

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14693

研究課題名(和文)放線菌染色体まるごと移動技術の確立

研究課題名(英文)Hyper Efficient Horizontal Genome Transfer Between Streptomyces Strains

研究代表者

片岡 正和 (KATAOKA, Masakazu)

信州大学・学術研究院工学系・准教授

研究者番号：90332676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Streptomyces nigrifaciensより分離した伝達性プラスミドpSN22の伝達に關与するtra遺伝子群を宿主ゲノムに挿入することで、高頻度なゲノム組換えを供与菌(この場合traを持つ株)と受容菌(trahを持たない菌)間で起こせることを発見した。この高頻度ゲノム組換えを異種の放線菌間で引き起こせるか否かの検討を行った。その結果、S. lividansをゲノム供与体として、S. avermitilis、S. coelicolorへゲノム移動、ゲノム組換えを引き起こせる結果を得た。ただしこの結果は実験者を変更した場合に再現しておらず、さらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：We have studied the conjugation mechanism of the pSN22, a small conjugative plasmid. pSN22 transfer depends on the four tra genes. After conjugation between S. lividans, the pSN22 derivatives transferred nearly 100% recipient cells, and up to 10⁻³ recipients were chromosome recombinants. To test the Hfr like behavior of the pSN22 tra system, the DNA fragment encoded the tra genes was inserted S. lividans TK21 genome with Neomycin resistant gene. The resultant strain was crossed with S. lividans TK24 derivative (Smr). Over 10% recipient cells showed Neomycin resistant, indicating that chromosomal transfer from donor cell occurred with very high frequency. To test the application possibility of this system in genomic engineering in Streptomyces, we tested the inter-species genome transfer from S. lividans to the other Streptomyces strains.

研究分野：分子微生物学

キーワード：接合 ゲノム 遺伝子水平移動 tra遺伝子

1. 研究開始当初の背景

性による染色体交雑機構を持たない細菌界では、遺伝子水平移動によってゲノムが多様化したと考えられている。しかし、具体的なゲノムの可動化機構については、F 因子が大腸菌ゲノムに挿入された Hfr によるゲノム可動化などの古典的な微生物遺伝学で多用された大腸菌の例以外は知られていない。Hfr 様の高頻度なゲノム可動化機構が他の細菌でも確認できれば、細菌ゲノムの進化過程を実験的に可能にするのみならず、応用として細菌ゲノムの大規模編集手法の開発が期待できる。私は少数の遺伝子でプラスミドを伝達可能な放線菌の接合伝達機構について研究を進め、放線菌の接合伝達が低頻度のゲノムの移行を伴うことを明らかにしてきた。接合伝達に必要な遺伝子群を試しにゲノムに挿入したところ、高頻度にゲノム水平移動の結果としてのゲノム組み換え株が得られることを発見した。この独自にとらえたゲノムレベルの移動現象を分子メカニズムまで含めて証明・解明できれば、細菌のゲノム進化機構の進展に大きく貢献できる。また、ゲノムレベルの水平移動が可能となれば、抗生物質生産などで産業応用されている放線菌の大規模なゲノム編集の道も拓けると考えた。

2. 研究の目的

同種間(*Streptomyces lividans* 間:1-3) と異種間(*S. lividans* と他の *Streptomyces* 属間:4,5) の系で研究を実施する。

1. ゲノム移動に最小限必要な接合伝達遺伝子の確定
2. 線状プラスミドなど、系統の異なる接合伝達遺伝子の効果の確認による現象の一般性検証
3. ゲノム移行の定量的評価と線状ゲノム組み換えメカニズムの定性的評価
4. 異種間でも高頻度のゲノム移動が可能であることを検定する。
5. 同組換えを応用して1Mb以上の領域でのゲノム編集に挑戦する。

3. 研究の方法

放線菌ゲノムへの接合伝達関連遺伝子の挿入により高頻度ゲノム可動化現象を確実にするために、*S. lividans* を用いて同種間での高頻度ゲノム可動化の定量的な検出と線状ゲノムの水平移動での振る舞いの解析を行う。この系によって大腸菌以外の細菌で初めて高頻度ゲノム可動化現象が T4SS 以外の系によって明らかになる。また、樹立できた高頻度ゲノム可動化システムを利用し、*S. lividans* と *S. avermitilis* の異種間ゲノム移動と組換え株を検出する。異種間ゲノム組み換えが十分実用範囲の $10^{-3} \sim 10^{-4}$ の頻度であった場合、相同組換え系を利用した大型 DNA によるゲノム組み換えシステムを構築する。これが現実となるとプロトプラスト融合などの不安定かつ困難な方法に頼ってきた大規模ゲノム育種への道が開ける。

pSN22 の伝達遺伝子挿入による高頻度ゲノム移行の確認

1. *S. lividans* ゲノム内に pSN22 の伝達遺伝子群 (変異遺伝子を含む) を挿入し、受容菌と混合培養し、ゲノム伝達の結果のゲノム組み換え頻度を算出する。
2. 組み換える遺伝子座間の距離を変化させ頻度の違いを算出する (一点交差)。
3. 遺伝子座組み換えによる一点交差、二点交差の頻度を調べ、Hfr による環状ゲノム水平移動との違いを調べる (二点交差)。
4. 高頻度ゲノム移動の必要因子を明らかにする。

他の接合因子由来の伝達遺伝子群による高頻度ゲノム移行の確認

由来の異なる伝達遺伝子群を用いた高頻度ゲノム移行現象の一般性調査。

1. 線状プラスミド SAP1、pSN22 と同じ小型ローリングサークル複製 (RCR) プラスミドの pIJ101、型複製を行う大型プラスミド SCP2* の伝達関連遺伝子群をクローン化し、*S. lividans* ゲノム内に挿入する。構築した株を用いて遺伝交雑を行う。由来の異なる伝達遺伝子群によるゲノムの可動化頻度を出すことにより、高頻度ゲノム移動が一般的な現象か否かを判定する。
2. ゲノム可動化が認められたケースでは、必須領域の限定や変異遺伝子を用いた解析を行う。

異種間高頻度ゲノム移行の確認

1. 伝達関連遺伝子群と薬剤耐性遺伝子と同じ遺伝子座に挿入された *S. lividans* と *S. avermitilis* などゲノム解析の終了している株との異種間ゲノム組み換え頻度を測定し、異種間でのゲノム可動

化と組換え現象が起こるか否かを検定する。

2. 組み換え体のゲノムを巨大 DNA 電気泳動法である CHEF によって染色体型確定すると共に、組み換え体の表現系と染色体型の関連を明らかにする。
3. 線状ゲノム特有のテロメア領域の動向に着目し、ヘテロテロメアが可能か否かを調べる。
4. この項目の結果で提案の系が放線菌の応用をめざした大規模ゲノム編集に使えるか否かが決まる。おそらく非相同テロメアの存在は許されず、2 点交差を使った相同テロメア構造しか検出できないと予想している。

4. 研究成果

供与菌染色体への接合伝達関連遺伝子導入

供与菌 *S. lividans* TK21 菌株内への DNA 導入は、インテグラーゼ *int* と特定部位での相同組換えを起こす *attP* をコードしたアクチノファージベクター pKU460, pKU492 を用いた。ベクターの *attP* と放線菌の染色体内の特定部位 *attB* との相互的な部位特異的組換えにより、ベクターを染色体内へまると組み込む方法を採用した。

レプリカ平板法による定性評価

必須因子を持つ *traRABcIt* pKU460, Negative Control として pKU460 null, $\Delta traA$, ΔcIt , $\Delta traB\Delta cIt$ 菌株をそれぞれ供与菌とし、受容菌には *S. lividans* TKC24 伝達能を評価した。解析の結果、*traB* 欠損菌株および *cIt* 欠損菌株においては、染色体組換え体が確認されず、全長の *traRABcIt* 菌株および $\Delta traA$ 菌株においては伝達能が確認された。*S. lividans* TK24 を受容菌とした際は、TKC244 と同様に *traRABcIt* 菌株における染色体移行能が最も高い伝達能を示した。しかし、 $\Delta traA$ 菌株と ΔcIt 株における伝達能は TKC244 とは逆の伝

達能が確認された。

遺伝的交雑法による移行能の定量評価

レプリカ平板法と同様に、供与菌には、TK21/ *traRABcIt* pKU460, TK21/ *traRAB* pKU460, TK21/ *traRBcIt* pKU460, TK21/ *traRA* pKU460 を用いた。受容菌には、*S. lividans* TKC244 を用い、移行能の定量評価を行った。解析の結果、レプリカ平板法と同様に、*traRABcIt* 菌株では、高効率な移行能が確認され、 $\Delta traA$ 菌株では移行能の低下、 $\Delta traB$ 菌株および $\Delta traBAcIt$ 菌株では伝達能の損失を確認した。

遺伝的交雑法による異種菌間染色体移行能の定量評価

3名の実験者が独立に異種間ゲノム組み換えの定量評価を行った。レプリカ平板法と混合培養による定量評価を行った。供与菌には、*S. lividans* TK21/ *traRABcIt* pKU460 を用い、受容菌には *S. coelicor* 966, *S. avermitilis* ilv7, SUKA17 を用いて評価した。2名の実験者は同種間と比較して 10^{-3} 以下程度の頻度でゲノムの組換えを確認した。この頻度は通常の接合因子に依存するゲノム移行よりもはるかに大きい値であり、ゲノム工学への応用が期待できる結果となった。しかしながらこれらの再現を試みた1名の実験者は組換え体を確認することができなかった。この結果はこれまでの独立した2名の実験者による実験結果と相反する結果であり、条件、クローンの遺伝的背景等を調査中である。

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)

[学会発表](計14件)

佐藤 李花、横井 崇紘、宮武 徹、片岡 正和 放線菌プラスミド pSN22 由来接合伝達関連遺伝子群挿入による染色体移行解析 第二回デザイン生命研究会

2017 3/21 神戸

佐藤李花、横井 崇紘、宮武 徹、片岡 正和 放線菌プラスミド pSN22 由来 *tra* 遺伝子群ゲノム内挿入による染色体移行の解析 日本農芸化学会 2017 年年会 2017 3/18-20 京都

矢野嵩紘、宮武徹、横井崇紘、片岡正和 *Streptomyces nigrifaciens* 由来の環状プラスミド pSN22 をモデルとした、放線菌の接合伝達における必須因子 TraB の機能解析 日本農芸化学会 2017 年年会 2017 3/18-20 京都

Takahiro Yano, Tetsu Miyatake, Rika Sato, Takahiro Yokoi, Masakazu Kataoka Functional analysis of an essential protein for *Streptomyces conjugation*, TraB. 日本放線菌学会 2016 年度年会 2016 9/7-8 東京

丸山直也、池田治生、片岡正和 SAP1 をモデルとした放線菌線状プラスミドにおける接合伝達機構の解析 日本放線菌学会 2016 年度年会 2016 9/7-8 東京

Masakazu Kataoka, Tetsu Miyatake, Jin Hee Kim, Kosuke Murabata Hyper Efficient Horizontal Genome Transfer Between *Streptomyces* Strains by Insertion of Conjugative Transfer Genes on the Chromosome. Annual meeting of American Society for Microbiology 2016 2016 9/16-20 USA

村端広介、金眞熙、宮武徹、片岡正和 放線菌接合伝達遺伝子によるゲノム移行 日本農芸化学会 2016 年年会 2016 3/28-30 札幌

丸山直也、池田治生、片岡正和 線状プラスミドにおける接合伝達機構の解析 日本農芸化学会 2016 年年会 2016 3/28-30 札幌

矢野嵩紘、宮武徹、片岡正和 放線菌プラスミド pSN22 の接合伝達における必須タンパク質 TraB の機能解析 日本農芸化学会 2016 年年会 2016 3/28-30 札幌

Masakazu Kataoka Conjugation in modern microbiology 異分野融合ワークショップ 微生物生命システムと合成生物学の融合 2016 3/16-17 奈良先端大学院大学

矢野嵩紘、宮武徹、片岡正和 放線菌プラスミド pSN22 の接合伝達における必須タンパク質 TraB の膜局在及び ATPase 活性に関する解析 日本ゲノム微生物学会 2016 3/3-4 神戸

村端広介、金眞熙、宮武徹、片岡正和 放線菌接合伝達遺伝子による染色体移行手法の開発 グラム陽性菌ゲノム機能会議 2015 8/27-28 雄琴温泉

Masakazu Kataoka, Tetsu Miyatake, Mai Kobe Functional analysis of DNA channel protein, TraB, for

Streptomyces conjugation. ASM meeting 2015 5/30-6/3 Ner Orleans, USA
Takahiro Yokoi, Mitsuhiro Itaya, Hitotada Mori, Msakazu Kataoka
Optimization of Gene Transfer by the RK2 between Cross-species. ASM meeting 2015 5/30-6/3 Ner Orleans, USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

片岡 正和 (KATAOKA Masakazu)
信州大学・学術研究院工学系・准教授
研究者番号：90332676