

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680030

研究課題名(和文) ラボオートメーションを活用した大腸菌人工進化実験による適応進化ダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Analysis of adaptive evolution using an automated culture system of E. coli

研究代表者

古澤 力 (Furusawa, Chikara)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・チーリーダー

研究者番号：00372631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,800,000円、(間接経費) 6,240,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、進化過程における微生物の表現型・遺伝子型の変化を高精度に解析することにより、適応進化のダイナミクスを担うメカニズムの根源に迫ることを目的としている。まず系統的な進化実験を行うために、ラボオートメーションを用いた自動培養システムの構築を行い、数百系列の培養を対数増殖期を保つように植え継ぐことに成功した。そのシステムを用いて、様々なストレス添加条件下での進化実験を行い、その過程における遺伝子発現量の変化とゲノムへの変異固定を網羅的に定量した。これらのデータを統合することにより、一部の適応的な表現型の変化はゲノムの変異によって説明できないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Phenotype-genotype relationship in bacterial adaptive evolution still remains unclear. In this study, by using experimental evolution of bacterial cells, we quantified phenotypic change and genetic change during adaptive evolution to various stress conditions. For this purpose, first we developed an automated culture system by which we can maintain hundreds of independent culture series of bacterial cells. Then, by using this automated system, we performed experimental evolution of E. coli under various stress conditions, including acid, detergent, and antibiotic stresses, to obtain tolerant strains for these stresses. Expression changes and genetic mutations in the tolerant strains were analyzed by microarray experiments and next-gen sequencers, respectively. The results demonstrated that a part of adaptive phenotypic changes cannot be explained by fixed genetic mutations, suggesting that an unknown non-genetic mechanism plays a role in the dynamics of adaptive evolution.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命システム情報学

キーワード：進化 大腸菌 オートメーション トランスクリプトーム ゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

生物システムは一般に、環境の変化に応じて表現型と遺伝子型を柔軟に変化させ、その環境に適応することが可能である。その適応進化の過程における表現型の変化は、ゲノム変異に起因する進化的な機構と、ゲノム変異に依らない適応的な機構の双方に依存する。柔軟かつ頑強な適応進化のダイナミクスを理解するためには、この2つの機構の相互作用が本質的であると理論的にも予想されるが、その実験的な解析はほとんど行われていない。これは、既存の生物種の解析からの情報のみでは、それが現れてきた適応と進化のダイナミクスを再構成することがほぼ不可能なためである。この適応と進化のダイナミクスを時系列に沿って詳細に解析するためには、実験室の制御された環境下で人工進化実験を行い、その過程における表現型と遺伝子型の変化を経時的に定量するという構成的なアプローチが有効となる。

### 2. 研究の目的

本研究は、人工進化過程における微生物の表現型・遺伝子型の変化を高精度に解析することにより、適応進化のダイナミクスを担うメカニズムの根源に迫ることを目的としている。その目的のために、ラボオートメーション(培養ロボット)を用いた微生物の複数環境下・複数系列での人工進化実験と、マイクロアレイ・次世代シーケンサなどによる表現型・遺伝子型解析を組み合わせたハイスループットな適応進化ダイナミクス解析システムを構築する。こうした進化実験によって、環境ストレス耐性や、抗生物質耐性の*E. coli*を取得し、その表現型と遺伝子型の対応を解析することによって、適応進化ダイナミクスの詳細なメカニズムを明らかにする。さらには、進化実験を生物工学における有用微生物の育種に応用するために、その基盤となる *in silico* スクリーニングの手法などを開発する。

### 3. 研究の方法

多環境・多系列での進化実験は、実験者に大きな負荷を与える場合がある。実験者の負担を軽減し、安定に複数環境下・複数系列の人工進化実験を行うために、クリーンブース内に設置した自動分注機などを用いて、*E. coli*の長期植え継ぎ培養を可能とするシステムを構築する。

このシステムを用いるなどして、様々なストレス因子や抗生物質を添加した環境下での植え継ぎ培養による*E. coli*の進化実験を行う。得られた耐性株においてどのような表現型と遺伝子型の変化が生じたかを定量するために、超並列シーケンサによるゲノム変異解析と、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行う。

### 4. 研究成果

以下に3つの内容について成果を記す。



図1: 自動培養システムの外観。クリーンベンチ内に設置した分注ロボットに、インキュベータとプレートリーダーを接続している。

### ラボオートメーションによる自動進化実験システムの構築

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ーを組み合わせることで、全自動で微生物の植え継ぎ培養を可能とする培養ロボットシステムを構築した。培養は96-well プレートを用いる。一定の時間間隔で吸光度を測定し、それが一定値に達したら次の well に菌体を植え継ぐという一連の操作を自動的に行うことによって、対数増殖期を維持した長期間培養が可能となる。また、微生物の長期培養においては、大気中や隣接した well からの微生物の流入など、コンタミネーションが問題となる場合がある。このコンタミネーションが発生していないかを確認するために、微生物を入れない培地のみを well を長期間植え継いだところ、菌体の増殖は見られず、コンタミネーションが発生していないことが確認された(文献2)。

この自動進化実験システムの使用例として、*E. coli*の進化実験を酸・アルカリ・界面活性剤などの11種類のストレス環境下において、それぞれ10独立系列で行った(図2)。約1000時間の培養の後、ストレス環境下での増殖速度が有意に親株よりも大きいストレス耐性株の取得に成功した。これら耐性株について、超並列シーケンサ Illumina HiSeq を用いたゲノム変異解析を行ったところ、例えば高 NaCl ストレスの耐性株には *proV* 遺伝子に共通に変異が固定されるなど、耐性獲得に寄与すると予想される変異の同定に成功した。さらに、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行ったところ、同じストレスに対する耐性株には共通の発現プロファイルの変化が見出され、それらの発現量変化は、例えば RNA ポリメラーゼの  $\sigma$  サブユニットなど、様々な制御因子の発現変化によって説明可能であることが示唆された。これらの表現型・遺伝子型の変化がどのように関連するかを解析することによって、様々なストレス環境に対する適応進化ダイナミクスにおいて、ゲノム変異に起因する適応度の変化と、変異に依らない適応度の変化を定量するこ

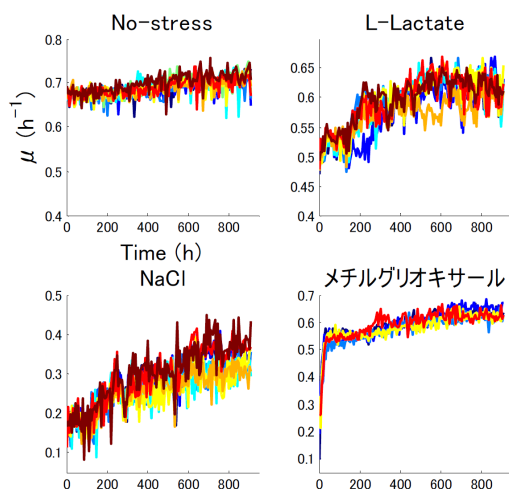


図2: 培養ロボットによる大腸菌進化実験の一例。図1の全自動進化実験システムを用いて、11種類のストレス環境下での大腸菌の植え継ぎ培養による進化実験をそれぞれ10独立系列で行った。約1000時間の培養後、それぞれの環境で親株より有意に増殖速度の大きいストレス耐性株の取得に成功している。

#### 抗生物質添加環境下での大腸菌進化実験

近年、抗生物質が効かない薬剤耐性菌の出現が大きな問題となっている。一方で、微生物がどのようなメカニズムによって耐性を獲得するか、未だ不明な点が残されている。そこで本研究では、大腸菌に効果があるとされる33種類の抗生物質を添加した環境での2000時間程度の進化実験を行い、その耐性獲得ダイナミクスの解析を行った。結果として、31種類の抗生物質については最小阻害濃度(MIC)が親株よりも有意に高い抗生物質耐性株の取得に成功した。

この耐性獲得のメカニズムを理解するために、超並列シーケンサによるゲノム変異解析を行ったところ、例えばアミノグリコシド系の抗生物質への耐性株は、電子伝達系に関与する遺伝子に集中して変異が固定されるなど、耐性獲得に寄与すると予想される変異を多数同定した。また、マイクロアレイによる発現解析を行い、同じ薬剤への耐性株は共通の発現プロファイルの変化が生じていることを確認し、例えばβラクタム系の抗生物質の耐性株はポーリンタンパク質をコードする *ompF* の発現量が共通して減少していることが明らかとなった。

さらに獲得した耐性株の表現型の変化を解析するために、ある薬剤へ耐性となった株が他の薬剤への耐性・感受性をどのように変化させるかを定量した。その結果、交差耐性と呼ばれるある薬剤への耐性獲得が他の薬剤への耐性獲得に繋がる現象が広く見出されたのに加え、ある薬剤 A への耐性獲得が、別の薬剤 B への超感受性(親株よりも感受性となる)を引き起こし、またその逆も成り立つというトレードオフの関係を持つ薬剤が見出された。例えば、アミノグリコシド系抗

生物質の耐性株は、クロラムフェニコールなどの抗生物質に対して超感受性となり、またその逆も成り立つことが示された。さらに、こうしたトレードオフの関係にある2種類の抗生物質を同時に添加することによって、耐性株の出現を抑制出来ることが確認された。

現在、様々な抗生物質に対する耐性株について、ゲノム配列と遺伝子発現プロファイルの変化、そして様々な抗生物質に対する耐性・感受性について定量したデータを取得しており、それらの間の相関を解析することが可能となっている。そうした相関解析の一つとして、発現プロファイルから耐性・感受性を予測する数理モデルの構築を行った。この手法では、数種類の遺伝子発現量の対数値を用いた重回帰解析によって、様々な薬剤への耐性・感受性を予測することに成功した。図3にその予測の一例を示すが、8種類の遺伝子発現量によって高い精度で薬剤への耐性・感受性を予測することが可能となっている。また、こうした解析に基づき、薬剤耐性に寄与する遺伝子発現変化を抽出することに成功した。

さらに、遺伝子発現量の変化などの表現型の変化と、ゲノムに固定された変異の対応を解析したところ、βラクタム系など一部の薬剤については、変異と表現型変化の相関が見出せないことが明らかとなった。実際に、β

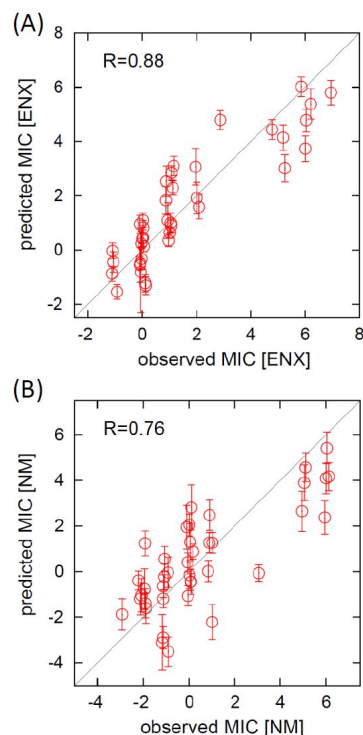


図3: 遺伝子発現量による薬剤耐性能の予測の一例。遺伝子発現量の線形和によって、最小阻害濃度(MIC)を指標とする薬剤耐性能を重回帰によって予測することが可能となる。(A)、(B)はそれぞれ、EnoxacinとNeomycinに対する10を底とする対数MICについて、実測値と予測値を示している。重回帰による予測は、*acrB*, *cyoC*, *mipA*, *ompF*, *pntB*, *pps*, *tsx*, *yfhL*の8遺伝子の発現量によって行われ、cross validation法によってoverfitを回避している。



ラクタム系の抗生物質を用いて短期間（例えば 200 時間）の進化実験を行ったところ、変異は一つもゲノムに固定されていないにもかかわらず、抗生物質耐性を安定に保持する株の取得に成功し、ゲノム変異に依らない適応的な表現型の変化が、抗生物質耐性株において見出されることを確認した。こうした知見は、問題となっている多剤耐性菌の出現メカニズムに新たな視点をもたらすと期待され、その分子メカニズムの同定を行う予定である。

進化実験の生物工学的応用に向けた *in silico* 解析

進化実験を用いて物質生産などに資する有用微生物を創成するためには、どのような遺伝子操作を前もって菌株に施しておくかを定める必要がある。これまでは、研究者の経験によってそうした遺伝子操作を決めていたが、ゲノム情報から代謝ネットワークの再構成が可能となった現在、より合理的な *in silico* スクリーニングへの期待が高まっている。そこで本研究では、フラックスバランス解析（FBA）に基づいて、どのような遺伝子破壊の組み合わせが目的物質の生産性向上をもたらすか、複数種類の破壊の組み合わせまで *in silico* でスクリーニングすることが可能な新たなアルゴリズムの構築を行った（文献 3）。また、そうしたスクリーニングに基づき遺伝子操作を加えた大腸菌株を構築し、3-ヒドロキシプロピオン酸の高生産株を取得することに成功した（文献 1）。

さらに、こうした進化ダイナミクスの基礎研究として、細胞モデルを用いた進化シミュレーションを行い、エピジェネティクスの効果などが進化ダイナミクスにどのように寄与するかを解析した（文献 4、6）。こうした理論研究は、適応進化ダイナミクスを進化実験によって理解するための基盤となる。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 7 件）

Kento Tokuyama, Satoshi Ohno, Katsunori Yoshikawa, Takashi Hirasawa, Shotaro Tanaka, Chikara Furusawa and Hiroshi Shimizu. (2014) Increased 3-hydroxypropionic acid production from glycerol, by modification of central metabolism in *Escherichia coli*, *Microbial Cell Factories*, 13:64, 査読有  
DOI: 10.1186/1475-2859-13-64  
Takaaki Horinouchi, Teruaki Minamoto, Shingo Suzuki, Hiroshi Shimizu, and Chikara Furusawa (2014) Development of an automated culture system for laboratory evolution, *Journal of Laboratory Automation*, 査読有

DOI: 10.1177/221106821542141  
Satoshi Ohno, Chikara Furusawa and Hiroshi Shimizu. (2014) FastPros: screening of reaction knockout strategies for metabolic engineering., *Bioinformatics*, 30(7): 981-7, 査読有  
DOI: 10.1093/bioinformatics/btt672  
Chikara Furusawa, Kunihiro Kaneko. (2013) Epigenetic feedback regulation accelerates adaptation and evolution, *PLoS One*, 8(5): e61251, 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0061251  
Satoshi Ohno, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu (2012) *In silico* screening of triple reaction knockout *Escherichia coli* strains for overproduction of useful metabolites, *J Biosci. Bioeng.*, 115(2):221 査読有  
doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.09.004  
Chikara Furusawa, Kunihiro Kaneko. (2012) Adaptation to optimal cell growth through self-organized criticality, *Physical Review Letters*, 査読有, 108(20):208103,  
Sunisa Chaturachai, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu (2012) An *in silico* platform for the design of heterologous pathways in nonnative metabolite production, *BMC Bioinformatics*, 13(1):93 査読有  
DOI:10.1186/1471-2105-13-93

〔学会発表〕（計 17 件）

古澤力, 実験室進化を用いた大腸菌の適応進化ダイナミクスの解析, E-Cell Workshop 2014 Spring, 2014.3.10, 神奈川  
堀之内貴明, 源晃明, 鈴木真吾, 清水浩, 古澤力, 全自動実験室進化システムの構築と大腸菌の多系列・多種ストレス環境下での実験室進化, 生命情報科学若手の会第 5 回研究会, 2014.2.17-19, 千葉  
鈴木真吾, 堀之内貴明, 古澤力, Bacterial evolution of cross-resistance and hypersensitivity to other classes of antibiotics, 第 87 回日本細菌学会総会, 2014.3.26-28, 東京  
古澤力, 大腸菌の実験室進化系を用いた適応進化ダイナミクスの解析, Interdisciplinary Symposium on Advanced Biology and Biotechnology 2013, 2013.12.13, 筑波  
堀之内貴明, 源晃明, 鈴木真吾, 清水浩, 古澤力, 全自動実験室進化システムによる大腸菌の多系列・多種ストレス環境の実験室進化, 第 36 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2013), 2013.12.3, 神戸  
堀之内貴明, 源晃明, 鈴木真吾, 清水浩, 古澤力, ラボオートメーションによる全自動多系列実験室進化システムの構築, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013.9.20, 広島  
古澤力, 大腸菌人工進化実験の表現型/遺伝子型解析 ~ 複数の時間スケールが絡

み合うダイナミクスの理解を目指して～、  
細胞システムの動態と論理 V,2013.3.21,  
和光

鈴木真吾, 堀之内貴明, 古澤力, 薬剤耐  
性大腸菌の実験進化的創出とゲノムク  
ス解析, 第7回日本ゲノム微生物学会年  
会,2013.3.8-10, 滋賀

古澤力, 生命システムの可塑性と安定性  
の理解へ向けて, 第1回  
NINS Colloquium「自然科学の将来  
像」,2013.2.5,箱根

堀之内貴明, 鈴木真吾, 小野直亮, 玉岡  
邦康, 平沢敬, 四方哲也, 清水浩, 古澤力,  
進化実験から得られたエタノール耐性大  
腸菌のマルチオミックス解析, 第64回日  
本生物工学会大会,2012.10.25,神戸

古澤力, 変動する環境下での人工進化実  
験による進化過程の解析, 「複合適応形  
質進化の遺伝子基盤解明」平成24年度公  
開シンポジウム,2012.9.26,東京

古澤力, 大腸菌人工進化実験の表現型/遺  
伝子型解析～複数の時間スケールが絡  
み合うダイナミクスの理解を目指して～,  
広島大学数理分子生命理学専攻第4回公  
開シンポジウム,2012.9.6-7,広島

鈴木真吾, 堀之内貴明, 古澤力, Analysis  
of evolutionary dynamics using experimental  
evolution of *Escherichia coli*, 第85回日本  
細菌学会総会,2012.3.29,長崎

堀之内貴明, 鈴木真吾, 小野直亮, 玉岡  
邦康, 平沢敬, 古澤力, 四方哲也, 清水浩,  
Multi-omics analysis of evolved *Escherichia*  
*coli* strains under ethanol stress revealed  
slow adaptation dynamics

実験室進化実験によって得られたエタノ  
ール耐性大腸菌のマルチオミックス解析  
が示す長い時間スケールを持つ適応現象,  
日本生物物理学会第49回年会,2011.9.18,  
兵庫

堀之内貴明, 玉岡邦康, 古澤力, 小野直  
亮, 鈴木真吾, 平沢敬, 四方哲也, 清水  
浩, エタノールストレス環境下の進化実  
験により得られた大腸菌のゲノムワイド  
な変異解析と遺伝子発現解析, 化学工学  
学会第43回秋季大会,2011.9.15,名古屋

古澤力, 堀之内貴明, 鈴木真吾, 小野直  
亮, 平沢敬, 四方哲也, 清水浩, 進化実験  
によって得られたエタノール耐性大腸菌  
株の網羅的表現型・遺伝子型解析, 日本  
進化学会第13回大会,2011.7.31,京都

Takaaki Horinouchi, Shingo Suzuki, Naoaki  
Ono, Kuniyasu Tamaoka, Takashi Hirasawa,  
Tetsuya Yomo, Hiroshi Shimizu, Chikara  
Furusawa, Comprehensive analysis of  
evolution dynamics in *Escherichia coli* from  
parallel experimental evolutions under  
ethanol stress condition, International  
Symposium on SYNTHESIZING LIFE  
AND BIOLOGICAL SYSTEMS,  
2011.10.25, Osaka, Japan

Chikara Furusawa, Takaaki Horinouchi,  
Shingo Suzuki, Naoaki Ono, Kuniyasu  
Tamaoka, Takashi Hirasawa, Tetsuya Yomo,  
and Hiroshi Shimizu, Genome-Wide  
resequencing and expression analyses of  
evolved *Escherichia coli* strains under  
ethanol stress, Society for Molecular  
Biology and  
Evolution(SMBE2011),2011.7.28, Kyoto,  
Japan

〔その他〕

受賞(計1件)

大野聡, 古澤力, 清水浩, 第22回生物工  
学論文賞授賞, 2014年9月(受賞内定)

6. 研究組織

(1)研究代表者

古澤力(FURUSAWA CHIKARA)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研  
究センター・チームリーダー

研究者番号: 00372631