総説

微生物進化実験の定量解析: 予測・制御・細胞状態論へ向けて

古澤 力^{1,2}, 堀之内貴明¹

¹理化学研究所・生命機能科学研究センター

²東京大学大学院理学系研究科・生物普遍性研究機構

During adaptive evolution, phenotype and genotype dynamically change; however, the relationship between these changes and associated constraints is yet to be fully elucidated. In this review, we focus on the analysis of phenotypic and genotypic changes occurred in *Escherichia coli* cells during laboratory evolution experiments. We demonstrated that the change of fitness can be quantitatively predicted by the expression changes of a small number of genes, suggesting that phenotypic changes in adaptive evolution are constrained on relatively low-dimensional dynamics. The automated system for laboratory evolution is also presented, which enables us to achieve large-scale data in bacterial adaptive evolution.

laboratory evolution / *Escherichia coli* / transcriptome / resequencing analysis / automation

1. はじめに

進化遺伝学者である Dobzhansky の広く知られた言葉として, “Nothing makes sense in biology except in the light of evolution.” とあるように, 生物システムを解析し理解をする上で, それを経てきた進化のプロセスを無視することは難しい. 我々の知る精巧かつ複雑なメカニズムを持つ生物システムは, 世代を重ね, 新たな形質を次々に獲得するという進化の歴史を経た結果として出現してきたものである. そうした生物システムの理解のためには, その歴史を紐解き, その進化プロセスが持つ性質を明らかにする必要がある.

もちろん, これまでにも多くの進化研究が成果を挙げてきたが, その多くは現存する生物種のゲノム配列や表現型, そして化石データなどを比較することを通じて, 過去に生じた進化プロセスを「再構成」することに主眼を置いてきた. このアプローチは現存する多様な生物種を解析対象にすることができる一方で, 再構成された進化プロセスに残る曖昧さなど, データの不完全性に起因する問題に苦慮することが多い. また, 現存する生物種の進化プロセスが, 基本的に 1 回きりの歴史的な事象であることに付随する困難さが存在し, 進化プロセスにおいて, 何が偶然で何が必然かを判別することは困難である.

こうした問題に対し, 実験室内で進化プロセスを構

成し, その解析を行う手法が注目を集めている¹⁾⁻³⁾. この進化実験の手法は以下のような特徴を持つ.

1. 進化プロセスの初期状態ならびにその過程を全て解析することができる
2. 環境条件を設定することができる
3. 同一条件の独立進化実験を複数回行うことにより, 偶然に生じた変化と必然的に生じる変化とを判別することができる

このような特徴に加え, 近年の超並列シーケンサーなどの分析機器の飛躍的な発展は, 進化実験の過程で生じる表現型や遺伝子型のゲノムレベルでの解析を可能とし, 進化プロセスの新たな理解をもたらしつつある. 本稿では, 我々のグループが行っている大腸菌進化実験の表現型-遺伝子型解析^{4), 5)} について紹介し, そこから見出される進化ダイナミクスが持つ性質について解説する.

2. 抗生物質耐性進化における表現型-遺伝子型マッピングの定量解析

進化を引き起こす一つの要因が, ゲノム上に生じる変異によって引き起こされる表現型の変化であることは間違いない. 一方で, 個々の変異がどういった表現型の変化を引き起こし, それが適応度の上昇にどのように寄与しているのかを定量的に解析した例は多くな

Analysis of Bacterial Laboratory Evolution toward Prediction, Control, and Macroscopic State Theory of Evolution

Chikara FURUSAWA^{1,2} and Takaaki HORINOUCI¹

¹Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN

²Universal Biology Institute, The University of Tokyo

い。進化プロセスにおいて、変異と表現型変化は一对一の対応を持つとは限らず、共通の表現型変化をもたらすような様々な変異が存在し、またその逆も成り立つ。さらに、表現型の揺らぎや環境応答などのような、ゲノム変異に依らない表現型可塑性が存在し、それが進化プロセスに関与し得ることは Waddington を始めとする多くの研究者が論じている⁶⁾。この表現型と遺伝子型の複雑かつ多対多の関係を理解するためには、進化プロセスにおける両者の対応を定量的に解析することが必要となる。以下、そうした研究例として、抗生物質を添加した環境下における進化実験について紹介する⁴⁾。

この研究では、様々な作用機序を持つ 10 種類の抗生物質をそれぞれ添加した環境下において、大腸菌の植え継ぎ培養を行った。この 96 ウェルプレートを用いた植え継ぎ培養では、薬剤濃度を一定の希釈倍率で段階的に変化させたウェルに等量の細胞を植菌し、増殖が確認できた薬剤濃度の最も高いウェルから、次の培養への植え継ぎを行っている。この毎回の植え継ぎにおいて薬剤濃度を変化させる培養を、24 時間間隔で 90 日間（おおよそ 900 世代）行ったところ、増殖が阻害される最小の薬剤濃度（最小阻害濃度; MIC）の有意な上昇が観察された（図 1 に例を示す; 詳細は文献 4 を参照）。これは、植え継ぎ培養により、大腸菌が添加した薬剤への耐性を獲得したことを意味している。

これらの耐性株について、様々な手法により表現型と遺伝子型の変化を解析した。最初に、ある一つの薬剤に対する耐性の獲得が、他の様々な薬剤に対する耐性・感受性をどのように変化させたかを定量化した。結果として、多くの耐性株において、植え継ぎ培養時に添加していた薬剤以外の薬剤に対しても耐性・感受性が大きく変化するという現象が見出された。図 2A は

図 1

抗生物質を添加した環境下での大腸菌進化実験。横軸は時間、縦軸は最小増殖阻止濃度（MIC）の対数を示す。同一の親株から始めた 4 つの独立培養系列の結果を示す。A: シプロフロキサシン（CPFX; DNA 複製阻害剤）と B: クロラムフェニコール（CP; タンパク質合成阻害剤）を添加した環境での結果をそれぞれ示している。

DNA 複製阻害剤であるエノキサシンに対する耐性株について、他の様々な薬剤に対する MIC の変化をプロットした例である。エノキサシン耐性株は、同じ DNA 複製阻害剤の多くの薬剤に対して耐性となり、さらにキノロン系の細胞壁合成阻害剤に対しても MIC が上昇する（耐性となる）一方で、アミノグリコシド系のタンパク質合成阻害剤に対しては、親株よりも MIC が低くなる（感受性となる）。こうした MIC の変化を、取得した耐性株の全てについて定量化し、それぞれの薬剤に対する各株の MIC の相関関係の解析を行った。例えば図 2B は、どちらも DNA 複製阻害剤であるエノキサシンならびにシプロフロキサシンについて、得られた耐性株全ての MIC をプロットしたものであり、片方の薬剤に対して耐性を獲得した大腸菌は、もう片方の薬剤に対しても耐性を持つという交差耐性と呼ばれる現象を見ることができる。興味深いことに、いくつかの薬剤間においては、MIC の負の相関が見出された（図 2C に例を示す）。これ

図 2

一つの薬剤への耐性獲得が他の薬剤の耐性・感受性に与える影響。A: 進化実験によって得られた 4 株のエノキサシン（ENX; DNA 複製阻害剤）への耐性株が、他の薬剤に示す耐性/感受性の変化を表している。中央の黒太線の円は親株の薬剤耐性を示し、放射状の軸は親株との耐性能の違いを MIC の対数比で示す。黒い太線の円より外側が親株に対して耐性、内側が感受性に対応する。ENX への耐性を獲得することにより、他の様々な薬剤への耐性や感受性が大きく変化している。B: エノキサシンとシプロフロキサシンの耐性能（親株との対数 MIC 比）の関係。各点はそれぞれ耐性株（合計 40 株）のデータに対応する。C: ネオマイシン（NM; タンパク質合成阻害剤）とクロラムフェニコールの耐性能の関係。NM への耐性獲得は CP への感受性をもたらし、またその逆も成り立つ。

は、2つの薬剤に対する耐性がトレードオフの関係にあることを意味している。そこで、これらのトレードオフの関係にある薬剤を同時に添加した環境下での進化実験を行ったところ、どちらの薬剤に対しても耐性進化が阻害されることが確認された⁷⁾。この結果は、複数の環境摂動の適当な組み合わせによって、進化プロセスがコントロールされ得ることを示唆している。

次に、このような耐性能の変化が生じたメカニズムを理解するために、耐性株のトランスクリプトーム解析を行った。結果として、多くの遺伝子の発現量変化が見出されたが、その数の多さからどの遺伝子が耐性獲得に寄与するかを判別することは難しかった。そこでこの研究では、どれくらいの自由度によって耐性能の変化が記述できるかを解析するために、次のような単純な線形モデルを用いて遺伝子発現プロファイルから耐性能変化を予測することを試みた。対数発現量の線形和によって耐性能が表現できると仮定し、

$$MIC_j^k = \sum_{i=1}^N \alpha_i^k X_{ij} + \beta^k \quad (1)$$

とモデル化した。ここで X_{ij} は j 番目の耐性株における遺伝子 i の対数発現量、 MIC_j^k は薬剤 k への j 番目の株の耐性能（対数変換した MIC）であり、 α_i^k と β^k はフィッティングによって決める未知パラメータである。ただし、大腸菌の遺伝子数は約 4,000 であり、それら全てのデータを用いると、未知パラメータが多すぎるためにオーバーフィッティングの状態になり、モデルの汎化性能が失われてしまう。そこで実験データを、学習データと検証データの 2 つに分割し、学習データでフィッティングを行い、検証データでそのモデルの予測精度の検証を行うという、いわゆる交差検証を実施した。この手法により、様々な遺伝子数ならびに遺伝子の組み合わせにおいてモデルを作成し、最も予測力が高くなるような遺伝子数を求めると、概ね 7～8 個の遺伝子の線形和によって、様々な抗生物質への耐性能を定量的に予測できることが示された（図 3）。この手法により、どのような遺伝子の発現量の変化が耐性能の獲得に寄与しているか、定量的に評価することに成功した（詳細は文献 4 を参照）。

少数の遺伝子の発現量から抗生物質耐性の予測に成功したことは、ゲノム、タンパク質、代謝反応といった膨大な要素が関与するような、抗生物質耐性の獲得という複雑な現象を、比較的少数の自由度によって記述可能であることを強く示唆している。その変化を引き起こした要因をさらに調べるために、超並列シーケンサーを用いた全ゲノムリシーケンス解析を行い、得

図 3

線形モデルを用いた遺伝子発現量による耐性能の予測。A: 式 (1) で予測に用いた遺伝子数と予測の正確さの関係。予測の正確さは実測値と予測値との相関係数によって評価している。B: 実測値と予測値の関係。8つの遺伝子の発現量による予測値（係数のフィットに用いていないテストデータ）と実測値をプロットした。それぞれの点は各耐性株の各薬剤に対する耐性能を表している。

られた耐性株のゲノム配列にどのような変化が生じたかを解析した。その結果、それぞれの耐性株で数個から十数個程度の変異が同定された。この遺伝子発現量とゲノムの変異の対応を解析したところ、遺伝子発現状態が非常に類似している耐性株の間であっても、必ずしも類似したゲノム変異が生じているというわけではなく、類似する遺伝子発現量の変化を引き起こすような変異が複数存在し、そうした変異による遺伝子発現状態の変化を通じて抗生物質耐性を獲得したことが示唆された。これらの結果は、遺伝子発現量や薬剤耐性などの表現型の変化は少数の自由度に強く拘束をされているが、一方で遺伝子型の変化への拘束は相対的に弱いことを示唆している。

3. ラボオートメーションを用いた全自動進化実験システムの構築

微生物を用いた進化実験では、環境に対する進化が観察されるまで植え継ぎ培養を継続する必要があるため、長期間にわたり同一の実験操作を繰り返す必要があるなど、実験者に多大な負荷がかかるという問題がある。この実験者への負荷のために、独立に維持できる進化系列の数には制限が生じ、様々な環境や初期条件からの系統的な進化実験を困難にしている。そこで我々は、ラボオートメーションを用いた全自動の進化実験システムを構築し⁸⁾、それを用いた進化プロセスの定量解析を行っている⁵⁾。

図 4 に我々が構築した進化実験システムの外観を示す。クリーンブース内に設置されたラボオートメーションシステム（Beckman Coulter 社製 Biomek NX[®]）に、増殖評価用のマイクロプレートリーダーとイン

図 4

全自動進化実験システム。クリーンブース内に置かれたオートメーションシステムにプレートリーダーとインキュベーターが接続されている。

キュベーターが接続されている。培養器には最大 44 枚の 96 ウェルまたは 384 ウェルマイクロプレートを格納することが可能であり、最大で 16,000 程度の独立培養系列を全自動で維持することが可能である。また、長期間にわたり細胞の入っていない培地のみの植え継ぎ実験を行い、クロスコンタミネーションが生じないことを確認している。このシステムを用い、酸・アルカリ・金属塩・アルコールなどの 11 種類の環境ストレスを添加した環境での進化実験を行ったところ、前述の抗生物質耐性の進化実験と同様に、比較的少数の自由度によってその表現型変化が記述され得ることが示唆されている⁹⁾。

4. おわりに

近年の超並列シーケンサーなどハイスループットの解析技術の飛躍的な性能向上により、ハイスループット解析と進化実験とを融合させることで、進化プロセスの大規模定量データの取得が可能となってきた。特に、オートメーションを活用して多系列の進化実験を系統的に行うことで、どのような表現型-遺伝子型の変化が適応度に寄与するかを抽出することが可能となり、そこから遺伝子の機能や環境適応の分子機構など、多くの新たな知見を得ることに成功している。ハイスループット解析や実験ロボットが今後さらに低価格化すれば、こうしたアプローチをさらに大規模に推し進めることが可能となる。こうした解析は今後、基礎科学にとどまらず、医学や生物工学など様々な分野に応用されることが期待できる。

また、進化実験の定量解析は、進化ダイナミクスが持つ一般的な性質を探索するにあたって重要なデータを提供しつつある。理論解析と計算機シミュレーション

を用いた研究により、進化ダイナミクスの結果として、取り得る表現型が比較的次元の状態空間に拘束されることが予測され、実験データとも良い対応を見せている⁹⁾⁻¹²⁾。こうした理論研究と本稿で紹介したような実験研究を統合することにより、進化プロセスにおいてどのような表現型-遺伝子型の変化は可能で、何が不可能なのか、そしてそのダイナミクスはどのように記述されるか、すなわち表現型進化の制約と方向性といった問題について新たな理解がもたらされるであろう。

文 献

- 1) Elena, S. F., Lenski, R. E. (2003) Nat. Rev. Genet. **6**, 457-469. DOI: 10.1038/nrg1088.
- 2) Conrad, T. M. *et al.* (2011) Mol. Sys. Biol. **7**, 509. DOI: 10.1038/msb.2011.42.
- 3) 古澤 力 (2018) 定量生物学, 第 11 章, 化学同人, 東京.
- 4) Suzuki, S. *et al.* (2014) Nat. Comm. **5**, 5792. DOI: 10.1038/ncomms6792.
- 5) Horinouchi, T. *et al.* (2017) Sci. Rep. **7**, 14009. DOI: 10.1038/s41598-017-14335-7.
- 6) Kirschner, M. *et al.* (2005) The plausibility of life: Resolving Darwin's dilemma. Yale University Press, New Haven.
- 7) Suzuki, S. *et al.* (2017) BMC Genomics **18**, 328. DOI: 10.1186/s12864-017-3718-2.
- 8) Horinouchi, T. *et al.* (2014) J. Lab. Automat. **19**, 478-482. DOI: 10.1177/2211068214521417.
- 9) Kaneko, K. *et al.* (2015) Phys. Rev. X **5**, 011014. DOI: 10.1103/PhysRevX.5.011014.
- 10) Furusawa, C., Kaneko, K. (2015) J. Roy. Soc. Interface **12**, 20150482. DOI: 10.1098/rsif.2015.0482.
- 11) Furusawa, C., Kaneko, K. (2018) Phys. Rev. E **97**, 042410. DOI: 10.1103/PhysRevE.97.042410.
- 12) Kaneko, K., Furusawa, C. (2018) Annu. Rev. Biophys. **47**, 273. DOI: 10.1146/annurev-biophys-070317-033155.

古澤 力

古澤 力 (ふるさわ ちから)

理化学研究所生命機能科学研究センターチームリーダー / 東京大学生物普遍性研究機構教授
2000 年東京大学総合文化研究科博士課程修了, 2001 年理化学研究所基礎特別研究員, 2003 年大阪大学大学院情報科学研究科准教授を経て 2011 年より現職。

研究内容: 普遍性生物学 (理論と実験)
連絡先: 〒 565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3
E-mail: chikara.furusawa@riken.jp

堀之内貴明

堀之内貴明 (ほりのうち たかあき)

理化学研究所生命機能科学研究センター研究員
2011 年大阪大学大学院情報科学研究科博士課程修了。同年より理化学研究所生命システム研究センター特別研究員。2016 年より同研究員。2018 年より現職。

研究内容: 進化工学とオミクス技術による進化過程の理解と制御, その応用
連絡先: 同上
E-mail: takaaki_horinouchi@riken.jp