

微生物の適応進化過程の理解とその応用

堀之内貴明・鈴木 真吾・古澤 力*

はじめに

微生物による物質生産などの工学的利用を効率良く行うためには、その表現型を適切にデザインする必要がある。合成生物学の手法を用いた表現型の拡張¹⁾、ゲノムスケールの代謝シミュレーションを用いた代謝予測²⁾などさまざまな手法を用いた微生物のデザインが活用されているが、それらの改変は必ずしもこちらが期待した結果をもたらさない場合がある。この原因としては、生物システムではさまざまな要素が複雑に相互作用をしているため、こちらが望むように変化させるための摂動が、予期しない結果をもたらすためと考えられる。この因果の絡まった細胞内のネットワークをどのように合理的にデザインできるかについては、まだ不明な点が多く残されている。

こうした人工的な表現型デザインが持つ困難さの一方で、生物システムはさまざまな環境に適応・進化をする能力を持っている。たとえばさまざまなストレス環境で微生物を培養することにより、比較的容易にそのストレス環境に適応した株を取得することができる。こうした高い柔軟性を持つように見える適応・進化のプロセスと、限られた可塑性をもたらす人工的な操作とは何が違うのであろうか？もちろん、変異と選択というダーウィン進化の枠組みがそこでの表現型変化の主要なドライビングフォースであることは間違いない。一方で、その過程においてどのように遺伝子型の変化と表現型の変化が対応しているか、その変化がどのような拘束条件の下にあるか、といった適応・進化プロセスの基本的な特性が明らかになっているとは言い難い。こうした適応・進化プロセスの理解は、どのような表現型変化は人工的に起こすことが難しいかを予測するなど、工学的応用のための表現型デザインの指針を与え得るものであろう。

我々のグループではこうした背景の下で、さまざまな環境下での植え継ぎ培養を用いた大腸菌の進化実験を行い、そこでの表現型と遺伝子型の解析から適応・進化プロセスが持つ性質の探求を行っている。本稿では、その一例として、さまざまな抗生物質を添加した環境下での大腸菌進化実験の解析と、系統的な進化実験を行うための技術開発について紹介する。

抗生物質を添加した環境での大腸菌進化実験³⁾

抗生物質に耐性を持つ微生物の出現は、医学・薬学の分野において大きな問題となっている。この適応・進化プロセスを詳細に解析することは、耐性菌の出現を抑制する新たな理解につながるとともに、そのプロセスの理解を通じて表現型デザインに寄与することも期待できる。

そこで本研究では、さまざまな作用機序を持つ10種類の抗生物質をそれぞれ添加した環境下において、4つの独立系列での大腸菌の植え継ぎ培養を90日間行い、それらの薬剤への耐性株を取得した(図1)。まず、これらの耐性株について、ある一つの薬剤に対する耐性獲得が、他のさまざまな薬剤に対する耐性・感受性をどのように変化させるかを定量したところ、多くの耐性株にお

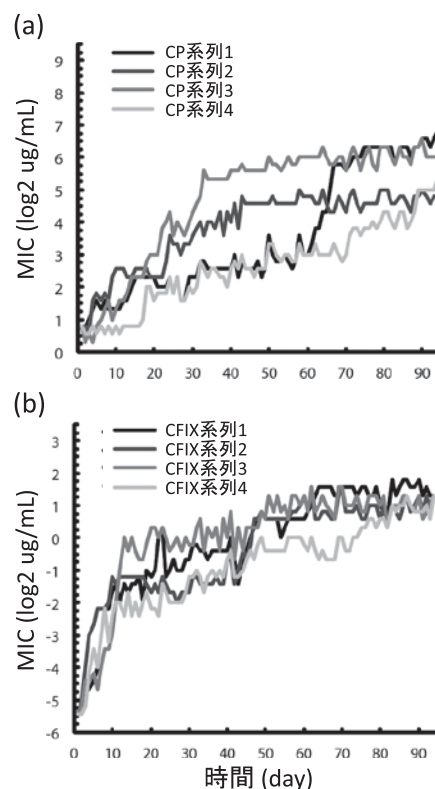


図1. 抗生物質を添加した環境での大腸菌進化実験。横軸は時間、縦軸は最少増殖阻止濃度 (MIC) の対数を示す。(a) クロラムフェニコール (CP; タンパク質合成阻害剤) と (b) セフェキシム (CFIX; 細胞壁合成阻害剤) を添加した環境での結果をそれぞれ示す。同じ親株から4つの独立系列を維持している。

*著者紹介 理化学研究所生命システム研究センター (チームリーダー) E-mail: chikara.furusawa@riken.jp

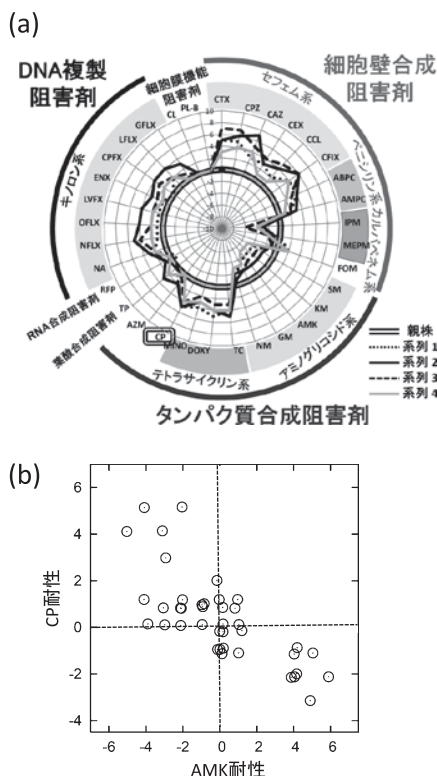


図2. 一つの薬剤への耐性獲得が他の薬剤の耐性・感受性に与える影響。(a) 進化実験によって得られたCP耐性株(4株)が他の薬剤に示す耐性/感受性。中央の二重線の円が親株の薬剤耐性能を示しており、放射状の軸は親株との耐性能の違いを最小増殖阻止濃度の対数比で示している。ここでは、中央の二重線の円より外側が耐性、内側が感受性を表す。(b) アミカシン (AMK; タンパク質合成阻害剤) とCPへの耐性を、最小増殖阻止濃度 (MIC) の親株に対する対数比でプロットしている。値が0の場合が親株と同じ耐性となり、正・負の値がそれぞれ耐性・感受性の大きさに対応する。

いて、他の薬剤に対する耐性・感受性の大きな変動が見られた(図2aに例を示す)。興味深いことに、いくつかの薬剤ペアについては、薬剤Aの耐性株が薬剤Bに対して親株よりも感受性となり、またその逆も成り立つというトレードオフの関係にあることが見いだされた(図2b)。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、両者への耐性獲得が阻害されることが確認され、こうした薬剤の組み合わせによって進化過程がコントロールされ得ることが示唆された⁴⁾。

この耐性獲得のメカニズムを理解するために、DNAマイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。その結果、それぞれの耐性株においてさまざまな遺伝子の発現量の変化がみられたが、その数の多さから、どのような発現変化が耐性獲得に寄与するかを抽出することは難しかった。そこで、線形モデルとクロスバリデーション法

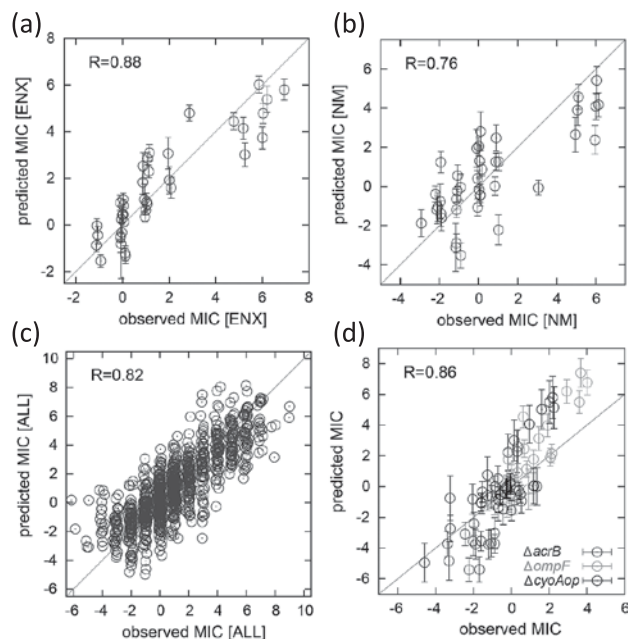


図3. 遺伝子発現量による薬剤耐性能の予測。遺伝子発現量の線形和によって、MICを指標とする薬剤耐性能を重回帰にて予測することが可能となる。(a) ~ (c) はそれぞれエノキサシン (ENX; DNA複製阻害剤)・ネオマイシン (NM; タンパク質合成阻害剤)・25種類の薬剤すべてに対する10を底とする対数MICについて、実測値と予測値を示している。重回帰による予測は、*acrB*, *cyoC*, *mipA*, *ompF*, *pntB*, *pps*, *tsx*, *yfhL*の8遺伝子の発現量に基づく。(d) は同じ遺伝子群による重回帰によって、*acrB*, *ompF*, *cyoC*破壊株についてMICの予測を行っている。

を適切に組み合わせることにより、遺伝子発現量から耐性の変化を予測することを試みたところ、7~8個の遺伝子の発現量を組み合わせることによって、さまざまな抗生物質への耐性能を高い精度で予測可能であることが示された(図3)³⁾。この手法によって、どのような発現状態の変化が耐性能の獲得に寄与しているかを定量的に評価することが可能となった。たとえば、図2bにあるアミノグリコシド系のタンパク質合成阻害剤への耐性とクロラムフェニコール耐性のトレードオフは、細胞内外のプロトン輸送のバランスによって生じることが示唆された。

少数の遺伝子の発現量から抗生物質への耐性予測が成功したことは、ゲノム、タンパク質、代謝反応といった膨大な要素に関わる抗生物質耐性の獲得について、比較的少数の要素(自由度)によって記述できることを意味している。その変化を引き起こした要因をさらに調べるために、得られた耐性株のゲノム配列がどのように変化しているかを次世代シーケンサーを用いて解析したところ、それぞれの耐性株で数個から十数個程度の突然変異が同定された。一方で、遺伝子発現量とゲノムの変異の

(a)



(b)

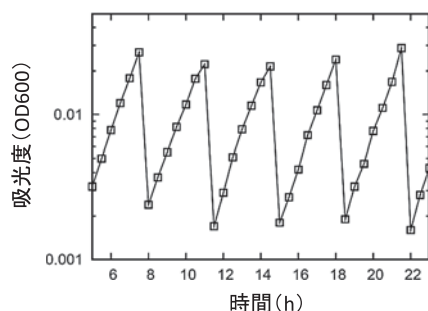


図4. ラボオートメーションを利用した全自動培養システム。(a) システムの外観。クリーンブース内に設置した分注ロボットに、インキュベーターとプレートリーダーが接続されている。(b) 植え継ぎ培養のデータ例。吸光度で測定した菌体濃度が一定値を超えると、隣のwellに植え継ぐ操作を全自動で行っている。

対応を解析したところ、類似した発現量変化が起こっている耐性株の間で、必ずしも類似した変異が生じているわけではなく、さまざまな変異が似通った遺伝子発現量の変化を引き起こし、それが抗生物質耐性の獲得につながっていることが示唆された。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。

多系列・多環境での進化実験のための 全自動培養システムの構築⁵⁾

進化実験の実施は、しばしば実験者に大きな負担をかける。こうした実験者への負担を回避し、複数環境・複数系列の進化実験を系統的に行うため、全自動の進化実験システムを構築した(図4)。クリーンブース内に設置された自動分注ロボット(Beckman Coulter社製Biomek NX)とインキュベーションシステム、および、吸光プ

レートリーダーを接続している。一定時間間隔で吸光度により細胞濃度を測定し、適当な植え継ぎ量を計算することによって、対数増殖期を保った継ぎ培養を全自動で行うことが可能となっている。384-well プレートを用いることによって、最大2000系列程度の培養を並行に(クロスコンタミネーションなしで)維持することができる。このシステムの性能を評価することを目的として、酸・アルカリなど11の異なるストレス環境下でそれぞれ10独立系列の進化実験を1000時間程度行い、それぞれの環境に耐性を持つ大腸菌を取得した。現在、これらのストレス耐性株についてトランスクリプトーム解析とゲノム変異解析が完了しており、表現型の変化と遺伝子型の変化の対応を解析している。

おわりに

次世代シーケンサーなどハイスループットの解析技術の興隆は、適応・進化プロセスにおける表現型と遺伝子型の対応について、詳細な定量データの取得を可能としている^{6,7)}。こうした解析から、そのプロセスにおいてどのような表現型変化が可能で、どのような変化が難しいか、そしてその制限はどのようなメカニズムで生じるかを理解することが重要となるであろう。本稿にある抗生物質耐性大腸菌の解析では、表現型の変化は少数自由度の変化に拘束されていることが示唆されている。また、数理モデルと安定性解析に基づく理論研究においても、こうした表現型変化の拘束が不可避であることが議論されている⁸⁾。こうした適応・進化プロセスが持つ性質を理解することで、工学的に有用な表現型がどのような摂動(たとえば遺伝子操作)によって可能となるか、その合理的な表現型デザインへ向けての基盤になると考えている。

文 献

- 1) Soma, Y. *et al.*: *Metab. Eng.*, **23**, 175 (2014).
- 2) Ohno, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 221 (2013).
- 3) Suzuki, S. *et al.*: *Nat. Commun.*, **5**, 5792 (2014).
- 4) Suzuki, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.02.003.
- 5) Horinouchi, T. *et al.*: *J. Lab. Autom.*, **19**, 478 (2014).
- 6) Toprak, E. *et al.*: *Nat. Genet.*, **44**, 101 (2012).
- 7) Kishimoto, T. *et al.*: *PLoS Genet.*, **6**, e1001164 (2010).
- 8) Kaneko, K. *et al.*: *Phys. Rev. X*, **5**, 011014 (2014).