

博士論文番号：0981014

網羅的な遺伝的相互作用解析に向けた
大腸菌の高効率二重欠失法と高精度生育測定法の開発

竹内 力矢
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 システム微生物学研究室
(森 浩禎 教授)

平成 27 年 01 月 20 日提出

目次

目次	2
第1章 序論	5
1.1 頑強性と遺伝的相互作用	5
1.2 網羅的な遺伝的相互作用解析	6
1.3 課題設定	7
1.4 本研究の位置付け	7
第2章 高密度・高精度コロニー定量測定方法の開発	10
2.1 緒言	10
2.2 材料と方法	12
2.2.1 培地及び試薬	12
2.2.2 使用菌株及びプラスミド	12
2.2.3 使用したソフトウェア	12
2.2.4 統計処理	12
2.2.5 コロニー画像取得方法	13
2.2.6 寒天培地上でのコロニー増殖測定方法	13
2.2.7 液体培地での増殖測定方法	13
2.3 結果	14
2.3.1 コロニー撮影装置の検討	14
2.3.2 コロニー定量式の検討	15
2.3.3 コロニーの増殖モデル式と増殖特性値	16
2.3.4 Neighbor effect の低減	18
2.3.5 Colony-live の構築	20
2.3.6 従来法との比較	22
2.3.7 LTG と SPG の補正	26

2.3.8	増殖動態による分類.....	28
2.3.9	システイン合成経路の重要性.....	33
2.4	考察.....	34
第3章	高効率二重欠失法の開発.....	37
3.1	緒言.....	37
3.2	材料と方法.....	39
3.2.1	使用菌株及びプラスミド.....	39
3.2.2	クローニング.....	39
3.2.3	液体での接合.....	40
3.2.4	GI plate set の作製.....	40
3.2.5	Keio collection の遺伝子欠失状況の解析.....	40
3.2.6	ロボットによる寒天培地への植菌方法.....	41
3.3	結果.....	42
3.3.1	CIP の構築.....	42
3.3.2	各種 SKO-Hfr 株による SKO の接合伝達効率.....	45
3.3.3	ハイスループットな SKO-Hfr 株作製法の検討.....	46
3.3.4	ハイスループットな DKO 作製法の検討.....	48
3.3.5	DKO 作製時の薬剤耐性獲得コロニーの判定.....	52
3.3.6	DKO 用の SKO ストック (GI plate set) の作製.....	53
3.3.7	DKO 作製法の評価.....	56
3.4	考察.....	58
第4章	網羅的な遺伝的相互作用解析.....	60
4.1	緒言.....	60
4.2	材料と方法.....	61
4.2.1	網羅的な遺伝的相互作用の解析方法.....	61

4.2.2	遺伝的相互作用スコアの計算.....	61
4.2.3	遺伝子相互作用情報の整理.....	61
4.3	結果.....	62
4.3.1	網羅的な遺伝的相互作用解析.....	62
4.3.2	遺伝的相互作用データに含まれる機能的相互関係.....	63
4.3.3	代謝シミュレーションの生育予測との比較.....	65
4.3.4	遺伝的相互作用と染色体距離.....	68
4.4	考察.....	71
	謝辞.....	73
	参考文献.....	74

第1章 序論

1.1 頑強性と遺伝的相互作用

ゲノム解析研究開始以降、ハイスループット技術は飛躍的な進歩を遂げ、多くのゲノムワイドな研究データが蓄積されている。多種多様な生物情報データベースの整備も進み、個々の遺伝子機能のみならず、遺伝子間の複雑な相互作用を統合的にシステムレベルで捉える研究が可能となってきた。生体システムとしての挙動の1つには頑強性（ロバスト性）がある (Kitano, 2002)。頑強性は環境変化・突然変異・ウイルス感染などに曝される生物の恒常性を保つために重要な生命の機能である。また、頑強性は生体が新しい機能を獲得して進化するためにも重要だとも考えられている (Kitano, 2004)。このように、頑強性は生体にとって欠かせない特徴である。生物における頑強性は網羅的な一遺伝子欠失から実験的に明らかとなってきている。大腸菌 (Baba et al., 2006)、枯草菌 (Kobayashi et al., 2003)、出芽酵母 (Giaever et al., 2002)、線虫 (Kamath et al., 2003) における研究では、ほとんどの遺伝子の単一欠失 (Single knockout: SKO) では表現型がでない。

頑強性を生み出す1つの要因として考えられているのは、代替経路（代替酵素）の存在である (Gu et al., 2003)。すなわち、ある遺伝子を SKO しても paralog 遺伝子、isozyme、並列経路などによって補償されるため、増殖変化は観測されない。しかし、二つの遺伝子を同時に欠失した (Double knockout: DKO) 場合、経路が完全に遮断されるため頑強性が崩壊して顕著な増殖変化が生じる。例えば個々の SKO では増殖に影響がなかったものの DKO すると致死にいたる「合成致死ペア」や SKO では増殖が低下したものの DKO すると生育が良くなる「サプレッサー変異」などである。このような個体の表現型に影響を与える複数の遺伝子座間の相互作用は一般にエピスタシス (epistasis) とよばれる。エピスタシスの中でも、特に増殖変化の観測により解析される相互作用は遺伝的相互作用 (Genetic interaction: GI) とよばれている (図 1.1)。遺伝子座間の相互作用により生育が悪くなる場合 (合成致死など) は負の遺伝的相互作用 (Negative GI)、逆に生育が良くなる場合 (サプレッサー変異など) は正の遺伝的相互作用 (Positive GI) と定義される (Dixon et al., 2009)。遺伝的相互作用の研究は歴史的に長く、これまでに多くの合成致死やサプレッサー変異が解明されている。しかしながら、遺伝子の組み合わせ数は膨大であり、1つ1つの DKO 株の作製には長い日数を要するため、解析領域は限られた一部分に留まっていた。

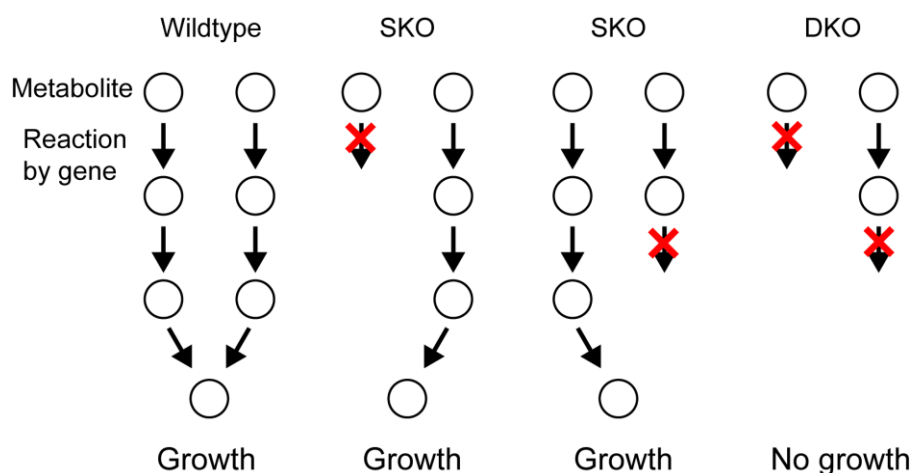


図 1.1 二重欠失による遺伝的相互作用解析の概念（合成致死の場合）

通常生物は生命維持に必須な代謝産物を合成するのに複数の経路を持つ。単一遺伝子欠失（SKO）により、一つの酵素遺伝子を破壊してその経路を遮断しても、他の経路がその反応を補償し、必須代謝産物は合成され、細胞は死に至らない。しかし、二重欠失（DKO）により、それらの経路が同時に遮断されると必須代謝産物が合成できず、細胞は死に至る。このような関係にある遺伝子ペアには負の遺伝的相互作用があるという。

1.2 網羅的な遺伝的相互作用解析

膨大な量の DKO 株を効率的に作製する技術がここ 15 年で非常に進歩した。まず SKO 株ライブラリーの整備が進み、次に大量の SKO 株同士を接合させて大量の DKO 株を効率的に作製できる植菌操作ロボットが開発された。また大量の DKO 株の細胞生育量を効率的に定量できる測定手法も開発された。出芽酵母では 2000 年に SKO 株ライブラリーが構築された後、SKO 株同士の接合による効率的な DKO 株の作製が開始され(Tong et al., 2001)、これまでに全遺伝子ペアの 75 %の GI 解析データが蓄積されている(Costanzo et al., 2010) (DKO の欠失順序を無視した場合)。網羅的な GI 解析によって遺伝子機能や遺伝子属する細胞内経路を推定できることが示唆されたことで(Tong et al., 2004)、有用な omics データとして認知されるようになった。出芽酵母をかわきりに他生物でも GI 解析が次々と報告され始めている(Dixon et al., 2009)。

大腸菌は現在においても非常に重要な原核単細胞モデル生物であり、現実の生産菌であるだけでなく、システム生物学、合成生物学における研究対象としてますますその重要性が増してきている。当研究室では大腸菌の SKO 株ライブラリーの構築を進め、2006 年に SKO 株ライブラリーを構築した(Baba et al., 2006)。あとは、

大腸菌同士を接合させるための技術を開発することで、網羅的な遺伝的相互作用解析が可能となる。

1.3 課題設定

大腸菌ゲノムには約 4000 遺伝子が存在するので、全二重欠失ペアの組み合わせは 800 万 (${}_{4000}C_2 = 8 \times 10^6$) にも及ぶ。そのため、二重欠失株の作製と生育測定はハイスループットにおこなうことが必須である。しかし、一般的にスループットを高めると測定データの質が犠牲となってしまう。測定データの質は網羅的な実験（ゲノムワイドなスクリーニング）において特に重要である。例えば、手技のバイアスによりゲノムワイドに均一な測定ができない場合は誤った情報が得られる可能性があり、測定の精度が悪い場合は統計的解析によって得られる情報が少ない。そのため、ゲノムワイドな実験においては測定データの質を向上させることで信頼性が大きく向上し、得られる情報が飛躍的に有用になる。

本研究では大腸菌の DKO 作製法と生育測定法のスループットを高めると同時に、現行法における問題点を精査してバイアスやノイズを低減することを目的とした。第 2 章では高密度かつ高精度なコロニー定量測定方法を開発した。第 3 章では高効率な DKO 作製法を開発した。第 4 章では開発した方法を用いて網羅的な GI 解析に向けた評価実験を行った。

1.4 本研究の位置付け

大腸菌では、酵母と同様に、これまでに transcriptome 解析で転写ネットワーク (Salgado et al., 2012)、proteome 解析でタンパク質間の相互作用ネットワーク (Arifuzzaman et al., 2006; Butland et al., 2005; Rajagopala et al., 2014)、metabolome 解析で代謝ネットワーク (Ohashi et al., 2008) などの網羅的な解析が進められるようになってきた。また、ECOGENE (<http://www.ecogene.org/>), ASAP (<http://www.genome.wisc.edu/tools/asap.htm>), PortEco (<http://www.porteco.org/>), EcoCyc (<http://ecocyc.org/>) など、大腸菌に特化したデータベースの開発も進んでいる。大腸菌の代謝経路、代謝産物を網羅したデータベースも整備され (Kanehisa et al., 2011)、全体を見わたそうとする研究環境が整ってきた。図 1.2 に示すように、細胞内機能は、転写や翻訳、複製、代謝、物質取り込みなど、単独で機能するものではなく、互いに相互作用することで細胞（生命）として存在する。このような細胞システムを理解するには、様々な相互作用を解明する必要がある。GI とは 2 つの遺伝子を欠失したことでタンパク質間の相互作用、転写制御ネットワーク、翻訳制御、代謝反応等々に影響を与えた結果としての生育変化である。そのため、GI には様々な相互作用による影響が含まれており、GI から直接その相互作用の分子機構を特定すること

は難しいものの、それに迫るための入り口を提供する(Babu et al., 2011; Butland et al., 2008)。網羅的な GI 解析により生体内の相互作用ネットワークの全容の解明が期待される。また、相互作用の関係性から機能的な解析も可能である。網羅的な GI データから機能未知遺伝子の機能推定(Costanzo et al., 2010)や moonlight protein のような複数の機能をもつ遺伝子の解明(Khan et al., 2014)、機能間のクロストークの解明(Babu et al., 2011)などがおこなわれている。

生体ネットワークは膨大で複雑であり、この挙動を理解するためにはコンピューターを用いた解析が必須である。これまでに、コンピューター上に正確な代謝ネットワークモデルが構築されている。Palsson らのグループは大腸菌の代謝モデルを構築しており、2011 年には大腸菌の 1366 遺伝子、2251 の代謝反応、1136 の代謝物質を搭載した代謝ネットワークモデルが公開された(Orth et al., 2011)。この大規模代謝モデルを利用することで、一遺伝子欠失の細胞生育への影響をシミュレーションすることが可能になった。シミュレーション技術は代謝経路の設計による物質生産効率の向上、ネットワーク構造解析による生体の理解に重要であると考えられている(Feist and Palsson, 2008)。しかしながら、現段階では SKO のシミュレーションにおける予測値と実測値の乖離（ギャップ）例が多く発見されており、予測精度を高めることが必要である(Orth and Palsson, 2012)。2 重欠失株（DKO）の生育シミュレーションでは、さらに予測精度が下がる(personal communication, Orth, Andrjek)。2 重欠失株の生育予測が難しい要因には代替経路や補償回路などの働きが明らかではないことが考えられ、現状ではこれらに関する情報はほとんどない。代替経路や補償回路の解析において網羅的な GI（二重欠失後の生育）データは非常に有用であり、モデルのギャップ解析において多大な貢献を与えると考えられる。

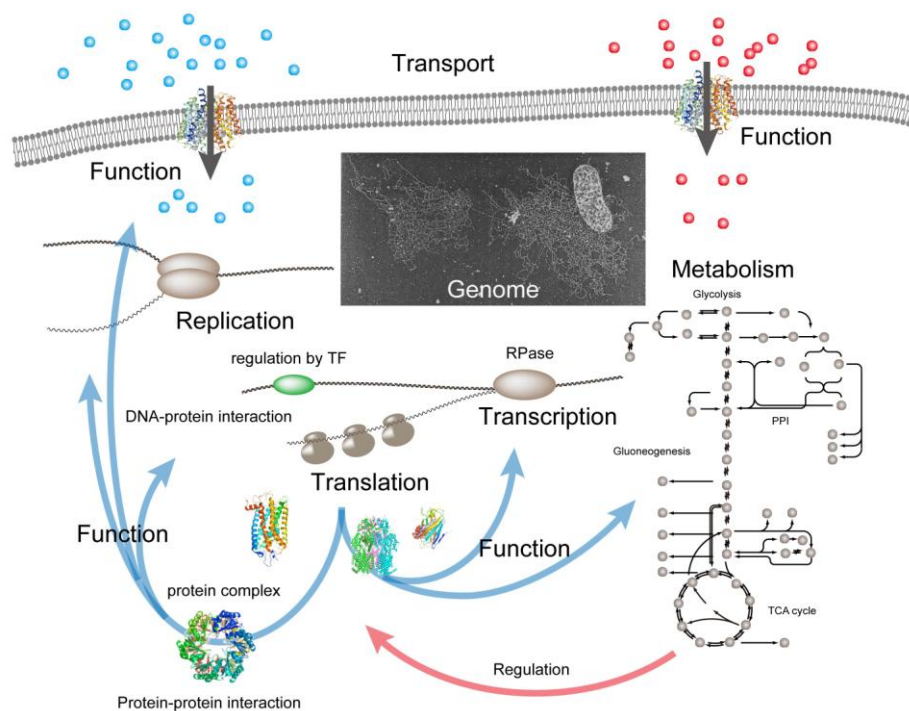


図 1.2 細胞システムの理解に向けた網羅的な GI 解析

細胞内では様々な機能が相互作用（連鎖）している。ゲノムから転写された mRNA はタンパク質に翻訳され、複数のタンパク質が複合体を形成して細胞外の物質を取り込み、取り込まれた物質は代謝経路によって分解され、分解することで得られたエネルギーや物質に応じて転写制御が行われる。網羅的な GI 解析により相互作用ネットワークの全容が解明されることで、複雑な細胞システムの全体像を捉えることができる。

第2章 高密度・高精度コロニー定量測定方法の開発

2.1 緒言

単細胞モデル生物の大腸菌や酵母でも約 5000 もの遺伝子が存在するため、ハイスループットな増殖速度測定が欠かせない。1990 年代のゲノムプロジェクトにより、シーケンサーを始め、高効率自動分注装置の開発など大規模自動化装置の開発が急速に進んだ。マイクロアレイ解析、タンパク質相互作用解析、そして代謝機能解析など OMICS 研究と言われる網羅解析技術の開発が進み、表現型としての細胞生育の網羅的かつ精密な測定が非常に重要になってきた。酵母研究において Yeast two-hybrid 法によるタンパク質相互作用解析や 2 重欠失株による遺伝的ネットワーク解析における網羅解析が進められ、2001 年には Biomek 社製自動分注ロボット (Biomek FX) を利用した方法で解析が進められた (Tong et al., 2001)。その後、微生物コロニーに特化した高効率かつ高精度な細胞植菌ロボットがトロント大学と Singer 社により開発され、殖菌密度もスタンプ速度も飛躍的に向上した (現在ではプレートあたり 24,576 の密度にも対応)。この方法は既存技術と比較して簡便かつ低コストであり、特に微生物を用いたゲノムワイドな大規模解析に適する。現在はこの方法を用いることで、網羅的な遺伝的相互作用の研究 (Babu et al., 2011; Costanzo et al., 2010)、遺伝子欠失-環境ストレスの相互作用の研究 (Nichols et al., 2011) などの大規模解析が進められている。これらの解析では一定時間培養後にカメラで撮影したコロニーの画像を用いて、その生育量を定量する。このような定量方法をここでは従来法 (Conventional method, CONV) と呼ぶ。

コロニーを用いた細胞生育測定における従来法には 3 つの問題点がある。

(1) コロニーの増殖測定においてコロニーの濃さ (mass) が反映されていないことである。従来法ではデジタルカメラでコロニーを撮影して、コロニー面積 (コロニー領域のピクセル数) を増殖値として定量している。コロニーの増殖をより正確に捉えるにはコロニーの濃さ (mass) を定量すべきであり、そのためには光の減少量を測定する必要がある。コロニーに光を透過させて撮影する装置にはデジタルカメラとスキャナーの 2 つがあるため、これら装置の選定をおこなうことにした。透過光の減少量から細胞量を概算するには、これまでの報告 (Shah et al., 2007) では、コロニー領域のピクセル輝度をバックグラウンド (寒天培地) 領域の平均ピクセル輝度で差し引いた値の積算値を細胞量として用いている。しかし、光の透過率は物体濃度の増加に伴って指数関数的に減少するため (Lambert-Beer の法則)、バックグラウンド領域の平均ピクセル輝度でコロニー領域のピクセル輝度を割った値の対数をとった積算値を細胞量とすべきだと思われる。

(2) 従来法は隣接コロニーからの生育への影響の補正が不十分であった。高密度にコロニーを並べるために、隣接コロニーとの間に十分な間隔がなく、生育の抑制 (Neighbor effect) を受ける。この Neighbor effect の要因は栄養の取り合いや細胞間コミュニケーション(quorum sensing)によるものと予想されるが、その原因は明らかではない。Neighbor effect の強さはコロニーの寒天培地上の位置やプレート毎によって変動するため、Neighbor effect は正確な増殖測定 of 妨げとなる。近年 Neighbor effect を減少させる補正法が開発され、従来法における増殖測定の正確性が向上している(Baryshnikova et al., 2010)。一方で、Neighbor effect の強さはコロニーサイズに依存すると考えられる。すなわち、コロニーサイズが大きくなるほどコロニー間の距離が近くなり、Neighbor effect が強くなると予想される。Neighbor effect とコロニーサイズとの関係が明かになれば、Neighbor effect を低減させる補正法が開発が可能になると期待される。

(3) 最後に、従来法には増殖の時系列情報が欠如していることである。従来法では特定の培養時間後におけるコロニーの大きさを測定しており、増殖動態の情報が欠落している。増殖動態からは増殖開始遅延時間、最大増殖速度、到達増殖量の 3 つの増殖特性情報が得られ(Warringer et al., 2003)、詳細な増殖の分析が可能になる。表現型には数多くのパターンが存在するが、増殖動態を分析することで多様な解析が可能となる。例えば、特定の生育 phase において影響をもつ生理機能、増殖動態の多様性(Warringer et al., 2011)、長い増殖開始遅延時間を示す遺伝子解析(Levin-Reisman et al., 2010)、土壌微生物の分類とそれらの相互作用(Ernebjerg and Kishony, 2012)などである。

精密な遺伝的相互作用解析手法の構築にはより正確な定量方法が必須である。従来のコロニー増殖の定量方法よりも正確な定量を可能にするため、上述の問題点を踏まえて新しいコロニー動態解析システム (Colony-live) を構築する。

2.2 材料と方法

2.2.1 培地及び試薬

Tryptone、Yeast extract、寒天粉末はナカライテスクより購入した。kanamycin は和光製薬工業より購入した。寒天培地プレート (Singer plus plate) は Singer instrument Co. Ltd. (Roadwater, UK; <http://www.singerinstruments.com/>)より購入した。Luria-Bertani (LB) 培地はオートクレーブ前に 1N NaOH を滴下して pH 7.4 に調節した。細胞培養は 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin を含む LB 培地で行った。寒天培地プレートの作製は LB 700 mL に 10.5 g の寒天を加え (寒天濃度 1.5%)、オートクレーブして 60°C 程度まで冷却した後に薬剤を加え、50 mL ずつプレートに分注した。プレートの使用前には乾燥させるために、クリーンベンチ内でプレートの蓋を下向きに開けた状態で 10-30 分程度送風した (乾燥時間は部屋湿度による)。

2.2.2 使用菌株及びプラスミド

大腸菌の一遺伝子欠失ライブラリーには 3 章で述べる GI plate set を使用した。カナマイシン耐性をもつ野生株には pXX563 を保持した BW25113 株を使用した。pXX563 は *kan* 遺伝子をコードする mini-F プラスミドである (研究室保管のプラスミド)。

2.2.3 使用したソフトウェア

解析は Ubuntu 12.10 で行なった。プログラムの開発には Python 2.7 (<http://www.python.org/>) 言語、python のモジュールである Numpy (<http://www.numpy.org/>)、Scipy (<http://www.scipy.org/>)、matplotlib (<http://www.matplotlib.org/>)、Open CV (<http://www.opencv.org/>)、rpy2 (<http://rpy.sourceforge.net/>) を使用した。画像解析は主に自作プログラムで行ったが、GUI tool として Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>) も使用した。統計解析は自作プログラムで行ったが、次に挙げる統計解析は R (R. Core Team, 2012) (<http://www.r-project.org/>) を用いた。Intra-class correlation coefficient (ICC) 値の計算は R の irr パッケージ (Gamer et al., 2012) の icc function の one-way ANOVA を、非線形回帰 (Gompertz、Logistic など) は R の nls 関数を用いた。Least trimmed squares (LTS) による頑強な回帰分析には R の robustbase パッケージ (Rousseeuw et al., 2012) の lrgReg function を用いた。

2.2.4 統計処理

ゲノムワイドな有意差検定には順位ベースのノンパラメトリックな手法 (Breitling et al., 2004) を用いた。ゲノムワイドな増殖データを R の RankProd パッケ

ージ (Hong et al., 2006) の rp function で処理することで、各 SKO 株における p 値と FDR 値を算出した。

2.2.5 コロニー画像取得方法

コロニー撮影装置には透過光源上に設置した Canon 社の Kiss Digital (カメラ) と透過光源ユニットを有する EPSON 社の GT-X8700 もしくは GT-X970 (スキャナー) を使用した。GT-X8700 は撮影装置の検討実験に使用して、それ以降の実験にはすべて GT-X970 を使用した。

2.2.6 寒天培地上でのコロニー増殖測定方法

コロニーの植菌操作には植菌ロボットの Singer RoToR HDA (Singer Instruments) を用いた。Colony-live の大型培養庫には TAITEC 社の Chromato chamber M-600FN を用いた。凍結保存されている 384 well プレートをクリックベンチ内にて室温で融解した。融解後の菌液を LB 培地プレートに 384-long pin (品番: RePad384 LW) を用いてスポットした。37°C で一晚培養後、384-short pin (品番: RePad384 A) を用いて 384 format の 4 プレート を 1536 format の 1 プレート にまとめた。37°C で一晚培養後、新しい LB 培地プレートに 1536-short pin (品番: RePad1536 A) を用いて複製した。この植菌後、Colony-live を用いてコロニーの増殖を観測した。

従来法によるコロニー生育測定は次のように行った。従来法のコロニー生育量は一定の培養時間後のコロニー面積である。本実験条件下では (大腸菌、37°C で培養) コロニーの増殖がほぼ停止する培養開始 20 時間後の測定とした。Colony-live で撮影された培養 20 時間後の画像からコロニー面積を定量した。得られた全ての生育値は、種々のバイアスを軽減するために補正処理した。

低密度 spotting 法による生育測定は次のように行なった。菌株を LB 培地で一晚培養し、培養液を LB 培地で OD₆₀₀ = 0.01 となるように希釈した。希釈後の菌液 4 μ L を LB 寒天培地にスポットした。縦 8 箇所、横 12 箇所の計 96 箇所に菌液をスポットした。最外周は野生株の菌液をスポットし、解析には使用しなかった。スポット後、Colony-live を用いてコロニーの増殖を観測した。

2.2.7 液体培地での増殖測定方法

96 well プレートの OD₆₀₀ 測定には Molecular Devices 社の SpectraMax Plus384 を用いた。96 well プレートの培養には Taitec 社の BioShaker M・BR-022 を用いた。LB 1ml / well の 96-deep well plate を用意し、ここに前培養液を OD₆₀₀ が 0.01 となるように加えて 37°C、900rpm で振盪培養した。培養開始後 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24 時間において培養液を採取し、適宜希釈を行い、OD₆₀₀ を測定した。

2.3 結果

2.3.1 コロニー撮影装置の検討

プレート上のコロニーを画像化する撮影装置を検討した。様々な生育速度を示す 12 種類の大腸菌 DKO 株を 12 区画（縦 16 スポット x 横 8 スポット）に植菌して 37°C で一晩培養した。コロニーが生育したプレートを透過光源によりカメラとスキャナーで撮影した（図 2.1）。

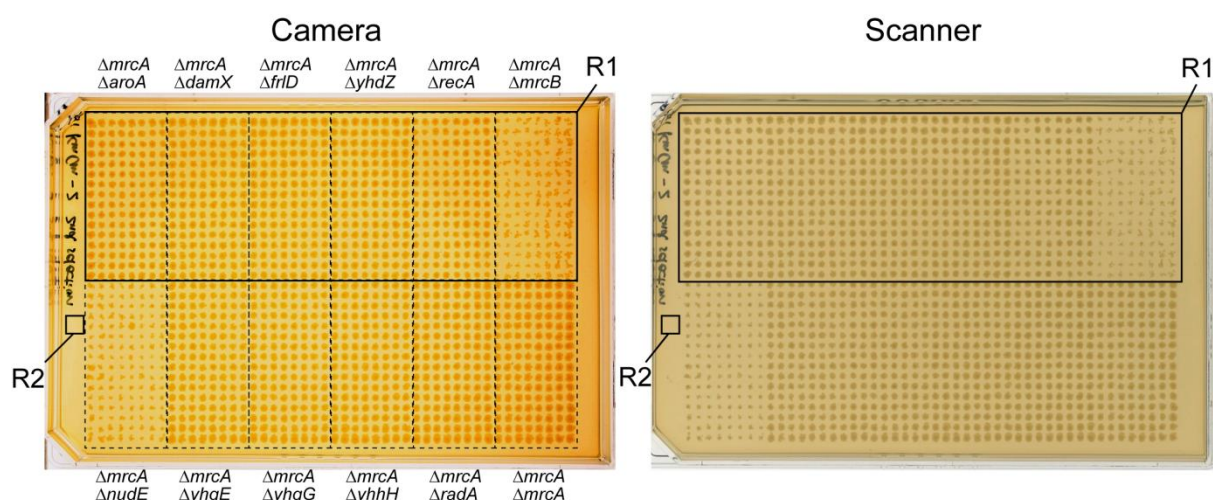


図 2.1 透過光源のカメラとスキャナーで撮影した画像

様々な生育速度を示す 12 種類の大腸菌 DKO 株を 12 区画（縦 16 スポット x 横 8 スポット）に植菌して 37°C で 20 時間培養した。培養後のプレートを透過光源下のカメラで撮影した画像（左）とスキャナーで撮影した画像（右）を示す。領域 R1 はコロニーの生育領域として、R2 はコロニーの存在しないバックグラウンド領域として解析に使用した。

まず撮影した画像におけるピクセル輝度の空間的な均一性を調べた。撮影した画像のコロニーが生育した領域（図 2.1 の R1 領域）を gray scale にして、X 軸の各点における Y 軸方向の平均輝度をプロットした（図 2.2 下段）。カメラ画像の X 軸方向の輝度は中央（600pixel 付近）を頂上として凸型に湾曲していた。これは周辺減光という現象であり、対象を均一に定量する上で問題となる。一方で、スキャン画像の X 軸方向の輝度は平坦であり、バックグラウンドの値は均一であった。スキャン画像では X 軸方向に移動するに従って輝度が若干ながら減少しているが、これはプレートの寒天培地の厚みを反映していると思われる。このことから、対象物をより均一に画像化できる装置はスキャナーであると考えた。つぎに、撮影した画像におけるノイズの大きさを評価した。カメラ画像とスキャン画像ではコロニー

領域のシグナル強度がほぼ同等であったため（図 2.2）、ノイズの大きさはピクセル輝度の分散によって比較した。撮影した画像のコロニーが生育していない領域（図 2.1 の R2 領域）を gray scale にして、ピクセル輝度の変動係数（分散÷算術平均）を計算したところ、カメラ画像は 0.065、スキャン画像は 0.025 であった。このことから、画像におけるノイズが小さいのはスキャナーであった。以上の結果を合わせて、コロニーが生育したプレートの撮影装置にはスキャナーを用いることにした。

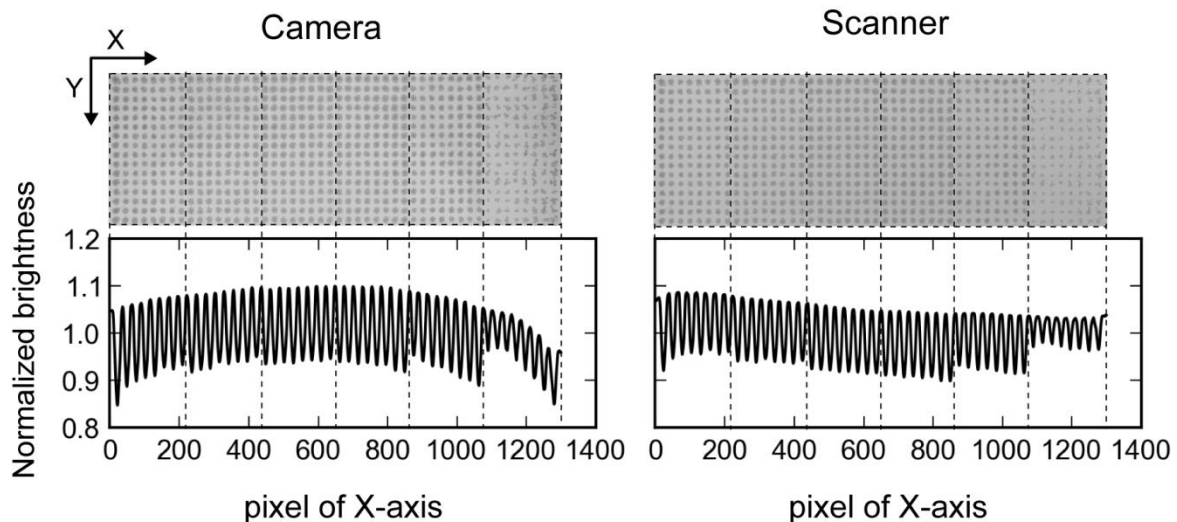


図 2.2 撮影した画像の空間的な均一性

プレート撮影画像（図 1）の領域 R1 を 8 bit の gray scale に変換した。X 軸の各点について Y 軸方向の平均輝度を計算した。カメラとスキャナーを比較するために、それぞれの Y 軸方向の平均輝度を全ピクセル輝度の平均値で割ることでノーマライズした。バックグラウンド領域（寒天培地）の輝度は高く、コロニーの生育領域の輝度は低いため、X 軸方向に波型のパターンとなっている。

2.3.2 コロニ一定量式の検討

透過光の減少量から細胞量を定量する式を検討した。検討に用いた式は差分式と対数式の 2 つである。大腸菌野生株の一晩培養液を 20 倍濃縮液して、この濃縮液を LB で段階希釈することで 16 種類の濃度の菌液 ($\times 20, \times 10, \times 5, \dots, \times 6 \times 10^{-4}$) を調製することで、テストプレートを作製した（図 2.3A）。テストプレートはプレートリーダーで OD₆₀₀ 測定した後、スキャナーで透過光スキャンして、差分式の細胞量 (m-dif) と対数式の細胞量 (m-log) を算出した。得られた 3 種類の定量値を菌液濃度に対してプロットした（図 2.3B）。高濃度領域と低濃度領域を除けば 3 つの定量値には直線性が見られることから、全ての値は菌液に対する定量性を有していた。対数菌液濃度-1.4 から 1.3 までの区間において m-dif は OD₆₀₀ 値とズレて

いるのに対し、m-log は OD₆₀₀ 値と一致していた。このことから、OD₆₀₀ 値とより近い定量性を有するのは差分式よりも対数式であった。このことから、細胞量の定量式には対数式を用いることにした。

$$\text{差分式: } m_{\text{dif}} = \sum_{i=1}^n (B_i - \bar{B})$$

$$\text{対数式: } m_{\text{log}} = \sum_{i=1}^n \left[-\log_{10} \left(\frac{B_i}{\bar{B}} \right) \right]$$

n : コロニー領域のピクセル数、 B_i : コロニー領域 i 番目のピクセル輝度、 \bar{B} : 寒天培地領域の平均ピクセル輝度

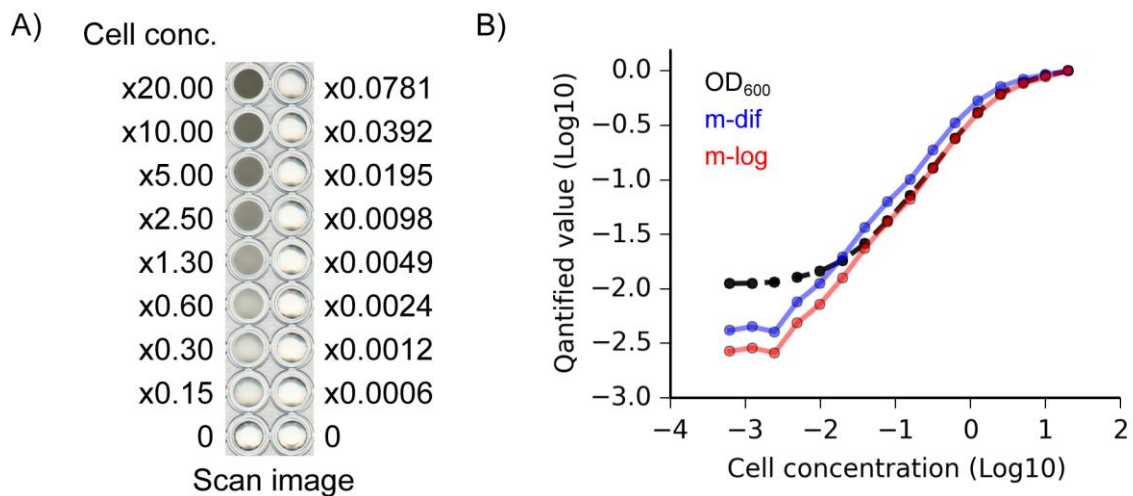


図 2.3 各菌液濃度における定量値

(A) サンプルプレートのスキャン画像。各 well には 16 種の濃度の菌液と LB 培地（blank）が入っている。菌液濃度は一晚培養後の菌液濃度を 1 とする相対値である。(B) 菌液の相対濃度の対数値と菌液の定量値（最大値が 1 となるように正規化）の対数値をプロットした。黒線は分光光度計の OD₆₀₀ 値、青線はスキャン画像から差分式で求めた定量値（m-dif）、赤線はスキャン画像から対数式で求めた定量値（m-log）である。

2.3.3 コロニーの増殖モデル式と増殖特性値

コロニーの経時的な生育値から増殖特性値を解析するために、増殖のモデル式へ回帰して増殖遅延時間(LTG)、最大増殖速度(MGR)、増殖到達量(SPG)を計算する式を検討した(図 2.4)。

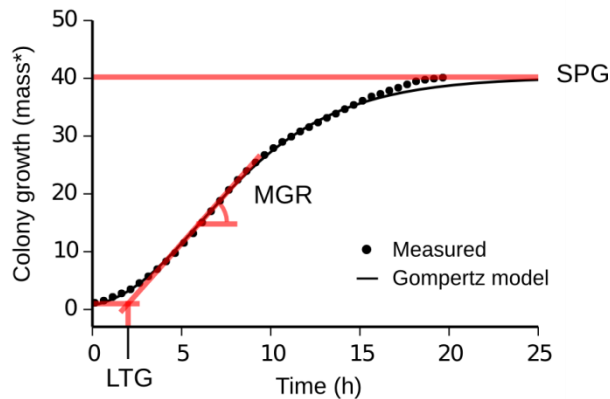


図 2.4 増殖特性値の解析

コロニー増殖の経時的な測定値（黒点）から3つの増殖特性値を求める。測定データを Gompertz model に回帰（実線）することで、最大の傾き（MGR）、MGR の接線と colony growth = 0 が交わるポイントの時間（LTG）、最大増殖量（SPG）を算出した。

増殖のモデル式には Logistic 関数式、Gompertz 関数式などがある。本実験条件下（37℃、LB 寒天培地）における大腸菌コロニーの増殖測定データを各種モデルに回帰して赤池情報量基準(AIC)を調べた結果、最もあてはめがよかった Gompertz 関数をモデル式として採用した。Gompertz 関数式には3つのパラメータ(a,b,c)がある。

$$G(t) = a \exp(-bc^t)$$

Gompertz 関数式のパラメータから LTG、MGR、SPG を求める計算式の導出は Zwietering らの報告(Zwietering et al., 1990)を基に次のように行なった。SPG は時間が無限大における増殖の収束値なのでパラメータ a と等しい。MGR と LTG は Gompertz 関数の一次導関数と二次導関数を用いた。

$$G'(t) = abc^t \ln(c) \exp(-bc^t)$$

$$G''(t) = abc^t \ln(c) \exp(-bc^t) [bc^t - 1]$$

MGR は変曲点における接線の傾きである。つまり、二次導関数が 0 となる時間 t_i を一次導関数に代入した場合の解が MGR である。

$$G''(t_i) = 0 \Rightarrow t_i = \frac{\ln(1/b)}{\ln(c)}$$

$$MGR = G'(t_i) = \frac{a \ln(c)}{e}$$

LTG は変曲点の接線と X 軸（増殖値=0）との交点である。つまり、接線の方程式が 0 となる時間が LTG である。

$$G'(t_s)(LTG - t_s) + G(t_s) = 0$$

$$LTG = \frac{\ln(1/b) - 1}{\ln(c)}$$

以上、Gompertz 関数式のパラメータから 3 つの増殖特性値を求める式を導出した。

$$LTG = \frac{\ln(1/b) - 1}{\ln(c)}, \quad MGR = \frac{a \ln(c)}{e}, \quad SPG = a$$

2.3.4 Neighbor effect の低減

Neighbor effect を調べるために、大腸菌野生株 1536 コロニーが生育するプレートにおける 5 つの隣接コロニーに囲まれた (Uncrowded) 152 コロニーと 8 つの隣接コロニーに囲まれた (Crowded) 154 コロニーの増殖の違いを調べた (図 2.5A)。図 2.5B 赤線グラフに示すように、隣接コロニーが少ない場合は明らかにより大きなコロニーが生育していることから Neighbor effect による生育の抑制が確認できた。Neighbor effect による生育の抑制が顕著に観察され始めたのは図 2.5B 矢印で示す培養開始後 2.5 時間からになる。この時間におけるコロニーの平均直径は 17 pixels (~1 mm) であった。このコロニーの直径は neighbor effect に起因する生育の違いが観測され出す最小のコロニーサイズと考えた。Neighbor effect による影響を最小限にするために、コロニーの横方向の増殖に対して観測領域を制限した。コロニー全体の細胞量 (mass) の代わりに、コロニー中央の直径 17 pixels の円領域における細胞量 (mass*) を生育の定量値とした。その結果、隣接コロニーの違いによる生育差は大幅に減少した (図 2.5C)。このことから、mass* を生育の定量値とした場合、Neighbor effect による影響が低減されることがわかった。

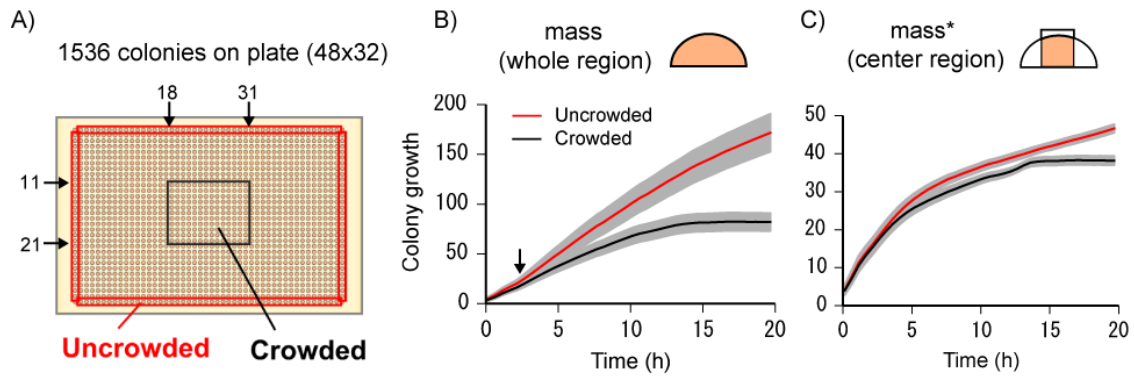


図 2.5 Neighbor effect の観測と低減

1536 の野生株コロニーをプレート上に生育させて経時的に撮影した。(A) 高密度なコロニー領域と低密度なコロニー領域を Neighbor effect の評価に用いた。これらの領域におけるコロニー増殖の経時変化について、(B) コロニー全領域の定量値(mass)と (C) コロニー中央領域だけを用いた定量値(mass*)をプロットした。赤色の実線は高密度なコロニー領域のコロニーの平均生育を、黒色の実線は低密度なコロニー領域のコロニーの平均生育を示す。灰色の領域は標準偏差である。

次に mass*を生育の定量値とした場合の効果を評価するために、コロニー位置、寒天プレートの違いによる測定のはらつきと再現性を調べた。まず、同じ株を異なるプレート位置においた場合の生育速度のはらつきを調べた。野生株の培養液をプレート上 1536 箇所に植菌して、1536 の野生株コロニーの最大増殖速度(MGR)の分散を計算した。従来法(CONV)や mass を定量値とした場合と比べて、mass*を定量値とした場合は MGR の分散が有意に小さかった(図 2.6A)。より現実的な評価をするために、GI plate set の SKO 株をランダムにプレート上に配置した場合(Shuffle array)の SKO 株の生育測定値のはらつきを調べた。この測定では様々な生育速度をもつ株がランダムに配置され、Neighbor effect がより複雑に生じることが予想される。各 SKO 株の MGR のばらつきを統合評価するには Intra-class correlation (ICC) が適している(Pellis et al., 2003)。ICC は複数回の測定結果の再現性のよさを表し、1 に近いほど再現性が高い(ばらつきが小さい)。生育測定値の ICC 値を調べた結果、mass*を定量値とした場合が有意に高かった(図 2.6B)。このことから、mass*を用いることで生育の測定精度が向上し、コロニーの生育位置による影響を低減できた。同様の評価をランダムに配置しない条件(通常測定条件)について行った場合においても、ICC 値は mass*を定量値とした場合が有意に高かった(図 2.6C)。以上の検討より、mass*を定量値とすることで、Neighbor effect が低減し、測定の再現性(精度)が向上することがわかったので、コロニーの定量値は mass*を用いることにした。

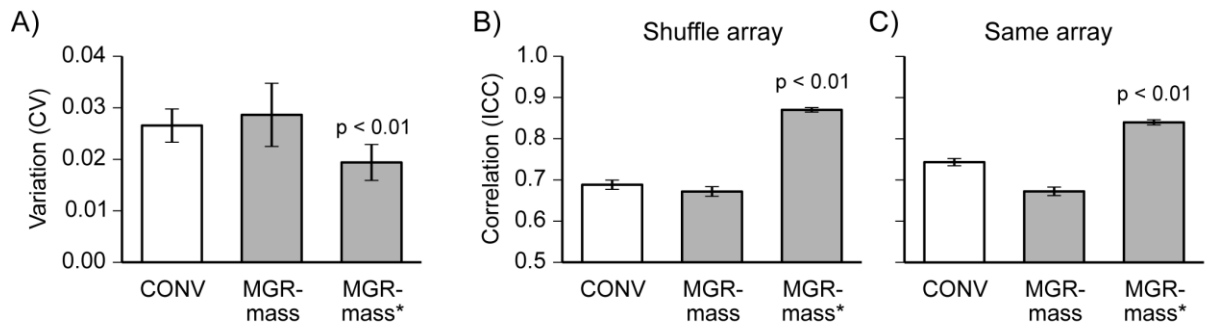


図 2.6 Neighbor effect の低減による測定精度の向上

各実験において、従来法 (CONV)、コロニー全領域の増殖速度 (MGR-mass)、コロニー中央領域を用いた増殖速度 (MGR-mass*) を計算した。(A) 1536 の野生株コロニーの増殖値の変動係数 (CV) を示した。(B) Keio collection を毎回ランダムに配置して (Shuffle) 増殖を測定した。4 回繰り返し測定した後、SKO 株増殖測定の再現性 (ICC) を計算した。p 値は CONV と MGR-mass* の統計的有意差を示す (以下同様)。(C) Keio collection を毎回同じ配置 (Same) で増殖を測定した。7 回繰り返し測定した後、再現性 (ICC) を計算した。

2.3.5 Colony-live の構築

ハイスループットな測定を可能にするコロニー増殖観測システムの Colony-live を構築した。測定容量を大きくするため、37°C の大型培養庫内に 12 台スキャナーを設置した。スキャナーにプレートを固定するため、GT-X970 用プレートマウントを設計して高田科学株式会社に依頼して作製した (図 2.7)。1 台のスキャナーは 4 枚のプレートをスキャンできるので、最大 48 プレート (約 7 万コロニー) の生育を観測可能である。スキャンは A4 サイズ、400dpi、24-bit color でおこない、TIFF 形式で保存した。プレートは Singer 社製 Plus plate を使用した。寒天プレートは下に向けて設置し、寒天培地の乾燥を防いだ。増殖動態を観測するために、培養開始から 20 時間後まで 30 分間隔で計 41 回、LB 寒天培地上のコロニーを透過光でスキャンした。

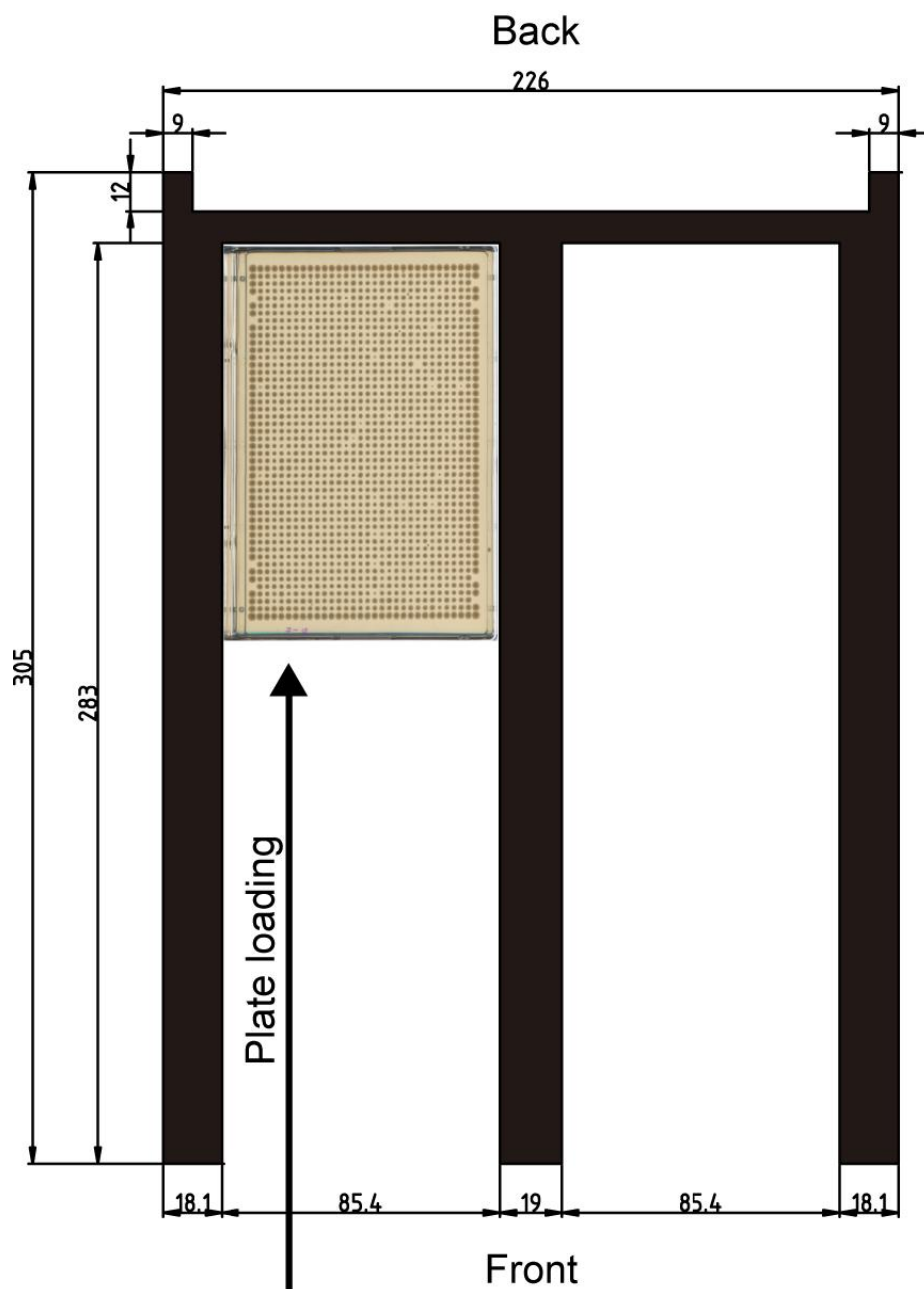


図 2.7 GT-X970 用プレートマウントの設計図

サイズの単位は mm である。材質は厚さ 5mm の黒色アクリル板である。スキャナー電源投入後の光量調節のために、back 側にスペースを設けた（このスペースがないと、スキャナー電源投入時にエラーが生じる）。プレートは front 側から押し込むように設置する。設置するプレートには Singer 社の Plus plate を想定しており、最大で 4 枚を設置できる。

画像中のコロニー増殖の定量解析は次のように行った。培養時間が最も長いスキャン画像を 8 bit のモノクロ画像に変換し、二値化処理をすることで、コロニー領域と寒天培地領域を判別した。この領域情報はすべての培養時間の画像に使用した。

各コロニーの領域について中央座標を調べ、中央から半径 7 pixels の円領域における細胞量 (mass*) をコロニーの細胞量とした。この作業を各培養時間のスキャン画像に対しておこない、経時的なコロニー生育値 (コロニー面積とコロニーマス) を算出した。経時的なコロニー生育値(m_t)の最小値が 0 となるように補正した。バックグラウンド (寒天培地) 輝度の変動 (標準偏差) は 0.1 程度であったので、このノイズに対して約 10 倍の値を増殖検出限界値 ($m_{Lim} = 1$) に設定して、この値以下の増殖値はノイズを消すために 0 とした。

$$G_t(t) = m_t - \min(m) \quad (\text{discard if } G < m_{Lim})$$

$G_t(t)$: 補正したコロニーの細胞量、 m_t : 培養時間 t におけるコロニーの細胞量、 m_{Lim} : コロニーの増殖検出限界値 (本研究では 1 とした)

経時的な観測点において、補正したコロニーの細胞量が 0 より大きくなった観測点を増殖開始点とした。増殖開始点から 30 観測点(15 時間に相当)までの生育値を Gompertz 関数式へ回帰して、3 つの増殖特性値 (LTG、MGR、SPG) を計算した。これらの増殖特性値には、寒天培地の厚さ、細胞の植菌量、コロニーの位置によるバイアスが存在する。このようなバイアス (系統誤差) を減少させるため、Baryshikova らの報告(Baryshnikova et al., 2010)に従って補正処理を行った。なお、論文のプログラムは MATLAB で記述されており我々の環境では実行できなかったため、MATLAB コードを Python コードへと書き変えて使用した。

2.3.6 従来法との比較

Colony-live の性能を検証するために、増殖低下を引き起こす大腸菌 SKO 株のスクリーニングを行った。大腸菌の SKO ライブラリー Keio collection の全株について、LB 培地・37°C 条件下における増殖測定を従来法 (CONV) と Colony-live で行った。Colony-live では LTG、MGR、SPG の値を算出するが、ここでは MGR を用いた。ほとんどの SKO 株の増殖は野生株と同等であり、顕著な表現型は出ない。この結果は出芽酵母における研究結果(Warringer et al., 2003)とも一致している。統計的に有意な ($p < 0.01, \text{FDR} < 0.01$) 増殖低下を起こした SKO 株の総数は、CONV の場合は 185 株、Colony-live の場合は 196 株であり、共通に見られたのは 109 株であった。CONV のみで選択された SKO 株 (Group1)、両方法で選択された SKO 株 (Group2)、Colony-live で選択された SKO 株 (Group3) のベン図を図 2.8 に、それらの遺伝子リストを表 2.1 に示す。

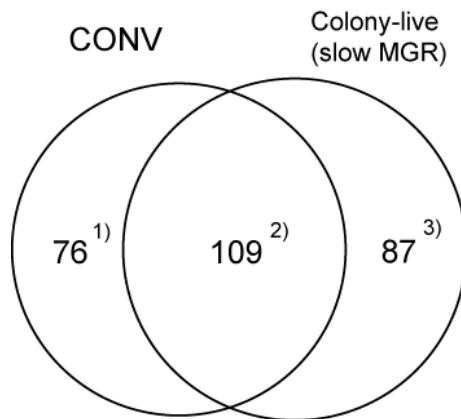


図 2.8 従来法と Colony-live の比較

Keio collection の全 SKO 株の増殖を従来法 (CONV) と Colony-live (MGR) で測定して、増殖が低下した SKO を統計的 ($p < 0.01$, $FDR < 0.01$) に判定した。各方法で得られた SKO の集合についてベン図を作製した。数字の右肩にはグループ番号 (表 2.1 と対応) を示した。

表 2.1 従来法と Colony-live の比較結果

Group	Genes
1	<i>aceE, aceF, acnA, acnB, acpH, appB, argO, aroC, bioA, crr, cvrA, dbpA, dnaK, dsbB, entH, envC, fes, flil, fryC, ftsP, fumA, fur, glyA, gpmM, hha, holC, htpG, icd, lpcA, mdtH, mpaA, nadA, narW, nudB, pdxB, pdxH, pflA, phoP, pnp, ptsI, quuQ, rarA, rfaD, rfaE, rfaF, rhmR, rppH, secB, sfmA, tatA, tatB, tatC, tig, tpx, yajC, ybhH, ycaC, ycaN, ycbK, ycdY, ycgX, ycjG, ydeP, ydfK, ydhB, ydhI, ydhT, yebG, yfbN, yfdM, yfiM, ygeH, yhbO, yhdU, yjeK, ylaC</i>
2	<i>aroD, atpA, atpB, atpC, atpD, atpE, atpF, atpG, atpH, bamB, cmk, cpxR, cyaA, cydB, cydD, cyoE, cysA, cysB, cysE, cysJ, dapF, degP, dnaT, envZ, fabH, fkpB, folB, glnA, gmhB, guaA, hflD, hyaD, iscS, iscU, lipA, lipB, lpd, lpxL, manA, mnmA, mtn, nuoA, nuoB, nuoC, nuoE, nuoF, nuoG, nuoH, nuoI, nuoJ, nuoK, nuoL, nuoM, nuoN, nusB, ompR, oxyR, pal, pgm, priA, rata, rbfA, recA, recB, recC, rimM, rimP, rlmE, rnt, rpe, rplA, rpsF, rsgA, ruvA, ruvC, sdhA, sdhB, smpB, sucA, sucB, sucD, sufA, surA, tola, tolB, tolQ, tolR, tpiA, trkA, tufA, tusA, tusB, tusC, tusD, tusE, ubiE, ubiF, ubiG, ubiH, ubiX, xerC, xerD, ybeD, ybeY, ybgT, yddE, ydhS, ydjl, yfeS</i>
3	<i>abgR, allC, aroE, aroK, aspA, betT, carB, ccmA, cysC, cysD, cysG, cysH, cysI, cysM, cysN, cysP, cysU, cysW, ebgR, efp, exuR, fau, fre, ghrA, hfq, hicB, hscA, ihfA, ihfB, intD, kilR, leuE, lpoA, lpp, lrp, marA, miaA, minC, mliC, mnmE, mnmG, mntR, mrcB, mutL, nagA, nlpI, pgl, phr, prc, pyrF, rnhA, rpmJ, rseA, safA, seqA, sppA, srmB, sspA, ssrA, truA, uspE, wbbI, yaaY, ybfB, ybfQ, ybiB, ybjC, ycfH, ycgN, ycgY, ychN, yciH, ycjS, ydhJ, yebE, yecE, yeeN, yeeS, yeiR, yfcR, yfdX, yfiB, ygbM, yggM, yjeA, yliI, zinT</i>

CONV と Colony-live の両方法で共通して選択された SKO 株 109 株は全体の約 40%であり、ほとんどの遺伝子は Respiration や Sulfur-relay 経路に関係するタンパク質をコードしていた。これらの遺伝子の SKO は顕著な増殖低下 (Doubling time が 1.5 から 2 倍程度伸びる) を引き起こすことが報告されている (Erhardt et al., 2012; Gulmezian et al., 2007; Ikeuchi et al., 2006)。このことから、両測定方法ともに、ゲノムワイドなスクリーニングにおいて顕著な増殖低下を検出できることを確認できた。

次に CONV では選択されず、Colony-live のみで選択された SKO 株 87 株について調べた。*mnmE* と *mnmG* 欠失株は Colony-live のみで選択され、mild な増殖低下 (Doubling time が 1.2 倍に伸びる) を示すことが報告されている (Yim et al., 2006)。また、システイン合成経路に関する遺伝子が Colony-live では全て選択された (図 2.9)。これらの遺伝子群の欠失による表現型は過去の知見がなく、個別に検証実験を行った。検証実験ではより正確に増殖を調べるため、先行研究 (Shah et al., 2007) に従って OD を合わせた菌液を低密度 (96 colonies/plate) にプレートへスポットし、その生育を観測した。検証実験の結果を表 2.2 に示す。顕著な増殖低下を示す *cysE*、*atpF* などの SKO 株では MGR が 0.2 以下であったが、システイン合成経路に関する欠失株では MGR が 0.6 - 0.8 程度であり、mild な増殖低下であることを確認した ($\Delta cysE$ は例外的に顕著な増殖を示す。*cysE* 以外の *cys* 遺伝子には代替

経路が存在するが、*cysE* は代替経路が存在しない。また *cysE* 遺伝子によって合成される O-acetylserine はシステイン合成経路に必要な中間体なので、*cysE* 欠失株ではシステイン合成経路が動かず、顕著な増殖低下が観測されると考えられる)。このことから、Colony-live は CONV では見逃がされた mild な増殖低下を検出できることがわかった。

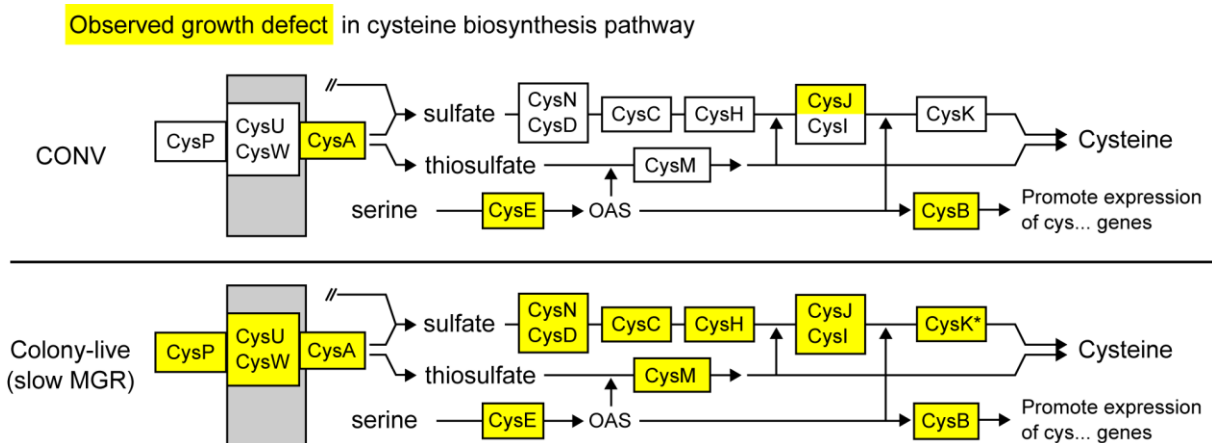


図 2.9 システイン合成経路における従来法と Colony-live の増殖低下判定

Keio collection の全 SKO 株の増殖を従来法と Colony-live (MGR) で測定して、増殖が低下した SKO を統計的 ($p < 0.01$, $FDR < 0.01$) に判定した。システイン生合成経路において増殖低下を示した遺伝子を黄色で示した。CysK は MGR の低下はなかったが、SPG の低下が観測された。代謝反応は実線の矢印、機能単位は四角、inner membrane は灰色の四角で示した。OAS は O-acetylserine の略である。

表 2.2 SKO 株の正確な増殖測定結果

Strain	LTG		MGR		SPG	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Wildtype	1.00	0.02	1.00	0.03	1.00	0.03
$\Delta cysN$	1.01	0.02	0.68	0.02	0.84	0.04
$\Delta cysD$	0.97	0.03	0.71	0.02	0.86	0.03
$\Delta cysC$	1.00	0.02	0.61	0.02	0.81	0.03
$\Delta cysH$	0.97	0.03	0.61	0.02	0.87	0.02
$\Delta cysJ$	1.25	0.04	0.66	0.03	0.91	0.04
$\Delta cysK$	1.14	0.02	0.85	0.03	0.94	0.03
$\Delta cysM$	1.20	0.02	0.86	0.03	1.00	0.02
$\Delta cysE$	0.96	0.07	0.15	0.01	0.41	0.07
$\Delta tusE$	1.70	0.04	0.70	0.01	1.00	0.04
$\Delta atpF$	0.91	0.07	0.16	0.02	0.32	0.04
$\Delta sucA$	0.80	0.04	0.37	0.02	0.51	0.04

最後に Colony-live では選択されず、CONV のみで選択された SKO 株 76 株について調べた。*dnaK* 欠失株は CONV のみで選択され、増殖低下が報告されている (Paek and Walker, 1987)。つまり、Colony-live は *dnaK* 欠失株の増殖低下を見逃した。この原因を明らかにするために、*dnaK* 欠失株の増殖を詳細に調べた。その結果、ほとんどのコロニーはドーム状の緩やかな山を形成するのに対し、*dnaK* 欠失株のコロニーは鋭い山を形成していた (図 2.10)。コロニーの中央領域に限ってみれば、*dnaK* 欠失株は通常のコロニーと同等程度に生育をしている。そのため、コロニーの中央領域の細胞量 (mass*) を調べる Colony-live では *dnaK* 欠失株の増殖低下が見逃されたと思われる。このようにコロニーの形態が異常な欠失株は *dnaK* 欠失株以外にも *tatA*, *tatB*, *tatC*, *secB*, *rfaE*, *ycbK*, *yfbN* などの欠失株で確認された。その他の株については検討できていない。

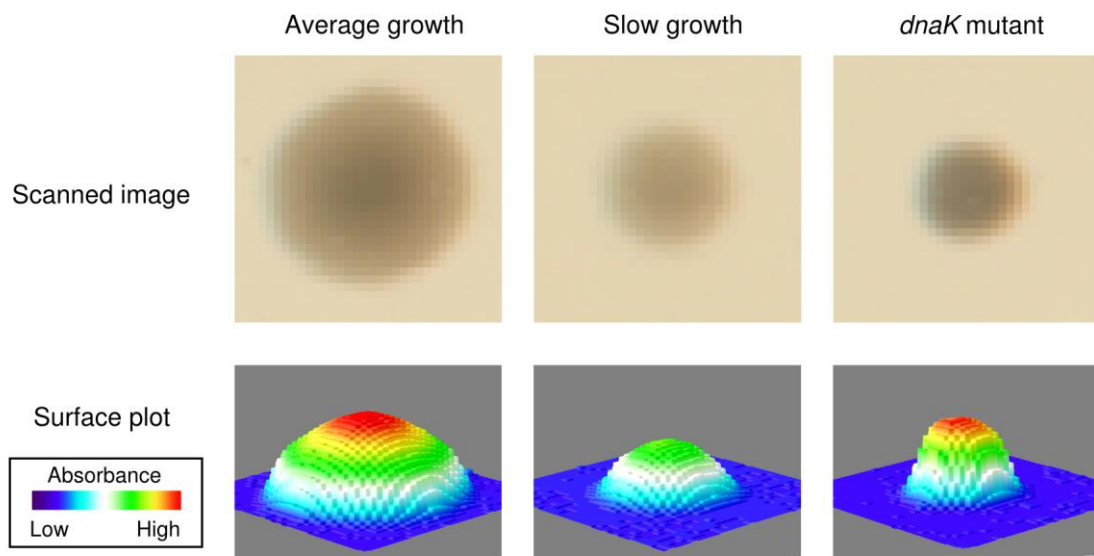


図 2.10 コロニー形態の異常

左から順に *gsp* 欠失株 (average growth)、*atpF* 欠失株 (slow growth)、*dnaK* 欠失株の 20 時間培養後のコロニーの生育状態を示す。上部はコロニーの撮影画像である。下部は ImageJ を用いてコロニーの生育状態を 3 次元で表したものであり、図中の色が暖色であるほど細胞が多く、寒色であるほど細胞が少ないことを示す。

2.3.7 LTG と SPG の補正

Colony-live で観測される LTG と SPG は MGR に依存しているため、異なる MGR の SKO 株の LTG または SPG を比較するには補正が必要だと考えた。そこで、

MGR-LTG と MGR-SPG の相関を理論式で回帰して、LTG と SPG を補正することにした。MGR-LTG の関係式は理論的研究(Baranyi, 1998)を基にした。本研究のように植菌量が多い場合、観測される増殖遅延時間 (λ) は増殖速度 (μ) と個々の細胞の増殖遅延時間 (τ) に依存する。

$$\lambda = \ln(1 + \mu\tau)/\mu$$

MGR-SPG の関係式は maintenance energy の研究(Pirt, 1965; Russell and Cook, 1995)を基にした。観測される増殖収量 (Y) は増殖速度 (μ) と maintenance 係数 (m) と理論的増殖収量 (Y_G) に依存する。

$$Y = \mu / \left(\frac{1}{Y_G} \mu + m \right)$$

これらの式と測定データを基に、外れ値の存在に強い robust な回帰分析手法である least trimmed squares(LTS)方法を用いて回帰分析を行った。LTS 分析には、R の robust base パッケージ(Rousseeuw et al., 2012)に含まれる ltgReg function を利用した。回帰分析の結果を図 2.11 に示す。回帰分析のパラメータを用いて、LTG の補正值 (nLTG) と SPG の補正值 (nSPG) は以下の式のように、測定値を MGR の従属変数で差し引くことで計算した。

$$\begin{aligned} \text{nLTG} &= \text{LTG} - \frac{\ln(1 + 1.72\text{MGR})}{\text{MGR}} \\ \text{nSPG} &= \text{SPG} - \frac{\text{MGR}}{0.64\text{MGR} + 0.36} \end{aligned}$$

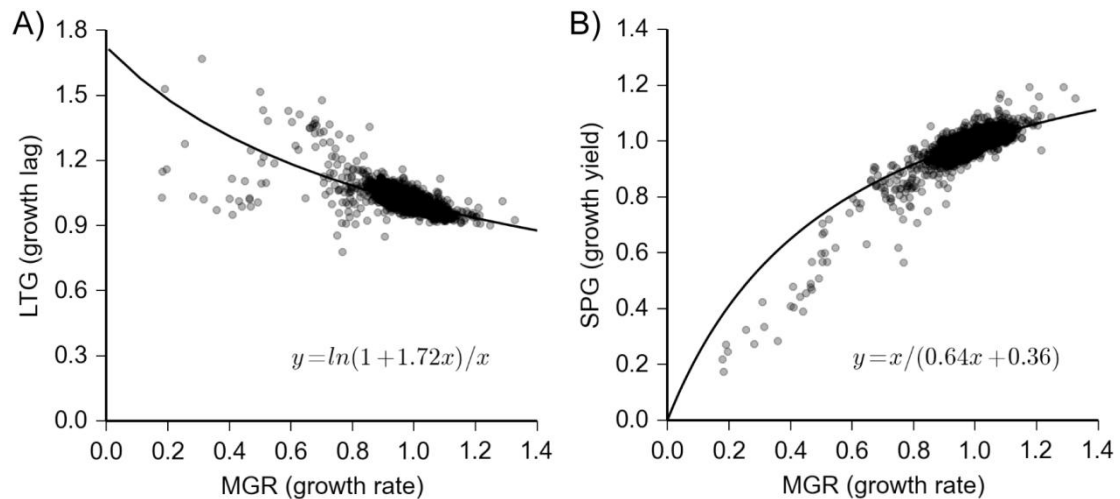


図 2.11 LTG と SPG の MGR 相関解析

Keio collection の全 SKO 株の増殖について Colony-live で 7 回測定して、各 SKO 株の LTG、MGR、SPG の平均値を求めた。(A) LTG と MGR の相関 (B) SPG と MGR の相関。Least trimmed squares (LTS) 法による回帰分析の結果を実線で、回帰式をプロット右下に示した。

2.3.8 増殖動態による分類

Colony-live で得られる増殖動態の有効性を検証するため、MGR が低下した SKO 株について、LTG と SPG を用いてさらに分類した。MGR による補正後の値を用いて、LTG が延長した SKO 株と SPG が低下した SKO 株を、統計的 ($p < 0.01$, $FDR < 0.01$) に判定した。結果を分類したベン図を図 2.12 に、その遺伝子リストを表 2.3 に示す。MGR が低下した SKO 株は 2 つの明確なグループに分類された。MGR が低下して LTG が長くなったグループ (LTG グループ) には 50 株が、MGR が低下して SPG が低下したグループ (SPG グループ) には 68 株が含まれていた。全てが悪化したのは (MGR が低下、LTG が延長、SPG が低下) したのは 5 株 (*cpXR*, *cydD*, *iscS*, *tolR*, *rimM*) のみであった。

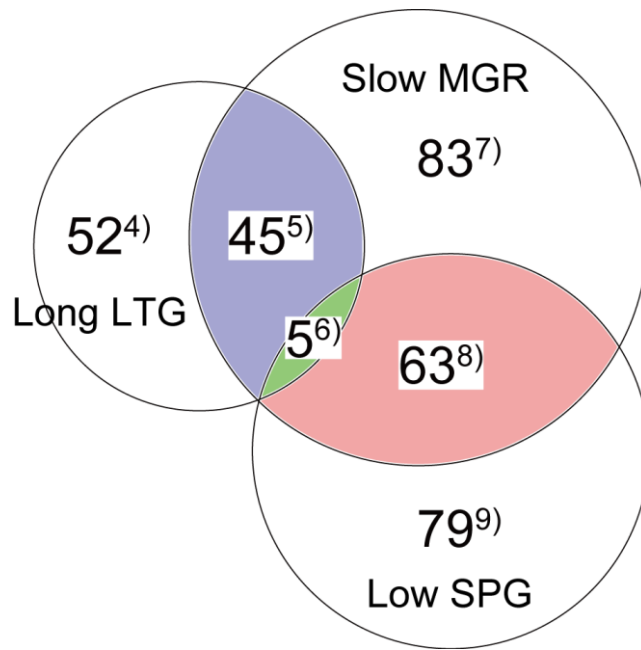


図 2.12 MGR、LTG、SPG による増殖変化の分類

Keio collection の SKO 株の増殖測定データを用いて、LTG が長い、MGR が遅い、SPG が低い SKO を統計的 ($p < 0.01$, $FDR < 0.01$) に判定した。各グループに属する SKO をベン図で比較した。数字は各集合における SKO 数であり、数字の右肩にはグループ番号を示した。このグループ番号は表 2.3 と対応している。

表 2.3 MGR、LTG、SPG による増殖変化の分類結果

Group	Genes
4	<i>ackA, acnA, aroC, cbl, ddpX, dedD, dnaJ, dnaK, dnaQ, efeB, envC, fadR, fdx, gpmM, hipB, lpcA, mdtH, pfkA, pgaC, pgpA, pncA, preT, proW, pta, ptsI, rfaF, rimJ, rimK, rnb, rpoS, rsxC, srlR, tatB, wcaK, yaiY, ybcK, ybgC, ycgE, ycgV, yciB, yciT, ydcS, ydhX, yegS, yfbS, yhcB, yhdU, yjeK, ymfA, ynfA, yohF, ytfK</i>
5	<i>aroD, bamB, carB, cmk, cydB, cysM, dnaT, fabH, glnA, hflD, hfq, hscA, iscU, manA, miaA, mnmA, nusB, pal, priA, rbfA, recC, rlmE, rnt, rpe, rplA, rpmJ, rpsF, rsgA, ruvA, ruvC, sspA, surA, tolQ, tufA, tusA, tusB, tusC, tusD, tusE, ubiX, xerD, ybeD, ybeY, ycgY, yjeA</i>
6	<i>cpxR, cydD, iscS, rimM, tolR</i>
7	<i>abgR, aroE, aroK, betT, ccma, cyoE, cysA, dapF, ebgR, efp, envZ, exuR, fau, fre, ghrA, hicB, ihfA, ihfB, intD, kilR, leuE, lpp, lpxL, lrp, marA, minC, mliC, mnmE, mnmG, mntR, mrcB, min, mutL, nagA, ompR, oxyR, pgl, pgm, phr, pyrF, ratA, recA, recB, rnhA, safA, sdhA, seqA, smpB, sppA, srmB, ssrA, sucD, sufA, trkA, truA, uspE, wbbI, xerC, yaaY, ybfB, ybfQ, ybgT, ybiB, ybjC, ycfH, ycgN, ychN, ycjS, yddE, ydhJ, ydhS, yebE, yecE, yeeN, yeiR, yfcR, yfdX, yfeS, yfiB, ygbM, yggM, ylil, zinT</i>
8	<i>allC, aspA, atpA, atpB, atpC, atpD, atpE, atpF, atpG, atpH, cyaA, cysB, cysC, cysD, cysE, cysG, cysH, cysI, cysJ, cysN, cysP, cysU, cysW, degP, fkpB, folB, gmhB, guaA, hyaD, lipA, lipB, lpd, lpoA, nlpI, nuoA, nuoB, nuoC, nuoE, nuoF, nuoG, nuoH, nuoI, nuoJ, nuoK, nuoL, nuoM, nuoN, prc, rimP, rseA, sdhB, sucA, sucB, tolA, tolB, tpiA, ubiE, ubiF, ubiG, ubiH, yciH, ydjI, yes</i>
9	<i>allC, aspA, atpA, atpB, atpC, atpD, atpE, atpF, atpG, atpH, cyaA, cysB, cysC, cysD, cysE, cysG, cysH, cysI, cysJ, cysN, cysP, cysU, cysW, degP, fkpB, folB, gmhB, guaA, hyaD, lipA, lipB, lpd, lpoA, nlpI, nuoA, nuoB, nuoC, nuoE, nuoF, nuoG, nuoH, nuoI, nuoJ, nuoK, nuoL, nuoM, nuoN, prc, rimP, rseA, sdhB, sucA, sucB, tolA, tolB, tpiA, ubiE, ubiF, ubiG, ubiH, yciH, ydjI, yes</i>

この結果を検証するため、LTG グループと SPG グループから 9 株の増殖動態を液体培地で培養して観測した。LTG グループの 2 株 (*rpe, rnt*) では LTG の遅延が、SPG グループの全 9 株 (*ubiG, ubiH, lpd, atpC, cysE, ubiE, folB, sucA, sucB*) では SPG の低下が確認できた。LTG グループの 2 株 (*tusE, cysM*) では、液体培地では LTG の遅延が観測されなかったが、固体培地では LTG の遅延が観測された。このように、培養環境に依存して LTG の長さが変化する可能性がある。残りの LTG グループの 5 株 (*rbfA, rlmE, rplA, rsgA, tesC*) では、液体培地での LTG の遅延は観測されておらず、固体培地での増殖観測はしていない。

次に、特定の増殖 phase で生理的に重要な機能を調べるため、LTG グループまたは SPG グループに共通する遺伝子機能をそれぞれ調べた。EcoCyc や KEGG の生物知識データベースを基に、両グループの約 80% の遺伝子を機能的にマッピングできた (図 2.13)。LTG グループの多くの遺伝子はリボソームの形成や tRNA の修飾に関与していた。一方、SPG グループのほとんどの遺伝子が呼吸鎖 (NADH dehydrogenase I, cytochrome b0 terminal oxidase, ATP synthase) と酸化ストレスの応

答システムに参与していた。この結果から、LTG の遅延が観測されるグループと SPG の低下が見られるグループを区別して選別することを可能にしていると考えられる。

この結果の信憑性を確かめるため、呼吸鎖関連遺伝子群の欠失による SPG の低下を調べた。SPG は細胞増殖の飽和点であり、培地濃度が一定である本実験条件では SPG を増殖収率とみなすことができる。呼吸鎖の経路が損傷すると増殖収率が低下することが知られている(Jensen and Michelsen, 1992)。例えば ATP 合成酵素をコードする遺伝子が破壊されると、大腸菌は ATP を合成するために効率が悪い基質レベルのリン酸化を行うため、増殖の効率が低下する。本実験の結果では主な呼吸鎖経路の SKO 株が SPG グループに含まれていた。加えて、呼吸鎖のうち効率が悪い経路である NADH dehydrogenase II (Ndh)と cytochrome bd-II terminal oxidase (AppB, AppC)が選択されなかった (図 2.13)。これらの結果から、Colony-live は増殖動態の表現型の違いを正確に捉えていると考えられる。

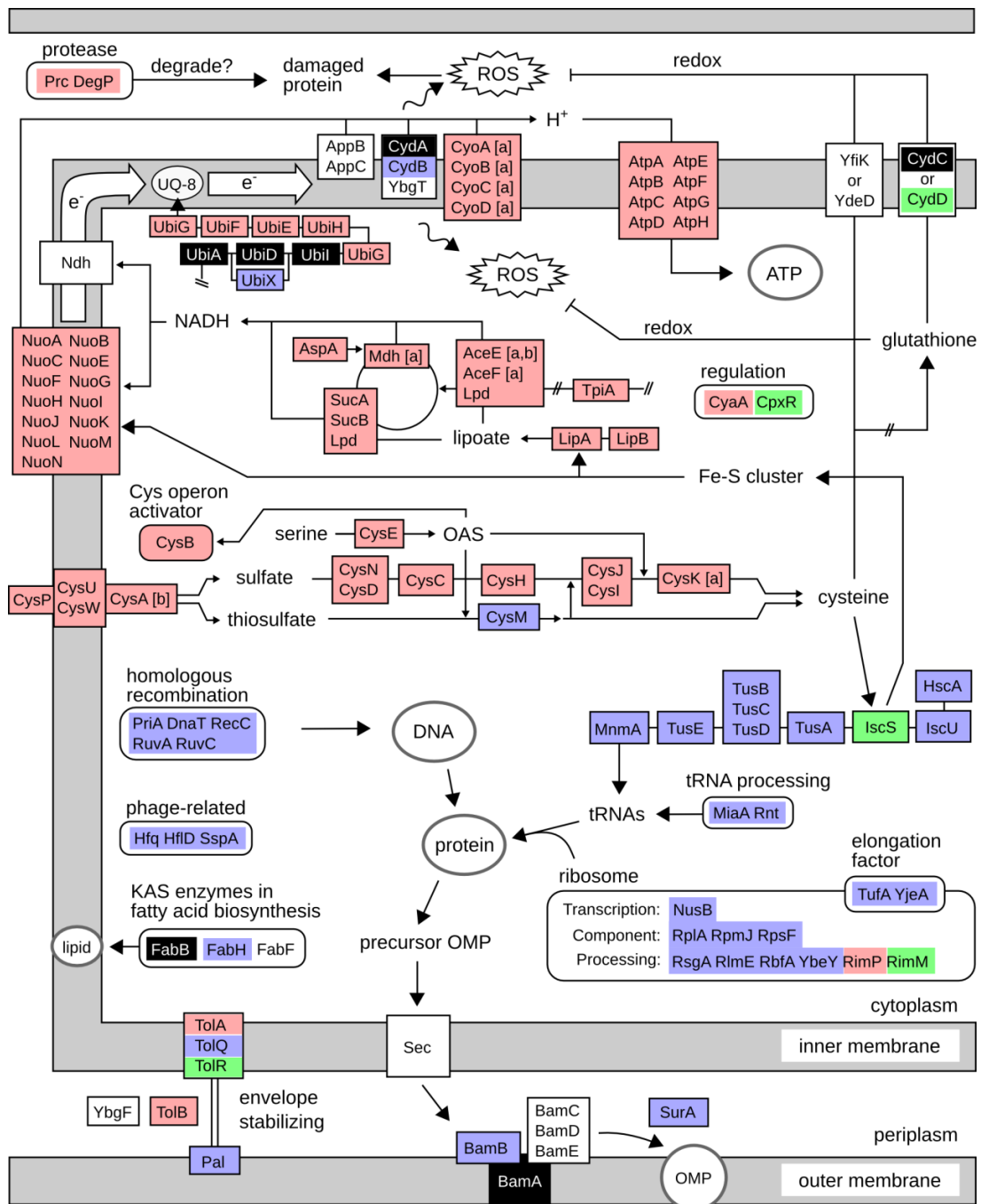


図 2.13 LTG の延長、SPG の低下が観測された欠失遺伝子の機能マッピング

図 2.12 の Group 5 (MGR と LTG) の欠失遺伝子は青色、Group 8 (MGR と SPG) の欠失遺伝子は赤色、Group 6 (MGR と LTG と SPG) の欠失遺伝子は緑色で示した。SPG のみが低下した欠失遺伝子は[a] を、低い有意性($p < 0.05$, $FDR < 0.05$) で SPG の低下が判定された欠失遺伝子は[b] を付加した。LB 培地条件での必須遺伝子は黒色、反応は矢印、タンパク質複合体は四角、機能グループは丸四角、細胞膜は灰色で示した。ROS: *Reactive Oxygen Species*; UQ-8: *UbiQuinone-8*; OAS: *O-Acetylserine*; KAS: β -*Ketoacyl-ACP Synthases*; OMP: *Outer Membrane Proteins*; Sec: *SecYEG* translocase.

2.3.9 システイン合成経路の重要性

Colony-live を用いたスクリーニングによって、システイン合成経路の SKO 株が増殖低下を示すことがわかった。これは予想外の結果であった。なぜなら、次の 2 つの理由からシステインの供給量は十分だと考えられるためだ。1 つは本実験で用いた LB 培地にはシステインが含まれていること(Sezonov et al., 2007)、もう 1 つはシステインを合成するには 2 つの経路が存在することである (図 2.14)。今回のスクリーニング結果では、ほとんどのシステイン合成経路の SKO 株が MGR と SPG を低下させていた。この MGR と SPG の低下は、システインの合成に関する物質を添加することで回復した (図 2.14)。このことから、システインの供給が不足していることが MGR と SPG を低下させる原因であることがわかった。つまり、大腸菌が通常の生育をするには十分量のシステインが合成される必要があることがわかった。

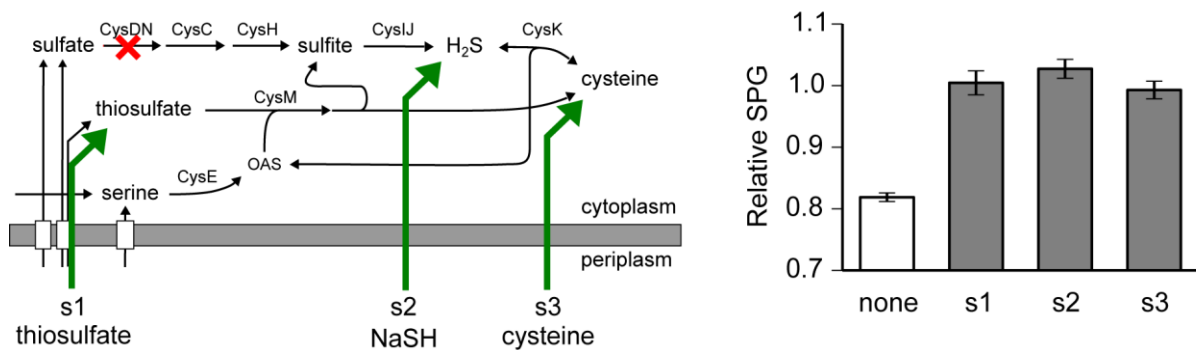


図 2.14 システイン合成関連基質の添加による *cysN* 欠失株の増殖低下の回復

cysN 欠失株の増殖低下がシステイン合成に関する基質を添加することで回復するかを調べた。左図にシステイン合成経路を示す。*cysN* 欠失により破壊された反応 (赤)、添加した基質 (緑色の矢印) を示した。NaSH (sodium hydrosulfide; 硫化水素ナトリウム) は細胞に取り込まれて H₂S (hydrogen sulfide; 硫化水素) となる。各基質を添加した際の増殖 (SPG) は 10 回測定した。右図に平均値と標準偏差 (エラーバー) を示した。relative SPG とは野生株 SPG を 1 とする相対的な増殖値である。

2.4 考察

本章では、ハイスループットな増殖測定における従来法(CONV)の 3 つの問題点を改良して、新しい増殖測定システム Colony-live を構築した。

従来方の 1 つ目の問題は、コロニーの縦方向の増殖を観測していないことである。まず、コロニーの撮影装置を検討した。コロニーの撮影装置として広く使用されるのはカメラである。しかし、本研究の結果から、カメラで撮影した画像には、図 2.2 で示したように、空間的な光量の歪みが生じており、また光の定量値のばらつきが大きいことが明らかとなった。一方、スキャナーで撮影した画像は空間的な光量の歪みが観測されず、光量値のばらつきも小さかった。カメラは撮影位置を一点に固定して瞬間的に撮影するのに対して、スキャナーは十分に照明を当てながら位置を移動しながら撮影するため、この違いが生じたと考えられる。次に、撮影したコロニーの画像から、縦方向の増殖（細胞量）を定量するための計算式を検討した。計算式として広く使用されているのは差分式である。しかし、通過光の減少を定式化した Lambert-Beer の法則では、対数式が用いられる。大腸菌培養液の希釈系列を用いて 2 式を評価した結果、対数式の方が細胞量の定量に適していることが明らかとなった（図 2.3）。このように、撮影装置と定量式を改良することで、コロニーの増殖をより正確に捉えることが可能となった。

従来法の 2 つ目の問題は、Neighbor effect により増殖測定値のばらつきが増加し、再現性が低下することである。Neighbor effect による影響を減らすために、Pirt のコロニー増殖モデルを参考にした。Pirt のモデルによると、コロニーの生育はコロニーの内部領域ではなく、コロニーの外周領域で起こる(Pirt, 1967)。コロニーの増殖を空間的に経時測定した結果、コロニーの内部領域よりも外周領域のほうが生育速度が早いことがわかった(McKay et al., 1997)。コロニーは増殖すればするほど横方向に増殖するので、隣接コロニーとの距離が近づき、Neighbor effect による影響が増大することが予想される。そこで、Neighbor effect を最小化するために、コロニーの中央領域の細胞生育のみ(mass*) を定量した。その結果、Neighbor effect は顕著に減少し、増殖測定値のばらつきを抑えて再現性を向上させることができた（図 2.5）。これによって、増殖低下を示す大腸菌の SKO 株スクリーニングにおいて、従来法では見逃された mild な増殖低下を捉えることに成功した（図 2.9）。

従来法の 3 つ目の問題は、増殖動態の情報が欠如していることである。従来法により得られた増殖値は、Colony-live で得られる 3 つの増殖特性値のうち MGR（最大増殖速度）との類似度が最も高かった。Colony-live では MGR 以外にも LTG、SPG が得られるので、増殖変化を更に細かく分類できる。今回のスクリーニング結果で MGR が低下した SKO 株のグループを、さらに「MGR が低下して LTG が延長したグループ」と「MGR が低下して SPG が低下したグループ」の 2 グループ

へ明確に分類できた (図 2.12)。そして、各グループの欠失遺伝子はそれぞれ異なる生理機能と関係していた (図 2.13)。つまり、特定の増殖 phase において重要だと考えられる生理機能が示唆された。このように、増殖動態を調べることによって、生物学的に意味のある詳細な増殖変化の分類が可能となった。

MGR と LTG が低下したグループの SKO 株と関係する生理機能は、主にタンパク質合成、tRNA 修飾経路、リボソームの maturation などであった。なぜこれらの欠失株が LTG を延長したのか？ tRNA の修飾はタンパク質への翻訳効率や fidelity に関係していると考えられているため (Agris et al., 2007)、これらの欠失株では新しいタンパク質の合成時間が伸びると予想される。定常期から対数増殖期への遷移では global expression profile が大幅に変化するため (Selinger et al., 2000)、増殖初期では大量の新規タンパク質合成が必要になる。従って、タンパク質合成時間が伸びた欠失株では増殖初期の時間 (lag time) が伸びたと考えられる。MGR と LTG が低下したグループにはタンパク質合成以外の機能も含まれていることから、lag time の延長には多様な機構が存在していると考えられる。

MGR と SPG が低下したグループの SKO 株と関係する生理機能は、主に呼吸鎖であった。興味深いことに、システイン合成経路の SKO 株においても、MGR と SPG が低下していた。これは、システイン供給不足による呼吸鎖活動の低下であると考えられる。呼吸鎖は主な酸化ストレス発生源であり (Imlay, 2008)、その酸化ストレスを除去する効果がシステインにはある (Ohtsu et al., 2010)。また、システインは Fe-S クラスターの形成に必須であり、Fe-S クラスターは NADH dehydrogenase I の合成に必須で、この酵素は呼吸鎖の重要な酵素の 1 つである。システイン合成経路と呼吸鎖とに関係があることは、当研究室で蓄積中の遺伝的相互作用データからも支持される結果が得られている。このように、増殖動態を調べることにより、増殖低下の機構を推測することができた。

以上のように Colony-live は従来法よりも優れた特徴を有する一方で、次のような課題を有する。1 つ目の課題はコロニーの形態情報を見逃がしたことである。コロニーの形態異常は *dnaK* 欠失株をはじめ、いくつかの SKO 株で観測されている。コロニーの形態異常が生じた場合、Colony-live では増殖変化を正確に捉えることができなかった。この問題を解決するため、コロニーの形態が定量できる解析手法の開発が望まれる。2 つ目の課題はスキャナーの光や熱によるコロニー生育への影響の有無が不明確な点である。Colony-live では増殖の経時変化を調べるため、強い光と生じた熱に何度も曝される。大腸菌には熱ストレス応答や可視光を感知するタンパク質があるため (Nakahigashi et al., 1992; Tschowri et al., 2009)、熱や光による生育への影響が懸念される。そこで SKO ライブラリーについて経時的スキャンの影響を評価した。30 分おきにスキャンした場合とそうでない場合の生育を比較したところ、顕著な違いは見られなかったため、SKO では光の影響はないと考えてい

る（図 2.15）。しかし、より複雑な環境（DKO や SKO に薬剤を加えた条件）では生育への影響が出る可能性が否定されたわけではない。3 つ目の課題は、現在の Colony-live の測定・解析パラメータが他の生物種や培地条件でそのまま利用できるかが不明な点である。本研究のパラメータは大腸菌が LB 寒天培地で 37°C で生育する条件に最適化した。コロニー形状や増殖パターンが異なる場合、現状よりもより適切なパラメータが存在すると思われる。生物種や培養条件等を大幅に変更した場合は、パラメータの見直し（回帰分析用の増殖モデル式、コロニー中央領域の直径など）を検討すべきである。

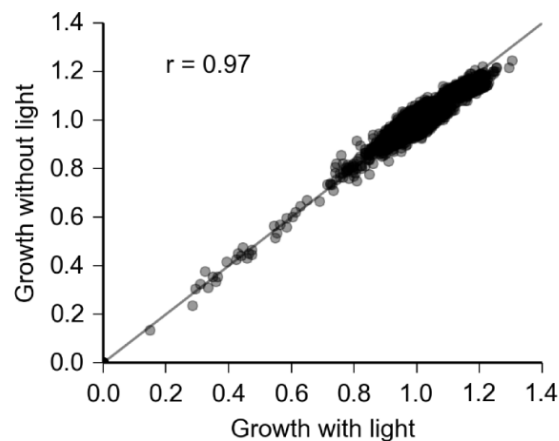


図 2.15 経時的スキャンによる生育への影響評価

37 °C で 20 時間培養後の全 SKO 株コロニーの増殖を 30 分間隔でスキャンを行なう条件(Growth with light) と、20 時間後に 1 回だけスキャンを行なう条件(Growth without light) で測定して比較した。コロニーの定量には中央領域の細胞量 (mass*) を使用した。

以上、本章では Colony-live を構築して、高いスループットを保ちながら測定の質を向上させることに成功した。Colony-live ではコロニーの縦横方向の増殖を経時的に観測することで、3 つの増殖特性値(LTG, MGR, SPG)を高い再現性で測定できた。増殖低下を起こす SKO 株を Colony-live でスクリーニングした結果、従来法では検出できなかった増殖低下を検出でき、さらに特定の増殖 phase と生理機能との関係を解明できた。今後、網羅的な DKO の増殖測定に Colony-live を用いることで、膨大な量の DKO 株の増殖動態を正確に捉え、質の高いデータを蓄積できると期待する。

第3章 高効率二重欠失法の開発

3.1 緒言

大腸菌の遺伝子を、相同組換えを用いて迅速かつ簡便に欠失する手法が、2000年に Datsenko らによって開発された(Datsenko and Wanner, 2000)。この手法を用いて、当研究室では大腸菌の一遺伝子欠失 (SKO) 株ライブラリーである Keio collection が構築された(Baba et al., 2006; Yamamoto et al., 2009)。大腸菌は約 4000 のタンパク質コードの遺伝子が存在し、全ての二重欠失株 (DKO) の総数は 800 万 (${}_{4000}C_2 = 8 \times 10^6$) に及ぶ。これまでに Keio collection の作製には約 3 年を要しており、全ての DKO 株を Datsenko らの手法で作製するのは事実上不可能である。加えて、実験に必要な人的、物的コストも大きな問題となる。そこで、我々は接合現象を利用し、2 種類の欠失を組み合わせ、2 重欠失化する方法の開発を進めることにした。この目的の為、新しくクロラムフェニコール耐性を持つ SKO 株ライブラリーの ASKA deletion collection を構築した (Keio collection はカナマイシン耐性)。その後、一方の SKO 株を Hfr 化(High Frequency of Recombination)することで、他方と接合し、2 種類の薬剤で選択する事で DKO 株が得られる。接合は 2 種類の大腸菌細胞を接触することで生じるため、自動化が容易と考えられ、作製速度を大幅に向上できると期待される。この接合による大腸菌の高効率二重欠失法の開発を進めた。

検討が必要な課題は 3 つ考えられた。1 つ目は高効率 Hfr 株の作製である。SKO 株ライブラリーの大腸菌は接合能力を持たない通常の大腸菌である。Hfr 化に必要な要素は F plasmid の *tra* 遺伝子群と伝達開始起点 (origin of transfer; *oriT*) である。Hfr 株では染色体上の *oriT* と目的の遺伝子欠失との距離が近いほど、短時間の接合で、遺伝子欠失領域が受容菌に効率良く伝達されると考えられる。そのため、様々な遺伝子欠失を高効率に伝達する Hfr 株を作製するには、*tra* 遺伝子群と *oriT* を持つ F plasmid 由来の断片を染色体上様々な位置に組み込む必要がある。そこで、特定の細胞においてのみ複製可能な plasmid 上に、*tra* 遺伝子群と *oriT* 及び相同組換えにより染色体に挿入するための断片を持つ CIP (Chromosome Integration Plasmid) と名付けた plasmid を構築する。挿入位置の違う CIP を用いて、Hfr 株に高効率で変換する手法を開発する。

2 つ目の課題は、部分二倍体等による目的の 2 重欠失株ではない状態での薬剤耐性獲得菌の出現頻度の低減である。寒天培地プレート上での接合による 2 重欠失法では、薬剤を含まない寒天培地上で接合した後に、2 種類の薬剤を含んだ寒天培地で DKO 株を選択する。その際持ち込まれる細胞量は多く、そのなかには目的の DKO 状態ではない細胞が薬剤耐性能を獲得して増殖することが高頻度で観測され

た。この出現頻度を低減し、目的とする2遺伝子欠失による生育への影響を可能な限り正確に測定する条件検討が重要となる。同時に、目的外の薬剤耐性獲得菌の出現を検出する手法の開発も重要と考えられる。増殖動態の観測により偽陽性及び陽性の2薬剤耐性菌の区別が可能かどうかを検討する。

3つ目の課題は自動化による高効率な実験に向けたSKO株コレクションの更新である。Keio collectionと名付けられた大腸菌の全ORFのSKO株ライブラリーは、2009年の山本らにより、コンタミネーションや遺伝子の部分二倍体化(partial duplication)により遺伝子欠失されていない株の存在が報告された(Yamamoto et al., 2009)。また、Keio collectionは2005年時点の遺伝子アノテーション情報を基に設計されたが、アノテーション情報はその後も更新が続けられている。最新の遺伝子情報に基づき欠失の問題点を整理しておくことが、その後の解析に非常に重要となってくる。また、ストックプレートのレイアウトをHigh-throughputな実験に向けて最適化することで、実験速度の向上や、測定データの質の向上の為に重要と考えられる。これらの更新を行ない、新しくGI(Genetic interaction)解析用の欠失株グリセロールストックプレートセットを構築する。

3.2 材料と方法

3.2.1 使用菌株及びプラスミド

SKO 株ライブラリーにはカナマイシン耐性をもつ Keio collection(Baba et al., 2006)を整理した GI plate set 及びクロラムフェニコール耐性を持つ ASKA deletion collection (発表準備中)を使用した。F plasmid は電気通信大学の三瓶 巖一博士から頂いた。BW38029 (*uid::pir*) 株、pAH143、pAH144 プラスミド(Haldimann and Wanner, 2001)は Purdue 大学の Barry Wanner 教授から頂いた。

3.2.2 クローニング

使用したプライマー配列を表 1 に示す。クローニング用の PCR プライマーの設計において、PCR に最適な priming site は Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)で決定した。プライマーの合成は Invitrogen に依頼した。PCR 産物を用いた相同組み換えは Datsenko らの方法(Datsenko and Wanner, 2000)に従った。NotI 制限酵素はタカラバイオ株式会社から購入した。

表 1 使用したプライマー

Name	Sequence 5' to 3'
RTP-1	TCTCGCATAAAAACTGCGCAGGGCGCTGAAGGCC ATCACCCGTTTCAGAACTGGCAGTTCCTACTCTCG
RTP-2	GCAGGTTTGCCACTGCGCCCCGTTGGGGATGTAA CGGACTTCCGGATCCAATTCCCATGTCAGCCGTTA
RTP-3	aaggaaaaagcggccgcACGCCACGAAGAGTATCAG
RTP-4	tttcctttgcgccgcGAGGCATCTCTGGCACATTG
RTP-5	CCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGA
RTP-6	GGCGATGAGCGAAATGTAGT
RTP-11	tttcctttgcgccgcATCTCCAGAGCTGGTATTGC
RTP-12	aaggaaaaagcggccgcTACTGAATCGGGACGAAGTG
RTP-13	tttcctttgcgccgcGTTTCAGTTGCAGGAACAGAG
RTP-14	aaggaaaaagcggccgcCGGAAATGGTGGAAAGAGAAC
RTP-15	tttcctttgcgccgcAGCTGGCGAGCAATGTGCAAAC
RTP-16	aaggaaaaagcggccgcCCGGCGTTGACGAAACATAC
RTP-17	tttcctttgcgccgcGAAAGATCCGGCGCATGTTCG
RTP-18	aaggaaaaagcggccgcTGAAGTATTGCCGATACCTG
RTP-19	tttcctttgcgccgcTCTTCCATGCCCCGGTAACGC
RTP-20	aaggaaaaagcggccgcGGCGAAATTAGCCACCGAAC
RTP-21	tttcctttgcgccgcTCTGGGCTATACCGATGAGG
RTP-22	aaggaaaaagcggccgcCTCCTGGCGTGTGGGTTATG
RTP-23	tttcctttgcgccgcAATTACCGTCGCCGATCAAC

RTP-24	aaggaaaaagcggccgcTTTGCCGAAGTGGTGATTGG
RTP-25	tttcttttgcggccgcAACTTACCGCCGTTGTATCG
RTP-26	aaggaaaaagcggccgcCGTTTACACTGCGTGTTTCG
RTP-27	tttcttttgcggccgcATAGCGGGCGGCAGAAGGAATC
RTP-28	aaggaaaaagcggccgcTCCAGCGATGCAGGTGGTAG

* 小文字の塩基配列は *NotI* 制限酵素によって切断される。

3.2.3 液体での接合

オス (Hfr) 株とメス株の培養液を 100 μ L ずつ試験管に加えて混合して、37°C のウォーターバスに 90 分間静置することで接合させた。接合後は LB 培地 1mL を加え、37°C で 1 時間振とう (回復培養) した。この培養液の希釈液 100 μ L を適当な薬剤を含む寒天培地上に撒いて 37°C で一晩培養した。寒天培地上に出現した接合体コロニー数 (CFU) はカウントして記録した。接合体コロニーは単離して薬剤耐性を確認した後、グリセロールストックとして保管した。

3.2.4 GI plate set の作製

プレート位置の並び替え (Cherry picker) には Eppendorf 社の epMotion 5070 を用いた。Keio collection などの 96 well プレート単位の SKO 株培養液を、位置を並び変えて 96 well のプレートに植菌して一晩培養した。プレートの全 well を埋めるために、一部の SKO 株培養液は 2 箇所植菌した。この培養液に終濃度 15% になるようにグリセロールを加えて、96 well プレートに 100 μ L、384 well プレートに 10 μ L を分注した。保存用の 384 well プレートには GENETIX 社のマイクロプレート 384well (品番: 384-well low profile(\times 6001)) を用いた。このプレートは保存容量 (20 μ L) が少ないため凍結保存状態から菌液が溶解するまでの時間が短かく、丸穴なので毛細管現象によるコンタミの可能性がない。

3.2.5 Keio collection の遺伝子欠失状況の解析

Keio collection のプライマーの塩基配列は設計当時の配列情報を用いた (Baba et al., 2006)。大腸菌 MG1655 株 (ACCESSION 番号: NC_000913) の染色体塩基配列 (FNA ファイル) と遺伝子アノテーション情報 (GFF ファイル) は NCBI の FTP サイト (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/>) からダウンロードした (version は NC_000913.2)。塩基配列の相同性検索には ssearch version 36.3.5b Nov 2011 (Smith and Waterman, 1981) を用いた。Keio collection のプライマーセットの塩基配列と一致する染色体領域を相同性検索で調べることで、プライマーセットの塩基配列から欠失した染色体領域を計算した。遺伝子アノテーション情報を基に、欠失した染色体領域に含まれる遺伝子とその欠失領域を調べた。Keio collection では対象

遺伝子の 2 番目のコドンから、終始コドンから 18nt 上流までの塩基配列が欠失される設計である(Baba et al., 2006)。この設計と最新の遺伝子アノテーション情報とのズレを計算し、整理した。

3.2.6 ロボットによる寒天培地への植菌方法

培養液やコロニーの寒天培地への植菌には、Singer Instruments 社 (UK) のスタンプロボットである Singer RoToR HDA を使用した。液体の培養液を寒天培地に移す場合には Singer Instruments 社の 384-long pin (品番: RePad384 LW) を用いた。コロニーを寒天培地に移す場合には Singer Instruments 社の 384-short pin (品番: RePad384 A) と 1536-short pin (品番: RePad1536 A) を用いた。これらの pin は使用后、必要に応じて 10% ブリーチ液に一晩漬けて、よくすすいで乾燥させることで再利用した。ストック液と接触する 384-long pin についてはコンタミネーションを防ぐために、使用前にエタノールを吹きかけ、30 分以上 UV ライトを照射して除菌した。

3.3 結果

3.3.1 CIP の構築

大腸菌で接合伝達するには *tra* 遺伝子群と接合伝達の開始起点 (origin of transfer: *oriT*) 配列が必要である。特に、SKO を接合伝達するには *oriT* 配列が染色体上に存在する株 (Hfr 株) が必要である。そこで SKO 株の染色体に *tra* 遺伝子群と *oriT* 配列を組み込んで SKO-Hfr 株を作製するためのツールとして、20 種類の CIP (Chromosome Integration Plasmid) を作製した。CIP は *oriT* 配列、*tra* 遺伝子群、ストレプトマイシン耐性遺伝子、条件的複製起点 *oriR γ* 、そして 10 種類 2 方向の大腸菌染色体の塩基配列 (約 300 bp) から構成される (図 3.1A)。CIP は大腸菌染色体の 300bp の部分配列を介して染色体へと組み込まれるように設計しており、20 種類の CIP により染色体上 10 箇所の 2 方向に組み込むことが可能である (図 3.1B)。CIP が染色体に組み込まれることによる表現型への影響を最小限にするために、CIP の大腸菌染色体の塩基配列は全て non-coding 領域とした。CIP の種類を選ぶことで、SKO-Hfr 株における接合伝達の開始位置と伝達方向 (Clockwise 型か Counter clockwise 型) を自由に決定できる (表 3.2)。

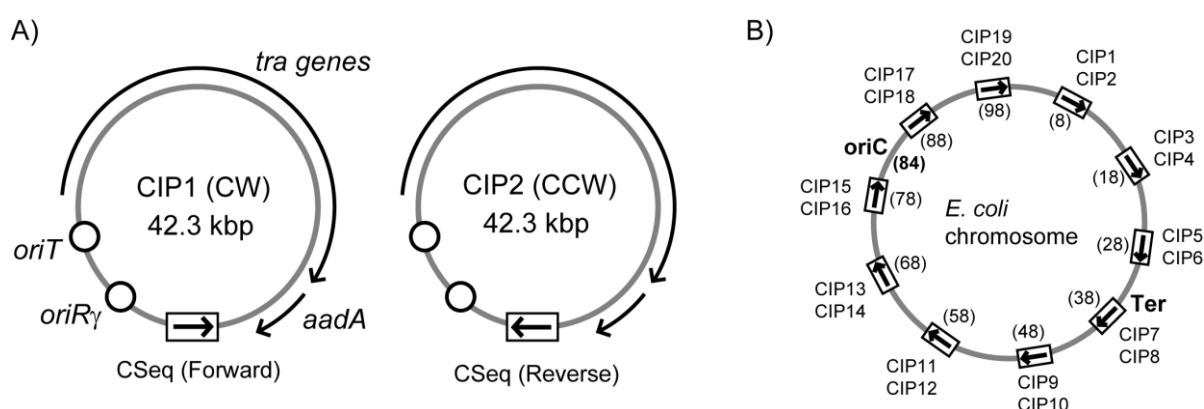


図 3.1 CIP の構造

(A) CIP は 42.3kbp の環状染色体であり、接合伝達起点 (*oriT*)、接合伝達遺伝子群 (*tra genes*)、条件付き複製起点 (*oriR γ*)、ストレプトマイシン耐性遺伝子 (*aadA*)、染色体配列 (Chromosome Sequence: CSeq) で構成される。染色体配列は 10 種で 2 方向 (染色体 Clockwise 方向と同じならば Forward、逆ならば Reverse) の組み合わせなので計 20 種類の CIP を構築した。(B) 20 種の CIP が組み込まれる大腸菌染色体の位置。括弧内の数字は大腸菌の環状ゲノム全体を 100 min としたときの染色体位置 (min) を表す。

表 3.2 20 種 CIP の挿入位置と接合伝達方向

CIP#	Integration position (bp)	Transfer direction
1	379273 - 379580 (8 min)	Clockwise
2	379273 - 379580 (8 min)	Counter clockwise
3	842329 - 842668 (18 min)	Clockwise
4	842329 - 842668 (18 min)	Counter clockwise
5	1304647 - 1304967 (28 min)	Clockwise
6	1304647 - 1304967 (28 min)	Counter clockwise
7	1776236 - 1776573 (38 min)	Clockwise
8	1776236 - 1776573 (38 min)	Counter clockwise
9	2238480 - 2238806 (48 min)	Clockwise
10	2238480 - 2238806 (48 min)	Counter clockwise
11	2697867 - 2698218 (58 min)	Clockwise
12	2697867 - 2698218 (58 min)	Counter clockwise
13	3156731 - 3157083 (68 min)	Clockwise
14	3156731 - 3157083 (68 min)	Counter clockwise
15	3628903 - 3629210 (78 min)	Clockwise
16	3628903 - 3629210 (78 min)	Counter clockwise
17	4091122 - 4091424 (88 min)	Clockwise
18	4091122 - 4091424 (88 min)	Counter clockwise
19	4555194 - 4555525 (98 min)	Clockwise
20	4555194 - 4555525 (98 min)	Counter clockwise

CIP の染色体への組み込みは次のように行った。CIP の複製は条件付き複製起点 *oriR γ* に依存しており、*oriR γ* の複製開始には *pir* 遺伝子産物 (π protein) が必要である。CIP 保持株には *pir* 遺伝子が染色体上に組み込まれており、*pir* 遺伝子を持たない SKO 株と接合させると、CIP は接合伝達後、複製されない。この状態で薬剤による選択を行うことで、CIP は染色体に組み込まれて SKO-Hfr 株が生じる (図 3.2)。すなわち、CIP 保持株と SKO (クロラムフェニコール耐性) 株を接合させ、クロラムフェニコールとストレプトマイシンで選択培養することで SKO-Hfr 株が得られる。

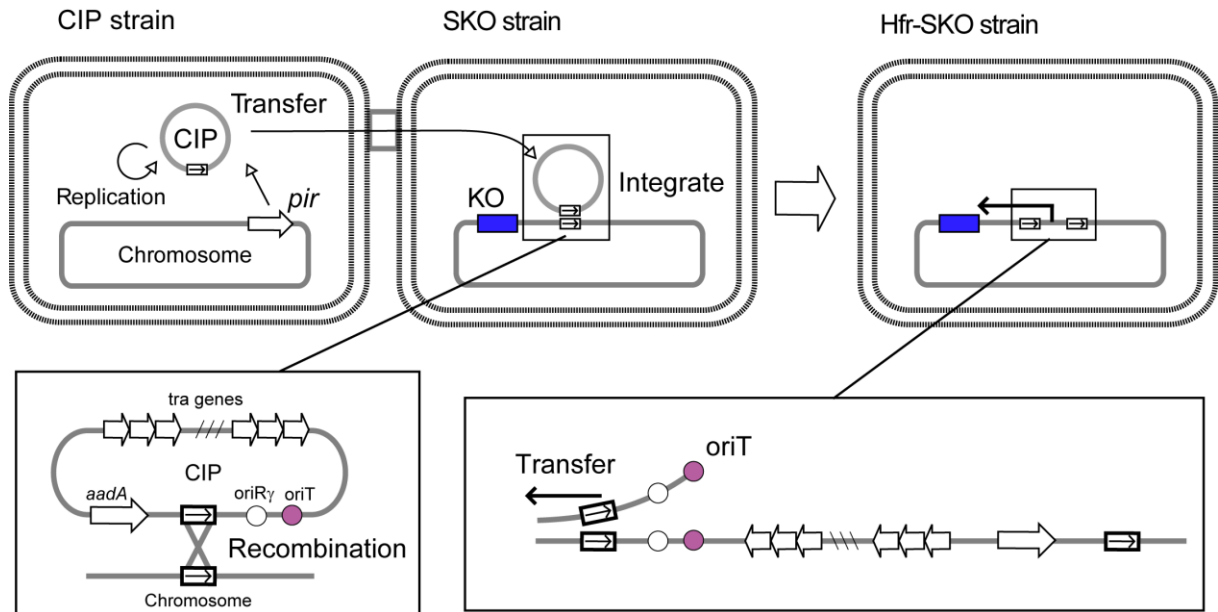


図 3.2 CIP による Hfr-SKO の作製

CIP 保持株では *pir* 遺伝子産物により CIP が複製される。CIP 保持株と SKO 株を接合させることで、CIP は SKO に伝達される。伝達された CIP は染色体配列を介する相同組み換えにより大腸菌の染色体へ組み込まれて、Hfr-SKO 株が生じる。Hfr-SKO 株では接合による染色体配列の伝達が *oriT* から始まる。この伝達は *oriT* から *tra* 遺伝子群から離れる方向となる（この例では *oriT* から Counter clockwise 方向に伝達が始まる）。

CIP のクローニングは次のように行った。Francois らの報告(François et al., 1990)を参考に *oriT* 配列と *tra* 遺伝子群は F plasmid の 58693 bp から 103 bp までの塩基配列とした。プライマーセット RTP-1,2 で pAH143 の *oriR γ* , *gen* 遺伝子配列を PCR 増幅して F plasmid と相同組み換えすることで、preCIP (*oriT*、*tra* 遺伝子群、*oriR γ* , *gen* 遺伝子) を作製した。形質転換体には F plasmid と preCIP の両方が保持されていたので (F plasmid の toxin-antitoxin 遺伝子 *ccdAB* が原因だと思われる)、BW38029 野生株と接合させることで preCIP のみを保持する株を単離した。次に、大腸菌ゲノム抽出液を 10 種類のプライマーセット (RTP-3,4; RTP-11,12; RTP-13,14; RTP-15,16; RTP-17,18; RTP-19,20; RTP-21,22; RTP-23,24; RTP-25,26; RTP-27,28) で PCR 増幅することで、10 種類の染色体塩基配列を得た。各染色体塩基配列と *NotI* 制限酵素処理した pAH144 プラスミドを ligation して、染色体塩基配列の ligation 方向を区別して単離することで、20 種の染色体含有プラスミド (*oriR γ* 、染色体塩基配列、*addA* 遺伝子) を作製した。20 種のプラスミドをプライマーセット RTP-1,2 で PCR 増幅して preCIP と相同組み換えすることで 20 種の CIP を作製した。

各 CIP の染色体塩基配列はプライマー RTP-5 または RTP-6 を用いた PCR 増幅によって確認した。

CIP を保持するための大腸菌株には染色体の *uid* 遺伝子内に *pir* 遺伝子を持つ、BW38029 ($\Delta uid::pir$) 株を利用した。 $\Delta uid::pir$ 株を CIP 保持株にして SKO 株と接合させて SKO-Hfr 株の作製を試みた結果、CIP が染色体に組み込まれていない株 (SKO-Hfr 株ではない株) が高頻度で生じた。この問題の原因を調査した結果、CIP 保持株の *pir* 遺伝子が SKO 株へと伝達されており、CIP が染色体に組み込まれずプラスミドとして保持される可能性が高いと示唆される実験結果を得た。そこで、 $\Delta uid::pir$ 株の代わりに、大腸菌染色体の *dap* 遺伝子内に *pir* 遺伝子が挿入されている BW38029 ($\Delta dap::pir$) 株を作製して、利用した。*dapA* 遺伝子は必須遺伝子であり、 $\Delta dap::pir$ 株は生育に必要な diaminopimelic acid (DAP) を生合成できない。CIP 保持株 ($\Delta dap::pir$) 株の培養は DAP 添加培地を使用し、Hfr 株の選択培養には DAP 非添加培地を使用した。DAP 非添加培地では *pir* 遺伝子が伝達された SKO 株は *dapA* 遺伝子が欠失されているため生育できない。CIP 保持株を $\Delta uid::pir$ 株から $\Delta dap::pir$ 株に変えた結果、CIP が受容菌側に接合伝達されたのちに染色体に組み込まれた株 (SKO-Hfr 株) が 100% の効率で得られるようになった。

3.3.2 各種 SKO-Hfr 株による SKO の接合伝達効率

20 種類の CIP を用いることで SKO-Hfr 株における *oriT* と欠失遺伝子の距離、接合伝達の方法を自由に選択できる。そこで、SKO-Hfr 株の SKO の接合伝達効率における *oriT* と欠失遺伝子の距離、接合伝達の方法、接合時間の影響を調べた。20 種類の CIP を $\Delta rhaS$ 株と接合させて 20 種類の $\Delta rhaS$ -Hfr 株を作製した。各 $\Delta rhaS$ -Hfr 株の培養液を大過剰に存在する $\Delta araC$ 株と接合させた後、出現した DKO ($\Delta rhaS\Delta araC$) 細胞をクロラムフェニコールとカナマイシン培地で、オス ($\Delta rhaS$ -Hfr) 細胞をクロラムフェニコール培地で選択培養して CFU を測定して、SKO の接合伝達効率を計算した。SKO の接合伝達効率はオス 1 細胞当りに出現した DKO 細胞数とした (Transfer efficiency = CFU of DKO cells / CFU of donor cells)。結果を図 3.3 に示す。SKO の接合伝達効率は SKO から *oriT* までの距離が遠くなるにつれて低下し、環状染色体の半周付近(50 - 60 min)を過ぎると増加した。また、Clockwise と Counter clockwise における結果は類似していた。このことから、SKO の接合伝達効率を高めるには伝達方向よりも、SKO と *oriT* との最短距離を短くすべきであると考えられる。一方、SKO と *oriT* との距離が遠い場合であっても、接合時間を長時間 (24 時間等) とすることで高い SKO の接合伝達効率を得られた。このことは、SKO の接合伝達効率は接合時間を長くすることでも向上させられることを示す。実際に Babu らは接合時間を長くすることで、*oriT* を固定した条件で様々な染色体位置の SKO を十分な効率で接合伝達させている (Babu et al., 2011)。

また SKO と *oriT* との距離が短い場合であれば、短い接合時間であっても高い SKO の接合伝達効率が得られた。このことから、SKO と *oriT* との距離を短くすることで、接合時間が短くても十分な効率で SKO を接合伝達できることがわかった。

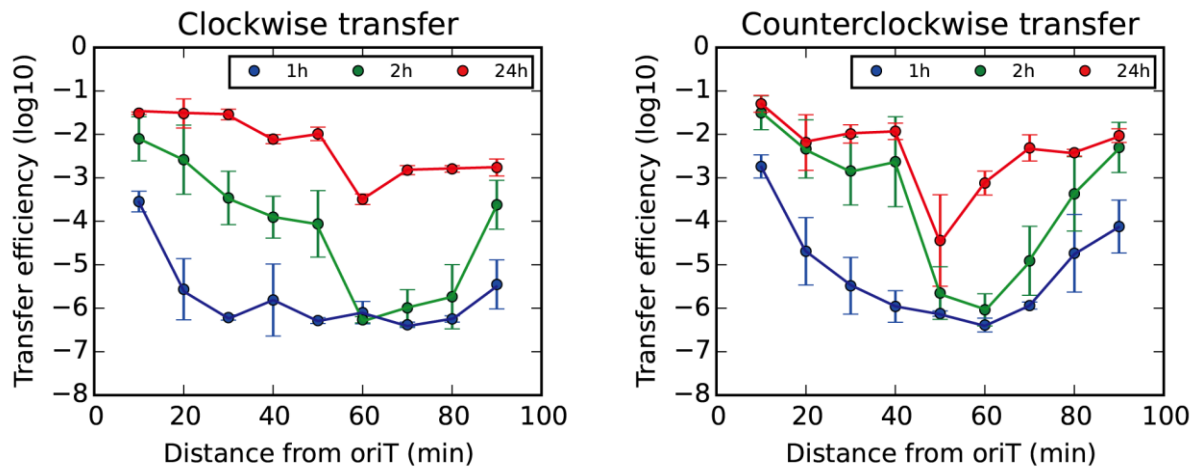


図 3.3 *oriT* から SKO までの距離と SKO 接合伝達効率の関係

20 種類の $\Delta rhaS$ -Hfr 株と $\Delta araC$ 株を 1、2、24 時間接合させて、 $\Delta rhaS$ -Hfr 株と DKO 株の細胞数から SKO 接合伝達効率を求めた (Transfer efficiency = CFU of DKO cells / CFU of donor cells)。SKO 接合 *oriT* から SKO までの染色体距離は染色体の全長を 100 min とする分割法であらわした。各ポイントは 3 回の実験結果の平均値であり、誤差バーは標準偏差である。

3.3.3 ハイスループットな SKO-Hfr 株作製法の検討

ハイスループットな SKO-Hfr 株の作製を可能にするため、96 well のプレート単位で SKO-Hfr 株を作製するプロトコルを構築した (図 3.4)。CIP 保持株と SKO 株とを接合させると、数個~数十個のコロニーが出現し、通常サイズと小さいサイズのコロニーが混在していた。小さいサイズのコロニーは single colony isolation により単離した状態でも小さいサイズのままであった。そのため、通常サイズの 2 コロニーを SKO-Hfr 候補株として single colony isolation した。単離したコロニーから 2 つの SKO-Hfr 候補株の培養液を得て、終濃度 15% になるようにグリセロールを混ぜて保存した。同時に、この培養液中の細胞が SKO されていること、CIP が組み込まれた状態 (Hfr) であることを適当なプライマーによる PCR 増幅で確認した。パイロット実験では SKO 株 96 株から 9 割程度 (86 株程度) の SKO-Hfr 株を作製できた。残りの 1 割の SKO 株では、接合後に CIP 由来の薬剤耐性能を持つ受容菌のコロニーが形成されなかったり、形成されたコロニーが SKO されていなかった。このことから、構築した方法を用いれば十分な効率で SKO-Hfr 株をハイス

ループットに作製できることがわかった。しかし、少量ながらも作製に失敗する株が存在するため、今後の改良が期待される。

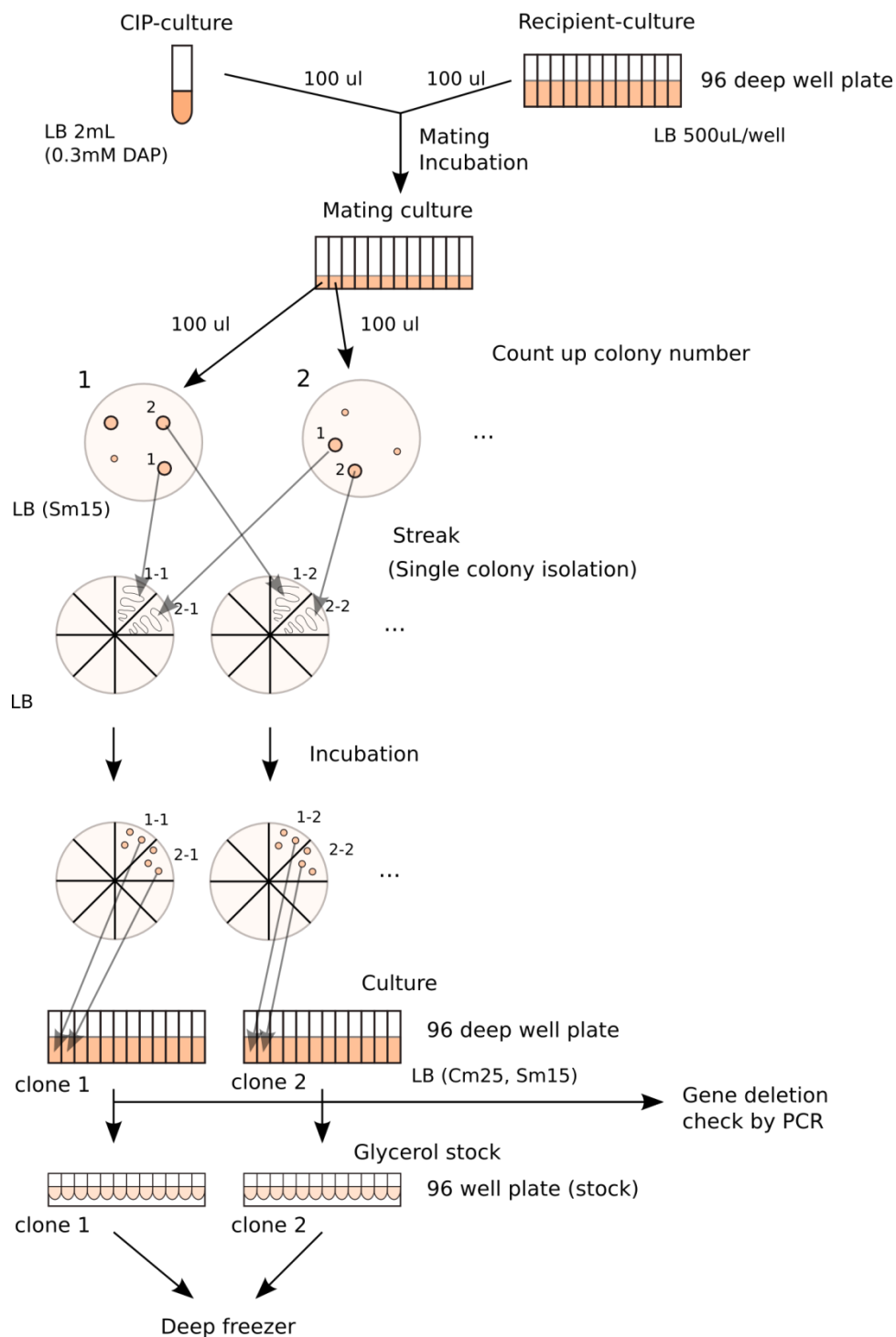


図 3.4 ハイスクロップな Hfr-SKO 株の作製方法

CIP 保持株を 0.3mM DAP 入り LB 培地 2mL に植菌し、37°C で一晩振とう培養することでオス培養液を用意した。同時に、LB 500 μ L /well の 96-deep well plate に ASKA deletion collection の SKO 株

を植菌し、37°Cで一晩振とう培養することでメス培養液を用意した。オス培養液 100 μ L とメス培養液 100 μ L を混合し、37°Cで 90 分間静置することで接合させた。接合した培養液 100 μ L を 15 μ g/mL Streptomycin 入り LB プレートにビーズを用いて塗布し、37°Cで一晩培養した。プレートには大小のコロニーが出現するので、大きいコロニーを LB プレートで single colony isolation した。単離コロニーを 25 μ g/mL Chloramphenicol と 15 μ g/mL Streptomycin 入りの LB 500 μ L/well が入った 96 deep well plate に植菌し、37°Cで一晩振とう培養することで候補株培養液を 2 クローン得た。この培養液において染色体上に SKO と CIP (Hfr 構造) が存在することを PCR 増幅により確認した。その後、Hfr 株培養液をグリセロールと混合し、混合液を 96 well plate に分注して -80°Cの deep freezer で保管した。

3.3.4 ハイスループットな DKO 作製法の検討

ハイスループットな DKO 作製時に必要な接合時間と薬剤選択条件の最適化を検討した。オス株の培養液を薬剤を含まない寒天培地上に塗布し、37°Cで 30 分間乾燥させた後、メス株の 1536 コロニーをスタンプして 37°Cで 1, 3, 6, 12, 24 時間培養を続け接合を行った。接合後はカナマイシン (Km) とクロラムフェニコール (Cm) を含む寒天培地にスタンプロボットを用いてレプリケートして DKO 株細胞を選択培養して、形成された DKO 株と期待される 2 薬剤耐性コロニーの生育具合を観測した。その結果、1 時間、3 時間はいびつな形状のコロニーが形成された。いびつな形状のコロニーは殖菌した薬剤耐性能を持つ細胞の初期量が少ない場合にも出現することをすでに観察していたので、この接合時間では DKO 作製量が不十分であると考えられる。6 時間、12 時間、24 時間では通常形状 (丸型) のコロニーが形成された。以上の検討実験より、接合時間が 6 時間あれば十分量の DKO 細胞が作製されると考えられる。

次に、DKO 株の薬剤選択条件を検討した。評価のために、DKO により致死となる既知のペア、生育が悪くなるペア、生育が変化しないペアを区画に分けて設置した (図 3.5)。薬剤選択は 2 回に分けて行うことを検討した。2 種類の SKO 株を混合する接合実験では、常に一方の欠失は他方では野生型の遺伝子を持っている。もっとも危惧した点は、供与菌側の野生型の遺伝子が接合で受容菌側に移動し、IS などを利用して受容菌で欠失されていた遺伝子の部分 2 倍体が作製されてしまうことである。1 次選択についてはさまざまな選択条件を試し (表 3.3)、2 次選択は Km 30 μ g/mL と Cm 25 μ g/mL の 2 薬剤を含む条件で固定した。各条件で 1 次選択を行い、2 次選択条件で 20 時間培養した後にプレートを撮影して、選択条件ごとの違いを比較した。その結果、致死となる DKO の区画 ($\Delta mrcA\Delta mrcB$) において、最も明確にコロニーが生育しなかったのは受容菌の持つ Km 耐性菌を選択し、供与菌を除去する C2 (Km 30 μ g/mL で 24 時間) であった (図 3.5)。以上の結果より、接合時間を 6 時間、カナマイシン培地で 24 時間の一次選択を行う方法を最適選択

条件とし、ハイスループットなスタンプロボットによる自動化 DKO 作製法を構築した (図 3.6)。この最適化条件であっても、致死となることが期待される既知の DKO の組合せの区画においてコロニーの生育が観測された。この問題に関して次項で検討を行った。

表 3.3 1 次選択条件の検討

Condition	Antibiotics ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	time (h)
C1	None	24
C2	Km 30	24
C3	Cm 25	24
C4	Km30 & Cm25	24
C5	Km30 & Cm25	3

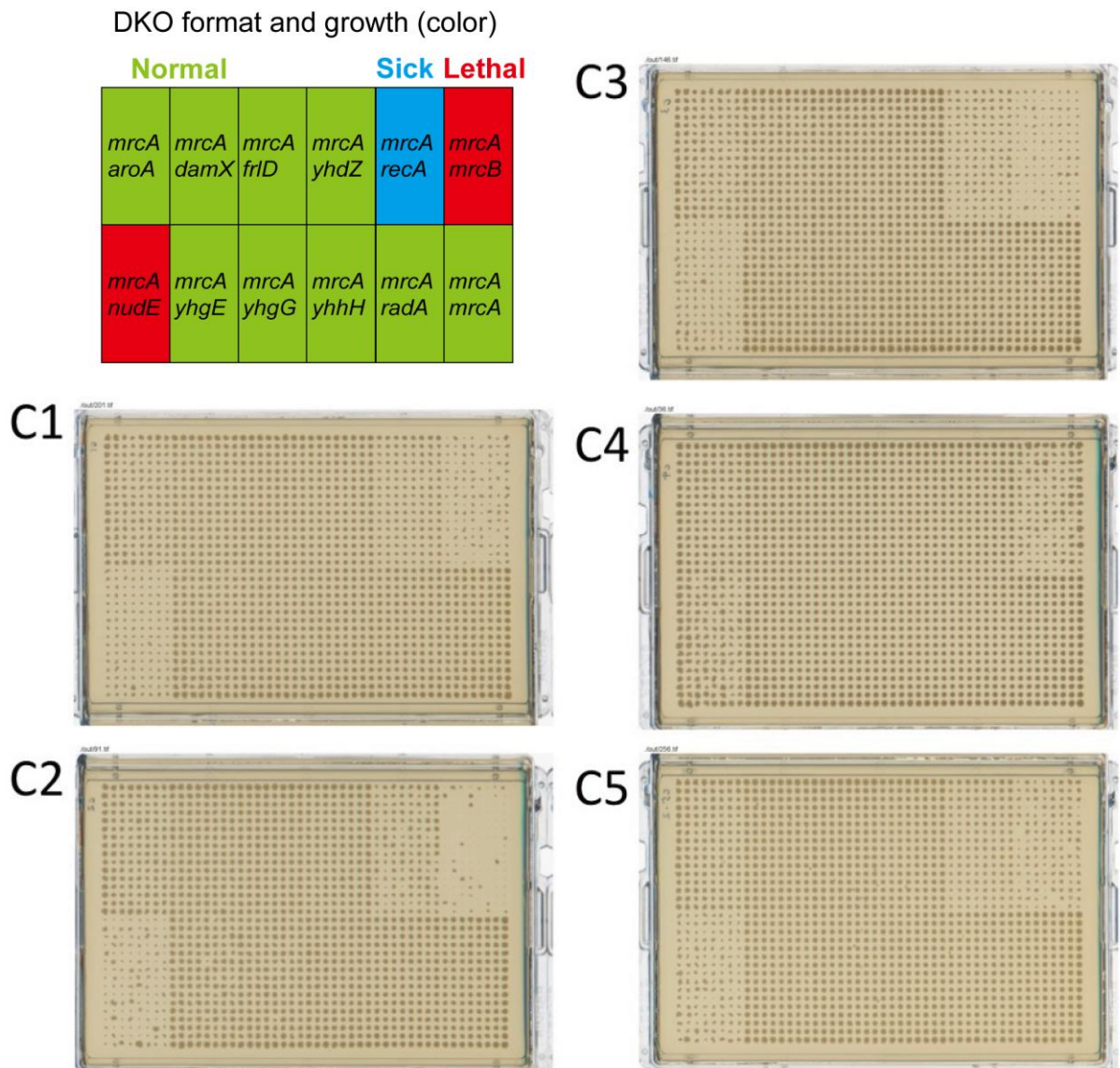


図 3.5 薬剤選択条件と DKO の生育結果

12 種類の SKO 株を $\Delta mrcA$ -Hfr 株と接合させて、表 3.1 に示す C1 ~ C5 の条件で 1 次薬剤選択を行った後、2 次薬剤選択を開始して 20 時間後のプレート撮影した。プレート上には 12 種類の SKO 株が 12 区画に配置されており、1 区画には 128 スポット（横 8 スポット、縦 16 スポット）が存在する。9 種類の DKO 株は正常に生育するが、 $\Delta mrcA\Delta recA$ 株（接合伝達効率が低下）は生育が悪く、 $\Delta mrcA\Delta nudE$ 株（隣接する遺伝子同士なので DKO 作製率が著しく低い）と $\Delta mrcA\Delta mrcB$ 株（合成致死ペア）は生育できない。また $\Delta mrcA\Delta mrcA$ 株は DKO 株が作製できないので生育しないはずだが、ここで用いた Keio collection の $\Delta mrcA$ 株は部分二倍体化していたため生育した。

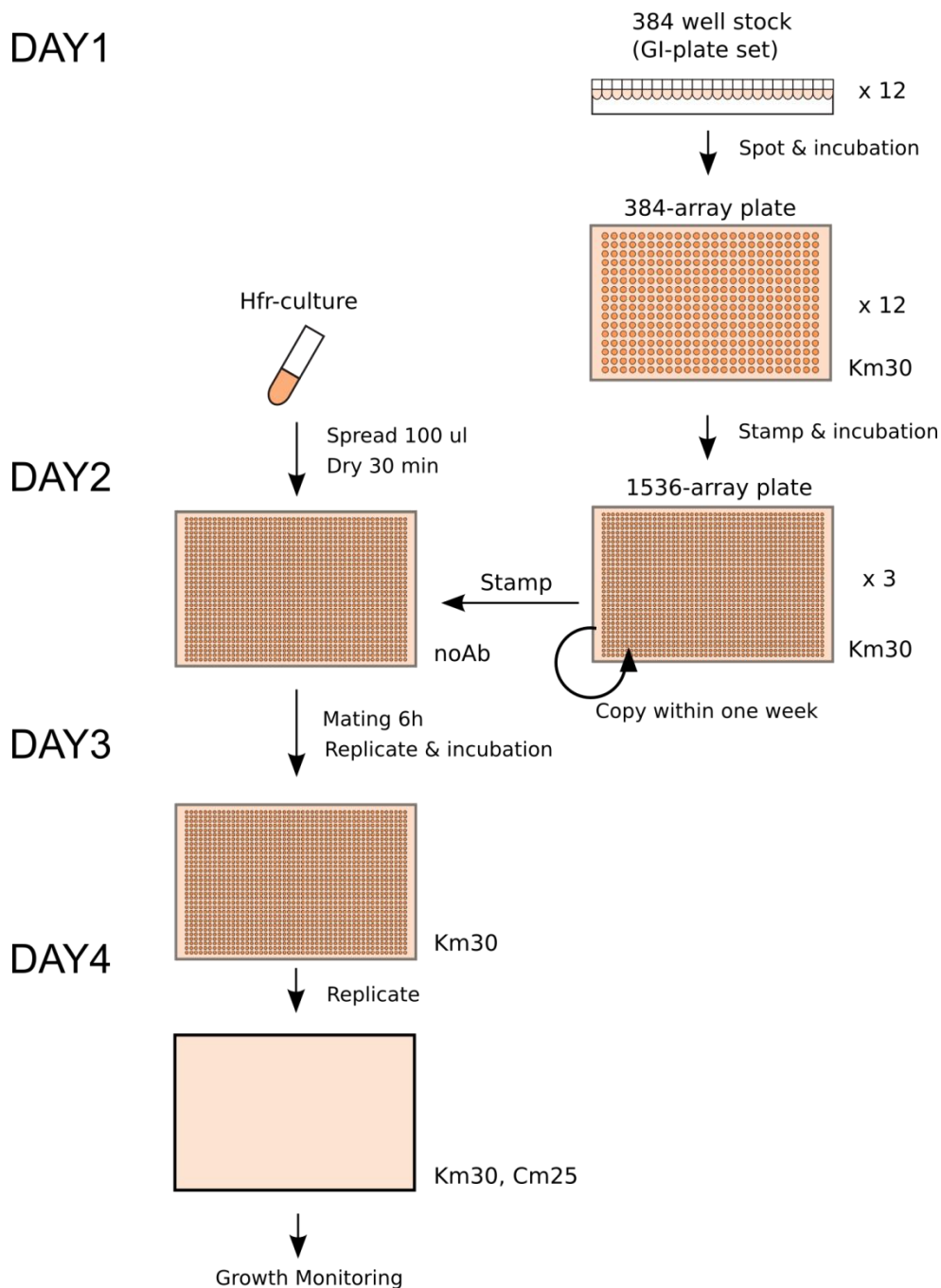


図 3.6 ハイスループットな DKO 増殖測定方法

全工程は 4 日間であり、作業者は 1 人を想定している。1 日目は 12 枚の 384 colony プレートが用意された状態を想定している。12 枚の 384 colony プレートは GI plate set の Stock を Km 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む LB 寒天培地 (プレート) にスポットして一晩培養することで作製できる。2 日目は 384 array コロニーを 1536 array に植えかえて 12 時間培養することで、3 枚の 1536 colony プレートを作製した。同時に目的の SKO-Hfr 株を 2 mL の LB 培地で一晩培養した。3 日目は SKO-Hfr 株の培養液 100 μL を 3 枚の薬剤を含まないプレート上に撒き、37°C で 30 分間乾燥させた。ここに 1536 colony プレートのコロニーをスタンプして、6 時間培養することで接合させた。接合後、コロニーを Km

30 $\mu\text{g/mL}$ を含むプレートにレプリケートして 24 時間培養することで、1 次選択を行った。4 日目は 1 次選択後のコロニーを Km 30 $\mu\text{g/mL}$ と Cm 25 $\mu\text{g/mL}$ を含むプレートにレプリケートして、プレートのコロニー増殖を Colony-live での観測を開始した。

3.3.5 DKO 作製時の薬剤耐性獲得コロニーの判定

致死となる DKO の区画 ($\Delta\text{mrcA}\Delta\text{mrcB}$) において 128 スポットのうち 26 スポットにおいてコロニーの生育が観測され、出現頻度は約 20% (26/128) と無視できないほど高かった (図 3.7)。

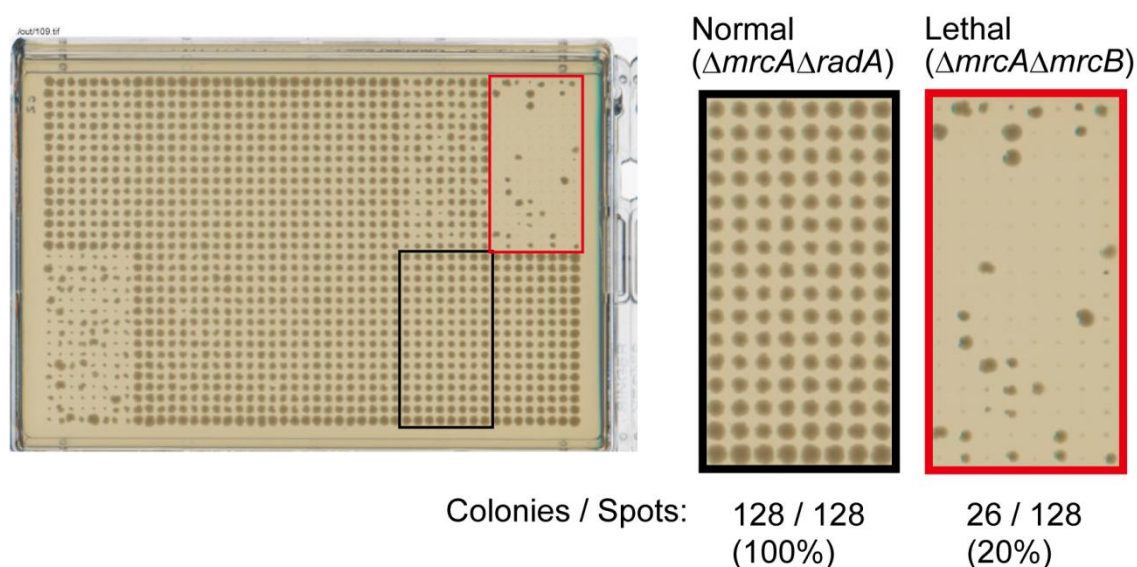


図 3.7 薬剤耐性獲得菌の出現

図 3.5 の C2 条件で 2 次選択培養 20 時間後の撮影写真である。通常の生育を示す DKO 区画 ($\Delta\text{mrcA}\Delta\text{radB}$) と致死となる DKO 区画 ($\Delta\text{mrcA}\Delta\text{mrcB}$) を切り出した。1 つの DKO 区画には 128 スポットがあり、コロニーの生育数は目視で判定した。

このようなコロニーを single colony isolation して単離した 20 コロニーの Cm、Km、Sm 薬剤耐性を調べた結果、1 コロニーは Km のみ耐性であり、残りの 19 コロニーは Cm と Km 耐性であった。このようなコロニーの細胞は遺伝子の duplication によって二重欠失されることなく薬剤耐性を獲得している可能性がある。以降、このようなコロニーを薬剤耐性獲得コロニーと呼ぶ。薬剤耐性獲得コロニーの生育速度を調べるために、致死となる DKO 区画と通常の生育を示す DKO 区画 ($\Delta\text{mrcA}\Delta\text{radA}$) の生育を経時的に観測してコロニー生育速度を調べた。致死となる DKO 区画で出現した薬剤耐性獲得コロニーの生育速度は通常の DKO コロニーと同等か若干低い程度であった (図 3.8A)。このように、薬剤耐性獲得コロニー

の出現によって合成致死となる DKO であっても、致死とは判定されない可能性がある。また、場合によっては通常の DKO コロニーの生育速度と等しくなることもあるため、致死が見逃されて偽陰性率が上がってしまう。一方、薬剤耐性獲得コロニーの増殖開始遅延時間は通常のコロニーと比べて顕著に伸びていた (図 3.8B)。今回のケースでは、通常コロニーの増殖開始遅延時間は全体の中央値の 0.9 ~ 1.1 倍の範囲に収まっているのに対し、薬剤耐性獲得コロニーの増殖開始遅延時間は全体の中央値の 1.4 倍以上であった。このことから、増殖開始遅延時間が異常に伸びた場合は薬剤耐性獲得コロニーが出現したと判定できることがわかった。増殖開始遅延時間は SKO の接合伝達効率 (*oriT* と SKO の染色体距離、接合時間など) に依存すると考えられるため、薬剤耐性獲得コロニーを判定するための増殖開始遅延時間の閾値は各実験ごとに調整するのが最善と考えられるが、詳細な条件検討は今後の課題である。

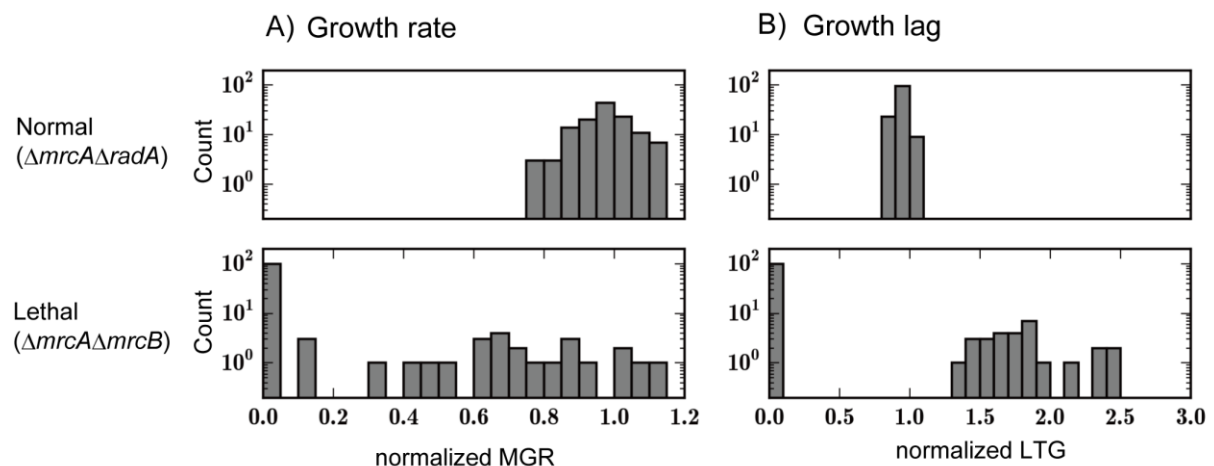


図 3.8 増殖遅延時間による薬剤耐性獲得の判定

図 5 の C2 条件において、通常の生育となる DKO 区画 ($\Delta mrcA \Delta radB$) と致死となる DKO 区画 ($\Delta mrcA \Delta mrcB$) の経時的な生育を解析した。1つの DKO 区画には 128 スポットがあり、それらの最大増殖速度と増殖開始遅延時間の分布をプロットした。これらは平均値で割ることでノーマライズした (平均値 = 1.0)。

3.3.6 DKO 用の SKO ストック (GI plate set) の作製

SKO ライブラリーである Keio collection は、独立 2 クローンを別々に保存し、その総数は 8000 を超える。また山本(Yamamoto et al., 2009)らにより報告されたように、部分 2 媒体あるいは欠失株と野生株の混合であるものなど、ハイスループットな DKO 作製に使うには種々の問題点がある事は上述した通りである。Keio collection から、2 独立クローンから正しく欠失されている株を選択し冗長性を除き、

選択した株の並びを解析に最適化を図った rearray を行い、GI plate set を作製した。まず正常に欠失された Keio collection の 3800 遺伝子の株を GI plate set に加えた。また野生株と混在した状態の 33 遺伝子の株は single colony isolation で単離してコンタミネーションがないことを PCR で確認した後、GI plate set に加えた。残りの 25 遺伝子の株は部分 2 倍体であり、essential gene の候補と考えられているので使用しなかった。また、近年作製された *yneN* 遺伝子欠失株(Eguchi et al., 2007)と、small RNA 遺伝子（当研究室、博士後期課程の野村航の成果、発表準備中）の 75 欠失株を GI plate set に加えた。GI plate set にストックするクローン数は 1 クローン / SKO とすることで、全ストック 384-well プレートの枚数を Keio collection の 24 枚から 12 枚に削減した。また SKO 株のストック位置には次の 3 点を考慮した。(i)隣接効果により最外周に位置するコロニーは内側のコロニーよりも約 2 倍大きく増殖して正確な増殖測定が難しいため、最外周にはカナマイシン耐性を持つ野生株 (BW25113/pXX563) を配置した。(ii)人的要因によるプレート種類や向きの誤りを防ぐため、各プレートの最外周に特有の空（菌が生育しない箇所）パターンを設置した。(iii)GI plate set のそれぞれのプレートにおけるあらゆる偏りを減らすため、各 SKO 株の位置はランダムに決定した。

次に、最新の遺伝子の染色体領域（遺伝子アノテーション）はいくつもの修正が加えられており、この修正によって Keio collection における SKO の定義から外れた SKO 株の存在を調べた。Keio collection における SKO の定義は「対象遺伝子の 2 番目のコドンから終始コドンの 18nt 上流までの塩基配列が欠失された状態」である(Baba et al., 2006)。Keio collection のプライマー配列セットから欠失されている領域を計算した。この推定欠失領域に含まれる遺伝子とその染色体領域を調べることで、最新のアノテーションと SKO の定義とのズレ、欠失により影響を受ける遺伝子の数を解析した。解析結果を図 3.9 に示す。個々の遺伝子についての解析結果は GenoBase (<http://ecoli.naist.jp/GB/>) を参照されたい(Otsuka et al., 2014)。Keio collection の 3559 株のうち 3045 SKO 株 (85.6%) は SKO の定義に一致しており、正確に 1 遺伝子が欠失されていた。しかし、514 株 (14.4%) は 1 遺伝子が欠失されているものの、SKO の定義とズレていることがわかり、多くの場合は N 末側の欠失開始位置がズレていた。これらの株では non-coding 領域が削れることによる影響や、遺伝子の塩基配列が完全に除かれていないことによる影響が懸念されるため使用には注意が必要である。残りの 306 株 (7.9%) では欠失領域に複数の遺伝子が存在しており、多くの場合は 2 つの遺伝子が存在していた。ほとんどの株では 1 遺伝子のほぼ全領域が欠失され、もう 1 つの遺伝子が部分的に欠失していた。これらの株は SKO ではなく DKO となっている可能性がある。ほとんどのケースでは前後に並んだ 2 つの遺伝子のコード領域が重複して（オーバーラップして）おり、SKO の定義に基づいて欠失の設計をする限り、DKO となってしまうことがわかっ

た。従って、この問題は Keio collection における SKO の定義（設計仕様）に起因していることがわかった。しかし、このような条件においても 2 つの遺伝子が ATGA の塩基配列で重複したケースであれば、欠失による影響はないため SKO と考えることができる(Otsuka et al., 2014)。

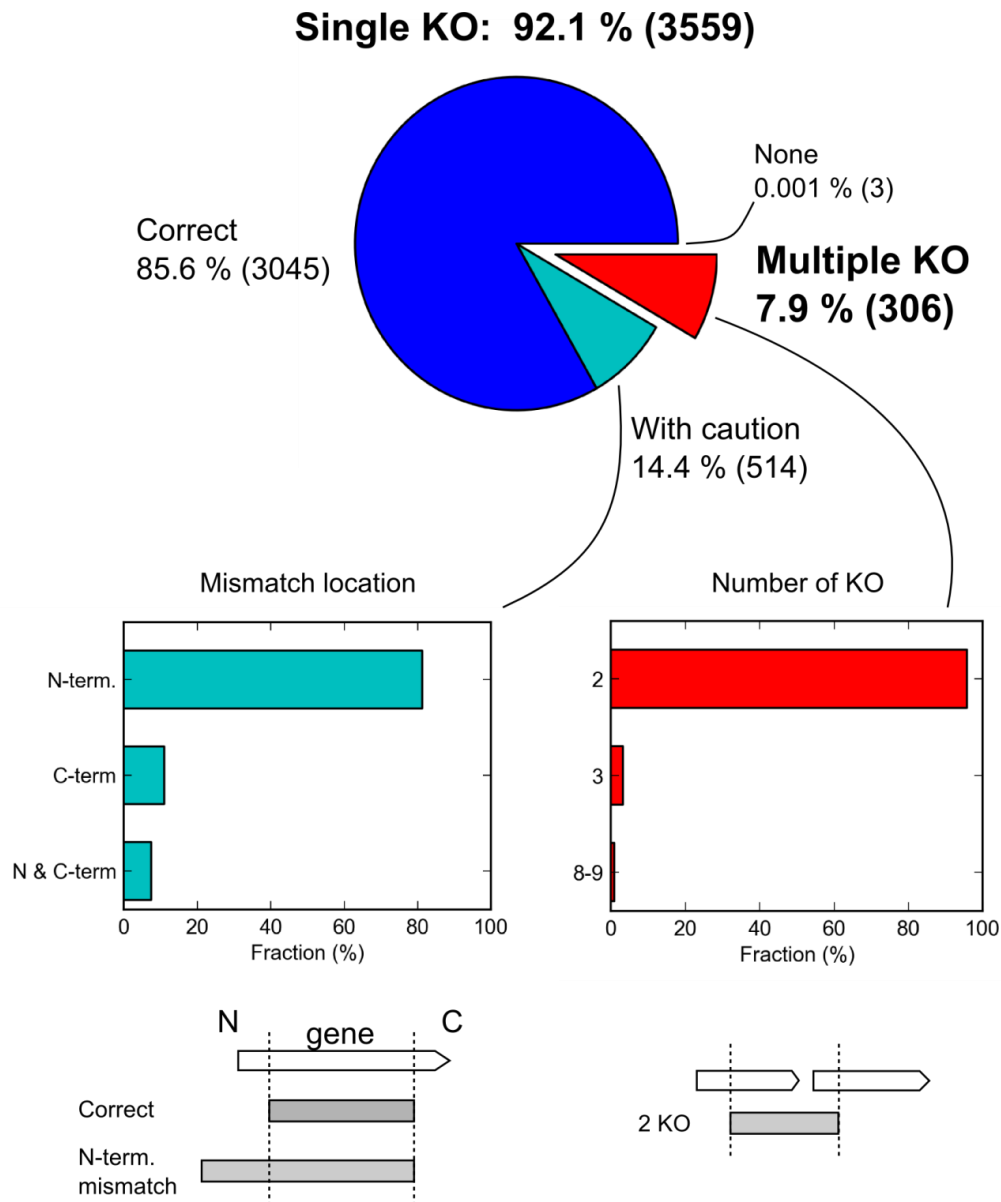


図 3.9 現在の Keio collection の遺伝子欠失状況

Keio collection のプライマーセットの塩基配列から、それぞれの株で欠失されている染色体領域を推定した。推定した染色体領域と 2013 年現在の遺伝子アノテーション情報を照らし合わせることで、Keio collection 株の遺伝子欠失状況を解析した。

3.3.7 DKO 作製法の評価

構築した DKO 作製法を用いてゲノムワイドに遺伝的相互作用のスクリーニングを行い、既知の遺伝的相互作用ペアが統計的に有意に検出できるかを調べた。*mrcA* 遺伝子と 4000 遺伝子の DKO 株を作製して増殖速度を測定することで、各 DKO 株の遺伝的相互作用スコア (epsilon) を計算して統計値 (Z score) に変換した。統計値の閾値は先行研究(Butland et al., 2008)と同じように、非常に厳しい閾値 (Z score > |4|) に設定した。大部分の DKO 株では遺伝的相互作用が観測されず (Z score が 0 付近)、遺伝的相互作用が観測された (Z score の絶対値が 4 以上) のはごく僅かのペアであった (図 3.10)。大部分の DKO 株では遺伝的相互作用が観測されないことはこれまでの先行研究においても報告されている(Dixon et al., 2009)。現在、*mrcA* 遺伝子において負の遺伝的相互作用が報告されている遺伝子ペアは $\Delta mrcA \Delta mrcB$ (Suzuki et al., 1978)と $\Delta mrcA \Delta lpoB$ (Typas et al., 2010)の 2 つである。スクリーニングの結果、*mrcA-mrcB* 遺伝子ペアの epsilon (Z score) はスクリーニングした中で最も低く、ついで $\Delta mrcA \Delta TU-2304$ 、 $\Delta mrcA \Delta lpoB$ の DKO であった。ここで *TU-2304* 遺伝子は *lpoB* 遺伝子の内部にコードされているため、 $\Delta mrcA \Delta TU-2304$ の DKO は $\Delta mrcA \Delta lpoB$ の DKO と同じとみなすことができる。これらのことから、 $\Delta mrcA \Delta mrcB$ と $\Delta mrcA \Delta lpoB$ の DKO の Z score は非常に厳しい閾値 (Z score > |4|) よりもさらに低い値であるため、統計的に非常に高い確度で負の遺伝的相互作用であると判定できる。このように現在報告のある *mrcA* 遺伝子における負の遺伝的相互作用を全て検出できた。このことから、構築した DKO 作製法による遺伝的相互作用の網羅的なスクリーニングが可能であると考えられる。

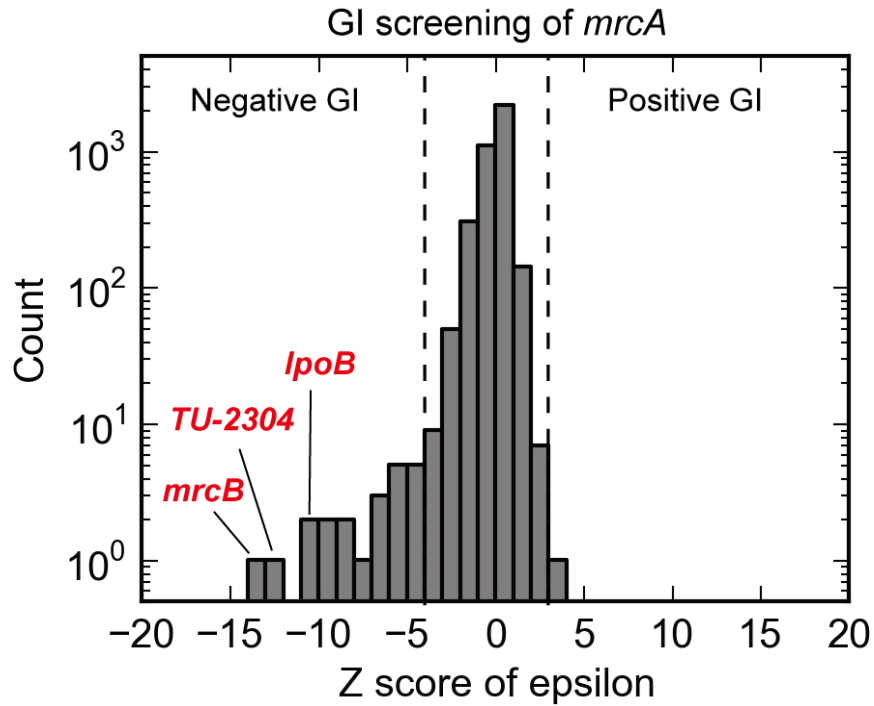


図 3.10 *mrcA* における GI スクリーニング結果

図 3.6 に示すハイスループットな DKO 増殖測定方法を用いて、約 4000 種類の SKO 株を $\Delta mrcA$ -Hfr 株と接合させて *mrcA* と全遺伝子における DKO 株の増殖を測定し、*epsilon* を計算した (*epsilon* の計算については第 4 章を参照されたい)。*epsilon* を統計値 (Z score) に変換した値の分布をプロットした。先行研究に従い、Z score の絶対値が 4 以上の場合は遺伝的相互作用があると判定した。

3.4 考察

本章では CIP を用いて大腸菌に接合能を獲得させ、接合によるハイスループットな DKO 作製方法を構築した。この 2 重欠失株作製方法と Colony-live による増殖定量測定システムを組み合わせた場合のスループットは 1,920,000 DKO strains / week であり、PCR 増幅と組み換えによる DKO 作製方法 (167 strains / week) と比べて、およそ 1 万倍にスループットが向上した。これに加えて、培養するだけで大量の DKO 株を作製できるのでコストを抑えることができた。大腸菌での接合による DKO 方法の開発は我々が進めており、UCSF の Carol A Gross 博士らのグループ (Typas et al., 2008)、トロント大学の Andrew Emili 博士らのグループ (Butland et al., 2008) へも研究リソースを供給している。現在、我々とは別に網羅的な DKO 作製を進めているのはトロント大学の Babu 博士である (Babu et al., 2011)。Babu らの方法と本研究で構築した方法の大きな違いは SKO-Hfr 株の作製に CIP を用いることにある。

SKO-Hfr 株の作製のために CIP を構築した (図 3.1) ことによって、Babu らの方法よりも 3 つの点で優れている。(1) Babu らは SKO-Hfr 株を作製するために、自然界から単離された Hfr 株を Datsenko らの方法 (Datsenko and Wanner, 2000) で SKO している。Datsenko らの方法は PCR 増幅と形質転換処理が必要なため、ハイスループット化ができない。一方、本研究では SKO 株に CIP を接合させることで SKO-Hfr 株を作製している。接合を用いているため、ハイスループットにできる。(2) Babu らの使用している単離 Hfr 株は Hfr Cavalli 株 (Babu et al., 2011) であり、メスの BW25113 株とは系列の異なる株であり、オスとメスで大幅に genotype が異なる。そのため、接合することで多様な genotype が生じる可能性がある。CIP の場合、SKO-Hfr 株の作製に用いる SKO 株は BW38029 株であり、供与菌と受容菌は同じ祖先株から作製された株である。最近これらの両株のゲノム配列を決定し、その違いの確認も行った (Otsuka et al, in preparation) ため問題とならない。(3) 従来法の単離 Hfr 株は *oriT* の位置が固定されているため、*oriT* との距離が長い SKO が存在する。このような場合、十分な効率で伝達するには長い接合時間が必要であるため (図 3.3)、Babu らの方法では接合時間は 24 時間である (Babu et al., 2011)。CIP では *oriT* と SKO の距離を短くすることが可能であるので、接合時間を 24 時間から 6 時間へと短縮している。

接合ではオスとメスの 2 種類の菌が混ざることによる染色体領域の組換えによる交換や挿入などの不確定要因があり、DKO されていない薬剤耐性細胞が出現する。これによって、合成致死ペアとなる DKO が見逃されてしまう場合 (false negative) がある。本研究と Babu らの方法では薬剤選択条件を最適化しており、2 段階で薬剤選択 (カナマイシン選択後にカナマイシン/クロラムフェニコール選択) を行う

ことで、薬剤耐性細胞の出現頻度を最小限に抑えている（図 3.5）。しかしながら、それでも本研究の検討においては薬剤耐性細胞の出現率は 5 回に 1 回程度であり、無視できるほどに小さくはなかった（図 3.7）。薬剤耐性細胞の出現率を実験的にさらに低下させることは難しいと思われるが、一方で薬剤耐性細胞の出現を判定することはできると考えた。すなわち、薬剤耐性細胞の出現数は DKO 細胞の出現数よりも圧倒的に少ないため、コロニー増殖曲線の立ち上がりが遅延すると予想される。Colony-live で DKO 細胞と薬剤耐性細胞のコロニー増殖動態を測定した結果、薬剤耐性細胞から形成されたコロニーでは DKO 細胞から形成されたコロニーよりも増殖開始時間が顕著に遅くなることが明らかとなった（図 3.8）。このように増殖開始時間が顕著に遅くなった DKO コロニーを合成致死と見なすことで、false negative の低減が期待される。一方で、接合効率や組み換え効率が低下して DKO が十分量作製されず、生育が悪くなる場合（false positive）も懸念される。CIP は F plasmid 由来の接合遺伝子群を用いている。F plasmid とさまざまな SKO 株と接合させた実験では、受容菌側の SKO による接合効率の違いは観測されなかった（Pérez-Mendoza and Cruz, 2009）。しかし、SKO によって相同組み換えの頻度が低下する可能性は十分に考えられる。このようなケースを考慮したノーマライズ方法が Baryshnikova らによって考案されており（Baryshnikova et al., 2010）、本研究でも採用している。

ハイスループットな実験用の SKO ストックプレートとして GI plate set を作製した。Keio collection の全ストックは、24 枚の 384 穴のプレートに保存されている。Keio collection は独立に分離した 2 株をそれぞれの遺伝子に対して保存しているが、欠失の評価を通った物のみを選択し、冗長性をなくし 24 枚から 12 枚へと縮小した。Colony-live を用いてより正確な増殖測定を可能にするために、Keio collection を並べ直し、新しく GI plate set を作製した。1 つの懸念はストックの凍結融解を繰り返すと、ストック株に変化が生じることである。特に、1 遺伝子欠失によって増殖が悪くなった株は凍結融解に弱いことが考えられる。そのため、使用する度に全コロニーが正常に生育していることをチェックすることが望ましい。また、大腸菌では small RNA などが新たに発見されており、遺伝子アノテーション情報はいまだに改訂され続けている。そのため、遺伝子欠失ライブラリーの更新は定期的におこなう必要がある。今回の解析によって、現在のライブラリーには遺伝子が正常に単一欠失できてない株が存在することが明らかとなった（図 3.9）。今後、これらの株について欠失領域を新しく設計しなおしていく必要がある。すなわち、遺伝子欠失ライブラリーの品質管理が必要である。

第4章 網羅的な遺伝的相互作用解析

4.1 緒言

これまでに構築したハイスループットな DKO 法と増殖動態測定法を用いて、大腸菌における遺伝的相互作用の網羅的な解析を開始した。網羅的な解析に当たって、蓄積され始めたデータの信頼性評価が重要である。

遺伝的相互作用とは2つの遺伝子を欠失したことでタンパク質間の相互作用、転写制御ネットワーク、翻訳制御、代謝反応など、細胞内機能ネットワークの部分的欠如による結果としての生育変化である。網羅的な遺伝的相互作用データの解析用途は幅広い。例えば、機能未知遺伝子の機能推定(Babu et al., 2011)、タンパク質複合体・シグナル経路の構成要素の解明(Baryshnikova et al., 2010)、細胞内機能ネットワークの解明(Costanzo et al., 2010)などに利用されている。そこで、本研究で蓄積された遺伝的相互作用データとこれまでの大腸菌における知見との一貫性を検証し、データの信頼性を評価することにした。

大腸菌は生物学におけるモデル生物として重要であるが、生産菌として工業的にも非常に重要な微生物である。代謝に関する研究もその蓄積が大きい。Palsson らのグループによって網羅的な代謝モデルが開発され続けており、2014年には大腸菌の1678遺伝子を含むFBA (Flux Balance Analysis)モデルが構築されている(Liu et al., 2014)。この代謝モデルとFBA理論を用いることで、代謝遺伝子を欠失した後の生育をシミュレーション予測が可能になっている。この予測精度を向上させるため、生育予測値と実測値との比較評価が始まっている。網羅的な一遺伝子欠失後の生育データと予測値が一致しないケース(ギャップ)を調べることで、モデルの改良が進められている(Orth and Palsson, 2012)。しかし、網羅的な一遺伝子欠失後の生育データでは代替経路(冗長な経路)による補償についてを解析できない。代謝経路を選択して最適化するためには、このような代替経路による補償を考慮する必要がある。そのため、網羅的な遺伝的相互作用(二重欠失後の生育)データによる代謝モデルのギャップを解析することにした。

大腸菌は1つの環状染色体を持ち、染色体上には機能単位で遺伝子が並んだオペロンが形成されている。また、遺伝子の発現量は染色体上の *oriC* に近くに位置する遺伝子ほど高く、*Ter* に近い遺伝子ほど低い傾向がある。このことから、大腸菌の遺伝子の染色体位置はランダムに決定されたものではなく、進化において選択されたものだと思われる。そのため、大腸菌染色体上で近接する遺伝子同士には何らかの関係が存在するように思われる。網羅的な遺伝的相互作用データから、染色体上で近接する遺伝子間の関係性の解析を試みる。

4.2 材料と方法

4.2.1 網羅的な遺伝的相互作用の解析方法

ターゲット遺伝子 (array 遺伝子) の SKO 株には Keio collection(Baba et al., 2006)を、クエリ遺伝子には ASKA deletion collection から作製した Hfr-SKO 株を使用した。SKO-Hfr 株には薬剤耐性と SKO が確認できた株のみを使用した。最初のうちは検証のために中心代謝経路に関わる遺伝子群などを中心にクエリ遺伝子として網羅解析を開始した。その後、機能的にランダムな選択になるように染色体の 0 min から時計周り方向に存在する遺伝子を順にクエリ遺伝子とした。ハイスループットな DKO 作製方法とその増殖測定方法は前章に記した。DKO 作製後、致死コロニー数/plate が 100 以下であること、コロニー生育パターンが全体の平均生育パターンと類似していること (ピアソンの積率相関係数が 0.6 以上) を確認した。これらが確認できない場合は遺伝的相互作用スコアの計算に使用しなかった。

4.2.2 遺伝的相互作用スコアの計算

遺伝的相互作用スコア (epsilon) の計算方法は Baryshnikova らの報告に従った (Baryshnikova et al., 2010)。epsilon の計算には Colony-live による最大増殖速度 (MGR) 値を用いた。クエリ遺伝子間の遺伝的相互作用 profile の類似性はピアソンの積率相関係数で求めた。

4.2.3 遺伝子相互作用情報の整理

大腸菌 MG1655 株 (Accession: NC_000913.3) の遺伝子のアミノ酸配列は NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より得て、アミノ酸配列の相同性を blastp を用いて計算し、50%以上の一致を示す遺伝子ペアを相同遺伝子ペアとした。遺伝子の転写制御情報は regulon DB v8.0 (Salgado et al., 2012)より得て、同一の転写 (促進または抑制) 制御を受けている遺伝子群の中の任意の 2 遺伝子の組合せを共発現遺伝子ペアとした。タンパク複合体と代謝経路の構成遺伝子情報は ecocyc (Keseler et al., 2012)より得て、同じタンパク質複合体に属する遺伝子群を遺伝子ペアとして、同じ代謝経路に属する遺伝子群を遺伝子ペアとした。遺伝子の機能カテゴリと EC 番号は multifun (Serres and Riley, 2000)から得て、同じ遺伝子機能カテゴリを持つ遺伝子ペアと同じ EC 番号を持つ遺伝子ペアを抽出した。遺伝子の機能番号を Gene ontology (Ashburner et al., 2000) (<http://geneontology.org/>) より得て、同じ機能番号を持つ遺伝子ペアを抽出した。

4.3 結果

4.3.1 網羅的な遺伝的相互作用解析

SKO-Hfr 株の作製を 786 遺伝子について試みた結果、クロラムフェニコールとストレプトマイシンへの薬剤耐性を持ち、染色体上の SKO を確認できた SKO-Hfr 株は 548 遺伝子について得られた (71%の成功率)。得られた SKO-Hfr 株を用いて DKO の作製を 2253 プレートについて試みた結果、致死コロニー数/plate が 100 以下であり、平均生育パターンとのピアソンの積率相関係数が 0.6 以上であったのは 1522 プレートであった (68%の成功率)。以上の結果、これまでに約 135 万の DKO ペア (349 query genes x 3868 target genes) についての遺伝的相互作用データを得た (図 4.1A)。全 DKO ペアの約 2 割を解析できたことになる (2 遺伝子の欠失順序の違いを無視した場合は約 2 割であり、欠失順序の違いを考慮する場合は約 1 割である)。クエリ遺伝子の選定は機能的にランダムにするために、染色体位置順に 0 min から進めた場合 (全体の約 75%) と、染色体位置に関係なく中心代謝経路や興味のある遺伝子を選択した場合 (全体の約 25%) とがある。図 4.1 Aにおいて灰色の部分に急激に下がる部分は、染色体位置順の遺伝子が終わった位置である。

解析した 349 のクエリ遺伝子の機能を Multifun の機能カテゴリー (Serres and Riley, 2000) で分類した結果、特定の機能に片よることなく様々な機能をもっていた (図 4.1B)。このことから、今回の解析データには機能によるバイアスがないものと考えた。大部分の DKO 株では GI score が 0 付近であり (図 4.1C)、大半の DKO ペアでは遺伝的相互作用が観測されなかった。この傾向は報告されている酵母で解析された網羅的な遺伝的相互作用データと一致している (Costanzo et al., 2010)。今回解析した遺伝子ペアのなかで同一培養条件 (LB 培地、37°C) における負の遺伝的相互作用 (合成致死) が報告されている遺伝子ペアは *gpmA-gpmM* (Foster et al., 2010)、*tktA-tktB* (Zhao and Winkler, 1994)、*acnA-acnB* (Suthers et al., 2009)、*mrcA-mrcB* (Suzuki et al., 1978)、*mrcA-lpoB* (Typas et al., 2010) の 5 つであり、これらは全て検出できた。このことから、本研究の遺伝的相互作用データがこれまでの報告とある程度一致していることが確認できた。

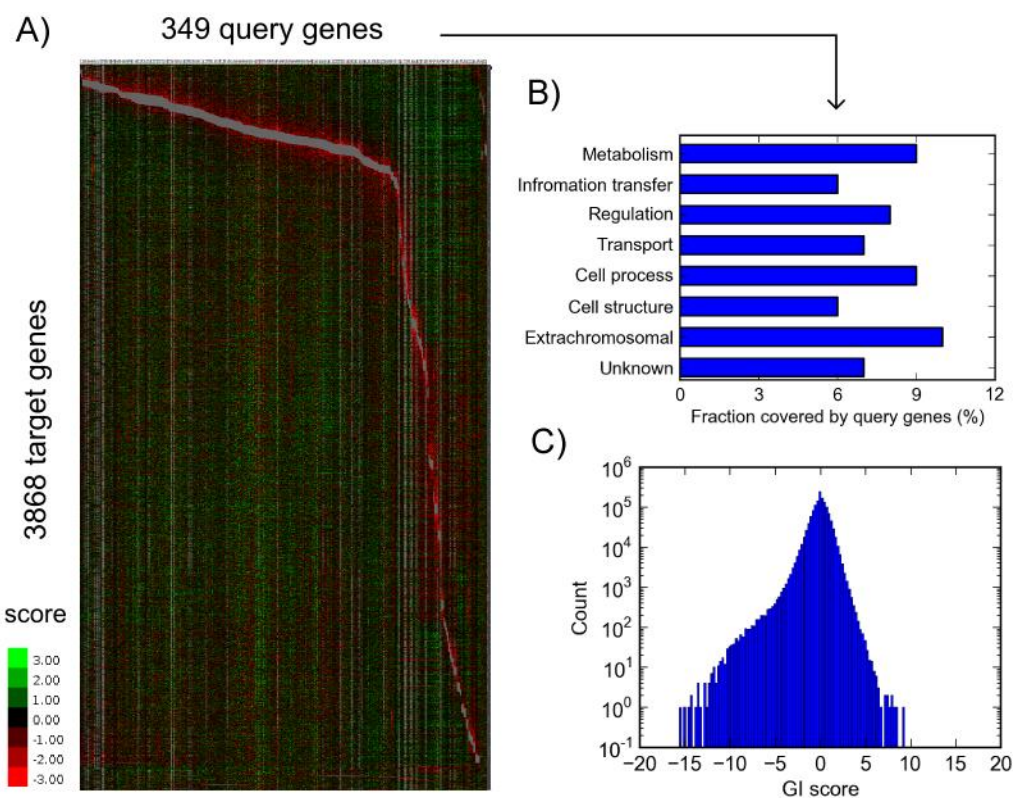


図 4.1 GI データの概要

これまでに 349 クエリ遺伝子と 3868 ターゲット遺伝子における GI を解析した。(A) GI をヒートマップで示した。赤色は negative GI、緑色は positive GI、黒色は GI が無いことを示す。染色体上でクエリ遺伝子に近接する遺伝子との DKO は作製効率が極端に低下するため、使用しないことにした (灰色)。クエリ遺伝子は染色体位置でソートした。クエリ遺伝子の選定基準は染色体位置順に 0 min から進めた場合 (全体の約 75%) と、染色体位置に関係なく中心代謝経路や興味のある遺伝子を選択した場合 (全体の約 25%) とがある。(B) 全てのクエリ遺伝子について、遺伝子機能を multifun 機能カテゴリで分類した。(C) GI スコア (統計値 Z-score に変換した) を対数頻度分布で示した。

4.3.2 遺伝的相互作用データに含まれる機能的相互関係

遺伝子ペアの遺伝的相互作用の出現パターン (遺伝子相互作用 profile) が類似する場合、その遺伝子ペアの生理機能は類似する傾向が示唆されている (Baryshnikova et al., 2010)。そこで、さまざまな遺伝子情報との相関を調べることにした。比較用の omics データとして、アミノ酸配列の相同性、タンパク質-タンパク質相互作用 (Arifuzzaman et al., 2006; Hu et al., 2009)、環境因子と遺伝子欠失との相互作用 (Nichols et al., 2011) を用いた。種々のデータと遺伝子情報との相関性は ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線の AUC (Area under the curve) によって求めた (表 4.1)。AUC が 0.5 の場合は相関がなく、AUC が 1 に近づくほど相関

性が高くなる。例えば、遺伝的相互作用の類似性と同じ EC 番号の遺伝子ペアとの AUC は 0.87 であり、高い相関性がある (図 4.2)。全体の結果を表 4.1 に示す。アミノ酸配列の相同性が高い遺伝子ペアでは同じ EC 番号を持つ遺伝子ペア情報において最も高い相関性 (AUC = 0.55) を示した。同様に、タンパク質-タンパク質相互作用ペアでは同じタンパク質複合体に属する遺伝子ペア情報において最も高い相関性 (AUC=0.54, 0.52) を示した。これらの結果は妥当であった。次に、表現型スクリーニングである環境因子と遺伝子欠失との相互作用と遺伝的相互作用のデータと各遺伝子情報の相関性は、これまでに述べた omics データの場合 (AUC=0.52~0.55) と比較して、高い相関性 (AUC=0.6~0.9) を示した。このことから、表現型スクリーニングデータは遺伝子情報との相関性が比較的高いことが示唆された。特に、本研究の遺伝的相互作用データは、今回の解析において、最も高い相関性 (AUC) を示しており、本研究データの有用性を強く示唆するものであると考えられる。

表 4.1 種々の omics データと遺伝子情報との相関性 (AUC)

Dataset	Co-TR	Operon	Pathway	Complex	Func-EC	Func-GO
Seq. homology	0.50	0.51	0.50	0.52	0.55	0.50
PPI ⁽¹⁾	0.50	0.50	0.50	0.54	0.52	0.50
PPI ⁽²⁾	0.50	0.51	0.50	0.52	0.51	0.50
c-SKO ⁽³⁾	0.59	0.68	0.60	0.76	0.55	0.52
GI (This study)	0.59	0.81	0.75	0.90	0.87	0.60

Seq. homology はアミノ酸配列の相同性、PPI はタンパク質-タンパク質相互作用、c-SKO は環境因子と遺伝子欠失との相互作用 profile の類似度、GI は遺伝的相互作用 profile の類似度である。ROC 解析におけるネガティブペアのセットはランダムな組み合わせとした。ROC 解析は 10 回行い、その平均 AUC 値を表に示した。(1) (Hu et al., 2009); (2) (Arifuzzaman et al., 2006); (3) (Nichols et al., 2011)

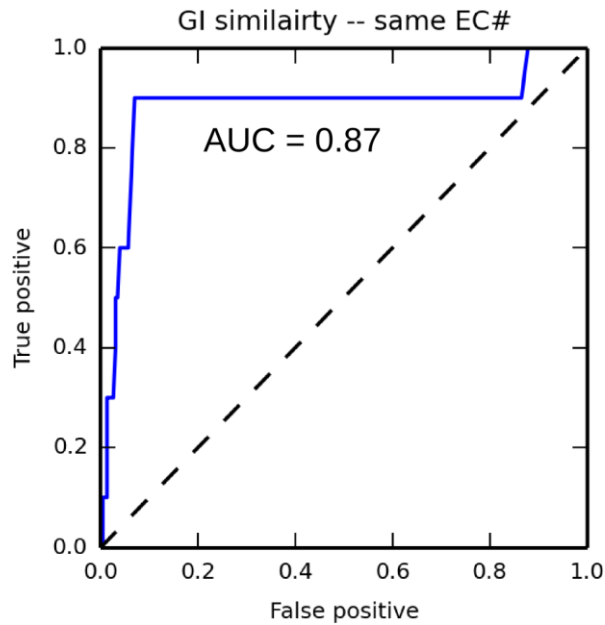


図 4.2 ROC 曲線と AUC

2 遺伝子間の GI プロファイルの類似度 (PCC) と酵素番号が同じペアとの相関性を ROC 曲線で示した。ROC 曲線下の面積 (AUC) は 0.87 であった。

4.3.3 代謝シミュレーションの生育予測との比較

Feist らの代謝モデル(Feist et al., 2007)を利用することで、*in silico* での 49544 遺伝子ペアの 2 重欠失をシミュレーションすることで生育予測値を得た。生育予測値と実測値を比較した結果、49544 遺伝子ペアのうち 193 遺伝子ペア (0.4%) の結果が異なり、90 ペアは予測よりも生育が良く、103 ペアは予測よりも生育が悪かった。生育が悪くなったペアのうち、*eda* 遺伝子と合成致死 (負の遺伝的相互作用) となる複数の二重欠失ペア (*eda-pgi*、*eda-pfkA*、*eda-gnd*) に着目した。これらの合成致死となる組合せは実験的に再現することを確認した (図 4.3)。*eda* 遺伝子は ED 経路の 1 反応を担う遺伝子であり、*pgi*、*pfkA*、*gnd* などは近隣の代謝反応を担う遺伝子である (図 4.4)。

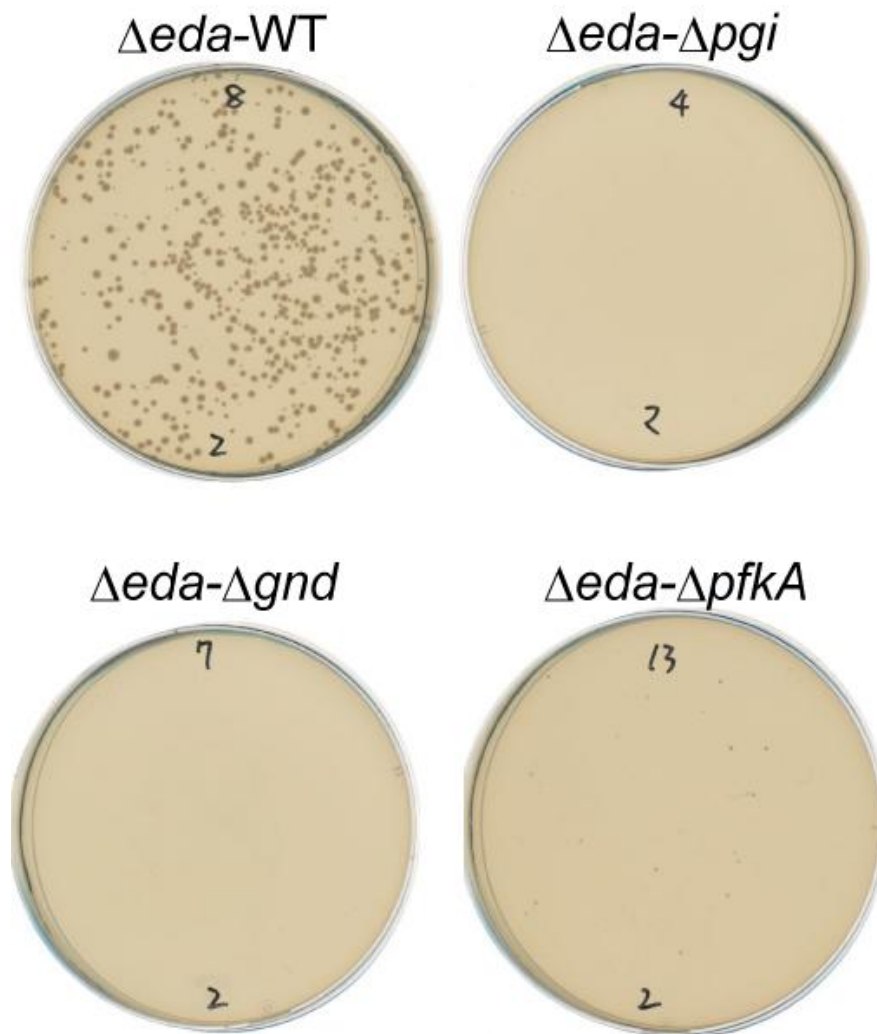


図 4.3 *eda* の負の遺伝的相互作用の検証

Δeda-Hfr 株を *Δpgi* 株、*Δgnd* 株、*ΔpfkA* 株と液体中で接合させて DKO 細胞を作製し、その接合液を 100 倍希釈して Km 30 μg/mL と Cm 25 μg/mL を含む LB 培地に 100 μL 撒いて、37°C で 16 時間培養した後のプレートを撮影した。同様の操作を Km 耐性を持つ BW25113 野生株についておこない、*Δeda* の接合伝達が生じていることを確認した。

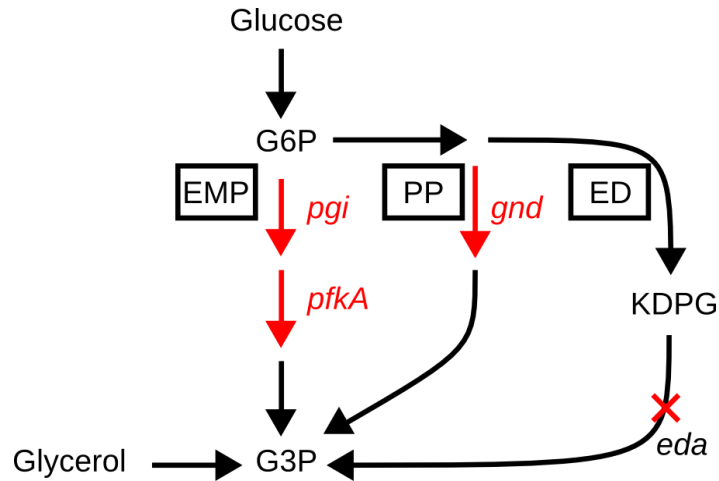


図 4.4 解糖経路における *eda* との合成致死ペア

eda が欠失した条件で合成致死になる遺伝子とその酵素反応（矢印）を赤色で示した。ここで示した経路はグルコースから Glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) までの中心代謝経路である。ここには Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) 経路、Pentose Phosphate (PP) 経路、Entner-Doudoroff (ED) 経路が存在する。G6P は Glucose-6-phosphate、KDPG は 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate の略である。

通常、生育できなくなる主な要因として考えられるのは、代謝物質の変換経路が失われるためである。しかし、解糖経路には EMP、PP、ED の 3 経路が存在しているため、二重欠失後でもグルコース 6 リン酸からグリセルアルデヒド 6 リン酸への変換は可能である。そのため、代謝モデルによるシミュレーションでは生育することが可能である。一方で *eda* 遺伝子が欠失すると、KDPG (2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate) が消費されず、蓄積すると考えられる。KDPG の急激な蓄積は静菌作用 (bacteriostatic) を引き起こすことが報告されている (Fuhrman et al., 1998)。通常 ED 経路への流れは少ないため、*eda* 遺伝子の単独欠失であれば KDPG の蓄積量は少なく生育できる。しかし、EMP 経路 (*pgi*, *pfkA*) や PP 経路 (*gnd*) の遺伝子が同時に欠失されると、ED 経路への流れが多くなり、KDPG が大量に蓄積するため生育できなくなると考えられた。これを検証するために、EMP 経路や PP 経路の遺伝子が欠失されても ED 経路への流れが多にならない培養条件 (Glycerol を炭素源とする最小培地) での DKO 株 (*eda-pgi*) の生育を調べた。LB 培地では生育しない *eda-pgi* 欠失株が 0.2% Glycerol MOPS 培地では生育した (図 4.5)。このことから、二重欠失により KDPG の過剰な蓄積が誘発され、増殖が抑制されることが示唆された。

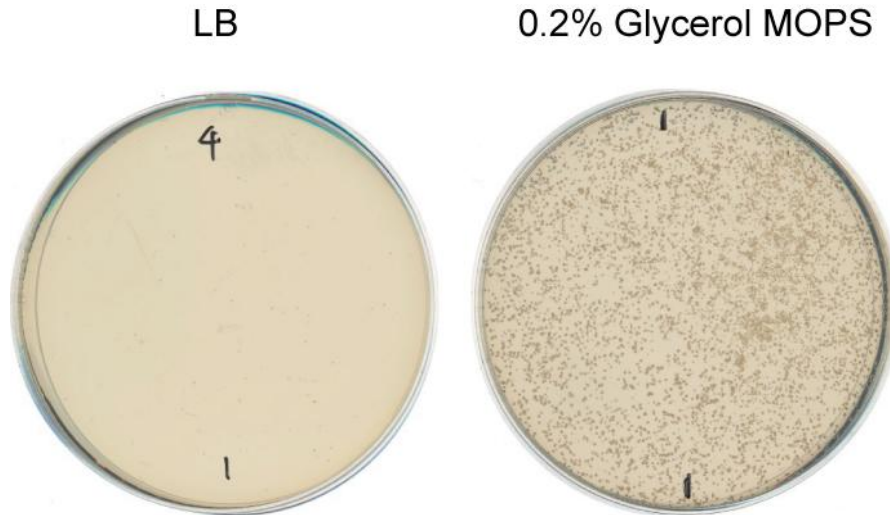


図 4.5 2 種類の培地における $\Delta eda\Delta pgi$ 株の生育

$\Delta eda\Delta pgi$ 株の培養液を LB 培地で 16 時間、0.2% Glycerol MOPS 培地で 52 時間培養した後のプレートを撮影した。 $\Delta eda\Delta pgi$ 株の培養液には Δeda -Hfr 株と Δpgi 株を液体接合させて、1/10 倍に希釈したものをを用いた。培地にはカナマイシン 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とクロラムフェニコール 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加した。培養温度は 37°C とした。

4.3.4 遺伝的相互作用と染色体距離

二重欠失した遺伝子ペアの染色体距離と遺伝的相互作用の観測数との関係を調べた。ノイズを減らすために、遺伝的相互作用は高いスコアが観測された場合 ($|e| > 0.5$) のみを使用した。正の遺伝的相互作用の出現頻度と染色体距離には相関が見られなかったが、負の遺伝的相互作用の出現頻度と染色体距離には負の相関がみられた (図 4.6)。

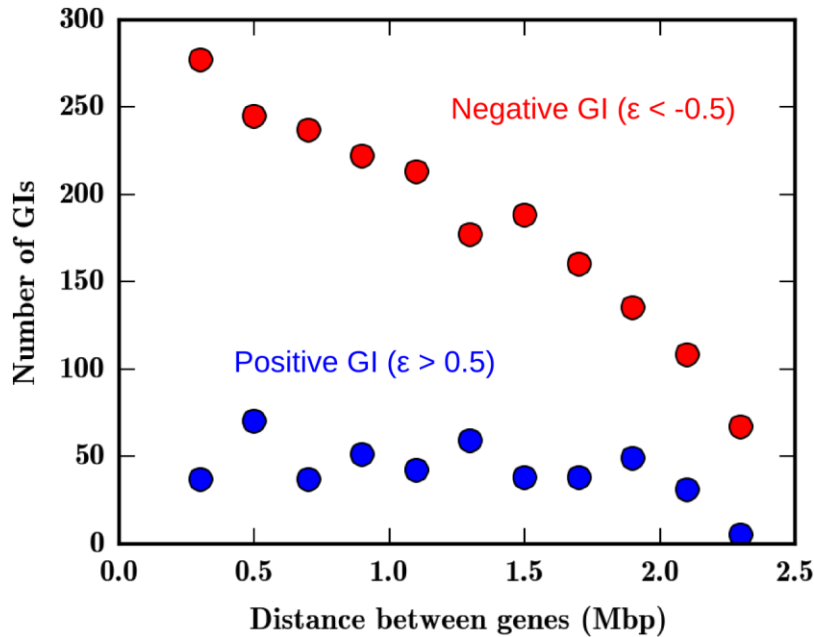


図 4.6 遺伝子ペアの染色体距離と GI 観測数の関係

GI ペアにおける 2 遺伝子間の染色体距離と GI ペアの観測数をプロットした。大腸菌は環状染色体なので 2 遺伝子間の距離は 2 つあるが、ここでは短い方を用いた。ε が 0.5 よりも大きい場合を positive GI、ε が -0.5 よりも小さい場合を negative GI と判定した。

次に、種々の遺伝子ペア情報と染色体距離の相関を調べた結果、同じ EC 番号 (図 4.7E) とアミノ酸配列 (図 4.7F) の相同性が高いペアにおいて同様の傾向がみられた。EC 番号は、基質と酵素反応で分類されているため、同じ EC 番号の遺伝子ペアは同じ酵素反応機構を持つ。アミノ酸の相同性が高いペアではタンパク質の構造が似ていると考えられ、生化学的な機能も類似する傾向がある。負の遺伝的相互作用がある遺伝子ペアは機能が類似する傾向がある (Baryshnikova et al., 2010)。これらのことから、大腸菌の染色体では遺伝子間距離と生理機能の類似性との間には負の相関があることが示唆された。興味深いことに、この傾向が染色体全域に見られる。通常同じ生理機能を持つ遺伝子はオペロンとして染色体上の一箇所に固まるが、今回の結果はオペロン単位を越えている。また、遺伝子間距離に対して生理機能の類似性が線形的に減少していくことも興味深い。

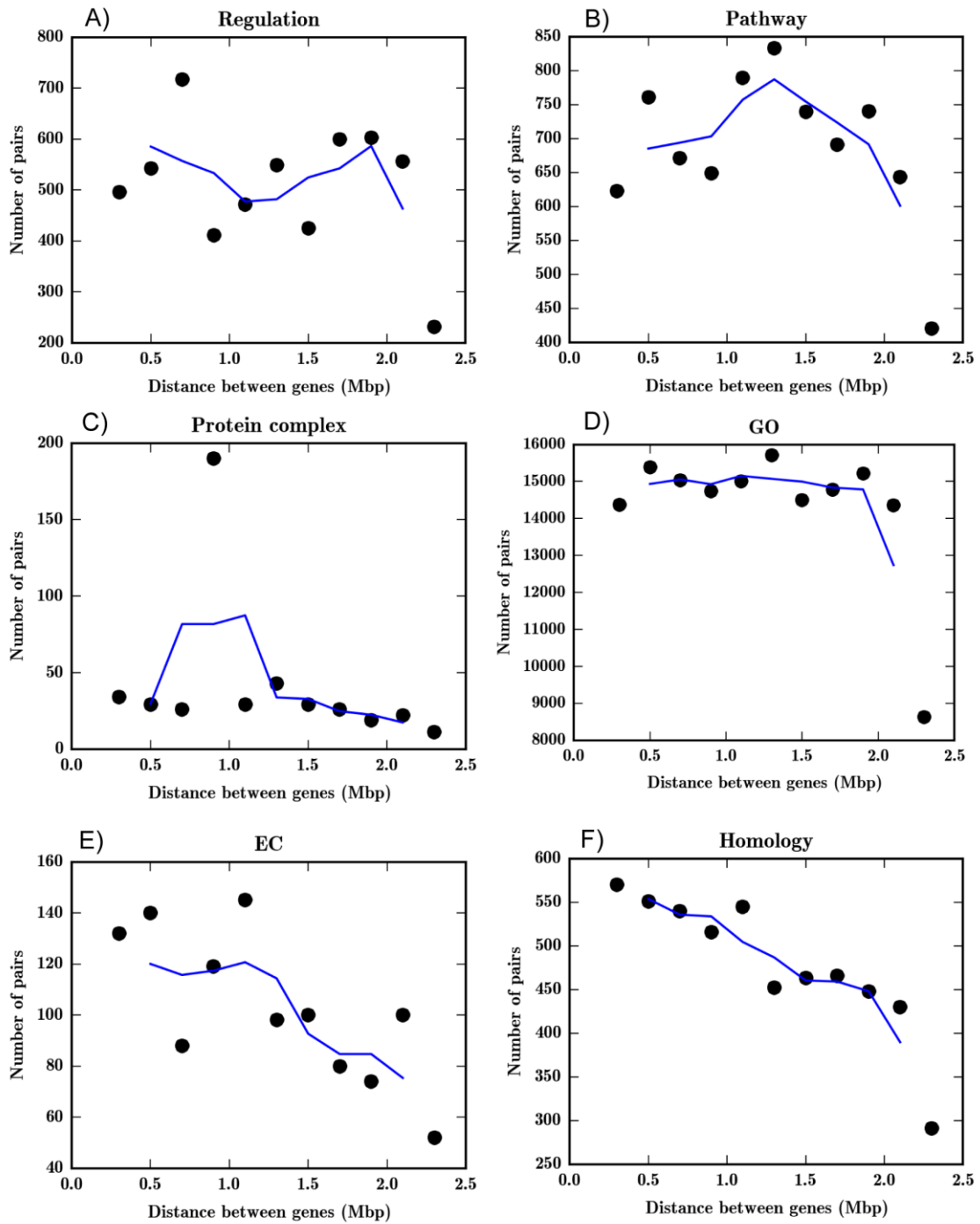


図 4.7 各種遺伝子ペアの染色体距離

各種遺伝子ペアの染色体距離とペアの観測数をプロットした。Regulation は同じ転写制御を受ける遺伝子ペア、Pathway は同じ経路に存在する遺伝子ペア、Protein complex は同じタンパク質複合体に存在する遺伝子ペア、GO は同じ Gene Ontology 番号を持つ遺伝子ペア、EC は同じ酵素番号を持つ遺伝子ペア、Homology はアミノ酸配列の相同性が 50%以上の遺伝子ペアである。

4.4 考察

本章では大腸菌における網羅的な GI 解析を開始し、現在までに全遺伝子ペアの約 2 割の解析を終えた。GI データの有用性を評価するために、様々な観点の遺伝子相互作用情報 (経路情報、転写制御情報、オペロン構造、タンパク複合体、遺伝子機能) との相関を調べた。現在利用可能な大腸菌の各種大規模 omics データ (アミノ酸の相同性、タンパク質-タンパク質相互作用、環境因子と遺伝子との相互作用) と比べて、GI データは様々な既存の遺伝子情報と高く相関していた (表 4.1)。このことから、GI データは、より確度の高い遺伝子相互作用の解析を可能にすることが示唆された。しかしながら、GI データはさまざまな相互作用の存在を示唆できるが、相互作用の種類までを特定することはできない。このような目的には、別の大規模データと組み合わせた解析が必要となる。例えば、タンパク質間相互作用の大規模データと GI データを統合できれば、よりバイアスとノイズが少ないタンパク質間相互作用情報が得られることが期待される。

GI データはさまざまな解析に使用できると考えられる。1つの解析例は代謝ネットワークモデルのギャップ分析である。今回、モデルを基にしたシミュレーション予測結果 (生死判定) と測定結果が一致しない 193 の DKO ペアを同定できた。ここには予測よりも生育が良かったもの、生育が悪かったものの 2つが含まれる。予測よりも生育が悪くなったもののうち、複数の解糖経路遺伝子の DKO ペア (*eda-pgi*, *eda-pfkA*, *eda-gnd*) について生育阻害の原因を考察した。個々の DKO ペアについて考えた場合には無数の可能性が存在するが、複数の DKO ペアを代謝マップ上に表して (図 4.4) 考えた場合には KDPG (2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate) の蓄積が推測された。KDPG の蓄積は静菌作用を示すことが報告されており (Fuhrman et al., 1998)、我々の確認実験でも KDPG が蓄積しにくい培養条件では *ΔedaΔpgi* 株が生育できることを確認した (図 4.5)。代謝物 KDPG の蓄積の実験検証が必要であるものの、網羅的な GI データを参考にすることで様々な可能性の中から候補を絞ることができ、文献情報などの情報を合わせた解析によりこれまで難しかった推論を可能にすることができている。もう 1つの解析例は GI のゲノムワイドな特徴の分析である。合成致死ペア (negative GI) の出現頻度は 2つの遺伝子ペア間の染色体上距離に依存して直線的に減少する傾向が観測された (図 4.6)。これと同様の傾向が同じ EC 番号ペア、アミノ酸の相同性が高い (paralog) ペアにおいても観測された (図 4.7 の E, F)。EC 番号は酵素反応機構により分類されているため、同じ EC 番号の遺伝子ペアは同じ酵素反応機構を持つ。アミノ酸の相同性が高いペアではタンパク質の構造が似ていると考えられ、生化学的な機能も類似する傾向がある。これらの結果から機能的に近い遺伝子同士は染色体上の近くに存在する傾向が示唆された。

現在、網羅的な GI 解析は富栄養培地 (LB 培地)、37°Cの培養条件で行っている。しかしながら、自然界の大腸菌は高温、低温、高浸透圧、低浸透圧、飢餓などの各種ストレスに曝されており、これらに対応して生存する機能を備えている。このようなストレスによって誘発される遺伝子群について GI 解析をするには、ストレスを与えた培養条件での実験が必要である。また、代謝ネットワークモデルによる生育シミュレーションを正確におこなうためには、培地成分が不明確な富栄養培地 (LB 培地) を用いるのではなく、培地成分が明確である合成培地 (M9 培地、MOPS 培地) を用いることが望ましい。このように、今後は、1つの培養条件だけでなく、様々な培養条件における網羅的な GI 解析が必要になると考えられる。

網羅的な GI 解析における問題は 2 点ある。1つはデータの蓄積に多大な労力と時間を要することである。一条件だけでの大腸菌の網羅的な GI 解析を完成させるために、現行の方法では 2 年の時間と膨大な消耗品等が必要である。前述したように、種々の環境条件を含めた網羅的な GI 解析をする場合にはさらに人的、物的リソースが必要である。これらを達成するためには、スループットの更なる向上が必須である。現在、Singer 社の RoToR HDA 装置を用いれば 1536 colonies/plate のさらに 4 倍のコロニー密度となる 6144 colonies/plate までの植菌操作が可能であり、実験条件等の最適化が必要となるが、検討すべき方法の一つと考えられる。もう 1 つは接合法によるバイアスが評価できていないことである。これを評価するには、別手法によりデータを蓄積して比較する必要がある。当研究室では 2 種類のトランスポゾン、barcode と次世代シーケンス技術を用いて、ランダムに挿入された 2 か所の変異箇所とその頻度を同定する手法を開発中である。トランスポゾンが挿入されない遺伝子ペアを調べることで、致死となる DKO ペアが解明できると期待される。このようなトランスポゾンを用いた技術により得られたデータと本研究のデータを比較することで、接合法によるバイアスを評価できると考えられる。

本研究では大腸菌の遺伝的相互作用のデータは全ペアの約 2 割まで解析した。今後さらにデータが蓄積されてくることで、大腸菌の大規模な細胞内の機能的ネットワークが解明されることが期待される。出芽酵母では蓄積された GI データを基に細胞内の機能的ネットワークが解析されており (Costanzo et al., 2010)、さらに近接した生物種間 (出芽酵母と分裂酵母) でオルソログ遺伝子に機能的な違いが存在するかということも研究されている (Frost et al., 2012)。大腸菌と酵母との比較から、真核生物と原核生物における機能的ネットワークの比較は今後の重要な課題である。GI データは GenoBase (<http://ecoli.naist.jp/GB/>) において公開予定であり、様々な研究者によるさらなる解析が期待される。

謝辞

本論文は奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 システム微生物学研究室教授の森 浩禎博士のご指導のもとに、著者が7年間(2007-2013)の在学中に行った研究成果をまとめたものです。本研究を進めるにあたって、懇切丁寧な御指導を賜りました森教授には深く謝意を表します。

本研究を進めるにあたりご指導を頂きました、奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科教授の高木 博史博士、同准教授の秋山昌広博士、同教授であった横田 明穂博士、同助教授であった中屋敷 徹博士、同研究員であった山本 奈津子博士と柳原 芳充博士、同大学情報科学研究科教授の金谷 重彦博士、慶應義塾大学先端生命科学研究所准教授の中東憲治博士、Purdue University Department of biological sciences 教授の Barry L. Wanner 博士に感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたりご助言やご協力を頂きました、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科教授であった Ian Smith 博士、同大学システム微生物学研究室 研究員の Steven Bowden 博士、研究員であった道瀬ひとみさん、技術員の任田 八恵さん、学生の大塚 悠太さんと野村 航さんと神田 純也さんと眞喜志一さん、卒業生の Yong Han Tek 博士と船岡信孝さんと草田 善之さんと五十嵐 秀憲さん、大阪医科大学 物理学教室講師の牧 泰史博士、京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンター助教授の田村 武幸博士、山口大学理学部物理・情報科学科教授の松野 浩嗣博士、学生だった相原 大輝さん、University of California San Diego 学生の Jonathan Monk さん、Universidad Pública de Navarra 教授の Javier Pozueta-Romero 博士と学生の Goizeder Almagro さん、University of Science and Technology Chittagong 教授の Md. Arifzaman 博士、National Yang-Ming University 教授の Hsuan-Cheng Huang 博士、National Taiwan University 学生の Han Lin さんに感謝申し上げます。

最後に、これまで不自由なく研究ができたのは両親の支えがあったからです。両親に心からの感謝の意を表します。

参考文献

Agris, P.F., Vendeix, F.A.P., and Graham, W.D. (2007). tRNA's Wobble Decoding of the Genome: 40 Years of Modification. *J. Mol. Biol.* 366, 1–13.

Arifuzzaman, M., Maeda, M., Itoh, A., Nishikata, K., Takita, C., Saito, R., Ara, T., Nakahigashi, K., Huang, H.-C., Hirai, A., et al. (2006). Large-scale identification of protein–protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Res.* 16, 686–691.

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., et al. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25, 25–29.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-Frame, Single-Gene Knockout Mutants: The Keio Collection. *Mol. Syst. Biol.* 2.

Babu, M., Díaz-Mejía, J.J., Vlasblom, J., Gagarinova, A., Phanse, S., Graham, C., Yousif, F., Ding, H., Xiong, X., Nazarians-Armavil, A., et al. (2011). Genetic Interaction Maps in *Escherichia coli* Reveal Functional Crosstalk among Cell Envelope Biogenesis Pathways. *PLoS Genet* 7, e1002377.

Baranyi, J. (1998). Comparison of Stochastic and Deterministic Concepts of Bacterial Lag. *J. Theor. Biol.* 192, 403–408.

Baryshnikova, A., Costanzo, M., Kim, Y., Ding, H., Koh, J., Toufighi, K., Youn, J.-Y., Ou, J., San Luis, B.-J., Bandyopadhyay, S., et al. (2010). Quantitative analysis of fitness and genetic interactions in yeast on a genome scale. *Nat Meth* 7, 1017–1024.

Breitling, R., Armengaud, P., Amtmann, A., and Herzyk, P. (2004). Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett.* 573, 83–92.

Butland, G., Peregrín-Alvarez, J.M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., et al. (2005). Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* 433, 531–537.

Butland, G., Babu, M., Díaz-Mejía, J.J., Bohdana, F., Phanse, S., Gold, B., Yang, W., Li, J., Gagarinova, A.G., Pogoutse, O., et al. (2008). eSGA: *E. coli* synthetic genetic array analysis. *Nat. Methods* 5, 789–795.

Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E.D., Sevier, C.S., Ding, H., Koh, J.L.Y., Toufighi, K., Mostafavi, S., et al. (2010). The Genetic Landscape of a Cell. *Science* 327, 425–431.

Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia coli* K-12 Using PCR Products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6640–6645.

Dixon, S.J., Costanzo, M., Baryshnikova, A., Andrews, B., and Boone, C. (2009). Systematic Mapping of Genetic Interaction Networks. *Annu. Rev. Genet.* 43, 601–625.

Eguchi, Y., Itou, J., Yamane, M., Demizu, R., Yamato, F., Okada, A., Mori, H., Kato, A., and Utsumi, R. (2007). B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 18712–18717.

Erhardt, H., Steimle, S., Muders, V., Pohl, T., Walter, J., and Friedrich, T. (2012). Disruption of individual *nuo*-genes leads to the formation of partially assembled NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1817, 863–871.

Ernebjerg, M., and Kishony, R. (2012). Distinct Growth Strategies of Soil Bacteria as Revealed by Large-Scale Colony Tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1345–1352.

Feist, A.M., and Palsson, B.Ø. (2008). The growing scope of applications of genome-scale metabolic reconstructions using *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 26, 659–667.

Feist, A.M., Henry, C.S., Reed, J.L., Krummenacker, M., Joyce, A.R., Karp, P.D., Broadbelt, L.J., Hatzimanikatis, V., and Palsson, B. (2007). A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.* 3.

Foster, J.M., Davis, P.J., Raverdy, S., Sibley, M.H., Raleigh, E.A., Kumar, S., and Carlow, C.K.S. (2010). Evolution of Bacterial Phosphoglycerate Mutases: Non-Homologous Isofunctional Enzymes Undergoing Gene Losses, Gains and Lateral Transfers. *PLoS ONE* 5, e13576.

François, V., Conter, A., and Louarn, J.M. (1990). Properties of New Escherichia Coli Hfr Strains Constructed by Integration of pSC101-Derived Conjugative Plasmids. *J. Bacteriol.* *172*, 1436–1440.

Frost, A., Elgort, M.G., Brandman, O., Ives, C., Collins, S.R., Miller-Vedam, L., Weibezahn, J., Hein, M.Y., Poser, I., Mann, M., et al. (2012). Functional Repurposing Revealed by Comparing *S. pombe* and *S. cerevisiae* Genetic Interactions. *Cell* *149*, 1339–1352.

Fuhrman, L.K., Wanken, A., Nickerson, K.W., and Conway, T. (1998). Rapid accumulation of intracellular 2 - keto - 3 - deoxy - 6 - phosphogluconate in an Entner - Doudoroff aldolase mutant results in bacteriostasis. *FEMS Microbiol. Lett.* *159*, 261–266.

Gamer, M., Lemon, J., and <puspendra.pusp22@gmail.com>, I.F.P.S. (2012). irr: Various Coefficients of Interrater Reliability and Agreement.

Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., et al. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* *418*, 387–391.

Gu, Z., Steinmetz, L.M., Gu, X., Scharfe, C., Davis, R.W., and Li, W.-H. (2003). Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* *421*, 63–66.

Gulmezian, M., Hyman, K.R., Marbois, B.N., Clarke, C.F., and Javor, G.T. (2007). The role of UbiX in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* *467*, 144–153.

Haldimann, A., and Wanner, B.L. (2001). Conditional-Replication, Integration, Excision, and Retrieval Plasmid-Host Systems for Gene Structure-Function Studies of Bacteria. *J. Bacteriol.* *183*, 6384–6393.

Hong, F., Breitling, R., McEntee, C.W., Wittner, B.S., Nemhauser, J.L., and Chory, J. (2006). RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics* *22*, 2825–2827.

Hu, P., Janga, S.C., Babu, M., Díaz-Mejía, J.J., Butland, G., Yang, W., Pogoutse, O., Guo, X., Phanse, S., Wong, P., et al. (2009). Global Functional Atlas of *Escherichia coli* Encompassing Previously Uncharacterized Proteins. *PLoS Biol* *7*, e1000096.

Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., and Suzuki, T. (2006). Mechanistic Insights into Sulfur Relay by Multiple Sulfur Mediators Involved in Thiouridine Biosynthesis at tRNA Wobble Positions. *Mol. Cell* 21, 97–108.

Imlay, J.A. (2008). Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 755–776.

Jensen, P.R., and Michelsen, O. (1992). Carbon and energy metabolism of atp mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 7635–7641.

Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., et al. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421, 231–237.

Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., and Tanabe, M. (2011). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* 40, D109–D114.

Keseler, I.M., Mackie, A., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., Bonavides-Martínez, C., Fulcher, C., Huerta, A.M., Kothari, A., Krummenacker, M., et al. (2012). EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Res.*

Khan, I., Chen, Y., Dong, T., Hong, X., Takeuchi, R., Mori, H., and Kihara, D. (2014). Genome-Scale Identification and Characterization of Moonlighting Proteins. *Biol. Direct* 9, 30.

Kitano, H. (2002). Systems Biology: A Brief Overview. *Science* 295, 1662–1664.

Kitano, H. (2004). Biological robustness. *Nat. Rev. Genet.* 5, 826–837.

Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K.K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., et al. (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4678–4683.

Levin-Reisman, I., Gefen, O., Fridman, O., Ronin, I., Shwa, D., Sheftel, H., and Balaban, N.Q. (2010). Automated imaging with ScanLag reveals previously undetectable bacterial growth phenotypes. *Nat. Methods* 7, 737–739.

Liu, J.K., O'Brien, E.J., Lerman, J.A., Zengler, K., Palsson, B.O., and Feist, A.M. (2014). Reconstruction and modeling protein translocation and compartmentalization in *Escherichia coli* at the genome-scale. *BMC Syst. Biol.* 8, 110.

McKay, A.L., Peters, A.C., and Wimpenny, J.W.T. (1997). Determining specific growth rates in different regions of *Salmonella typhimurium* colonies. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 74–76.

Nakahigashi, K., Miyamoto, K., Nishimura, K., and Inokuchi, H. (1992). Isolation and characterization of a light-sensitive mutant of *Escherichia coli* K-12 with a mutation in a gene that is required for the biosynthesis of ubiquinone. *J. Bacteriol.* 174, 7352–7359.

Nichols, R.J., Sen, S., Choo, Y.J., Beltrao, P., Zietek, M., Chaba, R., Lee, S., Kazmierczak, K.M., Lee, K.J., Wong, A., et al. (2011). Phenotypic Landscape of a Bacterial Cell. *Cell* 144, 143–156.

Ohashi, Y., Hirayama, A., Ishikawa, T., Nakamura, S., Shimizu, K., Ueno, Y., Tomita, M., and Soga, T. (2008). Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS. *Mol. Biosyst.* 4, 135–147.

Ohtsu, I., Wiriyanawudhiwong, N., Morigasaki, S., Nakatani, T., Kadokura, H., and Takagi, H. (2010). The l-Cysteine/l-Cystine Shuttle System Provides Reducing Equivalents to the Periplasm in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 285, 17479–17487.

Orth, J.D., and Palsson, B. (2012). Gap-filling analysis of the iJO1366 *Escherichia coli* metabolic network reconstruction for discovery of metabolic functions. *BMC Syst. Biol.* 6, 30.

Orth, J.D., Conrad, T.M., Na, J., Lerman, J.A., Nam, H., Feist, A.M., and Palsson, B.Ø. (2011). A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011. *Mol. Syst. Biol.* 7.

Otsuka, Y., Muto, A., Takeuchi, R., Okada, C., Ishikawa, M., Nakamura, K., Yamamoto, N., Dose, H., Nakahigashi, K., Tanishima, S., et al. (2014). GenoBase: comprehensive resource database of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* gku1164.

Paek, K.H., and Walker, G.C. (1987). *Escherichia coli* dnaK null mutants are inviable at high temperature. *J. Bacteriol.* 169, 283–290.

Pellis, L., Hal, N.L.W.F., Burema, J., and Keijer, J. (2003). The intraclass correlation coefficient applied for evaluation of data correction, labeling methods, and rectal biopsy sampling in DNA microarray experiments. *Physiol. Genomics* *16*, 99–106.

Pérez-Mendoza, D., and Cruz, F. de la (2009). *Escherichia coli* genes affecting recipient ability in plasmid conjugation: Are there any? *BMC Genomics* *10*, 71.

Pirt, S.J. (1965). The Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *163*, 224–231.

Pirt, S.J. (1967). A Kinetic Study of the Mode of Growth of Surface Colonies of Bacteria and Fungi. *J. Gen. Microbiol.* *47*, 181–197.

Rajagopala, S.V., Sikorski, P., Kumar, A., Mosca, R., Vlasblom, J., Arnold, R., Franca-Koh, J., Pakala, S.B., Phanse, S., Ceol, A., et al. (2014). The binary protein-protein interaction landscape of *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* *32*, 285–290.

R. Core Team (2012). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (Vienna, Austria).

Rousseeuw, P., Croux, C., Todorov, V., Ruckstuhl, A., Salibian-Barrera, M., Verbeke, T., Koller, M., and Maechler, M. (2012). *robustbase: Basic Robust Statistics*.

Russell, J.B., and Cook, G.M. (1995). Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* *59*, 48–62.

Salgado, H., Peralta-Gil, M., Gama-Castro, S., Santos-Zavaleta, A., Muniz-Rascado, L., Garcia-Sotelo, J.S., Weiss, V., Solano-Lira, H., Martinez-Flores, I., Medina-Rivera, A., et al. (2012). RegulonDB v8.0: omics data sets, evolutionary conservation, regulatory phrases, cross-validated gold standards and more. *Nucleic Acids Res.* *41*, D203–D213.

Selinger, D.W., Cheung, K.J., Mei, R., Johansson, E.M., Richmond, C.S., Blattner, F.R., Lockhart, D.J., and Church, G.M. (2000). RNA expression analysis using a 30 base pair resolution *Escherichia coli* genome array. *Nat. Biotechnol.* *18*, 1262–1268.

Serres, M.H., and Riley, M. (2000). MultiFun, a multifunctional classification scheme for *Escherichia coli* K-12 gene products. *Microb. Comp. Genomics* *5*, 205–222.

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., and D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *J. Bacteriol.* *189*, 8746–8749.

Shah, N.A., Laws, R.J., Wardman, B., Zhao, L.P., and Hartman, J.L., 4th (2007). Accurate, precise modeling of cell proliferation kinetics from time-lapse imaging and automated image analysis of agar yeast culture arrays. *BMC Syst. Biol.* 1, 3.

Smith, T.F., and Waterman, M.S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 147, 195–197.

Suthers, P.F., Zomorodi, A., and Maranas, C.D. (2009). Genome-scale gene/reaction essentiality and synthetic lethality analysis. *Mol. Syst. Biol.* 5, 301.

Suzuki, H., Nishimura, Y., and Hirota, Y. (1978). On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a series of mutants of *E. coli* altered in the penicillin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 664–668.

Tong, A.H.Y., Evangelista, M., Parsons, A.B., Xu, H., Bader, G.D., Pagé, N., Robinson, M., Raghibizadeh, S., Hogue, C.W.V., Bussey, H., et al. (2001). Systematic Genetic Analysis with Ordered Arrays of Yeast Deletion Mutants. *Science* 294, 2364–2368.

Tong, A.H.Y., Lesage, G., Bader, G.D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G.F., Brost, R.L., Chang, M., et al. (2004). Global Mapping of the Yeast Genetic Interaction Network. *Science* 303, 808–813.

Tschowri, N., Busse, S., and Hengge, R. (2009). The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 23, 522–534.

Typas, A., Nichols, R.J., Siegele, D.A., Shales, M., Collins, S.R., Lim, B., Braberg, H., Yamamoto, N., Takeuchi, R., Wanner, B.L., et al. (2008). High-throughput, quantitative analyses of genetic interactions in *E. coli*. *Nat. Methods* 5, 781–787.

Typas, A., Banzhaf, M., van den Berg van Saparoea, B., Verheul, J., Biboy, J., Nichols, R.J., Zietek, M., Beilharz, K., Kannenberg, K., von Rechenberg, M., et al. (2010). Regulation of peptidoglycan synthesis by outer-membrane proteins. *Cell* 143, 1097–1109.

Warringer, J., Ericson, E., Fernandez, L., Nerman, O., and Blomberg, A. (2003). High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 15724–15729.

Warringer, J., Zörgö, E., Cubillos, F.A., Zia, A., Gjuvsland, A., Simpson, J.T., Forsmark, A., Durbin, R., Omholt, S.W., Louis, E.J., et al. (2011). Trait Variation in Yeast Is Defined by Population History. *PLoS Genet* 7, e1002111.

Yamamoto, N., Nakahigashi, K., Nakamichi, T., Yoshino, M., Takai, Y., Touda, Y., Furubayashi, A., Kinjyo, S., Dose, H., Hasegawa, M., et al. (2009). Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants. *Mol. Syst. Biol.* 5.

Yim, L., Moukadiri, I., Björk, G.R., and Armengod, M.-E. (2006). Further insights into the tRNA modification process controlled by proteins MnmE and GidA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 34, 5892–5905.

Zhao, G., and Winkler, M.E. (1994). An *Escherichia coli* K-12 *tktA tktB* mutant deficient in transketolase activity requires pyridoxine (vitamin B6) as well as the aromatic amino acids and vitamins for growth. *J. Bacteriol.* 176, 6134–6138.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., and Riet, K. van 't (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.