

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670218

研究課題名(和文)細菌間で伝達されるRNAを記憶するDNAメモリの開発

研究課題名(英文) Development of a DNA memory that records cell-to-cell transfer of bacterial small regulatory RNA

研究代表者

山本 章治 (Yamamoto, Shouji)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：80469957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の主な目的は、細菌におけるRNAの伝達能を安定に記憶するメモリを開発することである。この系では、特定の低分子RNAが存在する場合に限って部位特異的組換え酵素TnpRの発現が活性化され、産生されたTnpRが標的遺伝子カセットの切り出しを触媒する。切り出し反応に伴い、クロラムフェニコール感受性・スクロース耐性の表現型にロックされる。コレラ菌のDNAコンピテンスを活性化を担う低分子RNAであるTfoRの検出系を構築し、性能評価を行った。その結果、いかに検出感度・特異性を高めることができるかが課題となった。

研究成果の概要(英文)：This study was done to develop a DNA memory that records cell-to-cell transfer of bacterial small RNA (sRNA). This system consists of two distinct elements: one is a sensor of specific sRNA and the other is a memory of sensed information. The sensor is a translational fusion of the site-specific recombinase gene tnpR with a target gene of the sRNA while the memory is a DNA cassette containing a chloramphenicol (Cm) resistance gene and a levansucrase gene, which is flanked by TnpR-binding sites. In response to the presence of a specific sRNA, the expression of TnpR is activated. Synthesized TnpR in turn promotes excision of the DNA cassette, which causes sensitivity to Cm and confers resistance to sucrose. I constructed a series of sensors/memories for TfoR, the competence-activating sRNA in *Vibrio cholerae*, and evaluated performances. However, their low specificities and sensitivities were problematic. It is necessary to improve these issues for developing this type of memory device.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌間コミュニケーション 低分子RNA RNA取り込み能 RIVET

1. 研究開始当初の背景

個々の細菌は空間内に存在する細菌集団と様々な戦略で相互作用し、同調的もしくは排他的にふるまう。Quorum sensing は種特異的な分泌性シグナル分子の濃度を菌密度情報としてモニターし、集団レベルで遺伝子発現を同調させる機構であり、病原性の発現や抗生物質耐性の獲得にも深く関わっている。Membrane vesicle は、膜に接した生体分子を膜小包に包んで運ぶ。一方、接合伝達や Nanotube のように細菌間の直接的な相互作用を介した細胞内高分子の伝達機構も存在する。しかしながら、いずれの場合でも RNA 分子が伝達される例は知られていない。現在までに多数の non-coding な低分子 RNA (ncRNA) が同定され、それらを介した遺伝子発現制御ネットワークが解明されつつある。細菌における制御性 ncRNA の多くは、標的 mRNA の翻訳開始領域と特異的な塩基対を形成し、翻訳や mRNA の安定性を制御する anti-sense RNA (asRNA) である。Quorum sensing やバイオフィーム形成のような細菌集団行動の制御には複数の asRNA が関わっている場合が多い。興味深いことに、細菌の asRNA は膜周辺に局在することが示唆されている。申請者もコレラ菌において新規な asRNA を同定しており、その発現が膜貫通型転写制御因子によって活性化されることを示した。以上の知見に加えて、多細胞生物の ncRNA は細胞間伝達されることが判明しており、細菌の RNA 伝達能についても検証する必要がある。

2. 研究の目的

一般的に細菌の RNA は不安定であり、それらを追跡することも容易ではない。そこで申請者は asRNA による ON/OFF 遺伝子スイッチ機構を応用すれば、少なくとも asRNA に関しては安定に検出する系が開発できるのではないかと考えた。本研究では asRNA の伝達性を記憶するためのメモリを構築する。解析対象の asRNA が donor (D) 株から recipient (R) 株に伝達された時のみ、標的 mRNA 翻訳の ON/OFF が起こるしくみである。これにともなって高効率な組換え系がはたらき、レポーター遺伝子が切り出される。結果として RNA 伝達性が不可逆的な表現型へと変換されるため、安定なメモリとして機能すると考えられる。本研究では asRNA に焦点を当て、細胞内に伝達された RNA を安定に記憶する DNA メモリを開発することを主な目的とする。

3. 研究の方法

1) 検定系の構築

細菌における asRNA は、標的 mRNA の翻訳を抑制するタイプ (OFF 型) と活性化するタイプ (ON 型) に分けられる。コレラ菌 ON 型 asRNA の 1 つである TfoR を検出する系を構築した。

この系は RIVET (Recombination-based in vivo expression technology) を応用したものであり、以下の 2 つの因子から構成される。1 つは特異的な asRNA を検出するセンサーである。これには TfoR の標的遺伝子 *tfoX* に部位特異的組換え酵素遺伝子 *tnpR* をプラスミド上で翻訳融合させたものを用いた。また、*tnpR* をコレラ菌染色体上の *tfoX* に翻訳融合させた株も構築した。2 つ目は検出情報を記憶するメモリであるが、これにはクロラムフェニコール耐性遺伝子 *cat* とレバンスクラゼ遺伝子 *sacB* が並んだカセットをコレラ菌染色体の *lacZ* 遺伝子に導入した。このカセットの両端には TnpR の認識部位 *res* (*res::cat::sacB::res*) を付加してあるため、センサーを搭載したメモリ株では、TfoR が存在する場合に限って TnpR の発現が活性化し、産生された酵素によって *cat::sac* カセットが切り出される。最終的にはクロラムフェニコール感受性・スクロース耐性の表現型が安定に付与されることが予想される (図 1 参照)。また、TfoR が存在しない場合のバックグラウンドを低下させるために、変異型 *res* (*res-1*: TnpR による切り出し効率が低下する変異) を導入した株も構築した。

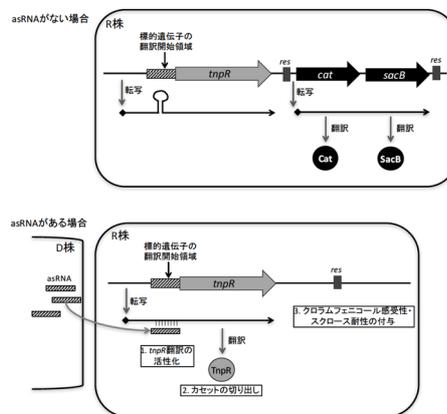


図1. ON型asRNA検出系の概念図

2) 検定法

概略を図 2 に示す。プラスミド性もしくは染色体性の TfoR センサーを搭載したメモリ株を、クロラムフェニコールを含む LB で前培養した。前培養液ペレットを LB で洗浄した後、菌懸濁液を LB に 1/100 希釈し、振盪培養を行った。A600 が 0.3 に達した時点でキチンオリゴ糖を加え、TfoR を発現誘導させた。2 時間誘導後、培養液を LA もしくはスクロースを含む LA にプレーティングし、越夜培養した。培養後プレート上のコロニー数をカウントし、*cat::sacB* カセットの切り出し効率 (スクロース入り LA 上の CFUs / LA 上の CFUs) を算出し

た。また、スクロース耐性コロニーについては、クロラムフェニコール感受性も調べた。

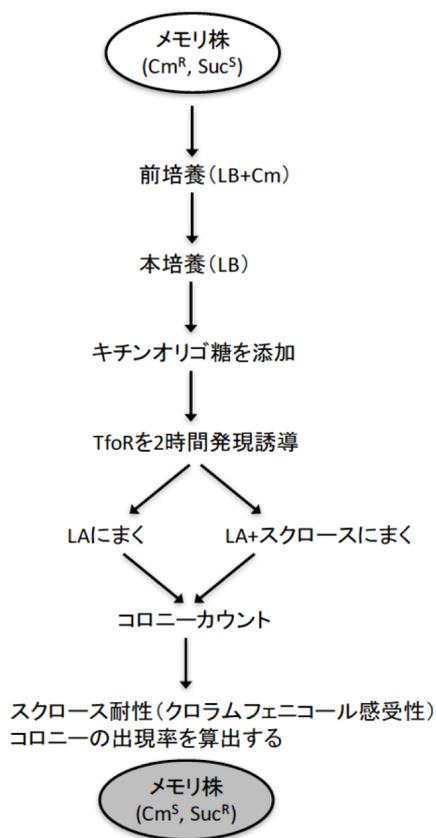


図2. 検定の流れ

4. 研究成果

センサープラスミドで形質転換させたメモリ株培養液にキチンオリゴ糖を加えて TfoR の発現を活性化させたところ、クロラムフェニコール感受性・スクロース耐性コロニーの出現率が著しく不安定であった。そこで染色体性のセンサーを持つメモリ株について同様な解析を行ったところ、クロラムフェニコール感受性・スクロース耐性コロニーの出現率は安定なものの、TfoR が発現誘導されない条件下でのバックグラウンドが高かった。メモリ株に *res-1* 部位を導入し、*cat::sacB* カセットの切り出し効率を低下させた場合、今度は TfoR を発現させても切り出し反応が起こらなくなった。研究を通じて、RNA を記憶する RIVET を開発するためには、検出感度・特異性を向上させることが課題となった。

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 1 件)

1. 山本章治. コレラ菌におけるキチン応答性シグナル伝達の PTS による制御. 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪, 2016 年 3 月.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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
山本 章治 (YAMAMOTO SHOUJI)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号：80469957

(2)研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者
三戸部 治郎 (MITOBE JIRO)
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号：40333364

(4)研究協力者 なし
()