

## 2023 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	<b>Rubrobacter radiotolerans の特性解析</b> —放射線抵抗性の分子機構の解明—
キーワード	① 放射線抵抗性、② <i>Rubrobacter radiotolerans</i> 、③ 遺伝子操作系の確立

### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	クボ アヤ 久保 彩
配付時の所属先・職位等 (令和5年4月1日現在)	東洋大学・学術研究推進センター・研究助手
現在の所属先・職位等	東洋大学・学術研究推進センター・研究助手
プロフィール	2019年東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 後期博士課程修了。米国オクラホマ州立大学でのポストドクを経て2021年8月より現職。博士課程では土壌細菌と外来DNAプラスミドの相互作用について、ポストドク時には緑膿菌の病原性を引き起こす分子機構について研究していた。現在は放射線抵抗性細菌のもつ放射線耐性機構について研究している。

### 1. 研究の概要

ゲノムDNAの安定な維持は正常な細胞機能の持続性および種の存続において必須であるが、紫外線をはじめとした放射線や化学物質などのストレスにより絶えず損傷を受けている。*Rubrobacter radiotolerans*は類まれな高い放射線抵抗性を示すことが知られているが、その分子機構は解明されていない。これは当該菌のゲノム情報は解読されている一方で、その情報を利用するための遺伝子操作系が確立していないことが原因である。そこで、本研究は*R. radiotolerans*の形質転換方法の確立を目指した。リファンピシン耐性突然変異株を取得し*rpoB*遺伝子の配列を調べたところ、突然変異においては比較的出現頻度の低い塩基欠失が生じた遺伝子を得ることができた。そこで、この変異*rpoB*を*rpoBΔ9*と命名し、形質転換実験に用いた。しかしながら、自然形質転換および電気穿孔法にて形質転換体を得ることができなかった。そこで、染色体の他に3つのプラスミドをもつことが分かっている*R. radiotolerans*標準株から1つのプラスミドが脱落した派生株を作製し、さらに、脱落させたプラスミドを基にベクターを作製した。今後は作製した宿主およびベクターを用いて形質転換方法を調べていく。当該菌の遺伝子操作系の確立は*R. radiotolerans*を用いた研究すべての礎となるだけでなく、当該菌の放射線抵抗性分子機構の解明に貢献できる。既に詳細な研究が進んでいる他の放射線耐性菌は独自の高効率なDNA修復機構があることが知られており、その特徴を生かした産業応用もされている。*R. radiotolerans*も当該菌独自の放射線に耐性を示すような機構があることが当然予想され、これを解明することで新たな角度からの技術革新を引き起こせる可能性を秘めている。

### 2. 研究の動機、目的

生物が種族として生き残るためには、ゲノム配列の情報を安定に保持し次世代へと伝えていくことが必須である。しかしながら、ゲノムDNAは放射線や環境中の化学物質、活性酸素等といったストレスにより絶えず損傷をうけている。また、細胞老化もDNA損傷の一因であり、

高等動物では神経変性疾患やがんの発生および進行の原因となる。損傷した DNA を速やかに修復することが生体恒常性を維持する基礎であるため、DNA 修復機構を明らかにすることは非常に重要である。

代表的な放射線抵抗性細菌である *Deinococcus radiodurans* はその分子機構に関する詳細な解析が進んでいる。*Deinococcus* 属特異的かつ高性能な DNA 修復機構をもつことが知られており、これを他の生物に応用することで放射線抵抗性を付与できることも分かっている。さらには、この機構の主要な因子である DNA 修復酵素は高効率な DNA 修復試薬として産業利用されている。また、この DNA 修復酵素の二本鎖切断 DNA との結合親和性の高さに着目し、哺乳動物細胞に生じた鎖切断損傷を効率よく可視化検出する新規技術への利用も期待されている。このように、放射線抵抗性細菌のもつ類まれな分子機構の解明は基礎研究のみではなく、産業応用という面でも重要な役割を果たしている。

上述の *D. radiodurans* よりも放射線に対する抵抗性が 2 倍以上高い細菌として *Rubrobacter radiotolerans* が報告されている。*R. radiotolerans* は 1973 年に世界屈指の天然ラドン温泉として知られている鳥取県三朝温泉から単離されたグラム陽性短桿菌である。*R. radiotolerans* もまた独自の放射線抵抗性機構を保持していると期待できる。しかしながら、*R. radiotolerans* の分子機構に関わる解析は全く行われていない。これは、当該菌のゲノム配列は解読されているものの、その情報を利用するための遺伝子操作系が確立していないことが原因である。そこで、本研究では *R. radiotolerans* の標準株である JCM2153 株を用いて形質転換方法の確立を目指した。この手法を用いることができるようになれば、当該菌の高い放射線耐性に関与する遺伝子を同定できる。それにより *D. radiodurans* とは異なる放射線抵抗性の性質を生かし、分子生物学分野における遺伝子工学の発展に貢献するなど様々な産業応用が期待できる。

### 3. 研究の結果

#### ①リファンピシン耐性株の取得

形質転換とは細胞の外部から DNA を導入することで宿主の遺伝的性質が変化し、本来その細胞にはなかった形質を獲得・発現することである。外部 DNA を *R. radiotolerans* の細胞内に取り込ませる方法を検討するにあたり、まずはどのような外部 DNA を用いるかを決定する必要があった。外部 DNA 取り込みの有無を簡便に確認するためには抗生物質耐性遺伝子等ポジティブスクリーニングに利用できる DNA の利用が望ましいと考え、リファンピシン (rif) 耐性株を取得することとした。Rif 耐性株は RNA ポリメラーゼの  $\beta$  サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子に自然突然変異が生じることで出現する。そこで、*R. radiotolerans* を 50 ng/ml の rif を含む寒天培地上で培養することで rif 耐性株を取得した。150 個の rif 耐性株のゲノム DNA を抽出し、*rpoB* の塩基配列を解読した。147 株では比較的突然変異の生じやすい塩基置換が生じており、3 株では *rpoB* 遺伝子配列内に 9 塩基欠失変異が生じていた。9 塩基欠失した *rpoB* を *rpoB* $\Delta$ 9 と名付け、以降の研究に用いることとした。欠失変異は比較的生じにくい変異であるため、*rpoB* $\Delta$ 9 を用いることで形質転換体と自然突然変異体を見分けることが可能になると考えたためである。

#### ②形質転換方法の検討

形質転換方法としては、自然形質転換および電気穿孔法を検討した。自然形質転換とは細胞が人為的な処理を施すことなしに外来 DNA を取り込むことである。現在 90 以上の細菌種において自然形質転換能をもつことが分かっており、また、大腸菌など自然形質転換能を持たないと思われてきた菌も特定の条件下では細胞外 DNA を取り込むことが明らかになっている。電気穿孔法とは短い電気パルスで細胞が液体に浸ることで細胞膜に電場を形成、一時的に孔を開け細胞内に外来 DNA を導入する手法である。形質転換時のバッファー条件、使用する菌の成長段階、回復培養時間などの検討も行ったが、形質転換体を取得することはできず、形質転換方法の確立には至らなかった。

### ③プラスミド脱落株の取得、ミニプラスミドの作製

形質転換体の取得に至らなかった一因として、rif 耐性自然突然変異体の出現頻度が当初の予想よりも高かったことが挙げられる。また、外来 DNA として *rpoB*Δ9 を用いることは、形質転換後に確実にその形質が発現するという利点がある一方で、外来 DNA の細胞内への取り込みやすさという形質転換効率の他に、染色体上の *rpoB* と外来 DNA である *rpoB*Δ9 の相同組換え頻度を考慮する必要がある。そこで、代替手段として形質転換方法の検討にプラスミド DNA を用いることにした。プラスミドとは染色体からは独立して複製・分配される自己増殖性の環状二本鎖 DNA である。プラスミド DNA 上にコードされている遺伝子が *R. radiotolerans* 細胞内にて確実に発現するかは不明瞭ではあるが、もしも問題なく機能するのであればプラスミド DNA が細胞内に取り込まれるだけで形質転換が行われるという利点がある (図)。

一般的に細胞外 DNA の取り込み効率は DNA 分子サイズが小さいほど高い。そのため、形質転換にはベクターと呼ばれる遺伝子などを運ぶ道具として人工的に改変された小型のプラスミドを用いるのが一般的である。しかし、当然ではあるが、*R. radiotolerans* がどのようなベクター DNA を保持可能であるかは不明であった。本研究に用いた *R. radiotolerans* の標準株である JCM2153 株は染色体の他に 3 つのプラスミド DNA (P1~P3) をもつことがゲノム情報より明らかになっている。そこで、一番小さな P3 プラスミドを基にクロラムフェニコール (Cm) 耐性遺伝子を保持するベクターを作製した。また、高温条件下で植継ぎを繰り返しながら培養することで P3 プラスミドを脱落した株も作製した。今後はこれら作製した P3 脱落株とベクター DNA を用いて形質転換方法の確立を目指す。

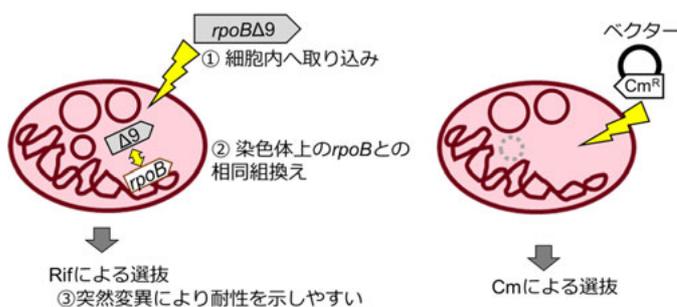


図 *rpoB*Δ9 を用いた形質転換の問題点 (左) と改善案 (右)

## 4. 研究者としてのこれからの展望

最初に分子生物学研究を始めた学部生の時の卒業研究はモデル生物である出芽酵母を用いたものでした。大学院に進学し、緑膿菌の同属である *Pseudomonas* 属細菌を扱うようになった時、「全然なにも解明されていない…！」と衝撃を受けたのを覚えています。ただし、出芽酵母と比較したら研究は進んでいなかったかもしれませんが、どちらもよく研究されている生物であることには変わりありません。時が経ち、現在用いている *R. radiotolerans* は本当に研究が進んでいない菌であり、未解明のことだらけです。若かりし頃の私に「分からないとはこういうことを言うのだよ」と教えてあげたい気持ちでいっぱいです。今までとは一味違う大変さもありますが、これまで培ってきた経験を活かしながら試行錯誤のもと研究を進めることに面白さも感じています。大変なことは多いですが、この面白いという気持ちを忘れることなく研究を続けていきたいと思っています。

## 5. 支援者 (寄付企業等や社会一般) 等へのメッセージ

本研究へご支援いただき誠にありがとうございました。本研究テーマである *Rubrobacter radiotolerans* は放射線耐性の機構どころか、放射線に強いということ以外ほとんどなにも分かっていない菌です。非常に新規性がある一方で、その新規性・挑戦性の高さから実現可能性が低いと指摘されることも多い研究テーマです。しかし、本奨励金に採択され、また書類審査時に選考委員会の方々から励ましのコメントをいただいたことで本研究の重要性、面白さを改めて確認することができ、研究遂行の励みとなりました。上述の通り現在の本研究は試行錯誤の連続であり、困難を極めています。しかしいつかこの研究が発展し、どこかで面白い報告ができるように、今後もより一層精進してまいります。



研究の様子