

微生物を用いたフラスコの中での実験進化



研究室紹介

柏木明子*

Experimental evolution using *Escherichia coli* and
RNA bacteriophage Q β

Key Words : Molecular evolution, adaptation, coevolution

はじめに

相互作用する多くの因子から成るシステムはいかに持続的に発展するのであろうか。多くの因子から成るシステム全般に共通するこの問題に対する解は生物の動態解析から得られる可能性がある。生物は複雑な遺伝子発現ネットワークを内在しており、そのネットワークを持つ生物がさらに相互作用し生態系を構築し、持続的に発展していると捉えることができる。生物は生育環境等の外部環境の変化や生物が内包する遺伝子発現ネットワーク等の内部環境の変化にどのように適応しているのであろうか。我々は実験室内の外部環境を厳密にコントロールしたフラスコの中で微生物を継代し、多世代にわたって変化する過程を解析することによってこのことを明らかにしようとしている。

モデル生物としての大腸菌とバクテリオファージ

私は大阪大学工学部醸酵工学科の4年生の時に卜部格教授の研究室に配属され、卜部格教授と四方哲也助手(当時)(現:大阪大学大学院情報科学研究科教授)の下で大腸菌(学名:*Escherichia coli*)を用いた実験進化の研究を開始した。現在、弘前大学農学生命科学部で大腸菌とそれに感染するRNAバクテリオファージQ β (Q β)を用いた研究を行っている。

大腸菌が実験進化のモデル生物として適していることには様々な要因が挙げられるが、最たるものはその世代時間の短さであろう。大腸菌は豊富な栄養分があれば20分程度で分裂し娘細胞を作る。この世代時間の短さはヒトの短い人生の中で研究することができるさらに短い時間の内で多世代にわたる変化を解析するのに適している。また、遺伝子操作技術が発達している点も重要である。現在世界中で行われている遺伝子組換え技術は大腸菌の存在がなくては成り立たない。この技術の発展は実験者が目的に応じた大腸菌変異体を容易に作り出すことや実験進化で得られた変異体を容易に解析することを可能にする。さらに、ゲノムサイズが小さく遺伝子数が少ないことも要因の一つである。ヒトのゲノムサイズが約3,200 Mbで約30,000~40,000遺伝子を有しているのに対し大腸菌のゲノムサイズは約4.6 Mbで約4,000遺伝子である。大腸菌は単細胞で少ない遺伝子数で生きているため、ヒトに比べて単純な生き物と感じられるかもしれない。しかし、実際に大腸菌を扱ってみると大変複雑な生き物である。そこで、本研究室では更にゲノムサイズが小さく、遺伝子数の少ない大腸菌に感染するRNAウイルスであるQ β をモデル生物として用いている。Q β は4,217塩基の1本鎖RNAゲノムに4つの遺伝子しかもたない。ウイルスが生物か否かという議論はあるが、Q β は大腸菌の約1/1000の遺伝子数で宿主大腸菌に感染後1時間以内に宿主の中で子孫を作り、宿主を殺して外に出て新たな宿主に感染することを繰り返している。また、Q β はその変異率の高さも特徴的である。DNAをゲノムとして持つ大腸菌の変異率は約 10^{-10} /base/replication¹であるのに対し、RNAをゲノムとして持つQ β は 10^{-3} ~ 10^{-5} /base/replication^{2,3,4}である。このことはQ β の集団が多様な変異体で構成されていることを意味する。以降、



* Akiko KASHIWAGI

1971年2月生
大阪大学大学院工学研究科応用生物工学
専攻博士後期課程修了(2001年)
現在、弘前大学 農学生命科学部 生物
資源学科 准教授 博士(工学)
実験進化学
TEL : 0172-39-3789
FAX : 0172-39-3789
E-mail : kashi_a1@cc.hirosaki-u.ac.jp

本研究室で行った大腸菌や Q β を用いた実験進化の例を示す。

共進化による宿主と寄生者の分子進化速度の増大

適応と対抗適応が続く共進化においては、両者の変化速度が上昇すると考えられる。このことは、ライバルの存在がスポーツ、研究、商売等様々な場面で両者の向上する速度を上げるという経験からも実感されることであろう。実際に分子進化速度が共進化によって増加することが実証可能なのであろうか。この問題に対し、本研究室では大腸菌と Q β の共進化系を構築した。これは、一日一回両者を含む培養液の一部を新鮮な培地に植え継ぐという継代培養である。両者の取り得る状態は3つ考えられる。(1) 宿主大腸菌が Q β に対して抵抗性を獲得し Q β がその後感染できなくなり、Q β が系から wash out され最終的に大腸菌だけとなる。(2) Q β の感染性が上昇し、宿主大腸菌が絶滅し Q β だけとなる。宿主が絶滅すると寄生者の Q β は増殖することができなくなり、最終的に両者が消失する。(3) 大腸菌と Q β が適応と対抗適応を繰り返し、表現型や遺伝子型を変えながら両者が共存する。実際に両者を混合して継代してみると (3) の両者の共存が見られた。表現型の変化とゲノム配列の変化を解析したところ、まず大腸菌が Q β に対して抵抗性を獲得した。しかし、その抵抗性は完全に Q β の感染を阻害するものではなく、わずかに Q β の増殖を許容する部分抵抗性で

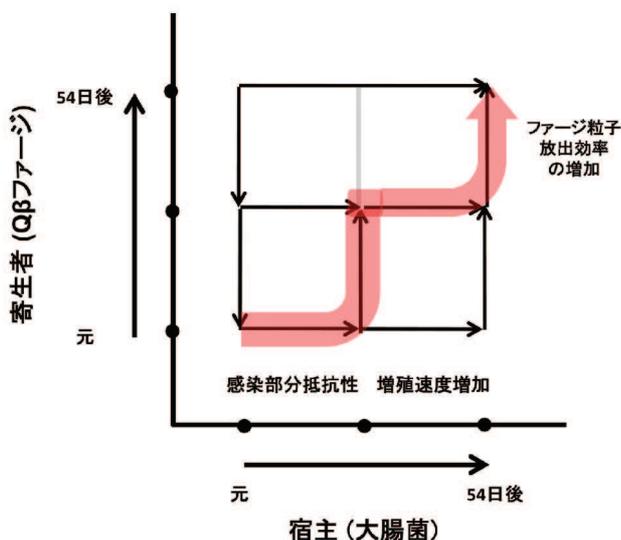


図1. 実験室内共進化系での宿主と寄生者の変化

あった。その部分抵抗性を示す大腸菌に対して Q β が実験進化開始時の Q β より子孫ファージをより多く産生する方向へと変化する対抗適応が生じていた。実際には子孫ファージの放出効率の増加と大腸菌に対する弱毒化が見られた (図1)。

また、コントロールとして Q β だけを継代し、Q β だけが変化する場合の分子進化速度と共進化した場合との分子進化速度とを比較すると、共進化した場合の方が約3.4倍大きかった。また、大腸菌ゲノムにおいても単独進化の場合^{5,6} よりも約10倍大きかった。これらにより、宿主と寄生者の両者の分子進化速度が共進化によって大きくなることを全ゲノムレベルの解析で実証した⁷。

Q β の高温適応実験進化

RNA ウイルスが元来増殖できない過酷な環境にさらされた場合、RNA ウイルスは増殖できるようになるのだろうか、また、増殖できるようになる場合はどれくらいの日数 (世代数) とどの程度のゲノムの変化を伴うのであろうか。本研究室ではこの問題に答えるため、通常 37°C で増殖する Q β の培養温度を段階的に上げることにより、元来増殖できない 43.6°C の高温条件で増殖可能となるまでの過程を解析した⁸。培養温度を 37.2°C、41.2°C、43.6°C と段階的に上げて継代したところ、少なくとも 60 日以内の短期間で増殖可能となった。また、その高温適応過程でのゲノムの変化を解析したところ、大規模なゲノムの変化を伴わず、少なくとも 13 箇所の点変異の蓄積により高温条件下で増殖可能となっていた。つまり、RNA ウイルスは全く増殖できなかった高温環境下にもたった2か月という短期間で、大変少ない点変異で適応したのである。興味深いことに、アミノ酸置換を伴わない点変異が高温条件下の増殖能獲得に大きく貢献しているという結果が得られた。さらに、これらの変異は単に高温での Q β の増殖能を上げることに寄与しただけではなく、その後の更なる高温環境でゲノムに導入される変異の適応度 (世代あたりの子孫数) への効果を負 (有害) から正 (有利) に変える遺伝的背景を提供した (図2)。これは導入される変異の遺伝的背景によって導入される変異の適応度への効果が正負逆となる sign epistasis の関係にあることを示している。Sign epistasis の存在は、進化の過程で取り

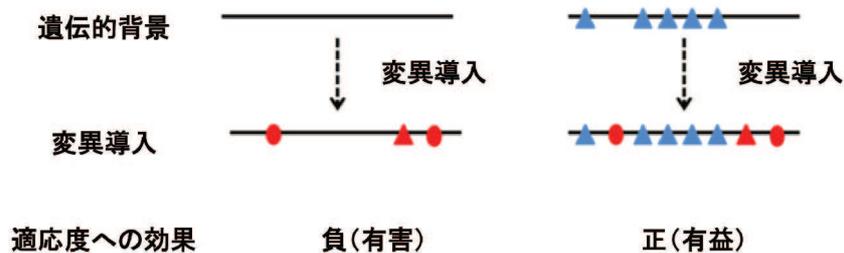


図2. 突然変異の適応度に対する遺伝的背景の影響

得る多くの経路の中で少ない（もしくは一つの）経路を選択するためには重要である。

おわりに

大腸菌やバクテリオファージが繰り返す生命現象は、ヒトの社会でも見られているように感じられる。そのため、微生物を用いた実験進化で抽出されるメカニズムは微生物に対してだけ適用されるものでなく、多くの要素が相互作用するシステムにおいても適用可能なメカニズムになり得ると考えられる。どういう現象に対する解を求めるのか、という問題設定の明確さがどのような実験進化系を組むのかにとって大変重要である。大腸菌やバクテリオファージを用いた実験から得られる結果は、我々ヒトが形成している社会の多くの問題を解決する糸口になる可能性を秘めていると考えられる。

参考文献

1. Drake, J.W., Proc. Natl., Acad. Sci. USA, vol.88, pp7164-7169, 1991.
2. Drake, J.W., Proc. Natl., Acad. Sci. USA, vol.90, pp 4171-4175, 1993.
3. Garcia-Villada, L. and Drake, J.W., PLoS Genetics, vol. 8, e1002832, 2012.
4. Bradwell, K. et al., Genetics, vol. 195, pp 243-251, 2013.
5. Kishimoto, T. et al., PLoS Genetics, vol.6, e1001164, 2010.
6. Barrick, J.E. et al., Nature, vol.461, 1243-1247, 2009.
7. Kashiwagi, A. and Yomo, T., PLoS Genetics, e1002188, 2011.
8. Kashiwagi, A. et al., J. Virology, in press, 2014.

