

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08121

研究課題名(和文) 生物多様性に悪影響をおよぼす生物を封じ込めるための強固な遺伝的プログラムの開発

研究課題名(英文) Robust genetic program for biological containment of environmentally invasive 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・ユニット長

研究者番号：60214409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：「生物学的封じ込め」は、危険性のある生物が、管理区域外では生存できないように、遺伝的にプログラムする技術である。理想的な生物学的封じ込め法の実例として、自然界には存在しない物質である非天然アミノ酸がないと生きられない大腸菌株の作出に成功し、新たな原理に基づく生物学的封じ込め法として提唱した。改良を重ねた結果、非天然アミノ酸がない状態でも生き残る菌体の発生率を10億分の1以下に抑えた、信頼性の高い封じ込め法を作ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この方法を用いて、これまで不可能だった、組換え生物や、環境への影響が懸念される生物種を、開放環境中に放って利用できる可能性がある。たとえば、強力な汚染物質分解能を付与した組換え微生物による環境浄化、金属の酸化還元能力を強化した組換え微生物によるオンサイトの鉱物製錬、一定時間後に自然に死滅する生ワクチン、有害生物に対する病原体散布によるバイオコントロールなどが、有望である。

研究成果の概要(英文)：Biological containment is a technique used to contain dangerous organisms in the laboratory. We proposed a novel containment system using a translational switch which is controlled by the naturally non-existent molecules, unnatural amino acids. Finally, we achieved a highly robust and reliable containment system with extremely low escape frequency (<1/1,000,000,000).

研究分野：微生物に対する生物学的封じ込め技術およびその周辺技術の開発

キーワード：生物学的封じ込め 非天然アミノ酸 合成生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有用だが危険性もある生物は多い(安全性の確認されていない遺伝子組換え生物、生態系を破壊する外来生物、病原体など)。そのような生物は、管理された区域でのみ、使用されることが望ましい(物理的封じ込め)。しかし、事故等で、そのような生物がいったん管理区域から環境中に逃げ出せば、自律的に増殖・定着して回復することは難しい。また、とても役立つ用途があるため、意図的に開放環境下で、そのような生物を使いたい場合も多い(組換え微生物を用いた環境汚染物質の分解、鉱物の精練、植物病原菌のバイオコントロール、生ワクチン、など)。

「生物学的封じ込め」は、そのような危険性のある生物が、管理区域外では生存できないように、遺伝的にプログラムする技術である。近年、合成生物学が急速に発展し、全合成ゲノムをもつ細菌の作出などをきっかけに、自然界の生物と大きく異なる遺伝情報が人為的に作られて、それが自然環境中の遺伝子プールに拡散してゆく危険性がクローズアップされた。その防止策として高度な生物学的封じ込め技術の開発が、欧米でプロモーションされている。申請者は、科研費「自然界に存在しない物質に対する栄養要求性による新規生物学的封じ込め技術の開発(挑戦的萌芽研究・2013年4月1日~2016年3月31日)」において、そのような封じ込め技術の開発をおこなった。理想的な生物学的封じ込め法は、自然界に存在しない物質に対する栄養要求性である。申請者が開発した非天然アミノ酸によりタンパク質の翻訳をオン/オフする翻訳スイッチ(Minaba & Kato, 2014; Kato, 2015a)を応用し、自然界には存在しない物質である非天然アミノ酸がないと生きられない大腸菌株の作出に成功し、新たな原理に基づく生物学的封じ込め法として提唱した(Kato, 2015b)(図1)。

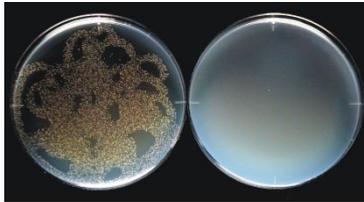


図1. 非天然アミノ酸がないと生きられない大腸菌株の作出。大腸菌に対する毒素(CoIE3)が恒常的に発現し、かつ抗毒素(ImmE3)が非天然アミノ酸ヨウ化チロシン(IY)があるときにだけ発現する株は、IYがあると生存できるが、IYがないと死滅する。

+IY -IY

一方、同じ2015年に、申請者の構想とほぼ同じ原理(非天然アミノ酸に対する栄養要求性)の生物学的封じ込め法が、米国の2つの研究グループから発表された(Mandell et al, 2015; Rovner et al, 2015)。ただし、これらは大規模にゲノムを改変した特殊な大腸菌を用いており、一般的な大腸菌株や他の微生物種への応用は難しい。

2. 研究の目的

「非天然アミノ酸がないと生きられない大腸菌」を作り出すための遺伝的プログラムの原理は、これまでの研究で、すでに確立した。これを実用的な生物学的封じ込め技術に成熟させるために、次の2つの技術的課題を克服する。

(1) エスケーパーを発生させない。

遺伝的な変異によって、生物学的封じ込めの遺伝回路が破損し、非天然アミノ酸がなくても生きられる変異体(エスケーパー)が約 $1/10^5$ の確率で生じてしまう。非天然アミノ酸側鎖への依存性の付与、封じ込めの遺伝回路の多重化、翻訳スイッチの高性能化などで、その確率を $<1/10^8$ に抑制する。

(2) 組換え遺伝子を伝播させない。

予測できない生物進化への影響を防ぐため、封じ込めの遺伝回路を形成する組換え遺伝子が他の生物に伝播するのを、完璧に防ぐ必要がある。申請者の封じ込め法は、封じ込めの遺伝回路をコードした2つのプラスミドを導入する。これら2つのプラスミドに「相互依存性」や「非天然アミノ酸がないと毒性を発揮する」性質の付与などにより、他の微生物等に伝播しないように改良する。

3. 研究の方法

(1)大腸菌をモデルとして、封じ込め法の原理的な確立を目指した。系統として、それ自体が組換えタンパク質生産などに応用性が高いBL21-AIを選択した。

(2)部位特異的非天然アミノ酸導入系として、ヨウ化チロシン導入系(Sakamoto et al, 2009)およびZ-リジン導入系(Yanagisawa et al, 2008)を選択した。

(3)部位特異的非天然アミノ酸導入系を応用した翻訳スイッチの性能は、EGFP転写産物の翻訳効率を指標に、蛍光強度の測定により評価した。

(4)生物学的封じ込め法は、非天然アミノ酸に対する栄養要求性が生じさせる遺伝回路を組み込んだプラスミドを、宿主大腸菌に導入することによって構築した。

4. 研究成果

「非天然アミノ酸がないと生きられないようにする遺伝回路」を用いた生物学的封じ込め法の技術的課題を克服し、より高い封じ込め性能を得ることを目的として、封じ込め遺伝回路の中核である遊離非天然アミノ酸で制御する翻訳スイッチの性能改善をおこなった。これまで用い

ていた翻訳スイッチでは、非天然アミノ酸が存在しないときでも最大翻訳（最適な非天然アミノ酸存在時の翻訳）の数%から数十%の漏えい翻訳が認められ、エスケーパーの発生の原因のひとつと推測された。この翻訳スイッチの厳密化には、非天然アミノ酸非存在下（OFF 状態）における漏えい翻訳の抑制が重要である。その漏えい翻訳は、翻訳スイッチの非天然アミノ酸特異性の不完全性に由来するスイッチ由来成分（L_{Ta}S）と、翻訳スイッチの性能とは無関係に生じるバックグラウンドリードスルーに由来する成分（L_{Ta}BR）から構成されている。まず、L_{Ta}Sを抑制するため、翻訳スイッチの構成要素の発現自体を非天然アミノ酸依存性に替えて、正のフィードバック制御の遺伝回路を導入した。スイッチの構成要素である非天然アミノ酸特異的アミノアシル tRNA 合成酵素およびアンバー終止コドン抑制性 tRNA に対する転写および/もしくは翻訳レベルの多様なフィードバック回路を試験し、最大翻訳効率の損失が最小かつ漏えい翻訳が最大に抑制されるものを選抜した。さらに、標的遺伝子に対する調節配列を多重化して L_{Ta}BR を対策することにより、スイッチング性能を最大限引き上げた。その結果、モデル系として用いた 3-ヨウ化-L-チロシン導入系において、翻訳スイッチの ON/OFF 比は、約 300 倍に向上した（表 1）。その数値は、大腸菌において最も広く用いられている厳密な遺伝子特異的発現調節系である PBAD/AraC 系に匹敵した。さらに、この翻訳スイッチは、即応性、中間値出力に対応する調節性、および可逆性があり、人工遺伝回路への広い応用が期待できることが、示唆された。このような改善された翻訳スイッチを用いて、オリジナルの 3-ヨウ化-L-チロシン導入系を用いた封じ込め系と比較したところ、エスケーパー発生率を大幅に抑制できることが明

UaaRS/tRNA _{CUA}	Target gene	Gross gain ^a	Relative ME ^a	Yield (g/L)
IYRS/MJR1	1a-V5-EGFP	4.9 ^b	1	ND
2a-IYRS(M6V)/MJR1	1a-V5-EGFP	118	0.51	ND
2a-IYRS(M6V)/MJR1	2a-V5-EGFP	1415	0.22 ^c	3 × 10 ⁻²

らかになった。

表 1. 正のフィードバック回路および多重化したアンバー終止コドンによる非天然アミノ酸制御翻訳スイッチの厳密化。

エスケーパーの発生頻度の抑制、および導入遺伝子の拡散の防止を目的に、非天然アミノ酸依存性による生物学的封じ込め技術に用いる人工遺伝回路の改良をおこなった。ヨウ化チロシン導入系と単独の毒素-抗毒素 CoIE3-ImmE3 を用いたプロトタイプ封じ込め遺伝回路では、エスケーパーの発生率は約 10 万分の 1 にとどまり、構成する 2 つのプラスミドのうち毒素-抗毒素が座乗しない 1 つは遺伝子拡散を防止する仕組みは導入されていなかった。まず、非天然アミノ酸導入系を、より厳密性の高いスイッチング性能をもつものに置換することにより、エスケーパーの発生率を 10-100 分の 1 程度に抑制することに成功した。さらに、CoIE3-ImmE3 に加えて、2 つの新たな毒素-抗毒素（Kid-Kis および CcdB-CcdA）の有効性を確認した。そのうえで、2 つないし 3 つの毒素-抗毒素系を 1 つのシステムに導入した、より強固な封じ込め遺伝回路を構築したところ、エスケーパーの発生率を、NIH 基準（1 億分の 1 以下）より低い、10 億分の 1 以下（定量検出限界以下）に抑制することができた。また、複数の毒素-抗毒素系を、回路を構成する 2 つのプラスミドに分散して座乗させることにより、プラスミドを複製できる近縁種の細菌では、非天然アミノ酸が存在しない自然環境下において、プラスミドが抗毒素を発現できずに遊離毒素のみを産生する結果、宿主を殺す仕組みを構築した。これにより、組換え遺伝子を含むプラスミドの伝達を防止できると考えられる。

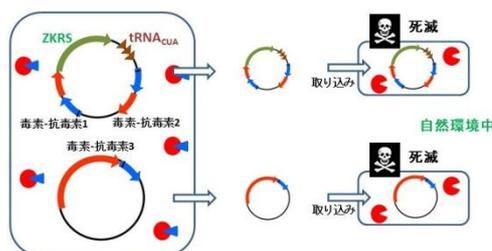


図 2. 封じ込め回路が座乗するプラスミドの水平伝播の防止。構成するプラスミド全てが毒素-抗毒素遺伝子を含む。非天然アミノ酸が存在しない自然環境下では、遊離毒素のはたらかにより、プラスミドを取り込んだ新しい宿主は死滅する。

さらに封じ込め技術を完璧にするため、大容量・長期培養で分離した稀なエスケーパーの発生機構を明らかにするため、その全ゲノム解析を行った。分離したエスケーパーは、いずれもゲノム中の冗長な tRNA 遺伝子の点突然変異が原因と特定された。そのような変異 tRNA の発生を防止すれば、エスケーパーの発生をさらに抑制できることが示唆された。それに対して、プラスミド上にある非天然アミノ酸依存性を付与する遺伝回路には変異は見つからなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kato Yusuke	4. 巻 7
2. 論文標題 Tight Translational Control Using Site-Specific Unnatural Amino Acid Incorporation with Positive Feedback Gene Circuits	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 1956 ~ 1963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.8b00204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yusuke Kato	4. 巻 20(4)
2. 論文標題 Translational Control using an Expanded Genetic Code	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20040887	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 加藤祐輔	4. 巻 3
2. 論文標題 生態系を守る生物学的封じ込め技術	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 32-37
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Yusuke	4. 巻 21
2. 論文標題 Extremely Low Leakage Expression Systems Using Dual Transcriptional-Translational Control for Toxic Protein Production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 705 ~ 705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21030705	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9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yusuke Kato
2. 発表標題 Highly-tight translational switch controlled by unnatural amino acids Translational control using an expanded genetic code
3. 学会等名 EMBO Workshop-Chemical Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤祐輔
2. 発表標題 毒素 抗毒素系の多重化により堅牢にした非天然アミノ酸要求性による生物学的封じ込め法
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke KATO
2. 発表標題 Tight control of target gene expression using site-specific unnatural amino acid incorporation with positive-feedback gene circuits
3. 学会等名 The 7th International Meeting on Synthetic Biology, SB7.0 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤祐輔
2. 発表標題 自然界にない物質がないと生きられない生物をつくる 生物学的封じ込め法
3. 学会等名 第69回日本生物工学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤祐輔
2. 発表標題 部位特異的非天然アミノ酸導入を応用した厳密な翻訳調節法
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤祐輔
2. 発表標題 正のフィードバック遺伝回路を用いて厳密に遺伝子の発現を制御する方法
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤祐輔
2. 発表標題 生物学的封じ込め技術 - 生ワクチンへの応用を例として -
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤祐輔、宮澤光博、菅原和恵、長澤裕也、菊佳男、林智人
2. 発表標題 病原性を人為的にコントロールできる高効率・高安全性生ワクチン
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会12.0
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤祐輔、宮澤光博、菅原和恵、長澤裕也、菊佳男、林智人
2. 発表標題 病原性をコントロールできる生ワクチン株作出技術と大腸菌性乳房炎への適用の展望
3. 学会等名 第24回日本乳房炎研究会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap (加藤祐輔) https://researchmap.jp/preastant4/ 農研機構 生体物質機能利用技術開発ユニット http://www.naro.affrc.go.jp/nias/introduction/chart/0205/index.html

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