

(様式第9 別紙2：公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 鈴木 伸昭 印/署名
2. 養成カリキュラム名：コリネ型細菌の染色体レベル遺伝子操作技術に関する研究
3. 養成カリキュラムの達成状況

本年度までに養成カリキュラムの課題を全てスケジュール通り、もしくは前倒しで消化している。例えば、コリネ型細菌の多数遺伝子削除の項目では、数十 kb のゲノム領域を 15 年度中に削除するという目標を大きく上回り、全ゲノム領域の 10% に相当する 330kb もの領域削除を終えた。そのほかの項目でも結果は順調に進行中で、NEDO フェロー最終年度の 16 年度もこの調子でカリキュラムの遅延なき消化を進める予定である。

4. 成果 (A 4 版 3 枚程度)

前年度、本研究開発業務の「高効率染色体レベル遺伝子操作技術の開発とその技術を利用した汎用ミニマムゲノム宿主細胞の創製」で、コリネ型細菌の基礎的知見、遺伝子組換え技術の習得を進めた。また、巨大目的ゲノム領域(多数遺伝子)を削除する「Target 多数遺伝子削除法」の開発に目処をつけた。

本年度は、前年度の成果を基にコリネ型細菌において、本研究開発業務の中で担当する国家プロジェクト「宿主細胞創製技術の開発：コリネ型細菌宿主細胞創製技術の研究開発とその応用」の主目的である「ミニマムゲノム創製」を目的とし、実際にコリネ型細菌で大規模遺伝子群削除をスタートさせた。削除反応系としては、前年度実施した中で非常に効率の良かった「Cre/loxP 組み換え反応」を利用したほか、新たに、メガヌクレアーゼ「I-SceI」および致死性遺伝子「*sacB*」を利用し、この両者を組み合わせることで、マーカー遺伝子をはじめとする異種 DNA 配列をゲノム中に残さない完全削除法を開発した。そして同法を用いてコリネ型細菌株 *C. glutamicum* R 株で生育に非必須と推定される部分の繰り返し削除を実施した。

以下に本年度実施した研究開発について詳細を記載する。

1) Cre/loxP システムを用いたターゲット多数遺伝子削除による大規模ゲノム改変

前年度の研究開発で比較ゲノム解析を実施し、*C. glutamicum* R 株ゲノムに生育に非必須と考えられる領域が多数、存在することを見出した。本年度はこれらの領域をさらに精査し分析することで、10kb 以上のサイズを持つ生育非必須と予測される領域計 11 個を抽出した。そこで、これらの領域を削除の第一ターゲットとして採用し、Cre/loxP システムによる方法で全領域削除に取り組んだ。なお、領域は約 10kb から 56kb までサイズは多岐にわたっていた。ゲノム中における抽出した領域を図 1-1 に示す。

また、この領域削除に必要なベクターを新たに設計し、分子生物学的手法を用いて構築した。前年度開発した方法では、loxP サイトをはじめとするゲノム改変に必要なツールを、相同性組換えによる 2 回交叉を利用した方法でゲノム中に導入したため、組換え体を取得するには抗生物質耐性を利用して候補株を選抜したのち、さらに 100-1000 株もの細胞をスクリーニングする必要があり、

効率が悪かった。この効率を上昇させるため、本年度、一回交叉のみでゲノム改変ツールが導入できる新規ベクターを作製した。

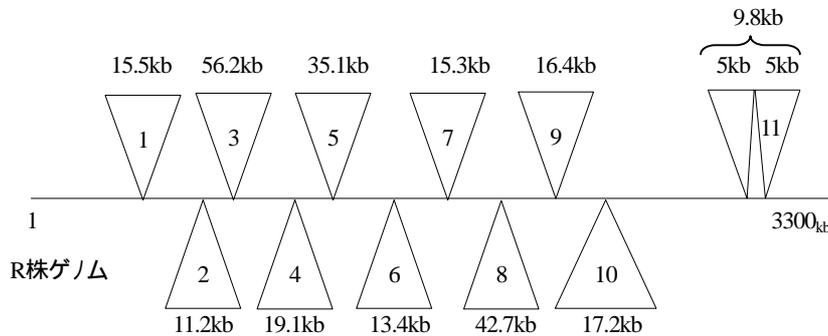


図1-1 比較ゲノム解析により見出した削除候補領域。サイズを合わせると計約250 kbになる。最大56 kb最小はNo11の5 kb。ただしNo11は約5 kbの領域がごく近傍に2箇所並んで存在したため、あわせて約10 kbとした。

ベクターの構造を図1-2に示す。GR1、2はそれぞれ、ベクターをゲノム中に組み込むために用いたDNA配列である。ターゲットとした削除領域の5、3隣接部分で適当な領域約1kbを抽出し、PCRにより増幅してベクターにつなげた。この部分によりベクターの全配列をゲノム中に一回交叉で組み込ませ、またベクターが所持する抗生物質耐性遺伝子を利用して削除対象領域の両端にloxPサイトが導入された細胞を選抜した。選抜した細胞はさらにpCRA405ベクターによって形質転換され、Creレコメナーゼが供給された。これにより、Cre//loxPシステムによる削除反応を行わせた。結果として、図1-1に記載した全ゲノム領域を削除し、トータルで計250 kbの領域をゲノム中より喪失させることに成功した。ゲノム解析で予想された推定生育非必須領域が、実際に生育に非必須であることを実験的に確認できたほか、コリネ型細菌ゲノムでこのようなサイズのゲノム領域を削除した例はこれまでに報告されていない。

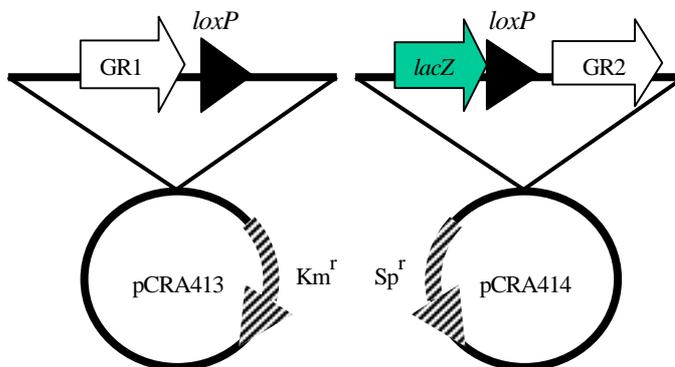


図1-2 削除用ベクターの構造。GR1,2によりベクター全体をゲノムに組み込む。組換え体の選抜はベクターに存在するカナマイシンおよびスペクチノマイシン耐性遺伝子を利用して行った。両ベクターを削除対象領域の両端に挿入したあと、Creレコメナーゼを供給することで削除反応を行わせた。

削除の成否は、削除によって対象ゲノム領域とともにベクター由来の抗生物質耐性遺伝子と lacZ 遺伝子が喪失されることを利用して確認した。また、それぞれの領域についてサイズは10 kb から56 kb まで多岐にわたるが、削除株が得られる効率はほとんど同じであった。これにより、Cre//loxP

システムがコリネ型細菌で非常に効率よく、また大規模ゲノム削除に極めて有効であることを実証できた。

次に、これに加えて削除領域のさらなる拡大を試みた。最大の削除対象領域(領域 3 (約 56 kb))について、さらにゲノムの下流方向に約 60 kb 延長し、計約 116 kb の削除実験を実施した。結果として 116 kb の領域は成功裏に削除され、Cre/*loxP* 法によりコリネ型細菌で 100 kb を超える巨大ゲノム領域を削除し、トータルで 320 kb (約 10 %) のゲノム領域を喪失させることに成功した。

2) 外来配列が残らない多数遺伝子削除法の改良と多重削除

前年度の研究開発では、メガヌクレアーゼと相同性組換えを利用することで外来配列を残さない大規模削除に成功したことを報告した。この手法は、削除対象領域の両端に相同性組換えを起こさせるために必要な配列の等しい部分を作製し、さらにその内側にメガヌクレアーゼ(制限酵素)による切断部位を導入する。次に細胞内でメガヌクレアーゼを発現させると導入した切断部位でゲノムが切断され通常、細胞は死に至る。しかし、一部の細胞では削除対象領域の両端に導入した配列の等しい部分により相同性組換えを生じ、メガヌクレアーゼの切断部位を含む削除対象領域を喪失することにより、メガヌクレアーゼの影響を受けなくなる。このような細胞はメガヌクレアーゼの発現下でも生存することができるため、これにより、削除対象領域を喪失した株を取得できるという原理である。

この手法には、DNA 配列等をうまくデザインすることでマーカを含む異種 DNA 配列が完全に削除できるなど、様々な利点がある。しかし、Cre/*loxP* システムを利用した方法等に比べて効率が低いこと、また、削除領域が巨大になるとさらに効率が低下し、削除株の取得が事実上難しくなるといった問題があった。

海外研究グループの報告でも、相同組換えを利用した方法では大腸菌で約 62 kb の領域削除株が得られる確率が 6-33 % とされている。前年度、コリネ型細菌に関して同様の反応系を試みた結果では、効率の点で大腸菌の報告と大差なくほぼ 100 % 近い割合で削除株が得られる Cre/*loxP* システムに比較して削除株取得の効率改善が必要と考えられた。そこで本年度、相同性組換えを利用した方法に Cre/*loxP* システム、*Bacillus subtilis* 由来の遺伝子でコリネ型細菌に誘導致死を起こすことができる遺伝子「*sacB*」を組み合わせ、大規模ゲノム領域を効率的にかつマーカレスに多重削除する手法の確立に取り組んだ。

用いたベクターを図 1-3 に記載する。新規開発ベクター pCRA415、pCRA416 は、Cre/*loxP* システムによる削除で本年度開発したベクターをベースに構築した。ゲノムに組み込むためのサイト (GR1, GR2) に加えて、相同性組換えを起こすため GR2 サイトを両方のベクターに導入している。このほか、ゲノム削除に用いる *loxP* サイト、I-*SceI* メガヌクレアーゼの認識サイト、また、シュークロース存在下でコリネ型細菌を死に至らしめる *sacB* 遺伝子、選抜を容易にするための β -ガラクトシターゼ遺伝子をそれぞれ導入した。

これらのベクターをコリネ型細菌に導入し、ゲノム改変サイトを目的削除領域の両端に導入したのち、Cre レコンビナーゼ、I-*SceI* メガヌクレアーゼの共発現ベクターを導入することで削除反応を行わせた。その後、さらに細胞をシュークロース培地上で培養することで *sacB* 遺伝子による誘導致死を生じさせ、*sacB* 遺伝子を喪失した株のみが得られるよう選択圧をかけた。結果として削除対象領域を喪失した多数の株を取得することに成功した。

このシステムでは、まず Cre による削除で削除対象領域のサイズを大幅に減少させる。続いて I-*SceI* によるゲノム切断と *sacB* 遺伝子による誘導致死を同時に生じさせることで、相同性組換えにより削除対象領域を喪失した株のみが高効率で取得できると考えられる。

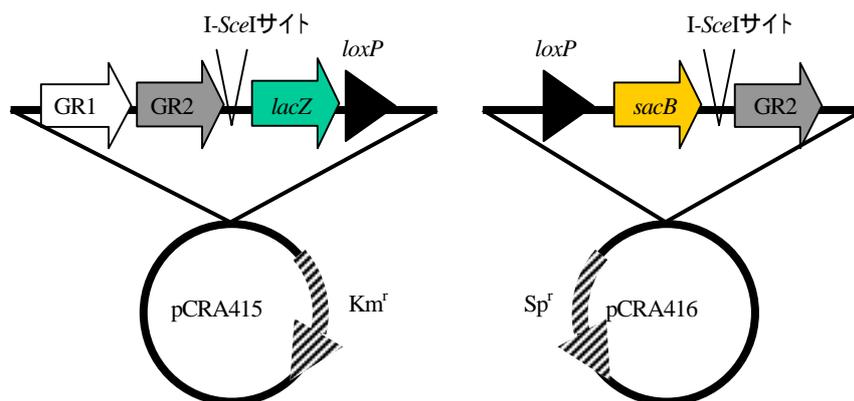
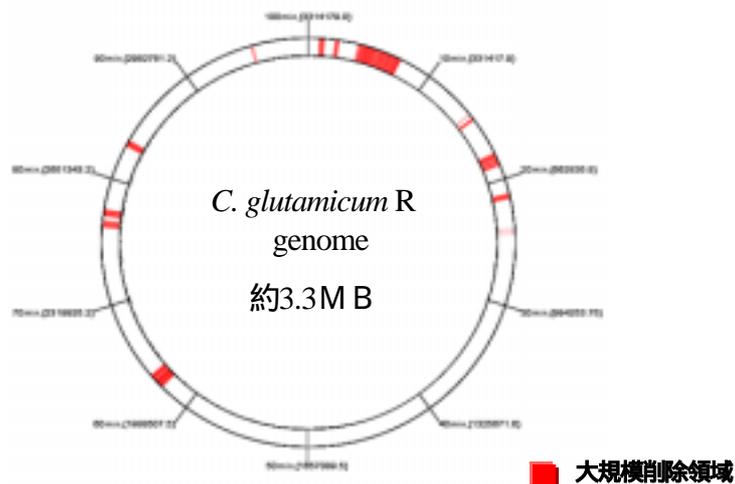


図 1-3 多重削除用ベクターの構造。pCRA415 は GR1 領域で、pCRA416 は GR2 領域でゲノムに組み込まれた。

本年度、この手法を用いることで、異種 DNA 配列を残さずゲノムを大規模に削除することに成功した。現在、同手法によるコリネ型細菌ゲノムの繰り返し削除を進めており、既に図 1-1 に示す領域のうち、1、8、11 の 3 箇所について既に多重削除することを終えた。このように任意のゲノム領域を繰り返し削除する手法確立に目処をつけた。また、これらの実験では、固体培地上に出現した株のうち 50-80 % で完全削除株を取得することができるなど、効率の点でも大きく改善することができた。

最後に本年度の成果として、ゲノム中から削除した領域を下図に示す。赤で示した部分が削除に成功した領域である。



5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。コピーを添付。)

鈴木伸昭、湯川英明、「コリネ型細菌の新規工業的利用 Cell Factory 創生への挑戦」、Bio ベンチャー、2004, vol4, No2

(2) 口頭発表 (発表済を対象。予稿集のコピーを添付。)

- 「多重削除が可能なコリネ型細菌新規大規模ゲノム削除法の開発」日本農芸化学会、2004年3月30日、広島県東広島市、日本農芸化学会大会講演要旨集 p139
- 「Cre/loxP システムを用いたコリネ型細菌における大規模削除」日本農芸化学会、2004年3月30日、東広島市、日本農芸化学会大会講演要旨集 p139
- 「IS 因子を利用したコリネ型細菌の多数遺伝子削除株の解析」日本農芸化学会、2004年3月30日、東広島市、日本農芸化学会大会講演要旨集 p139
- 「コリネ型細菌における大規模ゲノム削除法の開発」日本分子生物学会、2003年12月、神戸市、日本分子生物学会講演要旨集 p.779
- 「コリネ型細菌における IS 因子を利用したランダムゲノム削除法の開発」日本分子生物学会、2003年12月、神戸市、日本分子生物学会講演要旨集 p.779
- 「Cre/loxP 系を用いたコリネ型細菌における大規模ゲノム削除」日本生物工学会、2003年9月、熊本市、日本生物工学会講演要旨集 p.126
- 「コリネ型細菌における新規転移因子の機能解析」日本生物工学会、2003年9月、熊本市、日本生物工学会講演要旨集 p.126

(3) 特許等

1 件