

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12252

研究課題名(和文)細菌が持つ生育抑制システムを生物学的封じ込め技術に応用する試み

研究課題名(英文) A study on application of a bacterial growth control system for biological containment.

研究代表者

山本 真司 (Yamamoto, Shinji)

広島大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：50607348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細菌は自身の生育を抑制し細胞死をも引き起こす毒性タンパク質を作るシステム(TAシステム)を持つ。本研究では複数のTAシステムのON/OFFを一律に制御し、細菌の細胞死を任意に引き起こす仕組みの開発を目指した。

データベースから選抜した9種類のTAシステムをアグロバクテリアに導入、その生育抑制効果を精査し、4種のTAシステムを選抜した。これらを加工し組み合わせ、アグロバクテリアの染色体DNAに組み込んだ。この細菌を細胞死誘導条件に移すことで、野生株に比べ著しく生菌数を低下させることができた。TAシステムが遺伝子組換え細菌の外環境への流出などを防ぐ封じ込め技術へ利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Most bacteria contain TA system which causes conditional growth inhibition and even may leads to cell death. The aim of this study is to develop a method to induce the effective bacterial cell death by controlling the expression of the TA genes.

First, I choose nine types of TA systems from the bacterial DNA sequence database, and then cloned the TA genes under the control of lac promoter in low and medium copy number plasmids. The growth inhibition effect on host Agrobacterium cells by regulation of each TA gene expression was evaluated. Finally, four TA systems were selected as the cell death-inducible TA systems in this bacteria. One or more of the TA systems were introduced into the chromosomal DNA in the bacteria, and their growth inhibition effects were confirmed in different experimental condition. These data suggest that the TA system could be applicable as a tool for the biological containment methodology that prevents leakage of the gene modified bacteria.

研究分野：微生物学

キーワード：トキシンアンチトキシンシステム アグロバクテリア 植物形質転換 生物学的封じ込め

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組み換え微生物は、酵素やバイオ燃料などの物質生産や環境汚染物質の分解、植物の形質転換ツールなど多岐にわたって産業利用されている。微生物の応用利用が拡大すると同時に、これらの環境への漏出リスクも高まる。また、微生物は比較的容易に短時間で遺伝子組換え操作が行えることから、教育目的で不慣れな実験者が扱う機会も多く、さらなる拡散防止技術が求められている。

多くの真正細菌・古細菌のゲノムやプラスミド上には Toxin-Antitoxin システム (以下 TA システム) と呼ばれる、環境応答やプラスミド安定化に働く遺伝子が存在する。TA システムは細胞の生育抑制や細胞死を引き起こすトキシン遺伝子とその発現や毒性を抑えるアンチトキシン遺伝子から構成されている (図 1)。私は、植物病原菌アグロバクテリアのもつ病原プラスミドの高い安定性が、TA システムによるものであることを解明した。また同時に、同細菌が植物の形質転換ツールとして頻繁に利用され、外環境にさらされやすい現状を踏まえ、同細菌の封じ込め技術の一つとして TA システムの活用を着想した。

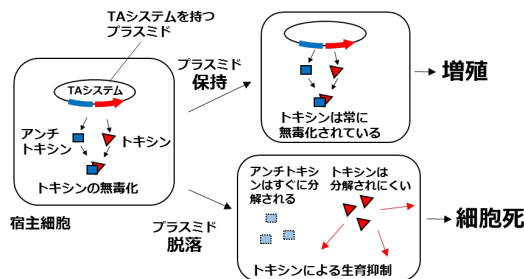


図 1 TA システムによるプラスミド安定化メカニズムの例

2. 研究の目的

本研究は、バクテリアに内在する生育抑制システムである TA システムを、抗生物質に匹敵する新たな生物学的封じ込め技術として提案し、その可能性を検証することを目的としている。TA システムによる生育制御の基本的なメカニズムを図 2 に示す。具体的な研究項目は以下の通り。

(1) データベースを利用したバクテリアゲノム上の TA システムの特定・分類

既存のデータベースや Web サイトを利用し、アグロバクテリアで機能し得る TA システムを探索する。また、作用機序の異なる TA システムを分類する。

(2) 厳密に制御可能なプロモーターの選択と TA システムのクローニング

アグロバクテリアで生育抑制を制御できる程度に発現調整が可能なプロモーターを選別し、その下に TA システムをクローニングする。

(3) TA システムによるバクテリアの生育抑制・細胞死の評価

選択したプロモーターおよび TA システムをアグロバクテリアに導入し、発現調整によって生育抑制効果が見られるかを確認する。

(4) 形質転換操作での TA システムによるアグロバクテリア除菌効果の検証および応用可能性の検討

生育抑制の誘導が可能な TA システムを組み込んだアグロバクテリアについて、実際の実験条件 (植物形質転換操作など) における生育抑制効果を検証する。

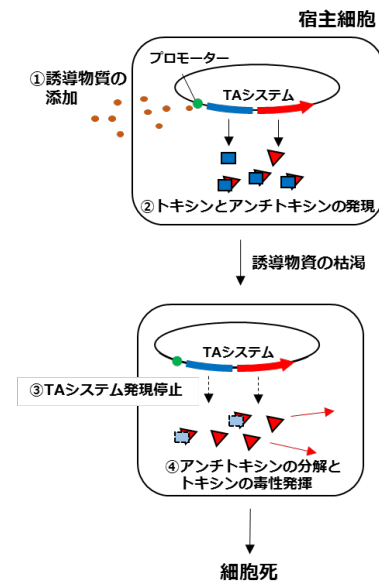


図 2 TA システムを利用した生育制御

各種プロモーターに応じた誘導物質を加え (1)、TA システムを発現誘導する (2)。必要に応じて新たな培地へ移す場合や外環境へ流出した場合、誘導物質の枯渇により TA システムの発現が停止 (3)。残存トキシンの活性により (4) 細胞死・生育抑制が引き起こされる。

3. 研究の方法

研究方法の大まかな流れを図 3 に示した。

(1) TA システムの特定と作用機序による分類

バイオインフォマティクスツールを利用した TA システムの特定

既知の TA システムの構造的特徴と塩基配列の類似性をもとに、バクテリアゲノム上の TA システムを予測するプログラム (Toxin-antitoxin database) を用い、現在全塩基配列が公開されている *Rhizobium* 属細菌について、そのゲノム上に存在する TA システムを推定した。

作用機序の推定と TA システムの選別

現在までに複数のトキシンの作用機序が研究・報告されており、未知の TA システムのトキシンについては推定アミノ酸配列情報から、ある程度その作用機序が予測できる。そこで、*Rhizobium* 属細菌のゲノム上に見出された TA システムについて、トキシンの作用機序を推定し分類、異なる作用機序をもつと思われるものを 9 つ選抜した。

(2) プロモーターの選別と生育抑制の評価

プロモーターの選別とクローニング

大腸菌と違い、アグロバクテリアで厳密に発現調整が可能なプロモーターは限られる。候補のプロモーター領域として、ラクトースオペロンプロモーター (P_{lac})、アラビノースオペロンプロモーター (P_{BAD})、アグロバクテリアの病原遺伝子のプロモーター (P_{Ti2}) を選択した。これらの下流に TA システムを導入したプラスミドを作製した。このプラスミドを持ったアグロバクテリアを発現誘導物質を加えた培地で生育させた後、誘導物質を含まない培地に移し、その生育抑制効果を調べた。

各種 TA システムによる生育抑制の評価

候補とした9種のプロモーターを P_{lac} 下流につなげ、コピー数による影響を見るために、低コピー数プラスミド (*repABC* レプリコン) と中コピー数プラスミド (pBBR レプリコン) にクローニングした。これらを導入したアグロバクテリアを TA 遺伝子発現誘導後、通常の培地へ移し経過時間と生育細胞数の推移を調べた。

(3) 植物形質転換操作における封じ込め技術としての有効性の評価

植物の形質転換に用いるアグロバクテリアへの TA システムの組み込み

植物の形質転換用菌株としては *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株を用いた。高い生育抑制効果を示した4種のプロモーターについて、同一プロモーター下に単一あるいは複数組み合わせさせて EHA105 株の染色体 DNA に組み込んだ。

形質転換後の植物組織に残存するアグロバクテリア生菌数の測定

タバコ葉片を用いた一般的なアグロバクテリアによる形質転換操作を行った後、時間経過に伴う植物組織中のアグロバクテリア生菌数を調べた。具体的には、TA 遺伝子が発現した状態のアグロバクテリアと植物との共存培養後、TA 遺伝子の発現が促されない通常の選択培地へ移植し、その後経過日数毎の植物片に残るアグロバクテリア生菌数 (CFU) を調べた。

(4) 他の輸送系での応用可能性の評価

アグロバクテリアから酵母へのタンパク質輸送系への応用可能性

アグロバクテリアから酵母への DNA およびタンパク質輸送実験系についても、TA システムによる生育抑制が有効かどうか評価した。輸送タンパク質として VirE2 と融合させた Cre タンパク質を用い、供与菌株であるアグロバクテリアにこのタンパク質を発現するプラスミドをもたせ、病原遺伝子誘導条件 (タンパク質輸送誘導条件) で受容酵母との共存培養を行った。このとき、組み込み TA システムの発現を促すため IPTG を同時に培地に添加している。

当初の計画では大腸菌からの DNA 輸送系で

の有効性も確認する予定であったが、選抜した TA システムは特異性が高く大腸菌では有効に機能しなかったため、同輸送系での評価は割愛した。

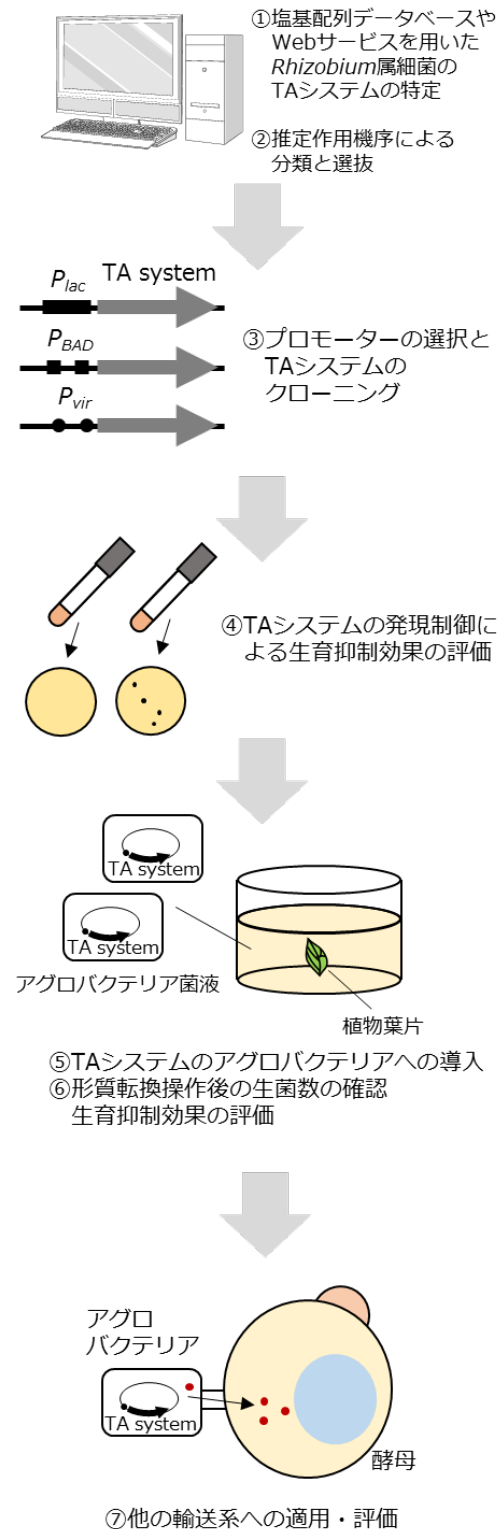


図3 研究の流れ

4. 研究成果

(1) TA システムの特定と作用機序による分類

Rhizobium 属細菌 10 種の塩基配列データから推定された 228 の候補 TA システムについて、それらがコードするトキシタンパク質の保存ドメインの類似性に基づいて 12 種類に分類した (ParE, MazF, RelE, VapC, Doc, HipA, letS, GNAT, YndB, MNT-HEPN, RES, zeta)。これら 12 種類に分類できないものも多数見られたため、未知の TA システムはまだ多く存在すると思われる。本研究の生育制御候補 TA システムとして、相同性の高い ORF の多さなどから 9 種が選抜された (表 1)。

表1 候補TAシステム

Toxin type	TA genes	Source organism
MazF	avi3504-3503	<i>A. vitis</i> S4
RelE	avi3784-3785	<i>A. vitis</i> S4
Doc	Arad1742-1741	<i>A. radiobacter</i> K84
HipA	Ach5RS23325-23330	<i>A. tumefaciens</i> Ach5
GNAT	Arad0428-0429	<i>A. radiobacter</i> K84
YndB	RHEPE00138-00139	<i>R. etli</i> CFN42
ParE	Arad7597-7598	<i>A. radiobacter</i> K84
letS	Atu6082-6083	<i>A. tumefaciens</i> C58
Vap	tiorf24-25	<i>A. tumefaciens</i> MAFF301001

(2) プロモーターの選別と生育抑制の評価

3 種のプロモーター P_{lac} , P_{BAD} , P_{T12} について、その下流に Doc タイプと ParE タイプの TA システムを結合したプラスミド (低コピー数) を作製し、生育抑制誘導能を調べた。その結果、 P_{lac} -TA では IPTG 添加によって TA 遺伝子を発現誘導しても生育に影響なく、IPTG を含まない培地に移すことで生育が抑制されることが確認できた。一方、 P_{BAD} -TA ではアラビノース添加による発現誘導およびアラビノース非存在培地への移植によっても生育にほとんど影響は見られなかった。また、 P_{T12} -TA については、アセトシリゴンによる TA 遺伝子発現誘導の時点で著しく細胞の生育を阻害するため、以降の生育制御は困難であった。従って、以降 P_{lac} を生育制御用プロモーターとした。

9 種の候補 TA システムについてそれぞれ P_{lac} 下流に結合させ、中コピー数プラスミドと低コピー数プラスミドに導入した。次に、これら TA プラスミドを導入したアグロバクテリアについて、IPTG を含む培地に移植し TA 遺伝子を発現させても生育に影響がなく、その後 IPTG を含まない培地へ移植した場合に生育が抑制されるものを選抜した。結果、RelE, Doc, ParE, letS タイプの 4 つの TA システムが選ばれた (図 4)。

これらの TA 発現プラスミドを大腸菌に持たせた場合には、同様の誘導処理を行っても生育抑制効果は見られなかった。従って今回選抜した TA システムについては大腸菌では機能していないと考えられ、従って当初予定していた大腸菌を用いた輸送系での生育抑制実験については割愛した。

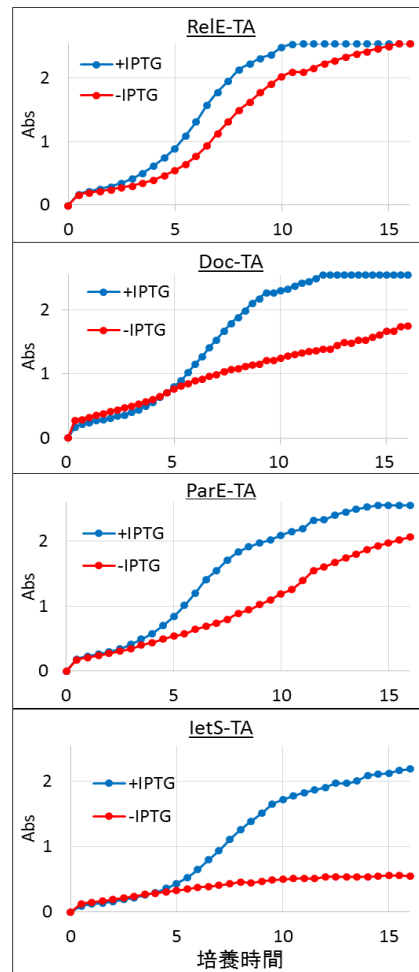


図4 TA遺伝子発現誘導後の生育抑制 IPTGで誘導培養を行った後、IPTGを含む(+ある)または含まない(-)培地へ移植したときの生育抑制効果。

(3) 植物形質転換操作における封じ込め技術としての有効性の評価

生育抑制効果の見られた 4 つの TA システムについて単一あるいは複数を組み合わせ、 P_{lac} 下流につなげたコンストラクトを作製した (図 5)。この DNA 断片をアグロバクテリアの染色体 DNA 中のトリプトファン合成遺伝子 (*trpE*) 内に挿入する形で組み込んだ。

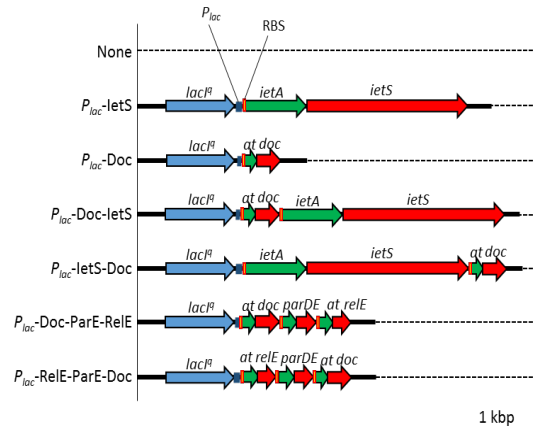


図5 ゲノムに組み込んだTA遺伝子の構成

TAを持たない対照菌株を含めこれら7種のアグロバクテリア菌株について、液体培地での生育抑制効果を見たところ、複数組み合わせたものが単一のTAをもつものよりも抑制効果が低い場合があることがわかった(図6)。これは、同一プロモーター下に複数のTAシステムを導入する際のTA遺伝子断片の前後が短すぎるなど各TAが適切に機能していないことが原因と思われる。

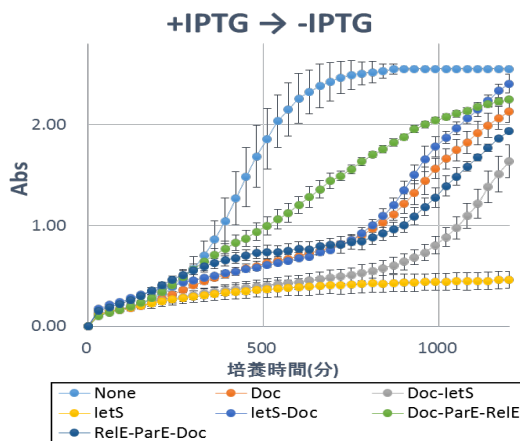


図6 TA組み込み菌株の生育抑制誘導

液体培地での生育抑制効果の高かった3種(letS, Doc-letS, RelE-ParE-Doc)について、植物の形質転換操作における生育抑制を確認した。その結果、共存培養後の残存生菌数は対照菌株と比べ著しく低下しており、それは抗生物質の添加でさらに維持される傾向が見られた(図7)。これは導入TAシステムの変異や一過的な毒性を乗り越えたものが出現するためであると考えられる。

(4)他の輸送系での応用可能性の評価

同じTAシステム組み込み菌株を用いてアグロバクテリアから酵母へのタンパク質輸送実験における残存生菌数を比較した。TAシステム発現誘導条件で受容酵母との共存培養を行い、その細胞懸濁液をIPTGを含まない培地へ塗布し残存生菌数をみた(図8)。結果、TAシステム発現条件から非発現条件への移行によって効果的な生育抑制効果が見られた。

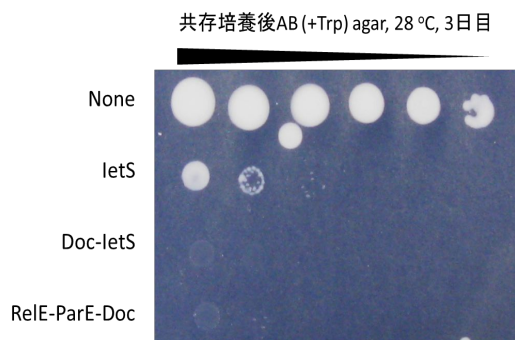


図8 酵母との共存培養後のTAシステム組み込みアグロバクテリアの生育抑制

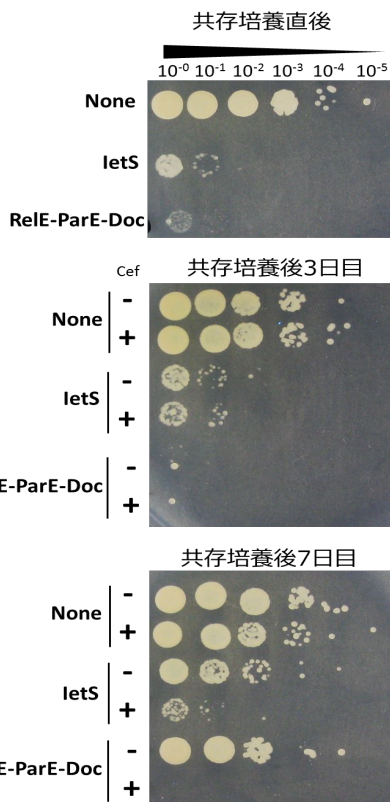


図7 植物形質転換後の葉片に残存したアグロバクテリア生菌数の推移
選択培地に抗生物質セフトキサシムを含む(+), 含まない(-)

今後の展望

本研究によって、TAシステムによる細菌の生育制御の可能性が示唆されたが、課題もまた見つかった。一つは、個々のTAシステムの特異性である。本研究で選抜したTAシステムはアグロバクテリアでは機能するものの大腸菌ではその毒性を発揮しなかった。従って、種々の菌株に汎用できるシステムを構築するには選択するTAの種類やその改良が必要となる。二つ目は複数のTAシステムの適切なオペロン化である。各TAシステムが活性を最も発揮しうるコンテキストを理解する必要があり、また、異なる生物種由来の複数の遺伝子を一つのオペロンに組み込む技術の発展も必要である。さらには耐性菌の出現の問題もある。当初の予定では複数のTAシステムを組み合わせることで耐性菌の出現率を低く抑えることができると予測していた。しかしながら、昨今パーシスターセルの出現にTAシステムの関与が報告されてきており、不用意なTAシステムの発現がこうした耐性細胞の出現を促しうる可能性も考慮しなければならない。

しかしながら本研究によって、複数の実験系でTAシステムによる生育制御が可能であることが示唆された。また、抗生物質との併用によって静菌効果が持続することも認められ、上述した課題が克服できれば新規の封じ込め技術としての応用可能性は十分にあると思われる。

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)

山本真司、Vita Agustina、坂井綾子、守口和基、鈴木克周
複製遺伝子 *repABC* を二つ具備する Ti プラスミドの各 *repABC* 領域の機能
日本農芸化学会 2017 年度 (平成 29 年度) 大会 [京都]
2017

S. Yamamoto, V. Agustina, A. Sakai, K. Moriguchi and K. Suzuki
An extra *repABC* locus in the *incRh2* Ti plasmid pTiBo542 exerts incompatibility toward an *incRh1* plasmid
FEMS2017
2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 真司 (Yamamoto Shinji)
広島大学・理学研究科・特任助教
研究者番号: 50607348