

[招待論文]

## 微生物がもたらす未来

### Future Perspectives Provided by Researches on Microbes

板谷 光泰

慶應義塾大学環境情報学部教授

Mitsuhiro Itaya

Professor, Faculty of Environment and Information Studies, Keio University

柘植 謙爾

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科特任講師

Kenji Tsuge

Project Assistant Professor, Graduate School of Media and Governance, Keio University

ダグラス マレー

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科特任准教授

Douglas B. Murray

Project Associate Professor, Graduate School of Media and Governance, Keio University

戸谷 吉博

大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻特任助教

Yoshihiro Toya

Project Assistant Professor, Department of Bioinformatic Engineering,  
Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University

中東 憲治

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科特任准教授

Kenji Nakahigashi

Project Associate Professor, Graduate School of Media and Governance, Keio University

**Abstract:** 微生物はヒトには身近な存在であったにもかかわらず、19世紀後半にパスツールとコッホにより証明されるまでその存在すら認知されていなかった。現在は、食品、医薬品からバイオエタノールに至るまで広範な物質生産に利用されている。応用範囲の広い微生物はその種類も生活環境も非常にバリエーションに富んでおり、一言でくくることは不可能である。IAB (Institute for Advanced Biosciences) では開設以来、モデル微生物である、大腸菌、枯草菌、酵母、および実用菌である納豆菌を対象に基礎研究を展開してきた。我々の実績が世界に向けて発信しつづけていることを紹介する。

Microbes before recognized by Pasteur and Koch in late 19th century were mysterious, though abundant around our human life. Today, microbes are used to provide various materials from food to bioethanol regardless of their extreme variations. This paper describes our continuous research activities focused on so-called model microbes such as *E. coli*, *B. subtilis*, and Bakers yeast. It should be addressed that our outstanding achievements started from the date of IAB (Institute for Advanced Biosciences) establishment in 2001 have been globally influential.

Keywords: 遺伝子、ゲノム、モデル微生物、代謝物質、シミュレーション  
genes, genomes, model microbes, metabolites, simulation

## 1 はじめに

微生物が日常会話の話題になることは少ない。微生物の姿は顕微鏡でしか見ることができないのが最大の理由であるが、実はヒトの生活空間は微生物だらけである。ヒトの身体そのものも微生物まみれである。肌には常在菌がいること、口腔内の虫歯原因菌、胃がんの原因といわれるピロリ菌が酸性の高い胃液の中で、また大腸には膨大な数と種類の菌叢がある。また、パン、味噌、醤油、漬物、酒などほぼ毎日口にする食品は言うに及ばず、抗生物質に代表される医薬品や、最近ではバイオ燃料に至るまで微生物が生産しており、どれを欠いても我々の快適な日常生活は成り立たない。微生物は見えないだけで普段の生活で困ることはなく特に意識することもない。もちろん病気を引き起こす病原微生物も多数いてこちらのほうが一般にはニュース性が高い。

我々が今後も健やかに暮らしていくためには目に見えない膨大な微生物とのおつきあいをやめることはできない。微生物は、単細胞であることが特徴であり、私たちの身体を細かくしていくと最終的には細胞になるが、最初から単細胞でも独立して暮らしていけるのが微生物である。

生物はその姿形、生活、性質を親から受け継ぎ子孫に継代する。実際に継代されるのは遺伝子であり、遺伝子はDNAでできている。さらにゲノムには遺伝子のすべてが書き込まれていて、遺伝子の情報にしたがって細胞が運営される。ヒトの場合、髪の毛から足の爪の細胞まですべて合わせて37兆個ありヒトの生き様はゲノムの遺伝子により制御されている。ヒトゲノムに書き込まれている遺伝子の数は3万程度とされており子孫にはこのDNAだけが

伝わってゆく。単細胞である微生物は遺伝子の数はヒトの数十分の一である。それでも数千個に達し、一個の細胞でも運営する観点からは複雑さはそれほど簡単ではない。単細胞だからといって、単純ではないのである。

2001年に山形県鶴岡市に先端生命科学研究所 (Institute for Advanced Biosciences: IAB) が開設された。この研究所はオミックス解析を基盤にして動物、植物、微生物の生命活動を解明し、我々の生活に還元できる出口を目指している。研究材料としての微生物は安全なモデル微生物である大腸菌、枯草菌、酵母、および実用菌としての納豆菌に絞られている。

IABでの微生物研究では、これらの遺伝子の働きを調べて生命活動の本質に迫ることと、微生物を積極的に利用して私たちの健康、環境に資する多くの課題に取り組んでいる。本稿では4種類の微生物を材料とした研究について、それぞれについてのIABのプロフェッショナルが紹介する。

## 2 世界が注目する Keio Collection (中東)

大腸菌を改めて紹介する。大腸菌は環境中に生息するバクテリアであるが、ヒトに限らず大腸から分離されるのでこの名前がつけられている。150年以前のパスツールの時代から知られているが、この菌を最も有名にしたのは、1980年代から始まる遺伝子工学の基本株として採用されたことである。前述のように、微生物が持っている遺伝子は数千個が一般的である(表1)。酵母でも、枯草菌でも、納豆菌でも遺伝子数は同じようだが、どれくらいの遺伝子の働きが分かっているのであろうか? 最も良く研究されている大腸菌の場合で、答えは、多く見積もっても8割、少なく見積もると5割程度である。残りは機能未知遺伝子と呼ばれる。幅がありすぎるように見えるかもしれないが、8割と5割の差である3割は、推定できる遺伝子カテゴリーにもとづ

表1 IABで扱うモデル微生物のゲノムと遺伝子

| 種類  | ゲノムの大きさ  | 遺伝子の数 | 配列決定年 |
|-----|----------|-------|-------|
| 大腸菌 | 4641652  | 4318  | 1997  |
| 枯草菌 | 4215606  | 4353  | 1997  |
| 納豆菌 | 4097429  | 4504  | 2010  |
| 酵母  | 12157105 | 6331  | 1996  |

いている。微生物ゲノムが初めて解析され、どんな遺伝子が存在するか全てが明らかになってから、ほぼ20年も経つことを考えると、意外なほど多くの遺伝子の働きがわかっていない。

ゲノム中に遺伝子が残っているということは、その生物にとって何かしら役に立つ機能を持っている事を意味する。未だに多くの機能未知遺伝子が残っているということは、我々が知らない微生物の能力がそれだけあることを示唆している。また、既に良く機能がわかっていると考えられていた遺伝子について、知られていなかった別の機能を持ち合わせていることがときおり明らかになることもあり、たかが微生物の遺伝子機能にも、未だわからないことが沢山あるのが現状である。

遺伝子の機能を調べるのには、その遺伝子を欠損させて (= 働かなくして)、何が起きるかを調べる方法がよく使われる。例えば、ある遺伝子を欠損させてグルタミン酸というアミノ酸無しで増殖できなくなった場合、欠損した遺伝子は細胞内でグルタミン酸の合成に関係すると考えられる。前述の2割の機能未知遺伝子についても、欠損させたときの性質を解析することで、機能推定ができると期待される。しかし、これまでの多くの研究で明らかにならなかった機能なので、解明するには、これまでと異なる、多くの方法を試す必要がある。もう一つの問題は、同じ遺伝子の欠損株でも、もともになる親(株)が異なると性質が違うことであり、多くの遺伝子欠損株を使って性質を比較するには、同じ親株に由来する欠損株で比較する必要がある。

そこで、我々は同じ大腸菌の親株から、機能未知、既知を問わず遺伝子一つ一つ全てについて欠損株を作製し、全部まとめて一度に性質を調べられるようなセットを作ることにした。このような研究リソースは、遺伝子機能を調べるだけでなく、細胞を一つのシステムとして捉える、システム生物学と呼ばれる研究に極めて重要なものである。狙った遺伝子を欠損させることはこの仕事を始めた当時でも可能だったが、とても時間と労力がかかる方法だった。そこで米国 Purdue 大学の Wanner 教授(当時)らが新規開発した方法を使い、まず3年かけて、約300の必須遺伝子(その遺伝子が欠損すると生存できなくなる遺伝子)を除く4000遺伝子それぞれについて、さらに、一遺伝子について2株ずつ、合計8000株の欠損株コレクションを作製した。当初、

このシリーズを KO (Knock Out) コレクションと呼んでいたが、Keio の名前を冠する価値のあるものとお墨付きをうけて、正式名称を Keio Collection として発表した (Baba *et al.*, 2006)。

Keio Collection は我々の研究に利用するだけでなく、世界中の研究者に使ってもらうことで、バクテリアを使ったシステム生物学全体の隆盛を目的としており、正式発表前から希望する研究者に配布していた。2006 年には配布株数が 90 万株を越え、とても研究室レベルでは依頼に対応できなくなったので、その後は、各国のバイオリソースプロジェクトに委託して配布が行われている。(国内では <http://www.nbrp.jp> より) 2008 年に配布 300 万株を突破した (図 1) 以降統計は取っていないが、現在、既にシステム生物学だけでなく大腸菌を使う研究のスタンダードリソースの地位にあることは間違いない。

ただ、それだけ多くの利用者がいると様々な問題が生じた。多数よりなる生物学的リソースでは数パーセントの間違いがある事は一般的だが、コピーを繰り返すことで、元のリソースにあった間違いだけでなく、取り違い、混入、新たな突然変異による性質の変化など、元はなかった問題も生じる。他の問題として、ゲノム上の遺伝子の解釈が変わって、元々は遺伝子と思われていなかった部分が新たに遺伝子と判明したり、逆に遺伝子がなくなるケースもある。リソースを作製してしまえば、後の管理はしない方針をと

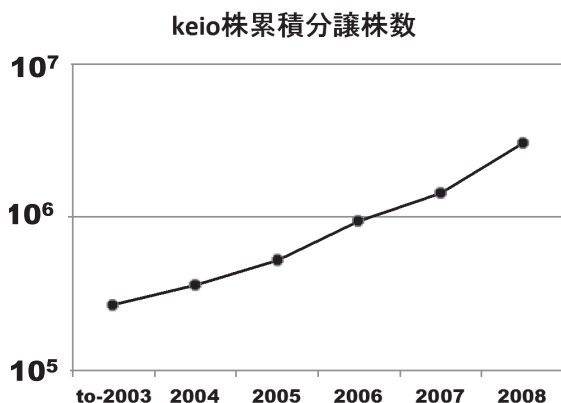


図 1 Keio Collection の世界への貢献

るグループもあるが、我々は、研究のクオリティを上げるため、様々な問題に対応し、最新で使える状態に Keio Collection を維持することが必要と考え、リソースや情報のアップデートを行っている (Yamamoto *et al.*, 2009; Otsuka *et al.*, 2014)。

### 3 大腸菌のシステム生物学研究 (中東)

IAB が当初から掲げてきた目標の一つは、微生物のふるまいを理解、予測可能にして、望む性質を持った微生物のデザインを可能にすることである。そのためには、遺伝子の機能を知るだけでなく、「どの遺伝子がいつ、どのくらい働いているか、そして、その時細胞の代謝がどうなっているか」を理解する必要がある。代謝とは、細胞が外部から栄養源などの物質を取り込んで、様々な酵素反応によって自分と同じ細胞を合成したり、そのために必要なエネルギーを取り出して、不必要になった物質を細胞の外に排出したりする過程である (後述の戸谷項目参照)。

細胞の中では数千以上の代謝反応が行われており、それぞれについて遺伝子から酵素タンパク質がどれくらい造られ、代謝物がどれくらい存在し、どれくらいの反応が起きているか、すなわち、代謝に関わる物質の網羅的解析 (マルチオミクス解析) を行うことは容易ではない。特に、低分子化合物を網羅的に測定できなかったのが問題で、IAB で CE-MS (キャピラリー電気泳動と質量分析法) によるメタボローム解析技術が実用化されると、すぐにこれを利用した微生物の研究を開始した (Saito *et al.*, 2006)。最も規模の大きかったのは、複数グループの共同プロジェクトであった大腸菌のマルチオミクス解析で (Ishii *et al.*, 2007)、この研究の結果、大腸菌の代謝は取り入れる栄養源 (ブドウ糖) の量の変化や、1 遺伝子の欠損によっても、全体としては大きな影響を受けないということがわかった。1 つの遺伝子が欠損すると、その遺伝子から作られる酵素が直接関わる代謝反応は大きく影響を受けるが、その影響は局所的で、代謝経路が冗長で頑強な構造をしていることで全体の代謝にはあまり影響を受けないものと考えられた (Ishii *et al.*, 2007; 中東 & 富田, 2010)。この研究はマルチオミクス解析による代謝研究の先駆けとして大きな評価を受けている。

同時に、この研究は、Keio Collection などの1遺伝子欠損株を利用して遺伝子機能を探る方法では、代謝が変わらないため表現型が現れにくいという限界が示唆されていた。しかし、複数の遺伝子を同時に欠損させて頑強性を破ることができれば、この問題が解決できるはずで、これに対応するため我々は複数遺伝子の変異株をハイスループットに構築し、その表現型を調べる方法を開発した。この方法では遺伝子の組み合わせは膨大な数になるため実験結果の解釈が容易にはできない。そこで我々は既知の遺伝子機能から細胞代謝のシミュレーションモデルを構築し、同じ多重欠損株の表現型を実験と比べる方法を用いた。実験とシミュレーション結果が一致しないケースは未知の代謝反応の存在を示唆しており、これを様々な手法で検証することで新規の代謝経路や遺伝子調節機構が発見できるはずである。この方法によって実際、ペントースリン酸回路と呼ばれる基本的な代謝経路に未知のバイパス反応を発見した (Nakahigashi *et al.*, 2009) (図2)。大腸菌の中心炭素代謝系のように非常に良く調べられた経路にも未知の代謝経路が隠されていたことは驚きだった。この経路は大腸菌では遺伝子欠損株だけ、しかもキシロースという糖を使うときだけ出現する特殊な経路であるが、乳酸菌ではこの経路が普通に使われることも明らかにした。

この結果は、我々の手法で予想もしなかった新しい代謝経路を明らかにできることを示している。しかしモデルを使った表現型の予測にはまだまだ問題があり、中でも大きな課題は表現型に大きく影響する細胞内外の物質移動やエネルギー収支の定量性の情報が不足していることである。特に細胞のエネルギー消費の半分以上を占めるタンパク質合成について定量的な情報を得ることは、全体のエネルギー収支の面からも、個々のタンパク質機能の観点からも極めて重要であることから、タンパク質の合成、分解の網羅的定量にも取り組んでいる (Nakahigashi *et al.*, 2014)。

#### 4 IAB 独自の代謝解析 (戸谷)

大腸菌は生物学的知見が豊富であることに加え、遺伝子組換え技術が確立しており、また安価な培地で生育可能、高い増殖速度など有用物質生産の宿主として有益な特性を備えており、これまでにアミノ酸、アルコール、タン



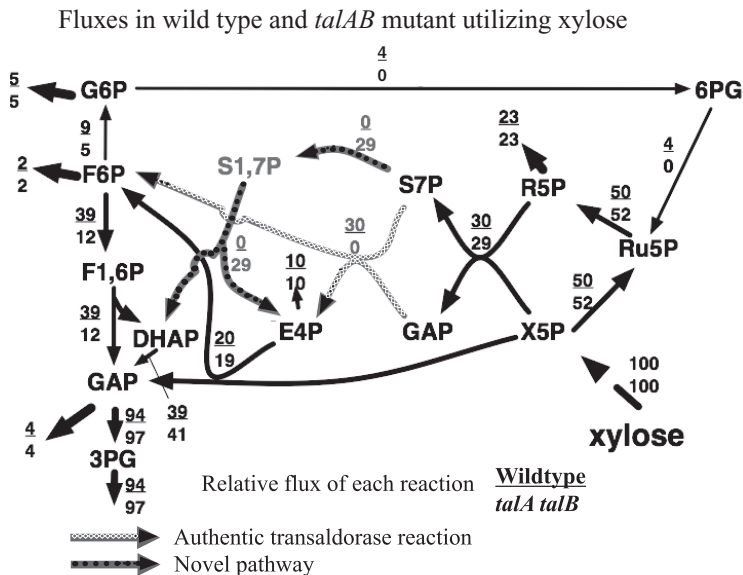


図2 基本代謝であるペントースリン酸回路代謝経路で新たに発見された未知のバイパス反応

パク質など様々な有用物質の生産に成功している。実用化に向けては、この生産効率を高めていくことが必要である。近年では既知の知見に基づいて、合理的に代謝システムの改変を行うことを目指した代謝工学という概念が提唱されており (Stephanopoulos and Vallino, 1991)、細胞の代謝システムの正確な理解が強く求められている。

代謝システムを理解するには何が必要だろうか？ 代謝の主な登場人物は、低分子化合物と酵素である。近年、分析技術の発達に伴い低分子化合物や酵素の存在量を網羅的に測定する技術が開発されている。IABの曾我らによって開発された CE-MS は細胞内の代謝物質濃度を一齐に測定する技術であり、一度の分析で数百種類の代謝物質を定量することが可能である (Soga *et al.*, 2002)。このような代謝物レベルの測定は代謝経路のボトルネックを予測するのに役立っている。

一方で、目的に合わせてより精密に代謝をチューニングするためには、実際に代謝がどのように働いたかを調べる必要があり、そのためには個々の酵



素反応の速度（フラックス）を明らかにすることが重要である。 $^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析は、直接測定することができない細胞内の代謝フラックスを同位体標識実験に基づいて明らかにする手法である (Shimizu, 2004)。同位体標識実験では、特定部位の炭素原子を  $^{13}\text{C}$  安定同位体で標識した基質で細胞を培養する。取り込まれた基質は様々な経路を経由して代謝され、フラックスの情報は代謝物の  $^{13}\text{C}$  標識パターンに反映されるため、この情報を利用してフラックスを推定する。本解析のコンセプトを図 3(a) に示した。図 3(a) の代謝経路では、代謝物 A から B に変換される過程で 2 つの経路がある。経路 1 と経路 2 では炭素骨格の移動に違いがあるため、基質の 1 番目の炭素原子を  $^{13}\text{C}$  で標識することで、経路 1 を経由した場合は代謝物 B に炭素原子が含まれる。一方、経路 2 を経由した場合は代謝物 B には標識炭素原子が含まれない。 $^{13}\text{C}$  の質量数は  $^{12}\text{C}$  より 1 大きいため、代謝物 B を質量分析することで、経路 1 と経路 2 のフラックス比を求めることができる。実際の代謝経路についての解析では、代謝物の骨格炭素原子の移動が複雑なため、代謝経路モデルを利用したコンピューターシミュレーションによって計算する。IAB では、この  $^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析を利用して、大腸菌の中核代謝経路の酵素遺伝子を欠失した際の影響の解析を実施してきた (Ishii *et al.*, 2007, Toya *et al.*, 2010)。図 3(b) に、大腸菌のピルビン酸キナーゼ欠失株のフラックス分布を示した (Toya *et al.*, 2010)。ピルビン酸キナーゼは解糖系下流の PEP から Pyr への変換を触媒する酵素であり、この酵素を欠失した際には補充反応を介した迂回経路が活性化する様子が見られる。このような遺伝的摂動がフラックスにどう影響するか調べることで、代謝システムが有する調節メカニズムが明らかになってきている。

また IAB では、酵素反応速度論に基づく動的な代謝モデルの開発も行われており (Ishii *et al.*, 2004)、このようなモデルを利用することで遺伝子の破壊や酵素の発現量を変えた際の代謝の変化を容易にシミュレーションすることができる。実験で明らかにされた調節メカニズムをモデルに実装することで、より高精度な予測が可能になるであろう。今後、有用物質生産を目的とした大腸菌の育種において、フラックス分布に基づく代謝改変や *in silico* シミュレーションに基づく代謝システムの最適化は益々重要になってくるだろう。

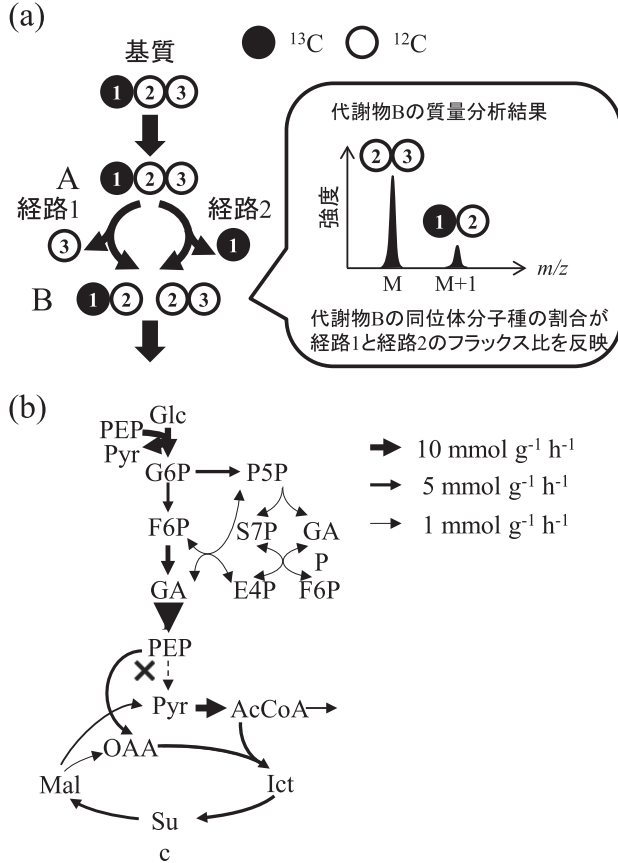


図3 (a) フラックス推定解析の概念。詳細は本文参照。(b) 大腸菌のピルビン酸キナーゼ欠失株のフラックス分布。ピルビン酸キナーゼ (PEP) 欠失には補充反応を介した迂回経路が活性化する。

## 5 IAB 独創と独走の枯草菌（板谷、柘植）

枯草菌は「かれくさきん」ではなく「こそうきん」と発音する。枯れた草の表面から簡単に分離できるための命名かと推察されるが、英語名 *Bacillus subtilis* からはそのイメージは伝わってこない。大気中にも土壌中にも、地球上のどこからでも見つかる微生物であり化粧品や洗剤等の成分やタンパク質も大量に生産できるので、産業的規模での大量生産に実用化されている。

大腸菌が世界共通の背番号 K-12 がついているのと同様、研究室での材料としての枯草菌は背番号 168 番がつけられている安全な枯草菌株が用いられる。この枯草菌 168 番は DNA を自分のゲノム中に取り込む能力が高いことが特徴で、枯草菌を利用する遺伝子操作技術は大腸菌を用いる操作技術とは異なる特徴を有する。現代風に言えば CRISPR-Cas9（最近開発された簡便な遺伝子改変ツール、切断したい標的塩基配列を含む guide RNA と Cas9 タンパク質の共発現でターゲット配列の変換を実現）レベルでのゲノム編集が柔軟にできる資質を備えていたことで、特に複雑でしかも巨大な DNA を設計して取り扱う技術が開発されていた。具体的には、大量の遺伝子を同時に操作する枯草菌ならではのユニークな技術である。枯草菌で構築された大量の遺伝子は別の微生物に移して発現させ、タンパク質、脂肪、ホルモン、抗がん剤等を生産させる技術開発に利用される。IAB では枯草菌を用いる利点にさらに改良を加えて、大量の遺伝子を設計段階から、迅速に構築する段階、そして枯草菌以外の有用生産性微生物に導入するまでの一貫したパイプラインを目指して研究を行っている（図4）。大量の遺伝子を同時に扱う技術は世界ではまだまだ未熟であり、この分野での枯草菌の独自性をとことん磨くことによって、生物学研究の方法論を新規に構築したいとの強い思いがある。このパイプラインが普遍的な技術になれば、世界の微生物での物質生産性向上に大いに資すると考えている。2002 年から世界的に開始された合成生物学の流れと我々の研究の流れは時期的にも内容的にもタイムリーにマッチしている。現在主流の生物学研究は、自然の生物を眺めて（観察）解析して結論を帰納するのが通常である。これに対して合成生物学では、対象を新規にデザインし実際に構築して調べ、さらに再デザインして調べなおすプロセスにより、創って調べる明確に定義された分野である。

## 6 枯草菌のみが行える大規模遺伝子集積（柘植）

代謝工学、合成生物学の実践においては、多数の遺伝子を取り扱う必要がある。そのソースとなる遺伝子については、遺伝子合成技術の進展により、ゲノムプロジェクトで明らかになった遺伝子、あるいは新規に設計した遺伝子など、どのような遺伝子でもテキスト情報から準備可能となってきた。一方、

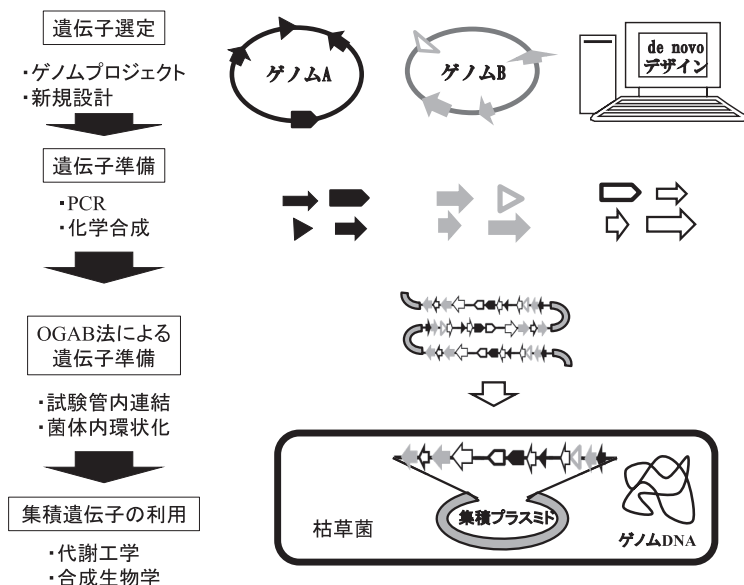


図4 枯草菌を利用する遺伝子集積のパイプライン概略図。柘植、板谷の総説参照

遺伝子の数が増えるにしたがって、これらを正しく連結するために要する時間と労力が増加してきており、DNA 断片をいかに正確にかつ迅速に連結するかが近年の合成生物学の一つの焦点になっている。現在までに様々な方法が考案されているが、その中の一つが、我々が考案した多数の遺伝子断片の集積が可能な OGAB 法 (Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis*) である (図 4、Tsuge *et al.*, 2003)。既存の遺伝子断片集積法が、主に大腸菌、あるいは出芽酵母を用いているのに対して、OGAB 法は、上述の枯草菌特有の遺伝子取り込み能力を利用した遺伝子断片集積法である。本法では、まず、OGAB ブロックと呼ぶ DNA 断片を設計するところから始まる。OGAB ブロックは、その両末端に隣に連結する DNA 断片を指定するための 3 塩基程度の突出末端 (一本鎖 DNA 部分) を持つ。突出末端を持つ DNA 断片どうしの連結においては、その突出配列が相補でないと DNA 連結酵素が認識しないので、その突出を一か所にしか現れない配列とすることで、多数の DNA 断片でも順序や向きを指定して連結可能である。最終的にこれらの OGAB ブロックは 1

つの環状のプラスミド DNA に集積されるが、この過程が他の方法には見られない OGAB 法独自の方法となる。DNA 断片を集積して得られるプラスミド 1 個をプラスミド 1 単位と表現するならば、OGAB 法ではプラスミド 2 単位以上の繰り返し (タンデムリピート) となる直線状の DNA を、OGAB ブロックを試験管内で連結することにより準備し、これを枯草菌のコンピテントセル (DNA 受容能力を有する状態の細胞) に与えることにより、菌体の内部で環状化してプラスミド 1 単位の形に集積する。本法では、通常困難とされる試験管内での DNA の環状化の工程を経ないため、従来法に比べて多数の DNA 断片 (～15 断片) や、非常に長い DNA 断片 (5 万塩基) の集積に適している。現在これらの技術により多数の遺伝子が必要な、抗生物質、カロテノイドなどの代謝系を構築するための方法 (Tsuge *et al.*, 2007; Nishizaki *et al.*, 2007) や、更にはゲノム DNA を構築する方法を検討している (柘植・板谷, 2012)。

## 7 国民食の納豆を極める (板谷)

納豆はおよそすべての日本人 (好みの程度は別として) が知っている単語である。鎌倉時代から知られており、元来は大豆の保存食として重宝されていた。私たちの生活には、味噌、醤油、酒、チーズのような微生物発酵による食品が多数あるが、納豆が納豆菌による大豆の無塩発酵によってできることが明治時代に明らかにされた。納豆菌は納豆をつくるために必要な菌であり枯草菌とは親戚で安全、安心な菌である。納豆菌のゲノムは IAB と慶應義塾大学理工学部と共同で 2012 年に決定した (Nishito *et al.*, 2010)。枯草菌と納豆菌は親類・近縁であると長い間考えられていたが、ゲノム配列情報の結果からはそれほど似ているわけではなく、ヒトとネズミくらいの違いがあることが判明した (板谷, 2011)。この事実から、我々は枯草菌と納豆菌両方の比較研究によって、それぞれ単独の研究だけでは判明しなかったさまざまな現象が解明されると期待している。例えば納豆菌ゲノム中には頻繁にみられる IS (Insertion sequence: 動く遺伝子) が枯草菌ゲノムには全くない。この不思議さは比較研究で明らかにされるだろうし、その成果は他の微生物にも適用され则认为している。食品微生物である納豆菌には残念ながらゲノム編集、

遺伝子改変の手段は使えない。納豆菌が保持しているプラスミドは枯草菌でも利用できることを IAB での研究で示されており (Kuroki *et al.*, 2007; Ohtani *et al.*, 2008)、この安定で使いやすいプラスミドを大量の遺伝子の同時操作に必須のシステムとして利用すべく研究している。

## 8 酵母の利用に向けた基盤研究 Systems Energetics (Murray)

All cellular systems are comprised of vast networks of interacting molecules whose activity changes in time (dynamically). Recent advances in science have produced huge amounts of data, regarding metabolites, proteins, transcripts, and gene structure. However, we are only beginning to understand how these sub-systems interact dynamically. Understanding cellular dynamics and integration into mathematical models, can lead to novel strategies to tackle disease. We use the bakers' yeast as a model organism to study how cells work. Yeast has much of the same cellular physiology to human cells and great advances have been made through these studies. Indeed, two recent Nobel laureates were awarded for work done using yeast (<http://www.exploreyeast.com/article/yeast-cellular-model>).

At the IAB, we use precise growth conditions, perturbation experiments and frequent time-series analyses, to understand the overall dynamic growth program of the cell. We discovered huge groups of genes are regulated by changes in ATP availability (cellular energy state)(Murray *et al.*, 2007, Machne *et al.*, 2012). The growth program initiates with energy becoming available and biosynthesis of much of the cellular apparatus (anabolic genes; 図 5). Thus, creating a drain on energy that triggers mitochondrial inhibition, the general stress response and the genes involved in energy production (catabolic genes). This has lead to the development of a simple model of gene expression, which can recapitulate much of the growth and stress response of cells. Moreover, our recent work discovered the structure

of chromatin (a major DNA-protein-RNA complex in cells) was sensitive to energy state (Amariei *et al.*, 2014). Chromatin functions to package DNA within the cell to protect it from damage and package it

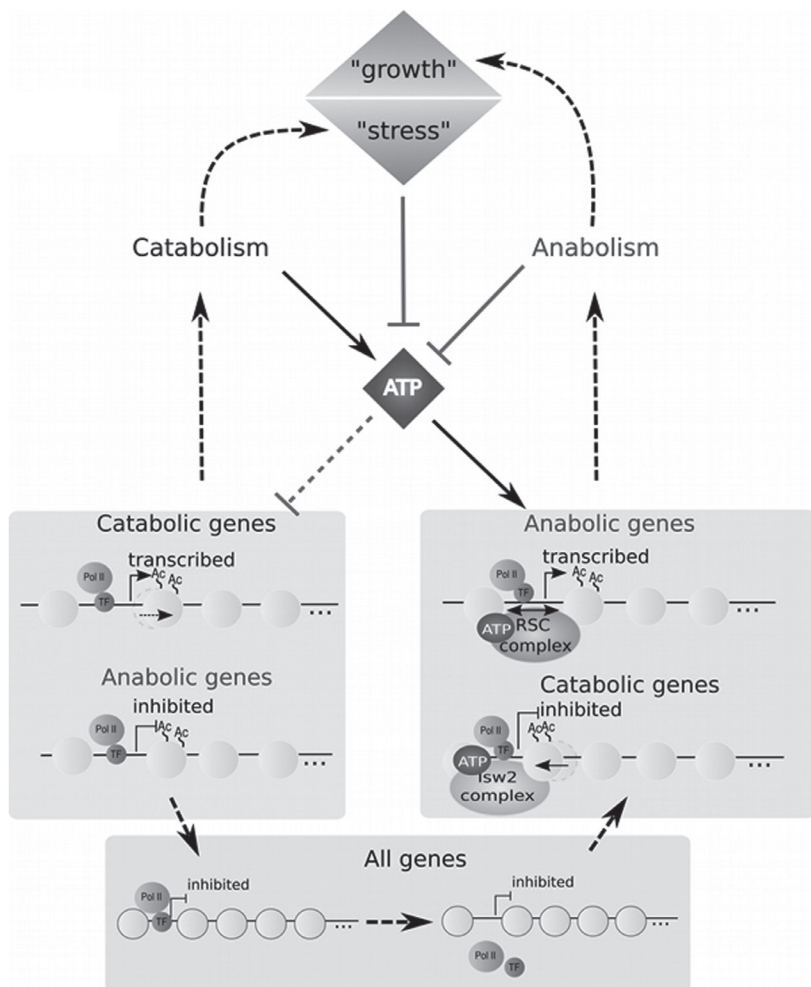


図5 A simple model for the energetic dependence of transcription in baker's yeast (see text for details and the references therein). Circles represent chromatin; ovals represent other DNA binding complexes.



into the nucleus of the cell. Its structure is akin to beads-on-a-string and the key enzymes involved in organizing it are energy dependent. We found that when energy conditions were low, global chromatin structure became highly organized, leading to other protein-DNA complexes involved in transcription falling off and DNA synthesis halting. We termed this state as a transcriptional ‘reset’ point.

As the core metabolism of energy production, cell-division cycle, chromatin regulation, transcription, and mitochondria are essentially the same as human cells, our findings are immediately applicable to healthy and disease states (Pray *et al.*, 2008). A particular interest is the application of our findings to the long known “Warburg effect” that is present in >95% of cancers. Where diseased cells shift metabolism to consume glucose more quickly for rapid growth. In a similar manner to yeasts, this state change in cellular dynamics and energetics lead to an increase genome instability, an inhibition of mitochondria and a disruption in chromatin (Ward *et al.*, 2012).

## 9 終わりに

本稿で述べたように単細胞と一括して扱われる微生物も多種多様である。我々は酒、ビールなどのアルコール飲料を楽しむことができ、醤油、味噌のような保存のきく発酵食品にいたるまで肉眼では見えない微生物の恩恵にあずかっている。近年では、微生物がサトウキビやトウモロコシから燃料やプラスチックなどの化成品の生産も行われるようになり、微生物はグローバルな話題の中心になることも多い。物質生産という直接的な貢献だけでなく、実は炭素循環を通じて我々の地球環境の保全にも貢献している。IAB での福田らによる腸内細菌研究や、伊藤らによる藻類のバイオ燃料生産研究と異なり、IAB での我々のグループでの微生物研究はモデル微生物に限られるが、モデル微生物だからこそその研究成果は世界が直ちに認識、判断可能であることを強調したい。最先端の分野でのチャレンジに対する答えを今後も迅速に、そして確実に発信しつづけてゆきたい。

## 参考文献

- 板谷 光泰「納豆菌と枯草菌：ゲノムから眺める安全な菌の活用 第13章」『発酵・醸造食品の最新技術と機能性II』シーエムシー出版、2011年、pp.111-118。
- 柘植 謙爾・板谷 光泰「ゲノム再構築技術の応用と課題：汎用性、迅速性、コスト 第1章ゲノムからの視点」『合成生物学の隆起』シーエムシー出版、2012年、pp.1-9。
- 中東 憲治・富田 勝「マルチオミクス (multi-omics) 解析で見えてきた大腸菌の遺伝・環境変化に対する応答機構」『遺伝子医学 MOOK 16』2010年、pp.166-187。
- Amariei, A., Machné, R., Stolc, V., Soga, T., Tomita, T., and Murray, D.B., “Time resolved DNA occupancy dynamics during the respiratory oscillation uncover a global reset point in the yeast growth program.” *Microbial. Cell*, 1, 2014, pp.279-288.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H., “Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.” *Mol. Syst. Biol.*, 2, 2006, p.0008.
- Ishii, N., Robert, M., Nakayama, Y., Kanai, A., and Tomita, M., “Toward large-scale modeling of the microbial cell for computer simulation.” *J. Biotechnol.*, 113, 2004, pp.281-294.
- Ishii, N., Nakahigashi, K., Baba, T., Robert, M., Soga, T., Kanai, A., Hirasawa, T., Naba, M., Hirai, K., Hoque, A., Ho, P.Y., Kakazu, Y., Sugawara, K., Igarashi, S., Harada, S., Masuda, T., Sugiyama, N., Togashi, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Yugi, K., Arakawa, K., Iwata, N., Toya, Y., Nakayama, Y., Nishioka, T., Shimizu, K., Mori, H., and Tomita, M., “Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations.” *Science*, 316, 2007, pp.593-597.
- Kuroki, A., Ohtani, N., Tsuge, K., Tomita, M., and Itaya, M., “Conjugational transfer system to shuttle giant DNA cloned by the *Bacillus subtilis* genome (BGM) vector.” *Gene*, 399, 2007, pp.72-80.
- Machne, R. and Murray, D.B., “The Yin and Yang of Yeast Transcription: Elements of a Global Feedback System between Metabolism and Chromatin.” *PLoS One*, 7, 2012, p.e37906.
- Murray, D.B., Beckmann, M., and Kitano, H., “Regulation of yeast oscillatory dynamics.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 2007, pp.2241-2246.
- Nakahigashi, K., Toya, Y., Ishii, N., Soga, T., Hasegawa, M., Watanabe, H., Takai, Y., Honma, M., Mori, H., and Tomita, M., “Systematic phenome analysis of *Escherichia coli* multiple-knockout mutants reveals hidden reactions in central carbon metabolism.” *Mol. Syst. Biol.* 5, 2009, p.306.
- Nakahigashi, K., Takai, Y., Shiwa, Y., Wada, M., Honma, M., Yoshikawa, H., Tomita, M., Kanai, A., and Mori, H., “Effect of codon adaptation on codon-level and gene-level translation efficiency in vivo.” *BMC Genomics*, 15, 2014, p.1115.
- Nishizaki, T., Tsuge, K., Itaya, M., Doi, N., and Yanagawa, H., “Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in *Escherichia coli* by ordered gene assembly in *Bacillus subtilis* (OGAB).” *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 2007, pp.1355-1361.
- Nishito, Y., Osana, Y., Hachiya, T., Pependorf, K., Toyoda, A., Fujiyama, A., Itaya, M., and Sakakibara, Y., “Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis* natto from very short read data.” *BMC Genomics*, 11, 2010, p.243.
- Ohtani, N., Sato, M., Tomita, M., and Itaya, M., “Restriction and modification on

- conjugal transfer between *Bacillus subtilis* 168.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 2008, pp.2472-2475.
- Otsuka, Y., Muto, A., Takeuchi, R., Okada, C., Ishikawa, M., Nakamura, K., Yamamoto, N., Dose, H., Nakahigashi, K., Tanishima, S., Suharnan, S., Nomura, W., Nakayashiki, T., Aref, W.G., Bochner, B.R., Conway, T., Gribskov, M., Kihara, D., Rudd, K.E., Tohsato, Y., Wanner, B.L. and Mori, H., *Nucleic Acids Res.*, 43(Database issue), 2015, pp.D606-617.
- Pray, L., “Hartwell’s Yeast: A Model Organism for Studying Somatic Mutations and Cancer.” *Nature Education*, 1, 2008, p.183.
- Saito, N., Robert, M., Kitamura, S., Baran, R., Soga, T., Mori, H., Nishioka, T., and Tomita, M., “Metabolomics approach for enzyme discovery.” *J. Proteome Res.*, 5, 2006, pp.1979-1987.
- Shimizu, K., “Metabolic Flux Analysis Based on <sup>13</sup>C Labeling Experiments and Integration of the Information with Gene and Protein Expression Patterns.” *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 91, 2004, pp.1-49.
- Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M., and Nishioka, T., “Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry.” *Anal. Chem.* 74, 2002, pp.2233-2239.
- Stephanopoulos, G.N. and Vallino, J.J., “Toward a science of Metabolic Engineering.” *Science*, 252, 1991, pp.1675-1681.
- Toya, Y., Ishii, N., Nakahigashi, K., Hirasawa, T., Soga, T., Tomita, M., and Shimizu, K., “<sup>13</sup>C-metabolic flux analysis for batch culture of *Escherichia coli* and its *Pyk* and *Pgi* gene knockout mutants based on mass isotopomer distribution of intracellular metabolites.” *Biotechnol. Prog.*, 26, 2010, pp.975-992.
- Tsuge, K., Matsui, K., and Itaya, M., “One step assembly of multiple DNA fragments with designed order and orientation in *Bacillus subtilis* plasmid.” *Nucleic Acids Res.*, 31, 2003, p.e133.
- Tsuge, K., Matsui, K., and Itaya, M., “Production of the non-ribosomal peptide plipastatin in *Bacillus subtilis* regulated by 3 relevant gene blocks assembled in a single movable DNA segment.” *J. Biotech.*, 129, 2007, pp.592-603.
- Ward, P.S. and Thompson, C.B., “Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate.” *Cancer Cell*, 21, 2012, pp.297-308.
- Yamamoto, N., Nakahigashi, K., Nakamichi, T., Yoshino, M., Takai, Y., Touda, Y., Furubayashi, A., Kinjo, S., Dose, H., Hasegawa, M., Datsenko, K.A., Nakayashiki, T., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H., “Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants.” *Mol. Syst. Biol.*, 5, 2009, p.335.

〔受付日 2015. 2. 25〕