

研究終了報告書

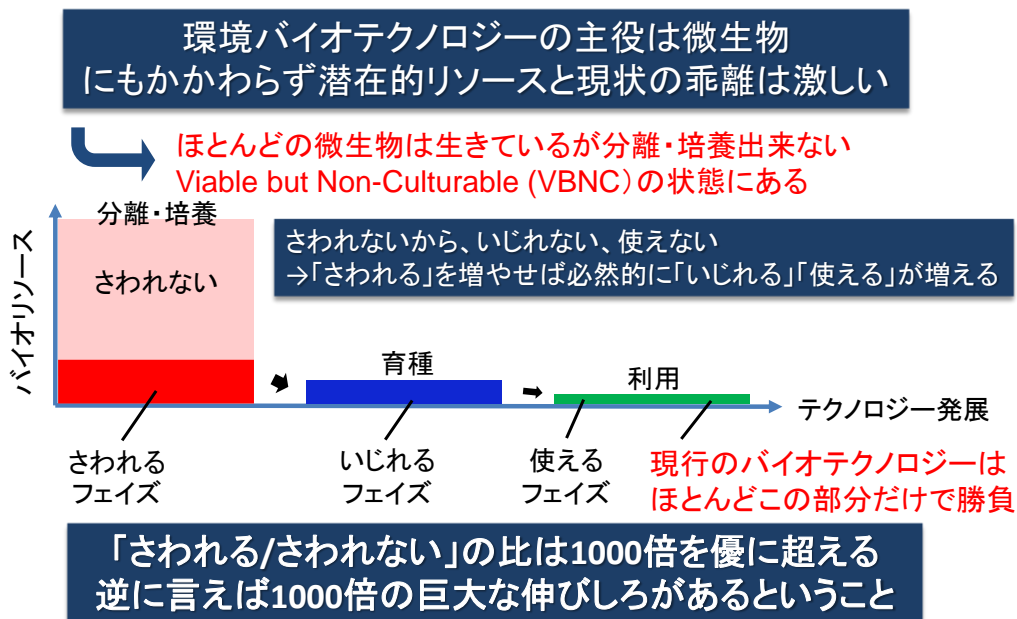
「遺伝子を釣り針に任意環境微生物を特異的に獲得する」

研究期間： 2020年12月～2023年3月

研究者： 木村善一郎

1. 研究のねらい

微生物生態系はあらゆる生命圏において連続的に存在する地球上もっとも大規模かつ普遍的な生態系である。多くの微生物生態系は個体数比 99% を占める少数の優占種；既知記載種（さわれる微生物）と、各々の個体数比 0.1% 以下ながら圧倒的多種類の未記載種（さわれない微生物）で構成されている。少数の優占種がバイオマスとして大量に存在する一方でバイオマスとしては優占種よりもはるかに劣る存在比率ながら、未分離希少種の系統的多様性は優占種の 5000 倍を超える、すなわち 99.98% が未記載種であり、生物種ベースで捉えた場合、未記載という事象にはほとんどのケースにおいて単純に生態系内において希少であるという要因が関与している。逆に「希少であるゆえにさわれない」という事象を解決できるならば、ほとんどが「さわれない」という微生物生態系が抱えるギャップを大きく埋めることにつながる。



微生物生態系内の未記載種を分離は、微生物種の持つ基質資化性・親和性に基づく集積培養を利用することが現状ほぼ唯一採りうる戦略である。しかしながら集積培養は未記載種を系統的に「狙って」分離することが出来ない。従って未記載種の集積・分離法は分離条件の組み合わせの総当たりによる、いわばチカラワザと幸運に依拠した手法である。一方で本応募研究の完成（GEBMI 法の実装）はゲノム編集技術を用いて「環境 DNA 塩基配列を自在に操作」することにより「狙った種をたやすく分離」できる未来に繋がる。

GEBMI 法は応募者が独自に開発したものであり、ゲノム編集システムを微生物生態系に

導入し、系内の「任意の微生物」のゲノム改変を実施し、集積・分離へと至る選択圧とする技法である。本技術は、古典的培養方法論において困難な希少微生物圏（レアバイオスフィア）への普遍的アクセス（一般解）を可能とし得る現状唯一の方法である。

2. 研究成果

(1)概要

2.1 成果概要

本研究の遂行により下記する3件の成果を得た。

1) プラスミドベース GEBMI

プラスミドを混合菌体に導入し、CRISPR/Cas9 ゲノム編集により、混合菌体中から任意菌（モデルとしては大腸菌）を特異的に分離する技術を確立した。本技術は現状の編集効率から試料中の存在絶対量 10^5 細胞以上であれば直接分離対象とし得る。

2) GFP 付加 dCas9 を用いたプロテインベース GEBMI の導入条件最適化

プロテインベース GEBMI は Cas9 タンパク質の細胞導入効率向上が利用に不可欠である。従って GFP 付加 dCas9 を細胞導入効率アッセイに利用して、エレクトロポレーションによる導入条件検討を行った。結論として一般的に利用されている市販品のエレクトロポレーターは Cas9 のようなタンパク質を原核細胞に導入するには電圧出力が不十分である可能性が確認された。この問題解決のためバイオ MEMS 技術を用いた Multi-conditional electroporator (MCEP) の開発にも取り組んだ。

3) ACT-X 領域内研究者を主軸とする新規研究グループ構築

本領域の理研 BDR 芝井博士、大阪大学岡橋准教授らとともに新規研究グループを形成し大型予算に応募した。微生物電気合成をコア技術とする廃水・廃棄物からの有価物生産プロセスの構築に関する内容であり、「電気を食べる細菌」の DBTL サイクル構築に関する内容である。本領域内の岡本アドバイザーの並列型電気培養システムについても技術提供を頂いた。

(2)詳細

1) プラスミドベース GEBMI の確立

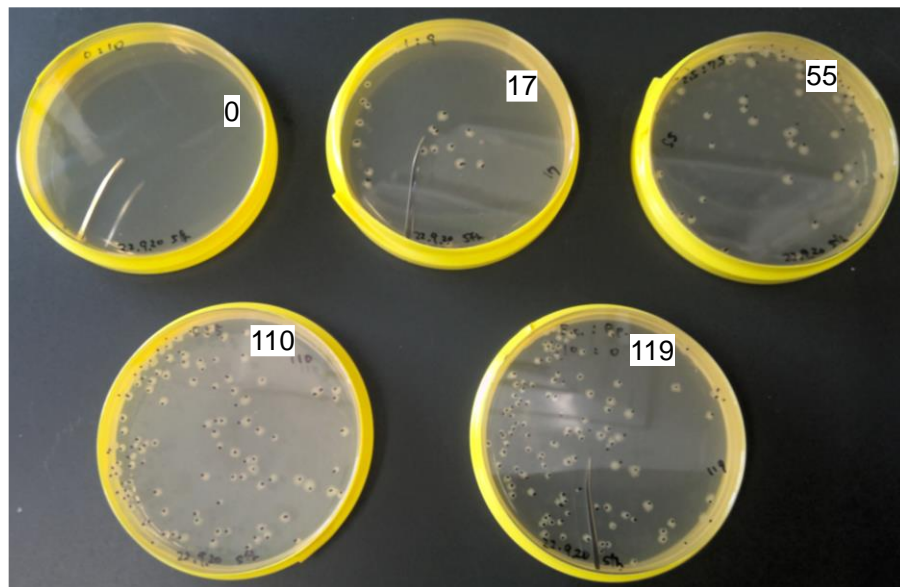
GEBMI の実現可能性を決定づけるのは、広い菌種に対して高効率にゲノム編集が可能か？という点である。広い菌種に使えるという点はプロテインベースでのゲノム編集がより汎用性が高い、一方で高効率という点では過去に原核細胞で極めて多数の実績があるプラスミドを用いた手法が優れている。これらのプラスミドを用いることである程度広い菌種に対し、高効率に配列改変をすることを目指した。さらに現状として、原核細胞のゲノム編集は二重鎖切断までは高い効率でできるものの、その後の相同組み換え修復（HDR）が低く、結果として編集体を得られないという状況が頻発する。筆者はこの課題解決に向け HDR の効率向上のために λ red 誘導性発現システムを CRISPR/Cas9 システムと共役させることとした。

具体的には X プラスミド（詳細を伏す）をバックボーンに Cas9、ガイド RNA、および λ red システムの発現系を備えたプラスミドを作成した。



作成プラスミドを *Pseudomonas putida* KT2240 に導入したが、複数回の試行にも関わらず、現在までに変異体の獲得には至っていない。同 X プラスミドの空白ベクターを入れた際には容易にプラスミド保持細胞が得られたため、プラスミドサイズが導入効率に重大な影響を与えることが示唆された。現在この課題解決のため「予めプラスミドを保持した複合系」の作成を行っている。

この実験により All-in-one プラスミドの作成は幾つかの課題があることが明らかとなり、ガイド RNA 以外を含むプラスミドと、ガイド RNA 発現用プラスミド (Y プラスミド; 詳細を伏す) を同時導入する戦略を考案した。



この戦略に則り、大腸菌と *P. putida* KT2240 株の混合菌体 (上写真は左上から右下にかけて大腸菌の割合増加) に対し、X プラスミドおよび Y プラスミドおよびドナー DNA を導入したところ、大腸菌のみが獲得された。すなわち、混合菌体から標的細菌のみを分離するという基本コンセプトをこの実験で示すことが出来たと考えている。

2) GFP 付加 dCas9 を用いたプロテインベース GEBMI の導入条件最適化

プラスミドベース GEBMI は使用の可否に宿主特異性という極めて強い選択圧がかかる。

GEBMI は将来的に「あらゆる」菌の第一分離戦略となることを目指していることから、Cas9 プロテインとガイド RNA からなる複合体（リボヌクレオプロテイン; RNP）の細胞導入により「ホストの理論に影響されずに」「ベクターの理論だけで」配列改変することが望ましい（プロテインベース GEBMI）。本研究では dCas9-GFP（市販品）からなる RNP を作成し、セルソーターにより細胞導入効率を検証した。右図は dCas9-GFP の RNP を K12 株に電圧ポレーションした際のフローサイトメトリーであるが、大腸菌へのプラスミド導入条件（2500V, 25 μ F, 電極間隙 2mm）の場合導入効率は 10⁵cells に 1cell 程度であることが確認された。電圧ポレーションの

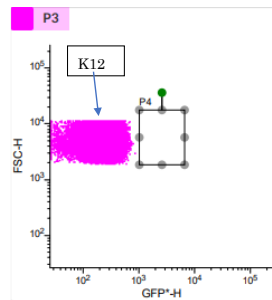
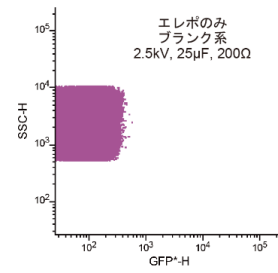
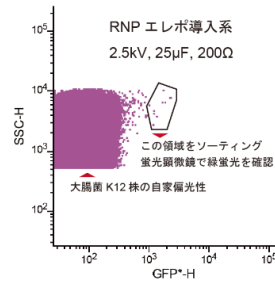


図 1. K12

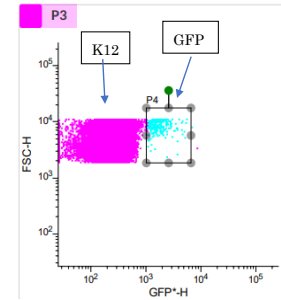


図 2. IPTG+(添加 12 時間)

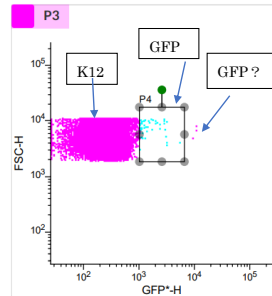


図 3. IPTG+(添加 4 時間)

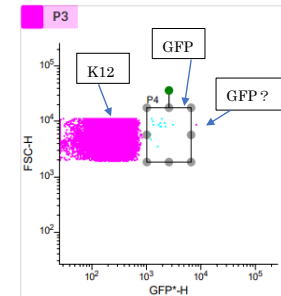
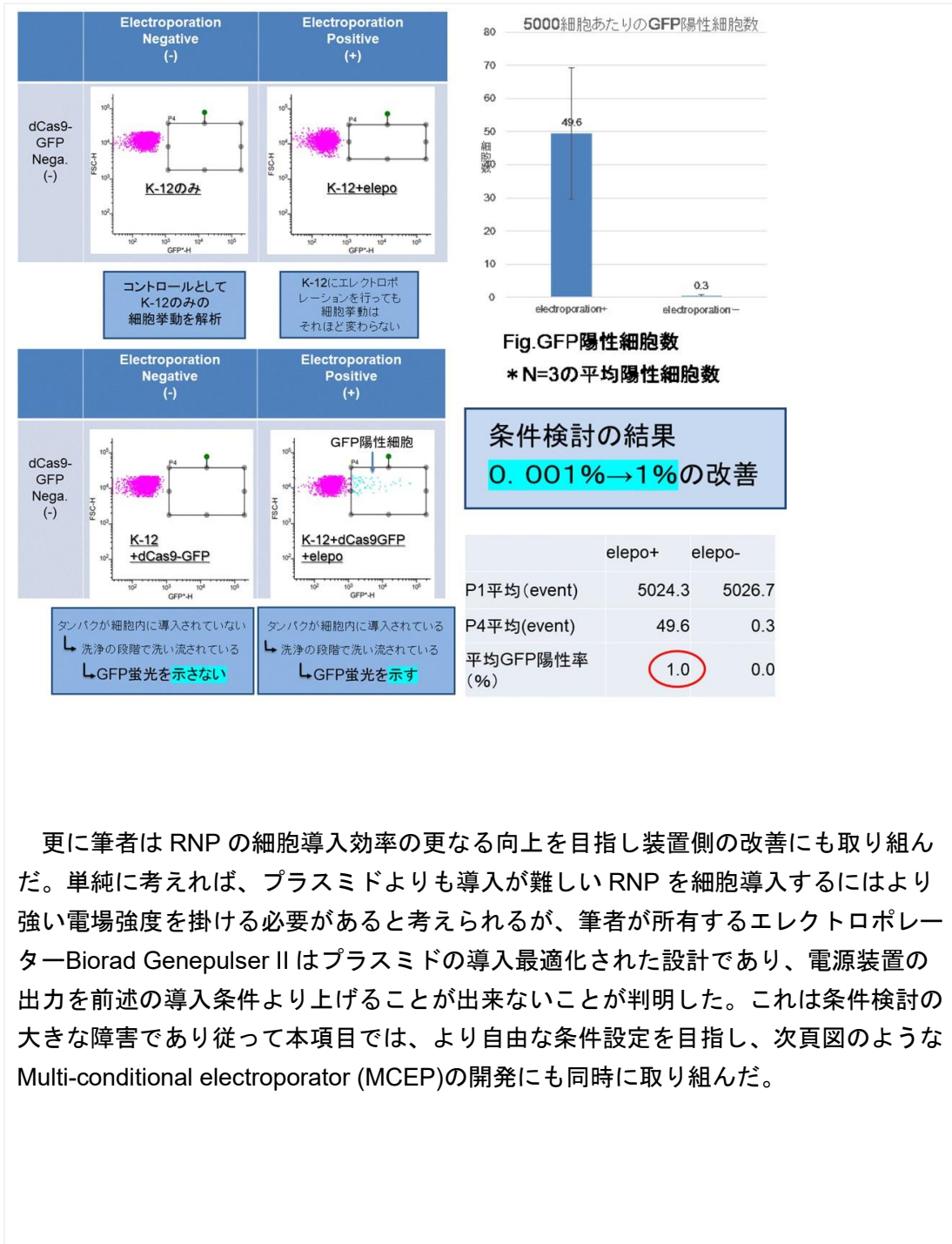


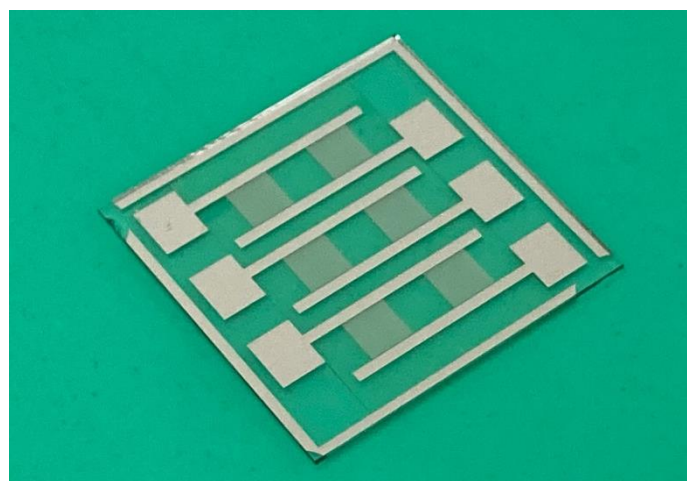
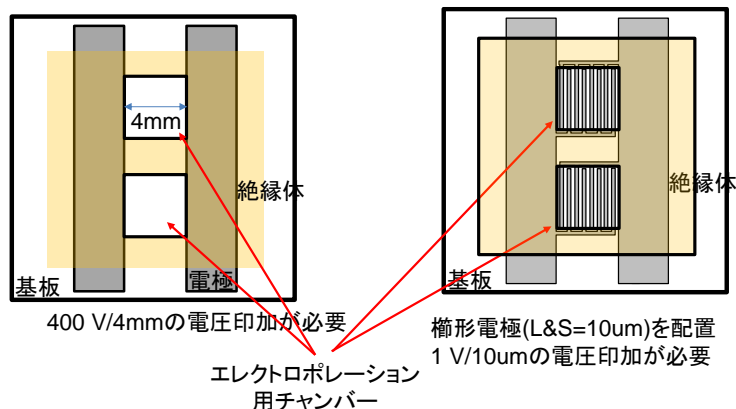
図 4. IPTG 無添加

1 操作回あたり 10⁹細胞を扱うと仮定し、この中から 10⁴程度が細胞に Cas9 が導入され、さらにそのうちの 10⁻⁶細胞が HDR による修復を受ける、などの仮定をすると、操作回あたりに獲得される菌体数は 10⁻²細胞となる。つまり獲得に至らない。この問題は 10⁵cells に 1cell という効率を如何に向上するかにかかっている。

筆者は当該課題の解決のため細胞側のコンピテンシー向上を目指し、複数の培養時間条件に基づく大腸菌 K12 株コンピテントセルの作成に取り組み、上記のアッセイ系を用いた RNP 細胞導入効率の向上を検討した。この検討の結果極若齢（詳細を伏す）の K12 株細胞への RNP 電圧ポレーションにより細胞導入効率をおよそ 1000 倍まで向上可能であることが判明した。この条件であればおよそ 1%の細胞に RNP を輸送することが可能である。前節での計算式にこの効率を適用すると操作回あたり 10¹細胞の獲得が可能となる。つまり、プロテインベース GEBMI の使用に足る。



当該装置は本校江口正徳准教授（バイオ MEMS を専門）との共同研究として実施した。本技術は同一操作で他検体を別コンディションでエレクトロポレーション可能であることから、高出力でより大きな電気穿孔による RNP 導入の条件出しの高速化、変異体獲得効率の向上を期待できる。現在当該装置は次頁写真に示す試作機の制作が終了している。当該装置は、電極間隙が極めて短く 10 μ m 程度の間隙に原核細胞が配置され印加を受ける。エレクトロポレーションの効率は電圧ではなく、電圧と電極間距離の関数である電場強度で決定されると考えられており、当該装置は過去例のない極めて微小な間隙距離の実現により、市販の安価な電源で極めて高い電場強度を実現出来た。現在当該装置で大腸菌のエレクトロポレーションの条件検討と従来品との効率比較を進めている。現状の使用感としては電気穿孔装置としては十分に使えるが、電極へのダメージを軽減できるようなパルス印加を条件に加えることなしには、使用による電極へダメージが大きすぎるため使い捨てにする必要がある。現在も装置寿命向上を含め装置改良に取り組んでおり、これらの条件出しが終了次第プロテインベース GEBMI の効率向上に使用していく。



3) ACT-X 領域内研究者を主軸とする新規研究グループ構築

本領域の理研 BDR 芝井博士、大阪大学岡橋准教授らとともに新規研究グループを形成し大型予算に応募した。微生物電気合成をコア技術とする廃水・廃棄物からの有価物生産プロセスの構築に関する内容であり、「電気を食べる細菌」の DBTL サイクル構築に関する内容である。本領域内の岡本アドバイザーからも技術提供を頂いた。

3. 今後の展開

1) プラスミドベース GEBMI の更なる展開

プラスミドベース GEBMI はほどなく完成に至ると予想している。現状の課題は、プラスミドサイズに依存して、導入困難な菌種が存在する可能性があるということである。この問題は開発中の Multi-conditional Electroporator (MCEP) を用いることで解決を試みている。

2) プロテインベース GEBMI の更なる展開

22 年度後半にブレイクスルーとなる Cas9-sgRNA 複合体 (RNP) 細胞導入効率の劇的改善 (0.001%→1%) に成功した。これに加え MCEP を用いて細胞導入効率と細胞生存率の積が最大となる条件出しを試みている。最終的な到達点として GEBMI は難培養細菌を含む「あらゆる」微生物種取得の第一選択戦略を目指しており、そのためにはプラスミド宿主域という制約を回避できるプロテインベースの技術が望ましく、今後も効率改善に取り組んで行く必要がある。

3) 今後の研究拡大戦略

本研究の後継研究課題が JST 創発的研究に採択された。従って今後は、「プラスミドベース GEBMI の技術的完成」を第一優先に取り組んでいく。

一方でプラスミドベース GEBMI を用いて実試料からの微生物分離も進めていく。GEBMI は狙った菌を配列特異的に釣る、微生物分離戦略として一般化出来る革新的なものであり、この手法の強みは、「配列情報さえあれば」、混合菌体から任意の細胞を分離出来るということ、つまり自動化に向くということである。応募者は GEBMI をコア技術に環境試料からの新奇微生物分離→新種提唱までの一連の流れをオートメーション化することで、「培養可能細菌でさえあれば」「網羅的に」分離可能な技術として、微生物分離領域のゲームチェンジャーとなることを目指している。ラボオートメーションの専門家である当領域内芝井博士、バイオ MEMS の専門家である呉高専江口准教授に協力を依頼済みである。また全自動化には各装置群の集約化が最重要であるが、集約化装置をオーダーメイド可能なロボティクス技術者・研究者との連携も既に進めている。

4) 社会実装へ

GEBMI で分離した細菌は、その分離した時点でゲノム編集が可能という特徴がある。つまり圧倒的に使い勝手が良い。これは現在の分離→遺伝子改変法試行→育種→産業微生物化という微生物の産業化スキームを分離→育種→産業微生物化へと短絡出来る。実のところ現状分離された 20000 種の原核微生物の内、遺伝子改変可能であることが示された種はそのうちの 1%以下に過ぎないが、今後は GEBMI の適用により分離即改変可能となる。GEBMI が潜在する網羅性は、産業上重要性の高い「遺伝子改変可能なバイオリソース」を圧倒的に拡大可能であり、食品系・製薬系企業との連携が見込まれる。企業連携→社会実装を視野に連携先を探索してく予定である。

4. 自己評価

2年半の研究期間で開始当初の研究目的である下記の2点についての達成を目指した。

1) GEBMIの技術的完成

目標1については条件付で達成した。混合菌体中から標的細菌をCRISPR/Cas9システムを用いて配列改変し、標的細菌を分離するという微生物分離システムの確立に成功した。

2) 環境試料への実装

遅れているが、分離対象となる複合微生物系の集積を進めている。

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：0件

GEBMIのコア技術出願次第投稿予定である。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数：1件(特許公開前のも含む)

1) 特願2021-045341・出願人：国立高等専門学校機構・希少微生物の選択的培養方法・発明者：木村善一郎・2021年3月19日 単独出願

(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) 遺伝子を釣り針に任意環境微生物を特異的に獲得する, 木村善一郎, ACT-X 「環境とバイオテクノロジー」は地球環境の危機を救う!, バイオインダストリー協会

2) 菌をこちらの都合に合わせる。新たな微生物分離戦略, 木村善一郎, KOSEN EXPO