

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660075

研究課題名(和文) ゲノム編集技術と1細胞ゲノム解析を融合した難培養性微生物の遺伝子機能解析

研究課題名(英文) Single-cell genomics and genome editing of unculturable protist

研究代表者

雪 真弘 (Yuki, Masahiro)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：50572773

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)：本研究は、培養することが困難なシロアリ腸内に共生する原生生物をCRISPR/Casシステムによりゲノムを編集することにより、これまで不可能であった難培養性微生物の遺伝子機能を可能にすることを目的とした。その結果、原生生物のゲノムから、セロビオハイドロラーゼ遺伝子を同定し、切断部位を決定した。また原生生物のコドン使用頻度を求め、cas9, GFP遺伝子をコドン最適化した。cas9 mRNA, gRNA, 相同性組換え用DNAをシロアリ腸内に注入した。また、原生生物ゲノムから細菌由来の配列を除くため、原生生物細胞表面共生細菌のゲノムをシングルセルゲノム解析で明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to perform genome editing of uncultivated symbiotic protists in the termite gut using the CRISPR/Cas system. Cellobiohydrolase genes were detected in the symbiotic protist genome, and their target Cas9 sites were determined. We also calculated the codon usage of the protist genome, and optimized the cas9 and GFP genes accordingly. The mixture of cas9 mRNA, gRNA and DNA for homologue recombination was injected into the termite gut. Furthermore, in order to remove contaminating sequences of symbiotic bacteria from the protist genome, we analyzed the genome of ectosymbionts by single-cell genomics.

研究分野：分子生物学

キーワード：CRISPR シロアリ 共生原生生物

1. 研究開始当初の背景

メタゲノム・トランスクリプトーム解析など微生物群全体を解析する培養を介さない手法により、これまで培養が困難であった微生物に関しても、これらの解析対象になり始めている。これらの解析から得られた遺伝子配列情報をもとに難培養性微生物が有するタンパク質の機能解析は、培養可能な生物で発現を行い(異種発現)、解析されている。シロアリ腸内微生物は難培養性であるが、メタゲノム・トランスクリプトーム解析が行われている。そこから発見されたセルラーゼの一種であるエンドグルカナーゼは、異種発現系により発現に成功し酵素学的性質が解析されている。しかし、異種発現することが難しい難発現性タンパク質は多く、解析できるタンパク質は限られている。さらに、難培養性微生物であるため遺伝子欠損株等を作製することもできず、生体内での遺伝子の機能も明らかにすることは不可能であった。

生物のゲノム編集に関して、ZFN (Zinc Finger Nuclease)やTALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)等の幾つかの技術が開発されていた。CRISPR/Casシステムは、原核生物で見つかった獲得免疫機構で侵入したプラスミド等を切断する。このシステムをゲノム編集に用いて、非モデル生物の遺伝子欠損株等の作製が報告されていた [Cong et al., 2013]。

2. 研究の目的

シロアリの腸内には、十数種の真核の単細胞生物である原生生物と多種多様な細菌が共生していることが知られている。しかし、これらの微生物のほとんどが難培養性微生物であるため、メタゲノムやメタトランスクリプトーム解析が行われている。そこから発見されたセルラーゼの一種であるエンドグルカナーゼは、異種発現系により発現に成功し酵素学的性質が解析されている [Otagiri et al., 2013]。しかし、難発現性タンパク質は多く、解析されたタンパク質は限られている。本研究では、ゲノム編集技術の1つであるCRISPR/Cas9システムを使用することによって、シロアリ腸内に共生する難培養性原生生物のゲノムを編集し、これまで不可能であった難培養性微生物の遺伝子機能解析を可能にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 原生生物に共生する細菌の1細胞ゲノム解析

原生生物には、その細胞内外に細菌が共生していることから、原生生物のドラフトゲノム配列には、共生細菌のゲノムも含まれる可能性があった。そのため、これらの共生細菌のゲノムを解読し、原生生物のドラフトゲノム配列から、共生細菌の配列が含まれるかを

確かめた。まず、シロアリ腸内の共生細菌をセルソーターにより、1細胞毎に分離し、Phi29 DNA polymeraseを用いて、全ゲノム増幅を行った。これを鋳型にPCRにより、16S rRNA 遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスにより、塩基配列を決定した。原生生物に共生している細菌の全ゲノム増幅サンプルを用いて、次世代シーケンサーMiSeq用ライブラリーを作製し、シーケンスを行った。得られたショートリードは、SPAdesを用いて、アセンブルした。

(2) 遺伝子切断部位の選定

CRISPR/Cas9システムによって切断し、GFP遺伝子を相同組換えで挿入する標的遺伝子を結晶性セルロース分解酵素であるセロビオハイドロラーゼ遺伝子として実験を行った。シロアリ腸内に共生する原生生物のドラフトゲノム配列から、Blast検索によりセロビオハイドロラーゼ遺伝子を探索した。これらの配列中に、Cas9が切断するNGGを有している配列をリストアップした。候補配列は、ゲノム全体に対して相同性検索を行い、他の遺伝子が切断されないよう特異性を確認した。特異性があった配列を鋳型にガイドRNAを作製した(図1)。

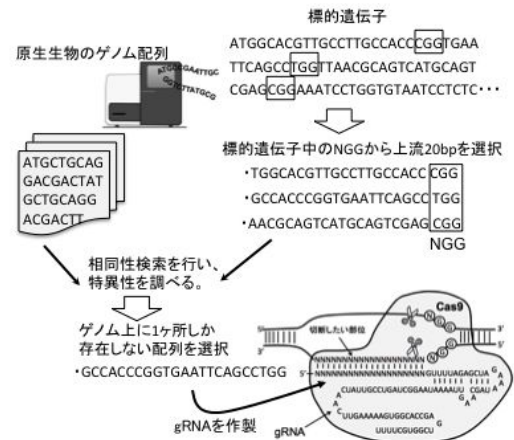


図1. gRNA作製の流れ

(3) Cas9 遺伝子、GFP 遺伝子のコドン最適化

Cas9 をコードする mRNA を腸内原生生物に導入し発現させるため、原生生物のコドン使用頻度を求めた。これをもとにコドン最適化した DNA を合成し、これを鋳型に 5' cap 構造と 3' poly-A を付加した mRNA を大量に調製した。相同性組換えに使用する GFP 遺伝子もコドン最適化を行い、DNA を合成した。インバース PCR により、コドン最適化 GFP 遺伝子を、クローニングしたセロビオハイドロラーゼ遺伝子の Cas9 切断部位に挿入したプラスミドを作製した。このプラスミドを鋳型に、PCR により、相同組換え用 DNA を作製した。

(4) 腸内原生生物への核酸導入方法の確立

作製した cas9 mRNA, gRNA, 相同組換え用

DNA を原生生物に取り込ませるため、これら核酸を混ぜた溶液をろ紙に染み込ませて、これを餌にシロアリを飼育した。また、コントロールとして、相同組換え用 DNA のみ、水のみを染み込ませたろ紙で飼育した。飼育したシロアリを経時的にサンプリングし、腸内容物を回収し、PCR により標的配列での組換えの有無を調べた。また、核酸混合液を実体顕微鏡下でキャピラリーによって、シロアリ腸内に直接接種し、セルロースパウダー上で飼育した。これらのシロアリに関しても、組換えの有無を調べた。

4. 研究成果

(1) 原生生物細胞表面共生細菌のシングルセルゲノム解析

原生生物の細胞表面に共生する Bacteroidales 目細菌の *Candidatus Symbiothrix dinenymphae* のゲノムをシングルセルゲノム解析で明らかにした。今回の解析では、全ゲノム配列の約 80% に当たる総塩基数が約 3.5Mb のドラフトゲノム配列を得ることができた。ゲノム配列にコードされている遺伝子の機能を推定した結果、リグノセルロース分解に関与する遺伝子を 58 個有していることが分かった。これまで、シロアリ腸内では、リグノセルロース分解を担っているのは、原生生物だけと考えられていたが原生生物共生細菌である *Ca. S. dinenymphae* もリグノセルロース分解に寄与していることが初めて示唆された(図 2)。また、原生生物の細胞内に共生する *Treponema* 属細菌のシングルセルゲノム解析も行い、ドラフトゲノム配列の取得に成功した。そして、得られたドラフトゲノム配列を使用し、原生生物のゲノム配列中の細菌由来の配列を推定した。

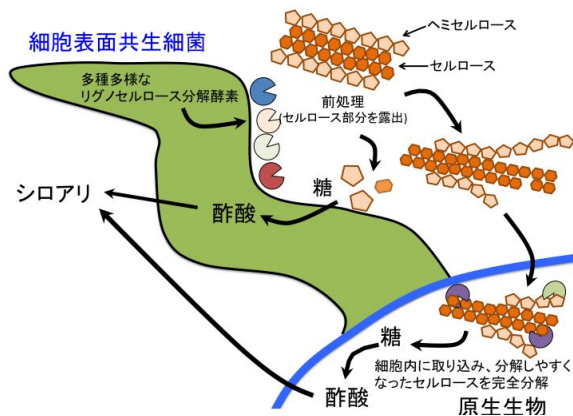


図 2. 原生生物細胞表面細菌のリグノセルロース分解

(2) 原生生物のセロピオヒドロラーゼ遺伝子

Blast 検索の結果、原生生物ゲノムから 5 個のセロピオヒドロラーゼ遺伝子を同定した。これらの配列中で、3' 末端が NGG である 23 塩基の配列を検索した。その結果、

合計 11 個の gRNA 候補を見つけた。これらの配列を全ゲノム配列に対して相同性検索した結果、全ての配列で相同的な配列はなかった。これらの配列から、相同性組換えで GFP を含むセロピオヒドロラーゼに載せかえるため、プロモーターとターミネータ領域が 1kb 以上ある scaffold12609 のセロピオヒドロラーゼ遺伝子を用いて実験を進めた。

(3) コドン最適化

原生生物のゲノム配列から取得されたセロピオヒドロラーゼ遺伝子のコドン使用頻度を求めた。これを参考に Cas9 のコドンを最適化し、DNA を合成した(図 3)。また、GFP 遺伝子に関しても、同様にコドンの最適化を行い、セロピオヒドロラーゼ遺伝子の Cas9 切断部位に GFP が組み込まれたプラスミドを作製した。

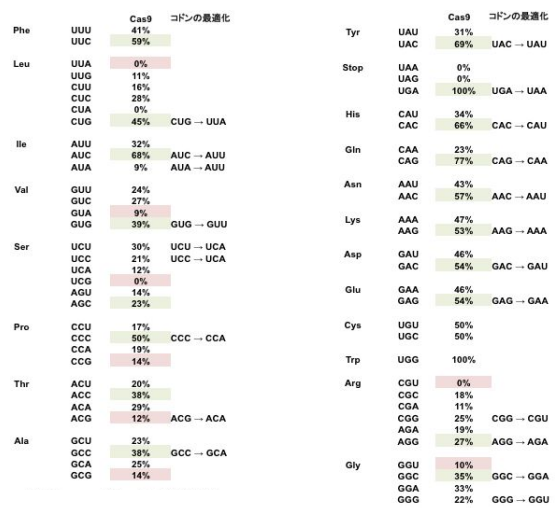


図 3. コドン最適化

(4) CRISPR-Cas9 システムによる組換え原生生物の作製

Cas9 mRNA, gRNA, セロピオヒドロラーゼ-GFP 遺伝子を染み込ませたろ紙で飼育したシロアリの腸内容物を GFP プライマーを用いた PCR により、組換えの有無を調べた。飼育 4 日後のサンプルにおいて、コントロールでは見られないバンドが増幅したが、シーケンス結果から、GFP 遺伝子ではない配列であることが分かった。このバンドは、飼育 7 日後のサンプルにおいても確認された。

次に、腸内に核酸が届いていない可能性を考え、Cas9 mRNA, gRNA, セロピオヒドロラーゼ-GFP 遺伝子を混ぜた核酸混合液を作製し、キャピラリーで腸内に直接接種した。しかし、接種後、数時間でシロアリが死んでしまった。核酸の導入方法は、さらなる検討が必要である。

今回の研究からは、組換え原生生物の作出には至らなかった。Cas9 を mRNA ではなくタンパク質にして、標的生物に入れる方法など、様々な方法が現在開発されている。難培養性微生物の遺伝子機能解析は、新たな生物資源

の獲得という観点からも、その必要性が増していくものと考えられるため、新たな方法等も検討し、研究を継続していく。

<引用文献>

Le Cong, F. Ann Ran, David Cox, Shuailiang Lin, Robert Barretto, Naomi Habib, Patrick D. Hsu, Xuebing Wu, Wenyan Jiang, Luciano A. Marraffini and Feng Zhang, Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, Vol 339, 819-823 (2013).

Masato Otagiri, Crisanto M. Lopez, Katsuhiko Kitamoto, Manabu Arioka, Toshiaki Kudo, Shigeharu Moriya, Heterologous expression and characterization of a glycoside hydrolase family 45 endo-1,4-glucanase from a symbiotic protist of the lower termite, Reticulitermes speratus. Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol 169, 1910-1918 (2013).

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)

Masahiro Yuki, Hirokazu Kuwahara, Masaki Shintani, Kazuki Izawa, Tomoyuki Sato, David Starns, Yuichi Hongoh and Moriya Ohkuma, Dominant ectosymbiotic bacteria of cellulolytic protists in their termite gut also have the potential to digest lignocellulose, Environmental microbiology, Vol 17, 4942-4953 (2015).
査読有

6. 研究組織

(1)研究代表者

雪真弘 (YUKI, Masahiro)

理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：50572773