

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02433

研究課題名(和文) ミニマムゲノム細菌を用いた遺伝子機能の網羅的同定による生命の基幹システムの理解

研究課題名(英文) Understanding the core systems of organisms through analysis of gene functions in the minimal genome bacterium

研究代表者

柿澤 茂行 (Kakizawa, Shigeyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：10588669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミニマムゲノム細菌JCVI-syn3Bを用いて、誘導プロモーター系などをテストするとともに、未知遺伝子の機能を網羅的に解明する系を開発した。特に、遺伝子の特異的ノックダウンが可能なCRISPR interference (CRISPRi) システムの導入に成功し、テトラサイクリン誘導プロモーター系が最も効果的であることを確認した。このシステムを多数の未知遺伝子に適用し、遺伝子機能解析を行う基盤を確立した。これにより、ミニマムゲノム細菌の基本的な生命機能の全容解明に向けた重要な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、最小の生命システムを持つミニマムゲノム細菌において、未知遺伝子の機能を網羅的に解析する基盤を構築した点と、新たなバイオテクノロジーの発展に寄与する可能性がある点にある。特に誘導プロモーター系とCRISPRi技術を用いることで、遺伝子発現の精密な制御を可能にした。これにより生命の基本システムを解析するための重要なツールを提供し、生命科学の基礎研究に貢献することが期待される。加えて、ミニマムゲノム細菌を用いた研究により、合成生物学において新たな応用の道を開く可能性がある。例えば、最小限の遺伝情報で機能する細胞を設計することで、効率的な生産システム等の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tested inducible promoter systems and developed a system to comprehensively elucidate the functions of unknown genes using the minimal genome bacterium JCVI-syn3B. Specifically, we successfully introduced a CRISPR interference (CRISPRi) system capable of specific gene knockdown and confirmed that the tetracycline-inducible promoter system is the most effective. This system was applied to lots of functional unknown genes in JCVI-syn3B, establishing a procedure for gene function analysis. We obtained significant insights towards understanding the fundamental life functions of minimal genome bacteria.

研究分野：細菌ゲノム学

キーワード：細菌ゲノム 必須遺伝子 マイコプラズマ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年作成された「ミニマムゲノム細菌」は、必須遺伝子もしくは準必須遺伝子のみを残したゲノムを持つ細菌であり、473 遺伝子 (531 kbp) のみを持つ (1)。もうこれ以上の遺伝子の削減は困難であることから、「細胞が生存するためにはどんな遺伝子や細胞機能が必要なのか」といった問いに答えることができ、「生命機能の根幹」の理解に貢献すると期待された。しかし驚くべきことに、この 473 遺伝子のうち 149 遺伝子 (31.5 %) が機能未知遺伝子であることが分かり、細菌が持つ遺伝子の機能についてあまり理解が進んでいない現状が浮き彫りとなった。

### 2. 研究の目的

本研究は、近年作成された「ミニマムゲノム細菌」を用い、その機能未知遺伝子の機能を網羅的に解明することで、生物にとって必須な基本システムの全容を解明することを目的とする。これにより、生命の最少システムの定義と、生命システムのより深い理解を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究ではミニマムゲノム細菌を用いた機能未知遺伝子の機能解析を目指し、いくつかの段階に分けた検討を行った。

ミニマムゲノム細菌はいくつかのバージョンが存在するが、本研究では、JCVI-syn3.0 に 19 程度の遺伝子を追加することにより細胞形態が比較的均一となった JCVI-syn3B を用いることとした (1, 2) ミニマムゲノム細菌で使用可能な遺伝子操作系のテストおよび導入と、その検証を行った。ミニマムゲノム細菌は、米国ベンター研究所で作成された JCVI-syn3B を用いた (1)。生育および形質転換には SP4 培地を用い、液体培地と固形アガー培地を用いた。SP4 培地にはウシ血清 (fetal bovine serum: FBS) が 17% の濃度で含まれる栄養豊富な培地であり、JCVI-syn3B の生育をサポートすることが知られている (1)。ミニマムゲノム細菌の形質転換法は、PEG を用いて細胞融合を誘導する方法を用いた。形質転換に用いるプラスミド系は、大腸菌で増幅し調整できるプラスミドであり、かつ、Cre-lox recombination により遺伝子断片を JCVI-syn3B のゲノム中に挿入できる「Landing pad プラスミド」系を用いた。この方法は、プラスミド上にコードされている Cre recombinase の発現により、プラスミド上の LoxP 配列とゲノム上の LoxP 配列との間で組換えが起こることを利用し、プラスミド上の任意の遺伝子配列をゲノムに組み込むことができる手法である (3, 4)。なおこのプラスミドは、ミニマムゲノム細菌 JCVI-syn3B の細胞内においては複製しない。大腸菌における耐性マーカーはゼオシン、JCVI-syn3B 組換え体の選抜にはピュロマイシン耐性遺伝子を用いた。

任意のタイミングで遺伝子発現を誘導するための誘導プロモーター系は、以下に述べるように、テトラサイクリン誘導プロモーター系 (Tet リプレッサー系) とセオフィリン誘導プロモーター系 (リボスイッチ系) の 2 種類を用いた。CRISPRi のための dCas9 遺伝子 (ヌクレアーゼ部位に変異を持ち、ゲノムの切断を誘導しないが、ゲノムに結合して転写を阻害するもの) は、マイコプラズマのコードに最適化された配列を使用した。特に、トリプトファンをコードする箇所を UGA コドンに変更した。これにより、dCas9 遺伝子はマイコプラズマ内においては正しく翻訳されるが、大腸菌等ではストップコドンの挿入により正しいサイズの dCas9 が翻訳されないため、dCas9 に起因する生育阻害などの不具合が生じないようにした。

### 4. 研究成果

本研究により、ミニマムゲノム細菌における遺伝子機能な解明に向けた系の開発および、多くの知見を得ることができた。

まずミニマムゲノム細菌で使用可能な遺伝子操作系を導入し、その効果を検証した。まず、遺伝子の特異的ノックダウンに有効とされる CRISPR interference (CRISPRi) の導入をテストす

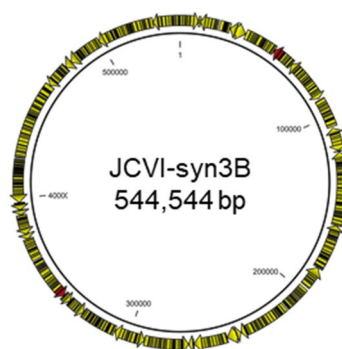


図 1. ミニマムゲノム細菌のゲノムマップ

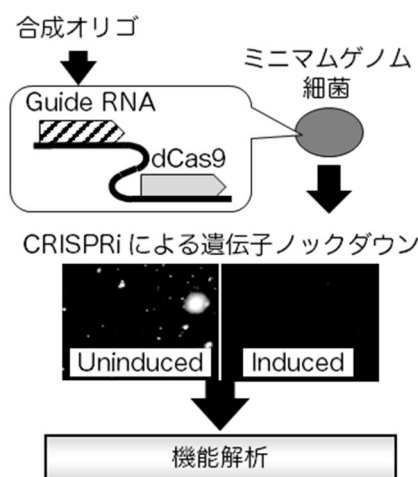


図 2. ミニマムゲノム細菌における CRISPRi システム

る。

ることとした。CRISPRi は、特定の遺伝子の発現を狙ったタイミングで抑制することができるため、遺伝子機能解析において非常に有用と考えられた。必須遺伝子はロックアウトが不可能であり、また常時ロックダウンされると菌体の増殖に影響を与えると予想されるため、発現のオン/オフを行う誘導プロモーター系も併せて検討した。テトラサイクリン誘導プロモーター系 (Tet リプレッサー系) とセオフィリン誘導プロモーター系 (リボスイッチ系) をミニマムゲノム細菌に導入し、その特異性や発現量、非誘導時の発現リーク量、またターゲット遺伝子による差異などを検証した。その結果、事前に得られていた情報と同様に、テトラサイクリン誘導プロモーター系がミニマムゲノム細菌において最も効果的であることが分かった。また複数の遺伝子をターゲットとしたロックダウンを行い、ターゲット遺伝子の mRNA 量が有意に減少および、細胞の増殖抑制が確認された。

次にこの手法を多くの遺伝子に拡張し、多くの遺伝子をターゲットとした CRISPRi システムの開発を行った。これにより、より包括的な遺伝子機能解析が可能となると期待される。ターゲットした遺伝子は、主にミニマムゲノム細菌がもつ機能未知遺伝子を選んで設計を行った。ゲノム上にコードされる遺伝子に対する網羅的なガイド RNA の選定、CRISPRi プラスミド上のガイド RNA 配列の合成とプラスミド構築、配列の確認、構築したプラスミドを用いたミニマムゲノム細菌の形質転換と、ゲノムへの組換えによる遺伝子挿入、などの一連の研究を遂行した。その結果、ほぼすべての遺伝子に対してロックダウンできる系の開発に成功した。構築の途中で、予期せぬ変異が CRISPRi プラスミドへ挿入されてしまうトラブルが多発し、それらの原因を追究したところ、変異の大半は PCR に起因するエラー挿入であることが判明した。このトラブルを解決するため、複数の試行錯誤を行った。その結果、なるべく PCR を経ない手法を開発し、またプラスミド構築の際にどうしても PCR を経る際にはその増幅長を短くする方法を用いることとした。

多くの遺伝子に対する特異的のロックダウン系が完成したため、それらの細胞を増殖させ、対数増殖時にテトラサイクリンを追加することによって CRISPRi を誘導し、誘導後の細胞の形態変化や生育速度の詳細な解析を行った。その結果、いくつかの遺伝子においては菌体の生育阻害が起こる一方で、細胞状態が大きく変化しない菌株もあることがわかった。

本研究の成果に基づき、今後も多数の遺伝子に対して CRISPRi 技術を適用し、ミニマムゲノム細菌の遺伝子機能解析を進めていく予定である。これにより、生命の基本システムの全容解明に向けたさらなる進展が期待される。

#### < 引用文献 >

Hutchison, C.A., 3rd, Chuang, R.Y., Noskov, V.N., Assad-Garcia, N., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Gill, J., Kannan, K., Karas, B.J., Ma, L., Pelletier, J.F., Qi, Z.Q., Richter, R.A., Strychalski, E.A., Sun, L., Suzuki, Y., Tsvetanova, B., Wise, K.S., Smith, H.O., Glass, J.I., Merryman, C., Gibson, D.G., and Venter, J.C. (2016): Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*. **351**, aad6253.

Pelletier, J.F., Sun, L., Wise, K.S., Assad-Garcia, N., Karas, B.J., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Mershin, A., Gershenfeld, N., Chuang, R.Y., Glass, J.I., and Strychalski, E.A. (2021): Genetic requirements for cell division in a genomically minimal cell. *Cell*. **184**, 2430-2440 e2416.

Krishnakumar, R., Grose, C., Haft, D.H., Zaveri, J., Alperovich, N., Gibson, D.G., Merryman, C., and Glass, J.I. (2014): Simultaneous non-contiguous deletions using large synthetic DNA and site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* **42**, e111.

Mariscal, A.M., Kakizawa, S., Hsu, J.Y., Tanaka, K., Gonzalez-Gonzalez, L., Broto, A., Querol, E., Lluch-Senar, M., Pinero-Lambea, C., Sun, L., Weyman, P.D., Wise, K.S., Merryman, C., Tse, G., Moore, A.J., Hutchison, C.A., 3rd, Smith, H.O., Tomita, M., Venter, J.C., Glass, J.I., Pinol, J., and Suzuki, Y. (2018): Tuning gene activity by inducible and targeted regulation of gene expression in minimal bacterial cells. *ACS Synth Biol.* **7**, 1538-1552.

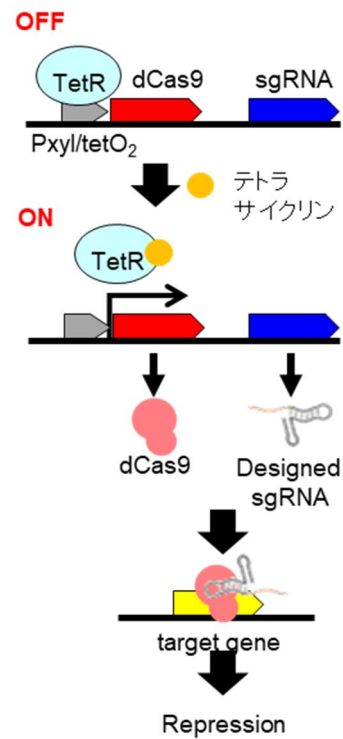


図3. ミニマムゲノム細菌における誘導プロモーター系

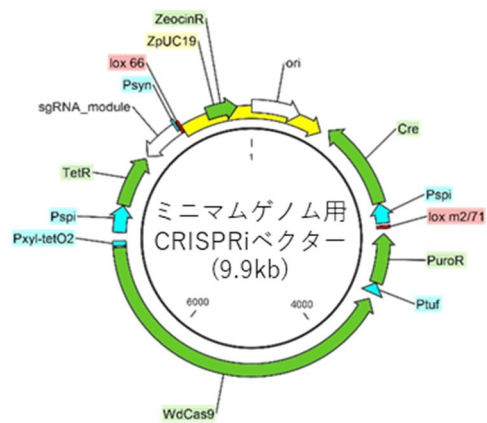


図4. CRISPRi ベクター

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Mizutani, M., Omori, S., Yamane, N., Suzuki, Y., Glass, J.I., Chuang, R.-Y., Fukatsu, T., and Kakizawa, S.	4. 巻 15
2. 論文標題 Cloning and sequencing analysis of whole Spiroplasma genome in yeast	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1411609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2024.1411609	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kakizawa, S., Hosokawa, T., Oguchi, K., Miyakoshi, K., and Fukatsu, T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Spiroplasma as facultative bacterial symbionts of stinkbugs.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in microbiology.	6. 最初と最後の頁 1044771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.1044771	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kiyama, H., Kakizawa, S., Sasajima, Y., Tahara, Y.O., and Miyata, M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Reconstitution of a minimal motility system based on Spiroplasma swimming by two bacterial actins in a synthetic minimal bacterium.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances.	6. 最初と最後の頁 eabo7490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abo7490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mariscal, A.M., Kakizawa, S., Hsu, J.Y., Tanaka, K., Gonzalez-Gonzalez, L., Broto, A., Querol, E., Lluch-Senar, M., Pinero-Lambea, C., Sun, L., Weyman, P.D., Wise, K.S., Merryman, C., Tse, G., Moore, A.J., Hutchison, C.A., 3rd, Smith, H.O., Tomita, M., Venter, J.C., Glass, J.I., Pinol, J., and Suzuki, Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Tuning Gene Activity by Inducible and Targeted Regulation of Gene Expression in Minimal Bacterial Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synth Biol.	6. 最初と最後の頁 1538-1552.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.8b00028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kakizawa, S.	4. 巻 1875
2. 論文標題 A Multiplex-PCR Method for Diagnosis of AY-Group Phytoplasmas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 143-149.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8837-2_11.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Baba, T., Kakizawa, S., Mori, H., Kuruma, Y., Kurokawa, K., and Oshima, T. (2020): Minimal genomes : how many genes are required for living cells.	4. 巻 129
2. 論文標題 Minimal Genomes: How Many Genes Does a Cell Require To Be Viable	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Geography (Chigaku Zasshi).	6. 最初と最後の頁 805-824.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5026/jgeography.129.805	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kakizawa, S. (2020)	4. 巻 22
2. 論文標題 細菌のゲノム編集.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本ゲノム微生物学会誌.	6. 最初と最後の頁 6-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Igarashi, K., and Kakizawa, S.	4. 巻 129
2. 論文標題 Chemical Evolution Mediated by Metal Sulfides and the Origin of Iron-sulfur Proteins.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Geography (Chigaku Zasshi)	6. 最初と最後の頁 853-870.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5026/jgeography.129.853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 柿澤 茂行	4. 巻 99
2. 論文標題 人工生命? 人工のゲノムをもった細菌	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 303 ~ 303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.99.6_303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 水谷雅希、宮腰かおり、古賀隆一、深津武馬、柿澤茂行
2. 発表標題 酵母を用いた細菌ゲノムクローニング
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 最少ゲノム細菌 (ミニマルセル) を用いた生命機能の解析
3. 学会等名 第30回大阪母子医療センターシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 合成ゲノム細菌の特徴と安全性
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 最少ゲノム細菌（ミニマルセル）を用いた生命機能の解析
3. 学会等名 自然科学研究機構 生理学研究所研究会 「極限環境適応」（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 マイコプラズマのミニマルセルを用いた生命機能の解析
3. 学会等名 第81回日本寄生虫学会東日本支部大会・日本共生生物学会第6回大会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 ミニマルセルを使った生命機能の解析：最もシンプルな細胞から見えるもの
3. 学会等名 第23回極限環境生物学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水谷雅希，宮田真人，柿澤茂行
2. 発表標題 酵母を用いたマイコプラズマ・モービレのゲノムクローニング
3. 学会等名 第49回日本マイコプラズマ学会 学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shigeyuki Kakizawa, Yo Suzuki
2. 発表標題 Specific gene knock-down system in the minimal mycoplasma.
3. 学会等名 The 8th Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology (AOM) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沼崎るみ・山根倫子・John Glass・Ray-Yuan Chuang・柿澤茂行
2. 発表標題 酵母でクローニングしたSpiroplasma 全ゲノムのシーケンス解析
3. 学会等名 第47回日本マイコプラズマ学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水谷雅希、柿澤茂行
2. 発表標題 難培養性細菌の全ゲノムクローニング
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 ミニマルセル(最小ゲノム細菌)を用いた生命機能の解析
3. 学会等名 大隅財団 微生物コンソーシアム(招待講演)
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 ミニマルセルを用いた生命機能の解析
3. 学会等名 第18回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 ミニマルセルを用いた細菌の高次機能の再構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 ミニマルセルを用いた生命機能の解析
3. 学会等名 シンポジウム「環境応答」
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 Whole genome cloning of genome-reduced insect symbionts
3. 学会等名 The 11th Wolbachia Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水谷雅希、古賀隆一、深津武馬、柿澤茂行
2. 発表標題 Adaptive laboratory evolution of JCVI-syn3.0B to low temperature
3. 学会等名 24th Biennial Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 マイコプラズマのミニマルセルとは
3. 学会等名 第48回日本マイコプラズマ学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水谷雅希、宮腰かおり、柿澤茂行
2. 発表標題 難培養性細菌の全ゲノムクローニング
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水谷雅希、宮腰かおり、古賀隆一、深津武馬、柿澤茂行
2. 発表標題 酵母を用いた難培養性細菌の全ゲノムクローニング
3. 学会等名 第16回 日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 ミニマルセルを使った生命機能の解析
3. 学会等名 第一回総合微生物学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水谷雅希、古賀隆一、深津武馬、柿澤茂行
2. 発表標題 Adaptive laboratory evolution of JCVI-syn3.0B to low temperature
3. 学会等名 24th Biennial Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水谷雅希、柿澤茂行
2. 発表標題 最も小さなゲノムで生きる人造細菌
3. 学会等名 年次大会2023「会いに行ける科学者フェス」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水谷雅希、宮腰かおり、古賀隆一、深津武馬、柿澤茂行
2. 発表標題 Whole genome cloning of unculturable bacteria in budding yeast
3. 学会等名 第61回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 柿澤茂行	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 133
3. 書名 実験医学2023年2月号, 「長鎖DNA合成 ゲノムは読む時代から書く時代へ, 4)細菌の全ゲノム合成」	

1. 著者名 水谷雅希, 古賀隆一, 深津武馬, 柿澤茂行	4. 発行年 2023年
2. 出版社 株式会社シーエムシー出版	5. 総ページ数 264
3. 書名 未培養微生物研究の最新動向, 「第6章 細菌の全ゲノムクローニングと未培養細菌への応用」	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------