

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22657040

研究課題名（和文） バクテリア全ゲノム交換法の開発

研究課題名（英文） Development of total genome exchange method in a bacterium.

研究代表者

田端 和仁 (TABATA KAZUHITO)

東京大学・大学院工系研究科・助教

研究者番号：50403001

研究成果の概要(和文):バクテリアゲノムの交換を目指し、その方法を開発する研究を行った。ゲノム交換を行うためには、宿主バクテリアのゲノムを取り除く必要がある。制限酵素の発現系を利用してゲノム破壊株の作成に成功した。さらに導入するゲノムも切断から守るため、認識部位のメチル化にも成功した。ゲノム入れ替えを試みたところ、いくつかのコロニーを得ることが出来たが、それらの持つゲノムはキメラ状態になっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文): We developed the method of exchanging a bacteria genome. In order to perform genome exchange, a host's genome must remove. So, we succeeded in preparation of the genome destructive digestion bacteria using a restriction enzyme expression system. Furthermore, we succeeded also in methylation of the genome to introduce and prepared the genome by which restriction enzyme is not cut. We tried to exchange of the genome using genome destruction bacteria and methylation genome. As a result, some colonies could be obtained. However, it was suggested as a result of the genome PCR or the sequence analysis of the genome that the genome of these bacteria is a chimera of two genomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	0	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	510,000	3,510,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：ゲノム・バクテリア・再構成

1. 研究開始当初の背景

生物のゲノム交換や改変は近年活発に報告されている。たとえば、C. Lartigue らは、

Mycoplasma capricolum に対し、別種の *M. mycoides* の全ゲノムを導入し *M. mycoides* に作り替える事に成功した (*Science*)

317, 632(2007))。この結果は、ゲノムを交換することで新しい細胞が生まれることを示した初の結果である。他にも、M. Itaya らによって、外部からゲノムを取り込む能力を持った *Bacillus subtilis* を使用し、そのゲノムにシアノバクテリアのゲノムを丸ごとクローニングするという方法が報告されている (*PNAS* **102**, 15971(2005))。このように、バクテリアゲノムを大規模に改変したり入れ替えたいという要望は確実に存在する。これは、学術的な興味と産業的な興味をベースとなっている。科学的な興味は、ミニマムゲノムに代表されるような生命に必要な最小限の遺伝子の決定で、産業的には、微生物の代謝経路を遺伝子的にデザインし制御することで、有用物質を効率的に生産させるバクテリアの作成である。これまでこのようなバクテリアはゲノムを相同組換えによって部分的に欠失させることで作成されてきた。しかしながら、最も実験的に使用される大腸菌でも欠失させた領域は1.27Mbpと元々の28%でしかない。しかしながら、Gibson D.G. らは800kbp程度の *Mycoplasma* 全ゲノム合成が可能であると報告したのである (*Science* **319**, 1215(2008))。

2. 研究の目的

この全ゲノム合成とバクテリアゲノム導入法が組み合わせれば、デザインしたゲノムを用いることで、最小ゲノムバクテリアの創出や物質生産バクテリアの創出がきると考えられる。しかしながら、大腸菌などの細菌類のゲノム交換法は存在しない。そこで我々は、大腸菌のゲノムを他種の大腸菌もしくは他属の細菌 (*Salmonella* 属など) と完全に入れ替える技術開発を行う。

3. 研究の方法

我々が考案したゲノム交換は4つのステップからなる。詳細は以下に述べるので、簡単に各ステップを解説する (図1)。

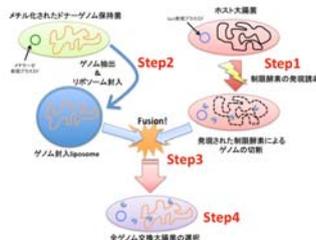


図1 全ゲノム交換大腸菌の作成方法

Step1: 大腸菌内部で制限酵素を発現誘導し、ゲノムを切断。

Step2: メチル化されたドナーゲノムを調整

し、リポソームに封入。

Step3: ゲノム破壊大腸菌とメチル化ゲノム封入リポソームを融合。

Step4: 薬剤耐性などで選択し、得られたコロニーをPCRやSouthern blotで解析。

4. 研究成果

上記各ステップに分けて研究成果を記載する。

Step1: 大腸菌内部で制限酵素を発現誘導し、ゲノムを切断。

大腸菌を多種ゲノムの入れ物として利用するために、元々ある大腸菌ゲノムを取り除く必要がある。そのため、制限酵素を発現する系を構築し、外部からの誘導により、ゲノムが切断され、機能しなくなるシステムを作成した。具体的には、制限酵素 SacI を選択した。この酵素は、6塩基認識の制限酵素で大腸菌ゲノムをおよそ200断片に切断する。このような酵素の発現系は、わずかでも発現の漏れがあると大腸菌が死滅してしまうため、厳密に発現を制御できる系を必要とする。そのため、我々は、DE3溶原菌を用いたIPTG誘導系とT7リゾチームによるT7ポリメラーゼ活性抑制を用いて発現制御を行った。また、DE3溶原菌は大腸菌BL21株のrecA欠損株である、BLRを使用した。本大腸菌に、SacIをコードしたプラスミドを導入し、対数増殖期まで培養後、IPTGを加えて、制限酵素の発現を誘導した。その後、ゲノムDNAの抽出を行い電気泳動にてその存在を確認した (図2)。

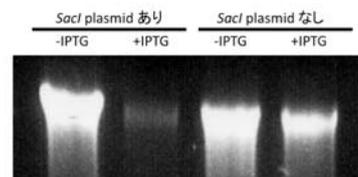


図2 制限酵素 SacI 発現大腸菌における、発現誘導後のゲノム量の比較

IPTG添加後、2時間で菌体を回収し、菌体重量をそろえてゲノム抽出を行った。抽出後、0.3%アガロースゲルで電気泳動し、全長のゲノム量の比較を行った。SacIの発現が誘導されたものに限り、有意にバンド強度が低下するため、SacIによるゲノムの切断が起こっているものと考えられる。

しかしながら、発現誘導後その生菌数を調べたところ、誘導後4時間から菌数の増加が見られた (図3)。

制限酵素の発現誘導後も、元の菌数から、10万分の1程度が生存することが分かった。この生菌数がなぜ生残できるのかを調べた。生菌数が発生する原因として、以下の3つを考えた。

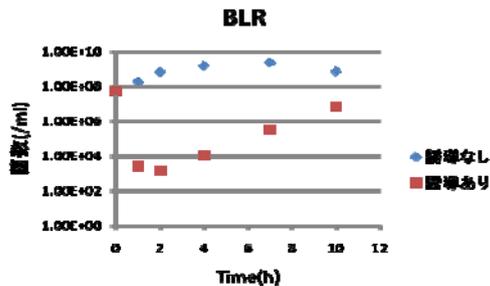


図3 SacI 発現後の生菌数の変化

①ゲノム DNA に修飾がおこり、SacI で切断されなくなっている
 ②pET-17b の SacI 発現システムに変異が入っている
 ③ゲノム DNA の SacI 発現システムに変異が入っている
 ①に関しては生存菌のゲノムを抽出し、SacI で切断したところ、切断されることが確認された。②に関しては生存菌からプラスミド DNA を抽出し、別の BLR 株に導入して、発現誘導を行った。すると、本来と同様に生菌数の減少が見られたため、プラスミド自体の変異はないことが分かった。③に関しては、ゲノム上の T7 ポリメラーゼ配列を確認したところ、確認をした 4 つの生存菌全てに変異が認められた。また、それらの変異は、T7 ポリメラーゼの活性に重要な役割を果たしている C 末部分に集中していた。このことより、T7 ポリメラーゼが生存菌を有無原因であると事が示唆された。これらの現象は、大腸菌のゲノム複製によって導入される変異の割合より、非常に高く、また、生存菌の出現割合もほぼ毎回一定であることから、ゲノムの切断と修復を知る上で非常に興味深い現象である。また、本研究において、企業と共同でバクテリアを観察するためのデバイスを作成し、共同で特許出願を行った。今回の研究では、1 バクテリアを対象とし、生存菌が生存できないような抗生物質条件を利用することで、この問題を回避する。

Step2: メチル化されたドナーゲノムを調整し、リポソームに封入。

SacI によってゲノムが破壊された大腸菌に、サルモネラゲノムをそのまま導入した場合、大腸菌内に残存する SacI によってサルモネラのゲノムまで切断されてしまうと考えられる。これを回避するために、SacI 認識配列をメチル化し、切断から守るための SacI メチラーゼ (SacI-M) をサルモネラ内に導入する必要がある。そこで、そのクローニングと、サルモネラ内での発現を行った。SacI-M は *Streptomyces achromogenes* より、クローニングを行い、pUC18 に組み込んだ後、

Salmonella Typhimurium NKS524 株に導入した。その後、ゲノムを調製し、メチラーゼ保有株と非保有株において SacI による切断実験を行った (図4)。



図4 メチル化されたゲノムの確認。ゲノム調製後、SacI を反応させてパルスフィールド電気泳動によって確認。切断されたものはプラグ内から流れ (lane2, 4)、切断されなかったもののみ内部に残る (lane6)。lane1:大腸菌ゲノム lane2:大腸菌ゲノム+SacI lane3: *Salmonella*ゲノム lane4: *Salmonella*ゲノム+SacI lane5: メチル化された *Salmonella*ゲノム lane6: メチル化された *Salmonella*ゲノム+SacI

上記の結果でも分かるように、メチル化によってサルモネラゲノムが切断されなくなっていることが分かる。よって、SacI-M の発現によって、ドナーとなるサルモネラゲノムの調製に成功した。

続いて、精製されたゲノムを閉じこめるためのリポソーム作成方法に関して検討を行った。近年、リポソーム作成法としてエマルジョン法が利用されている。この方法の利点は、リポソームに閉じこめたい分子の溶液でエマルジョンを作成し、そのエマルジョン溶液と水との界面を通過させることでリポソームを作成できる (図5左)。さらに、リポソーム内の溶液濃度もエマルジョン作成時に決定でき、かつ、全てのリポソームが同じ内容物を持つという利点がある。そこで、本法を利用してリポソーム作成を試みた。その結果図5右に示すようなリポソームを得ることが出来た。

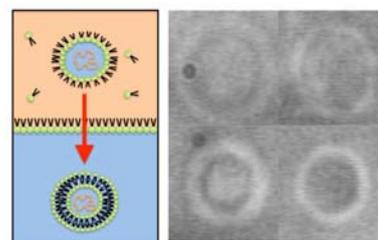


図5 エマルジョン法によるリポソームの作成方法(左) (S. Pautot *et al.* *Lungmuir* 19, 2870 (2003)) と同法で作成したリポソーム (右)

しかしながら、ゲノムを含んだ溶液で作成を試みたところ、ほとんどリポソームが形成されることが分かった。そのため、その他の方も検討する必要がある。

Step3&Step4:ゲノム破壊大腸菌とメチル化ゲノム封入リポソームを融合し、薬剤耐性などで選択。得られたコロニーを PCR や Southern blot で解析。

ゲノムを含んだリポソーム作成が非常に困難であったため、プロトプラスト化したゲノム破壊大腸菌と、精製したサルモネラゲノムの直接融合を試みた。具体的には、大腸菌に IPTG 誘導をかけて 1 時間後に集菌して、プロトプラスト化を行った。サルモネラゲノム DNA は Plug 法で精製した後、Plug を β -agarase で処理して、溶液状にした。この様にして準備した大腸菌とサルモネラゲノム DNA を混合して PEG とインキュベートした後、カナマイシンを含む LB プレートにまいた。サルモネラゲノム上にはカナマイシン耐性遺伝子がコードされている。その結果、7 個のコロニーを得ることが出来た。これら、得られた菌体の持つゲノム DNA が大腸菌のものであるかサルモネラのものであるか確認するために、大腸菌もしくはサルモネラ特異的な遺伝子に結合するプライマーを設計して、コロニー PCR を行った。大腸菌マーカーには *aslA* 遺伝子をサルモネラマーカーには STM0285 遺伝子を選択した (図 6)。

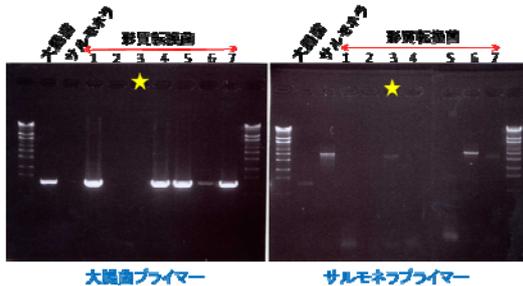


図 6 形質転換菌ゲノムチェックコロニーPCR

形質転換菌のゲノムチェック PCR で、大腸菌プライマーとは反応せずサルモネラプライマーとだけ反応するものがあれば、それはサルモネラの遺伝子を持つ、目的の菌であると考えられる。今回、レーン 3 のようにサルモネラプライマーとだけ反応する菌を得ることができた。しかし、レーン 6, 7 のように両方のプライマーと反応するものや、レーン 1, 4, 5 のように大腸菌プライマーとだけ反応するものも存在した。この解析で確認できるのは一つの遺伝子を持つかどうかだけであり、ゲノム全体がどうなっているかはわからない。今回大腸菌とサルモネラ両方の遺伝子を持つと考えられるものや、サルモネラ遺伝子を持たないのに Kan 耐性を持つ菌が確認されたことより、形質転換菌のゲノムはキメラになっている可能性が考えられる。形質転

換菌のゲノム全体を解析できるように、次の実験を行った。また、この 7 つのコロニーはコロニー 1 と 4 のみ継代培養が可能であったが、その他のコロニーは全て継代出来なかった。

上記のような解析では、どれくらいの領域のゲノムが形質転換されているのかわからなかった。そこで大腸菌、サルモネラそれぞれのゲノム上に分散して配置する 5 つの遺伝子の存在を確認することで、形質転換菌にそれぞれのゲノムがどのような割合で存在するのかを検証した。このために Multiplex PCR を利用して検証した。Multiplex PCR は、一つの PCR 反応系に複数のプライマー対を同時に使用することで、複数の遺伝子領域を同時に増幅する方法である。

また、今回確認を行ったゲノム上の遺伝子とその位置は図 7 にまとめた。

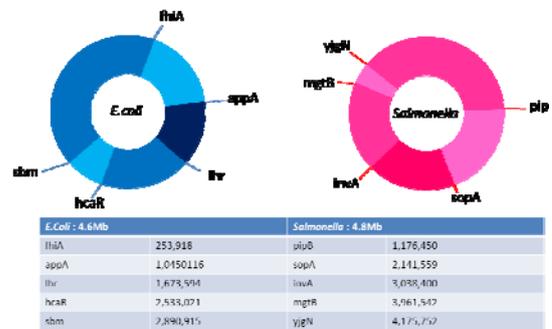


図 7 Multiplex PCR で確認する遺伝子

今回、新たに形質転換菌を調製し、本実験に用いた。

結果、24 コロニーの形質転換体が得られ、すべてが 5 つの大腸菌遺伝子すべてを持っていた。また、これらの形質転換体は同時に 0 ~ 5 個のサルモネラ遺伝子も持ち合わせていた。また、先ほどの実験で継代可能であった 2 つの形質転換菌は 5 つすべてのサルモネラ遺伝子を持っていた。

<i>yjgN</i>	○	○	○	○	○	○				
<i>pipB</i>	○	○	○	○			○			
<i>sopA</i>	○	○	○					○		
<i>invA</i>	○	○		○					○	
<i>mgtB</i>	○									
	2	1	1	1	1	1	3	1	1	12

図 8 形質転換菌が保持していた遺伝子の組み合わせと菌数

以下に、これまで得られた形質転換菌が保持していた遺伝子の組み合わせを記す (図 8)。

本実験により、サルモネラの DNA を部分的に保持していると考えられる菌体を得ることができた。Multiplex PCR の結果、調べた 5 つのサルモネラ遺伝子の内 4 つを保持している菌体が確認されたが、これらは広範囲のサルモネラ DNA を持つと考えられる。しかし、今回の解析ではサルモネラゲノムのほんの一部を確認しただけであるため、本当に広域のゲノム形質転換が起こっているかはわからない。それを確認するためには、全ゲノムのシーケンスを行うなどの解析が必要である。

そこで、Solid システムを用いた全ゲノムシーケンスを行った。本システムを用いた全ゲノム解析では、大腸菌標準株のゲノム配列に対して形質転換体ゲノムは 50%程度一致した。しかしながら、Solid システムから得られる配列情報はそれらすべてをアセンブリして一つのゲノム配列を作成するといった目的には向かない。これは、1 本当たり得られる配列情報が 75bp と短いためである。そのため、今後は未知配列のアセンブリをおこなうことが可能なイルミナシステムでのシーケンスを計画している。

以上の結果から、全ゲノム交換法の開発とまでは至らなかったが、それに使用できるツールとなる遺伝子組換え体をいくつか関せさせることが出来た。また、サルモネラゲノムを取り込んだと思われる形質転換体も得られており、今後の解析に期待が持たれる。これら結果から、ゲノム交換法が真に開発されるための下地がととい、十分視野に入れることが可能となったと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. 物質・デバイス領域共同研究セミナー、公開シンポジウム

2013 年 02 月 25 日

札幌・北大電子研

田端和仁(招待講演)

2. 生物物理学会第 50 回年会

2012 年 09 月 22 日~2012 年 09 月 24 日

名古屋・名古屋大学東山キャンパス

田端和仁、十河孝夫、野地博行

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 8 件)

1. 名称：微生物又は細胞を捕捉するための基体、及び該基体の製造方法

出願番号： 特願 2010-161870

出願人： 株式会社フジクラ (1)、技術研究組合 BEANS 研究所 (2)、東京大学 (3)

発明者：(1) 額賀 理、山本 敏、(2) 田端 和仁、(3) 杉山 正和

出願日： 2010/7/16

2. 名称：基体、及び該基体の製造方法

出願番号： 特願 2010-221440

出願人： 株式会社フジクラ (1)、技術研究組合 BEANS 研究所 (2)、東京大学 (3)

発明者：(1) 額賀 理、山本 敏、(2) 田端 和仁、(3) 杉山 正和、竹内 昌治

出願日： 2010/09/30

PCT 出願あり

3. 名称：基体、及び該基体の製造方法

出願番号： 特願 2010-222225

出願人： 株式会社フジクラ (1)、技術研究組合 BEANS 研究所 (2)、東京大学 (3)

発明者：(1) 額賀 理、山本 敏、(2) 田端 和仁、(3) 杉山 正和

出願日： 2010/09/30

4. 名称：微細流路の製造方法および微細流路を有する基体

出願番号： 特願 2010-261702

出願人： 株式会社フジクラ (1)、技術研究組合 BEANS 研究所 (2)、東京大学 (3)

発明者：(1) 額賀 理、山本 敏、(2) 田端 和仁、(3) 杉山 正和

出願日： 2010/11/24

5. 名称：微細孔を配した基体の製造方法、及び該基体

出願番号： 特願 2011-024998

出願人： 株式会社フジクラ (1)、技術研究組合 BEANS 研究所 (2)、東京大学 (3)

発明者：(1) 額賀 理、山本 敏、(2) 田端 和仁、(3) 杉山 正和

出願日： 2011/2/8

6. 名称：微細孔を配した基体の製造方法、及び微細孔を配した基体

出願番号： 特願 2011-117153

出願人： 株式会社フジクラ (1)、技術研究組合 BEANS 研究所 (2)、東京大学 (3)

発明者：(1) 額賀 理、山本 敏、(2) 田端 和仁、(3) 杉山 正和

出願日： 2011/5/25

7. 名称：脂質膜を形成するための基体、及び該基体の製造方法

出願番号： 特願 2011-142946

出願人： 株式会社フジクラ (1)、技術研

究組合BEANS研究所(2)、東京大学(3)
発明者：(1)額賀 理、山本 敏、(2)田
端 和仁、(3)杉山 正和、竹内昌治
出願日： 2011/6/28

8. 名称：基体、及び分析方法
出願番号： 特願 2011-187510
出願人： 株式会社フジクラ(1)、技術研
究組合BEANS研究所(2)、東京大学(3)
発明者：(1)額賀 理、山本 敏、(2)田
端 和仁、(3)杉山 正和
出願日： 2011/8/30

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田端 和仁 (TABATA KAZUHITO)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号：50403001

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし