

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>

生物を基本的な特性である「自己増殖」および「増殖能の維持」という観点からとらえた時、どんな簡単な細胞性生物についてさえ、さらに細胞内で起こる一連の過程の中で最低限必要な基本的過程に絞ったとしても、人類はまだシステム全体を分子レベルで説明できるまで理解できてはいない。バクテリアの全ゲノムが解読されるようになってから、バクテリアなどを材料とした情報科学的または実験科学的な研究が盛んに行われ、これまでにいくつかの生物について全必須遺伝子が同定され、大腸菌、枯草菌などのモデル生物では、それら全ての機能が近い将来明らかにされるであろうと予想できるところまで来ている。ただそれでこれらのバクテリアのシステムの全体像が明らかになるかという、そう簡単ではない。必須遺伝子の次は最小必須遺伝子群が問題になる。

「最小必須遺伝子群」が実際に同定された生物はまだないが、単に全必須遺伝子を集めたものではないと考えられるのは、「複数の経路（バイパス）が存在する必須な過程」が存在するからである。必須遺伝子は「一つの経路による必須な過程」に関与する遺伝子というにすぎない。「複数の経路が存在する必須な過程」に関与する遺伝子は見かけ上非必須遺伝子である場合が多いので、遺伝子さらにはその遺伝子が関与する過程さえ同定が難しい。「最小必須遺伝子群」を同定しそれら全ての機能を明らかにするためには、これらの「隠れている」「複数の経路が存在する必須な過程」をどう同定し解析するかが問題となる。

本研究は大腸菌を材料として、実験的に最小必須遺伝子群を同定しそれら全ての機能を明らかにすること、つまり細胞増殖、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2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
- (2) システム構成要素の解析：機能未知必須遺伝子の機能解析および複数の経路が存在する必須な過程の同定、解析

前者(1)についてはこれまでに染色体の約30%を欠失させた大規模欠失株を作製することに成功し、すでに2005年に報告している。またさらに次の段階の大規模欠失株を作製するための基本的な情報を得るために、染色体の個々の領域の欠失変異（複製起点、終結点を除く全ての領域の広域欠失変異群）を作製し、今年度2007年に報告した（論文1）。現在それらの結果を基にさらに大規模に染色体を欠失させた菌株の作製を進めている。

また後者(2)については、まず必須遺伝子群の中の機能未知必須遺伝子群について機能解析を進めている。また大規模欠失株を利用することにより「複数の経路が存在する必須な過程」に関与する遺伝子群の同定と解析を試みている。大規模欠失株では複数の遺伝子の欠損により、「複数の経路が存在する必須な過程」が「一つの経路による必須な過程」になる場合が考えられ、その場合は残った一つの過程に関与する遺伝子が必須遺伝子となるので、同定、解析が容易になると考えられる。つまり野生株では見えなかった遺伝子、過程が、大規模欠失株を利用することにより初めて見

えるようになると考えられる。

<2007年度の研究の当初計画>

- (1) 染色体大規模欠失株の作製
すでに染色体（約4.6 Mb）の約30%を欠失させた染色体（約3.3 Mb）を持つ大規模欠失株の作製に成功し報告しているが、大腸菌の最小ゲノムシステムを目指して、さらに大きく染色体を欠失させた超大規模欠失株を作製する。具体的には、染色体を欠失させるために新たに構築したシステムをテスト、改良しながら実際にさらに大規模な染色体欠失株作製を進める。

- (2) 新規及び機能未知必須遺伝子群の機能解析
機能がまだきちんと明らかにされていない必須遺伝子はあと十数個のみであるが、その中で特に染色体、タンパク質の動態に関与するものとしてDNase, proteaseをコードすると予想される遺伝子群、また細胞表層の形成に関与する遺伝子群について重点的に解析を進める。具体的には、すでに単離した高温感受性変異株を利用して抑圧変異株などの単離、解析を行い、機能的に関連する遺伝子群の同定、遺伝学的な解析を進める。また同時にそれぞれを精製して生化学的な解析を進め、合わせてそれぞれの細胞内での機能を明らかにする。

- (3) 複数の遺伝子の欠損による表現型の解析
細胞内で起こっている多くの過程の中で複数の経路がある場合、つまりバイパスがある過程については、野生株では解析するのが難しい。大規模欠失株を用いると多くの遺伝子が欠損しているためにバイパスがなくなった状態になる可能性があり、その場合にはその過程に関与する遺伝子が必須遺伝子となり同定、解析が容易になる。実際にそのようなケースとして、これまでに作製した大規模欠失株では定常期における生存率が低下している事を見出し、それが複数の遺伝子の欠損による事を示した。そこでこの表現型について原因遺伝子群を同定し、定常期の生存機構について調べる。また細胞増殖についても複数の経路によって支えられている必須な過程の同定、解析を試みる。

<2007年度の成果>

- (1) 染色体大規模欠失株の作製
新しい染色体欠失システムを用いてさらに大規模に染色体を欠失させた株の作製を進めた。野生株の染色体は約4.6 Mbであり、これまで我々が報告した最小染色体は約3.3 Mbであったが、さらに欠失変異を組み合わせることで、全染色体の約38%を欠失して約2.8 Mbの染色体を持つ株の作製に成功した。
- (2) 新規及び機能未知必須遺伝子群の機能解析
(a) 細胞表層の生合成に必須な遺伝子群の機能ネットワークの解析：機能未知必須遺伝子について遺伝学的解析を進め、リポ多糖(LPS)、ペプチドグリカンの基質の輸送に関与すると考えられる遺伝子群を同定した。
具体的にはまず機能未知必須遺伝子の一つ *yhbN* 遺伝子がコードするタンパク質が、リポ多糖の外膜局在に必須な Imp タンパク質と相同なドメインを持つことから、*yhbN*, *imp* 遺伝子の高温感

受性変異株やリポ多糖合成に関与する *htrB*, *msbA*, *msbB* 遺伝子をクローニングしたプラスミドなどを用いて遺伝学的解析を行い、*yhbN* 遺伝子がリポ多糖の生合成に関与する事を示した。

また機能未知必須遺伝子の一つの高温感受性変異株を高温で培養した時に、細胞の径が大きくなりゴーストを生じることを見出した。そこでこの遺伝子が細胞壁の生合成に働く可能性を考えて遺伝学的解析を行い、ペプチドグリカンの生合成に関与することを示した。さらに東邦大の藤崎博士との共同研究により、高温感受性変異株においてペプチドグリカン合成の中間体が蓄積することを示し、生化学的にもペプチドグリカンの生合成に必須であることを示した。この遺伝子がコードするタンパク質の相同性から、ペプチドグリカン合成の基質を結合したキャリアリピッドを内膜内で回転 (flip-flop) させる酵素である可能性があり興味深い (投稿準備中)。

さらに β -バレルタンパク質の外膜への局在に必須な YaeT タンパク質複合体に含まれる、生育に必須な YfiO タンパク質の高温感受性変異株から多コピーサプレッサーを単離する事により、関与する新規遺伝子を同定した。さらにその新規遺伝子の変異遺伝子を作製して調べた結果、ペプチドグリカンとの相互作用が機能に重要であることがわかった (投稿準備中)。

(b) 染色体動態に必須な遺伝子群の機能ネットワークの解析: DNA分解酵素をコードすると予想される機能未知必須遺伝子について、その高温感受性変異株を用いた遺伝学的解析によりDNAジャイレースと機能的に関連があることが分かった。またその遺伝子がコードするタンパク質の精製を行って実際にDNAを切断することを示し、その遺伝子がDNA分解酵素をコードすることを確かめた。

(c) タンパク質動態に必須な遺伝子群の機能ネットワークの解析: タンパク質分解酵素をコードすると予想される機能未知必須遺伝子について、高温感受性変異株、抑圧変異株などを単離して調べたところ、3つの機能未知必須遺伝子が機能的に関連していることがわかった。

(3) 複数の遺伝子の変異による表現型の解析

すでに報告した染色体の約 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、複数の欠失変異を組み合わせることによりその表現型が見られる事を示し、その原因遺伝子の一部が存在する領域を特定した。また細胞増殖についても、複数の経路が存在する必須な過程を同定するためのシステムの構築を進めた。

<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。また今年度論文の形で報告した広域欠失株の網羅的作製も、類似の報告は皆無である。さらに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 (著書 1)、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で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>

さらに大規模に染色体を欠失させた菌株の作製を進めているが、生育が悪くなる場合が多くなってきている。可能性としては

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などが考えられるが、これらは未知の分野でありまだ原因ははっきりしない。また「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なかったのに、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」の同定を進めているが、「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い。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。生存率低下の原因遺伝子については、染色体ライブラリーを利用して何度か同定を試みたが、まだ成功していない。理由はわからないが、シス位での活性、コピー数の影響などの可能性も考えられる。

<今後の課題>

大規模欠失株の作製については、欠失させることにより徐々に生育が悪くなってきているが、これは「複数の経路が存在する必須な過程」の存在と密接に関連している可能性がある。従ってこれらの過程に関与する遺伝子群の同定が重要であり、そのためのシステムの構築が今後の課題である。これまで相同的組換えにより欠失変異株を単離してきたが、一つの組換え機構だけでは組換え部位、頻度などに片寄りがある場合があるので、別の組換え機構である部位特異的組換えも導入し、2つの組換え機構を組み合わせることを考え、現在 FLP-FRT 部位特異的組換えを導入した新しいシステムの構築を進めている。

全必須遺伝子 302 個のうち機能がまだよくわかっていない必須遺伝子はあとわずかになってきているが、機能解析は一筋縄では行かずヒントをつかむまでが難しく時間もかかる。これらの解析を速やかに行うことが今後の課題である。本研究では特に、DNA分解酵素、タンパク質分解酵素をコードする遺伝子群の解析に絞りつつあり、大変興味深い結果が得られてきている。

我々の作製した大規模欠失株では定常期の生存率が低下している事が明らかになったが、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いない。変異株の選択が難しいことや、定常期の生存に関しては複数の経路が存在していることがその理由と考えられるが、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、一つの研究方向が明らかになってきた。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る。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. 708051700

Kato, J. and Hashimoto, M. Construction of consecutive deletions of the *Escherichia coli* chromosome. *Molecular Systems Biology Microbiol.* 3: Article number 132 (2007)

2) 著書

1. 801211548

Kato, J. and Hashimoto, M. Construction of long chromosomal deletion mutants of *Escherichia coli* and minimization of the genome. *Methods in Molecular Biology* 416 (Microbial gene Essentiality: Protocols and Bioinformatics) Humana Press Inc. (2008)