

博士論文  
T4 ファージと大腸菌間の網羅的な相互作用解析

近藤恒平  
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)  
2019年 6月 12日

序論.....	7
1. ファージが地球全体に与える影響.....	7
2. T4 ファージの感染機構.....	7
3. T4 ファージゲノムの構造とコードされる遺伝子群の全体像.....	10
4. ファージ感染に影響を与える宿主側の因子.....	12
5. バクテリア生存に関わるバイオフィルムの機能.....	14
6. ファージとバイオフィルムに関する研究.....	15
7. パーシスタント現象について.....	17
8. 本研究の目的.....	19
材料と方法.....	22
1. 材料.....	22
1-1. 培地.....	22
1-2. 試薬.....	22
1-3. 使用株.....	23
1-4. プラスミド.....	23
2. プライマー.....	24
3. T4 ファージの増殖に影響を与える候補株の探索.....	26
4. ファージ存在下における候補株の生育曲線.....	27
5. 平板効率(EOP: Efficiency of Plating)の測定.....	27
6. T4 ファージゲノムの増幅.....	28
7. T4 ファージゲノムの酵母内アッセムブリ.....	28
8. 一段階増殖実験.....	28
9. 吸着アッセイ.....	29
10. COG 解析.....	29
11. クリスタルバイオレット法を用いたバイオフィルムアッセイ.....	29
12. 細胞毒性の評価.....	30
13. 細胞凝集アッセイ.....	30
14. バイオフィルム抽出及びバイオフィルム内のタンパク質の確認.....	30
15. LC-MS/MS による細胞外タンパク質の同定.....	31
16. T4 ファージに対する感受性試験.....	31
17. パーシスターの生存実験.....	31
18. データ解析及び可視化.....	32

<b>結果</b> .....	<b>33</b>
1. T4 ファージに耐性を示す大腸菌一遺伝子欠失株の網羅的探索.....	33
1-1. スクリーニング条件の最適化.....	33
1-2. LB 培地でのスクリーニング.....	34
1-2-1. 候補株の COG 解析.....	37
1-2-2. LB 培地で検出された遺伝子の概観.....	40
1-3. MOPS 培地下でのスクリーニング.....	42
1-3-1. 得られた候補株の概観.....	42
1-3-2. MOPS 培地で得られた候補株の COG 解析.....	44
1-4. LB 培地と MOS 培地で得られた候補株の比較.....	46
2. 液体培養下における候補株の OD <sub>600</sub> の継時的変化.....	50
2-1. スポットテストの検出回数と液体培地での溶菌度合いの関連性.....	54
2-2. 溶菌パターンによるクラスタ解析.....	56
2-3. T4 ファージへの影響が低い欠失株の溶菌パターン.....	58
3. 候補に挙がった変異株の EOP 測定.....	59
4. 候補株が影響を与える感染段階の推定.....	61
4-1. 吸着アッセイによる吸着効率の評価.....	61
4-2. 候補株の一段階増殖実験.....	62
5. バイオフィームとファージに関する研究.....	68
5-1. バイオフィームアッセイ.....	68
5-2. バイオフィーム生産誘導培地とファージ感染.....	69
5-3. 細胞の密度評価.....	70
5-4. バイオフィーム内のタンパク質の比較.....	71
5-4-1. 1.5 M NaCl の細胞毒性の評価.....	71
5-4-2. 候補株の細胞外タンパク質の抽出及び同定.....	74
5-5. 鞭毛の欠失による T4 ファージへの耐性評価.....	76
6. ファージはパーシスタント細胞を死滅させる.....	77
<b>考察</b> .....	<b>79</b>
1. スクリーニングの実験手法について.....	79
2. スクリーニングで得られた遺伝子について.....	80
3. これまで報告のない遺伝子群について.....	82
3-1. アミノ酸代謝とファージの増殖への影響.....	82

3-2. カリウムやカチオンに関与する遺伝子 .....	83
3-3. T4 ファージの DNA 合成に関する考察 .....	84
3-4. 呼吸鎖に関わる遺伝子と T4 ファージの感染の関連性 .....	86
3-5. 大腸菌の prophage 遺伝子を介したファージへの耐性機構 .....	86
4. パースターとファージの関連の考察 (ppGpp による飢餓応答の観点から) .....	88
5. 今後の展望 .....	89
<b>総括 .....</b>	<b>91</b>
<b>謝辞 .....</b>	<b>93</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>94</b>
<b>補足情報 .....</b>	<b>110</b>

要旨

所属 (主指導教員)	システム微生物学研究室 (森浩禎 教授)		
氏名	近藤恒平	提出	平成 31年 1月 21日
題名	T4 ファージと大腸菌間の網羅的な相互作用解析		
<p>ファージは海や土壌、腸内など、宿主となる微生物の生息する様々な環境に存在する。地球上のファージの総数は <math>10^{31}</math> 粒子数程度存在しており、地球上に最も多く存在する生命体である。その中でも、T4 ファージは 1940 年代から盛んに研究が行われ、mRNA の発見から原核生物におけるイントロンの発見など、分子生物学に大きく貢献してきた。これまでの研究の蓄積により、感染サイクル全体の概観は把握できるが、タンパク質コード遺伝子の 40%以上はいまだに機能未知であり、どのように宿主の代謝機能を制御し、乗っ取りを行うのかの詳細なメカニズムは未解明な点が残る。また、宿主の遺伝子産物や代謝産物、さらには宿主細胞における生理状態の変化が T4 ファージの感染効率にどのような影響を与えるかについては研究が進んでいないのが現状である。</p> <p>本研究では、T4 ファージの感染効率に影響を与える宿主遺伝子群を同定、解析することで、宿主と T4 ファージの遺伝子群の相互作用ネットワーク解明を目的とする。T4 ファージ増殖に影響を与える宿主側遺伝子探索を目的に、大腸菌の一遺伝子欠失株(Keio collection)を用いて、T4 ファージ存在下で生育可能な欠失株のスクリーニングを行った。</p> <p>LB 培地と最少培地である MOPS 培地の二種類を用いて実験を行ったところ、それぞれの条件で 70 以上の候補株が検出された。候補株の中には、受容体であるリポポリサッカライドを合成する遺伝子群や <i>ompC</i> といった T4 ファージの受容体をコードする遺伝子群も検出され、本スクリーニング法の有効性を確認している。候補株の中には cryptic prophage gene である <i>ymp</i> 遺伝子群 (<i>ympE</i>、<i>ympR</i>、<i>ympO</i>、<i>ympP</i>、<i>ympQ</i>) が新規に検出された。また、幾つかの cryptic gene を欠失すると平板効率 (EOP) の減少やプラークサイズが小さくなるといった表現型を示した。<i>ympE</i> と <i>ympP</i> の欠失株については宿主細胞からのファージ生産数を示すバーストサイズが減少したことから、これらの遺伝子群はファージ生産能に影響を与えることが推測された。一方、MOPS-glucose 培</p>			

地でのスクリーニングでは、グルコースを単一炭素源として利用するため、LB培地で得られた候補株と代謝に関わる候補株が重複しない結果となった。また、MOPS培地では、電子伝達系に関わる *nuoG* や欠失するとムコイドの表現型を示すプロテアーゼの *lon* の欠失株が検出された。

吸着アッセイにより、吸着段階に影響する遺伝子群を同定したところ、外膜リポ多糖合成・修飾に関与する酵素遺伝子群 (*lpcA*、*waaE*)、Glycine 合成経路の *glyA*、16S rRNA のプロセッシング酵素の *ybeY*、転写伸長因子の *greA* などが選択された。LPS 合成関連遺伝子群の欠失では、吸着効率が最大で 40%程度減少した。*glyA* や *ybeY*、*greA* は、これまでに報告が無く、吸着に影響を与える新規な遺伝子群として得ることができた。得られた候補株におけるバーストサイズを一段階増殖実験で測定したところ、多くの欠失株で低下が観察された。転写・翻訳に関与する遺伝子群 (*greA*、*ychF* 等) もバーストサイズが減少しており、T4 フェージの転写・翻訳にも影響を与えていることが示唆された。

幾つかの欠失株はムコイドのコロニーを形成した。バイオフィームや細胞外高分子物質の増加によるフェージ抵抗性の可能性を考え、ムコイド状コロニーを示した株 ( $\Delta ydfK$ 、 $\Delta ymfR$ 、 $\Delta nsrR$ 、 $\Delta TU-2304$ ) について、クリスタルバイオレット法によりバイオフィーム量の測定を行なった。その結果、T4 フェージ存在下で野生型と比較してわずかではあるが、有意にバイオフィームが増加していた。また、細胞外のタンパク質の種類を比較したところ、 $\Delta ydfK$ 、 $\Delta ymfR$ 、 $\Delta nsrR$  では約 50 kDa のタンパク質の存在量の増加が確認された。このタンパク質を質量分析で解析したところ、鞭毛の主要構成成分である FliC であることが示された。NsrR は鞭毛などに関わる遺伝子群のレプレッサーであることが明らかとなっている。一方、Cryptic prophage 領域にコードされる *ydfK* と *ymfR* における FliC の存在量との関連についてこれまで報告がなく、Cryptic prophage ではあるが、宿主機能を介した異種フェージ間相互作用の可能性を持つ。 $\Delta ydfK$ 、 $\Delta ymfR$ 、 $\Delta nsrR$  の各欠失株に  $\Delta fliC$  を導入した二重欠失株を作製し、T4 フェージへの感受性試験を行ったところ、それぞれの一遺伝子欠失株と比較して感受性を示したことから、FliC は T4 フェージ感染に対する防御機構の因子の一つであることが示唆された。

## 序論

### 1. ファージが地球全体に与える影響

ファージは地球上で最も多く存在している生命体で、海や土壌、腸内など宿主である細菌が生息する様々な環境に存在する。地球上に存在するファージの数は  $10^{31}$  粒子数程度と見積もられており (Waterbury and Valois, 1993)、この数字は細菌の総数の 10 倍にも上る。海洋中では一つの細菌に約 10 個のファージが感染していることが知られている (Wommack and Colwell, 2000)。ファージは特定の宿主に対して感染と溶菌を繰り返し、原核生物の生態系に大きな影響を与えるだけでなく、遺伝子の水平伝播による進化を促進する。実際に腸管出血性大腸菌のベロ毒素が cryptic prophage の領域に存在することから、ファージの形質導入による遺伝子の水平伝播により獲得されたと考えられている (Scotland et al., 1983)。さらに、日々増殖する原核生物の 20% はファージにより溶菌されるため (Steward et al., 1992a, 1992b)、生態系だけでなく、炭素循環にも大きな影響を与えている (Clokic and Mann, 2006; Middelboe et al., 2003)。近年、海洋に存在する大量のファージを対象にゲノムレベルの網羅解析が行われ、1 万を超える海洋ファージのゲノムが解読された (Roux et al., 2016)。得られたファージにコードされる遺伝子には硫黄や窒素の代謝に関与する遺伝子が発見されたことから、炭素循環だけでなく、硫黄や窒素循環に影響を及ぼすことが示唆された (Roux et al., 2016)。このようにファージは地球上における原核生物の生態系のみならず、地球上の化学的循環にも大きな影響を与えていると考えられている。

### 2. T4 ファージの感染機構

ファージは 20 世紀初頭に発見されて以来、多くの研究が行われてきた。ファージの感染様式には 2 種類あり、感染後すぐに宿主を溶菌させるビルレントファージと、感染後溶菌させずに宿主ゲノムに潜んだ後、ストレスなどの刺激が与えられた場合に溶菌するテンペレートファージに分類される。

T4 ファージは 1940 年代から分子生物学の分野において最も研究されてきたビルレントファージであり、T4 もしくは、T4 と非常に近縁の T2 ファージを研究する過程で、mRNA や原核生物におけるスプライシング機構などが発見され

(論文(Miller et al., 2003)に T4 ファージによって歴史的発見がまとめられている)、遺伝学分野においても大きく貢献したモデル生物の一つである。T4 ファージのゲノムサイズは約 170 kb で、他のファージと比較しても大きく、コードする遺伝子は約 300 である。T4 ファージの感染サイクルを図 1 に示した。

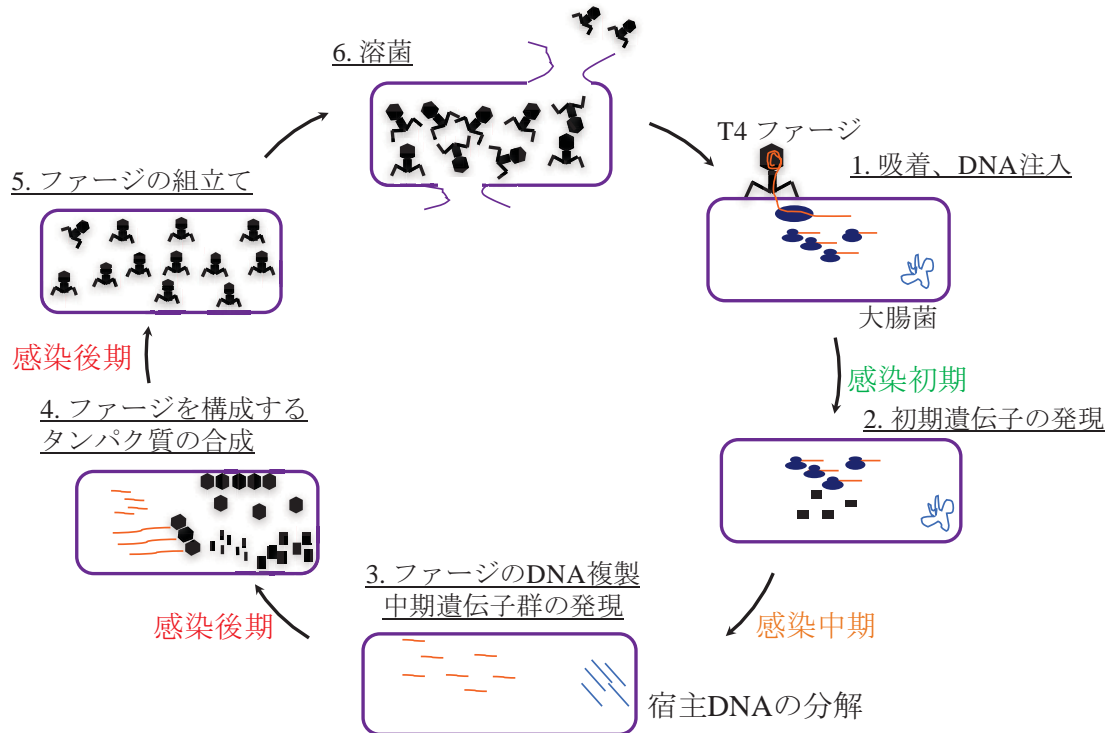


図 1. T4 ファージの感染サイクル

T4 ファージが大腸菌の受容体に吸着し、ファージゲノムの注入が起こる (1)。続いて、宿主の RNA ポリメラーゼを利用し、初期遺伝子を合成する (2)。感染中期の遺伝子発現が起こり、ファージのゲノム複製が開始される (3)。ファージの頭部や尾部などが合成され始め (4)、最終的には子ファージが組立てられ、感染後 20~30 分で溶菌が起こり、子ファージが外部に放出される (5、6)。

ファージはそれぞれ感染する宿主領域が決まっており、T4 ファージの場合は大腸菌と赤痢菌を宿主として感染する(Goebel, 1949)。大腸菌 K-12 株における受容体は外膜のタンパク質である OmpC 及び LPS (リポポリサッカライド) だが、大腸菌 B 株への吸着には OmpC を必要とせず、リポポリサッカライドにのみ吸着する(Yu and Mizusima, 1982)。T4 ファージは一連の感染サイクルにおいて、第一に宿主のリポポリサッカライドなどの受容体に吸着し、その後自身のゲノムを宿主細胞内に注入する (図 1)。感染後直ちに大腸菌の転写、翻訳



装置や代謝機能、DNA 複製機能を乗っ取り、自身の DNA 合成及び構成タンパク質を発現する。例えばファージの Alt タンパク質は、宿主の RNA ポリメラーゼを ADP-リボシル化することで、自身の初期遺伝子が開始される(Rohrer et al., 1975; Skorko et al., 1977)。また、T4 ファージのプロモーター活性の方が、大腸菌のプロモーター活性よりも強いため、T4 ファージ遺伝子の転写が優先されることが知られている(Sommer et al., 2000)。感染初期の転写に必要な  $\sigma$  因子は宿主の持つ  $\sigma^{70}$  である (図 2)。感染初期には ModA と ModB が発現し、宿主 RNA ポリメラーゼの二つの  $\alpha$  サブユニットがリボシル化されると T4 ファージの初期プロモーターの転写は阻害され、中期以降の遺伝子の転写が進行する (Tiemann et al., 2004)。中期遺伝子の転写には、宿主の転写因子  $\sigma^{70}$  に加え、T4 ファージのコードする MotA と AsiA が必要とされる(Colland et al., 1998) (図 2)。

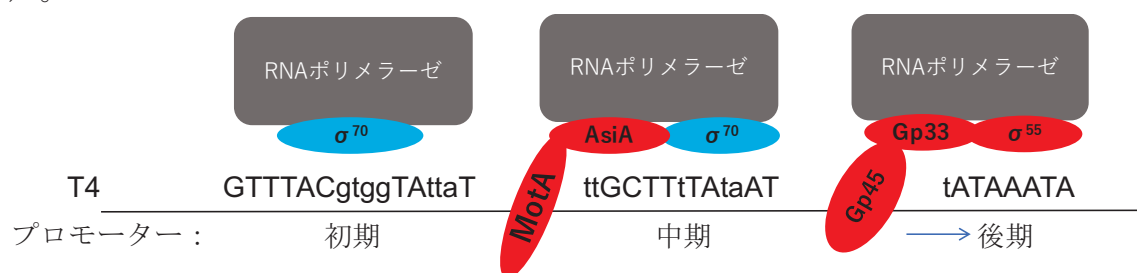


図 2. それぞれの感染段階におけるプロモーター配列と転写因子

RNA ポリメラーゼと青色の因子は大腸菌にコードされる遺伝子、赤色はファージ側にコードされる遺伝子を示す。感染初期には、 $\sigma^{70}$  に親和性の強いファージプロモーターからの転写が起こる。その後、発現された遺伝子産物 (MotA、AsiA など) の機能により、転写装置の中期プロモーターの発現誘導が起こり、後期には、ファージの持つ  $\sigma$  因子 ( $\sigma^{55}$ ) および Gp45, Gp33 による RNA polymerase の後期プロモーターの誘導が起こる。(Miller et al., 2003)の図を改変した。

AsiA と MotA は協働して感染中期プロモーターに RNA ポリメラーゼを呼び込み、伸長状態に導く (Hinton, 1996)。T4 ファージのゲノム複製、および相同組換えタンパク質の発現も感染中期から後期の段階で行われる (Mosig et al., 2001)。

感染後期に進行するには T4 ファージの DNA がヒドロキシメチルシトシン (dHMC) に修飾されている必要がある。感染後期では DNA の複製及び T4 ファージを構成するタンパク質が合成され、ファージ粒子の組み立てが行なわれ

る。感染後、数十分が経過すると宿主の細胞壁が溶かされ、新しく合成された子ファージが細胞外に溶出される。

大腸菌はファージの感染を防ぐために、様々な防御機構を発達させてきたが、その一方で T4 ファージも宿主の防御機構から逃れるために進化し続けてきた。例えば、T4 ファージは宿主の制限酵素を不活化するタンパク質 Arn をコードし、制限酵素による DNA の分解を防ぐ(Dharmalingam et al., 1982)。また、近年、大腸菌の CRISPR は、T4 ファージの修飾されたゲノムには効果がないことが示された(Bryson et al., 2015)。更に、大腸菌のトキシンタンパク質である LsoA が T4 ファージのアンチトキシンである Dmd によって不活化され(Wan et al., 2016)、トキシンによる大腸菌の死滅を防ぎ、T4 ファージ増殖に適した環境を保つ事が示された(Wan et al., 2016)。その他にも宿主側にコードされるトキシンと T4 ファージ側のアンチトキシンに関する研究(Fineran et al., 2009; Otsuka and Yonesaki, 2012)が精力的に行われており、ファージの中で最も研究されてきた T4 ファージでさえ、近年になり大腸菌間との新しい相互作用や生存戦略が発見され始めている。これまでの膨大な研究の蓄積によって、T4 ファージの感染サイクルの全体像は理解されつつあるが、感染してすぐに宿主細胞の代謝機能をファージ生産のために奪い取る分子機構については、未解明な点が多く、感染サイクルの全貌解明には至っていない。また、T4 ファージのコードタンパク質 278 個のうち、40%以上のタンパク質が未だ機能未知である (NCBI の T4 ゲノムの ORF において hypothetical protein または conserved hypothetical protein と表記されたものを計上) (図 3)。これら機能未知タンパク質は他のタンパク質とも相同性を示さず(Kawabata et al., 2000)、機能推定を行うのが困難であるが、感染初期に発現する(Luke et al., 2002)ことから、宿主細胞機能の奪い取りの初期段階に重要な機能を有すると考えられる。

### 3. T4 ファージゲノムの構造とコードされる遺伝子群の全体像

T4 ファージの感染は上述のように、感染初期（前初期、後初期）、中期、後期に分類される (図 1)。それぞれの感染段階において発現する遺伝子がマイクロアレイを用いて詳細に解析された(Luke et al., 2002)。感染初期段階において転写される遺伝子には、*gp30*(DNA リガーゼ)、DNA トポイソメラーゼ、*gp41*(DNA ヘリカーゼ)など T4 ファージの DNA 合成に関わるタンパク質をコー

ドする遺伝子が比較的多い。また、*e.8*、*e.7*、*mobD.5* や *frd.3* などの遺伝子は感染初期において転写量が非常に高いが、これらの遺伝子はいずれも機能未知である。初期遺伝子の多くが、大腸菌に対して強い毒性を示すこと、また、T4 フェージが初期段階で宿主の活動を制御する(Kutter et al., 2018)ことなどを考慮すると、初期に発現する機能未知の遺伝子の多くが、宿主の代謝を乗っ取る機能を有する可能性があると予想される。機能未知遺伝子の多くは、感染初期に比較的多く集中しており、また、コードする方向が反時計周りに多いという特徴を有する(図3)。感染サイクルの初期段階において、大腸菌の活動をどのように制御するかについては未解明な点が多いが、T4 フェージの機能未知の遺伝子と宿主との相互作用解析により、T4 フェージが大腸菌の活動を制御、支配する機構を解明することができると考えられる。感染中期になると、T4 フェージの転写は MotA 依存性のプロモーターによって行われ、T4 フェージの相同組換え酵素である UvsX、UvsY や Gp47 などが発現する。また、感染後期のコンカテマー作製に関わるその他の遺伝子群も中期に転写される。T4 フェージの DNA 複製は中期から始まり、後期の間も行われ続ける。感染後期には、頭部のカプシドタンパク質など、T4 フェージを構成する構造タンパク質が発現し、自発的な組み立てが行われた後、溶菌酵素により破壊された細胞壁から子フェージが放出される。

T4 フェージの頭部を構成する主要なタンパク質 Gp23 の折りたたみは、宿主のシャペロニン GroEL と T4 フェージのコシャペロニン Gp31 を必要とする(Bakkes et al., 2005)。gp31 の欠失した T4 フェージは異常な頭部を形成し、感染能を失う(Bakkes et al., 2005)。本来の GroEL の働きは宿主のフタ様のタンパク質である GroES と協働し、基質タンパク質を GroEL の空洞内部に落とし込み、宿主内の 10%以上の基質タンパク質の折りたたみを補助する(Ewalt et al., 1997; Fujiwara et al., 2010)。しかし、頭部タンパク質 Gp23 の大きさは GroEL / GroES 複合体で形成される空洞の大きさの限界とほぼ同じであり、折りたたむことができない(Hunt et al., 1997)。T4 フェージは GroES 様タンパク質の Gp31 をコードし、GroEL / Gp31 複合体を形成する。GroEL / Gp31 複合体は GroEL / GroES 複合体と比較してより大きい空洞が形成されるため、Gp23 を折りたたむことが可能である(Hunt et al., 1997)。このシャペロニン GroEL とフェージのコードするコシャペロニン Gp31 の相互作用は、T4 フェージが宿主のタンパク質を利用、あるいは依存して、子フェージを生産する一例である。

自身のゲノムが複製された後、感染後期にファージ自身の相同組換え酵素 (UvsX、UvxY、Gp32、Gp46、Gp47 など) により、コンカテマーが形成され (Yonesaki and Minagawa, 1985, 1989)、その後、ファージカプシドにコンカテマーのゲノムが取り込まれる。DNA が頭部に入りきらなくなると頭部における DNA の通り口に存在するターミナーゼ Gp17 により、DNA が切断される。その際、ゲノムの約 2% に相当する 3.3 kb 分のランダムな末端部分が余分に詰め込まれるという考え方が一般的である (Louie and Serwer, 1990)。

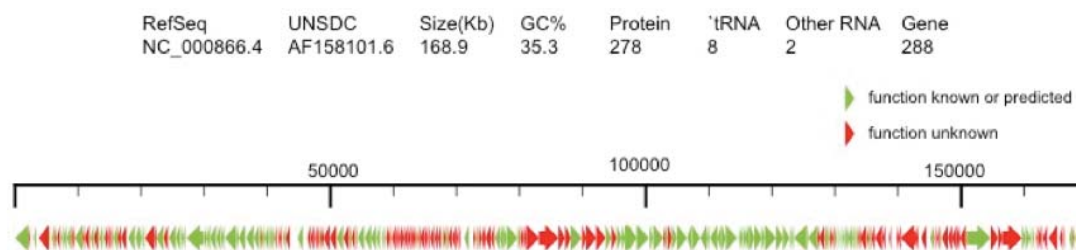


図 3. T4 ファージのゲノムとコードされる遺伝子機能既知 (緑) と未知 (赤) の遺伝子をそれぞれ区別した。

#### 4. ファージ感染に影響を与える宿主側の因子

ファージは宿主の生理的な状態や栄養、温度などの環境条件によって感染効率に影響を受ける。感染効率とは吸着効率、ファージの生産効率、増殖速度などを含めた全体のファージ生産効率のことを指す。過去に分離されたファージに耐性を示す変異株の多くが受容体の変異であることから、感染効率に影響を与える大きな要因の一つは、吸着段階である。 $\lambda$  ファージと T7 ファージの受容体の一つは lipopolysaccharide (LPS) である。K-12 株における LPS の構造は、主に inner core と outer core に分けられる (図 4)。これまでの研究で、inner core の転移酵素 (WaaC、WaaF) の欠失株が  $\lambda$  ファージと T7 ファージの両方のファージに対する耐性株として得られた (Maynard et al., 2010; Qimron et al., 2006) (図 4)。outer core では、それぞれのファージに耐性となる転移酵素の遺伝子が異なる。 $\Delta waaO$  は  $\lambda$  ファージにおいて、 $\Delta waaR$  は T7 ファージで、それぞれ耐性株として得られた (図 4)。以上のように、同じ LPS を受容体としていても、感染効率に影響を与える LPS の構造はそれぞれのファージで異なる。

T4 ファージは K-12 株の OmpC タンパク質と LPS を受容体として吸着する。T4 ファージの吸着には、その他のファージと同様に inner core の存在が重要で

あり、inner core のトランスフェラーゼ (WaaC や WaaF など) を欠失した株では、吸着効率が低下することがすることが既に報告されている(Washizaki et al., 2016)。また、heptose の修飾酵素に関わる *lpcA* の欠失株は T4、T7、 $\lambda$  のファージにおいて感染効率の減少の低下が検出された(Maynard et al., 2010; Tamaki et al., 1971)。

T4 ファージの感染効率に影響を与える遺伝子は受容体関連以外にも幾つか報告されている。例えば、tail-specific protease の一つである *prc* は、T4 ファージの溶菌酵素の働きを阻害することで、溶菌の遅延をもたらす(Slavcev and Hayes, 2003)。また、integration factor の *ihfA* と *ihfB* の二重遺伝子欠失株では、T4 ファージの増殖速度を低下させることが知られているが、詳細なメカニズムは解明されていない(Zablewska and Kur, 1995)。以上のように、大腸菌の遺伝子欠失はしばしば T4 ファージの感染効率を減少させる。一方で、遺伝子の欠失により、ファージ増殖が改善される遺伝子が近年になり報告された。transcription factor の一つである *DksA* は RNA ポリメラーゼに結合し、RNA の伸長効率に影響を与える(Perederina et al., 2004)。*dksA* を欠失した株は T4 ファージの生産効率が上昇し、過剰発現した場合は T4 ファージの感染初期のプロモーター領域の転写レベルを低下させることで、子ファージの生産効率を減少させることが示唆された(Patterson-West et al., 2018)。

T4 ファージは宿主の遺伝子産物のみならず、宿主内部のカリウムやマグネシウムなどの陽イオンの減少により、子ファージの生産効率が低下するが、T7 ファージではイオンの影響を受けないことが報告されている(Kuhn and Kellenberger, 1985)。また、ファージは宿主の転写や翻訳装置を借りて転写や翻訳を行うが、T7 ファージを用いた実験において、宿主の RNA ポリメラーゼの伸長速度やリボソームなどの翻訳に関する因子の存在量によって T7 ファージの子ファージ生産速度が変化することが明らかとなった(You et al., 2002)。T4 ファージにおいても転写、翻訳の装置を宿主に依存しているため、T7 ファージと同様にそれら宿主の装置の量や質などに影響を受けると考えられる。以上のようにファージの感染効率は宿主の生理的条件に大きく影響を受ける。

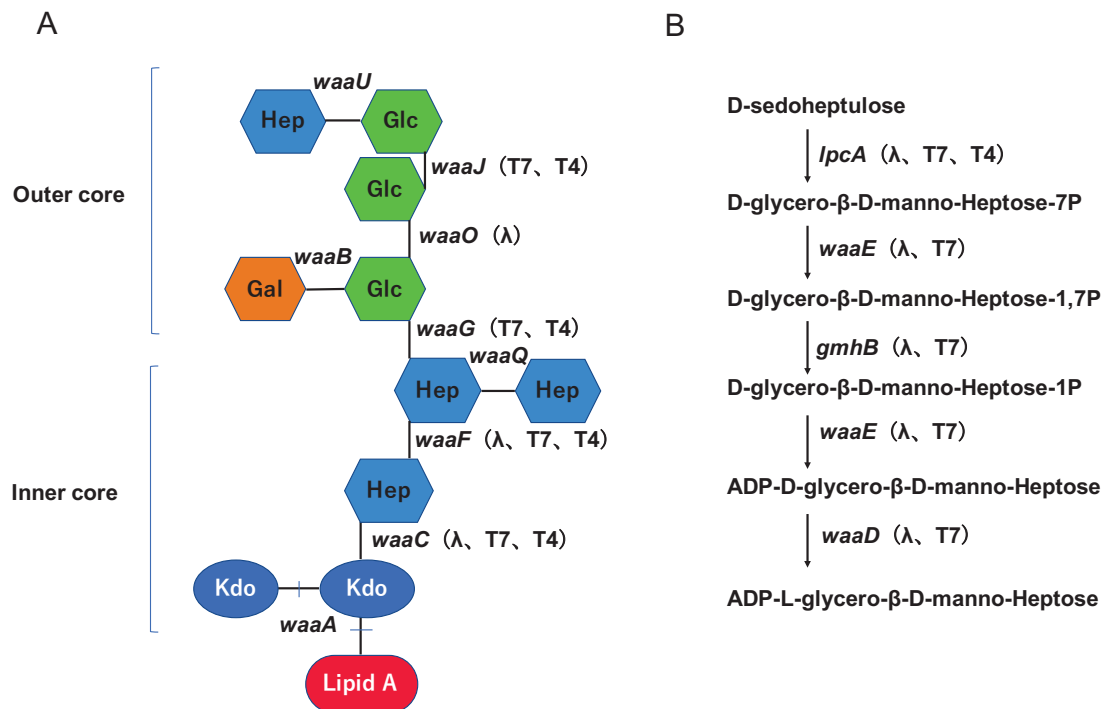


図 4. K-12 株の LPS の構造と合成に関わる遺伝子群

A. LPS の構造と合成に関与する遺伝子。B. 修飾されたヘプトース (Hep) の合成経路。カッコ内のファージ名はその遺伝子が欠失した場合に、感染できなくなるファージを表す。Hep:ヘプトース、Gal:ガラクトース、Glc:グルコース、Kdo: 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid

## 5. バクテリア生存に関わるバイオフィルムの機能

環境中において微生物はしばしば個体面に付着し、菌体の集合体を形成する。さらにその集合体は細胞外高分子物質 (extracellular polymeric substances : EPS) などのバイオフィルムにより覆われており、安定化した三次元構造を有する (図 5)。細胞外物質は主に、菌体外多糖 (exopolysaccharide) や鞭毛、細胞外 DNA(extracellular DNA)、curli 線毛、コラン酸、セルロース、OMV

(Outer Membrane Vesicle) などで構成されるが、これら細胞外に存在する物質は、種や環境によって変化する。バイオフィルムによって覆われた細胞は、抗生物質などに比較的耐性を有するようになることが報告されている(Benveniste and Davies, 1973; Lewis, 2001)。その理由としてバイオフィルム内に存在する菌体は代謝活性が減少し休眠化する菌体 (休眠細胞 : Dormant Cell) が増え、ストレス下で生き残ることが可能となる、いわゆるパーシスタンス現象により、

抗生物質に対して耐性化することが提唱されている(Benveniste and Davies, 1973; Lewis, 2010)。

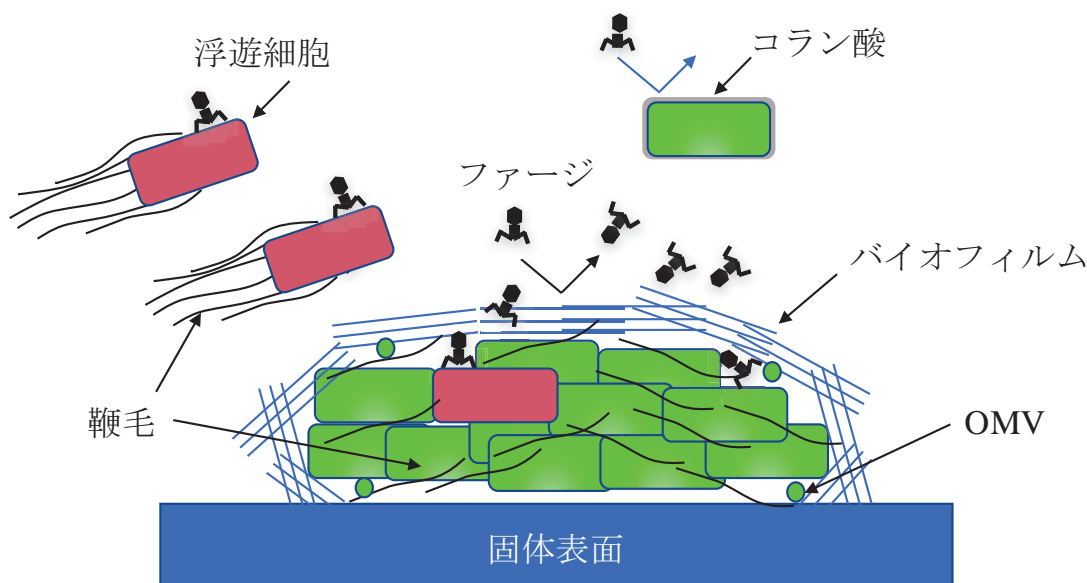


図 5. バイオフィルムの構造とファージの関連性

バイオフィルムは、細胞外多糖 (exopolysaccharide) やセルロース、鞭毛、繊毛、OMV (Outer Membrane Vesicle) といった様々な細胞外高分子物質から構成される。バイオフィルム内の細胞は、抗生物質などの環境ストレスから保護される。赤色で示した大腸菌はファージによって感染した細胞を、緑色はバイオフィルムによってファージの感染から保護される細胞をそれぞれ示す。

## 6. ファージとバイオフィルムに関する研究

バイオフィルムの細胞外高分子物質を含む三次元的構造は、シェルターの役割を果たし、ファージがバイオフィルム内へ侵入することを防いでいると考えられる (図 5)。一方で、幾つかのファージは細胞外多糖を分解する polysaccharide lyase などの分解酵素をコードし、バイオフィルムの主要な構成成分を分解することができる(Thompson et al., 2010)。また、Doolittle らは、野生型大腸菌 K-12 株のバイオフィルム内の菌体に対して T4 ファージが感染することを報告した(Doolittle et al., 1996)。T4 ファージは細胞外高分子物質を分解する遺伝子をコードしていないと考えられているが、バイオフィルム内に拡散し、菌体に感染することが可能である。また、Tait らは様々なファージを用いて、*Enterobacter coloaec* のバイオフィルムの除去を試みたところ、異なる三種類のファージを混合した場合、単体のファージを用いた場合と比較して効率よくバイオフィルム除去したことを報告した(Tait et al., 2002)。以上のように、ファ-

ジは化学的な抗生物質よりも大きいにも関わらず、バイオフィルムを分解したり、バイオフィルム内部の宿主に感染することが可能である。したがって、ファージは抗生物質に耐性化しやすいバイオフィルムの分解やバイオフィルム中に存在する菌体を溶菌し、死滅させる非常に優れた方法となる。

ファージは細胞外高分子物質を分解する様々な遺伝子をコードし、バイオフィルム内の細胞に感染するように進化してきた。一方で、バイオフィルムや細胞外高分子物質の合成量や構成要素の違いによって、ファージの感染は妨げられることが報告されている(Kim et al., 2015; Vidakovic et al., 2017) (図 5)。T7 や T4、 $\lambda$  ファージに対する耐性変異株を個体培地上から単離したところ、莢膜を構成する物質のコラン酸の合成量が増加していた(Kim et al., 2015)。また、それらの変異体に対して、クリスタルバイオレット法を用いてバイオフィルム量を測定したところ、野生型よりも増加していたことが報告された(Kim et al., 2015)。さらに、近年、CRISPR-dcas9 を用いて T4 ファージに耐性を有する遺伝子をスクリーニングした研究において、必須遺伝子である *yrfF* 遺伝子がスクリーニングされた(Rousset et al., 2018)。*yrfF* の変異体は Rcs(Regulator of Capsule synthesis)経路を活性化させることで、コラン酸の合成量を増加させる(Cho et al., 2014) (図 6)。コラン酸が増加した大腸菌の表現型はムコイドになることが知られており、細胞壁に存在する受容体を遮蔽することで、T4 ファージが吸着することを防ぐ(Rousset et al., 2018)。すなわち、バイオフィルムを構成する物質の合成量を増加させることで、ファージへの耐性を示すと考えられる。

ファージと宿主は、バイオフィルムを通して感染と防御といった攻防を繰り返しているが、ファージ、特に多糖を分解する酵素を持たないファージがどのようなメカニズムでバイオフィルム内に拡散するのか、もしくは、バイオフィルムを構成する様々な物質がどのようにファージの拡散を抑止するかについては根本的な疑問にも関わらず、ほとんど研究がなされてこなかった。そのような中で、2018 年に、Vidakovic はバイオフィルムを構成する種類と構造の変化が、T7 ファージのバイオフィルムへの拡散にどのような影響を与えるかを報告した(Vidakovic et al., 2017)。著者らによると、*curli fiber (csgB)* や鞭毛 (*fliC*) を欠失すると、T7 ファージはバイオフィルム内に拡散できるようになったが、細胞外多糖を欠いたバイオフィルムには内部に拡散することができなかった。顕微鏡観察などの結果により、 $\Delta csgB$  株や  $\Delta fliC$  株では、バイオフィルム内の細胞同士の間空間が生じていることが示された。これらの結果は、ファージの



バイオフィーム内への拡散、および内部の細胞への感染効率は、バイオフィームを構成する物質等によって変化することを示している。さらに、理論解析により、密度の高い細胞集団に侵入したファージは感染効率の減少が示唆された (Bull et al., 2018)。このように、バイオフィーム内の細胞の配向や密度によって、ファージの拡散性や感染性に影響を与えることが近年になって報告され始めている。

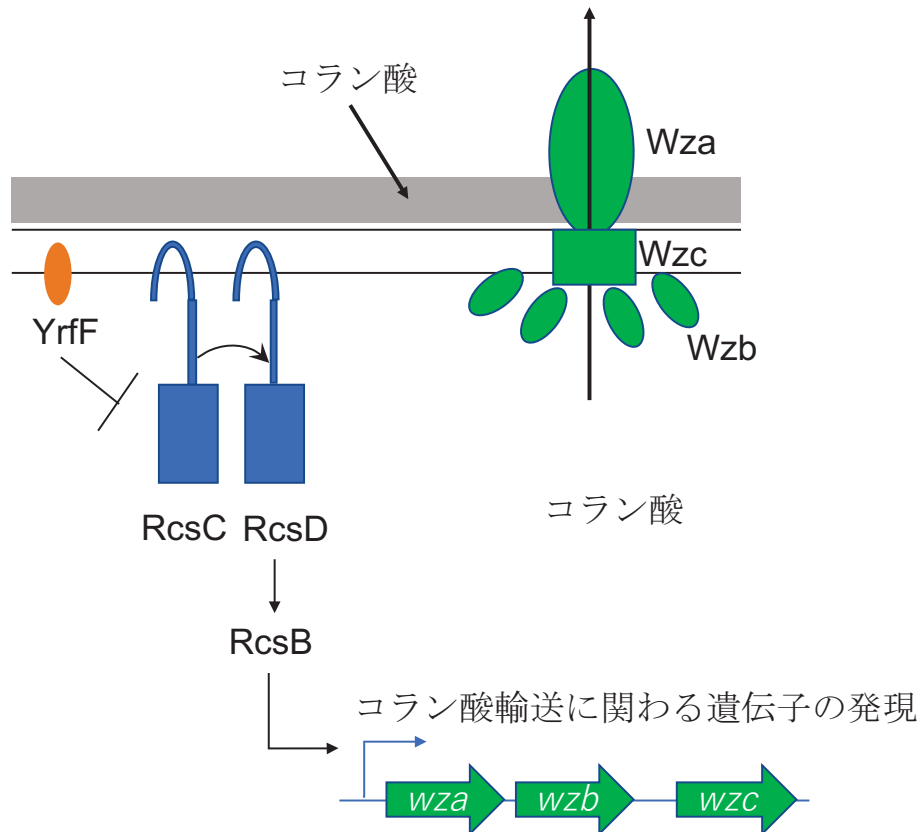


図 6. *yrfF* によるコラン酸の制御

*YrfF* は内膜に局在しており、*RcsC* タンパク質を負に制御している。*Rcs* システムは phosphorelay によって、*RcsB* を活性化し、コラン酸に関わる遺伝子の転写を促進する。コラン酸は、コラン酸を輸送する *Wza*、*Wzb*、*Wzc* のタンパク質によって外部に放出される。

## 7. パーシスタント現象について

バイオフィーム内部の菌体は、代謝活性が低下しやすく、パーシスタント化が起きやすい。パーシスタンスとは直接的な遺伝子の変異に起因することなく、確率的な転写パターンの相違によって、細胞集団がストレス環境下で長期

間一定数の細胞が生き残り続ける現象のことを指す(Joseph W. et al., 1944)。例えば大腸菌が抗生物質に暴露された際、多くの細胞は数十分以内に死滅するが、一定数の割合で生き残り、抗生物質のない新たな培地に移すと再び増殖を始める。生き残った細胞をさらに抗生物質に暴露しても、大部分は死滅し、やはり一定の割合で細胞が生存する。仮に遺伝子変異により耐性化した場合、抗生物質の存在下で生存する菌体数は増加するはずである。

パーシスターは遺伝子変異を伴わず、ストレス環境下で生き残る菌体を意味するが、実際には、パーシスターの数に影響を与える遺伝子が発見されている。*hip* 変異体は野生型と比較して 100 – 1000 倍程度パーシスターが増加する(Moyed and Bertrand, 1983)。HipAB は II 型のトキシン-アンチトキシンに分類されており、HipA がトキシン、HipB がアンチトキシンである(Black et al., 1991)。HipA は、グルタミル-tRNA シンターゼを不活化し、大腸菌の飢餓状態を引き起こすことでパーシスターの数を増加させる(Germain et al., 2013)。HipA の変異体 (HipA7) は、HipB との結合力が低下し、結果的に未結合の HipA の量が増加することで、細胞の活動低下と引き換えに抗生物質に対して耐性を有するようになる(Rotem et al., 2010)。パーシスターは抗生物質だけでなく、熱ストレス(Scherrer and Moyed, 1988)やプロフェージ誘導(Pearl et al., 2008)などに対して耐性化する一方で、UV ストレスやカナマイシンなどには感受性となる(Scherrer and Moyed, 1988)。さらに、 $\lambda$  フェージはパーシスターに吸着し、パーシスタントの状態から生育状態に移行した際に感染、溶菌することが報告された(Pearl et al., 2008)。しかし、フェージとパーシスターとの関係性に関する論文は非常に限られており、特に溶菌フェージとパーシスターに関する報告は、調べた限り皆無である。また、異なるストレスに対してパーシスターがどのように応答するかについては依然として未解明な点が多く残されている。

パーシスターは、実験室のみで生じる現象だけでなく、薬剤耐性化することで院内感染の原因にもなりうる。例えば、肺炎の患者から単離された緑膿菌は、高度にパーシスタント化していた(Stepanyan et al., 2015)。また、尿路感染症の患者から単離された大腸菌は *hip* 遺伝子に変異が生じており、パーシスタントのレベルの増加により多剤耐性を示すことが報告された(Schumacher et al., 2015)。このように、近年になって、パーシスターが薬剤に対して耐性化し、院内感染の問題等を引き起こすことが明らかとなった。バイオフィルム中の細胞は栄養が制限されるため、パーシスタンス現象が引き起こされやすく、少なくとも

もバイオフィルム中のパーシスターは抗生物質に対し耐性化すると提唱された (Lewis, 2005, 2010)。また、 $\Delta hipA$  株ではバイオフィルム中の細胞のパーシスタントの割合を減少させることが知られている (Lewis, 2005)。以上のように、バイオフィルム内の細胞はパーシスタント細胞が生じやすく、バイオフィルムの除去は臨床の場における喫緊の課題と言えよう。

## 8. 本研究の目的

ファージが自身の増殖のために宿主の因子を利用することから、どのような因子がファージの感染に影響を与えるかを理解することは、ファージと宿主間の感染サイクルの解明に重要である (図 7)。しかし、ファージと宿主間の相互作用や、ファージの感染に影響を与える大腸菌側の因子を網羅的に解析することは技術的な観点においても非常に困難であった。しかし、1990 年代のゲノムプロジェクト以降、多くの網羅的リソースの開発、解析技術の革新などが行われ、T4 ファージの解析が盛んに進められた時代からは研究環境の大きな変革が成し遂げられた。さらに、大腸菌の一遺伝子欠失株ライブラリーである Keio collection (Baba et al., 2006) や大腸菌遺伝子のクローンライブラリーである ASKA library (Kitagawa et al., 2006) が開発され、大腸菌においては全遺伝子を対象とした解析が可能となった。これらのリソースが開発されたことをきっかけに、ファージの増殖に影響を与える因子を網羅的に解析する研究者らが現れた。2006 年には Keio collection と ASKA library を利用して T7 ファージの増殖に影響を与える遺伝子群をスクリーニングした研究が報告され (Qimron et al., 2006)、この研究に続いて、 $\lambda$  ファージを用いたスクリーニング解析が 2010 年に行われた (Maynard et al., 2010)。これらの研究は、スクリーニングの手法こそ異なるが、ファージに対して耐性を有する大腸菌側の遺伝子をスクリーニングしたものである。

上述のように、大腸菌ではこれまでに網羅的リソースの構築がすでに行われ、ゲノムワイドな解析が可能であるが、その他の種においては、大腸菌ほどリソースが構築されておらず、網羅的な解析は困難であった。そのような中、2016 年頃以降になるとトランスポゾンによるランダム変異の導入と次世代シーケンサー (NGS) を利用して、大腸菌以外の細菌とファージの相互作用解析が行われてきている。トランスポゾンと NGS の組み合わせによるファージと宿主の網羅的な解析に関する初期の論文は、*Caulobacter crescentus* とそれを宿主

とする  $\phi$ CbK ファージを用いた研究である(Christen et al., 2016)。さらに近年、薬剤耐性菌の増加が問題となり、この対策としてファージを薬剤として用い、病原菌に対処するというファージ療法（もしくはファージセラピー）が注目を集めており、すでに臨床レベルでファージが動物や人命を救うといった例が報告されている(Biswas et al., 2002; Kutateladze and Adamia, 2008; Ramesh et al., 1999)。このような流れを受け、さらなるファージ療法の発展に向けて、ファージが宿主側のどのような因子に影響を受けるかについて注目を浴びつつある。例えば、病原菌に感染する赤痢菌と P22 ファージの組み合わせで、P22 ファージへの耐性および感受性を示す遺伝子をトランスポゾン挿入により網羅的に検出し、新たに DNA 注入に必要な遺伝子が発見された(Bohm et al., 2018)。また、O157 と T 系ファージの相互作用においても網羅的な探索がなされている(Lauren A. Cowley, 2018)。

T4 ファージは宿主に対する毒性が強く、感染効率も高いため、ファージセラピーへの応用において期待が大きい。宿主の遺伝子産物や代謝産物、そして生理状態の変化が感染効率にどのような影響を与えるかについては研究が進んでいないのが現状である。本研究では、大腸菌の必須遺伝子以外の全遺伝子を対象に、T4 ファージの増殖に影響を与える遺伝子群の探索を行い、感染効率に影響を与える要因の解明を目指す(図 7)。また、LB 培地と最少培地である MOPS-glucose 培地の二種類をスクリーニングで使用し、栄養源など、環境の変化により、感染効率に影響を与える因子が変化するかについて比較、解析する。さらに、スクリーニングにおいて、候補株の中には固体培地では耐性を有するが、液体培地上においては感受性を示す株が存在した。それらの株の多くは、ムコイド上のコロニーを形成していた。このことから、候補株の中にはファージに対する耐性化が、バイオフィームなどの細胞外物質の変化に起因するものと考えられた。そこで、T4 ファージの感染とバイオフィームの相互作用の解析を行い、バイオフィームにおける感染効率に影響を与える要因を解析することを第二の目的とする。

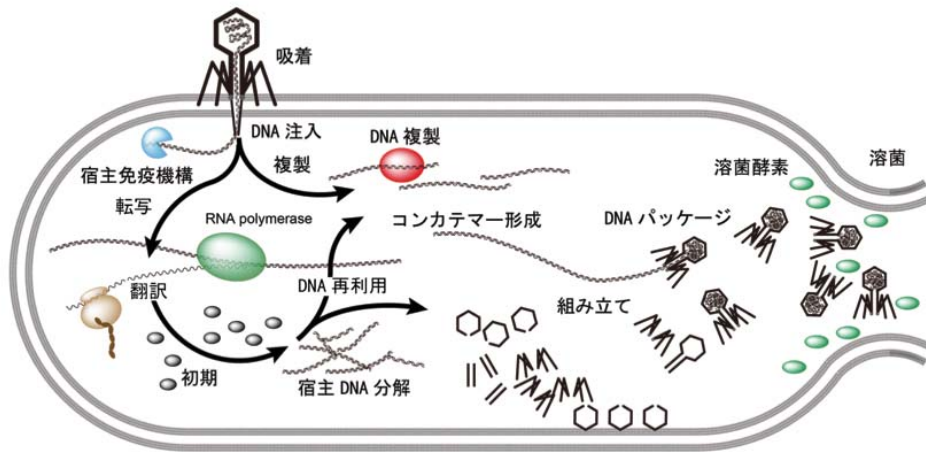


図 7. T4 ファージの感染

左から右に行くにつれて、感染段階が進行する。感染が進行していく中で、T4 ファージは転写やシャペロンなど、宿主のタンパク質を利用する。

# 材料と方法

## 1. 材料

### 1-1. 培地

本研究で使用した培地は基本的に Molecular Cloning 3rd edition(Sambrook., 2001)に従った。下記の培地組成は特に断りのない限り 1 リットルあたりの量を示す。候補株のスクリーニングには LB 培地 (tryptone 10 g、yeast extract 5.0 g、NaCl 10 g、1 N NaOH 0.5 ml、agar 15.0 g)、MOPS 培地 (40×MOPS 25 ml、0.528 M MgCl<sub>2</sub> 1 ml、0.276 M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ml、1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 ml、20 % glucose 20 ml) を使用した。40×MOPS の作製は (MOPS 33.4 g、tricine 28.8 g、NaCl 116.8 g、NH<sub>4</sub>Cl 20.4 g、KOH 64.0 g) を超純水に添加し、10 N NaOH もしくは 10 N HCl を添加することで pH 7.3 に調整し、オートクレーブを用いて高圧蒸気滅菌 (121℃、20 分間) した。その後、micro nutrient solution 2 ml、34 mg/ml ZnCl<sub>2</sub> 0.2 ml、43 mg/ml Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.2 ml、60.5 mg/ml Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2 ml を添加し、0.22 μm のフィルター (Millipore 社) でフィルター滅菌し、-30℃で保存した。また、micro nutrient solution は (FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 50 g、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.84 g、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.62 g、MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.4 g、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.18 g、CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.04 g) を超純水に混合し、80 ml の 1 N HCl を混合することで作製した。それぞれの培地にカナマイシン (和光純薬工業) を終濃度 30 μg/ml になるよう添加した。固形培地には 1.5 %、軟寒天培地には 0.6 %になるように Agar (ナカライテスク) を加えた。

細胞凝集アッセイには YESCA 培地 (casamino acid 10.0 g、yeast extract 1.0 g、agar 20.0 g)を用いた。

酵母培養は YPDA 培地 (Bacto yeast extract 10.0 g、polypeptone 20.0 g、adenine sulfate 0.1 g、agar 20 g、2% glucose)、酵母の選択培地には合成培地 SD (-Ura、+Ade) 培地 (yeast nitrogen base 6.7 g、glucose 20.0 g、casamino acid 5.0 g、12 mg/ml adenine solution 15 ml、40 mM tryptophan 8 ml) を用いた。

### 1-2. 試薬

本研究で使用したカナマイシンは終濃度 30 μg/ml、アンピシリン (和光純薬工業) は 50 μg/ml となるように超純水に加え、十分に溶解させた後、0.22 μm

のフィルターでフィルター滅菌した。1.5 M NaCl 溶液は、1.5 M となるように NaCl (ナカライテスク) を加え、121°C、20 分間でオートクレーブによる滅菌を行った。また、滅菌水は、超純水を 121°C、20 分間でオートクレーブによる滅菌を行った。

### 1-3. 使用株

本研究で使用した一遺伝子欠失株は全て Keio collection (Baba *et al.*, 2006) を用いた。

表 1. 使用した株一覧

菌株	遺伝子型	由来
BW25113	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 ΔaraBAD567 ΔrhaBAD568 rph-1</i>	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
T4 ファージ	野生型	生物資源センター (NBRC 番号 : 2004)
T7 ファージ	野生型	中国学園大学 川野光興先生より譲渡
BY4741	<i>MATa hisΔ1 leuΔ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	東京大学 谷内江望先生より譲渡

### 1-4. プラスミド

カナマイシン耐性を有する野生型 (BW25113) は、プラスミド pXX563 (mini-F plasmid, single copy number) を保有する大腸菌を用いた。pRS416 は大腸菌と酵母の両方で機能するシャトルベクターで、酵母における選択マーカーは *URA3* 遺伝子と大腸菌の *ampR* 遺伝子である。

表 2. 使用したプラスミド一覧

名称	遺伝子型	由来
pRS416	pBluescript <i>URA3 CEN6 ARSH4 ampR</i>	東京大学 谷内江望先生より譲渡
pXX563	pXX325, <i>kanR</i>	当研究室にて作製

## 2. プライマー

T4 フェージゲノムの増幅に用いたプライマーを下記に示す（表 3）。フェージ断片の増幅は、5 kb 断片ずつが隣り合うそれぞれの断片の 50~100 bp の相同配列を持つように設計した。また、両端の配列が隣り合うようにそれぞれの断片を増幅した。赤色で示した部分は pRS416 相同な配列である。

表 3. プライマー一覧

配列	増幅部位
ataactcagtagatgaaggatttcg	T4_5_down1
aaacatataaaattgatggaaagcc	T4_5_down2
ctttacggatttttttctctacaactc	T4_5_down3
ctgtttactttttggttgaaattgag	T4_5_down4
acgattttcaattatctaagcctac	T4_5_down5
ccttatttgagatataatatcaagagc	T4_5_down6
tttgcattggctgaatttgatgaata	T4_5_down7
cttattgcagaaggcttatctaaac	T4_5_down8
cgtcccagaatatgttaaataaatg	T4_5_down9
gagaagaacatgaaaactcgtaaac	T4_5_down10
gctttgaataaagcaaatgatattgg	T4_5_down11
atataatgttcctggttatggcttatg	T4_5_down12
gtttaaaacgtggttttaatatcaagg	T4_5_down13
ctgacgatgattttattttattggc	T4_5_down14
ataatattgaagatcaatggtcagtc	T4_5_down15
agtatcagaagatgacctagaattac	T4_5_down16
atctcgtaaattattgtattgagttcc	T4_5_down17
tcaggagaaacaccagttttattag	T4_5_down18
catatggttcaaccagttaatttc	T4_5_down19
tatcaccatacaatacgtaacctac	T4_5_down20
gttttgatagtcatttgtgttaacc	T4_5_down21
aacatgagattgattatgagaactg	T4_5_down22
aattatgaagaagaatttgaaacgga	T4_5_down23



tggaaatTTTtctaagtctcttccctt	T4_5_down24
ctttactaaagttgaatcgaaggctc	T4_5_down25
agaacgcttaattgagaagatgaaa	T4_5_down26
ctccaactaatgatgttttattagctc	T4_5_down27
ttaaattcgcaatTTTcgcaaaggta	T4_5_down28
ttaattcaacacgattcgttaatcc	T4_5_down29
aatcgttgaagctattgctaataga	T4_5_down30
tatagcaacaattcgattattcgtc	T4_5_down31
tataaacaaaagaattacgacagctac	T4_5_down32
ccttgatcatcatcattggtgaaaa	T4_5_down33
<b>ATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGG</b> <b>AAACAGCTA</b> atgtacaatattaatgcctgacca	T4_5_down34
<b>TTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGCGGTAA</b> <b>TCATGGTCA</b> aatTTTccttattaggccgc	T4_5_up1
cgttatcttcaactgttacttgattg	T4_5_up2
gtatactctgcttctataatacgaac	T4_5_up3
acatattcaactacagttaaaggaag	T4_5_up4
aatctcctcagtagtttatgtttatatag	T4_5_up5
gaaatgaaccgccataaataacatc	T4_5_up6
ccttagtttatagcccagattatta	T4_5_up7
agtttaaaattcttcacaaaagattcc	T4_5_up8
tataccatctgcaatcatttcttgt	T4_5_up9
cttgggtggagttttaaatcttttag	T4_5_up10
cttctctatgtcctttctgataatcac	T4_5_up11
taaagaccgataccagagattttac	T4_5_up12
taagtttatctgcaatcgctaaaag	T4_5_up13
ggaatatcactaatatcctggactg	T4_5_up14
attgtaaacttattcttcgtctagc	T4_5_up15
ggtcgaagttattaacaatcaaatcc	T4_5_up16
tgactaccaagaacaagtgaatc	T4_5_up17
tttgttacaggattcgaatTTTgag	T4_5_up18
ccaaacatagaatcagctattaatgac	T4_5_up19

ttgatataatccccctatggataacagc	T4_5_up20
accgtttataccaagaagctatcaa	T4_5_up21
agatattgtaagtgtatatgcgaaag	T4_5_up22
tttcaatgaatgactttccagactc	T4_5_up23
gaatatcctgacgcttaagattatg	T4_5_up24
aattaggtatggctaaattatctgc	T4_5_up25
gccccagtatctttattgatataaac	T4_5_up26
ttatcttactactttccaatgctgc	T4_5_up27
cccacttatctttgatattcatttttgag	T4_5_up28
ttttcagtcctcgtttcttcagaaat	T4_5_up29
tgcttgatcttcgtaattttcatcc	T4_5_up30
cgattatattcagattcagtgagaag	T4_5_up31
tcgacttcaaatgatactacatcag	T4_5_up32
gatattctatctgggtgcttagatcg	T4_5_up33
agttattattccaagtattagccatc	T4_5_up34
TGACCATGATTACGCCAAGC	pRS416_L
TAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATC	pRS416_R

### 3. T4 フェージの増殖に影響を与える候補株の探索

55°Cに保温した軟寒天培地 10 ml に  $5 \times 10^7$  pfu/ml の濃度のフェージを 100  $\mu$ l 加え、LB あるいは MOPS 寒天培地上に加えた。室温で軟寒天培地を固めた後、384 well の microtiter plate に保存されている 3906 株の Keio collection と 42 個の sRNA の欠失株を 384 のピンを用いて、Singer Roter HDA (Singer 社) でスポットした。LB 培地では約 22 時間、MOPS 培地で約 34 時間、37°C で静置培養した。コロニーが形成されているスポットの株を T4 フェージに抵抗性を持つ候補株として選択した。目視により判別可能な微小なコロニーも候補株の対象とした。また、候補株検出の際に、コロニーの形状によって通常のコロニー (normal)、ムコイド上のコロニー (mucoid)、コロニーの形状が半球状ではなく不均一な形のもの (uneven colony) の三種類に目視により分類した。以上の実験を LB 培地で 3 回、MOPS 培地で 4 回行った。

#### 4. ファージ存在下における候補株の生育曲線

スポットスクリーニングで得られた候補株をそれぞれ LB 培地中で OD<sub>600</sub> = 0.5 まで時間振盪培養後、96 穴プレートに 100 μl 移した。T4 ファージを MOI = 0.1、0.01 になるように添加し、その時の時間を 0 分とし、37°C で振盪培養した。培養には、TAITEC Bio shaker M BR-22 を利用した。培養開始後 10 分ごとに 240 分までマイクロプレートリーダー(日本モレキュラーデバイス社 SPECTRA max PLUS)で OD<sub>600</sub> を測定した。測定値は、以下の式を用いて補正した値 FI (Fitness Index) を算出した。

$$FI = \frac{(OD_{Keio} - OD_{Keio+T4})/OD_{Keio}}{(OD_{wt} - OD_{wt+T4})/OD_{wt}}$$

OD<sub>Keio</sub> はそれぞれの候補株における OD<sub>600</sub> 値、OD<sub>Keio+T4</sub> は候補株に T4 ファージを感染させた際の OD<sub>600</sub> 値を示す。また、OD<sub>wt</sub> は野生型の OD<sub>600</sub> 値を示す。FI は、ファージによる OD<sub>600</sub> の減少度を生育度で補正して比較した値であり、この値が低いほど、野生型と比較して OD<sub>600</sub> が減少しにくい（野生型と比較して溶菌しにくい）とみなす。

#### 5. 平板効率(EOP : Efficiency of Plating)の測定

平板効率 (EOP) とは、ファージのプラーク形成効率のことを指す。1×10<sup>3</sup>~1×10<sup>4</sup> pfu/ml 程度となるように、T4 ファージ溶液を調製した。一晚培養した候補株と調製した T4 ファージ 100 μl それぞれを 5 ml の軟寒天培地に添加し、LB 培地上に塗布した。その後、37°C で一晚静置培養を行い、野生型の plaque 数と候補株のプラーク数を計測し、以下の式で EOP を測定した。

$$EOP = \frac{PlaqueNum(X_{Keio})}{PlaqueNum(wt)}$$

PlaqueNum(X<sub>Keio</sub>)は候補株におけるプラークの形成数、PlaqueNum(wt)は野生型のプラークサイズを示す。この式は野生型のプラーク数と候補株の数を比較することで候補株のプラークの形成効率を評価する式である。

## 6. T4 ファージゲノムの増幅

T4 ファージゲノム 169 kbp の全ての領域を PCR で 5 kbp ごとに増幅した。なお、T4 ファージゲノムの抽出は Molecular cloning 3rd edition を参考に行った。プライマー設計には snap gene (GSL biotech 社) を用いた。用いた DNA ポリメラーゼは長鎖の増幅に優れる Tks Gflex DNA polymerase (Takara 社) を使用し、PCR の条件は、Tks Gflex DNA polymerase の説明書に従った。それぞれの PCR 産物を Amicon Ultra - 0.5 (Millipore 社) を用いた脱塩を行った。実験手順は、Ultra amicon 0.5 の説明書に従った。脱塩した DNA 産物に対して、吸光度計 (JASCO V-630 BIO spectrophotometer) を用いて濃度測定を行った。

## 7. T4 ファージゲノムの酵母内アッセムブリ

YPDA 培地で一晚培養した酵母を新しい培地の 1/10 量移し、 $OD_{600} = 0.8 \sim 1.0$  まで培養した。酵母のコンピテントセルの作製は、EZ - transformation kit (Zymo Research 社) を使用し、Zymo Research 社提供の説明書に記載される方法に従って行った。続いて、6 で得られたそれぞれの T4 ファージゲノム 5 kb 全断片及び、pRS416 をそれぞれ 250 fmol ずつコンピテントセルに加え、EZ - transformation kit の EZ3 溶液を 500  $\mu$ l 添加し 30°C で 1 時間 45 分ほど培養した。その後、YPDA 培地を 500  $\mu$ l 加えて 30°C で 1 時間 45 分振盪培養した。その後、遠心 (15,000 rpm、10 秒) し、YPDA 培地を除き、細胞を滅菌水で懸濁し、SD (-Ura、+Ade) 培地に塗布し一晚 30°C で静置培養した。

## 8. 一段階増殖実験

候補株を 5 ml の LB 培地に添加し、 $OD_{600} = 0.5$  まで培養後、T4 ファージを  $MOI = 0.5$  の割合で添加した。37°C で 6 分静置し、十分に T4 ファージを大腸菌細胞に吸着させた。5 ml の培養液から 100  $\mu$ l 回収し、5  $\mu$ l のクロロホルムの入ったチューブに移し、遠心 (15,000 rpm、1 分) 後の上清を回収した (1)。残りの培養液は 10,000 倍に希釈し、37°C、160 rpm で振とう培養することで感染を開始させた (Time (t=0))。8 分おきに 100  $\mu$ l 回収し、クロロホルム添加ありとなしのチューブに希釈した培養液をそれぞれ 100  $\mu$ l 回収し、遠心 (15,000 rpm、1 分) 後の上清を回収した (2)。(1) と (2) の上清に存在す

るファージの数をプラークアッセイにより計測し、未吸着のファージと生産されたファージの数を計算した。バーストサイズ (B) は、全体のファージ数 (A)、未吸着ファージ数 (U)、生産されたファージ数 (P) として以下の式により算出した。

この式は、感染した細胞あたりの生産された子ファージを算出する式である。

$$B = (P)/(A - U)$$

## 9. 吸着アッセイ

候補株を OD<sub>600</sub> = 0.5 まで培養し、T4 ファージを MOI = 0.1 の割合で添加後、37°C で振盪培養を行った。振盪培養開始後 2 分、5 分、8 分ごとに菌体 100 µl を回収した。回収した菌体を 15,000 rpm、1 分間遠心し、上清を別のマイクロチューブに移した。続いて、一晚培養した野生型の大腸菌 100 µl を 5 ml のソフトアガーに混合し、LB 寒天培地に塗布した。翌日プラークの数を計測し、以下の式で未吸着のファージ (%) を求めた。全体のファージ (A)、未吸着ファージ (U) とした以下の式で求めた。

$$\text{未吸着ファージ(\%)} = \frac{U}{A} \times 100$$

## 10. COG 解析

COG 解析はデータベース eggNOG 5.0 を用いて行った(Huerta-Cepas et al., 2019)。LB 培地における候補株は 3 回のうち 2 回、もしくは MOI = 0.01 のファージ濃度で測定した際に 80 分の Fitness Index が 0.95 以下の候補株を対象に解析を行った。また、MOPS 培地における候補株においては、4 回のうち 2 回以上検出された株を対象に COG 解析を行った。

## 11. クリスタルバイオレット法を用いたバイオフィームアッセイ

クリスタルバイオレット法によるバイオフィームの定量は論文(Merritt et al., 2015)を改変し、実験を行った。一晚培養した培養液を OD<sub>600</sub> = 0.5 に合わせてマイクロタイタープレート (Caplugs 社) に 100 µl 添加した。T4 ファージを MOI = 0.1 の割合で混合し、37°C、24 時間静置培養後、プレートリーダーで

OD<sub>600</sub>を計測した。マイクロタイタープレートに純水で3回洗浄して培養液を除き、数時間プレートに乾燥させた。その後、0.1%クリスタルバイオレットを125 µl添加し、20分ほど静置した。クリスタルバイオレットを除き、プレートを乾風させた後、ethanol : acetone = 8:2 溶液を200 µl入れ、バイオフィルムを溶出した。バイオフィルムの定量はプレートリーダーでOD<sub>595</sub>を測定した。

## 12. 細胞毒性の評価

一晩培養させた候補株を9,500 rpm、5分間遠心分離を行い、上清を取り除いた。それぞれの株に生理食塩水、もしくは1.5 M NaCl 溶液で懸濁し、LB 寒天培地に塗布し、37°Cで一晩培養した。翌日にコロニーの数を計測し、それぞれの懸濁した溶液の違いによる細胞数を評価した。

また、それぞれの溶媒で懸濁した大腸菌をLIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen 社) のSYTO 9 と PI (Propidium Iodide) をそれぞれ3 µl/ml の濃度で添加し、15分ほど暗所で静置させた後、5 µl をスライドグラスに乗せ蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000) にて観察を行った。

## 13. 細胞凝集アッセイ

5 ml の LB 培地及び、YESCA 培地を15 ml のコニカルチューブに入れ、それぞれ一晩培養した培養液をOD<sub>600</sub>=0.1 になるように調整し、新しい培地に添加した。その後、8時間ごとに48時間まで、目盛り3 ml の部分から100 µl 回収し、OD<sub>600</sub>をマイクロタイタープレートで測定した。

## 14. バイオフィルム抽出及びバイオフィルム内のタンパク質の確認

バイオフィルム抽出の方法は、論文(Chiba et al., 2015)を参考に行った。候補株をLB 培地 (37°C)、YESCA 培地 (28°C) でそれぞれ前培養を行った。培養液を100倍希釈し、LB 及び YESCA 寒天培地もしくは液体培地に植菌し、LB 培地では37°Cで24時間、YESCA 培地では28°Cで48時間静置培養した。その後、個体培地に生育した菌体を掻き取って100 µl の1.5 M NaCl 溶液に懸濁し、vortex で十分に混合した。液体培地においては、遠心分離 (9,000 rpm、5分) 後、上清を取り除き、1.5 M NaCl を200 µl 添加してボルテックスで十分に混合した。その後、1.5 M NaCl に溶解した細菌のOD<sub>600</sub>を、最もOD値の低い候補株に調整した。7,500 rpm、15分で遠心後上清を回収し、バイオフィルム溶液

とした。バイオフィルム内に存在するタンパク質の確認は12%のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS - PAGE によって行った。なお、SDS - PAGE に関わる試薬作成や実験手順等は、Molecular cloning 3rd edition を参考に実験を行った。

#### 15. LC-MS/MS による細胞外タンパク質の同定

目的タンパク質のバンドを切り出し、マイクロチューブに入れ、60% アセトニトリル (ACN) / 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> を 200μl 加え、室温で 10 分振とうした。その後、上記溶液を除き、10 mM DTT / 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> を 200 μl 加え、56°C で 45 分間保温した。その後、DTT 溶液を取り除き、55 mM インドール酢酸 (IAA) / 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> を 200 μl 加え、室温で 30 分間遮光して静置した。IAA 溶液を取り除き、60% ACN/50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> を加え、室温 10 分振とうした。溶液を取り除き、トリプシン溶液を数滴添加し、一晚消化させた。新しいチューブに消化液を移し、ゲルの入ったチューブに 50% ACN / 0.2% formic acid (FA) 溶液を 200μl 加え 10 分振とうさせた。その後、真空遠心乾燥機で 50% ACN / 0.2% formic acid の溶媒を飛ばし、乾固させた。乾燥後、50 μl の 5% ACN / 0.1% FA 溶液で可溶化し、LC - MS/MS (リニアトラップ-電場型フーリエ変換質量分析計、LTQ-Orbital XL) で測定した。

#### 16. T4 ファージに対する感受性試験

一晚培養した候補株 100 μl と 2.0 × 10<sup>7</sup> pfu/ml の T4 ファージ 100 μl を 5 ml の軟寒天培地に混合した。続いてそれらを寒天培地上に塗布し、37°C で一晚培養して翌日に得られたコロニー数を計測した。

#### 17. パーシスターの生存実験

一晚培養した野生型の大腸菌を新しい LB 培地に添加し、OD<sub>600</sub> = 0.2 になるまで 37°C で振盪培養を行った。その後、アンピシリン (終濃度 : 50 μg/ml) 、カナマイシン (終濃度 : 30 μg/ml) 、T4 ファージ、T7 ファージ (いずれも MOI = 0.1) をそれぞれ大腸菌と混合し、30 分間隔で 120 分まで培養液を回収し、LB 寒天培地上に塗布した後、37 度で一晚培養した。一晚培養後のコロニーの数をパーシスターとして計測した。

## 18. データ解析及び可視化

データの解析及び可視化には excel もしくは jupyter notebook (<https://jupyter.org>) 上で、python 3.6.4 (<https://www.python.org>) を用いて行った。また、Python のライブラリーである matplotlib 3.0.2 (<https://matplotlib.org>)、pandas 0.22.0 (<https://pandas.pydata.org>)、scipy 1.0.0 (<https://www.scipy.org>)、seaborn 0.9.0 (<https://seaborn.pydata.org>) 等を import し、解析に使用した。エラーバーは標準偏差 (SD) を表す。student の  $t$  検定を用いて両側検定を行い、P 値は\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、n. s. : 優位差なしをそれぞれ表す。



## 結果

### 1. T4 ファージに耐性を示す大腸菌一遺伝子欠失株の網羅的探索

#### 1-1. スクリーニング条件の最適化

大腸菌 K-12 株 BW25113 の一遺伝子欠失株ライブラリーである Keio collection を用いて T4 ファージに対する耐性株のスクリーニングを行った。3906 株に上る大腸菌株の選択を高効率に行う為に、384 well の培養液を、Singer 社製のスタンプロボットを利用してプラスチックピンで培養液を少量釣り上げ、ファージを含んだソフトアガーにスポットする方法を検討する。その為、個々の欠失株の細胞数を正確に揃えることは現実的に難しい。そこで、スクリーニング法の最適化を図る為に、軟寒天培地に混和するファージ濃度の検討を行った（図 8）。

ソフトアガー中のファージ濃度を  $5.0 \times 10^3$  pfu/ml から  $5.0 \times 10^6$  pfu/ml まで 10 倍希釈系列を作製し、384 ピンを用いて、Singer RoTor で Keio collection の欠失株をスポットし、37°C、一晚静置培養で出現するコロニー数と形状による野生型との比較検討を行った（図 8）。 $5.0 \times 10^3$  pfu/ml と  $5.0 \times 10^4$  pfu/ml では、野生型のコロニーが現れており（図 8 の赤枠）、溶菌が不十分であることから、スクリーニングに適さない濃度であることが解った。一方、 $5.0 \times 10^5$  pfu/ml と  $5.0 \times 10^6$  pfu/ml で比較したところ、両条件共に野生型はコロニーが検出されないという結果となった。一方、幾つかの耐性と考えられるコロニーが観察されたが、より低濃度で選択を行う方が候補株を得やすいと考え、終濃度  $5.0 \times 10^5$  pfu/ml のファージ濃度でスクリーニングを行うことに決定した。

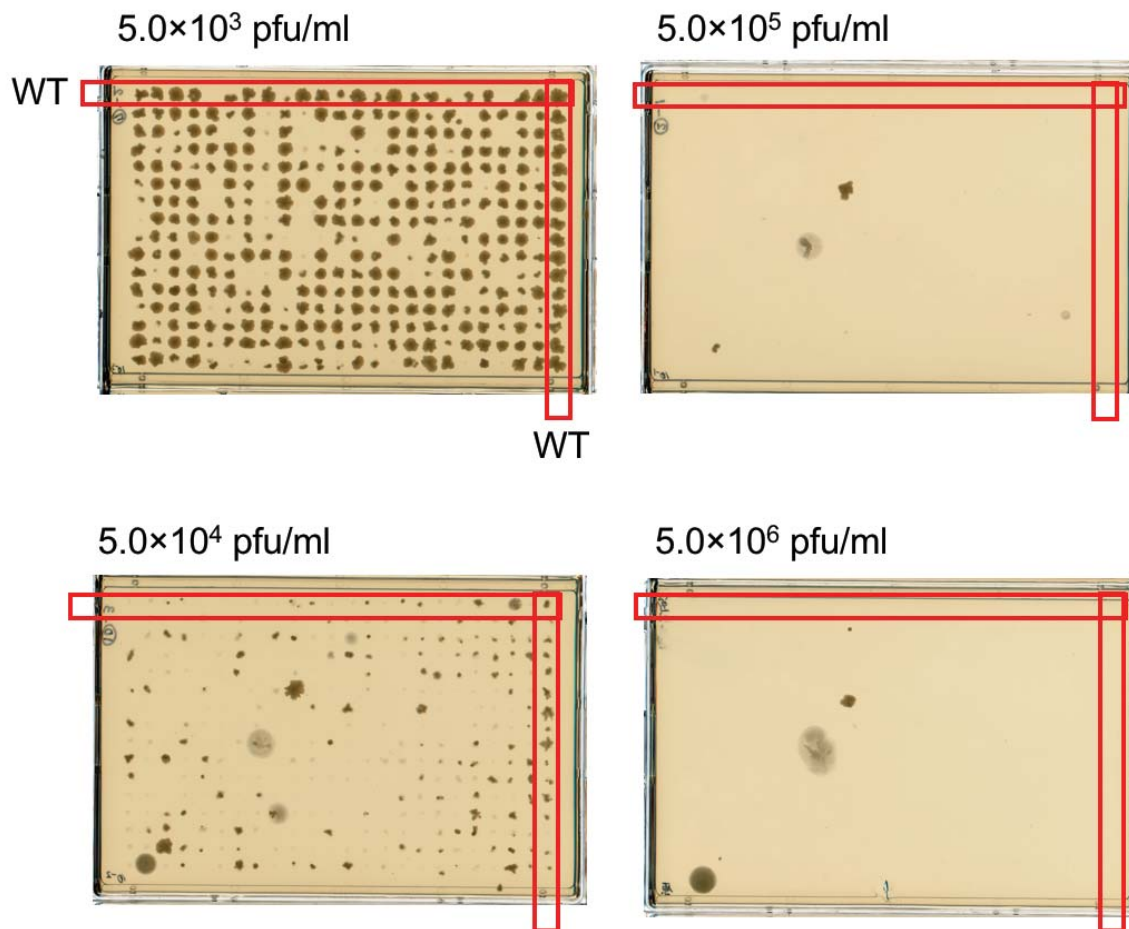


図 8. スクリーニングにおけるファージの最適濃度条件の検討

ソフトアガーに含めるファージ濃度を  $5.0 \times 10^3$  pfu/ml から、 $5.0 \times 10^6$  pfu/ml までの条件で検討を行った。赤枠で囲ったスポットが野生型大腸菌で、それ以外は欠失株である。

## 1-2. LB 培地でのスクリーニング

T4 ファージに対する耐性株のスクリーニングを行う為、1-1 で決定した濃度 ( $5.0 \times 10^5$  pfu/ml) になるよう T4 ファージをソフトアガーに添加し、その上に Keio collection をスポットした。翌日に生育したコロニーの候補株を同定した (図 9)。

条件検討で確認したように、野生型の大腸菌はコロニーが観察されず、 $10^5$  pfu/ml という条件では、ほぼ全ての野生型大腸菌は死滅したことが観察された。同様にほとんどの Keio collection 株の溶菌も観察された (図 9 A)。しかしこの条件において、幾つかの Keio collection 株はコロニーが観察された (図 9 A)。これらの欠失株は T4 ファージに対して野生型よりも強い耐性を有すると

考えられる。これまで外膜ポリンタンパク質(*ompC*)(Montag et al., 1990)、リポ多糖合成に関与する LPS 合成関連遺伝子(*lpcA*, *galU*, *waaC*, *waaF*)(Hossain et al., 1994; Maynard et al., 2010; Washizaki et al., 2016)など、T4 ファージ感染の受容体関連遺伝子群の変異による耐性が報告されている。これら過去に報告されている遺伝子群が本スクリーニングも同定できたかどうかにより、今回のスクリーニング法の妥当性を確認した。受容体の欠失株 $\Delta ompC$ は3回のうち2回、*lpcA* (3回のうち2回)、*galU* (3回のうち3回)、*waaC* (3回のうち2回)と *waaF* (3回のうち1回)が選択でき、本スクリーニングの有効性が確認でき、本スクリーニング手法の妥当性が示された。受容体関連以外で耐性化が報告された遺伝子群においても、今回のスクリーニング法により検出することができた。例えば、溶菌を阻害することで知られている *prc*(Slavcev and Hayes, 2003)の欠失株は3回のうち3回検出された。Integration factor の遺伝子 (*ihfA*, *ihfB*) は両方の遺伝子を欠失した二重遺伝子欠失株において感染効率が減少することが報告されているが(Zablewska and Kur, 1995)、本スクリーニングでは $\Delta ihfA$ と  $\Delta ihfB$  がそれぞれ一回ずつ検出され、integration factor の一遺伝子欠失株においても耐性を有する可能性を示唆するものである。*ihf* 遺伝子は子ファージ生産に影響を与えており、受容体の欠失と比較すると耐性の強度は低いと思われるが、本スクリーニングでは、このような弱い耐性を有する遺伝子群も検出できると考えられる。スクリーニング結果の全体を図 9 A に、選択されてきた候補株の3回のスクリーニングにおけるコロニーの形状の一例を図 9 B に示す。

全 3906 株の Keio collection と 42 種類の sRNA の欠失株を対象に3回のスクリーニングした結果、134 の遺伝子欠失株が程度の差は見られるが T4 ファージに対する耐性を示す株として同定することができた。3回のスクリーニングで選択された頻度をベン図 (図 10) で示す。取得できた全遺伝子リストは補足表に示す。

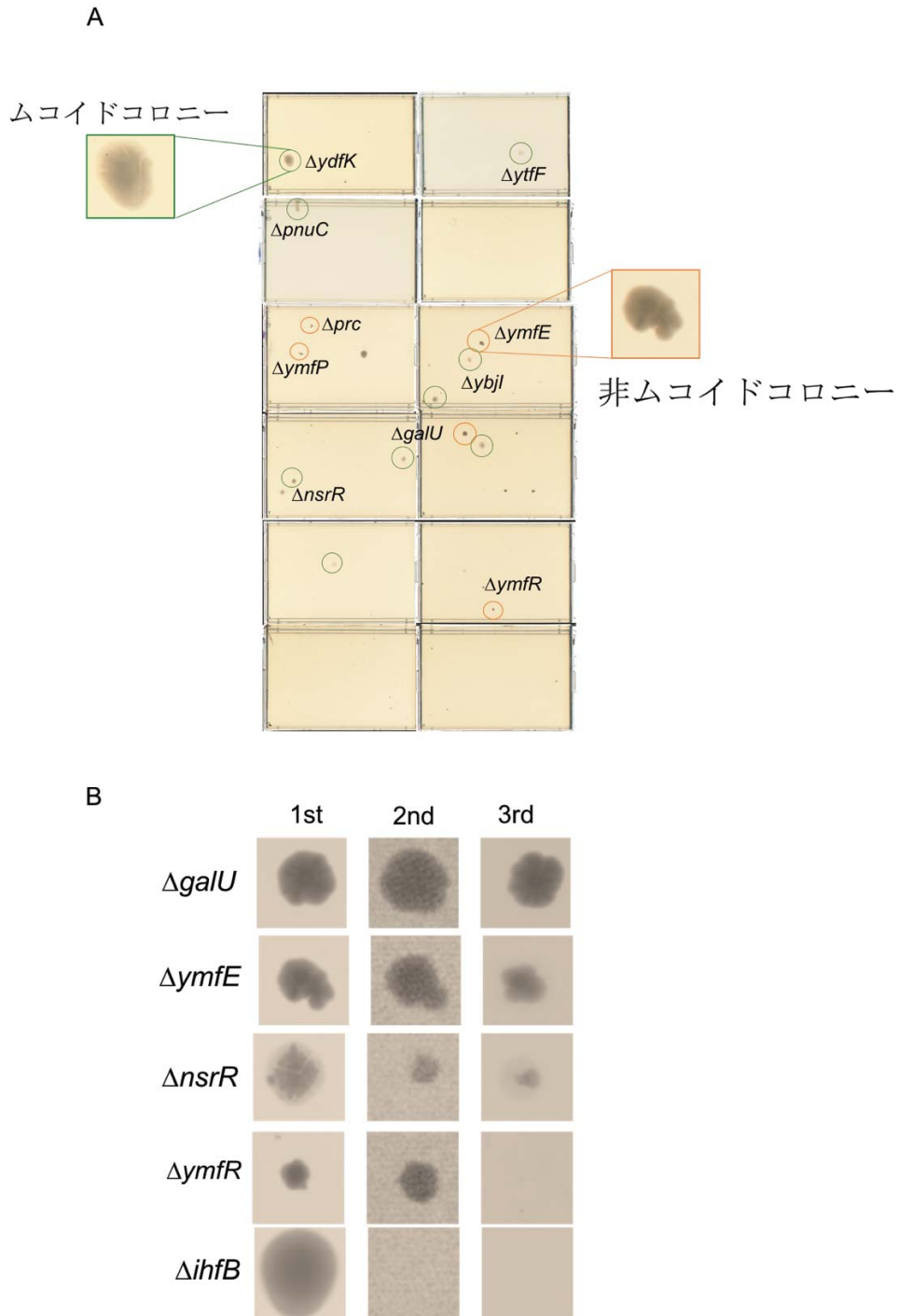


図 9. Keio collection を用いた T4 フェージに対する耐性株のスクリーニング  
 A. スポット後、一晚培養しスクリーニングを行なったプレート全体像。緑色の円で囲んだコロニーはムコイド様コロニーを形成した株、赤は非ムコイド様コロニーの株を示す。B. 幾つかの候補株における3回のスクリーニングでのコロニーを示す。

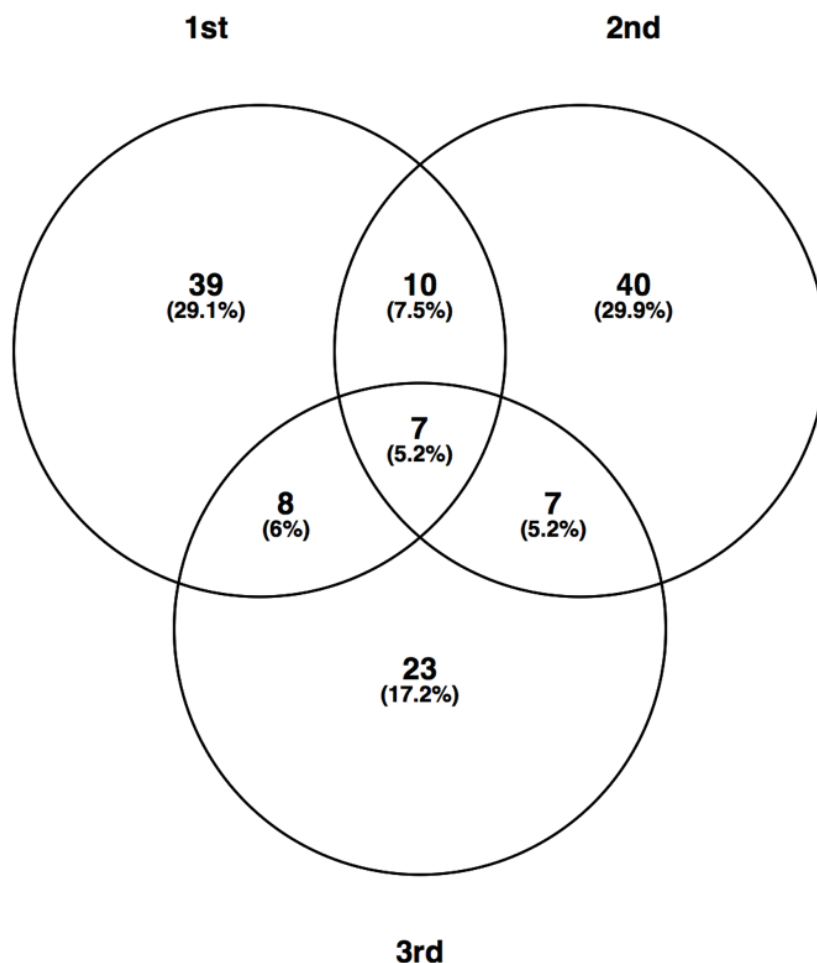


図 10. 三回のスクリーニングテストにおける候補株の数  
first、second、third はそれぞれ 1、2、3 回目の実験を意味する。

### 1-2-1. 候補株の COG 解析

得られた候補株の遺伝子がどのような機能を有し、また、濃縮されたかを調べるため、得られた候補株を Cluster of Orthologous Group(COG)により分類を行った(図 11)。COG(Roman et al., 2007)とは、現在解読されている完全長の原核生物のゲノムを主に対象として、タンパク質の配列比較を行い、オーソログスのタンパク質を 23 種類の機能別に分類したものである。今回使用したデータベース eggNOG は 5090 のゲノムを元にタンパク質を分類している COG データベースである。

COG 解析から、最も大きい割合を占めたグループは、機能未知 (S) に分類されるカテゴリー (16.9%) であることが示された(図 11)。また、アミノ酸の輸送や代謝 (E)、炭水化物に関わる遺伝子群 (G) が 10%以上を占めてい

た。また、細胞膜に関わる遺伝子群 (M) も 10%以上を占めており、完全な細胞膜が重要であることが示唆された (図 11、表 4)。これまで報告のある遺伝子は細胞壁に関連する遺伝子群 (M) に多く集中しており (表 4 の赤色で示した遺伝子)、これらの遺伝子は LPS の合成や OmpC であることから、これまでに検出されてきた遺伝子は主に吸着段階に影響を与える変異株であることが理解できる。

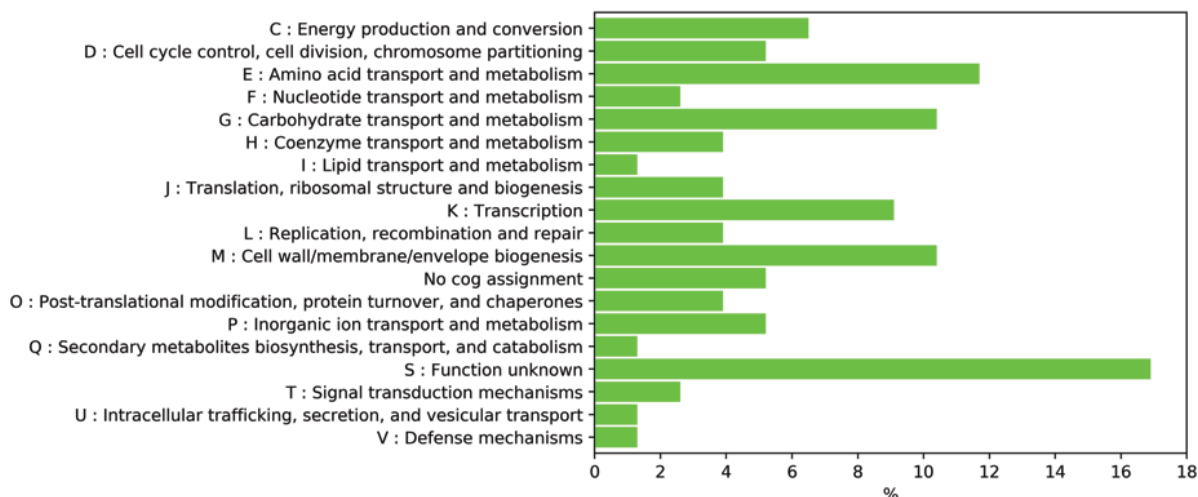


図 11. LB 培地で得られた候補株の COG による分類

図中の数字は、分類された遺伝子の数を表す。

表 4. COG により分類されたカテゴリーの遺伝子

赤色で示した遺伝子は、これまで T4 フェージの感染に影響を与えるという報告のある遺伝子を表す。

<b>C : Energy production and conversion</b> <i>gltP, napH, sucC, glcD, eutD</i>
<b>D : Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning</b> <i>nlpI, ftsP, fic, nlpD</i>
<b>E : Amino acid transport and metabolism</b> <i>glyA, hisH, ycaM, yidK, dppA, yggp, sdaA, ytfF, nikE</i>
<b>F : Nucleotide transport and metabolism</b> <i>yahJ, rdgB</i>
<b>G : Carbohydrate transport and metabolism</b> <i>pgm, lpcA, ptsN, manZ, alsA, ytfF</i>

---

**H : Coenzyme transport and metabolism**

*pnuC*, *waaE*, *citC*

---

**I : Lipid transport and metabolism**

*paaG*

---

**J : Translation, ribosomal structure and biogenesis**

*ybeY*, *ychF*, *ymdE*

---

**K : Transcription**

*nsrR*, *hns*, *greA*, *cspD*, *nac*, *bdcR*, *iraM*

---

**L : Replication, recombination and repair**

*dnaQ*, *ihfB*, *recC*

---

**M : Cell wall/membrane/envelope biogenesis**

*galU*, *prc*, *waaC*, *ompC*, *pal*, *waaF*, *tonB*, *nlpD*

---

**O : Post-translational modification, protein turnover, and chaperones**

*dsbA*, *yibF*, *yhaM*

---

**P : Inorganic ion transport and metabolism**

*opgG*, *pstA*, *copA*, *nikE*

---

**Q : Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism**

*ybjI*

---

**S : unknown function**

*ymfE*, *yihD*, *ymfP*, *ymfO*, *ymfR*, *chaB*, *ydeK*, *yehK*, *ycfL*, *ybfE*, *yaiA*, *ydfK*, *abgB*

---

**T : Signal transduction mechanisms**

*envZ*, *yhbX*

---

**U : Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport**

*tolB*

---

**V : Defense mechanisms**

*ybhS*

---

**Unassigned (No cog assignment)**

*TU-2304*, *mgrR*, *ylil*, *yew*

---

### 1-2-2. LB 培地で検出された遺伝子の概観

三回のスクリーニング実験のうち、三回とも検出された株は7株であった (*ydfK*, *ymfE*, *nsrR*, *galU*, *pgm*, *TU-2304*, *prc*) (図 10)。*pgm* は phosphoglucomutase をコードしており、GalU の基質である  $\alpha$ -D-glucopyranose 1-phosphate を  $\alpha$ -D-glucopyranose 6-phosphate から合成する反応を触媒する。 $\alpha$ -D-glucopyranose 1-phosphate は、GalU によって UDP- $\alpha$ -D-glucose に変換され、LPS の outer core のグルコースの材料となる。*galU* の欠失した株では、outer core の全てのグルコースが欠落した LPS を形成する (図 12) (Genevaux et al., 1999)。したがって、 $\Delta$ *pgm* 株が耐性を示した主な理由として、GalU の基質低下に伴う outer core の欠落した LPS によって、吸着効率が低下したと考えられる。OmpC や WaaC、WaaF など LPS の転移酵素をコードする欠失株は吸着段階に大きな影響を与えるため、これらの欠失株は3回とも検出されると予想したが、予想に反して2回 (*waaC*, *ompC*)、もしくは1回 (*waaF*) ずつしか検出されいという結果となった。

e14 cryptic prophage の遺伝子 *ymfE* や、Qin prophage の *ydfK* の欠失株が3回全てのスクリーニングで検出され、大腸菌のゲノム中に存在する prophage 遺伝子が T4 ファージの感染効率に影響を与えているものと思われる。

sRNA の *TU-2304* においても3回のうち3回とも検出された。*TU-2304* はミコイドを形成していたことから、細胞外物質の増加が考えられる。

3回のうち2回検出された遺伝子群はそれぞれ5%~10%程度となった (図 10)。 $\lambda$  ファージの cryptic gene である遺伝子群 (*ymfO*, *ymfP*, *ymfR*) は2回検出されたが、これら *ymf* の遺伝子群はオペロンを形成する (Mehta et al., 2004)。*ymf* 遺伝子群のほとんどが機能未知であるが、e14 cryptic prophage 領域を欠失させた株では、薬剤やその他のストレスに対して耐性を有するようになり、バイオフィルムの量もわずかに増加することが報告されている (Liu et al., 2015; Wang et al., 2010)。

LPS の合成に関与する遺伝子群 (*lpcA*, *waaE*) は3回のうち2回検出された (図 12)。*lpcA* と *waaE* は、 $\lambda$  ファージ及び、T7 ファージのスクリーニングの際にも検出され (Qimron et al., 2006) (Maynard et al., 2010)、inner core の修飾されたヘプトース (L-glycero-D-manno-heptose) が多くのファージの感染に重要であることが示唆された。



細胞分裂に関わる *ftsP* の欠失株についても検出された。*ftsP* と T4 ファージの増殖への影響に関する報告は存在しないが、前述の赤痢菌へのトランスポゾン挿入による P22 ファージの増殖に影響を与える研究では、クロモゾームの分配に必要な *ftsK* や細胞分裂を制御する *minD* の細胞分裂に関連する遺伝子の変異体が同定されており (Bohm et al., 2018)、正常な細胞分裂がファージの感染に重要であることが示唆されている。また、*ftsP* の欠失株はフィラメント状のフェノタイプを示す (Samaluru et al., 2007) ため、健全な細胞分裂もしくは細胞の形がファージの吸着や増殖に重要である可能性が考えられる。

スポットティングテストにおいて、3 回の実験のうち 1 回しか検出されない欠失株はそれぞれ 17%~30% となり、1 回のみ検出された遺伝子群の割合は、他の回数との割合と比較して最も多い結果となった (図 10)。LPS における outer core の細胞壁側から一番目のグルコースを転移する遺伝子 (*waaG*) の欠失株は一回検出された。T4 ファージは LPS のグルコースの存在により、感染様式が異なることが知られており、LPS の outer core に存在するグルコース分子に特異的に結合する (Montag et al., 1990) (図 12)。 $\Delta waaG$  株の LPS は  $\Delta galU$  株同様に、グルコースを含む outer core が除去されているため (David E. Heinrichs, 2002; Genevaux et al., 1999)、T4 ファージの吸着に影響を与えると考えられる。また、*tolB* や *nlpI* などが検出されたが、これらの遺伝子に変異が導入されると、Outer Membrane Vesicle (OMV) の合成量が増加することが報告された (McBroom et al., 2006)。OMV はファージと吸着してファージを不活化するため (Manning et al., 2011)、これらの変異体は OMV の増加により、ファージへの耐性を付与すると考えられる。

候補株の中には、転写や翻訳、もしくは複製に関する遺伝子群 (*ybeY*、*yehF*、*greA*、*dnaQ*) が検出された (表 4)。これらの欠失株は総じて、生育速度が遅く (Baba et al., 2006)、T4 ファージはこれらの欠失株に感染しても十分な転写もしくは翻訳、複製などが行えず、結果的に子ファージの増殖が減少すると予想される。

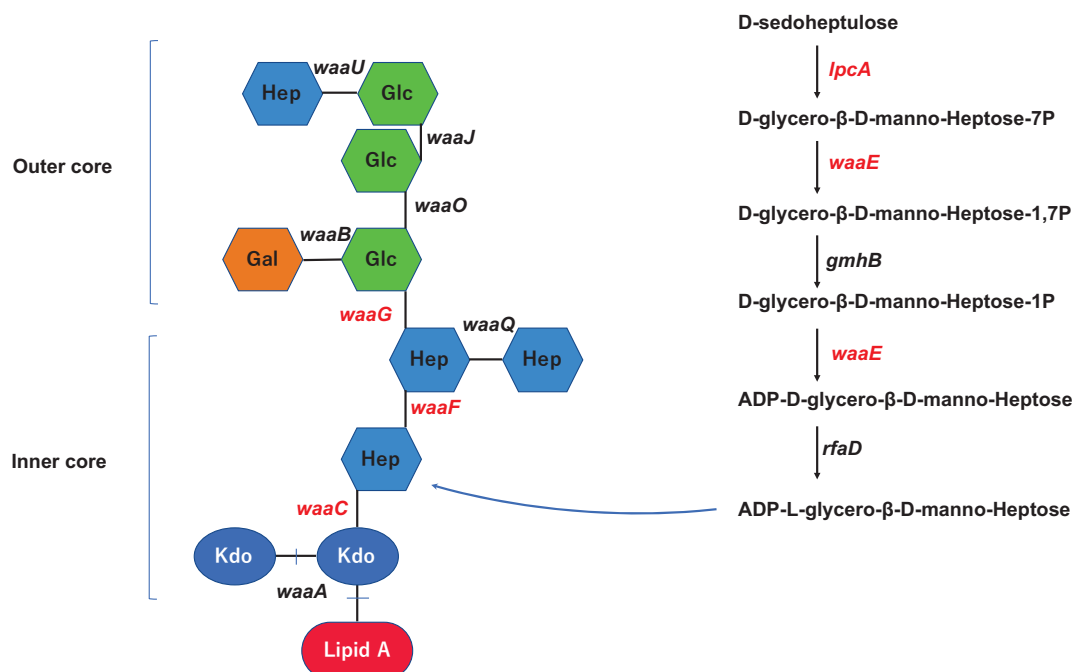


図 12. BW25113 における LPS の構造と合成に関わる遺伝子群

BW25113 の LPS の構造は、lipid A に 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid(Kdo) が結合し、さらにその上に L-glycero-D-manno-heptose (Hep) が結合することで、inner core を形成する。Outer core では 3 つの glucose (Glc) が結合し、最上段の Glc には Hep が結合する。Hep は幾つかの遺伝子により、D-sedoheptulose から合成される。赤色で示した遺伝子はスクリーニングでファージに耐性を示した遺伝子、黒色が検出されなかった遺伝子である。

### 1-3. MOPS 培地下でのスクリーニング

MOPS 培地下で生育する大腸菌は、生育に必要な最小限の物質を合成できるが、LB 培地では代謝関連遺伝子が欠失しても培地中から代謝物質が相補可能であるのに対して、最少培地である MOPS 培地では補えない場合が多い。このように、栄養源や代謝産物の変化といった環境の違いによって、T4 ファージの感染に耐性を示す遺伝子がどのように異なるかを解析した。

#### 1-3-1. 得られた候補株の概観

最少培地である MOPS 培地の条件下で、スポットスクリーニングを行った(n = 4) (図 13)。スポットティングの結果、受容体や LPS の生合成に関わる *ompC*、*lpcA*、*waaF*、*pgm*、*waaC*、*galU* などが検出され、本スクリーニングの実験系が MOPS 培地条件下においても機能していることが示された。4 回中 4

回とも検出された遺伝子は 17 個の欠失株で、全体の約 5.7%に相当する（図 13）。その候補株の中には、MOPS 培地と LB 培地の両方で検出された欠失株の中には cryptic phage gene である *ymfO*、*ymfP*、*ymfQ*、*ymfR*、*ymfE* が検出され、LB 培地で検出されたプロファージの遺伝子は MOPS 培地においても全て検出されるという結果となった。以上のことから、プロファージ領域の欠失株は環境に左右されることなく、T4 ファージに対して強い耐性を示すことが示唆された。また、LB 培地において 3 回のうち 3 回とも検出された *nsrR* が MOPS 培地でも検出された。

LB 培地において、*dsbA* は 2 回、*nlpI* は一回ずつ検出されたが、MOPS 培地では 4 回中 4 回とも検出された。anti  $\sigma$  factor の一つである *rseA* は、LB 培地では検出されなかったが、MOPS 培地では 4 回のスクリーニング全てで得られた。RseA は  $\sigma^E$  の働きを阻害しており、 $\sigma^E$  は、飢餓応答シグナルである ppGpp やエンベロープストレスにより活性化し、リポタンパク質や外膜タンパク質の合成に影響を与えることが報告されている(Missiakas et al., 1997)。*rseA* の欠失により細胞壁に存在する構成タンパク質が変化した結果、T4 ファージに感染しにくくなった可能性が考えられる。もしくは、*rseA* の欠失により RNA ポリメラーゼの  $\sigma$  サブユニットの専有率が  $\sigma^E$  の結合する割合が増加し、T4 ファージの利用する  $\sigma^{70}$  の専有率が減少することで、T4 ファージの転写効率が減少する可能性が考えられる。

LB 培地で得られた候補株の中には、*ybeY*、*yehF*、*dnaQ* など転写や翻訳に関わる欠失株が検出されたが、MOPS 培地では検出されなかった。その理由として T4 ファージの増殖速度や生産速度が、上記の欠失株と宿主の生育速度よりも優位になったことから、コロニーが形成されない結果となったのではないかと予想している。また、LB 培地では 3 回のうち 2 回検出された *glyA* は、MOPS 培地ではほとんど生育しないため(Baba et al., 2006)、MOPS 培地条件下ではコロニーが検出されないという結果となった。

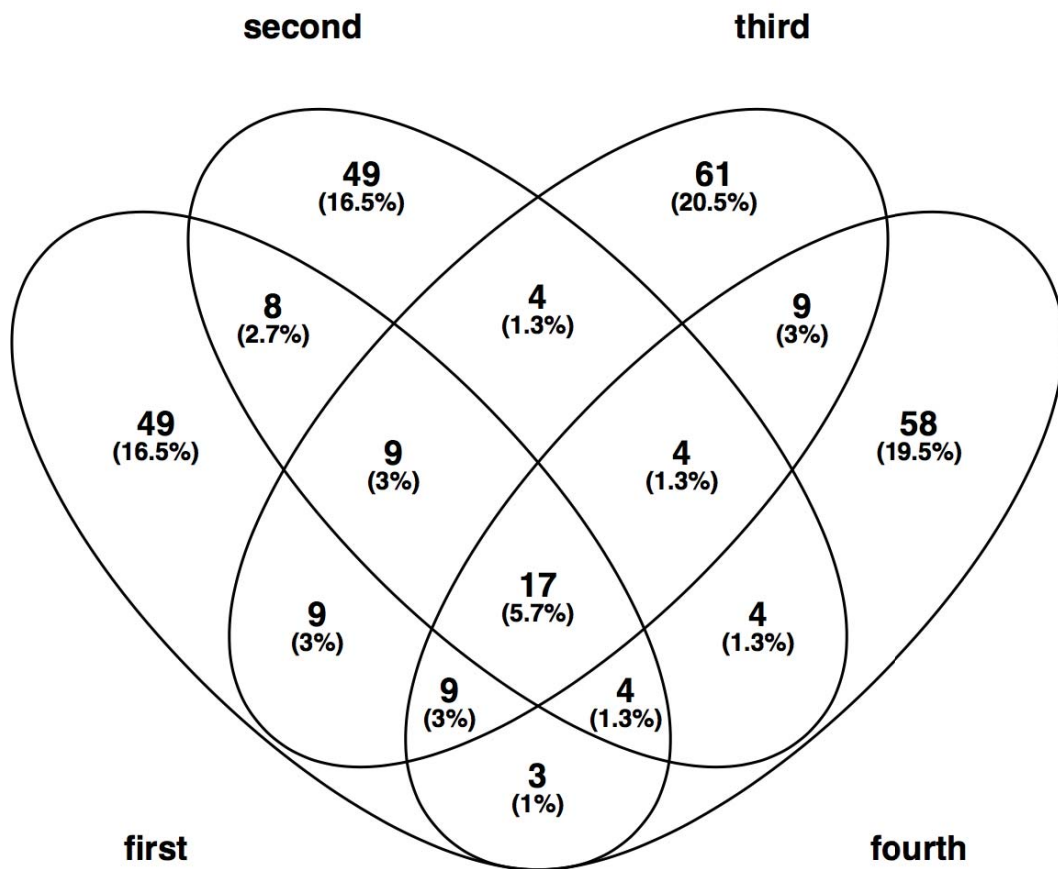


図 13. MOPS で得られた候補株の数

first、second、third、fourth は MOPS 培地における何回目のスクリーニングかを示す。

### 1-3-2. MOPS 培地で得られた候補株の COG 解析

MOPS 培地で得られた候補株について COG 解析を行ったところ、LB 培地と同様に、機能未知のカテゴリーが最も多く、また、細胞膜に関連するタンパク質群も 13% となり、機能未知の分類について多い結果となった (図 14)。さらに、エネルギー生産に関わるカテゴリー (C) が 4 番目に多いことが示された (図 14)。一方、LB 培地においては、C のカテゴリーは 6 番目に多い結果であった。MOPS 培地でのスクリーニングでは、C のカテゴリーに分類される遺伝子 *yjw*、*nuoG*、*ynfF*、*cptB* などの呼吸に関わるような遺伝子も検出された (表 5)。T4 フェージの宿主への DNA 注入には膜電位勾配の存在が必要である (Labedan and Goldberg, 1979)。*nuoG* は NADH quinone oxidoreductase のサブユニットであることから、プロトン濃度勾配の形成に関与していると考えられ

る。また、Uniprot で調べたところ、*yjjW* や *ynfF* も呼吸を活性化させる鉄硫黄クラスターに結合するタンパク質と推定されている。したがって、これらの遺伝子も膜電位形成に関与し、欠失したことにより膜電位の勾配が減少することで、T4 フェージの DNA 注入の効率が低下したと推測する。以上のことから、LB 培地では検出されないが、最少培地である MOPS のような低栄養な条件下では、感染効率は膜電位の影響を受けやすいことが示唆された。

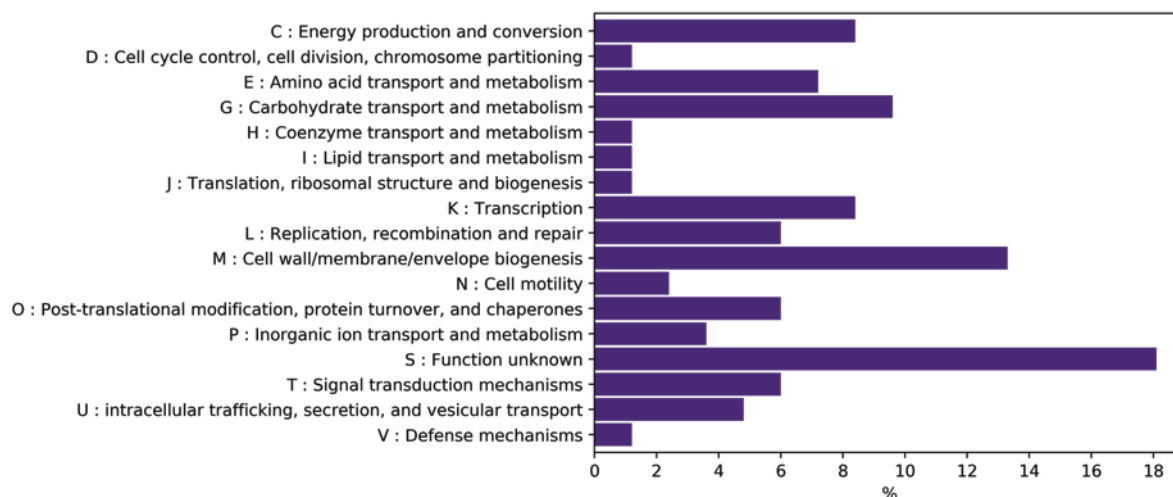


図 14. MOPS 培地で検出された候補株における COG の分類  
図中の数字は、分類された遺伝子の数を表す。

表 5. MOPS 培地で検出された候補株の COG 分類及び遺伝子名

赤色で示した遺伝子は、これまで T4 フェージの感染に影響を与えるという報告のある遺伝子を表す

**C : Energy production and conversion**

*gldA*, *nuoG*, *cptB*, *ynfF*, *yjjW*, *gltP*, *glcA*

**D : Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning**

*cedA*

**E : Amino acid transport and metabolism**

*aroG*, *nanA*, *yjeK*, *yjhF*, *gntP*, *gltI*

**G : Carbohydrate transport and metabolism**

*lpcA*, *pgm*, *gntP*, *gltI*, *rpiA*, *manZ*, *rpiB*, *talA*

**H : Coenzyme transport and metabolism**

*waaE*

**I : Lipid transport and metabolism***yhbT*

---

**J : Translation, ribosomal structure and biogenesis***tmcA*

---

**K : Transcription***yiiD, nsrR, yggD, slmA, nanR, cra, mraZ*

---

**L : Replication, recombination and repair***pinQ, pqqL, ihfA, ihfB, umuC*

---

**M : Cell wall/membrane/envelope biogenesis***waaF, opgH, galU, tolA, ompA, ompC, prc, waaC, osmF, phoE, mscS*

---

**N : Cell motility***yggR*

---

**O : Post-translational modification, protein turnover, and chaperones***dsbA, trxC, lon, dsbB, djlC*

---

**P : Inorganic ion transport and metabolism***znuC, ddpC, narK*

---

**S : Function unknown***ymdE, ymfR, nlpI, ydeJ, yohC, ydfK, ymfO, ymfQ, ymfP, yfbN, ycbJ, yjbE, yhhL, uspB, yqjF, hns*

---

**T : Signal transduction mechanisms***rseA, envZ, rtn, ompR, yliE*

---

**Defense mechanisms***mcrA*

---

**1-4. LB 培地と MOS 培地で得られた候補株の比較**

LB と MOPS 培地でそれぞれ得られた候補株をベン図および、COG による分類、比較を行った (図 15、表 6)。LB 培地と MOPS で共通して得られた株は 27 個で、約 20%程度であった。COG 解析により、共通した候補株の中で最も多い分類は機能未知に分類される S のカテゴリーで、22%に相当する。LB と MOPS 培地に共通で、かつ S に分類された遺伝子は *ymf* 遺伝子群 (*ymfE*、

*ymlO*, *ymlP*, *ymlQ*, *ymlR*) および *ydfK* などのプロファージ領域の遺伝子群が 27 遺伝子のうち遺伝子中 6 遺伝子を占めた。このことから、*yml* 遺伝子などのプロファージの欠失株は、環境が変化した場合においても、T4 ファージに対して耐性を示すことが分かった。また、エネルギー生産に関わるカテゴリー C は *gltP* のみが LB と MOPS で検出された (図 15、表 4)。アミノ酸の代謝に関わるカテゴリー (E) は、LB 培地条件下で 16.1% と最も多いカテゴリーとなった。一方、MOPS 培地では 11% であった。LB 培地では、アミノ酸が比較的豊富に存在しており、アミノ酸の代謝や輸送が遺伝子欠失によりできなくなると、大腸菌の生理的条件に影響を与え、結果的に T4 ファージの合成に影響を与えるのではないかと予想する。特に、グルタミン・グルタミン酸の生合成や輸送に関与する遺伝子が幾つか検出された (*hisH*, *ycaM*, *gltP* など)。

MOPS 培地では、カテゴリー C、E、K、M が 11.3% となった。C のカテゴリーの中では、NAD や FAD を利用する遺伝子が多く検出された。MOPS のような栄養の欠乏状態では、NAD などのエネルギー生産に関わる電子伝達系のバランスの欠如、もしくは膜電位の減少が T4 ファージの感染効率に影響を与えている可能性がある (図 15、表 4)。また、MOPS 培地では、*lon* が検出された (カテゴリー O)。*lon* の欠失株では、ムコイド状のコロニーを形成する。ムコイドの構成成分はコラン酸であり、この物質が細胞壁を覆い、受容体を遮蔽することで、T4 ファージの吸着を阻害することがすでに報告されている (Kim et al., 2015)。飢餓ストレスを含めた一般的なストレスによって、ムコイドフェノタイプを示す RcsA が活性化されると、結果的にコラン酸の合成量が増加するが (Weissbach and Brot, 1991)、通常 Lon が RcsA タンパク質を分解し、Rcs の働きを抑制する (Torres-Cabassa and Gottesman, 1987)。飢餓状態において  $\Delta lon$  の株は RcsA が分解されないため、LB 培地の時と比較して MOPS 培地下でより多くのムコイドを合成することで、結果的にファージに対して耐性を付与されたものと思われる。

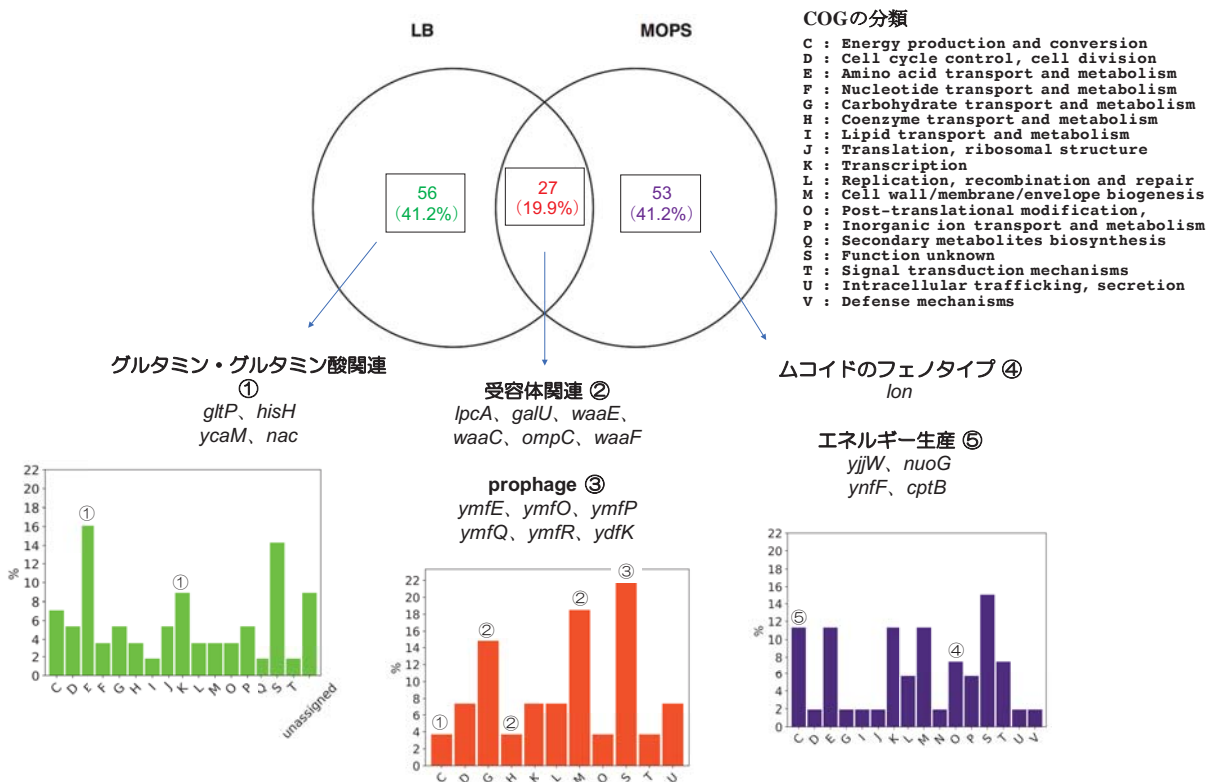


図 15. MOPS 培地と LB 培地における候補株の分類

MOPS 培地で 4 回中 2 回以上検出された候補株と、LB 培地で少なくとも一回検出された候補株を対象にベン図を作成した。LB 培地で得られた候補株の COG (緑)、LB と MOPS で得られた候補株の COG 分類 (赤)、MOPS で得られた候補株の COG 分類 (紫) をそれぞれ示す。Unassigned は COG による分類がなされていないものを表す。表記した遺伝子は、濃縮された遺伝子を表しており、番号 (①~⑤) はそれらの遺伝子がどの COG に分類されているかを示す。

表 6. それぞれの培地で得られた欠失株

LB のみに得られた株 (LB)、LB と MOPS 培地で得られた株 (LB と MOPS)、MOPS のみに得られた株 (MOPS) をそれぞれ示す。category は COG による分類を表す。

LB	category	LB と MOPS	category	MOPS	category
<i>napH</i>	C	<i>gltP</i>	C	<i>gldA</i>	C
<i>sucC</i>	C	<i>nlpI</i>	D	<i>nuoG</i>	C
<i>glcD</i>	C	<i>pgm</i>	D	<i>cptB</i>	C
<i>eutD</i>	C	<i>lpcA</i>	G	<i>ynfF</i>	C
<i>ftsP</i>	D	<i>talA</i>	G	<i>yjjW</i>	C



<i>fic</i>	D	<i>manZ</i>	G	<i>glcA</i>	C
<i>nlpD</i>	D	<i>rpiA</i>	G	<i>cedA</i>	D
<i>glyA</i>	E	<i>waaE</i>	H	<i>gltI</i>	E
<i>hisH</i>	E	<i>nsrR</i>	K	<i>aroG</i>	E
<i>ycaM</i>	E	<i>hns</i>	K	<i>nanA</i>	E
<i>yidK</i>	E	<i>ihfB</i>	L	<i>yjhF</i>	E
<i>dppA</i>	E	<i>ihfA</i>	L	<i>gntP</i>	E
<i>yggP</i>	E	<i>galU</i>	M	<i>yjeK</i>	E
<i>sdaA</i>	E	<i>prc</i>	M	<i>rpiB</i>	G
<i>ytfF</i>	E	<i>waaC</i>	M	<i>yhbT</i>	I
<i>nikE</i>	E	<i>ompC</i>	M	<i>tmcA</i>	J
<i>yahJ</i>	F	<i>waaF</i>	M	<i>yiiD</i>	K
<i>rdgB</i>	F	<i>dsbA</i>	O	<i>yggD</i>	K
<i>ptsN</i>	G	<i>ymfE</i>	S	<i>slmA</i>	K
<i>ycjN</i>	G	<i>ymfP</i>	S	<i>nanR</i>	K
<i>alsA</i>	G	<i>ymfO</i>	S	<i>cra</i>	K
<i>pnuC</i>	H	<i>ymfR</i>	S	<i>mraZ</i>	K
<i>citC</i>	H	<i>ydfK</i>	S	<i>pinQ</i>	L
<i>paaG</i>	I	<i>ymfQ</i>	S	<i>pqqL</i>	L
<i>ybeY</i>	J	<i>envZ</i>	T	<i>umuC</i>	L
<i>ychF</i>	J	<i>tolB</i>	U	<i>opgH</i>	M
<i>ymdE</i>	J	<i>tolR</i>	U	<i>tolA</i>	M
<i>greA</i>	K			<i>ompA</i>	M
<i>cspD</i>	K			<i>osmF</i>	M
<i>nac</i>	K			<i>phoE</i>	M
<i>bdcR</i>	K			<i>mscS</i>	M
<i>iraM</i>	K			<i>yggR</i>	N
<i>dnaQ</i>	L			<i>trxC</i>	O
<i>recC</i>	L			<i>lon</i>	O
<i>pal</i>	M			<i>dsbB</i>	O
<i>tonB</i>	M			<i>djlC</i>	O
<i>yibF</i>	O			<i>znuC</i>	P

<i>yhaM</i>	O		<i>ddpC</i>	P
<i>opgG</i>	P		<i>narK</i>	P
<i>pstA</i>	P		<i>ydeJ</i>	S
<i>copA</i>	P		<i>yohC</i>	S
<i>ybjI</i>	Q		<i>yfbN</i>	S
<i>yihD</i>	S		<i>ycbJ</i>	S
<i>chaB</i>	S		<i>yjbE</i>	S
<i>ydeK</i>	S		<i>yhhL</i>	S
<i>yehK</i>	S		<i>uspB</i>	S
<i>ycfL</i>	S		<i>yqjF</i>	S
<i>ybfE</i>	S		<i>rseA</i>	T
<i>yaiA</i>	S		<i>rtn</i>	T
<i>abgB</i>	S		<i>ompR</i>	T
<i>yhbX</i>	T		<i>yliE</i>	T
<i>ybhS</i>	unassigned		<i>secB</i>	U
TU-2304	unassigned		<i>mcrA</i>	V
<i>mgrR</i>	unassigned			
<i>ylil</i>	unassigned			
<i>yeeW</i>	unassigned			

## 2. 液体培養下における候補株の OD<sub>600</sub> の継時的変化

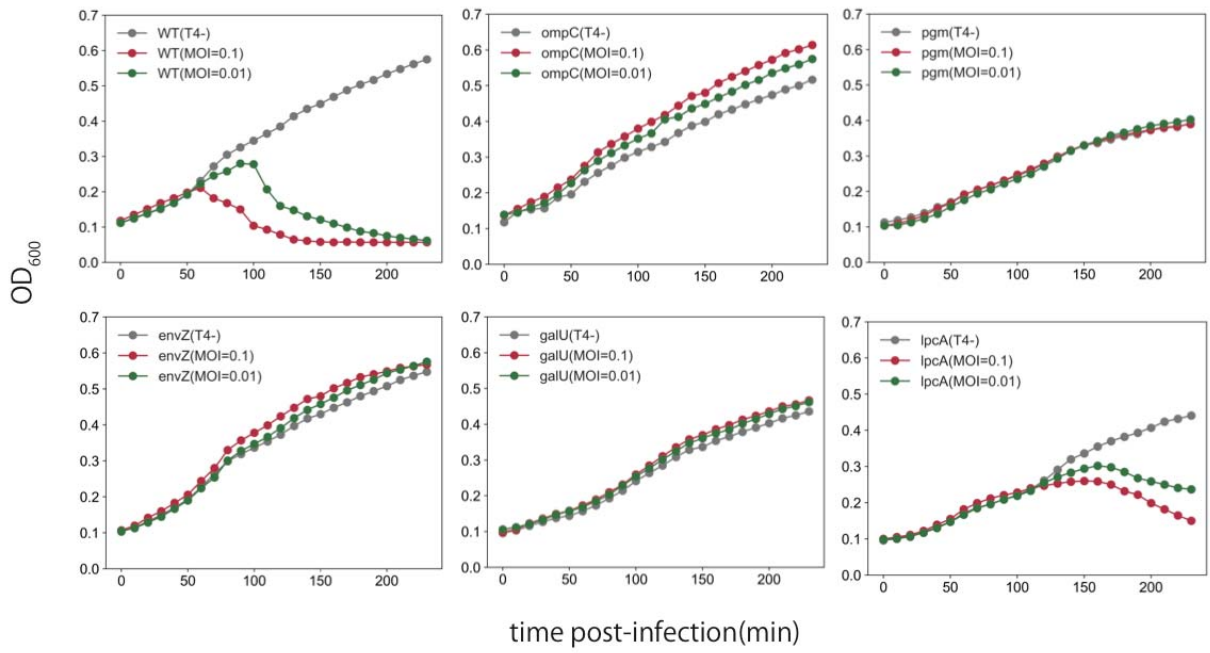
LB 培地で耐性を示した欠失株における詳細な解析のために、液体培養下でそれぞれの欠失株に T4 ファージを感染させ、10 分ごとに濁度 (OD<sub>600</sub>) を計測した (図 16)。野生型の大腸菌に T4 ファージを MOI = 0.1、0.01 で感染させた場合、それぞれ約 1 時間と 2 時間後に溶菌 (OD<sub>600</sub> の減少) が開始された (図 16 WT)。一方、受容体である *ompC* と *galU* を欠失させた変異株では、MOI = 0.01、0.1 のいずれの条件下でも溶菌が観察されず、非常に強い耐性を持つことが示された (図 16 A)。また、*pgm* や *ompC* の発現を制御する *envZ* の欠失株においても同様に強い耐性を示した。さらに、スポットスクリーニング実験で 3 回とも検出された *ymfE* や 2 回検出された *ymfO* の欠失株においても OD の減

少がほとんど観察されず、強い耐性を有することが示唆された。*ympP* では野生型と比較して溶菌するまでの時間が遅延していた (図 16 B)。

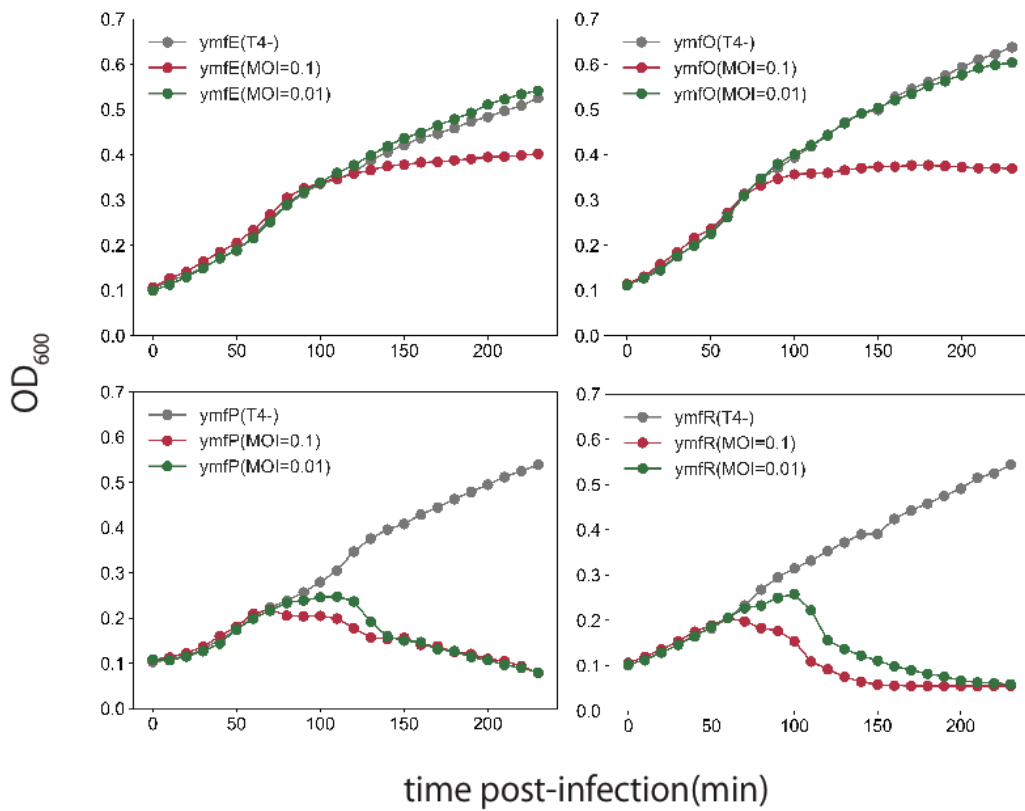
*glyA*、*pnuC*、*ytfF*、*yehF*、*ftsP*、*ybeY* など、受容体との関連性が見られない遺伝子の欠失株においても、最終的に溶菌が生じているが、野生型と比較すると溶菌までの時間が長い事から、T4 ファージとの相互作用が考えられる (図 16 C)。上記の遺伝子群は、T4 ファージの増殖に影響を与えるという報告が存在せず、本研究により、T4 ファージの増殖に影響を与える新規の遺伝子を同定したと言える。

*prc* 遺伝子はプロテアーゼタンパク質をコードしており、T4 ファージの holin タンパク質のシグナル配列の切断に関与していることが知られている (Slavcev and Hayes, 2003)。 $\Delta prc$  は最終的には溶菌したが、OD<sub>600</sub> の減少が遅いクラス (図 16 C 赤枠) に分類され、野生型と比較すると耐性を有することが示された。ストレス存在下における細胞分裂の制御に関与する *ftsP* 遺伝子の欠失株においても溶菌までの時間が遅延していた (図 16 C 赤枠)。 $\Delta nsrR$ 、 $\Delta ydfK$  株はスクリーニングの際、3 回の実験のうち 3 回とも検出されたため、液体培養下でも強い耐性を示すと予想されたが、予想に反して OD<sub>600</sub> の減少が野生型と比較しても変化が見られないという結果となった。考えられる理由として、固体培地と液体培地の違いによるファージと宿主との相互作用の違いが生じている可能性が考えられる。*ydfK* はプロファージの遺伝子の一つで、cold shock response の transcription factor として関与していると考えられている (Polissi et al., 2003) (Raghavan et al., 2011) が、詳細な機能は解明されていない。また、*nsrR* は transcription regulator として鞭毛に関与する遺伝子群など、約 30 の遺伝子発現やバイオフィルム形成にも関与しており (Partridge et al., 2009) (Filenko et al., 2007)、T4 ファージの感染効率に影響を与えている可能性がある。*nlpD*、*pal*、*opgG* などの膜タンパク質に局在する遺伝子の欠失株が比較的低い耐性度合いを示した (図 16 C)。これらの遺伝子は T4 ファージの直接の受容体ではないが、細胞膜や細胞壁の不完全性などが T4 ファージの感染効率に影響を与えると考えられる。

A



B



C

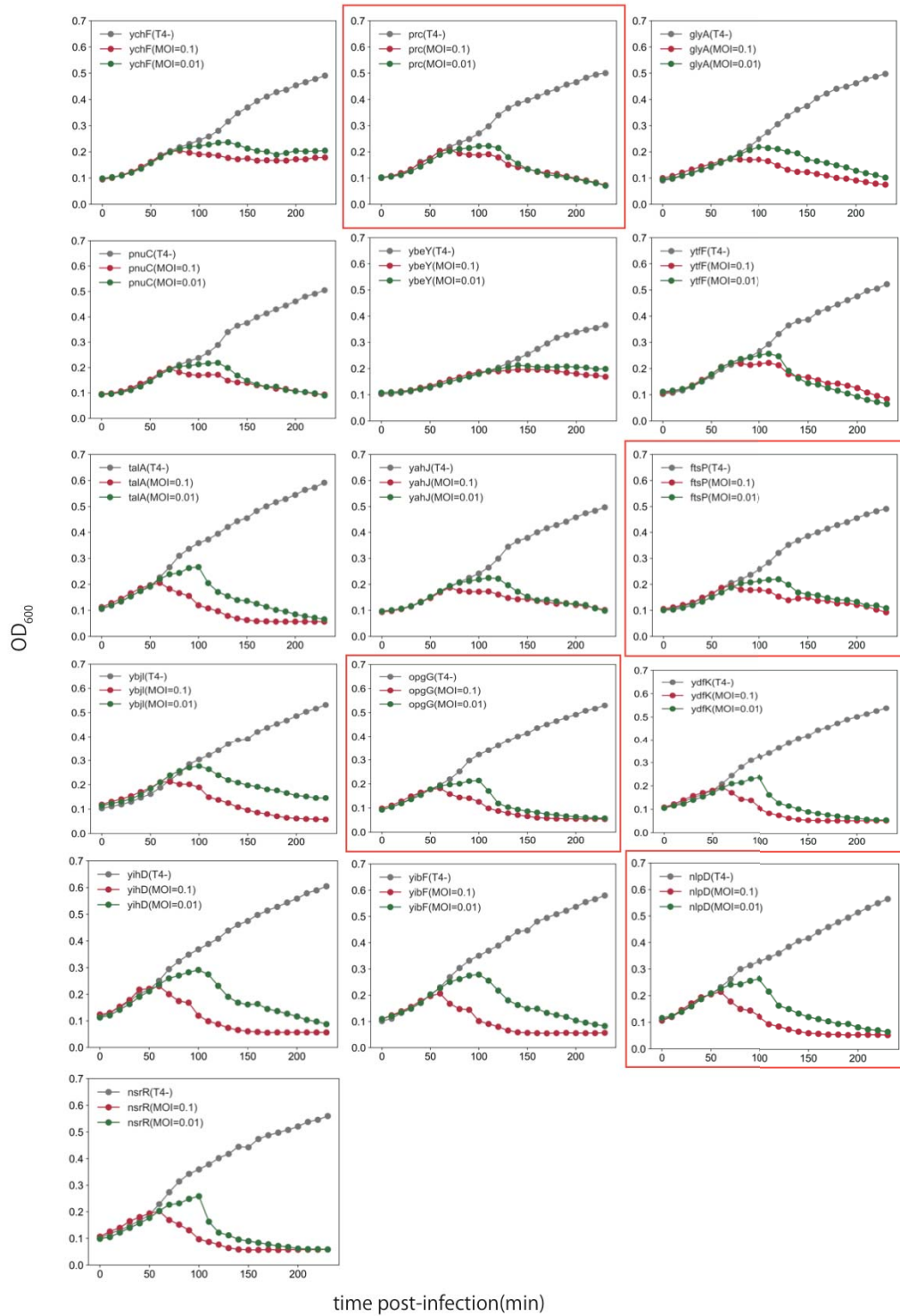


図 16. T4 フェージ感染下における候補株の OD<sub>600</sub> の推移

青色 : T4 添加なし、灰色 : MOI=0.1、赤色 : MOI = 0.01 をそれぞれ示す。A. 耐性の強いグループ、B. *ymf* 遺伝子グループ、C. その他最終的には溶菌が確認されたグループに分類した。赤枠で示した欠失株は本文で言及している遺伝子。

## 2-1. スポットテストの検出回数と液体培地での溶菌度合いの関連性

液体培地における野生型と候補株の T4 フェージの溶菌による OD<sub>600</sub> の減少度を比較するために、それぞれの遺伝子欠失株の生育の違いを補正した以下の Fitness Index (FI) を定義し、フェージによる溶菌効率を野生型と比較した。

$$FI = \frac{(OD_{Keio} - OD_{Keio+T4})/OD_{Keio}}{(OD_{wt} - OD_{wt+T4})/OD_{wt}}$$

FI は 1 より下回るほど野生型と比較して T4 フェージ添加時の OD<sub>600</sub> が減少しにくい、つまり溶菌が起こりにくいことを示す。例えば、*ompC* の欠失株などの OD<sub>600</sub> の減少が起こらないような受容体の欠失株は、-0.49 と非常に低い値を示し (図 17 uneven-colony)、野生型と同様の OD<sub>600</sub> の減少が観察される変異株 (*ydfK*) は、1 に近い値を示す。また、OD の減少が遅延した株、*prc* の FI は、0.39 程度となった。

液体培地と、個体培地における候補株の T4 フェージへの耐性を比較するために、スポットスクリーニングで検出された回数と FI を比較した。3 回行った LB 培地でのスポットスクリーニングの結果、3 回中 3 回検出された遺伝子は全体の候補株のうちの約 5% に相当する 7 個の遺伝子のみであった。また、2 回検出された遺伝子群は全体の約 25% 程度となり、その他は一回のみ検出された。このように、遺伝子によってスクリーニングでされない回が存在したが、これは、耐性度の強さによる違いと予想される。また、本研究では候補株のグリセロールストックをピンに付着させてスポットしており、スクリーニングの回によって培地上に添加される細胞数が異なる可能性等も考えられる。そこで、スポットテストで検出された回数と FI を比較した (図 17)。1 回のみ検出された株における FI の平均値は 0.97 となり、2 回 (0.45) や 3 回 (0.38) 検出された株の FI と比較しても高い数値を示した (表 7)。以上のように、1 回のみ検出された候補株の耐性度は、複数回検出された遺伝子群と比較して、T4 フェージ添加時の OD の差が野生型と同程度であることを示す 1 付近の値をとる傾向が示された (図 17 all、表 7)。また、FI の分散を回数ごとに比較すると、2 回と 3 回でそれぞれ 0.21、0.37 となったが、1 回のみ検出された候補株の分散は 0.033 となり、非常に低い分散の値をとるため、1 付近の FI に近い値をとる株が多いことが示された (図 17、表 7)。

本研究ではスクリーニングの際に、コロニーの形状からムコイド(mucoïd)、非ムコイド(non-mucoïd)、非常に小さなコロニー(uneven-colony)に分類した。それぞれのコロニーの形状ごとにFIと検出回数を比較したところ、ムコイドを形成したコロニーにおいては、検出回数が増加してもFIの値が1付近に存在する株が比較的多く存在していた(図17 mucoïd)。ムコイドを示す株は膜タンパク質をコードする遺伝子 *nlpD*、*opgG* やバイオフィームに関連する *ydfK* や *nsrR* などが分類されており、このようなFI値が1付近を示すムコイドの候補株の中には、コラン酸やその他の細胞外高分子物質の増加により個体培地上では耐性を示しやすいが、液体培地上では細胞外高分子物質は散乱しやすく感受性を示す株が存在すると考えられる。

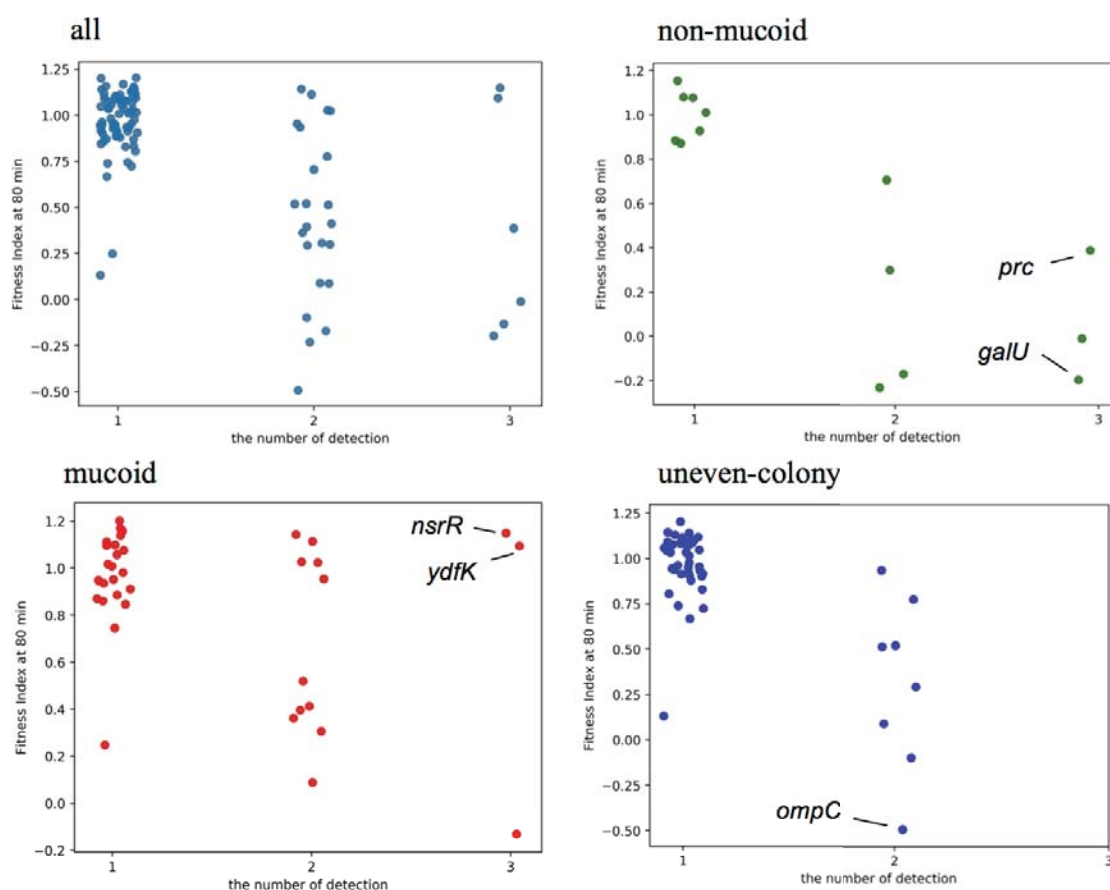


図 17. スクリーニングにおける検出回数と FI の比較

それぞれの候補株の液体培地における 80 分の FI と固体培地上で検出された回数を比較。全ての候補株における相関 (all)、コロニーの違いにより、mucoïd、non-mucoïd、uneven-colony に分類し、それぞれのコロニーの形状ごとの FI と検出回数の関係性を調べた。

表 7. 検出された回数別の FI の統計データ

	1 回	2 回	3 回
サンプル数 (n)	71	23	6
平均	0.97	0.45	0.38
中央値	1.0	0.41	0.19
分散	0.033	0.21	0.37

## 2-2. 溶菌パターンによるクラスタ解析

スポットスクリーニングで 2 回以上検出された欠失株において、液体培地上での野生型との OD の差で溶菌パターンの比較を行うために、感染後の 80 分から 170 分における FI の継時的変化をヒートマップによって可視化し、解析した。また、デンドログラムは凝集型階層クラスタリングの一つである Ward 法を用いて行った。ヒートマップで可視化した結果、FI によっていくつかのクラスタに分類された (図 18)。受容体に関わる欠失株は低い FI を示し (cluster a)、強い耐性を示すクラスタに分類された。これまで報告されている *prc* 欠失株においても強い耐性を示す cluster c に分類された。

また、それぞれのクラスタと COG による遺伝子の分類を比較した結果、全ての遺伝子ではないが、同じ COG のカテゴリーに分類された遺伝子群が異なるクラスタに分類される傾向を示した。これには幾つかの理由が考えられる。それぞれの遺伝子が COG によって分類されたカテゴリー以外の機能を有する、もしくは、分類されたカテゴリー内の遺伝子においても、T4 フェージの感染に影響を与える段階は異なることが考えられる。例えば、*glyA* はアミノ酸合成のカテゴリー (E) に分類されているが、後の吸着アッセイで示すように、実際には吸着段階に影響を与える。また、*ompC* と *pal* において、カテゴリーの同じ細胞壁の関連のカテゴリー (M) に分類されているが、両者の FI は大きく異なり、異なるクラスタに分類された。*pal* の変異株は OMV の合成量の増加によって (McBroom et al., 2006)、T4 フェージの不活化に関与していると考えられるため、*pal* の欠失株は、受容体としての *ompC* とは異なる機構で耐性化したと予想される。COG 解析は、どのような遺伝子が検出されたかを俯瞰するためには有用な手法ではあるが、カテゴリーから感染のどの段階に影響を与えるかについて推測することは困難である。クラスタの分類とそれぞれの機能の類



似性から感染のどの段階に影響を与えるかをある程度推測することが可能であると考えられる。

*yml* 遺伝子群 (*ymlE*, *ymlO*, *ymlP*, *ymlR*) では FI によって、a、c、d のクラスターに広く分類された。*yml* 遺伝子は、吸着効率は野生型とほとんど変化しないが (図 18)、バーストサイズがそれぞれの *yml* の遺伝子で異なり、*yml* のそれぞれの遺伝子やその領域が欠失によっても耐性の度合いが異なることが示唆された。クラスタリングの結果、*ymlE* と *ymlO* は強い耐性を示す分類を示す一方、*ymlR* と *ymlP* は異なるクラスターに分類されており、*yml* 遺伝子においてもそれぞれの耐性化機構は異なるのではないかと予想している。

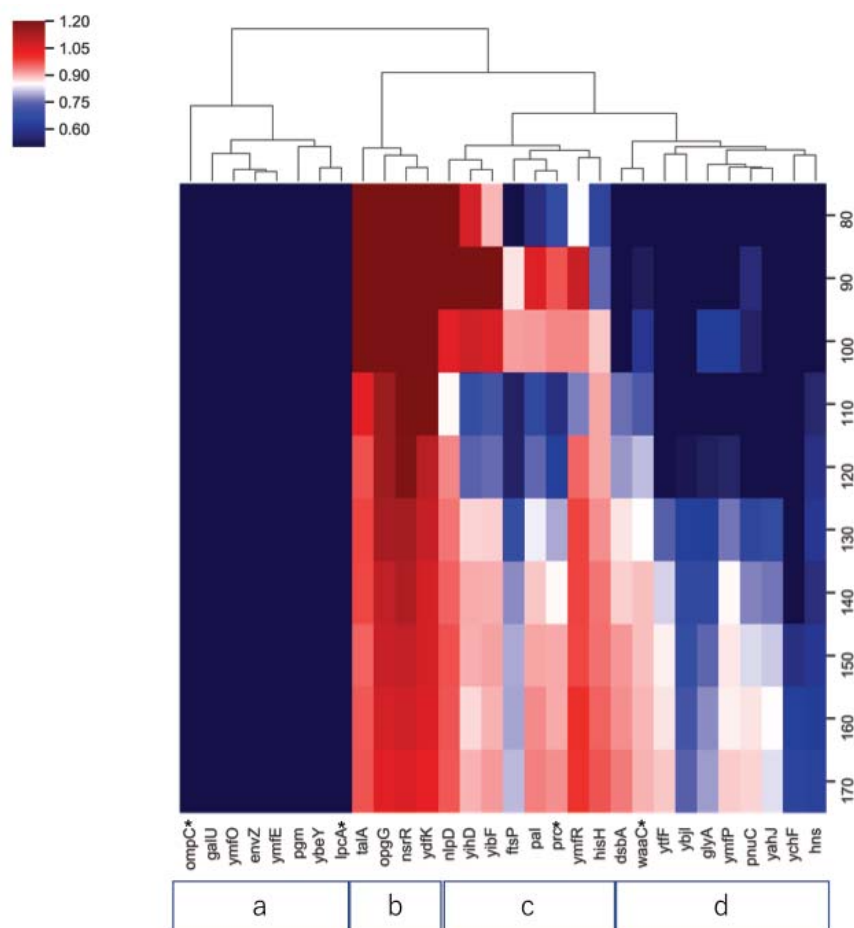


図 18. 候補株の溶菌パターンによるクラスタ解析  
 液体培地における MOI = 0.01 の時の溶菌パターンについて 80 分から 170 分の FI を用いて、Ward 法によるクラスタ解析を行った。濃い青色になるほど低い FI を、濃い赤色になるほど高い FI を示す。\*はこれまで耐性を有することが知られている遺伝子。

### 2-3. T4 フェージへの影響が低い欠失株の溶菌パターン

3回のスポットティングテストにおいて、一回のみ検出された候補株はFIが1付近の傾向にあった(図19)。このような欠失株では、液体培地でのOD減少パターンが野生型と似ているため、溶菌度合いの比較が難しい。そこで、FIの値で候補株の耐性度を評価した。

スポットティングテストで3回のうち2回検出された候補株 $\Delta waaC$ 、 $\Delta dsbA$ をFIのコントロールとして一回のみの候補株と比較した。 $\Delta waaC$ と $\Delta dsbA$ は比較的低いFIを示したが、これらの欠失株の値を下回る株も存在した(図19 A-D)。MOI=0.1と比較してMOI=0.01条件下ではFIが1を下回る株の数が多いたことが示された(図19 C、D)。幾つかの候補株(*waaE*、*greA*、*dnaQ*、*ihfB*など)では、MOI=0.1、0.01ともに、1を大きく下回っていた(図19 C、D)。 $\Delta ihfB$ は、*ihfA*との二重遺伝子欠失株でT4フェージに耐性を有することが報告されていたが、 $\Delta ihfB$ の一遺伝子欠失株でも、WTと比較して溶菌しにくいことがFI値より示された。*dnaQ*は、DNAポリメラーゼのコアサブユニットであり、*greA*は転写の補助因子としてRNAポリメラーゼと相互作用するため、これらの遺伝子が欠失することでT4フェージのゲノム複製や転写に影響を与えている可能性が考えられる。さらに、*dnaQ*においてはDNAポリメラーゼIIIのDNAの十分な合成速度を保つために必要である。T4フェージのDNAポリメラーゼとDnaQが相互作用するか否かは未解明であるが、T4フェージDNAポリメラーゼの伸長速度にも影響を与えるのではないかと考えられる(Studwell and O'Donnell, 1990)。

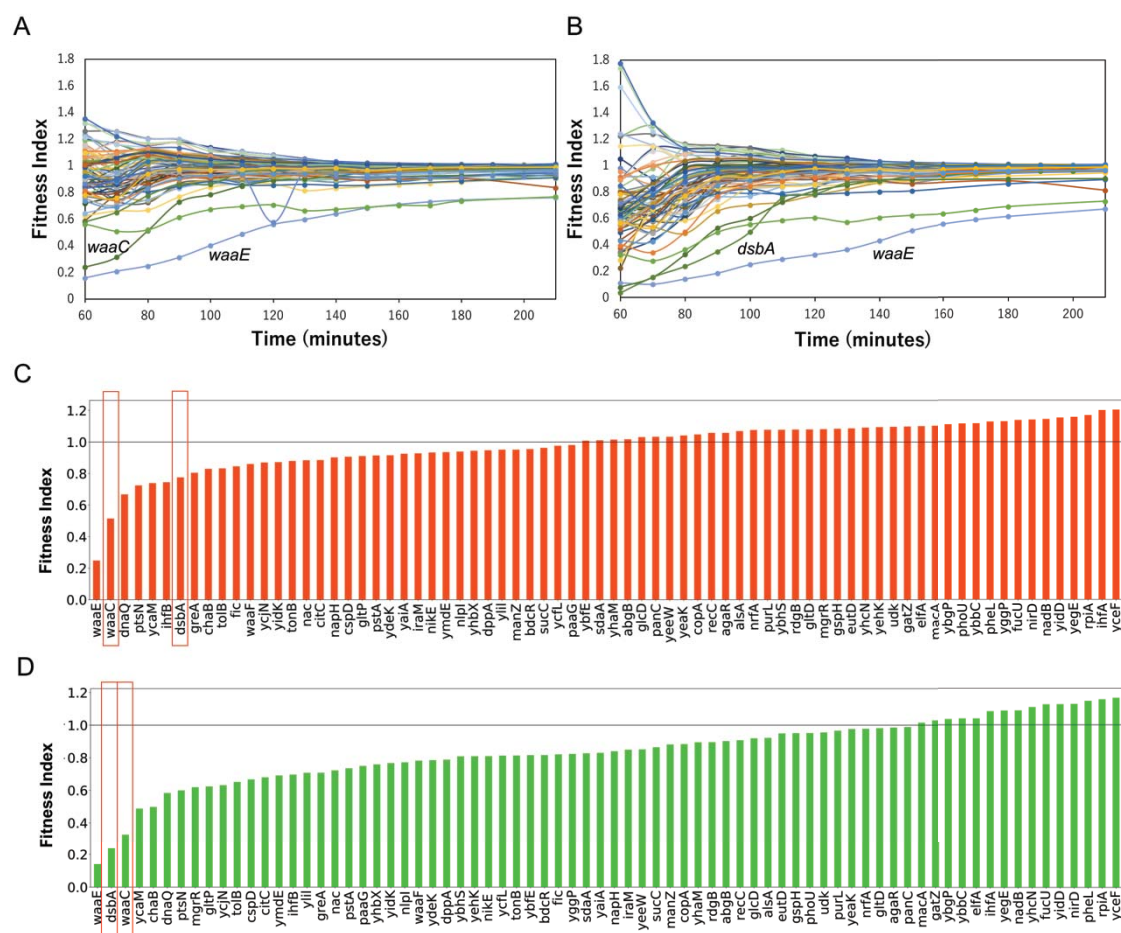


図 19. スポッティングテストで一回のみ検出された候補株における FI の比較  
 A. MOI = 0.1, B. MOI = 0.01 でそれぞれファージを感染させた際の候補株の継時的な FI。C. MOI = 0.1, D. MOI = 0.01 の条件において、感染後 80 分経過後の FI を比較した。比較のために 2 回検出された  $\Delta waaC$  と  $\Delta dsbA$  の FI をコントロールとして示した (C と D の赤枠)。

### 3. 候補に挙げられた変異株の EOP 測定

大腸菌の野生型及び変異株に T4 ファージを感染させ、プラークの数を比較し、それぞれの変異株の EOP を算出した (表 8)。LPS の受容体の生合成に関わる *galU* の欠失株では EOP が 0.01 未満となりプラーク形成効率が非常に低いことが示された。一方、*ompC* 欠失株においては受容体であるにもかかわらず、0.2 以上であった。つまり、少なくとも T4 ファージの 20%程度は  $\Delta ompC$  株に感染し、プラークを形成したことを意味する。実際に、K-12 株と  $\Delta ompC$  で感染効率はほぼ変化が生じないという報告があり、OmpC に依存しない感染

が示唆されているが(Gentles et al., 2013)、本実験においても $\Delta ompC$ においてプラークが形成されたことから、OmpC タンパク質に非依存的な感染様式で感染することが予想される。 $\Delta pgm$  の EOP は 0.5 未満となったが、Pgm は GalU の基質となる代謝産物を合成するため、欠失すると LPS の合成量低下につながると思われる。

*ompC* 遺伝子を正に制御する *envZ* の欠失株においても高いプラーク形成効率を示した。液体培地における OD 測定では、*ompC*、*envZ* の欠失株では *galU* 欠失株同様に非常に強い耐性を示したが、EOP 解析の結果、*ompC* もしくは *envZ* の欠失株は *galU* 欠失株と比較して 10 倍以上も効率的にプラークを形成している事から、T4 ファージの *ompC* への依存性は、液体培地か固体培地かといった感染する際の物理的な環境によって変化する可能性が考えられる。また、液体培地の感染実験で、強い耐性を示した *ymfO*、*ymfP*、*ymfR* 欠失株の EOP も低く、*ymf* 遺伝子群は T4 ファージの増殖になんらかの影響を与えていることが示唆された。幾つかの欠失株ではプラークサイズが野生型と比較して非常に小さい結果となった(表 8 の Plaque size) が、これは合成された子ファージの吸着効率が非常に悪い、若しくは野生型と比較して一細胞あたりに合成される子ファージの数(バーストサイズ)が少ないためであると考えられる。

**表 8. 候補株の EOP 測定**

No plaque はプラークが形成せず、検出限界以下であることを示す。-は野生型と同様のプラークの大きさであることを示す。

$\Delta gene$	EOP	Plaque size
<i>ymfE</i>	No plaque	
<i>galU</i>	0.0015	small plaque
<i>ymfO</i>	0.027	small plaque
<i>prc</i>	0.039	small plaque
<i>ymfR</i>	0.065	small plaque
<i>ymfP</i>	0.17	small plaque
<i>ompC</i>	0.24	-
<i>pgm</i>	0.27	small plaque
<i>nlpD</i>	0.35	-
<i>ybeY</i>	0.36	-
<i>envZ</i>	0.80	-
<i>glyA</i>	0.86	-
<i>ybjI</i>	0.97	-

#### 4. 候補株が影響を与える感染段階の推定

スポットスクリーニングにより、これまで T4 ファージの感染に影響を与える報告のない候補株が数多く検出された。続いて、これらの遺伝子が感染サイクルのどの段階に影響を与えるかについて見積もるために、吸着アッセイによる吸着段階に影響を与える候補株及び一段階増殖実験による子ファージの生産に影響を与える候補株を調べた。

##### 4-1. 吸着アッセイによる吸着効率の評価

得られた幾つかの候補株では、新たに T4 ファージの吸着に影響を与えると考えられる LPS 合成に関与する遺伝子群や *envZ* 欠失株など、*OmpC* の発現に影響を与える遺伝子が検出されたため、これらの候補株が実際に吸着効率に影響を及ぼすかを評価した (図 20)。

T4 ファージは大腸菌に不可逆的に吸着し、不活化する。つまり吸着したファージは他の細胞に感染することができなくなる。一方、未吸着のファージは不活化していないため、吸着能力を有する。したがって、ファージと大腸菌を混合した後、遠心により吸着ファージと大腸菌を一緒に沈殿させることで、上清に残存する未吸着ファージの数を計測することが可能である。

未吸着ファージを測定した結果、T4 ファージは野生型の大腸菌に効率良く感染し、8 分後における未吸着ファージの割合は添加したファージの 1.8%程度であった。一方、LPS の修飾された glycerol- $\beta$ -D-manno-heptose 合成に関与する遺伝子 (*lpcA*、*waaE*) の欠失株では、未吸着ファージが 40%程度残存していた。 $\Delta lpcA$ 、 $\Delta waaE$  の吸着効率の結果から、T4 ファージの吸着により影響を与える LPS の構成要素として inner core に位置する修飾された heptose が T4 ファージの吸着に重要であることが示唆された。*lpcA* もしくは *waaE* 欠失株の LPS 構造は主に 2 種類存在すると考えられる。一つは、修飾されていない heptose を有する LPS、二つ目は heptose の上側に糖が結合していない LPS である。後者は inner core が欠落しているため、T4 ファージの吸着効率の顕著な減少を招くと考えられる。

*ompC* の発現を負に制御する  $\Delta envZ$  では、吸着開始から 8 分後でも 50%以上が未吸着の状態であった。 $\Delta ompC$  においては、2 から 8 分の間で、未吸着ファージが減少せず、60%以上のファージが上清に残り続けていた。LPS の生合成に関与する  $\Delta galU$  と  $\Delta pgm$  における未吸着ファージは感染 5 分後にそれぞれ 30%、8%

となり、最も吸着効率のよい $\Delta pgm$ においても野生型と比較して4倍程度の吸着効率の減少が観察された。PgmはGalUの基質となる代謝産物を合成するため、欠失するとLPSの合成量低下につながると考えられる。

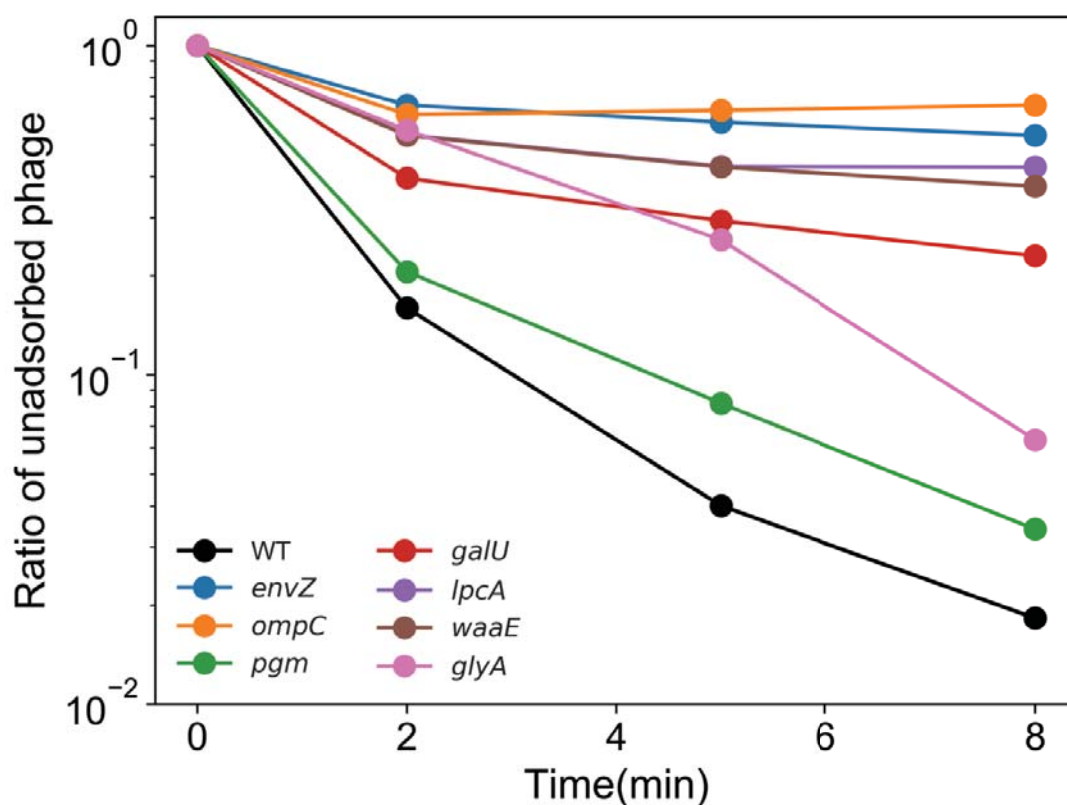


図 20. 候補株の T4 ファージの吸着アッセイ

それぞれの候補株と T4 ファージを混合した時間を 0 分として、未吸着ファージを計測した。最初に添加したファージ数に対するファージ数に対する未吸着のファージの比を算出した。

#### 4-2. 候補株の一段階増殖実験

得られた候補株の子ファージ生産効率を調べるために、一段階増殖実験を行った。また、吸着効率に影響を与える新規の遺伝子群を調べるために、一段階増殖実験と同時に候補株の吸着効率も測定した。クロロホルム処理した場合、宿主がクロロホルムにより溶菌するため、宿主内部に存在する子ファージを外部に放出する事ができる。一方、クロロホルム処理無しではファージの溶菌酵素によって外部に放出されたファージのみを計測できる。通常、T4 ファージは

大腸菌と混合後 10 分以内に吸着し、その後 5~10 分程度の潜伏期を経て、20 分程度まで増殖を続ける。感染後 30 分にはファージの合成が停止するが、この時期を定常期（プラトー期）という。この時感染細胞あたりの子ファージの生産数をバーストサイズという。バーストサイズは、ファージの種類や温度、環境条件、宿主の生理状態などで変化するが、同条件下では常に一定の値を有する。通常、LB 培地における野生型大腸菌に感染した T4 ファージのバーストサイズは約 100 程度であることが知られている(Ellis and Delbruck, 1938)。得られた欠失株に対して一段階実験と吸着アッセイを行う事で、それぞれの候補株における、吸着効率や増殖時間、バーストサイズなどがわかるため、T4 ファージの感染・増殖の各ステップにおける宿主遺伝子欠失の影響を知る事ができる。

宿主側の受容体である OmpC をコードする遺伝子 *ompC* や LPS の合成に関与する *galU* などの欠失株においては、野生型と比較して 10 倍ほど吸着効率が低下した (図 21 A)。また、グルコース-6P からグルコース-1P に変換する酵素をコードする遺伝子の欠失株  $\Delta$ *pgm* では液体培地での感染実験から予想された通り、野生型と比較して吸着効率が 3 倍以上低下しており、吸着効率に影響を与えていることが示された。また、タンパク質翻訳に関わる *ybeY* や転写伸長因子をコードする *greA* の欠失株において、未吸着ファージがそれぞれ 60 %、30%程度存在しており、吸着効率は野生型と比較してそれぞれ約 10 倍と 4 倍程度低下していた (図 21 A)。*greA* の欠失株は吸着効率に影響を与えるが、一段階増殖実験の結果、プラトーに達するまでの時間が遅くなり (図 21 B)、バーストサイズも低下していた事から、 $\Delta$ *greA* は吸着効率と子ファージ生産の両方に影響を与える事が示された (図 21 B、C)。一方で、*ymf* 遺伝子群は、野生型と同程度かわずかに吸着効率の上昇が認められた (図 21 A)。また、 $\Delta$ *ompC* と  $\Delta$ *envZ*、 $\Delta$ *ybeY* は吸着効率が顕著に減少しており (図 21 A)、一段階増殖では、0 分と 8 分におけるプラーク数がその他の変異株よりも多く検出されたことから (未吸着ファージが混在していると考えられる)、バーストサイズの測定が困難であると考え (図 21 B-b)、バーストサイズを表記していない。

一段階増殖実験の結果、多くの候補株においてバーストサイズが低下した (図 21 B-a)、C)。これまでの T4 ファージの研究において、子ファージ生産の低下する遺伝子の候補株は報告が非常に限られていたが、本研究のスクリ

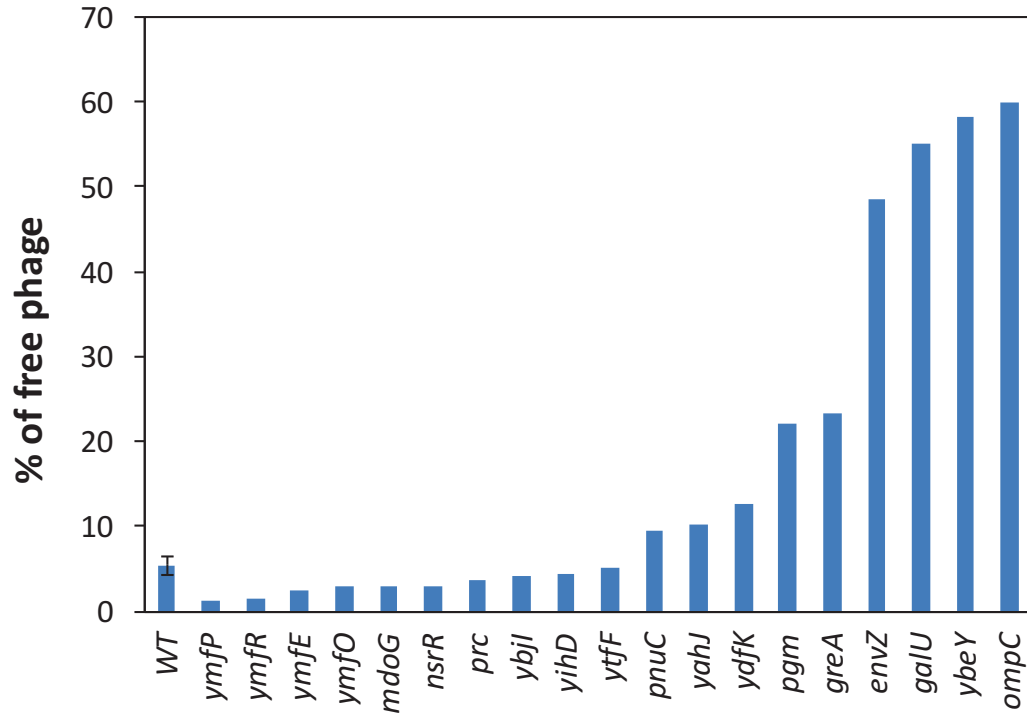
ーニングで得られた候補株の多くは、受容体関連だけでなく、ファージの生産に影響を与える遺伝子群の検出が例証された(図 21 B、C)。T4 ファージは宿主の RNA ポリメラーゼやリボソームを借りるため、感染効率は宿主の転写や翻訳の効率に影響を受ける。転写や翻訳関連の欠失株がバーストサイズを減少させたかを評価したところ、*ychF* などの翻訳に関わる遺伝子の欠失株はバーストサイズが減少していた(図 21 C)。したがって、 $\Delta ychF$ 、 $\Delta greA$  や  $\Delta ybeY$  など、T4 ファージの感染効率がこれらの遺伝子産物に転写や翻訳遺伝子に大きく影響を受ける事が示唆された。

*Prc* は、tail-specific protease であり、欠失すると溶菌がうまく進行せず、見かけ上の平板効率が減少することが報告されている(Slavcev and Hayes, 2003)。*prc* の一段階増殖実験ではクロロホルム未処理のプラーク数が、クロロホルム処理のプラーク数よりも減少していることから、これまでの報告通り、*prc* は溶菌の段階に影響をあたえていると考えられる(図 21 B-a) )。一方で、その他の候補株においては、クロロホルムの未処理と処理ありの条件下でプラークサイズが大きく変化しているものは存在せず、溶菌段階に影響を与える候補株は  $\Delta prc$  以外は見つけれられないという結果となった。

*yfmE* と *yfmP* 遺伝子の欠失株は、バーストサイズが減少することが示され(図 21 B-a)、C)、子ファージの合成量に影響を与えることが示された。一方で、 $\Delta ymfR$  と  $\Delta ymfO$  は野生型と同程度のバーストサイズとなり、*ymf* 遺伝子の種類によってバーストサイズが異なるため、*ymf* 遺伝子領域の中でも欠失する遺伝子の種類によって、子ファージ生産効率の影響力が異なる事が示唆された。おそらく、*ymf* 遺伝子のファージ耐性化のメカニズムがそれぞれの prophage 遺伝子(領域)で異なるものと思われる。

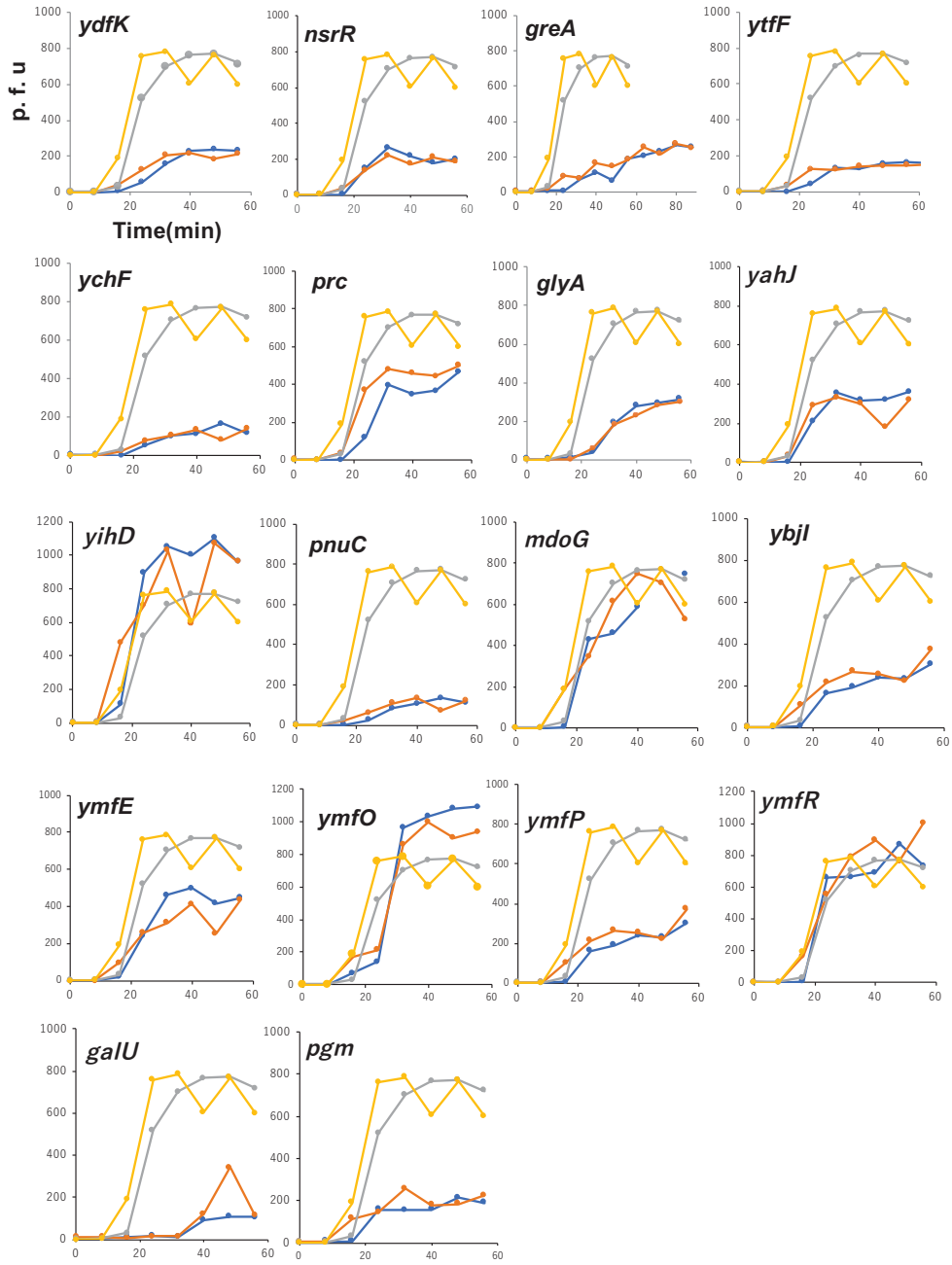


A

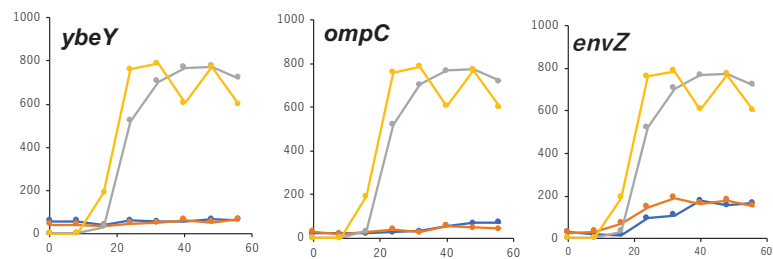


B

a)



b)



C

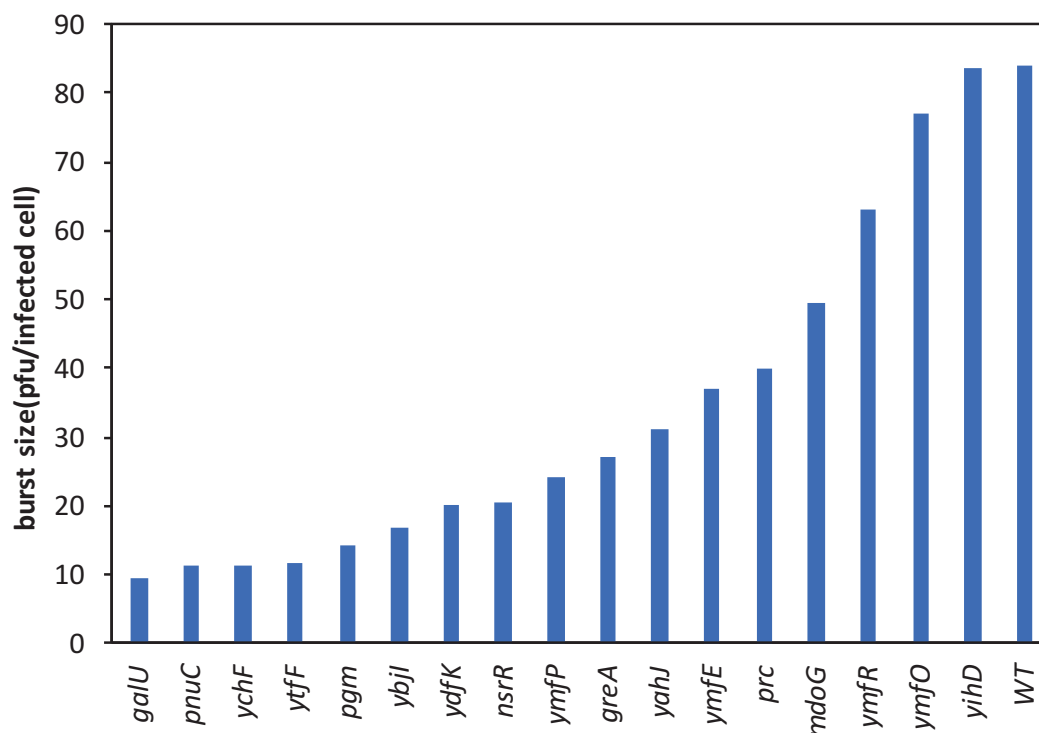


図 21. 候補株の一段階増殖実験および、吸着効率の比較

A. それぞれの吸着効率の比較。ファージを添加してから 5 分後の未吸着ファージを示している。Free phage は未吸着のファージを意味しており、たとえば野生型では添加した約 95% のファージは吸着したことを意味する。B. 一段階増殖の結果。それぞれの候補株における子ファージの増加を示した。黄色と灰色がそれぞれ野生型の大腸菌におけるクロロホルム処理ありとなしの結果を示す。また、赤色と青色がそれぞれ候補株でのクロロホルム処理ありとなしの結果を示す。C. それぞれの候補株におけるバーストサイズを測定した。バーストサイズの計算方法は材料及び方法を参照されたい。

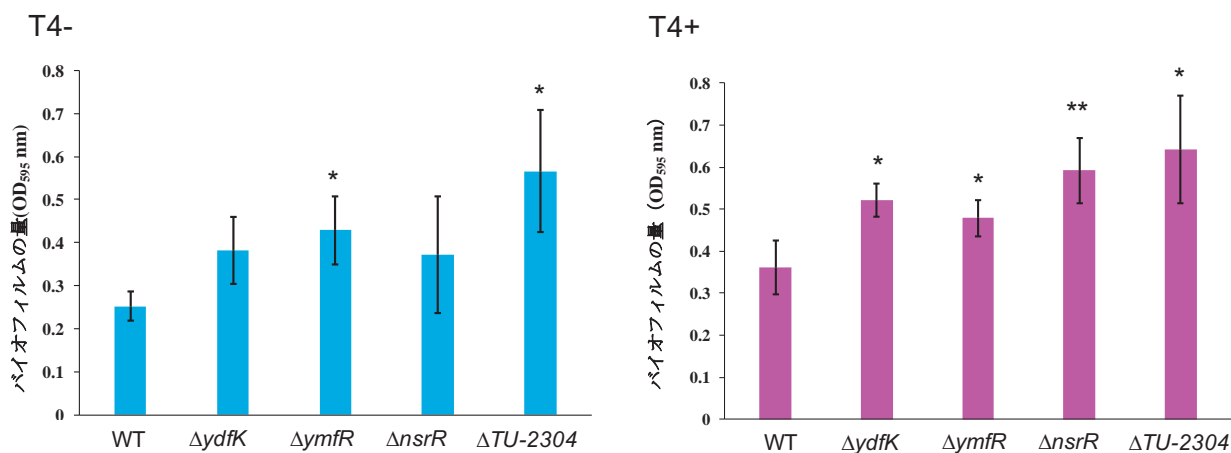
## 5. バイオフィームとファージに関する研究

### 5-1. バイオフィームアッセイ

スポットティングテストにおいて、幾つかの候補株のコロニーの形状が T4 ファージ存在下でムコイド状を示した（補足表）。このような株においては、固体培地上ではバイオフィームなどの細胞外高分子物質の合成量が増加し、T4 ファージの感染を防御しているのではないかという仮説を立てた。そこで、ムコイドの表現型を示した $\Delta ydfK$ 、 $\Delta ymfR$ 、 $\Delta nsrR$ 、 $\Delta TU-2304$  に対して、細胞外高分子物質の種類や存在量を評価した。初めに、これらの欠失株に対して T4 ファージの非存在下、もしくは存在下で培養した細胞のバイオフィームをクリスタルバイオレット法によって測定した。クリスタルバイオレットは主にバイオフィームの構成要素の一つである *exopolysaccharide* を染色するため、バイオフィームの定量にしばしば用いられる。

T4 ファージを混合していない場合、バイオフィームの量は、 $\Delta ymfR$  と  $\Delta TU-2304$  のバイオフィーム量が野生型と比較して優位に増加した ( $P < 0.05$ ) (図 22 A T4-)。 *TU-2304* (*ECS-078*) は sRNA であるが、*TU-2304* の転写方向の下流にムコイド形成に関与する *yrfF* が位置する (補足図)。 *TU-2304* は、*yrfF* のプロモーター領域上流の-35 の領域に重なりあって存在する可能性があるため (補足図)、*TU-2304* の欠失より、RNA ポリメラーゼの結合する-35 領域が欠けてしまい、下流の *yrfF* の転写に影響を与えている可能性が考えられる。 T4 ファージと混合して生育させた場合、全ての候補株のバイオフィーム量が WT と比較して有意に増加した (図 22 A T4+)。一方で、T4 ファージの添加の有無によるバイオフィーム量の増加率はどの候補株においても野生型と比較して統計的な優位差は確認されなかった (図 22 B)。これらの結果から、候補株は T4 ファージ存在下でバイオフィームの絶対量が WT よりも多く存在するが、*exopolysaccharide* の合成誘導は、野生型と同様であると考えられる。つまり、T4 ファージ存在下での *exopolysaccharide* の増加量は野生型と比較して同等であると考えられる。バイオフィームを形成する細胞外高分子物質の種類は *exopolysaccharide* 以外にも多様に存在するため、これらの候補株では、野生型と比較して細胞外を構成する物質が異なる可能性が考えられる。

A



B

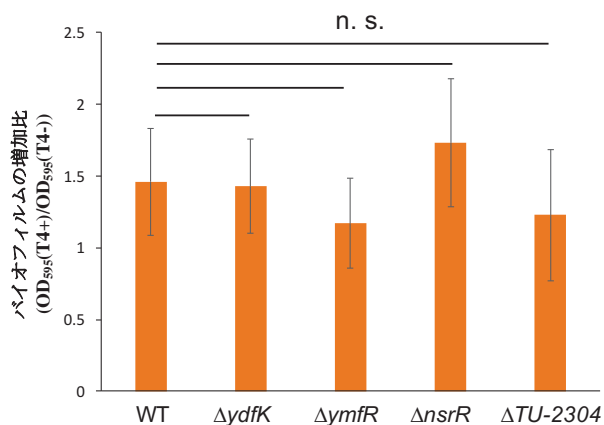


図 22. 候補株におけるバイオフィルムの定量

A. T4 フェージ非添加及び添加におけるそれぞれの株のバイオフィルムの定量。T4 フェージの有無によるバイオフィルムの増加比。B. T4 フェージ添加時のバイオフィルム量 / T4 フェージ未添加時のバイオフィルム量で計算した。エラーバーは 4 回の実験の標準偏差を表す。\*は  $P < 0.05$ 、\*\* は  $P < 0.01$ 、n. s. は優位差なしをそれぞれ表す。

## 5-2. バイオフィルム生産誘導培地とフェージ感染

バイオフィルムが誘導される条件下で、T4 フェージの感染効率が影響を受けるかを評価した。バイオフィルム合成を誘導する YESCA 培地上で T4 フェージと共に候補株を培養すると、T4 フェージ存在下でもほぼ一面に菌体が生育したが、LB 培地ではコロニーが数個しか観察されない結果となった (図 23)。したがって、YESCA 培地のようなバイオフィルム合成の誘導を引き起こす状況では、大腸菌のフェージに対する耐性が付与されることが示唆された。

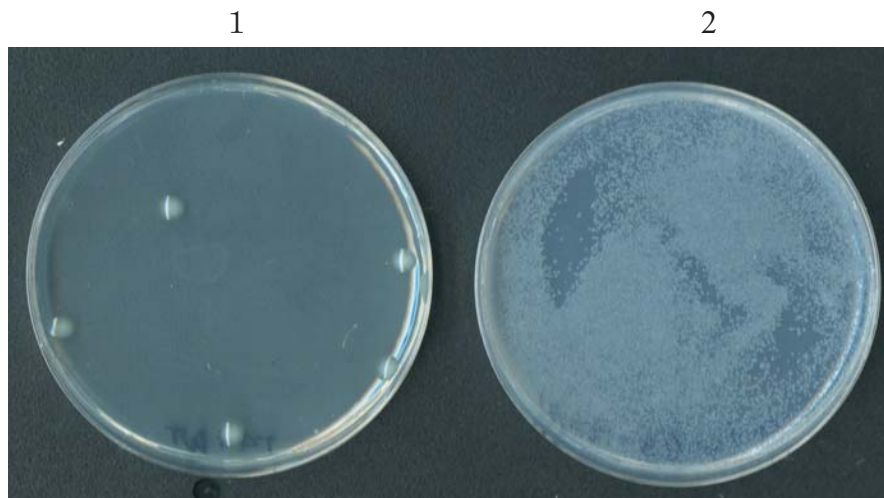


図 23. バイオフィルム合成誘導に伴う T4 ファージへの耐性の評価  
LB 培地 (1) と YESCA 培地 (2) における T4 ファージ耐性の違いの比較。LB 培地で一晩培養した野生型を 100  $\mu$ l、 $10^7$  pfu/ml の T4 ファージを 100  $\mu$ l をそれぞれの培地に添加した。

### 5-3. 細胞の密度評価

宿主の細胞密度が濃い場合、ファージの感染効率は減少することが報告されている(Bull et al., 2018)。また、バイオフィルムの量と細胞凝集に正の相関があることが示され(Sorroche et al., 2012)、したがって、凝集による高密度な細胞同士の集合体の形成は、バイオフィルムの形成と密接な関係がある。そこで、候補株が高密度の細胞集団を形成するかを評価するために、細胞凝集アッセイ (auto-aggregation assay) を行った (図 24)。細胞凝集アッセイは細胞が培養液の底に沈む能力を測定する手法で、しばしばバイオフィルムの形成能力 (細胞の凝集や沈着能力など) の指標として解析に用いられる(Tareb et al., 2013)。

候補株に対して細胞凝集アッセイを行った結果、LB 培地では沈殿は野生型と同様であったが、バイオフィルム形成が誘導される YESCA 培地では、*ydfK*、*ymfR*、*nsrR* の欠失株が、野生型と比較してより沈殿が生じていた (図 24)。また、野生型と比較してより沈殿していた株 (*ydfK*、*ymfR*、*nsrR*) において、上清の菌体の存在量も野生型と比較して減少していた (図 24)。

YESCA 培地は、低塩濃度でバイオフィルムの合成を誘導する環境であり、候補株は細胞がより密に集合する傾向が示された。T4 ファージの添加は宿主に

とって環境ストレスの一つであるため、細胞が凝集するような応答が引き起こされている可能性が考えられる。

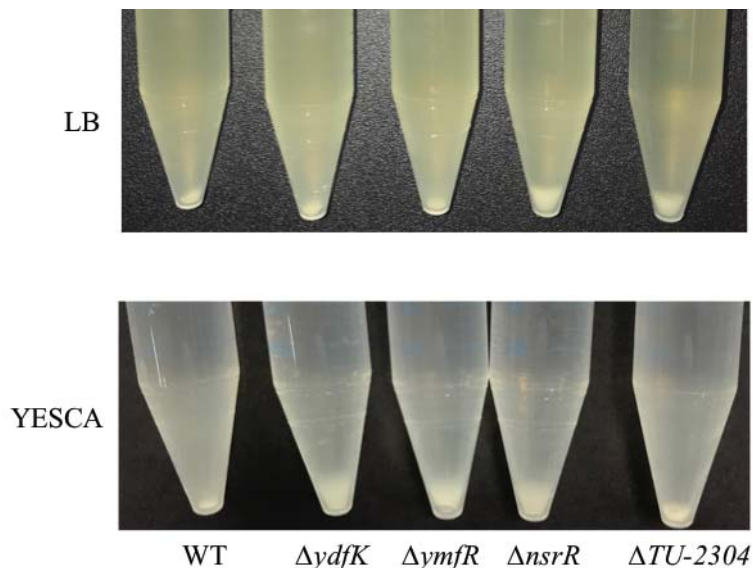


図 24. 細胞凝集アッセイの結果。

LB 培地と YESCA 培地で静置培養し、LB 培地は 24 時間、YESCA 培地では 48 時間静置培養し、細胞の沈殿を評価した。

#### 5-4. バイオフィーム内のタンパク質の比較

##### 5-4-1. 1.5 M NaCl の細胞毒性の評価

続いて、バイオフィーム内を構成する主要な成分である細胞外タンパク質の種類に変化が生じている可能性があると考え、バイオフィームの量が上昇した候補株のバイオフィームを抽出し、細胞外タンパク質のパターンを比較した。構成タンパク質を Chiba らの方法で抽出し評価した(Chiba et al., 2015)。著者らは 1.5 M NaCl の溶媒で懸濁した場合においても、野生型大腸菌に対して毒性はなく、浸透圧による溶菌も起こらないことを実証している。しかし、本研究で用いた株において、1.5 M NaCl 処理による細胞への毒性が懸念される。また、溶菌が生じていた場合、細胞内のタンパク質が検出されてしまい、細胞外タンパク質との区別が困難になる。したがって、1.5 M NaCl 溶液が候補株に影響を与えるかを調べる必要があると考えた。そこで、細胞数の計測及び、生細胞を染色する SYTO 9 と死細胞を染色する PI(propidium iodide)を用いた live/dead staining 法により候補株に対する 1.5 M NaCl の細胞毒性を調べた。それぞれの

欠失株を一晩培養し、生理食塩水と 1.5 M NaCl のそれぞれの溶媒で懸濁後の細胞の生菌数を比較したところ、すべての株においてどちらの条件でも細胞数に差は見られない結果となり（図 25）、1.5 M NaCl の細胞毒性はないことが示された。また、蛍光顕微鏡下で生細胞と死細胞を live/dead staining kit を用いて区別した。70 %エタノールに曝露した大腸菌はほとんどが赤色に染色されており大部分が殺菌されたが、1.5 M NaCl で懸濁した細胞は、野生型と同様にそれぞれの候補株において PI ではほとんど染色されず、桿状の形を保持していた。したがって、1.5 M NaCl 溶液で処理をした場合でも、死細胞はほとんど存在せず、溶菌も生じないことが示された（図 26）。

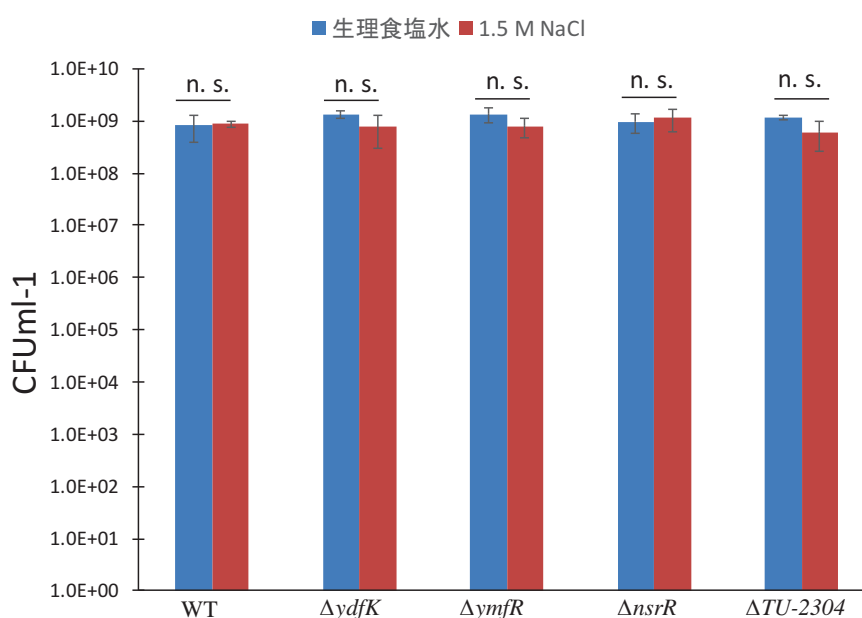


図 25. 1.5 M NaCl 溶液と生理食塩水の細胞数の比較

生理食塩水と 1.5 M NaCl 溶液を細胞の懸濁液として用いたときの細胞の数の比較。それぞれの候補株を一晩培養して、菌体を回収し、遠心分離した。その後、沈殿した細胞を生理食塩水、もしくは 1.5 M NaCl 溶液で懸濁し、細胞数を測定した。エラーバーは 3 回の実験の標準偏差を表す。n. s. は優位差なしをそれぞれ表す。



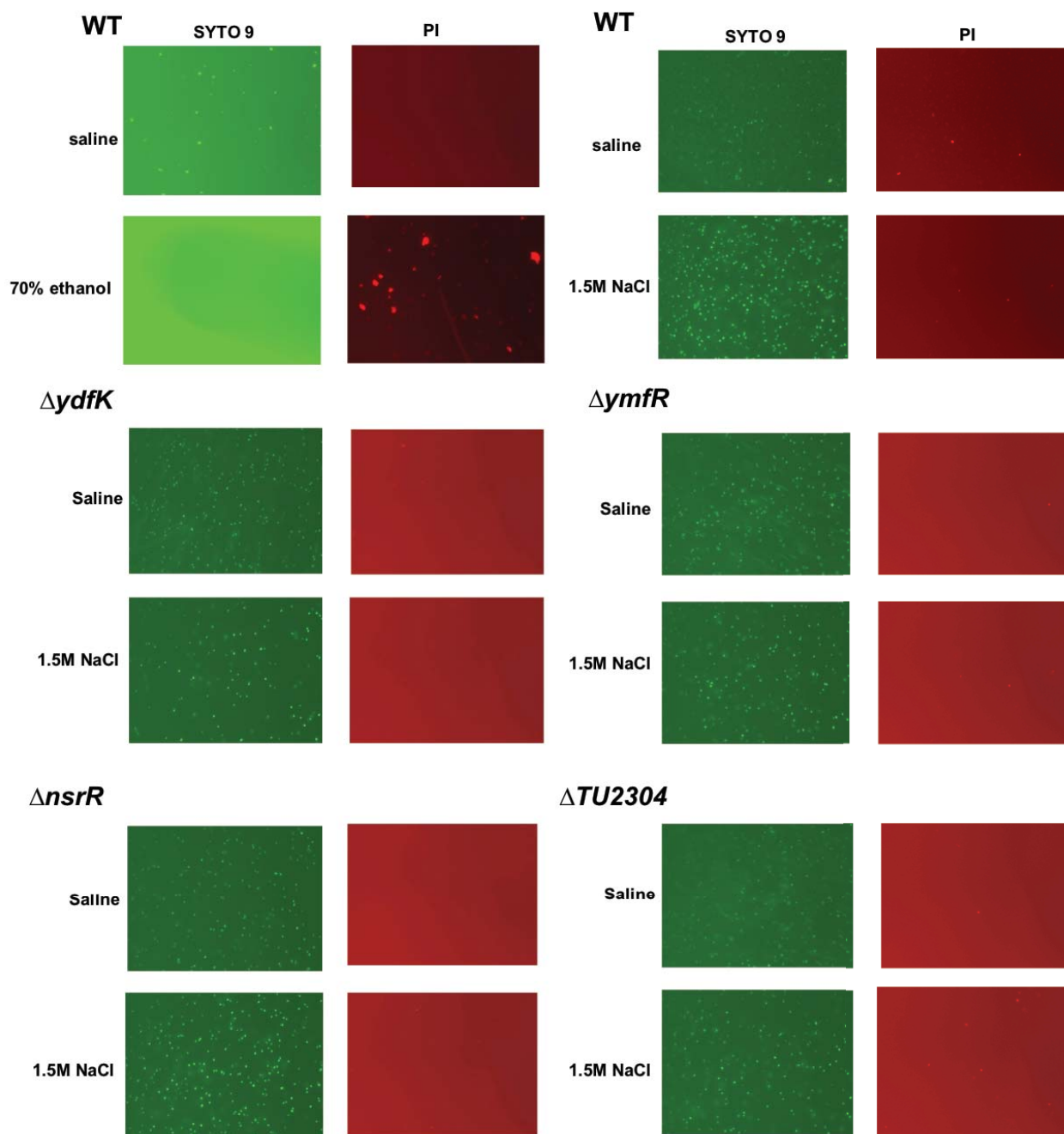


図 26. 1.5 M NaCl 溶液の細胞毒性評価

Live/Dead staining による 1.5 M NaCl 溶液の毒性評価。ネガティブコントロールとして 70 %エタノールに 5 分間曝露させ、Live/Dead staining による生死判定を行った。

#### 5-4-2. 候補株の細胞外タンパク質の抽出及び同定

5-4-1 で 1.5 M NaCl 溶媒の細胞毒性を示さないことが実証されたため、次に 1.5 M NaCl 溶液を用いて、WT、 $\Delta ydfK$ 、 $\Delta ymfR$ 、 $\Delta nsrR$ 、 $\Delta TU-2304$  のバイオフィルムを抽出した。今回は、個体培地と液体培地での静置培養で、かつ LB 培地とバイオフィルムの量を増加させる YESCA 培地の両方で実験を行った。バイオフィルムに存在するタンパク質を SDS-PAGE で展開したところ、 $\Delta ydfK$ 、 $\Delta ymfR$ 、 $\Delta nsrR$  の三つの株では 50 kDa 付近に野生型と比較して存在量の増加しているタンパク質が検出された（図 27 の赤い矢印の部分）。また、このタンパク質の存在量は、固体培地及び液体培地、また LB 培地及び YESCA 培地においても増加した（図 27）。候補株にのみ検出された 50 kDa のタンパク質を同定するため、得られたタンパク質のバンドを切り出し、トリプシン消化後、LC-MS/MS により解析したところ、鞭毛の主要な構成成分である FliC タンパク質であった。 $ydfK$  と  $ymfR$  に関してはこれまで FliC の発現を制御するという報告は存在せず、本研究によって初めて  $\Delta ydfK$  と  $\Delta ymfR$  における FliC の存在量の増加が示された。

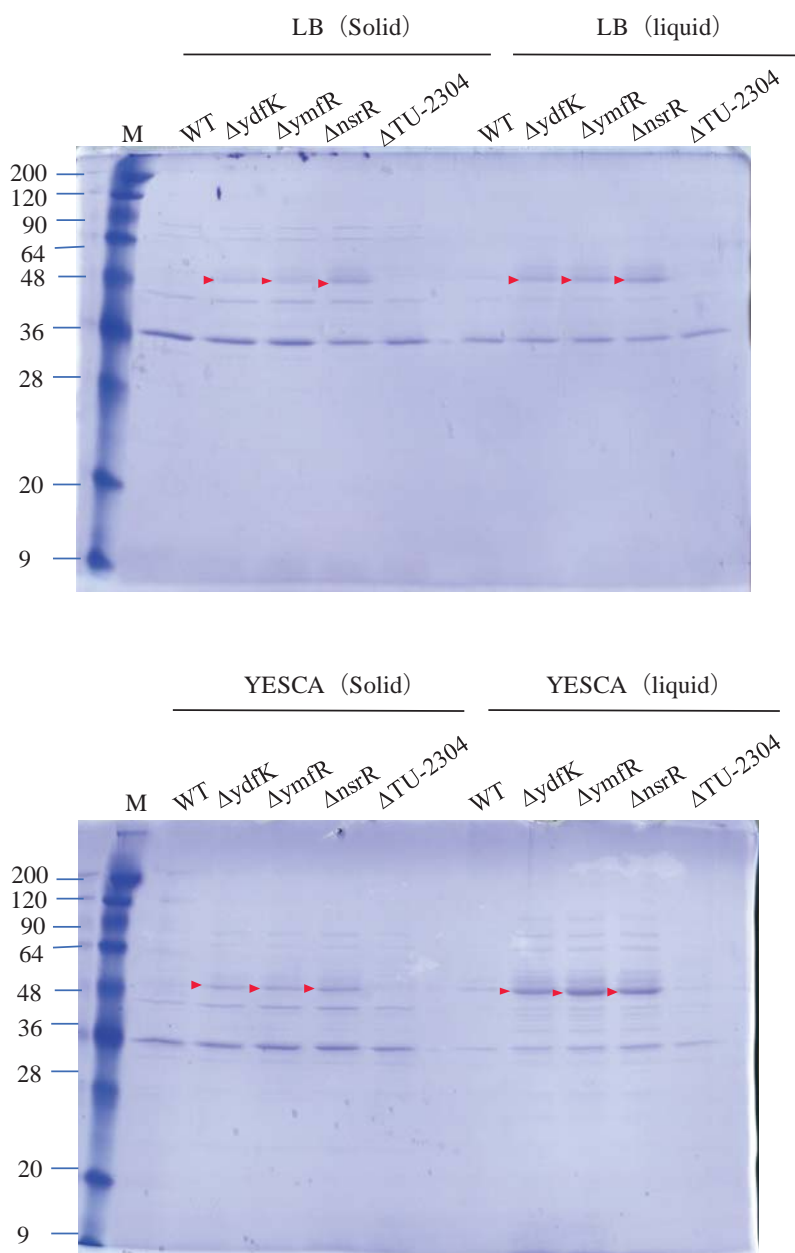


図 27. 細胞外タンパク質の比較

一晚培養した候補株をそれぞれ新しい培養液に移し、LB 培地では 24 時間、YESCA 培地では 48 時間培養した。その後、菌体を遠心により回収し、1.5 M NaCl 溶媒でバイオフィルムを抽出し 12% のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により、タンパク質を展開し、CBB 染色でタンパク質を検出した。赤い矢印で示した部分は、候補株において存在量の増加が観察されたタンパク質。

### 5-5. 鞭毛の欠失による T4 ファージへの耐性評価

FliC の存在量が増加した変異株  $\Delta nsrR$ 、 $\Delta ymfR$ 、 $\Delta ydfK$  に対して、*fliC* を欠失させた二重欠失株を作製し、T4 ファージへの感受性を評価した (図 28 A)。それぞれの二重欠失株では、候補株と比較して感受性が増加する傾向を示した (図 28 A)。耐性を有していた  $\Delta ydfK$  候補株が *fliC* を欠失したことにより、T4 ファージに感受性となることが示された ( $P < 0.01$ ) (図 28 A)。また、*nsrR* の一遺伝子欠失株と比較して、 $\Delta nsrR \Delta fliC$  株が T4 ファージにより感受性を示す傾向が示された ( $P < 0.05$ ) (図 28 A)。 $\Delta ymfR$  では T4 ファージ存在下で、寒天培地一面に菌が観察される菌叢の状態となったが、 $\Delta ymfR \Delta fliC$  では一面に溶菌する結果となった (図 28 B)。一方、 $\Delta fliC$  と WT との比較を行ったところ有意な差は生じなかった (n. s.) (図 28 A)。WT における FliC の存在量が低いため、 $\Delta fliC$  欠失株との感受性に差が現れなかったと考えられる。

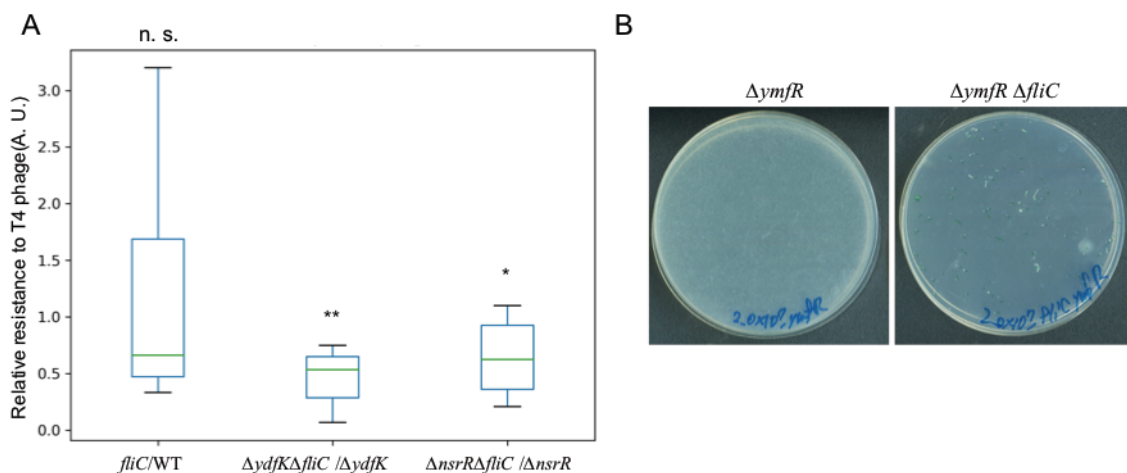
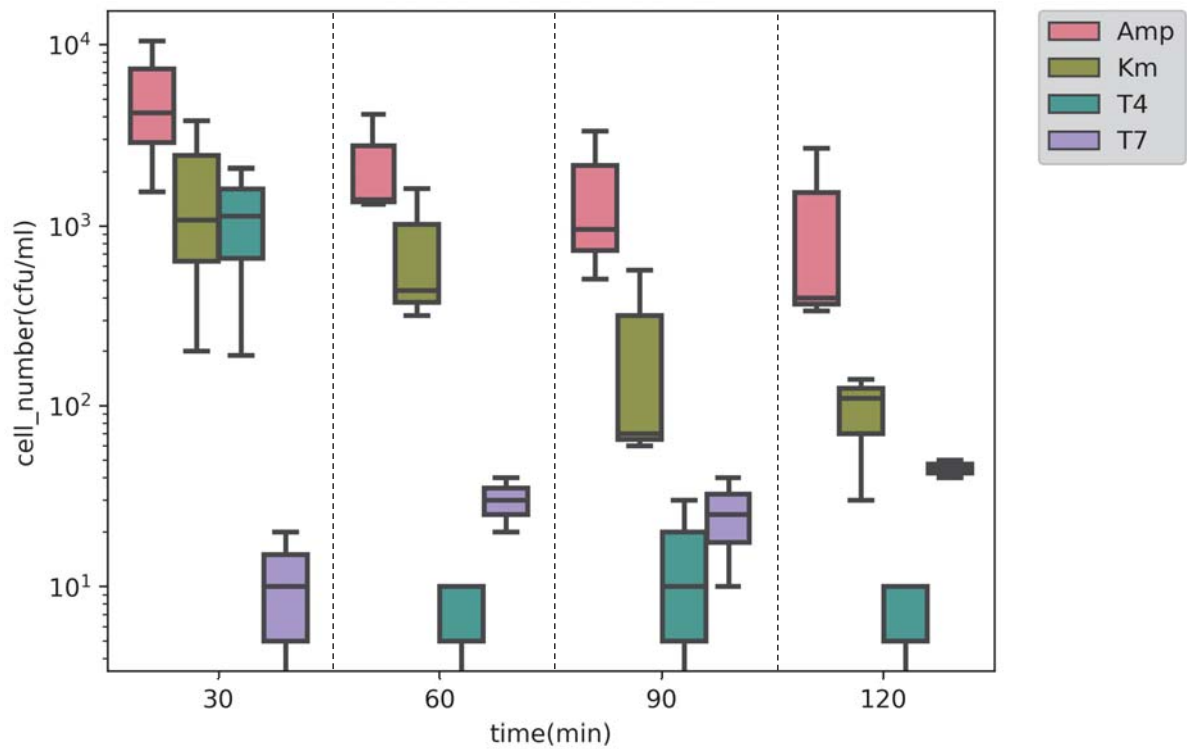


図 28. 候補株と *fliC* の二遺伝子欠失株の T4 ファージに対する感受性評価  
それぞれの候補株と *fliC* と欠失株を欠失させた二遺伝子欠失株をそれぞれ T4 ファージと混合し、LB 観点培地に塗布し、一晚培養後のコロニーを計測した。A. 二遺伝子欠失株で生じたコロニーの数を候補株で生じたコロニーで割った値でそれぞれ 6 回の実験を行った。\*は  $P < 0.05$ 、\*\* は  $P < 0.01$ 、n. s.は優位差なしをそれぞれ表す。B.  $\Delta ymfR$  と  $\Delta ymfR \Delta fliC$  の結果を示す。

## 6. ファージはパーシスタント細胞を死滅させる

パーシスタント細胞は、薬剤の存在下において死滅せずに生き残るが、ファージがパーシスタント細胞に感染し、死滅させることが可能かを評価した（図 29）。本研究で用いた薬剤は、パーシスターの解析に頻繁に用いられるアンピシリンおよび、パーシスター細胞が感受性を示すカナマイシンを使用した。また、ファージは T7 ファージと T4 ファージの二種類を使用した。野生型の大腸菌に薬剤もしくはファージを暴露し、30 分ごとに 120 分まで菌体を薬剤なしの培地に塗布し、一晚培養した。培養後得られたコロニーをパーシスターとして計測した。

暴露後 30 分における細胞の数は、アンピシリンやカナマイシンと比較して、T7 ファージに暴露した際に 100 倍ほど減少した（図 29）。一方、T4 ファージは抗生物質と比較して細胞数に大きく変化が現れないという結果となった。60 分経過すると、T4 ファージと T7 ファージに暴露したパーシスターの数は抗生物質と比較して大きく減少しており、90 分においても同様の結果となった。暴露後 120 分のパーシスタント細胞では、カナマイシンと T4 ファージ、T7 ファージがアンピシリンと比較して細胞数が減少していた。以上のことから、溶菌ファージに分類される T4 ファージと T7 ファージは、一定以上存在するパーシスターを 60 分以内に速やかに死滅させることが示され、これまでパーシスターに効果を表すカナマイシンと比較しても、短時間でかつ多くのパーシスターを死滅させることが示された。



**図 29. パーシスターの抗生物質及び、ファージに対する感受性**  
 薬剤には、アンピシリンとカナマイシン、ファージは T4 ファージと T7 ファージを使用した。抗生物質もしくはファージに野生型の大腸菌を暴露し、30 分ごとに、菌体を回収し、LB 寒天培地上に塗布後、翌日生じたコロニー数を計測した。3 回もしくは 2 回の実験を行った。

## 考察

### 1. スクリーニングの実験手法について

本研究のスポットスクリーニングは、T7 ファージの変異株取得の際に Qimron らが用いた方法に準じ、寒天培地上に T4 ファージを含む軟寒天培地を重層し、その上に Keio collection をスポットする手法を用いて行った(Qimron et al., 2006)。Maynard らは、 $\lambda$  ファージを用いて Keio collection の個々の株の EOP の減少を指標とした方法により、宿主細胞- $\lambda$  ファージの相互作用ネットワーク解析を報告した(Maynard et al., 2010)。EOP によるスクリーニングは、偽陽性が生じにくいという利点が考えられるが、T4 ファージは感染効率が多少低下した場合でもプラークを形成することが可能であるため、EOP の手法では耐性の低い株の検出に不向きである事や、ファージと大腸菌を混合し、プラークの数を数える必要があるため簡便な手法とは言えない。Keio collection 中の約 4000 株個々の細胞数を測定し、厳密に MOI を一定にしたスクリーニング法は、現実的には大きな困難を伴う。第一段階のスクリーニング法としてスポット法は非常に簡便で、さらに、添加するファージの濃度を調整することで、ファージの増殖にわずかな影響を与える遺伝子群の検出や、定性的ではあるが野生型ファージへの感受性の違いを比較することは可能である。

高濃度のファージ下でスクリーニングした場合、概して受容体の変異株などの強い耐性を示す遺伝子群しか得られない(Christen et al., 2016)。一方で、ファージ濃度が極端に少ない場合、培地上にファージが存在しない部分が生じ、偽陽性が増えるデメリットも考えられる。そこで、本スクリーニングを始めるにあたり、Keio collection の培養液と野生型大腸菌によるスクリーニング法に最適なファージ濃度の検討を行った。最終的に、寒天培地上の WT のコロニーが検出されず、かつ全面的に溶菌する低濃度 ( $5.0 \times 10^5$  pfu/ml) の条件で行ったため、偽陽性は最低限に抑えられていると考えられる。したがって、本スクリーニングは、受容体などの比較的強い耐性だけでなく、ファージの増殖にわずかな影響を与える遺伝子なども検出することが可能であり、本研究の重要な部分でもある。

## 2. スクリーニングで得られた遺伝子について

LB 培地において、3 回行ったスクリーニングの結果、3 回中 3 回検出された遺伝子は全体の候補株のうちの約 5%に相当する 7 遺伝子であった。2 回検出された遺伝子群は 25 遺伝子ほどが得られ、全体の約 20%程度となった。その他は一回のみ検出された。初期スクリーニングでの検出回数の違いは、それぞれの変異株の耐性度の違いや、軟寒天培地中の  $10^5$  粒子のばらつきによるものと考えられる。もしくは、スクリーニングの回によって培地上にスポットされる細胞数が異なるためである可能性も考えられる。

得られた候補株について、これまで欠失すると耐性を有すると報告のある遺伝子群について検出された。例えば、LPS の合成に関わる酵素群について、inner core の転移酵素である *waaC* と *waaF* が LB 培地と MOPS 培地の両方で検出された。さらに、outer core のグルコース転移酵素 *waaG* が検出されたことから、T4 ファージの吸着に重要な LPS の転移酵素は精度よく検出され、精確なスクリーニングが行われていることを示した。また、inner core の合成に関与する遺伝子 (*waaC*、*waaF*) が検出されたことから T4 ファージの感染には、これまでの報告の通り (Washizaki et al., 2016)、LPS の inner core が重要であることが本研究においても例証された。inner core の修飾された heptose 合成に関与する遺伝子群は、*lpcA* と *waaE* の欠失株が得られた。これらの欠失株の LPS の構造は、修飾されていない heptose を有する LPS、もしくは heptose の上側に糖が結合していない LPS で構成されている (Tamaki et al., 1971)。後者 (上側に糖が結合していない LPS) は inner core が欠落しており、T4 ファージの吸着効率の顕著な減少を招くと考えられる。*lpcA* と *waaE* が検出された一方で、同じ heptose の修飾の代謝経路上の *rfaD* (*waaD*) や、*gmhB* などは検出されなかった (図 12)。*rfaD* や *gmhB* は、修飾された heptose の合成量にあまり影響を与えない可能性も考えられる。また、大腸菌 K-12 株においては、OmpC も受容体として利用されることが知られており、本研究においても検出された。しかし、受容体にも関わらず、LB 培地では 3 回のうち 2 回、MOPS 培地では 4 回のうち 3 回のみ検出された。さらに、LB 培地で検出された  $\Delta$ *ompC* のコロニーの形状は欠けたような非常に小さいコロニー (uneven) (補足表) であり、ある程度は、感染し溶菌したと考えられる。したがって、T4 ファージは *ompC* を欠失させた変異株に対しても感染が成立していることがスクリーニング結果より示された。T4 ファージは、OmpC に依存しない感染が示唆されており、未だ解明さ



れていない吸着様式が存在すると考えられる(Gentles et al., 2013)。integration host factor(*ihfA*, *ihfB*)や、*hns*、*prc*などのこれまでに報告されている遺伝子群も検出され、T4 ファージの感染に影響があることが知られている遺伝子は、調べた限り全て得られた。このような遺伝子群は、子ファージの生産など、吸着段階以外の感染ステップに関与しているが、そのような遺伝子は報告例が少ない。実際にスクリーニングで得られた候補株の中でこれまで耐性化の報告のある遺伝子群（表 4、5 の赤色で示した遺伝子）は LPS 合成等に関連する遺伝子など、細胞壁関連のカテゴリ（M）に集中しており、ほとんどが受容体関連の遺伝子であることが改めて認識できる。一方、本研究で得られた遺伝子の中には、子ファージ生産に関わる遺伝子群が多く検出することができた。例えば、転写や翻訳に関与している遺伝子（*greA*、*ybeY*、*yehF*）の欠失株が検出された。これらの遺伝子は実際にバーストサイズが減少しており、T4 ファージの転写や翻訳に影響を与えていることが示唆された。また、*greA* と *ybeY* は吸着効率も減少していた（図 21 A）。吸着効率が減少する理由は定かではないが、*greA* は欠失すると、細胞内の glycogen の量が野生型よりも減少することが知られている(Eydallin et al., 2007)。glycogen は LPS の outer core における基質となる glucose (UDP-glucose) から合成されていることから、 $\Delta greA$  は LPS の基質が減少しているのではないかと考えられる。今回検出されなかった数多くの転写因子や翻訳関連のタンパク質装置が、T4 ファージの感染に影響を与えているかどうかについては今後のさらなる研究が必要である。また、LB 培地のスクリーニングでは、グルタミンやグルタミン酸の取り込みや代謝に関与する遺伝子の欠失株が検出された。これらの遺伝子の考察については後述するが、グルタミンやグルタミン酸の細胞内の量が重要であることが示唆された。一方で、その他のアミノ酸に関連する遺伝子で、濃縮して得られた候補株は存在しないという結果となった。アミノ酸に関与する遺伝子群（カテゴリ E）の中には、ジペプチドトランスポーター（*dppA*）や、セリンデアミナーゼ（*sdaA*）などが検出されたが、その他の遺伝子はまだ機能の解明されていない putative な遺伝子が大半をしめた。濃縮されたアミノ酸がグルタミンやグルタミン酸関連の遺伝子以外に存在しないという結果は、T4 ファージが特定のアミノ酸に影響を受けないことを示唆するものと思われる。本スポットスクリーニングで、e14 cryptic prophage 領域の *yml* 遺伝子（*ymlE*、*ymlO*、*ymlP*、*ymlQ*、*ymlR*）と Qin cryptic prophage 領域の *ydfK* 遺伝子の欠失株が得られた。これらの遺伝子

は、これまで T4 フェージ耐性に関わるという報告はなく、**prophage** を介した新たな宿主側の生存戦略を発見したと考えられる。また、これらの遺伝子は液体培地の溶菌パターンは、*ymfE* などでは、ほとんど溶菌が起こらないが、*ymfR* では野生型と同程度に溶菌した。また、バーストサイズがそれぞれの *ymf* 遺伝子によって異なることから、これらの遺伝子群は異なる感染段階に影響を与えている可能性も考えられる。

本研究では、スポットスクリーニングで得られた候補株に対して、さらに液体培養下における T4 フェージ耐性を評価した。受容体に関与しないと考えられる膜タンパク質 (*nlpI*、*nlpD*、*tolB*、*pal*) などは、液体培地上で野生型と比較して OD の減少度合いに大きな差が見られなかった。これらの遺伝子群は膜タンパク質であり、欠失株は細胞壁を不安定化し OMV を多量に生み出すことで、T4 フェージの OMV 吸着による不活化を招くと考えられる(Manning et al., 2011)。少なくとも、*nlpI*、*tolB*、*pal* の変異体は非常に多くの OMV を生み出すことが報告されている(McBroom et al., 2006)。このような特徴を有する(耐性度の低い)候補株は、液体培地の溶菌パターンでは、野生型との区別が困難であり、液体培地条件下でスクリーニングしても見過ごしてしまう可能性が高い。このことは、固体培地と液体培地といった物理的な環境の違いによって検出の感度が異なる、また、耐性に寄与する遺伝子が異なる、などを暗示しており、スクリーニング系の選択の重要性を示唆するものである。

T4 フェージの組み立てに必須であるシャペロニン GroEL は、宿主の大腸菌の生育に必須な遺伝子であるため、一遺伝子欠失株として Keio collection に存在しない。このように、大腸菌約 300 個の必須遺伝子については、Keio collection には存在せず、それらの遺伝子が T4 フェージにどのような影響を与えるかについての解析は、今後の研究が必要である。

本スクリーニングにおいて、これまで T4 フェージの感染に影響を与えるという報告のない遺伝子が多数検出されたことから、本研究は宿主側のどのような因子が T4 フェージの増殖に影響を与えるかといった全体像を明らかにするための一助となると考えられる。

### 3. これまで報告のない遺伝子群について

#### 3-1. アミノ酸代謝とフェージの増殖への影響

本研究で使用した培地は、栄養が豊富な LB 培地と貧栄養培地である MOPS 培地の二種類である。LB 培地で得られた候補株の中にはグルタミン酸やグルタミンの生合成に関与する遺伝子が多く検出された (*gltP*, *hisH*, *ycaM*)。これらの遺伝子群は COG による分類では、アミノ酸代謝とトランスポーターに分類されている。また、*abgB* は COG では機能未知に分類されているが、N-(4-aminobenzoyl)-L-glutamate から 4-aminobenzoate と L-glutamate への開裂を触媒する遺伝子であることが既に報告されている(Riaz et al., 2019)。グルタミンは、DNA の前駆体であるプリンヌクレオチドの土台となる 5-phosphoribosyl 1-diphosphate (PRPP) から出発する *de-novo* 合成の最初の反応にグルタミンが用いられる。したがって、これらのグルタミン生合成に関わる遺伝子群は DNA の合成に影響を与える可能性がある。さらに *abgB* は DNA 合成に重要な葉酸の代謝に関与しており、欠失による葉酸の枯渇から T4 ファージの DNA 合成機能の低下を招く可能性が考えられる。

大腸菌における細胞内の窒素源の 88%はグルタミン酸、残りはグルタミン由来であることが知られている(Prusiner et al., 2006)。今回検出されたグルタミン酸やグルタミンに関与する遺伝子群の欠失によって細胞内のグルタミン酸やグルタミン量が低下し、利用可能な窒素源の低下によるアミノ酸合成量の不足から、ファージ生産の減少をもたらしたものと考えられる。また、窒素源に関与する *nac* (nitrogen assimilation control) 遺伝子の欠失株が得られた。Nac は、窒素源の飢餓状態に応答し、窒素同化やタンパク質の分解など、細胞内の利用可能な窒素量を増加させる遺伝子群を制御する転写因子である(Zimmer et al., 2000)。このように、窒素源の低下や飢餓が予想される候補株が複数検出されたことから、ファージの感染は、宿主の窒素源に影響を受けると考えられる。

*glyA* の欠失株は、吸着段階に影響を与えていることが本研究により示され、アミノ酸代謝に関与する遺伝子でも、T4 ファージの感染サイクルに影響を与える段階が異なることが予想される。

### 3-2. カリウムやカチオンに関与する遺伝子

カリウムは細胞の浸透圧の調節のみならず、DNA ポリメラーゼの活性や効率的なタンパク質合成に必要なイオンで、大腸菌の正常な代謝を行うためには細胞内に 200 mM ~ 400 mM の濃度が必要であると考えられている(Ravish et al., 2016; Rhoads et al., 1976)。冒頭で述べたように、T4 ファージ増殖は種々のカ

チオン濃度によって感染効率が変化する。例えば、細胞内のカリウムイオン濃度が 150 mM 程度まで減少すると、細胞内の T4 ファージ生産効率が減少する。本スクリーニングにおいて、カリウムのトランスポーターに関与する遺伝子が幾つか検出された (*ptsN*, *chaB*)。 *chaB* はカチオントランスポーターの regulator として *chaA* などのトランスポーターの発現を制御している。トランスポーター *ptsN* は、carbohydrate phosphotransferase system の一つであり、2010 年に Lee らは、*ptsN* の欠失株が  $\sigma^s$  の制御下にある多くの遺伝子の発現量を増加させることを報告した(Lee et al., 2010)。これらの遺伝子の発現パターンの変化は、*ptsN* を介した細胞内のカリウム濃度の変化により  $\sigma^{70}$  と  $\sigma^s$  が RNA ポリメラーゼへ競合的に結合するために生じる変化である。 $\Delta ptsN$  は、 $\sigma^s$  の優位な RNA ポリメラーゼへの結合を示す(Lee et al., 2010)。一方、T4 ファージは、感染初期と中期の転写に  $\sigma^{70}$  転写因子を利用する。このような知見を含めて考えると、今回のスクリーニングで検出された  $\Delta ptsN$  などでは、細胞内のカリウム濃度の上昇(Ravish et al., 2016)により、 $\sigma^{70}$  の選択性が下がる事で T4 ファージの初期および中期の転写が低下した結果、ファージの感染効率が減少したと考えられる。カリウムトランスポーターは、現在 TrkAEGH、KdpFABC そして Kup(TrkD)の輸送系が知られているが、これらの遺伝子群は今回のスクリーニングでは検出されなかった。*trkA* は Trk カリウムトランスポーターの NAD 結合コンポーネントとして機能しているが、 $\Delta trkA$  の細胞内カリウムイオン濃度は野生型と比較して 12%程度の減少にとどまる(Durand et al., 2016)。おそらく T4 ファージの増殖効率に影響を与えるほどカリウム濃度が低下しないため、スクリーニングでは検出されなかったと考えられる。また、カルシウムイオン輸送体には他に Kdp や Kup が存在し、冗長な構成を取っているため、本スクリーニングでは検出されなかったと考えられる。

### 3-3. T4 ファージの DNA 合成に関する考察

T4 ファージは、LB 培地などの富栄養的な条件下では一細胞あたり約 100 個の子ファージが生産される。T4 ファージは、自身のゲノム合成のために分解した宿主の DNA 分解産物を利用することが知られているが、1 細胞あたりに生じる 100 個の T4 ファージゲノムの長さは大腸菌ゲノムの 3.7 倍に匹敵する 168 kbp  $\times$  100 = 16.8 Mbp となり、大腸菌ゲノムの大きさが 4.6 Mbp であることを考慮すると、理論的には大腸菌のゲノム分解産物のみの利用では子ファージのゲ

ヌクレオチド合成に必要なヌクレオチドを補うには不足する。T4 ファージは感染後 5 分経過すると、DNA 合成が開始される。T4 ファージは自身の修飾された DNA (HMC) を合成するためのヌクレオチド代謝に関連する遺伝子群を有する。したがって、T4 ファージはヌクレオチドの合成に必要な遺伝子群をコードしており、ある程度までは自身で DNA 合成が可能であると思われる。例えば、DNA の deoxynucleotide monophosphate(dNMP)の一部は分解された宿主の DNA から得られるが、残りは ribonucleotide diphosphate (NDP) からの合成に関与する T4 ファージ由来の *nrdA*、*nrdB* などによって dNMP が得られる。T4 ファージにコードされるそのほかの DNA 合成関連遺伝子は、ribonucleotide を出発点として、自身の修飾された DNA を合成する。本スクリーニングでは、nicotinamide riboside transporter をコードする *pnuC* が検出された。nicotinamide riboside は幾つかの代謝段階を経て最終的には *de novo* 合成の原材料となる PRPP を介し、ヌクレオチドの材料となる(Rodionov et al., 2008)。 $\Delta pnuC$  株は、液体培地での OD 減少が野生型と比較して遅延しており、またバーストサイズも低下していた。一段階増殖実験において、 $\Delta pnuC$  株はプラトーに達するまでの時間が遅延していた。これらの結果と PnuC の機能から考察するに、 $\Delta pnuC$  株では、細胞内に nicotinamide riboside を取り込めず、DNA の材料となる PRPP の量が減少した結果、DNA 合成量が低下したことで子ファージの合成速度及び合成量が低下したと考えられる。また、また、nicotinamide riboside は NAD の合成に関与しているが、近年になって、網羅的なファージ – 宿主間の軍拡競争に関わる遺伝子群を同定した論文が報告され、細胞内の NAD がファージの感染効率に関与することが示唆された(Doron et al., 2018)。また、NAD は、大腸菌の約 12%の生化学的反応に利用されるため(Osterman, 2009)、細胞内の NAD 存在量の変化によって、T4 ファージの感染が影響を受ける可能性が考えられる。

PRPP 合成経路に関わる *talA* と *rpiA* の欠失株が LB 培地および MOPS 培地において検出され、さらに MOPS 培地では *rpiB* も検出された (図 30)。PRPP の合成に関与する遺伝子群が濃縮されて検出され、これらの遺伝子群の欠失は、PRPP の合成量低下から T4DNA 合成量の低下を招いたと考えられる。

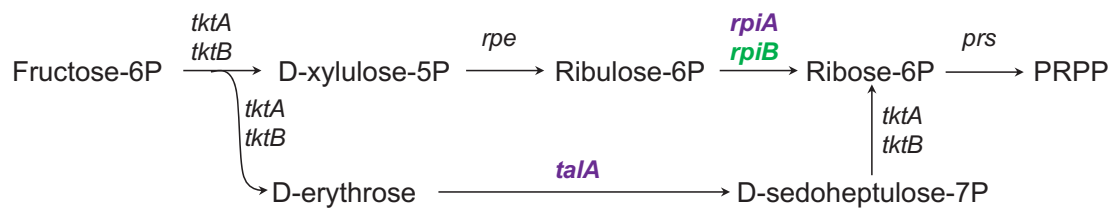


図 30. スクリーニングで検出された PRPP 代謝に関わる遺伝子群  
 緑色が MOPS 培地で得られた遺伝子。紫色で示した遺伝子名は LB と MOPS で  
 検出された。prs 遺伝子は必須遺伝子であるため、Keio collection に存在しな  
 い。

### 3-4. 呼吸鎖に関わる遺伝子と T4 ファージの感染の関連性

T4 ファージは吸着後、自身の DNA を注入するが、注入の際に必要な駆動力はプロトンによる膜電位の差であることが知られている(Furukawa et al., 1983)。MOPS 培地では、エネルギー生産に関わる遺伝子がいくつか検出された (*nuoG*, *cptB*, *yjjW*, *ynfF*)。 *nuoG* はシトクロムのタンパク質をコードし、NADH から電子を受け渡す機能を有している。また、*cptB* は呼吸鎖のフラボタンパク質のサブユニットである(Maher et al., 2018)。これらの遺伝子の欠失によって、膜電位差がどの程度減少するかについては報告がないようだが、少なくとも呼吸鎖であることから、プロトンの濃度勾配を生み出しているということ、また、*nuoG* の欠失株は、膜電位に依存する薬剤の取り込みを阻害することから、膜電位差の保持に重要であることが示唆されている(Wistrand-Yuen et al., 2018)。従って、これらの候補株は、大腸菌の膜電位を減少させ、T4 ファージの DNA の注入を阻害することで、感染効率に影響を与えているのではないかと考えられる。この仮説を確認するためには、*nuoG* などの欠失株に対して、膜電位を測定できるような蛍光試薬（例えば Invitrogen から販売されている BacLight Bacterial Membrane Potential Kit）で膜電位を測定する。また、SYBR-goldなどで染色された T4 ファージの DNA が、大腸菌の中に注入されるかを蛍光顕微鏡下で観察することで、注入効率を評価することができると考えている(Choi et al., 2013)。

### 3-5. 大腸菌の prophage 遺伝子を介したファージへの耐性機構

大腸菌 K-12 の BW25113 株には、CP4-6, DLP12, e14, rac, Qin, CP4-44, CPS-53, CPZ-55 そして CP4-57 の 9 領域が不活化されたプロファージ (cryptic prophage) 領域として存在する (Wang et al., 2010)。prophage がその他のファージに対する耐性機構を宿主に付与するという報告は多くのファージで知られている (Bondy-denomy et al., 2016; Dedrick et al., 2017; Samson et al., 2013)。λ 様ファージ HK97 は大腸菌に感染後、他のファージ DNA の細胞内への注入を阻害し、他ファージによる多重感染を防ぐ (Cumby et al., 2012)。ファージ感染・溶原化後、何らかの機構によりファージ溶菌サイクルに機能する遺伝子の不活化により cryptic phage 化したとしても、そのファージが持つ他のファージに対する排他的な抑制機構に機能する遺伝子群の機能は不活化されないことは十分に考えられる。この排他的抑制機構は、その分子機構においては多様化しているが、多重感染を防ぐ機構としては、ファージに広く保存されている (Bondy-denomy et al., 2016; Dedrick et al., 2017; Samson et al., 2013)。また、不活化されている cryptic prophage 領域はストレス応答にも関与する。その一例として、大腸菌の prophage 領域である CP4-57 領域を介したバイオフィルムの制御が挙げられる (Wang et al., 2009)。UV などの DNA 損傷によるストレスを受けると、CP4-57 領域がゲノムから切り出され、鞭毛関連遺伝子群 (*flg*, *flh*, *fli*) の発現量が増加し、その結果、バイオフィルム形成が促進され、UV などのストレスに対して耐性化することが知られている (Wang et al., 2009)。しかしながら、CP4-57 の cryptic prophage 領域によって、どのように鞭毛関連タンパク質の発現が増加するかといった詳細なメカニズムは解明されていない (Feiner et al., 2015; Wang et al., 2009)。

本スクリーニングにおいて e14 lambdoid cryptic prophage 領域の *yml* 遺伝子群 (*ymlE*, *ymlO*, *ymlP*, *ymlQ*, *ymlR*) 及び、Qin prophage 領域の *ydfK* の欠失株が検出され、*ymlR* と *ydfK* の欠失株において FliC タンパク質の合成量が増加していることを示した (図 27)。また、鞭毛の欠失により *ydfK*, *ymlR* の欠失株における T4 ファージへの感受性が増加した。鞭毛は motility 及び固体表面の接着のために重要な役割を果たすため、バイオフィルムの形成初期、もしくは成熟に重要な因子であることが知られている (Besharova et al., 2016; Pratt and Kolter, 1998; Wood et al., 2006)。さらに鞭毛は、バイオフィルム内の細胞の配向や大腸菌の細胞密度にも影響を与えることが示唆されている (Laganenka et al., 2016)。シミュレーションレベルではあるが、ファージは密になった細胞集団に

侵入すると、感染効率が減少することが報告されている(Bull et al., 2018)。したがって、 $\Delta ydfK$ 、 $\Delta ymfR$ 、 $\Delta nsrR$  は鞭毛が増加することで、細胞密度が上昇することで T4 ファージの感染効率が減少した可能性がある。

$\Delta ymfR$  とは対照的に、 $\Delta ymfE$  と  $\Delta ymfP$  はバーストサイズが減少しており、T4 ファージの子ファージ生産に影響を与えることが示唆され、e14 lambdoid cryptic prophage 領域は T4 ファージ感染サイクルのそれぞれ異なる段階に影響を与えている可能性がある。*ymf* 遺伝子の考察をまとめると、*ymf* は機能未知ではあるが、T4 ファージをストレスとして大腸菌が感知すると、ストレス応答を引き起こすことで鞭毛の増加による細胞の高密度化及び、ファージ生産の合成量の低下を引き起こすのではないかと思われる。*ymf* 遺伝子と T4 ファージとの相互作用に関する報告は存在せず、本研究によって prophage を介した宿主側における新たな生存戦略の因子を発見したと考えている。

#### 4. パーシスターとファージの関連の考察 (ppGpp による飢餓応答の観点から)

T7 ファージと T4 ファージは 60 分以内にほとんどのパーシスターを死滅させることが本研究結果より明らかとなった。したがって、アンピシリンなどの抗生物質と比較して T 系ファージはパーシスターを効率よく死滅させる非常に効率の良い手法となりうる。これまでの報告より、 $\lambda$  ファージはパーシスターが休眠状態から活動を再開する際に、感染することが示された(Pearl et al., 2008)。つまり、 $\lambda$  ファージは休眠状態の細胞を死滅させるわけではない。大腸菌は飢餓状態に陥ると、ppGpp の合成量が増加することで、それに伴う代謝活性の低下が引き起こされ、休眠状態に移行する。ppGpp の増加による代謝の低下は、パーシスタント化する主要な要因の一つである(Germain et al., 2015)。宿主の代謝の低下は、多くのファージにとって感染効率の低下を招くことが予想されており、実際に ppGpp の合成遺伝子関連が、子ファージの合成を阻害することが示唆されている(Dedrick et al., 2017)。しかしながら近年、T4 ファージの感染効率は ppGpp の合成量に影響を受けないことが報告された(Patterson-West et al., 2018)。ppGpp は主に、代謝の低下やタンパク質の分解、toxin-antitoxin system における toxin の量を増加させる傾向にあるが、T4 ファージは、宿主の toxin を中和することができる遺伝子をコードすることが知られている(Alawneh et al., 2016; Otsuka and Yonesaki, 2012; Wan et al., 2016)。したがって、T4 ファー



ジは ppGpp の増加に伴う代謝の低下にほとんど影響を受けず、ppGpp の合成量の増加した宿主に対しても効率よく感染するものと考えられる。実際に、今回のスクリーニングでは、*hipB* 遺伝子などの ppGpp に関与し、パーシスター細胞の量を増加させるような遺伝子の欠失株は LB 培地、MOPS 培地ともに検出されない結果となった。また、ATP の減少もパーシスター化の原因の一つであるが(Shan et al., 2017)、ATP の合成量の低下に伴うパーシスターの形成に関与する TisAB(Dörr et al., 2010)などは本スクリーニングで検出されず、T4 フェージは ATP が低下した状態の宿主に対しても効率よく感染できるものと思われる。

## 5. 今後の展望

本研究では、T4フェージの感染効率に影響を与える大腸菌側の遺伝子を同定し、さらに、吸着アッセイと一段階増殖実験により、候補遺伝子が感染のどの段階に影響を与えているかを解析した。今回得られた候補株の多くは、これまで報告のない遺伝子が多く存在したことから、本研究の結果はT4フェージと大腸菌間の相互作用の全体像を把握する一助となると考えられる。一方で、本研究は宿主側の遺伝子群にのみ着目したものであり、T4フェージ側の遺伝子の観点からの研究を行っていない。溶菌フェージの欠失株を網羅的に作製することは容易ではなく、そのようなライブラリーなどはほとんど存在しないのが現状である。そのような中で近年、酵母の強い相同組換え能を用いたIn-yeast assemblyという手法を用いて、T7フェージの尾部を他のフェージの尾部に変換することで宿主領域を変換させたキメラフェージを作製することに成功した(Ando et al., 2015)。このことは、In-yeast assemblyを利用して溶菌フェージの遺伝子組換えが行えることを意味する。また、2017年にCRISPR-Cas9を用いて、T4フェージのゲノムを編集することが実証された(Tao et al., 2017, 2018)。以上のように、近年になって溶菌フェージの遺伝子解析を容易に解析するための手法が発達し始めている。今後は、これらの手法を用いて、T4フェージと大腸菌間を網羅的に解析し、50%以上を占めるT4フェージの機能未知遺伝子の機能解析及び大腸菌との遺伝的相互作用を推し進めていくことが可能であろう。

産業などの分野でバクテリアを用いている場合に、しばしばフェージのコンタミネーションが問題となる(Brussow et al., 1994)。本研究では、T4 フェージに対して吸着効率の大幅な低下を招く強い耐性を示す遺伝子群を網羅的かつ詳細

に同定することができた。コンタミネーション防止のために、本研究により強い耐性を示した *ompC* や LPS 関連遺伝子、もしくは受容体に関与する遺伝子と子ファージ生産能の低下をもたらす株の組み合わせなど、感染段階に影響を与えるそれぞれの遺伝子を組み合わせることで、T4 ファージに対して非常に強く、且つ T4 ファージ側の耐性を発生し難い、産業用の大腸菌を作製することが可能であると思われる。

近年、薬剤耐性菌の脅威が増加しつつあり、世界保健機構 WHO によると 2050 年までに薬剤耐性による死亡者数が世界で 1000 万人と推定され、がんの死亡者数を超えるほどまでに薬剤耐性の脅威が高まっている。そのような中で、ファージを抗生物質として用いるというファージ治療への試みが盛んになっている (Azam and Tanji, 2019; Kutateladze and Adamia, 2008)。実際にアメリカでは、ファージ治療センターやベンチャーなどの会社を設立し、来る薬剤耐性菌の問題にファージを用いて取り組んでいる。しかしながら、実際に、人間の体内などの自然環境下でファージがどのような感染効率で感染するかについては、ほとんど解明されていないのが実状である。また細菌は、多くの環境下でバイオフィルムを形成し、様々な環境変化に抵抗している。そのような状態の宿主に対してファージがどのように感染するかについては未解明な点が多く、実際にファージを体内に服用しても、感染効率が悪く効果が現れない可能性も否めない。本研究では、培地の物理的環境の違いによって、耐性化する遺伝子に違いが見られた。また、MOPS 培地では、LB 培地とは異なる遺伝子の欠失株が検出され、膜電位に関わる遺伝子群や  $\Delta lon$  などのムコイド形成を誘導する候補株が得られた。さらに、バイオフィルム内のタンパク質の種類の違いによって、ファージに対する感受性が変化したことを明らかにした。これらの結果は、実際にファージが感染する様々な環境下で、T4 ファージの効率の良い感染に必要な大腸菌側の遺伝子が異なることを示唆するものであり、様々な環境下での感染様式を研究するための一助を本研究が担うことができたのではないかと考えている。このようなファージと宿主の相互作用に関する研究は、ファージセラピーに対する期待の高まりとともに少しずつ注目が集まっており、今後も盛んに研究が行われると考えられる。

## 総括

本研究では、T4 ファージの感染効率に影響を与える宿主側の遺伝子群を同定した。スクリーニングにおけるファージの濃度を注意深く検討し、決定したことで、受容体以外の子ファージ生産に影響を与える遺伝子群も検出することが可能となった。

以下、本研究によって得られた結果をまとめたものである。

1. LB 培地では、グルタミンやグルタミン酸に関与する遺伝子群 (*hisH*、*ycaM*、*gltP*、*nac*) が検出され、宿主内の窒素源が感染効率に影響を与えることが示唆された (図 11、表 4 より)。
2. 得られた候補株において、DNA の材料となる PRPP の合成に関与する遺伝子群が LB 培地及び MOPS 培地の両方で濃縮されて検出された。T4 ファージは自身のゲノムを合成するために、PRPP などの原材料を大腸菌側に依存していると考えられる (図 30、表 6 より)。
3. 液体培地の溶菌の度合いから、受容体の欠失株と e14 cryptic prophage 領域の遺伝子は、OD の減少が観察されず、強い耐性を示した (図 16)。
4. e14 cryptic prophage 領域の遺伝子 (*ymfE*、*ymfO*、*ymfP*) を欠失すると、比較的強い耐性が得られ、平板効率 (EOP) やバーストサイズの減少が観察されたことから、これらの遺伝子の欠失株は、子ファージ生産に影響を与えていると考えられる (図 21、表 8 より)。
5. *greA*、*ychF*、などの転写や翻訳に関与する遺伝子の欠失株はバーストサイズが減少していたことから、子ファージの生産に影響を与える転写、翻訳装置のタンパク質を同定した。また、 $\Delta greA$  と  $\Delta ybeY$  は吸着効率の減少した (図 21 より)。

6. *ydfK* と *ymfR* の欠失株は、鞭毛の主要構成成分である FliC の存在量が増加していた (図 27)。また、 $\Delta ydfK\Delta fliC$ 、 $\Delta ymfR\Delta fliC$ 、 $\Delta nsrR\Delta fliC$  株はそれぞれの一遺伝子欠失株と比較して T4 ファージに対して感受性を示した (図 28 より)。従って、FliC は T4 ファージに対して耐性化する一つの要因であることが示された。

図 31 は、T4 ファージの感染サイクルを示しており、赤色で示した遺伝子が本スクリーニングより新たに T4 ファージの感染に影響を与えることが例証された遺伝子群の一覧である。本スクリーニングにより、T4 ファージが大腸菌のどのような機能を有する遺伝子群に依存しやすいかという全体像の一端を解明できたと考えられる (図 31)。

また、本研究における宿主側の耐性に関する遺伝子の解明によって、微生物を培養する工場におけるファージの汚染や、ファージセラピーとして利用する際の有益な情報をもたらすと考えている。

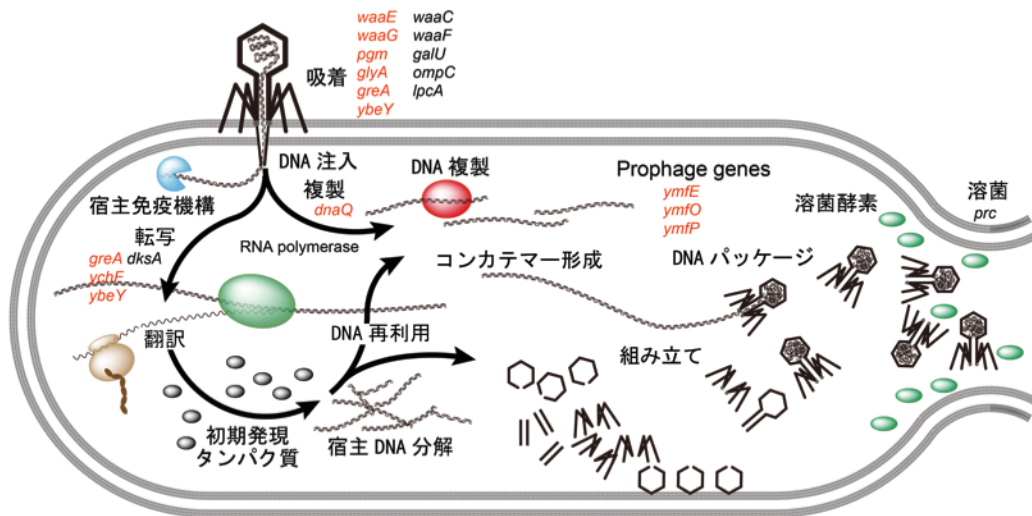


図 31. T4 ファージの感染機構と感染効率を低下させた遺伝子群  
黒色が既知の遺伝子、赤色が本研究により新たに得られた遺伝子群の一覧

## 謝辞

この論文は私が奈良先端科学技術大学院大学において、博士後期課程での研究をまとめたものです。本研究遂行にあたりご鞭撻賜りました森浩禎教授、武藤愛助教に感謝申し上げます。的確なアドバイスをいただきました、高木博史教授、真木寿治教授に感謝申し上げます。また、酵母内アッセムブリの技術的な指導及び酵母とpRS416プラスミドを譲渡していただきました、東京大学の谷内江望准教授に感謝申し上げます。LC-MS/MSを用いた実験では、本大学の技術員の倉田理恵様より、丁寧にご指導いただきました。ここに感謝の意を表します。3年間苦楽を共にした森研究室のメンバーに感謝の意を表します。特に、T4ファージの研究を共に行った合田君、竹本君、岡島君に感謝いたします。手探りの状態からT4ファージの研究を仲間と進められたことは私の財産です。技術員の任田八恵様にはいろいろ気にかけていただき、とても楽しい日々を過ごせました。ありがとうございます。最後に、これまで辛抱強く支えていただきました、両親に感謝申し上げます。

## 参考文献

Alawneh, A.M., Qi, D., Yonesaki, T., and Otsuka, Y. (2016). An ADP-ribosyltransferase Alt of bacteriophage T4 negatively regulates the Escherichia coli MazF toxin of a toxin-antitoxin module. *Mol. Microbiol.* *99*, 188–198.

Ando, H., Lemire, S., Pires, D.P., and Lu, T.K. (2015). Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing. *Cell Syst.* *1*, 187–196.

Azam, A.H., and Tanji, Y. (2019). Peculiarities of Staphylococcus aureus phages and their possible application in phage therapy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *103*, 4279–4289.

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*, 0008.

Bakkes, P.J., Faber, B.W., van Heerikhuizen, H., and van der Vies, S.M. (2005). The T4-encoded cochaperonin, gp31, has unique properties that explain its requirement for the folding of the T4 major capsid protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 8144–8149.

Benveniste, R., and Davies, J. (1973). Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* *42*, 471–506.

Besharova, O., Suchanek, V.M., Hartmann, R., Drescher, K., and Sourjik, V. (2016). Diversification of gene expression during formation of static submerged biofilms by Escherichia coli. *Front. Microbiol.* *7*, 1568.

Bigger, J.W. (1944). Treatment of Staphylococcal Infections With Penicillin By Intermittent Sterilisation. *Lancet* *244*, 497–500.

Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Paul, B., Trostel, A.N., Powell, B., Carlton, R., and Merrill, C.R. (2002). Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.* *70*, 204–210.

Black, D.S., Kelly, A.J., Mardis, M.J., and Moyed, H.S. (1991). Structure and Organization of Hip, an Operon That Affects Lethality Due To Inhibition of Peptidoglycan or Dna-Synthesis. *J. Bacteriol.* *173*, 5732–5739.

Bohm, K., Porwollik, S., Chu, W., Dover, J.A., Gilcrease, E.B., Casjens, S.R., McClelland, M., and Parent, K.N. (2018). Genes affecting progression of bacteriophage P22 infection in *Salmonella* identified by transposon and single gene deletion screens. *Mol. Microbiol.* *108*, 288–305.

Bondy-denomy, J., Qian, J., Westra, E.R., Buckling, A., Guttman, D.S., Davidson, A.R., and Maxwell, K.L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *ISME J.* *10*, 2854–2866.

Brussow, H., Fremont, M., Bruttin, A., Sidoti, J., Constable, A., and Fryder, V. (1994). Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* *60*, 4537–4543.

Bryson, A.L., Hwang, Y., Sherrill-Mix, S., Wu, G.D., Lewis, J.D., Black, L., Clark, T.A., and Bushman, F.D. (2015). Covalent modification of bacteriophage T4 DNA inhibits CRISPR-Cas9. *MBio* *6*, e00648-15.

Bull, J., Christensen, K., Scott, C., Jack, B., Crandall, C., and Krone, S. (2018). Phage-Bacterial Dynamics with Spatial Structure: Self Organization around Phage Sinks Can Promote Increased Cell Densities. *Antibiotics* *7*, 8.

Chiba, A., Sugimoto, S., Sato, F., Hori, S., and Mizunoe, Y. (2015). A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. *Microb. Biotechnol.* *8*, 392–403.

Cho, S.H., Szewczyk, J., Pesavento, C., Zietek, M., Banzhaf, M., Roszczenko, P., Asmar, A., Laloux, G., Hov, A.K., Leverrier, P., et al. (2014). Detecting envelope stress by monitoring  $\beta$ -barrel assembly. *Cell* 159, 1652–1664.

Choi, Y., Shin, H., Lee, J.H., and Ryua, S. (2013). Identification and characterization of a novel flagellum-dependent Salmonella-infecting bacteriophage, iEPS5. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4829–4837.

Christen, M., Beusch, C., Bösch, Y., Cerletti, D., Flores-Tinoco, C.E., Del Medico, L., Tschan, F., and Christen, B. (2016). Quantitative Selection Analysis of Bacteriophage  $\phi$ cbK Susceptibility in *Caulobacter crescentus*. *J. Mol. Biol.* 428, 419–430.

Clokic, M.R.J., and Mann, N.H. (2006). Marine cyanophages and light. *Environ. Microbiol.* 8, 2074–2082.

Colland, F., Orsini, G., Brody, E.N., Buc, H., and Kolb, A. (1998). The bacteriophage T4 AsiA protein: A molecular switch for sigma 70-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* 27, 819–829.

Cumby, N., Edwards, A.M., Davidson, A.R., and Maxwell, K.L. (2012). The Bacteriophage HK97 gp15 Moron Element Encodes a Novel Superinfection Exclusion Protein. *J. Bacteriol.* 194, 5012–5019.

David E. Heinrichs, J.A.Y. and C.W. (2002). Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 30, 221–232.

Dedrick, R.M., Jacobs-sera, D., Bustamante, C.A.G., Garlena, R.A., Mavrich, T.N., Pope, W.H., Reyes, J.C.C., Russell, D.A., Adair, T., Alvey, R., et al. (2017). prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence. *Nat. Microbiol.* 2, 16251.



Dharmalingam, K., Revel, H.R., and Goldberg, E.B. (1982). Physical mapping and cloning of bacteriophage T4 anti-restriction endonuclease gene. *J. Bacteriol.* *149*, 694–699.

Doolittle, M.M., Cooney, J.J., and De Caldwell (1996). Tracing the interaction of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes. *J. Ind. Microbiol.* *16*, 331–341.

Doron, S., Melamed, S., Ofir, G., Leavitt, A., Lopatina, A., Keren, M., Amitai, G., and Sorek, R. (2018). Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science.* *359*, eaar4120.

Dörr, T., Vulić, M., and Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* *8*, e1000317.

Durand, A., Sinha, A.K., Dard-dascot, C., and Michel, B. (2016). Mutations Affecting Potassium Import Restore the Viability of the *Escherichia coli* DNA Polymerase III holdI Mutant. *PLOS Genet.* *12*, e1006114.

Ellis, E.L., and Delbruck, M. (1938). The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* *22*, 365–384.

Ewalt, K.L., Hendrick, J.P., Houry, W.A., and Hartl, F.U. (1997). In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* *90*, 491–500.

Eydallin, G., Viale, A.M., Morán-Zorzano, M.T., Muñoz, F.J., Montero, M., Baroja-Fernández, E., and Pozueta-Romero, J. (2007). Genome-wide screening of genes affecting glycogen metabolism in *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett.* *581*, 2947–2953.

Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., and Herskovits, A.A. (2015). A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 641–650.

Fileenko, N., Spiro, S., Browning, D.F., Squire, D., Overton, T.W., Cole, J., and Constantinidou, C. (2007). The NsrR regulon of *Escherichia coli* K-12 includes genes encoding the hybrid cluster protein and the periplasmic, respiratory nitrite reductase. *J. Bacteriol.* *189*, 4410–4417.

Fineran, P.C., Blower, T.R., Foulds, I.J., Humphreys, D.P., Lilley, K.S., and Salmond, G.P.C. (2009). The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 894–899.

Fujiwara, K., Ishihama, Y., Nakahigashi, K., Soga, T., and Taguchi, H. (2010). A systematic survey of in vivo obligate chaperonin-dependent substrates. *EMBO J.* *29*, 1552–1564.

Furukawa, H., Kuroiwa, T., and Mizushima, S. (1983). DNA injection during bacteriophage T4 infection of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *154*, 938–945.

Genevaux, P., Bauda, P., and Dubow, M.S. (1999). Identification of Tn10 insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. *Arch Microbiol.* *172*, 1–8.

Gentles, Q., Ireland, A., Kong, E., and Smith, D. (2013). Increased Bacteriophage T4 Infectivity in Aging *Escherichia coli* Biofilms is Not Dependent on OmpC Expression. *J. Exp. Microbiol. Immunol.* *17*, 120–124.

Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., and Gerdes, K. (2013). Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA. *Mol. Cell* *52*, 248–254.

Germain, E., Roghanian, M., Gerdes, K., and Maisonneuve, E. (2015). Stochastic induction of persister cells by HipA through (p) ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 5171–5176.

Goebel, F. (1949). Studies on bacteriophage : the relationship between the somatic antigens of *Ahigella sonnei* and their susceptibility to bacterial viruses. *J. Exp. Medicine* *90*, 255–265.

Hinton, D.M. (1996). Bacteriophage T4 Middle Transcription System: T4-Modified RNA Polymerase; AsiA, a  $\sigma 70$  Binding Protein; and Transcriptional Activator MotA. *Methods Enzym.* *274*, 43–57.

Hossain, S.A., Tanizawa, K., Kazuta, Y., and Fukui, T. (1994). Overproduction and Characterization of Recombinant UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Escherichia coli* K - 12. *J. Biochem.* *115*, 965–972.

Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S.K., Cook, H., Mende, D.R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L.J., et al. (2019). EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res.* *47*, D309–D314.

Hunt, J.F., Vies, S.M. Van Der, Henry, L., and Deisenhofer, J. (1997). Structural Adaptations in the Specialized Expand the Size of the Anfinsen Cage. *Cell* *90*, 361–371.

Kawabata, T., Arisaka, F., and Nishikawa, K. (2000). Structural/functional assignment of unknown bacteriophage T4 proteins by iterative database searches. *Gene* *259*, 223–233.

Kim, M.S., Kim, Y.D., Hong, S.S., Park, K., Ko, K.S., and Myung, H. (2015). Phage-Encoded Colanic Acid-Degrading Enzyme Permits Lytic Phage Infection of a Capsule-Forming Resistant Mutant *Escherichia coli* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* *81*, 900–909.

Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., and Ioka-nakamichi, T. (2006). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library ( A Complete Set of *E. coli* K -12 ORF Archive ): Unique Resources for Biological Research. *DNA Res.* *299*, 291–299.

Kuhn, A., and Kellenberger, E. (1985). Productive phage infection in *Escherichia coli* with reduced internal levels of the major cations. *J. Bacteriol.* *163*, 906–912.

Kutateladze, M., and Adamia, R. (2008). Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Médecine Mal. Infect.* *38*, 426–430.

Kutter, E., Bryan, D., Ray, G., Brewster, E., Blasdel, B., and Guttman, B. (2018). From host to phage metabolism: Hot tales of phage T4's takeover of *E. coli*. *Viruses* *10*, 387.

Labedan, B., and Goldberg, E.B. (1979). Requirement for membrane potential in injection of phage T4 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 4669–4673.

Laganenka, L., Colin, R., and Sourjik, V. (2016). Chemotaxis towards autoinducer 2 mediates autoaggregation in *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* *7*, 12984.

Lauren A. Cowley (2018). Transposon Insertion Sequencing Elucidates Novel Gene Involvement in Susceptibility and Resistance to Phages T4 and T7 in *Escherichia coli* O157. *MBio* *9*, e00705-18.

Lee, C., Cho, S., Kim, H., Kim, M., Peterkofsky, A., and Seok, Y. (2010). Potassium mediates *Escherichia coli* enzyme IIA Ntr -dependent regulation of sigma factor selectivity. *Mol. Microbiol.* *78*, 1468–1483.

Lewis, K. (2001). Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 999–1007.

Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochem.* *70*, 267–274.

Lewis, K. (2010). Persister Cells. *Annu. Rev. Microbiol.* *64*, 357–372.

- Liu, X., Li, Y., Guo, Y., Zeng, Z., Li, B., Wood, T.K., Cai, X., and Wang, X. (2015). Physiological function of Rac Prophage during biofilm formation and regulation of Rac excision in *Escherichia coli* K-12. *Sci. Rep.* *5*, 16074.
- Louie, D., and Serwer, P. (1990). Blunt-ended ligation can be used to produce DNA ladders with rung spacing as large as 0.17 MB. *Nucleic Acids Res.* *18*, 3090.
- Luke, K., Radek, A., Liu, X., Campbell, J., Uzan, M., Haselkorn, R., and Kogan, Y. (2002). Microarray Analysis of Gene Expression during Bacteriophage T4 Infection. *Virology* *299*, 182–191.
- Maher, M.J., Herath, A.S., Udagedara, S.R., Dougan, D.A., and Truscott, K.N. (2018). Crystal structure of bacterial succinate:quinone oxidoreductase flavoprotein SdhA in complex with its assembly factor SdhE. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, 2982–2987.
- Manning, A.J., Kuehn, M.J., McDermott, P., Walker, R., White, D., Kulp, A., Kuehn, M., Ellis, T., Kuehn, M., Kobayashi, H., et al. (2011). Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* *11*, 258.
- Maynard, N.D., Birch, E.W., Sanghvi, J.C., Chen, L., Gutschow, M. V, and Covert, M.W. (2010). A forward-genetic screen and dynamic analysis of lambda phage host-dependencies reveals an extensive interaction network and a new anti-viral strategy. *PLoS Genet* *6*, e1001017.
- McBroom, A.J., Johnson, A.P., Vemulapalli, S., and Kuehn, M.J. (2006). Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J. Bacteriol.* *188*, 5385–5392.
- Mehta, P., Casjens, S., and Krishnaswamy, S. (2004). Analysis of the lambdoid prophage element  $\epsilon 14$  in the *E. coli* K-12 genome. *BMC Microbiol.* *4*:4.
- Merritt, J.H., Kadouri., D.E., and O’Toole, G.A. (2015). Growing and Analyzing Static Biofilms. *Curr Protoc Microbiol.* *1B 1*, 1–29.

Middelboe, M., Riemann, L., Steward, G.F., Hansen, V., and Nybroe, O. (2003). Virus-induced transfer of organic carbon between marine bacteria in a model community. *Aquat. Microb. Ecol.* *33*, 1–10.

Miller, E.S., Kutter, E., Mosig, G., Kunisawa, T., Ruger, W., Arisaka, F., and Ru, W. (2003). Bacteriophage T4 Genome Bacteriophage T4 Genome †. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *67*, 86–156.

Missiakas, D., Mayer, M.P., Georgopoulos, C., and Raina, S. (1997). Modulation of the *Escherichia coli*  $\sigma$  E ( RpoE ) heat-shock transcription-factor activity by the RseA , RseB and RseC proteins. *Mol. Microbiol.* *24*, 355–371.

Montag, D., Hashemolhosseini, S., and Henning, U. (1990). Receptor-recognizing proteins of T-even type bacteriophages. *J. Mol. Biol.* *216*, 327–334.

Mosig, G., Gewin, J., Luder, A., Colowick, N., and Vo, D. (2001). Two recombination-dependent DNA replication pathways of bacteriophage T4, and their roles in mutagenesis and horizontal gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 8306–8311.

Moyed, H.S., and Bertrand, K.P. (1983). *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J. Bacteriol.* *155*, 768–775.

Osterman, A. (2009). Biogenesis and Homeostasis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Cofactor. *EcoSal Plus* *3*.

Otsuka, Y., and Yonesaki, T. (2012). Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnlA toxins. *Mol. Microbiol.* *83*, 669–681.

Partridge, J.D., Bodenmiller, D.M., Humphrys, M.S., and Spiro, S. (2009). NsrR targets in the *Escherichia coli* genome: New insights into DNA sequence requirements for binding and a role for NsrR in the regulation of motility. *Mol. Microbiol.* *73*, 680–694.

Patterson-West, J., James, T.D., Fernández-Coll, L., Iben, J.R., Moon, K., Knipling, L., Cashel, M., and Hinton, D.M. (2018). The E. Coli global regulator DksA reduces transcription during T4 infection. *Viruses* *10*, 308.

Pearl, S., Gabay, C., Kishony, R., Oppenheim, A., and Balaban, N.Q. (2008). Nongenetic individuality in the host-phase interaction. *PLoS Biol.* *6*, e120.

Perederina, A., Svetlov, V., Vassylyeva, M.N., Tahirov, T.H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., and Vassylyev, D.G. (2004). Regulation through the secondary channel - Structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell* *118*, 297–309.

Polissi, A., De Laurentis, W., Zangrossi, S., Briani, F., Longhi, V., Pesole, G., and Dehò, G. (2003). Changes in Escherichia coli transcriptome during acclimatization at low temperature. *Res. Microbiol.* *154*, 573–580.

Pratt, L.A., and Kolter, R. (1998). Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* *30*, 285–293.

Prusiner, S., Miller, R.E., and Valentine, R.C. (2006). Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate Control of the Enzymes of Glutamine Metabolism in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *69*, 2922–2926.

Qimron, U., Marintcheva, B., Tabor, S., and Richardson, C.C. (2006). Genomewide screens for Escherichia coli genes affecting growth of T7 bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 19039–19044.

Raghavan, R., Sage, A., and Ochman, H. (2011). Genome-wide identification of transcription start sites yields a novel thermosensing RNA and new cyclic AMP receptor protein-regulated genes in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* *193*, 2871–2874.

Ramesh, V., Fralick, J.A., and Rolfe, R.D. (1999). Prevention of Clostridium difficile - induced ileocecitis with Bacteriophage. *Anaerobe* *5*, 69–78.

Ravish, S., Shimada, T., Mishra, V.K., Upreti, S., and Sardesai, A.A. (2016). Growth Inhibition by External Potassium of *Escherichia coli* Lacking PtsN (EIIANtr) Is Caused by Potassium Limitation Mediated by YcgO. *J. Bacteriol.* *198*, 1868–1882.

Rhoads, D.B., Waters, F.B., and Wolfgang, E. (1976). Cation Transport in *Escherichia coli* VIII . Potassium Transport Mutants. *J. Gen. Physiol.* *67*, 325–341.

Riaz, N., Wolden, S.L., Gelblum, D.Y., and Eric, J. (2019). Chemical Space of *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase Inhibitors: New Approaches for Discovering Novel Drugs for Old Bugs. *Med Res Rev.* *39*, 684–705.

Rodionov, D.A., Ingeniis, J. De, Mancini, C., Cimadamore, F., Zhang, H., Osterman, A.L., and Raffaelli, N. (2008). Transcriptional regulation of NAD metabolism in bacteria : NrtR family of Nudix-related regulators. *Nucleic Acids Res.* *36*, 2047–2059.

Rohrer, H., Zillig, W., and Mailhammer, R. (1975). ADP-Ribosylation of DNA-Dependent RNA Polymerase of *Escherichia coli* by an NAD<sup>+</sup>: Protein ADP-ribosyltransferase from Bacteriophage T4. *Eur. J. Biochem.* *60*, 227–238.

Roman, L.T., Eugene, V. koonin, and Lipman, D.J. (2007). A Genomic Perspective on Protein Families. *Science.* *278*, 631–638.

Rotem, E., Loinger, A., Ronin, I., Levin-Reisman, I., Gabay, C., Shores, N., Biham, O., and Balaban, N.Q. (2010). Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 12541–12546.

Rousset, F. Ois, Cui, L., Siouve, E., Becavin, C., Depardieu, F., and Bikard, D. (2018). Genome-wide CRISPR-dCas9 screens in *E. coli* identify essential genes and phage host factors. *PLoS Genet* *14*, e1007749.

Roux, S., Brum, J.R., Dutilh, B.E., Sunagawa, S., Duhaime, M.B., Loy, A., Poulos, B.T., Solonenko, N., Lara, E., Poulain, J., et al. (2016). Ecogenomics and potential biogeochemical impacts of globally abundant ocean viruses. *Nature* *537*, 689–693.



Samaluru, H., Saisree, L., and Reddy, M. (2007). Role of SufI (FtsP) in cell division of *Escherichia coli*: Evidence for its involvement in stabilizing the assembly of the divisome. *J. Bacteriol.* *189*, 8044–8052.

Samson, J.E., Magadán, A.H., Sabri, M., and Moineau, S. (2013). Revenge of the phages : defeating bacterial defences. *Nat. Publ. Gr.* *11*, 675–687.

Scherrer, R., and Moyed, H.S. (1988). Conditional impairment of cell division and altered lethality in *hipA* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* *170*, 3321–3326.

Schumacher, M.A., Balani, P., Min, J., Chinnam, N.B., Hansen, S., Vulić, M., Lewis, K., and Brennan, R.G. (2015). HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. *Nature* *524*, 59–66.

Scotland, S. M. Smith, H. R. Willshaw, G. A, & Rowe, B. (1983). vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet* *ii*:216.

Shan, Y., Gandt, A.B., Rowe, S.E., Deisinger, J.P., Conlon, B.P., and Lewis, K. (2017). ATP-Dependent Persister Formation in *Escherichia coli*. *MBio* *8*, e02267–16.

Skorko, R., Zilling, W., Rohrer, H., Fujiki, H., and Mailhammer, R. (1977). Purification and Properties of the NAD<sup>+</sup>: Protein ADP-ribosyltransferase Responsible for the T4-Phage-Induced Modification of the  $\alpha$  Subunit of DNA-Dependent RNA Polymerase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* *79*, 55–66.

Slavcev, R.A., and Hayes, S. (2003). Blocking the T4 lysis inhibition phenotype. *Gene* *321*, 163–171.

Sommer, N., Salnien, V., Gineikiene, E., Nivinskas, R., and Ruger, W. (2000). T4 early promoter strength probed in vivo with unribosylated and ADP-ribosylated *Escherichia coli* RNA polymerase: A mutation analysis. *Microbiology* *146*, 2643–2653.

- Sorroche, F.G., Spesia, M.B., Zorreguieta, Á., and Giordano, W. (2012). A Positive Correlation between Bacterial Autoaggregation and Biofilm Formation in Native *Sinorhizobium meliloti* Isolates from Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 4092–4101.
- Stepanyan, K., Wenseleers, T., Duéñez-Guzmán, E.A., Muratori, F., Van Den Bergh, B., Verstraeten, N., De Meester, L., Verstrepen, K.J., Fauvart, M., and Michiels, J. (2015). Fitness trade-offs explain low levels of persister cells in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Ecol.* *24*, 1572–1583.
- Steward, G.F., Wikner, J., Smith, D.C., Cochlan, W.P., and Azam, F. (1992a). Estimation of virus production in the sea: 1. Method development. *Mar. Microb. Food Webs.* *6*, 57–78.
- Steward, G.F., Wikner, J., Smith, D.C., Cochlan, W.P., and Azam, F. (1992b). Estimation of virus production in the sea: 2. Field Result. *Mar. Microb. Food Webs.* *6*, 57–78.
- Studwell, P.S., and O'Donnell, M. (1990). Processive replication is contingent on the exonuclease subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *J. Biol. Chem.* *265*, 1171–1178.
- Tait, K., Skillman, L.C., and Sutherland, I.W. (2002). The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication. *Biofouling* *18*, 305–311.
- Tamaki, S., Sato, T., and Matsushashi, M. (1971). Role of lipopolysaccharides in antibiotic resistance and bacteriophage adsorption of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* *105*, 968–975.
- Tao, P., Wu, X., Tang, W.C., Zhu, J., and Rao, V. (2017). Engineering of Bacteriophage T4 Genome Using CRISPR-Cas9. *ACS Synth. Biol.* *6*, 1952–1961.
- Tao, P., Wu, X., and Rao, V. (2018). Unexpected evolutionary benefit to phages imparted by bacterial CRISPR-Cas9. *Sci. Adv.* *4*, eaar4134.

Tareb, R., Bernardeau, M., Gueguen, M., and Vernoux, J.P. (2013). In vitro characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. *J. Med. Microbiol.* *62*, 637–649.

Thompson, J.E., Pourhossein, M., Waterhouse, A., Hudson, T., Goldrick, M., Derrick, J.P., and Roberts, I.S. (2010). The K5 lyase KflA combines a viral tail spike structure with a bacterial polysaccharide lyase mechanism. *J. Biol. Chem.* *285*, 23963–23969.

Tiemann, B., Depping, R., Gineikiene, E., Kaliniene, L., Nivinskas, R., and R ger, W. (2004). ModA and ModB, two ADP-ribosyltransferases encoded by bacteriophage T4: Catalytic properties and mutation analysis. *J. Bacteriol.* *186*, 7262–7272.

Torres-Cabassa, A.S., and Gottesman, S. (1987). Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis. *J. Bacteriol.* *169*, 981–989.

Vidakovic, L., Singh, P.K., Hartmann, R., Nadell, C.D., and Drescher, K. (2017). Dynamic biofilm architecture confers individual and collective mechanisms of viral protection. *Nat. Microbiol.* *3*, 26–31.

Wan, H., Otsuka, Y., Gao, Z., Wei, Y., Chen, Z., Masuda, M., Yonesaki, T., Zhang, H., and Dong, Y. (2016). Structural insights into the inhibition mechanism of bacterial toxin LsoA by bacteriophage antitoxin Dmd. *Mol. Microbiol.* *101*, 757–769.

Wang, X., Kim, Y., and Wood, T.K. (2009). Control and benefits of CP4-57 prophage excision in *Escherichia coli* biofilms. *ISME J.* *3*, 1164–1179.

Wang, X., Kim, Y., Ma, Q., Hong, S.H., Pokusaeva, K., Sturino, J.M., and Wood, T.K. (2010). Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat. Commun.* *1*, 147–149.

Washizaki, A., Yonesaki, T., and Otsuka, Y. (2016). Characterization of the interactions between *Escherichia coli* receptors, LPS and OmpC, and bacteriophage T4 long tail fibers. *Microbiologyopen* 5, 1003–1015.

Waterbury, J.B., and Valois, F.W. (1993). Resistance to co-occurring phages enables marine *Synechococcus* communities to coexist with cyanophages abundant in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3393–3399.

Weissbach, H., and Brot, N. (1991). MicroReview Regulation of capsular synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol. Microbiol.* 5, 1593–1597.

Wistrand-Yuen, E., Knopp, M., Hjort, K., Koskiniemi, S., Berg, O.G., and Andersson, D.I. (2018). Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. *Nat. Commun.* 9, 1599.

Wommack, K.E., and Colwell, R.R. (2000). Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 69–114.

Wood, T.K., González Barrios, A.F., Herzberg, M., and Lee, J. (2006). Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 361–367.

Yonesaki, T., and Minagawa, T. (1985). T4 phage gene *uvsX* product catalyzes homologous DNA pairing. *EMBO J.* 4, 3321–3327.

Yonesaki, T., and Minagawa, T. (1989). Synergistic action of three recombination gene products of bacteriophage T4, *uvsX*, *uvsY*, and gene 32 proteins. *J. Biol. Chem.* 264, 7814–7820.

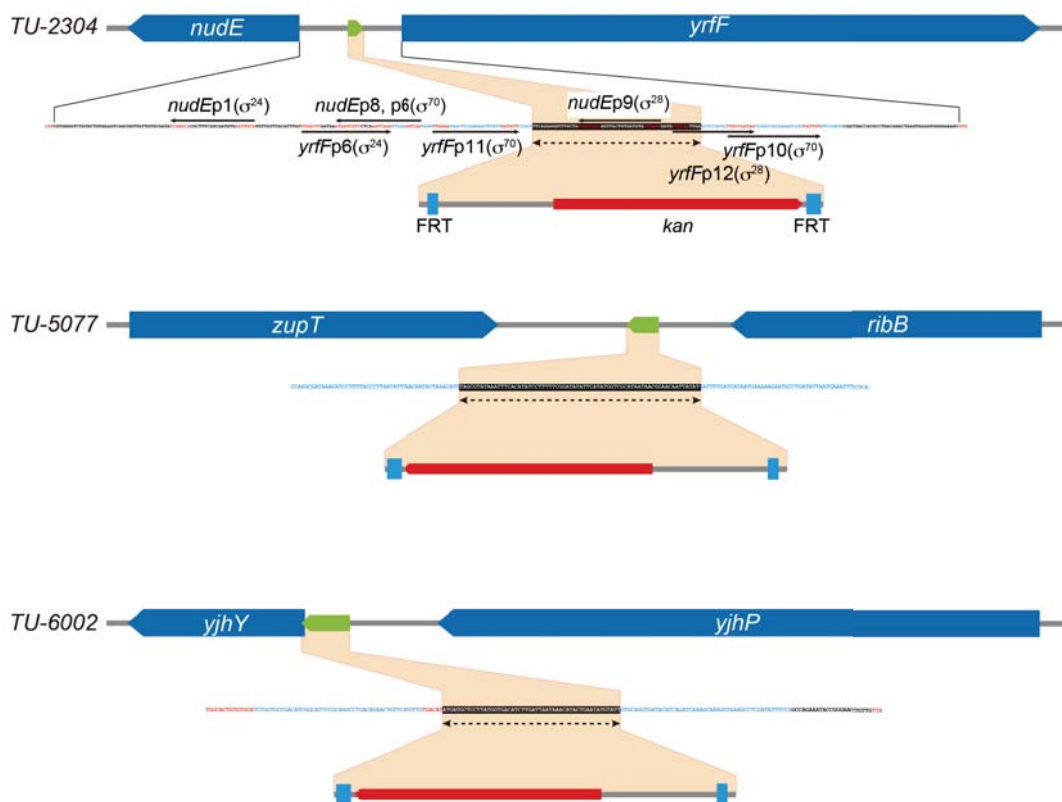
You, L., Suthers, P.F., and Yin, J. (2002). Effects of *Escherichia coli* Physiology on Growth of Phage T7 In Vivo and In Silico. *J. Bacteriol.* 184, 1888–1894.

Yu, H., and Mizusima, S. (1982). Roles of Lipopolysaccharide and Outer Membrane Protein OmpC of *Escherichia coli* K-12 in the Receptor Function for Bacteriophage T4. *J. Bacteriol.* *151*, 718–722.

Zablewska, B., and Kur, J. (1995). Mutations in HU and IHF affect bacteriophage T4 growth: HimD subunits of IHF appear to function as homodimers. *Gene* *160*, 131–132.

Zimmer, D.P., Soupene, E., Lee, H.L., Wendisch, V.F., Khodursky, A.B., Peter, B.J., Bender, R.A., and Kustu, S. (2000). Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: Scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 14674–14679.

## 補足情報



### 補足図. 検出された sRNA の位置

緑色の矢印は検出されたsRNAを示す。それぞれのsRNAは、カナマイシン耐性遺伝子 (*kan*) に置換されている。赤色で示した配列は、-35、-10の領域である。TU-2304において、*kan*に置換された部位に*yrfF*のRNAポリメラーゼの結合に関わる-35領域があるため (*yrfp12*( $\sigma^{28}$ )の領域)、*yrfF*の転写効率が減少したと考えられる。TU-6002は、*yjhY*の開始コドンに重複しており、欠失により開始コドンが欠けている可能性が考えられる。プロモーター情報は、ecocyc (<https://ecocyc.org>) より取得した。

補足表 ; LB MOPS におけるスクリーニング結果

LB と MOPS 培地でそれぞれ検出された全欠失遺伝子のデータを示す。

Count はそれぞれの培地で何回検出されたかを表す。また、Morphology は、それぞれの培地で検出された主要な表現型を示す。Morphology は、mucoid、non-mucoid、uneven に分類し、判別が困難な場合は空白とした。分類の詳細は材料と方法を参照されたい。

ECK	gene	Synonym	LB		MOPS		Description
			Count	Morphology	Count	Morphology	
ECK1231	<i>galU</i>	<i>verA, ychD</i>	3	non-mucoid	4	non-mucoid	glucose-1-phosphate uridylyltransferase
ECK4174	<i>nsrR</i>	<i>yjeB</i>	3	mucoid	4	mucoid	nitric oxide-sensitive repressor for NO regulon
ECK0676	<i>pgm</i>	<i>blu, pgmA</i>	3	non-mucoid	4	non-mucoid	phosphoglucomutase
ECK1124	<i>ymfE</i>		3	mucoid	4	non-mucoid	shifted translation start +9 nt;AUG start codon;e14 prophage;predicted inner membrane protein
ECK3852	<i>dsbA</i>	<i>dsf, iarA, ppfA</i>	2	uneven	4	non-mucoid	thiol:disulfide interchange protein;periplasmic;alkali-inducible
ECK0223	<i>gmhA</i>	<i>isn(H.i.), lpcA, tfrA, yafI</i>	2	non-mucoid	4	uneven	D,D-heptose 1;7-bisphosphate phosphatase;predicted RpiR family transcription factor
ECK1138	<i>jayE</i>	<i>ymfP</i>	2	non-mucoid	4	uneven	e14 prophage;predicted defective Pfam PF04865 Baseplate_J family protein;C-terminal fragment
ECK1136	<i>ymfR</i>		2	non-mucoid	4	uneven	e14 prophage;predicted protein
ECK3151	<i>nlpI</i>	<i>yhbM</i>	1	uneven	4	non-mucoid	lipoprotein involved in osmotic sensitivity and filamentation
ECK3610	<i>waaF</i>	<i>rfaF</i>	1	mucoid	4	uneven	ADP-heptose:LPS heptosyltransferase II
ECK1829	<i>prc</i>	<i>tsp</i>	3	non-mucoid	3	uneven	carboxy-terminal protease for penicillin-binding protein 3
ECK1537	<i>ydfK</i>		3	mucoid	3	mucoid	Qin prophage;predicted cold shock protein;predicted YnaE/YdfK family transcription regulator
ECK3391	<i>envZ</i>	<i>cpr, ompB, perA, tpo</i>	2	non-mucoid	3	uneven	two-component regulatory system sensory histidine kinase protein (autophosphorylation site, His243);senses osmolarity;OmpR is partner response regulator
ECK1232	<i>hns</i>	<i>B1, bglY, cur, drc, drdX, drs, fimG, H1, hnsA, irk, msyA, osmZ, plIG, topS, topX, verA, virR</i>	2	mucoid	3	non-mucoid	global DNA-binding transcription regulator H-NS
ECK2207	<i>ompC</i>	<i>butR, meoA, par</i>	2	uneven	3	non-mucoid	OM (outer membrane) porin protein C
ECK1137	<i>beeE</i>	<i>ymfO</i>	2	uneven	3	uneven	e14 prophage;predicted defective Pfam PF04860 family protein;N-terminal fragment
ECK3042	<i>hldE</i>	<i>gmhC, rfaE, waaE, yqiF</i>	1	mucoid	3	uneven	heptose 7-P kinase/heptose 1-P adenylyltransferase;LPS core precursor synthesis: bifunctional enzyme involved in both D-glycero-D-manno-heptose-1-phosphate and ADP-D-glycero-D-manno-heptose synthesis
ECK1710	<i>ihfA</i>	<i>hid, himA</i>	1		3	non-mucoid	integration host factor (IHF);DNA-binding protein;alpha subunit
ECK0903	<i>ihfB</i>	<i>himD, hip</i>	1	mucoid	3	non-mucoid	integration host factor (IHF);DNA-binding protein;beta subunit
ECK2910	<i>rpiA</i>	<i>ygfC</i>	1	mucoid	3	uneven	ribose 5-phosphate isomerase;constitutive
ECK1139	<i>ymfQ</i>		1		3	uneven	e14 prophage;predicted baseplate or tail fiber protein
ECK2459	<i>talA</i>		2	mucoid	2		transaldolase A
ECK3611	<i>waaC</i>	<i>rfaC, yibC</i>	2		2		LPS heptosyltransferase I;LPS core biosynthesis;transfers innermost heptose to KDO
ECK4070	<i>gltP</i>		1	mucoid	2	uneven	glutamate;aspartate ABC superfamily transporter ATP-binding protein
ECK1817	<i>manZ</i>	<i>gptB, mpt, ptsM, ptsX</i>	1	mucoid	2		mannose-specific enzyme IID component of PTS
ECK3392	<i>ompR</i>	<i>kmt, ompB</i>	1		2	non-mucoid	two-component regulatory system DNA-binding response regulator protein (autophosphorylation site, Asp55);EnvZ is partner histidine kinase protein
ECK0729	<i>tolB</i>		1		2	uneven	periplasmic protein
ECK1034	<i>opgG</i>	<i>mdoA, mdoG</i>	2	mucoid	1	uneven	shifted translation start -18 nt;AUG start codon;osmoregulated periplasmic glumay (OPG) biosynthetic periplasmic beta-1,6-branching glycosyltransferase
ECK0730	<i>pal</i>	<i>excC</i>	2	uneven	1	uneven	peptidoglycan-associated OM (outer membrane) lipoprotein
ECK3119	<i>agaR</i>	<i>yhaW</i>	1	mucoid	1	uneven	transcription regulator (repressor) of aga regulon
ECK4080	<i>aisA</i>	<i>yjcW</i>	1	uneven	1	uneven	D-allose ABC superfamily transporter ATP-binding protein
ECK1826	<i>kdgR</i>	<i>yebP</i>	1		1	non-mucoid	transcription regulator of KDG regulon;DNA-binding
ECK3719	<i>pstA</i>	<i>phoR2b, phoT, R2pho</i>	1	uneven	1	uneven	phosphate-specific ABC superfamily transporter permease
ECK0384	<i>yaiA</i>		1	uneven	1	uneven	predicted protein;OxyR-regulated
ECK0706	<i>ybgP</i>		1	mucoid	1	mucoid	predicted periplasmic pilus chaperone;may be required for the biogenesis of predicted YbgD fimbria
ECK3008	<i>TU-2304</i> <i>ftsP</i>	<i>suffl, sui, ygiJ(S.t.)</i>	3 2	mucoid mucoid			septal ring component that protects the divisome from stress;multicopy suppressor of ftsI(Ts)
ECK2548	<i>glyA</i>		2	uneven			serine hydroxymethyltransferase;binds Zn(II)
ECK2018	<i>hisH</i>		2	uneven			imidazole glycerol phosphate synthase;glutamine amidotransferase subunit with HisF
ECK2737	<i>nlpD</i>		2	mucoid			activator of AmiC murein hydrolase activity;lipoprotein
ECK0740	<i>pnuC</i>		2	mucoid			nicotinamide mononucleotide transport protein
ECK0322	<i>yahJ</i>		2	mucoid			predicted deaminase with metallo-dependent hydrolase domain
ECK0651	<i>ybeY</i>		2	uneven			metal-binding heat shock protein;required for rRNA maturation;ssRNA-specific endoribonuclease;16S rRNA 3' end maturation and quality control co-endoribonuclease working with RNase R;rRNA transcription antitermination factor;involved in late-stage 70S ribosome quality control and maturation of 3' terminus of 16S rRNA
ECK0834	<i>ybjI</i>		2	mucoid			5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino) uracil phosphatase;pyrimidine phosphatase;riboflavin synthesis;catalyzes the dephosphorylation of flavin mononucleotide (FMN) : may also hydrolyze erythrose 4-phosphate (Ery4P)
ECK1191	<i>ychF</i>	<i>engD, gtp1</i>	2	uneven			ribosome-associated K <sup>+</sup> -dependent ATPase
ECK3581	<i>yibF</i>		2	mucoid			predicted glutathione S-transferase homolog;Glutathione (GSH) transferase homolog;that might be involved in selenium metabolism
ECK3850	<i>yihD</i>		2	mucoid			predicted DUF1040 family protein YihD
ECK4206	<i>ytfF</i>		2	mucoid			predicted DMT transport protein family inner membrane protein
ECK1333	<i>TU-6002</i> <i>abgB</i>	<i>ydaI</i>	1	mucoid			p-aminobenzoyl-glutamate hydrolase;B subunit
ECK0866	<i>aqpZ</i>	<i>bniP</i>	1				aquaporin Z
ECK3226	<i>argR</i>	<i>Rarg, xerA</i>	1				transcription regulator;repressor of Arg regulon
ECK3047	<i>bacA</i>	<i>uppP</i>	1	mucoid			Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase BacA(UppP);overproduction confers bacitracin resistance
ECK4244	<i>bdcR</i>	<i>yjgJ</i>	1	uneven			transcription regulator (repressor) of divergent bdcA
ECK1211	<i>chaB</i>		1	uneven			cation transport regulator;accessory and regulatory protein for chaA
ECK0611	<i>citC</i>	<i>ybeO</i>	1	mucoid			citrate lyase ligase:[citrate [pro-3S]-lyase] ligase
ECK0478	<i>copA</i>	<i>ybaR</i>	1	uneven			copper-silver-translocating P family protein ATPase efflux pump;involved in copper resistance;copper- and silver-inducible;regulated by copper-responsive CueR regulator (activator)
ECK0871	<i>cspD</i>	<i>cspH, ybjA</i>	1	uneven			Inhibitor of DNA replication;predicted transcription factor with cold shock domain
ECK0215	<i>dnaQ</i>	<i>mutD</i>	1	uneven			DNA polymerase III epsilon subunit;streptomycin, azaserine-resistant;3' to 5' proofreading;lexA regulon
ECK3531	<i>dppA</i>	<i>alu, dpp, fpp</i>	1	mucoid			dipeptide-;heme-binding protein;periplasmic;for transport and chemotaxis
ECK1181	<i>emtA</i>	<i>mltE, sltZ, ycgP</i>	1				lytic murein endotransglycosylase E
ECK2453	<i>eutD</i>	<i>eutI, ypfA</i>	1	uneven			phosphate acetyltransferase
ECK3349	<i>fic</i>	<i>vhpT(B.s.)</i>	1	mucoid			adenosine monophosphate-protein transferase domain protein;RpoS-regulated;predicted toxin gene

ECK	gene	Synonym	LB		MOPS		Description
			Count	Morphology	Count	Morphology	
ECK3891	<i>frvX</i>	<i>yilI</i>	1	uneven			predicted peptidase homolog
ECK2797	<i>fucl</i>		1				L-fucose isomerase
ECK2799	<i>fucU</i>		1	mucoid			L-fucose mutarotase
ECK2088	<i>gatZ</i>		1	mucoid			D-tagatose 1,6-bisphosphate aldolase 2;subunit
ECK0977	<i>gfcB</i>	<i>ymcC</i>	1				predicted O-antigen capsule production lipoprotein
ECK2974	<i>glcD</i>	<i>gox,yghM</i>	1				glycolate oxidase subunit
ECK3203	<i>gltD</i>	<i>aspB,ossB,psiQ</i>	1	non-mucoid			glutamate synthase;4Fe-4S protein;small subunit
ECK2995	<i>gpr</i>	<i>mgrA,yghZ</i>	1				L-glyceraldehyde 3-phosphate reductase;NADPH-dependent;weak methylglyoxal reductase;overproduction confers increased resistance to methylglyoxal;aldo/keto reductase
ECK3170	<i>greA</i>		1	uneven			transcription elongation factor;transcript cleavage factor
ECK3316	<i>gspH</i>	<i>hoffH,hopH</i>	1	uneven			predicted general secretory pathway component;cryptic
ECK3494	<i>hdeA</i>	<i>yhhC,yhiB</i>	1				stress response protein acid-resistance protein
ECK1147	<i>iraM</i>	<i>elb1,elbA,ycgW</i>	1	non-mucoid			RpoS stabilizer during Mg starvation;anti-RssB factor
ECK1508	<i>lsrD</i>	<i>ydeZ</i>	1				autoinducer 2 (AI-2) import system permease protein
ECK0861	<i>ltaE</i>	<i>ltaA,ybjU</i>	1				L-allo-threonine aldolase;pyridoxal phosphate (PLP)-dependent
ECK0869	<i>macA</i>	<i>ybjY</i>	1	uneven			bifunctional macrolide transport protein subunits of ABC superfamily protein: ATP-binding component; membrane fusion protein (MFP) component
ECK4510	<i>mgrR</i>		1	uneven			sRNA antisense regulator down regulates YgdQ and EptB;PhoPQ-regulated;Hfq-dependent;affects sensitivity to antimicrobial peptides
ECK2202	<i>mgo</i>	<i>yojH</i>	1	mucoid			malate dehydrogenase;FAD/NAD(P)-binding domain
ECK0100	<i>mutT</i>	<i>nudA</i>	1	uneven			nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase marked preference for dGTP 7,8-dihydro-8-oxoguanine-triphosphate prefers dGTP causes AT-GC transversions
ECK1983	<i>nac</i>		1	non-mucoid			DNA-binding transcription regulator (repressor) of <i>gdhA</i> , <i>RpoN</i> , and <i>GlnG</i> (NtrC) regulons for nitrogen assimilation
ECK2572	<i>nadB</i>	<i>nic,nicB</i>	1	uneven			quinolinate synthase;L-aspartate oxidase (B protein) subunit
ECK2196	<i>napH</i>	<i>yejZ</i>	1	uneven			ferredoxin family protein essential for electron transfer from ubiquinol to periplasmic nitrate reductase (NapAB)
ECK3464	<i>nikE</i>	<i>hydC,hydD</i>	1	uneven			nickel ABC superfamily transporter ATPase
ECK3354	<i>nirD</i>		1	uneven			nitrite reductase;NAD(P) H-binding;small subunit
ECK4063	<i>nrfA</i>		1	mucoid			nitrite reductase;formate-dependent;cytochrome
ECK2281	<i>nuoB</i>		1				NADH:ubiquinone oxidoreductase;chain B
ECK1391	<i>paaG</i>	<i>ydbT</i>	1	mucoid			1,2-epoxyphenylacetyl-CoA isomerase;oxepin-CoA-forming;phenylacetic acid degradation
ECK0132	<i>panC</i>		1	uneven			pantothenate synthetase
ECK2595	<i>pheL</i>	<i>pheAE</i>	1				<i>pheA</i> gene leader peptide
ECK3717	<i>phoU</i>	<i>phoT</i>	1	uneven			negative regulator of PhoR/PhoB two-component regulatory system;Bag domain, chaperone Hsp70 family protein suggests PhoU promotes dephosphorylation of phospho-PhoR/PhoB via protein-protein interaction
ECK2822	<i>ppdA</i>		1				predicted prepilin peptidase-dependent protein
ECK2159	<i>psuK</i>	<i>pscK,yeiC</i>	1				pseudouridine kinase
ECK3193	<i>ptsN</i>	<i>rpoP,yhbl</i>	1	uneven			sugar-specific enzyme IIA component of PTS
ECK2555	<i>purL</i>	<i>purG</i> (S.t.), <i>purI</i>	1	non-mucoid			phosphoribosylformyl-glycineamide synthetase
ECK2949	<i>rdgB</i>	<i>yggV</i>	1				dITP/XTP pyrophosphatase
ECK2818	<i>recC</i>		1	uneven			exonuclease V (RecBCD complex);gamma chain
ECK3894	<i>rhaM</i>	<i>yilL</i>	1				L-rhamnose mutarotase
ECK4238	<i>ridA</i>	<i>yjgF</i>	1				enamine/imine deaminase;reaction intermediate detoxification
ECK1361	<i>rzoR</i>	<i>Rz1</i>	1				Rac cryptic prophage;predicted lipoprotein
ECK1812	<i>sdaA</i>		1	non-mucoid			L-serine deaminase I
ECK0716	<i>sucC</i>		1	uneven			succinyl-CoA synthetase;beta subunit;acid inducible
ECK1246	<i>tonB</i>	<i>exbA,T1rec</i>	1	uneven			membrane spanning protein in TonB-ExbB-ExbD transport complex
ECK2060	<i>udk</i>	<i>uck</i>	1	mucoid			uridine/cytidine kinase
ECK3621	<i>waaG</i>	<i>rfaG</i>	1	mucoid			UDP-glucose:(heptosyl) LPS alpha-1,3-glucosyltransferase;LPS core biosynthesis protein;glucosyltransferase I
ECK0163	<i>yael</i>		1				predicted phosphodiesterase;shows phosphodiesterase activity with model artificial chromogenic substrate bis-p-nitrophenyl phosphate (bis-pNPP)
ECK0492	<i>ybbC</i>		1	uneven			predicted immunity protein downstream of <i>rhsD</i>
ECK0673	<i>ybfE</i>		1	mucoid			LexA-regulated protein;CopB family protein
ECK0782	<i>ybhS</i>		1	uneven			predicted inner membrane transport subunit of ABC superfamily protein
ECK0890	<i>ycaM</i>		1	uneven			predicted Inner membrane transport protein
ECK1072	<i>yceF</i>		1	uneven			predicted Maf family protein;m(7) GTP pyrophosphatase
ECK1090	<i>ycfL</i>		1	uneven			predicted protein
ECK1305	<i>ycjN</i>		1	mucoid			predicted ABC sugar transport protein periplasmic binding protein
ECK1609	<i>ydgA</i>		1				predicted DUF945 family protein
ECK1785	<i>yeaK</i>		1	uneven			aminoacyl-tRNA editing domain protein
ECK1999	<i>yeeW</i>		1	uneven			CP4-44 cryptic prophage predicted protein
ECK2012	<i>yefM</i>		1				antitoxin of YoeB-YefM toxin-antitoxin system;antitoxin component of a toxin-antitoxin (TA) module;antitoxin that counteracts the effect of YoeB toxin;YefM binds to the promoter region of <i>yefM-yeoB</i> operon to repress transcription;YeoB acts as a corepressor
ECK2061	<i>yegE</i>		1				predicted diguanylate cyclase;GGDEF domain signaling protein
ECK2110	<i>yehK</i>		1	uneven			predicted protein
ECK2642	<i>yfjZ</i>		1				CP4-57 cryptic prophage predicted antitoxin of YpfJ-YfjZ toxin-antitoxin system
ECK2927	<i>yggP</i>		1	uneven			predicted dehydrogenase
ECK3099	<i>yhaM</i>	<i>yhaN</i>	1	uneven			predicted L-serine dehydratase alpha chain
ECK3162	<i>yhbX</i>		1	uneven			predicted EptAB family protein phosphoethanolamine transferase;inner membrane protein
ECK3227	<i>yhcN</i>		1	uneven			predicted cadmium and peroxide resistance protein;stress-induced
ECK3697	<i>yidD</i>		1	non-mucoid			predicted UPF0161 family protein;may be involved in insertion of integral membrane proteins
ECK3670	<i>yidK</i>		1	non-mucoid			predicted transport protein
ECK4344	<i>yjiY</i>	<i>oppE?</i>	1				predicted inner membrane transport protein;YehTU-regulated in stationary phase
ECK0827	<i>ylii</i>		1	uneven			soluble aldose sugar dehydrogenase
ECK1016	<i>ymdE</i>		1	mucoid			predicted defective FabD family protein malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase;C-terminal fragment
ECK1519	<i>yneJ</i>		1				predicted LysR family protein DNA-binding transcription regulator of <i>lamB</i>
ECK1503	<i>yneO</i>	<i>orfT,ydeK,ydeU</i>	1	uneven			predicted defective OM autotransporter adhesin;AidA homolog
ECK2646	<i>ypjC</i>	<i>ypjB</i>	1				predicted defective protein with eight;predicted transmembrane helices;apparent stop at codon 161
ECK1035	<i>opgH</i>	<i>mdoA,mdoH</i>			4	uneven	membrane glycosyltransferase (OPG) biosynthetic ACP-dependent transmembrane UDP-glucose beta-1,2 glycosyltransferase;nutrient-dependent cell size regulator;FtsZ assembly antagonist
ECK1538	<i>pinQ</i>	<i>ydfL</i>			4	uneven	Qin prophage;predicted site-specific recombinase



ECK	gene	Synonymn	LB		MOPS		Description
			Count	Morphology	Count	Morphology	
ECK1488	<i>pqqL</i>	<i>pqqE,pqqM,yddC</i>			4	uneven	shifted translation start +12 nt;AUG start codon;predicted periplasmic M16 family protein zinc metalloendopeptidase
ECK2570	<i>rseA</i>	<i>mclA,yfiJ</i>			4	uneven	anti-sigma factor
ECK3599	<i>secB</i>				4	uneven	protein export chaperone
ECK0728	<i>toIA</i>	<i>cim,excC,lky</i>			4	uneven	membrane anchored protein in ToIA-ToIQ-ToIR complex
ECK3881	<i>yiiD</i>				4	mucoid	shifted translation start +48 nt;AUG start codon;predicted GNAT family protein N-acetyltransferase
ECK1173	<i>dsbB</i>	<i>dsbX,iarB,roxB,ycgA</i>			3	uneven	disulfide oxidoreductase;membrane-spanning protein;oxidizes periplasmic DsbA;DTT-sensitive phenotype
ECK3937	<i>gldA</i>				3	non-mucoid	Glycerol dehydrogenase;NAD+ dependent;1,2-propanediol (and derivatives) oxidoreductase;D-1-amino-2-propanol:NAD+ oxidoreductase
ECK0648	<i>gltI</i>	<i>ybeJ,yzzK</i>			3	uneven	glutamate/aspartate periplasmic binding protein component of GltJKLI ABC superfamily transporter
ECK0433	<i>lon</i>	<i>capR,deg,dir,lonA,lopA,muc</i>			3	mucoid	DNA-binding ATP-dependent protease La;lon mutants form long filamentous cells
ECK1145	<i>mcrA</i>	<i>rgIA</i>			3	uneven	e14 prophage;5-methylcytosine-specific restriction endonuclease B
ECK2277	<i>nuoG</i>				3	uneven	NADH:ubiquinone oxidoreductase;chain G
ECK0948	<i>ompA</i>	<i>con,tolG,tut</i>			3		OM (outer membrane) protein A with weak porin activity;T-even phage receptor;homodimer, abundant cell surface protein
ECK2892	<i>sdhE</i>	<i>cptB,ygfY</i>			3	uneven	Flavinator of succinate dehydrogenase;antitoxin of CptAB toxin-antitoxin pair
ECK3631	<i>slmA</i>	<i>ttk,yicB</i>			3	uneven	DNA-binding anti-FtsZ division inhibitor;predicted TetR family transcription factor
ECK0727	<i>tolR</i>				3	uneven	membrane spanning protein in ToIA-ToIQ-ToIR complex
ECK2580	<i>trxC</i>	<i>yfiG</i>			3	uneven	thioredoxin 2
ECK1530	<i>ydeJ</i>				3	uneven	predicted defective PncC family protein;does not have nicotinamide-nucleotide (NMN) amidohydrolase activity
ECK2925	<i>yggD</i>				3	uneven	predicted DNA-binding MtrYggD family transcription regulator
ECK2945	<i>yggR</i>				3	non-mucoid	predicted pilus retraction ATPase
ECK2128	<i>yohC</i>				3	non-mucoid	predicted Yip1 family inner membrane protein
ECK0743	<i>aroG</i>				2	uneven	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase;phenylalanine repressible
ECK1729	<i>cedA</i>	<i>ydjP</i>			2	uneven	DNA-binding cell division modulator
ECK0081	<i>cra</i>	<i>fruC,fruR,fruS?,serR?,shl</i>			2		catabolite regulator (repressor)-regulator (activator) transcription repressor of fru operon and others
ECK1479	<i>ddpC</i>	<i>yddQ</i>			2	uneven	D;D-dipeptide ABC superfamily transporter;membrane translocase
ECK0642	<i>djIC</i>	<i>hscD,ybeV</i>			2	mucoid	J domain-containing HscC co-chaperone;Hsc56
ECK4140	<i>epmB</i>	<i>yjeK</i>			2	non-mucoid	protein required for EF-P-mediated translation of polyprolines;lysylation of EF-P Lys34;weak lysine 2,3-aminomutase activity
ECK2969	<i>glcA</i>	<i>yghK</i>			2	uneven	glycolate permease;also recognizes lactate
ECK4312	<i>gntP</i>	<i>yjiB</i>			2	uneven	fructuronate and gluconate transport protein
ECK0082	<i>mraZ</i>	<i>yabB</i>			2	uneven	DNA-binding transcription regulator and inhibitor of RsmH methyltransferase activity
ECK2920	<i>mscS</i>	<i>yggB</i>			2	uneven	mechanosensitive channel protein;small conductance
ECK3214	<i>nanA</i>	<i>npl</i>			2	mucoid	N-acetylneuraminatase lyase
ECK3215	<i>nanR</i>	<i>yhcK</i>			2	non-mucoid	shifted translation start +9 nt;AUG start codon;transcription regulator of nan operon;induced by sialic acid;DNA-binding
ECK1217	<i>narK</i>				2	non-mucoid	nitrate/nitrite transport protein
ECK2124	<i>osmF</i>	<i>yehZ</i>			2	uneven	predicted transport protein subunit: periplasmic-binding component of ABC superfamily protein
ECK0242	<i>phoE</i>	<i>ompE</i>			2	uneven	OM (outer membrane) phosphoprotein protein E
ECK4083	<i>rpIB</i>	<i>alsB,alsI,yjcA</i>			2	uneven	ribose 5-phosphate isomerase B/allose 6-phosphate isomerase
ECK2170	<i>rtn</i>				2	uneven	predicted membrane-anchored cyclic-di-GMP phosphodiesterase
ECK2470	<i>tmcA</i>	<i>ypfl</i>			2	uneven	elongator methionine tRNA (ac4C34) acetyltransferase
ECK1172	<i>umuC</i>	<i>uvm</i>			2	uneven	DNA polymerase V;subunit C
ECK3479	<i>uspB</i>	<i>yhiO</i>			2	uneven	universal stress (ethanol tolerance) protein B
ECK0910	<i>ycbJ</i>				2	uneven	predicted kinase family protein domain protein
ECK2267	<i>yfbN</i>				2	uneven	predicted protein
ECK3145	<i>yhbT</i>				2	uneven	SCP-2 sterol transfer family protein
ECK3450	<i>yhhL</i>				2	non-mucoid	predicted DUF1145 family protein
ECK4018	<i>yjbE</i>				2	uneven	extracellular polysaccharide production threonine-rich protein
ECK4285	<i>yjhF</i>				2	uneven	KpLE2 phage family protein element;predicted GntP family protein transport protein
ECK4371	<i>yjjW</i>				2	uneven	predicted pyruvate formate lyase activating enzyme
ECK0823	<i>yliE</i>				2	uneven	predicted cyclic-di-GMP phosphodiesterase;inner membrane protein;overproduction reduces biofilm formation;cyclic-di-GMP acts as second messenger that controls cell surface-associated traits
ECK1583	<i>ynfF</i>				2	uneven	predicted DMSO (dimethyl sulfoxide) reductase chain YnfF;S- and N-oxide reductase;A subunit;periplasmic;terminal reductase during anaerobic growth on various sulfoxide and N-oxide compounds
ECK3092	<i>yqjF</i>				2	non-mucoid	predicted quinol oxidase subunit
ECK1859	<i>znuC</i>	<i>yebM</i>			2	non-mucoid	ABC superfamily protein zinc transport protein;ATP-binding component
ECK0574	<i>hokE</i>	<i>ybdY</i>			1	uneven	toxic polypeptide;small
	<b>TU-5077</b>				1	uneven	
ECK1135	<i>aaaE</i>	<i>ymlN</i>			1		e14 prophage;predicted defective phage terminase protein A family protein
ECK1618	<i>add</i>				1	uneven	adenosine deaminase
ECK2463	<i>aegA</i>	<i>yffG</i>			1	uneven	predicted bifunctional oxidoreductase: FeS binding subunit/NAD/FAD-binding subunit
ECK3128	<i>agaD</i>	<i>yraF</i>			1	uneven	Enzyme IID Nag;PTS system;N-acetylgalactosamine-specific enzyme IID;EIID-Nag;remnant of aga operon
ECK0505	<i>allB</i>	<i>glxB3,ybbX</i>			1	uneven	allantoinase: allantoin for anaerobic nitrogen;tetrameric
ECK0463	<i>apt</i>				1	uneven	adenine phosphoribosyltransferase;adenine salvage;AMP from PRPP + Ade
ECK2839	<i>araE</i>				1	uneven	low-affinity L-arabinose transport protein
ECK3199	<i>arcZ</i>	<i>psrA16,ryhA,sraH</i>			1	uneven	sRNA positive antisense regulator of rpoS;binds Hfq
ECK0111	<i>aroP</i>				1	uneven	aromatic amino acid transport protein
ECK4009	<i>arpA</i>	<i>yjaC</i>			1	mucoid	ankyrin repeat protein
ECK3488	<i>arsC</i>	<i>arsG</i>			1	uneven	arsenate reductase
ECK0855	<i>artP</i>				1	uneven	arginine ABC superfamily transporter ATPase
ECK3515	<i>bcsC</i>	<i>yhlL</i>			1	non-mucoid	cellulose synthase subunit
ECK0312	<i>betT</i>				1	uneven	High-affinity choline transport protein;BCCT family protein;bet genes confer protection against osmotic stress by making the osmoprotectant glycine betaine from choline
ECK1620	<i>blr</i>				1	uneven	beta-lactam resistance protein;divisome-associated membrane protein;multi-copy suppressor of ftsQ1(Ts)
ECK4185	<i>bsmA</i>	<i>yjfO</i>			1	uneven	biofilm peroxide resistance protein
ECK3910	<i>cdh</i>	<i>pnuE(S.t.),ushB(S.t.)</i>			1	uneven	CDP-diacylglycerol phosphatidylhydrolase
ECK1871	<i>cmoA</i>	<i>yecO</i>			1	uneven	carboxy-SAM (S-adenosyl-L-methionine) synthase

ECK	gene	Synonym	LB		MOPS		Description
			Count	Morphology	Count	Morphology	
ECK3905	<i>cpXR</i>	<i>yiiA</i>			1	mucoid	two-component regulatory system DNA-binding response regulator protein (autophosphorylation site, Asp51); CpxA is partner histidine kinase protein
ECK2532	<i>csiE</i>	<i>csi-16</i>			1	uneven	stationary phase inducible protein; sigma S-dependent promoter
ECK3543	<i>cspA</i>				1	uneven	cold-inducible RNA chaperone and anti-terminator; aids gene expression at low temperature; cold shock protein CS7.4; binds ssRNA and ssDNA
ECK1443	<i>curA</i>	<i>yncB</i>			1	uneven	curcumin/dihydrocurcumin reductase; NADPH-dependent
ECK0566	<i>cusB</i>	<i>silB(S.t.), ylcD</i>			1	uneven	copper/silver efflux system; membrane fusion protein
ECK1875	<i>cutC</i>	<i>dinY?</i>			1	non-mucoid	predicted copper homeostasis protein
ECK0336	<i>cynT</i>				1	uneven	carbonic anhydrase; beta class
ECK2059	<i>dcd</i>	<i>dus, paxA</i>			1	mucoid	dCTP deaminase; mutants suppress lethal dut mutants
ECK4373	<i>deoC</i>	<i>dra, thyR, tlr</i>			1	uneven	2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase (DERA); deoxyriboaldolase
ECK3687	<i>dgoR</i>	<i>yidW</i>			1	non-mucoid	predicted GntR family transcription regulator (repressor) of dgoKAT operon; growth on 2-keto-3-deoxygalactonate; binds D-galactonate as an inducer
ECK3635	<i>dinD</i>	<i>orfY, pcsA, yicD</i>			1	uneven	DNA damage-inducible protein D
ECK1797	<i>dmlR</i>	<i>yeaT</i>			1	uneven	LysR family transcription regulator (activator) of dmlA; autoregulator (repressor)
ECK1950	<i>dsrB</i>				1	uneven	predicted protein regulated by DsrA; H-NS; and RpoS
ECK1852	<i>edd</i>				1	non-mucoid	6-phosphogluconate dehydratase
ECK2260	<i>elaB</i>	<i>yfbD</i>			1	uneven	ribosome-binding protein of unknown function; may be membrane-anchored
ECK3603	<i>envC</i>	<i>slm11, yibP</i>			1	uneven	activator of AmiB, C murein hydrolases; septal ring factor
ECK2320	<i>epmC</i>	<i>yfcM</i>			1	uneven	elongation Factor P Lys34 hydroxylase
ECK2455	<i>eutQ</i>	<i>ypfC</i>			1	uneven	ethanolamine utilization (eut) operon protein of unknown function
ECK2999	<i>exbB</i>				1	uneven	Uptake of enterochelin; resistance or sensitivity to colicins; similarity with TolQ
ECK0151	<i>fhuD</i>				1	uneven	ferric hydroxamate periplasmic binding protein; fhuD mutants are albomycin-resistant hydroxamate-dependent iron uptake cytoplasmic membrane component
ECK4306	<i>fimI</i>				1	uneven	fimbrial protein involved in type 1 pilus biosynthesis; FimA homolog
ECK0045	<i>fixX</i>	<i>yaaT</i>			1	mucoid	predicted ferredoxin related to carnitine metabolism
ECK1936	<i>fliF</i>	<i>flaAll, 1, flaBl</i>			1	uneven	flagellar basal body M-ring protein
ECK2315	<i>flk</i>	<i>div, rflH</i>			1	uneven	flagella assembly protein; prevents premature secretion of FigM; senses flagellar assembly stage
ECK3836	<i>fre</i>	<i>fadI, flrD, fsrC, hsm-6</i>			1	non-mucoid	NAD(P) H-flavin reductase; ferrisiderophore reductase C
ECK2795	<i>fucA</i>	<i>fucC, prd</i>			1	uneven	L-fucose-1-phosphate aldolase
ECK1486	<i>gadC</i>	<i>acsA, xasA</i>			1	uneven	glutamate:gamma-aminobutyric acid antiporter
ECK3114	<i>garL</i>	<i>yhaF</i>			1	uneven	alpha-dehydro-beta-deoxy-D-glucarate aldolase
ECK2086	<i>gatB</i>				1	uneven	galactitol-specific PTS system EIIC component
ECK2972	<i>gicF</i>	<i>gox, yghL</i>			1	uneven	glycolate oxidase 4Fe-4S iron-sulfur cluster subunit
ECK3862	<i>glnL</i>	<i>glnR, ntrB</i>			1	uneven	two-component regulatory system sensory histidine kinase protein (autophosphorylation site, His139); GlnG is partner response regulator; nitrogen regulator II; NRII
ECK3204	<i>gltF</i>	<i>ossB</i>			1	uneven	periplasmic protein
ECK3393	<i>greB</i>				1	non-mucoid	transcript cleavage factor
ECK3309	<i>gspB</i>	<i>pinO, pioO</i>			1	non-mucoid	part of gsp divergon involved in type II protein secretion
ECK3318	<i>gspJ</i>	<i>yhel</i>			1	non-mucoid	predicted general secretory pathway component; cryptic
ECK3320	<i>gspL</i>	<i>yheK</i>			1	uneven	general secretory pathway component; cryptic
ECK0104	<i>guaC</i>				1	uneven	guanine deaminase; an aminohydrolase; ammeline deaminase
ECK0953	<i>hclD</i>	<i>srjB</i>			1	uneven	DNA helicase IV
ECK1431	<i>hicA</i>	<i>yncN</i>			1	uneven	mRNA interferase toxin of HicAB toxin-antitoxin system
ECK1500	<i>hipA</i>				1	non-mucoid	serine protein kinase; required for persister formation; toxin of HipAB toxin-antitoxin system; EF-Tu kinase
ECK3608	<i>hldD</i>	<i>gmhD, htrM, nbsB, rfaD, waaD</i>			1	uneven	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase; heat-inducible; LPS; allows high-temperature growth
ECK4338	<i>hsdS</i>	<i>hsp, hss</i>			1	uneven	specificity determinant for hsdM and hsdR
ECK0434	<i>hupB</i>	<i>dpeA, hopD</i>			1	uneven	HU; DNA-binding transcription regulator; beta subunit
ECK0966	<i>hyaD</i>				1	uneven	hydrogenase 1 maturation protease
ECK2984	<i>hybG</i>				1	mucoid	hydrogenase 2 accessory protein
ECK2715	<i>hycF</i>	<i>hevF</i>			1	non-mucoid	formate hydrogenlyase complex iron-sulfur protein
ECK3678	<i>ibpB</i>	<i>hslS, htpE</i>			1	uneven	heat shock chaperone
ECK4010	<i>iclR</i>				1	uneven	transcription regulator; DNA-binding
ECK3661	<i>ilvN</i>				1	uneven	acetolactate synthase I; small subunit
ECK2525	<i>iscA</i>	<i>yfhF</i>			1	uneven	FeS cluster assembly protein
ECK3934	<i>katG</i>				1	uneven	catalase-peroxidase HPI; heme b-containing
ECK3902	<i>kdgT</i>				1	uneven	2-keto-3-deoxy-D-gluconate permease (transport) protein
ECK3187	<i>kdsC</i>	<i>yrbl, yrbJ</i>			1	mucoid	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase
ECK2840	<i>kduD</i>	<i>ygeC, yqeD</i>			1	uneven	2-deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase; KDG oxidoreductase; DKII reductase; 20-ketosteroid reductase
ECK2931	<i>loiP</i>	<i>yggG</i>			1	uneven	Phe-Phe periplasmic metalloprotease; OM (outer membrane) lipoprotein; low salt-inducible; heat shock protein that binds Era; predicted YcaL family transcription factor
ECK0880	<i>lrp</i>	<i>alsB, ihb, livR, lrs, lss, lstR, mbf, oppI, rblA</i>			1	uneven	transcription regulator; leucine-binding; DNA-binding
ECK0807	<i>mntR</i>	<i>ybiQ</i>			1	non-mucoid	DNA-binding transcription regulator of mntH manganese regulon; Mn(2+)-responsive
ECK3013	<i>mqsR</i>	<i>ygiU</i>			1	uneven	GCU-specific mRNA interferase toxin of MqsR-MqsA toxin-antitoxin system and biofilm/motility regulator
ECK0703	<i>nei</i>				1	uneven	endonuclease VIII/5-formyluracil/5-hydroxymethyluracil DNA glycosylase
ECK3460	<i>nikA</i>	<i>hydC, hydD</i>			1	uneven	nickel-binding and heme-binding ABC superfamily transporter periplasmic protein
ECK3651	<i>nlpA</i>				1	uneven	cytoplasmic membrane lipoprotein-28
ECK0615	<i>pagP</i>	<i>arcA, ybeG</i>			1	uneven	shifted translation start +6 nt; GUG start codon; phospholipid:lipid A palmitoyltransferase
ECK0419	<i>panE</i>	<i>apbA(S.t.)</i>			1	non-mucoid	2-dehydropantoate reductase; NADPH-specific; ketopantoate reductase (KPR)
ECK0284	<i>paoB</i>	<i>yagS</i>			1	uneven	PaoABC aldehyde oxidoreductase; FAD-containing subunit
ECK2520	<i>pepB</i>	<i>yfhI</i>			1	uneven	aminopeptidase B
ECK1721	<i>pfkB</i>				1	uneven	6-phosphofructokinase II
ECK2981	<i>pitB</i>				1	uneven	cryptic low-affinity phosphate transport protein
ECK2821	<i>ppdB</i>	<i>ygdC</i>			1	mucoid	predicted prepilin peptidase-dependent protein
ECK2497	<i>ppk</i>				1	uneven	polyphosphate kinase; component of RNA degradosome
ECK1701	<i>ppsR</i>	<i>duf299, ydiA</i>			1	mucoid	bifunctional regulatory protein: PEP synthase kinase and PEP synthase pyrophosphorylase
ECK0461	<i>priC</i>				1	mucoid	primosomal replication protein N'
ECK4207	<i>qorB</i>	<i>qor2, ytfG</i>			1	mucoid	NAD(P) H:quinone oxidoreductase
ECK3813	<i>rarD</i>	<i>yigH</i>			1	uneven	predicted chloramphenicol resistance permease
ECK3471	<i>rbbA</i>	<i>yhiG, yhiH</i>			1	uneven	bifunctional ribosome-associated ATPase: ATP-binding protein/ATP-binding protein/predicted membrane protein
ECK3156	<i>rbfA</i>	<i>sdr-43, yhbB</i>			1	uneven	30s ribosome binding factor
ECK0388	<i>rdgC</i>	<i>yaiD</i>			1	uneven	nucleoid-associated ssDNA and dsDNA binding protein; competitive inhibitor of RecA function

ECK	gene	Synonymn	LB		MOPS		Description
			Count	Morphology	Count	Morphology	
ECK3775	<i>rho</i>	<i>hdf,nitA,nusD,psuA,rmsC,sb</i> <i>aA,sun,tabC,tsu</i>			1	uneven	transcription termination factor
ECK3159	<i>rimP</i>	<i>yhbC</i>			1	uneven	ribosome maturation factor for 30S subunits
ECK4176	<i>rlmB</i>	<i>yjflH</i>			1	mucoid	23S rRNA mG2251 2'-O-ribose methyltransferase;SAM (S-adenosyl-L-methionine)-dependent
ECK4196	<i>rpsF</i>	<i>sdgH</i>			1	uneven	30S ribosomal subunit protein S6
ECK0072	<i>setA</i>	<i>yabM</i>			1		broad specificity sugar efflux system
ECK4502	<i>shoB</i>	<i>ryfB,yphI</i>			1	mucoid	toxic membrane protein
ECK3490	<i>slp</i>				1	uneven	OM (outer membrane) lipoprotein
ECK3335	<i>slyX</i>				1	mucoid	phi X174 lysis protein
ECK2169	<i>mepS</i>	<i>spr,yeiV</i>			1	mucoid	murein DD-endopeptidase;space-maker hydrolase;mutational suppressor of prc thermosensitivity;OM (outer membrane) lipoprotein
ECK2875	<i>ssnA</i>	<i>ygfL</i>			1	uneven	predicted chlorohydrolase/aminohydrolase
ECK0949	<i>sulA</i>	<i>sfiA</i>			1	mucoid	SOS cell division inhibitor
ECK3107	<i>tdcA</i>				1	uneven	transcription regulator of <i>tdc</i> operon;DNA-binding
ECK1423	<i>tehB</i>				1	uneven	tellurite resistance protein;predicted SAM (S-adenosyl-L-methionine)-dependent methyltransferase
ECK0988	<i>torA</i>				1	uneven	trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase I;catalytic subunit
ECK0985	<i>torT</i>	<i>yccH</i>			1	uneven	periplasmic sensory protein associated with TorS/TorR two-component regulatory system
ECK3155	<i>truB</i>	<i>yhbA</i>			1	uneven	tRNA U55 pseudouridine synthase
ECK3864	<i>typA</i>	<i>bipA,yihK</i>			1	uneven	ribosome-associated GTP-binding protein
ECK3435	<i>ugpE</i>				1	uneven	glycerol-3-phosphate transport protein subunit
ECK3480	<i>uspA</i>				1	uneven	universal stress global response regulator
ECK1514	<i>uxaB</i>				1	uneven	altronate oxidoreductase;NAD-dependent
ECK3083	<i>uxaC</i>	<i>ygiX,ygiY,ygiZ</i>			1	mucoid	uronate isomerase
ECK4315	<i>uxuR</i>				1	non-mucoid	DNA-binding transcription regulator of fructuronate-inducible hexuronate <i>uxu</i> regulon
ECK3777	<i>wzzE</i>	<i>metNst,wzz,yifC</i>			1	uneven	entobacterial common antigen (ECA) polysaccharide chain length modulation protein
ECK0066	<i>yabl</i>				1	uneven	predicted DedA family inner membrane protein;SNARE_assoc family protein;ionizing radiation survival protein
ECK0136	<i>yadL</i>				1	uneven	predicted fimbrial family adhesin protein of <i>yadCKLM-htrE-yadVN</i> fimbrial operon
ECK0208	<i>yafC</i>				1	mucoid	predicted DNA-binding LysR family transcription regulator
ECK0224	<i>yafJ</i>				1	mucoid	predicted type 2 glutamine amidotransferase family protein
ECK0213	<i>yafS</i>				1	mucoid	predicted S-adenosyl-L-methionine (SAM)-dependent methyltransferase
ECK0279	<i>yagN</i>				1	non-mucoid	CP4-6 cryptic prophage predicted protein
ECK0281	<i>yagP</i>				1	uneven	pseudogene LysR family protein fragment;predicted transcription regulator LYSR family protein
ECK0380	<i>yaiC</i>	<i>adrA(S.t.)</i>			1		predicted CsgD-regulated membrane sensor diguanylate cyclase for cellulose biofilm and motility regulation
ECK0356	<i>yaiX</i>	<i>yaiF</i>			1	uneven	predicted defective acetyltransferase;interrupted by IS2
ECK0374	<i>yaiY</i>				1	uneven	predicted inner membrane protein;DUF2755 family protein
ECK0477	<i>ybaQ</i>				1	mucoid	predicted DNA-binding YbaQ family transcription regulator
ECK0506	<i>ybbY</i>	<i>glxB4</i>			1	uneven	predicted uracil/xanthine transport protein
ECK0678	<i>ybfG</i>	<i>ybfH</i>			1	uneven	predicted defective DUF2625 family protein
ECK0762	<i>ybhB</i>				1	uneven	predicted UPF0098 family protein cytoplasmic protein;Raf kinase inhibitor RKIP homolog
ECK0775	<i>ybhL</i>	<i>aceP</i>			1	uneven	predicted UPF0005 family inner membrane acetate transport protein;BAX Inhibitor-1 family protein
ECK0860	<i>ybjT</i>				1	uneven	predicted NAD-dependent oxidoreductase with NAD(P)-binding domain
ECK0889	<i>ycaD</i>				1	uneven	predicted MFS family inner membrane transport protein
ECK0897	<i>ycaP</i>				1	mucoid	predicted UPF0702 family inner membrane protein
ECK0992	<i>yccE</i>				1	mucoid	predicted PRK09784 family protein
ECK1214	<i>ycho</i>	<i>ychP</i>			1	uneven	predicted invasin;intimin/invasin homolog
ECK1313	<i>ycjV</i>	<i>ymjB</i>			1		predicted defective ATP-binding MalK family protein component of a transport system;apparent frameshift at codon 321
ECK1380	<i>ydbL</i>				1	uneven	predicted DUF1318 family protein
ECK1932	<i>yedN</i>	<i>yedM</i>			1	uneven	predicted defective IpaH/YopM family protein;apparent frameshifts at codons 104 and 331 and stop at codon 268
ECK1978	<i>yeeN</i>				1	uneven	predicted UPF0082 family protein
ECK2063	<i>yegD</i>				1	uneven	predicted Hsp70 chaperone family protein
ECK2178	<i>yejH</i>	<i>yejI,yejJ</i>			1	uneven	predicted ATP-dependent DNA or RNA helicase
ECK2236	<i>yfaD</i>				1	non-mucoid	predicted transposase_31 family protein
ECK2371	<i>yfdX</i>				1	non-mucoid	predicted secreted protein
ECK2392	<i>yfeC</i>				1	uneven	shifted translation start -15 nt;AUG start codon;predicted DUF1323 YfeC/YfeD family DNA- binding transcription regulator
ECK2425	<i>yfeW</i>	<i>pbp4B</i>			1	uneven	predicted periplasmic esterase;weak penicillin binding protein PBP4B
ECK2602	<i>yfiB</i>				1	uneven	predicted positive effector of YfiN activity;OM (outer membrane) lipoprotein
ECK2635	<i>yfjV</i>	<i>ypjL,ypjM</i>			1	non-mucoid	CP4-57 cryptic prophage predicted defective pump protein
ECK2649	<i>ygaQ</i>	<i>ygaR,yqaC,yqaD</i>			1	uneven	predicted alpha-amylase-related domain protein required for swarming phenotype
ECK2765	<i>ygcR</i>				1	uneven	predicted flavoprotein with role in a redox process
ECK2793	<i>ygdG</i>	<i>exo,xni</i>			1	uneven	Ssb-binding protein;misidentified as ExoIX;synthetic lethal with <i>polA</i> ;no nuclease activity detected;flap endonuclease family protein (FEN family protein) protein
ECK2829	<i>ygdR</i>				1	mucoid	predicted DUF903 family protein;verified lipoprotein
ECK3011	<i>ygiS</i>				1	uneven	predicted periplasmic-binding component of ABC superfamily complex for deoxycholate transport system
ECK3015	<i>ygiW</i>				1	uneven	predicted hydrogen peroxide and cadmium resistance periplasmic protein;stress-induced OB-fold protein
ECK3068	<i>ygiL</i>	<i>ebgB</i>			1		predicted inner membrane transport protein
ECK3098	<i>yhaL</i>				1	uneven	predicted protein
ECK3141	<i>yhbO</i>				1	uneven	stress-resistance protein;predicted protease homolog
ECK3222	<i>yhbB</i>				1	mucoid	predicted DUF1043 family inner membrane-anchored protein
ECK3346	<i>yhfK</i>				1	non-mucoid	predicted FUSC superfamily inner membrane transport protein
ECK3365	<i>yhfU</i>				1	non-mucoid	predicted DUF2620 family protein
ECK3367	<i>yhfW</i>				1	uneven	predicted phosphopentomutase-related metalloenzyme superfamily protein
ECK3370	<i>yhfZ</i>				1	mucoid	predicted DNA-binding transcription regulator
ECK3467	<i>yhhH</i>				1	uneven	predicted NTF2 fold immunity protein for polymorphic toxin RhsB
ECK3457	<i>yhhS</i>				1	uneven	predicted arabinose efflux transport protein
ECK3472	<i>yhil</i>				1	uneven	predicted membrane fusion protein (MFP) of efflux pump
ECK3477	<i>yhiN</i>				1	uneven	predicted oxidoreductase with FAD/NAD(P)-binding domain
ECK3586	<i>yibH</i>				1	uneven	predicted membrane fusion protein (MFP) component of efflux pump protein
ECK3654	<i>yicN</i>				1	mucoid	predicted DUF1198 family protein

ECK	gene	Synonym	LB		MOPS		Description
			Count	Morphology	Count	Morphology	
ECK3689	<i>yidA</i>				1		erythrose 4-P and mannose 1-P phosphatase;catalyzes dephosphorylation of different sugar phosphates including erythrose-4-phosphate (Ery4P);ribose-5-phosphate (Rib5P);fructose-1-phosphate (Fru1P);fructose-6-phosphate (Fru6P);glucose-6-P (Glu6P);and also imidodiphosphate (Imido-di-P) and acetyl phosphate (Acetyl-P);Selectively hydrolyzes alpha-D-glucose-1-phosphate (Glu1P) and has no activity with the beta form
ECK3690	<i>yidB</i>				1	uneven	predicted DUF937 family protein
ECK3688	<i>yidX</i>				1	uneven	predicted lipoproteinC
ECK3707	<i>yieE</i>				1	uneven	predicted phosphopantetheinyl transferase;COG2091 family protein
ECK3803	<i>yifL</i>				1	uneven	predicted lipoprotein
ECK3889	<i>yijG</i>				1	uneven	predicted DUF3829 family protein lipoprotein
ECK3913	<i>yiiR</i>				1	uneven	predicted DUF805 family inner membrane protein
ECK3914	<i>yiiS</i>				1	uneven	predicted UPF0381 family protein
ECK3929	<i>yixX</i>				1	mucoid	predicted DUF830 family protein
ECK4030	<i>yjbl</i>				1	mucoid	predicted defective SopA-related (Pfam PF13981);pentapeptide repeat protein (COG1357);apparent frameshifts at codons 62 and 86
ECK4039	<i>yjbl</i>				1	mucoid	predicted protein
ECK4060	<i>yjcE</i>				1	mucoid	predicted cation/proton antiporter
ECK4195	<i>yjfy</i>				1	uneven	predicted protein
ECK4316	<i>yjiC</i>				1	mucoid	predicted protein
ECK4365	<i>yjiG</i>				1	uneven	predicted dUMP phosphatase
ECK0824	<i>yliF</i>				1	uneven	predicted membrane-anchored diguanylate cyclase
ECK1030	<i>ymdA</i>				1	uneven	predicted secreted protein or lipoprotein
ECK1130	<i>ymfJ</i>				1	mucoid	e14 prophage;predicted protein
ECK1449	<i>yncH</i>				1	mucoid	predicted IPR020099 family protein;required for swarming
ECK1590	<i>ynfL</i>				1	uneven	predicted LysR family DNA-binding transcription regulator
ECK1719	<i>yniD</i>				1	uneven	predicted expressed protein
ECK1989	<i>yoeA</i>	<i>yoeE</i>			1	uneven	CP4-44 cryptic prophage predicted disrupted hemin or colicin receptor;interrupted by IS2 and C-terminal fragment deletion
ECK2543	<i>yphD</i>				1	uneven	predicted sugar transport protein subunit: membrane component of ABC superfamily protein;may be part of binding-protein-dependent transport system YphDEF;may be responsible for the translocation of substrate across the membrane
ECK2644	<i>ypjA</i>				1	uneven	predicted adhesin family protein OM (outer membrane) autotransporter protein
ECK2872	<i>yqeC</i>				1	uneven	predicted selenium-dependent hydroxylase accessory protein
ECK2846	<i>yqeJ</i>				1	mucoid	predicted protein;part of T3SS PAI ETT2 remnant
ECK2961	<i>yqgA</i>				1	uneven	predicted DUF554 family inner membrane protein
ECK2943	<i>yqgE</i>				1	mucoid	predicted protein
ECK3022	<i>yqiA</i>	<i>yzzl</i>			1		predicted acyl CoA esterase;displays esterase activity toward palmitoyl-CoA and pNP-butyrate
ECK3140	<i>yraR</i>				1	non-mucoid	predicted nucleoside-diphosphate-sugar epimerase
ECK3266	<i>yrdA</i>				1	uneven	bacterial transferase hexapeptide domain protein
ECK3468	<i>yrcC</i>				1	uneven	predicted protein fragment (pseudogene)
ECK4218	<i>ytfP</i>				1	uneven	predicted UPF0131 family protein;may play a role in antibiotic biosynthesis
ECK4223	<i>ytfQ</i>				1	mucoid	predicted galactofuranose binding protein: periplasmic-binding component of ABC superfamily protein
ECK4379	<i>ytjB</i>	<i>smp</i>			1	uneven	predicted SMP_2 family protein membrane-anchored periplasmic protein