

[招待論文：総説・レビュー論文]

接合伝達法の活用によるゲノム合成から細胞導入までの一気通貫システム

A Streamlined Method to Produce Cells Possessing Synthesized Genomes

板谷 光泰

信州大学特任教授

前慶應義塾大学環境情報学部教授

Mitsuhiro Itaya

Specially-Appointed Professor, Shinshu University

Former Professor, Faculty of Environment and Information Studies, Keio University

Correspondence to: bgmitaya@gmail.com

Abstract: 巨大な DNA が合成できる時代になった。しかしながら、多数の遺伝子を含む DNA はサイズが大きすぎて、最終目的の細胞に導入する手法は限定的である。枯草菌は巨大 DNA 合成のプラットフォームであり、我々は合成した巨大 DNA を別の細胞に導入する簡便で確実な手法に取り組んだ。接合伝達を利用する巨大 DNA 導入法は、慶應義塾大学先端生命科学研究所で開発され、導入対象の細胞は、枯草菌、納豆菌、シアノバクテリアにまで拡大された。特に、納豆菌は日本人の感性をくすぐる納豆の生産菌であり、物質生産にも直結する。納豆菌への DNA 導入では、制限修飾系という古くて新しい課題に直面して、接合伝達システムの応用と限界をあらためて認識した。導入対象細胞のバリエーションに対応すべく、今後の実践的な取り組みを加速するであろう。

Giant DNA can be synthesized but its delivery protocol to desired cells has been required. *Bacillus subtilis* has been established as a platform to produce giant DNA. A delivery protocol was developed at the Institute for Advanced Biosciences by application-oriented use of conjugational transfer system. The established protocol enables accurate and efficient transmission of giant synthesized DNA to recipient *B. subtilis* cell. Furthermore, the similar protocol was applied to deliver DNA to *B. natto*. The *B. natto* strain however should lack restriction-modification genes, reminding us that the genes are one of inhibitory factors on conjugational transfer. This is a good reminder on manipulation of future industrial microbes that have never accepted giant DNA before.

Keywords: 合成 DNA、DNA 細胞導入、接合伝達、納豆菌、枯草菌

DNA synthesis, DNA delivery to cell, conjugational transfer, *Bacillus natto*, *Bacillus subtilis*

1 はじめに

生命科学は21世紀になってゲノムを“合成”して研究する動きが加速している。20世紀には、ゲノムは「調べて学ぶ」対象であり、ゲノムをつくれる(複製できる)のは生物だけで、当時の遺伝子工学の手法では不可能であり、ゲノム全合成などSF世界の話だった。21世紀、ゲノムは「作って学ぶ」対象になり、トップダウン型のパイオニア研究課題になった。対象ゲノムも、単細胞微生物から動物、植物まで拡大する動きを見せている(板谷, 2019; 板谷・金子, 2019)。我々は、枯草菌をプラットフォームとする独自のゲノム合成手法を開発し、図1に示した。ドミノ法¹⁾として報告したゲノム合成手法の完成度は高く、例として3500kbもの巨大なシアノバクテリアゲノムすべてを枯草菌ゲノム中で合成した(板谷, 2010; 2012; 板谷・柘植, 2007)。しかしながらドミノ法で合成したDNAは図1に示したように、枯草菌ゲノム中に納まったままでは宝の持ち腐れである。次の課題は、合成DNAを目的とする対象細胞に導入するゲノム移動への挑戦であった。合成したDNAは多数の遺伝子を含むためにサイズは巨大化し、当然ながら100kbpを超えることもある。合成DNA部分だけを枯草菌ゲノムから切り離して目的の対象細胞に導入し、遺伝子の発現を再起動させることで、ゲノム合成から細胞までの一貫通貫システムは完成する。以下、ゲノム合成を可能にしたドミノ法を2章で、合成DNA部分だけの切り離しは3章で、巨大なDNAを細胞に導入する接合伝達システムは4章で記述する。そして納豆菌を対象細胞として、接合伝達システムが適用できるまでを5章で概略する。さらに接合伝達システムの応用範囲を拡大する取り組みを6章で紹介する。これらの課題は、2006～2019年に、主として慶應大学先端生命科学研究所(Institute for Advanced Biosciences)で実施された。

2 枯草菌の形質転換法でゲノム合成法確立

DNAを細胞へ導入するには幾つかの方法がある。最も有名なのは、大腸菌の遺伝子工学で利用される形質転換法(transformation)と電気穿孔法(electroporation)である。大腸菌への形質転換法は大成功をおさめ、遺伝子工学の必須のツールとなった。しかしながら、大腸菌への導入DNAはプラス

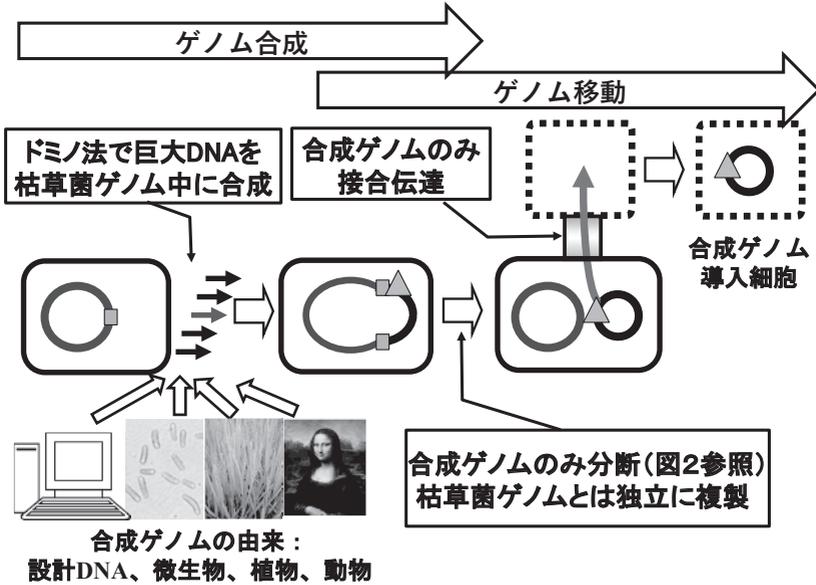


図1 枯草菌を利用する、ゲノム合成から細胞導入への一気通貫システム

四角は枯草菌、点線四角は導入対象の細胞を示す。細胞内のゲノムは円で表示。合成ゲノムは左に示した細胞の枯草菌ゲノム中の四角の部分に、ドミノ法で合成する。ドミノ法は本文および注1)を参照。枯草菌ゲノムと連結した合成ゲノム(濃太線で表示、中央の細胞)は、図2で示す分断、或いはコピー操作で枯草菌ゲノムから独立させる(右細胞)。あらかじめ組み込んであるpLS20による接合伝達システムにより、三角で示した開始点から始まり、導入対象細胞(点線正方形)との間で形成されるタンパク質の通り道(四角)内を一本鎖で移動する。移動したDNAは点線正方形内で2本鎖に戻り、合成DNAだけを有する細胞になる。ゲノム合成からゲノム移動までの操作は全て枯草菌細胞内で行うので、安定に保護される(図3参照)。従って、水溶液中にDNAを抽出することはなく、水溶液中での障害を受けることなく巨大DNAでも確実に安定に扱える(図4参照)。

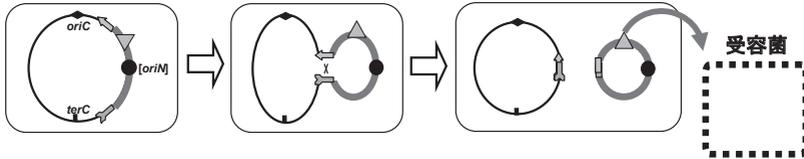
ミドDNA(環状2本鎖)に限られ、大腸菌のゲノム内に組み込まれることは稀であった。従って、大腸菌を利用するゲノムDNA合成は、水溶液中で調製できるプラスミドDNAの構築に依存するので、プラスミドよりはるかに巨大なゲノムDNAの合成は困難であった。一方で筆者が研究した枯草菌は、自発的にDNAを取り込む性質を有しており(Chen and Dubnau, 2004)(Chen et al., 2005)しかも、枯草菌細胞に取りこまれたDNAは枯草菌ゲノムに優先

的に組み込まれる性質を示した (Itaya and Tanaka, 1991)。枯草菌のユニークな DNA 取り込みのおかげで、同じ配列を末端に有する DNA 断片を枯草菌ゲノム中で連続して継ぎ足して、巨大な DNA を枯草菌ゲノム中に構築することが可能となった。図1に示すドミノ法¹⁾であり、枯草菌をプラットフォームとするゲノム合成の中核技術が確立された (Itaya, 2022)。

3 合成 DNA 部分だけ切り出して移動させる準備

ドミノ法で枯草菌ゲノム中に合成した DNA だけを他の細胞に導入するには枯草菌ゲノムから切り離して調製する必要がある (図1右半分)。そのために巨大な DNA を枯草菌ゲノムから切り離せる操作法を2種類開発した。ゲノム分断法、ゲノムコピー法と称する操作法は図2に示した。両操作法ともに、枯草菌独特の相同組換え能力に依存しており、分離後は枯草菌ゲノムとは独立に環状2本鎖DNAとして安定に保持されるように複製開始点を付与してある。では分離されたDNAをどのように対象細胞に導入すればよいだろう。対象細胞は必ずしも枯草菌のようにDNAを積極的に取り込む能力があるとは限らない。電気穿孔法は巨大なDNA導入の一般的な手法であるが、形質転換法でも電気穿孔法でも水溶液で調製したDNAが絶対必要である。しかしながらDNAは長鎖高分子であり、水溶液中で損傷を受ける。特にサイズが100kbpを超えると水溶液中では剪断、擦り切れなどの物理的損傷が増大して不安定になる (Kaneko et al., 2005)。そこで注目したのは接合伝達システムだった。接合伝達現象は原核細菌の間で属・種を超えてDNAを移動する水平伝播現象のひとつであり、DNAのサイズに関係なく細胞に保護されて移動する (Low et al., 2014)。1998年当時、枯草菌から枯草菌に接合伝達で移動するpLS20プラスミドが唯一報告されていた (Tanaka and Koshikawa, 1977)。pLS20の詳細は4章で記述するが、図2ではゲノム分断法、ゲノムコピー法で分離されたDNAにpLS20プラスミド由来の接合伝達システムをあらかじめ組み込んでいるので、巨大な環状二本鎖DNAを水溶液に取り出すステップから解放された。言い換えれば、接合伝達システムのおかげで、DNAを細胞外の水溶液に取り出す操作ステップは不要になった。

(A) ゲノム分断法



(B) ゲノムコピー法

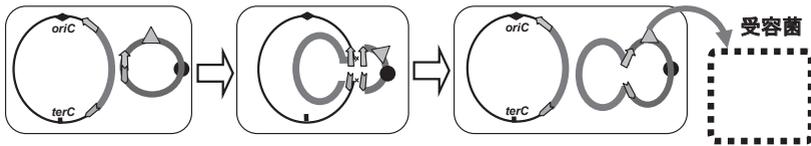


図2 合成 DNA 部分だけを枯草菌ゲノムから切り離して分離独立させる手法

枯草菌ゲノム(円)の複製開始点 *oriC* と複製終結点 *terC* を表示。合成ゲノム部分は、ゲノム右半分内に太線で示した領域。

(A) ゲノム分断法

合成 DNA をゲノム内相同組換えシステムで枯草菌ゲノムから完全に分断、独立複製させる手法。(左) 合成ゲノムの両末端に、二つの矢印部分を挿入。これらの配列間で組み換えが生じる(中央)。結果として太線の合成 DNA が枯草菌ゲノムから分離して、環状 2 本鎖 DNA として独立複製する(右)。太線合成 DNA が安定して複製するために、●で示す pLS20 複製開始点 (*oriN*) を挿入しておく。この環状 2 本鎖 DNA を接合伝達で対象細胞(点線四角)に移動させる(曲線矢印で表記)ために組み込んだ pLS20 接合伝達システムの遺伝子群 (T4SS) と移動開始点 (*oriT*) は、三角として合体表記した。

(B) ゲノムコピー法

枯草菌ゲノム中の合成 DNA (太線) を pLS20 プラスミドにコピーする手法。pLS20 プラスミドに、相同組換えでコピーするために、上記とほぼ同じ、二つの矢印部分を組み込んだ pLS20 を構築、枯草菌に導入しておく(左)。これらの配列間でゲノムとプラスミド間で組み換えが生じる(中央)と枯草菌ゲノム中の太線合成 DNA が pLS20 にコピーされる。コピーされた太線 DNA 部分は pLS20 の複製開始点●(*oriN*)により、枯草菌ゲノムとは独立に複製する。ゲノム分断法と比べて、コピーできる合成 DNA サイズは小さい(100kbp)が操作は簡便(Kuroki et al., 2007)。pLS20 接合伝達システムの遺伝子群 (T4SS) と移動開始点 (*oriT*) は、三角として合体表記した。この環状 2 本鎖 DNA を接合伝達で対象細胞(点線四角)に移動させる(曲線矢印で表記)。

4 枯草菌での接合伝達システムの確立

形質転換法と接合伝達法の比較を図3に示した。枯草菌で可動する唯一の接合伝達プラスミド pLS20 (64kbp) は、受容菌の範囲が調べられた (Koehler and Thorne, 1987) 以外は全く報告例がなく、筆者らが pLS20 利用の取り組みを開始した 1998 年頃には、あらゆることを手探りで調べなければならなかった。図3に示した pLS20 が DNA を枯草菌 (供与菌) から枯草菌 (受容菌) に移動する機構では、relaxase と呼ぶタンパク質が pLS20 塩基配列中の *oriT* と呼ばれる配列に結合して、菌体間をつなぐ通路 (管状のタンパク質複合体) に運ぶ。この通路は pLS20 が保持する T4 遺伝子群と呼ばれる遺伝子産物によって形成される。受容菌内に移動した一本鎖全長 DNA は複製により二本

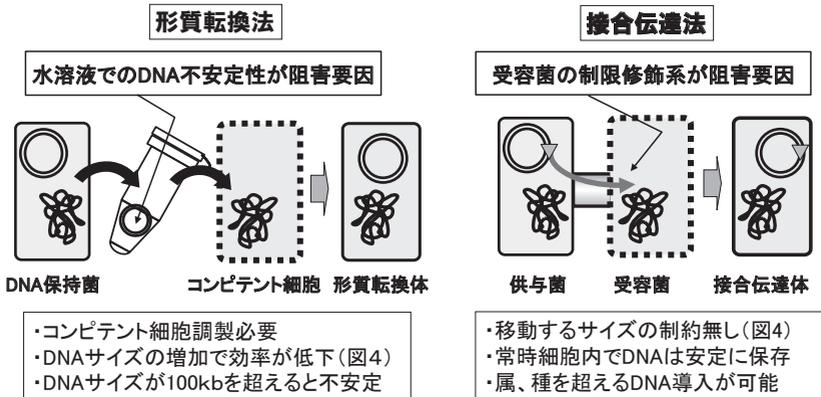


図3 合成 DNA の導入、形質転換法と接合伝達法の相違

左：形質転換法：DNA を受け取るコンピテント細胞の調製が必須。導入する DNA は水溶液中での調製が必須。阻害要因として、100kbp を超える巨大 DNA の水溶液中での不安定性が指摘されている。

右：接合伝達法：接合伝達プラスミドが保持する、Type IV secretion system (T4SS 遺伝子群) と DNA 伝達開始点 (*oriT* 配列、三角で表示) が必須因子 (Singh et al., 2013)。受容菌に特別な前処理は不要。接合伝達では、T4SS 遺伝子群の働きで細胞間に DNA が通過できるタンパク質の管が形成され (横向きの四角)、一本鎖 DNA が三角から曲線矢印で示すようにその管を通して移動。受容菌で一本鎖 DNA は二本鎖に修復され、接合伝達体が得られる。接合伝達システムによる、属、種を超える DNA 導入は本文 6 章を参照。受容菌が保持する制限修飾系は一本鎖 DNA に作用してこれを分解、接合伝達を阻害する。この阻害要因の納豆菌の例は本文 5 章および図 5A に示す。

鎖のプラスミドになり、接合伝達が完了する。我々は、10年以上にわたる分子生物学、分子遺伝学の手法を駆使した研究によって、pLS20 システムを図1に示したゲノム移動のシステムに組み入れることに成功した(板谷, 2019; Itaya et al., 2006; Itaya et al., 2018a; Itaya et al., 2018b; Itaya et al., 2019)。その結果、形質転換法と接合伝達法で移動させられる DNA のサイズ依存性が比較検討できるようになり、その結果は図4に示す。形質転換法ではサイズが大きくなれば頻度は極端に減少し、100kbp を超えるとほぼゼロになる。しかし、接合伝達システムは予想された通り 800kbp までほとんど効率に変化はない(Itaya, 2022)。形質転換法に利用する DNA は水溶液中で損傷を受けやすいが、接合伝達システムでは枯草菌細胞が損傷から保護することの明確な結果である。

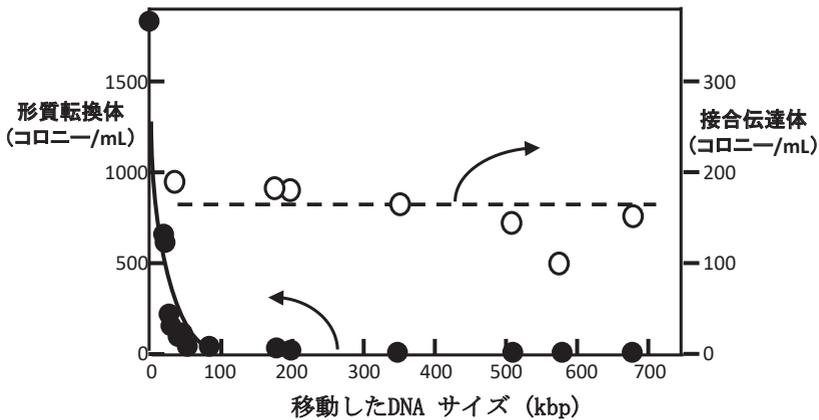


図4 接合伝達法での DNA 移動は、サイズの制限がなくなる

接合伝達法と形質転換法で枯草菌に導入できる DNA のサイズ。横軸に DNA サイズ (kbp 単位)。黒丸 (●) で示す形質転換法での導入効率 (左縦軸に表記) は、DNA サイズに逆比例して低下して、100kbp を超えると形質転換体はほとんど得られない (Itaya, 2022)。接合伝達法で移動した頻度は白丸 (○) で示す。DNA サイズが 700kbp を超えても一定の導入効率 (右縦軸に表記) を示した。形質転換法での効率減少は水溶液状態で調製した DNA の不安定性に起因すると考えている (Kaneko et al., 2005)。

5 納豆菌への接合伝達システム適用

古来、納豆は日本人にはなじみ深い。味噌や醤油、清酒等日本が誇る伝統

的な発酵食品のひとつである(板谷, 2011)。納豆は、煮た大豆の表面で納豆菌が特徴的なネバと栄養価の高い成分を生成する(図5(B)の写真参照)。納豆菌と大豆だけで数日間で生成される納豆は、塩を全く使わない健康食品である。

納豆菌²⁾は枯草菌と同じグラム陽性菌に分類され、ゲノム解析も終了している(Kamada et al., 2014)。食しても安全な納豆菌を物質生産の代表菌にしたいとの希望を抱き、筆者は1992年頃から納豆菌の研究に取り組んだ。枯草菌と同様にDNAを導入することから始めたが、筆者のラボで保管する納豆菌への取りこみは全く生じなかった。慶應大学先端生命科学研では、電気穿孔法と接合伝達法によるDNA導入手法を検討した。しかしながら、納豆

(A) 納豆菌への接合伝達阻害要因は制限修飾系

(B) 納豆菌での納豆生成

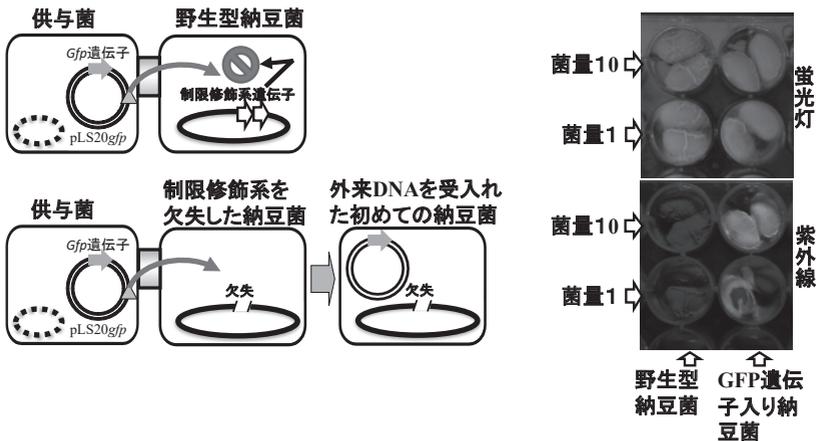


図5 納豆菌への接合伝達システム適用

(A) 納豆菌への接合伝達阻害要因は制限修飾系

野生型納豆菌(上段)では枯草菌から供給される一本鎖DNAを制限修飾系のDNA分解酵素が分解し、接合伝達体は全く得られない。制限修飾系がゲノムから欠失した納豆菌(下段)では、多数の接合伝達体を与えた(Itaya et al., 2019)。

(B) 納豆菌での納豆生成

巨大DNAを接合伝達で導入できる納豆菌を用いたデモ実験。煮大豆2粒に納豆菌をふりかけ(下段は上段の10分の1の菌数)、42℃で2日培養して、表面にネバのある納豆を作製した。GFP遺伝子を導入した納豆菌は紫外線を照射すると(下段右)大豆表面で緑色の蛍光を発する。納豆菌が納豆作製する決定的写真である。

菌への電気穿孔法は、効率が著しく低く、菌株ごとに条件検討が必要で一般的ではないと結論した。また、pLS20 の接合伝達法を納豆菌に適用しても、導入は全く起きなかった。

納豆菌²⁾は枯草菌の近縁種であるにもかかわらず DNA を全く受け入れなかったのであるが、制限修飾系遺伝子を欠損した納豆菌を偶然得ることにより、接合伝達法が有効に適用されブレイクした (Itaya et al., 2019)。制限修飾系欠損納豆菌 (図 5A) の取得は偶然ではあったが、この結果により、接合伝達の阻害要因は制限修飾系であるとの古典的な結論を再確認した。さらに今後、接合伝達システムを適用する原核微生物の制限修飾系遺伝子の有無は重要な検討課題であることも再認識できた。しかしながら、原核微生物の制限修飾系遺伝子は塩基配列の相同性がほとんど無く、ゲノム配列情報からの検索、予測はほぼ不可能である。実際我々が得た納豆菌は、ゲノムの一部が欠失しており、欠失部分に含まれる遺伝子が制限修飾系遺伝子であるとのあとづけで推測できるレベルであった。教科書で学んだ知識を、納豆菌に教えてもらったと感無量であった。図 5B で紹介するように、接合伝達で GFP 遺伝子を導入した納豆菌は、暗闇で紫外線のもとで緑に輝く納豆を与えた。納豆菌の今後の応用に向けての標準株となると期待している (Itaya et al., 2022)。

6 接合伝達システムの将来

接合伝達は、T4SS 遺伝子群と移動開始配列 (*oriT*) があれば作動する。ただし、移動対象の細胞は接合伝達プラスミドに大きく依存する。pLS20 は現時点では宿主域が枯草菌近縁種に限定される narrow host range タイプである。つまり枯草菌を供与菌として、pLS20 プラスミドが移動できる受容菌は納豆菌も含めた枯草菌近縁種に限られる (Koehler and Thorne, 1987)。枯草菌から他の宿主域に接合させるには広域宿主域 broad host range の接合伝達システムを使う必要があり、我々はその中の pUB307 と呼ばれるプラスミドに注目し 2010 年頃から本格的な研究を開始した。pUB307 の供与菌は大腸菌に限定されるが、受容菌は、枯草菌 (Yokoi et al., 2019)、シアノバクテリア (Itaya et al., 2018c)、酵母 (未発表) に拡大され、広域宿主域の成果を得ている。枯草菌が pUB307 の供与菌になれば、枯草菌で合成した巨大 DNA を、

種を超えて移動させる夢の移動システムとなり、図1と図2に示した対象細胞(点線四角)の範囲が、動物細胞、植物細胞にまで拡大すると期待している。

7 おわりに

現代の遺伝子、ゲノム研究は、それらを実際に構築して始まる。微生物利用は、日本の伝統的な発酵、培養技術の蓄積で世界をリードしているが、生産に適する細胞(微生物)はすべて自然から分離され、培養工学、代謝工学、遺伝子工学等の適用で、産業に有用な高生産株が構築される。そのような微生物(細胞)を、全く新規に作り出すことはできないだろうか。つまりゲノムを設計して所望の活力を得た微生物を作る、それは30年前にはSF世界の話だったが、現在では現実的なバイオニア研究課題である。繰り返しになるが、我々はゲノム全塩基配列が判明していることが前提の時代にいる。多種多様な生物は、この遺伝子(塩基配列)を保持している(あるいは保持していない)ことを前提とする時代であり「眺めて驚く学問から、作って調べさらに役立つ学問へ」を標榜し続けたいと思っている。接合伝達研究は、1998年三菱化学生命科学研究所で開始され、2006年からは慶應義塾大学先端生命科学研究所で実施された。接合伝達は昭和時代の微生物遺伝学では必須の学習項目であったが、本邦では現在は絶滅危惧テーマに近い。1980代に開始された大腸菌での遺伝子工学手法が席卷し、接合伝達研究が消えていった。筆者は枯草菌ゲノムの研究に関連して、ゲノム合成だけでは片手落ちであると考え、合成したDNAを有効に活用するまでのひとつながりのシステム構築のために接合伝達システムを導入した。それらは、「一気通貫システム」として全貌を紹介できるまでに至った(板谷, 2019)。pLS20プラスミドの発見者の田中暉夫博士は、筆者が1986年から所属した三菱化学生命科学研究所での直属の上司である。この出会いがきっかけでpLS20の分与に限らず、枯草菌を扱うノウハウを気前よく伝授していただいた。一般の認知度は大腸菌よりも落ちる枯草菌の魅力にはまって生涯研究対象に選び、形質転換法、接合伝達法を確立して、共同研究者らとともに、新しいことへの挑戦、誰も見たことのない将来を仰ぎ見た40年であった。本文で紹介した納豆菌株すべて、そしてゲノム合成に使用された枯草菌株の多くは、国立遺伝学研究所内のナショナルリ

ソースプロジェクト (NBRP *Bacillus subtilis*) に寄託された。分譲依頼は <https://shigen.nig.ac.jp/bsub/> まで。

謝辞

本稿で紹介した接合伝達と納豆菌研究は多くの学生、技術員、学外研究者の方々の参加を得た。特に、枯草菌ゲノムから必要部分をゲノムコピーする技術は、政策・メディア研究科博士黒木あずさ君の尽力に、また納豆菌への接合伝達研究は環境情報学部学生、永作真弓、島田友恵両君に専念していただき、いずれも論文発表にこぎつけた。富田勝研究所長は、接合伝達研究の外部評価がされにくかった枯草菌、納豆菌の接合伝達研究を長年認めてくださり、心から感謝します。

注

1) ドミノ法

図 1 に示す、ずれた横矢印の一团は組み込みのために必要な DNA を示す。隣り合う矢印 DNA の前と後ろは完全に同じ配列である。遊具のドミノが一部分重なって倒れるように、この同じ配列で前後のドミノ DNA を繋げることが可能となった。枯草菌で合成する DNA の材料は、おおむね 10 ~ 50kbp 程度の小型のドミノのセットであり、これらをドミノ倒しの要領で連続して組み込む手法である、詳細は (板谷, 2010; 2012; 2019; Itaya, 2009; 2013; Itaya et al., 2005; Itaya et al., 2008; Itaya, 2022)。ドミノの数を増やして倒すほど、合成 DNA サイズは巨大化し、大きさは 500kbp を超える (本文では巨大 DNA と呼称する)。ちなみに、世界で最小の生命体であるマイコプラズマ菌のゲノムは 480kbp であり、少なくともこのサイズの DNA は枯草菌ゲノム中で確実に合成できる。

2) 納豆菌と枯草菌

多くの日本人にとって納豆は健康食品である。元来は大豆の煮豆を稲藁で包むと、稲藁にもともと存在していた天然納豆菌の働きで納豆を作る 包納豆 という自然任せの無塩発酵食品であった。食品としての安全性は確立しており、スターターの納豆菌を煮大豆にふりかけるだけの簡便さもあり、自家製納豆の紹介が WEB でも頻繁に見つかる。市販の納豆には、普通 50 グラムの納豆に納豆菌が数十億匹含まれており、丸ごと食しても、人体に無害、枯草菌以上に安全なことは納豆を愛し食する日本人により数百年に亘って証明されている (板谷, 2011)。納豆菌には標準株が無かったが、我々が主として研究した納豆菌株のゲノムを解読した (Kamada et al., 2014)。接合伝達法で DNA を導入できる株はこの株から分離された。今後はこの分離株が納豆菌の標準株になると期待されている (Itaya et al., 2019; Itaya et al., 2022)。一方、枯草菌 168 株は、外部の DNA を自分の細胞内に能動的に取りこむ性質 (コンピテントセル) のおかげで、遺伝的掛け合わせによる、基礎、応用の研究に用いられている。ゲノムの全塩基配列は 1997 年に決定されている。少なくとも分子生物学分野で枯草菌と言えば枯草菌 168 株であり、人体には無害で病原性の無い安全性の高い枯草菌標準株である。

参考文献

- 板谷光泰、柘植謙爾 (2007) 「メガクローニングとキメラゲノム：ゲノムデザイン過程での未知との遭遇」『化学と生物』45 (4), pp. 226-228.
- 板谷光泰 (2010) 「ゲノム構造の再編成 第2章」浅島誠、黒岩常祥、小原雄治編『現代生物科学入門9 合成生物学』岩波書店.
- 板谷光泰 (2011) 「納豆菌と枯草菌：ゲノムから眺める安全な菌の活用 第13章」監修北本勝ひこ『発酵、醸造食品の最新技術と機能性II』シーエムシー出版., pp. 111-118.
- 板谷光泰 (2012) 「生命システムにおけるゲノム科学とゲノム工学 第7章」田口精一編『生命システム工学—進化分子工学から進化生命工学へ』化学同人., pp. 131-146.
- 板谷光泰、金子真也 (2019) 「ゲノム合成の潮流」『実験医学』37 (3), pp. 452-457.
- 板谷光泰 (2019) 「合成ゲノムを細胞に導入する潮流：世界を変える接合伝達システム」『日本ゲノム微生物学会ニュースレター』(20), pp. 2-7.
- Chen, I., and Dubnau, D. (2004) “DNA uptake during bacterial transformation”, *Nat. Rev. Microbiol.* 2, pp. 241-249.
- Chen, I., Christie, P.J. and Dubnau, D. (2005) “The ins and outs of DNA transfer in bacteria”, *Science*. 310, pp. 1456-1460.
- Itaya, M. and Tanaka, T. (1991) “Complete physical map of the *Bacillus subtilis* 168 chromosome constructed by a gene-directed mutagenesis method”, *J. Mol. Biol.* 220, pp. 631-648.
- 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., USA*. 102, pp. 15971-15976.
- Itaya, M., Sakaya, N., Matsunaga, S., Fujita, K., and Kaneko, S. (2006) “Conjugational transfer kinetics for *Bacillus subtilis* in liquid culture”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, pp. 740-742.
- Itaya, M., Fujita, K., Kuroki, A., and Tsuge, K. (2008) “Bottom-up genome assembly using the *Bacillus subtilis* genome vector”, *Nat Methods*. 5, pp. 41-43.
- Itaya, M. (2009) “Recombinant Genomes: Novel Resources for Systems Biology and Synthetic Biology”, In P. Fu and S. Panke (eds.) *Systems Biology and Synthetic Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Itaya, M. (2013) “Chap 12. Tools for Genome Synthesis”, In H. Zhao (ed.) *Synthetic Biology tools and applications*, Academic Press, Elsevier Inc., pp. 225-242.
- Itaya, M., Hasegawa, M., Tomita, M., and Sato, M. (2018a) “The first high frequency of recombination-like conjugal transfer from an integrated origin of transfer sequence in *Bacillus subtilis* 168”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82, pp. 356-362.
- Itaya, M., Sato, M., Hasegawa, M., Kono, N., Tomita, M., and Kaneko, S. (2018b) “Far rapid synthesis of giant DNA in the *Bacillus subtilis* genome by a conjugation transfer system”, *Scientific Reports*. 8, 8792.
- Itaya, M., Kusakabe, H., Sato, M., Tomita, M., and Sato, R. (2018c) “Efficient delivery of large DNA from *Escherichia coli* to *Synechococcus elongatus* PCC7942 by broad-host-range conjugal plasmid pUB307”, *J. Biochemistry*. 164, pp. 15-20.
- Itaya, M., Nagasaku, M., Shimada, T., Ohtani, N., Shiwa, Y., et al. (2019) “Stable and efficient delivery of DNA to *Bacillus natto* using pLS20 conjugal transfer plasmids”, *FEMS Microbiol. Lett.* 366(4), fnz032. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz032>

- Itaya, M. (2022) “*Bacillus subtilis* 168 as a unique platform enabling synthesis and dissemination of genomes”, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 68, pp. 45-53.
- Itaya, M., Sato, M., Watanabe, S., and Kataoka, M. (2022) “Effective plasmid delivery to a plasmid-free *Bacillus natto* strain by a conjugational transfer system”, *J. Biochem.* in press.
- Kamada, M., Hase, S., Sato, K., Toyoda, A., Fujiyama, A., et al. (2014) “Whole Genome Complete Resequencing of *Bacillus subtilis* Natto by Combining Long Reads with High-Quality Short Reads”, *PLOS ONE*. 9, e109999.
- Kaneko, S., Akioka, M., Tsuge, k., and Itaya, M. (2005) “DNA shuttling between plasmid vectors and a genome vector: Systematic conversion and preservation of DNA libraries using the *Bacillus subtilis* genome (BGM) vector”, *J. Mol. Biol.* 349, pp. 1036-1044.
- Koehler, T. M., Thorne, C.B. (1987) “*Bacillus subtilis* (natto) plasmid pLS20 mediates interspecies plasmid transfer”, *J. Bacteriol.* 169, pp. 5271-5278.
- Kuroki, A., Ohtani, N., Tsuge, K., Tomita, M., and Itaya, M. (2007) “Conjugational transfer system to shuttle giant DNA cloned by the *Bacillus subtilis* genome (BGM) vector”, *Gene*. 399, pp. 72-80.
- Low, H.H., Gubellini, F., Rivera-Calzada, A., Braun, N., Connery, S., et al. (2014) “Structure of a type IV secretion system”, *Nature*. 508, pp. 550-553.
- Singh, P.K., Ramachandran, G., Ramos-Ruiz, R., Peiró-Pastor, R., Abia, D., et al. (2013) “Mobility of the native *Bacillus subtilis* conjugative plasmid pLS20 is regulated by intercellular signaling”, *PLoS Genet.* 9, e1003892.
- Tanaka, T., and Koshikawa, T. (1977) “Isolation and characterization of four types of plasmids from *Bacillus subtilis* (natto)”, *J. Bacteriol.* 131, pp. 699-701.
- Yokoi, T., Itaya, M., Mori, H. and Kataoka, M. (2019) “Optimization of RK2-based gene introduction system for *Bacillus subtilis*. (2019)”, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 65, pp. 265-272.

[受付日 2022. 7. 4]