

# 大腸菌を用いた長期実験進化への挑戦 ～ストレスを受け入れ生き延びる方法の探究～

岸 本 利 彦\*



研究室紹介

Long-term thermo-adaptive evolution of *E. coli*Key Words : Experimental evolution, Thermo-adaptive Evolution, Thermophilic *E. coli*, Bioplastic production

## はじめに

生命はおよそ 40 億年前に地球上に出現し、現在まで途絶えることなく生き延び、繁栄してきた。その過程は、「進化」と呼ばれ、これまでに様々な学説が提唱、検証されてきた。また「進化すること」は生命の定義の一つとされ、進化メカニズムを知ることが生命のメカニズムの一端を知ることと等しいと考えられている。

近年、多様な生物のゲノム情報の蓄積により、進化メカニズムの分子レベル、細胞レベルでの理解が大きく進展している。その中で、実験室で生物を培養し続けることで生物の進化過程を解析する、実験進化研究が大きな役割を担っている。

実験進化では、①世代時間が短く研究期間内で進化に必要な世代数を達成可能、②進化過程の細胞を保存可能で先祖細胞との直接比較研究が容易、③ゲノム情報が確定しており変異解析が可能、④ゲノムサイズが小さく簡単にゲノム解析が可能、⑤培養条件を任意に設定でき、温度や薬物などのストレスも与えることが可能、などの理由で多くの研究で微生物が使用されている。また、微生物を用いると、数 ml の少量培養液中でも数億～数十億という生物集団の進化が可能であり、多くの進化学説を生み出した集団遺伝学との相性も良い。このように実験進化は、化石研究などでは不可能であったことを可能と

する新しい進化研究手法となっている。

本稿では、私達の研究室で実施している長期実験進化研究の取り組みと今後の展望などについて紹介する。

## 実験進化研究

実験進化研究では、従来の進化研究では検証できなかった「進化の場で実際にどのような現象が起きているか」を、ゲノムレベルから表現型の変化まで解析可能である。早くからこのアプローチの有用性に気づき、実験進化を長期にわたり実践することで、多くの知見を発表しているのが、Richard Lenski のグループである。彼らは 65000 世代以上の大腸菌の進化実験を行い、進化により新しい代謝系が獲得される過程や<sup>1)</sup>、進化における遺伝子変異間の相互作用の重要性について<sup>2)</sup>など、生物進化のダイナミクス解析において実験進化の有用性を広く示した<sup>3)</sup>。現在では多くの進化研究者が、大腸菌に限らず、酵母などの真核生物でも実験進化研究を行っている。

2004 年当時、私は進化の素人だったが、出身研究室の恩師、先輩の勧めで Lenski の論文などに触れ、その実験のシンプルさと得られる成果の奥深さに魅了された。私は、大腸菌を用いて致死ストレス環境への進化実験を行うことで、生物の生き残り戦略が見えてくるかもしれないと考えた。そして、周囲のサポートもあり、2005 年に研究に着手した。

## 致死ストレス環境への実験進化

我々の実験進化研究は、致死ストレスへの継続的適応進化を目的としている。対象生物として致死温度が約 43℃の大腸菌を用い、致死温度への適応進化をこれまで 17 年にわたり行っている。その進化方法は、「対数増殖を維持するように毎日の植菌濃度を調整して培養をする」ことである。この方法



\* Toshihiko KISHIMOTO

1964年11月生まれ  
大阪大学大学院 工学研究科 醗酵工学  
専攻博士前期課程 (1989年)  
現在、東邦大学 理学部 生物分子科学  
科 教授 博士(理学)  
TEL : 047-472-1836  
E-mail : kisimoto@biomol.sci.toho-u.ac.jp

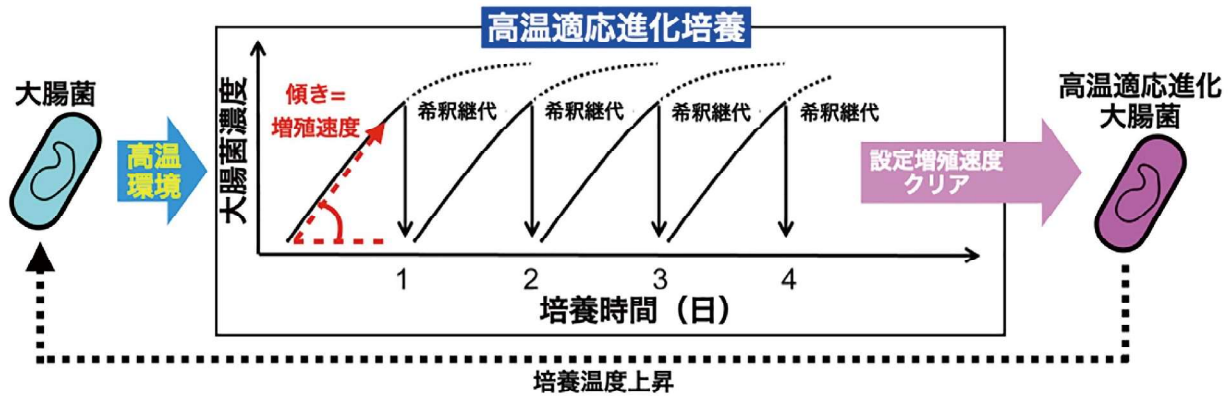


図1 高温適応進化における進化培養スキーム (参考文献4) より抜粋改変)



図2 培養装置

進化培養のインキュベーターと水面変化を最小限にするための給水タンク（給水タンクは培養装置一台につき連結）培養試験管の傾き、設置位置、振盪速度などは一定

では、日々の大腸菌濃度を測定することで増殖速度 (= 適応度) をリアルタイムで得ることができる。設定した増殖速度を2日以上連続してクリアすると培養温度を上昇させ、新しい温度への適応進化を進める (図1, 2)。このサイクルを繰り返すことで、2022年9月時点で48.3℃、48.1℃で安定増殖する2系統の大腸菌の樹立に成功している。これらの大腸菌は、至適増殖温度からみてほぼ高温菌に近い性質を獲得していると考えられる。以下にこれまでの研究成果をいくつか紹介する。

**強者選択から多様性重視の進化へ：45℃適応進化過程において、遺伝子修復系酵素の変異により修復機能が低下し、大腸菌の変異率が大幅に上昇した。その結果、高温適応に重要な変異が自然選択される「正の選択」から、高変異率になって進化に寄与しないと考えられる変異も多く発生し集団内の多様性が増すことで高温環境に適した大腸菌が生まれやす**

くなる「中立的進化」に変化した<sup>4)</sup>。またこのような高変異率進化でも分子時計は成立することを示した<sup>5)</sup>。

**短期応答から長期適応へ：致死環境へのストレス応答と適応進化の関係性について、致死温度への環境変化直後でも通常と同様の即応的なヒートショック応答で死を免れたのち、高温環境にゆっくり適応進化してゆくことが明らかとなった<sup>6)</sup>。**

**高変異率進化大腸菌の特性について：面白いことに、高変異率での高温適応進化では、より高温への進化が進むにつれて、変異率も上昇傾向を示した。これは高変異率であることが、進化に有利であったことを示唆している。その結果得られた2系統の47.9℃適応大腸菌では、それぞれが1500以上の変異を蓄積し、異なるゲノム配列の大腸菌となっていた。このことから、高温適応進化大腸菌は、多様な変異タンパク質を機能させる能力を持つように進化したことが示唆される。**

### 実験室進化がもたらすもの

現在、さらなる高温への実験進化を継続中である。この研究では、高温への適応戦略に関する知見以外にも様々な副産物が生み出されている。ここではいくつかの例を紹介する。

#### 1) 異種遺伝子発現宿主としての可能性

先述の通り、高温適応進化大腸菌はさまざまな変異タンパク質の発現を許容可能と考えられる。そこで、高温適応進化大腸菌で異種遺伝子の発現を検討している。その一環として、SDGsの観点からも注目されている生分解性バイオプラスチックの生産宿主としての活用を検討している。従来、大腸菌を宿

主として *Ralstonia eutropha* のプラスチック合成遺伝子 (phb C, A, B) を発現させた場合、プラスチック生産温度は 30°C が上限であった<sup>7)</sup>。ところが、我々の大腸菌で phb C, A, B を発現させると、40°C 以上のプラスチック合成が可能であった (図 3)。高温でのプラスチック生産では、硬度の高い高付加価値プラスチックの生産などが検討可能となる。現在、生産性の向上や、高温で異種遺伝子発現に重要な遺伝子変異の探索を行っている。



図 3 プラスチック生産大腸菌

40°C 以上でプラスチックを生産した高温適応進化大腸菌細胞内の赤い粒子がプラスチック (ナイルレッド染色)

## 2) 教育への効果：研究室の進化

実験進化研究を始めて一番よかったのは、自身の研究に対する感覚の変化や、学生との価値観の共有を実感できたことである。実験進化では、大きな目標を定めたら、環境設定をしてあとは大腸菌を培養し続けること、そして大腸菌の変化をありのままに受け入れて解析してゆくことが必要となる。これは簡単そうに思えるが、私にとっては非常に難しいことであった。予測不能な変化をし続ける大腸菌に対し、どのように進化条件を設定し、培養を継続してゆくかなど、研究開始当初には想定できなかったことが多々あり、ただただ謙虚にありのままを受け入れてゆくことが大切であることを学んだ。それはそのまま、研究テーマの設定や進め方に影響を及ぼし、学生への指導も変化した。学生の研究対象への向き合い方や、実験への取り組み方にも変化が生まれ、研究室全体が実験進化研究で良い方向に進化している様に感じている。

## おわりに

本稿では、我々の実験進化研究を紹介させていただいた。実験進化研究が、研究成果以外にも多くのことを研究室にもたらしてくれたことを皆様に紹介できていれば、本当に嬉しい。

15 年以上の進化継続の間には、東日本大震災や今なお続くコロナウイルス禍など、研究継続が困難なこともたくさんあった。その都度、研究室のメン

バーが力を合わせ進化実験を継続してくれたおかげで、諦めることなく今日まで進化を続けることができています。これまで研究室を支えてくれた学生や共同研究者の皆様には心から感謝している。

またこの研究を始めるために大阪大学の恩師、先輩はじめ本当に多くの方々に助けていただいた。この研究に関係して下さった方々への感謝を胸に、これからも私を新しい世界に導き、素晴らしい人たちと巡り合わせてくれた実験進化に向き合ってゆく所存である。

最後に、本稿を執筆する機会をいただいた、北海道大学 大井俊彦先生、大阪大学 藤山和仁先生に御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Blount, Z. D., Borland, C. Z., Lenski, R. E., PNAS, 105, 7899, 2008
- 2) Plucaïn, J., Hindre, T., Le Gac, M., Tenaillon, O., Cruveiller, S., Medigue, C., Leiby, N., Harcombe, W. R., Marx, C. J., Lenski, R. E., Schneider, D., Science, 343, 1366, 2014
- 3) Tenaillon, O., Barrick, J. E., Ribeck, N., Deatherage, D. E., Blanchard, J. L., Dasgupta, A., Wu, G. C., Wielgoss, S., Cruveiller, S., Medigue, C., Schneider, D., Lenski, R. E., Nature, 536, 165, 2016
- 4) Kishimoto, T., Iijima, L., Tatsumi, M., Ono, N., Oyake, A., Hashimoto, T., Matsuo, M., Okubo, M., Suzuki, S., Mori, K., Kashiwagi, A., Furusawa, C., Ying, B. W., Yomo, T., PLoS Genet, 6, e1001164, 2010
- 5) Kishimoto, T., Ying, B. W., Tsuru, S., Iijima, L., Suzuki, S., Hashimoto, T., Oyake, A., Kobayashi, H., Someya, Y., Narisawa, D., Yomo, T., PLoS Genet, 11, e1005392, 2015
- 6) Ying, B. W., Matsumoto, Y., Kitahara, K., Suzuki, S., Ono, N., Furusawa, C., Kishimoto, T., Yomo, T. BMC Genomics, 16, 802, 2015
- 7) Taguchi, S., Maehara, A., Takase, K., Nakahara, M., Nakamura, H., Doi, Y., FEMS Microbiol Let, 198, 65, 2001