

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08832

研究課題名(和文)ゲノムでの遺伝子出現機構のパスウェイ解析

研究課題名(英文) Determination of PODiR signaling pathway

研究代表者

間世田 英明 (Maseda, Hideaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：10372343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請期間中に、PODiRシステムを惹起するパスウェイとPODiRシステムに重要な遺伝子を決定した。ストレスによるSOS応答がPODiRシステムの惹起に重要であることがわかった。ストレスレスの状態では、本システムは誘発されないが、同定した因子の強制発現を行うと生菌数当たり10⁻⁴程度まで本システムが誘発されることが明らかになった。このことから、ストレスを細胞が感知し、まずはターゲット遺伝子認識用の特殊な核酸が作られ、その核酸と共にSOS応答を発動し、ターゲット遺伝子の編集が起こり、遺伝子が作られそのストレスに耐性(今回は抗生物質)になるという画期的な環境適応進化の機構が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、環境にตอบสนองして遺伝子が作られるという、いままで全く明らかにされていなかった、生物の根本的な環境適応と進化の機構を明らかにしたものである。この成果によって、生物が環境に適応する(遺伝子発現で環境になじむ=遺伝子は変わらない)なかで、それが生物の進化(遺伝子自体が合目的に変化する)する機構が初めて明らかになった。この成果は、遺伝病の解析とその治療の革新的進展をもたらすものと期待される。

研究成果の概要(英文)：During this research period, pathways that elicit the PODiR system and genes important for the PODiR system were determined. We found that stress-induced SOS response is important for the initiation of PODiR system. This system was not induced in stressless condition, but it was revealed that the forced expression of the identified factor induces this system up to about 10⁻⁴ per viable cell count. From this result, the cells sense the stress, then a special nucleic acid for target gene recognition is made, the SOS response is triggered together with that nucleic acid, the target gene is edited, and a new gene is created. The epoch-making mechanism of environmental adaptation evolution to become resistant (this time an antibiotic) has been clarified.

研究分野：分子生物学

キーワード：微生物 進化 適応

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、緑膿菌の抗生物質に対する耐性化に、驚いたことに遺伝子がゲノム中に出現するという全く新しい耐性化機構があることを見出していた。研究を重ねその機構のキーとなる因子の同定や真核細胞でも同システムが稼働することを突き止めていた。しかし、その全貌となる更なる因子の同定とそのトリガーが何であるのかは明らかになっていなかった。そこで、更なる因子の同定とトリガーとなる環境変化・因子の同定がこのシステムの理解には必要であった。

2. 研究の目的

多剤耐性菌の出現は、人類が見出してきた様々な抗生物質を一瞬にして無力なものにし、現在危機的状況になっている。これを食い止める方法として申請者は、耐性化のプロセスを解析し、そこを遮断することで、菌を殺さず耐性化させない薬剤の開発を目指し、緑膿菌多剤耐性株 NfxC 株の耐性化のプロセスを解析している。解析の結果、NfxC 株は、ゲノム上の遺伝子をコードしない領域に存在する重なり有ったダイレクトリピートで特異的な決まった塩基の欠失を起こし、フレームシフトの結果、耐性関連遺伝子を生み出し、耐性化することを突き止めた。さらに本現象が、緑膿菌だけでなく様々な生物に共通して存在する自己ゲノム編集機構であることが分かり、生物の新規の環境応答機構であることがわかってきた。本申請では、この遺伝子の生み出しに関わるタンパク質とパスウェイを同定することを目的としている。

3. 研究の方法

1.培養条件（温度、酸素濃度、pH等）を種々変化させる、あるいは、培養培地に作用濃度以下の抗生物質を種々添加し培養することで、PODiR システムが惹起する外界環境を同定し、その条件下で高発現している遺伝子群を RNA-seq により決定する。また、2.PODiR 配列核酸をカラムに固定化し、そこに結合する大腸菌のタンパク質を取得・同定する。そして、既に同定した因子の知見と合わせ、PODiR に重要なパスウェイおよび遺伝子を決定していく。また、PODiR システム役割についての知見を得るべく、抗生物質を利用しないアッセイ系（PODiR 配列を導入した蛍光タンパク質）を確立し、ストレスフリーおよび真核細胞での PODiR システム稼働の可否について検討する。

i) PODiR システムによる遺伝子の出現（塩基の特異的欠失）効率に影響を与える培養条件の検討

緑膿菌では、PODiR システムにより、8bp が欠失し、薬剤排出ポンプ遺伝子 MexEF-OprN の正の調節遺伝子 *mexT* がゲノム中に出現し、多剤耐性化が起こる。実際、MexEF-OprN の良質な基質であるクロラムフェニコールに曝露した場合、プレリミナリーな検討ではあるが、2 倍程度 *mexT* 遺伝子の出現率が高かった。しかし、どのような外界環境を感知した場合に、PODiR システムが惹起し、遺伝子の出現が励起されるのかは、全くはわかっていない。そこで、MIC 以下の抗生物質の添加や、温度、pH、酸素濃度を種々に変化させ培養し、*mexT* 遺伝子の出現率を測定し、PODiR システムが惹起される環境を同定する。出現率は、種々の環境に曝露後にクロラムフェニコール含有培地に形成するコロニーの数により算出する。（MexEF-OprN の発現によってのみ、緑膿菌は、800 µg/ml のクロラムフェニコールを含む培地でコロニーを形成可能である）ところで、MIC 以下の抗生物質を

含む培地で培養した場合、MexEF-OprN の排出基質の場合、抗生物質による選択圧によって、*mexT* 遺伝子の出現率に関係なく、見かけ上 MexEF-OprN 発現による耐性株の割合が増えてしまう危険性をはらんでいる。そこで、その可能性が疑われた場合には、*mexEF-oprN* を破壊した $\Delta mexEF-oprN$ 株を作成し、その株に Fig. 2 のスクリーニングで既にアッセイ系として成立している *mexT* 遺伝子に Cm^r 遺伝子を融合させた TdCm カセットを利用する。本カセットは、PODiR システムで 8bp の欠失が起きた場合にのみ、フレームシフトの結果クロラムフェニコール耐性のみを示す。

ii) RNA-seq による PODiR システム惹起パスウェイの解析

次に i) の解析によって明らかにされる PODiR システムを最も発動させる培養条件で培養した細胞と通常の条件あるいは最も PODiR システムが発動を起こさない条件で培養した細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて全遺伝子の発現を比較する。これにより、PODiR システムが発動している際に発現が上昇している遺伝子を同定し、PODiR システム惹起にいたるパスウェイと PODiR システムに重要であると考えられる遺伝子を推察・決定する。

iii) PODiR システムに関与する新規因子の取得

先に我々は、大腸菌の 3909 株からなる一遺伝子ノックアウトライブラリーを用いて、(PODiR システムによる耐性化が起きないことを指標に、) PODiR システムの重要 9 因子の同定に成功した。その因子の半数は、全ての生物が有していると考えられるタンパク質であり、生命活動には非常に重要なタンパク質であった。しかし、このノックアウトの方法は、大腸菌のノックアウトライブラリーを用いたスクリーニングの結果取得された因子であり、ノックアウトのできない PODiR システムに重要な働きをしている因子は取得できない。また、上記 i), ii) では、遺伝子の発現量の解析から、PODiR システムに重要な遺伝子等の同定を検討している。しかしながら、i) において、PODiR システムを十分に惹起する条件が決定されない可能性や ii) において、明確に発現した遺伝子やパスウェイが同定できない可能性も考えられる。そこで、PODiR システムに重要である遺伝子やその翻訳産物を、PODiR 構造に結合するタンパク質の取得を試みる。PODiR 構造を形成する DNA (or 核酸) をカラムに固定化し、そこに大腸菌の粗酵素液を流すことで PODiR 構造に結合するタンパク質を取得する。DNA のカラムへの固定には、ストレプトアビジン・ビオチンのアフィニティーを利用するものと、化学反応により直接 PODiR 構造を形成する DNA (核酸) を共有結合させることなどを検討する。結合したタンパク質の配列から、結合タンパク質を同定し、そのタンパク質群と既已取得している 9 因子から、PODiR システム発動に重要な因子・パスウェイを推定・決定する。そして、i), ii) から得られるであろう知見 (PODiR システムに重要な因子とパスウェイ) と比較検討し、PODiR システム発動のパスウェイの詳細を解き明かしていく。さらに、i), ii), および iii) で同定されるであろうタンパク質と 9 因子を種々大腸菌で高発現させ、遺伝子の出現率を測定し、PODiR システムに必要なキータンパク質の同定をさらに確実なものとしていく。

iv) ストレスフリー状況下での PODiR システムによる遺伝子の出現現象の確認

PODiR システムの発動の可否は、Fig. 2 のように抗生物質含有プレー上に形成されるコロニーの数により測定していた。しかし、この場合、PODiR システムが抗生物質のないよ

うなストレスフリー状況下でも起きるのか否かを正確には測定できていない。そこで、バクテリアで機能する蛍光タンパク質の遺伝子内部に人工的に PODiR 配列を埋め込み、不活性型蛍光タンパク質を作成し、PODiR システムが発動して機能型遺伝子に再生することを蛍光により測定することで、ストレスフリー下でどの程度 PODiR システムが機能しているのか定量する。

v) 真核生物での PODiR システムの解析

既に、*in silico* の PODiR 配列の探索の研究から、ヒト細胞においても PODiR システムが機能し、遺伝子の生滅に関与している可能性を得ている。iii) の実験系を真核生物（候補として、2n 藻類 or 酵母、ヒト細胞等）に適応し、PODiR 配列の導入により機能を無くした蛍光タンパク質をコードする遺伝子、あるいは、同方法により機能を無くした薬剤耐性マーカー遺伝子を、上述の真核細胞に導入し、機能の回復を蛍光あるいは薬剤耐性により確認することで、真核生物での PODiR システムの有無やその機構について比較検討していく。アッセイマーカー遺伝子には、真核細胞で機能することが確認されているピューロマイシン遺伝子やハイグロマイシン遺伝子等、蛍光タンパク質には、GFP などを第一候補として、PODiR アッセイマーカーを作成し、検討していく。

4. 研究成果

i) PODiR システムによる遺伝子の出現（塩基の特異的欠失）効率に影響を与える培養条件の検討

MIC 以下の抗生物質の添加や、温度、pH、酸素濃度を様々に変化させ培養し、*mexT* 遺伝子の出現率を測定し、PODiR システムが惹起される環境の同定を試みた。その結果、MIC 以下の濃度の抗生物質 A に暴露した場合、本システムの効率が数倍高くなることを見出した。

ii) RNA-seq による PODiR システム惹起パスウェイの解析

次に i) の解析によって明らかにされた PODiR システムを最も発動させる培養条件で培養した細胞と通常の条件あるいは最も PODiR システムが発動を起こさない条件で培養した細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて全遺伝子の発現を比較した。その結果、最も発現が強く確認されたのは *mexT* 遺伝子そのものであり、転写産物が本システムのトリガーであることが強く示唆された。

iii) PODiR システムに関与する新規因子の取得

先に我々は、大腸菌の 3909 株からなる一遺伝子ノックアウトライブラリーを用いて、（PODiR システムによる耐性化が起きないことを指標に、）PODiR システムの重要 9 因子の同定に成功していた。ii) で検討があまりうまくいかないことも想定して、本計画を立てていたが、予想に反し、非常に良い結果を得ることができた。そこで、更に研究を進めるべく、因子の一部と ii) の転写産物を逆転写した DNA フラグメントを作成し、その結合が起きるのかいなか、タンパク質をカラムに固定し、測定したところ、結合していることを簡易的に検

出することができた。このことから、因子が核酸と結合し、本反応を進めている可能性が強く示唆された。

iv) ストレスフリー状況下での PODiR システムによる遺伝子の出現現象の確認

PODiR システムの発動の可否は、従来抗生物質含有プレー上に形成されるコロニーの数により測定していた。しかし、この場合、PODiR システムが抗生物質のないようなストレスフリー状況下でも起きるのか否かを正確には測定できていない。そこで、バクテリアで機能する蛍光タンパク質の遺伝子内部に人工的に PODiR 配列を埋め込み、不活性型蛍光タンパク質を作成し、PODiR システムが発動して機能型遺伝子に再生することを蛍光により測定することで、ストレスフリー下でどの程度 PODiR システムが機能しているのか定量した。その結果、ストレスレスの状態では、本システムは稼働しないことが明らかになり、これらの因子がストレスに応答していることが明確になった。また、そこに強制的に取得した因子を発現されることで本システムを強制的に稼働させることも可能となった。

v) 真核生物での PODiR システムの解析

既に、*in silico* の PODiR 配列の探索の研究から、ヒト細胞においても PODiR システムが機能し、遺伝子の生滅に関与している可能性を得ている。iii) の実験系を真核生物（候補として、2n 藻類 or 酵母、ヒト細胞等）に適応し、PODiR 配列の導入により機能を無くした蛍光タンパク質をコードする遺伝子、あるいは、同方法により機能を無くした薬剤耐性マーカー遺伝子を、上述の真核細胞に導入し、機能の回復を蛍光あるいは薬剤耐性により確認することで、真核生物での PODiR システムの有無やその機構について比較検討した。その結果、アッセイ系の構築には成功したが、因子のホモログをトランジェントに導入させた状態では、変化が認められず、真核での因子の同定には至らなかった。

このように申請期間中に、PODiR システムを惹起するパスウェイと PODiR システムに重要な遺伝子、さらには本システムを誘導するストレスを明らかにし、遺伝子が作られそのストレスに耐性（今回は抗生物質）になるという画期的な環境適応進化の機構が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Liting Hao, Kunihiro Okano, Chi Zhang, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Chuanping Feng, Motoo Utsumi, Ikko Ihara, Hideaki Maseda, Kazuya Shimizu	4. 巻 4
2. 論文標題 Effects of levofloxacin exposure on sequencing batch reactor (SBR) behavior and microbial community changes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 227-238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 間世田英明
2. 発表標題 バクテリアの耐性獲得機構に見られる自己ゲノム編集機構の解析と育種への応用
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 間世田英明
2. 発表標題 バクテリアの耐性獲得機構に見られる自己ゲノム編集機構の解析と育種への応用
3. 学会等名 公益社団法人 新化学技術推進協会（JACI）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 間世田英明
2. 発表標題 緑膿菌の多剤耐性獲得機構をゲノム編集技術に応用する
3. 学会等名 緑膿菌感染症研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ゲノム編集方法	発明者 間世田 英明	権利者 徳島大学・産総研
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/029213	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

特にありません

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----