

機関番号：32612

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710203

研究課題名 (和文) 人工オペロン創製に向けたオペロン構築原理に関する研究

研究課題名 (英文) Study on an operon rule toward designing of artificial operon

研究代表者

柘植 謙爾 (TSUGE KENJI)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・講師

研究者番号：70399690

研究成果の概要 (和文)：人工的にオペロンを創製するための基礎研究として、大腸菌のゲノム上に分散して存在する解糖系遺伝子を様々な遺伝子順序で連結することでポリシストロン型オペロンを作成し、宿主の生育速度と遺伝子発現量を指標にオペロンの機能性と遺伝子連結順序との関係を調べた。その結果、プロモーターの近傍ほど遺伝子発現が高くなり、離れるに従って減少することを見出した。このオペロン構築原理に従い野生型大腸菌で発現量の多い遺伝子からプロモーターに近くなるように配置した人工オペロンは、調べた中で最も生育が良かった。

研究成果の概要 (英文)：To identify possible operon rule, glycolytic genes of *Escherichia coli* were assembled in multiple types of polycistronic operons that have variety in gene connection order. Through evaluation of functionality by growth and gene expression analysis, a feature of operon in which gene expression profile is downward trend from promoter-proximal to -distal position was revealed. Arrangement of genes according to expression strength of the genes in wild type gave an operon with fastest growth in tested.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ゲノムデザイン学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ゲノムデザイン、オペロン、遺伝子集積、解糖系、OGAB、大腸菌、枯草菌

1. 研究開始当初の背景

近年深刻化する地球温暖化や、エネルギー問題、食糧問題の解決の糸口として、従来の石油エネルギーを背景とした環境負荷の高い生産形態に替わる、生物を利用した低負荷型生産システムが模索されている。全ゲノム配列完全解読と代謝経路の解明が進むにつれ、代謝工学的見地からゲノムを改変し、特定の物質の物質生産に特化した微生物が次々と作成されている。さらにこの流れが加速し、

バクテリアゲノム自体を1からデザインし、物質・エネルギー生産に特化した微生物を作成しようとする機運が高まってきた。この実現には、ゲノムレベルの「巨大DNAの構築技術」が不可欠であるが、2005年のラン藻ゲノムの枯草菌ゲノム中への完全クローニング(板谷ら、PNAS)や、2008年の米国ベンター研究所の化学合成DNAによるマイコプラズマゲノムの構築の成功(Gibsonら、Science)などにより、技術が確立したことが示された。

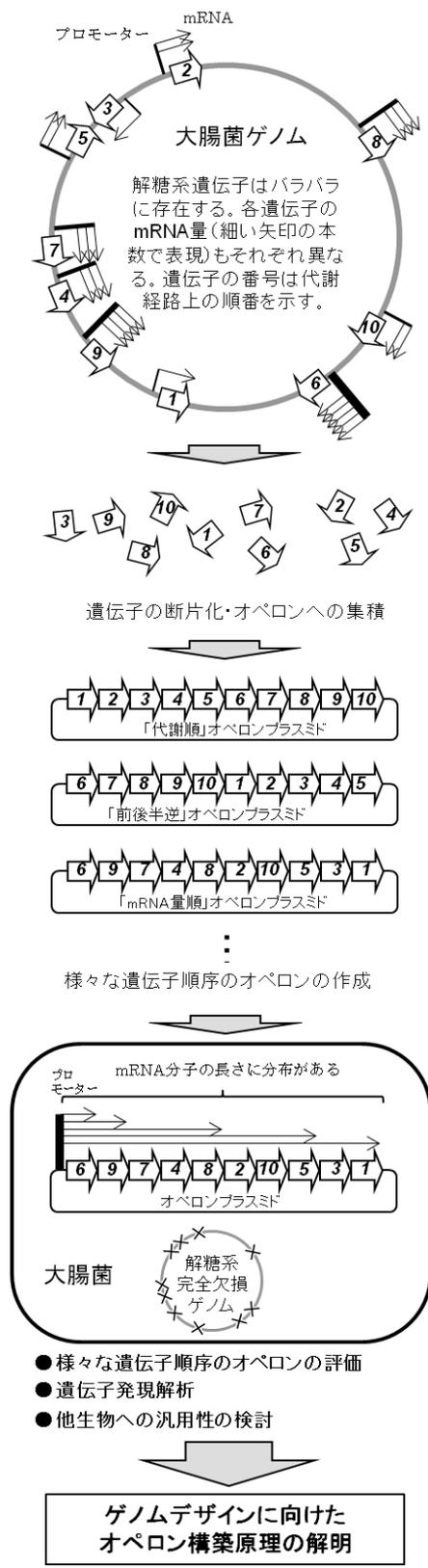


図1 本研究の全体像

次に重要となるのは「ゲノムのデザイン」である。どのような遺伝子を材料に使用するかという、「遺伝子の選抜」についてはオミックスデータの蓄積により障害は改善され

てきた。ところが、複数の遺伝子をゲノムにまとめるかという「遺伝子配置」については、それぞれの遺伝子の発現量をどのように制御するかという問題を考慮した上での有効な方法は特に見出されていなかった。

そこで、私は一つのプロモーターで複数の遺伝子発現を制御する「オペロン構造」に着目した。オペロン構造とは、複数の遺伝子が上流にある1個もしくは少数のプロモーターからまとめて転写される遺伝子の集合様式で、バクテリアゲノム中に一般的に見出される。それでは、オペロンを創るには、単純に一つのプロモーターの下に複数の構造遺伝子を直列に連結しただけの、ポリシトロン構造になってさえすればよいのかというと、そうではない。オペロンに参加する遺伝子数が10の場合、 $10! = 3,628,800$ 通りの膨大な遺伝子連結順序が可能だが、全て同じ性能を示すとは考えにくい。過去に作成した人工カロテノイドオペロンについては、遺伝子に連結順序により生産量が大きく異なったため(柘植ら、AEM(2007))、少なくとも遺伝子の連結順序がオペロンの機能性に影響を与えることは間違いない。

各遺伝子をただ連結しただけのポリシトロンではなく、“オペロン”をデザインするためには、未だ明らかでない「オペロン構築原理」を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

究極的には、遺伝子一つ一つをつなぎ合わせてゲノムを作る「ゲノムデザイン」の実現を目標に、本研究提案ではそのスタートとして、人工的にオペロンを作るためにはどうしたらよいかという「オペロン構築原理」を解明することを目的とした。大腸菌の解糖系の遺伝子を取り上げ、天然には存在しない“解糖系オペロン”を遺伝子集積により構築し、それを以下に示す3つの観点で調べた(図1)。

(1) 様々な遺伝子順序のオペロンの評価

人工解糖系オペロンのみで生育する大腸菌を準備し、そこに様々な遺伝子連結順序をもつ解糖系オペロンを置換的に導入し、その機能性を、生育速度を指標に評価する。

(2) 遺伝子発現解析

オペロン内の遺伝子の連結順序が mRNA の存在量の分布や RNA ポリメラーゼ密度に与える影響を調べ、結果としてオペロン全体活性にどう影響するかを調べる。

(3) 他生物での汎用性の評価

作成した解糖系オペロンの生物種を超えた汎用性の検討を行う。

3. 研究の方法

(1)材料

大腸菌 MG1655 株派性株の BW25113 株を用いた。解糖系の遺伝子として、*glk*, *pgi*, *fba*, *pfk*, *tpi*, *gap*, *pgk*, *gpm*, *eno*, *pyk* の 10 個をオペロンの集積対象として選抜した。

(2)培地

グルコースを 0.4%含む MOPS 培地（以下グルコース培地と記す）を用いて増殖を調べた。

(3)遺伝子集積法（OGAB 法）

私が開発した遺伝子集積法の OGAB 法を用いた。本方法は、枯草菌のプラスミド形質転換系を利用した、効率的な遺伝子集積法である。解糖系の各遺伝子の断片を用意し、各遺伝子の断片をタンデムリピート上に連結した後、一旦枯草菌に形質転換することにより、枯草菌中に解糖系オペロンプラスミドを構築した。その後プラスミドを精製して大腸菌株に形質転換した。

(4)解糖系遺伝子の削除

人工解糖系オペロンプラスミドを保持した状態で、大腸菌ゲノム中にある解糖系を遺伝子を Wanner 法により一つずつ削除した。

(5)遺伝子発現解析

mRNA は一旦 cDNA に変換し、ChIP 法では得られた DNA はその状態で、リアルタイム PCR 装置や、マイクロアレイを用いて、オペロン内の遺伝子発現量の分布を調べた。

4. 研究成果

(1)様々な遺伝子順序のオペロンの評価

①ゲノム中の解糖系遺伝子の完全欠損

解糖系は、生物にとって必須な機能であるので、ゲノム中の遺伝子を欠損させることは、数個の遺伝子を除いて不可能であった。そこで、作成したプロトタイプの解糖系オペロンプラスミドを保持させた状態でゲノム中の全解糖系遺伝子の欠損を行った結果、大腸菌のゲノム中に存在する内在性の解糖系遺伝子の全遺伝子の欠損が可能であった。

②様々な遺伝子連結順序の解糖系オペロンの作成

野生株における各遺伝子の RNA 存在量について詳しく見てみると転写量の多い遺伝子や少ない遺伝子が存在するため（図 1）、遺伝子連結順序によってオペロンの全体活性が変化する可能性が考えられた。そこでこのうちの 3 種類、即ち、代謝順に必要な遺伝子をプロモーターから連結した「代謝順」オペロンと、このオペロンの前半の 5 遺伝子と後半

の 5 遺伝子を入れ替えた「前後半逆」オペロン、そして、野生型の大腸菌から調べられた mRNA の存在量の多い順にプロモーターに近くなるように連結した「mRNA 量順」オペロンなどを作成した。また、「代謝順」、「前後半逆」、「mRNA 量順」の各オペロンについて初めから終わりまでの順序を完全に逆転した「逆代謝順」、「逆前後半逆」、「逆 mRNA 量順」についても作成した。さらに、「mRNA 量順」オペロン中での連続する 4 つの遺伝子について、連結順番を入れ替えた網羅的オペロンライブラリーも構築した。当初計画した全てのオペロンは、枯草菌のレベルで全て構築可能であったことは、特筆すべき結果である。

③人工解糖系オペロンの種類の置換

(1)で作成したゲノム DNA 上から解糖系遺伝子を完全に除去した株が有するプロトタイプの解糖系オペロンは、薬剤選択マーカーがない。一方、②で作成した解糖系オペロンは薬剤耐性マーカーがあるので、これをプロトタイプオペロン保持株に形質転換し、薬剤で選択することを試みたところ、ほとんどの全てのオペロンで薬剤耐性株が得られた。詳細に調べた結果、プロトタイプオペロンを排除して、目的のオペロンのみに置換されていることを確認した。

④オペロン保持株の増殖曲線

グルコース培地中での各構築株の増殖曲線を調べたところ、オペロン内の遺伝子の順序により増殖速度が大きく異なることが判明した（図 2）。特に、「mRNA 量順」オペロンは増殖が早く、野生株に近い増殖速度を示し、野生型で良く発現している遺伝子から順番に遺伝子を連結することが有効であることが示された。

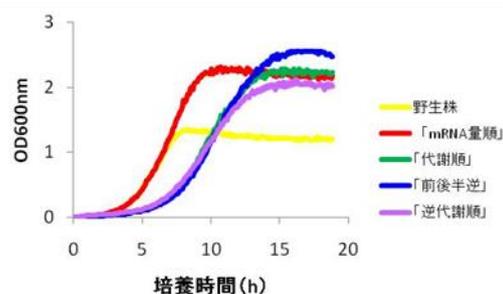


図 2 各オペロンを有する大腸菌株のグルコース培地での増殖曲線

(2)遺伝子発現解析

①人工解糖系オペロンの mRNA 分子形状の分布解析

オペロンの各遺伝子の mRNA がどのような分布をしているのかをリアルタイム RT-PCR と DNA チップを用いて調べた。その結果、局所的な変動を除けば概ねプロモーターに近い

遺伝子ほど mRNA の存在量が増加し、遠くなるほどに減少するという、単調減少の傾向を示し (図 3)、これにより「mRNA 量順」オペロンが野生型の mRNA のプロファイルに似たために増殖が良かった可能性が考えられた。

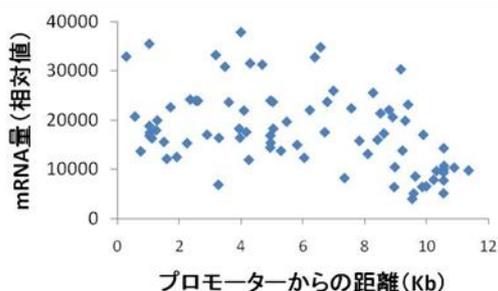


図3 マイクロアレイ解析によるオペロン内の遺伝子発現量の単調減少

②ChIP法によるRNAポリメラーゼの局在解析
上記各オペロンを有する大腸菌を、増殖中にホルムアルデヒドを添加して固定し、超音波で破碎後、RNAポリメラーゼ抗体で免疫沈降し、得られたDNAのすることによりChIP解析を行い、オペロン上でのRNAポリメラーゼ局在を解析した。その結果、RNAポリメラーゼ密度は、mRNAの存在量と同じようにプロモーターから離れるに従って減少する傾向が確認された。

(3) 他種生物での汎用性の検討

作成した解糖系オペロンプラスミドの一般性を評価するために、大腸菌以外のバクテリアであるグラム陰性菌の枯草菌について、作成した解糖系オペロンのみによる生育が可能であるかどうかを評価するために枯草菌の解糖系の完全欠損株の取得を試みた。大腸菌の解糖系遺伝子の欠損と同様に、作成した大腸菌解糖系プラスミドを保持させた状態で、ゲノム上の解糖系遺伝子の欠損を行った。その結果、枯草菌の一部遺伝子の除去に成功したが、残念ながら枯草菌のgap遺伝子を含むオペロンの削除は成功しなかった。この原因としては、今回作成した解糖系オペロンは、枯草菌を相補する能力がないものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Itaya, M. and Tsuge, K. Construction and Manipulation of Giant DNA by a Genome Vector. *Methods Enzymol.* 498, 427-447 (2011) [査読なし]

[学会発表] (計8件)

- ① 柘植謙爾、ゲノムデザイン学—人工解糖系オペロンにおける転写・翻訳調節、日本農芸化学会、2011年3月11日(要旨集発行日)、震災のため要旨集のみ
- ② 柘植謙爾、ゲノムデザイン学：人工解糖系オペロンによるオペロン構築原理の解明、BMB2010(日本分子生物学会)、2010年12月8日、神戸ポートピア(兵庫県)
- ③ 柘植謙爾、人工解糖系オペロンのデザイン、細胞を創る研究会、2010年11月12日、東京大学(東京都)
- ④ 柘植謙爾、An artificial glycolysis operon library toward elucidation of possible “operon rule”、日本遺伝学会、2010年9月22日、北海道大学(北海道)
- ⑤ 柘植謙爾、ゲノムデザイン学：オペロン構築原理の解明に向けた人工解糖系オペロン、グラム陽性菌ゲノム機能研究会、2010年9月3日、ホテル木曾路(長野県)
- ⑥ 柘植謙爾、ゲノムデザイン学—人工解糖系オペロンによるオペロン構築原理の探求、日本農芸化学会2010大会、2010年3月29日、東京大学(東京都)
- ⑦ 柘植謙爾、Genome designing biology: Exploration of the best gene order in an artificial glycolysis operon、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月10日、パシフィコ横浜(横浜市)
- ⑧ 柘植謙爾、Designing of an operon toward creation of an artificial genome、UK-Japan Workshop on Systems Biology、2009年9月24日、コスモスクエアホテル(大阪市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.iab.keio.ac.jp/jp/content/view/328/139/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柘植 謙爾 (TSUGE KENJI)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・講師

研究者番号：70399690

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 研究代表者
該当なし