

令和 6 年 5 月 1 0 日



長 浜 バ イ オ 大 学
Tel : 0749-64-8100 (代)

名 古 屋 大 学
Tel : 052-558-9735 (広報課)

科学技術振興機構 (J S T)
Tel : 03-5214-8404 (広報課)

遺伝子組換え困難な細菌を遺伝子組換えしやすく改変 ～バイオものづくりへの応用に期待～

ポイント

- 微生物を利用して有用な物質を得るバイオものづくりに有望な細菌 “*Acinetobacter* 属 Tol 5 株” の遺伝子組換えが困難な理由が、外来 DNA に対する防御機構であることを解明した。
- 2つの制限酵素遺伝子を欠損させた Tol 5 株を作出し、エレクトロポレーション法による遺伝子導入を行ったところ、その効率が約 5.7 万倍向上。遺伝子組換えしやすい細菌への改変に成功した。
- 得られた Tol 5 変異株は、バイオものづくりにおける基盤微生物としての活用が期待されると共に、Tol 5 株で得られた知見を他の遺伝子組換え困難な細菌へ適用することで基盤微生物の多様化への貢献が期待される。

J S T 戦略的創造研究推進事業において、長浜バイオ大学バイオサイエンス学部の石川 聖人准教授と名古屋大学大学院工学研究科の堀 克敏教授は、遺伝子組換えが困難な細菌 *Acinetobacter* 属 Tol 5 株^{注1}を、遺伝子組換えが容易な細菌へと改変することに成功しました。

微生物を用いた物質生産、いわゆるバイオものづくり^{注2}は、従来の化石資源を原料としたさまざまな製造プロセスを置き換える「持続可能なものづくり」として注目を集めています。効率的な物質生産には、バイオものづくりに適した微生物の作出が不可欠ですが、その基礎となる微生物のことを基盤微生物といいます。自然界に存在する有用な細菌の多くは、生産機能向上や機能改変のための遺伝子組換えが困難であるため、基盤微生物としては利用しづらい課題がありました。本研究グループは、バイオものづくりに有望な細菌として、多様な炭化水素を栄養素として利用でき、生産物質回収が容易な *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 に注目して研究を進めていますが、これも他の細菌と同様に遺伝子組換えが困難でした。

本研究では、Tol 5 株で遺伝子組換えを困難にしている要因が、外来 DNA に対する防御機構であることを解明しました。さらに、Tol 5 株の2つの制限酵素^{注3}の遺伝子を欠損させると、遺伝子組換え効率が劇的に向上することを明らかにしました。つまり、2つの制限酵素遺伝子を欠損した Tol 5 株は、遺伝子導入・組換え DNA 構築^{注4}・ゲノム編集技術の1つである塩基編集^{注5}が適用可能な遺伝子組換えしやすい細菌となりま

した。

遺伝子組換えしやすくなった Tol 5 株はバイオものづくりの基盤微生物としての活用が期待されます。加えて、制限酵素の遺伝子を欠損させると遺伝子組換えの効率が上がるという本研究における知見は、遺伝子組換え困難な微生物を遺伝子組換えしやすくするアプローチとして有効であり、未活用微生物への適用により、バイオものづくりの基盤微生物に多様性を与えることに役立つことが期待されます。

本研究成果は、2024年5月9日（米国東部時間）発行のアメリカ微生物学会科学誌「*Applied Environmental Microbiology*」に掲載されました。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

戦略的創造研究推進事業 個人型研究（さきがけ）

研究領域：「ゲノムスケールの DNA 設計・合成による細胞制御技術の創出」

（研究総括：塩見 春彦 慶應義塾大学 教授）

研究課題名：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

（グラント番号 JPMJPR20K2）

研究者：石川 聖人（長浜バイオ大学 准教授）

研究実施場所：名古屋大学・長浜バイオ大学

研究期間：令和2年11月～令和6年3月

<研究の背景と経緯>

バイオテクノロジーと情報科学の発展に伴い、遺伝子回路を設計し、目的の機能を有する細胞や生物を作り出す合成生物学^{注6}が注目されています。なかでも、微生物を利用して有用物質を生産するバイオものづくりは、持続可能な社会の実現に貢献する技術として研究開発が活発化しています。合成生物学分野においては遺伝子組換えしやすく扱いやすい特徴ゆえに大腸菌が基盤微生物として用いられてきました。しかし、医薬品や食品、化学品・素材・繊維・燃料など多様な産業への応用を見越し、大腸菌では生存できない多様な環境でも増殖でき、より複雑な化合物を生産できる基盤微生物が求められています。自然環境にはさまざまな物質変換能力を有し、かつ環境ストレスに強い細菌が存在します。このような細菌は、バイオものづくりにおける基盤微生物として魅力的ですが、遺伝子組換えしづらいものが多く、その研究開発には多大な時間が費やされています。

本研究で着目した *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 株は、自然環境から分離されたトルエン分解細菌であり、高い有機溶媒耐性・多様な物質変換能力・高い付着性と凝集性といったバイオものづくりに適した特徴を有しており、新たな基盤微生物として注目されています。しかし、他の環境細菌と同様に Tol 5 株の遺伝子組換えは容易でないため、その研究開発に多くの時間が費やされることが課題でした。

<研究の内容>

Tol 5 株の遺伝子組換えを困難にしている要因が、Tol 5 株の外来 DNA に対する防御機構であることを明らかにしました（図2）。そして、防御機構の1つである制限修飾系^{注7}を機能不全にするために、2つの制限酵素遺伝子を欠損させたところ、エレクトロポレーション^{注8}による DNA 導入効率が約 5.7 万倍向上しました（図3）。さらに、この制限修飾欠損株は、試験管内および細胞内での DNA アッセンブリ^{注9}にも適用することができました（図4）。

これは大腸菌で日常的に行われている組換え DNA の構築が、Tol 5 変異株でも実施できることを示しています。加えて、他の *Acinetobacter* 属細菌で開発された塩基編集ツールを搭載したプラスミド DNA^{注10}をエレクトロポレーションにより導入し、標的遺伝子の塩基配列を書き換えることができました。近年、遺伝子組換えやゲノム編集に利用するツールをプラスミド DNA として広く共有し（オープンソース化）、他の研究者が速やかに成果を活用できる体制が整っています。開発されたプラスミド DNA を改良することなく、そのまま利用できることは研究開発を迅速に進めるためには重要です。

自然環境中の細菌は、膨大な数のウイルス（バクテリオファージ）にさらされており、これら細菌は、バクテリオファージから送り込まれてくる DNA を排除することで感染を免れています。遺伝子組換えには、人工的に設計構築した組換え DNA を標的とする細菌に導入する必要がありますが、自然環境中から分離した細菌にとっては組換え DNA もバクテリオファージの DNA と同じ外来 DNA なので、同様の機構で排除してしまうことが考えられます。多くの環境分離細菌は遺伝子組換えが困難です。こういった細菌では、Tol 5 株と同様に外来 DNA に対する防御機構が組換え DNA の導入を阻むことで、遺伝子組換えが困難となっている可能性が示唆されます。

<今後の展開>

バイオものづくりの基盤微生物として有望な Tol 5 株の遺伝子組換えの効率が高まったことで、例えば、Tol 5 株の多様な炭水素代謝能力を活用し、未活用化合物を原料とした物質生産が可能になるなど、当該分野の研究が加速することが期待されます。

また、本研究では、外来 DNA に対する細菌の防御機構である制限修飾系を不活化することで、遺伝子組換えの効率を劇的に向上させました。制限修飾系は多くの細菌が有している防御機構であるため、本研究のアプローチを踏襲することにより、他の細菌でも同様の効果が得られると期待できます。多くの環境分離細菌の遺伝子組換えが容易となることで、バイオものづくりに用いる細菌のバリエーションが広がり、未利用原料の活用・生産物の多様化・生産効率の向上などが見込まれます。

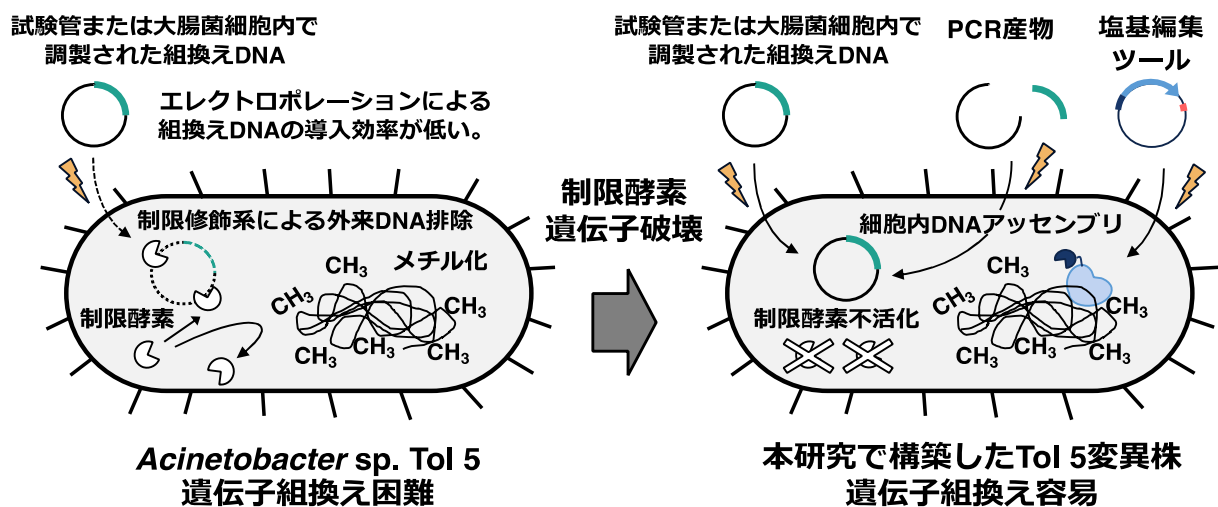


図1 本研究成果の概要

バイオものづくりの基盤微生物として有望な *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 株は、試験管内または大腸菌細胞内で調製された組換え DNA をエレクトロポレーションにより細胞内に導入する効率が低いことが問題となっていた。本研究では、外来 DNA の排除機構である制限修飾系が遺伝子導入の障壁となっていることを明らかにした。制限修飾系では、自身のゲノム DNA に施されているメチル化修飾パターンの異なる外来 DNA を制限酵素が分解する。試験管内や大腸菌細胞内で調製された組換え DNA のメチル化修飾パターンは、Tol 5 のゲノム DNA に施されているものと異なるため、内在性の制限酵素によって分解されてしまう。Tol 5 株の 2 つの制限酵素遺伝子を破壊すると、メチル化修飾パターンの異なる組換え DNA を効率的に導入できるようになった。さらに、PCR 産物を直接導入して細胞内で連結すること（細胞内 DNA アッセムブリ）や塩基修飾ツールの導入により標的遺伝子の配列を書き換えることに成功した。

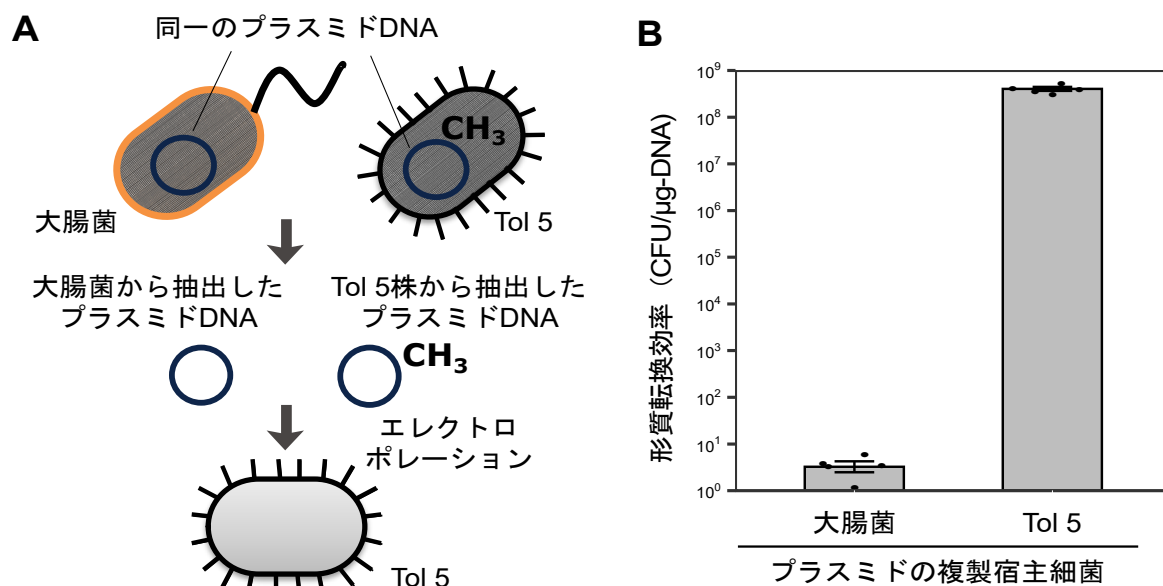


図2 Tol 5 株の外来 DNA に対する防御機構が遺伝子導入の効率に与える影響

A *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 株の有する外来 DNA 排除機構が、遺伝子組換えを困難にしていることを検証するために、同一プラスミド DNA を異なる宿主細菌から抽出し、それらをエレクトロポレーションにより Tol 5 株へ導入した。**B** 大腸菌から抽出したプラスミド DNA では Tol 5 株にほとんど遺伝子導入（形質転換）できなかったが、Tol 5 株から抽出したプラスミド DNA では約 1 億倍高い効率で形質転換することができた。加えて、Tol 5 株から抽出したプラスミド DNA には大腸菌とは異なるメチル化修飾パターンが施されていることが確認できた。これらの結果を併せて考えると、Tol 5 株はメチル化修飾のパターンの違いに基づいてプラスミド DNA を排除し、遺伝子組換えを妨げていることが明らかとなった。

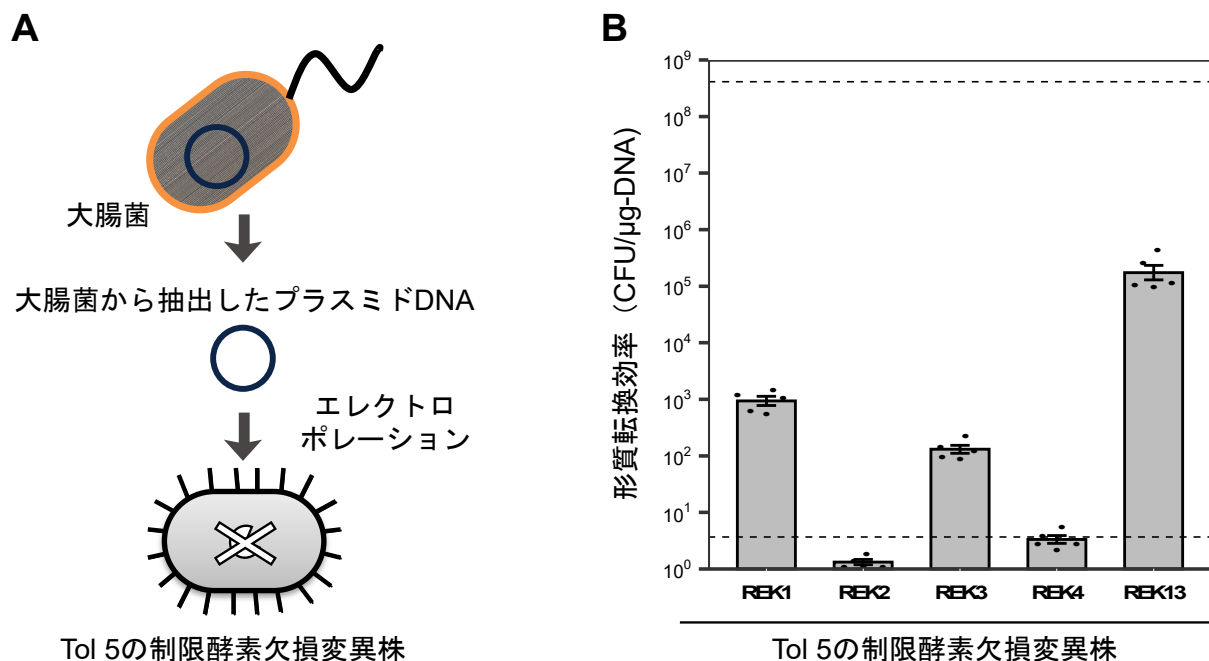


図3 制限酵素遺伝子の欠損が *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 の遺伝子導入に与える影響

A メチル化修飾パターンに基づく外来 DNA 防御機構として最もよく知られている制限修飾系の影響を調べるために、*Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 株の制限酵素欠損株に大腸菌から抽出したプラスミド DNA をエレクトロポレーションにより導入した。**B** REK1, REK2, REK3, REK4 と名付けた異なるタイプの制限酵素遺伝子欠損株に対して実施したところ、REK1 と REK3 の変異株では野生株よりも効率よく遺伝子導入（形質転換）できた（グラフ内の下の点線は野生株の形質転換効率を示す）。また、REK1 と REK3 変異株で欠損させた遺伝子を同時に欠損させた変異株である REK13 は野生株よりも約 5.7 万倍の効率で形質転換できるようになった。グラフ内の上の点線は Tol 5 株から抽出したプラスミド DNA を用いた際の形質転換効率を示す。

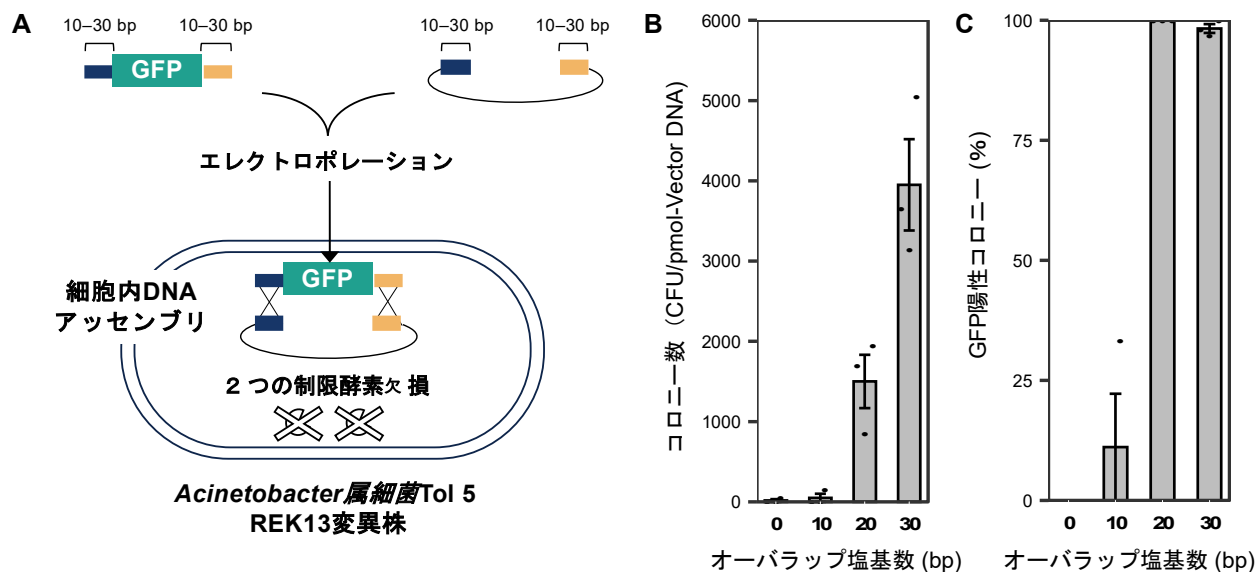


図4 制限酵素欠損変異株を用いた細胞内 DNA アッセンブリ

A *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 株の制限酵素欠損株 (REK13 変異株) を用いた細胞内 DNA アッセンブリの概要図。末端に 10-30 bp のオーバーラップを含む PCR 断片を直接エレクトロポレーションし、細胞内酵素の働きで DNA アッセンブリする。ベクター側の PCR 断片はゲンタマイシン耐性とアンピシリン耐性遺伝子を持ち、インサート側の PCR 断片は *gfp* 遺伝子 (GFP) を含んでいる。**B** エレクトロポレーション後、ゲンタマイシンおよびアンピシリンを添加した寒天培地に出現したコロニー数。**C** アンピシリンとゲンタマイシンを添加した LB 寒天培地上に出現したコロニーのうち、GFP の蛍光を発したコロニーの割合。これらの結果から、高価な試験管内 DNA アッセンブリ試薬を使用しなくても、REK13 変異株の細胞内で末端にオーバーラップを有する PCR 産物を連結できることが確認された。

<用語解説>

注1) *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5

堀教授がトルエン除去装置から分離した細菌。有機溶媒に高い耐性を持ち、多様な炭化水素を栄養素とすることができることに加え、高付着性・凝集性というバイオプロセスに有利な特徴を併せ持つ。

注2) バイオものづくり

微生物や動植物等の細胞を利用して、バイオマス資源や大気中の二酸化炭素を原料に、化学品や燃料、食品などを生産する取り組み。

注3) 制限酵素

DNA を特定の部分で切断する酵素。遺伝子工学では試験管内で DNA を切断する際に利用されるが、細菌細胞内では主にバクテリオファージ（細菌に感染するウイルスのこと）の感染を免れるために機能する。

注4) 組換え DNA 構築

異なる生物に由来する DNA や、人工的に合成した DNA を組み合わせて新しい遺伝子配列を持ったDNAを作る技術。プラスミドのような環状の組換えDNAは大腸菌を用いて構築し、増幅させることが一般的である。

注5) 塩基編集

ゲノム編集技術の1つであり、DNA の特定の1文字（塩基）を直接的に変更する。一般的なゲノム編集とは異なり、DNA の二重鎖切断を行わないことを特徴とする。

注6) 合成生物学

遺伝子や細胞レベルで生物を設計・構築・最適化し、新しい生物機能を作り出す研究分野。組換え DNA 構築を用いて生物機能を改変する遺伝子組換えは、合成生物学に欠かすことができない技術である。

注7) 制限修飾系

細菌がバクテリオファージからの感染を免れるために有しているシステム。このシステムは制限酵素とメチル化修飾酵素から成り立っている。制限酵素はバクテリオファージから送り込まれた DNA を特定の箇所で切断して感染を妨げる。一方、メチル化修飾酵素は細菌自身の DNA をメチル化して制限酵素による切断から保護する。

注8) エレクトロポレーション

細胞に電気パルスを加えることで、細胞に一時的な穴を開けて、DNA などの大きな分子を細胞内に導入する技術。遺伝子組換え困難な微生物に対してエレクトロポレーションでDNAを導入することは困難であり、Tol 5 株は接合伝達という時間のかかる方法でしか遺伝子導入することができなかった。

注9) DNA アッセンブリ

複数の DNA 断片を組み合わせて1つのDNAにする技術。DNA 連結酵素を用いた古典的な方法から、複数の酵素を組み合わせた方法、細胞内の酵素活性を利用して連結する方法などがある。

注10) プラスミド DNA

染色体とは独立した遺伝因子、遺伝子工学の必須ツール。

<論文タイトル>

“英語タイトル The elimination of two restriction enzyme genes allows for electroporation-based transformation and CRISPR-Cas9-based base-editing in the non-competent Gram-negative bacterium *Acinetobacter* sp. Tol 5.”

（日本語タイトル 2つの制限酵素遺伝子を除去することで、非コンピテントなグラム陰性細菌 *Acinetobacter* 属 Tol.5 のエレクトロポレーションによる形質転換と CRISPR-Cas9 に基づく塩基編集が可能となる）