

# 生きている状態をどのように理解できるか ～理論と実験からのアプローチ～

古澤 力

(理化学研究所・生命機能科学研究センター / 東京大学・生物普遍性研究機構)

## 1 はじめに

生物システムは、様々な環境変化や内部状態の揺らぎの下で機能し続けられる頑強性（ロバストネス）を持つ。実際に、細胞内の化学反応は分子の少数性などに起因する大きな揺らぎが存在するが<sup>1</sup>、その中でも自己複製や環境適応など複雑な機能を実現している。その一方で、生物システムは環境変化などに対し、適応や進化などの過程を通じ内部状態を柔軟に変化させるという可塑性を持つ。この頑強性と可塑性が両立できるという性質は、我々の知る人工システムとは本質的に異なる点であると思われるが、複雑な化学反応のネットワークがどのようにしてその両立を可能とするか、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。

頑強性と可塑性を理解するためには、そのシステムが持つ状態を記述する必要がある。例として、約4,000種類のタンパク質を持つ、比較的単純な生物である大腸菌を考える。仮に1つの大腸菌の状態が、内部のタンパク質の発現量（細胞当たりの分子数）によって決まり、細胞の空間構造などは無視できるとすると、ある瞬間の大腸菌の状態は、それぞれのタンパク質の発現量を軸とした約4,000次元の状態空間内の一点として表すことができる。また、環境適応や進化の過程における細胞状態の時間発展は、その空間内の軌跡として描くことが出来るであろう。しかしながら、この大腸菌の状態を記述するのに4,000の自由度が必要とは限らない。大腸菌が生きている状態を保つためには、タンパク質の発現量は精密に制御をされる必要があり、しばしば複数のタンパク質の発現量は相関して変化をする。こうした相関は細胞状態の有効自由度を減らす結果となる。では、大腸菌の状態を記述する有効自由度はどれくらいの数であり、それをどのようにして取り出すことが出来るであろうか？そうしたマクロ的な状態量を用い、生物システムの状態遷移はどのように記述できるであろうか？本稿の前半では、理論解析と計算機シミュレーションを基盤とした、増殖する細胞におけるマクロ状態論について論じる。また後半では、その実験的検証に向けた大腸菌進化実験について紹介をする。

## 2 定常増殖をする細胞状態のマクロ記述

大腸菌のように単細胞で増殖する生物種を考える。議論を簡単にするために、細胞間の相互作用は無視できるとして、分裂ごとにその状態を変化させない定常的な増殖をしているとする。実験的には、試験管内で対数増殖をする微生物を考えれば良い。上述のように、細胞内には数千の種類のタンパク質が存在し、代謝物質などその他の化学成分も多く存在するが、その数を  $M$  としよう。この  $M$  は十分に大きい値であり、つまりこの細胞の状態を表すには膨大な数の自由度が必要にみえる。ただし、今は分裂ごとに状態が変わらないという定常状態を仮定しているので、こ

<sup>1</sup>例えば、大腸菌が持つタンパク質の平均分子数を網羅的に調べた研究によると [1]、生育に必須な（そのタンパク質をコードする遺伝子を削除すると致死的な）重要なタンパク質でも、細胞当たり平均分子数が数個といったものが多く存在する。

の  $M$  種類の全ての成分は分裂ごとに2倍になる必要がある。それでは、この定常状態の仮定がどのような状態の「拘束」をもたらすか、以下に簡単なモデルを用いて論じる（詳細は文献 [2, 3] を参照）。

まず  $M$  種類の化学成分について、分子数を変数とすると細胞の成長と分裂によって非連続的に変化をして扱いにくい。そこで、分子数を細胞体積で割った濃度で考えることにして、その各化学成分の濃度を  $x_1, x_2, \dots, x_M$  で表す。その成分濃度は細胞内での合成や分解などの化学反応によって時間的に変化する。加えて、細胞は増殖率  $\mu$  でその体積を増加させるとし、体積増加による濃度の希釈も考えるとする。これらをまとめ、 $i$  番目の成分濃度の時間変化は、

$$dx_i/dt = f_i(\{x_j\}; E) - \mu(E)x_i \quad (1)$$

とあらわせるとする。ここで  $f_i$  は合成と分解を表す関数で、全ての化学成分濃度  $\{x_j\}$  と環境条件  $E$  に依存するとしている。この  $E$  は環境中の栄養濃度でも、温度でも、他のストレス条件でもよい。一般には  $E_1, E_2, \dots$  と多くの環境条件が存在するが、まずは簡単化のために単一の環境条件（例えば温度）を変化させる場合を考えて、ひとつのスカラー・パラメータ  $E$  であらわせるとしよう。また右辺第二項は体積増加による希釈を表している。

ここで各成分の濃度の対数  $X_i = \log x_i$  を導入し、また  $f_i = x_i F_i$  という量  $F_i$  を導入する。すると (1) は

$$dX_i/dt = F_i(\{X_j(E)\}; E) - \mu(E) \quad (2)$$

と表せる。このとき定常状態の仮定を考慮すると、成分濃度は各  $i$  について

$$F_i(\{X_j^*(E)\}; E) = \mu(E) \quad (3)$$

をみたすことになる。つまり、定常的に増殖する細胞においては、その状態変化は  $\mu(E)$  という1つの量の変化でパラメータ化された線上に拘束されていることがわかる。

ここで、基準となる環境  $E_0$  から  $E (= E_0 + \delta E)$  への変化を考える。この環境変化により、各成分の（対数）濃度が  $X_i^*$  から  $X_i^* + \delta X_i$  にかわり、増殖率  $\mu$  が  $\mu + \delta \mu$  に変化したとしよう。ここで、もしこれらの変化があまり大きくないとして、線形の応答のみを考慮すれば、 $E_0$  での  $F_i(\{X_j^*(E)\})$  の  $X_j$  での偏微分を  $J_{ij} = \partial F_i / \partial X_j$ 、また環境  $E$  での偏微分を  $\gamma_i = \partial F_i / \partial E$  とすれば

$$\sum_j J_{ij} \delta X_j(E) + \gamma_i \delta E = \delta \mu(E) \quad (4)$$

となる。

ここで  $\delta E$  に対して線形の範囲で考えたので  $\delta \mu \propto \delta E$  と仮定して  $\delta \mu = \alpha \delta E$  とおけば

$$\sum_j J_{ij} \delta X_j(E) = \delta \mu(E) (1 - \gamma_i / \alpha) \quad (5)$$

となる。 $\gamma_i$  はもとの状態と  $E$  の方向で決まり  $E$  の大きさにはよらないので  $\sum_j J_{ij} \delta X_j(E) / \delta \mu(E) = \sum_j J_{ij} \delta X_j(E') / \delta \mu(E')$  となり、その結果

$$\frac{\delta X_j(E)}{\delta X_j(E')} = \frac{\delta \mu(E)}{\delta \mu(E')} \quad (6)$$

がすべての成分  $j$  に成り立つことになる。これは、環境条件を変えたときの成分量の（対数）変化の比率は各成分によらず共通であり、その比が2状態での細胞増殖率変化の比  $\delta \mu(E) / \delta \mu(E')$  で表せることを意味している。言い換えると、細胞の増殖率というマクロ変数によって  $M$  種類の成分量の変化が規定されていることになる。

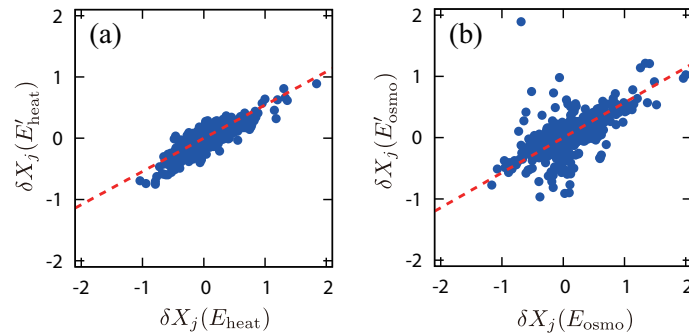


図 1: 大腸菌に異なる強さの環境ストレスを与えた場合の遺伝子発現量変化: ある環境ストレスのタイプを  $a$  とし, その強さを  $E_a$  と  $E'_a$  としたときに  $(\delta X_j(E_a), \delta X_j(E'_a))$  をすべての mRNA 種類  $j$  に対してプロットしたもの. ここで,  $\delta X_j(E_a)$  は遺伝子  $j$  の発現量の対数がもとの (ストレスなし) の状態から, ストレス環境  $E_a$  でどれだけ変化したかをあらわす. また図中の点線は, 式 (6) から予想される理論ラインを示す. ここでストレスのタイプは (a) では高温 (heat), (b) では浸透圧 (osmo) となっている (詳細は [2] 参照).

以上の議論は, 細胞が定常的に増殖し, かつ全成分の希釈が増殖率というグローバル変数に依存すること, そして環境の変化が大きくないとして線形化したことの単純な帰結である. ここでは多くの仮定が存在するが, 興味深いことに, ここで得られた式 (6) の関係性が, 多くの実験データと良い対応を見せている. 例えば図 1 は, いくつかのストレス環境下で培養された大腸菌のトランスクリプトーム解析の結果を示している. トランスクリプトーム解析では, 菌体から mRNA を抽出し, それぞれの遺伝子についてそれをコードした mRNA の分子数を網羅的に定量しており, この実験では定常増殖する  $10^8$  程度の細胞から mRNA を抽出している. 図 1a では, 大腸菌に異なる 2 つの強さの熱ストレスを加えたときの, mRNA 発現レベルの変化を縦軸・横軸にプロットしている. 横軸は, 大腸菌にストレスを加えない通常環境で計測した発現量を  $x_j(E_0)$  とし, 環境  $E_{\text{heat}}$  で得られた発現量を  $x_j(E_{\text{heat}})$  とした場合の対数発現量変化  $\delta X_j(E_{\text{heat}}) = \log x_j(E_{\text{heat}}) - \log x_j(E_0)$  を示し, また縦軸は, より強い熱ストレスを加えた環境  $E'_{\text{heat}}$  での対数発現量変化を示している. つまり, 異なる温度差での各 mRNA の対数変化量が縦軸・横軸にプロットされており, 図の各点は異なる遺伝子に対応する. すると図にあるように, 数千の発現量にわたってほぼ共通の比例関係が見出される. さらに温度ストレスだけでなく, 浸透圧を変化させたストレスに対しても同じプロットを行うと, 図 1b にあるように, やはりほぼ比例関係が得られる. さらに, これらのプロットの傾きは, 2 つの状態での増殖率変化の比  $\delta\mu(E)/\delta\mu(E')$  に合致し, 理論と良い対応を見せている.

図 1 は同じ種類のストレスを異なる強さで加えた場合の関係を解析しているが, 興味深いことに, 異なる種類の環境変化を与えた場合においても, 式 (6) の関係が成り立つことが見出されている. 図 2 は, 図 1 と同じデータを用い, 異なるストレスに対する応答を解析している. 縦・横軸の定義は図 1 と同じであり, 例えば図 2a では, 横軸に浸透圧ストレスを与えたときの対数発現量変化, 縦軸に熱ストレスを与えたときの変化を示しており, また図中の点線は図 1 と同様に増殖率変化の比を表している. さまざまな組み合わせや, 異なるデータセットを用いて解析を行ったが, その多くで式 (6) で示された関係が成り立つことが確認されている. つまり

$$\delta X_j(E) = c_j \delta\mu(E) \quad (7)$$

がなりたっていて, この  $c_j$  は成分  $j$  によるけれども環境の種類  $E$  にはあまりよらないことを意味している.

式 (6) の関係は, 定常増殖の仮定の下での簡単な解析から得られたものではあるが, それが実験的に広く見出されることは決して自明な結果ではない. まずこの式の導出では, 環境の変動に

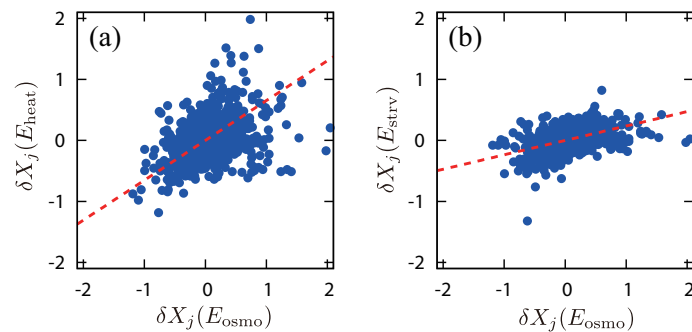


図 2: 異なる環境ストレスを与えた場合の遺伝子発現量変化: (a) 浸透圧ストレスと高温ストレスの組み合わせについて、遺伝子発現変化 ( $\delta X_j(E_{\text{osmo}})$ ,  $\delta X_j(E_{\text{heat}})$ ) をすべての mRNA 種類  $j$  に対してプロットしたもの。同様に、(b) では浸透圧-飢餓の組み合わせでプロットしている。図中の点線は図 1 と同様に式 (6) から予想される理論ラインを示す。いずれでも多くの成分に対して比例関係が成り立ち、その比例係数は増殖率変化から予想されるものとおおよそ一致する (詳細は [2] を参照; また他のデータセットを用いた解析は [3] を参照)。

よる状態変化は十分に小さいとして、線形の応答のみを取り出している。しかし図 1 と図 2 で示した実験では、増殖率が半分以下となったようなデータも用いており、状態変化が小さいと仮定することは難しいように見える。また、図 2 で示したように、異なる種類の環境においても比例関係が成り立つが、 $\gamma_i$  が大きく環境に依存しない理由は明白ではない。この性質は適当に選んだ大自由度力学系では成り立たないと予想される。一方で、実際の生物システムではそれが広く成り立つということは、それが何らかの進化過程の結果であることを示唆している。そこで次節では、細胞モデルの進化シミュレーションを用い、こうした低次元への拘束が出現する理由について考察する。

### 3 複製細胞モデルの進化シミュレーション

線形応答を仮定した理論解析と実験データから、全ての化学成分に対する共通の比例関係の存在が示唆された。この関係が出現する条件が、進化過程によってどのように変化するかを考えたい。そこで、簡単な複製細胞モデル [4] を用い、その進化シミュレーションを行うことにより、この関係が成り立つ条件を探索する。

細胞内部には  $K$  種類の化学成分があるとする。  $X_i$  を  $i$  の種類の成分だとして、それらの間で  $X_i + X_{c(i,m)} \rightarrow X_m + X_{c(i,m)}$  の反応、つまりつまり  $i$  から  $m$  への変換が触媒  $c(i,m)$  によって起こる。ここで  $c(i,m)$  は  $X$  の中から選ばれ、結果として反応全体はネットワークを構成する。この触媒ネットワークは細胞の遺伝子型により決まるが、初期条件としてはランダムに選んで適当に決めている。

さらに外部環境には栄養成分が一定濃度で存在するとして、それらは膜を透過して細胞内に取り込まれるとしている。細胞内にある栄養成分のセットを  $X_1, X_2, \dots, X_m$  とし、それらの外部環境での濃度が  $\mathbf{o} = \{s_1^o, \dots, s_m^o\}$  で与えられるとする。それら是对応する内部の輸送体成分で能動的に細胞内に輸送されるとし、各栄養成分の取り込み量は対応する輸送体の濃度と環境中の栄養成分濃度の積に比例するとしている。この取り込まれた栄養成分は、触媒反応ネットワークによって他の分子に変換され、結果として細胞内の総分子数は増加していく。そこで細胞内の分子数の合計がある程度以上になったら、細胞が分裂して約半分の分子数からなる娘細胞が形成されるとする。

外部からの取り込みと触媒反応の進行により細胞は成長するが、その成長速度 (分裂時間の逆数) はネットワーク  $c(i,m)$  に依存する。そこで、この細胞の進化過程をシミュレートするために、

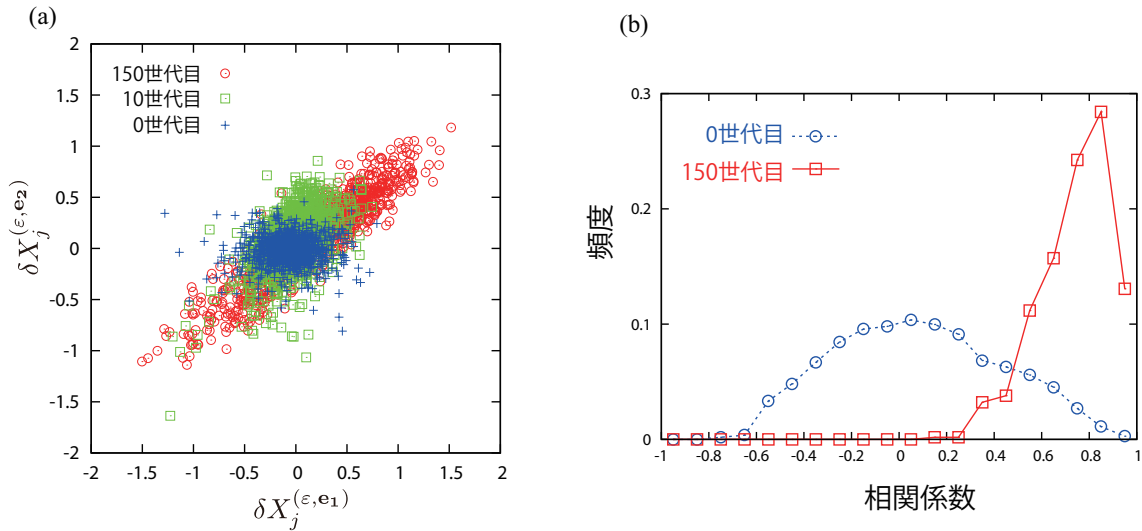


図 3: 細胞モデルの計算機シミュレーションにおける環境応答: (a) 細胞モデルの全ての成分について、異なる環境  $e_1$  と  $e_2$  への応答を  $\delta X_j^{(\varepsilon, e_1)}$  を横軸に、 $\delta X_j^{(\varepsilon, e_2)}$  を縦軸としてプロット. 0 世代 (進化前のランダムネットワーク), 10 世代, 150 世代でのデータを示している. 進化とともに比例関係が形成されていく. (b) この両者の相関係数を様々な環境 ( $e_1, e_2$ ) に対して求めてそのヒストグラムを求めた. 進化前と進化後 (50 世代目) のネットワークについてプロットしている. 進化とともに相関係数が 1 に近いものが増えていく.

親のネットワーク  $c(i, m)$  のパスに少しだけ変異を入れて異なるネットワークを持つ次世代細胞集団をつくり、その中から成長の速い細胞を一定の割合で選ぶ. この操作を繰り返すことにより、与えられた環境で、より速く成長できる細胞を進化させていく.

このような手順により、一つの環境で高い成長速度を持つようになった細胞に対し、まず環境変化に対する応答を調べた. そのために外部環境をもとの  $s_1, \dots, s_m$  から  $s_j^{(\varepsilon, e)} = (1-\varepsilon)s_j^0 + \varepsilon s_j^e$  へと変える. ここで  $e = \{s_1^e, \dots, s_m^e\}$  は新しい環境の方向であり  $\varepsilon$  はもとの環境からどのくらい、その方向に変えたかの強さを表す. こういう異なる環境に細胞をおいて、もとの環境からどれだけ成分組成  $x_j^{(\varepsilon, e)}$  が変化したかを調べる. 上述の理論で解析したのは対数変化なので  $\delta X_j^{(\varepsilon, e)} = \log(x_j^{(\varepsilon, e)} / x_j^0)$  を各成分で調べ、それとともに、成長速度  $\mu$  がどれだけ変化したかを求める (その変化量を  $\delta\mu^{(\varepsilon, e)}$  とする).

この細胞の環境応答を、進化以前のランダムなネットワークと進化したあとでのネットワークで比較してみる. まず同種の環境変化、つまり同じ  $e$  の方向に異なる大きさ  $\varepsilon$  で環境を変化させた時に、各成分がどう変化したかを調べてみる. すると小さい変動 (小さい  $\varepsilon$ ) に対しては  $\delta X_j^{(\varepsilon, e)}$  は進化前にしても後にしても環境変化の強さ  $\varepsilon$  に比例する. ただ進化後には、比例して変化する領域が広がり、比例係数と成長速度変化が合致する結果となる.

次に、異なる環境変化  $e_1$  と  $e_2$  に対しての応答を解析する.  $\delta X_j^{(\varepsilon, e_1)}$  と  $\delta X_j^{(\varepsilon, e_2)}$  の関係を調べると、図 3a のように進化が進むにつれその比例関係が強くなる. 進化後では多くの成分に対して比例関係が成り立ち、その比例係数は成長速度とほぼ一致している. 実際この相関係数を様々な環境に対して求めると、進化後では 1 に近づいている (図 3b). 1 つの環境で進化させたのであるが、様々な環境に対しても応答が全成分にわたって強く相関するのである. そして、この比例係数は進化後では、成長速度比とよく一致している.

これらの結果は、ある一つの環境における進化の結果として、環境変化に対する応答が低次元の変化に拘束されていることを示唆する. そこで、ランダムに決めた様々な  $e = \{s_1^e, \dots, s_m^e\}$  と  $\varepsilon$  に対する変化をプロットしてみる. ただしこの細胞モデルでは成分数が 1000 と多いので、主成分分析を用いて 3 つの主成分に  $\{X_j\}$  を射影してプロットしたのが図 4a である. 図にあるように、

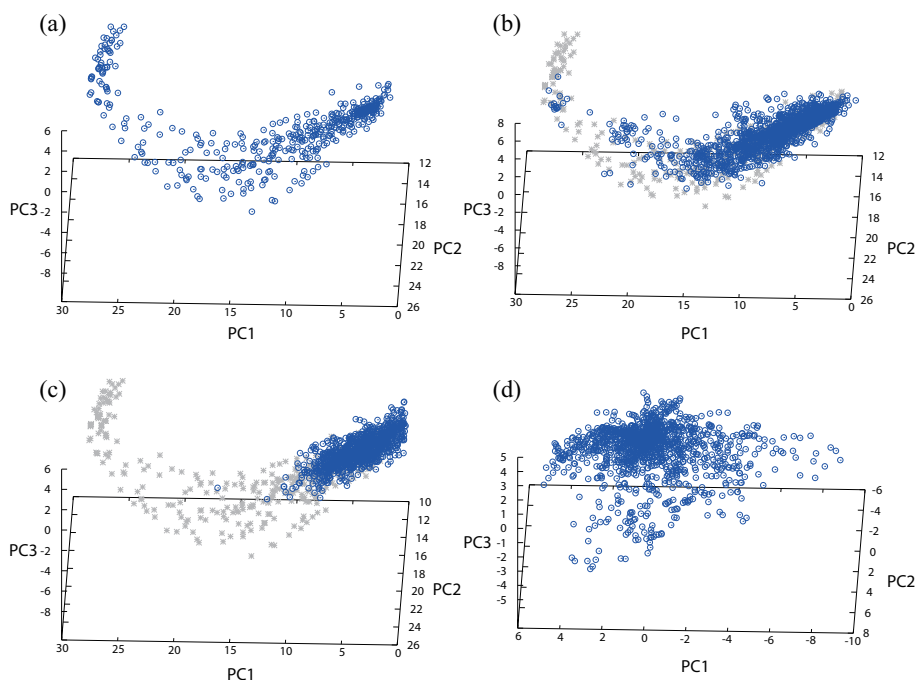


図 4: 細胞モデルでの各成分の変化を主成分空間上でプロットしたもの。進化後 (図 3 の 150 世代目) の反応ネットワークを用いたときの (a) ランダムな環境変化, (b) 反応ネットワークに対する変異, (c) 化学反応のノイズによる成分変化をプロット。主成分分析は (a) の環境変化を与えたときのデータに対して行い, 同じ主成分空間に (b), (c) のデータを濃い丸点で重ね書きしている (薄い\*の点は (a) のデータを参考のために示している)。環境変化, 反応ネットワークへの変異, そして化学反応のノイズによる変化が同じ方向におおよそ沿っていることが判る。一方で, (d) は進化前のランダムネットワークに対して環境を変えたときの成分変化を示しているが, この場合は構造が見られない (詳細は [3] を参照)。

進化後の細胞では, ランダムな環境変化に対する応答がある一つのライン上にだいたい乗っている。これに対し進化前のランダムなネットワークではこうした構造は見られない (図 4d)。

以上は, 環境条件を変えたときの状態変化であった。同様に, 反応ネットワークの変異に対しての状態変化と, 反応ダイナミクスのノイズでの状態の揺らぎを, この主成分空間でプロットしてみると (図 4b と c), これらも, 先のライン上でおよそ変化している。まとめると, 環境変化, 内部のノイズ, 遺伝子変異に対する状態変化は, 共通の 1 次元ライン (ないし低次元の図形) 上で変化する。つまり元来高次元であらわされていた表現型 (状態) の変化は, その起因が異なっても, 共通の低次元ライン上に拘束されている。

このシミュレーション結果を考えると, 適応と進化の過程における可能な状態変化は 1 次元ないしは低次元の多様体上に拘束をされているという仮説が成り立つであろう。つまり, 多くの構成要素からなる高次元の表現型であろうと, 進化の過程で選択されてきた状態においては, その少数の「変化しやすい方向」が存在し, それ以外の方向への変化は生じにくい。そしてその変わりやすい方向は, 短い時間スケールの化学反応レベルの揺らぎから, 環境適応や進化といった長い時間スケールでの変化で共通である。ではこうした変化のしやすい方向は, 実際の生物システムに見出されるのであろうか? こうした表現型進化における拘束を定量的に解析することを目的として, 我々のグループでは大腸菌の進化実験を行っている。次節では, その大腸菌を用いた進化ダイナミクスの表現型・遺伝子型解析について紹介する。

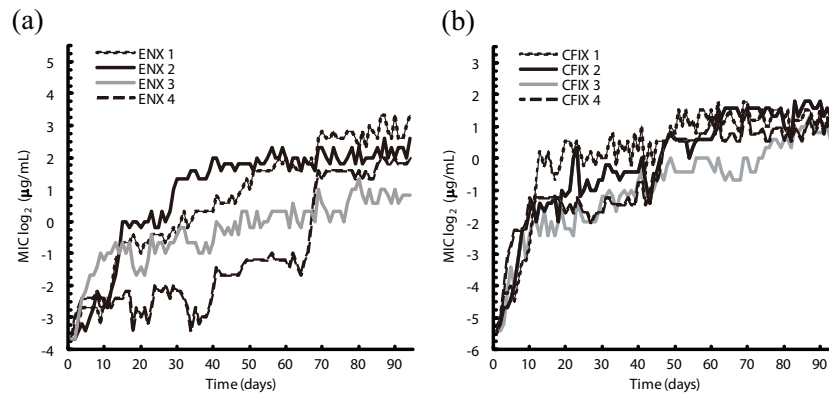


図 5: 抗生物質を添加した環境下での大腸菌進化実験. 横軸は時間, 縦軸は最小増殖阻止濃度 (MIC) の対数を示す. 同一の親株から始めた 4 つの独立培養系列の結果を示す. (a) シプロフロキサシン (CPFX; DNA 複製阻害剤) と (b) クロラムフェニコール (CP; タンパク質合成阻害剤) を添加した環境での結果をそれぞれ示している.

#### 4 大腸菌の抗生物質耐性進化における表現型と遺伝子型の定量解析

これまで行われてきた進化研究の多くは, 現存する生物種のゲノム配列や表現型, そして化石データなどを比較することを通じて, 過去に生じた進化プロセスを「再構成」することに主眼を置いてきた. この方法は, 自然界で実際に生じた進化プロセスを対象にすることが出来る一方で, 再構成された進化過程に残る曖昧さや, 進化前の表現型にアクセスすることが出来ない場合が多いといったデータの不完全性に悩まされる場合が多い. また, 現存する生物種の進化プロセスが, 基本的に 1 回りの歴史的事象であることに付随する困難さが常に存在する. そのため, 他の科学分野で重視される再現性や普遍性を担保することが難しく, また進化プロセスの過程で生じた変化において, 何が偶然で何が必然かを判別することは非常に難しい.

こうした進化研究におけるデータの不完全性を回避し, 進化プロセスが持つ様々な性質を定量的に明らかにすることを可能とする手法として, 実験室内で進化プロセスを構成し, それを解析するアプローチを考える. この進化実験の持つアドバンテージとしては, 以下のものが挙げられる.

- 進化プロセスの初期状態と, そこからの時間発展の全てを解析対象とすることが出来る.
- 一定環境や時間的に変動する環境などの様々な環境条件や, そこでの選択圧の強さを実験的にコントロールすることが出来る.
- 同一の環境において, 同一の初期条件から複数の独立進化実験を行い解析することにより, そこでの進化プロセスにおいて何が偶然に生じた変化で, 何が必然的に生じる変化であるかをある程度判別することが出来る.

以降そうした研究例として, 抗生物質を添加した環境下における進化実験と, そこでの表現型変化の拘束について述べる [5].

この研究では, 様々な作用機序を持つ 10 種類の抗生物質をそれぞれ添加した環境下において, 大腸菌の植え継ぎ培養を行った. この 96 ウェルプレートを用いた植え継ぎ培養では, 薬剤濃度を一定の希釈倍率で段階的に変化させたウェルに等量の細胞を植菌し, 増殖が確認できた薬剤濃度の最も高いウェルから, 次の培養への植え継ぎを行っている. この毎回の植え継ぎにおいて薬剤濃度を変化させる培養を, 24 時間間隔で 90 日間 (おおよそ 900 世代) 行ったところ, 増殖が阻害される最小の薬剤濃度 (最小阻害濃度; MIC) の有意な上昇が観察された (図 5a と b に例を示

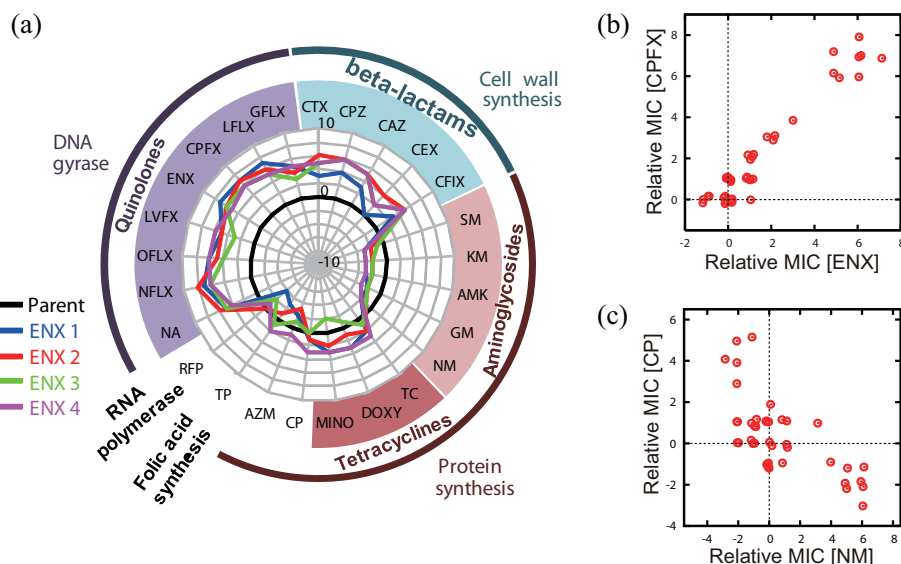


図 6: 一つの薬剤への耐性獲得が他の薬剤の耐性・感受性に与える影響. (a) 進化実験によって得られた 4 株のエノキサシン (ENX; DNA 複製阻害剤) への耐性株が, 他の薬剤に示す耐性/感受性の変化を表している. 中央の黒太線は親株の薬剤耐性を示し, 放射状の軸は親株との耐性能の違いを MIC の対数比で示す. 黒い太線の円より外側が親株に対して耐性, 内側が感受性に対応する. ENX への耐性を獲得することにより, 他の様々な薬剤への耐性や感受性が大きく変化している. (b) エノキサシンとシプロフロキサシンの耐性能 (親株との対数 MIC 比) の関係. 各点はそれぞれ耐性株 (合計 40 株) のデータに対応する. (c) ネオマイシン (NM; タンパク質合成阻害剤) とクロラムフェニコールの耐性能の関係. NM への耐性獲得は CP への感受性をもたらし, またその逆も成り立つ.

す; 詳細は [5] を参照). これは, 植え継ぎ培養により, 大腸菌が添加した薬剤への耐性を獲得したことを意味している.

これらの耐性株について, さまざまな手法により表現型と遺伝子型の変化を解析した. 最初に, ある一つの薬剤に対する耐性の獲得が, 他の様々な薬剤に対する耐性・感受性をどのように変化させたかを定量した. 結果として, 多くの耐性株において, 植え継ぎ培養時に添加していた薬剤以外の薬剤に対しても耐性・感受性が大きく変化するという現象が見出された. 図 6a は DNA 複製阻害剤であるエノキサシンに対する耐性株について, 他の様々な薬剤に対する MIC の変化をプロットした例である. エノキサシン耐性株は, 同じ DNA 複製阻害剤の多くの薬剤に対して耐性となり, さらにキノロン系の細胞壁合成阻害剤に対しても MIC が上昇する (耐性となる) 一方で, アミノグリコシド系のタンパク質合成阻害剤に対しては, 親株よりも MIC が低くなる (感受性となる). こうした MIC の変化を, 取得した耐性株の全てについて定量し, それぞれの薬剤に対する各株の MIC の相関関係の解析を行った. 例えば図 6b は, どちらも DNA 複製阻害剤である示すエノキサシンならびにシプロフロキサシンについて, 得られた耐性株全ての MIC をプロットしたものであり, 片方の薬剤に対して耐性を獲得した大腸菌は, もう片方の薬剤に対しても耐性を持つという交差耐性と呼ばれる現象を見ることが出来る. 興味深いことに, いくつかの薬剤間においては, MIC の負の相関が見出された (図 6c に例を示す). これは, 2つの薬剤に対する耐性がトレードオフの関係にあることを意味している. そこで, これらのトレードオフの関係にある薬剤を同時に添加した環境下での進化実験を行ったところ, どちらの薬剤に対しても耐性進化が阻害されることが確認された [6]. この結果は, 複数の環境摂動の適当な組み合わせによって, 進化プロセスがコントロールされ得ることを示唆している.

次に, このような耐性能の変化が生じたメカニズムを理解するために, 耐性株のトランスクリプトーム解析を行った. 結果として, 多くの遺伝子の発現量変化が見出されたが, その数の多さからどの遺伝子が耐性獲得に寄与するかを判別することは難しかった. そこでこの研究では, どの



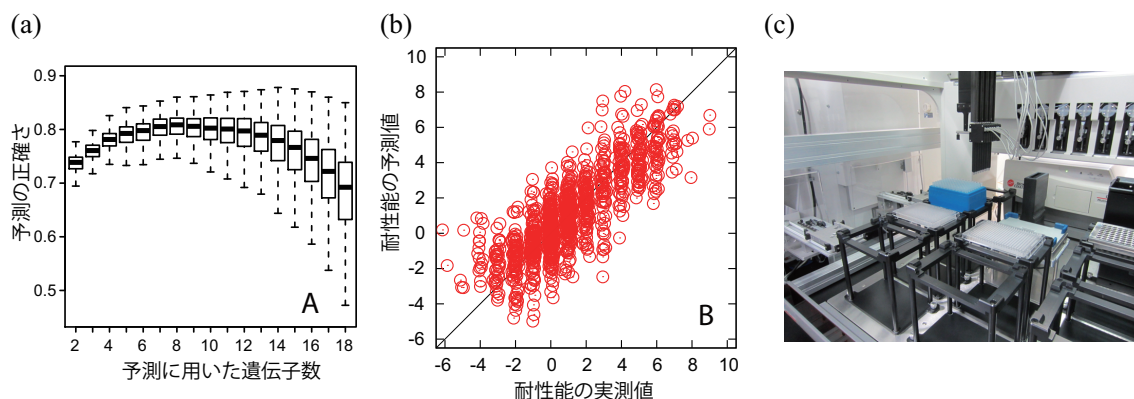


図 7: 線形モデルを用いた遺伝子発現量による耐性能の予測. (a) 式 (8) で予測に用いた遺伝子数と予測の正確さの関係. 予測の正確さは実測値と予測値との相関係数によって評価している. (b) 実測値と予測値の関係. 8つの遺伝子の発現量による予測値 (係数のフィットに用いていないテストデータ) と実測値をプロットした. それぞれの点は各耐性株の各薬剤に対する耐性能を表している. (c) 全自動進化実験システム. クリーンブース内に置かれたオートメーションシステムにプレートリーダーとインキュベーターが接続されている.

れくらいの自由度によって耐性能の変化が記述できるかを解析するために, 次のような単純な線形モデルを用いて遺伝子発現プロファイルから耐性能変化を予測することを試みた. 対数発現量の線形和によって耐性能が表現できると仮定し,

$$MIC_j^k = \sum_{i=1}^N \alpha_i^k X_{ij} + \beta^k \quad (8)$$

とモデル化した. ここで  $X_{ij}$  を  $j$  番目の耐性株における遺伝子  $i$  の対数発現量,  $MIC_j^k$  は薬剤  $k$  への  $j$  番目の下部の耐性能 (対数変換した MIC) であり,  $\alpha_i^k$  と  $\beta^k$  はフィッティングによって決める未知パラメータである. ただし, 大腸菌の遺伝子数は約 4,000 であり, それら全てのデータを用いると, 未知パラメータが多すぎるためにオーバーフィッティングの状態になり, モデルの汎化性能が失われてしまう. そこで実験データを, 学習データと検証データの 2 つに分割し, 学習データでフィッティングを行い, 検証データでそのモデルの予測精度の検証を行うという, いわゆる交差検証を実施した. この手法により, 様々な遺伝子数ならびに遺伝子の組み合わせにおいてモデルを作成し, 最も予測力が高くなるような遺伝子数を求めると, 概ね 7~8 個の遺伝子の線形和によって, 様々な抗生物質への耐性能を定量的に予測できることが示された (図 7ab). この手法により, どのような遺伝子の発現量の変化が耐性能の獲得に寄与しているか, 定量的に評価することに成功した (詳細は文献 [5] を参照).

少数の遺伝子の発現量から抗生物質耐性の予測に成功したことは, ゲノム, タンパク質, 代謝反応といった膨大な要素が関与するような, 抗生物質耐性の獲得という複雑な現象を, 比較的少数の自由度によって記述可能であることを強く示唆している. その変化を引き起こした要因をさらに調べるために, 超並列シーケンサーを用いた全ゲノムリシーケンス解析を行い, 得られた耐性株のゲノム配列にどのような変化が生じたかを解析した. その結果, それぞれの耐性株で数個から十数個程度の変異が同定された. この遺伝子発現量とゲノムの変異の対応を解析したところ, 遺伝子発現状態が非常に類似している耐性株の間であっても, 必ずしも類似したゲノム変異が生じているというわけではなく, 類似する遺伝子発現量の変化を引き起こすような変異が複数存在し, そうした変異による遺伝子発現状態の変化を通じて抗生物質耐性を獲得したことが示唆された. これらの結果は, 遺伝子発現量や薬剤耐性などの表現型の変化は少数の自由度に強く拘束されているが, 一方で遺伝子型の変化への拘束は相対的に弱いことを示唆している.

## 5 ラボオートメーションを用いた全自動進化実験システムの構築

微生物を用いた進化実験では、環境に対する進化が観察されるまで植え継ぎ培養を継続する必要があるため、長期間にわたり同一の実験操作を繰り返す必要があるなど、実験者に多大な負荷が掛るといった問題がある。この実験者への負荷のために、独立に維持できる進化系列の数には制限が生じ、様々な環境や初期条件からの系統的な進化実験を困難にしている。そこで我々は、ラボオートメーションを用いた全自動の進化実験システムを構築し [7]、それを用いた進化プロセスの定量解析を行っている [8]。図 7c に我々が構築した進化実験システムの外観を示す。クリーンブース内に設置されたラボオートメーションシステム (Beckman Coulter 社製 Biomek NXP) に、増殖評価用のマイクロプレートリーダーとインキュベーターが接続されている。培養器には最大 44 枚の 96 ウェルまたは 384 ウェルマイクロプレートを格納することが可能であり、最大で 16,000 程度の独立培養系列を全自動で維持することが可能である。また、長期間にわたり細胞の入っていない培地のための植え継ぎ実験を行い、クロスコンタミネーションが生じないことを確認している。このシステムを用い、様々な細胞機能の阻害剤 (タンパク質合成阻害・細胞壁合成阻害など) や重金属・変異誘発剤などの 95 種類の環境ストレスを添加した環境での進化実験を行ったところ、前述の抗生物質耐性の進化実験と同様に、比較的少数の自由度によってその表現型変化が記述されることが示されている。この研究に関しては出版前となっているので、講演においてその詳細を述べることにする。

## 6 おわりに

理論解析、細胞モデルの進化シミュレーション、そして微生物の進化実験から、自己複製する生物システムの適応・進化過程が、比較的低次元の状態遷移に拘束されていることが明らかになりつつある。そうした次元を抽出し、その関係性を明らかにすることにより、分子レベルでの記述とは異なる、マクロレベルの状態量を用いた生物システムの記述と、そこでの状態遷移則の構築に繋がるであろう。講演では、どのように生物システムを理解すべきかを議論したい。

## 参考文献

- [1] Y. Taniguchi et al., *Science* **329**(5991), 533 (2010).
- [2] K. Kaneko, C. Furusawa, T. Yomo, *Phys. Rev. X* **5**(1), 011014 (2015).
- [3] C. Furusawa and K. Kaneko, *Phys. Rev. E* **97**(4), 042410 (2018).
- [4] C. Furusawa and K. Kaneko, *Phys. Rev. Lett.* **90**(8), 088102 (2003); *Phys. Rev. Lett.* **108**(20), 208103 (2012).
- [5] S. Suzuki, T. Horinouchi, C. Furusawa, *Nature Commun.* **5**, 5792 (2014).
- [6] S. Suzuki et al., *BMC Genomics* **18**(1), 328 (2017).
- [7] T. Horinouchi et al., *Jour. Lab. Auto.* **19**(5), 478 (2014).
- [8] T. Horinouchi et al. *Sci. Rep.* **7**(1), 14009 (2017).