

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640135

研究課題名(和文)大腸菌の進化実験を用いた生体リズム現象の創出

研究課題名(英文)Analysis of biological rhythm by using laboratory evolution

研究代表者

古澤 力(Chikara, Furusawa)

国立研究開発法人理化学研究所・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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、周期的に時間変動する環境下で大腸菌の進化実験を行い、どのような表現型と遺伝子型の変化が出現するかを解析することを目的とした。周期的に変動する炭素源や抗生物質添加といった環境下で大腸菌を植え継ぎ培養することにより、変動環境に適応した大腸菌の取得を試みた。結果として、2つの抗生物質の添加を周期的に切り替えた場合に、一方の薬剤には耐性を獲得し、もう一方への耐性獲得は抑制されるという非対称な進化ダイナミクスが見出された。このことは、環境が時間的に変動することにより、進化ダイナミクスの軌跡に複雑なバイアスがかかる場合があることを示している。

研究成果の概要(英文)：In this project, we analyzed evolutionary dynamics of *E. coli* under dynamically changing environment by using laboratory evolution. We cultured *E. coli* cells under periodically changing culture environments (e.g., carbon sources and addition of antibiotics) to obtain adapted cells to such dynamic environments. As results, we found that by adding two antibiotics periodically, resistance acquisition to one drug was significantly suppressed in comparison with stationary drug addition, while resistance acquisition to the other drug was unchanged. The results suggested that evolutionary routes can be biased by changing environment over time.

研究分野：生物物理学

キーワード：変動環境 進化実験 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

生物システムの多くは、昼夜サイクルや季節変動など周期的に変動する環境条件に対して、動的に内部状態を変化させることにより適応をしている。そうした動的な適応は、環境変動を入力とした単なる応答とは限らず、概日リズムや概年リズムのように、自らリズムを作り出すことによって環境変化を予測し適応する「生体リズム現象」が多くの生物種で見出されている。しかしながら、こうした環境と表現型の動的かつ適切な相互作用がどのように出現するか、その過程については理解が進んでいるとは言い難い。動的に変化する環境下において、どのような表現型の時間変化が生じることを定量的に解析することにより、一定の適応度の下でのみ議論されてきた進化研究に新たな視点をもたらすと期待できる。また、近年の進化実験技術の発展は、こうした動的に変動する環境下での進化ダイナミクスの解析を可能としている。こうした背景を踏まえて、本研究では時間的に変動する環境下での進化実験を行い、そこで表現型の変化を解析した。

2. 研究の目的

本研究では、周期的に時間変動する環境下で大腸菌の進化実験を行い、どのような表現型と遺伝子型の変化が出現するかを解析することを目的とした。複数の環境条件と、それぞれ複数の独立進化系列について解析を行い、変動する環境下における進化ダイナミクスが持つ性質を定量する。そうしたデータを統合することにより、生体リズム現象など動的適応のメカニズムを理解する。

3. 研究の方法

本研究では、時間的に変動する環境条件下での進化実験を行うために、研究代表者が開発したラボオートメーションによる全自動の進化実験システムを用いる(Horinouchi et al, 2014; 図1)。このシステムでは、クリーンブース内に設置された自動分注口ポット(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、植え継ぎ培養による進化実験を全自動で行うことが可能である。インキュベータでは 44 枚の 384-ウェルプレート培養することが可能であり、合計で 16,000 ウェル以上の独立培養系列を維持することが出来る。このシステムを用いることにより、様々な異なるストレス環境条件や、時間的に変動する環境条件の下での大腸菌進化実験が可能となっている。

4. 研究成果

進化実験で用いる変動する環境条件として、本研究では異なる炭素源の切り替えと、異なる作用機序を持つ抗生物質の切り替

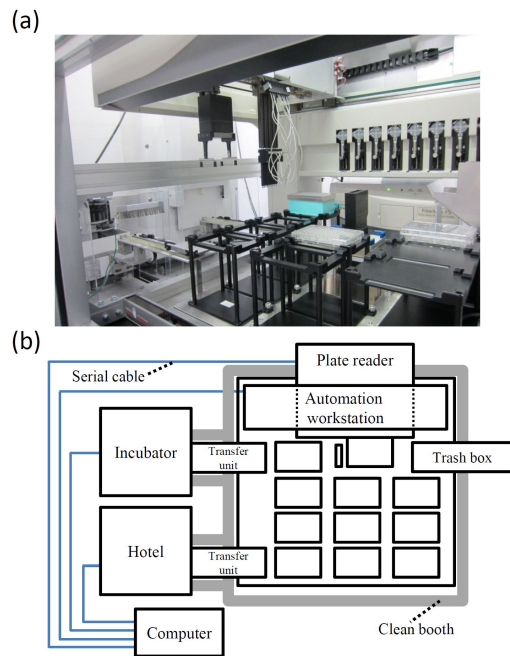


図1: 長期植え継ぎ培養自動化システム。(a) システムの外観。(b) ユニット間接続の概念図

えの2種類を用いた。

異なる炭素源を時間的に切り替える環境下での進化実験では、最初にグルコース炭素源環境と酢酸炭素源環境の切り替えを用いた。炭素源の切り替えでは、代謝状態の大幅な切り替え(解糖経路 糖新生経路)が生じることが期待できる。菌体植え継ぎ時の炭素源持ち込みの影響を下げるために、植え継ぎのタイミングを炭素源の枯渇に近い所で行った。植え継ぎの時間間隔を6時間として、環境切り替えの時間間隔を6~24時間と変化した進化実験を200時間程度行った。当初の期待としては、環境切り替え後しばらくは、炭素源と細胞の内部状態(例えば、糖新生経路が活性化されているなど)のミスマッチにより、一時的に増殖速度が落ちることが期待された。しかしながら、グルコースと酢酸の環境切り替えでは、そのような環境切り替え直後の増殖速度の低下は観察されなかった。環境切り替えを行わない培養(継続的なグルコースあるいは酢酸炭素源での培養)と、環境切り替えを導入した培養において、それぞれの環境での増殖の振る舞いはほぼ同一であり、期待した環境切り替えによるダイナミックな状態変動や、そうした変動の進化過程による最適化といった変化を見出すことが出来なかった。こうした炭素源を切り替える培養を、様々な異なる炭素源(グリセロールや、トリプトファン・フェニルアラニンなどのアミノ酸など)について行ったが、同様に環境切り替えの影響を見出すことが出来ず、環境切り替えに対する適応進化のダイナミクスを解析することは出来なかった。次に、異なる作用機序を持つ2つの抗生物質について、その添加を時間的に切り替

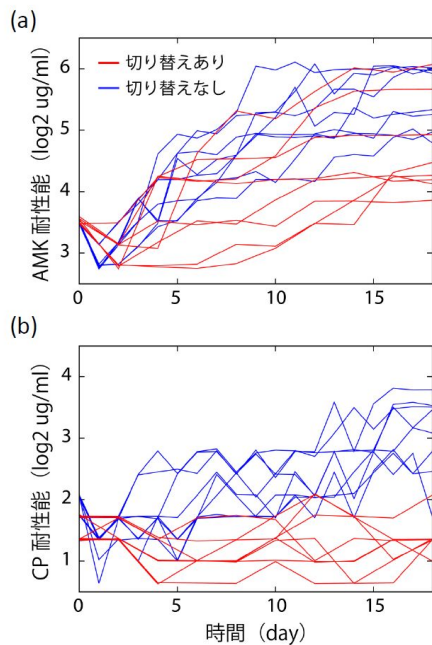


図2: 時間的に変動する環境での進化実験。アミカシン(AMK)とクロラムフェニコール(CP)を1日ごとに切り替えた進化実験を行い、AMKとCPの耐性能(最小阻害濃度)の変化をプロットしている。環境切り替えにより、CP耐性能の上昇が抑制される。

えた進化実験を行った。研究代表者による先行研究として、タンパク質合成阻害剤であるクロラムフェニコール(CP)と、アミノグリコシド系のタンパク質合成阻害剤であるアミカシン(AMK)は、大腸菌における耐性能がトレードオフの関係にあることがわかっている。つまり、大腸菌がCP耐性を獲得するとAMK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ことが示されている(Suzuki et al, Nature Communications 2014)。こうしたトレードオフの関係にある薬剤を時間的に変動した形で添加することにより、内部状態を動的に変化させることによる環境適応が見出されると期待し、前述の全自動進化実験システムによる進化実験を行った。コントロールとして、トレードオフの関係にない別の抗生物質であるセフェキシム(CFIX)を添加した進化実験を併せて行った。図2にその結果の一例を示す。図2(a)は、CPとAMKの添加を24時間ごとに切り替えた環境下での進化実験の結果を、単独添加の進化実験の結果と併せて示している。興味深いことに、環境切り替えによって、AMKへの耐性能の上昇は単独添加の場合とほぼ代わらないが、CPへの耐性能の向上は有意に抑制されることが見出された。一方で図2(b)に示すトレードオフの関係になりAMKとCFIXの組み合わせでは、そのような環境変動による進化ダイナミクスの変化は見出されなかった(論文準備中)。

このように、時間的に変動する環境下での進化実験により、一定環境とは異なる進化ダ

イナミクスを観察することに成功した。興味深いことに、図2(a)に示す耐性能の上昇は、トレードオフの関係にあるAMKとCPにおいて非対称に現れる。この非対称性の起源として、AMK適応状態とCP適応状態の遷移時間の非対称性が考えられる。そうした適応過程のダイナミックな性質が、進化過程に及ぼす影響を今後解析すべきであろう。トランスクリプトーム解析などを用い、どのような適応過程がこの非対称性を担っているかを検討する予定である。本研究では、時間的に変動する環境下での進化実験を用いることにより、環境変動が進化ダイナミクスに与える影響を解析した。当初予定していた、生体リズム現象の解析には至らなかったが、動的環境下での進化ダイナミクスの基盤を構築できたと考えている。

<引用文献>

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1件)

Takaaki Horinouchi, Shingo Suzuki, Takashi Hirasawa, Naoaki Ono, Tetsuya Yomo, Hiroshi Shimizu, Chikara Furusawa, BMC Evo. Biol. 15, 2015, pp. 180
doi: 10.1186/s12862-015-0454-6. 査読あり

[学会発表](計18件)

古澤力、生物システムの安定性と可塑性：理論と実験からのアプローチ、2015.12.10、第34回BMIRC研究会、九州工業大学 飯塚キャンパス
古澤力、大腸菌進化実験と細胞シミュレーションを用いた適応進化ダイナミクスの解析、2015.12.2、第38回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場
古澤力、Toward Understanding of Adaptive Evolution: Computational Analysis and Experimental Evolution、2015.11.27、平成27年度生命システム理論研究会、東京医科歯科大学
古澤力、生物システムの安定性と可塑性：大腸菌進化実験によるアプローチ、2015.11.16-11.18、山田研究会「生物と非生物をつなぐ」、ラフォーレ修善寺
古澤力、大腸菌の進化実験を用いた進化ダイナミクスの解析とその応用、2015.10.28、第67回日本生物工学会大会、城山観光ホテル
古澤力、大自由度ダイナミクスから「生きている状態」の記述へ、2015.9.13-9.15、第53回日本生物物理学会年会、金沢大学角間キャンパス
古澤力、Toward Understanding of

Adaptive Evolution: Computational Analysis and Experimental Evolution, 2015.8.24-8.26、QBiC Symposium: High-dimensional data for the design principles of life、理化学研究所 大阪キャンパス

古澤力、適応進化ダイナミクスの解明：微生物実験と理論解析、2015.7.17、東大理学部物理学科懇話会、東京大学本郷キャンパス

古澤力、ゲノム解析の先に見えるもの：大腸菌進化実験の表現型・遺伝子型解析、2015.7.1-7.3、第4回NGS現場の会、筑波国際会議場

古澤力、進化ダイナミクスの構成的理解～大腸菌進化実験から何が見えるか？～、2015.6.27、第8回Evo-devo青年の会、名古屋大学理学南館

古澤力、大腸菌進化過程の表現型・遺伝子型解析：抗生物質耐性菌の出現抑制へ向けて、2015.6.16、アジレントゲノミクスフォーラム、浅草橋ヒューリックホール

古澤力、Phenotypic Convergence in Experimental Evolution of Antibiotic Resistant Bacteria、2015.5.11-5.13、2nd Symposium on Complex Biodynamics & Networks、鶴岡市先端研究産業支援センターレクチャーホール

古澤力、ゲノム解析の先に見えるもの～大腸菌進化実験の表現型・遺伝子型解析～、2015.5.10、1030回生物科学セミナー(東京大学理学部生物学科)、東京大学本郷キャンパス

古澤力、Theoretical/experimental analysis of robustness and plasticity in biological systems、2015.3.16-3.18、第56回日本植物生理学会年会シンポジウム、東京農業大学

古澤力、進化実験から見えてきたもの：微生物の適応進化過程の理解とその応用、2014.11.25、合成生物学シンポジウム、神戸大学

Chikara Furusawa、Creating stress tolerant bacterial cells by experimental evolution、2014.11.9-11.11、5th Asian Symposium on Innovative Bio-production and Biorefinery、Taiwan

古澤力、抗生物質を添加した環境での大腸菌進化実験、2014.10.15-10.16、第87回生化学会大会シンポジウム、国立京都国際会館

古澤力、代謝デザインへ向けたシステムバイオロジー、2014.8.19、第105回醗酵学懇話会生化学会、キリンビール(株)神戸工場

に残された謎：複数の形質が絡み合う進化プロセスはどのようにして可能か？(進化の謎をゲノムで解く；長谷部光泰監修) 2015、8-19

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.qbic.riken.jp/mbd/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古澤力(FURUSAWA, Chikara)
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

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

〔図書〕(計1件)

古澤力、学研メディカル秀潤社、進化学