

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380197

研究課題名(和文)メタゲノム遺伝子の網羅的発現を目指した大腸菌宿主の開発

研究課題名(英文)Escherichia coli host engineering for non-biased expression of metagenomic library

研究代表者

宮崎 健太郎 (Miyazaki, Kentaro)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：60344123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、様々な微生物由来の遺伝子を均等発現する大腸菌宿主を創成することを目標に、開始コドンやORF内部の翻訳律速要因の特定と、翻訳開始因子IF3、リボソームの改良による発現改良を試みた。その結果、異種IF3等による開始コドン変異体の発現亢進、16S rRNA置換変異により創成された変異リボソームを含む大腸菌により、翻訳特性を改変できることを見出した。今後は、実メタゲノムを用いたスクリーニングに応用展開していく予定である。

研究成果の概要(英文)：We have applied translational engineering approach to solve the problem in heterologous expression problem in Escherichia coli. Initiation factor 3 as well as the ribosome was engineered to alter the translational profile and variants that showed enhanced expression of genes having non-AUG initiation codon were identified. Also, mutant ribosome that have 16S rRNA from non-E. coli bacteria showed a ltered, or enhanced expression of reporter gfp genes, that were not efficiently expressed in wild type E. coli.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：メタゲノム バイオテクノロジー 大腸菌 ゲノム育種 リボソーム工学

### 1. 研究開始当初の背景

環境中の微生物の大半が培養できないという事実が判明して以来、個々の微生物を分離培養することなく、微生物群集を集団のまま直接ゲノム解析するメタゲノミクスという研究手法が誕生した。腸内細菌や海洋・土壌など、環境と生物の関わり合いを遺伝子レベルで解析する新たな学問領域として、近年急速な展開をみせている。一方、メタゲノミクスは、自然環境中に眠る未利用遺伝子資源の活用技術としても注目されている。分離培養できない微生物から取り出したゲノム断片を大腸菌等の宿主に保持させ、組換えライブラリーをスクリーニングすることで有用遺伝子を発掘しようという試みである。究極的な目的は、有用遺伝子を活用した生物プロセスの革新である。このように次世代遺伝子探索技術として有望視されるメタゲノミクス技術であるが、大きな問題も抱えている。多様な生物由来の異種遺伝子を単一の宿主で発現させることが極めて困難なのである。これまでにも活性ベースのスクリーニングで得られた多くの遺伝子が取得されてきているが、その大半が宿主（大腸菌）と近縁な微生物に由来するものと推定され、大腸菌と系統的に離れた微生物由来の遺伝子は取得されにくいという傾向にある。環境DNAを直接クローニングすることで「培養」の問題を回避することができるものの、「異種発現」という新たな問題が生じたのである。

### 2. 研究の目的

ゲノムワイドな変異やリボソーム工学の手法により、異種遺伝子発現特性の異なる変異大腸菌ライブラリーを作出し、レポーター遺伝子などを用いて変異株を分離、様々な生物種由来の遺伝子をバイアスなく発現する宿主を創出する。こうして得られた変異株をメタゲノムライブラリーの探索用宿主として活用する。

### 3. 研究の方法

ゲノム解析が完了している各種微生物（枯草菌、放線菌など）のコードン特性に合わせ、アミノ酸配列は同一ではあるが塩基配列の異なる GFP 遺伝子を数種類全合成する。系統的に離れた微生物ゲノムをモデルにすることで、実環境中の微生物多様性を再現した「模擬メタゲノム」とする。大腸菌変異ライブラリーの作成法としては、大腸菌がもともと保有する内在性翻訳因子の変異による発現亢進株を取得する方法、メタゲノム遺伝子を共発現する宿主を用い、外来性の発現増強因子を探索する方法の両面からアプローチする。難発現性遺伝子の発現を亢進する変異株や外来因子を同定すると共に、育種を重ねる。発現効率の向上が一定の段階に達した時点で、実メタゲノムを用いて効果を検証する。

### 4. 研究成果

まず、当研究室で行ったメタゲノムライブラリーのスクリーニング実験を通じて得た様々な遺伝子配列を解析した結果、スクリーニング対象となった遺伝子そのものについては、例外なく AUG を開始コドンに持ち、プリンリッチなリボソーム結合部位を有していたのに対し、直接のターゲットとならなかった遺伝子については、必ずしもこのような特徴を有していないことが判明した。このことは、広く使われる大腸菌の特徴として、開始コドンとリボソーム結合部位に強いバイアスがかかっており、メタゲノムライブラリー中に含まれる遺伝子の中には、配列の特徴上、効率的に翻訳し得ないものが含まれるのではないかということが示唆された。そこで、本課題ではまず第一に、メタゲノム遺伝子の特徴の一つとして開始コドンに着目し、AUG, GUG, UUG を開始コドンとする緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を合成した。また、開始コドン認識に深く関わるとされている翻訳開始因子に着目し、その構成成分の一つである IF3 を対象に、これらのレポーター遺伝子の発現特性が改変できないかについて検討した。

まず、大腸菌 IF3 の機能を精密に検証するために、ゲノム上に存在する IF3 遺伝子を完全欠失させることを試みた。IF3 は必須遺伝子であるため、ただ単にゲノム上から欠失させることはできない。そこで、IF3 を含む様々な遺伝子断片を組み込んだレスキュープラスミドを構築し、本プラスミドで生育を相補しながらゲノム上の IF3 の欠失を行った。その結果、IF3 だけではなく、その前後領域を含む遺伝子断片を用いたレスキュープラスミドを用いた場合にゲノム上の IF3 遺伝子を完全欠失させることができた。以後の実験では、本欠損株と上述の開始コドン置換型 GFP 遺伝子を用いて様々な IF3 の機能を検証した。

野生型大腸菌では AUG>GUG>UUG の順序の強い発現バイアスが観察された。完全欠失株に対し大腸菌 IF3 をプラスミドで相補した株でも同様のバイアスが確認された。次いで放線菌等の異種生物由来の IF3 を組み込んだ変異宿主を創成したところ、生育を相補させることができた。これらの変異株の生育は、大腸菌由来の IF3 で相補した場合と比較して 37°C では大差なかったが、外来 IF3 によっては低温感受性 (25°C) を示した。また、AUG/GUG-GFP 遺伝子の発現レベルを向上させる IF3 も同定された。このように、IF3 の置換変異が生育状態や翻訳特性に大きな影響を及ぼすことが推察された。

次に、変異 PCR 法により大腸菌 IF3 遺伝子のランダム変異ライブラリーを構築し、増殖、開始コドンの異なる GFP の発現レベルを比較した。その結果、増殖には大きな影響を与えずに、GFP (AUG) や GFP (GUG) の発現を 1.5-2 倍程度向上させる変異体が得られた。

上記研究では開始コドンに着目した研究

を行ったが、これに加え ORF 内部の翻訳律速因子にどのようなものがあるかを検索する研究を行った。GFP の ORF 配列を様々な生物種のコドン特性に合わせ遺伝子を数種類全合成した。これらを実際に大腸菌に導入した結果、大腸菌以外の生物種に最適化した遺伝子については、予想通り、低い蛍光値しか示さないことを確認した。さらに、発現レベルが大腸菌型 GFP と比較し 1/10 程度であった枯草菌型 GFP を進化工学的に高発現型に改変することを試みた。得られた変異体を詳細に解析した結果、開始コドン周辺の二次構造が翻訳効率に強く影響することを見出した。こうして得られた「難発現性」の遺伝子をレポーターとして、以後の改良型リボソームのスクリーニングに用いた。

リボソームを改変する方法としては、大腸菌の 16S rRNA 完全欠損株を異種由来 16S rRNA で生育相補させる方法により行った。その結果、大腸菌の近縁種のみならず、綱レベルで異なる遠縁の細菌由来の 16S rRNA が大腸菌のリボソーム成分と強調して機能するという画期的な発見をした。異種 16S rRNA は大腸菌の生育を相補するものの、コロニーや細胞の形態、増殖速度、また異種遺伝子発現などにおいて、野生型とは異なる性質を示した。また異種 16S rRNA を含む変異株において、いくつかの GFP 遺伝子を 10-20%程度高発現することも判明した。

上記の通り、翻訳開始因子を用いた異種遺伝子発現の強化や 16S rRNA 遺伝子置換という方法により、大腸菌内で発現効率の低いレポーター遺伝子について高発現する宿主の創成に成功した。「模擬メタゲノム」とも言えるレポーターの発現を確認した現在、今後は、実メタゲノムを用いたスクリーニングに応用展開していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Nakashima N, Miyazaki K (2014) Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. *Int J Mol Sci* 15, 2773-2793 (査読有)
2. Kitahara K, Miyazaki K (2013) Revisiting bacterial phylogeny: Natural and experimental evidence for horizontal gene transfer of 16S rRNA. *Mob Genet Elements* 3, e24210 (査読有)
3. Uchiyama T, Miyazaki K (2013) Metagenomic screening for aromatic compound-responsive transcriptional regulators. *PLOS ONE*, 8, e75795 (査読有)
4. Uchiyama T, Miyazaki K, Yaoi K (2013) Characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity. *J Biol*

*Chem*, 288, 18325-18334 (査読有)

5. Verma D, Kawarabayasi Y, Miyazaki K, Satyanarayana T (2013) Cloning, expression and characteristics of a novel alkalistable and thermostable xylanase encoding gene (mxyl) retrieved from compost-soil metagenome. *PLOS ONE*, 8, e52459 (査読有)
6. Tsukuda M, Miyazaki K (2013) Directed evolution study unveiling key sequence factors that affect translation efficiency in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*, 116, 540-545 (査読有)
7. Tsukuda M, Miyazaki K (2013) DNA fragmentation caused by an overdose of Zeocin. *J Biosci Bioeng*, 116, 644-646 (査読有)
8. Engel K, Ashby D, Brady SF, Cowan DA, Doemer J, Edwards EA, Fiebig K, Martens EC, McCormac D, Mead DA, Miyazaki K, Moreno-Hagelsieb G, O' Gara F, Reid A, Rose DR, Simonet P, Sjöling S, Smalla K, Streit WR, Tedman-Jones J, Valla S, Wellington EMH, Wu C-C, Liles MR, Neufeld JD, Sessitsch A, Charles TC (2013) Meeting Report: 1st International Functional Metagenomics Workshop May 7-8, 2012, St. Jacobs, Ontario, Canada. *Stand Genomic Sci*, 8, 106-111 (査読無)
9. Kitahara K, Yasutake Y, Miyazaki K (2012) Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 19220-19225 (査読有)
10. Kitahara K, Miyazaki K (2011) Specific inhibition of bacterial RNase T2 by helix 41 of 16S ribosomal RNA. *Nat Commun* 2, 549 doi: 10.1038/ncomms1553 (査読有)
11. 佃 美雪, 佐藤 允治, 宮崎 健太郎 (2014) 16S rRNA の「水平伝播」—異種 16S rRNA による遺伝的相補—, *化学と生物*, 52-2, 70-72 (査読無)
12. 宮崎 健太郎 (2012) リボソームに翻訳以外の機能を発見, *産総研 TODAY*, 12, 20-20 (査読無)
13. 宮崎 健太郎 (2011) メタゲノムからの有用酵素の探索, *月刊 Bio Industry*, 28, 32-38 (査読無)

[学会発表] (計 30 件)

1. 宮崎 健太郎, Ribosomal RNA の人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン, 日本農芸化学会大会 2014, 神奈川県, 2014/03/29
2. 末永 光, 水田 志織, 宮崎 健太郎, 矢

- 追 克郎, メタゲノム手法は培養法を凌駕するののか: 遺伝子資源取得に際しての手法間の比較, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 神奈川県, 2014/03/28
3. 佐藤 允治, 宮崎 健太郎, 腸内細菌目の 16S rRNA の網状進化, 第 8 回 日本ゲノム微生物学会年会, 東京都, 2014/03/07
  4. 宮崎 健太郎, Functional metagenomics and Escherichia coli host engineering for efficient enzyme discovery, Kasetsart university Seminar, Bangkok, Thailand, 2014/02/21
  5. 宮崎 健太郎, Escherichia coli host engineering for efficient enzyme discovery, AMBC2014, Bangkok, Thailand, 2014/02/20
  6. 宮崎 健太郎, Ribosomal RNA の人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン, 産業微生物の力を深化させる日本の技~育種の最前線~ 我が国独自の起点・技術から, 東京都, 2013/12/17
  7. 佃 美雪, 中島 信孝, 宮崎 健太郎, アンチセンス RNA を用いた新規カウンターセクション技術の開発, 細胞を創る研究会 6.0, 山形県, 2013/11/14
  8. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, Ribosomal RNA の人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン, 細胞を創る研究会 6.0, 山形県, 2013/11/14
  9. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, Escherichia coli host engineering for efficient enzyme discovery, CBI 学会 2013 年大会, 東京都, 2013/10/28
  10. 宮崎 健太郎, Escherichia coli host engineering for efficient enzyme discovery, Enzyme Engineering XXII Conference, 富山県, 2013/09/24
  11. 宮崎 健太郎, リボソーム工学に基づく大腸菌の宿主機能改変, 第 65 回日本生物工学会大会, 広島県, 2013/09/19
  12. 宮崎 健太郎, Escherichia coli host engineering for efficient enzyme discovery, 2013 SIMB Annual Meeting, San Diego, USA, 2013/08/12
  13. 北原 圭, 宮崎 健太郎, 大腸菌への遺伝子水平伝播実験により示された 16S rRNA の種間和合性, 第 10 回 21 世紀大腸菌研究会, 静岡県, 2013/06/20
  14. 佐藤 允治, 宮崎 健太郎, 系統ネットワーク法で見る腸内細菌目 16S rRNA の網状進化, 第 2 回リボソームミーティング, 東京都, 2013/03/26
  15. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, 16S rRNA 置換変異による大腸菌宿主改良, 第 2 回リボソームミーティング, 東京都, 2013/03/26
  16. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, 16S rRNA の置換変異による大腸菌宿主デザイン, 「細胞を創る」研究会 5.0, 神奈川県, 2012/11/21
  17. 宮崎 健太郎, メタゲノムからの有用遺伝子探索, 次世代シーケンス東京セミナー・メタゲノムセミナー, 東京都, 2012/10/25
  18. 北原 圭, 宮崎 健太郎, 16S リボソーム RNA のヘリックス 41 はリボヌクレアーゼ I の特異的インヒビターである, 第 9 回 21 世紀大腸菌研究会, 滋賀県, 2012/06/21
  19. 宮崎 健太郎, Functional screening strategy, International Functional Metagenomics Workshop, Waterloo, Canada, 2012/05/07
  20. 宮崎 健太郎, メタゲノムからの酵素探索, 第 34 回日本分子生物学会年会, 神奈川県, 2011/12/13
  21. 宮崎 健太郎, リボソーム改変を起点とした微生物システム機能の理解に向けて, 第 10 回 微生物研究会, 千葉県, 2011/11/12
  22. 佃 美雪, 北原 圭, 宮崎 健太郎, Diversification of cellular phenotype through ribosome engineering in Escherichia coli, 第 10 回 微生物研究会, 千葉県, 2011/11/12
  23. 宮崎 健太郎, Creation and evolution of insertional fusion protein, 細胞を創る研究会 4.0, 大阪府, 2011/10/28
  24. 佃 美雪, 北原 圭, 宮崎 健太郎, Diversification of cellular phenotype through ribosome engineering in Escherichia coli, 細胞を創る研究会 4.0, 大阪府, 2011/10/27
  25. 佃 美雪, 北原 圭, 宮崎 健太郎, Diversification of cellular phenotype through ribosome engineering in Escherichia coli, International Symposium on SYNTHESIZING LIFE AND BIOLOGICAL SYSTEMS, 大阪府, 2011/10/25
  26. 内山 拓, 宮崎 健太郎, PIGEX 法のハイスループット化の検討, 日本生物工学会大会, 東京, 2011/09/27
  27. 宮崎 健太郎, メタゲノムを活用した新規酵素の探索, 日本生物工学会, 愛知県, 2011/09/27
  28. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, 進化工学手法による異種蛋白質発現における翻訳律速因子の同定と発現効率化, 日本蛋白質科学会, 大阪府, 2011/06/08
  29. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, 進化工学的手法による異種蛋白質発現における発現律速因子の同定と発現効率化, 第 8 回 21 世紀大腸菌研究会, 長野県, 2011/05/19
  30. 岡本 玲亜, 宮崎 健太郎, 大腸菌翻訳開始因子 IF3 の遺伝子欠損株の作成, 21 世紀大腸菌研究会, 長野県, 2011/05/18
- [図書] (計 10 件)
1. Suenaga H, Miyazaki K (2014) Encyclopedia of Metagenomics,

- extradiol dioxygenases retrieved from the metagenome, Springer
2. 宮崎 健太郎 (2013) 進化分子工学の最前線, 生物種を超えた 16S rRNA 遺伝子の機能相補性の解明, pp. 223-229, NTS
  3. 宮崎 健太郎 (2012) 生体の科学, リボソームに翻訳以外の機能があるーリボスクレアーゼ作用阻害, pp. 356-357, 医学書院
  4. 宮崎 健太郎 (2012) 生命システム工学, 遺伝子資源の多様化, pp. 18-27, 化学同人
  5. 宮崎 健太郎 (2012) 生命システム工学, 進化分子工学の事始, pp. 3-17, 化学同人
  6. Suenaga H, Miyazaki K (2011) METAGENOMICS and its applications in agriculture, biomedicine, and environmental studies, Exploring microbial community for novel genetic resources by activity-based screening of a metagenomic library, pp. 367-380, Nova Science Publishers
  7. Miyazaki K (2011) Methods in Enzymology, MEGAWHOP Cloning: A method of creating random mutagenesis libraries via megaprimer PCR of whole plasmids, pp. 399-406, Elsevier
  8. Hosokawa-Okamoto R, Miyazaki K (2011) Metagenomics: Current Innovations and Future Trends, Escherichia coli host engineering for efficient enzyme discovery from metagenome, pp. 241-252, Horizon Press
  9. Miyazaki K (2011) Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats, Novel aromatic degradation pathway genes and their organization as revealed by metagenomic analysis, pp. 439-450, Wiley/Blackwell
  10. Miyazaki K (2011) Biodegradative Bacteria, Diversity and evolution of aromatic degradation pathway enzymes in an activated sludge, pp. 249-260, Springer

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: 新規なカウンターセレクション法  
発明者: 佃 美雪, 中島 信孝, 宮崎 健太郎  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2013-226229  
出願年月日: H25/10/31  
国内外の別: 国内

名称: 翻訳特性の改変された大腸菌  
発明者: 宮崎 健太郎, 佃 美雪

権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2012-102128  
出願年月日: H24/04/27  
国内外の別: 国内

名称: 翻訳特性の改変された大腸菌  
発明者: 宮崎 健太郎, 佃 美雪  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 61/611827  
出願年月日: H24/03/16  
国内外の別: 国外 (米国)

○取得状況 (計 1 件)

名称: 酵素遺伝子スクリーニング法  
発明者: 内山拓, 宮崎 健太郎  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特 5397666  
取得年月日: 2013/11/01  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

1. <https://staff.aist.go.jp/miyazaki-kentaro/group/index.html>
2. <https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-synthe/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 健太郎 (Miyazaki Kentaro)  
産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長  
研究者番号: 60344123