

大腸菌遺伝的ネットワーク解明に向けて

森 浩禎

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・生体情報学

慶應義塾大学・先端生命科学研究所

1980年代に議論されてきたゲノム研究が、1990年台に入り、実際にゲノムプロジェクトが動き出し、大量の情報の実験による取得、情報の処理等が要求される様になった。1990年台の10年間を境に、それまでとその後の生物学を大きく変わった。技術革新がもたらしたものは、それをういた生物学自身をも大きく変えてきた。

ゲノムプロジェクトよりもたらされたもの、それは、その生物の持つ遺伝子のおおよその数を示せるようになってきたことであろう。Small RNA など、まだまだ予測の難しい分子種もあるが、少なくとも ORF に関しては、ほぼ全体像が明らかになってきた。

1. ゲノム研究からシステム生物学へ

遺伝子がある程度明らかになり、その産物であるタンパク質(生物を構成する部品)がほぼ出そろった。これにより、個々の部品(遺伝子)がどのような機能に割り振られそうかを議論できる段階に入った。部品の科学からシステム(機能単位)の科学が可能になってきたわけである。大腸菌の ORF を分類すると、転写因子はおおよそ 300 遺伝子、transporter 関連遺伝子は 390 個、というように機能の割り振りがある程度可能になった¹⁾。システムとして捉えようとするシステム生物学の研究の歴史は古い²⁾。しかし、実際の生物を相手に、機能単位を構成する遺伝子をまとめて、実験生物学と情報生物学、数学等の境界領域として研究が可能になったことがこれまでとは違うシステム生物学である。

2. システム生物学への期待

システムとして細胞を理解するということは、部品としての遺伝子の解析から、部品の集合による機能単位、最終的には細胞全体の完全な理解へと続く研究である。ゲノム解析研究や逆遺伝学などと同様に、研究の方向がそれまでとは逆であることが、理解を時に難しくする。これまでの分子生物学を考えると、ある表現型などの機能が明らかな遺伝子を元に、その周辺で、物理的あるいは遺伝学、生化学的に相互関係のある遺伝子を探しだしていくことにより、機能グループの同定と解析が進んだ。すなわち点から出発する研究と言える。一方、ゲノム研究により、機能既知か未知かは別にして、少なくともタンパク質をコードすると考えられる遺伝子のほとん

どは予測可能となった。そして、それら遺伝子をおある程度機能推定から、個々のシステムへと分類がある程度可能である。すなわち、これまで点からの出発であったものが、点の集合である面からの出発が可能になってきた。

この方向の研究を進めることを目的に我々が選択した道が、全てを網羅したリソース開発である。1996年から検討を開始した³⁾。

3. リソース

全遺伝子を対象とする大規模なリソース開発は、それにかかる費用と労力を考えても、遂行する価値がある。大きな理由は、全ての遺伝子を同じ土俵の上で比較を可能にするからである。タンパク質には、複数の生理機能を持つものもあり⁴⁾、全ての遺伝子を対象として簡便な機能スクリーニングを通して、過去の解析結果との比較を行うことも重要と考えている。また、網羅的リソース開発により初めて可能になる解析も多い。gain of function と loss of function の二つの方向から、全予測遺伝子の plasmid clone library⁵⁾と単一遺伝子完全欠失株ライブラリー(Keio collection)⁶⁾の作製を行った。

4. リソースを活用して

全体を網羅したリソースは、大腸菌の研究を大きく変化させた。これまでの解析を加速するだけでなく、不可能であった研究を可能にしている。

- (ア) 現在では、合成オリゴ DNA による DNA マイクロアレイが主流となっているが、タカラバイオと共同でベクター配列を利用した共通のプライマーにより、全予測遺伝子の cDNA による、マイクロアレイを作製し、解析に供した⁷⁻¹⁸⁾。
- (イ) GFP 融合型プラスミドライブラリーの蛍光を利用して、各遺伝子産物の細胞内局在性の解析を行った(遺伝学研究所・仁木博士との共同研究、<http://ecoli.naist.jp>)。遺伝子によっては過剰発現により inclusion body を形成する場合が存在するので、可能なかぎり、IPTG による誘導をかけない状態で、適当な発現を示す細胞を顕微鏡下で探して、解析を行った。
- (ウ) プラスミドクローンを利用して、His タグを用いた pull down 法によるタンパク質相互作用解析を行った¹⁹⁾。全クローンから His タグにより精製ができた約 2600 遺伝子に関して、11500 の相互作用の同定を行った。一方、ほとんどの膜タンパク質は精製することが出来ず、解析を進めることができなかった。今後の課題である。
- (エ) クローンをを用いることで、網羅的な酵素化学的機能スクリーニングが可能となった。これまで不明であったビタミン合成サルベージ経路の 2 ステップの酵

素遺伝子の同定²⁰⁾、phosphataseなどの機能を持つ新規酵素遺伝子の探索など²¹⁻²⁴⁾、簡便に進めることを可能にした。また、タンパク質を簡便に精製できることから、構造解析のためのタンパク質供給源としても活用されている²⁵⁾。

5. 遺伝的ネットワーク解明に向けて

細胞は、環境の変動になどに対して、その細胞内の環境を安定に保たせている²⁶⁾。ホメオスタシスであり、細胞のロバスト性である。欠失株ライブラリー構築の課程で、解糖系など中心代謝系の酵素も、大半が欠失可能であった。このことは、アイソザイムの存在や代替経路の存在によるものと考えられるが、これらが細胞のロバスト性をもたらしている機構の一つである。この分子機構の解明には、単一の遺伝子欠失に対して、そのアイソザイムや代替経路の特定が必要である。2重欠失株による合成致死及び生育阻害を示す遺伝子欠失の組合せ同定は、遺伝的ネットワーク解析と呼ばれ、ロバスト性の分子機構解明に向けた重要な解析である。我々は、これまで転写制御ネットワーク、タンパク質相互作用ネットワークの解析を進めてきたが、新たに遺伝的ネットワーク解析を目的として、網羅的かつシステムティックな2重欠失株作製の系の開発と、解析方法の開発を進めている。そのために新規の欠失株ライブラリーの開発を行い、これまでの一遺伝子欠失を接合により2重欠失株にする系の開発を行っている。これまでの開発と解析の現状を示す。

6. 今後の課題

これまで我々が開発したリソース群は、それらの分譲総数が150万を超えた。これらのリソースの質の向上も今後の大きな課題である。ゲノムアノテーションの宿命であるが、大腸菌においても遺伝子数を正確に確定することは難しい。また遺伝子の開始位置も、変更になることがある。

欠失株ライブラリーにおいては、部分2倍体の問題も存在する。

長い視点にたった研究を進めていければ、と考えている。

1. M. Riley, et al. *Nucleic Acids Res*, **34**: 1-9 (2006)
2. A. Trewavas. *Plant Cell*, **18**: 2420-30 (2006)
3. H. Mori, et al. *Res Microbiol*, **151**: 121-8 (2000)
4. C.J. Jeffery. *Trends Biochem Sci*, **24**: 8-11 (1999)
5. M. Kitagawa, et al., *Complete set of ORF clones of Escherichia coli ASKA library (A Complete Set of E. coli K-12 ORF Archive): Unique*

- Resources for Biological Research*, in *DNA Res.* 2005. p. 281-290.
6. T. Baba, et al. *Mol Syst Biol*, **2**: 2006 0008 (2006)
 7. M. Kawano, et al. *Mol Microbiol*, **45**: 333-49 (2002)
 8. K. Kodama, et al. *Mol Microbiol*, **45**: 1575-88 (2002)
 9. S. Minagawa, et al. *J Bacteriol*, **185**: 3696-702 (2003)
 10. K. Nakahigashi, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 1473-8 (2002)
 11. T. Oshima, et al. *Mol Microbiol*, **46**: 281-91 (2002)
 12. T. Oshima, et al. *Mol Microbiol*, **45**: 673-95 (2002)
 13. Y. Eguchi, et al. *Microbiology*, **149**: 2819-28 (2003)
 14. F. Biville, et al. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **5**: 37-45 (2003)
 15. Y. Eguchi, et al. *J Bacteriol*, **186**: 3006-14 (2004)
 16. M.S. Kabir, et al. *Microbiology*, **150**: 2543-53 (2004)
 17. M. Kuroda, et al. *Mol Microbiol*, **49**: 807-21 (2003)
 18. D. Hagiwara, et al. *J Bacteriol*, **185**: 5735-46 (2003)
 19. M. Arifuzzaman, et al. *Genome Res*, **16**: 686-91 (2006)
 20. J. Melnick, et al. *J Bacteriol*, **186**: 3660-2 (2004)
 21. M. Proudfoot, et al. *J Biol Chem*, **279**: 54687-94 (2004)
 22. C.F. Gonzalez, et al. *J Biol Chem*, **281**: 14514-22 (2006)
 23. E. Kuznetsova, et al. *J Biol Chem*, **281**: 36149-61 (2006)
 24. N. Awano, et al. *Appl Environ Microbiol*, **71**: 4149-52 (2005)
 25. X. Dong, et al. *Protein Sci*, **16**: 528-34 (2007)
 26. N. Ishii, et al. *Science*, **316**: 593-7 (2007)