

ゲノムデザインに向けて

森 浩禎

21世紀最初の10年が終わり、生物学の進化は、多くの技術革新に後押しされ加速される一方である。特に最初の10年間の後半に姿を現した次世代型シーケンサーにより、生物学はゲノム生物学の革新から、再び新たな革新の時代と言えよう。

一方で、ヒトゲノムのドラフトが決められた2001年には、多くの人々が「ゲノムの時代は終わった」と感じてしまったのではないだろうか。あれから5年も経たないうちにシーケンス技術の革新が起こり、再び生物学を変えようとしている。ゲノムの時代は終わってはいなかった。今、化学合成されたDNAを用いたバクテリア創成が可能な時代になってきている。また、微生物のゲノム全体を他の微生物に丸ごとクローン化も可能になってきた。これで、もう有用微生物は設計し、作製可能な時代になったと多くの人々が誤解してしまうのではないだろうか。確かに微生物ゲノムの合成やゲノム全体のクローン化への道は開かれた。いざ創ろうとすると、どのようにゲノムを設計すればいいのか、すぐに躓いてしまうことに気がつくはずである。まだまだ細胞の構築ルールがわからないのである。21世紀に入り、システム生物学の発展が著しい。それまでが個々の遺伝子の、ある意味「部品」の科学を、部品が集まった「システム」の科学を目指そうとする。一つずつは正しいけれども、それら全体を見てみると思った通りには行かないのである。

これだけ調べられてきた「大腸菌」においてすらゲノムデザインができない現状とその理由、そして今後の可能性を考えてみたい。

大腸菌とは

大腸菌は、地球上もっともよく解析の進んでいる生物の一つであり、生物学的知見の蓄積がもっとも大きい生物である。そのため、研究方法論の充実もすばらしい。研究リソースにおいても、網羅的な遺伝子クローン、欠失株ライブラリーもそろい、研究対象としては理想的なものの一つである。

このバクテリアが発見されたのは古く、1885年ドイツの小児科医、Theodor Escherich (1857–1911) により報告された腸内細菌である。その後、発見者にちなみ、*Escherichia coli* と命名されたのが1919年である。現在、一般的に大腸菌と呼ばれ研究開発に利用されているものは、K-12株およびB株と言われる種類である。K-12株は、

1922年にアメリカの病院で快復期のジフテリア患者の便から分離され、Stanford大学で保管されていたものである。その後、Lederbergらにより、性接合の存在が明らかにされ、遺伝学が可能であることが示されたことから、大腸菌研究が急加速した。多くの細胞内の詳細な分子機構がこの生物により明らかにされてきたことは説明を要しないであろう。産業利用の面から見ても重要な生物である。最初に遺伝子組換えにより製品化されたのも大腸菌を利用したヒトインシュリンである。1977年にヒトインシュリンの遺伝子がクローン化され、初めての組換え医薬品が誕生したのが1982年である。

大腸菌ゲノム比較から見えるもの

21世紀に入り、シーケンス技術革新による生物学が大きく変化すると冒頭でも述べたが、配列決定された大腸菌ゲノムの数は、公開されているかどうかは別として、すでに現在では200を超えている。2002年では、モデル大腸菌としてよく利用されるK-12株以外に、尿路感染性大腸菌と腸管出血性大腸菌とが比較された²⁾。この解析によると、K-12株に約1500の遺伝子が外部から入り、K-12の持つ約500の遺伝子を捨てることで、O157ができていくことになる。多くの遺伝子が入り出しているわけである(図1)。次世代型シーケンサーの登場により、ゲノム解析の速度は急激に増し、多くの大腸菌ゲノムの比較が進められてきている^{3,4)}。2010年の段階で、60種を超える大腸菌のゲノムが比較されている。すべての大腸菌で共通に存在する遺伝子群をコアゲノム、重

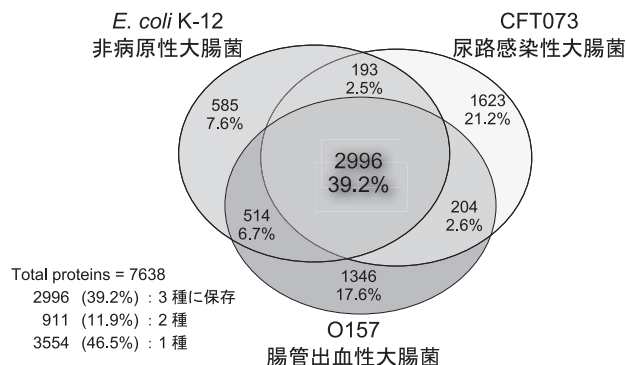


図1. 3種の大腸菌比較. 3種類の大腸菌を比較したベン図. Welch, R. A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 17020 (2002)より改変.

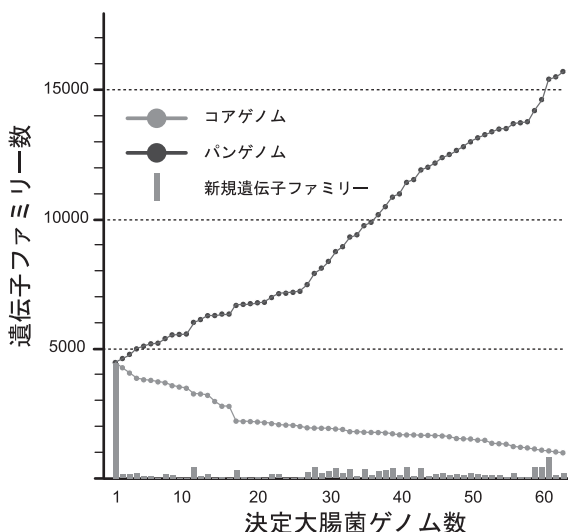


図2. 61種類の大腸菌比較。横軸は決められた大腸菌ゲノムの数。61種類の大腸菌ゲノム配列の比較。共通に存在する遺伝子をコアゲノムと言い▲で示す。重複を除いたコアゲノム以外の遺伝子をパンゲノムと言い●で示す。バーは、その時に読まれた大腸菌ゲノムからの新規遺伝子ファミリーの数。Lukjancenko, O. et al.: *Microb. Ecol.*, **60**, 708 (2010)より改変。

重複を除いたすべての遺伝子がパンゲノムと定義される。60種の大腸菌のコアゲノム遺伝子ファミリーの数は、2000ほどである(図2)。K-12株の半数である。これら共通のコアゲノムさえ持てば大腸菌として生育できるのかどうかは今後合成あるいは欠失による検証が必要である。

ゲノム改変の方法

上述のように、大腸菌を例にとっても通常必要がないと考えられる遺伝子群はかなりの数になるものと思われる。これらを除いて最小の遺伝子セットを持つ大腸菌の構築がこれまで長年検討されてきた。何をもち最小とするか、あるいは何に最適化させるか、という問題が別に存在する。生命としての最小ゲノム、物質生産等工学的な最適化など、目的により違う。またそもそも目的に応じた最小化を設計できるのか、は大きな課題である。この点は後に議論したい。最小化の方法は大きく2通りに分けられる。遺伝子欠損とゲノム合成である。ゲノム合成は、2010年にJ. C. Venter研究所のGibsonらにより化学合成されたオリゴDNAを用いて作製された合成染色体を持つ最初のバクテリア細胞の創成が報告され、生命の合成の時代は始まった⁵⁾。一方、日本でもItayaらが枯草菌染色体をベクターとして用いて藍藻ゲノムのクローン化を行った⁶⁾。自然界からの長大なゲノム断片の集積技術の確立である。これらは本特集で板谷の解説に詳しい。

遺伝子欠損には、ゲノム上から完全に欠失を行う方法

と、変異導入による欠損がある(図3)。(A)に示す方法は、ゲノム上に部位特異的配列を2カ所挿入し、その配列の間を部位特異的組換えにより欠失させる方法である。ゲノム上に2種類のトランスポゾンを利用して特定のloxP配列をランダムに挿入したライブラリーが構築された⁷⁾。2種類のトランスポゾンの挿入位置は決定されており、除きたいゲノム領域を挟むように挿入株を選択し、P1トランスダクションにより1つのゲノム上にまとめる。その後、部位特異的組換え酵素(Cre)の誘導により、2つのトランスポゾンに挟まれた領域が欠失される方法である。(B)に示された方法は、首都大学東京の加藤らにより開発が進められてきた欠失方法である。2種類のプラスミドを染色体の欠失させる領域の両サイドに別個に組換えを利用して挿入する。2つのプラスミドが挿入された株を選択後、こちらも部位特異的組換え酵素(FLP)を発現させることで、特定の部位(FRT)が組換えを起こすことで、挟まれた領域が欠失する方法である⁸⁾。この方法を繰り返すことで、約30%のゲノムの縮小化を実現している。同様の方法で、FRTなどの部位を残さない方法でISやその挿入された部位の遺伝子など、不必要と考えられる遺伝子群を個別に除いた縮小ゲノム大腸菌が作製されている。生育や形質転換効率なども調べられており、野性型大腸菌と比較して、効率の上昇が見られる⁹⁾。(C)に示す方法は、MAGE (multiplex automated genome engineering) と名付けられた方法で、染色体からの大規模欠失ではなく、同時に多くの変異を導入することでゲノム改変を行おうとする方法である¹⁰⁾。この方法もλRED組換え酵素を利用する方法である。変異を入れた合成オリゴDNAを設計し、対象の部分に組換えで変異を導入する方法で、一度に多くの種類の合成DNAを入れることで高効率に遺伝子改変を行う方法である。

ゲノムデザインの現状

これまでなぜゲノムの設計ができなかったのかを考えてみたい。一つは、ある遺伝子をクローン化し、そのコピーを増やしても、思い通りには代謝経路の補強には至らないものである。転写制御では、フィードバック制御がかかり、その遺伝子の発現が抑えられる。また、酵素反応においては、一部の酵素が増えたとしても、生成物によるアロステリック制御により活性が抑えられる。

2000年に3つのお互いに抑制しあう遺伝子をつ一つのプラスミドにクローン化することで、オシレーションを実現し¹¹⁾、設計・デザインへの道が開かれたが、思い通りのデザインには至っていないのが実情である。

一方、代謝経路のモデル化、予測の研究も進んできている。FBA (flux balance analysis) など、代謝経路全体の動きを捉えることが可能となってきた。大腸菌では

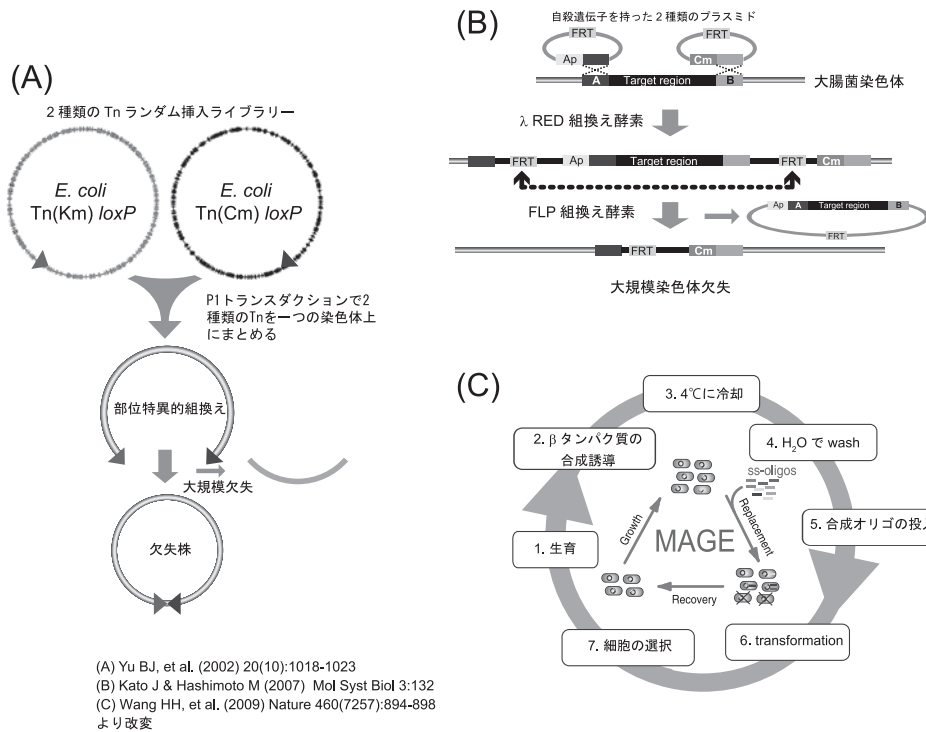


図3. 大規模ゲノム改変技術. (A) Yuらにより開発された2種類のトランスポゾン挿入ライブラリーを利用した大規模欠失方法. 二つのトランスポゾンを組み合せ、その間を組換えにより欠失させる. (B) (A)の方法と類似するが、ターゲットした2カ所に部位特異的組換え配列を導入し、その間を組換えにより欠失させる方法. (C) 合成DNAで設計した変異を組換えで導入する方法. 一度に複数種のオリゴDNAを導入可能な方法.

1260の代謝系の遺伝子をモデル化し、シミュレーション可能になっている¹²⁾. これまでの単一あるいは少数の酵素の詳細な酵素科学的解析から代謝経路全体への解析へと広がってきたが、その結果を基にしたデザインには至っていないのが現状である.

予測・デザインを難しくするのは何か？

筆者らは網羅的な解析を可能にする事を目的に、大腸菌全予測遺伝子の欠失株ライブラリーの構築を行った¹³⁾. 作製により明らかになったことは、327遺伝子はLB培地では欠失することができないということと同時に、それ以外の大半の遺伝子の欠失については、ほとんど生育に影響が出ないということである. おそらく、遺伝子の欠失を、他の遺伝子(群)が補償するか、代替経路が生まれるものと考えられる.

解糖系、TCA回路を例に考えてみる. 図4に示すように、Glucose-6Pから、Pyruvate、Acetyl-CoAを経て、TCA回路に入り、エネルギー生産、その他生体構成物質の生合成が進む. この経路を別の見方で書き直したものが図4-Bである. 基質と生成物という2項関係をCytoscapeというソフトウェアで描画したものである. 図4-Aとは様子かなり違ったものになる. 解糖系においても多くのループの存在が分かる. これは、ある

経路を遮断しても、別の経路により、物質を作り出す可能性を示す. これが細胞のロバスト性の一つの機構であり、育種を難しくしている少なくとも一つの原因である. 代謝経路、ゲノムのデザインが難しい理由である.

2重欠失株による遺伝的相互作用解析

ある遺伝子が別の遺伝子を相補する関係を遺伝的相互作用と呼ぶ¹⁴⁾. 広義にはEpistasisと言われる関係である. ではどの遺伝子が、ある遺伝子欠失を補償するのか? この関係を明らかにすることで、経路の単純化およびデザインへの道が開ける可能性が高い. ある遺伝子の変異を相補する遺伝子の探索の歴史は古い. 合成致死解析と呼ばれる方法である. 方法の概念を図5に示す. 代謝経路を例に示すが、通常重要な代謝基質を合成するのに複数の経路が存在する. 一方の経路の遺伝子を破壊しても、他の経路が働き、その欠失の影響は出ない. 同様に他方の経路が欠失しても生育には影響しない. しかし、これらの経路を同時に欠失させると、合成できなくなり、細胞は生育できなくなる. 出発地点から目的地へのルート探索と同じである. ある経路が遮断された場合に、どの代替ルートを経由して目的地に到達するかを調べるのである. 方法は単純だが、網羅的に行おうとすると、組み合わせの数が大きな壁になる. 大腸菌でも、約4000に

中心代謝経路

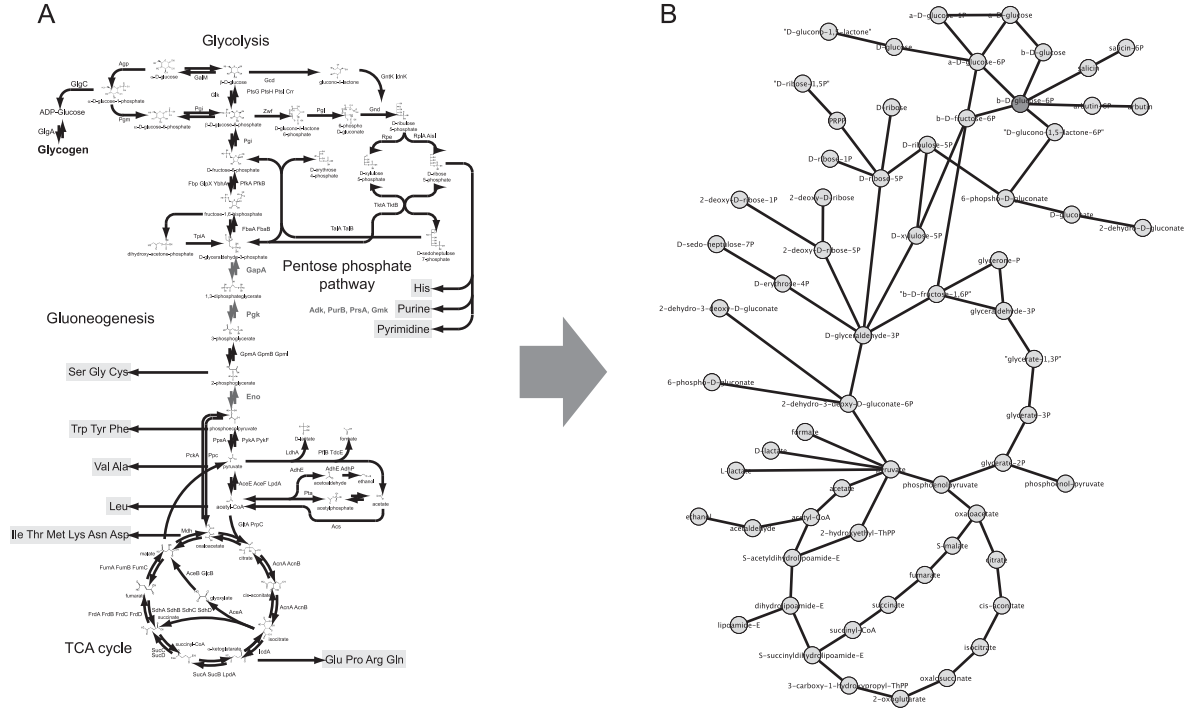


図4. 中心代謝経路. A) 教科書でよく見られる中心代謝経路の形. B) 中心代謝経路の(基質-酵素)-基質)の関係をネットワーク可視化ツールで示したもの. 既成概念とはだいぶ違う様子が分かる.

遺伝的相互作用ネットワーク解析

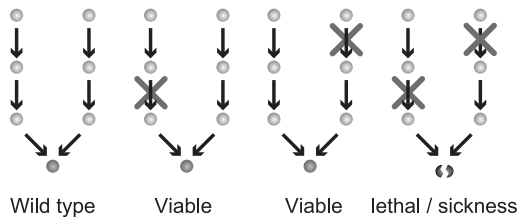


図5. 合成致死解析の概念図. 平行な経路が存在する場合, 片方を破壊しても, 他方で補償されるが, 両方の経路を破壊することで, 致死性を示す.

も上るタンパク質をコードする遺伝子が存在する. それらの総組合せとなると, 4000×4000の1600万組合せの2重欠失株の作製が必要となる. これをいかにして実現させるかが, 一遺伝子欠失株ライブラリー作製後の筆者らの大きな課題であった.

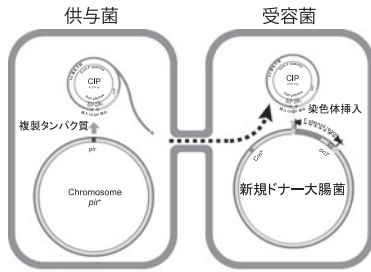
1600万種の網羅的2重欠失は可能か?

冒頭でも紹介したが, 大腸菌は性接合を行う. もし2種類の欠失株ライブラリーと, 宿主の性を制御できる手法が開発できれば, 接合で欠失の2重化が可能である.

現在同様の方法でシステマティックに2重欠失株による解析が出芽酵母と分裂酵母および大腸菌で進められている. 出芽酵母については, トロント大学, ミネソタ大学, ハーバード大学など, 北米の研究機関が中心となり¹⁵⁾, また分裂酵母はUCSFのグループが網羅解析を精力的に進めている¹⁶⁾. ここでは, 筆者ら日本のグループが大きく貢献している大腸菌での網羅的遺伝的ネットワーク解析を簡単に紹介する.

筆者らは, 2006年に一遺伝子欠失株ライブラリーを発表したが, それ以前より, システマティックな2重欠失株作製の方法の検討を進めてきた. 当初は接合とファージによる形質転換の2つの方法を検討したが, 最終的に接合による方法に絞り, 方法の確立を進めた. その結果, 2008年にトロント大学およびUCSFとの共同で, 最初の検討結果を公表した^{17,18)}. 公表の段階では, 2つ目の欠失株ライブラリーと大腸菌宿主の性を制御するツールは完全には開発を終えていなかったが, 接合により単一欠失をシステマティックに組み合わせることが可能であることを示した. 大腸菌は鉄イオウの生合成経路が*isc*と*suf*の2つの経路が存在する. この二つの経路の間の相互作用の同定に成功し, さらに*suf*遺伝子群と非常に強い遺伝的相互作用を示す機能未知の遺伝子の同定に成功している. 現在では, 2つ目の欠失株ライブラリー

A) 大腸菌雄化



B) 接合による欠失の統合

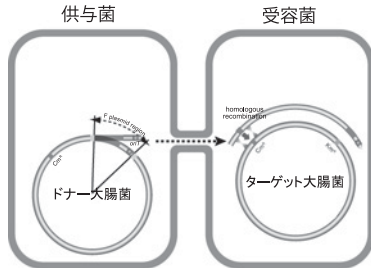


図6. 宿主の性の制御と接合によるシステムティックな2重欠失株作製方法. 雄株でFプラスミドが染色体に挿入されたものをHfrといい、大腸菌間の接合に利用される. 接合に必要な遺伝子群を持つCIPプラスミドを作製し、挿入させることで宿主の性を制御する.

の開発も終え、また宿主の性を制御するプラスミドの開発も終了し、共有の為の公開を準備中である. 宿主の性の制御方法と接合による欠失の2重化の方法を模式図を図6に示す. 大腸菌の性は、Fプラスミドに規定される. Fを持つ宿主は、持たない宿主と接合を行い、Fが伝播する. Fプラスミドは91 kbと大型で低コピーのプラスミドで、接合伝達に必要な領域は*tra*遺伝子群と*oriT*と呼ばれる部位である. このFプラスミドが染色体に組み込まれたものをHfr (high frequency of recombination)と呼び、Fの移動とともに大腸菌染色体部分を移動することから、大腸菌の遺伝子地図作成や形質導入に利用された. 図6-Aに宿主細胞のHfr化の方法、図6-BにHfr化を行った欠失株と、別の薬剤耐性を持つ欠失株ライブラリーとの間で接合をさせることで、システムティックに2重欠失化を行う方法を示す. 接合はプレートあたり1536欠失株の密度で進めており、大きく効率化を図っている(図7).

設計は可能か？

システムティックな大腸菌細胞遺伝的ネットワーク解析は始まったばかりである. 現在、この系を利用した解析を進めているが、蓄積されつつある膨大なデータから

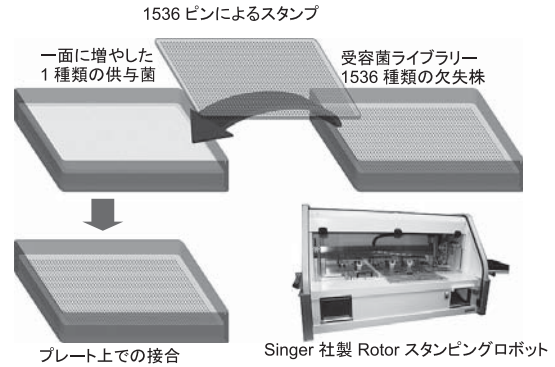


図7. High-throughput接合方法. 1536種の雌株欠失株を観点プレート上でコロニーを形成させ、そのコロニーを高密度のピンとスタンプロボットを用いて、一面に押し株を増やした観点プレートにスタンプし、接合する.

何が読み取れ、どの様に設計につなげることができるのか. 解析は始まったばかりであるが、少なくともこの情報から冗長な経路の同定が可能である. これまでも大規模欠失の導入によるゲノムの縮小化が進められてきた. 冗長な経路を削り、ゲノムを縮小化することで細胞を制御し易くなり、より物質生産に適した細胞を創ることが期待される.

これからようやく、「どの遺伝子を残すのか」が設計できるようになり、逆に「どの遺伝子が削れるのか」が分かるようになることが期待される. この先に、ゲノムの化学合成および縮小化の設計が見えてくるものと考えられる.

文 献

- 1) Tatum, E. L. and Lederberg, J.: *J. Bacteriol.*, **53**, 673 (1947).
- 2) Welch, R. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 17020 (2002).
- 3) Rasko, D. A. et al.: *J. Bacteriol.*, **190**, 6881 (2008).
- 4) Lukjancenko, O. et al.: *Microb. Ecol.*, **60**, 708 (2010).
- 5) Gibson, D. G. et al.: *Science*, **329**, 52 (2010).
- 6) Itaya, M. et al.: *Nat. Methods*, **5**, 41 (2008).
- 7) Yu, B. J. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1018 (2002).
- 8) Kato, J. and Hashimoto, M.: *Mol. Syst. Biol.*, **3**, 132 (2007).
- 9) Posfai, G. et al.: *Science*, **312**, 1044 (2006).
- 10) Wang, H. H. et al.: *Nature*, **460**, 894 (2009).
- 11) Elowitz, M. B. and Leibler, S. A.: *Nature*, **403**, 335 (2000).
- 12) Feist, A. M. et al.: *Mol. Syst. Biol.*, **3**, 121 (2007).
- 13) Baba, T. et al.: *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 2006 (2006).
- 14) Hartman, J. L. et al.: *Science*, **291**, 1001 (2001).
- 15) Costanzo, M. et al.: *Science*, **327**, 425 (2010).
- 16) Roguev, A. et al.: *Nat. Methods*, **4**, 861 (2007).
- 17) Butland, G. et al.: *Nat. Methods*, **5**, 789 (2008).
- 18) Typas, A. et al.: *Nat. Methods*, **5**, 781 (2008).