

平成29年3月17日 記者説明会

# ゲノム編集技術などによる遺伝子組換え 微生物の安全性を高める技術を開発

---

広島大学大学院先端物質科学研究科  
助教 廣田隆一

# 合成生物学の時代における遺伝子組換え微生物の開発と利用の現状

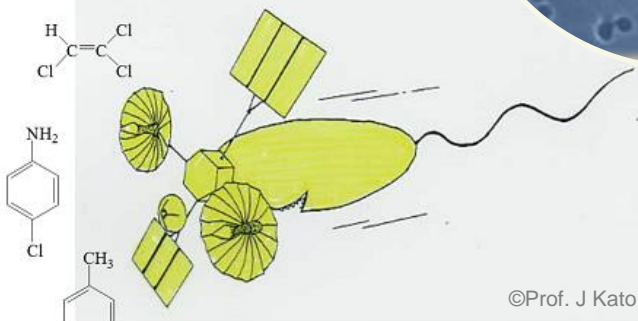
## バイオテクノロジーの技術革新

- ゲノム編集技術
- 代謝工学(人工代謝系)
- 合成生物学(Synthetic Biology)

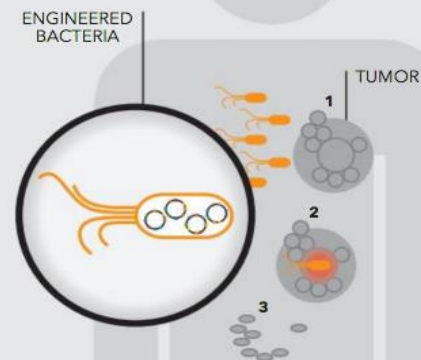
### 経口ワクチン



IL-10生産乳酸菌  
Nat Biotechnol 2003



バイオレメディエーション(環境浄化)



癌細胞を攻撃する大腸菌

[www.synberc.org](http://www.synberc.org)



[saharaforestproject.com](http://saharaforestproject.com)

バイオ燃料高生産藻類

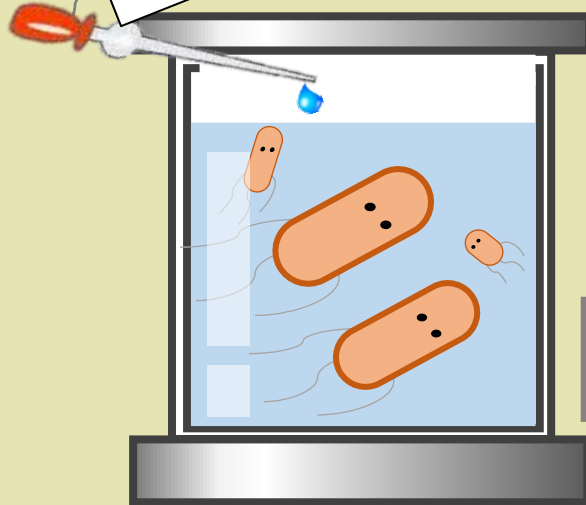
GMOの拡散防止の効果を高める技術が求められる

# 生物学的封じ込め(Biocontainment)

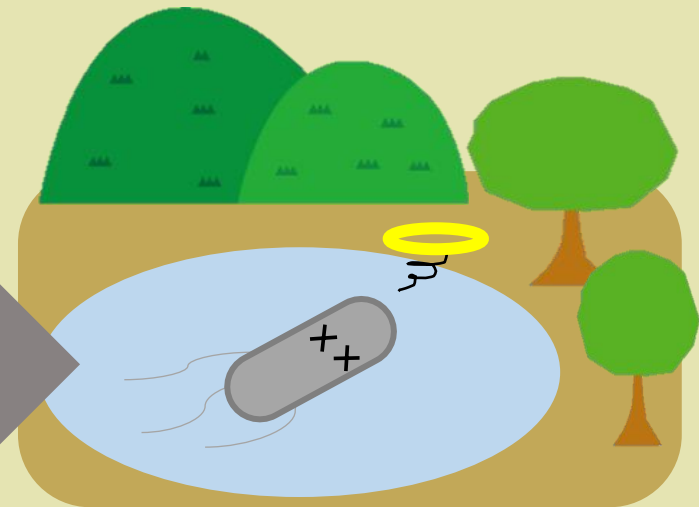
組換え体が実験室以外で生育することができなくなるような遺伝的性質をあらかじめ与え、環境中で生存できなくする方策

## 栄養要求性の付与による封じ込め

自然界に存在しない栄養源



もし自然環境に逃げ出しても...



# 米国エネルギー省(DOE)も生物学的封じ込めをグラントの要件に



## Biosystems Design to Enable Next-Generation Biofuels and Bioproducts

次世代バイオプロダクションのためのバイオシステムデザイン(予算規模:約1-5億円/件)

Funding Opportunity Number: DE-FOA-0001650  
Announcement Type: Initial  
CFDA Number: 81.049

Issue Date:	10/12/2016
Pre-Application Due Date:	12/19/2016 at 5 PM Eastern Time
Encourage/Discourage Date:	01/06/2017 at 5 PM Eastern Time
Application Due Date:	03/20/2017 at 11:59 PM Eastern Time

*“Applications should include **strategies to address biocontainment**, minimizing risks of potential release of engineered organisms into the environment or other unintended outcomes.”*

開発する微生物には、環境漏出におけるリスクを最小限にするための  
生物学的封じ込めを施さねばならない

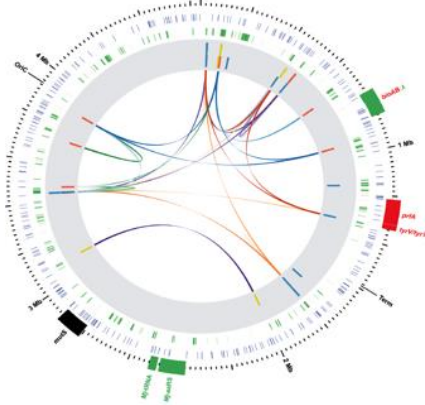
# 合成生物学の時代の新しい生物学的封じ込め手法

## ■古典的な方法論

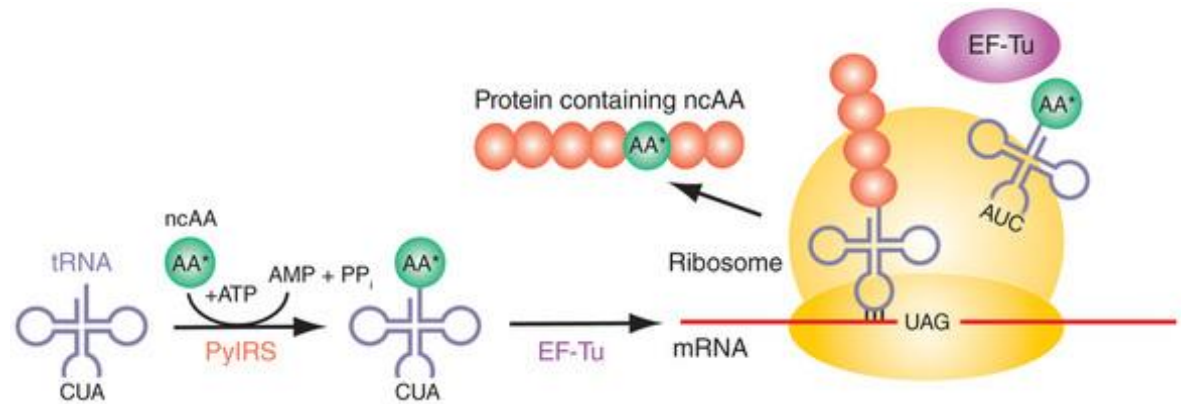
- 栄養要求性の付与(例:アミノ酸要求性、細胞構成成分の合成欠損)
- 自発的な細胞死の誘発(例:トキシン-アンチトキシンシステム)

## ■合成栄養要求性の創出 ~人工アミノ酸を使った封じ込め手法~

Mandell et al. Nature 2015, 518: 55-60    Rovner et al, Nature 2015, 518: 89-93



TGAコドンが書き換えられた大腸菌ゲノム



大腸菌ゲノムの155個のTGAコドン全てを書き換え、**非天然アミノ酸**に依存する大腸菌封じ込め株を作製。米国の2つのグループから2015年に同時発表。

課題

- 要求物質である合成アミノ酸が高価
- 株の作製が極めて複雑

# 亜リン酸を利用したバイオテクノロジー(技術的背景)

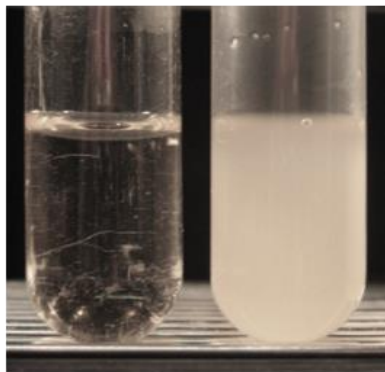
## 亜リン酸( $\text{HPO}_3^{2-}$ )

- 通常の生物は利用できないリン化合物
- 環境中には存在しない



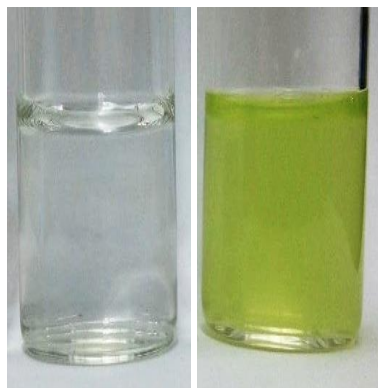
### 分裂酵母

WT    *ptxD*



### 微細藻類 (シアノバクテリア)

WT    *ptxD*



### シロイヌナズナ

WT    *ptxD*



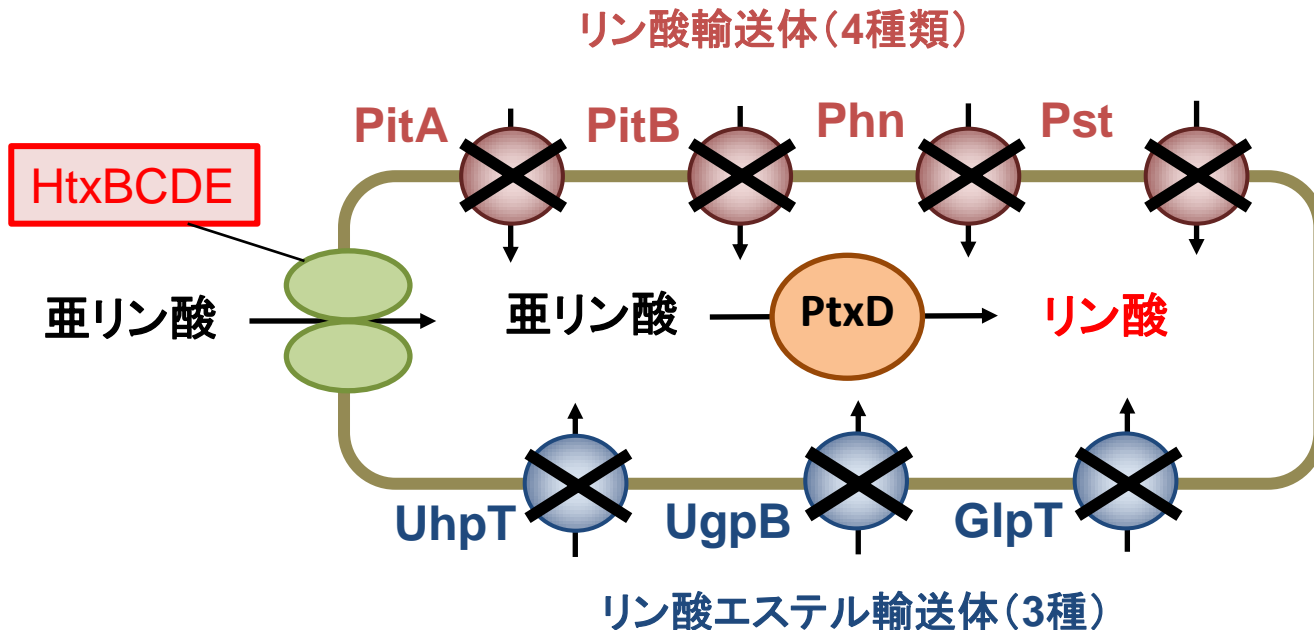
リン源: 亜リン酸

➡ 抗生物質を使用せずに目的株の選択的な培養が可能

# 亜リン酸しか利用できない性質をつくることができるか？

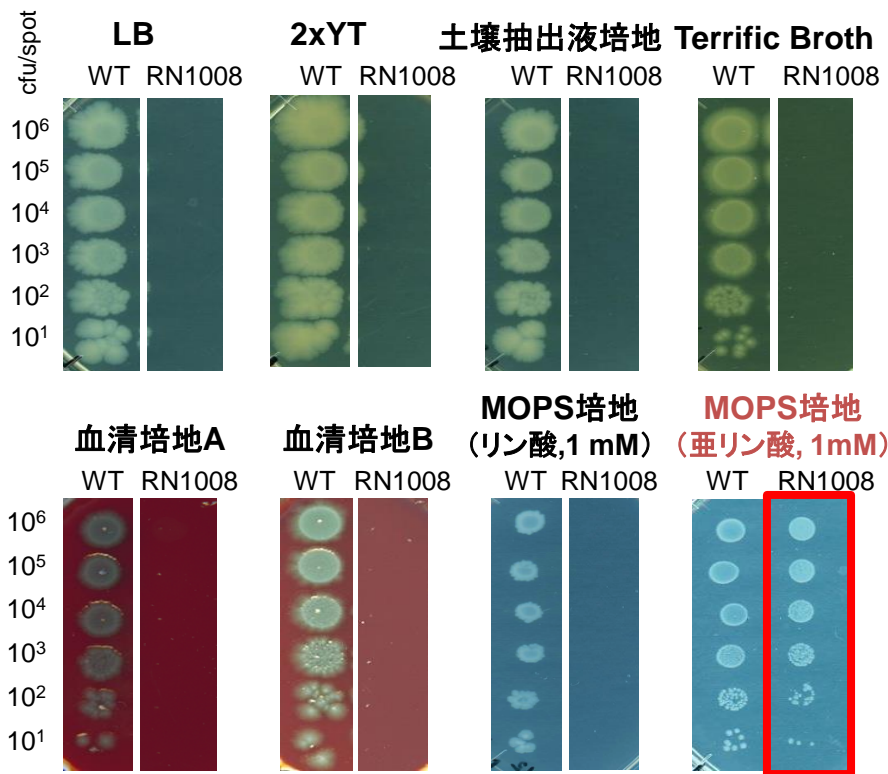
## 亜リン酸を利用した封じ込めに必要な要件

1. 亜リン酸の利用能力 → PtxD遺伝子の導入
2. リン酸利用能力の喪失 → リン酸輸送体遺伝子の破壊
3. リン酸を取り込まず、亜リン酸だけを取り込む輸送体 → HtxBCDE

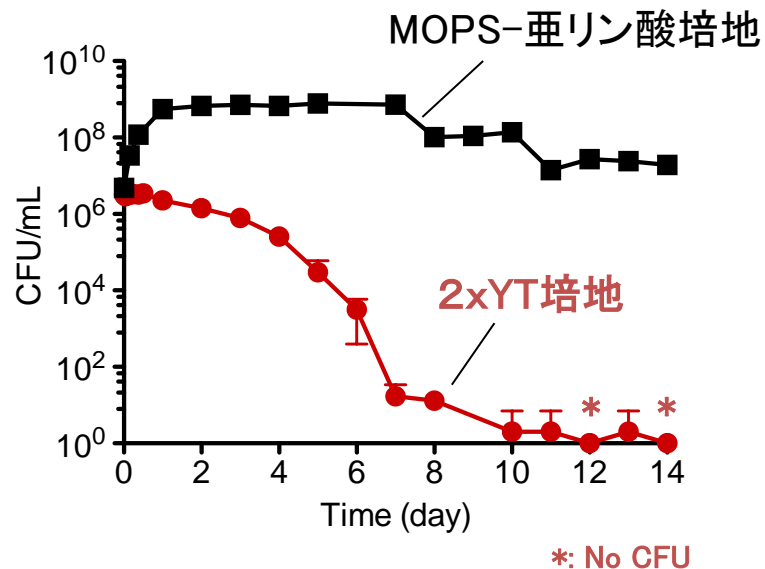


# 大腸菌封じ込め株RN1008は亜リン酸がないと生育できない

## ◆RN1008株の様々な培地における増殖



## ◆RN1008株の生存率



廣田隆一、黒田章夫:特願2016-170317

Hirota R, et al. Sci. Rep. 2017

- 封じ込め株は亜リン酸が無いと生育できない
- 非許容培地では生存率が1週間で $10^{-5}$  %以下に低下  
2週間で完全に死滅
- 亜リン酸が無い条件では、5兆匹の大腸菌のうち1匹も増殖することはできなかった(世界最高レベル)



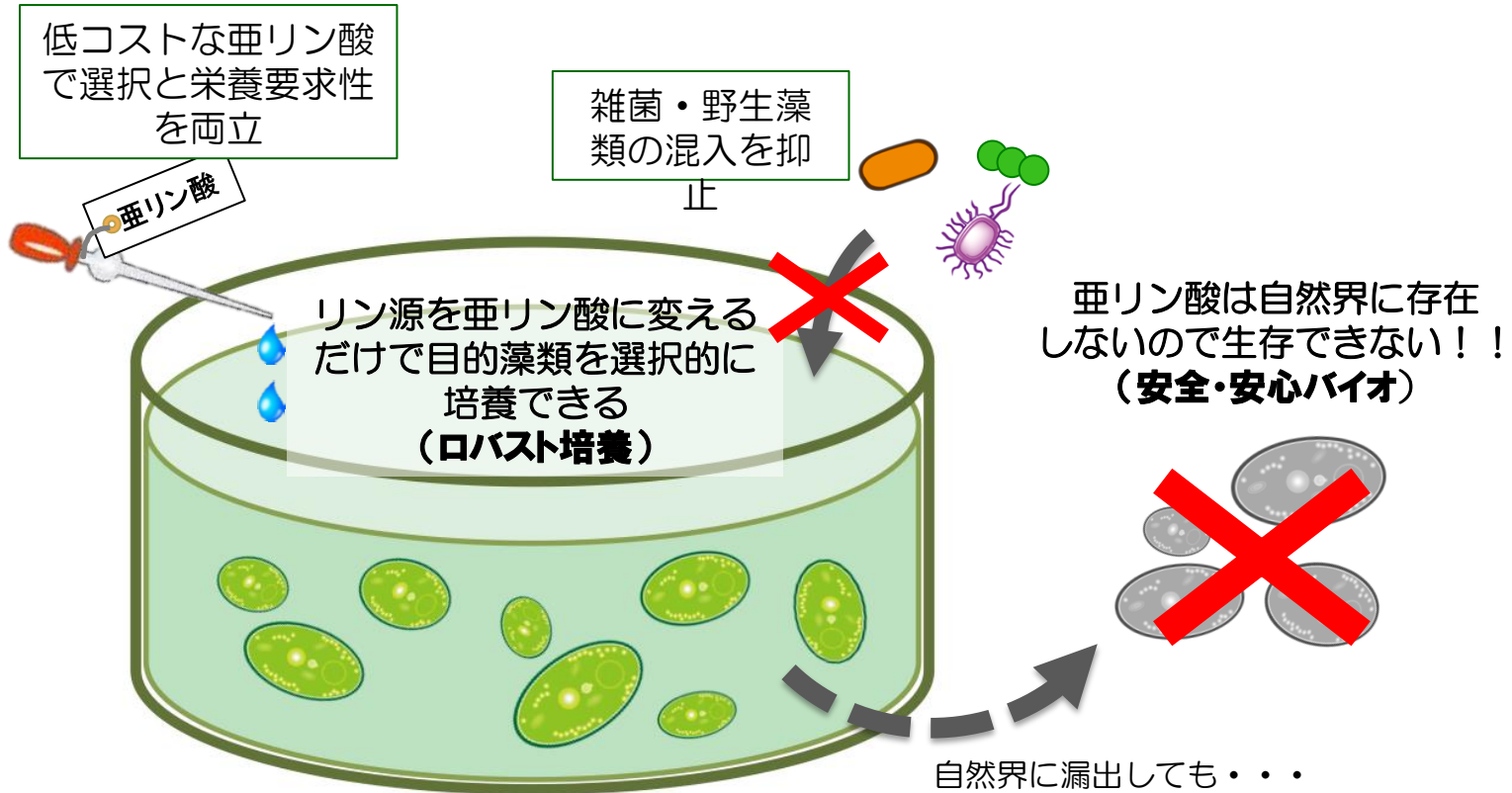
# まとめ: 合成アミノ酸を用いた封じ込め手法との比較

	本手法	Rovner et al. (Nature 2015)
選択物質	亜リン酸	合成アミノ酸 (4-Azido-L-phenylalanine) + ジアミノピメリン酸
封じ込め効果	極めて高い (検出限界値: $1.9 \times 10^{-13}$ /cell)	極めて高い (検出限界値: $6.3 \times 10^{-12}$ /cell)
加工が必要な 遺伝子数	合計10個 (大腸菌: 8個遺伝子破壊 + 2種類遺伝子導入)	155個以上 (全TAGコドンの書き換え + tRNA + アミノアシルtRNA synthetase)
他種バクテリア への適用	容易	極めて困難
コスト	¥0.4/L (廃棄物からも得られる)	¥6,186/L

「リン」という生命の必須元素に対する要求性を初めて作り出した

# 将来的には・・・

バイオプロダクションの実用化を推進し、  
低炭素化社会の構築に貢献！！



屋外において組換え体を封じ込めたまま培養可能に

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## A Novel Biocontainment Strategy Makes Bacterial Growth and Survival Dependent on Phosphite

Received: 01 November 2016

Accepted: 13 February 2017

Published: 20 March 2017

Ryuichi Hirota<sup>1</sup>, Kenji Abe<sup>1,2</sup>, Zen-ichiro Katsuura<sup>1</sup>, Reiji Noguchi<sup>1</sup>, Shigeaki Moribe<sup>1</sup>, Kei Motomura<sup>1</sup>, Takenori Ishida<sup>1</sup>, Maxym Alexandrov<sup>1</sup>, Hisakage Funabashi<sup>1</sup>, Takeshi Ikeda<sup>1</sup> & Akio Kuroda<sup>1</sup>