

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82626

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：15KK0266

研究課題名（和文）全ゲノム操作が拓く難培養細菌の遺伝子工学（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Whole genome manipulation for understanding of biology of unculturable bacteria  
(Fostering Joint International Research)

研究代表者

柿澤 茂行 (kakizawa, shigeyuki)

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：10588669

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,900,000円

渡航期間：19ヶ月

研究成果の概要（和文）：本国際共同研究では、全ゲノムクローニングの技術を発展させることで難培養細菌の機能解析を行うことを目的とする。本研究では独自に複製可能なプラスミドを用い、ここに対象となる細菌のゲノムを挿入する系を新たに用いた。これにより、巨大なゲノム断片をより簡便にハンドリングできるとともに、扱うゲノム全体のサイズを小さくすることが可能となる。まずはこのプラスミドについての性状および導入法を検討し、効率よく導入できる方法を確立した。加えて酵母内においてYAC（酵母人工染色体）ベクター内の配列を自在に操作（挿入や欠失、変異など）する技術を確立・習得した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this project is establishing novel techniques to handle large genomic DNA fragments and to analyze biology of unculturable bacteria. In this project, I used a new plasmid vector that could be replicate in mycoplasma cells, and tried to introduce large DNA fragment into the plasmid vector. In this way, there are less risks of shearing of large DNA molecules during handling. First, I analyzed several characteristics of this plasmid, e.g., replication efficiency, effective transformation methods, etc. Next, I tried to modify the plasmid in Yeast cells, since the vector could be introduced into Yeast cells.

研究分野：細菌学

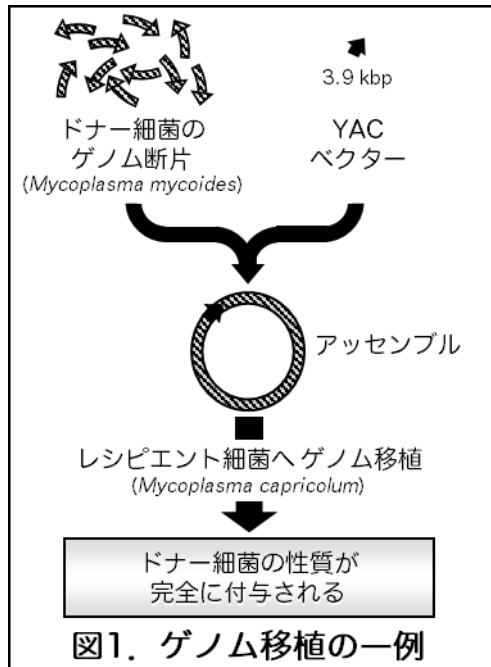
キーワード：細菌 ゲノム 合成生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノム操作技術の進展

合成ゲノム学の分野において、微生物のゲノムを大規模に扱うための手法が立て続けに開発されつつある。マイコプラズマという細菌を用いた例を挙げると、メガ bp 単位のゲノムを酵母の細胞内においてアセンブルする手法 (PNAS 105: 20404-9, 2008)、溶液中で数百 kbp の DNA をアセンブルする手法 (Nature Methods 6: 343-5, 2009)、細菌の環状ゲノムをまるごと細胞へと「ゲノム移植」する手法等が開発されている (Science 317: 632-8, 2007; Science 325: 1693-6, 2009 など)。これらの新手法は、巨大なゲノム断片を操作・改変する上で画期的かつ利用価値の高い技術である。

これらの手法を開発する中で、「ゲノム移植によってドナー細菌の性質をレシピエント細菌へと完全に付与できる」という興味深い知見が得られている (図1)。具体的には、ドナー細菌の増殖速度・コロニー形状・タンパク質の発現様式・膜タンパク質のレポーターなどのすべての性質がレシピエント細菌へと付与され、移植後の細菌はドナー細菌とまったく区別がつかなくなった (Science 317: 632-8)。この知見は、細菌が持つ多くの性質を、ゲノム移植によりすべて付与できるという好例である。



(2) 植物病原細菌ファイトプラズマ

ファイトプラズマは 700 種以上の植物に感染する植物病原細菌であり、ヨコバイなどの昆虫によって伝搬される。また植物および昆虫の細胞内に局在するというユニークな性質を持つ。ファイトプラズマは世界各国で多くの農作物に感染し、農業生産に甚大な被害を与えている一方で、植物に葉化 (花の形

はそのまま、花の組織が葉に変化し、緑色の花をつける病徴)・叢生 (枝や葉が無数に生えブッシュ状になる病徴)・萎縮 (背丈が小さくなる。ドワーフ症状)などのユニークな病徴を誘導する点は非常に興味深く (図2)。加えて植物と昆虫という異なる生物界の宿主に感染できるホストスイッチング機構も興味深い。

- 葉化 (花が葉に変化する)
- 萎縮 (背丈が小さくなる)
- 叢生 (枝がたくさん生じる)
- 黄化 (葉や茎が黄色く変化する)
- つき抜け (花から茎や葉が生じる)

図2. ファイトプラズマが示す多様な病原性

しかしファイトプラズマは依然として培養ができないことから、その研究は非常に困難である。そのような状況の中、研究代表者らは世界に先駆けファイトプラズマのゲノム解読に成功した (Nature Genetics 36: 27-9, 2004)。ファイトプラズマゲノムのサイズは極めて小さく、AT-rich であり、多数の遺伝子を欠損することが明らかとなった。特に、これまで細菌において広く保存されている遺伝子や代謝経路を数多く持たないことが明らかとなった。これは、ファイトプラズマの生活環境が「宿主の細胞内」という非常に栄養の豊富な環境であるため、エネルギー源や栄養素、有機物質等は細胞外に豊富にあるため自身で生産する必要が無い。そのため、それらの関連遺伝子の多くを欠損したためと考えられる。すなわちファイトプラズマゲノムは生存環境への適応から「ゲノムリダクション」を起こしたと推定された。またそのゲノム配列から、その病原性などを司る遺伝子の候補を多数見いだすことができたが、依然としてファイトプラズマの培養や遺伝子操作はできず、その遺伝子機能の詳細な解析が困難であるのが現状である。

このような状況の中、申請者はゲノム操作技術を応用することでファイトプラズマの研究がより進展するのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本国際共同研究では、全ゲノムクローニングの技術をベースとして、その技術を発展させることで難培養細菌の機能解析を行うことを目的とする。これにより、大規模なゲノムのハンドリング技術を確認すると共に、各細菌の持つ機能を解析する技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

難培養細菌ゲノムを操作・導入する系について、本研究では独自に複製可能なプラスミ

ドを用い、ここに対象となる細菌のゲノム断片を挿入する系を新たに用いることとした。これにより、巨大なゲノム断片をより簡便にハンドリングできるとともに、扱うゲノム全体のサイズを小さくすることが可能となるため、ゲノムの物理的な断片化 (shearing) 等のリスクを軽減させ、効率的にゲノム断片を扱うことが可能となると期待される。

#### 4. 研究成果

まずはこのプラスミドについての性状および導入法を検討し、効率よく導入できる方法を検討した。このプラスミドを用いて、複数のマイコプラズマ菌株を形質転換する必要があるが、この手法について改良を加えて検討を重ね、簡便かつ効率よく形質転換を行うことが出来る系を見出した。従来のマイコプラズマの形質転換法は煩雑であったが、本研究により大幅に時間と労力を削減できる手法を提案できた。

次にここに各種の DNA 断片を挿入し、それが複製可能であるかどうか検証した。その結果、多くの配列について問題なく複製可能であることが分かった。加えて、酵母内において YAC (酵母人工染色体) ベクター内の配列を自在に操作 (挿入や欠失、変異など) する技術を確認・習得した。具体的には、Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) 法 (Biol. Proced. Online, 17:6, 2015) や、Tandem repeat coupled with endonuclease cleavage (TREC) 法 (Nucleic Acids Res., 38(8):2570-2576, 2010)、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-Cas9 (CRISPR-Cas9) (ACS Synth. Biol., 5(1):104-109, 2016) などの手法を用いることで、より簡便に酵母内のインサート配列を改変することが可能であった。これらの手法により、マイコプラズマ細胞内で複製が可能なプラスミドを酵母において自在に操作・改変することが可能となり、大規模ゲノム操作系に向けた知見を得ることが出来た。

#### 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 1 件)

1. Ana M. Mariscal\*, Shigeyuki Kakizawa\* (co-1st author), Jonathan Hsu, Kazuki Tanaka, Luis González-González, Alicia Broto, Enrique Querol, Maria Lluch-Senar, Carlos Pinero, Lijie Sun, Philip D. Weyman, Kim S. Wise, Chuck Merryman, Gavin Tse, Adam J. Moore, Clyde A. Hutchison III, Hamilton O. Smith, Masaru Tomita, J. Craig Venter, Luis Serrano, John I. Glass, Jaime Piñol, and Yo Suzuki. 「Tuning gene

activity by inducible and targeted regulation of gene expression in minimal bacterial cells」, ACS Synthetic Biology, *in press* (2018) DOI 10.1021/acssynbio.8b00028 (\* equally contribution)

[学会発表](計 3 件)

1. 柿澤 茂行, 田中 一己, Yo Suzuki, 「ミニマムゲノム細菌の遺伝子機能解明に向けた CRISPRi による遺伝子ノックダウン系の開発」, 第 12 回 日本ゲノム微生物学会, 2018. 3.6. 京都府京都市.
2. Shigeyuki Kakizawa, Jonathan Hsu, Kazuki Tanaka, Lijie Sun, Philip D. Weyman, Kim S. Wise, Chuck Merryman, Gavin Tse, Adam J. Moore, Clyde A. Hutchison III, Hamilton O. Smith, Masaru Tomita, J. Craig Venter, John I. Glass, and Yo Suzuki. 「Inducible CRISPRi in the minimal mycoplasma」 The 7th Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology (AOM), 2018.5.19, Shinjuku, Tokyo, Japan
3. Shigeyuki Kakizawa, Jonathan Hsu, Kazuki Tanaka, Lijie Sun, Philip D. Weyman, Kim S. Wise, Chuck Merryman, Gavin Tse, Adam J. Moore, Clyde A. Hutchison III, Hamilton O. Smith, Masaru Tomita, J. Craig Venter, John I. Glass, and Yo Suzuki. 「TUNING GENE ACTIVITY BY INDUCIBLE AND TARGETED REGULATION OF GENE EXPRESSION IN MINIMAL BACTERIAL CELLS」 The 22nd Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM), July 9-12, 2018, Portsmouth, New Hampshire USA

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿澤 茂行 (KAKIZAWA SHIGEYUKI)  
国立研究開発法人 産業技術総合研究所・  
生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：10588669

(2)研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

John Glass

The J. Craig Venter Institute, Synthetic  
Biology & Bioenergy group, Professor

〔その他の研究協力者〕

Yo Suzuki

The J. Craig Venter Institute, Synthetic  
Biology & Bioenergy group, Assistant  
Professor

Kim Wise

The J. Craig Venter Institute, Synthetic  
Biology & Bioenergy group, Senior  
Scientist