

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19875

研究課題名（和文）遺伝子組換え生物を特異的に除去する方法の開発

研究課題名（英文）Development of a method to specifically remove genetically modified organisms

研究代表者

加藤 祐輔（Kato, Yusuke）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・グループ長補佐

研究者番号：60214409

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：非天然アミノ酸Z-リジンをセンスコドンに対応してタンパク質に導入する系を組み込んだ大腸菌株を作出した。Z-リジンを与えると、機能が失われた異常なたんぱく質が作られるので、大腸菌の成長は著しく阻害された。その成長阻害の度合いは、選択したコドンに著しく依存した。側鎖の性質がZ-リジンと乖離するほど、コドン-アンチコドンの相互作用が強いほど、毒性は強くなる傾向がみられた。この仕組みを用いて、新規のカウンターセレクションマーカーとして応用できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

産業で使われる生物には、安全性の確認がなされていない遺伝子組換え生物、研究やワクチン製造に用いられる病原体、および在来種を駆逐して増殖する外来生物など、「役に立つが、危険性もある」生物が多数ある。本研究は、そのような生物が環境中に漏出した場合、自然の生物には影響を与えずに、特異的に除去できる仕組みを開発した。危険性をあわせもつ生物を、より安全に使用できるだろう。また、物質生産などにおいて、微生物の密度を調節し、最適な効率を得る方法としても応用できるだろう。

研究成果の概要（英文）：An E. coli strain that harbors a system that incorporates the unnatural amino acid Z-lysine into proteins at the sense codons was constructed. The growth of E. coli was severely inhibited in the presence of Z-lysine because non-functional proteins were produced. The degree of growth inhibition was significantly dependent on the codon selected. Large differences in the nature of the side chains from Z-lysine and strong codon-anticodon interactions enhanced toxicity. We demonstrated that this genetic device can be applied as a novel counter-selection marker.

研究分野：合成生物学

キーワード：生物学的封じ込め 微生物の成長制御 非天然アミノ酸 カウンターセレクションマーカー 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

生物に特有な危険性の本質は「自律的に増殖するので、いったん環境中に漏出したらコントロールできない」点にある。これは、化学物質や放射能など、時とともに減衰する他の環境汚染問題とは、根本的に異なる性質である。そのため、環境に悪影響が予想される生物は厳しく管理されるべきだが、物理的に隔離する古典的な方法(物理的封じ込め)は、ヒューマンエラーによって、しばしば破綻する。生物学的封じ込めは、生物に遺伝的プログラムを施して、そのような野放図な拡散を防ぐ技術であり、根本的な解決法である。申請者を含めて、急速に進歩した合成生物学の手法を用いて、生物学的封じ込め技術の開発が続けられている。しかし、万一、開放環境中に拡散してしまったそのような生物を、他の生態系を構成する生物に影響を与えずに、特異的に駆除する方法は、これまで必要性が指摘されていたにも関わらず、ほとんど報告されていなかった。

2. 研究の目的

産業に用いられる「役に立つが、危険性もある生物(安全性が確認されていない遺伝子組換え生物、生態系を破壊する有用外来生物、研究開発およびワクチン用の病原体など)」を、他の生物には無害な処理によって、特異的に死滅させる方法を開発する。これにより、これらの生物が環境中に野放図に拡散して、生態系に悪影響を及ぼす危険を解消する。その結果、これらの生物を用いた物質生産、環境浄化、ワクチンなどの環境安全性が飛躍的に高まり、生物産業の拡大と、環境保全を両立した社会を実現できる。

3. 研究の方法

本研究は、封じ込めようとする生物を特異的に排除する方法を、次のようにデザインした。

- (1) 他の生物には、影響を及ぼさないこと
- (2) 意図せず、標的生物が死滅しないこと
- (3) 可能な限り、単純な仕組みで達成できること。
- (4) 原理的に、全ての生物種に適用できること。

このような条件をすべて満たす方法を開発するのは容易ではないが、本研究は以下のように解決を目指している。

- (1)については、一般の生物には無害である非天然アミノ酸を、標的生物を死滅させる物質として用いることにより、解決した。
- (2)については、非天然アミノ酸は自然界には存在しないので、意図せず標的生物が死滅することもないと考えられた。
- (3)は、1つの酵素および1つの tRNA 遺伝子のみからなる単純な遺伝回路で達成できた。
- (4)は、コドンとアミノ酸の対応は、細菌から多細胞真核生物まで、ほとんど保存されている。その対応関係を乱すことを原理とする本法は、生物種によらず有効と推測された。

4. 研究成果

以前、毒性タンパク質の生産と生物学的封じ込めのための、厳密かつ無段階制御可能な翻訳制御デバイスを報告した(図 1A)。この技術は、部位特異的非天然アミノ酸(Uaa)導入を用いた標的タンパク質の条件的な翻訳に基づくものである。このデバイスでは、Uaa 特異的 tRNA 合成酵素(UaaRS)と、UAG 停止コドンに Uaa を組み込む基質 tRNA が、標的生物の細胞内で発現させる。また、標的遺伝子のコード領域に単一または複数の UAG コドンが挿入される。Uaa が挿入された

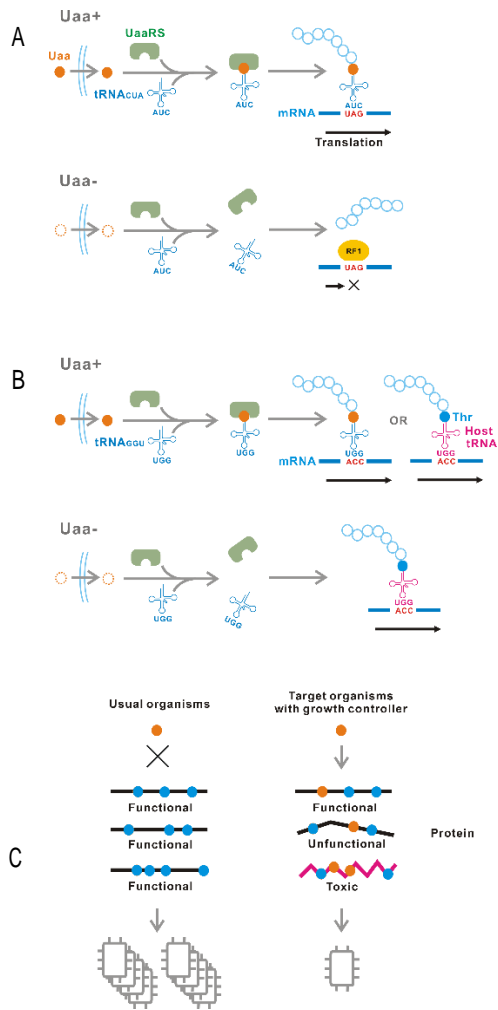


図1. 組換え微生物を特異的に除去する仕組み。(a) Uaaによるタンパク質の翻訳制御。(b) Uaaのセンスコドンに対応する導入による遺伝的宿主傷害デバイス。(c) Uaa誤導入による毒性の発揮。

標的遺伝子の翻訳は、Uaaの非存在下では中断されるが、Uaaの存在下ではUAGストップコドンのリードスルーにより機能的タンパク質が生産される。ここでは、Uaa制御翻訳制御デバイスと概念的に類似した、宿主傷害デバイスを開発した。この宿主傷害デバイスは、通常のタンパク質を構成するアミノ酸に割り当てられたセンスコドンにUaaを組み込む(図1B)。Uaaは、本来割り当てられたアミノ酸に対して競合的に多くのタンパク質に組み込まれ、その結果、機能を失ったまたは毒性を持つ異常なタンパク質が生成される(図1C)。最終的に、広範囲の生物学的プロセスが妨害されることにより、宿主を障害する。

非天然アミノ酸 *N*-ベンジルオキシカルボニル-L-リジン(ZK)をtRNA^{Pyl}に特異的に付加する改変ピロリジルtRNAシンテターゼ(ZKRS)を用いて、ZKにより宿主を傷害するデバイス構築した。tRNA^{Pyl}遺伝子のアンチコドン配列をランダム化し、種々のセンスおよびナンセンスコドンにZKを組み込んだ。予備試験において、これらの菌株の一部はZKの存在下で著しく増殖が抑制されたが、他の菌株は比較的耐性であった。各株からプラスミドを分離し、改変されたtRNA^{Pyl}遺伝子のアンチコドン塩基配列を決定した。最終的に、全64コドンに完全対応したアンチコドン配列の完全なコレクションを作成し、ZK感受性を決定した(図2)。その結果、増殖抑制の大きさはtRNA^{Pyl}遺伝子のアンチコドン配列に依存することが確認された。いくつかの興味深い相関関係が見られた。Gly、Val、Ala、Proのような小さなアミノ酸のコドンと相補的なアンチコドンは、しばしば強い毒性を示した。一方、Arg、Lys、Trp、Tyr、Pheのような大きなアミノ酸のコ

ドンは、そのほとんどが低毒性であった。ZKへの置換により、側鎖の物理化学的性質に大幅な変化をもたらす置換が、毒性が高いと説明できる。停止コドンに相補的なアンチコドンは弱いが無毒であった。相対成長率は、UGA、UAA、UAGの停止コドンでそれぞれ1.01、0.47、1.00であった。終止コドンは、リードスルーにより延長された産物を生じるだけなので、有害な変異になりにくいのが理由と考えられる。

注目すべきことに、同一アミノ酸に割り当てられた多くのN1N2ペアにおいて、(N2N1相補塩基)CおよびGコドンに対応するGN1N2およびCN1N2アンチコドンを含むtRNA^{Pyl}の毒性が、(N2N1相補塩基)UおよびAコドンに対応するAN1N2およびTN1N2アンチコドンのそれより比較的高い傾向を示した。解析の対象となったGN1N2-AN1N2(プリン)ペアとCN1N2-UN1N2(ピリミジン)ペアのうち、ほとんどのペア(25/29)でGN1N2とCN1N2が高い増殖阻害率を示した。また、3つのペアでは毒性に大きな差はなく、1つのペアだけが毒性が低いことを示した。tRNA^{Pyl}は各コドンに対して必ずしも理想的に安定した結合を作らないので、より強い結合を生じるGC塩基対を含むコドンの方が効率よくZKを導入するため、強い毒性を示したのだろう。

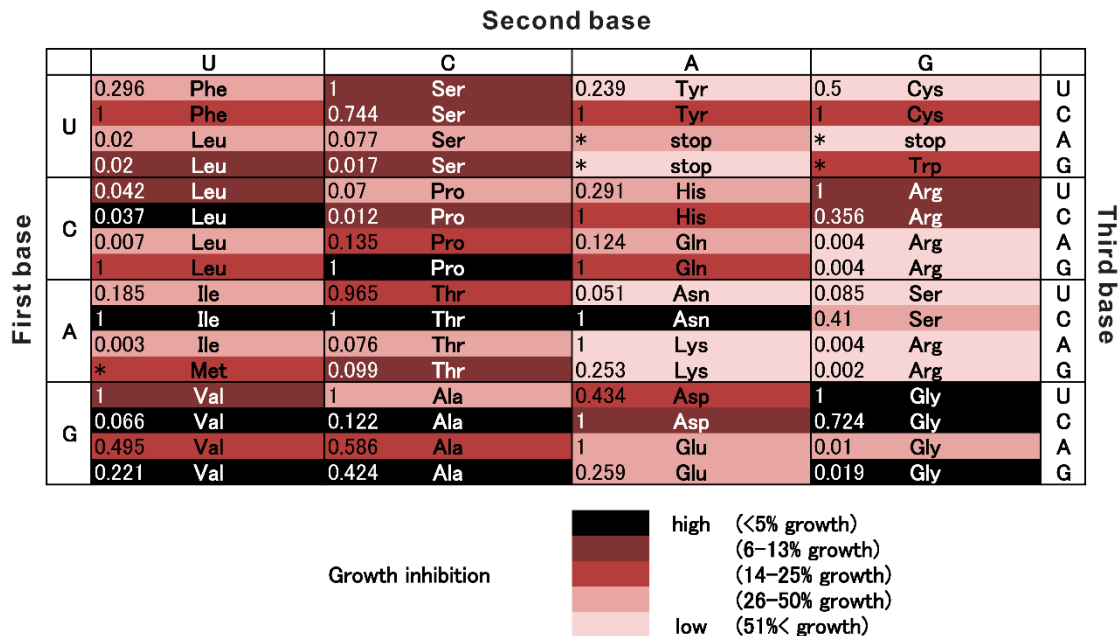


図2. 宿主の成長阻害に対する tRNA^{Pyl} のアンチコドン配列の影響。図は、アンチコドンの相補配列で示している。

次に、この宿主傷害デバイスを応用して、新規のカウンターセレクションマーカーとして利用できるか検証した。カウンターセレクションマーカーとは、条件的に宿主細胞の死滅や激しい増殖抑制を促す遺伝子のことである。これらのマーカーは、二段階ゲノム編集、組換えベクターの選択、およびプラスミドキュアリングなど、さまざまな用途に役立つ遺伝学的ツールである。プラスミドキュアリングとは、細菌からプラスミドを除去する遺伝子操作のことを指す。この技術は、様々な遺伝子工学的応用において重要である。例えば、ゲノム編集では、プラスミドの段階的導入とその除去がしばしば必要とされる。さらに、加工された DNA 配列、菌株の遺伝子操作のための酵素遺伝子、およびスクリーニング/特性評価ツールを導入するためのプラスミドは、通常、菌株の最終的な使用の前に除去される。高度なプラスミドキュアリングは、あらかじめカウンターセレクションマーカーをプラスミドに組み込み、マーカーが毒性を発揮する条件下で培養し、プラスミドを失った生き残りの細菌を選択するものである。

プラスミドキュアリングの手順を図3に示す。結果の典型的な例として、強い増殖抑制効果を持つ tRNA^{Pyl}₆₀₀ を持つカウンター-セレクションマーカーを含む標的プラスミドにおける結果も、あわせて示す。このプラスミドは、クロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) も有している。まず、標的プラスミドを含む細菌をクロラムフェニコール無添加培地で一晩(およそ 10 世代、約 18 時間) 培養を行った。この培養では、*cat* を発現していない細菌も生存できるため、標的プラスミドを失った細菌が保持している細菌と混在することになる。予備実験では、宿主傷害デバイスの効果により、目的プラスミドを持つ細菌は ZK を含む固体培地では増殖できないことがわかった。ZK 耐性およびクロラムフェニコール耐性のエスケーパーの頻度は < 70ppm(0 エスケーパー / 1.4 × 10⁴ CFU) と推定された。一方、目的のプラスミドを持たない細菌は正常に増殖し、コロニーを形成した。培養後の細菌懸濁液を希釈し、固形培地に播種した。その結果、予想されるエスケーパーの頻度よりはるかに高い、接種菌の約 2% が、プラスミドを失った ZK 耐性コロニーとして分離された。プラスミドが失われることにより、ZK 耐性と *cat* の消失によるクロラムフェニコール感受性が発現する。分離された ZK 耐性コロニーからランダムにピックアップした 64 個のコロニーはすべてクロラムフェニコール感受性であり、プラスミドの喪失が確認された。これら

の結果から、ZKRS- $tRNA^{Pyl}_{GCC}$ は信頼性の高いプラスミドキュアリングのためのカウンターセクションマーカーとして使用できることが示唆された。

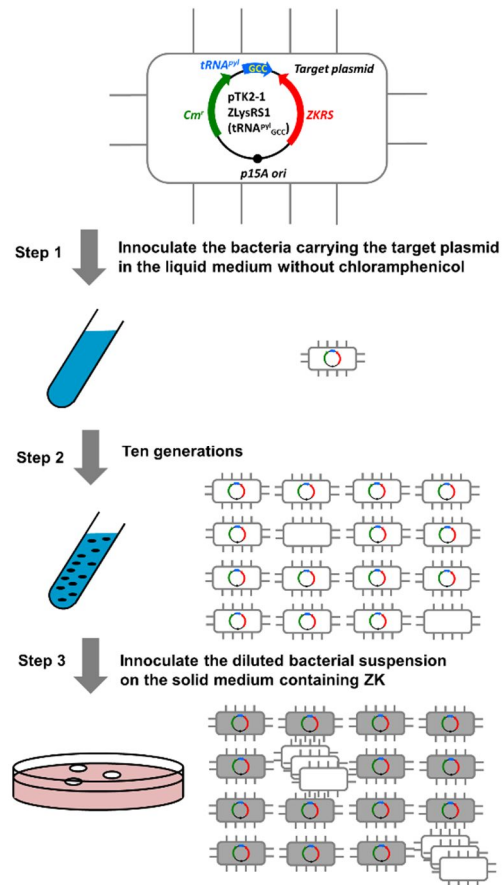


図3 .ZK の存在下で宿主傷害性を発揮するカウンターセクションマーカーによるプラスミドキュアリング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kato Yusuke	4. 巻 11
2. 論文標題 An Unnatural Amino Acid-Regulated Growth Controller Based on Informational Disturbance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 920 ~ 920
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life11090920	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 -

1. 著者名 Kato Yusuke	4. 巻 22
2. 論文標題 Plasmid Curing and Exchange Using a Novel Counter-Selectable Marker Based on Unnatural Amino Acid Incorporation at a Sense Codon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11482 ~ 11482
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222111482	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 -

1. 著者名 Kato Yusuke, Lou Chunbo	4. 巻 12
2. 論文標題 Synthetic Genetic Elements, Devices, and Systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 945 ~ 945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life12070945	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------