

進化の過程における遺伝的多様性と新規性の役割の解明

The role of standing variation versus new variation in the evolutionary response

ミシガン州立大学 井筒 弥那子
派遣期間 2017年3月31日～2018年3月31日
研究機関 Department of Microbiology and Molecular Genetics,
Michigan State University
East Lansing, MI, 48824 United States
研究指導者 Prof. Richard E. Lenski

Although in recent years it has been widely assumed that biodiversity and environmental adaptation are connected, it is still unclear how important the role of biodiversity is in evolution. In this research project, I plan to approach this issue by letting organisms evolve in the laboratory, a strategy called “experimental evolution”. To develop an efficient experimental plan, here I examine the optimal population sizes for experimental evolution studies. I changed the population sizes using different dilution regimes and tracked the divergence of allele frequency during the course of evolution. I calculated the fitness of the evolved lines and compared the fitness between populations evolved with different dilution regimes. We predicted that the higher fitness would be gained by the populations with 8-fold dilution regimes in terms of the tradeoff between loss of genetic variations by population bottleneck and gain of variations by new generations. However, the actual fitness values appeared to contradict our prediction. To this end, I provide the experimental evidences and insight into the effect of population bottlenecks, and the optimal design of a long-term experimental evolution to understand the role of standing variation and new variation in the adaptive evolution.

研究目的

進化した変異が選択が始まる前から集団内に存在した変異 (standing variation) であるのか選択が始まってから生じた新たな変異 (new variation) であるのかを特定することは進化の初期やその後のプロセスを理解するうえで非常に重要な課題である[1,2]。しかし、自然界で進化した生物に関して、その適応的変異が standing variation であったのか new variation であったのかを特定するのは困難である。そこで、本研究では生物を実験室内の特定の環境で飼育し進化させる実験進化を用いてこの課題にアプローチする[3]。特に、アメリカ・ミシガン州立大学の Dr.Lenski のグループが確立した大腸菌を用いた長期実験進化システムを利用して[4-5]、2つの由来の異なる変異の適応進化における役割を実験科学的に証明することを目的とした。

研究経過

進化のダイナミクスを理解するうえで集団のサイズ (集団内の個体数) は非常に重要な要素である。特に本研究課題では、新しい環境に既に適応的な standing variation を維持するのに十分な集団サイズであること、適応するための new variation を獲得するのに十分な集団サイズであること、が求められる。そのため、standing variation と new variation の直接比較を行う前に、予備実験として集団サイズが適応進化に与える影響を調べる進化実験を行った。実験は Lenski 研で 30 年間継続して行われている long-term experimental evolution (LTEE) の手法を基盤とし、大腸菌を継代する際の希釈率を変化させることで集団サイズと 1 日あたりに大腸菌が分裂する回数 (世代数) をコントロールし、希釈率の違いが最終的な適応度上昇に与える影響を調べた。また、進化をリアルタイムで追跡するために Ara- と Ara+ という異なる

る遺伝子マーカーを持つ大腸菌を混ぜた状態で進化実験をスタートし、3日毎にマーカーを検知できるプレートに進化途中の集団を撒いて、マーカーの割合の変化を調べた[6]。進化実験はLTEEと同じグルコース制限最少培地で行っており、Ara-とAra+のマーカー遺伝子はこの環境適応には影響しないことが先行研究でわかっている[5]。希釈率としては、LTEEで用いられている100倍、理論上適応変異の維持と獲得の効果を最大にすると期待される8倍を基準に、2倍と1000倍も用意し、それぞれ12のレプリカを用意して、計48集団を150日間継代し、進化させた。進化実験自体はすべての系列で150日間であるが、希釈率によって1日に経る世代数が異なる。2倍希釈は1世代、8倍希釈は3世代、100倍は約6.6世代、1000倍は約10世代と期待される。つまり、150日間の進化実験は2倍希釈の集団で150世代、8倍で450世代、100倍で1000世代、1000倍で1500世代の継代を重ねたと考えられる。

用意した12のレプリカは祖先系統であるREL606とREL607の冷凍ストックを一度培養プレートにまいて単離したそれぞれ12の系統から始めている。つまり、基本的にはREL606とREL607と同じゲノムを持つことが期待されるが、数個の変異が入っている可能性もあり、12のレプリカは異なる系統として扱っている。面白いことに、3番と5番の系統はすべての希釈倍率で同じようなマーカーの変化を見せており、特に最初の150世代（希釈倍率によって日数は異なる）はマーカーの割合までほぼ同じであった。これは、3番と5番の祖先系統のAra-かAra+のどちらかに選択を始める前にすでにグルコース制限最少培地に対する適応的な変異または有害な変異が入っていたために、片方のマーカーに選択が偏ってしまったためと考えられる。これを確かめるために、祖先系統の3番、5番のAra-とAra+の凍結ストックを利用して、元の祖先系統であるREL606またはREL607と競合培養を行い、それぞれの適応度を測定した。その結果、3番のAra-が顕著に適応度が低い事、5番のAra-が顕著に適応度が高い事が判明した。特に適応的な変異の数は有害な変異の数より少ないと考えられるため、選択圧のない状態でクローン単離した中に適応的な変異があった5番のAra-のような例は非常に珍しいと考えられる。また、進化150日目に48のラインからそれぞれクローンを単離し、適応度を計測し、適応度の値に関して分散分析

を行ったところ、希釈倍率に加えて、スタートの系統も最終的な適応度に影響している事が示唆された。ゲノムシーケンスをするまでは実際に12の系統それぞれにREL606・REL607とは異なる変異が存在するのか、それはどのような遺伝子に入った変異であるのか調べるのは困難であるが、数個の変異がその後の進化に与える影響を強く示唆する興味深い結果となった。

適応度の時系列変化を調べるために、進化90日目の適応度も測定し、150日目の適応度と比較したところ2倍と8倍の希釈倍率条件で平均適応度が減少していることがわかった。しかし、この適応度の変化は統計的に有意と言える差ではなかった。100倍と1000倍希釈に関しては適応度は上昇していたが、この変化も統計的に有意ではなかった。測定回数を増やす事で有意差を検出することも可能だが、今回は0日目の適応度と比較することで時系列変化を議論することが十分可能であると判断した。0日目の適応度は実際には測定していないが、12のレプリカ集団は4つの異なる希釈条件で同じであるため、0日目の平均適応度も4つの希釈条件で同じと考えられる。そのため、時系列変化は150日目の適応度データだけで議論できると考えられる。

150日目の適応度を4つの異なる希釈条件で比較したところ、100倍、1000倍、8倍、2倍の順で平均適応度が高いことが分かった。理論上は8倍で最も高い適応度が期待されたが、結果は異なるものとなった。適応度の対一比較では100倍と2倍、100倍と8倍の比較でのみ有意差がみられた。100倍と1000倍では希釈後の集団サイズに10倍もの差が、150日間の進化で約500世代の差があったが、適応度には顕著な差は見られなかった。

考察

集団サイズの変化は、standing variationの維持とnew variationの獲得との間でトレードオフの関係を生み出す。理論上、このトレードオフを克服し適応的な変異をより効率的に獲得できるのは8倍希釈系列で継代を行った場合であると予想された。しかし、実際に大腸菌を用いて実験進化を行った場合、150日目で最も高い適応度を獲得したのは100倍希釈系列の集団であった。1000倍系列でも100倍と同様の高い適応度が観察されたが、実験の煩雑性を考慮すると100倍が最も効率よく適応進化を促す希釈系列

であると考えられた。

その他の実験条件を変えた際にも同様の結果が得られるのかは明らかではない。特に今回の実験は new variation からの進化を想定したものであり、standing variation との比較を今回の条件で行うと new variation に有利に働く可能性がある。しかし、数ある先行研究の中で new variation が standing variation に勝ることを示唆する結果は非常に少なく [1-2]、直接比較を行う上で初期条件を new variation 優位に設定するのは妥当であると考えられる。このプロジェクトの次の段階として、standing variation が優位になる条件と new variation が優位になる条件を比較することが可能となるためである。

今後、今回の結果を踏まえて 100 倍希釈系で standing variation と new variation の直接比較を長期進化実験によって行う予定である。

参考文献

1. Sergey Kryazhimskiy, Daniel P. Rice and Michael M. Desai, 2012, Population subdivision and adaptation in asexual populations of *Saccharomyces cerevisiae*, *Evolution*, 66-6: 1931-1941
2. Carlos J.R.Anderson, 2012, The role of standing genetic variation in adaptation of digital organisms to a new environment, *Artificial Life*, 13: 3-10
3. Tadeusz J.Kawecki, Richard E.Lenski, Dieter Ebert, Brian Hollis, Isabelle Olivieri, Michael C.Whitlock, 2012, Experimental evolution, *Trends Ecol. Evol.*, 27-10: 547-560
4. Jeffrey E. Barrick and Richard E. Lenski, 2013, Genome dynamics during experimental evolution, *Nat. Rev. Genet.*, 14: 827-839
5. Richard E. Lenski, Michael R. Rose, Suzanne C. Simpson, and Scott C. Tadler, 1991, Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2,000 generations. *American Naturalist* 138:1315-1341
6. Jeffrey E. Barrick, Mark R. Kauth Christopher C. Strelhoff, and Richard E. Lenski, 2010, *Escherichia coli* rpoB mutants have increased evolvability in proportion to their fitness defects. *Molecular Biology and Evolution* 27:1338-1347

研究の発表

誌上発表

1. Minako Izutsu, Jack Dodson, Thomas LaBar and Richard E. Lenski, The effect of the population bottleneck on the rate of adaptation in experimental evolution with *Escherichia coli*, *in preparation*
2. Tanush Jagdish, Devin Lake, Minako Izutsu, Richard E. Lenski, Fine-Scale Analyses of Late-Term Adaptation in Asexual Populations, *in preparation*