

博士論文

耐性遺伝子の除去に抗した薬剤に対する適応

Physiological Adaptation to Antibiotic Exposure against
Resistance Gene Deletion

小金澤 優太

目次

1	序論	3
1.1	本論文の背景	3
1.2	本論文の目的	7
1.3	本論文の構成	8
2	耐性遺伝子の除去に抗した薬剤に対する大腸菌の履歴依存的な適応	10
2.1	本章の要約	10
2.2	序論	11
2.2.1	本研究の背景	11
2.2.2	光を利用した細胞反応の制御	12
2.2.3	一細胞観察のためのデバイス	14
2.2.4	本研究について	14
2.3	方法	16
2.3.1	細胞株の構築	16
2.3.2	遺伝子組換え効率の測定	17
2.3.3	MIC 測定における細胞の培養	17
2.3.4	デバイス作製	18
2.3.5	顕微鏡観察のための細胞培養と手順	18
2.3.6	一細胞計測した細胞画像の取得と解析	19
2.3.7	mother machine デバイスからの細胞サンプリングと全ゲノム解析	20
2.4	結果	21
2.4.1	バッチ培養における遺伝子組換え	21
2.4.2	クロラムフェニコールのない環境における耐性遺伝子の除去	22
2.4.3	クロラムフェニコール投与下における耐性遺伝子の除去に抗した部分的な成長の回復	23
2.4.4	遺伝子除去から時間が経った後に Cp を投与すると成長の回復が阻害される	32
2.4.5	成長の回復に伴って、耐性遺伝子を除去された細胞はリボソームタンパク質のストイキオメトリーを回復する	34
2.4.6	相対的に (p)ppGpp 量の多い耐性遺伝子除去株が成長を回復する	45
2.5	考察	51
3	蛍光タンパク質を利用したスカーレスなゲノム組換え法の効率化	55
3.1	本章の要約	55
3.2	序論	55
3.2.1	本研究の背景	55
3.2.2	λ -Red 組換え酵素を用いた遺伝子組換え法	56

3.2.3	λ-Red 組換え酵素と I-SceI メガ制限酵素を用いた薬剤耐性マーカーレス遺伝子組換え法	57
3.2.4	λ-Red 組換え酵素と I-SceI メガ制限酵素を用いたスカーレス遺伝子組換え法	57
3.2.5	本研究について	59
3.3	方法	60
3.3.1	プラスミドの構築	60
3.3.2	pTKRED プラスミドの導入	61
3.3.3	<i>tetA</i> および蛍光タンパク質遺伝子の導入	61
3.3.4	<i>tetA</i> および蛍光タンパク質遺伝子の除去およびスカーレスな遺伝子の組換え	62
3.3.5	pTKRED プラスミドの除去	63
3.3.6	遺伝子組換え効率の測定	63
3.3.7	MIC 測定における細胞の培養	65
3.3.8	<i>tetA-gfp</i> 遺伝子または <i>tetA-mcherry</i> 遺伝子を持つ細胞の成長測定	65
3.4	結果	65
3.4.1	蛍光遺伝子を発現するスカーレス遺伝子組換え中間体の作製	65
3.4.2	スカーレスな遺伝子の導入	67
3.4.3	遺伝子の除去	76
3.4.4	遺伝子組換え部位に依存した組換え	79
3.4.5	大型遺伝子の導入	83
3.5	考察	87
4	まとめ	91
4.1	本論文のまとめ	91
4.2	今後の展望	92
4.2.1	耐性遺伝子を失っても Cp に適応する機構の理解の深化	92
4.2.2	遺伝子組換えした細胞の一細胞観察の応用可能性	93
4.2.3	本研究で得られた手法が遺伝子型-表現型対応関係に与える影響について	94
	参考文献	95
	謝辞	112
	Supplemental Data	113

1 序論

1.1 本論文の背景

ある環境での細胞の表現型を遺伝子型がどれだけ厳密に決定づけるかについて理解することは古くから現在まで研究されている遺伝学研究的な重要な問題の一つである。遺伝についての研究、あるいは推論は遺伝子型や表現型の概念が定義されるよりもずっと前から行われてきた。知られている最古の例は古代ギリシャの Hippocrates の仮説である [1]。どうして親と子の性質は似るのか、親あるいは祖先から子へどのように特徴や形質が伝わるのかという問題に対して、Hippocrates は体の様々な部位から物質を生成し、それが生殖器に集まり結合することで生殖物質が形成され、伝達されると考えた [1, 2]。このような考え方は C. Darwin のパンゲネシス (“pangenesis”) 仮説にも見られる [2]。ただしここでは遺伝する物質と形質の間に明瞭な区別はなかった。

遺伝因子と形質や特徴を区別した初期の有名な研究が G. Mendel の “Versuche über Pflanzen-Hybriden” (邦訳: “雑種植物の研究”) である [3, 4]。G. Mendel はエンドウマメ (*Pisum sativum*) を交配させることで、種子の形、胚乳 (子葉) の色、種子の皮の色、完熟した莢の形態、未熟な莢の色、花の配置、茎の長さの 7 つの形質がどのように変わるかを調べた。この研究の中で示されたのが有名な Mendel の遺伝の法則 (分離の法則、独立の法則、顕性 (優性) の法則) である。G. Mendel はエンドウマメのそれぞれの形質について純系同士を交配させた雑種第一代を自家受粉させるとその後自家受粉を繰り返した時に形質が不変になるエンドウマメが現れることを示した。この結果から、このようなエンドウマメが作られるには胚細胞と花粉細胞のそれぞれに全く等しい因子が働いていると考えた。さらにこの顕性あるいは潜性になる因子が雑種の胚細胞や花粉細胞において統計上同数作られていると仮定し、エンドウマメの各形質が現れる割合を見事に説明した。ただし、Mendel のこの研究は、よく知られるように H. De Vries, C. Correns, E. Tschermak らに “再発見” されるまで日の目を見なかった [5, 6, 7]。

このような遺伝する因子と、観察できる形質、特徴を分離し、1900 年代初頭に表現型や遺伝子型の概念を定義したのは W. Johannsen である。彼の定義によると、表現型 (“phenotype”) とは “All “types” of organisms, distinguishable by direct inspection or only by finer methods of measuring or description ...” [2]、すなわち直接見ることができるか、あるいはより詳細な測定や記述の方法によってのみ区別することができる形質あるいは特徴のことを意味する。表現型はこのような実在するものであり、形や構造、大きさや色などの無数の表現型がその時代から記述されてきた。一方で表現型と対立する概念として遺伝子型 (“genotype”) があり、遺伝子型は “A “genotype” is the sum total of all the “gene” in a gamete or in a zygote.” [2]、すなわち接合子や配偶子に含まれる遺伝子 (“gene”) 全体を意味する。この遺伝子とは現在の分子生物学で用いられているようなタンパク質 (酵素) の一次配列に対応するような情報ではなく、メンデルの研究における因子 (“factor”) に対応するものであり、遺伝因子と形質の対応を想定していた。

このような遺伝子型と表現型の概念の分離の重要性を W. Johannsen はマメの長さの分布を用いて説明した [2]。彼は純系の遺伝的に同一であると考えられるマメであっても環境の要因の違いによって豆の長さが揺らいでいることを示した。また、逆に複数の純系のマメを混ぜた時にある長さの一つのマメがどの純系のマメかを見分けることがほとんど不可能であることも述べた。これらの結果は単一の遺伝子型であっても複数の表現型

をとりうるし、単一の表現型であっても異なる遺伝子型に由来している可能性があることを意味する。表現型のばらつきの要因を遺伝する因子と外部要因とに分離するため、遺伝子型という概念を表現型と区別したと考えられている [8]。

G. Mendel から現代に至るまで多くの研究者はこの遺伝子型と表現型の対応関係を“遺伝子型がどの表現型に対応するか”ではなく、“遺伝子型の違いは表現型の違いにどのような影響を及ぼすか”ということから探索してきた [2, 3, 8, 9]。実際 W. Johannsen は “*We do not know a “genotype”, but we are able to demonstrate “genotypical” differences or accordances.*” [2] と述べている。この遺伝子型の違いと表現型の違いの対応は G. Mendel のエンドウマメの実験の 7 つの形質のように一つの遺伝子が一つの形質を決定するような単純な対応だけではなく他の遺伝子や W. Johannsen の述べるように気温などの外的環境などと共に考える必要があった。

その一つの例が 1907 年に W. Bateson によって提唱された “epistasis” と呼ばれる現象である [10]。彼はラットの体色がグレー (agouti)、黒、茶色 (cholorate) になることをグレーになる遺伝子と黒になる遺伝子の 2 つの遺伝子を用いて、黒色の遺伝子の有無によらずにグレーになる遺伝子を持っていればグレー、グレーの遺伝子がない時に黒色の遺伝子を持っていれば黒色、どちらの遺伝子も持たないと茶色になると説明した。グレーになる遺伝子、黒色になる遺伝子という二つの遺伝子の関係を記述する際に顕性や潜性という言葉を用いることは、顕性や潜性が厳密には対立遺伝子でのみ定義される関係であるため不適切である。そのため、Bateson は表現型が現れるグレーになる遺伝子を “epistatic”、表現型が現れない黒色の遺伝子を “hypostatic” という言葉で表現した [10]。現代では “epistasis” という言葉は今述べたような優性上位と呼ばれる現象だけでなく、一つの遺伝子座の遺伝子型の違いが表現型に及ぼす影響が他の遺伝子の遺伝子型によって変化する現象全体に対して使われている [9, 11]。広義の “epistasis” 現象については G. Mendel もインゲンの花の色の形質を説明する際に似たようなことを推測していた [3]。インゲンの花の色は白色または紫紅色であるのだが、白色と紫紅色を交配した雑種第二代では花の咲いた 31 株のうち 1 株だけが白色であった。もし一つの因子で花の色が説明できるのであれば 4 つに 1 つは白色の花のインゲンが得られるはずであるため、この白色のインゲンが得られる割合と大きく異なっていた。そこで G. Mendel は 2 つまたはそれ以上の因子が花の色に関与していると想定し、この複数の因子の少なくとも一つが顕性であれば紫紅色になるというのちに epistasis の中でも同義遺伝子と呼ばれる現象を考えていた。これに基づくと 2 つの因子を仮定した場合には 16 株に 1 株、3 つの因子を仮定した場合には 64 株に 1 株のみが白色の花になると説明した。

遺伝子型と表現型の対応関係の複雑さは “genetic canalization” あるいは “表現型バッファリング” と呼ばれる現象でも観察される。genetic canalization あるいは canalization は遺伝子や環境の摂動をバッファし、表現型レベルでは違いが観察されなくなるという 1940 年代に C. Waddington によって提唱された概念である [12]。C. Waddington は野生型の生物の発生の恒常性から遺伝子型の違いがあったとしても発生過程に違いが現れることなくバッファすることができると洞察した [12]。さらに近年、Hsp90 と呼ばれる分子シャペロンが遺伝子型の違いが表現型に現れることを抑制していることがわかった。分子シャペロンはタンパク質のフォールディングを補助するタンパク質である [13]。Hsp90 に変異を与える、あるいは Hsp90 を抑制する薬剤の投与によって、*Drosophila* の発生が影響を受け、それまで抑制されてきた遺伝子型のばらつきの影響が表現型に現れた [14]。その結果として、翅の血管の発生や、目の形成などが変化した。Hsp90 のような分子シャペロンを

介した canalization あるいは遺伝子型のばらつきに対するバッファリングは広く他の生物種でも調べられている [14, 15, 16, 17]。

epistasis や canalization のように、遺伝子型-表現型の対応関係は他の遺伝子や環境など複数の要因が関与しており、その複雑さのため現在でも完全には理解されていない。確かに 20 世紀の分子生物学の発展は遺伝学にも大きな影響を及ぼした。遺伝子が染色体にあり、遺伝子の本体が DNA であること、また遺伝子がタンパク質 (酵素) の一次配列情報を有していること、DNA の塩基配列とタンパク質の対応 (コドン表) が作られたことなど、その例は枚挙にいとまがない [5, 6, 7]。その中で遺伝子という概念も、ある特定のタンパク質をコードする情報という意味でも使われるようになってきている [5, 18]。しかしながら、それでもなお遺伝学の本質的な課題は G. Mendel から今に至るまで変わらず遺伝子型の違いが表現型の違いにどのように現れるかという点である [8, 9]。それは “*We sometimes seem to have forgotten that the original question in genetics was not what makes a protein but rather ‘what makes a dog a dog, a man a man.’*” [19] という D. Noble の言葉にも表されている。また、遺伝子や遺伝子型は発生のような表現型を決める要素の一つではあるものの、遺伝子だけで表現型が決まる “blueprint” というわけではない [19, 20, 21, 22]。だからこそ一部の生物において全塩基配列が決定できるようになった今であっても、この遺伝子型と表現型の対応関係の理解は道半ばであり、現在でも模索され続けている。

先述したとおり遺伝子型-表現型の対応関係は遺伝子型の違う細胞の表現型の違いを調べることによって模索されてきた。特に近年では、ノックアウトや突然変異といった方法で遺伝子型に変化を与えた細胞と元の遺伝子型をもつ細胞の表現型を比較することが行われている [23, 24]。この比較を行うためには塩基配列を読む技術や意図した遺伝子変異 (遺伝子除去、遺伝子挿入、点突然変異 etc.) を与えるための遺伝子組換え技術、ゲノム編集技術の発展が不可欠である。ゲノムシーケンス技術としては 1970 年代に開発されたサンガーシーケンス法 [25, 26] が、現在までよく用いられている。また、近年では次世代シーケンスと呼ばれる技術が発達し、サンガー法に比べてより多くの配列を同時に読むことで大量の塩基配列情報を読むことができるようになった [27, 28]。このような発展の中で、大腸菌をはじめとして [29]、多くの生物種のゲノムが決定されてきた。一方で、遺伝子組換え技術も急速に発展してきている [30]。例えば 2000 年に K. Datsenko と B. Wanner によって発表された遺伝子組換え手法 [31] は大腸菌の遺伝子組換えにおいて今でもよく用いられる手法の一つである [32, 33]。この手法を用いて開発された大腸菌の一遺伝子ノックアウトライブラリー (Keio コレクション [34]) は目的の表現型に関わる遺伝子のスクリーニングに活用されている [35, 36, 37]。また近年では CRISPR/Cas9 システム [38, 39] を利用した遺伝子組換え技術も発展し続けている。これらの方法では、元の遺伝子型を持つ細胞株に対して変異を与え、目的の遺伝子変異が起こった細胞を選択的に取得し変異株を樹立している。

また、遺伝子型-表現型の対応関係の探索には遺伝子組換え技術と同様に様々な表現型を測定する技術も必要不可欠である。測定できる表現型として古くから用いられてきたものとしては細胞やコロニーの形態、色などが挙げられる。さらに近年では技術の発展によってマイクロアレイや RNA-Seq による遺伝子の発現量 [40] やマスマスペクトロメーターによるタンパク質量の測定 [41] など、細胞内の分子情報を網羅的にはかるオミクスデータも得られるようになってきた。また、全く同じ遺伝子型を持つ細胞であっても細胞ごとの各遺伝子の発現が揺らぐことが 1 細胞レベルの観察によって明らかにされている [42, 43, 44, 45, 46, 47]。そのため近年では

遺伝子型-表現型対応を考える際にも従来の集団レベルでの解析だけでなく一細胞レベルでの解析、比較も行われている [23, 24, 48]。

このような遺伝子組換え技術、細胞の表現型を測定する技術の発展は遺伝子型-表現型の対応関係の決定に貢献してきた。しかしながら、この対応関係の評価では遺伝子型に変異を与えてから十分時間がたった、表現型が安定した細胞集団を樹立し、その集団の表現型を変異を与えていない細胞集団の表現型と比較している。そのため、遺伝子型に変化を与えてから新たな安定表現型が得られるまでに細胞がどのような状態変化過程を辿るかという知見は限られている [49, 50, 51, 52, 53]。

遺伝子型に変化を与えてから、表現型に変化が及ぶまでの遅れ時間について焦点を当てた研究の一つは S. Luria と M. Delbrück の研究である。S. Luria と M. Delbrück の研究では大腸菌におけるファージ耐性の出現頻度の分布から、耐性が突然変異によってもたらされることを示したが、その研究の中で表現型の遅れについて議論していた。彼らは、もし突然変異が起こってから耐性が形質として現れるまで n 世代かかるのならば、 2^n 個の倍数の細胞が耐性を持った状態で現れると予想した。しかし実際の結果では突然変異の出現個数が 1 つとなるようなものが多かったため、彼らは表現型の遅れはほとんどない ($n \approx 0$) と結論づけた [49]。一方、近年の研究において L. Sun らは大腸菌のゲノム DNA の倍数性により変異遺伝子がホモになるまでに数世代かかり、その結果、表現型の遅れが生じることを示した [52]。1 つのゲノムに対して潜性変異が入ったとしても、初期ではその変異は他のゲノムの同じ遺伝子には存在しないため、その影響が表現型上には現れてこない。そこで彼らは、薬剤耐性遺伝子を導入したあとすぐに耐性表現型を得た細胞の割合と、一度薬剤のないプレートにまいた後で薬剤ありのプレートにまいた時に耐性を持つに至った細胞の割合の比を組換えからの時間を変えて評価した。すると平均して組換えから 3~5 回の複製、分裂の後から薬剤耐性表現型が現れることを示した [52]。実際、現在分子生物学で用いられる遺伝子組換えの手法では、通常遺伝子組換えした後数時間培養しその後選択マーカー入りの培地に曝す必要がある [31]。このことは遺伝子を組換えてから表現型が現れるまでに一定の時間を要することを示唆している [52]。

また、L. Sun らの研究では遺伝子変化直後の細胞をアガーにまいて顕微鏡観察することによって表現型変化を一細胞レベルでも観察した [52]。彼らはナンセンス突然変異が入った *yfp* 遺伝子を持つ細胞に対して、変異を修正する DNA を電気穿孔法によって導入し、30 分間 LB 培地で回復させた後観察したところ、一部の細胞系列で観察開始の 4~5 世代後から YFP の蛍光が観察されることを示した。

遺伝子型の変化が表現型の変化へ波及する様子を一細胞レベルで観察した他の研究としては接合による遺伝子の水平伝播の観察が挙げられる [53, 54]。S. Nolivos らは *tetA-mcherry* 遺伝子を持たせたプラスミドがレシピエントの大腸菌に入ってから *mCherry* の蛍光を観察した。この時プラスミドの水平伝播は GFP 蛍光を用いた *parS*/ParB 結合システム [55] を用いて確認した。*mCherry* の蛍光は 30 分後に観察されたが、これは *mCherry* のフォールディングにかかる時間 ($t_{50} = 22$ 分 [56]) を考慮するとプラスミドを獲得してから数分以内に発現が始まっていることを示唆している [53]。

これらの近年の研究は遺伝子型に対する摂動が表現型に及ぶ様子を一細胞レベルで観察した研究であり、遺伝子型変化と表現型変化の時間差を明らかにしているが、いくつかの問題点を抱えている。L. Sun *et al.* では遺伝子組換えで一本鎖 DNA を導入 [57] して点突然変異を誘起している [52]。そのため、遺伝子の挿入や除去と

いった組換えには用いることが難しい。また、電気穿孔法での導入は遺伝子組換え効率あまり高くなく最終的な組換え率は1%から0.1%のオーダーであった [52]。さらに電気穿孔法によってフィラメント状の細胞が出現することも過去の研究で知られており、細胞の生理状態に影響を与える [52, 58]。その上、電気穿孔法を行うことから遺伝子組換え前の細胞の状態を調べることは困難である。また、S. Nolivos らの研究ではゲノム上の変化ではなく、プラスミドの水平伝播を用いて観察をしている。そのため遺伝子を追加すること以外は困難であり、遺伝子の欠損や点変異の影響を調べることができない。そして、ドナー細胞とレシピエント細胞の両方を同じ場所で観察する必要がある。ドナー細胞とレシピエント細胞を見分けるために異なる蛍光タンパク質遺伝子を用いる必要があり、その結果として遺伝子型状態のプローブとして用いることのできる蛍光タンパク質の種類が限られてしまう。さらに、どちらの研究でも細胞の状態変化を数時間までしか観察できていない。これまで述べてきたように遺伝子型摂動から表現型が変化し始めるまでの時間は0世代から4~5世代と必ずしも一定ではなく、そのため安定化するまでの時間も導入手法と与える遺伝子変異によるだろう。また、安定した表現型が数世代周期の振動を示すこともある [59] ため、長期観察が求められる。また、これまで挙げてきた研究では、組換え前の一細胞レベルでの表現型がその後の表現型にどのような影響を与えるかについては議論されていない。

一方で、直接的に遺伝子型に摂動を与えていないものの、遺伝子発現を誘導する、あるいは抑制した後の細胞の表現型変化を観察した例は多く行われてきた。これらの観察から得られる知見は遺伝子型-表現型の対応関係を理解するために有用であるかもしれない。しかしながら、ある遺伝子の転写あるいは翻訳を抑制した場合とその遺伝子を除去した場合のとりうる表現型は必ずしも一致するわけではない。その例として“genetic compensation (遺伝子補償)”と呼ばれる現象が挙げられる。遺伝子補償とは変異した遺伝子またはその遺伝子に関連した遺伝子の RNA、タンパク質レベルを変化させることで遺伝子変異による細胞機能の喪失を補償できる現象のことである [60]。この遺伝子補償と呼ばれる現象では変異が入った遺伝子の mRNA の分解によって配列の似た遺伝子の発現量が増加するというメカニズムが明らかになっている [61, 62]。一方でこの現象は CRISPRi による抑制では観察されず、遺伝子変異を与えた場合と異なる表現型になった [61]。

また、成長に必須な遺伝子の発現を抑制した場合に、抑制している環境にもかかわらず、その遺伝子の発現を回復するような適応現象があることも知られている [63, 64]。この結果は遺伝子を持ってさえいれば発現できる状態を見つけられることを示唆している。このような研究を考慮すると、誘導系を用いた結果と遺伝子型に摂動を与えた際の結果を同一視することは必ずしも適当ではない。

1.2 本論文の目的

これまでの遺伝子型-表現型の対応関係探索における背景を踏まえて、本博士論文ではこれまでほとんど観察されてこなかった遺伝子型が変化した直後からの細胞の表現型の変化を追尾観察することを目指した。特に一細胞レベルで追尾観察を行うことで、全く同じ遺伝子変異を与えた際に表現型の変化過程がどの程度異なっているのかということが明らかにできるだろう。これは従来の、遺伝子型に変異を与えてから十分時間が経った細胞の表現型を比較することでは得られない情報である。また、このような一細胞レベルでの追尾観察を用いることで、これまでは遺伝子組換え株を樹立することができなかった致死的な変異に対しても、変異を与え

てから生存、増殖ができなくなるまでの細胞の表現型変化の様子を観察することができると考えられる。さらに、遺伝子型-表現型の対応関係を考える上で重要な要因である他の遺伝子の発現量や細胞の生育環境の影響について、遺伝子型に変異を与える前の遺伝子発現の違いや細胞が遺伝子変異を与えられる前後でさらされていた環境の違いが遺伝子組換えをした後の表現型にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目指した。そのため、本研究では一細胞追尾観察している細胞に対して、遺伝子組換え、特に遺伝子の除去という摂動を与え、その後の細胞の表現型変化を観察する実験系を構築した。この実験系を用いて薬剤環境下で薬剤耐性遺伝子を除去する実験を行った(2章)。この薬剤耐性遺伝子除去実験によって、従来の遺伝子型-表現型の対応関係からは予想されないような、耐性を十分下げる遺伝子変異に対する細胞の履歴依存的な適応現象を発見した。

また、1.1 本論文の背景でも述べたように、遺伝子組換え技術は細胞の遺伝子型の違いを生み出すという点で遺伝子型-表現型の対応関係を調べるために現在では不可欠な技術である。従来、細菌によく用いられている方法では意図しない配列(スカー配列)が残存することや、導入可能な遺伝子配列の長さが短いという欠点があった。また、近年開発された方法では導入できる配列長の長さや意図しない配列の残存といった欠点は克服できたものの、遺伝子組換え部位によっては効率が低いという問題が残っていた。組換え効率が低いと組換えに成功した細胞を取得するために多くの時間や手間を割くことになってしまう。そのため、本研究では今後の遺伝子型-表現型の対応関係探索に有用な新たな高効率遺伝子組換え技術の構築を目指した。蛍光タンパク質を利用し、遺伝子組換え効率が低い組換えであっても蛍光の有無から組換えに成功した細胞を効率よく識別する手法を構築した(3章)。

1.3 本論文の構成

2章では、細胞の生存あるいは成長に関わるような薬剤耐性遺伝子を除去し、その後の細胞の振る舞いを観察した。本研究では静菌剤として広く知られるクロラムフェニコール(Cp)[65]を用いて実験を行なった。この実験では、遺伝子型変化によって生じる一細胞レベルでの表現型の変化を追跡観察するため、マイクロ流体デバイスと光で遺伝子組換え酵素を制御する光遺伝学のシステムを組み合わせた。これらの実験系を用いて、あらかじめ蛍光タンパク質遺伝子 *mcherry* でタグ付けしたクロラムフェニコール耐性遺伝子である *chloramphenicol acetyltransferase (cat)* 遺伝子 [66, 67] を大腸菌のゲノム上に導入し、この遺伝子を除去した時の細胞の挙動を明らかにすることを目指した。

mcherry-cat 遺伝子を導入した大腸菌に対し、Cp環境下で *mcherry-cat* 遺伝子を除去したところ、25%の系列で耐性遺伝子が失われた。このうち40%の耐性遺伝子を失った細胞系列では、耐性遺伝子なしにCp環境下で分裂を継続した。一方で遺伝子除去を薬剤のない環境で行い、10時間以上経った後にCpを投与した場合このようなCpに対する適応は見られなかった。

適応できた細胞とできなかった細胞の違いを明らかにするため、蛍光タンパク質遺伝子を用いて、Cpの標的であるリボソームの大サブユニット、小サブユニットタンパク質(RplS, RpsB)、及び細胞のグローバルな発現制御に関わる因子である guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate および guanosine 5'-triphosphate 3'-diphosphate(まとめて(p)ppGpp)のレポーター RpoS の変化を観察した。リボソームのデュアルレポーター株を用いた実験では、Cp環境下で *cat* 遺伝子を失った細胞では RplS と RpsB の量比が崩れることを見出した。

しかし、分裂を継続する細胞ではこの量比が成長の回復とともに回復する事を確認した。また、RpoS レポーター株を用いた実験では耐性遺伝子の除去によって RpoS の発現量が減少した一方で、分裂を継続する細胞では分裂を停止した細胞より RpoS の量が多いことを確認した。これらの結果は耐性遺伝子の除去に対しても細胞が耐性遺伝子以外の遺伝子発現状態を変化させながら適応的な状態を見つけることができることを示している。一方で適応的な状態に至れるかどうかは細胞内の発現状態や遺伝子除去のタイミングと細胞がさらされる環境の履歴によって変化することを示唆している。

次に 3 章では、既存の遺伝子組換え技術を改良して、より効率よく遺伝子組換えに成功した細胞を取得する方法の開発を目指した。大腸菌のゲノムにスカー配列を残さずに遺伝子組換えを実現する手法として H. Tas らが開発した λ -Red と I-SceI を用いた方法がある [68]。しかしこの方法は遺伝子組換え部位によっては組換え効率が低いという問題があった。そこで本研究では遺伝子組換えに失敗したコロニーと成功したコロニーを蛍光の有無で識別できる手法を構築することで、組換え効率が低い場合でも選択的に遺伝子組換えに成功した細胞を取得できるようにすることを目指した。

実際、構築した手法を用いたところ、組換え効率が 1% ~ 5% 程度であっても、高い効率 (80% ~ 100%) で組換えに成功したコロニーを選択することに成功した。この手法では遺伝子の導入だけでなく、スカーレスな遺伝子除去にも成功した。さらに H. Tas らの研究と同様に 7 kbp 程度の長い配列の遺伝子も導入できることを確認した。これらの結果から、蛍光を利用することで高い効率で遺伝子組換えに成功したコロニーを取得する手法を確立した。このような遺伝子組換え手法の改良は遺伝子型-表現型対応関係の理解の深化に寄与しうる。

4 章ではこの博士論文のまとめと今後の展望を行う。

2 耐性遺伝子の除去に抗した薬剤に対する大腸菌の履歴依存的な適応

2.1 本章の要約

本章では、大腸菌のゲノム上に導入したクロラムフェニコール (Cp) 耐性遺伝子を Cp 環境下で除去し、その後の細胞の成長や遺伝子発現の変化を観察した。一細胞レベルでの表現型の変化を追尾観察するため、マイクロ流体デバイス mother machine と青色光で遺伝子組換え酵素を制御する Photoactivatable Cre (PA-Cre) システムを組み合わせた。あらかじめクロラムフェニコール耐性遺伝子である *cat* 遺伝子が大腸菌のゲノム上に導入し、この実験系を用いて遺伝子を除去した時の細胞の挙動を明らかにすることを旨とした。

まず Cp のない環境下でこの実験系の評価を行った (2.4.1-2 節)。 *mcherry-cat* 遺伝子を導入した大腸菌を用いて 30 分の青色光照射したところ、25%の系列で *mcherry-cat* 遺伝子が失われた。また、青色光の照射や耐性遺伝子の有無は細胞の成長に影響を及ぼさなかった。

次に Cp 環境下で *mcherry-cat* 遺伝子を除去した (2.4.3 節) ところ、耐性遺伝子を失った細胞系列のうち 40% の細胞系列では、耐性遺伝子なしに Cp 環境下で 60 時間以上分裂を継続した。この Cp に対する適応は適応的な追加変異によるものではなかった。一方で遺伝子除去を薬剤のない環境で行い、10 時間以上経った後に Cp を投与した場合このような適応は見られなかった (2.4.4 節)。

この耐性遺伝子の除去に抗した適応は耐性遺伝子の産物 CAT の残留では説明できない。そのため、*cat* 遺伝子以外の細胞の発現状態の変化が必要である。適応できた細胞とできなかった細胞の違いを明らかにするため、Cp の標的であるリボソームの大サブユニット、小サブユニットタンパク質 (RplS、RpsB) の発現量変化を観察した (2.4.5 節)。リボソームのデュアルレポーター株 (*rplS-mcherry*、*rpsB-mvenus*) を構築し、Cp 環境下で *cat* 遺伝子を除去したところ、25%程度の耐性遺伝子を失った細胞系列が得られた。耐性遺伝子を失った細胞では成長の低下とともに RplS と RpsB の量比が崩れた。しかし、分裂を継続する細胞ではこの量比が成長の回復とともに回復する事を確認した。

さらにリボソームの発現に関与し、細胞のグローバルな発現制御に関わる因子である (p)ppGpp のレポーターである RpoS の発現量変化を観察した (2.4.6 節)。この RpoS レポーター株 (*rpoS-mcherry*) を用いた実験により Cp 環境下で *cat* 遺伝子を失うと RpoS の発現量が低下することを確認した。耐性遺伝子を失っても分裂を継続する細胞では分裂を停止した細胞に比べて適応途中の段階で RpoS の発現量が多かった。ここで観察された RpoS の量の関係はリボソームレポーターでの観察結果から予想される挙動と一致していた。

これらの結果は耐性度を下げ、従来の遺伝子型-表現型対応で考えた場合成長ができなくなるような遺伝子変異に対しても細胞が適応的な状態を見つけることができることを示している。一方で適応的な状態に至れるかどうかは細胞内の発現状態や遺伝子除去のタイミングとそれ以前に細胞が経験する環境の履歴によって変化することを示唆している。

2.2 序論

2.2.1 本研究の背景

自然界において細菌は外部環境および遺伝的な摂動に常に曝されている。生存、増殖するために細胞はこれらの摂動に対し適応できる、あるいは頑健である必要がある。環境摂動の例として栄養枯渇が挙げられる。栄養枯渇の際、大腸菌および近縁の細菌は RpoS と呼ばれるストレス環境の際に誘導される σ ファクターを発現し、これを介して細胞自身をストレスから守るために細胞内の代謝産物や遺伝子発現のプロファイルを変化させる [69]。アミノ酸産生の遺伝子が発現される一方で増殖に必要な因子や転写翻訳のためのタンパク質の発現は抑制される [70, 71]。その結果成長を抑制し、アミノ酸を生成することで限られた栄養環境の中で細胞自身を守っている。

また、紫外線 (UV) の照射や複製の際のエラーは SOS 応答を誘起し、DNA の修復系と突然変異の両方を誘導する [72]。DNA の修復系では SOS 応答によって誘導される UvrABCD によって、ヌクレオチド除去修復が行われる。ヌクレオチド除去修復では DNA の歪みを認識しその部分を切断し、DNA 鎖を作り直すことで DNA の損傷を修復する。一方で SOS 応答によって活性化した RecA タンパク質により UmuCD タンパク質が活性化する。活性化した UmuCD は結合して DNA ポリメラーゼ V となる。この DNA ポリメラーゼは損傷乗り越え合成をするため、変異が入りやすいポリメラーゼである [73]。そのため変異が生成される。

もし必須な遺伝子配列に遺伝子変異が生じ、修復されなかったら、その影響は細胞の表現型に影響を及ぼし、時として細胞死の原因ともなる。遺伝子変化によってどのくらい迅速に表現型が変化するか、また、ある環境で同じ遺伝子変化が生じた場合、常に同じ表現型になるのかという問いは遺伝学において重要な問題である。F. Ryan や L. Sun の研究では遺伝子型の変化から表現型の変化までの時間を議論している [51, 52]。F. Ryan の研究では UV の照射によって出現するペニシリン耐性の頻度が、UV 照射直後にペニシリンに曝す場合よりも、UV 照射後ペニシリンのない環境で 12 世代ほど培養した後にペニシリンに曝した場合の方が増加することを確認した [51]。F. Ryan はこのペニシリン耐性細胞が出現する頻度の上昇の原因を遺伝子型の変化が表現型の変化に反映されるまでに時間がかかるという考えだけでなく、複数の仮説を提案した。例えば、L. Sun らの研究のように細胞内に染色体が複数コピー存在しそのうちの一つに潜性変異が入ったため耐性表現型が現れるまでに複数回分裂が必要だったという仮説や、あるいはペニシリン耐性変異を得た細胞が野生型よりも成長率が高かったといった仮説を立てて、F. Ryan の研究で見られた遺伝子型の変化から表現型の変化までの時間が説明できることを指摘した [51]。しかしながら、多くの遺伝学の研究においては遺伝子型-表現型対応の時間依存性や対応の冗長性という点についてはほとんど考慮されていない [52]。

一方で、細胞内の生理調整システムによって遺伝子変化の影響を和らげる、あるいは補償できることがわかっている。その一例が 1.1 本論文の背景で説明した表現型バッファリングを担うタンパク質のフォールディングを助けるタンパク質、分子シャペロンである。全ての遺伝子変異の影響をバッファすることができるわけではないものの、分子シャペロンによって一部の遺伝子変異の影響が表現型に顕在化することを妨げていることが知られている [74]。突然変異を蓄積した大腸菌に対して分子シャペロンの一つである GroE を過剰発現させると適応度が上昇することがわかっている [15, 75]。一方でショウジョウバエの分子シャペロン Hsp90 を阻害すると羽や眼の形が野生型と異なる物が多く現れる [14]。このような現象は細菌やショウジョウバエだけで

なく酵母 [17, 76]、植物 [16] などでも知られており、分子シャペロンによる表現型のバッファリングは原核生物、真核生物問わず幅広く保存されている。

また、多くの生物で、変異した遺伝子またはその遺伝子に関連した遺伝子の RNA、タンパク質レベルを変化させることで遺伝子変異による細胞機能の喪失を補償できることが知られている [60]。この遺伝子補償と呼ばれる現象では変異が入った遺伝子の mRNA の分解によって配列の似た遺伝子の発現量が増加するというメカニズムが明らかになっている [61, 62]。

また、枯草菌において、変異した芽胞生成の制御因子の発現ノイズによって芽胞形成表現型に対する影響が部分的にしか浸透しないという現象 (partial penetrance) も知られている [77]。このような多種の生物にまたがる観察結果から、遺伝子変異によって引き起こされる表現型変化は、環境や細胞の生理的状态に基づいて変化しうることが示唆される。それによって生物の生存や進化が促進されているかもしれない。

これまで触れてきたような先行研究がある一方で、薬剤環境下で薬剤耐性遺伝子を除去するような遺伝子変異に対して細胞が生き残る術があるのかという問題に対してはいまだに十分に調べられていない。さらに、遺伝子変異直後に細胞がどのような反応を示すのか、また、より長時間のスケール (数十世代以上) で見たときに、細胞の生理状態あるいは表現型的な状態はどのような変化過程を辿るのかという点についてもほとんど理解されていない。これらの問題を解決するためには、制御されたタイミングで意図した遺伝子変異を発生させることと、変異前からの表現型の変化過程や最終的に行きつく表現型を明らかにするために、変異が起きた細胞を一細胞レベルで長時間追跡することが必要である。

2.2.2 光を利用した細胞反応の制御

意図した遺伝子変異を意図したタイミングで誘導する方法の一つとして光を用いた細胞内反応の操作を利用することが考えられる。光を利用した細胞内反応の操作は元々神経伝達制御の分野で発展したものであるが [78]、近年遺伝子発現制御 [79, 80, 81, 82, 83] やタンパク質相互作用のスイッチング [84, 85]、シグナル伝達の制御 [86, 87] などにも応用されている。光を利用した遺伝子組換えについても Cas9 や Cre と呼ばれる遺伝子組換え酵素を制御する形で近年開発がいくつもなされている [88, 89, 90, 91, 92]。

その中で本研究では佐藤守俊研究室で開発された PA-Cre システムを用いた (Fig. 1)[92]。PA-Cre 遺伝子組換えシステムは CreC および CreN と呼ばれる遺伝子組換え酵素 Cre[93] の断片に、p-Magnet (p-Mag) および n-Magnet (n-Mag) をそれぞれ 2 アミノ酸リンカーを用いて結合したタンパク質からなる。p-Mag と n-Mag はアカパンカビの光受容体タンパク質 Vivid 由来のタンパク質であり、青色光の照射によってヘテロ二量体を形成する [85]。そのため、PA-Cre システムを発現している細胞に青色光を照射することによって pMag-CreC と nMag-CreN が結合し、Cre が遺伝子組換え活性を回復する。青色光照射のタイミングを制御し、あらかじめ意図した遺伝子組換えを引き起こせるように Cre の認識配列である loxP 配列を導入することによって、意図した遺伝子組換えを意図したタイミングで誘起することができるようになる。

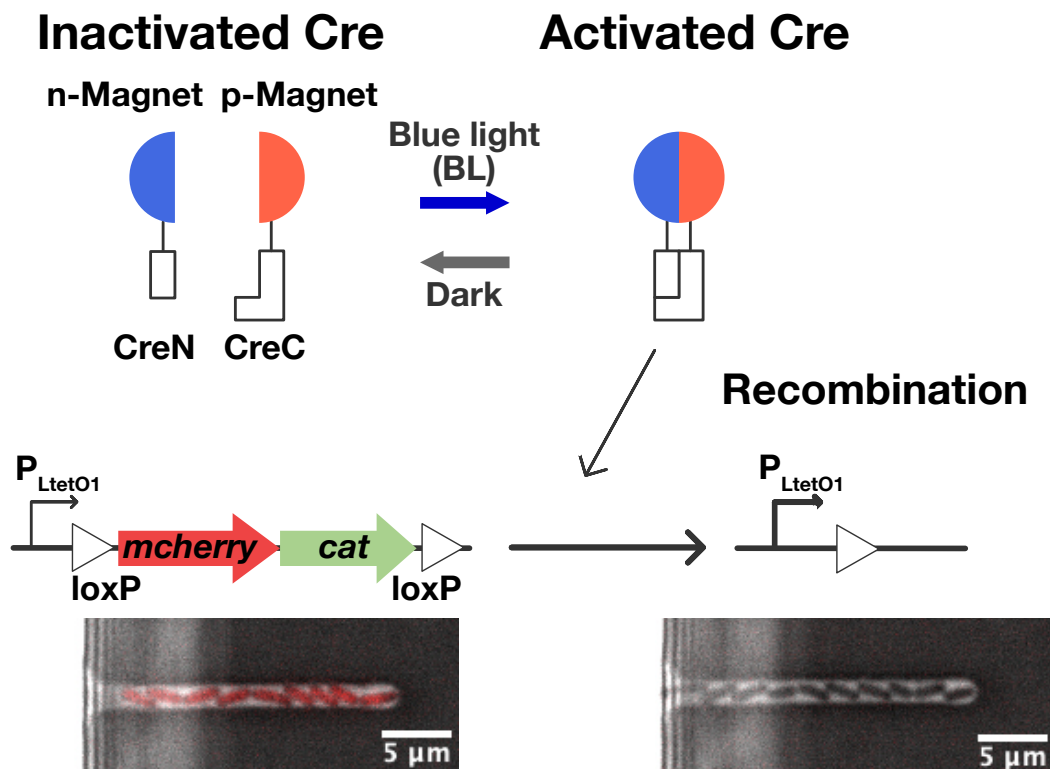


Fig. 1: PA-Cre 遺伝子組換えシステム. 青色光の照射によって p-Mag 及び n-Mag のヘテロ二量体が形成される。これによって Cre が組換え活性を取り戻し、目的遺伝子 *mcherry-cat* を除去する。下の画像は位相差像と mCherry-CAT の蛍光像の重ね合わせである。左の画像と右の画像はそれぞれ青色光の照射前の大腸菌と照射後の大腸菌の画像である。

2.2.3 一細胞観察のためのデバイス

一細胞レベルで細胞の状態を長時間追跡する方法は、この20年で数多く開発されている [94, 95, 96, 97, 98]。その中でも特に多くの研究で用いられている方法は“mother machine”と呼ばれるデバイスである (Fig. 2)[94]。mother machine は P. Wang らによって発表されたマイクロ流体デバイスであり、新鮮な培地が一定の流速で流れるメイン流路と、細胞がトラップされその内部で分裂成長する観察チャンネルからなる。観察チャンネルの一方の端はメイン流路に接続されており、ここから常に栄養が供給される。もう一方の端は閉じられており、行き止まりになっている。そのため、閉じられた端にいる細胞が分裂成長をするとメイン流路側に他の細胞を押し出していき、押し出された細胞は最終的に培地の流れによって排除される。一方で、閉じられた端にいる細胞自身は常に一番奥に残るため、この細胞は長期間にわたり観察チャンネルの中にとどまる。この細胞を観察することで細胞の表現型の変化を長期間追跡することができる。この mother machine デバイスは当初は大腸菌の計測に用いられていた [94, 97, 99, 100, 101, 102] が、現在では枯草菌 (*Bacillus Subtilis*)[103]、酵母 (*Schizosaccharomyces Pombe*)[104]、培養細胞 [105] などにも用いられている。また、mother machine を応用した類似の形状のデバイスも多く作られるなど発展を続けている [106, 107, 108]。

2.2.4 本研究について

本研究では意図したタイミングで意図した遺伝子変異を与え、その後の細胞の表現型変化を追跡観察するため、PA-Cre システムおよび mother machine を組み合わせた。大腸菌 (*Escherichia coli*) の染色体上に蛍光タンパク質遺伝子でラベルした薬剤耐性遺伝子を、遺伝子の上流および下流に loxP 配列を入れた形で導入した。この大腸菌を mother machine にトラップし、青色光を照射することで意図した薬剤耐性遺伝子の除去をデバイス内で誘導した。薬剤環境下で耐性遺伝子を失った細胞は5-7世代のうちに成長速度が減少した。しかし、耐性遺伝子を失った細胞の一部は、新たな薬剤耐性を付与する遺伝子変異を得ることなく、徐々に成長を回復した。対照的に、薬剤のない環境で耐性遺伝子を除去し、10時間以上経ったのちに初めて薬剤を投与した場合、耐性遺伝子を失った細胞は全て成長を続けることができなかった [109]。

さらに耐性遺伝子を失ってもなお Cp に対して適応する細胞の耐性遺伝子以外の変化を観察するため、Cp の標的であるリボソームや、リボソーム遺伝子を含むグローバルな遺伝子制御に関与する (p)ppGpp のレポーター RpoS について観察した。その結果、耐性遺伝子の除去によってリボソームタンパク質の量比が崩れた。一方で分裂を継続した細胞では量比の崩れが回復することがわかった [109]。さらに RpoS レポーターを用いた実験からリボソームレポーターの結果から予想される挙動と一致する形で (p)ppGpp が減少することがわかった。

これらの結果から細菌は薬剤環境で耐性を下げるような遺伝子変異であっても、*cat* 遺伝子以外のグローバルな遺伝子発現プロファイルを変化させることによって適応できることを示した。しかしながら、適応状態に至るかどうかは細胞が経験する環境や遺伝子除去の履歴に依存していることを示唆している。

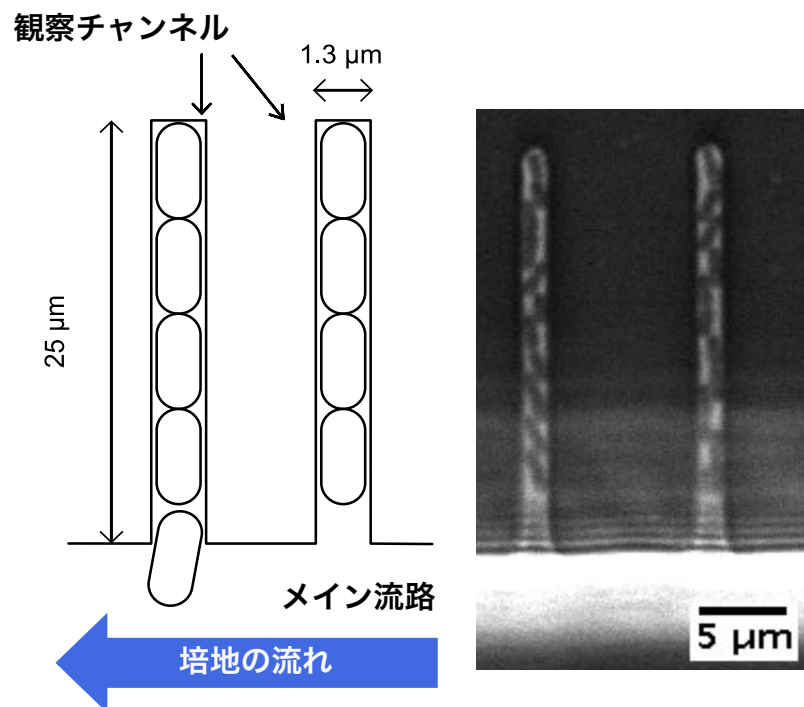


Fig. 2: **Mother Machine** マイクロ流体デバイスの概略図. mother machine は観察チャンネルとメイン流路からなる。観察チャンネルには細胞が捕捉されておりメイン流路から常に新鮮な培地が供給されることで成長分裂を安定に繰り返す。観察チャンネルの一方の端はメイン流路に繋がっており、こちらの端に近い細胞は培地の流れによって排出される。一方で逆の端は閉じられているため、観察チャンネル奥の細胞は長時間チャンネル内に留まり続ける。

2.3 方法

2.3.1 細胞株の構築

細胞株の構築の際には、特に指定のない限り Luria Bertani (LB, Difco) 液体培地を用いて 37°C で震盪培養した。また、顕微鏡の観察を含むいくつかの実験においては M9 最小培地を用いた。M9 最小培地は M9 salt (Difco)、2 mM MgSO₄ (Wako)、0.1 mM CaCl₂ (Wako)、0.2% (w/v) glucose (Wako) および 0.2% (v/v) MEM amino acid (50×) solution (Sigma) から構成される。必要に応じて以下の薬剤および他の化合物を添加した。使用した濃度は特に記述のない限り、以下の通りである。ampicillin (Amp, Wako); 50 μg/mL, kanamycin (Km, Wako); 20 μg/mL, chloramphenicol (Cp, Wako); 15 μg/mL, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Wako); 0.1 mM。

プラスミドおよび細胞株の構築に使用した、細胞株、プラスミド、プライマーはそれぞれ Table S1、S2、S3 に記載されている。プラスミドは PRIME STAR (Takara) もしくは KOD-PLUS-Neo (TOYOBO) を用いて増幅した PCR 産物を DNA ligase (T4 DNA ligase, Takara) で接着するか、ExoIII クローニング [110] の手法を用いて構築した。このようにして構築したプラスミドは大腸菌 JM109 コンピテントセルにヒートショック (42°C、45 sec) を用いて導入し、適切な薬剤を含む LB 寒天培地で選択した。現れたコロニーについて GoTaq (Promega) を用いたコロニー PCR によってプラスミドの有無を確認し、LB 培地で一晩 37°C 培養したものをグリセロールストックにして -80°C で保存した。

mcherry-cat 遺伝子および *cat* 遺伝子は λ-Red リコンビネーション [31] を用いて大腸菌 F3 ゲノム (W3110 Δ*fliC*::FRT Δ*fimA*::FRT Δ*flu*::FRT [96]) の *intC* 部位に導入した (YK0080, YK0116, YK0134, YK0135, YK0147)。同様に蛍光ラベルされたりボソームタンパク質レポーター遺伝子 (*rplS-mcherry* および *rpsB-mvenus* または *rplS-mvenus* および *rpsB-mcherry*) の構築についても λ-Red リコンビネーションを用いて大腸菌 BW25113 株に導入した (MUS3, MUS13)。これらのリボソームタンパク質レポーター遺伝子は P1 フェージを用いた形質転換で F3 株に導入した (MUS5, MUS6, MUS16)。これらのリボソームレポーター株は若本研究室特任助教の梅谷実樹博士が構築したものを頂いた。これらの遺伝子組換えを行ったコロニーは Km を含む LB 寒天培地で選択し、コロニー PCR によって遺伝子組換えの有無を確認した。遺伝子組換えに成功した細胞は pCP20 プラスミドを用いた *flp*-FRT 組換えによって Km 耐性遺伝子を除去した [31]。これらの *loxP* に挟まれた *mcherry-cat* 遺伝子または *cat* 遺伝子を持つ細胞に対して電気穿孔法を用いて pYK022 プラスミドを導入し、遺伝子組換え実験に用いる大腸菌株 YK0083, YK0118, YK0136, YK0137, YK0148 を構築した。

耐性遺伝子を失った細胞株 (YK0085, YK0138, YK0139, YK0149) の構築のために、耐性大腸菌 YK0083, YK0136, YK0137, YK0148 をそれぞれ Amp を含んだ 2 mL の LB 液体培地で一晩培養した。培養液 10 μL を Amp および IPTG を含む 2 mL の M9 合成培地に加えた。この培養液を 3 時間 37°C で震盪培養し、PA-Cre の発現を誘導した。その後、この試験管に対して青色 LED (CCS) を 24 時間照射した。この時の照射強度は 6.8 mW であり、これは顕微鏡下でのデバイス上における照射強度と同一になるようにした。この培地を 100 μg/mL Amp を含んだ LB 寒天培地に塗布し、一晩 37°C で培養した。生えてきたコロニーの耐性遺伝子の有無はコロニー PCR によって確かめた。意図した遺伝子長を持つコロニーを Amp を含む 2 mL の LB 液体培地で一晩 37°C で培養し、グリセロールストックとして -80°C で保存した。

作製したプラスミドおよび遺伝子を組換えた細胞株については、それぞれ PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) および Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega) を用いて抽出した。プラスミドおよびゲノム上の改変部位については PRIME STAR を用いて PCR で増幅した。増幅した塩基配列は外注によってサンガー法で確認した (FASMAC)。

2.3.2 遺伝子組換え効率の測定

大腸菌株 YK0083 を Amp を含んだ LB 液体培地で一晚培養した。100 μ L の培養液を 21,500 \times g で遠心分離し (CT15E、himac、Hitachi)、上清を捨てたのち、1 mL M9 培地で懸濁した。“IPTG” 条件では Amp および IPTG を添加した 2 mL の M9 培養液の中に懸濁液を加えた。“no IPTG” 条件では Amp を添加した 2 mL の M9 培養液を用いた。試験管にはアルミホイルを巻き、意図しない光の照射を防いだ。培養開始時の OD₆₀₀ は 0.001 になるようにした (分光光度計; UV-1800、Shimadzu)。PA-Cre の発現誘導のため 3 時間 37°C で震盪培養したのち、試験管のアルミホイルを取り除き、37°C で震盪培養しながら LED から青色光を照射した。この時の照射強度は 6.8 mW になるように調整した。青色光照射時間は Fig. 4 の条件に対応させた。培養時間を一定にするため、照射時間が 6 時間に満たない試験管については、照射時間を過ぎたあとは再度アルミホイルで試験管を覆い 37°C で震盪培養を続けた。

耐性遺伝子を失った細胞の割合を調べるため、照射開始から 6 時間後に震盪培養を停止させ、培養液を OD₆₀₀ = 1.0×10^{-6} となるように薄めた。希釈した培養液 150 μ L を 100 μ g/mL Amp を含んだ LB 寒天培地に塗布し、寒天培地を入れたシャーレごとアルミホイルで覆った。この培地を 37°C で 18 時間培養した。培養後、培地に生えてきたコロニーの数および、蛍光を発するコロニーの数を倒立顕微鏡を使って、白色光照射条件と蛍光タンパク質 mCherry の励起光照射条件で数えた (stereomicroscope: Olympus SZ61; LED 光源: NIGHTSEA SFA-GR)。耐性遺伝子を失った細胞の割合は蛍光を発しないコロニー数を全コロニー数で割ることで求めた。蛍光の有無と耐性遺伝子の除去の関係を検証するために蛍光を発するコロニー、発しないコロニーのそれぞれについてコロニー PCR を行い、*cat* 遺伝子の有無と蛍光の有無が対応することを確認した。

2.3.3 MIC 測定における細胞の培養

グリセロールストックに保存された細胞を Amp を含む 2 mL の LB 培地 (Fig. 7、17 と 26) または M9 培地 (Fig. 10) に植菌した。この培地を 37°C で一晚 200 rpm で震盪培養した。100 μ L の培養液を 1.5 mL チューブにとり、21,500 \times g で 3 分間遠心分離した。上清を廃棄したのち、新たに 1 mL の M9 培地でペレットを懸濁した。この培地の濁度を測定し、Amp を含んだ 2 mL M9 培地に加えた。培養開始時の OD₆₀₀ は 0.01 になるようにした。3-4 時間、37°C で震盪培養した後、この培地を新たな M9 培地に OD₆₀₀ が 0.001 になるように加えた。この培地には 0.1 μ g/mL から 1000 μ g/mL の範囲の濃度で Cp を投与した (Fig. 7、10、17 と 26)。23 時間、37°C で培養した後、この培地の濁度を分光光度計 (Fig. 7、17 と 26) またはプレートリーダー (FilterMax F5、Molecular Devices; Fig. 10) で測定した。

2.3.4 デバイス作製

初めにメイン流路と観察チャンネルを転写するためのフォトマスクを、レーザー描画装置 (DDB-201-TW、Neoark) を用いてマスクブランクス (CBL4006Du-AZP、Clean Surface Technology) に描画し作製した。マスクブランクス上のフォトレジストは NMD-3 (Tokyo Ohka Kyogo) によって現像し、溶解した部分のクロム層は MPM-E30 (DNP Fine Chemicals) によって取り除いた。アセトン (Wako) を用いて残りのフォトレジストを取り除き、MilliQ 水でリンスした後ブロアーを用いて乾燥させた。

mother machine のための鋳型はシリコンウェハー (ID447、 $\phi=76.2$ mm、University Wafer) の上に作製した。まず、SU8-2 (MicroChem) をウェハー上に $1.2 \mu\text{m}$ の高さになるようにスピコートを用いて塗布した。塗布したウェハーを 65°C で 1 分、その後 95°C で 3 分加熱した。このウェハーに対して観察チャンネルのフォトマスクを使い、マスクアライナー (MA-20、Mikasa) で UV 光を三回照射した (各照射 1.7 ミリ秒、 $22.4 \text{ mW}/\text{cm}^2$)。照射後、ウェハーを 65°C で 1 分、その後 95°C で 3 分加熱し、SU8 developer (MicroChem) で SU8 を溶解した。ウェハーは 2-プロパノール (Wako) でリンスし、乾燥させた。

次に SU8-3025 (MicroChem) を用いてウェハーに高さ $25 \mu\text{m}$ となるように塗布した。塗布したウェハーを 65°C で 3 分、その後 95°C で 7 分加熱した。このウェハーに対してメイン流路のフォトマスクを使い、マスクアライナーで UV 光を三回照射した (各照射 30 秒、 $22.4 \text{ mW}/\text{cm}^2$)。照射後、ウェハーを 65°C で 3 分、その後 95°C で 10 分加熱し、SU8 developer で SU8 を溶解した。ウェハーは 2-プロパノールでリンスし、乾燥させた。

ポリジメチルシロキサン (PDMS) の基質およびエージェント (Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit、Dow Corning) を 10:1 の割合で混ぜて、アルミホイルで作ったトレイで覆われた SU-8 の鋳型に流し込んだ。真空引きによって気泡を取り除いた後、 65°C で 1 時間以上加熱した。固まった PDMS のデバイス部分を切り出し、メイン流路の両端に穴 ($\phi=2.0$ mm) を開けた。この PDMS デバイスを 2-プロパノールで洗い、 65°C で 30 分以上乾燥した。

PDMS に貼り付けるカバーガラス (厚さ: $0.13\text{-}0.17$ mm、 24×60 mm、Matsunami) については、10 倍希釈したコンタミノン溶液 (Contaminon[®] LS-II、Wako) で 30 分、99.5% エタノール (Wako) で 15 分、そして 0.8 M NaOH 溶液 (8 M NaOH (Wako) を 10 倍希釈したもの) で 30 分間超音波洗浄した。洗浄溶液を変える各ステップ毎にカバーガラスは MilliQ 水でリンスした。洗い終わったカバーガラスは 140°C で 1 時間乾燥させた。

作製した PDMS デバイスと洗ったカバーガラスを貼り付けるため、コンパクトエッチャー (FA-1、SAMCO) を使い、表面に酸素プラズマを照射した (O_2 : $20 \text{ mL}/\text{分}$ 、RF Power: 25 W 、照射時間: 10 秒)。貼り付けた後 65°C で 5 分加熱した。その後、PDMS の穴にシリコンチューブ (内径: 1 mm 、外径: 2 mm 、Tigers Polymer Corporation) を差し込み、穴とチューブのつなぎ目に少量の固まっていない PDMS を塗った。 65°C で一晩加熱し、チューブと PDMS デバイスを固定した。

2.3.5 顕微鏡観察のための細胞培養と手順

グリセロールストックに保存された細胞を Amp を含む 2 mL の LB 培地に植菌した。この培地を 37°C で一晩 200 rpm で震盪培養した。 $200 \mu\text{L}$ の培養液を 1.5 mL チューブにとり、 $21,500 \times g$ で 3 分間遠心分離し

た。上清を廃棄したのち、新たに 1.5 mL の M9 培地でペレットを懸濁した。希釈した培養液を Amp を含んだ 50 mL M9 培地に初期 OD₆₀₀ が 0.01 となるように加え、37°C で 5-6 時間、200 rpm で震盪培養した。この培養液 50 mL を 50 mL チューブに移して、2,350 × g で 5 分間遠心分離機 (CT6E、himac、Hitachi) で遠心分離した。遠心分離してできた細胞のペレットを 200 μL の M9 培地で再懸濁した。

mother machine デバイスに細胞を詰める前に、シリンジを用いて、デバイスの観察チャンネルおよびメイン流路を 99.5% エタノール、M9 培養液、1%(w/v) bovine serum albumin (BSA、Wako) の順番に 0.5 mL ずつ流して洗った。洗浄後に細胞の懸濁液をデバイスに導入し、37°C で 1-2 時間培地を流すことなく暗所に静置することで観察チャンネルに細胞が入ることを促した。細胞がチャンネルに入ったことを確認した後、0.1 mM IPTG および 0.1% BSA を添加した M9 培地を 2 mL/h で流し始めた。Cp 環境下での遺伝子除去実験の場合、培地を流し始めた段階から 15 μg/mL Cp も培養液に添加した。mother machine 内で一晩培養した後、タイムラプス撮影を開始した。一細胞計測実験において、指定したタイミングで青色光を 30 分照射した。培地の流速は 2 mL/h を維持し、メイン流路に細胞が凝集し詰まることを抑止するため、1 日に 1-2 回程度 30 分間、5 mL/h に増加させた。

2.3.6 一細胞計測した細胞画像の取得と解析

タイムラプス撮影は、蛍光顕微鏡 ECLIPSE Ti (Nikon) に 100× 油浸対物レンズ (Plan Apo λ, NA 1.45, Nikon)、デジタル CMOS カメラ (ORCA-flash, Hamamatsu Photonics)、蛍光の励起のための LED 光源 (DC2100, Thorlabs) を取り付けたもので行った。位相差像の撮影には、ND フィルターおよび赤色フィルターを通した透過光を、*mcherry-cat* の除去実験の際には 20 ミリ秒、リボソームのレポーター株、RpoS レポーター株を用いた *cat* の除去実験の際には 50 ミリ秒照射した。赤色フィルターは意図しない PA-Cre の活性化を防ぐために導入した。蛍光画像の撮影は適切なフィルターキューブ (mVenus の蛍光撮影; YFP HQ (Nikon)、mCherry の蛍光撮影; TxRed (Nikon)) を通して行った。*mcherry-cat* 遺伝子除去実験では、mCherry の蛍光画像は 2 分毎に 500 ミリ秒間の露光時間で撮影した。リボソームレポーター株の除去実験においては mVenus および mCherry の蛍光画像を 10 分毎に露光時間 100 ミリ秒で撮影した。RpoS レポーター株の除去実験においては mCherry の蛍光画像を 10 分毎に 250 ミリ秒間撮影した。意図しない遺伝子除去を避けるため、青色光照射後からは IPTG を培養液から除いた。

遺伝子除去実験における顕微鏡下での青色光の照射は顕微鏡と独立して制御した。青色光の光源にはテーブル LED (7.2 mW、波長;464-474 nm、60 LED/m、LED PARADISE) を用いて、mother machine デバイスの周りに取り囲むように設置した。LED 照射の ON/OFF はタイマー (REVEX) で制御した。

画像解析には ImageJ Fiji (<http://fiji.sc/>) を利用した。mother machine 画像の位置合わせには mother machine Analyser (MoMA) マクロ内の HyperStackReg を利用した [97]。細胞の輪郭抽出には位相差像を用いて半自動的にを行い、細部の修正を iPad Pro の Sidecar を用いて手動で行った。細胞の輪郭抽出と、追跡のためのマクロは過去に報告されたものを用いた [96]。遺伝子の除去は mCherry-CAT の蛍光 (*mcherry-car* 遺伝子除去実験) または伸長率 (*cat* 遺伝子除去実験) から判断した。耐性遺伝子を失った細胞のうち分裂を続けた細胞系列 (growth-restored) と続かなかった細胞系列 (growth-halted) の分類は青色光照射と Cp 投与の遅い方から 50

時間後から 60 時間後までの 10 時間に分裂をしているかで分類した。

ImageJ Fiji から取得した一細胞系列のデータは Python3 (<https://www.python.org/>) および Numpy (<https://numpy.org/>), Scipy (<https://www.scipy.org/>), pandas (<https://pandas.pydata.org/>), Matplotlib (<https://matplotlib.org/>), seaborn (<https://seaborn.pydata.org/>), FastDTW [111], JupyterLab (<https://jupyterlab.readthedocs.io/en/latest/>) のライブラリを用いて解析した。

階層クラスタリング (Fig. 18) においては、一細胞系列の mCherry-CAT の蛍光輝度値および細胞の伸長率の推移を分類した。この解析には実験全体の一細胞系列のデータを用いた。各時系列の組み合わせの一致度は dynamic time warping と呼ばれる尺度を用いた [111]。クラスタリングには凝集型階層クラスタリングを用いた [112, 113]。複数の時系列のクラスターと一つの時系列、またはクラスター同士の一致度はクラスター内の各要素の時系列の一致度の平均から算出した。

2.3.7 mother machine デバイスからの細胞サンプリングと全ゲノム解析

mother machine デバイスでのタイムラプス撮影の後、培地を 0.1% BSA を含む M9 培地に交換し、Cp を除いた。6 時間以上培養を続けることで、耐性遺伝子を失った状態で成長を回復した細胞系列の成長をさらに回復させた。その後、mother machine デバイスから排出される廃液を 1.5 mL チューブに集めて OD₆₀₀ を分光光度計で測定した。細胞溶液を M9 培地で薄め、OD₆₀₀ が 3.3×10^{-9} に対応する濁度まで薄めた。200 μ L の希釈溶液を 96 穴プレートの各穴に入れた。200 μ L の希釈溶液に入っていると想定される細胞の個数 k はポアソン分布 $P(k) = \lambda^k e^{-\lambda} / k!$ に従うと想定した。実験で $P(0) = 0.58$ という値が得られたため、平均 $\lambda = 0.54$ と算出した。そのため $P(1) = 0.31$, $P(2) = 0.085$, かつ $P(k \geq 3) = 0.018$ となる。96 穴プレートはアルミホイルで遮光しつつ、37°C で二晩 200 rpm で震盪培養した。細胞が現れた穴に対して、PCR を行い、*cat* 遺伝子の有無を確認した。*cat* のある細胞およびない細胞の両方を選択し、37°C で一晩震盪培養した。これらのサンプルを -80°C でグリセロールストックとして保存した。

回収した大腸菌の mCherry-CAT の蛍光輝度値の測定のため (Fig. 10)、グリセロールストックに保存された細胞を Amp を含む 2 mL の M9 培地に植菌し、37°C で一晩 200 rpm で震盪培養した。この培養液 10 μ L を新たに Amp を含んだ 2 mL M9 培地に加え、37°C で 4 時間震盪培養した。細胞培養液 0.3 μ L を 1.5% (w/v) の寒天 (Wako) で固めた M9 寒天培地の上に添加し、カバーガラスで挟んだ。蛍光の撮影には、蛍光顕微鏡 ECLIPSE Ti (Nikon) に 100 \times 油浸対物レンズ (Plan Apo λ , NA 1.45, Nikon)、デジタル CCD カメラ (ORCA-Rs, Hamamatsu Photonics)、蛍光の励起のための LED 光源 (DC2100, Thorlabs) を取り付けたもので行った。位相差像の撮影では一回の撮影あたり 50 ミリ秒ハロゲンランプ光を照射した。mCherry の蛍光画像の撮影には TxRed のフィルターキューブを用いて 500 ミリ秒の励起光照射を行った。

次に、回収した細胞の全ゲノム解析を行った。グリセロールストックに保存された細胞を 5 mL の M9 培地に植菌し、37°C で一晩 200 rpm で震盪培養した。分光光度計を用いてこの培養液の濁度を測定した。その後 rifampicin (Wako) をこの培養液に最終濃度が 300 μ g/mL となるように添加した。3 時間 37°C で静置した後、これらの細胞のゲノムを DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN) を用いて抽出した、その後、TruSeq DNA PCR Free kit (illumina) を用いて全ゲノムシーケンズのライブラリ調整を行なった。このライブラリを

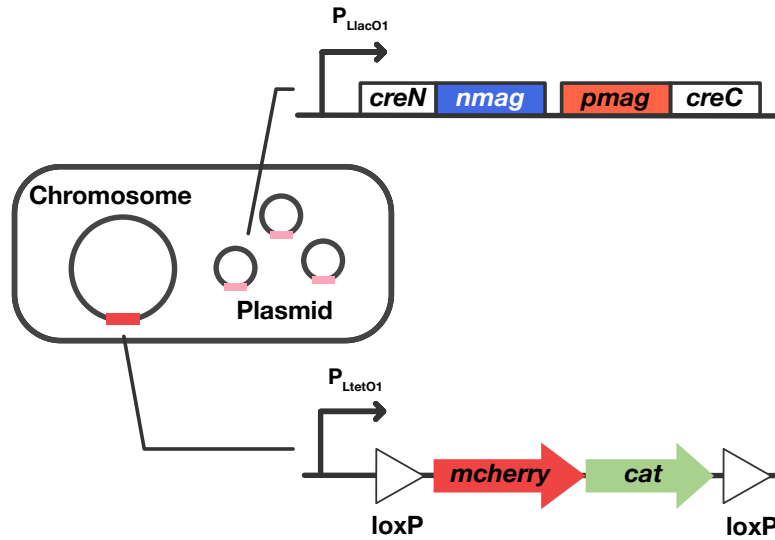


Fig. 3: 大腸菌 YK0083 株の概略図。 YK0083 株は染色体上の *intC* 部位に青色光の照射によって除去可能な *mcherry-cat* 遺伝子を持つ。この *mcherry-cat* 遺伝子は恒常発現プロモーター P_{LtetO1} の下流にある。また、PA-Cre システムのための遺伝子 (*creN-nmag* 遺伝子及び *pmag-creC* 遺伝子) を発現する低コピープラスミド pYK022 を持っている。CreN-nMag、CreC-pMag は IPTG によって発現誘導される。

NovaSeq (illumina) を用いてシーケンス情報を取得した。ライブラリ調整およびシーケンスは Macrogen Japan (Tokyo, Japan) に外注した。シーケンスデータは breseq を用いて解析した [114]。

2.4 結果

2.4.1 バッチ培養における遺伝子組換え

薬剤耐性遺伝子の除去に対する一細胞レベルでの応答を調べるため、蛍光タンパク質 mCherry と融合させた Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) タンパク質を発現する大腸菌株を構築した (Fig. 3)。CAT タンパク質は Cp をアセチル化することで不活化する耐性タンパク質である [66, 67]。 *mcherry-cat* 遺伝子は大腸菌の染色体上に導入した。導入した遺伝子の上流および下流には組換え酵素 Cre の認識配列である loxP 配列も導入した。Cre を制御するため、PA-Cre システムを用いた。このシステムに必要な *pmag-creC*、 *creN-nmag* はもともと真核細胞に対してデザインされたものである。大腸菌で使用するため、低コピープラスミド pMW118 に *pmag-creC*、 *creN-nmag* 遺伝子を移し、上流に IPTG で誘導可能な P_{LlacO1} プロモーターを挿入し、 *pmag-creC* と *creN-nmag* 遺伝子のリンカーとなっていた P2A ペプチド [115] を除去したプラスミド pYK022 を作製した。 *mcherry-cat* 遺伝子を導入した大腸菌に pYK022 を導入したこの構築した細胞株を YK0083 と名付けた。

まず、大腸菌内における PA-Cre システムの評価を行った (Fig. 4)。YK0083 株を試験管内で培養し、0~6

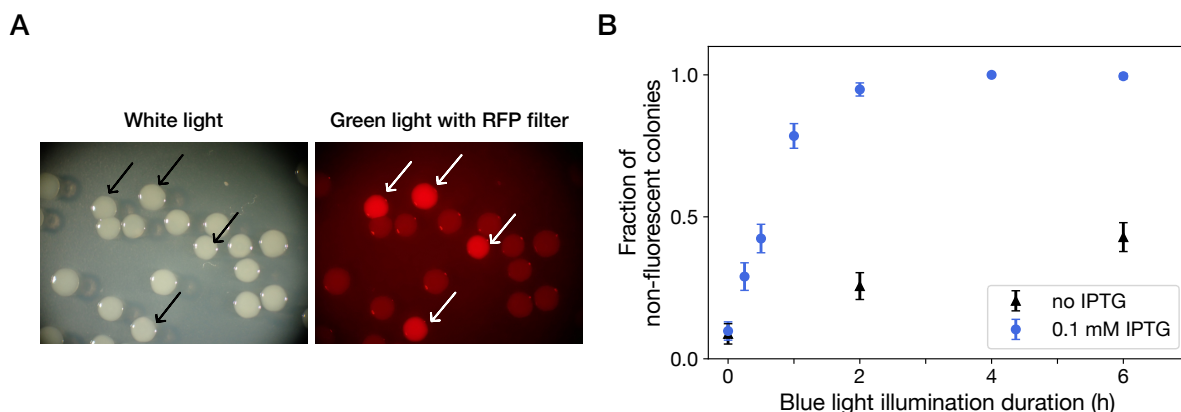


Fig. 4: バッチ培養での青色光照射による耐性遺伝子除去. (A) 青色光照射後にまいた大腸菌 YK0083 のコロニー画像。この YK0083 株は 1 時間の青色光照射後に LB アガーに塗布した。コロニーは白色光 (左) 及び、mCherry-CAT 蛍光の励起光 (右) で撮影した。mCherry-cat 遺伝子を持つ細胞のコロニーは励起光下で見分けることができる (矢印のコロニー)。 (B) 青色光照射時間と mCherry-CAT 蛍光を発しない細胞の割合の関係。点は平均を表している。エラーバーは 1.96 倍の標準誤差を示している。no IPTG 条件 (黒三角) では細胞は IPTG のない M9 培地で培養しながら青色光照射を行った。0.1 mM IPTG 条件 (青丸) では細胞を 0.1 mM IPTG を投与した M9 培地で培養しながら青色光照射を行った。 ($N = 239$ (no IPTG, 0 h); $N = 328$ (no IPTG, 2 h); $N = 364$ (no IPTG, 6 h); $N = 327$ (0.1 mM IPTG, 0 h); $N = 335$ (0.1 mM IPTG, 0.25 h); $N = 373$ (0.1 mM IPTG, 0.5 h); $N = 344$ (0.1 mM IPTG, 1 h); $N = 350$ (0.1 mM IPTG, 2 h); $N = 296$ (0.1 mM IPTG, 4 h); $N = 209$ (0.1 mM IPTG, 6 h))

時間青色光 ($\lambda = 470$ nm, 6.8 mW) を照射した。この培養液を LB 寒天培地に塗布し蛍光を失ったコロニーの割合を測定した (Fig. 4A, B)。その結果、青色光照射時間が長くなるほど蛍光を失う細胞の割合が増加し、4 時間の照射で 100% ($n = 296$) の細胞が蛍光を失った (Fig. 4B)。一方で IPTG を投与していない場合、青色光を 6 時間照射した後であっても $57 \pm 5\%$ の細胞は蛍光を発していた (Fig. 4B)。コロニー PCR の結果から、蛍光の消失と mCherry-cat 遺伝子の除去が対応することも確かめられた (Table 1)。また、cat 遺伝子が Cre による除去後に細胞内のゲノム上の他の部位に残っているかを確かめるため、intC 部位および cat 遺伝子内の配列を増幅するようなコロニー PCR を行ったところ intC 部位での遺伝子除去の有無と cat 遺伝子の有無が完全に一致した (Table 2)。この結果は Cre による除去後、cat 遺伝子が残存したり、ゲノム上の他の部位に残っていないことを示唆している。

2.4.2 クロラムフェニコールのない環境における耐性遺伝子の除去

次に Cp のない培養条件において mother machine 内での遺伝子除去を行った。顕微鏡下で青色光を照射するため、卓上の LED 照射装置 ($\lambda = 464 \sim 474$ nm、観察場所における LED の強度; 6.8 mW) を自作した (Fig. 5)。

Table 1: *mcherry-cat* 遺伝子の除去. mCherry-CAT 蛍光と *cat* 遺伝子の存在の対応関係. FL+及び FL-は目で見て mCherry-CAT の蛍光が確認された/確認されなかったコロニーを表している. *cat+*及び *cat-*はコロニー PCR によって *cat* 遺伝子が確認された/確認されなかったコロニーを表している. 蛍光が確認されなかった細胞は全て *cat* 遺伝子を失っていた. また、1つのコロニーを除き全ての蛍光を確認したコロニーは *cat* 遺伝子を有していた.

	FL +	FL -
<i>cat</i> +	19	0
<i>cat</i> -	1	20

Table 2: *mcherry-cat* 遺伝子の除去. コロニー PCR で *intC* 部位および *cat* 遺伝子内を増幅させた時のコロニーの数. *intC* 部位に $P_{LtetO1}loxP$ -*mcherry-cat-loxp* 遺伝子を導入した細胞株 YK0118 に対して 1 時間青色光を照射した後、LB プレートにまいて一晩培養して出てきたコロニーを調べた. *cat* +は *cat* の PCR バンドが確認されたコロニー、*cat* -は *cat* の PCR バンドが増幅しなかったコロニーを表す. また、 $intC::P_{LtetO1-loxp}$ -*mcherry-cat-loxp* は *intC* 部位の遺伝子除去がされていないコロニーであり、 $P_{LtetO1-loxp}$ は遺伝子除去に成功したコロニーを表す. 全ての *intC* 部位で遺伝子が除去されていたコロニーが *cat* 遺伝子を失っていることから、*cat* 遺伝子がゲノム上の他の部位に残ることがないことを確認した.

	<i>cat</i> +	<i>cat</i> -
$intC::P_{LtetO1-loxp}$ - <i>mcherry-cat-loxp</i>	19	0
$intC::P_{LtetO1-loxp}$	0	21

30 分間の青色光照射により 25%の細胞系列 (50/200) が mCherry-CAT の蛍光を失った (Fig. 6A)。これらの細胞では *mcherry-cat* 遺伝子が除去されたと考えられる. mCherry-CAT の蛍光シグナルは mCherry-CAT タンパク質が細胞の成長分裂で希釈されることによって 4-5 世代で観察されなくなった (Fig. 6B)。また、30 分間の青色光照射や遺伝子組換えは細胞の成長に影響を与えなかった (Fig. 6C)。一方で青色光を照射しなかった場合、蛍光を失う細胞は現れなかった (0/422 (観察時間; 30 時間))。これは青色光照射が耐性遺伝子の除去を誘導していることを示している。

2.4.3 クロラムフェニコール投与下における耐性遺伝子の除去に抗した部分的な成長の回復

次に常に 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cp を含む培地を流し続けつつ、mother machine 内で YK0083 株の耐性遺伝子 *mcherry-cat* の除去を誘導した. この濃度の Cp は耐性遺伝子を持つ YK0083 株の最小生育濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に比べて十分小さく、細胞の成長にも大きな影響を与えない (Fig. 7)。一方で、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cp は耐性遺伝子をあらかじめ失っている細胞株 YK0085 の MIC の 1.5 倍の濃度である (Fig. 7)。YK0085 株は YK0083 株をバッチ培養中に青色光を照射し、選択した細胞株である (2.3.1 を参照)。そのため、この濃度の Cp 環境下では、mother machine 内で耐性遺伝子を除去された YK0083 株の成長は停止すると予想された。

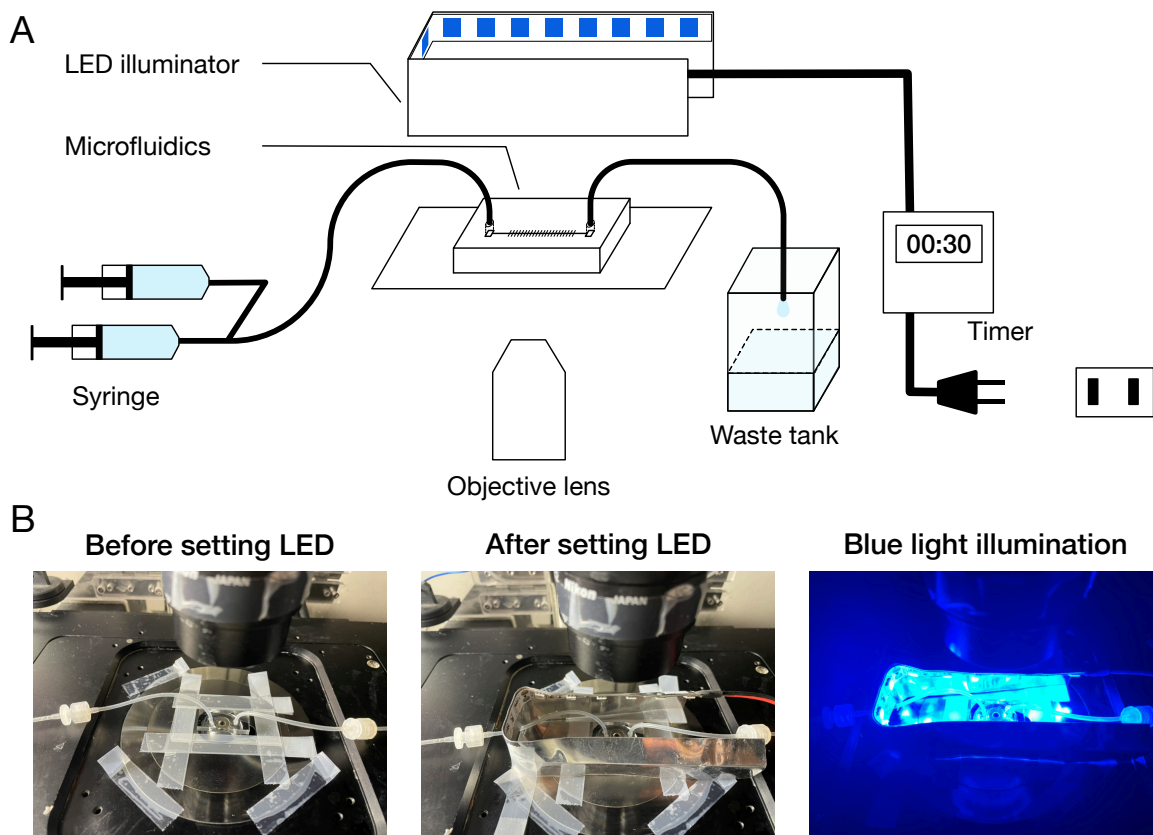


Fig. 5: 顕微鏡ステージ上での LED を用いた青色光照射. (A) 顕微鏡と LED 照射装置の概略図。マイクロ流体デバイスに青色光を照射するための自作の LED 照射装置を顕微鏡のステージ上に配置した。照射のタイミング、照射時間は顕微鏡とは独立に制御されたタイマーを用いた。(B) マイクロ流体デバイスとステージ上の LED 照射装置の画像。

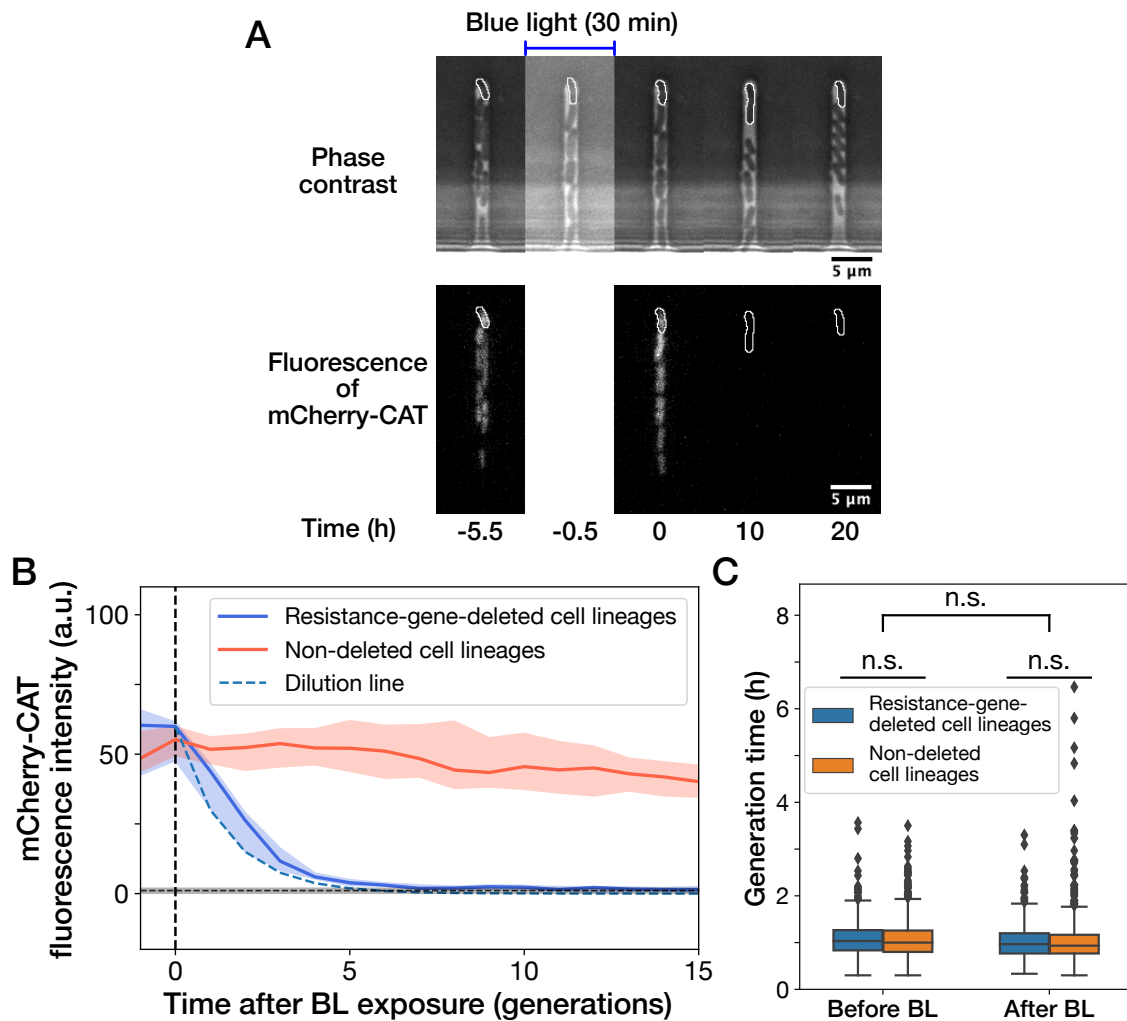


Fig. 6: 遺伝子除去に対する細胞応答の一細胞計測。(A) 遺伝子除去実験のタイムラプス画像。上下の画像はそれぞれ位相差像と、mCherry-CAT 蛍光画像を表している。観察チャンネルの閉じられた端に位置する細胞系列(画像内の白線で囲われた細胞)を追尾観察した。30分の青色光照射(-0.5 h から 0 h)によってこの細胞系列では mCherry-CAT の蛍光が失われた。(B) 耐性遺伝子を失った細胞系列 (resistance-gene-deleted cell lineages; 赤) 及び耐性遺伝子を失わなかった細胞系列 (non-deleted cell lineages; 青) の mCherry-CAT 蛍光輝度値の変化。線及び影の領域はそれぞれ中央値と 25-75%幅を表す。シアン色の破線は mCherry-CAT の蛍光輝度値が分裂ごとに半分になると仮定したときの想定される蛍光輝度値の減衰を表す。また水平に引かれた黒点線と灰色の領域はそれぞれ親株 W3110 Δ F3 を mother machine 内で観察した時の蛍光輝度値の中央値および 25-75%幅 (バックグラウンドレベル) を表す。(C) 耐性遺伝子を失った細胞と耐性遺伝子を持っている細胞の青色光照射前後 10 世代の世代時間。箱髭図の中心線、両端はそれぞれ世代時間の中央値、25-75%領域を示す。髭は外れ値を除いた最小値、最大値を表す。点は外れ値を表している。青色光照射前後、耐性遺伝子の有無で細胞系列を分けて世代時間を比べたところ、有意水準を 0.01 としたときに有意な差は観察されなかった。 $(p = 0.47$ (青色光照射前の耐性遺伝子を失った系列と失わなかった系列)、 $p = 0.027$ (青色光照射後の耐性遺伝子を失った系列と失わなかった系列)、 $p = 0.055$ (青色光照射前と照射後の細胞系列)、Mann-Whitney U test)。

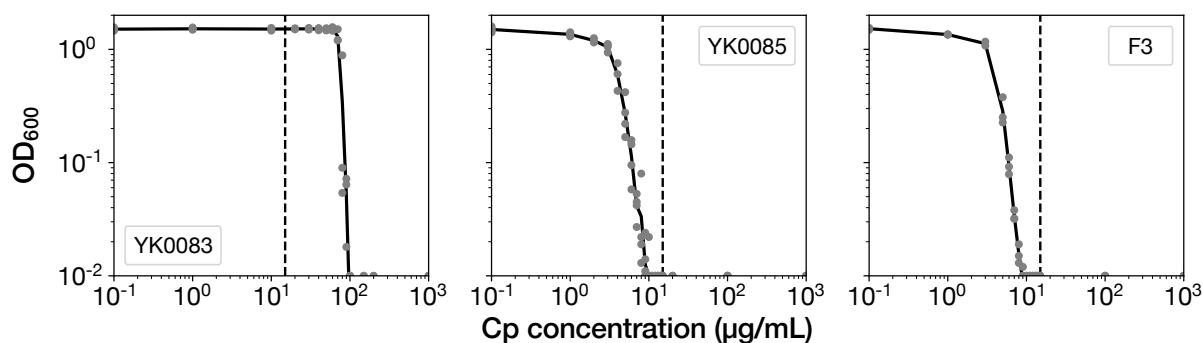


Fig. 7: **MIC test.** 灰色の点是对应する Cp 濃度の M9 合成培地で 23 時間各細胞株を培養した時の OD₆₀₀ の値である。OD₆₀₀ が 0.01 以下になる最小の Cp 濃度を各細胞の MIC として用いた。タイムラプスの実験では 15 µg/mL の Cp 濃度を用いた (破線)。この計測は少なくとも三回行った。

30 分間の青色光の照射は 24.5% (343/1399) の YK0083 細胞に *mcherry-cat* の除去を誘導した (Fig. 8A)。耐性遺伝子を失わなかった細胞系列 (non-deleted cell lineages) は細胞の世代時間も mCherry-CAT の蛍光輝度値にもあまり変化が見られなかった (Fig. 8B, C)。一方で、耐性遺伝子を失った細胞系列 (resistance-gene-deleted cell lineages) は徐々に成長速度が減少した (Fig. 8D-G)。これらの系列の mCherry-CAT の蛍光輝度値は 4-5 世代ほどでバックグラウンドレベルに低下し (Fig. 8D, F, 9A)、それに対応して、世代時間が増加した (Fig. 8E, G, 9B)。耐性遺伝子を失った細胞系列のうち 62.7% (163/260) が成長を停止させた (resistance-gene-deleted cell lineages (growth-halted)) 一方で、残りの 37.3% の細胞系列は成長、分裂を回復、継続し、*cat* 遺伝子なしに計測時間内で最大 30 世代以上安定に分裂を続けた (resistance-gene-deleted cell lineages (growth-restored)); Fig. 9A, B)。これらの成長を続けた細胞系列では Cp の投与が継続しているにもかかわらず、細胞の世代時間が 6.3 時間 (6-9 世代での中央値) から 3.2 時間 (15-30 世代の中央値) に回復した (Fig. 9B)。細胞の伸長率についても、成長の回復と同様に複数世代にまたがって回復した (Fig. 9C)。

私たちはこの Cp 投与下での成長の回復が、mCherry タンパク質との融合から放れ独立して発現するに至った *cat* 遺伝子が残存している、あるいは耐性を付与する新たな突然変異を獲得したことによるものではないかと考えた。この仮説を調べるため、mother machine デバイスで観察した際に排出される廃液を回収し、限界希釈法を用いて 1 個程度のごく少数の細胞から培養することで *intC* 部位において *mcherry-cat* を失った細胞集団を複数獲得した (Fig. 10A、詳細は 2.3.7 参照)。PCR と蛍光輝度値の測定から、*intC* 部位において耐性遺伝子を失った細胞では *cat* 遺伝子も mCherry 蛍光も失っていることを確かめた (Fig. 10B)。さらにこれらのサンプルに対して全ゲノムシーケンスを行ったところ、5 つの細胞サンプルのうち 4 サンプルには突然変異は確認されなかった (Table. 3)。1 つのサンプルについては点突然変異が確認されたものの、この点突然変異を持つ細胞サンプルは他の 4 サンプルや事前に耐性遺伝子を除去した細胞 YK0085 と同様に MIC に変化が見られなかった (Fig. 10C)。そのため、Cp 環境下での成長の回復の理由としてこの遺伝子変異の影響はないと考えられる。

また、細胞内に残存する mCherry-CAT タンパク質の影響で成長が維持されている可能性もないと考えられる。なぜなら、遺伝子欠損によって新たな生産が停止したタンパク質の場合、30 回の細胞分裂によってその量

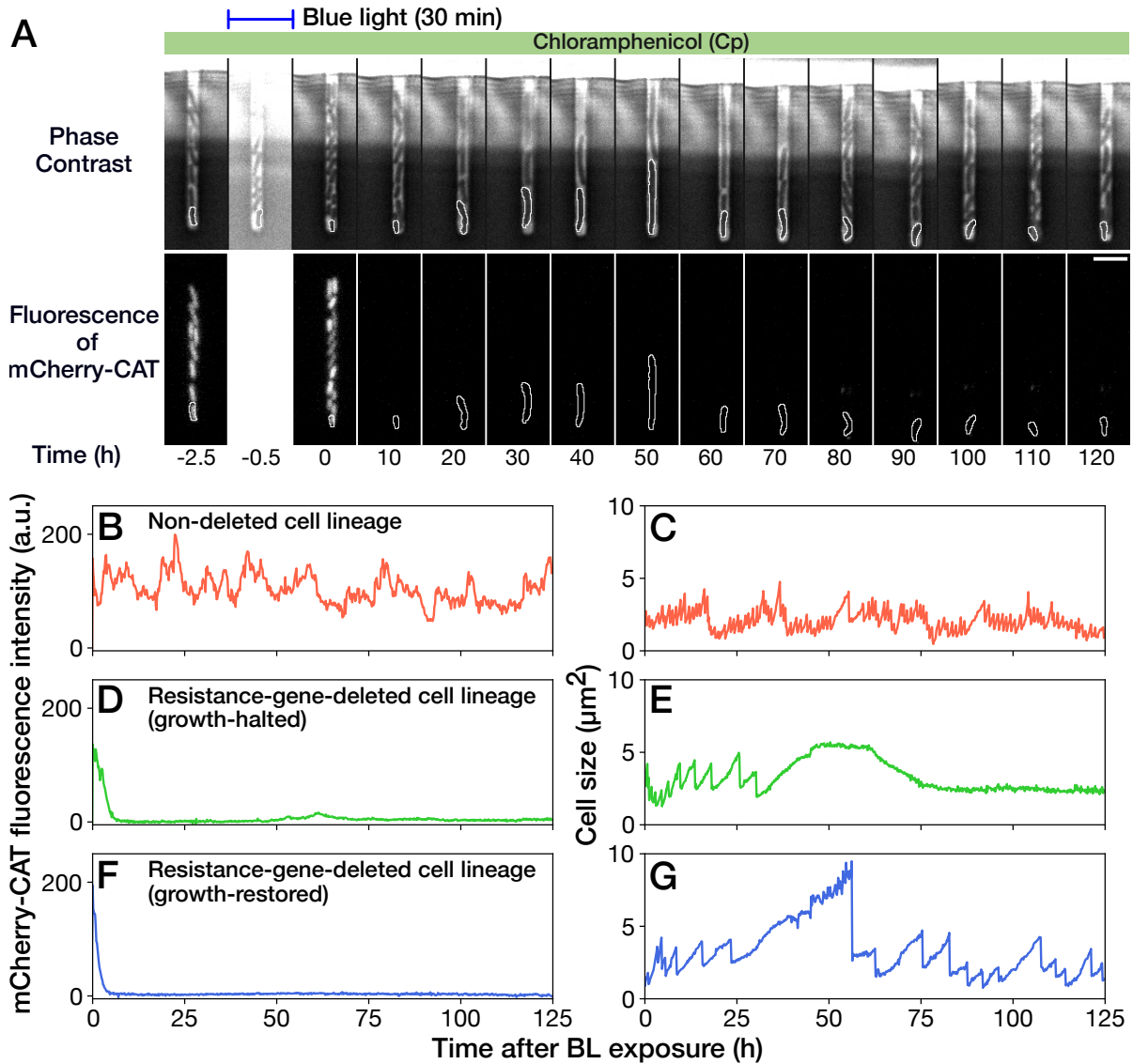


Fig. 8: Cp 環境下での Cp 耐性遺伝子除去実験. (A) Cp 環境下で Cp 耐性遺伝子を失っても成長、分裂を続けた細胞のタイムラプス画像。上下の画像はそれぞれ位相差像と、mCherry-CAT 蛍光画像を表している。観察チャンネルの閉じられた端に位置するの細胞系列 (画像内の白線で囲われた細胞) を追尾観察した。30 分の青色光照射 (-0.5 h から 0 h) によってこの細胞系列では mCherry-CAT の蛍光輝度値が失われた。スケールバー、5 μm 。(B-G) 一細胞系列の mCherry-CAT 蛍光輝度値と細胞サイズの推移。(B, C) 耐性遺伝子を失わなかった細胞系列 (Non-deleted cell lineages) (D, E) 耐性遺伝子を失って分裂を停止した細胞系列 (Resistance-gene-deleted cell lineages (growth-halted))。60 h 付近での細胞サイズの減少は細胞が Cp 投与環境下で収縮したことによるものである。(F, G) 耐性遺伝子を失ったにもかかわらず分裂を続けた細胞系列 (Resistance-gene-deleted cell lineages (growth-restored))。

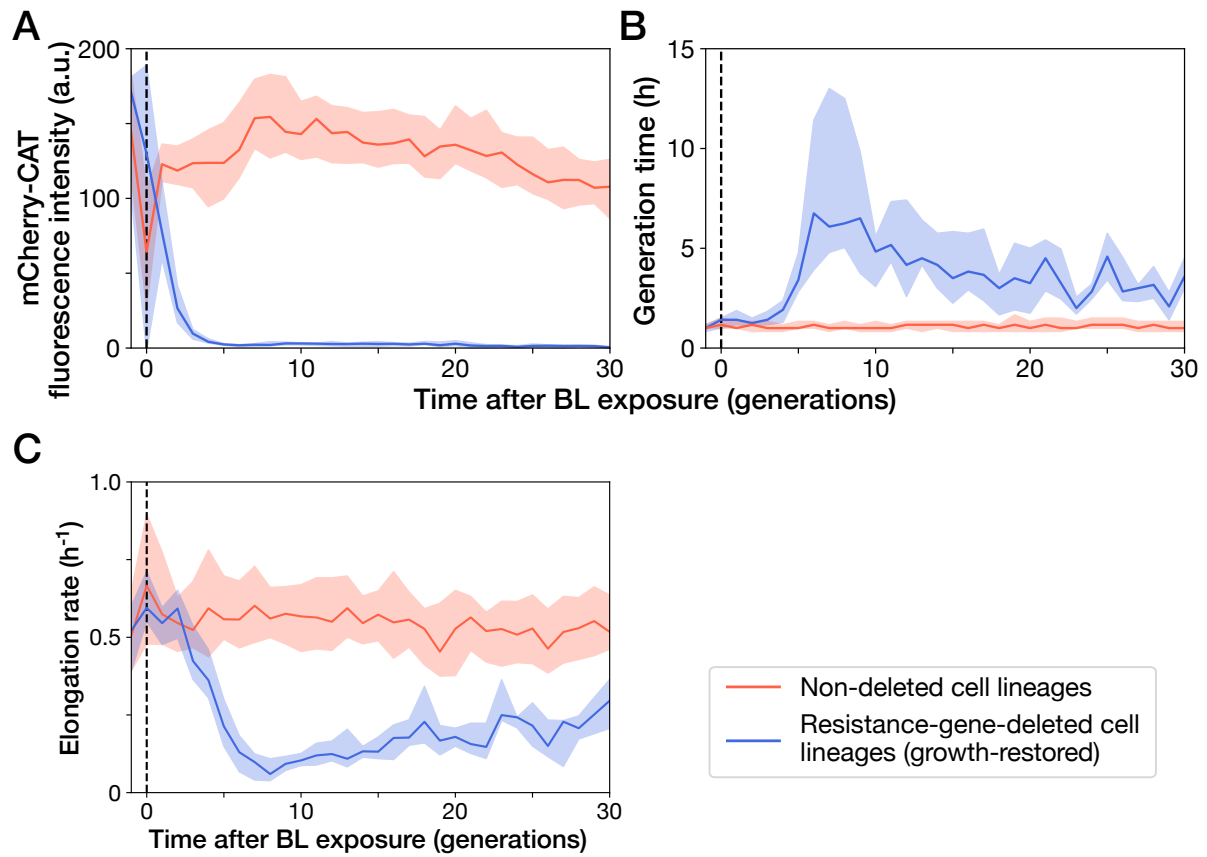


Fig. 9: C_p 環境下で C_p 耐性遺伝子を除去した細胞の世代ごとの表現型の変化. (A) mCherry-CAT の蛍光輝度値. (B) 細胞の世代時間. (C) 細胞の伸長率. 線と影の領域はそれぞれ中央値と 25-75% の領域を表す. 赤色は耐性遺伝子を失わなかった細胞系列に対応する. 青色は耐性遺伝子を失ったにもかかわらず分裂を継続した細胞系列に対応する. グラフの横軸は細胞の青色光照射後の世代に対応する.

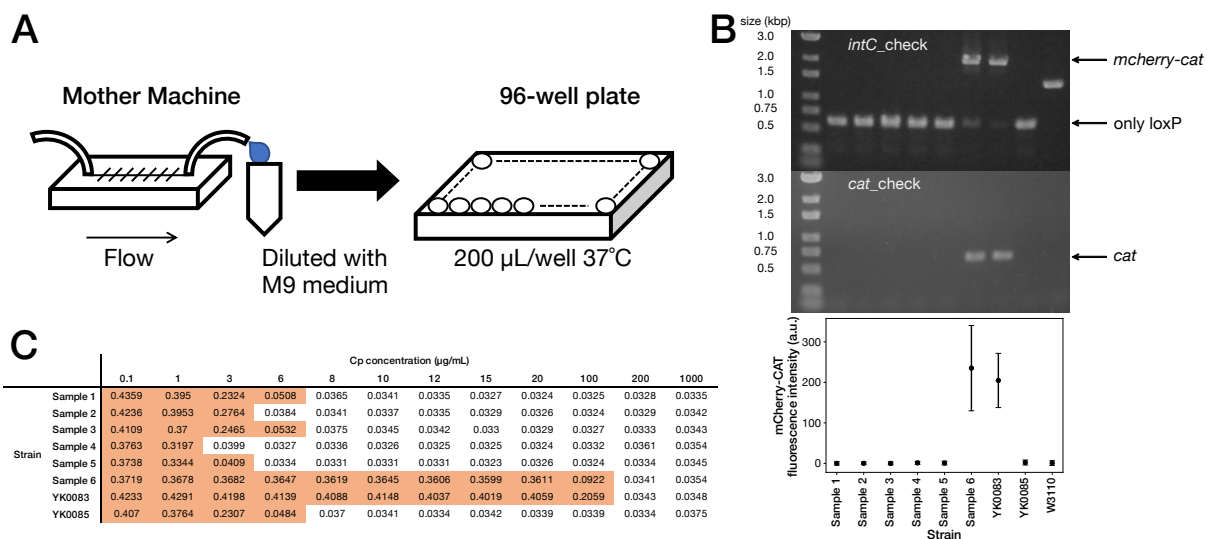


Fig. 10: mother machine から排出された細胞サンプルでの mCherry-CAT 蛍光と *mcherry-cat* 遺伝子除去の関係. (A) mother machine の廃液から耐性遺伝子を失った細胞を回収する方法の概略. 耐性遺伝子を失った細胞を取得するために Mother machine から排出された培養液を回収した. この培養液を新鮮な M9 培養液で段階的に希釈し、限界希釈した培養液を 96 穴プレートに入れて培養した. (B) 耐性遺伝子の除去と mCherry-CAT 蛍光の有無の対応関係. 細胞は 96 穴プレートで培養して増殖した細胞を用いた. *mcherry-cat* 遺伝子の除去は PCR によって *intC* 部位及び *cat* 遺伝子を調べることで確認した. サンプル 1-5 において *intC* 部位において *mcherry-cat* 遺伝子が確認されないこと及び *cat* 遺伝子が存在しないことを確認した. サンプル 6 では *mcherry-cat* 遺伝子を確認した. 下のプロットは各サンプルを M9 アガーにまき、顕微鏡を用いて撮影した mCherry-CAT の蛍光輝度値である. (C) MIC test. サンプル 1-6 及び YK0083、YK0085 を 23 時間、対応する Cp 濃度で培養した際の OD₆₀₀ の値である (開始 OD₆₀₀, 0.001). この MIC test は 96 穴プレートで行った. 背景がオレンジ色の場所は OD₆₀₀ > 0.04 に対応する. サンプル 1-5 では耐性遺伝子をあらかじめ除去した細胞株 YK0085 と比べて MIC の上昇は観察されなかった.

は $2^{30} \approx 10^9$ 倍に希釈される. 大腸菌一細胞を構成する全タンパク質数ですら 10^6 - 10^7 個程度と見積もられており、30 世代の間、細胞質に mCherry-CAT タンパク質が残りに残るとは考えにくい [116].

成長を停止した細胞系列と成長を続けた細胞系列の間には青色光照射前の mCherry-CAT の蛍光輝度値に有意な差は見られなかった (Fig. 11A). さらに耐性遺伝子の除去の成功/失敗にもこの青色光照射前の mCherry-CAT の蛍光輝度値に有意な差は見られなかった (Fig. 11A). 同様に、青色光照射前の大腸菌の伸長率についても耐性遺伝子の除去や除去後の細胞の運命との相関がなかった (Fig. 11B). これらの結果から、Cp を継続的に投与する実験条件では遺伝子除去のタイミングにおける mCherry-CAT の量や細胞の伸長率は *cat* 遺伝子除去の起こりやすさや成長を停止するか回復するかという細胞の運命決定に影響を与えないことがわかった.

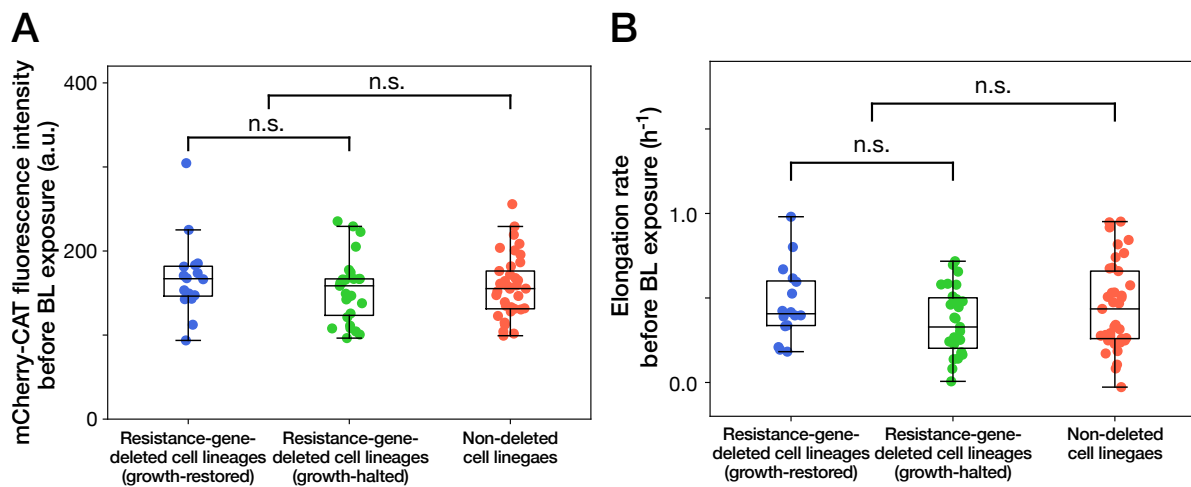


Fig. 11: 青色光照射前の mCherry-CAT タンパク質の発現量や伸長率は耐性遺伝子除去後の運命に影響を与えない. (A) 青色光照射前の mCherry-CAT 蛍光輝度値. 各点は細胞系列の青色光照射前、1 時間平均の mCherry-CAT の蛍光輝度値を表している. 青色は耐性遺伝子を失ったにもかかわらず分裂を継続した細胞系列に対応する. 緑色は耐性遺伝子を失って分裂を停止した細胞系列に対応する. 赤色は耐性遺伝子を失わなかった細胞系列に対応する. $p = 0.30$ (耐性遺伝子を失った細胞のうち分裂を継続した細胞系列としなかった細胞系列の比較); $p = 0.85$ (耐性遺伝子を失った細胞系列と失わなかった細胞系列の比較)、Welch の t 検定. (B) 青色光照射前の伸長率. 各点は細胞系列の青色光照射前、1 時間の細胞の伸長率を表している. 各点の色の対応については (A) と同様である. $p = 0.12$ (耐性遺伝子を失った細胞のうち分裂を継続した細胞系列としなかった細胞系列の比較); $p = 0.35$ (耐性遺伝子を失った細胞系列と失わなかった細胞系列の比較)、Welch の t 検定.

Table 3: 全ゲノムシーケンスを用いた突然変異の探索. mother machine から排出された細胞を限界希釈し、1 から数個の細胞由来の耐性遺伝子を失った細胞集団サンプル 1-5 を獲得した。このサンプルのうちサンプル 3 において 1 つの点突然変異を確認した。また、他のサンプルでは突然変異は確認されなかった。

Sample No.	Mutation	Position	Base	Annotation
Sample 1	no mutation			
Sample 2	no mutation			
Sample 3	mutation in <i>leuC</i> site	80471	G ->T	A132S
Sample 4	no mutation			
Sample 5	no mutation			

2.4.4 遺伝子除去から時間が経った後に Cp を投与すると成長の回復が阻害される

耐性遺伝子を持たない細胞株 YK0085 のバッチ培養での MIC が $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ より十分低いため、mother machine 内で YK0083 株の耐性遺伝子を除去した際にも全ての細胞が成長を停止すると予想された。しかしながら、実際には 40%の細胞が Cp の投与下でも成長、分裂を続けた。このような齟齬が mother machine デバイスを利用したことによって Cp が十分に効いていないことによるのかどうかを調べるため、Cp 耐性遺伝子を除去した細胞株 YK0085 を mother machine に導入し、Cp なしの環境で成長させた後 $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ Cp を投与する実験を行った (Fig. 12A-C)。YK0083 の耐性遺伝子除去実験の結果とは異なり、Cp の投与によって全ての細胞が成長、分裂を停止した (“Pre-deleted”; Fig. 12C)。この結果から、mother machine 内という特別な環境条件でも今回用いた Cp 濃度は感受性株の成長を停止させるのに十分な濃度であることがわかった。そのため Cp 耐性遺伝子の除去に抗した適応が mother machine という特別な環境によるものであるという仮説は否定された。一方で、この結果は細胞が耐性遺伝子なしに Cp の投与に耐えて、成長を回復するためには遺伝子除去のタイミングが重要であることを示唆している。

この遺伝子除去のタイミングについてさらに調べるために、耐性株 YK0083 を mother machine 内で Cp なしで成長させ、青色光の照射によって遺伝子を除去してから Cp を投与する実験を行った (Fig. 12A)。青色光の照射から Cp の投与までの時間は T_c とし、0 時間から 10 時間まで変化させた (Fig. 12A)。 T_c を変化させた実験において、*mcherry-cat* を失った細胞の割合は 24-28%であり、この割合は Cp 環境下で耐性遺伝子を失った細胞系列の割合 (24.5%) と比べて変化しなかった (Fig. 12B)。青色光照射後すぐに Cp を投与した場合、また、照射した 3 時間後に Cp を投与した場合、成長を続けた細胞系列の割合は Cp 環境下で青色光を照射した場合の割合とほとんど一致した ($T_c = 0$ 時間; 38.0% (93/245)、 $T_c = 3$ 時間; 44.8% (78/174); Fig. 12C)。一方で $T_c = 6$ 時間の時、成長を続けた細胞の割合は 18.5% (34/184) に減少した (Fig. 12C)。さらに青色光を照射した 10 時間後に初めて Cp を投与したところ、成長を回復した細胞系列は観察されなかった (0/195; Fig. 12C)。 $T_c = 0$ 時間および $T_c = 3$ 時間の場合において事前に Cp を投与していた細胞と同程度の割合の細胞系列が成長を続けられたことから、耐性遺伝子除去前から Cp が投与されていることが耐性遺伝子除去に反して成長を続けることに必要であるという仮説は否定される。

成長を続ける細胞の割合が T_c の違いによって変化したという結果から、Cp 投与開始時に細胞内に少量の mCherry-CAT タンパク質が存在することがその後の Cp 環境下で成長を継続するために必要ではないかと推測した。実際に *mcherry-cat* 遺伝子の除去後 Cp の投与時までに、細胞の成長に合わせて細胞内の mCherry-CAT の蛍光輝度値は減少している (Fig. 13A、B)。細胞ごとの mCherry-CAT のタンパク質量が成長の回復に与える影響を調べるため、各 T_c における耐性遺伝子を失った細胞系列を Cp 投与時の mCherry-CAT の蛍光輝度値の上位 50%と下位 50%の二つのグループに分けた (Fig. 14)。 $T_c = 0$ 時間および $T_c = 3$ 時間の場合には二つのグループ間での成長を回復する細胞の割合に有意な差は見られなかった (Fig. 14)。一方で、 $T_c = 6$ 時間については mCherry-CAT の蛍光輝度値が上位 50%のグループが下位 50%のグループと比べて成長を続ける細胞の割合が 2.4 倍高かった (Fig. 14)。 $T_c = 10$ 時間では細胞の蛍光輝度値は耐性遺伝子をもたない YK0085 細胞株とほとんど差がなく (Fig. 13A、B)、上述の通り成長が回復した細胞系列が観察されなかった (Fig. 12C)。これらの結果は耐性遺伝子なしに成長を続けるためには Cp 照射時に少量の mCherry-CAT タンパク質が必要であ

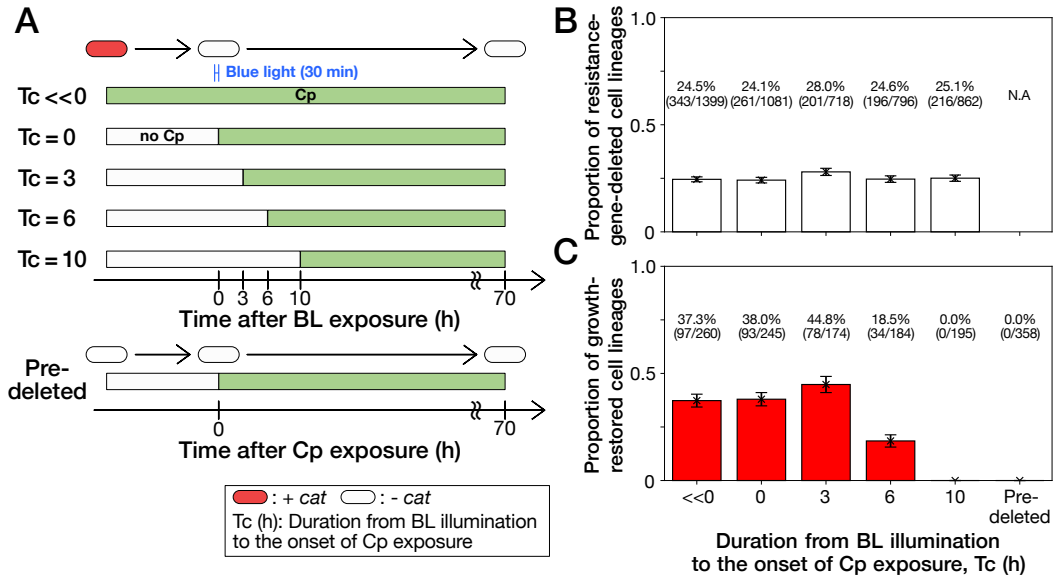


Fig. 12: 履歴依存的な Cp 耐性表現型の維持. (A) Cp 耐性遺伝子の除去タイミングと Cp 耐性表現型の関係性を測定する実験の概要。青色光照射終了後から Cp 投与開始までの時間 (T_c) を 0 h-10 h まで様々に変化させた。 $T_c \ll 0$ は青色光照射前から継続的に Cp を投与している実験を表す。“Pre-deleted” はあらかじめ *mcherry-cat* 遺伝子を除去した YK0085 細胞株を用いた実験の結果を示す。YK0085 を用いた実験では他の耐性遺伝子除去実験と耐性遺伝子を持つ細胞が同等になるようにあらかじめ 7:3 の割合で YK0083 株を mother machine に入れて行い、青色光を照射しなかった。(B) 異なる T_c 条件における *mcherry-cat* 遺伝子の除去に成功した細胞系列の割合。全ての細胞系列のうちの耐性遺伝子を失った細胞系列の数は棒グラフの上に示した。エラーバーは得られた確率が二項分布に従うとしたときの標準誤差である。(C) 異なる T_c 条件における耐性遺伝子を失っても分裂を継続した細胞系列の割合。全ての *mcherry-cat* 遺伝子を失った細胞系列のうちの成長を続けた細胞系列の数は棒グラフの上に示した。エラーバーは得られた確率が二項分布に従うとしたときの標準誤差である。耐性遺伝子を失った細胞系列の数が (B) と異なるのは、いくつかの細胞において mCherry-CAT の蛍光が失われたことを確認した後観察チャンネルから細胞が流出し、細胞系列の分類が決定ができなかったことによる。

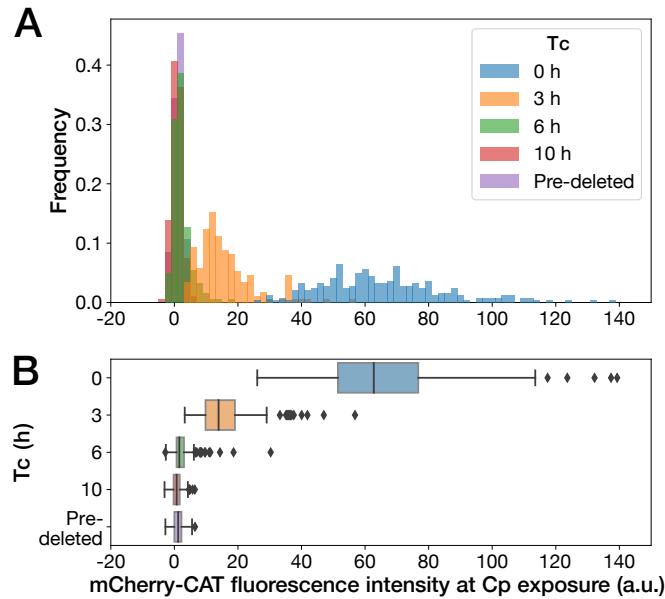


Fig. 13: Cp 投与時における mCherry-CAT 蛍光輝度値の分布. (A、B) 異なる T_c 条件における Cp 投与タイミングでの耐性遺伝子を失った細胞系列の mCherry-CAT 蛍光の輝度値分布. (A) ヒストグラム. (B) 箱髭図. mother machine の観察チャンネル内に耐性遺伝子 *mcherry-cat* を持つ細胞が混ざり、蛍光が移りこんだ細胞系列及び Cp 投与タイミング時に蛍光のバックグラウンドノイズが大きかった細胞系列については正確な蛍光強度の評価ができないため除外した。

ることを示唆している。しかしながら、mCherry-CAT タンパク質の量が多くても必ずしも安定に成長を続けられるわけではなく、耐性遺伝子なしに Cp を照射された細胞系列が成長を続けられる最大の割合は 40% であると考えられる。

2.4.5 成長の回復に伴って、耐性遺伝子を除去された細胞はリボソームタンパク質のストイキオメトリーを回復する

前節では耐性遺伝子を除去した後、細胞内に残存した mCherry-CAT が Cp 環境下での成長の回復に重要であることについて示した。しかし、細胞の成長、分裂によって mCherry-CAT は希釈されてしまうため、遺伝子を失ってから数世代を超えて成長を継続、回復した細胞系列では残存した mCherry-CAT が直接的に Cp を不活化したとは考えられない。Fig. 8F、9A に示すように耐性遺伝子を失っても成長を回復した細胞の mCherry-CAT の蛍光輝度値は検出限界以下である。そのため、成長の回復には mCherry-CAT 以外の細胞の生理的な変化が必要であると推測した。

クロラムフェニコールは細菌の 50S サブユニットを標的としている [65]。そのため耐性遺伝子の除去から成長の回復までにリボソームの状態が変化したと考えた。リボソームの状態変化を調べるために、2つのリボソームタンパク質 RplS および RpsB に翻訳レベルで蛍光タンパク質 mCherry、mVenus を融合した RplS-mCherry、

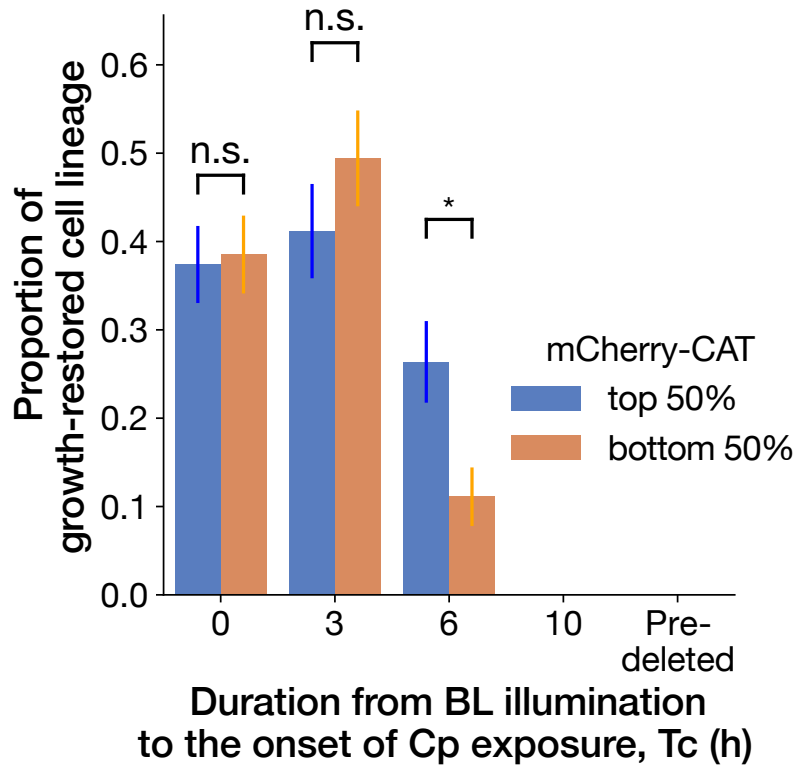


Fig. 14: Cp 投与時における mCherry-CAT の蛍光輝度値に依存した分裂を続ける細胞系列の割合. 青色とオレンジ色の棒グラフはそれぞれ Cp 投与時の mCherry-CAT の輝度値が中央値よりも高い細胞系列と低い細胞系列における増殖を続けた細胞の割合を表す。エラーバーは得られた確率が二項分布に従うとしたときの標準誤差である。 $T_c = 10$ h と “Pre-deleted” 条件では成長を続ける細胞系列が確認されなかった。mCherry-CAT 蛍光の上位 50% と下位 50% の間の割合の違いは $T_c = 6$ h の条件のときにのみ統計的に有意であった。 ($p = 0.86$ ($T_c = 0$ h); $p = 0.28$ ($T_c = 3$ h); $p = 8.6 \times 10^{-3}$ ($T_c = 6$ h), two proportional z-test).

RpsB-mVenus を発現するリボソームレポーター細胞株 YK0136、および蛍光タンパク質を反転させた RplS-mVenus、RpsB-mCherry を発現する Cp 耐性細胞株 YK0137 を構築した (Fig. 15)[117]。RplS、RpsB はそれぞれリボソームの 50S サブユニット、30S サブユニットのタンパク質である。この 2 つのリボソームタンパク質はリボソーム構築の際に最後の方に組み込まれ、それぞれフィードバック制御を受けているため過剰に作られることがないという性質を持った必須タンパク質である [118, 119]。そのため先行研究において、リボソームのサブユニットの量比を調べるためにこの二重蛍光レポーター株が用いられた [117]。YK0136 株と YK0137 株にはリボソームレポーター遺伝子に加え、上端および下端に *loxP* 配列を有する *cat* 遺伝子を染色体上の *intC* 部位に導入し、また、PA-Cre 遺伝子組換えシステムのためのプラスミドを導入した (Fig. 15)。今回の実験では mCherry 蛍光タンパク質を RplS もしくは RpsB に融合しているため、*cat* 遺伝子には *mcherry* 遺伝子を結合させなかった。また、YK0136 株および YK0137 株に対してそれぞれ青色光を照射し、耐性遺伝子を除去した大腸菌株 YK0138、YK0139 を作製した (2.3.1 参照)。

これらの YK0136-YK0139 株についてバッチ培養したところ、YK0137、YK0139 株の成長率が YK0136、YK0138、リボソームレポーター遺伝子をもたない親株と比べて減少していた (Fig. 16)。そのため、YK0137、YK0139 株のリボソームレポーターの配列は細胞の成長や生理的性質により影響を及ぼしていると判断して、その後の実験には YK0136 株と YK0138 株を用いた。YK0136 株の Cp に対する MIC は YK0083 株の MIC と同等であった (Fig. 17)。

また、*cat* 遺伝子が Cre による除去後に細胞内に残っているかを確かめるため、バッチ培養中に青色光を照射し、一部の YK0136 細胞に遺伝子の除去を誘導したところ、*mcherry-cat* 遺伝子の除去と同様に *intC* 部位での遺伝子除去の有無と *cat* 遺伝子の有無が完全に一致した (Table 4)。この結果は Cre による除去後、*cat* 遺伝子が残存したり、ゲノム上の他の部位に残っていないことを示している。

Table 4: *cat* 遺伝子の除去. コロニー PCR で *intC* 部位および *cat* 遺伝子内の配列を増幅させた時のコロニーの数。 *intC* 部位に *P_{LtetO1}-loxP-cat-loxP* 遺伝子を導入した細胞株 YK0118 に対して 1 時間青色光を照射した後、LB プレートにまいて一晚培養して出てきたコロニーを調べた。 *cat* + は *cat* の PCR バンドが確認されたコロニー、 *cat* - は *cat* の PCR バンドが増幅しなかったコロニーを表す。また、 *intC::P_{LtetO1}-loxP-cat-loxP* は *intC* 部位の遺伝子除去がされていないコロニーであり、 *P_{LtetO1}-loxP* は遺伝子除去に成功したコロニーを表す。全ての *intC* 部位で遺伝子が除去されていたコロニーが *cat* 遺伝子を失っていることから、 *cat* 遺伝子がゲノム上の他の部位に残ることがないことを確認した。

	<i>cat</i> +	<i>cat</i> -
<i>intC::P_{LtetO1}-loxP-cat-loxP</i>	14	0
<i>intC::P_{LtetO1}-loxP</i>	0	54

YK0136 株を用いて、mother machine 内で Cp 環境下の細胞に対して青色光を照射し、Cp 耐性遺伝子の除去実験を行った。今回の実験では mCherry-CAT ではなく CAT タンパク質のため、mCherry 蛍光の減少から耐性遺伝子の除去を判別することができない。Cp 環境下での *mcherry-cat* 遺伝子の除去実験では耐性遺伝子を失った細胞系列は成長速度が大きく減少したため、リボソームレポーター株の耐性遺伝子除去実験におい

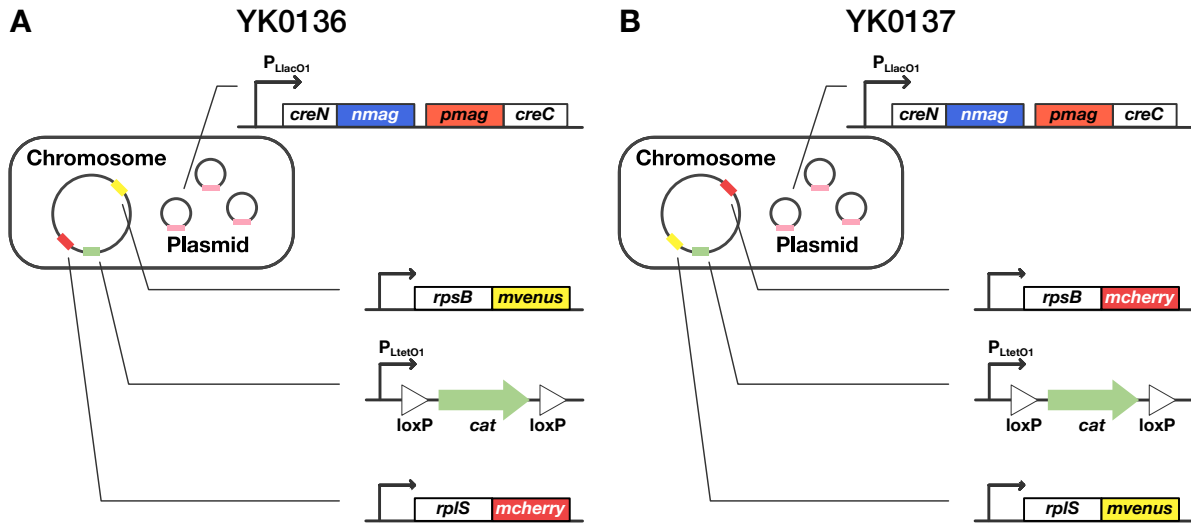


Fig. 15: 大腸菌 YK0136、YK0137 株の概略図。(A)YK0136 株は染色体上の元の位置から蛍光タンパク質を融合したリボソームタンパク質 (RplS-mCherry および RpsB-mVenus) を発現する。(B)YK0137 株は染色体上の元の位置から蛍光タンパク質を融合したリボソームタンパク質 (RplS-mVenus および RpsB-mCherry) を発現する。さらに染色体上の *intC* 部位に青色光の照射によって除去可能な *cat* 遺伝子を持つ。この *cat* 遺伝子は恒常発現プロモーター P_{LtetO1} の下流にある。また、PA-Cre システムの遺伝子 (*creN-nmag* 遺伝子及び *pmag-creC* 遺伝子) を発現する低コピープラスミド pYK022 を持っている。CreN-nMag、CreC-pMag は IPTG によって発現誘導される。

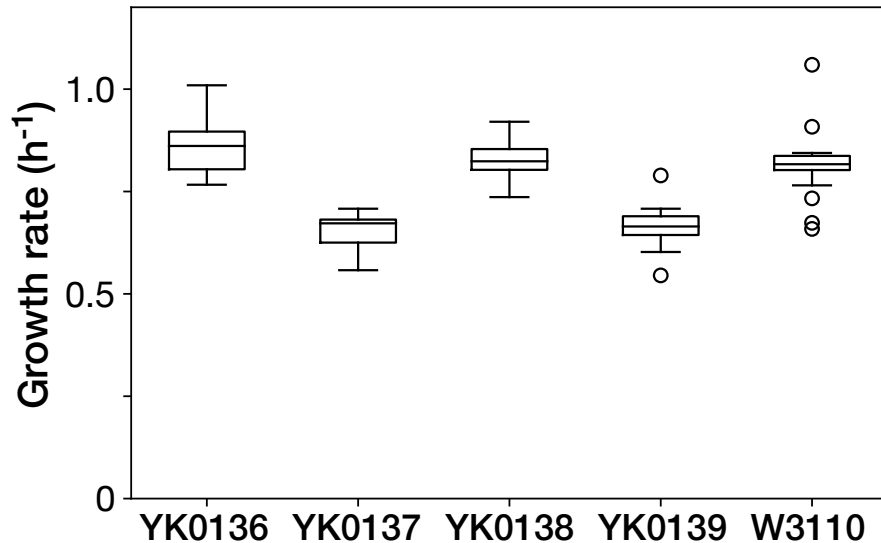


Fig. 16: リボソームレポーター株ごとの細胞の成長率の比較。リボソームレポーター株 YK0136-YK0139 株及び親株である W3110 Δ F3 の成長率を比較した。箱髭図の中心線、両端はそれぞれ世代時間の中央値、25-75% 領域を示す。髭は外れ値を除いた最小値、最大値を表す。点は外れ値を表している。

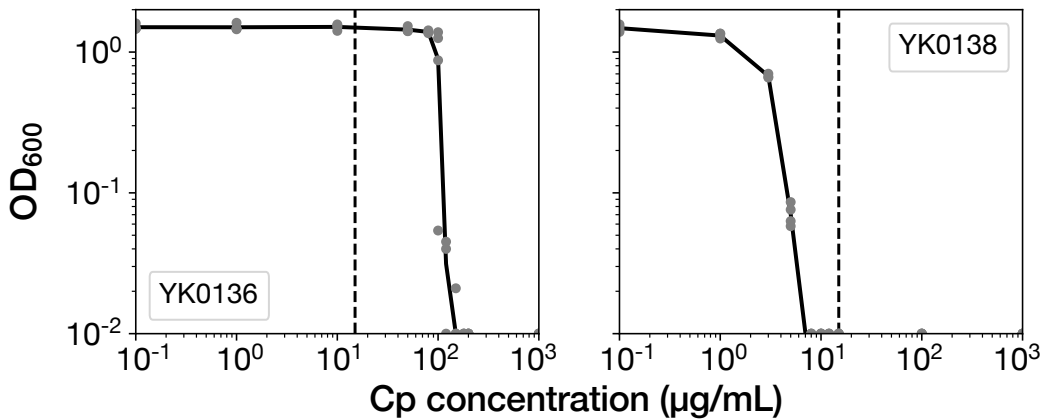


Fig. 17: リボソームレポーター株における MIC test. 灰色の点是对应する Cp 濃度の M9 合成培地で 23 時間、各細胞株を培養した時の OD₆₀₀ の値である。OD₆₀₀ が 0.01 以下になる最小の Cp 濃度を各細胞の MIC として用いた。タイムラプスの実験では 15 μg/mL の Cp 濃度を用いた (破線)。この計測は少なくとも三回行った。

ても、青色光照射後の成長速度の減少に基づいて耐性遺伝子の除去の有無を判断した。この基準の正当性を確かめるために *mcherry-cat* 遺伝子の除去実験における mCherry-CAT 蛍光輝度値の推移と伸長率の推移を階層クラスタリングの手法を用いてそれぞれクラスタリングした (Fig. 18)。1つの細胞系列を除いて、蛍光輝度値によって分類した耐性遺伝子を失った細胞系列のクラスターと伸長率によって分類した耐性遺伝子を失った細胞系列のクラスターが一致したため、伸長率を除去ができたかどうかの基準として用いた。Cp 環境下での 30 分間の青色光の照射によって 28.6% (452/1587) の YK0136 株が耐性遺伝子を失った。この割合は Fig.8 での *mcherry-cat* 遺伝子の除去割合と変化が見られなかった。

YK0083 を用いた実験と同様に、45.9% (158/344) の *cat* 遺伝子を失った細胞が、15 μg/mL Cp の環境下で耐性遺伝子を失った直後の成長の低下から徐々に成長を回復した (Fig. 19、20A、21)。一方で耐性遺伝子をもたない YK0085 株に対して Cp を投与した場合と同様に、同濃度の Cp を mother machine 内で *cat* 遺伝子をあらかじめ除去した YK0138 細胞株に投与した場合には同じような成長の回復は見られなかった (0/1138; Fig. 20A)。

Cp 環境下で *cat* 遺伝子を除去したところ、RplS-mCherry と RpsB-mVenus のどちらにも蛍光輝度値の上昇が観察された (Fig. 20B、C)。この上昇は RplS-mCherry で特に大きかった (Fig. 19D、G、20B)。同様にリボソームのサブユニットバランス (RplS-mCherry/RpsB-mVenus 比率) は崩れ、およそ 3 倍に増加した (Fig. 20D、22)。この初期におけるサブユニットバランスの崩れは成長を回復した細胞系列と成長を停止した細胞系列のどちらでも観察された (Fig. 20D、22)。しかし、成長を回復した細胞系列ではこの比率が耐性遺伝子除去前の状態まで戻った一方で、成長、分裂を停止した細胞系列では崩れたままであった (Fig. 20D、22)。この結果はリボソームタンパク質の発現バランスの回復と Cp 環境下での成長の回復に相関があることを示唆している。

Fig. 11 と同様に青色光照射前の細胞の状態とその後の細胞系列の運命の関係について調べた。細胞の伸長

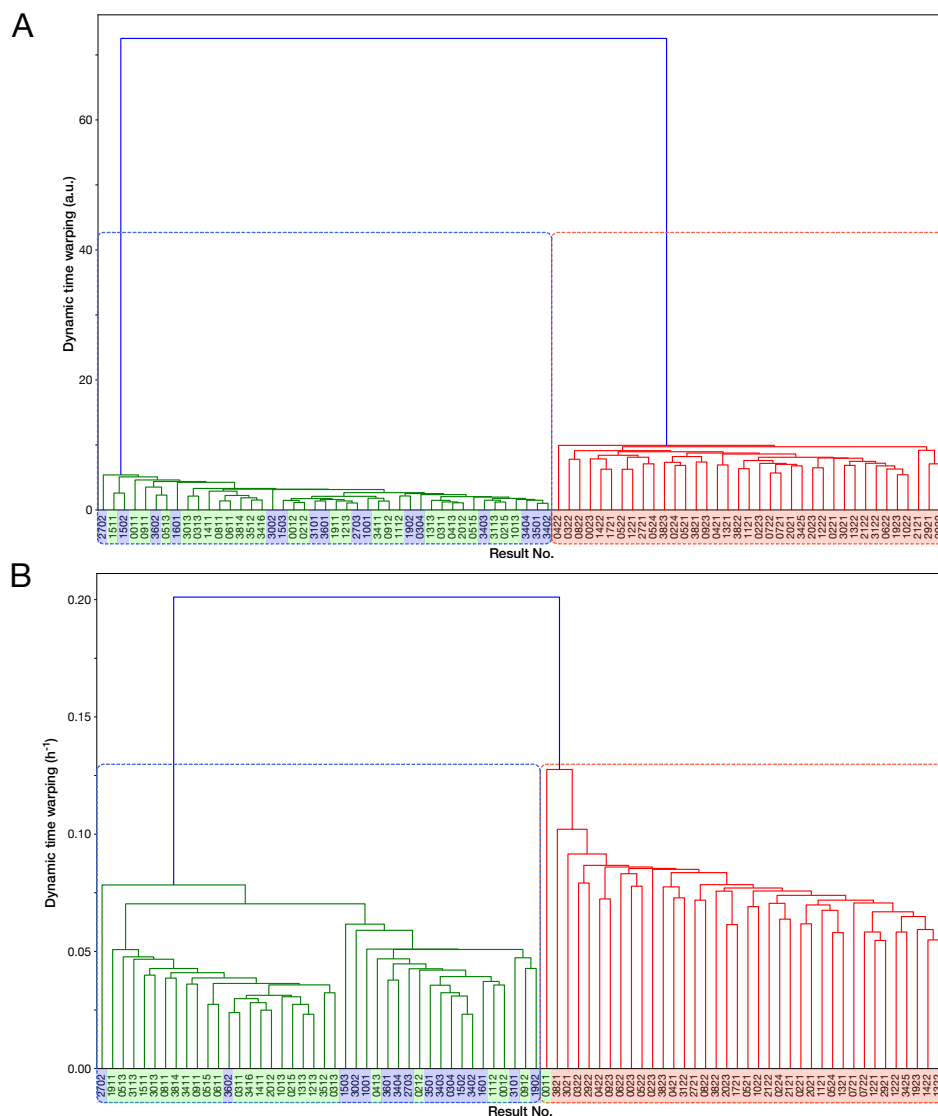


Fig. 18: 細胞の伸長率の時間変化によって Cp 環境下で耐性遺伝子を失った細胞を判別することができる。(A) mCherry-CAT 蛍光輝度値の時間変化に基づいた細胞系列の階層クラスタリング。クラスタリングには計測の全期間の mCherry-CAT 蛍光輝度値のデータを用いた。細胞系列ごとの違いの尺度として dynamic time warping 尺度を用いた。横軸に書いてある数は細胞系列の ID を示している。ID の背景色は細胞系列の運命に対応する色をつけたものである: 青色は耐性遺伝子を失っても分裂を続けた細胞系列に対応する。緑色は耐性遺伝子を失って分裂できなくなった細胞系列に対応する。赤色は耐性遺伝子を失わなかった細胞に対応する。(B) 細胞の伸長率の時間変化に基づいた細胞系列の階層クラスタリング。クラスタリングには計測の全期間の細胞の伸長率のデータを用いた。青色の破線及び赤色の破線で囲まれた細胞系列は二つの主要なクラスターでありそれぞれ耐性遺伝子を失った細胞系列と耐性遺伝子を持っている細胞系列に対応する。耐性遺伝子を失った細胞系列のうち、誤って耐性遺伝子を失っていない細胞のクラスターに振り分けられている細胞系列は 1 つ (0011) だけであり、他の細胞系列は正しく振り分けられていた。そのため細胞の伸長率は Cp 環境下で高い精度で耐性遺伝子を失った細胞系列と耐性遺伝子を持つ細胞系列を区別することができる。

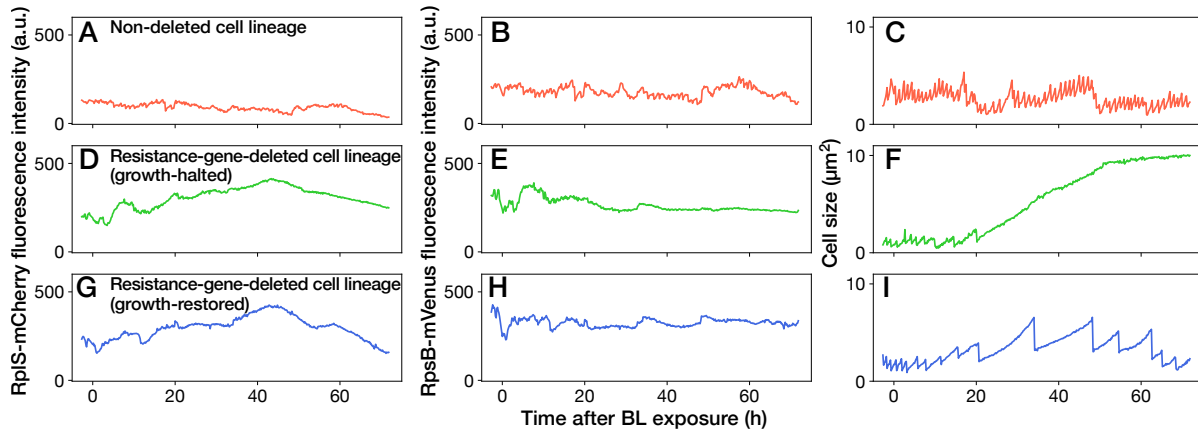


Fig. 19: Cp 投与下におけるリボソームレポーター株を用いた耐性遺伝子除去実験の一細胞系列例. (A-I) 一細胞系列の RplS-mCherry と RpsB-mVenus 蛍光輝度値と細胞サイズの推移. (A-C) 耐性遺伝子を失わなかった細胞系列 (Non-deleted cell lineages) (D-F) 耐性遺伝子を失って分裂を停止した細胞系列 (Resistance-gene-deleted cell lineages (growth-halted)). (G-I) 耐性遺伝子を失ったにもかかわらず分裂を続けた細胞系列 (Resistance-gene-deleted cell lineages (growth-restored)).

率、RplS-mCherry および RpsB-mVenus の蛍光輝度値、また、RplS-mCherry/RpsB-mVenus の蛍光の比率のいずれも耐性遺伝子の除去の起こりやすさや耐性遺伝子を失った細胞系列の中で成長を回復するかどうかといった運命に大きく影響してはいなかった (Fig. 23)。

耐性遺伝子をもたない YK0138 細胞株に対して 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cp を投与した際、YK0138 の耐性遺伝子を Cp 環境下で除去した時と同様に RplS-mCherry の蛍光輝度値は上昇した (Fig. 20B)。一方で YK0138 の耐性遺伝子を除去した場合とは反対に RpsB-mVenus の蛍光輝度値は減少した (Fig. 20C)。この結果は先行研究で野生型の大腸菌に対して Cp を投与した際に観察された結果と一致していた [120]。この Cp 投与初期からの RpsB-mVenus の蛍光輝度値の減少はリボソームタンパク質のバランス (RplS-mCherry/RpsB-mVenus) をより迅速に増加させた (Fig. 20D)。この比率の上昇に合わせて、Cp の投与によって YK0138 の伸長率は YK0138 の耐性遺伝子除去よりも早く減少した (Fig. 20A)。

YK0138 の耐性遺伝子除去の実験や、YK0138 に対して Cp を投与する実験から、RplS-mCherry/RpsB-mVenus の蛍光の比率の増加と細胞の伸長率の減少には相関がありそうである。そのためこの二つについて YK0138 の実験のうち耐性遺伝子を失った系列、および YK0138 の実験結果から相関を調べたところ負の相関が観察された (Spearman $\rho = -0.58$, 95%信頼区間 [-0.62, -0.53]; Fig. 24)。青色光の照射前、リボソームバランスの比率は狭い範囲に収まっている (95%区間: 0.84-1.18; Fig. 22, 24)。Cp 耐性遺伝子の除去や Cp の投与によって蛍光輝度値の比率はこの幅を超え、同時に細胞の成長は抑制された (Fig. 22)。これらの結果は、Cp 耐性遺伝子なく成長、分裂を回復する細胞ではリボソームタンパク質のバランスの回復も伴っていることを示唆している。

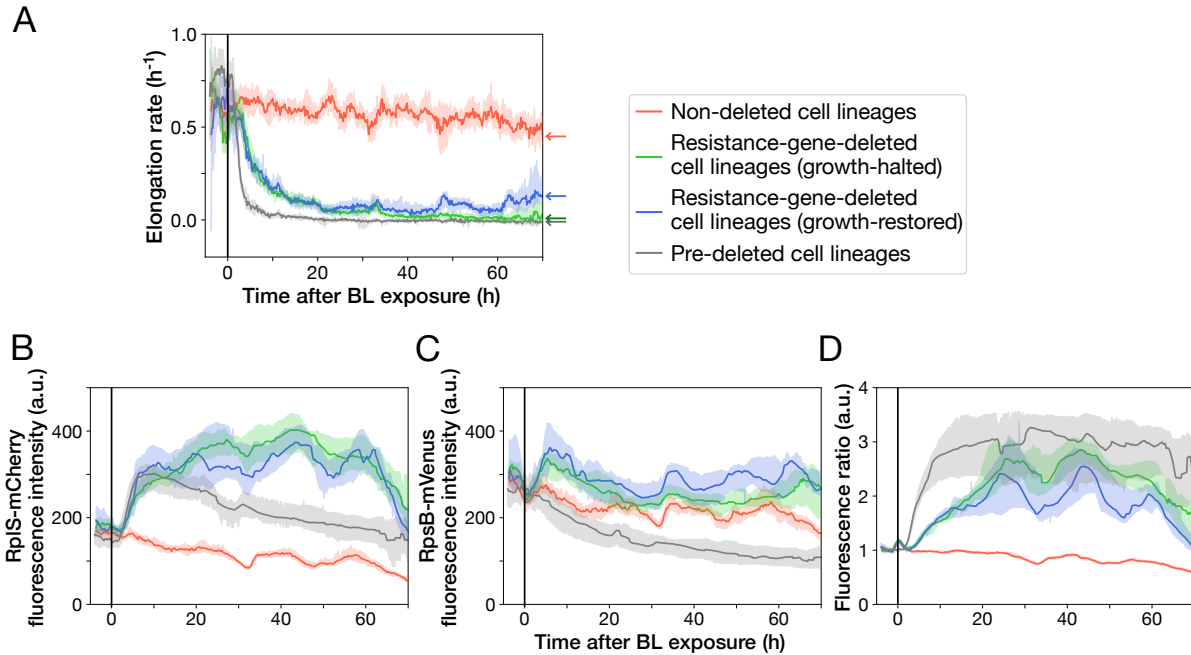


Fig. 20: Cp 投与下におけるリボソームレポーター株を用いた耐性遺伝子除去実験. (A) 細胞の伸長率の時間変化. 線は各時間における伸長率の中央値を表し、影の領域は細胞系列を 1000 回サンプリングして得られた中央値の 95% 領域を表している. 赤色は耐性遺伝子を失っていない細胞系列を示している. 緑色は耐性遺伝子を失って分裂を停止した細胞系列を表す. 青色は耐性遺伝子を失っても分裂を継続した細胞系列を表す. 灰色はあらかじめ耐性遺伝子を除去した YK0138 細胞系列を示す. 色と細胞系列の対応は (B-D) でも同様である. (B) RplS-mCherry 蛍光輝度値の時間変化 (C) RpsB-mVenus 蛍光輝度値の時間変化 (D) RplS-mCherry/RpsB-mVenus の蛍光比の時間変化. RplS-mCherry/RpsB-mVenus の蛍光輝度値の比は青色光照射前の蛍光輝度値の平均値で規格化した.

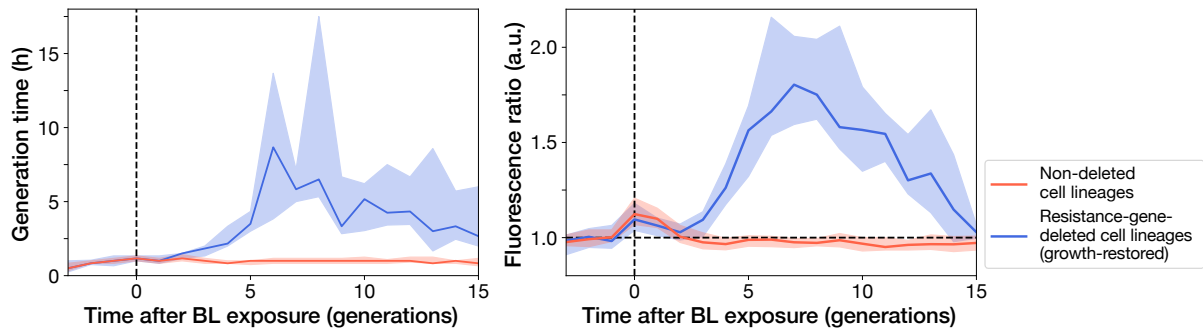


Fig. 21: Cp 耐性遺伝子除去後の細胞の世代時間と RplS-mCherry/RpsB-mVenus の蛍光輝度値の比の世代ごとの変化. (A) 世代時間の世代ごとの推移. (B) RplS-mCherry/RpsB-mVenus の蛍光輝度値の比の推移. 線及び影の領域はそれぞれ中央値と 25-75%幅を表す. 赤色は耐性遺伝子を失っていない細胞系列を示している. 青色は耐性遺伝子を失っても分裂を継続した細胞系列を表す. 灰色はあらかじめ耐性遺伝子を除去した YK0138 細胞系列を示す.

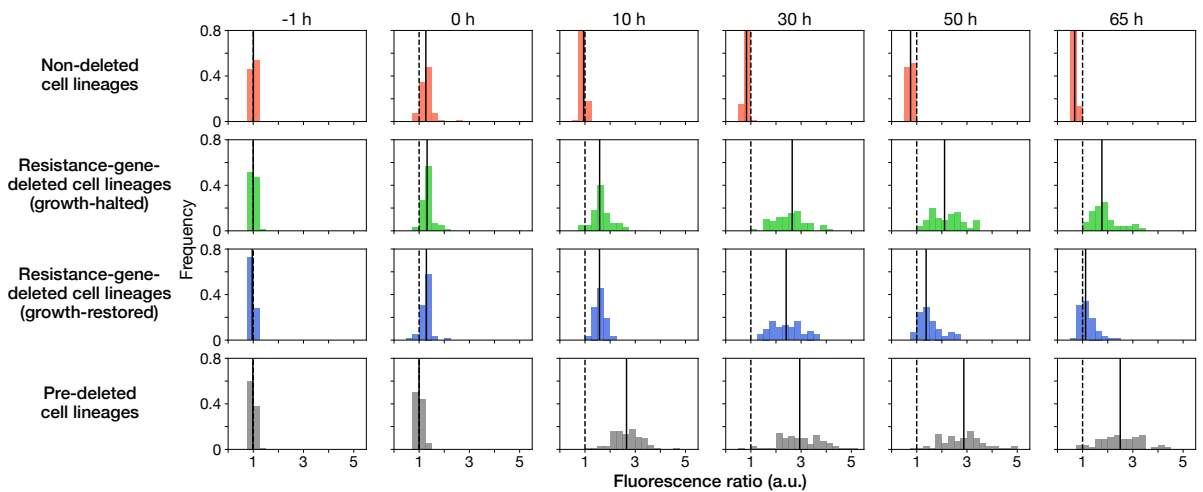


Fig. 22: RplS-mCherry/RpsB-mVenus の蛍光比の時間ごとの分布. 各時間における細胞系列分類ごとの RplS-mCherry/RpsB-mVenus の蛍光輝度値の比. 黒い破線は蛍光比が 1 の線である. 黒い実線は分布の中央値を示している.

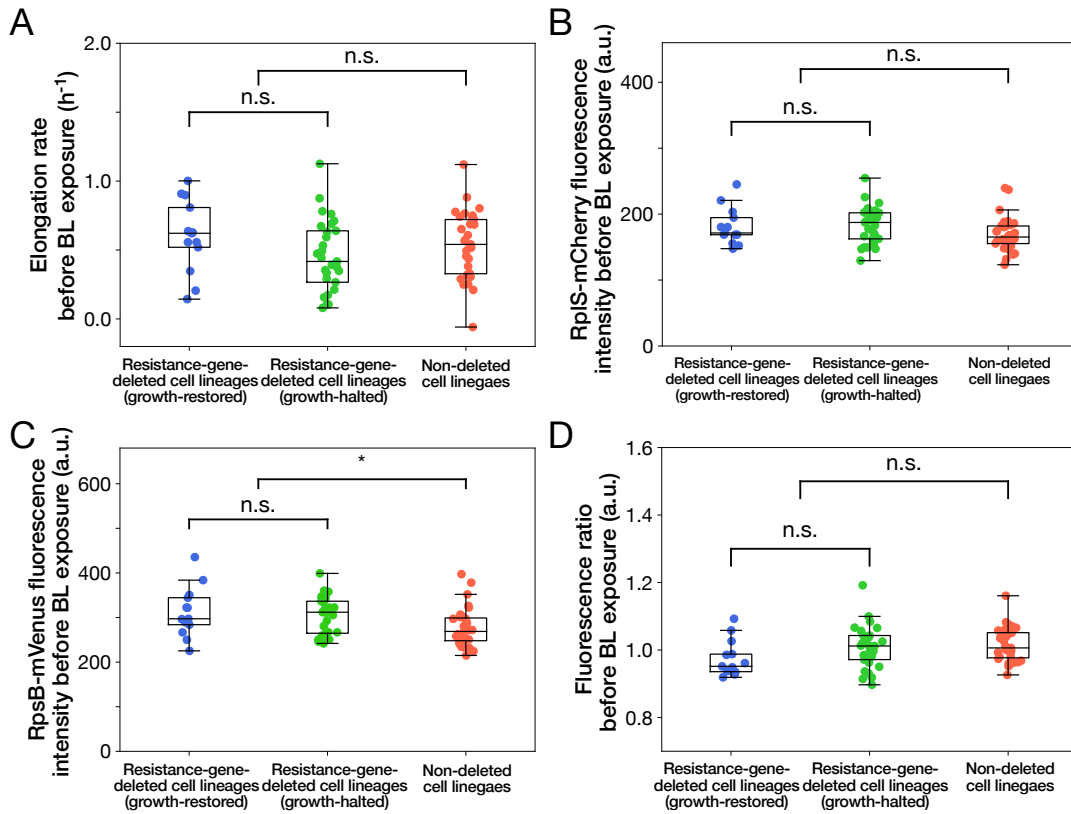


Fig. 23: 青色光照射前の細胞の表現型と耐性遺伝子除去後の細胞の運命の関係。(A) 青色光照射前の細胞の伸長率とその後の細胞の運命の関係。青色は耐性遺伝子を失っても分裂を継続した細胞系列に対応する。緑色は耐性遺伝子を失って分裂できなくなった細胞系列に対応する。赤色は耐性遺伝子を失わなかった細胞に対応する。色と細胞系列の対応は (B-D) でも同様である。各点は細胞系列の青色光照射前、1 時間平均の細胞の伸長率を表している。 $p = 0.10$ (耐性遺伝子を失った細胞のうち分裂を継続した細胞系列としなかった細胞系列の比較); $p = 0.54$ (耐性遺伝子を失った細胞系列と失わなかった細胞系列の比較)、Welch の t 検定。(B) 青色光照射前の RplS-mCherry の蛍光輝度値とその後の細胞の運命の関係。各点は細胞系列の青色光照射前、1 時間平均の RplS-mCherry の蛍光輝度値を表している。 $p = 0.87$ (耐性遺伝子を失った細胞のうち分裂を継続した細胞系列としなかった細胞系列の比較); $p = 0.038$ (耐性遺伝子を失った細胞系列と失わなかった細胞系列の比較)、Welch の t 検定。(C) 青色光照射前の RpsB-mVenus の蛍光輝度値とその後の細胞の運命の関係。各点は細胞系列の青色光照射前、1 時間平均の RpsB-mVenus の蛍光輝度値を表している。 $p = 0.60$ (耐性遺伝子を失った細胞のうち分裂を継続した細胞系列としなかった細胞系列の比較); $p = 0.010$ (耐性遺伝子を失った細胞系列と失わなかった細胞系列の比較)、Welch の t 検定。アスタリスクは有意水準 0.01 のとき、有意差があることを表す。(D) 青色光照射前の RplS-mCherry/RpsB-mVenus の蛍光比とその後の細胞の運命の関係。各点は細胞系列の青色光照射前、1 時間平均の RplS-mCherry/RpsB-mVenus の蛍光比を表している。 $p = 0.098$ (耐性遺伝子を失った細胞のうち分裂を継続した細胞系列としなかった細胞系列の比較); $p = 0.15$ (耐性遺伝子を失った細胞系列と失わなかった細胞系列の比較)、Welch の t 検定。

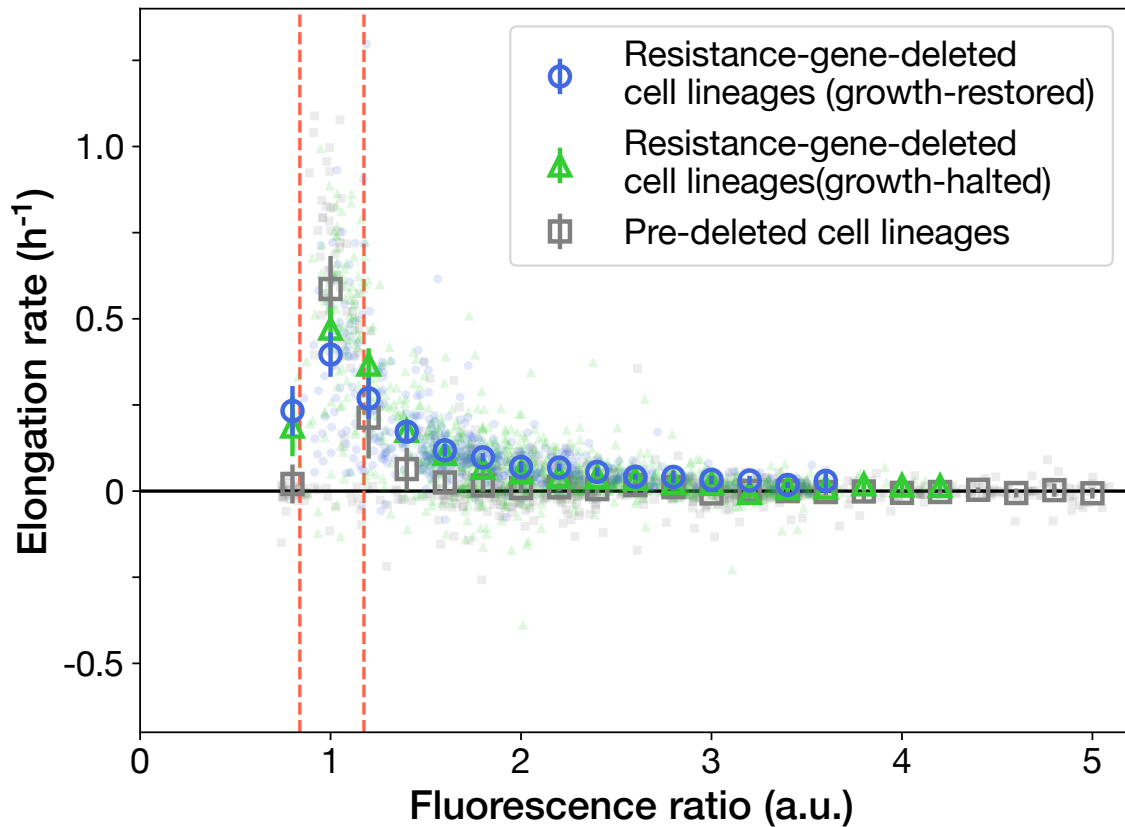


Fig. 24: Cp 投与下の RplS-mCherry/RpsB-mVenus の蛍光輝度値の比と細胞の伸長率の関係. 小さい点は各細胞系列での 2 時間ごとの平均の RplS-mCherry/RpsB-mVenus の蛍光比と細胞の伸長率を表している. 大きな白抜き点は蛍光比 0.2 a.u. ごとに区切った中での平均の伸長率である. エラーバーは 1.96 倍の標準誤差を表す. 青色は耐性遺伝子を失っても分裂を継続した細胞系列に対応する. 緑色は耐性遺伝子を失って分裂できなくなった細胞系列に対応する. 灰色は耐性遺伝子をあらかじめ失っている細胞系列に対応する. 赤い点線は青色光照射前の耐性遺伝子を持ち続けた細胞系列の平均 $\pm 1.96 \times$ (標準誤差) の蛍光輝度値の比の幅を示している. Spearman $\rho = -0.58$, 95%信頼区間 $[-0.62, -0.53]$.

2.4.6 相対的に (p)ppGpp 量の多い耐性遺伝子除去株が成長を回復する

前節では Cp 環境下で Cp 耐性遺伝子を失った細胞はリボソームタンパク質の発現バランスが崩れることを確認した。その上で耐性遺伝子を失いつつも成長分裂を続ける細胞では成長速度の回復とともに当初崩れた発現バランスが回復することがわかった。リボソームタンパク質の量は rRNA とともにフィードバックによって制御されている [118, 119, 121, 122]。それに加えて、全体的なりボソーム量は (p)ppGpp の量によって変動することが知られている [123]。(p)ppGpp は細胞のグローバルな遺伝子発現を直接的、間接的に制御する因子である [70, 124, 125, 126, 127, 128, 129]。(p)ppGpp の細胞内の量の制御は細胞の成長率に寄与している [130, 131]。さらに先行研究から Cp は細胞内の (p)ppGpp 量を減少させることがわかっている [132]。

そのため、耐性遺伝子除去後のリボソーム量の変化や成長の回復と (p)ppGpp 量の変化が関連していると考えた。(p)ppGpp 量は ^{32}P のような放射性同位体を用いた薄層クロマトグラフィーなどで測定することができ [133]、これらは細胞を破壊することが必要である。一方で生細胞の中で (p)ppGpp 量を直接測定する方法は知られていない。この問題を克服するため、 σ ファクター RpoS に蛍光をラベルした *rpoS-mcherry* 遺伝子を導入した大腸菌 YK0148 株を作製し、実験に用いた (Fig. 25)。RpoS は細胞増殖における定常期や栄養の枯渇などのストレス環境にさらされた際、(p)ppGpp が増加することで発現が誘導される σ ファクターである [125, 126, 134]。そのため先行研究においても (p)ppGpp を間接的にモニターするためにこの RpoS に蛍光タンパク質を結合させた融合タンパク質が利用されている [135, 136]。YK0148 株には RpoS レポーター遺伝子に加え、上端および下端に *loxP* 配列を有する *cat* 遺伝子を染色体上の *intC* 部位に導入し、また、PA-Cre 遺伝子組換えシステムのためのプラスミドを導入した。今回の実験でもリボソームレポーター実験と同様に *mcherry* 遺伝子を RpoS に融合しているため、*cat* 遺伝子には *mcherry* 遺伝子を結合させなかった。YK0148 株の Cp に対する MIC は YK0083 株や YK0136 株の MIC とほとんど差がなかった (Fig. 26)。

YK0148 株を用いて、mother machine 内で Cp 環境におかれた細胞に対して青色光を照射し、Cp 耐性遺伝子の除去実験を行った。今回の実験でも mCherry 蛍光の減少から耐性遺伝子の除去を判別することができないため、細胞の伸長率変化から遺伝子除去ができたかどうかを判断した。Cp 環境下での 30 分間の青色光の照射によって 40.9% (648/1585) の YK0148 株が耐性遺伝子を失った。

25.6% (155/605) の *cat* 遺伝子を失った細胞が、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cp の環境下で耐性遺伝子を失った直後の成長の低下から徐々に成長を回復した (Fig. 27, 28A)。一方で耐性遺伝子をもたない YK0085 株に対して Cp を投与した場合と同様に、同濃度の Cp を mother machine 内で YK0149 細胞株に投与した場合には 1 細胞を除き同じような成長の回復は見られなかった (1/1376)。YK0149 株は YK0148 株を試験管でバッチ培養し、途中で青色光を照射することで *cat* 遺伝子をあらかじめ除去した株である (2.3.1 参照)。

Cp 環境下で *cat* 遺伝子を除去したところ、耐性遺伝子を失った細胞系列において RpoS-mCherry 蛍光輝度値の減少が観察された (Fig. 27C, E, 28B)。この減少は野生型の大腸菌に Cp を投与すると (p)ppGpp が減少するという先行研究と一致する [132]。RpoS-mCherry 蛍光輝度値の推移から成長を回復する細胞では成長分裂を停止した細胞に比べて RpoS-mCherry の蛍光輝度値が高いことがわかった (Fig. 28B)。

また、ppGpp の減少はリボソームの発現を誘導し、一方で RpoS の量を減少させる [70]。さらに先行研究において Cp の濃度を上げると細胞の成長率が減少し、翻訳されるタンパク質に占めるリボソームの割合が増

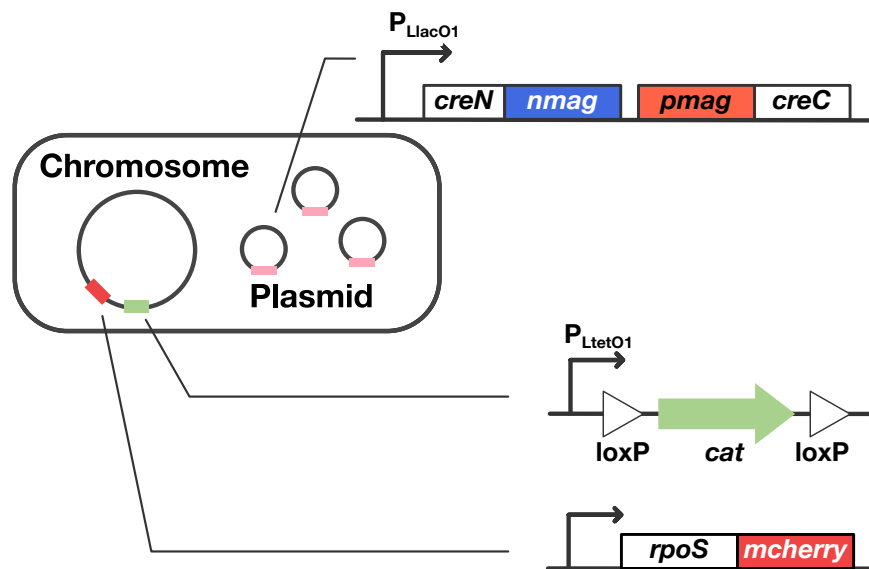


Fig. 25: 大腸菌 YK0148 株の概略図。 YK0148 株は染色体上の元の位置から蛍光タンパク質を融合した RpoS タンパク質 (RpoS-mCherry) を発現する。さらに染色体上の *intC* 部位に青色光の照射によって除去可能な *cat* 遺伝子を持つ。この *cat* 遺伝子は恒常発現プロモーター P_{LtetO1} の下流にある。また、PA-Cre システムの遺伝子 (*creN-nmag* 遺伝子及び *pmag-creC* 遺伝子) を発現する低コピープラスミド pYK022 を持っている。CreN-nMag、CreC-pMag は IPTG によって発現誘導される。

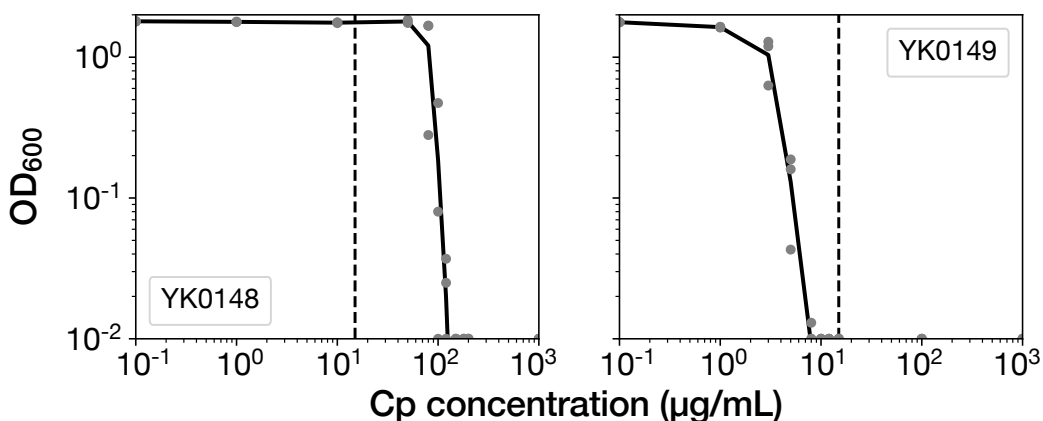


Fig. 26: *RpoS* レポーター株における MIC test. 灰色の点是对应する Cp 濃度の M9 合成培地で 23 時間各細胞株を培養した時の OD_{600} の値である。 OD_{600} が 0.01 以下になる最小の Cp 濃度を各細胞の MIC として用いた。タイムラプスの実験では $15 \mu\text{g/mL}$ の Cp 濃度を用いた (破線)。この計測は少なくとも三回行った。

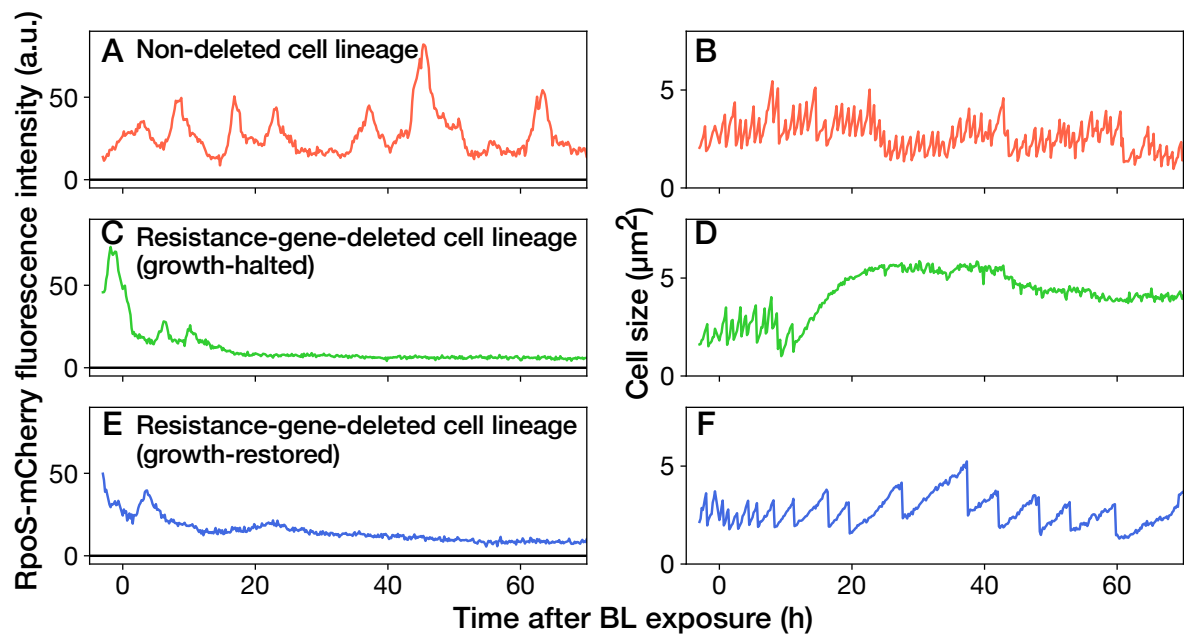


Fig. 27: Cp 投与下における RpoS レポーター株を用いた耐性遺伝子除去実験の一細胞系列例。(A-F) 一細胞系列の RpoS-mCherry 蛍光輝度値と細胞サイズの推移。(A、B) 耐性遺伝子を失わなかった細胞系列 (Non-deleted cell lineages) (C、D) 耐性遺伝子を失って分裂を停止した細胞系列 (Resistance-gene-deleted cell lineages (growth-halted))。(E、F) 耐性遺伝子を失ったにもかかわらず分裂を続けた細胞系列 (Resistance-gene-deleted cell lineages (growth-restored))。

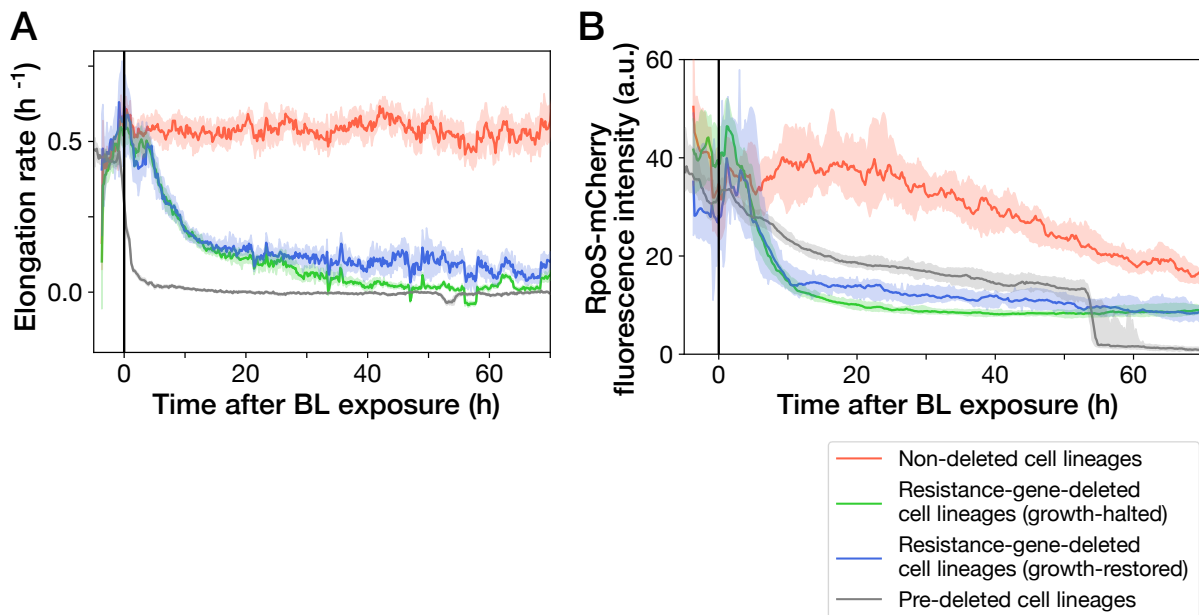


Fig. 28: Cp 投与下における RpoS レポーター株を用いた耐性遺伝子除去実験. (A) 細胞の伸長率の時間変化。線は各時間における伸長率の中央値を表し、影の領域は細胞系列を 1000 回リサンプリングして得られた中央値の 95% 領域を表している。赤色は耐性遺伝子を失っていない細胞系列を示している。緑色は耐性遺伝子を失って分裂を停止した細胞系列を表す。青色は耐性遺伝子を失っても分裂を継続した細胞系列を表す。灰色はあらかじめ耐性遺伝子を除去した YK0149 細胞系列を示す。色と細胞系列の対応は (B) でも同様である。(B) RpoS-mCherry 蛍光輝度値の時間変化。YK0149 の系列 (灰色) が青色光照射後 50 時間から 60 時間の間で急激に減少しているが、これはこのタイミングで多くの細胞系列が溶菌したためである。

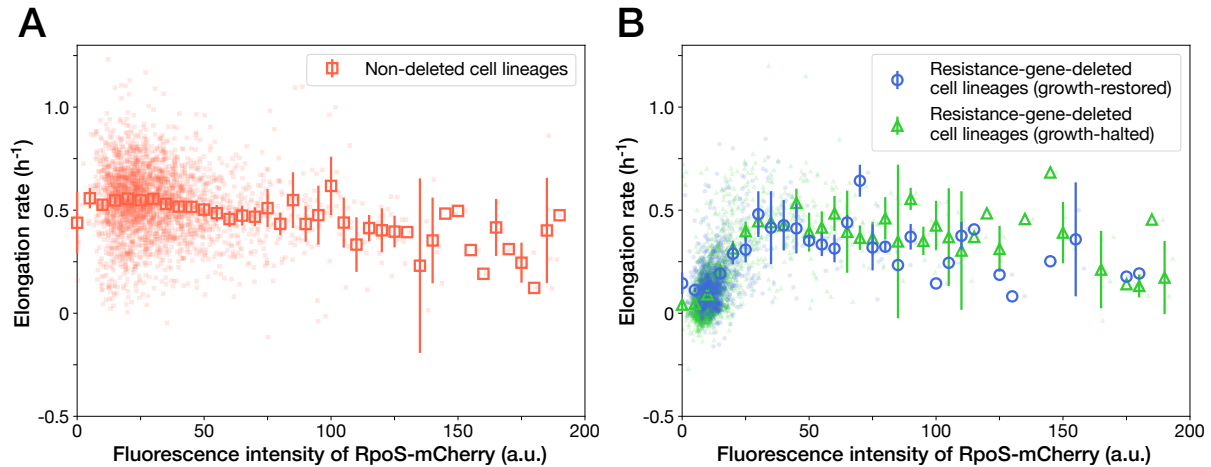


Fig. 29: **RpoS-mCherry** 蛍光輝度値と細胞の伸長率の関係. 小さい点は各細胞系列での2時間ごとの平均のRpoS-mCherryの蛍光と細胞の伸長率を表している。大きな白抜き点は蛍光輝度値5 a.u.ごとに区切った中での平均の伸長率である。エラーバーは1.96倍の標準誤差を表す。(A) 耐性遺伝子を持っている細胞の細胞の伸長率とRpoS-mCherryの蛍光輝度値の関係。赤色は青色光照射前の耐性遺伝子を持ち続けた細胞系列に対応する。Spearman $\rho = -0.15$, 95% 信頼区間 $[-0.21, -0.09]$ 。(B) 耐性遺伝子をCp環境で失った細胞の細胞の伸長率とRpoS-mCherryの蛍光輝度値の関係。青色は耐性遺伝子を失っても分裂を継続した細胞系列に対応する。緑色は耐性遺伝子を失って分裂できなくなった細胞系列に対応する。Spearman $\rho = 0.53$, 95% 信頼区間 $[0.49, 0.58]$ 。

加することも知られている [137]。そのため、耐性遺伝子を除去したRpoSのレポーター株YK0148の成長率とRpoSの発現量が正の相関を持つことが予想される。RpoS-mCherryの蛍光輝度値と細胞の伸長率の相関関係を調べたところ、耐性遺伝子を持っている細胞株ではほとんど相関がない (Spearman $\rho = -0.15$, 95% 信頼区間 $[-0.21, -0.09]$; Fig. 29A) のに対して、耐性遺伝子を失った細胞では正の相関が得られた (Spearman $\rho = 0.53$, 95% 信頼区間 $[0.49, 0.58]$; Fig. 29B)。これらの結果は *cat* 遺伝子を失った細胞がCp環境下で増殖を続けるためにはRpoS-mCherryの蛍光輝度値の減少が少ない、すなわち (p)ppGppの減少が小さいことが重要であることを示唆している。

Fig. 11, 23と同様に青色光照射前の細胞の状態とその後の細胞系列の運命の関係について調べた。細胞の伸長率とRpoS-mCherryの蛍光輝度値のいずれも耐性遺伝子の除去の起こりやすさや耐性遺伝子を失った細胞系列の中で成長を回復するかどうかといった運命に大きく影響してはいなかった (Fig. 30)。

あらかじめ *cat* 遺伝子を除去した株YK0149に対してCpを投与したところ、YK0085, YK0138細胞株と同様にmother machine内でCp投与環境下で耐性遺伝子を除去された時に比べ、急激に細胞の成長が停止した (Fig. 28A)。一方で興味深いことにRpoS-mCherryの蛍光輝度値の減少はmother machine内で耐性遺伝子を失った細胞よりも緩やかであった (Fig. 28B)。これは急激に成長が止まったために成長による希釈の影響が弱かったこと、およびRpoSはプロテアーゼによって積極的に分解制御されるタンパク質 [69, 134] であるが、この

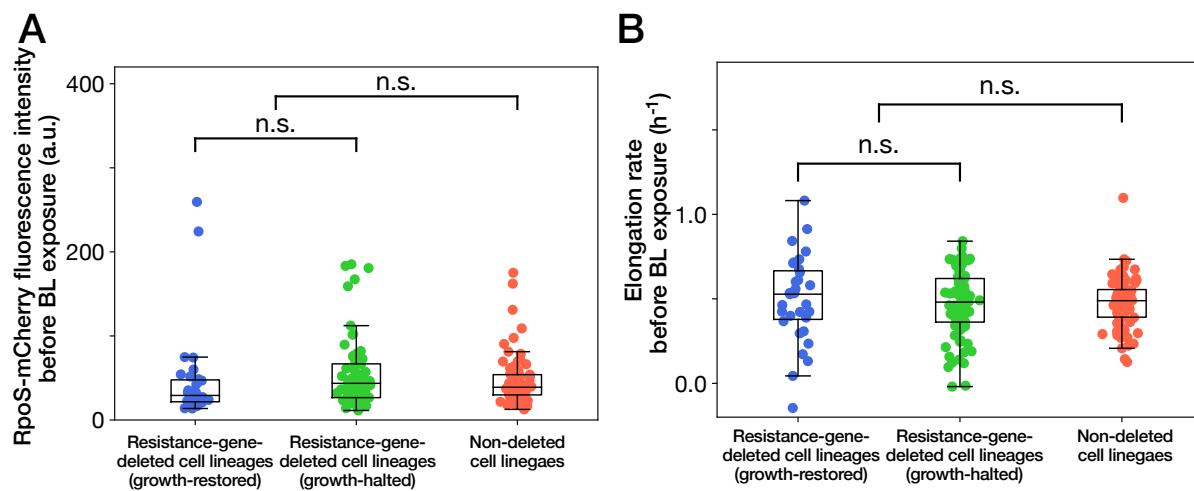


Fig. 30: 青色光照射前の RpoS レポーター株の RpoS-mCherry の発現量と伸長率は耐性遺伝子除去後の運命に影響を与えない. (A) 青色光照射前の RpoS-mCherry 蛍光輝度値. 各点は細胞系列の青色光照射前、1 時間平均の RpoS-mCherry の蛍光輝度値を表している. 青色は耐性遺伝子を失ったにもかかわらず分裂を継続した細胞系列に対応する. 緑色は耐性遺伝子を失って分裂を停止した細胞系列に対応する. 赤色は耐性遺伝子を失わなかった細胞系列に対応する. $p = 0.58$ (耐性遺伝子を失った細胞のうち分裂を継続した細胞系列としなかった細胞系列の比較); $p = 0.91$ (耐性遺伝子を失った細胞系列と失わなかった細胞系列の比較)、Welch の t 検定. (B) 青色光照射前の伸長率. 各点は細胞系列の青色光照射前、1 時間の細胞の伸長率を表している. 各点の色の対応については (A) と同様である. $p = 0.57$ (耐性遺伝子を失った細胞のうち分裂を継続した細胞系列としなかった細胞系列の比較); $p = 0.52$ (耐性遺伝子を失った細胞系列と失わなかった細胞系列の比較)、Welch の t 検定.

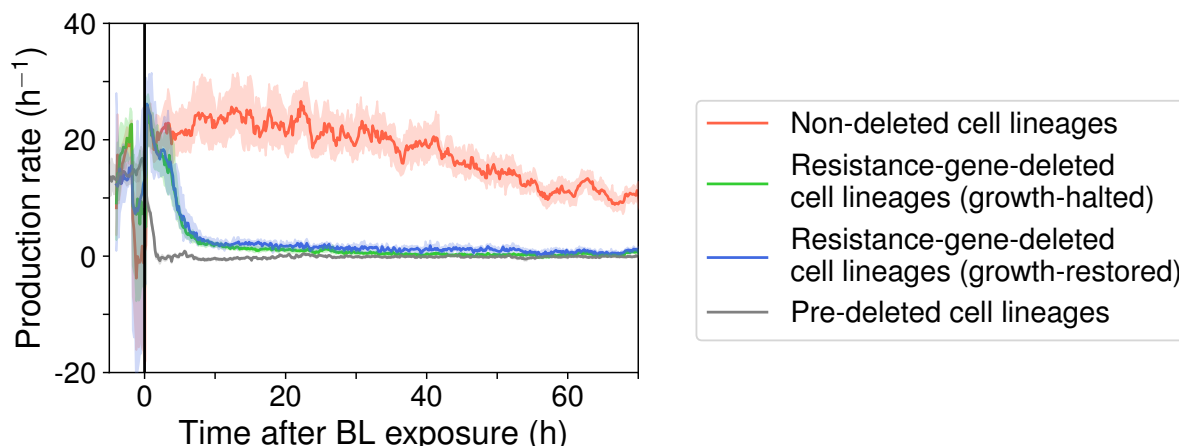


Fig. 31: Cp 投与下における RpoS-mCherry の生産率の時間変化. 線は各時間における生産率の中央値を表し、影の領域は細胞系列を 1000 回サンプリングして得られた中央値の 95% 領域を表している。赤色は耐性遺伝子を失っていない細胞系列を示している。緑色は耐性遺伝子を失って分裂を停止した細胞系列を表す。青色は耐性遺伝子を失っても分裂を継続した細胞系列を表す。灰色はあらかじめ耐性遺伝子を除去した YK0149 細胞系列を示す。生産率は $(c(t + \Delta t)v(t + \Delta t) - c(t)v(t))/v(t)\Delta t$ で算出した。ただし t は時刻、 Δt は撮影の時間幅 (1/6 h)、 $c(t)$ は時刻 t における細胞内平均の RpoS-mCherry の蛍光輝度値、 $v(t)$ は時刻 t における細胞のサイズを表す。そのため $c(t)v(t)$ は時刻 t における細胞内の全 RpoS-mCherry の輝度値を表す。

分解の機構も Cp の投与によって急激に停止したためだと考えられる。実際、YK0149 細胞株の RpoS-mCherry の生産率は Cp 投与後すぐに 0 以下に減少していた (Fig. 31)。

2.5 考察

様々な環境や遺伝的背景の中で遺伝子型-表現型の対応関係を明らかにすることは遺伝学研究の重要なアプローチである。しかし従来の研究では遺伝子変化から十分時間が経った、安定した終状態の表現型に基づいてこの対応関係を模索している。そのため細胞の過去の履歴が終状態の表現型にどのように影響を及ぼすか、また、遺伝子変化によって起こる表現型変化や終状態の表現型の一細胞ごとの違いについての知見は限られている [50, 51, 52]。本研究では Cp 環境下で Cp 耐性遺伝子である *cat* 遺伝子を除去するという実験を行い、従来の遺伝子型-表現型対応の知見を考慮すると成長できなくなるような耐性を下げる遺伝子変異であっても大腸菌が適応することを示した (Fig. 8, 9)。さらにこの適応は何らかの新たな耐性遺伝子の獲得によっている訳ではないことも確認した (Fig. 10, Table 3)。しかし、Cp を投与するよりも十分前にこの耐性遺伝子を除去した場合、このような適応は見られなかった (Fig. 12)。そのためこれらの結果は、細胞が耐性遺伝子を失ってもなお耐性状態になるかどうかは、耐性遺伝子除去のタイミングと細胞が置かれた環境の履歴に依存していることを示唆している [109]。

Cp 環境下での耐性遺伝子 *cat* の除去によってリボソームタンパク質 (RplS と RpsB) の化学量論的なバランスが崩れ、成長を回復する細胞系列ではこのバランスが回復することを明らかにした (Fig. 20)。細胞の伸長率

トリボソームタンパク質の蛍光強度比 (RplS/RpsB) は強く相関していた (Fig. 24)。その上、早く成長している耐性遺伝子を有している細胞株ではこのバランスの幅が狭く強く制御されていた (Fig. 22)。また、RpoS のレポーターを用いた実験から、Cp 環境下で耐性遺伝子を失った細胞では RpoS-mCherry の蛍光輝度値が減少するものの、分裂を継続した細胞系列では停止した細胞系列より適応途中の段階の RpoS-mCherry の蛍光輝度値が高かった (Fig. 28)。Cp 環境下で耐性遺伝子を失った細胞では RpoS-mCherry の蛍光輝度値と細胞の伸長率が正の相関を持っていた (Fig. 29)。これらの結果はリボソームバランスの回復や RpoS を制御する (p)ppGpp のレベルを維持しておくことと耐性遺伝子を失った後に Cp に適応することの関連を示唆している。

リボソームタンパク質の発現バランスの回復について、どのような機構によって発現バランスを回復するかは明らかにはなっていない。考えられるシナリオの一つはリボソームタンパク質遺伝子の複数の階層にまたがるフィードバック制御である。多くのリボソームタンパク質は rRNA に結合するだけでなく、自身の mRNA にも結合することができる [138, 139, 140, 141, 142, 143]。あるリボソームタンパク質が過剰発現すると rRNA に結合できなかつた余剰リボソームタンパク質が自身の mRNA に結合し、このリボソームタンパク質、および同一オペロン内の遺伝子の翻訳を阻害する [138, 139]。リボソームタンパク質の rRNA と mRNA との競合はリボソームの構成要素のストイキオメトリーを制御すると考えられている [141]。例外的に、*rplS* 遺伝子が含まれる *trm* オペロンではこの mRNA に結合するフィードバック制御は機能していない [118]。*rplS* 遺伝子は先行研究から翻訳レベルでの制御を受けていることがわかっている [144]。これらのリボソーム量に対する転写レベル、翻訳レベルでの制御を耐性遺伝子の成長を回復するために利用していると考えられる。また、リボソームオペロンにはリボソームタンパク質の遺伝子だけでなく、RNA ポリメラーゼのサブユニット、翻訳の開始因子や伸長因子、膜貫通型トランスポーターの遺伝子も含まれている [141, 142]。そのため、リボソーム関連遺伝子のフィードバック制御によってグローバルな遺伝子発現プロファイルが変化する。このグローバルな変化は Cp 環境下で細胞が成長できる発現状態を探す一助になる。

さらにリボソームタンパク質遺伝子を制御する因子として (p)ppGpp がある [133]。栄養枯渇やヒートショックのようなストレス環境において、ストレスの種類に合わせて (p)ppGpp 合成酵素である RelA [145] または (p)ppGpp の合成分解の両機能を持つ酵素である SpoT [146, 147] の発現が誘導され (p)ppGpp の量が増加する [127]。(p)ppGpp の増加は RNA ポリメラーゼの転写開始を制御することで遺伝子発現プロファイルを変化させる [70, 71, 124]。その結果としてリボソームや DNA 複製因子の発現は抑制され、一方でアミノ酸合成酵素の発現は誘導される。また、逆に (p)ppGpp の減少はリボソームの発現が誘導され、アミノ酸の合成酵素の発現が抑制される。そのため (p)ppGpp を合成することのできない細胞 ($\Delta relA \Delta spoT$; (p)ppGpp⁰ 細胞株) はアミノ酸の添加されていない環境では生育できない [147]。さらに (p)ppGpp 合成酵素の過剰発現や分解酵素の過剰発現によって (p)ppGpp 量に摂動を加えると細胞の成長速度が低下する [131]。

Cp を含む多くの翻訳阻害剤を野生型の大腸菌に投与すると (p)ppGpp 量を減少させる [132]。(p)ppGpp の減少はリボソームの発現を誘導する点から、Cp の投与または *cat* 遺伝子の除去によってリボソームタンパク質の発現が誘導される本研究の結果とも一致する。また、(p)ppGpp の摂動によってリボソームタンパク質遺伝子の転写量は変化するもののその変動は必ずしもタンパク質複合体の化学量論に沿った変動ではない [124]。そのため (p)ppGpp 量の変動はリボソームタンパク質のバランスが崩れた原因の一つと考えられる。その後成長分

裂を回復した細胞では (p)ppGpp の量が少量ながらも多く細胞内に残存したため、リボソームタンパク質のバランスや成長を回復できた一方で、成長を回復できなかった細胞ではより (p)ppGpp が減少したためより強くリボソームのバランスが崩れ成長できなくなったと推測される。分裂を継続した細胞において (p)ppGpp の量が多かったことは耐性遺伝子除去後の RpoS-mCherry の蛍光輝度値が高かったこととも一致している (Fig. 28)。また、(p)ppGpp は RNA ポリメラーゼだけでなく、転写因子、翻訳因子、DNA 複製因子、cyclic di-GMP と cyclic di-AMP を直接的、間接的に影響を及ぼす [129]。そのため、(p)ppGpp は細胞の発現状態をグローバルに変化させ、この変化はリボソームのフィードバック制御と同様に Cp 環境下で細胞が成長できる発現状態の探索に役立つと考えられる。

Cp 環境下で Cp 耐性遺伝子を失っても成長分裂を続けた細胞では、一度成長がほとんど停止し、その後変異を得ることなく部分的に成長が回復するという細胞の表現型の変化が観察された (Fig. 9)。Cp のような翻訳阻害剤は低温ストレスタンパク質 (Csp タンパク質群) を誘導する [148, 149, 150, 151]。また、大腸菌に対して低温ストレスを与えると (p)ppGpp も減少することも知られている [152, 153]。興味深いことに低温ストレスに置かれた細菌は、タイムスケールこそ異なるものの一度数時間成長を停止してから、その後成長を部分的に回復する *acclimation* と呼ばれる現象が知られている [148, 154, 155]。この過程で細胞の翻訳速度が減少することもわかっている [148, 155, 156]。さらにリボソームプロファイリング [157, 158] を用いた研究によって、低温にさらされた大腸菌では成長が停止している段階においてリボソームを含むタンパク質複合体の量比が崩れるということも示されている [155, 159]。この類似性から Cp に対する適応と低温ストレスに対する適応ではストレスの種類が異なるもののタンパク質の翻訳の阻害を起点に、同じ反応経路が使いまわされているかもしれない。このような複数のストレス反応で (p)ppGpp を介して同じ反応経路を用いているのは、高温ストレス、アミノ酸や炭素、窒素の枯渇、浸透圧ストレスのような異なるストレスがどれも (p)ppGpp の増加を引き起こすこと [129, 160] や、(p)ppGpp 濃度が上昇した細胞が Amp や DNA の複製阻害剤であるキノロン系の薬剤ストレスに対して強くなること [161] にも観察される。そのため、低温ストレス下での細胞の反応や性質の変化を理解することは、今回の Cp に対する耐性遺伝子のない適応について理解を深めるきっかけになるだろう。例えば、低温ストレス下で発現する Trigger Factor は分子シャペロンであり、低温下での発現量が生存と関連することが知られている [151]。このようなタンパク質が翻訳阻害剤存在下でのタンパク質のフォールディングを助けているかもしれない。また、CspA やそのホモログは RNA/DNA シャペロンとして働いている [156, 162, 163]。

また、Cp 投与のタイミングで少量の CAT タンパク質が残存していることが適応に必要なこと (Fig. 12-14) はかろうじて耐えられる細胞の生理状態を経験することが表現型的な耐性を獲得するために必要であるということを示唆している。生死を分けるような危機的な状態を経験することが生存に寄与する現象は、細胞を低濃度の薬剤に曝すと耐性度が上昇する “adaptive resistance” と呼ばれる現象と類似している [164]。A. George らの研究では低濃度の Cp 環境に 200 世代晒した細胞を培養したところ、野生型の MIC の 10 倍以上の濃度の Cp に対しても耐性を示した [164]。また、この耐性度の上昇は遺伝子の変異によるものではなかった [164]。また、細胞を低濃度の薬剤に曝した後、致死を超える高濃度の薬剤を与えた際に薬剤に耐える “persister” 細胞の出現頻度が上昇する現象も知られている [165, 166]。T. Dorr らの研究では大腸菌に低濃度の ciprofloxacin を投与することで SOS 応答に関わる遺伝子を事前に発現することでその後の MIC 以上の ciprofloxacin から耐えて

いるとしている [165]。さらに、近年の研究では低濃度の薬剤に曝す代わりに飢餓ストレスによって (p)ppGpp を誘導することでも persister 細胞が増加することが確認されている [167]。今回の研究では RpoS-mCherry の蛍光輝度値は減少しているものの、*cat* 遺伝子を失っても分裂を継続した細胞では比較的高い RpoS-mCherry の蛍光輝度値であったため SOS 応答に関わる遺伝子が関与している可能性がある。事前に低濃度の薬剤にさらされた場合と同様に、耐性タンパク質量が減少している状態で Cp にさらされることによって遺伝子発現状態が変化しているのかもしれない。細胞内部の変化と環境の変化に対する適応に相似的な機構が関与しているかどうかは調べる価値があるだろう。

一方で、*cat* 耐性遺伝子を失い、Cp を投与された際、どんなに多くの CAT タンパク質があったとしても、成長分裂を続けられる細胞の割合はおおよそ 40% で頭打ちである。全ての細胞が成長分裂を続けられる状態を見つけない理由は定かではないが、適応できる遺伝子発現状態に到達できるかどうかは確率的なのだと考えられる。それに加えて、細胞内の環境のわずかな違いが寄与している可能性がある。mother machine の観察チャンネルの幅や長さの違いは細胞の物理状態 (細胞サイズや世代時間) が変化することがわかっている [168]。また、最近の研究から個々のチャンネルごとに異なる微細環境が作られていることもわかってきている [59, 169, 170]。これらの先行研究の結果は栄養の富んだ環境条件で得られたものであるが、薬剤環境でも同様にチャンネルごとの違いが生じている可能性がある。このような違いはあらかじめ *cat* 遺伝子を失っている細胞を成長させるほど大きくはないものの、Cp 環境下で分裂を続けられるかどうかが決定的に影響を与えているかもしれない。

致死的な遺伝子変化に対して履歴依存的に適応するという実験的な証拠は限られているものの、本研究で示した光遺伝学を利用した遺伝子組換えシステムとマイクロ流体デバイスを用いた一細胞追尾観察の組み合わせは *cat* 遺伝子以外の遺伝子や、大腸菌や他の細菌に限らず、酵母やヒトのような真核生物にも適応可能である。このアプローチは薬剤耐性を持つ細菌や癌細胞の出現に新たな知見を与えるかもしれない。遺伝子変異だけによらない耐性の進化を理解することは、薬剤耐性の広がりを抑えるあるいは制御するための新たな薬剤の使用戦略を考えるための役に立つだろう。

3 蛍光タンパク質を利用したスカーレスなゲノム組換え法の効率化

3.1 本章の要約

本章では蛍光タンパク質を利用した λ -Red と I-SceI を用いたスカーレスな遺伝子組換え法の効率化について述べる。まずは遺伝子組換えの中間体の細胞が持つ *tetA* 遺伝子に *gfp* 遺伝子または *mcherry* 遺伝子を付与した細胞を構築し、その性質を調べた (3.4.1 節)。この中間体を用いて蛍光タンパク質 *mcherry* 遺伝子や *gfp* 遺伝子をゲノム上の 6 か所にスカー配列なく組換える実験を行い、組換えの効率を測定した (3.4.2 節)。さらに、遺伝子の除去に対しても同様の手法が適応できるかを確かめるため、スカーレスな遺伝子除去を行った (3.4.3 節)。

これらの実験の中で、遺伝子の導入が起きていないにもかかわらず、中間体の細胞が持っていた *tetA-gfp* 遺伝子が失われた細胞が多く生じた。この細胞がなぜ出てくるかを確かめるために、組換え遺伝子がない状態で λ -Red と I-SceI を誘導して中間体を培養した (3.4.4 節)。組換え遺伝子がないにもかかわらず、多数の *tetA-gfp* 遺伝子が失われた細胞が確認されたことから、ゲノム同士が結合したことが示唆された。さらにこの意図しないゲノム同士の結合は λ -Red が関与していることを明らかにした。

さらに H. Tas らの研究では 7 kbp 近い長い配列の導入に成功していた。本手法でも同程度の長さまで遺伝子導入できるかを確かめるため、*lacZ* 遺伝子、*lacZYA* 遺伝子、*lac* operon (*lacIZYA*) 遺伝子の導入を *intC*、*attB*、*galK* に対して行った (3.4.5 節)。どの場合にも遺伝子組換えに成功した細胞が得られ、また、興味深いことに遺伝子組換え効率は必ずしも組換え配列の長さに逆相関しなかった。

3.2 序論

3.2.1 本研究の背景

2 章まででも記したように遺伝学における重要な問題の一つは遺伝子型-表現型の対応関係を理解することである。従来、この対応関係は二つに大別される手法、順遺伝学と逆遺伝学によって調べられてきた。順遺伝学とは目的の表現型を示す細胞を出発点として、他の細胞と比べてどのような遺伝子が異なっているのか、どのような遺伝子変異が原因となっているのかという点に注目して遺伝子の役割を明らかにする手法である。例として薬剤耐性に関わる遺伝子変異の同定が挙げられる。細菌の転写を阻害する薬剤 rifampicin に対して薬剤耐性を持つ大腸菌株を取得するために、様々な濃度の rifampicin 環境下で大腸菌を生育すると、多くの大腸菌は rifampicin によって成長できなくなるものの、ごく一部 (1-数個) の大腸菌が生き残る [171, 172]。このような方法で取得した rifampicin 耐性の大腸菌の遺伝子型を調べることで rifampicin の耐性を付与する遺伝子変異 (*rpoB* 遺伝子; RNA ポリメラーゼの β サブユニット) が特定されている [173, 174, 175]。この例のように表現型からその原因となる遺伝子型変異を明らかにする手法が順遺伝学である。

一方で順遺伝学とは反対に、目的の遺伝子に変異を生じさせる、あるいは特定の変異を導入して発現させ、その後の表現型変化から遺伝子の働きを推定する手法が逆遺伝学である。例えば、順遺伝学的手法で得られた薬剤耐性の候補遺伝子を野生型の細胞に導入し、その後、実際に薬剤耐性が得られたか、また、ある遺伝子ネットワークに関与していると考えられる遺伝子をノックアウトすることによってその制御が働かなくなるかといったことを確認する手法である。近年では大腸菌のようなモデル生物に対して、致死遺伝子以外の一遺伝子をノック

クアウトしたライブラリを作成し [34]、目的の現象に関与する遺伝子を網羅的に探し出すような研究も行われている [35, 36, 37]。さらに、このライブラリの細胞 (~4000 種類) の表現型 (e.g. 成長率や細胞サイズ) を網羅的に調べるといった研究も行われている [24]。このように遺伝子変異から表現型の変化を観察し、遺伝子の役割を明らかにする手法が逆遺伝学である。逆遺伝学的手法を行うためには自由に遺伝子の除去や導入ができる必要があり、このためには遺伝子組換え技術が必要不可欠である。

細菌における遺伝子導入のもっとも簡便な方法は目的遺伝子を持ったプラスミドの導入である。プラスミドとはゲノム DNA ではない自己複製可能な環状の DNA であり、通常ゲノムサイズにくらべてとても小さい (数千 ~ 数万 base pair)。このプラスミド内に目的の遺伝子 (e.g. 変異を持った遺伝子や、野生型が持っていない遺伝子) を導入することで目的遺伝子を細胞内で発現させることができる。これによって細胞内での目的遺伝子の働きを調べることができる。しかしプラスミドを用いた方法にはいくつか欠点がある。1つ目はプラスミドのコピー数にはばらつきがあり、細胞集団内で目的遺伝子のコピー数が異なってしまうことがあるという点である。2つ目は遺伝子の除去が表現型に及ぼす影響は調べられない点である。3つ目は複数のプラスミドを利用する場合、不和合性を考慮する必要がある点である。4つ目はプラスミド、特に高コピープラスミドについては細胞に負荷をかけ細胞の成長や表現型に影響を及ぼす点である [176]。最後に、細胞内にプラスミドを維持するために薬剤を必要とし、薬剤は MIC レベル以下でも遺伝子発現や成長に影響を与える可能性がある点である [177]。このような欠点から、プラスミドを用いる場合だけでなく、細菌のゲノムに直接遺伝子導入、改変する場合も多い。大腸菌のゲノムに遺伝子変異を与える際、もっともよく利用されている方法の一つに 2000 年に K. Datsenko と B. Wanner によって発表された λ -Red 組換え酵素を用いた方法があげられる [31]。

3.2.2 λ -Red 組換え酵素を用いた遺伝子組換え法

K. Datsenko と B. Wanner の方法では目的遺伝子を増幅した PCR 産物を電気穿孔法で細胞内に挿入し、組換え酵素によって挿入した産物をゲノム上に組換える [31]。まず、目的遺伝子および上端と下端に FRT 配列を持つ薬剤耐性遺伝子 (彼らの論文の中ではカナマイシンまたはクロラムフェニコールを利用した。) を PCR によって増幅する。この時 PCR に用いるプライマーには 36-50 bp の導入先の遺伝子配列の相同配列を付加する。予め λ -Red システムの発現を誘導した細胞内に電気穿孔法を用いて PCR 産物を導入する。数時間から 1 日ほど SOC 培地で回復させたのち、適切な薬剤を含んだ寒天培地に細胞をまく。出現したコロニーは多くの場合、目的の遺伝子がゲノム上の特定位置に挿入された細胞である。その後、Flippase を発現するプラスミドを導入し、Flp-FRT 反応によって FRT 配列に挟まれた薬剤耐性遺伝子を除去する。Flippase 発現のプラスミドおよび λ -Red システムを発現するプラスミドは温度感受性のため、42°C で培養することで取り除くことができる。これによって目的の場所に目的遺伝子を持つ細胞を作製することができる。

この遺伝子組換え法は先述のノックアウトコレクションライブラリーをはじめとして、もっとも多く使われている遺伝子組換え手法の一つである。しかしこの方法では 3 kbp を超えるような配列の導入確率が悪いことがわかっている [178]。さらに、この手法では目的遺伝子だけでなく FRT 配列も一つ染色体上に残ってしまう。このような意図していない配列をスカー配列と呼ぶ。大抵の研究ではこの FRT 配列の影響は調べられておらず、無視されている。しかし、この λ -Red 組換え酵素を用いた遺伝子組換え法を繰り返し利用する際に、残存

した FRT 配列によって、誤った場所に遺伝子組換えされることや Flippase によって意図しない FRT 配列間の遺伝子を取り除いてしまうことが起こりうる [178]。また、近年の研究からランダムな配列であってもプロモーター活性を持ってしまうことがあることがわかってきた [179]。Flp-FRT のような系を必要とするのは目的遺伝子とともに薬剤マーカーを導入するからである。そのため、薬剤耐性マーカーを目的遺伝子と同時に導入しない遺伝子組換え法 [178] や FRT のようなスカーが残らない遺伝子組換え法 [68, 180] の開発が進められている。

3.2.3 λ -Red 組換え酵素と I-SceI メガ制限酵素を用いた薬剤耐性マーカーレス遺伝子組換え法

マーカーレスな遺伝子組換えは近年開発が進んでいる手法である。その一つとして T. Kuhlman と E. Cox により開発された λ -Red 組換え酵素と I-SceI メガ制限酵素を用いた遺伝子組換え法が挙げられる [178]。I-SceI メガ制限酵素は 18 bp の配列を認識する制限酵素である [181]。この 18 bp の配列は回文配列ではなく、野生型の大腸菌には存在しない配列である。

この方法は大きく 2 段階に分けられる。第一段階としてゲノム上の目的部位にテトラサイクリン (Tc) 耐性遺伝子 (*tetA*) を λ -Red 組換え酵素を用いて導入する (Fig. 32)。isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) で制御した λ -Red 組換え酵素遺伝子とアラビノースで制御した I-SceI メガ制限酵素遺伝子をプラスミド (pTKRED) から発現することができる細胞に対して、電気穿孔法を用いて *tetA* 遺伝子配列を導入する。その際、*tetA* 遺伝子の上端、下端に I-SceI 認識配列を導入し、さらにその外側にそれぞれ 25 bp の landing pad 配列を挿入する。この landing pad 配列は大腸菌のゲノム上にない配列を用いたものである。組換えに成功した細胞を Tc で選択する。

第二段階ではまずこの細胞に対して目的遺伝子を持つプラスミド (pTKIP) を導入する (Fig. 32)。この時目的遺伝子の上端および下端にはゲノム上と同じ landing pad 配列があり、さらにその外側に I-SceI 認識配列が挿入されている。pTKIP プラスミドを導入した細胞に対し、IPTG およびアラビノースを添加した培地で培養することで I-SceI を誘導し、pTKIP プラスミドおよび *tetA* 周りの I-SceI 認識配列を切断する。 λ -Red 組換え酵素の働きによってプラスミドから切り離された目的遺伝子配列上端下端の landing pad 配列とゲノム上の landing pad 配列が結合されることで目的遺伝子が導入された細胞が得られる。この時、遺伝子の導入に失敗した細胞は環状ゲノムが切断された状態になるため増殖できないあるいは遅くなる。そのため遺伝子組換えした細胞が得られる。この方法では目的遺伝子を導入する際に薬剤マーカーを必須とはせず、また、最大 7 kbp まで導入することができる点で B. Wanner の方法よりも優れている [178]。一方で、この方法では目的遺伝子の両端に 25 bp ずつの landing pad 配列が残ってしまうという点でスカー配列が残ってしまう。また、I-SceI の切断とその後の細胞増殖の阻害は完全なものではなく、組換えの部位によっては遺伝子組換えに失敗した細胞も生き残ってしまい、出現したコロニーの数%、 λ -Red 組換え酵素を利用しても 20% 以下のコロニーしか目的遺伝子をもたない部位もあるなど必ずしも高い成功率ではない [178]。

3.2.4 λ -Red 組換え酵素と I-SceI メガ制限酵素を用いたスカーレス遺伝子組換え法

薬剤耐性マーカーレスな遺伝子組換えを応用して、近年、スカーレスな遺伝子組換えが発展している [68, 180]。H. Tas らの研究では薬剤耐性マーカーレスな遺伝子組換えの際に用いた landing pad 配列の代わりに導入先の

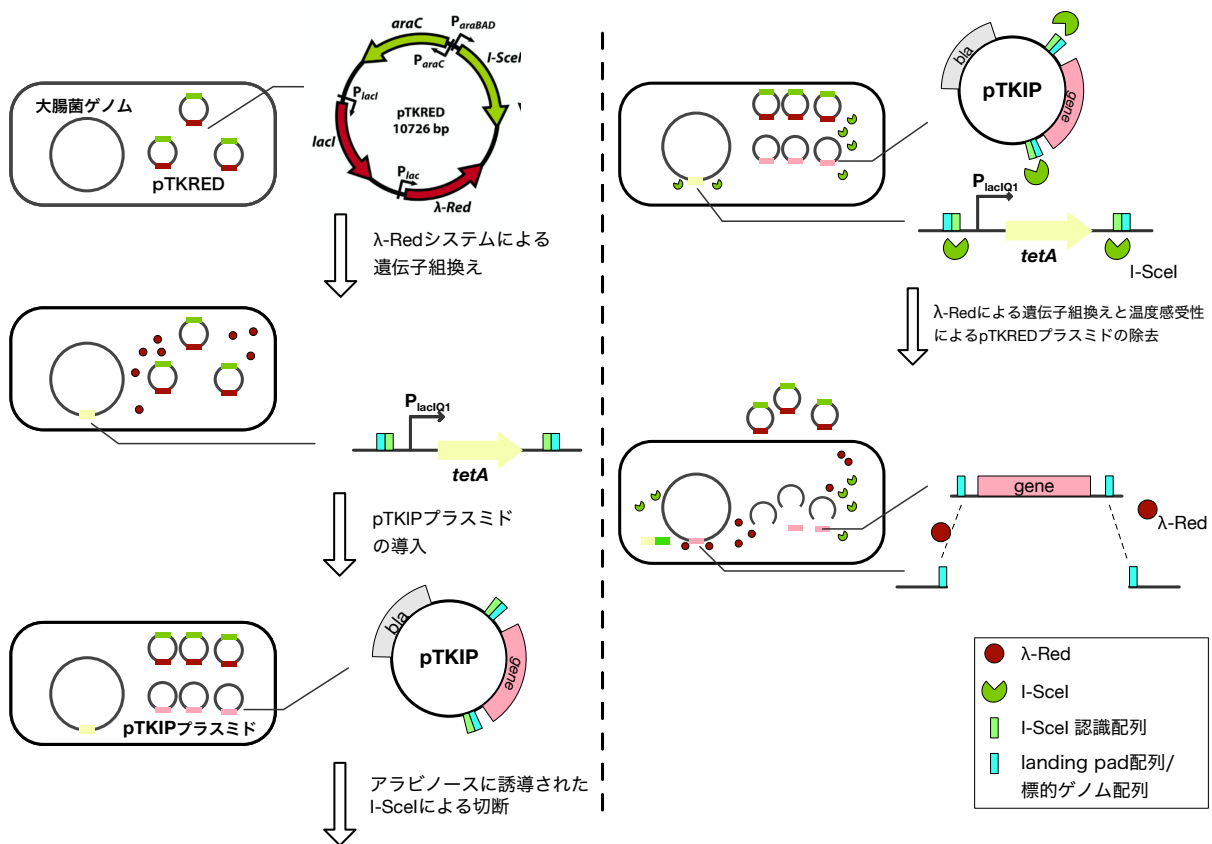


Fig. 32: T. Kuhlman や H. Tas らの遺伝子組換え方法の概略図。この図では *tetA* 遺伝子を持った中間体を作成したのち、この遺伝子と入れ替わりに目的遺伝子 (図の中の *gene*) を導入している。I-SceI メガ制限酵素および λ -Red を発現する pTKRED プラスミドおよび組換え遺伝子を持つ pTKIP プラスミドを有している。水色の長方形は T. Kuhlman と E. Cox の方法では 25 bp の landing pad 配列と呼ばれる配列であり [178]、H. Tas らの方法ではゲノムの末端部分の配列になる [68]。

末端のゲノム配列を用いることで λ -Red 組換え酵素と I-SceI メガ制限酵素によってスカー配列を出すことなく遺伝子組換えできることを示した [68] (Fig. 32)。また配列の工夫次第で遺伝子の挿入だけでなく除去もできることを確認した。

この方法では対抗選択なしだと遺伝子組換え部位によって 6-97%、対抗選択ありの場合だと 50%以上の細胞で遺伝子組換えが成功した。しかし、彼らの研究の中では 3 か所の遺伝子部位の組換え効率の評価しか行っておらず、全てのゲノム位置で同等の高い確率で遺伝子組換えができるかは不明である。実際、T. Kuhlman と E. Cox の研究では数%から 10 数%の組換え効率の場所も存在する [178]。そのため、どの遺伝子組換え部位においても遺伝子組換えに成功した細胞を効率的に取得する方法が求められる。

また、近年発展してきた CRISPR/Cas9 システムを利用して、薬剤マーカーレス、スカーレスに遺伝子組換えを行う手法も同様に開発が進んでいる [38, 182]。しかし CRISPR を利用した方法でも、B. Wanner らの方法と同様に長い配列の導入効率が低下した [38]。また、野生型の大腸菌ゲノムを切断しないことがわかっている I-SceI メガ制限酵素 [181] と異なり、CRISPR/Cas9 システムでは guideRNA のオフターゲットの影響により、意図しない遺伝子切断が誘導されることがある [183]。そのため、I-SceI よりもより慎重に設計を行わなければならない。

3.2.5 本研究について

DNA は高次構造を持っており、構造によって酵素の反応のしやすさは異なる。これによって遺伝子組換え効率自体も染色体上の位置によってバラバラであり、全ての位置で高い効率で遺伝子組換えを行うことは困難である。また、染色体上の位置によって遺伝子発現量は変化する [184, 185]。そのため、*tetA* 遺伝子の発現を利用した対抗選択が全ての遺伝子部位で適応できるかわからない。実際、われわれの予備実験では *tetA* 遺伝子に対するフザリン酸を用いた対抗選択において *intC* 部位に導入した場合には MIC が野生型よりも小さくなるが、*galK* 部位に導入した場合には等しいことがわかっている (Fig. 33)。

組換え効率の低い遺伝子組換えでは、遺伝子組換えに成功した細胞を得るためにより多くのコロニーを確認する必要があり、時として確認のためのコロニー PCR や遺伝子組換え実験自体を繰り返す必要がある。この過程は時間および費用のかかる過程である。

そのため本研究では λ -Red 組換え酵素と I-SceI メガ制限酵素を用いたスカーレス遺伝子組換え法に対して、たとえ組換え効率が低くとも、高速にコロニーをスクリーニングする方法を開発した。この方法はプラスミド構築における青白選択 [186, 187] を応用したものである。青白選択は *lacZ* 遺伝子の α 因子を利用している [188]。これが存在すると LacZ が機能し X-gal と呼ばれる物質を分解することで青色に、これが発現しない場合はコロニーが白色になる [186]。この α 因子をベクタープラスミドのクローニングサイトに入れることで、クローニングサイトを利用して遺伝子を挿入した場合は α 因子の遺伝子が破壊され、白色のコロニーになる。一方でベクターだけのプラスミドが細胞に入った場合は青色になる。この結果、コロニーを見ただけで目的のプラスミドを持つ細胞を選択することができる。この青白選択はプラスミドを形質転換する細胞の *lacZ* 遺伝子に変異が入っていることが必須であるため、使える細胞は限られていた。この点を乗り越える方法として、近年では *lacZ* 遺伝子の α 因子の代わりに GFP のような蛍光タンパク質を利用する方法も開発されている [189]。

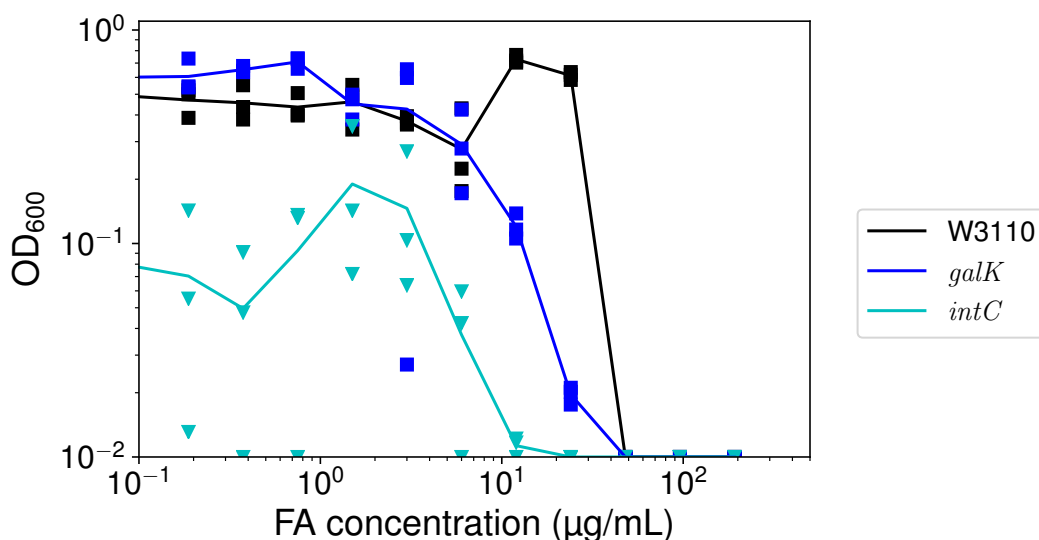


Fig. 33: *tetA* 遺伝子を導入した細胞の MIC test. 灰色の点は各細胞株における 23 時間、対応する FA 濃度の MOPS RDM 培地で培養した時の OD₆₀₀ の値である。青四角は *galK* 部位に *tetA* 遺伝子を導入した細胞を表す。水色三角は *intC* 部位に *tetA* 遺伝子を導入した細胞を表す。黒四角は *tetA* を導入していない親株を表す。OD₆₀₀ が 0.01 以下になる最小の FA 濃度を各細胞の MIC として用いた。この計測は少なくとも三回行った。

本研究でも蛍光タンパク質を利用して遺伝子組換えに成功したかどうかを判別することを目指した。そこで本実験では遺伝子組換え部位としてよく用いられる *attB*[190]、*intC*、*galK*[44] に加え、先行研究から染色体上の位置の違いから発現量が異なると思われる 3 か所 *aslB*、*tam*、*yqeC*[184] の 6 か所に対して遺伝子組換えを行った。λ-Red 組換え酵素と I-SceI メガ制限酵素を用いたスカーレス遺伝子組換え法では *tetA* 遺伝子を導入した中間体が存在する。この段階に *tetA* 遺伝子の代わりに転写的に融合した *tetA-gfp* 遺伝子または *tetA-mcherry* 遺伝子を導入した。このようにした後に 2 段階目のスカーレスな遺伝子組換えを行うと、遺伝子組換えがうまくいかなかった細胞では GFP または mCherry の蛍光が観察される一方で、遺伝子組換えが成功した細胞では蛍光が観察されなくなると予想される。この方法を用いることで、遺伝子組換えに成功したコロニーの割合が 2% のような部位でも 90% を超える確率で遺伝子組換え細胞を選択できることがわかった。また、先行研究では低確率であるため無視されていた pTKIP プラスミドが残存したコロニーについても蛍光を用いて選択的に確実に除外することができるようになった。

3.3 方法

3.3.1 プラスミドの構築

構築した細胞、プラスミドおよびプラスミド作製に用いたプライマーはそれぞれ Table S4、S5、S6 を参照。

プラスミドの構築には ExoIII クローニングを用いた [110]。まずバックボーンとなるプラスミドベクターおよび必要ならば挿入配列を KOD Plus Neo (TOYOBO) または Prime STAR (Takara Bio) で増幅した。増幅し

た PCR 産物を Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製したのち、DpnI (New England Biolab) で処理した。DpnI を加えて 2 時間以上 37°C で温めた後、再度精製を行った。精製した PCR 産物 (ベクターのみの場合 8 μ L、ベクターと挿入配列の場合それぞれ 4 μ L) を ExoIII 酵素で 14°C、1 分間処理し、その後 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA、Wako) を加え反応を停止させた。この産物をカラム精製した後、55°C、37°C の順に 3 分ずつ温めた。その後全量を 100 μ L の JM109 コンピテントセルに加え、30 分間氷上に静置した。42°C で 45 秒ヒートショックを与えた後、再度氷上に 2 分間静置した。1 mL SOC 培地を加え、溶液を試験管に移し、37°C で 2 時間以上培養した。目的プラスミドを選択するマーカーが ampicillin (Amp、Wako) の場合は最後の培養の過程は省いた。この溶液を必要な薬剤を持つ LB (Difco) 寒天培地 (1.5%(w/v); Agar (Wako)) にまき、37°C で一晩静置培養した。寒天培地に用いた薬剤と薬剤濃度は以下の通りである。Amp: 100 μ g/mL、chloramphenicol (Cp、Wako): 20 μ g/mL。

プレートに現れたコロニーは GoTaq (Promega) を用いた PCR により目的プラスミドの保持の確認を行った。目的のプラスミドを持っているコロニーを、選択薬剤を添加した 2 mL の LB 液体培地 (用いた薬剤濃度 Amp 50 μ g/mL、Cp 20 μ g/mL) に植菌し、37°C で一晩培養した。培地の一部をグリセロールストックにして -80°C で保存し、残りを使って PureYield[™] Plasmid Miniprep System (Promega) でプラスミドを精製した。Prime STAR 酵素を用いた PCR で ExoIII 処理をしてつなぎ合わせた部位および挿入配列の塩基配列を増幅し、ゲル精製をした。精製した産物を外注によってサンガー法で確認した (FASMAC、Genewiz(現在は Azenta))。

3.3.2 pTKRED プラスミドの導入

遺伝子組換えを行う大腸菌をグリセロールストックから取り、2 mL LB 液体培地に植菌した。この培地を 37°C で一晩 200 rpm で震盪培養した。10 μ L の培養液をとり、新たに 2 mL LB 培地に加え、37°C で震盪培養した。3 時間の培養後、氷上に 30 分静置した。冷えた培養液を 1.5 mL チューブにとり、4°C、21,500 \times g で 1 分間遠心した (CT15E、himac、Hitachi)。上清を捨てたのち、10%グリセロール溶液 (Wako) で 1 mL で懸濁して 4°C、21,500 \times g で 1 分間遠心した。グリセロールでの洗浄を 2 回繰り返した後、50 μ L の 10%グリセロール溶液で懸濁し、1 μ L の PTKRED プラスミドを加えた。0.1 cm 幅のキュベット (Bio-rad) に全量入れ、電気穿孔法によってプラスミドを導入した (~1.8kV、~5.5 ms; Micro Pulser エレクトロポレーター、Bio-rad)。電気ショック後すぐに 1 mL の SOC 培地を加え、30°C で 2 時間以上震盪培養した。培養液を 50 μ g/mL Storeptomycin (Sm、Wako) を添加した LB 寒天培地に塗布し、30°C で一晩静置培養した。出現したコロニーを 50 μ g/mL Sm を含む 2 mL LB 液体培地に加え 30°C で一晩震盪培養した。この培養液をグリセロールストックにして -80°C で保存した。

3.3.3 *tetA* および蛍光タンパク質遺伝子の導入

挿入する塩基配列 *tetA-gfp* 遺伝子および *tetA-mcherry* 遺伝子は Prime STAR を用いてそれぞれ pYK057、pYK056 をテンプレートとして PCR で増幅した。PCR 産物はゲル精製を行い、その後 DpnI 処理した。37°C で 2 時間以上静置した後、再度精製した。

グリセロールストックとして保存した pTKRED プラスミドを導入した細胞を 50 μ g/mL Sm を含む 2 mL

LB 培地で一晚、30°C で震盪培養した。この培養液 500 μ L を 2 mM IPTG と 50 μ g/mL Sm を含む 50 mL LB 培地を入れたフラスコに加え、3 時間、30°C で震盪培養した。50 mL チューブにこの培養液を移し、氷上で 30 分間冷却した。その後 2,480 \times g で 7 分間遠心分離 (CT6E、himac、Hitachi)、上清を廃棄した。1 mL の 10% グリセロール溶液で懸濁し、4°C、21,500 \times g で 1 分間遠心し (CT15E)、上清を捨てる操作を 3 回繰り返した。500 μ L の 10% グリセロール溶液で懸濁し、350 μ L の懸濁液を 50 μ L の精製した PCR 産物に加えた。この溶液を 0.2 cm 幅のキュベット (Bio-rad) に入れ、電気穿孔法によって塩基配列を導入した (\sim 2.6 kV、 \sim 3.8 ms; Micro Pulser エレクトロポレーター)。即座に SOC 培地を加え、30°C で 2 時間以上震盪培養した。この培養液を全量 50 μ g/mL Sm および 20 μ g/mL tetracycline hydrochloride (Tc、Wako) を含んだ LB 寒天培地に塗布し、30°C で一晚以上培養した。Tc の分解を防ぐため、作業時を除いて寒天培地はアルミホイルで覆った。

寒天培地上に現れてきたコロニーに対し、適切なフィルターで蛍光を目視でチェックし、目的の蛍光を発するコロニーに対し GoTaq を用いてコロニー PCR を行った。目的遺伝子の導入が確認できたコロニーを 50 μ g/mL Sm および 20 μ g/mL Tc を含む LB 培地 2 mL に加え、一晚、30°C で震盪培養した。この培養液の一部をグリセロールストックとして -80°C で保存した (*tetA-gfp*; YK0194、YK0195、YK0200、YK0209、YK0217、YK0218、*tetA-mcherry*; YK0196、YK0201、YK0208、YK0210、YK0211、YK0220)。また残りの培養液から Wizard[®] Genomic DNA Purification kit (Promega) を用いてゲノム DNA を抽出した。Prime STAR 酵素を用いた PCR で導入配列の塩基配列を増幅し、ゲル精製をした。精製した産物を外注によってサンガー法で確認した (FASMAC)。

3.3.4 *tetA* および蛍光タンパク質遺伝子の除去およびスカーレスな遺伝子の組換え

まず目的遺伝子およびゲノム配列に相同な 25bp ずつの配列を持つ pTKIP プラスミドを導入した。I-SceI 認識配列で挟まれた *tetA-gfp* 遺伝子および *tetA-mcherry* 遺伝子および pTKRED プラスミドを持つ細胞のグリセロールストックを 50 μ g/mL Sm を含む LB 培養液 2 mL に加え、一晚、30°C で震盪培養した。培養液 10 μ L を 50 μ g/mL Sm を含む 2 mL の LB 培養液に加え、3 時間、37°C で培養した。3 時間の培養後、氷上に 30 分静置した。冷えた培養液を 1.5 mL チューブにとり、4°C、21,500 \times g で 1 分間遠心した (CT15E)。上清を捨てたのち、10%グリセロール溶液 (Wako) で 1 mL で懸濁して 4°C、21,500 \times g で 1 分間遠心した。グリセロールでの洗浄を 2 回繰り返した後、50 μ L の 10%グリセロール溶液で懸濁し、1 μ L の目的遺伝子およびゲノム配列に相同な 25bp ずつの配列を持つ pTKIP プラスミドを加えた。0.1 cm 幅のキュベットに全量入れ、電気穿孔法によってプラスミドを導入した。電気ショック後すぐに 1 mL の SOC 培地を加えた。培養液を 50 μ g/mL Sm および 100 μ g/mL Amp を添加した LB 寒天培地に塗布し、30°C で一晚静置培養した。

出現したコロニーを I-SceI および λ -Red を用いて遺伝子組換えを行った。培養液として 0.5%(v/v) グリセロールおよび 0.4%(w/v) アラビノースを含む MOPS EZ rich defined medium(MOPS RDM; Teknova) を用いた。コロニーを 2 mM IPTG および 50 μ g/mL Sm を含む 5 mL MOPS RDM に加え、濃い濁度になるまで 30°C で震盪培養した (通常二晩)。この培養液を MOPS RDM で 1.0×10^{-6} 希釈し、100 μ L を LB 寒天培地に塗布し、37°C で一晚静置培養した。ただし、繰り返しスカーレス遺伝子組換えをする場合、100 μ L を 50 μ g/mL Sm を含む LB 寒天培地に塗布し、30°C で一晚から二晩静置培養した。培養して出現したコロニーを蛍光チェッ

クシ (方法は 3.3.6 参照)、蛍光を失ったコロニーに対して GoTaq を用いたコロニー PCR を行って意図した遺伝子組換えの有無および pTKIP プラスミドが除去できていることを確認した。

3.3.5 pTKRED プラスミドの除去

pTKRED プラスミドは温度感受性プラスミドのため高温培養することで除去される。T. Kuhlman らが開発した組換え手法と同様に、目的遺伝子を持つコロニーを 2 mL LB 培地に加え、一晚 42°C で震盪培養した [178]。100 μ L の培養液を LB 寒天培地に勾配をつけて置いた。出現したコロニーに対して再度コロニー PCR を行い目的遺伝子の有無を確認した。目的遺伝子を持つコロニーを 2 mL の LB 培地で 37°C で一晚震盪培養した。この培地の一部をグリセロールストックとして保存した。また残りの培養液から Wizard[®] Genomic DNA Purification kit を用いてゲノム DNA を抽出した。Prime STAR 酵素を用いた PCR で導入配列の塩基配列を増幅し、ゲル精製をした。精製した産物を外注によってサンガー法で確認した。

pTKRED プラスミドの有無の確認としてコロニーを 2 mL の LB 培地で 37°C で一晚震盪培養する際に、同じコロニーの一部を 50 μ g/mL Sm を含む 2 mL の LB 培地で 37°C で一晚震盪培養した。この溶液が培養できないことをもって、pTKRED の除去を確認した (Fig. 34)。

3.3.6 遺伝子組換え効率の測定

意図した遺伝子組換えに成功した細胞の割合を調べるため、スカーレス遺伝子組換えを行った細胞をまいた LB プレートのコロニーの数を調べた。コロニーの計数は LB プレートを 37°C で 24 時間静置培養した後に行った。培養後、培地に生えてきたコロニーの数および、蛍光を発するコロニーの数を倒立顕微鏡を使って、白色光と蛍光タンパク質 GFP または mCherry の励起光の条件で数えた (stereomicroscope: Olympus SZ61; LED 光源: NIGHTSEA SFA-BL (GFP 用)/SFA-GR (mCherry 用))。観察された蛍光が pTKIP プラスミド由来か *tetA-gfp* 遺伝子または *tetA-mcherry* 遺伝子由来かは目視における蛍光の強度の違い、または白色光でのコロニーの色の違いから見分けた。遺伝子組換えに成功した細胞の割合は蛍光を発しないコロニーの数を全コロニーの数で割ることで求めた。また、スカーレスに *mcherry* 遺伝子または *gfp* 遺伝子を導入した場合、導入した蛍光遺伝子の有無も確認した。導入した *mcherry* 遺伝子または *gfp* 遺伝子由来の蛍光を発するコロニーの数をそれぞれ *tetA-gfp* 遺伝子または *tetA-mcherry* 遺伝子由来の蛍光を発しないコロニーの数で割ることで、真の遺伝子組換えに成功した細胞の割合を求めた。

蛍光の有無と遺伝子組換えの成功を検証するために蛍光を発するコロニー、発しないコロニーのそれぞれについてコロニー PCR を行い、導入した遺伝子の有無と対応することを確認した。また、同じコロニーに対して、プラスミドの有無が蛍光で予測されたものと一致するかもコロニー PCR によって確認した。

さらに、各遺伝子組換えに対して塩基配列の確認も行った。まず、コロニー PCR で導入遺伝子が確認されたコロニーをそれぞれの遺伝子組換え部位に対して 5 つずつ 2 mL の LB で 37°C で一晚震盪培養した。一部の培養液をグリセロールストックとして保存し、残りを 1.5 mL チューブに移し、21,500 \times g で 3 分間遠心分離して上清を捨てた。-20°C で一晚以上保存した後、600 μ L の滅菌水で懸濁し、PCR のテンプレートに 1 μ L を用いた。Prime STAR 酵素を用いた PCR で導入配列の塩基配列を増幅し、ゲル精製をした。精製した DNA

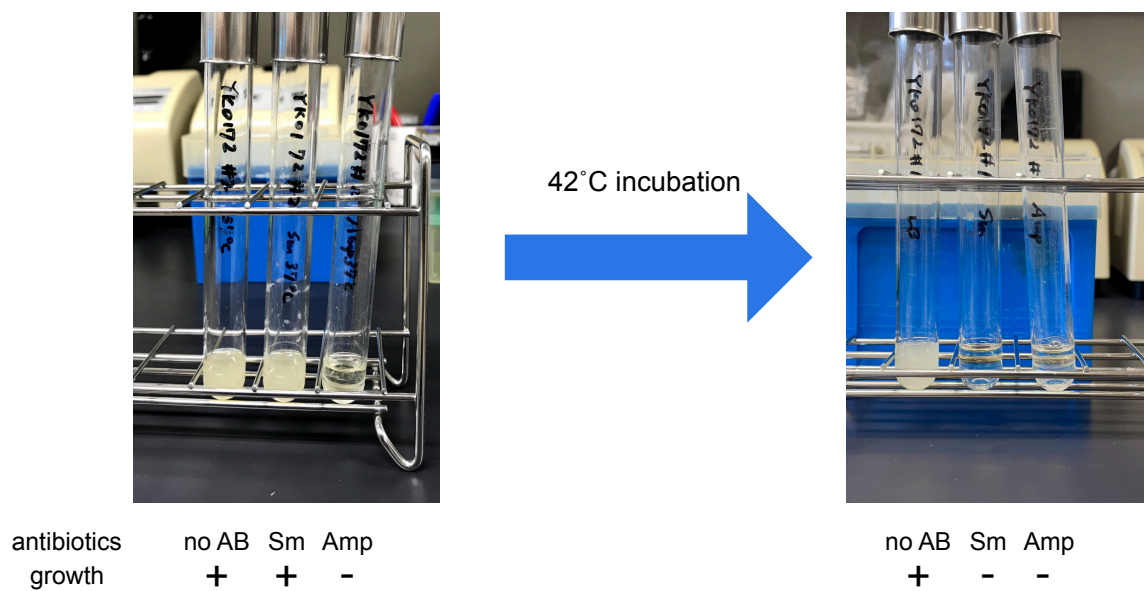


Fig. 34: pTKRED プラスミド除去. *galK* 部位に遺伝子を導入した細胞が pTKIP プラスミドおよび pTKRED プラスミドを失っていることを確認した。42°C で培養する前は pTKRED プラスミドを有しているため Sm 環境下で培養可能である。ただしこのタイミングでも pTKIP プラスミドは失われているため Amp 環境では生育できない。42°C の培養後の細胞を同じ濃度の薬剤環境で培養した場合、Sm 環境でも生育しなかった。no AB: no antibiotics.

の配列を外注によってサンガー法で確認した (FASMAC、Genewiz (Azenta))。

3.3.7 MIC 測定における細胞の培養

グリセロールストックに保存された細胞を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Sm を含む 2 mL の LB 培地に植菌した。この培地を 30°C で一晚 200 rpm で震盪培養した。50 μL の培養液を 1.5 mL チューブにとり、21,500 \times g で 3 分間遠心分離した。上清を廃棄したのち、新たに 1 mL の LB 培地あるいは MOPS RDM (0.5% グリセロール) 培地でペレットを懸濁した。この培地の濁度を測定し、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Sm を含んだ 2 mL LB 培地あるいは MOPS RDM (0.5% グリセロール) 培地に加えた。培養開始時の OD₆₀₀ は LB 培地の場合 0.001、MOPS RDM (0.5% グリセロール) 培地の場合は 0.01 になるようにした。3-4 時間、30°C で震盪培養した後、この培地を新鮮な同じ培地 200 μL に OD₆₀₀ が 0.001 になるように 96 穴プレートの各ポジションに加えた。この培地には薬剤なし、および 0.3125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で 2 倍ずつ 11 段階で設定した濃度の Tc または 0.1875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 192 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で 2 倍ずつ 11 段階で設定した濃度のフザリン酸 (FA、Wako) を投与した (Fig. 33、37、39)。23 時間、30°C で培養した後、この培地の濁度をプレートリーダー (FilterMax F5、Molecular Devices) で測定した。MIC には 23 時間後の OD₆₀₀ が 0.01 を超えない最小の薬剤濃度を用いた。

3.3.8 *tetA-gfp* 遺伝子または *tetA-mcherry* 遺伝子を持つ細胞の成長測定

グリセロールストックに保存された細胞を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Sm を含む 2 mL の LB 培地に植菌した。この培地を 30°C で一晚 200 rpm で震盪培養した。50 μL の培養液を 1.5 mL チューブにとり、21,500 \times g で 3 分間遠心分離した。上清を廃棄したのち、新たに 1 mL の MOPS RDM (0.5% グリセロール) 培地でペレットを懸濁した。この培地の濁度を測定し、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Sm を含んだ 2 mL MOPS RDM (0.5% グリセロール) 培地に加えた。培養開始時の OD₆₀₀ は 0.01 になるようにした。3-4 時間、30°C で震盪培養した後、この培地を新鮮な同じ培地 200 μL に OD₆₀₀ が 0.001 になるように 96 穴プレートの各ポジションに加えた。この培地には条件に合わせて、0.4% アラビノース及び 2 mM IPTG を投与した (Fig. 43、44)。30°C で培養しながら、この培地の濁度を 5 分ごとにプレートリーダー (Epoch2、BioTek) で測定した。lag time の算出には OD₆₀₀ が 0.2 を超える時間を用いた。

3.4 結果

3.4.1 蛍光遺伝子を発現するスカーレス遺伝子組換え中間体の作製

序論で述べた方策に従って、蛍光によって判別するスカーレス遺伝子組換え法を用いて遺伝子の導入を行った。遺伝子の導入する部位として前述の通り attB、*intC*、*galK*、*aslB*、*tam*、*yqeC* の 6 か所を用いた。これらの場所と働きは Fig. 35 および Table 5 に記した。

T. Kuhlman らの研究で用いた pTKS/CS プラスミドを改変し *tetA* 遺伝子と I-SceI 認識配列の間に *mcherry* 遺伝子あるいは *gfp* 遺伝子を転写レベルで導入したプラスミド pYK056、pYK057 を構築した。pYK057 を PCR のテンプレートとして増幅した *tetA-gfp* 遺伝子を attB、*intC*、*galK*、*aslB*、*tam*、*yqeC* に導入した 6 種類の細胞を構築した (YK0194、YK0195、YK0200、YK0209、YK0217、YK0218)。これらの細胞は野生型の W3110

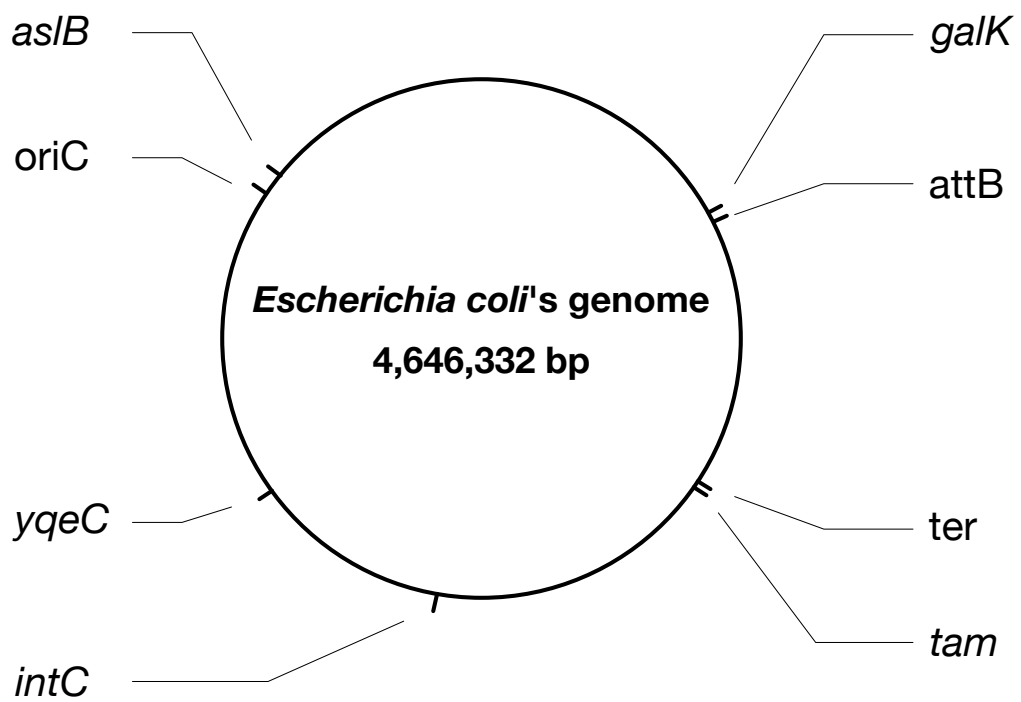


Fig. 35: 遺伝子組換え部位の染色体上の位置. *attB*、*intC*、*galK*、*aslB*、*tam*、*yqeC* の6つの遺伝子と複製開始地点 *oriC*、複製停止位置 *ter* の場所を記している。

Table 5: 遺伝子組換え部位の大きさと働き。

Name	Position	Length	Product
<i>galK</i>	789253-790401	1148	galactokinase
<i>attB</i>	807750-807765	15	phage attachment site
<i>tam</i>	1609060-1609818	758	trans-aconitate methyltransferase
<i>intC</i>	2471991-2473148	1157	predicted prophage CPS-53 integrase
<i>aslB</i>	3652488-3653723	1235	predicted regulator of arylsulfatase activity
<i>yqeC</i>	3012943-3013713	770	conserved hypothetical protein

と比べて高い GFP 蛍光を発していた (Fig. 36)。また、GFP 蛍光の強度は組換え部位によって有意に差があった (Fig. 36)。先行研究と同様に [184, 185]、この強度の差は導入した遺伝子の *oriC* からの位置だけで説明できるものではない。

次にこれらの細胞の薬剤に対する応答を調べた。Tc に対する薬剤応答を調べたところ、どの細胞も野生型 (MIC: 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に比べて高い MIC ($\geq 80 \mu\text{g}/\text{mL}$) であったが、細胞ごとに MIC が異なり、GFP 蛍光の最も高かった *aslB* 部位では MIC も最も高かった (320 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Fig. 37A)。*tetA* は対抗選択としてフザリン酸 (FA) を用いることができることが知られている [191, 192]。しかしながら、FA について MIC を測定したところ、今回の細胞では野生型細胞の MIC と変化がなかった (48 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Fig. 37B)。そのため、今回の組換えでは T. Kuhlman の手法と同様に *tetA* による対抗選択は用いなかった。これらの結果は *tetA-mcherry* を導入した細胞 (YK0196, YK0201, YK0208, YK0210, YK0211, YK0220) を用いた場合でも同様であった (Fig. 38, 39)。

3.4.2 スカーレスな遺伝子の導入

まずは蛍光タンパク質遺伝子 *mcherry* 遺伝子をスカーレスに導入する実験を行った。遺伝子組換えの中間体として *gfp* を *tetA* とともに発現させた細胞を用いて、各導入部位の 25 bp の相同配列に挟まれた *mcherry* 遺伝子を持つ pTKIP-TC プラスミド (Table S5) を導入した (Fig. 40)。この細胞を I-SceI および λ -Red を誘導しながら培養したところ全ての組換え部位でスカーレスに *mcherry* 遺伝子が導入されている細胞が得られた。*mcherry* 遺伝子の導入頻度を求めるために得られたコロニーに対し mCherry の蛍光を確認した (Fig. 41)。導入に成功した細胞は mCherry の蛍光を発し、失敗した細胞では mCherry の蛍光は観察されないはずである。そのため導入の頻度は (mCherry 蛍光を発するコロニー数)/(総コロニー数) で算出した (Table. 6 Correct %)。この頻度は出現したコロニーをランダムに選択したときに目的のコロニーを取得できる確率を表している。ただし、Fig. 41 の白色光の画像にあるように一部のコロニーでは高コピープラスミドである pTKIP-TC プラスミドが残存していると考えられる蛍光を強く発するコロニーが現れた (Fig. 41: 矢印 1)。このような細胞は先行研究でも 1%程度観察されていた [178]。実用上 pTKIP-TC プラスミドは失われて欲しいため、このようなコロニーは mCherry 蛍光を発するコロニー数から除外した (Table. 6 Plasmid +)。Table 6 が示すように、遺伝子組換え効率は組換え部位によって様々であり、3.8% (8/209, *attB*) から 98.9% (463/468, *galK*) まで様々で

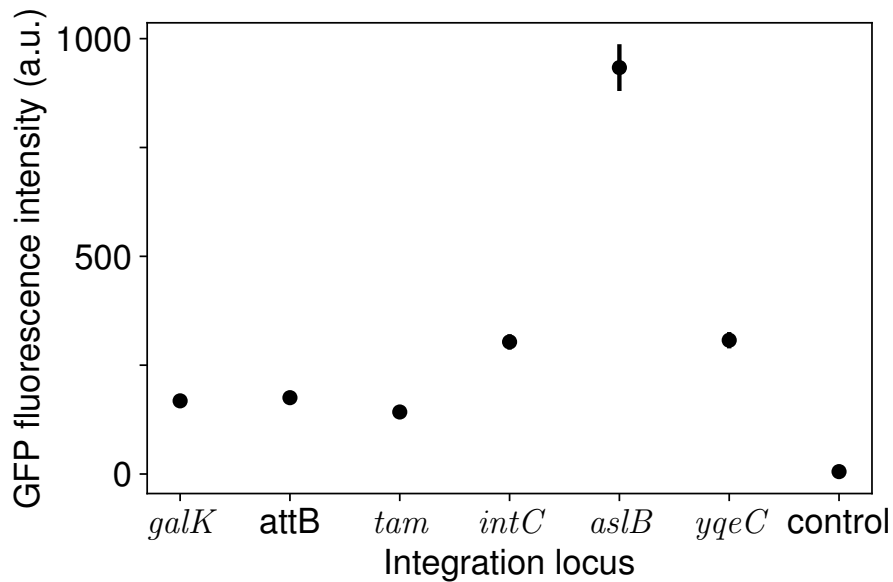


Fig. 36: *tetA-gfp* 遺伝子を導入した細胞の蛍光輝度値. M9 アガー上にまいた細胞の GFP 蛍光を撮影した。黒点は各細胞の平均の蛍光輝度値、エラーバーは 1.96 倍の標準誤差を表している。control は *tetA-gfp* 遺伝子を導入していない親株での蛍光輝度値を表す。

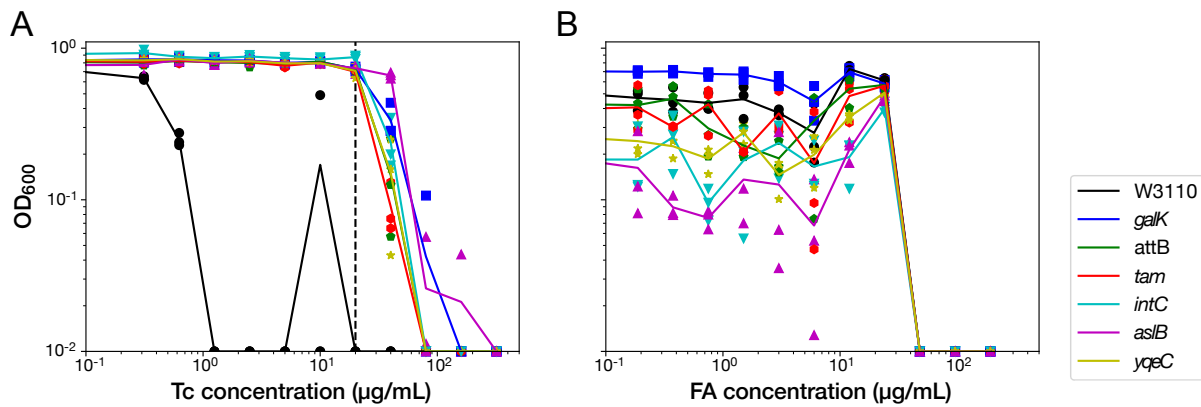


Fig. 37: *tetA-gfp* 遺伝子を導入した細胞の MIC test. 灰色の点は (A) 対応する Tc 濃度の LB 培地あるいは (B) 対応する FA 濃度の MOPS RDM 培地で 23 時間各細胞を培養した時の OD₆₀₀ の値である。OD₆₀₀ が 0.01 以下になる最小の薬剤濃度を各細胞の MIC として用いた。各色はそれぞれ組換え位置に対応する。ただし黒色は *tetA-gfp* 遺伝子を導入していない親株を表す。組換え中間体作製では 20 µg/mL の Tc 濃度を用いた (破線)。この計測は少なくとも三回行った。

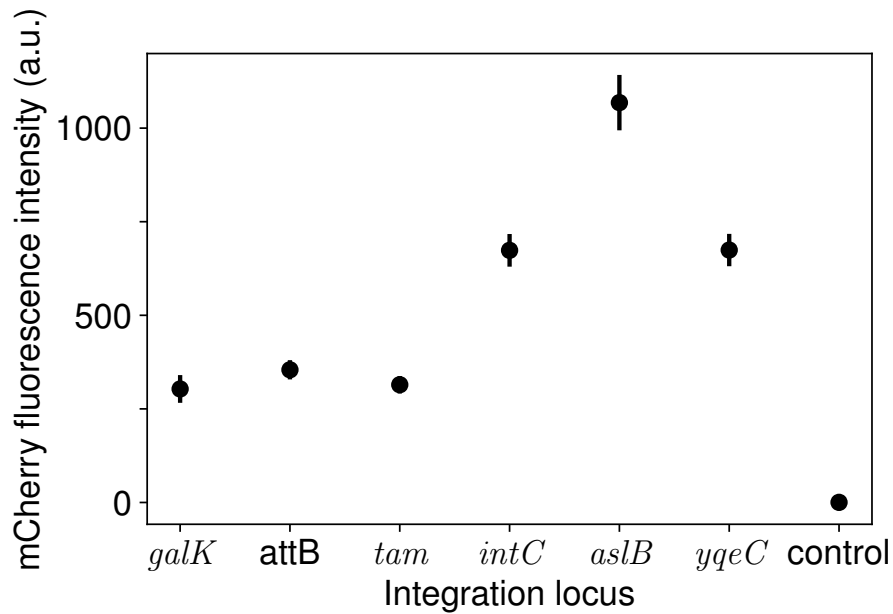


Fig. 38: *tetA-mcherry* 遺伝子を導入した細胞の蛍光輝度値. M9 アガー上にまいた細胞の mCherry 蛍光を撮影した。黒点は各細胞の平均の蛍光輝度値、エラーバーは 1.96 倍の標準誤差を表している。control は *tetA-gfp* 遺伝子を導入していない親株での蛍光輝度値を表す。

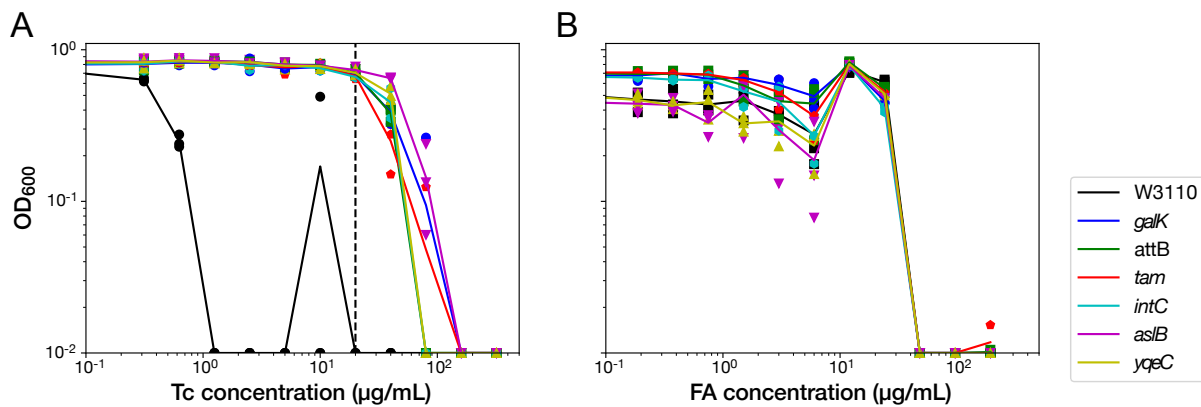


Fig. 39: *tetA-mcherry* 遺伝子を導入した細胞の MIC test. 灰色の点は (A) 対応する Tc 濃度の LB 培地あるいは (B) 対応する FA 濃度の MOPS RDM 培地で 23 時間各細胞を培養した時の OD₆₀₀ の値である。各色はそれぞれ組換え位置に対応する。ただし黒色は *tetA-gfp* 遺伝子を導入していない親株を表す。OD₆₀₀ が 0.01 以下になる最小の薬剤濃度を各細胞の MIC として用いた。中間体作製では 20 µg/mL の Tc 濃度を組換え用いた (破線)。この計測は少なくとも三回行った。

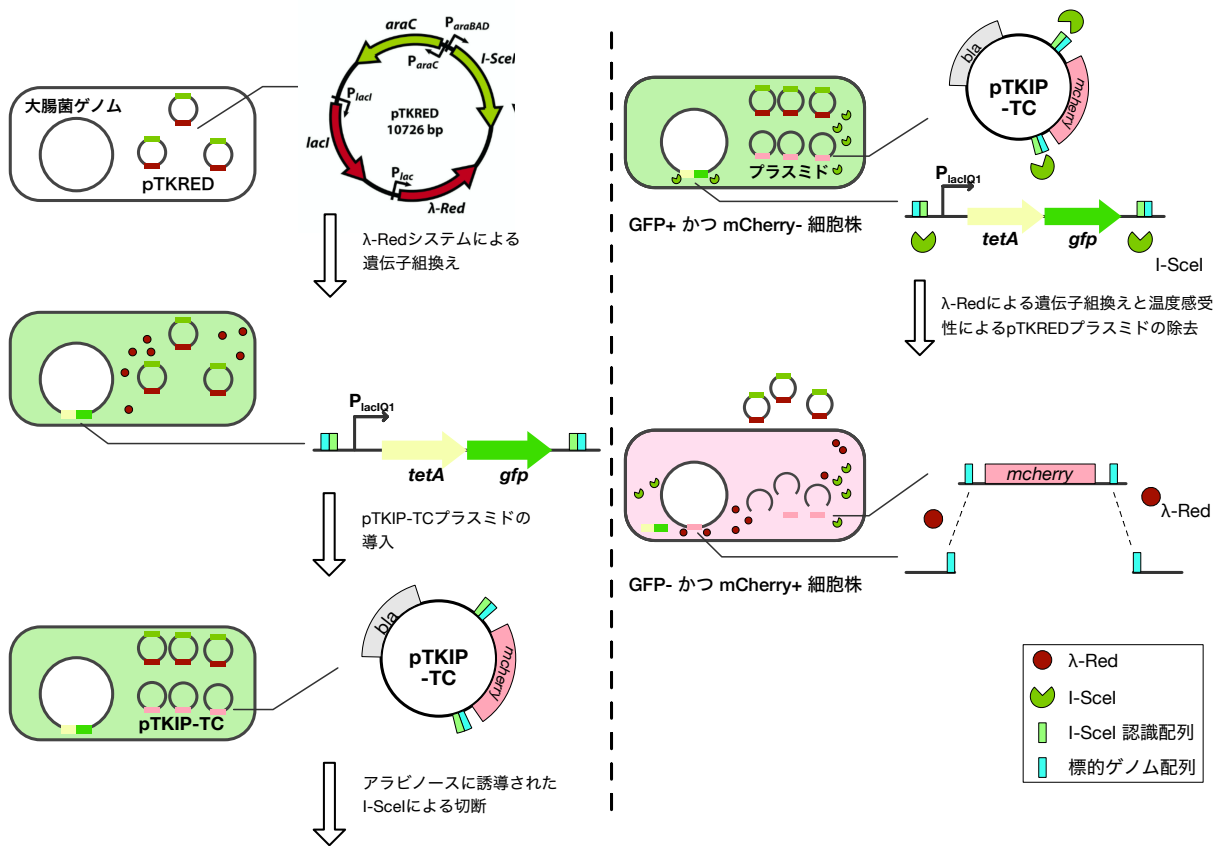


Fig. 40: スカーレスな遺伝子導入方法. 今回の遺伝子組換え法の概略図. この図では *tetA-gfp* 遺伝子を持った中間体を作成したのち、この遺伝子と入れ替わりに *mcherry* 遺伝子を導入している. 左側に示されている細胞の背景色は予想される蛍光の色である. I-SceI メガ制限酵素および λ -Red を発現する pTKRED プラスミドおよび組換え遺伝子を持つ pTKIP-TC プラスミドを有している.

あり、染色体上の位置などの傾向は見られなかった。

遺伝子組換えをした細胞が中間体の GFP 蛍光を用いて効率良く抽出できているかを確認するため、得られたコロニーに対して GFP の蛍光を確認した。導入に失敗した細胞では *gfp* 遺伝子および *tetA* 遺伝子が残存しているため、コロニーは GFP の蛍光が観察される一方で、導入に成功した細胞では GFP の蛍光は観察されなはずである。そのため GFP の蛍光の結果から (mCherry 蛍光を発するコロニー数)/(GFP 蛍光を発しないコロニー数) を求めた (Table. 6 Correct after GFP check %)。この頻度は GFP 蛍光の情報を用いて GFP のないコロニーを選択した際に目的のコロニーが得られる確率である。Table 6 によると全ての組換え部位において遺伝子組換えに成功した細胞を選べる確率が向上し、特に *attB* ではランダムに選択した場合には 3.8% (8/209) しか目的のコロニーを選択できないのに対し、GFP の情報を用いると 88.9% (8/9) に向上した。しかしながら *galK*、*aslB* 部位を除いて、100%の精度ではなく、一部の細胞では mCherry 蛍光も、GFP 蛍光も観察されない細胞が現れた。この細胞の出現頻度も部位によって様々で、特に *intC* 部位においては GFP 蛍光を発しない細胞のうち 22.0% (54/245) でこのような細胞が見られた。これらの細胞では部位依存的な意図しない遺伝子組

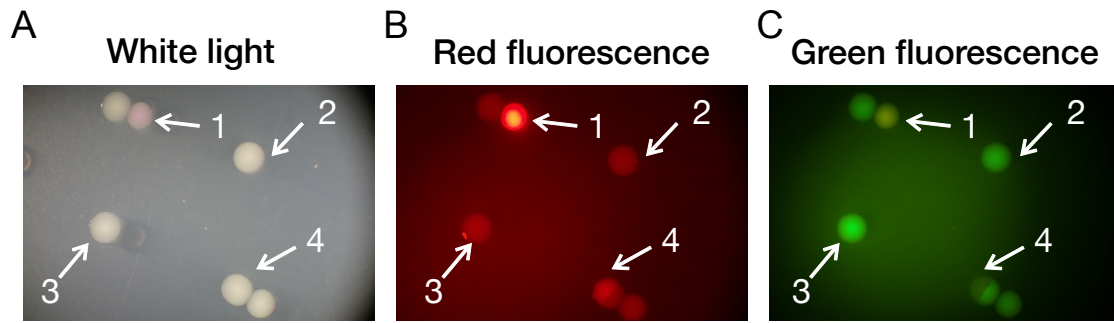


Fig. 41: スカーレスに *mcherry* 遺伝子を導入したコロニー画像。中間体の細胞には *tetA-gfp* 遺伝子が入っている。(A) 白色光画像。(B) mCherry 蛍光画像。(C) GFP 蛍光画像。GFP 蛍光の観察されなかった細胞では mCherry 蛍光が観察された (矢印 4)。また、白色光の画像の中に赤く見えるコロニーがあるがこれは高コピープラスミドである pTKIP-TC プラスミドを有している細胞である。1; pTKIP-TC プラスミドの残留したコロニー。2, 3; *mcherry* 遺伝子の導入に失敗して GFP 蛍光が残っているコロニー。4; GFP 蛍光が失われて mCherry の蛍光が観察されるコロニー。4 のコロニーの右半分は GFP+ のコロニーが混ざっている。

換えが起こっていると考えられる。このような意図しない遺伝子組換えは過去の I-SceI および λ -Red を用いた遺伝子組換えでも観察されていた [68, 178]。

次にこれらの蛍光を用いた遺伝子組換えの有無が正しいのかを確認するために一部のコロニーに対して、コロニー PCR およびサンガーシーケンス法を用いた配列の確認を行なった。GFP 蛍光を発するコロニー、発しないコロニーに対してコロニー PCR を行なったところ、全ての部位を合計して 97.2% のコロニーが GFP の蛍光から予想される PCR 産物が観察された (Table 7)。GFP 蛍光を発しないにもかかわらず、導入した遺伝子産物のバンドが見られなかった細胞は mCherry の蛍光が観察されなかった細胞と一致した。pTKIP プラスミドの一部を増幅するプライマーを用いて PCR を行なったところ、蛍光から識別したプラスミドの有無と完全に一致した。さらに I-SceI の制限酵素反応によって生じた *gfp* 断片が意図せず染色体上に組換えられていないことを確認するため遺伝子組換えに成功した細胞に対して PCR を行なったところ、全ての細胞で中間体が持っていた *gfp* 遺伝子断片が失われていた (0/30)。

スカーレスな遺伝子組換えが一塩基レベルで意図した遺伝子配列になっているかを確かめるため、各遺伝子部位について目的の遺伝子産物がコロニー PCR で確認されたコロニーを 5 コロニーずつ選択し、細胞を培養した。PCR によって培養した細胞の遺伝子組換え部位の配列を増幅し、配列をサンガーシーケンスで調べたところ、96.7% (29/30) の配列が意図したものだだった (Table 8)。残りの 1 つは *tam* 部位に点突然変異が入っていた。これらの結果から、GFP の蛍光を用いることでスカーレスに遺伝子組換えした細胞を精度高く選択できることが確認された。

これまでの実験はスカーレス遺伝子組換えの中間体として *gfp* 遺伝子を用いていたが、複数の遺伝子組換えを行った細胞では既に *gfp* 遺伝子が導入されていたり、*gfp* 遺伝子を最終産物として導入することもありう

Table 6: **GFP** 蛍光を利用した遺伝子組換え成否の判別。各遺伝子組換え部位において、プラスミドを持つコロニー、GFP 蛍光を発するコロニー、GFP 蛍光を発しないコロニーのうち mCherry 蛍光を発するコロニー、mCherry 蛍光を発しないコロニーの数を示している。Correct %は (mCherry 蛍光を発するコロニー数)/(総コロニー数) で算出したランダムにコロニーをピックアップしたときの mCherry 蛍光を発するコロニーの割合、Correct after GFP check %とは (mCherry 蛍光を発するコロニー数)/(GFP 蛍光を発しないコロニー数) から求めた GFP 蛍光を発しないコロニーのうちの mCherry 蛍光を発するコロニーの割合を表している。

Site	Plasmid+	GFP+	GFP-		Total	Correct%	Correct after GFP check%
			mCherry-	mCherry+			
<i>galK</i>	1	4	0	463	468	98.9	100.0
<i>attB</i>	22	178	1	8	209	3.8	88.9
<i>tam</i>	2	1	13	394	410	96.1	96.8
<i>intC</i>	11	158	54	191	414	46.1	78.0
<i>aslB</i>	66	0	0	547	613	89.2	100.0
<i>yqeC</i>	23	0	12	546	581	94.0	97.8

る。そのため、*gfp* 遺伝子以外の蛍光タンパク質遺伝子でも同様の操作ができることを確認するため、*gfp* 遺伝子の代わりに *mcherry* 遺伝子を *tetA* 遺伝子とともに導入してスカーレス遺伝子組換えを行った。今回は最終的に導入する遺伝子を *gfp* 遺伝子とした。pTKIP-TG プラスミド (Table S5) を用いて I-SceI および λ -Red を誘導しながら培養したところ全ての組換え部位でスカーレスに *gfp* 遺伝子が導入されている細胞が得られた。*mcherry* 遺伝子を導入した場合と同様に、遺伝子組換え効率の測定を行なった。GFP の導入頻度を求めるために得られたコロニーに対し GFP の蛍光を確認した。導入に成功した細胞は GFP の蛍光を発し、失敗した細胞では GFP の蛍光は観察されないはずである。そのため導入の頻度は (GFP 蛍光を発するコロニー数)/(総コロニー数) で算出した (Table. 9 Correct %)。この頻度は出現したコロニーをランダムに選択したときに目的のコロニーを取得できる確率を表している。Table 9 が示すように、遺伝子組換え効率は組換え部位によって様々であり、3.8% (7/189, *attB*) から 100% (470/470, *aslB*) まで様々であり、確率の高さは *mcherry* 遺伝子を導入する際と同じ傾向であった。

次にこちらについても蛍光を用いた遺伝子組換えの有無が正しいのかを確認するために一部のコロニーに対して、コロニー PCR およびサンガーシーケンス法を用いた配列の確認を行なった。mCherry 蛍光を発するコロニー、発しないコロニーに対してコロニー PCR を行なったところ、全ての部位を合計して 97.2% (140/144) のコロニーが mCherry の蛍光から予想される PCR 産物が観察された (Table 10)。また、mCherry 蛍光を発しないにもかかわらず、導入した遺伝子産物のバンドが見られなかった細胞は GFP の蛍光が観察されなかった細胞と一致した。さらにスカーレスな遺伝子組換えが一塩基レベルで意図した遺伝子配列になっているかを確かめるため、各遺伝子部位について目的の遺伝子産物がコロニー PCR で確認されたコロニーを 5 コロニーずつ選択し、細胞を培養した。PCR によって培養した細胞の遺伝子組換え部位の配列を増幅し、配列をサンガーシーケンスで調べたところ、90.0% (27/30) の配列が意図したものだ (Table 11)。残りの 3 つは点突然変

Table 7: **GFP** 蛍光の有無と **PCR** における増幅。各遺伝子組換え部位において、Table 6 で現れたコロニーのうち GFP+、GFP-のコロニーがそれぞれ *tetA-gfp* 遺伝子、*mcherry* 遺伝子の長さのバンドが観察されるかを確認した。オレンジ色の背景は蛍光の有無から予想される PCR の結果と一致する場所を示している。

<i>galK</i>	PCR band +	PCR band -	<i>intC</i>	PCR band +	PCR band -
GFP+	0	4	GFP+	0	12
GFP-	20	0	GFP-	10	2

<i>attB</i>	PCR band +	PCR band -	<i>aslB</i>	PCR band +	PCR band -
GFP+	0	16	GFP+	0	0
GFP-	7	1	GFP-	24	0

<i>tam</i>	PCR band +	PCR band -	<i>yqeC</i>	PCR band +	PCR band -
GFP+	0	1	GFP+	0	0
GFP-	22	1	GFP-	24	0

TOTAL	PCR band +	PCR band -
GFP+	0	33
GFP-	107	4

異が *tam* 部位に入っていた。これらの結果から、GFP の蛍光を用いることでスカーレスに遺伝子組換えした細胞を精度高く選択できることが確認された。

Table 8: スカーレスに導入した *mcherry* 遺伝子の配列確認. 各遺伝子組換え部位において、Table 6 で現れたコロニーのうちコロニー PCR で *mcherry* 遺伝子の長さのバンドが観察されたコロニーを 5 つずつサンガー法によって配列を確認した。

site	Sample	Correct
<i>galK</i>	5	5
<i>attB</i>	5	5
<i>tam</i>	5	4
<i>intC</i>	5	5
<i>aslB</i>	5	5
<i>yqeC</i>	5	5

Table 9: mCherry 蛍光を利用した遺伝子組換え成否の判別. 各遺伝子組換え部位において、プラスミドを持つコロニー、mCherry 蛍光を発するコロニー、mCherry 蛍光を発しないコロニーのうち GFP 蛍光を発するコロニー、GFP 蛍光を発しないコロニーの数を示している。Correct %は (GFP 蛍光を発するコロニー数)/(総コロニー数) で算出したランダムにコロニーをピックアップしたときの GFP 蛍光を発するコロニーの割合、Correct after mCherry check %とは (GFP 蛍光を発するコロニー数)/(mCherry 蛍光を発しないコロニー数) から求めた GFP 蛍光を発しないコロニーのうちの mCherry 蛍光を発するコロニーの割合を表している。

Site	Plasmid+	mCherry+	mCherry-		Total	Correct%	Correct after mCherry check%
			GFP-	GFP+			
<i>galK</i>	0	1	0	534	535	99.8	100.0
<i>attB</i>	0	182	0	7	189	3.7	100.0
<i>tam</i>	0	0	17	547	564	97.0	97.0
<i>intC</i>	0	76	91	216	383	56.4	70.4
<i>aslB</i>	0	0	0	470	470	100.0	100.0
<i>yqeC</i>	0	1	23	577	601	96.0	96.2

Table 10: mCherry 蛍光の有無と PCR における増幅. 各遺伝子組換え部位において、Table 9 で現れたコロニーのうち mCherry+, mCherry-のコロニーがそれぞれ *tetA-mcherry* 遺伝子、*gfp* 遺伝子の長さのバンドが観察されるかを確認した。オレンジ色の背景は蛍光の有無から予想される PCR の結果と一致する場所を示している。

<i>galK</i>	PCR band +	PCR band -
mCherry+	0	1
mCherry-	23	0

<i>intC</i>	PCR band +	PCR band -
mCherry+	0	12
mCherry-	10	2

<i>attB</i>	PCR band +	PCR band -
mCherry+	0	17
mCherry-	7	0

<i>aslB</i>	PCR band +	PCR band -
mCherry+	0	0
mCherry-	24	0

<i>tam</i>	PCR band +	PCR band -
mCherry+	0	0
mCherry-	24	0

<i>yqeC</i>	PCR band +	PCR band -
mCherry+	0	1
mCherry-	21	2

Total	PCR band +	PCR band -
mCherry+	0	31
mCherry-	109	4

Table 11: スカーレスに導入した *gfp* 遺伝子の配列確認. 各遺伝子組換え部位において、Table 9 で現れたコロニーのうちコロニー PCR で *gfp* 遺伝子の長さのバンドが観察されたコロニーを5つずつサンガー法によって配列を確認した。

site	Sample	Correct
<i>galK</i>	5	5
<i>attB</i>	5	5
<i>tam</i>	5	2
<i>intC</i>	5	5
<i>aslB</i>	5	5
<i>yqeC</i>	5	5

Table 12: GFP 蛍光を利用した遺伝子除去成否の判別. 各遺伝子組換え部位において、GFP 蛍光を発するコロニー、GFP 蛍光を発しないコロニーの数を示している。Correct %は (GFP 蛍光を発しないコロニー数)/(総コロニー数) で算出したランダムにコロニーをピックアップしたときの GFP 蛍光を発するコロニーの割合を表している。

Site	GFP+	GFP-	Total	Correct%
<i>galK</i>	3	387	390	99.2
<i>attB</i>	107	6	113	5.3
<i>tam</i>	31	320	351	91.2
<i>intC</i>	132	90	222	40.5
<i>aslB</i>	39	287	326	88.0
<i>yqeC</i>	0	284	284	100.0

3.4.3 遺伝子の除去

さらにこの蛍光を利用した遺伝子組換えの検出法を利用して、遺伝子の除去を行なった (Fig. 42)。蛍光遺伝子の導入において、pTKIP プラスミドが残存しているコロニーが確認されたため (Table 6)、pTKIP プラスミドが除去されていることを担保するため、pTKIP プラスミドの I-SceI 認識配列の外に *gfp* 遺伝子を恒常発現する pYK071 プラスミドを構築した (Fig. 42)。この pYK071 プラスミド内の 2 つの I-SceI 認識配列の間に遺伝子除去をした際に残したい配列の両端 25bp ずつを挿入したプラスミド pTKIP-del (pYK72-pYK077、Table S5) を 6 か所の遺伝子部位それぞれに対して構築した。

このプラスミドを *tetA* および *gfp* 遺伝子を染色体に導入した細胞に対して導入した。遺伝子の挿入の際と同様に、I-SceI および λ -Red を誘導しながら培養したところ全ての組換え部位でスカーレスにそれぞれの遺伝子が除去された細胞が得られた (Table 12)。今回の場合、プラスミドにも染色体にも *gfp* 遺伝子が含まれており、遺伝子の除去に成功して pTKIP-del プラスミドを失った細胞でのみ GFP 蛍光が観察されないはずである。そのため GFP の蛍光を失っている細胞の割合を調べた。遺伝子部位ごとに割合は異なり、5.3% (6/113、*attB*) から 100% (284/284、*aslB*) まで様々で遺伝子挿入の時と割合は似ていた (Table 12)。

蛍光から得られた遺伝子組換えの成否が予測通りであるかを確かめるためにコロニー PCR を行なった。コロニー PCR と GFP 蛍光による予測は 86.1% (124/144) で一致していたが、*intC*、*tam*、*yqeC* では GFP を失っているにもかかわらず意図した PCR バンドが増幅しない細胞が現れた (Table 13)。さらにスカーレスな遺伝子組換えが一塩基レベルで意図した遺伝子配列になっているかを確かめるため、各遺伝子部位について目的の遺伝子産物がコロニー PCR で確認されたコロニーを 5 コロニーずつ選択し、細胞を培養した。PCR によって培養した細胞の遺伝子組換え部位の配列を増幅し、配列をサンガーシーケンスで調べたところ、93.3% (28/30) の配列が意図したものだ (Table 14)。残りの 2 つは点突然変異が *tam* 部位に入っていた。これらの結果から、GFP の蛍光を用いることで場所によって精度に違いはあるもののスカーレスに遺伝子除去した細胞を精度高く選択できることが確認された。

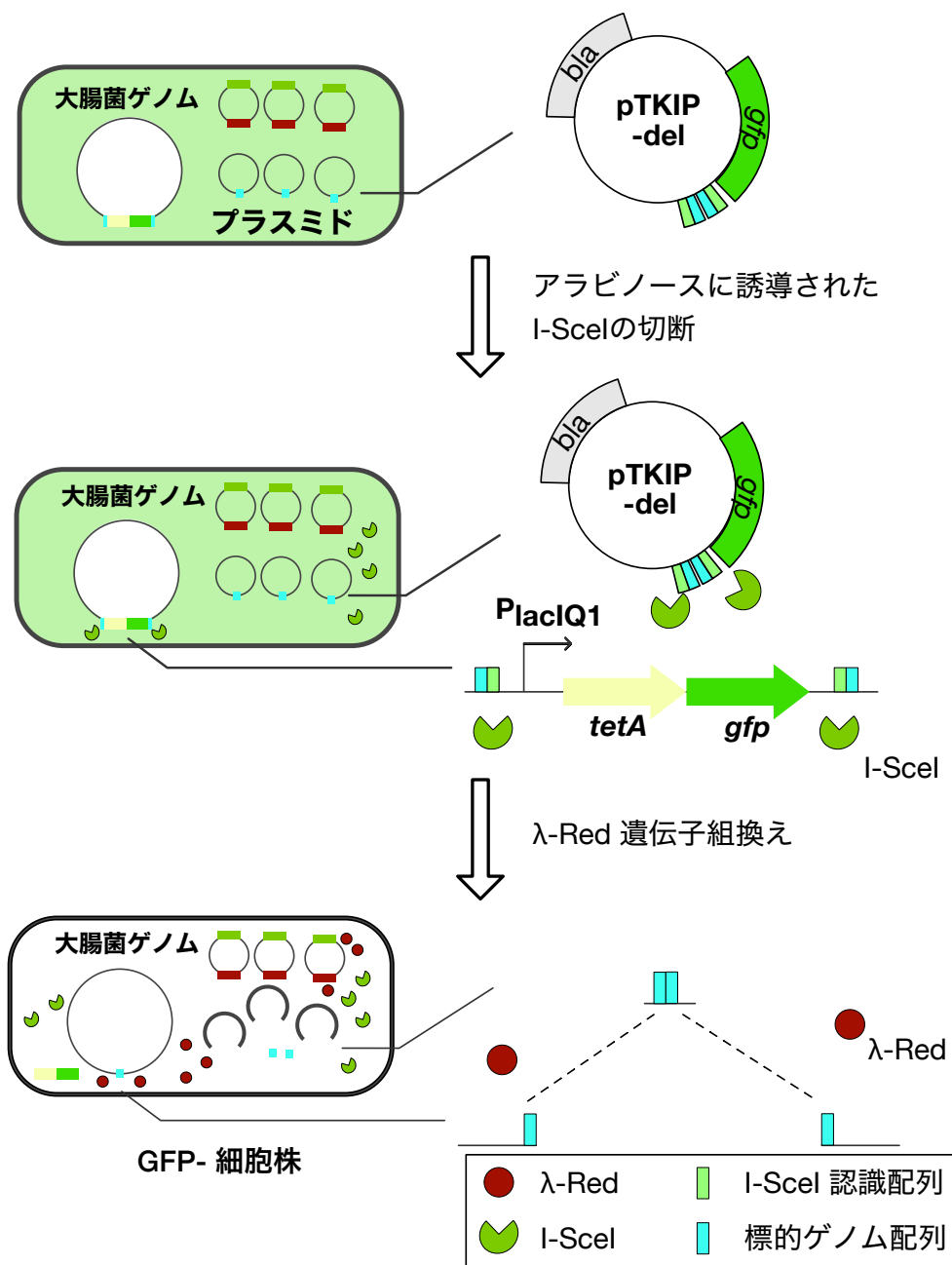


Fig. 42: スカーレスな遺伝子除去の概略図。Fig. 40 で用いた *tetA-gfp* 遺伝子を持った中間体を用いた。残った染色体の両端の配列 A、B を持つ pTKIP-del プラスミドを利用し、この部分を I-SceI で切断する。切断された DNA 断片が λ-Red によって組換えられることでスカーレスに遺伝子除去を行う。

Table 13: **GFP** 蛍光の有無と **PCR** における増幅. 各遺伝子組換え部位において、Table 12 で現れたコロニーのうち GFP+、GFP-のコロニーがそれぞれ *tetA-gfp* 遺伝子、遺伝子が除去された場合の長さのバンドが観察されるかを確認した。オレンジ色の背景は蛍光の有無から予想される PCR の結果と一致する場所を示している。

<i>galK</i>	del - and/or plasmid +	del + and plasmid -	<i>intC</i>	del - and/or plasmid +	del + and plasmid -
GFP+	3	0	GFP+	11	1
GFP-	0	21	GFP-	4	8

attB	del - and/or plasmid +	del + and plasmid -	<i>aslB</i>	del - and/or plasmid +	del + and plasmid -
GFP+	19	0	GFP+	9	0
GFP-	0	5	GFP-	0	15

<i>tam</i>	del - and/or plasmid +	del + and plasmid -	<i>yqeC</i>	del - and/or plasmid +	del + and plasmid -
GFP+	8	0	GFP+	0	0
GFP-	8	8	GFP-	7	17

Total	del - and/or plasmid +	del + and plasmid -
GFP+	50	1
GFP-	19	74

Table 14: スカーレスに遺伝子除去した配列の確認. 各遺伝子組換え部位において、Table 12 で現れたコロニーのうちコロニー PCR で遺伝子が除去された後の配列の長さのバンドが観察されたコロニーを5つずつサンガー法によって配列を確認した。

site	Sample	Correct
<i>galK</i>	5	5
attB	5	5
<i>tam</i>	5	3
<i>intC</i>	5	5
<i>aslB</i>	5	5
<i>yqeC</i>	5	5

3.4.4 遺伝子組換え部位に依存した組換え

前節までにおいて、蛍光を用いて6か所の遺伝子組換え部位においてスカーレスな遺伝子組換えあるいは遺伝子の除去に成功した細胞を高効率で取得することに成功した。組換え効率や蛍光を発しないコロニーの出現頻度は導入する遺伝子部位によって大きく異なっていた (Table 6、9、12)。一方で一つの組換え部位における蛍光を発しないコロニーの出現頻度パターンは *gfp* 遺伝子や *mcherry* 遺伝子を導入する場合も遺伝子を除去する場合も似た傾向であった (Table 6、9、12)。そのため、この I-SceI および λ -Red を用いた遺伝子組換えの成功確率は組換え部位に依存しているのではないかと考えた。

そこで、各遺伝子組換え部位に *tetA-gfp* 遺伝子、または *tetA-mcherry* 遺伝子を持つ中間体の細胞の性質とその後の遺伝子組換え効率の関連を調べた。まず、*tetA-gfp* 遺伝子、または *tetA-mcherry* 遺伝子を持つ細胞を IPTG (λ -Red の誘導)、アラビノース (I-SceI の誘導) の有無の条件を変化させて培養した。培養した細胞の成長が見られ始める lag time を各条件で取ったところ、I-SceI の誘導をしない場合では *tetA-gfp* 遺伝子、または *tetA-mcherry* 遺伝子を持つ細胞と野生型 W3110 の間に差がなかった (Fig. 43A、B、44A、B)。一方で、I-SceI を誘導すると *tetA* 遺伝子を導入した細胞の方が有意に lag time が大きくなった (Fig. 43C、D、44C、D)。それぞれの遺伝子組換え部位の lag time については I-SceI を誘導しない場合、 λ -Red の誘導によって差は見られなかったが、I-SceI の誘導をした場合、 λ -Red の誘導によって lag time が短くなった (Fig. 43C、D、44C、D)。各遺伝子組換え部位における lag time の長さは *tetA-gfp* 遺伝子の場合と *tetA-mcherry* 遺伝子の場合で似通っており、*attB* や *intC* で小さく、*aslB*、*tam* で大きかった (Fig. 43、44)。

次に、pTKIP プラスミドを持たせずに IPTG とアラビノースを添加して *tetA-gfp* 遺伝子を持つ細胞を培養した際に、GFP 蛍光を発する細胞が現れるのか GFP 蛍光を発しない細胞が出現するのかを調べた。pTKIP プラスミドを導入した細胞にスカーレスな遺伝子組換えを行う方法と同様の方法でそれぞれの細胞を培養し、LB プレートにまいた。出てきたコロニーを計数したところ、これまでの結果と同様に *attB*、*intC* では多くの GFP 蛍光を発するコロニーが現れた (*attB*: 99.6%、*intC*: 86.3%; Table 15)。これらの GFP を持つコロニーの多い細胞では I-SceI 誘導下の lag time が小さかった。これらの結果は *attB* や *intC* のような部位では I-SceI の切断効率が悪いので *tetA-gfp* を持つ細胞も育つことができるために lag time が短くなるということを示唆している。

一方でどの遺伝子部位においても pTKIP プラスミドを持たせていないにもかかわらず、GFP 蛍光を発しないコロニーが現れた。このようなコロニーが中間体の蛍光を発しないにもかかわらず、目的の遺伝子が得られない細胞に対応していると考えられる。これまでの結果 (Table 7、10、13) から、このようなコロニーは pTKIP プラスミドがある場合は多くは出現しなかった (コロニー PCR を行った GFP-コロニーのうちそれぞれ 4/111、4/113、19/93)。この結果は pTKIP を介した組換え細胞の方が早く出現した、あるいは多く出現したためではないかと考えられる。

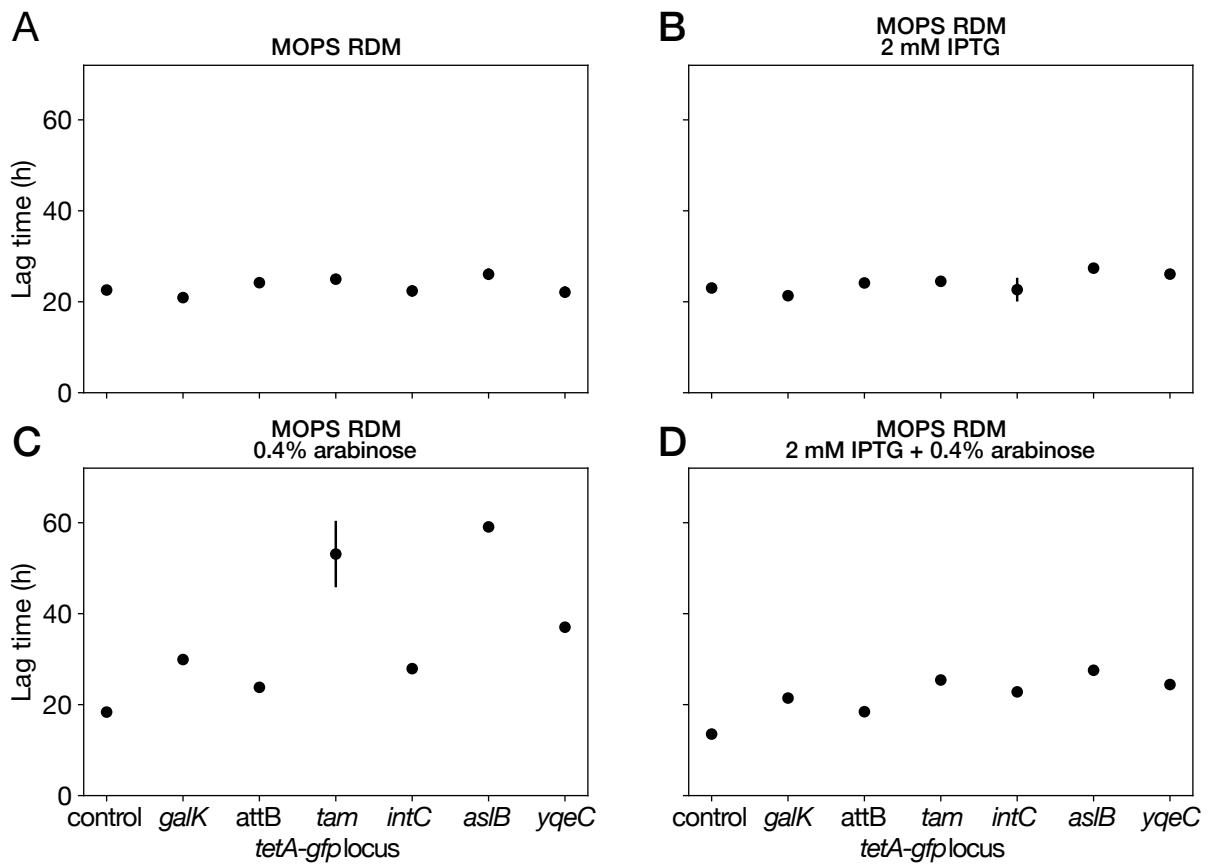


Fig. 43: *tetA-gfp* 遺伝子を持つ細胞の lag time. スカールズ遺伝子組換えを行う細胞の中間体である *tetA-gfp* 遺伝子を持つ細胞を (A) MOPS RDM (0.5% グリセロール) (B) MOPS RDM (0.5% グリセロール + 2 mM IPTG) (C) MOPS RDM (0.5% グリセロール + 0.4% アラビノース) (D) MOPS RDM (0.5% グリセロール + 0.4% アラビノース + 2 mM IPTG) で培養した時の平均の lag time。lag time は 96 穴プレートリーダーを用いて測定した OD₆₀₀ が 0.2 を超えた時間を用いた。エラーバーは 1.96 倍の標準誤差を表す。

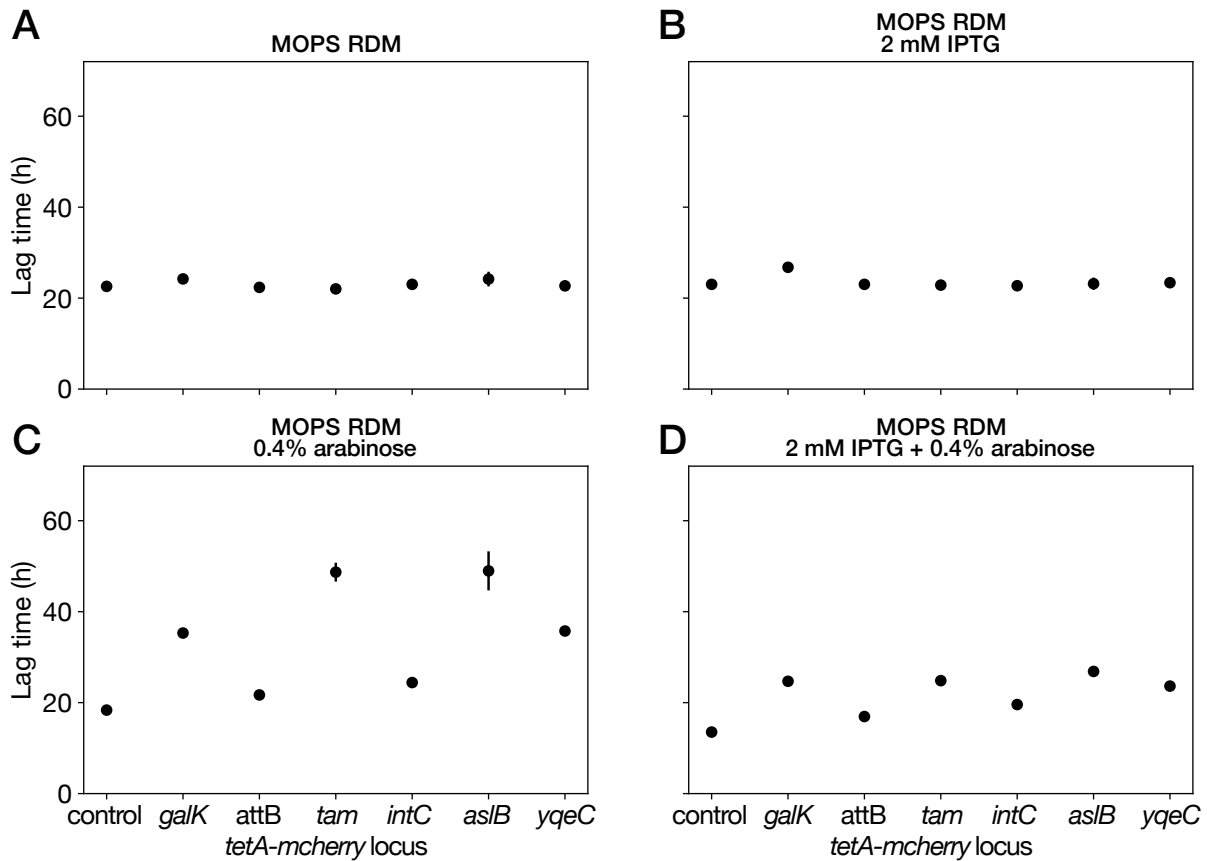


Fig. 44: *tetA-mcherry* 遺伝子を持つ細胞の lag time. スカールズ遺伝子組換えを行う細胞の中間体である *tetA-mcherry* 遺伝子を持つ細胞を (A) MOPS RDM (0.5% グリセロール) (B) MOPS RDM (0.5% グリセロール + 2 mM IPTG) (C) MOPS RDM (0.5% グリセロール + 0.4% アラビノース) (D) MOPS RDM (0.5% グリセロール + 0.4% アラビノース + 2 mM IPTG) で培養した時の平均の lag time。lag time は 96 穴プレートリーダーを用いて測定した OD₆₀₀ が 0.2 を超えた時間を用いた。エラーバーは 1.96 倍の標準誤差を表す。

Table 15: pTKIP プラスミドのない細胞での I-SceI の誘導. 各遺伝子組換え部位において、GFP 蛍光を発するコロニー、GFP 蛍光を発しないコロニーの数を示している。fraction of GFP + colony (%) は (GFP 蛍光を発するコロニー数)/(総コロニー数) で算出した。

Site	GFP +	GFP-	Total	fraction of GFP + colony (%)
<i>galK</i>	172	935	1107	15.5
<i>attB</i>	256	1	257	99.6
<i>tam</i>	26	1031	1057	2.5
<i>intC</i>	220	35	255	86.3
<i>aslB</i>	181	941	1122	16.1
<i>yqeC</i>	19	843	862	2.2

3.4.5 大型遺伝子の導入

さらに挿入遺伝子の長さで遺伝子組換え割合の関係を調べた。先行研究ではおよそ 7 kbp までの遺伝子の挿入に成功している [68, 178]。今回の研究では *lacZ* 遺伝子、*lacZYA* 遺伝子、*lac operon*(*lacI-lacZYA*) 遺伝子の導入を行った。これらの遺伝子の長さはそれぞれ 3.3 kbp、5.4 kbp、6.5 kbp である。これまでの研究で組換え効率が異なることがわかっている *intC*、*attB*、*galK* の 3 部位に対してこれらの遺伝子を挿入することを目指した。

それぞれの挿入部位における pTKIP-del プラスミドをバックボーンにして大腸菌 W3110 ゲノム由来の *lacZ* 遺伝子、*lacZYA* 遺伝子、*lac operon* 遺伝子を 25 bp ごとの相同配列の間に導入した pKTIP-*lacZ* (pYK081、pYK082、pYK085)、pKTIP-*lacZYA* (pYK083、pYK086、pYK088)、pKTIP-*lac operon* (pYK084、pYK087、pYK089) プラスミドを構築した。このプラスミドを用いて I-SceI および λ -Red を誘導しながら培養した。それぞれの遺伝子組換えについて蛍光を用いて GFP を発するコロニー、GFP 蛍光を発しないコロニーを計数した。これまでの場合と同様に *lacZ* 遺伝子、*lacZYA* 遺伝子、*lac operon* 遺伝子のいずれの場合も *attB* への導入において GFP 蛍光を発したコロニーの割合がもっとも多かった (*lacZ*: 98.8%、*lacZYA*: 98.2%、*lac operon*: 55.3%、Table 16)。

また、これらの GFP 蛍光を失った細胞について実際に意図した遺伝子組換えが行われているかを確認するためにコロニー PCR を行った。*intC*、*attB*、*galK* の全ての部位について、*lacZ* 遺伝子、*lacZYA* 遺伝子、*lac operon* 遺伝子の導入に成功した (Table 17)。*lacZ* 遺伝子の導入では *intC*、*galK* への導入はほぼ全てのコロニーで遺伝子の導入に成功した (*intC*: 49/51、*galK*: 47/48、Table 17)。一方で *attB* では GFP 蛍光を失った 10 コロニーのうち 2 つしか目的の遺伝子を持つコロニーが得られなかった。*lacZYA* 遺伝子の導入ではどの部位でも遺伝子組換えの成功率が低く、GFP 蛍光を発しないコロニーのうち、*galK* 部位でも半分程度 (26/48)、*intC* 部位や、*attB* 部位ではほとんどのコロニーが組換えに失敗していた (*intC*: 4/34、*attB*: 2/13、Table 17)。興味深いことに、*lacZYA* 遺伝子よりも長い *lac operon* 遺伝子ではどの組換え部位であっても *lacZYA* 遺伝子より組換え効率が高かった (*intC*: 34/43、*attB*: 34/41、*galK*: 41/48、Table 17)。この結果は遺伝子組換え効率が必ずしも導入遺伝子長が長くなるほど悪くなるわけではないことを示している (Fig. 45)。また、これらの細胞のうちのいくつかを培養した。PCR によって培養した細胞の遺伝子組換え部位の配列を増幅し配列をサンガー法で調べたところ、全ての塩基配列が意図したものだだった。

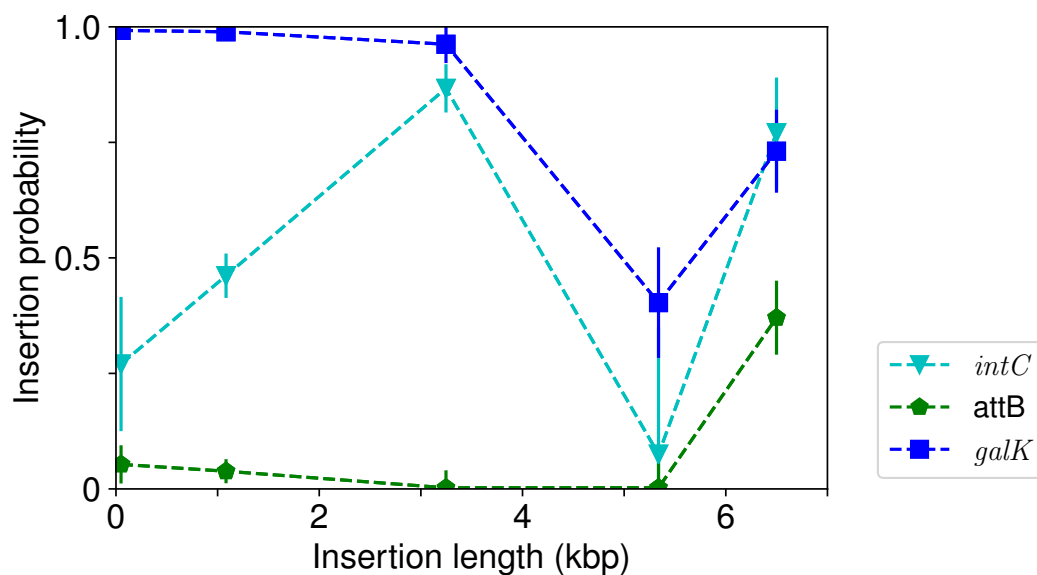


Fig. 45: 遺伝子組換え長と組換え効率の関係. *tetA-gfp* 遺伝子を持たせた中間体の細胞に対して pTKIP プラスミドを用いて遺伝子組換えをした場合の *intC*、*attB*、*galK* 部位の組換え効率。組換え効率は GFP-コロニーの割合と GFP-のコロニーの中で目的遺伝子長の PCR バンドが得られた割合の積で求めた。ただし、*mcherry* 遺伝子を導入した場合は mCherry 蛍光を発するコロニーの割合を用いた。エラーバーは 1.96 倍の標準誤差を表す。

Table 16: GFP 蛍光を利用した遺伝子除去成否の判別. 各遺伝子組換え部位において、*lacZ* 遺伝子、*lacZYA* 遺伝子、*lac operon* 遺伝子について GFP 蛍光を発するコロニー、GFP 蛍光を発しないコロニーの数を示している。Correct %は (GFP 蛍光を発しないコロニー数)/(総コロニー数) で算出したランダムにコロニーをピックアップしたときの GFP 蛍光を発するコロニーの割合を表している。

lacZ

Site	GFP+	GFP-	Total	Correct%
<i>intC</i>	86	794	880	90.2
<i>attB</i>	807	10	817	1.2
<i>galK</i>	14	799	813	98.3

lacZYA

Site	GFP+	GFP-	Total	Correct%
<i>intC</i>	328	581	909	63.9
<i>attB</i>	805	15	820	1.8
<i>galK</i>	192	559	751	74.4

lac operon

Site	GFP+	GFP-	Total	Correct%
<i>intC</i>	21	820	841	97.5
<i>attB</i>	203	164	367	44.7
<i>galK</i>	123	729	852	85.6

Table 17: **GFP** 蛍光の有無と **PCR** における増幅. 各遺伝子組換え部位において、Table 12 で現れたコロニーのうち GFP+、GFP-のコロニーがそれぞれ *tetA-gfp* 遺伝子、遺伝子が除去された場合の長さのバンドが観察されるかを確認した。オレンジ色の背景は蛍光の有無から予想される PCR の結果と一致する場所を示している。

<i>lacZ</i>			<i>lacZYA</i>		
<i>intC</i>	<i>lacZ</i> -	<i>lacZ</i> +	<i>intC</i>	<i>lacZYA</i> -	<i>lacZYA</i> +
GFP+	10	0	GFP+	10	0
GFP-	2	49	GFP-	30	4

<i>attB</i>	<i>lacZ</i> -	<i>lacZ</i> +	<i>attB</i>	<i>lacZYA</i> -	<i>lacZYA</i> +
GFP+	18	0	GFP+	11	0
GFP-	8	2	GFP-	13	2

<i>galK</i>	<i>lacZ</i> -	<i>lacZ</i> +	<i>galK</i>	<i>lacZYA</i> -	<i>lacZYA</i> +
GFP+	8	0	GFP+	8	0
GFP-	1	47	GFP-	22	26

lac operon

<i>intC</i>	<i>lac operon</i> -	<i>lac operon</i> +
GFP+	8	0
GFP-	9	34

<i>attB</i>	<i>lac operon</i> -	<i>lac operon</i> +
GFP+	11	0
GFP-	7	34

<i>galK</i>	<i>lac operon</i> -	<i>lac operon</i> +
GFP+	8	0
GFP-	7	41

3.5 考察

本研究では細胞に蛍光タンパク質をもたせることで、コロニーの蛍光を測定し、スカーレスに遺伝子組換えを行う方法を開発した。この方法は特に元々遺伝子組換え効率の悪い染色体部位において、蛍光の情報を用いなかった場合に比べて組換え細胞の取得効率を大幅に改善した。例えば *mcherry* 遺伝子の導入においては *intC* 部位では 46.1%から 78.0%、*attB* においては 3.8%から 88.9%に向上した (Table 6)。3.8%から 88.9%への向上は、組換えに成功したコロニーを得るために平均的に 26 個以上のコロニーを調べていたところから、1-2 個のコロニーだけを調べれば良いということであり、時間や試薬の使用量の削減にもつながる。

このようなコロニーの色を用いた遺伝子組換えの判別はプラスミドにおける青白選択がよく知られている [186, 187]。青白選択では *lacZ* 遺伝子の産物が X-gal を分解することでコロニーが青くなることを利用している [186]。そのため、完全な *lacZ* 遺伝子がゲノム上に存在する場合、用いることができないという制約がある。一方で遺伝子組換えにおいて本手法は特定の遺伝子を欠失させるなどの制約は持たないため、I-SceI、 λ -Red を用いることのできる細胞で適応可能である。遺伝子組換えを行いたい細胞に既に蛍光タンパク質遺伝子が存在する場合には異なる蛍光タンパク質によって代替可能である (例えば *gfp* 遺伝子があるあるいは組換える場合は *tetA-mcherry* 遺伝子を用いることができた; Table 9-11)。このような制約の少なさはこの方法の有用性の一つである。

遺伝子組換え部位の中で配列を確認したところ *tam* 遺伝子部位に高頻度で点突然変異が見られた。この原因を調べるために、点突然変異周りの配列を調べた。すると、pTKIP の I-SceI 認識配列の末端と *tam* 遺伝子の末端の間に 6 bp のうち 5 bp が一致していた (Fig. 46)。全ての点突然変異において、この *tam* 遺伝子の末端の一致していなかった 1 塩基が I-SceI 認識配列の塩基配列に変異していた。そのため、突然変異の多さは一般的なものではなく、*tam* 遺伝子部位や同様の似た配列を持つ部位に対して遺伝子を導入、除去する場合に発生すると考えられる。これに対しては pTKIP プラスミドの相同配列を長くすることなどで対処することができると考えられる。

遺伝子導入の際にどれだけ効率よく GFP-のコロニーが出るかはこの手法において重要な問題の一つである。これまでの遺伝子挿入、除去の結果は染色体上の位置に依存して GFP+のコロニーの出現率が決まっていることを示唆している (Table 6、9、12 および 16)。pTKIP を導入していない *tetA-gfp* 遺伝子を持った細胞に対し、I-SceI と λ -Red を誘導して得られたコロニーに関してもこの傾向が確認された (Table 15)。さらに、多く *tetA-gfp* 遺伝子、あるいは *tetA-mcherry* 遺伝子が残る *attB* や *intC* 部位では I-SceI 誘導下で lag time が短かった (Fig. 43、44)。これらの結果は I-SceI による切断のされやすさが、遺伝子組換え部位によって異なることを示唆している。

一方で 6 か所しか調べていないものの、この GFP+のコロニーの残存確率は *oriC* からの距離といった、大域的なゲノムの位置には依存していないようである。例えば *galK* と *intC* は *oriC* から見て対称な位置に存在する (Fig. 35)[44]。しかしながら *galK* では GFP コロニーはほとんど観察されないのに対し、*intC* では 20-60% のコロニーが GFP 蛍光を発していた (Table 6、9、12)。また、近い距離にある *galK* (61°) と *attB* (63°) について比較すると *galK* では GFP コロニーはほとんど観察されないのに対し、*attB* では GFP 蛍光を発するコロニーが 90%を超えて現れた (Table 6、9、12)。これらの結果は大域的なゲノム上の位置には依存していないこ

とを示唆している。また、同様に *tetA-gfp* 遺伝子や *tetA-mcherry* 遺伝子を持っている細胞の発現量とも相関していない (Fig. 36、38)。

従来の K. Datsenko と B. Wanner の方法では PCR 産物を細胞内に導入し、 λ -Red を用いて組換えていた [31]。この方法では 2 kbp を超える DNA 配列を導入する際に組換え効率が低下するという制約があった [178]。近年では λ -Red を二回繰り返すことで *tetA* 遺伝子の対抗選択に加えて、*sacB* 遺伝子のスクロースに対する対抗選択を用いてスカーレスに遺伝子組換えする方法が開発されている [193]。しかしこの方法でも λ -Red を用いて電気穿孔法で PCR 産物を細胞内に入れているので、K. Datsenko と B. Wanner の方法と同様に組換え配列の長さに制約が出てしまう。そのため、T. Kuhlman らによって、I-SceI メガ制限酵素を用いて細胞内でプラスミドを切断することで組換える方法が開発された [68, 178, 180]。この方法では 7 kbp 程度の長い DNA 配列でも導入することができる。H. Tas らが開発した手法ではスカーレスに遺伝子導入することに成功しているが、本研究の attB 部位への遺伝子組換えのように、遺伝子組換え部位によっては組換え効率が悪い場所が存在する。H. Tas らは対抗選択を用いて効率を高めていたが、必ずしも対抗選択がうまくいくわけではない。その上、対抗選択の中には遺伝子除去を必要とする場合もある [194, 195]。本研究では最終的に除去される *tetA* 遺伝子に蛍光タンパク質遺伝子を導入することで、例え組換え効率の悪い遺伝子組換え部位であっても、効率よく組換えに成功した細胞を得られることを示した。さらに本研究の手法においても T. Kuhlman らの研究や H. Tas らの研究と同様に長い DNA 配列でも一度に導入することに成功した (Table 16、17)。この研究によって、これまでより自由に遺伝子組換えを行うことができるようになるだろう。

また、Keio コレクション [34] をはじめとして、多くの研究で用いられている K. Datsenko と B. Wanner の方法では数十 bp のスカーが残っていた [31]。このスカーが細胞の表現型、周囲の遺伝子の発現やゲノムの局所的な構造に与える影響はほとんどの研究で無視されてきた。簡便なスカーレス遺伝子組換え方法の発展はこれまで無視されてきたスカーの影響を調べる契機となりうる。また、スカーレスな遺伝子組換えは進化の過程の再現に相性が良い。進化実験などで獲得した変異を持つ細胞に対して、得られた変異が本当に目的の表現型に影響を与えているかを調べるために、その変異を元の細胞にスカーレスに導入することで遺伝子変異の影響を正確に見積もることが可能となる。

一方で I-SceI を用いた遺伝子組換えでは意図しない組換え細胞が現れることが知られている [178]。このような細胞は本手法を用いても *intC* 部位を中心に現れた (Table 6、9 の GFP-かつ mCherry-のコロニー)。さらに、pTKIP プラスミドを持たない *tetA-gfp* 遺伝子を持つ細胞を I-SceI と λ -Red の誘導下で培養すると GFP 蛍光が観察されない細胞が観察された (Table 15)。そのため、この蛍光を発しないにもかかわらず遺伝子組換えに失敗した細胞は pTKIP プラスミドなしに I-SceI による切断から修復できた細胞だと考えられる。また、 λ -Red の有無で I-SceI 誘導下の lag time が異なることから (Fig. 43、44)、この修復には λ -Red が関与していると推測される。DNA の二本鎖切断に対して、 λ -Red を介して修復できることはプラスミドで実際に確かめられている [196]。このような修復がゲノム上で起きることで意図しない遺伝子組換え細胞を生み出していると考えられる。

このような意図しない細胞の出現は I-SceI を用いた組換えの効率を下げる。この細胞は蛍光による選択では取り除くことができない。そのため、どれだけ多くのコロニーが意図した遺伝子変異を持つかはそれぞれの遺

伝子組換えの効率とそれぞれの組換えを持った細胞の増殖速度に依存する。本研究の結果から、意図しない遺伝子組換えの頻度は場所ごとの依存性が大きい。例えば *intC* 部位ではどの組換えにおいても数十%のコロニーで意図しない遺伝子組換えが蛍光、PCR の結果から観察された (Table 6、9、13)。一方で *galK* や *aslB* では蛍光遺伝子の導入や遺伝子除去の際には全く観察されなかった (Table 6、9、13)。細胞の増殖速度の点に関しては出現した細胞では細胞の成長速度は野生型のものとあまり変わらなかったことから、成長を阻害するような遺伝子の導入については効率が悪くなる可能性がある。

本手法は蛍光の有無が遺伝子の組換えと対応しているという点でこれまでの遺伝子組換え手法と異なる。そのため、pTKRED プラスミドを持たせていれば、fluorescently-activated cell sorting (FACS) を用いてコロニーを介さずに遺伝子組換えを行うことが可能である。これまでの手法では、遺伝子組換えを行った後の細胞は寒天培地にまいて、必要に応じて薬剤などの選択を行うことで目的の細胞を取得してきた [31, 68, 178, 180, 193]。しかしながら、本論文の 2 章で見たように細胞の遺伝子組換え前後の環境によって細胞の表現型が異なることがある。寒天培地で培養することは栄養へのアクセスのしやすさといった点で液体培養とは異なる環境であり、また、液体培地では増殖できるが、コロニー形成ができない細胞も存在する [197]。本手法を FACS と組み合わせることで、コロニー形成できない遺伝子型の細胞であっても遺伝子組換えを行うことができるようになる。また、常に液体培地の環境で遺伝子組換えをした場合、あるいは液体培地を継ぎ足すことで常に対数増殖期においた細胞と従来の寒天を用いた選択において同じ遺伝子組換えを行った際に表現型がどのように変化するのか、同じ表現型に到達するのかといった点を調べるのが可能になる。そのため、この手法は単に遺伝子組換え手法の改良という点だけでなく、履歴に依存した遺伝子型-表現型対応の探索においても活用できる。

大腸菌ゲノムの*tam*部位 5'-atatcacgtcagctggtaatgacgTCGGGAagaatTTTTgctg-3'
tam 遺伝子の下流領域

*tam*部位導入のための
 pTKIP プラスミド 5'-atatcacgtcagctggtaatgacgTAGGGAtaacagggtaat-3'

目的	tam部位導入用	I-SceI 認識配列
遺伝子	homolog配列	

Fig. 46: *tam* 遺伝子における点突然変異. 大腸菌ゲノム上の *tam* 遺伝子の下流配列と *tam* 配列に遺伝子組換えをするための pTKIP プラスミドの I-SceI 認識配列の末端の比較. 5' 末端からの 25 bp (5'-atat ~ gacg-3') は *tam* 部位に導入するための homolog 配列. その下流の 6 塩基の配列 (大文字かつ太字) が、大腸菌ゲノムでは TCGGGA であるのに対して I-SceI 認識配列では TAGGGA と 5' 末端から数えて 2 塩基目の C が A となっている (赤字) 以外同じ塩基である. そのため、C から A への意図しない点突然変異が入りやすい。

4 まとめ

4.1 本論文のまとめ

ある環境における細胞の表現型が遺伝子型によってどの程度決定されるのかは遺伝学における基本的な問いである。多くの研究では遺伝子変化を与えた細胞と元の野生型の細胞の表現型を比較することでこの対応関係を探索している。この方法では意図した遺伝子組換えを与えられる技術の発展が不可欠である。これまでの研究では意図しない配列が残ったり [31, 178]、必ずしも高い組換え効率を得られないといった問題があった。

そこで本博士論文の3章では組換え効率の低さを補うため、蛍光タンパク質遺伝子を利用した組換え法を開発した。この方法では既に開発されていた I-SceI と λ -Red システムを利用したスカーレス遺伝子組換え [68] を基にして、組換えの中間体としての細胞に対して *gfp* 遺伝子または *mcherry* 遺伝子を付与することによって、*tetA* 遺伝子が抜けたかどうかをコロニーの蛍光から確認できるようにした。この手法によってランダムにコロニーを選択した場合には3.8%の確率でしか目的のコロニーが得られなかった染色体位置の組換えでも GFP の蛍光を利用することで、目的のコロニーを得られる確率が88.9%へとが向上した (Table 6)。このように効率的に目的遺伝子型を持った細胞が得られることは遺伝子の除去 (Table 12, 13) やより長い配列の導入 (~ 7 kbp; Table 16, 17) においても確認した。

一方で遺伝子型-表現型の対応関係を明らかにする際に従来の研究では、3章の遺伝子組換え手法のような遺伝子変化から十分時間が経った、安定した終状態の表現型に基づいてこの対応関係を探索している。そのため細胞の過去の履歴が終状態の表現型にどのように影響を及ぼすか、また、遺伝子変化によって起こる表現型変化や終状態の表現型の一細胞ごとの違いについてはよく調べられていない。

そこで本博士論文の2章では大腸菌に対する静菌剤である Cp の耐性遺伝子 *cat* を除去し、その後の一細胞レベルの表現型の変化を CAT タンパク質やリボソームタンパク質、大腸菌のグローバルな発現制御因子として知られる (p)ppGpp のレポーターとして RpoS の発現量を追跡することで観察した。この観察のため、われわれの研究では mother machine マイクロ流体デバイス [94] と青色光照射によって遺伝子組換え酵素を制御できる PA-Cre システム [92] を組み合わせた [109]。この実験系を用いた観察によって、Cp 環境下で *cat* 遺伝子を除去するという遺伝子変異に対して、40%程度の大腸菌が新たな遺伝子変異を獲得することなく適応できることを示した (Fig. 8, 12)。このような適応は *cat* 遺伝子を失ってから十分時間が経った後に Cp を初めて投与した場合には観察されなかった (Fig. 12)。Cp 投与のタイミングを変化させた実験から、Cp を投与するタイミングに少量の CAT 耐性タンパク質があることは耐性遺伝子なく Cp に適応するために重要であることも示された (Fig. 14)。そのため、この耐性遺伝子除去に抗した適応は細胞が置かれた環境の変遷や遺伝子組換えのタイミングに依存していることがわかった。

さらに、*cat* 遺伝子の除去によってリボソームタンパク質 (RplS, RpsB) の量比が崩れることがわかった (Fig. 20)。Cp に適応して分裂を継続した細胞では成長率の回復を伴ってこの量比の崩れが回復した (Fig. 20, 22)。また、RpoS のレポーターを用いた観察から、分裂を継続する細胞の方が分裂できなくなった細胞よりも、適応途中での RpoS の量が多く、リボソームの結果と整合した結果が得られた (Fig. 28)。リボソーム遺伝子はいくつかのオペロンによって構成されており、RNA ポリメラーゼのサブユニットや翻訳の開始因子や成長因子

が含まれている [141, 142]。また、RpoS を制御している因子 (p)ppGpp は RpoS やリボソームだけでなく直接的、間接的にグローバルに遺伝子発現を変化させる [70, 124, 127, 129, 130]。そのため、これらの結果は *cat* 遺伝子の除去によって細胞内の遺伝子発現プロファイルが変化しており、その結果として一部の細胞で適応的な状態に辿り着いたことを示唆している。

4.2 今後の展望

4.2.1 耐性遺伝子を失っても Cp に適応する機構の理解の深化

本論文では Cp の耐性遺伝子 *cat* を失ったにもかかわらず、野生型の細胞では生育できない Cp 濃度に適応する細胞が現れた。この細胞では RpoS-mCherry が減少し、一方でリボソームタンパク質が増加して発現量のバランスが崩れていた。2 章の考察の中では、これらの現象と (p)ppGpp、低温ストレスとの関連を指摘した。

(p)ppGpp は栄養飢餓の際に細胞内に多く存在する因子 [70, 198] であり、RNA ポリメラーゼのプロモーター結合性を変化させ、タンパク質の安定性や活性を制御する役割を担っている [127, 128, 129]。RpoS も (p)ppGpp によって制御されている因子の一つであり、(p)ppGpp の増加によってより安定になることが知られている [69]。また、発現についても (p)ppGpp の量に応じて発現量に変化することがわかっている [69]。そのため、今回の RpoS-mCherry の結果は *cat* 遺伝子の除去によって (p)ppGpp 量を減少させた一方で、耐性遺伝子を失っても分裂を続けた細胞系列では分裂を停止した細胞系列と比較して高い (p)ppGpp を有していることを示唆している。(p)ppGpp の変化がグローバルな遺伝子の発現変動を引き起こしていること [70, 124, 130] を踏まえると、(p)ppGpp の変化は細胞が Cp への適応状態を見つけるために必要である可能性がある。

この仮説を検証するためには (p)ppGpp の量に対して摂動を与えることが必要である。大腸菌において (p)ppGpp の量は *relA* 遺伝子 [145] および *spoT* 遺伝子 [146, 147] によって制御されている。過去の研究において (p)ppGpp の過剰発現はプラスミドを用いて *relA* 遺伝子を加えることによって行われていた [147]。一方で (p)ppGpp の減少については *spoT* 遺伝子が (p)ppGpp の分解だけでなく合成も行う酵素であるため、 $\Delta relA \Delta spoT$ のように (p)ppGpp を合成できない細胞以外で検証することは難しかった。しかし、近年の研究で、*mesh1* 遺伝子と呼ばれる *Drosophila melanogaster* の (p)ppGpp 分解酵素が (p)ppGpp 合成能をもたずに大腸菌でも機能することがわかった [131]。そのため、*relA* 遺伝子および *mesh1* 遺伝子を誘導することで大腸菌内の (p)ppGpp に摂動を与えることができる [131]。このシステムを用いれば、*cat* 遺伝子を Cp 環境下で除去した後に (p)ppGpp の量を増加させることで Cp に適応して分裂を続けられる細胞の割合が増える、あるいは、(p)ppGpp を減少させることで Cp によって成長分裂できなくなる細胞が増加することを示すことができるかもしれない。

また、(p)ppGpp が制御する遺伝子のうちどのような遺伝子/遺伝子群が重要であるのかという問いはより詳細にこの適応を理解するために肝要である。その遺伝子の候補の一つが低温ストレス時に発現誘導される遺伝子群だと考える。なせなら低温ストレスにさらされた細胞では、(p)ppGpp が減少する [152, 153]、成長が一旦急激に遅くなった後 (acclimation 期)、遅いながらも成長が回復する [155, 162, 163]、複合タンパク質のストイキオメトリーが acclimation 期に崩れる [155, 159]、低温によって翻訳が阻害される [155] といった今回の Cp 環境下で *cat* 遺伝子を失った後、Cp に適応して分裂を再開するまでと類似した現象が多く見られているためである。さらに Cp の投与が低温ストレス時に誘導される *csp* 遺伝子群や Trigger Factor (TF) を誘導するこ

とが知られており、この点からも低温ストレス遺伝子群の Cp に対する適応の役割を調べることは重要であると考え [150, 151]。特に低温ストレスで発現が誘導される TF は分子シャペロンとして働くことが知られている [151]。分子シャペロンはタンパク質のフォールディングを助けることで、遺伝子型の点突然変異のような摂動が表現型に現れにくくする働きが原核生物、真核生物のどちらでも知られている [14, 15, 16, 75]。今回の実験では *cat* 遺伝子自体は除去されたため、分子シャペロンがあったとしても機能する CAT タンパク質が得られるわけではない。しかしながら Cp によって翻訳が途中で阻害された不完全なタンパク質のフォールディングを助けることで細胞の生存、分裂を助けているかもしれない。また、CspA タンパク質やそのホモログは RNA シャペロンとして働くタンパク質であり、mRNA の二次構造に関与することで翻訳を助けることができる [155, 156, 162]。*cspA* 遺伝子をはじめとした *csp* 遺伝子群や TF と今回の適応の関連を調べるためには今回のリボソームや RpoS のような蛍光タグを融合したレポーターあるいはプロモーターライブラリー [199] を用いた転写レポーターを構築し、*cat* 遺伝子を除去する実験を行うことで *csp* 遺伝子と Cp に対する適応の関連が調べられるだろう。また、*csp* 遺伝子群や TF の遺伝子 *tig* は *cspA* をはじめとして Keio コレクションが構築されている遺伝子である [34]。そのため、 $\Delta cspA$ や Δtig などの細胞株での *cat* 遺伝子除去実験や Cp の耐性度測定などのデータも役に立つかもしれない。

4.2.2 遺伝子組換えした細胞の一細胞観察の応用可能性

過去の環境によってその後の細胞の表現型が変化することは集団レベルでの研究で確認されている。例えば、事前に低濃度の薬剤にさらされた細胞において、耐性度が上昇する adaptive resistance と呼ばれる現象が知られている [164]。また、事前に同種、または異種の低濃度の薬剤、あるいは栄養飢餓にさらされた場合に、致死の薬剤を投与されたときにごく一部の割合で生き残る persister 細胞の割合が増加することがわかっている [165, 166, 167]。

細胞のさらされている環境やその履歴は遺伝子組換え時にも重要である。例えば K. Datsenko と B. Wanner の遺伝子組換えの方法は遺伝子組換えしてから数時間後に薬剤 (カナマイシンや Cp) を投与する [31]。組換え直後にカナマイシンや Cp を投与すると、組換えた遺伝子に耐性遺伝子が含まれていたとしても、先に薬剤の影響で翻訳が阻害されてしまい耐性を発揮できないためである。このような現象は S. Nalivos らの研究でのプラスミドの水平伝播でも確認されている。 $\Delta acrAB$ のような細胞に対して Tc のない環境とある環境でプラスミドの水平伝播によって *tetA-mcherry* 遺伝子を導入したところ、接合から 8 時間後 Tc のない環境では mCherry の蛍光が確認されたのに対して、Tc のある環境では耐性遺伝子を導入しているにもかかわらず mCherry の蛍光が確認されなかった [53]。水平伝播時の環境の依存性は Tc 環境だけでなく、Cp やエリスロマイシンのような翻訳阻害剤でも確認された [53]。

しかしながら、致死的な遺伝子変異に対する履歴依存的な細胞の適応を調べた研究はいまだ限られている。特に、知る限り一細胞レベルで調べた研究は存在しない。2 章では mother machine と呼ばれるマイクロ流体デバイスと、光で遺伝子組換え酵素を制御できる PA-Cre を組み合わせることで一細胞レベルで遺伝子変異を引き起こしその前後の環境や細胞のばらつきがどのように遺伝子組換え後の表現型に波及するかを明らかにした。この組み合わせは今回用いた大腸菌だけでなく、他の生物種に対して用いることが可能である。mother machine

のようなマイクロ流体デバイスは幅や高さなどを自由に変更できるため、生物種に合わせたデバイスを作成することが可能である [94, 103, 104, 105]。また、PA-Cre は元々真核生物で使うために作成されたシステムであるため [92]、こちらも生物種を問わずに利用可能である。さらに Cre を用いた遺伝子組換えについても今回は *cat* 遺伝子の除去しか行わなかったが他の遺伝子の除去や遺伝子の発現の ON/OFF を入れ替えるといった自由な遺伝子組換えパターンが可能である [92]。そのため薬剤耐性に限らない幅広い応用が可能であり、遺伝子型摂動に対する表現型の変化や適応についてより詳細な理解が得られるようになるだろう。

4.2.3 本研究で得られた手法が遺伝子型-表現型対応関係に与える影響について

mother machine と PA-Cre の組み合わせは、決まった環境で同じ遺伝子組換えを数十から数百の細胞系列に引き起こすという点で同じ進化条件を何回も繰り返した際にどれだけ同じ表現型に収束するのかを確かめるフレームワークともなりうる。また、この方法では遺伝子組換えの際の環境も実験者が自由に設定できる。現実には耐性菌が出現し広まる際の環境は必ずしも遺伝子組換えを行うような薬剤のない環境ではない [200]。細菌感染症にかかった患者から耐性菌が発生する場合には薬の服用によって薬剤の濃度が周期的に変化しているだろう。また、致死ではない低濃度の薬剤においても野生型に比べて耐性菌が広まりやすいこともわかっている [177]。そのため、薬剤環境下で直接遺伝子組換えできることは耐性菌の進化のような現象に対して新たな知見を得ることにつながりうる。

一方で 3 章で開発した効率的に選択できるスカーレスな遺伝子組換え方法では、実験室進化などで得られた遺伝子変異を再現することができる。耐性度の上昇のような実験室進化では多くの遺伝子変異が得られることがわかっている [201, 202]。K. Datsenko と B. Wanner の方法では耐性遺伝子を除去するために使った FRT 配列が残存する [31] ため完全な再現ではなかった。このような進化の再現をできることで、進化によって得られる性質 (耐性度の上昇 etc.) が遺伝子の変化のみで得られるのか、遺伝子の変化に加えて環境に対する表現型レベルでの細胞のグローバルな遺伝子発現の適応にもよっているのかを明らかにすることができる。このような遺伝子変化と表現型の適応を分けるためにこの手法が有効である。

さらに 3 章の考察で述べたように FACS を利用することで液体培地だけで組換えを続けて行うことができるようになれば、寒天培地にコロニーを形成することなく遺伝子組換えを行うことができるようになる。このような手法によってこれまでの大腸菌の遺伝子組換えのほとんどで行われてきた寒天培地上のコロニーで選択するという手順由来する影響を評価することができる。2 章で見たように細胞が経験した過去の環境によって同じ遺伝子組換えをした細胞を同じ環境においても表現型が異なることがわかった。液体培地と寒天培地を行き来する事による履歴が遺伝子組換えした細胞の表現型を変化させることもあるかもしれない。同様に、液体培地の量を工夫することで stationary phase に入らずに細胞の遺伝子組換えを行うこともできるかもしれない。このような従来の研究では遺伝子組換えの際に意図せずとも入っていた環境の履歴がなくなった際に細胞の表現型にどのような変化が起こるかを確認することはより詳細な遺伝子型-表現型の対応関係や、遺伝子組換えに対する細胞の履歴依存性を理解することにつながるだろう。

参考文献

- [1] Cobb M. Heredity before genetics: a history. *Nature Reviews Genetics* 2006 7:12. 2006;7(12):953–958. doi:10.1038/nrg1948.
- [2] Johannsen W. The Genotype Conception of Heredity. *The American Naturalist*. 1911;45(531):129–159. doi:10.1086/279202.
- [3] Mendel G. Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen der naturfoschung Vereins*. 1866;4:3–47.
- [4] メンデル. 雑種植物の研究. 岩波書店; 1928.
- [5] Gayon J. From Mendel to epigenetics: History of genetics. *Comptes Rendus Biologies*. 2016;339(7):225–230. doi:https://doi.org/10.1016/j.crvi.2016.05.009.
- [6] Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R. *Molecular Biology of the Gene*. 7th ed. Pearson; 2013.
- [7] Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R. *ワトソン遺伝子の分子生物学*. 7th ed. 東京電機大学出版局; 2017.
- [8] de Vienne D. What is a phenotype? History and new developments of the concept. *Genetica*. 2021; p. 1–7. doi:10.1007/s10709-021-00134-6.
- [9] Orgogozo V, Morizot B, Martin A. The differential view of genotype-phenotype relationships. *Frontiers in Genetics*. 2015;6:179. doi:10.3389/fgene.2015.00179.
- [10] Bateson W. Facts limiting the theory of heredity. *Science*. 1907;26(672):649–660. doi:10.1126/science.26.672.649.
- [11] Phillips PC. Epistasis - The essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(11):855–867. doi:10.1038/nrg2452.
- [12] Waddington CH. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*. 1942;150(3811):563–565. doi:10.1038/150563a0.
- [13] Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011;475(7356):324–332. doi:10.1038/nature10317.
- [14] Rutherford SL, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*. 1998;396(6709):336–342. doi:10.1038/24550.
- [15] Fares MA, Ruiz-González MX, Moya A, Elena SF, Barrio E. Endosymbiotic bacteria: GroEL buffers against deleterious mutations. *Nature*. 2002;417(6887):398. doi:10.1038/417398a.

- [16] Queitsch C, Sangstert TA, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*. 2002;417(6889):618–624. doi:10.1038/nature749.
- [17] Cowen LE, Lindquist S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: Drug resistance in diverse fungi. *Science*. 2005;309(5744):2185–2189. doi:10.1126/science.1118370.
- [18] Noble D. Genes and causation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2008;366(1878):3001–3015. doi:10.1098/rsta.2008.0086.
- [19] Noble D. *The music of life: biology beyond genes*. Oxford University Press; 2008.
- [20] デニス・ノーブル. 生命の音楽ゲノムを超えて—システムバイオロジーへの招待. 新曜社; 2009.
- [21] Alberch P. From genes to phenotype: dynamical systems and evolvability. *Genetica*. 1991;84(1):5–11. doi:10.1007/BF00123979.
- [22] Pigliucci M. Genotype-phenotype mapping and the end of the 'genes as blueprint' metaphor. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010;365(1540):557–566. doi:10.1098/rstb.2009.0241.
- [23] Levy SF, Siegal ML. Network hubs buffer environmental variation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biology*. 2008;6(11):e264. doi:10.1371/journal.pbio.0060264.
- [24] Campos M, Govers SK, Irnov I, Dobihal GS, Cornet F, Jacobs - Wagner C. Genomewide phenotypic analysis of growth, cell morphogenesis, and cell cycle events in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*. 2018;14(6):e7573. doi:10.15252/msb.20177573.
- [25] Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 1975;94(3):441–448. doi:10.1016/0022-2836(75)90213-2.
- [26] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
- [27] Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2013;6:287–303. doi:10.1146/annurev-anchem-062012-092628.
- [28] Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*. 2021;82(11):801–811. doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012.
- [29] Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 1997;277(5331):1453–1462. doi:10.1126/science.277.5331.1453.

- [30] Nakashima N, Miyazaki K. Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(2):2773–2793. doi:10.3390/ijms15022773.
- [31] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(12):6640–6645. doi:10.1073/pnas.120163297.
- [32] Kim J, Webb AM, Kershner JP, Blaskowski S, Copley SD. A versatile and highly efficient method for scarless genome editing in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *BMC Biotechnology*. 2014;14(1):1–13. doi:10.1186/1472-6750-14-84.
- [33] Reisch CR, Prather KLJ. The no-SCAR (Scarless Cas9 Assisted Recombineering) system for genome editing in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*. 2015;5(1):1–12. doi:10.1038/srep15096.
- [34] Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular Systems Biology*. 2006;2(1):2006.0008. doi:10.1038/msb4100050.
- [35] Niba ETE, Naka Y, Nagase M, Mori H, Kitakawa M. A genome-wide approach to identify the genes involved in biofilm formation in *E. coli*. *DNA Research*. 2007;14(6):237–246. doi:10.1093/dnares/dsm024.
- [36] Inoue T, Shingaki R, Hirose S, Waki K, Mori H, Fukui K. Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(3):950–957. doi:10.1128/JB.01294-06.
- [37] Eydallin G, Viale AM, Morán-Zorzano MT, Muñoz FJ, Montero M, Baroja-Fernández E, et al. Genome-wide screening of genes affecting glycogen metabolism in *Escherichia coli* K-12. *FEBS Letters*. 2007;581(16):2947–2953. doi:10.1016/j.febslet.2007.05.044.
- [38] Pyne ME, Moo-Young M, Chung DA, Chou CP. Coupling the CRISPR/Cas9 system with lambda red recombineering enables simplified chromosomal gene replacement in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015;81(15):5103–5114. doi:10.1128/AEM.01248-15.
- [39] Jiang Y, Chen B, Duan C, Sun B, Yang J, Yang S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015;81(7):2506–2514. doi:10.1128/AEM.04023-14.
- [40] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(1):57–63. doi:10.1038/nrg2484.
- [41] Schmidt A, Kochanowski K, Vedelaar S, Ahrné E, Volkmer B, Callipo L, et al. The quantitative and condition-dependent *Escherichia coli* proteome. *Nature Biotechnology*. 2016;34(1):104–110. doi:10.1038/nbt.3418.

- [42] Novick A, Weiner M. ENZYME INDUCTION AS AN ALL-OR-NONE PHENOMENON. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1957;43(7):553–566. doi:10.1073/pnas.43.7.553.
- [43] Ozbudak EM, Thattai M, Kurtser I, Grossman AD, Van Oudenaarden A. Regulation of noise in the expression of a single gene. *Nature Genetics*. 2002;31(1):69–73. doi:10.1038/ng869.
- [44] Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS. Stochastic gene expression in a single cell. *Science*. 2002;297(5584):1183–1186.
- [45] Golding I, Paulsson J, Zawilski SM, Cox EC. Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria. *Cell*. 2005;123(6):1025–1036. doi:10.1016/j.cell.2005.09.031.
- [46] Kærn M, Elston TC, Blake WJ, Collins JJ. Stochasticity in gene expression: From theories to phenotypes. *Nature Reviews Genetics*. 2005;6(6):451–464. doi:10.1038/nrg1615.
- [47] Raj A, van Oudenaarden A. Nature, Nurture, or Chance: Stochastic Gene Expression and Its Consequences. *Cell*. 2008;135(2):216–226. doi:10.1016/j.cell.2008.09.050.
- [48] Taniguchi Y, Choi PJ, Li GW, Chen H, Babu M, Hearn J, et al. Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science*. 2010;329(5991):533–538. doi:10.1126/science.1188308.
- [49] Luria S, Delbrück M. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics*. 1943;28(6):491–511. doi:10.1038/nature10260.
- [50] Newcombe HB. Delayed Phenotypic Expression of Spontaneous Mutations in *Escherichia Coli*. *Genetics*. 1948;33(5):447–476.
- [51] Ryan FJ. Phenotypic (Phenomic) Lag in Bacteria. *The American Naturalist*. 1955;89(846):159–162. doi:10.1086/281875.
- [52] Sun L, Alexander HK, Bogos B, Kiviet DJ, Ackermann M, Bonhoeffer S. Effective polyploidy causes phenotypic delay and influences bacterial evolvability. *PLoS Biology*. 2018;16(2):e2004644. doi:10.1371/journal.pbio.2004644.
- [53] Nolivos S, Cayron J, Dedieu A, Page A, Delolme F, Lesterlin C. Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer. *Science*. 2019;364(6442):778–782. doi:10.1126/science.aav6390.
- [54] Babić A, Lindner AB, Vulić M, Stewart EJ, Radman M. Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science*. 2008;319(5869):1533–1536. doi:10.1126/science.1153498.

- [55] Nielsen HJ, Ottesen JR, Youngren B, Austin SJ, Hansen FG. The *Escherichia coli* chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate cell halves. *Molecular Microbiology*. 2006;62(2):331–338. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05346.x.
- [56] Balleza E, Kim JM, Cluzel P. Systematic characterization of maturation time of fluorescent proteins in living cells. *Nature Methods*. 2018;15(1):47–51. doi:10.1038/nmeth.4509.
- [57] Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, Court DL. Recombineering: A homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nature Protocols*. 2009;4(2):206–223. doi:10.1038/nprot.2008.227.
- [58] Calvin NM, Hanawalt PC. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *Journal of Bacteriology*. 1988;170(6):2796–2801. doi:10.1128/jb.170.6.2796-2801.1988.
- [59] Tanouchi Y, Pai A, Park H, Huang S, Stamatov R, Buchler NE, et al. A noisy linear map underlies oscillations in cell size and gene expression in bacteria. *Nature*. 2015;523(7560):357–359. doi:10.1038/nature14562.
- [60] El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genetics*. 2017;13(7):e1006780. doi:10.1371/journal.pgen.1006780.
- [61] Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölper S, Krüger M, et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*. 2015;524(7564):230–233. doi:10.1038/nature14580.
- [62] El-Brolosy MA, Kontarakis Z, Rossi A, Kuenne C, Günther S, Fukuda N, et al. Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature*. 2019;568(7751):193–197. doi:10.1038/s41586-019-1064-z.
- [63] Stolovicki E, Dror T, Brenner N, Braun E. Synthetic gene recruitment reveals adaptive reprogramming of gene regulation in yeast. *Genetics*. 2006;173(1):75–85. doi:10.1534/genetics.106.055442.
- [64] Stern S, Dror T, Stolovicki E, Brenner N, Braun E. Genome-wide transcriptional plasticity underlies cellular adaptation to novel challenge. *Molecular Systems Biology*. 2007;3(1):106. doi:10.1038/msb4100147.
- [65] Pongs O. *Chloramphenicol*. Berlin, Heidelberg: Springer, Berlin, Heidelberg; 1979. p. 26–42.
- [66] Murray IA, Shaw WV. O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997;41(1):1–6.
- [67] Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004;28(5):519–542. doi:10.1016/j.femsre.2004.04.001.

- [68] Tas H, Nguyen CT, Patel R, Kim NH, Kuhlman TE. An Integrated System for Precise Genome Modification in *Escherichia coli*. *PLOS ONE*. 2015;10(9):e0136963. doi:10.1371/journal.pone.0136963.
- [69] Battesti A, Majdalani N, Gottesman S. The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*. 2011;65(1):189–213. doi:10.1146/annurev-micro-090110-102946.
- [70] Traxler MF, Summers SM, Nguyen HT, Zacharia VM, Hightower GA, Smith JT, et al. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 2008;68(5):1128–1148. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06229.x.
- [71] Durfee T, Hansen AM, Zhi H, Blattner FR, Ding JJ. Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2008;190(3):1084–1096. doi:10.1128/JB.01092-07.
- [72] Walker GC. The SOS Response of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology*. vol. 1. ASM Press; 1987. p. 1400–1416.
- [73] Tang M, Pham P, Shen X, Taylor JS, O'Donnell M, Woodgate R, et al. Roles of *E. coli* DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. *Nature*. 2000;404(6781):1014–1018. doi:10.1038/35010020.
- [74] Geiler-Samerotte KA, Zhu YO, Goulet BE, Hall DW, Siegal ML. Selection Transforms the Landscape of Genetic Variation Interacting with Hsp90. *PLoS Biology*. 2016;14(10):e2000465. doi:10.1371/journal.pbio.2000465.
- [75] Sabater-Muñoz B, Prats-Escriche M, Montagud-Martínez R, López-Cerdán A, Toft C, Aguilar-Rodríguez J, et al. Fitness trade-offs determine the role of the molecular chaperonin GroEL in buffering mutations. *Molecular Biology and Evolution*. 2015;32(10):2681–2693. doi:10.1093/molbev/msv144.
- [76] Jarosz DF, Lindquist S. Hsp90 and environmental stress transform the adaptive value of natural genetic variation. *Science*. 2010;330(6012):1820–1824. doi:10.1126/science.1195487.
- [77] Eldar A, Chary VK, Xenopoulos P, Fontes ME, Losón OC, Dworkin J, et al. Partial penetrance facilitates developmental evolution in bacteria. *Nature*. 2009;460(7254):510–514. doi:10.1038/nature08150.
- [78] Deisseroth K. Optogenetics. *Nature Methods*. 2011;8(1):26–29. doi:10.1038/NMETH.F.324.
- [79] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Hsu PD, Heidenreich M, Cong L, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*. 2013;500(7463):472–476. doi:10.1038/nature12466.
- [80] Motta-Mena LB, Reade A, Mallory MJ, Glantz S, Weiner OD, Lynch KW, et al. An optogenetic gene expression system with rapid activation and deactivation kinetics. *Nature Chemical Biology*. 2014;10(3):196–202. doi:10.1038/nchembio.1430.

- [81] Han T, Chen Q, Liu H. Engineered Photoactivatable Genetic Switches Based on the Bacterium Phage T7 RNA Polymerase. *ACS Synthetic Biology*. 2017;6(2):357–366. doi:10.1021/acssynbio.6b00248.
- [82] Langan RA, Boyken SE, Ng AH, Samson JA, Dods G, Westbrook AM, et al. De novo design of bioactive protein switches. *Nature*. 2019;572(7768):205–210. doi:10.1038/s41586-019-1432-8.
- [83] Chen SY, Osimiri LC, Chevalier M, Bugaj LJ, Nguyen TH, Greenstein RA, et al. Optogenetic Control Reveals Differential Promoter Interpretation of Transcription Factor Nuclear Translocation Dynamics. *Cell Systems*. 2020;11(4):336–353.e24. doi:10.1016/j.cels.2020.08.009.
- [84] Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya La, Schwartz JW, Ehlers MD, Tucker CL. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nature Methods*. 2010;7(12):973–975. doi:10.1038/nmeth.1524.
- [85] Kawano F, Suzuki H, Furuya A, Sato M. Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins. *Nature Communications*. 2015;6(7):6256. doi:10.1038/ncomms7256.
- [86] Mühlhäuser WWD, Fischer A, Weber W, Radziwill G. Optogenetics - Bringing light into the darkness of mammalian signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2017;1864(2):280–292. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.11.009.
- [87] Furuya A, Kawano F, Nakajima T, Ueda Y, Sato M. Assembly Domain-Based Optogenetic System for the Efficient Control of Cellular Signaling. *ACS Synthetic Biology*. 2017;6(6):1086–1095. doi:10.1021/acssynbio.7b00022.
- [88] Nihongaki Y, Kawano F, Nakajima T, Sato M. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nature Biotechnology*. 2015;33(7):755–760. doi:10.1016/j.cej.2015.10.060.
- [89] Bubeck F, Hoffmann MD, Harteveld Z, Aschenbrenner S, Bietz A, Waldhauer MC, et al. Engineered anti-CRISPR proteins for optogenetic control of CRISPR - Cas9. *Nature Methods*. 2018;15(11):924–927. doi:10.1038/s41592-018-0178-9.
- [90] Schindler SE, McCall JG, Yan P, Hyrc KL, Li M, Tucker CL, et al. Photo-activatable Cre recombinase regulates gene expression in vivo. *Scientific Reports*. 2015;5:13627. doi:10.1038/srep13627.
- [91] Taslimi A, Zoltowski B, Miranda JG, Pathak GP, Hughes RM, Tucker CL. Optimized second-generation CRY2-CIB dimerizers and photoactivatable Cre recombinase. *Nature Chemical Biology*. 2016;12(6):425–430. doi:10.1038/nchembio.2063.
- [92] Kawano F, Okazaki R, Yazawa M, Sato M. A photoactivatable Cre-loxP recombination system for optogenetic genome engineering. *Nature Chemical Biology*. 2016;12(12):1059–1064. doi:10.1038/nchembio.2205.

- [93] Nagy A. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis*. 2000;26(2):99–109. doi:10.1002/(SICI)1526-968X(200002)26:2;99::AID-GENE1;3.0.CO;2-B.
- [94] Wang P, Robert L, Pelletier J, Dang WL, Taddei F, Wright A, et al. Robust growth of *Escherichia coli*. *Current Biology*. 2010;20(12):1099–1103. doi:10.1016/j.cub.2010.04.045.
- [95] Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004;305(5690):1622–1625. doi:10.1126/science.1099390.
- [96] Hashimoto M, Nozoe T, Nakaoka H, Okura R, Akiyoshi S, Kaneko K, et al. Noise-driven growth rate gain in clonal cellular populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(12):3251–3256. doi:10.1073/pnas.1519412113.
- [97] Kaiser M, Jug F, Julou T, Deshpande S, Pfohl T, Silander OK, et al. Monitoring single-cell gene regulation under dynamically controllable conditions with integrated microfluidics and software. *Nature Communications*. 2018;9(1):212. doi:10.1038/s41467-017-02505-0.
- [98] Potvin-Trottier L, Luro S, Paulsson J. Microfluidics and single-cell microscopy to study stochastic processes in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 2018;43:186–192. doi:10.1016/j.mib.2017.12.004.
- [99] Taheri-Araghi S, Bradde S, Sauls JT, Hill NS, Levin PA, Paulsson J, et al. Cell-size control and homeostasis in bacteria. *Current Biology*. 2015;25(3):385–391. doi:10.1016/j.cub.2014.12.009.
- [100] Bergmiller T, Andersson AMC, Tomasek K, Balleza E, Kiviet DJ, Hauschild R, et al. Biased partitioning of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC underlies long-lived phenotypic heterogeneity. *Science*. 2017;356(6335):311–315. doi:10.1126/science.aaf4762.
- [101] Robert L, Ollion J, Robert J, Song X, Matic I, Elez M. Mutation dynamics and fitness effects followed in single cells. *Science*. 2018;359(6381):1283–1286. doi:10.1126/science.aan0797.
- [102] Uphoff S. Real-time dynamics of mutagenesis reveal the chronology of DNA repair and damage tolerance responses in single cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(28):E6516–E6525. doi:10.1073/pnas.1801101115.
- [103] Norman TM, Lord ND, Paulsson J, Losick R. Memory and modularity in cell-fate decision making. *Nature*. 2013;503(7477):481–486. doi:10.1038/nature12804.
- [104] Nakaoka H, Wakamoto Y. Aging, mortality, and the fast growth trade-off of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS Biology*. 2017;15(6):e2001109. doi:10.1371/journal.pbio.2001109.
- [105] Seita A, Nakaoka H, Okura R, Wakamoto Y. Intrinsic growth heterogeneity of mouse leukemia cells underlies differential susceptibility to a growth-inhibiting anticancer drug. *PLoS ONE*. 2021;16(2 February):e0236534. doi:10.1371/journal.pone.0236534.

- [106] Lawson MJ, Camsund D, Larsson J, Baltekin Ö, Fange D, Elf J. In situ genotyping of a pooled strain library after characterizing complex phenotypes. *Molecular Systems Biology*. 2017;13(10):947. doi:10.1007/978-3-642-40498-6_38.
- [107] Jin M, Li Y, O’Laughlin R, Bittihn P, Pillus L, Tsimring LS, et al. Divergent Aging of Isogenic Yeast Cells Revealed through Single-Cell Phenotypic Dynamics. *Cell Systems*. 2019;8(3):242–253.e3. doi:10.1016/j.cels.2019.02.002.
- [108] Li Y, Jiang Y, Paxman J, O’Laughlin R, Klepin S, Zhu Y, et al. A programmable fate decision landscape underlies single-cell aging in yeast. *Science*. 2020;369(6501):325–329. doi:10.1126/science.aax9552.
- [109] Koganezawa Y, Umetani M, Sato M, Wakamoto Y. History-Dependent Physiological Adaptation to Lethal Genetic Modification under Antibiotic Exposure. *bioRxiv*. 2021; p. 2021.09.05.459045. doi:10.1101/2021.09.05.459045.
- [110] Li C, Evans RM. Ligation independent cloning irrespective of restriction site compatibility. *Nucleic Acids Research*. 1997;25(20):4165–4166. doi:10.1093/nar/25.20.4165.
- [111] Salvador S, Chan P. Toward accurate dynamic time warping in linear time and space. *Intelligent Data Analysis*. 2007;11(5):561–580. doi:10.3233/ida-2007-11508.
- [112] Izakian H, Pedrycz W, Jamal I. Fuzzy clustering of time series data using dynamic time warping distance. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*. 2015;39:235–244. doi:10.1016/j.engappai.2014.12.015.
- [113] Guijo-Rubio D, Duran-Rosal AM, Gutierrez PA, Troncoso A, Hervas-Martinez C. Time-Series Clustering Based on the Characterization of Segment Typologies. *IEEE Transactions on Cybernetics*. 2020; p. 1–14. doi:10.1109/tcyb.2019.2962584.
- [114] Deatherage DE, Barrick JE. Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods in Molecular Biology*. 2014;1151:165–188. doi:10.1007/978-1-4939-0554-6_12.
- [115] Kim JH, Lee SR, Li LH, Park HJ, Park JH, Lee KY, et al. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e18556. doi:10.1371/journal.pone.0018556.
- [116] Milo R. What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values. *BioEssays*. 2013;35(12):1050–1055. doi:10.1002/bies.201300066.
- [117] Nikolay R, Schloemer R, Schmidt S, Mueller S, Heubach A, Deuerling E. Validation of a fluorescence-based screening concept to identify ribosome assembly defects in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(12):e100. doi:10.1093/nar/gku381.

- [118] Wikström PM, Byström AS, Björk GR. Non-autogenous control of ribosomal protein synthesis from the *trmD* operon in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. 1988;203(1):141–152. doi:10.1016/0022-2836(88)90098-8.
- [119] Aseev LV, Levandovskaya AA, Tchufistova LS, Scaptsova NV, Boni IV. A new regulatory circuit in ribosomal protein operons: S2-mediated control of the *rpsB*-*tsf* expression in vivo. *RNA*. 2008;14(9):1882–1894. doi:10.1261/rna.1099108.
- [120] Siibak T, Peil L, Dönhöfer A, Tats A, Remm M, Wilson DN, et al. Antibiotic-induced ribosomal assembly defects result from changes in the synthesis of ribosomal proteins. *Molecular Microbiology*. 2011;80(1):54–67. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07555.x.
- [121] Yamagishi M, Nomura M. Effects of induction of rRNA overproduction on ribosomal protein synthesis and ribosome subunit assembly in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1988;170(11):5042–5050. doi:10.1128/jb.170.11.5042-5050.1988.
- [122] Gourse RL, Takebe Y, Sharrock RA, Nomura M. Feedback regulation of rRNA and tRNA synthesis and accumulation of free ribosomes after conditional expression of rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(4):1069–1073. doi:10.1073/pnas.82.4.1069.
- [123] Lemke JJ, Sanchez-Vazquez P, Burgos HL, Hedberg G, Ross W, Gourse RL. Direct regulation of *Escherichia coli* ribosomal protein promoters by the transcription factors ppGpp and DksA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(14):5712–5717. doi:10.1073/pnas.1019383108.
- [124] Sanchez-Vazquez P, Dewey CN, Kitten N, Ross W, Gourse RL. Genome-wide effects on *Escherichia coli* transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019;116(17):8310–8319. doi:10.1073/pnas.1819682116.
- [125] Hirsch M, Elliott T. Role of ppGpp in *rpoS* stationary-phase regulation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2002;184(18):5077–5087. doi:10.1128/JB.184.18.5077-5087.2002.
- [126] Brown L, Gentry D, Elliott T, Cashel M. DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level. *Journal of Bacteriology*. 2002;184(16):4455–4465. doi:10.1128/JB.184.16.4455-4465.2002.
- [127] Magnusson LU, Farewell A, Nyström T. ppGpp: A global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*. 2005;13(5):236–242. doi:10.1016/j.tim.2005.03.008.
- [128] Potrykus K, Cashel M. (p)ppGpp: Still Magical? *Annual Review of Microbiology*. 2008;62(1):35–51. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162903.

- [129] Dalebroux ZD, Swanson MS. ppGpp: Magic beyond RNA polymerase. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(3):203–212. doi:10.1038/nrmicro2720.
- [130] Potrykus K, Murphy H, Philippe N, Cashel M. ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli*. *Environmental Microbiology*. 2011;13(3):563–575. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02357.x.
- [131] Zhu M, Dai X. Growth suppression by altered (p)ppGpp levels results from non-optimal resource allocation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(9):4684–4693. doi:10.1093/nar/gkz211.
- [132] Lund E, Kjeldgaard NO. Metabolism of Guanosine Tetraphosphate in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*. 1972;28(3):316–326. doi:10.1111/j.1432-1033.1972.tb01916.x.
- [133] Cashel M, Gallant J. Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature*. 1969;221(5183):838–841. doi:10.1038/221838a0.
- [134] Bougdour A, Gottesman S. ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(31):12896–12901. doi:10.1073/pnas.0705561104.
- [135] Maisonneuve E, Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell*. 2014;157(3):539–548. doi:10.1016/j.cell.2014.02.050.
- [136] Svenningsen MS, Veress A, Harms A, Mitarai N, Semsey S. Birth and Resuscitation of (p)ppGpp Induced Antibiotic Tolerant Persister Cells. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1–13. doi:10.1038/s41598-019-42403-7.
- [137] Scott M, Gunderson CW, Mateescu EM, Zhang Z, Hwa T. Interdependence of cell growth and gene expression: Origins and consequences. *Science*. 2010;330(6007):1099–1102. doi:10.1126/science.1192588.
- [138] Lindahl L, Zengel JM. Operon-specific regulation of ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(12):6542–6546. doi:10.1073/pnas.76.12.6542.
- [139] Zengel JM, Mueckl D, Lindahl L. Protein L4 of the *E. coli* ribosome regulates an eleven gene r protein operon. *Cell*. 1980;21(2):523–535. doi:10.1016/0092-8674(80)90490-0.
- [140] Dean D, Yates JL, Nomura M. Identification of ribosomal protein S7 as a repressor of translation within the str operon of *E. coli*. *Cell*. 1981;24(2):413–419. doi:10.1016/0092-8674(81)90331-7.
- [141] Nomura M, Gourse R, Baughman G. Regulation of the Synthesis of Ribosomes and Ribosomal Components. *Annual Review of Biochemistry*. 1984;53(1):75–117. doi:10.1146/annurev.bi.53.070184.000451.

- [142] Zengel JM, Lindahl L. Diverse Mechanisms for Regulating Ribosomal Protein Synthesis in *Escherichia coli*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 1994;47(C):331–370. doi:10.1016/S0079-6603(08)60256-1.
- [143] Nomura M. Regulation of ribosome biosynthesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: Diversity and common principles. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(22):6857–6864. doi:10.1128/jb.181.22.6857-6864.1999.
- [144] Byström AS, van Gabain A, Björk GR. Differentially expressed *trmD* ribosomal protein operon of *Escherichia coli* is transcribed as a single polycistronic mRNA species. *Journal of Molecular Biology*. 1989;208(4):575–586. doi:10.1016/0022-2836(89)90149-6.
- [145] STENT GS, BRENNER S. A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1961;47(12):2005–2014. doi:10.1073/pnas.47.12.2005.
- [146] Laffler T, Gallant J. *spoT*, a new genetic locus involved in the stringent response in *E. coli*. *Cell*. 1974;1(1):27–30. doi:10.1016/0092-8674(74)90151-2.
- [147] Xiao H, Kalman M, Ikehara K, Zemel S, Glaser G, Cashel M. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(9):5980–5990.
- [148] Jones PG, VanBogelen RA, Neidhardt FC. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1987;169(5):2092–2095. doi:10.1128/jb.169.5.2092-2095.1987.
- [149] VanBogelen RA, Neidhardt FC. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(15):5589–5593. doi:10.1073/pnas.87.15.5589.
- [150] Jiang W, Jones P, Inouye M. Chloramphenicol induces the transcription of the major cold shock gene of *Escherichia coli*, *cspA*. *Journal of Bacteriology*. 1993;175(18):5824–5828. doi:10.1128/jb.175.18.5824-5828.1993.
- [151] Kandror O, Goldberg AL. Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(10):4978–4981. doi:10.1073/pnas.94.10.4978.
- [152] Pao CC, Dyess BT. Stringent control of RNA synthesis in the absence of guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate. *Journal of Biological Chemistry*. 1981;256(5):2252–2257. doi:10.1016/s0021-9258(19)69769-3.

- [153] Mackow ER, Chang FN. Correlation between RNA synthesis and ppGpp content in *Escherichia coli* during temperature shifts. *MGG Molecular & General Genetics*. 1983;192(1-2):5–9. doi:10.1007/BF00327639.
- [154] Jones PG, Cashel M, Glaser G, Neidhardt FC. Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1992;174(12):3903–3914. doi:10.1128/jb.174.12.3903-3914.1992.
- [155] Zhang Y, Burkhardt DH, Rouskin S, Li GW, Weissman JS, Gross CA. A Stress Response that Monitors and Regulates mRNA Structure Is Central to Cold Shock Adaptation. *Molecular Cell*. 2018;70(2):274–286.e7. doi:10.1016/j.molcel.2018.02.035.
- [156] Goldstein J, Pollitt NS, Inouye M. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(1):283–287. doi:10.1073/pnas.87.1.283.
- [157] Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JRS, Weissman JS. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*. 2009;324(5924):218–223. doi:10.1126/science.1168978.
- [158] Li GW, Burkhardt D, Gross C, Weissman JS. Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell*. 2014;157(3):624–635. doi:10.1016/j.cell.2014.02.033.
- [159] Taggart JC, Li GW. Production of Protein-Complex Components Is Stoichiometric and Lacks General Feedback Regulation in Eukaryotes. *Cell Systems*. 2018;7(6):580–589.e4. doi:10.1016/j.cels.2018.11.003.
- [160] Hauryliuk V, Atkinson GC, Murakami KS, Tenson T, Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nature Reviews Microbiology*. 2015;13(5):298–309. doi:10.1038/nrmicro3448.
- [161] Spira B, Ospino K. Diversity in *E. coli* (p)ppGpp Levels and Its Consequences. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:1759. doi:10.3389/fmicb.2020.01759.
- [162] Thieringer HA, Jones PG, Inouye M. Cold shock and adaptation. *BioEssays*. 1998;20(1):49–57. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199801)20:1;49::AID-BIES8;3.0.CO;2-N.
- [163] Phadtare S, Alsina J, Inouye M. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology*. 1999;2(2):175–180. doi:10.1016/S1369-5274(99)80031-9.
- [164] George AM, Levy SB. Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: Involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. *Journal of Bacteriology*. 1983;155(2):531–540. doi:10.1128/jb.155.2.531-540.1983.

- [165] Dörr T, Lewis K, Vulić M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*. 2009;5(12):e1000760. doi:10.1371/journal.pgen.1000760.
- [166] Johnson PJT, Levin BR. Pharmacodynamics, Population Dynamics, and the Evolution of Persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genetics*. 2013;9(1):e1003123. doi:10.1371/journal.pgen.1003123.
- [167] Svenningsen MS, Svenningsen SL, Sorensen MA, Mitarai N. Existence of log-phase *Escherichia coli* persists and lasting memory of a starvation pulse. *bioRxiv*. 2021; p. 2020.09.17.301598. doi:10.1101/2020.09.17.301598.
- [168] Yang D, Jennings AD, Borrego E, Retterer ST, Männik J. Analysis of factors limiting bacterial growth in PDMS mother machine devices. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9(MAY):871. doi:10.3389/fmicb.2018.00871.
- [169] Susman L, Kohram M, Vashistha H, Nechleba JT, Salman H, Brenner N. Individuality and slow dynamics in bacterial growth homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(25):E5679–E5687. doi:10.1073/pnas.1615526115.
- [170] Vashistha H, Kohram M, Salman H. Non-genetic inheritance restraint of cell-to-cell variation. *eLife*. 2021;10:1–21. doi:10.7554/eLife.64779.
- [171] Wehrli W, Knüsel F, Staehelin M. Action of rifamycin on RNA-polymerase from sensitive and resistant bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1968;32(2):284–288. doi:10.1016/0006-291X(68)90382-3.
- [172] Rabussay D, Zillig W. A rifampicin resistant rna-polymerase from *E. coli* altered in the β -subunit. *FEBS Letters*. 1969;5(2):104–106. doi:10.1016/0014-5793(69)80305-4.
- [173] OVCHINNIKOV YA, MONASTYRSKAYA GS, GUBANOV VV, GURYEV SO, CHERTOV OY, MODYANOV NN, et al. The Primary Structure of *Escherichia coli* RNA Polymerase: Nucleotide Sequence of the rpoB Gene and Amino - Acid Sequence of the β - Subunit. *European Journal of Biochemistry*. 1981;116(3):621–629. doi:10.1111/j.1432-1033.1981.tb05381.x.
- [174] Ovchinnikov YA, Monastyrskaya GS, Gubanov VV, Lipkin VM, Sverdlov ED, Kiver IF, et al. Primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase nucleotide substitution in the β subunit gene of the rifampicin resistant rpoB255 mutant. *MGG Molecular & General Genetics*. 1981;184(3):536–538. doi:10.1007/BF00352535.
- [175] Lisitsyn NA, Sverdlov ED, Moiseyeva EP, Danilevskaya ON, Nikiforov VG. Mutation to rifampicin resistance at the beginning of the RNA polymerase β subunit gene in *Escherichia coli*. *MGG Molecular & General Genetics*. 1984;196(1):173–174. doi:10.1007/BF00334112.

- [176] Moriya H, Shimizu-Yoshida Y, Kitano H. In vivo robustness analysis of cell division cycle genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*. 2006;2(7):1034–1045. doi:10.1371/journal.pgen.0020111.
- [177] Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens*. 2011;7(7):e1002158. doi:10.1371/journal.ppat.1002158.
- [178] Kuhlman TE, Cox EC. Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs. *Nucleic Acids Research*. 2010;38(6):e92–e92. doi:10.1093/nar/gkp1193.
- [179] Yona AH, Alm EJ, Gore J. Random sequences rapidly evolve into de novo promoters. *Nature Communications*. 2018;9(1):1530. doi:10.1038/s41467-018-04026-w.
- [180] Yang J, Sun B, Huang H, Jiang Y, Diao L, Chen B, et al. High-efficiency scarless genetic modification in *Escherichia coli* by using lambda red recombination and I-SceI cleavage. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014;80(13):3826–3834. doi:10.1128/AEM.00313-14.
- [181] Colleaux L, D'Auriol L, Betermier M, Cottarel G, Jacquier A, Galibert F, et al. Universal code equivalent of a yeast mitochondrial intron reading frame is expressed into *E. coli* as a specific double strand endonuclease. *Cell*. 1986;44(4):521–533. doi:10.1016/0092-8674(86)90262-X.
- [182] Zhao D, Yuan S, Xiong B, Sun H, Ye L, Li J, et al. Development of a fast and easy method for *Escherichia coli* genome editing with CRISPR/Cas9. *Microbial Cell Factories*. 2016;15(1):1–9. doi:10.1186/s12934-016-0605-5.
- [183] Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. 2015;4(11):e264. doi:10.1038/mtna.2015.37.
- [184] Bryant JA, Sellars LE, Busby SJW, Lee DJ. Chromosome position effects on gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(18):11383–11392. doi:10.1093/nar/gku828.
- [185] Scholz SA, Diao R, Wolfe MB, Fivenson EM, Lin XN, Freddolino PL. High-Resolution Mapping of the *Escherichia coli* Chromosome Reveals Positions of High and Low Transcription. *Cell Systems*. 2019;8(3):212–225.e9. doi:10.1016/j.cels.2019.02.004.
- [186] Messing J, Gronenborn B, Mueller-Hill B, Hofschneider PH. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(9):3642–3646. doi:10.1073/pnas.74.9.3642.
- [187] Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene*. 1985;33(1):103–119. doi:10.1016/0378-1119(85)90120-9.

- [188] Ullmann A, Jacob F, Monod J. Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. 1967;24(2):339–343. doi:10.1016/0022-2836(67)90341-5.
- [189] Speltz EB, Regan L. White and green screening with circular polymerase extension cloning for easy and reliable cloning. *Protein Science*. 2013;22(6):859–864. doi:10.1002/pro.2268.
- [190] Landy A, Ross W. Viral integration and excision: Structure of the lambda att sites. *Science*. 1977;197(4309):1147–1160. doi:10.1126/science.331474.
- [191] Bochner BR, Huang HC, Schieven GL, Ames BN. Positive selection for loss of tetracycline resistance. *Journal of Bacteriology*. 1980;143(2):926–933.
- [192] Maloy SR, Nunn WD. Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1981;145(2):1110–1112.
- [193] Li XT, Thomason LC, Sawitzke JA, Costantino N, Court DL. Positive and negative selection using the tetA-sacB cassette: Recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(22):e204–e204. doi:10.1093/nar/gkt1075.
- [194] Warming S, Costantino N, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(4):1–12. doi:10.1093/nar/gni035.
- [195] Wong QNY, Ng VCW, Lin CCM, Kung HF, Chan D, Huang JD. Efficient and seamless DNA recombineering using a thymidylate synthase A selection system in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(6):1–9. doi:10.1093/nar/gni059.
- [196] Takahashi N, Kobayashi I. Evidence for the double-strand break repair model of bacteriophage λ recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(7):2790–2794. doi:10.1073/pnas.87.7.2790.
- [197] Nosho K, Yasuhara K, Ikehata Y, Mii T, Ishige T, Yajima S, et al. Isolation of colonization-defective *Escherichia coli* mutants reveals critical requirement for fatty acids in bacterial colony formation. *Microbiology*. 2018;164(9):1122–1132. doi:10.1099/mic.0.000673.
- [198] Seyfzadeh M, Keener J, Nomura M. spoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(23):11004–11008. doi:10.1073/pnas.90.23.11004.
- [199] Zaslaver A, Bren A, Ronen M, Itzkovitz S, Kikoin I, Shavit S, et al. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nature Methods*. 2006;3(8):623–628. doi:10.1038/nmeth895.

- [200] Andersson DI, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(7):465–478. doi:10.1038/nrmicro3270.
- [201] Toprak E, Veres A, Michel JB, Chait R, Hartl DL, Kishony R. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nature Genetics*. 2012;44(1):101–105. doi:10.1038/ng.1034.
- [202] Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, Chait R, Gross R, Yelin I, et al. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science*. 2016;353(6304):1147–1151. doi:10.1126/science.aag0822.

謝辞

本論文は筆者が東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻若本祐一准教授には指導教官として本研究の実施の機会をいただき、研究の遂行の際には熱心にご指導賜った。また、本論文の作成にあたって多くの助言をいただいた。深謝の意を表す。同専攻佐藤守俊教授には本研究の実施に不可欠であった PA-Cre システムを提供していただき、また研究結果について議論していただいた。深謝の意を表す。同専攻金子邦彦教授、澤井哲教授、市橋伯一教授、ならびに岡山大学学術研究院環境生命科学学域農生命科学専攻守屋央朗准教授には本博士課程論文を精読していただき、大変貴重な意見をいただいた。深謝の意を表す。

本研究室特任助教梅谷実樹博士には本研究について議論していただいたのみならず、リボソームレポーター株の提供をしていただいた。感謝の意を表す。本研究室技官大倉玲子氏には筆者が本学教養学部統合自然科学の卒業研究で本研究室に加入した時から、分子生物学実験の初心者であった私に一から実験技術をご指導いただき、技術面で多くの助言をいただいた。感謝の意を表す。研究室のスタッフ、先輩方、同期、後輩の皆様には本研究の遂行にあたり、幾度となく議論していただき、数多くのご助言、ご指摘をいただいた。感謝の意を表す。

本研究を遂行するにあたって、日本学術振興会特別研究員奨励費 JP19J22506 の助成をいただいた。

Supplemental Data

Supplemental Tables

Table S1: 2章の細胞株リスト.

mCherry-CAT 除去のための細胞

Name	Ancestor	Genotype	Plasmid	Resistance	Source
F3	W3110	$\Delta fliC\Delta fimA\Delta flu(\Delta F3)$			[96]
YK0083	W3110	$\Delta F3 intC::P_{LtetO1}\text{-loxP-}$ $RBS4\text{-mcherry-cat-loxP}$	pYK022	Amp, Km, Cp	This study
YK0085	W3110	$\Delta F3 intC::P_{LtetO1}\text{-loxP}$	pYK022	Amp, Km	This study

リボソームレポーター細胞

Name	Ancestor	Genotype	Plasmid	Resistance	Source
MUS3	BW25113	$rplS\text{-mcherry-FRT-kan-FRT}$		Km	Miki Umetani
MUS13	BW25113	$rpsB\text{-mvenus-FRT-kan-FRT}$		Km	Miki Umetani
MUS5	W3110	$\Delta F3 rplS\text{-mcherry-FRT}$			Miki Umetani
MUS6	W3110	$\Delta F3 rplS\text{-mcherry-FRT}$ $rpsB\text{-mvenus-FRT}$			Miki Umetani
MUS16	W3110	$\Delta F3 rplS\text{-mvenus-FRT}$ $rpsB\text{-mcherry-FRT}$			Miki Umetani
YK0118	W3110	$\Delta F3 intC::P_{LtetO1}\text{-loxP-}$ $RBS4\text{-cat-loxP}$	pYK022	Amp, Km, Cp	This study
YK0134	MUS6	$intC::P_{LtetO1}\text{-loxP-RBS4-cat-loxP}$		Amp, Km	This study
YK0135	MUS16	$intC::P_{LtetO1}\text{-loxP-RBS4-cat-loxP}$		Amp, Km	This study
YK0136	MUS6	$intC::P_{LtetO1}\text{-loxP-RBS4-cat-loxP}$	pYK022	Amp, Km, Cp	This study
YK0137	MUS16	$intC::P_{LtetO1}\text{-loxP-RBS4-cat-loxP}$	pYK022	Amp, Km, Cp	This study
YK0138	MUS6	$intC::P_{LtetO1}\text{-loxP}$	pYK022	Amp, Km	This study
YK0139	MUS16	$intC::P_{LtetO1}\text{-loxP}$	pYK022	Amp, Km	This study

RpoS レポーター細胞

Name	Ancestor	Genotype	Plasmid	Resistance	Source
	W3110	$\Delta F3$ <i>rpoS-mcherry</i>			Wakamoto lab
YK0148	W3110	$\Delta F3$ <i>rpoS-mcherry intC::</i> <i>P_{LtetO1}-loxP-RBS4-cat-loxP</i>	pYK022	Amp, Km, Cp	This study
YK0149	W3110	$\Delta F3$ <i>MUC2 MUC8 intC::</i> <i>P_{LtetO1}-loxP</i>	pYK022	Amp, Km	This study

Table S2: 2章のプラスミドリスト.

λ-Red ゲノム導入 [31]

Name	Backbone	Gene	Resistance	Source
pKD46			Amp	CGSC
pCP20			Amp	CGSC

PA-Cre プラスミド

Name	Backbone	Gene	Resistance	Source
	pcDNA3.1	<i>pCMV-lox2272-loxp-inverse-mvenus-lox2272-loxp</i>	Amp, Neo, Km	Sato lab
	pcDNA3.1	<i>pCMV-rfp-pmagrec</i>	Amp, Neo, Km	Sato lab
	pcDNA3.1	<i>pCMV-rfp-nmagren</i>	Amp, Neo, Km	Sato lab

***E. coli* 用 PA-Cre プラスミド**

Name	Backbone	Gene	Resistance	Source
pTmCherryK3	pMW118	<i>PLtetO1-RBS3-mcherry-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km	Wakamoto lab
pLVK4	pMW118	<i>PLlacO1-RBS4-mvenus-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km	Wakamoto lab
pTVCK4	pMW118	<i>PLtetO1-RBS4-mvenus-cat-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km	Wakamoto lab
pKK1	pMW118	<i>PLlacO1-rfp-pmagrec-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km	This Study
pKK2	pMW118	<i>PLlacO1-rfp-nmagren-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km	This Study
pYK001	pMW118	<i>PLlacO1-RBS3-pmagrec-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km	This Study
pYK002	pMW118	<i>PLlacO1-RBS3-nmagren-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km	This Study
pYK016	pMW118	<i>PLlacO1-RBS3-pmagrec-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km	This Study
pYK017	pMW118	<i>PLlacO1-RBS3-crennmag-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km	This Study
pYK018	pMW118	<i>PLlacO1-RBS3-crennmag-pmagrec-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km	This Study
pYK022	pMW118	<i>PLlacO1-RBS3-crennmag-pmagrec-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km	This Study

floxed mcherry-cat/cat 遺伝子構築

Name	Backbone	Gene	Resistance	Source
pYK006	pMW118	<i>P_{LtetO1}-RBS3-lox2272-mvenus-loxp-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km, Cp	This Study
pYK007	pMW118	<i>P_{LtetO1}-RBS3-lox2272-mcherry-loxp-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km, Cp	This Study
pYK008	pMW118	<i>P_{LtetO1}-RBS3-lox2272-mcherry-loxp-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km, Cp	This Study
pYK009	pMW118	<i>P_{LtetO1}-RBS3-lox2272-mcherry-loxp-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km, Cp	This Study
pYK010	pMW118	<i>P_{LtetO1}-RBS4-lox2272-mcherry-loxp-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km, Cp	This Study
pYK011	pMW118	<i>P_{LtetO1}-lox2272-RBS4-mcherry-loxp-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km, Cp	This Study
pYK023	pMW118	<i>P_{LtetO1}-loxp-RBS4-mcherry-loxp-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km, Cp	This Study
pYK028	pMW118	<i>P_{LtetO1}-loxp-RBS4-mcherry-loxp-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km, Cp	This Study
pYK029	pMW118	<i>P_{LtetO1}-loxp-RBS4-mcherry-cat-loxp-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km, Cp	This Study
pYK035	pMW118	<i>P_{LtetO1}-loxp-RBS4-cat-loxp-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km, Cp	This Study

リボソームレポーター構築

Name	Backbone	Gene	Resistance	Source
pMU1	pMW118	<i>P_{LlacO1}-RBS4-mcherry-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km	Miki Umetani
pMU2	pMW118	<i>P_{LlacO1}-RBS4-mvenus-FLP-kan-FLP</i>	Amp, Km	Miki Umetani

Table S3: 2章のプライマーリスト.

PA-Cre プラスミド構築		
No	Sequence	Construct
pLVK_	CAGGCATCAAATAAAAACGAAAGGCTCA	ExoIII クローニングを用いた pKK1、pKK2 構築用プライマー。pLVK3 を pLVK_pTVK_F & pLVK3_pTVK3_R で増幅。
pTVK_F	GTC	
pLVK3_	GGTACCTTTCTCCTCTTTAATGTTTTTC	pCMV-rfp-pmagrec を L3_TagRFP_F & Crec_Term_R で増幅。pCMV-rfp-nmagren を L3_TagRFP_F & 141031-nMagCreN-R で増幅。
pTVK3_R	GG	
L3_	GGACGCACTGACCGAAAACATTAAGA	
TagRFP_F	GGAGAAAGGTACCATGGTGTCTAAGG GCGAAG	
Crec_	CCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTT	
Term_R	TATTTGATGCCTGTTAGTCCCCATCTT CGAGCAG	
141031- nMag CreN-R	TTCGTTTTATTTGATGCCTGTTAGTTC AGCTTGCACCAGG	
YKp0001	ATGCATACTCTTTATGCCCCCGG	pYK001、pYK002 構築用プライマー。pKK1 と pKK2 のそれぞれをテンプレートとして <i>gfp</i> 遺伝子を除去した。
YKp0002	GGTACCTTTCTCCTCTTTAATG	
YKp0053	AACAGGAAATGGTTCCTGCTGAACC	pYK016 構築用プライマー。pYK001 をテンプレートとし、リンカーを変えた。
YKp0054	GGTACCTTCTGTTTCGCACTGGAATC	
YKp0022	GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	ExoIII クローニングを用いた pYK017 構築用プライマー。pYK002 を YKp0022 & YKp0052、YKp0049 & YKp0056、YKp0055 & YKp0057 でそれぞれ増幅し、 <i>nmag</i> と <i>cren</i> の順番を変えた。
YKp0049	AAGAGGAGAAAGGTACCATGACCTCTG ATGAAGTCAGG	
YKp0052	CATGGTACCTTTCTCC	
YKp0055	CATACTCTTTATGCCCCCGGTGG	
YKp0056	GCATAAAGAGTATGGGTACCGTTCAGC TTGCACCAG	
YKp0057	CTCCAGCCTACACTTATTCTGTTTCGC ACTGGAATC	

YKp0058	TTATTCTGTTTCGCACTGGAATCCC	ExoIII クローニングを用いた pYK018 構築用
YKp0059	GCGAAACAGAATAAAGGAGAAAGGTAC CATGCATAC	プライマー。pYK016 を YKp0059 &
YKp0060	GCTCCAGCCTACACTTAGTCCCCATCT TCGAGCAGC	YKp0060、pYK017 を YKp0022 & YKp0058 でそれぞれ増幅し、 <i>pmag-crec</i> と <i>cren-nmag</i> を同一プラスミドにのせた。
YKp0006	CAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCA GTCG	ExoIII クローニングを用いた pYK022 構築用
YKp0061	TTATTTGATGCCTGTTAGTCCCCATCT TCGAGCAGC	プライマー。pYK001 を YKp0006 & YKp0052、pYK018 を YKp0049 & YKp0061 でそれぞれ増幅し、ターミネータを加えた。

floxed cat プラスミド構築

No	Sequence	Construct
YKp0026	CGTTTTATTGATGCCTGATAACTTCGT ATAGCATAC	pYK006 構築用プライマー。pCMV _lox2272_loxp_inverse-mvenus_lox2272_loxp を
YKp0027	CATTAAAGAGGAGAAAGGTACCATAACT TCGTATAGGATAC	テンプレートとした。
YKp0029	CTTATTAGAATTCGCCGCCATGGTGAGC AAGGGCGAG	ExoIII クローニングを用いた pYK007 構築用
YKp0030	CATTATACGAAGTTATCTCGAGTTATCC ACGCGTGAGC	プライマー。pTmCherryK3 を YKp0029 & YKp0030、pYK006 を YKp0031 & YKp0032 でそれぞれ増幅し、 <i>mvenus</i> を <i>mcherry</i> に変
YKp0031	CTCGAGATAACTTCGTATAATG	えた。
YKp0032	GGCGGCGAATTCTAATAAGG	
YKp0035	ATAACTTCGTATAAAGTATCCTATACGA AGTTATGGTACC	pYK008 構築用プライマー。pYK007 をテン プレートとし、スペーサー配列を取り除いた。
YKp0036	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAAC ATGGCCATCATC	
YKp0037	TAACCTCGAGATAACTTCGTATAATG	pYK009 構築用プライマー。pYK008 をテン プレートとし、SacI と MluI を取り除いた。
YKp0038	CTTGACAGCTCGTCCATGC	
YKp0039	GAAAAAATAACTTCGTATAGGATAC	pYK010 構築用プライマー。pYK009 をテン プレートとし、RBS を変えた。
YKp0040	CTCCTCTTTAATGTTTTTCGGTCAGTGCG	
YKp0041	GAAGTTATAGGAGGAAAAAATGGTGA GCAAGGGCGAGGAGG	pYK011 構築用プライマー。pYK010 をテン プレートとし、RBS と loxP を入れ替えた。
YKp0042	GTATAAAGTATCCTATACGAAGTTATCT TTAATGTTTTTCGGTCAGTGCG	

YKp0069	CCGAAAACATTTAAAGATAACTTCGTATA GCATACATTATACG	pYK023 構築用プライマー。pYK011 を YKp0041 & YKp0069 で増幅し、lox2272 を loxP に変えた。
YKp0083	ATACATTATACGAAGTTATCAGGCATCA AATAAACG	pYK028 構築用プライマー。pYK023 をテン プレートとし、loxP の方向を変えた。
YKp0084	GCTATACGAAGTTATCTCGAGTACTTG TACAGCTC	
YKp0072	CGAGCTGTACAAGGAGCTCGAGAAAAA AATCACTGG	ExoIII クローニングを用いた pYK029 構築用 プライマー。pYK028 を YKp0072 &
YKp0075	CTTGTAACAGCTCGTCCATGCCGCCGGT GG	YKp0089、pTVCK4 を YKp0075 & YKp0083 でそれぞれ増幅し、 <i>cat</i> 遺伝子を加えた。
YKp0089	CGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATC TCGAGTTATCCAC	
YKp0109	GAGAAAAAATCACTGG	pYK035 構築用プライマー。pYK029 をテン プレートとし、 <i>mcherry</i> を取り除いた。
YKp0110	CATTTTTTTCCTCCTATAAC	

λ-Red を用いたゲノム導入

No	Sequence	Construct
intC_	AGTTGTTAAGGTCGCTCACTCCACCTT	λ-Red で <i>floxed mcherry-cat-FRT-kan-FRT</i> (pYK029) または <i>cat-FRT-kan-FRT</i> (pYK035) を <i>intC</i> 部位に導入するためのプラ イマー。
PtetO1_	CTCATCAAGCCAGTCCGCCCATCCCT	
F3	ATCAGTGATAGAGATTG	
intC_R	CCGTAGATTTACAGTTCGTCATGGTTC GCTTCAGATCGTTGACAGCCGCAATT CCGGGGATCCGTCGACC	
oMU94	ACCTGCGTGAGCGTACTGGTAAGGCT GCTCGTATCAAAGAGCGTCTTAACGT GAGCAAGGGCGAGGA	pMU1 をテンプレートに <i>mcherry-FRT-kan-FRT</i> を <i>rplS</i> に融合する。
oMU107	GCCAGCCAATTGGCCAGCCCTTCTTAA CAGGATGTCGCTTAAGCGAAATCTTG TGTAGGCTGGAGCTGCT	
oMU92	GTTCTCAGGATCTGGCTTCCCAGGCG GAAGAAAGCTTCGTAGAAGCTGAGGT GAGCAAGGGCGAGGA	pMU2 をテンプレートに <i>mvenus-FRT-kan-FRT</i> を <i>rpsB</i> に融合する。

oMU108 TTGCCGCCTTTCTGCAACTCGAACTAT
 TTTGGGGGAGTTATCAAGCCTTATTG
 TGTAGGCTGGAGCTGCT

シーケンス確認のためのクローニングプライマー

No	Sequence	Construct
M13F	CAGGAAACAGCTATGAC	pMW118 由来のプラスミドのクローニングプライマー
pM1_pVT_seq_primer1	GGCACCCCAGGCTTTAC	
intC_check_F	GATCGATACTTGCTGTGGTTGATG	<i>intC</i> 部位のクローニングプライマー
intC_check_R2	CCTCTTAGTTAAATGGATATAACGAGCC CC	
oMU96	TCCAGACTCACTCTCCGGTAGT	<i>rplS</i> 部位のクローニングプライマー
oMU110	GACAAATTCCACGCAGCAATCTCAC	
oMU26	AAGCAAACAACCTGGGTATTCCGGT	<i>rpsB</i> 部位のクローニングプライマー
oMU28	CTCGCTCATCCCGGTCACTTACTGA	
rpoS_check_F	ATCGGCGGAACCAGGCTTTTGCTTG	<i>rpoS</i> 部位のクローニングプライマー
rpoS_check_R	AAAGGTCCGATGGGCATCGGACCTT	

Table S4: 3章の細胞株リスト.

親株及び PCR テンプレートゲノム

Name	Ancestor	Genotype	Plasmid	Resistance	Source
F3	W3110	$\Delta fliC \Delta fimA \Delta flu (\Delta F3)$			[96]
F3.intC::					
TmCherry6	F3	$intC::P_{LtetO1}-RBS_4-mcherry-FRT$			Wakamoto lab
F3.galK::					
TmCherry6	F3	$galK::P_{LtetO1}-RBS_4-mcherry-FRT$			Wakamoto lab

landing-pad-gfp を持つ遺伝子組換え中間体

Name	Ancestor	Genotype	Plasmid	Resistance	Source
YK0194	W3110	$\Delta F3_galK::landing\ pad-gfp$	pTKRED	Sm, Tc	This study
YK0195	W3110	$\Delta F3_intC::landing\ pad-gfp$	pTKRED	Sm, Tc	This study
YK0200	W3110	$\Delta F3_yqeC::landing\ pad-gfp$	pTKRED	Sm, Tc	This study
YK0209	W3110	$\Delta F3_attB::landing\ pad-gfp$	pTKRED	Sm, Tc	This study
YK0217	W3110	$\Delta F3_aslB::landing\ pad-gfp$	pTKRED	Sm, Tc	This study
YK0218	W3110	$\Delta F3_tam::landing\ pad-gfp$	pTKRED	Sm, Tc	This study

landing-pad-mcherry を持つ遺伝子組換え中間体

Name	Ancestor	Genotype	Plasmid	Resistance	Source
YK0196	W3110	$\Delta F3_galK::landing\ pad-gfp$	pTKRED	Sm, Tc	This study
YK0201	W3110	$\Delta F3_aslB::landing\ pad-gfp$	pTKRED	Sm, Tc	This study
YK0208	W3110	$\Delta F3_intC::landing\ pad-gfp$	pTKRED	Sm, Tc	This study
YK0210	W3110	$\Delta F3_attB::landing\ pad-gfp$	pTKRED	Sm, Tc	This study
YK0211	W3110	$\Delta F3_tam::landing\ pad-gfp$	pTKRED	Sm, Tc	This study
YK0220	W3110	$\Delta F3_yqeC::landing\ pad-gfp$	pTKRED	Sm, Tc	This study

Table S5: 3章のプラスミドリスト.

 λ -Red と I-SceI を用いた遺伝子組換えプラスミド [178]

Name	Backbone	Gene	Resistance	Source
pTKRED			Sm	[178]
pTKIP			Amp, Km	[178]
pTKS/CS			Tc, Cp	[178]

蛍光遺伝子を追加した pTKS/CS プラスミド

Name	Backbone	Gene	Resistance	Source
pTmCherryK6	pTKS/CS	<i>P_{LtetO1}-mcherry-FRT-kan-FRT</i>	Amp, Km	Wakamoto lab
pUA66-GFP	pTKS/CS	<i>rpsL-gfp</i>	Km	Wakamoto lab
pYK056	pTKS/CS	<i>tetA-mcherry</i>	Tc, Cp	This Study
pYK057	pTKS/CS	<i>tetA-gfp</i>	Tc, Cp	This Study

mcherry 導入用プラスミド (pTKIP-TC)

Name	Backbone	Gene	Resistance	Source
pYK051	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-mcherry-FRT-for-intC</i>	Amp	This Study
pYK052	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-mcherry-FRT-for-galK</i>	Amp	This Study
pYK053	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-mcherry-for-intC</i>	Amp	This Study
pYK054	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-mcherry-for-galK</i>	Amp	This Study
pYK061	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-mcherry for aslB</i>	Amp	This Study
pYK062	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-mcherry for tam</i>	Amp	This Study
pYK063	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-mcherry for yqeC</i>	Amp	This Study
pYK068	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-mcherry for attB</i>	Amp	This Study

gfp 導入用プラスミド (pTKIP-TG)

Name	Backbone	Gene	Resistance	Source
pYK064	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-gfp for intC</i>	Amp	This Study
pYK065	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-gfp for aslB</i>	Amp	This Study
pYK066	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-gfp for tam</i>	Amp	This Study
pYK067	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-gfp for yqeC</i>	Amp	This Study
pYK069	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-gfp for attB</i>	Amp	This Study
pYK070	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-gfp for galK</i>	Amp	This Study

遺伝子除去用プラスミド (pTKIP-del)

Name	Backbone	Gene	Resistance	Source
pYK060	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-mcherry</i>	Amp	This Study
pYK071	pTKIP	<i>P_{LtetO1}-gfp</i>	Amp	This Study
pYK072	pYK071	<i>deletion for attB</i>	Amp	This Study
pYK073	pYK071	<i>deletion for tam</i>	Amp	This Study
pYK074	pYK071	<i>deletion for aslB</i>	Amp	This Study
pYK075	pYK071	<i>deletion for galK</i>	Amp	This Study
pYK076	pYK071	<i>deletion for intC</i>	Amp	This Study
pYK077	pYK071	<i>deletion for yqeC</i>	Amp	This Study

lac 遺伝子導入用プラスミド (pTKIP-lac)

Name	Backbone	Gene	Resistance	Source
pYK081	pYK071	<i>lacZ for attB</i>	Amp	This Study
pYK082	pYK071	<i>lacZ for intC</i>	Amp	This Study
pYK083	pYK071	<i>lacZYA for intC</i>	Amp	This Study
pYK084	pYK071	<i>lac operon (lacIZYA) for intC</i>	Amp	This Study
pYK085	pYK071	<i>lacZ for galK</i>	Amp	This Study
pYK086	pYK071	<i>lacZYA for galK</i>	Amp	This Study
pYK087	pYK071	<i>lac operon for attB</i>	Amp	This Study
pYK088	pYK071	<i>lacZYA for attB</i>	Amp	This Study
pYK089	pYK071	<i>lac operon for galK</i>	Amp	This Study

Table S6: 3章のプライマーリスト.

蛍光を追加した pTKS/CS プラスミド構築

No	Sequence	Construct
YKp0205	TAGGGATAACAGGGTAATGATGGCGCC	
YKp0206	CTAAGCACTTGTCTCCTGTTTACTCCCC	ExoIII クローニングを用いた pYK056 構築用
YKp0207	GGAGACAAGTGCTTAGAGGAGGAAAAA AATGGTGAGC	プライマー。 pTKS/CS を YKp0205 & YKp0206 で増幅。 pTmCherryK6 を
YKp0208	TACCCTGTTATCCCTATTACTTGTACAG CTCGTCCATG	YKp0207 & YKp0208 で増幅。
YKp0211	TAGGGATAACAGGGTAATGATGGCGCC TCATCCCTG	
YKp0212	TTTTTTCCTCCTCTAAGCACTTGTCTCC	ExoIII クローニングを用いた pYK057 構築用
YKp0213	TAGAGGAGGAAAAAAATGAGTAAAGGA GAAGAACTTTTC	プライマー。 pTKS/CS を YKp0211 & YKp0212 で増幅。 pUA66-GFP を YKp0213
YKp0214	ACCCTGTTATCCCTATTATTTGTATAGT TCATCCATGC	& YKp0214 で増幅。

landing-pad-mcherry/gfp 導入用プライマー

No	Sequence	Construct
YKp0201	AGGTCGCTCACTCCACCTTCTCATCAA GCCAGTCCGCCCATAGGGATAACAGG GTAATGTACCATTTACG	<i>intC</i> 部位に <i>landing-pad-mcherry/gfp</i> を導入 するためのプライマー。 <i>mcherry</i> : YKp0201 & YKp0215、 <i>gfp</i> : YKp0201 & YKp0217。
YKp0215	CAGTTCGTCATGGTTCGCTTCAGATCG TTGACAGCCGCAATTACCCTGTTATC CCTATTACTTGTACAGC	homolog 配列を伸ばし導入効率を上げるため に PCR 産物を YKp0221 & YKp0222 で再増 幅した。
YKp0217	ACAGTTCGTCATGGTTCGCTTCAGATC GTTGACAGCCGCAATTACCCTGTTAT CCCTATTATTTGTATAG	
YKp0221	GTGCTATTCGATAGTTGTTAAGGTCGC TCACTCCACC	
YKp0222	CAAGCATTCGGTAGATTTACAGTTCGT CATGGTTCGC	

YKp0203	TCAGCGACAGCTTGCTGTACGGCAGG CACCAGCTCTTCCGTAGGGATAACAG GGTAATGTACCATTTACG	<i>galK</i> 部位に <i>landing-pad-mcherry/gfp</i> を導入するためのプライマー。 <i>mcherry</i> : YKp0203 & YKp0216、 <i>gfp</i> : YKp0203 & YKp0218。
YKp0216	GTCAGCGATATCCATTTTCGCGAATC CGGAGTGTAAGAAATTACCCTGTTAT CCCTATTACTTGTACAGC	
YKp0218	AGTCAGCGATATCCATTTTCGCGAAT CCGGAGTGTAAGAAATTACCCTGTTA TCCCTATTATTTGTATAG	
YKp0225	AAACAACCTTTTTGTCTTTTTACCTTCC CGTTTTCGCTCAAGTAGGGATAACAGG GTAATGTACCATTTACG	<i>attB</i> 部位に <i>landing-pad-mcherry/gfp</i> を導入するためのプライマー。 <i>mcherry</i> : YKp0225 & YKp0226、 <i>gfp</i> : YKp0225 & YKp0227。
YKp0226	TCCGGGCTATGAAATAGAAAAATGAAT CCGTTGAAGCCTATTACCCTGTTATCC CTATTACTTGTACAGC	homolog 配列を伸ばし導入効率を上げるために PCR 産物を YKp0270 & YKp0271 で再増幅した。
YKp0227	CTCCGGGCTATGAAATAGAAAAATGAA TCCGTTGAAGCCTATTACCCTGTTATC CCTATTATTTGTATAG	
YKp0270	GAAAATGTGTTTCACAGGTTGCTCCGGG CTATGAAATAG	
YKp0271	GGTATCACTTAAAGGTATTA AAAACAA CTTTTTGTCTT	
YKp0228	CCTTAACGTATTGAAGGATGACTTCAG GCAAGGAGCGACCTAGGGATAACAGG GTAATGTACCATTTACG	<i>aslB</i> 部位に <i>landing-pad-mcherry/gfp</i> を導入するためのプライマー。 <i>mcherry</i> : YKp0228 & YKp0229、 <i>gfp</i> : YKp0228 & YKp0230。
YKp0229	CGCCGCATCCGGCAATCAACCGCAGGC GGCCGCCGATTTATTACCCTGTTATCC CTATTACTTGTACAGC	homolog 配列を伸ばし導入効率を上げるために PCR 産物を YKp0268 & YKp0269 で再増幅した。
YKp0230	ACGCCGCATCCGGCAATCAACCGCAGG CGGCCGCCGATTTATTACCCTGTTATC CCTATTATTTGTATAG	
YKp0268	GCCCCACGGTATGATTTCCGCCCTAAC GTATTGAAGG	

YKp0269	GTAGGCCGGATAAGGCGTTTACGCCGC ATCCGGCAATC	
YKp0231	TTATCTACAATTGGGGTAACGCGCTGA CGGGAGTAAAAAATAGGGATAACAGG GTAATGTACCATTTACG	<i>tam</i> 部位に <i>landing_pad-mcherry/gfp</i> を導入するためのプライマー。 <i>mcherry</i> : YKp0231 & YKp0232、 <i>gfp</i> : YKp0231 & YKp0233。
YKp0232	AAAAATTCTTCCCGATCGTCATTACCA GCTGACGTGATATATTACCCTGTTAT CCCTATTACTTGTACAG	homolog 配列を伸ばし導入効率を上げるために PCR 産物を YKp0272 & YKp0273 で再増幅した。
YKp0233	AAAAATTCTTCCCGATCGTCATTACCA GCTGACGTGATATATTACCCTGTTAT CCCTATTATTTGTATAG	
YKp0272	GTGAGGCGAATTTATCAATTTTATCTA CAATTGGGGTAAC	
YKp0273	GATGAAGCCGAAATTCCAGCAAAAATT CTTCCCGATCG	
YKp0234	AAGTTGGGGATAATTTATCCCAGAGAG GTCATAAAGACTCTAGGGATAACAGG GTAATGTACCATTTACG	<i>yqeC</i> 部位に <i>landing_pad-mcherry/gfp</i> を導入するためのプライマー。 <i>mcherry</i> : YKp0234 & YKp0235、 <i>gfp</i> : YKp0234 & YKp0236。
YKp0235	TCAATGGATATCCTTTCAGTAACCCGG AATACCCGGGCCGATTACCCTGTTAT CCCTATTACTTGTACAG	homolog 配列を伸ばし導入効率を上げるために PCR 産物を YKp0274 & YKp0275 で再増幅した。
YKp0236	TCAATGGATATCCTTTCAGTAACCCGG AATACCCGGGCCGATTACCCTGTTAT CCCTATTATTTGTATAG	
YKp0274	GAAAATATTCATACCAACCTCAATGGA TATCCTTTCAG	
YKp0275	GCGTACTTCCTGATGGATTAAGTTGG GGATAATTTATC	

pTKIP-TC プラスミド構築

No	Sequence	Construct
YKp0183	CGATCTGAAGCGATAGGGATAACAGGG TAATGCAGGATGC	ExoIII クローニングを用いた pYK051 構築用プライマー。 pTKIP を用いて YKp0183 &
YKp0184	CTTGATGAGAAGGATTACCCTGTTATC CCTAAGGTGGCAC	YKp0184、 W3110_ <i>intC</i> :: <i>Tmcherry6</i> ゲノムを用いて YKp0185 & YKp0186 でそれぞれ増幅

YKp0185	ATCCTTCTCATCAAGCCAGTCC	
YKp0186	TATCGCTTCAGATCGTTGACAG	
YKp0187	GGATTCGCGAAAATAGGGATAACAGGG TAATGCAGGATGC	ExoIII クローニングを用いた pYK052 構築用 プライマー。 pTKIP を用いて YKp0187 &
YKp0188	TGCCTGCCGTACAATTACCCTGTTATCC CTAAGGTGGCAC	YKp0188、 W3110_ <i>galK::Tmcherry6</i> ゲノム を用いて YKp0189 & YKp0190 でそれぞれ増 幅
YKp0189	ATTGTACGGCAGGCACCAGCTC	
YKp0190	TATTTTCGCGAATCCGGAGTG	
YKp0180	TGCGGCTGTCAACGATCTGAAG	pYK053、 pYK054 構築用プライマー。
YKp0181	TAGAAACGCAAAAAGGCCATCCG	pYK051 を YKp0180 & YKp0181 で増幅した
YKp0182	TTCTTACACTCCGGATTCGCG	(YKp053)。 pYK052 を YKp0182 & YKp0181 で増幅した (YKp054)。
YKp0256	CCTGCGGTTGATTAGGGATAACAGGGT AATGCAGGATGCTGCTGGCTAC	ExoIII クローニングを用いた pYK061 構築用 プライマー。 pYK053 を用いて YKp0256 &
YKp0257	CTGAAGTCATCCATTACCCTGTTATCCC TAAGGTGGCACTTTTCGGGG	YKp0257、 YKp0258 & YKp0259 でそれぞれ 増幅
YKp0258	ATGGATGACTTCAGGCAAGGAGCGACC TCCCTATCAGTGATAGAG	
YKp0259	TAATCAACCGCAGGCGGCCGCGGATTT TAGAAACGCAAAAAGGCC	
YKp0260	TGGTAATGACGATAGGGATAACAGGGT AATGCAGGATGCTGCTGGCTAC	
YKp0261	TCAGCGCGTTACATTACCCTGTTATCC CTAAGGTGGCACTTTTCGGGG	ExoIII クローニングを用いた pYK062 構築用 プライマー。 pYK053 を用いて YKp0260 &
YKp0262	ATGTAACGCGCTGACGGGAGTAAAAA TCCCTATCAGTGATAGAG	YKp0261、 YKp0262 & YKp0263 でそれぞれ 増幅
YKp0263	TATCGTCATTACCAGCTGACGTGATATT AGAAACGCAAAAAGGCC	
YKp0264	CCGGGTTACTGATAGGGATAACAGGGTA ATGCAGGATGCTGCTGGCTAC	ExoIII クローニングを用いた pYK063 構築用 プライマー。 pYK053 を用いて YKp0264 &
YKp0265	CTCTCTGGGATAATTACCCTGTTATCCC TAAGGTGGCACTTTTCGGGG	YKp0265、 YKp0266 & YKp0267 でそれぞれ 増幅
YKp0266	ATTATCCCAGAGAGGTCATAAAGACTCT CCCTATCAGTGATAGAG	

YKp0267	TATCAGTAACCCGGAATACCCGGGCCGT AGAAACGCAAAAAGGCC	
YKp0277	TTCATTTTTCTATAGGGATAACAGGGT AATGCAGGATGCTGCTGGCTAC	ExoIII クローニングを用いた pYK068 構築用 プライマー。 pYK053 を用いて YKp0277 &
YKp0278	GGAAGGTAAAAAATTACCCTGTTATCCC TAAGGTGGCACTTTTCGGGG	YKp0278、YKp0279 & YKp0280 でそれぞれ 増幅
YKp0279	ATTTTTTACCTTCCCGTTTCGCTCAAGT CCCTATCAGTGATAGAG	
YKp0280	TATAGAAAATGAATCCGTTGAAGCCTT AGAAACGCAAAAAGGCC	

pTKIP-TG プラスミド構築

No	Sequence	Construct
YKp0024	CAGGCATCAAATAAAACGAAAGG	ExoIII クローニングを用いた pTKIP-TG プラ スミド構築用のプライマー。 各 pTKIP-TC
YKp0040	CTCCTCTTTAATGTTTTTCGGTCAGTGCG	プラスミドを YKp0024 & YKp0040 で増幅。 pUA66-GFP を YKp0247 & YKp0276 で増幅
YKp0247	ACATTAAAGAGGAGGAAAAAAATGAGT AAAGGAGAAGAAC	した。
YKp0276	TTATTTGATGCCTGTTATTTGTATAGTT CATCCATGCC	

pYK071 プラスミド構築

No	Sequence	Construct
YKp0142	CACATTTCCCGAAAAGTGC	ExoIII クローニングを用いた pYK060 構築用 プライマー。 pTKIP を YKp0244 &
YKp0243	CGCGGAACCCCTATTTG	YKp0245 で増幅。 pTmCherryK6 を YKp0142 & YKp0243 で 増幅して <i>mcherry</i> を 導入した。
YKp0244	AATAGGGGTTCCGCGTACTTGTACAG CTCGTCCATGC	
YKp0245	TTTCGGGGAAATGTGTCCCTATCAGTG ATAGAGATTGAC	
YKp0040	CTCCTCTTTAATGTTTTTCGGTCAGTGC G	ExoIII クローニングを用いた pYK071 構築用 プライマー。 pYK060 を YKp0040 &
YKp0246	AATAGGGGTTCCGCGTATTTGTATAG TTCATCCATGCC	YKp0243 で増幅。 pUA66-GFP を YKp0246 & YKp0247 で 増幅して <i>mcherry</i> を <i>gfp</i> に入れ 替えた。

pTKIP-del プラスミド構築

No	Sequence	Construct
YKp0283	AAATCGGCGGCCGCTGCGGTTGATTA GGGATAACAGGGTAATGCAGGATGCT GCTGGCTAC	pYK075 構築用プライマー。pYK071 をテンプレートとした。
YKp0284	GGTCGCTCCTTGCCTGAAGTCATCCAT TACCCTGTTATCCCTAAGGTGGCACT TTTCGGGG	
YKp0285	AGGCTTCAACGGATTCATTTTTCTATAG GGATAACAGGGTAATGCAGGATGCTG CTGGCTAC	pYK072 構築用プライマー。pYK071 をテンプレートとした。
YKp0286	CTTGAGCGAAACGGGAAGGTAAAAAAT TACCCTGTTATCCCTAAGGTGGCACT TTTCGGGG	
YKp0287	TTCTTACACTCCGGATTCGCGAAAATA GGGATAACAGGGTAATGCAGGATGCT GCTGGCTAC	pYK073 構築用プライマー。pYK071 をテンプレートとした。
YKp0288	CGGAAGAGCTGGTGCCTGCCGTACAAT TACCCTGTTATCCCTAAGGTGGCACT TTTCGGGG	
YKp0289	TGCGGCTGTCAACGATCTGAAGCGATA GGGATAACAGGGTAATGCAGGATGCT GCTGGCTAC	pYK076 構築用プライマー。pYK071 をテンプレートとして YKp0289 & YKp0290 で増幅した。作られたプラスミドに変異が入っていたため、YKp0295 & YKp0296 で増幅し修正した。
YKp0290	TGGGCGGACTGGCTTGATGAGAAGGAT TACCCTGTTATCCCTAAGGTGGCACT TTTCGGGG	
YKp0295	CCGCCCATGCGGCTGTCAAC	
YKp0296	CAGCCGCATGGGCGGACTGG	
YKp0291	ATATCACGTCAGCTGGTAATGACGATAG GGATAACAGGGTAATGCAGGATGCTG CTGGCTAC	pYK074 構築用プライマー。pYK071 をテンプレートとした。
YKp0292	TTTTTTACTCCCGTCAGCGCGTTACATT ACCCTGTTATCCCTAAGGTGGCACTT TTTCGGGG	

YKp0293	CGGCCCGGGTATTCGGGTTACTGATA GGGATAACAGGGTAATGCAGGATGCT GCTGGCTAC	pYK077 構築用プライマー。 pYK071 をテンプレートとして YKp0293 & YKp0294 で増幅した。 作られたプラスミドに変異が入っていたため、 YKp0297 & YKp0298 で増幅し修正した。
YKp0294	GAGTCTTTATGACCTCTCTGGGATAAT TACCCTGTTATCCCTAAGGTGGCACT TTTCGGGG	
YKp0297	GGTACTGATAGGGATAACAGGGTAAT GCAGGATGCTGCTGGCTACCCTG	
YKp0298	CCCTATCAGTAACCCGGAATACCCGGG CCGGAGTCTTTATGACCTCTCTG	

pTKIP-lac プラスミド構築

No	Sequence	Construct
YKp0315	CGGAAGAGCTGGTGCCTGCCGTAC	ExoIII クローニングを用いた pYK085、
YKp0316	GCACCAGCTCTTCCGGCGCAACGCAAT TAATGTGAGTTAG	pYK086、pYK089 構築用。 pYK075 を YKp0182 & YKp0315 で増幅する。 インサート配列は W3110 ゲノムを YKp0316 &
YKp0317	TCCGGAGTGTAAGAATTATTTTTGACA CCAGACCAACTGG	YKp0317 (<i>lacZ</i>)、 YKp0316 & YKp0318
YKp0318	TCCGGAGTGTAAGAAGGCATGATGCGA CGCTTGTTCTCTGC	(<i>lacZYA</i>)、 YKp0319 & YKp0318 (<i>lac operon</i> (<i>lacIZYA</i>)) で増幅した。
YKp0319	GCACCAGCTCTTCCGGACACCATCGAA TGGCGCAAACC	
YKp0320	TGGGCGGACTGGCTTGATGAG	ExoIII クローニングを用いた pYK082、
YKp0321	AAGCCAGTCCGCCAGCGCAACGCAAT TAATGTGAGTTAG	pYK083、pYK084 構築用。 pYK076 を YKp0180 & YKp0320 で増幅する。 インサート配列は W3110 ゲノムを YKp0321 &
YKp0322	TCGTTGACAGCCGCATTATTTTTGACA CCAGACCAACTGG	YKp0322 (<i>lacZ</i>)、 YKp0321 & YKp0323
YKp0323	TCGTTGACAGCCGCAGGCATGATGCGA CGCTTGTTCTCTGC	(<i>lacZYA</i>)、 YKp0324 & YKp0323 (<i>lac operon</i> (<i>lacIZYA</i>)) で増幅した。
YKp0324	AAGCCAGTCCGCCAGACACCATCGAA TGGCGCAAACC	
YKp0325	AGGCTTCAACGGATTCATTTTTTC	ExoIII クローニングを用いた pYK081、
YKp0326	CTTGAGCGAAACGGGAAGG	pYK087、pYK088 構築用。 pYK072 を YKp0325 & YKp0326 で増幅する。 インサート配列は W3110 ゲノムを YKp0327 &
YKp0327	CCCGTTTCGCTCAAGGCGCAACGCAAT TAATGTGAGTTAG	

YKp0328	AATCCGTTGAAGCCTTTATTTTTGACA CCAGACCAACTGG	YKp0328 (<i>lacZ</i>), YKp0327 & YKp0329 (<i>lacZYA</i>), YKp0330 & YKp0329 (<i>lac operon</i> (<i>lacIZYA</i>)) で増幅した。
YKp0329	AATCCGTTGAAGCCTGGCATGATGCGA CGCTTGTTCTCTGC	
YKp0330	CCCGTTTCGCTCAAGGACACCATCGAA TGGCGCAAAACC	

シーケンス確認用クローニングプライマー

No	Sequence	Construct
YKp0167	ATAAGGGCGACACGGAAATG	pTKIP プラスミドのクローニングプライマー
YKp0168	AGATGTAGGTGTTCCACAGG	YKp0167 & YKp0168: pTKIP プラスミド;
YKp0220	GAAGACCATACGCGAAAAGTAG	YKp0220 & YKp0168: pYK071 プラスミド
intC_ check_F	GATCGATACTTGCTGTGGTTGATG	<i>intC</i> 部位のクローニングプライマー
intC_ check_R2	CCTCTTAGTTAAATGGATATAACGAGCC CC	
galK_ check_F2	GTCGCACCCCAGTCCATCAG	<i>galK</i> 部位のクローニングプライマー
galK_ check_R2	AATGCTGGCAGAGACCCAGC	
YKp0345	CAGAGACCCAGCGAGACC	
YKp0248	TGCTGACGCATCTTATCCAG	<i>aslB</i> 部位のクローニングプライマー
YKp0249	TTTCTGTGCATTTTCGTCACC	
YKp0252	GTGTGCGGAAACTGGAATCT	<i>tam</i> 部位のクローニングプライマー
YKp0253	CCATCTGCAACGCTATTGAA	
YKp0254	CTTCGAGTTTTGCAGCCTCT	<i>yqeC</i> 部位のクローニングプライマー
YKp0255	TCCGGCAGCGGTAATTATAC	
YKp0281	TCAGAAGGACGTTGATCGGG	<i>attB</i> 部位のクローニングプライマー
YKp0282	TTTTTACCGTTCACGCGCTG	
YKp0337	GAACGATCGCCAGTTCTGT	<i>lac</i> 遺伝子のクローニングプライマー
YKp0344	AAAAATCCATTTTCGCTGGTG	
YKp0346	CAATGCTTTGCGAGATACCC	<i>gfp</i> 遺伝子のクローニングプライマー
YKp0347	AAAGGGCAGATTGTGTGGAC	

lac 遺伝子配列確認用プライマー

No	Sequence	Construct
YKp0332	GATGGCGGAGCTGAATTAC	
YKp0333	ATGCTGAATGAGGGCATC	
YKp0334	GGCGTTACCCAACTTAATCG	シーケンス確認用プライマー
YKp0335	GACGTCTCGTTGCTGCATA	<i>lacZ</i> : YKp0334-YKp0337
YKp0336	GCCTGTATGTGGTGGATGA	<i>lacZYA</i> : YKp0334-YKp0341
YKp0338	GACATTGGCGTAAGTGAAGC	<i>lac</i> operon: YKp0332-YKp0341
YKp0339	CAGCAACTGATGGAAACCAG	
YKp0340	GCCAGCAGTAGAGGCATTT	
YKp0341	CGCTGGAAGTGTTATTCTG	