「ゲノムの構造と機能」
平成１０年度採択研究代表者

森　浩禎

（奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター　教授）

「大腸菌におけるゲノム機能の体系的解析」

１．研究実施の概要

１９９７年１月に大腸菌の全ゲノム配列の決定を終えた。そのゲノム配列を元に、全遺伝子による大腸菌の統合像の解明を目的とする研究である。そのために、１）ゲノム配列情報解析、２）ゲノムデータベース構築およびWWWによる情報公開、３）実験的機能解析を進めるものである。

１）ゲノム配列情報解析：全ゲノム配列決定が終了した微生物を利用した比較を中心に進めており、主としてａ）微生物の持つ多様性解析、ｂ）クラスター解析による遺伝子を構成する構造や機能の単位の抽出、ｃ）クラスター解析を元にした機能予測、ｄ）遺伝子相互作用解明に向けた開発を行っている。現在は２１種の微生物ゲノムからの情報解析を進めている。

２）ゲノムデータベース構築およびWWWによる情報公開：過去の解析結果等の情報およびこれからの情報を体系的にデータベース化することの重要性は、大腸菌の統合像解明に向けて必須のものである。これまでの変異株の情報を体系的に収集しデータベース化を行っている。また、ゲノム配列の解析より得られた情報をデータベース化し、現在WWWによる検索システムの開発を終え、すでに広く国内外を問わず公開を行っている。

３）実験的機能解析：配列情報解析より得られた情報を活用しながら、ａ）全遺伝子の機能解明、ｂ）全遺伝子のネットワーク解明に向けた網羅的遺伝子転写解析を大きな柱とした研究・開発を行っている。そのために、これまで全遺伝子のクローン化のためのベクター開発、個々の遺伝子の発現調節株など機能解明を目的とした種々のベクター開発、染色体上任

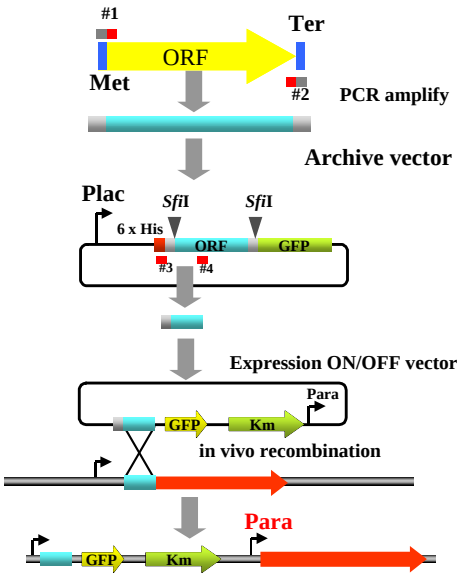

図１

意の領域における欠失株作成のためのベクターおよびシステム開発を中心に開発を進めてきた。現在、これらの開発は終了し、全遺伝子のクローン化を中心に進めている。すでに全遺伝子の１／４は終了し、平成１１年度中に完成の予定である。この完成により、ア）個々の遺伝子によりコードされているタンパク質の簡便な精製、イ）DNAチップ作成、ウ）発現調節株とDNAチップによる網羅的転写解析が可能となる。

２．研究実施内容

研究体制を大きく１）リソース開発グループ、２）情報解析グループ、３）データベース開発グループ、そして４）機能解析グループの４つに分割し、研究・開発を進めてきた。平成１０年度の研究・開発の中心は、リソース開発グループを中心において、ａ） 全遺伝子のクローン化と 機能未知 orf の発現調節株作製のシステム開発、ｂ）全必須遺伝子の同定と今後の機能解析を目的とした遺伝子破壊および欠失株作製システムの開発、ｃ）２次元電気泳動によるタンパク質のカタログ化を行う。もう一つの重点課題は大腸菌に関するデータベースの構築およびWWWによる公開である。過去の大腸菌研究から得られた遺伝子情報および全ゲノム配列解析より得られた解析結果をデータベースとして構築し、我々の研究に活用するのと同時に、広く公開を行う。

【リソース開発グループ】

全遺伝子のクローン化システムおよび発現調節株作製システムの開発：予測全遺伝子のクローン化（アーカイブ化）および発現調節株作製の手順を図１に示す。全遺伝子のクローン化を行う理由は１）DNA チップ作製、２）Ｈｉｓタグによる簡便なタンパク質精製、３）GFP による細胞内局在性解析、４）発現調節株作製を行うためのものである。

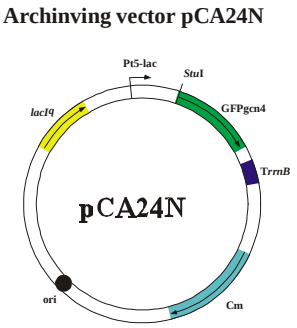

図２

アーカイブを目的としたベクターの構造を図２に示す。各遺伝子コード領域の２番目のコドンと最後のアミノ酸をコードするコドンまでを増幅できる合成オリゴDNAを作成する。この増幅断片を blunt end で *Stu*I サイトにクローン化することで、N末端に６×Ｈｉｓ、C末端に GFP が in frame に融合するように設計を行った。また、元の遺伝子のコード領域が *Sfi*I の制限酵素により切り出され、簡便に他の目的のベクターに移せるようにも設計を行っ

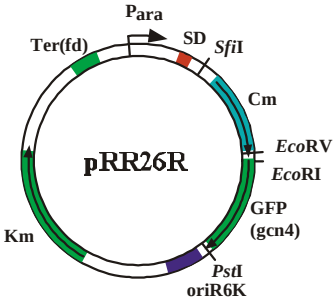

図３

ている。この融合遺伝子はＩＰＴＧによる誘導を受けるプロモーターの制御下にあり、*lacI*^{q}により厳密にその発現が抑えられている。ベクター自身はマルチコピーのプラスミドであるが、この発現制御により細胞内に他コピー存在すると致死に至る遺伝子群もクローン化可能となっていることは、いくつかの遺伝子により確認済みである。

発現調節株作製ベクターの構造を図３に示す。クローン化した遺伝子のＮ末端から適当な長さになるように合成オリゴ DNA を設計する。Ｎ末端側のベクター領域の合成オリゴ DNA と作製したコード領域上のプライマーを利用し DNA を増幅する。増幅断片をこのベクターの *Sfi*I-*Eco*RV サイトにクローン化し、得られたクローンを目的の大腸菌に形質転換することで、組換えにより発現調節株が得られる。このベクターは、Ｒ６Ｋプラスミドの複製起点を持ち、その複製には複製開始タンパク質を要求する。このタンパク質を trans に供給する大腸菌においてのみ複製することが可能となる。これを利用し、複製開始タンパク質を trans に供給する株でクローン化を行い、得られたクローンを野生型の株に形質転換し、薬剤耐性で選択を行うと、形質転換したプラスミドが染色体上の相同領域と組換えを起こして染色体上に挿入されたものが得られる。原理上、必ずベクターにクローン化した断片部分が染色体上で重複する。この断片が機能を持たないようにする為に、可能な限りクローン化を行う断片は短い方がよい。しかし、短くすると組換えの効率の低下が起こる。同時に発現を人工的に制御するために入れているアラビノースプロモーターの領域による相同組み換えが起こる確立が高くなり、目的のクローンを得る確立が減少する。そこで、増幅断片の適当な長さを決めるために、１２０ｂｐの倍数で６００ｂｐまでの長さの、各クローンの組換え体の得られる効率の検討を行った。その結果、２４０ｂｐでも十分な効率で組換え体を得ることができることが明らかになったので、Ｎ末より２４０ｂｐの長さで発現調節株作製を行うこととした。

<u>トランスポゾン挿入による網羅的破壊株作製</u>：Tn10 系統のトランスポゾンの改良を行い、挿入による完全破壊株を網羅的に作製を行うシステムの開発を行った。また、必須遺伝子における挿入変異株を得るために、λファージベクターによる小原クローンをミニＦ由来のベクターに移し、相補させることにより挿入変異を分離するシステムの開発も行っている。このシステムより、必須遺伝子等の遺伝学的解析を可能にするものである。トランスポゾンが挿入されたライブラリーの挿入位置の決定を行い。最終的に９５％以上の遺伝子における破壊株の作製を行う。

<u>網羅的欠失株作製システム開発</u>：生育に必須なトランスまたはシスに働く因子を全て同定し、最終的には増殖、細胞複製に必須な最小遺伝子セットを明らかにする事を目的とする。そのためにまず系統的、網羅的に欠失変異株を作製するシステムの開発を行った。そこで、過去の研究により、ある生育条件下で必須とされる遺伝子を文献から整理し、データベース化を行った。この結果より、染色体上約２００の領域につい

て欠失を起こさせる事で、全ゲノムを網羅できる事が明らかとなった。現在は、その領域を増幅させるオリゴ DNA の設計を終え、既に 50 領域について欠失の準備が整った。今後は順次、欠失を入れ、必須領域の同定を行う。最終的に欠失させることのできなかった領域の解析により生育に必須な遺伝子の同定を行う。

２次元電気泳動法によるタンパク質のカタログ化：RFHR 法と O'ffarel の系とによる 2 次元電気泳動のゲルパターン上での各 orf の同定とカタログ化を行う。この結果を WWW を通じて広く国内外の研究者と共有できる体制を整える。

【情報解析グループ】

遺伝子ネットワーク解明に向けた情報科学的解析技術の開発：既知の代謝反応やシグナル伝達に関与する遺伝子ネットワークをモデルとして，これをさらにゲノム上での遺伝子の位置関係および遺伝子相互の配列類似度で補強しつつ，実験データとモデルとをあてはめていく手法を開発する。特にマイクロアレイによる実験結果より遺伝子ネットワーク解明のための技術開発を行っており、網羅的転写解析の開始と同時に解析が行える基盤を整える。

コドンおよびアミノ酸部分配列利用による大腸菌遺伝子の発現量及び機能の推定：

１．遺伝子のコドン利用は，翻訳における tRNA と相互作用に基づいた性質が反映されており，この事実を利用して大腸菌遺伝子の細胞内の生産量を推定する。さらに蛋白質コード領域の推定に利用する。

２．大腸菌全遺伝子のコドン利用特性にもとづいた自己組織的方法による遺伝子の分類を行う。そのために，遺伝子のコドン利用をベクトルで表現し，このベクトルをもとに自己組織化的学習に従って代表となるコドン構造を推定し，コドン利用特性により遺伝子を体系的に分類し、包括的な遺伝子機能の推定に役立てる。現在、１７種による解析を終え、orf の機能分類との対応関係の解析を行っている。又、新たに決定された微生物ゲノムを含め、21 種による解析も進め出した。

【データベース開発グループ】

これまでに報告されている大腸菌の突然変異データ（対象遺伝子、遺伝子機能の詳細、突然変異の種類、突然変異による活性の変動、復帰変異の有無、サプレッサー変異の有無、など）について、文献や配列（野生型と各種の変異型の塩基ならびにアミノ酸配列データ）を網羅し、ゲノム構造データに関連させて利用できるデータベースに整える。それとともに、近縁のバクテリアの相同遺伝子と関連づけ、機能の面からも検索できるよう工夫する。それによって、大腸菌のゲノムデータを中心に、そこから遺伝子ならびに遺伝子群あるいは制御領域等について機能的に類縁を辿って行けるデータベースの構築を行う。ゲノム情報解析より得られた情報のデータベース化を

行い、変異データベースとともに、WWWによるシステム開発を行い、広く国内外を問わず情報公開を行う。特に本研究グループからの成果を多くの基礎生物学研究者及び大腸菌研究者と共有することで、研究の促進を図りたい。

【機能解析グループ】
リソースグループにより開発されたクローン等を用い、網羅的な機能解析を行うシステム構築を行うものである。現在、個々の機能カテゴリーにおいて９６穴のマイクロタイタープレートや固形培地を用いた簡便な機能解析方法のシステム開発をおこなっている。

３．主な研究成果の発表（論文発表）
無し