

「自己消去プログラム」を実装した環境浄化細菌の試作

研究代表者 千葉大学工学部共生応用化学科 助教授 梅野太輔

共同研究者 千葉大学工学部共生応用化学科 教授 斎藤恭一

1. 緒言

細菌の持つ化学変換能力は多種多様であり、重金属や放射性物質の捕集・不溶化、有害有機物の酸化分解など、環境浄化力を持つ微生物は多数報告されている。これらを用いたバイオレメディエーションは、環境負荷が少なく、コスト的にも優れた環境浄化法である。しかし、微生物を環境中に大量に散布することは、それ自体が生態系に深刻な影響を与える行為でもある。遺伝子組み換えによって機能改良された細菌などを環境放出するとき、この懸念は特に大きいものとなる。浄化作業の完了後、確実かつ速やかに自己消滅するよう微生物を「プログラム」できれば、微生物は、「環境浄化ロボット」として、より汎用的な存在になるだろう(Figure 1)。

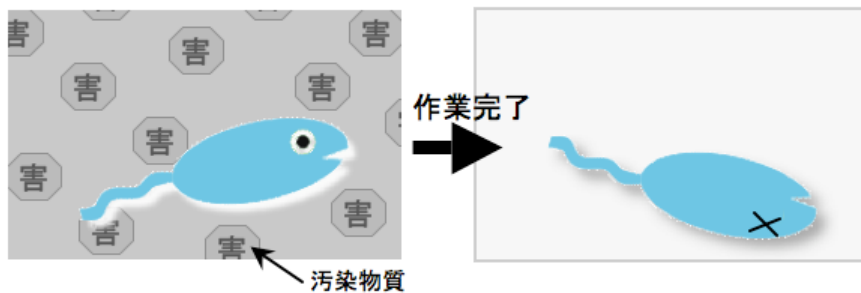


図1 自己消去プログラムを実装した環境浄化ロボット

この目的で使う「自己消去プログラム」は、「1.自分だけを」選択的に消去するものでなければならない。環境浄化ロボットは、浄化作業の終了を自ら感知し、そして自身に毒を盛る。そしてその毒は、環境浄化ロボットを、「2.一匹残らず」死滅させねばならない。たとえば *cccB* など毒性蛋白質の生産は、「自分だけを」は満たしている。しかし莫大な細菌集団の中には、生き延びる道(毒性蛋白質の生産阻害や解毒(分解)、対外放出など)を見つけ出し、自決命令に背くものが現れる。つまり、「2.一匹残らず」の要件を満たすのは難しい。いわゆる耐性菌の出現は、私たちが現有するあらゆる制菌機構に対して報告されている。このことは、感染性細菌との戦いにおいても、最も深刻な問題として認識されている。

これら耐性菌は、強い淘汰に誘導された「進化」の産物である。その駆動力は、遺伝子変異である。つまり、遺伝子変異の頻度を極限まで下げれば(進化速度を極限まで下げることが出来れば)、耐性菌の出現を抑え込むこともできる。しかし、フィールド散布される細菌の数は莫大なものとなる。すでに驚くほど高い生物の遺伝子複製精度(1エラー/10¹⁰塩基合成)を、更に6-8桁も上げるのは、不可能に近い挑戦である。

本研究で検討するのは、遺伝子変異を逆手にとった殺菌機構である。進化の源である遺伝子変異

であるが、一般に遺伝子変異は有害である:ランダムに遺伝子上に導入されたひとつの突然変異が致命的である、あるいは多少なりとも有害である確率(〜70%)は、耐性化(進化)を与える確率(数万分の1から数億分の1)よりはるかに高い。遺伝子変異を短期間に多数蓄積させれば、細菌集団の生存能力に致命的なダメージを与えることができる。遺伝子の複製忠実度がある閾値を下回るとき、その生物の子孫はどれも機能欠陥をもったものばかりとなり、もはや一匹の生きた子孫をも残せなくなるだろう。「エラーカタストフィ」(遺伝情報の急速な風化に拠る種の絶滅)は、HIV などレトロウイルスの根絶法として、有望視されている¹⁾。

この殺菌法の最大の特徴は、耐性化菌の出現の難しさにある。跳ね上がった遺伝子変異速度(毒の生産速度)にブレーキをかける方法はあるかもしれない(遺伝子変異発生装置の無力化など)。しかし、ある細菌がたまたまそれを獲得したとしても、その細菌は既により多くの有害な遺伝子変異を蓄積していれば、適応菌/耐性菌として出現することはない。つまり遺伝子情報の破壊は、その力価が十分高いとき、逃げ道のない確実な殺菌プログラムとなりうる。

2. 本研究の概要

細胞の複製は、極めて高い精度で行われている(1複製エラー/10¹⁰塩基合成)。その精度は、Figure2 に示す4つの生化学プロセスによって保証されている。逆に言えば、これらひとつひとつが、うまく改造すれば、遺伝子変異の生産装置となりうる。本研究では、この4つの機構に関わる、種々の変異生産機構(ミューテータ機構)を作成した。これらミューテータ機構それぞれを大腸菌に導入し、細胞内の遺伝子変異の頻度と種類を調査した。また、ミューテータを導入した細胞の生存率を検定し、エラーカタストロフィの自殺装置としての性能を評価した。これらを安全に大腸菌「ロボット」にインストールし、切れ味よい自己消去プログラムとして機能するための回路デザインについて議論する。

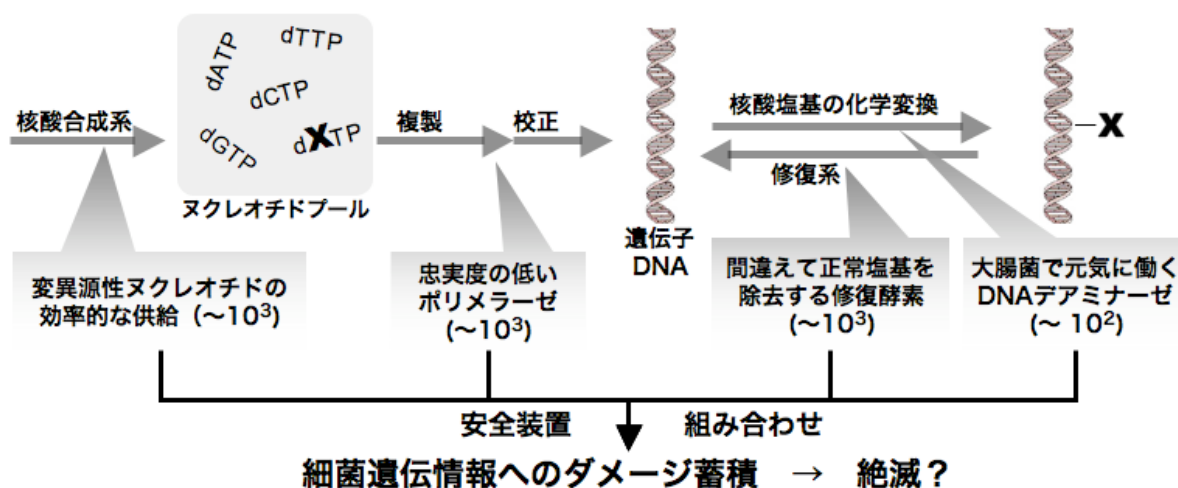


Figure 2. 4つのミューテータ機構. 細胞は、(1) 核酸原料の供給系の異常、(2) DNA複製酵素の精度の低減、(3) 修復経路の破綻、(4) 遺伝子DNAの化学変換、の4つの機構でミューテータ化する。それぞれに対して、カッコ内の数字は、本研究で確認したミューテータ酵素それぞれが単独で細胞内遺伝子変異頻度を何倍上げ得たかを示す。

3. 細胞内での遺伝子変異「スペクトル」の解析法²⁾

我々が試作するミューテータ装置の性能評価、そして改良のための指針を得るためには、それらを導入した細胞において、(1)どんなタイプの遺伝子変異が、(2)どれほどの頻度で、そして(3)どこに蓄積するのか、を記述する「テスト」システムが必要である。

細胞内の遺伝子変異はごくまれなイベントであり、それを直接計測するのは極めて困難である。そこで分子遺伝学では、抗生物質に対する耐性獲得種の出現頻度などをもって、間接的に変異速度を評価する。ある抗生物質に対して耐性を獲得(あるいは復活)する頻度が高いものは、それだけ細胞内の遺伝子変異速度が高いというわけである。しかし今までの手法では、「(2)どれほど」は分かっても、「(1)どんなタイプの」遺伝子変異が起こったかを知ることはできなかった。遺伝子情報は、DNA 上に A, G, T, C の4つの文字の配列情報として書き込まれている。その情報の変化(遺伝子変異)には、A:T→T:A, A:T→C:G, A:T→G:C, G:C→C:G, G:C→A:T, G:C→T:A の6種類がある。6つの塩基置換それぞれに対し、それが起こったときのみ「復活する」TEM1 変異体遺伝子を作成した。これらを持つ細胞の耐性獲得(復活)頻度の比較を行うだけで、DNA シークエンスを一切経ることなく、変異の頻度のみならず、そのタイプが見積もれるようになった。

4. DNAポリメラーゼの忠実度と指向性の制御³⁾

遺伝子変異の頻度をあげる最も直接的な方法は、遺伝子複製酵素の作業精度を落とすことである。Campsらは、大腸菌のDNAポリメラーゼI(PolI_{EC})という酵素に3つのアミノ酸変異を加え、DNA複製でエラーを起こしやすく改造したものを試作している⁴⁾。我々はこのシステムを改良し、細胞内の遺伝子およびプラスミドDNAの多様化速度をあげる努力を重ねてきた。現在、その変異頻度は、8,000〜10,000塩基に一つほどであり、これは、世界最大馬力のミューテータとして認知されている。一方、その高い変異頻度は、ColE1というPolI依存性の複製開始点をもつプラスミド上で計測される値である。実際に大腸菌遺伝子に蓄積する遺伝子変異は、これより2桁〜3桁ほど低い値であった。つまり、変異マシンとしての馬力のほとんどは、大腸菌遺伝子とは別のところに振り向けられてしまう。

我々は、大腸菌以外に由来するDNAポリメラーゼを用いて、大腸菌ゲノム複製を低い忠実度で合成させてみようと考えた。注目したのは、T7ファージという大腸菌に感染するウイルスの複製酵素(T7Pol)である。この酵素は上述のPolI_{EC}と類縁関係にあり、その絶対活性も Processivity (一度DNAに結合した後、一筆でどれほどDNA鎖を伸長できるかを示す値)も、PolI_{EC}よりはるかに高い。

T7PolをTrcプロモータの下に置き、その細胞内PolI活性を評価したところ、検出限界以下の活性しか示さなかった。大腸菌染色体にT7Polがかかわることは出来ないようである。ところが、T7Polのアミノ末端に大腸菌ポリメラーゼの5→3エキソヌクレアーゼを融合すると、この融合ポリメラーゼは、大腸菌ポリメラーゼ1と同等の高いPolI活性を獲得した(Figure 3)。この融合蛋白質は、ColE1プラスミドの複製/増幅には全く関わることができない。こうして、ゲノム指向性の高いポリメラーゼを得ることができた。現在は、この融合蛋白質のミューテータ化を進めているところである。

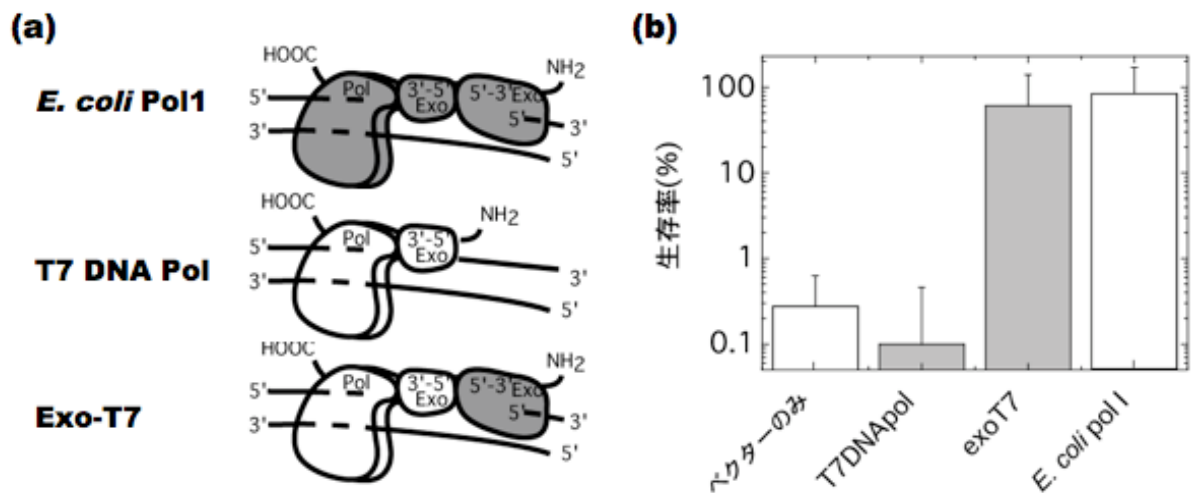


Figure 3 大腸菌および T7 ファージ由来の DNA ポリメラーゼとその融合蛋白質. (a) 大腸菌と T7 のポリメラーゼ I は進化的に近縁であるが、T7 ポリメラーゼには、5'→3' エキソヌクレアーゼドメインがない。これを足した Exo-T7 を作成した。(b) JS200 株 (Pol I の温度感受性株) は 37°C で死滅するが、ポリメラーゼ I を外から与えると、この温度で生存できる。T7 ポリメラーゼにこの活性はなかったが、大腸菌由来の 5'→3' エキソヌクレアーゼドメインを与えたもの (Exo-T7) は、大腸菌ポリメラーゼ I と同等の高い生存率を与えた。

5. 人工ヌクレオシド取り込みによるエラーカタストロフィ^{5,6)}

根岸らは、たいへん興味深い人工塩基 (P と略称される) を試作している⁷⁾。この塩基はいわゆる偽ヌクレオチド塩基であり、DNA 鎖の中で、G と A と塩基対を形成できる。またそのヌクレオチドは DNA ポリメラーゼ類によって非常に効率よく DNA 鎖にとりこまれる。DNA 鎖にあって P は、T としても C としても振る舞うため (Figure 4)、GC⇌TA 変異を高頻度に引き起こす。これを 10μM ほど含む培地の中で増殖する大腸菌は、その遺伝子に高速に遺伝子変異を蓄積する。その結果、培地中の大腸菌集団のなかで、わずか 1 割程度の大腸菌しか子孫をつくる能力を保持していないことが示された。

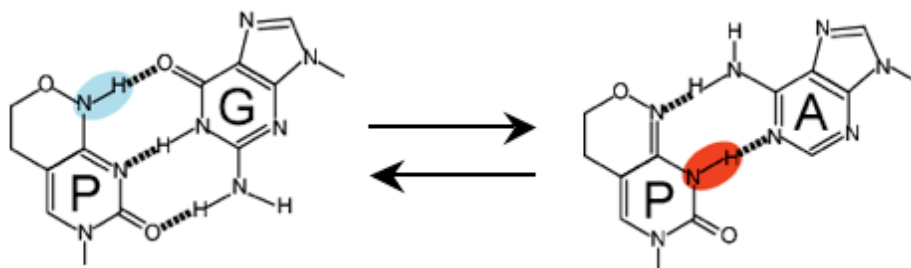


Figure 4 人工塩基 P. この塩基はアミノ型 (左)、イミノ型 (右) の 2 つの構造異性を持ち、遺伝子 DNA 内で G と A とペアを形成できる。このため、ヌクレオシドのかたちで培地に加えると、極めて高頻度に遺伝子変異を誘発する。

この研究は、我々が知る限り、細菌のエラーカタストロフィについて言及した唯一の例である。我々は、この研究を更に発展させ、極めて効率的な変異死 Pathway を作り出すことにした。この dP から DNA までの経路の中で、最初のリン酸化反応が律速であることを確かめた。次に、この反応を触媒するチミジンキナーゼ(TK)、とくにヘルペスウイルス由来の TK_{HSV} を高発現させた大腸菌は、ごくわずかな dP ($< 1\mu M$)を与えるだけで、効率的に細胞死に至ることを見いだした (Figure 5: 生存率 $\sim 1ppm$)。

一方で、この dP 毒性に対する「免疫系」「解毒経路」の探索も行った。塩基異常を修復する塩基除去修復経路の酵素を各種スクリーニングした結果、ヒト由来アルキルアデニングリコシラーゼを発現させる大腸菌が dP に対して 100 倍以上の耐性を持つことが明らかになった⁸⁾。

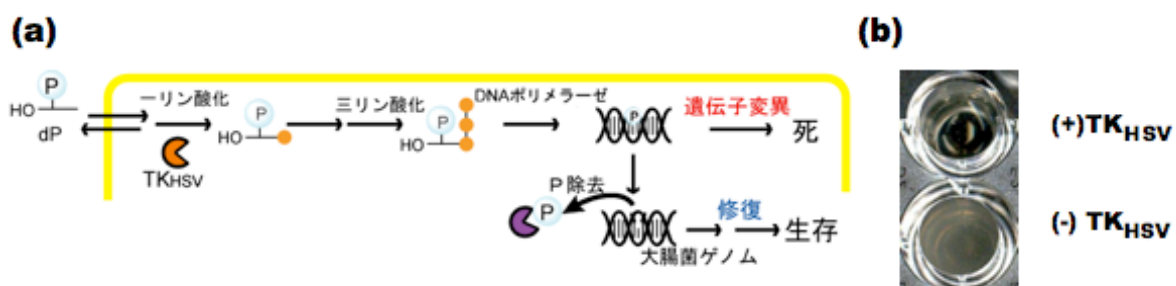


Figure 5 人工塩基 P の取り込み経路(死の Pathway)と解毒機構。 (a) P はヌクレオシドのかたちで細胞内に移入する。細胞内の3つの酵素によってリン酸化され、さらに DNA ポリメラーゼによって DNA に取り込まれる。結果、細胞は有害変異を蓄積し、細死に至る。この P を効率的に除去する経路を構築できれば、細胞は dP に対して耐性をもつようになる。(b) わずかな dP ($\sim 0.75\mu M$)を培地に加えると、 TK_{HSV} をもつ大腸菌だけが細胞死に至る。

6. DNA デアミナーゼ; 指向性のある遺伝情報破壊装置^{9, 10)}

免疫細胞は、ごく短期間のうちに、さまざまな抗原(バクテリアやウイルスなど)に対抗する抗体を発明する。抗体産生細胞は、その抗体遺伝子を超高速に多様化しているが、これを担う酵素が、AID (Action-Induced DNA Deaminase)である。この酵素は、DNA 鎖中の C のアミノ基を選択的に脱アミノ化し、ウラシル(U)を生じる。生じた U は遺伝情報としては T と等価であり、結果として、 $G:C \rightarrow A:T$ 変異を与える (Figure 6)。AID は、いわば天然のミューテータ酵素として働いているわけである。

この酵素の大腸菌ミューテータとしての性能評価を行った。AID を大腸菌に導入したときに 10~100 倍ほど遺伝子変異速度が上昇することは、既に Neuberger らによって示されている¹¹⁾。我々の構築した系でも、彼らが報告しているのとはほぼ同じ結果がみられた。すなわち、AID の発現は、大腸菌遺伝子やプラスミド DNA の遺伝子変異頻度を、10倍ほど上昇させた。また、ウラシル修復経路の欠損は、その変異上昇度を更に1桁上げた。そして細胞内で起こる遺伝子変異の種類は、ほとんど $G:C \rightarrow A:T$ 一色となった (Figure 6b)。

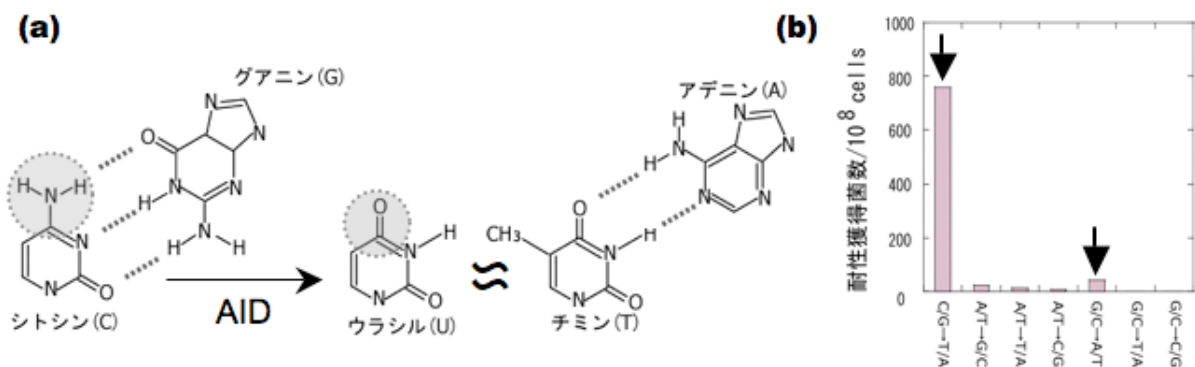


Figure 6 AID (ヒトデアミナーゼ) のミューテータ機能. (a) AID の変異化学. この酵素は、DNA 上のシトシンの一級アミノ基を酸化的に脱アミノ化し、ケト基に変換する。その結果得られたウラシルは、複製時にチミンに置き換えられるため、C:G→T:A タイプの変異がひきおこされる。(b) AID の細胞内活性. 3 節で示した手法を用いて、AID 導入菌の変異タイプ/頻度を評価した。細胞内の遺伝子変異のほとんどが、C:G→T:A であることがわかる。

特に我々の興味をひくのは、その作用対象が一本鎖 DNA に偏重する¹²⁾という報告である。遺伝子 DNA は通常二本鎖であるが、遺伝子が読み出されるとき(転写されるとき)、一時的に一本鎖状態を経る。ここでデアミナーゼの作用を受けやすくなるため、頻りに転写されている部位は、その他よりも遺伝子変異が蓄積しやすいことになる。

我々は、プラスミド上の強力な遺伝子スイッチ(プロモータ配列)の下流に、蛍光蛋白質(mRFP)の遺伝子を配置した。誘導物質によって遺伝子スイッチを ON としたとき、mRFP 遺伝子への変異蓄積速度は、スイッチ OFF 時よりも、はるかに高く、失活変異体(色なし)コロニーが多数現れた。AID はミューテータとしての馬力そのものは低い、転写活性な遺伝子にたいへん高い指向性をもつミューテータであるらしい。細胞内の転写活性を制御することで、抗体産生細胞よろしく、ミューテータの作用部位を大腸菌内の特定域に集中できるわけである。生存に必須な遺伝子の転写活性に AID 活性を集中させれば、AID は効率的な自殺機構を与えるであろう。

7. まとめと展望

本研究では、大腸菌の遺伝子変異速度(進化速度)を上げるさまざまな機構を、その(1)馬力、(2)変異スペクトル、(3)指向性、の3点において評価した。それぞれ単独でも 100~10,000 倍の範囲で遺伝子変異速度を上昇させる、優れたミューテータである。とくに「死のプログラム」としては、dP によるミューテータ機構(第 5 節)が高い殺菌力を示した。これにミューテータポリメラーゼ(第 4 節)や AID デアミナーゼ(第 6 節)を「うまく」組み合わせることができれば、更に殺傷力の高い、強力なミューテータ装置を完成できるであろう。

現在、我々は、Figure 7 に示す遺伝子回路の組み立てを進めているところである。これには、漏れない遺伝子発現スイッチ、そしてさまざまな有害物質に対する高感度センサユニットの開発も含まれる。自殺機構の馬力は高くなるほど、その扱いは非常に難しくなる。環境浄化ロボットとして細菌を

使う場合、このミューテータ装置がわずかにでも作動すると、細胞のほとんどが作業中に消滅してしまふ。自然界に存在する遺伝子スイッチは、OFF 状態においても、わずかな蛋白質発現を許す。ここに、上述のミューテータの単純な「掛け合わせ」を阻む主要因がある。本研究を更に進める上で何より重要なのは、出力ゼロを担保する切れ味よい遺伝子スイッチの開発である。

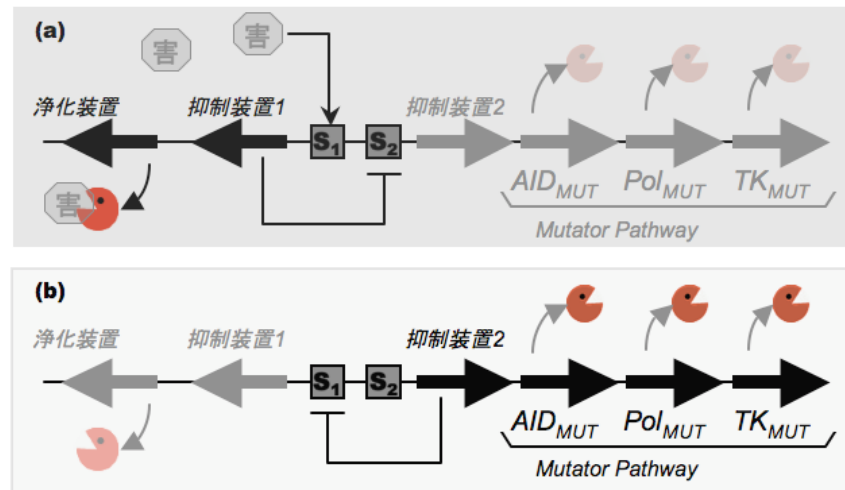


Figure 7 細胞ロボットの「自己消去」回路。 (a) 有害物質の濃度があるレベルを超えると、浄化装置のスイッチ(S1)はOnとなる。同時に、Mutator Pathwayのスイッチ(S2)の抑制因子が細胞内で作られるため、細胞は浄化作業に専念できる。(b) 有害物質のレベルが下がると、浄化装置の生産は次第に止まる。同時に S2 の抑制因子の生産もとり、mutator pathway(死の経路)が発現する。同時に S1 に対する抑制因子も発現するために、S2(死のスイッチ)は全開となる。

生物工学は現在、新しい局面を迎えつつある。合成生物学者と呼ばれる人々によって、細胞の振る舞いを、完璧にプログラム制御する試みが盛んに行われている¹²⁾。信頼できる「自己消去機能」の完成は、環境浄化のみならず、バクテリア「ロボット」を使ったあらゆるバイオテクノロジーにおいて、不可欠な項目である。本研究は途上であるが、これからも遺伝子変異を駆動とする細胞死の Pathway の完成を目指し、本研究を進めてゆきたい。

8. 謝辞

本研究を行うにあたり、Manel Camps 博士(ワシントン大学)、Larry Loeb 博士(ワシントン大学)、そして Michael Neuberger 博士(ロンドン大学)から多くの助言をいただきました。本研究は、JFE 21世紀財団2005年技術研究助成のご支援によって行われたものです。ここに深く感謝いたします。

参考文献

- [1] Loeb LA. ら, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 96, 1492 (1999)
- [2] 鈴木 剛 千葉大学工学部 卒業論文(2006)

- [3] 星健太郎 千葉大学大学院工学研究科 修士論文(2007)
- [4] Camps M. り, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 100, 9727 (2003)
- [5] 坂口祐介 千葉大学工学部 卒業論文(2006)
- [6] 田代洋平 千葉大学工学部 卒業論文(2007)
- [7] Negishi K. り, *Genetics*, 161, 1363 (2002)
- [8] 山崎智之 千葉大学大学院工学研究科 修士論文(2007)
- [9] 安野佳代 千葉大学工学部 卒業論文(2006)
- [10] 鈴木恵一 千葉大学工学部 卒業論文(2007)
- [11] Petersen-Mahrt り, *Nature*, 418, 99 (2002)
- [12] Pham り, *Nature*, 424, 103 (2003)
- [13] 梅野太輔, 現代化学 2007. 4月号(印刷中)