

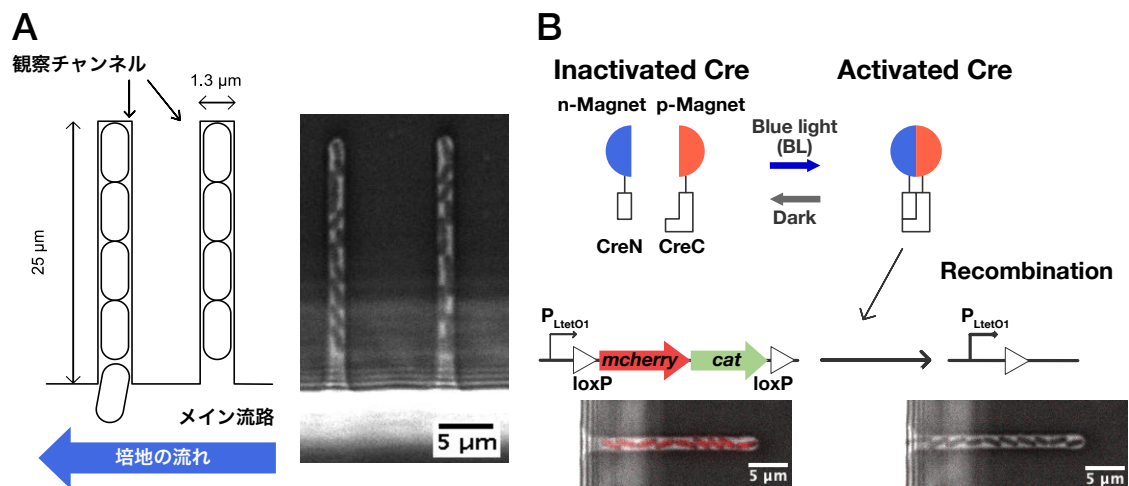
## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 小金澤 優太

ある環境での細胞の表現型を遺伝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遺伝学の重要な課題の一つであり、古くから多くの研究によって調べられてきた。従来、遺伝型-表現型の対応関係は、ノックアウトや突然変異といった方法で遺伝型に変化を与えた細胞の表現型を、元の遺伝型をもつ細胞の表現型と比較することによって調べられてきた。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を与える遺伝子組換え技術、細胞の表現型を測定する技術が不可欠であり、これらの技術は現在に至るまで発展を続けている。しかしながら、この遺伝型-表現型の対応関係の評価では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、比較してきた。そのため、遺伝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。また、組換え前の一細胞レベルの表現型がその後の表現型に及ぼす影響についてはほとんど調べられてこなかった。さらに、致死的な遺伝子変異に対して細胞が適応できるのかという問題に対してもいまだに十分に調べられていない。

これらの問題を明らかにすることを目指して、本博士論文の2章では遺伝子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尾観察するため、マイクロ流体デバイス mother machine (Fig. 1A)と青色光で遺伝子組換え酵素を制御する光遺伝学を利用した Photoactivatable Cre (PA-Cre)システム (Fig. 1B)を組合せた実験系を構築した。この実験系を用いて、クロラムフェニコール(Cp)耐性遺伝子 *chloramphenicol acetyltransferase (cat)*をゲノム上に導入した大腸菌



**Fig. 1 mother machine** マイクロ流体デバイスと PA-Cre システムの概略図. (A) mother machine の概略図。観察チャンネルでは細胞が捕捉されている。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、もう一方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る。(B) PA-Cre の概略図。青色光照射により Cre が組換え活性を取り戻して目的遺伝子 *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照射前と照射後の大腸菌の画像である。

に対して Cp 環境下で耐性遺伝子を除去し、その後の細胞の成長や遺伝子発現の変化を観察した。

まず Cp のない環境下でこの実験系の評価を行なった。耐性タンパク質 CAT の量を観察するため蛍光タンパク質 mCherry を融合した mCherry-CAT を用いた。*mcherry-cat* 遺伝子を導入した大腸菌に対して 30 分の青色光照射したところ、25%の系列が遺伝子の除去に成功した。また、青色光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* 遺伝子を除去したところ、Cp のない場合と同様に 25%の系列で *mcherry-cat* 遺伝子が失われたことを確認した。耐性遺伝子を失った細胞系列のうち 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 30 世代以上、分裂を継続した (Fig. 2)。この Cp に対する適応は適応的な変異の獲得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。

遺伝子除去によって新たな mCherry-CAT の生産が停止した場合、30 回の分裂でタンパク質量は  $2^{30} \sim 10^9$  倍に希釈される。大腸菌一細胞を構成する全タンパク質は  $10^6$  から  $10^7$  個程度と見積もられているため、細胞質に mCherry-CAT が残留しているとは考えにくい。そのため、この耐性遺伝子の除去に抗した適応を理解するには mCherry-CAT 以外の細胞の発現状態の変化を観察する必要がある。そこで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

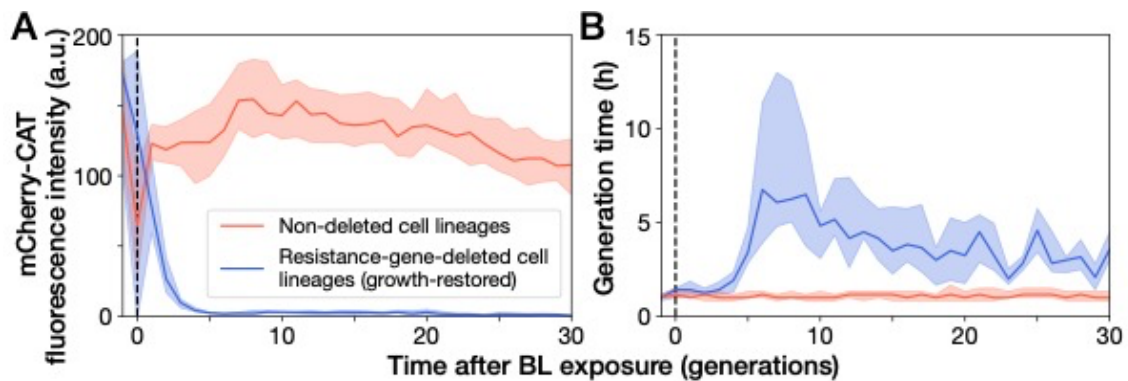


Fig. 2 Cp 環境下での耐性遺伝子を除去した細胞の mCherry-CAT 蛍光輝度値と世代時間の変化. (A) mCherry-CAT の蛍光輝度値. (B) 細胞の世代時間。線と影の領域はそれぞれ中央値と 25-75%の領域を表す。赤色は耐性遺伝子を失わなかった細胞系列、青色は耐性遺伝子を失った後も分裂を継続した細胞系列を表す。横軸は青色光照射後の世代に対応する。

変化を観察した。リボソームのデュアルレポーター株(*rplS-mcherry*, *rpsB-mvenus*) に PA-Cre システムで除去可能な *cat* 遺伝子を持つ細胞株を構築した。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 の蛍光輝度値の量比が崩れた。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 guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate および guanosine 5'-triphosphate 3'-diphosphate (総称して (p)ppGpp)のレポーターである RpoS の発現量変化を観察した。RpoS レポーター株 (*rpoS-mcherry* 遺伝子) を用いた実験から、Cp 環境下で *cat* 遺伝子を失うと RpoS の量が低下することを確認した。また、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時に RpoS の量が多かった。

これらの結果は致死的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。耐性遺伝子を除去された細胞では、CAT 以外のリボソームタンパク質や RpoS の発現量も変化していた。リボソーム遺伝子を含むオペロンには RNA ポリメラーゼ遺伝子なども含まれている。また、*rpoS* 遺伝子の制御因子の 1 つである (p)ppGpp や RpoS 自身は細胞の遺伝子発現状態をグローバルに変化させる。そのためこれらの因子の変動は *cat* 遺伝子以外の発現状態も一緒に変化することで適応的な状態を獲得していたことを示している。一方でたとえ事前に Cp に曝していても 60%程度の耐性遺伝子を失った細胞系列は Cp 環境下で分裂を継続できなかったことから適応的な状態に至るかどうかは確率的であり、その割合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が示唆される。

また、本研究論文の 3 章では既存の大腸菌に対する遺伝子組換え技術を改良し、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。遺伝型-表現型の対応関係の

探索には遺伝子組換え技術が不可欠である。特にゲノム上に意図した遺伝子を導入、除去できることは遺伝学だけでなく、進化学や分子生物学の発展の面からも重要である。従来、大腸菌でよく用いられる遺伝子組換え技術では意図した配列の他に数 10 bp ほどの意図しない配列(スカー配列)が残存する欠点があった。

一方、近年ではスカー配列が残らないスカーレスな遺伝子組換え法が発展してきている。その一つが H. Tas らによって開発された  $\lambda$ -Red と I-SceI を用いた遺伝子組換え手法である。この手法ではまず目的のゲノム上の組換え部位にテトラサイクリン耐性遺伝子 *tetA* 遺伝子を導入した中間体を作製する。この *tetA* 遺伝子は両端にメガ制限酵素である I-SceI の認識配列を持っている。さらに I-SceI 認識配列で挟まれた目的遺伝子を持つプラスミドをこの中間体に導入し、I-SceI を誘導することでプラスミドとゲノムをそれぞれ切断する。切断してできたゲノムと目的遺伝子の断片を  $\lambda$ -Red システムを利用して結合することで目的遺伝子を導入した細胞を取得できる。しかしこの手法は遺伝子組換え部位によっては効率が悪いという欠点があった。

そこで本研究ではこの遺伝子組換えの改良を行った。今回の改良では組換え効率をあげるのではなく、蛍光タンパク質を利用して、遺伝子組換えの成否をコロニーの蛍光で識別できる手法の構築を目指した。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、遺伝子導入部位によらず蛍光を発することを確認した。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 か所に対してスカーレスに導入する実験を行った。組換えの効率を測定したところ染色体上の位置によって組換え効率は 3.8% から 98.9% と様々だったものの、中間体の蛍光の有無から識別することで 70% 以上の確率で目的遺伝子が導入されたコロニーを選択できた。また、スカーレスな遺伝子除去でも構築した手法が適応できることを確認した。

さらに H. Tas らの手法では 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 (lacI-lacZYA)* 遺伝子の導入を行った。どの導入配列でも遺伝子導入できることを確認し、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。

本研究で構築した手法はより効率よく組換え細胞を取得するだけでなく、今後蛍光活性化セルソーティング(FACS)などと組み合わせてコロニーを介さない組換え細胞の作製にも活用できる。従来の研究では意図せずとも行ってきた寒天培地上でコロニーを選択するという手順がその後の細胞の表現型に与える影響を調べることで、遺伝型-表現型の対応関係の履歴依存性を理解することにもつながるだろう。

本博士論文では致死的な遺伝子変異に対しても大腸菌が適応できることを示した。さらに適応できるかどうかは変異の入るタイミングや細胞が曝された環境の履歴に依存した。遺伝型-表現型対応の履歴依存性に対する知見は未だ限られており、本研究で構築した一細胞計測と光遺伝子操作の組合せや蛍光を用いた遺伝子組換え技術はこの履歴依存性の新たな知見を得るための手法として活用できるだろう。