

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22643

研究課題名(和文)合成細菌と全ゲノムクローニング法を用いたマイコプラズマ滑走運動の再構築

研究課題名(英文) Reconstruction of mycoplasma gliding motility in synthetic bacterium by using whole genome cloning method

研究代表者

水谷 雅希 (Mizutani, Masaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・産総研特別研究員

研究者番号：60886274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイコプラズマ属細菌は動物の寄生菌であり、いくつかの種において、宿主表面に結合したまま移動する滑走運動を示すことが報告されている。本研究は、滑走運動遺伝子群をクローニングし、合成細菌JCVI-syn3.0Bに導入することで、滑走運動の再構築を目的としたものである。酵母TAR法を用いてマイコプラズマ・モービレの全ゲノムを合成細菌に導入可能なvectorとアセンブルすることに成功した。また、滑走運動遺伝子群がコードされている6つのオペロンをPCRで増幅し、それらを約3割の比較的高い効率でタンデムにアセンブルすることに成功した。これを合成細菌に導入するための形質転換実験を現在進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌遺伝子のクローニングは大腸菌を用いた実験系が広く利用されている。しかし、大腸菌ではクローニング可能な遺伝子のサイズ上限がおおよそ十数kb程度であり、全ゲノムや長鎖オペロンなどのクローニングは難しい。本研究では、酵母を用いて777 kbのマイコプラズマ・モービレの全ゲノムをクローニングすることに成功した。また合計約60 kbにもなる滑走遺伝子群6オペロンを高効率でタンデムにアセンブルすることにも成功した。これらの酵母を用いたゲノムクローニングは、汎用性が高く、手法を改変したことで高効率なクローニングが可能となったことは大きな成果であり、今後の当該分野の発展に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：The members of bacterial genus Mycoplasma are parasites of animals and some of them have been reported that they have gliding motility. In this project, we focused on the reconstitution of gliding motility using two methods, the cloning of gliding motility genes and transformation it into a synthetic bacterium JCVI-syn3.0B. We succeeded to clone the whole genome of Mycoplasma mobile using yeast TAR methods. Next, we amplified gliding related 6 operons by PCR and tandemly assembled them using yeast TAR methods with 30% of successful ratio. Transformation them into the synthetic bacterium is ongoing.

研究分野：合成生物学

キーワード：マイコプラズマ ゲノムクローニング 酵母TAR法

## 1. 研究開始当初の背景

マイコプラズマはヒトを含む様々な宿主へと感染する寄生性細菌の一群であり、そのうちの十数種において宿主表面上に貼り付いたまま移動する滑走運動を示すことが報告されている。この滑走運動はマイコプラズマがゲノム縮小と細菌細胞壁であるペプチドグリカン層の消失を伴う進化の過程で獲得された特異な仕組みであり、マイコプラズマ以外の生物にはないため、生物物理学的にも細菌進化学的にも非常に興味深い。また、滑走運動がマイコプラズマ感染に必須であることが報告されており、感染症学やマイコプラズマ病理学的にも重要である。

マイコプラズマ滑走運動についてはこれまで、淡水魚の病原菌であるマイコプラズマ・モービレでよく研究されており、滑走装置の詳細な構造や構成タンパク質が明らかになりつつある。滑走装置は細胞内部で ATP を加水分解することで滑走運動のための力を発生する内部構造と、細胞表面にあり、宿主表面上のシアル酸オリゴ糖に結合し、引っ張ることで菌体を前進させる表面構造に分けられる。これらの構成タンパク質は、ゲノム上の6つのオペロン領域にコードされていることが報告されている(図1)が、これらすべてが滑走運動に必須であるのか、これら以外にも必須なタンパク質が存在するか、については明らかではない。なぜなら、マイコプラズマ・モービレは既存の相同組換え法などの標的変異導入法が利用可能でないため、自由な変異株の作製が困難なためである。

近年、米国クレイグベンター研究所により、細菌ゲノムを丸ごと酵母にクローニングする手法が確立され、酵母を用いた細菌ゲノムの維持や増幅、CRISPR/Cas9を用いた変異導入が可能となった。また2016年に同研究所によってマイコプラズマの遺伝子情報を基に人工合成最少遺伝子細菌 JCVI-syn3.0 が創られ、これにマイコプラズマの仲間であるスピロプラズマやウレアプラズマの遺伝子を導入することで、導入遺伝子の機能解析が行った例が報告されている。

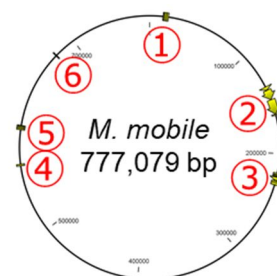


図1. 滑走遺伝子マップ

## 2. 研究の目的

本研究では、酵母でマイコプラズマ・モービレのゲノムをクローニングし、合成細菌に導入することによって滑走運動を再現することが出来れば、上記の標的変異導入困難を克服し、また滑走運動に必要な十分な構成タンパク質の最少セットを知ることができるのではないかと考えた。

## 3. 研究の方法

本研究では、酵母 Transformation-associated recombination (TAR)法を用いて、マイコプラズマ・モービレのゲノムをクローニングする。細菌遺伝子のクローニングは大腸菌を用いた実験系が広く利用されている。しかし、大腸菌ではクローニング可能な遺伝子のサイズ上限がおおよそ十数 kb 程度であり、全ゲノムや長鎖オペロンなどのクローニングは難しい。一方、酵母 TAR 法は、酵母が持つ相同組換え能を利用して、末端に相同配列を持たせた DNA 断片をアセンブルする方法であり、~2 Mb の DNA をクローニングすることができると言われている。このようにしてクローニングしたマイコプラズマ・モービレゲノムを合成細菌に導入し、滑走運動を試みる(図2)。

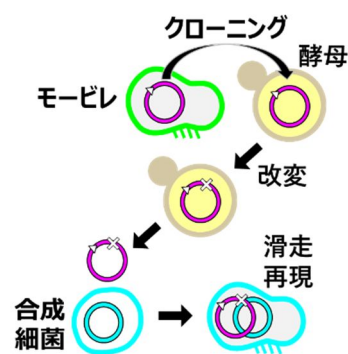


図2. 運動再現実験の流れのイメージ

## 4. 研究成果

まず初めに、マイコプラズマ・モービレ全ゲノム(約777 kb)のクローニングを行った。マイコプラズマ・モービレを培養し、90 μl 容積のアガロースプラグに封入した。このアガロースプラグをタンパク質分解酵素と界面活性剤で処理することで、菌体からゲノムDNAを露出させた。さらに制限酵素処理を行った後、アガラーゼ処理によって開環したゲノムDNAを調整した。これを末端にマイコプラズマ・モービレゲノム開環部との相同配列を持たせた酵母人工染色体ベクターと共にスフェロプラスト化した出芽酵母 VL6-48 株に導入した。得られたコロニーに対して、マイコプラズマ・モービレのゲノム上にだいたい等間隔で設計した21のプライマーセット

を用いて、コロニーPCRを行った結果、すべてのバンドが検出され、全ゲノムクローニングの成功が示唆された。次にこのクローン酵母にマイコプラズマ・モービレ全ゲノムがひとつの環状DNAとして正しくクローニングされているかについて確かめるために、パルスフィールド電気泳動を行った。クローン酵母を培養し、アガロースプラグに封入し、細胞壁分解酵素、タンパク質分解酵素と界面活性剤で処理することで、酵母からゲノムDNAを露出させた。さらにこのプラグを通常のアガロースゲル電気泳動にかけると、酵母の染色体DNAをアガロースプラグから除去し、その後制限酵素処理を行うことでクローニングゲノムとベクターを切り離した。このプラグをパルスフィールド電気泳動にかけた結果、ポジティブコントロールであるマイコプラズマ・モービレ菌体から抽出したゲノムと同じ位置にバンドが検出されたことから、全ゲノムクローニングの成功が強く示唆された。

次に、マイコプラズマ・モービレ全ゲノムのクローニングゲノムを合成細菌に導入する形質転換実験を試みた。マイコプラズマ・モービレ全ゲノムを内在するクローン酵母を培養し、アガロースプラグに封入し、細胞壁分解酵素、タンパク質分解酵素と界面活性剤で処理することで、酵母からゲノムDNAを露出させた。これをアガラーゼ処理することでクローニングゲノムを抽出し、合成細菌にゲノム移植法を用いて導入することを試みた。しかし、コロニーが現れなかったため、形質転換体を取得することができなかった。この原因としては、合成細菌のゲノムサイズ545 kb に対して導入ゲノムサイズ約780 kb が大きすぎた可能性が考えられた。

そこで、より小さな導入ゲノムで滑走運動を再現するために、ゲノム中の滑走運動に関わるとされる6オペロンのみのクローニングを行った。クローニングの手法としては、近年注目されているRA-RCR法によるアセンブルを試みた。PCRで各オペロンを増幅し、ゲル切精製後、等モル比になるように混ぜ、RA-RCR反応を行ったが、目的のアセンブル産物は得られなかった。同様にGibson assembly法によるアセンブルも試みたが、目的のアセンブル産物は得られなかった。

そこで、酵母TAR法によるアセンブルを試みた。PCRで各オペロンを増幅し、等モル比(0.017 pmol/fragment)になるように混ぜ、スフェロプラスト化処理を行った出芽酵母に導入したところ、1枚の寒天プレートから数百個のコロニーが得られた。ここから32コロニーを取得し、6オペロンの5つの繋ぎ目を標的としたジャンクションPCRを行ったところ、9つのコロニーですべての標的バンドが検出され、約3割の比較的高い効率で6オペロンをタンデムにアセンブルした目的の産物が得られていることが示唆された(約58 kb)。このうちの2クローンについて、クローン酵母からDNAを精製し、酵母の染色体のみを分解した後に、一か所切断の制限酵素で処理し、アガロースゲル電気泳動を行った。その結果、マーカの最大値である30 kbよりも上部に一本のバンドが検出されたことから、目的の産物が得られている可能性がより強く示唆された。これらを合成細菌に導入するための形質転換実験を現在進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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

〔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
---------	---------