

様 式 C - 7 - 1

平成 2 8 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)（一般） 4. 研究 期 間 平成 2 8 年度～平成 3 0 年度
5. 課 題 番 号

1	6	H	0	2	4	8	5
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 細胞の生存 - 自然界における大腸菌の場合

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・創成科学研究科	教授
3 0 1 7 4 7 4 1	ヤマダ マモル 山田 守	山口大学・創成科学研究科	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
9 0 3 3 2 6 7 6	カタオカ マサカズ 片岡 正和	信州大学・学術研究院工学系	准教授

9. 研究実績の概要

大腸菌K-12株のリソース群を活用し、種間相互作用による相互作用ネットワーク解析手法の確立と解析を進める。

1) 各成育期の細胞内外の物質及び状態の定量解析：細胞生育時の物理的・化学的定量方法の確立を進め、特にin vivoでの細胞内pHの変動解析を可能にした。C、N及びP源枯渇による細胞死、再生育開始までの時間変動、細胞寿命の変化の解析から、一部の分子機構解明への糸口を掴んだ。

2) Chemical genomics解析、異種間競合、宿主腸内環境での解析に向けたBar-code欠失株ライブラリーによる混合培養解析手法の確立と解析：全遺伝子欠失株混合培養によるpopulation変動をbarcode 欠失株を利用して、長期定常期でのpopulation変動、特定の薬剤に対する耐性機構解析、200種類を超える薬剤に対する網羅的な遺伝子相互作用解析を平行して解析を進めた。それぞれの解析でのデータ取得は終わることができ、一部は論文発表を行った。

宿主腸内環境に向けてbarcode欠失株にStreptomycin耐性を付加する方法を検討し、ribosomeの変異による耐性付与のための株を作製した。これにより、接合を用いて高効率に薬剤耐性の付与を可能にした。

3) モデル化：局所モデルとグローバルモデルとの統合化は、国際共同研究グループと共に構築し（Kierzek, A., Surrey大学）、その成果は論文発表を行った。遺伝型と細胞生育を、遺伝子発現量、代謝物量など、定量測定結果をニューラルネットやディープラーニングなどの情報学手法によるグローバル及び局所モデル構築を進めており、アルゴリズムの検討はすでに論文として発表した。

10. キーワード

(1) 大腸菌	(2) 相互作用ネットワーク	(3) 長期定常期	(4) 細胞生育
(5) 細胞死	(6) lag	(7)	(8)

11. 現在までの進捗状況

(区分)(1) 当初の計画以上に進展している。

(理由)

研究開始当初の目標は、細胞内のpH、代謝基質濃度等の変動をrealtimeに測定する方法の確立を行い、細胞集団の、長期定常期、薬剤・化学物質ストレス等、環境変動に対する応答に対する細胞内遺伝子機能ネットワークに迫ることであった。これに対し、pH測定を含め、in vivoで蛍光タンパク質を利用したrealtimeの変動測定も可能になり、予想以上の進捗を見せた。構築した一遺伝子Bar-code欠失株ライブラリー混合培養による、混合培養中の各遺伝子欠失のpopulation中の変動を、bar-codeの頻度をシーケンサーで定量することで解析を進める方法論も、確立することができ、3週間の長期定常状態を維持した環境中での各欠失株のpopulation中の変動を定量化することができた。また、同欠失株混合培養液を用いて、薬剤に対する各遺伝子欠失の混合培養中のpopulation変動への影響を解析することで、薬剤に対する各遺伝子欠失の影響の解析を可能にした。最初の例として、細胞への毒性を示すTelluriteの毒性機構の解明と、自然界からの化合物を含んだ200種を超える化合物の各遺伝子欠失株の集団中での生育の影響を行い、すでにTelluriteに関しては論文化も行うことができ、想定以上の進捗を示すことができた。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

一遺伝子Bar-code欠失株ライブラリーの混合培養中の各欠失株の変動の定量化において、その実用性を示すことができた。まずは、大腸菌本来の生育環境である腸内環境においての解析手法の確立を行う。そのためには、Bar-code欠失株の持つChloramphenicol耐性に対して、宿主個体の腸内環境の清浄化のため、Streptomycin耐性を付与する必要がある。すでに2016年度に、リボソームタンパク質(rpsL)の変異によるStreptomycin耐性を、Hfr化した大腸菌株に移した。これにより、接合を用いて、全Bar-code欠失株に対して、薬剤耐性を与える準備は整ったので、実際に耐性遺伝子を移動させ、生体内での大腸菌の各遺伝子の生育への影響をbar-code解析を用いた解析手法の確立を行い、解析を進める。現在は、アメリカOklahoma州立大学のProf. Conway及び台湾国立成功大学のDr. Wangのグループと共同でin vivo解析を進める予定でいる。細胞機能のモデル化と実験サイドとの連携、環境の違いによる定常期、再生育、生育開始遅延、対数増殖と言った細胞生育の基礎解析は徹底して進める。

13. 研究発表（平成 28 年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計（6）件／うち査読付論文 計（6）件／うち国際共著論文 計（5）件／うちオープンアクセス 計（6）件

著 者 名	論 文 標 題				
W. Hou, T. Tamura, W.-K. Ching and T. Akutsu	Finding and analyzing the minimum set of driver nodes in control of Boolean networks				
雑 誌 名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Advances in Complex Systems	有	19	2016	1-32	該当する
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）					
なし					
オープンアクセス					
オープンアクセスとしている（また、その予定である）					

著 者 名	論 文 標 題				
Tomoyuki Kosaka, Masayuki Murata, and Mamoru Yamada	Survival strategy of Escherichia coli in stationary phase: involvement of σ E-dependent programmed cell death				
雑 誌 名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
INTECH	有	in press	2017	in press	-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）					
なし					
オープンアクセス					
オープンアクセスとしている（また、その予定である）					

著 者 名	論 文 標 題				
Atsushi Mizuta, Ge, Qi-Wei, and Hiroshi Matsuno	Dependent Shrink of Transitions for Calculating Firing Frequencies in Signaling Pathway Petri Net Model				
雑 誌 名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Algorithms	有	10	2016	1-4	該当する
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）					
なし					
オープンアクセス					
オープンアクセスとしている（また、その予定である）					

著 者 名		論 文 標 題				
Morales, E. H. Pinto, C. A. Luraschi, R. Munoz-Villagran, C. M. Cornejo, F. A. Simpkins, S. W. Nelson, J. Arenas, F. A. Piotrowski, J. S. Myers, C. L. Mori, H. Vasquez, C. C.		Accumulation of heme biosynthetic intermediates contributes to the antibacterial action of the metalloid tellurite				
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Nat Commun		有	8	2 0 1 7	15320	該当する
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1038/ncomms15320						
オープンアクセス						
オープンアクセスとしている (また、その予定である)						

著 者 名		論 文 標 題 【掲載確定】				
Nishihara, T. Inoue, J. Tabata, S. Murakami, S. Ishikawa, T. Saito, N. Fukuda, S. Tomita, M. Soga, T.		Synthetic Biomarker Design Using Analyte-Responsive Acetaminophen				
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Chembiochem		有	in press	2 0 1 7	in press	該当する
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1002/cbic.201700023						
オープンアクセス						
オープンアクセスとしている (また、その予定である)						

著 者 名		論 文 標 題 【掲載確定】				
Takeyuki Tamura Wei Lu Jiangning Song Tatsuya Akutsu		Computing Minimum Reaction Modifications in a Boolean Metabolic Network				
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics		有	in press	2 0 1 7	in press	該当する
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
なし						
オープンアクセス						
オープンアクセスとしている (また、その予定である)						

〔学会発表〕 計（５）件／うち招待講演 計（５）件／うち国際学会 計（４）件

発 表 者 名	発 表 標 題	
森 浩禎	『微生物ゲノム情報から未知機能を探る』網羅解析から未知機能、未同定酵素探索. Challenges towards unveiling hidden functional modules in E. coli using new resources and methods.	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
分子生物学会（招待講演）（国際学会）	2016年12月01日～ 2016年12月01日	横浜パシフィコ（神奈川県・横浜市）

発 表 者 名	発 表 標 題	
山田 守	マイナーな研究から：大腸菌のプログラム死と長期定常期	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
日本農芸化学会中四国第47回講演会（招待講演）	2017年01月28日～ 2017年01月28日	島根大学（島根県・松江市）

発 表 者 名	発 表 標 題	
武藤 愛	Applications of comprehensive E.coli single-gene knockout mutants libraries: Keio collection and Aska deletion	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
SYNBIOCHEM/MIB SynBio mini-Conference（招待講演）（国際学会）	2016年07月26日～ 2016年07月26日	Manchester, UK.

発 表 者 名	発 表 標 題	
Takeyuki Tamura	Computing Minimum Reaction Modification in a Boolean Metabolic Network	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
2016 Biotech and Pharmaceutical Service Platform - Biological Network Analysis Conference（招待講演）（国際学会）	2016年11月04日～ 2016年11月04日	新竹、台湾

発 表 者 名	発 表 標 題	
武藤 愛	生命システム原材料の起源と進化：現在の生化学反応に生命初期進化の痕跡は残っているか	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第89回日本生化学会大会（招待講演）（国際学会）	2016年09月26日～ 2016年09月26日	東北大学（宮城県・仙台市）

〔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

〔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. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計（1）件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所
Systems Microbiology of E. coli	2017年03月15日～2017年03月17日	淡路夢舞台（兵庫県・淡路市）

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究 : 国際共同研究である

共同研究相手国	相手方研究機関			
Chile, USA	Universidad de Santiago de Chile	University of Minnesota	Yumanity Therapeutics, Cambridge	-
Taiwan	National Cheng Kung University	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-				

17. 備考

GenoBase

<http://ecoli.naist.jp>

現在、不正アクセスのため、閉鎖中。可能な限り早く立ち上げたいが、技術的補助が必要な状況となっている。