

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15365

研究課題名(和文)細菌の反復配列遺伝子の相同組換えはどのように抑制されているか

研究課題名(英文)How is the homologous recombination of a gene with repetitive sequence suppressed in bacteria?

研究代表者

石川 聖人(Ishikawa, Masahito)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：70750602

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、グラム陰性細菌Acinetobacter sp. Tol 5が反復配列を有するataA遺伝子をどのように相同組換えから保護しているかを明らかにすることを目的とした。ataA遺伝子の相同組換え頻度を測定する方法を構築し比較したところ、Tol 5株では大腸菌よりもataA遺伝子の相同組換え頻度が低く抑えられていることが確かとなった。加えて、相同組換え頻度の向上した変異株の分離に成功し、変異した遺伝子を特定できた。また、ataA遺伝子の反復配列内に存在するメチル化修飾を検出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

相同組換えは、よく似た塩基配列間(相同配列間)で生じるDNAの組換えであり、損傷を受けたDNAの修復機構として生物に普遍的に保存されている。しかし、反復配列に対しても作用することがあり、時に重要な遺伝情報を書き換え、遺伝子本来の機能を失わせてしまう。それにも関わらず、多くの生物のゲノムDNAには相同配列が連続した反復配列が存在する。反復配列の相同組換えを抑制する機構が明らかとなれば、望まない組換えを抑制することや、効率的な遺伝子の書き換えをする技術開発に繋がると期待できる。

研究成果の概要(英文):This study aimed to clarify how the Gram-negative bacterium Acinetobacter sp. Tol 5 protects the tandem repeat sequences of the ataA gene from homologous recombination. I constructed a method to measure the frequency of homologous recombination in the ataA gene and compared it between Tol 5 and E. coli. As a result, the frequency of homologous recombination was much lower in Tol 5 than in E. coli. In addition, I successfully isolated a mutant strain with an increased frequency of homologous recombination and identified the mutated gene. We also successfully detected methylation modifications in the tandem repeat sequences of the ataA gene.

研究分野：生物工学、分子遺伝学

キーワード：反復配列遺伝子 相同組換え バクテリア Acinetobacter メチル化修飾 ナノポアシーケンサー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

相同組換えは、よく似た塩基配列間（相同配列間）で生じる DNA の組換えであり、損傷を受けた DNA の修復機構として生物に普遍的に保存されている。しかし、損傷 DNA 以外の相同配列に対しても作用することがあり、時に重要な遺伝情報を書き換え、遺伝子本来の機能を失わせてしまう。それにも関わらず、細菌のゲノムには類似性の高い配列が繰り返される反復配列が存在する。この細菌ゲノムの基本原理を解明し、人為的に解除・誘導できれば、DNA を切らずに相同組換えを誘発することや、望まない相同組換えを抑制することなど、今までにない DNA の操作技術が開発できる。研究代表者が独自に発見した接着性ナノファイバー蛋白質 AtaA の遺伝子には、相同組換えの標的となる反復配列が多く存在する（図 1）。一見、機能喪失がすぐにも起きてしまいそうな遺伝子構造をしているが、不思議なことに、*ataA* の宿主細菌である *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 では安定に維持されている。ところが、Tol 5 と異なる細菌で *ataA* 遺伝子を発現させると相同組換えが起こりやすいことに偶然気付いた。このことは、Tol 5 は *ataA* 遺伝子の相同組換えを抑制するためのシステムを有することを示唆するが、その実態は全く明らかでなかった。



図 1 *ataA* 遺伝子の塩基配列模式図。同一の色は同じ種類の反復配列を示す。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究課題の核心をなす学術的「問い」として、「Tol 5 は *ataA* 遺伝子をどのように維持しているか」を設定した。この問いに対して解を出すために、本研究期間中は宿主細菌である Tol 5 と異種細菌である大腸菌における相同組換え頻度の算出と、相同組換え抑制の関連因子の特定を目指した。原核生物の相同組換えを触媒する酵素は RecA であるため、相同組換え抑制の関連因子は、①DNA 修飾（メチル化）による *ataA* 遺伝子の標識化と②DNA 結合蛋白質による RecA の阻害を想定して実験を設計した。

### 3. 研究の方法

*ataA* 遺伝子の相同組換え頻度を定量するための“プローブプラスミド”を設計・構築した。スクロースを毒性物質に変換する SacB の遺伝子を *ataA* 遺伝子の反復配列間に挿入し、これを Tol 5 株と大腸菌で複製できるプラスミドにクローニングした（図 2）。このプラスミドを保持する形質転換体はスクロースを含む培地では増殖できないが、*ataA* 遺伝子の反復配列間で相同組換えが起こると *sacB* 遺伝子の欠失が起こり、プラスミドを保持していても生きられるようになる。なお、*sacB* 遺伝子の挿入位置を変えたバリエーションを作ることによって、反復配列の種類によって相同組換え頻度の違いを調べることを試みた。プローブプラスミドの形質転換 Tol 5 株と大腸菌を抗生物質含有の液体培地で一晚培養した後、スクロースの含まれる寒天培地と含まれない寒天培地に播種した。翌日に各培地に形成したコロニーを計測し、スクロース含有培地で形成したコロニー数をスクロース不含有培地で形成したコロニー数で除した値を相同組換え頻度とした。

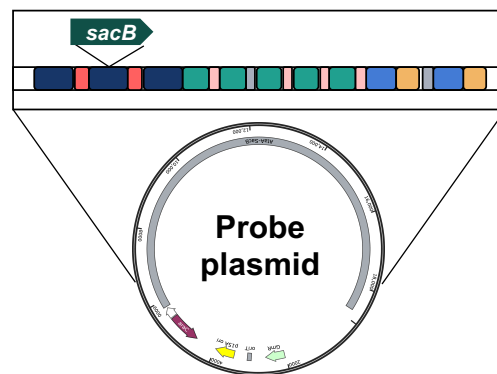


図 2 プローブプラスミドの例

*ataA* 遺伝子のメチル化修飾が宿主である Tol 5 と大腸菌でどのように異なるかを調べるために、*ataA* 遺伝子を含むプラスミドを Tol 5 の形質転換体から抽出し、Oxford Nanopore Technologies (ONT 社) の Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109) を用いてライブラリーを構築した。得られたライブラリーは MinION (ONT 社) でシーケンシングし、データをソフトウェア Tombo により解析した。

RecA の働きを抑制する蛋白質を特定するために、相同組換え頻度の増加した変異株を順遺伝学的に探索した。Tol 5 株のランダムトランスポゾン変異ライブラリーにプローブプラスミドを導入し、スクロース含有培地で選択した。得られた変異株の相同組換え頻度を上述の方法

で評価し、野生株よりも相同組換え頻度が向上していること確かめた。トランスポゾン挿入箇所特定にはインバース PCR を用いた。

#### 4. 研究成果

##### 1. 宿主細菌と異種細菌における相同組換え頻度の算出

予備的知見として、*ataA* 遺伝子の相同組換えは宿主発現よりも異種発現の方が起こりやすいことは定性的にはわかっていた。これを定量的に評価するために、プローブプラスミドを用いた手法を提案した。図 2 のプローブプラスミド (pPrb1) を用いて Tol 5 株と大腸菌 BL21 (DE3) 株 (RecA 活性有) の相同組換え頻度を算出したところ、大腸菌は Tol 5 株よりも約 100 程度相同組換え頻度が高いことが定量的に確かとなった (図 3)。図 4 は異なるプローブプラスミド pPrb2, pPrb3 を用いて Tol 5 株の相同組換え頻度を比較した結果を示している。pPrb1 を用いたときの相同組換え頻度は pPrb2 と pPrb3 を用いたときのそれよりも有意に低いことが明らかとなった。このことは、各プローブプラスミドに含まれる反復配列の種類によって相同組換えの頻度が異なることを示している。

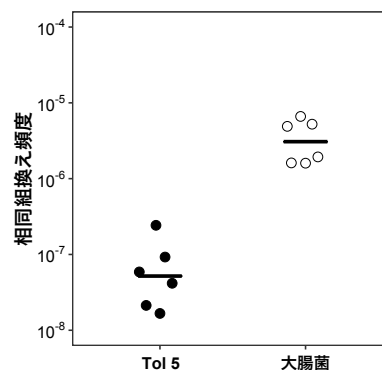


図 3 プローブプラスミド pPrb1 を用いた Tol 5 株と大腸菌の相同組換え頻度の定量

##### 2. *ataA* 遺伝子のメチル化解析

DNA のメチル化は転写因子と DNA の親和性を変化させることから、RecA と DNA の親和性にも影響し、相同組換えを抑制するのではないかと類推した。加えて、Tol 5 には大腸菌とは異なる制限修飾系を有するという予備的知見があった。本研究期間中は、*ataA* 遺伝子のメチル化修飾が、宿主である Tol 5 と大腸菌でどのように異なるかを調べることを目的とし、ナノポアシーケンサー MinION (ONT 社) を用いて解析することを試みた。ソフトウェア Tombo を使って解析したところ、*ataA* 遺伝子の反復配列内には、大腸菌 BL21 (DE3) には存在しないメチル化修飾のモチーフが検出された。

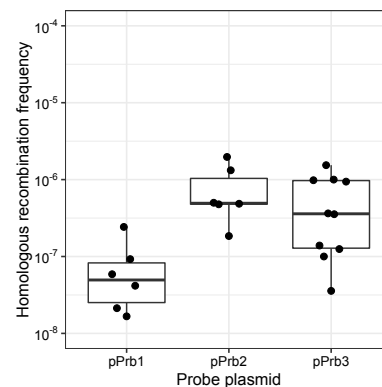


図 4 プローブプラスミドによる Tol 5 株の相同組換え頻度の違い

##### 3. 相同組換え抑制に関連する遺伝子の順遺伝学的探索

約 4,000 コロニーの変異株から構成される Tol 5 のランダムトランスポゾン変異株ライブラリーから、プローブプラスミド pPrb1 を用いて相同組換え頻度の向上した変異株を 1 種類分離できた。この変異株は Tol 5 の野生株と比べて 100 倍以上相同組換え頻度が高かった。トランスポゾンの挿入部位付近をインバース PCR によって増幅してシーケンシングしたところ、この変異株は遺伝子 X が不活性化していることが明らかとなった。遺伝子 X を対立遺伝子置換法によって選択的にノックアウトし、プローブプラスミド pPrb1 で相同組換え頻度を測定したところ、やはり 100 倍以上野生株よりも高いことが確かめられた。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aoki Sota, Yoshimoto Shogo, Ishikawa Masahito, Linke Dirk, Lupas Andrei, Hori Katsutoshi	4. 巻 129
2. 論文標題 Native display of a huge homotrimeric protein fiber on the cell surface after precise domain deletion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 412 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.09.022	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 該当する

1. 著者名 Noba Kosaku, Ishikawa Masahito, Uyeda Atsuko, Watanabe Takayoshi, Hohsaka Takahiro, Yoshimoto Shogo, Matsuura Tomoaki, Hori Katsutoshi	4. 巻 141
2. 論文標題 Bottom-up Creation of an Artificial Cell Covered with the Adhesive Bacterionanofiber Protein AtaA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 19058 ~ 19066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b09340	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野場考策, 石川聖人, 植田淳子, 渡邊貴嘉, 芳坂貴弘, 吉本将悟, 松浦友亮, 堀 克敏
2. 発表標題 バクテリオナノファイバー蛋白質AtaAで修飾した接着性人工細胞の創出
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野場考策, 石川聖人, 植田淳子, 渡邊貴嘉, 芳坂貴弘, 吉本将悟, 松浦友亮, 堀 克敏
2. 発表標題 高付着性蛋白質AtaAで被覆された人工細胞のボトムアップ創出
3. 学会等名 2019年度日本生物工学会中部支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川聖人, 飯尾 魁, 堀 克敏
2. 発表標題 環境汚染物質依存性の生物学的封じ込めシステムの開発
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川聖人、堀 克敏
2. 発表標題 環境汚染物質に依存する生物学的封じ込め技術の開発
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木壮太, 吉本将悟, 石川聖人, 堀克敏
2. 発表標題 正確なドメイン欠損による巨大ファイバータンパク質の再構成
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2019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
研究協力者	堀 克敏  (Hori Katsutoshi)  (50302956)	名古屋大学・大学院工学研究科・教授    (13901)	

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
---------	---------