

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14688

研究課題名（和文）異種生物の融合進化実験による異種ゲノム融合進化株の創生と解析

研究課題名（英文）Construction and analysis of bacterial strains carrying heterologous bacterial genome by heterologous protoplast fusion.

研究代表者

前田 智也（Maeda, Tomoya）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：10754252

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、異種細菌細胞同士を融合させることで二種類の細菌が有するゲノムを併せ持った融合生物を構築する技術開発を目指した。異種生物間の細胞融合を生じさせるプロトプラスト融合に着目し、大腸菌と様々な異種細菌の細胞融合を試みたが、いずれも二種類のゲノムを有する融合生物は得られなかった。そこで、異種細菌ゲノムに大腸菌由来シングルコピープラスミドの配列を予め挿入した状態で大腸菌と細胞融合を行ったところ、大腸菌に異種細菌ゲノム全長を導入することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有用微生物の育種には、宿主には無い性質を付与するために、外来遺伝子情報を大規模に導入することが重要である。しかし、ゲノムスケールで宿主に異種ゲノムを組換える技術は、現時点では枯草菌や酵母といった特殊な宿主に限定されていた。本研究により、一回の細胞融合実験により大腸菌に異種細菌ゲノムを導入することが可能であることが明らかになった。こうした技術を用いることで、有用微生物の新しい育種法の開発へと応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this project, I aimed to develop a new technology to construct heterologous genome fusant bacterial strain. First, protoplast fusion experiments that cause cell fusion were performed using various bacterial pairs. However, none of them produced a heterologous genome fusant. Next, to replicate and maintain heterologous genome in *E. coli*, the sequence of a single copy plasmid derived from *E. coli* was introduced to the *Corynebacterium glutamicum* genome. Then, the recombinant *C. glutamicum* strain was fused with *E. coli* by protoplast fusion. It was confirmed that the obtained fusant strains carry both *E. coli* and *C. glutamicum* genome sequences.

研究分野：システムゲノム科学

キーワード：細胞融合 水平伝播 進化実験 プロトプラスト 異種ゲノム融合 細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、長鎖 DNA の人工合成技術が発達してきたため、任意のゲノム配列を全合成することは技術的には可能になってきた。しかしながら、枯草菌にシアノバクテリアの全ゲノムを導入した組換え菌の構築 (Itaya et al, PNAS, 2015) や、酵母に細菌の全ゲノムを導入した (Karas et al, Nat Protocol, 2014) 先行研究が示すように、異種のゲノム配列を単に宿主に導入しただけでは異種ゲノムは機能せず、異種が示す特徴的な性質も発現しない。つまり、期待する機能を発現させるゲノム設計を行なうためには、異種ゲノムや、宿主ゲノムが本来有していない人工的な配列を宿主内で安定に機能させるためのメカニズムを解明することが必須である。

自然界では、異種由来のゲノム情報が宿主ゲノムに統合される水平伝播により、有益な機能の獲得が引き起こされている。現存種のゲノム解析から、水平伝播による異種生物からのゲノム配列の導入と、それに伴う新しい機能の獲得は頻繁に生じていることが明らかになっている。代表例としては、実験室株である非病原性の大腸菌 K-12 株と、病原性大腸菌 O157 株のゲノム解析の結果、O157 株は 1.4 Mbp の外来配列を獲得し、それが病原性の発現に必要であることが確認されている (Ogura et al, 2009 PNAS)。また、大腸菌を含むプロテオバクテリア門の細菌には光合成能を有しているものが多く、これらの細菌が持つ光合成遺伝子クラスターは水平伝播により他種生物へと伝達されていることも報告されている (Zeng et al, 2014 PNAS)。このように、「異種ゲノムを機能させる」という難題が、自然界では一般的に生じてきた現象であることを示している。しかし、現存種のゲノム情報だけでは、進化の途中経過を解析することが大変困難である。そのため、外来ゲノムが機能するように変化する過程を解明するためには、実験室で水平伝播による進化過程を再現し、親株同士が持つ有用形質を併せ持つ新たな生物種を創生する技術開発が必要とされていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、様々な系統関係にある細菌のペアを細胞融合させ、適切な選択圧下で進化実験を行うことにより、親株同士が持つ有用形質を併せ持つ新たな生物種を創生し、それが生じ得る進化ダイナミクスを解明することである。また、異種細菌ゲノムを簡便に宿主細菌に導入すること自体が技術的に困難なため、これを可能にする技術開発を行う。

3. 研究の方法

本研究では、まず、様々な系統関係にある細菌のペアをプロトプラスト融合により細胞融合させ、それぞれの親株が有する特徴的な抗生物質耐性を指標とした選択圧をかけることで融合進化株を取得する実験を行った。プロトプラスト融合は、細胞壁分解酵素であるリゾチーム等を用いて細菌の細胞壁を除去した後、高浸透圧条件下で培養することで得られる球状の細胞 (プロトプラスト) を、融合を促進するポリエチレングリコール (PEG) 処理することで、異種細胞同士を融合させる方法である (Hopwood Ann. Rev. Microbiol. 1981)。本研究では、大腸菌、枯草菌、コリネ型細菌、及び大腸菌と同じ腸内細菌科の細菌 (*Citrobacter amalonaticus* と *Rahnella aquatilis*)、*Pseudomonas putida* を用いて、これらの細菌を組み合わせたプロトプラスト融合実験を行った。

続いて、大腸菌に異種細菌ゲノムを簡便に導入する方法を開発するために、大腸菌とコリネ型細菌を用いた検討実験を行った。コリネ型細菌をゲノムドナーとして用い、コリネ型細菌ゲノム上に大腸菌 miniF 由来のシングルコピープラスミド (pBeloBACK) 配列を、エレクトロポレーション法により挿入した株を構築した。この組換え株と大腸菌 (レシピエント) を PEG 存在下でプロトプラスト融合させる。細胞壁合成を再開させる培地で培養 (プロトプラスト再生) する際に、異種ゲノムが導入された大腸菌株のみを選択する (コリネ型細菌に導入した pBeloBACK 由来のカナマイシン耐性と、コリネ型細菌の増殖を阻止するための栄養要求性及び薬剤感受性を利用) ことで、コリネ型細菌ゲノムを複製する大腸菌株を取得する (図 1)。

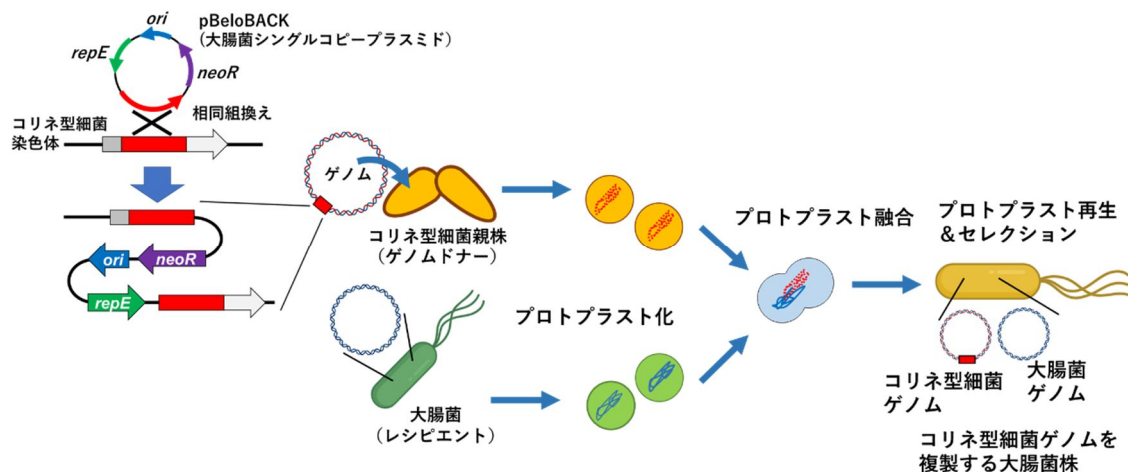


図 1. コリネ型細菌ゲノムを簡便に大腸菌に導入する方法

4. 研究成果

(1) 様々な系統関係にある細菌同士の細胞融合実験

大腸菌、枯草菌、コリネ型細菌、及び *C. amalonaticus*、*R. aquatilis*、及び *P. putida* を用いて、これらの細菌を組み合わせたプロトプラスト融合実験を行った。先行研究では、異種細菌間におけるプロトプラスト融合により、両方の親株の特徴を兼ね備えた融合株が取得された例がいくつか報告されている。しかしながら、これらの先行研究ではいずれも表現型レベルでの確認にとどまっているものがほとんどであり、異種間プロトプラスト融合によりゲノム交換等が生じたことを明確に示した研究は存在しない。本研究において、上記6種類の細菌同士を用いたプロトプラスト融合を行い、融合前の細菌AとBが、ストレスS1に対してはAが強く、S2についてはBが強いようなストレスの組み合わせを用いた選択圧をかけた進化実験を行った。例えば、大腸菌の方がカナマイシンに耐性を示す一方、*C. amalonaticus*の方が6-メルカプトプリンに耐性を示すため、これらの融合株について、カナマイシンと6-メルカプトプリンによる二重選択を行った。このような方法により、二種類のストレス耐性を獲得した融合株を得ることができたので、続いてIllumina社の次世代シーケンサーであるMiSeqを用いたゲノム解析を行った。しかしながら、親株同士の近縁関係に関係無く、いずれの融合株においても異種間におけるゲノムの交換は観察されなかった。そのため、進化実験で得られた株は、どちらかの親株が突然変異により耐性を獲得したものであることが示唆された。一方、栄養要求性に基づいた選択圧を用いた異種間プロトプラスト融合実験も行ったが、こちらにおいても異種間におけるゲノムの交換を観察することはできなかった。以上の結果から、単純に異種細菌間でプロトプラスト融合を行った場合、異種間のゲノム交換は生じないか、もしくはとても低い頻度でしか生じないことが示唆された。

(2) コリネ型細菌ゲノムを大腸菌に導入する実験

アミノ酸等の有用物質生産に用いられるコリネ型細菌のゲノム上に大腸菌のシングルコピープラスミド pBe1oBACK の配列を挿入した株を構築し、これをクローニングに一般的に用いられる大腸菌 DH5 株とプロトプラスト融合させたところ、DH5 株にコリネ型細菌の全ゲノム(3.3 Mbp)を導入することに成功した(図2)。大腸菌にこれだけ大きな外来DNAが一度に導入されたことは世界中でも報告はなく、本法によるコリネ型細菌の全ゲノム導入が現在世界最長記録である。また、従来法とは異なりPCRやゲノム断片の人工合成等が必要なく、ドナーが保有するゲノムそのものを直接宿主細胞内に導入するため、導入時におけるPCR等のエラーを気にせずに簡便かつ低コストで異種ゲノム全長を大腸菌に導入できる画期的な方法である。さらに、先行研究で使用したコリネ型細菌は、グラム陽性細菌であり、グラム陰性細菌の大腸菌とは門レベルで異なっているため、本法は系統関係に依存しない可能性が高い。一方、得られた融合株は継代培養を繰り返すとコリネ型細菌ゲノムが消失してしまう現象が観察されたため、安定的に異種細菌ゲノムを維持させる方法を開発することが今後の課題である。

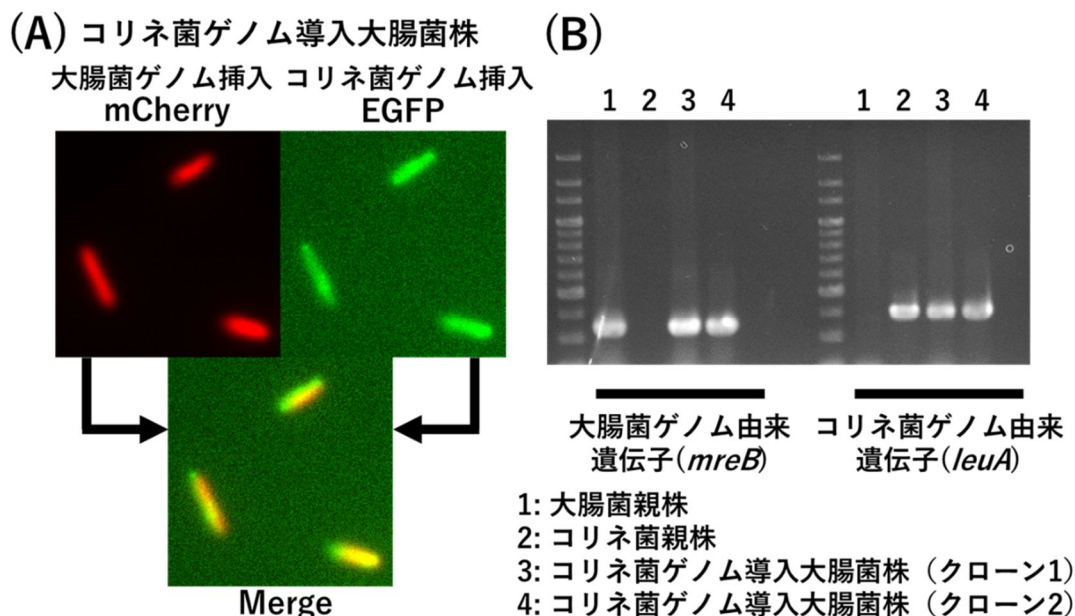


図2. コリネ型細菌ゲノム導入大腸菌株の確認実験。(A) コリネ型細菌と大腸菌の融合株における蛍光顕微鏡観察結果。大腸菌親株ゲノム上に蛍光遺伝子 mCherry を挿入し、一方コリネ型細菌親株の (pBe1oBAK 配列を含む) ゲノム上に別の蛍光遺伝子 EGFP を挿入してプロトプラスト融合を行った。得られた融合株では、それぞれの親株が保有していた2種類の蛍光遺伝子の両方が発

現していることが確認された。(B)PCR 法による確認実験の結果。得られた融合株では、両方の親株がゲノム上にコードされている遺伝子 (*mreB* と *leuA*) の両方を保有していることが確認された。

細菌において、様々なゲノム編集技術が開発されているが、申請者が開発したプロトプラスト融合を利用した異種ゲノム導入法は世界初の技術である。大腸菌において大規模（数十～数百 Kbp レベル）にゲノム編集を行なう技術として、Yale 大学のグループによる接合伝達を用いた CAGE 法 (Ma et al. 2014 Nat Protoc)、Cambridge 大学のグループによるファージ由来の組換え酵素と CRISPR/Cas9 を用いた REXER 法 (Wang et al. 2016 Nature) 等があるが、異種ゲノム全長を大腸菌に導入した例は報告されていない。そのため、本研究における大腸菌に異種ゲノム全長を導入する技術自体がインパクトの高い研究成果であると言える。また、異種ゲノム全長を別種に導入した例としては、慶應大学のグループによる枯草菌を用いたドミノ法 (Itaya et al. 2005 PNAS) や、Venter 研究所のグループによる酵母に大腸菌の全ゲノムを複製させる研究 (Karas et al. 2014 Nat Protocol) 等が報告されている。しかしながら、これらの方法は宿主の特性を利用したものであり、大腸菌に適用することはできない。これに対して本研究で開発した方法は、モデル生物である大腸菌に、プロトプラスト融合と、大腸菌のシングルコピープラスミド由来の配列を用いて異種細菌ゲノムの全長を導入する画期的な方法である。今後の課題として挙げた、異種細菌ゲノムを安定的に維持させる技術を開発することで、異種細菌ゲノムを宿主細菌に導入し、機能させることで新しい有用形質を獲得する有用微生物の育種技術などへの応用が可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maeda Tomoya, Horinouchi Takaaki, Sakata Natsue, Sakai Aki, Furusawa Chikara	4. 巻 72
2. 論文標題 High-throughput identification of the sensitivities of an Escherichia coli recA mutant strain to various chemical compounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 566 ~ 573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-019-0160-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibai Atsushi, Maeda Tomoya, Kawada Masako, Kotani Hazuki, Sakata Natsue, Furusawa Chikara	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of Three Star-Shaped Bacteria, Stella humosa, Stella vacuolata, and Stella Species ATCC 35155	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00719-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00719-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 前田 智也、岩澤諄一郎、堀之内 貴明、阪田 奈津枝、川田 正子、小谷 葉月、酒井 亜希、田邊 久美、古澤 力
2. 発表標題 全自動培養システムを用いた多種ストレス環境下における大腸菌の大規模実験室進化
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田 智也、堀之内 貴明、阪田 奈津枝、川田 正子、小谷 葉月、酒井 亜希、田邊 久美、古澤 力
2. 発表標題 全自動培養システムを用いた多種ストレス環境下における大腸菌の大規模実験室進化
3. 学会等名 第17 回微生物研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoya Maeda, Takaaki Horinouchi, Natsue Sakata, Hazuki Kotani, Aki Sakai, Kumi Tanabe, Chikara Furusawa
2. 発表標題 High-throughput experimental evolution of Escherichia coli under various stress environments using an automated culture system
3. 学会等名 第46回内藤コンファレンス(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoya Maeda, Chikara Furusawa
2. 発表標題 Identification of mutations conferring resistance to anti-tuberculosis drugs by laboratory evolution of non-pathogenic Mycobacterium on agar plate. 『ICSB2019 The 20th International Conference on System Biology』
3. 学会等名 ICSB2019 The 20th International Conference on System Biology(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田智也、古澤力
2. 発表標題 非病原性結核菌の抗結核剤に対する進化実験
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://researchmap.jp/t0maeda/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----