様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月 ２０ 日現在

機関番号：１４６０３
研究種目：基盤研究(A)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｈ０２４８５

研究課題名（和文）細胞の生存　-　自然界における大腸菌の場合

研究課題名（英文）Survival strategy of a cell; intra- and inter-species interaction analysis by barcode tchnology in Escherichia coli

研究代表者

森　浩禎（Mori, Hirotada）

奈良先端科学技術大学院大学・データ駆動型サイエンス創造センター・教授

研究者番号：９０１８２２０３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　35,080,000円

研究成果の概要（和文）：長期定常状態、非致死濃度の抗生物質あるいは細胞毒性を持つ化学物質を含む培地中の個体数変動を、分子バーコード欠失株の混合培養での定量法を確立した。培養3週間の約4000遺伝子欠失株の個体数変動を定量し、予想以上の変動を確認した。細胞毒性を持つ抗生物質や化学物質を含む培地中での欠失株の変動解析により、遺伝子と各種薬剤との高効率な相互作用解析を可能にし、その細胞毒性の分子機構解明に対して非常に有効であることを実証した。さらに二重欠失株による非必須遺伝子の網羅的遺伝的相互作用解析及びCRISPRiによる必須遺伝子を含めた遺伝的相互作用解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
全ての欠失株の混合培養による生育モニター手法の確立を行なった。この基盤技術は、これまでの大腸菌の研究の蓄積を活用し、さらに抗生物質や毒性を示す化合物と遺伝子欠失との相互作用解析が可能になったことで、薬剤や毒性物質の細胞内分子機構解明への新たな研究開発の展開を可能にした。

研究成果の概要（英文）：We have constructed the single gene knockout library of E. coli with 20nt random sequence as molecular bar-code. And we have established the method to monitor the population changes of each of single gene deletion strains in variety of growth condition using molecular bar-code and NGS technologies. Out of 4000 genes, two independent knockout isolates of 3600 genes using lambda RED method had been constructed. 7000 deletion strains carrying different bar-codes were mixed and grown in variety of different condition, such as long time incubation in LB up to three weeks, sub-lethal level of antibiotics or toxic compounds in LB to monitor their population changes. We successfully showed the valuableness of this new bar-code deletion library to monitor their population changes. And the quantitative trace method of each of genes' knockout strains in the mixed culture opened the door to the novel analysis way to the resistance, persister or toxicity mechanisms of cells and chemical compounds.

研究分野：システム生物学

キーワード：大腸菌　分子バーコード　population dynamics　混合培養液　遺伝的相互作用　CRISPRi　必須遺伝子　網羅解析

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

細胞の生育の大半は定常期であり、その生活環の中で対数増殖を行う時期は非常に限定されている。さらに単独で生育しているわけではなく、絶えず周辺の他生物種との相互作用を繰り返す。この環境を生延びる為に、「どのように増殖が始まり、何故増殖が止まるのか」は、生命活動を考える上で非常に重要であるにもかかわらず、意外なほど注意が払われてこなかった。自然界での生活環は、増殖と非増殖の繰り返しであり、自然界での微生物の役割、宿主生命体との共生関係や病原性の研究、物質生産効率化等、細胞増殖時以外の生命活動解明は、古いがきわめて新しい問題である。

定常期とその前後では遺伝子発現変化のみならず、タンパク質分解や修飾の重要性も考えられる。そして定常期では増殖速度を表現型とした変異株の解析が出来ない。さらに解析対象物質の安定性、量的確保の難しさ、機器の感度の問題もあるが、近年の測定技術の進歩は目覚ましい。このような状況の中、細胞内における機能ネットワークの分子基盤の上で、生物及び化学環境との相互作用の解析を可能にしたい。

２．研究の目的

自然環境下での生命は、化学的、物理的環境変動の中を、周辺に共存する生物種と競合、協調など絶えず相互作用を繰り返し生存する。大腸菌は、その名の由来の様に本来の生存の場は哺乳動物の腸内と考えられるが、実際には、土壌、湖沼等広く分布し、動物体内との間を循環している。その間、宿主生物との相互作用のみならず、周辺のファージや微生物種との相互作用を繰り返し、環境を生き抜く。自然環境下の生命の生存戦略を考える上で、対数増殖期は非常に短く、分裂をしない期間が続くことは、全ての生命に当てはまる。「細胞とは」という基本問題は、全ての細胞増殖期における他生物種との相互作用による生理機能ネットワーク変動の解析である。これまでの機能ネットワーク解明の取組み及び解析技術の格段の進展により、細胞分裂開始から対数増殖期、定常期、死滅期、長期定常期を経て分裂再開する細胞の定量的な解析が可能になった。開発済み網羅的リソースを活用し、種内及び種間の相互作用を、大腸菌遺伝的背景の違いによる相互作用の定量解析を可能にし、その分子基盤の解明を可能にする基盤確立を行い、細胞内機能ネットワークの動態解析と繋げ、細胞の普遍的生存戦略に迫る。

３．研究の方法

(1) 分子バーコード欠失株を用いた網羅解析

20 塩基のランダム配列を薬剤耐性遺伝子断片上に導入した大腸菌一遺伝子欠失株ライブラリーの構築を行った。そのライブラリーを、それぞれ独立に一晩培養したものを等量ずつ混和し、混合培養液を作製し、グリセロールストックとして保存する。この混合培養液を用いて、目的に応じた生育環境で培養を行う。分取したサンプルから染色体 DNA を回収し、バーコード領域のみを増幅する primer により調整する。primer の持つ配列決定用アダプターから配列決定を Illumina HiSEQ を用いてバーコード領域の頻度を計算する。その頻度を用いて、各培養液における欠失株の population 分布の解析を進める。

(2) 遺伝的要因の細胞生育に与える影響の High-throughput 測定

初年度に同定した変異を、親株に移す作業を進め、責任変異の同定を進める。モデル化グループとの連携で、変異の知見をモデルに反映する作業を共同で進める。2 重欠失による遺伝的ネットワーク解析を継続し、データの蓄積と解析を着実に進める。炭素源の違う環境では、100 遺伝子と全遺伝子との組合せを終了予定とする。

(3) 宿主腸内環境及び異種間競合時における遺伝的要因が生育に与える影響の測定

作製したバーコード欠失株に Streptomycin 耐性能を持つ rpsL 変異を、接合により導入する。バーコード欠失株と同じ宿主に rpsL 変異を P1 transduction 法を用いて導入する。その後 CIP（我々が開発した宿主大腸菌の性制御プラスミド）を染色体に挿入することで Hfr 化を行う。この rpsL 変異を持つ Hfr 株とバーコード欠失株を接合させ、rpsL 変異による Sm 耐性及びバーコード欠失株の Cm 耐性の二重選択により rpsL 変異を効率的に導入する。その後単一コロニーを選択し、染色体構造を PCR で確認することで Sm 耐性を持ったバーコード欠失株ライブラリーの構築を行い、Mouse を用いた in vivo 解析に供する。

４．研究成果

(1) 分子バーコード欠失株による細胞生育に与える影響の網羅解析

これまで 20 塩基の分子バーコードを導入した一遺伝子欠失株ライブラリーの構築を行い、その混合培養液中の各欠失株の量的変動をシーケンサーを用いて解析を可能にし、長期定常期、化学物質を含む培地及び非致死的な濃度での抗生物質を含んだ LB 培地中の各欠失株の変動解析を行った。

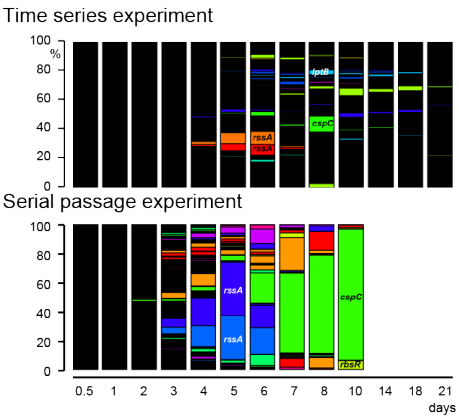
① LB 培地中 3 週間という長期間の定常期での培養中の各遺伝子欠失の量的変動解析

修復関連の遺伝子欠失株を除く全バーコード欠失株を混合し、LB 培地に殖菌し、培地交換せず 37°C3 週間培養を続ける。その間経時的に培養液を分取し、その半量から細胞を遠心で集菌し染色体 DNA を精製を行い、分子バーコード領域を PCR で取得する。残る半量を新しい LB 培地に希釈し、OD600=1 になるまで培養を行い、同様に染色体 DNA を精製し、バーコード領域を取得する。図に示すように、欠失を作る際の薬剤耐性断片に存在し、分子バーコードの両端は全

ての欠失株で同じ配列を持つため、一つの primer セットでバーコード領域を増幅することが可能である。
増幅したバーコード領域をシーケンサーで読み、予め決定しているバーコード配列と比較することで、欠失株の培養液中での population を定量する。その結果、定常期中においても各欠失株の population の変動を観察することが可能となった。

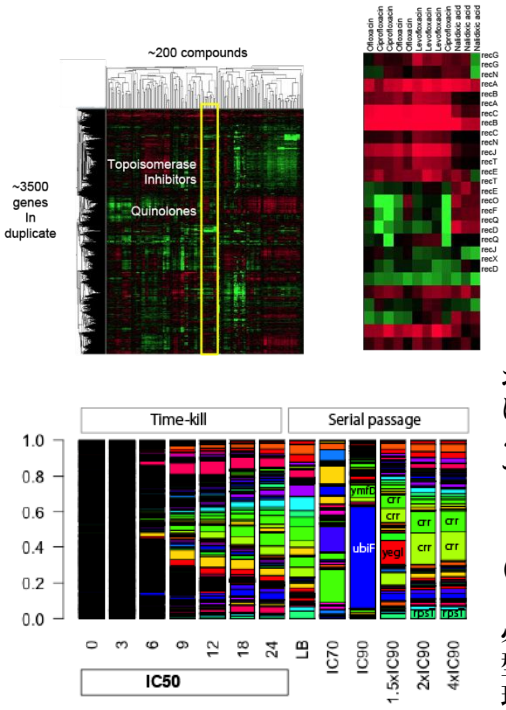
② 化学物質を含む培地での欠失株の変動

①と同様に、混合培養を、非致死性の濃度の各化学物質を含む培地で一定時間培養後、バーコード領域を調整し、シーケンス解析により頻度分布の解析を行う。クラスター解析を行い、図で示す結果を得ている。現在は 200 を超える化学物質での解析結果を得た段階である。また試験的に NIH の抗がん剤等に利用される化学物質ライブラリーを用いて、選択した欠失株ライブラリーを用いて同様の実験を行なっている。結果を得られて来ており、現在解析を進めている段階である。一部、チリにおいて深刻な鉱山汚染の原因の一つとなっているテルルの細胞毒性機構の解明にもバーコード欠失株ライブラリーでのスクリーニングを行い、その細胞死を引き起こす分子機構の解明を行った（文献）。



③ 薬剤を含む培地での欠失株の変動

Gentmycin, Kanamycin, streptomycin, Tetracyclin, Ciprofloxacin, Nalidixic Acid 及び Tripethopurim を含んだ LB 培地で、IC50 で 24 時間の population 変動を、さらに IC50 で培養した 24 時間後の培養液を高濃度の薬剤を入れた培地に移し、耐性株の変動の解析を行った。結果は図に示す。

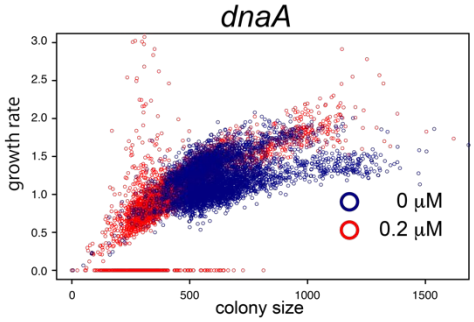


以上、分子バーコード欠失株ライブラリーの有用性を示すことができ、現在はその解析を進めている。

さらに Mouse を利用した in vivo 解析を計画しており、全てのバーコード欠失株に、Mouse の無菌化において使用される Streptomycin の耐性を持たせる必要がある。その為、現在 Streptomycin 耐性を示す rpsL 変異を、接合により移動させている。

(2) 二重欠失株による遺伝的相互作用解析

二重鎖切断能を持たない変異型 Cas9 を利用して、必須遺伝子の knockdown 株作製を行った。接合移動型 Plasmid から、発現誘導型プロモーターによる発現制御可能な dCas9 及びターゲット遺伝子の N 末側に設計した gRNA を構成的に供給する系の開発を行った。誘導剤である aTc の量に応じて dCas9 の存在量が増え、その結果必須遺伝子の発現が抑えられる。これらの plasmid を、一遺伝子欠失株ライブラリーである Keio collection と接合でシステマティックに組合せ二重変異株を得る。その後、dCas9 の供給量を調整することで、網羅的な必須遺伝子の遺伝的相互作用解析を可能にした。
最初の 24 必須遺伝子の解析が終了し、現在、残る約 300 の必須遺伝子の解析を順次進めている。



(3) 代謝モデル最適化手法の開発及びグリコーゲン合成のシミュレーションによる解析

① 動的モデルによる局所モデルと制約モデルによるグローバルモデルとの統合化を進め、その結果は国際共同研究として公表した。大腸菌は PTS 経路を利用してグルコースを外部より取り込む。Petri ネットを利用し、PTS 経路の動的モデルを記述した。その上で、各中間代謝物質の量を、グローバルモデルである Palsson らの FBA モデルの対応する物質の入力とすることで、動的モデルと制約モデルによるシミュレーション実験を行い、統合化モデルの有用

性を示した。

②近年の合成生物学的技術の発達に伴い、有用化合物を生産する最小の代謝ネットワークのデザインが非常に重要になる。そこで、細胞の成長率と目的化合物の生産率に関する制約を小さなグリッドを用いて表現し、グリッドごとに最小の代謝流束分布を計算して、最適な代謝のデザインを見つける手法の開発を行った。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 13 件）

1. R. Sugimoto, N. Saito, T. Shimada, K. Tanaka, Identification of YbhA as the pyridoxal 5'-phosphate (PLP) phosphatase in Escherichia coli: Importance of PLP homeostasis on the bacterial growth. The Journal of general and applied microbiology 63, 362-368 (2018). PubMed: 29187681, 査読有
2. T. Tamura, W. Lu, J. Song, T. Akutsu, Computing Minimum Reaction Modifications in a Boolean Metabolic Network. IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform 15, 1853-1862 (2018). PubMed: 29989991, 査読有
3. T. Tamura, Grid-based computational methods for the design of constraint-based parsimonious chemical reaction networks to simulate metabolite production: GridProd. BMC Bioinformatics 19, 325 (2018). PubMed: 30217144, 査読有
4. M. Murata, A. Ishii, H. Fujimoto, K. Nishimura, T. Kosaka, H. Mori, M. Yamada, Update of thermotolerant genes essential for survival at a critical high temperature in Escherichia coli. PloS one 13, e0189487 (2018). PubMed: 29485997, 査読有
5. L. Maier, M. Pruteanu, M. Kuhn, G. Zeller, A. Telzerow, E. E. Anderson, A. R. Brochado, K. C. Fernandez, H. Dose, H. Mori, K. R. Patil, P. Bork, A. Typas, Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. Nature 555, 623-628 (2018). PubMed: 29555994, 査読有
6. G. Almagro, A. M. Viale, M. Montero, F. J. Munoz, E. Baroja-Fernandez, H. Mori, J. Pozueta-Romero, A cAMP/CRP-controlled mechanism for the incorporation of extracellular ADP-glucose in Escherichia coli involving NupC and NupG nucleoside transporters. Scientific reports 8, 15509 (2018). PubMed: 30341391, 査読有
7. M. Sato, T. Suzuki, M. Kawano, M. Tamura, Circulating osteocyte-derived exosomes contain miRNAs which are enriched in exosomes from MLO-Y4 cells. Biomed Rep 6, 223-231 (2017). PubMed: 28357077 , 査読有
8. T. Nishihara, J. Inoue, S. Tabata, S. Murakami, T. Ishikawa, N. Saito, S. Fukuda, M. Tomita, T. Soga, Synthetic Biomarker Design Using Analyte-Responsive Acetaminophen. Chembiochem : a European journal of chemical biology, (2017). PubMed: 28236354, 査読有
9. M. Yumura, N. Yamamoto, K. Yokoyama, H. Mori, T. Yomo, N. Ichihashi, Combinatorial selection for replicable RNA by Qbeta replicase while maintaining encoded gene function. PloS one 12, e0174130 (2017). PubMed: 28328998, 査読有
10. E. H. Morales, C. A. Pinto, R. Luraschi, C. M. Munoz-Villagran, F. A. Cornejo, S. W. Simpkins, J. Nelson, F. A. Arenas, J. S. Piotrowski, C. L. Myers, H. Mori, C. C. Vasquez, Accumulation of heme biosynthetic intermediates contributes to the antibacterial action of the metalloid tellurite. Nat Commun 8, 15320 (2017). PubMed: 28492282, 査読有
11. H. Wu, A. v. Kamp, V. Leoncikas, W. Mori, N. Sahin, A. Gevorgyan, C. Linley, M. Grabowski, A. A. Mannan, N. Stoy, G. R. Stewart, L. T. Ward, D. J. Lewis, J. Sroka, H. Matsuno, S. Klamt, H. V. Westerhoff, J. McFadden, N. J. Plan, A. M. Kierzek, MUFINS: multi-formalism interaction network simulator. npj Systems Biology and Applications 2, 16032 (2016). PubMed:28725480, 査読有
12. T. Kosaka, M. Murata, M. Yamada, Survival strategy of Escherichia coli in stationary phase: involvement of σE-dependent programmed cell death. INTECH, (2016). DOI:10.5772/67672, 査読有
13. H. Wu, A. von Kamp, V. Leoncikas, W. Mori, N. Sahin, A. Gevorgyan, C. Linley, M. Grabowski, A. A. Mannan, N. Stoy, G. R. Stewart, L. T. Ward, D. J. M. Lewis, J. Sroka, H. Matsuno, S. Klamt, H. V. Westerhoff, J. McFadden, N. J. Plant, A. M. Kierzek, MUFINS: multi-formalism interaction network simulator. NPJ Syst Biol Appl 2, 16032 (2016). PubMed: 28725480, 査読有

〔学会発表〕（計 48 件）

2018 以降のみ記載

1. 大田菜都子、大澤歩、高坂智之、山田守、大腸菌における SulA 依存性溶菌に関与する遺伝子の解明（Elucidation of the genes responsible for SulA-dependent）、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019
2. 川野 光興，石本 巧，齊藤 峰輝、Type Ⅰトキシン－アンチトキシン系の巧妙な遺伝子発現制御機構、第 13 回ゲノム微生物学会年会、2019
3. Tomoyuki Kosaka, Understanding the thermotolerant mechanisms in mesophilic bacteria: essential genes for survival at critical high temperature and physiological and genetical characteristics of thermo-adapted mutants from ethanologenic bacterium, Final Joint Seminar of CCP, 2018
4. Takeyuki Tamura, Grid-Based Computational Methods for the Design of Constraint-Based Parsimonious Chemical Reaction Networks to Simulate Metabolite Production, Gridprod COBRA conference 2018, 2018
5. 森 浩禎，シンポジウム「多次元速度論からの生物の理解」，第 91 回日本生化学会大会，2018
6. 武藤愛、田中雄一郎、野﨑麻希、森浩禎，大腸菌合成致死遺伝子の網羅的検出による未知代替経路の探索，第 91 回日本生化学会大会，2018
7. 松野 浩嗣，大域代謝モデルのペトリネット制御シミュレーションによるジオキシー現象解析，化学工学会第 50 回秋季大会，2018
8. 田村 武幸，Computational methods for design of metabolic networks for production of valuable compounds，生命医薬情報学連合大会，2018
9. 田村 武幸，有用化合物を生産・増産する代謝ネットワークを設計するアルゴリズム,情報処理学会バイオ情報学研究会，2018
10. Mitsuoki Kawano, Identification and characterization of Escherichia coli small, noncoding RNAs Seminar at University of Parma, 2018
11. 田村 武幸，有用物質を生産・増産する準最適な代謝流束均衡モデルのデザイン，日本生物工学大会，2018
12. Hiroshi Matsuno, Keita Kouyama, Adrien Faure Boolean modeling of metabolic networks: application to the phosphotransferase system The 23rd International Technical Conference on Circuit/System, Compmuters and Communications, 2018
13. Koumei Arima, Masashi Kubota, Ayaka Sugii, Manabu Sugii, Hiroshi Matsuno, Simulation analysis of diauxic shift in Escherichia coli using a large scale metabolic network model The 23rd International Technical Conference on Circuit/System, Compmuters and Communications 2018, 2018
14. 川野 光興，齊藤 峰輝，トキシン-アンチトキシン遺伝子を活用した多剤耐性菌の生育抑制法の開発，第 91 回日本細菌学会総会，2018
15. 川野 光興，齊藤 峰輝 大腸菌の複数の遺伝子発現を同時に制御できるアンチセンス RNA，第 12 回日本ゲノム微生物学会年会，2018

〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0 件）

○取得状況（計　0 件）

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：山田　守
ローマ字氏名：(YAMADA, mamoru)
所属研究機関名：山口大学
部局名：創成科学研究科
職名：教授
研究者番号（8 桁）：30174741

研究分担者氏名：松野　浩嗣
ローマ字氏名：(MATSUNO, hiroshi)
所属研究機関名：山口大学
部局名：創成科学研究科

職名：教授
研究者番号（8 桁）：10181744

研究分担者氏名：田村　武幸
ローマ字氏名：(TAMURA, takeyuki)
所属研究機関名：京都大学
部局名：化学研究所
職名：准教授
研究者番号（8 桁）：00437261

研究分担者氏名：片岡　正和
ローマ字氏名：(KATAOKA, masakazu)
所属研究機関名：信州大学
部局名：学術研究院工学系
職名：准教授
研究者番号（8 桁）：90332676

研究分担者氏名：牧　泰史
ローマ字氏名：(MAKI, yasushi)
所属研究機関名：大阪医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8 桁）：60401733

研究分担者氏名：斎藤　菜摘
ローマ字氏名：(SAITO, matsumi)
所属研究機関名：鶴岡工業高等専門学校
部局名：物質工学科
職名：准教授
研究者番号（8 桁）：50287546

研究分担者氏名：川野　光興
ローマ字氏名：(KAWANO, mitsuoki)
所属研究機関名：川崎医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8 桁）：00455338

(2)研究協力者
研究協力者氏名：高坂　智之
ローマ字氏名：(KOSAKA, tomoyuki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。