

KEIO IAB RESEARCH DIGEST

VOL
02

AUTUMN
2009

www.iab.keio.ac.jp

RESEARCH HIGHLIGHT

- » 温泉に生息する古細菌から最大で3つに分断されている tRNA 遺伝子を発見
- » 超好熱性古細菌から見いだした GTP 依存性の RNA 連結活性を有する新規酵素の解析
- » シアノシステインによるタンパク質化学的切断法の開発と膜プロテオミクスへの応用
- » CE-TOFMS による胃がんおよび大腸がん組織のメタボローム解析
- » Chaos Game Representation によるゲノムのフラクタル解析
- » 大腸菌複数遺伝子欠損株を用いた解析による未知の代謝経路の発見

RESEARCHER INTERVIEW

第3回 柘植謙爾 講師 (ゲノムデザイン)

遺伝子断片に夢をのせて。DNA 配列情報から新たなゲノムの具現化へ

第4回 曾我朋義 教授 (メタボロミクス・分析化学)

こだわりが生む楽しみ。全代謝物質一斉測定法を携え、飽くなき知識の探究へ

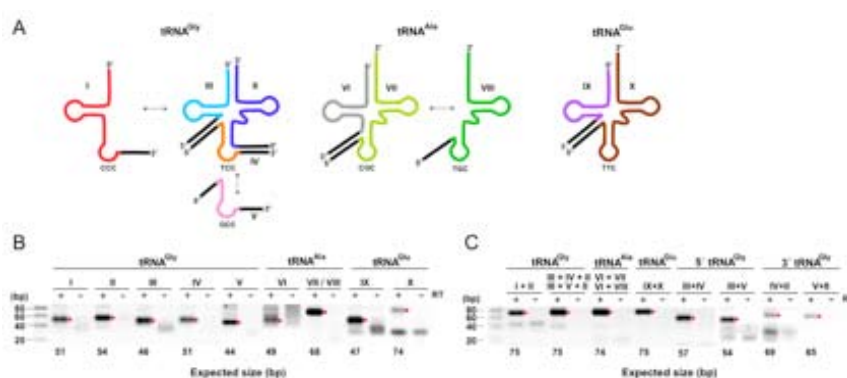
温泉に生息する古細菌から最大で3つに分断されている tRNA 遺伝子を発見

Tri-split tRNA の発見からゲノム進化の道筋を探る

Fujishima, K., Sugahara, J., Kikuta, K., Hirano, R., Sato, A., Tomita, M. and Kanai, A. **Tri-split tRNA is a transfer RNA made from 3 transcripts that provides insight into the evolution of fragmented tRNAs in archaea.** *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, **106**(8), 2683-2687.

生命の主要な構成成分であるタンパク質は、20種類のアミノ酸が連続的に結合したものである。どのアミノ酸をどの順番で結合するかという情報は遺伝子としてDNAに書かれており、これがDNAからMessenger RNA (mRNA)に転写され、さらにmRNAがリボソームと呼ばれるタンパク質と核酸の複合体に取り込まれてアミノ酸配列に翻訳される。具体的には、リボソーム内でmRNAは3塩基ごとに読まれ、それぞれの3塩基(コドン)に対応するアミノ酸が正確にリボソームまで運搬され、つぎつぎに連結していくことでタンパク質が合成される。このアミノ酸の運搬はリボ核酸であるTransfer RNA(tRNA)が担っていることから、tRNAの進化や原型を調べることで、核酸(DNAやRNA)からタンパク質への遺伝情報伝達(翻訳系)の生い立ちを明らかにできる可能性がある。

tRNAの起源には諸説あるが、太古のtRNAは短いステムループ構造をとる配列だったのではないかという仮説が現在、幅広く支持されている。近年、系統樹の深い位置から分岐している寄生性古細菌 *Nanoarchaeum equitans* に、tRNAが1つの遺伝子ではなく、2つの遺伝子に分断された状態でコードされている split tRNA が発見され、このtRNAが太古のtRNAのなごりである可能性が示唆された。一方で *N. equitans* は過去に大規模なゲノム縮小が生じていたことが明らかとなったことから、split tRNAはゲノム配列の再編成によって生じた副次的な現象であるという可能性も考えられた。これまでに藤島皓介博士らによって行われたtRNA配列の網羅的系統解析から、split tRNAがイントロ



10種の split tRNA の組み合わせと RT-PCR による発現確認

(A) *C. maquilingensis* における10種類の split tRNA の異なる組み合わせから作られる6種類の成熟型 tRNA。5種類の split tRNA^{Gly} から3種類の tRNA^{Gly}(CCC/TCC/GCC)が、3種類の split tRNA^{Ala} から2種類の tRNA^{Ala}(CGC/TGC)、そして2種類の split tRNA^{Glu} から1種類の tRNA^{Glu}(TTC)が生じている。エキソン配列は split tRNA ごとにそれぞれ色分けされている(I, 赤; II, 青; III, 水色; IV, 橙; V, 桃; VI, 灰; VII, 黄緑; VIII, 緑; IX, 紫; X, 茶)。(B) RT-PCR 法による10種類の split tRNA の発現確認。(C) 成熟型とプロセス中間型 tRNA の RT-PCR 法による発現確認。特異的なプライマーにより純粋に RNA 産物のみが発現していることを確かめるため、逆転写酵素を含まないサンプルをネガティブコントロールとして用意した(RT-)。赤い点は予想されたサイズで増幅した産物の位置を示す。

ン型及び非イントロン型 tRNA と同一起源を有するという証拠は得られていたが、tRNA 遺伝子の断片化が初期の生命にあったものなのか、あるいは進化の過程で獲得されたものなのかに関しては未だに決着がついていなかった。

こうした状況の中、藤島博士・菅原潤一氏らの研究グループでは、フィリピン温泉から理化学研究所の伊藤隆前任研究員らによって単離された超好酸好熱性古細菌 *Caldivirga maquilingensis* のゲノムから新たにグリシン、アラニン、グルタミン酸に対応する計10種の split tRNA 遺伝子が発見した(図1A)。特にグリシンに対応する2つの tRNA (TCC/GCC) は3つの異なる遺伝子から転写された3本の1本鎖 RNA が細胞内で部分的に結合し、スプライシングを受けることによって成熟 tRNA を作りあげることが示唆され、Tri-split tRNA と名付けられた。

非常に興味深いことに、これらの split tRNA はアンチコドン(mRNA上のコドンを認識する部分)に対応するRNA鎖を入れ替えることにより、異なるコドンに対応する成熟 tRNA を細胞内で合成していることが示唆された。また、RT-PCR及びPCR産物の塩基配列を決定したところ、実際にこれらの split tRNA が転写され、成熟 tRNA を合成していることが確認された(図B、C)。

C. maquilingensis と *N. equitans* という異なる門に属する古細菌において split tRNA が発見されたことは、短い遺伝子産物を複数組み合わせで機能性のRNA(今回のケースでは tRNA)を作る機構が古細菌の共通祖先に備わっていた可能性を示す結果となった。さらに面白いことに *C. maquilingensis* の split tRNA が断片化している位置は近縁種のイントロン介在型 tRNA のイントロ

ン配列の挿入位置と完全に一致しており、配列も非常に酷似していた。これは split tRNA がイントロン介在型 tRNA の祖先である、あるいはその逆である可能性が強く示唆された。

今回の研究で明らかになった Tri-split tRNA 遺伝子は、複数のピースが集まって初めて意味のあるものを形成することから、藤島博士はこれを「ジグソーパズ

ル」と例え、tRNA 以外の RNA においても初期の生命システムではジグソーパズル状になっていた可能性を示唆した。もしこのようなジグソーパズルの組み合わせの試行錯誤の中からより長く、より高次の機能を有する機能性 non-coding RNA あるいは mRNA が生じてゲノムに固定化されたとすれば、遺伝子重複や水平伝播に代表される DNA レベルの遺

伝子進化とは異なる、RNA レベルでの遺伝子進化の可能性を提示したことになる、と藤島博士は語る。この可能性を探る意味でも古細菌における tRNA 遺伝子の進化を考えることは非常に重要であり、藤島博士らの今後の研究が期待される。

(初出: 09年7月28日 編集: 木戸信博)

超好熱性古細菌から見いだした GTP 依存性の RNA 連結活性を有する新規酵素の解析

古細菌の断片化された tRNA を連結する酵素を発見、新しい RNA 連結メカニズムの存在を示唆

Kanai, A., Sato, A., Fukuda, Y., Okada, K., Matsuda, T., Sakamoto, T., Muto, Y., Yokoyama, S., Kawai, G. and Tomita, M. **Characterization of a heat-stable enzyme possessing GTP-dependent RNA ligase activity from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus***. *RNA*, 15(3), 420-431.

tRNA は mRNA の有する情報をタンパク質へ変換する上で不可欠な分子である。多くの真性細菌（バクテリア）では tRNA はそのまま転写される形でコードされているが、ヒトや酵母などの真核細胞生物や、高熱・高塩・高酸などの極限環境に生息する古細菌（アーキア）の tRNA には、DNA から転写後に切りとられるイントロンを有するものが存在する。このイントロンを切り出すために tRNA エンドヌクレアーゼと呼ばれる切断酵素が使われることはよく知られているが、イントロンを切り出した後に、断片化した tRNA を再び連結するような酵素に関してはほとんど分かっていなかった。

金井教授らのグループでは、これまでに超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* のタンパク質ライブラリを用いたスクリーニング系を構築し、RNA 関連タンパク質のプロテオームレベルでの同定を推し進めてきた。今回は、同ライブラリ中に見出した GTP 依存性の tRNA 連結活性を有する PF0027 タンパク質について生化学的および構造生物学的な解析を行った。

PF0027 は、184 残基のアミノ酸からなる推定分子量 21 kDa のタンパク質であり、2'-5' RNA リガーゼ（連結酵素）

である大腸菌の LigT (20 kDa) とアミノ酸レベルで 27% の相同性を示した。LigT にイントロンが除かれた酵母菌由来の tRNA 断片の連結を行なう酵素活性があるので、この基質構造を模した合成 RNA を用いて RNA リガーゼ活性を解析した (図 1)。

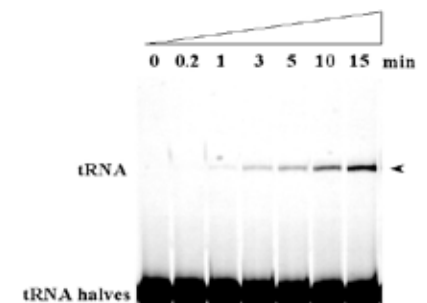
その結果、基質となる tRNA 断片の 3' 末端側に環状のリン酸が存在し、さらに 5' 末端側に OH 基が存在した場合に、PF0027 タンパク質は RNA リガーゼの活性を示すことが分かった。この tRNA 断片は、生体内で tRNA 前駆体が tRNA エンドヌクレアーゼにより切断された場合の RNA 断片の末端構造と一致している。

また、NMR 法にて PF0027 タンパク質の高次構造を決定し、オリゴ RNA の添加による化学シフト変化の解析からその RNA 結合領域を同定した。これは千葉工業大学、理化学研究所および東京大学との共同研究により達成することができた、と金井教授は語る。ここで、PF0027 による連結反応には GTP が必須であるが GTP の分解は必要ではなく、これまでになかった新規のメカニズムによって RNA の連結が行われることを示唆している。

その一方で、PF0027 による RNA 連

結の効率は悪く、連結部位が 3'-5' 結合ではなく 2'-5' 結合であることから、この酵素のみで生物学的に活性のある tRNA の連結反応を遂行しているとは考えられなかった。金井教授らのグループは、tRNA 連結に関わるさらなる因子の同定と、3'-5' 結合反応の試験管内再構成を目指し、現在も挑戦を続けている。同グループがさがりかけている古細菌の断片化された tRNA の謎を解き明かすパズルのピースは着実にそろいつつある。

(初出: 09年5月14日 編集: 木戸信博)



精製した PF0027 タンパク質による試験管内 tRNA 連結反応。化学合成した tRNA の 5' 側および 3' 側の各半断片と精製した PF0027 タンパク質を GTP γ S (GTP のアナログ) 存在下にインキュベートすることで、各断片が連結した分子ができることを示している。

シアノシステインによるタンパク質化学的切断法の開発と膜プロテオミクスへの応用

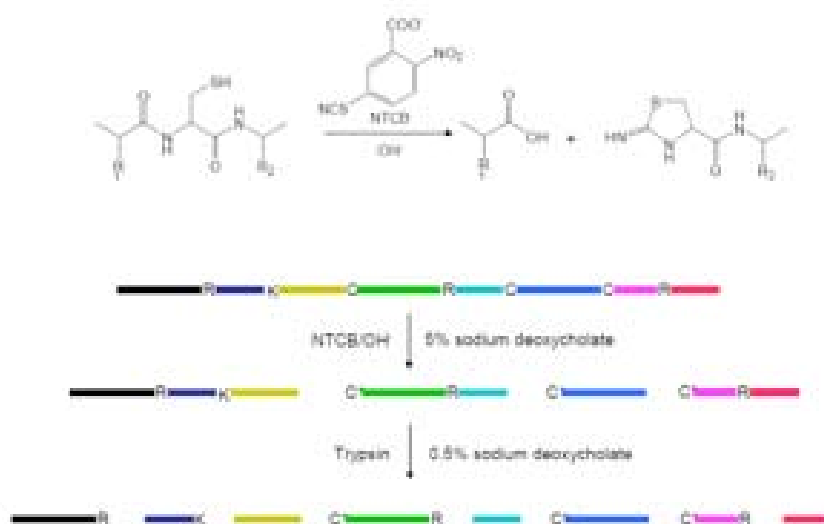
コンピュータ解析と実験科学の融合がもたらす、膜プロテオミクスへの大きな一歩

Iwasaki, M., Takeshi, M., Tomita, M., and Ishihama, Y. **Chemical Cleavage-Assisted Tryptic Digestion for Membrane Proteome Analysis.** *J. Proteome Res.*, **8**, 3169-3175.

我々生物の細胞膜には、多数のタンパク質（膜タンパク質）が埋め込まれ、細胞内外の情報を伝達する仲介役としての役割を担っている。現在市販されている薬剤の約65%が膜タンパク質を標的としていることからわかるとおり、これらは生物にとって非常に重要であり、さかんに研究がおこなわれている。膜タンパク質はきわめて疎水性な性質をもつことで、疎水性な膜上に局在し、重要な機能を発揮することができるが、一方ではその性質ゆえに、現在の実験手法では網羅的な同定（細胞内に存在している多数のタンパク質を一気に見つけること）が困難である。

修士課程2年の岩崎未央氏らのグループでは既に、トリプシンを用いた相間移動法 (Masuda *et al.*, 2008) を開発し、膜タンパク質の同定効率を大きく改善した。しかし、トリプシンのアミノ酸切断サイトは膜貫通領域に少なく、質量分析計の測定可能範囲内からはずれずような大きいペプチドを生ずる傾向にある。そのため、膜タンパク質に適した切断手法の開発が求められてきた。

今回岩崎氏はコンピュータ解析をおこない、システイン切断とトリプシン切断サイトを組み合わせることで膜タンパク質の同定効率が改善することを予測した。この予測を確かめるために、2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid (NTCB) を用いたシステイン化学的切断法を最適化し、トリプシンと組み合わせさせて大腸菌の膜タンパク質に応用した。その結果、まず反応時間を12時間から30分へと大幅に短縮できた上に、1530個のタンパク質および667個の膜タンパク質を同定することに成功し、



シアノシステインによる切断反応を含むタンパク質断片化の概略図

タンパク質を網羅的に同定・定量するには液体クロマトグラフィー・質量分析計 (LC-MS/MS) を用いるのが一般的であり、分析前処理として、タンパク質をトリプシンなどの酵素で特異的に切断し、断片化する必要がある。本手法では、高濃度の溶解剤存在下でタンパク質をシステインで切断したのちに、溶媒を希釈してトリプシンで切断し、LC-MS/MS で分析した。

精度の面でもトリプシンを用いた相間移動法と比較して約15%向上することができた。さらに、膜タンパク質は膜を数回貫通するような構造をとるために、従来は貫通する回数が多くなればなるほど可溶化および断片化が困難になるが、岩崎氏らの手法を用いることによって、膜貫通回数に関係なく膜タンパク質を同定することができるようになった。そのため、従来より高効率に膜タンパク質を同定することができるようになり、膜プロテオーム解析において大きく貢献する手法となることが期待される。

無論、この新手法の開発は容易ではなかった。特にシアノシステイン切断反応の反応効率を調べる実験は困難をきわめ、システインを含むペプチドとラベル化剤を幾種類も試行錯誤するのに一ヶ月

半を要した。しかし、そのおかげで逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィー、ラベル化反応といった実験理論および技術をしっかりと体得し、研究に臨むことができた、と、岩崎氏は語った。

プロテオミクスは生体内のタンパク質を網羅的に解析する技術であるが、未だ発展途上であり、試料中に含まれる全てのタンパク質を1回の測定で分析できるまでには、解決しなければならない問題が多数ある。岩崎氏は、今後も高効率にタンパク質解析ができる新規手法の開発を続け、世界でいち早くこの問題を解決したいと語る。プロテオミクスが成熟した技術となり、生命現象の探究には欠かせない技術として広い分野で使われる日を夢見て、岩崎氏の挑戦は続く。

(初出：09年10月14日 編集：木戸信博)

CE-TOFMS による胃がんおよび大腸がん組織のメタボローム解析

がん組織における未知のエネルギー獲得機構の解明へ

Hirayama, A., Kami, K., Sugimoto, M., Sugawara, M., Toki, N., Onozuka, H., Kinoshita, T., Saito, N., Ochiai, A., Tomita, M., Esumi, H. and Soga, T. **Quantitative Metabolome Profiling of Colon and Stomach Cancer Microenvironment by Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry.** *Cancer Res.*, 69(11), 4918-4925.

がん細胞が、比較的酸素濃度が高い条件下においても、主に酸素を使わない解糖系によってエネルギー産生を行う現象はワーバーク効果と呼ばれ、これまでに様々ながん種において観察されている。また、がん細胞は活発な増殖のために多量のグルコースを必要とし、近年のPET診断はまさにこの特性を利用した診断技術である。しかし、一部のがん種においては血流が乏しいために、慢性的な低酸素や極度の栄養不足状態にありながら生存・増殖していることが知られている。つまり、このようながん細胞におけるエネルギー産生は大量のグルコースを必要とする解糖系の亢進だけで説明することは難しく、血流量が多い栄養的に恵まれた環境下で増殖するがん種とは異なったエネルギー代謝を行っている可能性がある。そこで今回、平山研究員らのグループは、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS)を用いたメタボローム測定により、大腸がんおよび胃がん患者から採取したがん組織および正常組織の代謝物質を一斉分析し、がん組織のエネルギー産生のメカニズムに迫った。

その結果、CE-TOFMSを用いたメタボローム測定によって、16名の大腸がん患者と12名の胃がん患者の腫瘍組織中からそれぞれ平均877種類、1142種類の代謝物質由来のピークを得た。これらの代謝物質に関しては標準物質を用いて各サンプルの1g臓器中の定量値を算出し、全サンプルの平均値をグラフに記載した。なおグルコースに関しては、液体クロマトグラフ-質量分析装置(LC-MS)を用いて定量値を算出した。

まず、腫瘍組織中のグルコース量は、正常組織中の量に比べて大腸がんで約1/10、胃がんでは約1/3程度であった。一方で、解糖系の中間物質量は非腫瘍組織と比べて同等かそれ以上であり、さらに解糖系の最終産物である乳酸量は両腫瘍組織中において有意に高かった。このことは、ワーバークが報告したがんの培養細胞の実験で得た結果と一致しており、ヒトのがん組織でも解糖系が亢進していることが示唆された。

今回新たに明らかになったのは、クエン酸回路の代謝中間体である。胃では正常組織、がん組織ともクエン酸回路の代謝中間体は一定量存在している。しかし大腸ではどちらの組織でもクエン酸回路前半の代謝物(クエン酸からサクシニルCoAまで)がほとんど検出されておらず、ATP量も極めて低い。大腸の酸素分圧は胃のそれに比べて5分の1程度と報告されており、大腸では正常組織もがん組織も酸素を必要とする酸化的リン酸化反応はほとんど行われていないのではないかと推測される。

不思議なことに、特に大腸のがん組織では、クエン酸回路の後半部分の代謝物(コハク酸、フマル酸、リンゴ酸)が有意に増加していた。古くから嫌気性微生物や回虫などの寄生虫や二枚貝の一部では、嫌気的条件下でフマル酸呼吸と呼ばれる代謝によってATP産生が行われることが知られている。大腸がん組織ではコハク酸が蓄積しており、嫌気性条件下での回虫の代謝パターンと類似していた。

仮に大腸がんはフマル酸呼吸を行うとしても、それに必要なフマル酸はどこから供給されるのかという疑問が残る。図

示していないが、今回の測定で得られたアミノ酸及びヌクレオチドの量を比較した結果、どちらのがん種においても、グルタミン以外のすべてのアミノ酸が有意に増加していた。血管新生が不十分ながん組織では、血液からのアミノ酸の供給も不足していると考えられるため、このアミノ酸の増加は不思議である。人体内で合成できない必須アミノ酸も増加していること、コラーゲンの分解によって特異的に生成されることが知られているヒドロキシプロリンが増加していることから、平山氏は、オートファジーと呼ばれる細胞内のタンパク質分解機構によってアミノ酸ががん組織に供給されているのではないかと仮説を立てた。つまり、がん組織ではコラーゲンなどの周囲のたんぱく質を積極的に分解し、ATP産生を行うための前駆体としてアミノ酸を取り入れているのだろう。

今回のようにヒト体内の代謝物質量を計測するには、個人の生活環境の違いを考慮に入れてサンプルの選定に注意を払う必要がある。今回用いたサンプルは、一人の患者から手術で摘出した部位のうち腫瘍組織と正常組織をペアでとってきたものであり、そのような個人差の影響をある程度軽減することができる。これにより、代謝の違いをよりはっきり見ることができた。

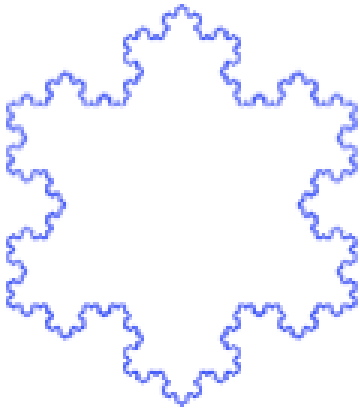
今後の展望としては、より多くのがん組織で同じ研究を行うことで、各種のがんの代謝の違いをより体系的に捉え、代謝の違いをベースにした抗がん剤等の開発が可能になるのではないだろうかと平山氏は語る。今後の活躍に期待したい。

(初出: 09年10月14日 編集: 木戸信博)

Chaos Game Representation による ゲノムのフラクタル解析

複雑系カオス理論を応用した新規ゲノム可視化手法を開発

Arakawa, K., Oshita, K. and Tomita, M. A web server for interactive and zoomable Chaos Game Representation images. *Source Code Biol. Med.*, 4, 6.



コッホ曲線 (Wikipedia より)
正三角形の各辺を三等分して中央に新たな三角形を作るを繰り返すことで描ける。

「シェルピンスキーのギャスケット」や「コッホ曲線」で知られるフラクタル図形は、図形の部分と全体が自己相似形になっているもので、自然界でも海岸線や樹木の枝の形など、いたるところで見つけることができる。また、フラクタル図形は有限の面積の中に無限の長さを持つことができるため、わたしたち人体内でも血管の分岐構造や腸の内壁など表面積を必要とする器官はフラクタル構造をもつことが多い。「シェルピンスキーのギャスケット」と「コッホ曲線」は共に正三角形をもとにして、単純なルールを繰り返すことによって描くことができるが、同様に一見不規則な変動（カオス）を元にしても、隠された法則性と十分な反復回数があれば、無作為な手順によってグラフを描くことでカオスアトラクターと呼ばれるフラクタル図形を得ることができる。このようにしてカオスからフラクタル図形を作ることは「カオスゲーム」と呼ばれる。

ゲノムの塩基配列情報は一見ランダムに見えるが、遺伝子をコードするために隠れた規則性を持っている。そこで、1990年代から Jeoffrey らによってゲノム塩基配列のカオスゲームの応用が提

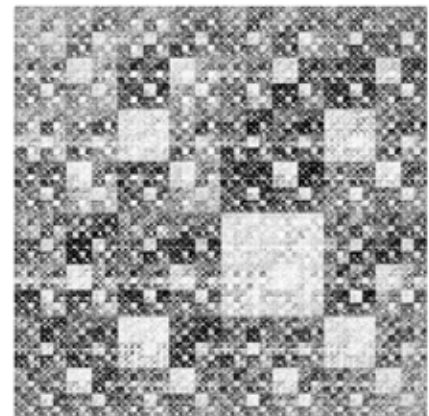
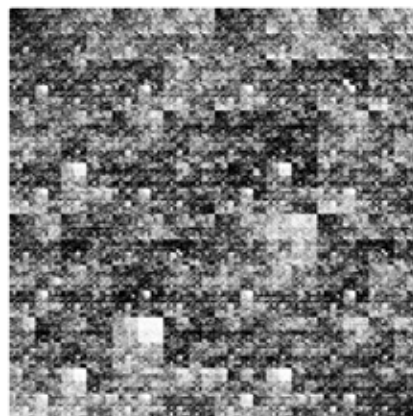
案され、研究されてきた。ある生物のゲノムは、通常 "Genomic Signature" (ゲノムの署名) と呼ばれる固有の2塩基頻度分布を持つが、同様にカオスゲームによって得られた Chaos Game Representation (CGR) も固有のパターンを示す。このように、ゲノムの大きさに依存しない生物種間の特徴比較や、特徴的な塩基配列の存在に CGR は利用されてきた。また、数学的には CGR は塩基配列のマルコフ遷移確率表を非正数度数に一般化したものであることが Almeida らによって示され、あらゆる長さの塩基配列のマルコフ性 (ある並びが来た時にどういう配列が次に並びやすいか、という確率論モデル) を解析する上で有用であると注目されてきている。

一方で、CGR を一般化マルコフ遷移確率表として用いるにはいくつか問題がある。まず、通常のピクセル画像として CGR を扱うかぎりはその解像度に限界があり、長い配列や長いマルコフ性の観察ができない。また、CGR 自体は単なる点の集合であるので、内部の座標系がマルコフ遷移確率表におけるどの配列に相当するのかを把握することができない。そこで、荒川講師らは多段階解像度を Google Maps API を用いた

Zoomable User Interface によって表現し、相同な座標系を持つオリゴ配列表とユーザ入力による座標ハイライトを実装することで、ユーザ操作を前提とした新しい CGR 可視化手法を開発した。誰もが簡単に扱えるようにウェブサービスとして実装された本可視化手法を使えば、CGR によって特徴的なオリゴ配列の解析が容易になる。

先端科学においては、研究者の発想を支援するための可視化手法が欠かせない。一方で、複雑化を続ける現代科学のデータは多次元・多階層化してきており、従来のように単純に画像として表現するだけではもはや十分ではない、と荒川講師は語る。そして、このような複雑なデータの可視化には、ユーザによる操作を前提とし、インタラクションによって表現を変えるような可視化が必要であり、ユーザインタフェースを含めた可視化が今後のサイエンティフィックビジュアライゼーションの進むべき道、だと言う。情報学と生物学の融合によって生まれたバイオインフォマティクスという先端領域においては、可視化という科学研究における基本的なもののあり方もまた変わっていかざるをえないようだ。

(初出: 09年10月14日 編集: 木戸信博)



大腸菌 (左) とシアノバクテリア (右) の Chaos Game Representation

大腸菌複数遺伝子欠損株を用いた解析による未知の代謝経路の発見

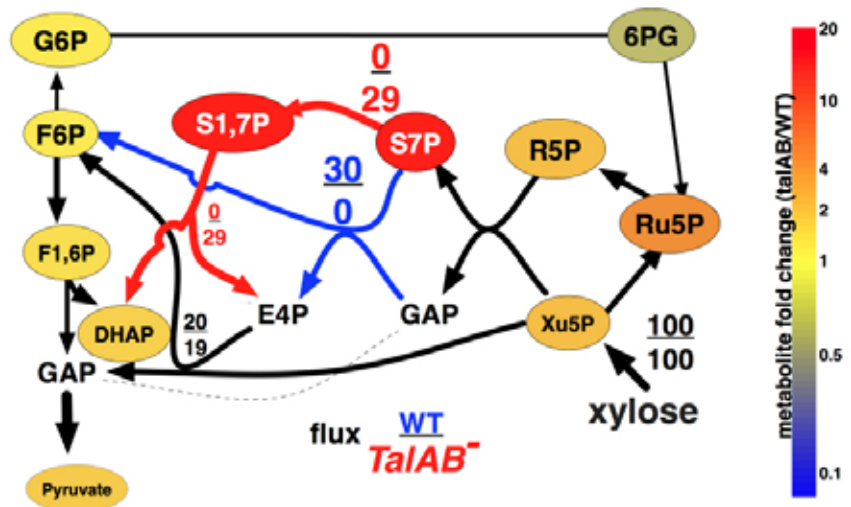
ゲノムスケールシミュレーションとフェノーム・メタボローム・トランスクリプトーム解析の組み合わせから新規代謝経路の発見へ

Nakahigashi, K., Toya, Y., Ishii, N., Soga, T., Hasegawa, M., Watanabe, H., Takai, Y., Honma, M., Mori, H. and Tomita, M. **Systematic phenotype analysis of *Escherichia coli* multiple-knockout mutants reveals hidden reactions in central carbon metabolism.** *Mol. Syst. Biol.*, 5, 306.

中心炭素代謝系は生物がエネルギーを得るために主要な役割を担っている代謝系であり、過去100年にわたり詳しく解析されてきた経路である。その解析には大腸菌がモデル生物として用いられ、他の生物種と比べ非常によく研究されてきた。しかし、今回 中東憲治准教授らのグループはこの代謝系に未知の反応経路が潜んでおり、条件によって誘導されることをあきらかにした。

中東准教授らのグループではまず大腸菌の中心炭素代謝系遺伝子の多重欠損(2重または3重欠損)株を構築した。そして、それぞれの株の増殖速度を12種類の培地で測定し、1遺伝子欠損株では通常増殖速度を示すものの、複数の変異が重なることではじめて増殖速度が遅くなる遺伝子欠損の組み合わせを調べた。さらに、この結果を大腸菌代謝のゲノムスケールモデル(iAF1260)を用いた実験と同様のシミュレーションと比較することで、未知経路を予測した。シミュレーションでは遅い増殖を示すと予測されたが、実際には親株と同様の早い増殖を示した場合、そこには中心炭素代謝系にこれまで知られていない反応が存在しうることが予測される。このシミュレーションに際して、正確な予測が行えるように1遺伝子欠損株のデータを用いてモデルを修正しているが、これは代謝経路の知識と試行錯誤を必要とする煩雑なものだったと中東准教授は語る。

その後、欠損株の表現型、そして、メタボロームとトランスクリプトーム解析のデータを用いて共同研究者らとディスカッションを重ね、未知の反応の正体を推測した。さらに、炭素13を使ったフラックス解析と*in vitro*酵素活性解析でついにその存在を確認した。その結果、



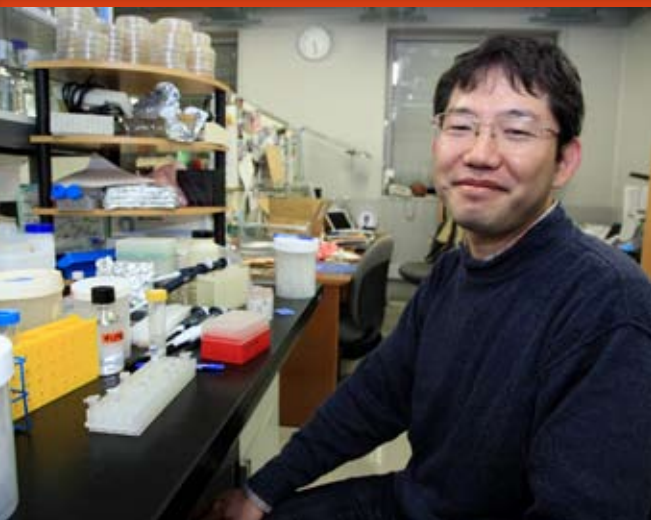
トランスアルドラーゼ欠損株(TalAB)のキシロース利用時のメタボライトレベルと代謝経路。ペントースリン酸経路と解糖系の一部の代謝物濃度、及び13C-MFAにより推定された流束を示した。楕円は各メタボライト量の野生型との比を、数字はキシロース取り込みを100とした野生型/TalAB株の各反応流束を示す。

新規経路はペントースリン酸経路の中間代謝物であるS7P(セドヘプツロース-7-リン酸)を出発点とし、S17P(セドヘプツロース-1,7-ビスリン酸)を経由してE4P(エリトロース-4-リン酸)とG3P(グリセルアルデヒド-3-リン酸)を生成する2反応からなり、いずれも解糖系の酵素であるホスホフルクトキナーゼとアルドラーゼが触媒することが判明した。

この新規経路は大腸菌野生株ではほとんど機能していないが、トランスアルドラーゼ欠損株が(キシロース、グルコン酸など)特定の炭素源を利用する際に出現する。これは遺伝子発現の変化によって誘導されるものではなく、細胞中でS7Pが蓄積することがトリガーとなって出現することがユニークであり、このような仕組みは中心炭素代謝系の頑強さを支える一要因であると考えられる。

多重欠損株の表現型解析とゲノムスケールモデルの組み合わせによる遺伝子の機能探索は、これまで解析し尽くされてきた代謝経路からでも新規反応を見つけることが可能なほどパワフルであることをこの研究は示した。この手法をさらに広範囲の遺伝子欠損株に用いることができるだろう。今回発見した経路は、大腸菌では遺伝子欠損株でのみ現れると考えているが、乳酸菌などの一部の生物はトランスアルドラーゼを持たない可能性があり、この新規経路が天然に存在する可能性がある。キシロースの資化は木質バイオマスの利用に大変重要であり、今回の発見がより効率的なキシロース資化の技術開発につながることを期待している、と中東准教授は語った。

(初出: 09年10月20日 編集: 木戸信博)



講師

柘植謙爾

Assist. Prof. Kenji Tsuge

専門：分子生物学・分子進化学・発生学

遺伝子断片に夢をのせて。DNA 配列情報から新たなゲノムの具現化へ。

—現在はどうな研究テーマに取り組まれているのでしょうか。

一番大きな目的は『ゲノムをデザインする』ことです。ゲノムデザインというと、生物をつくる、というニュアンスに近いのかもしれませんが、それよりも限定的に、DNA を操って生物に必要な完全なゲノムを作るにはどうしたらいいのか、ということを目指しています。

その中でも、トップダウン方式とボトムアップ方式という2つの方式があります。トップダウンは板谷さんがやっている研究で、ある生物の中に違う生物のゲノムを完全に入れこんでから、徐々に外来ゲノムの方を発現させるためにはどうすればいいか、という方式です。

僕がメインに考えているのはボトムアップという方式で、遺伝子の単位からゲノムをデザインしていくという発想です。ボトムアップ方式で非常に重要な実験手法として遺伝子集積があります。遺伝子の断片を自分で操れないとゲノムデザインは難しいので、効率良く遺伝子を集積する方法を発明してゲノムをデザインしていきたいな、というわけです。

—その方法とは？

枯草菌プラスミドの形質転換系を利用して遺伝子集積する方法で、名前を OGAB 法 (Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis* 法) と言います。この方法は、僕が知る限り、という前提がつくのですが、少なくともゲノムをデザインするという観点においては最も優れた方法だと考えています。

一番成績が良いものでは、13 個の DNA 断片を混ぜてライゲーションという連結操作を1回するだけで、自分が指定した順番通りに全断片を連結することができました。しかも、OGAB 法は薬剤マーカでプラスミドを持っている枯草菌の形質転換体をとってくるのですが、8割以上が13個の断片を正しい順序や向きに連結していたという状況でした。

ゲノム構築において遺伝子の並べ方は重要か？

—13 個の DNA 断片の向きや順序にはどのような工夫をされているのでしょうか？

13 個の断片中に遺伝子が10個あったのですが、10 個の遺伝子の連結順序というのは10の階乗通りあります。10の階乗ってどのくらいになると思います？すぐには出てこないと思いますが、362万8800通りという数です。オペロンという一つの転写単位を作成する時にそういう数が発生するという事です。遺伝子がコードしている向きはすべて左から右へと一定の方向なのですが、その向きの中での並び順というのが約300万通り存在するわけですね。ちなみにそのコードの向きを考慮せずに並べ替えをしたとすれば、単純な意味でいくつになるのですかね・・・さらに2の10乗倍かかってくるのですぐには計算できませんが、もっと莫大な数字になります。遺伝子の向きを一定にして考えただけでも300万という数字になるわけです。これらの遺伝子を連結したものが、果たして同じような性質を示すのか、というところに非常に興味を持っています。

たとえば大腸菌には4千数百の遺伝子がありますが、その4千数百の遺伝子をただやみくもにつなげて一本のDNAにしたら生物として成り立つのかといえば、そんなことはないと考えています。順番というのが非常に重要な概念として成立しているのではないかと、それを解き明かしたい。ということで、手はじめに、その遺伝子をどういう順番で連結すればよいか、順番に意味があるのかについて研究しようとしています。

—うまくいったプラスミドの遺伝子発現はどうだったのでしょうか？

今までに論文にした成果では、カロテノイドという、皆さんが食品でとるような色素性物質の5つの遺伝子を使いました。5つの遺伝子には5の階乗通りの並び順が存在しますが、代謝(経路)で遺伝子をはたらく順序の早いものからABCDEという風に並べて1つ目の並び順にしました。次はEが先頭に来てEABCD、その次はDEABCという形で、先頭を順に移

動させた5種類の並び順を選びました。これにプロモーターをつなげてオペロンにし、大腸菌で発現可能なプラスミドとして枯草菌でクローニングしてから大腸菌に導入してカロテノイドの生産量を調べました。すると、遺伝子を連結する順番によって生産量が変わるという現象が見いだされ、代謝の順序に並べたときに一番生産量が高いという結果が得られました。(T. Nishizaki *et al.*, 2007, Applied and Environmental Microbiology)。

こういう現象を何が規定しているのかについては非常に興味がありました。そこで、各遺伝子の mRNA のその時点で残っている存在量、つまり(生産されたもの) - (分解されたもの)の量を RT-PCR 法で測定してみました。その結果、遺伝子の連結順にかかわらず、mRNA の量が最も多いのはプロモーターに近いところに連結された遺伝子でした。一方、mRNA 量が少ないのはプロモーターから遠い遺伝子で、連結順にしたがって単調に減少していました。つまり、mRNA の存在量は一回下がってから増加したり中央が高くなるのではなく、プロモーターの位置から単純に減少していくことが分かりました。

野生型のオペロンでもそうなるのではないかと漠然と言っている論文はありますが、遺伝子の連結順序によっては、遺伝子の構成に変化がなくても活性(発現量)が変わってしまう現象があることとなります。すなわち、遺伝子の単位から生物を作り上げようとした時には、遺伝子を連結する順番は非常に重要ではないか、ということです。

—10個の遺伝子をつなげたときも、代謝の順につなげた物が機能としては一番良かったのでしょうか？

10個の遺伝子は解糖系の遺伝子なのですが、代謝の順に連結したものをまず作りました。次に、これらの遺伝子は大腸菌由来のものなのですが、中東さんがとられた野生型の大腸菌における各解糖系遺伝子の mRNA 量のデータをみると、10個の遺伝子の中に非常に多く発現している遺伝子と発現していない遺伝子があることが分かったので、そのデータに基づいて並べたオペロンを作りました。代謝順のものとも mRNA 量の順番のものをよく見るとほぼ正反対に近いような並び方をしている、代謝経路の先頭の遺伝子は発現量が比較的少なく、経路の後半にくる遺伝子は発現量が多いことが分かりました。そこで、代謝経路にしたがったものを中央で切って逆転させたものも作ってみました。

この3つのオペロンの性質を調べるのは難しく、解糖系がない生物に入れれば一番良いのですが大腸菌の解糖系遺伝子には必須遺伝子が多いので、作ったオペロンの機能を完全に評価することはなかなかできませんでした。そこで、IABにある Keio コレクションという大腸菌の1遺伝子を欠損した株に作ったオペロンを持つプラスミドを入れて増殖を調べました。どの欠損株でも、あるプラスミドを入れて普通に生息したらそのプラスミドが100%働いているのだらうという推測ができます。

その結果、最初につくった代謝経路順に並べたプラスミドで

はある程度増殖は回復したものの、野生型では mRNA 量が多い代謝経路後半に位置する遺伝子の欠損株はあまり相補できませんでした。プラスミドを入れたことで本来はコロニーを得られない培地で生えるようにこそなりましたが、増殖が非常に遅いという状況でした。一方、代謝経路前半の転写量をあまり必要としない遺伝子の欠損株は完全に回復していました。

それを改善しなければ遺伝子の連結順序を解決したことにはならないので、野生型大腸菌の mRNA 発現量を基準にして並べたものについて同じ実験をしたところ、一遺伝子欠損株は全て完全に相補したのです。ほぼ野生型と同じように生育できるようになりました。なので、ひょっとすると、遺伝子が必要としている mRNA 量の多い順番に遺伝子を連結することに意味があるのではないかと考えているところです。

—エネルギー生産に近い遺伝子がより多く発現している、といことなのでしょう？

それは非常に難しいのですが、たとえば先ほど説明したカロテノイドではそういう傾向はなく、代謝経路の順番にしたがっていたものが比較的成绩が良かったので、個々のケースによるのではないかと見ています。カロテノイドの遺伝子に関しては野生型の mRNA 量を調べていないので、というか、そもそもカロテノイドを作る遺伝子が大腸菌の遺伝子ではないので調べようがないのですが、大腸菌の解糖系遺伝子については調べることができます。野生型のオペロンについては調べることができませんが、ともかく必要としている mRNA 量の順番にしたがって並べる手法は代謝経路がわかっていなくても利用できるという点において非常に有用だと考えています。

—OGAB 法では一度にいくつまで遺伝子をつなげることができるのでしょうか？

集積する遺伝子の断片が突出を持つように調整します。この突出は、DNA 二本鎖の 3' 末端が飛び出るような形で、かつ、出っばっている部分が3塩基になるように設計をしています。

3塩基の配列の相補な関係にあるものはリガーゼをいれれば連結できますが、逆の言い方をすれば、相補な関係のものが一カ所以外には出現しないように突出の形状を連結部位の数だけ用意してあげれば、いくつもの断片を一度に連結できます。この3塩基の突出は4種類の塩基からなっているので、4の3乗で64通りあるのですが、右の断片と左の断片というかたちで相補なものも64個の中にふくまれているため、実際には32カ所の連結ができることとなります。ただし、経験上なのですが、GやCをふくまないAとTだけの突出は水素結合が非常に弱いためになかなかうまくいかないなど、突出の形によってはライゲーションが難しい配列もあります。そういうことも考慮すると、断片の数としてはせいぜい20個位が限度かもしれません。しかしながら、3塩基の突出を5'末端突出で作ることも不可能ではないので、同じ配列でも突出の形状の違いによってコントロールできれば、原理上は無制限に連結できるのではないかと思います。

もう少し具体的な話をしますと、この方法が今まで他の菌、たとえば大腸菌などでできなかった理由があります。枯草菌はDNAを自発的に取り込む性質がありますが、大腸菌では電気をかけたり、塩化カルシウムの溶液につけて膜構造を変化させたりすることでDNAを無理矢理入れています。

形質転換が得意な枯草菌を使ったからできたこと。

枯草菌がDNAを取り込むときは細胞表面にDNAを認識するタンパク質が出現して、2本鎖のDNAを捕まえて1本鎖になるよう切断した後、DNAの片方の鎖だけを菌の中に取り込みます。もうひとつの鎖は細胞表面で分解されているらしく、菌体中に入るのは1本鎖のDNAです。それを考えると、プラスミドは環状の2本鎖DNAなので、そんなものが枯草菌の細胞表面で捕まえられて切断されてしまったら菌の中でプラスミドがもとの形に戻るといことはあまり期待できません。実際、大腸菌のようなプラスミドの形質転換は非常に難しかったですね。

ところが、枯草菌でプラスミドの形質転換ができないというわけではなくて、1回取り込んだ1本鎖のDNAをまた元の環状プラスミドに再生するような配列があれば簡単に形質転換ができます。その配列のことを我々はタンデムリピートと言っているのですが、あるプラスミドのユニットが全く同じ方向に複数連結した直線状のDNAがあると、これはどこかで細胞表面から菌体の中に取り込まれていくのですが、そのときに1本鎖で入っていったプラスミドが1個以上入ると、切断された部分をリカバーするような情報をもったDNAというのが入っていきます。詳しいメカニズムはわかりませんが、切断箇所をリカバーするような情報を利用してその部分を直すことを枯草菌はしていて、それを利用してプラスミドを菌体の中で再生してしまう、ということができるといえます。一見不思議なのですが、こういう形でプラスミドの形質転換ができることは昔から分かっていた。

要するに・・・大腸菌で複数の断片からなるプラスミドを作るとは極めて困難なのですが、枯草菌の形質転換ではDNAが切断されることが大前提なので、環状DNAを作る必要がありません。線状になっていればよくて、かつ繰り返しがあればどこで切断されるか分からないランダムな切断なんですけれども、それをリカバーするためには1個分以上入れればよいと。その部分を利用すると、複数の断片からなるプラスミドを簡単に再生できるわけです。こうして、遺伝子集積が可能になることを発見してこれを使おうとしたのですが、技術的な部分でひとつだけ問題があります。大体おわかりいただけるのですが、DNA断片のモル数がすべて同じ比率である必要があります。たとえば、あるベクターだけがあるものに対して2倍多いとすると、両端がベクターで止まってしまってその先の連結が続きません。それでも多分集積はできると思いますが、DNA断片の濃度がバラバラだときれいなタンデムリピートはできません。このDNAの濃度を合わせるところが技術的には

難しいです。断片の数が多くなるほど高い効率を出すのが難しいのですが、DNAの濃度を正確に量る測定方法である程度解決できるということが分かってきました。

完全なプラスミドを切断して断片比を揃える・・・逆転の発想で成功。

DNAの濃度をコントロールするときに、最初は電気泳動で写真をとって濃度を調べていたのですが、その後蛍光物質による正確な定量を行うようになってはじめて、先ほど説明したような13断片もの接続が可能になってきました。一回集積して完成したプラスミドは突出を作るために制限酵素を利用してつくっているので、人工的な制限酵素サイトが残っています。よって、同じ制限酵素で切断するともとのDNA断片に戻りますが、それを再度集積に用いるわけです。最初につくったのは人工的に調整した断片なので幾らかモル比にズレがあるのですが、2回目には一度完成したプラスミドを切断して得られた断片なのでモル比がきれいに1になります。それをもう一度連結し形質転換すると、自分が一生懸命濃度比をあわせた物よりも100倍とか1000倍のオーダーで形質転換頻度が高くなるということがわかっています。そこから、濃度を綺麗にあわせることがこの方法において非常に重要である、ということが分かります。

—非常にスマートな方法ですね。

僕もそう思います(笑)非常に簡単な原理ですが、これを実際にやってみたところがすごい。そして思った通り非常にうまくいったということですね。この方法の特徴をもう少しだけ宣伝させていただきますと、これは最近論文にしたものなのですが、0.6kbしかない小さな遺伝子断片と、1.0kbくらいの遺伝子断片、そして38kbある大きな遺伝子断片を用意しました。大きな断片と小さな断片の長さの比は64倍くらいと、非常に大きな違いがあります。これらの断片と10数kbあるプラスミドの断片を集積したところ、

大きな遺伝子に対して小さな遺伝子が同じ向きかどうかなど、さまざまな向きの物をつくることに成功しました(K. Tsuge et al., 2007, Journal of Biotechnology)。この方法では遺伝子の長さに関係なくプラスミドを構築できるというメリットがあります。大腸菌のプラスミドは環状にする必要がありますが、おしりと頭が空間的に出会う可能性が極めて低くなるため、長くなればなるほど環状化が難しくなります。枯草菌で連結をする場合は、長さ自体は関係なくいくらでも伸びます。この違いによって、集積の効率が極端に違ってきます。これは基本的には大腸菌では無理な方法で、枯草菌を使ってはじめてできる点で我々が優位に立っているとと言えます。

—強く影響を受けた人や、出来事はありますか。

大学院は東京工業大学の試験科学研究所というところで、現

在の化学農薬（化学的に合成された農薬）に比べて環境に優しいと考えられる微生物農薬というものの研究開発を行っていました。具体的にはコンポスト、要するに堆肥です。ある堆肥にいる微生物が抗生物質を出して病原菌の作用を抑えている、という事実が当時分かってきたところで、僕はその抗生物質の遺伝子の研究で博士号をとりました。その抗生物質の遺伝子はサイズが40kbもある極めて長いものですが、非常に大きな遺伝子を取り扱う技術が当時はまだなく、大きな遺伝子を自由に加工する技術が必要だと感じていました。その後、今の三菱化学生命科学研究所で、大きな遺伝子を取り扱うための技術を習得したいということで板谷さんのところに入ったという経緯があります。なので、枯草菌をずっと扱っていましたが、大きなDNAもずっと扱ってました。あまり研究の断絶はなくここまで来ているというような状況です。

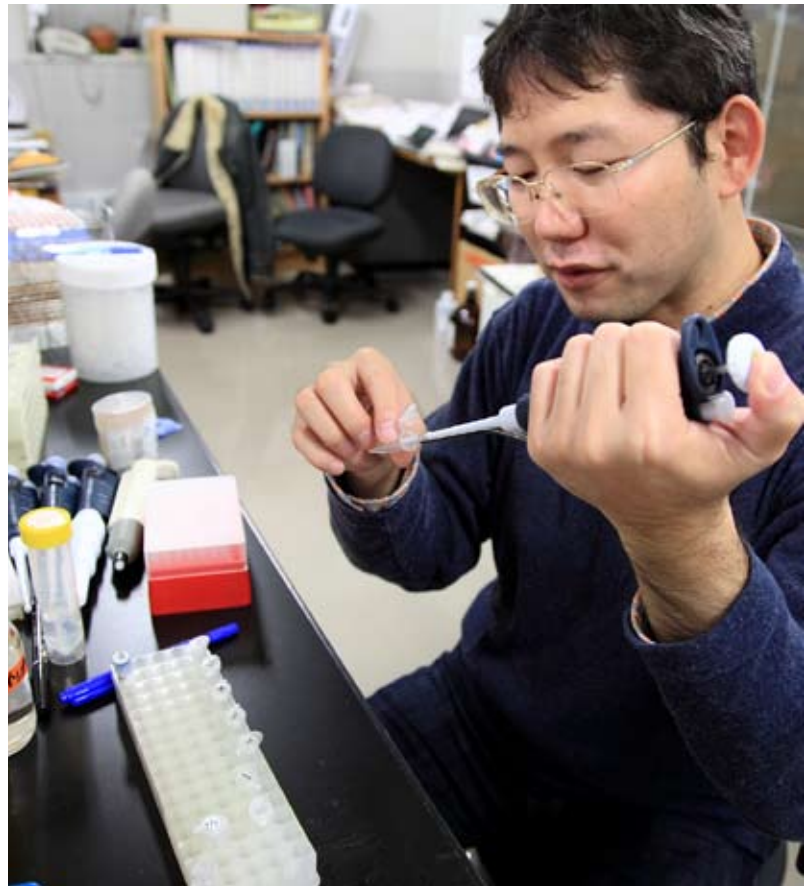
—一番最初に手がけた研究は何ですか。

学部時代は埼玉大学の伏見譲先生という方の研究室にいました。伏見譲先生はものすごく有名な先生で、レーザーと蛍光物質を利用してシーケンシングを自動化する機械の基本的な原理を考案した人です。残念ながら特許は取れなくて、のちのち大きな損失であったことが明らかになるわけですが・・・

そこでは進化分子工学をやっている、人工的に進化が起こせるんじゃないかっていう、そういうものを検証するための実験系をやっていました。大腸菌の*lacZ*遺伝子をできるだけ大量に発現させるようプロモーターに変異を加え、*lacZ*の発現量をモニターするための蛍光物質を取り込ませます。細胞の中でその蛍光物質をいっぱい出させてセルソーターという機械にかけると蛍光強度をモニターすることができるので、*lacZ*発現量の高いものを細胞一個のレベルで分離できます。そうしてとってきた優良な株のプロモーターに対してさらに変異をかけて、同じ操作を繰り返していくと、人工的な進化が検証できるわけです。蛍光物質をどのように大腸菌に取り込ませるか、いったん取り込ませた蛍光物質が酵素の活性によって蛍光を持つようになった後、大腸菌から漏れないようにするにはどうしたら良いかという研究をしていました。そういうところからも人工的な進化に関する興味があって、今でも関心として持っています。

—欠かせない日課はありますか。

最近、鶴岡に来てからはよく釣りをするようになりました。その行為自体は暇なところもありますが、自然の中に入ってゆっくりと今までの研究を振り返るよい時間になっているのではないかと思います。鶴岡という自然環境にいるからこそ、可



能だということですね。非常に優れたアイデアが思いついたというわけではありませんが。

—「封神演義」の太公望みたいな感じですね(笑)

そうですね、常に大物を狙っていきたいということで(笑)そういう研究方針でやっています。

—それでは最後に、将来の展望をお聞かせください。

ゲノムシーケンスというのが非常に行われてきて、遺伝子の種類や配列はやたらとたくさん手に入れることができました。しかしながら、そのままでは単にテキストの情報にしかすぎなくて、それを有効活用した例はほとんどありません。自分たちはそれらの情報を実物に変換するための橋渡しができたらいいなあ、と思います。

一つの遺伝子を連結していくことで、モノをたくさん作るようなシステムを構築したいと思っています。たとえばバイオエタノール等の燃料の問題や、あるいは二酸化炭素排出の問題がありますが、そういうものをクリアできるような基礎技術開発の一端を担えたらいいなと。ゆくゆくはそれをさらに発展させて、完全に自分の思いどおりにゲノムをデザインできる状況が実現できたらいいなと考えています。

—本日はどうもありがとうございました。

(2007年11月10日 インタビューア：小川雪乃 編集：西野泰子 写真：増田豪)



教授

曾我朋義

Prof. Tomoyoshi Soga

専門：メタボロミクス・分析化学

こだわりが生む楽しみ。全代謝物質一斉測定法を携え、飽くなき知識の探求へ。

—現在はどうのような研究テーマに取り組まれているのでしょうか。

細胞内にある全代謝物質を総称して、メタボロームと呼びます。ひとつの細胞内に含まれる代謝物質は、微生物で数百種類、哺乳動物で数千種類、植物で数万種類あることが知られていますが、これだけの数の代謝物質を一斉に測定できる分析法は開発されていませんでした。

DNAはATGCのわずか4種類、プロテオームの場合でもアミノ酸20個で構成されており、性質も近い物質です。しかし、代謝物質はそれぞれの物理化学的性質が非常に似通ったものから全く異なるものまでであるため、これらを一度に測定することが難しかったのです。

最初に慶大先端生命研（IAB）の富田所長にお会いしたときに、「E-Cellによる全細胞シミュレーションを可能にするために、どうしても実際の細胞内の個々の代謝物を定量したい」と熱く語られました。これが、キャピラリー電気泳動—質量分析計（CE-MS）によるメタボローム測定法開発のきっかけでした。

私は大学時代は慶大工学部の有機化学の研究所で抗生物質の合成を行っていました。その後横河電機に入社し、分析機器の応用開発に取り組んでいました。IABに入る前は、キャピラリー電気泳動装置（CE）に、質量分析計（MS）を組み合わせたCE-MS法を研究開発していました。将来はこの分析法が世の中を変えると確信していました。CE-MS法はイオン性物質であれば何でも測定できるという可能性を秘めていたからです。IABに着任してから細胞に存在する代謝物質を調べたところ、驚いたことにほとんどがイオン性物質でした。そして、CE-MSしかないと感じました。これまで蓄積してきた知識と経験を生かして着任一年でキャピラリー電気泳動質量分析計（CE-MS）によるメタボローム測定法を世界で初めて開発し、微生物の細胞内から二千種類弱の代謝物質を一斉に測定することができました。

現在IABにはCE-MS装置が30台以上あり、このメタボローム解析技術を軸に現在までに大学や研究機関と100件以上の共同研究を行っています。特に力を入れているのは、慶應の医学部、国立がんセンターや東大の医学部などと共同で行っているバイオマーカーの探索等の医薬分野の研究です。バイオマーカーとは生体や組織の異常を示す物質のことで、例えば糖尿病の診断に使われている血糖値があります。現在バイオマーカーは世界中の製薬会社が血眼になって探しています。これまで遺伝子やタンパク質などの高分子のバイオマーカーの探索が行われてきましたが、なかなか新しいものが発見されていません。そこで、私たちはメタボローム解析技術を用いて低分子バイオマーカーを見つけ出そうとしています。

多様な分野で活躍するメタボローム解析

慶應の医学部と共同で行った研究で、市販の解熱鎮痛剤の大量摂取によって引き起こされる急性肝炎のバイオマーカーを発見しました。また、国立がんセンターとの共同研究では各種のがん患者のがん組織と正常組織を送っていただきメタボローム測定を行っています。あるがん組織に特異に多く存在する物質を見つけ、それが血液でも有意に増加していれば新規のバイオマーカーになります。近い将来、血液を測るだけで「あなたは大腸がんになる可能性があります」と簡単に診断される日が来るかもしれません。またアルツハイマー病の早期診断も可能になるかもしれません。

一方、特定の疾患のバイオマーカーを発見すれば、疾患バイオマーカーの変動を薬物投与後に見ることで薬効を測定することができます。また毒性のバイオマーカーも有用です。薬物を投与した時に毒性バイオマーカーが増加すれば、その薬は毒性が高いということがわかる。このように、バイオマーカーは創薬の開発に大変有用です。

今まで述べてきたことなどが私たちのグループが行っている

医療や医薬に関する研究ですが、それ以外にメタボローム解析を環境分野にも応用しています。伊藤君（伊藤卓郎研究員）が話したと思いますが、窒素源がなくなると二酸化酸素を取り込んで軽油を作り出す緑藻類がいます。まず、その緑藻が何で軽油を作り出すのかというメカニズムを解明する。さらに、その緑藻をもっと早く培養させることや、あるいはもっと効率よく軽油をつくらせる方法を追求していけば、安く迅速に、かつ大量に二酸化炭素から軽油を産生することも夢ではありません。これは現在直面している地球温暖化と石油資源枯渇の両方の問題を解決する画期的な方法論かもしれません。

オイル産出微生物以外では、植物プラスチックの原料開発にも取り組んでいます。

サトウキビからグルコースを取り出し、そのグルコースを原料にして大腸菌に高純度のD-乳酸とL-乳酸を生産させます。D-乳酸とL-乳酸を重合させるとポリ乳酸プラスチックができますが、これが今注目されています。何が良いかというと、そのプラスチックを焼却すると二酸化炭素が発生しますが、発生した二酸化炭素はサトウキビを育てるときに利用するため、排出された二酸化炭素の多くをリサイクルすることが可能です。ポリ乳酸プラスチックは石油を使用しないし、排出した二酸化炭素を再利用することができます。私たちは、メタボローム解析技術の測定結果を見ながら、ポリ乳酸プラスチックの原料を高純度に生産する大腸菌の開発を行っています。

さらに、メタボローム解析技術を食料や農作物の研究にも応用しています。稲の病気の中でも主要なものにイモチ病があります。しかし、同じ稲でもイモチ病菌に強い稲と弱い稲というのがあるそうです。私たちのグループでは、イモチ病に強い稲の開発研究を行っています。イモチ病に強い稲は、イモチ病菌が感染したときに対抗する抗菌性物質を多く産生している可能性が高く、抗菌性物質の代謝経路が増強されていることが予測されます。したがってメタボローム解析技術によって抗菌性物

質を産生する代謝経路を特定し、その代謝経路を増強することができれば、イモチ病に強い品種への改良が可能になります。

一方、メタボローム解析を様々な基礎研究にも応用しています。例えば、これまで不明だったトランスポーター（組織に存在する低分子物質を輸送するタンパク質）の機能解明にメタボローム解析が大変な威力を発揮することが分かってきました。野生型マウスと機能未知のトランスポーターの遺伝子がノックアウトされたマウスを準備し、それぞれのマウスの各臓器・血液・尿などに存在する低分子物質を片っ端から測定します。

トランスポーターは特異的にある物質を細胞内外へ輸送します。したがって、野生型とノックアウトマウスのメタボローム測定結果を比較し、ノックアウトマウスにのみ、ある物質が特定の臓器にないことがわかれば、ノックアウトした遺伝子から発現したトランスポーターがどの臓器でどの物質の輸送に関与しているかを見つげだすことができます。これまで二つの大学と共同研究を行いました。両方ともトランスポーターの機能を一発で発見しています。

—研究のポリシーはなんでしょか？

最先端の代謝物質の一斉分析法を開発することができたので、いろんな分野の研究者にこの測定法を使っていただいて、成果をたくさん出して欲しい。その成果が世の中に役立てば大きな喜びです。

新たな知見を得たときの爽快感がたまらない。

—一番興味があることはなんでですか？

研究をしていて一番感動するときは、これまでわからなかったかかった問題が解決されたときです。分析装置の開発でもバイオマーカーの探索でも、予想もしなかった結果が得られる場合がある。その原因をあれこれ仮定し解決策を実験する。これを繰り返しているうち原因が判明し問題を解決することができる。この時自分の至らなさを思い知るとともに、新たな知見を得たことでたまらなく爽快感になる。この気分を味わうために研究を続けているようなものです。

でも、一度知ってしまったものには興味はなくなってしまう。だから今までの経験を振り返ると、その分析法をある程度理解してしまうともうそこには興味がない。

だから、これまで他の分析法の開発に移ってきました。しかし、CE-MS法に関しては、まだ解明できない現象がいくつかあります。

バイオの知識は全くなかったけれど、自



分の開発してきた分析技術が通じるか試したくて新たな研究分野に飛び込みました。いろいろな研究者と共同研究をしても向こうが何を言っているのか最初はさっぱりわからなかった。でも、何度も何度も聞いているうちに少しずつわかってくる。だからどの分野の研究も、取り掛かったら非常に面白いのではと思いますね。自分には到底太刀打ちできない分野も多いですけど。

—有機合成をされていたという事ですが、一番最初に手がけたのは？

抗生物質の全合成、大学4年生のときです。共同研究していた協和発酵がホーチミシンという抗生物質を開発していました。研究室の教授が、そのホーチミシンの構造から水酸基だけをはずした物質を合成したらもっと効くかもしれない、と考えて、それを学生が合成していた。どうやって合成するか経路や手順なんて、4年生には全くわからなかった。それは研究室の先輩達がちゃんと考えていて、すでに合成経路が確立されていたので、僕が4年当時にやったのはひたすら実験（労働）することだけ（笑）。

全部で36工程あって、最初の原料は大量に必要なので1番目の反応を1ヶ月位かけて何度も何度も行った。36工程というのは大変なことで、例えば1工程での収率が90%としても、全工程のトータル収率は0.9の36乗です。とんでもなく低い収率になるはずですよ。しかも、90%の収率で反応が進むことなんてほとんどなくて、もっと悪い。どこか1工程に50%とか、あるいは2カ所くらい50%とかが入ると、本当に少なくなってしまう。

問題にぶち当たって とことん考えるのが楽しい。

大学4年の時は月曜から土曜まで朝から夜中までずっと実験していましたね。となりは分析化学の研究室で、彼らは昼頃来て、のぞくとみんな楽しそうにケーキを食べながらお茶を飲んでいる。夕方になるとみんなで帰っていく。私の研究室は雰囲気もピリピリしていてみんなひたすら実験していた。今に見てるといっただけで働いていた。

工程が進むにつれて合成物はどんどん少なくなっていく。26行程目までいったら、ほんのひとつまみになっちゃって、12月中旬の27工程目ですぐに無くなっちゃった。本当に全部なくなっちゃった（笑）。それでぼ～ぜんとしちゃって。これまで1年間自分がやってきたのは何だったんだと。

その翌年に36行程、全部完成したと聞いた。合成された抗生物質はいろいろな細菌に加えて抗菌作用があるかどうかを確認します。その抗生物質は全く効きかなかったと聞いた。だから非常に非効率ですよ。あのおとき思ったのは、1年費やしても一つの物質が合成できなかった。その後40年研究して

も40個できるかどうか。自分が有機合成に全人生を費やしても、もしかするとひとつも当たらないかもと思って、有機合成はやめたんです。結構おもしろかったけれど。それで、企業に就職した。

—どういった企業に就職しようと思ったのですか？

研究職に就きたかったので、学部卒でも研究職に就けるといっところを探しました。ただ、学部卒で研究職に就ける化学系の会社っていうのはほとんどなかった。そうこうしている時に横河電機に就職した先輩が来て、「うちの会社なら学卒でも研究職に就けるよ」って言われました。ボーナスも12ヶ月、ということを知って、そんな会社は他に無いと思って入社した。そうしたら営業に配属になっちゃった（笑）。配属後6ヶ月たった頃とうとう我慢できなくなって、会社を辞めて大学院に再入学して修士を取得して研究職に就きたい、と上司に言ったら、1か月後に部署を変えてくれた。今思うとわがままな新入社員ですが、そのお陰で研究開発ができるようになった。そのときの上司には今でも感謝しています。

—人生を変えた出来事はありますか？

・うーん。いっちゃん変わったのはなんだろうねえ、失恋かなあやっぱり。20代後半に。暇だとよくよく考えて悲しくなるので、ひたすら実験していました。土日に新しい分析法の開発をしていたら論文が少しずつたまってきた。その頃、会社を訪れたある大学の先生に、こんなにたくさん論文を持っていればすぐにドクターがとれる、と言われて、それで博士論文を書きました。39歳の時です。博士を持つといろいろな研究機関に応募できるのでバイオの研究職に応募しようとしていたのですが、バイオの実務経験が無いととってこない所が多かったんです。その時、この研究所（IAB）が募集を出していて・・・、それから現在に至っています。

—人生で成し遂げたいことは？

この方法（代謝物質の一斉測定）によって大発見が生まれたら最高なんだけど。あとは、分野にこだわらず、おもしろそうな研究があればやってみたい。今は代謝を少しずつ理解しようとしています。代謝もわかってくると面白い。でも代謝を完全に理解するのはすべての時間を注いでも難しそう。今はまとまった時間がとれないため、実験は研究員や技術員の方をお願いしています。夢は、定年後自分の家の実験室をつくって、若い頃のように自分で実験して論文を書くことですね。単なる自己満足ですが。問題にぶち当たってとことん考えるのが楽しい。まあ、趣味の釣りが難しければ、海に通う日々になるかもしれないけれど。

—本日はどうもありがとうございました。

（2007年11月9日 インタビューア：小川雪乃 編集：西野泰子 写真：増田豪・荒川和晴）

NEWS HEADLINE 2009 Apr. - Sep.

第19回日経BP技術賞 医療・バイオ部門賞を受賞

慶應義塾大学先端生命科学研究所の板谷光泰教授、柘植謙爾講師らは、「巨大ゲノム再構築技術」にて第19回日経BP技術賞 医療・バイオ部門賞を受賞しました。(09.4.7) [<http://www.iab.keio.ac.jp/jp/content/view/346/1/>]

「メタボローム測定装置の発明」が平成21年度全国発明表彰発明協会会長賞を受賞

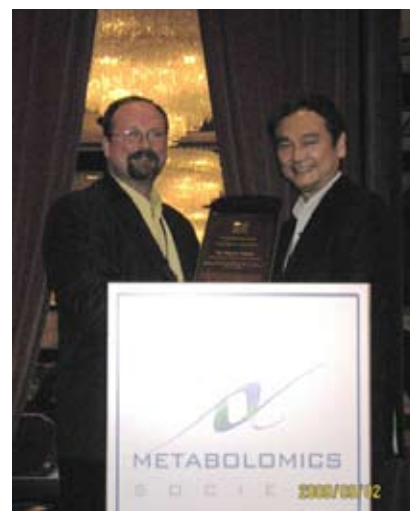
慶應義塾大学先端生命科学研究所の曾我朋義教授が「メタボローム測定装置の発明」(特許3341765号)により、平成21年度全国発明表彰 発明協会会長賞(主催:社団法人発明協会)を受賞しました。(09.5.15) [<http://www.iab.keio.ac.jp/jp/content/view/354/1/>]

「光る大学発ベンチャー20選」(経済産業省発表)に鶴岡市の慶大先端生命研究ベンチャー2社が選出される

経済産業省が先月発表した「平成20年度大学発ベンチャーに関する基礎調査報告書」の中で、「光る大学発ベンチャー20選」に、鶴岡市のバイオベンチャー企業である、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社(本社:山形県鶴岡市、菅野隆二社長)とスパイバー株式会社(本社:山形県鶴岡市、関山和秀社長)が共に選出されました。(09.6.25) [<http://www.iab.keio.ac.jp/jp/content/view/361/1/>]

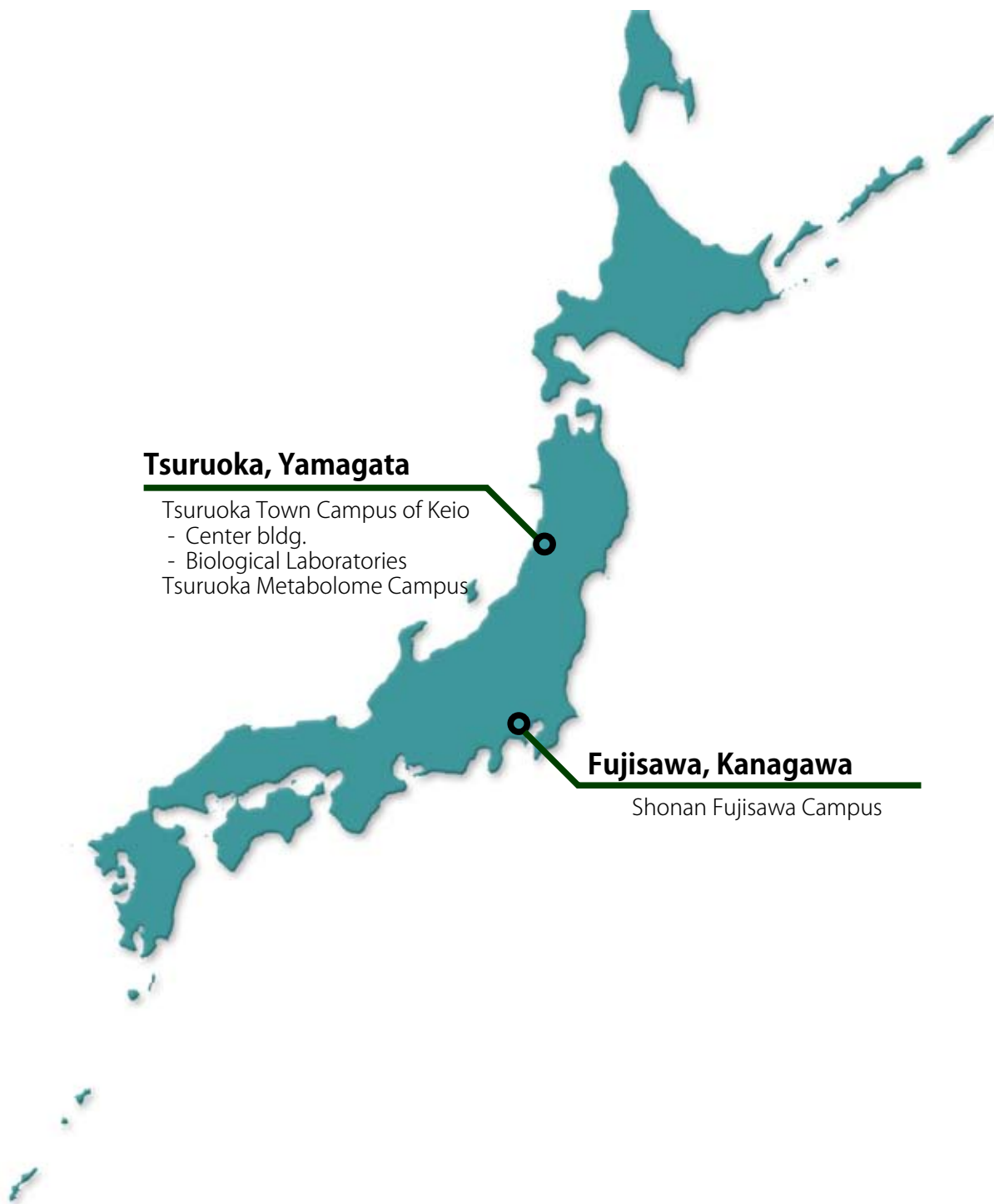
富田所長、国際メタボローム学会功労賞を受賞

慶應義塾大学先端生命科学研究所(山形県鶴岡市)の富田勝 所長は、8月30日-9月2日にカナダ・エドモントンにて開催された第5回国際メタボローム国際会議において、「国際メタボローム学会 功労賞」を受賞しました。(写真)(09.9.4) [<http://www.iab.keio.ac.jp/jp/content/view/365/1/>]



Latest Publications

- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M. and Yanagawa, H. (2009) Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J. Biol. Chem.*, **284**(1), 478-485.
- Tsuchiya, M., Selvarajoo, K., Piras, V., Tomita, M. and Giuliani, A. (2009) Local and Global responses in complex gene regulation networks. *Physica A*, **388**(8), 1738-1746.
- Shintani, T., Iwabuchi, T., Soga, T., Kato, Y., Yamamoto, T., Takano, N., Hishiki, T., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakurakawa, T., Ishikawa, K., Goda, N., Yitagawa, Y., Kajiyama, M., Matsumoto, K., Suematsu, M. (2009) Cystathionine β -synthase as a Carbon Monoxide-sensitive Regulator of Bile Excretion. *Hepatology*, **49**, 141-150.
- Kanai, A., Sato, A., Fukuda, Y., Okada, K., Matsuda, T., Sakamoto, T., Muto, Y., Yokoyama, S., Kawai, G. and Tomita, M. (2009) Characterization of a heat-stable enzyme possessing GTP-dependent RNA ligase activity from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *RNA*, **15**(3), 420-431.
- Yachie, N., Saito, R., Sugahara, J., Tomita, M. and Ishihama, Y. (2009) In silico analysis of phosphoproteome data suggests a rich-get-richer process of phosphosite accumulation over evolution. *Mol. Cell Proteomics*, **8**(5), 1061-1071.
- Selvarajoo, K., Tomita, M. and Tsuchiya, M. (2009) Can complex cellular processes be governed by simple linear rules? *J. Bioinform. Comput. Biol.*, **7**(1), 243-268.
- Fujishima, K., Sugahara, J., Kikuta, K., Hirano, R., Sato, A., Tomita, M. and Kanai, A. (2009) Tri-split tRNA is a transfer RNA made from 3 transcripts that provides insight into the evolution of fragmented tRNAs in archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**(8), 2683-2687.
- Tsuchiya, M., Piras, V., Choi, S., Akira, S., Tomita, M., Giuliani, A. and Selvarajoo, K. (2009) Emergent genome-wide control in wildtype and genetically mutated lipopolysaccharides-stimulated macrophages. *PLoS One*, **4**(3), e4905.
- Arakawa, K., Suzuki, H. and Tomita, M. (2009) Computational Genome Analysis Using The G-language System. *Genes, Genomes and Genomics*, **2**(1), 1-13.
- Arakawa, K., Tamaki, S., Kono, N., Kido, N., Ikegami, K., Ogawa, R. and Tomita, M. (2009) Genome Projector: zoomable genome map with multiple views. *BMC Bioinformatics*, **10**, 31.
- Saito, N., Robert, M., Koichi, H., Matsuo, G., Kakazu, Y., Soga, T. and Tomita, M. (2009) Metabolite profiling reveals YihU as a novel hydroxybutyrate dehydrogenase for alternative succinic semialdehyde metabolism in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **284**, 16442-16451.
- Iwasaki, M., Takeshi, M., Tomita, M., and Ishihama, Y. (2009) Chemical Cleavage-Assisted Tryptic Digestion for Membrane Proteome Analysis. *J. Proteome Res.*, **8**, 3169-3175.
- Ooga, T., Ohashi, Y., Kuramitsu, S., Koyama, Y., Tomita, M., Soga, T., Masui, R. (2009) Degradation of ppGpp by nudix pyrophosphatase modulates the transition of growth phase in the bacterium *thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.*, **284**(23) 15549-15556.
- Shintani, T., Iwabuchi, T., Soga, T., Kato, Y., Yamamoto, T., Takano, N., Hishiki, T., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakurakawa, T., Ishikawa, K., Goda, N., Yitagawa, Y., Kajiyama, M., Matsumoto, K., Suematsu, M. (2009) Cystathionine β -synthase as a Carbon Monoxide-sensitive Regulator of Bile Excretion. *Hepatology*, **49**, 141-150.
- Ravichandran, A., Sugiyama, N., Tomita, M., Swarup, S. and Ishihama, Y. (2009) Ser/Thr/Tyr phosphoproteome analysis of pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas* species. *Proteomics*, **9**(10), 2764-2775.



Tsuruoka, Yamagata

Tsuruoka Town Campus of Keio
- Center bldg.
- Biological Laboratories
Tsuruoka Metabolome Campus

Fujisawa, Kanagawa

Shonan Fujisawa Campus



Tsuruoka Town Campus of Keio (TTCK)
14-1 Babacho, Tsuruoka City
Yamagata Pref.
997-0035 JAPAN
Tel +81-235-29-0800 (Fax -0809)

Shonan Fujisawa Campus (SFC)
5322 Endo, Fujisawa City
Kanagawa Pref.
252-8520 JAPAN
Tel/Fax +81-466-47-5099