

## 大腸菌における頻度依存適応度

小須田 和 彦

有性生殖を行なう殆んど全ての生物の自然集団に多量の遺伝的変異が保有されていることは、一般によく知られた事実である。Lewontin and Hubby (1966) 以来の多くの研究により、酵素をはじめとするタンパクレベルでの遺伝的変異が、それまでに研究された形態的形質や生理的形質に関する変異に比べて予想以上に大きなものであることが明らかにされてきた。この様な莫大な遺伝的変異の保有機構を解明することが集団遺伝学の主要な目的の一つとなっている。現在、タンパクレベルにおける変異が自然淘汰 (natural selection) の対象となっているとする平衡淘汰説 (balancing selection theory) と、そうではなく自然淘汰に無関係であるとする中立説 (neutral theory) が相対立しているが、いずれの説が正しいかを決定することが急務である。平衡淘汰説には変異の保有機構によって、超優性 (overdominance), 多様化選択 (diversifying selection), 頻度依存選択 (frequency-dependent selection) 等が主に挙げられる。

頻度依存選択は古くは Fisher (1930), Wright and Dobzhansky (1946) により平衡多型 (balanced polymorphism) の機構の一つとして論議されたが、タンパクレベルの変異保有機構として提唱したのは Kojima and Yarbrough (1967) である。頻度依存選択においては集団における遺伝子頻度 (gene frequency) もしくは遺伝子型頻度 (genotype frequency) が平衡状態におけるそれより低くなれば、その遺伝子 (型) をもつ個体の適応度 (fitness) が他の個体よりも大きくなり、逆に遺伝子 (型) 頻度が高くなるとその適応度が小さくなる。即ち少数有利の (minority advantage) の現象が見られることをその特色としている。平衡状態においては全ての遺伝子型のもつ適応度に差はなく、従って、集団に遺伝的荷重 (genetic load) が全くかかることなく遺伝的変異が維持できることになる。Kojima and Yarbrough (1967) 以来、頻度依存選択を肯定する研究も否定的な報告も多数ある (Tobari and Kojima 1967, Kojima and Tobari 1969a, Ayala 1971, Yamazaki 1971, Bundgaard and Christiansen 1972, Nassar *et al.* 1973, Dolan and Robertson 1975, Birley and Beardmore 1976, Morgan 1976, Smouse and Kosuda 1977, DeBenedictis 1977, 1978a, Gromko and Richmond 1978, Kosuda 1978, Nassar 1979)。しかしながら、変異保有機構としての頻度依存選択の役割を把握するためには、更に数多くの実験を行ないその普遍性を明らかにする必要がある。

自然淘汰に関する実験研究は、適応度が温度とか湿度といった物理的要因や集団における遺伝子 (型) 頻度や集団密度 (population density) といった生物的要因や時間要因等と無関係に一定 (constant) であるとして扱おうことがしばしば間違いである事を示している (Lewontin 1955, Birch

1955, Lewontin and Matsuo 1963, Kojima 1971, Kosuda 1974, 1976, 1978, Smouse and Kosuda 1976)。

本実験の目的は比較的多量の糖を含む培養液中で大腸菌 (*Escherichia coli*) の二種の遺伝子型  $lac^+$  と  $lac^-$  を混合培養し, Kosuda (1978) の方法を用いて適応度が遺伝子頻度の関数であるかどうかを確かめることにある。半数性生物である大腸菌を用いて淘汰実験を行うことは, 選択的な力としての超優性を考えなくて良い点等, 遺伝・生態学的問題を明らかにするのに種々の利点がある (Kosuda and Smouse 1973)。

#### 材料と方法

本研究に用いられた材料並びに実験方法は, Kosuda and Smouse (1973), Kosuda (1978) におけるものと同一のものである。*Escherichia coli* K-12 株の野生型系統 ( $F^- \lambda^- lac^-$ ) と紫外線照射によって欠失を誘発する事により, この野生型系統より直接得られた  $lac^-$  突然変異系統の 2 系統が用いられた。 $lac^-$  突然変異系統は, したがって, 決して野生型 ( $lac^+$ ) に戻ることはなかった。培養方法は Atwood *et al.* (1951 a) の serial transfer method が採用された。

標準培養液中で培養された  $lac^-$  遺伝子型 0.1cc と, 同じく液体培養された  $lac^+$  遺伝子型の 1/100 希釈液 0.1cc とが混合された。こうしてつくられた混合集団における  $lac^+$  の遺伝子頻度が調べられた。その結果  $lac^+$  遺伝子の初期頻度  $p_0$  は 0.010 であった。混合集団は炭素源としてのラクトース, アラビノース, グルコースの 3 種類の糖をもつ培養液 19.8cc を含む 100cc 三角フラスコに入れられ, 48時間培養された。上記 2 種類の遺伝子型を含む混合培養液は, 48時間毎に新しい培養液を含む三角フラスコに連続的に移し変えられた。この時, 0.2cc の混合培養液が新しいフラスコ中の 19.8cc の培養液中に移され, 各回とも同時に遺伝子頻度推定用の標本が別にとられた。この過程が約 1 ヶ月程繰返された。全ての培養は  $37.5^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ , 毎分 80 回の往復振盪の条件で行なわれた。また各 transfer 毎に 450nm における optical density により, 集団密度が調査された。液体培養液は最小塩類 ( $2\text{g/l KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.5\text{g/l K}_2\text{HPO}_4$ ,  $0.5\text{g/l Na}_3 \cdot \text{C}_3\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$ ,  $0.1\text{g/l MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $1\text{g/l } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) と 3 種類の糖 (ラクトース・アラビノース・グルコース) からできており, 本研究では 2 種の含有糖量が採用された。即ち実験 A での含有糖量は  $0.750\text{g/l}$  で, 実験 B では  $1.00\text{g/l}$  であった。本研究は含有糖量のみ Kosuda (1977) と異なる。Kosuda (1977) においては培養液中の糖濃度は  $0.50\text{g/l}$ ,  $0.25\text{g/l}$ ,  $0.125\text{g/l}$ ,  $0.00625\text{g/l}$  の 4 つが採用された。ただし, 含まれるラクトース・アラビノース・グルコースの比率は 5:4:1 であった。この点は Smouse and Kosuda (1977), Kosuda (1978) と同じである。実験 A と実験 B では含有糖量が異なるだけで, 他の条件は全く同一にされた。

各 transfer の際には混合培養液から標本が抽出され, 混合集団中における野生型  $lac^+$  と  $lac^-$  の相対頻度が推定された。標本は適度に希釈され, シャーレ上の EMB (Eosin Methylene Blue) 寒天固型培地上で培養された。 $lac^+$  は EMB 寒天培地上では緑色のコロニーを作り,  $lac^-$  のコロニーは淡いピンクか白色となるので, これら 2 つの遺伝子型は EMB 寒天培地を用いれば容易

に区別される。実験A, 及びBにおける野生型  $lac^+$  の初期頻度は共に0.010で, その後の頻度変化が追求された。

#### 結果並びに考察

単一培養(純培養 pure culture)における野生型  $lac^+$  と突然変異  $lac^-$  の集団密度が調査された。集団密度は450nmにおけるOD(optical density)で表わされ, 3つの反復 replicate の平均値が表1に示されている。培養液中の糖濃度が0.750g/lである実験Aでは,  $lac^+$  と  $lac^-$  のODはそれぞれ0.755と0.427であり, 一方, 培養液中の含有糖量が1.000g/lである実験Bにおいては,  $lac^+$  のODが0.905,  $lac^-$  のそれが0.572となった。予想されることではあるが, 実験BにおけるODは両遺伝子型共に実験Aにおけるそれより大きな値となっている。接種(inoculation)の

表1 450nmにおけるOD (Optical Density)

	Amount of Sugars (g/l)	WT	Lac <sup>-</sup>
Exp. A	0.750	0.7552±0.0116	0.4270±0.0042
Exp. B	1.000	0.9045±0.0152	0.5717±0.0075

48時間後における生細胞数の対数がODの一次関数であることが確かめられているので(Smouse and Kosuda 未発表), 培養液中の糖濃度が増加するにつれ集団密度が高くなると考えられる。表1は培養液中の糖濃度とODで表わされる集団密度との間に正の相関があることを示している。この事はKosuda (1978)により明らかにされたことである。 $lac^-$  突然変異はラクトースを利用できないのであるから,  $lac^+$  と  $lac^-$  の集団密度に顕著な差異があるのはごく自然なことである。従って, これら2種類の遺伝子型が本実験の様に炭素源の一つとしてラクトースを含む培養液に一諸に混合培養されるならば,  $lac^-$  突然変異は野生型  $lac^+$  との競争においてかなり不利となることが予期される。

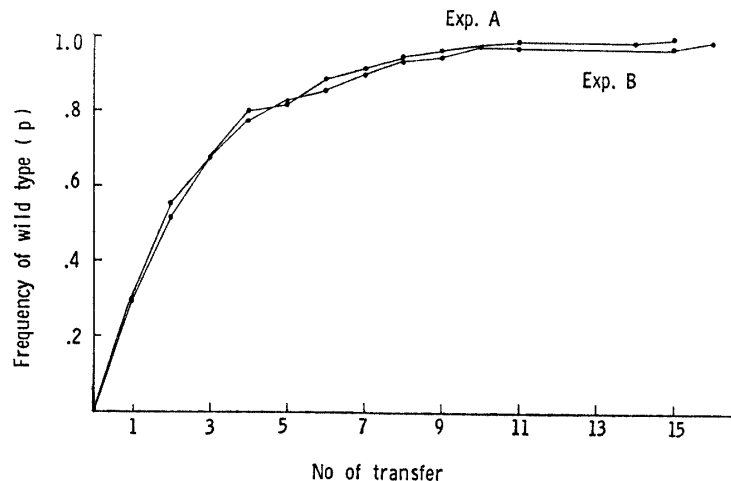


図1 実験A, Bにおける野生型  $lac^+$  の頻度変化

表2 実験A, Bの3つの反復集団 (replicate population)  
における野生型 lac<sup>+</sup> の相対頻度変化

No. of Transfer	Exp. A				Exp. B			
	a	b	c	Mean	a	b	c	Mean
1	0.319	0.280	0.297	0.299	0.305	0.286	0.297	0.296
2	0.558	0.557	0.557	0.557	0.523	0.512	0.518	0.518
3	0.639	0.672	0.653	0.673	0.677	0.655	0.700	0.677
4	0.776	0.762	0.862	0.800	0.765	0.766	0.789	0.773
5	0.798	0.852	0.810	0.820	0.827	0.808	0.850	0.828
6	0.886	0.901	0.870	0.886	0.853	0.848	0.865	0.855
7	0.919	0.924	0.910	0.918	0.911	0.884	0.905	0.900
8	0.941	0.946	0.952	0.946	0.920	0.933	0.956	0.936
9	0.976	0.952	0.956	0.962	0.929	0.944	0.970	0.948
10	0.982	0.974	0.965	0.974	0.963	0.978	0.971	0.971
11	0.987	0.976	0.984	0.982	0.963	0.960	0.987	0.970
12	...	...	...	...	...	...	...	...
13	...	...	...	...	...	...	...	...
14	0.975	0.989	0.996	0.987	...	...	...	...
15	0.996	0.993	1.000	0.996	0.959	0.999	0.946	0.968
16					0.969	1.000	0.979	0.983

事実、野生型 lac<sup>+</sup> は終始 lac<sup>-</sup> 突然変異を圧倒し、lac<sup>-</sup> 遺伝子は究極的には混合集団から除去された(表2, 図1)。この点、実験A及びBの3つの replicate 間に相違はみられなかった。また、この結果は Kosuda (1978) と一致している。

3つの replicate 間に lac<sup>+</sup> と lac<sup>-</sup> の相対頻度の変化の様相に殆んど変わりがみられなかったので、図1には平均値のみが与えられている。図1は表2と共に、培養液の含有糖量が増加するにつれ遺伝子の置換速度が減少している事を示している。何故なら lac<sup>+</sup> 遺伝子の初期頻度が同一であるにもかかわらず、実験Bにおいては実験Aよりも lac<sup>-</sup> 遺伝子が遅く混合集団から除去されている。即ちこのことは、野生型 lac<sup>+</sup> と lac<sup>-</sup> 突然変異の相対適応度が集団密度に依存していることを示唆している。このことは Kosuda (1978), Smouse and Kosuda (1977) によって明確に指摘されたことである。即ち lac<sup>-</sup> の相対適応度は集団密度が小さくなるにつれ低くなる事が明らかにされている。

集団の全個体数または総重量は集団の適応度 (population fitness) の一つの尺度として用いられることがある(Carson 1961)。しかしながら、遺伝子型の単一培養におけるこの様な尺度をもって淘汰実験の結果を予想することはしばしば不成功に終るが(Lewontin and Matsuo 1963, Dawood and Strickberger 1969), 本実験では有効であった。

Kosuda (1978) は適応度が集団の遺伝子(型) 頻度に依存して変化するものか、頻度に依存せずに一定の値をとるかを決める方法を考案している。それによれば、もし lac<sup>-</sup> 突然変異の相対適応度が集団中の遺伝子(型) 頻度に依存しないで一定の値  $1-s$  ( $s$  は淘汰係数を示し正数) をとるな

ら、

$$\text{logit } p_t = \ln \frac{p_t}{1-p_t} = -t \log_e(1-s) + \text{logit } p_0 \quad (\text{但し } p_t \text{ は世代 } t \text{ における野生型 lac}^+ \text{ の相対頻度, } p_0 \text{ は初期頻度を表わす})$$

となり  $\text{logit } p_t$  の世代に対する回帰が直線になる。一方、相対適応度が一定の値をとらず遺伝子(型)頻度に依存し、 $\text{lac}^-$  遺伝子型の適応度が  $1-s(q_t-\hat{q})^K$  (但し  $q_t=1-p_t$  で  $\hat{q}$  は  $\text{lac}^-$  の平衡頻度を表わし、本実験では表1から  $\hat{q}=0$  となることが判る。 $K$ は正の定数) で与えられるならば、

$$\text{logit } p_t = -\sum_{i=1}^{t-1} \log_e(1-s q_i^K) + \text{logit } p_0$$

となり、 $\text{logit } p_t$  の回帰が世代に対して直線にはならず曲線となる (Kosuda 1978)。本実験において、 $\text{lac}^-$  の相対適応度が集団における遺伝子(型)頻度に依存しているか依存しないで定数をとっているかを明らかにするため、表1に与えられている相対頻度を用いて  $\text{logit } p_t$ 、即ち  $\ln(p_t/1-p_t)$  を計算し世代に対する回帰を求めた (図2)。図2に示された様に  $\text{logit } p_t$  の回帰は明らかに直線とはならず曲線となっている。事実、分散分析の結果、実験A、B共に回帰の曲線性は1%レベルで有意となっている (表3,4)。以上の結果は、本実験では適応度が集団中の遺伝子(型)

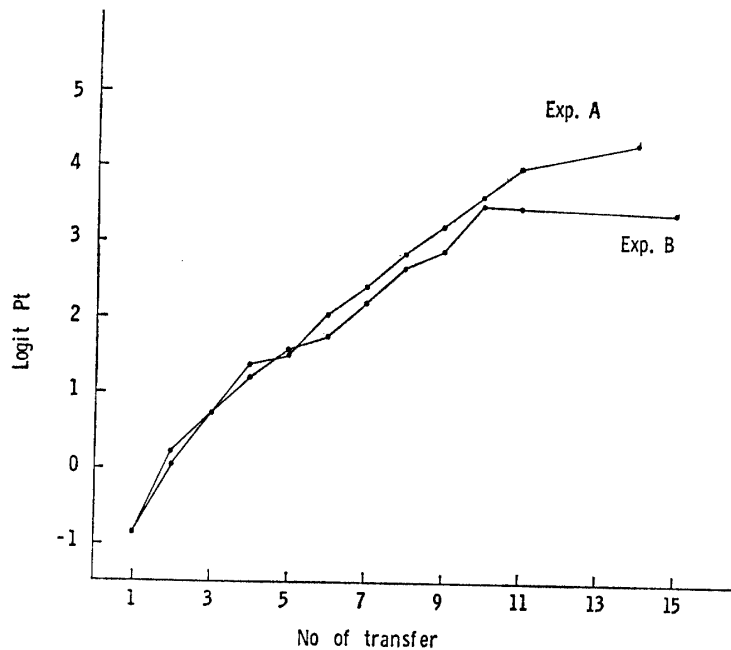


図2  $\text{logit } p_t$  の変化

表3 実験Aにおけるロジット  $p_t$  の回帰に関する分散分析

Source	df	S. S.	M. S.	F
Regression	2			
Linear	1	102.088	102.088	858.600**
Quadratic	1	2.352	2.352	19.777**
Residual	35	4.161	0.119	
Total	37	108.600		

表4 実験Bにおけるロジット  $p_t$  の回帰に関する分散分析

Source	df	S. S.	M. S.	F
Regression	2			
Linear	1	74.456	74.456	194.910**
Quadratic	1	7.361	7.361	19.310**
Residual	35	13.343	0.382	
Total	37	95.159		

頻度に明らかに依存していること、即ち  $lac^-$  遺伝子(型)の減少と共に  $lac^-$  遺伝子(型)の相対適応度が大きくなっていくことを示している。

しかしながら、 $lac^-$  の平衡頻度  $\hat{q}_0$  が  $\hat{q}=0$  となることから(表1, 図1),  $lac^+$  と  $lac^-$  の適応度の逆転がおこらないことが判る。従って、本実験でみられた頻度依存性は遺伝的変異を積極的に保持する機構として働いていないことになる。何故なら、変異保有機構の一つとしての頻度依存選択においては適応度が頻度に依存して変わり、しかも頻度が平衡時より低くなるとその適応度が他の遺伝子(型)のそれより高くなる必要がある(Ayala and Campbell 1974)。しかしながら、変異減退の速度を遅らせるという点で消極的効果をもっているだろう。

Smouse and Kosuda (1977), Kosuda (1978) は本実験と同一の材料と実験方法を用いて、適応度が集団密度に依存する事を報告している。即ち集団密度が大きくなるにつれ、 $lac^-$  遺伝子型の相対適応度が低下する事を明らかにしている。しかしながら、適応度が遺伝子(型)頻度に依存するという明らかな証拠は得られなかった。即ち  $\logit p_t$  は世代に対してはほぼ直線となり曲線性は有意とはならなかった(Kosuda 1978)。本実験と Kosuda (1978) との唯一の相違点は培養液中の糖濃度で、Kosuda (1978) の実験においては 0.0625g/l, 0.125g/l, 0.250g/l, 0.500g/l の比較的低い含有糖濃度が用いられた。比較的高い糖濃度が用いられた本実験では、当然高い集団密度が得られている(表1 Kosuda (1978) の表1参照)。従って、頻度依存適応度の発現には培養液中の糖濃度によって支配される集団密度が関係していることが考えられる。集団密度が高い時、適応度はより遺伝子(型)頻度に依存し、集団密度が低い時に適応度は一定になると示唆される。この様に適応度の頻度依存性の発現に集団密度が関与していることは Kojima and Huang (1972), Huang *et al.* (1971), Nassar (1979) の報告からも示されている。

#### 要 約

大腸菌の野生型  $lac^+$  と突然変異型  $lac^-$  との間の淘汰実験が、serial transfer methodにより、2種の含有糖濃度(0.750g/l と 1.0g/l) 下で行なわれた。両遺伝子型の相対頻度の変化が追求された。その結果、 $\logit p_t \left( = \ln \frac{p_t}{1-p_t} \right)$  が時間と共に直線ではなく曲線になる事が示された。このことは淘汰係数が集団中における遺伝子(型)頻度に依存する事を意味している。また、淘汰が集団密度に依存する事も示唆された。

## 引用文献

- Atwood, K. C., L. K. Schneider, and F. J. Ryan 1951 Periodic selection in *E. coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. (U. S. ) 37 : 141-155.
- Ayala, F. 1971 Competition between species: Frequency dependent. Science 171 : 820-824.
- Ayala, F. J. and C. A. Campbell 1974 Frequency-dependent selection. Ann. Rev. Ecol. Syst. 5 : 115-138.
- Birch, L. C. 1955 Selection in *Drosophila pseudoobscura* in relation to crowding. Evolution 9 : 389-399.
- Birley, A. J. and A. J. Beardmore 1977 Genetic composition, temperature, density and selection in an enzyme polymorphism. Heredity 39 : 133-144.
- Bundgaard, J. and F. B. Christiansen 1972 Dynamics of populations. I. Selection components in an experimental population of *Drosophila melanogaster*. Genetics 71 : 439-460.
- Carson, H. 1961. Heterosis and fitness in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. Evolution 15 : 496-509.
- Dawood, M. M. and M. W. Strickberger 1969 The effect of larval interaction on viability in *Drosophila melanogaster*. II. Changes in age structure. Genetics 63 : 201-211.
- DeBenedictis, P. A. 1977 Studies in the dynamics of genetically variable populations. I. Frequency- and density dependent selection in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. Genetics 87 : 343-356.
- DeBenedictis, P. A. 1978a Are populations characterized by their genes or by their genotypes. Am. Naturalist 112 : 155-175.
- Dolan, R. and A. Robertson 1975 The effect of conditioning the medium in *Drosophila*, in relation to frequency-dependent selection. Heredity 35 : 311-316.
- Fisher, R. A. 1930 *The genetical theory of natural selection*. Oxford Univ. Press.
- Gromko, M. H. and R. H. Richmond 1976 Mode of selection maintaining an inversion polymorphism in *Drosophila melanogaster*. Genetics 88 : 357-366.
- Huang, S. L., M. Singh, and K. Kojima 1971 A study of frequency-dependent selection observed in the esterase 6 locus of *Drosophila melanogaster* using a conditioned media method. Genetics 68 : 97-104.
- Kojima, K. and S. L. Huang 1972 Effects of population density on the frequency-dependent selection in the esterase-6 locus of *Drosophila melanogaster*. Evolution 26 : 313-321.
- Kosuda, K. 1974 Effects of population density on fitness in *E. coli*. Jap. J. Genetics 49 : 304.
- Kosuda, K. 1976 On the mode of selection in *Escherichia coli*. III. Frequency-dependent selection. Jap. J. Genet. 51 : 420.
- Kosuda, K. 1978 Effects of population density and gene frequency on fitness in *Escherichia coli*. Josai Univ. Bulletin 2 : 95-103.
- Kosuda, K. and P. Smouse 1973 On the mode of selection in *Escherichia coli*. Jap. J. Genetics 48 : 427.
- Kojima, K. 1971 Is there a constant fitness value for a given genotype? No! Evolution 25 : 281-285.
- Kojima, K. and Y. N. Tobari 1969a The pattern of viability changes associated with genotype frequency at the alcohol dehydrogenase locus in a population of *Drosophila melanogaster*. Genetics 61 : 201-209.
- Kojima, K. and Y. N. Tobari 1969b Selective modes associated with karyotypes in *Drosophila ananassae*. II. Heterosis and frequency-dependent selection. Genetics 63 : 639-651.

- Kojima, K. and K.M. Yarbrough 1967 Frequency-dependent selection at the Esterase 6 locus in *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.) 57 : 645-649.
- Lewontin, R.C. 1955 The effects of the population density and competition on viability of *Drosophila melanogaster*. Evolution 9 : 27-41.
- Lewontin, R.C. and J.L. Hubby 1966 A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amounts of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 54 : 595-605.
- Lewontin, R.C. and Y. Matsuo 1963 Interaction of genotypes determining the viability in *Drosophila busckii*. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.) 49 : 182-190.
- Margan, P. 1976 Frequency-dependent selection at two enzyme loci in *Drosophila melanogaster* Nature 263 : 765-766.
- Nassar, R., H.J. Muhs and R.D. Cook 1973 Frequency-dependent selection at the Payne inversion in *Drosophila melanogaster*. Evolution 27 : 558-564.
- Nassar, R. 1979 Frequency-dependent selection at the Lap locus in *Drosophila melanogaster* Genetics 91 : 327-338.
- Tobari, Y.N. and K. Kojima 1967 Selective modes associated with inversion karyotypes in *Drosophila ananassare*. I. Frequency-dependent selection. Genetics 57 : 179-188.
- Smouse, P. and K. Kosuda 1977 the effects of genotypic frequency and population density on fitness differentials in *Escherichia coli*. Genetics 86 : 399-411.
- Wright, S and Th. Dobzhansky 1946 Genetics of natural populations. XII. Experimental reproduction of some of the changes caused by natural selection in certain populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 31 : 125-156.
- Yamazaki, T. 1971. Measurement of fitness at the Est-5 locus in *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 67 : 579-603.