

【森浩禎】



[森 浩禎 \(Hirotsada Mori\) - マイポータル - researchmap](#)

・研究テーマ

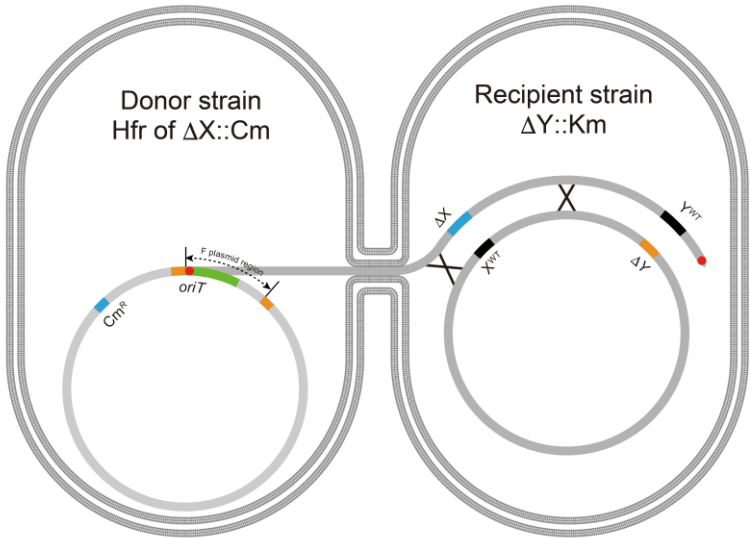
○遺伝的ネットワーク解析

これまで遺伝子工学の技術を用いてゲノム改変を行い、有用な生命構築の挑戦が多くなされてきたが予想通りの表現型を得ることは非常に難しい。デザインされた改変が難しく、多くの場合は突然変異と選択を繰り返す方法で育種が行われてきた。これは、細胞の持つ遺伝子全体のネットワークが未解明であることに大きく起因する。細胞内ネットワーク構造解明を目的として、二重遺伝子欠失株構築による遺伝子的相互作用ネットワーク解明を進めてきている。細胞内全遺伝子の網羅的な二重欠失株の相互作用解析の完成を目指す。

Genetic network analysis

To obtain and accumulate data for analysis of genetic interactions between all genes in the cell by comprehensive double deletion strain analysis. Obtain and accumulate genetic interaction analysis data between all genes in the cell by systematic double deletion strain analysis. These data are the genetic interaction data of all the combinations between two genes, and this information will be used to elucidate the structure of the intracellular functional networks. The overall picture of the analysis is shown in Figure 1. If we can read the intracellular network structure and the range of dynamic rewiring within that structure, we will be able to design the genome from scratch. This is a point that was not possible based on the accumulation of biology in the 20th century. Even in *E. coli*, it is necessary to construct 16 million combinations of double deletion strains, and it is not easy to obtain cell growth information for all combinations, but the current method has made it feasible in a realistic time frame. Our group that developed this system hopes to first obtain information covering the entire system and then move closer to elucidating the rules of cells. Furthermore, the accumulated data will be enormous. We will share it with research communities with diverse backgrounds in many fields, such as mathematics, information science, physics, chemistry, and engineering, to build a community that enables broad analysis and accelerates it.

# Double knock-out by conjugation



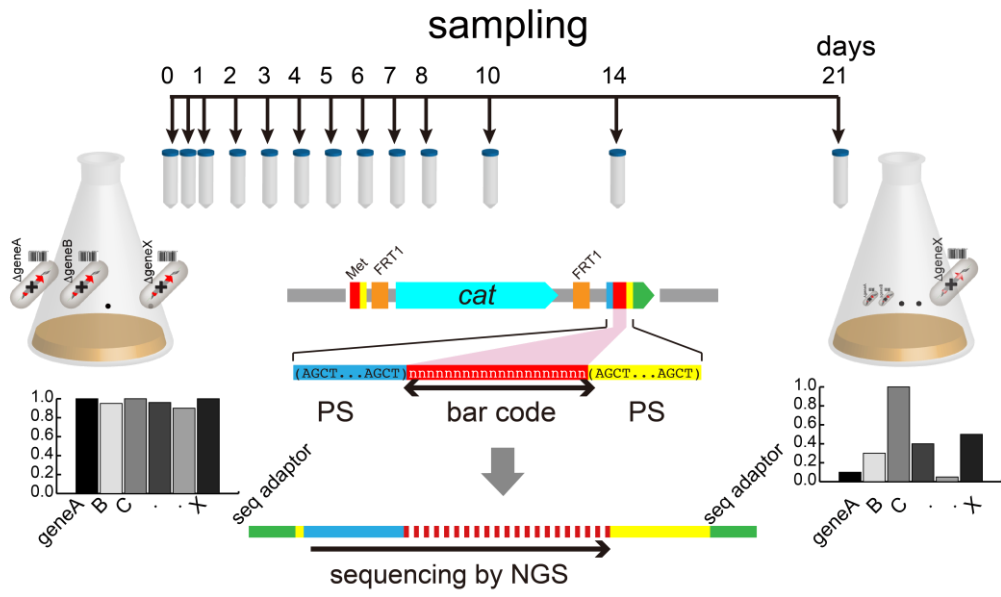
### ○Bar-code 欠失株ライブラリーによる population dynamics 解析

混合培養液中の個々の細胞の区別を可能にする barcode 欠失株を構築してきた。この新規リソースを用いると、多くの可能性を広げることが可能になる。すでにいくつかの評価実験による検証も進み、その効果は実証できた段階である。これまで大腸菌で 4000 遺伝子の欠失株を個別に一欠失株毎に解析を行う必要があった。しかし barcode 欠失株を利用すると、全ての株の混合培養液による解析で、全ての株の population 変動を、barcode 配列を deep sequencer で読み取ることで可能とした。しかも競合環境で行うために、少しの生育の違いも、単独での解析と比較して大きな差として同定可能になる。さらに配列解析による細胞数分布を解析するため、競合実験により減少する欠失株も定量的に同定が可能である。この新規リソースによる解析を、化学物質、他微生物および宿主動物体内環境による生育への影響の解析を通じ、細胞間相互作用および化学物質-遺伝子相互作用ネットワーク解析を進める。

#### Population dynamics analysis by the bar-code deletion collection

We have constructed the barcode deletion library that allows us to distinguish individual cells in mixed cultures. We have already completed several evaluation experiments, enabling us to identify the deletion genes of individual cells in a population of cells in a mixed culture medium. A schematic diagram of the system is shown in Figure 2. Using this system, we will proceed with the analysis of interactions between all gene deletion strains and the growth environment, host organism, and other microorganisms. In the growth environment, the physiological activity of chemicals such as drugs, toxic substances such as metals, and all other chemicals can be analyzed using the growth of *E. coli* cells as an indicator. The interaction with the host and other microorganisms in the same growth environment can also be analyzed quantitatively by analyzing the effects of the deleted gene in the *E. coli* cells. We will create a database of the obtained information, share it with the community, and accelerate the analysis by providing a place for analysis not only to us but also to other researchers in the community at large.

# Population dynamics by Bar-seq



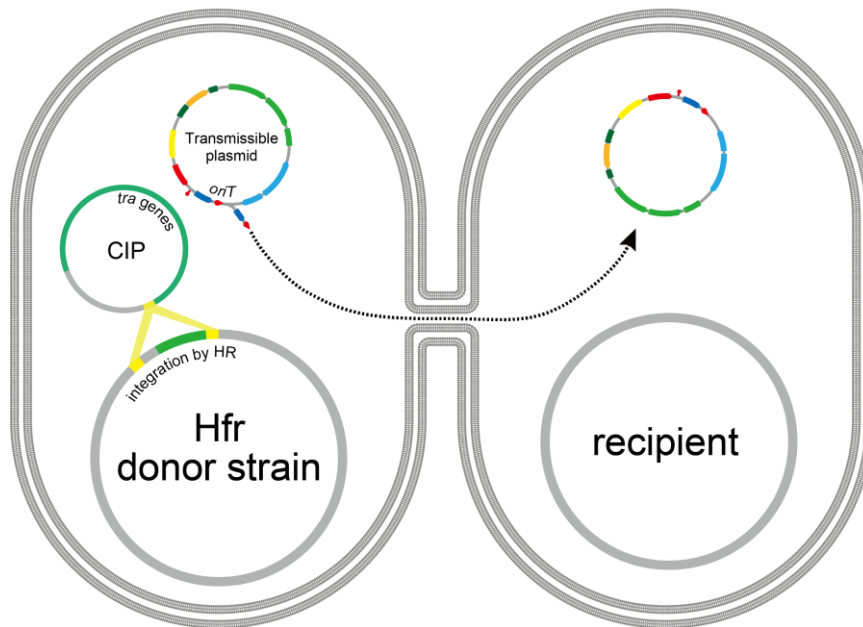
○接合を用いた高効率巨大 DNA 移動方法の開発

これまで、2種類の大腸菌一遺伝子欠失株ライブラリーを、F plasmid の接合機能を活用し、高効率に二重欠失株構築法の開発を行い、二重欠失株による遺伝的相互作用ネットワーク解析を進めてきた。この技術を利用し、種を超えた接合による高効率巨大 DNA 移動を可能にする plasmid ベクターの開発を進めてきた。

High efficient huge DNA transfer method using conjugation

We have developed a high efficient method for constructing double deletion strains by using the conjugation of F plasmid to construct a library of two E. coli single gene deletion strains and have been analyzing the genetic interaction network of the double deletion strains. Using this technology, we have developed plasmid vectors that enable cross-species huge DNA transfer by conjugation.

### Self-transmissible plasmid by conjugation



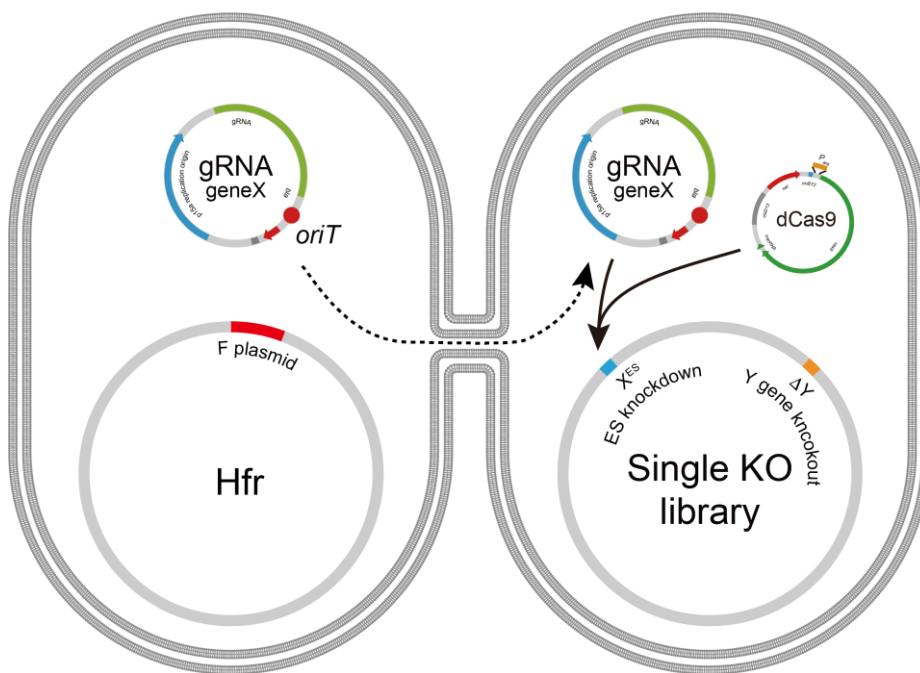
○CRISPRiによる必須遺伝子 Knockdown ライブラリー

一遺伝子欠失株ライブラリーには、必須遺伝子は含まれていない。そこで、欠失が不可能な必須遺伝子に関して、CRISPRiを利用した Knock-down ライブラリーの開発を行った。この系を活用し、必須遺伝子の網羅的解析を可能にしている。現在は、このライブラリーを用い、必須遺伝子と非必須遺伝子の網羅的遺伝的相互作用ネットワーク解析を進めている。

Knockdown library of the essential genes of *E. coli* K-12

Single-gene deletion libraries do not contain essential genes. Therefore, we developed a Knockdown library using CRISPRi for essential genes that cannot be deleted. This system enables comprehensive analysis of essential genes. Currently, using this library, we are performing a comprehensive genetic interaction network analysis of essential and non-essential genes.

### Knockdown by CRISPRi



○Bar-code 欠失株による Population dynamics 解析

Bar-code 欠失株の混合培養液を用いて、さまざまな培養環境における個々の遺伝子欠失株の population 動態の定量解析を可能にした。長期定常期における大腸菌の動態を解析した例を図に示す。この系を用い、致死濃度の薬剤を含む培養液に大腸菌が曝せられた際の、生残に関わる遺伝的背景の同定を進めている。Bar-code 欠失株によるスクリーニングで得られた候補株を用いた二重欠失遺伝的相互作用解析で、persister 発生に関わる細胞内ネットワーク機構の解明を進める。

Population dynamics analysis by the deletion collection with bar-code

The use of mixed cultures of Bar-code deletion strains has enabled quantitative analysis of the population dynamics of individual gene deletion strains in various culture conditions. An example of the analysis of *E. coli* dynamics in the long-term stationary phase is shown in the figure. Using this system, we are identifying the genetic background of survival of *E. coli* when exposed to lethal concentrations of drugs and are elucidating the intracellular network mechanisms involved in persister development by analyzing double deletion genetic interactions using candidate strains obtained through screening of Bar-code deletion strains. We are also working to elucidate the intracellular network mechanisms involved in persister development.

## Population dynamics by Bar-seq

