

納豆菌類の遺伝育種に役立つ効率的ゲノム編集
ツールの構築

東京農業大学 生命科学部 バイオサイエンス学科

朝井 計

納豆生産菌の納豆菌は、食べられる細菌として、ヨーグルト生産菌の乳酸菌とともに安全性が認知されている (Generally Recognized as Safe)。乳酸菌はそれ自体が腸内細菌として健康に役立つ面が強調されているが、納豆菌は、納豆菌が発酵過程によって生じる産物の健康面での有用性が重視され、腸内での機能はあまり注目されていない。耐久性の芽胞を形成する納豆菌は、胃の強酸性環境を通過して生存したまま腸に届くことが可能であり、これは乳酸菌にはない大きな利点である。従って、納豆菌の有用物質生産能の向上だけでなく、納豆菌そのものを有用腸内細菌として解析・育種するための、高効率な実験系が望まれるが、適切なシステムはまだない。

有用納豆菌の開発において、スクリーニングや突然変異に依存した有用菌の探索・育種には限界があり、また、遺伝子組換えは社会に受け入れられていない。近年、ゲノム編集技術によって、異種 DNA の残留や標的以外の変異の有無を確認することが前提となるが、栄養価を高めた野菜の販売が認められてきている。消費者の健康に役立つという点で、ゲノム編集技術により改良された食品は、野菜などの植物だけでなく、微生物を含む発酵製品にまで、将来的に認知の範囲が広がる可能性は大きい。

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は納豆菌の亜種で、実験室株の枯草菌 168 株は自然形質転換効率が非常に高い、モデル細菌として位置づけられ、大腸菌同様に、遺伝子組み換え系やツールが充実している。納豆菌由来の pLS20 は枯草菌から他の *Bacillus* 属細菌間に転移する接合伝達プラスミドである。また、*Staphylococcus aureus* 由来のプラスミド pUB110 は pLS20 をヘルパーとして、枯草菌から他の *Bacillus* 属細菌間に転移する mobilizable plasmid である。従って、枯草菌で必要な遺伝子断片を調整し、それを納豆菌へ接合伝達で導入するというスキームを考案した。そこでまず、pUB110 を元にして、枯草菌から納豆菌やその他の *Bacillus* 属細菌へ接合伝達により移送可能で、ゲノム編集や遺伝子組換えを誘発する、大腸菌—枯草菌のシャトルベクターの作製し、その有効性を評価したので、ここに報告する。

実験方法

1. ゲノム編集 CRISPR/Cas9 の利用 (図 1)

CRISPR/Cas9 システムは、あらゆる生物種で、ゲノム DNA・遺伝子を高い精度でノックイン・ノックアウト等の変更が可能な、ゲノム編集と呼ばれる技術である。遺伝子組換え操作が簡便な細菌においても、特に外来 DNA 配列を宿主ゲノム DNA に残さず塩基配列を改変する際に、大変有効である。この系では、PAM 配列を含むガイド RNA (sgRNA) と Cas タンパク質 (Cas9)、及びそれらによって生じる標的部位の二

重鎖切断を修復することで欠失変異・塩基置換変異を導入するための鋳型 DNA 断片が必要である。また、Cas9 タンパク質は DNA ヌクレアーゼであり、発現が細胞に害を及ぼすことが十分考えられるため、ゲノム編集を誘発する際にのみ発現できるように、誘導物質添加によって *cas9* 遺伝子の転写が誘導されるように、マンノースにより誘導されるプ

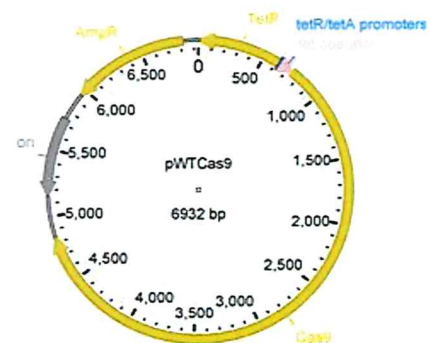


図 1 pWTCas9 のマップ

ロモーター (PmanP) を利用した⁽¹⁾。この誘導は枯草菌や納豆菌のゲノムにコードされている ManR 転写因子に依存しているため、大腸菌内ではおこらない。

2. 接合伝達の利用

接合伝達とは、細菌が細胞と細胞を物理的に連結(接合)し、プラスミド DNA 等を相互にやり取りする、細菌にとって普遍的な現象である。分類上同種・同属細菌同士の接合伝達は言うに及ばず、属を超えた接合伝達も知られている。このような広範囲にわたる普遍的な接合伝達の機構が完全に解明されているわけではないが、いくつかの細菌種で、細菌間伝達可能な接合伝達プラスミドが解析されている。

納豆菌のプラスミド pLS20 は納豆菌と同属のバチルス属細菌間で、接合伝達によって移動可能であることが古くから知られている⁽²⁾。

3. Mobilizable plasmid の利用

Mobilizable plasmid とは、単独では接合伝達できないが、pLS20等の接合伝達プラスミドの助けを借りて(helper plasmid という)、移送可能な、最少の因子(oriT と *mov*)だけを有するプラスミドである。一般的に接合伝達プラスミドは、細菌同士の連結に必要なタンパク質などの遺伝子に加え、機能未知の遺伝子を数多く有しており、数百塩基対を超えるプラスミドである。このような大きなプラスミドの分子生物学的な扱いは難しい。一方、Mobilizable plasmid は移動に必要な因子が既知で、かつ少数なので、ゲノム編集に必要な DNA 配列を構築することが容易である。黄色ブドウ球菌由来のプラスミド pUB110(図2)は pLS20 を helper plasmid とする、Mobilizable plasmid であり、pLS20 同様バチルス属間で移動可能であることが知られている⁽²⁾。pUB110 には病原性はない。

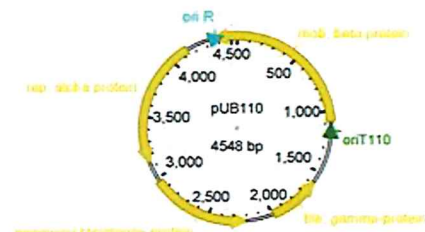


図2 pUB110 のマップ

4. 接合伝達

抗生物質を添加した寒天プレートに、ドナーの枯草菌、レシピエントの枯草菌あるいは納豆菌を前培養した。L字管に LB 培地 5ml を入れ、そこにドナー、レシピエントをそれぞれ OD600 が 0.01 になるように植菌し、37°C で 15~17h 浸透培養した。滅菌しておいた三角フラスコに LB 培地 20 ml を入れ、37°C に温める。そこに前述の振盪培養したドナー、レシピエントの培養液を 1 ml ずつと自然形質転換を防ぐ為に 3.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNaseI を添加し、更に 37°C 125 rpm で 2h 振盪培養した。1.5 ml マイクロチューブにドナーとレシピエント培養液を 150 μl ずつ加え混合し、37°C で 15 分静置培養した。培養液を、レシピエント、ドナー、および、トランシピエントを選択するために、適宜抗生物質を添加した寒天プレートに適宜希釈し、100 μl ずつプレーティングし、37°C で一晚培養し、翌日コロニーカウントを行った。

実験結果

1. Mobilizable plasmid である pCJCSS 及び pCJS の作製

野生型の Cas9 をコードする遺伝子を有する、大腸菌内で複製可能な ColE1 型の複製領域をもつプラスミドである pWTCas9⁽³⁾ (図1) について、以下の改変を施した。cas9 遺伝子内にある汎用制限酵素 BamHI、EcoRI、SacI の認識部位を、アミノ酸を変えることなく、部位特異的塩基置換によって、認識できない配列に変化させた。大腸菌細胞内で選択可能なアンピシリン耐性遺伝子を、大腸菌、枯草菌の両者で選択可能な、各種抗生物質 (スペクチノマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン) 耐性遺伝子に置換した。cas9 遺伝子はテトラサイクリンで誘導可能な制御系で転写誘導されるように構築されていたが、これをマンノースプロモーターに置き換えた。sgRNA をクローニングするための BamHI/EcoRI 部位と鋳型 DNA 断片をクローニングするための NotI 部位をマンノースプロモーターの上流に導入した。NotI 部位には、クローニングの可否を選択できるように RFP (赤色蛍光タンパク質) をコードする遺伝子を導入した。

枯草菌細胞内での複製に必要な複製領域及び接合伝達に必要な oriT110 と mob を有するプラスミド pUB110 (図2) について以下の改変を施した。納豆菌細胞内から導入したプラスミドを排除するために、pUB110 の納豆菌内での複製に必要な Rep タンパク質に温度感受性変異を導入した。

改変した pWTCas9 及び pUB110 プラスミドを融合し、pCJCSS (スペクチノマイシン耐性) (図3)、pCJCSH (ハイグロマイシン耐性)、pCJCSK (カナマイシン耐性) をそれぞれ構築した。また、プラスミドの接合伝達による移送と、遺伝子組み換えを簡便に実施するために、マンノースプロモーターと cas9 遺伝子を欠失させたプラスミド、pCJS (図4)、pCJH、pCJK を作製した。



図3 pCJCSS のマップ

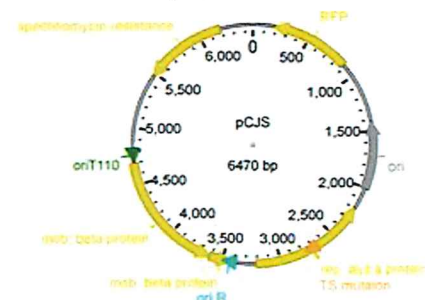


図4 pCJS のマップ

2. 作製したプラスミドの接合伝達の確認

作製したプラスミド pCJCS が pLS20 を helper plasmid として、接合伝達によって移送可能かどうかを試験した。pLS20 を有する枯草菌株に、形質転換法により、pUB110、pCJCSS、pCJCSK をそれぞれ導入した菌株をドナーとし、テトラサイクリン耐性の枯草菌株をレシピエントとして、接合伝達をおこなった (図5)。その結果、pLS20 そのものの移送に加えて、オリジナルの pUB110 だけでなく、今回作製した pCJCSS、pCJCDK の移送も確認された。また、pCJCSS、pCJCDK の選択抗生物質存在下で、54℃での温度感受性も確認した。



図5 接合伝達確認

3. pCJCSH を用いた枯草菌ゲノムへの点変異の導入

枯草菌の翻訳の必須遺伝子 *prfB* には増殖の温度感受性点変異(*prfB45*)が知られている⁽⁴⁾。そこで、pCJCSH に *prfB45* 付近を認識する sgRNA と、点変異を導入した鋳型 DNA を大腸菌を用いてクローニングした(pCJCSH45)。pCJCSH45 を用いて枯草菌 168 株を形質転換した。その際選択培地にはプラスミドの導入選別の 150 μ g/ml ハイグロマイシンに加えて、Cas9 を誘導するために、1% マンノースを添加した。得られたコロニーの 4 つを 2 枚の添加無しの LB 寒天培地にストリークし、それぞれ 30°C (図6左)、52°C (図6右)で一晩培養した結果、2 クローンが、温度感受性を示した。温度感受性を示したクローンについて、ハイグロマイシン感受性と、シーケンシングにより *prfB* 遺伝子内に *prfB45* 変異が導入されていることを確認した。



図6 ゲノムへの点変異導入の確認

4. 枯草菌からモデル納豆菌への接合伝達によるプラスミド移送の確認

枯草菌から枯草菌への pLS20 の移送効率は 0.2% (トランシピエント細胞数/レシピエント細胞数 $\times 100$) 程度だが、枯草菌からゲノム配列が公開されているモデル納豆菌 (NEST105) への pLS20 の移送効率は極めて低かった(図7)。さらに、pLS20 を helper plasmid として、pCJH の移送効率を検討した(図8左)。その結果、トランシピエントの出現は確認できなかった。

ここまでは、培養したドナー細胞とレシピエント細胞を混合した後、トランシピエントを選択する際に、抗生物質耐性を指標として LB 培地を用いた。ドナーに用いている枯草菌 168 株はトリプトファン要求性である。使用した納豆菌はビオチン要求性ではあるが、トリプトファン非要求性であり、両者はトリプトファンの添加・非添加によって最少培地で選択可能であった。そこで、トランシピエントを選択する際に、トリプトファン要求性を指標として最少培地を用いて、同様の実験を行った。その結果、pLS20 の移送は相変わらず低頻度だったが、pCJH の移送が約 6% の効率で観察された(図8右)。

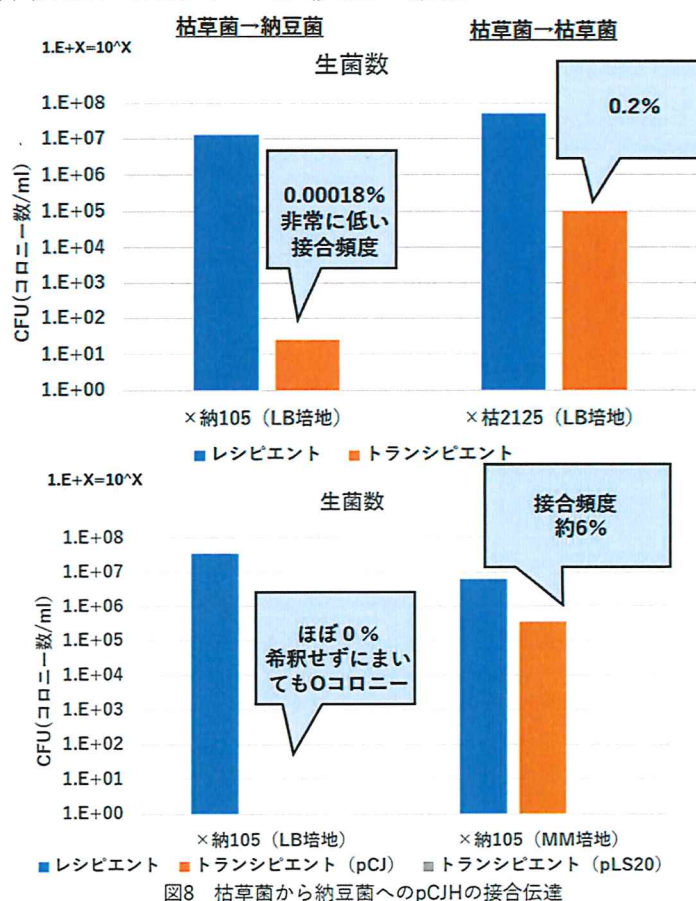


図8 枯草菌から納豆菌へのpCJHの接合伝達

5. 枯草菌から市販の納豆菌への接合伝達によるプラスミド移送の確認

本研究の目的は納豆菌の育種がメインテーマであるので、前述のプラスミド移送が市

販の納豆由来の納豆菌でも観察されるかを検討した。異なる納豆販売会社(M社、Y社、T社とした)の納豆中の大豆をサンプルチューブ中で滅菌水に懸濁し、80℃で10分間加温し、納豆菌の孢子を選別し、それぞれの納豆からの納豆菌を得た。

各社の納豆菌レシピエントとし、pLS20を有する枯草菌168株をドナーとして前述の方法で、pCJHの接合伝達による移送の確認を行った。その際にはトランシピエントの選択には最少培地を用いた。

その結果、3者とも高効率でpCJHの移送が観察されたとともに、pLS20の移送も、pCJHよりは低頻度だが、観察された(図9)。

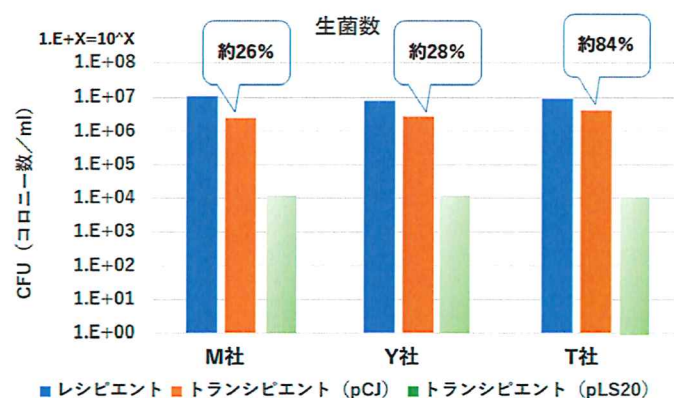


図9 枯草菌から市販の納豆菌へのpCJHの接合伝達

考察

接合伝達プラスミド pLS20 を helper plasmid として、pUB110 の oriT と mov だけを移植することで、その DNA を接合伝達で移送することが可能だった。枯草菌でも sgRNA-Cas9 タンパク質を用いたゲノム編集により、高効率でゲノムに点変異を導入することが可能であった。枯草菌から納豆菌への接合伝達は、ドナーとレシピエントを混合したものから、トランシピエントを選択する際に、LB 培地で選択するよりも、最少培地で選択した場合、顕著に頻度が上昇した。枯草菌から納豆菌への接合伝達の頻度を減少させる要因として、以下の2つが考えられる。1) 納豆菌は pLS20 あるいは類似のプラスミドを保有しているので、pLS20 を介した二重の接合伝達を妨げる免疫機構があり、そのため効率が低下する⁽⁵⁾。2) 納豆菌には枯草菌と異なる制限修飾系があり、そのため枯草菌から移送された DNA が納豆菌の制限酵素により切断されるため効率が低下する⁽⁶⁾。実際、pLS20 の枯草菌から納豆菌への移送頻度は pCJH より低いのは、DNA のサイズ(前者は約 65kbp、後者は約 6kbp)の違い、すなわち、サイズが小さい方が制限を受けにくいことに起因することが考えられる。最少培地で選択することで移送頻度が劇的に上昇した原因は現在不明だが、最少培地では pLS20 の 2 重移送を防ぐ排除システムが働かない、あるいは、レシピエントの制限酵素の発現を抑制していることなどが考えられる。

要約

枯草菌(*Bacillus subtilis*)に代表される *Bacillus* 属細菌は、発酵食品(納豆菌)や生物農薬として利用される有用細菌を数多く含むが、実験室株の枯草菌 168 株のように自然形質転換効率が高いものは多くない。納豆菌由来の pLS20 は枯草菌から他の *Bacillus* 属細菌間に転移する接合伝達プラスミドである。また、*Staphylococcus aureus* 由来のプラスミド pUB110 は pLS20 をヘルパーとして、枯草菌から他の *Bacillus* 属細菌間に転移する mobilizable plasmid である。そこで、pUB110 を元にして、枯草菌から納

豆菌へ接合伝達により移送可能で、納豆菌にゲノム編集や遺伝子組換えを誘発する、大腸菌—枯草菌のシャトルベクターの作製を行った。

大腸菌細胞内での複製に必要な ColE1 型の複製領域、枯草菌細胞内での複製に必要な pUB110 の複製領域及び接合伝達に必要な oriT110 と *mob*、大腸菌—枯草菌間で有効な抗生物質耐性遺伝子、外来 DNA のノックインのためのドナーDNA と sgRNA のクローニング部位、及び *cas9* 遺伝子を有する pCJCS 系列のプラスミドと *cas9* を欠失させた pCJ を作製した。pCJCS を用いた形質転換とゲノム編集で枯草菌に温度感受性点変異が導入できた。枯草菌から納豆菌への pCJ の接合移送をトランスピエント(接合伝達体)を最少培地で選択することで、高頻度で実現する系を構築した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり研究助成を賜りました、公益財団法人タカノ農芸化学研究財団に心より感謝申し上げます。本研究で使用した、枯草菌株、モデル納豆菌株を分与していただき、技術協力・ご助言を頂きました、東京農業大学客員教授・信州大学客員教授 板谷光泰に厚く御礼申し上げます。実験を精力的に手伝っていただいた、研究室の学生、須田和奏さん、千田桃子さんに深く感謝します。

文献

- (1) Sun T. and Altenbuchner J. (2010) Characterization of a mannose utilization system in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 192(8):2128–2139.
- (2) Koehler T.M. and Thorne C.B. (1987) *Bacillus subtilis* (natto) plasmid pLS20 mediates interspecies plasmid transfer. J. Bacteriol. 169(11):5271–5278.
- (3) Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., and Lim W.A. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell. 152(5):1173–1183.
- (4) Asai K., Inaoka T., Nanamiya H., Sadaie Y., Ochi K., and Kawamura F. (2007) Isolation and characterization of sporulation–initiation mutation in the *Bacillus subtilis* *prfB* gene. Biosci. Biotechnol. Biochem. 71(2):397–406.
- (5) Gago-Córdoba C., Val-Calvo J., Miguel-Arribas A., Serrano E., Singh P.K., Abia D., Wu L.J., and Meijer W.J.J. (2019) Surface Exclusion Revisited: Function Related to Differential Expression of the Surface Exclusion System of *Bacillus subtilis* Plasmid pLS20. Front. Microbiol. 10:1502.
- (6) Itaya M., Nagasaki M., Shimada T., Ohtani N., Shiwa Y., Yoshikawa H., Kaneko S., Tomita M., and Sato M. (2019) Stable and efficient delivery of DNA to *Bacillus subtilis* (natto) using pLS20 conjugational transfer plasmids. FEMS Microbiol. Lett. 366(4):fnz032.