

研究終了報告書

「自動培養装置と機械学習による細胞状態のフィードバック制御系の開発」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：芝井 厚

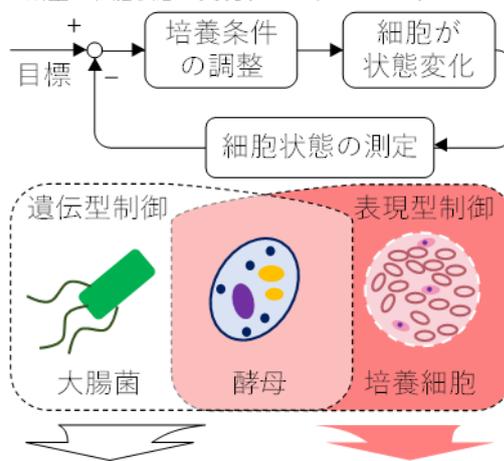
1. 研究のねらい

細菌や酵母などの微生物細胞は、その生息環境に応じて性質を変え、また集団としては環境に適応するように遺伝的に進化する。実験室内においては、そのような周囲環境としての細胞の培養条件について統制を取ることができる。そしてそのうえで様々な培養条件において、マルチオミックスのレベルで細胞システムあるいは細胞集団の表現型／遺伝型を網羅的に観察することができる。一方で、培養条件の検討は過去の知見や試行錯誤、実験者の手作業での職人技によるところが大きく、細胞システムを意のままに操るような制御手法はいまだ得られていない。また細胞の挙動は動的で複雑であるが、それに合わせて実験者がつきっきりで培養条件を動的に調整し続けるような手法もまた実現が困難であると考えられる。ここで近年、一部で取り入れられつつある実験の自動ハイスループット化により、細胞状態の予測と制御に工学的に取り組むことが可能となりつつある。

従来の分子生物学において、細胞システムとは実験操作と分析により仕組みを解き明かす対象であった。また細胞工学や進化工学はあくまで細胞システムをあらかじめ定めた所望の状態に作り替えることを目的としたいわば構築の工学であり、システムの動的な操作や安定化などを目指す制御工学的な視点を取り入れるには至っていなかった。しかしながら上述の通り生きている細胞は自発的な内部のダイナミクスも有する動的なシステムであり、任意の状態遷移や安定化などを実現・保障するためにはフィードバック構造を持つ制御系の構築が不可欠である。そのため、細胞状態の自動フィードバック制御系を構築することで、細胞システムを外部から動的に操作・安定化する新技術の基盤を開発することを本研究の目的とした(図1)。

ねらい：細胞状態の制御技術の開発

目標と現在との差分から環境を動的に変化させ、所望の細胞状態を実現するフィードバックループ



- ・次世代の進化工学
 - バイオ燃料生産など
 - 新規有用酵素の獲得
 - ・生物進化の実験的理解
- ・細胞状態の誘導/安定化
 - iPS細胞など再生医療
 - 難培養細胞の品質保証
 - ・発生機構の構成的理解

図1: 細胞の状態をフィードバック制御

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、実験室内で培養されている生細胞の状態をリアルタイムに観察しながらその培養環境を動的に自動制御することにより、細胞を所望の状態に向けて動的に制御する技術の開発を目指した。本研究では近年普及しつつあるラボオートメーション技術を用いて、細胞の状態に合わせて培養条件を自動フィードバック制御する系を、細菌の遺伝型、酵母の遺伝型／表現型などを制御対象として構築することとした。

初年度に、「フィードバック制御」において最もシンプルなもののひとつである比例制御(目標値と現在値の誤差に比例して操作量が決まる)を、所属先ラボの有する自動培養装置に実装する作業を行った。そして大腸菌の複数薬剤耐性進化の制御系の立ち上げを以下の通り遂行した。まずアミカシンとクロラムフェニコールの2種の抗生物質耐性に対応する2次元の耐性平面において、これらの交差感受性の制約を超えた進化を人為的に制御によって実現できるかを検証した。その結果、上記の関係を突破して両方の薬剤に耐性を持つ大腸菌進化株が得られた。

第二年度には、1年目に立ち上げた大腸菌の複数薬剤耐性進化の制御系を用いて動的制御の有効性を実証する実験を行った。クロラムフェニコール、カナマイシン、ノルフロキサシンの3種の抗生物質に対する耐性に対応する3次元空間において、祖先株大腸菌のプロファイルから放射状に広がるよう複数の進化目標を設定し、それぞれの目標に近づくよう環境制御実験を実施した。その結果、複数薬剤に同時に強くなる場合を含めいずれも設定した目標に近づいていくような進化の軌跡を実現することができた。また本年度はそのように細菌用に構築した進化制御系を実装できる自動培養装置に、真核生物である出芽酵母を供することを試みた。細菌に抗生物質を与えるとときと同様に出芽酵母に抗真菌薬を投与し、その自動植え継ぎによる適応進化実験を実施した。その結果、細菌のときと同様のセットアップで薬剤耐性菌を取得可能であることが確認できた。

最終年度である第三年度には、第二年度に立ち上げた酵母の進化実験系において、細胞が強く凝集して薬剤の効果が不安定になるという特有の問題があることを明らかにした。それに対して、用いている自動培養装置に強振とうユニットを新たに統合することでその問題が解決可能であることを示した。

(2) 詳細

研究テーマ「細菌・酵母の実験室内進化制御系の開発」

全体の研究期間を通して、大腸菌の複数薬剤耐性進化の制御系(図 2a)を用いて動的制御の有効性を実証する実験を行った。クロラムフェニコール、カナマイシン、ノルフロキサシンの3種の抗生物質に対する耐性に対応する3次元空間において、祖先株大腸菌のプロファイルから離れるようにいくつかの進化目標を設定し、それぞれの目標に近づくよう環境制御実験を実施した。また本年度はそのように細菌用に構築した進化制御系を実装できる自動培養装置に、真核生物である出芽酵母を供することを試みた。細菌に抗生物質を与えるとときと同様に出芽酵母に抗真菌薬であるアムホテリシンB(AMPH-B)を投与し、その自動植え継ぎによる適応進化実験を実施した。その結果、細菌のときと同様のセットアップで薬剤耐性

菌を取得可能であることが確認できた(図 2b)。これをもって最終年度、酵母の遺伝型／表現型の自動培養装置中での制御研究を進めるのと並行し、培養細胞の表現型に摂動を与える系も相同的に構築する。

これまでに上記で得られたような結果について、研究会等でたびたび発表を行った。また所属先研究室が参画している新学術領域や ERATO の領域会議などのクローズドな場で関連する結果などを報告した。今後、学術雑誌等へ本研究課題の成果発表を進める。今後、学術雑誌上での出版による本研究課題の成果発表を進める。

細胞と環境のフィードバックループ

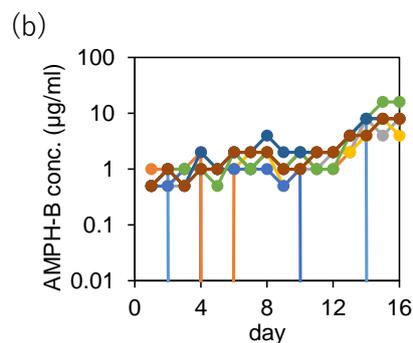
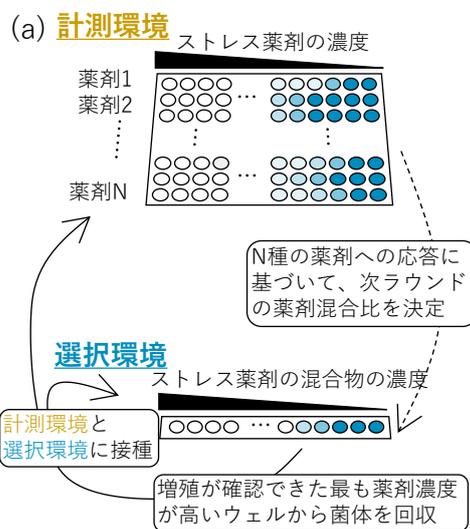


図2: (a) 複数薬剤の添加パターンを、細菌が各薬剤にどれほど耐性を示すかに応じて動的に制御するフィードバックループ。これを自動培養装置に制御器として実装した。(b) 出芽酵母S288C株に抗真菌薬アムホテリシンBをストレスとして与える耐性進化実験を自動培養装置を用いて行った結果の耐性上昇曲線。

3. 今後の展開

本研究において、ラボオートメーション技術に基づく細菌の薬剤耐性進化の制御は確立されつつある。今回は比較的制御が容易と期待できる薬剤の組み合わせを選択していたが、今後は臨床の現場などにおける薬剤耐性菌・多剤耐性菌の出現抑制の文脈からより社会的インパクトがあると考えられる問題設定を準備し、その制御に取り組む。ここで、対象とする細菌も現在はもっとも一般的なモデル生物である大腸菌を用いたが、病原菌である緑膿菌やその近縁主などより医学的位置づけのはっきりした生物についても扱うことで研究を発展させる。さらに、現行の進化制御システムは大型でその周囲を覆うことができないため好気的な条件下での細菌しか扱うことができないが、装置の小型化に取り組んで嫌気条件でも使用可能とすることで、腸内細菌叢の制御や電気細菌の培養など、社会的な需要がたかまりつつある分野への実装を進める。

4. 自己評価

研究目的の達成については大きく分けて細菌、酵母、培養細胞の3段階のうち酵母までしか進まず、別のプロジェクトで培養細胞を扱っているとはいえその達成状況については反省がある。原

因は大きく分けて 2 つで、一つは自分自身が達成目標を大きく設定したことであり、今後、自身や他者の研究ペースをより正確に見積もれるよう研鑽していきたい。もう一つは新型コロナウイルスの流行による長期的な物流の乱れであるが、そのような世相の乱れ自体に対してロバストな研究推進力を習得・発揮できるよう努力していきたい。また実験結果自体は価値のあるものが多く得られたので、できるだけ早くそれらの成果について順次論文出版していきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

総説・学会発表

芝井厚, “実験室内で細菌の進化を観察・制御する”, 生物工学会誌『バイオメディア』, 99(9), 2021.

○芝井厚, 古澤力, “細菌の複数薬剤耐性実験進化をラボオートメーションでフィードバック制御する”, 2022 年日本バイオインフォマティクス学会年会, P-1, 千里ライフサイエンスセンター, 2022 年 9 月

○芝井厚, 古澤力, “細菌の薬剤耐性空間上の進化軌跡を自動フィードバック制御する”, 日本進化学会第 24 回大会, P-26, プラサヴェルデ, 2022 年 8 月

○芝井厚, 武藤愛, “2000 万円の機器の機能を別の 2000 万円の機器に 5000 円くらいで足す”, Laboratory Automation 月例勉強会, オンライン開催, 2021 年 11 月