

## バクテリア最小ゲノムシステムの構築

●加藤 潤一

首都大学東京大学院 理工学研究科 生命科学専攻

### <研究の目的と進め方>

一つのモデル生物についてきちんと全体像を理解するということは、より高等な生物を理解するための基礎として重要であり、また生命のシステムとしての理解を深めるためにも重要である。我々は*大腸菌*を材料として、細胞増殖、生存の基本的なシステムの全体像を分子レベルで理解することを目指して研究を進めている。

*大腸菌*の細胞増殖機構の全体像を理解するためには、まず細胞増殖に必要な全遺伝子を同定し、それらの機能を明らかにする必要がある。細胞増殖に必要な全遺伝子には、染色体上になければならない必須領域（複製起点のようにシスに必須な領域）とトランスに働く必須領域があるが、我々はこれまでの系統的、網羅的な染色体広域欠失株の作製により、シスに必須な領域については *oriC*、トランスに働く必須遺伝子については 302 個の遺伝子を必須遺伝子と同定している。

しかしこれらの必須遺伝子は野生株で破壊すると細胞増殖ができなくなる遺伝子群であり、これらの遺伝子群だけを持つ *大腸菌* 株が細胞増殖できるとは考えられない。つまり細胞増殖に必要な過程のうち、バイパスのある過程に関与する遺伝子群は必須遺伝子としては同定されておらず、破壊しても表現型がわからない非必須遺伝子として見えている。*大腸菌*の細胞増殖機構の全体像を理解するためには、必須遺伝子が関与する必須な過程と、バイパスのある必須な過程の両方の理解が必要である。

バイパスのある必須な過程については、系統的、網羅的に同定、解析する方法がこれまでになく、どのように解析すればいいかということが大きな問題であったが、我々は染色体大規模欠失株を利用した解析が有効であると考えている。つまり大規模な染色体欠失によりバイパスが機能しなくなった菌株では、残った経路に関与する遺伝子が必須遺伝子となるので、その過程および関与する遺伝子の同定が可能になる。もし実験的に最小必須遺伝子群を持つ *大腸菌* 株（全ての遺伝子が生育に必要な菌株）ができたとしても、必須な全ての過程はバイパスがない状態になっていることになり、全ての必須な過程に関与する遺伝子を必須遺伝子として同定できる

本研究では、*大腸菌*の細胞増殖、生存の基本的なシステムの全体像を明らかにするために、二つの方向で研究を進めている。

(1) システムの単純化：*大腸菌*染色体大規模欠失株の作製（実験的な最小必須遺伝子群の同定）

(2) システム構成要素の解析：生育に必要な過程に関与する遺伝子群の機能解析

(1) についてはこれまでに染色体（約 4.6Mb）の 40% 弱を欠失させた菌株の作製に成功している。今後さらに大規模に欠失させた菌株の作製を進め、実験的な最小必須遺伝子群の同定を目指す。

(2) については大きく分けて二つの方向の研究を進めている。

(ア) 機能未知必須遺伝子の解析

(イ) バイパスが存在する必須過程に関与する遺伝子群の同定、機能解析

### < 2008 年度の研究の当初計画 >

(1) システムの単純化：*大腸菌*染色体大規模欠失株の作製（実験的な最小必須遺伝子群の同定）

これまでに作製した大規模欠失株からさらに大規模に染色体を欠失させた菌株の作製を行う。また染色体大規模欠失株の作製およびバイパスのある必須な過程に関与する遺伝子の同定のために新しい実験系を構築する。

(2) システム構成要素の解析：生育に必要な過程に関与する遺伝子群の機能解析

(ア) 機能未知必須遺伝子の解析

まだ機能が明らかにされていない必須遺伝子群の中で、特にこれまでに興味深い知見が得られている二つの必須遺伝子群について遺伝学的、生化学的解析を進める。

一つは DNase をコードすると予想される機能未知必須遺伝子 *yqgF* で、この遺伝子の高温感受性変異株から調製したプラスミドの構造について解析を進める。また *YqgF* タンパク質の精製を行い、高温感受性変異株から調製したプラスミドなどを基質に用いて活性を同定、解析する。

もう一つは、上記の我々が同定した新規及び機能未知必須遺伝子のうちの 3 遺伝子 *yeaZ*, *ygiD*, *yjeE* で、*YeaZ*, *YgiD*, *YjeE* の物理的相互作用について調べ、また精製し組み合わせて活性の同定を試みる。また基質についての情報が不足しているため、これらの遺伝子の高温感受性変異株からのサプレッサー変異株、合成致死株の単離などの遺伝学的解析を進める。

(イ) バイパスが存在する必須過程に関与する遺伝子群の同定、機能解析

染色体大規模欠失株を利用し定常期の生存に必要なシステムについて解析を進めるとともに、上記の新しい実験系を用いて細胞増殖に必要な過程の遺伝子群の同定を試みる。

### < 2008 年度の成果 >

(1) システムの単純化：*大腸菌*染色体大規模欠失株の作製

*大腸菌*染色体大規模欠失株の作製を進める中で、野生株では欠失できた領域が大規模欠失株では欠失株が単離できないケースが出てきたので、これらの領域を解析するために新しい実験系を構築した。欠失株が単離できない原因としては、組換え頻度が低い可能性と、大規模に欠失させたために必須になった遺伝子が欠失領域に存在する可能性が考えられた。そこで今までは相同的組換えだけを利用していましたが、それに加えて FLP-FRT 部位特異的組換えを利用すること、また欠失させた領域がプラスミドとして細胞内に維持されることもできるようにした系を構築した。実際にこれまでの方法では欠失させることができなかった 6 つの領域（約 20-40 kb）について試みたところ、欠失株が得られたので、何らかの理由で相同的組換えの頻度が低下していたことが原因で、染色体はまだ欠失、縮小できることが示唆された。

(2) システム構成要素の解析：生育に必要な過程に関与する遺伝子群の機能解析

#### (ア) 機能未知必須遺伝子の解析

DNase をコードすると予想される機能未知必須遺伝子 *yqgF* について、高温感受性変異株から調製したプラスミドでは超らせん構造が変化していることを見出した。また *YqgF* タンパク質を精製して調べた結果、endonuclease 活性が検出された。また遺伝学的解析により、転写に関与することが示唆され、DNA の正常な構造を維持することにより転写を正常に進ませる新規なメカニズムの可能性が考えられた。

もう一方の機能的に関連している三つの機能未知必須遺伝子 *yeaZ*, *ygjD*, *yjeE* については、*YgjD* と *YeaZ* が複合体を作ることを見出した。*YgjD*-*YeaZ* 複合体を部分精製して調べた結果、種々の DNA を基質にした時に興味深い DNase 活性が検出された。近年古細菌のホモログが AP endonuclease であるとの報告があったが、遺伝学的解析からは支持する結果が得られず、これも転写に関与することが示唆された。

#### (イ) バイパスが存在する必須過程に関与する遺伝子群の同定、機能解析

染色体の約 30% を欠失させた大規模欠失株の定常期における生存率が著しく低下している事を見出し、この性質が複数の遺伝子が欠損したことによることを明らかにしていたが、その原因遺伝子の一つとして *dps* を同定した。また増殖期の生菌率が低下していることもわかり、これも複数の遺伝子の欠損によるもので、やはり *dps* 遺伝子の欠損が原因の一つであることがわかった。*Dps* タンパク質は、定常期において DNA と非特異的に結合して安定な「バイオクリスタル」と呼ばれるヌクレオプロテイン複合体を形成し、多くのストレスから DNA を保護していることが知られており、これまで外からのストレスに対する *dps* 遺伝子の機能については報告されていたが、今回 *dps* 遺伝子が直接増殖、生存に重要であることが明らかになった。

#### <国内外での成果の位置づけ>

染色体大規模欠失株についてはこれまでに他のグループからも報告されているが、我々のように 30% 以上もの領域を欠失させた菌株の作製は他に例がない。また大規模欠失株の利用により、複数の遺伝子の変異による表現型の解析が可能であることを実際に示した例も他には全くない。欠失変異を作製する種々のシステムや、機能未知必須遺伝子群の解析に用いている遺伝学的解析システムなどの技術面も、我々が独自に開発したものである。このように本研究は戦略から、欠失させる技術、実際に作製した欠失株、また必須遺伝子群の解析結果まで、どれをとっても国内外に類がなく大変ユニークでオリジナルなものである。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

大規模に染色体を欠失させた菌株の作製において、新たな欠失変異を導入した株が得られなかったり、生育が著しく悪くなってきたりする場合が多くなってきていた。可能性としては組換え頻度が低いこと、複数の経路が存在する必須な過程がかなり多いこと、染色体のサイズが重要であることなどが考えられたが、これらは未知の分野であり原因をはっきりさせるのが困難だった。

一方「複数の経路が存在する必須な過程」を同定するために、「野生株では欠失できたのに、大規模欠失株では欠失させることができない染色体領域」の同定を進めようとしていたが、「欠失変異が単離されるかどうか」で「欠失させることができるかどうか」を判断する事が、欠失変異が単離される頻度が低いために難しかった。

これらを解決するために新しい欠失変異を導入するシステムを構築したが、システムを動かすためにはいろいろと細かい問題が

生じ、それらを解決するのが予想外に困難だった。しかし今回システムが動き始め、欠失変異を導入することができるようになり、その結果まださらに染色体を欠失できることも示唆されたので、今後は染色体大規模欠失株の作製をさらに進めることができると思われる。

また定常期の生存については、関与する遺伝子群が予想以上に多く、定常期の生存機構が想像以上に複雑な過程であることが明らかになってきた。原因遺伝子の同定については、染色体ライブラリーを利用して何度か同定を試みたが成功せず、多数の部分欠失変異を作製することによって原因遺伝子を同定することができた。多数の部分欠失変異を作製するのが、時間と手間がかかり困難だった。しかし原因遺伝子が同定されると、定常期ではプラスミドが消失する興味深い現象が明らかになり、染色体ライブラリーを利用して同定できなかった原因がわかってきた。

#### <今後の課題>

大規模欠失株の作製については、新しい欠失システムができたのでさらに進めていくことができるようになったが、欠失変異を導入するために時間と手間がかかり、より効率的に改良していくことが今後の課題である。

機能未知必須遺伝子群の解析については、今年度 *yqgF* また *yeaZ*, *ygjD*, *yjeE* の両方の遺伝子群についての解析が大きく進んだ。Biochemical function と Biological function の両方について大変興味深い手がかりが得られてきたので、今後の解析が楽しみになっている。しかしどちらも転写に関与することがわかってきたが、*in vivo*, *in vitro* のアッセイ系をうまく組み立てて解析していくことが今後の課題である。

我々の作製した大規模欠失株を利用して定常期の生存機構の解析が進み始めた。今まで定常期の生存率が低下した変異株は *rpoS* 変異株ぐらいであり、他にはほとんど単離されておらず、定常期の生存機構については遺伝学的解析が難しく、解析が進んでいない。変異株の単離が難しい理由としては、定常期の生存を支える複数の経路が存在している可能性が考えられる。今回大規模欠失株を利用した解析により重要な手がかりが得られてきて、一つの研究方向が明らかになってきた。多数の遺伝子の欠損によって生存率が低下していることが明らかになってきたが、原因遺伝子群の同定を効率的に進めることが今後の課題である。定常期の生存は基礎生物学的な興味はもちろん、応用面でも物質生産に微生物を用いる場合には定常期での培養が重要であることなどから、非常に興味深い問題であり、今後大規模欠失株を利用した研究が大いに期待される。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文

1. 901140959  
Mizoguchi, H., Sawano, Y., Kato, J., and Mori, H. Superpositioning of deletions promotes growth of *Escherichia coli* with a reduced genome. *DNA Research* 15: 277-284. (2008)
2. 901141005  
Inoue, A., Murata, Y., Takahashi, H., Tsuji, N., Fujisaki, S., and Kato, J. Involvement of an essential gene, *mviN*, in murein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190: 7298-7301. (2008)