

様 式 C - 7 - 1

## 平成 26 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
3. 研究種目名 基盤研究(A)      4. 研究期間 平成25年度～平成27年度
5. 課題番号 

2	5	2	5	0	0	2	8
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 長期定常期から分裂再開までの細胞の生存戦略

## 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 ヒロタダ 森 浩慎	バイオサイエンス研究科	教授

## 8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名
0 0 4 3 7 2 6 1	タムラ タケユキ 田村 武幸	京都大学・化学研究所	助教
1 0 1 8 1 7 4 4	マツノ ヒロシ 松野 浩嗣	山口大学・理工学研究科	教授
3 0 1 7 4 7 4 1	ヤマダ マモル 山田 守	山口大学・医学（系）研究科（研究院）	教授
6 0 4 0 1 7 3 3	マキ ヤスシ 牧 泰史	大阪医科大学・医学部	講師
7 0 3 2 2 7 4 0	ナカヒガシ ケンジ 中東 憲治	慶應義塾大学・その他の研究科	准教授

## 9. 研究実績の概要

モデル大腸菌K-12株を活用し、化学物質と遺伝子産物との相互作用解析を目的に20塩基の分子バーコードを導入した一遺伝子欠失株ライブラリーの構築を試み、欠失株としての評価を終え、すべてのバーコード領域の配列決定後、ライブラリーとして確立した。このライブラリーを用いて、本年度は2つの大規模解析への可能性の検証を行った。1)すべての欠失株を混合した培養液を用いた、長期定常期中のpopulation変動の定量的解析、2)同じく混合培養液を用いて、化学物質を含んだ培地中の各欠失株のpopulation変動解析、の二つを行いバーコード欠失株の有用性を確認することができた。一方、1)の長期定常期での欠失遺伝子の影響を調べた解析では、特定のバーコード領域の増大と、再び生育可能な状態になった環境での次のpopulationを築く遺伝子欠失株とが必ずしも一致しないという問題を持つことが判明した。これはゲノムDNAが細胞の形態が保たれていてDNA分解酵素などから保護される状態にありながら、次の世代として再び細胞分裂を開始することができない、あるいは非常に遅れて生育する可能性を示している。そのため、長期間の培養液から経時的にサンプリングを行い、一部は前回と同様にバーコードの頻度をシーケンスで確認し、残る培養液はフレッシュな培地に替え、再び生育させ、一定時間後にシーケンスによりバーコードの頻度を調べ、遺伝子欠失と再生育能力との相関の解析を進めた。シーケンス解析自体は次年度に持ち越している。接合伝達可能な低コピープラスミドクローンライブラリーの構築を行い、ライブラリーとして確立した。そして上述のバーコード欠失株を相補するライブラリーの構築も終了し、相補株におけるバーコード解析を可能にした。

## 10. キーワード

(1) 大腸菌	(2) 分子バーコード	(3) 一遺伝子欠失株	(4) deep sequence
(5) 真コピー可動型発現プラスミド	(6) population変動	(7) Multiplex解析	(8) Chemical Genomics

## 11. 現在までの達成度

(区分)(1) 当初の計画以上に進展している。

(理由)

一遺伝子バーコード欠失株ライブラリーの構築を終了し、最初のパイロットテストを、長期定常期におけるpopulation変動及び薬剤を含む培地での欠失遺伝子と薬剤との相互作用を定量的に解析するシステムの構築を完成した。また本年度はプラスミドから該遺伝子の増産による影響もバーコード解析を可能にするライブラリーの構築を行った。予定以上に進展した事は、リソース及び方法論の確立により、急速に共同研究も拡張、発展していることも大きい。

## 12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

来年度は、最終年度でもあり、まず構築したリソースを活用して得られた大量の情報の解析を進めることと、論文化を中心に進める。また、これまで開発を行った低コピー可動プラスミドは、Fプラスミドの移動起点(oriT)を持つ。これは、大腸菌間では非常に効率良くプラスミドの移動を可能にするが、incPプラスミドのRP4由来のoriTを利用することで、大腸菌-放線菌間など種を超えた接合による移動を可能にする。接合は通常は形質転換とは違い、巨大DNAの移動を可能にする。すでにこれまでのベクターにRP4由来のoriTを導入したプラスミドを構築できており、巨大DNA移動システム構築など、応用へ向けた拡張を図る。さらに本プロジェクト終了後本プロジェクトで得られたリソースや方法論をベースに、我々としては、今後10年、20年のスパンでシーズを出し続けることができるような基礎、基盤研究に目を向けた研究を中心に進めること、そして研究グループ内外を問わず、共同研究等で短期的な活用に向けた方向に应用できるような体制を取れるような仕組みを検討する。

## 13.研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(7)件 うち査読付論文 計(7)件

著者名		論文標題			
Lu, W., Tamura, T., Song, J. & Akutsu, T.		Computing smallest intervention strategies for multiple metabolic networks in a boolean model.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Journal of computational biology	有	22	2   0   1   5	85-110	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1089/cmb.2014.0274.					

著者名		論文標題			
Takeuchi R, Tamura T, Nakayashiki T, Tanaka Y, Muto A, Wanner BL, & Mori H		Colony-live -a high-throughput method for measuring microbial colony growth kinetics- reveals diverse growth effects of gene knockouts in Escherichia coli.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
BMC microbiology	有	14	2   0   1   4	171	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1186/1471-2180-14-171					

著者名		論文標題			
Montero M, M Rahimpour, AM Viale, G Almagro, G Eydallin, A Sevilla, M Canovas, C Bernal, AB Lozano, FJ Munoz, E Baroja-Fernandez, A Bahaji, H Mori, FM Codoner, & J Pozueta-Romero		Systematic Production of Inactivating and Non-Inactivating Suppressor Mutations at the relA Locus That Compensate the Detrimental Effects of Complete spoT Loss and Affect Glycogen Content in Escherichia coli.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
PloS one	有	9	2   0   1   4	e106938	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1371/journal.pone.0106938					

著者名		論文標題			
Khan I, Y Chen, T Dong, X Hong, R Takeuchi, H Mori, & D Kihara		Genome-scale identification and characterization of moonlighting proteins.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Biol Direct	有	9	2   0   1   4	30	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1186/s13062-014-0030-9					

著者名		論文標題			
Conway T, JP Creecy, SM Maddox, JE Grissom, TL Conkle, TM Shadid, J Teramoto, P San Miguel, T Shimada, A Ishihama, H Mori, & BL Wanner		Unprecedented high-resolution view of bacterial operon architecture revealed by RNA sequencing.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
mBio	有	5	2   0   1   4	e01442-14	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1128/mBio.01442-14					

著者名		論文標題			
Aoki W, M Saito, R Manabe, H Mori, Y Yamaguchi, & E Tamiya		Integrating reductive and synthetic approaches in biology using man-made cell-like compartments.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Scientific reports	有	4	2   0   1   4	4722	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1038/srep04722					

著者名		論文標題			
Nakahigashi K, Y Takai, Y Shiwa, M Wada, M Honma, H Yoshikawa, M Tomita, A Kanai, & H Mori		Effect of codon adaptation on codon-level and gene-level translation efficiency in vivo.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
BMC Genomics	有	15	2   0   1   4	1115	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1186/1471-2164-15-1115					

(学会発表) 計(10)件 うち招待講演 計(3)件

発表者名		発表標題	
Kataoka, M.		Old is New? : New horizon of conjugation in the generation of synthetic biology.	
学会等名	発表年月日	発表場所	
Plasmids: History & Biology of Cold Spring Harbor symposium	2014年09月21日 ~ 2014年09月23日	Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA	

発表者名		発表標題	
Hiroshi Matsuno		Modeling of glycogen utilization in E.coli	
学会等名	発表年月日	発表場所	
The Third BMIRC International Symposium for Virtual Physiological Human (招待講演)	2015年03月05日 ~ 2015年03月06日	Iizuka, Fukuoka, Japan	

発表者名		発表標題	
Atsushi Mizuta		Properties of Dependent Subnets in a Retention-Free Petri Net	
学会等名	発表年月日	発表場所	
The 29th International Technical Conference on Circuit/Systems Computers and Communications (ITC-CSCC)	2014年07月01日 ~ 2014年07月04日	Phuket, Thailand	

発表者名	発表標題	
Mori, H	Past, Present and Future of Science and Technology using E. coli	
学会等名	発表年月日	発表場所
Diversity and Convergence of Life Science (招待講演)	2014年09月02日 ~ 2014年09月03日	Busan, Korea

発表者名	発表標題	
Mori, H	E. coli Systems Biology: from the Comprehensive Experimental Side.	
学会等名	発表年月日	発表場所
Taiwan Proteomics Society Annual Conference & Translational and Systems Biology Symposium. (招待講演)	2014年11月12日 ~ 2014年11月13日	Taipei, Taiwan

発表者名	発表標題	
Takahiro Yokoi	Development and optimization of DNA transfer system in B. subtilis using heterogeneous conjugal transfer.	
学会等名	発表年月日	発表場所
IUMS 2014	2014年07月27日 ~ 2014年08月01日	Montrial, Canada

発表者名	発表標題	
片岡 正和	放線菌への巨大遺伝子クラスター輸送系の開発	
学会等名	発表年月日	発表場所
2014年度グラム陽性菌ゲノム機能会議	2014年09月03日 ~ 2014年09月05日	鶴岡, 山形

発表者名		発表標題	
藤山 和也		SulA 依存性溶菌における zwf の役割	
学会等名		発表年月日	発表場所
日本農芸化学会中四国第41回講演会(支部例会)		2015年01月24日～2015年01月24日	水産大学校、下関市、山口

発表者名		発表標題	
脇 義賢		大腸菌における長期定常期生存に有利な変異とその表現型	
学会等名		発表年月日	発表場所
日本農芸化学会中四国第41回講演会(支部例会)		2015年01月24日～2015年01月24日	水産大学校、下関市、山口

発表者名		発表標題	
加藤 薫平		高温適応によって獲得した大腸菌耐熱化変異株の解析	
学会等名		発表年月日	発表場所
日本農芸化学会2015年度(平成27年度)大会		2015年03月27日～2015年03月29日	岡山大学津島キャンパス、岡山市、岡山

〔図書〕計(3)件

著者名		出版社		
Mori H, R Takeuchi, Y Otsuka, HT Yong, W Nomura, & BL Wanner		Springer		
書名		発行年	総ページ数	
Microbial Production From Genome Design to Cell Engineering		2014	12	

著者名	出版社		
森 浩禎	化学同人		
書名	発行年	総ページ数	
ゲノム・シーケンサー革命	2 0 1 5	13	

著者名	出版社		
Mori H, K Yokoyama, R Takeuchi, K Makishi, W Nomura, Y Otsuka, H Dose, & BL Wanner	Springer		
書名	発行年	総ページ数	
Gene Essentiality: Methods and Protocols	2 0 1 4	21	

## 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

(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
				出願年月日	



15.備考

GenoBase  
<http://ecoli.naist.jp/GB>