

論文の内容の要旨

長期細胞動態計測を用いた大腸菌の増殖と適応の解析

(Analysis on growth and adaptation of *Escherichia coli*
with long-term measurement of cellular dynamics)

橋本 幹弘

細胞間における表現型の違いは遺伝子型や環境の違いだけによって引き起こされるわけではなく、たとえ同一環境下、同一遺伝情報をもつクローン細胞集団であっても、表現型にはばらつきが生じ、時々刻々と状態が変化することが知られている（表現型ゆらぎ）。このような表現型のゆらぎは、生物にとっては単なる誤差やノイズではなく、分化、適応や進化などの生命現象を支える本質的な役割を担っているのではないかと考えられ注目を集めている。近年の1細胞計測技術の進展により、細胞内のRNAやタンパク質などの遺伝子発現量や細胞サイズなどの形状のばらつきなどを精度良く定量的に評価することができるようになり、多くの研究が行われるようになってきた。

1細胞計測には、フローサイトメトリーや1細胞イメージング法と呼ばれる計測手法が広く一般的に利用されているが、そのほとんどが、ある一時点、もしくは、限られた時間内での細胞集団の平均値、分散といった統計量を計測するものであり、いくつかの問題点がある。時系列情報が全て失われてしまっていることは当然であるが、それ以前に、得られたデータを正確に解釈することができていない危険性が十分にある。通常は、細胞集団の平均値、分散といった統計量は、細胞の内因的な性質が反映されたものであると考えるが、細胞集団に対して計測した統計量は、個々の細胞に起こる状態変化と、そ

の状態差に依存した増殖能の違いに起因する自然選択の効果を反映したものであるため、常に増殖能のゆらぎによるバイアスがかかったデータが取得されることになる。

そこで、まず第2章では、これらの問題を考慮した新たな計測系として、大腸菌を材料とし、環境制御下で1細胞動態を長期的に追尾計測可能な計測系（ダイナミクス・サイトメーター）の開発を行った（図1）。この計測系を使うことによって、個々の細胞の状態変化を少なくとも170世代の長期にわたって、観察することができることを確認した。

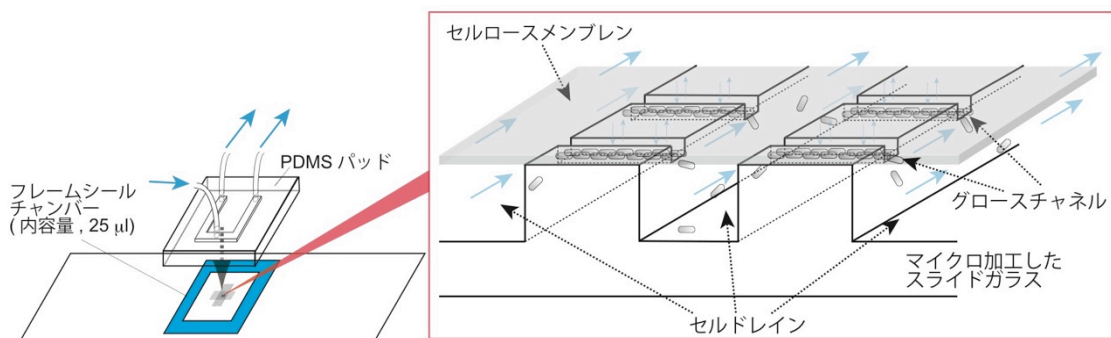


図1 灌流系とマイクロ加工ガラス基板の構成図

ガラス基板に掘られた溝に細胞を滴下し、上面からセルロースメンブレンでシールすることで細胞を保持することができる。細い溝（グロースチャンネル）の端にきた細胞は太い溝（セルドレイン）に落ち系外へ排出される。細胞周囲の培養液は、PDMSで作られた灌流装置で系内に供給され、セルロースメンブレンを介して速やかに培地交換が行われる。

第3章では、実際に、このダイナミクス・サイトメーターを使い、大腸菌をモデル生物として、細胞成長のゆらぎと集団ダイナミクスの関係を理論、実験の両面から定量的に調べた。理論的な考察として、年齢構造化個体群モデルを考えると、1細胞の増殖率よりも集団の増殖率の方が高くなることが導出できる。これを実験的に検証するために、環境や株が異なる条件で実験を行った。その結果、今回行った条件全てでモデルから導出できる集団の年齢分布と増殖率は、実験データから直接計算できるものとよく一致し、実際に、1細胞の増殖率よりも集団の増殖率の方が高くなることを確かめることができた（図2(A)）。また、この差と成長ゆらぎの関係を調べるため、増殖率の利得（集団の増殖率と1細胞の増殖率の差を1細胞の増殖率で割った値）と世代時間の変動係数の関係を調べた。その結果、成長のゆらぎが大きいと増殖率の利得が大きくなる傾向があ

ることがわかった (図 2 (B))。これは、たとえ 1 細胞の増殖率が変化しなくても、ゆらぎが大きくなると集団の増殖率が大きくなることを意味し、成長ゆらぎと適応の関係を考える上で重要な結果である。また、ダイナミクス・サイトメーターで取得した長期時系列データを使うことによって、これまで検証が困難であった系列の視点を取り入れたモデルの実験検証もできた。また、モデルからでは予測できない結果として、世代時間と世代時間の分散には線形関係があることを見出した。驚くべきことに、分散が 0 となる平均世代時間の値は正で、大腸菌が最も速く成長するとされている条件で培養した時の集団の世代時間 (約 20 min) に近いことがわかった。もし、この関係が普遍的な関係であるとすれば、この制約条件によって 1 細胞の世代時間の最小値が決定されることになる。

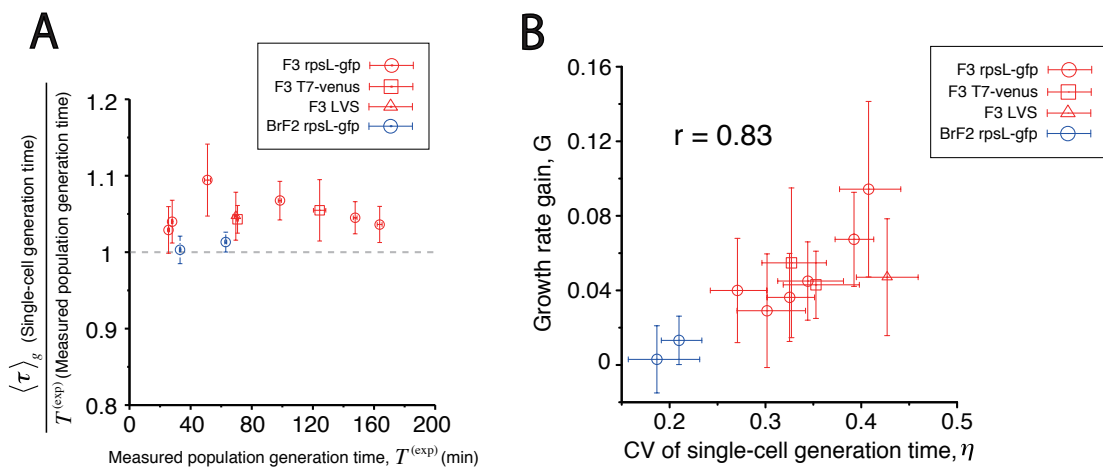


図 2 1 細胞の世代時間と集団の世代時間の相違

(A) 1 細胞の世代時間と集団の世代時間の比較 実験的に直接計測された集団の世代時間に対する 1 細胞の世代時間の割合。この値が 1 より大きければ、集団の世代時間よりも 1 細胞の世代時間の方が大きいことを意味する。

(B) 1 細胞の世代時間の変動係数 η と増殖率の利得の指標 G の関係 増殖率の利得の指標 G は、集団の増殖率と 1 細胞の増殖率の差を 1 細胞の増殖率で割った値。X 軸のエラーバーは、95%ブートストラップ信頼区間、Y 軸のエラーバーは、2S.D.ブートストラップエラー範囲。

バクテリア (大腸菌はその一種) は予測できない環境変動に対しても、高い適応能力をみせる。実験室内でバクテリアをストレス条件下で培養を続けると、徐々に成長が回復してくるとい現象が観察される。第 4 章では、このような適応機構を理解する為に、

ダイナミクス・サイトメーターと、新たに考案したデバイス（ウェルチャンバー）を用いて、耐性遺伝子の発現量がモニター可能な大腸菌の薬剤応答を観察した。ウェルチャンバーは、四角いウェルの中に細胞を入れセルロースメンブレンで蓋をして細胞を閉じ込め、その中を2次元平面的に成長する様子を観察できるように設計したデバイスである。薬剤（クロラムフェニコール）濃度を変え、それぞれの生存確率を計算した結果、ある薬剤濃度で、死ぬ細胞と生き残る細胞が共存する不均一な薬剤応答が観察された（図3）。さらに解析を進め、耐性遺伝子の発現量と生存確率の関係を調べた結果、耐性遺伝子の発現量が高い細胞の方が生き残る確率が高いことがわかった。また、薬剤投与後しばらくの間は、耐性遺伝子の発現量が高い細胞の方が、体積成長率が速いことがわかった。しかしながら、ゆらぎが大きく耐性遺伝子の発現量の高い低いだけでは、細胞の運命を決めることは難しいことがわかった。生き残った細胞について調べるために、ダイナミクス・サイトメーターを使って長期観察した。その結果、生き残った細胞は、環境に適応し安定的に増殖し続けることがわかった。また、安定的に増殖する細胞集団では、耐性遺伝子の発現量と体積成長率の相関がなくなっていることがわかった。今回の結果は、細胞の適応能力の高さを示すのと同時に、発現量の高低だけでは説明できない適応機構の存在を示唆する結果ではないかと考える。

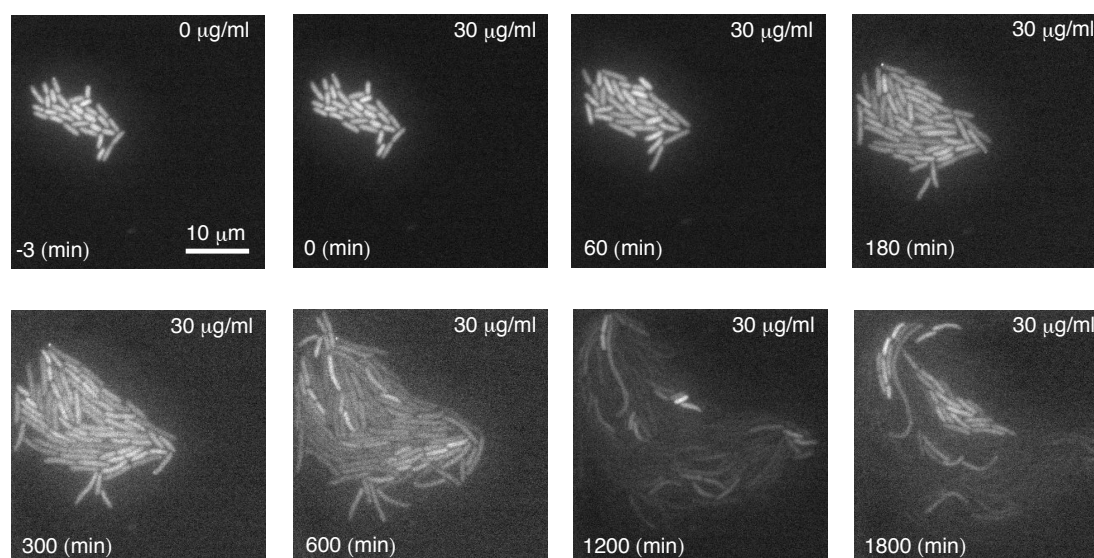


図3 不均一な薬剤応答の時系列

蛍光（YFP）画像。2枚目（0min）からクロラムフェニコール濃度30µg/ml培地に切り替えた。切り替え後、全体的に成長率は低下し数回分裂後、死亡する細胞が生じ、一部の細胞が生き残った（7枚目、1200min）。生き残った一部の細胞は増え続けた（8枚目、1800min）。