

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24年5月15日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22655053

研究課題名（和文） ゲノム組換えへの挑戦とそれを利用した合成生物学

研究課題名（英文） Exploring the possibilities of genome recombination

研究代表者

跡見 晴幸 (ATOMI HARUYUKI)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90243047

研究成果の概要（和文）： 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の高い形質転換効率に着目し、ゲノム DNA を用いて大規模な DNA 組換えを試みた。ウラシル・トリプトファン要求性を示す宿主を用いてこれらの要求性の解除を指標に形質転換体の選択を行った。野生型 *T. kodakarensis* のゲノムを用いた場合には目的の組換え株が容易に得られた。近縁の超好熱菌ゲノムを用いた場合は、ゲノム DNA 供与体の短い DNA 断片を予め挿入した *T. kodakarensis* を宿主とした場合に組換え株が得られた。

研究成果の概要（英文）： Focusing on the high transformation efficiency of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, we explored the possibilities of performing wide-scale DNA recombination. Mutant strains displaying uracil or tryptophan auxotrophy were used as host cells, and selection was based on their prototrophy. We were able to obtain prototrophs using the genomic DNA of wild-type *T. kodakarensis*. By inserting a small DNA fragment from the DNA donor beforehand, we were able to obtain transformants using genomic DNA from other hyperthermophiles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：遺伝子組換え、超好熱菌、メタゲノム、ゲノム組換え、合成生物学

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* を宿主として超好熱菌としては世界初となる遺伝子破壊・挿入系を開発してきた (T. Sato et al., J. Bacteriol., 185, 210-220 [2003], T. Sato et al., Appl. Environ. Microbiol., 71:3889-3899 [2005])。本菌における形質転換には塩化カル

シウム法などの処理を必要としないことから、外来 DNA の取り込みおよび相同的組換えが比較的高い確率で起きると考えられる。

これまでの遺伝子工学技術では単一の遺伝子もしくは少数遺伝子から構成される単一の代謝経路をクローニング・導入するのが通常であったが、本研究では *T. kodakarensis* の高い DNA 取り込み能および組換え能に着

目して、他種生物由来のゲノム規模の DNA を *T. kodakarensis* ゲノム内に組み込む「ゲノム組換え」に挑戦する。ゲノム組換えの成否は *T. kodakarensis* の「ゲノム不安定性」と「非相同的組換えの起こりやすさ」に依存し、本研究ではそれらに対する知見も得たい。もしゲノム組換えが可能であれば従来は非現実的であった他生物由来の複雑な生命機能を付与した微生物 (*T. kodakarensis*) の創生が可能となる。また現在では、DNA シーケンシングの発達により様々な生物のゲノム解析が進み莫大なゲノム情報が蓄積しているため、ゲノム供与生物の選択や組換え後の解析が容易である。

技術開発の面から見ても、これまでに gene sequencing が genome sequencing へと発展してきたように gene cloning に対応する genome cloning (metabolome cloning)、gene shuffling に対応する genome shuffling という合成生物学における新しい手法を開拓できる可能性がある。また学術的な面から考えると、本研究で目指すゲノム組換えやそれに伴ったゲノム再編の過程そのものが、生物の多様化と進化のメカニズムと関係している可能性もある。今まで生物の多様化 (進化) は微少変異や少数遺伝子の水平伝播が蓄積することにより進んできたというのが通説であるが、もしゲノムレベルでの組換えを実証できればこの概念が大きく変わる可能性も出てくる。

2. 研究の目的

本研究では *T. kodakarensis* の高い DNA 取り込み能および組換え能に着目して、他種生物由来の巨大 DNA 断片を *T. kodakarensis* ゲノム内に組み込む「ゲノム組換え」に挑戦する。

3. 研究の方法

これまでに *T. kodakarensis* KU216 ($\Delta pyrF$), KUW1 ($\Delta pyrF$, $\Delta trpE$), KUWH1 ($\Delta pyrF$, $\Delta trpE$, $\Delta hisD$) の 3 種の宿主を作製しており、KU216; *pyrF* および KUW1; *pyrF*+*trpE* の組み合わせについては選択マーカーとして既に汎用されるレベルにある。よって *pyrF*, *trpE*, (*hisD*) を有する他生物由来ゲノムを *T. kodakarensis* に挿入してウラシル要求性やトリプトファン要求性 (ヒスチジン要求性) などの栄養要求性を指標に他種生物のゲノムが組み込まれた *T. kodakarensis* を選抜した。

栄養豊富な天然培地 ASW-YT 培地で培養直後の *pyrF* 欠損株 (KU216 や KUW1 など) は 1 代目の Ura⁻ ASW-AA 液体培地 (合成培地) ではピリミジン類の持ち込みにより増殖を示し、継代 2 代目から厳密なウラシル要求性を示す。形質転換手法としては 1 step のス

クリーニングで形質転換体を取得できることが望ましいが、今回は大規模かつ非相同的なゲノム組換えが起こる時間を与えるため、緩やかに選択圧がかかる *pyrF* での選抜を優先的に行った (*pyrF* > *trpE*)。また、1 箇所の組換えではなく大規模な組換えを期待していることから 2 つないし 3 つの選択圧を順番、もしくは同時にかけることも効果的と考えた。

超好熱菌を原始生命体であると考えられる説もあり、原始地球上には超好熱菌のみが存在した可能性もあることから、ゲノム供与微生物も超好熱菌の中から選抜することとした。超好熱菌の中でも *T. kodakarensis* にはない生命機能を有する株、硫酸還元能を示す *Archaeoglobus fulgidus*、酸素呼吸能を有する *Pyrobaculum calidifontis* などを最終目標としている。

また、相同性が低いゲノム同士の組換えは難しい可能性も考えられるため、*T. kodakarensis* 自身や *Pyrococcus furiosus*、*Pyrococcus horikoshii* などの比較的近縁のゲノムから段階的に試した。

4. 研究成果

まずゲノム DNA で形質転換を行って組換えが起こる可能性とその際に必要なゲノム DNA の量を検討した。これまでは基本的に 3 μg のプラスミド DNA や linear DNA を用いて *T. kodakarensis* の形質転換を行ってきた。プラスミド DNA が約 6,000 bp としてゲノムが約 2,000,000 bp なので同じマーカー遺伝子 *pyrF* の分子数を確保するためには 333 倍の約 1,000 μg が必要である。この量のゲノム DNA を使用するのには現実的でないため、まず KU216 宿主および pUDTrpE (*pyrF* マーカーの *trpE* 破壊ベクター) を用いて形質転換に必要な DNA 量を検討した。その結果、0.03 μg でもウラシル要求性が相補された *PyrF*+株が得られた。ただし増殖の起ち上がりが $3 > 0.3 > 0.03 \mu\text{g}$ だったので DNA 量が多い方が組換えが起こりやすいことが示唆された。つまりゲノム DNA に換算すると 10~1000 μg 相当量の範囲内で組換えが起き、多い方が良いことが分かった。抽出量の限界も考慮して 1 回の形質転換に使用するゲノム DNA 量はプラスミドの 30 倍の 90 μg に設定した。また、プラスミド DNA 0.03 μg でも形質転換が成功したことは改めて *T. kodakarensis* の DNA 取り込み・組換え能の高さを示している。

次に KU216 を宿主として KOD1 ゲノムを用いて *PyrF*+株が得られるかを検討した。まず *T. kodakarensis* KOD1 および KU216 のゲノム DNA を抽出した。プラスミド DNA と異なりゲノム DNA の場合、細胞内に取り込まれ難い可能性も考えられたため、塩化カ

ルシウム処理したものや、ゲノム DNA を予め制限酵素処理して断片化したものでも形質転換を行った。また、ネガティブコントロールとして *pyrF* 遺伝子をもたない KU216 のゲノムでも形質転換を行った。その結果、塩化カルシウム処理および制限酵素処理の有無に拘わらず KOD1 ゲノムで処理したものは PyrF+株が得られ、KU216 ゲノムでは得られなかった。

KOD1 ゲノムで形質転換を行って得られた PyrF+株集合体からゲノム DNA を抽出して遺伝子型を PCR により解析した。その結果、*pyrF* 部位で組換えが起こり欠損が復帰して KOD1 株の遺伝子型にもどっていることが分かった。これらの結果から *T. kodakarensis* KU216 においては *T. kodakarensis* KOD1 から抽出したゲノム DNA 90 μ g を用いて PyrF+株への形質転換が可能なが分かった。

次に近縁の超好熱始原菌のゲノムを用いて形質転換・外来遺伝子の導入を試み、*Pyrococcus furiosus* の場合を中心に報告する。近縁種の *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, Crenarchaeota の *Pyrobaculum calidifontis* のゲノム DNA を抽出し、*T. kodakarensis* KU216 株を宿主として形質転換を行い、PyrF+株のスクリーニングを行った結果、ウラシル要求性が解除された形質転換株は得られなかった。ゲノム DNA 量、形質転換の条件、培養条件等を検討したが、*T. kodakarensis* KU216 株への外来 *pyrF* 遺伝子の導入は認められなかった。そこで、*P. furiosus* の場合においては同菌の比較的短いゲノム DNA 断片を予め *T. kodakarensis* KU216 株に挿入し、形質転換を試みた。宿主株を構築するため、*T. kodakarensis* KU216 株の Rubisco 遺伝子 (TK2290) 上流の non-coding 領域または *chiA* 遺伝子 (TK1765) 上に *P. furiosus* (Pfu) ゲノム断片を導入した。PCR による確認や導入した *P. furiosus* 由来ゲノム断片周辺部位の塩基配列を決定し、作製した株が全て目的の遺伝子型を有することを確認した。さらに *P. furiosus* ゲノム上で *pyrF* 遺伝子を挟むような 2 つの DNA 断片を、2 つの断片間の距離を変化させ、*T. kodakarensis* ゲノムに挿入した。これらを宿主として、*P. furiosus* ゲノムを用いて形質転換を行ったところ、PyrF+株が得られ、それらのゲノム上に *pyrF* 遺伝子を含む *P. furiosus* ゲノム断片が挿入されていた。

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 4 件)

1. Leigh, J.A., Albers, S.V., Atomi, H., Allers, T.

Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, Thermococcales and Sulfolobales.

FEMS Microbiology Reviews, 35(4), 577-608, 2011.

(査読有り)

2. Nunoura T, Takaki Y, Kakuta J, Nishi S, Sugahara J, Kazama H, Chee G-J, Hattori M, Kanai A, Atomi H, Takai K, Takami H. Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group.

Nucleic Acids Research, 39, 3204-3223, 2011.

(査読有り)

3. Maruyama, H., Shin, M., Oda, T., Matsumi, R., Ohniwa, R.L., Itoh, T., Shirahige, K., Imanaka, T., Atomi, H., Yoshimura, S.H., Takeyasu, K.

Histone and TK0471/TrmBL2 form a novel heterogeneous genome architecture in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*.

Molecular Biology of the Cell, 22(3), 386-398, 2011.

(査読有り)

4. Kim, Y.J., Lee, H.S., Kim, E.S., Bae, S.S., Lim, J.K., Matsumi, R., Lebedinsky, A.V., Sokolova, T.G., Kozhevnikova, D.A., Cha, S.S., Kim, S.J., Kwon, K.K., Imanaka, T., Atomi, H., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Lee, J.H., Kang, S.G.

Formate-driven growth coupled with hydrogen production.

Nature, 467(7313), 352-355, 2010.

(査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

1. 田頭健太, 松原正晃, 福田青郎, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の有するウイルス様領域に関する研究、日本アーキア研究会第 2 4 回講演会、慶應義塾大学鶴岡キャンパス、平成 2 3 年 9 月 3 日。

2. Haruyuki Atomi, Novel enzyme discovery and metabolic engineering in hyperthermophiles, Second Japan-Argentina Workshop、総評会館、東京、平成 2 2 年 1 1 月 9 日。

3. 跡見晴幸、超好熱菌を宿主とした細胞工学の試み、第5回産業用酵素シンポジウム、長浜バイオ大学、平成22年11月6日。

4. Haruyuki Atomi, Novel enzymes and pathways in hyperthermophilic archaea. Gordon Research Conference: Biocatalysis, □Bryant University, RI, USA, 平成22年7月13日。

[その他]

ホームページ等

<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/atomi-lab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

跡見 晴幸 (ATOMI HARUYUKI)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90243047