

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K17885

研究課題名（和文）大腸菌合成致死遺伝子の網羅的検出による代謝経路の論理的再構築

研究課題名（英文）Theoretical re-construction of metabolic pathways by comprehensive genetic interaction analysis

研究代表者

武藤 愛 (Ai, Muto)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・訪問研究員

研究者番号：80730506

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：細胞の中では、連鎖的な酵素反応によって物質の合成あるいは分解が行われている。この連鎖的な反応は代謝経路と呼ばれる。この代謝経路を有用化合物の生産や有害物質の分解に利用するため、既知の代謝経路を統合した代謝モデルの構築が進んでいる。本研究では、大腸菌の二重遺伝子欠失株の生育を網羅的に測定することによる、代謝経路に関連する遺伝子のスクリーニングを行なった。その結果、既存の代謝モデルからは説明のつかない、遺伝子間の代謝機能補完関係が見つかった。これらの補完関係から、新規の代謝機能が見つかる可能性があり、より洗練された代謝モデル構築への貢献が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの代謝経路の発見は、研究者の経験則や発想に基づき、個別の遺伝子破壊実験などを経て為されてきた。本研究は、網羅的スクリーニングによる代謝寄与遺伝子情報を提供することにより、新規代謝経路の効率的な発見を支援するものである。本研究で得られた大腸菌遺伝子間の合成致死関係、及びそこから新たに示唆された遺伝子の新規代謝機能によって、より精度の高い代謝モデルを構築することで、生物工学や合成生物学の発展を加速できるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In cells, substances are synthesized or degraded through a chain of enzymatic reactions. This chain of reactions is called metabolic pathways. To utilize these metabolic pathways for the production of useful compounds and the degradation of harmful substances, metabolic models integrating known metabolic pathways are being constructed. In this study, genes related to metabolic pathways were screened by comprehensive measurements of the growth of double gene deletion strains of *Escherichia coli*. As a result, metabolic function complementation relationships between genes were observed that could not be explained by existing metabolic models. These complementary relationships may lead to the discovery of novel metabolic functions and are expected to contribute to the construction of more sophisticated metabolic models.

研究分野：システム生物学

キーワード：合成致死 遺伝的相互作用 代謝経路 大腸菌遺伝子欠失株ライブラリ 接合伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞の中では、様々な化合物が連鎖的な化学反応によって別の化学構造へと物質変換されることにより、細胞の構成要素の合成あるいは分解が行われている。この連鎖的な化学反応は代謝経路と呼ばれ、多くの場合、ゲノムDNAにコードされた複数のタンパク質からなる酵素群によって触媒される。この代謝経路を改変することにより、有用化合物の生産や有害物質の分解などに適した細胞をデザインする試みが世界中で進行中である。

これらの代謝経路情報を集積し、代謝反応で代謝化合物を繋いだネットワークを表したものが代謝ネットワークモデルである。大腸菌は、細胞の代謝系について最もよく調べられた生物の一つであり、現在までに iAF1260 (Feist et al, 2010) や iJ01366 (Orth et al., 2011) をはじめとした優れた代謝モデルが構築されている。しかしながら、それらの代謝モデルを基に細胞の生育を予測したところ、実験で確認された生存に必須な遺伝子のうち 20% を正しく予想できなかったことが報告されており (Orth et al., 2011)、未知の代謝経路の存在が示唆されている。未知の経路の存在は、代謝系の設計や制御に大きな障害となる一方、生物工学的に有用な代謝機能が潜在している可能性もあり、国内外で探索が進められているが、それらを網羅的に検出する取り組みは未だ行われていない。

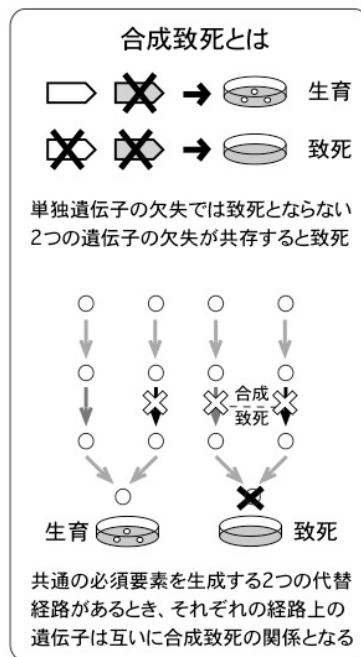


図1. 合成致死

2. 研究の目的

単独での遺伝子欠失では致死とならないが、他の遺伝子の欠失が共存すると致死性を示す現象を合成致死と呼ぶ (図1)。合成致死性を示す遺伝子は、細胞の生育に必要な機能を相互に補完する関係にある。本研究では、機能補完関係が代謝経路の間に存在する場合、理論上、一方の経路上の遺伝子は、他方の経路上の複数の遺伝子に対し合成致死性を示す点に着目した。そこで本研究では、大腸菌の遺伝子欠失株ライブラリを用いて合成致死性を網羅的に検出し、機能補完関係にある遺伝子群を明らかにすることで、未知代謝経路の発見を目指した。

3. 研究の方法

合成致死遺伝子のスクリーニングには、大腸菌の一遺伝子欠失株ライブラリ Keio collection (Baba et al, 2004) 及び Aska deletion library (Otsuka et al, 2015) を使用した。大腸菌には、細胞から別の細胞へDNAを移動させることのできる接合伝達というシステムが存在する。このシステムを利用することで遺伝子欠失株のゲノムDNAを別の遺伝子欠失株に送り込むことが可能である。Aska deletion library 由来の株 (以下 ASKA 株) の遺伝子欠失領域を接合伝達によって Keio collection 由来の株 (以下 Keio 株) へ移動し、相同組換えを利用してゲノムに組み込むことによって、二重欠失株の構築を行なった。具体的には、ASKA 株のゲノムDNAに接合伝達関連遺伝子群及び伝達開始起点 (*oriT*) を導入し、Hfr (High Frequency of Recombination) 化することで、ASKA 株に接合伝達能を持たせた。Hfr 化された ASKA 株を寒天培地上に塗布し、そこに 1,536 の Keio 株を並べて植菌する。ASKA 株と Keio 株を同

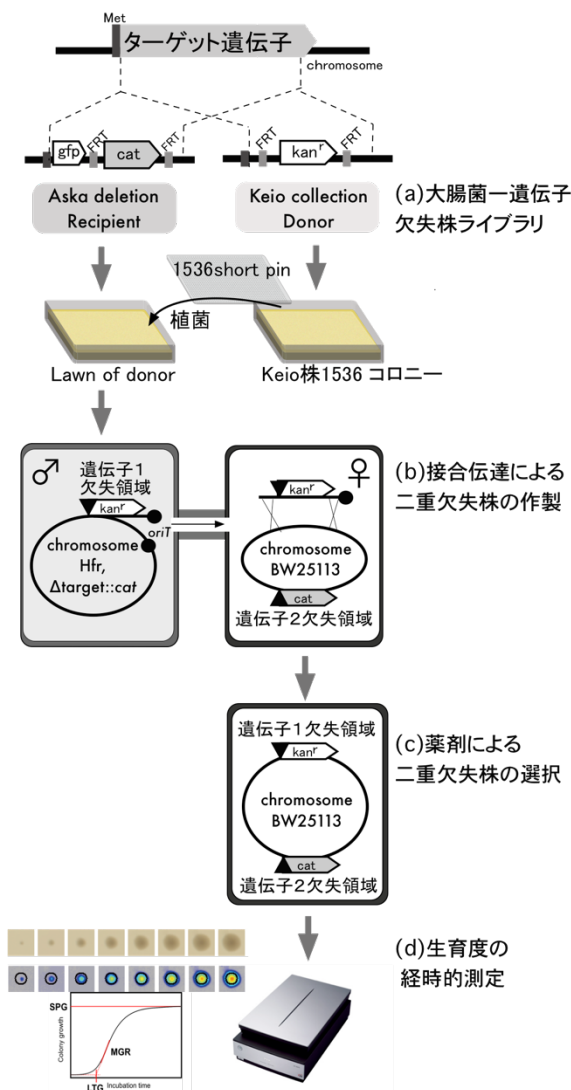


図2. 合成致死遺伝子スクリーニング実験

居させることで2つの株の間で接合伝達が起こり(図2b)、それぞれの遺伝子欠失領域に導入した薬剤耐性遺伝子によって遺伝子欠失領域の移動した株だけを選択することで、二重欠失株を得る(図2c)。1枚の寒天培地につき1,536株を取り扱うことができ、3枚の寒天培地で大腸菌の全遺伝子欠失株4,000株を網羅できる。

得られた寒天培地上の二重欠失株の生育を、当研究室で開発された経時的コロニー体積モニタリングシステム colonylive (Takeuchi et al, 2014) を用いて観察及び数値化した(図2d)。二重欠失によって生育が著しく低下する株を特定し、合成致死を示す遺伝子の組み合わせを得た。大腸菌の全非必須遺伝子について、合成致死遺伝子プロファイルによるクラスタリングを行い、共通の遺伝子に対し合成致死性を示す遺伝子群を得た。

4. 研究成果

(1) 一遺伝子欠失株の生育度測定

まず、栄養培地および最小培地における一遺伝子欠失株の網羅的生育度測定を、Keio株を用いて行い、必須遺伝子の網羅的スクリーニングを行なった。得られた必須遺伝子情報に基づき、代謝パスウェイデータベースを参照して必須代謝経路を特定した。

M9Glucose 最小培地ではKeio collectionの3,809株のうち157株が生育せず、非生育株に対応する欠失遺伝子は、M9Glucose 最小培地における必須遺伝子とみなされた。これらの必須遺伝子の産物から構成される174の代謝経路が必須代謝経路として抽出された。これらの代謝経路の多くはアミノ酸の合成経路であった。また、必須代謝経路上に存在する非必須遺伝子(例: 図3)として、M9Glucose 最小培地で13遺伝子、アミノ酸添加培地を含めると21遺伝子が特定された。

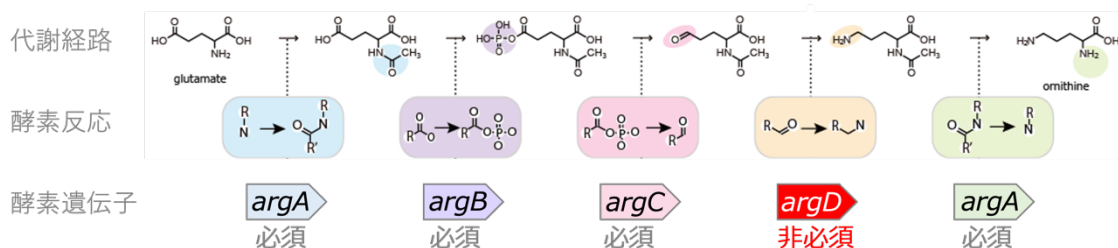


図3. 一遺伝子欠失株の生育度測定実験により得られた、最小培地における必須代謝経路および必須経路上の非必須遺伝子の一例

(2) 合成致死遺伝子の網羅的スクリーニング

① 遺伝子座特異的な二重遺伝子欠失株作製効率の低下と生育度補正

接合伝達および相同組み替えを利用した二重遺伝子欠失株作成法では、ゲノム上で近接する遺伝子間の二重遺伝子欠失株作製効率が著しく低下することが知られている。これは2つの遺伝子欠失領域が近いほど、相同組み替えの終点が生じる確率が下がるためである。本研究において得られた二重遺伝子欠失株の生育度情報を、大腸菌ゲノムDNA上の位置と併せて可視化したところ、上記のASKA株の欠失遺伝子の近傍遺伝子を欠失するKeio株の見た目の生育低下が栄養培地と最小培地の両方で見られたのに対し、遺伝子座特異的な生育度の低下が、最小培地上でのみ観測された(図4)。二重遺伝子欠失株作製効率の低下は、常に接合伝達起点から200kb以内の遺伝子座にある遺伝子の欠失株において起こっていた。このことから、伝達起点に近い遺伝子領域は他の部分に比べ相同組み替えの頻度が高いことにより、Keio collection側の遺伝子欠失領域が組み換わってしまうことによって薬剤耐性遺伝子が失われ、二重欠失株作製効率の低下が生じているのではないかと考えた。二重欠失株作成効率の低下による見かけの生育度低下を補正するため、ゲノム上の位置情報に沿って生育度データをノーマライズする手法を開発した。

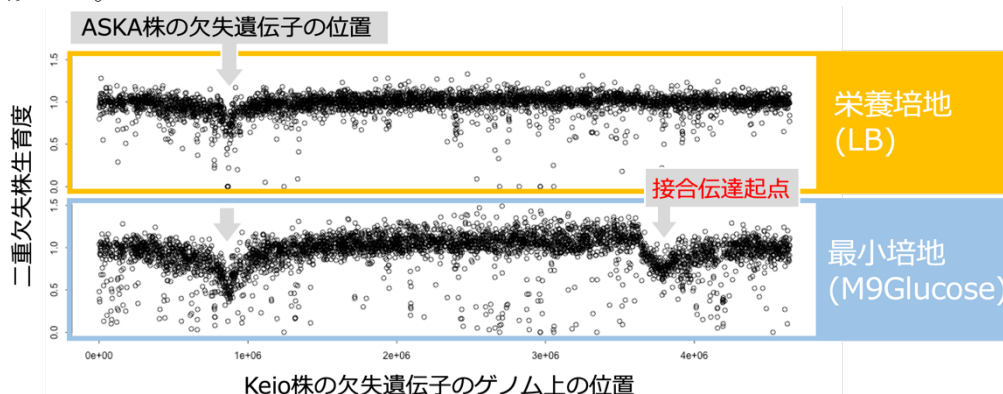


図4. 遺伝子座特異的な見かけの生育度低下の培地による違い

②機能補完遺伝子の探索

得られた二重欠失株の生育度データを①で開発した手法によりノーマライズし、(1)で得られた単一欠失株の生育度から予測される二重欠失株の生育度との差を遺伝的相互作用スコアとして、合成致死遺伝子の網羅的抽出を行なった。その結果、390 遺伝子ペアが合成致死遺伝子ペアとして抽出された(図 5)。(1)で得られた、必須代謝経路上に存在する非必須遺伝子について、共に欠失した時に細胞が致死あるいは強い生育度の低下を示す遺伝子群を、機能補完候補遺伝子として検討を行なった。

機能補完候補遺伝子にはパラログ遺伝子や類似反応を触媒する酵素の組み合わせが含まれており、これまでに対応付けがなされていなかった遺伝子-代謝反応間の関係が、網羅的検出によって示唆された(例：図 6)。同時に、遺伝的相互作用ペアには代謝酵素ではない膜タンパクや転写因子、機能未知遺伝子も多数含まれていた。これらの遺伝子が直接に代替反応を担っているとは考えにくいことから、細胞が代替酵素や代替代謝経路だけでなく、膜輸送や転写制御ネットワークなどを含む広範なシステムとして、遺伝子変異に対する頑健性を獲得している可能性が示唆された。

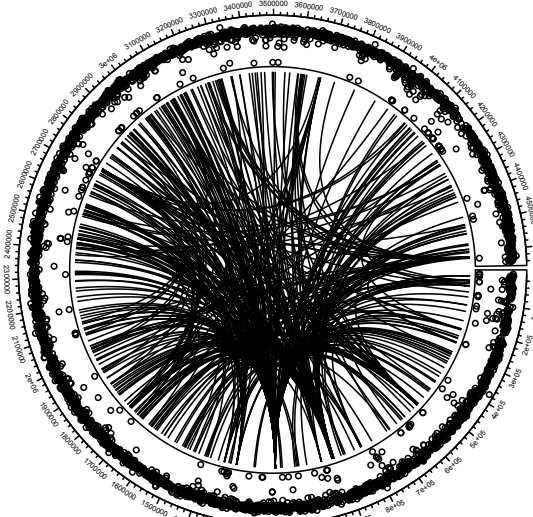


図 5. M9Glucose 最小培地における合成致死遺伝子のゲノム上の位置

外枠の数値は genome loci を、プロットはその位置にある遺伝子の欠失株の生育度を示し、内側の線は合成致死を示した遺伝子ペアを結ぶ。

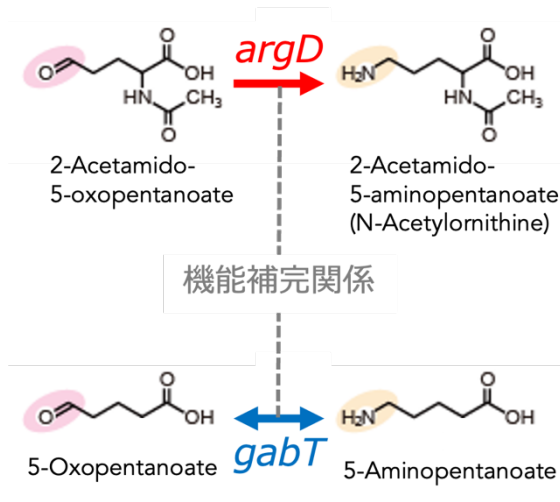


図 6. 機能補完候補遺伝子の一例

図 3 に示した必須代謝経路上の非必須遺伝子 *argD* と、アミノトランスフェラーゼをコードする *gabT* とを共に欠失した二重欠失株は、著しい生育の低下を示す。両遺伝子のコードする酵素の基質・産物は異なるものの、両者の構造はアセトアミド基の有無を除けば一致しており、反応による構造変化のパターンも一致していることから、ArgD 非存在下で GabT が必須経路を代替している可能性がある。

③合成致死遺伝子プロファイルによる遺伝子のクラスタリング

iJ01366 の開発者である米カリフォルニア大学の Jonathan Monk 博士の協力の下、代謝ネットワークモデルに基づく合成致死関係の予測結果と、本研究で得られた二重遺伝子欠失株生育実験データに基づく合成致死関係を比較し、両者の相違が最も小さくなる遺伝的相互作用スコアの閾値を求めた。その閾値を使用した際の合成致死遺伝子プロファイルの類似性を用い、Keio collection に含まれる 3,809 株の欠失遺伝子についてクラスタリングを行った。得られたクラスタの中で代謝酵素を多く含むものに着目し、未知代謝経路の候補遺伝子セットとした。得られた候補遺伝子セットには、炭水化物代謝系および補酵素の合成系において、既知の代謝ネットワークから予測されたものとは異なる合成致死関係を示す遺伝子セットが含まれていた。

これまでの代謝経路の発見は、研究者の経験則や発想に基づき、個別の遺伝子破壊実験などを経て為されてきた。本研究は網羅的スクリーニングによる代謝寄与遺伝子情報を提供することにより、新規有用経路の効率的な発見を支援するものである。本研究で得られた大腸菌遺伝子間の合成致死関係、及びそこから新たに示唆された遺伝子の新規代謝機能によって、より完成度の高い代謝モデルを構築することで、生物学や合成生物学への貢献はもちろんのこと、代謝系の進化的構築原理の理解に繋がると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 武藤 愛
2. 発表標題 『実験自動化 x 遺伝子欠失株ライブラリ』で目指す新規代謝ネットワークの探索
3. 学会等名 2021年日本バイオインフォマティクス学会年会・第10回生命医薬情報学連合大会(IIBMP2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武藤 愛
2. 発表標題 大腸菌の網羅的二重欠失株生育実験データに基づく代謝ネットワークモデルの補完
3. 学会等名 2020年日本バイオインフォマティクス学会年会・第9回生命医薬情報学連合大会(iibmp2020) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ai Muto-Fujita, Jonathan Monk, Yuichiro Tanaka, Bernhard O Palsson and Hirotada Mori.
2. 発表標題 Genome-scale genetic interaction analysis to rewire comprehensive metabolic models of Escherichia coli
3. 学会等名 ISMB/ECCB 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ai Muto-Fujita, Jonathan Monk, Yuichiro Tanaka, Bernhard O Palsson and Hirotada Mori.
2. 発表標題 Rewiring diagram of Escherichia coli metabolic network models by Genome-scale genetic interaction analysis
3. 学会等名 2019年日本バイオインフォマティクス学会年会・第8回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武藤愛
2. 発表標題 化学反応モジュールから探る代謝ネットワークの進化
3. 学会等名 CBI学会2019年大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武藤愛、田中雄一郎、野崎麻希、森浩禎
2. 発表標題 大腸菌合成致死遺伝子の網羅的検出による未知代替経路の探索
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森 浩禎 (Mori Hirotada)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
アメリカ合衆国	カリフォルニア大学サンディエゴ校		