

細胞融合と CRISPR/Cas9 を用いた大規模異種間ゲノム組換え法の開発

前田 智也

理化学研究所 生命機能科学研究センター

(現所属：北海道大学大学院 農学研究院)

研究成果： コリネ型細菌のゲノム上に大腸菌のシングルコピープラスミドの配列を挿入した株を構築し、これを大腸菌とプロトプラスト融合させたところ、大腸菌にコリネ型細菌の全ゲノムの導入に成功した。一方、得られた融合株においてコリネ型細菌ゲノムの複製が不安定であり、短期間で消滅してしまうことが明らかになったため、引き続き、異種ゲノムの安定維持と、導入した異種ゲノムとの間で部位特異的組換えを生じさせる方法の開発を行っていく。

研究の目的

本研究では、細胞融合とゲノム編集法を組み合わせることで、異種細菌間で大規模なゲノム組換えを生じさせる新しいゲノム編集法を開発することを目的としている。有用微生物の育種には、宿主には無い性質を付与するために、外来遺伝子情報を大規模に導入し、それを発現させることが重要である。しかし、ゲノムスケールで宿主に異種ゲノムを組換える技術は、現時点では枯草菌や酵母といった特殊な宿主に限定されている。そこで本研究では、大腸菌やコリネ型細菌等、発酵産業等で一般的に用いられている宿主において大規模に異種ゲノムを組換える方法の開発を目指した。

方法

研究方法① プロトプラスト融合を用いた異種細菌の融合方法

プロトプラスト融合とは、細胞壁を除去し、溶菌しないように高浸透圧条件下で維持した細胞（プロトプラスト）を融合促進剤であるポリエチレングリコール存在下で融合させる方法である[1]。本研究では、大腸菌とアミノ酸生産菌であるコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* を親株として、異種間細胞融合をプロトプラスト融合により行った。これは細胞壁をリゾチーム等で除去し、溶菌しないように 0.5M Sucrose を含む高浸透圧緩衝液中で維持した細胞（プロトプラスト）を融合促進剤であるポリエチレングリコール存在下で融合させる方法である。大腸菌は 30mg/ml のリゾチームで処理した後、500 µg/ml のアンピシリン含有 GP 培地で培養してプロトプラスト化した。一方、コリネ型細菌はペプチドグリカン層の外側に脂肪酸であるミコール酸から構成される分厚い外壁を備えており、大腸菌と同様の方法ではプロトプラスト化しなかった。そこで、コリネ型細菌を BHI 培地で培養した後、BHI/MSM buffer (20 mM MgCl₂、0.5 M Sucrose、20 mM マレイン酸、pH 7) に D-シクロセリン

を 400 µg/ml 添加した 2%寒天培地に約 10^9 細胞を塗布して約 5 日間培養して、L-form と呼ばれる突然変異体を取得した。L-form はプロトプラスト同様に細胞壁を持たないため、高浸透圧条件でのみ維持可能な細胞であるが、プロトプラストと異なり増殖が可能である。こうして作成した大腸菌のプロトプラストと、コリネ型細菌 L-form を 40%の PEG6000 buffer (40% PEG6000, 20 mM MgCl₂, 0.5 M Sucrose, 20 mM マレイン酸, 10 mM CaCl₂, 5% DMSO, pH7) に懸濁し、室温で 5 分インキュベートすることで異種細菌間細胞融合を行った。プラスト再生は、GP 培地に 1% BSA を添加した培地を用いて 30°C で 50 r/min、2 日間の培養を行った。

研究方法② 細胞融合時における CRISPR/Cas9 による大規模異種ゲノムの組換え

大腸菌の親株ゲノムに、組換え部位のホモロジーアームを挿入するために、コリネ型細菌のゲノム由来の配列 (約 1 kbp) を 2 か所に予め挿入した株を作成した。続いて、この株に、コリネ型細菌ゲノムにおける組換え領域 (約 100 kbp) を切り出すための 2 種類の gRNA 遺伝子をホモロジーアーム上流部分に挿入した株 ECHG2 株を作成した。また、CRISPR/Cas9 と λRED を発現させるためのプラスミド pRedCas9DG を構築し、CPGET1 株に形質転換した。一方、コリネ型細菌ゲノムにおける大腸菌に挿入したホモロジーアーム部分の内側領域に、クロラムフェニコール耐性遺伝子を挿入した *cgLLR::cat* 株を作成した。この大腸菌 CPGET1/pRedCas9DG 株とコリネ型細菌 C 株を方法①のプロトプラスト融合条件において異種間プロトプラスト融合を行い、その間に gRNA と CRISPR/Cas9 及び λRED を発現させることで、100 kbp の異種間ゲノム組換えが生じるか調べた。

結果

大腸菌 ECHG2/pRedCas9DG 株とコリネ型細菌 *cgLLR::cat* 株の L-form をプロトプラスト融合させたが、大腸菌ゲノムにコリネ型細菌ゲノム由来の配列約 100 kb が部位特異的に組換えられた株を取得することはできなかった。一方、構築した pRedCas9DG プラスミドにおいて CRISPR/Cas9 及び λRED の発現等は、大腸菌においてマーカーレス破壊株の作成や、外来遺伝子導入ができることを確認できた。このことから、異種ゲノムが共存している時間を延ばす事で、異種細菌間で大規模なゲノム組換えを生じさせることが可能になるのではないかと考えた。そこで、大腸菌にコリネ型細菌ゲノムを導入し、1 つの細胞内に 2 種類のゲノムが共存している状態を維持させるために、コリネ型細菌ゲノム上に大腸菌 *miniF* 由来のシングルコピープラスミド (pBeloBACK) 配列と EGFP 遺伝子を、エレクトロポレーション法により挿入した株を構築した。この組換え株と大腸菌 DH5α 株に *mCherry* 遺伝子を挿入した株を PEG 存在下でプロトプラスト融合させた。プロトプラスト再生する際に、コリネ型細菌ゲノムが導入された大腸菌株のみを選択する条件で培養した (コリネ型細菌に導入した pBeloBACK 由来のカナマイシン耐性と、コリネ型細菌の増殖を阻

止するための栄養要求性及び薬剤感受性を利用)。これにより生じたシングルコロニーを再度分離し、蛍光顕微鏡と PCR によるコリネ型細菌ゲノム導入の確認を行った。得られた融合株では、それぞれの親株が保有していた 2 種類の蛍光遺伝子の両方が発現していることが確認された。また、PCR 法による確認実験の結果、得られた融合株では両方の親株がゲノム上にコードされている遺伝子 (*mreB* と *leuA*) の両方を保有していることが確認された。一方、得られた融合株は継代培養を 3 回以上繰り返すとコリネ型細菌ゲノムが消失してしまう現象が観察された。

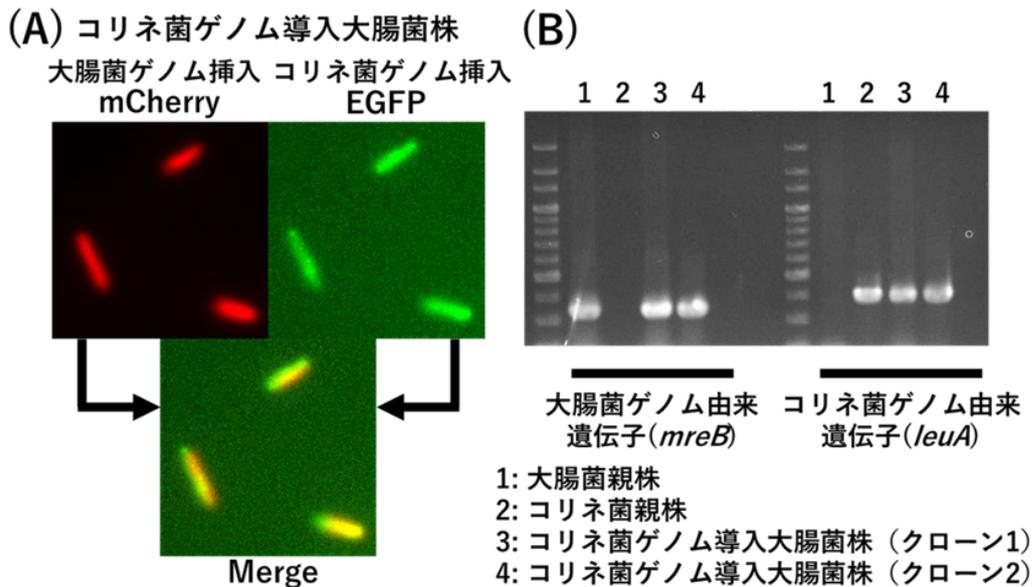


図 1. コリネ型細菌ゲノム導入大腸菌株の確認実験。(A) コリネ型細菌と大腸菌の融合株における蛍光顕微鏡観察結果。(B) PCR 法による確認実験の結果。

結論

プロトプラスト融合と、大腸菌のシングルコピープラスミド由来の配列を用いて異種細菌ゲノムの全長を導入できることが示唆された。今後の課題として、異種細菌ゲノムを安定的に維持させる技術を開発することで、異種細菌ゲノムを宿主細菌に導入し、機能させることで新しい有用形質を獲得する有用微生物の育種技術などへの応用が可能になると期待される。

文献

- 1) Hopwood, D.A. (1981) Genetic studies with bacterial protoplasts. *Annu Rev Microbiol.* **35**: 237–272.