

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14889

研究課題名(和文)リン酸を利用できない生命体の構築：リンのコントロールによる遺伝子組換え体封じ込め

研究課題名(英文)Engineering phosphorus metabolic pathway for biological containment of genetically modified microorganisms

研究代表者

廣田 隆一(Hirota, Ryuichi)

広島大学・先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：90452614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子工学技術の発展によって、開放環境での利用が想定された有用遺伝子組み換え微生物(GMM)が作製されている。今後これらを安全に実用化するためにはGMMの意図せぬ増殖を防止し安全性を高めるための技術が必要である。生物学的封じ込めの方法論として、特定の化合物に生育を依存させる手法がある。亜リン酸は環境中ではほぼ検出されないため、亜リン酸に完全に生育を依存させることが出来れば、封じ込めの原理として利用できる。大腸菌をモデルとして本原理の実証を試みた結果、亜リン酸依存性は、高い封じ込め効果と、経済性、シンプルさを兼ね備えた、実用的な手法として利用可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Owing to the rapid evolution of biotechnology, genetically modified microorganisms (GMMs) hold great promise for the use in various application fields. However, the scientific community still needs to resolve a number of biosafety and biosecurity issues. A possible way to prevent the uncontrolled proliferation of GMMs is through biocontainment, which involves modifying the essential genes to make the growth and survival of cells dependent on specific chemicals. Here, we developed a novel strategy by engineering phosphorus metabolic pathway of bacteria. This approach combines the deletion of endogenous phosphate (H_3PO_4 , Pi) transporters with the expression of the genes for metabolizing phosphite (H_3PO_3 , Pt), yielding an *Escherichia coli* strain strictly dependent on Pt which is an ecologically rare but inexpensive chemical. Considering the high containment efficacy and the simplicity, this strategy can contribute to the development of a reliable and cost-effective biocontainment system.

研究分野：応用微生物工学

キーワード：生物学的封じ込め 亜リン酸 リン代謝 遺伝子組換え微生物

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組換え技術の発展は、様々な能力を有する遺伝子組み換え微生物 (GMM) の開発を可能にし、その利用を農業、医療、環境浄化など物理学的な封じ込めに限定されない領域に拡大しつつある。しかし、GMM の開放環境での利用はカルタヘナ法により制限されており、実際に利用する事は極めて困難である。GMM の意図せぬ増殖を抑制し、安全性を高めるための技術は、GMO の実用化とバイオ産業発展のために必要不可欠である。リン酸は ATP、核酸などの成分として、全ての生命にとって必須の成分である。本研究では、通常の生物が利用できない亜リン酸や次亜リン酸などの還元された形態のリンを代謝するバクテリアの機能を利用し、天然には存在しないリンの供給によって生物の増殖をコントロールするという全く新しい概念の GMM の封じ込め技術を開発する。

2. 研究の目的

リンは一般的に知られるリン酸 (H_3PO_4 , +V 価, 以下 P_i と略) 以外にも、亜リン酸 (H_3PO_3 , +III 価, Pt) や次亜リン酸 (H_3PO_2 , +I 価, HPt) などの還元型の状態を取ることができる。しかし、亜リン酸と次亜リン酸は、環境中に有効な濃度としては存在しない。一方、リンは生物の必須元素であり、ATP や核酸などの成分として生物の育成に欠かすことのできない栄養素である。そこで、亜リン酸しか利用できない形質を作ることができれば、生物学的封じ込めの原理として利用できると考えられる (図 1)。本研究では、大腸菌をモデルケースとして、亜リン酸だけに生育を依存する新たな生物学的封じ込め手法を開発することを目的とした。また、得られた株においてその封じ込め効果の評価を行った。

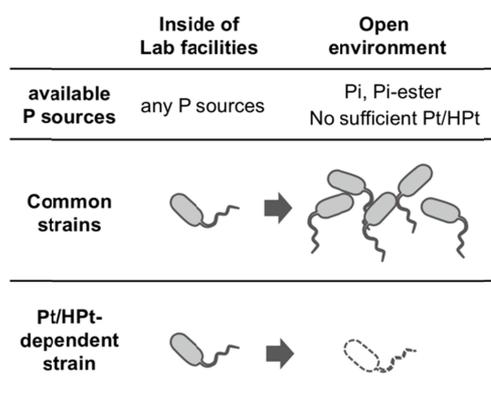


図 1 : 本研究のコンセプト

3. 研究の方法

3-1. リン酸輸送体のリン酸/亜リン酸輸送能の解析

これまでに報告されていた無機リン酸を含むリン化合物の輸送体が、リン酸あるいは亜リン酸に対してどの程度の特異性を示すか

全く調べられていなかった。そこで、無機リン酸の輸送体をすべて破壊した大腸菌株 MT2012 ($MG1655$ $pitA::frrt$, $pitB::frrt$, $phnC::frrt$, $phoA::frrt$, $pstSCAB::Kan^r$) に、特異性を調べたい輸送体を発現させ、その株のリン酸あるいは亜リン酸をリン源とする MOPS 合成培地 (MOPS- P_i , -Pt) における増殖を調べることで、輸送体の特異性を調べた。培養液中のリン濃度 (最終濃度) は 1.0 mM とした。リン酸の取り込みをさらに詳細に解析するために、放射性同位体でラベルされたリン酸 [^{32}P] PO_4^{3-} の取り込みを調べた。

3-2. リン酸取り込み遺伝子完全欠損株の作成

リン酸を取り込まず、亜リン酸を取り込む輸送体 HtxBCDE を用いて、リン酸取り込み遺伝子を完全に欠損させた株の作製を行った。まず、単独遺伝子破壊株ライブラリーから P_1 ファージを用いた形質導入によって、リン酸輸送体遺伝子を破壊し、カナマイシンカセットを除去するというサイクルを繰り返すことで、 $pstSCAB$ 以外の $pitA$, $pitB$, $phnC$, $glpT$, $ugpT$, $uhpT$ の 6 個の遺伝子破壊を行った。次に、カルシウム法を用いた形質転換によって、 $PtxD$ 発現プラスミド $ptxD/pTW229$ および HtxBCDE 発現プラスミド $htxBCDE/pSTV28$ を導入した。得られた株に対して $pstSCAB$ を破壊し、MOPS-Pt プレート培地にて、37 °C、7 日培養にてリン酸取り込み遺伝子完全欠損株 (RN1008 株) を獲得した。それぞれの遺伝子が破壊されていることは、得られた株の PCR 解析により行った。

3-3. 作製株における封じ込め効果の評価

MOPS-Pt で培養した RN1008 を、リン酸をリン源とする固形寒天培地 (2xYT 培地: 増殖非許容培地) にプレーティングし、コロニーの出現を確認した。同時に培養液の一部について、適宜希釈を行い MOPS-Pt 寒天培地 (増殖許容培地) にプレーティングし、出現したコロニー数から全菌体数を概算した。そして全菌体数のうち、どの程度の割合で亜リン酸に依存しない変異株が出現するかを調べた。4.0 L の MOPS-Pt 液体培地から得られた菌体を 6000g、15 分間で遠心した後、菌体ペレットを、滅菌水を用いて一回洗浄した後、同条件で遠心操作を行い 1/100 容量 (40 mL) の滅菌水で再懸濁した。この懸濁液を 18 cm 角スクエアディッシュ (Nunc 社) で作製した 2xYT 寒天培地プレート 32 枚に対して、1.0-1.5 mL ずつプレーティングし、37 °C で 3 週間静置培養を行った。一部の培養液は適宜希釈したのち MOPS-Pt 寒天培地にプレーティングし、全菌体数の測定に用いた。

3-4. 封じ込め株の生存率測定

RN1008 の生存変化を調べるために、前培養菌体を 100 mL の MOPS-Pt および MOPS- P_i 液体培地が入った 500 mL 三角フラスコに植菌

し、37 でインキュベートした。その後、経時的に培養液を採取し、適宜希釈した後 MOPS-Pt プレート（許容培地）にプレATINGし、生細胞の数を計測した。

4. 研究成果

4-1. 亜リン酸特異的輸送体 HtxBCDE の発見

これまでにリン酸輸送体をはじめとするリン化合物の輸送体について、亜リン酸や次亜リン酸に対する基質特異性を調べられた例は皆無であった。*E. coli* MT2012 は4種の無機リン酸輸送体が全て欠損した破壊株である。そこで、亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PtxD) を導入した MT2012 (MT2012-ptxD) に解析の対象とする輸送体を発現させ、その株の亜リン酸およびリン酸での増殖を調べることでリン基質の取り込み能力を調べた。大腸菌由来の PitA, PitB, PhnCDE, PstSCAB, *Ralstonia* sp. 4506 が有する亜リン酸輸送体 PtxABC および *Pseudomonas stutzeri* WM88 が有する次亜リン酸輸送体 HtxBCDE を MT2012 に発現させ、MOPS-Pt および MOPS-Pi 培地における増殖を調べた。その結果、PitA, PitB, PstSCAB, PhnCDE, PtxABC はいずれも MOPS-Pt および MOPS-Pi 培地で増殖が可能であった (図 2a)。

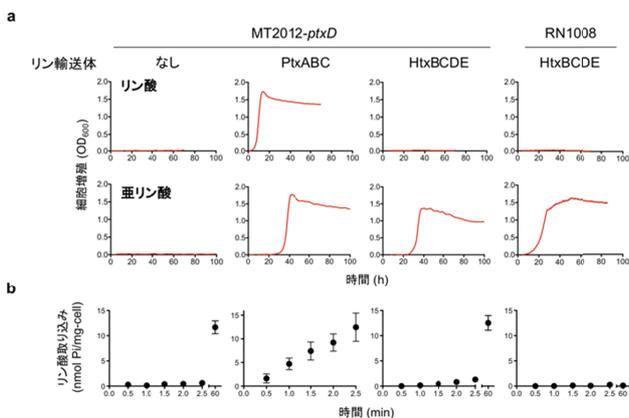


図 2: MT2012-ptxD を用いたリン輸送体の基質特異性解析。
a: リン輸送体を導入した株の MOPS-Pi, Pt における増殖。
b: ^{32}P -リン酸を用いた微量リン酸の取り込み解析

一方 HtxBCDE を発現させた MT2012-ptxD は、MOPS-Pi では増殖が見られず、MOPS-Pt においてのみ増殖した。放射性同位体でラベルされたリン酸 ($^{32}\text{P}\text{PO}_4^{3-}$) の取り込みを調べた結果、HtxBCDE を導入した MT2012-ptxD はコントロール株と同様、全くリン酸を取り込まないことが分かった (図 2b)。以上のことから、HtxBCDE はリン酸を取り込まず、亜リン酸を区別して取り込むという、本研究のコンセプトに合致した機能を有したリン輸送体であることが明らかとなった。

4-2. リン酸取り込み遺伝子完全欠損株 RN1008 の作製

大腸菌には無機リン酸輸送体 PitA, PitB, PhnCDE, PstSCAB に加え、3つのリン酸エス

テルの輸送体 UhpT, UgpB, GlpT が存在する。そこでこれらも遺伝子破壊のターゲットとした。PstSCAB を除く6つの輸送体を、それぞれの遺伝子の単独破壊株から調製した P1 ファージを用い、形質導入により遺伝子破壊した。大腸菌のアルカリホスファターゼには亜リン酸酸化活性があるとの報告があるため、*phoA* も遺伝子破壊の対象とした。*pstSCAB* 以外の輸送体遺伝子を破壊した株に、*ptxD/pTW229*, *htxBCDE/pSTV* を導入し、RN1007 株を得た。次に RN1007 株に対して、*pstSCAB* 破壊株から調製した P1 ファージによりリン輸送体の全遺伝子破壊を試みた。抗生物質を含む MOPS-Pt 培地でスクリーニングを行った結果、約5日後に破壊株と思われるコロニーが得られた。得られた株の遺伝子型は PCR によって確認し、予定したとおりの遺伝子破壊が行われていることを確認した。

4-3. RN1008 株の亜リン酸依存性の評価

得られた RN1008 株が予測通り、亜リン酸以外のリン化合物を利用できないという表現型を有するか、評価を行った。リン酸、亜リン酸、グリセロール 3-リン酸 (G3P)、次亜リン酸 (HPt) をリン源とした MOPS 合成培地を調製し、滅菌水で3回洗浄した RN1008 を植菌した。細胞の増殖をモニタリングした結果、RN1008 は亜リン酸および次亜リン酸をリン源とした培地で増殖したものの、リン酸、G3P をリン源とした培地では全く増殖できなかった (図 3)。

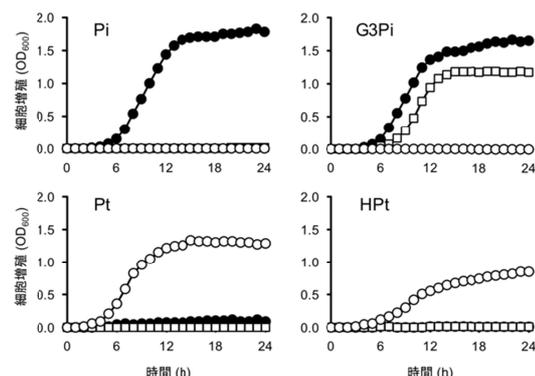


図 3: RN1008 の亜リン酸依存性の確認。

○: RN1008, ●: 野生株, □: MT2012 をそれぞれ表す。

また、MOPS 合成培地以外の複合培地でも同様に亜リン酸が無いと生育が出来ないかどうかを調べた。RN1008 培養液から菌体を集菌し、滅菌水で洗浄後、再懸濁したものをを用いて10倍段階希釈溶液を作製した。希釈菌体溶液を検定プレートにスポッティングし、コロニーの形成を調べた。その結果、RN1008 はいかなる複合培地においても増殖出来ないことが明らかとなった (図 4)。このことから、RN1008 は完全にその増殖を亜リン酸に依存している事が明らかとなった。

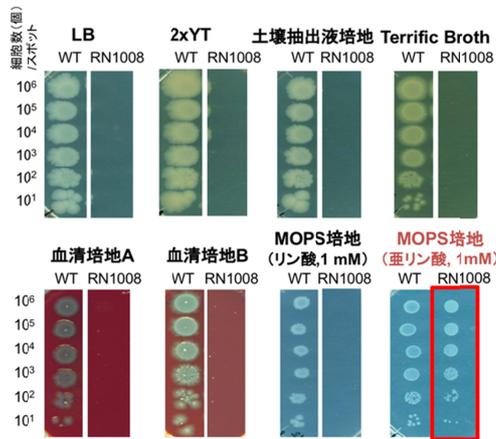


図4：様々な培地における RN1008 の増殖

4-4 . RN1008 の封じ込め効果の評価と生存率測定

RN1008 の封じ込め効果の定量的な評価を行うため、4 L の MOPS-Pt 培地で培養した菌体を非許容培地である 2xYT にプレーティングし、生育するコロニーの有無を調べた。その結果、3 週間経過後も全くコロニーの形成は起こらなかった。この時の全菌体数から、封じ込め効果は $1.94 \times 10^{-13} \text{ cell}^{-1}$ 以下であることが明らかとなった。この数値は、現在報告されている生物学的封じ込め手法の中で最も効果が高いものである。なお、米国 NIH が推奨する基準値は $10^{-8} \text{ cell}^{-1}$ であり、これを遙かに凌ぐ効果であった。

次に、RN1008 を亜リン酸を含む培地 (MOPS-Pt) および亜リン酸を含まない培地 (2xYT) で培養し、経時的に生存率を調べた。その結果、亜リン酸存在下では 2 週間経過後もほぼ生存率は変化していなかったが、亜リン酸が存在しない場合は、7 日後あたりに急激に生存率が低下し、14 日後にはほぼ生菌は検出されなくなった (図 5)。この原因は現在不明であるが、本手法は受動的な封じ込めの性質以外にも積極的に細胞死に至らしめる、能動的封じ込めとしての性質も有している可能性が示唆された。いずれにしても、亜リン酸が無い条件で生存率が低下する性質は封じ込めの観点からは好ましい性質であり、本手法の封じ込め効果の高さをもたらしている要因になっている可能性が考えられる。

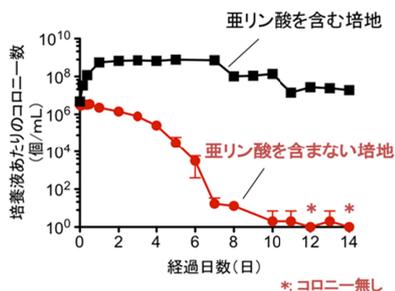


図 5：RN1008 の生存率変化

4-5 . まとめ

本研究において、バクテリアの還元型リン化合物の代謝能力を利用してリンの代謝経路を改変することで、亜リン酸に生育を依存させる方法論を確立することに成功した。また、本手法は、現在報告されている手法の中で最も高い効果を示した。さらに、本手法をたっせいするために加工が必要な遺伝子数は 10 個であり、他種微生物への適用も現実的なレベルである。亜リン酸は安価に得ることができるため、本手法は封じ込め効果の信頼性、簡便性、経済性を兼ね備えた封じ込め手法として利用できると期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Ryuichi Hirota, Kenji Abe, Zen-ichiro Katsuura, Reiji Noguchi, Shigeaki Moribe, Kei Motomura, Takenori Ishida, Maxym Alexandrov, Hisakage Funabashi, Takeshi Ikeda and Akio Kuroda, "A Novel Biocontainment Strategy Makes Bacterial Growth and Survival Dependent on Phosphite", Scientific Reports, 7:44748, 2017 (DOI: doi:10.1038/srep44748) (査読有り)
2. 廣田隆一、黒田章夫、"亜リン酸を利用した口バストな微生物の培養と生物学的封じ込め", 化学工業 (化学工業社) 68(6), pp41-47, 2017. (査読無し)
3. 廣田隆一、黒田章夫、"亜リン酸を利用した実用的な生物学的封じ込め手法", ケミカルエンジニアリング (化学工業社) 62(9), pp28-34, 2017. (査読無し)
4. 廣田隆一、黒田章夫、"亜リン酸デヒドロゲナーゼを利用した微生物の選択的培養技術", 化学と生物 (日本農芸化学会) 55(6), 369-371, 2017. (査読無し)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 本村圭, 廣田隆一, 佐野公亮, 神原亮大, 桂浦善一郎, 堀川凌平, 渡辺智, 池田 文, 石田文典, 舟橋久景, 黒田章夫, 亜リン酸を利用したシアノバクテリアの新規生物学的封じ込め手法の開発, 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名城大学) 2018 年 3 月 16 日
2. Ryuichi Hirota, Engineering of Phosphorus Metabolic Pathway: A Safeguard Strategy for Greater Use of Genetically Modified Microorganisms, International Congress on Pure & Applied Chemistry 2018 (Shem Reap, Cambodia) 2018 年 3 月 6 日
3. 廣田隆一, リン代謝経路の改変による生物学的封じ込め技術, 藍藻の分子生物学 2017 (かずさ DNA 研究所) 2017 年 12 月 2 日
4. 廣田隆一、黒田章夫、リン代謝経路の改変による微生物の選択的培養と生物学的封じ込め、第 69 回日本生物工学会シンポジ

- ウム (早稲田大学) 2017年9月13日
5. Hirota R., Abe K., Katsuura, Z.I., Motomura, K., Kuroda A. A novel biocontainment strategy makes bacterial growth dependent on phosphite, Society for Industrial Microbiology and Biotechnology, 2017年7月30日
 6. 廣田隆一、黒田章夫、亜リン酸を用いて遺伝子組換え体を封じ込める実用的手法、広島大学新技術発表会、JST本館、2017年6月13日、広島大学新技術発表会(東京) 2017年6月13日
 7. 廣田隆一、桂浦善一郎、野口麗次、森部重彬、舟橋久景、池田丈、黒田章夫、亜リン酸を用いた新規生物学的封じ込め手法、日本農芸化学会 2017年度大会、京都府(京都女子大学) 2017年3月20日
 8. 桂浦善一郎、廣田隆一、舟橋久景、池田丈、黒田章夫、亜リン酸要求性大腸菌の生物学的封じ込め効果と増殖特性解析、日本農芸化学会 2017年度大会、京都府(京都女子大学) 2017年3月20日
 9. 廣田隆一、ゲノム編集技術などによる遺伝子組換え微生物の安全性を高める技術を開発、広島大学-JST記者説明会、東京都(キャンパス・イノベーションセンター) 2017年3月17日
 10. 廣田隆一、桂浦善一郎、野口麗次、森部重彬、舟橋久景、池田丈、黒田章夫、亜リン酸を用いた新規生物学的封じ込め手法、日本農芸化学会 2017年度大会産学官学術交流フォーラム 技術交流会、京都府(京都女子大学) 2017年3月19日
 11. 廣田隆一、微生物の還元型リン化合物代謝とその応用 ~選択的培養と生物学的封じ込め~、第11回日本ゲノム微生物学会年会大会、横浜市(慶応義塾大学湘南藤沢キャンパス) 2017年3月4日
 12. 廣田隆一、黒田章夫、亜リン酸を利用した新規生物学的封じ込め手法の開発、産総研中国センターシンポジウム~生命科学の革新的展開~、広島市(ホテルセンチュリー21 広島) 2017年2月27日

〔図書〕(計3件)

1. 廣田隆一、ホスホン酸、リンの辞典、朝倉書店、2018、p86-87
2. 廣田隆一、リン酸の輸送と貯蔵、リンの辞典、2018、p100-101
3. 廣田隆一、亜リン酸の利用、リンの辞典、2018、p186

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

1. 名称：形質転換体、形質転換体の製造方法、および、当該形質転換体を用いた還元型リン

化合物の有無の検出方法
 発明者：廣田隆一、黒田章夫、本村圭
 権利者：広島大学
 種類：出願
 番号：特願 2018-038036
 出願年月日：2018年3月2日
 国内外の別：国内

2. 名称：形質転換体、形質転換体の製造方法、および、当該形質転換体を用いた還元型リン化合物の有無の検出方法
 発明者：廣田隆一、黒田章夫
 権利者：広島大学
 種類：出願
 番号：特願 2017-027588
 出願年月日：2017年7月31日
 国内外の別：国内

〔その他〕
 ホームページ等
<https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/38638>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
廣田 隆一 (Ryuichi HIROTA)
 広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授
 研究者番号：90452614
 - (2) 研究分担者 なし
 - (3) 連携研究者
荒川 賢治 (Kenji ARAKAWA)
 広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授
 研究者番号：80346527
 - (4) 研究協力者 なし