

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460529

研究課題名(和文) ゲノムでの遺伝子出現機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of gene appearance mechanism in genome

研究代表者

間世田 英明 (Maseda, Hideaki)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・准教授

研究者番号：10372343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、ゲノム中の遺伝子をコードしていない領域に遺伝子が作られてくる機構を見出し解析してきた。このような隠れ遺伝子が生まれたり、あるいは、欠失したりする領域がゲノムの中にどのくらい存在するのかを探索するソフトウェアを作成した。検索の結果、検索したすべての生物にそのような隠れ遺伝子が存在し、人では、数万箇所にあふぶことを明らかにした。検索された配列をランダムに選択し、それらの配列で遺伝子が生まれる反応が起こるか確認したところ、ランダムに選抜したすべての配列で、遺伝子が生まれる反応が起こった。さらに、人為的に、作成した配列でも同反応が起きることも確認した。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed the mechanism by which genes are created in the region nonencoding genes in the genome. We designed software that searches how many regions of such genomes are born or deleted in the genome. As a result of the search, it was revealed that such hidden genes existed in all analyzing organisms and ranged to tens of thousands in people. Sequences searched were selected randomly and it was confirmed whether gene-borning reactions occurred in those sequences. As a result, it was confirmed that reactions in which genes are born occur in all randomly selected sequences. Furthermore, artificially generating such a sequence and confirming whether or not gene-borning reactions occurred, it was also confirmed that the same reaction occurred.

研究分野：微生物制御学

キーワード：緑膿菌 隠れ遺伝子

1. 研究開始当初の背景

新興・再興感染症がしばしば新聞紙上で賑わし、効果的な対応策の開発が世界中で望まれている。その感染症の治療を難しくしている問題に、過去70年に及ぶ抗生物質の多用の結果として出現してきた(薬の効かない)交叉薬剤耐性菌の存在がある。中でも、薬剤排出ポンプの発現に伴う交叉薬剤耐性菌の出現は重篤で、このような菌は構造的にも作用的にも異なる多種の抗生物質を排出し、人類が見出してきた様々な抗生物質を一瞬にして無力なものにしてしまっている。感染症を制御するためには、耐性株が出現してしまうような従来型の殺菌・静菌に基づく抗生剤ではなく、新たなコンセプトの薬の開発が急務とされ、最近では病原菌を殺すのではなく、その毒性そのものを抑制する薬、Quorum-sensing 抑制剤の開発が進められてきた (Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 等)。申請者もその制御剤の開発に着手し、毒素発現を90%以上抑制する薬剤の開発に成功したものの、作用濃度や毒性等の問題から申請者のものを含め残念ながら実用に耐え得るものはいまだ開発されていない。更なる異なるコンセプトの薬の開発が求められている。そこで、申請者は、耐性菌の出現と新規の抗菌剤との“いたちごっこ無限ループ”から脱却できるような新たなコンセプトの制御として耐性株そのものを出現させない、あるいは、それを著しく抑制する薬剤の開発を目指すこととした。すなわち、耐性株になるプロセスを詳細に調べ、そこに関わる因子を抑制することで耐性株そのものを出不さない薬剤や対処法の確立を目指す。

2. 研究の目的

抗生物質の多用により、薬の効かない多剤耐性菌の出現が大きな社会問題となっている。申請者は、これまで細菌の抗生物質耐性化のプロセスを解析、抑制することで、耐性菌の出現を限りなく抑制する手法と薬剤の開発を目指し、研究を進めてきた。昨年度、ゲノムの特定領域での欠失によって、フレームシフトが生じ、隠れ遺伝子が出現することによって、多くの抗生物質に耐性化する現象(細菌の抗生物質の適応進化に関わる)と、そのキー因子を見出すことに成功した。しかし、そのキーとなる因子を見つただけで、その隠れ遺伝子出現機構についての詳細は明らかにできていない。そこで、この特定の欠失による隠れ遺伝子出現機構について詳細に解析し、新規細菌制御法の確立を目指すとともに、多くの生物でのこの機構の存在を確認することとした。

3. 研究の方法

(1)重なり合ったダイレクトリピートをゲノム配列から検索するソフトウェアの開発

重なり合ったダイレクトリピートが大腸菌でも緑膿菌でも、その重なっていない領

域が欠失することで耐性化することが明らかになった。そこで、そのような重なり合ったダイレクトリピートが、様々な生物のゲノム中にどのくらい存在するのかを明らかにするために、プログラミング言語 Perl を用いて、ゲノムから重なり合ったダイレクトリピートを検索するソフトウェアを開発する。現在、その試作品をすでに開発したところである。実際に緑膿菌のゲノム中には12箇所、大腸菌では8箇所存在することが明らかになった。まだ多くの改良点があるため、真核生物などへの適用ができていない。ソフト開発会社と共同で更なる改良を行い処理速度を高め、真核生物にも対応したソフトウェアの構築を行うとともに、人を含めた種々の生物のゲノムでの重なり合ったダイレクトリピートの個数を決定していく。

(2)検索された配列での意図した欠失の可否

欠失に関わる因子の検索の際、Fig. 3に示すアッセイプラスミドの構築し、欠失が起き、フレームシフトが生じた場合にのみ、クロラムフェニコール耐性遺伝子が発現し、クロラムフェニコール含有プレートで欠失の効率を測定可能なアッセイ系 (translational fusion assay) を構築している。このアッセイプラスミドは、任意の重なり合ったダイレクトリピート配列に対応できるように、制限酵素により配列の差し替えが可能ないように設計してある。そこで、このプラスミドを用いて(i)で検索された配列について、実際に大腸菌および緑膿菌内で意図した欠失の可否と効率について検討していく。しかし、検索された配列の内幾つかは、その予想される欠失塩基数が、6 bp や 9 bp であり、欠失後もフレームのシフトが起きず、欠失の可否および効率をクロラムフェニコール含有プレートでアッセイすることができない。また、配列ごとに付加されるアミノ酸配列が異なってしまうため、クロラムフェニコール耐性遺伝子の活性に影響を与えることも考えられる。そこで、translational fusion assay のようにフレームシフトによるアッセイ以外のツールの構築も必要であると思われる。そこで、申請者は、翻訳にカップリングしない transcriptional assay を構築する予定である。本アッセイ系では、重なり合ったダイレクトリピート配列を大腸菌コンセンサスプロモーターの-35 と-10 領域の間のスパーサー領域に導入する。転写の為には、スパーサー塩基数は16から19bpであることが必要であることから、それ以外の長さであると転写が起らない。そこで、欠失によってはじめて16から19bpになるように配列を設計すれば欠失の可否を下流の遺伝子(薬剤耐性遺伝子)の活性によって測定することが可能である。このシステムであれば、の問題点を克服することが可能である。実際に、スパーサーの長さ

を 16, 17, 18, 19, および 24 bp としたプラスミドを予備的に作成し確認したところ、確かに 24 bp の場合のみ転写が起こらないことを確認している。

(3) 様々な生物での重なり合ったダイレトリピートでの欠失の可否 それぞれの生物で複製可能なプラスミドに、(2) で作成した translational fusion assay システムを乗せることにより、他の生物でも重なり合ったダイレトリピート配列で意図した欠失が起こることを確認する。場合によっては、薬剤感受性の問題や codon usage の問題から上述の薬剤耐性マーカーが利用できない場合も考えられる。その場合は、異なる薬剤耐性マーカーを利用して対応していく。

(4) 重なり合ったダイレトリピートでの欠失機構の解明

本現象では重なり合ったダイレトリピートの重なっていない領域が結果的に特異的に欠失し、新たな遺伝子が出現し耐性化する。しかし、本当に重なっていない領域だけが欠失するのかどうかは未だ検討の余地が残されている。もしかすると、意図した数よりも短い領域での欠失が一部起きており、検出できないだけかもしれない。そこで、(2) で作成する transcriptional assay plasmid を用いて、本当に欠失が意図した数だけ起きていることを確認する。また、様々な配列、例えば変異を施し、一部重なりを崩した配列や、重なりを長くしたもの、あるいは、タンデムに配列したものなどを作成し、transcriptional or translational fusion assay を行い検討していく。

4. 研究成果

(1) 重なり合ったダイレトリピートをゲノム配列から検索するソフトウェアの開発

思考錯誤の結果、perl を使い、ソフトウェアの作成に成功した。そのソフトウェアは、微生物のゲノムであれば、10 秒程度で、遺伝子が自己ゲノム編集によって改変されてくる領域を見出すことが可能である。検索の結果、全て生物のゲノム上にそのような遺伝子が生まれる領域が存在することが明らかになった。人に至っては、数万箇所存在していることがわかった。

(2) 検索された配列での意図した欠失の可否

検索された配列で、遺伝子の誕生する反応が起きるかどうか検討した結果、見事に、検討した全ての配列で、遺伝子誕生反応がおこることを、独自に開発したアッセイプラスミド(3a, b) で確認した。

(3) 様々な生物での重なり合ったダイレトリピートでの欠失の可否

(2) とは逆に、様々な生物で遺伝子誕生反応が起きるかどうか検討した。その結果、確認した微生物全て、遺伝子誕生反応がおこることを確認した。

(4) 重なり合ったダイレトリピートでの

欠失機構の解明

3 a, b ベクターを用いて、意図したところだけで、遺伝子の誕生反応が起こるか否か検証した。その結果、意図したところで、意図した配列で遺伝子誕生反応がおこることを確

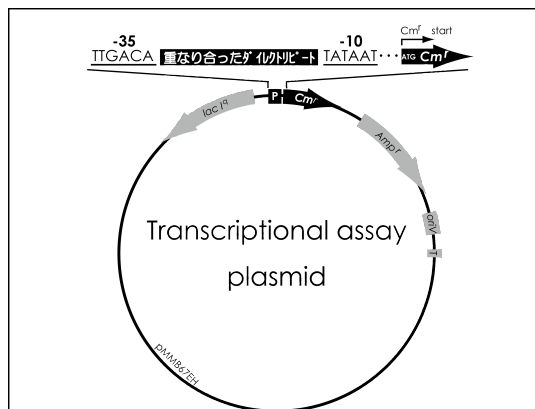


Fig. 3a Transcriptional assay plasmid

欠失が起こり、挿入した配列（重なり合ったダイレトリピート配列）の全長が 16-19 bp になって初めて転写が起こり、クロラムフェニコール耐性遺伝子が翻訳される。

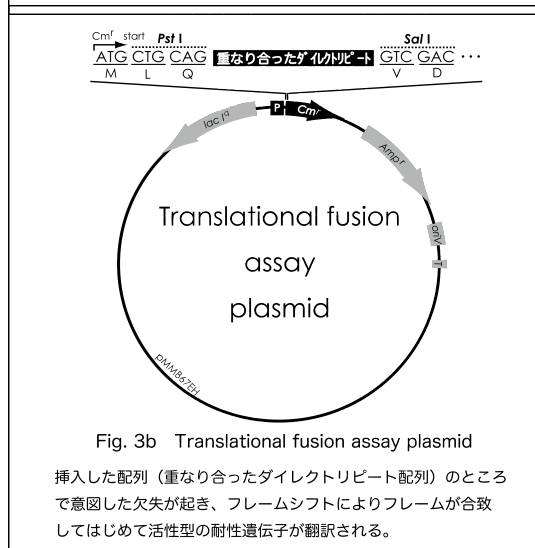


Fig. 3b Translational fusion assay plasmid

挿入した配列（重なり合ったダイレトリピート配列）のところで意図した欠失が起き、フレームシフトによりフレームが合致してはじめて活性型の耐性遺伝子が翻訳される。

認した。

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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

(1) 名称：ゲノム編集方法
 発明者：間世田英明、上手麻希
 権利者：徳島大学
 種類：特許

番号：特願 2016-158562
出願年月日：2016/8/12
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
間世田 英明 (MASEDA, Hideaki)
徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・
准教授
研究者番号：10372343

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者
なし ()