

Title	Analysis of gene expression for novel anti-tDNA transcripts in Escherichia coli
Sub Title	
Author	新原, 温子(Shinhara, Atsuko) 松井, 求(Matsui, Motomu) 富田, 勝(Tomita, Masaru) 金井, 昭夫(Kanai, Akio)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2008-02
Jtitle	研究会優秀論文
Abstract	本研究では、実験的手法を用いて現在までに見つかっている86個すべてのtRNAに関して詳細な発現解析を行った。その結果、21種類存在するアミノ酸のうち少なくとも13種類のアミノ酸に対応するtRNA遺伝子は、それ自身をターゲットとして制御しうるncRNAを伴うことが初めて示唆された。本論文ではこの結果に基づいてncRNAがtRNAの発現制御を行う事でタンパク質合成を調整しているという仮説を提唱すると共に詳細に議論する。
Notes	先端生命科学プロジェクト2007年秋学期
Genre	Technical Report
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0302-0000-0597

A

**Analysis of Gene Expression for
Novel anti-tDNA transcripts
in *Escherichia coli***

2007年 秋学期

AUTUMN

新原 温子 環境情報学部 3年

松井 求 政策・メディア研究科 修士課程

先端生命科学プロジェクト

慶應義塾大学湘南藤沢学会

研究プロジェクト優秀論文推薦のことば

ヒトからバクテリアまで全ての生物にとって、tRNAは必須の分子であり、tRNAの量を調節する機構が存在すれば、それは生命活動にとって大きな意味を持ちます。新原さんは、コンピュータを用いてtRNAがnon-coding RNA(ncRNA)という物質によって大規模に制御されているという新たな機構を予測しました。そして現在までに見つかっている86個すべてのtRNAに関して網羅的な実験を行うことで、実際にその機構が存在する事を初めて示唆しました。本研究はコンピュータ解析と生物実験を組み合わせた極めてユニークなものであり、優秀論文に推薦します。

慶應義塾大学
環境情報学部教授
富田 勝

Analysis of Gene Expression for Novel anti-tDNA transcripts in *Escherichia coli*

環境情報学部 3年 新原 温子
政策・メディア研究科 1年 松井 求

要旨

tRNA 遺伝子はタンパク質生合成の際に必須であり、tRNA 分子が担っている翻訳機構はどの生物種でも大変良く保存されている。*Escherichia coli* (*E. coli*) においては 21 種のアミノ酸に対応する 86 個の tRNA 遺伝子が知られている。一方で、Non-coding RNA (ncRNA) はタンパク質に翻訳される領域を持たない転写産物の総称であり、様々な機能を有する多くの ncRNA が近年報告されている。本研究では *E. coli* K12 株の全 86 tRNA に対して Northern Blotting を用いた網羅的な antisense RNA の発現解析を行った。また、tRNA 遺伝子それぞれに対して、antisense RNA の有無、生育に必須であるか否か、コドン使用頻度、発現量のデータを付加し、antisense RNA の有無にどのような特徴が存在するか観察した。その結果、Northern Blotting においては 86 個中 44 個の tRNA に対して antisense RNA の存在が示唆された。また、必須遺伝子か否か、コドン使用頻度の高低、発現量の高低と antisense RNA の有無に強い関係が観察されなかったことから、antisense RNA は個々に役割が異なっていることが示唆された。ここで、antisense RNA の Northern Blotting のバンドパターンの傾向から、200bp-400bp の antisense RNA の存在が示唆されたため tRNA のオペロンに注目して解析した結果、オペロンを組んでいる tRNA の antisense RNA で類似したバンドパターンが観察された。特に valV-valW オペロンで 300bp の antisense RNA が存在し、valW の発現量を抑制、調節することで、生物に不利な状態に陥る事なく tRNA^{val2} の量を調整していることが示唆された。

Keywords : *E. coli*, tRNA, Non-coding RNA, antisense RNA, RNase III, Northern Blotting

1. 序論

タンパク質は生物の体を構成する最も重要な成分の1つである。主なタンパク質として酵素、コラーゲン、ケラチンなどがあげられ、生命活動を担うタンパク質は10万種類以上もあることが知られている。ここで、タンパク質はアミノ酸が連なってできた分子であり、その順序によって形状や性質が決まるため、アミノ酸の運搬役である transfer RNA (tRNA) はタンパク質合成過程において重要な役割を担っており、また必須の分子である。タンパク質合成における tRNA の役割は、messenger RNA (mRNA) と合成されるポリペプチドの両方に結合するアダプター分子としての働きである (Frank *et al.*, 2005)。この連結により、遺伝コードを用いて mRNA の塩基配列に書き込まれた通りにポリペプチドのアミノ酸配列を合成することができる。また合成されたポリペプチドが折りたたみ、切断や化学修飾などのプロセッシングをうけることによって、タンパク質として機能を発揮する。ここで、*Escherichia coli* (*E.coli*) K12 株においては、40 個のアンチコドンをもつ 45 種類、全 86 個の tRNA が知られている (Withers M *et al.*, 2006)。これらの tRNA は、41 個が他の tRNA と、11 個が ribosomal RNA (rRNA) と、7 個が mRNA と polycistronic オペロンに組み込まれており、27 個が単体で発現する (Blattner *et al.*, 1997)。どの tRNA 遺伝子についても、最初は tRNA 遺伝子前駆体 (pre-tRNA) として転写され、5'/3' の両末端にある成熟 tRNA には観察されない余分な配列が複数のリボヌクレアーゼ (RNase) による一連のプロセッシングによって切断されることで機能を持つ成熟 tRNA が合成される。近年、tRNA 遺伝子のプロセッシングについて大規模に研究されているが、オペロンごとにプロセッシングパターンが違うことなどから、まだ解明されていないことも多い (Mohanty and Kushner., 2007; Li and Deutscher, 2002)。また、ゲノム規模での tRNA の転写開始調節制御として、プロモータとオペロンによる制御が知られている (Lamond *et al.*, 1985; Dittmar *et al.*, 2004)。しかしながら、tRNA の量を調節する大規模な転写機構の存在はあまり報告されていない。tRNA 遺伝子の転写が大規模に抑制又は活性化され、tRNA の量を調節する機構が存在すれば、それは生命活動にとって大きな意味を持つことが考えられる。

上述したように、mRNA というタンパク質に翻訳される RNA がある一方で、これまで不要な生成物であると考えられてきたタンパク質に翻訳されない転写産物である Non-coding RNA (ncRNA) が予想以上に多く存在し、重要な機能を持つことが近年次第に明らかになってきており、その役割の解明が重要な課題となっている。これまでに知られている数多くの ncRNA は 20mer 前後から 1000mer にいたるまで様々な形状をとる事や、遺伝子発現制御、染色体不活性化、rRNA 修飾などの様々な機能をもつことが知られており、その特徴や働きをさらに知るために活発に研究が行われている (Eddy, 2001)。特に、*E.coli* においては、バイオインフォマティクスを用いた網羅的な ncRNA の予測や (Chen *et al.*, 2002; Rivas *et al.*,

2001), マイクロアレイを用いた small sNon-coding RNA (sRNA) 候補の発現解析 (Tjden *et al.*, 2002 ; Wassarman *et al.*, 2001) といった先行研究が存在し, 様々な方法で新規 ncRNA が予測, 同定されており (Vogel and Sharma ,2005), 現在までに *E.coli* においては 80 個の sRNA が同定されている (Gottesman, 2005 ; Storz *et al.*, 2005). また, ncRNA の一種である antisense RNA では, 代表的な機能として sense 鎖と 2 本鎖を形成し Ribonuclease III (RNase III ;Portire *et al.*, 1987)のターゲットとなることによる制御機構等が知られている (Vogel *et al.*, 2003 ; Afonyushkin T *et al.*, 2005). また, RNaseIIIだけでなく RNase E による制御機構も知られている (Masse *et al.*, 2003).

そこで, 本研究では *E.coli* K12 株の全 86 tRNA に対して Northern Blotting を用いた網羅的な antisense RNA の発現解析を行った. また, tRNA 遺伝子それぞれに対して, antisense RNA の有無, 生育に必須であるか否か, コドン使用頻度, 発現量のデータを付加し, antisense RNA の有無にどのような特徴が存在するか観察した. その結果, Northern Blotting においては 86 個中 44 個の tRNA に対して antisense RNA の存在が示唆された. また, 必須遺伝子か否か, コドン使用頻度の高低, 発現量の高低と antisense RNA の有無に強い関係が観察されなかった事から, antisense RNA は個々に役割が異なっていることが示唆された. ここで, antisense RNA の Northern Blotting のバンドパターンの傾向から, 200bp~400bp の antisense RNA の存在が示唆されたため tRNA のオペロンに注目して解析した結果, オペロンを組んでいる tRNA の antisense RNA で類似したバンドパターンが観察された. 特に valV-valW オペロンで 300bp の antisense RNA が存在し, valW の発現量を抑制, 調節することで, 生物に不利な状態に陥る事なく tRNA^{val2} の量を調整していることが示唆された.

2. 対象と手法

Sequence Data

本研究の対象生物種は *E.coli* K12 株 MG1655 であり、ゲノム配列及び既知遺伝子のアノテーション情報は Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; 2007年9月26日) から得た。また、オペロンの情報は RegulonDB 5.8 (<http://regulondb.ccg.unam.mx/>; 2007年11月20日) から得た。

オリゴヌクレオチド

E.coli K12株においては86個のtRNAが知られており、40個のアンチコドンをもつ45種類によって構成されている。本研究では、全86個のtRNAに対してオリゴヌクレオチドをデザインした。まず、45種類のtRNAに対して、それぞれ antisense 鎖の発現の様子が観察できるように、tRNAの開始位置を+1とした時の+1から+35までの35bpをそのtRNAのオリゴヌクレオチドとした。次に、86個のtRNAに対して、Blast (Altschul *et al.*, 1990) による相同性検索や clustalw 1.83 (Chenna *et al.*, 2003) によるアライメントを行い、他のどの領域の35bpをとっても全く同じ配列がないような特異的な配列をデザインした。また、tRNAとオペロンを組んでいる rRNA と CDS に対しても同様にオリゴヌクレオチドをデザインした。オリゴヌクレオチドは北海道システム・サイエンス社に発注し、簡易カラム精製にて生成されたものを使用した。デザインしたオリゴヌクレオチドの全配列は Supplementary Table S1 にまとめた。

RNase III変異株

RNase III は2本鎖RNAを特異的に切断する endonuclease 酵素である (Robertson and Dunn, 1975)。また、Keio Collection とは *E.coli* K12 株 BW25113 の全通り遺伝子破壊株であり、その中の1つである RNase III をコードしている *rnc* 遺伝子破壊株を RNase III 変異株として用いた (Baba *et al.*, 2006)。

Total RNA の調整

E.coli K12 株 BW25113のWild TypeとRNaseIII変異株それぞれをM63培地 (5×M63 20mL, 40% glucose 1mL, Thiamine · HCl&MgSO₄ · 7H₂O 100ul, Mili Q 78.9mL) 10mLと15mLにそれぞれに植菌し、O/Nでプレカルチャーを行った。次に10mLでプレカルチャーを行った培地に関してRNA安定化処理 (RNAprotect Bacteria Reagent; Qiagen 社) を行い、これを定常期の試料とした。さらに15mLの培地を300mLのM63培地に入れ、OD₆₀₀ = 0.68になるまで震盪培養 (ORBITAL INCUBATOR MIR-220R; SANYO 社) を行った後、先と同様にRNA安定化処

理を行い、これを対数増殖期の試料とした。そして試料についてRNeasy mini kit (Qiagen 社) のプロトコルに従ってRNAを回収し、DNase I (TAKARA 社) で DNase処理を行なった。

Northern Blotting

4 μ g等量のTotal RNAについて8M Urea 6% polyacrylamide gelで電気泳動を行い、ナイロンフィルター (Amersham Biosciences 社) に転写し274nmのUVにてクロスリンクを行なった。次にBiotin 3' End DNA Labeling Kit (PIERCE 社) を用いてオリゴヌクレオチドの3' 末端をビオチンで標識し、ULTRAhyb-Oligo hybridization buffer (Ambion 社) の中で30min、室温でハイブリダイゼーションを行なった。その後、BrightSter Bio Detect Kit (Ambion社) を用いて室温もしくは42°Cで洗浄してECF 基質 (GE Healthcare社) を添加した後、検出器 (Bio Rad 社) で解析を行なった。

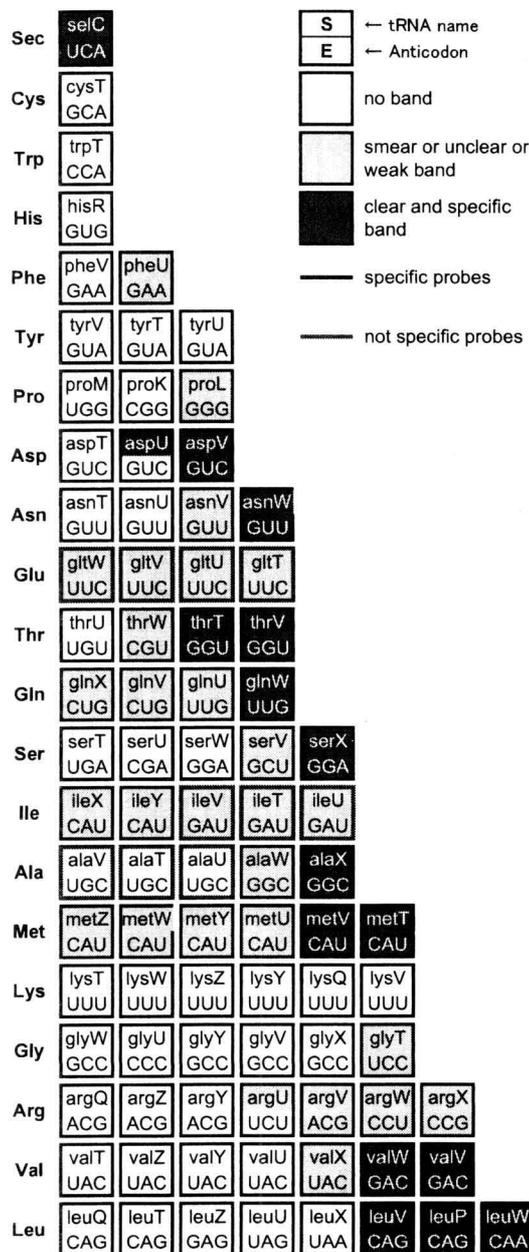
Biocomputational analysis

それぞれの遺伝子が生育に必須であるか否かについてのデータを、データベース Profiling of E.coli Chromosome ver.4 (PEC ; <http://www.shigen.nig.ac.jp/E.coli/pec/index.jsp>) から得た。また、*E.coli* K12 株 MG1655 の4294 個の遺伝子でのコドン使用頻度を計算した。45 種の tRNA に対する発現量のデータは、tRNA 配列をプローブとして用いたマイクロアレイデータを Gene Expression Omnibus (GEO; Platform GPL1746 ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>) から得た (Dittmar *et al.*, 2004)。同じプローブを用い、かつ、同じ条件でデータをとっているものに関してはそれらの平均値を発現量のデータとした。また、86 個の tRNA 全ての発現量のデータや、tRNA とオペロンを組んでいる rRNA や CDS の発現量のデータは、長さ 50mer で計 382177 領域についてデザインされているプローブを用いた Tiling array のデータを GEO (Platform GPL4458) から得た。プロモータ予測は、 $\sigma 70$ の重み行列を用いた解析ツールである *pftools* (Bucher *et al.*, 1996) を用いて行った。また、ターミネータ予測は、2次構造予測ツールである *RNAmotif* (Macke *et al.*, 2001) を用いることによって ρ 因子非依存性ターミネータを予測した。

3. 結果

3.1 全 86 tRNA の網羅的発現解析

21 種のアミノ酸に対応する 86 個の tRNA 全てについてオリゴヌクレオチドをデザインし、Northern Blotting による発現解析を行った (図 1)。その結果、16 個の tRNA においては明確かつ特異的なバンドが観察され、28 個の tRNA においてはスメア又は弱い又は不明瞭なバンドが観察され、42 個の tRNA においてはバンドが観察されなかった。Northern Blotting に用いたオリゴヌクレオチドは Supplementary Table S2 にまとめた。



86 個の tRNA それぞれに対して特異的なオリゴヌクレオチドをデザインしようと試みたが、tRNA 自身とその周辺配列は類似性が高いため、*gltW*, *gltV*, *gltU*, *gltT* では特異的なオリゴヌクレオチドをデザインすることができなかった。また、同様に *ileV*, *ileT*, *ileU* においてと、*alaV*, *alaT*, *alaU* においても特異的なオリゴヌクレオチドをデザインすることができなかった。その他の tRNA については、tRNA 内又はその周辺配列で特異的なオリゴヌクレオチドをデザインする事ができ、それぞれの tRNA に対して発現解析を行うことができた。Northern Blotting 解析において、同じオリゴヌクレオチドを用いても、洗浄の温度によってバンドパターンが異なる結果が観察された。

図 1：全 86 tRNA の網羅的発現解析

全 86 tRNA の antisense RNA に対する、Northern Blotting による網羅的発現解析の結果を、コードするアミノ酸ごとにまとめた。バンドパターンごとに色を区別し (上部：定常期, 下部：対数増殖期)、tRNA 遺伝子名とアンチコドンも示した。全くバンドが観察されなかったものは白色、スメア又は不明瞭又は弱いバンドが観察されたものは灰色、明確で特異的なバンドが観察されたものは濃い灰色で塗りつぶした。同じ tRNA に対して行った解析で、室温で洗浄した場合と、42°C で洗浄した場合で、バンドパターンが異なるものに関しては、不明瞭なバンドであるのみとした。また、それぞれの tRNA に対して、他のどの領域の 35bp をとっても全く同じ配列がないような特異的なオリゴヌクレオチドをデザインできたものを黒色の枠で、特異的なオリゴをデザインできなかったものは青色の枠で示した。

3.2 情報解析

tRNA の種類ごとに、Northern Blotting による発現解析と生育に必須な遺伝子であるか否か、コドン使用頻度、発現量のデータをそれぞれ統合し観察した (Supplementary Table S2). 生育に必須である tRNA か否かをデータベース PEC より得た. その結果, 86 個中 *argX*, *argU*, *cysT*, *glyT*, *hisR*, *leuU*, *leuW*, *leuZ*, *proM*, *serT*, *serV*, *thrU*, *trpT* の 13 個が生育に必須である遺伝子であった. そのうち Northern Blotting において明確なバンドが観察されたのは *leuW*, スメア又は弱い又は不明瞭なバンドが観察されたのは, *argX*, *argU*, *glyT*, *serV* であった. 次に, Northern Blotting によってバンドが観察されたもの 44 個と, 観察されなかったもの 42 個をそれぞれグループに分け, x 軸にコドン使用頻度, y 軸に発現量を取り, 生育に必須の遺伝子には * 印をつけることによって, antisense RNA の有無とコドン使用頻度, 発現量にどのような関係が存在するのか観察した (図 2). その結果, antisense RNA の有無とコドン使用頻度の高低で分布の偏りは観察されなかった. また, antisense RNA の有無と発現量の高低で分布の偏りは観察されなかった. さらに, コドン使用頻度と発現量の分布に相関は観察されなかった. 一方で, 生育に必須である遺伝子はコドン使用頻度が低い傾向が観察された.

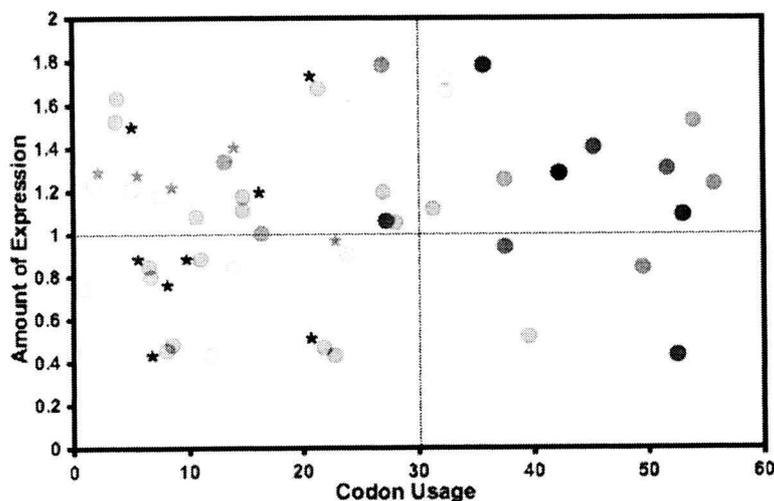


図 2 : antisense RNA の有無とコドン使用頻度と発現量の関係性

Northern Blotting によってバンドが観察されたものは赤い○で, 観察されなかったものに関しては黒い○で示している. 色が濃くなっている程, 同じ位置に重なって遺伝子が分布していることを示す. 生育に必須の遺伝子には * をつけている. x 軸はコドン使用頻度 (% ; 千分率), y 軸は発現量である.

3.3 オペロン解析

Northern Blotting による発現解析の結果をオペロンごとにまとめた (Supplementary Table S3). その結果, antisense RNA の Northern Blotting のバンドパターンは全体の傾向として, 200bp~400bp の長さの antisense RNA の存在が示唆されたため tRNA のオペロンに注目した. その結果, オペロンを組んでいる tRNA 遺伝子の antisense 側において, 明確かつ特異的なバンドであり, さらにバンドパターンが類似している *valV-valW* オペロンが観察された.

valV と *valW* は 2 つの遺伝子でオペロンを組んでおり, $\sigma 70$ プロモータである *valVp* によって転写が開始され, ρ 因子依存性ターミネータによって転写が終結することが知られている (図 3-A). 一次転写物は約 400bp であることが知られているが, ρ 因子依存性ターミネータであるため, 明確な転写終結位置は知られていない.

valV と *valW* の遺伝子が存在する sense 側と, antisense 側の両方について Northern Blotting を行った. その結果, sense 側では図 3-C の a) と b) のようにバンドが観察された. a), b) 共に 100bp 付近からスメアバンドが観察され, 77bp に成熟 tRNA が観察された. また, 約 60, 50, 20bp 付近にもそれぞれバンドが観察された. ここで, b) よりも a) の方が成熟 tRNA のバンドは濃く, b) では, 約 60, 50, 20bp 付近のバンドが濃く観察された. また, antisense 側では図 3-B に示したオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いた. 図 3-B の上段が c) anti_ *valV* のオリゴヌクレオチドであり, 下段が d) anti_ *valW* のオリゴヌクレオチドである. これらのオリゴヌクレオチドは, 赤い箱で示した 2 塩基の違いが存在する. Northern Blotting の結果, 図 3-C の c) と d) のようにバンドが観察され, c) と d) ではバンドパターンが一致した. また, 図 3-D は, antisense 側の 200~500bp 付近を引き延ばして Northern Blotting を行った結果である. 図 3-D で c) と d) の同じオリゴヌクレオチドを用いたところ, 図 3-C の c) と d) とバンドパターンが一致したため, 再現性がとれていることが確認された. 野生株の対数増殖期 (E) と定常期 (S) ではバンドパターンが異なり, E では 300bp に濃いバンドが観察されるのに対して, S では 500bp 付近に薄いスメアが, また 300bp に E より薄いバンドが, さらに 275bp 付近にバンドが観察された. また, 野生株と RNase III 変異株を比較すると, E では RNase III 変異株でのみ 500bp 付近にスメアが観察された. S では, 野生株では 275bp 付近に明確なバンドが観察されたが, RNase III 変異株では観察されなかった.

一方で, *valV* と *valW* の antisense 側でプロモータとターミネータを探索した. その結果, *pftool* によって, スコアが 46.72 である $\sigma 70$ プロモータ配列 1 と, スコアが 46.13 である $\sigma 70$ プロモータ配列 2 が同定された. しかしながら, *RNAmotif* によってターミネータ配列は同定することができなかった (図 3-A ; 図 4).

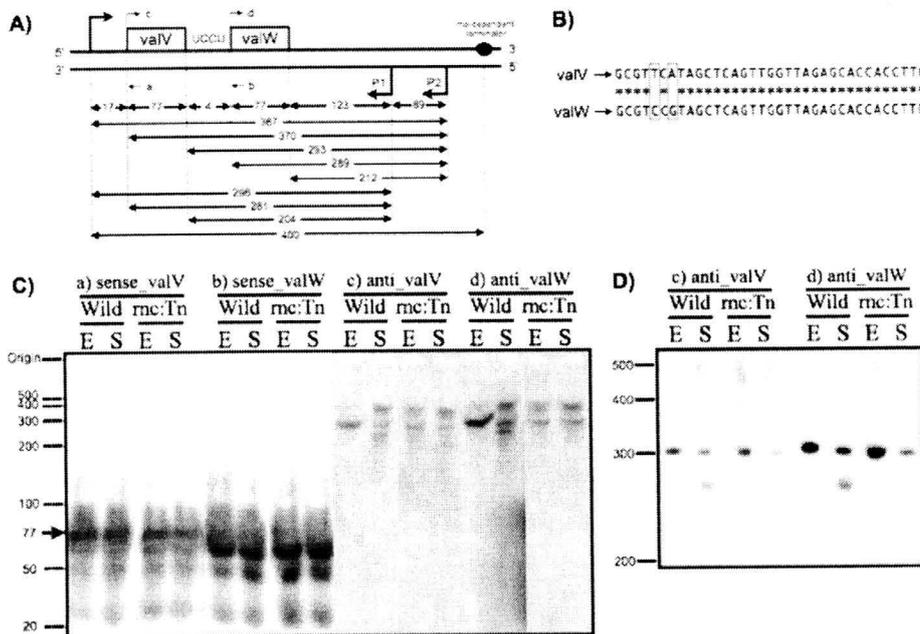


図 3: valV-valW オペロンの Northern Blotting 解析

valV-valW オペロンに対して Northern Blotting による発現解析を行った結果. A) valV-valW オペロンの様子と, Northern Blotting 解析に用いたオリゴヌクレオチドの位置を→で示している(a: sense_valV, b: sense_valW, c: anti_valV, d: anti_valW). プロモータは矢印で, ターミネータは●で示している. 下段には, 考えられる antisense RNA のバンドパターンの長さを示している(nt). B) オリゴヌクレオチド c と d の相同性を示している. 上段が c: anti_valV, 下段が d: anti_valW である. 同じ塩基の場合は*で, 異なる場合には空白で示している. さらに, 異なる塩基の場合は赤い箱で囲まれている. C) Northern Blotting による発現解析の結果. Origin はコームの位置を, y 軸はバンドの長さを示している (bp). これらの Northern Blotting は 42°C で洗浄したものである. E は対数増殖期, S は定常期を示している. Wild は野生株, mc:Tn は RNaseIII 変異株である. 洗浄は 42°C で行った. D) Northern Blotting において長い RNA が観察できるように, 8M Urea 6% polyacrylamide gel で電気泳動を行う際に通常は 55 分のところ, 200 分電気泳動したものを用いた. 洗浄は 42°C で行った.

```

+1      valV
sense → 5'gtgcacct acnacgttggtttccatagctt caattgattt gagcaccacc ttacatgggt
antisense → caacagtgga tgttgcaacg caagtatcga gtcaaccaat ctctggttgg aactgtacca

valW
caaacatcatt gattcagctc caattgcaag caactcctt gttccatagt taatttgggt
ccccagcaaa caagctcag gttacattgc gtgttggac gcaggcatcg agtroccaa

agagaccacc ctgcaatag tgggcatca ttgltcaagt caactcgaac gtaacagatt
tctctggttg gaactgtacc accccagcc accaagctca ggtgagcctg cgtgttctaa

ttcttaotct ggtctttccc tttttccctc tgtttctct ctgtatccaa taagttaaa
aagaattaga ccagaagagg aaaaaggagg acaagaagga gacataggtt atgcaattt

gatttacact gttctctgat gcgttatcag aaggagaatc gctatggcaa cttgtttaca
ctaatgtga ccagaacata cgaatagtc ttcctcttag cgaatccgtt gaacaaatgt
anti_promoter1

acttcatttt gcttttaatg gccctattgg cgaacaaatg gctgagcagc ttanaccact
tgaagttaaa cgaacattac cgggtaaac gctgctttac cgaactctag caatttggta
anti_promoter2

tgctgagtcg attaatcagg aacttggttt tctgtgaaag gtatggcaag aagtgaaaa
aggaactcag taattagctc ttggaacaaa agacaccttc catactctgc tttcaatttt

```

図 4: valV-valW オペロンの配列

valV と valW のオペロンの配列. 上段が sense 鎖, 下段が antisense 鎖である. +1 は転写開始点である. 赤い文字で示しているのが, それぞれ valV と valW 遺伝子. 青い文字で示しているのが, pfool によって予測同定された antisense RNA のプロモータ配列である.

4. 考察

4.1 全 86 tRNA の網羅的発現解析

21 種のアミノ酸に対応する全 86 個の tRNA 全てについてオリゴヌクレオチドをデザインし、Northern Blotting による発現解析を行った結果、16 個の tRNA においては明確かつ特異的なバンドが観察され、28 個の tRNA においてはスメア又は弱い又は不明瞭なバンドが観察され、42 個の tRNA においてはバンドが観察されなかった。以上より、*E.coli* K12 株においては 86 個中 44 個の tRNA に antisense RNA が存在することが示唆された。16 個の明確かつ特異的なバンドが観察されたものについては、42°Cでの洗浄などで再現性を取り直し、さらには 5'-RACE を行って antisense RNA の位置同定を行いたいと考えている。28 個のスメア又は弱い又は不明瞭なバンドが観察された tRNA については、42°Cで洗浄する、再現性をとるなどの必要がある。また、特異的なオリゴヌクレオチドがデザインできなかった 10 個については全て rRNA とオペロンを組んでおり、rRNA とその周辺配列の類似性も高い事より、antisense RNA が存在していると仮定した場合、trans 型の antisense RNA の存在が示唆される。

4.2 情報解析

Northern Blotting による antisense RNA の有無に、生育に必須の遺伝子であるか否か、コドン使用頻度、発現量のデータを付加する事で、antisense RNA の有無にどのような傾向が存在するのか観察したが、特に傾向は観察されなかった。ここで、生育に必須の遺伝子はコドン使用頻度が低いという傾向が観察されたが、これは、生育に必須であるか否かを判定するときの "tRNA をコードする遺伝子が 1 つである場合必須遺伝子とする" という条件が影響を与えていることが示唆される。以上より、tRNA に antisense RNA が存在し、さらに antisense RNA に機能があると仮定すると、tRNA 全体に対して同じ機能を持っているというわけではなく、個々に働きが異なることが示唆される。

4.3 valV-valW オペロン

valV-valW オペロンの antisense 鎖について、Northern Blotting による発現解析を行ったところ、対数増殖期で 300bp のバンドが、定常期では 500bp 付近にスメアと 300bp、275bp 付近にバンドが観察された。図 3-C と図 3-D から、異なるフィルターを用いた Northern Blotting で antisense 鎖において同一のバンドパターンが観察された事から再現性が確認された。以上より、valV-valW オペロンに antisense RNA が存在することが示唆された。また、*pftool* によって、2つのプロモータが予測された。このプロモータと、Northern Blotting で観察されたバンドの長さから、antisense RNA の位置は図 5 に示したような 2 通りが仮定される。

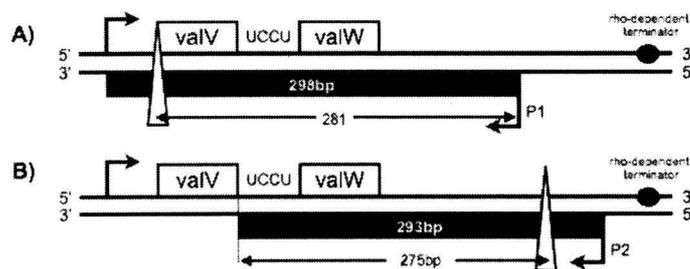


図 5 : antisense RNA の位置予測

pftool によって予測されたプロモータの位置と、Northern Blotting によって観察されたバンドの長さから予測された、2通りの antisense RNA が存在すると考えられる位置を示した。A) 予測されたプロモータ 1 (P1) から転写が始まると仮定した時、P1 から sense 鎖のプロモータまでの長さが 298bp である。黒い四角が antisense RNA が存在すると予想された位置を示している。また、三角は RNase III を示しており、P1 から、sense 鎖の *valV* の 5'末端までの長さが 281bp である。この位置で RNase III によって切断されることにより、281bp のバンドが観察されると予想される。B) 予測されたプロモータ 2 (P2) から転写が始まると仮定した時、P2 から、sense 側の *valV* の 3'末端までの長さが 293bp である。黒い四角が antisense RNA が存在すると予想された位置を示している。また、Northern Blotting より、RNase III で切断された 275bp の断片が観察されているため、三角で示した位置で RNase III によって切断がされていることが予想される。

プロモータ 1 (P1) から転写が開始されると仮定した時、図 5-A の黒い箱で示したような antisense RNA の存在が示唆される。また、プロモータ 2 (P2) から転写が開始されると仮定した時には、図 5-B の黒い箱で示したような antisense RNA の存在が示唆される。また、RNase III 変異株と野生株でバンドパターンを比較した時、野生株の S では観察された約 275bp のバンドが、変異株では観察されない事から、野生株では 300bp のバンドが RNase III によって切断されることによって 275bp のバンドが観察されるが、変異株ではその切断が起こらないために観察されないことが示唆される。観察されたバンドパターンから、RNase III 変異株による切断は図 5 の三角で示した位置で起こることが予想される。

ここで、*valV* と *valW* は、アンチコドン 5'-GAC-3'を有しており、このコドンを認識することが可能な tRNA はこの 2つだけであるため、どちらか一方が機能する事が可能であればどちらか一方は生育に必須ではないが、どちらも欠失してしまうと生物は生存することができないと考えられる。よって、図 5-A のように antisense RNA が存在した場合には、sense 鎖遺伝子と 2 本鎖を組む事で、遺伝子を抑制してしまっている生物に致命的であるため、tRNA 遺伝子の成熟のためのプロセッシングを活性化している又は sense 鎖遺伝子の分解を保護しているなどの機能が予想される。また、図 5-B では、*valW* にのみ antisense RNA が結合し 2 本鎖を形成することが考えられることより、*valW* の抑制という機能が予想される。ここで、図 5-B のように antisense RNA が存在していた時に、図 3 で用いた c) anti_ *valV* のオリゴヌクレオチドを用いた Northern Blotting でもバンドが観察されるということに矛盾が生じるが、これは、図 3-B で示したように、c) と d) のオリゴヌクレオチドには 2 塩基の違いしかないために、c) anti_ *valV* は d) anti_ *valW* よりも sense 鎖遺伝子と二本鎖を形成しにくい

がハイブリダイズしてしまっていることが考えられる。実際に、図 3-C, D どちらにおいても、c) の方が d) よりもバンドが薄く観察されている。今後は、現在 Northern Blotting では洗浄を 42℃で行っているが、洗浄の温度を上げていくことでハイブリダイズの条件をしぼっていく必要がある。さらに、図 3-C, D より、antisense RNA のバンドパターンが対数増殖期と定常期で異なっていた。これは、antisense RNA が対数増殖期と定常期で発現パターンを変化させることによって、sense 鎖の遺伝子の発現量を調節していることが示唆される。この事は、対数増殖期と定常期で生物が必要とする蛋白質質量も異なることから示唆される。現在は、S と E の 2 地点でのみ観察をしているが、OD₆₀₀ を細かくとる事で、どの地点でバンドパターンが変化するのかを観察したいと考えている。

一方で、sense 鎖遺伝子のバンドパターンに注目すると、*valV* では 77bp に成熟 tRNA が観察されるが、*valW* では成熟 tRNA よりも短い約 60, 50, 20bp のバンドが観察される事より、*valW* 遺伝子が antisense RNA によって抑制されていることが示唆される。実際に、*valV* と *valW* 遺伝子の発現量を比較すると、*valV* の発現量が 9796.48 であるのに対して、*valW* の発現量は 9037.32 と低かった (Supplementary Table S3 参照)。以上より、本研究では図 5-A のような sense 鎖遺伝子を活性化又は保護するような antisense RNA ではなく、図 5-B のように *valW* にのみかぶさるような antisense RNA が発現しており、*valW* と 2 本鎖を形成することによって、*valW* 遺伝子の発現量を抑制していることが示唆された。*valW* の発現量を調節することによって生物に不利な状態に陥る事なく、結果的には tRNA^{val2} の量を調整することができるのではないかと考えられる。

今後の展望としては、5'-RACE 法により antisense RNA の 5'末端を同定し、プロモータの位置を同定したいと考えている。antisense RNA の位置が明確になったら、antisense RNA を過剰発現、またはノックダウンさせることによる、*valV* と *valW* 遺伝子への影響を観察することによる機能解析を行いたいと考えている。antisense RNA の過剰発現では、発現誘導剤の量を調節する事で発現誘導し、sense 鎖遺伝子への影響を観察したいと考えている。

4.4 結論

E.coli K12 株では全 86 個中 44 個の tRNA において antisense RNA が存在し、これらの antisense RNA の有無と、必須遺伝子か否か、コドン使用頻度の高低、発現量の高低に強い関係が観察されない事から、antisense RNA は個々に役割が異なっていることが示唆された。また、*valV*-*valW* オペロンにおいては 300bp の antisense RNA が存在し、*valW* の発現量を抑制、調節することで、生物に不利な状態に陥る事なく tRNA^{val2} の量を調整していることが示唆された。

謝辞

本研究は慶應義塾大学環境情報学部の金井昭夫教授，平野麗子技術員との共同研究である。金井教授，平野技術員には実験を始めとし，研究に関して細部にわたるご指導をいただいた。また富田勝教授には研究を行う機会と環境をいただいた。以上の方々にこの場を借りて深くお礼申し上げたい。

参考文献

- Afonyushkin, T., Vecerek, B., Moll, I., Blasi, U. and Kaberdin, VR. (2005) Both RNase E and RNase III control the stability of sodB mRNA upon translational inhibition by the small regulatory RNA RyhB. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 1678-89.
- Altschul, SF., Gish, W., Miller, W., Myers, EW. and Lipman, DJ. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, **215**, 403-10.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, KA., Tomita, M., Wanner, BL. and Mori, H. (2006) Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.*, **2**, 2006.0008
- Blattner, FR., Plunkett G., Bloch, CA., Perna, NT., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, JD., Rode, CK., Mayhew, GF. *et al.* (1997) The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science.*, **277**, 1453-74.
- Bucher, P., Karplus, K., Moeri, N. and Hofmann, K. (1996) A flexible motif search technique based on generalized profiles. *Comput Chem.*, **20**, 3-23.
- Chen, S., Lesnik, EA., Hall, TA., Sampath, R., Griffey, RH., Ecker, DJ. and Blyn, LB. (2002) A bioinformatics based approach to discover small RNA genes in the Escherichia coli genome. *Biosystems.*, **65**, 157-77.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, TJ., Higgins, DG. and Thompson, JD. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3497-500.
- Dittmar, KA., Mobley, EM., Radek, AJ. and Pan, T. (2004) Exploring the regulation of tRNA distribution on the genomic scale. *J Mol Biol.*, **337**, 31-47.
- Eddy, SR. (2001) Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet*, **2**, 919-29.
- Frank, J., Sengupta, J., Gao, H., Li, W., Valle, M., Zavialov, A. and Ehrenberg, M. (2005) The role of tRNA as a molecular spring in decoding, accommodation, and peptidyl transfer. *FEBS Lett.*, **579**, 959-62.

- Gottesman, S. (2005) Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet.*, **21**, 399-404.
- Lamond, AI. and Travers, AA. (1985) Stringent control of bacterial transcription. *Cell.*, **41**, 6-8.
- Li, Z. and Deutscher, MP. (2002) RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *RNA.*, **8**, 97-109.
- Macke, TJ., Ecker, DJ., Gutell, RR., Gautheret, D., Case, DA. and Sampath, R. (2001) RNAMotif, an RNA secondary structure definition and search algorithm. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4724-35.
- Masse, E., Escorcia, FE. and Gottesman, S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, **17**, 2374-83.
- Mohanty, BK. and Kushner, SR. (2007) Ribonuclease P processes polycistronic tRNA transcripts in *Escherichia coli* independent of ribonuclease E. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 7614-25.
- Mohanty, BK. and Kushner, SR. (2007) Rho-independent transcription terminators inhibit RNase P processing of the secG leuU and metT tRNA polycistronic transcripts in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*
- Portier, C., Dondon, L., Grunberg-Manago, M. and Regnier, P. (1987) The first step in the functional inactivation of the *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase messenger is a ribonuclease III processing at the 5' end. *EMBO J.*, **6**, 2165-70.
- Rivas, E., Klein, RJ., Jones, TA. and Eddy, SR. (2001) Computational identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics. *Curr Biol*, **11**, 1369-73.
- Robertson, HD. and Dunn, JJ. (1975) Ribonucleic acid processing activity of *Escherichia coli* ribonuclease III. *J Biol Chem*, **250**, 3050-6.
- Storz, G., Altuvia, S. and Wassarman, KM. (2005) An abundance of RNA regulators. *Annu Rev Biochem*, **74**, 199-217.
- Tjaden, B., Saxena, RM., Stolyar, S., Haynor, DR., Kolker, E. and Rosenow, C. (2002) Transcriptome analysis of *Escherichia coli* using high-density oligonucleotide probe arrays. *Nucleic Acids Res*, **30**, 3732-8.
- Vogel, J., Bartels, V., Tang, TH., Churakov, G., Slagter-Jager, JG., Huttenhofer, A. and Wagner, EG. (2003) RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic Acids Res*, **31**, 6435-43.
- Vogel, J. and Sharma, CM. (2005) How to find small non-coding RNAs in bacteria. *Biol Chem*, **386**, 1219-38.
- Wassarman, KM., Repoila, F., Rosenow, C., Storz, G. and Gottesman, S. (2001) Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev*, **15**, 1637-51.

Withers, M., Wernisch, L. and dos Reis, M. (2006) Archaeology and evolution of transfer RNA genes in the Escherichia coli genome. *RNA*, **12**, 933-42.

Supplementary Table S1

Northern Blotting 解析に用いるためにデザインした全オリゴヌクレオチド配列.

ID	Gene	Target	Oligo Name	Position		Oligo sequence
				Left	Right	
74	lysY	antisense RNA	a_lysY	779777	-> 35 779811	gggtcgttagctcagttggtagagcagttgacttt
84	lysY	tRNA	lysY-1	779777	<- 35 779811	aaagtcactgctctaccaactgagctaacgaccc
93	lysY	tRNA	lysY-2	779797	<- 35 779831	aacctgcgaccaattgataaaagtcaactgctct
144	lysY	antisense RNA	a_lysY-1	779799	-> 35 779833	agcagttgacttttaactcaattggtcgaggttcg
145	lysY	antisense RNA	a_lysY-2	780188	-> 35 780222	tcagcaacggcccgtaggcgagcaagcgagtc
146	lysY	antisense RNA	a_lysY-3	780587	-> 35 780621	cgtatgggtcgttagctcagttggtagagcagttg
147	lysY	antisense RNA	a_lysY-4	780687	-> 35 780721	tagagacgtgaaggataacgttcgcttagcaacg
152	tRNA lys	antisense RNA	a_full_lysY	779777	-> 76 781051	gggtcgttagctcagttggtagagcagttgacttttaact aattggtcaggttcgaatcctgcacgaccacca
153	lysT	antisense RNA	a_lysT	779853	-> 35 779887	atcgcctaagtggaagcggtagtaaaaactggaag
154	lysW	antisense RNA	a_lysW	780242	-> 35 780276	aatgacggtaggttcagtggaagtagttgtagta
155	lysZ	antisense RNA	a_lysZ	780668	-> 35 780702	attdaaaggtggttactggtagagaaactggaagga
156	lysZ	antisense RNA	a_lysZ_2	780765	-> 35 780799	catctgaatgattaaagcagcataatcccgaacg
157	asnT,W,U,V	antisense RNA	a_asn_1	2042573	-> 35 2042607	tcctctgtagttcagtcagtagaacggcggactgt
158	glnX,V	antisense RNA	a_glnX,V	695693	<- 35 695727	tggggtatcgccaagcggtaagcaccggattctg
159	glnW,U	antisense RNA	a_glnW,U	696019	<- 35 696053	tggggtatcgccaagcggtaagcaccggatttttg
160	cysT	antisense RNA	a_cysT_1	1989977	<- 35 1990011	ggcgcgttaacaagcggttatgtagcggattgca
161	hisR	antisense RNA	a_hisR_1	3980532	-> 35 3980566	ggtggctatagctcagttggtagagccctggattg
162	trpT	antisense RNA	a_trpT_1	3944980	-> 35 3945014	agggcgtagttcaattggttagagcaccggtctcc
163	selC	antisense RNA	a_selC_1	3834245	<- 35 3834279	ggaagatcgtcgtctccggtgagcggctggactt
177	alaV,T,U	antisense RNA	a_alaV,T,U	225500	-> 35 225534	ggggctatagctcagctgggagagcctcgtcttg
178	alaX,W	antisense RNA	a_alaX,W	2516104	<- 35 2516138	ggggctatagctcagctgggagagcctcgtcatgg
179	aspU,V,T	antisense RNA	a_asp	228928	-> 35 228962	ggagcggtagttcagtcggttagaatacctgcctg
180	gltW,V,T,U	antisense RNA	a_glt	2727432	<- 35 2727466	gtccccttctctagagagccaggacacgcctct
181	pheV,U	antisense RNA	a_phe	3108388	-> 35 3108422	gcccggatagctcagtcggtagagcaggggattga
182	glyW,V,X,Y	antisense RNA	a_glyW,V,X,Y	1990107	<- 35 1990141	gcgggaatagctcagttggttagagcagacattgc
183	glyU	antisense RNA	a_glyU	2997045	<- 35 2997079	gcggcgtagttcaattggttagagcagggcttccc
184	glyT	antisense RNA	a_glyT	4173696	-> 35 4173730	gcgggcattcgtataatggctattacctagccttc
185	ileV,T,U	antisense RNA	a_ileV,T,U	225381	-> 35 225415	aggctttagctcagttggttagagcagccctcg
186	ileY	antisense RNA	a_ileY	2783825	<- 35 2783859	ggcccttagctcagttggttagagcagggcactca
187	ileX	antisense RNA	a_ileX	3213620	-> 35 3213654	ggcccttagctcagttggttagagcagggcactca
188	leuW	antisense RNA	a_leuW	696236	<- 35 696270	gcgggagtgccgaatggttagagcagcagatttt
189	leuZ	antisense RNA	a_leuZ	1989891	<- 35 1989925	gcccggatggtgaatcggtagacacaaaggattt
190	leuU	antisense RNA	a_leuU	3320146	<- 35 3320180	gccgaggtggtgaatggttagagcagcagctctg
191	leuT,V,P,Q	antisense RNA	a_leuT,V,P,Q	3980629	-> 35 3980663	gccgaagtgccgaatggttagagcagcagctctc
192	leuX	antisense RNA	a_leuX	4494428	-> 35 4494462	gccgaagtgccgaatcggtagagcagcagttgattc
193	metU,T	antisense RNA	a_metU,T	695929	<- 35 695963	ggctacgtagctcagttggttagagcacatcactc
194	metZ,W,V,Y	antisense RNA	a_metZ,W,V,Y	2945409	-> 35 2945443	cgccgggtggagcagcctggttagcctcgtcggctc
195	proL	antisense RNA	a_proL	2284233	-> 35 2284267	cgccacgtagcgcagcctggttagcgcacgctcatg
196	proM	antisense RNA	a_proM	3980758	-> 35 3980792	cgccgagtagcgcagcctggttagcgcacactggtt
197	proK	antisense RNA	a_proK	3706681	<- 35 3706715	cggtgattgcccagcctggttagcgcacttcgctt
198	argU	antisense RNA	a_argU	563946	-> 35 563980	gcgcccttagctcagttggttagagcaacgacctt
199	argW	antisense RNA	a_argW	2464331	-> 35 2464365	gtcctcttagttaattgatatataacgagccctcc
200	argQ,Z,Y,V	antisense RNA	a_argQ,Z,Y,V	2815848	<- 35 2815882	gcatcctagctcagctggatagagtagctcggcta
201	argX	antisense RNA	a_argX	3980398	-> 35 3980432	gcgcccttagctcagctggatagagcgtgcctcc
202	serW,X	antisense RNA	a_serW,X	925160	<- 35 925194	ggtgaggtgcccagtgctgaaggagcagccttg
203	serT	antisense RNA	a_serT	1030901	<- 35 1030935	ggaagtgtggccgagcgttgaaggcaccgctctt
204	serU	antisense RNA	a_serU	2041547	<- 35 2041581	ggagagatgccggagcggctgaacggaccggtctc
205	serV	antisense RNA	a_serV	2816633	<- 35 2816667	ggtgaggtggccgagcgtgaagcgcctccctc
206	thrW	antisense RNA	a_thrW	262095	-> 35 262129	gccgatatagctcagttggttagagcagcagcttcg
207	thrV	antisense RNA	a_thrV	3421643	<- 35 3421677	gctgatatagctcagttggttagagcagcagccttg
208	thrT	antisense RNA	a_thrT	4173777	-> 35 4173811	gctgatatagctcagttggttagagcagcagccttg
209	thrU	antisense RNA	a_thrU	4173411	-> 35 4173445	gccgacttagctcagttggttagagcagcagcttc
210	valT,Z,U,X,Y	antisense RNA	a_valT,Z,U,X,Y	779988	-> 35 780022	gggtgattagctcagctgggagagcactccctta

211	valV	antisense RNA	a_valV	1744459	-> 35	1744493	gcgttcatagctcagttggtttagagcaccaccttg
212	valW	antisense RNA	a_valW	1744540	-> 35	1744574	gcgtccgtagctcagttggtttagagcaccaccttg
213	tyrV,T,U	antisense RNA	a_tyrV,T,U	1286517	<- 35	1286551	ggtaggggttcccagcaggccaaggaggagcagactg
214	alaX	antisense RNA	a_alaX_1	2516139	<- 35	2516173	ttgaccaccagcaaaacttggtacgtaaacgcacatcgt
215	alaX	antisense RNA	a_alaX_2	2516028	<- 35	2516062	aaatttccaaacctcgtcgcaagcgggggtttttt
216	alaW	antisense RNA	a_alaW	2516254	<- 35	2516288	gatgccgccgtcaactcgacaagctttacgtgac
217	aspU	antisense RNA	a_aspU	229005	-> 35	229039	cttattaagaagcctcaggttaacgctcagggttt
218	aspV	antisense RNA	a_aspV	237008	-> 35	237042	ctattcactcatgaaatgagttcagagagccgca
219	aspT	antisense RNA	a_aspT	3944972	<- 35	3945006	ccctaattaggggctcagtttcaattggtagagcac
220	gltW	antisense RNA	a_gltW	2727327	<- 35	2727361	cctcaatatctcaaacagactgtaagtcttggt
221	gltT	antisense RNA	a_gltT	4166489	<- 35	4166523	aaagtcgccaccttaatatctcaaaactcatctt
222	pheV	antisense RNA	a_pheV	3108353	-> 35	3108387	cgagacgagcgaatcaggttaatgcgcccggt
223	pheU	antisense RNA	a_pheU	4360650	<- 35	4360684	cgagatgtgcagatcaggttaatgcgcccggt
224	glyW	antisense RNA	a_glyW	1990031	<- 35	1990065	gtttaaagacatcggcgtcaagcggatgctcggc
225	glyV	antisense RNA	a_glyV	4390348	-> 35	4390382	aatgcaaaattacgaagcaaaattaatgtagtac
226	glyX	antisense RNA	a_glyX_1	4390459	-> 35	4390493	aaatttgaaagtgtcgaagcagacagaccaca
227	glyX	antisense RNA	a_glyX_2	4390571	-> 35	4390605	aaatttgaaagtgtcgaagcagacagaccaca
228	glyY	antisense RNA	a_glyY	4390682	-> 35	4390716	aaatttctctcaataaaatccacagcagcggc
229	leuT	antisense RNA	a_leuT	3980594	-> 35	3980628	ccattagccacccttattagaagttgtgacaat
230	leuV	antisense RNA	a_leuV_1	4604067	<- 35	4604101	attatcttacttcttcttcttcttcttcttcttct
231	leuV	antisense RNA	a_leuV_2	4604189	<- 35	4604223	aaacgagcgcgatcaaaaagtaagatcagctgt
232	leuP	antisense RNA	a_leuP	4604310	<- 35	4604344	cgaccacaaaccacgttgatattgctcgcactgg
234	leuQ	antisense RNA	a_leuQ	4604425	<- 35	4604459	ccgtgtagcaattcttttaagaattgagtgat
235	metU	antisense RNA	a_metU_1	695852	<- 35	695886	aatcttgaatgatcgaatgatgtcggcaattca
236	metU	antisense RNA	a_metU_2	695964	<- 35	695998	gaatccaggtaccaccagccatcgaagaacaactct
237	metT	antisense RNA	a_metT_1	696245	<- 35	696279	tcttttttgcgggagtgccgaattggtagacgc
238	metT	antisense RNA	a_metT_2	696357	<- 35	696391	ccgcaacgcgataaggtatcgcgaaaaaaagat
239	metZ	antisense RNA	a_metZ	2945374	-> 35	2945408	gaaacgcgagcggatgatagtcgcacccagga
240	metW	antisense RNA	a_metW	2945486	-> 35	2945520	attaaaatttgatgaagtaagcagatcggtagcgc
241	metV	antisense RNA	a_metV	2945706	-> 35	2945740	attattgaacacctaacgggtgttttttgtttc
242	metY	antisense RNA	a_metY	3316312	<- 35	3316346	ttaccacaaacgagtagaatttgccacgttccagc
243	glnX	antisense RNA	a_glnX_1	695618	<- 35	695652	cattaaaaagctcgttcggcggagcttttgcctt
244	glnX	antisense RNA	a_glnX_2	695728	<- 35	695762	ttattcaagcagatcacttgaattgacccagct
245	glnV	antisense RNA	a_glnV	695840	<- 35	695874	atcgaatattgtcggcaaatccaaaccaatttgt
246	glnW	antisense RNA	a_glnW_1	695944	<- 35	695978	tcgaagaacaactcggctacgtagctcagttggt
247	glnW	antisense RNA	a_glnW_2	696054	<- 35	696088	atcttcttcgagtaagcggttaccgcccggttat
248	glnU	antisense RNA	a_glnU	696163	<- 35	696197	cctcccgcaccattcaccgaagaagcgtttacgga
249	argQ	antisense RNA	a_argQ	2815883	<- 35	2815917	gtatcaatcagcagtagaataagttttcccgat
250	argZ	antisense RNA	a_argZ	2816158	<- 35	2816192	ggtagcaatcagcagtaaaataaatttcccgat
251	argY	antisense RNA	a_argY	2816297	<- 35	2816331	tatcaaaaactcgcagtaagtaagtttcccgat
252	argV	antisense RNA	a_argV	2816572	<- 35	2816606	catccggggttcgaaatccccgcctaccgccattt
253	serW	antisense RNA	a_serW	925195	<- 35	925229	gttgccaccatgaggtttgtagcaaaaacttt
254	serX	antisense RNA	a_serX	1096876	<- 35	1096910	tagcgccttccagcaagacaggaacgacaattt
255	valT	antisense RNA	a_valT	779953	-> 35	779987	ctaactagttagttgtagtatccagcgtagatc
256	valZ	antisense RNA	a_valZ	780256	-> 35	780290	cggtggaagttagttgtagtatccagcagatc
257	valU	antisense RNA	a_valU	2518918	-> 35	2518952	ttgaactctccctataatgcgactccacacagcgg
258	valX	antisense RNA	a_valX	2519038	-> 35	2519072	tgtagctccgcgctgtagcaagaattggagaagt
259	valY	antisense RNA	a_valY	2519160	-> 35	2519194	gctaaatttctgtgaaagtgtgaagtaccgaagt
260	tyrV	antisense RNA	a_tyrV	1286552	<- 35	1286586	atctcaagcattaccctcaaaattgtaattaccct
261	tyrT	antisense RNA	a_tyrT	1286846	<- 35	1286880	ataaggagcaggcagtaaaaagcattaccctgt
262	tyrU	antisense RNA	a_tyrU	4173460	-> 35	4173494	ccagttcgattccgtagtcggcaccatcaagctcc
263	asnT	antisense RNA	a_asnT	2042538	-> 35	2042572	gtaccgtaagtaattaccgcccgttcacacgct
264	asnW	antisense RNA	a_asnW	2056127	<- 35	2056161	gtgggcatcgtaattaccgcccgttctcagcat
265	asnU	antisense RNA	a_asnU	2057840	-> 35	2057874	gatttttccggttaagatgctcctcaacaacgat
266	asnV	antisense RNA	a_asnV	2060249	-> 35	2060283	tgactgccattaatcagcccgttccacacgat
267	alaV,T,U	tRNA	alaV,T,U	225500	<- 35	225534	caagcaggcgcctcccagctgagctatagcccc
268	alaX,W	tRNA	alaX,W	2516104	-> 35	2516138	ccatgcaagcgcctcccagctgagctatagcccc
269	glyW,V,X,Y	tRNA	glyW,V,X,Y	1990107	-> 35	1990141	gcaaggtcgtccttaccactgagctattccgc
270	ileX	tRNA	ileX	3213620	<- 35	3213654	tgagtcgctgctcctcaaacctgagctaaaggcgc
271	leuW	tRNA	leuW	696236	-> 35	696270	aaatcggcgtctaccaatttcgccactccgc
272	leuT,V,P,Q	tRNA	leuT,V,P,Q	3980629	<- 35	3980663	gaagctagcgcgtctaccaatttcgccactccgc
273	metU,T	tRNA	metU,T	695929	-> 35	695963	gagtagtgcctcaaacactgagctacgtagcc
274	metZ,W,V,Y	tRNA	metZ,W,V,Y	2945409	<- 35	2945443	gagcccagcagctaccaggtcctccaccgcg
275	proL	tRNA	proL	2284233	<- 35	2284267	catgacggtgcctaccaggtcgcctacgtcggc

276	proK	tRNA	proK	3706681	-> 35	3706715	gaacgaagtgcctaccaggctgcgccaatcacg
277	glnX,V	tRNA	glnX,V	695693	-> 35	695727	cagaatcgggtgccttaccgcttggcgatacccca
278	glnW,U	tRNA	glnW,U	696019	-> 35	696053	caaaaaccgggtgccttaccgcttggcgatacccca
279	argW	tRNA	argW	2464331	<- 35	2464365	ggaggggctcgttatatccatttaactaagaggac
280	argQ,Z,Y,V	tRNA	argQ,Z,Y,V	2815848	-> 35	2815882	tagccgagtactctatccagctgagctacggatgc
281	argX	tRNA	argX	3980398	<- 35	3980432	gagggcagcgtctatccagctgagctacggcgc
282	serU	tRNA	serU	2041547	-> 35	2041581	gagaccgggtccgcttccagcgcctccggcatctctcc
283	serV	tRNA	serV	2816633	-> 35	2816667	caggggagcgccttccagcctctcgccacctacc
284	thrW	tRNA	thrW	262095	<- 35	262129	cgatgcgctgctctaccaactgagctatatcggc
285	thrV	tRNA	thrV	3421643	-> 35	3421677	ccaaggggtgcgctctaccaactgagccatatcagc
286	thrT	tRNA	thrT	4173777	<- 35	4173811	ccaaggggtgcgctctaccaactgagctatatcagc
287	valV	tRNA	valV	1744459	<- 35	1744493	caagtggtgctctaaccaactgagctatgaacgc
288	valW	tRNA	valW	1744540	<- 35	1744574	caagtggtgctctaaccaactgagctacggacgc
289	glt	tRNA	glt	2727432	-> 35	2727466	aagggcgggtcctggcctctagacgaaggggac
290	selC	tRNA	selC	3834245	<- 35	3834279	aagtcagcgcctcaccggagacgacgatcttcc
291	rrs	antisense RNA	a_rrs	223771	-> 35	223805	aaattgaagagtttgatcatggctcagattgaacg
292	rrl	antisense RNA	a_rrl	225759	-> 35	225793	ggttaagcagctaagcgtacacggtaggacccctg
293	rrf	antisense RNA	a_rrf	228756	-> 35	228790	tgcttggcggcctgagcgcgggtggtccacctgac
294	yhbC	antisense RNA	a_yhbC_1	3315576	<- 35	3315610	atatccagaaggcgaacctggttccccacttttaa
295	nusA	antisense RNA	a_nusA_1	3314061	<- 35	3314095	ccgtaatatgtgctggttcggtgacgaagcgtaa
296	infB	antisense RNA	a_infB_1	3311364	<- 35	3311398	tcgaaatcatcgagatccaactgaccattgcttaa
297	rbfA	antisense RNA	a_rbfA_1	3310799	<- 35	3310833	gtcgtgtaaccggacgacagcaagggaggactaa
298	truB	antisense RNA	a_truB_1	3309855	<- 35	3309889	cgctcgtcgcctggtggttgaatacccgcgctaa
299	rpsO	antisense RNA	a_rpsO_1	3309437	<- 35	3309471	cccagctcatcgagcgcctgggtctgctcgctaa
300	pnp	antisense RNA	a_pnp_1	3307055	<- 35	3307089	caccggaagctccgctgctgaacagggcgagtaa
312	ileV,T,U	tRNA	ileV,T,U	225381	<- 35	225415	caggaatgcctctaaccacctgaactacaagcct

Supplementary Table S2

Biocomputational 解析と Northern Blotting による発現解析の結果を統合した。

Species	Gene	Anticodon	Classification	Codon Usage	tRNA array	Log	Stat	42°C
Sel-Cys	selC	UCA	nonessential	0.002	0.443	163 ++	163 ++	163 ++
Cys	cysT	GCA	essential	11.168	0.881	160 --	160 --	
Trp	trpT	CCA	essential	14.758	1.173	162 --	162 --	
His	hisR	GUG	essential	21.901	0.461	161 --	161 --	
Phe	pheV	GAA	nonessential	37.577	1.251	222 -	222 -	
	pheU		nonessential			223 +	223 +	
Tyr1	tyrV	GUA	nonessential	27.319	1.057	260 -	260 -	
	tyrT		nonessential			261 -	261 -	
Tyr2	tyrU		nonessential			262 -	262 -	
Pro1	proK	CGG	nonessential	22.751	0.427	197 -	197 -	
Pro2	proL	GGG	nonessential	11.968	0.426	195 +	195 +	
Pro3	proM	UGG	essential	8.134	0.448	196 --	196 --	
Asp	aspT	GUC	nonessential	49.586	0.838	219 -	219 -	
	aspU		nonessential			217 --	217 ++	
	aspV		nonessential			218 ++	218 ++	
Asn	asnT	GUU	nonessential	37.658	0.938	263 --	263 --	
	asnU		nonessential			265 --	265 --	
	asnW		nonessential			264 ++	264 ++	
	asnV		nonessential			266 +	266 +	
Glu2	gluW	UUC	nonessential	55.777	1.229	180 +	180 +	180 +
	gluV		nonessential			180 +	180 +	180 +
	gluU		nonessential			180 +	180 +	180 +
	gluT		nonessential			180 +	180 +	180 +
Thr1	thrV	GGU	nonessential	31.333	1.116	207 ++	207 ++	
Thr3	thrT		nonessential			208 ++	208 ++	
Thr2	thrW	CGU	nonessential	13.985	0.837	206 +	206 +	
Thr4	thrU	UGU	essential	6.618	0.843	209 --	209 --	
Gln1	glnW	UUG	nonessential	14.854	1.108	246/247 ++	246/247 ++	159 ++
	glnU		nonessential			248 +	248 +	159 ++
Gln2	glnX	CUG	nonessential	28.065	1.048	243/244 --	243/244 --	158 ++
	glnV		nonessential			245 --	245 --	158 ++
Ser1	serT	UGA	essential	8.739	0.79	203 --	203 --	
Ser2	serU	CGA	nonessential	8.651	0.48	204 --	204 --	
Ser3	serV	GCU	essential	23.877	0.898	205 +	205 +	
Ser5	serX	GGA	nonessential	16.429	1.001	254 ++	254 ++	
	serW		nonessential			253 --	253 --	
Ile1	ileV	GAU	nonessential	54.058	1.524	185 ++	185 ++	185 --
	ileT		nonessential			185 ++	185 ++	185 --
	ileU		nonessential			185 ++	185 ++	185 --
Ile2	ileX	CAU	nonessential	3.939	1.628	187 +	187 +	187 -
	ileY		nonessential			186 +	186 +	
Ala1B	alaV	UGC	nonessential	52.528	0.432	177 -	177 -	177 -
	alaT		nonessential			177 -	177 -	177 -
	alaU		nonessential			177 -	177 -	177 -
Ala2	alaX	GGC	nonessential	39.632	0.517	215 ++	215 ++	
	alaW		nonessential			216 +	216 +	
Metm	metT	CAU	nonessential	26.972	1.194	237/238 ++	237/238 ++	193 ++
	metU		nonessential			235/236 +	235/236 +	193 ++
Metf1	metZ	CAU	nonessential	26.972	1.782	239 --	239 --	194 +
	metW		nonessential			240 --	240 --	194 +
Metf2	metV	CAU	nonessential	26.972	1.782	241 ++	241 ++	194 +
	metY		nonessential			242 -	242 -	194 +
Lys	lysT	UUU	nonessential	42.407	1.281	-	-	-
	lysW		nonessential			-	-	-
	lysZ		nonessential			74/144~	74/144~	-
	lysY		nonessential			147/152/	147/152/	-
	lysQ		nonessential			153~156	153~156	-
lysV	nonessential	-	-	-				

Gly1	glyU	CCC	nonessential	10.674	1.081	183	-	183	-		
Gly2	glyT	UCC	essential	7.553	1.175	184	+	184	+		
	glyW		nonessential			224	-	224	-		
Gly3	glyY	GCC	nonessential	53.035	1.089	228	-	228	-		
	glyV		nonessential			225	-	225	-		
	glyX		nonessential			226/227	-	226/227	-		
	argQ		nonessential			249	-	249	-		
Arg2	argZ	ACG	nonessential	45.346	1.401	250	-	250	-		
	argY		nonessential			251	-	251	-		
	argV		nonessential			252	+	252	+		
Arg3	argX	CCG	essential	5.141	1.207	201	+	201	+	201	-
Arg4	argU	UCU	essential	1.843	1.227	198	+	198	-		
Arg5	argW	CCU	nonessential	1.018	0.734	199	+	199	+		
	valT		nonessential			255	-	255	-		
	valZ		nonessential			256	-	256	-		
Val1	valY	UAC	nonessential	35.879	1.777	259	-	259	-		
	valU		nonessential			257	-	257	-		
	valX		nonessential			258	+	258	+		
Val2A	valW	GAC	nonessential	32.578	1.718	212	++	212	++	212	++
Val2B	valV		nonessential		1.655	211	++	211	++	211	++
	leuQ		nonessential			234	-	234	-		
Leu1	leuT	CAG	nonessential	51.735	1.297	229	-	229	-		
	leuV		nonessential			230/231	++	230/231	++		
	leuP		nonessential			232	++	232	++		
Leu2	leuU	UAG	essential	3.739	1.524	190	-	190	-		
Leu3	leuW	CAA	essential	13.176	1.327	188	++	188	++	188	++
Leu4	leuZ	GAG	essential	21.412	1.674	189	-	189	-		
Leu5	leuX	UAA	nonessential	13.297	1.338	192	-	192	-		

Spieces

tRNA は 45 種類に分類されている。

Gene

E. coli K12 株 MG1655 における tRNA 遺伝子名。

Anticodon

それぞれの tRNA が有しているアンチコドン。

Classification

データベース PEC (<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/index.jsp>) より得た。生育に必須である遺伝子の場合 essential, 必須でない場合 nonessential と記載している。

Codon Usag

E. coli K12 株 MG1655 の 4294 個の遺伝子でのコドン使用頻度を計算した (千分率)。通常のアンチコドン CAU によらない開始コドン, Met が 0.296% 存在した。また, 通常の終止コドンでないものが 31.349% 存在した。

tRNA array

tRNA の種類ごとの発現量のデータ。

Log

対数増殖期の Northern Blotting の結果。用いたオリゴヌクレオチドの ID (S1 と対応) を左側に, 結果を右側に記載している。以下の結果の見方は, Stat と 42°C にも共通である。++ が明確かつ特異的なバンド, + がスミア又は弱い又は不明瞭なバンドが観察された場合である。- はバンドが観察されたか不明瞭な場合, -- は明確にバンドが観察されなかったことをしめしている。

Stat

定常期の Northern Blotting 結果。

42°C

Log と Stat が室温で洗浄しているのに対して, 42°C で洗浄した Northern Blotting の結果。

Supplementary Table S3

E. coli K12 株 MG1655 のオペロン情報と Northern Blotting による発現解析の結果を統合した。さらに、Tiling array データより計算した遺伝子ごとの発現量のデータと、オペロンごとに計算した発現量のデータを統合した。

Operon ID	Gene	Type	Left	Strand & Length	Right	Expression	Log	Stat	42°C		
1	rsh	rRNA	223771	+ 1542	225312	339891.71	291	-	291	-	
	ileV	tRNA	225381	+ 77	225457	140219.94	185	++	185	++	
	alaV	tRNA	225500	+ 76	225575	88605.40	177	-	177	-	
	rriH	rRNA	225759	+ 2904	228662	343556.27	292	-	292	-	
	rriH	rRNA	228756	+ 120	228875	278003.16	293	+	293	+	
2	aspU	tRNA	228928	+ 77	229004	79655.53	217	-	217	++	
3	aspV	tRNA	236931	+ 77	237007	50332.42	50332.42	218	++	218	++
4	thrW	tRNA	262095	+ 76	262170	8028.56	8028.56	206	+	206	+
5	argU	tRNA	563946	+ 77	564022	3822.79	3822.79	198	+	198	-
6	glnX	tRNA	695653	- 75	695727	13486.45	243/244	-	243/244	-	
	glnV	tRNA	695765	- 75	695839	12014.13	245	-	245	-	
	metU	tRNA	695887	- 77	695963	9739.53	235/236	+	235/236	+	
	glnW	tRNA	695979	- 75	696053	10807.48	246/247	++	246/247	++	
	glnU	tRNA	696088	- 75	696162	14428.25	248	+	248	+	
	leuW	tRNA	696186	- 85	696270	10499.18	188	++	188	++	
	metT	tRNA	696280	- 77	696356	8577.17	237/238	++	237/238	++	
7	lysT	tRNA	779777	+ 76	779852	23436.92	*	-	*	-	
	valT	tRNA	779988	+ 76	780063	19883.23	17390.73	255	-	255	-
	lysW	tRNA	780066	+ 76	780141	21297.96	*	-	*	-	
8	valZ	tRNA	780291	+ 76	780366	21410.89	19712.66	256	-	256	-
	lysY	tRNA	780370	+ 76	780445	20807.22	*	-	*	-	
9	lysZ	tRNA	780592	+ 76	780667	15990.99	15990.99	*	-	*	-
10	lysQ	tRNA	780800	+ 76	780875	16578.93	16578.93	*	-	*	-
11	serW	tRNA	925107	- 88	925194	28303.09	28303.09	253	-	253	-
12	serT	tRNA	1030848	- 88	1030935	5322.81	5322.81	203	-	203	-
13	serX	tRNA	1096788	- 88	1096875	30107.91	30107.91	254	++	254	++
14	tpr	CDS	1286310	- 90	1286399	3752.04		*	2		
	tyrV	tRNA	1286467	- 85	1286551	7913.78	12443.04	260	-	260	-
	tyrT	tRNA	1286761	- 85	1286845	12402.61	261	-	261	-	
15	valV	tRNA	1744459	+ 77	1744535	9151.40	9796.48	211	++	211	++
	valW	tRNA	1744540	+ 77	1744616	9151.40	9037.32	212	++	212	++
16	leuZ	tRNA	1989839	- 87	1989925	20488.06	189	-	189	-	
	cysT	tRNA	1989938	- 74	1990011	15158.86	15898.09	160	-	160	-
	glyW	tRNA	1990066	- 76	1990141	12719.52	224	-	224	-	
17	serU	tRNA	2041492	- 90	2041581	4857.27	4857.27	204	-	204	-
18	asnT	tRNA	2042573	+ 76	2042648	119507.10	119507.10	263	-	263	-
19	asnW	tRNA	2056051	- 76	2056126	146405.63	146405.63	264	++	264	++
20	asnU	tRNA	2057875	+ 76	2057950	179251.37	179251.37	265	-	265	-
21	asnV	tRNA	2060284	+ 76	2060359	147993.30	147993.30	266	+	266	+
22	proL	tRNA	2284233	+ 77	2284309	4491.77	4491.77	195	+	195	+
23	argW	tRNA	2464331	+ 75	2464405	3818.68	3818.68	199	+	199	+
24	alaX	tRNA	2516063	- 76	2516138	31989.97	33777.07	215	++	215	++
	alaW	tRNA	2516178	- 76	2516253	31989.97	28207.03	216	+	216	+
25	valU	tRNA	2518953	+ 76	2519028	19047.43	16241.98	257	-	257	-
	valX	tRNA	2519073	+ 76	2519148	19047.43	17458.96	258	+	258	+
	valY	tRNA	2519195	+ 76	2519270	19047.43	18341.95	259	-	259	-
	lysV	tRNA	2519275	+ 76	2519350	19047.43	23619.93	*	-	*	-
26	rriG	rRNA	2724091	- 120	2724210	3465.63	289605.48	293	+	293	+
	rriG	rRNA	2724303	- 2904	2727206	3465.63	343556.21	292	-	292	-
	griW	tRNA	2727391	- 76	2727466	323936.99	115104.47	180	+	180	+
	rriG	rRNA	2727638	- 1542	2729179	3465.63	340230.89	291	-	291	-
27	ileY	tRNA	2783784	- 76	2783859	3465.63	3465.63	186	+	186	+
28	argQ	tRNA	2815806	- 77	2815882	10300.20	7171.90	249	-	249	-
	argZ	tRNA	2816081	- 77	2816157	10300.20	7633.83	250	-	250	-
	argY	tRNA	2816220	- 77	2816296	10300.20	7584.26	251	-	251	-
	argV	tRNA	2816495	- 77	2816571	10300.20	12763.33	252	+	252	+
	serV	tRNA	2816575	- 93	2816667	10300.20	29808.36	205	+	205	+

29	metZ	tRNA	2945409	+ 77	2945485	40003.02	40698.58	239	-	239	-	194	+
	metW	tRNA	2945519	+ 77	2945595		35689.23	240	-	240	-	194	+
	metV	tRNA	2945629	+ 77	2945705		37715.31	241	++	241	++	194	+
30	glyU	tRNA	2997006	- 74	2997079	7943.78	7943.78	183	-	183	-		
31	pheV	tRNA	3108388	+ 76	3108463	6703.29	6703.29	222	-	222	-		
32	ileX	tRNA	3213620	+ 76	3213695	5622.54	5622.54	187	+	187	+	187	-
33	pnp	CDS	3307055	- 2136	3309190	24647.87	8865.21	300	-	300	-		
	rpsO	CDS	3309440	- 264	3309703		27137.03	299	+	299	+		
	truB	CDS	3309858	- 939	3310796		6547.59	298	+	298	+		
	rfaA	CDS	3310802	- 396	3311197		9041.08	297	-	297	-		
	infB	CDS	3311364	- 2673	3314036		12017.78	296	-	296	-		
	nusA	CDS	3314061	- 1488	3315548		60887.91	295	-	295	-		
	yhbC	CDS	3315576	- 459	3316034		56681.12	294	-	294	-		
metY	tRNA	3316235	- 77	3316311	32331.88	242	-	242	-	194	+		
34	leuU	tRNA	3320094	- 87	3320180	5676.82	5676.82	190	-	190	-		
35	rffF	rRNA	3421445	- 120	3421564	318717.40	251861.96	293	+	293	+	293	++
	thrV	tRNA	3421602	- 76	3421677		95696.80	207	++	207	++		
	rffD	rRNA	3421690	- 120	3421809		299748.90	293	+	293	+	293	++
	rffD	rRNA	3421902	- 2904	3424805		343603.24	292	-	292	-		
	alaU	tRNA	3424980	- 76	3425055		97421.29	177	-	177	-	177	-
	ileU	tRNA	3425098	- 77	3425174		142484.80	185	++	185	++	185	-
	rfsD	rRNA	3425243	- 1542	3426784		339743.45	291	-	291	-		
36	proK	tRNA	3706639	- 77	3706715	3217.00	3217.00	197	-	197	-		
37	selC	tRNA	3834245	+ 95	3834339	3734.52	3734.52	163	++	163	++	163	++
38	rfsC	rRNA	3939831	+ 1542	3941372	329243.13	339951.03	291	-	291	-		
	gltU	tRNA	3941458	+ 76	3941533		163071.61	180	+	180	+	180	+
	rffC	rRNA	3941727	+ 2904	3944630		343085.11	292	-	292	-		
	rffC	rRNA	3944723	+ 120	3944842		260717.98	293	+	293	+	293	++
39	aspT	tRNA	3944895	+ 77	3944971	90722.58	90722.58	219	-	219	-		
40	trpT	tRNA	3944980	+ 76	3945055	48337.34	48337.34	162	-	162	-		
41	argX	tRNA	3980398	+ 77	3980474	27319.79	7362.04	201	+	201	+	201	-
	hisR	tRNA	3980532	+ 77	3980608		76757.99	161	-	161	-		
	leuT	tRNA	3980629	+ 87	3980715		20603.73	229	-	229	-		
	proM	tRNA	3980758	+ 77	3980834		6527.11	196	-	196	-		
42	rfsA	rRNA	4033554	+ 1542	4035095	322065.44	339164.44	291	-	291	-		
	ileT	tRNA	4035164	+ 77	4035240		130955.61	185	++	185	++	185	-
	alaT	tRNA	4035283	+ 76	4035358		100707.92	177	-	177	-	177	-
	rfaA	rRNA	4035542	+ 2905	4038446		343738.11	292	-	292	-		
	rfaA	rRNA	4038540	+ 120	4038659		258724.06	293	+	293	+	293	++
43	rfsB	rRNA	4164682	+ 1542	4166223	324322.61	342440.18	291	-	291	-		
	gltT	tRNA	4166395	+ 76	4166470		126968.87	180	+	180	+	180	+
	rffB	rRNA	4166664	+ 2904	4169567		343403.87	292	-	292	-		
	rffB	rRNA	4169660	+ 120	4169779		260922.33	293	+	293	+	293	++
44	thrU	tRNA	4173411	+ 76	4173486	174570.27	32839.13	209	-	209	-		
	tyrU	tRNA	4173495	+ 85	4173579		27366.54	262	-	262	-		
	glyT	tRNA	4173696	+ 75	4173770		25981.29	184	+	184	+		
	thrT	tRNA	4173777	+ 76	4173852		38503.04	208	++	208	++		
	tufB	CDS	4173970	+ 1179	4175148		237351.88						
45	rfsE	rRNA	4206170	+ 1542	4207711	327983.31	339451.46	291	-	291	-		
	gltV	tRNA	4207797	+ 76	4207872		142949.51	180	+	180	+	180	+
	rffE	rRNA	4208066	+ 2904	4210969		343526.19	292	-	292	-		
	rffE	rRNA	4211063	+ 120	4211182		263495.52	293	+	293	+	293	++
46	pheU	tRNA	4360574	- 76	4360649	8309.04	8309.04	223	+	223	+		
47	glyV	tRNA	4390383	+ 76	4390458	14512.56	15261.19	225	-	225	-		
	glyX	tRNA	4390495	+ 76	4390570		16599.38	226/227	-	226/227	-		
	glyY	tRNA	4390606	+ 76	4390681		12371.42	228	-	228	-		
48	leuX	tRNA	4494428	+ 85	4494512	7226.15	7226.15	192	-	192	-		
49	leuV	tRNA	4604102	- 87	4604188	19172.37	18396.12	230/231	++	230/231	++		
	leuP	tRNA	4604223	- 87	4604309		17954.01	232	++	232	++		
	leuQ	tRNA	4604338	- 87	4604424		19601.68	234	-	234	-		

*1 tRNA^{Lys}の遺伝子に対しての Northern Blotting 解析は ID 74, 144~147, 152, 153~156 の複数のオリゴヌクレオチドを用いた。

*2 *3 それぞれオリゴヌクレオチドをデザインしていないため、まだ実験を行っていない。

Analysis of Gene Expression for Novel anti-tDNA transcripts
in *Escherichia coli*

2008年2月28日 初版発行

著者 新原温子、松井 求

監修 富田 勝、金井昭夫

発行 慶應義塾大学 湘南藤沢学会
〒252-0816 神奈川県藤沢市遠藤5322
TEL:0466-49-3437

Printed in Japan 印刷・製本 ワキプリントピア

SFC-SWP 2007-A-001

■ 本論文は研究会において優秀と認められ、出版されたものです。