The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	大腸菌の人工進化実験における表現型・遺伝子型の網羅的解析
Author(s)	古澤, 力
Citation	大阪大学低温センターだより. 2012, 157, p. 6-12
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/4034
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

大腸菌の人工進化実験における表現型・遺伝子型の網羅的解析

情報科学研究科　古澤　　力（内線7432）
E-mail: furusawa@ist.osaka-u.ac.jp

１．はじめに

生物システムは一般に、周囲の環境変化に応じてその内部状態を変化させ、その環境に適応進化をすることが可能である。環境の変化はしばしば予測不可能なものであり、事前に準備されたプログラムを用いることは出来ない。そうした予測不能な環境変化に対し、システムの安定性を維持しつつ、柔軟な可塑性を示すことが出来る適応進化のメカニズムには未知な点が多く、その理解が生物システムの本質の理解にとって重要であると期待できる。本小論では、我々のグループが行っている大腸菌の人工進化実験を基に、進化ダイナミクスにおける表現型と遺伝子型の可塑性について簡単に議論する。

従来、生物進化のダイナミクスを理解するための研究の多くは、現存する生物種のゲノム配列や表現型を比較することを通じて、過去に生じた進化の過程を「再構成」することによって成されてきた。この方法は、現存する生物種という豊富なリソースを解析対象にすることが出来るというメリットがある一方で、再構成された進化過程に残る曖昧さや、進化前の表現型にアクセスすることが出来ないなど、データの不完全性に悩まされる場合が多い。また、その過程の再現性を確認することは難しく、解析された進化の過程において、何が偶然であり、何が必然であったのかを判別することが困難であった。それに対して、実験室内での人工進化実験を用いて、明確に定義された初期状態からの進化ダイナミクスを追うアプローチが存在する。微生物のように世代時間の短いモデル生物を、一定の環境下で長期間にわたって世代を重ねることにより、その環境に対する適応進化のダイナミクスを経時的に追跡することが可能となる。また、同一環境下で複数独立系列の実験を並行して行うことにより、その過程において共通に出現する性質について議論を行うことが可能である。こうした構成的な実験手法を用い、そこで生じた表現型と遺伝子型の変化を詳細に解析することにより、適応進化ダイナミクスが持つ一般的な性質を抽出可能であると期待できる。そこで本研究では、実験手法が確立しているモデル微生物である大腸菌を用いて、高エタノールストレス環境下での人工進化実験を複数系列で行った。得られたエタノール耐性株について*DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析と*次世代シーケンサを用いたゲノム変異解析を行うことによって、

---

*この印の付いている語は、後に「用語説明」があります。

その進化ダイナミクスにおける表現型と遺伝子型の変化を高精度で解析した[1]。以下、その実験結果とそこから見出された進化ダイナミクスが持つ性質を示す。

2．高エタノールストレス環境下での大腸菌の人工進化実験

図1(a）に人工進化実験の手順の概要を示す。ある大腸菌の親株から培養実験を始め、24時間の時間間隔での植え継ぎ培養を6つの独立系列で行った。培地は、5％エタノールを添加した10 mLのM9合成培地を用いた 。またこの培養実験では、細胞が対数増殖期を常に維持するように植菌濃度を調整した（実験条件の詳細は、文献[1]を参照)。このように対数増殖を保つ培養を長期間行うことにより、増殖速度の速い細胞が（変異などにより）出現すると、それが集団全体を乗っ取るという、増殖速度を適応度とした進化ダイナミクスを観察することが可能となる。図1(b）に、この5％エタノールストレス環境下での比増殖速度の変化をプロットしている。図に見られるように、2500時間の植え継ぎ培養の過程で、ゆるやかに比増殖速度が上昇し、最終的には初期の2倍程度の比増殖速度（つまり、世代時間が1/2）まで上昇した。この高エタノールストレス環境下で高い増殖能を示すエタノール耐性株を、その2500時間の後の増殖速度の順にA株～F株と名付けた。図2に、親株と耐性株AとFについて、様々なエタノール濃度下で比増殖速度を測定した結果を示す。

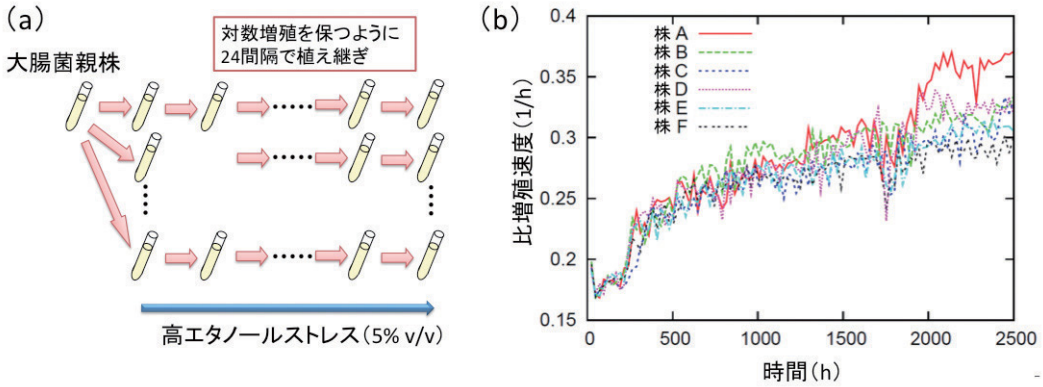

図1．大腸菌の長期植え継ぎ実験。(a）実験手順の模式図。(b）高エタノールストレス（5％）環境下での植え継ぎ培養における比増殖速度の変化。

図にあるように、耐性株は親株が増殖出来ない6.5%といった高エタノールストレス環境下でも増殖することが可能である一方、エタノールを含まない非ストレス環境下では親株に比較して低い増殖速度を示す結果が得られた。また、このエタノール耐性の表現型は、非エタノールストレス環境下においても安定に維持され得ることが示されている。例えば、これら耐性株をエタノールを含まないM9合成培地で100世代以上培養を続けても、エタノールストレスに対する耐性は安定に維持される。以降、これらエタ

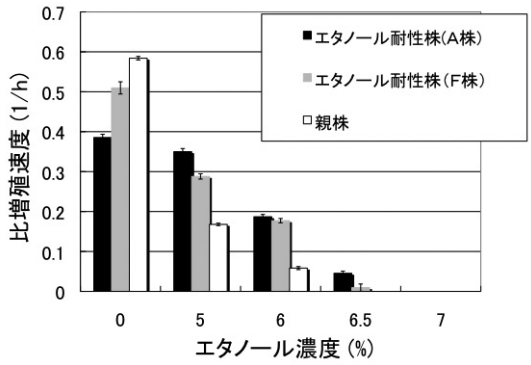

図2．様々なエタノール濃度下での大腸菌の比増殖速度。エラーバーは3回の培養結果の標準偏差を示す。

ノールストレス耐性株がどのようなメカニズムによって出現したかを、表現型と遺伝子型の網羅的解析に基づいて検証する。

３．エタノール耐性株の遺伝子発現解析

人工進化実験によって得られたエタノール耐性株が、親株と比較してどのように表現型を変化させたかを定量するために、**DNA**マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。親株とエタノール耐性株**A**～**F**について、それぞれ**5**％エタノールを含む環境と含まない環境下で培養し、対数増殖期に菌体を回収してマイクロアレイ解析に供した。結果として、**7**株×**2**条件＝**14**の発現プロファイル（それぞれが約**4000**種類の遺伝子発現量データを持つ）を取得した。その高次元のデータセットから、特徴的な表現型変化を抽出するため、主成分分析を行った。図**3**に、それら**14**の発現プロファイルについて、第一主成分（**PC1**）と第二主成分（**PC2**）で張られた空間での主成分得点をプロットしている。図から判るように、非エタノール環境下での発現プロファイル（**P0**、**A0**～**F0**）は図の左側、**5**％エタノール環境下のデータ（**P5**、**A5**～**F5**）は右側という明らかな分布の偏りが見られ、これは**PC1**が親株・耐性株共にエタノールストレスに対する応答に対応していることを意味している。一方で、親株（**P0**、**P5**）のデータが図の下部に、耐性株のデータが上部にあることは、**PC2**がエタノール耐性をもたらす耐性株共通の表現型変化に対応することを示している。ここで重要なことは、独立に行われた進化実験で得られた耐性株の間で、生じた発現量変化には高い相同性が見られるという点である。このことは、耐性機構の獲得のダイナミクスが偶然の積み重ねによって生じるのではなく、何らかの決定論的なダイナミクスが存在することを示唆している。

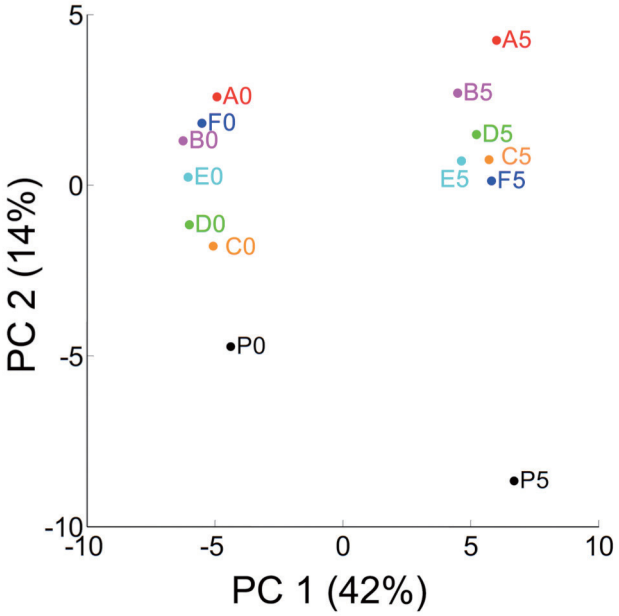

図**3**．発現量データの主成分分析。横軸に第一主成分、縦軸に第二主成分をとり、各データの主成分得点をプロットしている。**P0**、**P5**は親株の**0**％エタノール、**5**％エタノール環境下でのデータをそれぞれ表し、**A0**～**F0**と**A5**～**F5**は耐性株の**0**％、**5**％エタノール環境下でのデータをそれぞれ示す。第一・第二主成分の寄与度はそれぞれ**42**％と**14**％となっている。

また、エタノール耐性をもたらした発現量変化を遺伝子機能のレベルで議論するために、**PC2**に大きく寄与した遺伝子がどのような機能を持つかを解析した。その結果、ヒスチジン・トリプトファン・バリン・ロイシン・イソロイシンといったアミノ酸の生合成経路に関与する遺伝子が、**PC2**に正の方向へ有意に寄与しているおり、これらの生合成経路に関与する遺伝子がエタノール耐性株共通に発現上昇していることが示された。そうした発現量変化の例を図**4**に示す。この結果は、細胞内のそれらのアミノ酸濃度の上昇が、エタノール耐性に寄与していることを示唆しており、実際

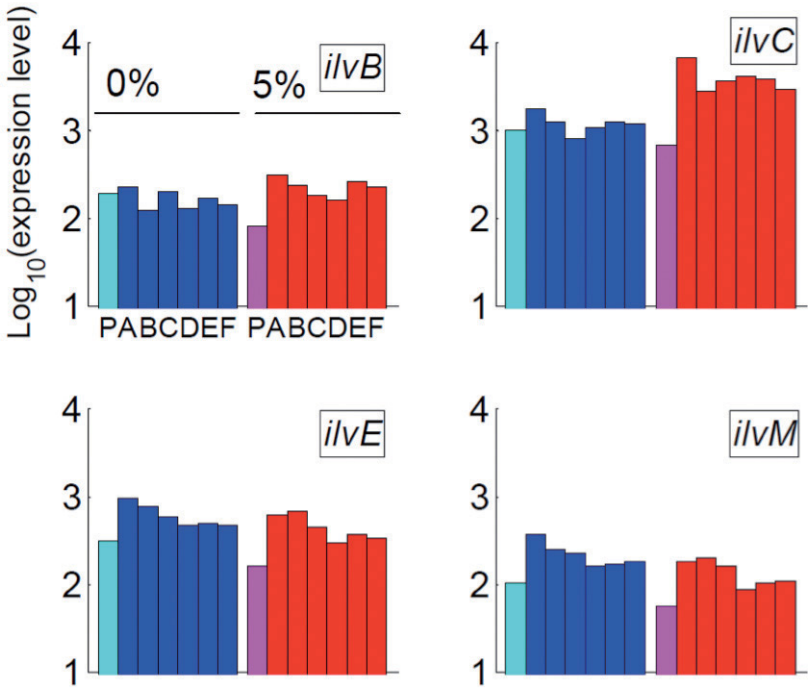

図 **4**．イソロイシン合成経路に関与する遺伝子の発現量変化。横軸にある**P**は親株を、**A**～**F**は耐性株を示す。縦軸は発現量の絶対値の**10**を底とする対数として表示している。ここに示した遺伝子は、イソロイシン合成経路に関与する遺伝子の一部であるが、その全てが上の図と同様の発現量変化を示す。全ての株において共通に、親株よりも発現量が上昇していることが解る。

にヒスチジン・トリプトファン・イソロイシンについては、それを培地に添加することによって、親株の高エタノールストレス環境下での増殖速度が上昇することが確認された。

４．エタノール耐性株のゲノム変異解析

マイクロアレイによる発現解析から、**6** 株の耐性株に共通で生じた表現型の変化を見出すことが出来た。その変化をもたらした機構の理解のために、ゲノム上に固定された突然変異を次世代シーケンサ**SOLiD**を用いて同定した。その結果として検出された**1**塩基置換の数を表 **1** に示す。表に見られるように、耐性株**A**株において塩基置換の数が他と比較して有意に多く、この**A**株において突然変異率が上昇していることが示唆された。実際、この**A**株で変異が導入された遺伝子には、ゲノム複製時のエラー校正に関与する遺伝子であり、この遺伝子の欠損が突然変異率の上昇をもたらすことが知られている**mutS**が含まれており[2]、その変異による活性低下が**A**株における突然変異率の上昇に寄与している可能性が考えられる。また、**A**株に固定された変異における*同義置換と非同義置換の比から、これら**126**の塩基置換については、その大多数が適応度（この場合は増殖速度）に対して中立な変異であることが示唆された。一方で、この**A**株は **6** つの耐性株の中で最も速い比増殖速度の上昇を見せた株であり（図 **1** 参照）、その高い突然変異率が進化速度の上昇に寄与した可能性が考えられる。こうした人工進化実験における変異率を上昇させるという戦略の出現は、**Lenski**らの研究においても見出されており[3]、その出現メカニズムと進化ダイナミクスへの影響は今後の重要な解析対象となる。

また、表**1**から見られるもう一つの重要な点は、残りの**B**株から**F**株において固定された変異の数が**10**以下という比較的少ない数に留まったことである。また、各耐性株において変異のオーバーラップは少数であった。この結果は、図**1**で示した比増殖速度の上昇のメカニズムについて、新たな視点をもたらす可能性がある。マイクロアレイによる発現量の網羅的解析では、これら**B**～**F**株においても、一部のアミノ酸生合成経路の活性化など、共通の方向の変化を見出すことができた。しかしながら、固定された変異のうち、これらの機能に関与される遺伝子に変異を見出すことは出来なかった。さらに、ゲノムに固定された変異の数がこのように少数で、かつオーバーラップが少数である結果は、図**1**で示した比増殖速度のゆるやかな上昇は、ゲノムへの変異に起因するものではなく、長い時間スケールをもつゲノム変異に起因しない表現型変化であることを強く示唆している。むろん、これまでに数百世代に渡るような長い時間スケールを持つ表現型変化のメカニズムは全く知られていないが、この実験結果を説明するためには、何らかの新たなメカニズムの存在が必要になると考えている。真核細胞では、ヒストンのメチル化などによる*****エピジェネティクスによる表現型変化のメカニズムが知られているが、原核生物である大腸菌において、そうしたエピジェネティックな表現型変化や、それがどのように世代を越えて継承されるかについては不明な点が多い。今後の解析対象となるであろう。

	A株	B株	C株	D株	E株	F株
一塩基置換(総数)	126	4	9	5	4	5
ORF内	114	1	6	2	1	2
同義置換	39	0	1	0	0	0
非同義置換	75	1	5	2	1	2
ORF間	12	3	3	3	3	3

*ORF(Open Reading Frame)とは、遺伝子をコードしている開始コドンから終止コドンまでの間の配列のこと。

5．まとめと展望

本研究では、進化ダイナミクスにおける一般的な性質の抽出を目指し、同一の初期状態から、同一の環境条件下で複数系列の人工進化実験を行った。結果として、良く知られた数分から数時間の時間スケールを持つ環境応答とも、長い時間スケールでゲノム変異を伴う進化のメカニズムとも異なる、長い時間スケールを持ち、かつゲノム変異に起因しない適応的な表現型変化が生じていることが強く示唆された。そのメカニズムは不明であるが、このような適応のダイナミクスを理解することは、安定な環境適応と進化を可能とする生物システムの本質の理解に重要な役割を果たすと期待できる。

むろん、今回の高エタノールストレス環境下での人工進化実験は、あくまでも一つの例であり、今回の結果の普遍性を確認するためには、より多くのストレス環境下や、時間的に変動する環境下などで、系統的な人工進化実験を行い、時系列解析を含めた表現型・遺伝子型の網羅的解析を行うことが重要となるであろう。我々のグループでは、そうした系統的な人工進化実験を可能とする、ラボオートメーションを用いた全自動の人工進化実験システムを構築している（図**5**）。このシステムでは、クリーンブース内に設置した自動分注ロボット（**Beckman Coulter**製**Biomek NX**）と、それに接続したインキュベータ、吸光**/**蛍光プレートリーダを組み合わせることにより、**96-well**プレートを用いた自動の植え継ぎ培養が実現されており、様々なストレス環境下での進化実験が行われている。この進化実験系で得られた菌株について、表現型と遺伝子型の変化を高精度かつ網羅的

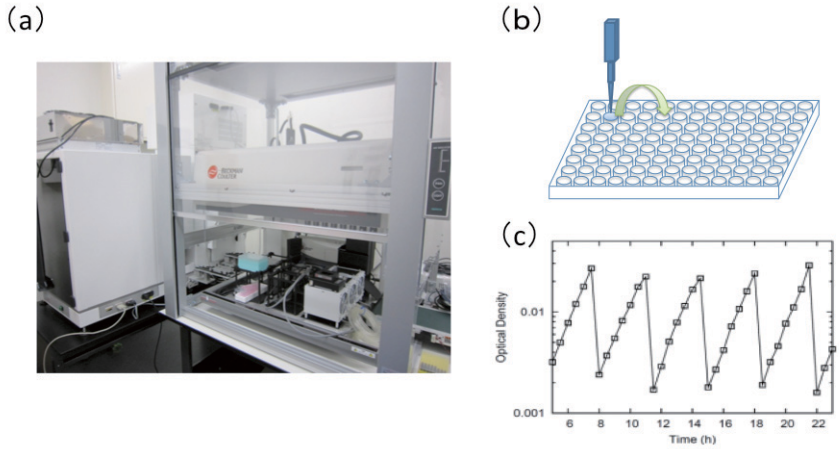

図 5．（a）ラボオートメーションを用いた全自動の人工進化実験システムの外観。分注ロボットにインキュベータとプレートリーダが接続されている。（b）96-wellプレートを用いて植え継ぎ培養を行う。（c）植え継ぎ培養の予備データの一例。100μLの合成培地で大腸菌を培養し、30分ごとに測定する吸光度が一定値を超えたら、10倍希釈で次のwellに植え継ぐ操作を自動で行っている。

に解析することにより、適応進化ダイナミクスが持つ普遍的な性質を解析する予定である。

謝辞

実際に長期間に渡る培養実験を行った堀之内貴明、玉岡邦康の両氏と、共同研究者である小野直亮、鈴木真吾、平沢敬、四方哲也、清水浩の各氏に感謝する。

参考文献

［1］Horinouchi T, Tamaoka K, Furusawa C, Ono N, Suzuki S, Hirasawa T, Yomo T, Shimizu H, Transcriptome analysis of parallel-evolved Escherichia coli strains under ethanol stress, BMC Genomics 11:579（2010）

［2］Li B, Tsui HC, LeClerc JE, Dey M, Winkler ME, Cebula TA, Molecular analysis of mutS expression and mutation in natural isolates of pathogenic *Escherichia coli*, Microbiology 149:1323-31（2003）

［3］Cooper VS, Lenski RE, The population genetics of ecological specialization in evolving Escherichia coli populations, Nature 407（6805）:736-9（2000）

用語解説

DNAマイクロアレイ

特定の塩基配列を持つDNA断片がサンプル中に含まれる量を、数万から数百万種類の塩基配列について同時に定量可能な分析機器のこと。基盤上にターゲットの塩基配列と相補的な配列を持つプローブと呼ばれるDNA断片（一般的には長さが20～60塩基）を配置し、そこに蛍光標識したサンプルのDNA断片をアプライし二本鎖を形成させた後に、その領域の蛍光シグナルを測定することによって、サンプル中の任意の配列を持つDNA断片の定量を行う。細胞からメッセン

ジャーRNAを取り出して、遺伝子配列と相補的なプローブを持つDNAマイクロアレイに供することにより、遺伝子発現を網羅的に定量することが可能となる。

次世代シーケンサ

近年実用化された、従来のサンガー法とは異なる原理に基づいて、高速に大量のDNAの塩基配列の決定（シーケンシング）を行う分析機器のこと。複数の手法が実用化されているが、それらの共通点として、限定された微小空間での化学反応（PCR反応）を並列で行う点と、蛍光物質を利用した高精度の画像解析を用いて塩基配列を決定する点が挙げられる。短いDNA断片の塩基配列を膨大な数だけ一度に決定することが可能であり、例えばロシュ社製のSOLiD 5500xlでは、75塩基のDNA断片について、10億本程度の配列決定が１回の解析で可能である。

同義置換と非同義置換

同義置換とは、塩基の置換（例えばアデニンがチミンに変化）した場合に、それがコードしているアミノ酸が変化しない場合を指し、非同義置換とはアミノ酸が変化する場合を指す。ランダムに塩基置換が生じ、それが適応度に影響を与えていない（つまり進化的に中立である）ときに、同義置換と非同義置換の比はゲノム配列から決定することが出来る。この比よりも非同義置換が多い場合には、それらの塩基置換には何らかの進化的な選択が生じていることを意味し、その情報から選択圧の強さを推定することが出来る。

エピジェネティクス

ゲノムDNAの塩基配列に依らない遺伝子発現の多様性を生み出すメカニズムの総称。例えば、真核生物ではゲノムDNAはヒストンと呼ばれるタンパク質に結合しているが、このヒストンがメチル化やアセチル化などの修飾を後天的に受けることにより、その部位からの遺伝子発現量が制御される。原核生物においては、ゲノムDNAのメチル化が、外来遺伝子と自らの遺伝子を区別するために用いられている。