

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22241050

研究課題名(和文) バクテリア細胞定常状態における細胞死に機能する遺伝子ネットワーク解析

研究課題名(英文) Analysis of cellular network during the death phase of stationary phase.

研究代表者

森 浩禎 (MORI HIROTADA)

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(和文)：

自然界のバクテリアは、その生育の大半は定常期である。定常期の細胞代謝は対数増殖期とは大きく異なり、対数増殖期に蓄積した増殖阻害物質や栄養源枯渇などのストレスに対処し、生存を可能にしていると考えられる。分子 bar-code を導入した欠失株ライブラリーを構築し、全て株の混合培養液での競合培養中の各遺伝子欠失株の population 変動を次世代型シーケンサーで定量解析を可能にした。

研究成果の概要(英文)：

Organisms in nature spend most of their life time in stationary growing phase. Cellular metabolisms in stationary phase are largely different to those in log phase. During long-term stationary phase, organisms might survive against variety of stresses, such as starvation of nutrient. To clear the physiological network during stationary phase, we have constructed the comprehensive bar-coded single gene deletion library of E. coli. Using this new resource, we have developed the method to quantitatively monitor the population dynamics of each of deletion strains during long-term stationary phase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	14,900,000	4,470,000	19,370,000
2011 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2012 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
年度			
年度			
総計	30,400,000	9,120,000	39,520,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：molecular bar-code, single gene deletion library, stationary phase, population dynamics, cell death

1. 研究開始当初の背景

バクテリアの自然界における生育の大半は定常期であり、その生活環の中で対数増殖を行う時期は非常に限られたものと考えられる。定常期の細胞代謝は対数増殖期とは大き

く異なり、対数増殖期に蓄積した増殖阻害物質や栄養源枯渇などのストレスに対処し、生存を可能にしていると考えられる。しかし、対数増殖期から定常期への遷移期、及び定常期における代謝の変動の知識は非常に限ら

れている。大腸菌では、定常期において、DNA 結合タンパク質による核様態構造の変化、RNA ポリメラーゼサブユニットの・70 から・S へのスイッチにより、定常期における転写が制御される。リボソームは2量体を形成し、100S リボソームと呼ばれる構造を取り、翻訳活性が制御される。さらに対数増殖期から定常期への遷移時期に90%以上の細胞がコロニー形成不能となる。このコロニー形成能を持たない細胞が、・E 依存的に溶菌を起すことが、分担者らの研究により明らかにされた。この事から、バクテリア細胞のプログラム細胞死の可能性が検討され、・E 依存の transcriptome 解析も行われた。一方、最近の研究より、・E 依存的に発現が減少する遺伝子に、Mg イオン取り込みに関わるポリンの関与が示唆されたが、その発現制御に、non-coding sRNA や RNA シャペロンである Hfq の関与が明らかにされた。

長年にわたる研究が進められたが、全体像の把握には遠いのが現状である。RNA 調整や死菌によるサンプル量の確保の難しさなど、技術的な障壁により、transcriptome 解析や proteome 解析などの omics 解析の少なさが全体像把握への道を閉ざしている。

これに対して、我々は bar code 配列を挿入した一遺伝子欠失株ライブラリーを構築し、全体像把握への道を切り開いた。我々は既に Keio collection と名付けた一遺伝子欠失株ライブラリーを構築し、広く公開を行ってきた。そのライブラリーに続き、20 塩基の特異的な配列を挿入し、遺伝子欠失と bar code 配列と対応可能な新規の一遺伝子欠失株ライブラリーの構築を行った。この研究リソースにより、ライブラリーの混合培養液を利用した競合実験により、定常期における遺伝子欠失の生育への影響の定量的解析を可能にした。これは、対数増殖期から遷移期を経て、定常期、さらに長期の定常状態を維持した後の細胞集団の各遺伝子欠失細胞の集団中の population を bar code 配列を新世代型シーケンサーで読み取ることによってその頻度を計算する。

一方で単一の遺伝子欠失のみでは、その表現型が出ないことが非常に多い。このことは、細胞は遺伝子機能欠損や環境の変化などの外因性・内因性の攪乱に対して非常にロバストであることを示しており、生命の本質である。我々は、中心代謝経路ネットワークにおいて、そのロバスト性を転写・翻訳・代謝の複数のネットワークレベルで示してきた。これに対して、一遺伝子欠失の補償経路を同時

に破壊することで、明確な表現型の観察が可能になる。この2重欠失による解析は、合成致死解析と呼ばれ、実績のある方法である。しかし、大腸菌の遺伝子数は4000を超え、2重欠失の組合せは膨大である。我々は、この問題に対して、新規の bar code 欠失株ライブラリーとこれまでの Keio collection を利用した接合による網羅的な2重欠失株作製の系を完成させた。bar code スクリーニング法とシステムティック合成致死解析、及びイン・シリコ解析により、定常期細胞内生理機能ネットワークを明らかにできる可能性が生まれた。

2. 研究の目的

以下の各項目を目的とする。

- 1) 対数増殖期から遷移期を経て、定常期、さらに長期の定常期の生育における一遺伝子欠失株の、細胞集団中の population の変動解析から定常期に重要な機能を持つ遺伝子群の探索
- 2) 選択された遺伝子欠失に対して、網羅的2重欠失株作製による遺伝的ネットワーク解析
- 3) クラスター解析によるネットワーク構造の解明
- 4) 1)及び2)より得られるデータからの仮説構築とそのモデル化
- 5) 3)で得られたネットワーク構造及び4)のモデルのペトリネットを利用したシミュレーションへの実装
- 6) シミュレーションによるデータマイニング
- 7) 各仮説の実験検証

3. 研究の方法

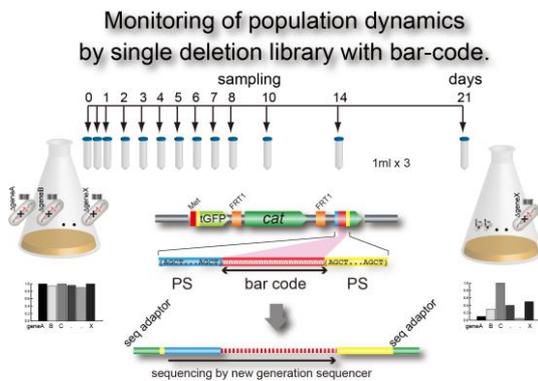
- 1) bar code 遺伝子欠失株ライブラリーセットの確立

平成21年度に構築した bar code 欠失株ライブラリーを、bar code 配列の確認（重複や反復配列など、問題になりそうな配列を持つ候補株の選定）を行った後、適当な候補株を選択し、欠失株ライブラリーセットとして確立する。

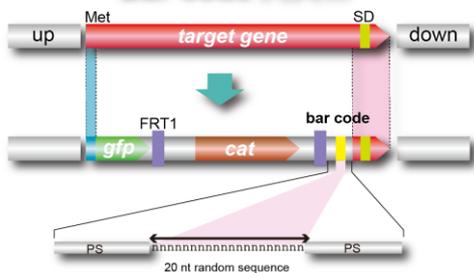
確立した欠失株ライブラリーから、独立に、全ての欠失株を生育させた培養液を調整し、等量ずつ混合し、1ml程度ずつ分注したグリセロールストックとして保管する。この混合培養液を種菌として、以降の実験に用いる。作製した2種類の欠失株の構造を図に示す。

2) 生育状況に応じた遺伝子欠失による population 変動の定量的解析

細胞の生育の lag phase, log phase、遷移期を経て定常期の各生育フェーズでの、各遺伝子欠失の population の変動を、bar code 欠失株の混合培養を利用して行う。植菌時の population を初期状態として、その後経時的に、2 週間程度の定常期を経るまで適当量（通常 1ml）の培養液のサンプリングを行う。染色体を抽出し、図で示すように、bar code 領域を挟む共通領域を用いて、bar code 領域の増幅を行う。この増幅断片を次世代型シーケンサーを用いて配列決定を行う。得られた bar-code 配列を用いて、各遺伝子欠失株の頻度を計算する。図に示す様に、全ての遺伝子欠失株は、PS1 及び PS16 と名付けたプライミングサイトを持つ。この配列を利用して、bar code 配列を増幅するプライマーの設計を行う。プライマーの blue の部分は、シーケンス反応に利用するアダプター配列であり、yellow の領域は数ベースの identifier として特定の配列を挿入する。これはシーケンス反応のコストダウンを狙ったものであり、特定の配列を導入することでサンプリングの時間の違いなど、違うサンプルを一度にシーケンスし、解析後に区別を行うことが可能になり、大幅にコストを抑えることが可能である。我々はすでに 3 塩基の identifier を導入し、12 以上の実験サンプルを区別可能であることを確認した。



Bar-code 欠失株



ターゲット遺伝子を構成物質 (Cm) 耐性遺伝子とランダムな 20 塩基の配列を持つ断片と置換した構造を持つ。

3) 定常期での種々の生育条件による population 変動解析

定常期では、 σS や global regulator として知られる Lrp の変異により、growth advantage in stationary phase (GASP) の表現型が現れることが知られている¹。これまで、この表現型は生理機能状態の全体的なゆらぎが原因であろうとされているが、その全体像の把握には至っていない。我々の bar code 欠失株ライブラリー及び 2 重欠失株による遺伝的ネットワーク相互作用解析により、一気に全体像に迫れることが期待される。すでに 2 週間という長期の定常期を経た 200 遺伝子欠失株の細胞集団による評価実験を行い、良好な結果を得た。この実験を全遺伝子欠失株に広げ、population 変動解析を進める。これにより、GASP 表現型を示す遺伝子欠失群、及び逆に感受性を示す遺伝子欠失の同定を進める。

4. 研究成果

1) bar code 遺伝子欠失株ライブラリーセットの確立

平成 21 年度に構築した bar code 欠失株ライブラリーを、bar code 配列の確認（重複や反復配列など、問題になりそうな配列を持つ候補株の選定）を行った。

各遺伝子欠失候補株のゲノム構造を図に示す方法で、該当遺伝子が薬剤耐性断片と置換されているかどうかを PCR により確認を行うが、その増幅断片を Sanger 法による配列決定で、bar-code 領域の配列を確認した。この方法で、最初の約 2000 遺伝子の bar-code 配列を決定することができた。一方、欠失が確認できない遺伝子を対象とした 2 回目のシステムティックな欠失株作製を進めたが、その際は、bar-code 配列決定の効率化と低価格化を進める為に、候補株 4 株の中から、1 番目と 2 番目の全遺伝子欠失候補株を混合し、下流側に位置する遺伝子配列との対応関係から、各欠失株の bar-code 配列を次世代シーケンサーを用いて、一度に解析を進めた。その結果、薬剤耐性と PCR によるゲノム構造の確認を終えた約 3500 遺伝子の取得候補株全ての bar-code 配列の決定を行うことができた。

その後、bar-code 配列同士あるいは染色体ゲノム上の相同配列の有無、高次構造の存在、連続塩基の有無、等の確認を行い、bar-code として不適切な物を除外し、bar-code 欠失株ライブラリーの候補株の確定を行った。

その後、評価を終えた欠失株候補株のみを Cherry Picker 分注機を用いて、選択を行い、遺伝子欠失株セットとして確立を行った。現在、リソースセンター等への寄託を含めて、公開の準備中である。

2) 生育状況に応じた遺伝子欠失による population 変動の定量的解析

細胞の生育の lag phase, log phase、

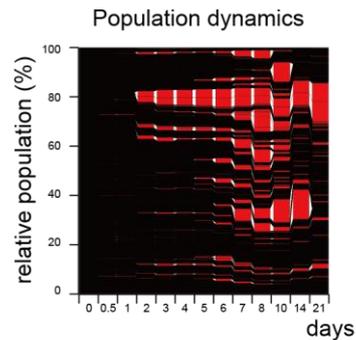
遷移期を経て定常期の各生育フェーズでの、各遺伝子欠失の population の変動を、bar-code 欠失株の混合培養を利用して行う為に、混合培養液における population 変動のパイロットテストを行った。方法は上述の図に示した通りである。パイロットテストには 200 遺伝子、800 候補株を利用し、再現性を含めて、検討を行った。

まず、各欠失候補株をそれぞれ独立に一晩培養した菌液を等量ずつ混合し、初期混合培養液の作製を行った。その混合培養液を新しい LB 培地に植え、競合培養を開始し、各時間におけるサンプルを取得し、ゲノム DNA を精製した。精製ゲノム DNA を鋳型にし、シーケンス用アダプター配列とそれぞれのサンプルを区別する為の identifier を導入したプライマーを用いて、目的の bar-code 領域を増幅を行った。増幅断片の精製後、シーケンサーで配列解析を行った。配列解析には、Illumina 社のシーケンサーを用い、解析は Python でプログラムを作成して行った。

その結果、bar-code 配列をシーケンサーで読むことで population の変動を定量的に解析することが可能であることを確認した。また、4 候補株の変動もその多くが共通の変動を見せ、再現性も確認した。一方、mutL や mutH など mutator 遺伝子等、修復に関与する遺伝子群が、長期混合培養後に population の大半を占めてしまうことが判明した。このときに観察されたことは、4 候補株の中で、ある一株だけが急激に増加していたことが観察された。これは、おそらく mutator 遺伝子の欠失により、修復活性の減少から、adaptive mutation の増加速度の向上で一時的な生育促進が原因と考えられた。

3) 定常期での種々の生育条件による population 変動解析

定常期では、 σS や global regulator として知られる Lrp などの変異により、growth advantage in stationary phase (GASP) の表現型が現れることが知られている。これまで、この表現型は生理機能状態の全体的なゆらぎが原因であろうとされているが、その全体像の把握には至っていない。我々の bar code 欠失株ライブラリー及び 2 重欠失株による遺伝的ネットワーク相互作用解析により、一気に全体像に迫ることが期待される。上記パイロットテストの結果を踏まえ、現在取得できている全遺伝子欠失株、3500 遺伝子に広げ、population 変動解析を進めた。上述の様に、mut 遺伝子群は除外し、それ以外の欠失株を、それぞれ独立に一晩培養を行った。培養液を等量ずつよく混和し、初期混合培養液とした。それらを新しい LB 培地 2L に植え、37 度で振盪培養を 3 週間続けた。その間、増殖を開始した直後の Lag phase、対数増殖期の log phase、stationary



phase、death phase、その後 3 週間後まで、サンプルを取得し、ゲノム DNA を CTAB 法にて精製を行い、パイロットテストと同様に各サンプルを区別する identifier とシーケンスアダプターを付加したプライマーを用いて、配列解析を行った。解析プログラムはパイロットテスト時と同様に、Python による自作プログラムでそれぞれの遺伝子欠失の頻度計算を行った。それぞれのサンプリング時における population の相対値を図に示す。3500 遺伝子、各 2 独立欠失株の全 7000 株の変動を示している。X 軸はサンプリングタイムを、Y 軸は%を示す。この図から分かることは、最初は全ての欠失株がほぼ均等な population を持っているが、生育が進むことにより、ある遺伝子欠失が増減することを示している。このように、個々の遺伝子欠失株の population 変動を混合競合培養により個別に、その変動を定量的に解析を行うことが可能になった。

現在は、この定量データを用いて、クラスター解析と GO データベースから、細胞生理的ネットワーク解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

以下全て査読有り

1. Nakayashiki T., Saito N., Takeuchi R., Kadokura H., Nakahigashi K., Wanner B. L., & Mori H. The tRNA Thiolation Pathway Modulates the Intracellular Redox State in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 195:2039-2049 (2013). JB.02180-12 [pii]

10.1128/JB.02180-12

2. Nakayashiki T. & Mori H. Genome-wide screening with hydroxyurea reveals a link between nonessential ribosomal proteins and reactive oxygen species production. *J Bacteriol* 195:1226-1235 (2013). JB.02145-12 [pii]

10.1128/JB.02145-12

3. Nagamitsu H., Murata M., Kosaka T., Kawaguchi J., Mori H., & Yamada M. Crucial Roles of MicA and RybB as Vital Factors for sigma-Dependent Cell Lysis in Escherichia coli Long-Term Stationary Phase. J Mol Microbiol Biotechnol 23:227-232 (2013). 000350370 [pii]

10.1159/000350370

4. Yamamotoya T., Dose H., Tian Z., Faure A., Toya Y., Honma M., Igarashi K., Nakahigashi K., Soga T., Mori H., & Matsuno H. Glycogen is the primary source of glucose during the lag phase of E. coli proliferation. Biochim Biophys Acta 1824:1442-1448 (2012). S1570-9639(12)00131-8 [pii]

10.1016/j.bbapap.2012.06.010

5. Usui Y., Hirasawa T., Furusawa C., Shirai T., Yamamoto N., Mori H., & Shimizu H. Investigating the effects of perturbations to *pgi* and *eno* gene expression on central carbon metabolism in Escherichia coli using (13)C metabolic flux analysis. Microb Cell Fact 11:87 (2012). 1475-2859-11-87 [pii]

10.1186/1475-2859-11-87

6. Murata M., Noor R., Nagamitsu H., Tanaka S., & Yamada M. Novel pathway directed by sigma E to cause cell lysis in Escherichia coli. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms 17:234-247 (2012). 10.1111/j.1365-2443.2012.01585.x

7. Shinhara A., Matsui M., Hiraoka K., Nomura W., Hirano R., Nakahigashi K., Tomita M., Mori H., & Kanai A. Deep sequencing reveals as-yet-undiscovered small RNAs in Escherichia coli. BMC Genomics 12:428 (2011). 1471-2164-12-428 [pii]

10.1186/1471-2164-12-428

8. Tohsato Y., Baba T., Mazaki Y., Ito M., Wanner B. L., & Mori H. Environmental dependency of gene knockouts on phenotype microarray analysis in Escherichia coli. J Bioinform Comput Biol 8 Suppl 1:83-99 (2010). S021972001000521X [pii]

[学会発表] (計 24 件, ポスター発表を除く) 2012

口頭発表

1. Y. Otsuka, R. Takeuchi, H. Dose, H-C. Huang, H-F. Juan, M. Yamada, H. Matsuno, B. L. Wanner, H. Mori1; Functional

Profiling of the E. coli Genes in Long-Term Stationary Phase. ASM meeting San Francisco, CA, 06/16/2012 - 06/19/2012.

2. 中屋敷徹、森浩禎 (2012) Keio collection を使った Hydroxyurea 感受性株の解析. 第 6 回日本ゲノム微生物学会年会. 2012 年 3 月 10 日 (土) ~ 12 日 (月). 会場: 立教大学池袋キャンパス.

3. Y. Otsuka¹, R. Takeuchi¹, H. Dose¹, H-C. Huang², H-F. Juan³, M. Yamada⁴, H. Matsuno⁵, B. L. Wanner⁶, H. Mori¹. (2012) Functional Profiling of the E. coli Genes in Long-Term Stationary Phase 第 6 回日本ゲノム微生物学会年会. 2012 年 3 月 10 日 (土) ~ 12 日 (月). 会場: 立教大学池袋キャンパス.

4. 中屋敷徹、森浩禎 (2012) Keio collection を使った Hydroxyurea 感受性株の解析. 第 6 回日本ゲノム微生物学会年会. 東京

5. Y. Otsuka¹, R. Takeuchi¹, H. Dose¹, H-C. Huang², H-F. Juan³, M. Yamada⁴, H. Matsuno⁵, B. L. Wanner⁶, H. Mori¹. (2012) Functional Profiling of the E. coli Genes in Long-Term Stationary Phase 第 6 回日本ゲノム微生物学会年会. 東京

招待講演

1. Hirotsada Mori (2012) Towards complete understanding of cellular network in Escherichia coli K-12, School of Biological Science, University of Reading, UK

2. 森浩禎 (2012) バクテリア接合伝達のゲノム操作への可能性, 農芸化学会シンポジウム, 2012, 京都

3. 森浩禎 (2012) 次世代型シーケンサーがもたらす大腸菌像; 「大量シーケンスと網羅解析から、モデル生物大腸菌を見直す」、第 6 回日本ゲノム微生物学会年会ワークショップ, 東京

2011

招待講演

1. Hirotsada Mori (2011) Towards complete understanding of cellular network in Escherichia coli K-12, School of Biological Science, University of Cambridge, UK

2. 森浩禎 (2011) ゲノム微生物学から遺伝学へのインパクト, 日本遺伝学会, 京都大学, 京都

3. Hirotsada Mori (2011) Perspective of network biology in Escherichia coli, UK-JP systems biology symposium, University of Surrey, UK

4. Hirotsada Mori (2011) Towards complete understanding of cellular systems., 5th International IECA conference, Mexico

5. 森浩禎 (2011) Towards complete understanding of cellular systems., "モデル生物丸ごと一匹シンポジウム", Spring 8, 2011 Aug. 20., 兵庫
6. 森浩禎 (2011) Genetic network in Escherichia coli K-12, KEGG シンポジウム, 京都
7. 森浩禎 (2011) Towards complete understanding of cellular network in E. coli, IUMS 2011, Sapporo

2010

口頭発表

1. Hirotda Mori, Tkeuchi, R., and Wanner, B. L. (2010) Towards complete elucidation of genetic interaction of E. coli and its application, 5th International Conference on Microbiology of Food, Health and Environment: Problems and Prospects in Developing Countries. Dhaka, Bagladesh.
2. Mori, H. (2010) New era for network analysis of Escherichia coli., International E.coli Alliance (IECA). West Lafayette, USA.
3. 中屋敷 徹. (2010) Keio collection を使った Hydroxyurea 感受性株の解析, 第5回日本ゲノム微生物学会年会. 宮城
4. 中屋敷 徹. (2010) Keio collection を使った Hydroxyurea 感受性株のスクリーニング, 第7回21世紀大腸菌研究会. 福岡.
5. 森浩禎. (2010) Towards complete understanding of cellular system., 日印転写シンポジウム. 沖縄.
6. 森浩禎. (2010) New era for network biology of Escherichia coli., Spring8. 兵庫
7. 森浩禎. (2010) Elucidation of physiological cellular network and potentialities towards genomic design., 第62回日本生物工学会大会. 宮崎

招待講演

1. 森浩禎(2010) 細胞内ネットワークの全体像解明に向けて。岡山大学・理学部, 岡山
2. 森浩禎 (2010) Systems biology resources and their applications., National Cheng Kung University, Taiwan

[図書] (計6件)

1. Masayuki Murata, Research Signpost, In Escherichia coli and Bacillus subtilis; The Frontiers of Molecular Microbiology Revisited, 2012, 21
2. Naoko Fujimoto, Chemical Biology, INTECH, 2012, 23
3. 森浩禎, 新曜社, 生命誌年間号 遊ぶ, 2012, 6

4. 森浩禎, シーエムシー出版, 微生物を活用した新世代の有用物質生産技術, 2012, 10
5. 森浩禎, シーエムシー出版, システム生物学におけるリソースの重要性, 2012, 11
6. 森浩禎, シーエムシー出版, 大腸菌網羅的変異株ライブラリーの創成と活用, 2012, 12

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森浩禎 (MORI HIROTADA)

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) 研究分担者

山田 守 (YAMADA MAMORU)

山口大学・医学研究科・教授

研究者番号: 30174741

(3) 研究分担者

松野 博嗣 (MATSUNO HIROSHI)

山口大学・理工学研究科・教授

研究者番号: 10181744

(3) 研究分担者

牧 泰史 (MAKI YASUSHI)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60401733