

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16109

研究課題名(和文)ボトムアップジェネティクスによる大腸菌ゲノム相同組み換えのシステム解析

研究課題名(英文) Reconstruction and analysis of E. coli homologous recombination by using bottom-up genetics

研究代表者

青木 航 (Aoki, Wataru)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10722184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、任意の生物学的システムの再構成をハイスループットに達成可能とする新規方法論「ボトムアップジェネティクス」を提唱し、その実証として、大腸菌のゲノム相同組み換えや転写マシナリーの再構成を試みることである。これまでに確立したボトムアップジェネティクスの基盤技術を統合し、大腸菌全遺伝子ライブラリを用いて人工細胞ライブラリを構築し、大腸菌のゲノム相同組み換えおよび転写マシナリーの再構成を試みたところ、人工細胞内部でターゲットが再構成された可能性が示唆された。現在、必要十分条件の決定に向けてさらなる解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

効率の大幅な向上はイノベーションに直結する。本研究では、構成的理解という現代生命科学のボトルネックのひとつの解消を目指しており、それが実現されれば、革新的バイオテクノロジーの連続的創出にも繋がると期待される。例えば、制限酵素・GFP・PCR・光遺伝学・ゲノム編集などのバイオテクノロジーは、必要十分条件が決定されたが故に高い改良性と多様なシーンへの移植可能性を持ち、普遍的ツールと成り得た。本研究で開発するボトムアップジェネティクスにより、多様な生物学的システムの再構成を迅速に達成できるようになれば、それらのバイオテクノロジーへの応用が加速すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to propose a novel methodology, "bottom-up genetics," to achieve high-throughput reconstruction of arbitrary biological systems. To demonstrate the feasibility of our concept, we tried to attempt reconstruction of homologous recombination and endogenous transcriptional machineries of E. coli. By integrating the fundamental technologies of bottom-up genetics established so far, we constructed an artificial cell library containing randomly distributed genes from the whole gene library of E. coli, and attempted to reconstitute the E. coli transcriptional machinery and homologous recombination, and some of the artificial cells fluoresced, suggesting that the target biological systems may have been reconstituted. We are currently conducting analysis to identify the necessary and sufficient factors for the systems.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 Bottom-up genetics 人工細胞

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の夜明けから 80 年以上が経ち、我々の知識は大きく増加している。一方、生命には多数のブラックボックスが残されており、我々の知識は極めて断片的でもある。例えば、大腸菌ですら全遺伝子の 20-30%が機能未知である。また、生命の核となる多くのシステムの全貌はいまだ解明されていない。

我々の断片的知識を統合し、生命システムの全貌を理解するには、「再構成」が必須である。なぜなら、生命システムが機能するための必要十分条件は、再構成によって初めて決定できるからである。また、再構成は、革新的バイオテクノロジーの創出にも重要である。制限酵素・GFP・PCR・光遺伝学・ゲノム編集などは、必要十分条件が決定されたが故に高い改良性と移植可能性を持ち、普遍的ツールと成り得た。

再構成は重要なマイルストーンだがその達成は極めて難しく、生命科学におけるひとつのボトルネックになっている。その原因のひとつは、生命科学の二大方法論 - 還元的方法と構成的方法 - が分断されているからである。

「**還元的方法**」では、複雑な総体(細胞や個体)を対象に、研究対象となる生命システムに關与する因子(遺伝子など)の探索・同定・解析が試みられる。この方法では、複雑なシステムを個別要素に分解して理解を深めることができるが、システム全体を捉えることは難しい。

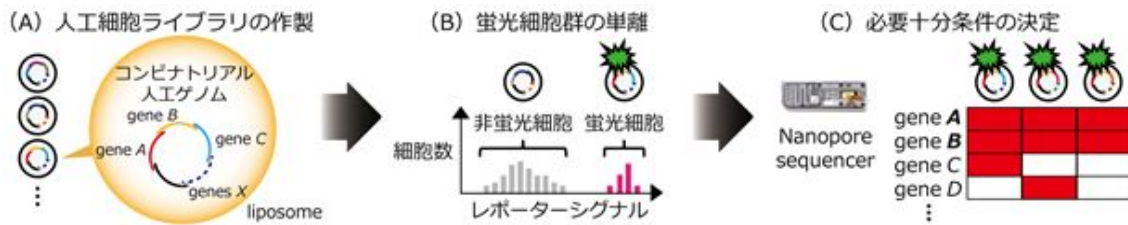
「**構成的方法**」では、還元的方法で同定された因子を組み合わせ、生命システムの再構成が試みられる。構成的方法は、必要十分条件を決定可能な唯一のアプローチである。しかし、多くの生命システムは、多段階の反応ステップから成り、かつ、1ステップに多数の因子が関わるため、その構成的理解には莫大なコンビネーションの検討が必要とされる。また、目的の反応が再構成できなかった場合、未知因子が存在するのかなど、その原因の特定は極めて難しい。

従来の生命科学では、還元的方法と構成的方法は別個の方法論として取り扱われる。そのため、生命システムの全体像がわからない状態で、因子の探索と構成的解析を別個かつ逐次的に進めざるを得ず、再構成に至るには莫大な時間と労力が必要とされる。

本申請の目的は、還元的方法と構成的方法のアドバンテージを統合した新規方法論「ボトムアップジェネティクス」の提唱と確立である。ボトムアップジェネティクスの核となるコンセプトは、「探索」と「再構成」を同時、かつ、仮説フリー・コンビナトリアル・ゲノムスケールに実行することで、任意の生命システムの必要十分条件となる因子のセットを迅速に決定可能とすることである。ボトムアップジェネティクスを汎用的技術として確立できれば、「構成的理解」という現代生命科学におけるボトルネックのひとつを解消できる可能性がある。本手法は、遺伝学を構成的に実行するものと位置づけられるため、ボトムアップジェネティクスと名付けた。

ボトムアップジェネティクスの核となる要素は、liposome 内部に再構成型転写翻訳システムを内包させた人工細胞である。この人工細胞は、内容物が厳密に定義されたタンパク質(RNA polymerase, ribosome, etc)・核酸(tRNAs)・代謝物(amino acids, NTPs, etc)により転写と翻訳が実装されている。この人工細胞は、さまざまな生命機能を再構成するための白紙の細胞と見なせ、遺伝子回路を封入することで多様な生命システムを実装できる。ボトムアップジェネティクスでは、この人工細胞に対し、コンビナトリアル人工ゲノムと蛍光レポーターを組み合わせ、以下に記載のプロセスを実行することで、任

意の生命システムの再構成を迅速に実現可能とする。



1. **全遺伝子ライブラリの構築**：研究対象となる生物の全遺伝子ライブラリ (e.g. 大腸菌の場合は約 4000 遺伝子) を準備する。
2. **蛍光レポーターの構築**：研究対象の生命システムに合わせて、それが「機能した場合」のみに蛍光を発するレポーターを構築する。
3. **人工細胞ライブラリの構築 (上図 A)**：ひとつひとつの liposome に対し、再構成型転写翻訳システム・蛍光レポーター・全遺伝子ライブラリからランダムに分配した遺伝子群を封入し、「人工細胞」ライブラリを構築する。それぞれの人工細胞が内包する人工ゲノムは、異なる組み合わせの遺伝子セットをコードする。
4. **機能的人工細胞の単離 (上図 B)**：研究対象の生命システムが機能して蛍光レポーターが作動した liposome を、フローサイトメーターを用いて単離する。
5. **必要十分条件の決定 (上図 C)**：機能的人工細胞に含まれていた遺伝子群を NGS により同定する。さらに、すべての機能的人工細胞に共通して含まれる遺伝子群をクラスター解析で同定し、必要十分条件となる遺伝子セットを推定する (図では A と B が必要十分条件と推定される)。

ボトムアップジェネティクスのスループットは極めて高い。例えば大腸菌 (約 4000 遺伝子) の 3 つの遺伝子から成る生命システムを再構成しようとする場合を考える。従来の逐次型アプローチにおいて、事前知識なしに再構成条件にヒットする確率は $1/(4000C_3) \approx 1/(1.1 \times 10^{10})$ となり、実現不可能である。本アプローチでは、例えば 4000 種類の遺伝子から 50 種類をランダムに選択して人工細胞ライブラリを構築すると、目的とする 3 つの遺伝子を含む人工細胞の出現確率は $1/(5.8 \times 10^5)$ となる。

効率の大幅な向上は破壊的イノベーションに直結する。本申請で提案するボトムアップジェネティクスは、従来は別個に検討せざるを得なかった「探索」と「再構成」を同時かつ網羅的に実行するという発想により、「構成的理解」という現代生命科学のボトルネックのひとつを解消できれば、多数のイノベーションに繋がると期待される。

2. 研究の目的

申請者はこれまでの研究において、大腸菌β-ガラクトシド加水分解システムをモデルとして、ボトムアップジェネティクスの概念が機能することを実証した (*Sci Rep* 2014)。さらに、遺伝子発現量の精密な制御や、遺伝子発現プロセスの定量解析など、ボトムアップジェネティクスの基盤を整えてきた (*BBB* 2017; *PLOS ONE* 2018a; *PLOS ONE* 2018b)。本研究では、ボトムアップジェネティクスの基盤をさらに強化しつつ、既に再構成されている生命システムを対象に、ボトムアップジェネティクスによる再々構成が可能かどうかを網羅的に検証する。また、大腸菌相同組み換えや転写マシナリーなどをターゲットとして、その再構成を試みる。

3. 研究の方法

遺伝子発現プロセスを定量的にトラッキングできる質量分析法の開発

再構成型転写翻訳システムの最適化を行う研究では、代謝物やタンパク質の変動を正

確に描写できるかどうかが重要になる。申請者はこれまでに、メートル長ナノモノリスカラムを用いた次世代 LC-MS/MS システムを開発し (*BBB* 2017 & *JBB* 2019)、代謝物とタンパク質の変動を精密に定量可能な方法を構築してきた (*Nat Commun* 2020 & *PNAS* 2020)。本技術を用いて、再構成型転写翻訳システム中における遺伝子発現プロセスを精密に評価可能な方法論を構築する。

ボトムアップジェネティクスによる大腸菌転写マシナリーや相同組み換えなどの再構成の試み

微生物から多細胞生物に至る多様な生命現象の構成的理解と革新的バイオテクノロジーの創出を実現する。例えば本研究においては、大腸菌の相同組み換えや転写マシナリーなど、生命にとって重要なシステムをターゲットに研究を進める。相同組み換えの再構成に向けた具体的方法を以下に記す。

1. 大腸菌の全 4000 遺伝子を含むライブラリを構築する。相同組み換えへの関与が知られている *RecA*, *RecBCD*, *RecF* などが入る確率を高めたライブラリも構築する。
2. 相同組み換えを特異的に検出するレポーターを構築する。このレポーターは 2 つの遺伝子断片から成り、相同組み換えで修復された場合に限り *LacZ* が生産されて蛍光を発する。
3. ひとつひとつの liposome に対し、蛍光レポーター・再構成型転写翻訳システム・全遺伝子ライブラリからランダムに分配した遺伝子群を封入し、人工細胞ライブラリを構築する。
4. 相同組み換えが起動して蛍光を発した liposome を単離する。
5. NGS により、蛍光細胞に共通して含まれる遺伝子群を同定する。同定された遺伝子群のみを用いて再現性を確認するとともに、遺伝子を一つずつ除いたコントロール実験も行い、必要十分条件であると真に規定できる遺伝子群を決定する。

4 . 研究成果

遺伝子発現プロセスを定量的にトラッキングできる質量分析法の開発

再構成研究において、各遺伝子の発現プロセスを正確に描写できるかどうかはトラブルシューティングのために重要である。申請者はこれまでに、任意のタンパク質を高い感度と特異性で定量可能なメートル長ナノモノリスカラムを用いた次世代 LC-MS/MS システムを開発し (*BBB* 2017 & *JBB* 2019)、代謝物とタンパク質の変動を精密に定量可能としてきた (*Nat Commun* 2020 & *PNAS* 2020)。本研究ではさらにそれを発展させ、特異性の高いタンパク質同定・定量を可能とする SRM 法を採用し、再構成型転写翻訳中の重要因子を定量・トラッキング可能な方法論を構築した。本研究では特に Ribosomal proteins (r-proteins) をターゲットにして最適化を行った。

r-Proteins の SRM 分析に向け、各 r-protein に対して以下の条件を満たすペプチドを選択した：(1) 精製したリボソームをインプットとした場合に強いピークを示すペプチド、(2) 大腸菌破砕液をインプットとした場合に (1) と同じ保持時間で強いピークを示すペプチド、(3) 各 r-protein を過剰発現させた大腸菌破砕液をインプットとした場合に (2) よりも強い強度を示すペプチド。各 r-protein に対して 3 つのペプチドを選択し、各ペプチドに対して 3-4 個のフラグメントイオンを選択した。

Skyline を用いてトランジションを予測し、精製リボソームをインプットとして調製したトリプシンもしくは Lys-C 消化物を分析して、各 r-protein のトランジションを選択した。その後、大腸菌破砕液または r-protein を過剰発現させた大腸菌破砕液をインプットとして調製したタンパク質消化物を分析し、トランジションを検証した。その結果、

各 r-protein に特異的なトランジションを選択することに成功した。この SRM 法の検量線を、精製リボソームのタンパク質消化物の希釈系列を用いて作製したところ、ほとんどのトランジションで高い相関係数が得られた。

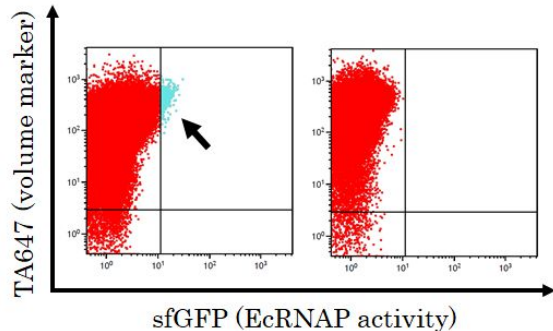
以上のように、本研究では、SRM 法を用いることで大腸菌の 54 種類の r-protein に対して特異性の高い qMS 法の開発に成功し、その成果を発表した (BBB 2020)。今後の研究では、この手法を多様なタンパク質に拡張することで、再構成型転写翻訳中のタンパク質発現プロセスを正確にトラッキングできるようになると期待される。

ボトムアップジェネティクスによる大腸菌転写マシナリーや相同組み換えなどの再構成の試み

ボトムアップジェネティクスの実証を目指して、本研究では主に 2 つの生物学的システムの再構成に取り組んだ。第一のターゲットは大腸菌転写マシナリーであり、これは既に 4 種のサブユニットから成るコア酵素と 因子が会合したホロ酵素が必要十分条件であることが知られているが、この 5 因子系が迅速に再構成できるかどうかは、ボトムアップジェネティクスのポテンシャルを示す上で重要になると考えられる。第二のターゲットは、いまだ再構成が実現されていない大腸菌相同組み換えである。相同組み換えの再構成が達成されれば、CRISPR と統合することで、任意の生物において自在なゲノム編集が可能になると期待され、極めて重要なターゲットと考えられる。

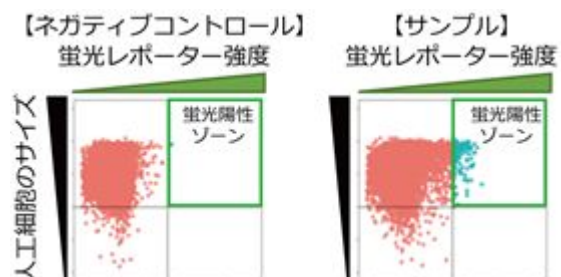
転写マシナリーをターゲットとした研究では、蛍光レポーターとして、tac promoter の下流に sfGFP 遺伝子を配置したカセットを設計した。この蛍光レポーターは、機能的な大腸菌転写マシナリーが存在する状況で、緑色蛍光を示すと期待される (下図)。

次に、ひとつひとつの liposome に対し、蛍光レポーター・再構成型転写翻訳システム・全遺伝子ライブラリからランダムに分配した遺伝子群を封入し、人工細胞ライブラリを構築した。この人工遺伝子群をインキュベートし、フローサイトメトリーで sfGFP 蛍光を検出したところ、一部の人工細胞で sfGFP 蛍光を発することがわかった (右図：左側がサンプルであり、黒矢印が蛍光陽性人工細胞を示す。右側が転写マシナリー関連遺伝子を除いたネガティブコントロール)。



現在、内部に含まれていた遺伝子を同定するための nanopore sequencing システムを構築し、解析を進めている。

さらに、大腸菌相同組み換えのような、再構成が実現されていない複雑な生命システムの再構成に取り組んだ。相同組み換えを再構成するための予備検討として、特異的蛍光レポーターを設計した。次に、ひとつひとつの liposome に対し、蛍光レポーター・再構成型転写翻訳システム・全遺伝子ライブラリからランダムに分配した遺伝子群を封入し、人工細胞ライブラリを構築した。レポーターと、直鎖状の大腸菌全遺伝子ライブラリを用いてボトムアップジェネティクスを実行したところ、転写マシナリーの実験のように、一部の liposome が蛍光を発した (右図)。この結果は、相同組み換えを起こした人工細胞が得られたことを示唆しており、現在こちらの研究に関しても、nanopore sequencing を用いた解析を進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kosaka Yuishin, Aoki Wataru, Mori Megumi, Aburaya Shunsuke, Ohtani Yuta, Minakuchi Hiroyoshi, Ueda Mitsuyoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Selected reaction monitoring for the quantification of Escherichia coli ribosomal proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0236850
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0236850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Wataru AOKI, Keisuke MOTONE, Mitsuyoshi UEDA
2. 発表標題 Reconstruction of biological subsystems using bottom-up genetics
3. 学会等名 ASBMB 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小坂唯心, 森めぐみ, 青木航, 植田充美
2. 発表標題 リボソームタンパク質の包括的な解析のためのselected reaction monitoring
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小坂唯心, 森めぐみ, 青木航, 植田充美
2. 発表標題 リボソーム生合成プロセス解析のための Selected reaction monitoring
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木 航, 植田 充美
2. 発表標題 質量分析で生物間相互作用を理解する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大谷 優太, 油屋 駿介, 水口 博義, 三浦 夏子, 青木 航, 植田 充美
2. 発表標題 高感度なSRMプロテオミクスに向けたモノリスカラムの細径ロング化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 遼治, 青木 航, 植田 充美
2. 発表標題 生細胞内分子クラウディング環境の再構成への試み
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中原 航, 青木 航, 植田 充美
2. 発表標題 ボトムアップジェネティクスによる生命現象のハイスループット再構成
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木 航, 植田 充美
2. 発表標題 モノリステクノロジーが切り開く次世代プロテオミクス・メタボロミクス
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Ohtani, Shunsuke Aburaya, Hiroyoshi Minakuchi, Natsuko Miura, Wataru Aoki, Mitsuyoshi Ueda
2. 発表標題 Advantages of proteomics using meter-long monolithic columns with small inner diameter
3. 学会等名 ASBMB 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wataru Aoki, Kana Miyamoto, Yuta Ohtani, Natsuko Miura, Shunsuke Aburaya, Yusei Matsuzaki, Kaho Kajiwara, Mitsuyoshi Ueda
2. 発表標題 Peptide Barcoding for Establishment of New Types of Genotype-Phenotype Linkages
3. 学会等名 ASM Microbe 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------