

大腸菌研究の歴史

森 浩禎

大腸菌は、我々の住む地球上でもっとも解析が進み、生物学的知見の蓄積がもっとも大きい生物の一つである。20世紀後半、この生物を利用して遺伝子の概念が構築されたと言っても過言ではない。モデル生物と言われる所以である。過去半世紀以上にわたる遺伝学、生化学そして分子生物学の大腸菌研究により、生物学的知識の蓄積のみならず、解析手法の蓄積も非常に大きい。このため、遺伝子を扱う研究では必ず利用される生物と言える。さらに、生物学研究のモデル生物としてだけではなく、工業レベルの生産菌としても重要なバクテリアである。その大腸菌の研究の歴史を振り返ってみたい。

大腸菌の発見

大腸菌自体は1885年ドイツの小児科医、Theodor Escherich (1857–1911) により発見された腸内細菌である¹⁾。当初は腸内より分離されたことから、*Bacterium coli*と大きく分類され、1895年に*Bacillus coli*と命名された²⁾。その後、発見者の名前を取り、*Escherichia coli*と再分類されたのが1919年である³⁾。現存する最初の保存菌としては、1920年にLondonで分離されたものが、NCTC86およびATCC4157という番号で保管されている。現在、一般的に大腸菌と呼ばれ研究に利用されている多くは、K-12株およびB株と言われる種類である。K-12株は、1922年にアメリカの病院で快復期のジフテリア患者の便から分離され、Stanford大学で保管されていた。K-12という番号は、抗原性とは関係なく単純にStanford大学での保管用番号であったようだ。その後、Lederbergらにより溶原化していたλファージが除かれW1485という株を経て、W3110が作製されたが⁴⁾、MG1655株もW3110と同じ系統である⁵⁾。B株は、1918年のフランス、パスツール研究所でのバクテリオファージの研究に遡る。1942年には同じくバクテリオファージT1とT7の研究でDelbruckらにより*Escherichia coli* Bの名称が利用されたのが現在のB株の由来である。2009年には、B株の全ゲノム構造が明らかにされたが⁶⁾、その株の由来がDaegelenらに詳細に調べられている⁷⁾。

接合の発見から遺伝学のスターへ

Stanford大で大腸菌の再発見後、Cliftonらにより1930年代にはバクテリアの代謝に関する研究に利用された^{8,9)}。その後Averyらにより遺伝子の実体がDNAであること¹⁰⁾、そしてLederbergらにより性接合の存在と遺伝学が可能であること¹¹⁾、が示されたことで大腸菌を用いた研究が急加速した。接合現象の発見以降、大腸菌の遺伝子地図作成が進められ、1964年の段階で100遺伝子が決定されている¹²⁾。「大腸菌でそうであることは象でもそうである」と言ったMonodらによるLactose遺伝子領域の遺伝学的解析から構造遺伝子とその制御領域から構成されるオペロン説の検証は一つの大きな金字塔である¹³⁾。

遺伝学から分子生物学へ

遺伝子を自由に操る技術は制限酵素の発見とベクターの開発まで待たなくてはならなかった。1950年代初頭にファージの宿主バクテリアへの感染効率が、宿主の遺伝的背景により違うことが報告され^{14,15)}、その後スイスのArber、アメリカのSmithらにより制限酵素の発見となった^{16,17)}。1973年にはEcoRI制限酵素で処理したDNA断片をpSC101プラスミドベクターに組み込み、大腸菌を形質転換することに成功し、*in vitro*でのDNA操作の時代が始まった¹⁸⁾。それ以降、研究対象の遺伝子をクローン化し解析を進める逆遺伝学が急速に広まると同時に、大腸菌をツールとして利用した他生物の研究も急速に発展した。大腸菌を利用した研究の動向を論文数で調べてみると70年代以降急速に増加している事がわかる(図1)。20世紀後半の大腸菌の生物学への貢献の度合いが他のモデル生物と言われる種と比較しても突出している事が伺える。その結果、大腸菌は地球上でもっとも解析の進んだ生物となり、20世紀後半の生物学の爆発的發展につながったことはいままでもない。

大腸菌ゲノムプロジェクト

ゲノム解析計画自体は、1980年代前半にアメリカ・エネルギー省を中心に原爆の人体への影響を調べるこ

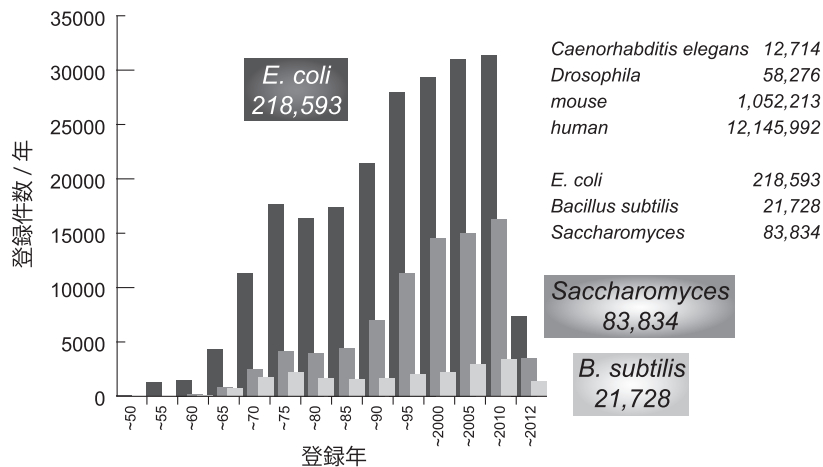


図1. PubMedでの生物種による論文数の変動. MeSHデータベースを利用し, 各生物種を研究対象とした論文の統計.

を目的に議論が進んでいた¹⁹⁾. 同時にDulbeccoがScienceでがん研究におけるゲノム解析の重要性を訴えた²⁰⁾. がんを理解するには, ヒトを理解する必要がある, そのためにはヒトゲノム計画が必要であるという論理である. 1980年代後半に議論が深まったゲノム計画は1990年に国際協力の下で開始された. 当時は人を月に送り込むより難しいとされたプロジェクトであるが, 多くの技術革新が生まれ, 当初の予想を遙かに超える勢いでゲノム研究が進んだのが, 1990年代である. その結果, 20世紀最後の10年間は生物学を大きく変えることになった. 21世紀に入り, ヒトゲノム構造の概要が明らかにされてからすでに10年が経つ^{21,22)}. 現在, 配列決定の速度は飛躍的に向上し, ゲノム情報は, その種の研究開始時に必須の情報となったと言える.

ヒトゲノム計画が議論されていた時期, 1987年に小原らにより大腸菌全ゲノムをカバーするλファージによる整列クローンライブラリー(小原クローン)が構築され, 制限酵素による物理地図が作成された²³⁾. この成果を活かし, 日本の大腸菌研究コミュニティは, 重点領域研究として²⁴⁻²⁶⁾第1期の「大腸菌ゲノムの全体像(代表: 由良隆)」の組織的ゲノム解析が開始された. 自動シーケンサーもない時代で, システムティックな配列決定の意義の議論が十分に進められないまま突入してしまった印象は拭えないが, それでも3年間のプロジェクトでの成果は, ゲノム配列がもたらす新たな可能性を示すことができたのではないだろうか^{27,28)}. 計画研究では, 各研究対象とする遺伝子の周辺を延長して決定するという方法が取られた. 一方, 筆者は公的データベースに登録されている大腸菌遺伝子配列の整理を始め, 染色体地

図上にマッピングを行った. ゲノムのどこが決まっている, どこが決まっていないのかを整理する必要に迫られていたからである. その後, 未決定の領域を持つ小原クローンを選別し配列決定を行うという方法をとった. その際作製したデータベースは, WEBデータベースとして発展させ, GenoBase (<http://ecoli.naist.jp/GB8>)として公開している.

3年間のプロジェクトの終了後, 総合研究A²⁹⁾として「大腸菌ゲノムのシステマティック・シーケンシング(代表: 溝渕潔)」が決定領域の分担方式で継続し, 約400 kbの領域を決定した(図2). 2期のプロジェクトを終えても, 連続して決定された領域は約600 kb程度であり, 全体の13%に過ぎない. 残る4 Mbもの配列を決定するためには, 抜本的な見直しが必要である. 自動シーケンサーも実用化に入り, アセンブル技術など, 開発の速度が加速度的に変化した時期である. 当時, TIGR研究所において*Haemophilus influenzae*のゲノム配列がショットガン方式で決定され出したとの話を聞き³⁰⁾, 見学しに押しかけ多くの効率化を学んだ. まだまだ全ゲノムをショットガン方式で進めるだけの基盤は揃っていなかったが, それまでのプロジェクトと違い徹底的な分業化を行った. 以前と同様に小原整列クローンを利用した方法を基本としたが, 分担ではなく, 「配列決定用クローン作製」「鋳型DNA調整」「シーケンス反応」「アセンブル」など徹底的な分業で効率化をはかった. そして, 新たにゲノム上の2カ所に大腸菌の染色体を切らない制限酵素サイトを挿入し, その間約1 Mbの断片をパルスフィールド電気泳動で精製し, ショットガン方式で決定する新しい方法も導入した. ヒトゲノムプロジェクトおよ

バイオよもやま話

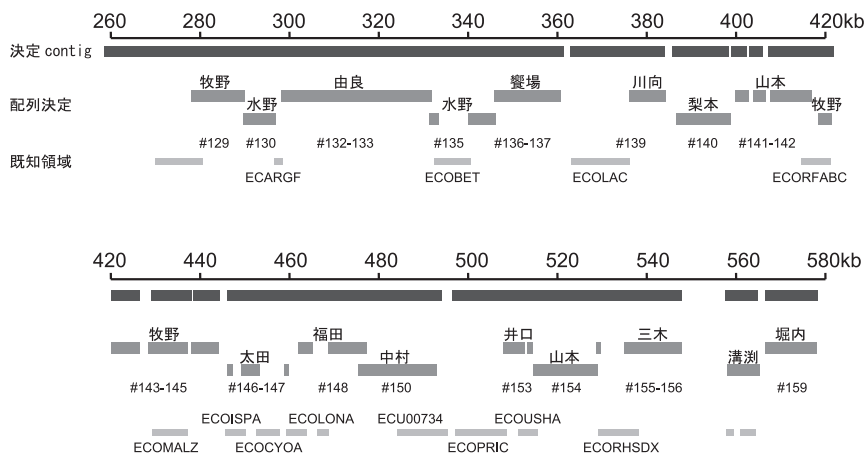


図2. 分担方式の第2期大腸菌ゲノムプロジェクト. 数直線は大腸菌ゲノムの位置を示す. 各メンバーにより#で表された小原クローンを分担して決定を行った. 既知領域は当時すでにGenBankなどにその配列が明らかにされていた領域を示す.

日本の大腸菌 K-12 株 ゲノムプロジェクト
1989 ~ 1997

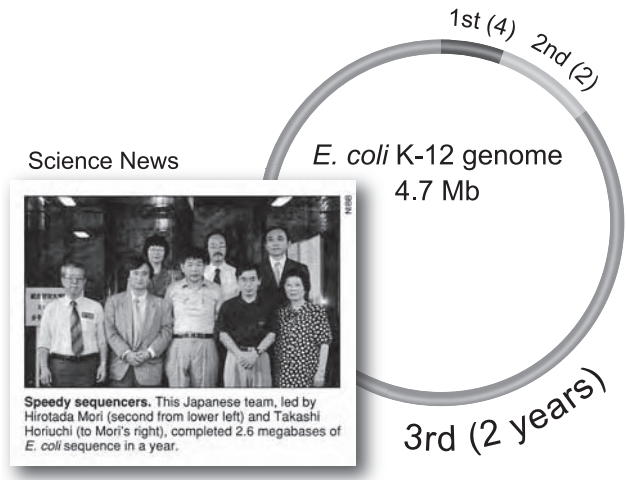


図3. 大腸菌ゲノムプロジェクトの決定領域と完成時のメンバー. 大腸菌ゲノムの各プロジェクトでの決定領域を示す. 1997年にゲノム決定を完成させた時のメンバーの写真を示す. サイエンスに報道された際の写真.

び文部省からの支援を受け³¹⁾, Wisconsin大学のBlattner³²⁾らと同時に全ゲノム構造を明らかにすることができた³³⁻³⁶⁾. 当時の技術³⁷⁾で1年間に2 Mbの決定を行ったことになる(図3). 現在では, デンマークでの話であるが, バクテリア1種のゲノム決定は学部学生の夏休みの課題となっている(Ussery, D 私信). 隔世の感である.

その後のゲノムプロジェクト

日米の決定したゲノム配列には300に上る違いが存在した. MG1655とW3110の株による違いか, あるいは

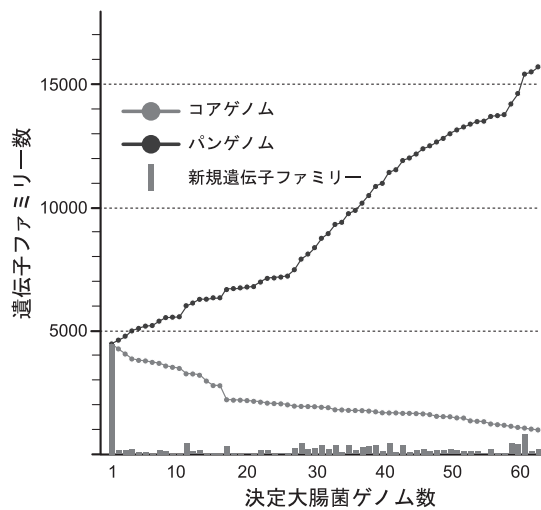


図4. 大腸菌61種によるコアゲノムとパンゲノム. Lukjancenko, O. et al.: *Microb. Ecol.*, **60**, 708-720 (2010)より改変.

配列決定エラーなのかを確定するため, 基礎生物学研究所の堀内博士らと共同で確認作業を続けた. 競争となっていた当初のゲノムプロジェクトも, 世界と共同で確認作業を進め⁵⁾, 配列確認後はこれも日米欧の共同作業で遺伝子アノテーションを行った³⁸⁾. その時に共通遺伝子IDとしてECK番号が採用された. その後も遺伝子アノテーション作業は続いている³⁹⁻⁴¹⁾. 日本の貢献は, モデル大腸菌のK-12株だけではない. 1996年に集団食中毒を引き起こした大腸菌O157の配列決定も宮崎大の林を中心としたグループにより決定された⁴²⁾. このO157もK-12株と同様にWisconsin大学のBlattnerらにより決定されている⁴³⁾. K-12の時もそうであったが, 配列決定

大腸菌ゲノム配列決定株

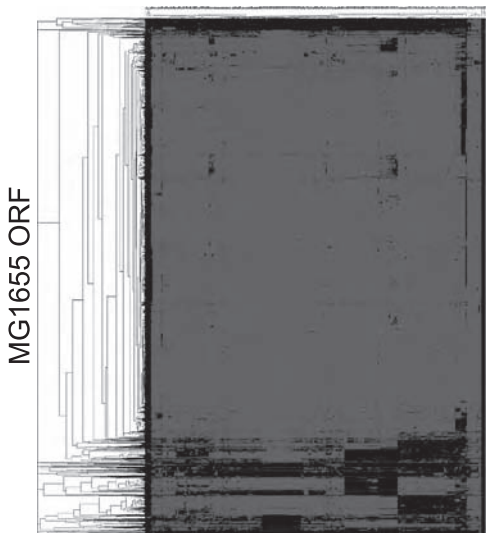


図5. 239種の大腸菌による比較. 現在入手可能な大腸菌ゲノム239種を用い, MG1655の持つ遺伝子の保存性を調べた. 灰色は保存されていることを示す.

の質の高さは日本側の強みであった.

21世紀に入ってからのシーケンス技術革新は目を見張る. 配列解析の速度と費用の劇的な変化は, 研究の方法自体の見直しを迫るものである. 2008年には3種の大腸菌の比較からすべての大腸菌が共通に持つコア遺伝子群とすべての遺伝子ファミリーを集めたパンゲノム遺伝子群の概念が提唱されたが, 2010年には61種類の大腸菌による解析に増え⁴⁴⁾ (図4), 2012年の時点では, 論文化はされていないが, 200を超える大腸菌による比較が可能である⁴⁵⁾ (図5, 竹内未発表). これらの解析によるとすべての大腸菌が持つコアゲノムには2300程度の遺伝子が存在するようである (Ussery D., Rasko, D. 私信). 次の疑問は, これらの遺伝子群を揃えると大腸菌ができていくのか, という問題である. この疑問に対して, 遺伝子を削る方向と合成するアプローチが考えられる. 前者は日本においても経産省プロジェクトの「ミニマムゲノムファクトリー」で作製が進められるなど, 世界においても数例の報告がある⁴⁶⁻⁴⁹⁾. コアゲノムとして選択された遺伝子だけを持つ大腸菌作製は現在のところ実現していないが, MAGEと名付けられた合成オリゴDNAを利用した変異導入の新しい方法⁵⁰⁾で作製が試みられようとしている (Wanner, BL. 私信). バクテリアゲノムの合成に関しては, Venterらによる化学合成⁵¹⁾, 板谷らによる全ゲノムクローン化⁵²⁾が可能になり, コアゲノム遺伝子のみを持つ人工バクテリア作製も可能な時代になったと言えよう.

Omics研究

1995年にBrownらが開発したマイクロアレイより網羅的な解析の時代が始まった⁵³⁾. 大腸菌の最初のマイクロアレイ解析はBlattnerらによりPCR増幅断片を利用して行われた⁵⁴⁾. 日本では, 筆者らがプラスミドクローンライブラリーを利用して全長ORFマイクロアレイをタカラバイオと共同開発した. 断片的な見方ではなく, 全体を通じた統計的な見方の重要性を認識させられ, 同時に数学の不思議さを実感した. 解析方法を数学者に相談したところ, 株価予測のアルゴリズムが使えるというのである. 分野を超えた解析方法確立の重要性を思い知らされた. 以降, マイクロアレイ, DNAチップによる解析は遺伝子発現解析のみならず, DNA-タンパク質結合領域同定, DNA修飾と広がってきたが, 次世代型シーケンサーの登場で感度, スループット共に取って代わられつつある⁵⁵⁾.

網羅解析にはリソースとデータベースが重要である. これらは一つのグループだけで構築するには困難が伴う. 酵母の研究コミュニティはいい成功例であろう. 早い時点でクローンや欠失株のリソース構築とデータベース構築およびそれらの共有が進み, 機能ゲノム解析からシステム生物学へと新しい分野で急速に研究が拡大した. 大腸菌ではコミュニティによる成果という訳ではないが, *lux* 遺伝子との融合株作製と解析⁵⁶⁾, 遺伝子間領域のクローン作製と解析⁵⁷⁾で *in vivo* 遺伝子発現解析がなされた. 網羅的変異株は, トランスポゾンランダム挿入により染色体大規模欠失を目的とした2種類のライブラリー⁴⁸⁾と機能解析を目的としたライブラリー⁵⁸⁾の二つの報告がある. 筆者らのグループも全遺伝子のプラスミドクローン^{59,60)}と一遺伝子欠失株ライブラリー⁶¹⁾の開発を行い, 広くコミュニティへの提供を行っている. 現時点で1500件を超える論文成果を生み出した. 網羅的リソースは全遺伝子を対象にした解析を可能にした. 全タンパク質相互作用^{62,63)}, タンパク質と化学物質の相互作用⁶⁴⁾や生理機能ネットワーク解析⁶⁵⁾など, 遺伝子研究を一気に違う次元に押し上げたといえるのではないか. 材料と共に新しい測定技術は新たな分野を生み出す. 慶應大学の曾我らはキャピラリー電気泳動と質量分析計を組合せた方法を開発し, 網羅的な代謝物質測定を可能にした⁶⁶⁾. この方法で種々の攪乱による代謝物質濃度, 遺伝子の転写量, タンパク質量の変動の網羅的な定量解析が行われた⁶⁷⁾.

最小ゲノム計画

NEDOの事業として、2000年より「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」が開始された。ミニマムゲノム（最小ゲノム）ファクトリーを構築し、工業プロセスの革新を進めることが目標である。何をもちて最小とするのか？ 目的によって、それぞれの最小化の意味は違う。産業的には、生産にとって不要なものを削ぎ、投入したエネルギーから最大効率で目的物の生産を行うことであろう。一方、何をもちて大腸菌や枯草菌、酵母といえるのか、さらには生命として存在できる最小遺伝子セットとは何か、など学問的にも非常に興味深い対象である。これまでも大腸菌⁴⁷⁻⁴⁹⁾や枯草菌⁶⁸⁾で大規模欠失の解析は進められたが、現在の豊富なゲノム情報と新たなゲノム改変技術により、今まさに加速できる研究対象である。

大腸菌のシステム生物学

生命をシステムとして理解しようとする生物学で、ゲノム研究以降急速に発展している学問分野である。転写因子と制御される遺伝子、酵素複合体、代謝ネットワークの冗長性など遺伝子間の相互関係の同定や定量、生理機能のシステムとしての動的特性の解明やシミュレーションと、その幅は広い。モデリングやシミュレーション自体を目的とした生物学自体は古い^{69,70)}。当時との大きな違いは、ゲノム構造の解明により、生命現象に機能し得る遺伝子のカタログができたこと、そしてより大きな単位での定量的モデル化であろう。大腸菌では、Palssonのグループが、大腸菌1260の酵素タンパク質による2077の代謝反応のモデル化を行った⁷¹⁾。2008年には液体クロマトグラフィーと質量分析計を組合せ大腸菌タンパク質の細胞内分布の定量解析が進められるなど⁷²⁾、着実に網羅的な定量解析と定量的モデル構築が進んでいる。

細胞内生理機能ネットワーク解明に向けて

大腸菌は一遺伝子程度が欠失しても生育に大きく影響する遺伝子はそう多くはない。ロバスト性と言われる。一つの機構として、経路が動的に構築し直され、遺伝子欠失が補償されることによるものと考えられる。そこで一遺伝子欠失を相補する遺伝子の探索を行うために、網羅的な全2重欠失株作製による合成致死解析を進めている。この目的のために、新たに別の薬剤耐性を持つ一遺伝子欠失株ライブラリーを構築し、2種類の一遺伝子欠失をHfrの接合で2重化する方法の開発を行った^{73,74)}。ある遺伝子の機能が別の遺伝子の影響を受ける関係をエ

ピスタシスと言い、2重欠失を利用して特に酵母で進んでいる。現在では約2000×4000遺伝子の網羅的組合せによる解析が報告された⁷⁵⁾。酵母と大腸菌でこの研究が進むことで、細胞内機能ネットワークの普遍性が見え、細胞構築のルール解明につながる事が期待される。これまで難しかった設計された育種への道を拓くことができればと考えている。

一般市民にとっての大腸菌

研究では輝かしい歴史を持つ大腸菌ではあるが、一般市民にはあまり快く受け入れられていないように思える。おそらく大半の市民が、「汚い」「危ない」と答えるのではないだろうか。腸内に生息する菌であることから、この菌の存在は糞便による水の汚染の指標にされる。しかし、大腸菌が腸内全体の微生物に占める割合はきわめて少なく、ヒト腸内常在細菌の0.01%以下に過ぎない。他の大部分は、*Bacteroides*属や*Eubacterium*属などの偏性嫌気性菌である。これら大腸菌を含め、常在細菌は、強い毒性を持った病原菌のヒトなどの体内への新入を防ぐ機能を持つ。一方、工業的にも大腸菌は非常に成功している種である。最初に遺伝子組換えが利用された製品は、大腸菌で作製されたヒトインスリンである。1977年にはヒトインスリンの遺伝子が⁷⁶⁾、1979年にヒト成長ホルモンの遺伝子⁷⁷⁾が続けて大腸菌でクローン化され、遺伝子工学による創薬が始まった。プラスミドと制限酵素を利用した組換え技術を開発したHerbert Boyerらにより始められた遺伝子組換え企業により実用化が進み、初めての組換え医薬品が誕生したのが1982年である。医薬品のみならず、アミノ酸など、有用物質生産菌として大きく活用されているが、企業側からの公表が少ないようである。正確な市場規模の調査は難しい。

最後に

現代の生物学の基礎を築いてきた大腸菌であり、また医薬・食品関連における生産菌としても大きな位置を占める大腸菌である。これだけ研究されてきた大腸菌である。「まだ未解明な部分がある」だけではなく、21世紀に入り新しい考え方の生物学が起り、「大腸菌でしかない新しい生物学」を目指した研究を進めることが重要である。その成果は、必ずや新しい生物学の普遍的概念をもたらし、新しい細胞の活用への道を拓くものと信じる。今私たちは、それを実現に導くことと、その展望を広く説明することが求められている。長い目でみた研究の先には大きな応用の可能性があることを一般にも説明していきたい。

文 献

- 1) Escherich, T.: *Fortschr. Med.*, **3**, 515 (1885).
- 2) Migula, W. (ed.): *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, p.20, W. Engelmann, Leipzig (1895).
- 3) Castellani, A. and Chalmers, A. J.: *Manual of Tropical Medicine 3rd ed.*, Williams Wood and Co., New York (1919).
- 4) Bachmann, B. J.: *Bacteriological reviews*, **36**, 525 (1972).
- 5) Hayashi, K. *et al.*: *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 2006. 0007 (2006).
- 6) Jeong, H. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **394**, 644 (2009).
- 7) Daegelen, P. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **394**, 634 (2009).
- 8) Clifton, C. E. and Logan, W. A.: *J. Bacteriol.*, **37**, 523 (1939).
- 9) Clifton, C. E. *et al.*: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **35**, 40 (1936).
- 10) Avery, O. T. *et al.*: *J. Exp. Med.*, **79**, 137 (1944).
- 11) Tatum, E. L. and Lederberg, J.: *J. Bacteriol.*, **53**, 673 (1947).
- 12) Taylor, A. L. and Thoman, M. S.: *Genetics*, **50**, 659 (1964).
- 13) Jacob, F. *et al.*: *Comptes rendus biologiques*, **328**, 514 (2005).
- 14) Bertani, G. and Weigle, J. J.: *J. Bacteriol.*, **65**, 113 (1953).
- 15) Luria, S. E. and Human, M. L.: *J. Bacteriol.*, **64**, 557 (1952).
- 16) Linn, S. and Arber, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 1300 (1968).
- 17) Smith, H. O. and Wilcox, K. W.: *J. Mol. Biol.*, **51**, 379 (1970).
- 18) Cohen, S. N. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3240 (1973).
- 19) http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/alta.shtml
- 20) Dulbecco, R.: *Science*, **231**, 1055 (1986).
- 21) Lander, E. S. *et al.*: *Nature*, **409**, 860 (2001).
- 22) Venter, J. C. *et al.*: *Science*, **291**, 1304 (2001).
- 23) Kohara, Y. *et al.*: *Cell*, **50**, 495 (1987).
- 24) <http://kaken.nii.ac.jp/ja/p/01655003>
- 25) <http://kaken.nii.ac.jp/ja/p/02237102>
- 26) <http://kaken.nii.ac.jp/ja/p/03221103>
- 27) Fujita, N. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1637 (1994).
- 28) Yura, T. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3305 (1992).
- 29) <http://kaken.nii.ac.jp/ja/p/04305005>
- 30) Fleischmann, R. D. *et al.*: *Science*, **269**, 496 (1995).
- 31) <http://kaken.nii.ac.jp/ja/p/08309009>
- 32) Blattner, F. R. *et al.*: *Science*, **277**, 1453 (1997).
- 33) Aiba, H. *et al.*: *DNA Res.*, **3**, 363 (1996).
- 34) Itoh, T. *et al.*: *DNA Res.*, **3**, 379 (1996).
- 35) Oshima, T. *et al.*: *DNA Res.*, **3**, 137 (1996).
- 36) Yamamoto, Y. *et al.*: *DNA Res.*, **4**, 91-113 (1997).
- 37) Rode C. K. *et al.*: *Gene* **166**, 1 (1995).
- 38) Riley, M. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **34**, 1 (2006).
- 39) <http://www.http.com/ecoli.naist.jp/GB8/>
- 40) <http://www.ecogene.org/3.0/>
- 41) <http://www.york.ac.uk/res/thomas/>
- 42) Hayashi, T. *et al.*: *DNA Res.*, **8**, 11 (2001).
- 43) Perna, N. T. *et al.*: *Nature*, **409**, 529 (2001).
- 44) Lukjancenko, O. *et al.*: *Microb. Ecol.*, **60**, 708 (2010).
- 45) <http://www.patricbrc.org/portal/portal/patric/Home>
- 46) NEDO: *fucus NEDO*, vol.**41** (2011).
- 47) Posfai, G. *et al.*: *Science*, **312**, 1044 (2006).
- 48) Yu, B. J. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1018 (2002).
- 49) Kato, J. and Hashimoto, M. *Mol. Syst. Biol.*, **3**, 132 (2007).
- 50) Wang, H. H. *et al.*: *Nature*, **460**, 894 (2009).
- 51) Gibson, D. G. *et al.*: *Science*, **329**, 52 (2010).
- 52) Itaya, M. *et al.*: *Nat. Methods*, **5**, 41 (2008).
- 53) Schena, M. *et al.*: *Science*, **270**, 467 (1995).
- 54) Richmond, C. S. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3821 (1999).
- 55) Mardis, E. R.: *Nat. Methods*, **4**, 613 (2007).
- 56) Van Dyk, T. K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 2555 (2001).
- 57) Zaslaver, A. *et al.*: *Nat. Methods*, **3**, 623 (2006).
- 58) <http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/nbrp/explanation/transposone.jsp>
- 59) Kitagawa, M. *et al.*: *DNA Res.*, **12**, 291 (2005).
- 60) Rajagopala, S. V. *et al.*: *BMC Genomics*, **11**, 470 (2010).
- 61) Baba, T. *et al.*: *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 2006. 0008 (2006).
- 62) Arifuzzaman, M. *et al.*: *Genome Res.*, **16**, 686 (2006).
- 63) Butland, G. *et al.*: *Nature*, **433**, 531 (2005).
- 64) Pathania, R. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 849 (2009).
- 65) Nichols, R. J. *et al.*: *Cell*, **144**, 143 (2011).
- 66) Soga, T. *et al.*: *Anal. Chem.*, **74**, 6224 (2002).
- 67) Ishii, N. *et al.*: *Science*, **316**, 593 (2007).
- 68) Morimoto, T. *et al.*: *DNA Res.*, **15**, 73 (2008).
- 69) Savageau, M. A.: *J. Theor. Biol.*, **25**, 365 (1969).
- 70) Savageau, M. A.: *J. Theor. Biol.*, **25**, 370 (1969).
- 71) Feist, A. M. *et al.*: *Mol. Syst. Biol.*, **3**, 121 (2007).
- 72) Ishihama, Y. *et al.*: *BMC Genomics*, **9**, 102 (2008).
- 73) Typas, A. *et al.*: *Nat. Methods*, **5**, 781 (2008).
- 74) Butland, G. *et al.*: *Nat. Methods*, **5**, 789 (2008).
- 75) Costanzo, M. *et al.*: *Science*, **327**, 425 (2010).
- 76) Itakura, K. *et al.*: *Science*, **198**, 1056 (1977).
- 77) Martial, J. A. *et al.*: *Science*, **205**, 602 (1979).