

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14658

研究課題名(和文) 遺伝子デザイン的手法によるウイルスゲノム再構築の研究

研究課題名(英文) Reconstruction of virus genome by dividing it into replaceable segments.

研究代表者

井口 義夫 (INOKUCHI, Yoshio)

帝京大学・理工学部・教授

研究者番号：60092144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌RNAファージQの感染性cDNA(ゲノムRNAから作製したDNA)を機能ユニット(モジュール)化した。部位特異的変異作製法により遺伝子領域の両側にユニークな制限酵素切断配列を導入し、cDNAを3個の遺伝子ユニットと発現調節領域を含む4個の非遺伝子ユニットに分割した。さらに、外被遺伝子上流の調節領域にリボソーム結合配列を導入し、2種類の新たな感染性cDNAを作製した。これにより、ユニットどうしの結合によるcDNAゲノムの再構築およびキメラゲノムの作製が可能になった。また、外被遺伝子の発現調節領域はファージ粒子形成にも関与することが推察された。

研究成果の概要(英文)：The complementary DNA (cDNA) of the genome RNA of E. coli RNA phage Q was divided into the seven functional units (modules). Using the site-directed mutagenesis, unique recognition sequences for restriction enzymes were created at the both sides of the genes. The altered Q cDNA consisted of three gene units and four non-gene units which contained the control regions of gene expression. Furthermore, two kinds of infectious cDNAs in which the ribosome binding sequences were introduced into the upstream region of the coat gene were made. It becomes possible to reconstruct Q cDNA by joining the modules and to make chimera cDNAs by replacing the units with the corresponding ones from other phages. The control region of the Q coat gene was thought to be engaged in phage particle formation.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ゲノム再構築 Q ファージ 感染性cDNA モジュラーゲノム 人工ウイルス SD配列

1. 研究開始当初の背景

(1) 当時は、自然界に存在する微生物マイコプラズマのゲノム DNA を化学的に人工合成する、あるいは大腸菌ゲノムの不要部分を取り除いてより小さなゲノムを作る研究が行われていた。しかし、ゲノム全体を機能ユニット(モジュール)が連結したモジュラーゲノムとして扱う研究はほとんど行われていなかった。

(2) しかし、ゲノム構造の成り立ちを理解する上で、また新しい性質を持つ生物を創り出すためにはゲノムを人工的に再構築する技術が必要となる。このような観点から、ゲノムサイズが小さくて取り扱いが容易な大腸菌ウイルスをモデル生物にして、ゲノムのユニット化とその再構築を目指す本研究を計画した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ウイルスゲノムをタンパク質の情報を持つ遺伝子部分と遺伝子発現調節領域などを含む非遺伝子部分にユニット化した後、それらを再び組み合わせてウイルスゲノムを再構築する。

(2) ユニット構造を改変して遺伝子発現、ウイルスの感染増殖能に与える効果を調べる。

(3) ウイルス間でユニットを交換してキメラゲノムを作製し、ウイルスゲノムの構造と機能について理解を深めて将来有用な人工ウイルス開発の基礎となる知見を得る。

3. 研究の方法

(1) ウイルスゲノムとして大腸菌 RNA ウィルス Q (Q ファージ) のゲノム RNA から作製した感染性 cDNA プラスミド (pQ_w) を使用した。Q cDNA は 4217 ヌクレオチドの大きさで、4 個 (Maturation (吸着、溶菌): A2、Coat (外被): C、Read-through (粒子形成): RT、RNA Replicase (RNA 複製酵素): R) の遺伝子を有する。PCR を利用した部位特異的変異作製法によりこれら遺伝子領域の両側にそれぞれユニークな制限酵素切断配列を創出し、各遺伝子および遺伝子発現調節領域を含む非遺伝子領域をユニット化して取り出せるようにした。

(2) Q ファージ C 遺伝子の発現調節領域にはリボソーム結合配列 (SD 配列) が無く、開始 AUG を含む RNA 二次構造 (hairpin) が見られる。上記 (1) で作製した改変 Q cDNA プラスミドを使用して、部位特異的変異作製法によりこの領域に SD 配列を導入すると共に RNA 二次構造を壊した。調節領域の改変がファージ増殖に与える効果を見るために、プラスミド保持菌培養液中に放出された感染性ファージ数 (plaque forming unit、PFU) を測定し、更にリアルタイム PCR により培養液中の

Q RNA 量を調べた。

(3) 近縁の SP ファージの cDNA を用いて A2 遺伝子を PCR 増幅し、(1) で作製した改変 Q cDNA の A2 遺伝子と置換して A2 遺伝子構造の違いがファージ増殖に与える効果を調べた。

4. 研究成果

(1) Q cDNA は 4 個の遺伝子 (A2、C、RT、R) と 4 個の非遺伝子領域 (5' -UTR、A2/C、RT/R、3' -UTR) から成る (図 1、上段。数字は RNA 5' 末端からの塩基番号)。RT 遺伝子は、C 遺伝子の翻訳が本来の終止コドンで終結せずに次の終止コドンで終結したものである。今回、C 遺伝子を含む RT 遺伝子を 1 個の遺伝子として扱った。また、制限酵素切断配列を導入するに際し、既存の DNA 塩基配列をできるだけ保存した。そのため、C 遺伝子上流の制限酵素 *Fba*I 切断配列および R 遺伝子上流の *Eco*T22I 切断配列を残した。そして、部位特異的変異作製法により *Fba*I 以外の各制限酵素に対する切断部位を 1 ヶ所だけ有する Q cDNA プラスミド pQ_{-TU} を作製した (図 1、下段)。 *Fba*I 切断配列は他に C 遺伝子内に 1 ヶ所、RT 領域内に 2 ヶ所存在する (図 1 および表 1)。一方、R 遺伝子内部に存在する *Fba*I 切断配列を消去した。

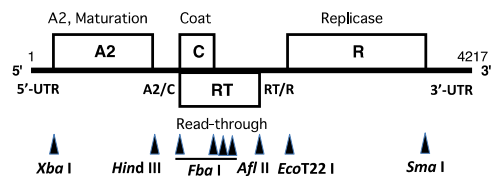


図 1. Q cDNA の概略図

		制限酵素					
		<i>Xba</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Fba</i> I	<i>Afl</i> II	<i>Eco</i> T22 I	<i>Sma</i> I
切断部位		TCTAGA ₅₄	AAGCTT ₁₃₂₈	TGATCA ₁₃₄₅	CTTAAG ₂₃₄₁	ATGCAT ₂₃₅₃	CCCGGG ₄₁₂₇
				TGATCA ₁₇₂₆			
				TGATCA ₂₀₇₇			
				TGATCA ₂₀₉₂			

表 1. Q cDNA 中の制限酵素切断部位

プラスミド pQ_{-TU} が産生するファージ Q_{-TU} は野生型 pQ_w が産生するファージ Q_w に比べてプラーク (溶菌斑) が小さく (図 2)、感染菌 (infective center、IC) 当たりの子ファージ数 (PFU/IC) は Q_w ファージの約 1/3 であった (図 3)。

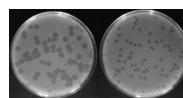


図 2. プラーク形態
左: Q_w 右: Q_{-TU}

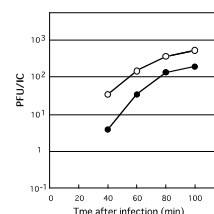


図 3. 一段増殖実験
○: Q_w ●: Q_{-TU}

(2)C 遺伝子上流の A2/C 領域はリボソーム結合部位であるが、同領域には SD 配列が無く、翻訳開始 AUG を含む RNA 二次構造が存在する(図 4)。C 遺伝子は RNA フェージ感染後に最初に発現する遺伝子であり、他の遺伝子発現は C 遺伝子の翻訳に依存している(翻訳共役)。そこで、キメラゲノムにおいて異なるウイルス由来の C 遺伝子でも確実に発現するように、SD 配列を持ち且つ RNA 二次構造を形成しない一般的な調節領域構造をした A2/C 領域を有する感染性 cDNA プラスミド pQ -TU12 を作製した(表 2)。下線は制限酵素切断配列、*Hind*III: AAGCTT、*Fba*I: TGATCA)、さらに、*Fba*I 配列を *Nco*I 配列 (CCATGG) に改変したプラスミド pQ -TU16 も作製した(表 2)。大腸菌 RNA フェージの C 遺伝子 5' 末端部の塩基配列は AUGGCN...なので、*Nco*I 配列に変えても C 遺伝子 5' 末端部の塩基配列を変える必要はない。また、*Nco*I 配列はプラスミド DNA 中に 1ヶ所だけ存在するのでキメラゲノム作製に都合が良い。このように、微生物ゲノムを機能ユニットに分割して再構築出来るような形に改変したのは本研究が最初である。プラスミド pQ -TU12 および pQ -TU16 が産生するフェージ Q -TU12 および Q -TU16 は野生型フェージ Q_w に比べてプラークは小さいが、これらプラスミド保持菌培養液中に放出された感染性フェージ数 (PFU) は野生型 pQ_w 保持菌よりも多かった(表 2)。これは、pQ -TU12 および pQ -TU16 保持菌は pQ_w 保持菌に比べて、菌体当たりの産生フェージ数は少ないがフェージ産生菌の割合が多いことを示唆している。

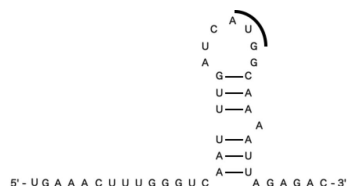


図 4. A2/C 領域の RNA 二次構造 (UGA は A2 遺伝子終始コドン、AUG は C 遺伝子開始コドン)

プラスミド	SD	RNA Hairpin	A2/C 塩基配列	β -gal. 活性 (相対量)	培養液中 PFU (個/ml)
pQ _w	×	○	UGAAACUUUGGGUCAAUUGAUC <u>CAUG</u>	100	299 × 10 ⁴
pQ-TU	×	○	UGAAGCUUUGGGUCAAUUGAUC <u>CAUG</u>	11	169 × 10 ⁷
pQ-TU12	○	×	UGAAGCUUUGGGUCA <u>AGGUGAUC</u> CAUG	95	56 × 10 ⁹
pQ-TU16	○	×	UGAAGCUUUGGGUCAAGGAG <u>ACCAUG</u>	45	60 × 10 ⁷
pQ-TU4	○	×	UGAAGCUUUGAGGAG <u>GUUGAUC</u> CAUG	202	<1 × 10
pQ-TU5	○	○	UGAAGCUUUGGGAGAAUUGAUC <u>CAUG</u>	355	<1 × 10

表 2. C 遺伝子発現とフェージ産生 (下線は制限酵素切断配列、二重下線は SD 配列)

(3)SD 配列の導入が C 遺伝子発現に与える効果を調べるために、5 種類の cDNA プラスミドの A2/C 領域を含む部分を新たなプラスミドにサブクローニングし、C 遺伝子の開始 AUG から 24 ヌクレオチド下流に連結したレポーター遺伝子 *lacZ* (β -galactosidase) の発現を比較した(表 2)。その結果、SD 配列を持たない pQ -TU に比べて SD 配列を導入した

いずれのプラスミド(pQ -TU4、-TU5、-TU12、-TU16)でも β -gal.活性が増加した。また、プラスミド pQ -TU4、-TU5 では β -gal.活性は野生型プラスミド pQ_w の 2~3 倍に増加したが感染性フェージ産生は見られなかった。一方、感染性プラスミド pQ -TU12 の β -gal.活性は野生型 pQ_w の 95%、pQ -TU16 では 45%であった。これらの結果から、SD の導入により C 遺伝子発現は増加するが、導入位置によって発現量が異なることが推察された。しかしながら、SD を持たない pQ -TU で β -gal.活性が野生型 pQ_w の 11%に減少したことは驚きであった。1 塩基の置換 (AAACTT → AAGCTT) により A2/C 領域とリボソームとの親和性が低下したと考えられるが詳しい理由はわからない。さらに、フェージ Q -TU は C 遺伝子発現が 90%低下していると推測されるにもかかわらずプラークを形成するので、その増殖機構についてさらに調べる必要がある。

(4)A2/C 領域は Q RNA 複製酵素の結合部位 (S 部位) と一部重複する。このことから、プラスミド pQ -TU4、pQ -TU5 保持菌でフェージ産生が無かったのは、SD 配列の導入により、A2/C 領域とリボソームの親和性が増加して RNA 複製酵素と S 部位との結合を妨げた、あるいは、A2/C 領域の RNA 構造の改変が S 部位と RNA 複製酵素の親和性を低下させた、ことによりフェージ RNA 合成が減少したためではないかと思われた。これを調べるためにプラスミド保持菌培養液についてリアルタイム PCR による解析を行ったところ、上清に含まれる Q RNA 量は野生型プラスミド pQ_w に比べて pQ -TU4 で 1/7、pQ -TU5 で 1/4 に減少していた。一方、菌体中のフェージ RNA 量は野生型と同程度であった(表 3)。

プラスミド保持菌培養液の Q RNA 量 (ng/ μ L)							
培養液の上清				培養液の菌体			
pQ _w	pQ-TU4	pQ-TU5	pBR322	pQ _w	pQ-TU4	pQ-TU5	pBR322
0.24	0.034	0.064	0.001	14	14	16	0.002

表 3. プラスミド保持菌における Q RNA 量

表 3 の結果は、pQ -TU4 および pQ -TU5 保持菌ではフェージ RNA 合成は抑制されず、むしろフェージ粒子形成が起きていないことを示唆した。フェージ粒子形成は C タンパク質 (あるいは RT タンパク質) とフェージ RNA の結合により起こる。もし、A2/C 領域が α RT) タンパク質との結合に関与しているとすれば、A2/C 領域の RNA 構造の改変によりフェージ RNA と C (RT) タンパク質の結合力が低下してフェージ粒子形成が起きなかったと考えられる。あるいは、プラーク形成が見られないのはフェージ増殖の早い段階での溶菌によるのかも知れない。溶菌作用を持つ A2 タンパク質はフェージ RNA 複製に伴って作られるが、RNA 複製酵素 (R) 遺伝子の発現は C 遺伝子の発現に依存している。そのため、C 遺伝子発現の増加が A2 遺伝子発現を促進し

てより早い段階で A2 タンパク質が菌体中に蓄積したために、十分量のファージ粒子が形成される以前に溶菌が生じたとも考えられる。本結果は、Q ファージ増殖機構に関してこれらの新しいアイデアを提案する。

(4) プラスミド pQ -TU の A2 遺伝子を SP ファージの A2 遺伝子で置換したキメラ cDNA を作製した。Q と SP ファージ間ではゲノム RNA 全体で 61%、A2 遺伝子で 60% の類似性がある。また、A2 タンパク質のアミノ酸配列の同一性は 46% であり、互いの A2 タンパク質は機能的に置換出来ることが *in vivo* 相補性試験で明らかになっている。しかしながら、作製したキメラ cDNA は感染性ファージを産生しなかった。原因は A2 遺伝子が SP ファージ由来の遺伝子で置換されたことにより、ゲノム RNA 立体構造が変化したためであると考えられる。今後、リアルタイム PCR によるファージ RNA 合成の検討、電子顕微鏡によるファージ粒子観察、およびファージ産生復帰変異株の cDNA 塩基配列の解析によりゲノム RNA 構造とファージ増殖の関係について貴重な知見が得られると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Yoshio Inokuchi、Ryosuke Kinoshita、Noriko Hakoshima
Reconstruction of RNA phage genome through dividing it into replaceable segments.
2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回 日本分子生物学会年会、第 90 回 日本生化学会大会)
2017 年

井口義夫、木下量輔、箱島紀子
Q ファージ外被遺伝子調節領域の構造と感染性
ファージ・環境ウイルス研究会合同シンポジウム
2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井口 義夫 (INOKUCHI, Yoshio)
帝京大学・理工学部・教授
研究者番号：60092144

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()