

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870575

研究課題名(和文)バクテリアのゲノムデザインに向けた、複製制御機構の開発

研究課題名(英文)Artificially Controlled Replication Machinery for Bacterial Genome Design

研究代表者

河野 暢明(KONO, Nobuaki)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任助教

研究者番号：90647356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、環状染色体を持つバクテリアを対象とし、ゲノム対称構造と複製効率の関係性を解明することで、人工的に制御された複製機構を維持したゲノムデザインを目指した。その結果、情報学や遺伝学などにおける様々な技術を横断的に用い、ゲノム構造が複製挙動に与える影響を詳らかにし、ゲノム構造の観点からバクテリアゲノムの進化を議論する事で、複製効率を視野に入れた人工ゲノムのデザインへの足がかりを築き上げる事に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this project, about a bacteria harboring circular chromosome, we set a goal to recognize the relationship between the genomic structure and replication efficiency, and design a bacterial genome by using various approaches in bioinformatics and genetics. As the results, first, we succeeded in constructing various mutants whose genomic structures were disrupted by inversion and dissection mutations in *Bacillus subtilis*, and developed a protocol for replication profiling method to observe the behavior of replication forks in cell. Using the mutants and methods, we cleared that the treatment of some gene factor enables to control the replication machinery.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 バイオインフォマティクス ゲノム複製 ゲノム構造 枯草菌

## 1. 研究開始当初の背景

すべての生物に共通するセントラルドグマの一つであるゲノム複製は、生物の生命活動や進化に大きく関わる機構であり、生物を生物たらしめる定義の一つとして数えられてきた。バクテリアの環状染色体には一对の複製開始・終結点があり、ほぼ全てのバクテリアゲノムでそれらは対称に存在している。この広い保存性は増殖効率との強い相関関係を支持している。先行研究によって人工的にゲノム改変することで対称構造を崩した変異体では、野生株よりも増殖効率が低下している事が発表されている (Lesterlin, *et al.*, 2005; Kuroki, *et al.*, 2008)。ところが、ゲノムの非対称構造が複製を乱していると示唆されながら、この対称構造と増殖効率の相互作用は分子レベルで明白に理解されておらず、相関関係を裏付ける決定的な因果関係は証明されていない。このメカニズムの解明は人工的なゲノムデザインにおける最大の問題を解決する事になる。人工ゲノムの構築には主に三つの問題が提唱されており、それぞれ (1) 大規模な外来 DNA のクローニング、(2) クローニングした DNA の安定維持、(3) そして生物として機能するための複製と言われている (Itaya, 2013)。一つ目の大規模な外来 DNA を挿入するには枯草菌を使ったメガクローニング技術 (Tsuge, *et al.*, 2003; Itaya, *et al.*, 2008) が開発されたことによって解決され、バクテリアゲノムを全てクローニングする事に成功している (Itaya, *et al.*, 2005)。二つ目の外来 DNA クローニング後の安定化には、枯草菌のゲノムをベクターとする BGM (*Bacillus subtilis* genome; Kaneko, *et al.*, 2005) ベクターや、それに基づいた Pr-cI システム (Kaneko, *et al.*, 2009) の構築によって解決された。ところが、最後の安定した DNA 複製に関する問題は解決されていない。例えばシアノバクテリアゲノムを BGM ベクターにクローニングする過程において、数メガを越すサイズの DNA を枯草菌ゲノムの片側に挿入すると、枯草菌ゲノムの対称構造が崩れてしまい、そのキメラ生物は正常に生育しない (Itaya, *et al.*, 2005)。そのため現状では、シアノバクテリアゲノムを分割して枯草菌ゲノムに挿入する事で対称構造を維持するという応急措置がとられている。ところがこれでは、高機能なバイオマテリアル精製のために必要とされる連続した長鎖 DNA のクローニングに応用する事ができず、さらには数カ所に分割して挿入されているは、その DNA 領域を一括して効率良く取り出す事ができず、ライブラリーとして機能できない。また、分子生物学の発展に大きく寄与する事が期待されている最小ゲノムなどの人工ゲノムを構築する研究において、そのゲノム対称構造と複製機構の関係性が不明瞭なままでは、革新的なゲノムデザインを行なう事ができない。そのため、ゲノム対称構造と複製機構に関わる分子メ

カニズムを明らかにし、複製の乱れの原因を探究する必要がある。ところが、これまで分子レベルでの解決がされてこなかった主な理由として、研究対象となりえる適切なモデル生物が存在していない事と、複製機構を包括的に観察するための検出方法が確立されていない事が挙げられる。

ゲノム構造と複製機構の関係性を研究する上で、それぞれの性質を持った対象生物を扱う必要がある。一般的によく用いられている大腸菌や枯草菌などのモデル生物では、増殖効率が高く、ゲノム対称構造は近縁種間でも強く保存されている。ところが、ゲノム対称構造がくずれていると考えられているバクテリアは全て非モデル生物であり、増殖効率は高くなく、遺伝子操作技術も確立されていない。さらにこれら複数の種を対象とする場合、他種間比較をしなければならず、複製やゲノム構造だけに着目した解析は困難である。また検出法に関して、本目的を達成する為には、バクテリアゲノム上での局所的な複製挙動ではなく、包括的な挙動を調査しなければならない。

## 2. 研究の目的

以上をうけて本研究課題では、対象生物及び検出法の不足という問題点を解決し、ゲノム対称構造と複製効率の関係性を解明することで、人工的なゲノム構造の設計を目指す。

### (1) 大規模なゲノム改変株の構築

ゲノム構造と複製機構の関係だけに差異を持たせ、複製の乱れを比較解析する必要がある為、遺伝子の欠損や外来遺伝子の挿入をせず、大規模なゲノム逆位及びゲノム分断を施した変異株の構築を行なう。

### (2) 複製プロファイル技術の確立

複製プロセス中に起こる DNA コピー数差を大量並列シーケンサーで検出し、複製挙動を包括的に観察するための技術の確率を目指し、複製挙動を的確に観測できる最適な条件検討を行い、最適な DNA 量、抽出期、そして読むべきリード数などを検証する。

### (3) 複製機構の制御

構築されたゲノム対称構造が崩れた変異株に対して、複製挙動を観察し、株間の比較解析から複製挙動の乱れに影響を与える因子を特定し、複製挙動のデザインを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 大規模なゲノム改変株の構築

ゲノム逆位株の構築には相同組換えと薬剤マーカーを組合わせた *ne-eo* システム (Toda, *et al.*, 1996) を、またゲノム分断株の構築にはこの *ne-eo* システムに加えて pLS20 プラスミドの複製開始領域を移植する事でゲノムの一部領域を第二染色体化させる技術 (Itaya and Tanaka, 1997) を用いる。これ

らの技術では既に対称構造を数キロレベルで崩した逆位株や枯草菌ゲノム約 300Kbp の分断株構築に成功している (Kuroki, *et al.*, 2008; Itaya and Tanaka, 1997)。これら確立された技術を用いて本研究課題では新たに、対称構造を左右で大規模にずらした 4 株、対称構造は崩さずに両側のリーディング・ラギング鎖のみを逆転させた逆位株 2 株、そして両側それぞれで 1Mbp 近い領域を分断して第二染色体化させる分断株 2 株、計 8 株の構築を行う。

## (2) 複製プロファイル技術の確立

環状染色体を持つバクテリアでは対数増殖期に複製開始点と終結点付近との間でゲノムのコピー数に大きな差が生じる事が知られており、そのコピー数の差を大量並列シーケンサーを用いて計算する事で、複製挙動を包括的に観察する事が可能になる。複製プロファイルと呼ばれるこの手法は既に酵母や大腸菌で実証されており (Müller and Nieduszynski, 2012)、研究代表者が行った事前解析でも枯草菌ゲノムに適用できる事が証明されていた (図 1)。

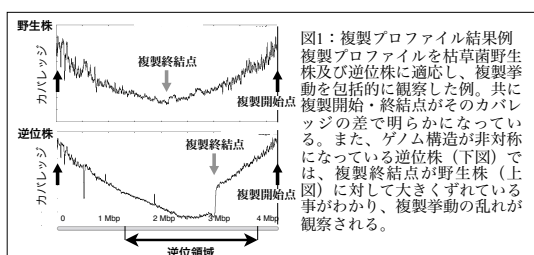


図1: 複製プロファイル結果例  
複製プロファイルは枯草菌野生株及び逆位株に適用し、複製挙動を包括的に観察した例。共に複製開始・終結点とそのカバレッジの差で明らかになっている。また、ゲノム構造が非対称になっている逆位株(下図)では、複製終結点(下図)に対して大きくずれている事がわかり、複製挙動の乱れが観察される。

しかしながら、複製開始・終結点の位置関係を明確に同定できる程の解像度はまだ得られておらず、増殖速度によってその精度が異なる可能性がある。そこでこの技術の精度及び画一性に影響を与える可能性のあるパラメータとしてサンプリング時期、DNA 抽出量、またシーケンスカバレッジなどが考えられるため、これらの条件検討を行う。まずサンプリング時期の検討には誘導期から対数期、定常期に至るまで各増殖期でのゲノム DNA サンプリングを行なう。また最適な DNA 抽出量を求めるため、サンプル間の生菌数に合わせて抽出するゲノム DNA 量を調整する。そしてカバレッジの検討には特色の異なる MiSeq、GS FLX+、並びに Ion PGM など各種シーケンサーを用いて、50x~1000x といった様々なカバレッジを読む予定である。以上約 10 サンプルのシーケンスは全て外注で行う。条件検討で得られたプロトコルを基に、今後の複製プロファイルを行なっていく。また複製プロファイルには大量のシーケンスデータを用いるため、大容量ストレージ及び解析サーバ、そして専門的なバイオインフォマティクス技術が必要になる。そこで、本研究ではより簡便に複製プロファイルを行なえる様、かかる解析を全自動で行なうシステムの開発を行なう。

## (3) 複製機構の制御

事前解析によってゲノム対称構造をくずした逆位株では、複製終結点とその転移先に移動している事が観察された (図 1)。より詳細な比較解析を行うため、新たに構築した逆位及び分断株に対して、複製プロファイルを用いて細胞内での複製挙動の観察を行う。また先行研究から、複製の進行はゲノム上の Ter 配列に囲まれた領域に阻害されると言われている。そこで、複製プロファイルから *in vivo* でその機構が機能している事を調べ、複製挙動の乱れの原因を特定し、Ter 配列に結合する事で複製フォークの進行を阻害する *rtp* 遺伝子 (非必須遺伝子) の欠損株を作成する。これにより、ゲノム非対称構造と複製機構との関係性理解、及び非対称複製挙動の改善を目指す。ゲノム対称構造が崩れた変異株であったとしても、複製の進行を阻害する因子を取り除く事で、野生株に近い増殖効率を持つと期待できる。増殖効率の変化は混合培養及び Spizizen 最小培地による生存率比較で検証する。

## 4. 研究成果

### (1) 大規模なゲノム改変株の構築

複製とゲノム構造の関係性を理解するため全てに先立ち、ゲノム構造のみが改変されたモデル生物の変異株構築を行った。対象種に遺伝学的手法が確立されている枯草菌を用い、ゲノム構造の改変には *ne-eo* システムを用いた。 *ne-eo* システムとは相同組換えを利用したゲノム逆位技術であり、プラスミドの複製開始点を利用する事で対象領域を分断後独自複製させる事で第二染色体化する事も可能である。この技術を用いて研究代表者は枯草菌の約 2Mbp に渡る逆位変異株 10 株と、300-800Kbp の分断変異株 2 株の作成に成功した。

### (2) 複製プロファイル技術の確立

次にゲノム全体の複製挙動を観察するための複製プロファイル技術の開発を行った。枯草菌に適した条件を決定する為に、DNA コピー数差が最も顕著に現れる増殖条件、抽出 DNA 量、シーケンス手法、そしてシーケンスデータの解析アルゴリズムの開発を行った。シーケンシングは主に外注し、実験及びデータ解析は研究代表者が行った。

### (3) 複製機構の制御

最期に複製挙動観察技術を用いて、構築したゲノム構造改変株の複製挙動を観察し、ゲノム構造と複製挙動の関係性を理解する事ができた。その結果、複製終結関連因子を利用する事で、人工的に複製挙動を操作する事に成功し、本研究成果を *Journal of Molecular Biology* 誌に発表した。

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 2 件)

- ① Kanoh Y, Matsumoto S, Fukatsu R, Kakusho N, Kono N, Renard-Guillet C, Masuda K, Iida K, Nagasawa K, Shirahige K, Masai H., Rif1 binds to G quadruplexes and suppresses replication over long distances., Nat Struct Mol Biol., 査読有, 22(11), 2015, 889-897, DOI: 10.1038/nsmb.3102.
- ② Kono N, Arakawa K, Sato M, Yoshikawa H, Tomita M, Itaya M, Undesigned selection for replication termination of bacterial chromosomes., J Mol Biol., 査読有, 426(16), 2014, 2918-2927, DOI: 10.1016/j.jmb.2014.06.005.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 河野暢明, ゲノム構造から見る遺伝子発現変動, グラム陽性学会 2015, 2015 年 8 月 27-28 日、滋賀
- ② 河野暢明, 枯草菌ゲノムの複製挙動制御, NGS 現場の会, 2015 年 7 月 1-3 日、茨城
- ③ Kono N. Revealed replication behavior on imbalanced Bacillus subtilis chromosome, 3R symposium 2014, 2014 年 11 月 17-21 日、静岡
- ④ 河野暢明, 大規模マルチオミクス解析に向けたパスウェイブラウザ, ゲノム微生物学若手の会, 2014 年 9 月 28-29 日、静岡
- ⑤ 河野暢明, ゲノムから攻める細菌学～新たな合成生物学の挑戦～, 細菌学若手コロッセウム, 2014 年 8 月 6-8 日、北海道
- ⑥ 河野暢明, ゲノム対称構造からのゲノムデザイン, 第 13 回微化研オープンセミナー, 2014 年 8 月 1 日、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
河野 暢明 (KONO, Nobuaki)  
慶應義塾大学・大学院政策・メディア研究科・特任助教  
研究者番号：90647356

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：