

予測可能な細胞工場システムは構築可能か？

森 英郎

はじめに

予測可能なシステム バイオインフォマティクスが盛んになり、ゲノム情報が正確に記述され、プロテオームやトランスクリプトームといった各種の網羅的解析情報が盛り込まれたデータベースが整理されつつある。生命活動のモデリングやシミュレーションといった分野での研究成果も刮目に値する。しかしながら細胞レベルの代謝をシミュレーションするという研究では、利用可能なパラメーターからの内挿的なシミュレーションの域を脱しておらず、外挿的なシミュレーションができる道具立ての開発が次の課題であろうと考えている。外挿的なシミュレーションが可能であるということがすなわち表題に掲げた「予測可能な (predictable)」ということであり、設計どおりの物質生産性を発揮してくれる細胞を「予測可能な細胞工場システム (predictable cell factory system)」と呼んでいる。筆者は微生物を利用した物質生産システムの開発研究を20年ほど行ってきたが、微生物といえども代謝を思った通りに動かすことは難しく、変異の付与と能力向上株の選抜を繰り返す工程すなわちトライアンドエラーという手法をいまだに手放すことはできないでいる。外挿的なシミュレーションが可能となれば、プロセス開発にかかる時間を短縮でき、実用的なインパクトが大きいというのが、応用分野にいるものとしての期待である。さてなぜ細胞レベルの代謝あるいは発酵生産というものは予測が難しいのであろうか。主要因の一つは、対象物が複雑すぎるということであろう。細胞内の代謝中間体がすべて同定されているわけではないし、代謝中間体あるいは末端の代謝産物によるフィードバック制御の実態がすべて解明されているわけではない。新しい制御系や代謝系路が一つ見つかるだけで、モデルを組み立て直す必要が出てくる。

バクテリアの細胞でさえブラックボックス よりシンプルなシステムほどシミュレーションし易いはずである。細胞レベルの代謝モデリングやシミュレーション研究の対象としては、ゲノム解析や基礎解析が進んでいるバクテリア種がより適していると考えられる。しかしながら実験室株として解析が進んでいる大腸菌 (*Escherichia coli*) K-12株でさえ、その全遺伝子の40%超

にあたる2000個程度の遺伝子がいまだに機能がわからない機能未知遺伝子である。ゲノム解析の終了したバクテリアといえども、その細胞はいまだにブラックボックスである。このようなブラックボックスを徹底的に解明して、シミュレーションの対象モデルとすることにはどれぐらいの時間がかかるのであろう。機能未知遺伝子の機能を解析することは一般的に困難で、定法があるわけではない。年間100程度の機能未知遺伝子の解析を行っても、2000個あれば20年かかる計算になる。これを待つてモデル系とすることは現実的ではないであろう。元来複雑な生命現象というものを徹底的に解明するという研究の方向性は無論必要である。しかしながらこと「IT駆動型微生物」を標榜する限りでは、よりシンプルなシステムを利用することが賢明であろう。そこでミニマムゲノム細胞の利用に着目した。

ミニマムゲノムファクトリー 組成が単純な合成培地中で旺盛に生育する微生物であれば、実用的には何ら問題がない。できるだけ遺伝子数が少ない染色体 (ミニマムゲノム) を持つ細胞で旺盛な生育能力を保持していれば、その細胞はモデリングやシミュレーションの材料に、より適しているはずであり、「予測可能な細胞工場システム」の母体となり得る。米国ではこのようなミニマムゲノム細胞を人工的に合成しようという研究分野 (synthetic genomics) が注目されている。しかしながら現時点ではバクテリオファージのゲノムを全合成するところが限界で、それ以上となるとまだハードルが高いようである。そうした全合成アプローチとは別の手法にてミニマムゲノムを構築する研究も進んでいる。米国ウィスコンシン大のBlattner博士らのグループは、大腸菌K-12株を材料として、染色体領域を順次削除する方法で、約15%の領域を削除したMDS43株を作製したと報告した²⁾。今後の方向性としては、さらなる染色体縮小化のみならず、発酵産物や医薬品の製造を見据えた遺伝子群の導入も検討されているようである。しかしながら大腸菌染色体上には2000個程度の機能未知遺伝子が存在するわけで、染色体の15%を欠失させたとしてもまだ相当量の機能未知遺伝子が残存しているはずである。日本では、経済産業省と新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) が、生物機能活用型循環産業システム創

造プログラムを立ち上げ、工業プロセスや環境関連分野でのバイオテクノロジーに関する基盤技術開発を進めており、2001年度より「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」プロジェクトを開始した。このプロジェクトの中には「宿主細胞創製技術の開発」「細胞モデリング技術の開発」「微生物遺伝資源ライブラリーの開発」の3つの研究開発項目が掲げられ、ブラックボックスではない微生物宿主細胞の創出、コンピューターモデルによる代謝シミュレーション技術開発、有用微生物・有用代謝酵素遺伝子の収集が進められ、2005年度に終了した。「宿主細胞創製技術の開発」の中では大腸菌、枯草菌、分裂酵母、出芽酵母、コリネ菌が出発材料として取り上げられた。筆者らを中心とした協和発酵の研究チームもそのプロジェクトに参加し、大腸菌染色体縮小化株に関する研究開発を行った。一般的な培養条件下で不必要な遺伝子群を積極的に排除し、より限定された遺伝子群のみ構成されるゲノムを作製する過程で、負の制御系やアミノ酸などの一次代謝産物分解系を遮断することで代謝系全体の活性化を図ることもできると考えた。不要遺伝子の徹底的排除により、システムとしてよりシンプルでかつ代謝が活性化された細胞のことを我々はミニマムゲノムファクトリー (minimum genome factory, 以下MGF) と呼んでいる。本稿では大腸菌 MGF 開発の現状を概説し、「予測可能な細胞工場システム」への発展的展開を議論したい。

大腸菌 MGF

研究開発の基本戦略 MGF を創製するためには理想的な遺伝子構成をデザインすることが必要であり、そのためには大腸菌全遺伝子に関する機能情報の収集が不可欠であった。また大腸菌染色体構造を大規模に加工する手法を開発する必要があった。しかしながら理想的なデザインが完成してから染色体縮小株の作製に取りかかったのでは、短期間でMGFを構築することは不可能であると判断し、遺伝子機能解析と染色体縮小化株作製(その評価を含む)を両輪として、プロジェクト開始時点から回転させ、最終的にはそれらを統合化することで機能的な染色体縮小化株であるMGFを構築することにした。

染色体縮小化株作製 前述のMDS43株においては、実験室株大腸菌K-12と病原性大腸菌O157とをゲノム塩基配列レベルで比較し、K-12 特異的な領域 (K-island) から比較的長いものを選択的に取り除くことで、染色体を縮小化していた³⁾。一方、首都大学東京の加藤らの検討からは、大腸菌染色体上には6~45 kb程度の長さの削除可能領域が多数存在しており、それらを欠失しても完

全培地での生育には影響がないことが示されていた⁴⁾。染色体縮小化株を作製するにあたり、独自に削除可能領域を設定した。大腸菌と同じ腸内細菌科に属するグラム陰性細菌であり、染色体サイズが641 kbと非常に小さな細胞内共生細菌*Buchnera* sp. APS株⁵⁾と大腸菌K-12株とのゲノム比較を行い、10遺伝子以上連続して大腸菌にのみ存在する領域を、推定削除可能遺伝子群として抽出した。次に、これらの領域に存在する遺伝子の既知情報を整理し、最小培地での生育に必要と考えられる遺伝子群を削除の対象から除外した。このようにして設計した削除対象領域を、MGF 作製のための基礎デザインとした。これらを順次欠失させることで、総延長1 Mb、染色体の22%を削除した染色体縮小化株MGF-01株を作製した⁶⁾。作製工程では、削除対象領域を欠失させるたびに最小培地での生育試験を行い、野生株と同等の生育を示すことを確認した。最小培地での生育に問題が生じた場合には、一工程前の菌株から縮小化を再開すると同時に、問題を生じさせた領域を削除対象から外した。染色体領域の削除に用いた方法は、加藤との共同研究で使用したマーカーレス染色体削除方法⁴⁾の改良法を用いた。MGF-01 株は野生型株と同等の倍加時間で生育を開始し、野生型株が増殖を停止した後もさらに増殖を続けるという性質を持っていた。また物質生産という面でも、スレオニン発酵力⁷⁾、ATP供給活性⁸⁾については野生株よりも上回っていた。比較ゲノム手法にて設計した基礎デザインに基づき作製した染色体縮小化株において、代謝機能が向上していたことは大きな収穫であった。使用した基礎デザインと生育を指標にした作製工程の有効性が示せたものと考えている。

遺伝子機能解析—コンパレティブゲノミックハイブリダイゼーション (CGH) による大腸菌共通遺伝子と不要遺伝子との識別 さて大腸菌の染色体縮小化作業を進めてたどり着くミニマムゲノムであるが、これは栄養要求性を示さずに旺盛な生育を示すために必要な遺伝子群のみから構成されるゲノムということになるだろう。そのミニマムゲノムを構成する遺伝子数が一体いくつになるかであるが、それを推定するためにさまざまな大腸菌株のゲノム構造を比較して、共通に保存されている遺伝子とそうでないものを識別した。大腸菌と一口に言っても、さまざまな株が存在している。我々が材料とした非病原性K-12株だけではなく、食中毒の原因菌として有名なO157株に代表される病原性株も含まれるし、尿路感染性大腸菌などの病原型に分類される株もある。これら形質が異なる株間のゲノム構造を比較することで、大腸菌という微生物種で保存されている遺伝子群と保存性の

低い遺伝子群を識別することが可能であると考えた。そこで大阪大学の戸邊との共同研究でCGH マイクロアレイ法による比較ゲノム解析を行った。大腸菌 K-12 株が保有する約4000 遺伝子に対するDNAをスライドグラス上にスポットしたDNA マイクロアレイを用いて、22 株の病原性株とのゲノムの相違を比較した結果から、共通で保存されている遺伝子と保存性の低いものがそれぞれ2600, 1400程度であることを見いだした⁹⁾。その結果を遺伝子の機能別にまとめて表1に示した。用いたDNA マイクロアレイには含まれていないK-12株遺伝子も400程度あり、そのうち半数程度はIS配列などのモバイルエレメント由来やアノテーション精度が低いと考えられる遺伝子群であった。残りの200 遺伝子程度については、保存性のある遺伝子である可能性もあるとして、CGH から示唆された2600 と合わせて2800 遺伝子というのが大腸菌という微生物種に共通な遺伝子数の最大値と推定した。この遺伝子数が大腸菌というバクテリアの基礎的性能を発揮するために必要な基本遺伝子数であろうと考え、現時点での染色体縮小化の目標にしている。病原性についてはO157 株の例に見るように後天的あるいは系統株別に獲得した形質であり¹⁰⁾、ここで言う基礎的性能にはもちろん含めない。

MGF-01株作製工程では約1000個の遺伝子を削除したが、その約70%はCGH 解析から削除可能と考えられる遺伝子群であった。つまりMGF-01株の基本デザインは、結果的にCGH 解析から推定される大腸菌の基本遺伝子群に近いものであった。それではさらなる染色体の縮小化を進めて、2800 遺伝子のミニマムゲノムを作製したと

して、これがシミュレーションの対象として十分にシンプル化しているものだろうか。表1に示した保存遺伝子の内訳の中で機能未知遺伝子の数は1000 以上である。染色体の縮小化は複雑な細胞システムをよりシンプル化するための効率的な手法であるが、それだけでは脱ブラックボックス化細胞の構築までなかなかたどり着けないということも、表1の結果から読み取れる。機能未知遺伝子について機能解析をする必要性を改めて示唆する結果でもあった。

遺伝子機能解析—網羅的な—遺伝子破壊株ライブラリーの代謝機能解析 染色体の縮小化を行ってもなお残存する機能未知遺伝子の機能解明と同時に、機能既知遺伝子に関してもさまざまなパラメーターの機能解析データを取得しておけば、MGFのさらなる改良にも役立つはずである。遺伝子破壊株は形質の変化が現れやすいので、その代謝機能や形質変化を定量的に測定することで、代謝や細胞機能に対してその遺伝子が本来果たしていた役割を推定することが可能となる。そこで奈良先端科学技術大学院大学の森との共同研究で、大腸菌 K-12 株の全遺伝子に対するそれぞれの単独遺伝子破壊株を用いた機能解析研究を実施した。米国Biolog社が提供している微生物分類用のシステムがある。95種類の炭素源に対する代謝活性測定をマイクロタイタープレート1枚で行い、そのパターン解析から属レベルでの分類を行うものであるが、これを遺伝子機能解析に応用した。グラム陰性細菌分類用のGN2-MicroPlate (Biolog社)を用いて、森らが作製した全4320株の単一遺伝子破壊株¹¹⁾について各種炭素源の資化能力を測定した。その代謝変化パターンデータをGeneSpringソフトウェアにより解析し、各遺伝子破壊株のクラスタリングを行った。類似の代謝変化パターンを示して同じクラスターに分類された株群を見ると、そこで破壊されている遺伝子群には機能面で関連があることが判明した¹²⁾。図1にはクラスターの1例を示した。このクラスターには呼吸鎖ならびにTCA回路関連の遺伝子が集中的にクラスタリングされていた。機能既知遺伝子に混じって26個の機能未知遺伝子が含まれていた。これら遺伝子について文献情報の検索を行ったところ、*yibO*については解糖系の重要な酵素であるbisphosphoglycerate非依存型のphosphoglycerate mutaseをコードしているということが1999年に報告されていた¹³⁾。また*yacE*については、CoA (CoA) 生合成経路上の重要酵素 dephospho-CoA kinaseをコードする遺伝子であることが2001年に報告されていた¹⁴⁾。この二つの遺伝子の例は、機能的に関連する遺伝子群が機能未知遺伝子を含んでうまくクラスタリ

表1. 遺伝子機能別に分類したCGH解析結果

機能	遺伝子数		
	全遺伝子*	保存	非保存
アミノ酸・核酸代謝	253	198	48
補酵素など代謝	127	114	11
細胞膜・輸送	564	347	204
細胞機能・制御	212	148	56
中央代謝・エネルギー	522	329	187
脂肪酸代謝	60	52	7
複製	90	74	12
転写・翻訳	200	170	15
その他	338	132	97
機能未知	2024	1022	787
総数	4390	2586	1424

* RNA をコードするものは対象外とした。

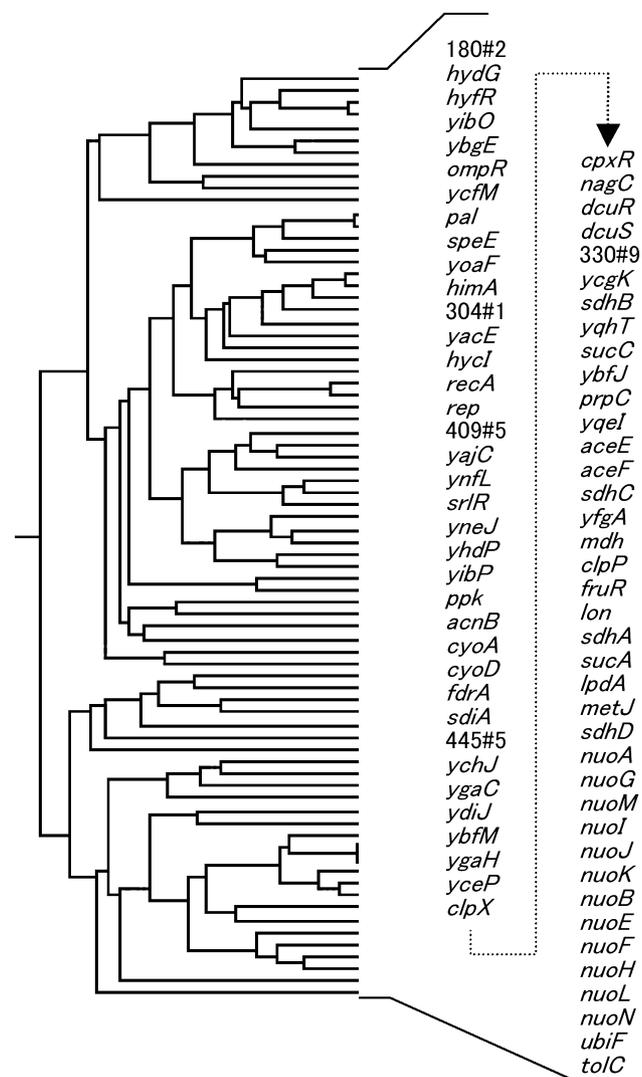


図1. Biologデータのクラスタリング結果。文献11で掲載したクラスタリング結果からSub-tree IVと分類した部分を抜き出した。

ングされていることを示しており、我々のクラスタリングデータならびにその手法が機能未知遺伝子の機能推定に有効であることを示唆した¹²⁾。図1にクラスタリングされた他の機能未知遺伝子に関しては、たとえば *yneJ*, *yqeI* や *ynfL* は調節因子をコードすると推定できる遺伝子である。これらの遺伝子はエネルギー生産のための重要な制御因子である可能性がある。我々のデータを用いた絞り込み過程を経て、重要な機能未知遺伝子に関して集中的に機能解析することで、効率的に細胞というブラックボックスを解明することが可能になるだろう。またデータの項目が増えればそれを利用して再度クラスタリング解析をすることもできる。これまでに気づかれていない重要遺伝子の探索という意味からも、全一遺伝子破壊株に関する網羅的なデータを取得することが重要であり、ATP供給活性⁸⁾、NADPH供給活性¹⁵⁾についても

網羅的なデータを取得しつつある。多次元の代謝解析データを取得し、重要遺伝子を選抜することで、代謝や物質生産に着目した MGF の改良のための基礎情報を整えることが可能だと考えている。

課題と将来像

生育、物質生産などの重要形質を損なわずに染色体を縮小化できることを実証し、遺伝子網羅的機能解析を進めてきた。今後は染色体縮小化をさらに進めると同時に、重要な機能未知遺伝子から順にその機能解析を進めたい。少なくとも遺伝子レベルで細胞の脱ブラックボックス化を達成することが、MGFの課題の一つである。また収集した遺伝子情報を基により合理的に MGF の代謝機能改良を進めたい。ただ機能既知遺伝子のみからなるミニマムゲノム細胞だけで外挿的シミュレーションが可能になるわけではないだろう。バイオインフォマティクス分野から今後生み出されて来るより高度なモデリングやシミュレーション技術を組み合わせることによりはじめて、「IT 駆動型微生物」の名前にふさわしいシステムとなると考えている。それこそが表題の「予測可能な細胞工場システム」であり、近い将来に現実のものになることを期待している。

大腸菌 MGF は、経済産業省の「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」プロジェクトの一環として、NEDO から委託を受けて実施したものです。また諸先生方との共同研究成果を含め本稿をまとめさせていただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

文 献

- 1) Smith, H. O. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15440 (2003).
- 2) Pósfai, G. *et al.*: *Science*, **312**, 1044 (2006).
- 3) Kolisnychenko, V. *et al.*: *Genome Res.*, **12**, 640 (2002).
- 4) Hashimoto, M. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **55**, 137 (2005).
- 5) Shigenobu, S. *et al.*: *Nature*, **407**, 81 (2000).
- 6) 溝口 寛ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, p.229 (2005).
- 7) 溝口 寛ら：日本生物工学会大会講演要旨集, p.69 (2005).
- 8) 原 清隆ら：日本生物工学会大会講演要旨集, p.177 (2005).
- 9) Fukiya, S. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **186**, 3911 (2004).
- 10) Ohnishi, M. *et al.*: *Trends Microbiol.*, **9**, 481 (2001).
- 11) Baba, T. *et al.*: *Mol. Systems Biol.*, in press (2006).
- 12) Ito, M. *et al.*: *Metab. Eng.*, **7**, 318 (2005).
- 13) Fraser, H. I. *et al.*: *FEBS Lett.*, **455**, 344 (1999).
- 14) Mishra, P. K. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **183**, 2774 (2001).
- 15) 日比 慎ら：日本生物工学会大会講演要旨集, p.37 (2005).