、Beta が結合し、一本鎖 DNA を保護する。Beta が結合した一本鎖 DNA は、相同配列を介して複製中のゲノム DNA の標的部位に結合し、ラギング鎖として振る舞うことで、ゲノム DNA に取込まれる。その結果、標的部位が、任意の配列で置換されたゲノム配列が生じる。

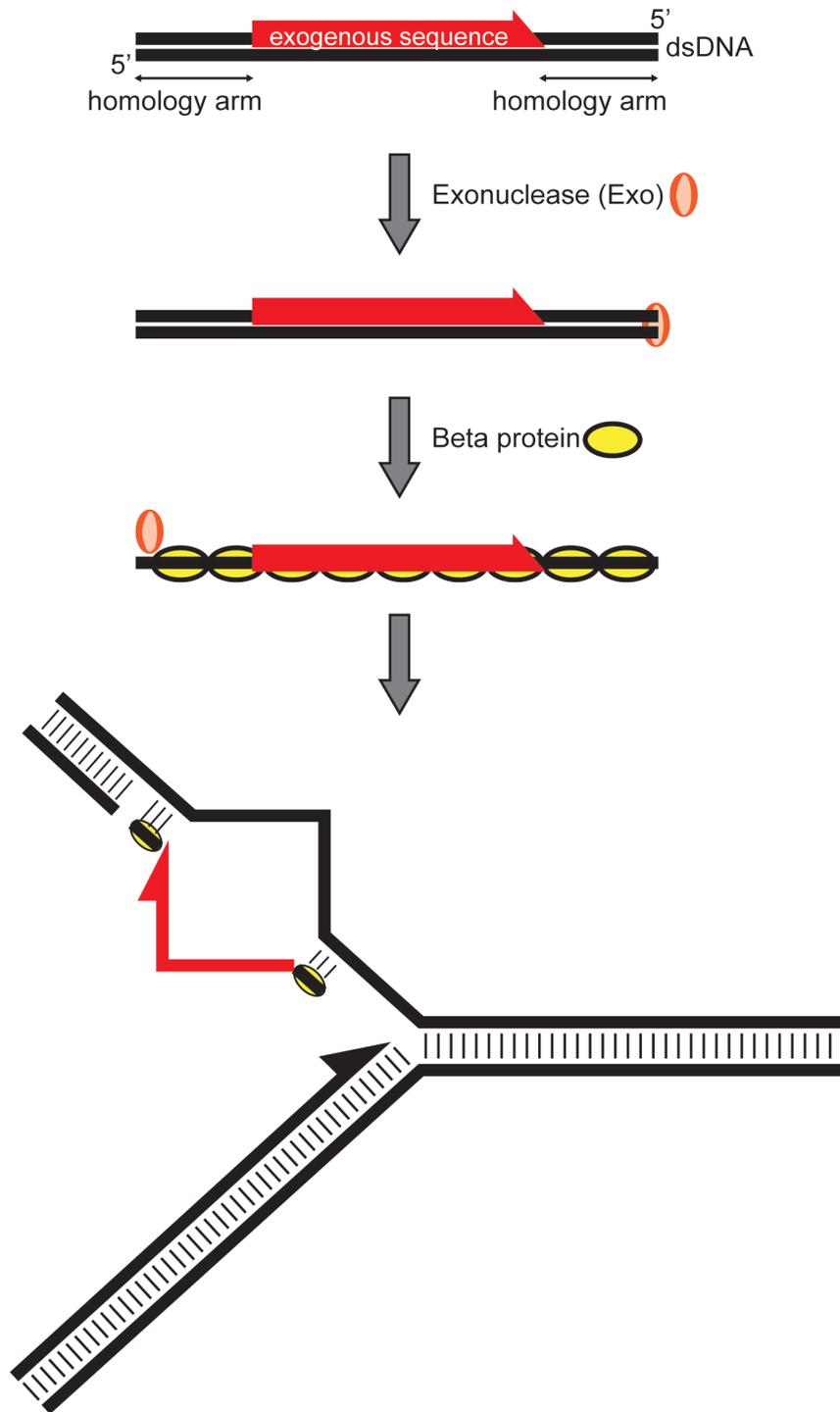


Figure 1.6. Lambda-RED を介した組換えの推定メカニズム; 文献(56)より引用。 .

1.3.8. Multiplex Automatable Genome Engineering (MAGE) ~多重ゲノム工学法

Lambda-RED を介したゲノム工学は、二本鎖 DNA だけでなく、一本鎖 DNA を用いてもよい。100 mer 程度の一本鎖 DNA であれば、化学合成だけで調製することができるため、主に、一塩基から数塩基にわたる変異を導入する際に便利である。2001 年に、Elis らは、一本鎖の DNA を介した組換えが、数塩基の変異導入であれば、全細胞の 6% が組換え体、という高い効率で起こる (cf. 二本鎖 DNA による kb スケールの配列置換の頻度は高くとも 10^{-4} 組換え体/全細胞(57)) ことを見いだした (58)。さらに、2003 年には、Constantino らが、大腸菌に内在するミスマッチ修復系 (遺伝子変異が生成した瞬間に形成されるヘテロ二重鎖~塩基対のミスマッチ:G-T など~を取り除く機構) を欠損させることで、一本鎖 DNA を介した組換えの効率が飛躍的に向上し、全細胞のうち 10-30% の細胞で組換えが起こることを発見した(59)。

Wang らは、この高い組換え効率に注目し、2009 年に Multiplex Automatable Genome Engineering (MAGE) という手法を作り上げた(Figure 1.7)(30)。この手法では、複数箇所を狙った一本鎖 DNA の混合物を、細胞に導入する。一回の導入操作では、細胞集団のうち、10-30% で、一カ所が組換わった細胞が生じる。二カ所、三カ所が組換わった細胞の発生頻度は、べき乗則に乗取るため、低い。とくに、10 カ所全てが組換わった細胞は、 10^{-14} 程度、つまり事実上生じない。しかし、もしこの組換え何度も (N 回) 繰り返すときには、10 カ所全ての部位において、1 回でも組換えが起こる確率 P は (1) 式によって定義される。

$$P[\%] = [1 - (1 - 0.03)^N]^{10} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

N = 90 に設定すれば、10 カ所全ての部位が組換わる確率は、およそ 50% にまで高められる。Wang らは、1 サイクル約 2 時間の組換え工程を、ロボティクスを用いて全自動化することで、数十回におよぶ組換え試行の繰返しを可能にし、短期間 (2.5 時間×90 回 = 9 日) で 10 カ所の組換えを同時に行うことに成功した。

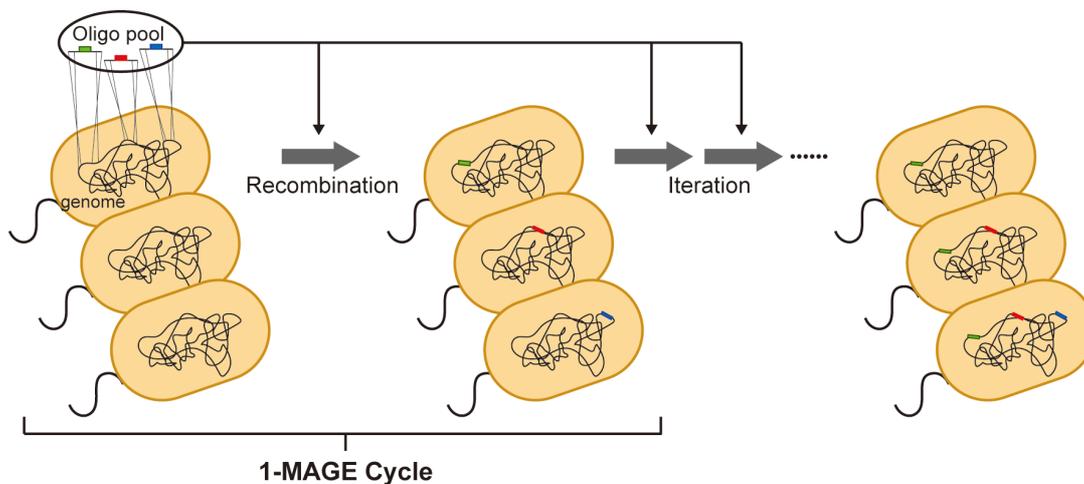


Figure 1.7. MAGE サイクル

重要な点は、MAGE は組換えの効率が高いときにのみ成立することである。もし組換えの起こる確率が 10 倍低いときには、90 サイクル MAGE を行っても、10 力所全てが組換えわった細胞は、0.5%程度にしかない。50%の頻度で組換え体を得るためには、およそ 900 サイクルの MAGE が必要になり、10 倍の時間がかかってしまう。大腸菌株の変異修復系の欠失や、オリゴ DNA の保護などを組み合わせ、組換え頻度を最大で~30%にまで高める工夫があって初めて、MAGE が実施できる。

多くの新規機能が異種細胞のゲノムから得られていることを考えれば、ゲノム改変法は、外来の塩基配列の挿入に対応可能であることが望ましい。上述のように、MAGE は数十 bp までのゲノム改変のコンビネーションを生み出すことに対して非常に強力なツールであるものの、遺伝子サイズ長い塩基配列の挿入には対応できない。それは、挿入される塩基配列が長くなるに連れ組換えが起こる頻度低下するためである(30)。10 bp を越えると組換えの頻度は 5%にまで低下する。先と同様に 10 力所に同時に 10 bp の塩基配列を挿入しようとしても、90 回の MAGE Cycle の後、10 力所すべてに塩基配列の挿入が起こった細胞は、0.5%程度しか発生しない。

遺伝子サイズの塩基配列の挿入に対応するには、MAGE Cycle あたりに組換えが起こる頻度を高めるしかない。近年、MAGE の手法は改良され、ゲノム上の部位は限定されるものの、20 bp の塩基配列の挿入の頻度を数十%にまで高め、プロモータサイズの塩基配列の同時挿入に対応した(31,32)。この手法を用いて、Wang らは、インディゴ色素の生合成経路における 12 個の酵素遺伝子のプロモータをそれぞれ T7 化した株をコンビナトリアルに作製することに成功している。しかしながら、さらに 10 倍以上長い、遺伝子サイズの塩基配列の挿入に対応するためには、組換えが起こる効率を現状（最大 0.1%程度）より 100 倍高めなければならない。GM Church のグループは、いくつかの細胞工学によって、5-10 倍の組換え効率の向上に成功しているが(60,61)、MAGE が、遺伝子サイズの塩基配列の挿入に対応するには、更なる組換え効率の向上が求められる。

1.3.9.2 ステップ-リコンビニアリング法

Lambda-RED による相同組換えを介したゲノム

工学は、効率がよく便利な手法であり、ゲノム配列の欠失や置換、あるいは外来配列の挿入などを、ゲノム上のいかなる部位でも、塩基レベルの解像度で実施できる（リコンビニアリングと呼ばれる）。その簡便さとスループットの高さから、広く普及している(57)。しかしながら、この手法をもってしても、遺伝子サイズ (> 1 kb) の塩基配列の相同組換えの低い効

率（高くとも 10^{-4} 組換え体/全細胞(57)）のために、2ステップの組換えと、引き続きポジティブ選択/ネガティブ選択から成る(54,55) (Figure 1.8);

1) まず、ゲノムの標的部位に”選択カセット (selection cassette)”と呼ばれる DNA 断片を、相同組換えを介して導入し、組換えが起こった細胞を、選択カセット内にコードされている抗生物質耐性によって選抜する。

2) 次に、選択カセットを導入したい外来配列と、やはり相同組換えを介して置き換える。今度は、選択カセット中にコードされている自殺遺伝子の機能を活性化することによって、選択カセットの残存している、すなわち組換わっていない細胞だけを死滅させる。

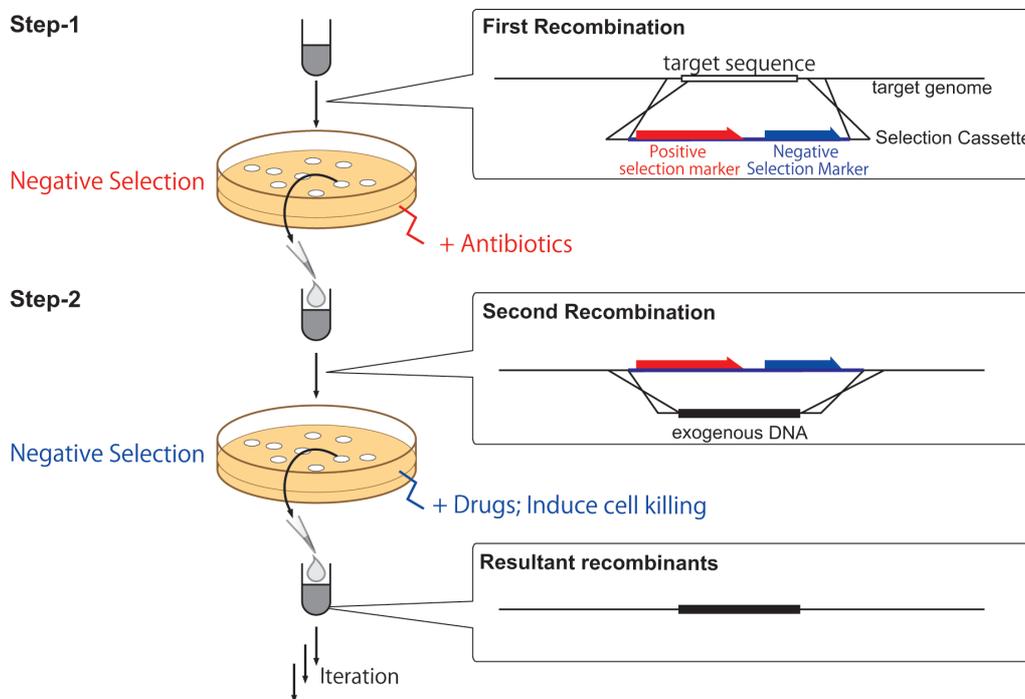


Figure 1.8. 2 ステップ-リコンビニアリング法の概要

Step-1; ゲノムの標的部位に”選択カセット”と呼ばれる DNA 断片を、相同組換えによって導入し、組換えが起こった細胞を、選択カセット内にコードされている抗生物質耐性によって選抜する。**Step-2;** 選択カセットを導入したい外来配列と、やはり相同組換えによって置き換える。今度は、選択カセット中にコードされている自殺遺伝子の機能を活性化することによって、選択カセットの残存している、すなわち組換わっていない細胞だけを死滅させる。

こうして、標的部位が目的配列で置換された細胞が得られる。この手法の問題の一つは、使い勝手のよいネガティブ選択法の不在であった。これまでに使われてきたネガティブマーカ―は全て、固体培地か(62,63), あるいは特別な遺伝型(64-69)を必要とするという制約がある。

2-ステップリコンビニアリングのもう一つの問題は、ネガティブ選択マーカ―に、ゲノム複製において変異が生じる、あるいはネガティブ選択マーカ―の毒性効果に対する耐性化変異がゲノム中に起こることである。ひとたびこのような”セレクションエスケープ”が生じれば、これらは速やかに細胞集団を占有し、続くステップでの組換え体の濃縮が不可能になる(69)。セレクションエスケープの発生頻度 (10^{-6} to 10^{-5} /cell) は、組換え体の生じる頻度 (10^{-5} to 10^{-4} /cell) に匹敵するため、実験者は、手作業によっていくつかのコロニーを単離し、その遺伝型を分析することによって、正しい組換え体を得る、という操作を、組換えのステップ毎に行なわなければならない。

原理的には、もし上述の問題が解決すれば、この方法は、同じスキームで何度も繰り返すことができるだろう。2ステップのリコンビニアリング法は、遺伝子サイズのゲノム工学に対応した手法の中でも広く普及している。そこで本研究では、この手法を改善、すなわち上述の二つの問題を解決し、全操作を自動化可能なかたちで繰り返すことのできるゲノム改変法を確立することを目指す。

1.4. 本論文の概要

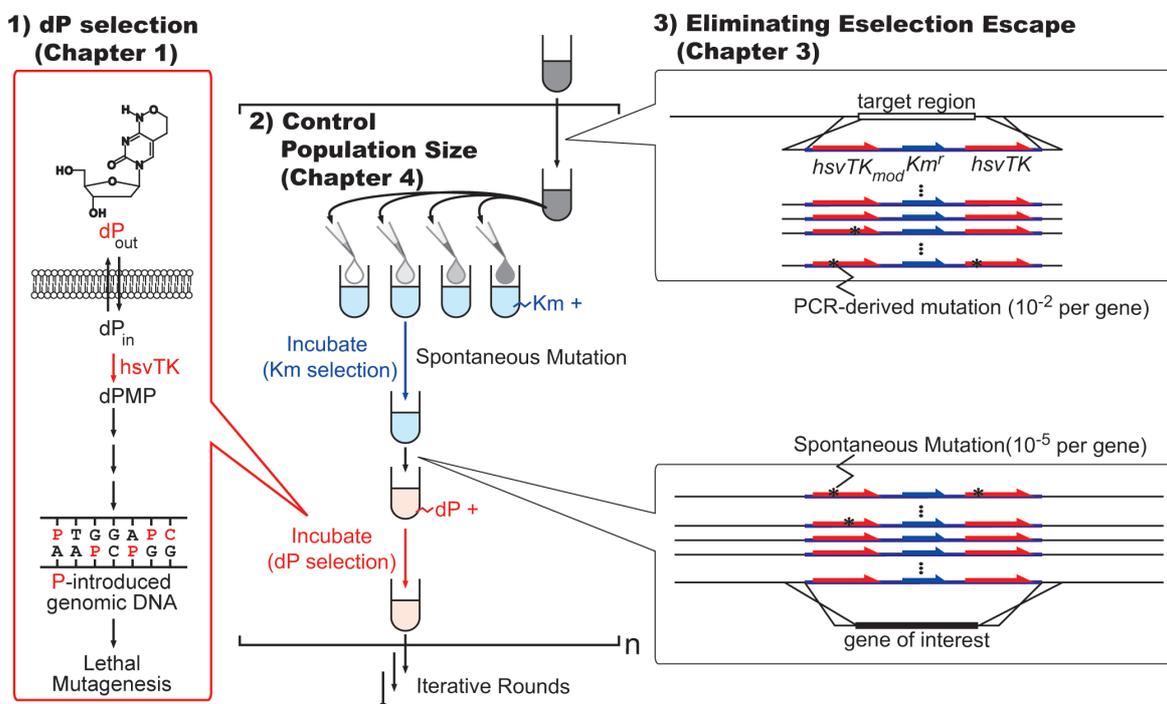


Figure 1.9. 本論文の構成

ゲノム工学の大規模化が進み、特に、多数の部位を、並列かつ何度も繰り返し書き換える手法に対する需要が著しく高まっている。ゲノム工学手法には、1.3項で述べたように様々な手法があるが、Lambda-RED リコンビニアリング法が最も広く普及している。本研究の目的は、この手法の、迅速さ/簡便さ/スループットを大きく改善し、組換え作業の全工程を液操作のみで実施できる様式 (Figure 1.9) に整えることである。全操作が液体操作のみで実施できれば、MAGE システム(30)のような方式で自動化可能であり、多段階のゲノム組換え操作の並列性が大いに高まると期待される。

Lambda-RED リコンビニアリング法を自動化可能なかたちにするためには、1.3.節でも述べたように、二つの大きな問題がある。一つは、ポジティブ/ネガティブ選択の過程が固体培地を使って行なわれていることである。ゲノム編集作業の自動化および高速化のためには、全工程を液操作のみで迅速に実施できるポジティブ/ネガティブ選択法が望ましい。ポジティブ選択マーカにはこの要件を満たすものが数多く知られている一方で、ネガティブ選択マーカは、1) セレクションを免れる細胞が頻発する、2) 細胞株による条件の最適化が必要である、3) 特別な遺伝子型を必要とする、あるいは 4) 選抜のために固体培地を必要とする、という欠点を抱えている。第二章で、リコンビニアリングの全ての操作を、液操作

のみで完了するために、液操作においても効率よく、そして迅速に組換え体を選抜可能なネガティブ選択法の開発を試みた。ここでは、ヒトヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ (hsvTK) が、dP という人工ヌクレオシドをリン酸化する活性を、ネガティブ選択マーカーとして利用することで、ゲノム組換え体の効率の良いネガティブ選択系を確立した。

二つ目は、セレクションエスケープの問題である。特にネガティブ選択法においては、ネガティブマーカー上、またはゲノム上に、ネガティブ選択マーカーの機能を無効化する遺伝子変異が起これ、そのために、非組換え体であるにも関わらず、ネガティブ選択を生き残る”セレクションエスケープ”が生じる。これまでは、このセレクションエスケープを除くために、一度細胞を寒天培地上に単離し、遺伝子型と表現型を調べるという作業が必要である。この作業が、組換え操作自動化のための大きなボトルネックの一つであった。第三章では、hsvTK/dP を用いたネガティブ選択系において、セレクションエスケープの発生の抑制を試みた。ここでは、ネガティブマーカー (hsvTK) を重複させることで、セレクションエスケープの発生頻度を大きく低減できることが明らかになった。

第四章では、第二-三章の技術を統合し、ゲノム編集作業の全工程を、液体操作のみで、かつ、繰り返し可能な様式で実施するワークフロー (**Figure 1.9**) を完成させた。特に、ゲノム編集における各操作間で、次の操作に持ち越す細胞数を適切に調節することが、全ての操作を液体操作のみで実施するために重要であることを見いだした。このワークフローを用いて、大腸菌ゲノムに、外来遺伝子を 4 連続で導入することに、世界で初めて成功した。さらに第五章では、この手法を、イソプレノイドを高生産する大腸菌株の作出に応用することを試みた。第六章では、以上の成果をまとめるとともに、その成果から明らかになった、ゲノム工学技術の新課題について述べる。

引用文献

1. Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T. *et al.* (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.*, **8**, 11-22.
2. Altenburg, E. (1928) The limit of radiation frequency effective in producing mutations. *The American Naturalist*, **62**, 540–545.
3. Auerbach, C.R., J. M.; Carr, J. G. . (1947) Chemical production of mutation. *Science*, **105**, 243–247.
4. Jackson, D.A., Symons, R.H. and Berg, P. (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 2904-2909.
5. Cohen, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W. and Helling, R.B. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 3240-3244.
6. Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F. *et al.* (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**, 1453-1462.
7. Beck, S. and Sterk, P. (1998) Genome-scale DNA sequencing: where are we? *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9**, 116-121.
8. Esvelt, K.M. and Wang, H.H. (2013) Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Mol. Syst. Biol.*, **9**, 641.
9. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 2006 0008.
10. Yamamoto, N., Nakahigashi, K., Nakamichi, T., Yoshino, M., Takai, Y., Touda, Y., Furubayashi, A., Kinjyo, S., Dose, H., Hasegawa, M. *et al.* (2009) Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants. *Mol. Syst. Biol.*, **5**, 335.
11. Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H. *et al.* (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis.

- Science*, **285**, 901-906.
12. Typas, A., Nichols, R.J., Siegele, D.A., Shales, M., Collins, S.R., Lim, B., Braberg, H., Yamamoto, N., Takeuchi, R., Wanner, B.L. *et al.* (2008) High-throughput, quantitative analyses of genetic interactions in *E. coli*. *Nature methods*, **5**, 781-787.
 13. Butland, G., Babu, M., Diaz-Mejia, J.J., Bohdana, F., Phanse, S., Gold, B., Yang, W., Li, J., Gagarinova, A.G., Pogoutse, O. *et al.* (2008) eSGA: *E. coli* synthetic genetic array analysis. *Nature methods*, **5**, 789-795.
 14. Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E.D., Sevier, C.S., Ding, H., Koh, J.L., Toufighi, K., Mostafavi, S. *et al.* (2010) The genetic landscape of a cell. *Science*, **327**, 425-431.
 15. Kaboli, S., Yamakawa, T., Sunada, K., Takagaki, T., Sasano, Y., Sugiyama, M., Kaneko, Y. and Harashima, S. (2014) Genome-wide mapping of unexplored essential regions in the *Saccharomyces cerevisiae* genome: evidence for hidden synthetic lethal combinations in a genetic interaction network. *Nucleic Acids Res.*
 16. Koonin, E.V. (2003) Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor. *Nature reviews. Microbiology*, **1**, 127-136.
 17. Feher, T., Papp, B., Pal, C. and Posfai, G. (2007) Systematic genome reductions: theoretical and experimental approaches. *Chem. Rev.*, **107**, 3498-3513.
 18. Goryshin, I.Y., Naumann, T.A., Apodaca, J. and Reznikoff, W.S. (2003) Chromosomal deletion formation system based on Tn5 double transposition: use for making minimal genomes and essential gene analysis. *Genome Res.*, **13**, 644-653.
 19. Yu, B.J., Sung, B.H., Koob, M.D., Lee, C.H., Lee, J.H., Lee, W.S., Kim, M.S. and Kim, S.C. (2002) Minimization of the *Escherichia coli* genome using a Tn5-targeted Cre/loxP excision system. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1018-1023.
 20. Posfai, G., Plunkett, G., 3rd, Feher, T., Frisch, D., Keil, G.M., Umenhoffer, K., Kolisnychenko, V., Stahl, B., Sharma, S.S., de Arruda, M. *et al.* (2006) Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science*, **312**, 1044-1046.
 21. Morimoto, T., Kadoya, R., Endo, K., Tohata, M., Sawada, K., Liu, S., Ozawa, T., Kodama, T., Kakeshita, H., Kageyama, Y. *et al.* (2008) Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*. *DNA Res.*, **15**, 73-81.
 22. Komatsu, M., Uchiyama, T., Omura, S., Cane, D.E. and Ikeda, H. (2010) Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 2646-2651.

23. Hashimoto, M., Ichimura, T., Mizoguchi, H., Tanaka, K., Fujimitsu, K., Keyamura, K., Ote, T., Yamakawa, T., Yamazaki, Y., Mori, H. *et al.* (2005) Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol. Microbiol.*, **55**, 137-149.
24. Westers, H., Dorenbos, R., van Dijl, J.M., Kabel, J., Flanagan, T., Devine, K.M., Jude, F., Seror, S.J., Beekman, A.C., Darmon, E. *et al.* (2003) Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*. *Mol. Biol. Evol.*, **20**, 2076-2090.
25. Suzuki, N., Nonaka, H., Tsuge, Y., Okayama, S., Inui, M. and Yukawa, H. (2005) Multiple large segment deletion method for *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 151-161.
26. Suzuki, N., Nonaka, H., Tsuge, Y., Inui, M. and Yukawa, H. (2005) New multiple-deletion method for the *Corynebacterium glutamicum* genome, using a mutant lox sequence. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8472-8480.
27. Pal, C., Papp, B. and Posfai, G. (2014) The dawn of evolutionary genome engineering. *Nature reviews. Genetics*, **15**, 504-512.
28. Itaya, M., Tsuge, K., Koizumi, M. and Fujita, K. (2005) Combining two genomes in one cell: stable cloning of the *Synechocystis* PCC6803 genome in the *Bacillus subtilis* 168 genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 15971-15976.
29. Jin, Y.S. and Stephanopoulos, G. (2007) Multi-dimensional gene target search for improving lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, **9**, 337-347.
30. Wang, H.H., Isaacs, F.J., Carr, P.A., Sun, Z.Z., Xu, G., Forest, C.R. and Church, G.M. (2009) Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, **460**, 894-898.
31. Carr, P.A., Wang, H.H., Sterling, B., Isaacs, F.J., Lajoie, M.J., Xu, G., Church, G.M. and Jacobson, J.M. (2012) Enhanced multiplex genome engineering through co-operative oligonucleotide co-selection. *Nucleic Acids Res.*, **40**, e132.
32. Wang, H.H., Kim, H., Cong, L., Jeong, J., Bang, D. and Church, G.M. (2012) Genome-scale promoter engineering by coselection MAGE. *Nature methods*, **9**, 591-593.
33. Isaacs, F.J., Carr, P.A., Wang, H.H., Lajoie, M.J., Sterling, B., Kraal, L., Tolonen, A.C., Gianoulis, T.A., Goodman, D.B., Reppas, N.B. *et al.* (2011) Precise manipulation of chromosomes in vivo enables genome-wide codon replacement. *Science*, **333**,

- 348-353.
34. Lajoie, M.J., Rovner, A.J., Goodman, D.B., Aerni, H.R., Haimovich, A.D., Kuznetsov, G., Mercer, J.A., Wang, H.H., Carr, P.A., Mosberg, J.A. *et al.* (2013) Genomically recoded organisms expand biological functions. *Science*, **342**, 357-360.
 35. Smith, H.O., Hutchison, C.A., 3rd, Pfannkoch, C. and Venter, J.C. (2003) Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 15440-15445.
 36. Chan, L.Y., Kosuri, S. and Endy, D. (2005) Refactoring bacteriophage T7. *Mol. Syst. Biol.*, **1**, 2005 0018.
 37. Gibson, D.G., Benders, G.A., Axelrod, K.C., Zaveri, J., Algire, M.A., Moodie, M., Montague, M.G., Venter, J.C., Smith, H.O. and Hutchison, C.A., 3rd. (2008) One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 20404-20409.
 38. Gibson, D.G., Glass, J.I., Lartigue, C., Noskov, V.N., Chuang, R.Y., Algire, M.A., Benders, G.A., Montague, M.G., Ma, L., Moodie, M.M. *et al.* (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, **329**, 52-56.
 39. Annaluru, N., Muller, H., Mitchell, L.A., Ramalingam, S., Stracquadanio, G., Richardson, S.M., Dymond, J.S., Kuang, Z., Scheifele, L.Z., Cooper, E.M. *et al.* (2014) Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science*, **344**, 55-58.
 40. Jewett, M.C. and Forster, A.C. (2010) Update on designing and building minimal cells. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **21**, 697-703.
 41. Mizuuchi, M. and Mizuuchi, K. (1980) Integrative recombination of bacteriophage lambda: extent of the DNA sequence involved in attachment site function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 3220-3224.
 42. Kilby, N.J., Snaith, M.R. and Murray, J.A. (1993) Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.*, **9**, 413-421.
 43. Santos, C.N., Regitsky, D.D. and Yoshikuni, Y. (2013) Implementation of stable and complex biological systems through recombinase-assisted genome engineering. *Nature communications*, **4**, 2503.
 44. Krishnakumar, R., Grose, C., Haft, D.H., Zaveri, J., Alperovich, N., Gibson, D.G., Merryman, C. and Glass, J.I. (2014) Simultaneous non-contiguous deletions using large synthetic DNA and site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.*, **42**, e111.
 45. Suzuki, E. and Nakayama, M. (2011) VCre/VloxP and SCre/SloxP: new site-specific

- recombination systems for genome engineering. *Nucleic Acids Res.*, **39**, e49.
46. Kim, Y.G., Cha, J. and Chandrasegaran, S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 1156-1160.
 47. Desjarlais, J.R. and Berg, J.M. (1994) Length-encoded multiplex binding site determination: application to zinc finger proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 11099-11103.
 48. Desjarlais, J.R. and Berg, J.M. (1993) Use of a zinc-finger consensus sequence framework and specificity rules to design specific DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 2256-2260.
 49. Desjarlais, J.R. and Berg, J.M. (1992) Toward rules relating zinc finger protein sequences and DNA binding site preferences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 7345-7349.
 50. Desjarlais, J.R. and Berg, J.M. (1992) Redesigning the DNA-binding specificity of a zinc finger protein: a data base-guided approach. *Proteins*, **12**, 101-104.
 51. Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y.L., Beausejour, C.M., Rock, J.M., Augustus, S., Jamieson, A.C., Porteus, M.H., Gregory, P.D. and Holmes, M.C. (2005) Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, **435**, 646-651.
 52. Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. and Bonas, U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, **326**, 1509-1512.
 53. Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. and Marraffini, L.A. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.*, **31**, 233-239.
 54. Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 6640-6645.
 55. Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P. and Stewart, A.F. (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.*, **20**, 123-128.
 56. Mosberg, J.A., Lajoie, M.J. and Church, G.M. (2010) Lambda red recombineering in *Escherichia coli* occurs through a fully single-stranded intermediate. *Genetics*, **186**, 791-799.

57. Sawitzke, J.A., Thomason, L.C., Costantino, N., Bubunenko, M., Datta, S. and Court, D.L. (2007) Recombineering: *in vivo* genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. *Methods Enzymol.*, **421**, 171-199.
58. Ellis, H.M., Yu, D., DiTizio, T. and Court, D.L. (2001) High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 6742-6746.
59. Costantino, N. and Court, D.L. (2003) Enhanced levels of lambda Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 15748-15753.
60. Mosberg, J.A., Gregg, C.J., Lajoie, M.J., Wang, H.H. and Church, G.M. (2012) Improving lambda red genome engineering in *Escherichia coli* via rational removal of endogenous nucleases. *PLoS One*, **7**, e44638.
61. Lajoie, M.J., Gregg, C.J., Mosberg, J.A., Washington, G.C. and Church, G.M. (2012) Manipulating replisome dynamics to enhance lambda Red-mediated multiplex genome engineering. *Nucleic Acids Res.*, **40**, e170.
62. Blomfield, I.C., Vaughn, V., Rest, R.F. and Eisenstein, B.I. (1991) Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol. Microbiol.*, **5**, 1447-1457.
63. Li, X.T., Thomason, L.C., Sawitzke, J.A., Costantino, N. and Court, D.L. (2013) Positive and negative selection using the *tetA-sacB* cassette: recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*
64. Stavropoulos, T.A. and Strathdee, C.A. (2001) Synergy between *tetA* and *rpsL* provides high-stringency positive and negative selection in bacterial artificial chromosome vectors. *Genomics*, **72**, 99-104.
65. Bird, A.W., Eler, A., Fu, J., Heriche, J.K., Maresca, M., Zhang, Y., Hyman, A.A. and Stewart, A.F. (2012) High-efficiency counterselection recombineering for site-directed mutagenesis in bacterial artificial chromosomes. *Nature methods*, **9**, 103-109.
66. Warming, S., Costantino, N., Court, D.L., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (2005) Simple and highly efficient BAC recombineering using *galK* selection. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e36.
67. Wong, Q.N., Ng, V.C., Lin, M.C., Kung, H.F., Chan, D. and Huang, J.D. (2005) Efficient and seamless DNA recombineering using a thymidylate synthase A selection system in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e59.

68. DeVito, J.A. (2008) Recombineering with *toIC* as a selectable/counter-selectable marker: remodeling the rRNA operons of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **36**, e4.
69. Gregg, C.J., Lajoie, M.J., Napolitano, M.G., Mosberg, J.A., Goodman, D.B., Aach, J., Isaacs, F.J. and Church, G.M. (2014) Rational optimization of *toIC* as a powerful dual selectable marker for genome engineering. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 4779-4790.

第二章

ヌクレオシドキナーゼを用いたネガティブ選択法

概要

ネガティブ選択マーカは、それが発現するときのみ細胞を殺す自殺遺伝子である。プラスミドや遺伝子を細胞から除くときに、ネガティブ選択マーカも同時に失うようにすることで、プラスミド/遺伝子が失われた細胞を濃縮する、といった目的で広く使われる。いままでに多くの分子機構がネガティブ選択マーカとして試されてきたが、1) それを持つ宿主を殺すという性質から、セレクションを免れる細胞が頻発する、2) 細胞株による条件の最適化が必要である、3) 特別な遺伝子型を必要とする、あるいは 4) 選抜のために固体培地を必要とする、という欠点を抱えている。本章では、ヒトヘルペスウイルス由来ヌクレオシドキナーゼと、人工ヌクレオシド dP を用いたネガティブ選択法が、これらの制約のない、優れたネガティブ選択マーカであることを見いだした。特に、選択操作に要する時間が短く、2時間の液体培養操作だけで、ネガティブ選択を完了できることがわかった。

2.1. 緒言

抗生物質耐性遺伝子などのポジティブ選択マーカーは、遺伝学/遺伝子工学の分野において、例えば、plasmidが導入された細胞の選択や、あるいはそのプラスミドの保持、を可能にするという点で、重要なツールである。典型的なポジティブ選択マーカーとして、カナマイシン耐性遺伝子は、1) 致死効率が高く耐性化が起こりにくい(1,2)、および2) 静菌（細胞の増殖を”可逆的に”止める）ではなく殺菌（細胞増殖を”不可逆的に”止める）タイプの作用機構のため液相でも選択可能である(3)、といった点で、重宝されてきた。一方、ネガティブ選択マーカーは、たとえばプラスミドの脱落した細胞の選抜や(4,5) やマーカーレスなゲノム工学(6,7) など、プラスミドや遺伝子を”除去”する際に使われる、重要なツールである(8)。これまでに、いくつかのネガティブ選択マーカーが報告されてきた [*rpsL* (9,10), *galK* (11), *thyA* (12), *tetA* (13), *sacB* (14-17), *upp* (18)および *tolC* (19,20)]。

ゲノム工学において、選抜操作を、液体のみで完了するには、選択の作用機序が殺菌的 (bactericidal) であり、かつその殺菌効率が高いことが望ましい。静菌的 (bacteriostatic) な作用機序の場合、非組換え体の増殖を止める効果しかないため、次の組換えステップに移行する、すなわち薬剤が取り除かれると、非組換え体は再び増殖してしまう。その結果、組換え体に対して 100 万倍多く存在する非組換え体を完全に除去することは困難である。ポジティブ選択マーカーには、カナマイシン耐性遺伝子が、その要件を満たす。一方で、ネガティブ選択マーカーの多くは、静菌的である。殺菌的なネガティブ選択マーカー (*sacB*, *tolC*) も幾つか知られているが、1) 特別な遺伝子型 (mutant allele) を必要とする、あるいは2) 選抜のために固体培地を必要とする、という欠点を抱えている (Table 2.1)。

Table 2.1. 既存のネガティブ選択マーカ―とその特徴

Gene	Drug	Need for Mutant Allele	Need for Solid Media	Bacteriostatic	Reference
<i>rpsL</i>	Streptomycin	Yes	Yes	Yes	(9,10)
<i>sacB</i>	Sucrose	No	Yes	No	(14-16)
<i>tetA</i>	Fusalic Acid	No	Yes	Yes	(13)
<i>tolC</i>	Colicin E1	Yes	No	No	(19-21)
<i>galK</i>	2-deoxy-galactose	Yes	Yes	Yes	(11)
<i>thyA</i>	dihydrofolate	Yes	Yes	Yes	(12)
<i>upp</i>	5-Fluoro Uracil	Yes	Yes	Yes	(18)
<i>hsvTK</i>	dP	No	No	No	This Study

ヒトヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ (hsvTK) は、遺伝子治療などによく用いられるネガティブ選択マーカーである(22)。ここでは、hsvTKが、ガンサイクロビル (Ganciclovir; GCV) やアサイクロビル (Acyclovir; ACV) などの合成ヌクレオシド (Figure 2.1) などに対して強い一リン酸化活性を示すことを利用している。根岸らは、6-(β-D-2-deoxyribofuranosyl)-3,4-dihydro-8H-pyrimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-one (dP) という合成ヌクレオシドが、10 μg/mL (~40 μM)の濃度で存在するとき、大腸菌の遺伝子変異頻度が高まり、細胞集団の80%が増殖能を失うことを報告している(23)。dPは、シチジンに良く似た塩基であり、互変異性体 (イミノ型とアミノ型) が、それぞれAまたはGと擬似ワトソン・クリック塩基対を形成する (Figure 2.2)。そのため、DNA複製において、鋳型鎖にPが含まれれば、DNAポリメラーゼはAまたはGをランダムに重合し、その結果、遺伝子変異が誘起される。田代らは、hsvTKが、dPも効率よく一リン酸化し、その結果、細胞集団の全てが増殖能を失い、その殺菌効率10⁷分の1に達することを見いだした(24) (Figure 2.3)。dPが引き起こした致死性の変異を修復する機構はなく、細胞死は不可逆なため、殺菌的に細胞死を引き起こすことから、ゲノム工学におけるネガティブ選択マーカーとして有望である。

そこで本章では、dPキナーゼ活性を、ゲノム工学におけるネガティブ選択マーカーとして応用し、迅速に、液操作のみで、そして効率よく組換え体を選抜することを試みた。まず、ゲノムにコードされたhsvTKが、細胞に十分なdP感受性を与えるか否かを検証した。次に、hsvTK/dPを使ったネガティブ選択法の、液操作における組換え体の選択効率について評価した。最後に、dPは人工の変異原性にヌクレオシドであるため、hsvTKを発現しない組換え体においても、遺伝子変異頻度を高め得る。このため、ゲノム上の別の部位にも、変異が導入される可能性がある。そこで、その可能性についても検証した。

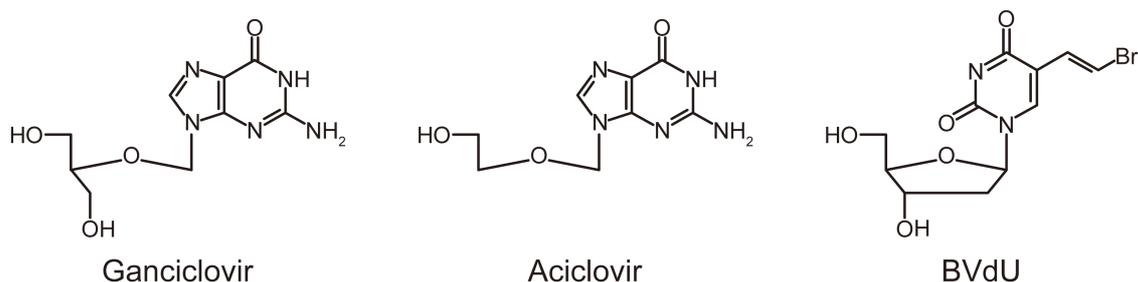


Figure 2.1. 遺伝子治療に使われている合成ヌクレオシド

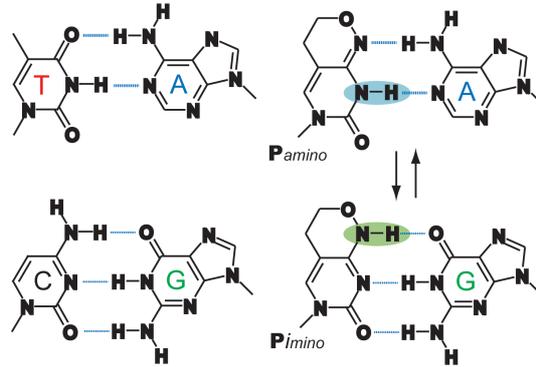


Figure 2.2. P 塩基が形成する擬似ワトソン・クリック塩基対

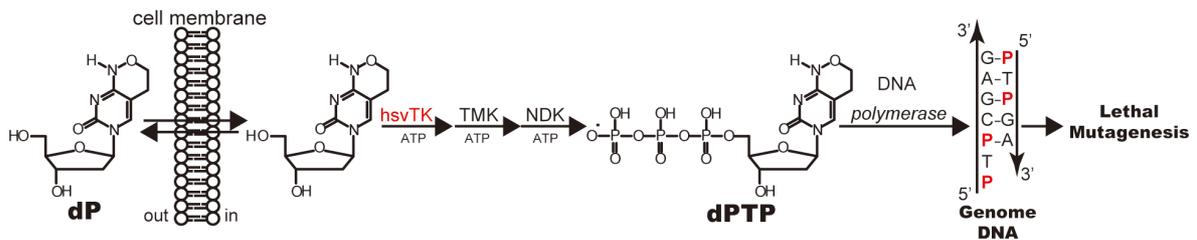


Figure 2.3. dP キナーゼを用いたネガティブ選択 (dP セレクション) 機構

(a) 作用機構, dP は細胞膜を通過し, hsvTK によって一リン酸化される。さらに内在性の二および三リン酸化酵素 (TMK および NDK) によって二および三リン酸化され, 最後は DNA ポリメラーゼによってゲノム DNA 取込まれる。ゲノムに取込まれた P 塩基は, A または P と塩基対を形成し, 細胞内の遺伝子変異頻度を高める。細胞は遺伝情報を破壊され, "lethal mutagenesis"によって速やかに死滅する

2.2. 結果

2.2.1. dP キナーゼ遺伝子のスクリーニング

リコンビニアリングの最初のステップ、すなわち選択カセットをゲノムに導入する段階において、選択カセットが長いほどゲノムへの導入効率が低下する(25)。そこで、選択カセットを構成する遺伝子は、より短い遺伝子が望まれる。そこで、hsvTK と並んで、非天然ヌクレオシドに対する高いキナーゼ活性を示すことが知られ、かつ、hsvTK (1129) のおよそ 2/3 の ORF 長 (690 bp) である、*Drosophila melanogaster* 由来ヌクレオシドキナーゼが、hsvTK に替わるネガティブ選択マーカーとして機能し得るかどうかを検討するために、dP 存在下におけるネガティブ選択マーカー機能を調べた。また、大腸菌および T4 ファージ由来のヌクレオシドキナーゼ (それぞれ TDK, T4-TK) についても、同様にネガティブ選択マーカーとしての機能も併せて調べた。

hsvTK, その不活性体 (hsvTK_{E83K}(26)), DmDNK, T4TK, および EcTK を発現する大腸菌について、dP による細胞死誘導の効率を評価した (**Figure 2.4**)。hsvTK, DmDNK, T4TK, および EcTK を発現する大腸菌の場合、dP の濃度増加に伴い生菌数が減少し、dP キナーゼ活性を示すことがわかった。特に hsvTK は、他の二つのヌクレオシドキナーゼよりも 10 倍低い dP 濃度においても、生菌数の大きな低下をもたらした。このことから、hsvTK が最も高い dP キナーゼ活性を有していることが示唆される。他方、DmDNK は知られているヌクレオシドキナーゼの中で最も"速い", すなわち kcat の大きな酵素であり、チミジンを基質としたときの kcat は hsvTK の 30 倍である(27,28)。このことも合わせて考えると、DmDNK の場合に、dP に対する感受性が hsvTK よりも低い原因は、hsvTK に比べて dP に対する親和性 (K_M) が低いと推測される。

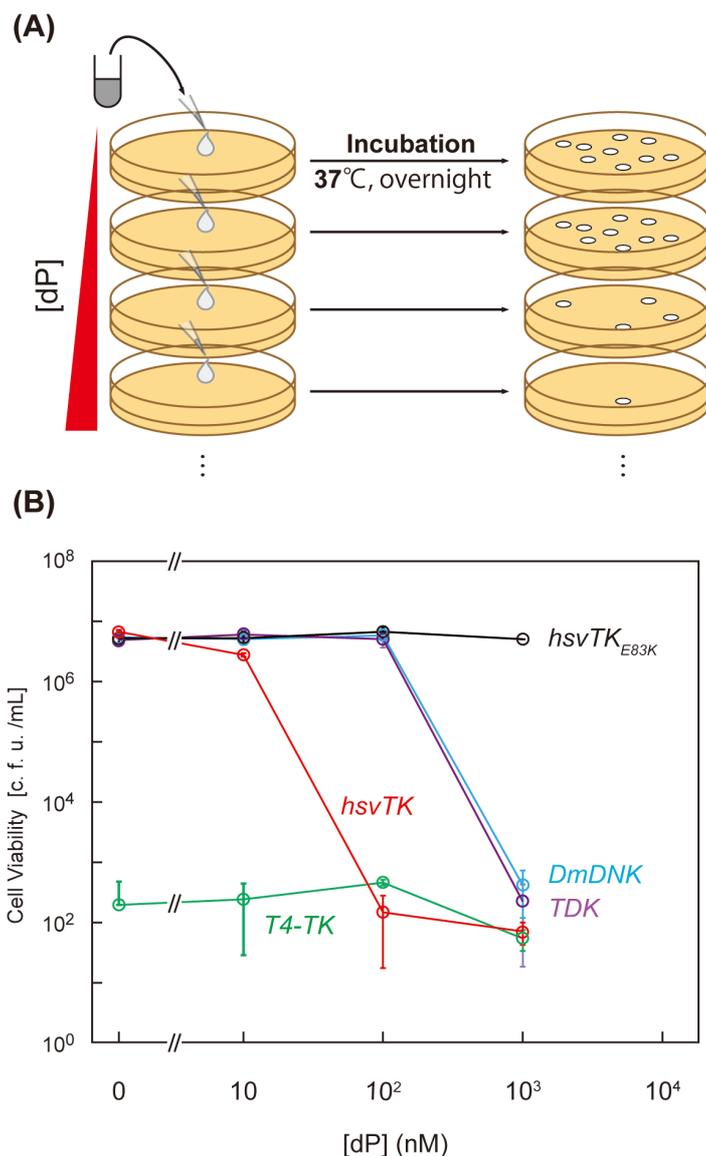


Figure 2.4 さまざまなヌクレオシドキナーゼを発現する細胞の dP 感受性

(A) 実験スキーム, (B) さまざまなヌクレオシドキナーゼをコードするプラスミドで形質転換された大腸菌株 JW1226 を, dP (0-10³ nM) を含むプレートに植菌し, コロニー形成能を評価した。

2.2.2. *hsvTK* のゲノムへの導入

dP セレクションは, 元々はプラスミド上にコードされた遺伝子スイッチ (遺伝子発現の ON/OFF を調節する装置) について, これが"OFF"状態にある細胞を選抜するために開発され, ゲノム上に *hsvTK* 遺伝子をコードする場合の機能は検証されたことがなかった。特に, プラスミドにコードされる場合は, *hsvTK* が細胞内に多コピー (10-100 コピー) 存在するのに対し, ゲノムの場合は 1 コピーのみであるため, プラスミドの場合よりも *hsvTK* の発現量が低

いことが考えられる。そこで、まずはゲノム上に *hsvTK* 遺伝子を導入し、dP キナーゼ活性、すなわち細胞死を誘導する活性を評価した。

まず、ゲノム上での *hsvTK* の機能を調べるために、*hsvTK* 遺伝子と、ポジティブマーカーであるクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) を含む DNA カセットに、*lacZ* locus と相同な 171 および 41 bp の配列を付した、"HC cassette" を作製した。この HC cassette を MG1655 株にエレクトロポレーションし、クロラムフェニコール (Cm) 培地上で、HC カセットでゲノム上の *lacZ* 遺伝子が置換された細胞を選択した (Cm セレクション, Figure 2.5(A))。得られた形質転換体 (MG1655-*tdkΔlacZ::hsvTK-cat*) から、無作為に 92 個のクローンを選び出し、その dP キナーゼ活性を調べたところ、89 クローンが dP 存在下でコロニー形成能を失った。残りの dP 耐性を示す 3 クローンと、dP 感受性を示す 3 クローンについて、*lacZ* 座位の遺伝型を調べたところ、dP 感受性の有無に拘らず、6 つ全てのクローンにおいて、*lacZ* 遺伝子が *hsvTK-cat* カセットに置換されていた (Figure 2.5(B))。

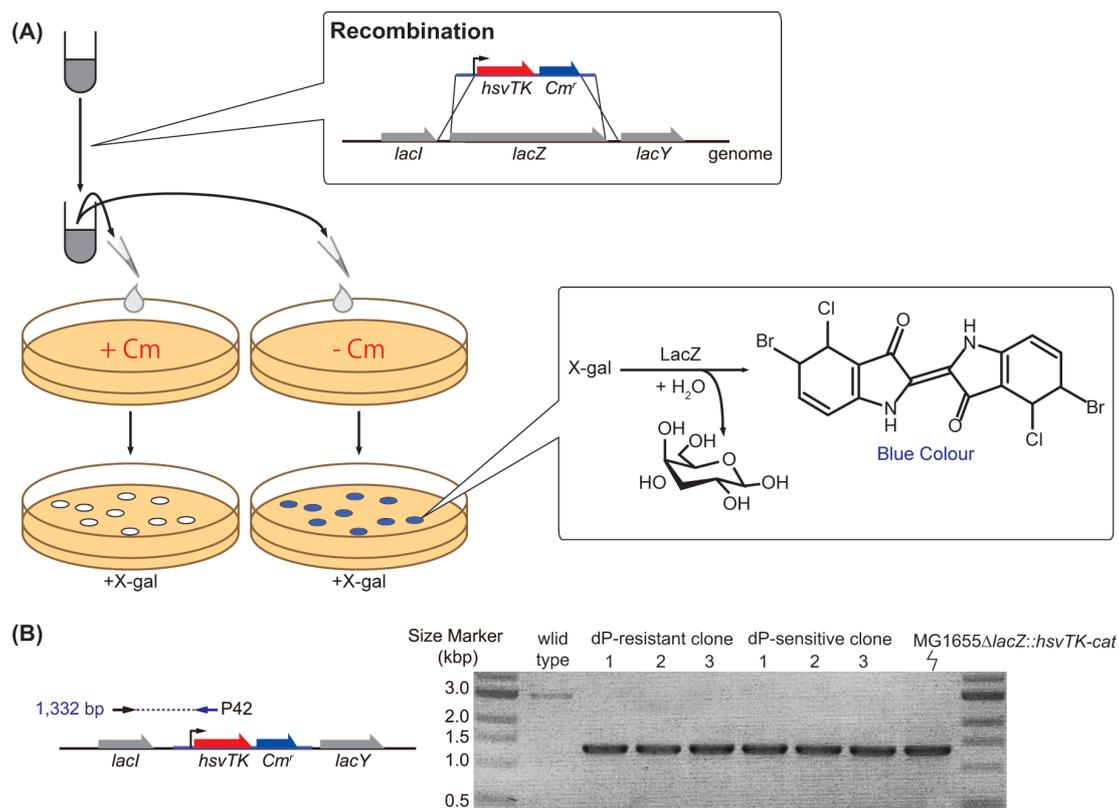


Figure 2.5. *lacZ* 座位への *hsvTK-cat* カセットの導入

(A) 組換えおよび Cm セレクションのスキーム, (B) Cm セレクションで得られたクローンの遺伝型解析, *lacZ* 座位の構成, プライマー, および予想される PCR 産物の長さ (bp) も示す。プライマー配列は Appendix 1 に示す。

2.2.3 シングルコピー-hsvTKのdPキナーゼ活性

上述のようにして得た dP 感受性を示したクローンから一つを選び、dP 濃度と、細胞の生存率の関係を調べたところ (Figure 2.6), dP 濃度が増加すると急激に生存率が低下し、1,000 nM では 10^{-5} に達した (Figure 2.6(B))。このことは、ゲノムにコードされた hsvTK においても、細胞内活性は、細胞死を引き起こすに十分であり、ゲノム工学に使えることを示している。また、他のネガティブ選択マーカー、例えば *sacB*(14-16)や *tetA*(13), および *rpsL*(9,10) などにおける、生存率の低下は 10^{-5} から 10^{-3} 程度である(9)ことと比べて、hsvTK/dP によるネガティブ選択系は、遜色ない性能を示した。

hsvTK がプラスミドにコードされる場合も同様に、dP 濃度の増加とともに生存率が低下し、dP 1,000 nM ではおよそ 10^{-6} に達した (Figure 2.6(C))。これと比べると、hsvTK がゲノムにコードされる場合は、10 倍ほど dP 添加時の生存率が高い。一方で、急激な生存率低下が起こる dP 濃度は変わらなかった。これらの結果は、hsvTK の発現量というより、その遺伝子のコピー数に依存した差であると考えられる (詳細は第三章で述べる)。

2.2.4. hsvTK/dP を用いたゲノム組換え体のネガティブ選択

次に、hsvTK のゲノム工学におけるネガティブセレクトアとしての性能を調べるために、ゲノム上に導入された HC カセットを、*lacZ* 遺伝子で置換することを試みた (Figure 2.7(A))。PCR 作製した *lacZ* 遺伝子をエレクトロポレーションした後、培養液を二つに分け、dP を 0 または 1,000 nM の濃度で含む LB プレートにそれぞれ植菌し、コロニーを形成させた (Figure 2.7(A))。

LB プレートには、LacZ + 株 (培地中に含まれる X-gal を LacZ が青色色素へと変換し、青色コロニーを形成する) が、およそ 10^{-4} (ca. 10^5 recombinants/ 10^9 total cells) の頻度で現れた。他方、dP を含む LB プレート上には、88%が LacZ + 株であり、dP 不在時に比べおよそ 2000 倍濃縮された。このことから、dP/hsvTK の組み合わせが、ゲノム工学におけるネガティブマーカーとして使用できることが示された。

lacZ 遺伝子をエレクトロポレーションした直後には、組換えが起こった細胞においても、hsvTK が発現している。エレクトロポレーション後の培養では、hsvTK の追加発現がないため、hsvTK の細胞内濃度は低下する。細胞に dP を与えるときに、hsvTK の細胞内活性が残存していると、組換え体においても、dP のリン酸化が起こり、細胞死を引き起こす可能性がある (False-Negative)。今回のプロトコルでは、dP の有無に拘らず、培地体積あたりの LacZ+株の割合は変わらず、LacZ - 株だけが 7×10^{-5} にまで低下していた (Figure 2.7(B))。このことは、dP は、hsvTK を発現する、すなわち HC カセットがゲノムに残存した非組換え体だけを選択的に殺菌できることを示している。

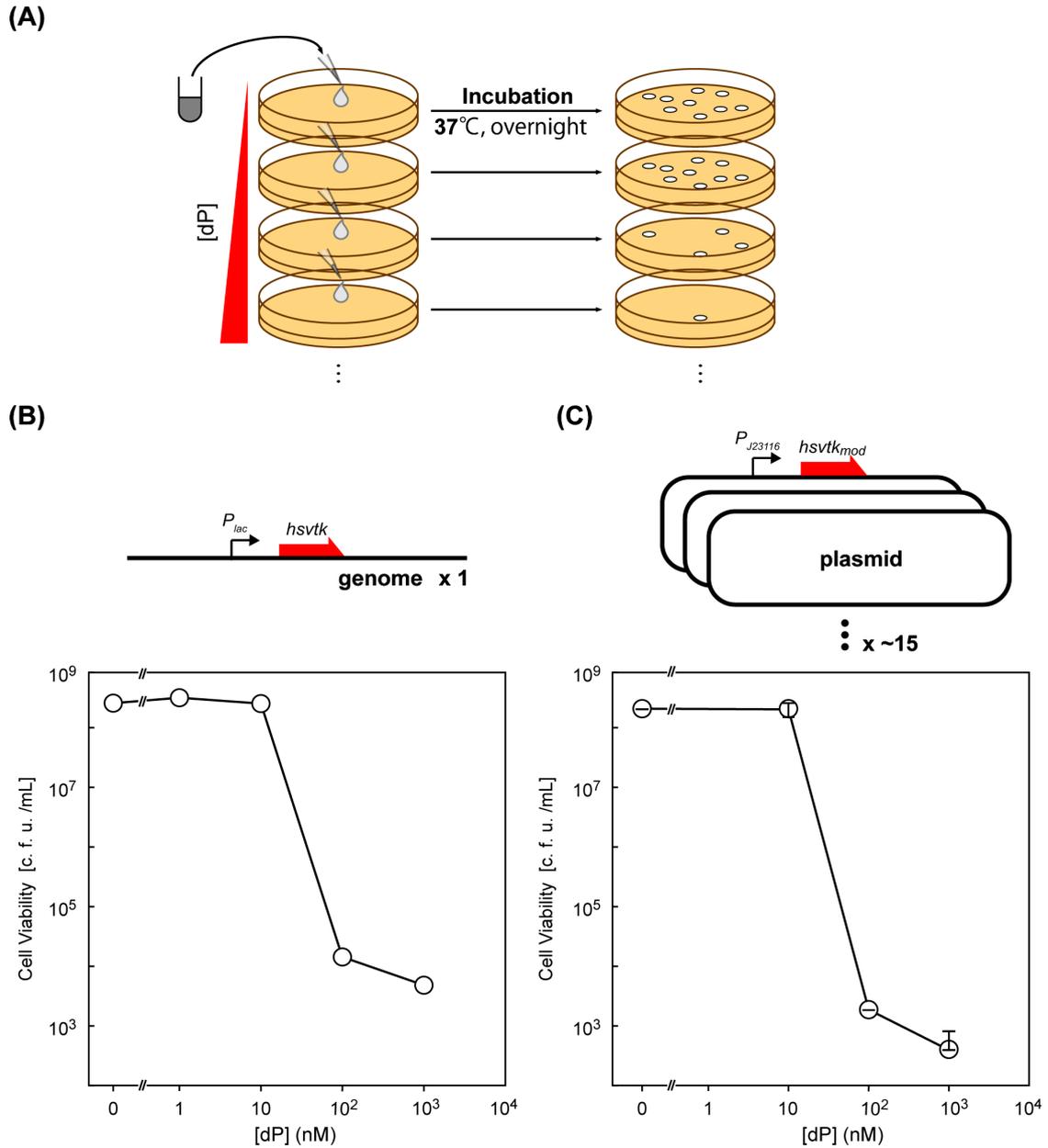


Figure 2.6. hsvTK/dP が誘導する細胞死の dP 濃度依存性

(A) 実験スキーム, (B) ゲノム (MG1655 Δ lacZ::hsvTK-cat) および (C) プラスミド (JW1226/pTrc-hsvTK) にコードされる hsvTK を持つ細胞に, dP (0-10⁴ nM) を加え培養し, 各時点において, 培養液をプレートに植菌し, コロニー数から生菌数を計測した。

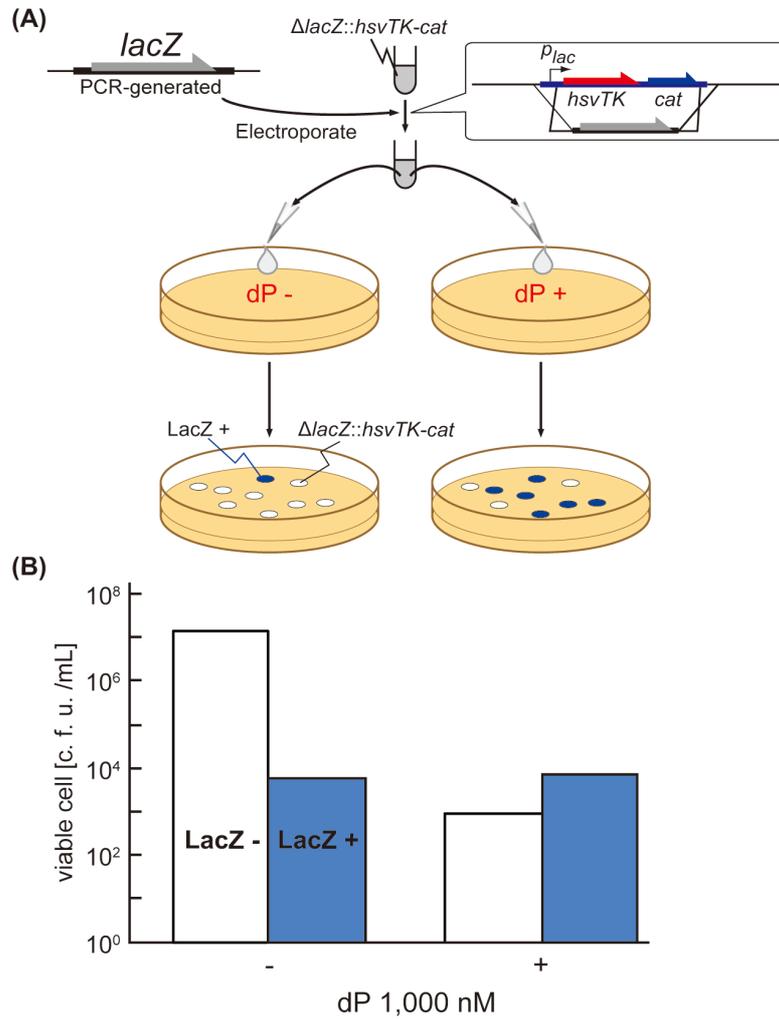


Figure 2.7. hsvTK/dP を用いた固体培地上でのゲノム組換え体のネガティブ選択

(A) 組換えのスキーム; *lacZ* 座位に挿入されていた *hsvTK-cat* カセットを, *lacZ* 遺伝子で置換し, 形質転換体を, dP 0, および 1,000 nM を含む LB 培地に植菌した。(B) dP を含む/含まない培地に得られた組換え体/非組換え体の生菌数。

2.2.5. dP セレクションに要する時間

dP 選択の特徴は、1) 液相でも選抜可能であること、および 2) 選抜時間が短いことである：プラスミドに *hsvTK* がコードされる場合、選抜時間は 5 分にまで短縮可能である(24)。この性質が、ゲノム工学においても有効であることを示すために、選抜効率と選抜時間の関係を調べた (Figure 2.8)。プラスミドにコードされる *hsvTK* 遺伝子の場合、dP 添加後すぐに細胞の生菌数が減少し、5 分で 10^5 分の 1 に達した (Figure 2.8(A))。一方、*hsvTK* がゲノムにコードされている場合は、dP 添加後に生菌数がゆるやかに減少し、60 分でおよそ 10^5 分の 1 に達した (Figure 2.8(B))。*hsvTK* がゲノムにコードされている場合でも、プラスミドにコードされる場合より遅いものの、60 分以内で選択を完了できた。一晩培養を必要とする多くの他のネガティブ選択法 (Table 2.1) と比べ、迅速なネガティブ選択系であった。

次に、ゲノム上に導入された HC カセットを、*lacZ* 遺伝子で置換し、組換え体を液体培地で選抜することを試みた (Figure 2.9(a))。2.2.1 項と同様に、PCR 作製した *lacZ* 遺伝子をエレクトロポレーションした後、培養液を二つにわけ、LB 培地と、dP を 1,000 nM の濃度で含む LB 培地とに、それぞれ植菌し、培養した。さまざまな培養時間において、培養液の一部をとり、LB プレートに植菌し、形成されたコロニーの色 (培地中に含まれる X-gal を *LacZ* が青色色素へと変換し、青色コロニーを形成する) から組換え体の割合を求めた (Figure 2.9(a))。dP 選択開始直後には、*LacZ* + 株 (培地中に含まれる X-gal を *LacZ* が青色色素へと変換し、青色コロニーを形成する) が、およそ 10^{-4} (ca. 10^5 組換え体/ 10^9 全細胞) の頻度で現れた。dP を含まない培地では、この割合はどの処理時間においても変わらなかった。他方、dP を含む場合では、組換え体の割合が時間とともに急激に増加し、~90%に達した (Figure 2.9(b))。dP キナーゼは、細胞の増殖を阻害するのではなく、殺菌するため、その作用に一晩培養は不要であった。実際に、選抜効率は dP 添加後およそ 2 時間でプラトーに到達した。

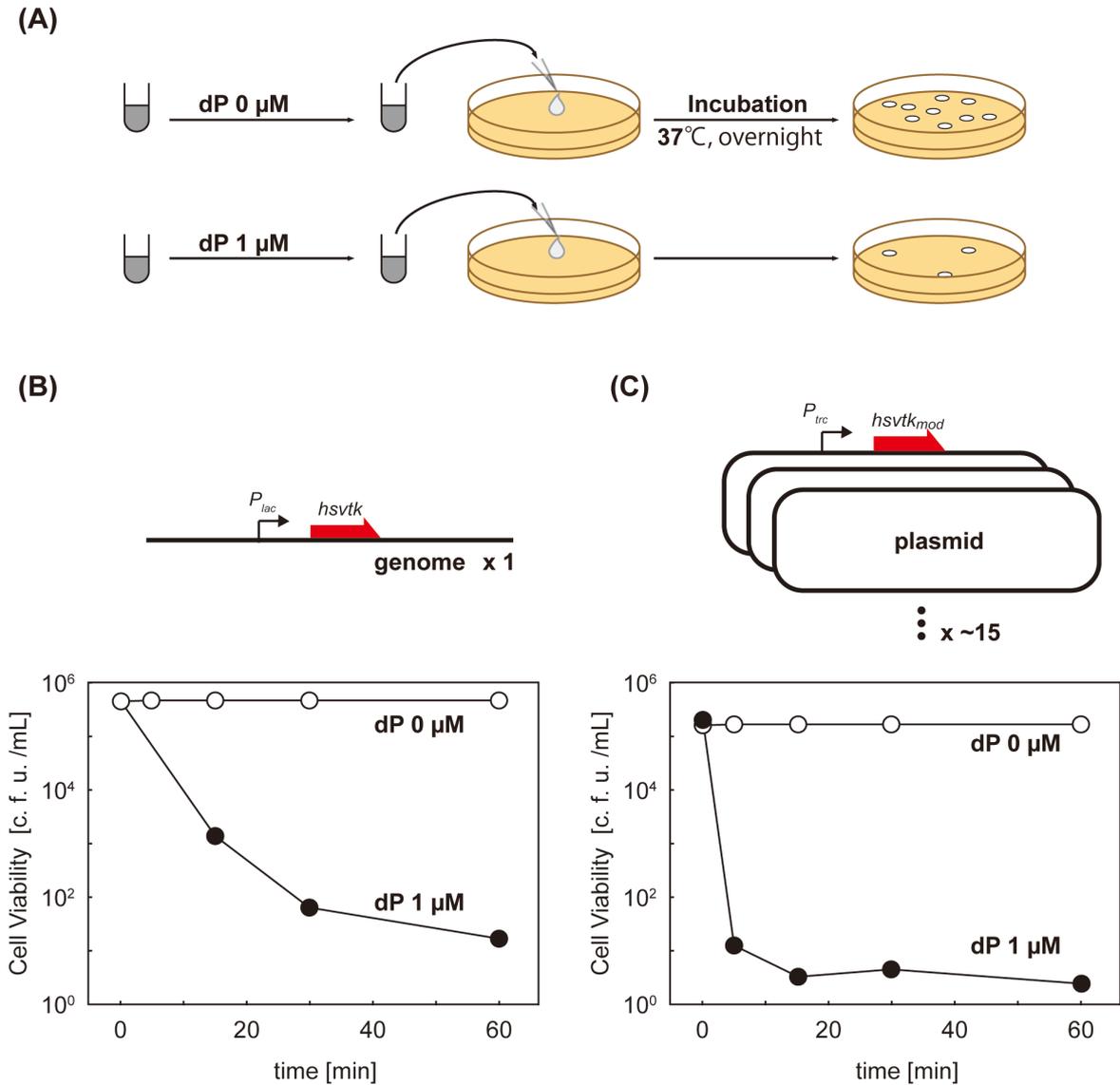


Figure 2.8. hsvTK/dP システムの細胞死の速度

(A) 実験スキーム, (B) プラスミド (文献(24) Figure S1 より引用, 大腸菌株 JW1226/ptrc-hsvTK)および (C) ゲノム上にコードされる hsvTK を持つ細胞に, dP (1 μ M) を加え培養した。各時点において, 培養液中の生菌数を調べた。

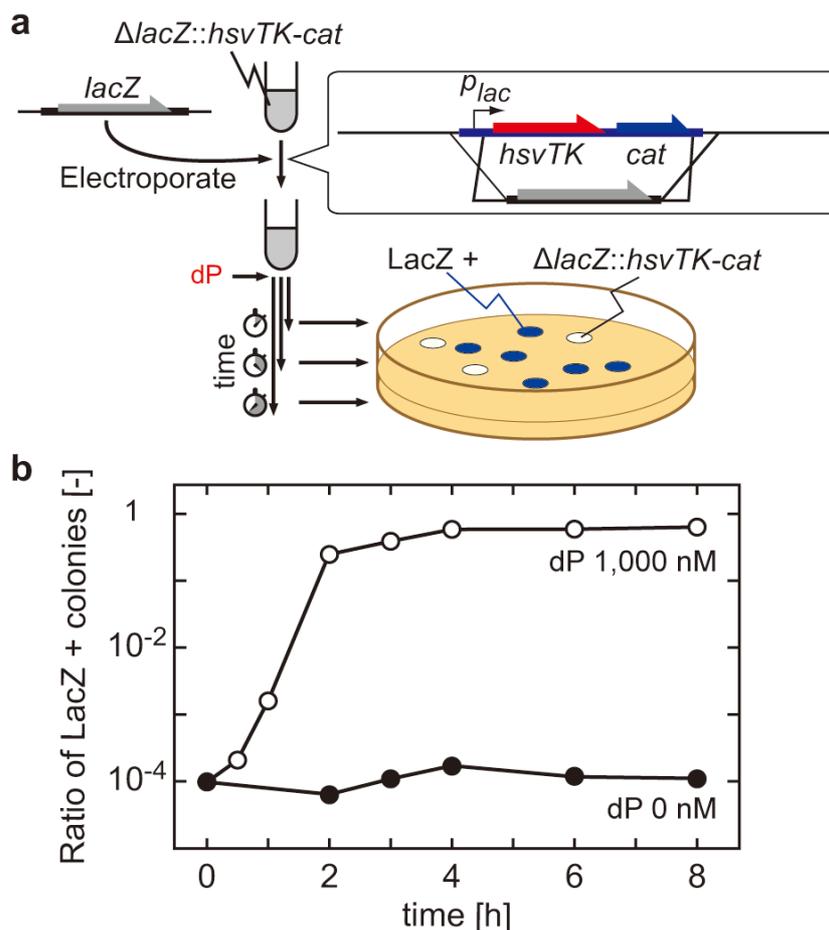


Figure 2.9. hsvTK/dP を用いた液体操作のみによるゲノム組換え体のネガティブ選択

(a) 組換えのスキーム; *lacZ* 座位に挿入されていた hsvTK-cat カセットを, *lacZ* 遺伝子で置換した, (b) dP 添加後の組換え体の存在比の経時変化. Open Circle; dP 1,000 nM, Closed Circle; dP 0 nM

2.2.6. hsvTK/dP を用いたネガティブ選択法による遺伝子変異の増加

dP セレクションは, 機構的に遺伝子変異頻度の向上に基づいている。dP が系内を細胞に与えることは, たとえ細胞が hsvTK を発現していなくても, 変異頻度を高める可能性がある。これは, 一般的にゲノム工学において望ましくない。dP 選択中に, 大腸菌ゲノム上で, 意図せぬ変異が誘発される可能性を検証するために, dP 存在下における大腸菌の遺伝子変異頻度を測定した (Figure 2.10)。

dP 濃度が高まるにつれて, 大腸菌の遺伝子変異頻度はわずかに高まり, 100 nM の dP 存在時には, 2 倍の遺伝子変異頻度であった。さらに dP 濃度が 1,000 nM に達すると, 遺

伝子変異頻度は dP 不在に比べ 15 倍高まった。これは、MAGE システムで用いられている遺伝子修復系の欠損株 (*mutS* mutant; 遺伝子変異頻度を 100 倍高めるよりも低い(29,30)。大腸菌ゲノムサイズ (4.6 Mbp) を考慮すると、1000 nM の dP 処理によって、大腸菌ゲノム内に一塩基変異が起こる確率は 4.6×10^6 [bp] $\times 2 \times 10^{-7}$ [mutation/bp] ~ 1 、つまり dP 選択の過程を経るごとに、ゲノム上に一カ所だけ変異が生じる。これを避けるためには、dP の濃度を 100 nM 以下にすることが望ましい。

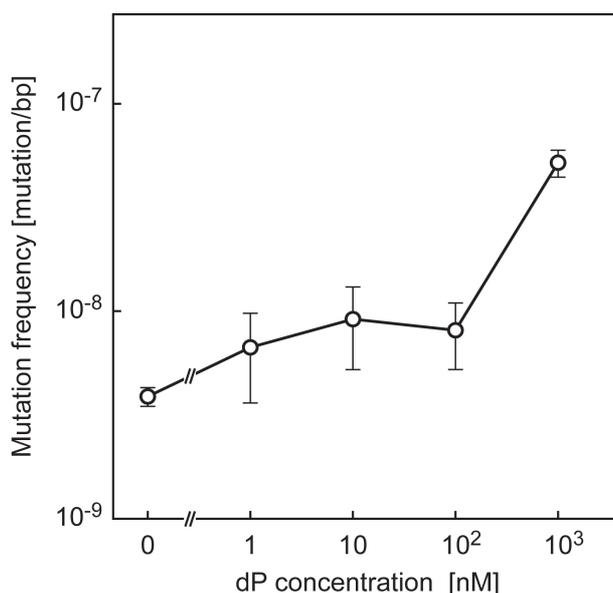


Figure 2.10. dP が大腸菌株 MG1655 の遺伝子変異頻度に与える影響

Error bar; \pm SD (N=3)。

また、細胞内には、酸化 (8-oxoG など) (31)、脱アミノ化 (ウラシルなど) (32)、アルキル化 (3-メチルアデニンなど) など、ダメージを受けた天然型変異原性ヌクレオシドが多く存在する。HSVTK を発現することによってこれらがリン酸化され、ゲノム DNA に取り込まれることによって、あるいは核酸代謝のインバランスなど副次的な理由によって、dP を与えずとも、細胞の遺伝子変異頻度は増加するという懸念がある。そこで、hsvTK の発現が、細胞の遺伝子変異頻度に与える影響を調べたところ、hsvTK の有無に拘らず、遺伝子変異頻度は変わらなかった (Table 2.2)。よって、hsvTK 遺伝子は dP のないところではゲノム不安定化をもたらさない、優れたネガティブマーカーであることがわかった。

Table 2.2. hsvTK 発現が細胞の遺伝子変異頻度に与える影響

Strain	Generation [-]	Frequency of Rif ^R rivertant [-]	Mutation rate [mutation/bp/generation]
hsvTK +	8.4	3×10^8	3×10^{-10}
hsvTK -	7.6	6×10^8	8×10^{-10}

2.2.7. 選択カセット中の *hsvTK* 遺伝子上に起こる PCR エラー由来の失活変異

ゲノム上に HC カセットが導入された株 (MG1655-*tdkΔlacZ::hsvTK-cat*) を作製する過程において、3つの dP^R耐性クローンが出現した (2.2.2 項, Figure 2.5(B))。これら3つのクローンには、*hsvTK* 遺伝子上に、アミノ酸変異を伴う (“ノンシノニマス”な) 変異があった (Table 2.3)。これらは、“アルギニン → アスパラギン酸”, “アルギニン → ヒスチジン”, “プロリン → セリン”など、アミノ酸の化学的性質を大きく変えるものであり、その結果 *hsvTK* の失活をもたらしていると考えられる。これらの変異は、PCR 複製におけるエラーによると考えられ、このことは、dP 耐性かつ Cm 耐性を示すクローン (すなわち、*hsvTK* が失活した HC カセットをゲノムに持つ) の出現頻度が、HC カセットを PCR 作製した際に用いたポリメラーゼの複製忠実度に依存することから裏付けられる (Table 2.4)。

ランダム変異のおよそ 25-30% (33,34) が、*hsvTK* (1129 bps) の失活をもたらす変異であると過程すれば、そして、PCR 反応の実効サイクル数を 10 (すなわち DNA が 1000 倍に増幅される) と過程すると、本実験 (Table 2.4, Vent^R ポリメラーゼの場合) における DNA ポリメラーゼのエラー頻度は、 3×10^{-6} mutations/base/replication と計算される。この値は、報告されている DNA ポリメラーゼのエラー頻度 (2.8×10^{-6} mutations/base/replication (35)) に近い。これらの結果から、*hsvTK* におこる失活変異の頻度を PCR 時起こる遺伝子変異の頻度をそのまま反映し、失活変異が培養中に濃縮されることは起こっていないと思われる。これは、他のネガティブ選択マーカー、例えば *sacB* (強い細胞毒性を示し、培養中に失活し易いことが報告されている (16,36)) とは対照的である。これは特に、*hsvTK* の本来の活性 (チミジンキナーゼ) としての活性が無毒であり、dP を加えたときにのみ、その細胞毒性が生じることに関与すると思われる。

Table 2.3. HC カセット導入後に現れた dP 耐性クローン (Figure 2.5B) の *hsvTK* 遺伝子の配列解析

Clone number	Nucleoside substitution	Amino Acid substitution
1	G599A	R200D
2	C123T, G647A	R216H
3	C391T	P131S

HC カセットがエレクトロポレーションされた MG1655 のプールから単離された 92 の Cm 耐性クローンのうち 3 つは、dP 耐性を示した。そのゲノム上の *hsvTK* 遺伝子を PCR 増幅し、P30 および P32 プライマー (**Appendix 1**) を用いてシーケンス反応を行なった。

Table 2.4. HC カセット導入後に生じる dP 耐性クローンの頻度の PCR 酵素依存性

Polymerase	Frequency of dP-resistant clones [%]
Phusion [®] (New England Biolabs)	0.2 ± 0.1
Vent _R [®] (New England Biolabs)	0.8 ± 0.3

HC カセットを Vent_R[®] または Phusion[®] DNA ポリメラーゼ(New England Biolabs)を使って、P1 と P2 プライマー(**Appendix 1**) によって *lacZ* 座位に対するホモロジーアームを付しながら PCR 増幅した。得られた DNA 断片は、pKD46 を持つ大腸菌株 MG1655 にエレクトロポレーションされ、LB-Cm と LB-Cm/dP 培地に植菌された。dP 耐性クローンの発生頻度は次式により算出した。

$100 \times [\text{Cm/dP 上に形成されたコロニー数}] / [\text{Cm プレート上に形成されたコロニー数}]$
 数値は、3 つのサンプルの平均値を標準偏差とともに示している。

2.2.8. hsvTK の変異失活による非組換え株（偽陽性）の発生

微生物ゲノムは、分裂とともに常に変異の蓄積が起こり、遺伝子は一定の頻度で失活する(37)。dP キナーゼ活性が確認されたクローンを用いても、 10^5 細胞にひとつの頻度で、dP 耐性クローンを得た(**Figure 2.5**)。ランダム変異のおよそ 25-30% が、hsvTK (1129 bps) の失活をもたらす変異であるという推算(33,34)に基づけば、そして世代数を 20 (すなわち細胞が 10^5 倍にまで増殖する) とすると、本実験におけるゲノム複製の遺伝子変異頻度は、 2×10^{-9} mutations/base/replication と計算される。この値は、報告されている大腸菌ゲノムの遺伝子変異の頻度(10^{-10} - 10^{-9} (37) mutations/base/replication (35))に近い。ここでも、すべてのクローンが hsvTK に変異を持っていた (**Table 2.5**)。そこで、この遺伝子変異が、細胞の dP 耐性化をもたらすことを調べるために、セレクションエスケープの細胞のゲノムから、*hsvtk* 遺伝子を PCR 増幅し、新たに大腸菌株 MG1655 株のゲノムに導入した。こうして得られた大腸菌株について dP 感受性を調べたところ、**Table 2.5** に示す変異を *hsvtk* に持つ大腸菌は、すべて dP 耐性を示した (**Figure 2.11**)。Lambda-RED 法を用いた組換えを用いる場合に得られる組換え体は、 10^{-5} - 10^{-4} (38) (組換え体/全細胞)であることを考慮すると、自然変異によって生じる dP 耐性クローン (10^{-5} 変異体/全細胞) は、無視できない偽陽性の原因である。

Table 2.5. ネガティブ選択におけるセレクションエスケープのクローンの *hsvTK* 配列解析

clone #	Nucleotide mutation	Amino Acid mutation
1	T865C	F289V
2	A472C	T158P
3	A472C	T158P
4	⁸⁶⁵ TTCACCCTG--> ⁸⁶⁵ TTCACCCTG - TTCACCCTG	²⁸⁹ FTL --> ²⁸⁹ FTL-FTL
5	A196C	T66P
6	A164C	D55A
7	⁸⁶⁵ TTCACCCTG--> ⁸⁶⁵ TTCACCCTG - TTCACCCTG	²⁸⁹ FTL --> ²⁸⁹ FTL-FTL
8	A683C	D228V
9	A196C	T66P

dP セレクションで発生する”セレクションエスケープ”のうち、9 つのクローンを個別に選り出し、その hsvTK 領域を、P30/P33 プライマー(**Appendix 1**)を用いて PCR 増幅し、配列解析を行なった。

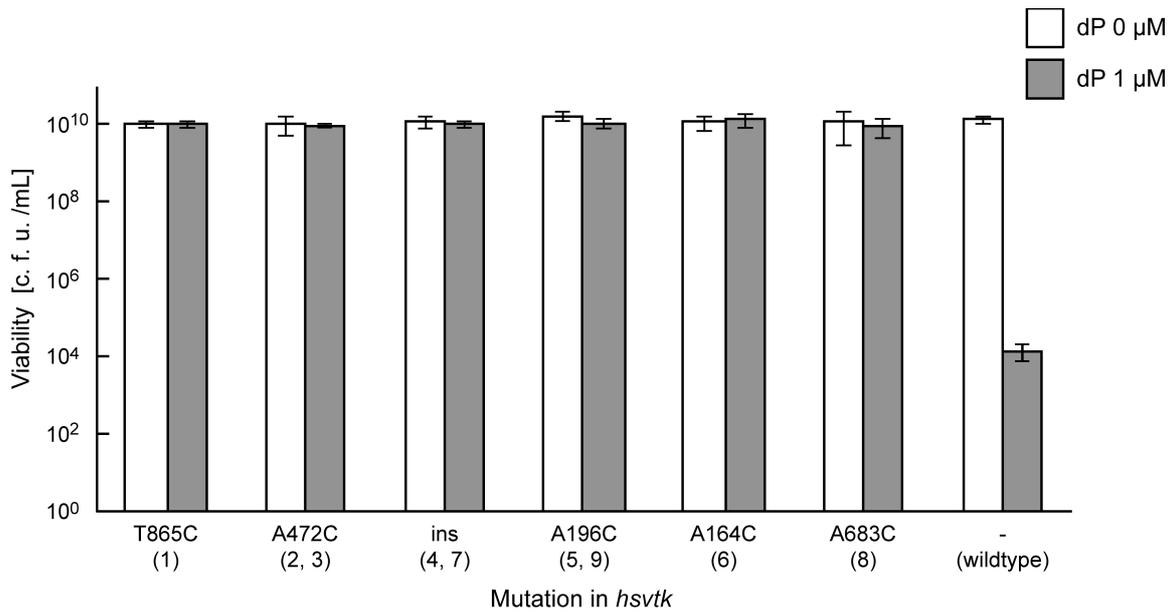


Figure 2.11. セレクションエスケープクローンで同定された *hsvTK* 上の変異が移植された大腸菌 MG1655 株の dP 感受性

dP セレクションエスケープで見つかった *hsvTK* 変異体 (Table 2.5) を PCR 増幅し, MG1655 株の *lacZ* 座位に挿入した。得られた組換え体を LB-Km 培地で培養し, 培養液を 0 (open bar) or 1 μM (closed bar) の dP を含む LB 固体培地に植菌した。対応するクローン番号 (Table 2.5) を括弧内に示す。

2.3. 考察

2.3.1. hsvTK/dP を用いた液操作のみによるゲノム組換え体のネガティブ選択の実現

本章では、hsvTK の dP キナーゼ活性が、ゲノム工学において、高効率かつ迅速なネガティブ選択マーカであることを示した(Figures 2.7 および 2.9)。特に、1) 液相で選抜可能であること、2) そのための時間が短い (~2 時間) こと、そして 3) 特別な遺伝型が不要であること、であるという点で、優れたネガティブ選択法であることがわかった。

hsvTK がゲノムにコードされる場合、プラスミドにコードされる場合と比べて、選択時間、すなわち生菌数低下を得るのにかかる時間が、およそ 10 倍長い (プラスミド~5 分, ゲノム~60 分, Figure 2.8)。この差は、以下の仮定から予想される選択時間の差に概ね近い;

- 1) プラスミドは細胞内に平均 15 コピー存在するのに対し、ゲノムは 1 コピーしかないため、ゲノムにコードされる hsvTK の発現量は、プラスミドのそれと比べて 15 分の 1 程度である。
- 2) hsvTK の酵素としての生化学パラメータ (とくに Kcat) は変化していないため、dP のリン酸化反応の速度 ($V_{max} = kcat \times [\text{細胞内 hsvTK 濃度} \sim \text{hsvTK 発現量}]$) は、hsvTK の発現量にのみ依存し、hsvTK がゲノムにコードされる場合はプラスミドの場合の 15 分の 1 である。

つまり、hsvTK がゲノムにコードされる場合でも、hsvTK の発現量さえ 10 倍高めることができれば、あるいは dP リン酸化活性 (kcat) そのものを高めることができれば、選択時間を数分のオーダーにまで短縮することは可能である。

2.3.2. セレクションエスケープは全て on-site (hsvTK) 上の遺伝子変異が原因であった

hsvTK/dP を用いたネガティブ選択の選抜効率は高く、組換え体を 88%にまで濃縮できた (Figure 2.7)。しかしながら、hsvTK が遺伝子変異によって失活することでセレクションを生き残る、"セレクションエスケープ"の細胞が 12%ほどみられた。これは、hsvTK 遺伝子を有するにも関わらず、dP セレクションを生き残る"セレクションエスケープ"が、 $\sim 10^{-5}$ ほどの頻度で出現するためである (Figure 2.6(B))。組換え体の出現頻度は 10^{-5} - 10^{-4} (38)であるから、dP セレクション後の細胞集団のうち、10-50%は、セレクションエスケープの細胞が占める。組換え体を効率よく得るためには、セレクションエスケープの細胞をいかに減らすかが重要である。

hsvTK/dP を用いたネガティブ選択系で生じるセレクションエスケープの頻度は、これまでに知られているネガティブ選択マーカにおける、セレクションエスケープの発生頻度と、おおむね同等であった (Table 2.1)。これは、セレクションエスケープの発生頻度が、細胞内の遺伝子変異の頻度(39)に依存するためである。多くの場合、セレクションエス

ケーブは、ネガティブ選択マーカー遺伝子自体に失活変異が起こる（“on-site”変異による耐性化）か、あるいは他の遺伝子、例えば薬剤を排出する遺伝子への変異によって、薬剤が排出される場合（“off-site”変異による耐性化）の二通りがある(20)。細胞内の遺伝子変異の頻度を大きく低減することは困難であることが知られているため(39)、セレクションエスケープの発生頻度を減らすためには、これら二種類の変異に対処する必要がある。Gregg らは、off-site (*tolQRA* 遺伝子) への変異について対処することで、セレクションエスケープを大いに低減することに成功している (20)。*hsvTK* の場合は、dP 耐性化をもたらす遺伝子変異の全てが on-site mutation であり、off-site mutation による dP 耐性化はみられなかった (**Table 2.5**, **Figure 2.11**)。第三章で、この on-site 変異によるセレクションエスケープを低減する工夫について述べる。

2.3.3. dP によって組換え体にも変異が導入されるリスク

本章で述べた *hsvTK* と dP を用いるネガティブ選択法は、変異原性ヌクレオシドの使用、ヌクレオシドキナーゼを過剰発現という二つの点から、ゲノム上での望まない遺伝子変異を誘起することが懸念される。著者が用いたプロトコルでは、dP を加えたときに、遺伝子変異頻度が 15 倍高まるのみであった (**Figure 2.10** および **Table 2.2**)。1 回のリコンビニアリング操作においては、4.6 Mbp のゲノム上に起こりえる塩基変異の数は、 6×10^{-8} [mutation/bp] \times 4.6×10^6 [bp] \times = 0.2 mutation/cell となり、得られた組換え体 100 細胞のうち、20 細胞で一カ所だけ変異が起きている計算になる。これを数回繰り返すことを考えると、ゲノム上に望まない変異が起こるリスクは無視できない。

dP 濃度が 100 nM 以下では、*hsvTK* を発現しない細胞の遺伝子変異に殆ど影響を与えない (**Figure 2.10**) が、同時に細胞死の効率もわずかに低下する (**Figure 2.6(B)**)。そのため、*hsvTK* の dP キナーゼ活性の改良、すなわち *hsvTK* の発現量を高める、より高い dP キナーゼ活性を示す（とくに dP に対して低い K_M を示す）キナーゼ遺伝子を探査する、といった工夫や、あるいはヌクレオシドインポータ(40)の追加発現によって、ネガティブ選択の過程に必要な dP 濃度を低減し、細胞の遺伝子変異頻度に影響しないようなネガティブ選択プロトコルの確立が望まれる。

2.4. 実験項

2.4.1. 試薬

6-(β-D-2-deoxyribofuranosyl)-3,4-dihydro-8*H*-pyrimido[4,5-*c*][1,2]oxazin-7-one (dP) (41)は、Berry and Associates (Bishop Circle East, Dexter, MI; cat. PY7270)から購入した。オリゴヌクレオチドは FASMAC Co., Ltd (Kanagawa, Japan)によって合成された。他の全ての試薬は特級試薬を用いた。抗生物質は必要に応じて以下の濃度で培地に添加した: 50 µg/mL カルベニシリン (Carb), 30 µg/mL クロラムフェニコール (Cm), and 50 µg/mL カナマイシン (Km)。

2.4.2. エレクトロポレーションのためのコンピテント細胞の調製

エレクトロポレーションのためのコンピテント細胞は、Datsenko および Wanner らによって記述された方法(42)にしたがって調製された。簡潔には、pKD46 を保持する細胞を、50 µg/mL の Carb. および 10 mM のアラビノースを含む LB 培地で培養し、Lambda-RED 酵素の発現が誘導した。OD ($\lambda = 600$ nm)が 0.4-1.0 に達したとき、細胞を氷冷しながら、滅菌水および 10% v/v グリセロールで 2 回ずつ洗浄し、最後に 20% v/v グリセロールで懸濁することで、エレクトロポレーション用コンピテント細胞を作製した。得られたエレクトロポレーション用コンピテント細胞(40 µL)に、100 ng の PCR 断片を加え(氷上)、この混合液は 0.1-cm-gap のキュベットの中でエレクトロポレーションされた (1.8 kV in a Gene Pulser electroporation apparatus (Bio-Rad, Hercules CA))。

2.4.3. 株およびプラスミド

本章で使用した全てのプラスミドを、Table 2.6 に示す。大腸菌株 K-12 MG1655 株を全ての実験で使用した。一部、プラスミド作製のために、大腸菌株 XL10-Gold-Kan^r (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を使用した。pKD46 プラスミド(42)は、L-アラビノースによって Lambda-RED 組換え系を誘導するために、ゲノム編集の前に MG1655 およびその派生株に導入した。

MG1655-*tdk* (MG1655Δ*tdk*::*tetRA*) は、*tdk* 遺伝子を PCR 増幅した *tetRA* カセットで置換することにより作製した。MG1655Δ*lacZ*::*hsvTK-cat* は、次のように作製した: *lacZ* 座位を標的としたホモロジアーームを付した *hsvTK-cat* カセット(HC カセット)を PCR 増幅により調製した(プライマーおよびテンプレートは Appendix 1 に示す)。この HC カセットを MG1655 株にエレクトロポレーションし、形質転換体を、Cm を含む培地で濃縮した。得られた MG1655Δ*lacZ*::*hsvTK-cat* 株の dP 感受性 (dP キナーゼ活性) は、dP (1 µM) を含む LB 寒天培地に細胞をスポット植菌することにより調べた。

Table 2.6. 本章で使用したプラスミド

Plasmid name	Genotype	Ori/marker	Source
pMW-hsvTK-cat	<i>P_{lac}-hsvTK-cat</i>	pSC101/Km ^r	This study
pAC-pJ23116-hsvtk _{mod}	pJ23116-hsvtk _{mod}	p15A/Cm ^r	This study
pHK	<i>p_{T5}-hsvTK_{mod}-p_L-Km^r</i>	ColE1/Amp ^r	This study
pKD46	<i>p_{BAD/AraC}-Lambda RED_{γβα}</i>	pSC101/Amp ^r	(42)
ptrc-hsvtk	ptrc-hsvtk	pBR322/Amp ^r	This study
ptrc-Dmdnk	ptrc-Dmdnk	pBR322/Amp ^r	This study
ptrc-Ectk	ptrc-Ectk	pBR322/Amp ^r	This study
ptrc-T4tk	ptrc-T4tk	pBR322/Amp ^r	This study
ptrc-hsvtk _{E83K}	ptrc-hsvtk _{E83K}	pBR322/Amp ^r	This study

2.4.4. dP 選択と選択効率の評価

ゲノムにコードされた hsvTK と、dP を用いたネガティブ選択の効率(Figure 2.6)は、ゲノムに導入された HC カセットを PCR 増幅された、1 kbp のホモロジーアームを上下流に付した 3 kbp の *lacZ* 遺伝子断片で置換することで調べた; 500 ng の精製 DNA 断片を、40 μL のエレクトロポレーションのためのコンピテントセル (MG1655Δ*lacZ*::*hsvTK-cat*) に加え、エレクトロポレーションした。得られた形質転換体の培養液を 1 mL の LB 培地に懸濁し、振とう培養 (37°C, 3 h) した。培養された細胞は、dP(1 μM)を含む LB 培地に植菌された。1-8 時間の振とう培養 (37°C, 200 r. p. m.) の後、培養液の一部を LB 寒天培地 (0.4% wt/v X-Gal および 0.1 mM IPTG を含む) に植菌し、37°C で一晩培養した。各時間で、組換え体/非組換え体の比を、青/白コロニーの比から決定した。

2.4.5. 遺伝子変異頻度の測定

プラスミド pKD46 を保持する MG1655 株、およそ 10⁶ 細胞を、100 μg/mL のアンピシリンを含む LB 培地 (2 mL) に植菌し、dP (0, 1, 10, 100 and 1000 nM, 終濃度)を、培養液に添加した。6 時間後に、培養液の一部を、リファンピシンを添加した/していない(rif assay (43)), LB 寒天培地 (dP 不在) に植菌した。37°C で 12 時間培養し、コロニー形成数を計測した。文献によれば(44), *rpoB* 遺伝子には、リファンピシンへの大腸菌の耐性化をもたらす、10 カ所のユニークな塩基部位がある。このことから、遺伝子変異頻度を式 (1) により定義し、算出した。

$$\text{リファンピシン耐性細胞数 [c. f. u.] / 全細胞数 [c. f. u.]} \times 10 \quad (1)$$

引用文献

1. Thorbjarnardottir, S.H., Magnúsdóttir, R.A. and Eggertsson, G. (1978) Mutations determining generalized resistance to aminoglycoside antibiotics in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **161**, 89-98.
2. Sasarman, A. and Horodniceanu, T. (1967) Locus determining normal colony formation on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **94**, 1268-1269.
3. Garrett, E.R. and Won, C.M. (1973) Kinetics and mechanisms of drug action on microorganisms. XVII. Bactericidal effects of penicillin, kanamycin, and rifampin with and without organism pretreatment with bacteriostatic chloramphenicol, tetracycline, and novobiocin. *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1666-1673.
4. Hynes, M.F., Quandt, J., O'Connell, M.P. and Puhler, A. (1989) Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis* *sacB* gene. *Gene*, **78**, 111-120.
5. Stojiljkovic, I., Trgovcevic, Z. and Salaj-Smic, E. (1991) Tn5-rpsL: a new derivative of transposon Tn5 useful in plasmid curing. *Gene*, **99**, 101-104.
6. Ried, J.L. and Collmer, A. (1987) An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis. *Gene*, **57**, 239-246.
7. Marx, C.J. (2008) Development of a broad-host-range *sacB*-based vector for unmarked allelic exchange. *BMC Res. Notes*, **1**, 1.
8. Reyrat, J.M., Pelicic, V., Gicquel, B. and Rappuoli, R. (1998) Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect. Immun.*, **66**, 4011-4017.
9. Stavropoulos, T.A. and Strathdee, C.A. (2001) Synergy between *tetA* and *rpsL* provides high-stringency positive and negative selection in bacterial artificial chromosome vectors. *Genomics*, **72**, 99-104.
10. Bird, A.W., Erler, A., Fu, J., Hériché, J.K., Maresca, M., Zhang, Y., Hyman, A.A. and Stewart, A.F. (2012) High-efficiency counterselection recombineering for site-directed mutagenesis in bacterial artificial chromosomes. *Nature methods*, **9**, 103-109.
11. Warming, S., Costantino, N., Court, D.L., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (2005) Simple and highly efficient BAC recombineering using *galK* selection. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e36.
12. Wong, Q.N., Ng, V.C., Lin, M.C., Kung, H.F., Chan, D. and Huang, J.D. (2005)

- Efficient and seamless DNA recombineering using a thymidylate synthase A selection system in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e59.
13. Karlinsey, J.E. (2007) lambda-Red genetic engineering in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Methods Enzymol.*, **421**, 199-209.
 14. Blomfield, I.C., Vaughn, V., Rest, R.F. and Eisenstein, B.I. (1991) Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol. Microbiol.*, **5**, 1447-1457.
 15. Li, X.T., Thomason, L.C., Sawitzke, J.A., Costantino, N. and Court, D.L. (2013) Positive and negative selection using the *tetA-sacB* cassette: recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **41**, e204.
 16. Mizoguchi, H., Tanaka-Masuda, K. and Mori, H. (2007) A simple method for multiple modification of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2905-2911.
 17. Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P. and Stewart, A.F. (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.*, **20**, 123-128.
 18. Rackham, O. and Chin, J.W. (2005) A network of orthogonal ribosome: mRNA pairs. *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 159-166.
 19. DeVito, J.A. (2008) Recombineering with *toIC* as a selectable/counter-selectable marker: remodeling the rRNA operons of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **36**, e4.
 20. Gregg, C.J., Lajoie, M.J., Napolitano, M.G., Mosberg, J.A., Goodman, D.B., Aach, J., Isaacs, F.J. and Church, G.M. (2014) Rational optimization of *toIC* as a powerful dual selectable marker for genome engineering. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 4779-4790.
 21. Sabet, S.F. and Schnaitman, C.A. (1971) Localization and solubilization of colicin receptors. *J. Bacteriol.*, **108**, 422-430.
 22. Patterson, A.V., Saunders, M.P. and Greco, O. (2003) Prodrugs in genetic chemoradiotherapy. *Curr. Pharm. Des.*, **9**, 2131-2154.
 23. Negishi, K., Loakes, D. and Schaaper, R.M. (2002) Saturation of DNA mismatch repair and error catastrophe by a base analogue in *Escherichia coli*. *Genetics*, **161**, 1363-1371.
 24. Tashiro, Y., Fukutomi, H., Terakubo, K., Saito, K. and Umeno, D. (2011) A nucleoside kinase as a dual selector for genetic switches and circuits. *Nucleic Acids Res.*, **39**, e12.
 25. Kuhlman, T.E. and Cox, E.C. (2010) Site-specific chromosomal integration of large

- synthetic constructs. *Nucleic Acids Res.*, **38**, e92.
26. Frobert, E., Ooka, T., Cortay, J.C., Lina, B., Thouvenot, D. and Morfin, F. (2005) Herpes simplex virus thymidine kinase mutations associated with resistance to acyclovir: a site-directed mutagenesis study. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 1055-1059.
 27. Knecht, W., Sandrini, M.P., Johansson, K., Eklund, H., Munch-Petersen, B. and Piskur, J. (2002) A few amino acid substitutions can convert deoxyribonucleoside kinase specificity from pyrimidines to purines. *EMBO J.*, **21**, 1873-1880.
 28. Kokoris, M.S. and Black, M.E. (2002) Characterization of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants engineered for improved ganciclovir or acyclovir activity. *Protein Sci.*, **11**, 2267-2272.
 29. Glickman, B.W. and Radman, M. (1980) *Escherichia coli* mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 1063-1067.
 30. Cox, E.C., Degnen, G.E. and Scheppe, M.L. (1972) Mutator gene studies in *Escherichia coli*: the *mutS* gene. *Genetics*, **72**, 551-567.
 31. Kanvah, S., Joseph, J., Schuster, G.B., Barnett, R.N., Cleveland, C.L. and Landman, U. (2010) Oxidation of DNA: damage to nucleobases. *Accounts of chemical research*, **43**, 280-287.
 32. Duncan, B.K. and Miller, J.H. (1980) Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature*, **287**, 560-561.
 33. Bershtein, S. and Tawfik, D.S. (2008) Ohno's model revisited: measuring the frequency of potentially adaptive mutations under various mutational drifts. *Mol. Biol. Evol.*, **25**, 2311-2318.
 34. Guo, H.H., Choe, J. and Loeb, L.A. (2004) Protein tolerance to random amino acid change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 9205-9210.
 35. Cline, J., Braman, J.C. and Hogrefe, H.H. (1996) PCR fidelity of *pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3546-3551.
 36. Link, A.J., Phillips, D. and Church, G.M. (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.*, **179**, 6228-6237.
 37. Drake, J.W. (1991) A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 7160-7164.

38. Sawitzke, J.A., Thomason, L.C., Costantino, N., Bubunencko, M., Datta, S. and Court, D.L. (2007) Recombineering: *in vivo* genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. *Methods Enzymol.*, **421**, 171-199.
39. Drake, J.W. (1993) General antimutators are improbable. *J. Mol. Biol.*, **229**, 8-13.
40. Vickers, M.F., Mani, R.S., Sundaram, M., Hogue, D.L., Young, J.D., Baldwin, S.A. and Cass, C.E. (1999) Functional production and reconstitution of the human equilibrative nucleoside transporter (hENT1) in *Saccharomyces cerevisiae*. Interaction of inhibitors of nucleoside transport with recombinant hENT1 and a glycosylation-defective derivative (hENT1/N48Q). *Biochem. J.*, **339 (Pt 1)**, 21-32.
41. Lin, P.K. and Brown, D.M. (1989) Synthesis and duplex stability of oligonucleotides containing cytosine-thymine analogues. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 10373-10383.
42. Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 6640-6645.
43. Cupples, C.G. and Miller, J.H. (1989) A set of *lacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 5345-5349.
44. Severinov, K., Soushko, M., Goldfarb, A. and Nikiforov, V. (1993) Rifampicin region revisited. New rifampicin-resistant and streptolydigin-resistant mutants in the beta subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14820-14825.

第三章

ネガティブ選択におけるセレクションエスケープの低減

概要

前章では、Herpes Simplex Virus thymidine Kinase (hsvTK)の dP キナーゼ活性が、液体操作で効率よく選抜できる優れたネガティブ選択マーカーであることを示した。しかしながら、hsvTK の、遺伝子変異による機能失活によって、ネガティブ選択を生き残る細胞（セレクションエスケープ）が生じるという問題があった。本章では、hsvTK の機能失活による、セレクションエスケープの発生を防ぐ為の、一連の改良について述べる。特に、hsvTK を重複することで、セレクションエスケープの頻度を最大で 10^6 倍低減することに成功した。

3.1. 緒言

細胞内の遺伝子機能は、点突然変異や組換え反応による欠失などによって、偶発的に失われる。ネガティブ選択マーカの機能についても例外ではなく、細胞内の変異 (e. g. 大腸菌では 10^{-9} - 10^{-10} 変異/bp (1)で点突然変異が、大腸菌の近縁種のサルモネラ菌では 1.0 - 25×10^{-10} deletion/cell/generation/2-kbp(31)の頻度で起こる) によってネガティブ選択マーカそのものの機能が失われ、ネガティブ選択を生き残る細胞、すなわち”セレクションエスケープ”を生じる。一晚大腸菌を培養する (例えば、 10^4 細胞から 10^9 細胞まで増殖する~およそ 20 世代に相当する) と、ある 300 アミノ酸 (900 bp) のタンパク質遺伝子に変異が生じる確率は、

$$20 \text{ (世代)} \times 900 \text{ (bp)} \times 10^{-9} \text{ (変異または欠失/bp)} = 2 \times 10^{-6}$$

である。ネガティブ選択マーカに起こる変異のうち、25-30%が機能失活をもたらすという推定(2,3)に基づけば、およそ 10^{-6} - 10^{-5} の頻度で、セレクションエスケープが生じる。

第二章で述べた Herpes Simplex Virus thymidine kinase (hsvTK)と変異原性ヌクレオシド dP を用いたネガティブ選択系も例外ではなく、 $\sim 10^{-5}$ の頻度でセレクションエスケープが生じる (cf. 2.2.7 項)。ネガティブ選択マーカの遺伝子サイズや機能によって頻度にわずかな差はあるものの、遺伝子変異によって生じるセレクションエスケープは、全てのネガティブ選択マーカに共通する問題である (Table 3.1)。組換え操作あたりで発生する組換え体の数 (10^{-6} - 10^{-4} (4)) を考慮すると、セレクションエスケープは、偽陽性の主要な原因の一つである (Figure 3.1)。組換えの頻度そのものを高めることができれば、セレクションエスケープが偽陽性として現れる頻度は相対的に小さくなる。しかしながら、最も成功した例(5)においても、数倍の上がり幅しかなく、セレクションエスケープの低減は、ゲノム工学における重大な問題である。

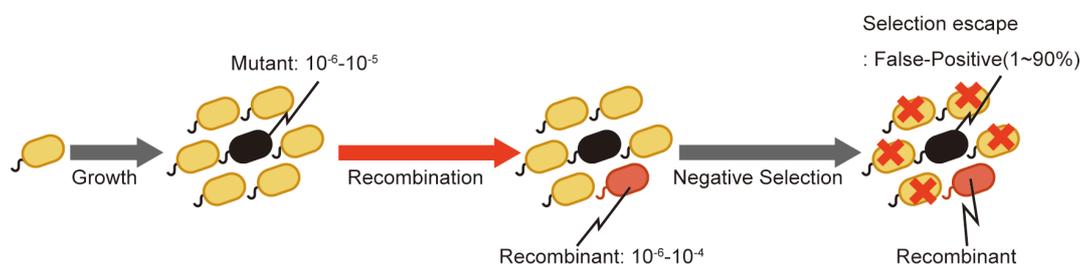


Figure 3.1 セレクションエスケープに由来する偽陽性の発生

Table 3.1. 既存のネガティブ選択マーカーとセレクションエスケープの頻度

Negative Selection marker(s)	Drug(s)	Selection escape frequency [-]	References
<i>sacB</i>	Sucrose	2.3×10^{-5}	(11)
<i>tetA</i>	Fusalic Acid	9.4×10^{-4}	(11)
<i>rpsL</i>	Streptomycin	5.7×10^{-5}	(11)
<i>tolC</i>	Colicin E1	N. T.	(7,8)
<i>galK</i>	2-deoxy-galactose-1-phosphate	N. T.	(12)
<i>thyA</i>	dihydrofolate	N. T.	(13)
<i>upp</i>	5-Fluoro Uracil	N. T.	(14)
<i>rpsL-tetA</i>	Streptomycin/ Kanamycin	1.1×10^{-6}	(11)
<i>sacB-rpsL</i>	Streptomycin/ Sucrose	N. T.	(15) (10)
<i>tetA-sacB</i>	Fusalic acid /Sucrose	$<6 \times 10^{-7}$	(16)

N. T.; Not Tested.

細胞の遺伝子変異そのものを大きく低減することは困難であり(6), ネガティブ選択マーカーそのものが機能を失う頻度そのものは変えられない。しかし, ネガティブ選択マーカーの機能失活を避ける試みは, 二通りの方法がある。一つは, ポジティブおよびネガティブ選択マーカー両方の機能を一つの遺伝子内にもつ”デュアル選択マーカー”を使用することである。ネガティブ選択マーカーの機能が失活した変異体は, ポジティブ選択マーカー機能についての選択圧の存在下で淘汰される (**Figure 3.2**)。例えば *tolC* マーカー(7,8)は, 界面活性剤 (例えば SDS) や抗生物質 (バンコマイシンなど) への耐性および Colicin E1 の毒化活性をそれぞれポジティブ/ネガティブ選択マーカーとして利用する。界面活性剤の存在下では, 界面活性剤を細胞外へ排出できる, すなわち, *TolC* が機能する細胞のみが生存する。このとき, *TolC* によるネガティブ選択のセレクションエスケープは, *TolC* そのものではなく, これと共同して機能する, *TolQRA* の機能損失へと移る。

もう一つは, ネガティブ選択マーカーを 2 コピー用いることで, 片方の機能損失をもう片方の遺伝子機能で補う方法である (**Figure 3.3**)。このようなアイデアは, Programmed Cell Death 機構 (PCD 機構) の分野では報告がされている。例えば, L. B. Jensen らは, *gef* という自殺遺伝子を, *Pseudomonas* 菌のゲノムに 2 コピー導入することによって, 単独では 10^{-6} であったセレクションエスケープの頻度を, 10^{-8} まで低減することに成功している(9)。ゲノム工学のコンテキストでも, ネガティブ選択系を二種類組み合わせて使用する例がいくつか知られている (**Table 3.1**)。

第二章で, *hsvTK/dP* によるネガティブ選択系におけるセレクションエスケープクローンのほとんど (9/9) が, *hsvtk* 遺伝子への変異 (これを on-site 変異と呼ぶ) であり, ゲノム上の他の部位への変異 (off-site 変異) によって *dP* に対して耐性化したクローンは見られなかった。そこで本章では次の 3 つの方法によって, *hsvTK* におこる失活変異によって生じる *dP* 選択の”セレクションエスケープの低減することを試みた。一つは, *hsvTK* のデュアル選択マーカーとしての機能を利用すること, 二つ目は, *hsvTK* をポジティブ選択マーカーと融合し, デュアル選択マーカー化すること, および 3 つ目は, *hsvTK* を 2 コピーもつ選択カセットを用いること, である。そのうち, *hsvTK* の二コピー化が, セレクションエスケープの低減に関して, 特に有効であることがわかった。

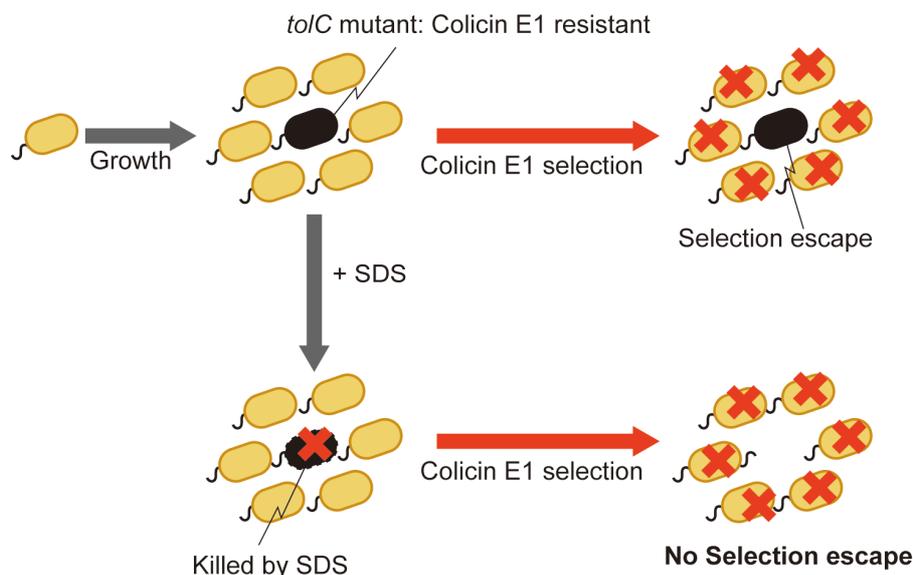


Figure 3.2. SDS 排出活性に対するポジティブ選択による ToIC 不活性変異体の除去

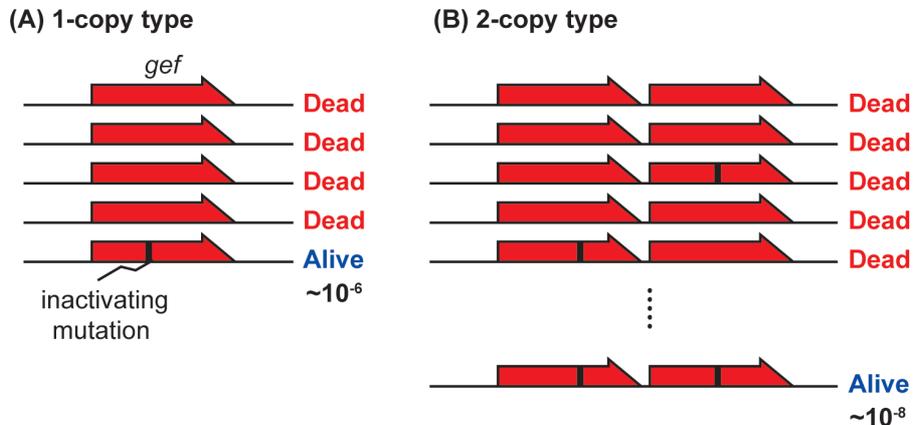


Figure 3.3. ネガティブ選択マーカーの重複によるセレクションエスケープの低減

(A) *gef* 遺伝子を単独で用いる場合、失活変異が起こるとその殺菌効果は失われる、(B) *gef* 遺伝子を 2 コピー用いると、片方の *gef* 遺伝子が失活してももう一方によって殺菌効果が担保される。

3.2. 結果

3.2.1. hsvTK のチミジンキナーゼ活性を用いたポジティブ選択 (dT セレクション)

DNA 合成の直接の前駆物質であるデオキシチミジン三リン酸(dTTP)の細胞内での供給は, de novo 経路とサルベージ経路により担われている。de novo 経路はデオキシチミジン一リン酸 (dTMP)合成を経て dTTP を合成するが, この経路は 5-フルオロ-2'-デオキシウラシル (5FdU) を加える停止することが知られている(17)。5FdU は, 細胞内で代謝され, 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン一リン酸 (5FdUMP) となる。5FdUMP は dTMP 合成酵素(ThyA)の阻害剤であり, これが存在すると細胞内の dTMP 合成が阻害される。この状況下では, 細胞の増殖は, 外因性のデオキシチミジン(dT)を用いて dTTP を合成するサルベージ経路に依存するため, TK 欠損の細胞では増殖が完全に止まる。tdk 欠損の細胞に hsvTK を導入すると, そのサルベージ経路が相補される。つまり, tdk 欠損細胞の生存は hsvTK の発現に依存する。

このようなメカニズムを利用して, チミジンキナーゼやその関連酵素活性の活性機能選択法がなされてきた (dT セレクション, Figure 3.4) (18,19)。他の様々なヌクレオシドアナログも, dT と基質ポケットを共有していることや, dT と dP とが良く似た構造を持つことから, dP キナーゼ活性の喪失は, dT キナーゼ活性の喪失を伴う予想される。そのため, dT キナーゼ活性についての”ポジティブ選択”によって, dP キナーゼ活性を失った変異体は除かれると考えられる (Figure 3.5)。

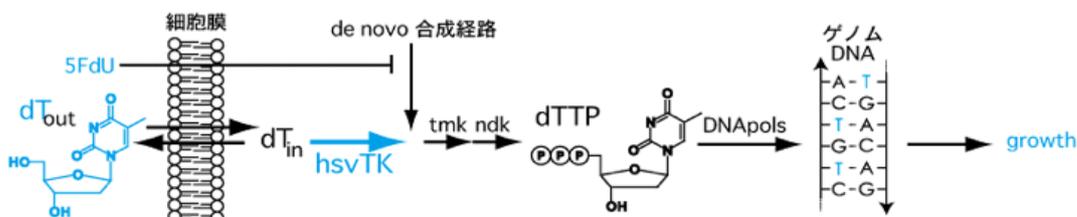


Figure 3.4. hsvTKのチミジンキナーゼ活性に対するポジティブ選択機構

tdk-株は, hsvTKの発現によってチミジンサルベージ経路が補われることによって, 5FdUの存在下でも生育できる(19)。一方, hsvTKを発現しない細胞は, 5FdUの存在下では, チミジン欠乏により死滅する。

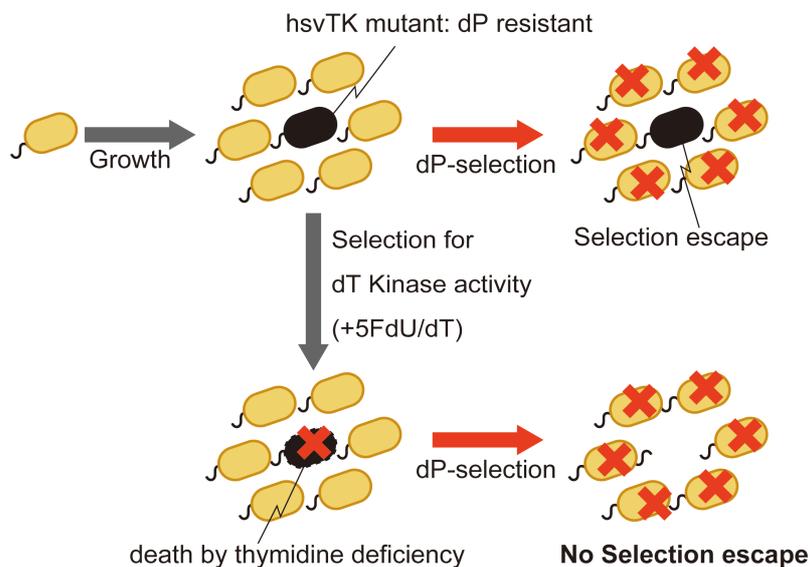


Figure 3.5. dT キナーゼ活性に対するポジティブ選択による hsvTK 失活変異体の除去

3.2.2. dT セレクションによるセレクションエスケープの低減

大腸菌株 MG1655, およびその *lacZ* 遺伝子が, *hsvTK-cat* カセットで置き換えられた大腸菌株 (MG1655 Δ *lacZ::hsvTK-cat*) に対し, 大腸菌がゲノム上のチミジンキナーゼ (*tdk*) 遺伝子をテトラサイクリン耐性遺伝子と置換し, 大腸菌株 MG1655-*tdk*, および大腸菌株 MG1655-*tdk* Δ *lacZ::hsvTK-cat* を作製した。これらの大腸菌株を, 5FdU (40 μ g/mL) と dT (0-80 μ g/mL) の存在下で培養し, *hsvTK* がゲノムに導入された株が選択的に増殖する dT 濃度を探索した (Figure 3.6)。培地中に dT を加えない場合, どちらの株も生育しなかった。一方で, dT を加えると, *hsvTK* を発現しない細胞は, 全く増殖しなかったのに対し, *hsvTK* を発現する細胞は生育した。このことから, この培養条件では, *hsvTK* を発現する細胞だけが選択的に増殖することが示された。

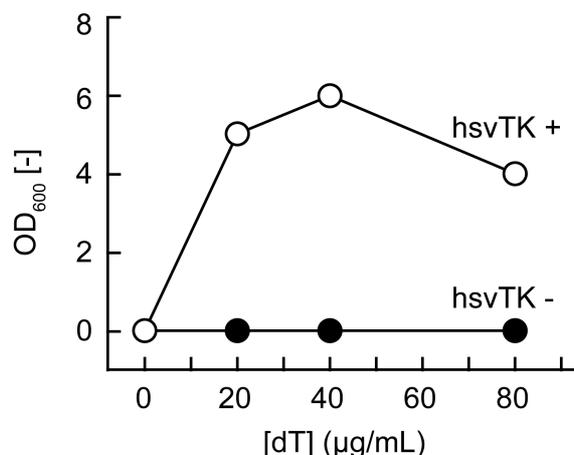


Figure 3.6. dT 選択による hsvTK 発現細胞の選択的な増殖

12 時間培養後の細胞培養液の濁度 (OD₆₀₀) を測定した。Open Circle : 大腸菌 MG1655-*tdkΔlacZ::hsvTK-cat* (hsvTK+), Closed Circle: 大腸菌 MG1655-*tdk* (hsvTK-)

5FdU を加えて培養した細胞集団では, hsvTK が dT キナーゼ活性を持つ細胞のみが濃縮されているはずである。そこで, 5FdU (40 μg/mL), dT (40 μg/mL) 存在下で培養した細胞について, セレクションエスケープの頻度を調べたところ, 2×10^{-5} であり, 5FdU/dT が存在しない条件で培養した場合の頻度 (8×10^{-5}) と比べて, 4 倍ほど低下した (Figure 3.7)。このことから, 細胞集団のなかに生じた dP キナーゼ活性を失った変異体の 1/4 は, dT キナーゼ活性も失っているために, Figure 3.5 に示す原理で, わずかながら除去されたと考えられる。残る 3/4 は, どうやって dP セレクションを逃れたのだろうか。

残る 3/4 の細胞は, 1) dP キナーゼ活性だけが選択的に失われたため, あるいは 2) hsvTK に dP キナーゼ活性の喪失をもたらす変異が起こっても, ポジティブ選択を生存するのに十分な dT キナーゼ活性が残存するため, に生じたと考えられる。dT キナーゼ活性は, その活性が 1/1000 に低下しても, 細胞の生育に十分な dTMP を生成することが報告されている(20)。そのため, 後者の理由で, 3/4 の細胞が現れたと考えている。Figure 3.5 に示す原理で, セレクションエスケープの頻度をさらに低減するためには, dP キナーゼ活性を高めるか, あるいは相対的に dT キナーゼ活性を低下させるようなタンパク質工学/進化工学が必要である。

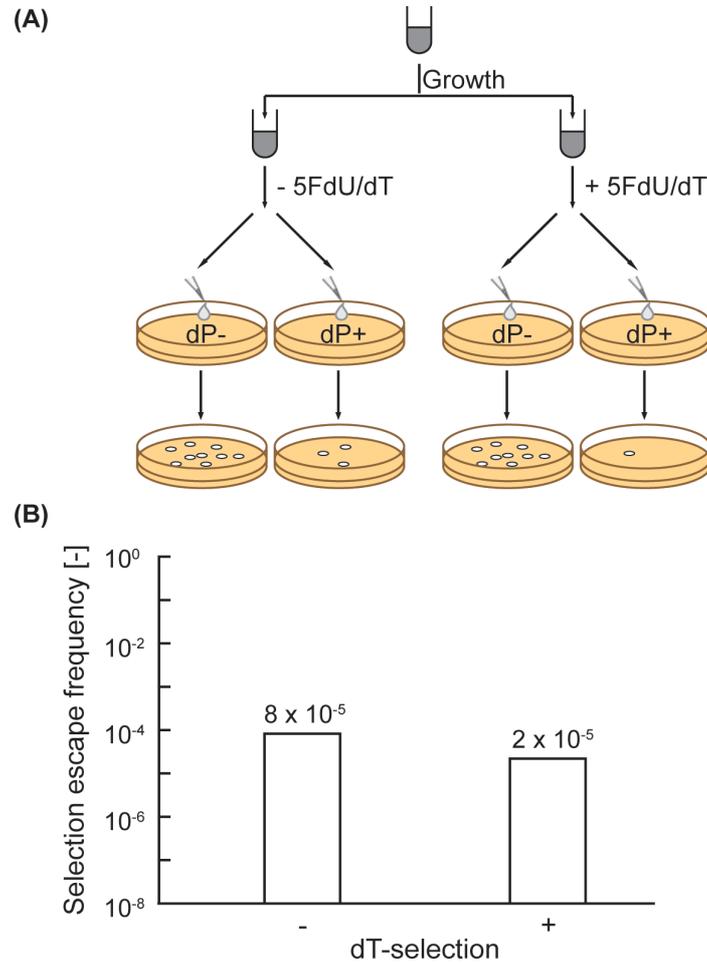


Figure 3.7. dT 選択の有無がセレクションエスケープ頻度を与える影響

(A) dT セレクション操作のスキーム; 5FdU(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)および dT (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 存在下で培養した後に, LB プレートまたは LB-dP(1,000 nM)プレートに植菌し, 生菌数を計測した, (B) dT セレクションをした/しない場合のセレクションエスケープの頻度, セレクションエスケープの頻度は次式で算出した;

$$\frac{[\text{LB-dP プレートに形成されたコロニー数}]}{[\text{LB プレートに形成されたコロニー数}]}$$

3.2.3 hsvTK とポジティブ選択マーカ－の融合による hsvTK のデュアル選択マーカ－化

タンパク質に起こるランダム変異のうち、25-30%が失活変異であると推定されている(2,3)。他方、コドン表から計算される”ナンセンス変異”（アミノ酸をコードするコドンが、翻訳の終結をコードするコドンに変異し、ポリペプチド合成が途中で止まる変異）の割合は、hsvTK の場合、3%である。大部分の変異は、1) 基質との結合ポケットや反応ポケットのアミノ酸が換わり、反応が起こらなくなる変異や、あるいは2) 酵素そのものの構造不安定化をもたらす、その細胞内濃度が低減する、といった効果をもたらす変異である。実験的には、ランダム変異の多くが前者であることが知られている(21)

不安定化した酵素変異体を除く工夫は、酵素の安定化を目指した進化工学の分野ではよく知られている(22)。Maxwel らは、酵素の安定性を高めるために、対象の酵素遺伝子と、ポジティブ選択マーカ－を融合した(23)。ここでは、酵素遺伝子とポジティブマーカ－、ここではクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) を融合し、酵素の安定性が高まる、すなわちその細胞内濃度が向上したとき、クロラムフェニコール耐性も同時に向上することを利用する。酵素が安定化すれば、クロラムフェニコール耐性を指標にそれを選択することができる。裏を返せば、酵素が一定以上不安定化する、あるいは酵素そのものが発現しなくなる変異（ナンセンス変異、フレームシフト変異など）場合には、クロラムフェニコール耐性が低下する。この原理を、hsvTK に起こる構造不安定化や、hsvTK そのものが発現しなくなる変異への処方箋として利用することを試みた。

hsvTK と融合するポジティブ選択マーカ－として、カナマイシン耐性遺伝子 (*Km^r*)、ブレオマイシン耐性遺伝子 (*ble*)、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*cat*) を選んだ。これらは最も広く使われているポジティブ選択マーカ－であり、プラスミド保持やゲノム工学においてよく使われてきた。真核細胞における遺伝子工学研究の分野では、*Km^r* (24)および *ble* (25)は過去に hsvTK 遺伝子と融合され、そのポジティブ/ネガティブ選択マーカ－としての機能が確認されている。これらの報告に次いで、著者も hsvTK の終止コドンを除き、ポジティブマーカ－の N 末端と繋ぐことによって、融合マーカ－を作製した (Figure 3.8)。

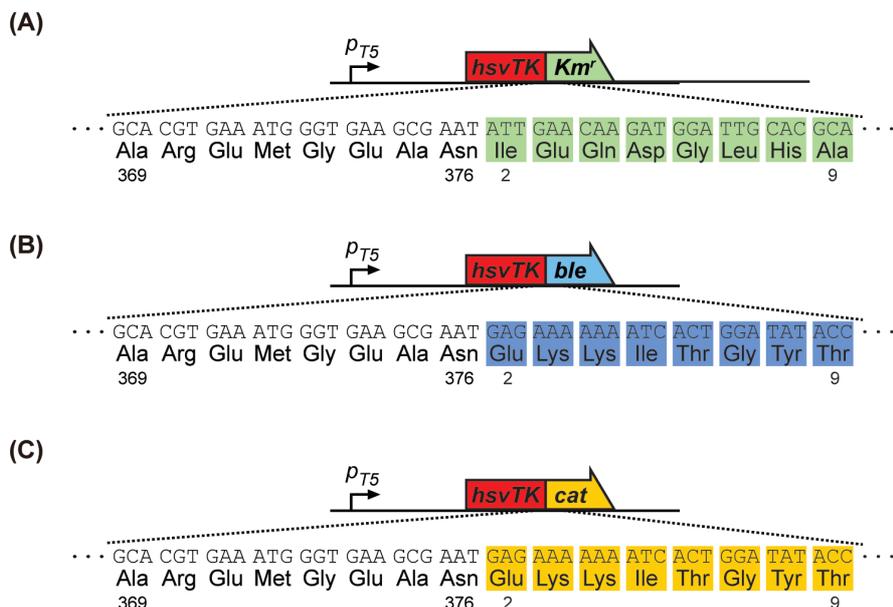


Figure 3.8. *hsvTK* と様々なポジティブ選択マーカースとの融合デザイン

(A) *hsvTK::kmr*, (B) *hsvTK::ble*, および(C) *hsvTK::cat* の, *hsvTK* とポジティブマーカースとの融合部位の塩基 (上側) およびアミノ酸 (下側) の配列を示す。

3.2.4 融合マーカースを用いたネガティブ選択

融合マーカースの, ネガティブ選択マーカースとしての機能を評価するために, 各種融合マーカースをコードするプラスミドで, 大腸菌を形質転換し, 得られた形質転換体をさまざまな濃度の dP 存在下で培養した (Figure 3.9)。融合マーカースを発現する細胞は, dP 濃度の増加とともに生菌数が減少した。一方, コントロール株 (融合マーカースの代わりに GFP^{UV} を発現するプラスミドを持つ) では, 同じ条件下で, 生菌数の低下は全く起こらなかった。1,000 nM の存在下における, *hsvTK::Kmr*, *hsvTK::ble*, および *hsvTK::CAT* の 選抜効率 (dP 不在/存在時の生菌数の比) は, それぞれ 3×10^6 , $>5 \times 10^7$, および 1×10^5 であり, 3 者のなかでは, *hsvTK::ble* が最も優れていた。

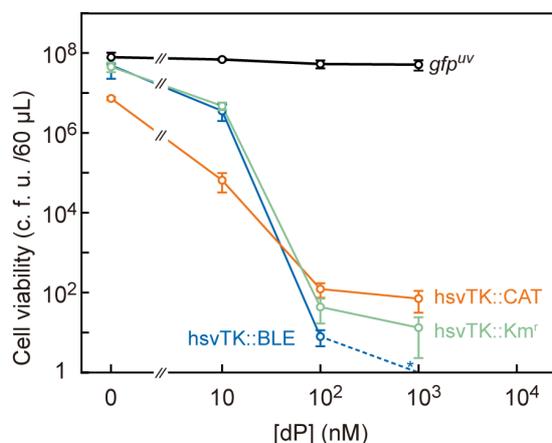


Figure 3.9. 融合マーカースのネガティブ選択マーカースとしての性能

様々な濃度 (0-1,000 nM)の dP の存在下で 3 時間培養した後の生菌数 *: コロニー形成がみられなかった。Error bar; ± SD (N=3)。

3.2.5. 融合マーカースを用いたポジティブ選択

融合マーカースの、ポジティブ選択マーカースとしての機能を評価するために、各種融合マーカースをコードするプラスミドで、大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体を各種抗生物質 (カナマイシン、ゼオシン、クロラムフェニコール) の存在下で培養した。カナマイシン 50 μg/mL で 3 時間培養すると、コントロール株 (*hsvTK::Km^r* の代わりに GFP^{UV} を発現するプラスミドを持つ) の生菌数はカナマイシン不在時の 10⁶ にまで低下した。一方で、*hsvTK::Km^r* を発現する大腸菌は、同じ条件下で、生菌数の低下は全く起こらなかった。そのようにして、*hsvTK::APH* は、効率のよいポジティブ選択マーカースとして使用できることがわかった。カナマイシンは、静菌ではなく殺菌効果を示す抗生物質であるため(26)、ポジティブ選択操作には 3 時間という短い時間で十分であった。

作製した 3 つの融合マーカースの中で、*hsvTK::Km^r* は、*hsvTK::Ble* や *hsvTK::CAT* より優れていた;1) *hsvTK::Ble* もカナマイシンに匹敵するポジティブ選択マーカース機能を示したが、調べた全ての濃度において、選択効率 (薬剤不在/存在時の生菌数の比) はカナマイシンに劣っていた(Figure 3.10(A)および(B))。ゼオシン濃度をさらに高めることで、選抜効率の改善が見込めるものの、高濃度のゼオシン処理はゲノム DNA の断片化を引き起こし、変異を誘発するため、これ以上の条件検討は行なわなかった。2) *hsvTK::CAT* は、調べたすべての条件において、選択効率は 100 を超えず (Figure 3.10(C))、クロラムフェニコールが静菌的な抗生物質であることを反映した(27)。3.2.4 項の実験結果とあわせて、ゲノム工学を試みる融合マーカースとして、*hsvTK::Km^r* が優れていると結論した。

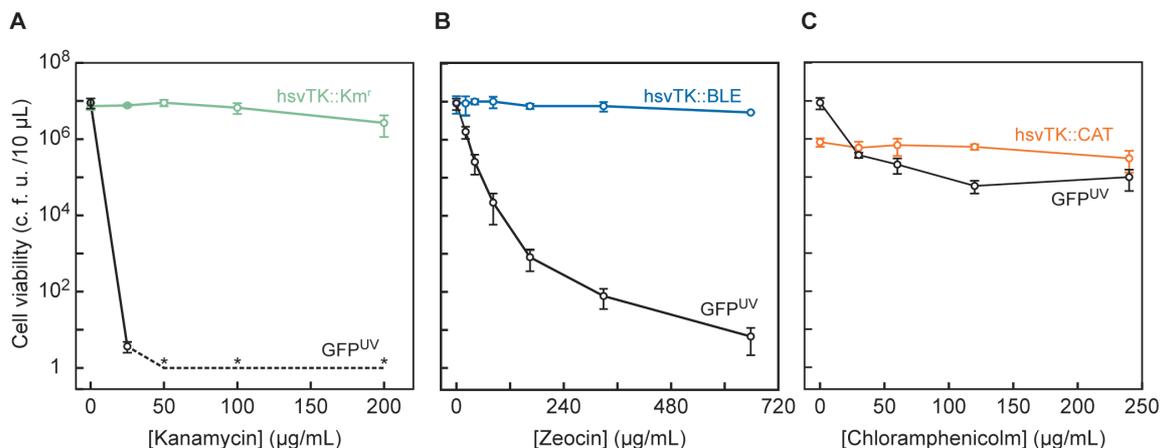


Figure 3.10. 融合マーカのポジティブ選択マーカとしての性能

様々な濃度の(A)カナマイシン, (B)ゼオシン, および(C)クロラムフェニコールの存在下で 3 時間培養した後の生菌数, *: コロニーは形成されなかった。Error bar; \pm SD (N=3)。

3.2.6. APH との融合化によるセレクションエスケープの低減

hsvTK::aph が, プラスミドにコードされる時には, ポジティブ/ネガティブ選択マーカとして優れていることを示した。ゲノム上でも, 同様に機能することを調べるために, hsvTK::km^r をポジティブ/ネガティブ選択マーカとした選択カセット (H::K cassette) を用いてゲノム工学を試みた。まず, ゲノム上の *lacZ* 遺伝子と, hsvTK::km^r マーカとの置換を行い, カナマイシン選択を行うことで, 大腸菌株 MG1655Δ*lacZ*::*p_{T5}-hsvTK::Km^r* を得た。

得られた組換え体 (MG1655Δ*lacZ*::*p_{T5}-hsvTK::Km^r*) について, そのセレクションエスケープの発生頻度を調べた (Figure 3.11)。hsvTK と Km^r の場合には, カナマイシン不在時には 4×10^{-6} であり, カナマイシンが存在してもその頻度はほとんど変わらなかった。一方, H::K cassette の場合, カナマイシン不在時に, 4×10^{-2} もの頻度でセレクションエスケープが生じた。これは, hsvTK を Km^r と融合することによって dP キナーゼ活性が低下しているためである。一方で, カナマイシンの濃度が高まるにつれて, セレクションエスケープの頻度はやや低下し, 100 μg/mL のカナマイシン存在時には, 6×10^{-3} にまで低減された。このことは, 3.2.3 項で述べた原理によって hsvTK に不安定化変異が起きた細胞を除去できているためと考えられる。

hsvTK::Km^r には, その安定性を高める, すなわち発現量を高める変異がわかっている (Appendix 2)。この変異体 (H::K^{mutant} Cassette, Figure 3.11) も, 同様にゲノムに導入して, セレクションエスケープの頻度を調べたところ, カナマイシン不在時には 2×10^{-6} の頻度でセレクションエスケープが生じた。これにカナマイシンを加えたところ, カナマイシン濃度の増加とともにセレクションエスケープ頻度は減少し, ついに HK cassette の 1/10, す

なわち 4×10^{-7} にまで低減された。これは、hsvTK に変異が起きた細胞のうち、構造不安定化や、hsvTK そのものが発現しなくなる変異が起きた hsvTK::APH はカナマイシン耐性を失っているために、カナマイシン存在下では、セレクションエスケープとして現れることがなくなったためである。

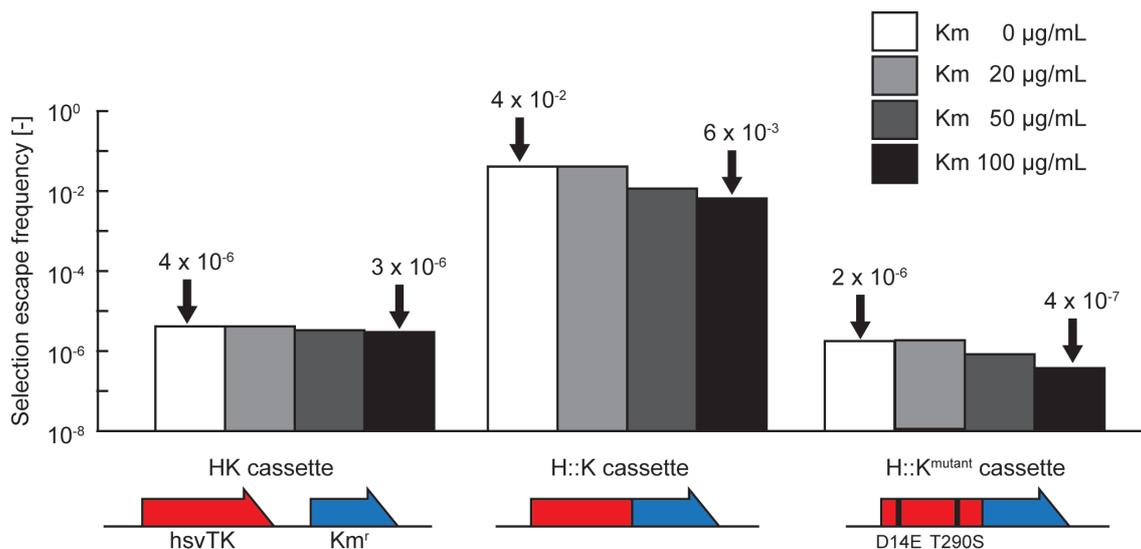


Fig. 3.11. カナマイシンセレクションの有無が hsvTK::Km^r の融合マーカのセレクションエスケープ発生頻度に与える影響; 各種セレクトをゲノムに持つ組換え体クローンについて、LB 培地で一晩培養した後、0 または 1,000 nM の dP および 0-100 µg/mL のカナマイシン (Km) を含む LB 固体培地に spot 植菌し、37°C で 12 時間培養した。形成されたコロニーの比からセレクションエスケープの頻度を算出した。

3.2.7. *hsvTK*の直列重複によるセレクションエスケープの低減

*hsvTK*を2コピー持つ、新たな選択カセット（HHKカセット）を作製し、一方の*hsvTK*に変異が起こり、そのdPキナーゼ活性が失われても、もう一方の*hsvTK*のdPキナーゼ活性がそれを補償する、という原理でセレクションエスケープの頻度を低減できないか検討した（**Figure 3.12(A)**）。*hsvTK*が1コピーの場合（HKカセット）、セレクションエスケープの頻度はおよそ 10^{-6} であるから、2つの*hsvTK*遺伝子がともに変異によって不活性化される確率は、一つの場合の2乗、すなわち $10^{-6} \times 10^{-6} = 10^{-12}$ と推測される。

大腸菌では、25 bp以上の相同配列どうして、相同組換えが起こるため(28-30)、全く同じ*hsvTK*遺伝子を並べれば、*hsvTK*間で相同組換えが頻発し、2つの*hsvTK*遺伝子が両方とも欠失して、セレクションエスケープが起こりえる。そこで、コドンを変更した*hsvTK*遺伝子（*hsvTK_{mod}*）を合成した。これら二つの遺伝子間の相同性は72%であり、最も長い相同配列はわずか11 bpである（**Figure 3.13**）。

こうして作製したHHKカセットをゲノムに導入した大腸菌について、dP培地で生存する、すなわち、*hsvTK*の機能が不活性化された細胞の生じる頻度を調べた。すると、その頻度は 1×10^{-9} であり、HKカセットのそれ（ 1×10^{-6} ）に比べて1000倍低減することができた（**Figure 3.12(B)**）。しかしながら、計算上の、2つの*hsvTK*がともに不活性化される頻度（ 10^{-12} ）には及ばなかった。その原因を調べるため、dP培地上に生存した細胞について、HHKカセット部分の配列解析を行なった（**Figure 3.14**）。その結果、dP培地に生えた細胞の全て（4/4）において、2つの*hsvTK*間で欠失が起きていることがわかった。その発生頻度は、ゲノム上でランダムに起こる組換えの頻度（ 1.0×10^{-10} to 2.5×10^{-9} /cell/generation/2-kbp(31)、大腸菌の近縁種である *Salmonella* 菌ゲノムで測定された値）におおよそ一致する。このことから、2つの*hsvTK*遺伝子の欠失は、相同配列を介さない、偶発的な事象であると推察される。

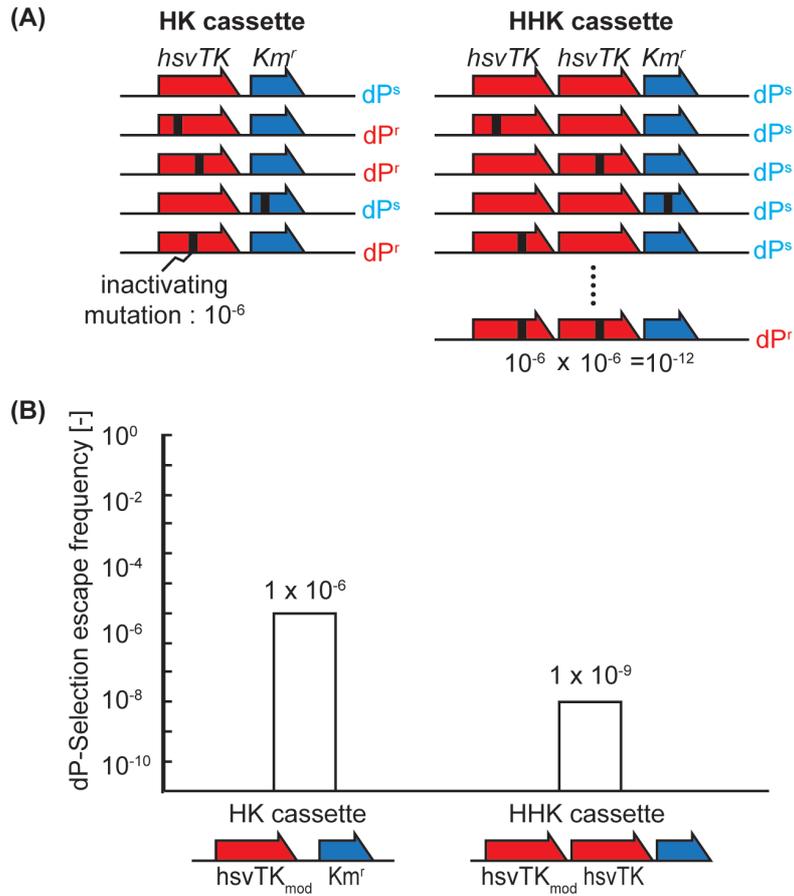


Figure 3.12. *hsvTK* の直列重複がセレクションエスケープの頻度に与える影響

(A) *hsvTK* の重複によりセレクションエスケープの頻度が低減される原理, dP^s ; dP 感受性, dP^r ; dP 耐性, (B) HKおよびHHKカセットの場合に生じたセレクションエスケープの頻度

第三章 ネガティブ選択におけるセレクションエスケープの低減

```

1
hsvTK > ATGGCTTCGTACCCCGGCCATCAACAGCGCTCTGCGTTCGACCAGGCTGCGCGTTCTCGCGGCCATAGCAACCGA
hsvTKmod > ATGGCGAGCTATCCGGGTCACACAGCATGCATCTGCTTTCGATCAGGCAGCGCGCAGCCGTGGTCATCTCTAAATCGT

76
hsvTK > CGTACGGCGTTCGCGCCCTCGCCGGCAGCAAGAAGCCACGGAACTCCGCCGGAGCAGAAAATGCCACGCTACTG
hsvTKmod > CGTACCGCACTGCGTCCGCGTCTGTCAGCAGGAGGCCACTGAGGTTTCGTCGGAGCAAAAGATGCCGACCCCTGTATA

151
hsvTK > CGGGTTTATATAGACGGTCCCACGGGATGGGGAAAACCACCACCACGCAACTGCTGGTGGCCCTGGGTTCCGCGC
hsvTKmod > CGGTATACATGATGGGCCGATGGTATGGGTAATAACCACCAGACCAATTAAGTGGTGGCTGGGCGAGCCGT

226
hsvTK > GACGATATCGTTACGTACCCGAGCCGATGACTTACTGGCGGGTGCTGGGGCTTCCGAGACAATCGCGAACATC
hsvTKmod > GATGATATTGTTTATGTGCTTGAACCGATGACGATATGGCGGTGCTGGGCGCGAGTGAAACTATTCGTAATATC

301
hsvTK > TACACCACACAACACCGCTCGACCAGGTTGAGATATCGGCCGGGGACGCGCGGCTGTAATGACAAGCGCCAG
hsvTKmod > TATACGACCCAGCATCGTCTGGACCAAGGGGAAATCAGCGCCGGTGTGTCAGCCGTAGTGTATGACAGTGCCTCAA

376
hsvTK > ATAACAATGGGCATGCCTTATGCCGTACCGACGCGTTCTGGCTCCTCATATCGGGGGGAGGCTGGGAGCTCA
hsvTKmod > ATACAGATGGTATGCCTTACGCAATACCGATCGCGTTCTGGCGCCGATATTTGGTGGTGAAGCCGGCAGTAGC

451
hsvTK > CATGCCCGCCCGCGCCCTCACCCCTCATCTTCGACCGCCATCCCATCGCCGCTCTGTGCTACCCGGCCGGC
hsvTKmod > CATGCGCCGCCCGCTGCCTGACCCCTGATTTTTGATCGTCAACCGATTGCGGCTCTGCTGTGCTATCCTGCTGCA

526
hsvTK > CGGTACCTTATGGGCAGCATGACCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTCGTTGGCCCTCATCCGCGGACCTTGCCCGGC
hsvTKmod > CGTTATCTGATGGGTTCTATGACCCCCAGGCCGTGCTGGCATTCGTTGCACTGATTCGCGCTACTCTGCTGGG

601
hsvTK > ACCAACATCGTGCTTGGGGCCCTTCCGGAGGACAGACACATCGACCGCTGGCCAAACGCCAGCGCCCGGGGAG
hsvTKmod > ACCAATATCGTGCTGGGGCGCTGCCAGAAGATCGTCATATCGACCGTCTGGCGAAACGTCAACCTCCTGGTGA

676
hsvTK > CGGCTGGACTTGGCTATGCTGGCTGCGATTTCGCGCGTTTACGGGCTACTTGC CAATACGGTTCGGTATCTGCAG
hsvTKmod > CGCTGGACTTGGCGATGCTGGCAGCGATTTCGTCGTGTATAAGCCTGCTGGCGAACACTGTCCGTTACCTGCAA

751
hsvTK > TGGCGGGGTCGTTGGCGGGAGGACTGGGGACAGCTTTCGGGGACGGCCGTGCGCCCGAGGGTGCAGGCCCCAG
hsvTKmod > TGGCGTGGCAGTTGGCGTGAAGATGGGGTCAACTGAGCGGTACGGCAGTTCCTCCGAGGGTGCAGAACCTCAG

826
hsvTK > AGCAACCGCGGCCACGACCCCATATCGGGGACAGCTTATTTACCCTGTTTCGGGCCCCGAGTTGCTGGCCCC
hsvTKmod > TCTAACGCAGGTCGCGTCCGCACATTTGGTGTATACCTGTTACCCTGTTCCGTTGCGCCGGAGCTGCTGGCACCA

901
hsvTK > AAGGCGACCTGTATAAAGTGTTCCTGGGCTTGGACGTTTCGGCCAAACGCCTCCGTTCCATGCACGTCTTT
hsvTKmod > AATGGGATCTGTACAATGTTTTCGCTGGGCGTGGATGTTTCGGCTAAGCGTCTGCGCAGCATGCATGTTT

976
hsvTK > ATCTTGATTACGACCAATCGCCCGCGGCTGCGGGACGCGCTGCTGCAACTTACCTCCGGGATGGTCCAGACC
hsvTKmod > ATCTTGATTATGATCAAAGCCAGCAGGCTGTCGTGATGCGCTGCTTCAACTGACTAGCGGCATGGTCAAACG

1051
hsvTK > CACGTCACCACCCCGGCTCCATACCGACGATATGCGACCTGGCGCGACGTTTGC CGGGAGATGGGGAGGCT
hsvTKmod > CATGTGACGACGCCGGGAGTATCCCGACCATCTGTGATCTTGCCTGACCTTCGCACGTGAAATGGGTGAAGCG

1126
hsvTK > AACTGA
hsvTKmod > AATTAA

```

Figure 3.13. 野生型 *hsvTK* 遺伝子とそのコドン修正型との配列アライメント

; 互いに一致する塩基がハイライトされている

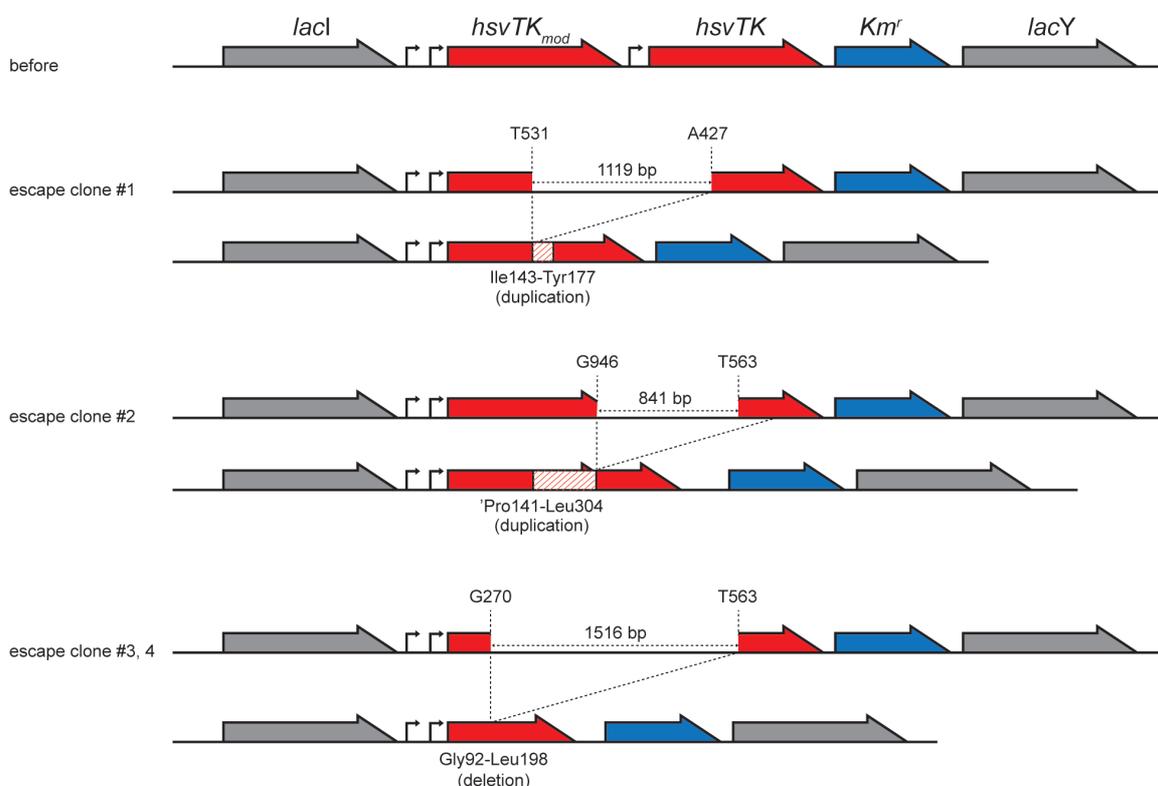


Figure 3.14. MG1655 Δ /*lacZ*::HKH カセット株から生じたセレクションエスケープの配列解析, 各セレクションエスケープのクローンについて, 欠損領域を上段に示す。また, その結果として転写・翻訳され得る *hsvTK* 変異体をその下段に示す。

3.2.8. *hsvTK* の入れ子型重複によるセレクションエスケープの低減

hsvTK の欠失を防ぐために, ポジティブマーカーであるカナマイシン耐性遺伝子 (*Km^r*) を, *hsvTK* と *hsvTK_{mod}* によって挟んだ形の選択カセット (HKH カセット) を作製した (Figure 3.15(A))。二つの *hsvTK* 遺伝子の欠失はカナマイシン耐性遺伝子 (*Km^r*) の欠失を伴い, カナマイシン耐性を失うため, カナマイシン存在下では, 非相同組換え体は増殖しない。この HKH カセットについて, セレクションエスケープの発生頻度を調べたところ, HK カセットの 10^6 倍, すなわち $<2 \times 10^{-12}$ にまで低減できた (Figure 3.15(B))。このことは, 変異による dP 耐性化が, ゲノム上の *hsvTK* の失活以外の理由では起こりにくいことを示している。

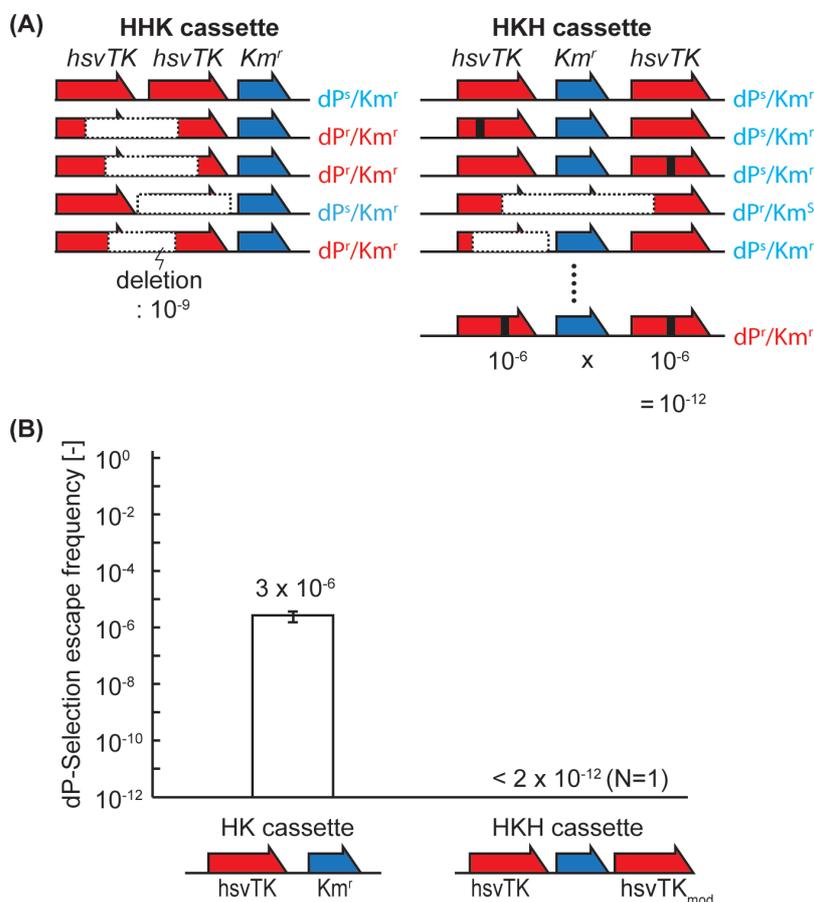


Figure 3.15. hsvTK の入れ子型の重複がセレクションエスケープの頻度に与える影響

(A) hsvTK-Km^r-hsvTK 型にすることによって、セレクションエスケープの頻度が低減される原理二つの hsvTK の欠失は、必ずカナマイシン耐性の喪失を伴う、dP^r; dP 耐性, dP^s; dP 感受性, Km^r; カナマイシン耐性, Km^s; カナマイシン感受性, indel; 挿入 (insertion)および欠失 (deletion), (B) HK および HKH カセットの場合に生じたセレクションエスケープの頻度, Error bar; ± SD (N=3)。

3.3. 考察

hsvTK/dP 系では off-site 変異による dP 耐性化の頻度は非常に低かった

本章では、hsvTK におこる失活変異によって生じる dP 選択の”セレクションエスケープの低減することを試みた。特に *hsvTK* を二コピーもつ選択カセットを用いることで、二つの *hsvTK* 遺伝子を重複させることで、セレクションエスケープの頻度を 2×10^{-12} 以下にまで低減することに成功した。この頻度は、*hsvTK* を一つだけ用いる場合から推定される、二つの *hsvTK* 遺伝子両方に失活変異が起こる確率 $(3 \times 10^{-6})^2 = 9 \times 10^{-12}$ に近い。また、HK カセットが挿入された大腸菌から生じるセレクションエスケープの *hsvTK* 座位を PCR 増幅し、別の大腸菌のゲノムに移したところ、得られた大腸菌は dP に対して耐性を示した（第二章，2.2.7 項）。このことは、*hsvTK* 遺伝子 (on-target) 以外の部位に起こる変異 (off-site 変異) による、dP に対する耐性化の頻度は、非常に低い (2×10^{-12} 以下) ことがわかる。

一般に、単純なネガティブ選択マーカの重複だけで、セレクションエスケープの頻度を大きく提言することは難しい。Jensen らは、自殺遺伝子 *gef* を重複することで、単独の場合 (10^{-6}) より、セレクションエスケープの頻度を 100 倍低減することに成功した (9)。しかしながら、単独の場合の二乗 ($10^{-6})^2 = 10^{-12}$ には及ばない。これは、ゲノム上の他の部位に、*gef* 遺伝子の活性を無効化する起こる遺伝子変異 (off-target 変異) が、二つの *gef* 遺伝子両方に遺伝子変異が起こるよりも高頻度にかかるためと推測される。Gregg らは、ネガティブ選択マーカ-*tolC* を用いたネガティブ選択系において、*tolC*(on-target)そのものではなく、*tolC* と共同して機能する、*tolQRA* 遺伝子を重複することによって、セレクションエスケープを低減することに成功した。二つ以上のネガティブ選択法を併用することで、off-site への変異にも対処し、セレクションエスケープを大きく低減した例も知られている(16)。

hsvTK/dP を用いたネガティブ選択系で、*hsvTK* の重複がセレクションエスケープの 6 桁以上の低減をもたらしたのは、dP に対する耐性化が、*hsvTK* の失活以外に起こり得ないためである。このことは他のネガティブ選択系と異なる本選択系にユニークな点である。この性質のため、*hsvTK* 遺伝子を 3 コピー化すれば、*hsvTK* の失活による dP 耐性化はさらに起こりにくくなると予想される ($(10^{-6})^3 = 10^{-18}$)。

3.4. 実験項

3.4.1. 試薬

6-(β-D-2-deoxyribofuranosyl)-3,4-dihydro-8*H*-pyrimido[4,5-*c*][1,2]oxazin-7-one (dP) (32)は、Berry and Associates 社(Bishop Circle East, Dexter, MI; cat. PY7270)から購入した。オリゴヌクレオチドは FASMAC Co., Ltd (Kanagawa, Japan)によって合成された。他の全ての試薬は特級試薬を用いた。抗生物質は必要に応じて以下の濃度で培地に添加した:50 µg/mL カルベニシリン (Carb), 30 µg/mL クロラムフェニコール (Cm), および 50 µg/mL カナマイシン (Km)。

3.4.2. 株およびプラスミド

本章で使用した全てのプラスミドを、**Table 3.2** に示す。大腸菌株 K-12 MG1655 株を全ての実験で使用した。一部、プラスミド作製のために、大腸菌株 XL10-Gold-Kan^r (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を使用した。pKD46 プラスミド(33)は、L-アラビノースによって Lambda-RED 組換え系を誘導するために、ゲノム編集の前に MG1655 およびその派生株に導入した。

本章で使用した全ての株を、**Table 3.3** に示す。MG1655-*tdk* (MG1655Δ*tdk*::*tetRA*) は、*tdk* 遺伝子を PCR 増幅した *tetRA* カセットで置換することにより作製した。MG1655Δ*lacZ*::*hsvTK-cat* は、次のように作製した:*lacZ* 座位を標的としたホモロジーアームを付した *hsvTK-cat* カセット(HC カセット)を PCR 増幅により調製した (プライマーおよびテンプレートは **Appendix 1** に示す)。この HC カセットを MG1655 株にエレクトロポレーションし、形質転換体を、Cm を含む培地で濃縮した。得られた MG1655Δ*lacZ*::*hsvTK-cat* 株の dP 感受性 (dP キナーゼ活性) は、dP (1 µM) を含む LB 寒天培地に細胞をスポット植菌することにより調べた。

Table 3.2. 本章で使用したプラスミド

Plasmid name	Genotype	Ori/marker
pJ204- <i>p</i> _{T5} ⁻ <i>hsvTK</i> :: <i>Km</i> ^r	<i>p</i> _{T5} ⁻ <i>hsvTK</i> :: <i>Km</i> ^r	<i>ColE1/bla</i>
pJ204- <i>p</i> _{T5} ⁻ <i>hsvTK</i> :: <i>cat</i>	<i>p</i> _{T5} ⁻ <i>hsvTK</i> :: <i>cat</i>	<i>ColE1/bla</i>
pJ204- <i>p</i> _{T5} ⁻ <i>hsvTK</i> :: <i>ble</i>	<i>p</i> _{T5} ⁻ <i>hsvTK</i> :: <i>ble</i>	<i>ColE1/bla</i>
pJ204- <i>p</i> _{T5} ⁻ <i>gfp</i> ^{UV}	<i>p</i> _{T5} ⁻ <i>gfp</i> ^{UV}	<i>ColE1/bla</i>

Table 3.3. 本章で使用した大腸菌株

Strain	Genotype
MG1655	- (wildtype)
MG1655- <i>tdk</i>	$\Delta tdk::tetRA$
MG1655- <i>tdk</i> , $\Delta lacZ::hsvTK-cat$	$\Delta tdk::tetRA$, $\Delta lacZ::hsvTK-cat$
MG1655 $\Delta lacZ::hsvTK-cat$	$\Delta lacZ::hsvTK-cat$
MG1655 $\Delta lacZ::hsvTK_{mod}-Km^r$	$\Delta lacZ::hsvTK_{mod}-Km^r$
MG1655 $\Delta lacZ::hsvTK_{mod}=Km^r$	$\Delta lacZ::hsvTK_{mod}=Km^r$
MG1655 $\Delta lacZ::hsvTK_{mod}^{mut}=Km^r$	$\Delta lacZ::hsvTK_{mod}^{mut}=Km^r$
MG1655 $\Delta lacZ::hsvTK_{mod}-hsvTK-Km^r$	$\Delta lacZ::hsvTK_{mod}-hsvTK-Km^r$
MG1655 $\Delta lacZ::hsvTK_{mod}-Km^r-hsvTK$	$\Delta lacZ::hsvTK_{mod}-Km^r-hsvTK$

3.4.3. エレクトロポレーションのためのコンピテント細胞の調製

エレクトロポレーションのためのコンピテント細胞は, Datsenko および Wanner らによって記述された方法(33)に従い調製された。簡潔には, pKD46 を保持する細胞を, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Carb.および 10 mM のアラビノースを含む LB 培地で培養し, Lambda-RED 酵素の発現が誘導した。OD ($\lambda = 600 \text{ nm}$)が 0.4-1.0 に達したとき, 細胞を氷冷しながら, 滅菌水および 10% v/v グリセロールで 2 回ずつ洗浄し, 最後に 20% v/v グリセロールで懸濁することで, エレクトロポレーション用コンピテント細胞を作製した。得られたエレクトロポレーション用コンピテント細胞(40 μL)に, 100 ng の PCR 断片を加え (氷上), この混合液は 0.1-cm-gap のキューベットの中でエレクトロポレーションされた (1.8 kV in a Gene Pulser electroporation apparatus (Bio-Rad, Hercules CA))。

3.4.4. TK セレクション

大腸菌株 MG1655 $\Delta tdk::tetRA/pKD46$, 大腸菌 MG1655 $\Delta lacZ::hsvTK-cat \Delta tdk::tetRA/pKD46$ を, それぞれ LB-Amp 培地 2 mL に植菌し, 15 時間, 30°C で振とう培養した。一晚培養液を 1 mL の SOB 培地 (Amp. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Arab. 10 mM, 5FdU 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +/-, dT 0-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IPTG 0.1 mM) で 48 時間振とう培養(30°C, 1000 rpm)し, 細胞密度 (OD₆₀₀) を測定した。

3.4.5. dP セレクションエスケープの発生頻度の評価

Table 3.3 に示す各種大腸菌株を、LB 培地（1 mL）で一晩培養（37°C, 200 r. p. m.）した培養液を、LB 寒天培地（dP 0 または 1000 nM を含む）に植菌した。セレクションエスケープの頻度を(1)式で定義し、算出した。

セレクションエスケープの頻度 [-] = 生菌数 (dP 1,000 nM) [-] / 生菌数 (dP 0 nM) [-] (1)

引用文献

1. Drake, J.W. (1991) A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 7160-7164.
2. Guo, H.H., Choe, J. and Loeb, L.A. (2004) Protein tolerance to random amino acid change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 9205-9210.
3. Bershtein, S. and Tawfik, D.S. (2008) Ohno's model revisited: measuring the frequency of potentially adaptive mutations under various mutational drifts. *Mol. Biol. Evol.*, **25**, 2311-2318.
4. Sawitzke, J.A., Thomason, L.C., Costantino, N., Bubunencko, M., Datta, S. and Court, D.L. (2007) Recombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. *Methods Enzymol.*, **421**, 171-199.
5. Wang, J., Sarov, M., Rientjes, J., Fu, J., Hollak, H., Kranz, H., Xie, W., Stewart, A.F. and Zhang, Y. (2006) An improved recombineering approach by adding RecA to lambda Red recombination. *Mol. Biotechnol.*, **32**, 43-53.
6. Drake, J.W. (1993) General antimutators are improbable. *J. Mol. Biol.*, **229**, 8-13.
7. DeVito, J.A. (2008) Recombineering with *tolC* as a selectable/counter-selectable marker: remodeling the rRNA operons of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **36**, e4.
8. Gregg, C.J., Lajoie, M.J., Napolitano, M.G., Mosberg, J.A., Goodman, D.B., Aach, J., Isaacs, F.J. and Church, G.M. (2014) Rational optimization of *tolC* as a powerful dual selectable marker for genome engineering. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 4779-4790.
9. Jensen, L.B., Ramos, J.L., Kaneva, Z. and Molin, S. (1993) A substrate-dependent biological containment system for *Pseudomonas putida* based on the *Escherichia coli* *gef* gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3713-3717.
10. Murphy, C.K., Stewart, E.J. and Beckwith, J. (1995) A double counter-selection system for the study of null alleles of essential genes in *Escherichia coli*. *Gene*, **155**, 1-7.
11. Stavropoulos, T.A. and Strathdee, C.A. (2001) Synergy between *tetA* and *rpsL* provides high-stringency positive and negative selection in bacterial artificial chromosome vectors. *Genomics*, **72**, 99-104.
12. Warming, S., Costantino, N., Court, D.L., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (2005) Simple and highly efficient BAC recombineering using *galK* selection. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e36.
13. Wong, Q.N., Ng, V.C., Lin, M.C., Kung, H.F., Chan, D. and Huang, J.D. (2005)

- Efficient and seamless DNA recombineering using a thymidylate synthase A selection system in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e59.
14. Rackham, O. and Chin, J.W. (2005) A network of orthogonal ribosome x mRNA pairs. *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 159-166.
 15. Hashimoto, M., Ichimura, T., Mizoguchi, H., Tanaka, K., Fujimitsu, K., Keyamura, K., Ote, T., Yamakawa, T., Yamazaki, Y., Mori, H. *et al.* (2005) Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol. Microbiol.*, **55**, 137-149.
 16. Li, X.T., Thomason, L.C., Sawitzke, J.A., Costantino, N. and Court, D.L. (2013) Positive and negative selection using the *tetA-sacB* cassette: recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*
 17. Yagil, E. and Rosner, A. (1971) Phosphorolysis of 5-fluoro-2'-deoxyuridine in *Escherichia coli* and its inhibition by nucleosides. *J. Bacteriol.*, **108**, 760-764.
 18. Dube, D.K., Black, M.E., Munir, K.M. and Loeb, L.A. (1993) Selection of new biologically active molecules from random nucleotide sequences. *Gene*, **137**, 41-47.
 19. Summers, W.C. and Raksin, P. (1993) A method for selection of mutations at the *tdk* locus in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **175**, 6049-6051.
 20. Dube, D.K., Horwitz, M.S. and Loeb, L.A. (1991) The association of thymidine kinase activity and thymidine transport in *Escherichia coli*. *Gene*, **99**, 25-29.
 21. Tokuriki, N., Stricher, F., Serrano, L. and Tawfik, D.S. (2008) How protein stability and new functions trade off. *PLoS Comput. Biol.*, **4**, e1000002.
 22. Waldo, G.S. (2003) Genetic screens and directed evolution for protein solubility. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 33-38.
 23. Maxwell, K.L., Mittermaier, A.K., Forman-Kay, J.D. and Davidson, A.R. (1999) A simple in vivo assay for increased protein solubility. *Protein Sci.*, **8**, 1908-1911.
 24. Schwartz, F., Maeda, N., Smithies, O., Hickey, R., Edelman, W., Skoultchi, A. and Kucherlapati, R. (1991) A dominant positive and negative selectable gene for use in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 10416-10420.
 25. Kuiper, M., Sanches, R., Gaken, J.A. and Bignon, Y.J. (2000) Cloning and characterization of a retroviral plasmid, pCC1, for combination suicide gene therapy. *Biotechniques*, **28**, 572-574, 576.
 26. Garrett, E.R. and Won, C.M. (1973) Kinetics and mechanisms of drug action on microorganisms. XVII. Bactericidal effects of penicillin, kanamycin, and rifampin with

- and without organism pretreatment with bacteriostatic chloramphenicol, tetracycline, and novobiocin. *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1666-1673.
27. Brock, T.D. (1961) Chloramphenicol. *Bacteriol. Rev.*, **25**, 32-48.
 28. Fujitani, Y., Yamamoto, K. and Kobayashi, I. (1995) Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length. *Genetics*, **140**, 797-809.
 29. Shen, P. and Huang, H.V. (1986) Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology. *Genetics*, **112**, 441-457.
 30. Lovett, S.T., Luisi-DeLuca, C. and Kolodner, R.D. (1988) The genetic dependence of recombination in *recD* mutants of *Escherichia coli*. *Genetics*, **120**, 37-45.
 31. Koskiniemi, S., Sun, S., Berg, O.G. and Andersson, D.I. (2012) Selection-driven gene loss in bacteria. *PLoS genetics*, **8**, e1002787.
 32. Lin, P.K. and Brown, D.M. (1989) Synthesis and duplex stability of oligonucleotides containing cytosine-thymine analogues. *Nucleic acids research*, **17**, 10373-10383.
 33. Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 6640-6645.

第四章

微生物ゲノムの多段階かつ連続な改変法

概要

リコンビニアリングは、微生物ゲノムを正確に、塩基レベルの解像度で編集することができる技術であり、フレキシブルなため、最も普及している。この手法は、2ステップの相同組換えと、ポジティブ/ネガティブ選択を必要とする。効率のよいネガティブ選択マーカーの不在が、手法のスループットを制限していた。加えて、“セレクションエスケープ”の発生が、本手法組における組換えプールに影響を与えるため、リコンビニアリング操作の度に手作業で取り除かなければならなかった。二章では、hsvTKのdPキナーゼ活性をネガティブ選択マーカーに用いることで、迅速に、かつ液操作のみでゲノム組換え体を選択できることを示した。三章では、hsvTKを重複することによって、セレクションエスケープを大きく低減することができた。本章では、リコンビニアリング法のスループットおよび堅牢性を改善するために、二および三章で作製したツールに加え、細胞数の調節という簡単な方法を加えて、シームレスにかつ自動化可能なゲノム工学のプロトコルを実現した。本手法をもちいて、4ラウンドのリコンビニアリングが、液体操作のみで、すなわち、途中でコロニー単離や遺伝型の確認をすることなく、10日で完了することができた。

4.1. 緒言

リコンビニアリングと呼ばれる、組換えを介したゲノム工学は、効率がよく便利な手法であり、ゲノム配列の欠失や置換、あるいは外来配列の挿入などを、ゲノム上のいかなる部位でも、塩基レベルの解像度で実施できる。特に、ファージ由来のメカニズム (Lambda-RED システム(1))は、その簡便さと使い勝手の良さから、広く使われてきた。この手法は、遺伝子サイズ (> 1 kb) の塩基配列の相同組換えの低い効率 (高くとも 10^{-4} 組換え体/全細胞(2)) のために、2 ステップの組換えと、引き続くポジティブ選択/ネガティブ選択から成る(1,3)。この手法の問題の一つは、優れたネガティブ選択法の不在であった。これまでに使われてきたネガティブマーカ―は全て、固体培地か(4,5)、あるいは特別な遺伝型(6-11)を必要とするという制約がある。

リコンビニアリングのもう一つの問題は、ネガティブ選択マーカ―に、ゲノム複製において変異が生じる、あるいはネガティブ選択マーカ―の毒性効果に対する耐性化変異がゲノム中に起こることである。ひとたびこのような”セレクションエスケープ”が生じれば、これらは速やかに細胞集団を占有し、続くステップでの組換え体の濃縮が不可能になる(8)。セレクションエスケープの発生頻度 (10^{-6} to 10^{-5} /cell) は、組換え体の収率 (10^{-5} to 10^{-4} /cell) に匹敵するため、実験者は、手作業によっていくつかのコロニーを単離し、その遺伝型を分析することによって、正しい組換え体を得る、という操作を、組換えのステップ毎に行なわなければならない。原理的には、上述の問題さえ解決すれば、2 ステップのリコンビニアリング法は、同じスキームで何度も繰り返すことができるだろう。

2 ステップのリコンビニアリング法は広く普及していること、そして遺伝子サイズのゲノム工学を、自動化可能なかたちで多重に繰り返す方法が不在を踏まえ、本研究では、この手法の改善を目指してきた。第三章で、液操作で効率のよいネガティブ選択マーカ―として、hsvTK/dP の組み合わせが有望であることを明らかにした。これによりついに、ポジティブ選択とネガティブ選択の両方が液操作で行なえるようになったため、組換え工程それぞれが液操作で行なえるようになった。第四章ではさらに、ネガティブ選択マーカ― (hsvTK) を重複させることによって、ネガティブ選択におけるセレクションエスケープが大きく低減できることを示した。本章では、二および三章で得た知見を統合し、組換え操作の全工程を液操作のみで実施するワークフロー (Figure 4.1) について述べる。

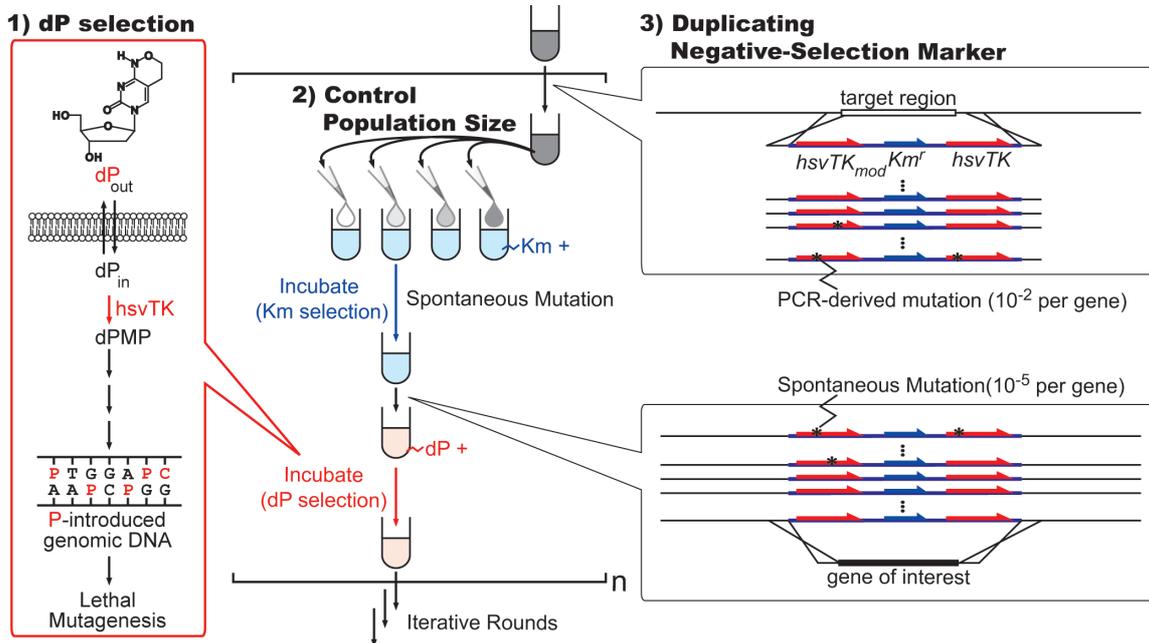


Figure 4.1. 多段階のリコンビニアリング操作

1) まず、dP キナーゼ活性が、液操作による、迅速かつ効率のよいネガティブ選択系として用いられた。dP 選択の機構は左パネルに示した。2) 次に、次ステップに移される細胞の数は、培養液をアリコート分割することによって調節され、PCR 由来の失活変異が、続くステップに繰り越さないようにした。3) 最後に、hsvTK 遺伝子の重複が、セレクションエスケープを大きく低減した。

4.2. 結果

4.2.1. 細胞数の調節による PCR 由来変異の除去

最も高い複製忠実度を持つ（エラー頻度が小さい）DNA ポリメラーゼを用いても、0.2-1%の組換え体は、不活性化された *hsvTK* を持つ（cf. 二章 2.2.7 項）。これをそのまま次の組換えステップ、すなわち選択カセットと外来配列の置換と、引き続く dP 選択へと持ち越すと、dP 選択に対する”セレクションエスケープ”が、 10^{-3} - 10^{-2} の頻度で生じる。Lambda-RED システムを用いた組換え反応の頻度がおおよそ 10^{-5} - 10^{-4} （組換え体/ステップ）であることを考えると、dP 選択後の細胞集団のほとんど全てがセレクションエスケープの細胞であり、組換え体は 10^{-3} - 10^{-1} の頻度でしか得られない。このような、セレクションエスケープの発生は、自律的な複製システムの建設においても重要な問題である(12-14)。これらの分野では、空間的に隔離することによって、”ある種の細胞”だけを排除可能であることは、理論的(15-17)および実験的(12)に示されてきた。

このような仕事に触発され、細胞集団をいくつかのアリコートに分割することで、PCR による遺伝子変異を持つ細胞を排除することを試みた。アリコートあたりの組換え体の数を 10 と設定すると、PCR のエラー頻度が 0.2%（cf. 二章 2.2.7 項および Table 2.4）のとき、アリコートそれぞれの中に、PCR に由来する不活性化変異を *hsvTK* 内に持つ細胞が混ざり込む確率は 10%である。実際に、*hsvTK* カセットとカナマイシン耐性遺伝子（*Km^r*、第二章）から成る選択カセット(HK cassette) (Figure 4.2(b))を用いて、最初のステップの組換えすなわち、*lacZ* 遺伝子の *p_L-gfp^{mut3.1}*(18)カセットへの置換を試みた (Figure 4.2(a), Round-1)。このとき、HK カセットエレクトロポレーションした、組換え体を含む細胞集団を 10 倍ずつ希釈したシリーズを作製し、組換え体が含まれる最も高い希釈率の aliquot を次のステップに移したところ、このラウンドののち、細胞集団の 90% (85/94)が、GFPmut3.1 の蛍光を示し、一方で、残りの 10% (9/94)は、蛍光を示さなかった(Table 4.1)。細胞数の調節により、セレクションエスケープが低減できた。

1 ラウンド目の組換えの後に得られた無蛍光の細胞から 9 つを選びだし、 $\Delta lacZ::hsvTK-Km^r$ 座位の配列解析を行なった(Table 4.2)。9 つのうち 8 つの無蛍光クローンは、*hsvTK* に失活変異が生じた HK カセットを持つ”セレクションエスケープ”であった。このうち 4 つは、*hsvTK* 遺伝子のなかに、アミノ酸変異を伴う遺伝子変異が生じていた。また、他の 3 つは *hsvTK* 遺伝子全体を欠失していた。さらに、残る 1 つは、HK カセット全体を失っていた。9 つの無蛍光クローンのうちの 1 つは、*gfp^{mut3.1}* 遺伝子が、適切な位置に挿入されていたものの、そのなかにストップ変異（本来アミノ酸をコードする塩基が、遺伝子の翻訳終結シグナルに変わる変異）が起きていた。これは、蛍光の有無についての選抜は行なっていないこと、および PCR 時の遺伝子変異頻度(ca. 10^{-2} /step, cf. 二章 2.2.7 項)は、細胞の自

然変異の頻度 ($10^{-5}/\text{step}$) よりも高いため、ここでみつかった $\text{gfp}^{\text{mut3.1}}$ 遺伝子内への変異は、PCR エラーによるものと考えられる。

4.2.2. セレクションエスケープの発生によるゲノム組換えスキームの破綻

ゲノムにコードされた hsvTK が変異 (PCR エラーあるいは細胞の自然変異に由来する) によってひとたび不活性化されると、dP 選択のステップで、そのようなクローンが細胞集団を支配すると予想される。このことを確認するために、二つの遺伝子置換 ($\Delta\text{lacZ}::p_L\text{-gfp}^{\text{mut3.1}}$ and $\Delta\text{proV}::p_{T5}\text{-mrfp}$) の連続実施を試みた (**Figure 4.2(a)**)。

4.2.2.節で得られた細胞全てを、偽陽性 (無蛍光の細胞) を除去することなく、二ラウンド目の組換え ($\Delta\text{proV}::p_{T5}\text{-mrfp}$) を実施した。このラウンドでは、最初のステップ (すなわち、選択カセットの proV 座位への挿入およびカナマイシン選択) の後に、多数の無蛍光の細胞が得られた。続く 2 ステップ目 ($p_{T5}\text{-mrfp}$ カセットと選択カセットとの置換、および dP 選択) の後には、細胞集団は無蛍光かつカナマイシン耐性の細胞で占有された (**Table 4.1**)。

4.2.3. ネガティブ選択マーカー重複型の選択カセットを用いたゲノム組換えの連続実施

遺伝子変異頻度を大きく低減することは困難であることが知られている(19)。4 章で、 hsvTK を重複させることによって、セレクションエスケープの頻度を $<2 \times 10^{-12}$ にまで低減できることを示した。この、HKH カセット (**Figure 4.2(c)**) を用いて、2 ラウンドの連続組換えを試みた。今回は、1 ラウンド目の組換え、すなわち、Km セレクションと dP セレクションの後に、調べた全て (94/94) のクローンが、GFP 蛍光とカナマイシンに対する感受性両方を示した (**Table 4.1**)。これは、細胞集団のなかに、事実上セレクションエスケープ (変異により失活した選択カセットを保持する細胞) がほとんど存在しない ($<1\%$) ことを示している。

この細胞集団を、そのまま 2 ラウンド目の組換えに用いたところ、このラウンド ($\Delta\text{proV}::p_{T5}\text{-mrfp}$) においても、調べた全て (94/94) のクローンが、二回組換え体 (すなわち、 $p_L\text{-gfp}^{\text{mut3.1}}$ と $p_{T5}\text{-mrfp}$ 両方のカセットをゲノムに持つ) であった (**Table 4.1**)。そのようにして、ネガティブ選択マーカー遺伝子 (hsvTK) を重複で、セレクションエスケープが大きく低減されたことによって、ついに、コロニー単離と遺伝子型の確認なしに、2 ラウンドの組換えを連続に実施できた。

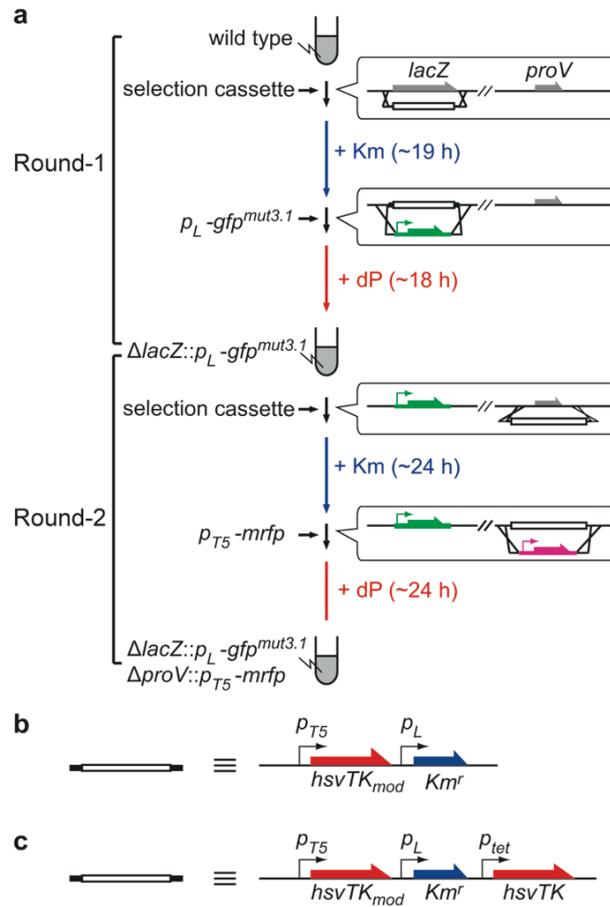


Figure 4.2. 2 ラウンドの連続組換えの実験ワークフロー

(A) 全体スキーム。 $lacZ$ および $proV$ 座位が, (B) 1 コピーの $hsvTK$ を持つ選択カセット (HK カセット) あるいは(C), (D) 2 コピーの $hsvTK$ を持つ選択カセット(HKH カセットまたは HHK)を用いて, p_L - $gfp^{mut3.1}$ および p_{T5} - $mrfp$ カセットにそれぞれ逐次置換された。

Table 4.1. 組換え体集団の表現型/遺伝型の解析; Figure 4.2(a)に示す各ラウンドの組換えの後, 94 クローンをランダムに選びだし, 増殖させ, 表現型 (蛍光) および遺伝型 (ゲノム PCR) を解析した。

Phenotype (Fluorescence)	Round-1			Round-2			
	GFP ^{mut3.1} +	GFP ^{mut3.1} -		GFP ^{mut3.1} + /mRFP +	GFP ^{mut3.1} - /mRFP +	GFP ^{mut3.1} + /mRFP -	GFP ^{mut3.1} - /mRFP -
Genotype ¹ (PCR)	NT ²	+	-	NT ²	+	+	NT ²
HK cassette	85 (90%)	1 (1%)	8 (9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	94 (100%)
HKH cassette	94 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	90 (96%)	2 (2%)	2 (2%)	0 (0%)

^{1.} $\Delta lacZ::p_L-gfp^{mut3.1}$ (round 1)あるいは $\Delta lacZ::p_L-gfp^{mut3.1}$ と $\Delta proV::p_{T5}-mrfp$ (round 2)に相当する PCR バンドが得られたクローン数。遺伝型解析に用いたプライマー(P34 and P43 ($p_L-gfp^{mut3.1}$), P35 and P40 ($p_{T5}-mrfp$) の配列は **Appendix 1** に示す。

^{2.} NT; not tested.

Table 4.2. 第一ラウンドのリコンビニアリングでみられた無蛍光クローンの遺伝型

clone number	HK cassette	Genotype
1	No	mutation in <i>gfp^{mut3.1}</i> (E205 stop)
2	Yes	mutation in <i>hsvTK</i> (D228V)
3	Yes	mutation in <i>hsvTK</i> (D228V)
4	Yes	mutation in <i>hsvTK</i> (D228V)
5	Yes	mutation in <i>hsvTK</i> (T158P)
6	Yes	<i>hsvTK</i> missing
7	Yes	<i>hsvTK</i> missing
8	Yes	<i>hsvTK</i> missing
9	No	No PCR product

HK カセットを用いた二ステップのリコンビニアリングの、第一ラウンドから(**Table 4.1**), *GFP^{mut3.1}* の蛍光を示さない 9 つのクローンを個別にピックし、その *lacZ* (あるいは $\Delta*lacZ*::*hsvTK*$) 座位の配列解析を行なった。PCR 増幅およびシーケンスに用いたプライマー (P30, 33, P44, and P45) は **Appendix 1** に示す。

4.2.4. *mrfp*遺伝子の連続組換え

マルチラウンドの組換えの、連続的なワークフローが確立できたので (**Figure 4.2**) , 本手法を連続的な遺伝子置換に適用し, 大腸菌ゲノム内の4つの座位 (*yjiDE*, *proV*, *lacZ*, and *rssB*) に, PCR作製した*pT7-mrfp*断片 (*mrfp*遺伝子がT7プロモータ下流にコードされている) を, 連続に挿入することを試みた (**Figure 4.3(A)**) 。T7プロモータ下流の*mrfp*遺伝子の発現を可能にするために, MG1655株の*araB*座位をあらかじめT7RNAPに置換した。得られた株, MG165-AIを4ラウンドの組換えに用いた。それぞれのラウンドにおいて, 対象領域に対する40 bpのホモロジーマームを, PCRによって付したHKHカセットを, 細胞 (MG1655-AI) にエレクトロポレーションし, カナマイシン選択 (24時間) を行なった。得られた細胞に, *pT7-mrfp*カセットをエレクトロポレーションし, dP選択を18-30時間行なった。得られた細胞集団を二つに分割し, 一方は解析のために保存し, 他方は次のラウンドの組換えに用いた。この過程を, 途中で止めることなく, 4ラウンド繰り返した。

4ラウンドの挿入/置換の各ステップにおいて, 表現型, すなわち細胞集団のRFP蛍光をフローサイトメーターによって調べた (**Figure 4.3(B)**) 。蛍光強度は, ラウンド数の増加に伴い前進的に増加し, ゲノム上の*pT7-mrfp*カセットのコピー数が段階的に増えていることが示唆された。

*pT7-mrfp*カセットの前進的な挿入は, PCR解析によっても解析した (**Figure 4.4**) 。各ラウンドのKmおよびdP選択後に, "中間体"の細胞混合液をPCR解析した。ここで, PCR解析には4つのプライマー (**Appendix 1**) をそれぞれの座位に対して使用した。プライマーミックスには, ターゲット領域の外側にアニールする共通のプライマー (P27, P35 P30, およびP37) と, 置換前の配列 (P28, P36 P31, およびP39) , HKHカセット (P42) , および*pT7-mrfp* (P40およびP41) にそれぞれアニールする3つのプライマーを含む (**Figure 4.4**) 。第一ラウンドの, 最初の細胞混合液では, 元の配列 (*yjiDE*) に相当するPCRバンド (218 bp) のみが検出された。HKHカセットとの配列置換と, 引き続きKm選択の後には, HKHカセットに相当するバンド (322 bp) のみが検出された。*p_{T7}-mrfp*のエレクトロポレーションと, 引き続きdP選択の後には, *p_{T7}-mrfp*の挿入に相当するバンド (765 bp) のみが検出された。続く3ラウンドの組換えすべてにおいて, ターゲット領域においてのみ, 遺伝型の完全なシフトがみられた (**Figure 4.4**) 。全てのPCRは, 単離された細胞ではなく, 細胞培養液から直接行なわれているため, **Figure 4.4**に示す結果は, 細胞集団全体の遺伝型の分布を表している。4ラウンドの組換えにおける8ステップすべてで, "正しくない"バンドは検出されなかったことから, "正しくない"遺伝型を持つクローン, 例えばセレクションエスケープのクローンは, 検出下限以下であることが示された。実際に, 4ラウンドの組換え後の細胞集団から7つのク

クローンを単離して調べたところ、全てのクローンで、 $p_{T7}\text{-mrfp}$ の挿入に相当するバンドが、すべての座位について確認された (Figure 4.5)。

本実験では、各ステップの操作時間を短縮する努力は投じなかった。それでもなお、1ラウンドは、組換え体の増殖速度に依存するものの、概ね2-3日で完了する (cf. 実験項; 4.4.4)。今回は、4ラウンドの組換えがおよそ10日で完了した。また、すべてのステップは液体操作のみで実施され、コロニー単離および各コロニーに対する多数のPCR反応など、手作業によって正しい組換え体を同定するという作業は不要であった。

細胞の蛍光は、組換えラウンド数の増加にともない、ゆっくりと横ばいになった。加えて、後半のラウンドでは、細胞の増殖速度の大きな低下がみられた。これはおそらく、宿主細胞への代謝負荷によるものと考えられる。4ラウンド目において、蛍光シグナルのピークが二つみられ、同時に、無蛍光の細胞もみられた。二つの蛍光シグナルピークのうち低い方は、3つの機能する $p_{T7}\text{-mrfp}$ カセットと、1つのPCRエラーによって不活性化された $p_{T7}\text{-mrfp}$ カセットをもつ細胞であると考えられる。他方、無蛍光の集団は、T7RNAPに不活性化変異が生じたクローンであると考えられる。

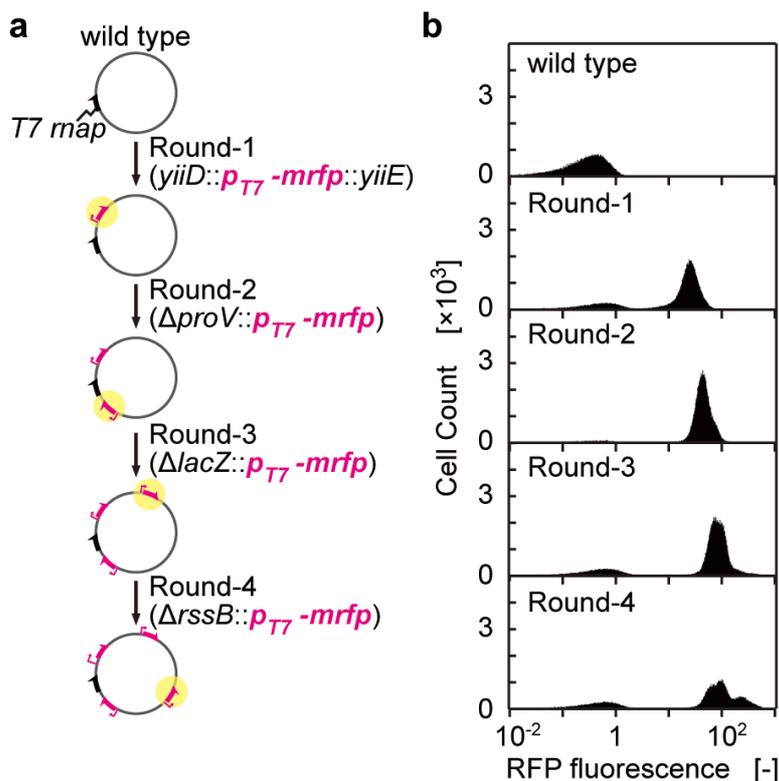


Figure 4.3 $p_{T7}\text{-mrfp}$ をコードするDNA断片による連続ゲノム組換え

(a) 4ラウンドの遺伝子置換のフローチャート, (b) 各ラウンドのリコンビニアリングの後の、細胞集団のフローサイトメーター解析

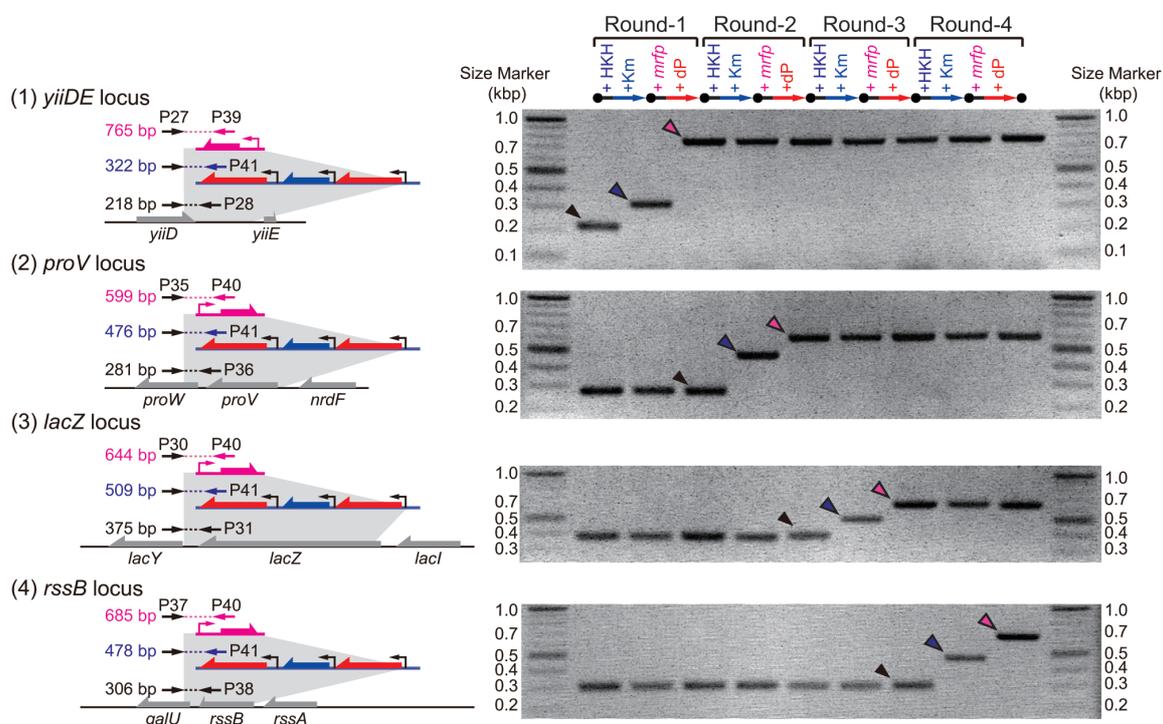


Figure 4.4. それぞれのラウンドの細胞集団(Figure 4.3)の4つの異なる座位に関する遺伝型解析

4ラウンドの連続した遺伝子置換の、前、後、そしてその間の9つ全ての培養液が、競争PCR解析に用いられた；PCRには、標的配列、*pT7-mrfp*、そしてHKHカセットにアニールする3つのプライマーを用いた。T各座位の構成、プライマー、および予想されるPCR産物の長さ (bp) は、(1) *yiiDE*, (2) *proV*, (3) *lacZ*, および (4) *rssB* 座位についてそれぞれ示す。プライマー配列はAppendix 1に示す。

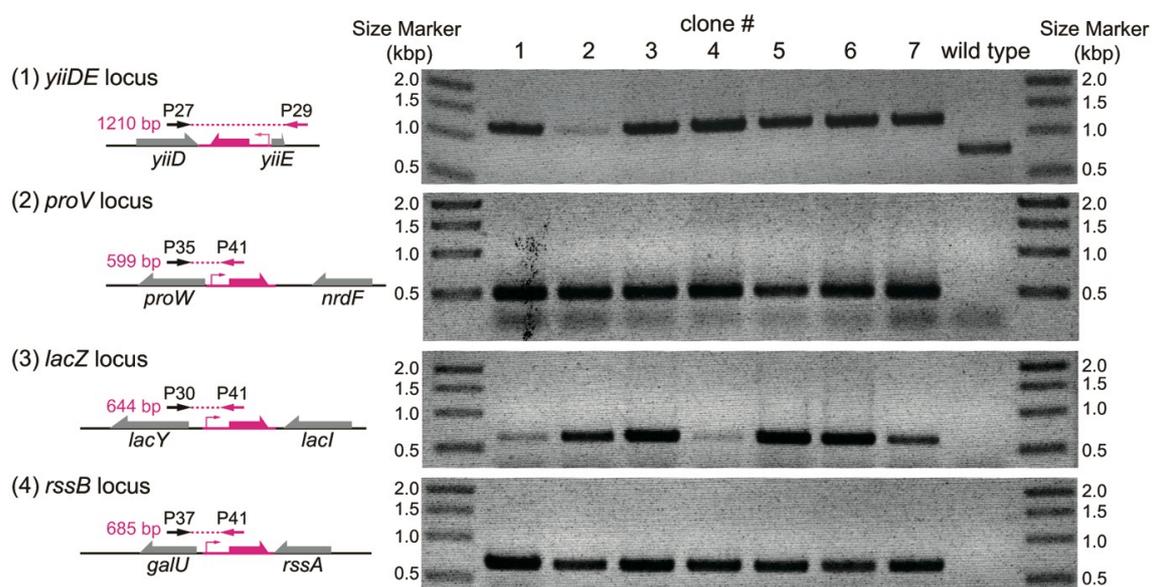


Figure 4.5. ラウンド4の細胞集団(Figure 4.3)から単離されたクローンの4つの異なる座位に関する遺伝型解析

7つのクローンが個別に単離され, *mrfp*遺伝子にアニーリングするプライマーを用いてPCR解析された。各座位の構成, プライマー, および予想されるPCR産物の長さ (bp) は, (1) *yiiDE*, (2) *proV*, (3) *lacZ*, および (4) *rssB* 座位についてそれぞれ示す。プライマー配列は**Appendix 1**に示す。

4.3. 考察

4.3.1. 組換え操作の連続実施における細胞数の調節の重要性

本章では、PCRエラーにより生じるセクションエスケープを、次のステップ、すなわちポジティブ選択に持ち越す細胞数を制限することによって除去することに成功した。PCRエラーは、ゲノム複製に比べて頻度が高い。そのため、PCRによって生じるセクションエスケープを除去するプロセスは、組換え操作の連続に実施する上で重要である。

細胞数調節のプロセス(#2 in **Figure 4.1**)は、PCRエラーに由来するセクションエスケープの低減に有効であるが、それでもこれが除去できない一定のリスクがある。細胞集団をいくつかのアリコートに分割したとき、アリコートあたりの組換え体の数を10、PCRのエラー頻度を0.2% (**cf. 2.2.7**) とすると、アリコートそれぞれの中に、PCRに由来する不活性化変異をhsvTK内に持つ細胞が混ざり込む確率は10%である (**cf. 4.2.1**)。すなわち、10ラウンドの組換えを行なうとき、そのうち一回は、セクションエスケープが混ざり込む計算になる。そこで、細胞集団を分割する際、2つ以上の逐次希釈系列を作製することを推奨する。セクションエスケープが系に混ざり込んだ場合、次のステップで容易に区別することができ、もう一つの系列においてもセクションエスケープがコンタミしている確率は低い(1%)。

このような方法で、原理的には、10個の系列を都度用意することで、このようなリスクを $(0.1)^{10} = 10^{-10}$ 、つまり事実上ゼロにまで低減できる。本手法は、全工程を液操作で行なえることから、ロボティクスと組み合わせることで、数百の系列を同時に扱うことができる。そのため、10以上の大規模ゲノム改変プロジェクトを並列に進行することができる。

細胞数調節のプロセス(#2 in **Figure 4.1**)が適切に行なわれれば、セクションエスケープ (dP耐性かつKm耐性のクローン)は、HKHカセットを使うとき、 10^{-10} にまで低減される。本研究では、DNA調製のスループットを高めるためにすべてのDNAカセットをPCRによって調製したが、これをPCRではなくプラスミドから (例えば制限酵素処理によって) 調製する方式に変更すれば、細胞数の調節操作(#2 in **Figure 4.1**)は省くことができる。

4.3.2. 本手法の適用限界 (1): 繰返し回数の上限

本手法の繰返し限界を規定する要因の一つは、PCR作製したカセットに起こる失活変異である。二つの実験が良く示したように、一定の割合 (数%) で、"挿入されたカセット (**Figure 4.3** における *pT7-mrfp* カセット)"にも失活変異が起こることは避けられない。選択カセットの場合とは異なり、導入配列の機能保持についての選択を行なうことはできない。各ラウンドで、導入した配列に変異が起こった細胞が生じる頻度は一定であっても、いずれかの部位に変異がある細胞の割合は、ラウンドを経る度に増加する。変異が起こる確率を1%とすると、10

ラウンドの組換えののちには、どれか一つの領域で変異が起こっている細胞の割合は、10%にまで増え、100ラウンド後には100%に達するため、原理的には、本手法の繰返し上限は、10-50ラウンドである予想される。

4.3.1で述べたように、DNAカセットに起こるPCR由来の遺伝子変異は、各組換え操作において、細胞数を調節することによって除去することができる。この操作を外來配列の導入と引き続くdP選択の過程にも適用すれば、導入した配列が遺伝子変異を持つ可能性を低減することができる。また、上述のように、外來配列もPCRを介さず、配列確認済みのプラスミドDNAから調製すれば、遺伝子変異に出会うリスクはさらに低減される。

4.3.3. 本手法の適用限界 (2): ゲノム改変の種類

本手法の適用限界は、おおよそLambda-REDシステムに準ずる。本手法は、セレクションエスケープの発生頻度が、目的の組換えの頻度に比べて十分低く抑えられていることが重要である。セレクションエスケープの発生頻度が十分低いときにおいても、組換えの頻度が相対的に低いときには、細胞集団がセレクションに占有されうる。とくに、長い(3.5 kb)を超える遺伝子の相同組換えの効率は低い(21)ため、例えば長いホモロジーアーム(0.1-1 kbp)をDNAカセットに付して組換えの頻度を向上させる(22)、などの工夫が必要だと予想される。このことについては、第五章において検証した。

4.4. 実験項

4.4.1. 試薬

6-(β-D-2-deoxyribofuranosyl)-3,4-dihydro-8H-pyrimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-one (dP) (23)は, Berry and Associates (Bishop Circle East, Dexter, MI; cat. PY7270)から購入した。オリゴヌクレオチドはFASMAC Co., Ltd (Kanagawa, Japan)によって合成された。他の全ての試薬は特級試薬を用いた。構成物質は必要に応じて以下の濃度で培地に添加した:50 μg/mL カルベニシリン(Carb), 30 μg/mL, クロラムフェニコール(Cm), and 50 μg/mL カナマイシン(Km)。

4.4.2. 株およびプラスミド

本章で使用した全てのプラスミドは**Table 4.3**に示した。大腸菌株K-12 MG1655株を全ての実験で使用した。一部, プラスミド作製のために, 大腸菌株XL10-Gold-Kan^r (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を使用した。pKD46プラスミド(1)は, L-アラビノースによってLambda-RED組換え系を誘導するために, ゲノム編集の前にMG1655およびその派生株に導入した。MG1655-AI (MG1655Δ*araB*::*T7rnsp-tetA*) は, BL21-AITM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)からPCR増幅した”AraC/pBAD-T7RNAPカセットでMG1655株の*araB*遺伝子を置換することで作製した。

Table 4.3. 本章で用いたプラスミド

Plasmid name	Genotype	Ori/marker	Source
pHK	<i>p_{T5}-hsvTK_{mod}-p_L-Km^r</i>	ColE1/Amp ^r	This study
pHKH	<i>p_{T5}-hsvTK_{mod}-p_L-Km^r-p_{tet}-hsvTK</i>	ColE1/Amp ^r	This study
pHHK	<i>p_{T5}-hsvTK_{mod} -p_L-hsvTK-Km^r</i>	ColE1/Amp ^r	This study
pUC-p _L - <i>gfp</i> ^{mut3.1}	<i>p_L-gfp^{mut3.1}</i>	ColE1/Amp ^r	This study
pJ204-p _{T5} - <i>mrfp</i>	<i>p_{T5}-mrfp</i>	ColE1/Amp ^r	This study
pET23d- <i>mrfp</i>	<i>p_{T7}-mrfp</i>	pBR322/Amp ^r	This study
pKD46	<i>pBAD/AraC-Lambda RED_{vβα}</i>	pSC101/Amp ^r	(1)

4.4.3. DNAカセットの調製

選択カセットおよび挿入カセットは, **Appendix 1**に示すプライマーセットを用いて, ターゲット領域へのホモロジーサイトを付しながらPCR増幅された。PCR反応は, 特別記載がない限り, KOD DNA polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて行なった。PCR産物を, DpnI処理およびゲル精製することによってテンプレートとなったプラスミドあるいはゲノムDNAを除去した。

4.4.4. エレクトロポレーションのためのコンピテント細胞の調製

エレクトロポレーションのためのコンピテント細胞は、DatsenkoおよびWannerらによって記述された方法(1)に従い調製された。簡潔には、pKD46を保持する細胞を、50 µg/mLのCarb. および10 mMのアラビノースを含むLB培地で培養し、Lambda-RED酵素の発現が誘導した。OD ($\lambda = 600$ nm)が0.4-1.0に達したとき、細胞を氷冷しながら、滅菌水および10% v/vグリセロールで2回ずつ洗浄し、最後に20% v/vグリセロールで懸濁することで、エレクトロポレーション用コンピテント細胞を作製した。得られたエレクトロポレーション用コンピテント細胞(40 µL)に、100 ngのPCR断片を加え(氷上)、この混合液は0.1-cm-gapのキュベットの中でエレクトロポレーションされた(1.8 kV in a Gene Pulser electroporation apparatus (Bio-Rad, Hercules CA))。

4.4.5. 遺伝子挿入/置換の連続実施

ステップ1: PCRにより適切なホモロジーアーム付しながら増幅された選択カセット(100 ng)を、MG1655株(あるいはMG1655-AI株)のコンピテントセル(40 µL)にエレクトロポレーションした。形質転換体はすぐに1 mLのLB-Carb培地に懸濁され、振とう培養された(30°C, 3 h)。通常、培養液はホモロジーアームの長さ、あるいはDNAカセットの長さによって、 10^2 - 10^5 の組換え体を含むその後、培養液を、Km耐性細胞の数が10を下回るようにアリコート分割した(この操作は、エレクトロポレーションされたDNA断片がPCR生成されていなければ省くことができる)。このアリコートのうち一つを、LB-Carb-Km培地(2 mL)に植菌し、振とう培養(24 h, 30°C)した。細胞を回収し、10 mMのL-アラビノースを含むLB-Carb-Kmに植菌し、上述(4.4.4)のとおりエレクトロポレーションのためのコンピテントセルを調製した。

ステップ2: 精製されたDNA断片、*mrfp*遺伝子がT7プロモータ下流にコードされ、適切なホモロジーアームに挟まれている(p_{T7} -*mrfp*, 100 ng)を、ステップ1で調製したエレクトロポレーションのためのコンピテントセル(40 µL)に加えた。得られた混合液をエレクトロポレーションされ、すぐに1 mLのLB-Carb培地に懸濁された。振とう培養(~3 h at 30°C)の後、培養液の一部を、LB-Carb-dP培地に植菌し、定常期に達するまで振とう培養(30°C for 18-30 h)した。得られた細胞は、10 mMのL-アラビノースを含むLB-Carb培地に植菌され、上述の方法でエレクトロポレーションのためのコンピテントセル調製に用いられた。このストックは、次のラウンドのステップ1に使用された。

4ラウンドのレコンビニアリング(ターゲット領域を p_{T7} -*mrfp*カセットに置き換える2ステップの組換え)は、ステップ1および2を、*yjiDE*, *proV*, *lacZ*, and *rssB*を標的として、連続に行なわれた。

4.4.6. 蛍光分析

大腸菌株の蛍光は、Fluoroskan Ascent (Thermo-Labsystems, Helsinki, Finland)を用いて調べた。次のexcitation/emissionの組み合わせを用いた: GFP^{mut3.1}, 485/527 nm, mRFP, 584/620 nm。細胞数による変動を是正するため、蛍光強度は培養液の細胞密度(OD₆₀₀)によって標準化された。細胞密度は、透明な 96ウェルプレートを使い、SpectraMax Plus 384 system (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)によって測定された。

細胞混合液のフローサイトメーター解析(**Figure 4.3**)は、次のように行なった; 各ラウンドの組換え操作後のグリセロールストックは、LB培地 (2 mL) で一晚培養 (5 mL試験管, 37°C, 200 rpm)。そして、20 µLの培養液は、10 mMのL-アラビノースを含むLB培地 (2 mL) に植菌され、振とう培養 (37°C, 3 h) された。およそ10,000細胞が、561 nm laserとmRFP (586/15)用の適切なフィルターセットを備えた、MACSQuant® VYB flow cytometer (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany) によって解析された。データはMACSQuant® Analyzer (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany)を用いて分析した。

引用文献

1. Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 6640-6645.
2. Sawitzke, J.A., Thomason, L.C., Costantino, N., Bubunencko, M., Datta, S. and Court, D.L. (2007) Recombineering: *in vivo* genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. *Methods Enzymol.*, **421**, 171-199.
3. Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P. and Stewart, A.F. (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.*, **20**, 123-128.
4. Blomfield, I.C., Vaughn, V., Rest, R.F. and Eisenstein, B.I. (1991) Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol. Microbiol.*, **5**, 1447-1457.
5. Li, X.T., Thomason, L.C., Sawitzke, J.A., Costantino, N. and Court, D.L. (2013) Positive and negative selection using the *tetA-sacB* cassette: recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*
6. Bird, A.W., Erler, A., Fu, J., Heriche, J.K., Maresca, M., Zhang, Y., Hyman, A.A. and Stewart, A.F. (2012) High-efficiency counterselection recombineering for site-directed mutagenesis in bacterial artificial chromosomes. *Nature methods*, **9**, 103-109.
7. DeVito, J.A. (2008) Recombineering with *toIC* as a selectable/counter-selectable marker: remodeling the rRNA operons of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **36**, e4.
8. Gregg, C.J., Lajoie, M.J., Napolitano, M.G., Mosberg, J.A., Goodman, D.B., Aach, J., Isaacs, F.J. and Church, G.M. (2014) Rational optimization of *toIC* as a powerful dual selectable marker for genome engineering. *Nucleic Acids Res.*
9. Stavropoulos, T.A. and Strathdee, C.A. (2001) Synergy between *tetA* and *rpsL* provides high-stringency positive and negative selection in bacterial artificial chromosome vectors. *Genomics*, **72**, 99-104.
10. Warming, S., Costantino, N., Court, D.L., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (2005) Simple and highly efficient BAC recombineering using *galK* selection. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e36.
11. Wong, Q.N., Ng, V.C., Lin, M.C., Kung, H.F., Chan, D. and Huang, J.D. (2005) Efficient and seamless DNA recombineering using a thymidylate synthase A selection system in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e59.
12. Bansho, Y., Ichihashi, N., Kazuta, Y., Matsuura, T., Suzuki, H. and Yomo, T. (2012) Importance of parasite RNA species repression for prolonged translation-coupled RNA self-replication. *Chem.*

- Biol.*, **19**, 478-487.
13. Breaker, R.R. and Joyce, G.F. (1994) Emergence of a replicating species from an *in vitro* RNA evolution reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 6093-6097.
 14. Hanczyc, M.M. and Dorit, R.L. (1998) Experimental evolution of complexity: *in vitro* emergence of intermolecular ribozyme interactions. *RNA*, **4**, 268-275.
 15. Bresch, C., Niesert, U. and Harnasch, D. (1980) Hypercycles, parasites and packages. *J. Theor. Biol.*, **85**, 399-405.
 16. Szathmary, E. and Smith, J.M. (1995) The major evolutionary transitions. *Nature*, **374**, 227-232.
 17. Verroust, P.J., Adam, C., Smith, M.D., Richard-Lenoble, D., Kourilsky, O. and Morel-Maroger, L.J. (1979) Circulating immune complexes and C3d in human parasitosis. *Kidney Int.*, **16**, 9-14.
 18. Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**, 33-38.
 19. Drake, J.W. (1993) General antimutators are improbable. *J. Mol. Biol.*, **229**, 8-13.
 20. Koskiniemi, S., Sun, S., Berg, O.G. and Andersson, D.I. (2012) Selection-driven gene loss in bacteria. *PLoS genetics*, **8**, e1002787.
 21. Kuhlman, T.E. and Cox, E.C. (2010) Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs. *Nucleic Acids Res.*, **38**, e92.
 22. Fujitani, Y., Yamamoto, K. and Kobayashi, I. (1995) Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length. *Genetics*, **140**, 797-809.
 23. Lin, P.K. and Brown, D.M. (1989) Synthesis and duplex stability of oligonucleotides containing cytosine-thymine analogues. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 10373-10383.

第五章

イソプレノイド増産を目指した多段階かつ並列なゲノム編集

概要

「あらゆる化合物・化成品をバイオ生産」を目標に、有価化合物（医薬品、ファインケミカル、燃料、材料）の効率的でスケラブルな生物生産技術の開発が急務とされている。このためには、細胞内代謝ネットワークを大規模に改変し、炭素源の殆どを増殖ではなく標的化合物の生産にまわす宿主、生産した物質の大量蓄積に耐える宿主、を作出する必要がある。しかし、従来の点突然変異やひとつふたつの遺伝子導入による細胞工学技術では、どのような形質（スペック）も、せいぜい数倍程度のあがり幅しかない。何十何百という遺伝子の導入／削除を、自在に、高速に、そして並列に行うことによってのみ、数百倍数千倍のオーダーでの機能向上が可能となる。本章では、これまでに開発した微生物ゲノムの連続改変法を用いて、大腸菌の連続ゲノム工学を敢行する。散在する「ちょっとよくなる」改良研究の所産を集積し、とくに有価イソプレノイドやカロテノイドの大量生産菌の樹立を試みた。

5.1. 緒言

イソプレノイドは、イソプレン単位 (C5) で構成される多様な構造を持つ天然化合物群であり、知られるだけで 55,000、未知のものを含めると自然界に 100 万種もあると言われている (1)。その中には、医薬、化成品、そしてディーゼル/ジェット燃料などとして価値のある化合物が数多く含まれている (2)。最大の特徴はその構造多様性であり、さまざまな物性を示す多数の化合物が、数種の共通の基質 (C5-C25 ニリン酸) から数ステップの酵素反応により合成できる。これは、イソプレノイド経路の最終産物は、最下流の合成酵素 (セット) を取り替えるだけで、用途に合わせた最適な化合物をオンデマンドに供給できることを意味する。そのため、各種イソプレノイドを、再生可能な炭素源 (グルコースやグリセロール) から効率よく生産する微生物生産系の確立は重要である (3-8)。

これまでに、イソプレノイド前駆体の供給経路 (**Figure 5.1**) を強化することで、イソプレノイドの増産が試みられてきた。しかし、従来の点突然変異やひとつひとつの遺伝子導入による細胞工学技術では、どのような形質 (スペック) も、せいぜい数倍程度のあがり幅しかない。何十何百という遺伝子の導入/削除を、自在に、高速に、そして並列に行うことによってのみ、数百数千倍のオーダーでの機能向上が可能となると予想されているが (9)、ゲノム改変法のスループットの低さから、既知の遺伝子改変をコンビナトリアルに集積する試みは、数例 (10,11) が知られるのみであった。

本章では、イソプレノイドの高効率な微生物生産のための、多段階のゲノム改変操作を行なった。このために、第五章で開発した「微生物ゲノムの連続改変法」を用いた。この手法は、全工程を液体のみで、かつ複数のゲノム改変操作を並列に行なうことができるため、イソプレノイド増産に寄与する既知の遺伝型 (9 つの遺伝子の欠損/11 の遺伝子導入, **Table 5.1**) をすべて集約する 9 ステップの組換えを、簡単に行なうことができる。また、中間体や、遺伝型の組み合わせも同時に検討可能である。作製した合計 4 種の株のイソプレノイド生産量を評価することで、遺伝子欠損/導入の未知のシナジー効果を探索した。またその過程で、本手法の適用限界のいくつかが明らかになった。

Table 5.1. イソプレノイド増産に資する既知の遺伝型

genotype	gene size [bp]	Function	Reference
$\Delta yliE$	2,349	putative membrane-anchored cyclic-di-GMP phosphodiesterase	(12)
$\Delta yfjP$	750	acyl CoA esterase	(12)
$\Delta rssB$	1,014	response regulator binding RpoS to initiate proteolysis by ClpXP	(12)
$\Delta clpXP$	2,024	protease	(12)
$\Delta gdhA$	1,344	glutamate dehydrogenase	(13)
$\Delta aceE$	2,664	pyruvate dehydrogenase	(13)
$\Delta fdhF$	2,148	formate dehydrogenase-H	(13)
$\Delta pykF$	1,413	pyruvate kinase I	(14)
$\Delta pykA$	1,443	pyruvate kinase II	(14)
+ <i>idi</i>	549	isopentenyl diphosphate isomerase	(15)
+ <i>dxs</i>	1,863	1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase	(15)
+ <i>ispDF</i>	1,190	Precursor synthesis	(15)
+ <i>yggT</i>	567	putative inner membrane protein	(13)
+ <i>appY</i>	750	global transcriptional activator	(13)
+ <i>rpoS</i>	993	RNA polymerase, sigma S factor	(13)
+ <i>pps</i>	2,379	phosphoenolpyruvate synthase	(14)
+ <i>ycgW, yjiD, elbB</i>	1,420	anti-RssB factors	(13)

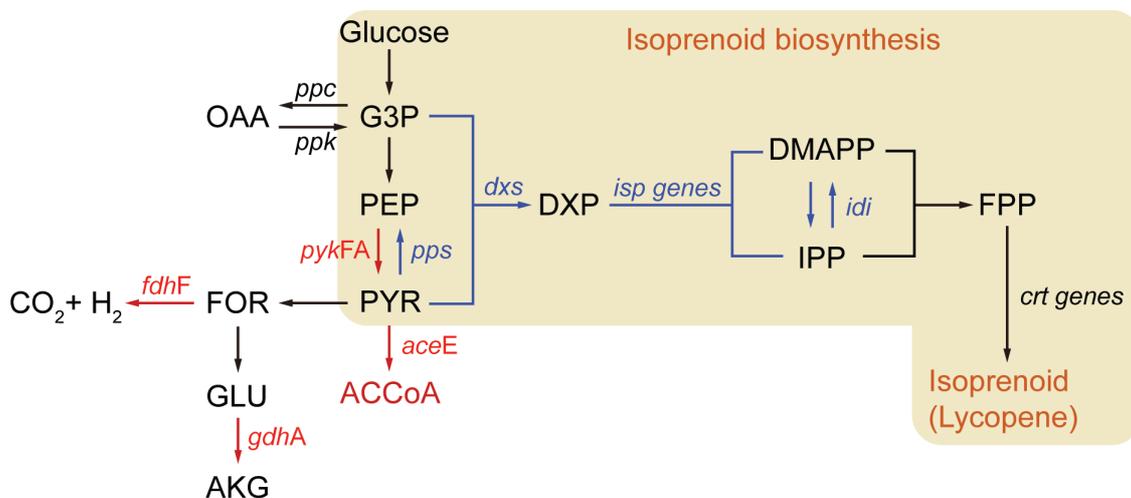


Figure. 5.1 イソプレノイド（リコペン）生合成経路とその競合経路

イソプレノイド（リコペン）合成経路とその競合経路を示す。大腸菌は glucose から FPP を生成する経路を有し、これにイソプレノイド/カロテノイドを生成する酵素 (ex, *crt genes*, etc...) を導入することにより、イソプレノイドを生産する。Table 5.1 に含まれる遺伝子のうち、欠損候補遺伝子を赤字、追加発現の候補遺伝子を青字で示す。

略語; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; PYR, pyruvate; DXP, 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; FPP, farnesyl pyrophosphate; ACCoA, acetyl-CoA; MVA, mevalonate; FOR, formate; GLU, glutamate; AKG, alpha-keto glutarate ; OAA, oxaloacetate; *dxs*, 1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase; *idi*, isopentenyl diphosphate isomerase; *pykF*, pyruvate kinase I; *pykA*, pyruvate kinase II; *ppc*, phosphoenolpyruvate carboxylase; *pck*, phosphoenolpyruvate carboxykinase; *aceE*, pyruvate dehydrogenase; *fdhF*, formate dehydrogenase; *gdhA*, glutamate dehydrogenase;

5.2. 結果

5.2.1. 候補遺伝子の欠損がイソプレノイド生産に与える影響

これまでに、遺伝子の欠損あるいは、追加導入（該当遺伝子の発現量向上をもたらす）によって、イソプレノイド、（多くの場合、その代表としてリコペンの生産量で評価している）の生産量をも高める遺伝子型が多数知られている（Table 5.1）。まず、各遺伝子の単一欠損株を作製し、それぞれのリコペン生産量を評価した（Figure 5.2）。*clpXP* を欠損した細胞でリコペン生産量が増加し、野生型と比べおよそ 1.17 倍となった。*yliE* を欠損した細胞ではリコペン生産量が減少し、野生型と比べおよそ 0.86 倍となった。その他の欠損株では野生型とほとんど生産量が変わらなかった。そこで、次節ではこれらの遺伝型の組み合わせと、Table 5.1 に示すいくつかの遺伝子の追加導入との組み合わせを試みた。

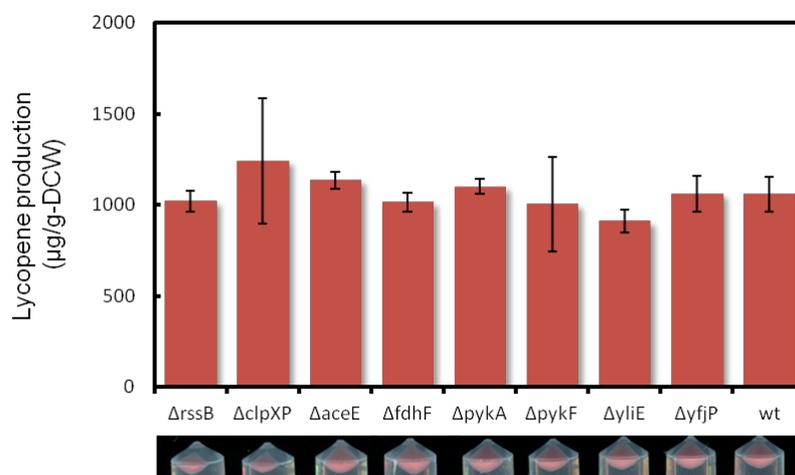


Figure 5.2 各単一欠損株のリコペン生産量評価 (N=4, ±SD), wt: 野生型

5.2.2. イソプレノイド増産を目指した4ラウンドの連続ゲノム編集

Table 5.1 に示す遺伝子型の組み合わせ効果を調べるために、Figure 5.3(A)に示す、多段階のゲノム工学を実施した。ここでは、欠損する遺伝子として、*yliE*, *yfp*, *rssB*, および *gdhA* を、追加導入する遺伝子として *yggT*, *appY*, *rpoS*, および *idi* をそれぞれ選出した。それぞれのラウンドにおいて、対象領域に対する 40 bp のホモロジーアームを、PCR によって付した HKH カセットを、細胞 (MG1655) にエレクトロポレーションし、カナマイシン選択 (24 時間) を行なった。得られた細胞に、挿入カセット (p_{T5} -*yggT*, p_{T5} -*appY*, p_{T5} -*rpoS*, p_{T5} -*idi*) カセットをエレクトロポレーションし、dP 選択を 18-30 時間行なった。得られた細胞集団を二つに分割し、一方は解析のために保存し、他方は次のラウンドの組換えに用いた。この過程を、

途中で止めることなく、4ラウンド繰り返し、各ラウンドにおいて、細胞の遺伝型をPCR解析によって解析した (**Figure. 5.3(B)**)。

第一ラウンドの、最初の細胞混合液では、元の配列 (*yII*E) に相当するPCRバンド (971 bp) のみが検出された。1ラウンドのリコンビニアリング (すなわち、HKHカセットとの配列置換と、引き続きKm選択、および*p*_{T5}-*yggT*カセットとHKHカセットとの置換と、引き続きdP選択) の後には、*p*_{T5}-*yggT*カセットの挿入に相当するバンド (1317 bp) のみが検出された (**Figure 5.3B-(1)**)。続く3ラウンドの組換えすべてにおいても、ターゲット領域において、遺伝型のシフトがみられた (**Figure 5.3B**)。

ただし、2ラウンド目の*yII*Eについては、dP選択の直後には*appY*のバンドがみられたものの、3および4ラウンド目ではそのバンドが検出されなかった。元の配列 (*yfjP*遺伝子) のバンドも検出されないことから、原因は不明であるものの、一度は正しく導入された*appY*が、培養中に欠失したと思われる。ゲノム上の遺伝子の偶発的な欠失は、頻度の低い (1.0×10^{-10} to 2.5×10^{-9} /細胞/世代/2-kbp(16)) 事象であることから、*appY*の追加発現が、細胞に増殖速度をもたらし、その結果、低い頻度で生じる*appY*を欠失した細胞が、培養の過程で濃縮されたものと予想される。

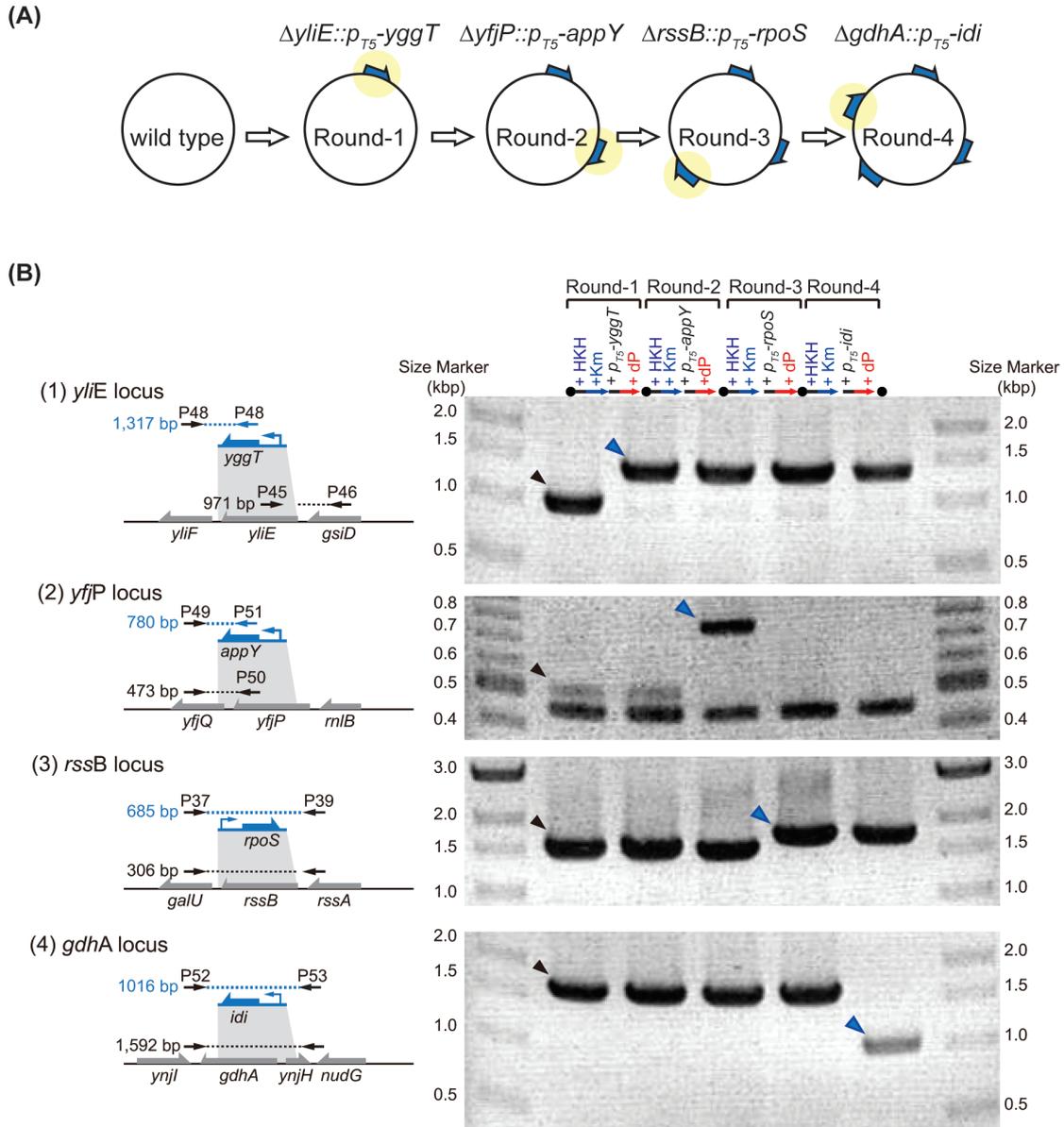


Figure 5.3. リコペン増産のための4ラウンドの連続ゲノム編集

(A) 4ラウンドゲノム編集のスキーム。(B) それぞれのラウンドの細胞集団の4つの異なる座位に関する遺伝型解析; 4ラウンドの連続した遺伝子置換の、前、後、そしてその間の9つ全ての培養液が、競争PCR解析に用いられた; PCRには、標的配列、HKHカセットおよび挿入遺伝子、にアニールする3つのプライマーを用いた。各座位の構成、プライマー、および予想されるPCR産物の長さ (bp) を、(1) *yliE*, (2) *yjfP*, (3) *rssB*, そして (4) *gdhA* 座位についてそれぞれ示す。プライマー配列はAppendix 1に示す。

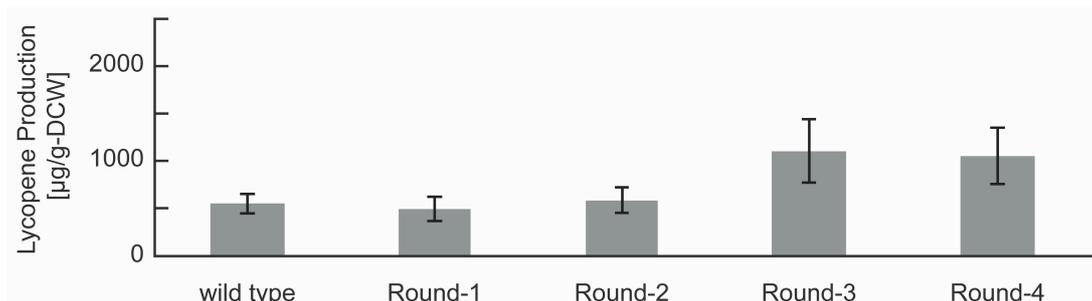


Figure 5.4. 得られた組換え株 (Figure 5.3) によるリコペン生産

Figure 5.3で得られた細胞株をpAC-LYCプラスミドで形質転換したのち、その培養液を振とう培養 (30°C, 24 h) した。細胞からリコペンをアセトン抽出し、吸光度からその量を調べた。

5.2.3. 4連続組換え株によるリコペン生産

上で得られた4つの大腸菌株について、そのリコペン生産量を調べた (Figure 5.4)。第一ラウンドでは、細胞のリコペン生産量に変化はなかったが、3ラウンド目では、リコペン生産量が増え、野生型の~2倍に達した。これは主に、3倍のリコペン増産が報告されているRpoSの追加導入によると思われる(13)。また、4ラウンド目では、*gdhA*を欠損し、*idi*を追加導入したが、リコペン生産量はほとんど変わらなかった。*gdhA*の欠損および*idi*の発現量を増すことによって、リコペン生産量が増加することが報告されているが(Table 5.1), *rpoS*導入株に対するこれらの加算効果はみられなかった。

5.2.4. 1-kbpを超える遺伝子の置換の試み

イソプレノイド増産のために大腸菌に導入する遺伝子のなかには、そのサイズが1 kbpを超えるものがいくつかある (Table 5.1)。リコンビニアリング法による塩基配列の置換は、遺伝子サイズが大きくなるに従い、組換えの頻度が低下することが知られている(17)。本手法が1 kbpを超える遺伝子断片の組換えにも対応可能であるか調べるために、*ispDF*遺伝子を、Figure 5.5(A)に示すスキームで*fdhF*と置換する組換えを試みた。

1ラウンドの組換え操作の後に、得られた細胞の遺伝型をPCRによって解析したところ、設計したPCRバンド (1,646 bp) はみられず、それより1 kbp以上短いバンド (~0.5 bp) がみられた (Figure 5.5(B))。1.5 kbp付近に薄いバンドがみられるが、ネガティブコントロール (野生型大腸菌) の場合にも同様のバンドがみられるため、PCRの非特異増幅に由来するバンドであると思われる。この結果は、*ispDF*遺伝子の一部分しか*fdhF* locusに導入されていないことを示唆する。

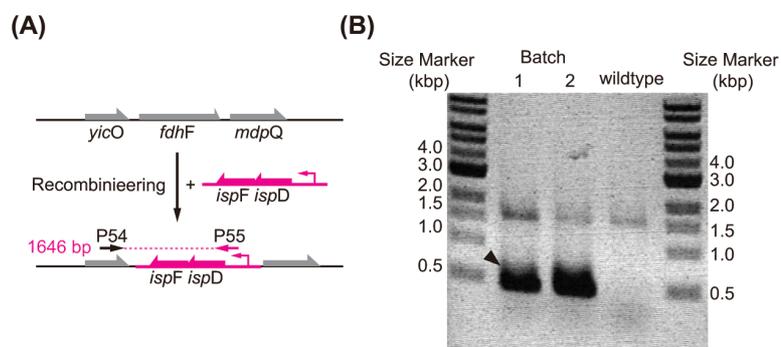


Figure 5.5. *fdhF*座位と*pT5-ispDF*カセットとの置換

(A) リコンビニアリングおよびPCR解析のスキーム (B) 1ラウンドのリコンビニアリング操作 (2ステップの組換え反応とポジティブ/ネガティブ選択) の後, 得られた細胞集団について *pT5-ispDF*カセットにアニーリングするプライマーを用いてPCR解析を行なった。各座位の構成, プライマー, および予想されるPCR産物の長さ (bp) も示す。プライマー配列は **Appendix 1**に示す。

5.3. 考察

ゲノムの連続組換え法はコンビナトリアルな代謝工学のための有用なツールとなり得る

本章では、第五章までで確立した、大腸菌ゲノムの連続組換え法が、代謝工学、すなわちイソプレノイド増産のためのゲノム工学法として使用することができた。今回は、4回の組換えを連続に実施し、全ての工程を液操作のみで、そして12日で完了できた。このことは、微生物生産、例えばここではイソプレノイド生産、に関する、既知の遺伝子改変操作をさらに集積していくことに、本手法が適していることを示している。

本章では、本手法の適用限界の一部も明らかになった。1 kbp を超える DNA 断片の導入を試みたが、セレクションエスケープは生じないものの、設計より短い断片が導入された (**Figure 5.5**)。この原因は、導入した DNA 断片を PCR 作製した際に、非特異的な PCR 増幅物が、*ispDF* の一部と、その上下流にホモロジーアームが付された DNA 断片が、標的配列と組換わったためである。このような非特異増幅による DNA 断片は、検出下限以下 (10% 以下) であるものの、設計した断片に比べて長さが短く (~0.5 kbp)、優先的に組換わり得る (17)。精製操作を複数回繰り返すなどによって、DNA 断片の純度を高めることで、この問題は回避できる可能性がある。また、*I-SceI* のような、エンドヌクレアーゼを用いた手法との組み合わせ (後述, **第六章, 6.2.1 項**) も有望である。

5.4. 実験項

5.4.1. 試薬

6-(β-D-2-deoxyribofuranosyl)-3,4-dihydro-8*H*-pyrimido[4,5-*c*][1,2]oxazin-7-one (dP) (18)は、Berry and Associates (Bishop Circle East, Dexter, MI; cat. PY7270)から購入した。オリゴヌクレオチドはFASMAC Co., Ltd (Kanagawa, Japan)によって合成された。他の全ての試薬は特級試薬を用いた。抗生物質は必要に応じて以下の濃度で培地に添加した: 50 µg/mL カルベニシリン (Carb), 30 µg/mL クロラムフェニコール (Cm), and 50 µg/mL カナマイシン (Km)。

5.4.2. 株およびプラスミド

本章で使用した全てのプラスミドはTable 5.2に示した。大腸菌株K-12 MG1655株を全ての実験で使用した。一部、プラスミド作製のために、大腸菌株XL10-Gold-Kan^r (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を使用した。pKD46プラスミド(19)は、L-アラビノースによってLambda-RED組換え系を誘導するために、リコンビニアリングの前にMG1655およびその派生株に導入した。

Table 5.2. 本章で使用したプラスミド

Plasmid name	Genotype	Ori/marker	Source
pHKH	<i>p_{T5}-hsvTK_{mod}-p_L-Km^r-p_{tet}-hsvTK</i>	ColE1/Amp ^r	This study
pAC-LYC	<i>CrtEIB</i>	p15A/Cm ^r	(20)
pKD46	<i>p_{BAD/AraC}-Lambda RED_{γβα}</i>	pSC101/Amp ^r	(19)

5.4.3. DNAカセットの調製

選択カセットおよび挿入カセットは、Appendix 1に示すプライマーセットを用いて、ターゲット領域へのホモロジーサイトを付しながらPCR増幅された。PCR反応は、特別記載がない限り、KOD DNA polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて行なった。PCR産物を、DpnI処理およびゲル精製することによってテンプレートとなったプラスミドあるいはゲノムDNAを除去した。

5.4.4. エレクトロポレーションのためのコンピテント細胞の調製

エレクトロポレーションのためのコンピテント細胞は、DatsenkoおよびWannerらによって記述された方法(19)に従い調製された。簡潔には、pKD46を保持する細胞を、50 µg/mLのCarb. および10 mMのアラビノースを含むLB培地で培養し、Lambda-RED酵素の発現が誘導した。OD (λ = 600 nm)が0.4-1.0に達したとき、細胞を氷冷しながら、滅菌水および10% v/vグリセ

ロールで2回ずつ洗浄し、最後に20% v/vグリセロールで懸濁することで、エレクトロポレーション用コンピテント細胞を作製した。得られたエレクトロポレーション用コンピテント細胞(40 μ L)に、100 ngのPCR断片を加え(氷上)、この混合液は0.1-cm-gapのキュベットの中でエレクトロポレーションされた(1.8 kV in a Gene Pulser electroporation apparatus (Bio-Rad, Hercules CA))。

5.4.5. 遺伝子挿入/置換の連続実施

ステップ-1: PCRにより適切なホモロジーアーム付しながら増幅された選択カセット(100 ng)を、MG1655株のコンピテントセル(40 μ L)にエレクトロポレーションした。形質転換体はすぐに1 mLのLB-Carb培地に懸濁され、振とう培養された(30°C, 3 h)。通常、培養液はホモロジーアームの長さ、あるいはDNAカセットの長さによって、 10^2 - 10^5 の組換え体を含むその後、培養液を、Km耐性細胞の数が10を下回るようにアリコート分割した(この操作は、エレクトロポレーションされたDNA断片がPCR生成されていなければ省くことができる)。このアリコートのうち一つを、LB-Carb-Km培地(2 mL)に植菌し、振とう培養(24 h, 30°C)した。細胞を回収し、10 mMのL-アラビノースを含むLB-Carb-Kmに植菌し、上述(5.4.4)のとおりエレクトロポレーションのためのコンピテントセルを調製した。

ステップ-2: 精製されたDNA断片(各遺伝子がT5プロモータ下流にコードされ、適切なホモロジーアームに挟まれている、100 ng)を、ステップ1で調製したエレクトロポレーションのためのコンピテントセル(40 μ L)に加えた。得られた混合液をエレクトロポレーションされ、すぐに1 mLのLB-Carb培地に懸濁された。振とう培養(~3 h, 30°C)の後、培養液の一部を、LB-Carb-dP培地に植菌し、定常期に達するまで振とう培養(30°C, 18-30 h)した。得られた細胞は、10 mMのL-アラビノースを含むLB-Carb培地に植菌され、上述の方法でエレクトロポレーションのためのコンピテントセル調製に用いられた。このストックは、次のラウンドのステップ1に使用された。

4ラウンドのレコンビニアリング(ターゲット領域を*p_{T7}-mrfp*カセットに置き換える2ステップの組換え)は、ステップ1および2を、*yliE*, *yfjP*, *rssB*, and *gdhA*を標的として、連続に行なわれた。

5.4.6. リコペン生産量分析

大腸菌株MG1655およびその派生株に、pAC-LYCプラスミドを形質転換した。形質転換体を2 mLのLB-Cm培地で一晩培養した。培養液の20 μ Lを、2 mLのM9(+0.4%グルコース)-Cm培地に植菌し、振とう培養(24 h, 30°C)した。培養液の濁度(OD₆₀₀)を透明な96ウェルプレ

ートを使い、SpectraMax Plus 384 system (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)によって測定した。

培養液からのリコペンの抽出は次のように行なった;細胞ペレットにアセトン1 mLを加え、ボルテックスした。その後、細胞を遠心集菌し、上澄みのアセトン層の吸光度(475 nm)を測定した。培養液の(濁度~OD₆₀₀)から細胞の乾燥重量を算出した。また、吸光度と、リコペンのモル吸光定数 $\epsilon = 185,000$ から、細胞内に蓄積したリコペン量を算出した。

引用文献

1. Ajikumar, P.K., Tyo, K., Carlsen, S., Mucha, O., Phon, T.H. and Stephanopoulos, G. (2008) Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol. Pharm.*, **5**, 167-190.
2. Brennan, T.C., Turner, C.D., Kromer, J.O. and Nielsen, L.K. (2012) Alleviating monoterpene toxicity using a two-phase extractive fermentation for the bioproduction of jet fuel mixtures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 2513-2522.
3. Fischer, M.J., Meyer, S., Claudel, P., Bergdoll, M. and Karst, F. (2011) Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast. *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 1883-1892.
4. Marienhagen, J. and Bott, M. (2013) Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *J. Biotechnol.*, **163**, 166-178.
5. Lange, B.M. and Ahkami, A. (2013) Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes--current status and future opportunities. *Plant biotechnology journal*, **11**, 169-196.
6. Kirby, J. and Keasling, J.D. (2009) Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**, 335-355.
7. Misawa, N. (2011) Pathway engineering for functional isoprenoids. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 627-633.
8. McCaskill, D. and Croteau, R. (1997) Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **55**, 107-146.
9. Santos, C.N. and Stephanopoulos, G. (2008) Combinatorial engineering of microbes for optimizing cellular phenotype. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12**, 168-176.
10. Wang, H.H. and Church, G.M. (2011) Multiplexed genome engineering and genotyping methods applications for synthetic biology and metabolic engineering. *Methods Enzymol.*, **498**, 409-426.
11. Wang, H.H., Isaacs, F.J., Carr, P.A., Sun, Z.Z., Xu, G., Forest, C.R. and Church, G.M. (2009) Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, **460**, 894-898.
12. Alper, H. and Stephanopoulos, G. (2008) Uncovering the gene knockout landscape for improved lycopene production in *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 801-810.
13. Jin, Y.S. and Stephanopoulos, G. (2007) Multi-dimensional gene target search for improving lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, **9**,

- 337-347.
14. Farmer, W.R. and Liao, J.C. (2001) Precursor balancing for metabolic engineering of lycopene production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.*, **17**, 57-61.
 15. Yuan, L.Z., Rouviere, P.E., Larossa, R.A. and Suh, W. (2006) Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metabolic engineering*, **8**, 79-90.
 16. Koskiniemi, S., Sun, S., Berg, O.G. and Andersson, D.I. (2012) Selection-driven gene loss in bacteria. *PLoS genetics*, **8**, e1002787.
 17. Sawitzke, J.A., Thomason, L.C., Costantino, N., Bubunencko, M., Datta, S. and Court, D.L. (2007) Recombineering: *in vivo* genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. *Methods Enzymol.*, **421**, 171-199.
 18. Lin, P.K. and Brown, D.M. (1989) Synthesis and duplex stability of oligonucleotides containing cytosine-thymine analogues. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 10373-10383.
 19. Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 6640-6645.
 20. Cunningham, F.X., Jr., Sun, Z., Chamovitz, D., Hirschberg, J. and Gantt, E. (1994) Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC7942. *Plant Cell*, **6**, 1107-1121.

第六章

結論

6.1. 本研究の成果

6.1.1. ヌクレオシドキナーゼと人工ヌクレオシドを用いたネガティブ選択法のゲノム工学への適用

本研究では、田代らが遺伝子発現の"OFF"状態を選択するために開発した、Herpes Simplex virus thymidine kinase (hsvTK)と人工ヌクレオシド (dP) を用いたネガティブ選択系(1)を、ゲノム工学に適用した。ゲノム工学においても、このネガティブ選択系が同じ効率で使用可能であり、1) 液操作のみで選択操作を完了できる、2) 特別な遺伝子型を必要としない、および3) 選択に要する時間が短い (~2 時間)、という点で、ゲノム工学においてネガティブ選択法に求められる要素を満たしている優れたネガティブ選択系であることを示した。

第二章では、ゲノム工学での使用で特に考慮すべき問題も明らかになった。

hsvTK/dP によるネガティブ選択系の応用に際して、変異原性ヌクレオシドの使用、ヌクレオシドキナーゼを過剰発現という二つの点から、ゲノム上での望まない遺伝子変異を誘起することが大きな懸案である。実際に、dP の添加によって細胞の遺伝子変異頻度は 15 倍増加するため、1~2 回のゲノム工学上においても問題にならないが、多数のリコンビニアリングを繰返し行なう場合には、無視できない頻度であることがわかった。遺伝子変異を誘起しない程度の低い濃度で細胞死を引き起こすことができるように、hsvTK の dP キナーゼ活性を高める進化工学が有望である。

選択効率の点では、hsvTK/dP を用いたネガティブ選択系は、他のネガティブ選択法と変わらず、"セレクションエスケープ"が生じることが明らかとなった。また、このセレクションエスケープが、hsvTK 遺伝子に起こる遺伝子変異によって、hsvTK の dP キナーゼ活性が失われたためであることが明らかになった (第二章)。hsvTK/dP 系において発生するセレクションエスケープの問題を解決するためのいくつかの工夫のうち、2 コピーの hsvTK でポジティブ選択マーカを間に挟むという選択カセット構成により、セレクションエスケープの発生頻度を $\sim 10^6$ 倍以上低く、すなわち $< 2 \times 10^{-12}$ にまで低減することができた (第三章)。

このことは、hsvTK/dP によるネガティブ選択の機構では、hsvTK 遺伝子の失活以外の理由では、細胞が選択から逃れる (耐性化する) ことは起こり得ないことを示している。これは、これまでに報告されているネガティブ選択系にはない、ユニークな性質である。

toI/C/colicin E1 システムでは、*toI/QRA* オペロンをあらかじめゲノム上に重複させておくことによって、セレクションエスケープ頻度を 4.3×10^{-11} にまで低減した。これに対して、本手法は、他の部位をあらかじめ編集することなく、セレクションエスケープを事実上根絶すること ($< 2 \times 10^{-12}$) に成功した、初めての例である。また、セレクションエスケープの出現頻度は、バイオセーフティ分野 (遺伝子組換え生物の封じ込めのために、組換え生物だけを死滅させようという試みがなされている) で報告されている最も低いセレクションエスケープ

頻度 ($<10^{-12}$) (2-4)と同等であり、そしてゲノム工学において報告されているネガティブ選択系のなかで最も低い。

6.1.2. 液体操作のみで実施可能な多段階のゲノム工学法の確立

二および三章で、ヌクレオシドキナーゼと人工ヌクレオシド dP の使用と、選択カセットの構成の変更によって、液体操作のみで選択可能であり、かつセレクションエスケープがほとんど発生しないネガティブ選択法を確立できた。これと、リコンビニアリングの各ステップ間で扱う細胞数を調節するという工夫を合わせて、リコンビニアリングを全て液操作のみで完了し、そしてそれを多段階にわたって繰り返すことに世界で初めて成功した（第四章）。

第五章では、多段階のリコンビニアリング作業を、液体操作のみで簡便に行なえるという性質を生かして、イソプレノイド増産に資する既知のゲノム工学操作を、一つの大腸菌株に集約し、それらの掛け合わせ効果を調べることに利用した。ゲノム上の複数箇所に對して、kbp サイズの遺伝子配列の置換を、多段階に行なえた例はこれまでにない。本手法の確立によって、例えばゲノム上に点在する数十の遺伝子からなる代謝経路について、他の生物種の遺伝子、あるいは完全に人工合成された遺伝子によって、全て置換し、その機能を調べることも可能になるだろう。

本研究では、リコンビニアリングの各ステップにかかる作業時間についての最適化は行なっていないものの、4 回のリコンビニアリング（すなわちゲノム上の 4 か所での遺伝子配列の置換）操作を、わずか 10 日で完了することができた。通常のリコンビニアリング作業では、1 回のリコンビニアリングについて、平均すると 7 日程度かかる(5)ところを、およそ 3 分の 1 にまで短縮することができた。本手法は全ての操作を液操作で実施でき、多数のリコンビニアリング操作を並列/連続に実施することができることから、実効的なリコンビニアリングのスループットの、大きな向上が見込まれる。

6.2. 展望

6.2.1. さらなるハイスループット化を目指して：長鎖 DNA の挿入への対応

本研究で確立した、液体操作のみで実施可能な多段階のゲノム工学法は、全ての操作を液操作で実施でき、多数のリコンビニアリング操作を並列/連続に実施することができる。しかしながら、第五章で明らかになったように、1 kbp を超える配列の導入は難しい。ゲノムを大きく書き換えるという点では、より長い、すなわち数 kbp から数 10 kbp の配列も導入できるような、手法改良が望まれる。大きな配列の導入が困難な理由の一つは、組換え効率だが、配列のサイズが大きくなるにつれて低下するためである(6)。この問題は、I-SceI エンドヌクレアーゼ法の利用によって対処できると考えられる (Figure 6.1)。

T. E. Kuhlman らは、I-SceI というエンドヌクレアーゼを用いて比較的長い、最大 7 kbp の配列をゲノムに導入することに成功している(6)。この方法では、まず I-SceI 認識配列をゲノム上にあらかじめ導入する。次に、I-SceI を発現すると、I-SceI 認識配列でゲノムの切断が起こる。ここで、標的部位との相同配列を付した配列との置換が起こる。この手法を本論文の方法に組み込めば (Figure 6.1)、7 kb までの配列導入が、連続/並列に導入できると考えられる。

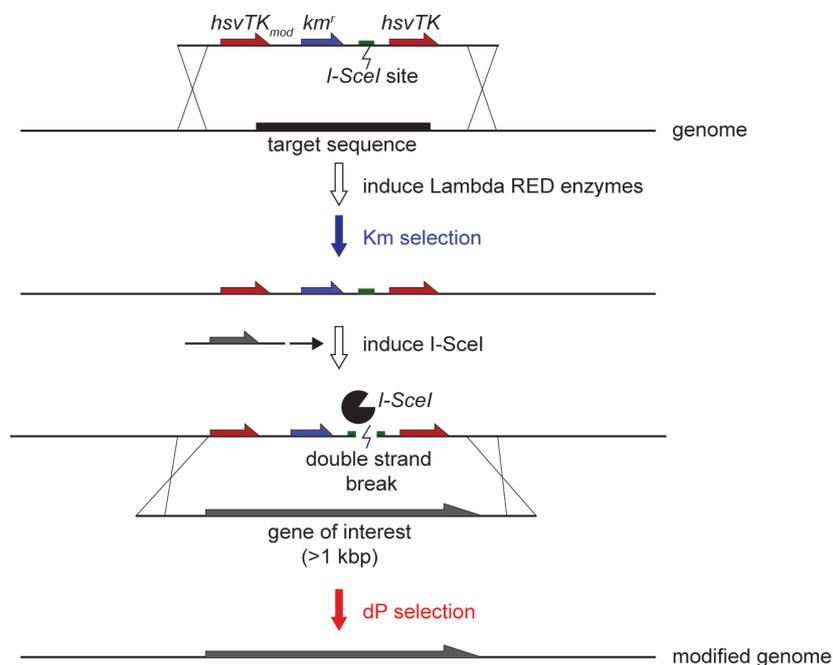


Figure 6.1. I-SceI を用いた改良型のゲノム編集法

6.2.2. ミニマムゲノムプロジェクトの高速化

多段階のゲノム工学プロジェクトとしては、大規模ゲノム欠損の研究が、最も典型的な例である。ここでは、細胞のゲノム上から、細胞の生存に必須でないと思われる遺伝子を、逐次欠失させ、大腸菌では、現在までに、およそゲノムの30%を欠失させることに成功しているものの(5)、これには細胞の増殖阻害を伴うため、さらなる欠損は困難な状況にある。これは、単独の欠失では細胞機能に影響を与えない遺伝子であっても、他の遺伝子の欠失との組み合わせによって、細胞が生存できなくなる場合が多くあるためである。

他の遺伝子欠失の組み合わせによって致死性を示すような遺伝型を探索するために、様々な遺伝子欠損の組み合わせを検討することが求められる。しかしながら、2つの遺伝子の欠損の組み合わせだけでも、

$$4,000 \times 4,000 = 16 \text{ 万通り}$$

の大腸菌株を作製することになり、さらに遺伝子が増えれば、組み合わせの数は天文学的に増える。そこでは、本論文の方法のような、全操作を液操作で実施できる方法が有望である。例えば384マルチウェルプレートなどを用いれば、数千~数万の遺伝子欠失株を並列に、そしておよそ3日で作製することができる。1万のサンプルを並列に扱い、1回の欠損操作を3日で完了すると仮定すれば、16万種の株（2遺伝子欠損の組み合わせの全てを含む）であっても、わずか48日で作製することができる。

6.2.3. 微生物ゲノムの”まるごと書き換え”の可能性

本研究が提案するゲノム改変法は全操作を液操作のみで実施できるため、例えば384マルチウェルプレートなどを用いて、数百のリコンビニアリングを並列/連続に行なうことが可能である。1回のリコンビニアリングの操作時間を3日とすれば、一ヶ月（30日）で10回のリコンビニアリングが完了できる。一回のリコンビニアリング操作で、およそ1 kbpの配列置換を実施すると仮定すれば、

$$1 \text{ kbp} \times 10 = 10 \text{ kbp}$$

の配列置換を、一つの株に対して行うことができる。これを、マルチウェルプレートを使って、例えば1,000通りを並列実施することも、本手法なら容易である。このようにして、10 kbpが書き換わった1,000種類の組換え株は、CAGE (Conjugation Assisted Genome Engineering) と呼ばれる方法を用いて、この1,000株を一つの株に集約することが可能である(7)。ここで

は、二つの株のゲノムを接合伝達によって融合するため、 n 回の操作で、 2^n の株を集約することができる。1000株を集約するために必要なCAGE操作の回数は、

$$\text{必要な CAGE 操作の回数} = \log_{10}(1000)/\log_{10}(2) = 10$$

1回のCAGE操作にはおよそ1週間かかるので、10週間(2.5ヶ月)で1000株の集約が完了する。以上をまとめると、1) まず、30日のリコンビニアリング操作によって、10 kbpを書き換えた株1,000種を作製し、2) 次に、その1000株をCAGE法によって10週間かけて集約することができ、4ヶ月弱でゲノムの10 Mbp相当を書き換えることができる。これは、大腸菌などの微生物ゲノムであれば、ゲノムまるまる一つ分を十分にカバーする。

6.2.4. “書き方(手法)”よりも“何を書くか(配列設計)”が問題である

ゲノムをスループットよく改変する手法が整えば、次はどんなゲノム配列にするか、というデザインが問題になる。このことは、J.C. Venterらのゲノム全合成プロジェクト(8,9)で、たった一塩基の変異が、細胞の生命機能著しく損なったことによっても強調される。そのため、一度大きく改変したゲノムについて、引き続き“小さな”ゲノム編集によって、その配列を最適化すること (**Figure 6.2**) が求められる。本論文で確立したゲノム編集法は、いくつかのゲノム改変を並列に多数検討することができるため、このような目的に適していると思われる。

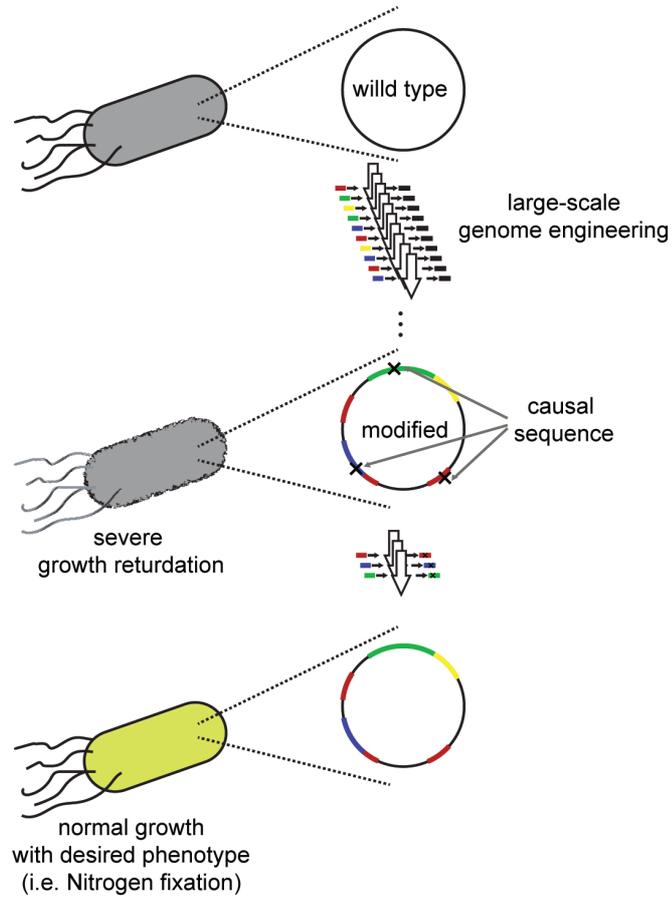


Figure 6.2. 大規模ゲノム編集工程の例

;まず, ゲノムを大きく編集し, 引き続き細かな配列の最適化を行う

引用文献

1. Tashiro, Y., Fukutomi, H., Terakubo, K., Saito, K. and Umeno, D. (2011) A nucleoside kinase as a dual selector for genetic switches and circuits. *Nucleic Acids Res.*, **39**, e12.
2. Gallagher, R.R., Patel, J.R., Interiano, A.L., Rovner, A.J. and Isaacs, F.J. (2015) Multilayered genetic safeguards limit growth of microorganisms to defined environments. *Nucleic Acids Res.*
3. Cai, Y., Agmon, N., Choi, W.J., Ubide, A., Stracquadiano, G., Caravelli, K., Hao, H., Bader, J.S. and Boeke, J.D. (2015) Intrinsic biocontainment: Multiplex genome safeguards combine transcriptional and recombinational control of essential yeast genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **112**, 1803-1808.
4. Mandell, D.J., Lajoie, M.J., Mee, M.T., Takeuchi, R., Kuznetsov, G., Norville, J.E., Gregg, C.J., Stoddard, B.L. and Church, G.M. (2015) Biocontainment of genetically modified organisms by synthetic protein design. *Nature*, **518**, 55-60.
5. Hashimoto, M., Ichimura, T., Mizoguchi, H., Tanaka, K., Fujimitsu, K., Keyamura, K., Ote, T., Yamakawa, T., Yamazaki, Y., Mori, H. *et al.* (2005) Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol. Microbiol.*, **55**, 137-149.
6. Kuhlman, T.E. and Cox, E.C. (2010) Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs. *Nucleic Acids Res.*, **38**, e92.
7. Ma, N.J., Moonan, D.W. and Isaacs, F.J. (2014) Precise manipulation of bacterial chromosomes by conjugative assembly genome engineering. *Nat. Protoc.*, **9**, 2285-2300.
8. Gibson, D.G., Benders, G.A., Axelrod, K.C., Zaveri, J., Algire, M.A., Moodie, M., Montague, M.G., Venter, J.C., Smith, H.O. and Hutchison, C.A., 3rd. (2008) One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 20404-20409.
9. Gibson, D.G., Glass, J.I., Lartigue, C., Noskov, V.N., Chuang, R.Y., Algire, M.A., Benders, G.A., Montague, M.G., Ma, L., Moodie, M.M. *et al.* (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, **329**, 52-56.

謝辞

この研究は千葉大学大学院，工学研究科，共生応用化学専攻，バイオマテリアル研究室（斎藤研究室）でおこなわれました。研究を進めるにあたり，多くの方々のご指導，ご助言をいただきました。この場を借りて感謝の気持ちを述べさせていただきます。

梅野 太輔先生には，iGEM での 2 年間と，研究室配属後の 6 年間にわたり，研究者として必要なことをたくさんご指導いただきました。また，私を持ち込むナイーブな研究アイデアについて，毎回真摯に受け止め議論に応じてくださったことに感謝しております。そのうち幾つかは，実際に論文として世に発表できる形にすることができました。このようなことを通して，研究アイデアを形にして世の中の役に立てようとする研究活動の喜びを体感させていただけたことは，研究者を志すことを決めた大きなきっかけの一つであり，また，その道のりを歩む上でかけがえのない財産になると感じています。今後も，先生からご指導いただいたことを胸に，精進していきたいと思えます。本当に有難うございました。

斎藤 恭一先生には，週間報告会などで，研究に関するご指導/ご助言をいただき，研究を進める上で大変勉強になりました。特に，報告書やプレゼンテーションの作成など，研究成果を人に伝える技術に関してさまざまご指導をいただきました。人に伝えるために，文章や図表を作る作業が，研究テーマを深めるためにいかに大切かということをお教えたいただけたことは，一生の財産になると感じています。ありがとうございました。

河合 繁子先生には，主に週間報告会で，貴重なご意見をたくさんいただきました。ありがとうございました。

片山 栄作先生には，工学・理学を問わず，さまざまな視点で，研究についての貴重なご意見をいただきました。ありがとうございました。

関 実先生，幸本 重男先生，そして岸川 圭希先生には，博士論文の審査をお引き受けいただきました。お忙しい中，貴重なお時間を割いて審査していただき，貴重なご教示とご助言をいただきました。厚く御礼申し上げます。

千葉大学医学部公衆衛生羽田明研究室の真下 陽一先生には，DNA の配列解析を手助けしていただきました。先生からいただいたアドバイスにより研究がスムーズに進行しました。この場を借りてお礼申し上げます。

法政大学，生命科学部，生命機能学科の川岸 郁朗先生，曾和 義幸先生には，微

生物ゲノムの組換え法について、一からお教えいただきました。また、ゲノム組換え法のユーザーとしての立場から、手法の是非について貴重なご意見をいただき、研究に対しての理解を深めることができました。厚く御礼申し上げます。

研究室の先輩・同級生・後輩の皆さんも、さまざまな場面において私を励まし、支えてくださり本当に有難うございました。特に、池 紘平くん、嶋村 陽くん、齋藤 聡司くんとは、本論文に関わるプロジェクトと一緒に担当し、様々な実験や議論を通して研究を深めることができました。ありがとうございました。

最後に、博士進学という私の選択を認め、支援してくれた家族には、感謝申し上げます。本当にありがとうございました。

2015年 2月 富永 将大

付録 1 本研究で使⽤したプライマー

付録 1

本研究で使⽤したプライマー

付録 1 本研究で使用したプライマー

Table A1. 本研究で使用したプライマー

No.	sequence	template DNA	template DNA	
P1	gattcattaatgcagctggcacg	Amplification of HC cassette with <i>lacZ</i> homology	pMW- <i>hsvTK-cat</i>	
P2	ttatTTTTgacaccagaccaactggaatgtagc gaccgcagggTTTTccagtcacg			
P3	cgatggcggagctgaattac	Amplification of <i>lacZ</i> from MG1655	genomic DNA (MG1655)	
P4	gattaatgatcagtggcgcaaagaac			
P5	cctaacagcaccaggattaaagtgaaattaat ctttcatcatacacgagcttcatgcatcg	Amplification of HK or HKH cassette with <i>yjiDE</i> locus homology	pHK or pHKH	
P6	ctgatggagagggggcgtgctgcctctctcattc aggtcactggcgtgctgctcgaaac			
P7	atgaccatgattacggattcactggccgctgTTTT acaacgagattacgcgcagaccacc	Amplification of HK or HKH cassette with <i>lacZ</i> locus homology		
P8	ttatTTTTgacaccagaccaactggaatgtagc gaccgcgcccttaggtacgaactc			
P9	cactaccgcgagcagggaaataattcccgccca aatagcttgagattacgcgcagaccacc	Amplification of HK or HKH cassette with <i>proV</i> locus homology		
P10	actgtccgccgctggcgtggtatcccacggatt atTTTgacgcccttaggtacgaactc			
P11	agcatgccactattgagtaaagccagtcaggg gagagaacgattacgcgcagaccacctg	Amplification of HK or HKH cassette with <i>rssB</i> locus homology		
P12	cattagcaggaatgcaaatttagcccgcgttat cgTTTgcgcccttaggtacgaactc			
P13	ctttacactttatgcttccggctc	Amplification of <i>p_L-gfp^{mut3.1}</i> cassette with <i>lacZ</i> locus homology		pUC- <i>p_L-gfp^{mut3.1}</i>
P14	gacaccagaccaactggaatgcatcagagc agattgtactgagag			
P15	cattaccagttggtctggtgtcaaaaataataat		Genomic DNA	
P16	gagccggaagcataaagtgtaaag			
P17	cgatggcggagctgaattac			
P18	gattaatgatcagtggcgcaaagaac			
P19	cctaacagcaccaggattaaagtgaaattaat	Amplification of <i>p_{TT}-mrfp</i> cassette	pET23d- <i>mrfp</i>	

付録 1 本研究で使用したプライマー

	cttcatgagatctcgatcccgcgaaattaatac	with <i>yiiDE</i> locus homology	
P20	ctgatggagaggggcggtgctgcctctctcattc aggtcacccattcgccattcagcaaaaaac		
P21	actgtccgcccgtggctggtatcccacggatt atthtgatcccgcgaaattaatacgaactcac	Amplification of <i>p_{TT}-mrfp</i> cassette with <i>lacZ</i> locus homology)	
P22	cactaccgcgagcagggaataattcccgccca aatagcttccattcgccattcagcaaaaaac		
P23	ttatthtgacaccagaccaactggaatgtagc gaccggagatctcgatcccgcgaaattaatac	Amplification of <i>p_{TT}-mrfp</i> cassette with <i>proV</i> locus homology	
P24	atgaccatgattacggattcactggccgctgttt acaacccattcgccattcagcaaaaaac		
P25	cattagcaggaatgcaaatttagcccgcgttat cgthtgctcaacgacaggagcac	Amplification of <i>p_{TT}-mrfp</i> cassette with <i>rssB</i> locus homology	
P26	agcatgccactattgagtaaagccagtcaggg gagagaacgtcccattcgccattcagc		
P27	atgthtagttatcgcccaggatg		
P28	ctgaacagtgatgtagcaagacacg	<i>yiiDE</i> test primers	
P29	gtgthtgaaggcacgtatatcgthc		
P30	cagcggthtgaataatagcgag		
P31	gaagaaggcacatggctgaatatcg		
P32	ggatacgacgataccgaagacag	<i>lacZ</i> locus sequence/test primer	
P33	gattcattaatgcagctggcacg		
P34	gaagagagtcaattcagggtgg		
P35	ctggaagacgggacggaaatg	<i>proV</i> test primers	
P36	gcgcgctthtagatcgtgagg		
P37	caacggggataacggctthttgac	<i>rssB</i> test primers	
P38	gatccgcccgatattctgattc		
P39	cgthtcaaagcatatcgttaaacacc	<i>mrfp</i> test primers	
P40	gggaaggacagthtcaggtagthc		
P41	cgthttatcctggattacgaccaatc	<i>hsvTK</i> test primers	

付録 1 本研究で使用したプライマー

P42	gtgcaaataaatttaagggaagtttccgatg	<i>gfp^{mut3.1}</i> test primers	
P43	gtcggctctgacaaaaagaaccg	<i>Km^r</i> gene sequence primer	
P44	ctgccgtaccgctcagttgac	<i>hsvTK_{mod}</i> sequence primer	
P45	gcgctccgataccagttgatagtaatg	<i>yliE</i> test primers	
P46	cttctttgcagcactggttgg		
P47	cattcattgaatgtgctacaccgatac		
P48	atgggtgtcgcagaagtattacagg	<i>yggT</i> test primer	
P49	ggacggtcacggcgaataag	<i>yfp</i> test primer	
P50	gcctgctgatgagctattcc		
P51	gagttaccagatgccctc	<i>appY</i> test primer	
P52	ggggagcatcatccgttaaatac	<i>gdhA</i> and <i>idi</i> test primer	
P53	cttgctaccgtcacattctgatg		
P54	agcagcagtcgcttcacgttcgct	<i>ispDF</i> test primer	
P55	caaatcgccggagctaaacc		

付録 1 本研究で使⽤したプライマー

付録 2

hsvTK とポジティブ選択マーカールの融合とその安定化

概要

第三章で、*hsvTK* とポジティブ選択マーカの一つであるカナマイシン耐性遺伝子 (*Km*) を融合し、両者の機能を併せ持つ、デュアル選択マーカの作製を試みたところ、その細胞内活性は大きく低下した。そこで、*hsvTK* の発現量を高める以下の進化工学を行なった (Figure A2.1) ;

- 1) まず *ble::gfp::ble* という、ゼオシン耐性機能と GFP 蛍光タンパク質機能の両方を併せ持つ融合マーカに、*hsvTK* をさらに融合した (*hsvTK::ble::gfp::ble*)。これにより、*hsvTK* の発現量変化を、細胞の GFP 蛍光で評価することができると考えた。
- 2) 次に、*hsvTK::ble::gfp::ble* にランダム変異を導入し、得られた変異体群の中から、細胞に強い GFP 蛍光を与えるものを探索した。
- 3) 最後に、得られた変異体の dP キナーゼ活性と、ゼオシン耐性を評価したところ、dP キナーゼ活性が大きく向上した *hsvTK::ble::gfp::ble* 変異体 (1A3, 1F2, 1E4, および 1F4) を見いだした。これらの配列解析を行なったところ、1A3 と 1F2 には、*hsvTK* 遺伝子のみに D14E および T290S というシノニマス変異がみられた (Table A2.1)。

得られた変異の効果は、*hsvTK* そのものの安定化、または融合マーカ全体の安定化に寄与するか、あるいはその両方と考えられる。

付録2 *hsvTK* とポジティブ選択マーカの融合とその安定化

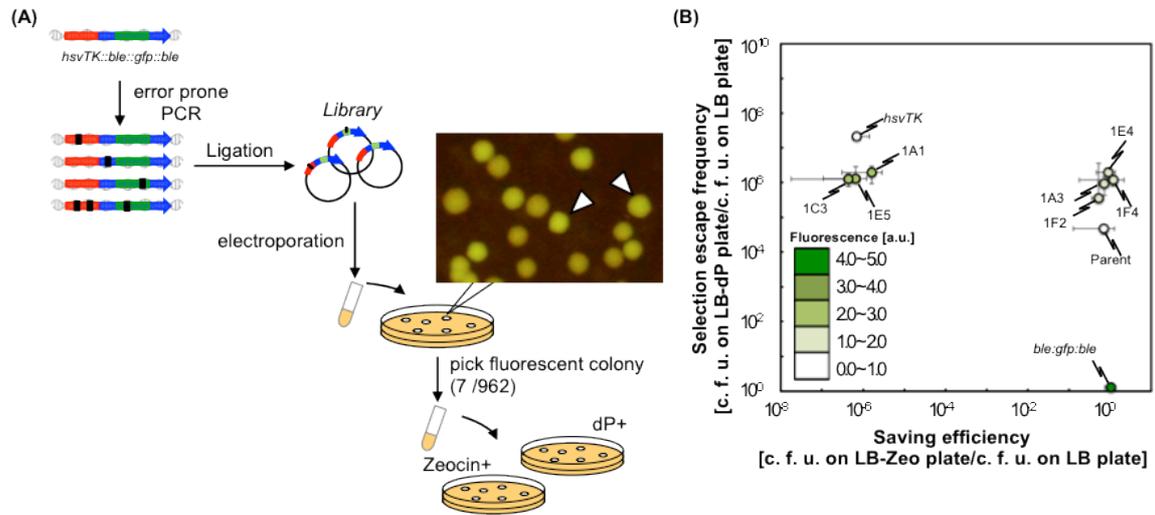


Figure A2.1. *hsvTK::ble::gfp::ble* の進化工学

(A) *hsvTK::ble::gfp::ble* の進化工学スキーム，まず，*hsvTK::ble::gfp::ble* を鋳型に変異導入 PCR (error-prone PCR) を行い，ベクターにライゲーションして，ライブラリを得た。次に，得られたライブラリを大腸菌に導入し，コロニーを形成させた。コロニーの中から，より強い蛍光を示すものを選択し，その dP キナーゼ活性とゼオシン耐性を調べた。(B) 単離されたクローンの dP キナーゼ活性とゼオシン耐性。

付録2 *hsvTK* とポジティブ選択マーカーの融合とその安定化

Table A2.1. 得られたクローン (Figure A2.1) の *hsvTK::ble::gfp::ble* の遺伝型解析

clone #	<i>hsvTK</i> region	<i>ble</i> region	<i>gfp</i> region
1A3	D14E	N.D.	V442V
	D211D		G471G
	E257E		
	T290S		
	H323H		
1F2	D14E	N.D.	V442
	D211D		G471G
	E257E		
	T290S		
	H323H		
1A1	T354A	V383A	T481A
	I361V	S426C	D507D
		R731R	
1C3	D14E	Q672R	V447V
	V120A	V673W	
	E225E	V674C	
		P675R	
		D676T	
1E4		E737K	G471G
			S636P
1F4		G714S	
1E5		Q671 stop	
		Q739R	