

# 大腸菌におけるゲノム機能の体系的解析

森 浩禎 (CREST・奈良先端科学技術大学院大学・遺伝子教育研究センター)  
磯野克巳 (神戸大学・理学部)、井口八郎 (京都大学大学院理学研究科)、  
加藤潤一 (東京大学医科学研究所)、金谷重彦 (山形大学・工学部)、西村昭子 (遺伝  
学研究所微生物保存研究室)、平賀壯太 (熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設細  
胞複製部門)、堀内 嵩 (基礎生物学研究所)、松田秀雄 (大阪大学・大学院基礎工学  
研究科)、三木健良 (九州大学・薬学部)、山本義弘 (兵庫医科大学遺伝学教室)、  
和田千恵子 (京都大学・ウイルス研究所)

1985年、Science誌におけるダルベッコの発言からゲノム研究は具体化した。日本においては小原らが世界に先駆けて大腸菌染色体の物理地図及び全染色体を網羅するコンティグクローン、いわゆる小原クローンを完成した(Cell, 1987, Vol. 50, 495-508)。これが契機となり、京都大学の由良が代表となり「大腸菌のゲノムプロジェクト」が動き出した。1989年のことである。その後組織の組み換えはあったが、最終的には1997年1月に基礎生物学研究所の堀内と奈良先端大の森を中心とするグループにより大腸菌ゲノムの全構造が明らかにされた。決定された染色体配列は情報学的な解析がなされ、その結果はデータベースとして奈良先端大及び遺伝研より公開されている (<http://ecoli.aist-nara.ac.jp>, <http://gib.genes.nig.ac.jp/Ec/>)。解析の結果、これほど良く研究された大腸菌でさえ、機能未知の遺伝子群が全体の半数を占めることが明らかとなった。生命の基本単位としての細胞の完全な理解に向けて、大腸菌は過去の蓄積の多さ、研究方法の充実等から最適の研究対象の一つであることは疑う余地はない。このような見地にたって、大腸菌ゲノムを決定したグループは「大腸菌の完全な理解」に向けて、ゲノム機能解析グループを形成し、バイオインフォマティクス及び実験の連携を取りながら研究を進めている。本グループは12の研究グループから構成し、大きく4つの活動グループに分けて研究開発を進めている。各グループは1)ゲノム生物学時代における網羅的な解析に供する研究材料の開発を目的とした「リソース構築グループ」、2)大量に生み出される生物学情報の解析を目的とした「バイオインフォマティクスグループ」、3)過去の蓄積およびこれから生み出される情報のインターネット時代にふさわしい形でのデータベース構築を目的とした「データベース構築グループ」、そして4)機能未知遺伝子群の網羅的な機能解析を目的とした「機能解析グループ」、の4つのグループである。

ゲノム生物学において、網羅的な機能解析を推進するためには網羅的かつ均質な研究材料の作製は避けて通る事のできないステップである。この目的のために (A) 大腸菌全遺伝子の破壊株作製、(B) 全遺伝子のクローン化を行ってきた。(A) は九州大学の三木を中心に、兵庫医大の山本、大阪大学の松田、そして奈良先端大の森の各グループでトランスポゾンによる挿入破壊株の分離・作製を進めている。方法はランダムにトランスポゾンを挿入させた大腸菌において、その挿入位置をシーケンシングによって同定するという方法である。破壊株の作製により、(a) 機能未知遺伝子群の機能解析、(b) 必須遺伝子の同定、(c) 特定の遺伝子破壊による他の遺伝子の発現への影響の解析からの遺伝子ネットワークの解明、などが期待される。

(B) は奈良先端大の森のグループにより構築を行った。予測された全ORFのPCRによる増幅断片を、この目的のために開発を行ったベクターにクローン化するものである。このベクターの特徴は、(a)簡便に他の目的のためのベクターに移し変えることが可能、(b)クローン化されたORFの発現をコントロール可能、(c)GFP遺伝子を融合させることで、細胞内局在性等の解析が可能、等の特徴をもっている。このクローンを利用し、宝酒造株式会社と共同で大腸菌のDNAマイクロアレイの開発を行った。

非常に大量の配列データが生み出されるゲノム研究において、バイオインフォマティクスを抜きにしては進めることが不可能である。グループでは、(a)アミノ酸配列の類似性から各ORFをグループ化による予測ORFの分類、機能推定、進化・系統解析を目的としたクラスター解析、(b)種を超えた遺伝子の水平伝達の同定や発現予測などを目的としたコドン利用頻度を利用した遺伝子の分類・解析、(c)DNAマイクロアレイを利用した遺伝子ネットワーク解明のためのソフトウェア開発を進めている。

データベース構築は解析結果のみならず、リソースのデータも含めて構築を行い、インターネットを通じて公開している。アドレスは <http://ecoli.aist-nara.ac.jp> である。

機能解析は、完成した破壊株のセットやクローン等のリソースを用い、網羅的にかつ簡便に機能の類推に結びつくようなアッセイ法の確立を行う。ゲノム解析において全体像を見ることは、個々の遺伝子(要素、ノード)の機能と、それらの相互関係(ネットワーク、アーク)の解明と言える。私たちは前者へのアプローチとして、構造上の類似性を元にしたクラスター解析等の情報学的アプローチ、破壊株等を利用した実験解析、後者を目的にDNAマイクロアレイやタンパク質相互作用の解析によるネットワーク解明を推進している。DNAマイクロアレイとはスライドグラス上に高密度に遺伝子領域のDNAをスポットしたものである。このアレイを用いることで、違う状態に置かれた細胞の遺伝子の発現状況を一度に取得し、比較することが可能になる。しかし、一度に大量のデータが生み出されるため、そのこからの意味抽出が容易ではない。我々は、データマイニングの一環として、京都大学のKEGGデータベースを利用し、その代謝マップ上に発現情報を取り込めるシステムを構築した。この手法は同時に、医学、薬学、工学、農学などの分野においても、大きく期待される技術であり、すでに病原性微生物に対する新たな薬剤開発につながる研究も報告されている。

これまでの大腸菌ゲノム解析への取り組みを紹介しながら、現在、我々が行っている研究開発の状況を紹介する。

#### 参考文献

1. Yamamoto, Y., Aiba, H., Baba, T., Hayashi, K., Inada, T., Isono, K., Itoh, T., Kimura, S., Kitagawa, M., Makino, K., Miki, T., Mitsunashi, N., Mizobuchi, K., Mori, H., Nakade, S., Nakamura, Y., Nashimoto, H., Oshima, T., Oyama, S., Saito, N., Sampei, G., Satoh, Y., Sivasundaram, S., Tagami, H., Takahashi, H., Takeda, J., Takemoto, K., Uehara, K., Wada, C., Yamagata, S. & Horiuchi, T. Construction of a Contiguous 874-kb Sequence of the Escherichia coli K12 Genome Corresponding to 50.0-68.8 min on the Linkage Map and Analysis of Its Sequence Features (Supplement). *DNA Research* **4**, 169-178 (1997).
2. Itoh T., Matsuda H. & Mori H. Phylogenetic analysis of the third hsp70 homolog in Escherichia coli; a novel member of the Hsc66 subfamily and its possible co-chaperone. *DNA Research* **6**, 299-305 (1999).
3. Itoh T., Okayama T., Hashimoto H., Takeda J., Davis R. W., Mori H. & Gojobori T. A low rate of nucleotide changes in Escherichia coli K-12 estimated from a comparison of the genome sequences between two different substrains. *FEBS Letters* **450**, 72-76 (1999).
4. Itoh T., Takemoto K., Mori H. & Gojobori T. Evolutionary instability of operon structures disclosed by sequence comparisons of complete microbial genomes. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 332-346 (1999).
5. Mori H., Isono K., Horiuchi T., Miki T. & E. coli genome project team in Japan. Functional Genomics of Escherichia coli in Japan. *Research in Microbiology* **151**, 121-128 (2000).