

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K14763

研究課題名（和文）被食-捕食-超捕食系における進化的軍拡競争の微生物実験進化系による解析

研究課題名（英文）Analysis of the evolutionary arms race in predator-prey-suprapredator systems using experimental microbial evolutionary systems

研究代表者

山本 京祐 (YAMAMOTO, Kyosuke)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：70636472

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では被食者（大腸菌もしくは*Pseudomonas fluorescens*）、捕食者（*Bdellovibrio bacteriovorus*）、超捕食者（*B. bacteriovorus*感染性ウイルス）の3種を用いた二者および三者混合連続培養による進化実験系を材料として、被食-捕食関係が連鎖したときに生ずる生態・進化現象を実験的に解析した。各種進化株・集団の生理学的・遺伝学的解析結果から、捕食者の多様化と被食者の対抗進化、さらには超捕食者による捕食者の進化制約といった様々な進化現象を実験室環境において見出すことができた他、集団ゲノム解析によってこれらの現象の分子基盤の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「食う 食われる」の関係は自然界で非常に一般的な生物学的相互作用であり生物の個体数変動だけでなく迅速な進化を駆動する原動力となるが、そこに「食うものをさらに食うもの（超捕食者）」が存在すると、「食う 食われる」関係がもたらす生態・進化現象が変化することを実験的に明らかにした。この結果は、自然界の複雑な食物連鎖のシステムにおいて生態・進化現象を解析・解明するには、1対1の関係性を評価するだけでは不十分なケースがあることを明確に示しており、生態学の基礎的知見としてのみならず生態系保全の観点からも重要な基盤的知見である。

研究成果の概要（英文）：In this study, the experimental evolutionary system was constructed by using prey (*Escherichia coli* or *Pseudomonas fluorescens*), predator (*Bdellovibrio bacteriovorus*) and super-predator (*B. bacteriovorus* infectious virus) in two- and three-species mixed continuous culture, and the ecological and evolutionary phenomena that occur when multiple predator-prey relationships are linked were experimentally analysed. The results of physiological and genetic analyses of various evolutionary strains and populations revealed various evolutionary phenomena in the laboratory environment, such as predator diversification and prey counter-evolution, as well as evolutionary constraints on predators by super-predators, and revealed part of the molecular basis of these phenomena through population genome analysis.

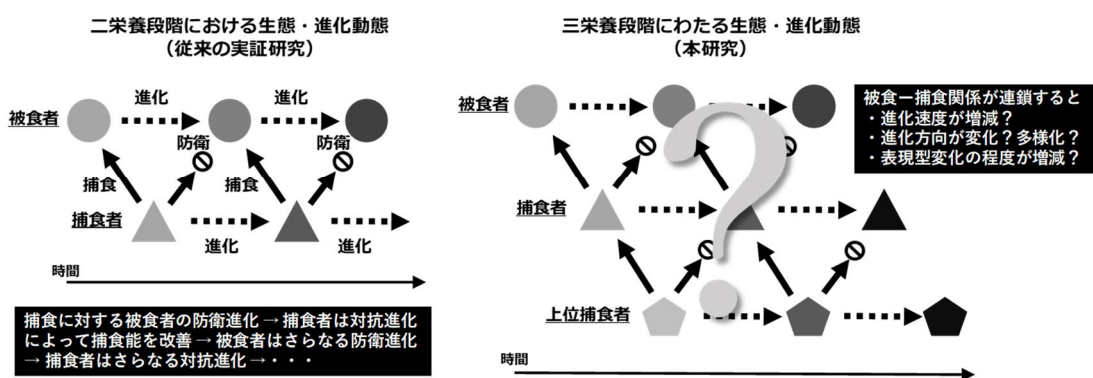
研究分野：微生物生態学

キーワード：生態 進化フィードバック 間接効果 進化的軍拡競争 進化動態 種間相互作用

1. 研究開始当初の背景

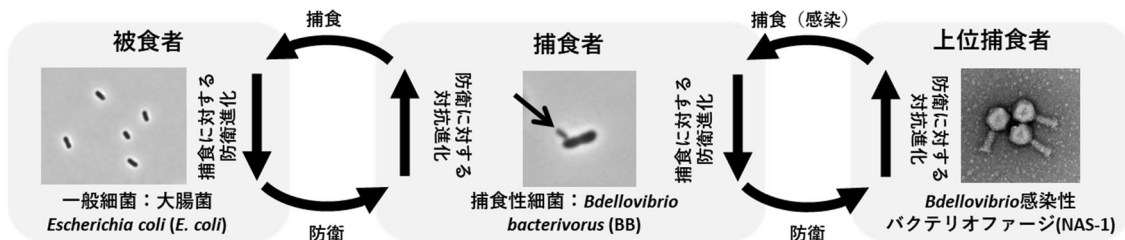
被食 - 捕食関係においては捕食に対する被食者の防衛進化とそれに対する捕食者のさらなる対抗進化が繰り返されることが広く知られており、こうした共進化過程は「進化的軍拡競争」と呼ばれ種多様性の創出・維持といった重要な生態現象に関わることが理論的・実験的に示されている (Thompson JN, 2005, Univ. of Chicago press 他)。しかし、従来の研究は二者間の関係性に注目した解析がほとんどであり、多くの実環境のような捕食者のさらに上位の捕食者が存在する三段階以上の被食 - 捕食関係の中で進化的軍拡競争がどのように進行し、群集の生態学的特性にどのように寄与するかについての知見は極めて乏しい。三者以上の関係性においては直接的な二者間の相互作用だけでなく間接的な相互作用 (間接効果) も生じることから、連鎖する複雑な被食 - 捕食系の進化動態は二者関係における進化動態の単純な足し合わせだけでは説明できないことが予想される。したがって、三段階以上の連鎖する被食 - 捕食関係において、二者間の相互作用とそれにより駆動される進化動態が第三者によってどのように変化するか (進化速度、方向性、表現型変化の強度など) そしてその結果群集全体の挙動にどのような影響を与えるのか、といった点を明らかにすることが必要である。

被食 - 捕食関係をめぐる進化的軍拡競争



2. 研究の目的

本研究では、微生物の有する速い進化速度や大きな個体群サイズを最大限活用したモデル進化実験系を用いることで、被食 - 捕食 - 超捕食系に特徴的な群集動態と進化動態を明らかにするとともに、それらのダイナミクスを生み出す種間の直接・間接的相互作用を解明することを目的とする。具体的には、被食者 (大腸菌) と捕食者 (*Bdellovibrio* 属捕食性細菌)、超捕食者 (*Bdellovibrio* 感染性ウイルス) からなる三者系と、被食者 - 捕食者からなる二者系を構築し、各実験系における全メンバーの個体群動態および表現型変化 (捕食に対する被食者の防衛能とそれを乗り越える捕食者の捕食能) とその遺伝学的背景 (遺伝的変異) を各系間で比較解析することで、種間相互作用と進化現象との関係性 (生態 - 進化フィードバック)、具体的には二者間の進化的軍拡競争が第三者の存在によってどのように変化するか、そして同時に群集全体の動態および進化動態がどのように変化するかを明らかにする。



3. 研究の方法

本研究では、主に 進化実験系の構築 (二者系および三者系)、群集動態の解析、進化株の表現型変化解析、表現型変化の遺伝学的基盤解明 (進化株のゲノム解析) を実施し、三者系に特徴的な進化動態 (各メンバーの進化速度、方向性、表現型変化の強度など) を明らかにするとともに、そうした進化動態および群集動態を司る重要な形質 (相互作用) の特定とその遺伝学的基盤を明らかにすることで、これらのダイナミクスをもたらすメカニズムの解明を目指す。

まず被食者 (大腸菌あるいは *Pseudomonas fluorescens*)、捕食者 (*B. bacteriovorus* [BB])、超捕食者 (*B. bacteriovorus* 感染性ウイルス) の3種を用い、二者および三者混合培養系を確立する。一定速度で系への新鮮培地の流入と系からの培養液の流出をおこなう連続培養系を用

い、各種培養条件(培地組成、滞留時間等)を検討しつつ混合培養実験をおこなう。実験期間中、構成種の個体数を経時的に測定し、安定的にメンバーが共存する(絶滅しない)条件を見出す。そして確立した二者および三者進化実験系において、構成種の個体数データから個体群サイズや個体数変動サイクル等を評価し、各系に特徴的な群集動態を明らかにする。基本的に被食者はコロニー計数法、捕食者ならびに超捕食者はブランク計数法によって個体数を測定する。各培養系から進化株を単離し、祖先株および進化株間の競合・捕食実験等により捕食・感染能とそれらへの防衛能の変化を定量的に解析する。その後、祖先株と進化実験で得られた進化株・集団について全ゲノムリシーケンスをおこない、比較解析によって変異点を特定し、実際の表現型データと照らし合わせることで形質変化の遺伝的基盤に関する情報を得る。その後、進化株の表現型や変異解析結果等のデータに基づき、進化・群集動態を決定づける上で重要な形質の抽出をおこなう。

4. 研究成果

大腸菌、BB、BB 感染性ウイルス NAS-1 の3種を用いた二者および三者混合培養系の確立を目指し、中スケール(20mL、試験管)での培養系を設計して連続培養システムの運転を実施した。その結果、培養期間中各生物種の個体数が変動しつつも共存する進化実験系を構築することができた(図1)。

培養期間終了時の培養系から捕食者および被食者の進化株をそれぞれ単離し、祖先株および単離株間の競合・捕食実験(タイムシフト実験)等によって捕食能とそれに対する防衛能(被食性)の変化を定量的に解析した(図2)。解析には被食者の個体数(濁度)減少速度を指標として導入し、性状変化を評価した。捕食者進化株の捕食性能を詳細に評価したところ、二者系で得られた進化株では最大でおよそ28%程度の捕食効率の増加が見られ、BBの祖先型大腸菌に対する適応的な捕食性能向上を確認した。本捕食者進化株は共進化した大腸菌進化株に対しても同様の捕食効率を示したことから、捕食性能向上に対する大腸菌の適応進化(対抗進化)はみられなかった。その一方で、捕食性能が向上した捕食者進化株であっても、共進化した大腸菌進化株に対しては捕食効率が増加しないケースもみられ、共進化過程において被食者側の対抗進化も進行しうることが示された。一般的に微生物捕食に対する捕食耐性は進化しづらいとされているが、本結果は捕食耐性進化の可能性の一例を示しているといえる。全体として、捕食能変化および捕食耐性変化の傾向は株間で様々であり、被食者と捕食者がそれぞれ多様化していることが示唆された。一方、三者系進化株においては一部の例外を除き一貫して捕食能が低下する傾向(最大でおよそ18%程度の捕食効率の低下)と捕食耐性が上昇する傾向がみられた。このことは三者系特有の進化軌道すなわち超捕食者からの選択圧に対する適応と捕食性能との間にトレードオフが存在し、超捕食者の存在が捕食者の進化を制約することを強く示唆しており、その結果として間接的に被食者の捕食耐性変化にも寄与していることが示唆された。

図1. 各培養系の群集動態

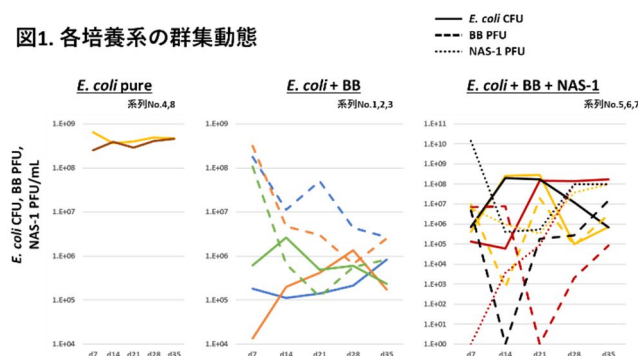
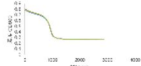


図2. 進化株の捕食性能、被食性

進化実験系から再分離したBB、E. coli (=進化株)を用いて混合培養
 捕食能・被食性(捕食抵抗性)の変化を、E. coli祖先株 × BB祖先株の濁度減少速度を1とした相対値で評価

相対的大腸菌減少速度	BB	
	祖先株	進化株
E. coli 祖先株	1	↓ or ↑
E. coli 進化株	↓ or ↑	↓ or ↑

1 > : 捕食速度上昇
 1 < : 捕食速度減少



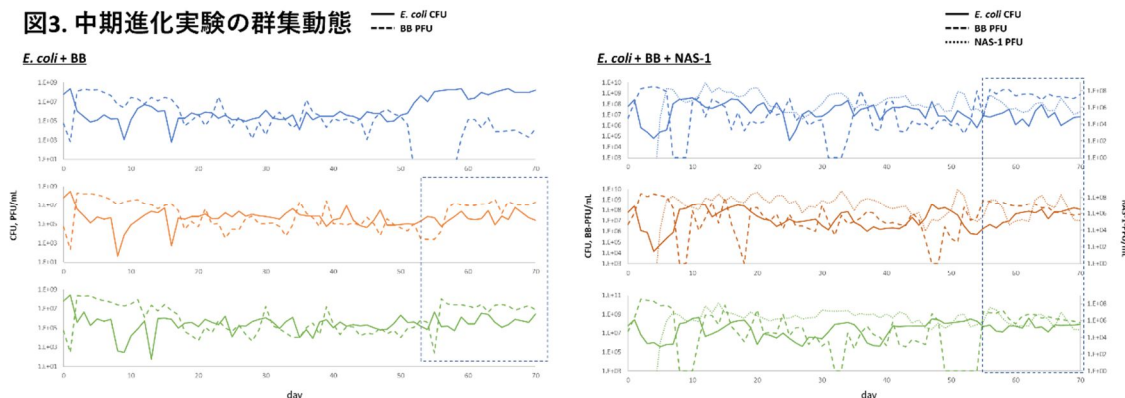
E. coli		BB				
		Anc	Evo1	Evo2		Evo3
二者系	No.1 Anc	1.00	1.04	1.00	1.18	← BB捕食能は上昇傾向、E. coliは対抗進化? ← BB捕食能が低下するケース ← BB捕食能が大きく増加するケース
	Evo	1.05	0.98	0.99	0.98	
No.2	Anc	1.00	1.03	0.86	1.05	← BB捕食能が低下するケース ← BB捕食能が大きく増加するケース
	Evo	0.97	1.02	1.03	1.00	
No.3	Anc	1.00	1.05	1.28	1.03	← BB捕食能が大きく増加するケース
	Evo	1.02	0.99	1.28	1.03	
三者系	No.5 Anc	1.00	0.83	0.98	0.99	← BB捕食能が低下する傾向
	Evo	1.07	0.82	1.07	1.06	
No.6	Anc	1.00	0.92	0.89	0.94	← 共通してBB捕食能が低下する傾向
	Evo	1.03	0.94	0.98	0.93	
No.7	Anc	1.00	0.91	0.88	0.94	← 共通してBB捕食能が低下する傾向
	Evo	1.06	0.90	1.00	0.98	
E. coli純培養(コントロール)	No.4 Evo	1.03				← 共通してBB捕食能が低下する傾向
	No.8 Evo	1.07				

上位捕食者の存在が捕食者の進化を制約する

観察された進化株の表現型変化に寄与すると考えられる遺伝的変異を同定するため、各培養系の培養終了時の集団ゲノム解析を実施した。進化集団ゲノムに蓄積した変異箇所を解析した結果、二者および三者系の被食者ゲノムには細胞壁や表面構造の生合成に関与する遺伝子(例: UDP-N-acetyl-D-mannosamine dehydrogenase 遺伝子)に変異を検出した。一方で、捕食者ゲノムに関しては二者および三者系共通で運動性関連遺伝子(例: 鞭毛モータータンパク遺伝子)に変異を検出した一方で、三者系でのみ細胞外膜成分の生合成に関与する遺伝子(例: 推定O抗原関連タンパク遺伝子)に変異を検出した。これらのことから、本実験系の適応過程において細胞間や細胞 ウィルス粒子間の直接的相互作用が選択圧として重要であることが強く示唆された。

より長期の培養期間における群集動態を詳細に評価するため、再度混合連続培養を実施し、構成種の個体群サイズを経時的に測定することで群集動態を解析した(中期進化実験系)。その結果、10週間に亘る培養期間の初期、中期、後期でそれぞれ異なった個体数変動パターン(周期・振幅)を示し、実験期間中の進化が群集動態に大きな影響を及ぼすことが示された。さらに、三者系においては二者系とは異なる個体数変動パターンの推移がみられたことから、生態プロセスの変化が進化プロセスに影響を与えていることが示唆された(図3)。

図3. 中期進化実験の群集動態



上記短期(5週間)中期(10週間)進化実験に加えて、被食者として *Pseudomonas fluorescens* を用いた二者および三者系を構築し、長期(10ヶ月)にわたる進化実験を実施した。複数の進化捕食者および進化被食者について捕食能または捕食耐性能をプラーク形成試験によって定性的に評価したところ、捕食がみられない被食者株 捕食者株の組み合わせが見出され、捕食能あるいは捕食耐性能が劇的に変化した進化株が生じている可能性が示唆された他、同一系内に異なる捕食性能を有する複数の進化株が共存している可能性も示唆された。

本研究では捕食性細菌および捕食性細菌に対する捕食者を利用した他に類をみないマイクロコズム実験を実施することで、捕食者の進化と被食者の対抗進化、さらには超捕食者による捕食者の進化制約といった様々な進化現象を実験室環境において見出すことができた。また、観察された表現型変化に資すると考えられるゲノム変化についても集団ゲノム解析によって捉えることに成功しており、進化現象の分子基盤を明らかにしつつある。詳細な進化動態や分子基盤については今後さらに解析を進めていく必要があるが、これまでの本研究の成果は連鎖する被食 捕食系における生態・進化動態に関する実験的解析例として進化・生態学的に重要な基盤的知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本京祐、玉木秀幸
2. 発表標題 微生物栄養カスケードにおける共進化動態の実験的解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本京祐、玉木秀幸
2. 発表標題 マイクロコズムを用いた多段階捕食-被食系における共進化動態の実験的解析
3. 学会等名 日本生態学会第69回全国大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------