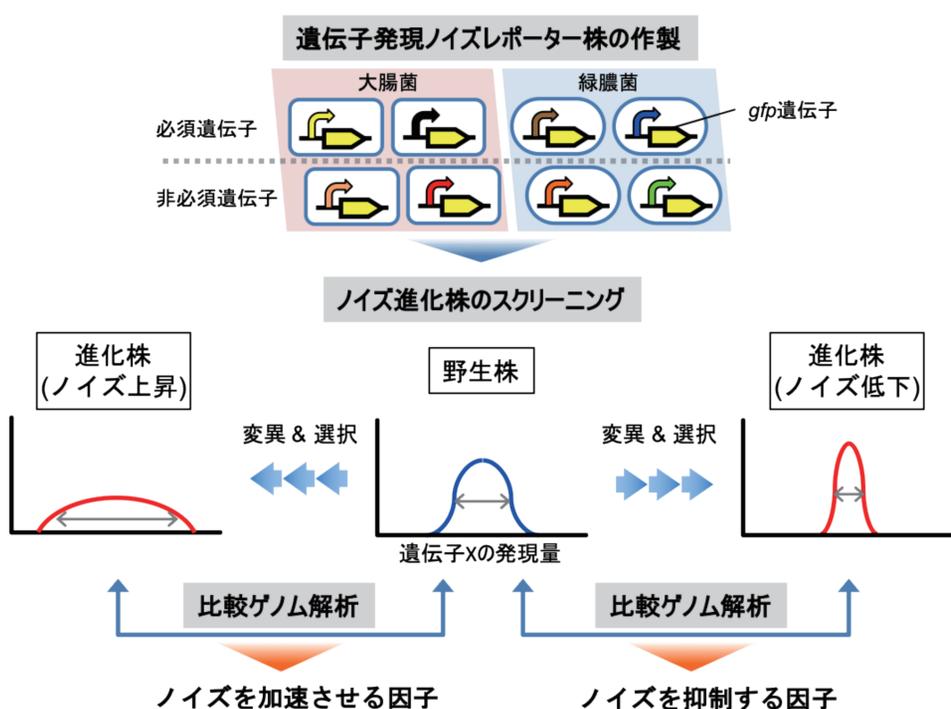


## 背景と目的

近年の1細胞解析技術の進展によって、同一条件で培養したクローン細胞集団であっても個々の細胞レベルの表現型は均一でないことが明らかになってきた。そのような1細胞レベルの表現型の不均一性がクローン集団内に機能的多様性と柔軟性を生み出し、集団全体のストレス耐性や物質代謝など様々な環境適応能力を促進させることも報告されている。このようなクローン集団内の表現型の不均一性は、**遺伝子発現レベルが細胞間ではばらつくこと(ノイズ)**によって生じるが、そのノイズを制御する機構を網羅的に明らかにしようという試みは少ない。そこで、本研究では大腸菌および緑膿菌をモデルとして、**遺伝子発現ノイズの制御因子をゲノムワイドに同定し、その制御機構の解明に繋げる**ことを目的とした。

## 方法



### 遺伝子発現ノイズレポーター株の作製

一般モデル生物の大腸菌 (*Escherichia coli* MG1655) と病原菌モデルの緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1) のゲノムから必須遺伝子と非必須遺伝子をそれぞれ複数選び、緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*gfp*) との転写融合レポーター株を構築した。個々の細胞の遺伝子発現を正確に定量するために、レポーター断片は mini-Tn7 を用いて染色体の同一部位に1コピーとなるように挿入した。

### 遺伝子発現ノイズ進化株のスクリーニング

各レポーター遺伝子の1細胞レベルの発現量ならびに細胞集団内のノイズ (Coefficient of Variation) は、セルソーターを用いて同一培養条件・同一成長期の約10万細胞から測定し、これを野生株の値とした。次に、遺伝子発現ノイズに選択圧をかけた進化実験を行い (未発表データのため詳細は割愛)、ノイズが野生株の値から変化した進化株の取得を試みた。

### 遺伝子発現ノイズ制御因子の同定

進化株の全ゲノムリシーケンスならびに野生株ゲノムとの比較によって変異部位を抽出した。抽出された変異を相同組換えによって野生株 (MG1655 および PAO1) に再導入し、遺伝子発現ノイズの変化が再現されることを確認することで、遺伝子発現ノイズの制御因子の同定とした。

## 結果と考察

### 進化株のスクリーニング

<i>E. coli</i> MG1655			
category	gene	noise up	noise down
essential	A	0	0
essential	B	0	0
essential	C	0	0
non essential	D	0	0
non essential	E	0	0
non essential	F	0	3

<i>P. aeruginosa</i> PAO1			
category	gene	noise up	noise down
essential	G	0	0
essential	H	0	0
essential	I	0	1
non essential	J	0	0
non essential	K	1	0
non essential	L	0	0

未発表データのため遺伝子名は非公表

30日間の進化実験を経て、*E. coli* MG1655株から非必須遺伝子Fの発現ノイズが低下した進化株が3株、*P. aeruginosa* PAO1株から必須遺伝子Iの発現ノイズが低下した進化株が1株、ならびに非必須遺伝子Kの発現ノイズが上昇した進化株が1株得られた。なお、15日間では進化株が得られなかったことから、本実験系では30日程度が必要最小期間と考えられた。

### ノイズ進化株の変異の特定

REPORTER STRAIN	MUTATION TYPE	ANNOTATION	CODON CHANGE	NOTE
K	Gap	Fha domain-containing protein	One Q (Gln) and one P (Proline) missing	
K	SNP	assimilatory nitrate reductase	S (Ser) > N (Asn)	
K	SNP	assimilatory nitrite reductase large subunit nirB	D (Asp) > N (Asn)	
K	SNP	two component sensor kinase	A (Ala) > T (Thr)	
K	SNP	amino acid permease	NO (His)	
K	SNP	phenazine biosynthesis protein PhzC	No N (Asn)	
K	SNP	sigma factor regulator FemR	No E (Glu)	
K	SNP	ECF sigma factor FemI	No K (Lys)	
K	SNP	cobaltochelatase subunit cobN	No V (Val)	
K	SNP	untranslated region		
K	SNP	sensor kinase eraS	No S (Ser)	
K	SNP	quinoprotein ethanol dehydrogenase exaA	G (Gly) > D (Asp)	
K	SNP	methylcrotonyl CoA carboxylase subunit beta liuB	G (Gly) > D (Asp)	
K	SNP	multidrug efflux protein	E (Glu) > K (Lys)	
K	SNP	transcriptional regulator	No I (Ile)	
K	SNP	ABC transporter ATP-binding protein	NO (His)	
K	SNP	ring-hydroxylating dioxygenase subunit	No G (Gly)	
K	SNP	epoxide hydrolase	L (Leu) > F (Phe)	
K	SNP	malto-oligosyltrehalose synthase	A (Ala) > R (Arg)	
K	SNP	hydrogen cyanide synthase subunit HcnB	No Y (Tyr)	
K	SNP	untranslated region		
K	SNP	biofilm formation protein PsiA	Q (Gln) > STOP	
K	SNP	untranslated region		
K	SNP	transcriptional regulator	No Q (Gln)	
K	SNP	transcriptional regulator	S (Ser) > N (Asn)	
K	SNP	hypothetical protein	No A (Ala)	
K	SNP	transcriptional regulator	No G (Gly)	
K	SNP	pyoverdine biosynthesis protein PvdI	No E (Glu)	
K	SNP	peptide synthase	No G (Gly)	
K	SNP	hypothetical protein	A (Ala) > V (Val)	
K	SNP	hypothetical protein	No V (Val)	
K	SNP	L-sorbose dehydrogenase	V (Val) > I (Ile)	
K	SNP	peptide synthase pvdI	E (Glu) > K (Lys)	
K	SNP	pyoverdine biosynthesis protein PvdG	No L (Leu)	
K	SNP	cation-transporting P-type ATPase	NO START	
K	SNP	glycine dehydrogenase gdh2	E (Glu) > K (Lys)	
K	SNP	transcriptional regulator MexT	E (Glu) > K (Lys)	
K	SNP	two-component response regulator	No F (Phe)	
I	GAP	transcriptional regulator MexT		
I	SNP	two-component sensor kinase	R (Arg) > L (Leu)	also found in the <i>E. coli</i> evolved mutant

進化株の全ゲノムをリシーケンスし進化前ゲノムと比較したところ、各進化株のゲノムに複数の点変異または欠失が見つかった。そこで、これらの変異の中から非同義置換や明らかに影響がないと考えられる非コード領域の変異等を除き、遺伝子アノテーション情報を精査したところ、興味深いことに、各進化株に特異的な変異だけでなく、複数の進化株に共通するオルソログ遺伝子 (すなわち普遍的に遺伝子発現ノイズを制御すると考えられる因子) にも変異が認められた。これらの中から実際に遺伝子発現ノイズに影響を与えている変異を同定するため、野生株において各変異を個別に相同組換えによって導入した再変異株の作製に成功した。現在、これら再変異株の遺伝子発現ノイズをセルソーターおよび time-lapse 顕微鏡により測定しており、ノイズ制御因子の同定を試みている。

### 進化前後の遺伝子発現ノイズの比較

