特　集

生命の完全な理解を目指して
―構成的遺伝学の提唱によるバイオインターフェイスの新しい視点―

青木　航*・植田　充美

生命と非生命のインターフェイスはどこにあるのだろうか．生命を生命たらしめる最小セットの遺伝子・タンパク質・代謝物とはどのようなものなのだろうか．WatsonとCrickによるDNA二重螺旋の発見以来，多くの知見が蓄積されてきたが，この問いには未だ答えることができていない．数多くの研究にも関わらず，なぜ大腸菌レベルでさえ，ブラックボックスの部分が多数残されているのだろうか．本稿では，現代生命化学の方法論を再考し，そこに内在する課題を指摘するとともに，筆者らが提唱する新しい方法論『構成的遺伝学』を解説する．

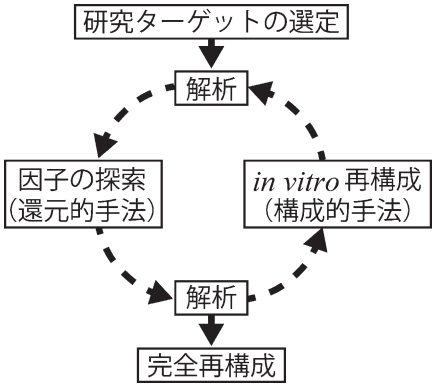

図1．従来の分子生物学のプロセス

構成的遺伝学の提唱

分子生物学の研究プロセス　生命科学の一つの目的は，研究対象となる生物学的システム（転写・翻訳・代謝など）を理解することである．「生物学的システムを理解する」という状況を正確に定義することは難しいが，Richard Feynmanが述べた“What I cannot create, I do not understand”という標語に表されるように，対象を因子に分解し，機能を解析し，*in vitro*で再構成し，モデル化することができれば，その生物学的システムをひとまずは理解できたといえるだろう．

生物学的システムを理解するために，分子生物学者はさまざまな手法を開発してきた．それらの手法はすべて，2種類の概念的枠組み―還元的手法と構成的手法―に分類される（哲学で用いられる用語とは少し異なる意味であることに注意）．還元的手法とは，研究対象となる生物学的システムに必要とされる因子を探索・同定・解析する探索的方法論であり，遺伝学やオミックスなどが相当する．還元的手法を用いることで，研究対象を複雑な全体から個別因子に落とし込んで解析することができるが，システムが全体としてどう働くかを理解することは難しい．この欠点を克服するために，構成的手法が用いられる．構成的手法とは，還元的手法で同定された因子を組み合わせて，生物学的システムの*in vitro*再構成・システム解析・モデル化を試みる証明的方法論であり，合成生物学やシステム生物学などが相当する．*in vitro*再構成と正確なモデル化に成功すれば，その生物学的システムを理解したといえるが，失敗した場合には何が足りないのかを知ることは難しい．

分子生物学の研究プロセスでは，個別関連因子の探索・同定・解析（還元的手法）と再構成によるシステム理解（構成的手法）が相補的に用いられ，一つの到達点として完全再構成に至る（図1）．しかし，従来の分子生物学の研究プロセスでは，生物学的システムの理解に莫大な労力と時間が必要とされ，大腸菌レベルでさえブラックボックスが多数残されている．たとえば，大腸菌ribosome生合成プロセスはもっとも複雑な生物学的システムの一つであり，60年以上にわたり多数の研究がなされてきたが，いまだその完全再構成は達成されていない．

構成的遺伝学　従来の分子生物学では，還元的手法と構成的手法を交互に繰り返すことで生物学的システムの理解が進められる．しかし，このプロセスではブラックボックスを完全に明らかにするために莫大な労力が必要とされることをすでに述べた．それではこの弱点を克服し，生命科学研究をハイスループット化することはできないのだろうか．

筆者らは，従来別個の方法論として扱われていた還元的手法と構成的手法の融合，すなわち，“因子の探索”と“再構成”を同時に行える方法論を開発できれば，上記弱点を克服できるのではないかと考えた．これは，研究の最初のステップとして生物学的システムの完全再構

*著者紹介　京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻（助教）　E-mail: aoki.wataru.6a@kyoto-u.ac.jp
科学技術振興機構さきがけ研究員

成を目指し，あとから生化学的解析やシステム解析を行うことを意味する（図2）．生物学的システムの全体像を把握するというもっとも難易度の高いステップを最初にクリアすることが可能であるならば，各因子の機能解析も迅速化することができ，生命科学のスループットを大幅に向上させられるだろう．

筆者らの提唱する新規方法論のコアが，人工細胞作製技術である．人工細胞とは，脂質二重膜（liposome）内部に完全再構成型転写翻訳システム（PURE system[1]）を含む人工の構造体である．この人工細胞に遺伝子断片を封入すると，それに対応したタンパク質を発現させられる．この人工細胞を用いて以下の戦略を実行することで，任意の生物学的システムの完全再構成が一度の実験で達成可能となる．

1. 研究対象となる生物学的システム（たとえばribosome生合成）が“機能した場合のみ”に蛍光を発するレポーターを作製する．
2. 一つひとつの人工細胞に，研究対象となる生物の全遺伝子ライブラリから遺伝子をランダムに分配し，人工細胞ライブラリを構築する（図3左）．分配された遺伝子群は，個々の人工細胞のゲノムと見なせる．同時に，蛍光レポーターと完全再構成型転写翻訳システム（PURE system）も人工細胞に封入しておく．人工細胞ライブラリを37°Cでインキュベートし，タンパク質を発現させる．
3. FACSなどを用いて人工細胞ライブラリを解析し，蛍光を発する細胞が存在するかどうかを調べる（図3中央）．PURE systemは構成要素が完全に定義づけられているので，生細胞やライセートのように何が入っているかわからないブラックボックスではない．蛍光を持つ細胞は，研究対象となる生物学的システムの機能に必要十分な遺伝子セットを含むと推定される．
4. 蛍光を示す細胞を1細胞レベルで単離する．次世代シーケンサーによる1細胞ゲノム解析を行い，複数の蛍光細胞に共通して含まれる遺伝子を同定し，生物学的システムの必要十分条件を決定する（図3右，図の例では遺伝子AとBが必要十分条件）．
5. バルク実験系で再現実験を行うとともに，システムのモデル化を行い，*in vivo*における挙動と比較して，生物学的システムの完全な理解を目指す．

この方法論の特徴は，研究対象となる生物学的システムに必要とされる遺伝子を発見するという遺伝学的手法を，生きた細胞を用いるのではなく，完全再構成型転写翻訳システム（PURE system）を用いて実行することである．そのため，筆者らは本方法論を『構成的遺伝学』と名付けた．また，この研究プロセスは従来の分子生物学のプロセスを逆向きにしたものであるため，『逆分子生物学』と呼ぶこともできる．

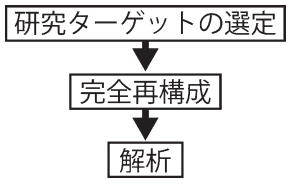

図2．構成的遺伝学のプロセス

構成的遺伝学の実証

β-ガラクトシド加水分解システムの再構成　構成的遺伝学のコンセプトを証明するために，大腸菌のβ-ガラクトシド加水分解システムをモデルとして，実証実験を行った．このβ-ガラクトシド加水分解システムは，*LacZ*遺伝子（β-ガラクトシダーゼ）のみを必要十分条件とするものであり，もっともシンプルなモデルであるといえる．筆者らは，人工細胞と大腸菌全遺伝子ライブラリ（4123遺伝子）を出発点とし，構成的遺伝学による*LacZ*遺伝子の超高速同定を試みた．

構成的遺伝学を実行するうえで必要な要素は，全遺伝子ライブラリと蛍光レポーターである．全遺伝子ラ

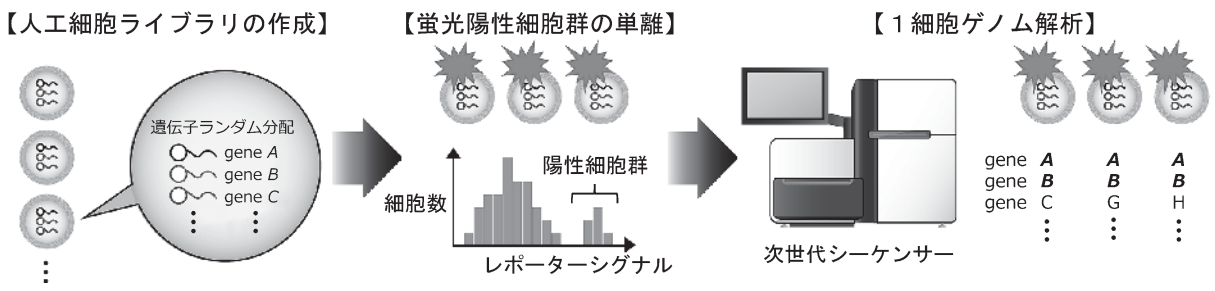

図3．構成的遺伝学の戦略

イブラリとしては，奈良先端大学の森らにより構築された，大腸菌の全4123遺伝子を含むASKA library[2]を利用した．蛍光レポーターとしては，CMFDG（5-chloromethylfluorescein di-β-D-galactopyranoside）を選択した．CMFDGはβ-ガラクトシド加水分解システムによって分解されると，蛍光を発する低分子化合物である．次に，PURE system，100 μM CMFDG，5 nM *Escherichia coli* ORF libraryを含む人工細胞ライブラリを作製した．作製された人工細胞を顕微鏡で観察すると，その平均サイズは2.4 μm（平均体積は7.2 fL）であった．遺伝子ライブラリの濃度を5 nMに設定したため，平均的サイズの人工細胞にはおよそ20種類の遺伝子がランダムに分配されていると推定される．重複組合せの公式から計算すると，4123遺伝子からランダムに20種の遺伝子を選んだ場合，そこに特定の一つの遺伝子が含まれている確率は，0.48％である．次のステップとして，作製した人工細胞を37°Cでインキュベートして遺伝子を発現させ，FACSで解析した．その結果，*E. coli* ORF libraryを含まない人工細胞ではCMFDG由来の蛍光は検出されなかったが，*E. coli* ORF libraryを含む人工細胞では，0.26％の人工細胞に蛍光が検出された．この値は理論的予測値である0.48％に非常に近い．さらに，蛍光人工細胞，および，ネガティブコントロールとして非蛍光人工細胞を単離し，含有されていた遺伝子を次世代シーケンサーにより同定した．蛍光人工細胞に含まれていた遺伝子に対してクラスター解析を行うと，すべての人工細胞に*LacZ*遺伝子が含まれて明瞭なクラスターを形成し，それ以外には共通因子は見つからなかった（図4）．また，非蛍光人工細胞に対しても同様の解析を行ったところ，共通成分は一つも見いだされなかった．この結果は，本申請で提案する『構成的遺伝学』のコンセプトが正しく働くことを証明するものであり，全遺伝子ライブラリを出発点として，研究対象とする生物学的システムが機能するための必要十分条件となる遺伝子セットを，超ハイスループットに同定できることを示している．筆者らはこの成果をScientific Reports誌に発表した[3]．

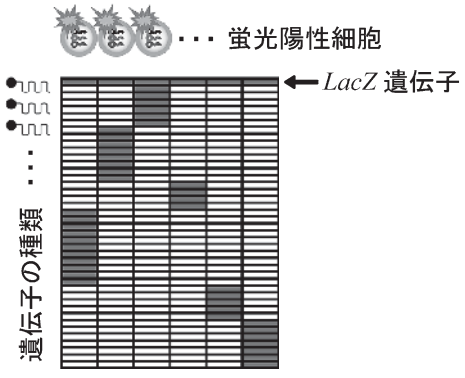

図4．蛍光陽性細胞の遺伝子クラスター解析

生命の完全な理解に向けて

構成的遺伝学には解決すべき課題がいくつか存在する．たとえば，多数の遺伝子を必要とする複雑なシステムの再構成を試みる場合，莫大な数の人工細胞ライブラリを構築しなければならないことである．仮に10種類の遺伝子を必要とする生物学的システムの再構成を試みる場合，各人工細胞に4000種類の遺伝子から200種類の遺伝子を分配すると仮定すると，10^{12}個の人工細胞ライブラリを構築する必要がある．より複雑な生物学的システムに構成的遺伝学を適用するためには，人工細胞作製方法の改良や，事前に候補遺伝子数を減らすといった工夫が必要になるだろう．また未知低分子が必要とされるシステムに関しては，別個の解決策が必要とされるだろう．しかしそれらの課題を解決することができれば，本稿で提案する構成的遺伝学は，以下のような特性を持つ，次世代生命科学における非常に強力な手法なると期待される[4,5]．

1. 適切なレポーターと遺伝子ライブラリを準備すれば，任意の生物の任意の生物学的システムの完全再構成が達成できる．
2. 構成的遺伝学を用いることで，少なくとも単一細胞レベルの生命現象に関しては，生物学的システムの全貌を捉えてから詳細な反応機構を解析できるようになるため，研究プロセスのハイスループット化が実現できる．
3. FACSや次世代シーケンサーなど，比較的普及しつつある解析法を用いるため，さまざまな研究室で利用しやすい．

文　献

1) Shimizu, Y. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751 (2001).
2) Kitagawa, M. *et al.*: *DNA Res.*, **12**, 291 (2006).
3) Aoki, W. *et al.*: *Sci. Rep.*, **17**, 4722 (2014).
4) 古村　峻ら（植田充美　監修）：ベンターの戦略，人工細胞の創製とその応用，シーエムシー出版，印刷中.
5) 青木　航ら（植田充美　監修）：人工細胞を用いた遺伝学的および合成生物学的手法の融合，人工細胞の創製とその応用，シーエムシー出版，印刷中.