

明 細 書

発明の名称：キメラプラスミドライブラリーの構築方法

技術分野

[0001] 本発明は、新規のキメラプラスミドライブラリーの構築方法に関する。

背景技術

[0002] 合成生物学の進展に伴い、複数の遺伝子を連結した長鎖DNAの需要が増加している。長鎖DNAの配列設計においては、使用する遺伝子の種類の選択肢やその遺伝子の発現強度の選択肢など、必然的に多数の発現パラメータを検討する必要があるため、一度の配列設計により目的の結果を達成できる可能性は低い。そこで、多くの場合、最初に設計（Design）し、構築（Build）した長鎖DNAを評価（Test）し、その中身について検討（Learn）を行い、この知見に基づいた新たなDNAを構築するというDBTLサイクル（Design-Build-Test-Learnサイクル）を実行することが前提となる。このDBTLサイクルにおいて多数の発現パラメータを同時に検討するためには、各発現パラメータについて複数の選択肢が存在する中から一つを選択し、それぞれを連結して多種の長鎖DNAを構築するコンビナトリアルライブラリー技術が、効率性の観点から望ましい。すなわち、単一の長鎖DNAのみを構築し評価するより、各発現パラメータに多様性のある複数種類の長鎖DNAを同時並行で構築し比較する方が、各発現パラメータに対するDNA設計の方向性を短いサイクルで導き易い。

[0003] しかしながら、一般的に長鎖DNAの合成には、金銭コスト、時間コストがかかり、複数の長鎖DNAを構築することが困難な場合が多い。長鎖DNA構築においては、化学合成により調達できるDNAの長さが200塩基程度と短いことなどの理由により、遺伝子の機能単位などを指標とした短いDNA断片を多数準備し、これを連結（集積）することにより構築する多重遺伝子断片集積技術が用いられている。このようなDNA断片の集積方法とし

ては、OGAB法（特許文献1：特開2004-129654号公報、非特許文献1：Tsuge, K., et al., *Nucleic Acids Res.* 31, e133 (2003)）、SLIC法（非特許文献2：Li MZ, Elledge SJ (2007) *Nature Methods* 4:251-256）、Golden Gate法（非特許文献3：Engler, C. et al. *PLoS ONE* (2008)）、Gibson Assembly法（非特許文献4：Gibson, D. G., et al. *Nat. Methods*, 6, 343-345. (2009)）、LCR法（非特許文献5：de Kok, S. et al. *ACS Synth. Biol.* (2014)）、出芽酵母の遺伝子集積法（非特許文献6：Gibson, D. G., et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 6, 105, 20404-20409, 2008）など様々な方法が開発されている。

[0004] 複数種類の長鎖DNAを低コストに簡便に調達するためには、この遺伝子集積の際に用いる短いDNA断片に発現パラメーターの異なるものを同時に複数準備し、これを組合せ的に連結するコンビナトリアルライブラリーを作成することが考えられる。上記の遺伝子集積法においても、コンビナトリアルライブラリーを構築する方法が開発されている。

[0005] また、これらの方法により調達された長鎖DNAのコンビナトリアルライブラリーをTestし、発現パラメーターの設計方向性をLearnする際には、長鎖DNAの遺伝子型と、その表現型を対応付ける必要がある。従来のコンビナトリアルライブラリーの構築においては、大別すると2つの方法がある。一つ目は、1つの遺伝子集積において、1種類の長鎖DNAを構築する方法である。この場合、それぞれ材料の異なる遺伝子集積をコンビナトリアルライブラリーの規模の数だけ、個別に行うことになる。どの遺伝子集積がどの遺伝子型になるのかを事前に把握できるため、TESTにおいて遺伝子型を改めて確認しなくとも表現型との対応を迅速に取れるというメリットはあるが、大規模化が困難であるというデメリットがある。二つめは、コ

ンビナトリアルライブラリーに用いる全ての材料を混合し、1回の遺伝子集積によりライブラリーを構築する方法である。この方法では、大規模なコンビナトリアルライブラリーが得られ易いというメリットがある。しかしながら、このライブラリーより選抜されたクローンがどの遺伝子型を持っているのかは、個別にシーケンシングにより塩基配列を確認する必要があるが、長鎖DNAになればなるほど塩基配列の確認に時間がかかるため、TESTが律速段階になるという問題点があった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2004-129654号公報（特許第4479199号）

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Tsuge, K., et al., *Nucleic Acid Res.* 31, e133, 2003

非特許文献2：Li MZ, Elledge SJ, *Nature Methods* 4:251-256, 2007

非特許文献3：Engler, C. et al. *PLoS ONE*, 2008

非特許文献4：Gibson, D. G., et al. *Nat. Methods*, 6, 343-345., 2009

非特許文献5：de Kok, S. et al. *ACS Synth. Biol.*, 2014

非特許文献6：Gibson, D. G., et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 6, 105, 20404-20409, 2008

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] このような状況の中、本発明は、長鎖DNAのコンビナトリアルライブラ

リーを効率的に構築することができ、かつ、律速段階となる塩基配列の確認をしなくとも迅速に次のDBTLサイクルのための長鎖DNAのコンビナトリアルライブラリーを準備可能な、新規の微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 長鎖DNAのコンビナトリアルライブラリー構築を効率的に行うためには、上述のとおり多重遺伝子断片集積技術を用いることが好ましいが、遺伝子集積技術の如何を問わず、集積対象の遺伝子断片が過不足ない状態、即ち各遺伝子断片のモル濃度が等しいことが重要である。しかしながら、特に10を超えるような多い遺伝子断片のモル濃度を等しいモル濃度に調整することは困難なために、遺伝子集積技術を利用して高効率に多数の選択肢からなるコンビナトリアルライブラリーを構築することは困難であった。

[0010] 通常遺伝子集積を行うための材料となる遺伝子断片の準備は、断片ごとに一つずつ行う必要があり、また、これらの断片を等モル濃度統合する際には、DNAの重量濃度を測定し、DNA断片の長さを元に計算をして添加量を決めるが、DNA濃度の測定誤差や、DNAのピペッティングの誤差などから、正確に等モル統合することは極めて困難であった。一方、一度集積してプラスミド状態になった集積体を制限酵素で切断すると元の材料に還元される場合は、得られた材料が理想的な等モル状態になる。本発明者らは、実際にこれを用いて再度集積を行うと、上述の手でDNA断片を統合して集積する場合に比較して100倍以上集積効率が向上することを見出した（Tsuge, NAR, 2003）。さらに、制限酵素で切断すると選択肢断片に分解される集積体の場合は、その選択肢断片の塩基配列が同定されなくても、実物のDNAが存在すれば、これを同様に準備された別の集積体由来の選択肢断片と混合することでコンビナトリアルライブラリーを構築することが可能となる。本発明者らは、この結果に着想を得て、本発明の高効率な長鎖DNAコンビナトリアルライブラリー構築法を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、

枯草菌のプラスミド形質転換系を利用した遺伝子集積法（OGAB法）において、コンビナトリアルライブラリーの集積に用いる全てのDNA断片のモル濃度の比率が可能な限り1に近づくようにするために、上記の方法を採用した。具体的には、コンビナトリアル化の対象となる選択肢遺伝子断片を一通り連結した種プラスミドを構築する。そして、別の選択肢遺伝子断片についても、別途種プラスミドを構築することで、選択肢の最大数に等しい数の種プラスミドを準備する。各種プラスミドを制限酵素で切断することで、一旦遺伝子断片が等モルに混合された溶液を得る。この溶液は、他の種プラスミドと混合しても等モル性が維持される。その後、これらの溶液が含む各種遺伝子断片を直線状に連結することにより、プラスミドベクター部分が周期的に出現する疑似タンデムリピート状態の高分子DNAを得て、これを用いて枯草菌を形質転換する。枯草菌体内でプラスミドベクター部分の相同性を利用して環状化することによりコンビナトリアルライブラリーを効率よく構築する。

[0012] この方法によると、コンビナトリアルライブラリーの構築に必要な等モル濃度の遺伝子断片を極めて簡便にかつ確実に準備でき、ライブラリーの構築規模を従来になく大規模にできるという特徴がある。また、この方法によると、得られたプラスミドの遺伝子型の確認をしなくとも次のサイクルの長鎖DNAのコンビナトリアルライブラリーを構築可能である。すなわち、本発明の要旨は、以下のとおりである。

[0013] [1] 宿主微生物中で有効な複製開始点を含むDNAと、単位DNAが連結した挿入DNAとを含む挿入DNAユニットを、少なくとも1つ有する、微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法であって、

（A）特定の連結順序で連結し得る、複数種類の単位DNAを連結させた、挿入DNAユニットを含むプラスミドを、OGAB法により複数種類調製する工程、

（B）工程（A）で調製した複数種類のプラスミドを、それぞれに適した制限酵素で処理して、単位DNAに分解し、複数種類の単位DNA混合液を調

製する工程、及び

(C) 工程 (B) で得られた複数種類の単位 DNA 混合液を用いて、O G A B 法により単位 DNA を再集積させ、長鎖 DNA 断片を調製する工程を含むことを特徴とする、微生物細胞形質転換用 DNA 断片の調製方法。

[2] 工程 (B) で得られる単位 DNA 混合液における、全ての DNA 断片のモル濃度の比率が 0.8 ~ 1.2 であることを特徴とする、[1] に記載の微生物細胞形質転換用 DNA 断片の調製方法。

[3] 工程 (A) において、一つの種類の挿入 DNA ユニットが含む単位 DNA の種類が、3 ~ 60 種類であることを特徴とする、[1] 又は [2] に記載の微生物細胞形質転換用 DNA 断片の調製方法。

[4] 工程 (B) で用いる制限酵素が 3 種以下である、[1] から [3] のいずれかに記載の微生物細胞形質転換用 DNA 断片の調製方法。

[5] 上記制限酵素が、突出末端を生成する制限酵素である、[1] から [4] のいずれかに記載の微生物細胞形質転換用 DNA 断片の調製方法。

[6] [1] から [5] のいずれかに記載の調製方法により得られた微生物細胞形質転換用 DNA 断片を含むプラスミド。

[7] 宿主微生物中で有効な複製開始点を含む DNA と、単位 DNA が連結した挿入 DNA とを含む挿入 DNA ユニットを、少なくとも 1 つ有する、微生物細胞形質転換用 DNA 断片の調製方法であって、

(B') [6] に記載の複数種類のプラスミドを、それぞれに適した制限酵素で処理して、単位 DNA に分解し、複数種類の単位 DNA 混合液を調製する工程、及び

(C) 工程 (B') で得られた単位 DNA 混合液を用いて、O G A B 法により単位 DNA を再集積させ、長鎖 DNA 断片を調製する工程を含むことを特徴とする、微生物細胞形質転換用 DNA 断片の調製方法。

[8] 得られた長鎖 DNA 断片を含むプラスミドを複数種類選択し、工程 (B') におけるプラスミドとして再利用することを特徴とする、[7] に記載の微生物細胞形質転換用 DNA 断片の調製方法。

[9] [1] から [5] 、 [7] 、 [8] のいずれかに記載の微生物細胞形質転換用 DNA 断片の調製方法を用いるキメラプラスミドライブラリーの構築方法。

発明の効果

[0014] 本発明によると、長鎖 DNA のコンビナトリアルライブラリーを迅速かつ効率的に構築することが可能となる。また、同一のライブラリーから選択された、塩基配列を確認していない複数のプラスミドを、新たなキメラライブラリー構築のために再利用することが可能である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図 1 は、集積用プラスミドベクター pGETS302-SfiI-pBR の構造を示す図である。

[図2]図 2 は、挿入ユニットを構成する単位 DNA の詳細構造を示す図である。

[図3]図 3 は、イソブタノールを高生産するためにデザインされた出芽酵母の人工的な代謝経路を示す図である。

[図4]図 4 は、本発明のキメラプラスミドライブラリーの構築方法を模式的に示す図である。

[図5]図 5 は、本発明の方法により得られた 1 回目のキメラプラスミドライブラリー中の各プラスミドにおける単位遺伝子の向きとイソブタノール生産量を示す図である。

[図6]図 6 は、形質転換に使用したプラスミドを種プラスミドとする、新たなコンビナトリアルライブラリーの構築工程を示す図である。

[図7]図 7 は、本発明の方法により得られた 2 回目のキメラプラスミドライブラリー中の各プラスミドにおける単位遺伝子の向きとイソブタノール生産量を示す図である。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明について詳細に説明する。なお、本明細書において、分子生物学的手法は特に明記しない限り当業者に公知の一般的実験書に記載の方法

又はそれに準じた方法により行うことができる。また、本明細書中で使用される用語は、特に言及しない限り、当該技術分野で通常用いられる意味で解釈される。

[0017] <微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法>

本発明は、長鎖DNAのコンビナトリアルライブラリーを効率的に構築することができ、得られたクローンの遺伝子型の確認をしなくとも新たなコンビナトリアルライブラリーの構築が容易である、新規の微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法に関する。具体的には、宿主微生物中で有効な複製開始点を含むDNAと、単位DNAが連結した挿入DNAとを含む挿入DNAユニットを、少なくとも1つ有する、微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法であって、

(A) 特定の連結順序で連結し得る、複数種類の単位DNAを連結させた、挿入DNAユニットを含むプラスミドを、OGAB法により複数種類調製する工程、

(B) 工程(A)で調製した複数種類のプラスミドを、それぞれに適した制限酵素で処理して、単位DNAに分解し、複数種類の単位DNA混合液を調製する工程、及び

(C) 工程(B)で得られた複数種類の単位DNA混合液を用いて、OGAB法により単位DNAを再集積させ、長鎖DNA断片を調製する工程を含むことを特徴とする。

[0018] 本発明においては、宿主微生物中で有効な複製開始点を含むDNA（プラスミドベクター）と、挿入DNAを含む挿入DNAユニットとを、交互に連結し得る構造を有する複数の単位DNAとして調製し、該単位DNAを連結して、挿入DNAユニットを少なくとも1つ有し、かつ同一の単位DNAを少なくとも2つ有するDNA断片を作製した後に、該DNA断片と宿主微生物のコンピテント細胞と共培養して、該微生物からプラスミドDNAを回収することによりコンビナトリアルライブラリーを調製し、コンビナトリアルライブラリーから選抜されたプラスミドDNAを新たなライブラリーの種プ

ラスミドとして利用することが可能な方法である。

[0019] 本発明において、挿入DNAユニットとは、宿主微生物中で有効な複製開始点を含むDNAと挿入DNAとを含む単位をいう。なお、微生物細胞形質転換用DNA断片は、挿入DNAユニットを1つ以上含んでいる。さらに、挿入DNAユニットには、宿主微生物中で有効な複製開始点を含むDNAと挿入DNA以外にも、必要に応じて適当な塩基配列を含むことができる。例えば、本発明の方法によって挿入DNAに含まれる遺伝子を発現するためのプラスミドを作製する場合には、プロモーターやオペレーター、アクチベーター、ターミネーターといった転写翻訳を制御する塩基配列を含んでもよい。酵母を宿主とした場合のプロモーターとして、具体的には、解糖系などの一次代謝産物のプロモーターなどが挙げられる。

[0020] 本発明において、宿主微生物中で有効な複製開始点を含むDNAとは、作製されるDNA断片で形質転換され得る微生物中でDNAの複製が行われるものであれば、いかなるものであっても良い。本発明の宿主微生物としては、*Bacillus* 属細菌が用いられるが、具体的な微生物と、該微生物中で有効な複製開始点を含むDNAとして、例えば*B. subtilis* (枯草菌) の場合は θ 型の複製機構を有するもので、具体的には、pTB19 (Imanaka, T., et al. J. Gen. Microbioi. 130, 1399-1408. (1984)) や pLS32 (Tanaka, T and Ogra, M. FEBS Lett. 422, 243-246. (1998)、pAM β 1 (Swinfield, T. J., et al. Gene 87, 79-90. (1990)) 等のプラスミドに含まれる複製開始点等の配列が挙げられる。

[0021] 本発明において、挿入DNAとは、クローニングしようとするDNAであり、その種類や大きさは特に限定されない。DNAの種類は、原核生物、真核生物、ウイルスなどの天然由来配列のみならず、人工設計配列などいずれでもよく、特に制限されない。好ましくは、一連の代謝経路を構成する遺伝

子群や、宿主ゲノムに存在する遺伝子発現の不活性化を目的としたアンチセンスRNA遺伝子群や、代謝経路遺伝子群とアンチセンスRNA群の両方が混入したものなどが挙げられる。本発明の挿入DNAは単位DNAが連結した構造を有する。

[0022] 本発明において単位DNAとは、互いにその順序を保ったまま繰り返し連結し得る構造を有しており、順に連結した単位DNAが、1つの挿入DNAとなるDNA断片を構成する。単位DNA断片のDNA鎖長は特に制限されない。なお、互いにその順序を保ったまま連結するとは、挿入DNA上で隣り合う配列を有する単位DNAがその順序および向きを保って結合することをいい、また、繰り返し連結するとは、挿入DNAの5'末端の塩基配列を有する単位DNAの5'末端と挿入DNAの3'末端の塩基配列を有する単位DNAの3'末端が結合することをいう。このような単位DNAとして、具体的には、例えば、断片の突出末端の塩基配列の相補性を利用して、お互いに順序を保ったまま繰り返し連結し得るような末端を有するものが挙げられる。この突出の構造は、回分構造（パリンドローム）以外であれば、5'末端突出、3'末端突出の突出の形状の違いも含めて、特に制限はない。ただし、単位DNAの作製の際に突出末端を制限酵素の消化により作製できることが好ましい。制限酵素としては、特定の配列を認識してその近傍に任意の配列の突出末端を作成可能な酵素を用いると、単位DNA断片の突出末端が各連結部位で異なるものにできるため、その連結する順序が保たれる。これらの制限酵素の例としては、通常の分子生物学に用いられる制限酵素の他に、人工制限酵素のTALENやZNF、あるいはCRISPR-Cpf1などの突出末端精製可能なCRISPR技術関連酵素などが挙げられるが、このましくはAarI、A1wNI、BbsI、BbvI、BcoDI、BfuAI、BglI、BsaI、BsaXI、BsmAI、BsmBI、BsmFI、BspMI、BspQI、BtgZI、DraIII、FokI、PflMI、SfaNI、SfiIなどのようなTypeII制限酵素を用いることが良い。

- [0023] 突出末端生成に用いられる制限酵素の種類数は1つの単位DNAの切り出しには、1種類の制限酵素による切断が好ましい。必ずしも全ての単位DNAを同一種類の制限酵素の消化により得る必要はないが、使用する制限酵素の種類数は少ない方がよく、3種類以下であることが好ましく、2種類以下であることがより好ましく、1種類であることがさらに好ましい。
- [0024] 挿入DNAユニットを構成する単位DNAのうち一つ以上の単位DNAについては、宿主細胞で有効な複製開始点を含む必要がある。それ以外の単位DNAについては、代謝経路クラスター、生物の連続したゲノム配列の一部もしくは全部、人工遺伝子、人工遺伝子回路等、連続した塩基配列を構成する要素であるが、単独の単位DNAが生物学的な機能単位と一致しなければならないという制約はない。
- [0025] 単位DNAの作製方法としては、本発明の単位DNAを作製し得る方法であればいかなるものであってもよい。例えば、鋳型DNA上の塩基配列に各突出末端を生成する制限酵素認識配列を付加したプライマーを用いたポリメラーゼチェインリアクション（PCR）により増幅したDNA断片、あるいは、予め末端に任意の突出配列を生成するように制限酵素認識配列を組み込んだ化学合成DNA断片などをプラスミドベクターにクローニングし塩基配列を確認後用いる。各単位DNAは、特定の順序で連結して最終的に取得したい微生物形質転換用DNA断片となるように設計される。目的とする挿入DNAを構成するために連結される単位DNAの数（種類）としては、3～60（種類）であり、好ましくは、5～50（種類）、より好ましくは、8～25（種類）、さらに好ましくは、10～20（種類）である。
- [0026] 以下に、本発明の微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法の各工程を詳細に説明する。
- [0027] [工程（A）]
- 本発明の微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法における工程（A）においては、いわゆる種プラスミドが調製される。種プラスミドは、工程（B）、および工程（C）を考慮して、集積体構築後に単位DNA断片に分割

可能なように、それぞれの設計に合わせて、適切な制限酵素認識配列を単位DNAの境界、もしくは近傍に導入されている構造である必要がある。制限酵素としては、AarI、AlwNI、BbsI、BbvI、BcoDI、BfuAI、BglI、BsaI、BsaXI、BsmAI、BsmBI、BsmFI、BspMI、BspQI、BtgZI、DraIII、FokI、PflMI、SfaNI、SfiIなどのように、任意の配列の突出末端を作製可能な酵素を用いることが好ましい。これらの制限酵素処理により得られる複数の突出配列は、単一種プラスミド内で唯一の配列となっている必要がある。また、種プラスミド群は、コンビナトリアルライブラリーの組換え単位（多くの場合単位DNAがその単位に一致するが、場合により組換え単位が一部の種プラスミドにおいては、複数の単位DNAからなる場合がある。）において同一の突出配列を、同一の鎖に、同一の順番で有する必要がある。

[0028] O G A B種プラスミドの構築においては、即ち、上述の各単位DNAをほぼ等モルとなるように調整した単位DNA混合液中、DNAリガーゼなどを用いて連結（ライゲーション）することにより微生物形質転換用DNA断片を作製することも可能であるが、上記の各単位DNAのみが遺伝子集積の出発材料に限定されるわけではなく、最終的に上述のように各単位DNAに分割可能な構造となっていれば、いかなる集積方法で準備された集積体も利用可能である。ここで、ほぼ等モルとは、単位DNA混合液における、全てのDNA断片のモル濃度の比率が0.8～1.2の範囲であること、好ましくは0.9～1.1の範囲であること、より好ましくは0.95～1.05の範囲であること、さらに好ましくは、1.0であることをいう。なお、単位DNA混合液における、全てのDNA断片のモル濃度の比率が上記数値範囲内となることを、単位DNA混合液に含まれる単位DNAの濃度の最高値を最低値で除した値が、1.0～1.5の範囲であること、1.0～1.2の範囲であること、1.0～1.1であること、1.0であることを、言い換えることもできる。

- [0029] 本工程で調製される種プラスミドの単位DNAは、遺伝子クラスター、遺伝子、遺伝子断片などどのようなものであってもよい。
- [0030] 単位DNAの連結方法は特に制限されないが、ポリエチレングリコールと塩の存在下で行うことが好ましい。塩としては、1価のアルカリ金属の塩が好ましい。具体的には、10%のポリエチレングリコール6000と250 mMの塩化ナトリウムを含むライゲーション反応液で行うことがより好ましい。また、各単位DNAの反応液中の濃度は特に制限はないが、好ましくは、各々1 fmol / μ L以上の濃度でかつ等モルである。ライゲーションの酵素、反応温度、時間は特に制限はないが、好ましくは、T4 DNAポリメラーゼで37℃、30分以上である。
- [0031] 本発明の微生物形質転換用DNA断片における宿主微生物としては、自然形質転換能を有するものであれば、特に限定されない。このような微生物としては、DNAを取り込む際に一本鎖DNAに処理して取り込む自然形質転換能を有するもの等が挙げられる。具体的には、*Bacillus*属細菌、*Streptococcus*属細菌、*Haemophilus*属細菌、および*Neisseria*属等が挙げられる。また、*Bacillus*属細菌としては、*B. subtilis* (枯草菌)、*B. megaterium* (巨大菌)、*B. stearothermophilus* (中度高熱菌) 等が挙げられる。このうち最も好ましい微生物としては、その自然形質転換能および組換え能に優れた枯草菌が挙げられる。
- [0032] 微生物細胞をコンピテントとする方法は、それぞれの微生物に適した公知の方法を選択することができる。具体的には、例えば、枯草菌の場合には、Anagnostopoulou, C. and Spizizen, J. J. *Bacteriol.*, 81, 741-746 (1961) に記載の方法を用いることが好ましい。また、形質転換の方法もそれぞれの微生物に適した公知の方法を用いることができる。コンピテント細胞に与えるライゲーション産物の液量も特に制限はない。好ましくは、コンピテント細胞培養液に対し、1/20から等量であり、より好ましくは、半量であ

る。形質転換体からプラスミドを精製する方法としても公知の方法を用いることができる。

[0033] 上述の方法により得られたプラスミドが目的とする挿入DNAを有していることは、制限酵素切断により発生する断片のサイズパターンや、PCR法、塩基配列決定法により確認することができる。また、挿入DNAが物質生産などの機能を有する場合は、その機能を検出することにより確認することが可能である。

[0034] コンビナトリアルライブラリー構築において用いる種プラスミドの調整は、一般的な環状プラスミドの精製法であればどのような方法でも用いることが出来るが、望ましくは、プラスミドDNA以外のDNAの混入の恐れのない方法が良く、具体的には塩化セシウム－エチジウムブロマイド密度勾配超遠心法が好ましい。

[0035] [工程 (B)]

本工程は、工程 (A) で調製した複数種類のプラスミド (種プラスミド) を、それぞれに適した制限酵素で処理して、単位DNAに分解し、複数種類の単位DNA混合液を調製する工程である。工程 (A) で調製した複数種類のプラスミド (種プラスミド) は、高純度に精製された後、単位DNAに分解される。単位DNAへの分解は、工程 (A) での設計に合わせて、適切な制限酵素を選択することができる。

[0036] 突出末端生成に用いられる制限酵素の種類数は1つの単位DNAの切り出しには、1種類の制限酵素による切断が好ましい。必ずしも全ての単位DNAを同一種類の制限酵素の消化により得る必要はないが、使用する制限酵素の種類総数は少ない方がよく、3種類以下であることが好ましく、2種類以下であることがより好ましく、1種類であることがさらに好ましい。

[0037] 本工程で得られる単位DNA混合液は、種プラスミドが極めて高純度に精製されるため、プラスミドDNA以外のDNA断片が存在しないようになっている。調製した長鎖DNAを制限酵素で切断し、制限酵素を取り除くことにより、全てのDNA断片のモル濃度の比率が限りなく1に近づいたDNA

断片溶液（単位DNA混合液）を得ることができる。

[0038] [工程（C）]

本工程は、工程（B）で得られた複数種類の単位DNA混合液を用いて、OGAB法により単位DNAを再集積させ、長鎖DNA断片を調製する工程である。工程（B）において得られた、全てのDNA断片のモル濃度の比率が限りなく1に近づいたDNA断片溶液（単位DNA混合液）を出発材料として遺伝子集積法（OGAB法）を行うことで、より効率的に遺伝子集積を行うことができる。なお、本工程における単位DNA混合液を用いて、OGAB法により単位DNAを再集積させる方法については、工程（A）における説明を適用できる。

[0039] 本発明は、さらに、宿主微生物中で有効な複製開始点を含むDNAと、単位DNAが連結した挿入DNAとを含む挿入DNAユニットを、少なくとも1つ有する、微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法であって、

（B'）上述した本発明の方法により調製された複数種類のプラスミドを、それぞれに適した制限酵素で処理して、単位DNAに分解し、複数種類の単位DNA混合液を調製する工程、及び

（C）工程（B'）で得られた単位DNA混合液を用いて、OGAB法により単位DNAを再集積させ、長鎖DNA断片を調製する工程を含むことを特徴とする、微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法も含まれる。

[0040] 上述した本発明の方法により得られた長鎖DNA断片を含むプラスミドを複数種類選択し、工程（B'）におけるプラスミドとして再利用することができる。

[0041] 本発明には、上述の本発明の調製方法により得られた微生物細胞形質転換用DNA断片を含むプラスミドも含まれる。また、本発明の調製方法を用いるキメラプラスミドライブラリーの構築方法も含まれる。

実施例

[0042] 以下の実施例にて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例

によって限定されるものではない。

[0043] 実施例において用いた試薬等、共通する試験方法等は以下のとおりである。

枯草菌の宿主としてRM125株(Uozumi, T., et al., *Mol. Gen. Genet.*, 152, 65-69 (1977))と、その派生株のBUSY9797株を用いた。枯草菌で複製可能なプラスミドベクターとしては、pGET118(Kaneko, S., et al., *Nucleic Acids Res.* 31, e112 (2003))を使用した。抗生物質カルベニシリンは、和光純薬工業社から購入した。抗生物質テトラサイクリンは、シグマ社から購入した。制限酵素SfiIとBspQIは、NEB社から購入した。T4 DNA Ligaseは、タカラバイオ社から購入した。大腸菌のプラスミド構築用の一般的なライゲーションには、Takara Ligation Kit (Mighty) (タカラバイオ社)を用いた。単位DNA調製用のPCR反応には、東洋紡社のKOD plus polymeraseを使用した。一方、プラスミドにクローニングされたDNAの塩基配列決定のためのコロニーPCRには、タカラバイオ社製のEx-Taq HSを用いた。pMD-19(simple)は、タカラバイオ社から購入した。環状プラスミド精製用酵素Plasmid Safeは、EPICENTER社製のものを使用した。DNA電気泳動用の低融点アガロースゲルである、2-Hydroxyethyl agaroseは、シグマ社から購入した。他の一般的な電気泳動用アガロースゲルは、インビトロジェン社のUltraPure Agaroseを使用した。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール 25：24：1と、TE飽和フェノール(8-キノリノール含有)は、ナカライテスク社製のものを使用した。リゾチームは和光純薬工業社から購入した。LB培地の培地成分及び寒天は、ベクトンディッキントン社製のものを使用した。IPTG(isopropyl β -D-thiogalactopyranoside)は、和光純薬工業社製を使用した。

他の全ての培地成分および生化学試薬は、和光純薬工業社製のものを使用した。

[0044] 特記以外のプラスミドの構築は、大腸菌DH5 α 株、JM109株、TOP10株の何れかを使用した。構築したプラスミドの大腸菌からの少量精製は、キアゲン社のQIAprep Spin Miniprep Kitを、大量精製は、同社のQIAfilter Midi Kitを用いた。酵素反応液からのDNAのクリーンアップには、キアゲン社のMinElute Reaction Cleanup Kitか、同社のQIAquick PCR purification Kitを用いた。通常のアガロースゲル電気泳動で分離して得られたゲルブロックを精製する場合は、キアゲン社のMinElute Gel Extraction Kitを用いた。超微量分光光度計は、Thermo社のnano-drop 2000を用いた。塩基配列決定には、アプライドバイオシステムズ社製の蛍光自動シーケンサーの3130xlジェネティックアナライザーを用いた。

[0045] 他の一般的なDNAの操作については、標準プロトコール (Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)) に従って行った。OGAB法等による枯草菌の形質転換とプラスミド抽出は、既法の通り行った (Tsuge, K., et al., Nucleic Acids Res. 31, e133. (2003))。

[0046] 1. 挿入DNAユニットの調製

(1) 集積用プラスミドベクターの構築

集積用プラスミドベクターpGETS302-SfiI-pBRは、大腸菌のpBR322の複製開始点と、枯草菌で機能する複製開始点repA、出芽酵母で複製可能なARS4とCEN6を有する大腸菌-枯草菌-酵母間シャトルプラスミドベクターで、pGETS109 (Tsuge, et.

al., Nucleic Acids Res., 31, e133 (2003)) を元に多段階の過程を経て構築されたプラスミドである。図1にその構造を、配列番号1に塩基配列を示す。集積遺伝子のクローニングサイトは、2つのSfiI切断部位間となっており、集積の際には最も大きい15kbのSfiI断片を用いる。大腸菌での選択は、アンピシリンを用いた。本プラスミド5μgに、滅菌水を添加して全体を40μlとした後、制限酵素に付属する10×NEB2.1 Bufferを5μlと、制限酵素SfiI (NEB社) 5μlを添加し50℃、2h反応させた。得られた液体を、低融点アガロースゲル電気泳動により分離後、ベクター本体の約15kbの断片をゲルから切り出し、目的のDNA断片を精製し、20μlのTEに溶解して、その1μlを取り超微量分光光度計により濃度を測定した。

[0047] (2) 単位DNA突出配列の設計法

図2に示すように、1つの挿入ユニットを構成する単位DNAは、集積用ベクターpGETS302を含めて、全部で14断片存在する。出芽酵母中でイソブタノール代謝経路に関わる遺伝子群は、全部で12個あり、これらを順に第1から第12単位DNAと定義する。出芽酵母中で、形質転換用選択マーカーとして働く、kanMX4を第13単位DNAと、集積ベクターを第14単位DNAと定義する。第1～第14単位DNAは数字通りに連続し、第14と第1単位DNAが連結する構造になることで、1つの挿入ユニットを形成する。各単位DNAの末端には、断片の左右にそれぞれに単位DNAの番号ごとに指定された固有の3塩基の3'末端突出塩基が存在する。この相補性により連結相手が指定されている。具体的には、次のような構成となる。(第14単位DNA) - GTT - (第1単位DNA) - TGA - (第2単位DNA) - CGA - (第3単位DNA) - TGT - (第4単位DNA) - GAT - (第5単位DNA) - TTG - (第6単位DNA) - GTC - (第7単位DNA) - ATG - (第8単位DNA) - TGG - (第9単位DNA) - TAG - (第10単位DNA) - ACT - (第11単位DNA)

) - G T A - (第 1 2 単位 D N A) - C T T - (第 1 3 単位 D N A) - T C
T - (第 1 4 単位 D N A)。

[0048] 2. 出芽酵母イソブタノール生産遺伝子群の遺伝子発現量の調節

(1) 出芽酵母

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、真核の微生物であり、真核生物モデル微生物として、研究が進んでおり、ゲノム配列が完全に明らかになっていて、様々な情報が蓄積している。出芽酵母は嫌気呼吸として、アルコール発酵を行う。出芽酵母はビールやワイン、日本酒などの発酵に古くから利用されており、エタノール生産能力の高さからバイオエタノール生産の宿主として広く用いられてきた。現在では、エタノール以外の有用物質生産の宿主としても工業的に広く用いられており、炭素鎖数が 3 以上の高級アルコールや各種の有機酸に加え、色素や香料、サプリメントなどの付加価値品の生産にも利用されている。真核生物である出芽酵母は、原核生物のバクテリアと異なりミトコンドリアや核などのオルガネラを有する。また、通常ポリシストロニックな発現形式ではなくモノシストロニックな発現形式をとるため、1 つの遺伝子ごとに 1 つのプロモーターが必要であり、例えば 1 2 個の遺伝子を発現させるためには 1 2 個のプロモーターが必要である。

[0049] (2) イソブタノール代謝経路デザイン

イソブタノールの主な用途は有機合成溶剤、ペイント除去剤、メタクリル酸 *i*-ブチルの原料である。また、イソブタノールは脱水することでイソブチレンに変換可能であり、エチル *t* e r t -ブチルエーテル (E T B E) などの燃料混合剤やバイオジェット燃料の原料として利用でき、さらにイソブチレンをイソオクテン (ジイソブチレン) に変換することで、様々なポリマーの原料としても利用可能である。出芽酵母は本来エタノールを主な生成物として生産するが、わずかながらフーゼルアルコールとしてイソブタノールを生産する。イソブタノールを高生産するためにデザインした出芽酵母の人工的な代謝経路を図 3 に示す。出芽酵母内の *L*-バリン代謝経路内の

2ケトイソ吉草酸 (2-keto-isovalerate) にケト酸脱炭酸酵素 (KDC) とアルコール脱水素酵素 (ADH) をコードする2つの遺伝子 (例えば、*Lactococcus lactis* 由来 *kivd* と出芽酵母由来 *ADH6*) を導入すればイソブタノールの生産量が向上するため、これを集積対象に加えた。しかしながら、基質の2ケトイソ吉草酸が本来ミトコンドリア内で生産されることや、ケトール酸還元異性化酵素 (*ILV5*) や *ADH6* が必要とする *NADPH* が不足しているなどの複数の原因により効率的なイソブタノール生産が行えない。そこで、ミトコンドリア内で行われるピルビン酸から2ケトイソ吉草酸までの経路 (図3二重線で示された代謝経路) を構成しているアセト乳酸合成酵素 (*ILV2*)、ケトール酸還元異性化酵素 (*ILV5*)、ジヒドロキシ酸脱水酵素 (*ILV3*) をコードする3つの遺伝子と、ミトコンドリア内の *NADPH* を調整するためのリンゴ酸酵素 (*MAE1*) の計4遺伝子 (図3で、二重下線で示された遺伝子) の発現の増強を目的にこれらを集積対象に加えた。さらに、これらの代謝経路を細胞質側にも構成されるように、*ilv2CEc*、*ilvDL1*、*alsLp* の3遺伝子、及び、細胞質内の *NADPH* の不足を解消するために、炭酸固定酵素 (*PYC2*)、リンゴ酸脱水素酵素 (*MDH2*)、リンゴ酸酵素 (*MAE1*) のN末端のミトコンドリア移行シグナルを取り除いた *sMAE1* の3遺伝子の計6遺伝子 (図3中、一重下線で示された遺伝子) を集積対象に加えた。以上に記載した12個の遺伝子には、それぞれ酵母内で強かに発現することの可能な一次代謝経路のプロモーターとターミネーターを導入した。

[0050] (3) 種プラスミド1：過剰発現遺伝子群セットのデザイン

出芽酵母中で12個の遺伝子を発現できるように、12種類のプロモーターおよびターミネーターを用いた発現カセットを設計した。具体的には、*ADH1*、*FBA1*、*HXT7*、*PDC1*、*PGK1*、*SED1*、*TDH1*、*TDH2*、*TDH3*、*TEF1*、*TEF2*、*TP11* のプロモーターとターミネーターを用いて、12種類の発現カセットを設計した (図4の遺伝子

ORF上の矢印がプロモーター配列を、ピンがターミネーター配列を意味する。)。それぞれの発現カセットのプロモーターとターミネーターの間には、挿入する遺伝子の開始コドン(ATG)から終止コドン(TAA)までをサブクローニングできるようにBspQIサイトを逆向きに2つ配置した配列(・・・atgAGAAGAGCTCTTCAataa・・・)を付加した。PDC1プロモーターとTDH2プロモーターについては配列中に含まれるBspQIサイトを削除するため、PDC1プロモーターは-492位のGをCに、TDH2プロモーターは-462位のCをGに、それぞれ変異させた配列を使用した。プロモーターとターミネーターを含む12種類の発現カセットの左右の末端配列は、SfiIでの切断後に単位DNAの番号ごとに指定された固有の3塩基の3'末端突出塩基が出現するようにデザインした制限酵素サイト(SfiIサイト)をそれぞれ付加し、相補性により連結相手が指定されるように配列を設計した。これらの12種類のプロモーターとターミネーターを含む発現カセットは、pMAもしくはpMKベクターにクローニングされるようデザインした。次に、出芽酵母中でのイソブタノール代謝経路に関わる12個の遺伝子群として、ilvEc、ilvDLI、alsLp、kivd、ILV3、ILV5、ADH6、PYC2、ILV2、MDH2、maeBEc、sMAE1を選定し、それぞれの遺伝子の開始コドンはATG、終止コドンはTAAで統一されるよう配列を改変した。また、これらの遺伝子は12種類の発現カセットのいずれにもサブクローニングできるよう、両末端にBspQIサイトを配置した配列(TAGGCTCTTCAatg・・・taaaAGAAGAGCCTA)を付加するよう設計した(図2)。BspQIサイトを両末端に有するこれらの遺伝子は、pCR-BIuntII-TOPOベクターにクローニングされるようにデザインした。最終的に、pMAもしくはpMKにクローニングされたADH1、FBA1、HXT7、PDC1、PGK1、SED1、TDH1、TDH2、TDH3、TEF1、TEF2、TPI1のプロモーターとターミネーターを有する12種類の発現カセットのBspQIサイトそれぞれに、il

vEc、ilvDLI、alsLp、kivd、ILV3、ILV5、ADH6、PYC2、ILV2、MDH2、maeBEc、sMAE1が挿入されるよう、合計12種類の過剰発現カセット（ilvCEc-1st, ilvDLI-2nd, alsLp-3rd, kindEc-4th, ILV3-5th, ILV5-6th, ADH6-7th, PYC2-8th, ILV2-9th, MDH2-10th, maeBEc-11th, sMAE1-12th）をデザインした（配列番号2-13）。また、出芽酵母内において、薬剤での選択が可能なように、第13番目の断片としてKanMX断片（kanMX4-13th）を導入した（配列番号14）。

[0051] (4) 種プラスミド2：発現抑制遺伝子群セットのデザイン

(3) 種プラスミド1：過剰発現遺伝子群セットのデザインを踏襲し、同一のプロモーターおよびターミネーター配列を用いているが、挿入する各遺伝子のORF断片は、過剰発現遺伝子群セットに比較して、反対向きとなるように設計した。具体的には(3)で設計した、それぞれの発現カセットのプロモーターとターミネーターの間には、挿入する遺伝子の開始コドン(ATG)から終止コドン(TAA)までをサブクローニングできるようにしたプラスミドをBspQIで切断し、ここに新たにBspQIサイトを逆向きに2つ配置した配列を連結することで、突出配列(・・・atgttaAGAAGAGCTCTTCAcattaa・・・の下線部配列)を変更したしたプラスミドを準備した。このような手順を経て作成された発現抑制カセット(ilvCEc-as-1st, ilvDLI-as-2nd, alsLp-as-3rd, kindEc-as-4th, ILV3-as-5th, ILV5-as-6th, ADH6-as-7th, PYC2-as-8th, ILV2-as-9th, MDH2-as-10th, maeBEc-as-11th, sMAE1-as-12th)の塩基配列を、配列番号15-26に示す。単位DNAの結果的に、種プラスミド2の単位DNAは、種プラスミド1の単位DNAに比較して、新たに導入した突出配列の6塩基分が長くなっている。なお、薬剤選択マーカーのKanMXについて

ては、種プラスミド1と同じものを使用した。

[0052] (5) 種プラスミドの構築

遺伝子 (ORF 領域) については、PCR 法を用いて出芽酵母 (YPH 499 株) ゲノムから増幅した。まず、上記で決定した突出組合せ間の DNA 配列を増幅するためのプライマーの 5' 末端に上記で決定した制限酵素認識部位を、望ましい突出を切り出す位置に付加し、更に 5' 末端に TAG の配列を付加したプライマーを使用した。これらのプライマー組を用いて、出芽酵母ゲノムから指定領域の DNA 断片を増幅した。PCR の反応条件は、1 反応 (50 μ l) につき、KOD Plus 10 $\times$ buffer Ver. 2 5 μ l、25mM MgSO₄ 3 μ l、dNTP (2mM each) 5 μ l、KOD Plus (1 unit/ μ l) 1 μ l、ラムダファージ DNA (TOYOBO) 48 pg、プライマー (F プライマーと R プライマーそれぞれ) 15 pmol、滅菌水を添加して作製し、GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems 社) により、以下のプログラムにより行った。94 $^{\circ}$ C、2 min、インキュベーション後、98 $^{\circ}$ C 10 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、68 $^{\circ}$ C 1 min を 30 サイクル行い、最後に 68 $^{\circ}$ C 7 min インキュベートした。

[0053] 増幅した DNA 断片は、0.7% の低融点アガロースゲル (2-Hydroxyethyl Agarose Type VII, シグマ社) で、1 $\times$ TAE (Tris-Acetate-EDTA Buffer) バッファー存在下で、汎用アガロースゲル電気泳動装置 (i-MyRun, N 核酸用電気泳動システム、コスモバイオ社) で、100V (約 8V/cm) の電圧を印加し、1h 泳動することにより、プラスミドベクターと単位 DNA を分離した。この泳動ゲルを、1 μ g/ml の臭化エチジウム (シグマ社) を含む 1 $\times$ TAE バッファー 100ml で 30 min 染色し、長波長の紫外線 (366 nm) で照らすことにより可視化することで、PCR 産物の目的サイズをカミソリで切り出し、1.5ml チューブに回収した。回収した低融点アガロースゲル (約 300mg 程度) に、1 $\times$ TAE バッファーを添加する

ことにより全体積を約700 μ lとし、これを65℃、10min恒温することにより、ゲルを溶解した。その後、等量のTE飽和フェノール（ナカライテスク社）を添加し、良く混合することで制限酵素を失活させた。遠心分離（20,000 $\times$ g、10min）によりフェノール相と水相に分離し、水相（約900 μ l）を新しい1.5mlチューブに回収した。ここに1-ブタノール（和光純薬工業社）を500 μ l添加し、良く混合後、遠心分離（20,000 $\times$ g、1min）により分離し、水分を飽和した1-ブタノールを取り除くという操作を水相の体積が450 μ l以下になるまで繰り返すことで、水相の体積を減少させた。これに、3M酢酸カリウム-酢酸緩衝液（pH5.2）を50 μ lと、エタノール900 μ lを添加し、遠心分離（20,000 $\times$ g、10min）することにより、DNAを沈殿し、これを70%エタノールでリンスして、20 μ lのTE（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0）に溶解した。この回収DNAは、使用まで-20℃で保存した。

[0054] 得られたDNA断片は、以下に示す方法によりTAクローニング法により大腸菌プラスミドベクター中にクローニングした。DNA断片8 μ lに、TAKARA社のPCR反应用酵素Ex-Taqに付属する10 $\times$ Ex-Taq Buffer 1 μ lに、100mM dATP 0.5 μ l、Ex-Taq 0.5 μ lを添加して、65℃で10min恒温することで、DNA断片の3'末端にAの突出を付加した。このDNA断片溶液1 μ lに、TAKARA社のpMD19-Simple 1 μ lと滅菌水3 μ lを混合後、TAKATA Ligation (Mighty) Mix 5 μ lを加え、16℃で30min恒温した。このライゲーション溶液の5 μ lを50 μ lの大腸菌DH5 α のケミカルコンピテントセルに添加して、氷上で15min恒温後、42℃で30sec熱ショックを与え、2min氷上で放置後、LB培地を200 μ l添加して、37℃で1h恒温後、カルベニシリンを100 μ g/mlの濃度で含む、1.5%寒天を含むLBプレートに塗抹し、37℃で終夜培養することによりプラスミドの形質転換体を得た。

- [0055] 得られたコロニーを、PCR用鋳型DNA調製試薬（シカジーニアスDNA調製試薬、関東化学）を用いて調製した。具体的には、試薬キット内の試薬aと試薬bを1：10の比率で混合した溶液を2.5 μ l用意し、ここにプレート上のコロニーをつまようじで少量採取したものを懸濁後、72℃、6 min処理後、94℃、3 min処理した。得られた液体に、TAKARA Ex-Taq用10×酵素2.5 μ lと2.5 mM dNTP溶液2 μ l、10 pmol/ μ lのM13Fプライマー0.25 μ lと10 pmol/ μ lのM13Rプライマー0.25 μ l、滅菌水17 μ l、Ex-Taq HS 0.5 μ lを添加して、94℃、5 minインキュベーション後、98℃、20 sec、55℃、30 sec、72℃、1 minを30サイクル行うことでDNAを増幅し、このPCR産物の塩基配列を調べることで、望ましい配列と完全に一致するかどうか調べた。最終的に全てのクローンから正しい配列が得られた。
- [0056] 望ましい配列を有するDNA断片をクローンするプラスミドを持つ大腸菌形質転換体をそれぞれ2 mlの100 μ g/mlのカルベニシリン入りLB培地で37℃、120 spm、一晩終夜培養し、得られた菌体を、QIAfilter Plasmid miniKit（キアゲン社）を用い、マニュアルに従って精製した。得られたプラスミドをBspQIで切断し、電気泳動によるサイズ分画によりORF領域を回収した。
- [0057] 酵母のプロモーターとターミネーターをBspQIサイトで連結したDNA断片をSfiIサイトで切り出せるように設計したDNAの合成（図2過剰発現用）は、サーモフィッシャー社に依頼した。これらのDNA断片は、プラスミドベクターpAMもしくはpMKにクローニングされた形で納品された。このプラスミドをBspQIで切断し、上述のORFのBspQI断片を連結したものを構築して種プラスミド1の単位DNAを持つプラスミドとして準備した。これらの単位DNA断片の配列は、配列番号2-13の通りである。種プラスミド2用には、上述のpMAもしくはpMKにクローニングされたプロモーターとターミネーターをBspQIサイトで連結したD

NA断片をBspQIで切断し、リンカーDNAを導入することにより、図2の発現抑制用の様に新たに構築した。このプラスミドをBspQIで切断し、上述のORFのBspQI断片を導入することにより構築した。これらの望ましい配列を有するDNA断片をクローンするプラスミドを持つ大腸菌形質転換体をそれぞれ2mlの100μg/mlのカルベニシリン入りLB培地で37℃、120spm、一晚終夜培養し、得られた菌体を、QIAfilter Plasmid miniKit（キアゲン社）を用い、マニュアルに従って精製した。得られたプラスミドの10μlを分取して、滅菌水30μl、10×NEB buffer #2 5μl、SfiI制限酵素（NEB）5μlを添加し、50℃、2h反応させることにより単位DNA断片をプラスミドベクターから切り離した。それを0.7%の低融点アガロースゲルで、1×TAE（バッファー存在下で、汎用アガロースゲル電気泳動装置で、50V（約4V/cm）の電圧を印加し、1h泳動することにより、プラスミドベクターと単位DNAを分離した。この泳動ゲルを、1μg/mlの臭化エチジウム（シグマ社）を含む1×TAEバッファー100mlで30min染色し、長波長の紫外線（366nm）で照らすことにより可視化することで、3kb付近をカミソリで切り出し、1.5mlチューブに回収した。回収した低融点アガロースゲル（約300mg程度）は、上述の通り精製し、20μlのTEに溶解した。このようにして調製した単位DNAプラスミドは、市販されているLambda phage genome DNA（TOYOBO）の希釈系列を基づいて作成した検量線を用いて、核酸蛍光染料のSYBR Green II 蛍光プレートリーダーにより定量した。

[0058] (6) 遺伝子集積

種プラスミド1の集積には配列番号2-14の、種プラスミド2の集積には配列番号14-26の各単位DNAと、遺伝子集積用ベクターのpGETS302-SfiI（配列番号1）が0.1foml以上の等モルを含む混合溶液10μlに2×ライゲーションバッファーを11μl添加し、全体を

37℃、5 min間恒温した後、1 μlのT4 DNAリガーゼ（Takara）を添加して、37℃で4 h恒温した。10 μlを取って電気泳動することによりライゲーションされていることを確認後、これを10 μl新しいチューブに採取し、枯草菌コンピテントセルを100 μl添加し、37℃で30 min、ダックローターで回転培養した。その後、300 μlのLB培地を添加して、37℃で1 h、ダックローターで回転培養し、その後、培養液を10 μg/mlのテトラサイクリン入りLBプレートに広げ、37℃で一晩培養した。コロニーは、過剰発現と遺伝子発現抑制のどちらの構築からも100個の形質転換体を得られた。プラスミドを抽出し制限酵素切断パターンを調べることでそれぞれ1個ずつ目的の構造（図4の工程（A）の種プラスミド）をもつ形質転換体を選択した。

[0059] （7）種プラスミドの高純度精製

塩化セシウム－エチジウムブロマイド密度勾配超遠心法により高純度のプラスミドDNAを調達した。具体的には、LB培地に抗生物質（テトラサイクリン）を加えたものを200 ml用意し、500 mlの三角フラスコに100 mlずつ入れて、37℃で終夜培養した。十分に増殖後、プラスミドのコピー数を増加させるために1 MのIPTGを各フラスコに100 μlずつ添加して、さらに3時間から12時間程度培養した。培養終了後、50 mlずつ50 mlチューブ（ファルコン2070）4本に分注し、5,000 rpm 10 min遠心した。上清を捨てて、菌ペレットをボルテックスにより完全にほぐした。10 mg/mlのリゾチーム入りSol. I 溶液（組成 50 mM グルコース、25 mM Tris-Cl（pH 8.0）、10 mM EDTA）を用意し、菌入りチューブ4本にそれぞれ2.5 mlずつ添加し、よく混合した。これを37℃、30 minインキュベーションした。5,000 rpm 10 min遠心して、上清をデカントで取り除き、新たにリゾチームの入っていないSol. Iを4本のチューブにそれぞれ2.5 ml添加し、ペレットを均一に懸濁した。新鮮なSol. II（組成 0.2 N NaOH、1%（w/v）ドデシル硫酸ナトリウム）を調製し、4

本のチューブにそれぞれ5 mlずつ添加し、ゆっくりと混合して透明にした。Sol. III (組成 60 ml 5 M 酢酸カリウム、11.5 ml 氷酢酸、28.5 ml 水) を各チューブに3.75 mlずつ添加し、白濁物質が均等に分散できるようにある程度強い力で混合した。5,000 rpm 10 min 遠心して、上清をピペットで吸い、新しい4本のネジ蓋の50 ml チューブ (ファルコン2070) に移した。それぞれのチューブに5 ml のフェノール・クロロフォルムを添加し、激しく混合した。5,000 rpm 10 min 遠心して、上清をピペットで吸い、新しい4本のネジ蓋の50 ml チューブ (ファルコン2070) に移した。100%エタノールをそれぞれ25 ml 添加し混合して、5,000 rpm 10 min 遠心した。上清を取り除いた。10 ml のTEに10 mg/ml のRNase A 溶液を10 μ l 添加した溶液 (終濃度10 μ g/ml) を各チューブに2.5 ml ずつ添加し、沈殿を溶解した。4本のチューブの液体を1本にまとめ、37℃の気相のインキュベーターで30 min インキュベーションした。インキュベーション終了後に5 ml のフェノール・クロロフォルムを添加し、よく混合後、5,000 rpm 10 min 遠心した。上清を新しい50 ml チューブに移し取り、Sol. III を1 ml 添加後、100%エタノールを25 ml 添加し、混合した。その後、5,000 rpm 10 min 遠心し上清を取り除いた。沈殿に5.4 ml のTEを添加し、完全に溶解した。次に、正確に秤量した6.40 g の塩化セシウムを投入し、完全に溶解した。更に、1.3 g/ml の塩化セシウム溶液 (1.3 g の塩化セシウムと1 ml の水を混ぜて作製した溶液で、体積調製していない。) を2.6 ml 添加した。最後に、10 mg/ml のエチジウムブロマイド溶液を600 μ l 添加し、よく混合した。超遠心チューブ (ベックマン362181) を1本用意し、超遠心チューブに中身を移した。バランスとの重さの違いが20 mg 以内になるように、水、あるいは1.3 g/ml 塩化セシウム溶液 (比重約1.5 g/ml 程度) を添加して重さを微調整した。超遠心装置 (ベックマンコールドター) で以下の条件で遠心を行った。温度 18℃、速度 5

0,000 rpm、加速度 Max、減速度 Maxで15時間以上遠心した。遠心終了後、紫外線(365 nm)観察下で、1 mlのシリンジに、針(21 G×5/8")をセットしたものを用意して、ccc型のプラスミドのバンドに挿し、プラスミド溶液を回収し、15 mlチューブ移した。ここにSol. IIIを500 μl添加し、次に、全体が3 mlになるように水を添加した。さらに、9 mlの100%エタノールを添加した。5,000 rpm 10 min遠心し、上清を取り除いた。得られた沈殿に700 μlのTEを15 mlチューブに添加し、DNAを溶解した。これを1.5 mlのチューブに移し、600 μlの1-ブタノールを添加して混合し、15,000 rpmで10 s程度遠心して、2層に分離し、上の層のブタノール層を捨てた。新たに、600 μlの1-ブタノールを添加して混合し、15,000 rpmで10 s程度遠心して、2層に分離し、上の層のブタノール層を捨てた。この操作を、水層が450 μl以下になるまで続けた。50 μlのSol. IIIを添加し、さらに100%エタノールを900 μl添加した。15,000 rpmで10 min遠心した。上清を捨てて、沈殿を70%エタノールでリンスした。沈殿を22 μlのTEに溶解した。

[0060] (8) 種プラスミドからの単位DNAの生成

図4の工程(B)の単位DNAの調製は、以下のように行った。超遠心法により高純度に精製した種プラスミド300 ng分を分取し、滅菌水で40 μlにメスアップ後、10×NEB buffer #2を5 μlと、制限酵素Sfi I (NEB社)を5 μl添加し、37℃、2 h反応させた。反応液を1 μl電気泳動して切断されていることを確認した。その後、2つの種プラスミドの反応液を統合し、450 μl フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1)(ナカライテスク社)を添加し、混合後、遠心分離(20,000×g、10 min)によりフェノール相と水相に分離し、水相(約900 μl)を新しい1.5 mlチューブに回収した。ここに1-ブタノール(和光純薬工業社)を500 μl添加し、良く混合後、遠心分離(20,000×g、1 min)により分離し、水分を飽和した

1-ブタノールを取り除くという操作を水相の体積が450 μ l以下になるまで繰り返すことで、水相の体積を減少させた。これに、3 M酢酸カリウム-酢酸緩衝液 (pH 5.2) を50 μ lと、エタノール900 μ lを添加し、遠心分離 (20,000 $\times$ g、10 min) することにより、DNAを沈殿し、これを70%エタノールでリンスして、20 μ lのTEに溶解した。

[0061] (9) コンビナトリアルライブラリーの構築

図4の工程(C)のコンビナトリアルライブラリーの構築は、以下のように行った。(8)得られたDNA混合溶液は、(6)で示した遺伝子集積法により集積し、約400個の形質転換体を得た。得られた形質転換体からランダムに96株のコロニーを選択して、2 mlの10 μ g/mlのテトラサイクリン入りLB培地で一晚培養し、内部のプラスミドのコピー数を増幅するためにIPTGを終濃度1 mMとなるように添加してさらに37°Cで3 h培養した。得られた菌体からプラスミドを抽出した。これらの抽出したプラスミドのそれぞれの遺伝子の向きを、配列番号27-62に示すプライマーセットを用いて、PCR法により決定した(図5)。その結果、12遺伝子全ての要素が揃っていたものは、75クローンで、21クローンは単位DNAの部分的欠損、あるいは、重複が認められた。75クローン中71種類の異なる組合せが存在し、4クローンについては、種類の重複が認められた。

[0062] (10) コンビナトリアルライブラリーの酵母への導入

(9)で得られた96個のコンビナトリアルライブラリーを酢酸リチウム(LiAc)法を用いて、酵母に導入した。具体的には、親株となる*S. cerevisiae* YPH499株をYPD培地(10 g/L 乾燥酵母エキス[ナカライテスク社製]、20 g/L ペプトン[ベクトン・ディッキンソン(BD Difco)社製]、20 g/L グルコース、40 mg/L アデニン硫酸塩)5 mLに植菌し、30°C、150 rpmで一晩培養した。培養液を3,000 rpmで5 min遠心分離して培地を捨てた後、滅菌蒸留水5 mLで菌体ペレットを懸濁した。さらに、3,000 rpmで5 min遠心分離した後、上清を捨て、TE/LiAc溶液1.5 mL

L (10×TE 150 μL、10×LiAc 150 μL、滅菌蒸留水1, 200 μL) に菌体ペレットを懸濁した。菌体懸濁液100 μLを1.5 mLエッペンドルフチューブに移し、プラスミドDNA (コンビナトリアルライブラリー) 1~5 X μLとCarrier DNA [タカラバイオ (クロンテック) 社製] 2 μLを加えた後、TE/LiAc/PEG溶液600 μL (10×TE 60 μL、10×LiAc 60 μL、50% PEG 3350溶液 480 μL) を加え、10 secボルテックスにて混合した。混合液を30℃で30 minインキュベーションした後、ジメチルスルホキシド (DMSO) 70 μLを加えて転倒混和し、さらに42℃で15 minインキュベーションした。14, 000 rpmで5 sec遠心分離した後、上清を完全に抜き取り、L-ロイシンを含まない100×アミノ酸ストック溶液 (4 g/L アデニン硫酸塩、2 g/L L-ヒスチジン、4 g/L L-トリプトファン、2 g/L ウラシル、3 g/L L-リシン) 250 μLを加えて菌体ペレットを懸濁し、滅菌蒸留水550 μLを追加した後、全量の懸濁液をSD培地 (6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids (YNB) [ベクトン・ディッキンソン (BD Difco) 社製]、20 g/L グルコース) の寒天プレート (培地に20 g/L 寒天末を加える) に広げ、乾燥したのちに30℃で3日間インキュベーションし、形質転換体を得た。

[0063] (11) 出芽酵母におけるイソブタノール生産性の評価

得られた酵母形質転換体のコロニーをSD選択培地 (L-ロイシンを含まない100×アミノ酸ストック溶液を加えたSD培地) 5 mLに植菌し、30℃、150 rpmにて3日間培養した。3,000 rpmで5 min遠心分離し培地を捨てた後、滅菌蒸留水5 mLで菌体ペレットを懸濁した。さらに3,000 rpmで5 min遠心分離して上清を捨てた後、新しいSD選択培地5 mLで菌体ペレットを懸濁し、30℃、150 rpmにて48時間培養した。培養液を3,000 rpmで5 min遠心分離した後、上清を回収した。アセトン45900 μLに回収した培地上清5100 μLを加

えてボルテックスにて混合し、12,000rpmで5min遠心分離した後、上清を回収した。回収した上清をガラスバイアルに移し、ガスクロマトグラフィー質量分析装置（GCMS QP2010 Ultra [島津製作所社製]）にて、DB-FFAPカラム [アジレント・テクノロジー社製] を用いて培地中に含まれるイソブタノールの濃度を定量した。その結果、図5に示すように、クローン96の146mg/Lを筆頭に様々なイソブタノール生産量を示す株が得られた。その中には過剰発現と、遺伝子発現抑制の種プラスミドを酵母に導入した株のイソブタノール生産量（それぞれ29mg/Lと15mg/L）よりも生産量の多い株が得られた。

[0064] (12) ライブラリーからの優良プラスミドの選択と、再度のライブラリー構築

イソブタノール生産量が120mg/ml以上となった、クローン8、42、68、96の形質転換に使用したプラスミドを種プラスミドとする、新たなコンビナトリアルライブラリーを構築した（図6）。まず、上記プラスミドを持つ枯草菌を大量培養し、(7)で示した超遠心法によりプラスミドを抽出し、(8)で示した方法により等モル混合した単位DNAを準備した。その後(6)で示した遺伝集積を行うことで、約200個の形質添加からなる2サイクル目のコンビナトリアルライブラリーを構築した。ここからランダムに選択した24コロニーについて、枯草菌からプラスミドを抽出し、(10)に示す方法で個別に酵母に導入し、(11)に示す方法でイソブタノール生産量を測定した。枯草菌から抽出したプラスミドについて別途(9)に記載の方法により各単位DNA内の遺伝子の向きを同定した。これらの結果を図7に示す。ライブラリーは、集積が完全に行われていないクローン3と12の2つのクローンを除く22個のクローンについて、期待通り、4つの種プラスミド中で共通となっている第6、第9、第11、第12単位DNAが共通となっており、その他の単位DNAについては、おおむね種プラスミドの組成比率を反映した形になった。22個中異なった組合せは、19種類存在し、そのうち2種類は種プラスミドとなった一回目のライブラリ

一のクローン68と96と同一であった。イソブタノール生産量については、クローン8、4、23、13が、それぞれ173, 171, 169, 164 mg/Lとなり、1回目のライブラリーの最高値の146 mg/Lよりも高い生産性を示すクローンが多数得られた。

産業上の利用可能性

[0065] 本発明によると、本発明によると、長鎖DNAのコンビナトリアルライブラリーを迅速かつ効率的に構築することが可能となる。特に、得られたプラスミドの遺伝子型の確認を行わなくても同一のライブラリーから選択された複数のプラスミドを、新たなキメラライブラリー構築のために再利用することが可能であるため、2回目以降のライブラリーの構築を迅速に行えるという特徴を有する。

請求の範囲

- [請求項1] 宿主微生物中で有効な複製開始点を含むDNAと、単位DNAが連結した挿入DNAとを含む挿入DNAユニットを、少なくとも1つ有する、微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法であって、
- (A) 特定の連結順序で連結し得る、複数種類の単位DNAを連結させた、挿入DNAユニットを含むプラスミドを、OGAB法により複数種類調製する工程、
- (B) 工程(A)で調製した複数種類のプラスミドを、それぞれに適した制限酵素で処理して、単位DNAに分解し、複数種類の単位DNA混合液を調製する工程、及び
- (C) 工程(B)で得られた複数種類の単位DNA混合液を用いて、OGAB法により単位DNAを再集積させ、長鎖DNA断片を調製する工程
- を含むことを特徴とする、微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法。
- [請求項2] 工程(B)で得られる単位DNA混合液における、全てのDNA断片のモル濃度の比率が0.8～1.2であることを特徴とする、請求項1に記載の微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法。
- [請求項3] 工程(A)において、一つの種類の挿入DNAユニットが含む単位DNAの種類が、3～60種類であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法。
- [請求項4] 工程(B)で用いる制限酵素が3種以下である、請求項1から3のいずれか1項に記載の微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法。
- [請求項5] 上記制限酵素が、突出末端を生成する制限酵素である、請求項1から4のいずれか1項に記載の微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法。
- [請求項6] 請求項1から5のいずれか1項に記載の調製方法により得られた微生物細胞形質転換用DNA断片を含むプラスミド。

- [請求項7] 宿主微生物中で有効な複製開始点を含むDNAと、単位DNAが連結した挿入DNAとを含む挿入DNAユニットを、少なくとも1つ有する、微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法であって、
- (B') 請求項6に記載の複数種類のプラスミドを、それぞれに適した制限酵素で処理して、単位DNAに分解し、複数種類の単位DNA混合液を調製する工程、及び
- (C) 工程(B')で得られた単位DNA混合液を用いて、OGAB法により単位DNAを再集積させ、長鎖DNA断片を調製する工程を含むことを特徴とする、微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法。
- [請求項8] 得られた長鎖DNA断片を含むプラスミドを複数種類選択し、工程(B')におけるプラスミドとして再利用することを特徴とする、請求項7に記載の微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法。
- [請求項9] 請求項1から5、7、8のいずれか1項に記載の微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法を用いるキメラプラスミドライブラリーの構築方法。