

令和元年6月21日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19240

研究課題名(和文) グラム陽性菌とアグロバクテリアを連携使用する核酸注入技術

研究課題名(英文) DNA injection by agrobacteria strengthened with gram-positive bacteria

研究代表者

鈴木 克周 (Suzuki, Katsunori)

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号：50221320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：グラム陽性菌とアグロバクテリアを連携使用することによって各種生物へ長いDNAを伝達可能にしようと企図して、新規な人工プラスミドを作成した。即ち、グラム陽性菌の広域伝達性(Mobilizable)プラスミドにグラム陰性菌用の広域複製遺伝子、T-DNA輸送の伝達起点RBおよび酵母菌で機能する複製分配遺伝子と選抜マーカー遺伝子を付加した。このプラスミドはグラム陽性菌と陰性菌双方で安定に維持でき、酵母菌への伝達を可能にした。また、アグロバクテリアから大腸菌へモデルT-DNAプラスミドの輸送が可能であり、輸送されたプラスミドは輸送前の構造を維持していることも示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アグロバクテリアのT-DNA輸送機構によって大腸菌へモデルT-DNAプラスミドを伝達できることを示した成果はアグロバクテリアのT-DNA輸送伝達域を拡張したに留まらず、T-DNA輸送機構の細菌接合装置起源とその後の分化研究の端緒となると共に、大腸菌の豊富な資源を利用した受容細胞側の分子機構解明を可能にした。モデルT-DNAプラスミドにグラム陽性菌の広域複製および伝達機能を付加したシャトルプラスミドを初めて作成し酵母菌へ輸送した成果は、長い外来DNAをアグロバクテリアで扱い種々の生物へ輸送するためのベクターツールの先駆けとなる。

研究成果の概要(英文)：Mobilizable plasmids were designed with an aim to transfer long size DNAs to a wide range of organisms taking the advantage of Agrobacterium's special ability to transform various organisms. A wide host range mobilizable plasmid functional in G(+) bacteria was combined with the origin of T-DNA transfer RB together with a wide host range replication gene for G(-) bacteria and yeast genes. The resultant plasmid was found able to shuttle bacteria and transferable from Agrobacterium to yeast strains. This study also indicated transportation of a model T-DNA plasmid to Escherichia coli strains.

研究分野：微生物遺伝学

キーワード：グラム陽性菌 アグロバクテリア 広域DNA伝達 T-DNA輸送 プラスミド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アグロバクテリアを用いる植物の遺伝子導入法の適用範囲は拡張されており、酵母・動物細胞・藻類や各種の菌類などにも及ぶ。この遺伝子導入方法は、様々な生物種に適用できるという利点に加えて、長いDNAを欠けることなく注入し核DNAに着実に組み込めるという長所からも全ての遺伝子導入技術の中で際立っている。しかし、アグロバクテリアを用いる方法にも問題があり改善が望まれる。その1つとして、アグロバクテリアは長いDNAを受け取る効率が低いという難点である。これは、大腸菌でも多少の差はあれ同様の傾向がある。一方、いくつかのグラム陽性菌では長いDNAを高頻度で受け取る能力が示されている。このようなグラム陽性菌とアグロバクテリアを連携して使用し両者の長所を併用できれば、長いDNAを自在に操作し活用することが可能となろう。連携使用するためには、グラム陽性菌からグラム陰性菌のアグロバクテリアへの輸送を可能にしなければならない。即ちグラム陽性菌の広域接合伝達系が重要である。ドイツのグローマン教授らはグラム陽性菌の広域接合伝達プラスミドをグラム陰性菌へ伝達することに成功したと報告している。この接合伝達プラスミドの分与を受けて研究を開始した。

2. 研究の目的

グラム陽性菌とアグロバクテリアを含むグラム陰性菌の間で容易に移植可能で、アグロバクテリアから酵母菌へ輸送することが可能なプラスミドを作成する。酵母菌と大腸菌をモデル受容菌としてプラスミドDNA伝達実験を行ない、T-DNA輸送装置によって注入できることを実証する。

3. 研究の方法

プラスミド作成： バクテリアおよび酵母菌では環状プラスミドを複製維持できる。アグロバクテリアからT-DNA輸送機構で環状プラスミドの全体を輸送し再環状化すれば輸送されたDNAを環状プラスミドとして容易に回収して構造を分析できるため、2種のモデルT-DNAプラスミドを作成した。アグロバクテリアと酵母菌および大腸菌間で維持できるモデルT-DNAプラスミドである。可動性プラスミドpSRKKmを母体として、T-DNA輸送起点RBおよび酵母用ベクターpSR316由来の酵母菌のウラシル合成遺伝子*URA3*と自律複製遺伝子*ARS*および動原体*cen*を付加したプラスミド(Fig 1)、および*URA3*をトリプトファン合成遺伝子*TRP1*に差換えたプラスミドを作成した。

グラム陽性菌とのシャトル型モデルT-DNAプラスミドは、グラム陽性菌の広域可動性プラスミドpMV158にT-DNA輸送起点RBおよび酵母用遺伝子*URA3*と*ARS*ならびに*cen*を付加した(Fig 2A)。

プラスミド輸送実験： プラスミドの広域輸送のための共存培養は細菌間では主としてLB寒天培地を用いたが枯草菌は分散し難くなることを経験したので堀江の培地を改変して使用した。アグロバクテリアから各種生物へのモデルT-DNAプラスミドの広域輸送はアセトシリングンを添加した弱酸性合成培地を使用した。細菌の輸送完了体選抜は抗生物質を添加した寒天培地を使用し、酵母菌の輸送完了体選抜はウラシルあるいはトリプトファンを含まない酵母用合成寒天培地を使用した。

4. 研究成果

モデル T-DNA プラスミド pSRK-R316 (Fig 1)を持つアグロバクテリア (ドナー菌) と大腸菌ならびに酵母菌 (受容体菌) と共存培養してから選択培地で培養したところ高頻度で伝達完了体コロニーを得た。ドナー菌を欠く対照と受容体菌対照実験では選択培地でコロニー形成皆無だったので、ドナー菌から受容体菌へ伝達されたと言える。この輸送のための共存培養培地からアセトシリンゴン(輸送遺伝子の発現誘導剤)を省く、あるいは T-DNA 輸送起点 RB を持たないモデル T-DNA プラスミドを使用した対照実験では、大腸菌と酵母菌へ伝達されないことから T-DNA 輸送装置に依存して輸送されたと判断した。T-DNA 輸送装置に依存して大腸菌にプラスミドが伝達される事象は本研究ではじめて示された。

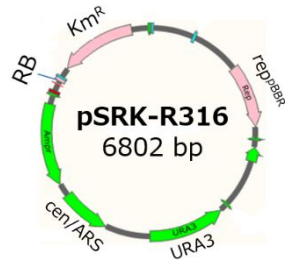


Fig 1. モデル T-DNA プラスミド pSRK-R316 の構造

アグロバクテリアから pSRK-R316 を受け取った大腸菌ならびに酵母菌からプラスミドを回収して分析したところ、輸送前の構造を維持していることがわかった。

モデル T-DNA プラスミド pMV-RByeast (Fig 2A)はグラム陽性菌とのシャトル型モデル T-DNA プラスミドである。pSRK-R316 (Fig 1)の一部をグラム陽性菌の広域可動性プラスミド pMV158 を母体として作成されている。Fig 2B に示すように、この pMV-RByeast は酵母菌へ伝達された。また、輸送のための共存培養培地からアセトシリンゴンを省くと伝達されないことから、T-DNA 輸送装置に依存した輸送が行なわれたと判断した。

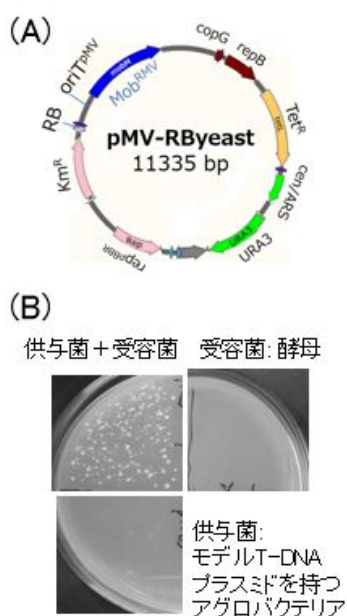


Fig 2. モデル T-DNA プラスミド pMV-RByeast の構造(A) および酵母菌への伝達(B)

(今後の展開方策)

pMV158 は小型多機能であることの反面として機能を維持したまま改変加工することが容易でなかった。また、研究代表者等にグラム陽性菌を扱う経験が乏しかったために当研究計画に掲げた第2の目標である長いDNAを扱う実験に至ることができなかった。今後は、この経験を踏まえてプラスミドを改良すると共に、長いDNAを安定に維持するためにドナー宿主細胞の改変を行なう。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Ohmine Y, Kiyokawa K, Yunoki K, Yamamoto S, Moriguchi K, Suzuki K (2018)

Successful transfer of a model T-DNA plasmid to *E. coli* revealed its dependence on recipient

RecA and the preference of VirD2 relaxase for eukaryotes rather than bacteria as recipients.

Frontiers in Microbiology 10.3389/fmicb.2018.00895

オープンアクセス 2018年

Yamamoto S, Sakai A, Agustina V, Moriguchi K, Suzuki K (2018)

Effective removal of a range of Ti/Ri plasmids using a pBBR1-type vector having a repABC

operon and a lux reporter system. Applied Microbiology and Biotechnology 102: 1823 ~ 1836.

10.1007/s00253-017-8721-7

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 2018年

[学会発表](計 3件)

Kiyokawa K, Ohmine Y, Yunoki K, Yamamoto S, Moriguchi K, Suzuki K (2018) Adaptation of VirD2 to function in host eukaryotic cells as revealed by comparative studies with Mob. 38th annual Crown gall conference. 2017.10.07-08. Oregon state university, Oregon, USA.

鈴木克周「アグロバクテリウムによる遺伝情報の水平移動」国立遺伝学研究所 研究会「生物種間における遺伝情報の水平移動」2017年度大学共同利用機関法人情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所研究会「生物種間における遺伝情報の水平移動」, 2017年8月1-2日, 三島市, 国立遺伝学研究所.

大嶺悠太, 清川一矢, 柚木和也, 山本真司, 守口和基, 鈴木克周. モデル T-DNA プラスミドのアグロバクテリウムからグラム陰性細菌への輸送. 第3回デザイン生命工学研究会, 2018年3月9-10日, 沖縄県今帰仁村, 今帰仁村コミュニティセンターホール.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

6 . 研究組織

(1)研究分担者 無し

(2)研究協力者 無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。