

平成25年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | 6 | 0 | 3 |
|---|---|---|---|---|

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科

3. 研究種目名 特別研究員奨励費 4. 研究期間 平成25年度～平成26年度

5. 課題番号

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 5 | ・ | 0 | 2 | 8 | 1 | 1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|

6. 研究課題名 バクテリア細胞における環境状態感知システムによる細胞内ネットワーク解析

7. 研究代表者

| 研究者番号 | 研究代表者名 | 所属部局名 | 職名 |
|-----------------|---------|------------|----|
| 9 0 1 8 2 2 0 3 | モリ 森 | ヒロタダ 浩禎 | 教授 |

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

| 研究者番号 | 研究分担者名 | 所属研究機関名・部局名 | 職名 |
|-------|------------------|----------------|---------------------------|
| | スティーブン Steven | ボウデン Bowden | 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 |
| | | | 外国人特別研究員 |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

9. 研究実績の概要

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

バクテリアにおける細胞内ネットワーク解明への高効率網羅的2重欠失株解析法の確立を目的として、2種類のトランスポゾンを利用した、2次元ランダムトランスポゾン変異株作製による遺伝的ネットワーク解析法の研究開発を行った。アイデアはトランスポゾンの中に別種のトランスポゾンを組み込み、Tn in Tn断片の構築を行った。全体はTn5で、その中にMariner Tnを導入した。研究開始当初は、Mariner Tnの構築も行う必要があったが、共同研究先の先行研究によりすぐに利用が可能になり、本トランスポゾンを用いた方法も同時に開発を開始した。本年度は、Tn in TnのPCR増幅のための鋳型プラスミドの構築を行った。同一染色体の挿入変異であることを確認するためのバーコードは、鋳型プラスミドをPCR増幅する際のPrimer配列に導入する。2段階でトランスポゾンの転移を活性化するシステムを構築し、導入しているバーコード領域をシーケンサーで読み取ることによって、同一染色体における2重挿入変異であることを確認する。挿入による遺伝子破壊ライブラリーの構築方法の検討と、その挿入位置の同定を、次世代シーケンサーを用いた解析システムの構築を進める。現在、Fプラスミドをベースにした低コピープラスミド上に、組換えを用いて鋳型となるTn in Tn断片のクローン化を行っており、当初予定していた構造の作製を終えた。挿入破壊のランダムさ及び遺伝子破壊の効率の評価を次世代シーケンサーを用いて行い、実験条件の最適化をはかる段階に来ているが、現在は増幅断片の形質転換による最初のTn断片のターゲット細胞への導入効率の向上をはかっている。

10. キーワード

(1) 大腸菌 (2) トランスポゾン (3) 2重変異株 (4) deep sequence
(5) multiplex解析 (6) 遺伝的ネットワーク (7) 網羅的解析 (8) 2次元Tn解析

(注)・印刷に当たっては、A4判（縦長）・両面印刷し、左端を糊付けすること。

11. 現在までの達成度

下欄には、交付申請書に記載した「研究の目的」の達成度について、以下の区分により自己点検による評価を行い、その理由を簡潔に記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。
 <区分>①当初の計画以上に進展している。 ②おおむね順調に進展している。 ③やや遅れている。 ④遅れている。

(区分) ①当初の計画以上に進展している。

(理由) 当初、2種類の Tn の入手および改良から始める予定であったが、共同研究先の先行研究により、開始当初より利用が可能になったことで、スムーズな開始を行えた。プラスミド構築においては、当初は TnmTII システムの中の2次元目の Tn 断片を切り出す目的で loxP 部位を導入し、Cre-lox の部位特異的組換えで挿入領域から切り出す構造で構築を開始した。Tn 断片の挿入後、切り出された Tn 断片にコードされるトランスポゼースの活性化で2次元目の転移をはかる予定であったが、Cre 組換え酵素の活性の制御が難しく、最終的に Cre 組換え酵素およびトランスポゼースは、別のプラスミドから供給する方法の開発も行った。当初からの想定外のこともあったが、うまく切り換えることができたと考えている。現時点で、最終段階のテストに近く入れると考えている。

12. 今後の研究の推進方策

本研究課題の今後の推進方策について簡潔に記述すること。研究計画の変更あるいは研究を遂行する上での問題点があれば、その対応策なども記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

これまでの鋳型プラスミドおよび Cre、Himer Tn とトランスポゼース供給プラスミドの構築は、ほぼ終了した。実際にバーコードを持たせた Tn in Tn 断片を PCR で調整し、大腸菌細胞に導入し、1次元目のランダム挿入変異の変異導入効率、ランダムさなどのテストを行う。そして、2次元目の転移の活性化を、Cre-Himer とトランスポゼース供給プラスミドを接合により導入、2次元目の転移変異導入効率のテスト、バーコードによる同一染色体であることの確認等の検証を進める。機能解析による確認のため、1次元目の変異を糖蓄積に関する遺伝子の挿入変異を選択し、2次元目のテストを行うことで、既知の synthetic lethal/sickness の相互作用を持つものの確認を行うことで、系の検証を進める。

13. 研究発表（平成25年度の研究成果）

※ 「13. 研究発表」欄及び「14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況」欄において記入欄が不足する場合には、適宜記入欄を挿入し、それによりページ数が増加した場合は、左端を糊付けすること。

〔雑誌論文〕 計 (0) 件 うち査読付論文 計 (0) 件

| 著者名 | 論文標題 | | | |
|---------------------------|-------|---|-----|---------|
| | | | | |
| 雑誌名 | 査読の有無 | 巻 | 発行年 | 最初と最後の頁 |
| | | | | |
| 掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子) | | | | |
| | | | | |

| 著者名 | 論文標題 | | | |
|---------------------------|-------|---|-----|---------|
| | | | | |
| 雑誌名 | 査読の有無 | 巻 | 発行年 | 最初と最後の頁 |
| | | | | |
| 掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子) | | | | |
| | | | | |

| 著者名 | 論文標題 | | | |
|---------------------------|-------|---|-----|---------|
| | | | | |
| 雑誌名 | 査読の有無 | 巻 | 発行年 | 最初と最後の頁 |
| | | | | |
| 掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子) | | | | |
| | | | | |

(注)・印刷に当たっては、A4判（縦長）・両面印刷し、左端を糊付けすること。

【学会発表】計(0)件 うち招待講演 計(0)件

| | | |
|------|-------|------|
| 発表者名 | 発表標題 | |
| | | |
| 学会等名 | 発表年月日 | 発表場所 |
| | | |

【図書】計(0)件

| | | |
|-----|-----|-------|
| 著者名 | 出版社 | |
| | | |
| 書名 | 発行年 | 総ページ数 |
| | | |

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

【出願】計(0)件

| 産業財産権の名称 | 発明者 | 権利者 | 産業財産権の種類、番号 | 出願年月日 | 国内・外国の別 |
|----------|-----|-----|-------------|-------|---------|
| 該当なし | | | | | |

【取得】計(0)件

| 産業財産権の名称 | 発明者 | 権利者 | 産業財産権の種類、番号 | 取得年月日 | 国内・外国の別 |
|----------|-----|-----|-------------|-------|---------|
| 該当なし | | | | | |
| | | | | 出願年月日 | |

15. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

| |
|---|
| http://ecoli.naist.jp/ |
|---|