

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660281

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)A novel biological containment system using synthetic auxotrophy for an unnatural amino acid

研究代表者

加藤 祐輔 (Kato, Yusuke)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・昆虫機能研究開発ユニット・上級研究員

研究者番号：60214409

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)：遺伝子組換え生物、病原体、環境適応性の強い外来種など、「役にたつが危険な生物」が、無制御に環境中で増殖・定着しないように、「自然界には存在しない物質・非天然アミノ酸がないと生きられない生物」を作出する方法を開発した。この方法を施した大腸菌は、実験室や工場で、非天然アミノ酸を与えられた時のみ生存できる。しかし、自然環境中に逃亡しても、非天然アミノ酸は存在しないので、死滅する。

研究成果の概要(英文)：We have developed a method to construct "an organism that cannot survive without an unnatural amino acid which has never been found in the natural environment", in order to prevent uncontrolled proliferation and colonization of "useful, but dangerous organisms" such as genetically modified organisms, pathogens and harmful invasive species. An *E. coli* strain that maintains this system can survive only in the presence of the unnatural amino acid in the laboratories and factories. Whereas, this strain dies in the natural environment because the unnatural amino acid does not exist there.

研究分野：合成生物学

キーワード：生物学的封じ込め 遺伝子組換え生物 翻訳調節 非天然アミノ酸 合成生物学

1. 研究開始当初の背景

震災後、科学技術に対する安全・安心に関わる関心が特に高まっている。望ましくない生物の環境中への拡散（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）は、放射性物質と並んで一旦汚染されれば回復が難しく、危険性が懸念されている。そのような生物は、管理環境外で生存できないよう、生物学的封じ込めの工夫がされることが望ましい。一方、有害物質を組換え生物などを用いて浄化するなど、そのような生物を環境中で用いることが有益な場合もある。昆虫でも、遺伝子組換えにより不妊化した個体を放ち、野生個体と交わせて病原体媒介昆虫（蚊）を駆除する方法が注目されている。これらの組換え体は、環境中で生存できないよう生物学的封じ込めのための遺伝子操作がなされているが、現状では変異による耐性の獲得や技術そのものの不完全さにより相当な割合でそれを逃れる個体が発生するため、環境中への拡散を防げないのが課題となっている。

2. 研究の目的

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。本研究は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を用いて、非天然アミノ酸（自然界には存在しない）の存在下のみで生存が可能な、新しい生物学的封じ込め技術を開発する。

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、それ自身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のモデルとして、ヨウ化チロシン導入系を選択した (Sakamoto *et al*, 2009)。

(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。また、スイッチオフ時の漏洩翻訳は、強毒性 RNA 分解酵素 ColE3 の発現コンストラクト維持を指標として評価した。

(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

(1)封じ込め遺伝回路を構築するための翻訳スイッチの開発

非天然アミノ酸依存性翻訳スイッチは、非天然アミノ酸を必須栄養素として要求する大腸菌を作出するための鍵技術である (図 1)。非天然アミノ酸が存在しないとき、発現量がほぼゼロになることが重要となる。アンバー終止コドンに非天然アミノ酸 3-ヨウ化-L-チロシン(IY)を導入するアミノアシル tRNA シンテターゼ/tRNA 系では、IY が存在しなくても約 7%の漏洩翻訳が認められた (図 2)。これは、シンテターゼまたは tRNA の発現抑制との併用、標的遺伝子に挿入するアンバー終止コドンの多重化、およびシンテターゼのプロモーターの適切な選択により、<1%に抑制できた (図 3 - 5)。さらに、標的遺伝子の転写調節との二重制御により、漏洩発現をほぼ完全にゼロに抑制することに成功した (図 6)。

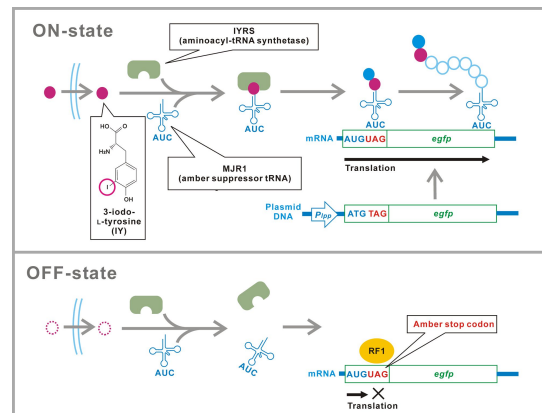


図 1 . 非天然アミノ酸依存性翻訳スイッチの原理

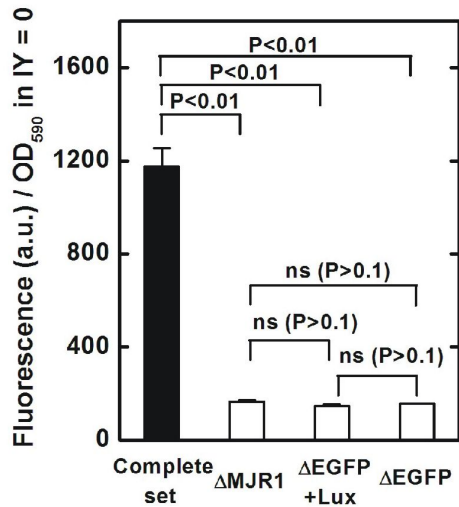


図2. 翻訳スイッチに認められる漏洩発現 (棒グラフ黒。他は陰性対照試料)

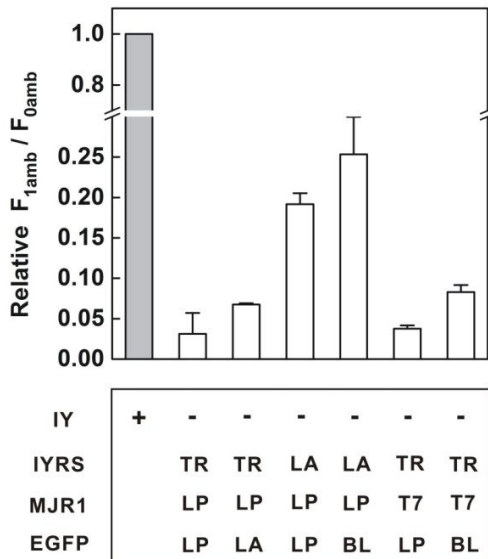


図3. シンターゼのプロモーターの選択による漏洩発現量の影響

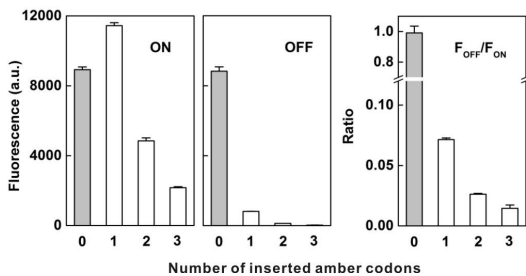


図4. 標的遺伝子に挿入するアンバーコドン数による漏洩発現量の影響

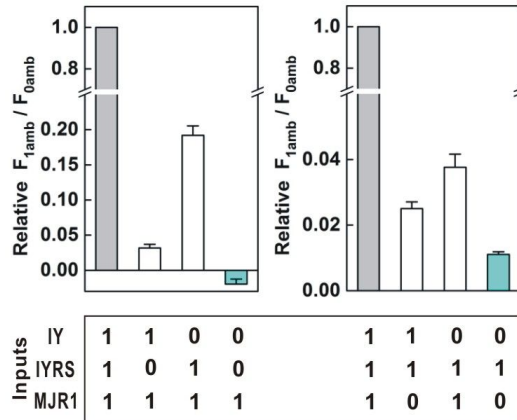


図5. シンターゼまたは tRNA の発現抑制との併用による漏洩発現の抑制

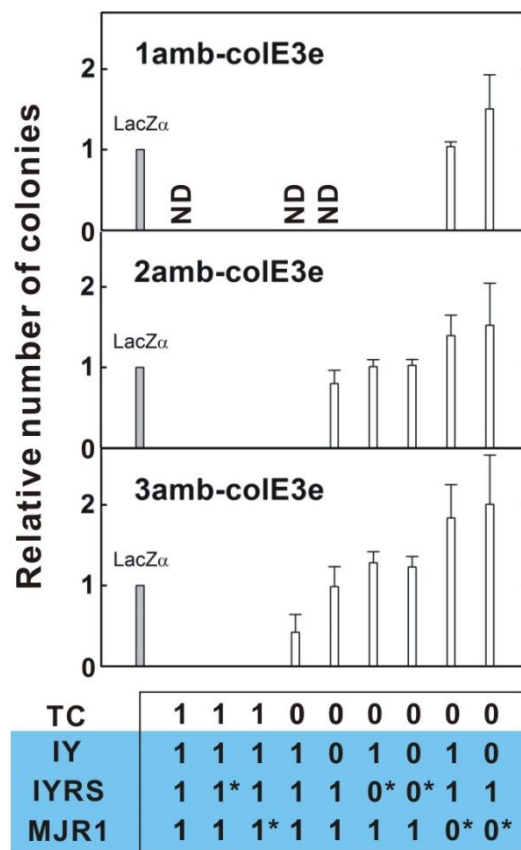


図6. 標的遺伝子の転写調節との二重制御による漏洩発現の完全抑制

(2) 非天然アミノ酸がないと生きられない大腸菌株の作出

能動的封じ込め法により、非天然アミノ酸に対する栄養要求性大腸菌株を作出した。能動的封じ込め法とは、生物が実験室外に逃亡した時、その生物に致死的な効果をもたらす遺伝子が発現するように、遺伝的に

プログラムして、逃亡を防ぐ方法である。ここでは、大腸菌に強毒性をもつ RNA 分解酵素コリシン E3 と、それに対する抗毒素イムノ E3 の遺伝子を、大腸菌 BL21-AI 株に導入した(図7)。イムノ E3 の翻訳開始コドン直下にアンバー終止コドンを挿入し、非天然アミノ酸ヨウ化チロシンによるアンバー抑制を利用した翻訳スイッチによる制御下に置いた。作出した大腸菌株 BL21-AI(IY,1amb-immE3)は、人為的にヨウ化チロシンを与えた培地では生育したが、ヨウ化チロシンがない培地では死滅した(図8)。このようにして、自然界に存在しない物質であるヨウ化チロシンに対する栄養要求性をもつ大腸菌株の作出に成功した。

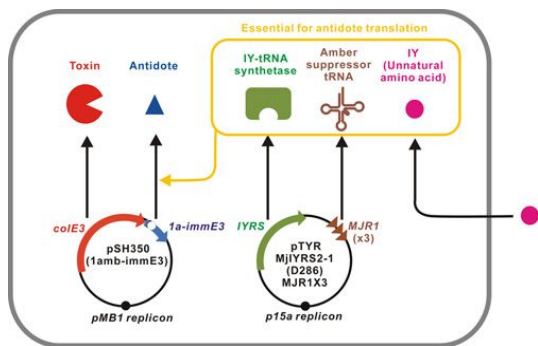


図7．非天然アミノ酸・ヨウ化チロシンがないと生きられない大腸菌を作るための遺伝回路

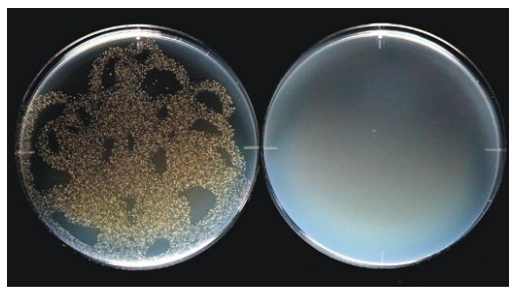


図8．ヨウ化チロシンがないと生きられない大腸菌

さらに、ヨウ化チロシン要求性大腸菌株の特性の解明をこころみた。生物学的封じ込めを施した生物が、生存に必須な因子を遮断した後、どの程度の時間生き残ることが

できるかは、その生物による外界への影響を予測する上で重要である。そこで、培地中から IY を除去したあと、BL21-AI(IY, 1a-immE3)の生菌数の時間変化を計測した(図9)。生菌数は直ちに減少せず、1時間後まではむしろ増加が認められた。2時間以降は、生菌数は指数的に減少した(半減期は、約 0.9 時間)。生物学的封じ込めで問題となることのひとつは、致死条件に置かれても生き残るエスケーパーの発生である。わずかなエスケーパーが発生すれば、コントロールできない環境中での増殖につながる危険性がある。エスケーパーの発生率は、 1.4×10^{-5} mutations/cell/generation と見積もられた。これは、71 千分裂に1つのエスケーパーが生じることを意味する。

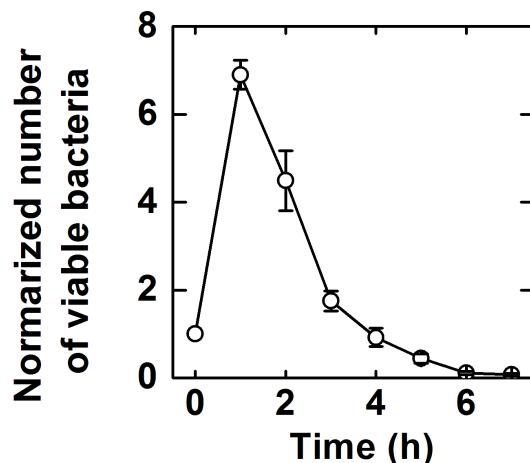


図9．IY 遮断後の封じ込め大腸菌の生存率

< 引用文献 >

Sakamoto K, Murayama K, Oki K, Iraha F, Kato-Murayama M, Takahashi M, Ohtake K, Kobayashi T, Kuramitsu S, Shirouzu M, Yokoyama S. Structure 17, 2009, 335-344 DOI: 10.1016/j.str.2009.01.008

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 5 件)

Minaba M, Kato Y. High-yield, zero-leakage expression system with a translational switch using site-specific unnatural amino acid incorporation. Applied and Environmental Microbiology 80, 2014, 1718-1725 DOI: 10.1128/AEM.03417-13

Kato Y. Tunable translational control using site-specific unnatural amino acid incorporation in Escherichia coli. PeerJ 3, 2015, e904 DOI: 10.7717/peerj.904

Kato Y. An engineered bacterium auxotrophic for an unnatural amino acid: a novel biological containment system. PeerJ 3, 2015, e1247 DOI: 10.7717/peerj.1247

Kato Y. Tunable translational control using site-specific unnatural amino acid incorporation in Escherichia coli. PeerJ PrePrints 3, 2015, e1056 DOI: 10.7287/peerj.preprints.855v1

Kato Y. An engineered bacterium auxotrophic for an unnatural amino acid: a novel biological containment system. PeerJ PrePrint 3, 2015, e1232 DOI: 10.7287/peerj.preprints.1001v1

〔学会発表〕(計 9 件)

Minaba M, Kato Y. Translational switch by site-specific unnatural amino acid incorporation. The 65th Fujihara Seminar: International Symposium on Synthetic Biology of Unnatural Base Pairs and Amino Acids (Tomakomai, Hokkaido, Japan), 1-4 October, 2013

皆葉正臣、加藤祐輔。部位特異的非天然アミノ酸導入を利用した翻訳スイッチと高収量無漏洩発現系への応用。「細胞を創る」研究会 6.0(山形県鶴岡市) 2013 年 11 月 14 ~ 15 日

加藤祐輔、皆葉正臣。部位特異的非天然アミノ酸導入を利用した翻訳スイッチの性能に影響する因子。日本農芸化学会 2014 年度大会(神奈川県川崎市) 2014 年 3 月 27 ~ 30 日

Kato Y. HYZEL: A high-yield zero-leakage expression system in Escherichia coli. 6th Annual Protein & Antibody Engineering Summit Europe (Lisbon, Portugal), 3-7 November, 2014 (invited)

Kato Y. High-yield, zero-leakage expression system in Escherichia coli. 6th Annual Protein & Antibody Engineering Summit Europe (Lisbon, Portugal), 3-7 November, 2014

加藤祐輔。自然界には存在しない物質がないと生きられない生物: 新しい生物学的封じ込め法の開発。日本農芸化学会

2015 年度大会(岡山県岡山市) 2015 年 3 月 26 ~ 29 日

Kato Y. Translational control using site-specific unnatural amino acid incorporation. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (Barcelona, Spain), 28-30 October, 2015

Kato Y. Microbes auxotrophic for unnatural amino acids: a novel biological containment system. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (Barcelona, Spain), 28-30 October, 2015

加藤祐輔。培地中の非天然アミノ酸で厳密に遺伝子の発現を制御する方法。日本農芸化学会 2016 年度大会(北海道札幌市) 2016 年 3 月 27 ~ 30 日

〔図書〕(計 1 件)

加藤祐輔、他、朝倉書店、環境と微生物の事典、2014、448

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 祐輔 (KATO, Yusuke)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・昆虫機能研究開発ユニット・上級研究員

研究者番号: 60214409