

大腸菌遺伝的ネットワーク解明に向けた現状と解析例

竹内 力矢、山本 奈津子、森 浩禎

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科

細胞は環境の変化や遺伝子の変化などに対して、細胞内の代謝物質の変動を少なくするように、遺伝子発現の変動、代替経路の活性化などで対処していると考えられる¹⁾。中心代謝系の遺伝子の一遺伝子欠失に対しても、多くの場合、遺伝子発現の変動と比較して、その細胞内代謝基質濃度の変動は少ない。これはアイソザイムや代替経路の存在により補償されるロバスト性である。この分子機構の解明を目指し、2重欠失株による合成致死及び生育阻害の解析で遺伝的ネットワーク解明を進めている。

我々はすでに一遺伝子欠失株ライブラリー(Keio collection)を作製した²⁾。2重欠失株をシステムティックに作製することを目的に、新規の欠失株ライブラリーの作製を行った。

Keio collection は対象の遺伝子を酵母の 2m プラスミドの部位特異的組換えサイトの FRT に挟まれた Km 耐性遺伝子と置換した構造の欠失株である。組換え酵素の FLP を発現させることで組換えにより、Km 耐性遺伝子を除くことが可能である。

一方、新規の欠失株ライブラリーは、同様の構造を持たせるが、新たな工夫としては、1) 対象遺伝子の開始コドンと reporter 遺伝子の turbo GFP を融合、2) 2重欠失にした際に既存の FRT 部位と組換えを起こさないように FRT1 を持たせ、3) 欠失株ライブラリーの混合培養液でのスクリーニングを可能にする為に、20nt の分子バーコードを導入した。

上記の2種類の欠失株を接合を用いて、欠失の2重化を行う。我々は、過去に行われた合成致死遺伝子の組合せ(*yfgL:surA*, *mrcA:mrcB*)を、我々の作製したライブラリーを用いて、Hfr による接合で再現できるかどうかを確認した。良好な結果を得ることができたので、現在、Hfr を自由に作る系を、F プラスミドの *tra* 遺伝子群と *oriT* を用いて作製している。

さらに、システムティックに接合を行う為に、384 の pin システムを用いて、寒天培地上で接合を行う系の開発を進めている。

上記の開発の現状を紹介し、今後の方向を議論したい。

1. N. Ishii, et al. *Science*, **316**: 593-7 (2007)
2. T. Baba, et al. *Mol Syst Biol*, **2**: 2006 0008 (2006)