

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：84431

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2019

課題番号：15K07402

研究課題名（和文）幅広いバクテリア種で汎用性のあるゲノム編集技術の開発

研究課題名（英文）Development of new genome editing method applicable to broad-range of bacteria

研究代表者

駒 大輔（Daisuke, Koma）

地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・主任研究員

研究者番号：80443547

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：汎用性のあるゲノム編集技術を開発するには、プラスミドのような個別の生物種に特有のベクターを用いるのではなく、全生物で共通して使えるベクターを用いてゲノム編集遺伝子を発現させればよい。それを達成するために、プラスミドを用いずに一過的にゲノム編集遺伝子を高発現するシステムの構築を目指した。

ゲノム編集遺伝子（Cas9とRed recombinase）をT7プロモーターに連結し、さらにT7RNAポリメラーゼを構成性のプロモーターに連結した環状DNA（非プラスミド型）を作製した。これを用いて大腸菌の染色体改変を行った結果、Red recombinaseによりゲノム改変することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「汎用性のあるゲノム編集技術」は、遺伝子をよりネイティブに近い環境下で発現させることを可能にするため、タンパク質の「大量調製」や「構造解析」に多大に貢献すると考える。また、さまざまなバクテリアでの「遺伝子機能解析」や「菌株育種」を簡便化するなど、多様な分野での基盤技術となる。ゲノム編集遺伝子や発現増幅遺伝子に好熱性ファージ由来のものを用いれば、あらゆる好熱菌を宿主にすることも可能となり、産業上有益なさまざまな耐熱性酵素の大量生産を行うことも容易になる。

研究成果の概要（英文）： The development of universal genome editing technology requires non-specific vectors rather than plasmids. To achieve such technology, we tried to express high level of genome editing genes transiently without plasmids.

Cas9 and Red recombinase were used as genome editing enzymes. Cyclic DNAs consisting of T7-controlled each genome editing gene and constitutive promoter-controlled T7 RNA polymerase gene were used for modification of E. coli chromosome. As a result, chromosome editing was achieved by red-rocombinase without plasmid.

研究分野：合成生物学

キーワード：ゲノム編集 相同組換え プラスミドフリー 大腸菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物で目的の遺伝子を高発現させてタンパク質を大量生産する場合には、一般的に、取扱いが容易なものが宿主として用いられる。大腸菌や分裂酵母などがその代表例である。しかしながら、コドンバイアスやその他の要因により、タンパク質が封入体を形成するなどして必ずしも活性のあるタンパク質が得られるわけではない。特に遠縁種の遺伝子ほど発現は困難な傾向にある。

この問題を解決する理想的な手段として、その遺伝子が由来する本来の菌株で発現させるか、取扱いが容易な近縁種で発現させることが考えられる。実際に、好熱菌由来の遺伝子は好熱菌で発現させた方が活性型のタンパク質として発現する可能性が高い。また、同じ好熱菌由来でも、細菌遺伝子は細菌、アーキア遺伝子はアーキアで発現させた方が良い結果が得られる傾向にある。しかし、そのためには遺伝子を運び機能させるためのベクターが必要であるため、宿主に利用できる菌種は限られているのが現状である。

プラスミドのような外来性ベクターが使えない菌種の場合、目的の遺伝子を高発現させるためには、「ゲノム(染色体)」に遺伝子を挿入すればよい。ゲノムは全ての生物が保有しているので、そこに遺伝子を挿入して発現する手段は、広域宿主プラスミドを用いるよりも「より確実な方法」である。ゲノムに目的遺伝子を挿入するためには、十分な組み換え活性を有する菌体にゲノムと相同な配列を持つ目的遺伝子を導入すればよい。しかし生物種によっては菌体内の組み換え活性が不十分なことが多く、その場合は相同組み換えを全く起こさないか、または効率が非常に悪い。それを解決する手段が「ゲノム編集」である。ゲノム編集では、リコンビナーゼやヌクレアーゼなどのゲノム編集酵素の遺伝子を強制的に発現させることにより、菌体内に導入した目的遺伝子のゲノムへの挿入効率を格段に高める。目的遺伝子を高発現プロモーターに連結して挿入すれば、タンパク質を高生産することも可能となる。

現在、微生物では Red リコンビナーゼや Cre-loxP システムを用いたゲノム編集技術がよく利用されている。一方、昨年に登場した CRISPR/Cas9 システム(バクテリアの後天性免疫獲得機構を利用したゲノム編集技術)は主に動植物細胞のゲノム編集に用いられているが、最近では酵母やバクテリアへの応用例も示されている(現在3例)。これらの技術開発は世界中で積極的に行われており、申請者も Red リコンビナーゼを用いた大腸菌のゲノム編集技術の開発を行ってきた。しかし、これまでの技術では生物種ごとにゲノム編集遺伝子をコードするプラスミドを作製する必要があり、宿主-ベクター系の開発されていない生物種ではゲノム編集を行うことすら困難であった。そこで、本研究では「幅広い生物種で共通して利用できる」汎用性のあるゲノム編集技術の開発を目指す。それにより多様な生物を遺伝子組み換えのための宿主として簡単に利用することが可能となり、さまざまな遺伝子をネイティブに近い環境条件下で高発現させることができるようになる。

2. 研究の目的

幅広いバクテリア種で汎用性のあるゲノム編集技術を開発する。具体的には、プラスミドを用いずに相同組換え酵素 (Red recombinase) やゲノム編集酵素 (Cas9) を機能させる。

3. 研究の方法

【使用した菌株と作製した菌株】

宿主となる菌株には *Escherichia coli* BW25113(DE3)株を用いた。GFP を構成的に高発現する大腸菌を作製するために、pET21a-FRT-AcGFP^{opt} (大腸菌用にコドン最適化されたオワンクラゲ由来の GFP 遺伝子を含む) を鋳型とし、delta-ascF-F (GACTGATAACAACACTACATCTACCCTACTGATAACAGGATAAAATCCGATGATTCCGGGGATCCGTCGACC) および delta-ascF-FRT-R (ACTTCTCGAAATACTGACATTTTCATCCTCAATTAAGACTTACTTCTTTATTCGCCAATCCGGATATAG) プライマーセットを用い、PrimeStar GXL DNA polymerase (Takara Bio.) によって染色体に導入するためのカセットを PCR 増幅した。増幅したカセットを精製し、*E. coli* MG1655 (DE3)/pKD46 株の ascF 座位に Red 相同組換えにより導入した(Koma et al. 2012. Appl. Microbiol. Biotechnol.)。同様に、構成性の tyrR プロモーターに連結した T7RNP ポリメラーゼ遺伝子を DE3 の座位に導入した。カセットの増幅には、鋳型 DNA に pET21a-tyrRp-T7RP、プライマーには delta-DE3-F (ACTTTTTGTCTTTTACCTTCCCGTTTCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCATTCCGGGGATCCGTCGACC) と delta-DE3-FRT-R (TCACAGGTTGCTCCGGGCTATGAAATAGAAAAATGAAATCCGTTGAAGCCTATTCGCCAATCCGGATATAG)を用いた(Koma et al. 2018. J. Biosci. Bioeng.)。次に MG1655(DE3) ascF::P_{T7}-AcGFP^{opt} 株から、FLP/FRT 部位特異的相同組換えによりカナマイシン耐性を除去し、さらに MG1655(DE3) DE3::P_{tyrR}-T7RP 株の P1 ライセートを用いて、MG1655(DE3) ascF::P_{T7}-AcGFP^{opt} DE3::P_{tyrR}-T7RP 株(構成的な GFP 高発現株)を作製した(Koma et al. 2012. Appl. Microbiol. Biotechnol.)。CE4 株と命名した。

【プラスミドおよび環状 DNA の作製】

TOPO-T7-AcGFP を鋳型 DNA とし、T7-AcGFP-OEP-F1(CATTTCCGCGGGATCGAGATC)と T7-AcGFP-OEP-R1(CAACACTCGAGAAGCTTGAGCTCT)のプライマーペアを用いて、Phusion HS2 DNA polymerase (Thermo)により P_{T7}-AcGFP の DNA 断片を増幅した。一方、TOPO-P-T7RP を鋳型とし、P-T7RP-OEP-F1(AGATCTCGATCCCGCGAAATG)と P-T7RP-OEP-R2 (CAACACTCGAG

GAGCTCCG) のプライマーペアを用いて、 P_{syn} -T7RP を増幅した (P_{syn} は構成的に機能する人工プロモーター)。次にそれぞれの DNA 断片を精製した後、Overlap extension PCR により 2 つの断片を結合した。まず、1st PCR として、PrimeStar DNA polymerase を用い、プライマーを添加しない条件で、2 つの DNA 断片を反応液に入れて PCR を 5 サイクル行った。次に 2nd PCR として、1st PCR での PCR 産物を鋳型 DNA として用い、P-T7RP-OEP-R2 と T7-AcGFP-OEP-R1 のプライマーセットを用いて PCR を行った。結合した DNA 断片を TOPO ベクターに連結し、TOPO- P_{T7} -GFP- P_{syn} -T7RP (pCE1 と命名) を得た。

次に pCE1 を鋳型とし、pCE3-F (GAGCTCAAGCTTCTCGAGTGTTG) と pCE3-R (TGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC) を用いてプラスミドバックボーンを PCR 増幅した。また pKD46 を鋳型 DNA とし、ABE-F (GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAATGGATATTAATACTGAAAC TGAGATCAAG) と ABE-R (CAACACTCGAGAAGCTTGAGCTCTCATCGCCATTGCTCCCC) を用いて Red recombinase を増幅した。PCR 酵素には Phusion HS2 を用いた。2 つの DNA 断片を Gibson assembly により結合し、 P_{syn} -T7RP と P_{T7} -Red recombinase を持つプラスミド pCE3 を得た。同様に、鋳型 DNA に pCas9、プライマーに Cas9-F (GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACA TGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAG) と Cas9-R (CAACACTCGAGAAGCTTGAGCTCTCAG TCACCTCCTAGCTGAC) を用い、 P_{syn} -T7RP と P_{T7} -Cas9 を持つプラスミド pCE4 を得た。

非プラスミド型の環状 DNA の作製のために、pCE3 または pCE4 を鋳型 DNA とし、CYC-F (CAACACTCGAGGAGCTCCG) と CYC-R (CAACACTCGAGAAGCTTGAGCTC) のプライマーペアを用いて、Phusion HS2 DNA ポリメラーゼにより T7RP と Red リコンビナーゼまたは T7RP と Cas9 の遺伝子を含む線状 DNA を PCR 増幅した。PCR 産物を *Xho*I で消化し、セルフライゲーションして環状 DNA を得た。

【相同組換えおよびゲノム編集実験】

LB 培地を用いて、BW25113(DE3)を OD₆₆₀ が 0.5 程度になるまで 37°C で振とう培養した。カナマイシン耐性遺伝子を含む DNA 断片と、環状 DNA T7P-Red をエレクトロポレーションにより大腸菌に導入し、37°C で 2 時間振とうした。カナマイシンを含む LB 培地に菌液をスプレッドし、37°C で一晚培養した後、出現したコロニーの数をカウントした。対照として、BW25113(DE3)/pKD46 株を用いて定法により Red 相同組換えを行った (Datsenko et al. 2000, PNAS)。

一方、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集を行った。gRNA を供給するプラスミド pTarget-F-AcGFP で形質転換した CE4 株 (CE4/pTarget-F-AcGFP) を、LB 培地を用いて、OD₆₆₀ が 0.5 程度になるまで 37°C で振とう培養した。ドナー DNA、T7-Red、T7-Cas9 をエレクトロポレーションで導入し、37°C で 1 時間リハビリテーションした後、LB 培地にスプレッドし、蛍光の消失した菌数をカウントした。コントロールとして、CE4/pTarget-F-AcGFP/pCas9 を用い、定法によりゲノム編集を行った (Jiang et al. 2015, Appl. Environ. Microbiol.)。

4. 研究成果

【ゲノム編集を行うための構成的な GFP 高発現株】

GFP を高発現する菌株 CE4 株を作製した。本株は、構成的に T7 プロモーターを発現する菌株 (Koma et al. 2018, J. Biotech. Bioeng.) に、T7RNA ポリメラーゼに連結した GFP 遺伝子を染色体に導入した菌株である (図 1)。

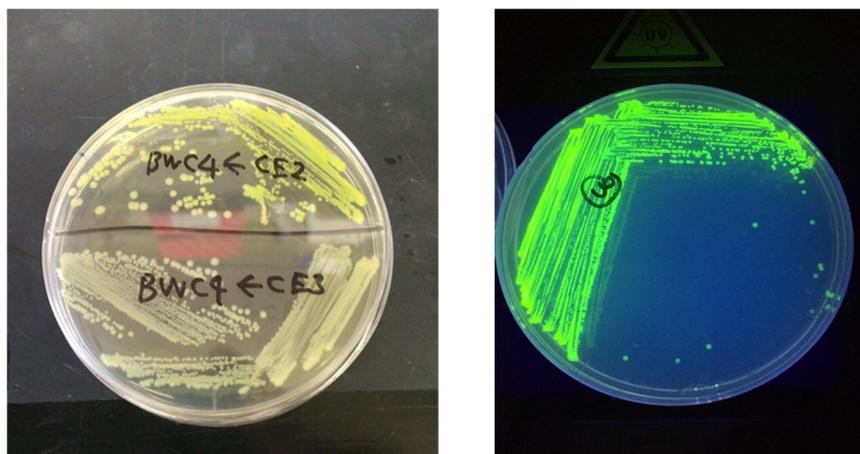


図 1 GFP を構成的に高発現する大腸菌

【プラスミドと環状 DNA の作製】

T7RNA ポリメラーゼと Red リコンビナーゼの遺伝子をコードするプラスミド pCE3 を作製した (図 2 左側)。T7RNA ポリメラーゼ遺伝子は構成性の合成プロモーター、Red リコンビナーゼ遺伝子は T7 プロモーターの下流に配置するようにした。また、このプラスミドを鋳型として

PCR を行い、セルフライゲーションして環状 DNA T7RP-Red を得た (図 2 右側)。

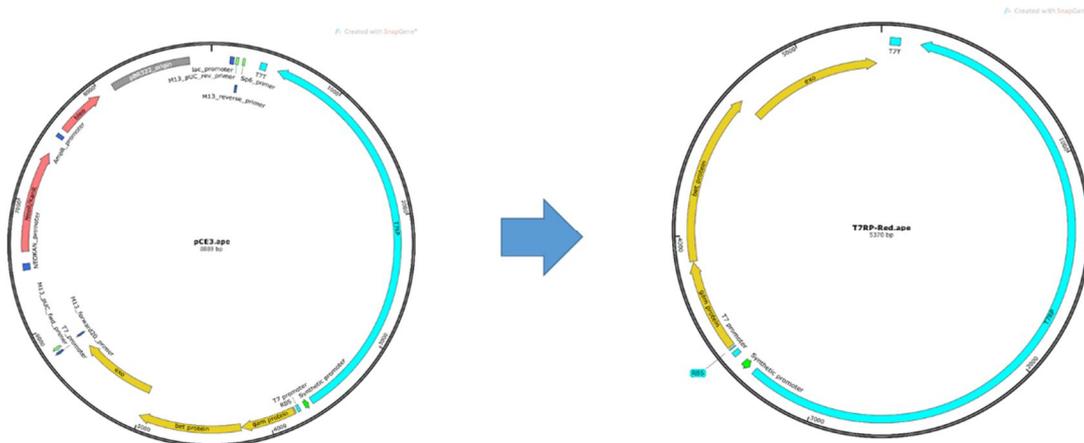


図 2 プラスミド pCE3 と環状 DNA T7RP-Red

同様に、T7RNA ポリメラーゼと Cas9 タンパク質の遺伝子をコードするプラスミド pCE4 を作製した (図 3 左側)。また、このプラスミドを鋳型として PCR を行い、セルフライゲーションして環状 DNA T7RP-Cas9 を得た (図 3 右側)。

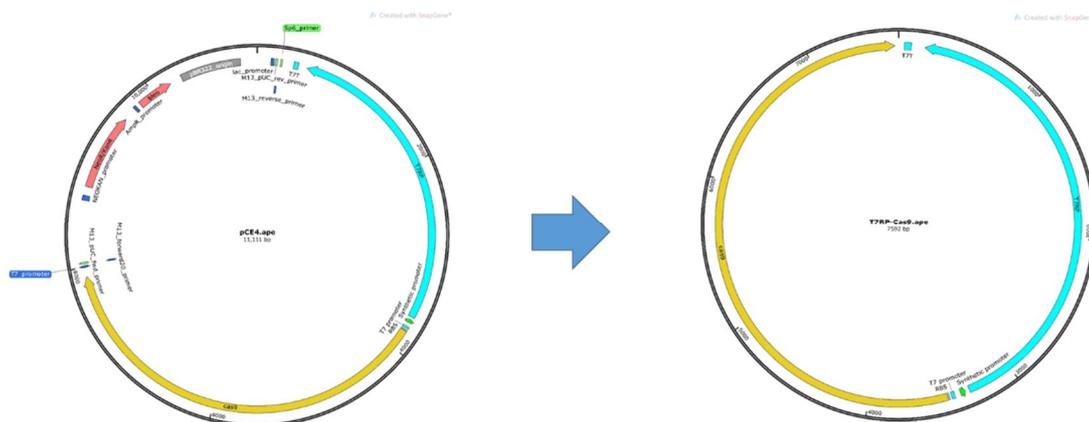


図 3 プラスミド pCE4 と環状 DNA T7RP-Cas9

【プラスミドフリーな相同組換えおよびゲノム編集実験】

非プラスミド性の環状 DNA T7-Red を用いて、大腸菌の染色体にカナマイシン耐性遺伝子が導入できるかどうか検証した (表 1)。その結果、通常のプラスミドを用いた Red 相同組換えよりも効率は非常に低いが、プラスミドフリーでも相同組換えが起こり、カナマイシン耐性を有する大腸菌が作製できることを実証した。

表 1 プラスミドを用いた相同組換えとプラスミドフリーな相同組換え

	通常の Red リコンビナーゼによる相同組換え	プラスミドフリーな相同組換え
全コロニー数 (cfu)	1.1×10^9	1.1×10^9
Km 耐性コロニー数 (cfu)	2.2×10^3	50
効率	$1/2 \times 10^{-6}$	$1/4.5 \times 10^{-8}$

次に、環状 DNA T7-Cas9 と T7-Red を用いて、大腸菌のゲノム編集を試みた。具体的には GFP 蛍光を示す大腸菌の GFP 遺伝子を部分欠失し、GFP 蛍光の消失した大腸菌を作製することを試みた (表 2)。pCas9 を用いた場合には全コロニー数が大幅に減り、CRISPR-Cas9 システムが機能していた。生じたコロニーのうち、27% で蛍光の消失が確認された。それに対して、プラスミドフリーな場合には多くのコロニーが生じ、さらに蛍光の消失した株は確認できなかった。Cas9 および Red リコンビナーゼの両方をプラスミドフリーで導入しており、Cas9 によるゲノム切断と Red リコンビナーゼによる相同組換え (修復) の両方の効率が悪いのが原因ではないかと考えられた。

表2 プラスミドを用いたゲノム編集とプラスミドフリーなゲノム編集

	pCas9 による GFP 蛍光の消失	プラスミドフリーゲノム編集 による GFP 蛍光の消失
蛍光コロニー数 (cfu)	2.6×10^2	1.2×10^7
非蛍光コロニー数 (cfu)	70	0
効率	0.27	0

【結論】

プラスミドを用いなくても大腸菌で相同組換えを起こせることを実証した。同様な方法で、大腸菌以外でも相同組換えを起こし、染色体に目的遺伝子を導入することが可能だと考えられるが、その点については今後検討する必要がある。ただし、プラスミドを用いた場合と比較して、プラスミドフリーな場合は相同組換え効率が低いため、効率低下の原因と改善についても併せて検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koma D, Kishida T, Yamanaka H, Moriyoshi K, Nagamori E, Ohmoto T	4. 巻 126
2. 論文標題 Escherichia coli chromosome-based T7-dependent constitutive overexpression system and its application to generating a phenylalanine producing strain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 586-595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2018.05.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koma D, Kishida T, E. Yoshida, H. Ohashi, Yamanaka H, Moriyoshi K, Nagamori E, Ohmoto T	4. 巻 86
2. 論文標題 Chromosome engineering to generate plasmid-free phenylalanine- and tyrosine-overproducing Escherichia coli strains that can be applied in the generation of aromatic-compound-producing bacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 Not yet
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.00525-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岸田隆寛、駒 大輔、大橋博之、山中勇人、森芳邦彦、長森英二、大本貴士
2. 発表標題 T7 発現系を応用したプラスミドフリーで誘導剤が不要なフェニルアラニン高生産菌の開発
3. 学会等名 第70会日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Koma
2. 発表標題 Escherichia coli chromosomal engineering toward high titer phenylalanine and tyrosine production
3. 学会等名 Metabolic Engineering 11 (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	田中 重光 (Shigemitsu Tanaka) (20509822)	地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・研究員 (84431)	
研究 分担者	森芳 邦彦 (Kunihiko Moriyoshi) (30416367)	地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・主任研究員 (84431)	