

バクテリア最小ゲノムシステムの構築

●加藤 潤一

首都大学東京大学院 理工学研究科 生命科学専攻

<研究の目的と進め方>

一つのモデル生物についてきちんと全体像を理解するということは、より高等な生物を理解するための基礎として重要であり、また生命のシステムとしての理解を深めるためにも重要である。我々は*E. coli*を材料として、細胞増殖、生存の基本的なシステムの全体像を分子レベルで理解することを目指して研究を進めた。

*E. coli*の細胞増殖、生存機構の全体像を理解するためには、まず必須な全遺伝子を同定し、それらの機能を明らかにする必要がある。細胞増殖、生存に必須な遺伝情報には、染色体上になければならない必須領域（複製起点のようにシスに必須な領域）とトランスに働く必須遺伝子がある。我々は系統的、網羅的な染色体広域欠失株の作製により、これらの同定を行った。

しかしこれらの必須遺伝子は野生株で破壊すると細胞増殖ができなくなる遺伝子群であり、これらの遺伝子群だけを持つ*E. coli*株が細胞増殖できるとは考えられない。つまり細胞増殖に必須な過程のうち、バイパスのある過程に関与する遺伝子群は必須遺伝子としては同定されておらず、破壊しても表現型がわからない非必須遺伝子として見えている。*E. coli*の細胞増殖機構の全体像を理解するためには、必須遺伝子が関与する必須な過程と、バイパスのある必須な過程の両方の理解が必要である。

バイパスのある必須な過程については、系統的、網羅的に同定、解析する方法がこれまでになく、どのように解析すればいいかということが大きな問題であったが、我々は染色体大規模欠失株（染色体縮小株）を利用した解析が有効であると考えている。つまり大規模な染色体欠失によりバイパスが機能しなくなった菌株では、残った経路に関与する遺伝子が必須遺伝子となるので、その過程および関与する遺伝子の同定が可能になる。もし実験的に最小必須遺伝子群を持つ*E. coli*株（全ての遺伝子が生育に必須な菌株）ができたとすると、必須な全ての過程はバイパスがない状態になっていることになり、全ての必須な過程に関与する遺伝子を必須遺伝子として同定できる。我々はこのように野生株では難しい解析を進めるために、また最終的には最小必須遺伝子群を実験的に同定することを目指して染色体大規模欠失株の作製を行った。

また同定した全ての必須遺伝子の機能を明らかにすることを目指して、必須遺伝子群の機能ネットワークや機能未知必須遺伝子群の機能についての解析を、遺伝学的解析を中心に行った。

以上本研究では、*E. coli*の細胞増殖、生存の基本的なシステムの全体像を明らかにするために、次の二つの方向で研究を進めた。

(1) システムの単純化

(ア) 染色体大規模欠失株の作製

(2) システム構成要素の解析

(ア) 全必須遺伝情報の同定

(イ) 機能未知必須遺伝子群の機能解析

(ウ) 定常期における生存機構の解析

<研究開始時の研究計画>

(1) 最小ゲノムシステムの同定と再構成

(a) 前特定領域研究「ゲノム」において全染色体の約97.2%の領域をカバーする広域欠失変異群を作製したので、残った領域について解析し、最終的には全染色体領域について広域欠失変異を作製することを試み、複製起点以外の*cis*に必須な領域が存在する可能性について調べる。

(b) 同定した染色体必須領域を連続的にmini-Fプラスミドにクローニングしていき、同時にそれを含む染色体領域を欠失させることにより、染色体の必須領域をさらに詳細に特定すると共に、人工最小染色体を構築するプロジェクトを開始する。

(2) 新規及び機能未知必須遺伝子群の機能解析

機能未知必須遺伝子群について、我々が構築した高温感受性変異株および抑圧変異株の単離、解析を容易に行なうシステムなどを利用して解析を進める。

<研究期間の成果>

(1) 全必須遺伝情報の同定

(a) 前特定領域研究「ゲノム」において系統的、網羅的な染色体広域欠失変異の作製を進めてきたが、それまで欠失変異を作製することができていなかった染色体領域について、特定の染色体領域をmini-FプラスミドまたはR6Kプラスミドに細胞内で移すシステムを構築して解析を進めた。その結果、残っていた全ての染色体領域をmini-Fプラスミドに移すことができた。従って*E. coli*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プラスミド存在下でその染色体領域を欠失させることができたことになり、結局*oriC*以外の全ての染色体領域を欠失させられることを示した。この結果は、*E. coli*の染色体には、*oriC*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になり、大変興味深い。

(2) 染色体大規模欠失株の作製

前特定領域研究「ゲノム」において、染色体の約30%を欠失させた染色体大規模欠失株の作製に成功したが、さらに大規模に染色体を欠失させた株の作製を進めた。作製にあたっては、これまで用いていた染色体欠失システムがうまく機能しないことがわかったので、別の染色体欠失システムを構築し、染色体をさらに欠失させた株の作製を進めた。野生株の染色体は約4.6 Mbであり、これまで我々が報告した最小染色体は約3.3 Mbであったが、さらに欠失変異を組み合わせることで、全染色体の約38%を欠失して約2.8 Mbの染色体を持つ株の作製に成功した。

(3) 新しい染色体欠失システムの構築

染色体必須領域を連続的にプラスミドにクローニングすると同時に染色体領域を欠失させ、最終的には人工最小染色体を構築するプロジェクトを開始するにあたって、野生株では欠失できなかった領域が大規模欠失株では欠失株が単離できないケースが問題になってきた。欠失株が単離できない原因としては、組換え頻度が低い可能性と、大規模に欠失させたために必須になった遺伝子が欠失

領域に存在する可能性が考えられた。そこでそのような領域を解析するための新しい実験系を構築した。具体的には、それまでは相同的組換えだけを利用していましたが、それに加えてFLP-FRT部位特異的組換えを利用し、また欠失させた領域がプラスミドとして細胞内に維持されることもできるようにした系を構築した。

(4) 新規及び機能未知必須遺伝子群の機能解析

(a) リンジン修飾酵素をコードする必須遺伝子、*mesJ* (*tilS*)の機能ネットワークの解析

RNA修飾の一つであるリンジン修飾酵素をコードする必須遺伝子、*mesJ* (*tilS*)についてサブレッサー変異株を単離した。サブレッサー遺伝子を同定したところ、リボソームタンパク質S1の遺伝子、*rpsA* 遺伝子のプロモーターと開始コドンの間に挿入配列IS1が挿入された変異であることがわかった。さらにMesJとS1が直接相互作用すること、S1がMesJのリンジン修飾活性を抑えることが明らかになり、細胞内でS1がMesJの活性調節に働いていることが示唆された。また*mesJ*変異のタンパク質合成に対する影響を調べるため、*mesJ*変異株の全タンパク質についてプロテオーム解析を行なった結果、細胞内の量が増加する28のタンパク質が同定された。その内の21個について遺伝子発現を調べたところ、多くのものについて顕著な発現量の増大が確認された。それらの遺伝子発現の特徴について調べた結果、多くは熱ショックタンパク質をコードすることがわかった。熱ショックタンパク質の誘導を抑える働きをするDnaKの遺伝子が、解読にリンジン修飾を必要とするAUAコドンを含み、また実際に*mesJ*変異株では細胞内のDnaKの量が減少していることが確かめられたことから、熱ショックタンパク質の増大は*dnaK*遺伝子の発現の低下による可能性が考えられた。

(b) 細胞分裂に必要なFtsZの機能及び情報発現ネットワークの解析

機能がまだよくわかっていないGTPaseをコードする必須遺伝子*obgE*の変異株では、細胞内のFtsZの量が減少することが明らかになった。*ftsZ*遺伝子は多くの内部プロモーター、多くの必須遺伝子を含む、複雑で長いオペロン内に存在することから、これまで遺伝子発現についての解析が難しかったが、*ftsZ*遺伝子を相補した状態で染色体上の*ftsZ*遺伝子を正確にレポーター遺伝子と置き換えた菌株を作製することによって、発現を解析するための新しいシステムを構築した。このシステムを用いて調べた結果、*ftsZ*遺伝子の発現が低下すること、またSpoTタンパク質が関与していることが明らかになった。

(c) 細胞表層の生合成に必要な遺伝子群の機能ネットワークの解析

機能未知必須遺伝子*yhbN*遺伝子がコードするタンパク質が、リボ多糖の外膜局在に必要なImpタンパク質と相同なドメインを持つことから、*yhbN*、*imp*遺伝子の高温感受性変異株やリボ多糖合成に関与する*htrB*、*msbA*、*msbB*遺伝子をクローニングしたプラスミドなどを用いて遺伝学的解析を行い、*yhbN*遺伝子がリボ多糖の生合成に関与する事を示した。

また機能未知必須遺伝子*movN*の高温感受性変異株を高温で培養した時に、細胞の径が大きくなりゴーストを生じることを見出した。そこでこの*movN*遺伝子が細胞壁の生合成に働く可能性を考えて遺伝学的解析を行ったところ、ペプチドグリカンの生合成に関与することが示唆された。さらに東邦大の藤崎博士との共同研究により、高温感受性変異株においてペプチドグリカン合成の中間体が蓄積することがわかり、ペプチドグリカンの生合成に必須であることが明らかになった。この遺伝子がコードするタンパク質の相同性からは、ペプチドグリカン合成の基質を結合したキャリアリピッドを内膜内で回転 (flip-flop) させる酵素である

可能性が考えられた。

さらに β -バレルタンパク質の外膜への局在に必要なYaeTタンパク質複合体に含まれる、生育に必要なYfiOタンパク質の高温感受性変異株から多コピーサブレッサーを単離する事により、関与する新規遺伝子*yiaD*を同定した。さらにこの*yiaD*遺伝子の変異株を作製して調べた結果、ペプチドグリカンとの相互作用が機能に重要であることがわかった。

(d) 転写に必要な遺伝子群の機能ネットワークの解析

機能未知必須遺伝子*yqgF*は、近年、コードするYqgFタンパク質の立体構造の解析から、一次構造の相同性は高くないものの、立体構造ではRNaseH様の折りたたみ構造を持つRuvCタンパク質と相同性が高いことが明らかになった。我々はこの*yqgF*遺伝子の高温感受性変異株から調製したプラスミドでは超らせん構造が変化していることを見出した。また遺伝学的解析により、転写終結に関与することが示唆され、qRT-PCRにより種々の遺伝子の転写について調べたところ、高温感受性変異株では遺伝子内および上流にRho依存性終結配列がある遺伝子群の転写量が低下していることがわかった。Rhoの阻害剤を作用させると転写量が回復することからも転写終結シグナルを乗り越えて転写を起こさせるのに機能していることが示唆され、DNAの正常な構造を維持することにより転写を正常に進ませる新規なメカニズムの可能性が考えられた。近年、Rhoタンパク質は外来遺伝子群の発現を抑制するシステムであることが明らかにされ、実際に染色体中のウイルス由来の領域 (プロファージ領域) を欠失させた菌株では、Rhoタンパク質の機能を補助する必須遺伝子である*nusA*、*nusG*遺伝子を欠失させても生育できることが報告された。この報告では*rho*遺伝子はまだ欠失できていないが、Rhoタンパク質の阻害剤に対して耐性になっていることが明らかになった。これらの結果により、外来遺伝子の発現を抑制せずには生育できないという、これまで知られていなかった大腸菌の姿が明らかになってきた。我々が機能解析を進めているYqgFタンパク質は、Rhoタンパク質による不具合を克服するために必須であるとも言えるので、もし外来遺伝子の欠失をさらに進めて*rho*遺伝子を欠失させることができればYqgFタンパク質も非必須になると考えられる。広い意味では外来遺伝子の発現を抑制するシステムの一つと考えられ、大変興味深い。

また我々は3つの機能未知必須遺伝子*yeaZ*、*ygiD*、*yjeE*が機能的に関連していることを遺伝学的に明らかにした。*ygiD*遺伝子は、原核生物はもちろん古細菌、真核生物にも広く保存されている遺伝子で、近年酵母においてテロメアの維持や転写制御に関与すること、また古細菌のホモログが脱塩基部位に作用するAP-endonucleaseであることが報告され、非常に注目されてきている。我々はこれらの*ygiD*、*yeaZ*、*yjeE*遺伝子が抗転写終結機構の阻害に働くことを示唆する結果を得ており、ゲノム中のウイルスゲノムに存在する抗転写終結機構と関連する可能性が考えられる。

(5) 定常期における生存機構の解析

我々が作製した染色体の約30%を欠失させた大規模欠失株では定常期における生存率が著しく低下している事を見出し、この性質が複数の遺伝子が欠損したことによることを明らかにした。その原因遺伝子の一つとして*dps*を同定したが、Dpsタンパク質は、定常期においてDNAと非特異的に結合して安定な「バイオクリスタル」と呼ばれるヌクレオプロテイン複合体を形成し、多くのストレスからDNAを保護していることが知られている。これまで外からのストレスに対する*dps*遺伝子の機能については報告されていたが、本研究のよって*dps*遺伝子が直接増殖、生存に重要であることが明らかになった。

<国内外での成果の位置づけ>

大腸菌の染色体を大規模に欠失させた株を作製した仕事を論文の形にしたところ、Editor および Reviewer 全員より非常に高い評価を得た。現時点では一つの生物の染色体をこれほど大規模に欠失させた例は他にない。

また前特定領域研究「ゲノム」から引き続いて進めてきた系統的、網羅的な染色体欠失株作製のプロジェクトも大変ユニークで類似の報告は皆無である。特にバクテリアでは染色体分配のメカニズムが未だに解明されておらず、真核生物のような動原体が染色体に存在するかどうかが残された大きな問題だったため、我々の仕事は大変大きな意義があった。さらに大規模欠失株の利用により、複数の遺伝子の変異による表現型の解析が可能であることを実際に示した例も他には全くない。このように本研究の染色体大規模欠失株作製、染色体広域欠失変異群作製は、戦略としても、また欠失させる技術、さらに実際に作製した欠失株、欠失変異のどれをとっても国内外で類がなく大変ユニークである。

機能未知必須遺伝子群の遺伝学的解析に用いたシステムも、我々が独自に開発したものである。また内容的にも、染色体複製開始調節と RNA 修飾との関連、RNA 修飾酵素 MesJ とリボソームタンパク質 S1 との機能的な関係、細胞表層の生合成に必須な遺伝子群、転写に必須な遺伝子群など全てオリジナルなものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

系統的な染色体欠失株作製のプロジェクトにおいて最後に残った領域の解析が予想外に困難で時間がかかった。その理由は、欠失変異株が単離できない場合に、欠失変異が作製できないことを示す方法がなかった事である。試行錯誤の末、細胞内で特定の染色体領域を mini-F プラスミドに移すシステムを構築、改良することにより解決することができた。

大規模に染色体を欠失させた菌株の作製において、新たな欠失変異を導入した株が得られなかったり、生育が著しく悪くなってきたりする場合が多くなってきていた。可能性としては組換え頻度が低いこと、複数の経路が存在する必須な過程がかなり多いこと、染色体のサイズが重要であることなどが考えられたが、これらは未知の分野であり原因をはっきりさせるのが困難だった。

一方「複数の経路が存在する必須な過程」を同定するために、「野生株では欠失できたのに、大規模欠失株では欠失させることができない染色体領域」の同定を進めようとしていたが、「欠失変異が単離されるかどうか」で「欠失させることができるかどうか」を判断する事が、欠失変異が単離される頻度が低いために難しかった。

これらを解決するために新しい欠失変異を導入するシステムを構築したが、システムを動かすためにはいろいろと細かい問題が生じ、それらを解決するのが予想外に困難だった。しかしシステムが動き始め、欠失変異を導入することができるようになり、その結果まださらに染色体を欠失できることも示唆されたので、今後は染色体大規模欠失株の作製をさらに進めることができると思われる。

また定常期の生存については、関与する遺伝子群が予想以上に多く、定常期の生存機構が想像以上に複雑な過程であることが明らかになってきた。原因遺伝子の同定については、染色体ライブラリーを利用して何度か同定を試みたが成功せず、多数の部分欠失変異を作製することによって原因遺伝子を同定することができた。多数の部分欠失変異を作製するのが、時間と手間がかかり困難だった。しかし原因遺伝子が同定されると、定常期ではプラス

ミドが消失する興味深い現象が明らかになり、染色体ライブラリーを利用して同定できなかった原因がわかってきた。

<今後の課題、展望>

大規模欠失株の作製については、新しい欠失システムができたのでさらに進めていくことができるようになったが、欠失変異を導入するために時間と手間がかかり、より効率的に改良していくことが今後の課題である。

機能未知必須遺伝子群の解析については、今年度 *yqgF* また *yeaZ*, *ygjD*, *yjeE* の両方の遺伝子群についての解析が大きく進んだ。Biochemical function と Biological function の両方について大変興味深い手がかりが得られてきたので、今後の解析が楽しみになっている。しかしどちらも転写に関与することがわかってきたが、*in vivo*, *in vitro* のアッセイ系をうまく組み立てて解析していくことが今後の課題である。

特に *yqgF* については、Rho タンパク質による不都合を解消するために必須であると考えられ、Rho タンパク質が外来遺伝子の発現を抑制するシステムの一つであるならば、YqgF タンパク質も広い意味でこのシステムの一つということになり大変興味深い。その点では今後、我々が作製した大腸菌染色体大規模欠失株において、まだ残っている外来遺伝子領域を欠失させた菌株を作製し、*rho* 遺伝子さらには *yqgF* 遺伝子、また *ygjD*, *yeaZ*, *yjeE* 遺伝子についても欠失を試み、これらが外来遺伝子の発現を抑制するシステムであることを明らかにすることが課題である。またこれら機能未知必須遺伝子 *yqgF*, *ygjD*, *yeaZ*, *yjeE* については、どの欠失変異がこれらの遺伝子の必須性に影響するかを調べることでより標的遺伝子を同定し、またそれぞれの遺伝子産物を精製して活性を同定することにより生化学的機能を明らかにして、外来遺伝子の発現を抑制するメカニズムを解明することが重要である。さらに他の必須遺伝子を含む染色体欠失変異を利用して染色体大規模欠失株における必須性を調べることで、外来遺伝子の発現の抑制に関与する他の必須遺伝子を同定することにより、外来遺伝子の発現を抑制するメカニズムの全容を解明できると思われる。

我々の作製した大規模欠失株を利用して定常期の生存機構の解析が進み始めた。今まで定常期の生存率が低下した変異株は *rpoS* 変異株ぐらいであり、他にはほとんど単離されておらず、定常期の生存機構については遺伝学的解析が難しく、解析が進んでいない。変異株の単離が難しい理由としては、定常期の生存を支える複数の経路が存在している可能性が考えられる。今回大規模欠失株を利用した解析により重要な手がかりが得られてきて、一つの研究の方向が明らかになってきた。多数の遺伝子の欠損によって生存率が低下していることが明らかになってきたが、原因遺伝子群の同定を効率的に進めることが今後の課題である。定常期の生存は基礎生物学的な興味はもちろん、応用面でも物質生産に微生物を用いる場合には定常期での培養が重要であることなどから、非常に興味深い問題であり、今後大規模欠失株を利用した研究が大いに期待される。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

1. 901141005

Inoue, A., Murata, Y., Takahashi, H., Tsuji, N., Fujisaki, S., and Kato, J. Involvement of an essential gene, *mviN*, in murein synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 190: 7298-7301. (2008)

2. 901140959

Mizoguchi, H., Sawano, Y., Kato, J., and Mori, H.

Superpositioning of deletions promotes growth of *Escherichia coli* with a reduced genome. DNA Research 15: 277-284. (2008)

3. 708051700

Kato, J. and Hashimoto, M. Construction of consecutive deletions of the *Escherichia coli* chromosome. Molecular Systems Biology Microbiol. 3: Article number 132 (2007)

4. 0701141504

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. Molecular Cell 21, 97-108 (2006)

5. 0601291732

Kato, J. (2005) Regulatory network of the initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. (Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology) 40: 331-342.

6. 0601291715

Ote, T., Hashimoto, M., Ikeuchi, Y., Su'etsugu, M., Suzuki, T., Katayama, T., and Kato, J. (2006) Involvement of the *Escherichia coli* folate-binding protein YgfZ in RNA modification and regulation of chromosomal replication initiation. Mol. Microbiol. 59: 265-275.

7. 0701141446

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. Molecular Cell 19, 235-246 (2005)

8. 0601291732

Kato, J. Regulatory network of the initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. (Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology) 40: 331-342 (2005)

9. 0601291658

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. (2005) Cell size (2005) Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. Mol. Microbiol. 55: 137-149.

2) 図書

1. 801211548

Kato, J. and Hashimoto, M. Construction of long chromosomal deletion mutants of *Escherichia coli* and minimization of the genome. Methods in Molecular Biology 416 (Microbial gene Essentiality: Protocols and Bioinformatics) Humana Press Inc. (2008)

3) 学会発表

1. 加藤 潤一、本多 弘典、大森 拓磨、金 景順、蔡 安蓉、橋本 昌征、樽谷 愛理 (2009) 大腸菌染色体大規模欠失株の作製と解析. 第3回日本ゲノム微生物学会年会 (東京) .

12. Kato, J. (2009) Construction of *Escherichia coli* long chromosomal deletion mutants and genome minimization. The 82nd Annual Congress of Japanese Society for Bacteriology (名古屋) .

2. 加藤 潤一、本多 弘典、大森 拓磨、金 景順、蔡 安蓉、橋本 昌征、樽谷 愛理 (2008) 大腸菌の染色体大規模欠失変異株の作製

とその性質. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (神戸) .

3. 立川智章、加藤潤一 (2008) 大腸菌の外膜タンパク質の膜局在化に必須な*yfiO*遺伝子の遺伝学的解析. 第2回日本ゲノム微生物学会年会 (大阪) .

4. 加藤潤一、本多 弘典、馬鳥裕史、橋本昌征、金景順 (2008) 大腸菌の染色体大規模欠失変異株の作製とその性質. 第2回日本ゲノム微生物学会年会 (大阪) .

5. 立川智章、加藤潤一 (2007) 大腸菌の外膜タンパク質の膜局在化に必須な*yfiO*遺伝子の遺伝学的解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 (横浜) .

6. 加藤潤一、本多 弘典、馬鳥裕史、橋本昌征、金景順 (2007) 大腸菌の染色体大規模欠失変異株の作製とその性質. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 (横浜) .

7. 馬鳥裕史、本多弘典、橋本昌征、加藤潤一 (2007) 大腸菌の染色体大規模欠失変異株の作製とその性質. 第1回 日本ゲノム微生物学会年会 (千葉)

8. 加藤潤一、馬鳥裕史、本多 弘典、橋本昌征 (2006) 大腸菌の染色体大規模欠失変異株の作製とその性質. 日本分子生物学会 2006 フォーラム (名古屋) .

9. Kato, J. and Hashimoto, M. (2006) *Escherichia coli* chromosome has no unique *cis*-acting essential regions other than origin and terminus of replication. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress.

10. 林和之、大手友武、田岡万悟、池内与志穂、橋本昌征、鈴木 勉、磯邊俊明、加藤潤一 (2005) 大腸菌ライジン合成酵素TilS (MesJ)の遺伝子発現調節への関与. 第28回日本分子生物学会年会 (福岡) .

11. 加藤潤一、橋本昌征 (2005) 大腸菌の系統的網羅的な染色体欠失変異株作製. 第28回日本分子生物学会年会 (福岡) .

4) データベース

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