Ettan DIGE as a necessary tool toward the genome designing

ゲノムデザイン学の必須ツールとしての Ettan DIGE

Mitsuhiro Itaya
Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, Tokyo, Japan

2D DIGE技術は現存する生物細胞でのタンパク質の動態を検知するのに有効な手段です。タンパク質をコードする遺伝情報はすべてゲノムに書き込まれているはずなので、ゲノムを大幅に改変して活用しようとするゲノム工学・ゲノムデザイン学の分野でもこの手法の導入は当然ながら大いに期待できます。ゲノムの全塩基配列は単細胞のバクテリアから高等動植物まで、現時点で150種を超える数のデータが登録されており(www.ncbi.nlm.nih.gov/)、非登録あるいは部分配列決定種まで含めると数百種類のゲノム全塩基配列が利用可能になっています。ゲノムを積極的にデザインしてゆく私達のゲノムデザイン学への取り組みを紹介します。

遺伝子変異

突然変異体を得ることは遺伝子を変異させることと基本的には同じです。数多くの突然変異体の中から目的に合致する株を取捨選択して、該当遺伝子を探索する伝統的な手法は現在でも有効です。一方で、遺伝子の塩基配列を計画的に変異させ、変異タンパク質をかなり自由に構築できるようになっています。塩基配列情報をもとに遺伝子を適宜改変し、改変遺伝子を元の株、あるいは第三の宿主にもどして効果を確かめる、いわゆる遺伝子工学的手法は極めて有効であることが実証されています。遺伝子工学的手法は、対象とするタンパク質（遺伝子）の数が増えたらどうなるでしょう。例えば10遺伝子を一度に改変して組み込むことはできるでしょうか。さらに100を超えるような多数の遺伝子を一度に対象にしようとすると状況は一変し、ゲノムレベルでの手法のイノベーションが必要になります。実際、バイオプロセス（一次・二次代謝反応系と言い換えてもよいですが）は多数の遺伝子産物（タンパク質）の連続的反応で遂行されます（1）。実際の細胞（バクテリア）を用いてこれらの事象を統合的に検証するためにゲノムデザイン学を提唱しました。

ゲノムデザイン学

我々が提唱している「ゲノムデザイン学」はまだ耳慣れない言葉かもしれません。概略はHPで紹介しているように（2）、塩基配列が判明しているゲノムを対象として自由に改変・設計することを究極の目的としています。ゲノムを設計するといってもまだまだ雲をつかむような話かもしれませんが、個別の遺伝子ではなく数千の遺伝子を含むDNAを一括して扱おうとするので当然話は大きくなります。コンピュータで解析、設計するのとは異なり、実際に生きている細胞のゲノムを扱うので時間と手間がかかります。ゲノムデザインは「解析」、「改変」、「活用」の3段階の取り組み（ゲノムの3Kと呼んでいます）が基本です（3）。私達が実際に手をつけた成果を紹介するのが適当かと思います。日本人の感性をくすぐる納豆を作る納豆菌（なっとうきん）を材料にして数百の遺伝子を移動定着させた我々の研究を紹介します。

納豆菌がつくる納豆

筆者が納豆菌に最初に触れたのは15年以上も昔のことで、枯草菌（こそうきん）という実験室株の近縁種としてのそれでした。煮た大豆と納豆菌だけであの独特の香り（臭いとは呼ばないことにしています）の豊富な納豆ができることに驚いたことからです。一般には意外に知られていませんが、納豆菌は煮た大豆の表面で、大豆からの栄養で育ちながらあの独特のネバネバを出します。ネバはバイオフィルムの一種で納豆菌自身の保護の役割も担っていますが、主成分はポリグルタミン酸と多糖類です。ポリグルタミン酸はグルタミン酸の重合体で納豆菌はこの合成酵素を持っています。その原料のグルタミン酸は、納豆菌が分泌するタンパク質分解酵素で大豆タンパク質を消化分解して供給されます。文章にするとこのように堅苦しくなりますが、要するに納豆生成に必要なタンパク質をコードする遺伝子群が納豆菌ゲノムの中に全て納まっているのです（図1）。必要な遺伝子の総数は不明ですが、便宜上これらを納豆遺伝子群と総称しています。納豆菌は煮た大豆表面に置かれた時それらの納豆遺伝子群を適宜発現させ、結果として我々の口を癒してくれる栄養豊富な食品に仕立て上げているのです。

納枯（ナツコ）のデザイン

納豆菌の近縁種の枯草菌ゲノム全塩基配列が1997年に決定され約4,000個の遺伝子が同定されました。大腸菌とともに最も集中的に研究された実験室株です。約40 %の遺伝子産物はいまだ機能未知ですが解析の努力は続いています（4）。一方、納豆菌ゲノムについてはゲノムの制限酵素マップ（ゲノム物理地図）が報告されており枯草菌のそれとかなり似ています（5）。全塩基配列はまだ報告されていませんが、溶源性ファージの種類とトランスポゾンの有無は別とすれば、制限酵素のパターンもほぼ同じなので遺伝子も大部分は同じであると考えています。

しかし、枯草菌はまったく納豆をつくれません。それは納豆遺伝子のいくつかを欠いているかもしくは不全になっていると解釈され、もしそうなら納豆遺伝子群を枯草菌にそっくり移してしまえば枯草菌が納豆を作れると考えました。実際の実験は、まだ枯草菌ゲノムの全塩基配列が決まる前でしたので、両ゲノム同士を交雑させ納豆遺伝子を少しずつ枯草菌ゲノムに取り込ませてみました。詳細は他の文献に譲ります（6、7）が、交雑を繰り返していくと、枯草菌ゲノム中の多数の部位が納豆菌ゲノム由来のDNAで置き換わった菌が創製され、しかも交雑度合いが上昇するにつれ次第に納豆発酵能力を獲得してきました（図1）。この遺伝的に安定なモザイクゲノムになった菌は、納豆菌と枯草菌の頭文字を一文字ずつ拝借して納枯（ナツコ）菌と命名しました（3、7）。ナツコ菌では、枯草菌ゲノム中の約1割が納豆菌由来の遺伝子に置換されていると見積もっています（6、7）。それらがうまく発現されて最終表現形の納豆発酵が可能になったのです。

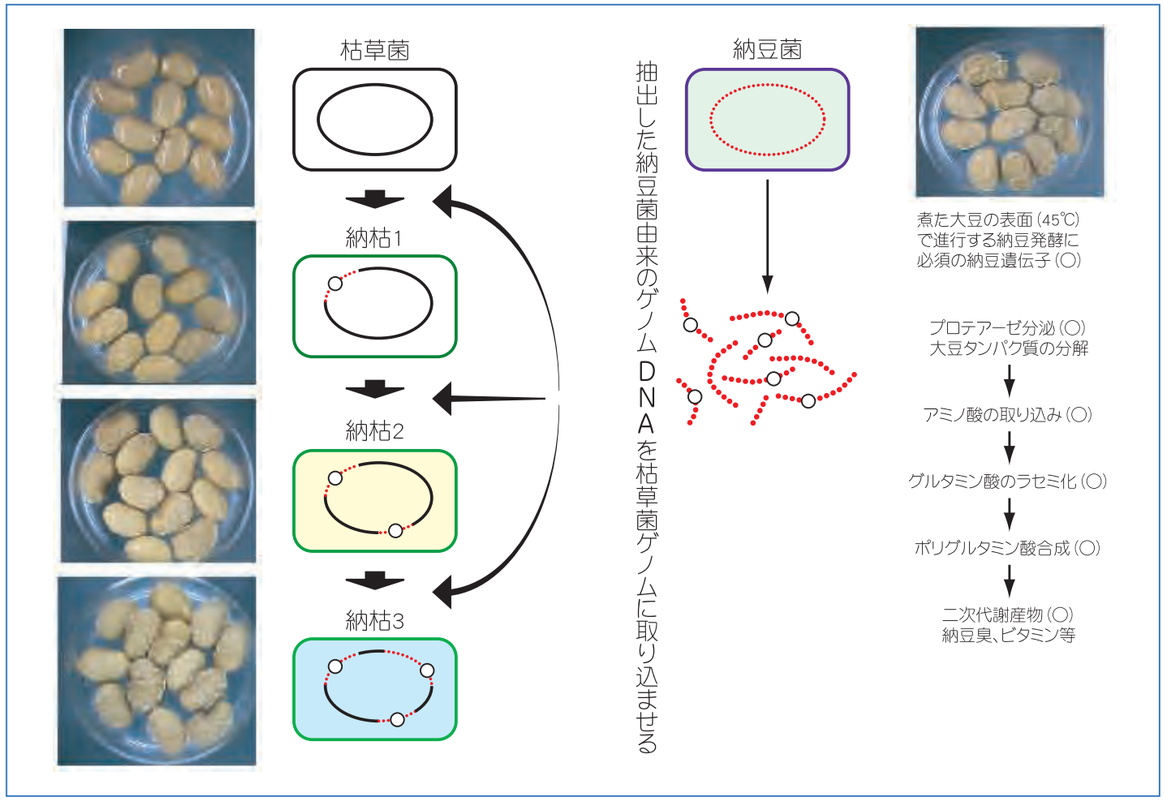

図1. 遺伝子集積の原点モザイクゲノムとしての納枯（ナツコ）菌
納豆菌ゲノム（右上）中の納豆遺伝子（○でイメージ表示）を枯草菌ゲノム（左上）をモザイク化しながら順次集積する。納枯（ナツコ）1,2,3と進むと納豆遺伝子が増えゲノムのモザイク度が進むにつれて、納豆の特徴の糸引きが，出現している。（煮た大豆に菌をふりかけて一晩45 ℃で培養した写真から）。右下に納豆遺伝子の働きの一部を掲載。

納枯（ナツコ）菌でのタンパク質発現

ナツコゲノム中での実際の交雑度は、理想をいえば納豆菌、納枯（ナツコ）菌のゲノム全塩基配列を決定すれば判明します。しかし、存在する遺伝子と実際に発現している遺伝子とを区別しないと研究になりません。転写産物の発現を調べるためのDNAマイクロアレイや、DNAチップでは遺伝子の塩基配列情報を基本にしますので、ナツコのような事情ではタンパク質を解析するほうが現実的です。実際菌体中で発現しているタンパク質を抽出して、2D DIGE技術で調べてみました。枯草菌に関しては精力的な解析の結果が得られており2Dデータからは通常の培地で約千余りのタンパク質が発現しているようです。我々は同じ手法で、まず納豆菌と枯草菌との比較データをとってみました。その結果は図2aに示したように、共通しているタンパク質（黄色）に加えて、納豆菌由来の発現タンパク（緑色）がかなり見られました。もちろん枯草菌由来の（赤色）もかなり見られますが、緑色がかなり特徴的なパターンを示していました。ナツコ菌と枯草菌の比較では（図2b）、ナツコ菌由来の（緑色）がやはりかなり見られ、驚いたことに納豆菌のそれに近いパターンでした。

DNAとタンパク質の変異検出

納豆菌では分子量、等電点で枯草菌由来のタンパク質とは区別できるタンパク質があることは予想していました。しかし、納豆菌と枯草菌とはお互いに“近縁種”であるということが頭にこびり付いていましたので、これほど明瞭なパターンの違いを見てまず驚きました。もう一つの驚きは、モザイク菌であるナツコ菌でもタンパク発現のプロフィルからは、ほとんど納豆菌ではないかと思わせる結果です。これらの結果と、ナツコ菌の現在までの知見を総合すると次のような結論が導かれました。ナツコ菌ゲノムは塩基配列レベルでは約1割程度のモザイク度しかないのに、発現タンパク質（そしておそらく発現制御機構も含めて）は納豆菌のそれに限りなく近いことです。

近縁種のタンパク質の電気泳動でのパターンは予想以上に変動が大きいことがわかります。これに関連しそうな結果が、チンパンジーとヒトの一部の染色体の塩基配列の比較で報告されました。それは、遺伝子の塩基配列のほんのわずかな違いが、翻訳産物であるタンパク質の違いに増幅して反映されることです。塩基配列がそして必然的にアミノ酸配列が似ている遺伝子（ホモローグとも呼ぶ）でも、一つでもアミノ酸が異なればタンパク質の分子量は異なり、変異の種類によっては等電点も異なるのです。さらに制御遺伝子の変化により下流のタンパク質の発現パターンが変動します。構造が似ている制御機能タンパクは、それ自身の量的な変動、あるいは若干の機能変異でも下流の多数のタンパク質の発現調節パターンを変える姿が垣間見えてきます。

再びゲノムデザイン学

今回は紙面の都合で近縁種である納豆菌由来の遺伝子集積を中心に紹介しました。ゲノムは機能未知遺伝子も含めた遺伝子の集積体です。これらの遺伝子資源を既存の手法とは異なるアプローチで役に

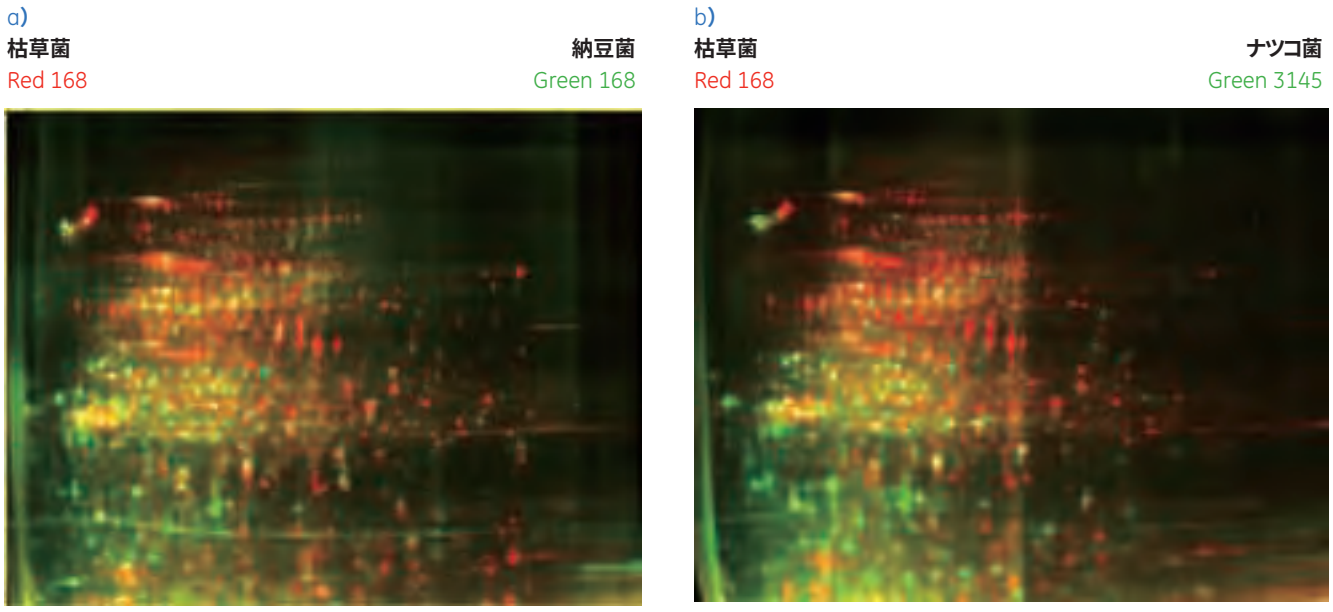

図 2. a) Ettan DIGE**システムによる分析。納豆菌**(Cy5:**緑**)**枯草菌**(Cy3:**赤**)**、b) Ettan DIGE**システムによる分析。ナツコ菌**(Cy5:**緑**)**枯草菌**(Cy3:**赤**)

たてる方法はあるでしょうか。枯草菌ゲノムには、外来のDNAを安定に組み込むことができます。枯草菌ゲノムのこの性質を利用して、我々は多数の遺伝子あるいはゲノムを丸ごと集積する基盤技術を開発しています(1、2)。現在、葉緑体ゲノム、ミトコンドリアゲノム、シアノバクテリアゲノム、マウスゲノムの一部を枯草菌ゲノム中に集積しています(2)。「集積したゲノムを改変、設計しゲノムの多様性を創り出しその結果を活用する」、それは我々の考えるゲノムデザイン学です。2D DIGE技術による発現タンパク質の解析手法はゲノムデザイン学に必須の強力な味方です。

参考文献

1. 柘植謙爾、板谷光泰 Bioベンチャー **4 (2)**, 34-37 (2004)
2. www.mitils.co.jp/research/project/index.html
3. 板谷光泰 日本獣医師会雑誌 **52**, 151-156 (1999)
4. 小笠原直毅 科学 **70**, 271-281 (2000)
5. M. Itaya *et. al. Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6247-6256 (2004).
6. M. Itaya & K. Matsui, *Biosci. Biotech. Biochem.* **63**, 2034-2037 (1999)
7. 板谷光泰 科学 **70**, 1073-1080 (2000)