

# 研究終了報告書

## 「リピート配列の相同組換えを保護する細菌ゲノムの分子基盤」

研究期間:2020年11月～2024年3月

研究者:石川 聖人

### 1. 研究のねらい

生物のゲノムを、機能発現のために合理設計したゲノムへと書き換えることができれば、バイオ産業に大きな利益をもたらすことができる。これを実現する技術としてゲノム編集は重要視されているが、ノックイン効率が低いという解決すべきボトルネックがある。これは相同組換え頻度の低さに起因する。ゲノム編集におけるノックインは、切断 DNA 鎖と任意の外来 DNA 断片との相同組換えによって行われる。DNA の切断によって相同組換えによる修復頻度が向上し、外来 DNA が組み込まれることを期待しているが、相同組換えによる修復は非相同末端結合による修復よりも頻度が低いため、外来 DNA のノックインは起こりにくい。

本研究のねらいは、タンデムリピート配列を相同組換えから保護する細菌ゲノムの分子基盤を解明し、その知見に基づく新たなゲノム操作技術の基盤を構築することである。タンデムリピート配列は、相同組換えによって機能損失するリスクがあるにも関わらず、細菌ゲノム中では安定に維持されている。このことはタンデムリピート配列を相同組換えから保護するシステムの存在を連想させる。この細菌ゲノムの基本原理を解明し、人為的に解除・誘導できれば、DNA を切らずに相同組換えを誘発することや、望まない相同組換えを抑制することなど、今までにないゲノムスケール DNA の操作技術が開発できる。

細菌性ナノファイバータンパク質 *AtaA* をコードする遺伝子(*ataA*)には、相同組換えによる機能損失が起きてしまいそうなタンデムリピート配列が複数存在する。*ataA* 遺伝子は、宿主細菌である *Acinetobacter* sp. Tol 5 株では安定に維持されているが、プラスミドで異なる細菌に供給すると *ataA* 遺伝子内のタンデムリピート間で相同組換えが高頻度に起こる。このことは、「Tol 5 株には *ataA* 遺伝子のリピート配列を相同組換えから保護するシステムがある」ことを示唆している。*ataA* 遺伝子の宿主細菌である Tol 5 株が、タンデムリピート配列の相同組換えをどのように抑制しているかを明らかにすることで、ゲノム合成領域が目指す「ゲノムの構造と機能の解明」に貢献し、バイオ産業の発展に資するゲノム操作技術の開発に有用な知見を提供することを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究の目的は、*ataA* 遺伝子の宿主細菌である *Acinetobacter* sp. Tol 5 が、リピート配列の相同組換えをどういった分子基盤により抑制しているかを明らかにすることである。RecA の機能を阻害するタンパク質(アンチリコンビナーゼ)と、*ataA* 遺伝子の塩基修飾の関与を想定して研究を実施した。*sacB* 遺伝子を選択マーカーとして用いて、*ataA* 遺伝子のリピート配列間で生じる相同組換えの頻度を測定する手法を確立した。*ataA* 遺伝子に存在するリピート配列のなかで、相同組換えの起こりやすい箇所と起こりにくい箇所をナノポアシーケンシングにより特定した。そして、それらには塩基修飾の違いがあることを発見した。アンチリコンビナーゼを同定する

ために、*sacB* 遺伝子をマーカーとする独自手法により、相同組換え頻度の向上した変異株をしたところ、*mutS* 遺伝子の変異株が得られた。*mutS* 欠損株の相同組換え頻度は異種細菌である大腸菌の値と同程度まで上昇したことから、DNA 修復酵素として知られる MutS が Tol 5 株ではアンチリコンビナーゼとしても機能していることが示唆された。

効率的に研究を進めていく目的で、Tol 5 株の完全長ゲノムを決定し[論文 2]、いくつかの制限酵素遺伝子を破壊して形質転換のしやすい株へと改変した。また、サブテーマとして *ataA* 遺伝子の発現時期の解析を行ったところ、細胞増殖の後期特異的に多く発現していることが明らかとなり、代謝が活発なときには転写レベルで抑制されていることが明らかとなった[論文 1]。CREST 岩崎グループとの領域内共同研究として、CRISPR-Cas の対偶遺伝子として発見された DUF4402 の機能解析を実施した。グラム陰性細菌 *Vibrio natriegens* の DUF4402 欠損株は、ファージに対してより頑強になる表現型を示した。当初の想定とは逆の表現型ではあったが、ファージとの相互作用に関わる因子であることは確認でき、同グループの開発した手法が機能遺伝子の探索に有効であることを示した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「相同組換えから保護されるリピート配列の特定」

*ataA* 遺伝子内には、複数種類のタンデムリピート配列が存在する(図 1)。このうち、相同組換えの起こりにくいものとそうでないものを特定できれば、相同組換え保護機構の解明に向けた重要な足がかりと考え、以下のような研究を実施した。

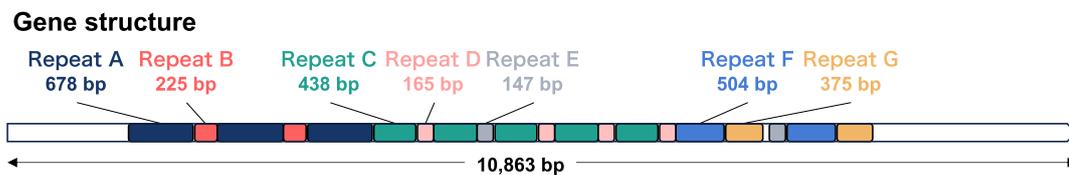


図 1 *ataA* の遺伝子構造の模式図。同色は同じリピート配列を示す。

相同組換え頻度を測定するための「プローブプラスミド」を 3 種類構築して評価を行った(図 2)。プローブプラスミドには、*ataA* 遺伝子のリピート配列間に対立遺伝子マーカーの *sacB* 遺伝子が挿入してある。*SacB* はスクロースを毒性物質に変換するので、このプローブプラスミドを保持するグラム陰性菌は、スクロースの含まれる培地中では生きられない。ただし、*ataA* 遺伝子のリピート配列間で相同組換えが起こると *sacB* 遺伝子の欠失が起こり、プラスミドを保持していても生きられるようになる。よって、スクロースの含まれる寒天培地で形成したコロニー数を、スクロースの含まれない寒天培地で形成したコロニー数で除することで相同組換えの頻度を算出することができる。pPrb1 では

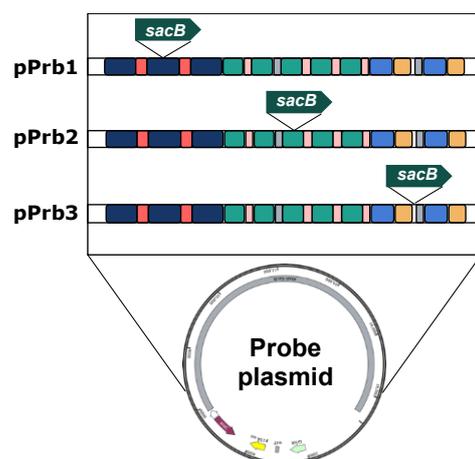


図 2 構築したプローブプラスミド。株の相同組換え頻度。

リピート配列 AB 間の、pPrb2 ではリピート配列 CDE 間の、pPrb3 ではリピート配列 FEG 間の相同組換えの起こりやすさを評価することができる。図 3 に各プローブプラスミドを用いて Tol 5 株の相同組換え頻度を定量した結果を示す。pPrb1 を用いたときよりも、pPrb2 と pPrb3 を用いたときのほうが相同組換え頻度が高いことが明らかになった。

次に、相同組換えの生じたリピート配列を網羅的に特定するために、プローブプラスミドを保持した Tol 5 株をスクロースの含まれる液体培地で植え継ぐことで、相同組換えの生じた株を集積した。集積された培養液から抽出される DNA 溶液は、異なる位置で相同組換えの起きたプラスミドのミクスチャーになっているはずである。これらを DNA サンプルとしてナノポアシーケンシング用のライブラリーを調製し、どのリピート配列で相同組換えが起きやすいかを塩基配列レベルで特定しようと試みた。図 4 はナノポアシーケンサー MinION によって得られたリード長のヒストグラムを示している。赤色の垂直線は相同組換え前の *ataA-sacB* 遺伝子の長さを示しており、これよりも短いリードは相同組換えによって遺伝子が短縮していることを意味する。どのプローブプラスミドにおいても、組換えの起こりやすい箇所があり、pPrb1 では Repeat A 間、pPrb2 と pPrb3 では Repeat EC-EF 間であることが明らかとなった。図 3 の相同組換え頻度の結果と合わせて考えると Repeat A 間よりも Repeat EC-EF 間の方が、組換えが起こりやすいことを示唆している。pPrb2 を用いたとき、Repeat C 間よりも Repeat EC-EF 間のほうが、相同組換えが起こりやすかった要因については、PacBio シーケンサーの解析によりメチル化修飾の違いが影響していることが示唆された。

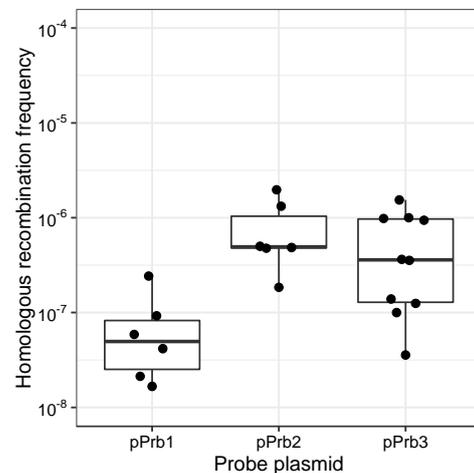


図 3 異なるプローブプラスミドを用いて評価した Tol 5 株の相同組換え頻度。

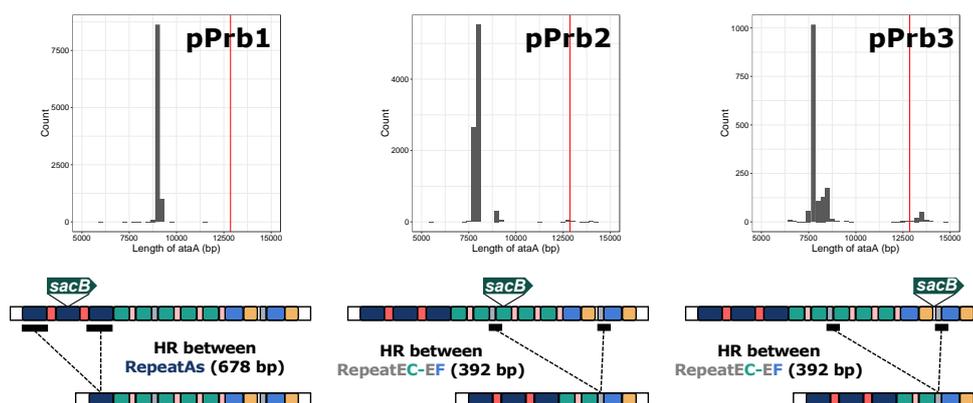


図 4 相同組換えの生じたプローブプラスミドのナノポアシーケンシング結果

### 研究テーマ B 「相同組換え頻度の向上した変異株の取得・解析」

Tol 5 株において、*ataA* 遺伝子の相同組換えが起こりにくいのは、相同組換えを抑制する因子(アンチリコンビナーゼ)が存在するためであると想定し、この因子が欠損したことにより相同組

換え頻度の向上した変異株を取得することを試みた。まず、Tol 5 株の完全長ゲノムを決定することから取り組んだ。ナノポアシーケンサーMinION とショートリードシーケンサーiSeq100 から得られたリードを用いてアセンブリすることで正確性の高い完全長のゲノム配列を得ることができた[論文 2]。ataA 遺伝子以外にもリピート配列を多く含む遺伝子がいくつか見つかかり、相同組換えを抑制する機能を有していることが示唆された。

ゲノム中にランダムに挿入されるトランスポゾンを用いて Tol 5 の変異株を大量に取得し、この混合物を変異株ライブラリーとした。変異株ライブラリーをプローブプラスミドで形質転換し、その直後に抗生物質とスクロースを含む寒天培地に播種した。相同組換えが起こり、sacB 遺伝子が抜け落ちないと増殖できないので、コロニー形成した変異株には相同組換え頻度が向上したものが集積されている可能性が高いと考えた。このスクリーニングの結果、相同組換え頻度が野生株と比べて 100 倍以上向上した mutS 変異株を取得できた。mutS 遺伝子を選択的に破壊した変異株 ( $\Delta mutS$ ) に各種プローブプラスミドを導入し、相同組換え頻度を測定したところ、Tol 5 野生株よりも相同組換えがはるかに起こりやすくなっており、その頻度は異種細菌である大腸菌と同程度になっていた(図 5)。この結果は、DNA 修復タンパク質である MutS が Tol 5 株のアンチリコンビナーゼとして機能することを示唆する。

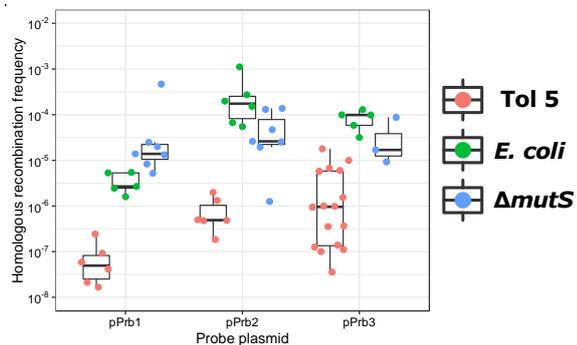


図 5 Tol 5 mutS 欠損株の相同組換え頻度

### 研究テーマ C 「形質転換し難い Acinetobacter sp. Tol 5 の遺伝子改変」

Tol 5 株は大腸菌と比べて遥かに形質転換効率が低いため、遺伝子組換えに多くの時間が費やされる課題があった。本研究を効率的に進めるためにも、Tol 5 株の形質転換を妨げる要因を特定し、それらを解除することを検討した。Tol 5 株は大腸菌で複製されたプラスミドを用いるとエレクトロポレーションではほとんど形質転換することができないが、Tol 5 株で複製された同一のものを用いると形質転換効率が約 1 億倍も向上することに気付いた(図 6)。このことから、Tol 5 細胞内で複製されたプラスミドには、Tol 5 株特有の塩基修飾が存在し、それに基づいて外来遺伝子と自己の DNA を見分けて排除することが想定された。実際に、Tol 5 株で複製されたプラスミド DNA を PacBio シーケンサーで解析し、メチル化修飾のある塩基を検出ところ、大腸菌とは異なる修飾パターンを持っていることが確認できた。そこでまずは制限修飾系の関与を疑い、Tol 5 株の制限酵素遺伝子を全て破壊し、形質転換効率への影響を調べた。その結果、タイプ1と3の制限酵素が

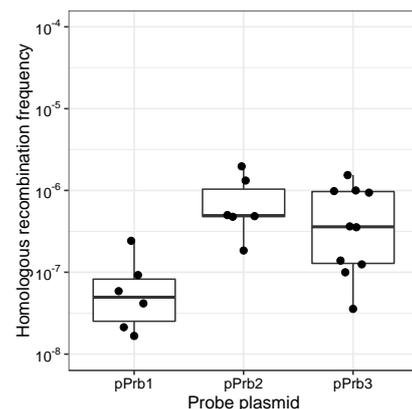


図 6 プラスミドの複製宿主依存的な Tol 5 株の形質転換効率

主要な働きをしていることが明らかとなり、それらの多重変異を行うと形質転換効率が野生株と比べて10万倍まで向上した(図7下の水平線との比較)。この変異株は、*in vitro* 及び *in vivo* でDNA assemblyを行うことができ、CRISPR-Casを基盤とする塩基編集を行うことができた。ゲノムへのトランスポゾン挿入も効率化され、上述した変異株ライブラリーの拡張に大きく貢献した。ただし、Tol 5細胞で複製されたプラスミドを用いた場合よりも形質転換効率が1000倍程度低いことから、制限修飾系以外の塩基修飾に関わる外来DNA排除システムが潜んでいることが示唆された(図7上の水平線との比較)。細菌の外来DNA排除システムからは、制限酵素やCRISPR-Cas9のようなゲノムを操作する技術が開発された実績があることから、Tol 5株に潜む未知のDNA排除システムを解き明かすことも、今後重要であると考えられる。

AtaAのような巨大タンパク質を生産することは、大量のエネルギーを必要とするはずだが、Tol 5株にとって負担ではないのか、遺伝子の発現制御はどうなっているのかという興味のもと、細胞増殖とAtaA生産の関係を明らかにする研究をサブテーマとして実施した。その結果、*ataA* 遺伝子は細胞増殖の後期特異的に多く発現していることが明らかとなり、代謝が活発なときには転写レベルで抑制されていることが明らかとなった[論文1]。これも相同組換えを抑制する一助となっているかもしれない。

#### 研究テーマ D 「*Vibrio natriegens* が有する CRISPR-Cas 対偶遺伝子の機能解析」

CREST 岩崎グループとの領域内共同研究を実施し、同グループの独自手法により特定した遺伝子の機能解析を実施した。CRISPR-Cas 遺伝子群を持たない細菌はDUF4402遺伝子群を有している傾向にあるが、CRISPR-Casの機能を相補するような機能を示すかどうかは不明であった。グラム陰性細菌 *Vibrio natriegens* はゲノムDNA上に2つのDUF4402を有していることに注目し、これらを欠損させる実験を担当した。得られた欠損株はファージに対して頑強となっており、想定とは逆の表現型ではあったが、ファージとの相互作用に関わる因子であることは確認できた。

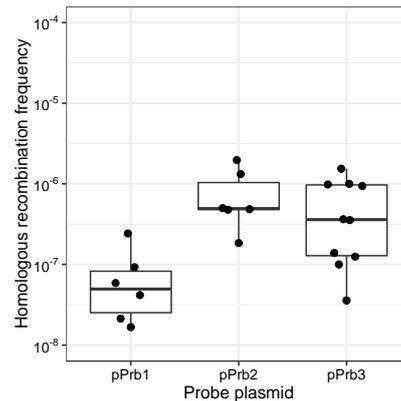


図7 Tol 5制限酵素欠損株の形質転換効率。上の水平線はTol 5株で複製されたプラスミド、下の水平線は大腸菌で複製されたプラスミドで形質転換した効率を示す。

### 3. 今後の展開

相同組換え頻度の向上した変異株から同定した MutS がどのようにアンチリコンビナーゼとして機能しているかを *in vivo* と *in vitro* の実験を通じて明らかにしていきたい。MutS はDNA修復タンパク質であるが、リピート配列の相同組換えを抑制する機能を有していることを示すことができれば、細菌分子遺伝学における重要な学術知見となる。また、その機能を改変することで相同組換えの頻度を操る技術へと発展し、ひいてはゲノムを操作する技術が創出される可能性がある。

*ataA* 遺伝子内で相同組換えの生じた位置を特定したところ、配列一致度は同じであるにも関わ

らず、相同組換え頻度が起こりにくいリピート配列があることに気付いた。PacBio シークエンサーを用いた解析結果を合わせて考えると、塩基修飾のあるリピート配列は相同組換えが低く抑えられている可能性が示唆された。大腸菌の MutS 複合体が関わる DNA 修復ではメチル化アデニンが目印として働くことから、Tol 5 株の相同組換え抑制メカニズムにも塩基修飾が一つの役割を果たしている可能性がある。DNA メチル化酵素を欠損させて相同組換え頻度に影響するかを調べていく予定である。

細菌における DNA メチル化の役割は主に制限修飾系による外来 DNA からの防除であることが知られている。自身の DNA をメチル化することで、外来 DNA と区別し、メチル化のない外来 DNA を切断する。従って、DNA のメチル化酵素を欠損させると、自身の DNA を分解するようになってしまうため致死となる。細菌において DNA メチル化酵素を欠損させる場合は、セトとなる制限酵素を欠損させなくてはならないが、研究を効率化する過程で全ての制限酵素を欠損させた Tol 5 変異株を構築している。この制限酵素全欠損株を基盤として、DNA のメチル化と相同組換え抑制との関与について調べていく。また、Tol 5 株には制限修飾以外の DNA 排除機構が存在することも示唆されている。これを解き明かすことは、新しいゲノム操作技術へと繋がっていく可能性があるため、引き続き研究していきたい。

領域内共同研究として実施した DUF4402 の機能解析については、組換えタンパク質と抗体を取得して、ファージとの相互作用や *V. natriegens* 細胞内で相互作用するタンパク質を明らかにしていきたいと考えている。DUF4402 タンパク質は細胞表層に繊毛を形成することが予想されているが、細菌の「毛」を長年研究してきた身としては、これが CRISPR-Cas システムの対偶遺伝子として検出されたことに強い興味を持っている。得られる成果は細菌遺伝学分野に重要な知見になる。また、ファージと細菌の軍拡競争に関わる遺伝子・タンパク質からは、遺伝子工学に重要なツールが生み出されていることから、DUF4402 自体やそれに関わる因子から新しいバイオ技術が創出される可能性があるかと期待している。

#### 4. 自己評価

「*ataA* 遺伝子の宿主である *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 が、リピート配列の相同組換えをどういった分子基盤により保護しているかを明らかにする」という目標に対し、より保護されるリピート配列の特徴と、相同組換え頻度に影響を与える遺伝子を特定できたことについては一定の成果が得られたと考えている。ただし、それらを確たるものにするための実験的証拠については不十分であると考えており、当初計画していた相同組換え抑制に関わる因子を用いた、相同組換えの細胞内・試験管内制御については道半ばとなってしまったことには反省している。できるだけ速やかに、実験データを取得して論文としてまとめる所存である。

一方で、当初は想定していなかった結果が得られたことについては満足している。研究を効率化するために実施した Tol 5 株を形質転換しやすい株へと改変した方法は、他の形質転換しにくい非モデル細菌にも適用できる可能性がある。この成果についてまとめた論文は *Applied Environmental Microbiology* 誌に投稿しており審査中である。

非モデル細菌の遺伝子組換えについて自信を深めたことから、岩崎グループとの共同研究においても *V. natriegens* の DUF4402 遺伝子の欠損実験を実施した。これを機にさらに非モデル細菌の遺伝子組換え実験に自信を深め、他の *Vibrio* 属細菌を扱う領域外研究者との共同研究を開

始し、成果が得られている。本さきがけ研究を通じて、非モデル細菌の遺伝子組換えが得意な研究者というスタイルを確立しつつある。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:3件

1. Masahito Ishikawa, Hajime Nakatani, Katsutoshi Hori. Growth phase-dependent production of the adhesive nanofiber protein AtaA in *Acinetobacter* sp. Tol 5. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2023, 135(3), 224-231.

*Acinetobacter* sp. Tol 5 のナノファイバータンパク質 AtaA は、巨大なタンパク質であり、細胞の周りを覆っている。このようなタンパク質を生産するには大量のエネルギーを必要とするはずだが、細胞増殖との関連性は明らかになっていなかった。本論文では、Tol 5 株の細胞増殖依存的な遺伝子発現と AtaA ファイバーの生産について明らかにした。

2. Masahito Ishikawa, Katsutoshi Hori. Complete genome sequence of the highly adhesive bacterium *Acinetobacter* sp. strain Tol 5. *Microbiology Resource Announcements*, 2021, 10 (35):e0056721.

*Acinetobacter* sp. Tol 5 のゲノムには巨大なリピート配列があるため、短いリードしか解析できない次世代シーケンサー (NGS) では完全長のゲノムを決定できていなかった。本研究では、ナノポアシーケンサー MinION で得られたロングリードと、iSeq 100 で得られた正確性の高いショートリードを用いたハイブリッドアッセムブリにより、精度の高い完全長ゲノムを決定できた。

### (2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Masahito Ishikawa and Katsutoshi Hori. Genetic modification in the non-competent Gram-negative bacterium *Acinetobacter* sp. Tol 5 for electroporation-based transformation and genome editing, ASBA2023
2. 石川聖人、堀 克敏. 合成生物学利用に向けた形質転換効率の低い細菌の遺伝子工学的改変. 2023, 第 75 回日本生物工学会大会
3. 石川聖人. バイオインフォマティクスショットワカル. 2023, 日本生物工学会バイオインフォマティクス相談部会 記念フォーラム (招待講演)
4. 堀 克敏、石川聖人. 「環境にあってはならない物質」に依存させる生物学的封じ込め. 2023, 日本農芸化学会 2023 年度大会 (招待講演)
5. 石川聖人、堀克敏. 長鎖反復配列遺伝子の相同組換え頻度の解析. 2021, 第 73 回日本生物工学会大会