

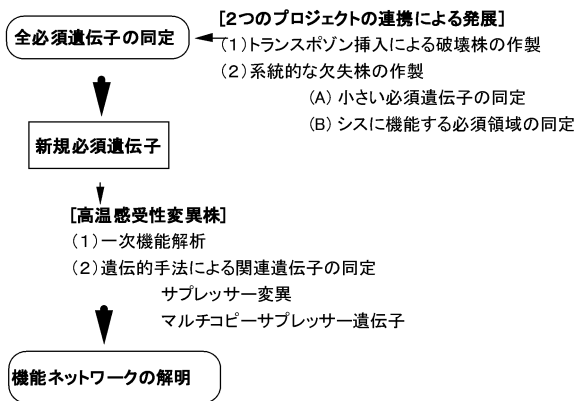
# 大腸菌必須遺伝子群の機能ネットワークの遺伝学的解析

●加藤 潤一<sup>1)</sup> ◆片山 勉<sup>2)</sup> ◆三木 健良<sup>3)</sup> ◆山本 義弘<sup>4)</sup> ◆駒野 照弥<sup>5)</sup>

1) 東京都立大学大学院理学研究科 (2000, 2001年度：分担、2002～2004年度：代表) 2) 九州大学大学院薬学研究院 (2000, 2001, 2003, 2004年度) 3) 九州大学大学院薬学研究院 (2000, 2001年度：代表)、福岡歯科大学歯学部 (2003, 2004年度：分担) 4) 兵庫医科大学医学部 (2000～2002年度) 5) 東京都立大学大学院理学研究科 (2003, 2004年度)

## ＜研究の目的と進め方＞

細胞性生物の増殖機構の全体像を明らかにするため、大腸菌を用いて増殖に最低限必要な遺伝情報（必須遺伝子、最小必須遺伝子群、染色体必須領域）を同定し、それらの機能を明らかにすることを目的とした。必須な遺伝情報の同定にはトランスポゾン挿入変異株と長い領域にわたる欠失変異株を利用した。また機能未知必須遺伝子の解析では、遺伝学的手法を効率良く導入し、高温感受性変異株、また抑圧変異株を単離して解析した。



## ＜研究開始時の研究計画＞

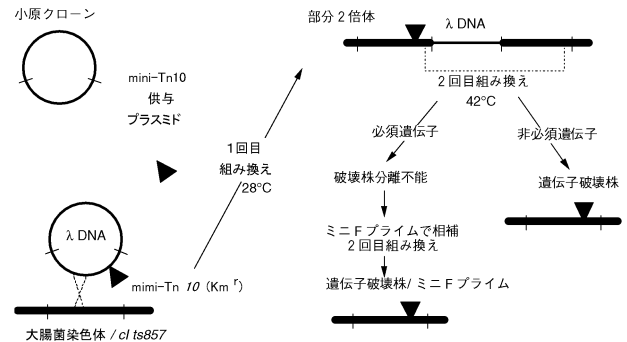
- (1) 全必須遺伝子の同定
  - (A) トランスポゾンによる網羅的破壊株作製  
トランスポゾンによる破壊株の作製を網羅的に進めることによって、必須遺伝子を同定する。
  - (B) 系統的な染色体広域欠失変異作製  
染色体広域欠失変異を系統的に作製し、欠失させる事ができなかった染色体領域より新規必須遺伝子を同定する。
- (2) 新規必須遺伝子の機能解析
  - (A) 高温感受性変異株の単離  
同定された新規必須遺伝子について高温感受性変異株を単離する。
  - (B) 抑圧変異株の単離、解析  
高温感受性変異株から抑圧変異株を単離し、抑圧遺伝子、多コピー抑圧遺伝子を同定する。
  - (C) 網羅的な一次機能解析  
高温感受性変異株、抑圧変異株について、細胞、染色体の形態などを中心に網羅的な解析を行う。

## ＜研究期間の成果＞

- (1) 全必須遺伝子の同定
  - (A) トランスポゾンによる網羅的破壊株作製  
破壊株作製法の基本的な考え方は、まず大腸菌の染色体断片を持つラムダファージ（小原クローン）上の染色体遺伝子をトランスポゾン挿入により破壊し、この破壊された遺伝子を、相同的組み換えにより染色体上

の相当遺伝子と置換しようというものである（図1）。

図1 小原クローンとミニトランスポゾンを用いた網羅的遺伝子破壊システム



具体的にはまず小原クローンを、トランスポゼースが発現しているためにトランスポゾン（ミニTn10 (KmR)）の転移が起こる株に感染させる。その株からラムダファージを回収すると、その中にラムダファージ上の大腸菌の染色体断片にトランスポゾンが挿入されたものが含まれている。回収したラムダファージを別の大腸菌（ラムダファージの変異型cIリプレッサー（高温感受性変異体）が発現している株）に感染させ、溶原化した株（ラムダファージ上の染色体部分の相同的組み換えにより染色体に挿入された株）をカナマイシン耐性のコロニーとして単離する。ここで重要なのは、この株ではラムダファージにクローン化された染色体領域に関しては2倍体となっているので、シス位に存在する遺伝子で相補された形で「必須遺伝子の遺伝子破壊株も分離されている」という点である。どの遺伝子に挿入されたかについては、ファージを誘発して得られるファージ溶菌液を利用した挿入部分の塩基配列決定により簡単に知る事ができる。

溶原化した株を42°Cで培養すると、ラムダファージの変異型cIリプレッサーが失活してラムダファージが増殖するために、大半の株は死ぬ。しかし溶原化している間に相同的組み換えがもう一度起こり、ラムダファージが染色体から切り出され、しかも細胞から消失した株は42°Cでも生き残る。その中からカナマイシン耐性のものを選択することによって、ラムダファージの持つ染色体領域にトランスポゾンが挿入されたものが、もともと染色体上にあった同じ領域と入れ替わったもの、つまり遺伝子破壊株、を得ることができる。ただしラムダファージが染色体から切り出されて細胞から消失した株は1倍体であるので、もしトランスポゾンが必須遺伝子に挿入された場合には破壊株が得られない。逆の言い方をすれば42°Cでカナマイシン耐性のものが得られるかどうかを調べることにより、挿入された遺伝子が必須遺伝子かどうかについての情報を得ることができる。

ラムダファージが染色体から切り出される段階で、相補するプラスミド（ミニFプライム）を共存させれば、トランス位で相補した必須遺伝子の破壊株が得られる。

相補するプラスミドとして複製が高温感受性のミニFプラスミドを用いたり、トランス位で相補する遺伝子に特異的に変異を導入する事により、容易に必須遺伝子の高温感受性変異株を作製することができるので、これらは機能解析に用いることができる。

既知必須遺伝子の変異株は、全て予想通りシス部分2倍体から1倍体破壊株を分離することが出来なかった。さらにこのような必須遺伝子の表現型を示す未解析遺伝子も同定された。またトランスポゾン挿入変異株の生育の程度も、生育するものとしめないものというように単純ではなく、平板上で、目に見えるコロニーを全く作らない遺伝子から、やっと目に見える程の極小コロニーを作るもの、微小コロニーを作るもの、小コロニーを作るもの、正常なコロニーを作るものまで連続的であり、単純に必須、非必須と判定することは困難であった。

3,837遺伝子 (87.1%) の破壊に成功した (表1)。二倍体破壊株の解析からは、増殖に関与するものとして370個の遺伝子が同定された。

表1 トランスポゾンによる遺伝子破壊株構築

	遺伝子数
予測される全遺伝子	4403 (100%)
用いた手法が適用可能な遺伝子	4185 (95.0%)
用いた手法が適用不可能な遺伝子	218 (5.0%)
小原クローンのギャップ領域内の遺伝子	21
Tn10挿入法が適用不能な領域内の遺伝子	92
rRNA、tRNA遺伝子等	105
変異株が分離された遺伝子	3837 (87.1%)
変異株が分離されなかった遺伝子	348 (7.9%)
(配列確認、保存が終了したもの)	>3600 (>81.8%)

### (B) 系統的な染色体広域欠失変異作製

初めて大腸菌の全遺伝子についての論文を網羅的に調べることにより、全遺伝子を文献的に必須遺伝子、非必須遺伝子、必須かどうか不明な遺伝子に分類し、既知必須遺伝子の整理を行なった。また既知の比較的長い領域にわたる染色体欠失変異についても整理を行なった。これらの結果については、山崎由紀子博士 (遺伝研) と共同でデータベースPEC<<http://shigen.lab.nig.ac.jp/ecoli/pec/index.jsp>>構築をして公開した。(研究発表リスト19)

次に既知欠失変異領域や既知必須遺伝子を除いた領域に対して、大腸菌の相同組換え系とColE1系プラスミド、polAts変異を用いたシステムにより、欠失させる染色体領域をKmR遺伝子に置換し、網羅的に平均約20kbの欠失変異 (中規模欠失 (MD)) を作製した。また中規模欠失株を取得できなかった領域について欠失株 (小規模欠失 (SD)) を作製した。具体的には、1ファージのred組換え系を利用し、PCRで調製したDNA断片 (欠失させたい領域に隣接する40merの配列を両側に付けたCmR遺伝子断片) を用いて、欠失させる染色体領域をCmR遺伝子に置換した。また必須遺伝子を含む領域については、ミニFプラスミドに必須遺伝子をクローニングし、そのプラスミドの存在下で染色体欠失株を作製した。

さらにこれらの方法で欠失変異が作製できなかった領域については、細胞内で特定の染色体領域をプラスミドに移すシステムを構築して、染色体欠失変異を作製した (FRTシステム)。具体的には、大腸菌の相同組換え系を利用して、欠失させる染色体領域の近傍の領

域をクローニングした2種類のプラスミド (FRTの配列を持つプラスミド) を染色体に組み込み、FLP組換え酵素を発現させてFRT間での組換えを誘導することにより、細胞内でFRTに挟まれた染色体領域を欠失させると同時に、その領域をクローニングしたミニFプラスミド (複製が高温感受性のプラスミド) が存在する状態にした。

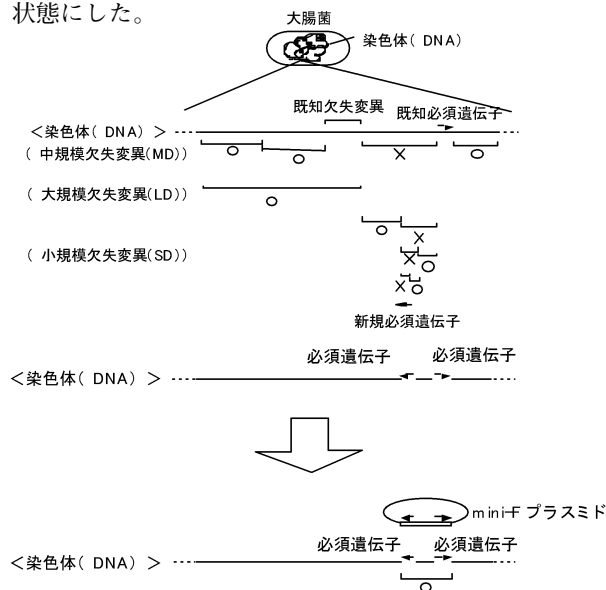


図2 系統的な染色体広域欠失変異の作製

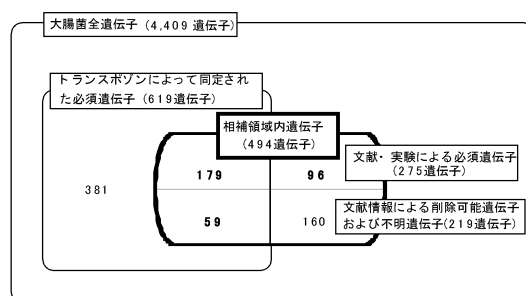
既知必須遺伝子及び大きな既知欠失変異を除いた染色体領域に中規模欠失変異を作製した。また、中規模欠失変異や既知欠失変異が連続している領域に、大規模欠失変異を作製した。さらに中規模欠失変異を作製した時に、欠失させることができなかった領域について、小規模欠失変異を多数作製した。○は作製できたもの、×は作製できなかったものを表す。

### (i) 必須遺伝子の同定

未知遺伝子の多くを含む領域について欠失変異の作製を試み、欠失させる事のできなかった領域についてさらに小規模な欠失変異の作製を試みることににより領域の特定を進め、新規必須遺伝子を同定した。また必須遺伝子を含む染色体領域についても、必須遺伝子をクローニングしたプラスミドにより相補した状態で欠失変異を作製した。

系統的網羅的な染色体広域欠失変異株作製において、プラスミドで相補させた領域内の遺伝子は494遺伝子になり、そのうち文献情報から我々が必須であると判断した遺伝子及び実験的に必須遺伝子であることを確認できた遺伝子は275遺伝子になった。またこの「相補領域内遺伝子群」、494遺伝子を、すでにOstermanらにより報告されているトランスポゾンを用いて同定された619の必須遺伝子と比較することにより、さらに59遺伝子が必須遺伝子と予想し、計334遺伝子を現段階での全必須遺伝子と考えた (図3)。

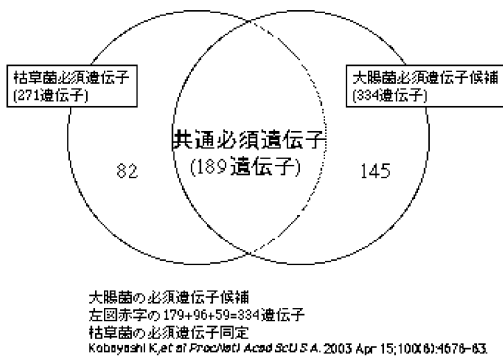
図3 大腸菌の全必須遺伝子



トランスポゾンによる必須遺伝子同定  
Gerdes SY, et al. J. Bacteriol. 2003 Oct;185(19):5673-84.

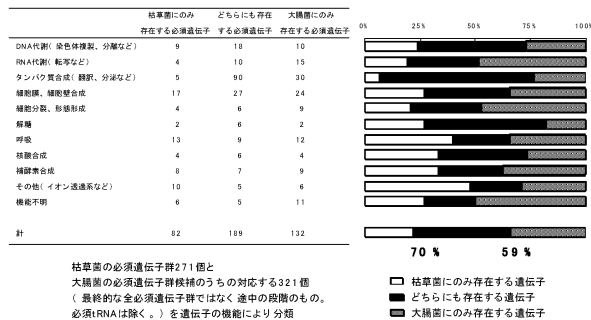
この我々が現時点で考えている大腸菌の全必須遺伝子(334遺伝子)を、枯草菌で同定されている271の必須遺伝子と比較したところ、必須遺伝子として両方で保存されているものは約65% (189遺伝子) にすぎなかった (図4)。

図4 大腸菌と枯草菌の必須遺伝子の比較(1)



大腸菌の全必須遺伝子とと考えている334遺伝子と、枯草菌の271の必須遺伝子を機能別に分類して比較したところ、共通ではない必須遺伝子は、表層系や補酵素の合成遺伝子などに多く、グラム陰性菌とグラム陽性菌のそれぞれの細胞の特徴を反映しているように思われた (図5)。

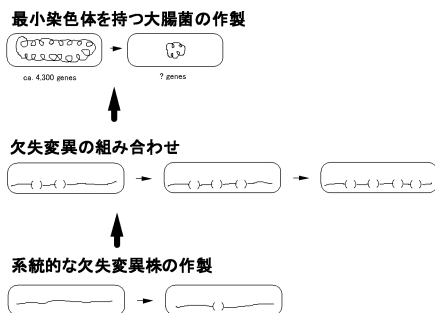
図5 大腸菌と枯草菌の必須遺伝子の比較(2)



(ii) 大規模欠失変異株の作製 (染色体の縮小化) (研究発表リスト12)

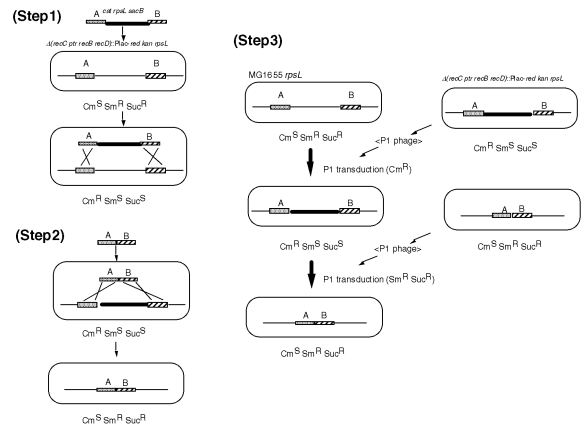
系統的に作製した染色体広域欠失変異の情報に基づき、長く連続する非必須領域について大規模欠失変異(ユニット)を作製し、それらを組み合わせることによって、染色体全体を縮小させた (図6)。

図6 欠失変異の組み合わせによる染色体縮小化



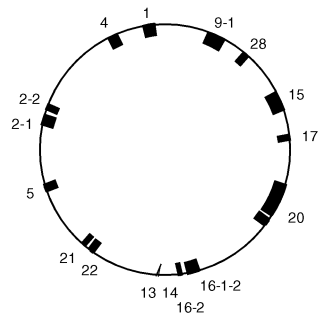
作製にあたっては、欠失部位にマーカーなどを残さない大規模欠失変異を比較的容易に作製し、またそれらを組み合わせるシステムを独自に構築した。具体的には、1ファージのred組換え系を利用し、ポジティブ選択用のマーカー (Cm<sup>R</sup>) とネガティブ選択用のマーカー (rpsL+, sacB) を組み合わせたカセットを用いた二段階の組換えによって、欠失部位にマーカーを残さない形の欠失変異を作製した (図7)。

図7 大規模欠失変異の作製



この方法を用いて約20の大規模欠失変異(ユニット)を作製し、それらのうちの15のユニットを組み合わせることに成功し、最終的に染色体のサイズを30%弱小さくした菌株を作製することができた (図8)。

作製した大規模欠失株についての性質を調べたところ、細胞の形態が野生株と異なる場合があることを見出した。大規模欠失変異のユニット16個を種々に組み合わせた菌株を顕微鏡により観察したところ、細胞の縦、横の長さに様々な変化が見られた。これらのユニットを単独で持つ菌株についても調べたが、それらでの変化より、ユニットを組み合わせることができた菌株での変化は大きかった。この結果は、単独ではそれほど細胞の形態に影響を与えない非必須遺伝子の欠損がいくつか重なって、大きな変化が出たものと考えられる。



(Deletion strain)	(Unit)	(Unit length)	(Total deletion length (%))
Δ1	1	111,734	111,734 (2.4)
Δ2	5	53,250	164,984 (3.6)
Δ3	28	52,245	217,229 (4.7)
Δ4	4	82,372	299,601 (6.5)
Δ5	2-2	46,153	345,754 (7.5)
Δ6	2-1	99,304	445,058 (9.6)
Δ7	16-2	46,517	491,575 (10.6)
Δ8	16-1-2	109,112	600,687 (12.9)
Δ9	17	72,554	673,241 (14.5)
Δ10	22	57,798	731,039 (15.8)
Δ11	21	42,636	773,675 (16.7)
Δ12	14	47,675	821,350 (17.7)
Δ13(-16-2)	13	41,411	816,244 (17.6)
Δ14(-16-2)	20	300,703	1,116,947 (24.1)
Δ15(-16-2)	9-1	125,568	1,242,515 (26.8)
Δ16(-16-2)	15	134,657	1,377,172 (29.7)

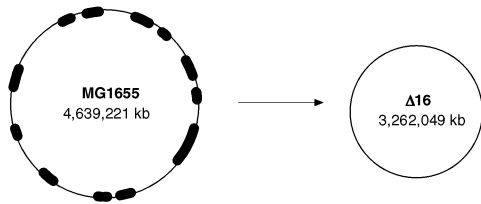


図8 染色体の縮小化

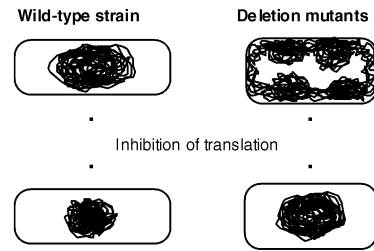
黒いボックスが大規模欠失変異のユニットを表している。これらのユニットを組み合わせて染色体を縮小化し、大規模欠失株、Δ16、を作製した。

細胞増殖の一つのプロセスが、一つのシステムによって支えられている場合、そのシステムに関わる遺伝子は必須遺伝子として同定される。しかし一つのプロセスが、複数のシステムによって支えられ、それらのシステムのうちの一つでも機能していれば生育する場合、それらのシステムに関わる遺伝子は非必須遺伝子として同定される。その遺伝子を破壊しても表現型が見つからない場合も多い。大規模欠失変異株では、複数のシステムが機能しなくなる場合があるかもしれない。その場合、残ったシステムに必要な遺伝子が必須遺伝子になる場合もあるだろうし、必須遺伝子にならなくても、欠損によって大きな変化が起こることが十分に考えられる。機能未知の非必須遺伝子には、少なくとも実験室で培養する条件では機能していない遺伝子と、機能しているがその遺伝子を破壊しても変化が見つけられない、つまり機能が見えない遺伝子があると考えられる。後者について、その機能を明らかにする時には、染色体を縮小化した菌株が有用になると思われる。

また作製した大規模欠失株及びそれらの作製に用いた大規模欠失変異のユニットを持つそれぞれの菌株について、フローサイトメトリーにより染色体複製開始調節について調べたが、多くのものについてはそれほど大きな異常は見られなかった。しかし核様体の存在状態、動態が大きく異なり、野生株では細胞中心部に1-2個の核様体が見られるのに対し、欠失株では核様体がいくつかの小さな塊になっており、しかも細胞の中心部に存在するのではなく、細胞全体に散らばって存在していることがわかった(図9)。大規模欠失株では細胞の幅が大きくなっており、以前、細胞の幅が大きくなった変異株と同様な性質が報告されているので、細胞の形の変化による二次的な影響と考えられる。

原核生物の染色体分配の機構は、長年、多くの研究者によって研究されてきたにもかかわらず、まだそのメカニズムが明らかになっていない。染色体を縮小化した菌株では、核様体は異常であるものの、無核の細胞はほとんど見られないので、染色体分配の機構は機能していると考えられる。核様体が野生株とは異なっているが、詳細に観察すると、一時的な染色体の凝集と細胞の極への移動と考えられる大変興味深いプロセスが見られた。野生株で染色体を観察した場合、いくつかのプロセスが重なっているため、染色体分配という研究対象のプロセスが見え難くなっているのかもしれない。それに対して染色体を縮小化した菌株ではそのいくつかのプロセスが欠損しているために、研究対象のプロセスが見えやすくなっている可能性がある。今後、野生株よりも単純なシステムとして染色体を縮小化した菌株が利用され、野生株では難しいプロセスの解析が進むかもしれない。

図9 大規模欠失株における核様体

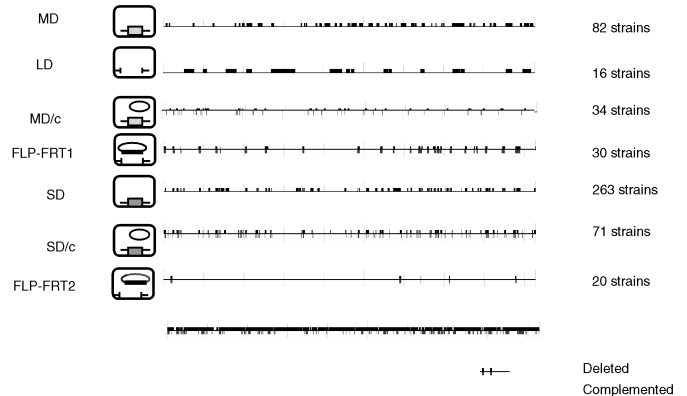


### (iii) 網羅的な欠失変異株の作製

中規模欠失 (MD)、小規模欠失 (SD)、大規模欠失 (LD) では欠失変異を作製することができなかった染色体領域について、細胞内で特定の染色体領域をミニFプラスミドに移すシステム (FRTシステム) を構築して解析を進めたところ、欠失変異を作製することができた。

従って大腸菌染色体の全領域について、必須遺伝子が存在しない領域についてはそのまま欠失させ、必須遺伝子が存在する領域についてはその必須遺伝子をクローニングしたミニFプラスミド存在下でその染色体領域を欠失させることにより、oriC, terC以外の全ての染色体領域を欠失させることができた(図10)。この結果は、大腸菌の染色体には、oriC, terC以外に、唯一存在するシスに機能する染色体必須領域はないことを意味し、大変興味深い。

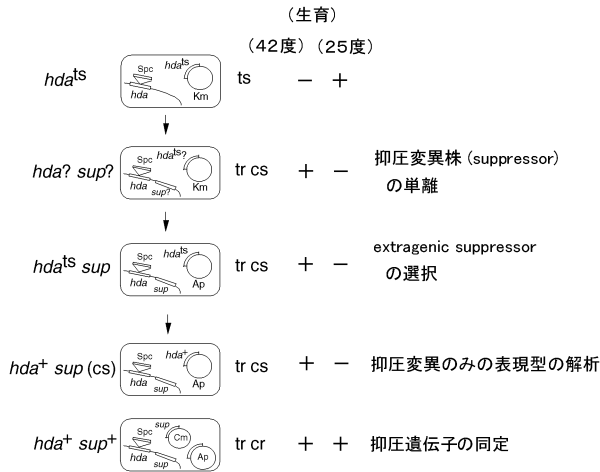
図10 網羅的な欠失変異株の作製



### (2) 新規および機能未知必須遺伝子の機能解析

系統的な欠失変異作製の過程で同定された新規必須遺伝子を含めた、まだ機能が明らかにされていない必須遺伝子について機能解析を行なった。基本的な方法としては、高温感受性変異株を単離して表現型を調べるとともに、高温感受性変異株から抑圧変異株を単離して関連遺伝子を同定し、それらの遺伝学的解析の結果を基に生化学的、分子生物学的な解析を行なった。遺伝学的解析を効率的に進めるためには、高温感受性変異株、抑圧変異株を単離、解析するシステムを構築した(図11)。

図11 抑圧変異株の単離、解析のためのシステム(例: *hda* 遺伝子)



(a) 染色体複製開始調節に必要な *hda* 遺伝子の解析 (研究発表リスト1, 2, 3, 7, 10, 11, 13, 15, 16)

(i) *hda* 遺伝子の同定と解析 (研究発表リスト2)

染色体DNAの複製は、細胞周期あたり一回だけ複製が起こるように厳密に制御されている。この調節機構についてはこれまで多くの研究により種々の興味深い機構が明らかになってきたが、本質的な問題を含めまだまだわからない点が多い。

大腸菌の染色体複製開始にはDnaA蛋白質が重要な働きをしている。DnaA蛋白質は複製開始起点(oriC)に結合し、結合部位周辺に局所的な変性を引き起こす。その結果、DNAらせんが巻き戻された場所ができ、そこに複製のための分子装置が組み立てられる。まずヘリカーゼであるDnaB蛋白質が入り、やがては複製反応の主役であるDNAポリメラーゼIIIがセットされ、実際の複製反応が開始する。

この複製開始反応を調節する機構の一つが「DnaA蛋白質の不活性化(RIDA, Regulatory Inactivation of DnaA)」である(図12)。DnaA蛋白質は細胞内でATPが結合した活性型として合成される。それがDNAポリメラーゼIIIによる複製開始反応が起きると同時に、ADPが結合した不活性型に変換される。この不活性化が起こらないと、一度複製開始反応が起きた直後に再び複製開始反応が起こり、その結果過剰な複製開始が起こってしまう。DnaA蛋白質は細胞内でATPが結合した活性型として合成される。それがDNAポリメラーゼIIIによる複製開始反応が起きると同時に、ADPが結合した不活性型に変換される。この不活性化が起こらないと、一度複製開始反応が起きた直後に再び複製開始反応が起こり、その結果過剰な複製開始が起こってしまう。

RIDA (Regulatory Inactivation of DnaA)

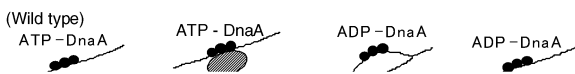
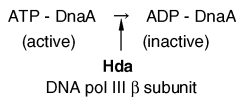


図12 大腸菌の染色体複製開始反応を調節する機構の一つである

「DnaA蛋白質の不活性化(RIDA, Regulatory Inactivation of DnaA)」。

野生株では複製開始反応が起こると同時に DnaA 蛋白質が不活性化され、一度複製が開始した直後に再び複製が開始することはない。この機構に欠損を持つ変異株(*dnaAcos* 変異株)では、過剰な複製開始が起こる。

この機構については片山博士らにより詳細な研究が行われていて、DNAポリメラーゼIIIのサブユニットの一つで、連続的な複製反応に必要な「スライディングクランプ」として働くbサブユニットが、このDnaA蛋白質の不活性化の反応に必須であることが明らかにされていた。しかしそれだけでは不十分で、*IdaB*と名付けられた未知の因子が必須であることが生化学的な研究によりわかってきた。

本研究では、まず大腸菌の染色体複製の過程に欠損を持つ新規変異株の単離と関連遺伝子の同定を行なった。染色体のモデルと考えられる低コピープラスミドであるミニFプラスミドを利用した方法により、複製に関する新規遺伝子を探索したところ、DNAポリメラーゼIIIのbサブユニットの変異の多コピー抑圧遺伝子として、DnaA蛋白質と相同性を持つ蛋白質をコードする新規*hda*遺伝子が同定されてきた(図13)。

*hda* 遺伝子は生育に必須であり、いくつかの遺伝学的な解析から、Hda蛋白質はoriCにおけるDnaA蛋白質の機能を抑える働きをしていると考えられた。そこでDnaA蛋白質のATP型(活性型)からADP型(不活性型)への変換について生化学的に試験管内で調べたところ、Hda蛋白質がこの変換に必須な働きをしていることが明らかになった。つまりHda蛋白質が、それまで正体が明らかでなかった*IdaB*因子そのものであることが明らかになった。

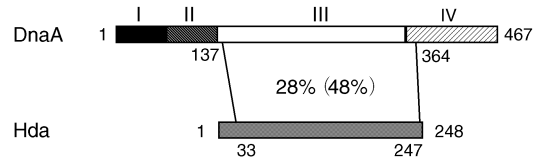


図13 大腸菌の染色体複製開始調節に必要な、DnaA 蛋白質と相同性を持つ

新規 Hda 蛋白質。

Hda 蛋白質(248 アミノ酸)は DnaA 蛋白質(467 アミノ酸)のドメイン III と相同性を持つ。

また実際に細胞内でも複製開始調節に働いていることを明らかにするために、*hda* 遺伝子の高温感受性株を単離して調べた。その結果、非許容温度で培養した変異株では複製開始が過剰に起こっており、Hdaは生体内でも染色体複製開始の調節に必須な働きをしていることが明らかになった。また変異株の解析から興味深いことに、開始過程だけではなく伸長過程にも関与していることがわかってきた。

本研究により、大腸菌の染色体複製開始調節機構の一つである「DnaA蛋白質の不活性化」に必須なもう一つの因子の正体が明らかになった。それは予想もしていなかったことにDnaA蛋白質と相同性を持つ、同じファミリー(AAA+蛋白質群)に属する新規蛋白質であった。これらAAA+蛋白質群の相互作用による、DnaA蛋白質の不活性化の具体的な分子機構は、今後の問題であり非常に興味深い点である。

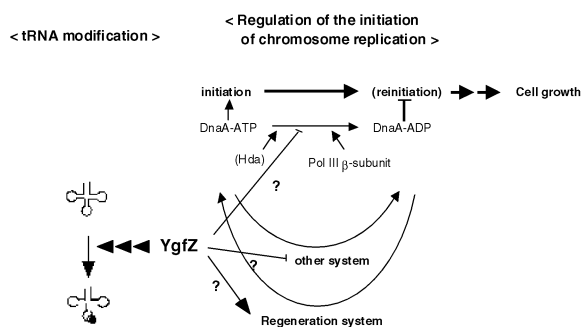
(ii) 抑圧遺伝子 *ygfZ* 遺伝子の同定と解析 (研究発表リスト18)

染色体複製開始調節に必要な *hda* 遺伝子の高温感受性変異株から抑圧変異株を単離し、その抑圧遺伝子として細胞増殖に重要な新規 *ygfZ* 遺伝子を同定した。*ygfZ* 遺伝子の欠失変異株を調べたところ、特に低温での細胞の生育が著しく阻害されること、また *ygfZ* 欠失変異は *hda* 高温感受性変異だけでなく *hda* 欠失変異による致死性をも抑圧することが分かった。さらに *ygfZ*

hda二重欠失変異株の複製起点 (oriC)、複製終結点 (terC) のコピー数を調べたところ、hda欠失変異による過剰な染色体複製開始と複製の伸長阻害がygfZ欠失変異により部分的に回復していることがわかり、実際にYgfZタンパク質がDnaAタンパク質の不活性化に関与することが示唆された。

さらにygfZ変異株から単離された抑圧変異を同定したところ、tRNA修飾に関与することが知られているtrmEの変異であることがわかった。そこでYgfZタンパク質もtRNA修飾に関与する可能性を考えてygfZ欠失変異株におけるtRNAの修飾についての解析を共同研究者に依頼したところ、tRNA修飾の一つであるm2Aが低温で培養した時に減少し、また別のtRNA修飾であるms2i6Aの量も培養温度にかかわらず少なくなっており、しかもその合成中間体であるi6Aが蓄積していることが分かった。これらの結果から染色体複製開始調節に関与するygfZ遺伝子は、同時にtRNAの修飾にも関与していることが明らかになった (図14)。

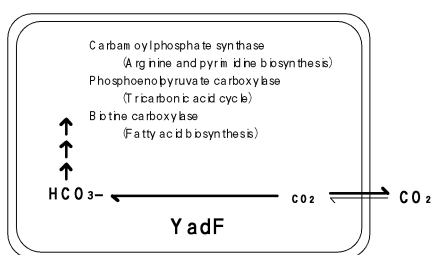
図14 抑圧遺伝子 ygfZ 遺伝子の機能



(b) 必須遺伝子yadFの解析 (研究発表リスト4)

新規必須遺伝子yadFについては、すでに炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase) をコードすることが報告されていたが、炭酸脱水酵素は二酸化炭素の水和を触媒し、真核生物においては呼吸・二酸化炭素の輸送・光合成などにおいて重要な役割を担っていることなどから盛んに研究されてきたが、細菌のものについてはまだあまり研究が進んでいなかった。我々はyadF遺伝子について、大腸菌に存在するもう一つの炭酸脱水酵素でシアン酸分解に関与するCynTの発現を誘導した場合にはyadF遺伝子がなくても生育できること、また高濃度 (5%) の二酸化炭素が存在する状態ではyadF遺伝子が必須ではないことを明らかにした。つまり大気中のような低い濃度の二酸化炭素存在下では、少なくともどちらかの炭酸脱水酵素が生育に必須であることを明らかにした。細胞内には炭酸(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)を必要とする生育に必須な酵素がいくつか存在することから、細胞内で必要な炭酸濃度を維持するために炭酸脱水酵素が機能していると考えられる (図15)。

図15 新規必須遺伝子 yadF の機能

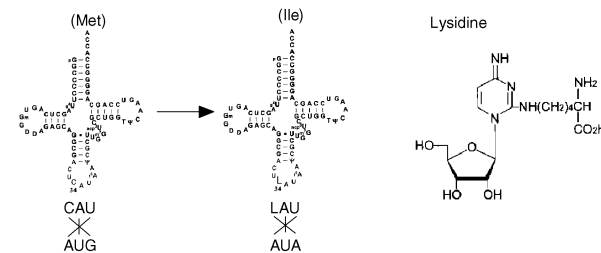


(c) 新規必須遺伝子mesJの解析 (研究発表リスト6, 14, 17)

新規必須遺伝子mesJについて、MesJタンパク質がtRNA修飾酵素であるTrmUタンパク質と構造的に相同性があることを見出したので、高温感受性変異株を単離し、得られた高温感受性変異株におけるtRNAの修飾について調べたところ、tRNAIleの修飾ヌクレオシド、リジン(L)の量が減少していることが分かった。この修飾はイソロイシンのマイナーコドンAUAを翻訳するために必須なもので、生育にも必須である。この結果は、同時に進行していた枯草菌での解析を補う形になり、MesJタンパク質がリジン修飾酵素そのものであることが明らかになった (図16)。

さらにmesJ遺伝子の機能について知見を得るために、mesJ高温感受性変異株から抑圧変異株を単離した。その抑圧変異の一つを解析したところ、リボソームタンパク質S1をコードするrpsA遺伝子のプロモーター領域に挿入配列IS 1 が挿入した変異であることが分かった。またmesJ高温感受性変異株においてS1タンパク質を高発現させると、高温での生育が著しく阻害されることもわかった。この抑圧変異株においては、高温でのリジン修飾が部分的に回復していることが明らかになったので、S1タンパク質がMesJタンパク質の機能に関与することが示唆された。そこでS1タンパク質とMesJタンパク質との相互作用を調べたところ、S1タンパク質はMesJタンパク質と共精製されることがわかった。

図16 MesJ タンパク質によるリジン修飾



一方、mesJ変異株における全タンパク質のSDS-PAGEのパターンから、いくつかのタンパク質は変異により量が増大することがわかった。網羅的なプロテオーム解析により、変異株で量が増大する28種のタンパク質が同定されたので、この内の21種について遺伝子発現を調べた結果、多くは遺伝子発現が増大していることがわかった。さらに解析を進めた結果、それらの多くは熱ショックタンパク質をコードすることが明らかになった。熱ショックタンパク質の発現を低下させるDnaKタンパク質の遺伝子にはAUAコドンがあり、実際に変異株におけるDnaKタンパク質の減少も確認されたので、その影響と考えられる。

(d) 必須遺伝子orn (yjeR)の解析

原核生物においてmRNAは迅速に合成され、また分解される。従って素早い遺伝子発現調節が可能となり、その結果環境の変化に即座に対応することができるのである。RNAはRNaseによって分解されるが、研究が進んでいる大腸菌では、これまでに少なくとも8種類ものRNaseが同定されている。これらはある程度機能が重複しており、単独で生育に必須なものは少ない。生育に必須なものとしては、endonucleaseであるRNase Eがよく知られている。RNase EはexonucleaseであるPNPase, RhlB RNA helicase, enolaseと共に細胞

内でdegradosomeと呼ばれる複合体を形成し、mRNAの分解に働いている。exonucleaseであるOrnは生育に必須なRNaseであり、これは短いRNAの分解に働くことがわかっていたが、RNase EとOrnはどちらも重要性が認識されていたものの、機能的な関連についてはこれまで明らかにされてはいなかったため遺伝学的解析を行なった。

まずorn遺伝子の高温感受性変異株を、mini-Fプラスミドを用いたプラスミドシャプリング法により単離した。得られたornTs遺伝子の塩基配列を決定したところ、3ヶ所にミスセンス変異の生じていることがわかった。次に得られた高温感受性変異株から高温耐性株を単離し、その中から低温感受性株を選択することにより、高温耐性かつ低温感受性の抑圧変異株を得た。この株に大腸菌の染色体ライブラリーを導入して低温耐性になったものを単離し、得られたプラスミド上の染色体領域を、塩基配列を決定する事により同定したところ、RNase Eをコードするrne遺伝子を含む領域であることがわかった。このプラスミドから種々の欠失プラスミドを作製し、またrne遺伝子のみをクローニングしたプラスミドも作製して、それらを高温耐性低温感受性の抑圧変異株に導入して生育を調べたところ、rne遺伝子のみをクローニングしたプラスミドによって低温耐性になることがわかった。そこでこの抑圧変異株のrne遺伝子の塩基配列を決定したところ、1ヶ所ミスセンス変異が同定され、rne遺伝子が抑圧遺伝子であること、つまりrne遺伝子がコードするRNase EとOrnは機能的に関連していることが強く示唆された。

RNase Eはdegradosomeとして機能することから、Ornもdegradosomeの構成成分の一つである可能性を考え、degradosome内にOrnが含まれるかどうかについて検討を行なった。RNase EとOrnは細胞内での分子数が少ないので、His-Tagを付けたRNase EとMyc-Tagを付けたOrnの両方を過剰生産する株を構築し、Niカラムを用いてHis-Tagを付けたRNase Eを含むdegradosomeを精製し、Anti-Myc抗体を用いたWestern blottingによりOrnの検出を試みたところ、degradosome画分にOrnが検出され、Ornもdegradosome構成成分の一つであることが明らかになった。本研究によりdegradosomeは、endonucleaseであるRNase E、長いRNAを基質とするexonucleaseであるPNPaseに加えて、短いRNAを基質とするexonucleaseであるOrnの、性質の異なる3種類のRNaseを含む複合体であることが明らかになった。

(e) 染色体複製開始調節に関与する因子の探索 (研究発表リスト5, 7, 8, 9, 11)

(i) mioC遺伝子の転写の複製開始制御における役割 (研究発表リスト5)

染色体複製は細胞周期の特定のタイミングで開始するよう厳密に制御されている。大腸菌染色体にはただ一つの複製開始起点oriCが存在する。oriCに複製開始タンパク質DnaAが結合することによって複製開始が引き起こされる。mioC遺伝子はoriCに隣接しており、mioCからの転写はoriCへ流入する。このoriCに流入するmioCの転写は細胞周期依存的に制御されており、複製開始前には抑制され、複製開始後には活性化される。また、mioC転写の複製開始制御における役割については、主に、oriCプラスミドを用いて検討されてきたが、明確な結論は得られていなかった。本研究では、染色体上のmioCプロモーターにトランスポゾン挿入変異の入った(mioCp9::Tn5)株を単離し、mioC転写の複製開

始制御における役割について検討した。

まず、mioCp9::Tn5変異株におけるmioC転写量の周期的変動を調べるため、複製周期を同調させて培養した細胞内でのmioC転写量を定量的SIアッセイにて継時的に測定した。その結果、mioCp9::Tn5変異株ではmioCの転写量には有意な変化はなかったが、細胞周期を通じて一定量の転写が起きており、野生株のような変動がみられなくなっていた。次に、mioCp9::Tn5変異が複製開始に及ぼす影響について検討した。過剰複製開始タイプであるdnaAcos低温感受性変異株にmioCp9::Tn5変異を挿入したところ、その低温感受性が解消された。また、複製開始能欠損タイプのdnaA高温感受性変異株に対して、mioCp9::Tn5変異は、その中間温度での増殖を阻害した。よって、mioCp9::Tn5変異は複製開始に阻害的に働くと考えられる。さらに、dnaC高温感受性株を用いて複製周期を同調させ、継時的にDNA合成量を定量したところ、実際にmioCp9::Tn5変異により、複製開始能の低下がおこることが分かった。最後に、フローサイトメーターを用いて細胞当たりに含まれるoriC数を測定し、複製開始のタイミングを検討した。その結果、mioCp9::Tn5変異株では、野生株に比べて複製開始のタイミングが大きく遅延していることが判明した。以上の結果より、oriCへ流入するmioC転写の細胞周期依存的変動には、複製開始のタイミング決定プロセスにおける、重要な役割があることが示唆される。

(ii) 新規diaA遺伝子の同定と解析 (研究発表リスト8)

大腸菌DnaAは染色体複製の開始因子である。過剰複製するdnaA変異株に対して網羅的トランスポゾン挿入法を適用し、多数の抑圧変異株を分離した。内1種では機能未解析の遺伝子が同定され、diaAと命名した。diaA遺伝子は染色体複製開始の細胞周期依存的制御に必須であった。DiaAタンパク質は、試験管内ミニ染色体複製系でDnaA機能を促進し、DnaAのN末ドメインに直接かつ特異的に結合した。DiaAはDnaAに直接相互作用し、開始反応促進に働くと思われる。

(iii) 新規hspQ遺伝子の同定と解析 (研究発表リスト9)

大腸菌DnaAは染色体複製の開始因子であるが、高温感受性のdnaA変異株に対して網羅的トランスポゾン挿入法を適用して、多数の抑圧変異を分離、解析した結果、機能未解析の遺伝子が同定され、hspQと命名した。hspQは、RNAポリメラーゼ・シグマ32因子依存的に発現する、新規の熱ショック遺伝子であった。また、この遺伝子は、変異DnaAの分解促進に必須であった。分解されるDnaA変異にはallele特異性が見られた。既知の熱ショック誘導型プロテアーゼ同様に、HspQ蛋白質も多量体を形成する。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

本特定領域研究期間中に、出芽酵母の全必須遺伝子が同定され、また本特定領域研究における枯草菌の全必須遺伝子の同定により、初めて真核生物のモデル微生物と原核生物のモデル微生物の必須遺伝子群の比較が可能になった。全遺伝子数(出芽酵母、6131; 枯草菌、4101)ではそれほど大きくは変わらないのに、全必須遺伝子数(出芽酵母、1105; 枯草菌、271)では大きく異なる。これはやはり原核生物がシステムとしてより単純であることを示しており、「システム生物学」における細菌の重要性が改めて示されたものと言える。

細菌の必須遺伝子の同定に関しては、すでにいくつか報告がある。しかし全遺伝子を破壊するプロジェクトはあるものの、本研究のような比較的長い欠失変異株を用いた研究は大変ユニークである。この点については、大規模欠失変異に関する論文を発表した際に、EditorおよびReviewer全員から非常に高い評価を受けた。小さな遺伝子、RNAを産物とする遺伝子、さらにシスに必須な領域などを含めた全ての生育に必須な遺伝情報を明らかにするためには非常に重要な実験系になると思われる。本研究では原核生物の必須遺伝子群の共通性、多様性を明らかにするために、大腸菌の全必須遺伝情報を同定し枯草菌と比較することを目指した。全必須遺伝子の同定には至らなかったが、得られた結果の範囲で枯草菌の必須遺伝子群と対応させることができた。

最小必須遺伝子群 (Minimal Gene Set) についての研究は「モデル微生物についてのシステム生物学研究」の一つとして重要である。微生物では一般に、「生育」=「増殖」であるので、最小必須遺伝子群についての研究は細胞増殖の基本的メカニズム、細胞増殖機構の全体像の解明を目指したものと言える。「モデル微生物についてのシステム生物学研究」の一つのゴールは、「一つの生物について全遺伝子の機能を明らかにすること」であり、そのための第一歩として必須遺伝子群の同定がある。本研究では大腸菌の全必須遺伝子群の同定には至らなかったが、推定が可能になり、枯草菌との比較から必須遺伝子群の多様性が具体的に明らかになった。これは最小必須遺伝子群を、「全ての生物で保存されている遺伝子群」として同定する事はできないというKooninの主張を具体的に示したものとして大きな意味がある。

必須遺伝子群の多様性については、どちらか一方にしかない遺伝子、両方にあるが一方のみ必須な遺伝子、一方では遺伝子が重複しているためにそれぞれは必須ではないものなど、その内容は様々である。機能別に分けた場合、特に細胞表層に関連するもの、たとえばリピドAの生合成に関与する遺伝子群 (たとえば大腸菌の*lpx*, *kds*遺伝子群) やリポプロテインの分泌系 (たとえば大腸菌の*lol*遺伝子群) などにおいて必須遺伝子に大きな違いが見られた。これはグラム陰性菌とグラム陽性菌の細胞表層の構造に大きな違いがあることを考えると理解しやすい。またその点と関連していると考えられるが、細胞分裂に関与する*fts*遺伝子群などで違いが大きいことも明らかになった。細胞分裂の過程では大腸菌、枯草菌のどちらにおいても、真核生物のチューブリン様タンパク質であるFtsZが中心的な働きをする点は共通であるが、近年調節機構などは多様であることが明らかになってきた。たとえば細胞分裂における隔壁形成の位置決定機構について、*minC*, *minD*遺伝子は共通であるものの*minE*遺伝子は枯草菌には存在するが枯草菌にはオルソログがなく、機能的には*divIVA*遺伝子が同様の役割を担っている。しかし大腸菌の*MinE*と枯草菌の*DivIVA*は細胞内の局在性、動態が大きく異なっており、メカニズムがかなり異なっていることが示唆されている。必須遺伝子群の差はこのようなメカニズムの差と関連している場合があると考えられる。細胞表層、細胞分裂以外でも、種々の機能に関する必須遺伝子群に様々な違いが見られて大変興味深い。たとえば染色体複製開始調節に関して、大腸菌ではイニシエータータンパク質であるDnaAの不活性化に必須な遺伝子*hda*が存在するが、枯草菌にはオルソログがない。近年、染色体複製開始についても、調節機構はかなり多様であることが明らかになってきているが、それを反映しているものと考えられる。リボソームタン

パク質の遺伝子群など翻訳過程に必須な遺伝子群には共通なものが多いが、それでもたとえば大腸菌のリボソームタンパク質S1のオルソログが枯草菌にはないなど、いろいろと異なる点もある。これまで機能が明らかになったと考えていたことについても、もう一度見直す必要があるかもしれない。アミノ酸配列での相同性が低くても機能的に同じ働きをするものもあるので単純には結論できないが、今回、必須遺伝子群全体での比較ができてかなりの相違点が見つかったことは、同じバクテリアでも、システムの基本的なメカニズムは共通であっても細かい点、特に調節機構などは多様であることを示しているものと考えられる。これは重要な概念であり、今回得られた結果は今後多くの面での機能解析に大きな手がかりを与え、具体的に「システムの多様性」が明らかになっていく際の土台となる重要な成果である。

本研究では、実験的に最小必須遺伝子群を同定するために、染色体の大規模欠失株の作製を試みた。大規模欠失株を作製するシステムを構築し、この方法を用いて実際に染色体のサイズを約30%縮小化した菌株群を作製することに成功した。細菌の染色体の大規模改変に関してはすでにいくつか報告があるが、本研究で構築した欠失変異を作製するシステムは、従来のものに比べて格段に容易であり、またマーカーなどを欠失させた後に残さない欠失変異を作製するので、菌株作製後の異常なゲノムの再編成を引き起こしにくい。染色体を大規模に改変する技術としては非常に優れており、国際的に高いレベルにある。また染色体のサイズを約30%縮小化した例は今までにどんな生物についても皆無であり、ゲノム縮小化についての取り組みが進んでいる大腸菌においても、欠失規模が段違いに大きい。「一つの生物について全遺伝子の機能を明らかにすること」の第一段階として「機能が明らかになった遺伝子のみから成る生物を作製すること」は有効であるが、今回実際に染色体の約30%を欠失した大腸菌を作製することができたことは、「モデル微生物についてのシステム生物学研究」のこれからの一つの方向を示すものとして大きな意味がある。

また本研究では機能未知必須遺伝子群の機能解析を進めた。これまでに同定したものを含めた約20の機能未知必須遺伝子のうち、*hda*, *yadF*, *mesJ* (*tilS*), *orn* (*yjeR*) などについて解析を進め、機能について新しい知見を得ることができた。機能未知必須遺伝子の機能解析において、突然変異、サプレッサー変異の単離、解析を効率的に行なうシステムの構築により、古典遺伝学的手法を効率的に導入することが可能になり、機能未知必須遺伝子群の機能解析における古典遺伝学的手法の有効性を示すことができた。我々の高温感受性変異株、抑圧変異株をシステムティックに単離、解析する技術は大変ユニークであり、他にあまり例を見ない。技術、実際の解析ともに国際的にも高いレベルにある。このように本研究により古典遺伝学的手法を効率的に適用することの有効性を示すことができたので、細菌には物理的な相互作用ネットワーク解析が比較的困難であるという面があっても、遺伝学的に機能的な相互作用ネットワークを解析することが比較的容易にできるという点から、細菌が「システム生物学研究」においても非常に重要なモデル生物であることを示すことができたと思う。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

本研究の系統的な染色体広域欠失株作製では、タンパク質をコードするORFだけではなく、産物がRNAである遺伝子やシスに必須な染色体領域を含め、生育に必須な



全遺伝情報の同定を目指した。必須領域についてはその領域をクローニングしたプラスミドの存在下で染色体領域を欠失させる形で、まずは染色体全領域の欠失を試み、その次にプラスミド上の領域を解析することにより、全必須遺伝情報を同定することを考えていたが、本研究では残念ながら全必須遺伝子を確定するには至らなかった。諸般の事情により、当初予定していたトランスポゾンによる網羅的破壊株作製のプロジェクトとの連携がうまくいかなかったことも原因の一つであるが、必須領域のクローニングと染色体領域を欠失させる作業が予想以上に多く困難であった。

当初、染色体複製開始調節に関与する遺伝子群をフローサイトメトリー解析により網羅的に同定することを計画していたが、大規模欠失株の解析と同時に染色体の約30%の領域については行ったものの、フローサイトメトリー解析を多数のサンプルについて正確に行うのは困難で、全染色体領域について探索するには至らなかった。

#### 〈今後の課題〉

生物をシステムとしてとらえその全体像を理解するためには大きくわけて「部分」と「全体」の両方の理解が不可欠である。「部分」の理解なくして「全体」の理解はあり得ず、しかし「全体」の理解は「部分」の理解の単なる集合ではないはずである。全体像の理解に向けた取り組みには、「素過程の解析」とそれらによる「再構成」が必要であると考え。つまりシステムを、構成する部品にまでバラバラにし、それら個々の機能を明らかにすると共に、それらの部品からもう一度システムを組み立てることが必要である。生物の場合の「再構成」とは、最終的には物質から生命システムを構築することであり、それは生物をより深く理解するために必要な過程である。この二つの方向の研究によって初めて全体像の理解が可能になると考える。

「素過程の解析」については、まず小さな遺伝子、RNAを産物とする遺伝子、さらにシスに必須な領域などを含めた全ての生育に必須な遺伝情報を明らかにすることが重要である。そのためには、必須な遺伝子を次々と他のレプリコン（例えばミニFプラスミド）にクローニングする形で人工最小染色体を作製すると同時に、染色体をさらに大規模に欠失させていくことが有効であると考え。つまりゲノムの「再構成」である。

本研究の系統的な欠失株作製プロジェクトを延長した形で、oriC, terC以外の染色体全領域の欠失変異を作製することができ、シスに働くユニークな領域は大腸菌の染色体にはoriC, terC以外に存在しないことを示す結果が得られた。真核生物とは異なり、シスに機能するユニークな染色体領域である動原体が、大腸菌の染色体には存在しないことが示されたことになる。それではどのようなメカニズムによって染色体が安定化されるのか。この問題をいかにして解くかということが今後の大きな課題の一つである。それに対しても、上記の人工最小染色体を構築するプロジェクトを利用することが有効であると思われる。つまり、途中で作製されるプラスミドを、まずレプリコンをミニFからoriCに変更し、また接合伝達により他の菌株に移せるように改良することなどによって、人工最小染色体を構築していく途中のどの段階で安定化されるのかという点について調べることができ、安定化に必要な染色体領域を同定できると考えられる。このようなアプローチは他に例がなく、ゲノムサイエンスによって初めて可能になるユニークな取り組みである。

「素過程の解析」については、当然のことではあるが、

同定と共に機能解析も重要であり、本研究では遺伝学的な手法の有効性を示したが、残された機能未知必須遺伝子群についても同様な解析を始めると同時に、得られた結果を基に生化学的、分子生物学的な詳細な解析を進めていく必要がある。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

(論文)

1. Inagawa, T., Kato, J., Niki, H., Karata, K., and Ogura, T. Defective plasmid partition in ftsH mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 265: 755-762 (2001). 2.0209261658
- Kato, J. and Katayama, T. Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 20(15), 4253-4262 (2001).
3. Katayama, T. Feedback controls restrain the initiation of *Escherichia coli* chromosomal replication. *Mol. Microbiol.* 41(1), 9-18 (2001).
- 4.04071520
- Hashimoto, M. and Kato, J. Indispensability of the *Escherichia coli* Carbonic Anhydrases YadF and CynT in cell proliferation at a low CO<sub>2</sub> partial pressure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (4), 919-922 (2003).
- 5.309031118
- Su'etsugu, M., Emoto, A., Fujimitsu, K., Keyamura K., and Katayama, T. Transcriptional control for initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*: fluctuation of origin transcription ensures timely initiation. *Genes to Cells*, 8, 731-745 (2003).
- 6.04071531
- Soma, A., Ikeuchi, Y., Kanemasa, S., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Ote, T., Kato, J., Watanabe, K., Sekine, Y., and Suzuki, T. An RNA-modifying enzyme that governs both the codon and amino acid specificities of isoleucine tRNA. *Mol. Cell* 19(3), 423-424 (2003).
- 7.404081759
- Kamiya, H., Iida, E., Murata-Kamiya, N., Yamamoto, Y., Miki, T. and Harashima, H. Suppression of spontaneous and hydrogen peroxide-induced mutations by a mutT-type nucleotide pool sanitization enzyme, the *Escherichia coli* ORF135 protein. *Genes to Cells* 8, 941-950 (2003).
- 8.0411151657
- Ishida, T., Akimitsu, N., Kashioka, T., Hatano, M., Kubota, T., Ogata, Y., Sekimizu, K., and Katayama, T. DiaA, a novel DnaA-binding protein, ensures the initiation timing of *Escherichia coli* chromosome replication. *J. Biol. Chem.* 279, 45546-45555 (2004).
- 9.0411242040
- Shimuta, T., Nakano, K., Yamaguchi, Y., Ozaki, S., Fujimitsu, K., Matsunaga, C., Noguchi, K., Emoto, A., and Katayama, T. Novel heat shock protein HspQ stimulates the degradation of mutant DnaA protein in *Escherichia coli*. *Genes Cells* 9, 1151-1166 (2004).
10. Su'etsugu, M., Takata, M., Kubota, T., Matsuda, Y. and Katayama, T. Molecular mechanism of DNA replication-coupled inactivation of the initiator protein in *Escherichia coli*: Interaction of DnaA with the sliding clamp-loaded DNA and the sliding clamp-Hda complex.

Genes Cells 9, 509-522 (2004).

11. Fujimitsu, K., and Katayama, T. Reactivation of DnaA by DNA sequence-specific nucleotide exchange in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 322(2), 411-419 (2004).
12. Hashimoto, M., Ichimura, T., Mizoguchi, H., Tanaka, K., Fujimitsu, K., Keyamura, K., Ote, T., Yamakawa, T., Yamazaki, Y., Mori, H., Katayama, T. and Kato, J. Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol. Microbiol.* 55: 137-149 (2005).
13. Kato, J. Regulatory network of the initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40: 331-342 (2005).
14. Ikeuchi, Y., Soma, A., Ote, T., Kato, J., Sekine, Y., and Suzuki, T. Molecular mechanism of lysidine synthesis that determines tRNA identity and codon recognition. *Mol. Cell* 19: 235-246 (2005).
15. Su'etsugu, M., Shimuta, T., Ishida, T., Kawakami, H. and Katayama, T. Protein associations in DnaA-ATP hydrolysis mediated by the replicase clamp-Hda complex. *J. Biol. Chem.* 280(8), 6528-6536 (2005).
16. Shioi, S., Ose, T., Maenaka, K., Shiroishi, M., Abe, Y., Kohda, D., Katayama, T., and Ueda, T. Crystal structure of a biologically functional form of PriB from *Escherichia coli* reveals a potential single-stranded DNA-binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326(4), 766-776 (2005).
17. Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., and Suzuki, T. Mechanistic insights into sulfur-relay by multiple sulfur mediators involved in thiouridine biosynthesis at tRNA wobble positions. *Mol Cell* 21: 97-108 (2006).
18. Ote, T., Hashimoto, M., Ikeuchi, Y., Su'etsugu, M., Suzuki, T., Katayama, T., and Kato, J. Involvement of the *Escherichia coli* folate-binding protein YgfZ in RNA modification and regulation of chromosomal replication initiation. *Mol. Microbiol.* 59: 265-275 (2006).

(データベース)

19. PEC< <http://shigen.lab.nig.ac.jp/ecoli/pec/index.jsp>>