

ゲノムビルダーおよびゲノムデザイナーとしての枯草菌

柘植 謙爾¹・板谷 光泰^{1,2*}

ゲノムビルダーとしての枯草菌

歴史上初めてとなるゲノムの全塩基配列情報がインフルエンザ菌で1995年に報告されたのを皮切りに、現在では多数のバクテリアのゲノム配列が明らかにされ、変異株の表現型を指標とした個のレベルの研究から全体を俯瞰するオミクス研究への変革が起こった。塩基配列レベルで眺めることからさらに次のステップを目指して、1997年頃から筆者らはゲノムの丸ごとクローニングというトップダウン法の確立に手を染めた。長年筆者らの研究対象であった枯草菌168株は、長大な外来DNAを自身のゲノム中に安定に保持できる能力を有しており、その最大長の限界を知るために全塩基配列が明らかにされたばかりの光合成細菌のラン藻*Synechocystis* PCC6803株のゲノム(3500 kbp)すべてのクローニングを試みた^{1,2)}(図1)。長大な3500kbpものゲノムDNAを溶液中に安定に取り出すことは今でも不可能である³⁾。したがってのりしろを付けた多数のラン藻ゲノムDNA

断片(平均約50 kbp)を用意し、それらをひとつずつ逐次的に組み込み伸長させることで、2005年に枯草菌によるラン藻ゲノムの丸ごとクローニングに成功し^{1,2)}枯草菌はゲノムビルダー(Genome builder)になれることが示された。ラン藻ゲノムを持つ枯草菌が光合成により水と二酸化炭素だけで増殖することを期待したが、残念ながら光合成はまだ行わない⁴⁾。そして2010年、アメリカのベンター研究所のグループが、マイコプラズマのゲノムを再構成し、実際に増殖させることに成功したことは記憶に新しい^{5,6)}。彼らは、酵母の組換え系を用いるゲノム再構築系を確立したが、のりしろを利用してゲノム断片をつなぎ合わせている点は筆者らと同じである。枯草菌は、動物のミトコンドリアゲノムや植物の葉緑体ゲノム⁷⁾も対象に幅広いゲノムクローニングが示され、さらにいったんクローニングした後で(現時点でそのサイズが~100 kb程度なら)環状プラスミドとして回収でき⁷⁾、ゲノムビルダーとしての活躍の範囲は日々拡大している⁸⁾。

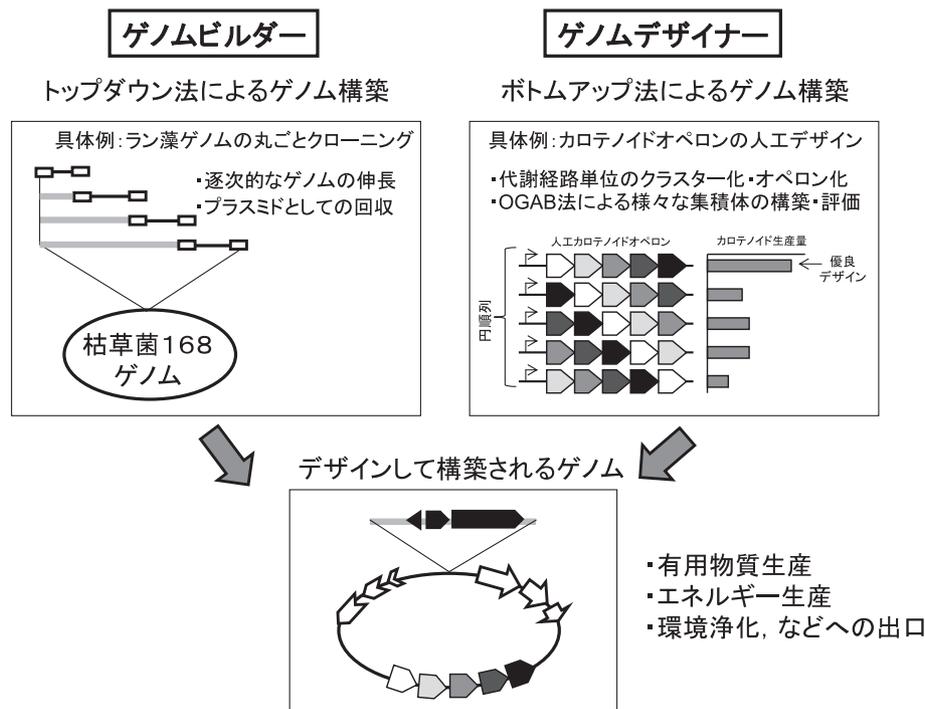


図1. 枯草菌による2大技術

*著者紹介 ¹慶應義塾大学先端生命科学研究所(教授) E-mail: mita2001@sfc.keio.ac.jp
²慶應義塾大学環境情報学部

ボトムアップ法によるゲノム構築

既存の生物が行うバイオプロセスをより効率化する、あるいは既存の生物にはない新たな機能を有するバクテリアをデザインして育種できるだろうか。前述のゲノム再構築例からは、既存のゲノムを丸ごとクローニングしこれを改変するというトップダウン的手法はもっとも現実的である。筆者らは一方で、新しいゲノム構築法として、遺伝子を最小単位としてこれを積み上げ、ゲノムを構築するというボトムアップ的手法の検討も行っている(図1)。ボトムアップでは使用する遺伝子すべての機能が判明しているのを前提とするのでゲノムサイズは比較的小さい。既存のゲノム丸ごとクローニングとは異なり、ゲノム中にどのように遺伝子を配置すべきかというデザインが最重要な点を指摘したい。既存のゲノムでも遺伝子が決してランダムに並んでいるわけではないことは、ゲノムの一部を大規模に人工的に逆位させた場合、つまり野生型のゲノム構造を崩すと増殖が大幅に遅れるなどの表現型が出現することなどからも容易に推測できる⁹⁾。とはいってもゲノム中の遺伝子配置問題は、既存のゲノム改変を対象とする限りはあまり深入りする必要はないようである。しかし遺伝子を積み上げて、1からゲノムをbuildする場合にはお手本がないだけに大問題である。この問題の解決法の一つとして、筆者らは、代謝経路ごとに関与する遺伝子群をクラスター化・オペロン化することで代謝経路を機能単位として最適化し、最終的にこれらをつなぎ合わせることによってゲノムを構築するお手本を提出しようと考えている。現実には代謝経路ごとの遺伝子の再配列における最適化ひとつとっても、遺伝子順序や向き、間隔などを考慮する必要がある(図1)。たとえばポリシストロニックオペロンのように1つのプロモーターの元にn個の遺伝子を並べる場合を考えると、その順列は、n!通り存在する。その数は5個の遺伝子で125通り、10個の遺伝子では3,628,800通りもある。すべての並び順で同じ表現型を示すとは考えにくかったため、実際にさまざまなクラスター・オペロンを構築し、詳細に調べることが必要だと考えた(これらの結果については、後述する)。しかしながら、大腸菌の既存のDNA組み換え技術では多数の遺伝子断片を一回の連結操作でデザインした順序でつなげることは困難である。そこで再び枯草菌の出番になる。

ゲノムデザイナーとしての枯草菌

DNAの断片をつなぎ合わせるためには、連結対象となる相手の断片とのりしろとなる同一塩基配列を共有す

る必要がある。ゲノムビルダーでは、数kbという長大なのりしろを使用した^{1,2,3,7)}。酵母組換え系を利用したベンター研究所の手法では、のりしろは60 bp程度と短い⁵⁾。のりしろは長いほど正確な連結を可能にするが、一方でその長さ分を相手DNAも共有しなければならないため、長いのりしろ部分は遺伝子集積のデザイン上の制約は大きくなる。多数のDNA断片をさまざまにつなぎ換えて集積体ライブラリーを構築するためには、隣り合うDNA断片間でのりしろの長さは小さいほど望ましい。たとえばのりしろが3bpだと32通りの連結が可能となり、10数個の遺伝子からなる代謝経路の遺伝子集積には十分な数である。しかも3 bpのりしろならば遺伝子間でのりしろ領域に出現させても遺伝子発現にはほとんど影響がないと考えられる。

筆者らは、3塩基の短いのりしろでDNA断片を集積するOGAB法という手法を考案した^{10,11)}。枯草菌のプラスミド形質転換系を利用した本方法では、多数の遺伝子断片を環状プラスミドの形態に集積する。まず、集積に用いる遺伝子の断片に3塩基の3'末端突出のりしろを持つDNA断片として調製する。これらの突出は、連結する断片の向きと順序を決定するため、プラスミド中で他に同じ配列が現れないように唯一の配列に設計する。これらの断片は、PCRで遺伝子断片を増幅する際にプライマーの末端にたとえばSfiI(5'-GGCCNNNN/NGGCC-3')などの認識部位とは異なる場所に切断サイトを持つTypeIISと呼ばれる制限酵素サイトを導入することで、Nが3個からなるフレキシブルなのりしろをデザインできる。得られたPCR断片はいったん大腸菌のプラスミドにクローニングし、制限酵素を用いて切り出す。材料となる遺伝子断片は集積を行うためのプラスミドベクターと併せて等モルの比率になるように濃度を調整した後DNAリガーゼを作用させて、ライゲーションを行う。プラスミドによる大腸菌の形質転換では、リガーゼ反応で予めDNAを環状に連結しておく必要がある(これは実は断片数が増えるにつれて極端に困難になる)が、枯草菌では、プラスミドの単位が同一方向にいくつもつながったようなタンデムリピートDNAは線状でも取り込んだ後で枯草菌が環状化してくれる。したがって試験管内で予めDNAを環状化しておく必要はなく、リガーゼ反応液をそのまま枯草菌コンピテントセルに加えるだけであとは「デザイナーである枯草菌」が環状化したプラスミドを筆者らに速やかに供給してくれる。以下にOGAB法を適用した3例で示されるように、楽々集積したDNAはたとえばゲノムbuilderでのゲノム構築に利用することが可能となる。

代謝経路ごとのゲノムデザインの実例

遺伝子を集積し、代謝経路ごとのクラスターやオペロンを構築する時、内部での遺伝子配列の重要性を検証するために、よく研究されている2次代謝産物の3つの例について、さまざまな遺伝子連結順序のクラスター・オペロンを構築し、その機能性を生産物の量を指標に評価した。これらの仕事では、OGAB法を難なくこなせるデザイナーとしての枯草菌の側面がいかに発揮された。

プリパスタチンクラスター プリパスタチンは、枯草菌が生産する環状リポペプチド性物質で、イネ病原性のカビに対する抗カビ活性を示す。この抗カビ物質のペプチド部分は、巨大なペプチド合成酵素により非リボソーム的に生合成される。これらの生産に必要な遺伝子は、ペプチド合成酵素群をコードする5つの遺伝子から成る巨大オペロン *ppsABCDE* (38.4 kb)、転写翻訳された PpsABCDE タンパク質を活性型に変換するために 4'-ホスホパンテテインを付加する *sfp* (1.0 kb)、*ppsABCDE* の発現制御に関わる *degQ* (0.6 kb) などが必要である。これらの遺伝子は枯草菌ゲノム中でほぼ等間隔に分散して存在しているため、これらを1つのクラスターに集約することが可能かどうか、そして、また可能な場合、どのように集約することがよいのかを検討した^{11,12)}。初めに *degQ*、*sfp*、*ppsABCDE* の各遺伝子について、プロモーターからターミネーターまでの1つの転写単位が、3塩基の3'末端突出を持つDNA断片となるようにPCRプライマーに制限酵素サイトを組込むなどして調製した。また、OGABの集積に使用するプラスミドベクターについてもさまざまな突出を持つように調製した。ベクタープラスミドの方向に対して、中身の3つの遺伝子断片の順列と向きを考慮すると合計48通りの遺伝子集積体の構築が可能となる。これらの集積プラスミドの構築をすべて行い、枯草菌のゲノム中に挿入した。その結果、集積体中の遺伝子の向きによって、プリパスタチンの生産性が変化することを確認した。集積の結果、最大の生産性を示すものは、遺伝子集積を行っていない野生株の生産性を上回るものも存在した。

人工カロテノイドオペロン カロテノイドは、黄色から赤色を呈する色素化合物で、植物や動物、バクテリアなどさまざまな生物種によって生産される。海洋性細菌の *Pantoea* 由来から取られたカロテノイド生産オペロンは大腸菌中でもよく発現し、最終生産物としてゼアキサンチンを生産する。本カロテノイドオペロン中には、5個の遺伝子が存在しており、4遺伝子と1遺伝子からなる2つの転写単位が向き合うようにつながった構造を

している。本クラスター内の遺伝子について人工オペロンへの再配列を試みた¹³⁾。まず、各遺伝子(コード領域とリボソーム結合部位)の断片をPCRで増幅し、個別にクローニングしたのち、制限酵素を用いて3塩基の3'末端突出を持つ断片として調製した。これらの5つの遺伝子断片と、プロモーターを配したプラスミドベクターをOGAB法により遺伝子集積した。本ゼアキサンチンオペロンの再配列においては、ゼアキサンチンの代謝経路中で登場する遺伝子からプロモーターに近くなるように配列した代謝経路順オペロンと、その代謝経路順の円順列の4つのオペロンの計5つのオペロンを構築し、このプラスミドの大腸菌中での生産量を調べた。その結果、代謝経路順オペロンは他の円順列オペロンに比較してゼアキサンチン生産量が多く、またその中間代謝産物であるβカロテンとβクリプトキサンチンの生産量も多かった。一方、他の円順列のオペロンは最終産物のゼアキサンチンの生産量こそ少なかったが、他のカロテノイド類はほとんど検出されず最終産物の純度が高い状態であった。

個々のオペロンの違いが何に起因しているのかということ調べるために、各オペロンを有する株からmRNAを調製し、各遺伝子のmRNA存在量を調べた。その結果、オペロン毎に遺伝子連結順序に関係なく、プロモーターに近い遺伝子ほどmRNAが多く存在し、離れるにしがって単調に減少する傾向があることが確認された。これにより遺伝子の連結順序の違いにより、酵素の量と比率が変化し、これがおのおのオペロンの性質を引き出していることが推測された。

人工PHAオペロン 生分解性プラスチックのポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、重合度により物性が変化し、超高分子量PHAは高強度な繊維やフィルムに加工できる。大腸菌に *Ralstonia eutropha* 由来の *phaABC* オペロンをプラスミドで導入することでPHA生産が可能であるが、現状では超高分子量PHAを効率的に生産することは困難である。そこで、モノマー供給に関わる *phaA* と *phaB* 遺伝子、重合に関与する *phaC* 遺伝子の発現量のバランスが変化することにより、分子量と生産効率のバランスのとれたオペロンが構築可能かどうかを検証した¹⁴⁾。3遺伝子のすべての順列(計6種類)の人工PHAオペロンをOGAB法により作成し、各オペロンを持つプラスミドを大腸菌中で発現させることでPHAの分子量と生産量を調べた。その結果、オペロン毎に各遺伝子の発現量が異なり、超高分子量PHAの生産に適したオペロンは *phaBCA* であることを明らかにした。

おわりに

枯草菌は納豆に代表される発酵食品に必要な菌として（納豆菌と称される）その人体への安全性は示されており、また生理活性物質や分泌酵素の宿主として用いられるなど、優れた物質生産宿主菌である。中でもラボストックの一つである枯草菌168株は本稿で取り上げたように、その類まれな形質転換能のおかげで、優秀なゲノムビルダーでもありゲノムデザイナーでもある。代謝経路のクラスター化・オペロン化については、現状では最適な遺伝子順序を予測することは難しく、しばらくは実際にさまざまな集積体を構築して調べる模索が続くが、その際に枯草菌168株は不可欠だろう。近い将来これらの知見を集約して有用物質生産菌のゲノムを合理的にデザインし構築することが出来るようになるよう努力したい。

人工カロテノイドオペロンの研究は、慶應義塾大学理工学部旧柳川研究室の西崎智子氏、土居信英先生、柳川弘志先生、また人工PHAオペロンの研究は東京工業大学大学院の廣江綾香さんと柘植丈治先生との共同研究の成果です。この場をお借りして御礼申し上げます。

文 献

- 1) Itaya, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15971 (2005).
- 2) 板谷光泰ら：蛋白質核酸酵素, **51**, 61 (2006).
- 3) Itaya, M. and Tsuge, K.: *Methods Enzymol.*, **498**, 427 (2011).
- 4) 板谷光泰, 柘植謙爾：化学と生物, **45**, 226 (2007).
- 5) Gibson, D. *et al.*: *Science*, **329**, 52 (2010).
- 6) 柘植謙爾, 板谷光泰：合成生物学の隆起－有用物質の新たな生産法構築をめざして－, シーエムシー出版 (in press)
- 7) Itaya M. *et al.*: *Nat. Methods*, **5**, 41 (2008).
- 8) 板谷光泰：化学と生物, **50**, 30 (2012).
- 9) Kuroki, A. *et al.*: *J. Biochem.*, **143**, 97 (2008).
- 10) Tsuge, K. *et al.*: *Nucleic Acid Res.*, **31**, e133 (2003).
- 11) Tsuge, K. *et al.*: *J. Biotch.*, **129**, 592 (2007).
- 12) 柘植謙爾, 板谷光泰：微生物機能を活用した革新的生産技術の最前線, p.65, シーエムシー出版 (2007).
- 13) Nishizaki, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1355 (2007).
- 14) Hiroe, A. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3177 (2012).