

「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

研究のねらい：ヒトゲノムの決定終了が間近に迫っている現在においても、機能未知遺伝子群の機能解明、遺伝子ネットワーク解明、病原性および有用微生物の有効利用等において大腸菌研究の重要性は明らかである。このような現状を踏まえ、ゲノム生物学からの大腸菌研究を推進することで一生物としての大腸菌の完全理解を目標とし、今後のゲノム生物学の基礎を築こうというものである。

これまでの研究の概要：大腸菌の生命活動の全体像を捉えるために、1) 大腸菌ゲノム配列解析より明らかになった配列情報の解析および整理とデータベース化、2) 網羅的な機能解析のためのORFクローンや、破壊株、欠失株などの研究材料の構築、3) 構築された材料による網羅的機能解析、4) トランスクリプトームおよびプロテオーム解析を行った。

成果：上記研究開発の結果、以下の成果を得ている。

1) 研究材料の作製

- (ア) 全予測遺伝子のクローン化の完成とそれを利用したDNAチップの完成
- (イ) 全遺伝子の破壊株作製に必要なランダムなクローン約12万クロンの完成と配列決定による約1000遺伝子の破壊の確認
- (ウ) 必須遺伝子と考えられてきた領域以外の約150箇所の領域の欠失から新規必須遺伝子の候補の確認
- (エ) 質量分析計を利用したRHFRタンパク質二次元電気泳動法によるgene-protein indexを共同研究での同定も含めて約300スポットの同定

2) バイオインフォマティクス

- (ア) 多変量解析を用いた遺伝子ネットワーク解析技術の開発
- (イ) 代謝パスウェイの荒印面と技術の開発
- (ウ) 多変量解析を利用した遺伝子の分類
- (エ) クラスタ解析による遺伝子の分類

3) データベース

- (ア) ホームページの改良及び拡張(検索システム及びコンテンツ)

4) 網羅的機能解析

- (ア) ORFクローンを用いた網羅的RNA結合タンパク質探索の系の確立
- (イ) 破壊株あるいは欠失株を利用した網羅的発現解析システムの確立
- (ウ) 機能未解析遺伝子の機能解析
- (エ) クローンを用いたタンパク質精製の系の確立

今後の見通し：全遺伝子のクローン化の完成により、そのクローンを利用した新たな解析システムの構築が可能となった。特にHisタグを付加しているため、簡便に精製が可能である。このことはタンパク質チップの作製、抗生物質のスクリーニング、高次構造の解析など、その利用の可能性は非常に高い。このシステムはSfiI制限酵素により簡便に遺伝子領域を移し変えることが可能なため、各目的にあったクローンの作製が簡便に行えるようになった。次年度はHisタグのGSTへの変更とGFPを取り除くことを行う。

DNAチップの完成により、網羅的な転写解析が可能となり、今後はクラスター解析の結果を利用しながら転写因子等による発現調節の全体像の解明が短期間の間に可能と考えられる。破壊株、欠失株を利用し、遺伝子ネットワーク解明へ向けた解析が可能であるし、すでに開始した。破壊株は機能探索に利用するだけでなく、遺伝子ネットワーク解明のための材料としても重要なものである。

ホームページの改良により、これまでの全システムの見直しを行うことができ、今後の拡張に容易に対応できるようになった。今後は網羅的実験結果を含めて、データベースのコンテンツの充実を図る。

2. 研究実施内容

目的：本年度の研究開発は a) DNAチップ作製、目的遺伝子のタンパク質精製、個々の遺伝子研究を目的に全予測遺伝子のクローン化、 b) 各遺伝子の機能解析および必須遺伝子の同定を目的とする網羅的破壊株と欠失変異株の作製を行い、システムティック機能解析に向けた研究材料の作製を行う。次いで、大腸菌ゲノムデータベースの拡張とシステムの改良を行う。さらにデータベースにDNAチップによる解析結果などの実験情報のデータベース化及び変異データベース（文献情報を基とする）の整備を行う。

方法と結果：研究開発を大きく4つ、材料、情報解析、データベースそして網羅的機能解析、に分けて進めているが、今年度は材料開発の完成とそれを基とした機能解析方法の確立を中心に進めた。材料開発は a) 全遺伝子のクローン化とDNAチップの作製、 b) トランスポゾンを用いた網羅的破壊株の作製、 c) 非必須領域の欠失株作製、 d) 質量分析計を用いた網羅的タンパク質インデックスの作成を進めた。以下にそれぞれの研究開発の方法と結果を示す。

1) 材料開発

(ア) 全遺伝子のクローン化およびDNAチップ作製

1999年4月より開始した大腸菌全予測ORFのクローン化は、同年12月に完成した。宝酒造株式会社と共同で本クローンを利用した大腸菌DNAチップの作製を行い、評価を含めて網羅的転写解析を開始した。現在では大腸菌全遺伝子を打ったDNAチップを完成させ、現在は宝酒造株式会社より市販されている。DNAチップによる解析は機能解析の項で解説する。

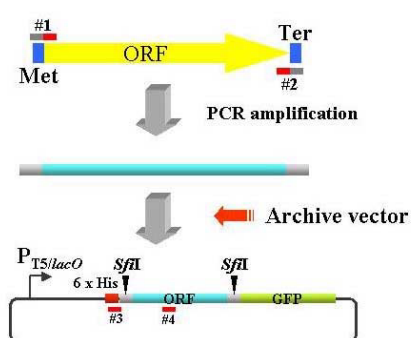


図1 ORFのクローン化とベクター

(イ) トランスポゾン挿入による網羅的破壊株作製

破壊株の構築は、第一段階として、トランスポゾン挿入変異株（シス部分2倍体）を各小原クローンあたり192株（あるいは384株、場合によっては572株）作製し、これらから得たファージ液を鋳型として

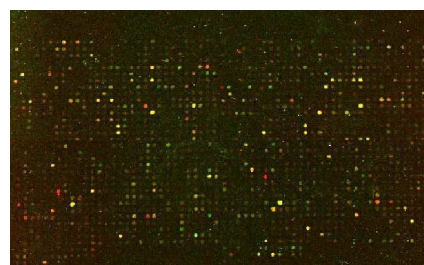


図2 DNAチップ

Long PCRを行い、次いで得られたDNAを用いて、トランスポゾン内部から染色体に向かって塩基配列を決定し、境界領域の塩基配列から破壊された遺伝子を同定した。第二段階として、それぞれの遺伝子の破壊株の中から、順方向、逆方向にトランスポゾンが挿入された変異株をそれぞれ1株ずつ選び、純化後、保存した。ついで、保存株からファージ液を作製し、境界領域の塩基配列を決定して、破壊された遺伝子の確認を行うと共に、保存株の高温でのコロニー形成能を定量的に測定することにより必須遺伝子か、否かの判定を行った。第一段階は純化していないトランスポゾン挿入変異株（形質導入体コロニー）をそのまま用いて行ったため、第二段階を行うことは必須である。また、必須遺伝子、非必須遺伝子の判定も純化後の菌株を用いて定量的に行うことが必要である。Long PCRは、宝酒造のPCRキットLaTaqとパーキンエルマー社のサーマルサイクラー9700を用い、鋳型としてはファージ粒子をそのまま用いて行った。PCRの条件は、Mg⁺⁺濃度、酵素濃度、各サイクルの温度条件などを変える事により検討した。

(ウ) 質量分析計によるタンパク質インデックス作製

大腸菌ゲノムの塩基配列から予測されるORFは約4300であるが、機能が分かっているものはそのうちの約50%である。私達はプロテオーム解析によ

り、残りの未知機能蛋白質の解明と大腸菌総ORFの機能分類、ネットワーク網の作成をめざしている。その基盤となるORFと発現蛋白質のN末残基の確認及び二次元電気泳動パターンの遺伝子-蛋白質インデックスの作成を行っている。私達がプロテオーム解析の方法として用いたのはラジカルフリー高還元性二次元アクリルアミドゲル電気泳動(RFHR)法である。1昨年5月からスタートし、現在までにプロテインシーケンサー及びMALDI-TOFMSで対数期で比較的多く発現されている蛋白質を約160個同定した。我々のプロテオーム解析のstrategyは大腸菌の粗抽出液をそれぞれCD(膜画分)、PRS(可溶性画分)、CR(リボソーム画分)に分画し、各分画の泳動サンプルを酢酸法によって調整し、RFHR二次元電気泳動を行い、泳動後、各スポットの蛋白質を、比較的高濃度の蛋白質スポットに関しては、PVDF膜に転写後、Peptide Sequencerにより同定し、微量蛋白質及びPVDF膜に転写出来ないものに関してはスポットのゲルを切り出しMALDI-TOFMSにより同定し、カタログ化を行った。また、機能解析の一環として破壊株等における細胞内発現タンパク質の同定と定量を行ってきた。一例として、DNAチップを用いたトランスクリプトーム解析の結果と比較することで、網羅的発現解析への基盤の確立を行った。導入したMALDI・TOFMSの需要は増大し、発現解析への期待の大きさが感じられる。実際、共同研究として京都大学ウイルス研究所、京都大学医学部、名古屋大学理学部、千葉大学薬学部、山口大学農学部、奈良先端大などとの共同研究が進行中である。

また、奈良先端の情報解析グループとの共同でホームページ作成を進めており、今後、相互に提携リンクしながら、新しいデータを定期的に更新していく予定である。Index作りにしぼった迅速な方法論も考えている。

(エ) システムティック欠失株作製

必須遺伝子、非必須遺伝子の同定、機能解析に有用な染色体欠失株を系統的、網羅的に作製する。最終的には染色体の全領域をカバーする欠失株のシリーズを作製することを目指す。

合計159株の欠失株作製を試み、73株が作製できた。(第一段階終了) 作製できなかった欠失株86個について、その領域内の一部を持つプラスミドで相補させた状態での欠失株の作製を進めた結果、さらに35株の欠失株を作製することができた。

2) 情報解析

- (ア) ゲノム配列解析システムと遺伝子ネットワーク解析のためのシステム開発
本研究では、遺伝子ネットワークの解明を支援するために、大腸菌の遺伝子について、代謝反応パスウェイのアライメントおよび必須遺伝子との対応

付け、主成分分析による遺伝子発現データの解析方法の開発を行った。これらは、現在、各所で行われつつある遺伝子ネットワーク解明のための基盤技術を提供するものと考えられる。

代謝反応パスウェイのアライメントアルゴリズム

大腸菌の代謝反応パスウェイは糖代謝などの基本的なパスウェイでも多数の分岐を伴う複雑なものとなっている。これらのパスウェイを異なる生物種間や、異なる代謝反応で比較・分析することは、進化の過程で生物がどのようにそのパスウェイを獲得したか、さらには、ある化合物を合成する方法についての知見を得る上で重要な情報であると考えられる。本研究では、反応の類似性に基づくパスウェイの比較分析手法の一つとして複数のパスウェイのアライメントを考えた。パスウェイの比較では、酵素のアミノ酸配列における類似性を用いることが多いが、酵素の機能すなわちEC番号が同じでも配列が全く異なる場合、つまり相同ではなく相似な(analogous)酵素があることが知られており、配列類似性に基づく比較は必ずしも適切ではないと考えられる。そこで、本研究では、酵素の持つ機能階層(EC番号)を利用することにより、階層構造をもつ記号に対して拡張されたアライメントアルゴリズムを開発した。具体的には、複数のパスウェイ間で相互にEC番号が類似した部分パスウェイをアライメントにより抽出する。このアライメントは、パスウェイの集合から反応の類似した部分的なパスウェイを抽出していると考えられる。さらに、このようにして得られた類似部分パスウェイ中の酵素をコードしている遺伝子を調べると、必須遺伝子と対応が見られることがわかった。例えば、下図はfatty acid elongationのパスウェイ(上段)とanaerobic respirationのパスウェイ(下段)をアライメントすることにより得られた、相互に類似した部分パスウェイであるが、上段のパスウェイではfabFを除いてすべて必須遺伝子である(必須遺伝子には遺伝子名の前に*を付けている)。この考察については今後の課題であるが、必須遺伝子からなるパスウェイを祖先型としてもう一方のパスウェイが分化した可能性も考えられる。

主成分分析による遺伝子発現データの解析

DNAマイクロアレイから大量に得られる遺伝子発現データを、主成分分析により解析する手法を開発した。現在、多数の条件(例えば、ある遺伝子を破壊したり、測定時期を変えたりするなど)で全遺伝子の発現量が得られるようになってきているが、各条件で個別に遺伝子の発現量を比較するのではなく、複数の条件での発現量の組合せを比較したいとき(例えば、任意の2つの条件で特異的な発現量を示す遺伝子の集合を求めるなど)で

は、条件の数が増えてくると調べなければならない組合せの数が急激に増大する恐れがある。そこで、各遺伝子を各条件ごとの発現量の組からなる多次元ベクトルと捉え、それらを原点を通る任意の直線に射影したときに、分散が最大となるような直線を求める。これが第1主成分となり、以下、これに直行する軸の中で2番目、3番目、...という形で分散の降順に第2主成分、第3主成分、...と求めていく。これにより、遺伝子の発現量全体で見たときに最も特徴のある軸を見つけることができる。

代謝物 1	酵素 1	代謝物 2	酵素 2	代謝物 3	酵素 3	代謝物 4	酵素 4	代謝物 5	酵素 5	代謝物 6
acy1-ACP	*fabB, fabF (2.3.1.41)					β -ketoacyl-ACP	*fabG (1.1.1.100)	D-3-hydroxyacyl-ACP	*fabA *fabZ (4.2.1.60)	trans-enoyl-acyl-ACP
formate	tdc (2.3.1.54)	pyruvate	pykA, pykF (2.7.1.40)	phospho-enol-pyruvate	ppc (4.1.1.31)	oxaloacetic acid	mdh (1.1.1.37)	malate	fumA, fumB, fumC (4.2.1.2)	fumarate

(イ) コドン組成を利用した遺伝子の分類

類義語コドンの選択は、合成される蛋白質の構造に影響を及ぼさないにもかかわらず、種固有のコドン利用特性が存在することが知られている。自己組織的にコドン使用により遺伝子を分類し種固有のコドン使用特性を把握することを試みた。競合学習型ニューラルネットワークとして知られているコホネンの自己組織化マップ法 (Self-Organizing Map : 以下 SOM とする) では、データの入力順序により学習後作成されるマップが異なる。そこで入力順序に依存しない SOM 法 (Batch-Learning SOM : 以下 BLSOM とする) を開発し、この方法を用いて大腸菌及び全塩基配列が決定されている 16 種のバクテリアの遺伝子に対し、コドン利用特性に基づいた遺伝子の分類を行い、本方法の評価を行った。その結果、これまでの SOM 法と比較しての有効性を確認できた。

(ウ) クラスタ解析

これまで、アミノ酸配列による類似性を基としたクラスタ解析を行ってきた。17種の微生物ゲノムにコードされる ORF、約 38,000 個の全てについてクラスタ解析を行った。その結果、これらの ORF は 2,684 個のクラスタに分類でき、現在は各グループの中の詳細について整理解析を行っている。これらのクラスタにおいて、それぞれの種固有のクラスタも存在しており、584 個のクラスタが特定の微生物種の ORF からのみ構成されているクラスタであった。

このクラスタ解析とモチーフ解析などを組み合わせて、今後の機能解析へ

向けたORFの整理も行っており、たとえば、タンパク質分解酵素をコードしていると考えられる遺伝子は大腸菌では104個程度存在すると予測されている。他の機能のORFも同様に整理を行っている。これらの解析結果は大腸菌ゲノムデータベースホームページより公開を行う。

3) データベース

(ア) ホームページの開設とシステム開発

大腸菌ゲノム配列より予測されるORFを中心にゲノムデータベースの構築を行ってきた。データベースシステムとしてはリレーショナルデータベースシステムを採用し、管理を行っている。公開のシステムはUNIXワークステーション上にapacheを利用したホームページを構築し、データベースとの連携はHTML、Javaを中心としたCGIプログラムにより実現させた。今後は機能解析などの実験結果も含めて公開を行うためのシステム開発を行う。

(イ) 変異データベースの構築

大腸菌の遺伝学的研究に関する文献から始めて、大腸菌研究の文献を網羅し、検索できるデータベースを作成し公開する。そのために、"Escherichia coli and Salmonella typhimurium"のBerlyn et al.の引用論文(約5000報)から出発して、それぞれの文献をOCRでデジタル化し、タイトル、著者名、要約、引用論文を抽出してまとめる。その一方、公開のためのweb pagesならびに必要なCGI-programsを作成する。本年度は4,045報の文献をデジタル化し、データベースとして整備し、ホームページからの公開のためのシステム開発を行っている。

4) システムティック機能解析

(ア) タンパク質非コード領域に関するシステムティック解析

タンパク質をコードする遺伝子以外の領域のシステムティック機能解析を目的に進める。RNA関連遺伝子を中心に解析方法の確立を行うために、(1) RNA関連遺伝子の「数」と「位置」について、細胞機能全体からの意義を把握、(2)tRNAや機能未知な低分子RNAについて新しい機能の検索を行い、最終的には全細胞機能における役割の把握を目指す。

遺伝子間領域(inter genic region(IGR))における偽tRNA遺伝子やtmRNA様遺伝子の網羅的検索を行った。(i) tRNAの3'末端部分からGTTCアームまでの半分子を一つのtRNAモチーフとして、全IGRについて検索した。その結果、2種類の偽tRNA遺伝子、2種類(Arg, Thr)の半tRNA分子の配列を見出したが、発現は確認できていない。(ii)大腸菌ゲノムの全塩基配列からすべてのIGRを取りだし、大きいものから100個のIGRについて、「くりかえし構造」などの詳細な検索を行った。その結果、13個についてユニ-

クなrepeating配列が見出されたが、その機能は不明である。(iii)大腸菌ゲノム上のtRNA遺伝子の欠失、あるいは破壊を行った。これまでにLeu6、Ser2、Thr2、Leu1クラスターについて成功した。現在、Gly1、Arg4、Gln2、Pro1などのtRNA遺伝子について実験が進行中である。(iv)大腸菌ゲノム上のある遺伝子やIGRを欠失させる必要のため、全遺伝子のクローンと*cre/loxP*系を利用した方法の開発を行った。

さらに本年度は全tRNA遺伝子のクローン化を進めており、ほぼ終了している。このリソースを利用し、ORFクローンとともにタンパク質-RNA相互作用の解析を進める。

(イ) トランスクリプトーム解析

リソース開発の項で解説したように、我々のグループでは大腸菌のDNAチップ(DNAマイクロアレイ)を完成させた。このDNAチップを用いて、最終的には細胞内の遺伝子ネットワークの解明を行いたい。そのために、今年度は実験手法の確立、解析方法の確立、そしてデータマイニングの方法の確立を行った。

検討項目は1)RNA抽出法、2)Cy 3及びCy 5によるラベルの方法、3)DNAチップのスライドガラス上でのハイブリダイゼーション法の確立、4)データコレクション、5)データ解析方法の確立、そして6)データマイニングの方法の確立を行った。当初はバクテリア固有の問題であるmRNAの精製の問題にとりかかったが、total RNAを多量に使用することで解決を図ることができた。データコレクションの後のデータ解析の方法である。データの数が膨大であるために、標準化の作業など、統計的手法を取り入れ、極力自動化を計れるようシステム開発を行った。その結果、現在ではデータコレクションの後の処理はほぼ自動処理が可能になり、我々研究者はデータの解釈に集中できる環境ができたと考えている。データの解釈のためのツール開発であるが、我々はまず、代謝パスウェイのデータベースを利用し、パスウェイを中心に解釈できるシステムの開発を行った。データ解析の結果は、代謝パスウェイの上に、それぞれの酵素をコードする遺伝子の発現パターンの変化を即時に表示可能した。その結果、生理学的な解釈が可能となっている。

(ウ) 大腸菌コロニー内の細胞間相互作用関連遺伝子の探索

大腸菌ゲノムプロジェクトではトランポゾンによる系統的な遺伝子破壊株の作製が進んでおり、この破壊株を用いた網羅的な機能解析が行われる予定である。しかしながら大腸菌遺伝子の多くは配列情報からだけでは機能推定不可能な遺伝子が多数有り、従来の観点からでは捉えることが出来無い機能

を持った遺伝子が多く含まれると考えられる。コロニーは均一な遺伝子構成を持つ大腸菌の集合体であるが、コロニー内では場所によって環境が異なり、発現している遺伝子構成や発現量に違いが見られるはずである。また、コロニーは個々の大腸菌が協調して細胞分裂を起こしていると考えられる。これらを踏まえるとコロニーを細胞性粘菌の様な多細胞体として捉えることが可能ではないだろうか。細胞性粘菌は周りの環境に応じて単細胞と多細胞のステージを切り替え、しかも多細胞時では機能分化し、単細胞生物と多細胞生物の両方の特徴を持っている。これには細胞間相互作用が必須であり、細胞性粘菌は細胞間相互作用のモデルとして注目を浴びている。大腸菌遺伝子機能解析において、大腸菌のコロニーを多細胞体として捉え、コロニー内でも同様に細胞間相互作用が行われていると推測し、これに関わる遺伝子の探索を計画した。本年度は、コロニー内細胞間相互作用関連遺伝子の探索法の確立を目的として、パイロット実験を行った。方法としては、コロニー内の遺伝子発現をレポーターを介して解析し、その発現パターンをコロニー形成過程で継時的に調査する。

遺伝子の発現パターンの解析方法は奈良先端大の北川により作製された遺伝子破壊用ベクターを用いた。本ベクターの特徴は染色体上の標的遺伝子/ORFのプロモーター下にレポーター遺伝子（GFPかLacZ）を組み込み、同時にその遺伝子をアラビノース誘導プロモーター支配下におくことが出来る点である。レポーター遺伝子の発現をデジタルカメラで取り込み、コロニー形成過程において継時的な発現量の変化を画像解析ソフトで定量化する。発現パターンの解析を通してコロニー内の細胞間相互作用関連遺伝子の探索を行う。細胞間相互作用には、外界に接している外膜蛋白質が関与していることが推測され、本年度はパイロット実験として大腸菌外膜蛋白質遺伝子60個についてアラビノース依存的破壊株の作製を行った。本年度はパイロット実験として外膜蛋白質遺伝子を選び、アラビノース依存的遺伝子破壊株の作製を進め、コロニー内の細胞間相互作用関連遺伝子の探索するための方法を検討した。コロニー内の遺伝子発現パターンを解析することで従来とは異なる観点から大腸菌を捉えることが出来、機能未知遺伝子の機能解析に役立つと思われる。

(エ) コイルドコイル構造を持つタンパク質をコードする遺伝子の機能解析

大腸菌の機能未知遺伝子の中で、クラスター解析及びモチーフ解析よりコイルドコイル構造を持つ遺伝子群の選択を行った。これらの遺伝子の破壊株を選択あるいは作製し、表現型の解析を行った。その中で、本年度は今後の網羅的な解析に向けたパイロットテストとしてyibP遺伝子に着目し、研究を進

めた。その結果、破壊株は42℃ではL培地（0.5% NaCl）で増殖できないことが明らかになり、必須遺伝子の可能性が高く、現在までに以下の結果を得ている。

*yibP*破壊株は42℃で保温すると細胞が伸長し、核様体も異常となり最終的には溶菌が起る。*yibP*破壊株はL培地中の塩濃度を1%に増加させると42℃でも増殖できる。2. コンピューターによるドメイン構造解析の結果YibPタンパク質（425アミノ酸残基）はN端に膜貫通シグナルを持ち、C端には球状ドメインがあり、中央部には長いコイルドコイルによるロッド-ヒンジ-ロッド構造を持つことが明らかになった。

YibP-Hisタンパク質は内膜分画に回収される。*yibP*遺伝子にTn10 *phoA*を挿入した変異株を多数分離したが、全てこれらの変異株のコロニーは白であった。このことから、YibPタンパク質のN端は内膜に貫入し、他の部分は細胞質側にあることがわかった。

精製したYibP-Hisタンパク質はカゼインを分解する活性を持っていることが予備実験から示唆された。

*yibP*破壊株の高温感受性を抑制する変異株を多数分離し、その中から低温感受性を示す変異について現在解析を行っている。

(オ) 機能解析としてのプロテオーム解析

大腸菌の網羅的タンパク質発現ネットワーク解析を目的として、これまでに作製してきたgene-protein indexを利用し、遺伝子破壊などによる発現パターンの変化をMALDI-TOFMSを用いて行った。今年度はDNAチップによる解析と組み合わせて、転写レベルと翻訳レベルを区別しながら解析を、メチル化酵素をコードするdam遺伝子の破壊株及び核様体タンパク質をコードする遺伝子群の破壊株において行った。染色体DNAアデニンメチル化酵素の欠損株における大腸菌の蛋白質の発現を野生株と比較することにより、この酵素によるDNA修飾がTCAサイクルに関与する酵素やエネルギー代謝系、ストレスに関係する蛋白質、ヌクレオチド代謝系、翻訳関係の蛋白質の発現を特に定常期に抑制していることを明らかにした。現在、大腸菌の培養温度を高温にしたときの応答に関与する蛋白質を解析中である。いずれの場合も奈良先端大でのトランスクリプトーム解析と共同で行うものである。培養条件、環境変化を与えた大腸菌や変異株を用いて、大腸菌ゲノムの総転写産物と総蛋白質の発現パターンを調べることにより大腸菌における遺伝子発現の全体像に迫りたい。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

Janosi L., Mori H., Sekine Y., Abragan J., Janosi R., Hirokawa G. and Kaji A.

Mutations Influencing the Frr Gene Coding for Ribosome Recycling Factor (RRF) *J. Mol. Biol.* 295 : 815 - 829 (2000)

Mori H., Isono K., Horiuchi T., Miki T. and E. coli genome project team in Japan
Functional Genomics of Escherichia coli in Japan *Research in Microbiology* 151 : 121 - 128 (2000)

Nakayama K., Takashima K., Ishihara H., Shinomiya T., Kageyama M., Kanaya S., Ohnishi M., Murata T., Mori H., and Hayashi T. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, And the F-type is related to lambda phage. *Molecular Microbiology* 38 : 213 - 231 (2000)

Uga, H., Komori, H., Miki, K. and Wada, C. The iteron regions necessary for the RepE-iteron interaction in vivo in mini-F plasmid of *Escherichia coli*., *J. Biochem.*, 127 : 537-541 (2000)

Yoshimura, S. H., Ohniwa, R. L., Sato, M. H., Matsunaga, F., Kobayashi, G., Uga, H., Wada, C. and Takeyasu, K. DNA phase transition promoted by replication initiator. *Biochemistry*, 31 : 9139-9145 (2000)

Tohsato Y., Matsuda H., Hashimoto A. A local alignment algorithm for metabolic pathway analysis, *Currents in Computational Molecular Biology*, 171-173 (2000)

Tohsato Y., Matsuda H., Hashimoto A. A multiple alignment algorithm for metabolic pathway analysis using enzyme hierarchy. *Intelligent Systems for Molecular Biology*, 8 : 376-383 (2000)

Tohsato Y., Matsuda H., Hashimoto A. An application of a pathway alignment method to the analysis of amino acid biosynthesis, *Genome Informatics*, 11 : 284-285 (2000)

Izutsu K., Wada C., Komine Y., Sako T., Ueguchi C., Nakura S., and Wada A. *Escherichia coli* ribosome-associated protein SRA, which increase during stationary phase. *J. Bact.*, 183: 2765-2773 (2001)

Kinouchi M., Kanaya S., Kudo Y. Detection of transfer RNA based on the cloverleaf secondary structure. *J. Comput. aided Chem.* 1 : 76-81 (2000)

Kinouchi M., Kanaya S., Ikemura T., Kudo Y. Detection of tRNA based on the clover secondary structure. *Genome Informatics Series*, 11 : 301-302 (2000)

Fukushima A., Kinouchi M., Kanaya S., Kudo Y., Ikemura T. Statistical analysis of genomic information : long-range correlation in DNA sequences. *Genome Informatics Series*, 11 : 315-316 (2000)

金谷重彦、木ノ内誠、大平賢、工藤喜弘、ゲノム情報処理技術に基づいた生物種固有のコドン使用多様性、*情報知識学会誌*、10 : 14-32 (2001)

森浩禎（奈良先端大） 大島拓（CREST・奈良先端大）大腸菌のトランスクリプトーム解析、ゲノム機能 発現プロファイルとトランスクリプトーム（編集 松原謙一）平成12年9月13日刊行