

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651233

研究課題名(和文)放線菌線状ゲノムを利用したゲノムスワップへの挑戦

研究課題名(英文)Challenge to make "genome swapping" using Streptomyces linear genome.

研究代表者

片岡 正和 (KATAOKA, Masakazu)

信州大学・工学部・准教授

研究者番号：90332676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：プロトプラスト融合法を応用した放線菌と枯草菌の細胞質混合法を開発・最適化した。また、放線菌ゲノムをホストゲノム、枯草菌ゲノムをゲストゲノムとして組み換える系を構築した。選択した放線菌の組み込み部位の周辺を調べたところ、プラスミドを組み込んだ場合はプラスミドが狙ったとおりに組み込まれていることがわかった。しかし、ゲノムが組み込まれているはずの選択株のゲノム上には、選択に用いた薬剤耐性遺伝子存在は認められなかったが、500kbから2Mbの組み込み点から離れた領域は含まれていなかった。視点を改めて、接合を利用した大腸菌-枯草菌間のゲノム工学を目指し、両者の接合による遺伝子交換技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：Toward establishment of bacteria having artificial twin genome functions, we tried to make *Streptomyces lividans* having whole *Bacillus subtilis* genome on the linear chromosome. We established cytoplasmic mixing method by using protoplast fusion between *S. lividans* and *B. subtilis*. To make twin genome functions, we applied site-specific integration system from actinophage phiC 31. In the case of using plasmid as the guest genome, we succeed to integrate into the host genome as on the experimental design. In the case of whole *B. subtilis* genome, we could detect the integration phenomena as antibiotic resistance, but we were not able to detect *B. subtilis* genome on the host genome. This impossibility may be caused from large GC content difference of both genomes. To take another approach to make the twin genome, we try to make conjugative transfer of large DNA from *Escherichia coli* to *B. subtilis*, and we make stable and novel protocol for the inter-species conjugative transfer.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ゲノムスワップ 放線菌 枯草菌 ツインゲノム

1. 研究開始当初の背景

人工生命体の創成は、現代生命科学の一つの夢である。2010年に Venter 研究所から人工合成ゲノムを持つマイコプラズマ菌誕生の報告があった(Science 2010)。次の目標は、産業応用を視野にゲノムデザインが施されている微生物創成になる。ゲノムデザインにより合目的な生命体を作製する等の合成生物学手法での微生物の創成は、既存の遺伝子工学とは異なり大型ゲノムをクローン化し、そのゲノムを自在に機能化あるいは不活化する方法が必要となる。また産業応用を視野に入れた場合には、デザインゲノムの宿主の性質も考慮対象である。本申請研究は、この技術的・生物学的障壁を乗り越えるため放線菌の、細菌では珍しい①線状ゲノムの特長を生かしたゲノム操作法を確立(線状ゲノム操作法の樹立)し、②約 4 Mb の枯草菌ゲノムを約 8 Mb の放線菌線状ゲノム上に同居させ出芽酵母と同サイズで原核生物最大級の 12 Mb のゲノムを持つ放線菌を樹立する(ツインゲノムの創成)。さらに③外環境変化により両者のゲノム機能変換を行う方法(ゲノムスワップ)の確立をめざす。②③では失敗の危険性も含有する挑戦的研究である。

2. 研究の目的

机上のパソコンで設計したゲノム情報を組み合わせて任意の機能を持つ生命体をつくる。現代生命科学の目標の一つは、膨大なゲノム情報を活用し、合成生物学手法で人間の役に立つ人工微生物を創成することである。目標達成には、巨大なゲノムの取り扱いや遺伝子発現など、実験科学上の障害や未知の領域を乗り越える必要がある。本申請研究は、巨大ゲノム操作の手法として、産業微生物として好適な放線菌の、原核生物では珍しい線状ゲノムを利用するゲノム操作法の確立を提案する。さらに開発した手法を用い、4Mb

の枯草菌のゲノム全てを 8 Mb の放線菌の線状ゲノム上に持つ微生物を樹立し、意のままに両者のゲノム機能を自在に発現させるゲノムスワッピングの世界を開拓することを最終目標とする。

3. 研究の方法

本研究では、放線菌の線状ゲノムに枯草菌のゲノムや任意の 100 kbp 以上の大型 DNA を組み込む方法を開発する。枯草菌ゲノムの組み込みに成功した暁には、抗生剤の選択によってゲノム機能を選択的に読み出し、放線菌型表現系と枯草菌型表現系を自在に変換するゲノムスワッピングを試す。線状ゲノムへの組み込みは、放線菌ファージの *attP* と放線菌ゲノムの *attB* 部位間の組み換え酵素 *int* による組み換えを利用する。枯草菌ゲノムの組み込みの際の染色体対合は、放線菌、枯草菌ともプロトプラスト化し、ポリエチレングリコール(PEG)でプロトプラスト融合して細胞質を混合し、二種の染色体を有する融合体を作製する。作製した融合体を枯草菌、あるいは放線菌特異的に作用する薬剤で選択することでゲノム情報の選択的読み出しを試す。

(1)放線菌リニアゲノムへの遺伝子挿入方法の確立とツインゲノムの創成

放線菌では、大腸菌の Red 系や枯草菌や酵母の相同組み換え系のような高頻度の相同組み換え系は開発されていない。連携研究者が開発した放線菌に感染する放線菌ファージの *int* 依存的な特異的組み換えで大型 DNA 断片や枯草菌のゲノムを放線菌線状ゲノム上に組み込む方法を確立し、その手法を用いてプロジェクトを進める。

(1-1)組み込みサイズの上限と複製対称性への影響

連携研究者が決定した放線菌ゲノムでは、*oriC* が線状ゲノムの中心部より 2 Mb ずれている。また、同じく連携研究者によって実施

された当該放線菌のゲノムの 1.5 Mb にわたる大規模ゲノム欠失は当該菌の生存性に何ら影響を与えなかった。これらの事実が、放線菌線状ゲノムは、ゲノムサイズの DNA を複製対称性に関わらず搭載できると申請者が考えるきっかけとなっている。これらゲノムサイズや非対称性への耐性の検証を行うと共に、組み込みシステムの有用性を試すため細菌疑似染色体ベクター (BAC) クローンの組み込みを試す。100 kbp レベルのゲノム領域を有する *attP-int* 領域を有し、放線菌二次代謝生合成系クラスターを有する BAC クローンを制限修飾系の弱い放線菌、*Streptomyces lividans* のゲノム上に挿入する。サイズ上限の検定や対称性アンバランスの確認のための 0.5-1Mb レベルの DNA 組み込みには、市販の YAC クローン (酵母の人工染色体) を加工して組み込み DNA として利用し、*oriC* を中心にした左右の染色体サイズのアンバランスを引き起こし、その影響をみる。

(1-2) 枯草菌ゲノムへの *attP-int* の組み込み

ツインゲノムを作製するため、枯草菌のゲノム上に *attP-int* と放線菌で有効な薬剤耐性遺伝子を組み込む。この組み込みには枯草菌のゲノムベクターシステムを利用する。すでに 1 種類の組み換え系をゲノムに持つ枯草菌を作製した。

(1-3) 放線菌-枯草菌ハイブリッドの創成

放線菌で機能する *attP-int* 組み込みシステムを挿入した枯草菌のゲノムを、放線菌のゲノムに挿入し、枯草菌ゲノムを線状染色体上に有する放線菌を創成する。組み込みのためには両者の染色体の対合が必要である。そのため放線菌、枯草菌ともプロトプラスト化し、ポリエチレングリコール (PEG) でプロトプラスト融合することで細胞質を混合し、二種の染色体を有する融合体を作製する。この融合体形成の効率化のため、あらかじめ枯草菌・放線菌のプロトプラストの DNA や細胞膜をヘキストや Diel などの蛍光試薬を利用し

て染色し、高効率の融合が得られる条件を決定する。モデル放線菌である *S. lividans* のプロトプラストは常時作製しており、枯草菌のプロトプラストは枯草菌研究者より効率よく作製する手法を導入した。現在低頻度だが、細胞融合体の形成を蛍光顕微鏡下で確認している。この枯草菌-放線菌の細胞質混合系は、たとえ枯草菌ゲノム全体の挿入が不可能な場合でも、項目における大型 DNA ユニットの挿入において手法的に必要なになる。

4. 研究成果

プロトプラスト融合法を応用した放線菌と枯草菌の細胞質融合法を開発・最適化した。開発した系は放線菌ゲノムへの部位特異的組み込みを行える actinophage の *attP-int* 領域と放線菌に薬剤耐性を与える遺伝子をゲノムに組み込んだ枯草菌を用いた。実験系の確認には枯草菌内で複製するプラスミド上に同様の遺伝子領域を組み込んだベクターを有する枯草菌を用いた。放線菌のプロトプラスト調整は通常の方法を、枯草菌プロトプラストの調整は赤松らの方法を応用した。両者のプロトプラストを蛍光色素でラベルして追うことで、融合の確認を行った。また、枯草菌に持たせたプラスミドの組み込みによる耐性遺伝子の発現でも確認した。水分活性を低下させる PEG では平均分子量 4000 の PEG を濃度 50% で使用した場合に最も効率が高かった。プロトプラスト再生中に枯草菌の増殖を特異的に阻害する抗生物質を検索、MIC を求めて使用し、放線菌型表現形の株だけを選択的に再生させた。システムで設計された薬剤耐性でゲノムを組み換えた放線菌を特異的に選択した。

選択した放線菌の組み込み部位の周辺を調べたところ、プラスミドを組み込んだ場合はプラスミドが狙ったとおりに組み込まれていることがわかった。しかし、ゲノムが組

み込まれているはずの選択株のゲノム上には枯草菌の遺伝子群は見当たらず、また、組み込み部位の周辺配列も保持されたままであった。組換え頻度はプラスミド系のほうが遙かに高かった。

完成した系を用いて枯草菌のゲノム上に放線菌 actinophage の組み込み部位を挿入し、前年度構築した融合系で細胞質融合を行った。抗生物質の併用による選択で、枯草菌ゲノム由来の代謝系を抑え、放線菌ゲノム由来の代謝系を持つ株を選択した。選択した株は表現形に少し異常が見られたが、放線菌の形態を示していた。選択された候補株からゲノムをとり、マルチ PCR で確認したところ、選択に用いた薬剤耐性遺伝子存在は認められたが、500kb から 2 Mb の組み込み点から離れた領域は含まれていなかった。さらに組み込み点周辺を調べると薬剤耐性遺伝子を含む、非常に小さな領域のみが組み込まれていた。CHEF を利用してゲノム型を調べたが、マクロ的にはホストに利用した放線菌のものと同じであった。この結果は一度組み込まれた枯草菌ゲノムが速やかに排除されたと考えられた。我々の結果や他のチームの枯草菌に巨大な GC 含量が高い DNA を組み込む試みの失敗より、あまりにもゲノムの GC 含量が違うゲノムの移植は困難だと考えられた。最後に視点を变えて、接合を利用した大腸菌-枯草菌間のゲノム工学を目指し、両者の接合による遺伝子交換技術を開発した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 6 件)

横井崇紘、片岡正和

Gene transfer method using cross-species conjugal transfer.

第 8 回長野ミーティング：生物資源の有効利

用を目指して

2014 年 3 月 2 日～4 日 長野

横井崇紘、板谷光泰、森浩禎、片岡正和
接合伝達機構を用いた *E. coli* -*B. subtilis*
間遺伝子操作法の確立

日本分子生物学会第 36 回大会

2013 年 12 月 3 日～6 日神戸

片岡正和 招待講演

ゲノムデザインに根ざす合成生物学の課題

日本遺伝学会 85 回大会ワークショップ

2013 年 9 月 19 日～21 日 横浜

横井崇紘、片岡正和

接合伝達機構を用いた大腸菌-枯草菌-放線菌間における遺伝子操作法の確立

グラム陽性菌ゲノム機能会議

2013 年 9 月 7 日～8 日つくば

片岡正和 招待講演

接合伝達機構を利用した巨大 DNA 操作

第 35 回日本分子生物学会ワークショップ

2012 年 12 月 11 日～14 日 福岡

片岡正和 招待講演

ゲノムデザインに根ざす合成生物学の課題

日本遺伝学会 84 回大会ワークショップ

2012 年 9 月 19 日～20 日 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 正和 (KATAOKA, Masakazu)

信州大学・工学部・准教授

研究者番号：90332676

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

池田 治生 (HARUO, Ikeda)

北里大学・北里研究所・教授

研究者番号：90159632