



Title	大腸菌における変異率及び増殖負荷の栄養条件依存性に関する研究
Author(s)	石澤, 裕佳
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52016
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

大腸菌における変異率及び増殖負荷の 栄養条件依存性に関する研究

提出先 大阪大学大学院情報科学研究科
提出年月 2015 年 1 月

石澤 裕佳

学位取得に関わる研究業績

学術雑誌

- [1] Yuuka Ishizawa, Bei-Wen Ying, Saburo Tsuru, Tetsuya Yomo, “Nutrient-dependent growth defects and mutability of mutators in *Escherichia coli*”, *Genes to cells*, doi: 10.1111/gtc.12199, 2014, 査読有（博士論文第2章）

国際会議

- [1] Yuuka Ishizawa, Bei-Wen Ying, Saburo Tsuru, Tetsuya Yomo, “Fitness change of mutators in different medium in accordance with apparent mutation rate”, 2nd ISSOL – The International Astrobiology Society and Bioastronomy (IAU C51) Joint International Conference, Nara Japan, July 2014, 査読有（博士論文第3章）

国内会議

- [1] 高橋裕佳, 應ベイウェン, 四方哲也, “大腸菌の自然突然変異率と増殖速度の相関性評価”, 第35回日本分子生物学会, 福岡, 2012年12月, 査読有
[2] 高橋裕佳, 應ベイウェン, 四方哲也, “大腸菌の自然突然変異率の増殖速度への影響”, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月, 査読有

内容梗概

多くの生物集団では、変異率が高い個体（mutator）が少数であるが存在することが知られている。変異率の上昇に伴い、適応に有益な変異を獲得する確率が増加するため、mutator は集団の適応進化を促進する役割があるとされている。従って、生物集団の適応進化の予測や制御をする上で、mutator の存在は軽視できず、その増殖能や変異率の特性を明らかにすることが求められる。これまでの先行研究から、mutator の変異率と増殖能は一定ではなく、栄養条件依存的に変化することが指摘されている。これは、mutator が適応進化を促進できる栄養条件が限られている可能性を示唆している。しかしながら、多くの mutator が同様の特性を有しているかは未知である。そこで本研究では、様々な mutator について増殖能と変異率の栄養条件依存性を明らかにすることを目的とした。

本学位論文は第 1 章から第 4 章により構成される。

第 1 章では本研究の背景と目的について記述した。

第 2 章では、野生型大腸菌から変異修復関連遺伝子を欠損させることで 17 種類の mutator を作製し、3 つの栄養条件における変異率と増殖速度を測定した。野性株の増殖速度と比較したところ、全体の傾向として栄養依存的に増殖速度が変化していた。また変異率は、栄養条件によらず一定の変異率を示す株もあったが、全体の傾向として栄養依存的に変異率が変化していた。

しかし、上記の変異率は、薬剤耐性獲得という表現型から間接的に変異率を測定しており、一部の mutator で観察された栄養依存的な変異率がゲノム上の塩基変異のレベルでどの程度合致するかは不明である。そこで第 3 章では、ゲノム全体の変異数から変異率を測定し、栄養依存的な変異率の変化が見られるかを確かめた。具体的には、変異の種類に対する選択がほとんどからない状況で変異を十分に蓄積させ、全ゲノムに入っている変異を特定した。その結果、第 1 章の結果と同様な、栄養条件依存的な変異率の変化を観察することができた。また、栄養条件による塩基置換の種類の偏りは観察されず、塩基置換の種類によって栄養条件依存的な変異率の違いが発生しているということは無かった。

第 4 章では、本研究で得られた知見をまとめ、栄養条件が豊富な方が適応進化を促進できることを示唆していることについて述べた。すなわち、mutator を含む集団の適応進化の予測や制御は栄養条件を対応付けて把握することで、効果的に行うことが可能になると考えられる。

目次

第1章 序論	1
1-1 研究の背景	1
1-1-1 生物集団内に存在する高変異率変異体 <i>mutator</i>	1
1-1-2 高変異率による環境適応の促進作用	3
1-1-3 高変異率に伴う増殖への負荷	5
1-1-4 <i>mutator</i> の増殖負荷と変異率を把握することの重要性	6
1-1-5 変異率の栄養依存性	6
1-1-6 増殖負荷の栄養依存性	6
1-1-7 <i>mutator</i> の栄養依存性の解明の意義	7
1-2 本研究の目的	7
1-3 本論文の構成	8
第2章 増殖速度と変異率の栄養条件依存性の解明	10
2-1 緒言	10
2-2 実験材料及び方法	11
2-2-1 使用菌株	11
2-2-2 使用培地	11
2-2-3 <i>mutator</i> 作製方法	13
2-2-4 変異率の測定方法	15
2-2-5 増殖速度の測定方法	16
2-2-6 <i>mutator</i> と野生株の共培養	17
2-3 結果	18
2-3-1 <i>mutator</i> の作製	18
2-3-2 変異率の測定	20
2-3-3 増殖速度の測定	22
2-3-4 変異率と増殖速度の関係	24
2-3-5 栄養条件依存的増殖負荷	26
2-3-6 栄養条件依存的変異率	29
2-3-7 有益変異の出現頻度の栄養条件依存性	31
2-4 考察	33
2-5 結論	39

第 3 章 ゲノムシークエンスによる変異率の測定	40
3-1 緒言	40
3-2 実験材料及び方法	41
3-2-1 <i>mutation accumulation experiment</i>	41
3-2-2 ゲノム抽出	42
3-2-3 次世代シーケンサーによるリシーケンス	42
3-2-4 コロニーの大きさによる世代数の計算	43
3-2-5 次世代ゲノムシークエンスデータの解析	44
3-2-6 Ka/Ks の計算	44
3-2-7 植継ぎ株の増殖速度の測定	45
3-3 結果	46
3-3-1 植継ぎ回数	46
3-3-2 コロニーの大きさによる世代数の計算	46
3-3-3 ゲノムシークエンスの結果解析	55
3-3-4 植継ぎ株の増殖速度	69
3-4 考察	70
3-5 結論	73
第 4 章 結言	74
参考文献	79

第1章 序論

1-1 研究の背景

1-1-1 生物集団内に存在する高変異率変異体 mutator

生物は、DNAの複製時のエラーやDNAの損傷によって、ある確率で変異が生じ、祖先と異なるDNA配列を獲得する。この変異が生じる確率は変異率と呼ばれ、例えば野生株の大腸菌では、一世代あたりに 10^{10} 塩基に1個程度の塩基置換変異が生じることが知られている[1]。これは、修復機構を持たないウイルス等に比べると非常に低い値である。一方で、多くの生物集団内には、変異率が低い野生型生物だけでなく、mutatorと呼ばれる高変異率変異体が存在していることが知られている[2]。変異率は次に述べる要因によって高くなることが知られている。DNA複製時のエラーやDNAの損傷によってできた塩基変異は、通常ミスマッチリペア(MMR)機構[3]–[5]やプルーフリーディング機構[6], [7]などの変異修復関連遺伝子の働きによって、修復される(図1-1)。ところが、この修復遺伝子自体に変異が生じ、その機能が欠損すると、変異を修復できなくなり、変異率が上昇する。したがって、mutatorが増殖すると変異体がより多く発生する(図1-2)。大腸菌の場合、MMRの変異によって約100倍から約1000倍まで変異率が上昇することが知られている。同様に、プルーフリーディング機構の関連遺伝子の変異からは約1000倍も変異率の高いmutatorが生じることが報告されている[8]。また、酵母ではMMRとプルーフリーディング機構の変異を組み合わせると、約10,000倍も変異率が上昇することも報告されている[9]。mutatorはこれらの研究のように人工的に遺伝子変異を導入することで生じるだけではない。Mutatorは、自然の生息環境[10], [11]や実験室内的培養環境[12], [13]でも頻繁に集団内に発生することが知られている。また、大腸菌のみならず、哺乳類のガン細胞集団内にも存在することが示されている[14], [15]。このように、mutatorは生物集団内に頻繁に出現する。

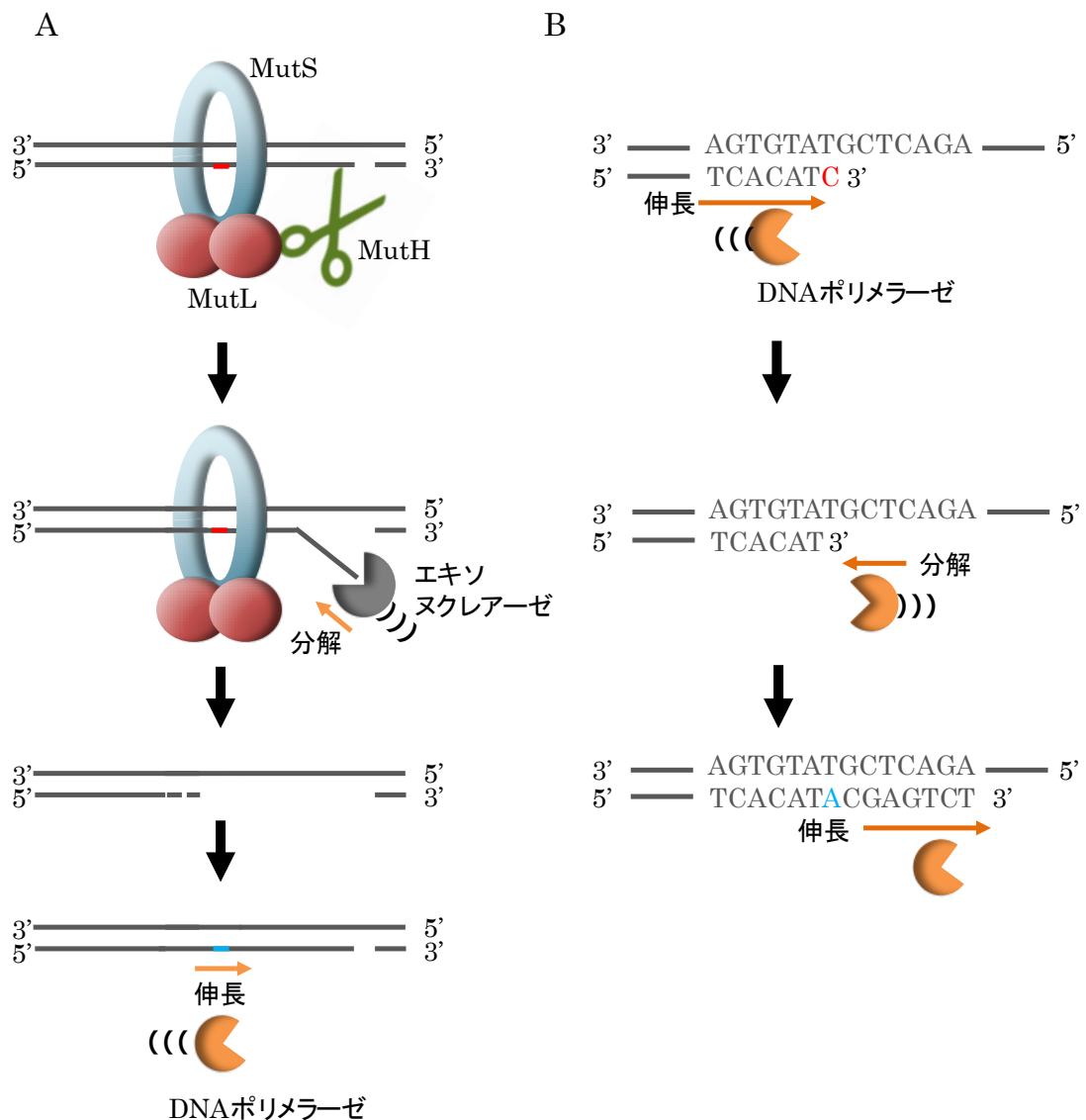


図 1-1 MMR と DNA ポリメラーゼのプルーフリーディング機構の概要図。

(A) MMR の概要図。変異箇所 (DNA 中の赤色部分) を MutS が認識し, MutL との複合体を形成すると MutH の活性によって DNA が切断される。切断部分からエキソヌクレアーゼが DNA を分解し, 分解された DNA は DNA ポリメラーゼによって正しい塩基 (DNA 中の青色部分) を含む鎖が複製される。(B) プルーフリーディング機構の概要図。DNA ポリメラーゼは DNA を合成する際に誤った塩基 (DNA 中の赤色部分) を挿入すると, 自身の 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性で誤りを訂正し, 正しい塩基 (DNA 中の青色部分) を挿入する。

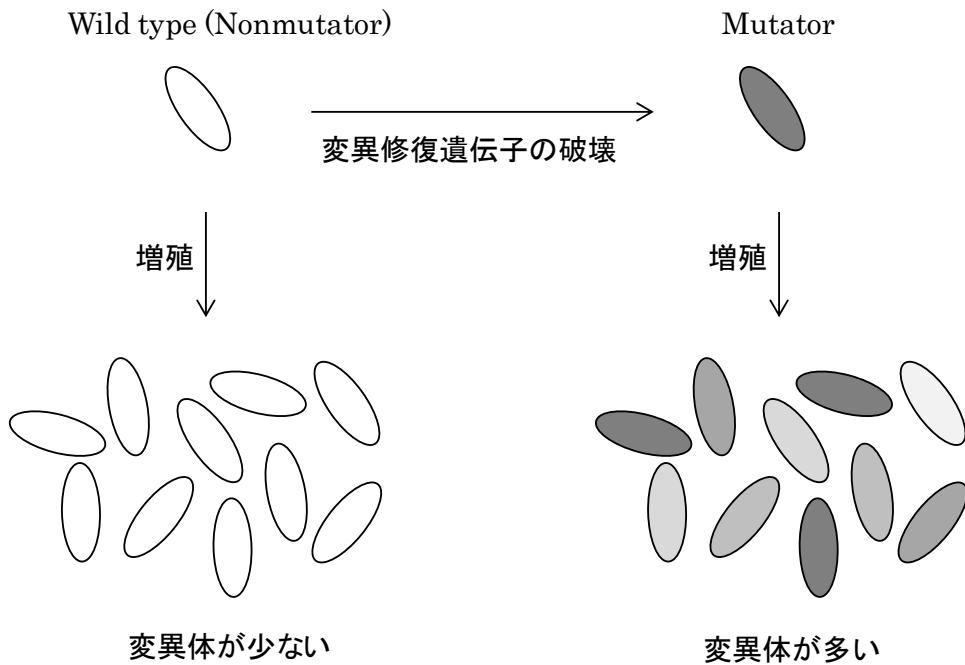


図 1-2 mutator の発生を示す概念図。

変異率が低い Wild type からは変異体が生じにくい。対照的に、変異修復関連遺伝子が破壊された Mutator からは変異率が高いため、変異体が生じやすい。Wild type は対比として nonmutator と呼ばれる。色の濃淡は異なる変異体を意味している。

1-1-2 高変異率による環境適応の促進作用

高い変異率を持ち、より多くの変異体を発生させる mutator は、生物集団にどのような効果を与えるのだろうか。変異は生物の遺伝情報を変化させるため、変異体の中には、祖先とは異なる性質を獲得するものが現れる。この異なる性質の中には、生息環境の中で個体数を高める能力（適応度）を向上させる有益な効果を持つものがある。このように有益な効果をもたらす変異は有益変異と呼ばれている。生物集団の中に有益変異を獲得した変異体が発生し、変異体の個体数の増加によって集団の適応度が増加すると、その集団は、その生息環境で生存・繁栄する能力がより高まった状態（高い適応状態）に移行する。この現象は一般に適応進化と呼ばれ、様々な生物進化で観察されている[16]。図 1-3 の実線は、典型的な適応進化の初期の様子を示している。有益変異によって高い適応度をもつ変異体が発生すると、世代を経るごとに集団がその変異体に置き換わっていく。つまり、低い適応度をもつ個体で構成された初期の集団が、高い適応度をもつ変異体で構成された集団に変化し、集団の適応度は増加していく。このような適応進化は、実験室内進化（高温などのストレス環境下での増殖能

力の増加や貧栄養環境での増殖能力の増加)で頻繁に観察されている [17], [18]. **mutator** を含む集団では、図 1-3 の破線のように、適応進化が加速されること(適応促進)が知られている [12], [13], [19]–[22]. 変異率が高い **mutator** は、増殖の過程で様々な変異体が生じるため(図 1-2)，有益変異が生じて高い適応度を獲得した変異体が高頻度に出現するためである。このことは理論的にも裏づけられている[2], [23]。しかしながら、**mutator** が集団内に存在しきえすれば、どのような状況でも適応促進できるというわけではない [19]。**mutator** の変異率が低ければ、高い適応度を獲得した変異体が出現しにくい。また、**mutator** の集団内での存在頻度が極端に低ければ、**mutator** から生じる変異体の数も減少してしまう。このような状況では、適応進化が促進されにくく、野生株(もしくは **nonmutator**)の適応進化と類似した適応進化が生じると考えられる。このように、生物集団の適応進化は、**mutator** の存在頻度および変異率に依存する側面がある。この二つの因子が、どのような条件によって変化するかは、十分にわかっていない。つまり、図 1-3 で模式的に示した実線と破線を左右する **mutator** の存在頻度と変異率が、どのような条件依存性を示すかは明らかとなっていない。**mutator** を含む生物集団の適応進化の理解 [22] や、**mutator** の活用 [19] のためには、**mutator** の変異率や存在頻度がどのような条件でどう変化するかを理解する必要がある。変異率を最大化させる条件を理解し、実現させることができれば、これまで発見できなかつた希少な遺伝子変異を探索することができるかもしれない。また、**mutator** の存在頻度や変異率を抑制させる条件を発見できれば、有害な変異を持つ変異体の出現を抑えることができるかもしれない。

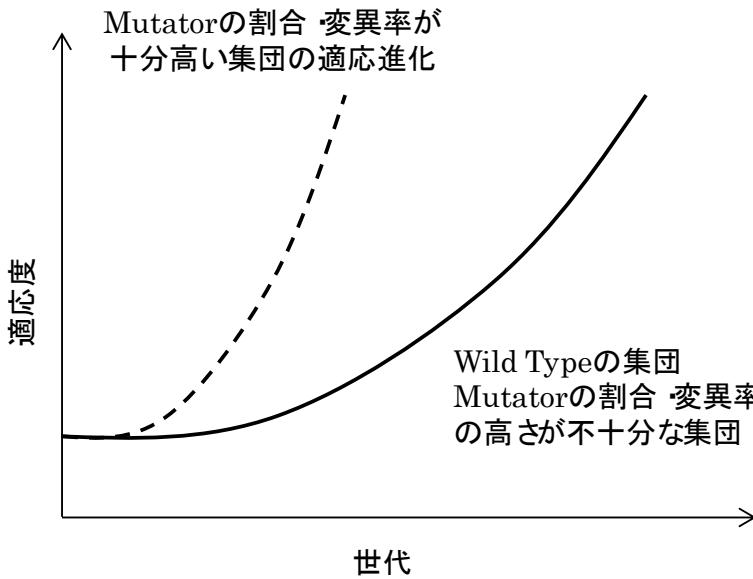


図 1-3 mutator による適応進化の促進効果を示す模式図.

実線は変異率の低い Wild type のみで構成される集団や, mutator の割合や変異率の高さが不十分な集団の適応進化を示している. 破線は mutator の割合や変異率が十分高い集団の適応進化を示している. mutator が十分な割合で初期集団内に存在し, 十分高い変異率を有している場合は, mutator から適応度の高い変異体が出現する確率が高くなるため, 集団の適応度の上昇が促進される. ここで適応度は, 増殖速度に限らず, 細胞の形態や運動性など個体数の増減・繁栄に関わる能力値を示している.

1-1-3 高変異率に伴う増殖への負荷

変異は有益変異だけではなく, そのほとんどが中立か有害変異であるため, 変異率の増加に伴って増殖速度に負荷が生じることが, 様々な生物で示されている [24]–[29]. 有害変異が蓄積することは増殖速度低下や生存率の低下（増殖負荷）を招くため, 生物集団にとって負担となる [30]–[33]. 変異率の非常に高い mutator にとっては, 高い変異率は有益変異を獲得しやすいとともに増殖速度低下や絶滅の危機に曝されることになる [8], [9]. 野生株は変異率が低いため, 有害変異による増殖速度の低下はほとんどないと考えられるが, 変異率の高い mutator は変異によって増殖速度が低下することが想定され, 野生株に比べたときの増殖速度の低下を本研究では増殖負荷であると定義する. mutator は集団内に低頻度で存在し, 大多数存在する野生型の個体との生存競争が起きているので, mutator の増殖負荷が大きくなると生物集団内の割合が低下し, 野生株との競争に負けてしまう. その結果, mutator による適応促進効果

が無くなり、結果的に生物集団の運命を左右することになる。

1-1-4 mutator の増殖負荷と変異率を把握することの重要性

従って、生物集団の適応進化の進行を予測し、さらに制御する上では、mutator の変異率及び増殖負荷の特性を把握する必要がある。この特性を理解していないと、予測範囲や制御の範囲が限定されてしまう。もし、環境が変化したときにそれらが一定でなく、変異率が低くなったり、増殖負荷がより大きくなり集団内の割合が低下したりすると、環境に対する適応は促進されないことが考えられる。つまり、環境が変化したときに変異率や増殖速度が変化し得るのかを明らかにすることは、mutator を含む生物集団の適応進化の予測範囲を広げる上で必須であると言える。

1-1-5 変異率の栄養依存性

一方で、先行研究から変異率は一定ではなく、環境の栄養条件に依存して（栄養が十分に存在する富栄養培地と、最小限の栄養しか含まれない貧栄養培地の違いに依存して）変化することが一部の mutator (*dnaQ* 変異株)で示されている [34]。栄養条件は環境中で容易に変化し得るものあり、生物の生存に大きな影響を与える重要な要因である。もし、変異率が環境変化に応じて高くなってしまえば、予測したよりも適応の促進スピードを速めることになる。逆に、変異率が低くなってしまえば mutator は野生株との競争に負けて消滅し、適応促進効果は全く見られないことになる。

1-1-6 増殖負荷の栄養依存性

さらに、増殖負荷の栄養条件依存性に関しては、変異がいくつか蓄積した酵母 (mutator ではない) で、増殖負荷の大きさが栄養条件に依存していたと示した先行研究がある [35]。さらに多くの変異が蓄積する mutator で、同様の性質が観察されると予測できる。しかし、変異を発生させた細胞で増殖負荷を調べた場合、栄養条件を変化させても変化しなかったと報告している先行研究もある [36]。また、mutator で増殖負荷の栄養条件依存性を確かめた先行研究は無く、ストレスのある環境の方が増殖負荷が大きい、又は小さいことを示す論文しかない [37], [38]。増殖負荷が変化する場合も、栄養条件の変化という環境変化が起こった場合、増殖速度が変化することから集団中の mutator の頻度が低くなる、又は高くなる可能性があり、正しく予測できないことが考えられる。

1-1-7 mutator の栄養依存性の解明の意義

このように、変異率とそれに伴う増殖負荷の栄養依存性が不明であると、mutator を含む生物集団の適応進化の予測や制御が困難になる。予測や制御ができないと、学術研究や工学分野の発展において、様々な問題が生じる可能性がある。例えば、先行研究で mutator によって適応促進された例が報告されているが、変異率や増殖速度が栄養依存的に変化することを無視した状態では、適応にかかる時間を見誤る可能性がある。または、病原菌は変異によってその性質を変化させ、薬剤が効かなくなることが問題とされているが、mutator がどの環境でも一定の変異率や増殖速度であると仮定していると、その耐性菌の出現速度や存在頻度の誤った予測をし、耐性菌や、有害な変異を持つ細胞の蔓延を招く可能性がある [39]。また、ゲノムの縮小を引き起こす変異の探索に mutator が使用されており、栄養条件を変化させることで変異率を高めることができれば、それを探索できる可能性が上がることが予想される [31]。さらに、進化工学による手法によって、新規の物質を探索する研究が広く行われている。例えば、モノクローナル抗体の探索などが行われている [40]。この探索に mutator を使用し、さらに栄養条件を変化させることで変異率を上昇させることができれば、より高確率に目的の細胞・物質が得られるであろう。このように、適応について正確に理解するためには、mutator の変異率や増殖速度の栄養依存性を解明することは必須なのである。

1-2 本研究の目的

これまで、mutator は環境が変化しても変異率や増殖速度が一定であると仮定し、集団の適応進化の予測や制御を行なおうとしてきた。しかし、mutator は環境条件によって変異率や増殖負荷が変化する可能性があり、その性質によって集団全体の挙動が変わることが予想される。従って、変動環境での mutator の適応促進の効果を理解する上で、それらの変異率や増殖速度の栄養依存性の解明は必須である。これらが解明できれば、mutator の種類から、その集団が異なる栄養条件でどのような挙動をするのかを予想でき、制御することも可能になると予想される。現在までに、mutator の増殖負荷や変異率は一定でなく、栄養条件依存的に変化することが一部の mutator で示唆されているが、様々な mutator においても同様の傾向が見られるのかはわかつていない。栄養条件は環境中でも容易に変化し得るものであり、この変化が与える影響を明らかにすることは重要であると考えられる。そこで、本研究では先行研究で用いられた種類と同じ遺伝子型の mutator 大腸菌も含め、様々な遺伝子型を持つ mutator 大腸菌を調べ、増殖負荷と変異率が栄養条件依存的にどのように変化するかを解明す

ることを目的としている。栄養条件は、先行研究と同様に富栄養培地である LB 培地と貧栄養培地、さらに野生株でそれらの培地で培養したときの中間の速度で増殖することがわかっている培地（貧栄養培地に 20 アミノ酸を加えた培地）を使用する。また、先行研究では特定の遺伝子（抗生物質耐性遺伝子など）に発生する変異から生じるとされる表現形の変化の頻度から変異率を測定していたが、ゲノムの位置によって変異率が異なることが先行研究によって明らかになっており [41]–[43]、抗生物質耐性遺伝子だけでなくゲノムに実際に発生した変異の数を測定することで、ゲノム全体の変異率を測定する必要がある。そこで、ゲノムシークエンスによって変異率を測定し、特定の遺伝子の表現形が変化する確率から求めた変異率と一致するのかを確かめることも目的とした。

1-3 本論文の構成

第 1 章では、*mutator* の性質と適応進化における役割を紹介し、*mutator* の変異率および増殖負荷の栄養条件依存性を解明することの意義を述べた。本研究では、適応進化の予測や制御を、異なる栄養条件でも行えるようにするために、*mutator* の変異率と高変異率に伴う増殖負荷の栄養依存性を明らかとすることを目的とする。

第 2 章では、複数の *mutator*において、変異率と増殖負荷が栄養の貧富に依存して変化することを示した。*mutator* を多数作製し、野生株と比較することで、先行研究で示唆された栄養条件依存性を支持する結果を得た。一方で、先行研究とは違い、栄養条件非依存的な変異率を示す *mutator* の存在も明らかにした。変異率の測定には、特定の抗生物質（ナリジキシン酸）を用い、抗生物質感受性表現型から耐性表現型へ変化する確率を指標にした伝統的な方法を踏襲した。また、野生株と *mutator* が共存する状態で培養した場合、栄養条件が良いほど、*mutator* の集団に占める割合が大きくなり、変異率が高くなることから、有益変異を獲得しやすくなっていることを示した。

第 3 章では、変異率の栄養条件依存性が、ナリジキシン酸耐性に関わる少数遺伝子の表現型でのみ現れるのではなく、ゲノム全体の遺伝子に波及し、遺伝子型の変異すなわち塩基変異として現れることを示した。つまり、第 2 章の結論が、塩基変異及びゲノムレベルで担保されていることを確認した。また、栄養条件依存的な変異率の違いが、選択の効果で低い変異率の個体が選ばれているという仮説だけでは説明できず、分子機構として変異率が栄養条件依存的に変化していることを示した。異なる栄養条件で継代し、十分に変異を蓄積した複数の *mutator* を用意し、ゲノムシークエンスによってゲノム上に生じた変異の数・種類を観測することでゲノム変異率を測定した。

第 4 章では、目的に対する答えとして、豊富な栄養が存在する条件の方が栄養の乏しい環境よりも変異率が高く、増殖負荷が小さくなることを示した。この結論は、栄養条件が豊富な方が適応進化を促進することを示唆している。すなわち、**mutator** を含む集団の適応進化の予測や制御をするためには、栄養条件を把握することが重要であると言える。栄養条件を豊富にすることで変異率を最大化させ、これまで発見できなかった希少な遺伝子変異を探索することを可能にするだろう。また、貧栄養条件にすることで、**mutator** の存在頻度や変異率を抑制させ、有害な変異を持つ変異体の蔓延を抑えることが可能になるだろう。

第 2 章 増殖速度と変異率の栄養条件依存性の解明

2-1 緒言

多くの生物集団では, mutator が少数であるが存在することが知られている。変異率の上昇に伴い, 適応に有益な変異を獲得する確率が増加するため, mutator は集団の適応進化を促進する役割があるとされている。従って, 生物集団の適応進化の予測や制御をする上で, mutator の存在は軽視できず, その増殖能や変異率の特性を明らかにすることが求められる。先行研究から, mutator の変異率と増殖能は一定ではなく, 栄養条件依存的に変化することが示唆されている。これは, mutator が適応進化を促進できる栄養条件が限られている可能性を示唆している。しかしながら, 多くの mutator が同様の特性を有しているかは未知である。そこで本章では, 様々な mutator について増殖能と変異率の栄養条件依存性を明らかにすることを目的とした。本研究では, モデル生物として大腸菌を使用した。大腸菌は分裂が速いので変異を短時間で蓄積させやすく, ゲノムの情報や遺伝子工学の技術が十分に発達していることから, 研究に用いやすいという利点がある。大腸菌の中でも MG1655 という名称の株を使用した。MMR 関連遺伝子である *mutS*, *mutL*, *mutH* と polIII のプルーフリーディング機構を担う *dnaQ* の遺伝子は, 変異が発生することで mutator となることが先行研究でわかつており, mutator を作製する際に一般的に使用される遺伝子なので, これらの遺伝子を, 単体, または複数組み合わせて欠損させることで, 17 株の mutator 大腸菌を作成した。また, これらの mutator の中には先行研究で用いられた mutator (*dnaQ*) も含まれている。それらの増殖速度と変異率を 3 つの栄養条件 (LB 培地, mM63+20AA 培地, mM63 培地) で測定した。先行研究でも富栄養培地と貧栄養培地が用いられていたためにこれらの培地を選択した。また, mM63+20AA 培地はそれら 2 つの培地の中間の増殖速度を野生株が示していたので, mM63+20AA 培地でも測定を行った。それぞれにおいて WT と mutator の差を相対化し, 栄養条件に依存した変異率, 増殖速度の違いを評価した。また, 野生株と mutator を貧栄養条件と富栄養条件で共培養することで, それらの割合の変化と, 有益変異の獲得しやすさの違いを観察した。

2-2 実験材料及び方法

2-2-1 使用菌株

野生株として、*Escherichia coli* (*E. coli*) MG1655 株を用いた。さらに、この株から派生した 17 株 mutator (MG1655ΔmutS::Cm, MG1655ΔmutL::Cm, MG1655ΔmutH::Cm, MG1655ΔdnaQ::Cm, MG1655ΔmutHΔmutL::Cm, MG1655ΔmutLΔmutH::Cm, MG1655ΔmutLΔmutS::Cm, MG1655ΔmutHΔmutS::Cm, MG1655ΔmutSΔmutH::Cm, MG1655ΔmutHΔmutSΔmutL::Cm, MG1655ΔmutHΔ dnaQ::Cm, MG1655ΔmutLΔ dnaQ::Cm, MG1655Δ dnaQ mutL::Cm, MG1655ΔmutSΔ dnaQ::Cm, MG1655Δ dnaQΔmutS::Cm) を使用した。

2-2-2 使用培地

本研究では、富栄養培地として一般的に用いられる培地の一つである LB 培地と、生存に必要最低限の栄養しか含まない最小培地として一般的に用いられる培地の一つである M63 培地を改変した mM63 培地 [44]、それらの中間の増殖速度 (*E. coli* MG1655 株の場合) を示す mM63+20AA 培地を使用した。mM63+20AA 培地は mM63 培地に 20 個のアミノ酸を添加したものである。それらの組成は表 2-1 に示している。

表 2-1 増殖速度測定に使用した試薬.

培地の種類	成分
LB 培地	Bacto Tripton 1% Yeast Extract 0.5% NaCl 1%
mM63 培地	K ₂ HPO ₄ 61.5 mM KH ₂ PO ₄ 38.5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 15.1 mM FeSO ₄ · 7H ₂ O 1.8 μM Thiamine HCl 15 μM MgSO ₄ 0.2 mM Glucose 22.2 mM
mM63+20AA 培地	K ₂ HPO ₄ 61.5 mM KH ₂ PO ₄ 38.5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 15.1 mM FeSO ₄ · 7H ₂ O 1.8 μM Thiamine HCl 15 μM MgSO ₄ 0.2 mM Glucose 22.2 mM 19 amino acids* 0.05 mM Tyrosine 0.02 mM

* 19 amino acidsは、Glycine, Alanine, Asparagine, Glutamine, Leucine, Isoleucine, Methionine, Serine, Proline, Threonine, Valine, Phenylalanine, Tryptophan, Aspartic acid, Glutamic acid, Arginine, Histidine, Lysine, Cysteineで構成される。

2-2-3 mutator 作製方法

設計したオリゴ DNA をプライマー（表 2-2）として、さらにプラスミドである pKD32 [45] をテンプレート DNA としてクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む DNA 断片を PCR によって増幅した。組換え酵素の遺伝子が配置されたプラスミドである pKD46 [45] を使用し、 λ -red homologous recombination 法 [45]–[47] によって、作製した DNA 断片と染色体上の欠損させたい目的遺伝子の相同組換えを行った（図 2-1）。組換えた DNA 断片にはクロラムフェニコール耐性遺伝子がコードされており、これを選択マーカーとしてクロラムフェニコールを含む培地で組み換え体の選択を行った。遺伝子の 2 重欠損株、3 重欠損株を作製する場合は、組換え酵素の遺伝子が配置された別のプラスミドである pCP20 [45] を使用した FLP-FRT recombination 法によって、染色体上に残ったクロラムフェニコール耐性遺伝子を除去した後に [45]、上記の手順を繰り返すことによって作製した。

表 2-2 設計したプライマー一覧。

欠損させる遺伝子	プライマー
<i>mutH</i>	5'-AATCAAGGTATCATGACATGTCCAACCTCGCCCA CTATGATTCCGGGGATCCGTCGACC-3' 5'-GCAGGTCAAAGCGATGGCTACTGGATCAGAAAATG ACTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
<i>mutS</i>	5'-ATGAGTGCAATAGAAAATTGACGCCATACGCC CAATGATTCCGGGGATCCGTCGACC-3' 5'-TTACACCAGGGCTCTCAAGCGATAAAATCCACTCCA GCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
<i>mutL</i>	5'-ATGCCAATTCAAGGTCTTACCGCCACAATGGCGAA CCAATGATTCCGGGGATCCGTCGACC-3' 5'-CTTCAGGGCTTTATGCCGGATGTAAATCAACA GATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
<i>dnaQ</i>	5'-ATGAGCACTGCAATTACACGCCAGATCG TTCTCGATACCGATGATTCCGGGGATCCG TCGACC-3' 5'-TTATGCTGCCAGAGGGCAACTTCCGCCTTCTTCT GCATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'

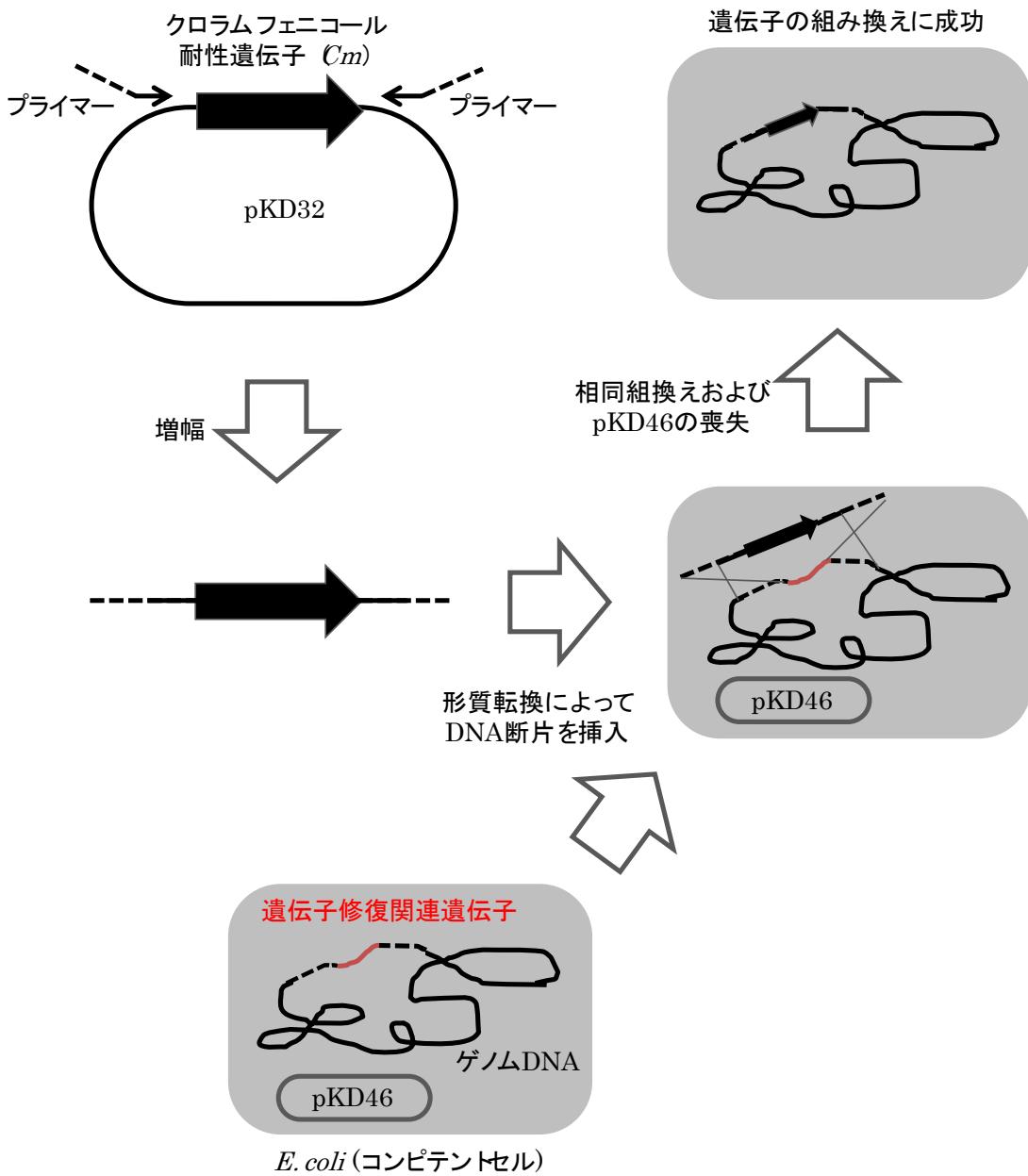


図 2-1 ゲノム相同組換えによる組換え体の作製概略図。

mutator 作製に係る手法の概略を示している。pKD32 からクロラムフェニコール耐性遺伝子を複製し、その断片を pKD46 を保持している大腸菌のコンピテントセルに形質転換する。大腸菌内部で相同組換えが起こり、クロラムフェニコール耐性遺伝子と目的遺伝子が組み換えられる。図中の黒色の大きい矢印はクロラムフェニコール耐性遺伝子を、黒色の小さい矢印はプライマーを（実線部分は pKD32 との相同配列、破線は組換えに必要な相同配列）、赤色部分は遺伝子修復関連遺伝子を示している。

2-2-4 変異率の測定方法

5 ml の液体培地に大腸菌株のグリセロールストックを添加し、それを 37 °C で 160 rpm の条件で一晩振とう培養することで、前培養液を得た。菌体が十分に増殖したことを確認した後、5 ml の新たな液体培地 20 本に 10^2 cells/ml から 10^5 cells/ml の初期細胞濃度になるように前培養液から菌体を植菌した。これ以降の方法を図 2-2 に示した。37 °C, 160 rpm で 6~48 時間振とう培養した後、培養液を遠心 (7500 rpm, 5 min) して上清を除いた。沈殿した菌体を、抗生物質 (80 µg/ml ナリジキシン酸 100 µg/ml リファンピシン) を含む LB 寒天培地に撒き、37°C で 2 日間静置培養した。変異率の計算は次の P_0 法を使用した [48]。植菌した寒天培地当たりの細胞数 (A)、全ての寒天培地の枚数 (N_M) 及び抗生物質耐性コロニーが出現しなかった寒天培地の枚数 (N_0) を求め式 2-1 によって薬剤耐性変異の変異率 m (Nal^R mutations/replication もしくは Rif^R mutations/replication) を求めた。

$$m = \frac{-\ln[N_0/N_M]}{A} \quad (\text{式 2-1})$$

ここで、 Nal^R はナリジキシン酸耐性を、 Rif^R はリファンピシン耐性を意味する。 Nt は 20 である。

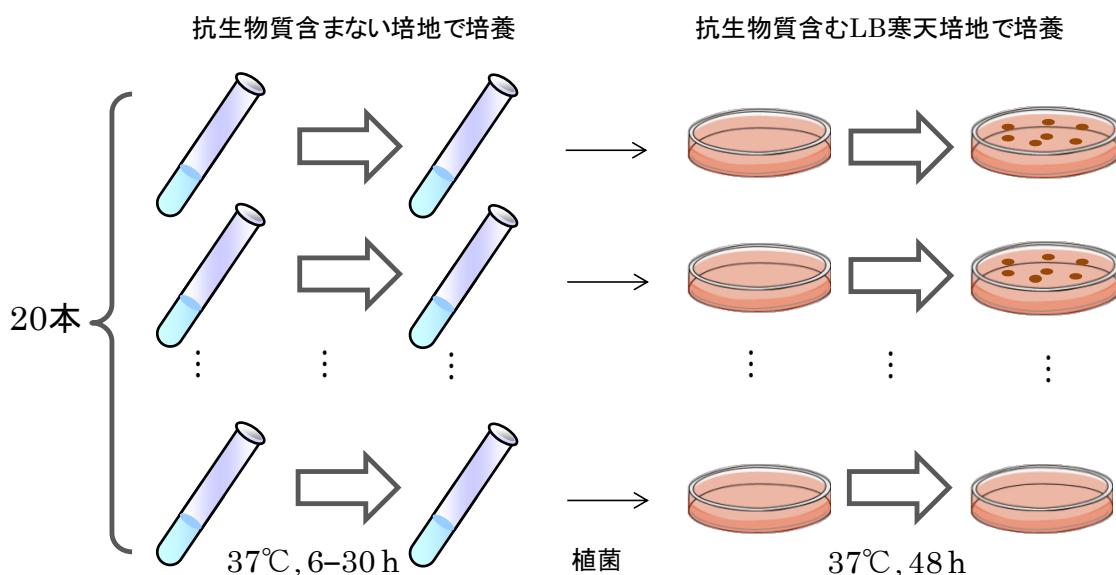


図 2-2 変異率測定方法。

20 本の試験管で、大腸菌を 37°C で 6 時間から 30 時間培養し、抗生物質を含む寒天培地に撒いた。寒天培地は 37°C で 48 時間培養し、変異率を P_0 法に従って測定した。 P_0 法は式 2-1 によって変異率が計算される。

P_0 法の原理について次に記す。変異率を調べるとき、集団中に存在する変異体の数を数え、集団中の割合を出すことで変異率を計算することはできない。なぜなら、変異体が培養途中で分裂すると、変異体の数と変異が発生した回数が一致しないためである。従って、 P_0 法では変異の数を数えて変異率を測定するのではなく、変異が発生しない確率について着目する。図 2-2 のように、複数の試験管で大腸菌を培養し、その細胞集団を抗生物質を含む寒天培地に撒くことで、抗生物質耐性を持つ変異体を獲得したコロニーの存在する寒天培地と存在しない寒天培地を得る。ここで、変異体の数は上で述べた理由からポアソン分布に従わないが、変異が発生しない確率はポアソン分布に従う。従って、1 つの集団内（ここでは 1 本の試験管内）で生じた変異の数が k 、生じた変異の平均値が M である確率 $P(x)$ は、

$$P(x = k) = M^k \times e^{-m} / k! \quad (\text{式 2-2}).$$

となる。ここで、 $k = 0$ である確率は、

$$P(x = 0) = M^0 \times e^{-m} / 0! \quad (\text{式 2-3}).$$

$$M = -\ln(P_0) \quad (\text{式 2-4}).$$

ここで 1 本の試験管の中で起こった分裂の回数は（細胞数 A ）-1 だが、細胞数は十分に大きいため ($10^5 \sim 10^9$ cells) 分裂の回数は細胞数 A と一致すると考え、1 回分裂するときに変異体が生じる確率を変異率とすると、変異率を求める式として式 2-5 が得られる。

$$m = -\ln(P_0)/A \quad (\text{式 2-5}).$$

P_0 は式 2-6 のように記述できるので、式 2-5 に代入し、式 2-1 が得られる。

$$P_0 = N_0/N_M \quad (\text{式 2-6}).$$

本論文では、20 本あればポアソン分布に従うだろうと考え、20 本の試験管で培養した。

2-2-5 増殖速度の測定方法

図 2-2 の抗生物質を含まない培地の培養液について、増殖速度 μ (h^{-1}) を以下の方法で求めた。前節 2-2-4 に記した方法で前培養液および本培養液を得た。前培養液の細胞濃度を測定し、本培養培地への植菌量から初期細胞濃度 (C_0 , cells/ml) を求めた。前培養液の細胞濃度および本培養液の最終細胞濃度 (C_t , cells/ml) は、フローサイトメーター (FACSCanto™II, Becton, Dickson and Company) を使用して測定した。フローサイトメーターで測定する際には、菌液は約 10^6 cells/ml になるように希釈してから、より正確な値を測定した。測定時に濃度既知の蛍光ビーズ (Floresbrite YG

Microspheres, 3 μm , Polysciences) を混合した (容積比は適宜調節した). 萤光ビーズの濃度と混合時の容積比及び測定結果として得られる萤光ビーズ個数と大腸菌の個数から, 測定時の細胞濃度菌体の細胞数を測定し, 大腸菌の希釈倍率を乗じることで細胞濃度求めた. 本培養における初期細胞濃度 C_0 , 最終細胞濃度 C_t および培養時間 t (h) から, 式 2-2 に従って増殖速度 μ を求めた.

$$\mu = \frac{\ln [C_t/C_0]}{t(\text{h})} \quad (\text{式 2-7})$$

式 2-7 はマルサス増殖モデル (Malthusian Growth Model) に基づいており [49], バクテリアの指数増殖に対して良いフィットが得られていることが知られている.

2-2-6 mutator と野生株の共培養

グリセロールストックから野生株と $\Delta mutS$ を LB 培地, mM63 培地に植菌し, 飽和濃度まで培養した. それぞれの株を, 96 ウェルプレートに 200 cells/ml となるよう, 200 μl の培地に植菌し, 37°C で静置培養した. 使用した培地は前培養と同じものであり, それぞれの株で 5 ウェルずつ植菌した. 飽和濃度まで培養したあと, それぞれのウェルの株を新しい 200 μl の培地に 200 cells/ml になるように植菌した. さらに 37°C で静置培養し, 飽和濃度に達したところで, 濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含む LB 培地の寒天培地, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ナリジキシン酸を含む LB 培地の寒天培地, 抗生物質を含まない LB 培地の寒天培地にそれぞれ 100 μl ずつまいた. このとき, ナリジキシン酸寒天培地には原液のままで, クロラムフェニコールの寒天培地と抗生物質を含まない寒天培地には 10^6 倍希釈したものをまいた.

2-3 結果

2-3-1 mutator の作製

変異率と増殖速度の関係性を調べるために、遺伝子修復関連遺伝子を単独、もしくは複数欠損させて mutator 大腸菌を作製した。欠損させた遺伝子は MMR に関与する *mutS*, *mutH*, *mutL* と, polIII のプルーフリーディング機構に関与する *dnaQ* である。これらの遺伝子を欠損させると DNA 複製の精度が低下し、変異率が上昇することが知られているため[8]、これらの遺伝子を欠損させることで多数の mutator を作成することにした。遺伝子を欠損させることで得られた mutator の遺伝子型は表 2-3 に示した。また、以降は表にある株名で記載することにする。欠損させる遺伝子は全組み合わせで行っており、二重欠損株に関しては、欠損させる遺伝子が同じでも順番が異なる場合は異なる株として扱うことにする。例えば、*mutS* と *mutL* の欠損株では ΔSL と ΔLS が存在し、 ΔSL は *mutS* を先に欠損させ、あとから *mutL* を欠損させている。逆に、 ΔLS では *mutL* が先に欠損されており、あとから *mutS* が欠損されている。同じ遺伝子を欠損してはいるが、異なる変異が蓄積していると予想されるので異なる株であると考えた。結果として、17 株の mutator 株を作製した。以降は表 2-3 にある株名で記載する。

表 2-3 作成した mutator の株名と遺伝子型.

株名	遺伝子型
WT (野生株)	MG1655
ΔS	$\Delta mutS$
ΔH	$\Delta mutH$
ΔL	$\Delta mutL$
ΔQ	$\Delta dnaQ$
ΔHL	$\Delta mutH, \Delta mutL$
ΔLH	$\Delta mutL, \Delta mutH$
ΔLS	$\Delta mutL, \Delta mutS$
ΔSL	$\Delta mutS, \Delta mutL$
ΔHS	$\Delta mutH, \Delta mutS$
ΔSH	$\Delta mutS, \Delta mutH$
ΔHSL	$\Delta mutH, \Delta mutS, \Delta mutL$
ΔHQ	$\Delta mutH, \Delta dnaQ$
ΔQH	$\Delta dnaQ, \Delta mutH$
ΔLQ	$\Delta mutL, \Delta dnaQ$
ΔQL	$\Delta dnaQ, \Delta mutL$
ΔSQ	$\Delta mutS, \Delta dnaQ$
ΔQS	$\Delta dnaQ, \Delta mutS$

mutL, mutH, mutS : DNAミスマッチ修復酵素をコードしている遺伝子.
dnaQ : DNAポリメラーゼIIIεサブユニットをコードしている遺伝子.
 複数遺伝子を欠損させている株は、遺伝子名を書いている順に欠損させた。例えば、 ΔSL は*mutS*を先に欠損させた後、*mutL*を欠損させている。欠損させる順によって蓄積している変異の種類が異なると考え、異なる遺伝的バックグラウンドを持つ株として扱っている。

2-3-2 変異率の測定

作製した mutator を使用して、3 つの栄養条件で増殖速度を測定した（図 2-3）。変異率の測定は Luria-Delbrück fluctuation test を使用し、ナリジキシン酸とリファンビシンに対する耐性を獲得する割合を検出した [48], [50]。栄養の豊富さが与える影響を調べるため、富栄養培地の一つとして一般的に用いられている LB 培地、最小限の栄養源しか含まれていない、貧栄養培地の一つとして一般的に用いられている mM63 培地、LB 培地と mM63 培地で野生株を培養したときの増殖速度のちょうど中間あたりの増殖速度を示した培地である、mM63+20AA 培地（貧栄養環境にアミノ酸を加えた培地）を使用した。野生株の変異率は 5×10^{-9} mutations/replication よりも低いのに対し、mutator は 5×10^{-9} mutations/replication よりも高く、全ての mutator において野生株よりも高い変異率を示していた。そして、栄養条件に依存して変異率が異なることを確認した（図 2-3BCD）。LB 培地での変異率はほとんどの mutator において 3 つの栄養条件の中で一番高かった。LB 培地と mM63+20AA 培地を比較すると、LB 培地の方が変異率が高い傾向がみられるが、有意ではなかった（図 2-3C）。mM63 培地と mM63+20AA 培地の変異率はほとんど違いは無かった（図 2-3D）。また、mM63 培地や mM63+20AA 培地では増殖できない株があったが（図 2-4 中の †），LB 培地では全ての株で増殖が見られた。これは、変異率が高いことによる増殖負荷が大きいことを示唆している。

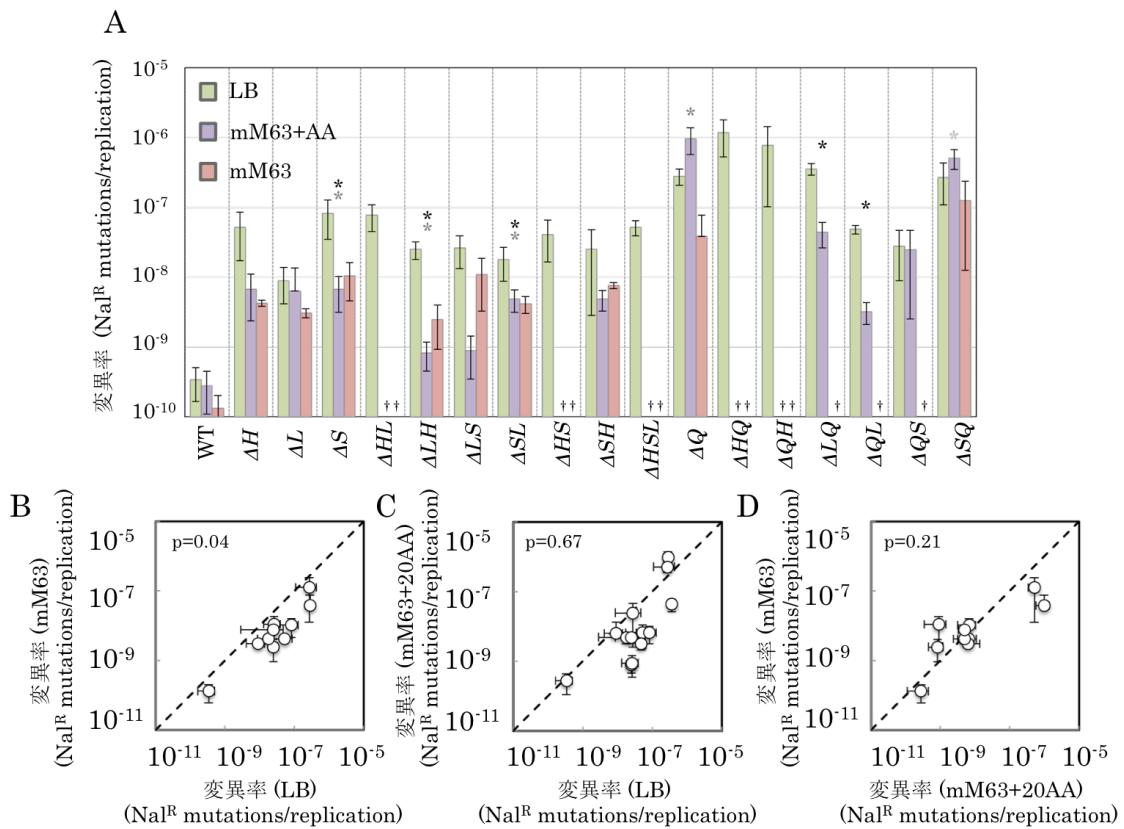


図 2-3 3 つの栄養条件での変異率.

(A) LB 培地, mM63+20AA 培地, mM63 培地で培養したときの変異率を示している. 緑色のバーは LB 培地, 紫色は mM63+20AA 培地, 赤色は mM63 培地での結果である. それぞれ, 3回の測定の平均値を示しており, エラーバーはそのときの標準偏差である. †は増殖せず, 測定できなかったものである. アスタリスクは t 検定によって有意差があったものを示している ($p=0.05$). 黒いアスタリスクは LB 培地と mM63+20AA 培地の比較, 濃いグレーのアスタリスクは LB 培地と mM63 培地の比較, 薄いグレーのアスタリスクは mM63+20AA 培地と mM63 培地の結果を示している. (B)-(D) それぞれの培地での変異率を比較している. (B) LB 培地と mM63 培地の比較. $p=0.04$ (C) LB 培地と mM63+20AA 培地の比較. $p=0.67$ (D) mM63+20AA 培地と mM63 培地の比較. $p=0.21$

2-3-3 増殖速度の測定

作製した mutator を用いて、指数増殖期の増殖速度を測定した（図 2-4, 2-5）。野生株を含めて 3 つの栄養条件で増殖速度を測定できたもの（10 株）に関しては、全ての株において LB 培地での増殖速度が一番大きく、 mM63+20AA 培地と mM63 培地の増殖速度を比較すると 10 株中 8 株で mM63+20AA 培地での増殖速度の方が大きかった。また、LB 培地では全ての株において増殖速度を測定できたのに対し、mM63+20AA 培地では 5 株、 mM63 培地では 8 株で増殖しないために測定することができなかった。これは、栄養条件が貧しいほど増殖負荷が大きい可能性を示唆している。

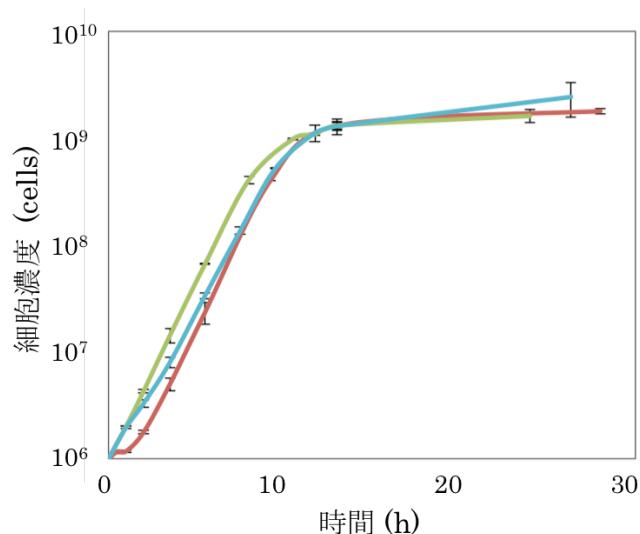


図 2-4 大腸菌の増殖曲線。

野生株, ΔS , ΔH の約 30 時間の間の増殖曲線を示している。約 10 時間後まで指数増殖し、その後飽和して一定の細胞濃度となる。赤色が野生株、青色が ΔS 、緑色が ΔH の増殖曲線である。エラーバーは 3 回の測定の標準偏差を示している。

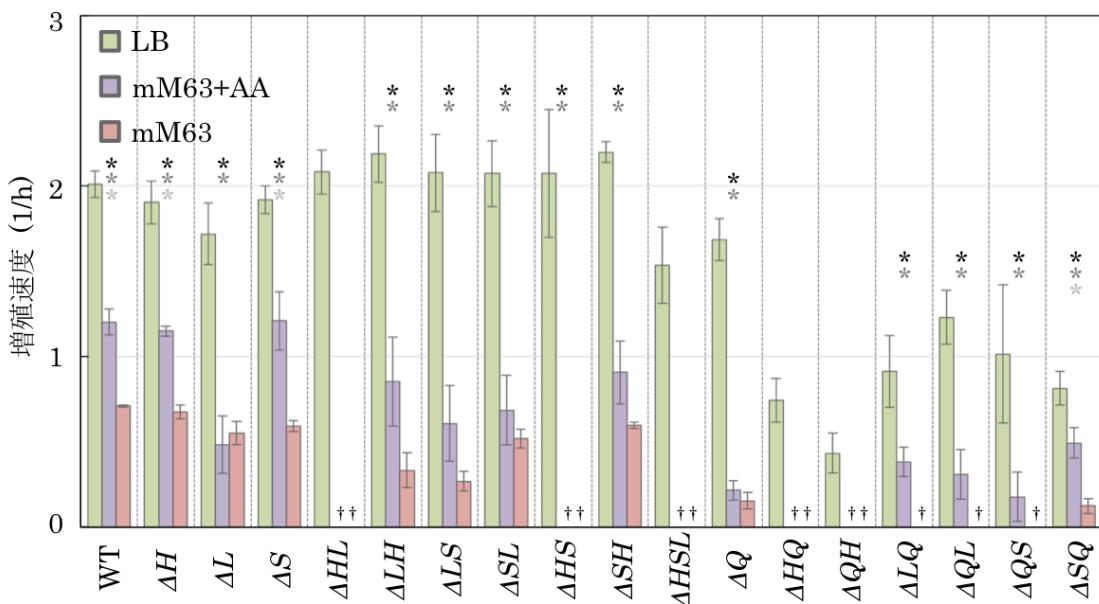


図 2-5 3 つの栄養条件での増殖速度.

LB 培地, mM63+20AA 培地, mM63 培地で培養したときの増殖速度を示している。緑色のバーは LB 培地, 紫色は mM63+20AA 培地, 赤色は mM63 培地での結果である。それぞれ、3 回の測定の平均値を示しており、エラーバーはそのときの標準偏差である。†は増殖せず、測定できなかったものである。アスタリスクは t 検定によって有意差があったものを示している($p=0.05$)。黒いアスタリスクは LB 培地と mM63+20AA 培地の比較、濃いグレーのアスタリスクは LB 培地と mM63 培地の比較、薄いグレーのアスタリスクは mM63+20AA 培地と mM63 培地の結果を示している。

2-3-4 変異率と増殖速度の関係

測定した変異率と増殖速度から、それらに相関があるのかを調べた（図 2-6）。その結果、変異率の高い株ほど増殖速度が低くなつた。これは、変異率が高い株ほど増殖負荷が大きいことを示している。有意に相関があるのか評価するために、スピアマンの順位相関係数を使用した結果、LB 培地 ($r=-0.65$; $P\text{-value}=0.003$) と mM63 培地 ($r=-0.64$; $P\text{-value}=0.05$) では有意に負の相関があつた。一方で、mM63+20AA 培地でも負の相関が見られたが、相関係数の大きさから強い相関ではなかつた ($r=-0.52$, $P\text{-value}=0.10$)。

さらに、LB 培地でも変異率と増殖速度には強い負の相関関係が見られるが、野生株よりも変異率が高くなつた株全てで増殖速度が低下するわけではないことが見て取れる。 10^{-10} から 5×10^{-8} Nal^R mutations/replication の株では野生株と増殖速度にそれほど大きな違いは無く、それ以上の変異率になると増殖速度が低下する傾向がある。一方で、mM63+20AA 培地と mM63 培地では野生株よりも変異率が高いほとんどの株で増殖速度が低下している。つまり、LB 培地では他の培地に比べて、変異率の上昇が許容されていることを示唆している。また、この結果から、幅広い変異率を持つ mutator を作製できたことがわかつた。生存するためには超えてはならない変異率があると予想されるが、今回作製した mutator の変異率が一番高い株は限りなく増殖速度が 0 に近く、最大の変異率に限りなく近いと予想される。また、増えることのできなかつた株も存在したので、それらは最大の変異率以上だったために生きることができなかつたのではないかと予想される。

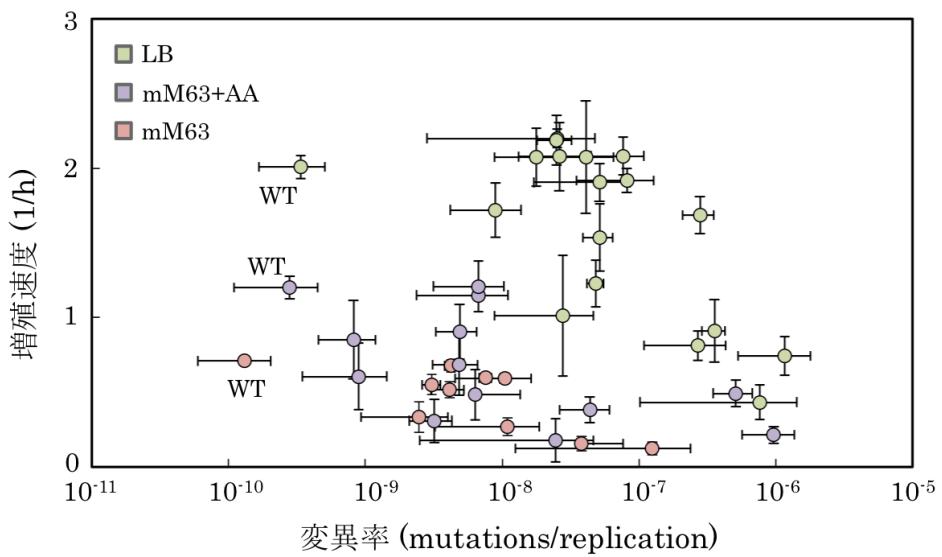


図 2-6 増殖速度と変異率の相関関係.

野生株と 17 株の mutator のうち測定できたものの変異率と増殖速度を示している。それぞれ 3 回の測定の平均値と標準偏差を示している。緑色のプロットは LB 培地、紫色は mM63+20AA 培地、赤色は mM63 培地での結果である。どの培地の結果も、一番変異率が低いプロットが野生株であり、その他は mutator である。

2-3-5 栄養条件依存的増殖負荷

次に、栄養条件が異なると野生株も増殖速度、変異率が変化するので、野生株と mutator の値の差を評価することで、栄養条件が増殖負荷にどれくらい影響を与えているのかをより定量的に評価した。mutator の増殖速度と野生株の増殖速度の違いを α と定義する。 α は以下のように表すことができる(式 2-8, 図 2-7)。

$$\alpha = \log \left(\frac{\text{mutator の増殖速度}}{\text{野生株の増殖速度}} \right) \quad (\text{式 2-8})$$

LB 培地, mM63+20AA 培地, mM63 培地での α をそれぞれ α_{LB} , α_{AA} , α_{63} と定義し、それら 3 つの α をそれぞれ比較した。また、含まれる栄養物質の数によって栄養の豊富さを定義し、LB 培地, mM63+20AA 培地, mM63 培地の順に栄養量が低下していく。2 つの栄養条件を比較したとき、栄養量のより多い環境の α (α_{rich}) よりも、栄養の少ない環境の α (α_{poor}) の α の方が大きいとき、富栄養培地が増殖負荷を緩和していると言える。逆に α_{rich} よりも α_{poor} の方が小さいとき、富栄養培地は増殖負荷を大きくしていると言える。

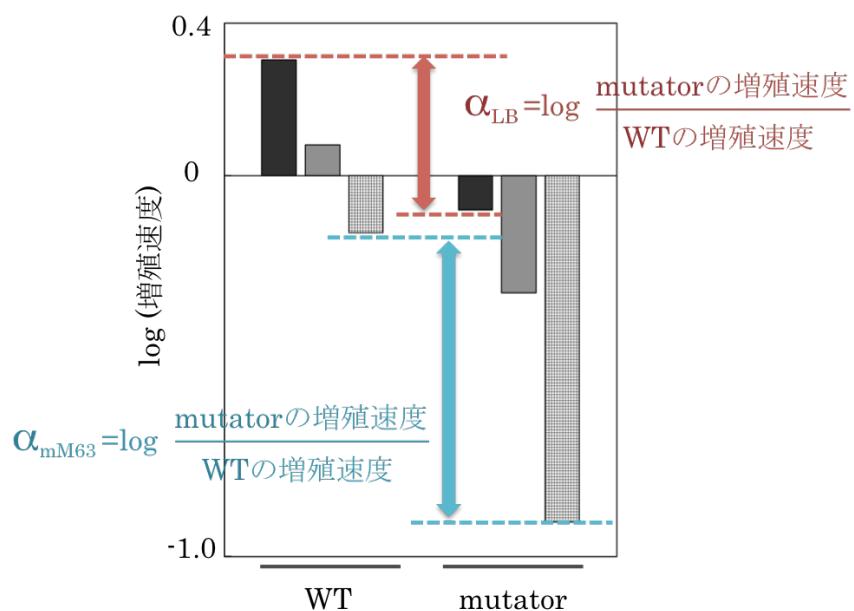


図 2-7 α の定義を示す概念図。

野生株と mutator の 3 つの栄養条件での増殖速度と、 α が指す部分について模式的に示した。縦軸は増殖速度を \log に変換したものを見ている。黒色のバーは LB 培地、濃いグレーのバーは mM63+20AA 培地、薄いグレーのバーは mM63 培地の結果である。赤い矢印は α_{LB} を、青い矢印は α_{mM63} を示している。

LB 培地と他 2 つの栄養条件の α を比較した場合、ほとんどの株 (LB 培地, mM63 培地では 9 株中 6 株, LB 培地, mM63+20AA 培地では 12 株中 8 株) で $\alpha_{\text{poor}} < \alpha_{\text{rich}}$ であった (図 2-8 A, B). また、全体での傾向もそれぞれ有意に α に差があった ($p=0.01$). 一方で、mM63+20AA 培地, mM63 培地の α を比較した場合は、有意に差があった株は 9 株中 1 株であり、どちらかに偏っていることは無かった (図 2-8 C). 全体の傾向も、t 検定によって有意な α の差が無いことが確かめられた ($p=0.69$). これらの結果は、十分な栄養が存在する場合は、mutator の増殖負荷が栄養によって緩和されていることを示している。アミノ酸の増殖負荷への影響は、株の種類に依存しており、株によっては栄養が mutator の増殖負荷を悪化させ得ることがわかった。

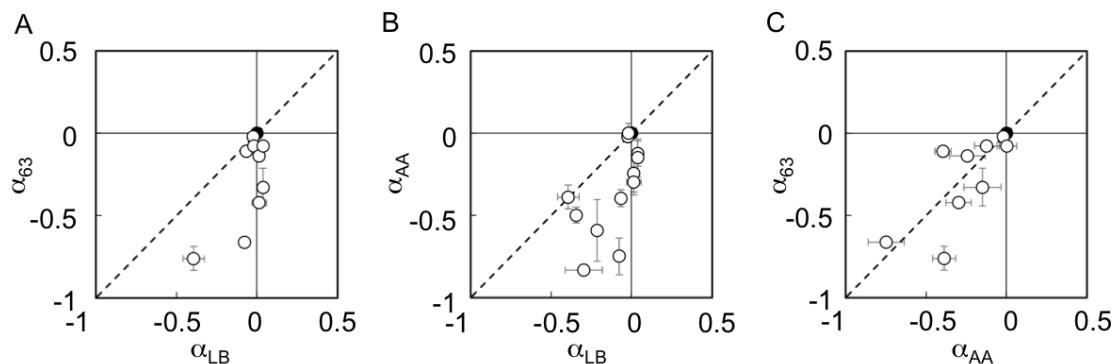


図 2-8 α_{rich} と α_{poor} の比較.

横軸は α_{rich} を、縦軸は α_{poor} を示している。エラーバーは 3 回の測定の平均である。白色のプロットは mutator, 黒色のプロットは野生株である。(A) LB 培地と mM63 培地での α の比較。t 検定により ($p=0.05$), mutator のデータのうち, 6 株は有意に差があった。(全 9 株) 全体の傾向は t 検定により有意に α に差があった。 $(p=0.01)$ (B) LB 培地と mM63+20AA 培地での α の比較。t 検定により ($p=0.05$), mutator のデータのうち, 8 株は有意に差があった。(全 12 株) 全体の傾向は t 検定により有意に α に差があった。 $(p=0.01)$ (C) mM63+20AA 培地と mM63 培地での α の比較。t 検定により ($p=0.05$), mutator のデータのうち, 1 株は有意に差があった。(全 9 株) 全体の傾向は t 検定により α の有意な差は無かった。 $(p=0.69)$

次に、富栄養条件では貧栄養条件に比べて、栄養によってどの程度増殖負荷が緩和されるのかを評価するために、それぞれの遺伝子型における $\alpha_{rich} - \alpha_{poor}$ を計算した。LB 培地とその他の 2 つの培地における差は 0 以上 1 以下であり、これは LB 培地が他の栄養量の少ない 2 つの培地に比べて、増殖負荷を約 10 倍近く緩和することが出来る事を示している（図 2-9）。

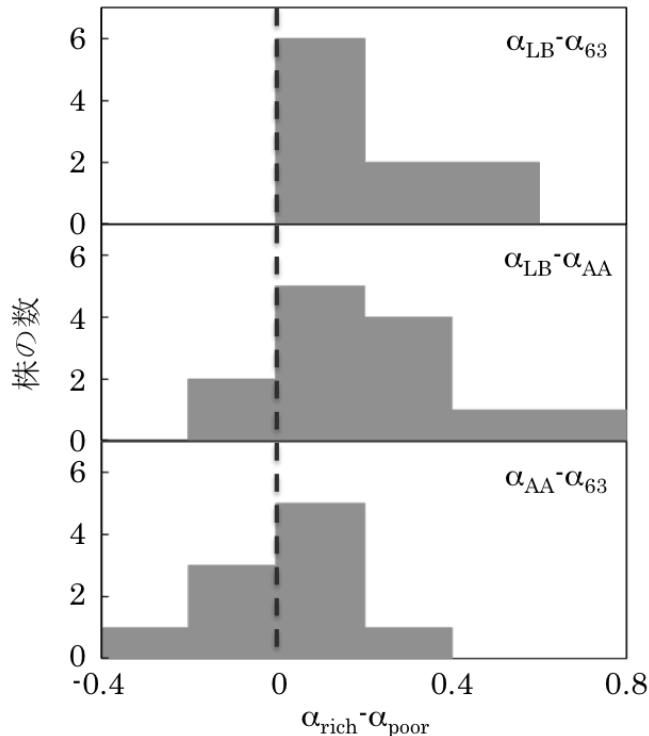


図 2-9 α_{rich} と α_{poor} の差。

縦軸は株の数、横軸は α_{rich} と α_{poor} の差を示している。上の図は LB 培地と mM63 培地での α の差、真中の図は LB 培地と mM63+20AA 培地での α の差、下の図は mM63+20AA 培地と mM63 培地での α の差を示している。破線は 0 の位置を示している。

2-3-6 栄養条件依存的変異率

増殖速度の場合と同様に、変異率の栄養条件に対する依存性について調べた。mutator の変異率と野生株の変異率の違いを β と定義する。 β は以下のように表すことができる(式 2-9, 図 2-10)。

$$\beta = \log\left(\frac{\text{mutator の変異率}}{\text{野生株の変異率}}\right) \quad (\text{式 2-9})$$

LB 培地, mM63+20AA 培地, mM63 培地での β をそれぞれ β_{LB} , β_{AA} , β_{M63} と定義し、それら 3 つの β をそれぞれ比較した。2 つの栄養条件を比較したとき、栄養量のより多い環境の β (β_{rich}) よりも、栄養の少ない環境の β (β_{poor}) の方が大きいとき、貧栄養培地の方が、野生株に比較して mutator の変異率がより大きく上昇していると言える。逆に β_{rich} よりも β_{poor} の方が小さいとき、富栄養培地の方が、野生株に比較して mutator の変異率がより大きく上昇していると言える。

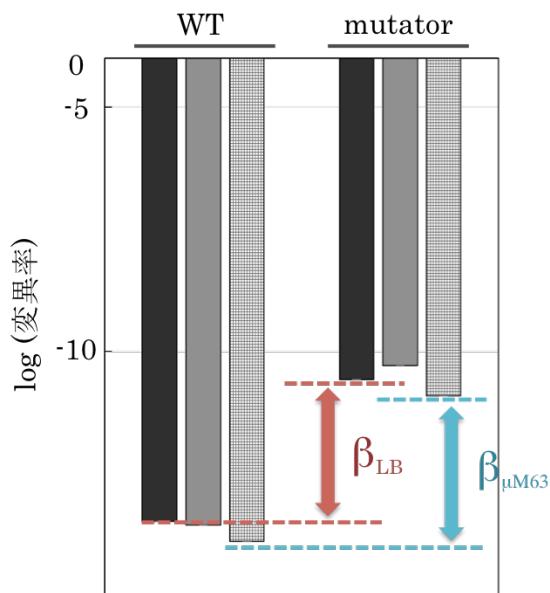


図 2-10 β の定義を示す概念図。

野生株と mutator の 3 つの栄養条件での変異率と、 β が指す部分について模式的に示した。縦軸は変異率を \log に変換したものを見ている。黒色のバーは LB 培地、濃いグレーのバーは mM63+20AA 培地、薄いグレーのバーは mM63 培地の結果である。赤い矢印は β_{LB} を、青い矢印は β_{mM63} を示している。

LB 培地と mM63 培地の栄養条件の β を比較した場合、約半数（9 株中 4 株）の株で $\beta_{63} < \beta_{LB}$ であった(図 2-11 A). また、全体の傾向も t 検定から有意に β に差があることが確認された($p=0.02$). さらに、LB 培地と mM63+20AA 培地の栄養条件の β を比較した場合、ほとんどの株（12 株中 7 株）で $\beta_{AA} < \beta_{LB}$ であった(図 2-11 B). また、こちらも全体の傾向も t 検定から有意に β に差があることが確認された($p=0.02$). 一方で、mM63+20AA 培地、mM63 培地の β を比較した場合は、有意な差があったのは 9 株中 3 株であり、 $\beta_{63} < \beta_{AA}$ と $\beta_{63} > \beta_{AA}$ のどちらも存在していて偏りは観察されなかった(図 2-11 C). また、全体的な傾向も有意な差は無かった ($p=0.30$). mM63 培地に 20 個のアミノ酸を添加することは、変異率に対してほとんど影響を与えていないと考えられる. 9 株のうち 1 株では有意に $\beta_{63} < \beta_{AA}$ となっており、この株 (ΔQS) は *dnaQ* が欠損した株である. 他の *dnaQ* 欠損株は mM63 培地では培養することができなかった. 他の 4 株 (ΔLH , ΔSH , ΔS) は有意に $\beta_{63} > \beta_{AA}$ であり、残りの株はアミノ酸を添加しても同程度の β であった. 従って、アミノ酸の添加が与える変異率への影響力は、遺伝子型に依存していることを示している.

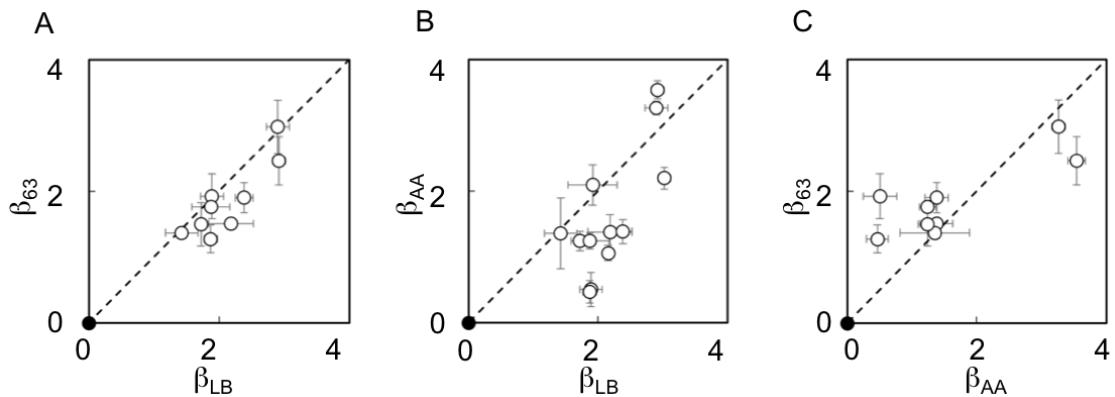


図 2-11 β_{rich} と β_{poor} の比較.

横軸は β_{rich} を、縦軸は β_{poor} を示している. 白色のプロットは mutator, 黒色のプロットは野生株である. (A) LB 培地と mM63 培地での β の比較. t 検定により ($p=0.05$), 全 9 株の mutator のデータのうち, 4 株は有意に差があった. また, 全体の傾向も t 検定により有意に β に差があった. ($p=0.02$) (B) LB 培地と mM63+20AA 培地での β の比較. t 検定により ($p=0.05$), 全 12 株の mutator のデータのうち, 7 株は有意に差があった. また, 全体の傾向も t 検定により有意に β に差があった. ($p=0.02$) (C) mM63+20AA 培地と mM63 培地での β の比較. t 検定により ($p=0.05$), 全 9 株の mutator のデータのうち, 4 株は有意に差があった. 全体の傾向は t 検定により α の有意な差は無かった. ($p=0.30$)

2-3-7 有益変異の出現頻度の栄養条件依存性

富栄養条件よりも貧栄養条件の方が、増殖負荷が大きくなることが 2-3-5 で示された。そのため、野生株と mutator が同一集団内に存在し、mutator は野生株よりも増殖速度が低い場合は、集団内の割合が低くなるはずである。そこで、野生株と mutator の一つである ΔS を 1 : 1 で混合し、LB 培地と mM63 培地で約 47 世代培養したあと、抗生物質を含まない寒天培地と ΔS のみが耐性を持つクロラムフェニコールを含む寒天培地にまいた。ここで ΔS を選んだ理由は、LB 培地では野生株と増殖速度が大きく変わらないのに対し、mM63 培地では野生株と差はあるものの、その差は他の mutator に比べると一番小さいので、培地による集団内の mutator の割合の差が ΔS で観察されれば、野生株に比べてより mM63 培地での増殖速度が低下している他の mutator では、より顕著に集団内の mutator の割合の差が観察されるだろうと考えたためである。 ΔS の増殖速度は、富栄養培地では野生株と比べて大きな違いは無く、貧栄養培地では野生株に比べて約 20% 低下しているので（図 2-5）、 ΔS の割合が貧栄養培地の方が低くなることが予想された。実験の結果、LB 培地では ΔS の割合が 56% であったのに対し、mM63 培地では 8% となり、大きな違いが観察された（ $p=0.055$ ）（表 2-4）。増殖速度から計算される予測値は、LB 培地では ΔS の割合が 17% であり、mM63 培地では 0.5% となるはずであった。LB 培地での差は誤差範囲内であるが、mM63 培地では有意に実験値の方が約 16 倍 ΔS の割合が高かった。この差を生み出した原因については考察の章で述べる。

表 2-4 共培養した場合の野生株と ΔS の割合

培地の種類	株の種類	
	WT	ΔS
LB 培地	44%	56%
mM63 培地	92%	8%

さらに、貧栄養培地では富栄養培地よりも集団内の割合と変異率が低下することから、有益変異を獲得する確率が低下することが予想される。これを確かめるために、野生株と ΔS を 1:1 で混合し、LB 培地と mM63 培地で約 47 世代培養したあと、抗生物質を含まない寒天培地と、耐性変異を獲得した変異体のみが生えることのできるナリジキシン酸を含む寒天培地にまいた。その結果、mM63 培地で培養したものは 5 枚の寒天培地のうち 1 枚しかコロニーが現れなかったのに対し、LB 培地で培養したものは 5 枚すべてにコロニーが現れた（図 2-12A）。また、それぞれの寒天培地に生えたコロニーの数から、集団中に占めるナリジキシン酸耐性を持つ変異体の割合を求めた。その結果、

LB 培地ではその割合が 5.8×10^{-8} だったのに対し, mM63 培地では 1.5×10^{-9} となっていた ($p=0.030$) (図 2-12B). この差は, ΔS のみを培養したときの LB 培地と mM63 培地での値の差よりも大きい (1.1×10^{-7} (LB 培地), 1.7×10^{-8} (mM63 培地), $p=0.001$). また, 変異率, 集団内の細胞数から計算すると, 培養開始から終了までに集団内で 1~8 回しか変異が発生していないはずであり, 偶然に変異率を変化させる変異が発生している可能性は限りなく低いと考えられる. さらに, 変異率から予測される値は LB 培地では 4.2×10^{-8} , mM63 培地では 5.5×10^{-9} であり, 実験結果と予測値がよく一致していた. これらの結果から, mutator を含む集団では, 富栄養条件である LB 培地よりも貧栄養条件である mM63 培地の方が, 有益変異を獲得する確率が低下していることが示された. すなわち, 十分に高い変異率を持つ mutator が十分な割合で存在していなければ, 有益変異を獲得する確率が低下するために, 効果的に集団の適応を促進できないことを示している.

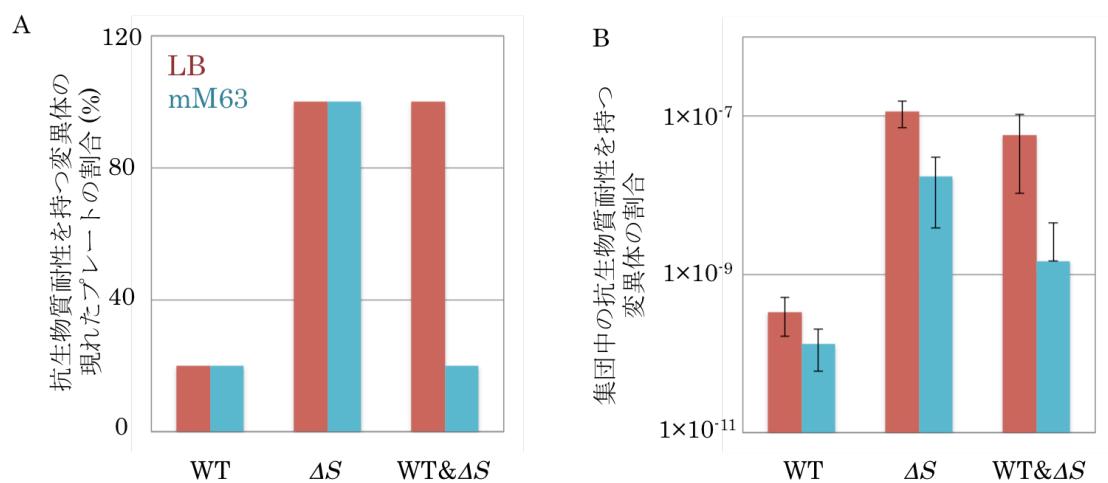


図 2-12 抗生物質耐性を持つ変異体の出現頻度の栄養条件依存性。

野生株と ΔS を1:1で混合し、培養した後での変異体の出現頻度を示している。

赤いバーはLB培地で培養したときの値、青いバーはmM63培地で培養したときの値である。(A)5枚の寒天培地のうち変異体の現れた寒天培地の割合。(B)集団中の変異体の割合、エラーバーは5回の実験の標準偏差である。

2-4 考察

本章では、複数の *mutator* を使用した実験から、増殖負荷と変異率に栄養条件依存性があることを明らかにした。大腸菌の野生株において、変異修復関連遺伝子を単独又は複数欠損させ、17種類の *mutator* を作製した。それらの増殖負荷と変異率を、3つの栄養条件 (LB 培地, mM63+20AA 培地, mM63 培地) で測定し、野生株の値と比較した。それによって、栄養が豊富なほど変異率が高く、増殖負荷が小さくなる傾向があることがわかった。

栄養条件が豊富な LB 培地では、変異率がある程度高くなっても増殖速度は野生株に比べて低下しておらず、変異率が 10^7 くらいまで高くなると増殖速度が低下した。一方で mM63 培地や mM63+20AA 培地では、もっと低い変異率から増殖速度が低下した。これは栄養が増殖負荷を緩和しているためであると考えられる。

ミスマッチリペアの遺伝子 (*mutS*, *mutL*, *mutH*) を欠損させた *mutator* と、プルーフリーディング機構の遺伝子 (*dnaQ*) を欠損させた *mutator* を比べると、先行研究の結果と同様にプルーフリーディング機構の遺伝子 (*dnaQ*) を欠損させた *mutator* の方が変異率は高くなっていた [8]。さらに二重欠損株や三重欠損株に着目してみると、必ずしも二重欠損株や三重欠損株の方が一重欠損株よりも変異率が高くなるということはなかった。しかし、一重欠損株では貧栄養培地で増えることができない株は無かつたのに対し、二重欠損株、三重欠損株になると増殖できない株が生じた。ミスマッチリペア遺伝子だけの二重欠損株では、6株中2株が貧栄養培地で増えることが出来なかつた。*mutS*, *mutL*, *mutH* は同じミスマッチリペアに関わる遺伝子なので、1つの遺伝子が欠損しても2つの遺伝子が欠損しても与えるダメージは大きく変わらないことが予想されたが、二重欠損株で増えない株が増えていたため、1つの遺伝子が欠損しても他の遺伝子が補うことが出来るためダメージが大きくならなかつたのに対し、2つや3つの遺伝子が欠損すると補うことのできる遺伝子も欠損しているために、ダメージが大きくなるのではないかと考えられる。また、*dnaQ* の欠損のある二重欠損株では6株中5株が貧栄養培地で増殖出来なかつた。二重欠損株になっても変異率は大きく上昇するわけではないが、増えることのできない株が増えているということは、二重欠損株や三重欠損株になることで一重欠損株よりも分子機構としては変異率が高くなっているが、変異が発生し、偶然に変異率が低くなったものだけが増えてきている、つまり選択の効果が働いている可能性が考えられる。また、ミスマッチリペアの遺伝子だけの二重欠損株よりも、ミスマッチリペアとプルーフリーディング機構の遺伝子の両方が欠損している二重欠損株の方が増殖できなくなる株の割合が高いのは、1種類の遺伝子修復機構が欠損するより2種類の遺伝子修復機構が欠損した方が、ダメージが大きいためである

と考えられる。

増殖負荷が栄養条件に依存していた理由は、栄養が変異による増殖負荷を緩和しているためだと考えられる。しかし栄養が豊富に含まれている LB 培地でのみ緩和は観察され、20 アミノ酸の添加では緩和されていなかった。限定された種類の栄養分では増殖負荷を緩和できないのに対して、豊富な栄養分では、様々な変異から生じた代謝に関わる負荷負荷を緩和できることを示唆している。これは、栄養が豊富な条件よりも乏しい条件の方が、生存に必要な遺伝子の数が多くなることを示した先行研究と一致している [46]。しかし、変異が発生すると様々な影響を与えることが予想され、必ずしも代謝に悪影響を与えるとは限らない。例えば、変異がタンパク質の立体構造に変化を及ぼすような影響を与えた場合、栄養成分がその悪影響を補うことはまれであるだとうと予想される。また、栄養条件とは異なるストレスである酸によるストレスが加わったとき、そのストレスは変異による増殖負荷の大きさを小さくしたと示す先行研究もある [51]。それにも関わらず、豊富な栄養が変異による増殖負荷を緩和することを複数の mutator で定量的に測定したことは驚くべき新しい発見であると言える。本研究は、細胞には様々な機能がある中で、悪影響を与える変異のうち大部分が代謝と関係していることを示唆している。

また、変異率が豊富な栄養条件で高くなることを複数の mutator で定量的に測定したことも新しい発見である。変異率が栄養条件に依存していた理由は、選択の効果や、変異が発生すると致死に至る塩基の数が栄養条件によって異なること、変異修復関連遺伝子の働きの効率の違いなどが考えられる。以下にその詳細を示す。

一つ目の可能性として（仮説 1），集団内の個体によって変異率が異なり、貧栄養培地では変異率の低い個体が選択されることによって、集団の平均の変異率が低くなっていることがあげられる（図 2-14）。集団内に様々な変異率を持つ個体が存在する場合、それらの平均をもって変異率として測定される。栄養が乏しい培地では低い変異率を持つ個体の方が生存に有利であるとすると、変異率が低い個体に正の選択がかかるため、平均の変異率が富栄養培地よりも低くなることが予想される。これについては、3 章で再び論じることにする。

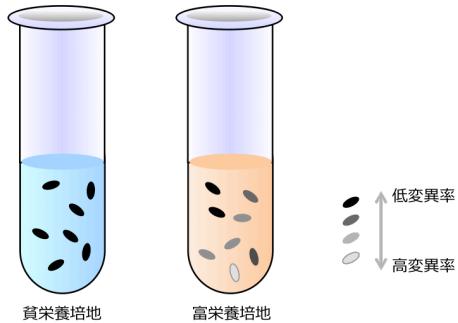


図 2-14 栄養条件による選択の概念図.

異なる培地で大腸菌を培養している図である。左の試験管は貧栄養培地、右の試験管は富栄養培地である。大腸菌は、その濃淡で変異率の違いを示している。富栄養培地の入った試験管では高変異率から低変異率まで様々な変異率を持つ個体が生きられることを、貧栄養培地の入った試験管では低い変異率の個体が選択されていることを示している。

仮説 2として、DNA修復関連遺伝子の活性や酵素の発現量が栄養条件に依存して変化している可能性が考えられる。この説を示唆する先行研究も存在する [52]。発生した変異は遺伝子修復関連遺伝子によってほとんどが修復される。それらの酵素の活性が上昇したり、細胞内の量（発現量）が増加することでより多くの変異を修復することができ、変異率が低下することが考えられる。貧栄養培地の方が酵素活性の上昇や発現量の増加が見られれば、貧栄養培地の方が変異率は低くなる現象が観察されるだろう。この仮説についても、3章で改めて議論する。

そして仮説 3として、変異が入ると致死になる領域が富栄養条件ほど小さくなり、その大きさの違いが変異率に影響を与える可能性がある。図 2-15のように、ゲノムのうち変異が発生することで致死をもたらす領域と、中立な領域に分ける。個体によって変異が入る部位は異なり、赤で示した致死領域に発生するとその個体は死に、黒で示した中立な領域に変異が入っても生き続けることができる。また、緑色で示した部位に変異が発生すると抗生物質の耐性を獲得する。2章で測定した変異率はこの緑色の領域に変異が発生する確率を求めていた。ここで、実際にゲノムに変異が発生する確率（実際の変異率）を m とし、全ゲノムのうちの致死領域の割合を f と定義する。抗生物質耐性によって測定された変異率を m' （見かけの変異率）とすると、致死領域に変異が入った個体は実験では検出されず、抗生物質耐性を獲得した個体の数は本来よりも少なく検出されるため、見かけの変異率は以下の式のように表すことができる。

$$m' = (1 - f) \times m \quad (\text{式 2-10}).$$

栄養条件によって致死領域の大きさは異なることが予想され、その大きさによって見かけの変異率 m' は大きく変化することが考えられる。LB 培地と mM63 培地の m' をそれぞれ m_{LB}' , m_{63}' , また, f を f_{LB} , f_{63} と定義する。この仮説では, m は LB 培地と mM63 培地で同じ値である。それぞれの値を代入すると、以下の式が得られる。

$$m_{LB}' / m_{63}' = (1 - f_{LB}) / (1 - f_{63}) = 7.8 \quad (\text{式 2-11}).$$

$0 < f_{LB} < 1$ であることを考慮すると, $0.8718 < f_{63} < 1$ が得られる。この f 値は、ゲノム全体のうち, 9 割弱の塩基配列に変異が発生すると致死となることを示すが、致死領域がこれほど広範囲に存在しているとは考えにくく、妥当ではないと考えられる。そのため、仮説 3 では変異率の栄養条件依存性を説明できない。

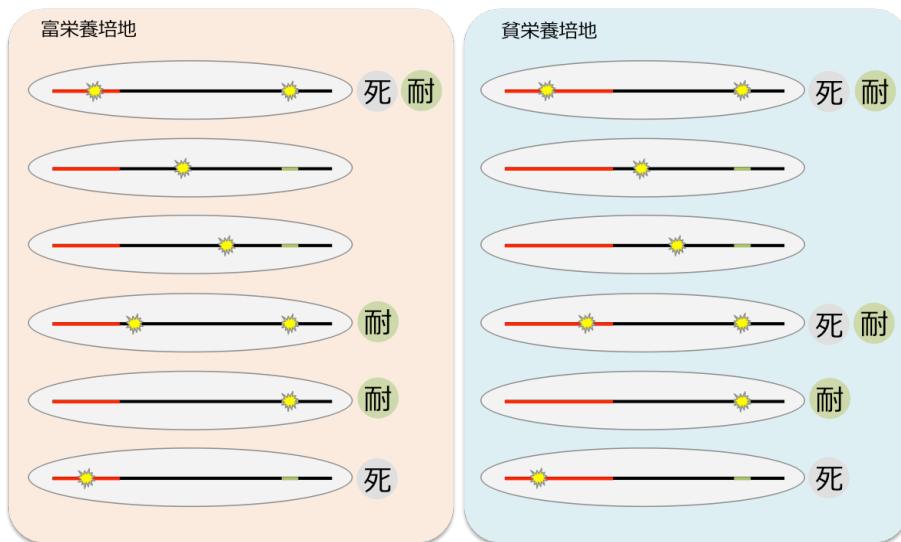


図 2-15 致死領域と変異率の関係。

6 匹の大腸菌とそのゲノムの模式図である。赤部分は致死領域、黒部分は中立領域とする。緑色部分に変異が入ると抗生物質に対する耐性を獲得する。黄色で変異の発生を表している。富栄養培地と貧栄養培地で変異の発生箇所は同じだが、致死領域の大きさが異なる。富栄養培地では耐性を獲得し、かつ生存できている個体は富栄養培地では 2 匹なのに対し、貧栄養培地では 1 匹になる。このように、致死領域の大きさが耐性を獲得した個体の検出に影響し、栄養条件によって変異率に差が出ることが予想される。

そして仮説 4 として、栄養条件によって細胞内の遺伝子の複製スピードが異なることで、変異による影響が変化する可能性が考えられる。栄養が豊富な方が複製起点の数が多くなることが知られており、一つの細胞内に存在する一時的な遺伝子のコピー数が多くなることで、変異が発生してもコピーの遺伝子が存在するために致死になる可能性が低くなると示唆している先行研究も存在する [53]。この場合は、変異を修復する効率は変化していない。しかし、本研究で mM63+20AA 培地では mM63 培地よりも増殖速度が大きくなっていたにも関わらず、変異率はそれらの培地で大きな差が無かった。従って、この説だけでは変異率の違いは説明することはできないと考えられる。mutator (ΔS)と野生株を共培養した実験において、集団中の ΔS の割合が予測値では 0.5% だったのに対し、実測値は 8% であった。野生株と ΔS のどちらか、もしくはどちらも増殖速度が変化していることが予想される。共培養することで相互作用し、互いの増殖に影響を与えていているのかもしれない。例えば、野生株が生成した物質が細胞外に漏れ、それを mutator が取り込むことで速く増殖できるようになっていると考えられる。

mutator は変異率が高いにも関わらず、どのようにして生き延びているのだろうか。有益変異を獲得できない限りは、有害な変異が蓄積しすぎると死滅してしまうことが富栄養条件での方が知られている [30]–[33]。変異率が高かったため、富栄養条件ではより環境適応を促進する効果が強いことが予想される。もし変異率が高いまま維持されているならば、いずれ変異の蓄積で集団中の全ての mutator が死滅してしまう可能性が高い。一方で、栄養条件に対応するように変異率が変化しているならば、有害変異による悪影響を最小限にすることで生き延びることを可能にしているのかもしれない。逆に、栄養が豊富な環境では変異による増殖負荷が小さいので、変異率を最大化し、有益変異の獲得を促進したり多様性を拡大させることで、環境適応や進化に貢献しているだろう。本研究は、栄養条件の変化に対応して変異率を変化させることの重要性を示唆している。

次に、図 2-6 のように、変異率が上昇すれば増殖速度が低下するという現象が、計算から求められるかについて議論する。先ほどと同様に、塩基当たりの変異率を m_b [error/bp/replication] とする。図 2-15 の赤領域に変異が x 個入る確率を $P(x)$ とする。また、ゲノム中の赤領域の割合を $f_d (<1)$ とする。今から赤領域に変異が入らない確率 $P(x=0)$ を求める。 $P(x)$ は、成功（変異が入れば成功とする）確率が m_b で、試行回数が $G \cdot f_d$ に対応する二項分布に従うと考えられるので、以下の式が得られる。

$$P(x) ==_n C_x \times p^x (1-p)^{n-x} = \text{Binom}(x, m_b, G \times f_d) \quad (\text{式 } 2-12)$$

$$P(x=0) = \text{Binom}(x=0, p=m_b, n=G \times f_d) = (1-m_b)^{G \times f_d} \quad (\text{式 } 2-13)$$

以下のように値を導入する。

$$G = 4 \times 10^6 \text{ [bp]}$$

$$f_d = 1 \text{ or } 0.1$$

$$m_b = 10^{10} \sim 10^6 \text{ [error/bp/replication]}$$

10^{10} は野生株を想定している。その結果, $P(0)$ を増殖速度であると考えると, 図 2-16 が得られた。Fd を 1 に設定しても, 変異率が 10^{-8} (mutations/bp/replication) 以上にならなければ増殖速度は低下しない。したがって, 実際の測定値よりも変異率が上昇したときの増殖速度の低下がみられないことになる。今回の計算で用いたパラメータだけでは, 変異による増殖速度の低下は説明できないことを示している。計算では, 変異は致死か中立しか想定していないので, 変異が発生することで増殖速度が低下することを考える必要があるのだろうと予想している。

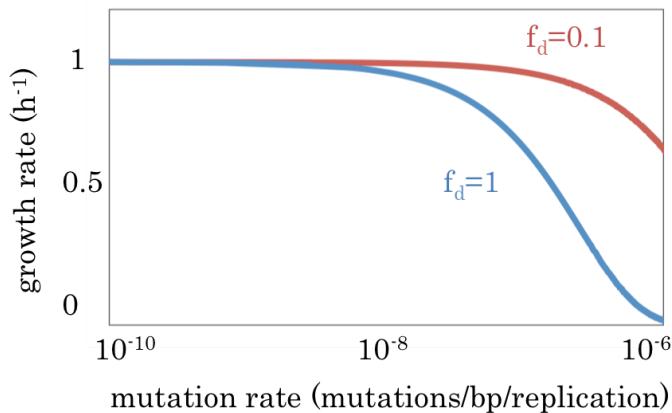


図 2-16 変異率が上昇したときの増殖速度の低下の予測

変異率が上昇したときの増殖速度の低下の様子を計算で求めた結果を示している。赤は f_d を 1 に, 青は f_d を 0.1 に設定したときの結果を示している。

ここで, 変異率は抗生物質耐性という形質の変異（表現型の変異）から間接的に求めたものであり, ゲノムに実際に発生する塩基変異（遺伝子型の変異）の確率と必ずしも一致するとは限らない。なぜなら, 先行研究から, ゲノムの部位によって変異の発生しやすさには差があることがわかっているため [41]–[43], 抗生物質耐性遺伝子による変異率とゲノム全体の変異率が一致しない可能性があるためである。知りたいのはある特定の遺伝子での変異率ではなく, ゲノム全体での変異率である。また, 形質の変化しか観察できていなかったため, 実際に塩基に変異が生じているとは限らない。DNA に変異は生じていないが, 形質だけが変化している可能性も考えられる。そこで 3 章では, ゲノムに実際に入っている変異から直接変異率を求め, 抗生物質耐性から求めた変異率と比較する。

2-5 結論

本章では、複数の *mutator* について増殖負荷と変異率に栄養条件依存性があることを明らかにした。野生型大腸菌の変異修復関連遺伝子を欠損させることで 17 種類の *mutator* を作製し、3 つの栄養条件 (LB 培地, mM63+20AA 培地, mM63 培地) における変異率と増殖負荷を測定した。野性株の増殖速度との違いを定量化し、栄養条件間でその値を比較した。その結果、一部の株は栄養条件に依存せず増殖速度の変化量は一定であったが、大半の株においては栄養量の多い LB 培地では他の培地に比べて変化量が大きくなっていた。変異率も同様に、野生株の変異率との違いを栄養条件間で比較したところ、その変化量は栄養条件によらず一定の変化量を示す株もあったが、約半数の株では他の培地に比べて LB 培地での変異率の変化量が大きかった。つまり、多くの *mutator* で栄養条件が豊富な方が変異率が高く、増殖負荷が小さいことを新しく発見した。また、その一方で、依存性の無い *mutator* も同時に存在することを新しく発見した。また、LB 培地の方が mM63 培地よりも集団内で *mutator* の占める割合が高くなりやすく、変異率も高いことから有益変異を獲得しやすいことを示した。変異率の測定方法としては、ナリジキシン酸という抗生物質を用い、抗生物質感受性表現形から耐性表現形に変化する確率を指標にした、伝統的な方法を使用した。

第3章 ゲノムシークエンスによる変異率の測定

3-1 緒言

第2章において、栄養条件依存的に変異率が異なる株があることが示された。しかし、これは抗生物質耐性から間接的に求めた変異率である。先行研究から、ゲノムの部位によって変異率が異なることが示されているため [41]–[43]、ゲノム全体においても、抗生物質耐性遺伝子と同程度の変異率で変異が発生しているかは定かではない。また、形質から判断しているため塩基置換が実際に予想される確率で発生しているかはわからない。そこで、3章では17株ある mutator のうち、代表として ΔS と ΔSQ を用いて、mutation accumulation experiment [31], [54], [55] という方法で大腸菌ゲノムに変異を十分に蓄積させ、ゲノムシークエンスによってその変異の数を特定することで、変異率を直接求めた。 ΔS と ΔSQ を選んだ理由には2つある。1つ目に、それぞれ栄養条件依存的に変異率が変化する株と変化しない株であること。2つ目に、ミスマッチリペアとプルーフリーディング機構という異なる遺伝子修復機構に関わる遺伝子が欠損していることである。このように、異なる性質、遺伝子型を持つ株であるため、これら2つの株を選んだ。2章までは試験管内で大腸菌を培養していたが、mutation accumulation experiment では集団内の個体数が大きいため、有利な変異を獲得したものが選択され生存競争に勝ち残りやすくなる。つまり選択の効果によって蓄積する変異の種類や数が変化し得る。mutation accumulation experiment では、固体培地で大腸菌を培養する。固体培地では細胞の集団であるコロニーができる、このコロニーを複数回植えついでいく。コロニーでの植継ぎは1細胞を植継いでいくことができるが、液体培地で植継ぐときには1細胞を植継ぐことは難しい。1細胞で植継ぐときにはどの変異が発生した細胞を選択するかは偶然によるが、1細胞以上の細胞集団で植継ぐときには、細胞間で選択がかかり、有利な変異が発生した細胞が大多数を占めやすくなる。このため、コロニーでの植継ぎは液体培地の植継ぎよりも容易に選択をかけずに植継ぐことができる所以である [54]。寒天培地での植継ぎでは、致死となる変異以外は悪影響を与える変異であっても固定されると考えられる。この条件で植え継ぐことで、実際に発生した変異のほとんどをゲノム中に固定させることができる。植え継いで十分に変異が蓄積したところでゲノム配列を解読して変異を特定した。変異の数と植継ぎが終了するまでに経験した世代数を使用して同義置換の変異率を計算し、抗生物質耐性という形質から間接的に求めた変異率と比較した。ゲノムシークエンスの結果から Ka/Ks [56] を計算し、同義置換と非同義置換の発生確率が同じであったかと、選択をかけずに変異を固定させることができたのかを確かめ、同義置換と同じ確率で非同義置換が発生し

ていたのかを確認した。Ka は変異が発生すると非同義置換になる塩基数にたいする実際に観測された非同義置換数の割合であり、Ks は変異が発生すると同義置換になる塩基数にたいする実際に観測された同義置換数の割合である。変異の種類に選択の力が働いておらず、発生確率に同義置換と非同義置換に差が無い場合、非同義置換と同義置換は同じ確率で固定されるはずである。従って、Ka/Ks は 1 に近いほど選択の力が働いていないと言える。また、塩基置換の種類である transition と transversion の割合を算出し、発生する変異の種類に栄養条件依存性があるのかを確かめた。transition はプリン塩基間、もしくはピリミジン塩基間の変異のこと、transversion はプリン塩基からピリミジン塩基、もしくはピリミジン塩基からプリン塩基への変異のことである。

3-2 実験材料及び方法

3-2-1 mutation accumulation experiment

mutation accumulation experiment によって大腸菌に多数の変異を蓄積させた [54], [31], [55]。ΔS と ΔSQ を LB 培地、mM63+20AA 培地又は mM63 培地の寒天培地に撒き、37°C で一晩培養した。この時点での寒天培地を No.0 とした。生えたコロニーのうち 1 つを選び、新しい LB 培地、mM63+20AA 培地又は mM63 培地の寒天培地に撒き（図 3-1）、37°C で一晩培養した。生えてきたコロニーは植え継ぎを 1 回経験したことになり、このときの寒天培地は No.1 とカウントする。同様に、この操作を繰り返すことで寒天培地が No.33 になるまで繰り返した。それぞれの株、培地で 3 系列行った。コロニーの成長が遅い場合は 2 日から 3 日培養してから植え継いだ。選択したコロニーは、他のコロニーと接することのない、寒天培地上に分離されているものを使用した。途中でコロニーが生えなくなった場合は、保存していた一つ前の寒天培地に戻り、異なるコロニーを撒くことで植え継ぎを続けた。

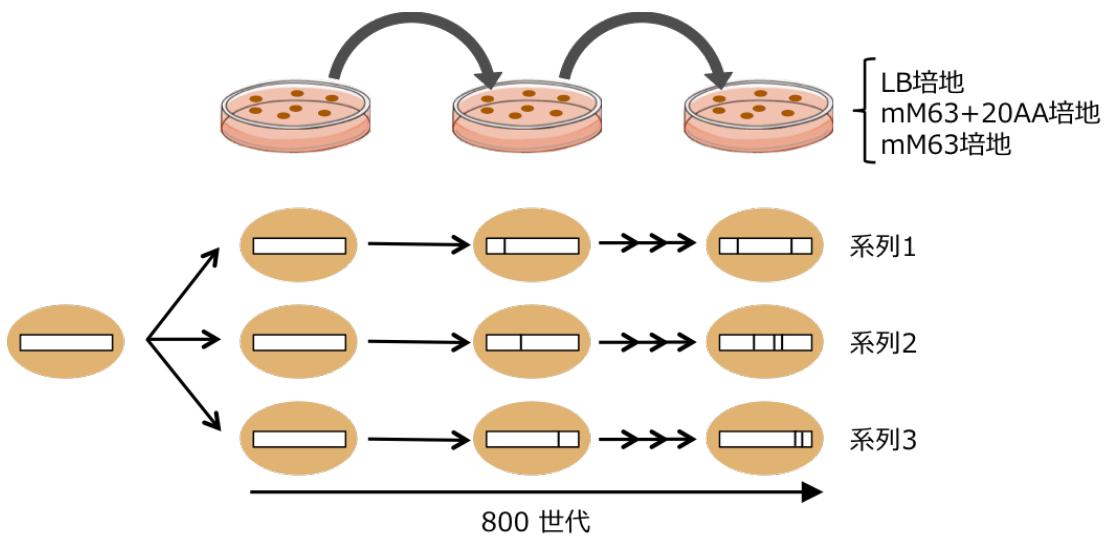


図 3-1 mutation accumulation experiment の実験概要図.

それぞれの株を 3 種類の培地 (LB 培地, mM63+20AA 培地, mM63 培地) からなる寒天培地で, 最大約 800 世代植え継いだ. それぞれの株, 培地で, 3 系列ずつ植え継いだ. 植え継ぎの過程で変異が蓄積していく. 図の上部分で植え継いでいる寒天培地の図を, 下部分に植継ぎの過程で大腸菌内に変異が蓄積していく過程を示している. 大腸菌の中にゲノムがあり, 線が 1 本入ると変異が 1 つ発生していることを示している.

3-2-2 ゲノム抽出

ゲノムを抽出したい大腸菌を 5ml の LB 培地に植菌し, 飽和濃度まで培養したあと, The Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp.) を使用してゲノム抽出を行った. 抽出したゲノムは NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc.) によって濃度を測定した.

3-2-3 次世代シーケンサーによるリシーケンス

抽出したゲノムの塩基配列は, 大阪大学微生物研究所の中村昇太先生に依頼し, 次世代シーケンサー (NGS) (Miseq, Illumina, Inc.) [57]で解読して頂いた. 次世代シーケンサーでは, まず抽出したゲノムを精度良く大量並列シーケンスするために短い DNA 断片に切断し, ライブライマーを作成する. 各断片の単位はリードと呼ばれ, このリードをリファレンス配列の相同部分にマップし, リファレンス配列と異なる塩基を変異であると判断する解析 (リシーケンス解析) を行った (図 3-2).

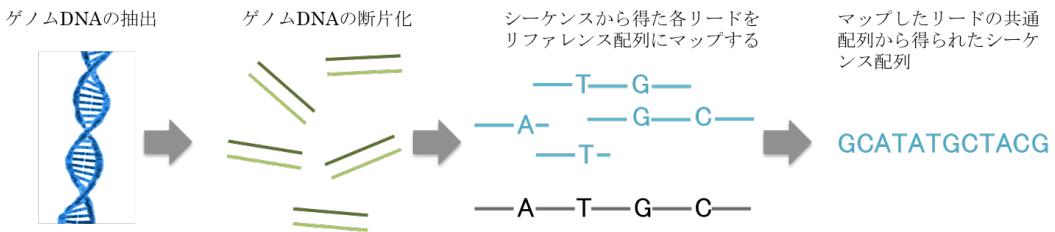


図 3-2 次世代シーケンサーの概要図.

抽出したゲノム DNA を断片化し, 各断片の配列をシークエンスする. シークエンスから得られた各リードをリファレンス配列にマップし, リードの共通配列からゲノム DNA の配列を得る. 図では二種類の緑色でゲノム DNA の断片を, 黒色でリファレンス配列, 青色でリード断片を示している.

3-2-4 コロニーの大きさによる世代数の計算

3-2-4-1 コロニーの大きさと細胞数の検量線の作成

LB 培地, mM63 培地, mM63+20AA 培地で作成した寒天培地で ΔS , ΔSQ を培養し, コロニーを得た. それぞれ 2~5 個のコロニーを寒天培地から切り取り, miliQ に懸濁させてフローサイトメーターで濃度を測定した. また, それぞれのコロニーの大きさを測定した. それぞれのコロニーの細胞数とコロニーの大きさのデータから, 縦軸が細胞数, 横軸がコロニーの大きさになるように検量線を作成した.

3-2-4-2 植え継いだコロニーの細胞数の計算

植継ぎに使用したコロニーの写真を撮影し, 画像処理によってコロニーの半径 (pix) を求めた. 実際に測定したコロニーの大きさ (mm) と画像処理から求めた大きさ (pix) には, $10 \text{ (mm)} = 245 \text{ (pix)}$ の関係にあったので, 画像処理で求めた大きさからミリメートルの単位に換算し, コロニーの面積を計算した. コロニーの面積から, 3-2-4-1 の検量線から得られた近似線を用いて細胞数を算出した.

3-2-4-3 世代数の計算

細胞が一定の間隔で分裂して増殖するとき, 集団内の細胞の総数は 2 倍ずつになるため, 初期細胞数から最終細胞数まで増殖するまでに経る世代数は, 最終細胞数を N_t , 初期細胞数を N_0 とするとき, $\log_2(N_t/N_0)$ で表すことができる. 1 匹の細胞が増殖して 1 つのコロニーが形成されるので, N_0 は 1 であり, N_t は 3-2-4-2 から求めたものを使用することで, 世代数を計算した.

3-2-5 次世代ゲノムシークエンスデータの解析

変異解析用のソフト（主に Burrows-Wheeler Aligner（BWA）と Samtools）を用いて、次世代シーケンサーで得られるデータから変異を抽出した [58], [59]. このとき、Phred クオリティスコア (Q) を 100 に設定して検出される変異を選抜した。Phred クオリティスコアとは、シーケンシングするときに発生するエラーの生じる確率を P_{error} とすると、以下の式 3-1 で表される数値のことである [60], [61].

$$Q = -10 \log_{10}(P_{\text{error}}) \quad (\text{式 3-1}).$$

これは、シーケンシングエラーが生じる確率は 10^{-10} % であるから、読み取られた塩基の信頼度は 99.999999999% であることを示している。言い換えると、 10^{10} リードのうち 1 リードの確率で、間違っているものが含まれることを示している。

3-2-6 Ka/Ks の計算

Ka/Ks は選択の力の大きさを数値化するためのものであり、 Ka は変異が発生すると非同義置換になる塩基の総数のうち、実際に発生した非同義置換の数であり、 Ks は変異が発生すると同義置換になる塩基の総数のうち、実際に発生した同義置換の数を示している [56], [62]. もし選択の力が働いておらず、同じ確率でどの塩基にも変異が発生するなら、 Ka と Ks は同じ確率になるはずである。従って、 Ka/Ks は 1 になる。しかし実際は、同義置換と非同義置換でコドンの使用頻度や、それぞれの種類の塩基で変異の発生しやすさが異なっている。そのため、 Ka/Ks は式 3-2 のように表すことができる。 $Nsyn$ は非同義置換の数、 Syn は同義置換の数、 $P(syn)$ は同義置換の発生する確率である。

$$Ka/Ks = \frac{Nsyn}{Syn} \times \frac{P(syn)}{1-P(syn)} \quad (\text{式 3-2}).$$

次に、 $P(syn)$ の導出について説明する。

i 番目の塩基置換を sub_i 、検出された塩基置換が sub_i である確率を $P(sub_i)$ 、 k 番目のコドンを c_k 、 c_k の出現頻度を $P(c_k)$ 、 c_k に sub_i が起こりうるパターン数を $n(sub_i / c_k)$ 、 c_k に sub_i が起こったときに同義置換になるパターン数を $n(syn / sub_i \cap c_k)$ と定義する。また、今回考える変異はコーディング領域無いの同義置換、非同義置換のみとする。

$$P(syn | sub_i) = P(sub_i) \sum_{k=1}^{64} \{P(C_k | sub_i) P(syn | sub_i \cap C_k)\} \quad (\text{式 3-3}).$$

$$P_{(syn|sub_i)} = P_{(sub_i)} \sum_{k=1}^{64} \frac{P_{(c_k)} n_{(syn|sub_i \cap c_k)}}{\sum_{m=1}^{64} \{P_{(c_m)} n_{(sub_i|c_m)}\}} \quad (式 3-4).$$

式 3-4 では塩基置換のパターンを 16 個にしているが、これを 6 個にまとめ、さらに計算すると式 3-5 が得られる。

$$P(syn) = K^T \begin{pmatrix} P(A: T \rightarrow T: A) \\ P(G: C \rightarrow C: G) \\ P(A: T \rightarrow G: C) \\ P(A: T \rightarrow C: G) \\ P(G: C \rightarrow A: T) \\ P(G: C \rightarrow T: A) \end{pmatrix} \quad (式 3-5).$$

K は式 3-6 で表され、コドンの使用頻度を示している。NCBI-GenBank のデータを使用して K を生成した。

$$K = \begin{pmatrix} K(A: T \rightarrow T: A) \\ K(G: C \rightarrow C: G) \\ K(A: T \rightarrow G: C) \\ K(A: T \rightarrow C: G) \\ K(G: C \rightarrow A: T) \\ K(G: C \rightarrow T: A) \end{pmatrix} \quad (式 3-6).$$

コドンバイアスと塩基置換のバイアスに関しては、先行研究を参考にして計算した [63]。

3-2-7 植継ぎ株の増殖速度の測定

mutation accumulation experiment によって植え継いだ株は、プレートリーダー (TECAN infinite F200 pro) によって増殖速度を測定した。96 マイクロウェルプレートの各ウェルに 200 μ l の培地（植継ぎ時に使用した培地と同じ種類）を分注し、グリセロールストックとして保存していた植継ぎ株を植菌した。プレートリーダーで 1 時間毎に吸光度を測定し、増殖曲線を得た。その結果から最大増殖速度を算出した。それぞれの株は 3 回ずつ測定し、その平均を求めた。

3-3 結果

3-3-1 植継ぎ回数

mutation accumulation experiment を行い, ゲノムシークエンスによって植継ぎ株の変異数や変異の種類を調べた. 最大 33 回植え継ぎ, グリセロールストックとして冷凍保存していたが, 再び増殖することができない株があった. そのため, 植継ぎ途中の株を使用することにした. 使用した株は表 3-1 の通りである.

表 3-1 使用した植継ぎ株.

培地の種類	LB			mM63+20AA			mM63		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ΔS	33	33	33	33	33	33	33	33	33
ΔSQ	33	29	14	14	15	15	33	33	33

ΔS と ΔSQ を, LB 培地, mM63+20AA 培地, mM63 培地で 3 系列ずつ植え継ぎ, それぞれの植え継いだ回数を示している.

3-3-2 コロニーの大きさによる世代数の計算

3-3-2-1 検量線の作成

コロニーの面積から細胞数を計算するために, ΔS , ΔSQ のコロニーの大きさと細胞数を測定し, 検量線を作成した(図 3-3). 培地の種類を無視して, ΔS , ΔSQ の細胞数とコロニーの面積の大きさの検量線を作成したところ, どちらの株においてもコロニーの面積と細胞数に強い相関があったので(図 3-3A), 培地の種類によるコロニーの大きさの違いは無視できるものと考えた. 一方で, それぞれの株ごとの近似線には傾きに差があるので, ΔS , ΔSQ でそれぞれの近似線を使用してコロニーの面積から細胞数を計算した. また, 植継ぎ後のコロニーの大きさと細胞数の関係が, 植継ぎ前と変化している可能性があるため, 植継ぎ後のコロニーの大きさと細胞数も測定した. 植え継いだコロニーの面積は平均が約 0.5 mm^2 だったので, 1 mm^2 までの面積のコロニーだけで測定した. 結果は図 3-3B, C に示している. 植継ぎ前と植継ぎ後で大きな差が無かつたので, 植継ぎを行った全てのコロニーで, 植継ぎ前のコロニーから作成した検量線を使用した.

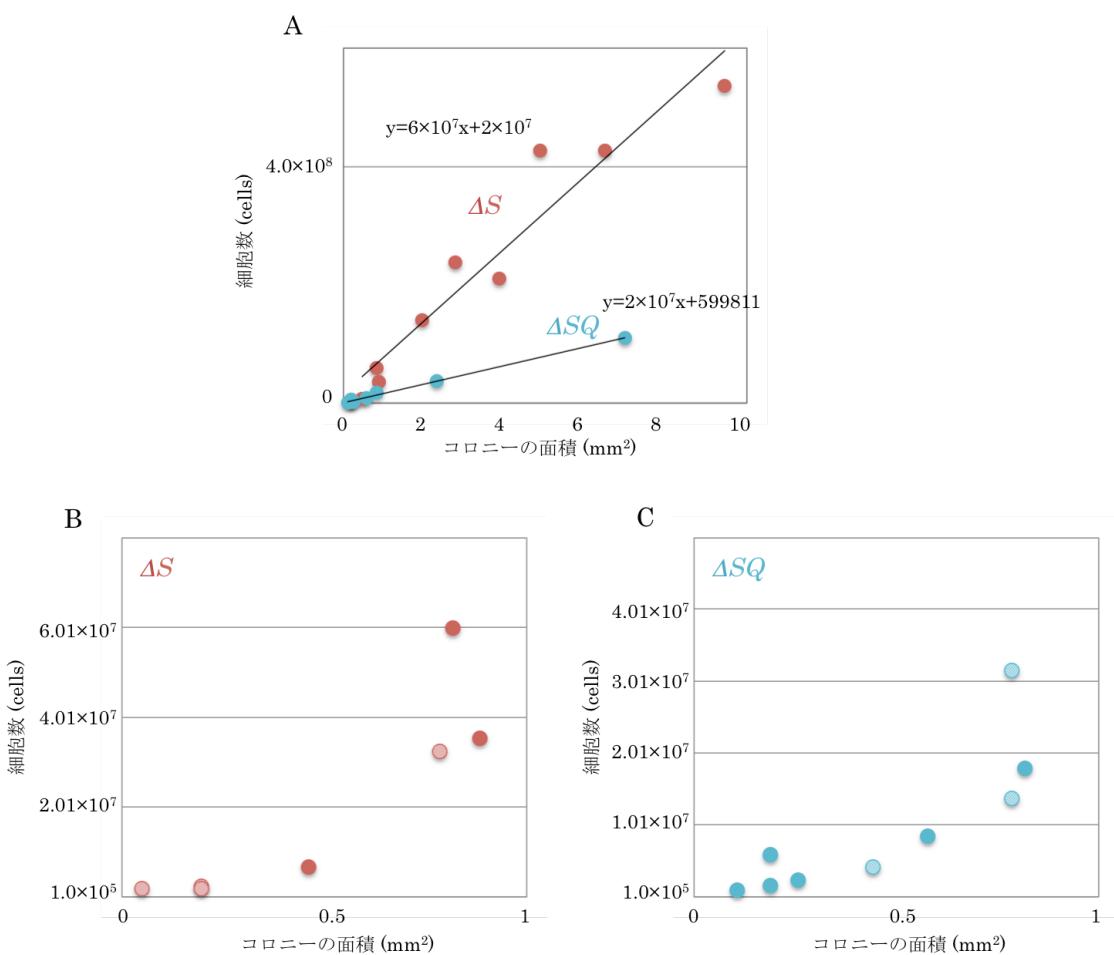


図 3-3 細胞数とコロニーの面積の検量線。

コロニーの面積から細胞数を求めるための検量線。縦軸は細胞数、横軸はコロニーの面積である。(A) 赤色のプロットは ΔS 、青色のプロットは ΔSQ である。式はそれぞれの近似線を示している。(B) ΔS の植継ぎ前と植継ぎ後のコロニーの面積と細胞数を示している。塗りつぶしたプロットが植継ぎ前、網掛けのプロットが植継ぎ後である。(C) ΔSQ の植継ぎ前と植継ぎ後のコロニーの面積と細胞数を示している。塗りつぶしたプロットが植継ぎ前、網掛けのプロットが植継ぎ後である。

3-3-2-2 コロニーの面積の測定

植継いだコロニーの面積を画像処理によって測定し、その結果を表 3-2、表 3-3、表 3-4 に示した。

3-3-2-3 面積から世代数の計算

それぞれの株の検量線を用いて、各系列のコロニーの細胞数を計算した。1 回か

ら一定間隔で2倍ずつに増殖して1つのコロニーを形成すると考えて、細胞数から世代数を計算した。1匹の細胞から1つのコロニーを形成するまでに経る世代数を表3-5、表3-6、表3-7に示した。

表 3-2 LB 培地で植え継いだコロニーの面積 (mm²).

植継ぎ回数	ΔS			ΔSQ		
	1	2	3	1	2	3
1	0.58	0.42	0.08	0.42	0.88	0.29
2	0.58	1.03	0.95	0.16	0.16	0.13
3	1.10	2.09	1.42	0.52	0.52	0.75
4	1.34	3.27	1.18	0.95	1.69	1.03
5	1.03	0.63	0.47	0.11	0.19	0.38
6	0.42	0.33	1.03	0.75	1.26	0.22
7	0.16	0.33	0.06	0.06	0.03	0.08
8	0.08	0.08	0.11	0.22	0.22	0.42
9	0.63	0.29	0.88	0.63	0.58	0.13
10	0.47	0.19	0.42	0.38	0.16	0.63
11	0.69	0.63	0.52	0.22	0.19	0.42
12	0.75	0.33	0.19	0.19	0.42	0.47
13	0.52	1.34	0.52	0.16	0.19	0.22
14	0.26	0.16	1.10	0.16	0.26	0.22
15	1.42	0.58	1.03	0.16	0.52	-
16	0.16	0.75	0.22	0.33	0.33	-
17	0.63	1.03	0.22	0.06	0.29	-
18	0.63	0.63	0.63	0.29	0.19	-
19	0.75	0.33	0.19	0.29	0.38	-
20	0.58	1.42	2.09	0.13	0.58	-
21	0.63	1.69	0.33	0.19	0.82	-
22	0.63	0.33	1.51	0.22	0.13	-
23	0.52	1.18	0.38	0.52	0.29	-
24	0.13	0.13	0.29	0.22	0.42	-
25	0.47	0.38	0.52	0.22	0.05	-
26	0.69	1.10	0.52	1.18	0.29	-
27	0.69	0.42	0.33	0.19	0.75	-
28	1.18	1.51	0.82	0.69	0.22	-
29	0.88	0.52	0.63	0.22	0.42	-
30	0.88	0.52	0.82	0.26	-	-
31	0.58	1.03	1.03	0.11	-	-
32	0.52	0.29	0.69	0.11	-	-
33	0.69	0.42	0.75	0.38	-	-

表 3-3 mM63+20AA 培地で植え継いだコロニーの面積.

植継ぎ回数	ΔS			ΔSQ		
	1	2	3	1	2	3
1	1.03	0.47	0.05	1.60	0.88	0.16
2	1.79	1.79	1.26	0.16	0.29	1.18
3	0.42	1.42	0.63	0.47	0.52	0.42
4	0.22	0.26	0.11	0.11	0.29	0.88
5	0.52	0.47	1.03	0.16	0.42	0.52
6	0.19	0.47	0.42	0.42	0.42	1.03
7	0.08	0.11	0.42	0.05	0.47	0.22
8	0.82	0.63	0.69	0.52	0.52	0.63
9	0.52	0.26	0.47	0.29	0.33	1.51
10	0.75	0.88	0.29	0.47	0.42	0.88
11	0.13	0.33	0.82	0.29	0.33	0.38
12	0.42	1.03	1.03	0.38	1.03	0.47
13	0.42	0.42	0.52	0.19	0.29	0.52
14	0.16	0.16	0.58	0.11	0.29	0.75
15	0.16	0.29	0.95	—	0.47	0.47
16	0.38	0.52	0.38	—	—	—
17	0.29	0.29	0.47	—	—	—
18	0.16	0.22	0.26	—	—	—
19	0.58	0.38	0.47	—	—	—
20	0.58	0.63	0.82	—	—	—
21	0.29	0.69	0.19	—	—	—
22	0.29	0.63	0.19	—	—	—
23	0.29	0.29	1.03	—	—	—
24	0.33	0.47	0.38	—	—	—
25	1.18	0.75	0.47	—	—	—
26	0.22	0.47	0.42	—	—	—
27	0.26	0.26	0.69	—	—	—
28	0.29	0.38	0.33	—	—	—
29	0.38	0.26	0.05	—	—	—
30	0.13	0.11	0.38	—	—	—
31	0.19	0.19	0.13	—	—	—
32	0.58	0.08	0.38	—	—	—
33	0.29	0.08	0.13	—	—	—

表 3-4 mM63 培地で植え継いだコロニーの面積.

植継ぎ回数	ΔS			ΔSQ		
	1	2	3	1	2	3
1	0.75	0.47	0.33	2.77	0.26	0.19
2	0.42	1.34	0.75	0.42	0.33	0.29
3	0.52	0.33	0.08	0.26	0.19	0.95
4	0.69	0.13	0.33	0.69	0.16	0.26
5	0.38	0.52	0.26	0.29	0.52	0.08
6	0.13	0.69	1.03	0.95	0.47	0.38
7	0.22	0.42	0.38	0.05	0.52	0.29
8	0.42	0.13	0.26	0.19	0.47	0.47
9	0.19	0.26	0.13	0.16	1.03	0.06
10	0.38	0.26	0.58	0.13	0.58	1.18
11	0.33	0.22	0.63	0.05	0.16	0.69
12	0.38	0.95	0.42	0.16	0.69	0.08
13	0.58	0.75	0.22	0.08	0.38	1.79
14	0.16	0.22	0.22	0.58	0.47	1.89
15	0.38	0.38	0.11	0.06	0.16	1.60
16	0.13	0.29	0.95	0.58	0.19	0.82
17	0.47	0.26	0.26	0.52	0.63	0.33
18	0.33	0.52	0.33	0.26	0.33	0.75
19	0.19	0.29	0.33	0.26	1.51	0.13
20	0.29	0.42	0.29	0.13	0.13	0.42
21	0.33	0.47	1.03	0.11	0.16	0.26
22	0.26	0.22	0.13	0.19	0.38	0.13
23	0.16	0.19	0.29	0.26	0.75	0.69
24	0.26	0.42	0.88	0.13	0.52	0.42
25	0.33	0.38	0.33	0.69	0.58	0.33
26	0.22	0.47	0.58	0.69	0.69	0.13
27	0.26	0.22	0.42	0.11	0.22	0.16
28	0.26	0.58	0.13	0.19	0.03	0.38
29	0.03	0.06	0.16	0.29	0.69	0.22
30	0.19	0.13	0.16	0.08	0.11	0.22
31	0.08	0.26	0.13	0.11	0.19	0.88
32	0.33	0.47	0.19	0.26	0.52	0.13
33	0.29	0.22	0.08	0.13	0.16	0.16

表 3-5 LB 培地で植え継いだ場合の世代数.

植継ぎ回数	ΔS			ΔSQ		
	1	2	3	1	2	3
1	24.5	24.2	23.4	24.2	24.9	24.0
2	24.5	25.0	25.0	23.6	23.6	23.5
3	25.1	25.9	25.4	24.4	24.4	24.7
4	25.3	26.4	25.2	25.0	25.6	25.0
5	25.0	24.6	24.3	23.5	23.7	24.1
6	24.2	24.1	25.0	24.7	25.3	23.8
7	23.6	24.1	23.3	23.3	23.2	23.4
8	23.4	23.4	23.5	23.8	23.8	24.2
9	24.6	24.0	24.9	24.6	24.5	23.5
10	24.3	23.7	24.2	24.1	23.6	24.6
11	24.6	24.6	24.4	23.8	23.7	24.2
12	24.7	24.1	23.7	23.7	24.2	24.3
13	24.4	25.3	24.4	23.6	23.7	23.8
14	23.9	23.6	25.1	23.6	23.9	23.8
15	25.4	24.5	25.0	23.6	24.4	
16	23.6	24.7	23.8	24.1	24.1	
17	24.6	25.0	23.8	23.3	24.0	
18	24.6	24.6	24.6	24.0	23.7	
19	24.7	24.1	23.7	24.0	24.1	
20	24.5	25.4	25.9	23.5	24.5	
21	24.6	25.6	24.1	23.7	24.8	
22	24.6	24.1	25.5	23.8	23.5	
23	24.4	25.2	24.1	24.4	24.0	
24	23.5	23.5	24.0	23.8	24.2	
25	24.3	24.1	24.4	23.8	23.3	
26	24.6	25.1	24.4	25.2	24.0	
27	24.6	24.2	24.1	23.7	24.7	
28	25.2	25.5	24.8	24.6	23.8	
29	24.9	24.4	24.6	23.8	24.2	
30	24.9	24.4	24.8	23.9		
31	24.5	25.0	25.0	23.5		
32	24.4	24.0	24.6	23.5		
33	24.6	24.2	24.7	24.1		
計	808.8	810.6	807.7	790.3	699.4	337.1

表 3-6 mM63+20AA 培地で植え継いだ場合の世代数.

植継ぎ回数	ΔS			ΔSQ		
	1	2	3	1	2	3
1	25.0	24.3	23.3	25.5	24.9	23.6
2	25.7	25.7	25.3	23.6	24.0	25.2
3	24.2	25.4	24.6	24.3	24.4	24.2
4	23.8	23.9	23.5	23.5	24.0	24.9
5	24.4	24.3	25.0	23.6	24.2	24.4
6	23.7	24.3	24.2	24.2	24.2	25.0
7	23.4	23.5	24.2	23.3	24.3	23.8
8	24.8	24.6	24.6	24.4	24.4	24.6
9	24.4	23.9	24.3	24.0	24.1	25.5
10	24.7	24.9	24.0	24.3	24.2	24.9
11	23.5	24.1	24.8	24.0	24.1	24.1
12	24.2	25.0	25.0	24.1	25.0	24.3
13	24.2	24.2	24.4	23.7	24.0	24.4
14	23.6	23.6	24.5	23.5	24.0	24.7
15	23.6	24.0	25.0		24.3	24.3
16	24.1	24.4	24.1			
17	24.0	24.0	24.3			
18	23.6	23.8	23.9			
19	24.5	24.1	24.3			
20	24.5	24.6	24.8			
21	24.0	24.6	23.7			
22	24.0	24.6	23.7			
23	24.0	24.0	25.0			
24	24.1	24.3	24.1			
25	25.2	24.7	24.3			
26	23.8	24.3	24.2			
27	23.9	23.9	24.6			
28	24.0	24.1	24.1			
29	24.1	23.9	23.3			
30	23.5	23.5	24.1			
31	23.7	23.7	23.5			
32	24.5	23.4	24.1			
33	24.0	23.4	23.5			
計	796.7	798.9	800.6	336.0	364.0	368.0

表 3-7 mM63 培地で植え継いだ場合の世代数。

植継ぎ回数	ΔS			ΔSQ		
	1	2	3	1	2	3
1	24.7	24.3	24.1	26.2	23.9	23.7
2	24.2	25.3	24.7	24.2	24.1	24.0
3	24.4	24.1	23.4	23.9	23.7	25.0
4	24.6	23.5	24.1	24.6	23.6	23.9
5	24.1	24.4	23.9	24.0	24.4	23.4
6	23.5	24.6	25.0	25.0	24.3	24.1
7	23.8	24.2	24.1	23.3	24.4	24.0
8	24.2	23.5	23.9	23.7	24.3	24.3
9	23.7	23.9	23.5	23.6	25.0	23.3
10	24.1	23.9	24.5	23.5	24.5	25.2
11	24.1	23.8	24.6	23.3	23.6	24.6
12	24.1	25.0	24.2	23.6	24.6	23.4
13	24.5	24.7	23.8	23.4	24.1	25.7
14	23.6	23.8	23.8	24.5	24.3	25.7
15	24.1	24.1	23.5	23.3	23.6	25.5
16	23.5	24.0	25.0	24.5	23.7	24.8
17	24.3	23.9	23.9	24.4	24.6	24.1
18	24.1	24.4	24.1	23.9	24.1	24.7
19	23.7	24.0	24.1	23.9	25.5	23.5
20	24.0	24.2	24.0	23.5	23.5	24.2
21	24.1	24.3	25.0	23.5	23.6	23.9
22	23.9	23.8	23.5	23.7	24.1	23.5
23	23.6	23.7	24.0	23.9	24.7	24.6
24	23.9	24.2	24.9	23.5	24.4	24.2
25	24.1	24.1	24.1	24.6	24.5	24.1
26	23.8	24.3	24.5	24.6	24.6	23.5
27	23.9	23.8	24.2	23.5	23.8	23.6
28	23.9	24.5	23.5	23.7	23.2	24.1
29	23.2	23.3	23.6	24.0	24.6	23.8
30	23.7	23.5	23.6	23.4	23.5	23.8
31	23.4	23.9	23.5	23.5	23.7	24.9
32	24.1	24.3	23.7	23.9	24.4	23.5
33	24.0	23.8	23.4	23.5	23.6	23.6
計	790.9	795.3	793.6	789.7	796.8	798.6

3-3-3 ゲノムシークエンスの結果解析

3-3-3-1 抽出したゲノム DNA の精製度

mutation accumulation experiment によって植え継いだ株のグリセロールストックを使って大腸菌を培養し、ゲノム DNA を抽出した。その際のゲノム量は表 3-8 の通りであった。

表 3-8 抽出ゲノム量 (ng).

培地	遺伝子型と植継ぎ系列					
	$\Delta S 1$	$\Delta S 2$	$\Delta S 3$	$\Delta S Q 1$	$\Delta S Q 2$	$\Delta S Q 3$
LB	1,590	2,040	2,748	1,652	9,905	792
mM63+20AA	1,437	6,237	8,907	11,498	2,109	947
mM63	276	8,706	17,199	1,406	1,893	16,205

3-3-3-2 リード数の評価

シークエンスの解像度は、シークエンスのカバレッジによって設定できる。ここでのカバレッジとは、ある生物のゲノムのシークエンスを調べる場合、その生物のゲノムサイズの何倍量の情報が得られたのかという意味である。例えば、ゲノムに対して平均 20 倍のカバレッジで解析する場合は、各塩基に対応するリード数が平均 20 個あることを意味する。ある特定の領域を高解像度で解析したい場合は 1000 倍ものカバレッジを要することがあるが、ゲノム全体を調べたい場合は低いカバレッジで複数のサンプルを解析することが多い。植え継いだ大腸菌株の塩基あたりの平均のカバレッジは、図 3-4 と表 3-9 に示した。全サンプルで平均 10 以上のカバレッジを示していた。Phred クオリティの値を 100 に設定しており、これは 10^{10} 個の塩基のうち、1 個の確率で不正確な塩基が含まれているという意味であるため、カバレッジが 10 以上あれば十分に正確な解析ができると考えたためである。また、解析にはさらに、全リードのうち 90% 以上のリードに変異が発生しているとされた塩基しか使用していないため、10 リード以上あれば正確な解析はできていると考えられる。さらに、平均カバレッジ数が一番小さかった株において、読めていなかった塩基数のうち変異であった可能性のある塩基数を計算し、その後の解析には影響を与えないほどの小さい値であったことを確認している。また、リード長の平均値を表 3-10 に示した。

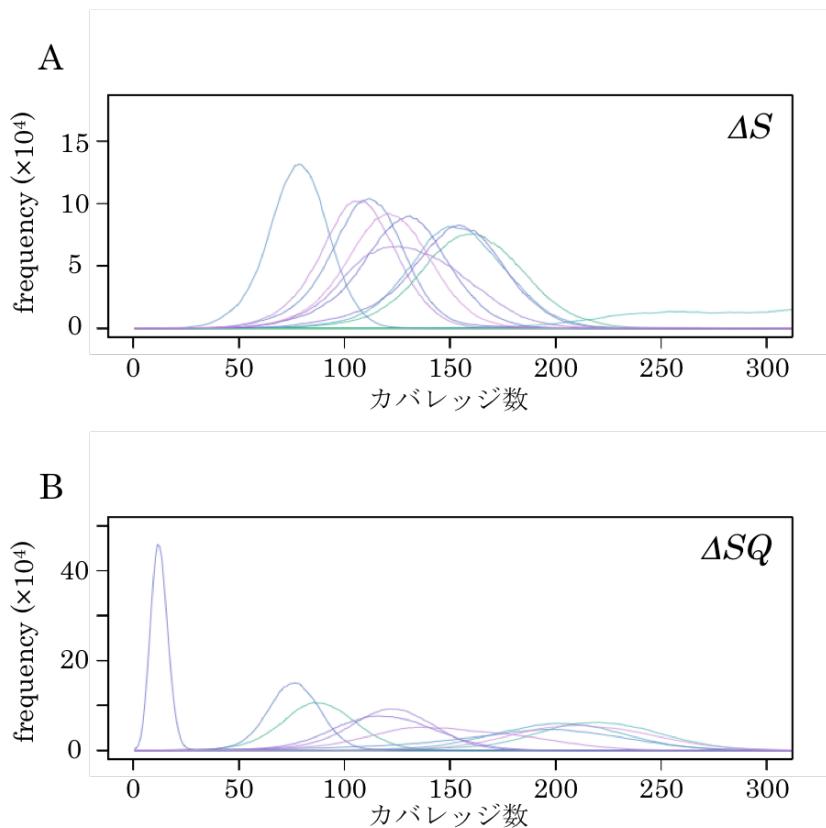


図 3-4 カバレッジの頻度.

1 塩基あたりのカバレッジ数を示している. 横軸がカバレッジの値, 縦軸が頻度である. (A) ΔS のカバレッジの頻度. (B) ΔSQ のカバレッジの頻度.

表 3-9 塩基あたりのカバレッジの平均値.

遺伝子型	使用培地と系列番号												
	LB			mM63 +20AA			mM63 +20AA			mM63 +20AA			祖先株
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
ΔS	110.5	127.6	151.4	160.4	349.4	152.9	130.0	106.2	121.5	78.2			
ΔSQ	76.4	119.2	12.9	219.0	200.8	184.5	121.9	149.7	212.7	88.2			

表 3-10 リード長の平均値. (bp)

遺伝子型	使用培地と系列番号												祖先株	
	LB			mM63 +20AA			mM63 +20AA			mM63 +20AA				
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
ΔS	229	164	229	251	251	251	251	184	181	181				
ΔSQ	232	165	228	232	244	230	183	194	230	188				

3-3-3-3 検出された変異

ゲノムシークエンスの結果、検出された変異は表 3-11 の通りである。リードのうち、どれか一つにでも参照配列と異なる塩基があれば、それは変異であるとしている。Phred クオリティスコアは 100 に設定した。

表 3-11 ゲノムシークエンスにより検出された変異の個数。

使用培地	遺伝子型	系列番号	base substitution															
			all mutations		All mutations (sufficient quality)		all		non coding		synonymous		stop codon		insertion		deletion	
			non	coding	non	synonymous	stop	codon	non	synonymous	stop	codon	insertion	deletion	non	2targets	Base	substitution
LB	ΔS	1	121	99	90	6	84	30	54	1	7	2	0	0	0	0	0	
		2	106	95	89	12	77	20	57	3	4	1	0	1	0	1	0	
		3	96	85	76	6	70	25	43	2	2	6	0	0	0	1		
	ΔSQ	1	3439	3147	2424	260	2164	705	1450	59	142	481	5	59	36			
		2	2064	1877	1382	170	1212	406	800	42	110	274	5	37	69			
		3	2348	1543	1256	147	1109	371	732	39	69	160	8	44	6			
mM63 +20AA	ΔS	1	34	29	26	3	23	8	15	1	1	0	0	0	0	2		
		2	40	37	34	2	32	9	23	0	0	2	0	0	0	1		
		3	53	48	41	6	35	11	23	0	5	1	0	0	1			
	ΔSQ	1	1712	1660	1145	146	999	312	676	38	94	287	3	8	123			
		2	1737	1634	1147	139	1008	328	674	38	92	252	0	9	134			
		3	1508	1421	984	122	862	257	601	37	84	263	2	10	78			
mM63	ΔS	1	56	43	39	3	36	11	25	0	3	1	0	0	0	0		
		2	60	48	40	6	34	9	23	1	2	4	0	2	0			
		3	57	48	42	5	37	10	25	0	2	1	0	2	1			
	ΔSQ	1	3264	3007	2211	251	1960	601	1345	61	170	459	10	98	59			
		2	2217	2071	1489	179	1310	438	867	47	131	318	7	38	88			
		3	2655	2563	1967	225	1742	533	1195	65	137	334	3	10	112			
ΔS 祖先株		10	2	7	0	7	2	5	0	1	0	0	0	0	0			
ΔSQ 祖先株		961	385	493	54	439	145	290	10	23	55	0	4	1				

3-3-3-4 コンタミネーションの有無の確認

mutation accumulation experiment によって大腸菌を植え継いだが、植継ぎの途中で異なる株が混在してしまっている（コンタミネーション）可能性がある。コンタミネーションの有無を確認するため、それぞれの株で共通する変異の数を評価した（表3-12, 3-13）。また、祖先株から受け継いでいる変異の数も特定した。もしコンタミネーションがあれば、祖先株から受け継いでいる変異を除いた場合の、共通する変異の数が多く存在するはずである。結果は、 ΔSQ において、LB 培地の系列 2 と mM63 培地の系列 2 において共通する変異が 1791 個あり、そのうち ΔSQ の祖先株と共通する変異は 188 個であったため、これら 2 つの系列はコンタミネーションしていることが考えられる。以降の解析では、この 2 つの株は除いている。

表 3-12 ΔS における各植継ぎ株における共通する変異の数.

使用培地と 系列番号	使用培地と系列番号								
	LB 1	LB 2	LB 3	mM63+ 20AA 1	mM63+ 20AA 2	mM63+ 20AA 3	mM63 1	mM63 2	mM63 3
LB 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB 2	7/7	-	-	-	-	-	-	-	-
LB 3	7/7	7/8	-	-	-	-	-	-	-
mM63+20AA 1	7/7	7/7	7/7	-	-	-	-	-	-
mM63+20AA 2	6/6	6/6	6/7	6/7	-	-	-	-	-
mM63+20AA 3	7/7	7/7	7/7	7/8	6/7	-	-	-	-
mM631	7/7	7/7	7/7	7/7	6/6	7/7	-	-	-
mM632	7/7	7/7	7/7	7/7	6/6	7/7	7/9	-	-
mM633	7/7	7/7	7/7	7/8	6/7	7/8	7/7	7/7	-

左側に祖先株から受け継いでいる変異の数を、右側に2つの植継ぎ株に共通する変異の数を示している。

表 3-13 ΔSQ における各植継ぎ株における共通する変異の数.

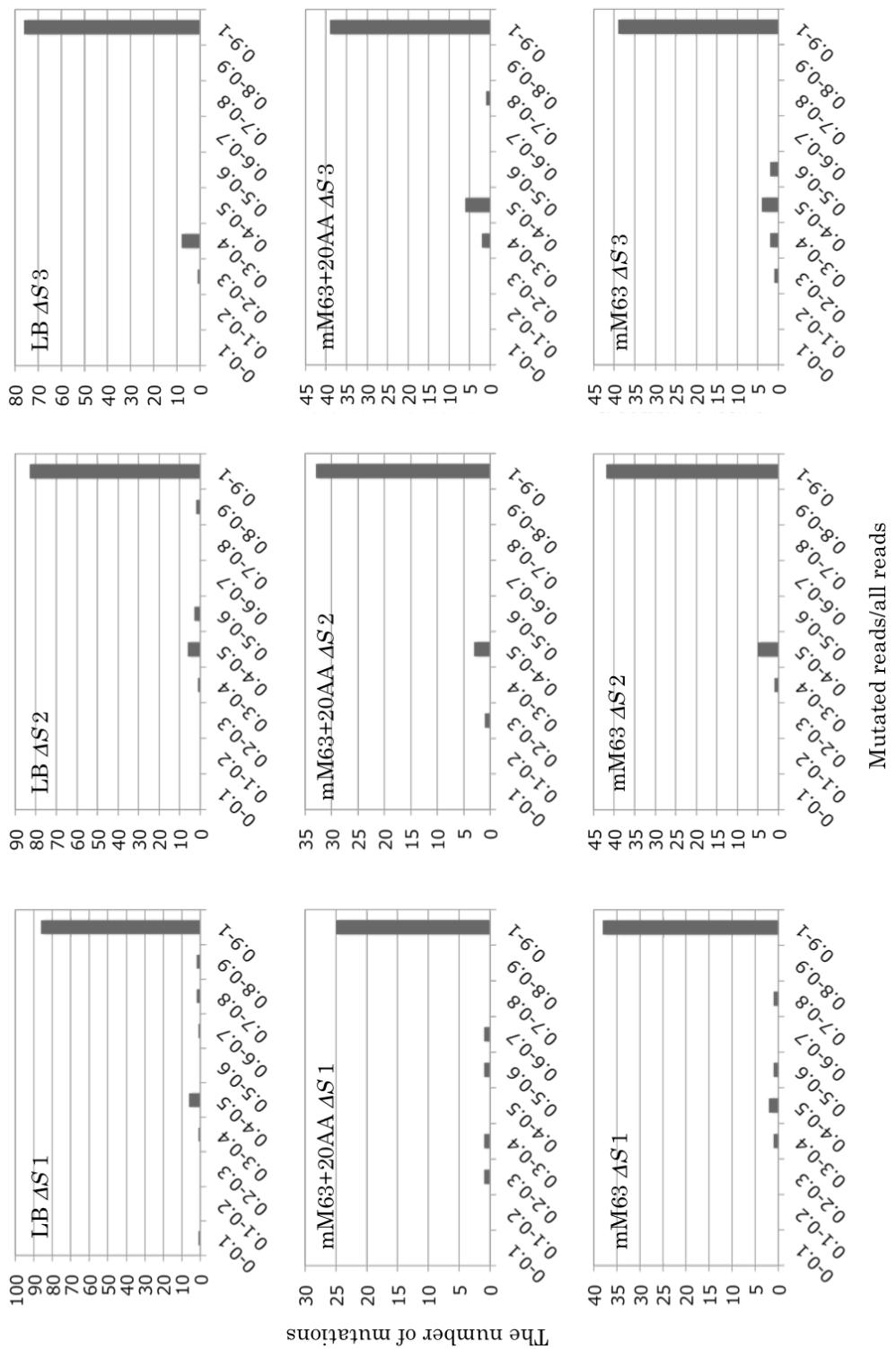
使用培地と 系列番号	使用培地と系列番号								
	LB 1	LB 2	LB 3	mM63+ 20AA 1	mM63+ 20AA 2	mM63+ 20AA 3	mM63 1	mM63 2	mM63 3
LB 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB 2	136/204	-	-	-	-	-	-	-	-
LB 3	129/180	153/219	-	-	-	-	-	-	-
mM63+20AA 1	46/46	54/67	47/51	-	-	-	-	-	-
mM63+20AA 2	46/47	56/70	49/53	351/448	-	-	-	-	-
mM63+20AA 3	46/47	55/69	47/49	352/443	359/460	-	-	-	-
mM631	46/47	57/67	49/51	351/432	346/443	357/448	-	-	-
mM632	136/206	188/179 1	153/218	54/73	56/79	55/74	57/73	-	-
mM633	46/47	56/71	49/52	349/448	351/455	353/450	352/440	56/76	-

左側に祖先株から受け継いでいる変異の数を、右側に2つの植継ぎ株に共通する変異の数を示している。

3-3-3-5 使用するデータの選出

解析に使用するデータの選定を行うために、全てのリードのうち、どれくらいの割合で変異の入ったリードが検出されているのかを調べた（図 3-5）。その結果、ほとんどが 0.9 以上であったが、0.4-0.5 の変異の数も多かった。これは、ゲノム抽出の際にいった変異であると考えられる。より正確な解析を行うため、0.9 以上の値を示す変異のみを以降の解析で使用した。また、0.5 以上のデータを使用しても以降の解析で同様の結果が得られている。

A



B

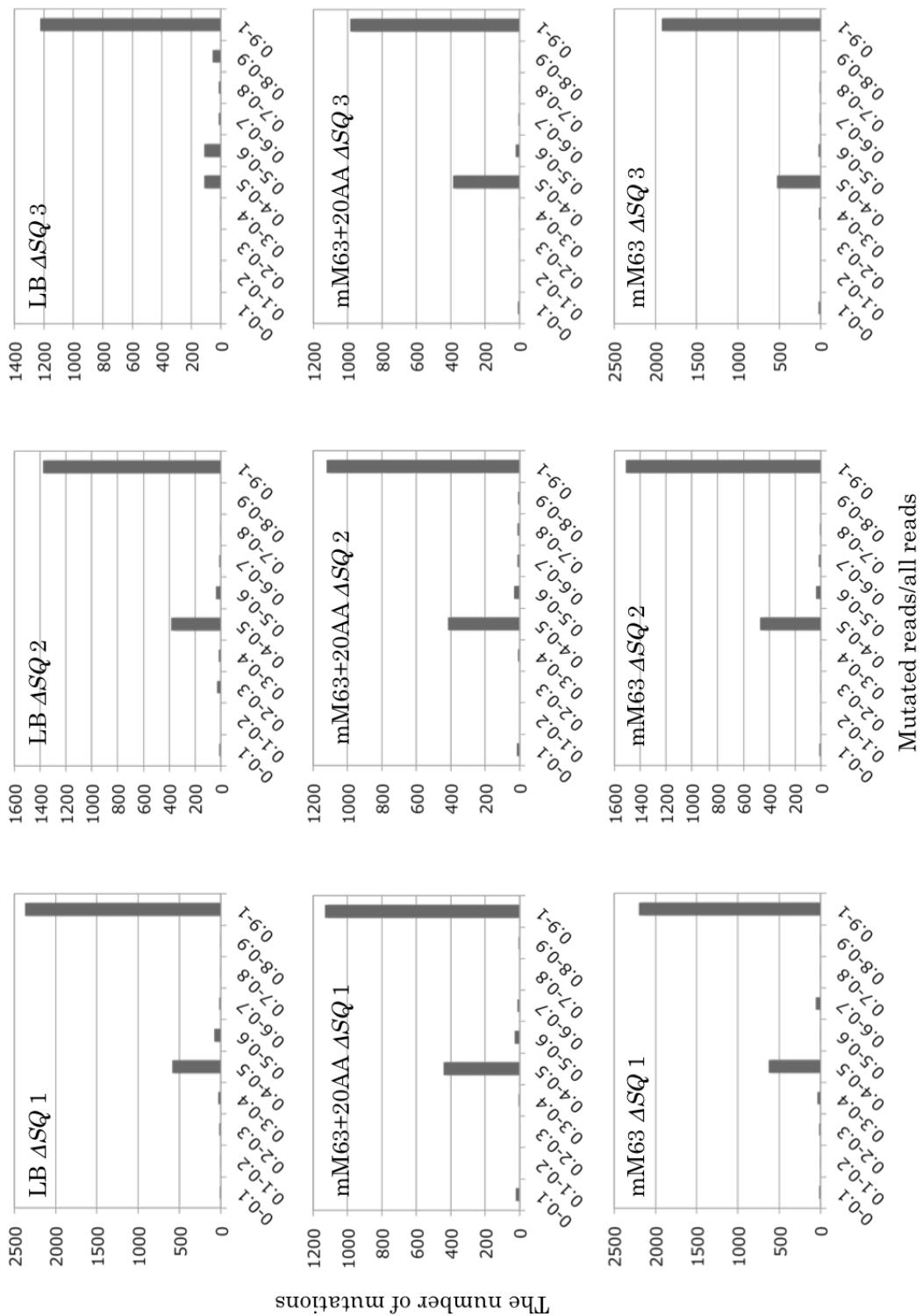


図 3-5 リードの割合の分布. 横軸は全てのリードのうちの、変異が入っていたリードの割合、縦軸は変異の数を示している。(A) ΔS . (B) ΔSQ . 数字は系列番号である.

3-3-3-6 変異率

ゲノムシークエンスで得られた変異の数と植継ぎ期間中の経過世代数から、同義置換の変異率を算出した。同義置換から変異率を測定する方法は一般的であり、選択がかかっていないと考えられるため、正確に変異率を計算できる方法として知られている。変異率は、選択が掛からない状態での値が知りたいので、全ての変異の情報ではなく同義置換の情報のみを使用した。変異率を算出した式は以下の通りである。変異率を m 、同義置換の数を Syn 、同義置換の発生する確率を P_{syn} 、全ゲノムに対する遺伝子がコードされている割合を R 、世代数を G 、ゲノムサイズを S とする。

$$m = \frac{Syn}{P(syn) \times R \times G \times S} \quad (\text{式 3-3}).$$

結果を図 3-6A に示す。赤は ΔS を、青は ΔSQ を示している。 ΔSQ は栄養条件間で有意な違いは見られなかったのに対し、 ΔS は LB 培地での変異率が mM63+20AA 培地と mM63 培地での変異率に比べてどちらも 2.7 倍高かった。抗生物質耐性から求めた変異率は図 3-6B に示す。 ΔSQ は栄養条件間で有意な違いは見られなかったのに対し、 ΔS は LB 培地での変異率が mM63+20AA 培地に比べて 11.1 倍高く、mM63 培地と比べた場合は 6.9 倍高かった。差の大きさは異なっていたが、栄養条件に対する変異率の変化の傾向はとても良く似ていた。また、変異率の大きさは、それぞれの測定方法で単位が異なるため、直接比較することはできない。

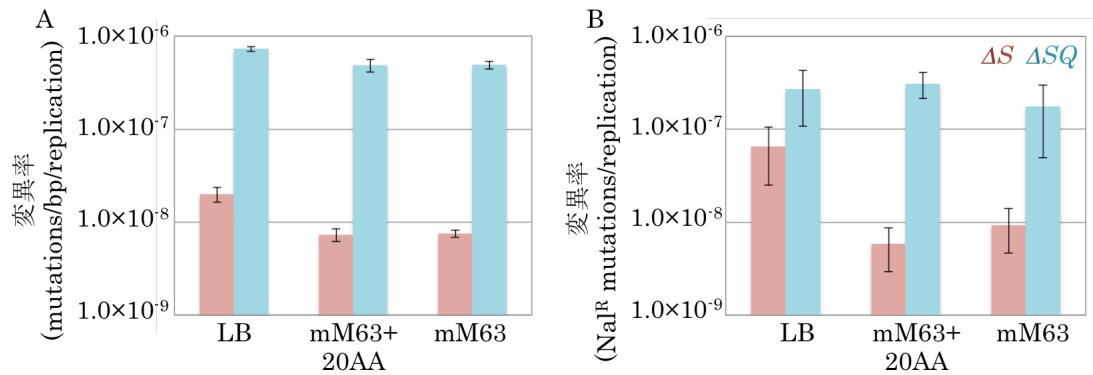


図 3-6 同義置換の変異率.

横軸は植継ぎ時の栄養条件を、縦軸は変異率を示している。赤のバーは ΔS 、青のバーは ΔSQ の結果である。(A) ゲノムシークエンスによって測定した変異率の結果を示している。 p 値は ΔS では、LB 培地と mM63+20AA 培地では 0.05, LB 培地と mM63 培地では 0.03, mM63+20AA 培地と mM63 培地では 0.89 である。 ΔSQ ではそれぞれ、0.28, 0.23, 0.62 である。(B) 抗生物質耐性を獲得する頻度によって測定した変異率の結果を示している。 p 値は ΔS では、LB 培地と mM63+20AA 培地では 0.03, LB 培地と mM63 培地では 0.03, mM63+20AA 培地と mM63 培地では 0.06 である。 ΔSQ ではそれぞれ、0.19, 0.63, 0.01 である。

3-3-3-7 Ka/Ks

次に、変異率は同義置換から求めているが、本研究で重要なのはゲノム全体の平均的な変異率である。そのため、非同義置換でも同じ確率で変異が発生し、固定されたのかを確かめる必要がある。そこで、本研究では同義置換と非同義置換が同程度の確率で発生し、固定されたのかを確かめるために、ゲノムシークエンスの結果から K_a/K_s を算出した [56]。1よりも大きい場合は非同義置換の方が発生確率が高いので、正の選択が働いている。逆に、1よりも小さい場合は同義置換の方が発生確率が高いので、負の選択が働いていることを示す。ゲノムシークエンスから得られた結果から算出した K_a/K_s は図 3-7 に示している。どちらの遺伝子型も、栄養条件にかかわらず K_a/K_s は1に近く、有意に K_a/K_s に差のあったものは無かった。従って、非同義置換と同義置換で変異の発生確率に違いは無く、選択がかからず変異が固定されたことを確かめることができた。つまり、同義置換での変異率だけでなく、全ゲノムの平均的な変異率に、栄養条件に対する依存性を確認できた。

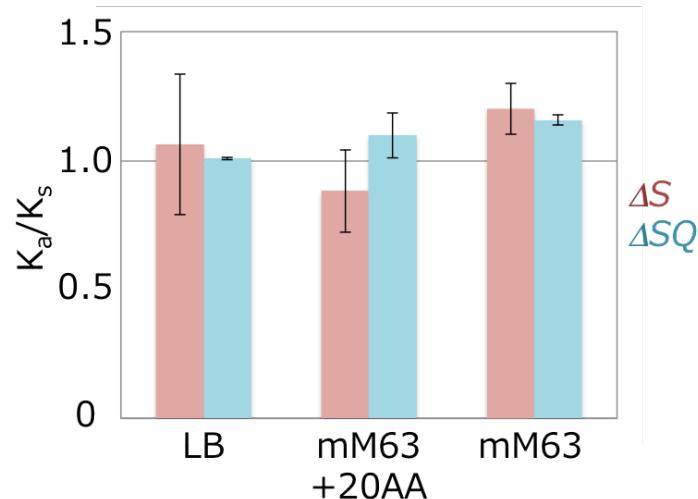


図 3-7 Ka/Ks.

横軸は植継ぎ時の栄養条件を、縦軸は K_a/K_s を示している。赤のバーは ΔS 、青のバーは ΔSQ の結果である。p 値は LB 培地と mM63+20AA 培地では 0.25、LB 培地と mM63 培地では 0.48、mM63+20AA 培地と mM63+20AA 培地+20AA では 0.03 である。 ΔSQ ではそれぞれ、0.26, 0.11, 0.89 である。

3-3-3-8 transitions と transversions

変異率が栄養条件によって異なっていたが、発生した変異に偏りがあるのか、それとも変異の種類に関係無く、どの変異も同様に変異率が変化しているのかはわからない。もし変異の種類に栄養依存的な偏りがあれば、それが原因で栄養条件依存的な変異率の違いが観察された可能性がある。そこで、発生した変異に偏りがあるのかを調べるために、transition と transversion の割合をゲノムシークエンスの結果から算出した。transition と transversion は塩基置換の種類であり、DNA の塩基はプリン塩基とピリミジン塩基に分けられるが、同じ種類の塩基に変化する塩基置換は transition と呼ばれ（例えば、プリン塩基であるアデニンからグアニンへの塩基置換）、異なる種類の塩基に変化する塩基置換は transversion と呼ばれる（例えば、プリン塩基であるアデニンからピリミジン塩基であるシトシンへの塩基置換）（図 3-8）。変異の種類に偏りがあれば、それらの割合は栄養条件に依存した違いが観察されるはずである。結果は、図 3-9 に示しているように、栄養条件の違いに依存した有意な違いは見られなかった。従って、塩基置換に偏りは無く、transition と transversion は同程度ずつ栄養条件に依存して変異率が変化しているのだと考えられる。

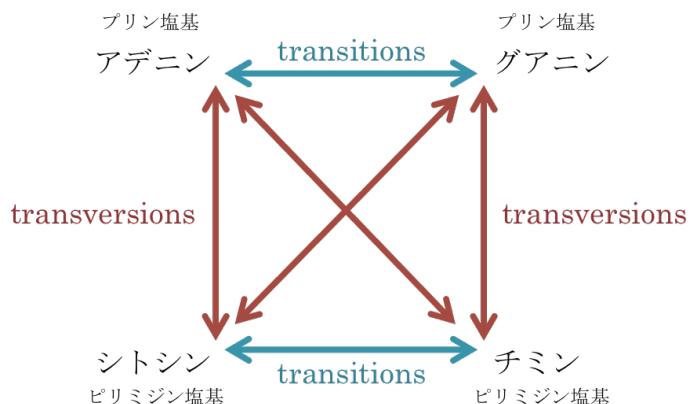


図 3-8 transition と transversion.

プリン塩基同士、ピリミジン塩基同士の塩基置換は transition と呼ばれ、プリン塩基とピリミジン塩基間で起こる塩基置換は transversion と呼ばれる。アデニンとグアニンはプリン塩基、シトシンとチミンはピリミジン塩基である。

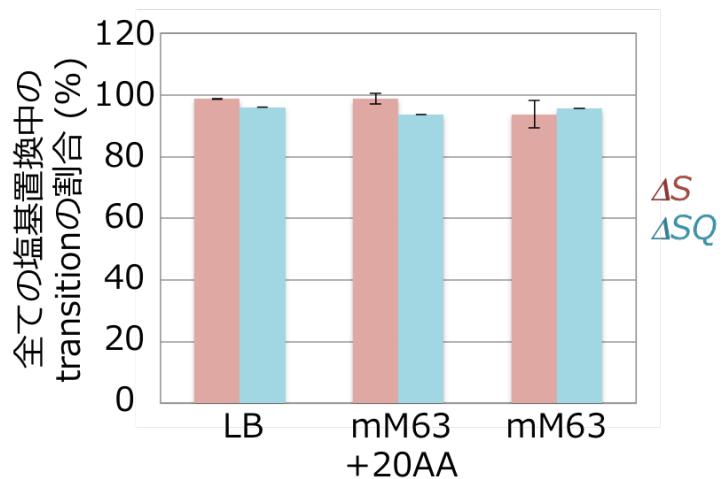


図 3-9 全ての塩基置換のうちの, transition が占める割合.

横軸は植継ぎ時の栄養条件を, 縦軸は全ての塩基置換中の transition の割合を示している. 赤のバーは ΔS , 青のバーは ΔSQ の結果である. p 値は ΔS では, LB 培地と mM63+20AA 培地では 0.96, LB 培地と mM63 培地では 0.25, mM63+20AA 培地と mM63 培地では 0.33 である. ΔSQ ではそれぞれ, 0.13, 0.60, 0.09 である.

3-3-4 植継ぎ株の増殖速度

植え継いだ株の形質が変化しているのかを確かめるために、増殖速度を測定した。 ΔS はそれほど大きな変化は無かったが、 ΔSQ は、植継ぎ株は祖先株に比べて増殖速度は大きく低下していた(図 3-10)。変異が多く発生したために増殖速度が低下したのだと考えられる。

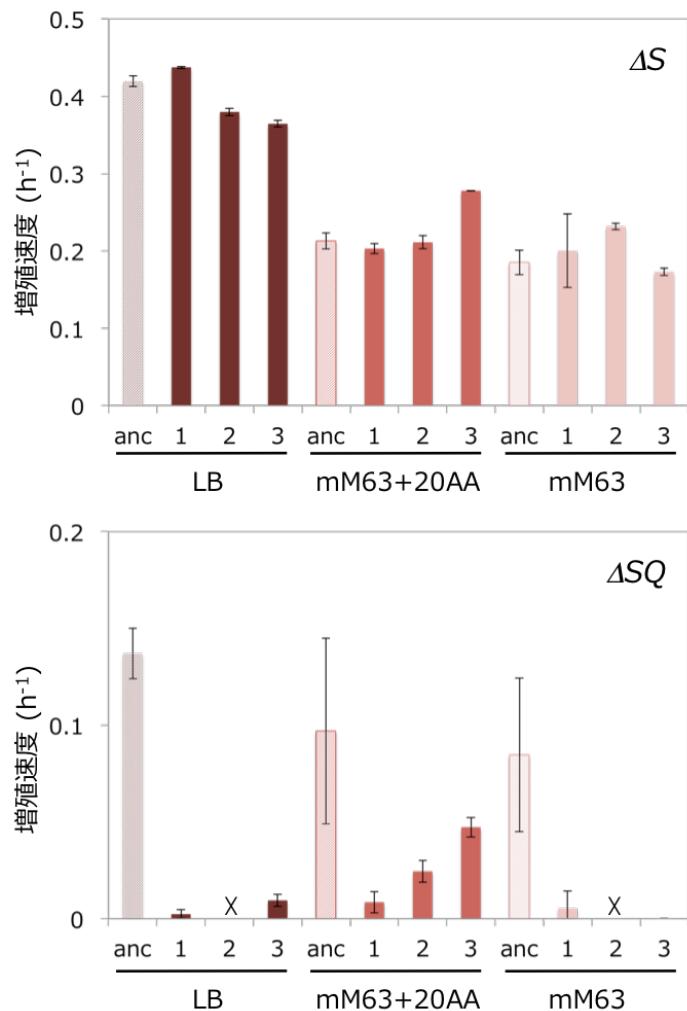


図 3-10 植継ぎ株の増殖速度。

上図は ΔS を、下図は ΔSQ の増殖速度を示している。濃い赤のバーはLB培地で植え継いだ株、薄い赤のバーは mM63+20AA 培地で植え継いだ株、ピンク色のバーは mM63 培地で植え継いだ株の結果である。網掛けは祖先株を、数字は系列番号である。エラーバーは3回の実験の標準偏差である。

3-4 考察

2章で栄養条件によって変異率が異なることが明らかとなつたが、その変異率は抗生物質耐性を獲得するときに関与する遺伝子の形質でしか観察できていない。ゲノム全体に発生する変異の変異率でも同様の傾向が得られるのか、また、形質から間接的に変異率を測定しているため、実際に塩基配列に変化が起こっているのかはわからない。そこで本章では、変異を十分に蓄積させた大腸菌 (ΔS , ΔSQ) を用い、ゲノムシークエンスによって蓄積した変異の箇所を特定することで変異率を測定した。その結果、 ΔS では LB 培地での変異率が他 2つの培地よりも高く、 ΔSQ では栄養条件依存性は観察されなかつたというように、栄養条件に対する依存性は一致していた(図 3-6)。従って、抗生物質耐性から得られた変異率が、塩基変異及びゲノムレベルで担保されていることが示された。また、塩基置換の種類である transition と transversion の割合を調べたところ、培地間の有意な差は見られなかつた(図 3-9)。そのことから、transition や transversion のどちらかの変異率ばかりが大きく変化するということではなく、ランダムに変異率が栄養条件に依存して変化していることが示唆された。

Mutation accumulation experiment によってコロニーを植継いだが、植継ぎ過程で変異が生じることで変異率自体が変化している可能性も考えられる。まず、 ΔS は植継ぎ後の株で変異率を測定したが、植継ぎ前の値と有意な差は無かつた。変異率に差がなければ、変異はランダムに起こるので線形に変異は蓄積していると考えられる。 ΔSQ に関しては、変異率を測定できなかつたが、計算上は変異率が変化していないと考えている。例えば、変異率を大きく見積もつて 10^{-6} (bp/replication)としたとき、ある塩基で 1 世代に変異が起こる確率は 10^{-6} である。800 世代(本研究では最大約 800 世代植継いだ) 植継ぐと、その塩基に変異が起こるのは $10^{-6} \times 800$ なので、 8×10^{-4} となる。従って、変異が発生すると変異率を変化させる塩基が仮に $1/(8 \times 10^{-4}) = 1.25 \times 10^3$ 個あれば、確率的に植え継いでいる間に変異率を変化させる変異が 1つ発生していることになる。しかし、実際は変異率を変化させる遺伝子座が 1 ゲノムの中に 1.25×10^3 個あることは考えにくいため、本実験で植え継いでいる間に変異率が変化する可能性は低いと考えられる。

変異率の大きさや培地間の差には変異率の測定方法による違いがあつた。なぜこのような違いが生じたのであろうか。まず、 ΔS の培地間での変異率の差に着目する。ゲノムシークエンスで求めた変異率は、LB 培地と他 2つの培地の変異率の差は 2.7 倍だったのに対し、抗生物質耐性で測定した場合は LB 培地での変異率が mM63+20AA 培地に比べて 11.1 倍高く、mM63 培地と比べた場合は 6.9 倍高かつた。つまり、ゲノムシークエンスの方が LB 培地と他の培地との変異率の差が小さくなつた。これは、2章の考察で記

述した選択の効果（1つ目の仮説）によって生じた差である可能性がある。抗生物質耐性で変異率を測定したときは、集団の大きさが大きいために選択の効果が働いていたことが予想されるが、mutation accumulation experiment では選択がほとんどかかっていないことが予想され、実際に選択の効果は見られなかった（図 3-7）。つまり、抗生物質耐性で測定したときは、選択の効果によって LB 培地に比べて他 2 つの培地の方が変異率の低い個体が選択され、集団の平均の変異率が結果的に低く測定されたのではないかと考えられる。また、抗生物質耐性遺伝子と、ゲノム全体の遺伝子で、栄養条件依存性の強さがそもそも異なるということも考えられる。そして次に、変異率の大きさについて議論する。2 章の変異率と 3 章の変異率は、単位が異なるので全く同じものであるというわけではない。2 章の変異率の測定方法では、変異が発生することで抗生物質耐性をもたらす遺伝子座が複数あることが考えられ、その数については諸説あるため、1 回分裂するときに塩基あたりに発生する変異率としては正確に求めることができない。3 章での変異率は、1 回分裂するときに塩基あたりに発生する変異率であり、2 章と 3 章の変異率の絶対値は対応しておらず、絶対値で比較することはできない。

変異率が栄養条件によって異なることの要因として、4 つ考えられることを 2 章の考察で記した。そのうち仮説 1 と仮説 2 について、3 章で得られた結果を用いて考察する。1 つ目の仮説は、集団内の個体によって変異率が異なり、貧栄養培地では変異率の低い個体が選択されることによって、集団の平均の変異率が低くなっている可能性があるという仮説である。2 つ目は、DNA 修復関連遺伝子の活性や酵素の発現量が栄養条件に依存して変化している可能性である。

まず 1 つ目の仮説から検証する。もし変異率の違いによる選択が働いている場合、高変異率の個体は増殖速度に対して悪影響を及ぼす変異が入り、低変異率の個体ではそのような変異が入りにくいため、低変異率の個体が競争に勝つという現象が起こっていると考えられる。さらに、栄養条件が貧しい mM63 培地や mM63+20AA 培地では LB 培地よりも、負の選択が大きくなっているはずである。逆に、もし選択のかからない環境で培養すれば栄養条件に依存して変異率に差は見られないことが予想される。mutation accumulation experiment で選択が働いているのかを示す指標である Ka/Ks では、本研究ではどの栄養条件でも 1 に近かったため、ほとんど選択の効果は働いていないと考えられる（図 3-6）。従って、変異率の栄養条件依存性が選択の効果から生じているのであれば、mutation accumulation とゲノムシークエンスから求めた変異率には栄養条件依存性は見られないはずである。しかし、実際に得られた結果には、栄養条件依存性が観察されたため、この仮説では説明できないことがわかった。

次に仮説 2 について考察する。DNA 修復関連遺伝子のうち、ミスマッチリペア

がうまく機能しない場合、塩基置換のうち transversion に比べて transition の変異の割合が多くなることが先行研究から示唆されている [52]。もしミスマッチリペアの発現量が栄養条件に依存して変化するのであれば、栄養条件に依存した transition の割合の違いも観察されるだろうと考えた。また、ミスマッチリペア以外の変異修復関連遺伝子の活性が変化しても transition や transversion の変異の入り方にバイアスがかかる可能性もある。そこで、ゲノムシークエンスの結果から transition の割合を算出した。その結果、transition の割合に栄養条件依存的な違いは観察されなかった（図 3-9）。従って、ミスマッチリペアの活性や酵素の発現量が栄養依存的に変化していることは無いことがわかった。しかし、ミスマッチリペア以外の変異修復関連遺伝子の活性や発現量が変化することで栄養条件依存的な変異率が観察されている可能性は考えられる。

以上より、仮説 1 は妥当ではなく、仮説 2 のみが栄養依存的変異率の違いの原因としての可能性が残っている。変異修復関連遺伝子の活性や発現量が変化している可能性をより追求するためには、ウエスタンブロッティングでタンパク質の発現量を調べたり、変異修復活性を調べる必要がある。

3-5 結論

本章では、栄養条件依存的な変異率が、ナリジキシン酸耐性の獲得に関わる遺伝子の表現形の変化として現れるだけでなく、ゲノム全体において塩基変異が同様の栄養条件依存性をもって現れることを示した。つまり、第2章の結論が塩基変異及びゲノムレベルで担保されていることを示した。また、選択の効果によって変異率が栄養条件依存性を持っていたのではなく、分子レベルで変異率が変化していることを示した。方法は、異なる栄養条件 (LB 培地, mM63+20AA 培地, mM63 培地) で継代し、十分に変異を蓄積させたあと、ゲノムシークエンスによって蓄積した変異の数と種類を特定することでゲノム変異率を測定した。この実験には、栄養条件に依存して変異率の異なる ΔS と、栄養条件が違っても変異率は同じであった ΔSQ を使用した。

第 4 章 結言

生物集団の適応進化の予測や制御を目指す上で, mutator の増殖負荷や変異率の理解は必須である。mutator の変異率は一定でなく, 栄養条件依存的に変化することが一部の mutator で示されているが, 様々な mutator においても同様の傾向が見られるのかはわかっていない。さらに, 増殖負荷も栄養条件によって変化し得ることが示唆されているが, 不明なままである。また, 先行研究では特定の遺伝子に発生する変異から生じる形質の変化から変異率を測定していたが, その方法ではゲノム全体で同じ確率で変異が発生するとは限らず, 実際に塩基置換が起こっているかも不明である。そこで, 本研究では様々な mutator 大腸菌を調べ, 増殖負荷と変異率が栄養条件依存的にどのように変化するのかと, ゲノムシークエンスで変異の位置を特定することで正確な変異率を測定し, 疑問を解明することを目的とした。

第 2 章では, 複数の mutator において, 変異率と増殖負荷に栄養条件依存性があることを示した。ミスマッチリペアやプルーフリーディング機構などの変異を修復する遺伝子を, 単独または複数欠損させることで, 17 種類の mutator を作製した。それらの変異率と増殖速度を栄養条件の異なる 3 つの培地 (LB 培地, mM63+20AA 培地, mM63 培地) で測定し, 野生株の値との違いを定量化した。その値を栄養条件間で比較し, mutator の増殖速度と変異率の大きさが栄養条件依存的に変化しているのかを評価した。ここでは変異率の測定方法は伝統的なものを採用しており, 抗生物質 (ナリジキシン酸) に対する耐性を獲得する確率を指標にしたものである。その結果, 増殖速度に関しては, LB 培地とその他 2 つの LB 培地よりも栄養が少ない培地を比較した場合, mutator の富栄養条件における増殖速度の低下は貧栄養条件に比べて小さくなっていた。細胞を個体別にみると, 中には, LB 培地は他の培地に比べて, mutator の増殖速度低下が約 10 分の 1 近くにまで抑えられているものがあった。また, mM63+20AA 培地と mM63 培地を比べた結果, ほとんど差が無かったことから 20 アミノ酸の添加は増殖速度の低下にほとんど影響を与えていないと言える。つまり, 豊富な栄養は変異による悪影響を緩和する効果があることが示唆された。有害変異が必ずしも代謝に関与するとは限らないにも関わらず, 有害変異が栄養によって緩和され, 増殖負荷が小さくなることを示したことは本研究による新たな発見である。有害変異の多くが代謝に関わっていることを示唆している。また, アミノ酸の添加だけでは代謝プロセスに対する関与が弱いことも示唆された。次に, 変異率に関しては, LB 培地とその他 2 つの栄養条件を比較した場合, 富栄養培地である LB 培地の方が変異率の上昇が大きくなっているこ

とがわかった。また、変異率の場合も 20 アミノ酸の添加は増殖速度の低下にほとんど影響を与えていなかった。つまり、先行研究で示唆されていたように、大きな傾向としては *mutator* の変異率は栄養条件に依存して変化するが、個体を個別にみてみると栄養条件に依存しない *mutator* もいることを本研究で初めて示した。また、栄養条件によって増殖負荷が増減するのか、変化しないのか、一般的に言えることは先行研究では明らかになっていたが、本研究によって *mutator* の場合は大きな傾向として栄養条件が豊富になるほど増殖負荷が現状していることが明らかになった。さらに、貧栄養条件の方が *mutator* の増殖負荷が大きくなることから、野生株と共存している場合は *mutator* の割合が貧栄養条件ほど小さくなり、富栄養条件よりも有益変異を獲得しにくくなることを示した。つまり、同じ種類の *mutator* でも栄養条件が異なれば、集団の適応を促進する効果には差が生じることを示している。十分に高い変異率を持ち、集団内に十分な頻度で存在する *mutator* が現れる富栄養条件では、そうではない貧栄養条件に比べて、有益変異を獲得する確率が高いために、集団全体の適応を促進する効果が大きいことが示された。

第 3 章では、変異率が栄養条件依存的に変化することを、ナリジキシン酸耐性に関わる遺伝子の表現形の変化でのみ現れるのではなく、実際にゲノム全体に塩基変異が入る確率からも示した。ゲノムの位置によって変異の発生確率が異なると報告されているが、その影響はほとんど無いと考えられる。3 つの栄養条件 (LB 培地, mM63+20AA 培地, mM63 培地)において、 ΔS と ΔSQ の 2 種類の *mutator* を継代培養し、十分に変異を蓄積させたあと、ゲノムシークエンスによって変異の数や種類を特定した。ゲノムシークエンスの結果からゲノムの同義置換の変異率を算出したところ、 ΔS では LB 培地での変異率がほかの 2 つの培地での値に比べて有意に高く、 ΔSQ では栄養条件に関わらず変異率は一定であった。つまり、変異率の栄養条件に対する傾向が一致していた。そのため、形質から間接的に求めた変異率は、ゲノムに実際に発生している変異の発生確率の栄養条件に対する傾向を反映していると考えられる。この変異率は同義置換の変異率であり、本研究ではゲノム全体の変異率を求めることが重要なので、非同義置換と同義置換が同確率で発生していたのかを確かめる必要がある。そこで、 Ka/Ks の値を求めた。 Ka/Ks は、同義置換と非同義置換が発生する確率が一致しており、それら変異が選択がかからず固定されていれば 1 となる。結果は、どの環境、遺伝子型でもほとんど 1 であり、発生した同義置換と非同義置換の確率は同じであり、選択の力もほとんどかかっておらずほとんどの変異が固定されていたことが確かめられた。また、発生した置換に栄養条件依存的な違いがあるのかを調べるために、transition

と transversion の割合を算出した。その結果、栄養条件に依存した置換の種類の変化は観察されなかった。したがって、栄養条件によって変異率は変化する株があるが、発生する置換の種類によってその発生確率が異なるということではなく、transition も transversion も同程度ずつ変異率が変化していることが明らかになった。

以上の 2 章および 3 章の結論をまとめると、mutator の栄養条件依存性について以下の 2 つのことが導き出せる。第一に、mutator 全体の傾向から、富栄養条件の方が、変異率が高い mutator が集団内で高い頻度で存在できると考えられる。高い変異率の証拠として、貧栄養条件に比べて富栄養条件では変異率が高くなる mutator が多く観察された（2 章）。この性質は、指標とした薬剤耐性の表現型においてのみ見られる特殊なものでなく、ゲノム上の多くの遺伝子に当てはまっていた（3 章）。さらに、栄養条件によって変異率が異なるのは、塩基置換バイアス（transition と transversion の比率）のみが変化するという事象によるものではなく、塩基置換変異が生じる確率が増加するという単純な性質によるものであるという実験結果を得た（3 章）。集団内の mutator の高い存在頻度を支持する実験証拠としては、野生株と比較したときの増殖負荷の大きさが、富栄養環境では小さくなることを観察している（2 章）。これらのことから、貧栄養条件よりも富栄養条件の方が、mutator の変異率が高くなり、増殖負荷のそもそも少ない野生株が混在した集団内でも、絶滅しにくく高頻度で存在できることが示唆された。第二に、mutator 個別の性質から、適応を促進できる mutator は環境によって異なる可能性が考えられる。その根拠として、栄養条件の違いによる変異率の変化量は一定ではなく、mutator ごとに大きく異なっていた（2 章、3 章）。また、mutator によっては、栄養条件によらず、ほぼ同じ変異率を示していた（2 章、3 章）。栄養条件の違いによる増殖負荷の変化量もやはり一定ではなく、mutator ごとに大きく異なっていた（2 章）。つまり、全体の傾向はみられるものの、増殖負荷と変異率の栄養条件の違いによる変化量は、いずれも mutator によって大きく異なっていた。この個別の違いは、集団内のその mutator の役割を少なからず左右すると考えられる。増殖負荷の大きさは mutator の存在頻度を、変異率の大きさは有益変異の発生確率をそれぞれ左右するであろう。従って、どの mutator も一様に適応を促進できるわけではなく、十分な存在頻度・変異率をもつ mutator のみが、その環境での適応進化を促進できると考えられる。すなわち、適応を促進できる mutator は環境によって異なる可能性が示唆される。以上の二点から、集団の適応に果たす mutator の役割としては、富栄養条件の方が mutator による適応進化を促進するが、その程度は mutator の種類に依存することが推察される。

本研究で得られた結果は、生物集団の適応進化の予測や制御を目指す上で軽視できないと考えられる。本研究で作成した *mutator* の多くで、栄養条件が豊富なほど増殖負荷が小さく、変異率が高かった。栄養条件が豊富な方が適応進化を促進できることを示唆している。つまり、栄養条件を調節することでこれまで発見出来なかった希少な遺伝子変異の探索や、有害な変異を持つ変異体の出現を抑えることが可能になるとと考えられる。例えば、進化工学と呼ばれる分野では、変異がランダムに発生することを利用して出来るだけ多様な機能や性質を持つ変異体を作り出し、その中から欲しい機能を獲得している変異体を単離することで、有益物質が作成されている。しかし、変異率の低い野生株を使用していっては長い時間がかかる。そこで *mutator* を使用すれば、変異率は 10 倍～1000 倍高いため、10 倍～1000 倍高い可能性で目的物質を得ることができる。変異を 2 つ以上獲得しなければ目的物質を得られない場合はなおさら大きな効果があるだろう。本研究で、*mutator* は栄養条件が豊富な方が増殖負荷が小さく、さらに変異率も高いことが明らかになったため、より効果的に *mutator* を使用する条件を発見できた。進化工学で *mutator* を使用する場合、出来るだけ栄養条件を豊富にすれば、変異率を最大化させ、増殖負荷を最小化することができるため、効率的に目的の変異を獲得した細胞を得ることができるだろう。また、メタゲノムという分野でも応用することができると考えている。環境中から採取した生物集団の構成を調べる際、その集団の遺伝子が培養中に変化してしまっては、正確な解析をすることができない。そこで、本研究の結果を応用し、なるべく栄養条件を乏しくしておけば、変異率を低く保つことができ、増殖速度も低いのでゲノムの複製回数も少なくて済み、変異が発生しにくくなる。そうすれば、解析は容易になると予想される。また、抗生物質耐性菌が生じたとしても、変異率を低く抑えることでその蔓延を抑えることが期待される。このように、本研究の結果から、培地の栄養条件を調節することで、生物集団の適応進化の予測や制御に貢献できると考えられる。

最後に、今後の課題について述べる。栄養条件に伴う増殖速度や変異率の変化量は、*mutator* の遺伝子型毎に異なっていた。その中には、増殖速度の変化量は小さいが変異率が大きく変化するタイプ (A) や、変異率はほとんど変化しないが増殖速度が大きく変化するタイプ (B) が存在した (図 4-1)。B タイプは、貧栄養条件になると大きく増殖能が低下してしまうために、適応を促進する前に集団内で淘汰されてしまう危険性が高い。一方で A タイプは、淘汰される危険性が低いが、貧栄養に環境が変化すると変異率は低下してしまう。この *mutator* ごとの特性を無視すると、変異率が非常に高

い mutator を含むはずの集団の方が、変異率が余り高くない mutator を含む集団よりも進化速度が遅くなるなどの予期せぬ結果が得られるであろう。どのような要因によってこのような個体差が生じるのかはまだ明らかではなく、その要因を解明することできさらに広範囲の条件で集団の進化速度を予測し、制御できるようになると期待される。また、本研究では貧富の栄養条件に限定して mutator の性質を調べたが、栄養以外の環境因子でも mutator の能力を左右する可能性はもちろん想定される。これらが今後の課題であると考えられる。

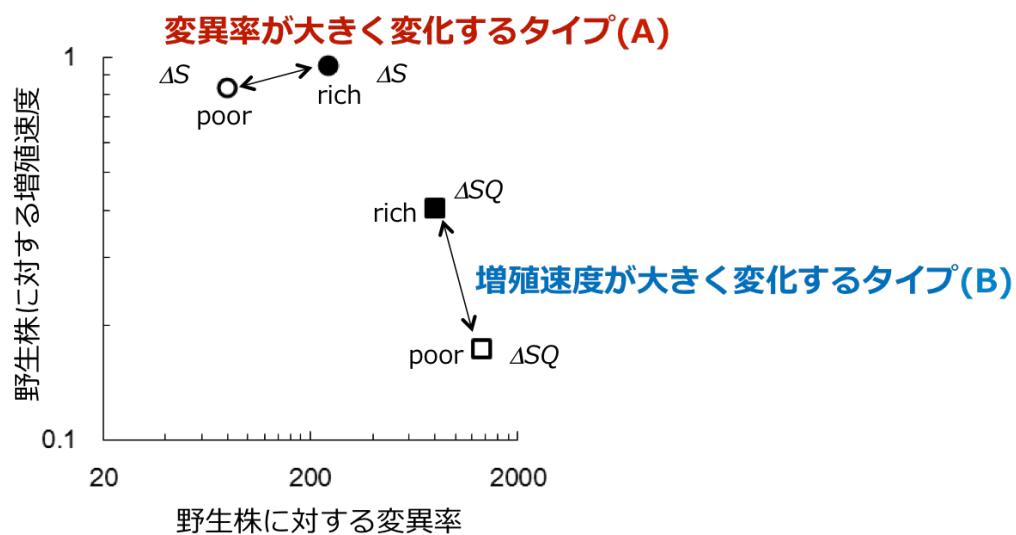


図 4-1 mutator のタイプ例。

横軸が野生株に対する変異率、縦軸が野生株に対する増殖速度である。白抜きのプロットは貧栄養培地での結果、塗りつぶしたプロットは富栄養培地での結果、丸いプロットは変異率が大きく変化するタイプである A、四角いプロットは増殖速度が大きく変化するタイプである B を示している。

参考文献

- [1] J. W. Drake, B. Charlesworth, D. Charlesworth, and J. F. Crow, “Rates of spontaneous mutation.,” *Genetics*, vol. 148, no. 4, pp. 1667–86, Apr. 1998.
- [2] F. Taddei, M. Radman, J. Maynard-Smith, B. Toupane, P. H. Gouyon, and B. Godelle, “Role of mutator alleles in adaptive evolution.,” *Nature*, vol. 387, no. 6634, pp. 700–2, Jun. 1997.
- [3] R. D. Kolodner and G. T. Marsischky, “Eukaryotic DNA mismatch repair.,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 9, no. 1, pp. 89–96, Feb. 1999.
- [4] R. R. Iyer, A. Pluciennik, V. Burdett, P. L. Modrich, P. Hsieh, K. Yamane, R. D. Kolodner, and G. T. Marsischky, “DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing.,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 106, no. 1, pp. 89–96, Feb. 2006.
- [5] P. Hsieh and K. Yamane, “DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing.,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 129, no. 7–8, pp. 391–407.
- [6] L. J. Reha-Krantz, “DNA polymerase proofreading: Multiple roles maintain genome stability.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1804, no. 5, pp. 1049–63, May 2010.
- [7] S. D. McCulloch and T. A. Kunkel, “The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases.,” *Cell Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 148–61, Jan. 2008.
- [8] I. J. Fijalkowska and R. M. Schaaper, “Mutants in the Exo I motif of Escherichia coli dnaQ: defective proofreading and inviability due to error catastrophe.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 7, pp. 2856–61, Apr. 1996.
- [9] A. J. Herr, M. Ogawa, N. a Lawrence, L. N. Williams, J. M. Egginton, M. Singh, R. a Smith, and B. D. Preston, “Mutator suppression and escape from

- replication error-induced extinction in yeast.,” *PLoS Genet.*, vol. 7, no. 10, p. e1002282, Oct. 2011.
- [10] J. E. LeClerc, B. Li, W. L. Payne, and T. A. Cebula, “High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens.,” *Science*, vol. 274, no. 5290, pp. 1208–11, Nov. 1996.
- [11] I. Matic, M. Radman, F. Taddei, B. Picard, C. Doit, E. Bingen, E. Denamur, and J. Elion, “Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*.,” *Science*, vol. 277, no. 5333, pp. 1833–4, Sep. 1997.
- [12] P. D. Sniegowski, P. J. Gerrish, and R. E. Lenski, “Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*.,” *Nature*, vol. 387, no. 6634, pp. 703–5, Jun. 1997.
- [13] E. F. Mao, L. Lane, J. Lee, and J. H. Miller, “Proliferation of mutators in A cell population.,” *J. Bacteriol.*, vol. 179, no. 2, pp. 417–22, Jan. 1997.
- [14] J. L. Martínez, F. Baquero, and D. I. Andersson, “Predicting antibiotic resistance.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 5, no. 12, pp. 958–65, Dec. 2007.
- [15] E. Heitzer and I. Tomlinson, “Replicative DNA polymerase mutations in cancer.,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 24, pp. 107–13, Feb. 2014.
- [16] N. H. Briggs, B. D. E.G., J. A. Eisen, D. B. Goldstein, and N. H. Patel, *Evolution*. Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2007.
- [17] J. E. Barrick and R. E. Lenski, “Genome-wide mutational diversity in an evolving population of *Escherichia coli*.,” *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 74, pp. 119–29, Jan. 2009.
- [18] T. Kishimoto, L. Iijima, M. Tatsumi, N. Ono, A. Oyake, T. Hashimoto, M. Matsuo, M. Okubo, S. Suzuki, K. Mori, A. Kashiwagi, C. Furusawa, B.-W. Ying, and T. Yomo, “Transition from positive to neutral in mutation fixation

along with continuing rising fitness in thermal adaptive evolution.,” *PLoS Genet.*, vol. 6, no. 10, p. e1001164, Oct. 2010.

- [19] D. A. Thompson, M. M. Desai, and A. W. Murray, “Ploidy controls the success of mutators and nature of mutations during budding yeast evolution.,” *Curr. Biol.*, vol. 16, no. 16, pp. 1581–90, Aug. 2006.
- [20] L. Chao and E. C. Cox, “Competition between high and low mutating strains of *Escherichia coli*.,” *Evolution*, 1983. .
- [21] W. Tröbner and R. Piechocki, “Competition between isogenic *mutS* and *mutT* populations of *Escherichia coli* K12 in continuously growing cultures.,” *Mol. Gen. Genet.*, vol. 198, no. 1, pp. 175–6, Jan. 1984.
- [22] A. Giraud, I. Matic, O. Tenaillon, A. Clara, M. Radman, M. Fons, and F. Taddei, “Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut.,” *Science*, vol. 291, no. 5513, pp. 2606–8, Mar. 2001.
- [23] O. Tenaillon, B. Toupance, H. Le Nagard, F. Taddei, and B. Godelle, “Mutators, population size, adaptive landscape and the adaptation of asexual populations of bacteria.,” *Genetics*, vol. 152, no. 2, pp. 485–93, Jun. 1999.
- [24] J. W. Drake, “The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes.,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 870, pp. 100–7, May 1999.
- [25] D. M. Wloch, K. Szafraniec, R. H. Borts, and R. Korona, “Direct estimate of the mutation rate and the distribution of fitness effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.,” *Genetics*, vol. 159, no. 2, pp. 441–52, Oct. 2001.
- [26] R. Sanjuán, A. Moya, and S. F. Elena, “The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 22, pp. 8396–401, Jun. 2004.

- [27] S. F. Elena, L. Ekunwe, N. Hajela, S. A. Oden, and R. E. Lenski, “Distribution of fitness effects caused by random insertion mutations in *Escherichia coli*,” *Genetica*, vol. 102–103, no. 1–6, pp. 349–58, Jan. 1998.
- [28] S. B. Joseph and D. W. Hall, “Spontaneous mutations in diploid *Saccharomyces cerevisiae*: more beneficial than expected.,” *Genetics*, vol. 168, no. 4, pp. 1817–25, Dec. 2004.
- [29] R. Kassen and T. Bataillon, “Distribution of fitness effects among beneficial mutations before selection in experimental populations of bacteria.,” *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 4, pp. 484–8, Apr. 2006.
- [30] S. Estes, P. C. Phillips, D. R. Denver, W. K. Thomas, and M. Lynch, “Mutation accumulation in populations of varying size: the distribution of mutational effects for fitness correlates in *Caenorhabditis elegans*.,” *Genetics*, vol. 166, no. 3, pp. 1269–79, Mar. 2004.
- [31] A. I. Nilsson, S. Koskineni, S. Eriksson, E. Kugelberg, J. C. D. Hinton, and D. I. Andersson, “Bacterial genome size reduction by experimental evolution.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 34, pp. 12112–6, Aug. 2005.
- [32] T. Mukai, “The Genetic Structure of Natural Populations of *Drosophila Melanogaster*. I. Spontaneous Mutation Rate of Polygenes Controlling Viability,” *Genetics*, vol. 50, pp. 1–19, Jul. 1964.
- [33] T. T. Kibota and M. Lynch, “Estimate of the genomic mutation rate deleterious to overall fitness in *E. coli*.,” *Nature*, vol. 381, no. 6584, pp. 694–6, Jun. 1996.
- [34] G. E. Degnen and E. C. Cox, “Conditional mutator gene in *Escherichia coli*: isolation, mapping, and effector studies.,” *J. Bacteriol.*, vol. 117, no. 2, pp. 477–87, Feb. 1974.
- [35] R. Korona, “Genetic load of the yeast *saccharomyces cerevisiae* under diverse environmental conditions,” *Evolution*, 1999. .

- [36] P. A. Lind and D. I. Andersson, “Whole-genome mutational biases in bacteria.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 46, pp. 17878–83, Nov. 2008.
- [37] L. L. Vassilieva, A. M. Hook, and M. Lynch, “The fitness effects of spontaneous mutations in *Caenorhabditis elegans*.,” *Evolution*, vol. 54, no. 4, pp. 1234–46, Aug. 2000.
- [38] K. Szafraniec, R. H. Borts, and R. Korona, “Environmental stress and mutational load in diploid strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 3, pp. 1107–12, Jan. 2001.
- [39] S. B. Levy and B. Marshall, “Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses.,” *Nat. Med.*, vol. 10, no. 12 Suppl, pp. S122–9, Dec. 2004.
- [40] T. Voeltzel, A. P. Morel, M. C. Rostan, J. Ji, C. Chiodino, F. Ponchel, J. Vigouroux, C. Caron de Fromentel, T. Soussi, and M. Ozturk, “A new set of monoclonal antibodies directed to proline-rich and central regions of p53.,” *Hybrid. Hybridomics*, vol. 23, no. 5, pp. 287–92, Oct. 2004.
- [41] I. Martincorena, A. S. N. Seshasayee, and N. M. Luscombe, “Evidence of non-random mutation rates suggests an evolutionary risk management strategy.,” *Nature*, vol. 485, no. 7396, pp. 95–8, May 2012.
- [42] J. W. Drake, “Too many mutants with multiple mutations.,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 42, no. 4, pp. 247–58, 2007.
- [43] J. W. Drake, “Mutations in clusters and showers.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 20, pp. 8203–4, May 2007.
- [44] A. Kashiwagi, I. Urabe, K. Kaneko, and T. Yomo, “Adaptive response of a gene network to environmental changes by fitness-induced attractor selection.,” *PLoS One*, vol. 1, p. e49, Jan. 2006.

- [45] K. A. Datsenko and B. L. Wanner, “One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 12, pp. 6640–5, Jun. 2000.
- [46] T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori, “Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 2, p. 2006.0008, Jan. 2006.
- [47] B.-W. Ying, Y. Ito, Y. Shimizu, and T. Yomo, “Refined method for the genomic integration of complex synthetic circuits.,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 110, no. 5, pp. 529–36, Nov. 2010.
- [48] S. E. Luria and M. Delbrück, “Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance.,” *Genetics*, vol. 28, no. 6, pp. 491–511, Nov. 1943.
- [49] T. Malthus Robert, “An Essay on the Principle of Population,” *ELECTRONIC SCHOLARLY PUBLISHING*, 1798. [Online]. Available: <http://www.esp.org/books/malthus/population/malthus.pdf>. [Accessed: 21-Dec-2014].
- [50] P. L. Foster, “Methods for determining spontaneous mutation rates.,” *Methods Enzymol.*, vol. 409, pp. 195–213, Jan. 2006.
- [51] R. Kishony and S. Leibler, “Environmental stresses can alleviate the average deleterious effect of mutations.,” *J. Biol.*, vol. 2, no. 2, p. 14, Jan. 2003.
- [52] R. M. Schaaper, “Mechanisms of mutagenesis in the *Escherichia coli* mutator mutD5: role of DNA mismatch repair.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 85, no. 21, pp. 8126–30, Nov. 1988.
- [53] S. Cooper and C. E. Helmstetter, “Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r.,” *J. Mol. Biol.*, vol. 31, no. 3, pp. 519–40, Feb. 1968.

- [54] M. Lynch, “Evolution of the mutation rate.,” *Trends Genet.*, vol. 26, no. 8, pp. 345–52, Aug. 2010.
- [55] H. Lee, E. Popodi, H. Tang, and P. L. Foster, “Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium Escherichia coli as determined by whole-genome sequencing.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 41, pp. E2774–83, Oct. 2012.
- [56] L. D. Hurst, “The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution.,” *Trends Genet.*, vol. 18, no. 9, p. 486, Sep. 2002.
- [57] I. Illumina, “De novo bacterial sequencing on the MiSeq system.,” 2011. .
- [58] H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, and R. Durbin, “The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.,” *Bioinformatics*, vol. 25, no. 16, pp. 2078–9, Aug. 2009.
- [59] H. Li and R. Durbin, “Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform.,” *Bioinformatics*, vol. 25, no. 14, pp. 1754–60, Jul. 2009.
- [60] B. Ewing and P. Green, “Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities.,” *Genome Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 186–94, Mar. 1998.
- [61] P. J. A. Cock, C. J. Fields, N. Goto, M. L. Heuer, and P. M. Rice, “The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 6, pp. 1767–71, Apr. 2010.
- [62] S. Kryazhimskiy and J. B. Plotkin, “The population genetics of dN/dS.,” *PLoS Genet.*, vol. 4, no. 12, p. e1000304, Dec. 2008.
- [63] Z. Yang and J. Bielawski, “Statistical methods for detecting molecular adaptation.,” *Trends Ecol. Evol.*, vol. 15, no. 12, pp. 496–503, Dec. 2000.

謝辞

本研究を行うにあたり、適切な研究指導と環境を与えてくださった四方哲也教授に感謝します。また、プレゼンテーションの技術など、自分の面白いと思うことをわかりやすく伝えるスキルを身につけることは、博士後期課程での目標の一つでありましたが、先生にはスキルの面でも数多くアドバイスを頂き、大変勉強になりました。

また私の研究の直接の指導に当たってくださった筑波大学の應ベイウェン准教授、大阪大学の津留三良助教に感謝します。博士後期課程からの本研究室にやってきて3年間で研究成果をまとめることができたのは、御二方の助力があってのことあります。應ベイウェン准教授には、阪大の教員として勤めていらっしゃった時期だけでなく、大阪大学から筑波大学に移られてからも、研究室立ち上げの慌しい時期にもかかわらず、多大な時間と労力を掛けて指導していただけたことにとても感謝しています。津留助教には、指導する生徒が多いにも関わらず、とても熱心な指導をしていただきました。私自身では気付かなかった点を指摘してくださることが多々有り、そのお陰で研究を発展させることができました。今後は研究という分野からは離れますが、御二人に教えを受けた者として恥ずかしくないよう、精進していきたいと思います。

また、情報科学研究科の清水浩教授、松田秀雄教授、若宮直紀教授、前田太郎教授には博士論文執筆にあたって有益なコメントを頂きました。大変感謝しております。

大阪大学微生物研究所の中村昇太助教と元岡大祐先生には、ゲノムシークエンスでお世話になりました。シークエンスに関して様々なことを教えて頂き、大変感謝しております。

津留（山脇）奈津子さんを中心とする技術補佐員の方々に感謝します。特に、mutatorの作製に関しては、山脇さんに大変お世話になりました。山脇さんの長年の経験から頂いたアドバイスによって実験がうまくいったことは疑いようもありません。

理化学研究所の谷口雄一さんには、研究の進捗や今後の方針について適切な助言を頂きました。ありがとうございました。

そしてこの3年間に同じチームとして過ごした飯島玲生さん、金子冬郎くん、村上由衣さん、吉田真理さん、山和馬くん、明野優也くん、高野壮太朗くん、高橋佑輔くん、清水天馬くん、芝井厚くん、高見梨沙さん、東雄貴くん、伊藤忠弘くん、小森隆弘

くん、斎藤紘美さんに感謝します。みなさんのおかげで日々の研究生活を楽しく過ごすことができました。

最後になりますが、経済的、精神的に支えてくださった私の家族に感謝します。