

# 酵母の組換え能を利用した 簡便・高効率なプラスミドの構築

守屋央朗, 蒔苗浩司

Series  
253

## はじめに

### gap-repair cloning とは？

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の細胞内は相同組換えの活性が非常に高く、数十 bp の相同領域をもつ DNA 断片を酵母細胞に導入してやるだけで相同組換えがおき、DNA 断片が連結される (正確には「組換え修復機構」によって連結される)。この活性を利用することで、制限酵素とリガーゼを用いずにさまざまなプラスミドを構築することができる。これを「gap-repair cloning (GRC)」とよぶ。GRC は簡便で自由度が高く、複雑な構造のプラスミドを容易に構築できる。われわれの研究室では、ほぼすべてのプラスミド構築を GRC とその派生法で行っている。本稿では、われわれの研究室で用いているプロトコルや実施例を紹介する。読者の研究室において GRC の導入を検討する材料となれば幸いである。

## 原理

前述のように、GRC では *S. cerevisiae* の相同組換え修復機構を利用して DNA を連結させる。細胞内に

ける DNA 断片の結合は、非相同末端結合と相同組換えにより起こるが、*S. cerevisiae* では非相同末端結合よりも相同組換えの活性が強いため、相同組換えによる DNA の結合が起こりやすいようである。われわれは、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) でも GRC が可能であることを確認している<sup>1)</sup>。この際、非相同末端結合にかかわる酵素遺伝子 *lig4* を破壊することで、GRC の効率がより高くなることを見出している<sup>1)</sup>。一方、非相同末端結合酵素の破壊による GRC 効率の上昇は *S. cerevisiae* では観察されていない。

*S. cerevisiae* の相同組換え活性を利用したプラスミドの構築は、David Botstein のグループから 1987 年にはじめて報告されている<sup>2)</sup>。また、2009 年には、Craig Venter のグループが合成 DNA からマイコプラズマの全ゲノム DNA を再構築する際、多数の DNA 断片を結合するために *S. cerevisiae* の相同組換え活性を利用している<sup>3)</sup>。具体的には、100 kb の DNA 断片 11 個を同時に酵母に導入し連結することで、マイコプラズマのゲノムが再構築されており、このことから酵母の相同組換え活性がいかに強力であるかがわかる。

Simple and highly efficient plasmid construction using recombination in yeast

Hisao Moriya/Koji Makanae : Research Core for Interdisciplinary Sciences (RICS), Okayama University (岡山大学異分野融合先端研究コア)

## 準備

GRCの肝は、構築するプラスミドの設計と構築の材料となるDNA断片の調製であり、それ以外は標準的な酵母のDNA操作である。本稿では、GRCを行うのに必要な培地、株とプラスミド、プロトコル、プラスミド作成支援ソフトウェアについて以下にリストするに留め、これらの詳細は解説しない。われわれの研究室で使用している試薬やプロトコルについては、本稿のサポートページ<sup>4)</sup>に掲載したので、そちらを参照していただきたい。ただし、酵母の培養等の経験が全くない研究者にとってはサポートページの情報でも不十分だと思われる。身近な酵母の研究者に教わるか、後述の参考図書<sup>7)8)</sup>を一読(熟読?)されることをおすすめする。なお、以下にリストした試薬やプラスミドがキット化され、ライフテクノロジーズ社から販売されている(GeneArt<sup>®</sup> High-Order Genetic Assembly Systems, with yeast growth media)。まずはキットを用いてGRCを導入してもよいかもしれない。

### 1 培地

- 完全培地 (YPD)

形質転換に用いる酵母株の培養に用いる。

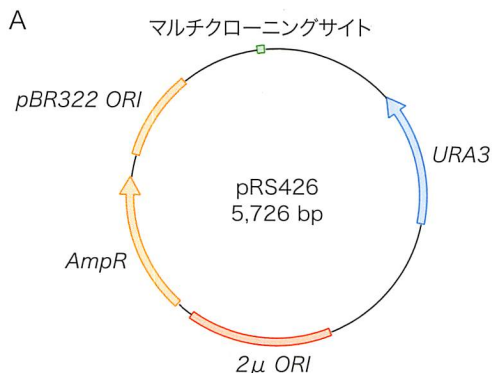
- 合成選択培地 (SC-Ura)

URA3をマーカーとしてもつプラスミドが導入された酵母株の選択に用いる。

### 2 株とプラスミド

- BY4741 (出芽酵母の標準株)

NBRP-yeast<sup>5)</sup>よりBY23849として入手可能である。



### B GRC実験の流れ

#### 0日目 (準備)

- ① 構築するプラスミドの設計
- ② PCR プライマーの設計・合成

#### 1日目

- ③ DNA断片の調製 (プラスミドの切断・PCR など)
- ④ 酵母細胞へのDNAの導入 (形質転換)・酵母の培養

#### 3日目

- ⑤ 酵母細胞からのプラスミドの回収・大腸菌への導入

#### 4~5日目

- ⑥ 大腸菌からプラスミドを精製、構造の確認

図1 出芽酵母を用いた gap-repair cloning (GRC) の基本

A) 典型的な出芽酵母→大腸菌のシャトルベクターである pRS426。pBR322 ORI、AmpR は大腸菌でのプラスミドの複製と選択に、2μ ORI、URA3 は酵母でのプラスミドの複製と選択に使われる。2μ ORI をもつプラスミドは酵母細胞中で多コピー (~30 コピー) で存在する。CEN (centromere) をもつプラスミドは、酵母細胞中に 1~2 コピーで存在する。  
B) GRC 実験の流れと日程の目安。詳細は本文を参照

- pRS426 (出芽酵母の標準的なプラスミドの1つ)

図1Aにプラスミドの構造を示した. NBRP-yeast<sup>5)</sup>より入手可能である.

## プロトコール

- クローニングにつかう DNA は大腸菌からアルカリ法で精製したもの, もしくはKOD-plus-NEO等のハイ・フィデリティ酵素で増幅したPCR産物
- 酵母の形質転換 (LiOAc法)
- 酵母からのプラスミド回収 (KOAc法)
- 酵母のコロニーPCR
- プラスミド構築支援ソフトウェア
- ApE<sup>6)</sup>: Mac・Windows どちらの環境でも使えるフリーのプラスミド構築支援ソフト

### 実験の流れ

図1Bに, 酵母を用いたGRC実験の一般的な流れを示した<sup>\*1)</sup>. また, 構築するプラスミドの設計が完了し, 構築の材料となるDNAが揃った段階から実験を開始した場合のおおよその日程を示した. 酵母がコロニーを形成するまでに2~3日程度かかる. また, 酵母からはアガロースゲル電気泳動で解析するのに十分な量のプラスミドDNAは得られないため, いったん大腸菌にプラスミドを導入し直す必要がある.

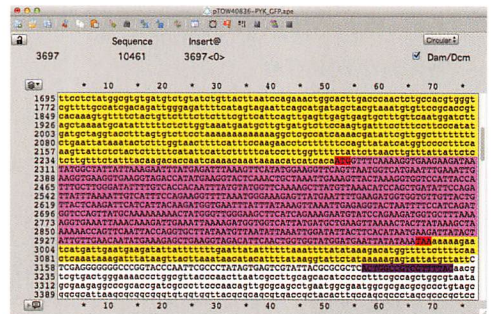
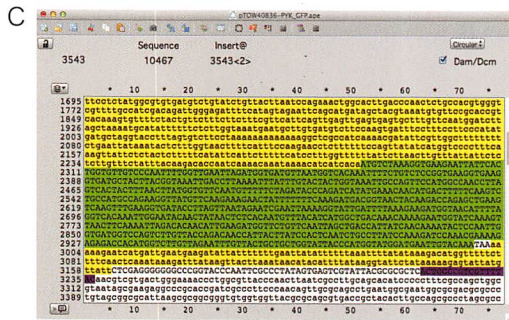
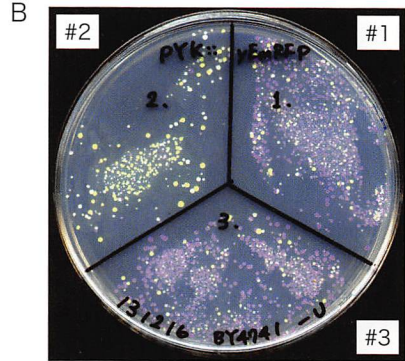
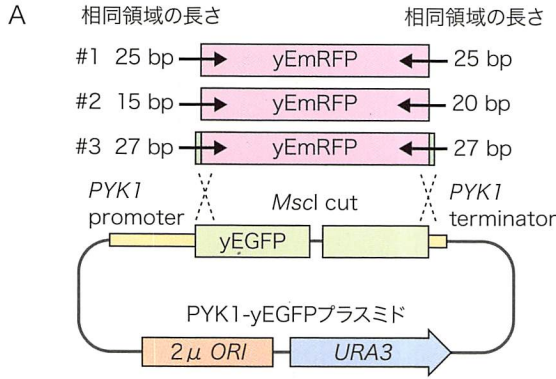
以下に, 図2および図3に示した実施例を紹介しつつ, GRC実験の流れを解説する. 図2にはプラスミド上の緑色蛍光タンパク質 (yEGFP) を赤色蛍光タンパク質 (yEmRFP) で置換した実施例を, 図3にはyEGFPに5カ所の変異を導入して青色蛍光タンパク質 (Azurite) を構築した実施例を示している.

#### ① 構築するプラスミドの設計

構築するプラスミドをソフトウェア上で設計する. 筆者らは, ApEというプラスミド構築支援ソフトを用いている. 実施例の図2C, D, 図3CはApEの画面のキャプチャーである.

プラスミドの設計の際には制限酵素サイトを気にせず, ベクターとインサートをつなぎたい場所に基いて設計すればよい. 実施例の図2Cでは, yEmRFPのコーディング領域の配列をコピーして, yEGFPのコーディング領域に置き換えることで設計は終了する. 図3Cでは変異を導入したい部位の塩基を置換すれば設計は完了である.

※1 酵母実験の参考となるマニュアルに関しては, 文献7, 8も参照.



**D**

```

aaagtattgttactcttttccatctcgtcttcttccatctcttggttttttcttattcttcttattctc
ctgtttttcttcttccagtttcttcttcccaaaatctctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
tattggttattttaaagatttattgagattttaaagtctcattgagaggttcagcttattgctcattg
tattgcaattttaaattg
aaggctgaagctgaagctgacacattgaggctactcaaatcgttaatttgaaggttactcaagctggc
attccaccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
tttcttggggtatttttctccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
ttattttttaaattttttaaattttttaaattttttaaattttttaaattttttaaattttttaaattt
tatttatttattttttaaattttttaaattttttaaattttttaaattttttaaattttttaaatttt
ttactcagatttctattcaagaattgggaaatttattataaagttaatttgaagagctcaattttccat
cagattggctcagattgcaaaaaaacattgggtgggaagcttcactcagaagaattgtaaccagaaga
tggctttaa
agctcaatttatacaaaactgaaattttaaagattgggtgctatttgaagctcaagcttataaagctt
tataaagcttcaaaactcagaaagcttataattttttaaattttaaattttaaattttaaattttaa
atttgaacacatttcaaaagctcgaagctgacacattcaactggctggcctggatgaattattataaa
aaaaaaagaa
ctatgttgaatggatatttatttttggattattttttaaatttctatataaagacatggttttcttctt
ccaaataaagatttcaagtcttcaatcaatcaatcttataaggtttcttataaaagaggtattctgtttc
  
```

**E** ベクター側と相同な25 bp プライミング配列

上流側プライマー 5'-aaacaaataaaacatcatcacaATGGTTTCAAAGGTGAAGA-3'

下流側プライマー 5'-tcatttcaatcatgattctttttTTATTTATATAATTCATCCA-3'

図2 GRCの実施例1：プラスミド上のyEGFPをyEmRFPで置換える

- A) プラスミド構築の概略。yEGFP内の1カ所でプラスミドを切断する制限酵素(MscI)を用いてプラスミドを処理し、相同領域の長さが異なる3つのプライマーセットでyEmRFPを増幅した。プラスミドとそれぞれのPCR産物を酵母に導入した。
- B) 実験結果の一例。緑色のコロニーは組換えが起きず(プラスミドの切れ残り、もしくはセルフレイゲーション)、マゼンタのコロニーは組換えが起きたものと考えられる。15 bp-20 bpの相同領域での組換え(#2)では効率が低く、25 bp以上の相同領域をもたせることで組換えの効率が上がり(#1ならびに#3)、マゼンタのコロニーが増えることがわかる。
- C~E) プライマーデザインの例。Aの#1の例を示している。C) ApEソフトウェア上で、yEGFPのATGからSTOP(緑色)をyEmRFP(赤色)と置換える。D) つなぎ目の前後の配列でプライマーを作成する(図中の矢印、5'→3'の向きで作成する)。E) プライマー配列の例

プラスミドに挿入を導入したい場合に行うことは、つなぎ目よりも内側の1カ所以上でベクターを切断する制限酵素を見つけることである。多くのプラスミド(図1AのpRS426など)は、マルチクローニングサイトをもっているため、その酵素の1つで切

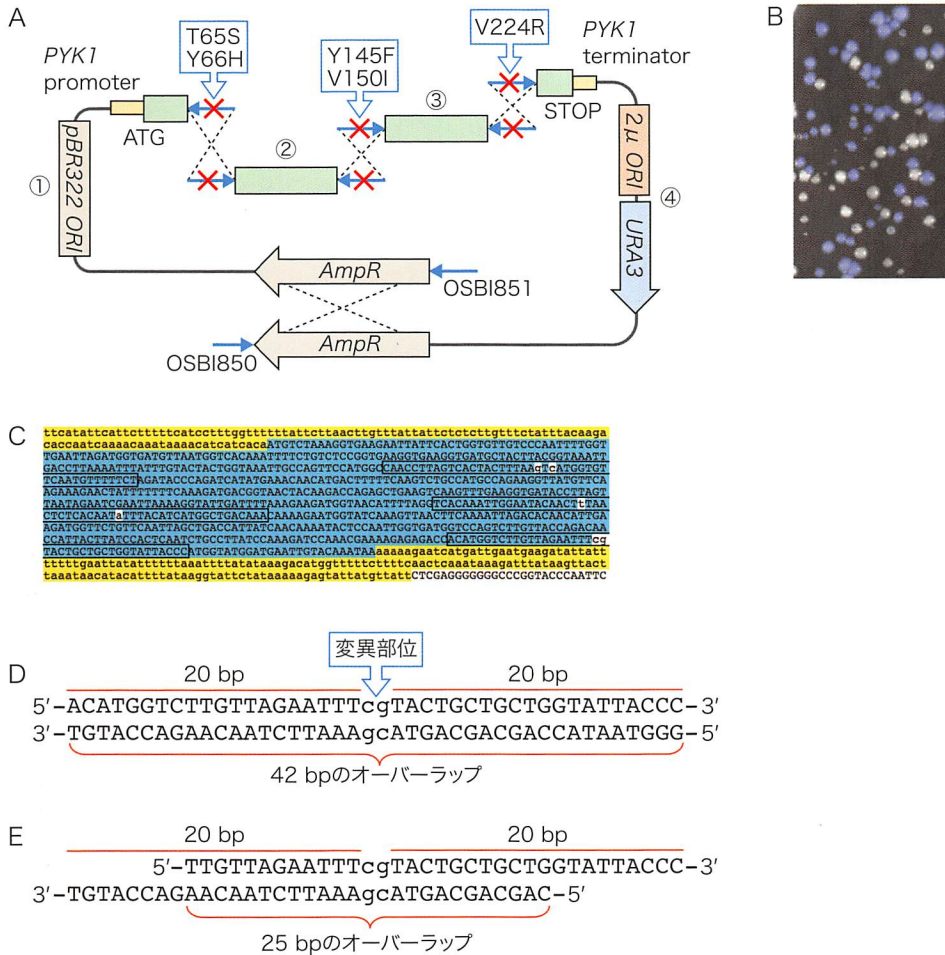


図3 GRCの実施例2：プラスミド上のyEGFPに変異を入れてAzuriteを作成する

A) プラスミド構築の概略。図の青色矢印で示したプライマーセットでPCRを行い①～④のDNA断片を作成し、それらすべてを同時に酵母細胞に導入した。B) 実験結果（コロニーの写真）。青色蛍光をもつコロニーを青色の疑似カラーで示してある。C～E) プライマー設計の例。C) 変異部位の前後の配列からプライマーを作成する（四角で囲んだ部位）。D) 変異部位前後の20 bpを含むプライマーを設計した例。センスとアンチセンスの両方を作成する。E) オーバーラップが25 bpになるようデザインした例。Dと同じ変異が導入されるが、プライマー長を若干短くできる

断すればよい。実施例の図2Aでは、yEGFP内のMscIのサイトでプラスミドを切断している\*2\*3。つなぎ目より内側でプラスミドを切断する酵素が見つからない場合には、実施例の図3Aで示したようにプラスミドを部分に分けてPCRで増幅し、GRCにより結合させることもできる。

なお、インサートのDNA断片は制限酵素で処理しないので、インサートの断片がどのような制限酵素で切断されるかは気にする必要はない。これは、さまざまな遺伝子を同じベクターに導入する際に、使える制限酵素について頭を悩まさずにすむことを意味している。

\*2 切断箇所は、相同組換えを起こす領域の内側であれば、DNA断片の結合箇所から離れていても構わない（DNAの結合は末端でなくても起こる）。

\*3 1カ所よりも2カ所で切断したほうが、組換えが起きていないプラスミドによるバックグラウンドが低い。

## ② PCRプライマーの設計・合成

次に、結合させたいDNA断片をPCR産物で増幅するためのプライマーを設計する。プライマー設計の原則は、DNA断片を結合させる「のりしろ」である相同領域と、PCRのプライミング配列がつながった構造になるよう設計することである。われわれは通常、のりしろが25 bp以上、プライミング配列が20 bpで設計している(図2E, 図3D, Eなど)<sup>\*4\*5</sup>。

図2の実施例では、プロモーター配列にyEmRFPをつなぎたいので、断片のつなぎ目を挟むようにプライマーを設計する(図2Dの矢印で囲んだ配列)。図2ではベクターと相同な配列の長さを変えた3つの実験を行った。それぞれ25 bp-25 bp (#1)、15 bp-20 bp (#2)、27 bp-27 bp (#3)の相同配列をもっている。図2Eは#1のプライマー設計である。

図3の実施例では変異を挟むように両方向のプライマーを設計した。5カ所の変異を3つのつなぎ目に振り分けたので、図3Aに示した6つのプライマーを設計した(図3Cの四角で囲んだ配列)。この実験ではベクターを2つの断片としてPCRで増幅した。プライマー設計の一例として、V224R変異を導入するためのプライマーを図3Dに示した。変異を挟んで20 bpずつをもつ両方向のプライマーを作成する。

## ③ DNA断片の調製(プラスミドの切断・PCRなど)

プラスミドを①で決めた制限酵素で処理する。われわれは通常、DNAの濃度を測定せず、以下のように制限酵素処理したプラスミドを調製しているので、その例を紹介する<sup>\*6\*7</sup>。実験に用いるプラスミドの濃度については、おのおのの研究室で予備実験による最適化を行ったほうがよいだろう。

- ① 1.5 mLの大腸菌カルチャーから精製したプラスミドを50  $\mu$ Lの水に溶かす。
- ② ①のプラスミド溶液10  $\mu$ Lを100  $\mu$ Lの溶液中で制限酵素処理する(～数日)<sup>\*8</sup>。
- ③ 2  $\mu$ Lの制限酵素処理済みプラスミドを酵母の形質転換に用いる。

次に②で設計・合成したプライマーを用いてPCRを行う。われわれは上記①で精製したプラスミドを1,000～10,000倍に希釈してテンプレートとすることが多い。PCRは、ハイ・フィデリティ酵素のKOD-plus-NEO (TOYOBO社)を用いて、50  $\mu$ Lのスケールで行っている。このうち5  $\mu$ Lをアガロースゲル電気泳動での確認に使用し、残りの10～45  $\mu$ Lを酵母の形質転換に使用している<sup>\*9\*10</sup>。

## ④ 酵母細胞へのDNAの導入(形質転換)・酵母の培養

酵母の形質転換は標準的なLiOAc法で行う。プラスミドの選択マーカーに従った合成培地で形質転換株を選択する。実施例図2ならびに図3では、ウラシル合成酵素URA3をマーカーとして用いて

※4 プライマーの合成エラーによる望まない変異を避けるために、プライマーは精製度が高いものを使うほうがよい(OPC, HPLC精製など)。

※5 プライマーが長くなりすぎるときには、合成コストを下げるためにオーバーラップを25 bpになるように設計することもできる(図3E)。

※6 プラスミドはアルカリ法で精製したグレードでよい(カラム精製・フェノールクロロホルム処理等は必要ない)。

※7 制限酵素処理を数日行った方が、組換えが起きていないプラスミドによるバックグラウンドが低い。

※8 酵素処理後に特別な処理(熱処理、アルカリホスファターゼ処理等)は必要ない。

※9 PCR後のサンプルをそのまま用いる(テンプレート・プライマー・酵素等のもち込みは問題にならないため、カラム精製等の特別な処理は必要ない)。

※10 PCR産物はシングルバンドであることが望ましい(ゲルからの切り出し可)。

いるので、SC-Ura培地で選択を行う。2～3日でコロニーが形成される<sup>※11</sup>。

図2の実施例ではyEGFPをyEmRFPに置換しているの、組換えが起こった場合にはマゼンタのコロニーが形成される。一方、組換えが起こらなかった場合（ベクタープラスミドの切れ残りやセルフライゲーション）は、緑色のコロニーとなる。実験結果を図2Bに示した。相同領域の短い#2では、緑色のコロニーが大半であるが、相同領域が25 bp以上の#1と#3では、マゼンタのコロニーの数が大幅に増えている。#3では90%以上のコロニーで組換えを起こしていた<sup>※12</sup>。

図3の実施例では期待通りの組換えが起きるとAzuriteがつくられるため、青色蛍光をもつコロニーがつくられる。図3Bはコロニーを拡大したものである。視野に見える約100個のコロニーの半分以上が青色蛍光をもっていた。

### ⑤ 酵母細胞からのプラスミドの回収・大腸菌への導入

われわれは、KOAc法により酵母からのプラスミド回収を行っている。酵母から回収したプラスミドの量は、電気泳動や塩基配列決定による解析に十分でないため、いったん大腸菌に導入する必要がある。われわれはエレクトロポレーション法により大腸菌を形質転換している。

本稿で紹介した実施例では、酵母のコロニーの蛍光で容易に組換えの判別がつくため、組換えが成功したと考えられるコロニーをいくつか培養し、そこからプラスミドを回収すればよい。一方、通常の実験では組換えが起こったかどうかは酵母のコロニーでは判別できない。この場合、3つの選択肢がある。

- ① 多数のコロニーを掻き集め、一度にプラスミドを回収する
- ② 複数のコロニーをピックアップして、それぞれからプラスミドを回収する
- ③ インサートの有無をコロニーPCRで確認し、ポジティブなコロニーからプラスミドを回収する

筆者らの研究室では、通常①を行っているが、酵母のコロニーに表現型が現れるもの（色がつくなど）については②を行うこともある。GRCは効率が高いので③は通常行わないが、組換え体が著しく得られにくい場合には選択肢としてありうるだろう。

### ⑥ 大腸菌からプラスミドを精製、構造の確認

大腸菌からプラスミドを精製し、制限酵素消化や塩基配列決定により構造を確かめる。これは通常のプラスミドの構築と同じである。

※11 制限酵素で消化したプラスミドのみをコントロールとして形質転換しておくとい。

※12 筆者らのこれまでの経験では、2種類の制限酵素で数日間処理したプラスミドと25 bp-25 bpの相同領域をもつインサート断片を用いた場合には、95%以上の確率で組換えが起こったコロニーが形成される。

## おわりに

最後に、従来の制限酵素—DNAリガーゼを用いたプラスミド構築と比べた際のGRCのメリット・デメリットをまとめた。

### GRCのメリット

- ① 設計の自由度が高い（制限酵素部位の情報を細かく知る必要がない、連結する配列に制約がない、断片の末端でなくても結合できる、複数の断片を同時に結合できる、欠失や部位特異的変異も導入できる）
- ② 高効率で組換えが起きたプラスミドが得られる
- ③ 長いDNA断片も利用できる
- ④ クローニングに用いるDNA断片を精製する必要がない

### GRCのデメリット

- ① 酵母を扱えなければならない
- ② 酵母用の複製起点と選択マーカーをもつプラスミドベクターが必要である
- ③ 時間・手間がかかる（酵母の培養とプラスミド回収のため）
- ④ プライマーが長くなる
- ⑤ PCRによりエラーが入る可能性がある

特に①～③は酵母を使うことにより生じるデメリットで、酵母を日常的に扱っていない研究者にとっては一番大きなハードルとなるだろう。

### 酵母以外の生物用のプラスミドを使えるようにするには？

上記②に関して、哺乳類細胞用のプラスミドベクターなど、酵母の複製起点と選択マーカーをもっていないプラスミドをGRCに用いたい場合には、酵母の複製起点と選択マーカーをそれらのプラスミドに移植する必要がある。これもGRCを用いれば容易に達成できる。佐賀大学の永野幸生准教授らは、この移植を容易に行う方法についてウェブページで解説している<sup>9)</sup>ので参照していただきたい。

### その他の「相同組換えクローニング」

前述したようにGRCは分裂酵母でも可能である。大腸菌でも成功したという報告があり<sup>10)</sup>、われわれの研

究室でも一度成功したが、再現性が非常に悪いため現在は行っていない。

プラスミドの構築にどのような技術を用いるかは、研究者のスキルや環境、どんなプラスミドを構築したいかによって異なるだろう。本稿をお読みいただき、メリットとデメリットの兼ね合いでGRCの導入を検討してみたい。

### 文献

- 1) Chino A, et al : PLoS One, 5 : e79652, 2010
- 2) Ma H, et al : Gene, 58 : 201-216, 1987
- 3) Gibson DG, et al : Science, 329 : 52-56, 2010
- 4) <http://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/~hisaom/>
- 5) <http://yeast.lab.nig.ac.jp/nig/>
- 6) <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>
- 7) 「バイオ実験イラストレイテッド〈7〉使おう酵母できる Two Hybrid」(水野貴之/著), 学研メディカル秀潤社, 2003 ※イラスト入りで酵母実験を詳細に解説した書籍
- 8) 「Methods in Yeast Genetics 2005: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual」(Amberg DC, et al), Cold Spring Harbor Laboratory Pr, 2005 ※Cold Spring Harbor Laboratoryで行われていた酵母実験コースのマニュアル
- 9) <http://www.iac.saga-u.ac.jp/lifescience/researches/research2.htm>
- 10) 例えば, <http://proteome.wayne.edu/RecombCloning2.pdf>

### ● 筆頭著者プロフィール ●

守屋央朗：1898年、神戸大学自然科学研究科博士課程修了。三菱化学生命科学研究所、ワシントン大学メディカルスクール（セントルイス）、ERATO-SORST北野共生システムプロジェクトなどを経て、現職。専門は酵母を用いたシステムバイオロジー。「タンパク質をどれだけ過剰にしたら細胞が死ぬか」に興味をもっている。最近の趣味は走ること。研究室：<http://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/> 個人のウェブページ：  
<http://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/~hisaom>  
ブログ「酵母とシステムバイオロジー」：  
[http://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/HM\\_blog](http://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/HM_blog)  
E-mail：hisaom@cc.okayama-u.ac.jp