

1 細胞ゲノミックスの為の試薬と環境

DNA-free phi29 DNA ポリメラーゼの開発

Reagents and environment for single cell genomics

高橋 宏和^{①,②,③}、岡村 好子^{①,②}、小堀 俊郎^③

Hirokazu Takahashi, Yoshiko Okamura, Toshiro Kobori

①広島大学大学院 先端物質科学研究科
Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University

②独立行政法人科学技術振興機構, CREST, 広島
CREST, Japan Science and Technology Agency (JST), Hiroshima

③(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization

はじめに

人類にとって微生物は重要な生物資源であり、これまでに様々な酵素が微生物から発見され、食品加工や医薬品製造など多くの産業分野で利用されている。しかし、従来の微生物研究は単離・培養を基本技術としていることから、これまでは培養可能な微生物しか有用酵素の探索対象にされてこなかった。このため、地球上に存在する微生物種の99%以上を占めると言われている培養が困難または不能な難培養微生物の生態については現在もほとんど解析が進んでいない。従って、難培養微生物は生物資源として非常に大きな潜在的可能性を秘めているにも関わらず、未だ手付かずの状態である¹⁾。

これら難培養微生物を解析する方法としてメタゲノム解析という手法が主に利用されてきた。メタゲノム解析は、海水や土壌など環境サンプルに含まれる微生物群集や、糞便に含まれる腸内細菌群集のDNAをまとめて回収し、その塩基配列をそのまま大量解読する手法である²⁾。メタゲノム解析はサンプルに含まれる微生物の種類やその構成等を解析するには非常に有効な手法であり、特に次世代シーケンサー(NGS)の登場によって解析量が飛躍的に拡大してからは、メタゲノム解析の報告は年々増加傾向にあり、例えば、腸内細菌の種類比が肥満に関与していることや病気との因果関係などが示唆されている。しかしながら、シーケンサーで解読できる個々の塩基配列長は長くても600 bp程度と

短く、特にNGSではさらに短いため、様々な微生物種の膨大な短い断片情報の中から、断片化前のゲノム配列を再構築して有用遺伝子を探索することは非常に困難である。そのため、メタゲノム解析で新規有用遺伝子を単離したという報告は、メタゲノム解析の報告数に比べて格段に少ない。

そこで近年では難培養微生物の生態や生理機能を解析する方法として、シングルセルゲノミクス(single cell genomics)と呼ばれる手法が提案されている³⁾。これは、環境中の微生物群集から微生物1細胞を単離し、全ゲノム増幅(Whole genome amplification, 以下WGA)と呼ばれる手法でゲノムDNA全体を複製し、複製したゲノムDNAの塩基配列を決定する方法である。微生物1細胞から全ゲノム配列の解析が可能となれば、培養することができない微生物であってもゲノムDNAの情報から生態や生理機能を推測することができ⁴⁻⁵⁾、さらにはゲノム配列情報から難培養性微生物の培養条件の推定や、新規有用遺伝子群を探索することも可能であるとされている。このWGAに最適な増幅方法として、10年ほど前からphi29 DNAポリメラーゼ(以下、phi29 DNAP)を利用したMultiple displacement amplification(MDA)法⁶⁾が有力な方法として今日最も多く利用されている。しかしながら、実際にMDAをシングルセルゲノミクスに適用するためにはいくつかの問題が存在している。

本報ではまず初めに、シングルセルゲノミクスのキープイントであるWGAに適した試薬としてのDNA-free phi29 DNAPの開発について報告する。

phi29 DNAPとMDA法

phi29 DNAPは、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に感染するバクテリオファージphi29が持つDNAポリメラーゼである⁷⁾。phi29 DNAPは、(1) 30℃付近で活性を持つ、(2) 強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持ち、複製のエラー率が極めて低い、(3) DNA合成速度が速い、(4) 一度の反応で長いDNA (70 kb 以上) を合成できる、そしてなにより(5) 強い鎖置換活性を持ち、伸張方向にある2本鎖DNAをほどこしながらDNA合成を進めることができる(図1)、といった他のDNAポリメラーゼにはないユニークな特徴を持つ。phi29 DNAPのこのような特徴を最大限に利用したMDAの増幅原理⁶⁾は図2に示す。MDAの特性とし

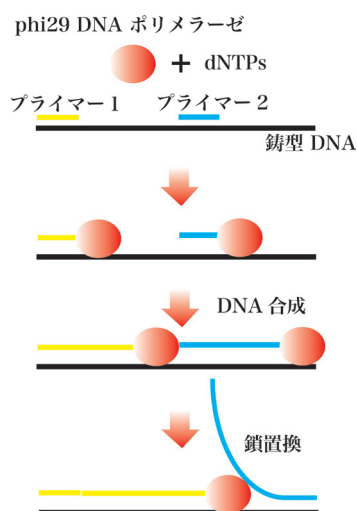


図1 phi29 DNAポリメラーゼによるDNA合成の模式図
phi29 DNAポリメラーゼは強い鎖置換活性を持ち、伸張方向にある2本鎖DNAをほどこしながら（鎖置換反応）、DNA合成はそのまま継続される。

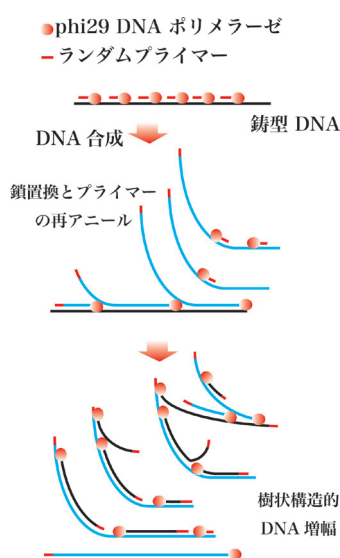


図2 MDA法の全ゲノム増幅模式図

て、(1) 増幅バイアスが起きにくい、(2) 全ゲノム配列に対するカバー率が高い、(3) 増幅後の収量がマイクログラムからミリグラムオーダーと非常に高い、などがあり、限られた数の細胞や貴重なサンプルもMDAで試料DNA全体を複製することにより、様々な遺伝子解析に用いることが可能になる。実際MDAは現時点で最も主力となるWGAであり、既に海外メーカーでキット化されている。

MDAの問題点

MDAは極わずかな試料DNAでもDNA全体を正確かつ大量に複製することができる革新的な技術である。しかし、MDAはその増幅原理から、反応溶液に含まれる全てのDNAが増幅されてしまう。そればかりか反応溶液に試料DNAを添加していないにも関わらず、試料DNAを添加した場合とほぼ同等量の増幅産物が検出され(図3)、何らかのDNAが非特異的な増幅産物として生成されたことが分かる。また、極めて微量の試料DNAをMDAに用いた場合、試料DNAに対する夾雑DNAの割合が高くなり、結果として非特異産物が大部分を占めることになり、実験結果の信頼性を揺るがす大きな問題になる。このように、増幅産物の有無または増幅量だけでは目的のDNAが増幅されたかどうかを判断できないため、増幅産物が目的の試料DNAに由来するかどうかを検証する何らかの方法、例えば制限酵素切断によるバンドパターンの解析やPCRによる既知領域の増幅等が必要である⁸⁻⁹⁾。

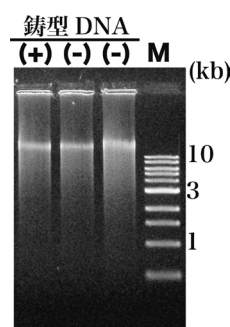


図3 MDA反応産物のアガロース電気泳動結果
(+) 鋳型有り、(-) 鋳型無し、MはDNAサイズマーカー。全ゲノムMDA反応産物は非常に大きな長さになるため、ゲノムDNAの電気泳動同様に約20 kb近辺に滞留する。

例として、既に市販されているphi29 DNAPを用いて試料DNA (pUC19) でMDA反応を行い、増幅産物を制限酵素 (BamH I/EcoR I) で切断した結果を示す(図

4). pUC19 DNAに由来する増幅産物は図中に黄色の矢印で示した約2.7 kbの明瞭なバンドとして検出され、pUC19 DNAに由来しない非特異産物(赤矢印)と区別することができる。試料DNAが多い場合はpUC19 DNA由来の増幅産物が検出されるが、試料DNAが少なくなるにつれpUC19 DNA由来の増幅産物は認められず、非特異産物だけが検出されることが分かる。しかしながら、配列情報が不明な難培養微生物ではこのような検証を行うことができないため、配列解析の結果が出るまで「何が増幅されたか判らない」という状況にある。

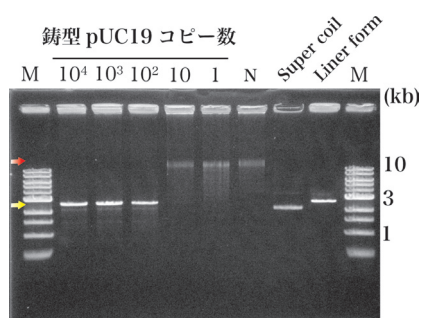


図4 増幅産物を制限酵素BamHI/EcoRIで切断後に電気泳動した結果
pUC19由来の産物は2.7 kbの明瞭なバンド(黄矢印)を示すのに対し、非特異産物(赤矢印)は制限酵素で切断されないため区別が可能。

このように試料DNAが少ないほど、非特異産物のリスクが高まるため、既報のMDA法の推奨プロトコルでは、安定した増幅産物を得るために、1ナノグラム以上(ヒト細胞で 10^3 細胞分、大腸菌で 10^6 細胞分)の試料DNAを要求している。したがって、MDAによる再現性・信頼性の高いシングルセルゲノミクスを行うためには、この非特異産物の問題を原因から解決する必要がある。その原因は、増幅に使用するランダムDNAプライマー同士による増幅とphi29 DNAPに夾雑しているDNA由来の増幅であるとされ、国内外の研究者がこの問題におよそ10年以上も取り組んでいる。

我々はまず、プライマーの構成をDNAからRNAに変更することによって、プライマー由来の非特異産物を抑制することに成功した⁹⁾。phi29 DNAPは逆転写酵素活性を持たないため、RNAを鋳型としては使えないが、プライマーとしては使えるためである。しかしながら、RNAプライマーの利用によって、phi29 DNAPに夾雑しているDNAが増幅結果に直接影響すること、すなわちphi29 DNAP製品のロット間差がより明確に結果に現れるようになってきた。

phi29 DNAPは遺伝子組換え大腸菌で生産されるため、生産過程や精製過程において、phi29 DNAPが大腸

菌のゲノムDNAを吸着し、精製した酵素溶液に夾雑DNAとして混入するものと考えられている。このような夾雑DNAによるDNA合成酵素の汚染は、PCRで用いられる耐熱性DNAポリメラーゼでも報告¹⁰⁾されており、このためPCRは非常に高感度であるにもかかわらず、これまで特に原核微生物感染症診断には積極的に利用されてこなかった経緯がある¹¹⁾。そこで我々は関東化学株式会社と共同で、phi29 DNAPのDNA-free化を図ることで、MDAにおける非特異産物の抑制を目指すこととした。

従来法によるphi29 DNAPの精製

DNAに高い親和性を示す酵素の精製方法として、DNA分解酵素(以下、DNase)により夾雑DNAを分解除去する方法が一般的に用いられてきた¹²⁾。PCR法に使用される耐熱性のDNAポリメラーゼでは、非耐熱性のDNaseを用いて夾雑DNAを分解した後、加熱処理によりDNaseだけを熱変性により失活させることができる。しかし、phi29 DNAPは中温性の酵素であるため、DNaseだけを熱変性させることはできない。そこで、phi29 DNAPを精製用タグとの融合タンパク質として大腸菌に発現させ、アフィニティレジンにタグを介してphi29 DNAPを固定化し、DNaseと分解した夾雑DNAを洗浄除去する方法をまず始めに検討した(図5A)。

本精製方法を用いて、DNaseとしてDNA断片の末端から分解する酵素、DNA断片の内部から分解する酵素、2本鎖DNAを分解する酵素、1本鎖DNAを分解する酵素など種々のDNaseを用いて夾雑DNAの分解除去を試みた。しかし、何れのDNaseを用いて調製したphi29 DNAPも全ゲノム増幅法において、非特異産物を抑えることはできなかった(図5B)。この原因として、phi29 DNAPとDNaseが立体的に干渉し、phi29 DNAPと結合したDNA分子にDNaseが接触できなかったのではないかと推測した。また、逆にDNase由来と思われるDNAの混入が一部で観察された(図5C)。さらには、本精製方法は大量のDNaseを使用するため、phi29 DNAPからDNaseを完全に洗浄・除去することが非常に困難であることも判明した。同様なDNase残存やDNA混入は、耐熱性DNAポリメラーゼのDNA-free化でも報告¹¹⁻¹²⁾があったため、DNaseに依存しない全く新しい精製方法を検討することとした。

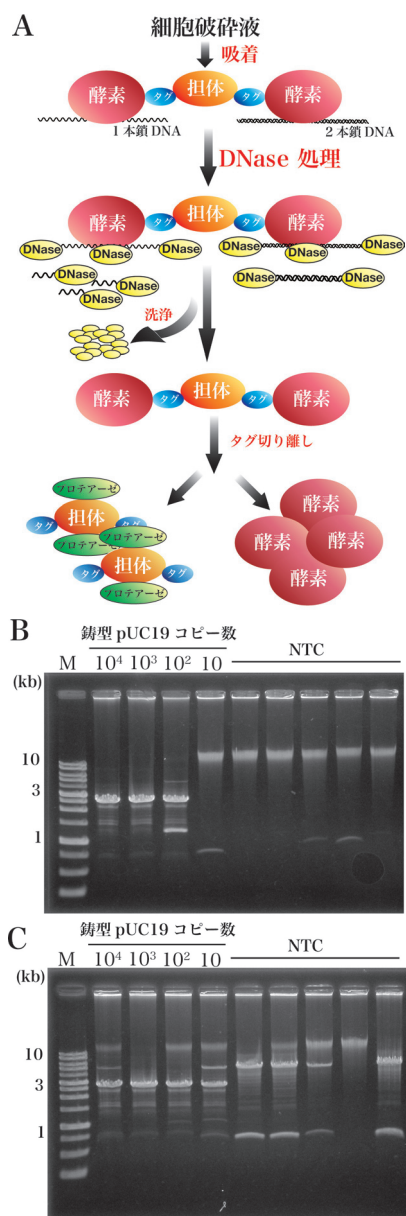


図5 従来法によるphi29 DNAPの精製
(A) DNaseを用いた非耐熱性酵素の精製工程。(B) 従来法で精製した酵素による増幅結果その1。(C) 従来法で精製した酵素による増幅結果その2。増幅産物はBamHI/EcoRIで切断後、電気泳動している。M, 1kb DNA サイズマーカー; NTC, no template control.

新たな精製方法の開発

(1) PEIによるゲノムDNAの沈殿除去

phi29 DNAPを大腸菌から抽出する過程で、ゲノムDNAを速やかに分離することが有効と考え、既に古典的な方法となりつつあるが、マイナスに荷電したDNA分子をプラスに荷電した分子、特に現存する素材の中で最もカチオン密度が高いポリマーであるポリエチレンジアミン(以下、PEI)で電気的に中和することでDNA分子を沈殿させる方法を検討した¹³⁾。

一方で菌体を破碎すると、菌体から溶出される高分子ゲノムDNAが破碎液粘度の上昇を引き起こすため、一般的には超音波処理やDNaseによるDNA断片化処理が行われる。しかし、この断片化処理が強いとゲノムDNAとphi29 DNAPの吸着を促進する傾向が見られた。そのため、菌体破碎液の粘度低下を確保しつつ、ゲノムDNAの断片化を極力抑える条件を検討した。その結果、DNase (Benzonase™, Millipore社)を用い、100 mM NaCl存在下で氷温下、5分間処理する条件が最適と判断された。さらにこの菌体破碎液にPEI溶液を添加することでゲノムDNAを不溶化させ、遠心分離により菌体破碎物残渣と一緒にゲノムDNAを沈殿物として除去した。結果的に菌体破碎液で検出されたDNAは、PEI添加後の遠心上清にはアガロースゲル電気泳動レベルでの確認では全く検出されず、大部分のゲノムDNAを菌体破碎液から速やかに除去することが可能となった。

(2) EMAによるdsDNAの不活化

PEI処理により大部分のゲノムDNAは除去されるが、phi29 DNAPと結合したDNA断片は残存したままである。耐熱性DNAポリメラーゼの場合、残存DNAに対し短波長の紫外線(260 nm)を照射することにより、DNAを不活化することがこれまでも行われてきた。しかしながら、紫外線照射はphi29 DNAPそのものにもダメージを与え活性の低下を引き起こすばかりか、完全に残存DNAを不活化することができないことが報告されている¹⁴⁾。

そこで、酵素活性には影響を与えない可視光を照射することで、2本鎖DNA(以下、dsDNA)を架橋可能なエチジウムブロミドモノアジド(以下、EMA)を利用して、残存するDNA分子を不活化する方法¹⁵⁾を検討することとした。EMAは低分子の化学物質であるため、高分子であるDNaseのように立体障害を受けることなく、phi29 DNAPに結合したdsDNAにも作用することができると考えられる。

光源としては、これまで利用されてきたハロゲンランプや蛍光灯では無く、市販品の白色発光ダイオード(LED)ランプを利用した。白色LEDランプは酵素にとって有害な紫外線領域の波長を一切含まず、EMAの吸収波長(456 nm, 青色波長)を含む。また、LEDランプは発熱量が低いため、40℃以上ではすぐに失活してしまうphi29 DNAPにとっては、熱の影響を回避しながら、不

活化に必要な量の可視光を照射することが可能となり、結果的にphi29 DNAPの失活を防ぎながらEMAによるdsDNAの不活化に成功した。

(3) phi29 DNAPによるssDNAの分解

EMAによるDNA不活化処理はdsDNAを架橋するものであり、1本鎖DNA(以下、ssDNA)を不活化することはできない。その一方で、phi29 DNAPはdsDNAよりssDNAに対して親和性が高い。さらにphi29 DNAPを利用したDNA増幅ではssDNAも非特異産物の原因になることから¹⁶⁻¹⁷⁾、ssDNAの混入に対しても新たな対策が必要であった。そこで、我々はphi29 DNAP自身が持つ強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性に着目し、ssDNAを分解することができないか検討することとした。

phi29 DNAPは30℃付近で高い活性を持つため、ssDNAを分解するためには30℃付近で加温する必要がある。しかし、精製途中のphi29 DNAPは非常に不安定であり、30℃付近で加温すると凝集体を生じ、収量が著しく減少する問題が生じた。そこで、phi29 DNAPの凝集

を抑制する方法、例えば非イオン性の界面活性剤等の添加物を検討した。その結果、酵素溶液にトレハロースを添加することで、phi29 DNAPの凝集を抑制できることを見出した。トレハロースはphi29 DNA合成酵素の活性を阻害しないため¹⁸⁾、phi29 DNAPを30℃付近で加温することができ、かつphi29 DNAPの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を利用したssDNAの分解除去が可能となった。

これまでに検討してきた(1)PEIによるゲノムDNAの迅速な沈殿除去、(2)白色LEDとEMAによる夾雑2本鎖DNAの不活化、(3)phi29 DNAPによる夾雑ssDNAの分解除去の3工程を組み合わせ、新たなDNAポリメラーゼの精製方法として確立した(図6)。

本精製方法で調製したphi29 DNAPのSDS-PAGEの結果を図7に示した。本精製方法により、タンパク質の純度としてシングルバンドのphi29 DNAP(約67 kDa)を調製することができた。収量は大腸菌1 g当たり約1.5 mgであり、phi29 DNAP精製の原著論文¹⁹⁾とほぼ同程度(50 mg/40 g of cells)かそれ以上を確保できている²⁰⁾。

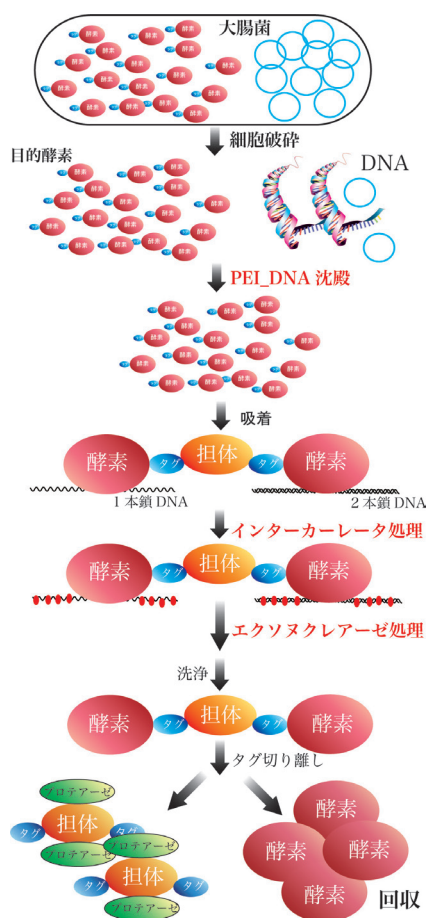


図6 新しく開発した非耐熱性ポリメラーゼの精製工程の模式図

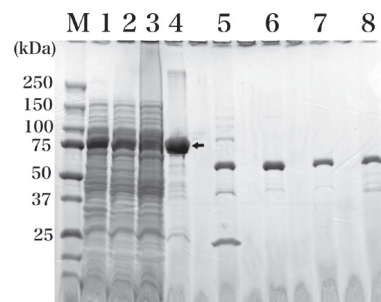


図7 各精製工程のSDS-PAGE結果
M, サイズマーカー; 1, 大腸菌破碎液; 2, PEI沈殿後上清; 3, カラム非吸着画分; 4, タグ切断前レジン; 5, タグ切断後レジン; 6, 精製画分(グリセロール添加前); 7, 精製画分(グリセロール添加前); 8, 市販酵素(1μg)。黒矢印はGST-phi29、赤矢印はphi29 DNAP(64kDa)を示す。

(4) DNA-free phi29 DNAPの品質評価

新たに開発した精製方法で調製した高純度phi29 DNAPの品質を評価するため、本酵素をMDAに適用した(図8)。試料DNAとしてpUC19 DNAを用いて、MDAでの検出下限を調査した結果、わずか10コピーのpUC19 DNAを特異的に増幅することが可能であった。10コピーのpUC19 DNAは約30アトグラム(3×10^{-17} g)であり、大腸菌1細胞のゲノムDNAが約5フェムトグラム(5×10^{-15} g)であることから、10コピーのpUC19 DNAは大腸菌ゲノムDNAの約100分の1量に相当する。

このことから、今回我々が開発したDNA-free phi29 DNAPを利用してMDAを行うことにより、微生物1細胞

分のゲノムDNAを試料としても、十分に特異的に増幅できるものと考えられる。

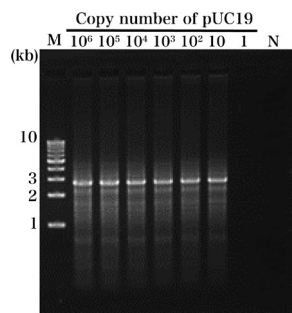


図8 MDA増幅産物の電気泳動
増幅反応には開発した精製方法で精製したphi29 DNAポリメラーゼを用いた。増幅産物はBamHI/EcoRIで切断後、電気泳動している。M, 1kb DNA サイズマーカー; N, no template control.

まとめ

今回我々はDNA合成酵素の新たな精製方法を開発し、DNA-free phi29 DNAポリメラーゼの生産に成功した。本酵素をMDAに適用することで、夾雑DNAの混入による非特異的なDNA増幅を大幅に抑制することが可能となった。この結果、適切な条件で本酵素をMDAに用いれば、十分に1細胞分のDNAでも全ゲノム解析が可能まで増幅可能となる。本方法で精製されたphi29 DNAPは、平成26年12月に「phi29 DNAポリメラーゼセット」として販売が開始されている。

その一方で、本酵素とMDAを利用してDNA増幅に使用する際には非常に注意しなければならない別の問題もより明確となった。ある程度予想はしていたことではあるが、MDA増幅反応を行う実験環境そのものが、増幅結果に多大な影響を与えることがこれまで以上に明確になってきた。実験環境そのもの、特に空气中に浮遊している微生物や細胞の死骸由来のDNAが、直接DNA増幅結果に影響をもたらすことは、これまでも感染症検査や、古生物のDNA増幅、法医学検査でもしばしば指摘されていた。MDAではその増幅原理のため影響が大きく、これまでPCRで取られてきた実験環境対策では不十分であることがより顕著になった(論文投稿中)。すなわち、内在性のDNAコンタミネーション問題を解決した先にあったのは、外因性DNAコンタミネーション問題である。

次の機会に、シングルセルゲノミクスのみならず、DNA増幅を行う為の実験環境の重要性とその対策について報告する。

参考文献

- 1) Uchiyama, T.; Miyazaki, T. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2009, 20 (6), 616-622.
- 2) Venter, J.C.; Remington, K.; Heidelberg, J.F.; Halpern, A.L.; Rusch, D.; Eisen, J.A.; Wu, D.; Paulsen, I.; Nelson, K.E.; Nelson, W.; Fouts, D.E.; Levy, S.; Knap, A.H.; Lomas, M.W.; Nealson, K.; White, O.; Peterson, J.; Hoffman, J.; Parsons, R.; Baden-Tillson, H.; Pfannkuch, C.; Rogers, Y.-H.; Smith, H.O. *Science*. 2004, 304 (5667), 66-74.
- 3) Lasken, R.S. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012, 10 (9), 631-640.
- 4) Hongoh, Y.; Sharma, V.K.; Prakash, T.; Noda, S.; Taylor, T.D.; Kudo, T.; Sakaki, Y.; Toyoda, A.; Hattori, M.; Ohkuma, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008, 105 (14), 5555-5560.
- 5) Hongoh, Y.; Sharma, V.K.; Prakash, T.; Noda, S.; Toh, H.; Taylor, T.D.; Kudo, T.; Sakaki, Y.; Toyoda, A.; Hattori, M.; Ohkuma, M. *Science*. 2008, 322 (5904), 1108-1109.
- 6) Dean, F.B.; Hosono, S.; Fang, L.; Wu, X.; Faruqi, A.F.; Bray-Ward, P.; Sun, Z.; Zong, Q.; Du, Y.; Du, J.; Driscoll, M.; Song, W.; Kingsmore, S.F.; Egholm, M.; Lasken, R.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002, 99 (8), 5261-5266.
- 7) Meijer, W.J.; Horcajadas, J.A.; Salas, M.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001, 65 (2), 261-287.
- 8) Hutchison, C.A. III.; Smith, H.O.; Pfannkuch, C.; Venter, J.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005, 102 (48), 17332-17336.
- 9) Takahashi, H.; Yamamoto, K.; Ohtani, T.; Sugiyama, S. *BioTechniques*. 2009, 47 (1), 609-615.
- 10) Rand, K.H.; Houck, H. *Mol. Cell. Probes*. 1990, 4 (6), 445-450.
- 11) Niimi, H.; Mori, M.; Tabata, J.; Minami, H.; Ueno, T.; Hayashi, S.; Kitajima, I. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49 (9), 3316-3320.
- 12) Corless, C.E.; Guiver, M.; Borrow, R.; Edwards-Jones, V.; Kaczmarek, E.B.; Fox, A.J. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38 (5), 1747-1752.
- 13) Burgess, R.R. *Meth. Enzymol.* 1991, 208, 3-10.
- 14) Woyke, T.; Sczyrba, A.; Lee, J.; Rinke, C.; Tighe, D.; Clingenpeel, S.; Malmstrom, R.; Stepanauskas, R.; Cheng, J.-F. *PLoS One*. 2001, 6 (10), e26161. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026161>, (accessed 2011-10-20).
- 15) Rudi, K.; Nogva, H.K.; Moen, B.; Nissen, H.; Bredholt, S.; Moretro, T.; Naterstad, K.; Holck, A. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 78 (1-2), 171-180.
- 16) Kobori, T.; Matsumoto, A.; Takahashi, H.; Sugiyama, S. *Anal. Sci.* 2009, 25 (12), 1381-1383.
- 17) Takahashi, H.; Matsumoto, A.; Sugiyama, S.; Kobori, T. *Anal. Biochem.* 2010, 401 (2), 242-249.
- 18) Pan, X.; Urban, A.E.; Palejev, D.; Schulz, V.; Grubert, F.; Hu, Y.; Snyder, M.; Weissman, S.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008, 105 (40), 15499-15504.
- 19) Blanco, L.; Salas, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984, 81 (17), 5325-5329.
- 20) Takahashi, H.; Yamazaki, H.; Akanuma, S.; Kanahara, H.; Saito, T.; Chimuro, T.; Kobayashi, T.; Ohtani, T.; Yamamoto, K.; Sugiyama, S.; Kobori, T. *PLoS One*. 2014, 9 (2), e82624. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0082624>, (accessed 2015-02-20).