

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570225

研究課題名(和文) 耐熱進化時に発現する新規クオラムセンシング機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the novel quorum-sensing mechanism observed in thermo-tolerant evolution process

研究代表者

岸本 利彦 (KISHIMOTO TOSHIHIKO)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：90339200

研究成果の概要(和文)：

大腸菌の45℃適応進化時に現れるクオラムセンシング様の相互作用に関して、クオルモン様の相互作用物質の同定・解析、相互作用の生理的解析、45℃適応進化大腸菌におけるゲノム解析による変異解析を行い、45℃適応は43℃適応までと同等の変異速度で達成された後、極端な変位速度の向上が見られたこと、発見した相互作用は45℃適応過程特異的なものであり乳酸が主要な役割を果たしている可能性があることを発見した。また、相互作用は、45℃適応進化初期に強く表れ適応と共に弱まってゆくことが示された。

研究成果の概要(英文)：

Intercellular interaction observed in thermo-tolerant evolution process of *E. coli* was quorum sensing like growth regulation. This interaction was mainly driven by lactic acid as quorumon. This interaction appeared strongly in early phase in 45 degree adaptation and decreased evolution time-dependently.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・進化生物学

キーワード：大腸菌、耐熱進化、クオラムセンシング、相互作用

1. 研究開始当初の背景

生物は外部環境との絶え間ない相互作用の下、活動している。しかし相互作用が進化過程でどのように生じ、進化にどのように影響してきたかは明らかではない。進化説はダーウィンによる自然選択、木村による遺伝子中立進化が一般的であるが、それだけでは相互作用と進化に関し詳細な説明はできていない。このため進化を実験室で再現し、相互作用が進化にどのように影響するかを解析・考察することは非常に重要である。しか

しながら研究開始当初の背景は以下のようなものであった。

生物は外部環境との相互作用や共生を通じて進化してきたとされているが、実際に実験室進化系を用いた進化過程で生体間相互作用を検出・解析した例は少ない。四方らは、細胞性粘菌と大腸菌が栄養飢餓に近い状態では共生状態を構築し、大腸菌は遺伝子発現状態を変化させることで適応することを報告している(Matsuyama SI., *et al.*, *Biosystems*, 73, 163-171, 2004)。また、柏木らはグルタミン

等の栄養物の分泌・受容を介した「競争的共存」により集団中に遺伝子の多様性が保持されることを報告している (Kashiwagi, A., *et al.*, *J. Mol. Evol.*, 52, 502-509, 2001)。しかしながら、相互作用の中でも低分子物質の分泌→検出→協調的遺伝子発現誘導を伴うクオラムセンシングに関しては、実験室適応進化系の中からクオラムセンシング能の獲得を実際に観察・解析した報告はない。

クオラムセンシングと進化に関しては、クオラムセンシング関連遺伝子の遺伝的系統解析がなされている (Lerat, E. & Moran, N.A., *Mol. Biol. Evol.*, 21, 903-913, 2004) が実際の進化過程を追跡したものではない。また、ある種の細菌のフェロモン誘導性反応は、プラスミド依存的で遺伝子の水平移動が関連していることが示唆されている (Dunny, G.M., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Bio. Sci.*, 362, 1185-93, 2007)。我々の実験系は、プラスミドを持たない単一コロニー由来の大腸菌の連続耐熱進化系であり、観察されるクオラムセンシングは水平移動で生じるものではなく、他生物種によらない純粋な進化的獲得形質である。

クオラムセンシングを誘導するクオルモンに関しては、緑膿菌等における Acyl-Homoserine Lactone (Fuqua, C., *et al.*, *Annu. Rev. Genet.*, 35, 439-468, 2001) や Autoinducer-2 (Waters, C.M. & Bassler, B.L., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 319-346, 2005) 等が報告されているが、直接進化に関連したクオルモンは報告されていない。

大腸菌の耐熱進化に関しては、43°Cが安定増殖の最高温度であり (Bennett AF., *et al.*, *EXS*, 83, 135-154, 1997)、44°Cでは大腸菌細胞質タンパク質変性により生育不可能となる (Gur, E., *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 46, 1391-1397, 2002) 等、多数の報告があるが、これまでに 45°C以上に耐熱進化した大腸菌の報告はない。また、耐熱進化における研究の多くは、耐熱性を獲得した株とその元株との表現型比較であり、進化過程で生じる連続的体変化の生化学的・生理学的解析は例がない。本研究では、クオラムセンシング機能獲得前後におけるクオルモンの有無による大腸菌の生理状態変化の連続測定・解析を行う。

以上のことから、本研究はこれまでに観察されていない現象を題材とし、進化と相互作用の相関を新たな側面から解析する非常にオリジナリティの高い研究であると考えられ、研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究では、耐熱進化で出現するクオラムセンシングに関する誘導物質 (クオルモン) の同定・機能解析 (合成物・誘導體による活性確認)、細胞へのクオルモン作用による細胞

レベルの応答機構解析、を行い、クオラムセンシング機構がどのように進化したか、他の生物でどのように保存されているか等の進化的解析を行うことを目的とした。具体的には、

- ・クオルモンの同定によりクオルモン機能を解明する。
- ・クオルモンの有無による細胞レベルの状態変化 (大腸菌サイズ、内部構造、タンパク質発現等) をフローサイトメーターを用いて明らかとする。さらに高温適応進化時にクオラムセンシングが細胞内部環境にどのような影響を与え、生理的に細胞がどのように変質してゆくかを解析する。
- ・クオルモン合成経路を解析し、クオラムセンシング発現機構を明らかとする。
- ・他生物種におけるクオラムセンシング機構の進化的保存性を、関連遺伝子の比較解析により明らかとする。
- ・クオルモンの機能の多面性を検討し、自然界におけるクオルモンの役割を検討する。

以上の結果を総合的に考察し、細胞間相互作用と進化の相関を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 耐熱進化大腸菌の構築

進化の出発大腸菌として *DHI AleuB:: (gfpuv5-km')* を用いた。培養の培地は、modified M63 medium (62 mM K₂HPO₄, 39 mM KH₂PO₄, 15 mM ammonium sulfate, 1.8 mM FeSO₄·7H₂O, 15 mM thiamine hydrochloride, 0.2 mM MgSO₄·7H₂O, and 22 mM glucose) に 2 mM leucine (Wako), 25 mg/mL of kanamycin sulphate (Sigma) を加えたものを使用した。培養は、各温度で 24 時間後の OD₆₀₀ が 0.1~0.2 となるよう対数増殖を維持しながら毎日継代培養を行った。24 時間で 0.1 を超えない場合は、更に 24 時間培養を行った。43°C 以上で 2 日以上増殖がみられない場合は、24 時間 37°C に戻して培養し、菌数が増えた後、適応温度での培養を再開した。増殖速度は、 $\mu(1/h) = \ln(OD_{600} \text{ at } 24 \text{ h}) / OD_{600} \text{ at } 0h / \text{culture time (h)}$ にて算出した。

(2) クオルモンの同定

-80°C グリセロールストックを起こし、mM63 培地で 44.6°C で 2 回継代培養した大腸菌を種菌として 1 l の mM63 培地に植菌し 24 時間 44.6°C で培養後、遠心分離により上澄みを回収した。回収した上澄みは、0.22 μm フィルター滅菌を行った後、エバポレーションにより 100ml まで濃縮した。濃縮後、Sephadex LH20 (GE Health Science) カラムクロマトグラフィー (Bed vol: 150ml) により分画を行った。活性分画をエバポレーション後、Gel

Permeation Chromatography (GPC)により分画し最終的な生成物を得た。

(3) バイオアッセイ

培養上澄みおよび精製分画はそれぞれ、バイオアッセイにより活性成分を検出した。その手順は、5ml mM63 培地 (+ Leu, Km)を標準培地として用い、バイオアッセイ対象は、1mlの培地を抜き取り、代わりに上澄み 1ml もしくは精製分画を溶解した mM63 培地 1ml を添加した後、植菌し、24 時間後の OD600 を測定した。上澄み、精製分画を添加していない mM63 培地のみで培養した大腸菌をコントロールとし、培養 24 時間後の OD600 の相対比率を求め、増殖誘導活性とした。

(4) 構造解析

バイオアッセイにより増殖誘導活性が見られた分画の ^1H NMR および ^{13}C NMR を 300 MHz NMR (Bruker Avance 300) を用いて測定した。得られたスペクトルから、分画に含まれる化合物の構造を推定した。複数の化合物が候補として考えられたため、市販の試薬のスペクトルと比較し、最終的に相互作用分子の構造を決定した。

(5) 相互作用解析

耐熱進化過程の各大腸菌をバイオアッセイの手順に従い、上澄みもしくは乳酸およびその誘導体を 20% (v/v) で加えた培養系で培養し、24 時間後の OD600 および 1 時間毎の Flow cytometry (FCM) による細胞数と細胞分布の解析を行った。FCM による細胞解析は、一定濃度の 2.0 μm 赤色蛍光ビーズ (Polyscience) と培養液を混合し FACS 解析を行い、検出されたビーズ数と大腸菌数から大腸菌濃度を算出した。

4. 研究成果

(1) 耐熱進化大腸菌におけるゲノム変異解析

大腸菌耐熱進化過程で明確な相互作用が見られるようになったのは、45 $^{\circ}\text{C}$ 適応過程からである。このため、大腸菌の進化過程における変異情報を得るために、45 $^{\circ}\text{C}$ 適応過程の大腸菌に関してゲノム解析を行い以下の結果を得た。

解析に使用した株は、進化前の先祖株 (Anc), 37 $^{\circ}\text{C}$ で長期培養した株 (37L), 41 $^{\circ}\text{C}$ 適応し 43 $^{\circ}\text{C}$ に培養温度を変化させる直前の分岐点株 (41B), 43 $^{\circ}\text{C}$ 適応し 45 $^{\circ}\text{C}$ に培養温度を変化させる直前の分岐点株 (43B), 45 $^{\circ}\text{C}$ で 88 日培養し 45 $^{\circ}\text{C}$ にかなり適応した株 (45A), 45 $^{\circ}\text{C}$ に完全に適応した最終適応株 (45L) を使用した。これらの株の系譜を図 1 に示す。

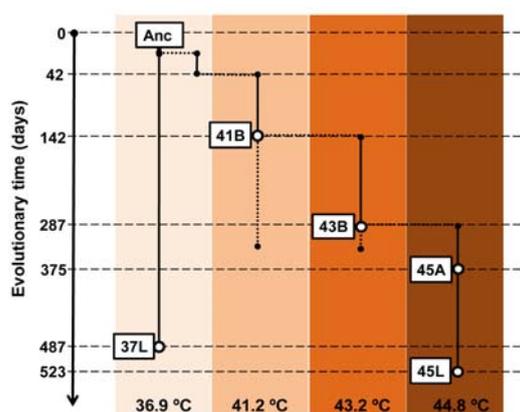


図 1 解析に使用した耐熱進化と解析対象株

これらの株の耐熱進化過程における増殖速度の変遷を図 2 に示す。全ての過程で、培養温度変化後初期の早い増殖速度の回復過程とそれに続くゆっくりとした増殖速度の増加を示す過程が存在することが確認された。

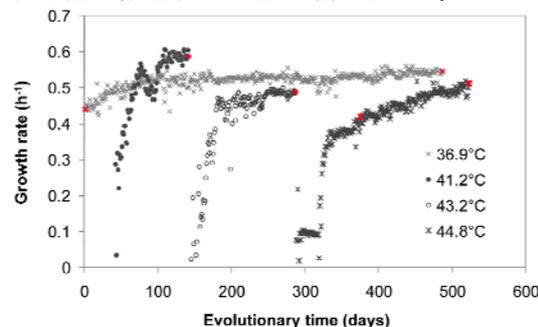


図 2 大腸菌高温適応進化過程での増殖速度の変遷
赤の印はそれぞれ解析に使用した株を示す。

タイリングアレイの変異解析結果を生データレベルで統計的再解析し、サンガー法も用いて全変異に対してシーケンスを行って、ゲノム変異を確定し、1塩基置換以外に、挿入と欠損配列も同定した。

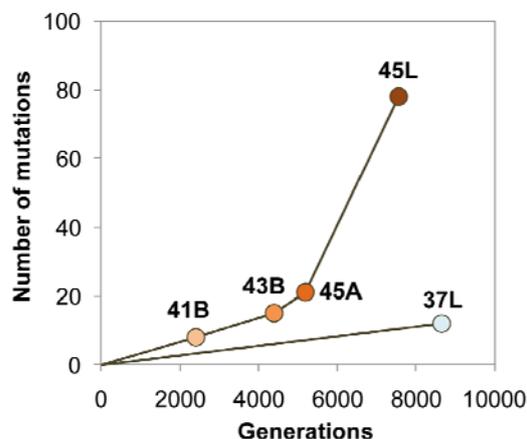


図 3 進化過程の世代数と変異数の相関

その結果を図 3 に示したが、各進化過程での変位速度は図 3 の傾きで与えられる。耐熱

進化過程では37°Cでの長期培養に比べ変異の数の増加が速いが、特に45Aから45Lの過程において非常に変異が増加していることが明らかとなった。

これをまとめたものが Table 1 である。

Table 1. Mutations occurring in the various evolution periods.

Evolutionary period	Number of SNPs	Number of InDels
Anc→37L	7	5
Anc→41B	6	2
41B→43B	3	4
43B→45A	7	4
45A→45L	46	11

The numbers of the single-nucleotide substitution (SNPs) and the small insertion and/or deletion (InDels) occurring in the various evolution periods were summarized. No large InDel was detected.
doi:10.1371/journal.pgen.1001164.t001

以上のことから、耐熱進化過程では45A株まではほぼ一定の変異速度で進化しており、その後極端な変異速度の上昇が見られたこととなる。相互作用は、43B~45A株の間で顕著に見られるようになったので、相互作用により変異率が低い状態の大腸菌の45°C環境への適応が促進された可能性が考えられる。また、この時期に導入された変異は相互作用に非常に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。変異解析に関する結果は、PLoS Genetics vol. 6 e1001164に掲載された。

(2) 45°C適応過程で生じる耐熱大腸菌特異的な相互作用で機能するクオルモンの同定

これまでの研究で45°C適応過程の大腸菌培養上澄みに大腸菌の45°Cでの増殖を促進する作用があることを見いだした(科研費 課題番号18570219)。そこで、培養上澄みからの増殖促進物質(以下クオルモン)の取得・同定を試みた。

まずクオラムセンシングが観察される大腸菌の培養液より培養上澄みを大量に取得するための大量培養系を構築した。その結果、エアインキュベーターの温度管理等を検討し1%培養でも通常の継代培養と変わらない程度の増殖誘導活性を有する培養が可能となった(データ示さず)。得られた培養上澄みより有機溶媒抽出(酢酸エチル、エタノール)とODSカラム精製を組み合わせクオルモンの精製を行った。その結果、*バ イ ア ヲ セ イ*にて増殖誘導効果を持つ分画を得た。活性分画の構造解析を行い、ウラシルを同定した。また*バ イ ア ヲ セ イ*にてウラシルに増殖誘導活性を確認した。ウラシルは、45°C適応大腸菌特異的に増殖誘導活性を示したため、クオルモン候補物質の一つであることが確認された。しかしながら

ら、ウラシルの増殖誘導活性は、多く見積もっても培養上澄み中の活性の数%程度であったため、新たなクオルモンの探索を行うこととした。

上述の過程では、有機溶媒に可溶性の分子を中心に探索をしたが、有機抽出の際に水相には、活性の半分以上が残存していた。このことから、水溶性のクオルモンに注目し、更に精製を重ねる毎に活性が小さくなり精製を重ねることが困難となることから、高感度の活性検出系の構築を行った。その結果、従来では、培養上澄みで6-15倍程度であった活性が高感度検出系では30-75倍程度の増殖誘導活性として検出できるようになった。

この検出系を用い、大量培養した45°C適応過程大腸菌の培養上澄みより、弱い疎水相互作用をもつゲル濾過カラムクロマトグラフィーとGPC (Gel Permeation Chromatography)の2段階精製により、ほぼ単一成分の相互作用分子の精製に成功した。NMR解析により、相互作用分子は Lactic acidであることを確認した。

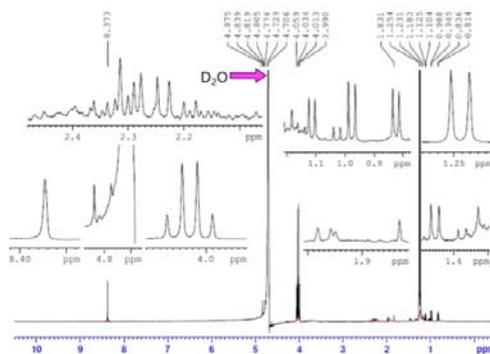


図4 培養上澄みから精製されたクオルモン候補物質のNMR

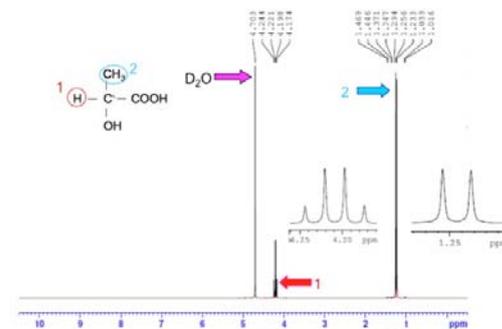


図5 Lactic acid のNMR

(3) クオルモンの機能解析

45°C適応大腸菌にウラシルを作用させたところ、45°C適応大腸菌特異的に増殖誘導活性を示したため、ウラシルはクオルモン候補物質の一つであることが確認された。しかしながらウラシルの溶解性の低さもあり、濃度依

存性を認めることができなかった。
45℃適応大腸菌に乳酸を作用させ、その濃度依存性を解析し、濃度依存的に相互作用が増加してゆくことを確認し、乳酸が目的とする相互作用分子候補の一つとして妥当なものであることを確認した。

(4)クオラムセンシングの生理学的意義の解析

クオラムセンシングにより高温環境で相互作用する大腸菌は、形態的・生理的にヘテロな表現型を示すことを見いだした(図6)。45℃適応大腸菌をプレート培養すると多様なコロニーが出現し、これらのコロニーを再度プレート培養しても多様なコロニーが出現した。また、これらのコロニー大腸菌を培養し、そのゲノムDNAを解析したところ、大腸菌ゲノム配列を持っていることから、この多様なコロニーは大腸菌であることが判明した。
45℃適応過程の大腸菌を液体培養し、その24時間の増殖様式を経時的な菌密度計測から行ったところ、培養上澄みの相互作用のない条件で低植菌密度では、増殖様式が一定でなく(傾きが経時的に変化)しかも増殖速度が遅い(傾きが穏やか)であった。この傾向は、45℃培養期間が短いほど顕著で適応進化と共に軽減された。

また培養上澄みを添加した状態で同様の検討を行った。その結果、上澄み添加による相互作用存在下では、植菌濃度、適応進化期間にかかわらず一様な増殖を示した。

この結果は、相互作用により多様な表現型の大腸菌の増殖が均一化され易くなることを示唆しており、進化的な現象では多様な細胞集団から特定の集団が絶滅、増殖したりすることで集団構成が変動する遺伝的浮動が誘発されやすくなることで高温適応が促進される可能性を示唆している。

また高温環境で相互作用する大腸菌は形態的・生理的にヘテロな表現型を示すが、上澄み無しの培養では、2つの細胞集団間で経時的な増殖特性が変化し互いに相互抑制的な増殖を示すが、上澄み添加培養では2つの集団は独立に増殖することが示唆された。このことは、相互作用がヘテロな集団が協調的な増殖を制御し、細胞集団の適応・進化を促進していることが示唆された。

以上の結果より、大腸菌は高温適応初期において乳酸等を介した相互作用を発達させ、ヘテロな集団構成を維持しながら増殖誘導・制御を行いながら適応してゆく可能性が示唆された。今回観察された相互作用は、進化により生じる新たな機能としてではなく、適応進化を進める上で必要な特性として出現し

た可能性が高く、これまでに報告されていないものであると考えられる。

以上の結果のうちゲノム解析部分に関しての本研究の成果として発表された論文の内容が4件の新聞発表として報道された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. T. Kishimoto, L. Iijima, M. Tatsumi, N. Ono, A. Oyake, T. Hashimoto, M. Matsuo, M. Okubo, S. Suzuki, K. Mori, A. Kashiwagi, C. Furusawa, Bei-Wen Ying, T. Yomo
Transition from positive to neutral in mutation fixation along with continuing rising fitness in thermal adaptive evolution
PLoS Genetics, 査読有, 6, 2010, e1001164
2. S. Watanabe, A. Komori, M. Saito, A. Uchida
Preparation and reaction of uracil substituted cyclen and cyclam: formation of tricyclic guanidinium and dihydroimidazolium salts
Tetrahedron, 査読有, 66, 2010, 1196-1201
3. H. Yashiroda, T. Mizushima, K. Okamoto, T. Kameyama, H. Hayashi, T. Kishimoto, S. Niwa, M. Kasahara, E. Kurimoto, E. Sakata, K. Takagi, A. Suzuki, Y. Hirano, S. Murata, K. Kato, T. Yamane, K. Tanaka
Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S Proteasome.
Nature structural & molecular biology, 査読有, 15, 2008, 228-236
4. S. Watanabe
Synthesis of fluorescent alkyl lactoside derivatives
Carbohydr. Res., 査読有, 343, 2008, 2325-2328

[学会発表] (計29件)

1. 大野浩平、岸本利彦、四方哲也、渡邊総一郎、大腸菌高温適応過程で機能する相互作用分子の探索、日本化学会 第91春季年会、2011年3月、講演予稿集
2. 上村康裕、田林沙織、山口祥一、田原太平、細井晴子、渡邊総一郎、ペプチドヘリックスの配向を決定するためのクロスリンカー色素の合成と評価、日本化学会 第91春季年会、2011年3月、講演予稿集
3. T. Kishimoto, S. Shimada, A. Oyake, T. Hashimoto, T. Yomo. Construction of high temperature genetic engineering system for thermo-tolerant *E. coli*. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010年12月7日神戸ポートアイランド

4. 飯島 玲生, 小宅 綾菜, 橋本 智美, 金子 冬郎, 鈴木 真吾, 岸本 利彦, 應 蓓文, 四方 哲也, 複数系列の大腸菌の高温適応進化過程におけるゲノム変異解析, BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010年12月7日神戸ポートアイランド
 5. 應蓓文, 北原和樹, 飯島玲生, 小野直亮, 鈴木真吾, 古澤力, 岸本利彦, 四方哲也, 長期実験室内進化からみた大腸菌の変異と発現の変遷, 第12回日本進化学会大会, 2010年8月3日, 東京工業大学 大岡山キャンパス
 6. 北原和樹, 岸本利彦, 小野直亮, 古澤力, 鈴木真吾, 應蓓文, 四方哲也, 高温適応進化における大腸菌の発現プロファイルのスナップショット, 第12回日本進化学会大会, 2010年8月3日, 東京工業大学 大岡山キャンパス
 7. 飯島玲生, 小宅綾菜, 橋本智美, 金子冬郎, 鈴木真吾, 岸本利彦, 應蓓文, 四方哲也, 複数系列の大腸菌の高温適応進化過程におけるゲノム変異解析, 第12回日本進化学会大会, 2010年8月3日, 東京工業大学 大岡山キャンパス
 8. 小宅綾菜, 岸本利彦, 四方哲也, 大腸菌の耐熱進化時に見られる相互作用の解析, 第12回日本進化学会大会, 2010年8月3日, 東京工業大学 大岡山キャンパス
 9. 橋本智美, 小宅綾菜, 岸本利彦, 四方哲也, 大腸菌高温適応時にみられる細胞挙動の解析, 第12回日本進化学会大会, 2010年8月3日, 東京工業大学 大岡山キャンパス
 10. 上村康裕・山下めぐみ・山口祥一・田原太平・細井晴子・渡邊総一郎, ペプチドヘリックスの配向を調べるための新しい架橋型色素の合成と性質, 日本化学会第90春季年会, 2010年3月28日, 大阪
 11. 飯島玲生, インバイウエン, 鈴木真吾, 岸本利彦, 小野直亮, 古澤力, 四方哲也, 大腸菌の実験室内での高温適応進化, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9-12日, パシフィコ横浜
 12. 北原和樹, インバイウエン, 小野直亮, 鈴木真吾, 岸本利彦, 古澤力, 四方哲也, 耐熱進化させた大腸菌のトランスクリプトーム解析, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9-12日, パシフィコ横浜
 13. 小宅綾菜, 橋本智美, 青柳美穂, 岸本利彦, 四方哲也, 大腸菌高温適応進化過程における細胞間相互作用の増殖速度への影響, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9-12日, パシフィコ横浜
 14. S. Watanabe, A. Komori, M. Saito, and A. Uchida, Preparation and reactions of uracil-substituted azamacrocycles, International Symposium on Multifunctional Organic Materials and Devices, 2009年12月11日, Funabashi, Japan
 15. T. Toyoshima, K. Yanai, T. Hasegawa, K. Yanai, and S. Watanabe, Synthesis of a new cross-linker to detect DNA-protein interaction, yposium on Multifunctional Organic Materials and Devices, 2009年12月11日, Funabashi, Japan
 16. Iijima, L., Ying, BW, Ono, N., Suzuki, S., Mori, K., Tatsumi, M., Kishimoto, T., Furusawa, C., Yomo, Genome-wide mutation analysis of the thermostable bacteria from experimental evolution., International Symposium on Complex System Biology, Sep. 29-Oct. 1, 2009, The University of Tokyo, Japan
 17. Kitahara, K., Ying, B-W., Ono, N., Suzuki, S., Kishimoto, T., Furusawa, C., Yomo, T., Transcriptome analysis of thermal adaptive Escherichia coli, The 8th International Workshop on Advanced Genomics, June 16-18, 2009, National Center of Sciences, Tokyo
 18. 岸本利彦, 四方哲也, 大腸菌を使った耐熱化実験進化系の中で出現した相互作用を中心とした現象の解析, 日本進化学会第10回大会, 2008年8月23日, 東大駒場キャンパス
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
岸本 利彦 (KISHIMOTO TOSHIHIKO)
東邦大学・理学部・准教授
研究者番号：90339200
 - (2) 研究分担者
渡邊 総一郎 (WATANABE SOICHIRO)
東邦大学・理学部・准教授
研究者番号：10287550
 - (3) 連携研究者
該当者無し