

(様式第9 別紙2：公開版)

## 養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 野中 寛 印 / 署名
  
2. 養成カリキュラム名： コリネ型細菌におけるゲノム解析に関する研究
  
3. 養成カリキュラムの達成状況

平成 15 年度下期スケジュールには、「コリネ型細菌のゲノムインフォマティクス解析技術」「比較ゲノム解析技術と知見」「コリネ型細菌の遺伝子発現プロファイルの解析」「コリネ型細菌の蛋白発現プロファイルの解析」の4項目が含まれており、前者2項目について、特に大きな成果を挙げることができた。「遺伝子発現プロファイルの解析」については、解析に用いるツールの選定、解析手法の確立を、「蛋白発現プロファイルの解析」については、解析用データベースの作成を行った。次年度、実際のコリネ型細菌の発現プロファイルの解析を本格的に進めていく。

### 4. 成果

*C. glutamicum* R 株には 3314149 bp のゲノム配列に対して 2990 個、49120 bp のプラスミド配列に対して 28 個の CDS が存在することがこれまでの当研究グループの研究で明らかとなっている。昨年度は、*C. glutamicum* R 株ゲノム配列と、他のコリネ型細菌 (*C. glutamicum* ATCC13032、*C. efficiens*、*C. diphtheriae*) 2 種のマイコバクテリウムとの比較、および、*C. glutamicum* R 株、*C. glutamicum* ATCC13032、*C. efficiens* 3 株間における全遺伝子アミノ酸配列の比較解析を行った。また、*C. glutamicum* 2 株間でさえ保存されなかった遺伝子を不要遺伝子と推定し、ゲノム配列から除去する候補として、12 kb を超える 8 箇所の領域の位置と長さを示すことに成功した。これらの領域は、当分室で開発されたコリネ型細菌の大規模 DNA 削除法により、削除が確認されている。

2003 年 11 月に *C. diphtheriae* のアノテーションが公開され、全遺伝子アミノ酸配列の比較解析ができるコリネ型細菌は 3 株 (*C. glutamicum* R、*C. glutamicum* ATCC13032、*C. efficiens*) から 4 株に増えた。これにより、コリネ型細菌に保存される“オーソログ遺伝子”が一層明確となる。また、*C. diphtheriae* は他の 3 株と異なり、病原菌で、物質生産細菌ではないため、物質生産細菌を特徴付ける遺伝子の発見も期待される。解析は、*C. glutamicum* R、*C. glutamicum* ATCC13032、*C. glutamicum* R、*C. efficiens*、*C. glutamicum* R、*C. diphtheriae* 間で、全遺伝子アミノ酸配列に対し、双方向に最も高い相同性がある遺伝子を、その 2 株間でのオーソログ遺伝子とする方法をとった。(昨年度までも一部同様の解析を行ってきたが、検索に用いるデータベースを更新し、手法を最適化、誤りを修正) 機能分けは、NCBI の COG (Clusters of Orthologous Groups) データベースによった。*C. glutamicum* R ゲノム上にコードされる全 2990 遺伝子のうち、約 50%にあたる 1493 遺伝子が 4 株で保存されていた。(グループ 1) これらは、コリネ型細菌を特

徴づける遺伝子群と考えられる。機能別には、K. Transcriptin、P Inorganic ion transport and metabolism、G Carbohydrate transport and metabolism、Q Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism が、それぞれ 43%(=77/180)、28%(=53/189)、40%(=76/192)、38%(=32/85)と保存割合が低い。NCBI COG の大分類 J,K,L の中で、K(転写)に属する遺伝子のみが保存割合が低く、コリネ型細菌の中でも転写制御に多様性があると考えられる。*C. glutamicum* R, *C. glutamicum* ATCC13032, *C. efficiens* の3株に保存され、*C. diphtheriae* には保存されない遺伝子群(グループ2)は、アミノ酸生産菌を特徴付ける遺伝子群、*C. glutamicum* R, *C. glutamicum* ATCC13032 の2株に保存され、*C. efficiens*, *C. diphtheriae* には保存されない遺伝子群(グループ5)は、*C. glutamicum* を特徴付ける遺伝子群として、DNA チップ解析、プロテオミクス解析等で挙動に注目していく必要がある。

ゲノム DNA の大規模削除を試みる際、致死遺伝子の情報は有用である。ゲノムワイドな観点でのコリネ型細菌における致死遺伝子は明らかとされていないが、大腸菌や枯草菌では報告がはじめている。ここでは、大腸菌 K12 株のデータベース PEC Database 中で、必須とされている遺伝子(Protein: 216 個 tRNA: 14 個 miscRNA: 2 個)のうち、RNA 遺伝子を除く 216 遺伝子との相同性検索を行い、コリネ型細菌において、削除すると致死に至る可能性の高い遺伝子の情報を得て、ゲノム上へのマッピングを行った。*C. glutamicum* R には、大腸菌 K12 株で必須と報告されている遺伝子 216 個のうち、170 個が存在した。大腸菌における必須遺伝子は、*C. glutamicum* R ゲノム内にほぼ均等に散在し、これらがコリネ型細菌においても必須であると仮定すれば、ゲノム DNA を大規模に削除する領域を見出すことは難しかった。グループ 1 には、他にも数多くのコリネ型細菌必須遺伝子が含まれていることが考えられるが、グループ 1 の遺伝子が存在しない大規模領域を見出すことも難しかった。しかしながら、これらは *in silico* 解析による推察にすぎず、実際は、必須遺伝子の機能を相補した大規模ゲノム DNA 削除株が得られる可能性も十分にあるだろう。

NEDO 養成技術者本人、および、研究グループの構成員が、容易にゲノム解析を行えるように、ウェブベース、ファイルメーカーベースのデータベースの構築を行っている。BLAST 相同性検索サービス、配列の切り出しサービスを実装し、全遺伝子リスト、全破壊株リスト、プロモーターの予測結果、全パスウェイ情報の閲覧が可能にした。ファイルメーカーベースのデータベースは、遺伝子破壊についての詳細情報記録用で、遺伝子破壊株を作成した本人が記入し、常に最新の情報を研究グループ全員で共有することができる。生物系の実験室において、実験者とバイオインフォマティクスの情報交換が課題とされるが、これらデータベースにより、実験データをすばやくゲノム解析に取り入れることができると同時に、ゲノム解析結果もすばやく研究グループ全員に還元する仕組みを作り上げることに成功した。

## 5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表(論文掲載済、または査読済を対象。コピーを添付。)

(2) 口頭発表(発表済を対象。予稿集のコピーを添付。)

1. 「Cre/loxP 系を用いたコリネ型細菌における大規模ゲノム削除」

日本生物工学会、2003年9月、熊本、日本生物工学会講演要旨集 p.126

鈴木伸昭、柘植陽太、二宮加奈、野中 寛、乾 将行、湯川英明

2. 「コリネ型細菌における大規模ゲノム削除法の開発」

日本分子生物学会、2003年12月、神戸、日本分子生物学会講演要旨集 p.779

鈴木伸昭、野中 寛、二宮加奈、柘植陽太、岡山 巧、乾 将行、湯川英明

3. 「コリネ型細菌の糖輸送系(PTS)遺伝子破壊株の構築と解析」

日本農芸化学会、2004年3月、広島、大会講演要旨集 p.43

岡井直子、野中 寛、池田洋子、和田真利子、鈴木伸昭、乾 将行、湯川英明

4. 「*Desulfitobacterium* sp. Y51 株 ゲノム解読」

野中 寛、篠田吉史、佐藤由美子、池永由布子、阿部美優紀、内藤香枝、原背良子、乾 将行、古川謙介、湯川英明

日本農芸化学会、2004年3月、広島、大会講演要旨集 p.138

5. 「Cre/loxP システムを用いたコリネ型細菌における大規模ゲノム削除」

日本農芸化学会、2004年3月、広島、大会講演要旨集 p.139

岡山 巧、二宮加奈、鈴木伸昭、柘植陽太、野中 寛、乾 将行、湯川英明

6. 「多重削除が可能なコリネ型細菌新規大規模ゲノム削除法の開発」

日本農芸化学会、2004年3月、広島、大会講演要旨集 p.139

鈴木伸昭、二宮加奈、岡山 巧、柘植陽太、野中 寛、乾 将行、湯川英明

(3) 特許等(出願番号を記載)