

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16114

研究課題名(和文)細菌進化の最適変異率の理論予測と実験検証

研究課題名(英文) Prediction and experimental verification of optimal mutation rate in bacterial evolution

研究代表者

芝井 厚 (Shibai, Atsushi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：40823620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細菌の突然変異率と進化能とのトレードオフ関係を実証・理解することを試みた。様々な変異率の大腸菌を増殖阻害剤添加環境で適応進化させ、その動態を観察することで進化能の違いを定量した。進化実験の材料として、大腸菌のDNA修復遺伝子を破壊させて様々な変異率を持つ大腸菌株を準備した。その結果、野生型に比べて数十～数百倍の変異率を持つ菌株の獲得に成功した。そしてこれらの菌株の増殖速度を測定し、高変異率化がもたらす増殖阻害効果を明らかにした。また全自動実験進化システムを駆使して多種の増殖阻害剤を用いた実験進化を行った。そして、変異率に対する進化能のピークを実験的に観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌にとって変異率が高いほど薬剤へ適応するための有益変異は多く生ずるはずであるが、同時に有害な作用を持つ変異による増殖阻害の効果もあるため、これらの間のトレードオフ関係が予想される。本研究では実験と並行してこのトレードオフの関係に基づくトイモデルを提唱した。そして、いろいろな作用機序からなる抗生物質での実験進化の結果と組み合わせ、殺菌剤よりも静菌剤のほうがよりよくフィットすることを明らかにした。これにより、当該のモデルの蓋然性や適用条件についても担保することができた。本研究の成果は適応進化の理解のみならず、人工進化の高速化や病原性細菌の薬剤耐性進化の抑制などを可能にするポテンシャルを有する。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to demonstrate and understand the trade-off between bacterial mutation rates and evolutionary speed. The evolutionary speeds were quantified by the experimental evolution of *E. coli* with various mutation rates in the environments treated with growth inhibitors. As a material for the evolution experiment, *E. coli* strains with various mutation rates were prepared by deleting the DNA repair genes of *E. coli*. As a result, we obtained strains with mutation rates much higher than that of the wild type. The growth rates of these strains were then measured to reveal the growth-inhibitory effects of higher mutation rates. And the experiment evolution using various growth inhibitors was carried out by an automated experimental evolution system. We then succeeded in experimentally observing the peak of evolutionary speed versus mutation rate.

研究分野：細菌の実験室内進化

キーワード：実験進化 大腸菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 生物システムにおいて、環境の変化に応じて適応的に進化するのは最も基本的な能力の一つである。ここで、遺伝的進化の駆動力は突然変異であり、申請者は大腸菌の変異率を操作した条件下での人工進化と、次世代シーケンサによる進化株ゲノムの網羅的解析に関する研究を行っている。その結果、高変異率はより多くの有益変異をもたらす一方で細胞の増殖能力を阻害するという、細菌の適応的振る舞いにおけるトレードオフ効果を持つことを見いだした[1,2]。この関係に着目して細菌の進化に最適な変異率、および変異率と進化能の関係を説明するモデルを得ることができれば、生命システムの適応進化の理解のみならず、人工進化の高速化や病原性細菌の薬剤耐性進化の抑制などを合理的に計画することを可能にするポテンシャルを有すると考えた。

(2) 様々な変異率の大腸菌による実験室内進化を観察すれば、その条件における最適な変異率を知ることができる。例えば、段階的なストレス薬剤濃度への適応進化を観察することで、ある高変異率株がその野生株より速く進化する様を見るのが可能である。すでに変異率が小、中、大、特大の4つの群を用いた先行研究から、変異率が特大より大のほうが細胞にとって有益であるという結果が見いだされつつあった[3]。本研究により多数の変異率条件でこの実験を行うことで、変異率と進化速度との関係を定量できると考えた。並行して高変異率化の増殖阻害効果を定量でき、そこから演繹的に最適変異率を予測する数理モデルと結果を比較することも可能だと考えた。そこで本研究では、様々な環境において多様な変異率の大腸菌で実験進化を行い、進化能が最大となる変異率を明らかにしようとした。さらに、高変異率化による有益変異増加と細胞増殖負荷のトレードオフモデルを用いて、実験検証と数理モデルの比較から変異率と進化能の関係の理解を目指すことを目指した。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、DNA修復系欠損を用いて大腸菌の変異率を操作し、それを用いたストレス耐性進化実験により変異率と進化能の関係を明らかにすることを試みた。そして数理モデルによる予測と比較し、考察することとした。これにより、ストレス環境下での大腸菌の最適変異率を明らかにし、変異率と進化能の関係を規定する機構を理解することを目的とした。

(2) 本研究では、変異率と進化速度の関係を決定するメカニズムを実験により解明することを目指した。このことは、これまで自然界の観察による博物学的な手法で理解が試みられてきた変異率と進化の関係について、実験室内の統制条件での検証により直接的かつ明瞭な理解をもたらさう。また、進化速度の予測と制御を可能にし、生物工学における人工進化の高速化や、医療における抗生物質耐性菌の出現の抑制など、医・工学分野における細菌進化の制御に広く貢献しうると考えた。

### 3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサを用いた多様な高変異率条件の定量解析

DNA修復系欠損技術により、大腸菌の多様な変異率条件の準備を試みた。変異率は野生型を基準としてその1000倍程度の範囲で満遍なく分布するように設計した。これらの大腸菌サンプルを100日ほど培養後にIllumina社の次世代シーケンサMiSeqを用いてそのゲノムDNA上に蓄積した点変異を検出し、各条件の変異率の上昇度合いを確かめることとした。DNA修復系欠損株は30株程度を作成し、変異率の重複具合を考慮して使用する株を選別するものとした。

(2) 高変異率での大腸菌のストレス耐性進化実験

細胞増殖を阻害するストレス薬剤に対する耐性進化実験を、上記の高変異率条件で実施することを計画した。薬剤濃度に勾配を持たせたマイクロウェルプレートに菌体を植菌し、一定時間後に増殖が見られたうち最も薬剤濃度が高かったウェルから次のプレートに植え継ぐ。これを繰り返すと、大腸菌の薬剤耐性が向上する様子を観察できると考えた。薬剤はそれぞれ作用機序の異なる5種を用い、結果の一般性を確保する。予備的な結果より、DNA修復系欠損を用いた実験において進化速度を定量し、変異率と進化速度との関係をプロットすることに成功していた。

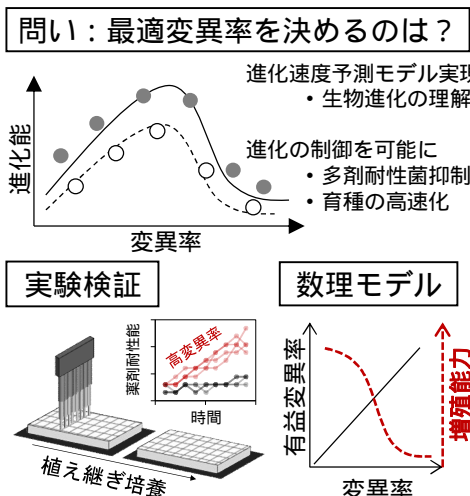


図1: 変異率と進化能の関係を解明。

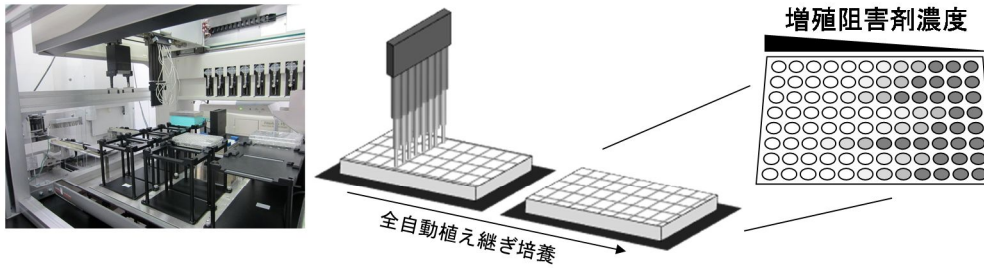


図2: 自動植え継ぎ装置の外観と、薬剤耐性進化実験の概要。クリーンブース内に分注機、培養機とプレートリーダーが統合されている。薬剤濃度に勾配を持たせたウェルプレート中の培地に植菌し、一定時間後に増殖が確認できたウェルから次のプレートに植え継ぐ。

### (3) ストレス耐性進化の最適変異率モデルによる検証

本研究では「有益な新規形質をもたらす」「細胞増殖を阻害する」という高変異率化の2つの作用に着目した。これらの相反する作用は変異率の上昇とともにそれぞれ強まり、結果として進化速度のピークを形成する。本研究では、モデルによる最適変異率の予測と、前項の実験結果とを比較することとした。ここで本モデルにおいては、最適変異率は増殖阻害の大きさに決まると示されているので、薬剤ごと、栄養条件ごとに増殖阻害の係数を実験で測定し、そこからそれぞれの最適変異率を予測できるかどうかでモデルを検証することを考えた。その展望として、予測モデルを用いれば任意の進化の加減速のような制御も可能なはずであり、その実証から有用物質生産菌の育種の最適化や抗生物質耐性菌の出現の抑制などの応用につなげることが可能と期待する。

## 4. 研究成果

(1) 大腸菌のDNA修復遺伝子を破壊させて様々な変異率を持つ大腸菌株を準備した。まずDNA修復系を構成している遺伝子 (*mutH*, *mutL*, *mutS*, *dnaQ*, *mutT*) の単独欠損及び二重欠損株を作成した。寒天培地上でコロニーを植え継ぐ変異蓄積実験を行い、その後、Illumina MiSeqを用いた全ゲノムリシーケンスにより蓄積した変異を検出し、世代あたりの変異率を算出した。結果、野生型 (WT) に比べて数十~数百倍の変異率になっていることを確認した (図 3a)。

(2) 高変異率化したこれらの菌株の増殖速度を測定し、高変異率化がもたらす増殖阻害効果を明らかにした (図 3b)。また得られた実験結果をモデルに回帰して増殖阻害係数を求めた。静菌剤であるクロラムフェニコールやトリメトプリムは濃度依存的に大腸菌の増殖速度を下げることで、一方で殺菌剤であるアミカシン、セフィキシム、シプロフロキサシンは濃度依存的に大腸菌集団の増殖可能な割合を下げることを確認した。

(3) 全自動実験進化システムを駆使して5種の増殖阻害剤を用いた試験的な実験進化を行った。それにより、従来定量的には観察されていなかった変異率に対する進化能のピークを実験的に観察することに成功した (図 3c)。そして、5種の薬剤間で変異率と進化速度との関係は異なっ

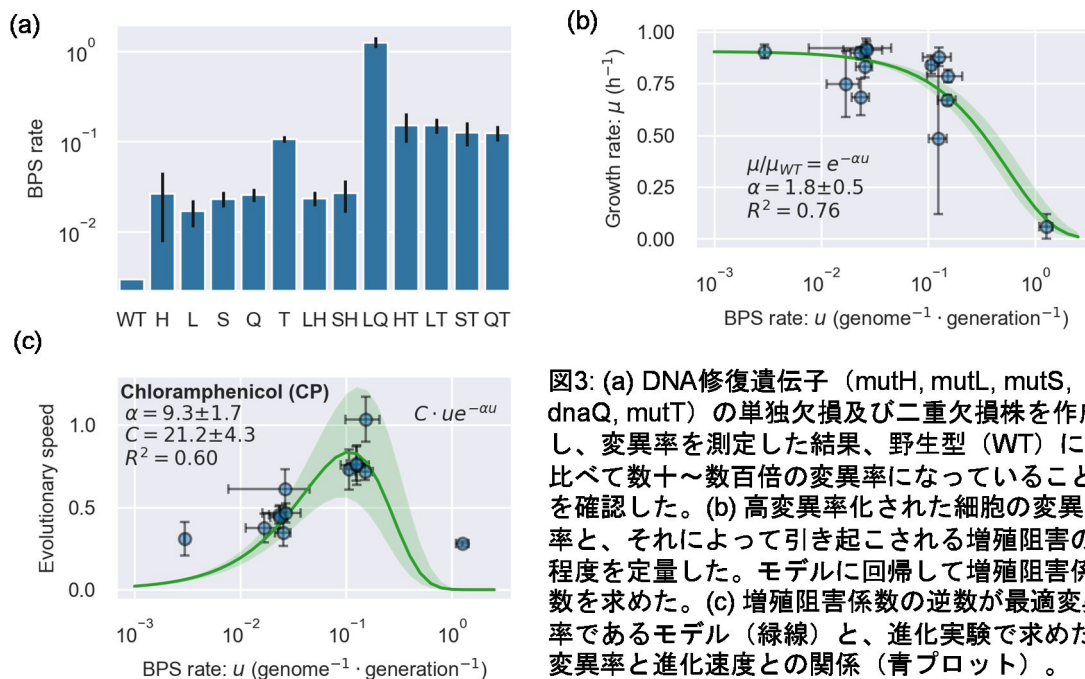


図3: (a) DNA修復遺伝子 (*mutH*, *mutL*, *mutS*, *dnaQ*, *mutT*) の単独欠損及び二重欠損株を作成し、変異率を測定した結果、野生型 (WT) に比べて数十~数百倍の変異率になっていることを確認した。(b) 高変異率化された細胞の変異率と、それによって引き起こされる増殖阻害の程度を定量化した。モデルに回帰して増殖阻害係数を求めた。(c) 増殖阻害係数の逆数が最適変異率であるモデル (緑線) と、進化実験で求めた変異率と進化速度との関係 (青プロット)。

た。高変異率化による増殖阻害で最適変異率を説明するモデルでは静菌剤のほうがよりよくフ

ィットすることを明らかにした。このことは、細菌の最適変異率が存在し、また条件によりそれが異なる、あるいは操作可能であることを示し、従来観察されていなかった新しい知見である。

<引用文献>

- [1] Shibai, et al., “Mutation accumulation under UV radiation in *Escherichia coli*”, *Scientific Reports*, 7; 14531, 2017.
- [2] Tsuru, et al., “Genomic confirmation of nutrient-dependent mutability of mutators in *Escherichia coli*”, *Genes to Cells*, 20(12) 972-981, 2015.
- [3] Sprouffske et al. “High mutation rates limit evolutionary adaptation in *Escherichia coli*”, *PLoS Genetics*, 14(4), 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 芝井厚, 古澤力
2. 発表標題 適応度地形の動的変化を通じた細菌進化のフィードバック制御の試み
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi SHIBAI, Chikara Furusawa
2. 発表標題 Feedback control of evolutionary trajectory of bacterial cells on fitness landscape
3. 学会等名 ICSB2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芝井厚, 古澤力
2. 発表標題 ストレス条件と耐性獲得との関係に基づく細菌進化のフィードバック制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芝井厚, 古澤力
2. 発表標題 自動培養系を用いた細菌実験進化のフィードバック制御の試み
3. 学会等名 第11回生命情報科学若手の会・研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芝井厚, 古澤力, 津留三良
2. 発表標題 大腸菌の種内進化において高発現遺伝子への純化選択は緩和されている
3. 学会等名 第12回生命情報科学若手の会・研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芝井厚, 古澤力, 津留三良
2. 発表標題 高変異率の大腸菌長期実験進化から遺伝子進化速度の一般法則を探る
3. 学会等名 日本進化学会第22回大会
4. 発表年 2020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
---------	---------