

「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

(ア) ねらい: 一つの生命体としての大腸菌細胞の完全な理解を目的とする。

(イ) これまでの研究の概要:

以下の研究開発項目を設定し、各担当を中心として研究を推進させた。必要に応じて担当グループへの人的配置を含め、すべての構成メンバーによる協調体制をとり研究開発を推進している。

① 研究材料の作製

1. IS などの重複を除いた全予測遺伝子(約 4,000 遺伝子)のクローンの作製とそれを利用した DNA マイクロアレイ作製(森、西村)
2. 全遺伝子の挿入破壊株作製(三木、山本、松田、磯野、堀内、森)
3. 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(加藤)
4. システマティックな in frame 欠失株の作製(馬場)
5. 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 作製(和田)

② バイオインフォマティクス

1. 多変量解析を用いた遺伝子ネットワーク解析技術および代謝パスウェイのアラインメント技術の開発(松田)
2. 多変量解析を利用した遺伝子の分類(金谷)
3. クラスター解析による遺伝子の分類(森)

③ データベース

1. 大腸菌データベースシステムの開発(森)
2. 大腸菌関連文献データベース(磯野)

④ 網羅的機能解析

1. ORF クローンをを用いた網羅的 RNA 結合タンパク質探索系の確立(井口、森)
2. 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(森)
3. 機能未解析遺伝子の機能解析(堀内、磯野、井口、森)

4. 未同定変異株の ORF クローンを利用した高効率同定(西村)
5. クローンをを用いたタンパク質精製の系の確立と相互作用解析の系の確立(森、馬場、和田)
6. 欠失株と DNA マイクロアレイを利用した網羅的転写解析(森)

(ウ) 成果:これまでの 3 年間は今後のシステムティックかつ網羅的なゲノム解析を推進するための基盤整備を中心に研究開発を進めてきた。上記①から③における基盤整備はほぼ当初の目的をクリアーできたと考えている。いかに成果をまとめる。

① 研究材料の作製

1. IS などの重複を除いた全予測遺伝子(約 4,000 遺伝子)において、GFP 融合型と非融合型および ColE1 タイプの複製起点を持った比較的低コピーベクターの 3 種類のクローンの完成。さらに酵母 two-hybrid system のベクター、GST タグ融合型のベクターの開発終了。クローンを利用した DNA マイクロアレイの宝酒造との共同開発と商品化。
2. 全遺伝子の破壊株作製に必要なランダムな変異株ライブラリー約 13 万クローンの構築と配列決定(未純化クローン)による約 3800 遺伝子の破壊株(約 5800 株)の候補の pick up を終了。この内約 5300 株の純化と保存(2002 年 3 月時点)を終わった。
3. 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。
4. 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 作製では共同研究との同定数を含めて 329 スポットの同定。質量分析計を利用した今後のプロテオーム解析(タンパク質間相互作用)の確立。

② バイオインフォマティクス

1. 多変量解析を用いた遺伝子ネットワーク解析技術および代謝パスウェイのアラインメント技術の開発を行い、代謝パスウェイの推測を可能にした。
2. 多変量解析を利用した遺伝子の分類を行い、バクテリア遺伝子の水平伝達の方向性推測を可能にした。さらに本方法論を利用して、DNA マイクロアレイのクラスター解析の方法論の開発を行った。
3. クラスター解析による遺伝子の分類により、遺伝子の構造によるクラスター化を行い、欠失株作製や今後のシステムティックな機能解析の基盤情報となっている。

③ データベース

1. 大腸菌データベースのシステムおよびコンテンツの両方の開発・改良を進めている。システムは RDB システムを採用し、WWW からの検索システムはすべて Java 言語を中心とした開発に切り替え、プラットフォーム依存性をなくした。コンテンツにおいては DNA マイクロアレイ解析結果の蓄積があり、広く大腸菌に関する研究促進を目的として、迅速な公開を行っている。なお、本データに関しては京都大学 KEGG データベースとも連携し、KEGG データベースからも公開を行っている。
2. これまでの大腸菌遺伝子研究における文献から情報を抽出し、それを電子化しデータベース化を行っている。構築してきた大腸菌ゲノムデータベースと連携させ、これまでのコンテン

ツの充実を図ることができた。今後も引き続き取り込む作業を続けている。

(エ) 今後の見通し:

上記①から③の研究開発項目は順調に進めることができたと考えている。また、機能解析へのアプローチとして DNA マイクロアレイを利用した transcriptome 解析、質量分析計を利用した proteome 解析を中心として開発を進め、DNA マイクロアレイ解析においては大腸菌の日本における同解析の中心として実験解析および実験後の情報処理、解釈システムと総合的な transcriptome 解析を推進している。現在すでに多くの共同研究を含め、システムティックな DNA マイクロアレイ解析を進めることで遺伝子転写ネットワークの解明に向けた解析が着実に進行しつつある。Proteome 解析においては gene-protein index の作製を中心に進めてきたが、ほぼ当初の目的を達成できたと考えており、ほぼ終了の時期と考えている。次の大きな課題はタンパク質間相互作用解析であるが、すでにクローンを利用して質量分析計で相互作用タンパク質の同定を行うシステムの確立を終了することができた。今後はタンパク質相互作用解析を中心として研究開発を推進し、1 年以内に全クローンの産物と相互作用する可能性のあるタンパク質の洗い出しは終了できると考えている。機能未解析の遺伝子群については、欠失株作製が順調に進んでいるので、順次欠失株を利用した機能解析へと移行させる。

2. 研究実施内容

研究開発担当ごとに以下にまとめる。

(ア) リソース開発研究

① ORF クローンの作製と DNA マイクロアレイ作製: 森(奈良先端大)

1. **【ねらい】**: 網羅的なゲノム解析に強力かつ柔軟に対応できる ORF クローンを作製し、それを基に各種機能解析を行うことを目的とする。
2. **【実施方法】**: ORF クローン作製には奈良先端大のスタッフである北川(現ドラゴンジェノミクス)の指導のもと、研究補助員 3 名で行った。DNA マイクロアレイ開発は宝酒造株式会社との共同開発で行い、具体的には奈良先端大の分担は ORF クローンの供給で、供給したクローンからベクター上の共通配列の相補的な合成 DNA を用いて各クローンの増幅を PCR で行い DNA スポッターを用いた DNA マイクロアレイを作製するのは宝酒造株式会社で行った。なお、出来上がった DNA マイクロアレイは宝酒造株式会社より同社の商品としてもリストされている。現在は北川の移動に伴い、これまで北川が担当してきた補助員の調整を代表の森とともに研究員の大島が担当している。
3. **【実施状況】**: CREST における研究開発スタート時点において開発途中であった ORF クローン用のベクターは順調に開発が進み、研究のスタート直後からクローン化の作業に取り掛かることができた。その後クローン化のための準備、特に PCR による増幅過程を踏むため、増幅の正確さと長い ORF の増幅に重点を置き検討を繰り返した。その結果、KOD ポリメラーゼを使用することにより問題点をクリアできた。各 ORF 領域は *Sfi* 制限酵素サイトに挟まれるように構築され、容易に他のベクターシステムに移し変えることが可能となっている。現在酵

母 two hybrid の系のベクター、N 末の His タグを GST タグに変えるベクター、ColE1 プラスミドの複製起点を持つ比較的低コピー数のベクターが利用可能となっている。C 末に付加されている GFP も *Nod* 制限酵素により容易に除くことが可能で、現在、すべてのクローンの処理が終わり利用可能である。GFP を除いたクローンの作製と GST タグに切り換えたクローンの作製はタンパクチップ作製およびタンパク質相互作用の網羅的な解析へと準備を進めることができた。

4.【結果】:ORF クローン(Archive clone)作製には当初 2 年程度かかる見通しをたてていたが、実際に始めるとマイクロタイプレートを利用した 96 単位での反応など工夫と改良を加えることで予想以上に早めることができた。全予測 ORF 数 4,388 のうち、IS などの重複遺伝子を除くとクローン化の対象数は 4,276 遺伝子となり、そのうち 4,270 遺伝子の増幅に成功した。PCR 増幅ができなかった 6 遺伝子の原因については現在究明中であるが、基本的に増幅する対象の長さが問題である可能性が高いと考えている。増幅断片をアガロースゲル電気泳動で分離精製を行い、精製された断片をベクターにクローン化した。2 コピー以上の断片が tandem に挿入されクローン化されたもの 2 遺伝子、逆向きのクローンしか取れなかった 3 遺伝子の存在が確認された。PCR で増えなかった 6 遺伝子のうち、3 遺伝子については N 末側だけを部分的に PCR により増幅させクローン化を行い、DNA マイクロアレイを作製する目的には十分機能することを確認した。以上の処理を最終的に約 10 ヶ月で終了した。現時点での配布可能なクローン数は 4,265 遺伝子である。このクローンを宝酒造に送付し、DNA マイクロアレイの開発を行った。ORF 長の長いクローンで PCR 増幅に問題が生じた場合は ORF の中ほどに増幅断片が 1kb 程度になるように適当なプライマーを設計し増幅を行った。増幅断片を GMS 社(現 Afinmetrix 社)製 DNA スポッターを利用して作製を行った。DNA マイクロアレイを利用した解析は機能解析の項で報告する。GFP を除いたクローン作製も順調に進み、trpL、JW2013 および yjhT を残すのみとなっている。これらの GFP 除去ができていない理由は不明であるが、引き続き除去を進める。

② トランスポゾンを用いた全遺伝子の破壊株作製:三木(九大)、山本(兵庫医大)

{協力者:松田(阪大)、磯野(神大)、堀内(基生研)、森(奈良先端大)}

- 1.【ねらい】:全塩基配列より約 4,300 の ORF が予測されたが、その内約半数は機能未解析であった。実験的手法による網羅的な機能解析を行うため、トランスポゾン挿入による大腸菌全遺伝子の破壊株作製を目的とする。
- 2.【実施方法】:本研究開発は1)システムの開発、2)トランスポゾン挿入小原クローンの作製、3)シス部分 2 倍体破壊株(各クローンを宿主細胞に溶原化させた部分 2 倍体)と破壊株由来のファージ鑄型の作製、4)配列決定によるトランスポゾン挿入位置の確認、5)シス部分 2 倍体破壊株から 1 倍体破壊株の確立、と多くのステップを要する。その為、各ステップを分担し共同で進めた。1)から5)までの各ステップのプロトコル化は配列決定による染色体上での破壊の位置決定を除いて三木および山本により本プロジェクト開始までにはほぼ終了している。配列決定の結果からの染色体上での破壊の位置決定は松田によりその原型のプログラムが

開発された。実際の破壊株作製においては、1)は三木が担当し、本プロジェクトの開始時点までにほぼ終了している。2)および3)は三木を中心に技術員および研究補助員とのチームで遂行した。4)は配列決定のための PCR 反応とシーケンス反応を三木、山本、磯野、堀内および補助員で担当し、反応産物を森のグループにおいて補助員により精製、電気泳動を行う。得られた配列により松田らにより開発されたプログラムを奈良の技術員により改良を加えられたものを利用して、染色体上での破壊の位置決定を行っている。

3. 【実施状況】: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、場合によってはさらにその数を増やして作製し、得られたファージ液を鋳型として Long PCR を用い各小原ファージクローンの大腸菌染色体部分の増幅を行う。得られた DNA を用いて、トランスポゾン内部から染色体側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する。次いで、それぞれの遺伝子について破壊株の中から、トランスポゾンの挿入方向が順方向及び逆方向で、かつ(できるだけ/トル)ORFのN末に近い位置に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。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うため、第二段階での再確認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、ファージライゼートを用いる為、かなり悪い条件で PCR 反応を行うことになる。したがって当初反応条件の検討に苦労したが、現在はその問題もほぼクリアーすることができ、三木、山本、磯野、堀内の各グループから破壊の位置確認のためのシーケンス反応済みのサンプルが森のグループにはほぼ定期的に送られている。反応は宝酒造のPCRキットLA Taqとパーキンエルマー社のサーマルサイクラー9700を用いている。PCRの条件は、 Mg^{2+} 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。
4. 【結果】:現在までに、大腸菌小原クローン 476 株の内、形質導入体が得られなかった 17 株を除いた 459 株において、トランスポゾンをランダムに挿入したライブラリーを作製した。各小原クローンあたり、192、384、あるいは576クローン作製、総数は約13万クローン(ファージライゼートを入れたマイクロタイタープレートにして合計1356枚)に上る。これまでに、作製したプレートのほぼ全てを用いての LongPCR と配列決定を一通り終了したが、一部のクローン(10クローン程度?)ではPCRによる増幅が困難(?)な為、配列決定が出来なかったので、染色体上に新たなプライマーを設計してPCRを行なうなどして、まず、459株全株の解析を終了することを目指した実験を進めている。これまでの配列決定が終了した株の結果に基づいて、約3800遺伝子の破壊株(約5800株)候補の選出 pick up を行い、この内5300株の純化と保存を終了した。しかしながら、パイロット実験として純化株の配列決定を一部行なったところ、未純化株(上記ファージライゼートのプレート)の配列解析の結果と一致しない株の割合がかなり高いという問題点が浮かび上がってきた。例えば、パイロット領域

(JD10349-JD10444)では 25 株/96 株が配列が間違っている、或いは配列決定できないという結果、yggV 遺伝子では 9 株/11 株が一致しないという結果を得ている。現在この原因を解析中であり、この原因が明らかになってから純化株の配列決定による破壊遺伝子の同定を行なう計画である。

③ 網羅的タンパク質同定:和田(京大)

1.【ねらい】:大腸菌ゲノムの総 ORF を蛋白質として同定し、それらの機能を明らかにして機能別に分類すること、及びそれらの相互関係からネットワーク網を構築するための基盤としての二次元電気泳動パターンにおける Gene-Protein Index の作製およびタンパク質間相互作用の網羅的同定方法の確立を行う。

2.【実施方法】:二次元電気泳動で通常よく使用される方法は O'Farrell の電気泳動法であるが、本プロジェクトにおいては、大阪医大の和田らにより開発された RFHR 二次元電気泳動法を用いて行った。その理由は大量のサンプルを処理できること、これまでは難しいとされていた酸性あるいはアルカリ性に偏ったタンパク質の同定が容易であること、同一ゲル上での重複がほとんどないこと、などの理由によるものである。実施体制は大阪医大の和田グループの協力を得、RFHR 二次元電気泳動法を習得後、技術員と和田および大学院生によるチームにより京大ウイルス研究所において遂行している。タンパク質同定は MALDI-TOFMS を利用して行った。

タンパク質間相互作用解析は慶応大学のグループと共同で、網羅的かつシステムティックな方法の検討を行った。方法は別章で述べるが、基本的に His タグの ORF クローンを利用して共精製されるタンパク質を質量分析計を利用して迅速な同定システムを構築するものである。

3.【実施状況】:大腸菌ゲノムの RFHR 二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析の基盤作りをこの研究課題の開始から行ってきた。総蛋白質の分画方法、抽出方法、泳動法、蛋白質の同定法等の検討を行い、膜蛋白質以外の細胞当たり 100 分子以上発現されている蛋白質の同定方法はほぼ確立した。この泳動法の gene-protein index の作成を行い、対数増殖期に発現される蛋白質 190 個を同定した。大阪医大のグループは同じ方法を用いて定常期に発現される蛋白質を解析しており、両者を合わせるとこの泳動法によって 328 個の大腸菌蛋白質を同定出来た。この結果は従来の二次元電気泳動法では到達できていない数であり(223 個)、この方法はプロテオミクスに優れていることがわかった。

4.【結果】:大腸菌ゲノムの総 ORF を蛋白質として同定し、それらの機能を明らかにして機能別に分類すること、及びそれらの相互関係からネットワーク網を構築することを最終の目標としている。これに先立ち、この研究の基盤となる RFHR 二次元電気泳動法の Gene-Protein Index を確立する必要があると作成した。対数増殖期に発現される比較的細胞内に多く(100 分子以上)発現されている蛋白質、約 190 個について RFHR-PAGE 上の位置の同定をペプチドシーケンサーと MALDI-TOFMS (CREST 購入機器)を用いて行った。今年度はこの Index を *E. coli* Japan のホームページで公開出来るように森研究室の協力で進めた。3 例の

プロテオミクスをこの Index を用いて行った。染色体 DNA の 5'-GATC-3' の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がわかった(T.Oshima, C. Wada et al., 投稿中)。現在、大腸菌を高温にしたときのストレス応答と大腸菌必須遺伝子 *obgE*(ObgE は GTPase 活性を持ち、ヒトまで保存されている)の欠損状態におけるプロテオミクスを行っている。いずれの場合もトランスクリプトーム解析を平衡して行っている。トランスクリプトームの解析は奈良先端大学のグループとの連携である。RFHR-PAGE の技術改良は大阪医大の和田グループによって行われた。タンパク質相互作用解析は His タグタンパク質の精製方法の確立と共精製されるタンパク質の同定のためのシステムの確立を行い、基盤整備を終了した。来年度における中心課題の一つとして進める予定である。

④ 系統的欠失株作製:

(1) 加藤(都立大)

1. 【ねらい】:染色体欠失株を系統的、網羅的に作製し、必須遺伝子、非必須遺伝子の同定、機能解析に役立てる。
2. 【実施方法】:分担者、加藤が実験補助員(他の研究費で雇用)とともに、全ての研究を実施している。
3. 【実施状況】:実際に欠失株を作製する方法としては、次のような方法を用いている。
 - 1) 欠失させたい領域の両側約 1.5kb ずつ(A, B)を、順番にベクター(664BSCK2)に Km 耐性遺伝子をはさむ形でクローニングする。
 - 2) 作製したプラスミドを MG1655 *rpsL polA12*株に導入する。この株の中では、42°Cにおいて 664BSCK2 プラスミドは複製できないので、Km 耐性のコロニーを選択することによりプラスミドが染色体に、A または B 領域の領域で相同的組み換えにより挿入されたものを単離することができる。
 - 3) さらに 35°Cで培養を続け、Km 耐性さらには Sm 耐性かつ Cm 感受性のコロニーを選択することにより、プラスミドが挿入された状態からもう一度相同的組み換えを起こし、染色体に欠失変異を起こし、プラスミドは染色体外に出て、さらには細胞の中からプラスミドがいなくなったものを得ることができる。

実際の欠失株作製については次のように計画している。

(第1段階)機能未知の ORF が存在する主な領域をカバーするように、一連の欠失株を設計し、作製を試みる。

(第2段階)欠失株が得られなかった領域については、その領域内の必須遺伝子をプラスミドで相補させた状態で欠失株を作製する。

(第3段階)既知の必須遺伝子の存在する領域など、第一段階で欠失を設計しなかった残りの領域についても、必須遺伝子を相補させた状態で欠失株を作製する。

4. 【結果】:

- 1) 合計 163 株の欠失株作製を試み、76 株が作製できた。(第1段階終了)
- 2) 作製できなかった欠失株 87 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 36 株の欠失株を作製することができた。
- 3) 欠失株が得られなかった領域について、その領域内にトランスに機能する必須遺伝子が存在するかどうかを調べる方法を開発した。その方法で残りの欠失させることのできなかった領域を調べたところ、26 の領域についてはその領域内にトランスに機能する必須遺伝子が存在することがわかった。

現在、2), 3)で得られた欠失株を利用して、未知必須遺伝子の同定を進めると同時に、残りの欠失させることのできなかった領域の解析を行っている。

(2) 馬場(慶応)

1. 【ねらい】:機能未知遺伝子の欠失株作製を行い、DNA マイクロアレイ解析、システムティック機能解析、メタボローム解析に供する。
2. 【実施方法】:馬場を中心に慶応のスタッフおよび研究員計4名、および奈良先端大チームとの共同で行っている。
3. 【実施状況】:欠失はWannerらにより開発された方法で進めている。実際に欠失株を作製する方法を示す。
 - 1) 下流遺伝子に対する極性効果をなくすために、in frame で欠失を導入する。そのために開始コドンを残し、さらに下流の遺伝子の SD 配列に相当する領域を残すために終止コドンを含めて 21b を残し欠失を行うように合成オリゴ DNA の設計を行った。薬剤耐性遺伝子を増幅するための配列 20b ずつをそれぞれ N 末オリゴおよび C 末オリゴに結合した形で予測全遺伝子用に設計を終え、DNA 合成を行った。
 - 2) 基本的には全遺伝子の欠失を行うが、目的に応じた欠失の優先度の設定を行った。特に遺伝子発現ネットワーク解明を大きな目標と設定を行っているため、それに必要と思われる転写調節因子の遺伝子などの選択を行った。
 - 3) 96 穴単位で選択した遺伝子の欠失用合成 DNA を用いて薬剤耐性遺伝子の PCR による増幅を行い、効率化を図る。
 - 4) 増幅断片を組換え用大腸菌 BW25113 株に形質転換し組換え体を作製する。
 - 5) 組換え体に FLP 発現プラスミドを導入し、薬剤耐性遺伝子断片の両側に存在する FRT 領域の組換えにより薬剤耐性遺伝子を抜く。薬剤耐性遺伝子を抜くので、多重欠失の導入が可能となる。また、欠失を行う遺伝子は開始コドンと終止コドンを残しているため、上流からの流れ込みを阻害することによる極性効果は無いと考えられる。
4. 【結果】:欠失予定遺伝子の優先度にしたがって、オリゴ DNA の合成を行い、欠失の導入を進めている。現在、機能既知遺伝子において 304 遺伝子、機能未知遺伝子において 269 遺伝子の欠失を行った。その結果、既知遺伝子の 304 のうち、279 遺伝子の欠失株を、未知遺伝子の 269 遺伝子のうち 253 遺伝子の欠失株を得た。これらは順次システムティック機能

および発現ネットワーク解析のための DNA マイクロアレイ解析に供する。現時点で欠失株作製は効率化を含め、方法論の確立は終了し、システムティックに欠失株の作製を行う段階にきた。現時点では1ヶ月あたり 300 遺伝子の欠失を行える体制が整い、来年度中には機能未知遺伝子群の欠失の目処を立てることができた。

(イ) 情報解析

① 遺伝子ネットワーク解析アルゴリズムの開発:松田(阪大)

1. 【ねらい】:大腸菌の遺伝子ネットワークの参照モデルの一つとして、代謝反応パスウェイに代表される既知の遺伝子ネットワークの情報をデータベースに整備するとともに、遺伝子間にある種々の関連(ゲノム上やパスウェイ上での距離や、発現プロファイルの類似性)を解析することにより、新たな遺伝子ネットワークの予測手法の開発を目指す。
2. 【実施方法】:初年度は松田を中心として補助員及び大学院生による開発を進めた。2年目以降は補助員による研究開発を中止し、松田及び大学院生による研究開発を進めてきている。遺伝子ネットワーク解析アルゴリズムの開発においては、奈良先端大の研究者を中心とする DNA マイクロアレイ解析を行っているチームとの連携を組み合わせながら研究開発を行っている。

3. 【実施状況】:

(1) 代謝反応パスウェイ・アライメントシステムの開発

EcoCyc および KEGG から大腸菌の代謝反応パスウェイをすべて取り出して、パスウェイごとにそのパスウェイの ID、パスウェイを構成する酵素の EC 番号およびその遺伝子名を組にして、パスウェイ上で出現する順番に従った表形式で格納したデータベースを構築した。また、パスウェイに分岐が存在するときは、分岐に ID をつけ、表形式のパスウェイの対応する位置におくようにした。これにより、表形式データの中にはパスウェイ中の直線的な部分しか登録されないが、同じ分岐点を持つパスウェイを相互に接続することで分岐を含むパスウェイも検索を可能にした。さらに、パスウェイ間の比較方法として、パスウェイ中の酵素の EC 番号の類似性に着目したアライメント手法を考案した。本手法と、パスウェイのデータベースと組み合わせることにより、相互に類似した反応を行うパスウェイが抽出できるシステムを開発した。

(2) XML に基づくゲノムデータの表現とその検索システムの開発

大腸菌ゲノムのデータは、塩基配列、ゲノム上での遺伝子の位置、遺伝子産物のアミノ酸配列、遺伝子の機能や遺伝子間の関連に関するデータなど大量かつ多様であり、既存のデータベースの形式(例えば、GenBank のフラットファイル)で表現するのは容易ではなかった。そこで、本研究では、構造化文書記述言語の一つである XML (eXtensible Markup Language)に基づいてゲノムに関する多様なデータを統一的に表現する形式である GXML (Genome eXtensible Markup Language)を開発し、これによるゲノムデータの格納およびその検索システムの開発を試みた。さらに、環状や直線状のゲノム構造や遺伝子間の種々の関連(ゲノム上での位置の近さ、配列類似度、代謝反応パスウェイでの位置の近さなど)を検索できる問合せ言語 GQL (Genome Query Language)を開発することにより、多様な遺伝子間の関連をゲノムレベルで統一的に検索

できることが可能となった。

(3) 発現プロファイルによる遺伝子のクラスタリング

DNA マイクロアレイ等から大量に得られる遺伝子発現プロファイルを利用して、遺伝子を分類することを試みた。発現プロファイルの比較からは、単に発現の様式が類似しているというだけでなく、例えば同じ遺伝子により制御を受けている一群の遺伝子集合を抽出することが原理的に可能である。しかし、発現プロファイルのクラスタリングでは、(a)発現量の測定値に比較的大きな実験誤差が含まれている、(b)遺伝子ごとに発現量測定に適切な条件が異なるので、遺伝子の分類ではすべての条件での発現量を使わずに、分類に適切な実験サンプルだけを選択する必要がある、(c)単に発現プロファイルの相関を見るだけでは、遺伝子間の直接的な制御と、間に別の遺伝子を介した間接的な制御とが区別できない、などの問題点があった。そこで、本研究では、(a)については、時系列データとして得られる発現プロファイルに対しては、離散フーリエ変換やウェーブレット変換などのデジタル信号処理の変換方式により周波数分析を行うことで高周波ノイズとして現れる実験誤差を除去する手法を開発した。(b)については、主成分分析により分類に適切と思われる成分を抽出することを試みた。(c)については、グラフィカルモデリングにより、間接的な相関関係を検出して取り除くことを試みた。

4. 【結果】:

(a) 代謝反応パスウェイ・アライメントシステムの開発

EcoCyc および KEGG から抽出した大腸菌の既知のパスウェイ 192 個を、表形式でデータを格納するデータベースを作成した。各パスウェイは、酵素および反応の分岐点である中間代謝物(2つ以上の酵素の基質または生成物となる代謝物)をノードとするグラフ表現で表される。今回作成したデータベースでは、ノードの総数は 1,465 個となった。パスウェイのアライメントによる比較については、大腸菌のパスウェイを相互に比較したところ、性質の良く似たアミノ酸の合成パスウェイや、DNA 塩基・RNA 塩基の合成パスウェイ、種々の糖の代謝パスウェイそれぞれの間に類似した反応の系列があることがわかった。

(b) XML に基づくゲノムデータの表現とその検索システムの開発

このシステムを使って、大腸菌ゲノム上で近い距離にあり、かつ代謝反応パスウェイ上でも同じパスウェイで近い位置にある遺伝子の組を検索したところ、トリプトファン(tryptophan)合成系の遺伝子などが得られた。

(c) 発現プロファイルによる遺伝子のクラスタリング

主成分分析の結果、*sufA*, *sufB*, *sufD* のオペロンなど共通の遺伝子により制御を受ける遺伝子群が分離できた。また、グラフィカルモデリングによる解析により、*malT*と*malS*の間の制御関係が示唆されるなどの結果を得た。

② コドン組成を利用した遺伝子の分類:金谷(奈良先端大)

1. 【ねらい】:バクテリアを中心としたゲノムプロジェクトの進展に伴った多種のゲノムの全塩基配列決定により生物全体にわたって共通なシステムと生物種に固有なシステムを遺伝子レベルで把握することが可能となりつつある。生物種に共通なシステムと多様なシステムを体

系的に理解することがバイオインフォマティクスの役割の一つであると考えて、“大腸菌の全体像”プロジェクトでは多変量解析法に基づいた種固有性と共通性を理解するための基盤整備を行い、解析することをねらう。

2. 【実施方法】:理論的裏づけは遺伝研の池村らの協力を得ながら、実際のアルゴリズムの設計ならびにプログラミング作業、さらなる解析は山形大学・工学部の木ノ内、大学院生らと開発を進めた。なお、金谷は平成 13 年 5 月より奈良先端科学技術大学院大学・遺伝子教育研究センターに移動し、さらに奈良先端大の大学院生も含め研究開発に参加した。山形は代表を工藤教授に変更し、引き続き木ノ内が金谷と協力しながら同分担を遂行している。
3. 【実施状況】:
 - 1) 大腸菌遺伝子をコドン使用相対頻度により61次元のベクトルに表現し、61次元空間における遺伝子の分布を最大に広げる軸(以下では Z1 軸と呼ぶ)を主成分分析により推定した。この Z1 軸の性質は池村らにより提案された4つの規則により説明することができており、インフォマティクス解析のみで種固有の最適コドンを推定することができることを意味する。
 - 2) 外来性遺伝子をコドン使用から予測を行うことを目的に研究開発を進めた。このタイプの解析では種内の遺伝子のコドン使用とさらに種間の遺伝子のコドン使用を体系的に把握することが必要となる。上述で述べた主成分分析でもその概略を把握することはできるが、種間の遺伝子コドン使用をより詳細に把握することが必要となる。そこで、コドン使用に基づいた生物種の個性を 61 次元のコドン使用特性を保持しながら非線形的に二次元のマップ上に表現する方法を開発した。
4. 【結果】:
 - 1) 大腸菌を含む、全ゲノム構造が決定された 17 種のバクテリア(*Aquifex aeolicus*, *Archaeoglobus fulgidus*, *B. subtilis*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia trachomatis*, *E. coli*, *Haemophilus influenza*, *Helicobacter pylori*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Pyrococcus horikoshii*, *Rickettsia prowazekii*, *Synechocystis* sp., *Treponema pallidum* と酵母(*S. cerevisiae*)についても上記の規則が Z1 軸の性質に反映されており、最適コドンを決めるための有効なインフォマティクスを提案できた。比較ゲノムの観点から大腸菌を含むバクテリアからヒトに至るコドン使用多様性を解析した。これらの成果は、欧文誌 *J. Mol. Evol* ならびに和文誌、情報知識学会誌にまとめた。塩基配列に対する Z1 の算出ができるように以下のウェブで公開している。
(URL:<http://ei4web.yz.yamagata-u.ac.jp/~kinouchi/codonfreq/>)
 - 2) 全塩基配列が決定されている 29 種のバクテリアの 59,122 個の遺伝子を対象に解析を進めた。独自に改良した自己組織化法を用いて各生物種の持つコドン特性を利用して最適に分離させることに成功した。その結果、枯草菌を代表とするグラム陽性細菌の有する遺伝子ほど分布の中心部に分布する傾向があり、コドン使用における偏りが小さいことを意味する。一方、プロテオバクテリアおよび古細菌の遺伝子については周辺に分布し、偏りが大

きいという知見を得た。さらに、コドン使用を指標にした生物間の遺伝子の水平伝達に対する全体像を把握することができた。これらの成果は欧文誌 Gene にまとめた。

③ ORF のクラスター解析による分類: 森(奈良先端大)

1. 【ねらい】: 遺伝子というものはそれ自身が最小の単位ではなく、さらに小さな部品の組み合わせにより構築されている。したがって、もしこれらの部品の構造や機能が明らかになれば、遺伝子の構造と機能はそれらの組み合わせで説明できると考えられる。
2. 【実施方法】: 研究員1名を中心に大学院生とのチームで研究を進めた。クラスターの詳細な解析法は松田(阪大)らにより開発されたアルゴリズムを用いたため、共同での作業も多い。
3. 【実施状況】: 微生物界に広がる全遺伝子を対象にクラスター解析を行った。そのため、大腸菌を含む、17種の微生物からの ORF の情報を用いて、クラスター解析を行った。クラスター解析とは、基本的にアミノ酸あるいは DNA 配列による相同性を利用して、クラスターとしてまとめる解析である。方法は最初に blast などの相同性検索ソフトを利用して、シングルリンケージクラスター解析を行う。この解析は簡単に言うと、「友達の友達は友達」方式で、直接、間接を問わず、ある閾値以上の類似性を示す全ての ORF をひとつのクラスターとしてまとめるものである。このクラスターに含まれる ORF 群を松田らにより開発されたグラフ理論に基礎をおく MDS 法を用いて、似ている領域の詳細な整理解析を行う。この解析により遺伝子部品の候補の同定を行う。クラスターに分けられた ORF の由来する種を解析することで、その ORF の普遍性と多様性が明らかになる。
4. 【結果】: 38,301 の ORF のうち 75%に相当する 28,952 個の ORF がお互いに何らかの類似性を示し、2,684 個のクラスターを形成した。クラスター内に解析を行った 17 種全ての生物種の ORF を含むものが 37 クラスター存在する。普遍性の高い ORF 群であり、リボソーム蛋白質の遺伝子などが含まれている。一方、大腸菌の ORF のみで構成されているクラスターが 84 個存在した。これらは大腸菌の中だけで、そのコピー数を増やしてきた ORF 群であるが、その中には繊毛関連の ORF が特にその数を増やし、10 コピーにも達している。繊毛遺伝子は感染性に大きな役割を果たしており、大腸菌の生活環の変化に大きく関わってきた可能性が考えられる。

④ 大腸菌の特徴推定の手段としての tRNA 遺伝子の並びの解析: 工藤(山大)

1. 【ねらい】: 研究の主力はコーディング領域の解析に向けられるので本研究では非コーディング領域の解明を通じてコーディング領域の特徴を浮き彫りにする。tRNA は長さ約 80 塩基でクローバ葉様二次構造をとることが知られている。ここでは tRNA 遺伝子を関連アミノ酸の 1 文字表記法とアンチコドンの組み合わせで表記することにする(例、Mcat)。その遺伝子は多くの場合、tRNA 遺伝子のみで、あるいは rRNA 遺伝子との組み合わせで、全体として長いコーディング領域の間のいわゆる intergenic 部位に挟まっている。その並びには共通のパターンがあることは古細菌の二つの型でそれぞれ知られており、また Muto らは *Bacillus subtilis* とマイコプラズマに AtceMcatIcatStga が存在することを根拠にそれらの近縁関係を論じた。これらの事実から tRNA 遺伝子の並びのクラス特異性の存在を感じ取れる

ので、細菌の中のグラム陰性菌としてのあるいは個別細菌としての 大腸菌(*Escherichia coli*) の特徴を検出することを試みる。

2. 【実施方法】:コンプリートゲノムか否かを問わず、すべてのゲノム情報からtRNA遺伝子の並びの情報を引き出す。間隔が 90 塩基程度以上の場合には未知の tRNA 遺伝子が 1 個以上潜んでいる可能性は一応考慮しながら間隔 200 程度までは隣接していると見なす。見つかった tRNA 遺伝子列は tRNA 遺伝子 1 個 1 個を見出しとして、KWIC 索引作成技術を援用してアラインメントを行う。その際にデータの存在場所のバクテリアの名前にクラス名を附しておく。今回は古細菌、グラム陰性菌、グラム陽性菌、マイコプラズマ、その他及び未知、に分類した。その他にグラム陽性菌とマイコプラズマを併せて拡大グラム陽性菌として扱った。
3. 【実施状況】:DDBJ/GenBank/EMBL ファイル (Release 19) から RNA(rRNA, tRNA)遺伝子の並びのデータを拾い出した。そのようなデータが見つかったバクテリアは 120 件であった。その内訳は古細菌が *Methanobacterium thermoautotrophicum* など 18 種、グラム陰性菌が *E. coli*, *Actinobacillus actinomycetemcomitance* など 41 種、グラム陽性菌が *B. subtilis*, *Mycobacterium leprae* など 40 種、マイコプラズマが *Acholeplasma laidlawii* など 13 種、その他が *Bradyrhizobium japonicum* など 8 種、である。見つかった RNA 遺伝子の並びは合計約 375 本であり、うちグラム陰性菌の *E. coli* からは (間隔塩基数はここでは省略) YgtaYgta, 16S-Ettc-23S, VtacVtacVtacKttt, AggcAggc, 5S-Tggt-5S, 16S-Ettc-23S-5S, 16S-IgatAtgc-23S,23S-5S, IgatAtgc-23S, 23S-5S-DgtcWcca, 16S-IgatAtgc-23S-5S, DgtcWcca, 16S-Igat, McatMcat, McatLtagQttgQttg,McatQctgQctg,RccgHgtgLcagPtgg, TtgtYgtaGtccTggt, D????Wcta, TtgtYgtaGtccTggt, 16S-IgatAtgc23S-5S-Tgga-5S, LgagMcat, 16S-Ettc-23S-5S, DgtcWcca, RccgHgtgLcagPtgg, 16S-IgatAtgc-23S, 23S-5S, 16S-Ettc-23S-5S, 16S-Ettc-23S-5S, GgccGgccGgcc, LcagLcagLcag, VtacVtacVtacKttt, AggcAggc, 16S-I????23S-5S-Tggt-5S, 23S-5S-Dgtc, 16S-Ettc-23S, 5S-gtcWcca, 23S-5S, TtgtYgta, LcagLcagLcag, AggcAggc, SgctRacgRacgRacgRacg, GgccGgccGgcc, VgacVgac, VtacVtacKttt, GgccCgcaLtaa, KtttVtacKtta, TtgtYgtaGtccTect, TggtTtgtYgtaGtccTggt, VtacVtacVtacKtta が採取された。なお Komine らが指摘した Kohara's Library における逆転は遺伝子 *rrnD* 内の 5S-T-5S-23S-AI-16S の中の 23SrRNA と遺伝子 *rrrE* 内の 16S-E-23S-5S の 23S rRNA に切れ目が入って(23S rRNA 2 個の破壊を伴った)起きたとされているが、23S-AI-16S の存在は検知できていない(*E. coli* では AI を探し当てていない。グラム陰性菌 *Campyrobacter jejuni* では 16S-AtgcIgat 見つかった)。
4. 【結果】:16S rRNA と 5S rRNA に挟まれた IgatAtgc は普遍的に見つかるが、TtgtPtgg や DgtcKttt が見つかったのは古細菌でのみ、EttcDgtc や HgtgQttg が見つかったのはグラム陽性菌のみであることなど、クラス特異性の存在という推理を支持する事例をいくつか見つけることができた。そしてグラム陽性菌 *M. leprae* のゲノムデータの中に EttcDgtc と思しき DNA 塩基配列が偶然みつかったとき、既報の EttcDgtc が見つかったのはグラム陽性菌のみであることから、それらの場合はすぐ上流に Kttt、あるいはすぐ下流に Vtac あ

るいは Fgaa があることに着目して確信をもって、相当する3遺伝子を M. leprae のこの EttcDgtc の近辺で探したところ、すぐ下流に Fgaa が 見つかった。このことはグラム陽性菌における EttcDgtcFgaa の事例の二つ目の存在を予測していることを意味する。この操作の延長でみつまっているたとえば VtacVtacVtac や RccgHgtg はグラム陰性菌特異的といえるが、さらにこの中で E. coli のみでみつまっているもの、E. coli ではみつかっていないもの、などに分類できる。その原因の分析はグラム陰性菌の中での E. coli の特徴を推定する別の面からの手段を提供するかも知れない。

(ウ) データベース

① 文献データベースの開発:磯野(神大)

1. 【ねらい】:大腸菌の突然変異データに関する文献や配列を網羅し、ゲノム構造データに関連させて近縁のバクテリアの相同遺伝子を含め、遺伝子あるいは制御領域等について機能的に検索できるデータベースを作製する。
2. 【実施方法】: 技術員を中心として文献複写を行い、それを OCR ソフトで文字情報として回収し、データベースに登録する。
3. 【実施状況】: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、過去の関連文献や遺伝子の塩基配列・遺伝子産物のアミノ酸配列(野生型と各種の変異型の塩基配列ならびに対応する遺伝子産物の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から出発して、遺伝子ならびに遺伝子群あるいは制御領域等について、構造的だけでなく、機能的にも類縁を辿って行けるデータベースの作製を行う。まず”Linkage Map of *Escherichia coli*, K-12, Edition 10: The Traditional Map” (*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 814-984, 1998) を大腸菌に関する研究文献収録の出発点とし、そこに収録されている文献を文献データとしてまとめるとともに内容を精査し、対象とされている大腸菌の遺伝子に関する突然変異データを収録してまとめてきた。この文献データはもともとデジタルな入力になされたものではないため、多くの誤りがあったので、データを整理して行く過程でそれらの誤りを除去し、さらに当該文献に引用されている文献を第2次文献として精査して、同様に突然変異データを収録してきてきた。その結果、これまでに約 4,000 の文献を収録した。その上で、これらの文献をデータベースとして WWW 上で公開するための準備を整えた。具体的には、著者名やキーワードによる検索はもとより、遺伝学的な検索を有効に行えるようにするために、遺伝子(歴史的な別名を含む)名の索引を作成し、また大腸菌の歴史的な遺伝子地図との対応も図る準備も整えてきた。しかし、現段階ではまだ文献データベースの域を出ていないので、今後より突然変異に重点を置いてデータを整理して行く必要がある。
4. 【結果】:現在公開には至っていないが、公開の為のプロトタイプの作製を行った。今後は公

開のために必要なインターフェースの改良、信頼性の問題などを解決し、できるだけ早い時期に公開を行う。

5. 【補足】: 昨年送付したもの以外に、あと数百件の未処理のデータがある。これらの公開については奈良先端の GenoBase にリンクさせる必要があり、3 月に実施する予定であったが遅れている。

② 大腸菌データベースの開発と公開: 森(奈良先端大)

1. 【ねらい】: ゲノム配列情報およびその解析結果とともに、本プロジェクトから派生する各種リソース群のデータ、磯野らによる変異データベースを構築し、広くインターネットを利用した公開のしくみをつくり、各種情報を大腸菌を含めた全ての生物学研究者との情報の共有を行う。
2. 【実施方法】: 技術員1名が中心となり検索システムの構築を行う。
3. 【実施状況】: これまで大腸菌のゲノム配列を中心に予測された ORF に関する情報を遺伝研との共同開発の GIB (Genome Information Broker) というシステムを用いて公開を行ってきた。しかし、これまでテキストベースのデータ構造だと、データ構造の違うデータの取り込みなど問題が生じるケースが多い。そこで、本プロジェクト開始よりデータ管理の方法を検討し、リレーショナルデータベースの採用に踏み切った。そのためにインターネットを通じてホームページからのデータの公開のシステムを最初から構築しなおした。データベースエンジンとしては PostgreSQL を利用し、開発には Java および PERL を利用している。これによりデータベースの構造などが非常に柔軟に対応可能となった。現在は本プロジェクトから派生するリソース群のデータベース化を行っている。
4. 【結果】: 当初大腸菌ゲノムにコードされる遺伝子群のアノテーション情報だけだったものが、アーカイブクローンを作製するために合成された合成 DNA、出来上がったアーカイブクロンのデータ、マイクロアレイ解析から得られるデータ、破壊株の情報、など、あらゆる種類のデータに簡便な対応が可能となった。そして、自前でホームページからの検索システムの開発が可能になったことで、非常に迅速に対応することが可能となっている。

(エ) 網羅的機能解析

① コード領域の機能解析: 堀内(基生研)

1. 【ねらい】破壊株の作成は、リソースグループによって開始され、その完成、あるいは部分的に進展するまでは、
 - 1) 我々の用いている大腸菌株 W3110 のゲノム全配列の完成
 - 2) 破壊株等を用いたシステムティック機能分類法の予定確立、の 2 つを中心に研究開発を進めた。現在本研究プロジェクトが進めている「大腸菌におけるゲノム機能の体系的解析」は、W3110 と呼ばれる野生株を用いて解析を行っている。これまで日本での大腸菌ゲノムの配列決定は、この株を用いて行ってきた。1997 年、我々も米国と同時に全配列を決定したとしたが、その時点では、W3110 株の配列は約7割で、他は既にデータベースに登録されていた W3110 以外の株の配列であった。W3110 株を本 CREST のプロジェクトで解析す

ることになり、そのためには、W3110 株の全配列データが必要となる。また、W3110 株の配列と米国で決定されたMG1655株配列との比較から、短期間でのゲノム変化(マイクロ進化)を知ることも興味あるところである。そのため W3110株の約3割の未決定領域のゲノム配列と、既決定領域のうち正確度の低い領域の配列決定を行った。

(ア) W3110 株の配列の完成

①【実施方法】:堀内の研究室が中心となり、森研究室と山本研究室に一部分担して実験を行った。方法は、従来の方法の変法と米国の手法の2種類を用いた。従来の方法は、1)小原クローン DNA を用いて大腸菌ゲノム由来部分の Long PCR 増幅および精製、2)超音波処理による断片化、3)ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるサイズ選抜、4)M13ファージベクターへの組み込み、5)プラークからのファージピッキング、培養および DNA 調製、6)シーケンス反応および DNA シーケンサーによる処理、7)配列結合ソフトウェア PhredPhrap を用いての配列結合処理、等のステップを経るものである。従来は、この処理を個々の小原クローンごとに行っていたが、連続する 20 前後の小原クローンを Long PCR し、それらの産物を混合した後に精製、そして2)以下のステップを進めるという方法に変更した。また、一部の領域については、上記のステップ1)に代えて、W3110 株のゲノム DNA に I-SceI 制限酵素サイトを挿入し、そこを切断することで得られる 190 - 240kb の断片を精製・断片化するという米国の手法を採用した。

②【実施状況】:正確度の低い既決定領域、および未決定領域を 10 ヶ所の領域に分けて(1つの領域は約 170 - 260kb)配列決定を行った。1領域当たり約 2,500 から 3,000 サンプルを調製し、それらの配列データを得て、結合処理を行った。その時点で、部分的に配列が得られず、ギャップ部分が生じた場合は、その部分にシーケンスプライマーを設計して、小原クローンを鋳型にギャップ部分の配列を決定した。

③【結果】:極めて正確と思われる w3110 株の全ゲノム配列を決定できた。MG1655 株との配列比較に関して、IS(挿入配列)は除いて両株で配列の異なる箇所を調べた。0 - 60 分領域は平均して 0 - 5 箇所/100kb とかなり少ない。一方複製開始点領域(85分)をピークに 60-100 領域では異なる箇所が 0-60 分に比べ 10 倍から 100 倍に増加していた。これは米国が決定したMG1655株の配列に誤りによるものが多いと思われる。というのは、米国のグループが、初期の技術でこの領域の配列決定したため、より多くの誤りを含むと考えられるからである。現在 W3110 株ゲノムの配列を解析を進めており、その成果を論文としてまとめたい。

(イ) 破壊株等を用いたシステムティック機能分類法の確立

①【実施方法】:堀内を中心に、本プロジェクト参加の若手研究員(助手、博士研究員)の意見交換を行い、スクリーニングの方法等の検討を行った。

②【実施状況】:本プロジェクトの目的は、1つの生物が有する全遺伝子の機能を明らかにすることによる生物の完全理解、特に1つの細胞が二つになる生物固有の能力の完全理解にあるが、そのためには全遺伝子の機能の解明が最も重要な課題である。現在種々の

手法により遺伝子機能の解明がなされているが、中でも最も強力な手法の1つは、目的の遺伝子を破壊しその破壊株の示す異常から遺伝子の機能を推察するという手法である。従来の分子遺伝学の手法は、まずある異常を示す変異株を分離し、その異常の原因である遺伝子を同定することであったが、ここでは逆にまず構造の判明している遺伝子の破壊株があり、その異常性をスクリーニングするというこれまでとちょうど逆の攻め方をする。そのためできるだけ多くの性質をチェックすることが、異常性を発見するために必要である。それがシステムティック機能分類法となる。そのためには、これまで大腸菌等で見出されてきた異常性を参考にスクリーニング法を考える必要がある。その他、その異常性を測るのに有る程度の定量性が必要となろう。というのは従来の個別の遺伝子解析研究では、典型的な異常性を示す変異株が分離解析されてきたが、全遺伝子破壊株を相手にする場合、中間的な異常性を示す株が多数予想されるからである。また、遺伝子機能が判明している破壊株についても、未知な破壊株と同様、全てのスクリーニングを行う必要がある。新しい機能の発見が、遺伝子機能のネットワーク作りに欠かせないからである。一方で、特定の機能や遺伝子群に注目した解析はその分野に興味のある研究者を中心に行うほうが実のある解析を行えるはずで、本プロジェクト内にとどまらない、外部との共同研究体制をとることが要求される。既に開始したプロジェクトを以下に挙げる。

- 1) アーカイブクローン、破壊株、欠失株を用いた、バイオフィルム形成能とコロニー形成能の網羅的スクリーニング。(神戸大)
- 2) tRNA 結合タンパクのスクリーニング(アーカイブクローン、精製タンパクを使用)(岐阜大)
- 3) two component、methylase、RNA helicase 等、ホモロジー解析の結果より機能カテゴリーは同定されているものの生理的な機能不明遺伝子について、欠失株での遺伝子発現プロファイル解析が進行中、あるいは計画中である。(名大、東大他)

③ 【結果】: 以上の様なことを踏まえ、次に様なスクリーニングの種類を計画した。

- 1) 糖の発酵性
- 2) 種々の薬剤(抗生物質、色素、その他)、化学物質に対する感受性、抵抗性
- 3) 紫外線、放射線、DNA障害を起こす化学物質に対する感受性、抵抗性
- 4) 生体低分子物質(アミノ酸、核酸、脂肪、ビタミン、その他)の要求性
- 5) 菌の移動能(ケモタキシス)
- 6) 条件致死性(低温、高温、嫌気条件、塩欠乏条件など)
- 7) 細胞形態、核形態、
- 8) 表面構造
- 9) タンパク(ペプチド)分解能
- 10) ファージ抵抗性、感受性

具体的な方法は以下の様に行う(それぞれ上の番号と対応)。

- 1) 液体培養し、色の変化で異常性を定量的に測定する。例えば、BTB 色素を含む液体

培地を用いて糖発酵性スクリーニングすると、発酵により緑から黄色への変化が起こるため、定量化が可能である。

- 2) 寒天培地に菌を塗布し、増殖を見る。この場合、幾種類かの希釈した菌液を塗布する。
- 3) (2)の様に塗布した寒天培地に紫外線等を照射し、増殖の変化を見る。
- 4) 生育に必要な寒天培地に生育しない株を集め、低分子物質を添加した寒天培地上での生育の有無をスクリーニング。
- 5) 軟寒天培地に菌を植え、その後の遊走性をスクリーニング。有る物質に対するケモタキシス能力も同様にスクリーニング。
- 6) 種々の培養条件での致死性をスクリーニング。寒天培地を用いる。
- 7) 顕微鏡観察によりスクリーニングする。必要な場合染色を行う。
- 8) コロニーの表面の観察。表面抗原に対する抗体を用いたスクリーニング。
- 9) タンパクやペプチドを含む培地に菌を植え、その分解をスクリーニング。
- 10) フェージを塗布した寒天培地上へのスポットでスクリーニング。

② 非コード領域の機能解析:井口(京大)

1. 【ねらい】:ゲノム機能の解析はタンパク質 ORF の解析のみでは不十分であり、RNA 関連遺伝子(転移 RNA、リボソーム RNA、機能未知低分子 RNA)の体系的把握に向けた研究を目指す。
2. 【実施方法】:スタッフを中心として大学院学生とのチームで研究を行ってきた。
3. 【実施状況】:
 - 1) 大腸菌で異種ゲノムからの遺伝子発現を行なわせる場合、コドン使用頻度の偏りによる転移 RNA 量の不足が問題となる。こうした問題を解決する材料提供のため、大腸菌の全転移 RNA 種について遺伝子のクローン化をおこなっている。
 - 2) 転移 RNA-like 構造をもつ低分子 RNA が注目されているが、大腸菌の全 DNA シーケンスから転移 RNA のモチーフ検索を行ない、新たな tmRNA(転移 RNA とメッセンジャーRNA 機能の両方をもつ)の発見を試み、現在その同定を行なっている。
 - 3) タンパク質合成やポルフィリン合成のグローバルな制御に関わっている大腸菌 *hemK* 遺伝子の機能メカニズムを知るために、この遺伝子の破壊株とマイクロアレイ技術を用いて、発現パターンの定量化を行ない、HemK(メチレーズの一種)のターゲット遺伝子を検索している。
4. 【結果】:3種類の rRNA 遺伝子内にコードされる tRNA を除いて(tRNA 遺伝子の増幅が困難なケースが多い)全ての遺伝子のクローン化に成功した。

③ システムティック機能解析のコーディネート(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):平賀(熊大)

1. 【ねらい】:機能未知遺伝子のゲノム情報あるいは本プロジェクトからの情報を利用しながら効率的に機能解明に持っていくための手法開発をねらう。そのために、一例として破壊株作

製段階での情報を利用して機能解析を行う。

2. 【実施方法】: 研究室室内スタッフおよび大学院学生とのチームにより研究を推進している。破壊株の情報は九州大学より随時手に入れている。
3. 【実施状況】: 破壊株の作成過程で、*yibP* 破壊株が高温で増殖できないことを発見した。YibP タンパク質は内膜に N 端の膜貫通シグナルで結合し、他の部分は細胞質側に存在することを証明した。精製した YibP タンパク質には β カゼイン分解活性が検出された。*yibP* 破壊株の高温感受性を抑制する変異株を2株分離し、その遺伝子を同定した。或る破壊株が高温感受性を示した場合に、その遺伝子の機能を解析する方法を模索するためのパイロット実験を兼ねてこの研究を行った。
4. 【結果】: YibP タンパク質が高温での増殖に必須なタンパク質であり、プロテアーゼ活性を持つことが明らかになった。

④ 細胞分裂遺伝子群の網羅的解析: 西村 (遺伝研)

1. 【ねらい】: 大腸菌をモデル生物とした研究により細胞内の諸反応についてはよく理解されているが、諸反応間のネットワークについては殆ど未解決である。ネットワークを解析することにより、整合的増殖の全体像に迫れると考える。この為に、故広田らにより設立された 5,000 株からなる温度感受性変異体バンクの中から、高温で分裂が停止する変異株 430 系統について、変異遺伝子を同定し、細胞分裂を介した細胞内諸反応間のネットワークを明らかにする。その為に遺伝的相補性が大量に解析できるような発現ベクターを構築し、まず全野生型 ORF のクローニングを行い、相補テストにより変異遺伝子 (*fts*) と ORF の対応付けを行う。
2. 【実施方法】: 主として補助員とのチームで開発を行ってきた。可動プラスミドの構築については、本研究室学生の修士論文の研究テーマとして行った。また、奈良先端大の協力により、アーカイブプラスミドからの再クローニングが可能となるように、*Sfi* 切断部位の導入によるプラスミドの改変を行った。
3. 【実施状況】: 昨年行った相補性テストでは、相補される変異株の確立は僅か 54%であった。このことから、2つの問題点が予測された。第一は、温度感受性変異体バンクを作成する時、強力な変異源であるニトロソグアニジンを用いているので、1株で2個以上の変異を有している特定の ORF だけでは相補されない可能性、第二は、アーカイブクローンから再クローニングする為に、共通の制限酵素部位 *Sfi* を付加した。この為、目的の ORF 蛋白の N 末、C 末各々に数個ずつ余分のアミノ酸が付加され、蛋白の活性が低下し相補されない可能性である。しかし、試行錯誤を重ねた結果、接合効率に起因していることが解り、接合時の培養方法の改善により、現在は 85%の確立でヒットする ORF を検索できるようになり、急ピッチで解析が進行している。
4. 【結果】: アーカイブクローンからの再クローニングにより、4,311 個の全 ORF を可動プラスミドにクローニングした。このセットクローンについては、現在、(1) 48 クローンずつ混合したセット(マイクロタイタープレート 1 枚)、(2) 8 クローンずつ混合したセット(6 枚)、(3) 1 クローンずつのセット(45 枚)の 3 種類のストックを作成している。目的の変異遺伝子を相補テストにより

検索する場合、(1)、(2)、(3)を順に用いて領域を絞って行けば、大量の相補テストを行う手間を省くことができる。次に、これを用いて相補テストにより *fts* 変異遺伝子を同定した。約 85% の確立で、*fts* 変異を相補する ORF が同定でき、現在までに 185 の細胞分裂変異株が 134 の遺伝子により相補されることが解った。同定した遺伝子の 25%は機能未知の *y* 遺伝子であったことから、細胞分裂機構の解明に新しい展開が期待される。また機能未知遺伝子の大半が細胞分裂などの高次生命現象に関与しているのではないかという当初の予想を裏付ける結果である。残り 25%は蛋白合成や DNA 合成などの基幹反応に関与する遺伝子、21%はイオン輸送やシャペロン、シグナル伝達などの細胞機能に関係した遺伝子、29%は代謝関係の遺伝子であった。この結果は、「細胞には細胞分裂を介した相互識別機構が存在する」という我々の仮説を強く指示するものである。その幾つかについて、詳細な分子機構の解析を行い、相互識別機構の実体を解明した(発表論文)。

⑤ 網羅的機能解析:磯野(神大)

1. 【ねらい】:本プロジェクトにおいて作製された大腸菌のアーカイブクローン群および作製した破壊株を用いて、現時点ではまだ機能が不明な遺伝子について組織的な解析を行う。特に、大腸菌細胞の集団内での役割に焦点を当て、コロニーを形成している大腸菌の細胞間に生じているであろう機能分化とそれを制御している遺伝子、ならびに、大腸菌の運動や走性などに直接間接に変化をもたらす遺伝子を網羅的に探索し解析する。
2. 【実施方法】:研究員を中心とした体制で本研究開発を推進している。
3. 【実施状況】:本 CREST プロジェクトで作製されたアーカイブクローンを用いた、細胞間コミュニケーションに関連すると思われる遺伝子の探索については、これまでに、コロニーの形成過程におけるそれぞれの遺伝子の発現パターンの解析、ならびに、それぞれの遺伝子のバイオフィーム形成に与える影響の解析を進めてきた。具体的には、アーカイブクローンの大量発現によりバイオフィーム形成に影響する遺伝子の探索を全クローンに対して行い、バイオフィーム形成能の低下、フィルム形態異常を示す遺伝子を約 100 個選別した。これらの遺伝子を詳細に解析する目的で、個々の遺伝子破壊株の作製に着手している。遺伝子破壊法には慶応の馬場らによって行われている Wanner の系を用いた。破壊株作製のプライマーを慶応から分与していただき、W3110 株上の遺伝子を標的にして行っている。得られた破壊株のバイオフィーム形成能および他の表現型の解析を進めている。また、コロニー形成過程の遺伝子発現パターン解析の一環として、先ず細胞間コミュニケーションに関与する遺伝子が含まれると思われる外膜関連遺伝子に注目した。外膜中にその存在が確認されている Y 遺伝子を含む約 60 個の遺伝子の破壊株を作製し、コロニー形成能や他の表現型の解析と、それぞれの遺伝子の発現パターン解析を進めている。

⑥ トランスクリプトーム解析

1. 【ねらい】:DNA マイクロアレイは網羅的に細胞内の遺伝子発現の変化を解析するのに非常に強力な方法である。大腸菌の全遺伝子を網羅した DNA マイクロアレイを作製し、そのアレイ及び破壊株あるいは欠失株を組み合わせた解析を進め、細胞内の遺伝子ネットワークの

解明を目的とする。

2. 【実施方法】:DNA マイクロアレイの開発はリソース開発の項で述べたアーカイブクローンを宝酒造株式会社の協力を得、DNA 増幅及びスライドグラスにスポットする作業を分担していただき作業を進めた。アーカイブクローン完成後、約3ヶ月でマイクロアレイが完成した。完成したマイクロアレイを利用して、条件検討などは研究員及び大学院生を中心としたチームで作業を進め、実験条件等、DNA マイクロアレイ解析の実験手法の確立を行った。得られたマイクロアレイの画像処理以降の情報解析に関しては、松田(阪大)及び金谷(山形大、現奈良先端大)の助言を得ながら、同じく研究員及び大学院生のチームで行ってきている。また、多くの共同研究を進めている。
3. 【実施状況】:アーカイブクローンの完成後、本プロジェクト開始2年目より DNA マイクロアレイ解析を開始した。当初、多くの研究機関、特に海外でこの手法を用いた解析がスタートしたが、いずれの研究機関においても試行錯誤が続けられており、その実験手法、解析手法などの確立がなされていなかったのが現状であった。そこで、我々は手法の確立を2年目の課題として取り組んだ。検討項目は1)RNA 抽出法、2)Cy3 及び Cy5 によるラベルの方法、3)DNA マイクロアレイのスライドグ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各項目である。特に得られたデータの標準化の方法には細心の注意を払い、データの再現性など DNA マイクロアレイに関する問題点について検討を重ね、自動処理化を目指し開発を進めた。データマイニングに関する開発は金久らにより構築された代謝反応パスウェイデータベースのKEGGを利用し、市販の解析ソフトである GeneSpring を利用して可視化した。実験条件、解析方法の確立を行ってからは、まず、*dam* 遺伝子の欠損株における遺伝子発現パターンの変化から、その細胞における Dam メチル化酵素の生理的な解析にどれほど強力かを示した。さらにバクテリアの細胞の核様体構造に大きく寄与する核様体タンパク質は同時に大きく転写にも影響を与えることが知られているが、その全体像を明らかにすることに挑戦した。使用した核様体タンパクは HU、IHF、LRP、CRP、FIS、H-NS である。それに加えて多くの共同実験が持ち込まれ、それぞれ大腸菌マイクロアレイ解析を行った。例えば、大腸菌の two component システムの機能の全貌を明らかにするため、全セットの欠失株を揃え、それを用いてDNAマイクロアレイ解析を行った。さらにこの方法によって得られたデータ及び解析結果を広く公開するために、データベース構築チームとの連携でデータベースの構築を進めている。
4. 【結果】:検討を開始した当初、total RNA から mRNA だけを取り出す方法が海外等で検討されてきたが、我々の検討から total RNA でも総 RNA 量を1回の実験で 20 μ g 以上を使用することで再現性よく結果を得られるようになった。問題となったのは、DNA マイクロアレイの画像データからの各スポットの定量されたデータの標準化であった。これに関しては、Cy3 及び Cy5 の定量されたデータの比の分布の統計処理を行うことで解決を図った。重要な点は、二つの蛍光強度の比の頻度分布を調べると正規分布と仮定することが可能であることである。

この分布に従うデータとそうでないデータに分離しておくことで自動化が可能になり、同時に再現性よくデータ処理が可能となった。データの解釈のためのツール開発であるが、我々はまず、代謝反応パスウェイデータベースである KEGG 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、代謝反応パスウェイの上に、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にした。その結果、生理学的な解釈が可能となっている。このシステムでは代謝反応パスウェイに登録されている遺伝子データしか、その解析対象に上らないが、それでも細胞内の生理的な意味付けには非常に強力なものである。このシステムを用いて *dam* の欠損株を利用した解析を行った結果、Dam メチル化酵素の本来の生理的な機能は細胞内エネルギーレベルを適正なレベルに保たせるところにあることを示すことができた。また、*dam* 欠損株はサルモネラ菌においてワクチン株になっているが、細菌の感染性における *dam* の機能も統一的に解釈することを示した。すなわち、エネルギーレベルの低下及び細胞外酸素濃度の低下により新たな電子受容体を探すために細胞を動かすシステムが動き出すが、それが *dam* 欠損株では抑えられてしまっており動くことができないことから感染性が下がることを示した。細胞内遺伝子の発現パターンの変化を代謝反応パスウェイの各遺伝子の発現パターンとして見えるようにしたことで、細胞内の生理的な意味付けが容易になり、*dam* 欠損株を例として、本システムを用いることで DNA マイクロアレイ解析が如何に細胞の全体像を見るうえで強力かを示すことができたと考えている。核様体タンパク質の欠損株の解析では対数増殖期と定状期の核様体構造および遺伝子発現においてそれぞれ Fis 及び H-NS が中心的な機能を持っていることを明らかにすることができた。このシステムの確立により、現在では多くの共同研究をも受け入れ、日本における大腸菌 DNA マイクロアレイ解析の中心としての地位を確立できたと考えている。その一例として、名古屋大学の水野及びアメリカの Wanner らとの共同研究として、大腸菌の two component システムの全遺伝子セットの欠失株を用いて、two component システムによる遺伝子ネットワーク解明を行った。その結果、それぞれのレギュレーターにより制御を受ける遺伝子群を明らかにすることができたと同時に、これまで言われてきたが確認できていなかったクロストークの問題に迫ることができた。現在は、この解析に用いた Wanner らの欠失株作製の系を用いて、大腸菌全遺伝子ネットワーク解明に必要と考えられる遺伝子群の欠失を新たに参加した慶応のチームと共同で作製し、DNA マイクロアレイ解析を行っている。

⑦ プロテオーム解析:和田(京大・ウイルス研)

1. 【ねらい】:転写を網羅的に見る DNA マイクロアレイ解析を相補する意味で、同時に翻訳を見ることで、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する。
2. 【実施方法】:奈良先端大チームによるDNAマイクロアレイ解析で利用した株を、同じ実験条件でタンパク質への翻訳を技術員及び大学院生を中心とするチームにより二次元電気泳動を用いて解析を行った。タンパク質の同定は MALDI-TOFMS 及びこれまでの gene-protein index を利用して行った。
3. 【実施状況】:DNA マイクロアレイによる解析と組み合わせて、転写レベルと翻訳レベルの両

者の同時解析を行っている。これまでに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を奈良先端大のチームと同じ株を用いて行った。現在は大腸菌の培養温度を高温にしたときの応答に関与するタンパク質を解析中である。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っている。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を明らかにする。

4. 【結果】:染色体 DNA の 5'-GATC-3'のアデニンメチル化酵素(Dam)の欠損株における大腸菌のタンパク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タンパク質、ヌクレオチド代謝系、翻訳関係のタンパク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(T.Oshima, C. Wada et al., *Mol. Microbiol.*, 投稿中)。現在、大腸菌を高温にしたときの応答と大腸菌必須遺伝子 *obgE*(ObgE は GTPase 活性を持ち、ヒトまで保存されている)の欠損状態におけるプロテオミクス、すなわちタンパク質を中心とした発現解析を行っている。いずれの場合もトランスクリプトーム解析を並行して行っている。

3. 研究実施体制

(ア) リソース開発研究グループ

① ORF クローン作製サブグループ

1. 森 浩禎(奈良先端大・遺伝子教育研究センター、教授)
2. 大腸菌予測 ORF の各種クローンの作製。本年度は細胞分裂遺伝子群の機能解析を目的としたクローンの作製にあたり、遺伝研・西村グループとの連携においても1種類のクローンセットの作製にあたった。

② Transposon 挿入破壊株作製サブグループ

1. 三木 健良(九州大学・薬学部、教授)
2. トランスポゾンを利用した網羅的挿入破壊株の作製。研究協力者として山本(兵庫医大)、松田(阪大)、磯野(神大)、堀内(基生研)、森(奈良先端大)らとともに作業分担をし研究開発にあたった。

③ 網羅的タンパク質同定サブグループ

1. 和田 千恵子(京都大学・ウイルス研究所、助教授)
2. RHFR 法による2次元電気泳動パターンにおける gene-protein index 作製。

④ 系統的欠失株作製サブグループ

1. サブグループ 1

- (ア) 加藤 潤一(東京都立大学、助教授)
- (イ) homologous recombination を利用したシステムティック欠失株作製

2. サブグループ 2

(ア) 馬場 知哉(慶応大学・先端生命科学研究所、講師)

(イ) Wanner 法による網羅的 in frame 欠失株作製

(イ) 情報解析グループ

① アルゴリズムサブグループ

1. 松田 秀雄(大阪大学・基礎工学、助教授)

2. 遺伝子ネットワーク解析アルゴリズムの開発

② コドン解析サブグループ

1. 金谷 重彦(山形大学・工学部、助教授)注、現奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科、助教授

2. コドン組成を利用した遺伝子の分類

③ ORF クラスタ解析サブグループ

1. 森 浩禎(奈良先端大・遺伝子教育研究センター、教授)

2. ORF のアミノ酸配列を利用したクラスタ解析による分類および機能予測。

④ tRNA 解析サブグループ

1. 工藤 喜弘(山形大学・工学部)

2. 大腸菌の特徴推定の手段としての tRNA 遺伝子の並びの解析

(ウ) データベース構築グループ

① 文献データベースサブグループ

1. 磯野 克巳(神戸大学・理学部、教授)

2. 大腸菌の突然変異データに関する文献や配列を網羅したデータベース構築。

② 大腸菌データベースサブグループ

1. 森 浩禎(奈良先端大・遺伝子教育研究センター、教授)

2. ゲノム配列情報およびその解析結果を網羅したデータベース構築と WWW からの公開

(エ) 網羅的機能解析グループ

① コード領域機能解析サブグループ

1. 堀内 嵩(基生研、教授)

2. コード領域における機能未知遺伝子群の機能解析。

② 非コード領域機能解析サブグループ

1. 井口 八郎(京都大学・理学部、教授)

2. 非コード領域における機能未知領域の機能解析。

③ 機能解析コーディネートサブグループ

1. 平賀 壮太(熊本大学、教授)

2. 本プロジェクトより派生する種々の情報を総合的に捉え、研究開発の方向性の打ち出し。
特に複製・分配・分裂に関する全遺伝子の同定。

- ④ 細胞分裂遺伝子群機能解析サブグループ
 1. 西村 昭子(遺伝研、助教授)
 2. 細胞分裂における突然変異株の変異遺伝子の同定。
- ⑤ 機能解析:磯野(神大)
- ⑥ トランスクリプトーム解析サブグループ
 1. 森 浩禎(奈良先端大・遺伝子教育研究センター、教授)
 2. DNA マイクロアレイを利用した解析システムの構築とシステムティック解析。
- ⑦ プロテオーム解析サブグループ
 1. 和田 千恵子(京都大学・ウイルス研究所、助教授)
 2. RHF法による2次元電気泳動法を利用した gene-protein index の作製。

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Fukuda, T., Nakahigashi, K. and Inokuchi H. (2001) Viability of *Escherichia coli* cells under long-term cultivation in a rich nutrient medium, *Genes & Genetic Systems*, 76: 271-278
- Kanjo, N., Nakahigashi, K., Oeda, K. and Inokuchi, H (2001) Isolation and Characterization of a cDNA from soybean and its homolog from, *Escherichia coli*, which both complement the light sensitivity of *Escherichia coli* HemH mutant strain VS101, *Genes & Genetic Systems*, 76: 327-334
- Izutsu, K., Wada, A. and Wada, C. (2001) Expression of Ribosome Modulation Factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp. *Genes to Cells*, 6: 665-676
- Kobayashi, G., Moriya, S. and Wada, C. (2001) Deficiency of essential GTP-binding protein ObgE in *Escherichia coli* inhibits chromosome partition. *Mol. Microbiology* 41: 1037-1052
- Izutsu, K., Wada, C., Komine, Y., Sako, T., Ueguchi, C., Nakura, S., and Wada, A. (2001) *Escherichia coli* ribosome-associated protein SRA, which increase during stationary phase. *J. Bact.*, 183: 2765-2773
- 森浩禎, 堀内嵩, 磯野克巳, 和田千恵子, 金谷重彦, 北川正成, 荒武, 大島拓 (2001) 大腸菌のポストシーケンスゲノム解析. 蛋白質・核酸・酵素, 46: 1977-1985
- Kanaya, S., Kinouchi, M., Abe, T., Kudo, Y., Yamada, Y., Nishi, T., Mori, H. and Ikemura, T. (2001) Analysis of codon usage diversity of bacterial genes with a self-organizing map (SOM): characterization of horizontally transferred genes with emphasis on the *E. coli* O157 genome. *Gene*, 276: 89-99
- 金谷重彦, 木ノ内誠, 大平賢, 工藤喜弘 (2001) 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: 14-31,
- Kawakami, H., Iwura, T., Takata, M., Sekimizu, K., Hiraga, S. and Katayama, T. (2001) Arrest of cell division and nucleoid partition by genetic alterations in the sliding clamp of the replicase and in

DnaA. Mol. Genet. Genomics, 266: 167-179

- Ohsumi, K., Yamazoe, M. and Hiraga, S. (2001) Different localization of SeqA-bound nascent DNA clusters and MukF-MukE-MukB complex in *Escherichia coli* cells. Mol. Microbiol., 40: 835-845.
- Sunako, Y., Onogi, T. and Hiraga, S. (2001) Sister chromosome cohesion of *Escheirchia coli*, Mol. Microbiol., 42: 1233-1241
- Fujita, K., Horie, T. and Isono, K. (2001) Cross-genomic analysis of the translational systems of various organisms. J. Indust. Microbiol. 27: 163-169.
- Isono, K. (2001) Genomics meets informatics (meeting report) Genome Biology 2: 4006.1-4006.3.
- Nihei, C., Nakayashiki, T., Nakamura, K., Inokuchi, H., Gennis, R.B., Kojima, S., & Kita. K. (2001) Abortive assembly of succinate-ubiquinone reductase (Complex II) in a ferrochelatase-deficient mutant of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet., 265: 394-404
- Nakano, H., Goto, S., Nakayashiki, K & Inokuchi, H. (2001) Temperature-sensitive mutations in various genes of *Escherichia coli* K-12 can be suppressed by the *ssrA* gene for 10Sa RNA (tmRNA). Mol. Gen. Genet., 265: 615-621
- Eguchi, A., Akuta, T., Okuyama, H., Senda, T., Yokoi, H., Inokuchi, H., Fujita, S., Hayakawa, T., Takeda, K., Hasegawa, M. and Nakanishi, M. (2001) Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into Mammalian cells, J. Bio. Chem., 276: 26204-26210
- Nakahigashi, K., Kubo, N., Maeda, M., Wada, C., Oshima, T., Mori, H. and Inokuchi, H. (2002) HemK, a new class of protein methyl transferase with similarity to DNA, methyl transferases, methylates polypeptide chain release factors and *hemK* knockout induces in translational termination, Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 1473-1478.
- 加藤潤一, 山本義弘, 三木健良, (2001) 大腸菌 K-12 株全遺伝子の系統的な機能解析, 蛋白質・核酸・酵素, 46: 2386-92
- 松田秀雄, 遠里由佳子 (2001) 代謝反応パスウェイの分岐を含む類似反応ネットワークの探索, 蛋白質・核酸・酵素, 46: 2550-2554
- Makinoshima, H., Nishimura, A. and Ishihama, A. (2002) Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. Mol Microbiol, 43: 269-280.
- Kawano, M., Kanaya, S., Oshima, T., Masuda, Y., Ara, T. and Mori, H (2002) Distribution of Repetitive Sequences on the Leading and Lagging Strands of the *Escherichia coli* Genome: Comparative Study of Long Direct Repeat (LDR) Sequences, DNA Research, 9: 1-10
- Yamagishi, K., Oshima, T., Masuda, Y., Ara, T., Kanaya, S. and Mori, H. (2002) Conservation of Translation Initiation Sites Based on Dinucleotide, Frequency and Codon

Usage in *Escherichia coli* K-12 (W3110): Non-random Distribution of A/T-rich Sequences Immediately Upstream of the Translation Initiation Codon, DNA Research 9: 19-24

- Onogi, T., Ohsumi, K., Katayama, T. and Hiraga, S. (2002) Replication-dependent recruitment of the β -subunit of DNA polymerase III from cytosolic spaces to replication forks in *Escherichia coli*, J. Bacteriol. 184: 867-870.
- Uehara T., Matsuzawa H., and Nishimura A. (2001) HscA is involved in the dynamics of FtsZ-ring formation in *Escherichia coli* K-12. Genes to Cells, 6: 803-814
- Fujishima H., Nishimura A., Wachi M., Takagi H., Hirasawa T., Teraoka, H., Nishimori K., Kawabata T., Nishikawa K., and Nagai K. (2002) *kdsA* mutations affect FtsZ-ring formation in *Escherichia coli* K-12. Microbial. 148:103-112
- Nakahigashi, K., Kubo, N., Narita, S., Shimaoka, T., Goto, S., Oshima, T., Mori, H., Maeda, M., Wada, C., and Inokuchi, H. (2002) HemK, a class of protein methyl transferase with similarity to DNA methyl transferases, methylates polypeptide chain release factors, and hemK knockout induces defects in translational termination, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 1473-1478

(2) 特許出願

国内特許 2 件