

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21年 4月 10日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2006 ～ 2008

課題番号：18201038

研究課題名（和文） 大腸菌 genetic network の解明

研究課題名（英文） Towards comprehensive analysis of genetic interaction of *E. coli*

研究代表者

森 浩禎 (Hirotada Mori)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：90182203

研究成果の概要：

網羅的に遺伝的ネットワークを解明することを目的に、2重欠失株作製の系の開発と解析の評価を行った。2重欠失の為の既存の欠失株ライブラリーにさらにもう1種類の欠失株ライブラリーの構築、単一欠失の接合による2重化のツールの開発、2重化の high throughput 化、解析システムのそれぞれの開発を行った。新規欠失株ライブラリーには、20nt の bar code を挿入し、創薬等の high throughput スクリーニングへの道も開いた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	15,800,000	4,740,000	20,540,000
2007年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
2008年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
年度			
年度			
総計	40,000,000	12,000,000	52,000,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：遺伝的相互作用、遺伝的ネットワーク、genetic interaction、合成致死、大腸菌、接合、バーコード

1. 研究開始当初の背景

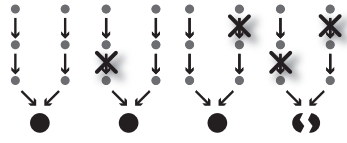
1980年代の中頃より議論され始めたゲノム研究が、1989年に大腸菌ゲノムのシステムティックな決定プロジェクトが日本で発足したのを最初に、1990年代に大きく進展した。当初予想されていた2030年から2050年のヒトゲノム完成が大幅に前倒しになり、2000年にはそのドラフト配列が発表された。1990年代の技術及び生物学の発展は、その後の生物学に大きなインパクトを与えてきた。このよう

な急激な生物学の転換期において大きく注目を集めるようになってきたものが『システム生物学』である。これまでの遺伝子単位での研究を、生体内の生命現象をシステムとしてとらえようと言うものである。いわゆる『ポストゲノム研究』の中で、transcriptome、proteome、metabolomeなどのomics研究が盛んに行われてきており、細胞内のお互いの関係を解析するということで、network生物学もその一つである。

細胞には『ロバスト性』という重要な性質がある。例えば、一遺伝子を欠失しても、通常表現型として現れてこない性質である。細胞の中には、その遺伝子の欠失に対する補償回路が存在する。この補償回路により、生命は多くの環境の変化などに対応できる。非常に単純な例をあげると、一つの酵素反応に二つのアイソザイムが存在する場合、一方の酵素遺伝子を欠失しても、他方の活性により、その酵素反応は存続し続ける。そのために、たとえ、その酵素反応が生命活動に必須のものであっても、表現型としては現れてこない。このように、生命活動の機能的なネットワークを解明することは、生命を理解する上で、非常に重要なことであり、このようなネットワーク関係を、『遺伝的ネットワーク』と言う。酵母をはじめ、大腸菌など、これまで多くの研究蓄積のあるモデル生物において、網羅的な実験研究リソース、情報データベースの整備が進んできた。このリソースと新たな技術を駆使し、これまで不可能であった網羅的な細胞内遺伝子機能相互関係の解明が可能になってきた。

2. 研究目的

Fig. 1 に示すように、一遺伝子では細胞に必須な物質の合成を止



めることはできないが、関連するステップの2重欠失により、その物質の合成は止められてしまう。これを利用して、2重欠失株と、その生育の解析により、細胞内遺伝的ネットワークの解明に迫る。

研究は、遂行に必要な 1) リソースの開発、2) ツールの開発、そして 3) 評価実験の3つのアプローチで進めた。

3. 研究方法

3-1) ASKA deletion collection の開発

欠失株のデザイン及び作製と確認の方法を Fig. 2 に模式的に示す。欠失は Wanner 法に従った。

遺伝子欠失候補株の薬剤耐性確認

384 穴ストレージプレート (オリジナルストック) を融かし、biomekFX の 384 ピン (太い方のピン) システムで2枚の寒天培地 (LB, Cm25 および LB, アンピシリン (以下 Amp) 50) にスポットし、37°C で1晩培養後、デジタルカメラでプレートを1枚ずつ撮影した。この画像を ImaGene マイクロアレイ用解析ソフトで解析し、各スポットのシグナル強度を算出した。すべてのスポットのシグナル分布を調べ、耐性チェックの閾値強度を決定した。Cm は 10^7 を、Amp は 5×10^6 を閾値とした (Fig. 3-b)。

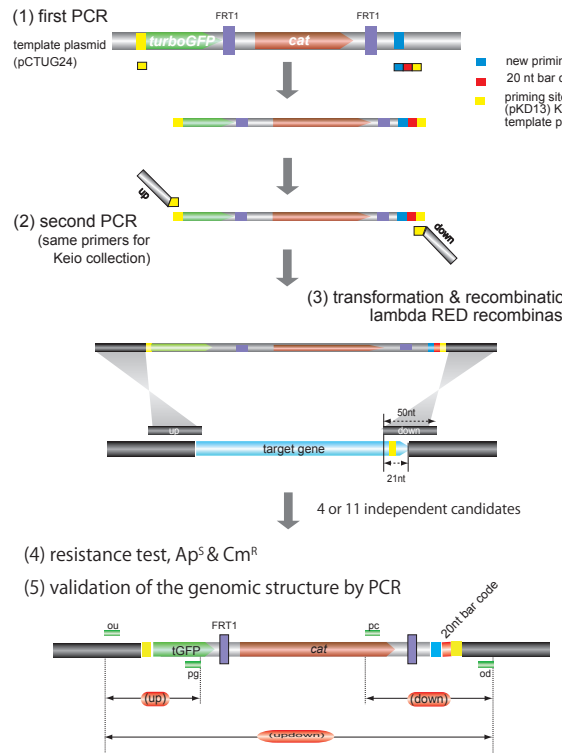


Fig. 2. Schematic view of the construction of ASKA deletion collection.

- 1) Preparation of the antibiotic resistant cassette with common set of primers. The sequences of yellow box are the same sequence of the priming sites of Keio collection. Blue box represents the specific priming site of Cm cassette template. Red box shows 20 nt random sequence, which will function as molecular bar code.
- 2) Fragments by the first step of PCR are then performed the second step of PCR using specific primer set for each of the target genes, which was used for the construction of Keio collection.
- 3) Fragments are transformed and integrated into the chromosome by RED recombination system.
- 4) Selection by Chloramphenicol resistance and checked Ampicillin sensitivity for elimination of pKD46, which carries RED recombinase.
- 5) Validation by genomic PCR.
- 6) Determination of sequence of bar code region.

PCRによる遺伝子欠失の構造確認

候補株の培養液、0.5μl を PCR の鋳型に用いた。PCR 反応液は 10 μl の反応で確認した。

primer は、全て最適化を図ったもので行った。

全量を電気泳動し、CCDカメラ (KURABO, Dolphin ゲル解析装置) で写真を撮り電子情報として保存した、確認を行った。

3-2) 接合による2重化のツール開発

大腸菌を Hfr 化する CIP (Chromosomal Integrating Plasmid) を作製した。CIPs を用いることにより、(i) tra 遺伝子群と oriT を染色体上 10 箇所へ正確に組み込み、(ii) 接合によって簡便な Hfr 化が可能である。Hfr 株と一遺伝子欠失ライブラリーを寒天

培地上で接合させれば、2重欠失株の作製とその生育速度の観測はHigh-throughput化できる。作製したHigh-throughputなシステムを用いて原核生物のGenetic interaction networkを解析する。

プラスミド及び菌株

改変F plasmidはF plasmidにChloramphenicol耐性遺伝子catを組み込んだプラスミドである。pAH143, pAH144は連携研究者により作製されたもので、薬剤耐性の獲得とプラスミド複製の制御の為に用いた。全ての大腸菌株はK-12株の派生株である。BW25141株はCIPsのレシピエントとして用いた。BW25113, BW38029は、それぞれKeio collection、ASKA deletion collectionに用いた。

培養液

細胞の培養にはグルコース未添加の1% Bacto tryptone(Difco)、0.5% yeast extract(Difco)、0.5% NaClを含むLB培地(pH 7.0)を用いた。種々の薬剤(Wako, Osaka, Japan)の終濃度は次の通りである: ampicillinは50 µg/mL、chloramphenicolは25 µg/mL、kanamycinは25 µg/mL、streptomycinは100 mg/mLである。

DNA操作

PCR断片はTaKaRa Ex Taq (Takara bio, Shiga, Japan)又はKOD polymerase (Toyobo, Osaka, Japan)とプライマーを用いて作製された。組換えはλ RED recombinationシステムを用いた。接合はMillerの方法に従った。制限酵素NotI (Takara bio, Shiga, Japan)は説明書に従って使用した。

大腸菌細胞スポットティング

自動分注ロボット装置BiomekFX (Beckman Coulter社製)と384 floatingピン:FP-4 (0.914 mm径, V&P Scientific社製)を利用して自動化システムを構築した。ピンの滅菌は10% breach、滅菌水、99.5%エタノールの順に浸けることで行った。

コロニーの定量

コロニー体積を定量するため、デジタルカメラEOS Kiss Digital (Canon社製)とライトボックスを用いて、透過光でプレートの写真を撮影した。JPEG形式の写真をImagemagickでTIFF形式の画像へ変換し、Imagene (BioDiscovery社製)により定量を行った。

4. 研究成果

4-1) ASKA deletion collectionの開発

全4,222標的遺伝子の欠失株を作製し、欠失候補株の評価は、2007年度の1st trialと2nd trialでは、

基本的にFig. 3に示す方法で行った。

2株以上の欠失株が分離できた遺伝子の数は、1st、2nd trialを合わせると、3,553遺伝子となった。約84%の遺伝子の欠失が終了した。

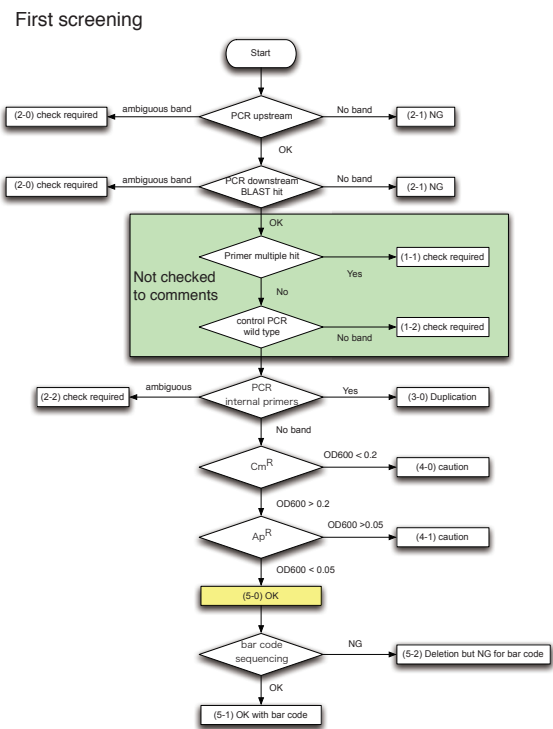


Fig. 3. Flow chart of evaluation.

a) The diagram of evaluation steps for the first round construction. All of the four candidates of each of the target genes were performed evaluation according this procedure. The deletion structure was confirmed by genomic PCR using up and down stream primer set. Partial duplication was checked using internal primer set of each of the target gene optimized by Primer 3 software.

b) The flow chart for the second round construction. For the second round, 7 candidates were picked out and applied for evaluation by genomic PCR. For the second round, external primer set instead of up and down-stream primer set was used.

配列確認

欠失部分の構造確認と、欠失に伴い導入したバーコード領域の配列を確認するために、構造確認に利用したPCR断片の配列決定を行った。一部は、現在共同研究として、Tronto大学にて次世代型シーケンサーSolexa (Illumina)を用いてこれらの短いDNA領域の配列決定を進めている。

Keio collectionの必須遺伝子候補との比較

Keio collectionでは、欠失株が作製できなかった遺伝子数が298遺伝子あり、さらに、非必須とされていたが部分2倍体株であったため新たな必須遺伝子候補とされたものが23遺伝子あり、合計321遺伝子が必須遺伝子候補である。これに対し、ASKA deletion libraryでは、2回のtrialで欠失できていないものは581遺伝子存在する (Fig. 4)。

KeioとASKAの両方で欠失出来なかった遺伝子のうち292遺伝子は共通しており、Keioの必須遺伝子候補のほとんどが、ASKAでも再現された。た

だ、Keio では必須遺伝子候補だったが ASKA では欠失ができたものが 29 遺伝子あり、このうち 20 遺伝子は大腸菌全遺伝子のプロファイルを整理したデータベース、PEC(<http://shigen.nig.ac.jp/pec>)でも非必須とされている。Keio と ASKA では、遺伝子型がほぼ同じ大腸菌株（それぞれ BW25113 と BW38029）を用いているので、必須遺伝子群も同様であっておかしくない ASKA でまだ欠失できていない 289 遺伝子についても、さらなる欠失の試みで取れる可能性はある。ただし ASKA では、欠失部位に挿入する遺伝子断片が turboGFP を含んでいて Keio の場合より長いことや、選択薬剤が異なること、薬剤耐性を発現させるプロモーターの強さが異なること、またバーコード化のためのランダム 20 塩基の並び方によっては下流の遺伝子発現に悪影響を与える配列を形成するかもしれないことなど、Keio とは少し異なった環境条件のもとで欠失実験を行っている。これらが細胞の生理的状态を変化させていれば、欠失できる遺伝子の種類や数が異なってくることは十分考えられる。

残りの 289 遺伝子は、Keio では欠失株が分離されているが、ASKA ではまだ 2 株以上の欠失株がそろっていない。

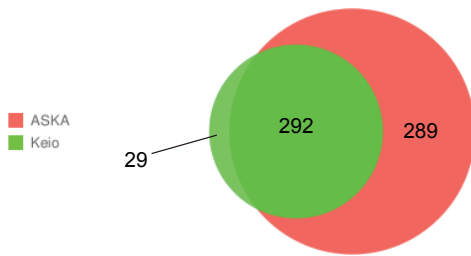


Fig. 4. Venn diagram of the comparison of essential genes candidates from Keio and ASKA deletion collections. 292 candidate genes were commonly failed to isolate as a single gene deletion mutant both from constructions of Keio and ASKA. 289 genes were failed to isolate by second trials of the construction of ASKA deletion collection. 29 genes, which were essential gene candidates from Keio collection, were established as single gene deletion in ASKA.

4-2) CIP(Chromosomal Integration Plasmid) の作製

接合で Hfr 化を行うため、(i) 染色体相同領域を持ち、(ii) streptomycin 薬剤遺伝子を持ち、(iii) 条件感受性の複製起点の、(iv) *tra* 遺伝子群と *oriT* 領域を持つ CIP を作製した。CIP は大腸菌 BW25114 の染色体相同領域、pAH144 の *addA* 遺伝子と *oriRy* 複製起点、F plasmid の *tra* 遺伝子群と *oriT* 領域から、 λ RED recombination システム (3) と標準的な遺伝学手法で作製した (Fig. 5)。*oriRy* 複製起点の複製開始には、通常の大腸菌にはない *pir* 遺伝子産物 (pi タンパク) が必要である。

2 重欠失株の作製

2 重欠失株の作製は 2 ステップ : (i) 一遺伝子欠失株の Hfr 化と (ii) 遺伝子欠失の伝達で行う (Fig. 6)。

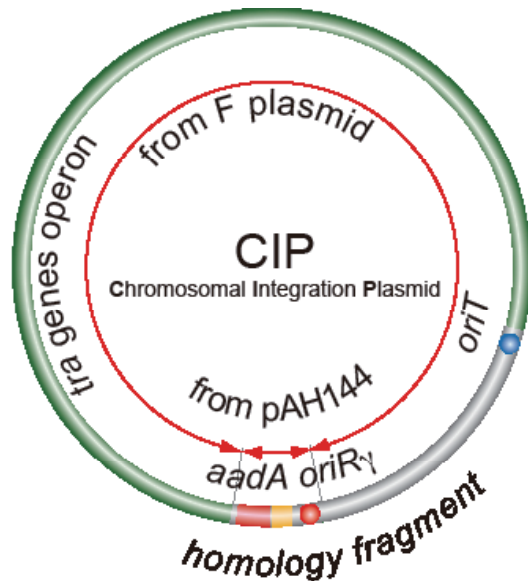
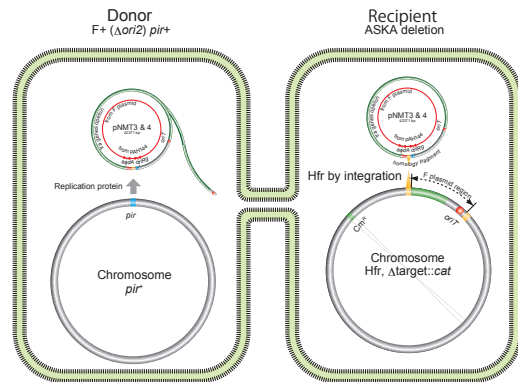


FIG. 5. CIP plasmid structure
Green bar represents *tra* genes operon and *oriT*(5). *aadA* (Sm resistance gene), *oriR* and gray region are from pAH143(6). About 300 bp fragment from BW25141 is shown as orange color region. Fragments from 10 different loci of the chromosome were cloned in both direction.

A) Construction of Hfr by conjugation and integration.



B) Construction of double knockout strain by mating

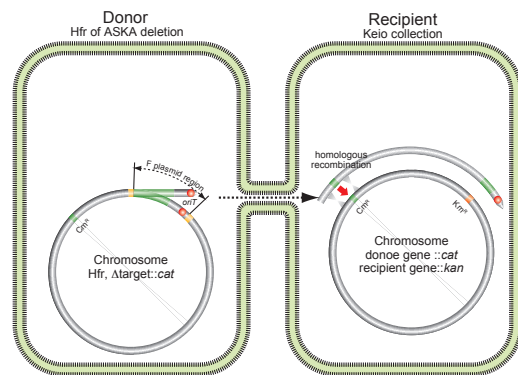


FIG. 6 Schematic view of double knockout strain construction (A) method for construction of Hfr by conjugation and integration of CIP into the chromosome of the recipient strain.

Donor strain is a producer of π protein, which is essential for replication of *oriRg* (6, 8).

(B) Double knockout strain construction by mating between Hfr strain having a Cm^R single gene knockout and 4000 single gene knockout library, Keio collection.

一遺伝子欠失株の Hfr 化効率

全 20 種の CIP 保持株を欠失株 (ASKA deletion collection) $\Delta rhaS$ 株と接合させた結果、約 100 コロニーの Hfr 株 (約 10^{-5} の頻度) が得られた。得られた Hfr 株と欠失株 (Keio collection) $\Delta araC$ 株を 24 時間接合させた場合、*oriT* と遺伝子欠失までの距離に依存しないで高効率 (donor 株に対する組換え体出現頻度) に 2 重欠失株が得られた。

2 重欠失株の作製効率

2 重欠失株の作製効率は “*oriT* から遺伝子欠失までの距離” と “接合時間” が影響するため、これらを検討した (Fig. 7)。2 時間接合した時には距離依存的に 2 重欠失株の作製効率が下がるが、24 時間接合した時には距離に依存しなくなることから、2 重欠失株の作製効率には “接合時間” が大きく影響することが分かった。

だが 24 時間接合しても、*oriT* と欠失遺伝子の間に Termination 領域が存在する場合 (CW 型では 60min 以降、CCW 型では 50min 以降)、作製効率は 10^{-2} 程度減少した。この結果は接合における DNA 複製が Termination 領域で阻害されることを示唆している。

2 重欠失株の作製効率は接合時間に大きく依存するが、接合時間が長いと (i) 変異が入りやすい、(ii) 実験時間が長くなるといった問題が生じる。接合時間を短縮するには、*oriT* と遺伝子欠失との距離が短く、Termination 領域をまたがないような位置に挿入される CIP を選択して Hfr 株を作製すればよい。

2 重欠失株作製の High-throughput 化と定量方法

自動分注ロボット装置 BiomekFX (Beckman Coulter 社製) と 384 floating ピン (V&P Scientific 社製) を利用して自動スポットティングシステムを構築した。Hfr 化した一遺伝子欠失株 (ASKA deletion collection) を寒天培地へ塗布し、Donor 株のローンを得る。Recipient である一遺伝子欠失株 (Keio collection) をプレートあたり 1536 株をスポットし、37°C で 24 時間静置して接合を行う。接合後、カナマイシンを含む選択培地で培養して

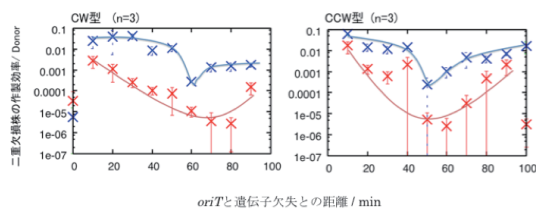


FIG. 7 Dependency of conjugation time and *oriT* position on the chromosome

rhaS (88.3 min) was used as query deletion carrying Cm^R in Hfr and *araC* (1.5 min) was used as recipient. Hfrs were made by integration of each of the 20 CIP plasmids. X axis represents distance between query deletion and *oriT* by unit of min, which represents about 45kb/min. Transfer of clock wise (CW) and counter clock wise (CCW) were separately analyzed. Red and blue lines represent 2 and 24 hours conjugation time respectively.

Donor 株を除いた後、カナマイシンとクロラムフェニコールを含む選択培地にスポットし、2 重欠失株を得る。生育は、コロニーをデジタルカメラ EOS Kiss Digital (Canon 社製) と Trans Illuminator を利用して、写真撮影を行い、Imagen (BioDiscovery 社製) により定量を行った。定量値は Fig. 8-B の式で吸光度を算出した。

評価実験

本システムを評価するため、機能的に遠い関係の遺伝子ペア (*mrcA*-*frlD*) と非常に近い合成致死ペア (*mrcA* - *mrcB*) (13) の 2 重欠失株を作製し、genetic interaction の指標 ϵ (2) を求めた (Fig. 9)。*mrcA*-*frlD* ペアは異なる機能を持っているため (*mrcA* はペプチドグリカン生合成、*frlD* は fructoselysine の代謝)、機能的に関係のない遺伝子ペアとした。また、ほとんどの遺伝子ペアは機能的に独立であることが酵母の実験より示されている。

2 重欠失株を作製した結果、機能的な関係が非常に遠いと考えられる 2 重欠失株 $\Delta mrcA \Delta frlD$ のコロニーは単一欠失と比べて変化なかったのに対し、

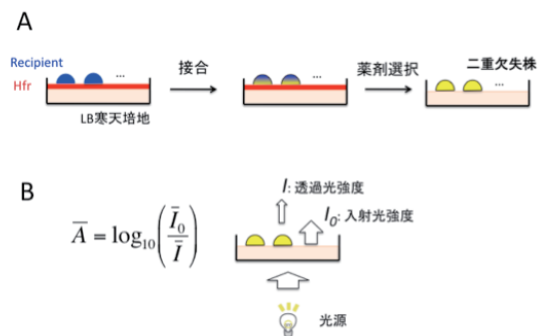


FIG. 8 High-throughput conjugation system and quantitative method

(A) Conjugation was performed on the surface of agar plate. Hfr query strain was spreaded on the agar plate as lawn. Recipient strains of Keio collection were spotted with a density of 1536. Conjugation was performed at 37°C for 2 or 24 hours. After conjugation, conjugants were transferred onto the Cm and Km containing agar plate for selection of double knockout strains. (B) Cell growth was quantified by transmitted light.

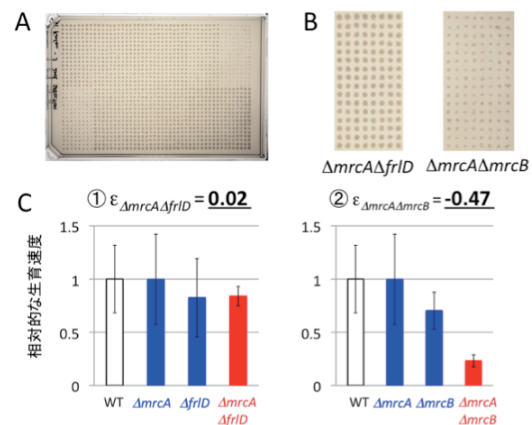


FIG. 9 Evaluation experiment using synthetic lethal gene pair (A) Picture of 1536 density double knockout strains on agar plate after 12 hours incubation at 37°C. Top right square region is 128 double knockout strains of the same combination of $\Delta mrcA$ and $\Delta mrcB$. (B) Magnified images of (*mrcA*, *frlD*) and (*mrcA*, *mrcA*). (C) Calculation of .

合成致死ペアの2重欠失株 *AmrcA**AmrcB* のコロニーは小さかった。128 箇所のスポットは、同じ生育速度を示すことから2重欠失株は安定して作製されたと考えられる。野生株と各々の欠失株の生育速度を測定し ϵ を求めた結果、機能的距離が大きい組合せの2重欠失株では $\epsilon_{mrcAfrtD}$ は 0.02 と 0 に近い。一方、機能的距離の近い組合せでは $\epsilon_{mrcAmrcB}$ は -0.47 と負の値となり、遺伝的機能距離の定量を行うことができた。

本研究開発による欠失株ライブラリー及び CIP を用いた大規模遺伝的ネットワーク解明に向けた評価実験を、アメリカ UCSF 大学及びカナダ Toronto 大学のグループと供に行い、その成果はすでに Nature Methods に共同で発表している。大腸菌というモデル生物を利用した、細胞の完全理解に向けた研究は、この成果に大きく加速された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

- 1 Typas, A., R.J. Nichols, D.A. Siegele, M. Shales, S.R. Collins, B. Lim, H. Braberg, N. Yamamoto, R. Takeuchi, B.L. Wanner, H. Mori, J.S. Weissman, N.J. Krogan, and C.A. Gross. High-throughput, quantitative analyses of genetic interactions in *E. coli*. *Nat Methods*; 5: 781-7, 2008, 査読有
- 2 Butland, G., M. Babu, J.J. Diaz-Mejia, F. Bohdana, S. Phanse, B. Gold, W. Yang, J. Li, A.G. Gagarinova, O. Pogoutse, H. Mori, B.L. Wanner, H. Lo, J. Wasniewski, C. Christopolous, M. Ali, P. Venn, A. Safavi-Naini, N. Sourour, S. Caron, J.Y. Choi, L. Laigle, A. Nazarians-Armavil, A. Deshpande, S. Joe, K.A. Datsenko, N. Yamamoto, B.J. Andrews, C. Boone, H. Ding, B. Sheikh, G. Moreno-Hagelseib, J.F. Greenblatt, and A. Emili. eSGA: *E. coli* synthetic genetic array analysis. *Nat Methods*; 5: 789-95, 2008, 査読有

ほか 13 件

[学会発表](計 62 件)

口頭発表

1. Mori H., Dose H., Ikegami Y., Yamamotoya T., Matsuno H., Narifusa Y., Nakahigashi K., Baba T., Datsenko K.A.&Wanner B.L., Systems approach towards understanding of *E. coli* central metabolism- Quantitative measurement of transcription and translation of glycolytic and TCA cycle enzymes, IMAGE2, Quebec, Canada (2007)04-05/ 30-03
2. 森 浩禎, 大腸菌のシステム生物学, 21 世紀大腸
ほか 28 件
ポスター発表

1. Mori Hirotda, Systems Approach Towards Understanding of *E. coli* Central Metabolism - Quantitative Measurement of Transcription and Translation of Glycolytic and TCA Cycle Enzymes, 2nd ASM Conference on Integrating Metabolism and Genomics(IMAGE2), Quebec, Canada (2007)05/ 03

ほか 28 件

招待講演

1. Mori Hirotda, Systems Biology of *E.coli*, Institute of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai, Republic of China (2007)11/ 16

ほか 3 件

[図書](計 2 件)

- 1 Baba, T. and H. Mori. The Construction of Systematic In-Frame, Single-Gene Knockout Mutant Collection in *Escherichia coli* K-12. *Methods Mol Biol*; 416: 171-81, 2008,.
- 2 Baba, T., H.C. Huan, K. Datsenko, B.L. Wanner, and H. Mori. The Applications of Systematic In-Frame, Single-Gene Knockout Mutant Collection of *Escherichia coli* K-12. *Methods Mol Biol*; 416: 183-94, 2008.

[その他]

データベース <http://ecoli.naist.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 浩禎 (Hirotda Mori)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス
研究科・教授

研究者番号 : 90182203

(2) 共同研究者

なし

(3) 連携研究者

Barry L. Wanner

Purdue University・教授