

「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

1.1 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。

1.2 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。

#### 1.2.1 リソースの作製

1.2.1.1 予測遺伝子（約4,000遺伝子）のクローンの維持管理と分譲システムの構築（森）

1.2.1.2 網羅的挿入破壊株作製（三木、山本、松田、磯野、堀内、森）

1.2.1.3 網羅的in frame 遺伝子欠失株作製（馬場）

#### 1.2.2 バイオインフォマティクス

1.2.2.1 類似部分グラフ探索による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）

1.2.2.2 マイクロアレイ解析支援システム（金谷）

1.2.2.3 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）

#### 1.2.3 データベース

1.2.3.1 大腸菌データベースシステムの開発（森）

1.2.3.2 大腸菌関連文献データベース（磯野）

1.2.4 網羅的機能解析機能未解析遺伝子の機能解析（堀内、磯野、井口、森）

1.2.4.1 未同定変異株のORFクローンを利用した高効率同定（西村）

1.2.4.2 タンパク質相互作用ネットワークの解明（森、馬場、和田）

1.2.4.3 遺伝子発現ネットワーク解明（森）

1.2.4.4 全タンパク質細胞内局在性の解析（仁木）

1.3 成果：本年度はこれまで構築を行ってきたリソース群、解析ツールなどを活用した網羅的な解析へと、研究開発の中心を移行した。以下に成果をまとめる。

#### 1.3.1 リソースの作製

- 1.3.1.1 構築を行ったプラスミドクローンの維持・管理及び分譲システムの構築を行った。得られているプラスミドクローンは全てクローン化両末端からの配列なり決定を進め、クローン化断片の再確認を行っている。また、迅速なリソース要求に応えられる為に、管理・分譲の方法の確立を行った。
- 1.3.1.2 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13万5000クローンの構築と配列決定（未純化クローン）により、57575株の変異株を同定した。これから7925株の破壊株（90%以上の遺伝子の変異株が分離されていると推定しているが、信頼できるアノテーション終了後計数予定）の選択を終了。この内約6200株の純化、保存、配列確認を終了した（2003年3月時点）。
- 1.3.1.3 2255遺伝子について遺伝子欠失株を作製し、このうち208遺伝子についてシステムティックな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が進行中、1440遺伝子については国内で個別に遺伝子機能解析が進行中。
- 1.3.2 バイオインフォマティクス
  - 1.3.2.1 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ル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。
  - 1.3.2.2 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法論の開発を行った。
  - 1.3.2.3 tRNA遺伝子クラスターを利用した大腸菌の特徴解析
- 1.3.3 データベース
  - 1.3.3.1 RDB(リレーショナルデータベース)を利用してWWWから検索可能なシステムとして構築している、GenoBaseシステムの拡張を行っている。ゲノム配列を中心として、プロジェクトから生み出されるデータの公開・情報共有を実現させている。
  - 1.3.3.2 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。
- 1.4 今後の見通し：本プロジェクト開始直後より構築を始めた大腸菌全予測遺伝子のプラスミドクローンの作製はGFP融合型と非融合型の2種類のクローンライブラリーが完成している。このプラスミドライブラリーを用いたDNAマイクロアレイも開発が終了し、すでにタカラバイオより商品化されている。すでに多くの解析に供されており、本プロジェクト内においては全タンパク質相互作用ネットワークの解明、遺伝子発現ネットワーク解明、共同研究としてタンパク質構造解析、酵素タンパク質の精製とパラメーター取得、遺伝子機能解析など国内外を問わず多くの研究開発に利用されるようになってきた。プロジェクト進行中にアメリカ、Pardue大学のWanner博士らにより開発された遺伝子欠失株作製方法を利用して、共同で全遺伝子の網羅的欠失株作製を開始したが、これも順調に進んでおり、2003年中の完成の目処が立っている。遺伝子

の完全な欠失として設計されているので、今後の遺伝子機能解析などの大きなリソースとして世界の注目を集めている。現在、すでに転写因子、代謝関連遺伝子の同欠失株によるマイクロアレイ解析が進行中であり、近くこの欠失株の重要性を示せるものと期待できる。バイオインフォマティクスにおける開発も順調に進み、実際に役に立つ解析システムとしてマイクロアレイ解析の現場にて活用されている。タンパク質相互作用ネットワークの解明も順調に進んでおり、こちらも2003年中の終了を予定している。タンパク質局在性解析もすでに全遺伝子産物の解析が終了しており、新規の事実も浮かび上がってきた。これら網羅的な解析から生み出される情報はこれからの細胞の完全な理解に向けた解析の大きな基盤となることは間違いなく、国内外を問わず非常に大きな注目を集めている。多くの共同研究依頼やリソース分与依頼などが如実にそれを物語っている。我々自身も、これまで構築したリソースやツールを用いた網羅的な解析へと研究開発の中心を移し、完全な理解、全細胞機能のモデル化に向けた解析へと進み世界をリードしていくことが可能と考えている。

## 2. 研究実施内容

### 2.1 リソース開発研究

#### 2.1.1 予測遺伝子（約4,000遺伝子）のクローンの維持管理と分譲システムの構築：森（奈良先端大）

2.1.1.1 【ねらい】：これまで本プロジェクトにて作製を行ってきたリソースの有効活用と本プロジェクトの研究の発展を目的としてリソースの維持管理と分譲を効率的に行うシステムの構築を行う

2.1.1.2 【実施方法】：本開発は以下の点の整備を行った。

##### 2.1.1.2.1 リソースの質の確保のための配列決定による確認作業

配列解析による確認作業は、各リソースが共通に持つベクター配列を利用して、クローン化断片の両側より配列決定を行う。

##### 2.1.1.2.2 保管体制の確立

クローンの保管をDNA溶液として行うものと、大腸菌に持たせた方法で進める。基本的に96穴マイクロタイターによるDNA溶液の保管と独立したチューブに保管する方法の2つの検討と実装を行った。

##### 2.1.1.2.3 分譲体制の確立

作製したリソースを用いた効率的な研究開発、特に本プロジェクトに於ける研究開発を中心に効率的な分譲体制を整える。

##### 2.1.1.2.4 新たなリソースへの拡張

大腸菌予測全ORFのクローンを終了し、維持管理システムを構築した。本システムはSfiIという制限酵素サイトがクローン化断片の両側に再生する様に設計してある。これを利用して他のベクターへのクローン化を容易にしている。このシステムをGatewayが採用しているシステムを導入することにより、invivoによる組み換えを利用

して、より簡便に他ベクターに移せるように設計を行った。

#### 2.1.1.3 【実施状況】：

2.1.1.3.1 ベクター側の共通配列をプライマーとして、ABI社製ダイターミネータキットを用いて反応を行い、反応産物を既設のABI 3700シーケンサーを用いて配列決定を行った。反応はすべて96単位で進めた。すでに全クローンの配列決定を終了した。BLAST解析を用いて、予測ORFが設計通りクローン化されているかどうかをチェックする。

#### 2.1.1.3.2 保管体制の確立

DNA溶液の-30℃及び大腸菌株の-80℃保存に耐えうる96マイクロタイター型の保存容器の選別を行った。96単位での操作を行うことで人為ミスを極力避けた。DNA溶液に関しては、96穴型分注ロボットを用い、コピーをとった。形質転換にも同様に96穴型分注ロボットを用いて形質転換を行った後、深底タイプの96穴型ブロックを用いて培養を行った。その後、グリセロールを15%加え96穴マイクロタイタープレートに移した。

2.1.1.3.3 本プロジェクト内外を問わず、研究の拡張を図るために分譲を始めている。現在のところ、多くの場合が全クローンをまとめて送る方式をとっているが、今後は個別の遺伝子の単独の送付も簡便に行えるように、ストック自身を96単位ではなく、1本ずつの個別のチューブに保管する方式が必要である。

2.1.1.3.4 Gatewayシステムというのは細胞内で相同配列を利用した組み換えでベクターの交換を行えるようにするシステムである。SfiIを用いて簡便にGateway用のベクターに移すことができるようにアメリカのテキサス大学との共同研究で開発を行った。本システムの有効性を確認するため、保管DNAストックの最初の1枚目についてクローン化断片のGatewayシステムへのクローン化を行い、有効性のテストを行っている

#### 2.1.1.4 【結果】：

2.1.1.4.1 配列決定を行うことで挿入断片の両末端の配列を約700bpずつ読み取り、クローンの断片の確認と方向の確認を行った。

2.1.1.4.2 96マイクロタイターによる保存方法は、使用プレートの選定、シールの方法、分注の方法、保管の方法の検討を行った。96単位でのコピー等の分注作業は96穴タイプの分注機をクリーンベンチの中に設置し、無菌的に処理が行えるようにした。現在、DNA及びプラスミドクローンを持った菌株の形で96穴タイプでの保管を行っている。個別チューブによる保管は分注の際の人的ミスを抑える方法の検討が必要であり、次年度の課題とした。

2.1.1.4.3 本プロジェクト内でのDNA及び菌株の移送、及びプロジェクト外の研究グループとの共同研究のためのクローンの送付を行ってきている。分譲のためのコピーの増幅方法と送付方法を決定し、確立している

2.1.1.4.4 アメリカテキサス大学のHu博士のグループとの共同研究で開発を進めた。

ベクターの構築は終わり、現在は最初のテストとして数十種の断片のSfiI制限酵素を利用した移動を行った。現在、そのクローンのGatewayシステムとしての性質のチェックを行っている。

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

2.1.2.1 【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。

2.1.2.2 【実施方法】：本研究は、下記の手順で行った。

2.1.2.2.1 システムの開発

2.1.2.2.2 トランスポゾン挿入小原クローンの作製

2.1.2.2.3 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

2.1.2.2.4 配列決定によるトランスポゾン挿入位置の確認

2.1.2.2.5 変異株の選択と純化、保存（正逆両向き、2株/ORF）

2.1.2.2.6 純化株からのファージ鑄型の作製と配列決定によるトランスポゾン挿入位置の確認

2.1.2.2.7 修復：間違いが見いだされた変異株の分離し直し

2.1.2.2.8 必須遺伝子及び細胞増殖に影響を及ぼす遺伝子の同定

2.1.2.2.9 非必須遺伝子についてシス部分2倍体破壊株から1倍体破壊株の作製と保存

2.1.2.2.10 本実験で用いた手法が適用できなかった小原クローン（14株）にカバーされる領域の個別的な方法による破壊株の作製

具体的には、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鑄型として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、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、保存する。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、否かの判定を行う。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。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、現在はその問題は完全にクリアーすることができた。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<sup>2+</sup>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。

- 2.1.2.3 【実施状況】：実際の破壊株作製においては、各ステップを各グループで分担し共同で進めた。上記（1）は三木が担当し、本プロジェクトの開始時点までにはほぼ終了していた。
- 2.1.2.3.1 （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。
- 2.1.2.3.2 （4）は、平成13年度以前は、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、電気泳動を行った。平成14年度においては、PCR反応は、三木及び磯野が担当、シーケンス反応、反応産物精製、電気泳動は堀内のグループが担当した。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、得られた配列から染色体上での破壊の位置決定を行った。
- 2.1.2.3.3 （5）は三木を中心に研究補助員等のチームで遂行した。
- 2.1.2.3.4 （6）のフェージ鑄型の作製は三木及び三木グループの研究補助員等が中心となって、PCR反応は三木が中心となって、シーケンス反応と反応産物の精製、電気泳動は堀内グループで、得られた配列結果の解析は松田のグループで行っている。
- 2.1.2.3.5 （7）（8）（9）及び（10）は、配列決定について堀内グループの援助を受けながら、三木グループが行っている。
- 2.1.2.4 【結果】：これまでに、全遺伝子の75%に相当する約3000遺伝子の破壊株、約6100の構築と保存が終了した。数ヶ月以内に、約90%の遺伝子の破壊株の確認と保存が終了する予定である。本実験で作製された破壊株の優れた点は、変異株が塩基配列から予想されたORF（アノテーション）に基かないで作製されていること、必須遺伝子や細胞増殖に関与する遺伝子の破壊株を抑圧変異の導入なしに分離できること、変異株の分離が報告された遺伝子を含めて網羅的に作製されていること、などである。これまでの遺伝子破壊株作製の進行状況は以下の通りである。
- 2.1.2.4.1 現在までに、大腸菌小原クローン476株の内、462株を用いて、トランスポゾン染色体上にランダムに挿入した破壊株セットを作製した。得られた破壊株の総数は約13万5000株、破壊株を保存したマイクロタイタープレートは合計1400枚に達する（ステップ3）。残り14株は形質導入体が得られなかったので個別に破壊することとした。
- 2.1.2.4.2 これらを用いてLongPCRと一次配列決定を終了し、染色体上に変異を持つ変異株57575株を同定した（ステップ4）。残りは、初期（開始時～2002年度）のPCR及び配列決定技術の力不足のため解析から落ちたもの、及びフェージDNA上にトランスポゾンが挿入されたものである。逆位領域など情報解析から漏れた3456株の変異株同定は現在進行中。
- 2.1.2.4.3 57575株の変異株から、7925株を選択、この内7411株の二倍体の純化と保存、非必須遺伝子の一倍体株構築を終了した（ステップ5）。残り513株は、進行中。

- 2.1.2.4.4 純化、保存が終了した7411株の内、6634株の配列決定による変異位置の確認を行い、6211株において変異株作製が終了した（ステップ6）。残り477株は、進行中。
- 2.1.2.4.5 4）の確認作業で、一次の配列決定と異なった結果などが得られた423株（6.4%）は、配列決定をやり直す、純化をやり直す、もとの一次保存株に戻って純化、保存からやり直す、別の破壊株を選択し直すなどの方法により、修復作業を行っている（ステップ7）。
- 2.1.2.4.6 上記6211株について、「定性的な方法」による必須遺伝子及び細胞増殖に影響を及ぼす遺伝子の同定に基づき、必須ではないと判断された株については一倍体破壊株を作製し、その保存を完了した（ステップ9）。
- 2.1.2.4.7 最終的に二倍体変異株の構築が終了した6211株については、現在「定量的な方法」により、必須遺伝子、細胞増殖に関与する遺伝子であるかどうかの判定を行う実験を開始した（ステップ8）。これまでの予備的な実験結果は、必須遺伝子と非必須遺伝子の中間的な表現型を示す多くの遺伝子が存在すること、必須、非必須については必ずしもこれまでの報告が正しくないことを示している。
- 2.1.2.4.8 小原クローンへのトランスポゾン挿入法による染色体遺伝子破壊が困難であった14株のうち、クローン#370については、本来の株とは逆向きに染色体DNAを挿入することにより遺伝子破壊が可能となったので、これを用いて破壊を開始した（ステップ10）。
- 2.1.3 系統的欠失株作製：馬場（慶応）
  - 2.1.3.1 【ねらい】：Wanner法による網羅的in frame遺伝子欠失株作製を行い、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。
  - 2.1.3.2 【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。
  - 2.1.3.3 【実施状況】：遺伝子欠失はWannerらにより開発された方法で進めている。以下に遺伝子欠失株作製の方法を示す。
    - 2.1.3.3.1 下流遺伝子に対する極性効果をなくす目的で、in frameで欠失を導入する。その為に開始コドンと終始コドンを含めた7コドン（21bp）が残るよう遺伝子欠失用の合成オリゴDNAを設計した。この設計により下流の遺伝子のSD配列に相当する領域が残ることで遺伝子欠失による下流遺伝子に対する極性効果が最小限に抑えられる。また、欠失用の合成オリゴDNAには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欠失遺伝子に対して設計し、DNA合成を行った。
    - 2.1.3.3.2 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。
    - 2.1.3.3.3 効率化の為に、96穴単位での遺伝子欠失株作製の実験システムを構築し、

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による増幅を行った。

- 2.1.3.3.4 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した。
- 2.1.3.3.5 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始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。
- 2.1.3.4 **【結果】**：欠失予定遺伝子の優先度に応じて、オリゴDNAの合成を行い、順次遺伝子欠失株の作製実験を進めている。現在までに2255遺伝子についての遺伝子欠失株を得た。このうち、208遺伝子については本CRESTプロジェクト内で機能解析が進行中である。この中には54の転写調節因子の遺伝子欠失株も含まれており、これらについては順次システムティックな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が進行中である。また、1440遺伝子については国内で個別に遺伝子機能解析が共同研究として進行中である。来年度の前期中には大腸菌の全予測遺伝子に対して遺伝子欠失株作製を完了させる目処を立てることに成功した。

## 2.2 情報解析

### 2.2.1 遺伝子ネットワーク解析アルゴリズムの開発：松田（阪大）

- 2.2.1.1 **【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等）を解析することにより、遺伝子ネットワークの基本構成単位を明らかにすると共に、必須遺伝子との関連、ネットワークの欠損部分（遺伝子が同定されていない酵素反応など）の解明を目指す。
- 2.2.1.2 **【実施方法】**：大阪大学において松田を中心として大学院生とともに研究開発を進めた。代謝反応パスウェイの解析結果と必須遺伝子の関連については、遺伝子破壊株作製グループと協調して研究開発を行ってきた。
- 2.2.1.3 **【実施状況】**：(1) ゲノムと代謝反応パスウェイの比較アルゴリズムの開発  
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ているが、これに酵素の遺伝子の名前やゲノム上での位置を付加した。これを使って、複数のパスウェイ間に現れる類似反応パターンの中で、その反応の触媒酵素の遺伝子がゲノム上で近接しているものをパスウェイの基本構成単位とみなして、これらを検出する方法を開発した。類似反応パターンの検出は、昨年度までに開発したEC番号間の類似性に着目したアライメントにより行い、ゲノムとの比較は部分グラフ探索手法を新たに考案した。
- 2.2.1.4 **【結果】**：(1) 大腸菌、枯草菌、インフルエンザ菌などの微生物の代謝反応パスウェイを網羅的に比較して、類似した反応系列を示す部分を抽出すると共に、得られた類似反応部分系列に含まれる酵素の遺伝子がゲノム上で近接しているものを探

索した。その結果、トリプトファンとヒスチジンという類似したアミノ酸の合成経路や、プリン塩基などの塩基の合成経路が、これらの微生物で類似反応部分系列となるとともに、それに含まれる酵素遺伝子がそれらのゲノム上で共通してオペロンを形成していることがわかった。これらオペロンと対応が付けられる反応部分系列は、真正細菌、古細菌やヒトにおいて共通して保存されているパスウェイを解析した研究報告 (J. M. Peregrin-Alvarez, et al., *Genome Res.* 13, 422-427, 2003) と良く一致しており、パスウェイの起源についての示唆を与えると考えられる。

## 2.2.2 コドン組成を利用した遺伝子の分類：金谷（奈良先端大）

2.2.2.1 【ねらい】：ゲノム上の遺伝子の配置、コドン組成に代表されるゲノム塩基組成における特徴、さらには、発現プロファイルを考慮することによる多面的視点での転写単位推定法を開発し、大腸菌ゲノム上の転写単位を予測した。

2.2.2.2 【実施方法】：バクテリアにおける分子生物学に関する12誌を1980年-2002年について調査し、600個の文献を整理し、SQL言語処理系によってリレーショナルデータベースシステムを構築した。この調査により、941遺伝子に対する401個の転写単位を収集することができた。全体のうち153個がモノシストロニックな転写単位である。また、248個がポリシストロニックな転写単位（941遺伝子）である。この文献情報をもとに本研究で開発した転写単位の推定法の精度を検討した。

2.2.2.3 【実施状況】：精度において70%の既知転写単位については転写単位を正しく予測できた。また1遺伝子の過不足までを許容範囲とした場合、全体の86%の既知転写単位はこの許容範囲内に含まれる。

2.2.2.4 【結果】：本手法は転写単位予測の実用に耐えられるものと考えられる。そこで、大腸菌ゲノム全体における転写単位を推定したところ、407個の転写単位がポリシストロニックな転写単位と予測された。転写単位に属する遺伝子が多数を占める機能クラスにより転写単位を特徴づけることを試みた。なお、以下の13種の機能クラスを本解析では用いた。(class 1, Amino acid metabolism; class 2, Biosynthesis of cofactors; class 3, Cell envelope; class 4, Cellular process; class 5: Central intermediary; class 6, Energy metabolism; class 7, Fatty acid/phospholipids metabolism; class 8, Nucleotide metabolism; class 9:,Regulatory functions; class 10, Replication; class 11 Transport/binding protein; class 12, Translation; class 13,Transcription) 407個の転写単位のうち182個(44%)はクラス1-13により特徴づけることができた。残りの225個の転写単位はいまのところ機能未知の遺伝子により構成されている。225個々の転写単位に属する遺伝子の機能を検討することにより明らかに転写単位が機能により特徴づけられたものを以下に列挙する。ID57において鉄輸送に関わる二つの遺伝子(fhuA、fhuB)が転写単位と予測された。ID152(yaiB-phoA-psiF)はリン酸飢餓に関わる転写単位、ID258(citAB)は2-コンポーネント系の転写単位、ID321(bioBFCF)はビオチン合成に関わる転写単位、ID401(ssuADCB)は芳香族スルホン酸輸送系に関わる転写単位、ID402(ycbQRST)

は外膜タンパク質からなる転写単位、ID462は鞭毛合成に関わる転写転写単位、ID542(sapCB)はペプチド輸送系、ID593(paaD-267#1)酸リン酸化酵素、ID772(ruvBA)はホリデー構造ヘリカーゼに関わる転写単位、ID779(f1hEAB), ID790(f1iDST-amyA), ID795(f1iFGHIJKLMNOPQR)は鞭毛合成に関わる転写単位、ID899(napHGADF)はフェレドキシ型電子伝達系、ID996(talA-tktB)はトランスアルドラーゼとケトララーゼによる転写単位、ID1134(recC-ptr-recB)はDNAヘリカーゼを中心とした複製系、ID1198(exbBD)は小分子カチオン輸送系、ID1213(ttdAB)はL-tartrate dehydrogenase、ID1250(agaYBC)はタガトースビスホスフェートアルドラーゼ、ID1449(glyQS)はグリシンtRNA合成酵素、ID1494(glvCBG)とID1576(frvBXR)はそれぞれPTSシステムに関わる転写単位、ID1533(rffTMK)はアミノ酸転移酵素、ID1730(fimEAICD)は絨毛合成に関わる転写単位である。このように遺伝子の発現プロファイルとゲノム上の位置にもとづいて転写単位を推定し、得られた転写単位の機能上の特徴を網羅的に整理することができた。

## 2.2.3 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）

2.2.3.1 【ねらい】：俯瞰的な観点から大腸菌の特徴を知る方法の一環として、またコーディング領域（mRNA遺伝子）を浮き彫りする意図で、コーディング領域ではない部位の特徴を調べる狙いで、バクテリア全体のtRNA遺伝子タンデムの特徴を調べる。tRNA遺伝子は長さ約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遺伝子に関連アミノ酸の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）。tRNA遺伝子はタンデム状態に並んでいることは特にグラム陽性細菌で顕著であるが、その存在位置はmRNA遺伝子、rRNA遺伝子の研究者からは“遺伝子が存在しない”いわゆる intergenic 部位と命名されるほど冷遇されることが多い。しかし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 *AtccMcatIcatStga* 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遺伝子タンデム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。

2.2.3.2 【実施方法】：コンプライートゲノムか否かを問わず、すべてのゲノム情報から tRNA 遺伝子タンデムの情報を引き出す。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遺伝子タンデムは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。

2.2.3.3 【実施状況】：DDBJ/GenBank/EMBLファイル（Release 19）からRNA(rRNA,

tRNA) 遺伝子タンデム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 actinomycetemcomitans* 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。

- 2.2.3.4 【結果】：最初アンチコドンを見逃し(Kudo et al., 1995)した予備調査は細菌種特異性タンデムの存在を暗示したが、アンチコドンを考慮して制限を厳しくしてもどこにでも見つかる普遍的であることが判明したタンデムはごく少数であった：例：IgatAtgc、グラム陰性菌 (*Escherichia coli*) とグラム陽性細菌 (*Bacillus subtilis*) の二つで見つかっている GgccCgcaLtaa、GgccCgcaLtaa など (Kudo et al., 1998)。KLから KtttLtaa, KtttLcag, KtttLtag とに識別されたのがグラム陽性細菌の中だけであった事実は細菌種特異性の多様な面の存在を示唆している。細菌の種類の数に対する共通タンデムの多様さはグラム陰性細菌ではグラム陽性細菌、マイコプラズマ (例：GgccLtaa; RacgPtggAtgc; McatIcatStga; QctgEctc; McatIcatStga; McatDgtcFgaa; EttcDgtc など。) に比べて乏しい。グラム陽性細菌 *Mycobacterium leprae* のゲノム断片 (GenBank U15182) で偶然見つけた EttcDgtc 候補をみつけたときいままで見つかった EttcDgtc の例を調べるといずれもグラム陽性細菌でのみ見つかったことがわかり、近傍 tRNA 遺伝子として上流の Vtac と Kttt が 1 例ずつ、下流の Fgaa 例があったので、いまの EttcDgtc 候補の上下流を探すと下流の適切な部位に Fgaa 候補を探しあてた (Kudo et al., 1998)。さて今回はグラム陰性菌の場合についてさらに分析を進め、*E. coli* 中心に 3 分類した：(1) *E. coli* でのみ：YgtaYgta, VtacVtacKttt, DgtcWcca AggcAggc AggcAggc など；(2) *E. coli* およびその他：RccgHgtg (*Photobacterium phosphoreum*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio harveyi* にあり、RccgHgtgLcagPtgg と延ばすと *A. hydrophila*, *S. typhimurium* だけ)；YgtaGtccTggt (*Stigmatella aurantiaca*, *Pseudomonas aeruginosa* NIH 18; TggtYgtaGtccTggt と延ばすと *E. coli* と *S. aurantiaca* だけとなり、類似の TtgtYgtaGcccTggt は *E. coli* にもなくなり、共通タンデムではなくなって *Thermus thermophilus* HB8 単独となる。) など；(3) *E. coli* にはない：DgtcDgtc *Pseudomonas aeruginosa* NIH 18; AtgcIgat *Campylobacter jejuni*; PtggHgtgPtgg *P. phosphoreum*, *V. harveyi*: (*V. harveyi* の場合は RccgHgtg [(2) 参照] に連続している)。今後は特に下記の二つのことを念頭) において解析を進める：(1) いままでは tRNA 遺伝子を求めて DNA 断片を調べるのに tRNA 遺伝子タンデムの存在が明記されている部位のみを探していたのを孤立しているように見える tRNA 遺伝子の上下流も探す。(2) 種の独立性の概念が次第に薄れているような傾向があるのに留意して tRNA タンデムの分析に際して細菌の系統図に考えを拘束されない方向に進む、すなわち tRNA 遺伝子タンデムの細菌間の類似性が生じる原因を生育環境などにも求め、近縁性にのみ

捕らわれることはしない。

## 2.3 データベース

### 2.3.1 文献データベースの開発：磯野（神大）

2.3.1.1 【ねらい】：これまでに解析された大腸菌の遺伝子ならびに突然変異に関する文献データを網羅して整備し、ゲノム構造データに連関させて近縁のバクテリアの相同遺伝子に関する情報を含め、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。

2.3.1.2 【実施方法】：技術員を中心として文献複写を行ってOCRソフトでデジタルデータに変換し、スペルミスその他のミスを除去後、データベースに収録してまとめる。

2.3.1.3 【実施状況】：昨年度に引き続き、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連関させて利用できるデータベースに整えた。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した。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ることのできるデータベースの作製を行った。これまでに大腸菌の遺伝学的な解析に関連した約4,500の文献を収録してある。

2.3.1.4 【結果】：これまでの段階でデータ整理を終えたので、奈良先端科学技術大学院大学のサーバーで公開しているGenobaseに組み入れるための作業を行い、データベース全体のまとめと内容の改善図り公開する

### 2.3.2 大腸菌データベースの開発と公開：森（奈良先端大）

2.3.2.1 【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やコンピュータによる機能解析結果、磯野らによる変異データベースなどを統合し、広くインターネットを利用した公開のしくみをつくり、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。

2.3.2.2 【実施方法】：技術員2名が中心となり検索システムの構築を行う。

2.3.2.3 【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、これまでの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扱いなどに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（データベースエンジンはPostgreSQL）を採用。インターネットを通じた、ホームページからのデータ検索システムを構築、更新している。開発にはPHP、JavaおよびPerl言語を利用している。現在は本プロジェクトから派生する実験結果やコンピュータ解析結果のデ

ータベース化を行っている。

- 2.3.2.4 【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ーンのデータ、マイクロアレイ解析から得られるデータ、破壊株、欠失株などのリソースの情報、など、あらゆる種類のデータを簡便にインターネット上で提供できるようになった。

## 2.4 網羅的機能解析

### 2.4.1 コード領域の機能解析：堀内（基生研）

- 2.4.1.1 【ねらい】この網羅的機能解析と次の破壊株を用いたシステムティック機能分類法の確立は、共に破壊株の完成が前提である。その完成は現在間近であるといえ、平成14年度始めには計画半ばの為、以下のことに鋭意取り組んだ。

#### 2.4.1.1.1 網羅的破壊株の破壊個所の配列決定

#### 2.4.1.1.2 機能解析に用いているW3110株の全塩基配列の決定

#### 2.4.1.1.3 網羅的破壊株の破壊個所の配列決定

三木らは網羅的破壊株の作製には、小原クローンを利用し、各クローンの大腸菌由来部分にトランスポゾンランダムに挿入させ、それを大腸菌ゲノムに置き換えることで、目的の破壊株を分離するものである。これには、挿入個所の配列決定が必須であり、その一部を基生研で行った。

- 2.4.1.2 【実施方法】：小原クローンの大腸菌ゲノム由来部分をPCRで増幅し、それをテンプレートに用いてトランスポゾン挿入部分の配列決定を行った。

- 2.4.1.3 【実施状況】と【結果】：合計13,250サンプルの配列決定を行い、各トランスポゾン挿入配列を同定した。

#### 2.4.1.3.1 W3110株の全塩基配列の決定

- 2.4.1.3.1.1 【ねらい】：これまで大腸菌の野生株として最も良く解析されてきた、また我々が本プロジェクトの機能解析を行ってきたW3110株の全塩基配列を決定することで、この株の解析の基盤を確立すると共に、米国が配列決定したMG1655との比較から、大腸菌のmicro-evolutionとしての過程を明らかにする目的で行った。

- 2.4.1.3.1.2 【実施方法】：本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。テンプレート作製法として、今回決定した領域の多くの部分を従来の方法を少し改良した変法を用い、残りを米国と類似の手法を用いた。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増幅によるテンプレート作製とその精製、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アップ、培養およびDNA調製、6) シークエンس反応およびDNAシークエンサーによる処理、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ヶ前後の各小原クローンをLong PCRした後、それらの

産物を混合し精製するところ以外は従来と同様に行った。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と類似の手法を採用した。全配列を決定し一本にした後、MG1655の配列と比較し、異なる配列部分に関して両株のゲノムDNAを用いてその部分の配列決定の再確定を行い、その異同を決定した。

2.4.1.3.1.3 【実施状況】と【結果】：W3110株の4,646,332塩基からなる全配列を決定した。MG1655株の配列との比較から、約350箇所の違いが存在すること、それらの配列の再確認実験から、大部分の違いはMG1655株側にあるが、おそらくその多くは配列決定時の誤りにあること、最終的な両株の配列の違いは8箇所9塩基だけであること、トランスポゾンの違いはそれより多い(15箇所)こと等が明らかとなった。更にそれらの違いについて、日本にあるW3110株の5種類のサブグループを用いて調べたところ、点変異・トランスポゾンともにサブグループ間でそのパターンに違いがあることが判明し、それらの系統関係を明らかにできた。現在新しいデータに基づくORFの解析を進行中である。

2.4.2 細胞分裂遺伝子群の網羅的解析：西村(遺伝研)

2.4.2.1 【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。

2.4.2.2 【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、SfiI切断部位の導入によるプラスミドの改変を行った。

2.4.2.3 【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特定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SfiIを付加した。この為、目的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。

2.4.2.4 【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。構築した可動プラスミドは、(1) 接合によりF+株からF-株に伝達されるので、いちいちコンピテントセルを作成する必要が無い、(2) IPTGによる発現制御、(3) コピー数が低いが、DNA採取時はクロマイにより増幅可能、(4) アンピシリン耐性遺伝子、マルチクローニングサイト、強力な終結配列などを有する。(5) クローン化を簡便にする為アーカイブクローンからの再クローニングを行うこととし、ベクターにSfiIクローニングサイトを導入した。これによりORF産物のN末に3個、C末に2個のアミノ酸が融合する。各クローンはF+ recA株に導入し、96穴のmicrotiter plate (45枚) に保存した。またスクリーニングの簡便化を図る為、混合クローンでも相補実験に使えるかどうか検討した結果、48クローンずつの混合培養液でも相補実験が旨くゆくことが解った。混合クローンセット (microtiter plate 1枚) と個別クローンセットを用いることにより、最初の相補テストにより48クローン内に絞り込み、次の相補テストによりターゲットクローンを検索するという僅か2回のテストでの検索が可能となった。

このような2種のクローンセットを用いて、244の細胞分裂遺伝子の温度感受性 (fts) 変異株を同定した。既知の分裂遺伝子は6%、機能未知遺伝子は30%であった。残り70%はDNA複製や蛋白合成などの基幹反応や、シグナル伝達やイオン輸送などの細胞反応、及び代謝関係の遺伝子であった。これらのことから、細胞の整合的増殖は細胞内諸反応と細胞分裂の共役によって成り立っていることが強く示唆された。また機能未知遺伝子が多数同定されたことで、今後の細胞分裂機構の解明に大きく道が開けた。

今後はfts変異を持つORFをクローン化し、馬場らにより樹立されている欠失株に導入することで変異の純化を行う。またこの系を用いて全機能未知ORFの温度感受性変異株を分離する。

#### 2.4.3 網羅的機能解析：磯野 (神大)

2.4.3.1 【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遺伝子機能の解析を行う。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と考えられる機能分化と、それを制御している遺伝子を網羅的に探索し解析する。

2.4.3.2 【実施方法】：研究員を中心とした体制で推進する。

2.4.3.3 【実施状況】：昨年に引き続き、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て、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を探索する。この目的で、アーカイブクローンに含まれる遺伝子の過剰発現によりバイオフィーム形成に影響を与えるかどうか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やバイオフィームの形態異常を示す遺伝子を約100個同定した。その上で、これらの遺伝子を詳細に解析する目的で、Wannerの系を用いて個々の遺伝子破壊

株を作製して解析した。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、大腸菌の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て解析した。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た。さらに同様の考えから、2成分系を構成する遺伝子についても解析を進めた。

2.4.3.4 【結果】：アーカイブクローンに含まれる遺伝子の過剰発現によるバイオフィーム形成への影響、ならびに遺伝子破壊株のバイオフィーム形成能や他の表現型の変化についての組織的な解析結果についてまとめて論文発表するとともに、2成分系を構成する遺伝子についての解析結果についてもまとめて論文発表の準備を進めている。

2.4.4 トランスクリプトーム解析：森（奈良先端大）

2.4.4.1 【ねらい】：大腸菌転写制御システムは複数の遺伝子については、個別に詳細な解析がなされている。しかしながら、それぞれのシステムがどのように重なりあい、どのように影響しあっているかということは、解析する手法が少なかったこともあり、ほとんどなされていない。本研究では、大腸菌DNAマイクロアレイと転写因子欠損株をもちいて、それぞれの欠損株における転写プロファイルを解析し、それを比較検討することにより、大腸菌の転写ネットワークを推測し、個々の転写制御間の関係を解析することを目標とする。

2.4.4.2 【実施方法】：約100の転写制御因子欠損株の生育を温度、および培養条件を変化させて調査し、欠損が生育に関して極端な悪影響をもたらすものについては、マイクロアレイ解析には用いない。生育がある程度正常で（倍加速度が2倍以上遅いものを不適合とする）、マイクロアレイ解析に使用できるものに関しては、MOPS（グルコースおよびカザミノ酸添加培地）で対数増殖期まで培養し、total RNAを抽出後、標識cDNAを作成し、マイクロアレイに供する。解析のバイアスに関してはreferenceとした親株由来のcDNAを複数調整し、そのデータをとることで補正する。

2.4.4.3 【実施状況】：本実験に使用するすべての変異株の生育データは固形培地に関しては、LB培地およびMOPS培地（固形）で20C, 30C, 37Cおよび42Cで取得した。また、液体培地に関しては、MOPS培地で37Cにおいて定常期まで計測を実施した。その結果rpoN欠損株を除く全ての株でマイクロアレイ解析が可能な程度の生育を示した。Total RNAの回収と標識cDNAの作成およびマイクロアレイ解析については、90変異株に関しては終了した。今後、転写プロファイルに関して顕著な変化を示した30変異株程度に関して再度、同様の解析を行い、MOPS培地、対数増殖期における転写制御システムの重なりに関して考察を行う予定である。

2.4.4.4 【結果】：上述したように90変異株についてのマイクロアレイ解析が終了した。その結果、一つの転写因子が数十から数百にわたる複数の遺伝子の制御を行う例はかなり少なく、核様態タンパク質やCRP等、きわめて限られ、かつ既に報告されてい

る転写因子のみであった。すなわち核様態タンパク質からなる限られた転写制御因子が研究室の培養条件下において広範囲の遺伝子の転写をコントロールしていることが確かめられた。また、転写プロファイルにほとんど変化を示さない変異株も半分以上存在した。これは多くの転写制御因子が、様々なストレスに対応して、極めて限られた遺伝子のみを制御していることを示している。

#### 2.4.5 プロテオーム解析：和田（京大・ウイルス研）

2.4.5.1 【ねらい】：大腸菌ゲノムのタンパク質間相互作用を網羅的に調べることでより総タンパク質間のネットワーク網の構築をめざしている。

2.4.5.2 【実施方法】：奈良先端大チームによって、大腸菌のゲノムの全ORF遺伝子がクローニングされた。このクローンの特徴はN末端にヒスチジンがあり、その後ORF遺伝子があり、IPTGで発現が誘導される。これを用いて、細胞抽出液をニッケルカラムにかけ、共抽出されるタンパク質を一次元のSDS電気泳動で分離して、各タンパク質バンドはMALDI-TOFMSによって同定した。これらの実験はポストドク及び技術員を中心とするチームにより行われた。

2.4.5.3 【実施状況】：5月からこのプロジェクトを開始し、条件検討に8月終わりまでかかった。課題は培養条件、細胞培養のどの時期に試料をとるか？発現量、精製法、電気泳動条件、マス試料の調整、マス測定自動化等であった。これらの細部の条件を決め、9月からシステムテックに始めた。

2.4.5.4 【結果】：ORFは約4300個ある。約2500個についてのタンパク質間相互作用結果を得た。既に文献で相互作用が報告されているものの多くは我々の系でも確認できた。さらにy遺伝子についても他のタンパク質との相互作用が多数観察され、機能を示唆する結果を得ることが期待出来る。オペロンや代謝マップでタンパク質間相互作用がみられた。現在これらのデータに基づき、高次なネットワーク構築をめざしている。

#### 2.4.6 大腸菌全ORFクローンのGFPを利用した局在性解析：仁木（遺伝研）

2.4.6.1 【ねらい】：原核細胞においてもそれぞれのタンパク質産物は細胞内の特定の場所に局在しその機能を果たしていると考えられる。したがって、機能未知のタンパク質産物について、細胞内局在性を明らかにすることはその機能を解き明かす上で重要な情報となる。この目的のために奈良先端大で作成されたアーカイブプラスミドライブラリーを用いて大腸菌全ORFクローンの細胞内局在性を明らかにする。

2.4.6.2 【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。奈良先端大が作成したアーカイブプラスミドライブラリーを研究材料として使用した。

2.4.6.3 【実施状況】：4352のアーカイブプラスミドライブラリーのクローンについて、それぞれの細胞を富栄養培地において30℃で培養し、これを蛍光顕微鏡の下に生きたまま観察した。その蛍光画像をCCDカメラで撮影し画像データベースとして記録した。

2.4.6.4 【結果】：GFPの蛍光が観察できなかったものは335クローンで、92%以上のクローンでなんらかの蛍光シグナルが記録できた。蛍光シグナルを検出したうち、そ

の大半は細胞全体に蛍光が分布していた。また、蛍光の輝点や固まりを持つ細胞は561クローン、細胞の周囲を蛍光が縁取り細胞膜への局在を示唆するものが517クローンあった。特徴的な細胞内局在としては、蛍光の輝点が細胞端に位置するもの、あるいは細胞長の1/4、3/4部位に位置するものがあった。さらに、輝点ではなく、分裂面にリング上に蛍光が観察されるクローンもあり、その中にはバクテリア・チューブリンであるFtsZタンパク質などがあった。FtsZタンパク質と類似した局在性を示すものとして、新たに4つの遺伝子を見いだした。このうち2つは新規の遺伝子であった。また細胞の周囲に蛍光が見られたクローンの中には、その遺伝子産物が膜タンパクとし知られているものが多く見出され、このような蛍光の分布パターンが膜タンパクの指標となることが示された。機能未知遺伝子において、構造の上では膜局在性とは予想されなかったにも関わらず、細胞膜に局在が観察されたことから、これらタンパク質産物は膜局在性ドメインを有するタンパクと複合体を形成していることが示唆された。

### 3. 研究実施体制

#### 3.1 リソース開発研究グループ

##### 3.1.1 ORFクローン作製サブグループ

3.1.1.1 森 浩禎（奈良先端大・遺伝子教育研究センター、教授）

3.1.1.2 大腸菌予測ORFの各種クローンの維持管理及び分譲。

##### 3.1.2 Transposon挿入破壊株作製サブグループ

3.1.2.1 三木 健良（福岡歯科大学・細胞分子生物学、教授）

3.1.2.2 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。

##### 3.1.3 系統的欠失株作製サブグループ

3.1.3.1 馬場 知哉（慶応大学・先端生命科学研究所、講師）

3.1.3.2 Wanner法による網羅的in frame 欠失株作製

#### 3.2 情報解析グループ

##### 3.2.1 アルゴリズムサブグループ

3.2.1.1 松田 秀雄（大阪大学・情報科学、教授）

3.2.1.2 遺伝子ネットワーク解析アルゴリズムの開発

##### 3.2.2 コドン解析サブグループ

3.2.2.1 金谷 重彦（奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科、助教授）

3.2.2.2 コドン組成を利用した遺伝子の分類

##### 3.2.3 tRNA解析サブグループ

3.2.3.1 工藤 喜弘（山形大学・工学部）

3.2.3.2 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

#### 3.3 データベース構築グループ

- 3.3.1 文献データベースサブグループ
  - 3.3.1.1 磯野 克巳 (神戸大学・理学部、教授)
  - 3.3.1.2 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。
- 3.3.2 大腸菌データベースサブグループ
  - 3.3.2.1 森 浩禎 (奈良先端大・遺伝子教育研究センター、教授)
  - 3.3.2.2 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
- 3.4 網羅的機能解析グループ
  - 3.4.1 コード領域機能解析サブグループ
    - 3.4.1.1 堀内 嵩 (基生研、教授)
    - 3.4.1.2 コード領域における機能未知遺伝子群の機能解析。
  - 3.4.2 細胞分裂遺伝子群機能解析サブグループ
    - 3.4.2.1 西村 昭子 (遺伝研、助教授)
    - 3.4.2.2 細胞分裂における突然変異株の変異遺伝子の同定。
    - 3.4.2.3 機能解析：磯野 (神大)
  - 3.4.3 トランスクリプトーム解析サブグループ
    - 3.4.3.1 森 浩禎 (奈良先端大・遺伝子教育研究センター、教授)
    - 3.4.3.2 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。
  - 3.4.4 プロテオーム解析サブグループ
    - 3.4.4.1 和田 千恵子 (京都大学・ウイルス研究所、助教授)
    - 3.4.4.2 タンパク質相互作用ネットワーク解明
  - 3.4.5 タンパク質産物細胞内局在解析サブグループ
    - 3.4.5.1 仁木 宏典 (遺伝学研究所、放射線・アイソトープセンター、助教授)
    - 3.4.5.2 全タンパク質のGFP融合クローンをを用いた細胞内局在性の解析。

#### 4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

##### (1) 論文発表

- 森浩禎<sup>1</sup>、金谷重彦<sup>1</sup>、餐場浩文<sup>2</sup>、大島拓<sup>3</sup>、増田泰<sup>3</sup>、(<sup>1</sup>奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター、<sup>2</sup>名古屋大学大学院生命農学研究科、<sup>3</sup>CREST、科学技術振興事業団)、大腸菌におけるポストゲノムシーケンス解析、化学と生物、第40巻第7号、2002年、平成14年7月
- Oshima, T.<sup>1</sup>, Wada, C.<sup>1,2</sup>, Kawagoe, Y.<sup>3</sup>, Ara, T.<sup>1,3</sup>, Maeda, M.<sup>1,2</sup>, Masuda, Y.<sup>1</sup>, Hiraga, S.<sup>4</sup> and Mori, H.<sup>1,5</sup>, (<sup>1</sup>CREST, JST(Japan Science and Technology), <sup>2</sup>Institute for Virus Research, Kyoto University, <sup>3</sup>Department of Cell Biology, Nara Institute of Science and Technology, <sup>4</sup>Department of Molecular Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and, Genetics, Kumamoto University School of Medicine, <sup>5</sup>Research and Education Center for Genetic

- Information, Nara Institute of Science and Technology), Genome-wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, 45(3), 673-695, 2002
- <sup>1</sup>児玉颯一、<sup>1</sup>小林武彦、<sup>2</sup>仁木宏典、<sup>3</sup>平賀壮太、<sup>4</sup>大島拓、<sup>4</sup>森浩禎、<sup>1</sup>堀内嵩、(<sup>1</sup>基礎生物学研究所、<sup>2</sup>遺伝学研究所、<sup>3</sup>京都大学、<sup>4</sup>奈良先端大) Amplification of Hot DNA segments in *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, 平成 14 年 9 月
- Kawano, M.<sup>1</sup>, Oshima, T.<sup>2</sup>, Kasai, H.<sup>3</sup> and Mori, H.<sup>1</sup>, (<sup>1</sup>Research and Education Center for Genetic Information, Nara Institute of Science and Technology, <sup>2</sup>CREST, JST (Japan Science and Technology), <sup>3</sup>Marine Biotechnology Institute, Kamaishi Laboratories) Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a cis-encoded small antisense RNA in *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, 45(2), 333-349, 2002
- <sup>1</sup>Makinoshima, H., <sup>2</sup>Aizawa, S., <sup>3</sup>Hayashi, H., <sup>4</sup>Miki, T., <sup>1</sup>Nishimura, A., and <sup>5</sup>Ishihama, A., (<sup>1</sup> National Institute of Genetics, <sup>2</sup>Teikyo University, <sup>3</sup>University of Tsukuba, <sup>4</sup>Kyusyu University Graduate School of pharmaceutical Sciences, <sup>5</sup>Nippon Institute for Biological Science), Growth Phase-Coupled Alterations in Cell Structure and Function of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, (2003). 185: 1338-1345, 2002, Feb. 2003
- <sup>1</sup>Fujita, C., <sup>2</sup>Nishimura, A., <sup>1</sup>Iwamoto, R., and <sup>1</sup>Ikehara, K., (<sup>1</sup>Nara Women's University, <sup>2</sup>National Institute for Genetics of Japan), 大腸菌 SpoT 蛋白の 4 つのドメインの ppGpp 合成活性, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(7), 1515-1523, 2002
- <sup>1</sup>Makinoshima, H., <sup>1</sup>Nishimura, A., and <sup>1</sup>Ishihama, A., (<sup>1</sup> National Institute of Genetics), 大腸菌の定常期移行増殖相に存在する異なるステージの細胞の分画, *Molecular Microbiology* (2002) 43(2), 269-279, 2002
- <sup>1</sup>Fujisima, H., <sup>1</sup>Nishimura, A., <sup>2</sup>Wachi, M., <sup>1</sup>Takagi, H., <sup>2</sup>Hirasawa, T., <sup>2</sup>Teraoka, H., <sup>1</sup>Nishimori, K., <sup>1</sup>Kawabata, T., <sup>1</sup>Nishikawa, K., and <sup>2</sup>Nagai, K., 大腸菌の *kdsA* 変異は FtsZ-ring 形成に影響を及ぼす, *Microbiology* (2002), 148, 103-112, 2002
- Onogi, T., Miki, T., and Hiraga, S., Behavior of Sister Copies of Mini-F Plasmid after Synchronized Plasmid Replication in *Escherichia coli* Cells., *J. Bacteriol.* 184(11) 3142-3145 (2002)
- Murata, T., Ohnishi, M., Ara, T., Kaneko, J., C-G. Han, Y. F. Li, Takashima, K., Nojima, H., Nakayama, K., Kaji, A., Kamio, Y., Miki, T., Mori, H., Ohtsubo E., Terawaki Y., and Hayashi T., Complete Nucleotide Sequence of Plasmid Rts1: Implications for Evolution of Large Plasmid Genomes,

J.Bacteriol., 184(12) 3194-3202 (2002)

- Miyake, S., Tohsato, Y., Takenaka, Y., and Matsuda, H., A clustering method for comparative analysis between genomes and pathways, Proceedings of International Conference on Database Systems for Advanced Applications, 8, 327-334 (2003), 2003年3月28日
- Yoshida, H.<sup>1</sup>, Maki, Y.<sup>2</sup>, Kato, H.<sup>3</sup>, Fujisawa, H.<sup>4</sup>, Izutsu, K.<sup>5</sup>, Wada, C.<sup>5</sup> and Wada, A.<sup>1</sup> (1 Dep. of Physics, Osaka Med. College, 2 Japan Science and Tech. Cor. 3 Otani Univ. 4 Dep. Of Botany, Faculty of Sci. Kyoto Univ. 5 Inst. For Virus Res., Kyoto Univ.), The ribosome modulation factor(RMF) binding site on the ribosome of Escherichia coli, J.Biochemistry, 2002、132、983-989
- Nakahigashi, K.<sup>1</sup>, Kubo, N.<sup>1</sup>, Narita, S.<sup>1</sup>, Shimaoka, T.<sup>1</sup>, Goto, S.<sup>1</sup>, Oshima, T.<sup>2</sup>, Mori, H.<sup>2</sup>, Maeda, M.<sup>3</sup>, Wada, C.<sup>3</sup>, Inokuchi, H.<sup>1</sup>; (1 Dep. of Biophysics, Graduate School of Science, Kyoto Univ., 2 Res.Educ.Cen.Genet.Info. NAIST, 3Inst. Virus Res., Kyoto Univ.), 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(3), 1473-1478 (2002)
- <sup>1</sup>Biville F, <sup>2</sup>Oshima T, <sup>3</sup>Mori H, <sup>4</sup>Kawagoe Y, <sup>1</sup>Bouvet O, <sup>1</sup>Rager MN, <sup>1</sup>Perrotte-Piquemal M, <sup>1</sup>Danchin A.(<sup>1</sup>Unite de Genetique des Genomes bacteriens, Departement de Biochimie et Genetique moleculaire, Institut Pasteur, <sup>2</sup>CREST, Nara Institute of Science and Technology Research and Education Center for Genetic Information, <sup>4</sup> Nara Institute of Science and Technology Biological Science ), ESCHERICHIA COLI Response to Exogenous Pyrophosphate and Analogs., J Mol Microbiol Biotechnol ;5(1):37-45 Related Articles, Links, 2003 Jan

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：1件(研究期間累積件数：3件)