

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510209

研究課題名（和文） 四型分泌機構を利用した動・植・酵母細胞への長鎖核酸導入

研究課題名（英文） Large DNA molecule introduction into animal, plant and yeast cells using Type IV secretion system.

研究代表者 守口 和基 (MORIGUCHI KAZUKI)

広島大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：30294523

研究成果の概要（和文）：

IncP 型プラスミドの持つ四型分泌機構を利用して真核細胞への遺伝子導入法としての応用を試みた。出芽酵母においては呼吸機能欠損変異体では遺伝子導入効率が上昇することを発見し、ミトコンドリア機能阻害剤を用いることにより、簡便で効率の高い大腸菌から出芽酵母への直接遺伝子導入法を確立した。さらに世界で初めて IncP 型プラスミドの持つ四型分泌機構を利用した高等植物への遺伝子導入に成功した。

研究成果の概要（英文）：

One of Type IV secretion systems (T4SS), which is derived from an IncP type plasmid, was applied as a novel gene introduction method into eukaryotic cells. We found that mitochondrial respiratory mutants in *S. cerevisiae* showed enhanced transformation efficiency. By using inhibitors of mitochondrial function, we successfully established a simple and efficient gene introduction method into *S. cerevisiae* from *E. coli*. In addition, we firstly observed direct gene transfer from *E. coli* to higher plant cells by applying this T4SS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：DNA レベルの生物間相互作用

1. 研究開始当初の背景

T4SS はアグロバクテリアの T-DNA 移行系やピロリ菌の CagA 移行系に代表されるように、真核細胞への DNA/タンパク質移行能力を持つ水平伝達系である。研究代表者は、Trans-Kingdom Conjugation（生物界間接合）と呼ばれる、RK2 (RP4) プラスミドの T4SS

による遺伝子の水平伝達を外来遺伝子侵入の実験モデル系とし、外來遺伝子の侵入に対する真核生物の防御システムについて出芽酵母を用いて解析を進めていた。出芽酵母を用いる理由としては、(1)真核生物のモデル生物として広く用いられており、得られた知見を他の真核生物に応用しやすいこと。

(2) (1)と関連して変異株が充実しており、ゲノムワイドな解析が可能であること。(3)単細胞生物であるために伝達した遺伝子は後代へ伝わり、水平伝達プラスミドに酵母用の選抜マーカーと複製起点を予め導入しておくことにより、簡単な実験系で水平伝達効率を測定することが可能である。(4)免疫システムやRNAi システムを持たない出芽酵母は、ウイルスやバクテリアからの攻撃に対し、真核生物で最も基本的な形態の防御システムしか持たない可能性がある。等の理由があった。本研究課題を開始する以前に、酵母のアポトーシス関連遺伝子は生物界間接合からの防御には関与しないことを明らかにしており、外来遺伝子を受容した酵母の積極的な排除は行われず、動植物細胞に比べ寛容性が高いものと推測していた。また、酵母の非必須遺伝子ノックアウト変異株からのゲノムワイドスクリーニングにより 22 株の生物界間接合効率上昇変異株を得ており、防御に関する遺伝子の更なる絞り込みとメカニズムの解析を主に遺伝学的な手法を用いておこなっていた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに得られた生物界間接合法のノウハウや酵母での接合効率上昇変異株の知見を酵母類および動植物細胞への遺伝子導入法として応用し、特に現在、植物で汎用されるアグロバクテリアを用いた手法より安全性や安定性の面で上回る遺伝子導入法を目指し、その基本技術の確立を目的とした。

3. 研究の方法

- (1). 水平伝達したベクターは *oriT* 領域を中心にヌクレアーゼにより欠失する可能性がある。生物界間接合では、特に塩基配列レベルでそのようなデータの蓄積が全く無い。どのくらいの頻度でどの程度の欠失が認められるのかについて明らかにするため、IncP 型 RK2 プラスミドの *oriT* 領域を持つシャトルベクターと IncQ 型 RSF1010 プラスミドの *oriT/mob* 領域を持つシャトルベクターについて欠失の程度と頻度を塩基配列レベルで調べる。
- (2). これまでに得られている 22 株の生物界間接合効率上昇変異株の原因遺伝子から、高等真核生物にも ortholog が存在して応用可能な確率が高い遺伝子を選抜し、それらの機能を阻害する事により、効率上昇をもたらすが毒性の少ない薬剤を探索する。出芽酵母は呼吸機能を阻害しても発酵により生存できるが、高等動植物では前出のミトコンドリア機能阻害剤の毒性はより高いものと推測さ

れる。ミトコンドリア関連遺伝子変異株以外の生物界間接合効率上昇変異株の原因遺伝子の機能から、機能阻害剤を探索する。

- (3). 動植物細胞においてはバクテリアのエンドトキシンなどによりアポトーシスが誘導される。動植物細胞で、大腸菌から生物界間接合による遺伝子導入をおこなう前提条件として、細胞死を起こさないことが必要である。細胞毒性の低い大腸菌株をスクリーニングするために、非必須遺伝子をゲノム網羅的にノックアウトした Keio collection (3909 株) をナショナルバイオリソースから入手する。96 well プレートで植物培養細胞と各大腸菌株を一定時間混合培養後、抗生物質を含む植物培地プレートにスポットしてカルスが形成されるものを選抜する。さらに解析結果を元に、クロニング用として一般的に使用される大腸菌株から弱毒性変異株を作製する。
- (4). (1)でおこなった水平伝達後のベクターの構造解析結果を踏まえて、生物界間接合による動・植物細胞への遺伝子導入用ベクターを作製する。
- (5). (1)～(4)で得られた知見、材料を用い生物界間接合による動・植物細胞への遺伝子導入にチャレンジする。検討項目として、① 酵母で得られた導入効率上昇をもたらす薬剤添加。② 既知のアポトーシス阻害剤の添加。③ 動物細胞については Toll like receptor 阻害剤の添加。等を想定。一過的な移行にせよ、遺伝子伝達例を示す事を最低目標とし、特にこれまでに成功例が報告されていない高等植物細胞への遺伝子移行を重点的に挑戦する。

4. 研究成果

- (1). ***oriT* 部位から始まる生物界間接合は、正確に再環状化する。**
 - ① 出芽酵母の相同組換え修復変異体 *rad51* Δ , *rad52* Δ および非同組換え修復変異体 *rad50* Δ , *yku70* Δ , *lig4* Δ を用いて受容側真核細胞が与える生物界間接合への影響を解析した。それぞれの変異体に由来する生物界間接合による形質転換体 10 株ずつについて移行した IncQ 型プラスミドベクターの *oriT* 部位を解析した結果、コントロールとして用いた野生株由来の形質転換体 1 株で欠失が見られたものの、その他は全て正確に再環状化していた。この結果より、生物界間接合におけるベクターの再環状化は受容側細胞の DNA 修復系とは独立して行なわれることが示された。

- ② *incP* 型 *oriT* 部位または *IncQ* 型 *oriT/mob* 領域を保持する，酵母 Two-hybrid系に利用可能なベクターをそれぞれ作製し，生物界間接合の正確さを解析した。各ベクターを用いた生物界間接合による形質転換体 32 株ずつについて移行したベクターを解析した結果，全ての形質転換体で正確に再環状化していた。更に *IncP* 型 *oriT* の挿入方向は移行の頻度や正確さに有意な影響を与えないこと，*IncP* 型ベクターは *IncQ* 型ベクターに比べ形質転換効率が優れていることが明らかになった。
- ③ 異なる選抜マーカーを保持させた 2 種の生物界間接合用ベクターを作製した。
a) それぞれを 1 つの供与側大腸菌に保持させて生物界間接合をおこなった場合。b) 2 種のベクターをそれぞれ別の供与側大腸菌に保持させて生物界間接合をおこなった場合。について受容側出芽酵母の形質転換効率を解析した。その結果，a) においては 2 種のベクターを同時に保持する形質転換体の割合は 1 種のベクターを保持する形質転換体の 16 %程度観察されたものの，b) のケースでは 2 種のベクターを同時に保持する形質転換体は得られず，検出限界以下であった。この結果から，i) 複数のベクターが供与側大腸菌 1 細胞から移行可能であること。ii) 受容側酵母細胞の集団中には一部の接合能が高い細胞集団が存在するのではなく，ランダムに選択されていることが示された。
- ④ 2 つの *IncP* 型 *oriT* 部位を選抜マーカー *TRP1* の両側に配置したベクターを作製して出芽酵母に対し生物界間接合をおこなった。その結果，*TRP1* が除去されたベクターを保持する形質転換体が 17 %の割合で観察された。この結果から生物界間接合ではベクターに *oriT* 部位を 2 つ配置させることにより，任意の領域を除去させて移行させるようにデザインが可能であることが示された。
- (2) 酵母における生物界間接合効率上昇変異株の知見は，動・植物細胞への導入には直接応用できない。
22 株の生物界間接合効率上昇変異株をさらに詳しく解析したところ，5 株を除いた全てが核コードのミトコンドリアタンパク質遺伝子の欠損株，もしくはミトコンドリアゲノム欠損株であった。先述の通り呼吸機能阻害による生物界間接合効率の上昇のアプローチは動・植物細胞では使えず，残る 5 株の原因遺伝子

についても，動・植物で構造および機能が共通し，その機能阻害剤が明らかになっているものを見出すことができなかつた。

(3) 弱毒性大腸菌株の発見

まずイネ 0c 培養細胞を用いて，植物病原菌のアグロバクテリアと大腸菌間での細胞毒性の差を，カルス形成可能な最大菌数を比較することにより確認した。その結果， 1.7×10^6 の 0c 細胞に混合可能な最大菌数はアグロバクテリアが 7.5×10^7 に対し大腸菌は 1.2×10^6 であり，64 倍の差が観察された。この結果は当初の推定通りアグロバクテリアが植物の防御応答をすり抜けるのに対し，大腸菌ではアポトーシスなどの防御応答反応が誘導されたためと考えられた。

そこで大腸菌の 1 遺伝子ノックアウト変異株コレクションの Keio コレクションを用い，0c 細胞に対し毒性の低い大腸菌株の単離をゲノム網羅的にスクリーニングした。総計 3909 株を解析した結果，8 株の弱毒性変異株を得ることができた。この中の 2 変異株については，近縁菌であるサルモネラ菌において原因遺伝子の変異が弱毒化を引き起こすことが報告されている為，T4SS を利用した遺伝子導入（生物界間接合）の際に動・植物細胞両方に対して使用可能なドナー株として今後期待できることがわかつた。

(4) 生物界間接合による遺伝子導入用ベクターの作製

- ① pEGFP-C1 に *IncP* 型プラスミドの *oriT* 部位を組み込んだ動物細胞への遺伝子導入用ベクターを作製した。リポフェクション法によって HeLa 細胞へ導入して GFP の蛍光を検出し，形質転換細胞が判別できることを確認した。
- ② GUS の C 末端に sGFP を融合したレポーター遺伝子を持つ植物細胞への遺伝子導入用ベクター pIG121Hm-intronGUS:sGFP を作成した。アグロバクテリウム法によりイネ 0c 細胞，タバコ BY-2 細胞へ導入実験をおこなったが GFP の明瞭な蛍光を検出することができなかつた。
そこで，作製したベクターは a) GUS:sGFP の融合タンパク質が十分な蛍光を発しない。b) レポーター遺伝子の発現が弱い。との 2 つの可能性を考え，トウモロコシのユビキチンプロモーターに *sGFP* 遺伝子を繋げたベクター pBUH3::sGFP を作製した。このベクターをパーティクルガン法によりタマネギの表皮細胞へ導入したところ，

sGFPの蛍光を確認できたため、生物界間接合に用いることとした。

(5). 生物界間接合による大腸菌から高等植物細胞への遺伝子伝達の成功

H23年度に実施した本研究は、東日本大震災の影響により研究費の交付に影響が出た為に、年度始めにテーマの絞り込みをおこなう必要が生じた。リスクは高いが、これまでに成功例が報告されていない、植物細胞への生物界間接合による遺伝子導入の実現に集中する事とした。

- ① 昨年度までの知見を利用して大腸菌DH10B株から植物細胞に対して毒性の弱い新規株を作製した。
- ② (4)で作製したベクターを弱毒性大腸菌株へ導入し、生物界間接合をおこなったところ、タマネギ表皮細胞とタバコBY-2培養細胞でGFP蛍光を発する一過的形質転換体を観察する事ができた(図)。しかしイネ0c培養細胞では細胞の自家蛍光が強く、作製したベクターでは一過的形質転換体の判別を明確におこなう事ができなかった。



図. 生物界間接合によりsGFP遺伝子が導入されたタマネギ表皮細胞.

- ③ ②のベクターのレポーター遺伝子をsGFPから、D型アミノ酸分解酵素遺伝子のDAOIを植物のコドン使用に適合させたsynDAOIに変更し、pBUH3::synDAOIベクターを作製した。イネ0c培養細胞に対し生物界間接合をおこない、D-セリンを含む培地上で培養したところ、D-セリン耐性形質転換体を得た。
上記のように、世界で始めて生物界間接合による植物細胞への遺伝子導入に成功した。
- #### (6). 本研究の総括と今後の展望
- 「高等植物培養細胞で、世界で初めて大腸菌からの接合による遺伝子伝達を実現する」という最大の目標を達成できたことから、本研究はおおむね順調に課題を達成できたと考える。酵母を用いた

解析により、生物界間接合で導入されたベクターは、99%以上の確率で正確に再環状化してプラスミドとして維持される事が明らかになった事も、今後の遺伝子導入系としての応用を期待させる。

本研究課題は本年度で終了するが、成果を特許および論文としてまとめる事が次の実用化ステップへの前提条件となる。動物細胞への導入は、今回は十分にチャレンジできなかった為、今後推進する必要がある。哺乳動物細胞への遺伝子導入法は本研究課題期間内にも著しく進歩し、競争に勝つ事は難しい。よって哺乳動物細胞以外の動物細胞への遺伝子導入法として活路を見出す。植物細胞への導入は、今回世界で初めて成功したものの、その導入効率を改善し、導入形態を慎重に解析することが今後必要である。これらについて植物培養細胞を用いて詰めていく予定である。さらに生物界間接合により形質転換植物を作製する事を目標とする。広島大学には隔離温室、特定網室などの設備が無い為、他研究機関との共同研究をおこなう予定である。

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4件)

1. 香山 弘明, 大腸菌による高等植物の細胞死の誘導とその解析, 平成24年度日本植物病理学会大会, 平成24年3月29日, 福岡
2. 山本 静香, ゲノム網羅的スクリーニング法を用いたイネ培養細胞に対する大腸菌の細胞毒性に関与する遺伝子の探索, 日本植物学会中国四国支部第68回大会, 平成23年5月14日, 香川
3. 白木 英介, Genome wide analysis of the factors in *E. coli* causing a suppression of plant cell growth, 日本育種学会第119回講演会 (平成23年3月30日), (横浜), 東日本大震災により講演会は中止となり, 要旨集の発行をもって発表とすることになった。
4. 守口 和基, 水平伝達に対するゲノム障壁の鍵遺伝子-酵母 *SSD1*, 第32回日本分子生物学会年会, 平成21年12月11日, 横浜

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/bio/PMOLBBI/index.html>.

6. 研究組織

(1) 研究代表者 守口 和基

(MORIGUCHI KAZUKI)

広島大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：30294523

(2) 研究分担者 該当無し

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 該当無し

()

研究者番号：