

大腸菌における遺伝情報の欠落が増殖に及ぼす影響の
網羅的分析

2021年1月

黒川真臣

大腸菌における遺伝情報の欠落が増殖に及ぼす影響の
網羅的分析

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
環境バイオマス共生学専攻
博士（学術）学位論文

黒川真臣

目次

業績.....	4
第1章 緒言.....	5
1.1 モデル生物としての大腸菌.....	5
1.2 大腸菌の遺伝情報.....	5
1.3 生物における増殖.....	6
1.4 本研究の目的.....	6
1.5 各章の位置づけ.....	7
第2章 遺伝子の単一欠失が増殖速度に及ぼす影響の網羅的評価.....	9
2.1 背景及び目的.....	9
2.1.1 遺伝子と細胞増殖.....	9
2.1.2 遺伝子発現と増殖速度.....	9
2.1.3 先行研究における課題と本章の目的.....	10
2.2 材料と方法.....	10
2.2.1 菌株.....	10
2.2.2 培地.....	10
2.2.3 Keio コレクションの冷凍ストック作成.....	12
2.2.4 ハイスループットな増殖測定.....	12
2.2.5 遺伝子発現解析.....	14
2.2.6 発現変動遺伝子 (DEGs) および増殖変動遺伝子 (DGGs) の評価.....	15
2.2.7 周期性解析.....	15
2.3 結果.....	16
2.3.1 単一遺伝子欠失株の増殖速度分布.....	16
2.3.2 増殖速度に基づいた非必須遺伝子の分類.....	17
2.3.3 遺伝子欠失株の増殖速度と欠失遺伝子の野生型における発現量の相関.....	21
2.3.4 増殖速度と遺伝子発現に共通したゲノム周期性.....	25
2.4 考察.....	27
2.4.1 周期性を生み出す要因.....	27
2.4.2 増殖速度と最大菌体濁度の関係.....	29
2.5 結論.....	31
第3章 ゲノムの縮小に相関した増殖速度の低下.....	32
3.1 背景及び目的.....	32
3.1.1 ゲノム縮小株の意義.....	32
3.1.2 代表的な大腸菌ゲノム縮小株の特徴.....	32
3.1.3 培地条件と増殖速度.....	35

3.1.4 先行研究における課題と本章の目的	35
3.2 材料と方法.....	36
3.2.1 使用した大腸菌株	36
3.2.2 使用した培地.....	37
3.2.3 大腸菌株グリセロールストック作成	37
3.2.4 増殖測定	38
3.2.5 増殖ダイナミクスの評価	38
3.2.5 菌体密度および細胞サイズの測定	38
3.2.6 多重回帰分析.....	39
3.2.7 欠失した遺伝子群の機能エンリッチメント解析	39
3.2.8 ゲノム縮小株のゲノム図作成	39
3.3 結果.....	39
3.3.1 ゲノム縮小株コレクションの特徴分析.....	39
3.3.2 ゲノム縮小に相関した増殖速度の低下.....	44
3.3.3 ゲノム縮小に相関した最大菌体濁度の低下	46
3.3.4 ゲノム縮小が増殖におよぼす影響と栄養条件の関係.....	47
3.3.5 ゲノム縮小に相関した増殖ダイナミクスの変化	48
3.3.6 複数パラメーターによる増殖速度の予測.....	51
3.4 考察.....	54
3.4.1 増殖測定の再現性	54
3.4.2 増殖速度の低下に寄与する遺伝子群	55
3.4.3 ゲノムの縮小が増殖速度の低下をつなぐ仮説.....	57
3.5 結論.....	58
第4章 ゲノム縮小株における増殖速度と変異率の相関.....	59
4.1 背景及び目的	59
4.1.1 変異率について	59
4.1.2 変異率とゲノムサイズの関係	59
4.1.3 先行研究における課題と本章の目的	60
4.2 材料と方法.....	60
4.2.1 使用した菌株・培地.....	60
4.2.2 変異率の測定.....	61
4.2.3 実験進化	62
4.2.4 ミスマッチ修復遺伝子の発現量と増殖速度の相関分析	63
4.3 結果.....	63
4.3.1 ゲノム縮小に相関した変異率の上昇	63
4.3.2 変異率の上昇に関係した遺伝子機能群の分析.....	66
4.3.3 ゲノム縮小株における変異率と増殖速度の相関.....	67
4.4.4 実験進化による増殖速度および変異率の変化.....	69

4.4 考察.....	71
4.4.1 増殖速度と変異率の負の相関.....	71
4.4.2 ゲノム進化とゲノム工学におけるゲノムサイズと変異率の関係.....	73
4.5 結論.....	74
第5章 ゲノムの縮小とロバスト性.....	75
5.1 背景および目的.....	75
5.1.1 微生物の生息環境.....	75
5.1.2 栄養条件と増殖速度.....	75
5.1.3 ゲノム進化と生息環境.....	76
5.1.4 先行研究における課題と本章の目的.....	76
5.2 材料および方法.....	76
5.2.1 菌株と培地.....	76
5.2.2 網羅的増殖測定.....	79
5.2.3 Robustness の評価.....	79
5.3 結果.....	80
5.3.1 培地組成の段階的な変化.....	80
5.3.2 ロバスト性の評価.....	81
5.3.3 ゲノム縮小に相関したロバスト性の低下.....	84
5.3.4 基準培地による実験進化.....	85
5.3.5 実験進化によるロバスト性の上昇.....	86
5.4 考察.....	88
5.4.1 培地成分の種類と濃度変化に対する応答.....	88
5.4.2 適応トレードオフ.....	89
5.4.3 ゲノムの縮小に伴うロバスト性の変化の生態学的意義.....	89
5.5 結論.....	90
第6章 結言.....	91
参考文献.....	96
図表一覧.....	105
謝辞.....	107

業績

学術論文

(査読あり)

1. M Nagai, M Kurokawa & BW Ying, The highly conserved chromosomal periodicity of transcriptomes and the correlation of its amplitude with the growth rate in Escherichia coli, *DNA Res*, Volume 27, Issue 3, 2020
2. L Liu*, M Kurokawa*, M Nagai, S Seno & BW Ying, Correlated chromosomal periodicities according to the growth rate and gene expression, *Sci Rep*, 10: 15531, 2020 * equal contribution
3. K Tsuchiya, YY CAO, M Kurokawa, K Ashino, T Yomo & BW Ying, A decay effect of the growth rate associated with genome reduction in Escherichia coli, *BMC Microbiol*, 18: 101, 2018
4. M Kurokawa & BW Ying, Precise, high-throughput analysis of bacterial growth” *J Vis Exp*, 127: e56197, 2017
5. I Nishimura*, M Kurokawa*, L Liu & BW Ying, Coordinated changes in mutation and growth rates induced by genome reduction, *mBio*, 8: e00676-17, 2017 * equal contribution,
6. M Kurokawa*, S Seno*, H Matsuda & BW Ying, Correlation between genome reduction and bacterial growth, *DNA Res*, 23: 517-525, 2016 * equal contribution

(査読無し)

1. M Nagai, M Kurokawa & BW Ying, The common chromosomal periodicity of transcriptomes is correlated with the bacterial growth rate, bioRxiv, Cold Spring Harbor Laboratory, 2020

総説

1. M Kurokawa & BW Ying, Experimental Challenges for Reduced Genomes: The Cell Model Escherichia coli, *Microorganisms*, MDPI journals, 8 (1): 3, 2020

第1章 緒言

1.1 モデル生物としての大腸菌

大腸菌はモデル微生物として、化合物の発酵生産といった応用研究から、生命現象に対する基礎研究など様々な研究に利用されている[1,2]。大腸菌がモデル微生物として広く利用される大きな要因として、培養の容易さと遺伝子操作の簡便さが挙げられる。大腸菌は栄養要求性が少なく、さらに糖などの炭素源を資化して自身の生育に必要なアミノ酸をすべて合成することができる[3]。そして、栄養が豊富に存在する環境下では、世代時間が約20分という他には類を見ない速さで増殖することができる[4]。また、大腸菌はプラスミドの保持能力や、ファージ感染能が高いことから、遺伝子工学技術がかなり早い段階から確立されている[5]。1973年にはプラスミドベクターを使用した形質転換技術が確立され[6]、異種遺伝子の高発現の研究も盛んにおこなわれて来た[7,8]。そして、近年においてもCRISPE-Cas9などの新しい技術が大腸菌の遺伝子操作にも用いられている[9,10]。さらに2019年には、大腸菌 MDS42 株のゲノムの人工合成も達成されており[11]、大腸菌は今後も生物学の基礎研究およびバイオ産業に欠かせない存在であり続けるであろう。

1.2 大腸菌の遺伝情報

1995年に初となる微生物のゲノム配列の解読がインフルエンザ菌で達成された[12]。その2年後の1997年に大腸菌のゲノム配列の解読が達成された[13]。大腸菌には4,000以上の遺伝子があることがわかり、個々の遺伝子の機能も次々と明らかとされてきた。2003年から大腸菌の遺伝子機能分類を行う大規模なプロジェクトが立ち上がり、2006年に大腸菌の全遺伝子の機能分類が発表された[14]。この時点においては54.1%の遺伝子は実験的にその機能が明らかであったが、それ以外の遺伝子は機能が予測段階か、もしくは予測すらできていなかった。2019年の段階での大腸菌データベース EcoCyc の情報に基づけば、63.7%の遺伝子の機能は実験的に確かめられたが、28.1%の遺伝子は機能の予測もできていない[15]。このように大腸菌の持つ遺伝子の中には機能がわからない遺伝子が多いという事実は、大腸菌の持つ遺伝子が実験室環境下においては不必要なものが多いことを反映している。単独で培養可能な細菌の中で最もゲノムサイズが小さなマイコプラズマのゲノム

サイズは 0.6 Mb ほどしかなく [16]、大腸菌ゲノム (約 4.6 Mb) の約 1/8 程度の大きさであることから考えても、大腸菌の遺伝情報には余剰な部分が多く含まれることが考えられる。

1.3 生物における増殖

増殖することは、生物において最も特徴的かつ重要な性質の一つである。大腸菌をはじめとする単細胞生物においては、増殖は細胞分裂とみなすことができる。増殖において遺伝情報は非常に重要な役割を担っている。増殖と遺伝情報は大きく分けて 2 つの側面に関係を持っている。1 つは遺伝情報の保存媒体である染色体をコピーして娘細胞に 1 つずつ分配することである。この過程は DNA の複製と呼ばれ、大腸菌においては約 400 万個連なった塩基配列をほとんど間違えることなく複製することで達成される。このようなゲノム複製機構にもとづいて、ゲノムの全長を短くすることによって、大腸菌の増殖に必要な時間や資源を減らすことができるのではないかという考えも存在する [17,18]。増殖と遺伝情報の関係のもう 1 つの側面は、エネルギーの獲得や、DNA の複製などのあらゆる生命活動を支えている酵素はすべてその生物が持つ遺伝情報を基に作られているという点である。遺伝情報の機能単位である遺伝子の機能はすでに多くが明らかになっているが、遺伝子はゲノム上で複雑な相互作用ネットワークを持ちながら機能しているため、個々の遺伝子の機能情報から細胞増殖の特徴を完全に理解することはいまだ困難である。大腸菌の代謝を化学反応のネットワークとみなして生育に必須な酵素の生化学反応をつなぎ合わせることで大腸菌の増殖を予測する研究も行われ、特定の環境における増殖速度を予測することにも成功している [19,20]。しかし、細胞増殖には代謝に直結していない遺伝子も関連しており、大腸菌の遺伝情報と増殖の関係はいまだ未解明な部分が多い。

1.4 本研究の目的

細胞の持つ遺伝情報と、その細胞の表現型との関係を理解することは生物学において重要な問題であり、精力的な研究がなされている [14]。しかしながら、遺伝情報および表現型に関する研究が進んでいる大腸菌でさえも、遺伝情報と増殖の関係はいまだに完全な理解とは程遠い。遺伝情報と増殖の関係の理解を難しくする大きな要因は生物の複雑性であ

る。その複雑性は様々な形で理解されている。例えば遺伝情報の機能単位である遺伝子は複雑な転写制御ネットワークを形成していることがよく知られている[20–23]。そのほか、細胞内における遺伝子の発現が共有かつ有限なリソースを使用して行われること[24]、また染色体の物理的構造が遺伝子の発現にも影響を与えていることなどが知られている[25]。このような遺伝情報の機能メカニズムの複雑性が原因となって、個々の遺伝子の機能を理解することによってその遺伝子の増殖への影響を完全に理解することはできない。そこで本研究では、個々の遺伝子の機能から遺伝子やゲノム領域の細胞増殖への寄与度を要素還元的に理解するのではなく、遺伝子やゲノム領域を欠失した大腸菌の増殖の測定分析によって遺伝情報の働きを一つのシステムととらえて理解することを目的とする。

1.5 各章の位置づけ

第1章では、本研究対象である大腸菌を中心として、遺伝情報の持つ特徴や細胞増殖の生物学的役割についてまとめ、遺伝情報と細胞増殖を結びつける研究が重要であることの意義を述べた。そして、本研究ではなぜこの問題に取り組むために、遺伝子やゲノム領域の欠失した大腸菌を使用するのかを説明した。

第2章では、個々の遺伝子の欠失が細胞増殖に及ぼす影響を定量的に理解するために、遺伝子の単一欠失株の増殖速度を網羅的に評価した。その結果、発現量が高い遺伝子ほど、欠失した際に増殖速度に与える影響が大きいことを明らかにした。さらに、遺伝子の増殖に対する寄与度および遺伝子発現量は、そのゲノム上の位置に強く影響を受けていることを明らかにした。この結果は、遺伝子の個々の機能だけでなく、ゲノム全体における位置関係が遺伝子の増殖に対する貢献度を決定づける重要な役割を果たしていることを示している。

第3章では、ある程度の長さを持ったゲノム領域の欠失が細胞増殖に与える影響を理解するために、ゲノム領域の欠失が段階的に蓄積して構成される全29株からなるゲノム縮小株コレクションの網羅的増殖測定を実施した。その結果、ゲノム配列の欠失が蓄積するのに従って、増殖速度や最大菌体濁度が低下することを明らかにした。そして、培地条件やゲノムの特徴から増殖速度を予測するモデルを構築した。第3章の研究によって、ゲノムの縮小が増殖の特徴に対して及ぼす影響の定量的な関係を初めて明らかにした。

第4章では、生物進化における重要なパラメーターである自然突然変異率とゲノム縮小の関係性を理解するために、ゲノム縮小株コレクションを用いた変異率の測定を実施した。その結果、ゲノムの縮小に伴って変異率が上昇することを明らかにした。また、変異率と増殖速度は負の相関関係にあることを明らかにした。さらに、ゲノム縮小株は実験進化によって増殖速度が上昇し、変異率は低下した。これらの結果は、変異率と増殖速度の負の相関関係が、ゲノムの縮小だけでなく実験進化の過程においても保たれていたことを示している。

第5章では、環境変化に対する増殖速度を一定に保つ能力（ロバスト性）とゲノム縮小の関係を理解するため、化合物の濃度を段階的に変化させた培地を用いて増殖測定を実施した。その結果、ゲノムの縮小に伴ってロバスト性は低下することが示された。ゲノムの縮小に伴うロバスト性の低下は、炭素源、窒素源、硫黄源といったタンパク質の構成成分において有意に確認された。そして、実験進化を実施するとロバスト性は回復することが明らかになった。

第6章では、本研究全体を通して得られた、遺伝情報の欠落が細胞増殖に及ぼす影響をまとめ、それらの結果から得られる考察を述べた。ゲノムの縮小に伴った増殖速度の低下、変異率の上昇、ロバスト性の低下が細菌の進化を促進させる可能性について議論した。そして、本研究の価値を広げるために必要と考えられる研究をまとめた。

第 2 章 遺伝子の単一欠失が増殖速度に及ぼす影響の網羅的評価

2.1 背景及び目的

2.1.1 遺伝子と細胞増殖

分子生物学の発展により、遺伝子の機能に関する知見が飛躍的に蓄積されてきた[15,21]。しかしながら、個々の遺伝子の機能が明らかとなったとしても、個々の遺伝子が増殖に対してどの程度寄与しているのかを理解できるわけではない。その大きな原因として、個々の遺伝子はその発現量によって働く程度を大きく変化させることが挙げられる。つまり、遺伝子のゲノム配列情報や個々の機能アノテーションといった静的な情報だけでは、遺伝子の本当の働きは捉えられない。

個々の遺伝子の増殖に対する寄与度の理解に大きく貢献した研究として、2006年に報告された大腸菌の網羅的単一遺伝子欠失株 Keio コレクションの構築がある[26,27]。この研究によって、大腸菌のすべての遺伝子に対して単一欠失が試みられ、大腸菌 K-12 BW25113 株の全 4288 遺伝子は 303 の必須遺伝子と 3985 の非必須遺伝子へ分類された。また、Keio コレクションを用いて、非必須遺伝子が欠失した大腸菌に対する網羅的な増殖の評価や細胞形状の評価も行われている[28–32]。このような研究によって、非必須遺伝子の役割に対する実験的なデータが蓄積されてきている。

2.1.2 遺伝子発現と増殖速度

遺伝子発現が増殖速度と関係していることは遺伝子の機能メカニズムから考えても明らかである。ゲノム全体の遺伝子発現と増殖速度の関係の間の数理的な法則性も見出されている[24]。遺伝子の発現を制御する分子的・物理的要因はいくつか知られている。例えば、大腸菌の遺伝子は約 300 個の転写因子による複雑な転写制御ネットワークを構築している[21,33]。また、大腸菌ゲノムの物理的構造も遺伝子の転写に影響を与えていることも知られている[25]。一方で、遺伝子発現データに対して機械学習の手法を用いることによって、遺伝子の特徴分類を行う研究も盛んにおこなわれている。このような研究によって、外部環境の変化に応答する遺伝子群や、増殖速度に相関して発現量が変動する遺伝子群も

わかってきている[34-36]。また、大腸菌の遺伝子発現は全ゲノムに対して特定の周期性パターンを示すことが15年ほど前から知られていた[37-40]。そして興味深いことに、2020年の研究によって周期性パターンの特徴と増殖速度の間に相関関係があることが明らかとなった[41]。

2.1.3 先行研究における課題と本章の目的

遺伝情報と細胞増殖の関係性を理解するための研究は数多く行われてきたが、その研究デザインとしては大きく2つの方向性があった。1つ目は、遺伝子を欠失させた細胞の表現型を調べることによって個々の遺伝子の細胞に対する寄与を理解すること。2つ目は、同一の大腸菌を異なる環境で培養した際の遺伝子発現パターンから増殖と関連した遺伝子発現パターンの変化を調べること。しかしながら、これらの研究は別々に行われているため、個々の遺伝子の増殖への寄与度と、個々の遺伝子の発現量の直接的な関係性はあまり理解されていない。そこで本研究では、遺伝子を中心に細胞増殖と発現量の関係性を理解することを目的として、単一遺伝子欠失株の増殖速度と遺伝子が欠失する前の野生型における遺伝子発現量を分析した。そして、個々の遺伝子の増殖速度に対する寄与度と発現量を比較し、さらにそれらのゲノムワイドなパターン解析を行った。

2.2 材料と方法

2.2.1 菌株

ナショナルバイオリソースプロジェクトを分譲元とする、Keioコレクション全3909株およびその野生型株である野生型大腸菌K-12BW25113を使用した。Keioコレクションは2006年に馬場らによって発表された、大腸菌の非必須遺伝子の網羅的単一欠失株ライブラリーである[26]。欠失遺伝子の部位にはカナマイシン耐性カセットが挿入されている。

2.2.2 培地

培地にはLB天然培地、M63グルコース最少培地の2種類を使用した。各培地の組成を

一覧にして示す(Table 1、2)。培地の作成にあたり、試薬の希釈には milliQ 水(Merck Millipore)を用いた。LB 培地は成分を希釈後、オートクレーブにて滅菌及び成分の溶解を行った(121°C、20 min)。M63 培地は成分を希釈後、フィルトレーション滅菌(ステリカップ(フィルター孔径 0.22 μm)、Merck Millipore)を行った。

Table 1 LB 培地組成

components	maker	concentration
LB broth (Miller)	SIGMA-ALDRICH	25 g/L

Table 2 M63 グルコース最少培地組成

components	maker	concentration
K ₂ HPO ₄	Wako	62 mM
KH ₂ PO ₄	Wako	39 mM
ammonium sulfate	Wako	15 mM
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Wako	1.8 μM
thiamine hydrochloride	Wako	15 μM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Wako	0.2 mM
glucose	Wako	22 mM

2.2.3 Keio コレクションの冷凍ストック作成

Keio コレクションの菌株は寒天プレートのコロニー状で分譲されたので、保存及び再現測定を可能にするため、グリセロール冷凍ストックを作成した。はじめに、96 ウェルマイクロプレート (corning) に LB 培地および M63 培地を 200 μ L 入れ、コロニーから少し菌体をかき取って培地中に懸濁した。各ウェルに培地の懸濁液が用意できた 96 ウェルマイクロプレートを 37°C で一晩静置培養した。培養後、冷凍時の水の結晶化を抑えるために各ウェルに 60%グリセロールを 50 μ L (終濃度 15%) ずつ懸濁した後、-80°C で保存した。一晩の培養で生育が確認されなかった菌株は、3 mL の LB 培地を入れた試験管に植菌しなおし、37°C、200 rpm で振盪培養した。菌の生育が確認できた後、マイクロチューブに分注し、60%グリセロールを終濃度 15%になるように懸濁してから-80°C で冷凍した。野生型株 BW25113 は、6 ml の LB 培地を入れた試験管に植菌し、37°C で 6 時間ほど培養したのちにマイクロチューブに分注し、60%グリセロールを終濃度 15%になるように懸濁してから-80°C で冷凍した。

2.2.4 ハイスループットな増殖測定

2.2.4.1 増殖測定

Keio コレクション 3909 株及び野生型株 BW25113 に対して、LB 培地および M63 培地を用いて増殖測定を実施した。96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに培地を 200 μ L ずつ分注し、上記で作成した菌体のグリセロールストックから菌体を一部かき取り植菌した。プレートリーダー (EPOCH2、BioTek) を用いて、菌体の培養および菌体濁度 (OD_{600}) の経時的な測定を実施した。培養温度は 37°C、振盪速度は 567 cpm (cycles per minute) の条件で 24 時間もしくは 48 時間培養し、その間 OD_{600} を 15 分もしくは 30 分間隔で測定した。各株はそれぞれの培地条件に対し 3 再現、異なる箇所のウェルによって行った。

2.2.4.2 増殖速度および最大菌体濁度の算出

プレートリーダーの OD₆₀₀ 測定はプレートリーダー専用のソフトウェア Gen5 を用いて行った。Gen5 によって得られた時系列の OD₆₀₀ のデータを表計算ソフト Excel (Microsoft) へ出力し、各測定の増殖曲線を作成して、増殖曲線のデータをもとに増殖速度および最大菌体濁度を算出した (Figure 1)。増殖速度の算出手順として、始めに連続する 2 点間の測定における比増殖速度を以下の式を用いて算出した。

$$\mu = \frac{\ln(C_{i+1}/C_i)}{t_{i+1} - t_i} \quad \text{Equation 1}$$

ここで、式中の t_i 、 t_{i+1} は連続する 2 点の測定時の培養時間、 C_i 、 C_{i+1} は時点 t_i 、 t_{i+1} における OD₆₀₀ の値を示している。そして、増殖曲線のすべての 2 点間の比増殖速度を算出し、連続する 5 つの比増殖速度のうち、平均値が最も高く、標準偏差が小さくなる 5 点の比増殖速度の平均値をその曲線から得られる増殖速度とした。最大菌体濁度は、プレートリーダーで測定した OD₆₀₀ の連続する 5 点のうち、平均値が最も高く、標準偏差が小さくなる 5 点の OD₆₀₀ の値の平均値を最大菌体濁度とした。各条件における 3 再現の測定から得られた最大増殖速度および最大菌体濁度の平均値および標準偏差を解析に使用した。

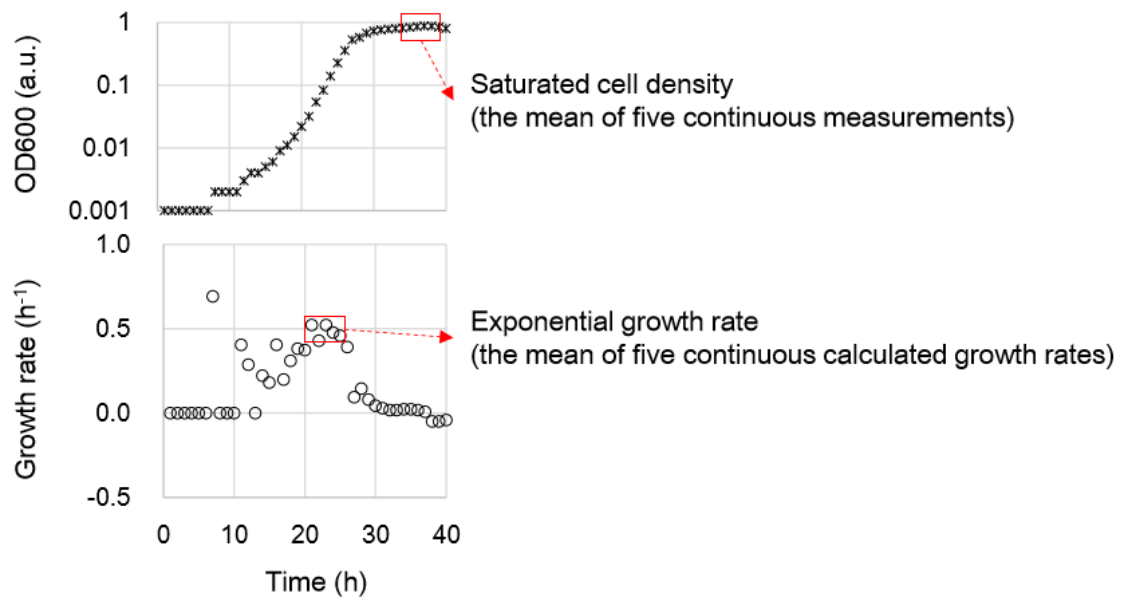


Figure 1 最大菌体濁度と増殖速度の算出

増殖曲線の測定値の連続する5点の OD₆₀₀ の平均値が最大となる平均値（上図の赤枠）をその測定における最大菌体濁度とする。増殖曲線の測定値の全ての2点間の比増殖速度を算出し、連続する5区間の比増殖速度の平均値が最大となる平均値（下図の赤枠）をその測定における最大増殖速度とする。

2.2.5 遺伝子発現解析

2.2.5.1 Total RNA 精製

Total RNA の精製および遺伝子発現解析は、野生型株 BW25113 を用いて LB 培地および M63 培地の各培地に対して3系列の再現で実施した。まず、LB 培地もしくは M63 培地を 5 mL 入れた試験管に BW25113 の冷凍ストックから少しかき取って植菌した。37°C、200 rpm で振盪培養し、指数増殖期中期（細胞濃度=約 10⁸ cells/mL）に達したところで、培養液を培養機から取り出し、氷温で冷やした RNA ストップ溶液（エタノール 90%: フェノール 10%）5 mL へ素早く混合した。続いて遠心し（7,000 rpm、4°C、3 min）、上清を取り除き、ペレットを-80°C で冷凍した。その後ペレットを解凍し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて製品説明書の指示通りに Total RNA を精製した。精製した Total RNA は RNase-free 水に溶解し、-80°C で保存した。

2.2.5.2 RNA-seq 解析

精製した大腸菌 BW25113 の Total RNA は次世代シーケンサーNovaSeq (Illumina) を用いて RNA-seq 解析を実施した。Ribo-Zero RNA removal Kit for gram negative bacteria (Illumina) を用いて Total RNA から rRNA を除去した。TruSeq Standarded mRNA LT sample prep kit (Illumina) を用いて、TruSeq Standarded mRNA sample preparation Guide (part #15031047 rev. E)に従って mRNA のライブラリー調整を実施した。NovaSeq 6000 S4 reagent kit (Illumina) を用いて、NovaSeq 6000 system user guide document #1000000019358 v02 に従って配列解析を実施した。解析した配列は、Bowtie2 を用いて、レファレンス配列 (Escherichia coli BW25113 GCF_000750555.1_ASM75055v1) に対してマッピングした。RNA-seq 解析の配列生データは GEO アクセッション番号 GSE136101 のもと、NCBI Gene Expression Omnibus database に保存した。

2.2.6 発現変動遺伝子 (DEGs) および増殖変動遺伝子 (DGGs) の評価

培地の変化によって遺伝子発現が有意に変動する遺伝子 (DEGs) および欠失株の増殖速度が有意に変動する遺伝子 (DGGs) の検出は rank product 法によって評価した。解析には解析ソフト R を用いて[42]、パッケージ RankProd を使用した[43]。FDR < 0.05 を基準として DEGs および DGGs を検出した。DEGs および DGGs の Gene category に基づいた機能エンリッチメント解析は Microsoft Excel の BINOMDIST 関数を用いて二項検定によって行い、Bonferroni 法による多重比較検定の結果得られた FDR を元に評価した。

2.2.7 周期性解析

大腸菌 BW25113 の全ゲノム長 (4,631.4 kb) を 1 kb 毎の 4632 区画に分割し、個々の遺伝子の発現量および欠失株の増殖速度を、遺伝子のゲノム上の位置と対応した区画に配置した。遺伝子の位置は、その遺伝子の中心を代表値とした。1つの区画に遺伝子が2つ以上存在する場合には平均値をとり、遺伝子が一つも存在しない区画にはその前後の区画の平均値をとった。100 区画 (kb) のウィンドウサイズで 1 区画毎の移動平均をとった後、フーリエ変換を用いて周期性解析を行った。周期性解析は、R の periodogram 関数を使

用し、周期性成分の有意性検定には *Fisher-g* 統計量を使用した[44]。

2.3 結果

2.3.1 単一遺伝子欠失株の増殖速度分布

3909 株の単一遺伝子欠失株とその野生型株 BW25113 に対して、LB 培地と M63 培地を用いた網羅的な増殖測定を実施した。その結果、いずれの培地条件においてもいくつかの遺伝子は欠失すると増殖が著しく低下した (Figure 2)。一方で大部分の株は野生型株を基準で正規分布に近い増殖速度の分布を示した (Figure 2)。この分布は、欠失しても増殖にほとんど影響を及ぼさない遺伝子が多く、増殖に及ぼす影響が大きな遺伝子程数が少ないことを意味する。M63 培地においては野生型と比較して増殖速度が低い遺伝子欠失株が多く、一方で LB 培地においては野生型と比較して増殖速度が高い遺伝子欠失株が多い (Figure 2)。このことは、LB 培地のように栄養が豊富な環境では余剰な遺伝子を持つことがコストとなっている可能性を示している。

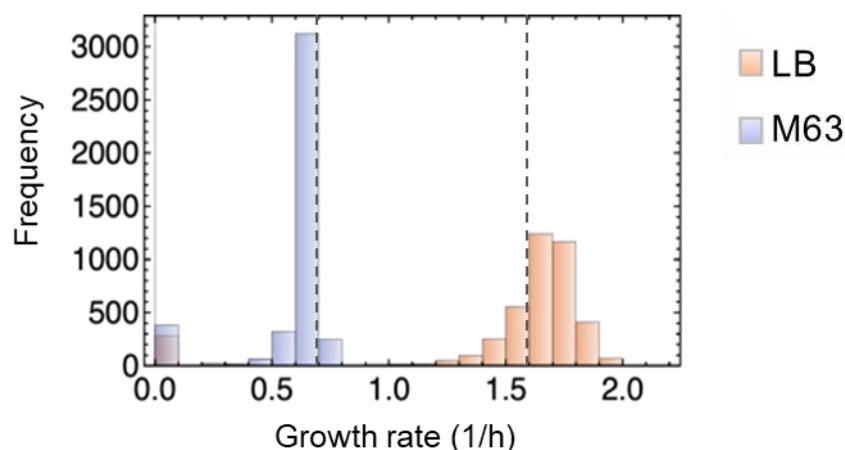


Figure 2 単一遺伝子欠失株の増殖速度分布

3909 株の非必須遺伝子単一遺伝子欠失株の LB 培地および M63 培地における増殖速度の分布がそれぞれオレンジ色および青色のヒストグラムで示されている。LB 培地および M63 培地における野生型株の増殖速度がそれぞれ 1.6 付近および 0.7 付近にひかれた垂直の点線で示されている。

2.3.2 増殖速度に基づいた非必須遺伝子の分類

遺伝子欠失株の増殖速度の分布をもとに、非必須遺伝子に対する新しい分類を試みた (Figure 3A)。ある遺伝子が野生型株において増殖に大きくポジティブに貢献している場合、その遺伝子の欠失株の増殖速度は野生型と比較して低くなると考えられ、その逆もまた然りである。そこで、遺伝子欠失株の増殖速度を非常に速い、速い、中程度、遅い、非常に遅いの5段階で分類し、その遺伝子欠失株において欠失している遺伝子を very negative、negative、neutral、positive、very positive の5つのグループに分類した (Figure 3B)。欠失すると増殖速度が非常に速くなる very negative に分類された遺伝子は、LB 培地と M63 培地の場合でそれぞれ 10 個および 14 個であった。LB 培地および M63 培地における very negative 遺伝子群には同一のものが一つも含まれていなかった (Table 3)。このことは、栄養条件が異なる場合には増殖のコストとなっている遺伝子が異なることを示している。欠失すると増殖が非常に遅くなる very positive に分類された遺伝子は LB 培地と M63 培地の場合でそれぞれ 151 個および 293 個であった (Figure 3B)。そして、63 個の遺伝子は LB 培地および M63 培地の両方において very positive 遺伝子群に含まれていた (Figure 4A)。very positive 遺伝子群に対して機能エンリッチメント解析を行った結果、いずれの培地条件における very positive 遺伝子群においても、Enzyme (e) の遺伝子が有意に多く含まれることが明らかとなった ($p < 0.01$) (Figure 4B)。この結果は、栄養条件が異なっても増殖に重要な役割を担う遺伝子は共通していることを示している。M63 培地においては、機能未知遺伝子群 (o) や機能が予測段階でしかわかっていない遺伝子群 (pe, pm) が very positive 遺伝子群に有意に多く含まれていた (Figure 4B)。この結果は、貧栄養条件においては機能がほとんど明らかとなっていない遺伝子が重要な役割を担っていることを示している。

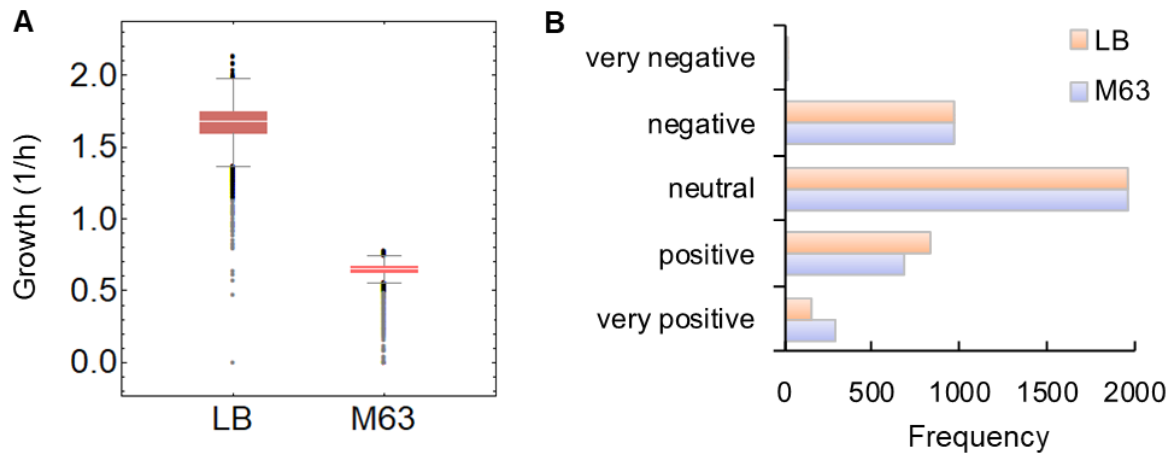


Figure 3 遺伝子欠失株の増殖速度に基づいた遺伝子の分類

(A) 3909 株の遺伝子欠失株の増殖速度を示した箱ひげ図。箱の上部は第三四分位数、箱の下部は第一四分位数、上下に延びた髭の長さは四分位範囲の 1.5 倍とした。(B) 箱ひげ図をもとに各遺伝子を 5 つのグループに分類した。欠失株の増殖速度が箱ひげ図においてひげの上限を超えている遺伝子を *very negative*、上のひげに含まれる遺伝子を *negative*、箱に含まれる遺伝子を *neutral*、下のひげに含まれる遺伝子を *positive*、ひげの下限を下回っている遺伝子を *very positive* とした。

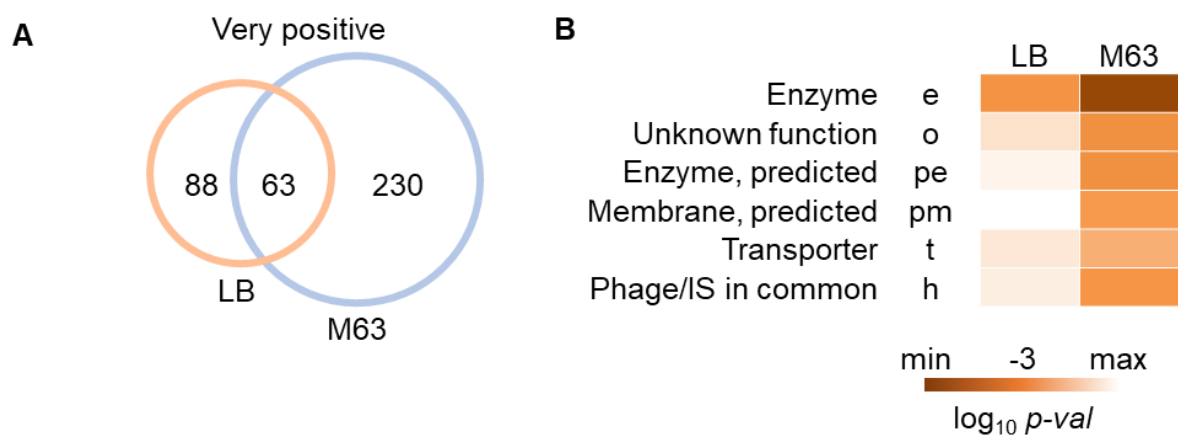


Figure 4 very positive に分類された遺伝子群の機能分析

(A) LB 培地および M63 培地における増殖測定の結果 very positive に分類された遺伝子群のベン図。ベン図中の数字は LB 培地もしくは M63 培地のみ、LB 培地と M63 培地の両方で very positive に分類された遺伝子の個数を意味している。(B) very positive に分類された遺伝子群の遺伝子機能エンリッチメント解析のヒートマップ。very positive に含まれている遺伝子群が、特定の Gene Category に多く含まれていることを二項検定によって分析した。有意性の高さを色の濃さで表している。

Table 3 増殖の負荷となっている遺伝子群

M63 培地および LB 培地において very negative に分類された遺伝子を表記している。JWID および genes は遺伝子の ID および名前を意味している。μ はその遺伝子が欠失した大腸菌の増殖速度を意味している。GC および function はその遺伝子の Gene Category の分類および機能アノテーションを意味している。

Media	JWID	Genes	μ (h ⁻¹)	GC	function
M63	JW0325	prpD	0.745	e	2-methylcitrate dehydratase
	JW4286	uxuB	0.748	e	D-mannonate oxidoreductase, NAD-binding
	JW1622	rsxD	0.75	pe	predicted inner membrane oxidoreductase
	JW5458	ygeK	0.75	pr	predicted DNA-binding transcriptional regulator
	JW3651	yidG	0.753	pm	predicted inner membrane protein
	JW3148	greA	0.753	f	transcription elongation factor
	JW3474	slp	0.753	lp	outer membrane lipoprotein
	JW2659	mprA	0.753	r	DNA-binding transcriptional regulator
	JW1527	ydeE	0.755	pt	predicted transporter
	JW5741	rnr	0.765	e	exoribonuclease R, RNase R
	JW3228	dusB	0.765	e	tRNA-dihydrouridine synthase B
	JW3561	aldB	0.769	e	aldehyde dehydrogenase B
	JW3499	bcsZ	0.775	e	endo-1,4-D-glucanase
	JW5397	hda	0.775	cp	ATPase regulatory factor involved in DnaA inactivation
LB	JW0229	frsA	1.998	r	hydrolase, binds to enzyme IIA(Glc)
	JW0858	ybjE	2.138	pt	predicted transporter
	JW1032	ymdB	2.079	o	conserved protein
	JW1446	yncD	2.009	pt	predicted iron outer membrane transporter
	JW1631	ydhA	2.083	lp	predicted lipoprotein
	JW1940	yodC	1.985	o	predicted protein
	JW2044	wcaA	2.04	pe	predicted glycosyl transferase
	JW3454	yhiI	2.126	pt	predicted HlyD family secretion protein
	JW3869	frvX	1.992	pe	predicted endo-1,4-beta-glucanase
	JW5679	rhsB	1.99	h	rhsB element core protein RshB

2.3.3 遺伝子欠失株の増殖速度と欠失遺伝子の野生型における発現量の相関

増殖測定に用いた LB 培地および M63 培地で野生型株を培養し、遺伝子発現量解析を行った。その結果、LB 培地および M63 培地のいずれの条件においても 3909 個の非必須遺伝子の野生型における遺伝子発現量とその遺伝子が欠失した株の増殖速度の間には弱いが有意な負の相関関係が確認された (Figure 5)。特筆すべき点として、増殖速度の値は 3909 株の遺伝型の異なる大腸菌から得られたデータであるにもかかわらず、野生型 1 種類の株から得られた遺伝子発現量との間に相関関係がみられたことは驚くべきことである。ここで見られた増殖速度と遺伝子発現の間の相関関係は、いくつかの先行研究で報告されているような単一の大腸菌株における、増殖速度に相関して遺伝子発現の特徴が変動することとは異なる現象である。

培地条件が変化した際に発現量が変動する遺伝子 (DEGs) と欠失した際の増殖速度が変動する遺伝子 (DGGs) が対応しているのかを確認した。Rank Product 法による統計分析の結果、DEGs は 199 個検出され、DGGs は 115 個検出された ($FDR < 0.05$) (Figure 6AB)。機能エンリッチメント分析の結果、enzyme (e) や transporter (t)、そして機能が明確にはわかっていない遺伝子群 (o、pe、pm、pr、pt) などが培地環境の変動に大きく応答していることが明らかとなった (Figure 6C)。さらに、DEGs および DGGs の両方に検出された 29 遺伝子はすべて、M63 培地での培養と比較して LB の培養時に遺伝子発現量は低くなり、増殖に対する寄与度も低くなる遺伝子であった (Figure 6D)。そしてそれらの多くはアミノ酸の代謝に関連していることが明らかとなった (Table 4)。この結果は、LB 培地のように栄養が豊富な条件においてはアミノ酸の代謝に関わる酵素生産が大腸菌にとってコストとなっていることを示唆している。

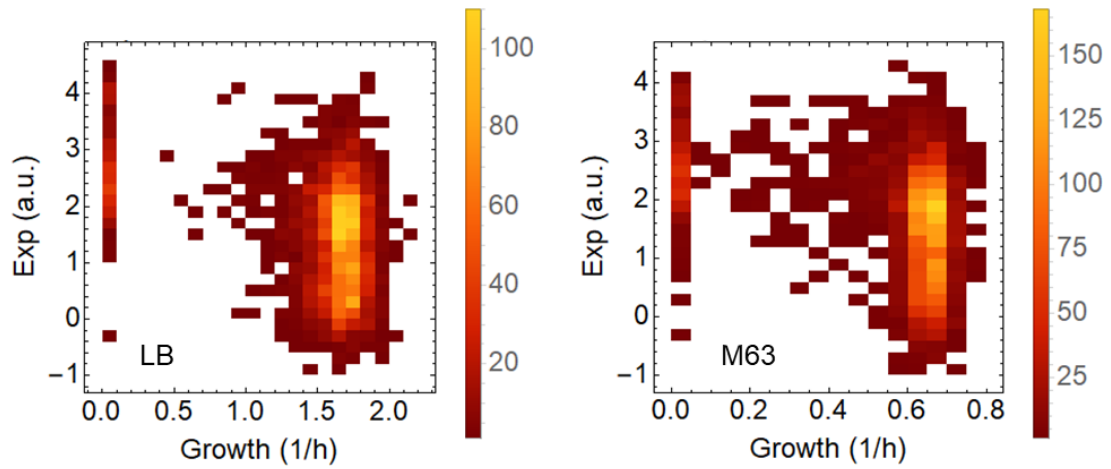


Figure 5 増殖速度と遺伝子発現の相関分析

左と右のグラフはそれぞれ LB 培地および M63 培地の培養条件における 3909 株の単一遺伝子欠失株の増殖速度と野生型株における遺伝子発現量の散布図。赤から黄色にかけての色のグラデーションはプロット（株・遺伝子）の密度を表している。LB 培地および M63 培地における Spearman の相関係数及び p 値はそれぞれ $\rho = -0.37$ ($p = 4 \times 10^{-36}$), $\rho = -0.39$ ($p = 2 \times 10^{-70}$) を示した。

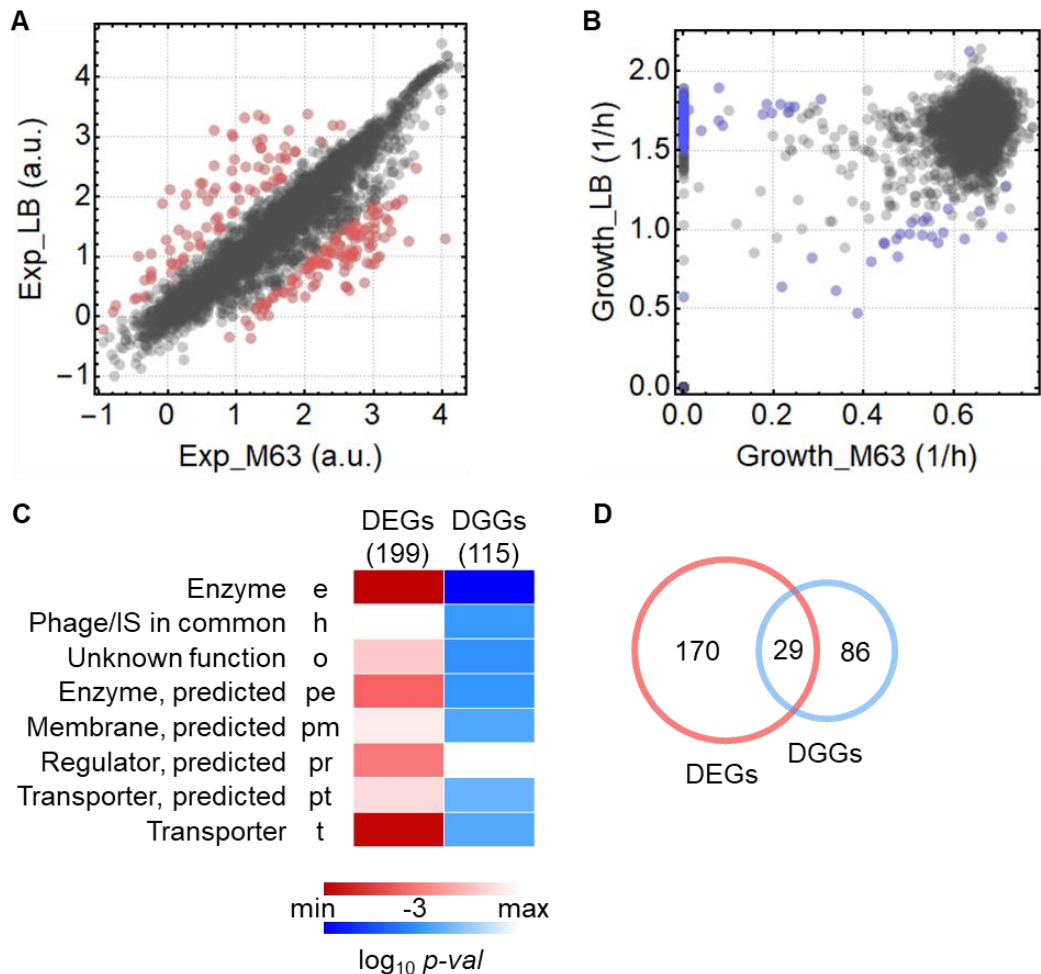


Figure 6 培地の変化に反応して発現量および増殖速度が変化する遺伝子

(A) 野生型株の遺伝子発現量の散布図。Exp_LB および Exp_M63 はそれぞれ LB 培地および M63 培地において指数増殖期で増殖している野生型株の遺伝子発現量 (\log_{10} RPKM) を意味する。培地の違いによって遺伝子発現量が有意に異なる遺伝子 (DEGs) は赤色で示されている。(B) 遺伝子欠失株の増殖速度の散布図。Growth_LB および Growth_M63 はそれぞれ LB 培地および M63 培地における遺伝子欠失株の増殖速度を意味している。培地の違いによって増殖速度が有意に異なる株において欠失している遺伝子 (DGGs) は青色で示されている。(C) DEGs と DGGs の機能エンリッチメント解析のヒートマップ。赤色および青色が濃いほど、DEGs および DGGs が特定の Gene Category に多く含まれていることを表す。(D) DEGs と DGGs のベン図。ベン図中の数字は DEGs もしくは DGGs のみ、DEGs と DGGs の両方に属している遺伝子数を表している。

Table 4 DEGs および DGGs に共通した遺伝子

DEGs および DGGs に共通して含まれていた遺伝子を記している。DEGs および DGGs は LB 培地と M63 培地の条件において遺伝子発現量および欠失株の増殖速度が有意に上昇もしくは低下した遺伝子を意味する。JWID および Genes は遺伝子の ID および名称を意味する。GC および function は遺伝子の Gene Category 分類および機能アノテーションを意味する。

DEGs LB/M63	DGGs LB/M63	JWID	Genes	GC	function
low	high	JW2786	argA	e	fused acetylglutamate kinase homolog (inactive) / amino acid N-acetyltransferase
low	high	JW5553	argB	e	acetylglutamate kinase
low	high	JW3930	argC	e	N-acetyl-gamma-glutamylphosphate reductase, NAD(P)-binding
low	high	JW3140	argG	e	argininosuccinate synthetase
low	high	JW3932	argH	e	argininosuccinate lyase
low	high	JW0758	bioB	e	biotin synthase
low	high	JW0760	bioC	pe	predicted methltransferase, enzyme of biotin synthesis
low	high	JW0761	bioD	e	dethiobiotin synthetase
low	high	JW2720	cysC	e	adenosine 5'-phosphosulfate kinase
low	high	JW2722	cysD	e	sulfate adenylyltransferase, subunit 2
low	high	JW2732	cysH	e	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase
low	high	JW2733	cysI	e	sulfite reductase, beta subunit, NAD(P)-binding
low	high	JW2721	cysN	e	sulfate adenylyltransferase, subunit 1
low	high	JW2416	cysW	t	sulfate/thiosulfate transporter subunit / membrane component of ABC superfamily
low	high	JW2003	hisC	e	histidinol-phosphate aminotransferase
low	high	JW3747	ilvC	e	ketol-acid reductoisomerase, NAD(P)-binding
low	high	JW0073	leuA	e	2-isopropylmalate synthase
low	high	JW5807	leuB	e	3-isopropylmalate dehydrogenase
low	high	JW0071	leuC	e	3-isopropylmalate isomerase subunit, dehydratase component
low	high	JW0070	leuD	e	3-isopropylmalate isomerase subunit
low	high	JW0074	leuL	l	leu operon leader peptide
low	high	JW3973	metA	e	homoserine transsuccinylase
low	high	JW3805	metE	e	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate-homocysteine S-methyltransferase
low	high	JW3913	metF	e	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
low	high	JW2880	serA	e	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
low	high	JW1252	trpA	e	tryptophan synthase, alpha subunit
low	high	JW1254	trpC	e	fused indole-3-glycerolphosphate synthetase / N-(5-phosphoribosyl)anthranilate isomerase
low	high	JW1255	trpD	e	fused glutamine amidotransferase (component II) of anthranilate synthase / anthranilate phosphoribosyl transferase
low	high	JW1256	trpE	e	component I of anthranilate synthase

2.3.4 増殖速度と遺伝子発現に共通したゲノム周期性

個々の遺伝子の増殖への影響と遺伝子発現量の関係性をゲノムシステムレベルで捉えるために、個々の遺伝子のゲノム上の位置との関係性を調べた。遺伝子はあまりに膨大な数存在しているため、各遺伝子の欠失株の増殖速度を配置してみてもあまりに複雑で特徴的なパターンは確認できない。そこで、100 kb のウィンドウサイズでの移動平均をとった後にゲノム全体のパターンを理解するためにフーリエ変換を利用した周期性解析を実施した。ここで、必須遺伝子は欠失すると増殖ができなくなるため、増殖速度を 0 として解析に使用した。周期性解析の結果、LB 培地および M63 培地いずれの条件においてもゲノム全体の遺伝子欠失株の増殖速度のパターンは 772 kb の周期性成分を最も強く含んでいることが明らかとなった (Figure 7A)。そして、772 kb の波長の周期を持つ正弦波曲線でフィッティングを行ったところ、遺伝子欠失株の増殖速度は全ゲノム長に対して 6 周期の周期性を示すことが明らかとなった (Figure 7B)。次に、遺伝子の発現量に対しても同様の周期性解析を行った結果、LB 培地および M63 培地いずれの条件においても 772 kb の周期性成分を有意に強く含んでおり、全ゲノム長に対して 6 周期の周期性を示した (Figure 7CD)。ここで、LB 培地における遺伝子発現は 4632 kb の波長の周期性成分を最も強く含んでいたが、これは全ゲノム長と一致しているため 2 番目に強い 772 kb の波長の周期性成分を使用した。周期性解析の結果より、LB 培地および M63 培地いずれの条件においても、遺伝子欠失株の増殖速度のゲノム周期性と遺伝子発現のゲノム周期性は山と谷がちょうど反転した同一の 6 周期の周期性を示した。この結果は遺伝子欠失株の増殖速度と野生型における遺伝子発現量の間負の相関関係がゲノムスケールのパターンにおいても反映されていることを示している。

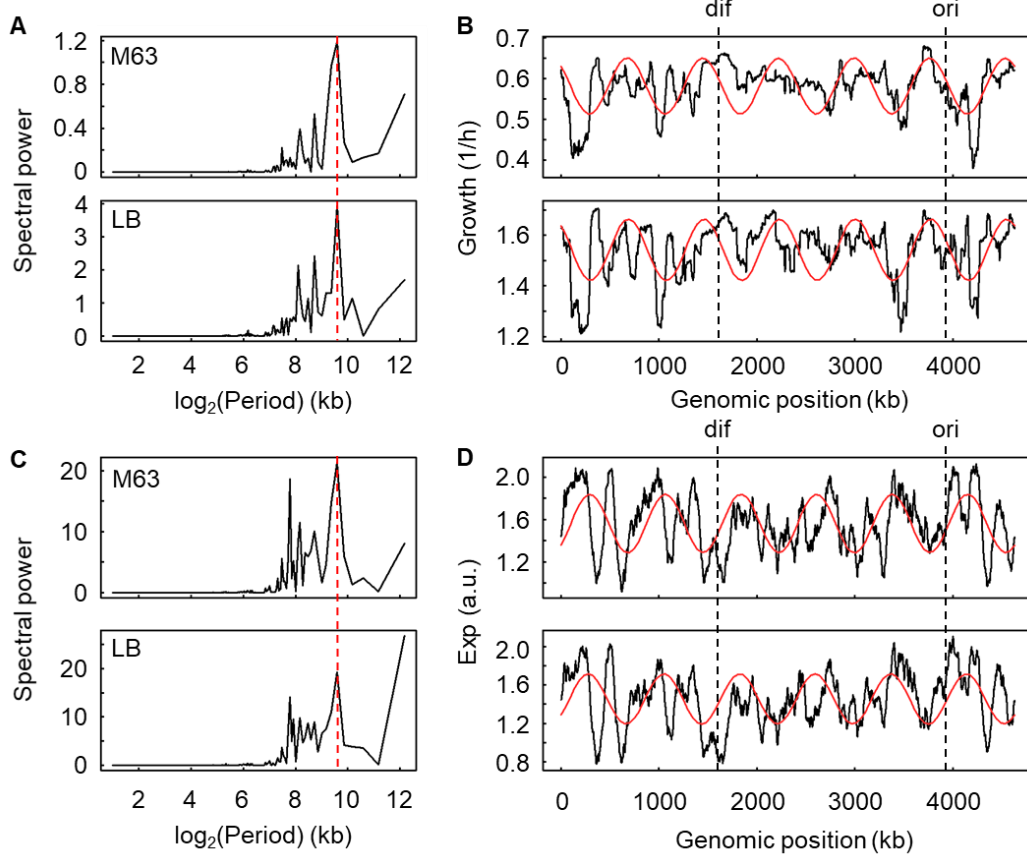


Figure 7 増殖速度と遺伝子発現量のゲノム周期性

(A) 増殖速度のフーリエ変換によって得られたパワースペクトル。最もパワーが高い周期 (772 kb) を垂直の赤い破線で示している。(B) BW25113 のゲノムに対して、非必須遺伝子のゲノム座標に遺伝子欠失株の増殖速度を、必須遺伝子のゲノム座標には 0 を対応させた。100 kb のウィンドウ幅で 1 kb 毎に移動平均をとった結果を黒い折れ線グラフで示している。最も強く含まれる周期性成分 (A の赤い破線) を持つ正弦波でフィッティングした結果を赤い曲線で示している。上下のグラフはそれぞれ M63 培地および LB 培地における増殖速度の周期性解析結果を示しており、最も強く含まれる周期性成分の *Fisher-G* 統計量はそれぞれ 0.168 ($p = 2 \times 10^{-182}$) および 0.146 ($p = 1 \times 10^{-155}$) を示した。

(C) 遺伝子発現のフーリエ変換によって得られたパワースペクトル。最もパワーが高い周期 (772 kb) を垂直の赤い破線で示している。(D) BW25113 のゲノムに対して、野生型における遺伝子発現量対応させた。上下のグラフはそれぞれ M63 培地および LB 培地における遺伝子発現の周期性解析結果を示しており、最も強く含まれる周期性成分の *Fisher-G* 統計量はそれぞれ 0.123 ($p = 3 \times 10^{-129}$) および 0.099 ($p = 2 \times 10^{-102}$) を示した。

2.4 考察

2.4.1 周期性を生み出す要因

本研究において確認された、遺伝子欠失株の増殖速度と遺伝子発現に共通した6周期の周期性はどのような要因に起因しているのだろうか。大腸菌をはじめとした細菌の染色体は核様体タンパク質によって特有の折り畳み構造を形成していることが知られている[45,46]。そして、この折り畳み構造によって遺伝子の発現を制御していることが明らかとなっている[47-49]。さらにいくつかの研究においては、核様体タンパク質の働きと遺伝子発現のゲノム周期性の関連が議論されている[37,41]。さらに興味深いことに、大腸菌の染色体は4つのマクロドメインという特有の構造を持つ領域と2つの非構造領域の6つの領域に分類されている[50,51]。しかし、大腸菌のマクロドメイン構造の形成メカニズムについてはいまだ完全な理解には至っていない。本研究で確認された遺伝子欠失株の増殖速度および遺伝子発現の周期性とマクロドメインの位置を重ね合わせてみても、マクロドメインがゲノム周期性に影響を与えているかどうかは判断に難しい (Figure 8)。しかし、全ゲノムに対する周期の数とドメイン構造の数の一致は、マクロドメイン構造がゲノム周期性に影響を与えている可能性が十分に考えられる。

遺伝子欠失株の増殖速度が全ゲノム長に対する周期性は、遺伝子の増殖に対する重要度が全ゲノム長に対して周期的なパターンで増減していることを示している。そこで、増殖に対して最も重要な必須遺伝子配置がゲノム周期性の形成に寄与しているのか確認した。必須遺伝子を入れずに Keio コレクション 3909 株の増殖速度のみを用いて周期性解析を行った結果、M63 培地および LB 培地における増殖速度はそれぞれ、波長 661.7 kb および 2316 kb の周期性成分が最も強く含まれる結果となった (Figure 9A)。この波長はそれぞれ、全ゲノムに対して7周期および2周期の周期性パターンを示す (Figure 9B)。この結果は、必須遺伝子と非必須遺伝子を合わせて周期性解析を行った場合に確認された6周期の周期性パターンの形成には、必須遺伝子が寄与していることを示している。また、単純に必須遺伝子の遺伝子発現結果を取り除いて、遺伝子発現の周期性解析を行った場合には6周期のパターンは変化しないことが示された。必須遺伝子を実際に欠失させたら生育ができないため確認はできないが、もしも必須遺伝子を欠失させた場合にはゲノム全体の遺伝子発

現に非常に大きな影響を及ぼして周期性パターンに大きな変化が起きると考えられる。

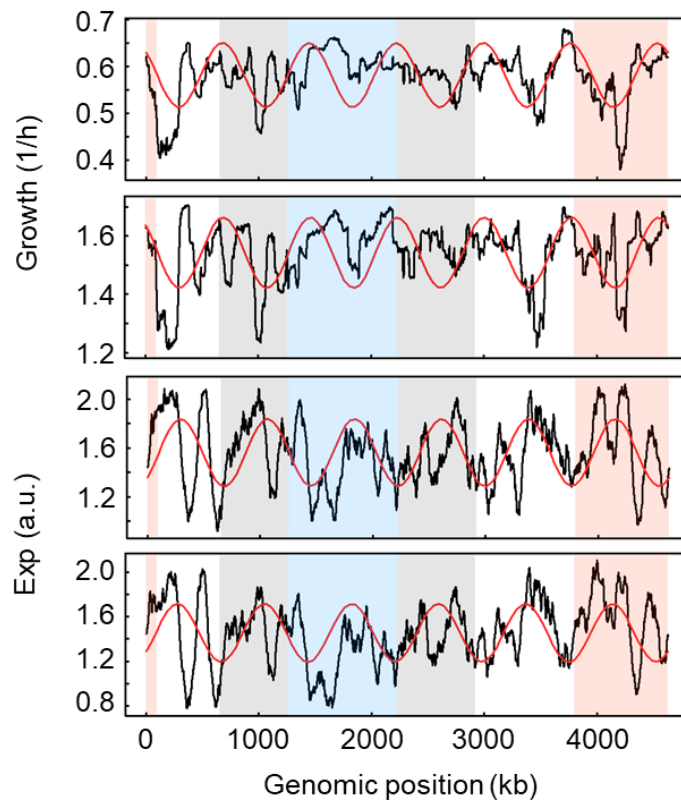


Figure 8 増殖速度および遺伝子発現の周期性とマクロドメインの対応

Figure 7B および 7D で示した増殖速度および遺伝子発現のゲノム周期性を示した。背景の色は赤、灰色、青、灰色がそれぞれ ori、right、ter、left の大腸菌マクロドメイン構造に対応している。白い背景の領域はそれぞれ non-structured right、non-structured left の領域に対応している。

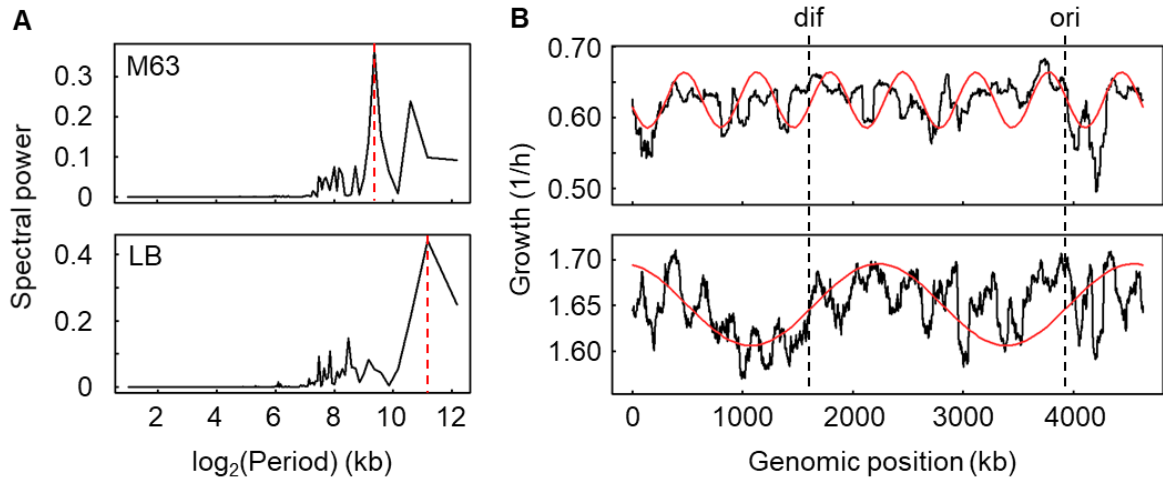


Figure 9 単一遺伝子欠失株の増殖速度のゲノム周期性

(A) 単一遺伝子欠失株の増殖速度のフーリエ変換によって得られたパワースペクトル。垂直に引かれた赤い破線は M63 培地および LB 培地において最もパワーが高い周期 (661.7 kb、2,316 kb) を表している。(B) BW25113 のゲノムに対して、非必須遺伝子のゲノム座標に遺伝子欠失株の増殖速度を対応させた。100 kb のウィンドウ幅で 1 kb 毎に移動平均をとった結果を黒い折れ線グラフで示している。最も強く含まれる周期性成分 (A の赤い破線) を持つ正弦波でフィッティングした結果を赤い曲線で示している。上下のグラフはそれぞれ M63 培地および LB 培地における増殖速度の周期性解析結果を示しており、最も強く含まれる周期性成分の Fisher-G 統計量はそれぞれ 0.199 ($p = 1 \times 10^{-207}$) および 0.199 ($p = 2 \times 10^{-220}$) を示した。

2.4.2 増殖速度と最大菌体濁度の関係

遺伝子単一欠失株 3909 株の増殖速度と最大菌体濁度の間には LB 培地および M63 培地いずれの結果においても有意な正の相関関係が確認された (Figure 10)。これは、しばしば増殖速度と集団サイズの間トレードオフ関係として知られている r/K 選択とは相反する結果である。r/K 選択は、生き残りの戦略として、増殖するスピードを上げる戦略 (r-戦略) と、一定の環境範囲内に生育可能な個体数の上限 (環境収容能力) を上げる戦略 (K-戦略) の 2 つ存在し、一般的には両戦略の達成の間にはトレードオフ関係があることが知られている [52,53]。元々は種ごとの生存戦略を示す理論として知られていたが、同一の種内にお

いてもこの法則が当てはまる例が確認されている。例えば、大腸菌や乳酸菌の実験進化において、増殖速度と最大菌体濁度がトレードオフ関係にあるという報告が複数報告されている[54,55]。また、分子生物学の知識と数理モデルを組み合わせ、微生物の増殖速度および最大菌体濁度間のトレードオフのメカニズムも研究されている[56]。

本研究において確認された増殖速度と最大菌体濁度の正の相関関係が、本研究の測定に特有の現象なのか、それとも Keio コレクションにおいては普遍的な現象であるのかを確認するために、Keio コレクションの増殖に関する公開データを用いた解析を行った。解析には3つの異なる研究、培養条件から得られたデータを使用した。1つ目は M9 培地で 384 ウェルマイクロプレートを用いた液体培養の OD₆₀₀ の測定結果[31]、2つ目は LB 寒天培地での培養におけるコロニー体積の測定結果[30]、3つ目は M9 培地で 96 ウェルマイクロプレートを用いた液体培養での OD₆₀₀ の測定結果である[29]。培養方法や増殖測定の手法が異なっているにもかかわらず、いずれの研究結果においても同じように増殖速度と最大集団サイズの間には正の相関関係があることを確認した (Figure 11)。

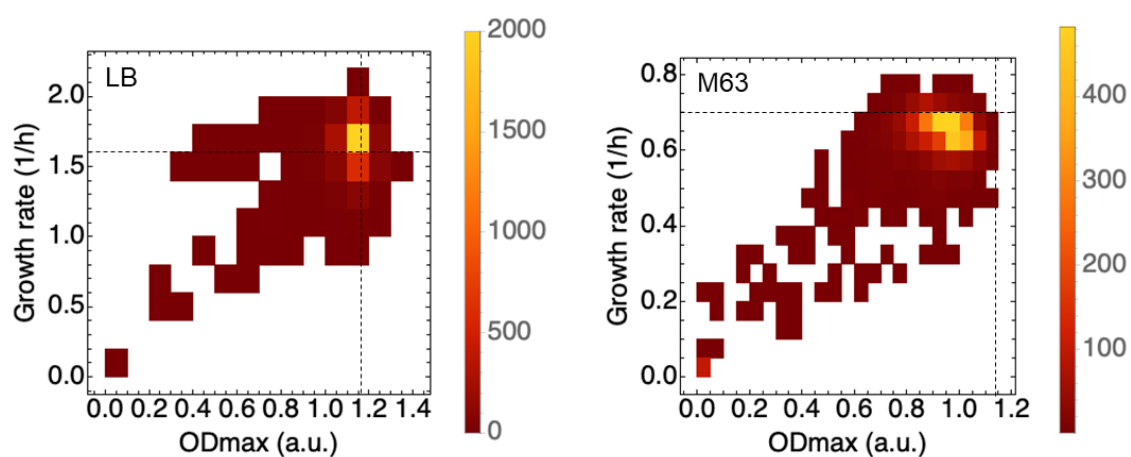


Figure 10 単一遺伝子欠失株の増殖速度および最大菌体濁度の相関分析

左と右のグラフはそれぞれ、LB 培地および M63 培地における単一遺伝子欠失株 3909 株の増殖速度及び最大菌体濁度の関係を示した散布図である。赤から黄色にかけての色のグラデーションは株の密度を表す。黒い破線はそれぞれの培地における野生型株の増殖速度および最大菌体濁度を示す。LB 培地 ($p = 1 \times 10^{-4}$)、M63 培地 ($p = 7 \times 10^{-6}$) いずれの条件においても有意な正の相関が示された。

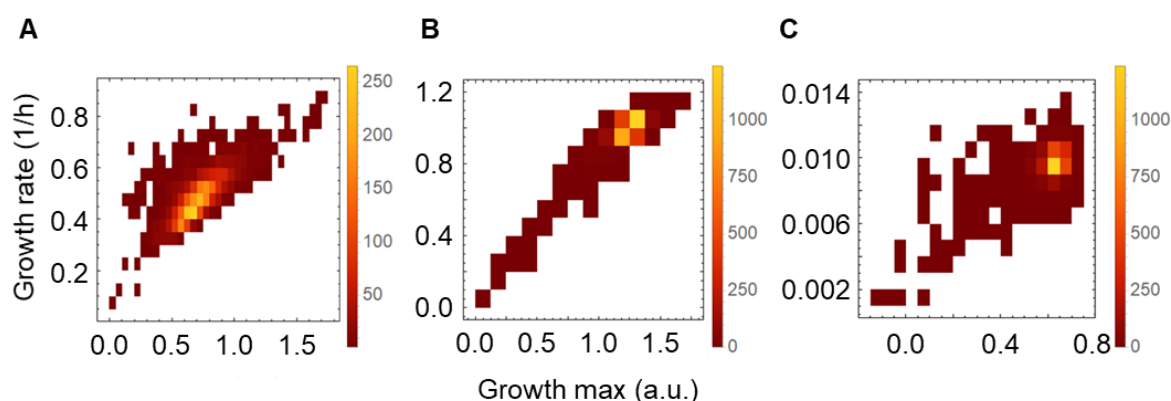


Figure 11 公開データを用いた増殖速度と最大菌体濁度の相関解析

Keio コレクションを使用した増殖測定の結果における増殖速度及び最大菌体濁度の関係を示した散布図。赤から黄色にかけての色のグラデーションは株の密度を表す。増殖速度および最大菌体濁度は相対値で示している。培養条件および菌株数は (A) M9 培地、384 ウェルマイクロプレート ($N=3907$) (B) LB 寒天培地 ($N=3350$) (C) M9 培地、96 ウェルマイクロプレート ($N=3301$)。

2.5 結論

本研究では、遺伝子の単一欠失株の増殖速度を網羅的な測定と野生型株における遺伝子の発現量を組み合わせることによって、遺伝子の増殖に対する寄与度と遺伝子発現量との間に相関関係があることを初めて明らかにした。これまでの研究においては、個々の遺伝子欠失株の増殖の特徴分析、増殖速度に関連した遺伝子発現パターンは調べられてきたが、3909 株の異なる大腸菌から得られた増殖速度のデータと野生型における 3909 遺伝子の発現量との間の相関関係は新規の発見である。さらに、遺伝子欠失株の増殖速度と野生型の遺伝子発現の周期性解析によって、増殖速度と遺伝子発現が同様に全ゲノムに対して 6 周期の周期性を示すことが明らかとなった。遺伝子発現の周期性はこれまでも知られていたが、3909 株の異なる大腸菌の増殖速度をゲノム上に並べたときに周期性を示したことは驚くべき結果である。本研究によって明らかになった、個々の遺伝子の増殖に対する寄与度の定量的データセットおよび周期性パターンは、増殖速度を保ったゲノム縮小株および人工ゲノム合成においても有用な情報を提供する。

第3章 ゲノムの縮小に 관련된 増殖速度の低下

3.1 背景及び目的

3.1.1 ゲノム縮小株の意義

大腸菌は生物の中でも生物学的な知見が最も蓄積された微生物と言える。さらに、その増殖能力の高さやゲノム操作の容易さから、物質生産などの工業利用にも広く用いられている[1,2]。近年では CRISPER-Cas9 などの新しい技術の大腸菌のゲノム工学への適用や[10]、大腸菌でのタンパク質生産の新しいツールの開発など[57]、大腸菌の生物工場としての役割は勢いを増している。ゲノム工学技術が大きく進歩する一方で、大腸菌をはじめとした生きた細胞の増殖や代謝のシミュレーションはいまだ大きな壁がある。遺伝子同士は細胞内で複雑に相互作用しあうため、組み込んだ外来遺伝子が思った通りに働かないことは多い[58]。比較的遺伝子数が少なく知見の多い大腸菌でさえ、その振る舞いを完全に理解するにはあまりに複雑なのである。そこで、生育に不必要な遺伝子を取り除くことによって、予測不能な遺伝子間相互作用の可能性が低く不必要な遺伝子を保持するコストが低い、理想的な生物工場の実現を目的として、大腸菌のゲノム縮小株が構築されている[17,59]。

3.1.2 代表的な大腸菌ゲノム縮小株の特徴

これまでにいくつかの大腸菌ゲノム縮小株が構築されている。ここでは、ゲノム縮小株の設計デザインおよび増殖の特徴についてまとめる (Figure 12)。

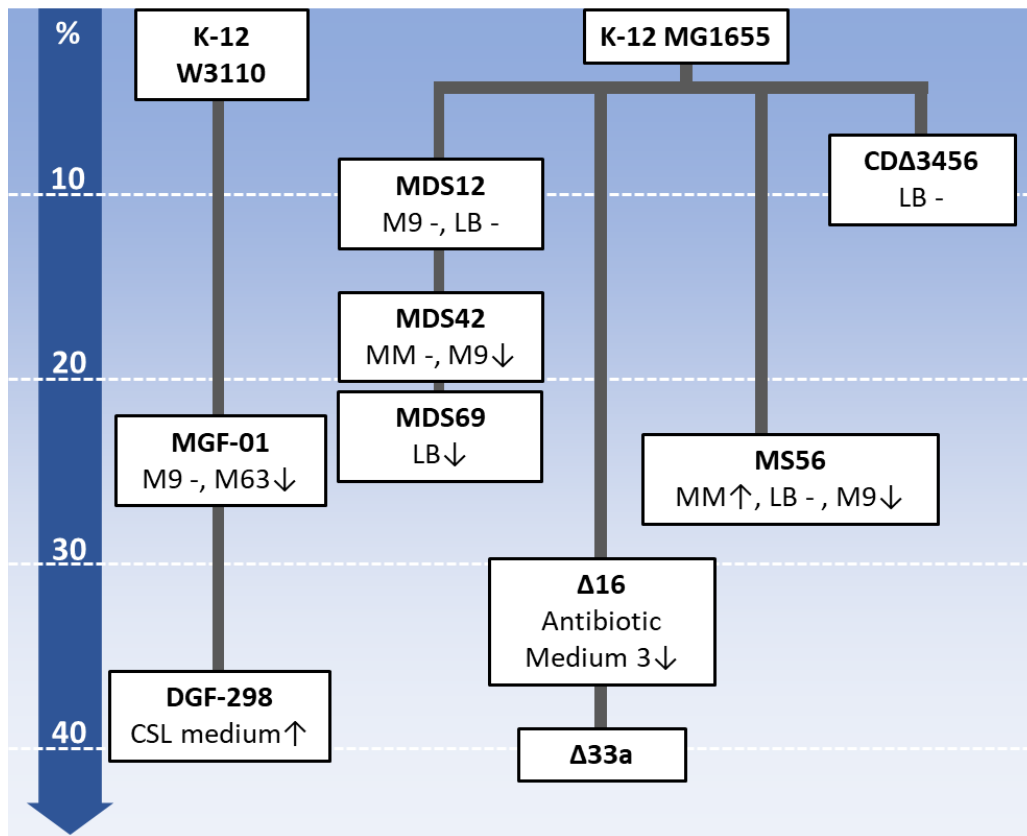


Figure 12 大腸菌ゲノム縮小株の増殖の特徴

野生型 W3110 および MG1655 から構築されたゲノム縮小株が、ゲノム全長に対する欠失領域の相対的な長さに応じて上から下まで配置されている。枠をつなぐ線は各株の構築における系統関係を示している。枠内にはゲノム縮小株の名前、増殖測定に用いられている培地、増殖速度の特徴が示されている。野生型と比較して増殖速度が上昇した場合には上向きの矢印、低下した場合には下向きの矢印、変化がない場合にはハイフンで表記されている。

3.1.2.1 Minimum Genome Factory (MGF)

2008 年に報告された MGF-01 は大腸菌 K-12 W3110 を野生型株とし、全ゲノムの約 22% が欠失している[60]。欠失領域のターゲットには大腸菌と同じγ-プロテオバクテリアに属し、約 641 kb と小さなゲノムを持つ *Buchnera sp.*との比較ゲノム解析の結果、10 遺伝子以上連続して大腸菌のみが保有している領域が選択された。合計で 95 個の欠失領域のターゲットから、実際に欠失させたときに大腸菌の生育に大きな悪影響を及ぼさなかった 53 の

領域が欠失された。MGF-01 の増殖の特徴としては、M9 最少培地で培養した際に増殖速度は野生型と似ているが、飽和期の細胞濃度が約 1.5 倍に増加したと報告されている[60]。2013 年には MGF-01 からさらに機能未知遺伝子や不必要な遺伝子 (ISs や toxin-antitoxin システムなど) を取り除き、全ゲノムの約 36%が欠失した DGF-298 が構築された[61]。そして、DGF-298 は野生型と比較して増殖速度は速く、最大菌体濃度は高くなることが報告された。

3.1.2.2 Multiple-Deletion Series (MDS)

2002 年に報告された MDS12 は、大腸菌 K-12 MG1655 を野生型株とし、K-12 株に特有に見られる全 12 か所の K アイランドの欠失によって、野生型ゲノムの約 8.1%が欠失している[62]。2006 年には MDS12 からさらにゲノムを縮小し、全ゲノムの約 14%が欠失した MDS42 が報告されている[63]。欠失領域は、大腸菌株 CFT073、EDL933、RS218、DH10B、O157:H7 および *Shigella flexneri* 247T との比較ゲノム解析の結果、K-12 株のみにみられるゲノム領域をターゲットとした。MDS42 はクリーンゲノム大腸菌株として知られ、多くの研究に用いられている。ある報告では MOPS 培地および LB 培地での生育は野生型株と変わらなかったという報告があるが[63]、M9 培地における増殖速度は野生型株と比較して 20%ほど低下したという報告もある[64]。そして 2016 年には、MDS42 からさらにゲノム領域を欠失させ、全ゲノムの約 20%が欠失した MDS69 が報告された。この研究においては、LB 培地において MDS69 は野生型株と比較して増殖速度が 17%低下したと報告されている[65]。

3.1.2.3 Δ16

2005 年に報告された Δ16 はその野生型大腸菌である MG1655 の全ゲノムに対して約 30%のゲノム配列が欠失している[66]。欠失領域は、文献情報をもとに評価した必須遺伝子を避ける形で決定された。野生型株の倍加時間が 26.2 分であるのに対し、Δ16 の倍加時間は 45.4 分に伸びたと報告されており、増殖速度が遅くなったことが示されている。2011 年には Δ16 からさらにゲノム配列を欠失させ、野生型と比較して約 40%のゲノム配列が欠

失した $\Delta 33a$ が構築された[67]。

3.1.2.4 MS56

2014 年に報告された MS56 はその野生型大腸菌である MG1655 の全ゲノムに対して約 23%のゲノム配列が欠失している[68]。欠失領域は ISs、K アイランド、鞭毛遺伝子、絨毛遺伝子、リポ多糖遺伝子がターゲットとされた。MS56 は LB 培地においては野生型株と同等の増殖速度を持つと示されているが、最少培地においては野生型と比較して増殖が速くなるという報告と遅くなるという報告が存在する[68,69]。

3.1.2.5 CD $\Delta 3456$

2002 年に報告された CD $\Delta 3456$ は MG1655 を野生型株とし、全ゲノムの約 7%が欠失している[70]。ゲノム配列の欠失には Tn5 トランスポゾンおよび Cre/loxP 組換えシステムを用いて、ランダムな領域を欠失させた。CD $\Delta 3456$ は LB 培地において野生型と同等の増殖を示したと報告されている。

3.1.3 培地条件と増殖速度

微生物培養において培地は、生育に必要な栄養源として、また生育空間として必須な働きを担っている。培地には大きく分けて、化学組成が明確ではない天然物を使用した天然培地と人工的に化学成分を組み合わせてことによって作成する合成培地が存在する。LB 培地は大腸菌培養に最も一般的な天然培地で、トリプトン、酵母抽出物、塩化ナトリウムなどを材料として作成される[4]。一般的に天然培地は合成培地と比較して栄養が豊富で、大腸菌をはじめとした細菌はより速く生育するという利点がある。一方で、合成培地であればその組成が完全に理解されているため、培地成分と細胞増殖の関係を理解することができるという利点がある。

3.1.4 先行研究における課題と本章の目的

これまでにいくつかの大腸菌ゲノム縮小株が構築されてきた。しかし、それらの研究の

は工業生産に最適な生物工場を構築することを最重要な目的としているものがほとんどである。その背景から、目的産物の収量の向上に注目が集められている一方で[60,68,71]、ゲノム縮小株自体の生物学的特徴についての知見はあまり報告されていなかった。また、増殖について調べられている場合も 2 つの点において課題が残っている。1 点目は多くの場合はゲノムの縮小が最も蓄積された株のみに対して行われている点である。そのため、ある特定の遺伝子を欠失したために増殖に影響が出たのか、ゲノムが短くなることが増殖に影響を与えているのか、といった情報が得られていなかった。2 点目は、ほとんどの場合はひとつの培地条件でしか増殖の評価をしていないという点である。培地条件によって増殖がどのように影響を受けるのかを理解することは工業的な実用を考えた場合にも重要な点である。そこで本研究では、ゲノムの縮小が細胞増殖に対して及ぼす影響を定量的に評価することを目的とした。この目的を達成するために全 29 株からなる大腸菌ゲノム縮小株コレクションの増殖の特徴を、3 種類の培地を用いて網羅的に分析した。本研究によって得られたデータは、増殖速度に影響が少ないゲノム縮小株のデザインに大きく寄与するものである。

3.2 材料と方法

3.2.1 使用した大腸菌株

ナショナルバイオリソースプロジェクトを分譲元とする、協和発酵広域欠失株コレクション (KHK コレクション) の中から、野生型株 W3110 とゲノム縮小型 28 株を使用した。本ゲノム縮小株コレクションはゲノム配列の欠失を蓄積しながら株が構築されている。本研究では便宜的に、野生型株を No. 0、ゲノム縮小型株を 28 段階のゲノム配列の欠失の蓄積に伴って No. 1 から No. 28 と命名した。最もゲノム配列の欠失が蓄積した No. 28 では野生型 W3110 の全ゲノムの約 21%のゲノム配列が欠失している。KHK コレクションは 2008 年に報告された MGF シリーズであり、本研究において No. 28 として扱う株は MGF-01 に対応している[60]。

3.2.2 使用した培地

本研究では LB 培地、M63 培地、MAA 培地（M63 培地に対して、20 種類のアミノ酸を添加）の 3 種類を用いた。LB 培地および M63 培地の組成は第 2 章で示した通りである。MAA 培地の組成を次に示す（Table 5）。MAA 培地は M63 培地と同様に、すべての培地成分を milliQ 水に溶解したのちにフィルトレーション滅菌した。

Table 5 MAA 培地組成

19AA はチロシンを除くタンパク質を合成する 19 種類のアミノ酸を意味する。

components	maker	concentration
K ₂ HPO ₄	Wako	62 mM
KH ₂ PO ₄	Wako	39 mM
ammonium sulfate	Wako	15 mM
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Wako	1.8 μM
thiamine hydrochloride	Wako	15 μM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Wako	0.2 mM
glucose	Wako	22 mM
19AA	Wako	0.2 mM
Tyr	Wako	0.05 mM

3.2.3 大腸菌株グリセロールストック作成

増殖測定の実験性の向上および株間の細胞状態の違いの抑制を目的に、均一な大腸菌株グリセロールストックを作成した。菌株は始め寒天プレートにコロニーを形成した状態で分譲されたため、3 mL の M63 培地を入れた試験管へ菌体を植菌し、振盪培養機で振盪培養（37°C、200 rpm）した。指数増殖期（OD₆₀₀ = 0.01~0.1）に到達したら、培養液 750 μL と 60%グリセロール 250 μL を混合し、1.5 mL スクリューキャップチューブに入れ、-80°C で保存した（保存用グリセロールストック）。次に、5 mL の M63 培地を入れた試験管に、保存用グリセロールストックから凍結菌液を少量かき取って植菌し、振盪培養機（BR-23UM MR、TAITEC）で振盪培養（37°C、200 rpm）した。指数増殖期に到達したら、培養液 750 μL と 60%グリセロール 250 μL を混合した後、1.5 mL マイクロチューブに 100 μL

ずつ分注し、 -80°C で保存した（測定用グリセロールストック）。測定用グリセロールストックは、測定の度に解凍し、余った分は捨て、毎回の測定で新しい測定用グリセロールストックを使用した。

3.2.4 増殖測定

測定用グリセロールストックを解凍し、マイクロチューブに $900\ \mu\text{L}$ の培地（LB、MAA、M63 のいずれか）を添加し、10 倍希釈菌液を作成した。新しいマイクロチューブに $900\ \mu\text{L}$ の培地を入れ、そこに 10 倍希釈菌液 $100\ \mu\text{L}$ を添加して 100 倍希釈菌液を作成した。96 ウェルマイクロプレートのウェルに 10 倍および 100 倍の希釈菌液を $200\ \mu\text{L}$ ずつ分注した。培地の蒸発を防ぐため、一番外側のウェルは測定には用いず培地を $200\ \mu\text{L}$ 入れた。プレートリーダーを用いて、96 ウェルマイクロプレートに準備した菌液を振盪培養（ 37°C 、567 cpm）した。OD₆₀₀ を 30 分もしくは 60 分間隔で 24 時間もしくは 48 時間測定した。測定誤差を抑えるため、各株の各培地条件に対して 11~30 再現の測定を実施した。プレートリーダーによって取得した OD₆₀₀ の経時的な測定データは第 2 章に表記した内容と同じ手順で増殖速度および最大菌体濁度を算出した。

3.2.5 増殖ダイナミクスの評価

合計 1060 本の増殖曲線のダイナミクスを比較するために、増殖曲線を正規化した。すべての増殖曲線に対して増殖の開始時点から最大 OD₆₀₀ までの到達時点までの間を 0 から 100 になるように正規化した。増殖の開始は一貫して OD₆₀₀ が上昇し始めた時点と定義した。OD₆₀₀ の測定値は最小値が 0、最大値が 1 となるように正規化した。正規化した増殖曲線の各 2 点間における増殖速度を算出し、最大増殖速度を示した時点をもっと増殖速度に到達するタイミング (τ) として評価した。

3.2.5 菌体密度および細胞サイズの測定

3 mL の M63 培地を入れた試験管に、解凍したグリセロールストックを $30\ \mu\text{L}$ 植菌し、振盪培養機で振盪培養（ 37°C 、200 rpm）した。培養液を経時的にサンプリングし、指数増

殖期から定常期にかけての菌体数と細胞サイズの測定を行った。測定には精密粒度分布測定装置 (Multisizer4、Beckman Coulter) を用いた。アパチャーは孔径 20 μl のものを使用した。希釈液 (アイソトン II、Beckman Coulter) 10 mL を入れた 25 mL 容量の専用キュベット (Beckman Coulter) に、培養液を 50 μL 懸濁し、測定を行った。

3.2.6 多重回帰分析

増殖速度、最大菌体濁度、ゲノムの縮小長、対称性、培地のデータを用いて多重回帰分析を行った。これらのデータの中で培地のみはカテゴリカルデータ (LB、MAA、M63) であるためダミーコーディングして分析に用いた。最適なモデルを評価するために、AIC (赤池情報量基準) に従って変数の選択を行った[72]。多重回帰分析および 3 次元プロットの作成には統計解析ソフト R を使用した[42]。

3.2.7 欠失した遺伝子群の機能エンリッチメント解析

遺伝子機能は 23 種類の Gene Category に当てはめて分類した[14]。欠失した遺伝子群の個数の偏りの有意性は、Microsoft Excel の BINOMDIST 関数を用いて二項検定を行った。 $p < 0.05$ を有意性の基準とした。

3.2.8 ゲノム縮小株のゲノム図作成

KHK コレクションの構築において欠失されたゲノム領域の情報はウェブサイトから入手した (<http://shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/>)。欠失領域を反映させたゲノム図の作成にはゲノム情報の可視化ツール BRIG (BLAST Ring Image Generator) を使用した[73]。

3.3 結果

3.3.1 ゲノム縮小株コレクションの特徴分析

本研究では、野生型大腸菌 K-12 W3110 からゲノム配列の欠失を段階的に蓄積させた 29 株の大腸菌ゲノム縮小株コレクションを用いて、ゲノムの縮小が細胞増殖に及ぼす影響を

評価した。各菌株は野生型株を No. 0 とし、ゲノム配列の欠失の段階的な蓄積の結果 No. 1 から No. 28 までが構築されている (Figure 13)。コレクションのゲノム配列の欠失領域は完全に累積するように構築されており、つまり No. 2 は No. 1 の欠失領域を含んでおり、No. 3 は No. 2 の欠失領域を含んでいる。各ゲノム縮小株の欠失領域の合計の長さを算出した結果、No. 1 から No. 28 にかけて約 48 kb から 982 kb のゲノム配列が欠失していることが明らかとなった。

つぎに、欠失したゲノム領域にどのような機能を持った遺伝子群が多く含まれているのかを調べた。大腸菌 W3110 の遺伝子を 23 種類の機能カテゴリーに分類し、その欠失数がランダムに欠失させた場合と比較して有意に多いもしくは少ない遺伝子群を分析した (Figure 14)。機能カテゴリーの分類は Gene Category に基づいて行った。なぜなら、Gene Category は大腸菌の全遺伝子に対して機能の分類がなされており、個々の遺伝子に対して重複なくただ 1 つの機能が割り当てられているためである (Table 6)。その結果、ファージやインサクション配列 (h)、機能を失った偽遺伝子 (su)、機能が解明されていない遺伝子 (o, pr, pt) に分類される遺伝子が多く欠失していることが明らかとなった。一方で、電子の運搬に関与する遺伝子 (c)、生体反応に関与する遺伝子 (e)、転写因子や核様体タンパク質 (f)、細胞膜関連遺伝子 (m)、RNA 遺伝子 (n) などにおいては欠失数が有意に少ないことが明らかとなった。ゲノム縮小領域は大腸菌の近縁種との比較ゲノム解析の結果、大腸菌のみが保持する遺伝子をターゲットとしていることを考えると、多く欠失されていたファージや機能が明確でない遺伝子は比較的最近大腸菌が獲得した遺伝子であると考えられる。一方で、欠失数が少なかった遺伝子群の遺伝子はその機能が生命維持に対して重要であり、生物進化の初期段階から保持している遺伝子が多いと考えらる。

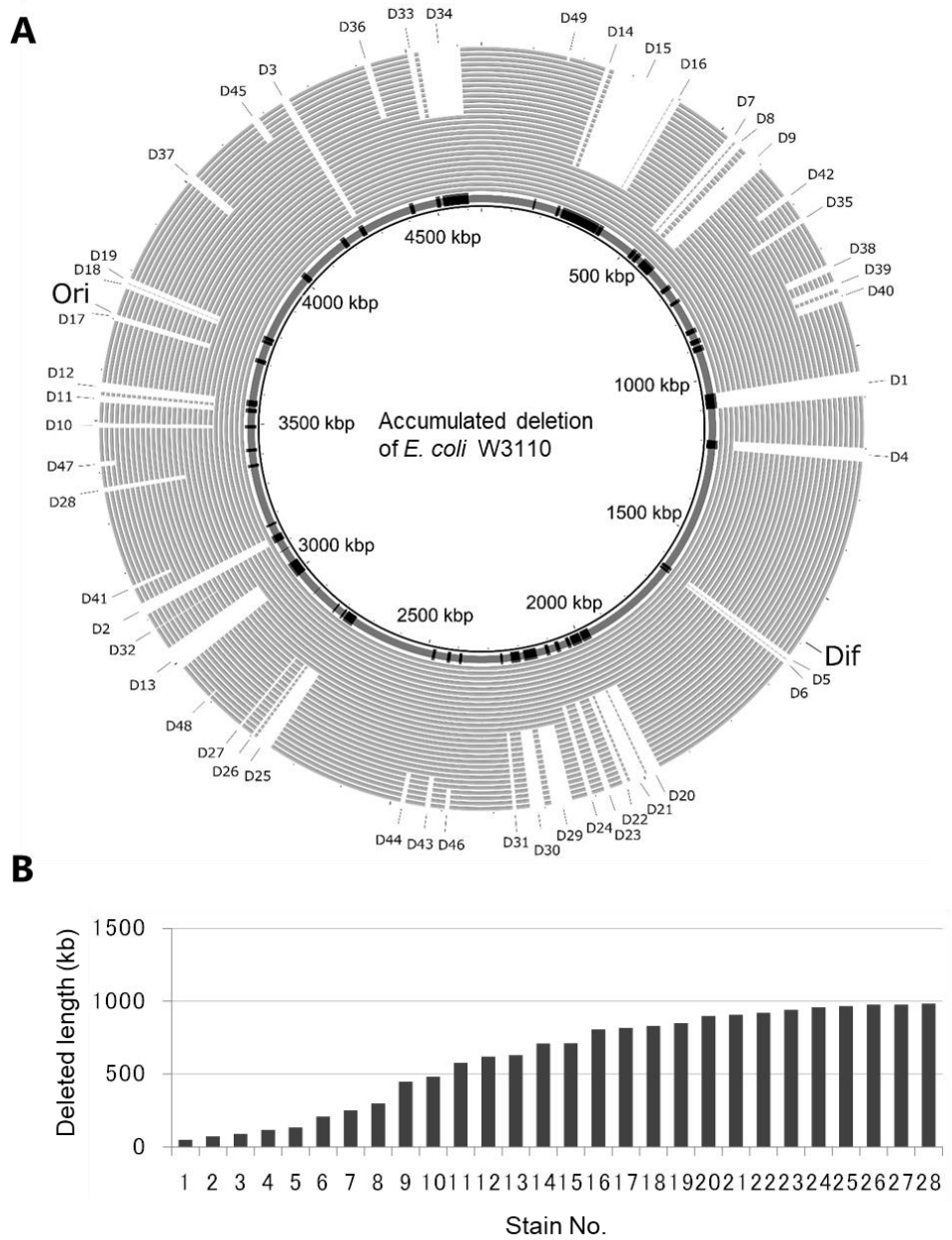


Figure 13 ゲノム配列の欠失領域の蓄積

(A) 一番内側の太い円は W3110 野生型のゲノムを示しており、縮小型での欠失領域が黒い垂線で記している。外側の 28 個の円は No. 1 から No. 28 までのゲノム配列を内側から外側にかけて表しており、外側の D1-49 は欠失領域の ID を意味する。Ori、Dif はそれぞれ大腸菌のゲノム複製開始点及び終結点である。(B) 28 株のゲノム縮小型株において蓄積したゲノム配列の欠失の長さの総長を表している。

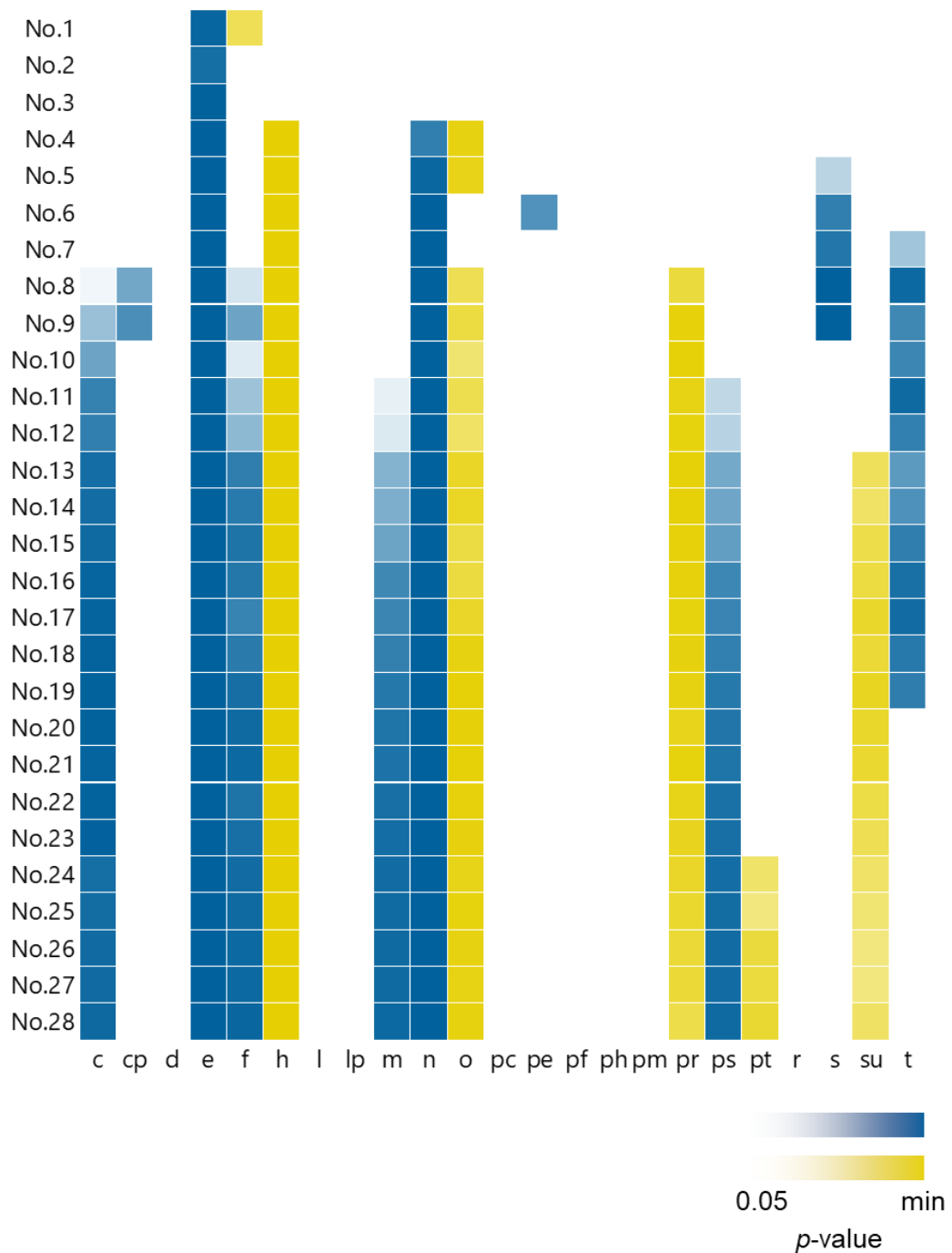


Figure 14 遺伝子群の欠失した個数の偏り

表は 28 株のゲノム縮小型大腸菌における 23 種の遺伝子機能カテゴリーごとに遺伝子の欠失数の確率的な希有さをヒートマップで表した。二項検定の結果、実際に欠失した遺伝子数が下裾 5%の分布に含まれるほど少ない場合には青、上裾 5%の分布に含まれるほど多い場合には黄色で色付けしている。色が濃いほど、有意性が高いことを示す。

Table 6 機能分類カテゴリーに含まれる遺伝子数

3つの主要な機能分類である Gene Category (GC)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)、Gene Ontology (GO) に KHK コレクションで欠失された遺伝子が含まれている数および含まれていない数を示している。GO はさらに biological process、molecular function、cellular component に分けて分類した。Strain No. は No. 1 から No. 28 までのゲノム縮小株を示しており、Add. del. は No. 1 から No. 28 までの構築段階において新規に欠失した遺伝子の数を示している。欠失した遺伝子が各分類法によって分類されている数 (assigned) およびされていない数 (not assigned) を分析し、No. 28 において欠失された全遺伝子のうちの分類された遺伝子の割合を百分率で評価した。

Strain No.	Add. del.	GC		KEGG		GO (biol. proc.)		GO (mol. Func.)		GO (cell. Comp.)	
		assigned	not assigned	assigned	not assigned	assigned	not assigned	assigned	not assigned	assigned	not assigned
1	45	45	0	11	34	14	31	2	43	20	25
2	19	19	0	5	14	4	15	0	19	2	17
3	13	13	0	4	9	6	7	0	13	8	5
4	53	53	0	0	53	0	53	0	53	1	52
5	42	42	0	8	34	7	35	0	42	7	35
6	69	69	0	10	59	20	49	0	69	18	51
7	19	19	0	3	16	1	18	0	19	5	14
8	181	181	0	32	149	41	140	1	180	32	149
9	37	37	0	7	30	18	19	0	37	15	22
10	111	111	0	38	73	47	64	0	111	36	75
11	60	60	0	4	56	10	50	3	57	10	50
12	7	7	0	4	3	6	1	0	7	1	6
13	68	68	0	10	58	18	50	0	68	21	47
14	7	7	0	3	4	1	6	0	7	2	5
15	19	19	0	2	17	2	17	0	19	1	18
16	69	69	0	7	62	25	44	0	69	26	43
17	11	11	0	1	10	1	10	0	11	2	9
18	18	18	0	7	11	3	15	0	18	1	17
19	39	39	0	10	29	8	31	0	39	15	24
20	21	21	0	9	12	13	8	1	20	11	10
21	10	10	0	2	8	3	7	0	10	1	9
22	27	27	0	10	17	12	15	0	27	10	17
23	16	16	0	0	16	0	16	0	16	0	16
24	17	17	0	12	5	4	13	0	17	6	11
25	10	10	0	0	10	0	10	0	10	0	10
26	9	9	0	2	7	2	7	0	9	5	4
27	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
28	19	19	0	4	15	2	17	0	19	5	14
Total del.	1017	1017	0	205	812	268	749	7	1010	261	756
Ratio of assigned		100%		20.2%		26.4%		0.7%		25.7%	

3.3.2 ゲノム縮小に相関した増殖速度の低下

29 種類の大腸菌株の網羅的な増殖測定を実施した。増殖速度の測定には M63 培地、MAA 培地 (M63 にアミノ酸を添加)、LB 培地を使用した。M63 培地、MAA 培地、LB 培地はそれぞれ貧栄養条件、中程度の栄養条件、富栄養条件を表している。29 株の 3 種類の培地における複数再現での増殖測定の結果 1060 の測定結果を得た。個々の測定における増殖速度を算出し、培地条件ごとに増殖速度とゲノム縮小長の相関分析を行った結果、いずれの培地条件においても有意な負の相関関係が確認された ($p < 0.01$) (Figure 15A)。

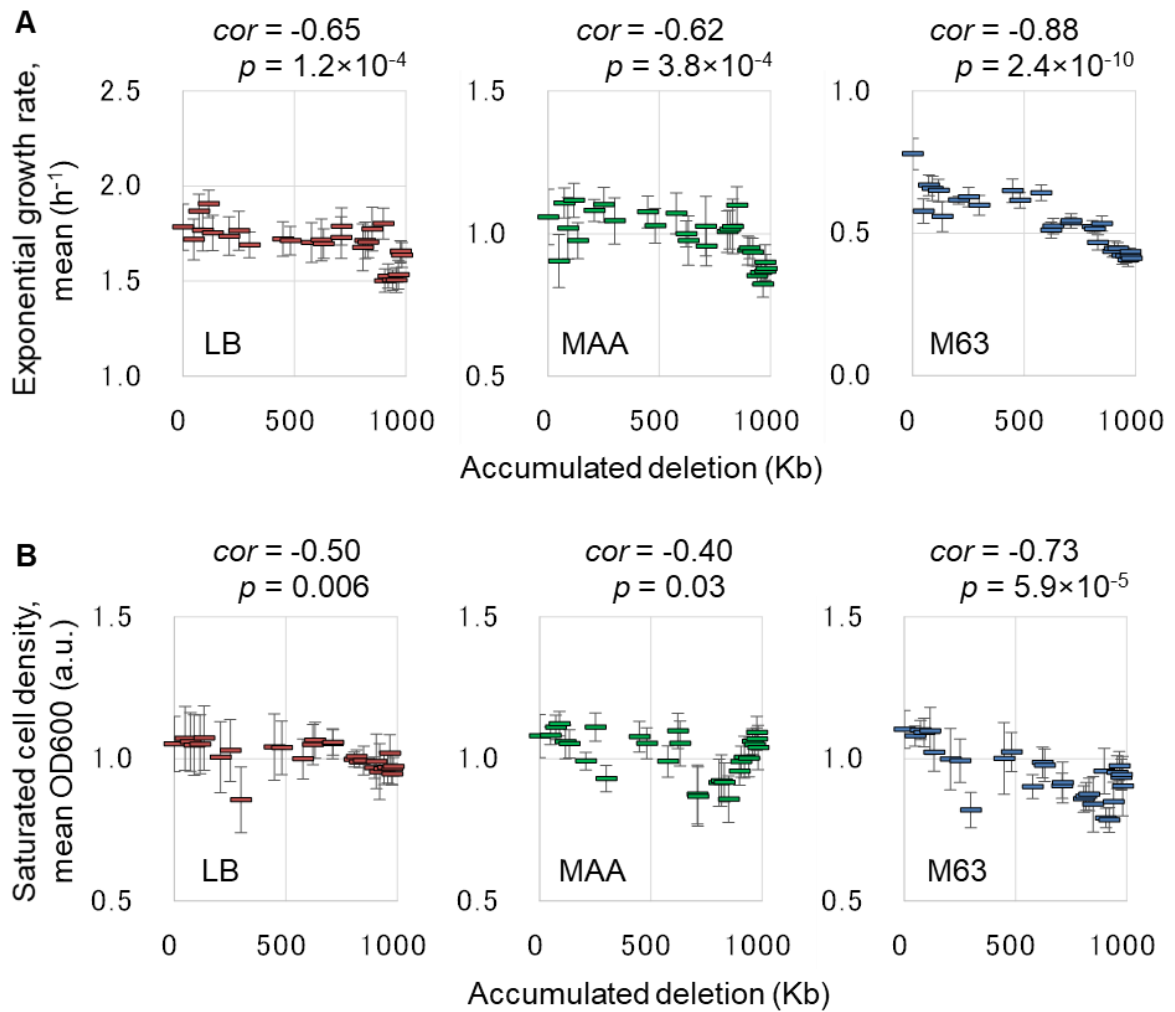


Figure 15 ゲノム縮小の蓄積に伴った増殖速度と最大菌体濁度の変化

ゲノム縮小の長さに対する増殖速度 (A) と最大菌体濁度 (B) の散布図。各プロットは 11~30 の測定値の平均値をとり、標準偏差をエラーバーで表した。LB 培地、MAA 培地、M63 培地における測定結果がそれぞれ左のグラフから赤、緑、青のプロットで示されている。各グラフの上には Pearson の相関係数と p 値が示されている。

3.3.3 ゲノム縮小に 관련된 最大菌体濁度の低下

29 種類の大腸菌株の増殖測定の結果、最大菌体濁度とゲノム縮小長の間にも有意な負の相関関係が明らかとなった ($p < 0.05$) (Figure 15B)。また、増殖速度と同様に相関関係はいずれの培地条件においても有意に確認された。最大菌体濁度は細胞の数や大きさなどの要因によって決定づけられる。そこで、ゲノム縮小による最大菌体濁度の低下についてさらに詳しく知るために、精密粒度分布測定装置を用いて M63 培地で培養した 29 株の飽和期における細胞濃度と細胞サイズを測定した。その結果、細胞濃度はゲノムの縮小長に対して負の相関が確認された (Figure 16A)。一方、細胞サイズはゲノムの縮小長に対して正の相関が確認された (Figure 16B)。つまり、ゲノムが短くなるほど、最大細胞濃度は低下し、細胞サイズは上昇する傾向が示された。細胞サイズの上昇は菌体濁度を上昇させるが、細胞密度の低下による菌体濁度の低下の方がより強く働くために、最大菌体濁度が低下したと考えられる。

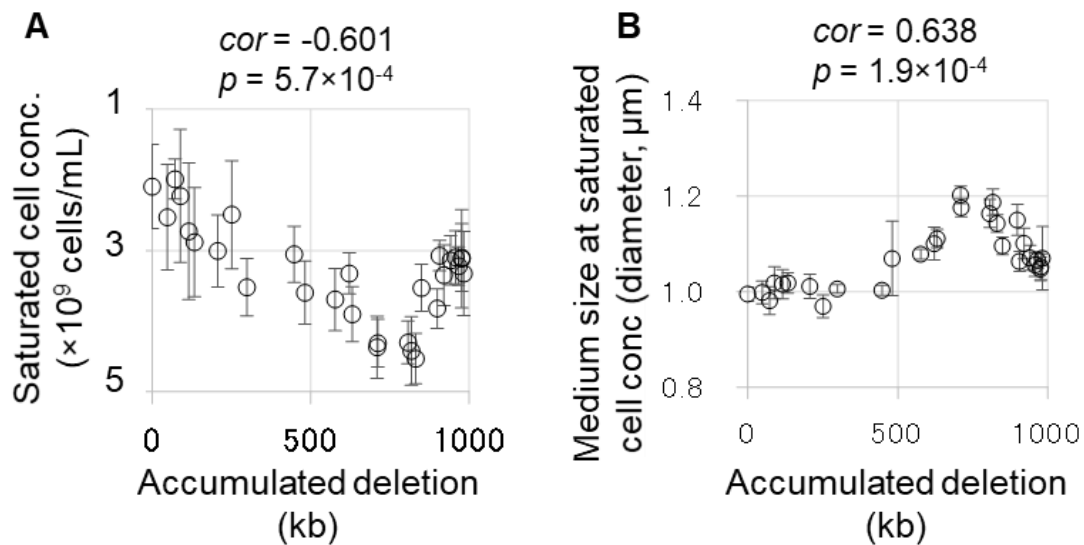


Figure 16 ゲノム縮小の長さに関連した定常期の細胞密度と細胞サイズの変化

欠失したゲノム配列の蓄積の長さに対して、M63 培地で培養した大腸菌 29 株の定常期に到達した時点での細胞密度 (A) と細胞サイズ (B) がプロットされている。プロットは平均値、エラーバーは標準偏差を示している。各グラフの上には Pearson の相関係数と P 値が示されている。

3.3.4 ゲノム縮小が増殖におよぼす影響と栄養条件の関係

3つの培地すべてにおいてゲノム配列の欠失の蓄積に相関して増殖速度と最大菌体濁度が低下することが分かった。そこで、このような変化の培地の種類による違いを明らかにするために、正規化して3種類の培地での測定結果を比較した (Figure 17)。正規化では野生型 (No. 0) の増殖速度と最大菌体濁度の値を1として、すべての測定値を相対値であらわした。そして、正規化したグラフを線形近似して得られる近似曲線の式を以下のようにあらわすことができる (Equations 2, 3)。

$$r = 1 - \alpha L_d \quad \text{Equation 2}$$

$$K = 1 - \beta L_d \quad \text{Equation 3}$$

ここで、 L_d 、 r 、 K はそれぞれ蓄積した欠失の長さ (kb)、一般化した増殖速度、菌体濁度を表している。定数 α 、 β はゲノム配列の欠失の長さに相関した増殖の低下の度合いを表している。異なる3つの培地では、 α_{M63} 、 α_{MAA} 、 α_{LB} はそれぞれ 5×10^{-4} 、 1×10^{-4} 、 9×10^{-5} である。 β_{M63} 、 β_{MAA} 、 β_{LB} はそれぞれ 2×10^{-4} 、 1×10^{-4} 、 7×10^{-5} である。したがって、1 kb の欠失は M63 培地、MAA 培地、LB 培地のそれぞれにおいて 0.05、0.01、0.009% の増殖速度の低下及び、0.02、0.01、0.007% の最大菌体濁度の低下をもたらす。 α と β はともに培地の栄養の豊富さに伴って変化している。つまり、ゲノム配列の欠失に伴った増殖変化は栄養依存性がある。欠失したゲノム配列は増殖速度 (r) と環境収容力 (即ち、最大菌体濁度、 K) の両方に影響を与えている、そしてその影響は貧栄養条件においてより顕著である。これは前述 r/K 戦略に当てはめてみると、栄養環境が r と K の両方にほぼ同程度に寄与することを示唆する。

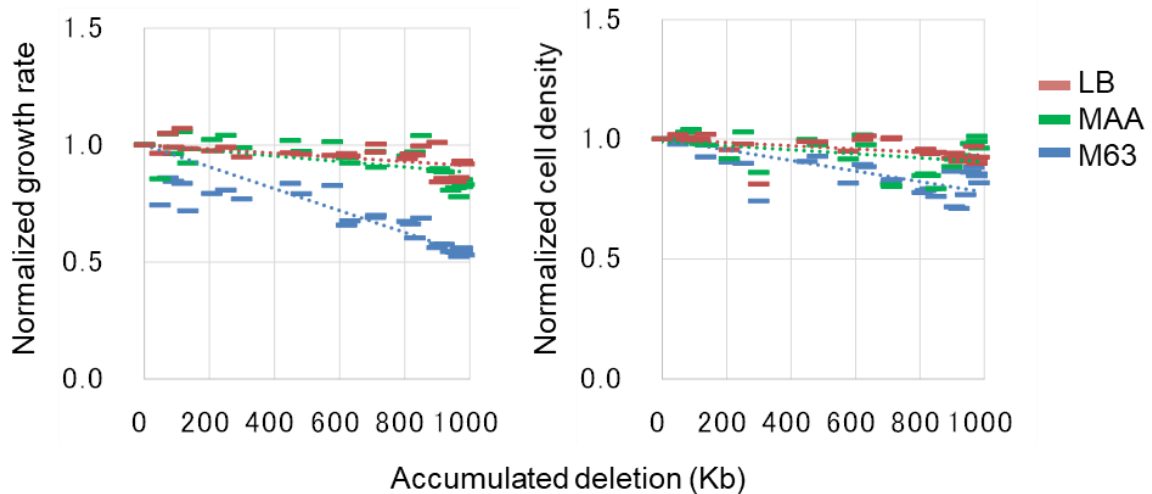


Figure 17 栄養条件に依存したゲノム縮小による影響

蓄積したゲノム配列の欠失の長さに対して、野生株の値を1とした相対値で正規化した増殖速度と最大菌体濁度の値がプロットされている。左右のグラフはそれぞれゲノム縮小の長さに相関した増殖速度および最大菌体濁度の低下を近似曲線の傾きで評価している。LB 培地、MAA 培地、M63 培地における増殖速度および最大菌体濁度の相対値をそれぞれ赤、緑、青で示している。

3.3.5 ゲノム縮小に相関した増殖ダイナミクスの変化

増殖速度、最大菌体濁度に加え、増殖のダイナミクスつまり最大増殖速度に到達するタイミングも細胞増殖において重要なパラメーターである。増殖速度や最大菌体濁度が異なる株間での増殖ダイナミクスを比較するために増殖曲線の正規化を行った。増殖の開始点から最大菌体濁度に到達するまでの時間を0から100に、最大菌体濁度に到達した際のOD₆₀₀の値を1になるように正規化した (Figure 18A)。これによって、ゲノムの縮小によって最大菌体濁度が低下した場合においても、増殖のダイナミクスが同じであれば正規化した後に似た増殖曲線となる (Figure 18B)。そして、正規化した増殖曲線の特徴を表すパラメーターとして最大増殖速度に到達するタイミング (τ) を算出し、ゲノム縮小長との相関関係を調べた結果、いずれの培地条件においても有意な負の相関関係が確認された ($p < 0.01$) (Figure 19)。この結果はゲノムの縮小によって増殖が開始してから最大増殖速度に到達するまでに時間を要するようになったことを表している。

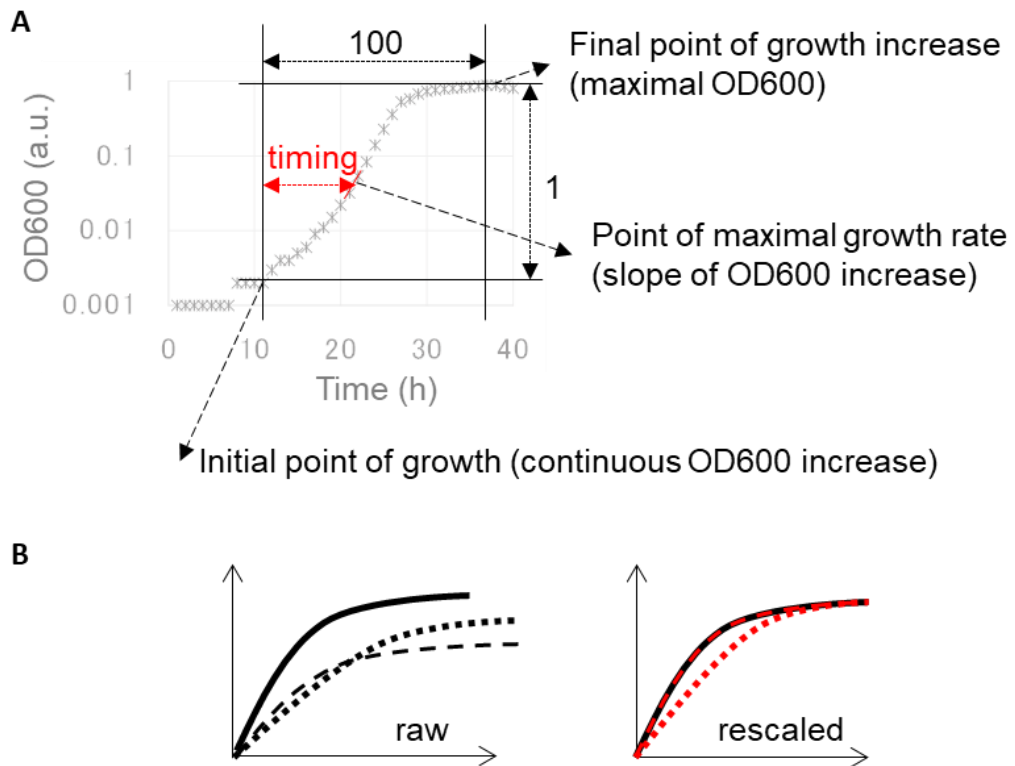


Figure 18 増殖曲線のリスケール

(A) 増殖速度が連続的に上昇し始めた時点から最大菌体濁度に達するまでの期間を 0 から 100、その期間における OD_{600} の変化を、最大 OD_{600} を 1 としてリスケールした。最大増殖速度に到達する timing (赤矢印) を 0 から 100 までの相対値で評価した。(B) 左図は、リスケールする前の増殖曲線、右図はリスケールした後の増殖曲線を示している。左図の黒い破線と点線はそれぞれ、右図の赤い破線と点線にリスケールされた。

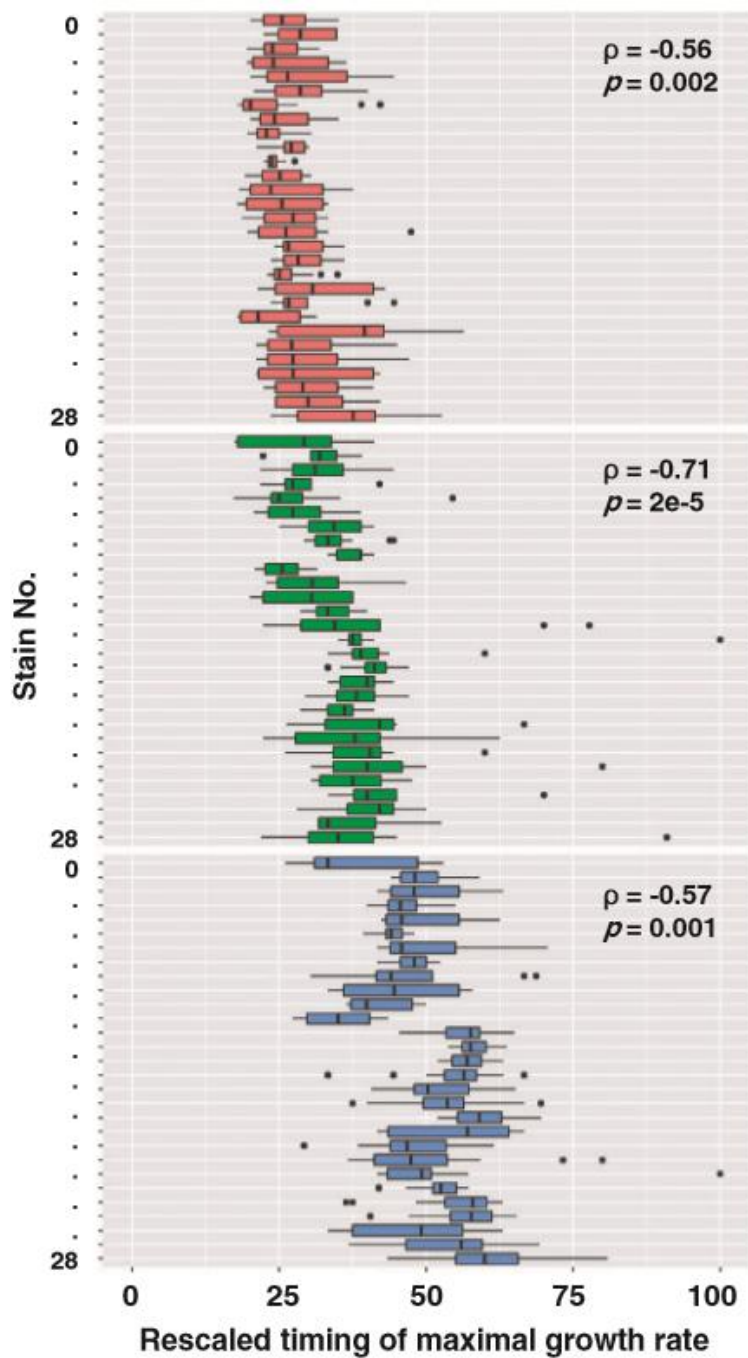


Figure 19 リスケールした最大増殖速度のタイミング

増殖速度が最大になるタイミングをリスケールした相対値で算出した。各株の 11 から 30 の測定結果を箱ひげ図で示している。3つのグラフは上から LB 培地、MAA 培地、M63 培地の結果をプロットしている。各箱ひげは No. 0 から No. 28 の解析結果を上から下にかけて並べている。欠失したゲノム配列の長さとも最大の増殖速度に到達するタイミングの Spearman の相関係数と p 値を各図の右上に示している。

3.3.6 複数パラメーターによる増殖速度の予測

ゲノムの縮小に相関した増殖速度の低下がみられたが、その原因の可能性として考えられるものはゲノム縮小の長さだけではない。そこで増殖速度の低下の主要な原因を明らかにするために多重線形回帰分析を行った。次の5つを変数とした。ゲノム縮小の長さ (L_d)、最大菌体濁度 (K)、培地 (M)、増殖速度が最大となるタイミング (τ)、複製開始点と終結点の非対称性 (θ) (Figure 20A)。大腸菌のゲノム複製は複製開始点から環状ゲノムを双方向に複製していき、ほぼ対極に存在する終結点で複製フォークがぶつかり複製が終了する。このような機構を考えると、複製の開始点と終結点为非対称の位置にあると複製に悪影響が出ると考えられる。これら5つの変数に対して、赤池情報量基準 (AIC) に基づいて最適なモデルを選択した。その結果、増殖速度の低下に最も強く影響を与えていた変数の組み合わせは L_d 、 M 、 θ であった。 K と τ に関しては、 L_d との間に多重共線性があるために、モデルには適応されなかった。増殖速度に対する多重線形回帰分析の結果は次のようあらわされる。

モデルの予測精度を示す R^2 の値は 0.982 を示し、この予測は実験で求めた増殖速度と近いことが確認できた (Figure 21)。多重線形回帰分析の結果によると、培地の種類とゲノムの縮小はともに増殖速度に対して非常に有意に影響を与えていた ($p < 0.01$)。対称性 (θ) については予測精度の上昇に貢献していたものの統計的有意性は確認されなかった ($p = 0.073$)。つまり増殖環境とゲノム縮小の長さが増殖速度を決定する重要な要因であることが証明された。 θ と増殖速度の変化自体には直接的な相関は見られなかったが、 θ を多重解析に用いることで予測の精度を上げることができた (Figure 20B)。ゲノム配列の欠失する場所も、影響はわずかではあるが確実に増殖速度に影響を与えていることが分かった。

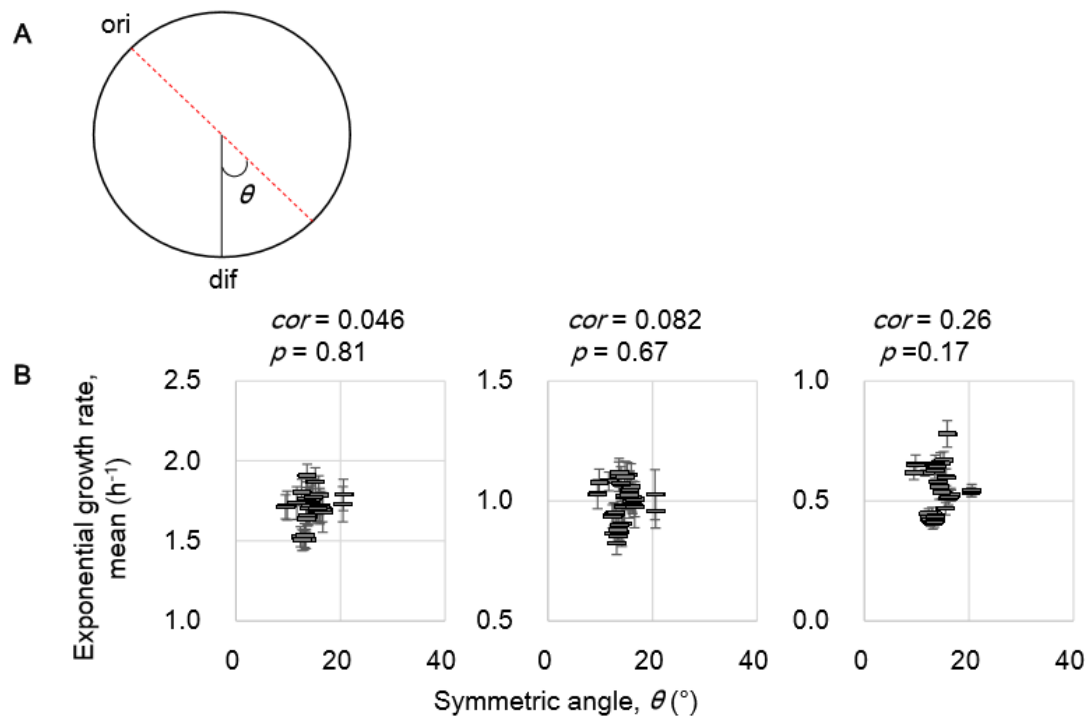


Figure 20 ゲノムの対称性

(A) ゲノムの対称性の模式図。赤点線が大腸菌ゲノムの複製開始点 (ori) を基準とした対称線を示している。環状ゲノムを真円と見立てて、ゲノムの複製終結点 (dif) と円の中心を結び、ori から始まる対称線との角度を θ とし、ゲノムの非対称性の評価指標とした。

(B) ゲノムの対称性と増殖速度の相関関係。 θ に対して左図から LB 培地、MAA 培地、M63 培地における増殖速度の測定値をプロットした。標準偏差をエラーバーで表した。各図の上には、 θ と増殖速度の Pearson の相関係数と p 値を示している。

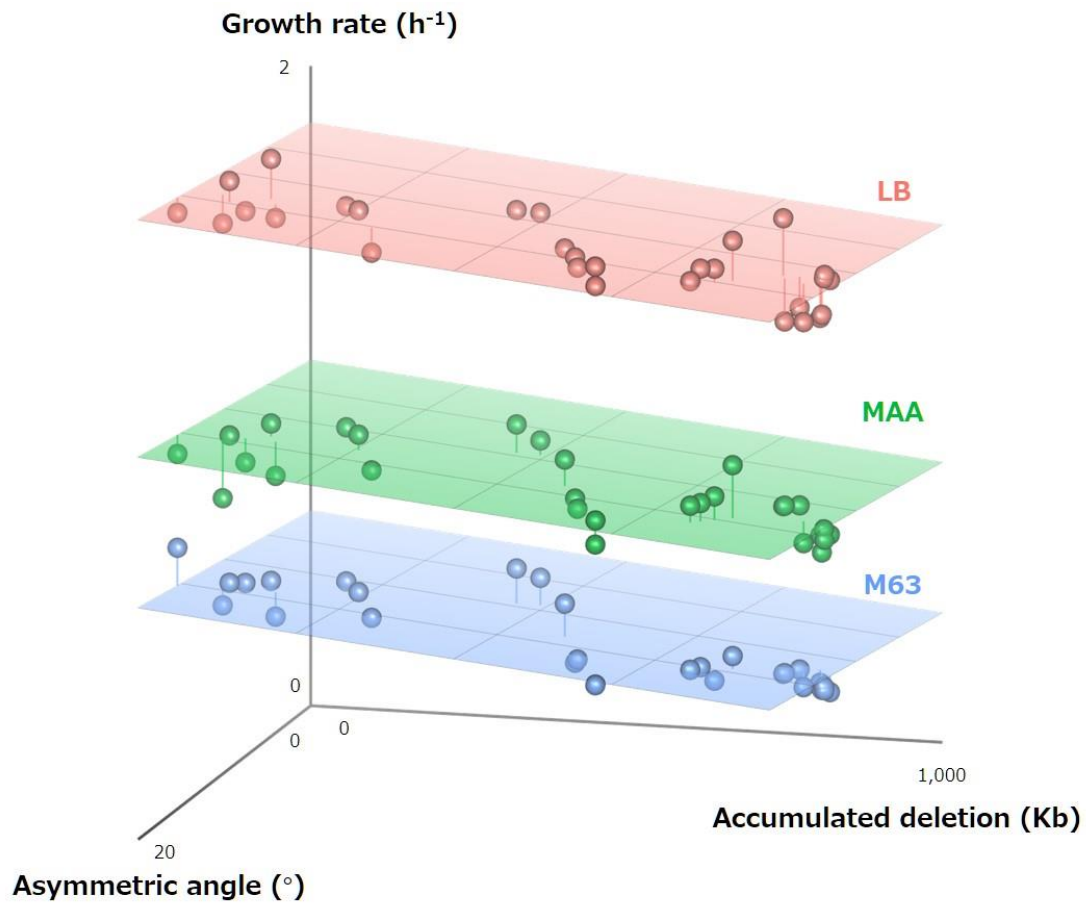


Figure 21 増殖速度の多重回帰分析

プロットの3本の直行した軸はそれぞれ、欠失したゲノム配列の長さ (kb)、増殖速度 (h^{-1})、ゲノムの非対称性 θ ($^{\circ}$) を表している。赤、緑、青の平面はそれぞれ LB 培地、MAA 培地、M63 培地の多重回帰分析による増殖速度の予測モデル、プロットは29株の測定値を示している。予測値と実測値の差をプロットから平面におろした垂線の長さで示している。

3.4 考察

3.4.1 増殖測定の変現性

本研究において、増殖速度を精度良く評価することは非常に重要な点である。一般的に、測定の変件（菌株・培地など）が増えるほど精度のよい増殖測定は人的時間的に困難になる。本研究では精度の高いハイスループットな増殖測定を可能にするために行った工夫が大きく2点がある。1点目は均一なグリセロールストックの作成である。各菌株に対して指数増殖期の変態の同一の培養液から複数のストックを作成し、一度解凍したストックは使い捨てにすることによって、変現性の高い実験を可能にした。2点目が96ウェルマイクロプレートを用いた複数変現の測定である。各条件に対して11系列以上の変現測定を行った。さらに、ウェルの位置による測定結果のバイアスを評価するために、始めにすべてのウェルに野生型大腸菌を入れて培養した。その結果、増殖速度はいずれのウェルにおいても規則的なバイアスはないことが分かったが（Figure 22A）、一方で最大菌体濁度についてはプレートの横方向でバイアスがかかること、および最も外側のウェルにおいてもバイアスがかかることが明らかとなった（Figure 22B）。この結果を受けて、各株の測定に対して右もしくは左のみに偏らないように配置して測定を行った。

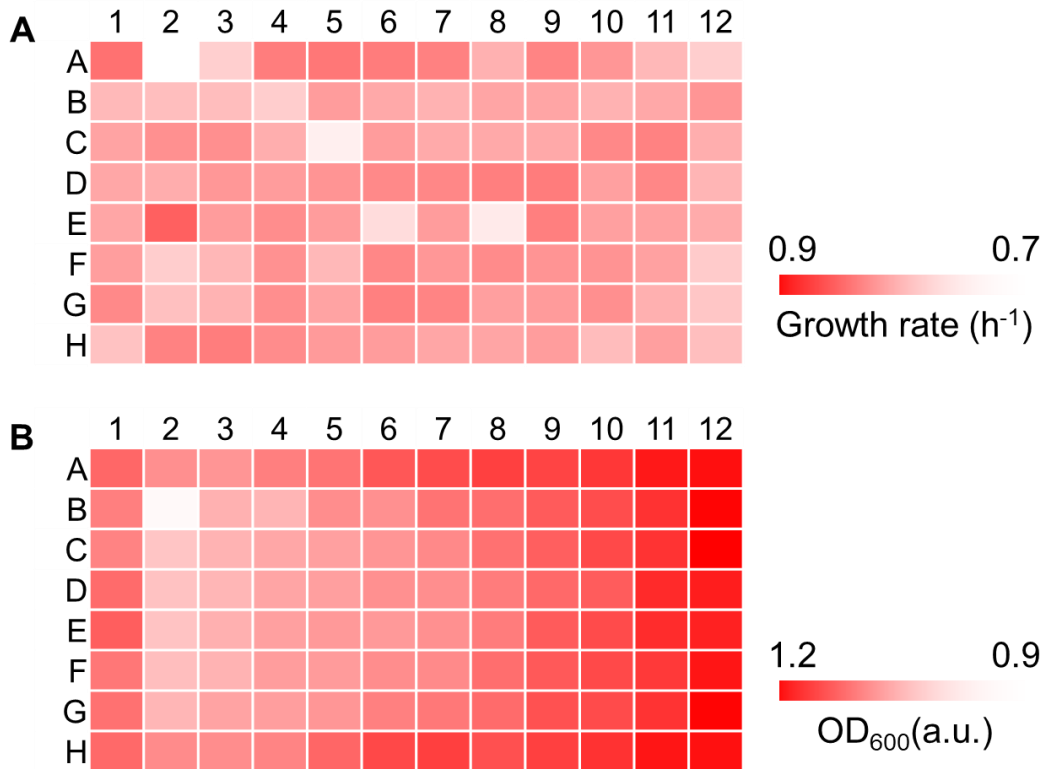


Figure 22 96 ウェルプレートの測定バイアス

(A) 増殖速度のヒートマップ。野生型大腸菌 W3110 のグリセロールストックを解凍し、M63 培地に希釈し、均一の条件で 96 ウェルへ植菌した。プレートリーダーを用いて経時的に OD₆₀₀ を測定し、各ウェルの測定における増殖速度を算出した。白から赤にかけての色のグラデーションは算出したウェルごとの増殖速度を遅いものから低いものまでのグラデーションを示している。(B) 最大 OD₆₀₀ のヒートマップ。白から赤にかけての色のグラデーションは算出したウェルごとの最大 OD₆₀₀ が低いものから高いものまでのグラデーションを示している。

3.4.2 増殖速度の低下に寄与する遺伝子群

特定の機能を持つ遺伝子群の欠失が増殖速度の低下に寄与しているのかを確認するために、遺伝子群ごとの欠失遺伝子数と増殖速度の相関関係を分析した。遺伝子の機能カテゴリー分類は Gene Category に基づいて行い、No. 28 において 10 個以上の遺伝子が欠失している 14 の機能カテゴリーの遺伝子群に対して分析を行った。その結果、M63 および LB においてはすべての遺伝子群において遺伝子の欠失数と増殖速度の間には有意な相関関

係が確認された (Figure 23)。このことは、貧栄養および富栄養どちらの条件においても、増殖に特に重要と考えられる遺伝子群 (Enzyme や Structural component など) だけではなく、増殖に直接関連していない機能を持つ遺伝子群 (Pseudogenes や Unknown など) などすべての遺伝子群が増殖に寄与していることを表している。一方で、MAA 培地においては有意な相関がみられない遺伝子群が存在した。これは、M63 に唯一添加されたアミノ酸がいくつかの遺伝子群の働きを特異的に補う働きをしたため、その遺伝子群が欠失しても増殖速度に影響が出にくかった可能性が考えられる。

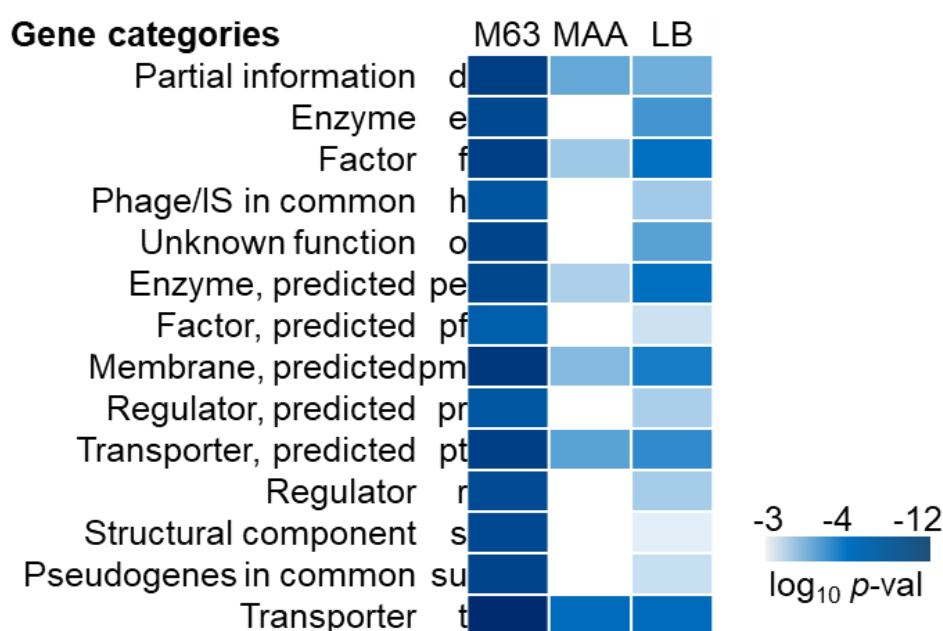


Figure 23 遺伝子機能ごとの欠失遺伝子数と増殖速度の相関

大腸菌の全遺伝子を 23 種類の Gene Category で分類し、No.28 において 10 個以上の欠失があった 14 種類の遺伝子群で解析を行った。欠失した遺伝子数と増殖速度の Pearson の相関係数と p 値を算出し、 p 値の対数を青色の濃さのグラデーションで表した。M63 培地、MAA 培地、LB 培地における増殖速度の結果で解析を行った。ヒートマップの左には Gene Category の機能とその略称が示してある。

3.4.3 ゲノムの縮小が増殖速度の低下をつなぐ仮説

細菌のゲノム情報は生育に必要なものだけでなく、生育に非必須な余剰ゲノム領域を多く保持していることが知られている[74]。これは、水平伝播などによってゲノムサイズを拡大しながらゲノム進化してきたことを反映している[75,76]。生育に必要なではない遺伝子を新しく獲得することはゲノムの複製や非必須な遺伝子の発現のためのコストが増えると考えられる。しかし、細菌進化の自然選択は増殖速度の速いものに有利に働く。そのような機構を考えると、ゲノムの拡大進化においては、新しいゲノム領域を獲得した後に余剰なゲノム配列も含めてゲノム全体の相互作用のネットワークの最適化が起これ、ゲノム領域の獲得以前と比較して適応度が高くなる必要がある。分子進化の観点から考えると、ゲノム配列の変化が大きいほど最適化状態との距離が大きいため[77]、ゲノム縮小の長さに依存して増殖速度が低下したことは理にかなっている。特定の遺伝子機能に関係なく、様々な機能の遺伝子がまんべんなく増殖に寄与していたことを考えると、ゲノムの縮小に伴った増殖速度の低下は遺伝子の機能の欠如ではなく遺伝子同士のネットワークが乱されたことに起因していると考えられる。そのため、実験進化によってゲノム配列の最適化が生じれば増殖速度が回復する可能性がある (Figure 24)。実際に複数の先行研究でゲノム縮小株を実験進化させることによって増殖速度が上昇することが報告されている[64,69]。

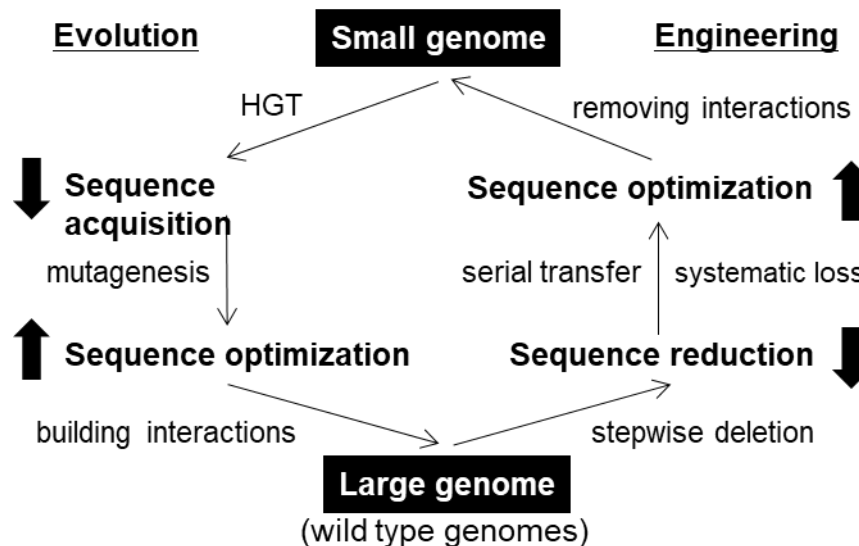


Figure 24 ゲノム縮小に関連した増殖速度の変化の仮説

左および右のフローチャートはそれぞれ、ゲノムの拡大進化および人為的なゲノム縮小の流れを示している。太く示された上向きおよび下向きの矢印は増殖速度の上昇及び低下を意味する。

3.5 結論

本章では、ゲノム配列の欠失が段階的に蓄積していく大腸菌ゲノム縮小株コレクションの増殖を網羅的に評価することによって、ゲノム縮小が増殖に与える影響を定量的に明らかにした。使用した3種類のいずれの培地においてもゲノムの縮小に伴って増殖速度が低下することが示されたが、貧栄養条件であるほど増殖速度の低下が顕著であることが明らかとなった。ゲノム縮小の長さやゲノムの対称性といったゲノムの特徴および培地条件から増殖速度を予測するモデルを構築した。この予測モデルは、ゲノム縮小株の構築における設計デザインやゲノム縮小株の工業利用における培養条件に対して有用な情報を提供できる。ゲノム縮小による増殖への影響の原因は明らかにはなっていないが、特定の遺伝子機能の欠落によるものではなく、様々な遺伝子の欠失がまんべんなく寄与していることが明らかとなった。

第4章 ゲノム縮小株における増殖速度と変異率の相関

4.1 背景及び目的

4.1.1 変異率について

生物においてゲノム DNA は遺伝情報を保存していると同時に、子孫への受け渡す役割を担っている。細菌のような無性生殖生物は理論的には完全に同一のゲノム DNA がコピーされて子孫に受け継がれるが、実際には DNA の複製過程に確率的に生じる突然変異によって、ゲノム配列が少し変化する。このような突然変異が生じる確率は変異率と言われ、一般的には1塩基当たりの複製エラー率で評価する[78]。突然変異はほとんどの場合、細胞にとって中立的もしくは有害な影響をもたらす[79]。一方で、一部の突然変異が抗生物質の獲得などといった細胞にとって有益な結果をもたらすことが知られている[80,81]。つまり、変異率は細胞の恒常性と進化能力のバランスを示す指標ともいうことができる。実際に、突然変異を生じやすい変異体の Mutator は適応進化の速度を上げるという報告がある[82]。一方で、Mutator の性質は全体がある程度適応した集団の中では不利に働くという報告もある[83]。変異率は生物種ごとにある程度固有の値であるが、同一集団においても実験進化の過程で変異率が上昇するという報告や現象するという報告がある[84-87]。

4.1.2 変異率とゲノムサイズの関係

これまでに様々な生物種に対して変異率が評価されている。例えば、大腸菌の変異率は約 10^{-10} ($\text{bp}^{-1} \text{ division}^{-1}$) と見積もられており、これは 10^{10} 塩基の複製に対して1回の複製エラーが生じることを意味している[88]。変異率は DNA ポリメラーゼによる DNA 伸長の正確性のみでなく、ミスマッチ修復遺伝子による修復機能などが働くことによって変異率が調節されている[89]。そのため、大腸菌の変異率はミスマッチ修復機構を持たないウイルスなどと比較するととても低い値を示している。ウイルスや原核生物、真核生物など様々な生物種に対して、変異率とゲノムサイズの関係性を調べた先行研究において、変異率とゲノムサイズの相関関係が明らかになっている[78]。つまり、ゲノムサイズの大きな生物ほど変異率は低いという傾向が示された。このことは、生物進化の過程において、変異

率とゲノムサイズは協調的に進化してきたことを表している。

4.1.3 先行研究における課題と本章の目的

先行研究において、ゲノムサイズと変異率の間に重要な関係性があることがわかっている。これは、生物のゲノム進化の過程において、ゲノムサイズの拡大に伴って変異率が低下してきたことを表している。それでは、人為的にゲノムを縮小した場合においてもゲノムサイズと変異率の相関関係は保たれているのだろうか。本研究ではこの疑問を明らかにするために、大腸菌ゲノム縮小株コレクションの変異率を網羅的に測定した。そして、ゲノムサイズと変異率の相関関係を評価した。さらに、変異率の上昇は適応進化の促進につながることや、対称的に増殖速度の負荷になることが知られている。そこで本研究では、変異率と増殖速度の関係性に対する理解を深めることを目的に、実験進化を通して変異率と増殖速度の関係を調べた。

4.2 材料と方法

4.2.1 使用した菌株・培地

第3章で用いた KHK コレクションのうち、ゲノムサイズがまばらに異なる 10 株 (No. 0、3、4、10、11、14、19、23、27、28) を使用した。液体培地は第3章で用いた LB 培地、MAA 培地、M63 培地の 3 種類を使用した。変異率の測定に用いた寒天培地は LB 培地とナリジキシン酸を入れた LB 寒天培地の 2 種類である (Table 7, 8)。LB broth および Agar を milliQ 水に混合した後に、オートクレーブ (121°C、20 min) にかけて滅菌および Agar の溶解をし、シャーレに分注した。ナリジキシン酸入り LB 寒天培地の作成には、オートクレーブの後、60°C 程度まで温度が下がったところでナリジキシン酸を添加した。

Table 7 LB 寒天培地組成

components	maker	concentration
LB broth (Miller)	SIGMA-ALDRICH	25 g/L
Agar	SIGMA-ALDRICH	15 g/L

Table 8 ナリジキシン酸入り LB 寒天培地作成

components	maker	concentration
LB broth (Miller)	SIGMA-ALDRICH	25 g/L
Agar	Wako	15 g/L
Nalidixic acid sodium salt	SIGMA-ALDRICH	80 mg/L

4.2.2 変異率の測定

本研究では、ナリジキシン酸の耐性獲得率を指標とした変動アッセイによって変異率を測定した[90]。液体培地（LB、MAA、M63 のいずれか）を 2 mL 入れた試験管 21 本に第 3 章で作成したグリセロールストックを 100 倍希釈して 20 μ L ずつ入れ、5~30 時間振盪培養（37°C、200 rpm）した。指数増殖期に到達したところで、21 本のうち 1 本の試験管の菌体濃度を CFU 計測した。CFU 計測は、培養液を 10^5 、 10^6 、 10^7 の 3 種類の倍率で希釈して各希釈倍率に対して 3 枚もしくは 4 枚の LB 寒天培地に散布して 24 時間 37°C で静置培養し、出現したコロニー数をカウントし、菌体濃度を算出した。残りの 20 本は、培養液全量を 2 mL マイクロチューブに移して遠心（4°C、7000 \times g、1 min）し、200 μ L ほどを残して上清を捨て、残りの上清にペレットを懸濁したのち、菌体全量をナリジキシン酸入り LB 寒天培地に散布した。その後 37°C で 72 時間静置培養し、コロニーの出現を確認した。変異率（ m ）は下記の式に当てはめて算出した。

$$m = \frac{-\ln(N_0/N_M)}{A} \quad \text{Equation 4}$$

ここで、 A は試験管に含まれていた細胞数、 N_M は全寒天培地の枚数（20 枚）、 N_0 はコロニーが出現しなかった寒天培地の枚数を意味する。 A は本来細胞分裂を起こした回数に対応するため、実際には細胞数 - 1 となるが、培養終了時の細胞数は十分に大きいため、培養終了時の細胞数を分裂回数とみなした。

4.2.3 実験進化

4.2.3.1 継代培養

24 ウェルマイクロプレート (IWAKI) を用いて継代培養を行った。はじめに、マイクロプレートの各ウェルに 1.8 ml の M63 培地を分注した。グリセロールストックを解凍し、一つのウェルの培地に植菌し、ピペッティングして菌液を均一になるまでかきまぜた。均一になった菌液から 200 μ l を隣のウェルに植菌し、再びよく懸濁した。この操作を 8 つのウェルに対して繰り返し、8 段階の希釈倍率 ($10^1 \sim 10^8$ 倍) で菌液を希釈した。植菌が終わったマイクロプレートは高温振盪培養器 (Deep Well Maximizer、TAITEC) で振盪培養 (37°C、500 rpm) した。24 時間後、培養液の OD₆₀₀ を測定し、指数増殖期 (OD₆₀₀=0.01~0.1) の状態にある培養液を選抜し、新しいプレートに同様に 8 段階の希釈倍率で植菌し、培養を行った。この操作を約 30 日間継続し、400 世代相当の継代培養を実施した。

4.2.3.2 世代数および増殖速度の計算

細菌の細胞において、1 世代は 1 回の細胞分裂に相当する。そのため、集団の細胞数が 2 倍になるごとに集団全体を平均してみたときに 1 世代経ったと捉える。細胞数と菌体濁度はほぼ比例関係にあるため、世代数 (*gen*) は以下の式に当てはめて算出した。

$$gen = \log_2(N_t/N_0) \quad \text{Equation 5}$$

ここで、 N_t は培養終了時の OD₆₀₀、 N_0 は培養開始時の OD₆₀₀ を意味する。培養開始時の OD₆₀₀ は直接測定できないので、ひとつ前の培養終了時の OD₆₀₀ の値を希釈倍率で割った値を使用した。

継代培養は常に指数増殖期を保っているため、培養開始時から培養終了時までの OD₆₀₀ の倍加速度を継代培養過程の増殖速度 (μ) として、以下の式に当てはめて算出した。

$$\mu = \frac{\ln(N_t/N_0)}{\Delta t} \quad \text{Equation 6}$$

ここで、 N_t は培養終了時の OD₆₀₀、 N_0 は培養開始時の OD₆₀₀ を意味する。 Δt は培養開始から培養終了までの時間 (h) を意味する。

4.2.4 ミスマッチ修復遺伝子の発現量と増殖速度の相関分析

遺伝子発現データは NCBI Gene Expression Omnibus database から、GEO series accession number GSE61749、GSE55719、GSE52770 で保存されているデータを使用した。これらのデータは遺伝型や培養環境が大腸菌から得られたマイクロアレイによるトランスクリプトームデータである[91–93]。合計 75 個の生データに対してグローバル正規化を施し、平均値をそろえた。そして、同一条件の生物学的再現実験のデータは平均して 1 つの代表データへと変換した。各遺伝子発現データに対応した増殖速度のデータは文献情報から入手した。

4.3 結果

4.3.1 ゲノム縮小に関連した変異率の上昇

KHK コレクションから野生型株を含んだ 10 株を選抜した。10 株を栄養条件の異なる 3 種類の培地 (LB、MAA、M63) で培養した際の変異率を測定した。興味深いことに、3 種類のいずれの培地で測定した結果においてもゲノムの縮小の長さに相関して変異率が上昇するという相関関係が確認された (Figure 25A)。これらゲノム縮小株は DNA のミスマッチ修復に関わる遺伝子はすべて保持している。そのため、ゲノムの縮小に伴う変異率の上昇は、特異的な遺伝子機能の欠落によるものではなく、多くの遺伝子の欠失の影響が積み重なった結果だと考えられる。ゲノムサイズと変異率の相関関係は、3 種類いずれの培地においても有意に確認されたが、その相関の強弱は培地の種類によって異なることが示された。M63 培地、MAA 培地、LB 培地という順に相関係数の絶対値が高くなっていることから、貧栄養条件であるほど、ゲノムの縮小と変異率の相関が強いことがわかる。次に、以下の式に当てはめて線形近似を行った。

$$\log_{10}(M_i) = r[\log_{10}(G_i)] + b \quad \text{Equation 7}$$

ここで、 M_i および G_i は各株に対応したそれぞれ変異率 ($\text{bp}^{-1} \text{ division}^{-1}$) およびゲノムサイズ (Mb) を意味する。 b はグラフの切片を意味し、 r はグラフの傾き即ちゲノムサイズの変化に対応した変異率の変化の度合いを意味する。 r の値は M63 培地、MAA 培地、LB 培地においてそれぞれ -14.6、-10.1、-5.1 を示し、栄養が豊富な培地ほどグラフの傾きが緩や

かであることがわかる。このことは、ゲノム縮小は DNA の複製エラーの発生を促進するが、栄養豊富な条件下においては変異率の発生を抑える力が働くと考えられる。さらに、LB 培地、MAA 培地、M63 培地における 10 株の変異率の分布を調べてみると、貧栄養条件から富栄養条件に変化するにしたがって変異率が高い状態から低い状態へ変化しており、富栄養条件において突然変異が起こりにくくなる現象を表している (Figure 25B)。

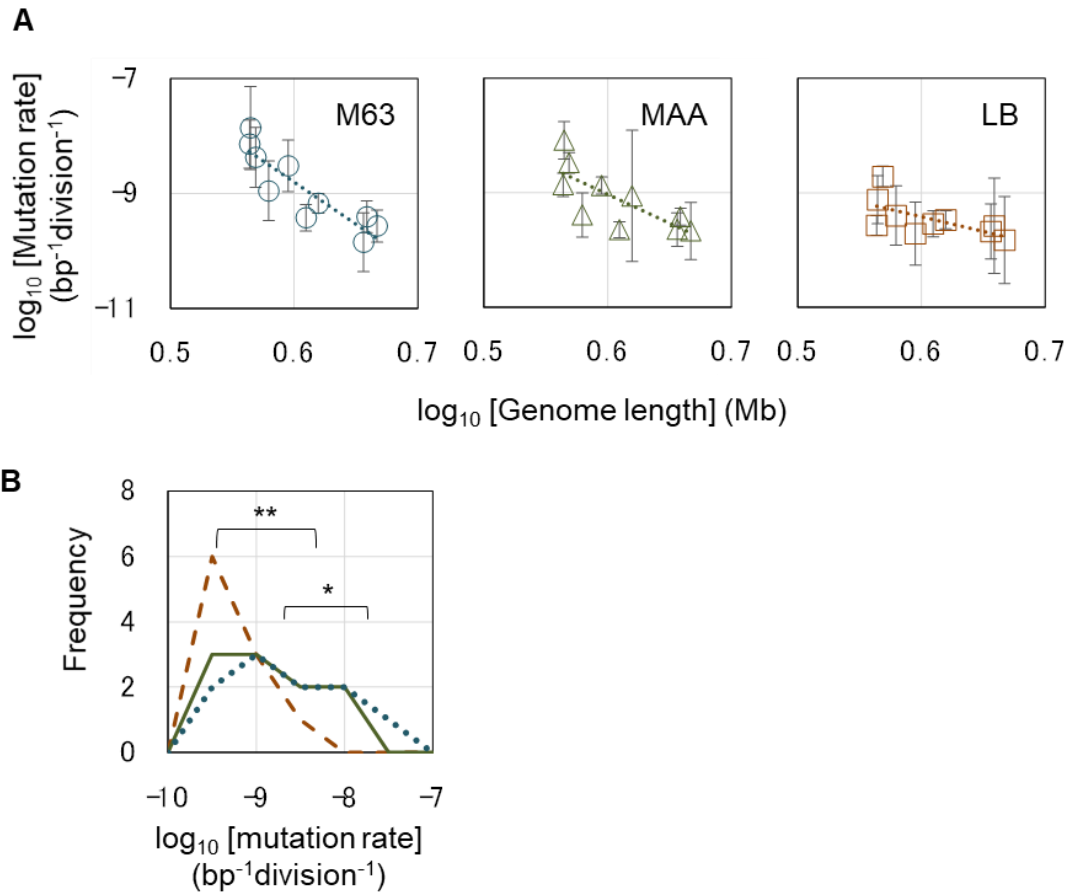


Figure 25 ゲノムサイズと変異率の相関

(A) ゲノムサイズと増殖速度の相関関係を示した散布図。野生型株とゲノム縮小株の合計 10 株の変異率が示されている。M63 培地、MAA 培地、LB 培地における測定結果がそれぞれ青、緑、赤のグラフで示されている。各条件での再現測定の平均値をプロットし、標準偏差をエラーバーで示している。Spearman の相関係数および p 値は M63 培地、MAA 培地、LB 培地の結果においてそれぞれ $\rho = -0.891$ ($p = 0.001$)、 $\rho = -0.830$ ($p = 0.003$)、 $\rho = -0.636$ ($p = 0.05$) を示した。点線は回帰直線を示しており、その傾きおよび決定係数は M63 培地、MAA 培地、LB 培地においてそれぞれ -14.6 ($R^2 = 0.79$)、 -10.1 ($R^2 = 0.57$)、 -5.1 ($R^2 = 0.41$) を示した。(B) 培地条件に依存して変化する変異率の分布。M63 培地、MAA 培地、LB 培地における 10 株の変異率の分布がそれぞれ、青い点線、緑の実線、赤い破線で示されている。Frequency は横軸の変異率に対応した株の数を意味している。アスタリスクは分布の差の有意性を示しており、3 種類の培地における変異率の分布は有意に差があることが示された (one-tailed t -test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)。

4.3.2 変異率の上昇に関係した遺伝子機能群の分析

ゲノムの縮小による変異率の上昇が、ゲノムの縮小領域に含まれていた特定の機能の遺伝子群によって引き起こされているのかどうかを確かめるため、欠失遺伝子の機能エンリッチメント解析と変異率との相関分析を行った。大腸菌の各遺伝子を Gene Category に基づいて 23 の遺伝子群に分類し、各遺伝子群に属する遺伝子がゲノムの縮小に伴って欠失した数を計数した。そして、23 の遺伝子群のうち、ゲノムの縮小が最も蓄積した No. 28 において 10 以上の遺伝子が欠失している 14 の遺伝子群に対して、遺伝子の欠失個数と変異率との相関分析を行った。その結果、富栄養条件の LB 培地での結果と比較して貧栄養条件の M63 培地での結果において、いずれの遺伝子群においても遺伝子の欠失個数と変異率の間の相関関係がより有意に確認された (Figure 25)。特に相関の有意性が高かった遺伝子群は、保存タンパク質 (d)、トランスポーター (t, pt) である。この結果は、保存タンパク質やトランスポーターが欠失することによって DNA の複製エラーが促進されることを示している。保存タンパク質は進化の過程でその配列がほぼ変化せずに保たれている遺伝子であり、その遺伝子自身の変異が生じにくいことが考えられる。しかし、本研究における変異率はナリジキシン酸耐性の獲得につながる変異の生じやすさから評価しているため、保存タンパク質遺伝子の変異の生じにくさと直接的な関係性があるのかは明らかではない。ここで見られた結果は、突然変異が生じにくいと考えられる保存タンパク質遺伝子がゲノム中に存在していることによって他のゲノム領域の突然変異の生じやすさにも影響を及ぼすことが示唆される。トランスポーターは細胞内と細胞外の化学組成条件を調整する役割を担っている。トランスポーター遺伝子の欠失が変異率の上昇を促すという結果は、富栄養条件において変異率の上昇が抑えられた結果に加えて、細胞内外の化学組成条件が変異率に大きく影響を及ぼしていることを表している。

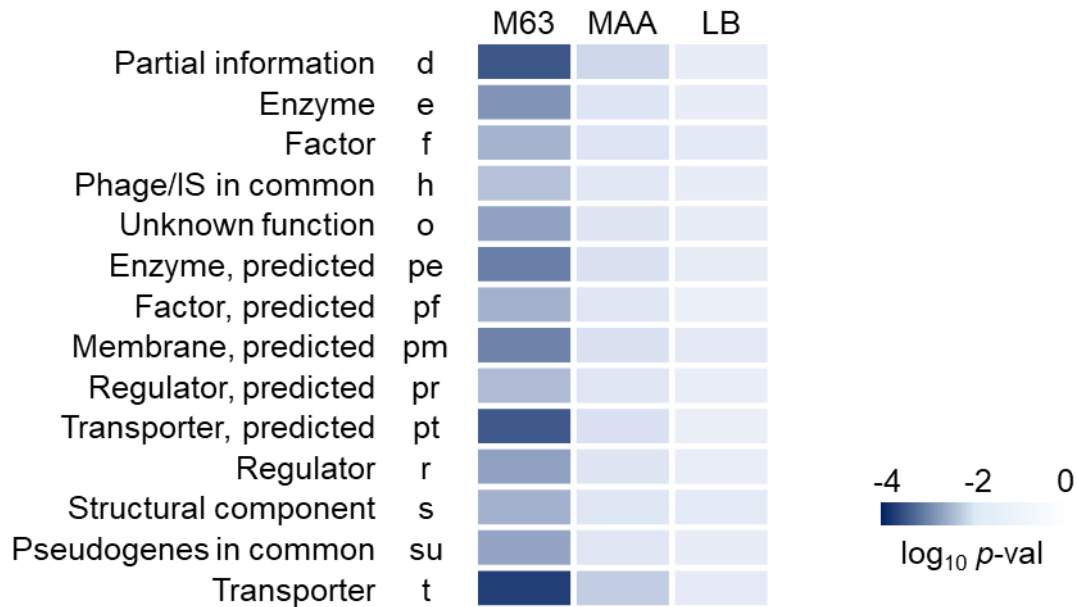


Figure 26 遺伝子機能ごとの欠失遺伝子数と変異率の相関

大腸菌の全遺伝子を 23 種類の Gene Category で分類し、No.28 において 10 個以上の欠失があった 14 種類の遺伝子群で解析を行った。欠失した遺伝子数と増殖速度の Pearson の相関係数と p 値を算出し、 p 値の対数を青色の濃さのグラデーションで表した。M63 培地、MAA 培地、LB 培地における変異率の結果で解析を行った。ヒートマップの左には Gene Category の機能とその略称が示してある。

4.3.3 ゲノム縮小株における変異率と増殖速度の相関

ゲノムの縮小に関連した変異率の変化は、第 3 章で示されたゲノムの縮小に関連した増殖速度の変化とよく似た変化を表している。そこで、ゲノムの縮小による変異率の変化が増殖速度の変化と関係があるのかを分析した。10 株のゲノム縮小株の 3 種類の培地における変異率と増殖速度の相関分析を行った結果、いずれの培地条件においても変異率と増殖速度の間には有意な負の相関関係が確認された (Figure 27)。この結果は、いずれの培地条件においても増殖速度の変化に伴って変異率が変化することを表しているが、その変化の度合いは培地条件によって変化した。その関係を定量的に評価するために、実験データを以下のモデル式に当てはめた。

$$\log_{10}(M_i) = \log_{10}(M_0) + (\alpha + \mu_i) \quad \text{Equation 8}$$

ここで、 M_i および μ_i はある条件（株と培地）における変異率と増殖速度を意味している。 M_0 は最大の変異率（増殖速度がゼロになった場合に相当）、 α は増殖速度の上昇に対する変異率の低下の割合を意味している。 M_0 および α はゲノムサイズに依存しない、培地条件によって固有の定数となる。そこで、実験データに対してモデル式の回帰分析を行った結果、 α は M63 培地、MAA 培地、LB 培地の条件においてはそれぞれ -4.9、-4.8、-2.4 と求められた。この結果は、増殖速度の低下に対する変異率の上昇の度合いは、富栄養条件（LB 培地）と比較して貧栄養条件（M63 培地、MAA 培地）においては 2 オーダーほど大きいということを示している。一方で変異率の潜在的な最大値を表す M_0 は LB 培地、MAA 培地、M63 培地においてそれぞれ $10^{-5.4}$ 、 $10^{-4.3}$ 、 $10^{-6.1}$ であり、MAA において最も高くなる結果となった。この結果は、アミノ酸は変異率の低下よりも増殖速度を上昇させることに大きく寄与しているために、変異率の潜在的な最大値が上昇したと考えられる。

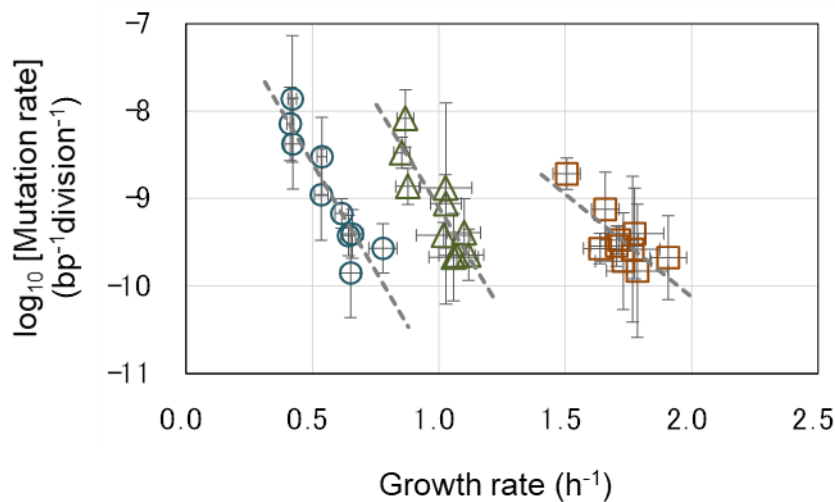


Figure 27 変異率と増殖速度の相関

野生株およびゲノム縮小株合計 10 株における、増殖速度と変異率の相関関係を示した散布図。M63 培地、MAA 培地、LB 培地のそれぞれの測定結果が青の丸、緑の三角、赤の四角で示されている。再現測定の平均値をプロットで示し、標準偏差をエラーバーで示している。Spearman の相関係数および p 値は M63 培地、MAA 培地、LB 培地のそれぞれにおいて、-0.915 ($p=2\times 10^{-4}$)、-0.782 ($p=0.008$)、-0.648 ($p=0.04$) を示した。灰色の破線は回帰直線を示しており、M63 培地、MAA 培地、LB 培地におけるその傾き及び決定係数はそれぞれ、-4.9 ($R^2=0.83$)、-4.8 ($R^2=0.76$)、-2.4 ($R^2=0.59$) を示した。

4.4.4 実験進化による増殖速度および変異率の変化

変異率と増殖速度の相関関係がゲノムの縮小に特有の現象なのか、それともある程度普遍性のある現象なのかを確認するために、ゲノムサイズが最も小さくなった No. 28 を M63 培地の環境で実験進化させた (Figure 28)。指数増殖期を保ちながら約 1 か月間継代培養を継続した。大腸菌を用いた実験進化の過程で増殖速度が上昇することは、いくつかの先行研究において確認されている [87,94,95]。No. 28 に対して約 400 世代の実験進化を行った結果、増殖速度が約 1.3 倍に上昇し、一方で変異率は約 1/10 に低下した (Figure 29A)。さらに興味深いことに、実験進化による増殖速度の上昇と変異率の低下の関係は、ゲノム縮小による増殖速度の低下と変異率の上昇を表したモデル式の軌道とほぼ一致していることが示された。つまり、増殖速度と変異率を変化させた原因が異なっても、両者の関係は保たれており、増殖速度と変異率の負の相関関係は普遍的な現象である可能性を示唆している。

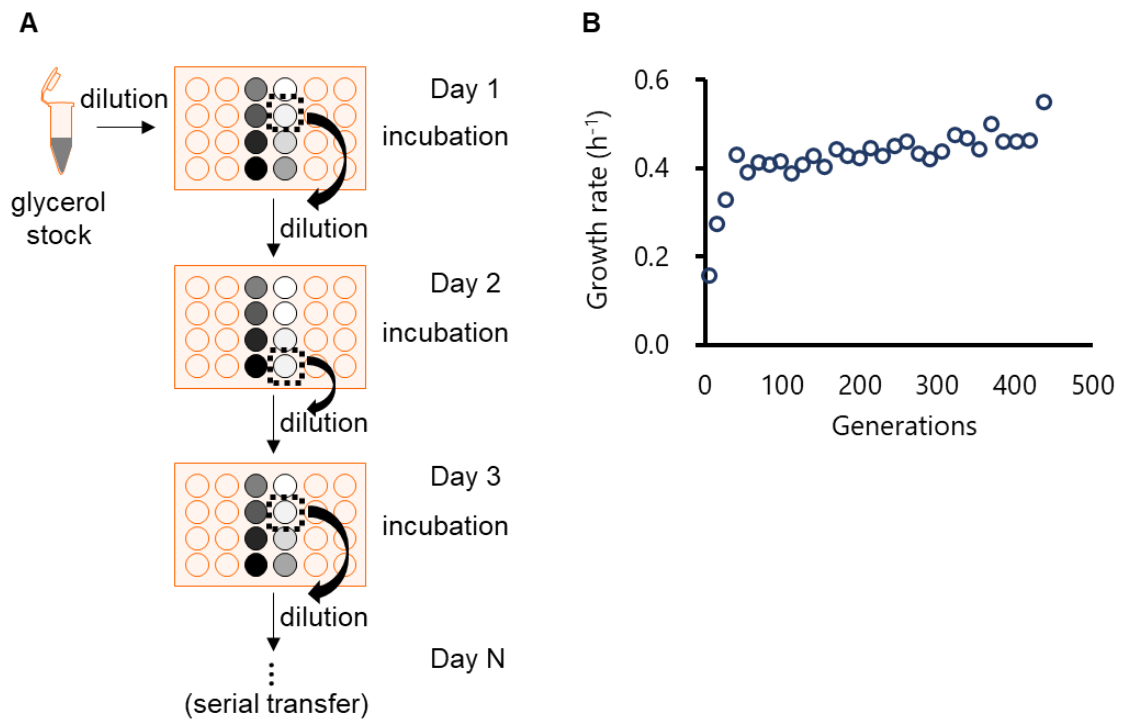


Figure 28 ゲノム縮小株の実験進化

(A) 実験進化手順。1 日目には、24 ウェルマイクロプレートに大腸菌のグリセロールストックを複数希釈倍率で植菌する。グレースケールで表されたウェルは一晩培養したのちの大腸菌の増殖具合を示している。点線の四角枠で囲ったウェルは OD_{600} から判断した指数増殖期の培養液を意味する。2 日目以降は選抜した指数増殖期の培養液から新しく用意した 24 ウェルマイクロプレートに複数希釈倍率で植菌する。(B) 植え継ぎ経過における増殖速度の変化。各植え継ぎの際に測定した OD_{600} の値をもとに世代数および増殖速度を算出した。

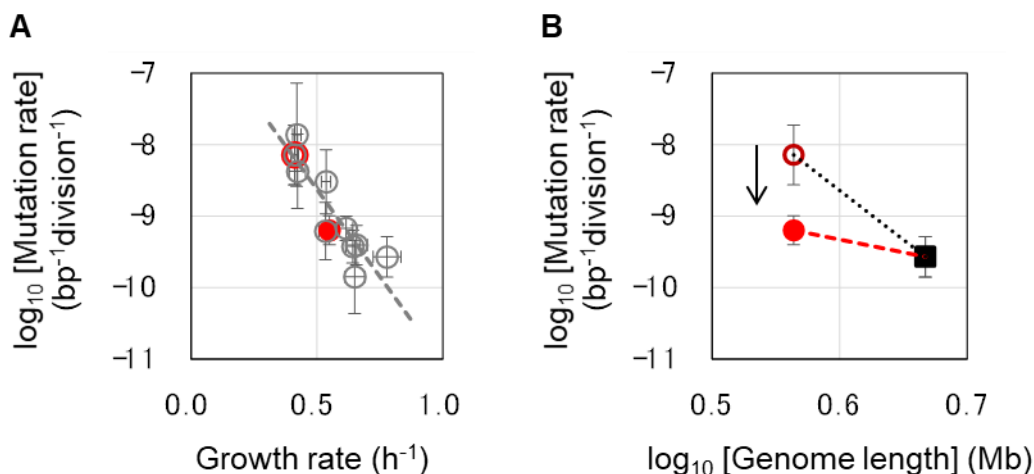


Figure 29 実験進化による増殖速度および変異率の変化

(A) 増殖速度および変異率の変化を示した散布図。赤い中抜き丸および赤い中塗りの丸は実験進化前および後のゲノム縮小株 No. 28 の M63 培地における増殖速度および変異率の測定結果を示している。グレーのプロットはおよび破線で示した回帰直線は Figure 27 で示した M63 培地における 10 株の増殖速度および変異率を示している。再現測定の前平均値をプロットし、標準偏差をエラーバーで示している。(B) 実験進化におけるゲノムサイズと変異率の数理的関係の変化。黒塗りの四角は野生型株のゲノムサイズおよび変異率を示す。中抜きの赤丸および中塗りの赤丸はそれぞれ進化前および進化後のゲノム縮小株 No. 28 のゲノムサイズおよび増殖速度を示す。黒い点線および赤い破線は、進化前および後の No. 28 と No. 0 におけるゲノムサイズと変異率をつないでおり、それぞれの傾きは-16.1 および-3.4 を示した。

4.4 考察

4.4.1 増殖速度と変異率の負の相関

本研究では、ゲノム縮小や実験進化が増殖速度および変異率に及ぼす影響を調べた。そして、増殖速度と変異率の負の相関関係がゲノム縮小および実験進化のいずれにおいても保たれていることが明らかとなった。しかし、この相関関係の原因は明確にはなっていない。大腸菌はいくつかのミスマッチ修復遺伝子を持っており、それらが働くことによって変異率を低く保っていることが知られている。そこで、もしも増殖速度の低下がミスマッ

チ修復遺伝子の働きも低下するという関係が存在するならば、増殖速度と変異率の相関関係を理解する手がかりとなる。そこで、この仮説を検証するために増殖速度のデータとリンクしている大腸菌のマイクロアレイトランスクリプトームデータ（合計 75 セット）をもとに、増殖速度とミスマッチ修復遺伝子の発現量の相関関係を分析した。対象としたミスマッチ修復遺伝子は *mutHLS* で、これらの遺伝子に変異が入る、もしくは欠失すると変異率が上昇することがすでに知られている[96]。予想に反して、増殖速度とこれらミスマッチ修復遺伝子の発現量の間には有意な相関は確認されなかった (Figure 30)。この結果は、増殖速度と変異率の相関関係は、変異率の調節に関わる特異的な遺伝子の影響ではなく、多くの遺伝子の総合的な働きや細胞の状態といった非常に複雑な要因によって生み出されていることを示している。

変異率の上昇は有害な変異の生じる可能性を上げるため、増殖速度に対する負荷となることが実験的および理論的研究によって知られている[96–99]。先行研究において、大腸菌のミスマッチ修復遺伝子欠損株を用いた増殖負荷の定量的な評価が行われた[96]。その結果、M63 培地および LB 培地において変異率の上昇に相関して増殖速度が低下することが明らかとなった。本研究においては、M63 培地および MAA 培地においては最もゲノムが縮小した No. 28 は変異率が約 1×10^{-8} まで上昇した。先行研究の結果においては変異率が約 1×10^{-8} を示す変異株においても増殖速度の低下がみられていることから、本研究における変異率と増殖速度の相関関係を生み出す要因として、変異率の上昇による増殖負荷が寄与していることが考えられる。一方で、LB 培地においては変異率が 5×10^{-8} までは増殖負荷はなく、それよりも変異率が高くなった時に負荷が現れたことなど、変異率の上昇による増殖負荷だけで本研究において見られた増殖速度と変異率の関係を説明することはできないと考えられる。

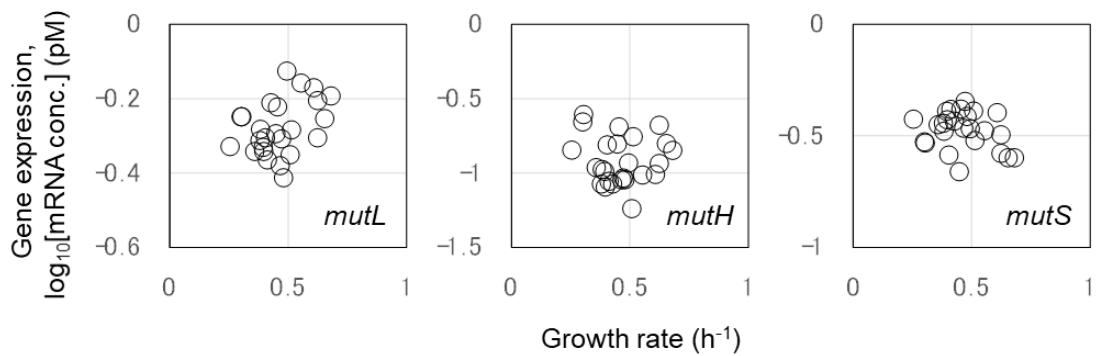


Figure 30 増殖速度とミスマッチ修復遺伝子の発現量の関係

公開データから得られたミスマッチ修復遺伝子の発現量と増殖速度の散布図。3つのグラフはミスマッチ修復遺伝子として左から *mutL*、*mutH*、*mutS* の発現量を示す。増殖速度と対数スケールで示した発現量の Pearson の相関係数および p 値は *mutL*、*mutH*、*mutS* においてそれぞれ、 $r = 0.39$ ($p = 0.05$)、 $r = -0.06$ ($p = 0.79$)、 $r = -0.26$ ($p = 0.20$) を示した。

4.4.2 ゲノム進化とゲノム工学におけるゲノムサイズと変異率の関係

本研究では 10 種類のゲノムサイズが異なる大腸菌を用いて、ゲノムサイズと変異率を対数グラフにプロットした際に線形的な関係性がみられた。先行研究において、様々な種のゲノムサイズと変異率の関係を調べたところ、同じような線形関係が報告されている。本研究では、グラフの傾き r は 3 種類の培地で約 $-5 \sim -15$ の範囲を示した。一方で、先行研究においては -1.1 程度であることが報告されている [78]。ここで興味深いことに、変異率とゲノムサイズを両対数グラフにプロットした際に、傾きがほぼ -1 の直線状に分布するということは、ゲノムサイズと変異率を掛け合わせた 1 分裂あたりのゲノム全体の変異率はいずれの種においてもほぼ一定であることを表している。生物種によって変異率は様々な分子機構によって調節されているが、その生物にとって最適な変異率はゲノムサイズによって決定されることを示唆している。本研究では、大腸菌のゲノム縮小過程でゲノムが縮小するほど変異率が上昇するという、関係は見られたが、両者の変化の程度の関係性を示すグラフの傾きは非常に大きい値となった。このことは、長い時間をかけてゲノムサイズを拡大してきた生物進化と比較して、人工的なゲノムの縮小があまりに短時間で行われたために、ゲノムの縮小した長さに応じて細胞へのストレスがかかり、ゲノムサイズと変異率

の間の法則性をはるかに超えて変異率が上昇したことが考えられる。もしも、短期間でのゲノムの縮小によるストレスが原因で変異率が大きく上昇しているのであれば、実験進化の過程は傾きが-1の直線に近づくように低下することが考えられる。そこで、実験進化後のNo. 28と野生型をつなぐ直線の傾きを調べたところ-3.4を示し、実験進化前と比較して-1の傾きに大きく近づいた (Figure 29B)。集団の適応度が低い際には変異率が高い Mutator の出現が集団の適応に有利に働く一方で、適応度が高い集団においては逆に Mutator の変異率を下げる変異が蓄積されることが報告されている[84]。細胞が置かれた環境に対して適応した状態においては、変異率とゲノムサイズの関係は対数グラフにした際に傾きが-1の直線にほぼ近い状態に落ち着く可能性が考えられる。

4.5 結論

本章では、ゲノムの縮小に相関して変異率が上昇すること、またゲノムの縮小による増殖速度の低下と変異率の上昇の間に相関関係があることを初めて明らかにした。ゲノムの人工的な縮小によって見られたゲノムサイズと変異率の間に相関関係はゲノム進化においてみられるものと同じの傾向を示していた。しかし、ゲノムサイズの変化に対する変異率の変化の程度には違いがみられた。ゲノムの縮小と変異率の相関を生み出すメカニズムは明らかにはなっていないが、様々なストレスが変異率を誘発することが知られているように、ゲノムの縮小が細胞にとってストレスとなっている可能性がある。そして、実験進化の過程でゲノムの縮小ストレスに適応し、増殖速度の上昇とともに変異率が低下したと考えられる。本章の研究は、ゲノムサイズ、増殖速度、変異率といった進化において重要なパラメーター同士の関係性を理解するうえで重要な知見を提供した。

第5章 ゲノムの縮小とロバスト性

5.1 背景および目的

5.1.1 微生物の生息環境

大腸菌をはじめとした微生物の多くは、栄養条件や温度などの変化が激しい環境に生育していることが知られている[100]。特に大腸菌には栄養が豊富条件と枯渇条件で多数の遺伝子の発現を適切に制御する転写因子（FFRP: feast/famine regulatory protein）を持っており[101]、この事実から大腸菌が栄養の豊富な条件と飢餓条件を繰り返し経験しながら進化してきたことが推測される。また、r/K 選択説においては、増殖速度が高くなる方向へ進化する r 戦略は環境変動の多い条件に適した戦略で、空間当たりの最大個体数を増やす K 戦略は環境変動が少ない条件に適した戦略とされている[53]。このような背景からも、増殖速度が非常に速い大腸菌は環境変動の激しい条件において進化してきたことが示唆される。このように変動の大きな環境で生息する生物においては、環境が変動しても増殖速度に影響を受けにくい性質は進化のダイナミクスを決定づける重要な指標と考えられる。

5.1.2 栄養条件と増殖速度

微生物培養においては、培地は細胞増殖および代謝に必要なすべての栄養源を供給する役割がある。どのような培地でどのような増殖速度を示すのかという疑問は微生物培養が始まった時から取り組まれ続けている疑問であるが、現在でもわかっていないことが多い。大腸菌の生育に必要な栄養素が明らかとなり、基本的な合成培地が確立された[102]。しかし、必要な栄養素の種類は明らかとなったが、個々の栄養素の培地中における濃度がどのように増殖に影響を与えているのかはわかっていないことが多い。培地中の栄養濃度と増殖速度の関係の理解に大きく貢献した研究として、Monod によって提唱された数理モデル（Monod Model）が有名である[103]。シンプルな式によって培地中の栄養成分の濃度変化に対する増殖速度の変化を予測することを可能にした。その後、過剰な栄養条件による増殖の阻害効果について理解が進むにつれ、改良されたモデルもいくつか報告されている[104,105]。しかし、これらのモデルは主に細胞の最も重要な構成要素となる炭素源に対し

て評価されたものである。近年では、機械学習を用いて培地組成と増殖速度の関係性の評価が行われ、炭素源や窒素源のみでなく微量元素の濃度変化が増殖に対して大きな影響を及ぼすことも明らかとなっている[106]。

5.1.3 ゲノム進化と生息環境

細菌のゲノム進化は、遺伝子重複や水平伝播などを通してゲノムサイズの拡大を伴いながら進行していく[75,76]。遺伝子重複によって重複された遺伝子の機能の変化や[107,108]、遺伝子の水平伝播による環境への適応は進化の原動力として知られている[109]。さらに、ゲノムサイズが大きく遺伝子機能に冗長性があることは外部環境の変動やストレスに対する耐性を高めることが議論されている[110,111]。そして実際に、多数の細菌のゲノムサイズと生息環境の分析から、ゲノムサイズが大きい細菌ほど生息している環境の種類が多いことが明らかとなった[112,113]。これらの研究から、生物進化の過程においてゲノムサイズが大きいほど外部環境の変動に対して影響を受けにくいという傾向が示されている。

5.1.4 先行研究における課題と本章の目的

これまでに本研究をはじめとしていくつかの研究において、ゲノムの縮小が増殖速度を低下させることが知られていた[65,66]。しかし、単独の培地条件、もしくは合成培地と天然培地のように構成成分の異なる培地条件を用いて評価されてきた。しかし、微生物の生息環境を考えると、特定の栄養条件に対する適応度のみでなく、栄養条件が連続的に変化した際に増殖速度がどのように変化するかを知ることは重要である。そこで本研究では、ゲノムの縮小が培地中の栄養濃度の変化に対する影響の受けやすさに与える影響を定量的に評価し、ゲノムの縮小との関係性を理解することを目的とした。

5.2 材料および方法

5.2.1 菌株と培地

本章では、KHK コレクションから野生株およびゲノム縮小株の5株 (No. 0、7、14、20、

28) を使用した。実験進化には M63 培地を使用した。培地の組成は第 2 章で示した通りである。増殖測定には 29 種類の合成培地を用いた。これらの組成は M63 培地に基づいて決定した。培地の作成のため、各培地成分のストック溶液を作成し、フィルトレーション滅菌して保存した。各ストック溶液の濃度は以下のとおりである：1M glucose、0.615 M K_2HPO_4 、0.382 M KH_2PO_4 、0.203 M $MgSO_4$ 、0.0152 M Thiamine/HCL、0.0018 M $FeSO_4$ 、0.766 M $(NH_4)_2SO_4$ 。培養の直前にこれらのストック溶液を混ぜて使用した。増殖測定に使用した 29 種類の培地組成を Table 9 に示す。

Table 9 29 種類の培地組成

Media	FeSO ₄ (mM)	Thiamine (mM)	MgSO ₄ (mM)	Glucose (mM)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (mM)	KH ₂ PO ₄ (mM)	K ₂ HPO ₄ (mM)
1	0.0018	0.0148	0.203	20	15.3	38.2	61.6
2	0.000018	0.0148	0.203	20	15.3	38.2	61.6
3	0.00018	0.0148	0.203	20	15.3	38.2	61.6
4	0.018	0.0148	0.203	20	15.3	38.2	61.6
5	0.18	0.0148	0.203	20	15.3	38.2	61.6
6	0.0018	0.000148	0.203	20	15.3	38.2	61.6
7	0.0018	0.00148	0.203	20	15.3	38.2	61.6
8	0.0018	0.148	0.203	20	15.3	38.2	61.6
9	0.0018	1.48	0.203	20	15.3	38.2	61.6
10	0.0018	0.0148	0.00203	20	15.3	38.2	61.6
11	0.0018	0.0148	0.0203	20	15.3	38.2	61.6
12	0.0018	0.0148	2.03	20	15.3	38.2	61.6
13	0.0018	0.0148	20.3	20	15.3	38.2	61.6
14	0.0018	0.0148	0.203	0.02	15.3	38.2	61.6
15	0.0018	0.0148	0.203	0.2	15.3	38.2	61.6
16	0.0018	0.0148	0.203	2	15.3	38.2	61.6
17	0.0018	0.0148	0.203	200	15.3	38.2	61.6
18	0.0018	0.0148	0.203	20	0.153	38.2	61.6
19	0.0018	0.0148	0.203	20	1.53	38.2	61.6
20	0.0018	0.0148	0.203	20	153	38.2	61.6
21	0.0018	0.0148	0.203	20	306	38.2	61.6
22	0.0018	0.0148	0.203	20	15.3	1.91	61.6
23	0.0018	0.0148	0.203	20	15.3	3.82	61.6
24	0.0018	0.0148	0.203	20	15.3	19.1	61.6
25	0.0018	0.0148	0.203	20	15.3	76.4	61.6
26	0.0018	0.0148	0.203	20	15.3	38.2	3.08
27	0.0018	0.0148	0.203	20	15.3	38.2	6.16
28	0.0018	0.0148	0.203	20	15.3	38.2	30.8
29	0.0018	0.0148	0.203	20	15.3	38.2	123.2

5.2.2 網羅的増殖測定

5 株の実験進化前後、合計 10 種類の菌株に対して 29 種類の培地で網羅的な増殖測定を実施した。ストック溶液を混合して培地を作成したのち、大腸菌株グリセロールストックを解凍して、培地に 1000 倍希釈したのち、増殖測定は 96 ウェルマイクロプレートに 200 μL ずつ分注した。菌液を分注し終えたマイクロプレートをプレートリーダーにセットし、37°C、567 rpm の設定で培養し、30 分ごとに OD_{600} の値を測定しながら 48 時間培養した。各条件に対して 6 再現以上の測定を行い、合計で 2220 の増殖曲線を取得した。取得した増殖曲線から、第 2 章で記載した手法に従って増殖速度を算出した。

5.2.3 Robustness の評価

同一の菌株、培地条件における増殖速度の測定結果の平均値を算出し、各株の各培地条件における増殖速度の代表値を得た。各培地成分の濃度変化に対するロバスト性を評価する際には、基準培地における増殖速度および対象とする培地成分の濃度が変化している条件における増殖速度を使用した。培地成分の濃度変化に対する増殖速度の変化に対して B-Spline を用いた近似曲線を取得した。近似曲線の取得には統計ソフト R の「spline」パッケージに含まれる「bs」関数を用いた。近似曲線を正規化するため、培地成分の濃度の上限から下限を 50 等分する 50 個の数値ベクトルを \mathbf{X} とし、 \mathbf{X} に対応した近似曲線の 50 個の y 座標からなる数値ベクトルを \mathbf{Y} とした。以下の式を用いて培地成分の濃度を 0 から 1 に正規化した。

$$\mathbf{N.X} = (\mathbf{X} - x_{min}) / (x_{max} - x_{min}) \quad \text{Equation 9}$$

ここで、 \mathbf{X} および $\mathbf{N.X}$ はそれぞれ 50 分割された培地組成の濃度を示す数値ベクトルおよび 0 から 1 に正規化された後の濃度を示す数値ベクトルを意味する。 x_{min} および x_{max} は数値ベクトル \mathbf{X} の最低値および最大値を意味する。次に以下の式を用いて近似曲線の最大値が 1 になるように正規化した。

$$\mathbf{N.Y} = \mathbf{Y} / y_{max} \quad \text{Equation 10}$$

ここで \mathbf{Y} および $\mathbf{N.Y}$ はそれぞれ \mathbf{X} ベクトルに対応した近似曲線の y 座標を示す数値ベクトルおよび最大値が 1 になるように正規化された \mathbf{Y} ベクトルを意味する。 y_{max} は \mathbf{Y} ベクトル

ルの最大値を意味する。こうして得られた $N.X$ および $N.Y$ を x 軸および y 軸に取る折れ線グラフが作成する面積を Robustness とした。

5.3 結果

5.3.1 培地組成の段階的な変化

栄養条件の変化に対するロバスト性を評価するために、培地組成を段階的に変化させた培地セットを作成した。M63 培地を基準培地として、M63 培地を構成する 7 種類の化合物の濃度を指数的に 5 段階で変化させて合計 29 種類の培地を作成した (Figure 31A)。化合物の中で、培地に溶解してイオンとして存在するものについてはイオン濃度に換算し、8 種類の培地成分として評価した (Figure 31B)。培地成分にはグルコースや N 源、S 源などの生体合成に必要な栄養源に加えて、金属イオン及びビタミンといった微量元素を含んでいる。なお、 K^+ および PO_4^{3-} は pH 緩衝に関係している。そして、各培地成分は K^+ および PO_4^{3-} を除いて培地中の濃度が最も低い条件から高い条件まで約 10,000 倍の差があり、非常に幅広い濃度範囲の条件を含んでいる。

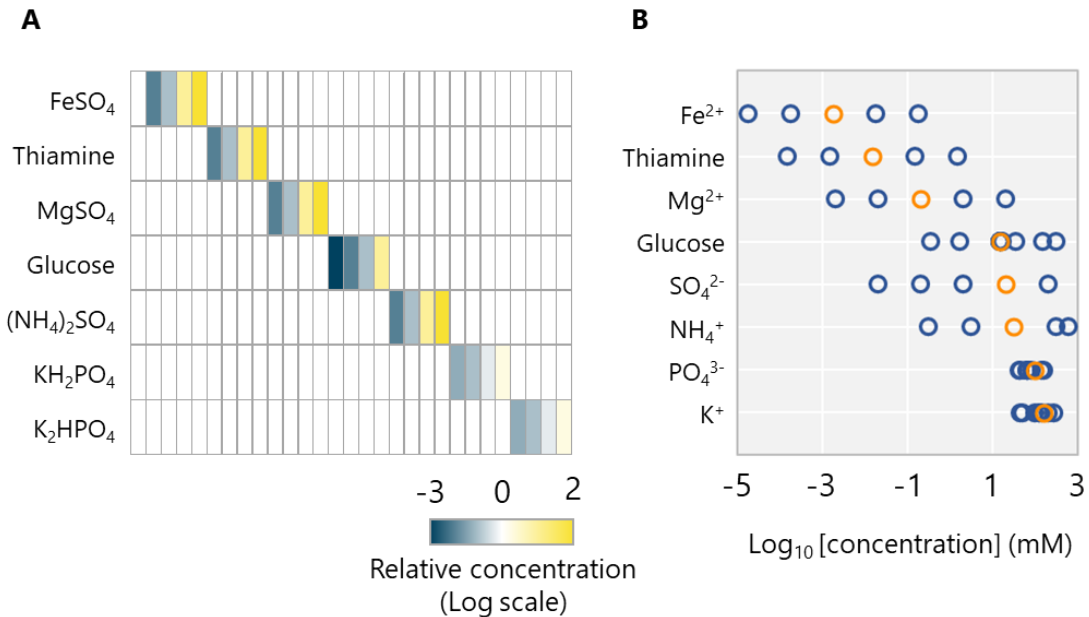


Figure 31 培地セットの特徴

(A) 化合物組成のヒートマップ。各列は全 29 種類の培地を示している。各行は培地を構成する化合物を表している。各培地に含まれる各化合物の濃度を一番左の列に示した基準培地に対する相対値で評価し、濃度の低いものから高いものまでのグラデーションを青から黄色のグラデーションで表した。(B) 培地中に含まれる培地成分の濃度範囲。A のヒートマップで示されている 29 種類の培地中に含まれる 8 種類の培地組成の濃度を示した。オレンジのプロットは基準培地における各培地成分の濃度を示しており、青のプロットは基準培地から濃度を変化させた培地における培地成分の濃度を示している。

5.3.2 ロバスト性の評価

大腸菌株の栄養条件の変化に対する増殖のロバスト性を確かめるために、ゲノムサイズが異なる 5 株に対する 29 種類の培地での網羅的な増殖測定を実施した。そして、8 種類それぞれの培地成分の濃度変化に対する増殖速度を各株に対して評価した (Figure 32)。その結果、glucose や NH₄⁺、Fe²⁺ などにおいては特に顕著に、培地成分の濃度が極端に低いもしくは高い場合に増殖速度が低下する山なりのダイナミクスを示した。SO₄²⁻ や K⁺、PO₄³⁻ は複数の化合物によって濃度が変化しているため、不規則な変動がみられるが、全体的に山

なりの形を描いている。次に、各株の各培地成分の濃度変化に対するロバスト性の定量的な評価を行った (Figure 33)。まず、培地成分の濃度変化に対する増殖速度の変化の全体像をスプライン近似曲線によって滑らかに表した。そして、培地成分の種類による濃度範囲の違いを均すために、濃度範囲を 0 から 1 に正規化した。また、ゲノムの縮小に伴う増殖速度の全体的な低下によるバイアスを補完するために、近似曲線の最大値が 1 になるように全体を正規化した。こうして得られた正規化した近似曲線の作る面積を **Robustness** と定義した。**Robustness** は、培地成分の種類の違いや増殖速度の全体的な高さに影響を受けずに、一定の環境勾配に対して増殖速度を一定に保つ能力を示す指標となっている。

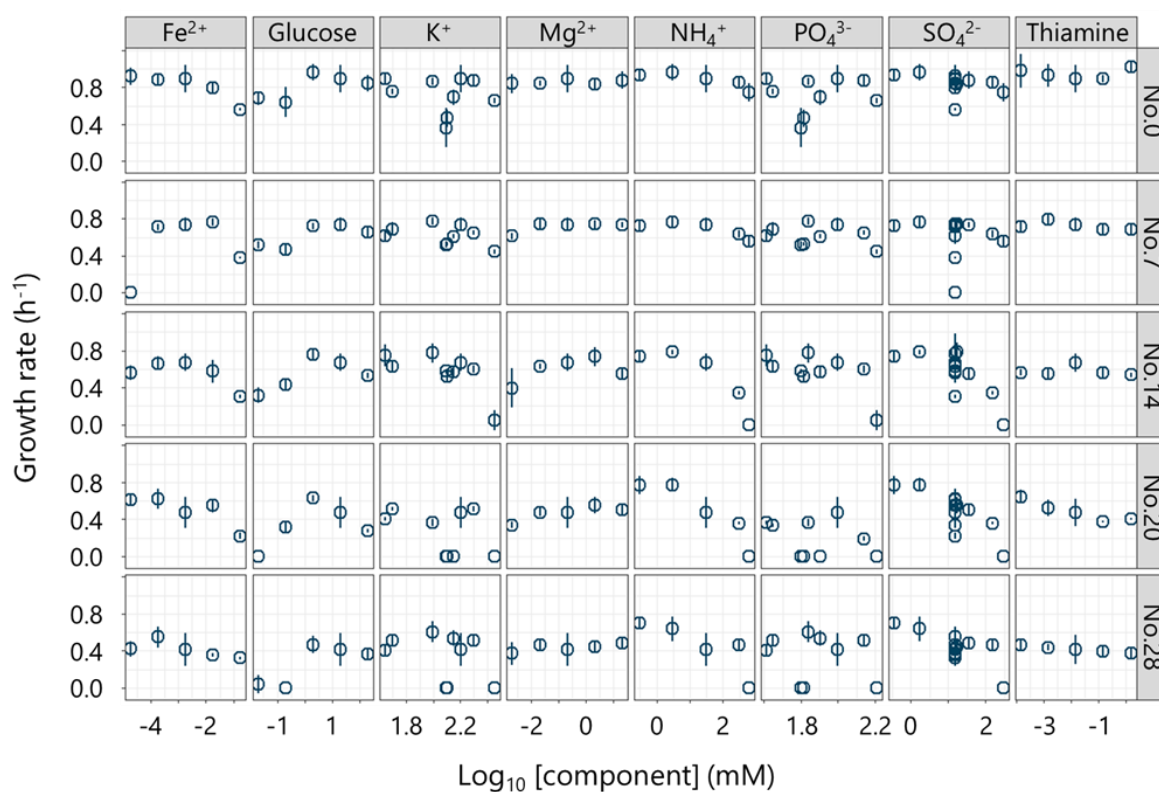


Figure 32 培地成分の濃度変化に対する増殖速度の変化

40 個の各散布図は各列に対応したイオンの濃度変化に対する、各行に対応した株の増殖速度の測定結果を示している。各条件での 6 再現以上の測定結果の平均値をプロットし、標準偏差をエラーバーで示している。

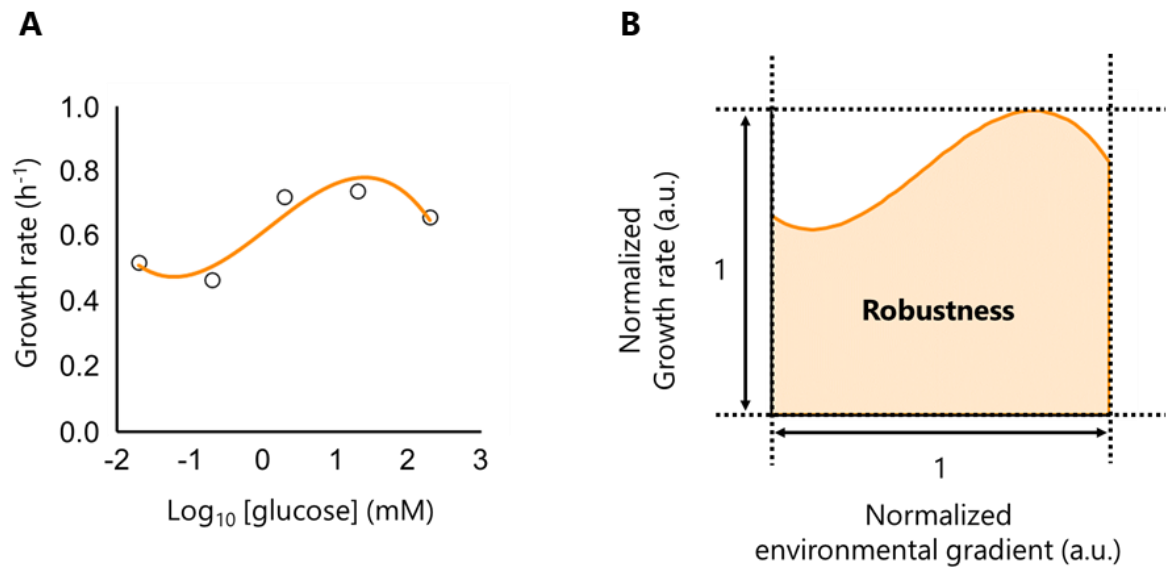


Figure 33 Robustness の評価

(A) スプライン近似曲線の作成。Figure32 の中から No. 7 のグルコースの濃度変化に対する増殖速度の測定結果を示している。オレンジの曲線は、グルコースの濃度変化に対する増殖速度の変化に対する B-spline によって作成した、スプライン近似曲線を示している。(B) Robustness の定義。オレンジの曲線は A の近似曲線に対して、横軸の最低値から最大値を 0 から 1 に正規化し、縦軸の最大値を 1 になるように正規化して得られた曲線。塗りつぶしで表した曲線の下面積を Robustness 定義した。

5.3.3 ゲノム縮小に関連したロバスト性の低下

ゲノムの縮小とロバスト性の関係を定量的に評価するため、ゲノム縮小の長さと Robustness の相関関係を調べた。その結果、いずれの培地成分の条件においても負の相関関係がみられ、Glucose、 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} の条件においては有意な負の相関が確認された (Figure 33)。この負の相関関係は、ゲノムが縮小するほど培地成分の濃度変化によって増殖速度が影響を受けやすくなることを示している。さらに、炭素源、窒素源、硫黄源といった生体合成に必須な栄養源ほど、ゲノムの縮小によるロバスト性への影響を受けやすいことが明らかとなった。ここで注意すべき点として、Robustness を評価する際には増殖速度の正規化を行っているため、ゲノムの縮小によるロバスト性の低下は、増殖速度の低下とは異なる現象である。増殖速度が縮小すると増殖速度が低下するだけでなく、栄養条件の変化というストレスに対して弱くなっていることを意味している。

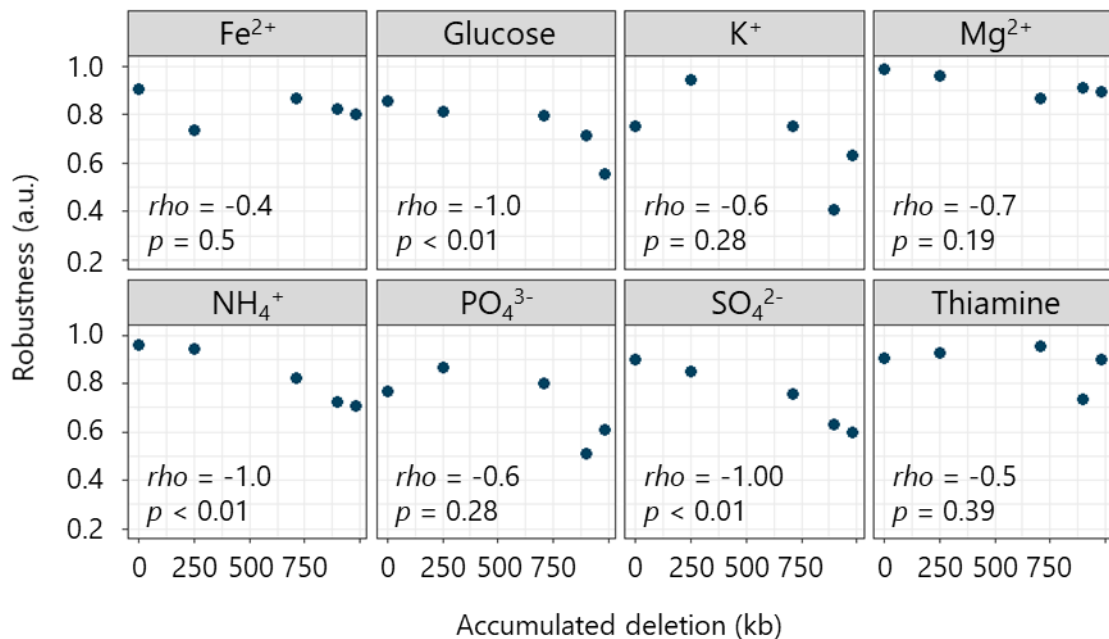


Figure 34 ゲノムの縮小と Robustness の相関

各散布図の縦軸は5種類の大腸菌株における散布図の上のラベルに示された培地成分の濃度変化に対する Robustness、横軸は5種類の大腸菌株のゲノム縮小の長さを示している。Spearman の相関係数および p 値が各散布図の中に示されている。

5.3.4 基準培地による実験進化

野生型株および4種類のゲノム縮小株を基準培地で実験進化させた (Figure 35)。実験進化は第4章と同じように24ウェルマイクロプレートを用いて、指数増殖期を保ちながら1000世代ほど実施した。野生型株においては増殖速度の不規則な変化がみられたが、ゲノム縮小株はいずれも世代数を重ねるにつれて増殖速度が上昇することが確認された。次に、ゲノムの縮小が適応の速度に影響を与えているのかを調べるために、実験進化前後の株での増殖速度を比較した。統計解析の結果、いずれの株においても実験進化によって増殖速度が有意に上昇したことが明らかとなった (Figure 36A)。さらに、適応速度とゲノム縮小の関係を調べるために、1世代あたりの増殖速度の上昇度合いとゲノム縮小の相関関係を調べたところ、有意な正の相関関係が確認された (Figure 36B)。この結果は、ゲノムがより縮小した株ほど適応速度が上昇したことを意味している。

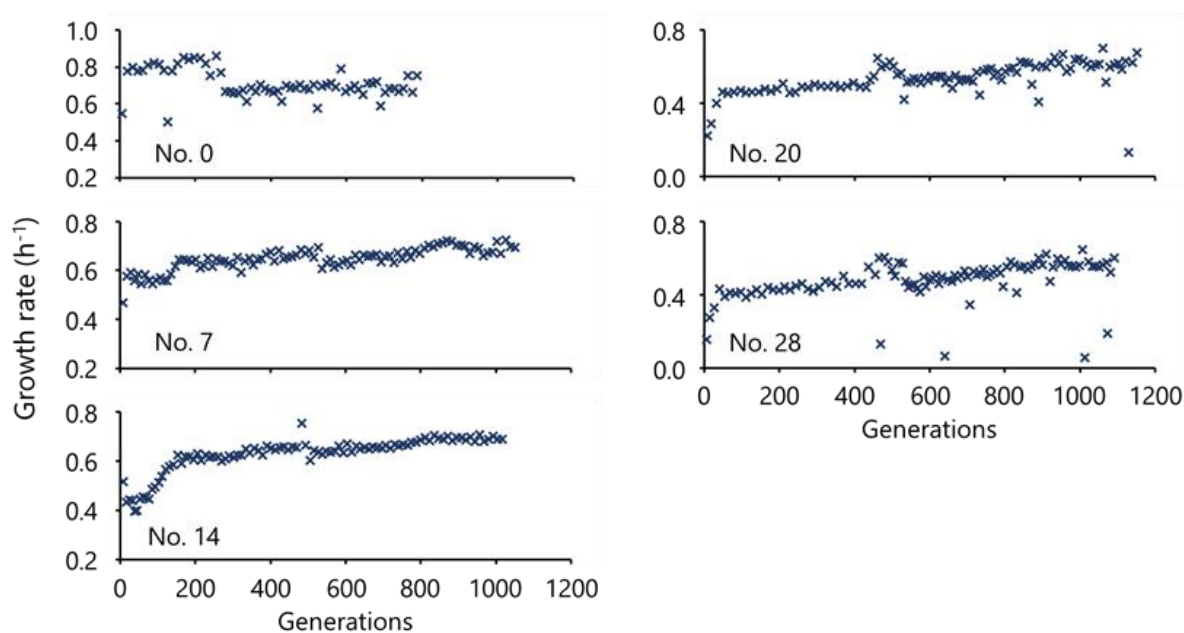


Figure 35 実験進化過程

5種類の大腸菌株の実験進化における世代数と増殖速度の変化。各植え継ぎの際に測定したOD₆₀₀の値をもとにEquations 5、6に従って世代数および増殖速度を算出した。各株の合計植え継ぎ世代数はNo. 0、No. 7、No. 14、No. 20、No. 28それぞれ786、1050、1016、1151、1091世代である。

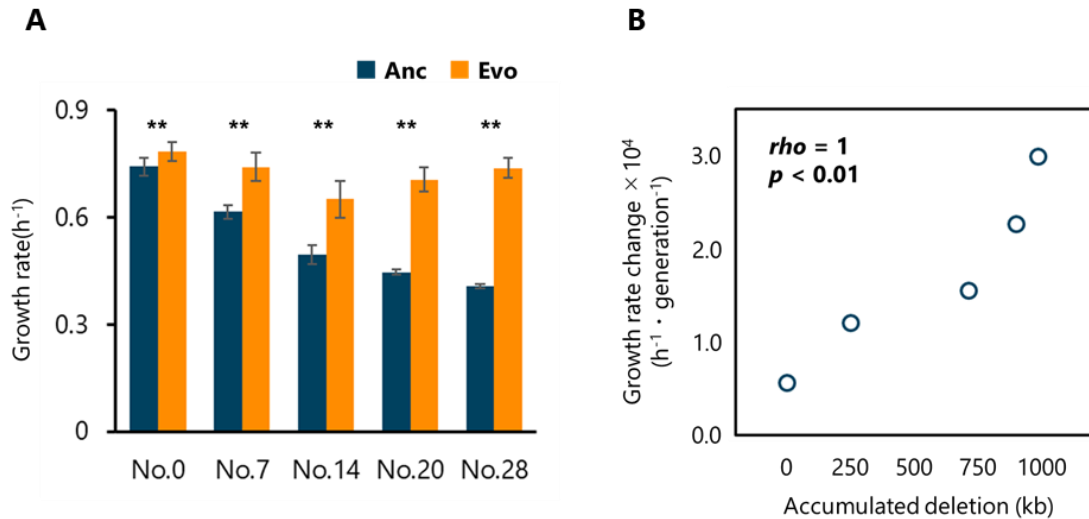


Figure 36 実験進化による増殖速度の上昇

(A) 実験進化前後の増殖速度の比較。5種類の大腸菌株の実験進化前および後の基準培地における増殖速度の測定結果を示した。青いバーは実験進化前、オレンジのバーは実験進化後を示している。各測定12の再現測定を行い、平均値をバーの長さで示し、標準偏差をエラーバーで示した。アスタリスクは実験進化前後における増殖速度の変化の優位性を示している (Student's Two-tailed *t*-test: ** $p < 0.01$)。 (B) 適応速度とゲノム縮小の相関分析。縦軸は各株の進化後の増殖速度と進化前の増殖速度の差を植え継ぎ世代数で除算した値を示している。横軸は各株のゲノム縮小の長さを示している。Spearmanの相関係数および p 値がグラフ中に示されている。

5.3.5 実験進化によるロバスト性の上昇

実験進化によって、進化環境である基準培地に対して適応することが明らかとなった。そこで次に、進化環境以外の培地成分濃度条件に対する適応度がどのように変化したのかを調べるために、進化後の5株の増殖速度を29種類の培地で網羅的に測定した (Figure 37)。培地成分の濃度変化に対する増殖速度の変化を分析すると、増殖速度が全体的に上昇していることが確認された。続いて、培地成分の濃度変化に対するロバスト性を評価するために、実験進化による Robustness の変化を評価した (Figure 38)。その結果、野生型や No.7 においてはいくつかの培地成分に対しては Robustness が低下することが確認されたが、大部分の条件では Robustness が上昇することが確認された。さらに、いずれの培地成

分においてもゲノムの縮小と Robustness の上昇速度には正の相関があり、Glucose、 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} の条件においては統計的な有意性が示された。この相関関係は、ゲノムが縮小するほど、幅広い環境に対して適応しやすくなることを表している。

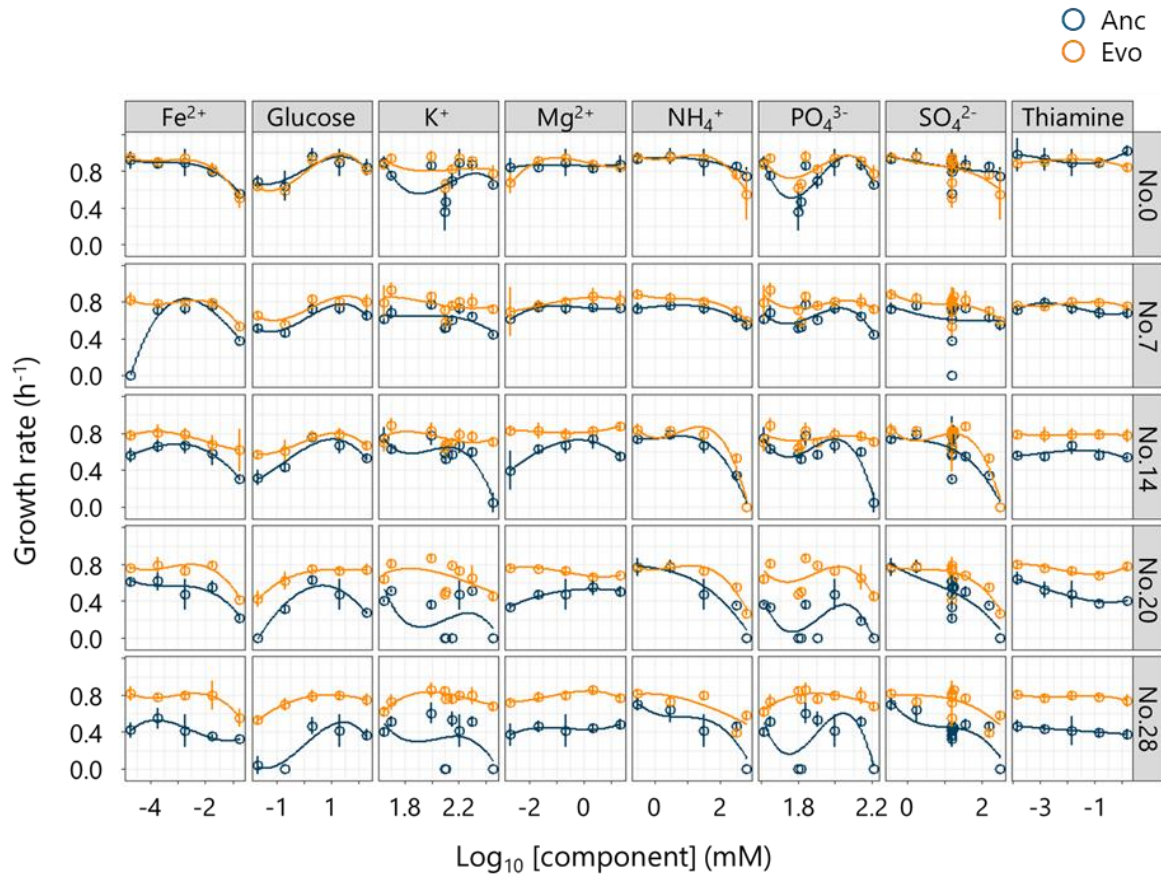


Figure 37 培地成分の濃度変化に対する増殖速度の変化

40個の各散布図は各列に対応したイオンの濃度変化に対する、各行に対応した株の実験進化前後の増殖速度の測定結果を示している。実験進化前の測定結果は青、実験進化後の測定結果はオレンジで示している。各条件での6再現以上の測定結果の平均値をプロットし、標準偏差をエラーバーで示している。青およびオレンジの曲線は培地成分の濃度変化に対する実験進化前および実験進化後の株の増殖速度の変化に対する B-spline によって作成した、スプライン近似曲線を示している。

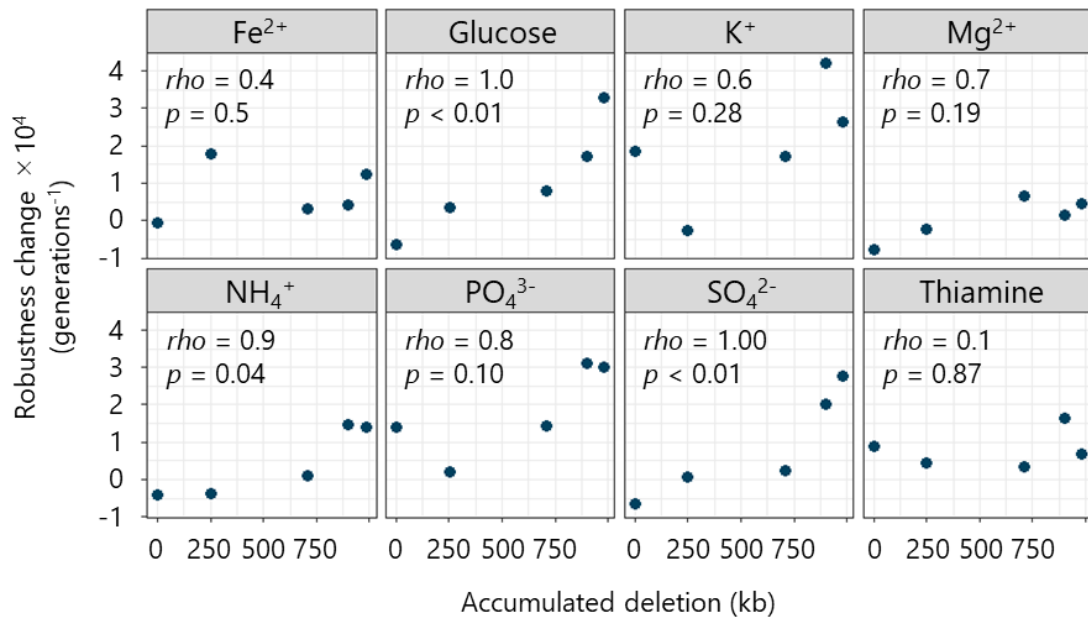


Figure 38 Robustness の変化とゲノム縮小の相関

各散布図の縦軸は5種類の大腸菌株における散布図の上のラベルに示された培地成分の濃度変化に対する Robustness の世代あたりの変化、横軸は5種類の大腸菌株のゲノム縮小の長さを示している。Spearman の相関係数および p 値が各散布図の中に示されている。

5.4 考察

5.4.1 培地成分の種類と濃度変化に対する応答

本研究の結果において、炭素源、窒素源、硫黄源の濃度変化に対するロバスト性はゲノムの縮小に相関して低下することが明らかとなった。ここで注意すべきこととして、ここで示された結果は、これらの栄養源の濃度変化が増殖に対して大きく影響を与えることを示しているのではなく、その度合いがゲノム縮小によって増加するということを意味している。炭素源や窒素源に対しては、濃度変化が増殖速度に影響を与えることが従来調べられてきたが[103,114]、最近行われた研究においては炭素源や窒素源に並んで、Mg²⁺の濃度変化が大腸菌の増殖に大きく影響を与えることが報告されている[106]。

なぜ、炭素源、窒素源、硫黄源の濃度変化による増殖への影響がゲノム縮小によって増加したのかは明らかではないが、これら3つの元素はタンパク質の主要な合成材料として

知られている。そのため、細胞内におけるこれらの存在量のバランスがタンパク質合成に重要であると考えられる。ゲノムの縮小によって生体内で合成されるタンパク質の組成が大きく摂動を受けているために、これら3つの栄養源の濃度変化に対して敏感に応答したと考えられる。

5.4.2 適応トレードオフ

ある環境に対する適応は、他の環境に対する適応度の低下を伴うことが、生態学における一般的な考え方として従来提唱されており[115,116]、生態学的観察および進化実験によっても確認されている[117-119]。しかし、数多くの実験進化研究から、適応トレードオフを伴わない場合もあることが知られている。どのような要因が適応トレードオフの有無に関係しているのかは、数々の議論がある[120,121]。その答えの一つとして、複数の研究結果および理論的な研究から、進化環境に対して適応していない状態から適応進化が開始された場合には適応トレードオフが生じないという傾向が示されている[122-124]。

本研究によって得られた結果ではゲノム縮小株においては、基準培地における実験進化によって培地成分の濃度が低い条件および高い条件においても適応度が上昇することが確認された。一方で、野生型大腸菌においては、基準培地に対する適応度の上昇がいくつかの培地成分における、成分濃度が低い条件および高い条件における適応度の低下につながった。このことは、野生型大腸菌は基準培地に対して元々適応度が高かったために適応トレードオフが生じた一方で、ゲノム縮小株においては元々進化環境である基準培地に対する適応度が低かったために、適応トレードオフが生じずに幅広い環境に対して適応度が上昇したと考えられる。

5.4.3 ゲノムの縮小に伴うロバスト性の変化の生態学的意義

ゲノム進化はゲノムが拡大する方向への進化に焦点が当てられることが多いが、ゲノムの縮小は細菌のゲノム進化の歴史において頻繁に起こっていることが知られている[125,126]。本研究では、ゲノムの縮小によって増殖速度が低下し、さらに増殖速度を高く保てる環境の幅が狭くなることを明らかにした。特に、本研究で用いたゲノム縮小株は増

殖に重要でない遺伝子をターゲットとしてゲノム領域を欠失させたにもかかわらず増殖に悪影響が出たことを考えると、自然界によって生じるランダムなゲノム縮小はそのほとんどの場合が増殖に有害であると推測できる。それにもかかわらずゲノムの進化の過程でゲノムの縮小が頻繁に生じているということは、ゲノムの縮小が増殖への影響を考慮したとしても進化にとって有益な役割を果たしていることを示唆している。

ゲノムの縮小によってもたらされる進化への利点として、進化能の上昇が考えられる。これまでに理論研究やウイルスを用いた実験によって、幅広い環境に対して適応度が高い集団よりも、狭い環境範囲のみで適応度が高い集団の方が進化が促進されることが示されている[127,128]。幅広い環境に対して適応度が高い場合には、多少の環境変動があったとしてもある程度適応度が高いため変異の獲得が有益になることはほとんどない。一方で、適応範囲が狭い場合には、環境が変動した際に適応度が低下し、新たな環境に対して有益に働く変異に強い選択圧がかかり、進化が促進される。同一遺伝型の集団の中で、一部の個体にゲノムの縮小が生じることを考えると、同じ環境に存在している場合ではゲノムの縮小した集団は適応度が低下するために淘汰されてしまう。しかし、ゲノムが縮小して適応範囲が狭くなった個体は、わずかに異なる環境に対しても敏感に適応し、欠失前の集団とは別の環境へ適応するように進化する可能性が高いと考えられる。

5.5 結論

本章では、ゲノムの縮小が栄養条件の変化への耐性（ロバスト性）に与える影響を評価した。この実現のために、培地成分の濃度を段階的に変化させた培地セットによる網羅的な増殖測定を実施した。その結果、ゲノムの縮小に相関してロバスト性が低下することが明らかとなった。この結果は、ゲノムが縮小するほど栄養条件の変化によって影響を受けやすくなったことを示している。次に、実験進化を行うことによってゲノムの縮小によって低下したロバスト性は回復することが示された。さらに、進化環境に対する適応速度およびロバスト性の上昇速度はゲノム縮小と相関関係にあることが明らかとなった。本研究は、自然界の細菌の増殖に重要と考えられる、環境の変化に対するロバスト性と自然界で頻繁に生じていると知られているゲノムの縮小の関係、さらにそれらと適応進化との関係を実験的に調べ、細菌の進化に対する理解へ貢献した。

第6章 結言

遺伝情報は生物の特徴を決定づける重要な役割を担っている。そして、増殖は細胞内での遺伝子の発現や物質代謝の総合的な状態を示す重要なパラメーターである。これまでに遺伝子が細胞内で担っている役割についての知見は数多く蓄積されてきているが、個々の遺伝子が実際に細胞の増殖にどれくらい寄与しているのかはほとんど知られていない。そこで本研究では、単一遺伝子の欠失株およびゲノム縮小株の特徴を網羅的に分析することによって、個々の遺伝子およびある程度の長さを持ったゲノム領域といった遺伝情報の欠落が増殖をはじめとした細胞の特徴に及ぼす影響を理解することを目的とした。

第2章では、個々の遺伝子の欠失が大腸菌の増殖に及ぼす影響を評価した。大腸菌の単一遺伝子欠失株コレクション (Keio コレクション) の増殖速度を、貧栄養条件の M63 最少培地および富栄養条件の LB 天然培地を用いて網羅的に測定した。その結果、遺伝子の単一欠失によって増殖速度が低下する株もあれば上昇する株もあることが明らかとなった。そして、遺伝子が欠失した際の増殖速度への影響を決定づける要因を理解するために、遺伝子欠失株の増殖速度と野生型株における遺伝子の発現量の相関関係を調べたところ、両者には有意な負の相関関係が確認された。つまり、野生型株において発現量が高い遺伝子ほど増殖速度に対する寄与度が高いことが示された。さらに、個々の遺伝子の増殖に対する寄与度と遺伝子発現量を決定づけるゲノムワイドな特徴を調べるために周期性解析を行った結果、遺伝子欠失株の増殖速度および遺伝子発現量は全ゲノムに対して6周期の周期性を示すことを明らかにした。この結果は、ゲノム全体における遺伝子の位置がその遺伝子の増殖に対する寄与度を決定づける要因であることを意味している。先行研究においても、Keio コレクションの網羅的な増殖測定は行われていたが、過去の研究では増殖速度が特異的に上昇した株や低下した株に特に注目が集められてきた。本研究では、Keio コレクション全株の特徴に対して包括的な視点で注目し、遺伝子が欠失した際の増殖への影響を決定づける要因を初めて明らかにした。

第3章では、ある程度の長さを持つゲノム断片の欠失が大腸菌の増殖に及ぼす影響を評価した。ゲノム配列の欠失が段階的に蓄積された全29株からなる大腸菌ゲノム縮小株コレクション (KHK コレクション) の増殖の特徴を網羅的に評価した。増殖測定は M63 培地、MAA 培地、LB 培地の3種類で行った。その結果、ゲノムが縮小するのに相関して、

増殖速度が低下すること、最大菌体濁度が低下すること、最大増殖速度に到達するタイミングが遅くなることを明らかにした。この傾向は3種類の培地のいずれにおいても確認されたが、増殖速度の低下および最大菌体濁度の低下は貧栄養条件の方が顕著に確認された。このことは、ゲノムの縮小による増殖速度および最大菌体濁度への影響が、栄養が豊富に存在している場合には緩和されることを示唆している。遺伝子機能エンリッチメント解析の結果、増殖速度の低下は特定の遺伝子機能群の欠失によるものではなく、様々な種類の遺伝子群の欠失が積み重なることによって生じていることが明らかとなった。多重回帰分析を用いて増殖速度の決定に寄与している因子を分析した結果、ゲノム縮小の長さ、ゲノムの対称性、培地条件によって増殖速度を精度よく予測するモデルを構築した。このモデルは、増殖速度への影響が少ないゲノム縮小株の設計デザインや、増殖速度を高く保つ培養条件の検討といった、ゲノム縮小株の実用に有益な情報を提供する。先行研究において、ゲノム縮小株の増殖速度が低下することがいくつかの研究によって報告されているが、その多くはゲノムが最も縮小された株の増殖を評価したものであった。本研究では、ゲノムが最も縮小された No. 28 のみでなく、その構築段階で作成される株すべてに対して網羅的に増殖測定を行うことによって、ゲノム縮小の長さと増殖の特徴の間の定量的関係を初めて明らかにした。

第4章では、ゲノムの縮小が変異率に与える影響を評価した。KHK コレクションの10株に対して、M63 培地、MAA 培地、LB 培地の培養条件における変異率を網羅的に評価した。その結果、ゲノムの縮小に相関して変異率が上昇することを明らかにした。ゲノムの縮小に相関した変異率の上昇は3種類のいずれの培地条件においても確認された。また、貧栄養条件であるほど変異率の上昇が顕著に確認された。この結果は栄養が豊富に存在している環境においてはゲノムの縮小による変異率の上昇が緩和されることを示唆している。つぎに、野生型株およびゲノム縮小株の10株における変異率と増殖速度の間の関係を調べたところ、変異率と増殖速度の間には負の相関関係が確認された。さらに、この相関関係の普遍性を確認するために、最もゲノムサイズが小さな No. 28 に対して実験進化を実施した。その結果、実験進化によって増殖速度が上昇した一方で変異率は低下した。この結果は、実験進化過程においても変異率と増殖速度の負の相関関係が保たれていたことを示している。先行研究において、ミスマッチ修復遺伝子およびプルーフリーディング遺

伝子の欠損株 (Mutator) において変異率が大きく上昇することが知られていたが、本研究ではゲノムの縮小によって変異率が上昇することを初めて明らかにした。また、様々な種類の Mutator においても、本研究で確認されたように増殖速度と変異率の間の負の相関関係が報告されている。このことは、増殖速度と変異率の相関関係がその原因を問わずに普遍的であることを示唆している。

第5章では、ゲノムの縮小が環境変化に対するロバスト性に与える影響を評価した。ロバスト性を評価するために、培地成分の濃度が段階的に変化する培地セットを用いて、KHK コレクションの5株に対して増殖測定を実施した。そして、培地成分濃度の変化に対する増殖速度の変化の小ささをロバスト性として評価した。その結果、グルコース、 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} の濃度変化に対するロバスト性がゲノムの縮小に相関して低下することを明らかにした。つまり、ゲノムが縮小するほど、グルコース、 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} の濃度変化に対して敏感に応答するようになっていることを示している。次に、培地成分の濃度が最も中間的な基準培地を用いた実験進化を実施した。その結果、グルコース、 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} の濃度変化に対するロバスト性の上昇速度とゲノム縮小の間に正の相関が確認された。つまり、ゲノムの縮小によってグルコース、 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} の濃度変化に対するロバスト性は低下したが、その分実験進化による回復が顕著であることが示された。先行研究において、特定の環境に対して適応すると、他の環境に対する適応度が低下する適応トレードオフがみられることが報告されている。本研究においては、野生型株においては、いくつかの栄養条件において栄養濃度が低い環境または高い環境における増殖速度の低下が確認された。一方で、ゲノム縮小株においては進化環境に対して適応したのみでなく、栄養条件の異なる環境に対しても適応度が上昇することが示された。本研究において、ゲノム縮小株が適応トレードオフを示さなかったことは、ゲノム縮小株は進化前の状態では基準培地に対する適応度が低かったことを表していると考えられる。

第2章から第5章の結果を受けて、次のようなゲノム進化ダイナミクスの仮説を考えた。第2章の結果からゲノム全体における遺伝子の位置関係が、個々の遺伝子の増殖に対する寄与度に大きく影響を与えていることが明らかとなった。このことから考えると、ある程度の長さを持ったゲノム領域が欠失することはゲノム全体の働きに対して大きな摂動をあたえ、細胞機能にストレスを与えることが考えられる。このようなゲノムの縮小に起因

したストレスが増殖速度の低下、変異率の上昇、ロバスト性の低下を引き起こしていると考えられる。そして、実験進化によって増殖速度およびロバスト性が上昇、変異率の低下が起こったのは細胞の自己最適化能力によってゲノムの縮小に対して適応したためであると考えられる。ゲノムの縮小は細菌のゲノム進化の過程で頻繁に生じてきた現象であることが知られている。しかし、本研究の第3章で明らかにしたようにゲノムの縮小はたとえば生育に重要なゲノム領域ではなかったとしても細胞にとって大きなストレスを与え、増殖速度が低下する。だとすると、自然界でゲノムの縮小が生じた場合には、ゲノムが縮小していない同種の個体と比較して適応度が低いために淘汰されてしまう可能性が高い。これは、ゲノム縮小がゲノム進化過程で頻繁に起こっているという事実と矛盾してしまう。そこで第4章と第5章で示された、変異率の上昇およびロバスト性の低下は適応進化を促進する役割をすると考えられる。変異率が上昇することは、有害な変異が生じやすくなる一方、有益な変異が生じる可能性も上がる。また、置かれた環境に対して適応度が低下している状態では有益な変異の割合が上昇することも知られている。そのため、適応度が低下している状態では変異率が上昇することは適応進化を促進すると考えられる。さらに、ロバスト性の低下、つまり適応度が高い環境範囲が狭くなることは適応進化を促進することが知られている。適応進化は確率的に生じる置かれた環境に対して適応度を上昇させる変異が選択されることによって達成される。ロバスト性が低い場合には、わずかな環境変化に敏感に応答して適応度が低下する。そして適応度が低下するほど有益な変異が生じやすくなるため、適応進化が促進される。これらを踏まえると、集団中の一部でゲノムの縮小が生じると、ゲノムが縮小した変異体は増殖速度が低下するが、元々適応していた環境とは異なる環境に対して適応度を上昇させる変異が生じやすくなる。その結果、元々の集団とは遺伝情報も大きく変化し、生育環境も変化することで淘汰されずに生き残ることができる。このようなメカニズムが細菌の進化過程において働いている可能性が考えられる。

本研究の価値をより深めるための今後の課題について述べる。ゲノムの縮小が細胞に対してストレスとなって増殖速度やロバスト性の低下がみられたと考えられるが、ゲノムの縮小が具体的に細胞にどのようなストレスとなっているのかはいまだ未解明である。この問題を解決するために、ゲノムの縮小による遺伝子発現パターンの変化やゲノムの物理的構造の変化などを調べることで理解に貢献できると考えられる。ゲノム上の個々の遺伝子

の発現は複雑な転写制御ネットワークやゲノムの物理的構造によって調節されていることが知られている。そのため、多数の遺伝子を含んだゲノム領域の欠失は細胞の遺伝子発現パターンに大きな摂動を与えることが考えられる。遺伝子発現パターンを評価する際には、個々の遺伝子の発現量に加えて、周期性解析のようなグローバルな遺伝子発現パターンの評価も重要となるだろう。また、本研究の第5章では環境変化に対するロバスト性を評価する際に、培地成分が量的に変化する条件を用いた。しかし、環境の変動には栄養濃度の変動だけでなく、栄養源の種類が異なる環境への遷移や抗生物質への暴露など、条件が質的に異なる場合が考えられる。このような質的な環境変化に対するロバスト性を知ることによって、ゲノム縮小の自然環境における生物進化に対して担っている役割をより深く理解することができる。

参考文献

1. Sanchez-Garcia, L.; Martín, L.; Mangues, R.; Ferrer-Miralles, N.; Vázquez, E.; Villaverde, A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: A 2015 update. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*.
2. Blount, Z.D. The Natural History of Model Organisms: The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife* **2015**, *4*, 1–12.
3. Marr, A.G. Growth rate of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **1991**, *55*, 316–333.
4. Sezonov, G.; Ari, R.D. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 8746–8749.
5. Morse, M.L.; Esther, M.L.; Joshua, L. Transduction in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **1956**, *41*, 142–156.
6. Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y.; Boyer, H.W.; Helling, R.B. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1973**, *70*, 3240–3244.
7. Itakura, K.; Hirose, T.; Crea, R.; Riggs, A.D.; Heyneker, H.L.; Bolivar, F.; Boyer, H.W. Expression in *Escherichia coli* of a Chemically Synthesized Gene for the Hormone Somatostatin. *Science* **1977**, *198*, 1056–1063.
8. Collins, D. Expression of Naphthalene Oxidation Genes in *Escherichia coli* Results in the Biosynthesis of Indigo. *Science* **1983**, *222*, 167–170.
9. Zhao, D.; Yuan, S.; Xiong, B.; Sun, H.; Ye, L.; Li, J.; Zhang, X.; Bi, C. Development of a fast and easy method for *Escherichia coli* genome editing with CRISPR/Cas9. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*, 1–9.
10. Jiang, Y.; Chen, B.; Duan, C.; Sun, B.; Yang, J.; Yang, S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 2506–2514.
11. Fredens, J.; Wang, K.; Torre, D. De; Funke, L.F.H.; Robertson, W.E.; Christova, Y.; Chia, T.; Schmied, W.H.; Dunkelmann, D.L.; Beránek, V.; et al. Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome. *Nature* **2019**, *569*, 514–518.
12. Fleischmann, R.D.; Adams, M.D.; White, O.; Clayton, R.A.; Kirkness, E.F.; Kerlavage, A.R.; Bult, C.J.; Tomb, J.F.; Dougherty, B.A.; Merrick, J.M.; et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **1995**, *269*, 496–512.
13. Blattner, F.R.; Iii, G.P.; Bloch, C.A.; Perna, N.T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-vides, J.; Glasner, J.D.; Rode, C.K.; Mayhew, G.F.; et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **1997**, *277*, 1453–1462.
14. Riley, M.; Abe, T.; Arnaud, M.B.; Berlyn, M.K.B.; Blattner, F.R.; Chaudhuri, R.R.; Glasner, J.D.; Horiuchi, T.; Keseler, I.M.; Kosuge, T.; et al. *Escherichia coli* K-12 : a cooperatively developed annotation snapshot — 2005. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1–9.
15. Kothari, A.; Krummenacker, M.; Latendresse, M.; Peter, E. The EcoCyc Database. *EcoSal Plus* **2019**, *8*, 1–34.

16. Himmelreich, R.; Hubert, H.; Plagens, H.; Pirkl, E.; Li, B.C.; Herrmann, R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4420–4449.
17. Fehér, T.; Papp, B.; Pál, C.; Pósfai, G. Systematic genome reductions: Theoretical and experimental approaches. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3498–3513.
18. Choe, D.; Cho, S.; Kim, S.C.; Cho, B.K. Minimal genome: Worthwhile or worthless efforts toward being smaller? *Biotechnol. J.* **2016**, *11*, 199–211.
19. Lewis, N.E.; Nagarajan, H.; Palsson, B.O. Constraining the metabolic genotype-phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 291–305.
20. Edwards, J.S.; Ibarra, R.U.; Palsson, B.O. In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 125–130.
21. Santos-Zavaleta, A.; Salgado, H.; Gama-Castro, S.; Sánchez-Pérez, M.; Gómez-Romero, L.; Ledezma-Tejeida, D.; García-Sotelo, J.S.; Alquicira-Hernández, K.; Muñiz-Rascado, L.J.; Peña-Loredo, P.; et al. RegulonDB v 10.5: Tackling challenges to unify classic and high throughput knowledge of gene regulation in *E. coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D212–D220.
22. Fang, X.; Sastry, A.; Mih, N.; Kim, D.; Tan, J.; Yurkovich, J.T.; Lloyd, C.J.; Gao, Y.; Yang, L.; Palsson, B.O. Global transcriptional regulatory network for *Escherichia coli* robustly connects gene expression to transcription factor activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 10286–10291.
23. Sastry, A. V.; Gao, Y.; Szubin, R.; Hefner, Y.; Xu, S.; Kim, D.; Choudhary, K.S.; Yang, L.; King, Z.A.; Palsson, B.O. The *Escherichia coli* transcriptome mostly consists of independently regulated modules. *Nat. Commun.* **2019**, *10*.
24. Scott, M.; Mateescu, E.M.; Zhang, Z.; Hwa, T. Interdependence of Cell Growth and Gene Expression: Origins and Consequences. *Science* **2010**, *330*, 1099–1103.
25. Dillon, S.C.; Dorman, C.J. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 185–195.
26. Baba, T.; Ara, T.; Hasegawa, M.; Takai, Y.; Okumura, Y.; Baba, M.; Datsenko, K.A.; Tomita, M.; Wanner, B.L.; Mori, H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2006**, *2*.
27. Yamamoto, N.; Nakahigashi, K.; Nakamichi, T.; Yoshino, M.; Takai, Y.; Touda, Y.; Furubayashi, A.; Kinjyo, S.; Dose, H.; Hasegawa, M.; et al. Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants. *Mol. Syst. Biol.* **2009**, *5*.
28. French, S.; Cote, J.-P.; Stokes, J.M.; Truant, R.; Brown, E.D. Bacteria Getting into Shape: Genetic Determinants of *E. coli* Morphology. *MBio* **2017**, *8*, 6–11.
29. Campos, M.; Govers, S.K.; Irnov, I.; Dobihal, G.S.; Cornet, F.; Jacobs - Wagner, C. Genomewide phenotypic analysis of growth, cell morphogenesis, and cell cycle events in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* **2018**, *14*.

30. Takeuchi, R.; Tamura, T.; Nakayashiki, T.; Tanaka, Y.; Muto, A.; Wanner, B.L.; Mori, H. Colony-live - A high-throughput method for measuring microbial colony growth kinetics - Reveals diverse growth effects of gene knockouts in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* **2014**, *14*, 1–11.
31. Falls, K.C.; Williams, A.L.; Bryksin, A. V.; Matsumura, I. *Escherichia coli* deletion mutants illuminate trade-offs between growth rate and flux through a foreign anabolic pathway. *PLoS One* **2014**, *9*.
32. Nichols, R.J.; Sen, S.; Choo, Y.J.; Beltrao, P.; Zietek, M.; Chaba, R.; Lee, S.; Kazmierczak, K.M.; Lee, K.J.; Wong, A.; et al. Phenotypic landscape of a bacterial cell. *Cell* **2011**, *144*, 143–156.
33. Shen-Orr, S.S.; Milo, R.; Mangan, S.; Alon, U. Network motifs in the transcriptional regulation network of *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* **2002**, *31*, 64–68.
34. Ying, B.W.; Yama, K.; Kitahara, K.; Yomo, T. The *Escherichia coli* transcriptome linked to growth fitness. *Genomics Data* **2016**, *7*, 1–3.
35. Feugeas, J.P.; Tourret, J.; Launay, A.; Bouvet, O.; Hoede, C.; Denamur, E.; Tenaillon, O. Links between Transcription, Environmental Adaptation and Gene Variability in *Escherichia coli*: Correlations between Gene Expression and Gene Variability Reflect Growth Efficiencies. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 2515–2529.
36. Matsumoto, Y.; Murakami, Y.; Tsuru, S.; Ying, B.; Yomo, T. Growth rate-coordinated transcriptome reorganization in bacteria. *BMC Genomics* **2013**, *14*.
37. Jeong, K.S.; Ahn, J.; Khodursky, A.B. Spatial patterns of transcriptional activity in the chromosome of *Escherichia coli*. *Genome Biol.* **2004**, *5*, R86.
38. Allen, T.E.; Price, N.D.; Joyce, A.R.; Palsson, B. Long-range periodic patterns in microbial genomes indicate significant multi-scale chromosomal organization. *PLoS Comput. Biol.* **2006**, *2*.
39. Allen, T.E.; Herrgård, M.J.; Liu, M.; Qiu, Y.; Glasner, J.D.; Blattner, F.R.; Palsson, B. Genome-Scale Analysis of the Uses of the *Escherichia coli* Genome: Model-Driven Analysis of Heterogeneous Data Sets. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 6392–6399.
40. Ying, B.W.; Seno, S.; Kaneko, F.; Matsuda, H.; Yomo, T. Multilevel comparative analysis of the contributions of genome reduction and heat shock to the *Escherichia coli* transcriptome. *BMC Genomics* **2013**, *14*.
41. Nagai, M.; Kurokawa, M.; Ying, B.W. The highly conserved chromosomal periodicity of transcriptomes and the correlation of its amplitude with the growth rate in *Escherichia coli*. *DNA Res.* **2020**, *27*, 1–7.
42. Ihaka, R.; Gentleman, R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *J. Comput. Graph. Stat.* **1996**, *5*, 299–314.
43. Hong, F.; Breitling, R.; McEntee, C.W.; Wittner, B.S.; Nemhauser, J.L.; Chory, J. RankProd: A bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis.

- Bioinformatics* **2006**, *22*, 2825–2827.
44. Wichert, S.; Fonkianos, K.; Strimmer, K. Identifying periodically expressed transcripts in microarray time series data. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 5–20.
 45. Liroy, V.S.; Cournac, A.; Marbouty, M.; Duigou, S.; Mozziconacci, J.; Espéli, O.; Boccard, F.; Koszul, R. Multiscale Structuring of the E. coli Chromosome by Nucleoid-Associated and Condensin Proteins. *Cell* **2018**, *172*, 771–783.
 46. Krogh, T.J.; Møller-jensen, J.; Kaleta, C. Impact of Chromosomal Architecture on the Function and Evolution of Bacterial Genomes. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–15.
 47. Lal, A.; Dhar, A.; Trostel, A.; Kouzine, F.; Seshasayee, A.S.N.; Adhya, S. Genome scale patterns of supercoiling in a bacterial chromosome. *Nat. Commun.* **2016**, *7*.
 48. Bryant, J.A.; Sellars, L.E.; Busby, S.J.W.; Lee, D.J. Chromosome position effects on gene expression in Escherichia coli K-12. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 11383–11392.
 49. Dorman, C.J. Genome architecture and global gene regulation in bacteria: Making progress towards a unified model? *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 349–355.
 50. Niki, H.; Yamaichi, Y.; Hiraga, S. Dynamic organization of chromosomal DNA in Escherichia coli. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 212–223.
 51. Valens, M.; Penaud, S.; Rossignol, M.; Cornet, F.; Boccard, F. Macrodomain organization of the Escherichia coli chromosome. *EMBO J.* **2004**, *23*, 4330–4341.
 52. Vadstein, O.; Attramadal, K.J.K.; Bakke, I.; Olsen, Y. K-selection as microbial community management strategy: A method for improved viability of larvae in aquaculture. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–17.
 53. Engen, S.; Lande, R.; Sæther, B.E. A quantitative genetic model of r- and K-selection in a fluctuating population. *Am. Nat.* **2013**, *181*, 725–736.
 54. Bachmann, H.; Fischlechner, M.; Rabbers, I.; Barfa, N.; Dos Santos, F.B.; Molenaar, D.; Teusink, B. Availability of public goods shapes the evolution of competing metabolic strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 14302–14307.
 55. Novak, M.; Pfeiffer, T.; Lenski, R.E.; Sauer, U.; Bonhoeffer, S. Experimental tests for an evolutionary trade-off between growth rate and yield in E. coli. *Am. Nat.* **2006**, *168*, 242–251.
 56. Mori, M.; Marinari, E.; De Martino, A. A yield-cost tradeoff governs Escherichia coli's decision between fermentation and respiration in carbon-limited growth. *npj Syst. Biol. Appl.* **2019**, *5*.
 57. Rosano, G.L.; Morales, E.S.; Ceccarelli, E.A. New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5-year update. *Protein Sci.* **2019**, *28*, 1412–1422.
 58. Cardinale, S.; Arkin, A.P. Contextualizing context for synthetic biology – identifying causes of failure of synthetic biological systems. *Biotechnol. J.* **2012**, *7*, 856–866.
 59. Beites, T.; Mendes, M. V. Chassis optimization as a cornerstone for the application of synthetic biology based strategies in microbial secondary metabolism. *Front. Microbiol.*

2015, 6.

60. Mizoguchi, H.; Sawano, Y.; Kato, J.I.; Mori, H. Superpositioning of deletions promotes growth of *Escherichia coli* with a reduced genome. *DNA Res.* **2008**, *15*, 277–284.
61. Hirokawa, Y.; Kawano, H.; Tanaka-Masuda, K.; Nakamura, N.; Nakagawa, A.; Ito, M.; Mori, H.; Oshima, T.; Ogasawara, N. Genetic manipulations restored the growth fitness of reduced-genome *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, *116*, 52–58.
62. Kolisnychenko, V.; Iii, G.P.; Herring, C.D.; Fehér, T.; Pósfai, J.; Blattner, F.R.; Pósfai, G. Engineering a Reduced *Escherichia coli* Genome. *Genome Res.* **2002**, *12*, 640–647.
63. Pósfai, G.; Umenhoffer, K.; Kolisnychenko, V.; Stahl, B.; Sharma, S.S. Emergent Properties of Reduced-Genome *Escherichia coli*. *Science* **2006**, *312*, 1044–1047.
64. Yuan, X.; Couto, J.M.; Glidle, A.; Song, Y.; Sloan, W.; Yin, H. Single-Cell Microfluidics to Study the Effects of Genome Deletion on Bacterial Growth Behavior. *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6*, 2219–2227.
65. Karcagi, I.; Draskovits, G.; Umenhoffer, K.; Fekete, G.; Kovács, K.; Méhi, O.; Balikó, G.; Szappanos, B.; Györfy, Z.; Fehér, T.; et al. Indispensability of Horizontally Transferred Genes and Its Impact on Bacterial Genome Streamlining. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1257–1269.
66. Hashimoto, M.; Ichimura, T.; Mizoguchi, H.; Tanaka, K.; Fujimitsu, K.; Keyamura, K.; Ote, T.; Yamakawa, T.; Yamazaki, Y.; Mori, H.; et al. Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol Microbiol* **2005**, *55*, 137–149.
67. Iwadate, Y.; Honda, H.; Sato, H.; Hashimoto, M.; Kato, J.I. Oxidative stress sensitivity of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *FEMS Microbiol. Lett.* **2011**, *322*, 25–33.
68. Park, M.K.; Lee, S.H.; Yang, K.S. Enhancing recombinant protein production with an *Escherichia coli* host strain lacking insertion sequences. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 6701–6713.
69. Choe, D.; Lee, J.H.; Yoo, M.; Hwang, S.; Sung, B.H.; Cho, S.; Palsson, B.; Kim, S.C.; Cho, B. Adaptive laboratory evolution of a genome-reduced *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* **2019**, *10*.
70. Yu, B.J.; Sung, B.H.; Koob, M.D.; Lee, C.H.; Lee, J.H.; Lee, W.S.; Kim, M.S.; Kim, S.C. Minimization of the *Escherichia coli* genome using a Tn5-targeted Cre/loxP excision system. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1018–1023.
71. Lee, J.; Sung, B.; Kim, M.; Blattner, F.R.; Yoon, B.; Kim, J.; Kim, S. Metabolic engineering of a reduced-genome strain of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Microb. Cell Fact.* **2009**, *8*.
72. Akaike, H. A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.* **1974**, *19*, 716–723.

73. Alikhan, N.F.; Petty, N.K.; Ben Zakour, N.L.; Beatson, S.A. BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* **2011**, *12*.
74. Lawrence, J.G.; Ochman, H. Molecular archaeology of the Escherichia coli genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 9413–9417.
75. Koonin, E. V.; Wolf, Y.I. Genomics of bacteria and archaea: The emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 6688–6719.
76. Kurland, C.G.; Canback, B.; Berg, O.G. Horizontal gene transfer: A critical view. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 9658–9662.
77. Novichkov, P.S.; Omelchenko, M. V.; Gelfand, M.S.; Mironov, A.A.; Wolf, Y.I.; Koonin, E. V. Genome-wide molecular clock and horizontal gene transfer in bacterial evolution. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 6575–6585.
78. Lynch, M. Evolution of the mutation rate. *Trends Genet.* **2010**, *26*, 345–352.
79. Eyre-Walker, A.; Keightley, P.D. The distribution of fitness effects of new mutations. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 610–618.
80. Comas, I.; Borrell, S.; Roetzer, A.; Rose, G.; Malla, B.; Kato-Maeda, M.; Galagan, J.; Niemann, S.; Gagneux, S. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 106–110.
81. Martinez, J.L.; Baquero, F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 1771–1777.
82. Lenski, R.E.; Sniegowski, P.; Gerrish, P. Evolution of high mutation rates in experimental populations of E. coli. *Nature* **1997**, *387*, 703–705.
83. Giraud, A.; Matic, I.; Tenaillon, O.; Clara, A.; Radman, M.; Fons, M.; Taddei, F.; Giraud, A.; Matic, I.; Tenaillon, O.; et al. Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science* **2001**, *291*, 2606–2608.
84. Wielgoss, S.; Barrick, J.E.; Tenaillon, O.; Wisner, M.J.; Dittmar, W.J.; Cruveiller, S.; Chanee-Woon-Ming, B.; Med'igue, C.; Lenski, R.E.; Schneider, D. Mutation rate dynamics in a bacterial population reflect tension between adaptation and genetic load. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 222–227.
85. McDonald, M.J.; Hsieh, Y.Y.; Yu, Y.H.; Chang, S.L.; Leu, J.Y. The evolution of low mutation rates in experimental mutator populations of Saccharomyces cerevisiae. *Curr. Biol.* **2012**, *22*, 1235–1240.
86. Kishimoto, T.; Iijima, L.; Tatsumi, M.; Ono, N.; Oyake, A.; Hashimoto, T.; Matsuo, M.; Okubo, M.; Suzuki, S.; Mori, K.; et al. Transition from positive to neutral in mutation fixation along with continuing rising fitness in thermal adaptive evolution. *PLoS Genet.* **2010**, *6*, 1–10.
87. Barrick, J.E.; Yu, D.S.; Yoon, S.H.; Jeong, H.; Oh, T.K.; Schneider, D.; Lenski, R.E.; Kim, J.F. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with Escherichia coli.

- Nature* **2009**, *461*, 1243–1247.
88. Drake, J.W.; Charlesworth, B.; Charlesworth, D.; Crow, J.F. Rate of spontaneous mutation rates. *Genetics* **1998**, *148*, 1667–1686.
 89. Fukui, K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J. Nucleic Acids* **2010**, *260512*.
 90. Luria, S.E.; Delbruck, M. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* **1943**, *28*.
 91. Ying, B.W.; Matsumoto, Y.; Kitahara, K.; Suzuki, S.; Ono, N.; Furusawa, C.; Kishimoto, T.; Yomo, T. Bacterial transcriptome reorganization in thermal adaptive evolution. *BMC Genomics* **2015**, *16*, 1–11.
 92. Murakami, Y.; Matsumoto, Y.; Tsuru, S.; Ying, B.W.; Yomo, T. Global coordination in adaptation to gene rewiring. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 1304–1316.
 93. Yama, K.; Matsumoto, Y.; Murakami, Y.; Seno, S.; Matsuda, H.; Gotoh, K.; Motooka, D.; Nakamura, S.; Ying, B.W.; Yomo, T. Functional specialization in regulation and quality control in thermal adaptive evolution. *Genes to Cells* **2015**, *20*, 943–955.
 94. Suzuki, S.; Horinouchi, T.; Furusawa, C. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–12.
 95. Horinouchi, T.; Tamaoka, K.; Furusawa, C.; Ono, N.; Suzuki, S.; Hirasawa, T. Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress. *BMC Genomics* **2010**, *11*.
 96. Ishizawa, Y.; Ying, B.W.; Tsuru, S.; Yomo, T. Nutrient-dependent growth defects and mutability of mutators in *Escherichia coli*. *Genes to Cells* **2015**, *20*, 68–76.
 97. Drake, J.W. The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *870*, 100–107.
 98. Kassen, R.; Bataillon, T. Distribution of fitness effects among beneficial mutations before selection in experimental populations of bacteria. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 484–488.
 99. Agrawal, A.F. Genetic loads under fitness-dependent mutation rates. *J. Evol. Biol.* **2002**, *15*, 1004–1010.
 100. Koch, A.L. The Adaptive Responses of *Escherichia coli* to a Feast and Famine Existence. *Adv. Microb. Physiol.* **1971**, *6*, 147–217.
 101. Yokoyama, K.; Ishijima, S.A.; Clowney, L.; Koike, H.; Aramaki, H.; Tanaka, C.; Makino, K.; Suzuki, M. Feast/famine regulatory proteins (FFRPs): *Escherichia coli* Lrp, AsnC and related archaeal transcription factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 89–108.
 102. Neidhardt, F.C.; Bloch, P.L.; Smith, D.F. Culture Medium for Enterobacteria. *J. Bacteriol. Microbiol.* **1974**, *119*, 736–747.
 103. Monod, J. The Growth of Bacterial Cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* **1949**, *3*, 371–394.
 104. Luong, J.H.T. Generalization of monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *29*, 242–248.
 105. Andrews, J.F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing

- inhibitory substrates. *Biotechnol. Bioeng.* **1968**, *10*, 707–723.
106. Ashino, K.; Sugano, K.; Amagasa, T.; Ying, B.W. Predicting the decision making chemicals used for bacterial growth. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–11.
 107. Zhang, J. Evolution by gene duplication: An update. *Trends Ecol. Evol.* **2003**, *18*, 292–298.
 108. Hittinger, C.T.; Carroll, S.B. Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature* **2007**, *449*, 677–681.
 109. Von Wintersdorff, C.J.H.; Penders, J.; Van Niekerk, J.M.; Mills, N.D.; Majumder, S.; Van Alphen, L.B.; Savelkoul, P.H.M.; Wolffs, P.F.G. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*.
 110. Zhu, L.; Zhu, Y.; Zhang, Y.; Li, Y. Engineering the robustness of industrial microbes through synthetic biology. *Trends Microbiol.* **2012**, *20*, 94–101.
 111. Hart, Y.; Alon, U. The Utility of Paradoxical Components in Biological Circuits. *Mol. Cell* **2013**, *49*, 213–221.
 112. Newton, I.L.G.; Bordenstein, S.R. Correlations between bacterial ecology and mobile DNA. *Curr. Microbiol.* **2011**, *62*, 198–208.
 113. Sriswasdi, S.; Yang, C.C.; Iwasaki, W. Generalist species drive microbial dispersion and evolution. *Nat. Commun.* **2017**, *8*.
 114. Shehata, T.E.; Allen, G.M. Effect of Nutrient Concentration on the Growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1971**, *107*, 210–216.
 115. Futuyma, D.J.; Moreno, G. The evolution of ecological specialization. *Annu. Rev. Ecol. Syst. Vol. 19* **1988**, 207–233.
 116. Kawecki, T.J.; Ebert, D. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* **2004**, *7*, 1225–1241.
 117. Rodríguez-Verdugo, A.; Carrillo-Cisneros, D.; González-González, A.; Gaut, B.S.; Bennett, A.F. Different tradeoffs result from alternate genetic adaptations to a common environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 12121–12126.
 118. Krenek, S.; Petzoldt, T.; Berendonk, T.U. Coping with temperature at the warm edge - patterns of thermal adaptation in the microbial eukaryote *paramecium caudatum*. *PLoS One* **2012**, *7*.
 119. Cooper, V.S. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. X. Quantifying the fundamental and realized niche. *BMC Evol. Biol.* **2002**, *2*, 1–9.
 120. Kassen, R. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J. Evol. Biol.* **2002**, *15*, 173–190.
 121. Bono, L.M.; Smith, L.B.; Pfennig, D.W.; Burch, C.L. The emergence of performance trade-offs during local adaptation: insights from experimental evolution. *Mol. Ecol.* **2017**, *26*, 1720–1733.
 122. Martin, G.; Lenormand, T. The fitness effect of mutations across environments: Fisher's geometrical model with multiple optima. *Evolution (N. Y.)* **2015**, *69*, 1433–1447.

123. Schick, A.; Bailey, S.F.; Kassen, R. Evolution of fitness trade-offs in locally adapted populations of *Pseudomonas fluorescens*. *Am. Nat.* **2015**, *186*, S48–S59.
124. Jasmin, J.N.; Zeyl, C. Evolution of pleiotropic costs in experimental populations. *J. Evol. Biol.* **2013**, *26*, 1363–1369.
125. Mira, A.; Ochman, H.; Moran, N.A. Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genet.* 2001, *17*, 589–596.
126. Puigbò, P.; Lobkovsky, A.E.; Kristensen, D.M.; Wolf, Y.I.; Koonin, E. V. Genomes in turmoil: Quantification of genome dynamics in prokaryote supergenomes. *BMC Med.* **2014**, *12*, 1–19.
127. Bono, L.M.; Draghi, J.A.; Turner, P.E. Evolvability Costs of Niche Expansion. *Trends Genet.* **2020**, *36*, 14–23.
128. Whitlock, M.C. The red queen beats the jack-of-all-trades: the limitations on the evolution of phenotypic plasticity and niche breadth. *Am. Nat.* **1996**, *148*, 318–321.

図表一覧

図一覧

Figure 1 最大菌体濁度と増殖速度の算出.....	14
Figure 2 単一遺伝子欠失株の増殖速度分布	16
Figure 3 遺伝子欠失株の増殖速度に基づいた遺伝子の分類	18
Figure 4 very positive に分類された遺伝子群の機能分析	19
Figure 5 増殖速度と遺伝子発現の相関分析	22
Figure 6 培地の変化に反応して発現量および増殖速度が変化する遺伝子.....	23
Figure 7 増殖速度と遺伝子発現量のゲノム周期性	26
Figure 8 増殖速度および遺伝子発現の周期性とマクロドメインの対応	28
Figure 9 単一遺伝子欠失株の増殖速度のゲノム周期性.....	29
Figure 10 単一遺伝子欠失株の増殖速度および最大菌体濁度の相関分析	30
Figure 11 公開データを用いた増殖速度と最大菌体濁度の相関解析.....	31
Figure 12 大腸菌ゲノム縮小株の増殖の特徴	33
Figure 13 ゲノム配列の欠失領域の蓄積	41
Figure 14 遺伝子群の欠失した個数の偏り	42
Figure 15 ゲノム縮小の蓄積に伴った増殖速度と最大菌体濁度の変化.....	45
Figure 16 ゲノム縮小の長さに相関した定常期の細胞密度と細胞サイズの変化	46
Figure 17 栄養条件に依存したゲノム縮小による影響	48
Figure 18 増殖曲線のリスケール	49
Figure 19 リスケールした最大増殖速度のタイミング	50
Figure 20 ゲノムの対称性	52
Figure 21 増殖速度の多重回帰分析.....	53
Figure 22 96 ウェルプレートの測定バイアス	55
Figure 23 遺伝子機能ごとの欠失遺伝子数と増殖速度の相関.....	56
Figure 24 ゲノム縮小に関連した増殖速度の変化の仮説.....	58
Figure 25 ゲノムサイズと変異率の相関	65
Figure 26 遺伝子機能ごとの欠失遺伝子数と変異率の相関	67
Figure 27 変異率と増殖速度の相関.....	68
Figure 28 ゲノム縮小株の実験進化.....	70
Figure 29 実験進化による増殖速度および変異率の変化.....	71
Figure 30 増殖速度とミスマッチ修復遺伝子の発現量の関係.....	73
Figure 31 培地セットの特徴.....	81
Figure 32 培地成分の濃度変化に対する増殖速度の変化.....	82
Figure 33 Robustness の評価	83
Figure 34 ゲノムの縮小と Robustness の相関.....	84

Figure 35 実験進化過程.....	85
Figure 36 実験進化による増殖速度の上昇.....	86
Figure 37 培地成分の濃度変化に対する増殖速度の変化.....	87
Figure 38 Robustness の変化とゲノム縮小の相関	88

表一覧

Table 1 LB 培地組成.....	11
Table 2 M63 グルコース最少培地組成.....	11
Table 3 増殖の負荷となっている遺伝子群	20
Table 4 DEGs および DGGs に共通した遺伝子.....	24
Table 5 MAA 培地組成.....	37
Table 6 機能分類カテゴリーに含まれる遺伝子数	43
Table 7 LB 寒天培地組成.....	60
Table 8 ナリジキシン酸入り LB 寒天培地作成.....	61
Table 9 29 種類の培地組成.....	78

謝辞

本論文の執筆に至るまでの研究生活において、数多くの方々にお世話になりました。そのすべての方々を挙げることはできませんが、本研究において特に大きな影響を与えてくださった方々を以下に書き記します。

指導教員の應蓓文准教授には、研究指導や研究環境を与えていただきました。研究室へ配属当初は研究に必要な知識や常識も全く持ち合わせていなかった私に、実験ノートの書き方から実験のやり方、論文の読み方など大変手厚くご指導いただきました。この時に教わった基礎が無ければ、研究を適切に進めることはできませんでした。そして6年もの長い間、研究がうまく進むように定期的に研究の進捗を確認していただき、適切な指摘や提案をいただいたおかげでこれまで研究を続けてこれました。また、研究面のみならず生活面においても心身の状態の変化に気付き気にかけていただきました。おかげで成長の機会に恵まれながら居心地のいい学生生活を送ることができました。心より感謝いたします。

環境バイオマス共生学専攻の中村顕教授、生物機能科学専攻の高谷直樹教授、持続環境学専攻の野村暢彦教授には本論文の執筆にあたり示唆に富んだ有益なコメントをいただきました。そのおかげで、本研究の価値をさらに広げるための重要な視点を得ることができました。大変感謝いたします。

中村顕教授、高谷直樹教授、竹下典男准教授、榊尾俊介助教をはじめとして、負荷適応研究室の皆様には毎週の研究ゼミおよび旅行など研究生活の様々なイベントを通して大変お世話になりました。様々な分野の研究発表を聞いたり、自分の研究に対してコメントをいただいたりしたことで、多面的な考え方を身につけることができました。大変感謝いたします。

研究室で共に過ごした内田圭祐さん、永井元基さん、會田穂乃香さん、人見健矢さん、橋詰崇雅さん、日原奨希さん、芦野一葉さん、西村一成さん、劉柳さん、伊地知真也さん、根本拓実さん、Xue Heng さん、土屋宏平さん。皆さんのおかげで楽しく有意義な研究生活を送ることができました。6年間研究への意欲を持ち続けていられたのは研究室の皆さんのおかげです。深く感謝いたします。

最後に、生活面を心配することなく研究に専念することができたのは、家族の支えがあったからにほかなりません。心より感謝いたします。