

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630222

研究課題名(和文)複合微生物プロセス制御のための遺伝子配列特異的な革新的微生物生育抑制技術の開発

研究課題名(英文)Development of novel bacterial growth inhibition technology for application of microbial process control

研究代表者

幡本 将史(Hatamoto, Masashi)

長岡技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20524185

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):本研究課題では、LNA/DNA混合オリゴのアンチリボソーム効果を確認するため、まずはin vitroでの遺伝子の発現抑制実験を行った。実験の結果、設計したLNA/DNA混合オリゴは添加する濃度を増加させると効果が高まる事、また標的部位によっては阻害効果が弱まることがわかった。次にE.coli AS19株を用いて増殖阻害実験を行った結果、高濃度のオリゴを使用しても阻害効果が見られなかった。そこで、ペプチドを付加したオリゴを用意し同様に実験を行った結果、ある程度の阻害効果は確認できたが、今後より詳細に実験を進める必要がある事がわかった。

研究成果の概要(英文):To evaluate an effect of anti-ribosome for microorganisms using LNA/DNA oligonucleotides, in vitro gene expression suppression experiments were conducted. From the experimental results, the designed LNA/DNA oligonucleotides had inhibitory effects depended on the dose concentrations, and the inhibitory effects were varied on its targeted site. So, as a next experiment pure bacterial cultures were used for inhibitory evaluations. From the results of growth inhibition experiments using E.coli strain AS19, little inhibitory effects were observed even though higher concentration of LNA/DNA was used. Then, peptide added LNA/DNA oligonucleotides were designed and conducted the same experiment described above. The peptide added LNA/DNA oligonucleotides had a inhibitory effect in a certain extent but further research is needed to establish the microbial growth control technology for environmental engineering.

研究分野：環境微生物工学

キーワード：16S rRNA アンチセンス 人工核酸 増殖抑制 微生物

1. 研究開始当初の背景

複合微生物系を用いる生物学的排水処理などのバイオプロセスでは、物理化学的パラメータ(温度、pH、滞留時間など)をコントロールする事で、プロセス制御または改良を行っている。言い換えれば、物理化学的パラメータを用いて、反応を担っている微生物叢を間接的に制御しているのである。そのため、例えばリン蓄積細菌をプロセス内に優占化させ、廃水中からのリン除去性能を向上させたい場合は、その目的の微生物(この場合はリン蓄積細菌)にあわせてプロセスのコントロールを行う。ところが、リン蓄積細菌と同じような生育環境を好み、互いに基質を巡って競合関係にあるグリコーゲン蓄積細菌(この微生物はリン除去には直接関与しない)も増殖してしまい、処理性能を悪化させてしまう事がある。また、処理プロセスにバルキングのような微生物に起因する問題が生じた場合、物理化学的パラメータによるプロセス制御だけでは対応が難しいため、原因菌を除去するための薬剤が使用される。しかしながらバルキング原因菌のみを死滅させるだけではなく、化学薬品によりその他の微生物にも悪影響を及ぼし、微生物叢のバランスを崩壊させてしまうという副作用がある。このような問題は、原因となっている微生物(上述の場合は、グリコーゲン蓄積細菌でありバルキング原因菌)のみをピンポイントで阻害する技術があれば容易に解決するはずである。つまり、微生物叢を構成している個々の微生物の増殖を特異的に抑制・阻害する技術があれば、微生物叢を管理者の意図する状態へと直接かつ容易にコントロールする事が可能となり、微生物コミュニティを制御し有効利用を目的としているバイオプロセスに革新をもたらす可能性を秘めた技術になりうるものである。

2. 研究の目的

本研究では、微生物叢を構成している個々の微生物を特異的に阻害・殺傷する技術の開発を行う基礎技術としてアンチセンス技術に着目した。この技術は細胞中の mRNA 配列と配列相補的なオリゴヌクレオチドを外から添加し、標的となる mRNA に交雑させることで翻訳を阻害(アンチセンス)し、細胞の生育や増殖を抑制させる技術のことである。この技術は医療分野において副作用の少ない治療法として、また抗生物質の代わりとして病原菌の mRNA をターゲットとして研究が行われている。しかし、ほとんどの微生物が分離培養されていない環境微生物叢においては、この技術をそのまま導入する事はほぼ不可能である。そこで、標的分子として rRNA に目を付けた。rRNA を標的としたアンチセンス法の研究報告は非常に少ない。大半の微生物が未培養である環境微生物においては、多くの場合 16S rRNA の遺伝子配列に基づいて解析されており、その膨大な

配列情報が今までに蓄積されている。従って、16S rRNA を標的としたアンチセンス法が開発されれば、環境中のある特定の微生物の生育を抑制できる、といった環境微生物研究のための魅力的なツールとなり、微生物を利用した排水処理等への応用が期待できる。

そこで、本研究では複合微生物系に適用できるアンチセンス技術の開発を最終目標として、人工核酸を用いて細菌の増殖阻害実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 純菌株を用いた増殖阻害実験

微生物の増殖阻害実験には *Escherichia coli* strain K12 と、細胞膜の透過性が高い変異株である *E. coli* strain AS19 を使用した。また、*E. coli* 以外の純菌株として *Bacillus subtilis* や *Ralstonia eutropha*、*Corynebacterium efficiens* を用いた。実験に使用した LNA/DNA オリゴは株式会社ジーンデザインにて委託合成した。実験に使用した LNA/DNA オリゴを表 1 に示す。阻害実験の手順は Good らの方法 に従い、必要に応じて一部改変した。まず、Mueller-Hinton (MH) 培地 (Difco) を用いて *E. coli* を 37 で一晩前培養した。前培養した K12 株は MH 培地で、AS19 株は LB 培地 (Difco) を使用し、 $10^6 \sim 10^8$ CFU/ml 程度の菌数に調整した。菌数調整後のサンプルは 96 穴プレートに分注後 LNA を異なる濃度で投入した。その後、VersaMax マイクロプレートリーダーを用いて、37 で 24 時間、5 分毎に 5 秒間の混合後、550 nm の波長により吸光度を測定した。ポジティブコントロールにはテトラサイクリン (100 μ M) を使用した。

(2) 無細胞系での転写 / 翻訳阻害実験

無細胞系での転写 / 翻訳阻害実験は、*E. coli* S30 extract system for circular DNA (Promega) を使用し、 λ -ガラクトシターゼ遺伝子が組み込まれている pGEM λ -Gal control DNA Plasmid (Promega) をテンプレートとして用いた。それぞれの反応系には LNA/DNA オリゴを異なる濃度で添加し、それ以外は製品添付の説明書通りに実験を行った。

表 1 実験に使用した LNA/DNA オリゴ

LNA name	sequence (1)	cell-free inhibition (2)
L338	CTGctgcctcccGTA	
L530	TATtaccgaggCTG	
L530scr	ATGctagcgctGCT	x
L907	GAGttttaaccTTG	
L1492	TGTtaccgacttCAC	
LmRBS	AAGgaggtgatcCAA	

1: 大文字がLNA、小文字がDNAを示す

2: 阻害効果が確認されたものを、されなかったものをxで示す

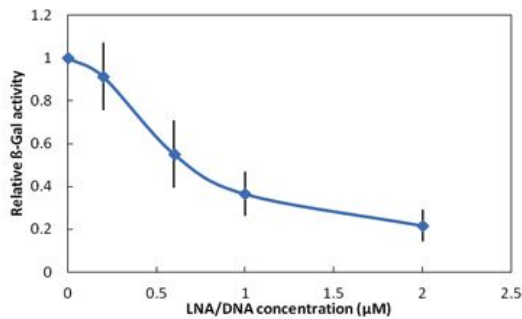


図1 mRBS 標的の LNA/DNA オリゴを用いた -ガラクトシターゼの転写 / 翻訳阻害実験の結果 . エラーバーは標準偏差を示す

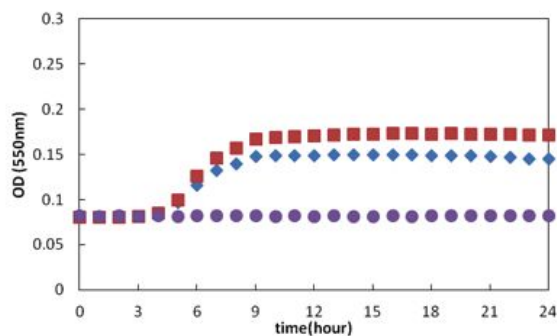


図2 mRBS 標的の LNA/DNA オリゴを用いた AS19 株の増殖阻害実験の結果 . が LmRBS (50 μM) , が LmRBS 添加なし , が Blank (LB 培地)を示す .

た。反応後の溶液分析は 96 穴プレートに分注し、-galactosidase enzyme assay system (Promega) を使用して 420nm の吸光度を測定する事で -ガラクトシターゼの発現量を計測した。

4 . 研究成果

(1) 無細胞系での転写 / 翻訳阻害実験

16S rRNA の mRNA binding site (mRBS) 標的の LNA/DNA オリゴ (LmRBS) を用いた時の -ガラクトシターゼの発現阻害実験の結果を図 1 に示す。実験の結果、LNA/DNA オリゴの添加量を増加させると -ガラクトシターゼの比活性が低下したことから、 -ガラクトシターゼの発現は添加 LNA/DNA オリゴ濃度に依存して阻害されていると考えられる。16S rRNA の 520-533 塩基目を標的とした LNA/DNA オリゴ「L530」でも -ガラクトシターゼの発現阻害が確認できた。一方で、L530 の配列を混合し、標的とミスマッチするように設計した LNA/DNA オリゴ「L530scr」では阻害効果を示さなかった。このことから LNA が配列依存的に 16S rRNA に交雑し -ガラクトシターゼの発現を阻害していると推定できた。

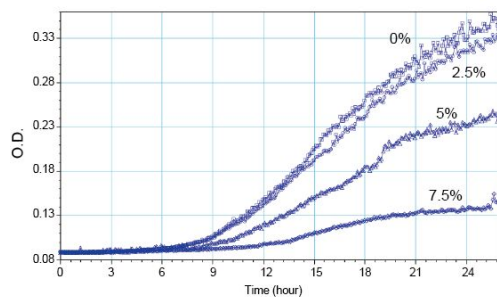


図3 DMSO 溶液による *C. efficiens* に対する増殖影響確認実験の結果 .

(2) 大腸菌の増殖阻害実験

16S rRNA の mRBS 標的の LNA/DNA オリゴ、LmRBS を用いて *E. coli* AS19 株の増殖阻害実験を行った結果を図 2 に示す。上述の -ガラクトシターゼの発現阻害実験では効果が確認できたが、本実験では最大 50 μM の LmRBS を使用したが阻害効果が見られなかった。LmRBS とほぼ同じ領域を標的とした peptide-PNA は既往の研究において大腸菌の増殖阻害効果を示している。この PNA オリゴには、PNA の細胞透過性を向上させる効果のある細胞膜透過ペプチドが付加されている。本研究では細胞膜が通常の大腸菌よりも弱い大腸菌 AS19 株を用いて実験を行ったため、LNA/DNA オリゴには細胞膜透過ペプチドを付加していなかったが、細胞膜透過性ペプチドを用いて実験を行う必要があることがわかった。

そこで、ペプチドを付加した LNA/DNA オリゴを用意し同様に実験を行った結果、ある程度の阻害効果は確認できたが、peptide-LNA/DNA オリゴを溶解させる溶液に使用する DMSO 溶液自体の阻害効果との差がはっきりと確認できなかったため (図 3)、今後より詳細に実験を進める必要がある事がわかった。

(3) 純菌株を用いた増殖阻害実験

大腸菌とは全く異なる系統分類群に属する微生物に対しても、複合微生物系において選択的な抑制・阻害効果があるかどうか確認するため、まずはその前段階として、*B. subtilis* や *R. eutoropha*、*C. efficiens* を用い実験を行った。その結果、*B. subtilis* と *C. efficiens* に関してはある程度の阻害効果が確認できた。一方、*R. eutoropha* では阻害効果はあまり観察されなかった。また、これらの微生物についても DMSO 自体の阻害効果も確認されたことから、阻害効果についてはより慎重にその効果を見極める必要があることがわかった。

(4) まとめ

無細胞系での α -ガラクトシターゼの発現阻害実験の結果、LNA/DNA オリゴを用いてもこれまでの PNA を用いた報告と同様に、標的 16S rRNA に交雑し、遺伝子の発現を阻害できる可能性が示唆された。しかしながら、細胞膜透過性ペプチドを LNA/DNA オリゴに付加しなかったため、細胞膜の透過性が低いことがわかった。そこで、細胞膜透過ペプチドを添加して実験を行った。その結果、大腸菌ではある程度の阻害効果が確認できた。一方で大腸菌とは細胞壁構造が大きく異なる *B. subtilis* では、阻害効果は確認できたものの、その効果は大腸菌のそれよりも低いものであった。また、*R. eutropha* ではあまり阻害効果が確認できなかった。これは、細胞壁構造の違いによる LNA/DNA オリゴの細胞内への取り込み効率によるものと考えられたことから、今後は細胞内への導入方法に関して最適化を図っていく必要がある。また、細胞膜透過性ペプチドは非常に高価であるため、他の方法も模索していく必要があることがわかった。

<引用文献>

Good L., Dryselius R., Nielsen P.E., Antisense effects in *Escherichia coli*. In: Nielsen, P.E. (編集) Peptide nucleic acids. Protocols and applications. Horizon Bioscience, 2004, 291-304
Hatamoto, M., K. Nakai, A. Ohashi, and H. Imachi. Sequence-specific bacterial growth inhibition by peptide nucleic acid targeted to the mRNA binding site of 16S rRNA. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol.84 (6), 2009, 1161-1168

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)

[学会発表](計1件)

幡本 将史、小泉 真登、山口 隆司、大橋 晶良、井町 寛之、LNA/DNA オリゴヌクレオチドによる微生物増殖阻害、ESCANBER Symposium、2014年3月3日、長岡市

6. 研究組織

(1)研究代表者

幡本 将史 (HATAMOTO Masashi)
長岡技術科学大学・工学研究科・助教
研究者番号：20524185