

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15442

研究課題名(和文)好気性微生物を用いたハイスループット解析によるアーキア工学ツールの作製

研究課題名(英文)High-throughput analysis using aerobic microorganisms for the construction of archaea engineering tools

研究代表者

古林 真衣子 (Furubayashi, Maiko)

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：90849895

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)：アーキアは多様で複雑な生物機能を持つことで知られ、遺伝子工学をより自在に行うことができれば、より魅力的な生物機能を生み出せるため期待が高まっている。しかしながらアーキア工学をするための遺伝子パーツ・ツールは、いまだに極めて少ない。本研究では、培養の簡単な好気性ハロアーキアおよび好気性好熱性細菌を利用して、アーキア発現制御パーツを作製することを目指した。まず多検体ディープウェルプレートを用いて1-2日でハロアーキアを培養する条件を確立した。さらに、シャトルベクターの作製により、プロモータ・レポーター配列を簡単に導入できるシステムを作製し、遺伝子機能をハイスループットに評価する実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物工学の研究の中でも、アーキアに用いることができる遺伝子工学ツールはいまだに少ないのが現状である。これは、細菌・真核生物に比べても転写発現の仕組みが異なることに加え、一般にアーキアの培養は全て難しいとされていることも大きく影響しているだろう。培養環境が嫌気・超高温など、セットアップが難しいために、生物工学者・合成生物学者の参入が少なかったのだろうと考えられる。本研究では、比較的培養が簡単である中温性・好気性のハロアーキアに注目し、そのハイスループットな培養条件検討と遺伝子工学ツールの機能評価を目指した。この戦略を応用することでさらなるアーキア工学の発展に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Archaea are known for their diverse and complex biological functions, and there are high hopes that more flexible genetic engineering can create more attractive biological functions. However, there are still very few gene parts and tools for archaea engineering. In this study, we aimed to create archaeal expression control parts using aerobic haloarchaea and aerobic thermophilic bacteria, which are easy to culture. First, we established conditions for culturing haloarchaea in 1-2 days using multi-well deep-well plates. Furthermore, by creating shuttle vectors, we created a system that can easily introduce promoter-reporter sequences and established an experimental system for high-throughput evaluation of gene function.

研究分野：microbial engineering

キーワード：genetic engineering haloarchaea carotenoids

1. 研究開始当初の背景

アーキアが生命の第 3 ドメインであると発見されて以来、細菌とも真核生物とも異なるこの生物の遺伝学研究が精力的に行われてきた。モデルアーキアと呼ばれる種、たとえば *Methanosarcina* や *Thermococcus*, *Halobacterium* などの生理学・生態学研究が発展し、アーキアの示す多様で複雑な生物機能が明らかになってきた。アーキアの中でもハロアーキア・メタン菌を含む *Euryarchaeota* 門も興味深い機能をもつことで知られる。例えばハロアーキアはその細胞内に空気を含むガスベシクルをつくり、池の表面に局在できる；同じ種をつくる光応答ポンプは太陽光を使ってイオンポンプを駆動させる。メタン菌は CO₂ を固定してメタン生成をすることから、エネルギー応用が期待されている。自然界からみつかったアーキアの有りのままの機能でさえ応用研究が有望であるが、もし遺伝子発現制御や、蛋白質工学、代謝工学を行うことができれば、より高効率で魅力的な生物機能を生み出せると考えられ、アーキア工学研究への期待が拡大し始めている。

しかしながら、アーキアの生物学パーツ・ツールは、いまだに極めて少ない。これは、細菌や真核生物の分野で発展している生物学・合成生物学の分野と比較すると、更にその差が際立つ。細菌や真核生物においては、DNA 合成の価格破壊やハイスループット解析、大規模ライブラリ設計や計算機モデル技術の進展により、多くの精巧パーツが作製・整備され、複雑・多遺伝子の制御が可能となっている。なぜアーキアだけはパーツが殆ど揃っていないのか？まず明らかな理由としては、アーキア研究の歴史が比較的浅いことが挙げられる。しかしそれだけではなく、転写発現の仕組みが異なることに加え、一般にアーキアの培養は全て難しいと思われていることも大きく影響しているだろう。つまり、既に確立された細菌・真核の発現ツールが使えない上に、培養環境が嫌気・超高温など、セットアップが難しいために、生物工学者・合成生物学者の参入が少なく、この分野の得意とするようなハイスループットなツール開発が行われてこなかったのだろうと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、培養の簡単な好気性ハロアーキアおよび好気性好熱性細菌を利用して、アーキア発現制御パーツを作製することを目指した。まず、37 度～45 度域で生育できるハロアーキアを用いて、多検体を同時に培養するための培養条件を決定し、これを用いて様々なプロモータの解析を行う。また、ハロアーキアはカロテノイドおよび本研究で確立した条件を用いることにより、今後さまざまな遺伝子工学ツールを評価することができるようになると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 培地の調整・培養条件

既報「The Halohandbook: Protocols for haloarchaeal genetics」および「Cline and Doolittle (1987) Efficient transfection of the archaeobacterium *Halobacterium halobium*」の方法に従って培地を作製した。96 穴または 48 穴ディープウェル培養では、すべてのウェルに 0.5 mL または 2 mL の培地を加え、500～1000 rpm にて振盪した。培地の蒸発を防ぐために湿らせたタオルを装置に配置した。固体培地の培養においても、湿らせた布を入れた袋の中に固体培地を入れ、3～7 日培養した。

(2) プラスミド DNA の構築と解析

Halobacterium sp. GRB 由来の pGRB ベクターの配列全体を人工遺伝子合成した。ここでは 2 つのプラスミドに分けて DNA 合成会社に依頼し、その末端に Type IIS 制限酵素サイトを入れておき、2 断片を p15A ベクターおよび oriT 配列 (gene fragment として注文) とアセンブリすることにより、ハロアーキア・大腸菌シャトルベクターを作製した。大腸菌用のセレクションマーカーとして Cm を使用し、ハロアーキアセレクションマーカーとしては *mevR* を使用した。また、目的配列を導入するための“Cargo”として、転写ターミネータ配列に挟まれた領域に複数の制限酵素配列を配置した。ここに転写レポーターとして緑色蛍光タンパク質 (SmRS-GFP) を導入し、その上流配列に様々なプロモータを導入した。

4. 研究成果

(1) 培養条件のスクリーニング

本研究においてはハロアーキア・好熱菌をハイスループットに培養できることが必須であるため、まずはハロアーキアの培養最適化を行なった。ハロアーキア液体培地 (塩 25% を含む) を 96 穴および 48 穴 Deep Well Plate に 0.5～2 mL 加え、ここに *Halobacterium salinarum* NRC-1

を植菌し、卓上振盪培養機で培養した。ここでは、湿らせた布を培養機内に加えておくことにより、水分の揮発による塩濃度上昇（塩析出）を抑えた。すると、37度と45度において、1~2日で細胞の生育を確認できた（図1）。また、多くの遺伝子パーツの評価を行うには形質転換とシングルコロニーの形成が必要となるため、寒天培地上での生育も重要である。既報のレシピにより寒天培地を作製したところ、シングルコロニーの形成には7日間を要した。より早くコロニー形成させることを目指し、さまざまな培地を検討したところ、ミネラルとグリセロールを加えた寒天培地を用いることにより、5日で同程度のコロニーを形成させることができた（図2）。しかし、液体培養での倍加時間を考慮すると固体培地での生育はまだ遅い。2~3日でコロニーを形成できるようになることが望ましいため、今後の研究にてさらなる条件検討が必要である。

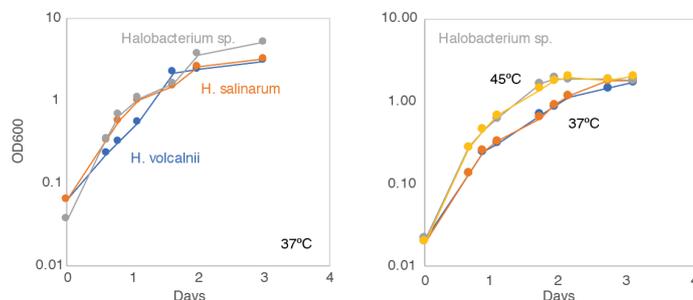


図1. ハロアーキアの生育曲線。

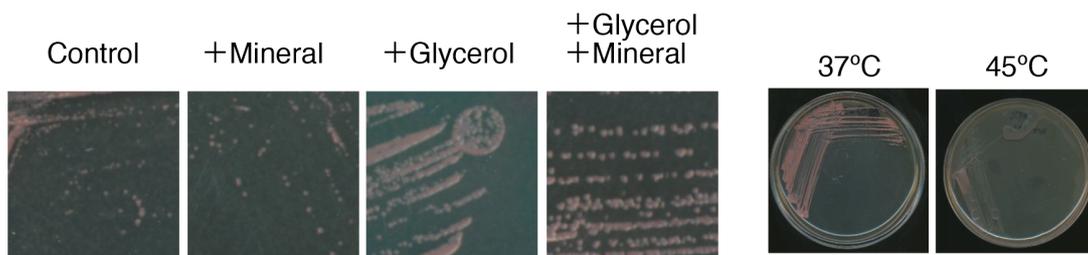


図2. Halobacterium salinarum NRC-1 の固体培地上のコロニー形成。

(2) プラスミドベクターおよび遺伝子パーツの作製と解析

ハロアーキアで用いることができるプラスミドベクターはいくつも報告がある。これまで報告があるハロアーキアプラスミドベクターを表1にまとめた。この中で、Halobacterium sp. GRB由来のpGRB プラスミドは長さが短い上に安定であり、コピー数が多いという報告があるため、これを選択したシャトルベクターの作製に取り掛かった。他の遺伝子パーツとの互換性を持たせるため、pSEVA (<https://seva-plasmids.com>) に準拠した制限酵素サイトを導入した。また、遺伝子を導入しやすいよう、pSEVAで言う“Cargo”領域に制限酵素のクローニングサイトを導入した。本ベクターを用いて、アーキアのパーツデザインに取り組んだ。アーキアのプロモータは保存された領域が少なく、プロモータ強度を制御する配列がよく理解されていない。近年、プロモータ領域の配列を解析・予測するような研究が多く報告されはじめているところである。本研究では、まずはゲノムの遺伝子上に配置されたプロモータ (100~200 base) を評価するため、これらの配列を gene fragment として注文し、レポーター遺伝子の上に配置することによって、その強度の評価を行なった。

また、ハロアーキアはカロテノイドを生合成することで知られている（ピンク色のコロニーも、カロテノイドおよび同じ生合成経路から作られるレチナール・ロドプシンの色に由来する）。ハロアーキアのカロテノイド遺伝子工学、または異種由来のカロテノイド遺伝子の導入により、ハロアーキアに様々なカロテノイド・レチナール化合物を作ることができるようになる。既報、および報告されているハロアーキアのゲノム配列データの相同性検索により、カロテノイド生合成遺伝子クラスターを特定した。評価したプロモータを用いてカロテノイド遺伝子の発現を制御するため、pGRB シャトルベクター上に DNA コンストラクトをデザインした。

以上のように、本研究ではハロアーキアのベクターを作製しハイスループットに遺伝子機能の評価を行うことを試みた。液体培養条件においてはハイスループットを達成した。この方法を応用することにより多数の遺伝子パーツを評価できるようになると考えられる。今後の課題として、固体培地での生育が挙げられる。本研究によりコロニー形成速度が多少改善されたものの、最適化されたとは言えず、より多くの遺伝子ツールの評価を行うためにはさらなる検討が必要となる。

表1. プラスミドベクター

Strain	Plasmid	Base	Type	Ref	Notes
Halobacterium salinarum	pHH1	pHH1	Natural		
	pHH9	pHH1	Truncated	Pfeifer1993	Low copy. Derived from pHH1 5.7 kb
	pUBP2	pHH1	Synthetic shuttle	pHH9 (5.7kb) Blaseio1990, Pfeifer1993	Used in Hf. volcanii: selection: 9/100 lost no selection: 23/63 lost = unstable
	pUBP3	pHH1	Synthetic shuttle	pHH9 AccI 2.9 kb	Used in Hf. volcanii: selection: 2/100 lost no selection: 24/100 lost = unstable
Halobacterium halobium	pNRC100	pNRC100	Natural		
Halobacterium sp. GN101	pHGN1	pHGN1	Natural	Ebert1984, Hall1989	Very short. Stable. Homolog with pGRB and pHSB.
Halobacterium sp. GRB	pGRB1	pGRB1	Natural	Ebert1984	Very short. Used in H. salinarum, H. halobium High copy (180)
Halobacterium sp. SB3	pHSB	pHSB	Natural	Ebert1984, Kagramanova1988	Very short.
	pHSB1	pHSB	Synthetic	Ebert1984, Hackett1989, 4 nt different from Kagramanova1988	Used in H. halobium
H. salinarum	pHsal	pGRB1	Synthetic shuttle	pGRB1 base. Silva-Rocha2015 mevR	
Haloferax volcanii DS2	pHV2	pHV2	Natural		Necessary region is 3 kb.
	pWL102	pHV2	Synthetic	Derived from pWL102	
Haloferax lucentense	pHK2	pHK2			Low copy (8). 3.8 kb necessary region

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 古林 真衣子	4. 巻 100
2. 論文標題 彩りと香りをもたらすアポカロテノイドの魅力	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 382～382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34565/seibutsukogaku.100.7_382	査読の有無 無
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 Furubayashi Maiko, Umeno Daisuke	4. 巻 671
2. 論文標題 Use of directed enzyme evolution to create novel biosynthetic pathways for production of rare or non-natural carotenoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in enzymology	6. 最初と最後の頁 351～382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2022.03.008	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Maiko Furubayashi
2. 発表標題 Engineering Novel Retinal-Related Compounds through Carotenoid Pathway Engineering and Enzyme Mutagenesis
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Carotenoids (ISC2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Maiko Furubayashi
2. 発表標題 Engineering Natural and Non-natural Carotenoid/Apocarotenoid Pathways in Escherichia coli
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Biology and Applications of Carotenoids, Retinoids and Other Apocarotenoids (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古林真衣子
2. 発表標題 希少/非天然カロテノイド・アポカロテノイドの生合成工学
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

〔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

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