

様式 F-7-1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成29年度）

所属研究機関名称		奈良先端科学技術大学院大学	機関番号	14603
研究 代表者	部局	データ駆動型サイエンス創造センター		
	職	助教		
	氏名	武藤 愛		

1. 研究種目名 若手研究(B) 2. 課題番号 17K17885

3. 研究課題名 大腸菌合成致死遺伝子の網羅的検出による代謝経路の論理的再構築

4. 補助事業期間 平成29年度～平成31年度

5. 研究実績の概要

単独での遺伝子欠失では致死とならないが、他の遺伝子の欠失が共存すると致死性を示す現象を合成致死と呼ぶ。本研究は、機能補完関係にある二つの代謝経路上の遺伝子は他方の経路上の遺伝子群に対して合成致死性を示す点に着目し、遺伝子欠失株ライブラリを用いた合成致死性の網羅的検出による、大腸菌の未知代謝経路のゲノムワイド探索を目的とする。

平成29年度は、まず最小培地及びアミノ酸を添加した最小培地における必須遺伝子の網羅的スクリーニングを、大腸菌遺伝子欠失株ライブラリKeio collectionを用いて行なった。得られた必須遺伝子情報に基づき、代謝パスウェイデータベースを用いた必須代謝経路の特定を行い、必須経路上の非必須遺伝子の抽出を行った。必須経路上の非必須遺伝子の存在は代替経路の存在を示唆しており、これらの非必須遺伝子に対し合成致死性を示す遺伝子の網羅的スクリーニングにより、未知の代謝経路の探索を進めている。具体的には、上記非必須遺伝子の欠失株のゲノムDNAを、接合伝達によってKeio collectionに導入することで二遺伝子欠失株コレクションを作製し、共に欠失したときに致死となる遺伝子(合成致死遺伝子)群の特定を順次行なっている。これらの合成致死遺伝子群が、未知の代替経路に関連する遺伝子の候補となる。

また、実験の遂行に伴い、4000株を同時に操作する網羅的スクリーニングにおいて、再現性を確保するための実験プロトコルの改善の必要性が明らかとなった。検討及び検証を行い、実験プロトコルの改善を行った。

6. キーワード

バイオインフォマティクス 代謝パスウェイ 遺伝的相互作用 合成致死 接合伝達 遺伝子欠失株ライブラリ

7. 現在までの進捗状況

区分 (3) やや遅れている。

理由
申請前の予備実験において、10反応からなるヒスチジン生合成経路の遺伝子のうち5反応の遺伝子は、M9最小培地にグルコースを添加した場合において非必須性を示すという結果が得られていた。しかしながら、この結果について再度検証を行なったところ再現性が得られなかった。網羅的スクリーニングの際には、1,536のアレイ状に並べられたコロニーをスタンピングロボットを用いて一度に植菌する。その際、コロニーの過生育によって隣のコロニーの侵入が起き易い部分が存在していたことにより、本来生育しない箇所にコロニーが生育したため、必須遺伝子が非必須として検出されたことが原因であったと考えられた。培養時間の管理及びvalidationの方法を見直し、実験プロトコルの改善を行った。

計画段階では初年度中に必須機能をもつ代謝経路上の非必須遺伝子300について、合成致死遺伝子の網羅的スクリーニングの完遂を予定していたが、実験プロトコルの検証と改善に時間を要したため、予定していた計画よりやや遅れている。

2 版

8. 今後の研究の推進方策

平成30年度は平成29年度に改善された実験プロトコルに従い、初年度中に達成できなかった300の非必須遺伝子の合成致死遺伝子の網羅的スクリーニングを順次行なう。得られている必須経路のうち、添加したアミノ酸に特異的に必須性を示す代謝経路上の非必須遺伝子から順にスクリーニングを進めることで、研究を推進する。スクリーニングデータの蓄積と並行して、合成致死を示す代謝関連遺伝子の共有度を遺伝子間の類似度とし、合成致死遺伝子のクラスタリング及び代謝経路の論理的再構築を行う予定である。

9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

当初、初年度に実験高速化のための手動卓上型ピペティングシステムを計上していたが、同機器が所属する研究室に導入されたため、当研究費からの購入を見送った。

遺伝子欠失株ライブラリを保管するために所属する研究室が保有していた超低温フリーザーが老朽化のため故障し、保管場所に重要な問題が生じたため、急速、超低温フリーザーを購入した。中古機器販売業者から購入したことにより比較的安価にて購入できたため、次年度使用額が生じた。

実験プロトコルの検討及び変更により、大腸菌の生育実験に必要な消耗品を当初予定していたよりも多く消費した。また、今後とも必要になる予定であるため、次年度使用額はミネルヴァテック社Singar plate及びPin等の消耗品の購入に使用する予定である。

10. 研究発表（平成29年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名	Ai Muto-Fujita, Yuichiro Tanaka, Jonathan Monk, Bernhard O. Palsson and Hirotsada Mori
2. 発表標題	Towards the discovery of unknown metabolic pathways in E.coli -An application of comprehensive genetic interaction analysis-
3. 学会等名	From Genetic Networks to a Cellular Wiring Diagram (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Nurhezreen Md Iqbal, 蓮實 紗弥, 石黒 宗, 山本-エヴァンス 楠, 森 秀人, 武藤愛, 谷内江 望 and 森 浩禎
2. 発表標題	分子バーコードを用いた大腸菌遺伝子欠失株混合培養時の集団動態の検出
3. 学会等名	NGS現場の会 第五回研究会
4. 発表年	2017年

〔図書〕 計0件

1 1 . 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件 / うち取得0件）

1 2 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

1 3 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
アメリカ合衆国	カリフォルニア大学サンディエゴ校	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-				

1 4 . 備考

-