

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03302

研究課題名（和文）高温適応進化におけるプロテオスタシスネットワークの挙動とその機能の解明

研究課題名（英文）Dynamics of proteostasis function during thermo-tolerant evolution of *E. coli*

研究代表者

岸本 利彦（Kishimoto, Toshihiko）

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：90339200

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高温適応進化大腸菌のプロテオスタシスネットワークにおける機能を解明するため、シャペロンネットワークにおけるgroLと、ヒートショック転写制御ネットワークの中心因子 32をコードするrpoHの変異に注目した。高温適応進化株のゲノム解析でプロテオスタシス系の変異率が高いことが示され、特にシャペロニンGroEの変異が重要であることが示唆された。rpoHの変異A264Vは高温適応株で有益であり、プロテオスタシス系遺伝子の発現を上昇させた。シャペロニンGroEの変異によるターゲットタンパク質の変化の網羅解析に重要な基質タンパク質を含むGroE複合体の精製方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、プロテオスタシス系の必須遺伝子は、進化において全て変異し、最大で遺伝子あたり4カ所の変異が確認されたことなどから、致死ストレス適応進化におけるプロテオスタシス系の重要性が示された。このことは、プロテオスタシス系が、生命の持つ頑健性と柔軟さの根源となるロバストネスに大きく関与していることを示している。プロテオスタシスの持つ変化の許容力は、進化ばかりでなく癌化などの現象にも大きく関与することが想定され、研究成果はこれらの方面にも役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on mutations in rpoH, which encodes groL in the chaperone network and 32, a central factor in the heat shock transcriptional regulatory network, to elucidate its function in the proteostasis network of high temperature-adapted evolved *E. coli*. Genome analysis of the evolved strains adapted to high temperatures showed a high mutation rate in the proteostasis system, suggesting that mutations in chaperonin GroE are particularly important. rpoH mutation A264V was beneficial in the high temperature adapted strains and increased the expression of proteostasis system genes. We established a method for purification of GroE complexes containing substrate proteins that are important for comprehensive analysis of changes in target proteins caused by mutations in chaperonin GroE.

研究分野：分子細胞進化学

キーワード：プロテオスタシス 高温適応進化 大腸菌 シャペロニン

1. 研究開始当初の背景

生命の機能実体であるタンパク質は、転写・翻訳によりフォールディングされない形 (図1: **Unfold**) で合成された後、正しくフォールディング (図1: **Native Fold**) され機能する。プロテオスタシスは、タンパク質を正しいフォールディングに導く、普遍的機構である (図1)。プロテオスタシスを制御する因子 (表1) の機能は解析が進んでおり (Kim, 2013, Annu. Rev. Biochem.)。老化など重要な生命現象との相関も明らかとされている (Kausik, 2015, Nat. Med.)。しかし、**プロテオスタシスの外部環境変化に対する挙動、特に進化に伴うプロテオスタシスの長期的な機能は、解明されていない。**大腸菌では、プロテオスタシスの制御因子の多くが必須遺伝子である (表1)。また、大腸菌のプロテオスタシスは、表1に示すシャペロン系、タンパク質分解系、転写制御系の **8 因子により説明できる** (Cho, Cell Rep., 2015)。これに加え、実験室進化系が確立している大腸菌は、外部環境変化に対する **プロテオスタシスの長期的挙動の解析材料として最適**である。本研究では、高温適応進化により得られた高温適応進化大腸菌を用いて、進化における **プロテオスタシスの挙動とその機能を解明する。**

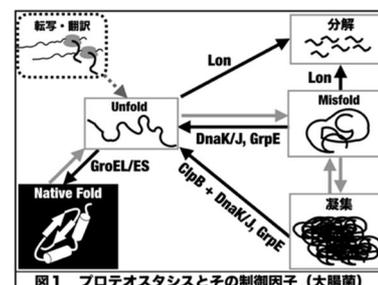


図1 プロテオスタシスとその制御因子 (大腸菌)

表1 大腸菌とヒトのプロテオスタシス制御因子の保存性

	ヒト	大腸菌
シャペロン系	HSP60 / HSP10	GroEL * / GroES *
	HSP70 / HSP40 + nucleotide exchange factor	DnaK / DnaJ + GrpE *
	HSP104	ClpB
タンパク質分解系	Proteasome, lysosome	Lon
転写制御系	Heat shock 転写因子	RpoH (σ 32) *

*: 必須遺伝子産物

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、**世界最高温度 (48 以上) で安定増殖する 2 系統の大腸菌の樹立に成功**している。この大腸菌は、タンパク質変性を誘起する持続高温ストレス下でも、細胞内環境を維持している。2 系統間で、異なる変異蓄積による独自の進化をしているにもかかわらず、両系統共に **プロテオスタシス制御因子に変異が顕著に蓄積 (7 遺伝子に 13 カ所: 他の領域の 5 倍以上の頻度: 図2) した。**中でも **4 つの必須遺伝子因子全て (表1、図2) が、変異していた。**また、45 適応進化過程ではタンパク質分解酵素 Lon 遺伝子 (表1) のナンセンス変異後に、シャペロニン GroEL/ES 遺伝子に変異が 2 カ所生じることで (図2, 45°C) 不溶性タンパク質が減少した (2019 進化学会)。さらにこれまでの進化で、図1の全てのプロテオスタシス制御因子の遺伝子発現を制御する RpoH (σ 32) 遺伝子に変異が生じ、DnaK を除く全てのシャペロン因子遺伝子に変異が蓄積された (図2)。これらの事実は、高温適応進化とプロテオスタシスが密接に関連することを、強く示唆している。

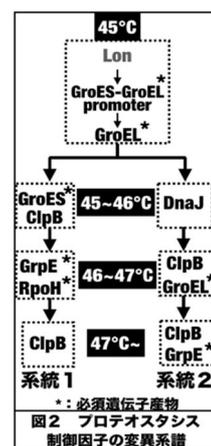


図2 プロテオスタシス制御因子の変異系譜

本研究では、高温適応進化大腸菌のプロテオスタシス (図1) におけるシャペロンネットワークにおける groL 変異機能、ヒートショック転写制御ネットワークの中心因子 σ 32 をコードする rpoH 変異を中心的な対象として、生命維持の普遍的メカニズムであるプロテオスタシスネットワークの進化における機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

高温適応進化: 大腸菌 DH1 Δ leuB:: (gfpuv5-kmr) 株を mM63 培地で対数増殖を維持し毎日継代培養し、段階的に培養温度を上昇させた (参考文献 1, 2)。培養温度は、一定の適応度 (0.33~0.4/hr) を 2 日間連続で超えた時に 0.1~0.2 上昇させた。

Genome, Transcriptome 解析: ゲノム解析は、進化前 (培養 0 日: Anc)、43 適応 (287 日) 45 適応 (375 日) 45 適応 (523 日) 46 適応 (系統 1: 623 日、系統 2: 583 日) 47 適応 (系統 1: 1153 日、系統 2: 1059 日) 47.3 適応 (系統 1: 1321 日) 47.4 適応 (系統 2: 1453 日) 47.9 適応 (系統 1: 1921 日、系統 2: 2000 日) 48.1 適応 (系統 1: 2350 日、系統 2: 2375 日) 48.2 適応 (系統 2: 2721 日) 48.3 適応 (系統 1: 2553 日) から、ゲノム DNA、Total RNA を抽出し、Macrogen 社、Relixa 社、慶應大学に依頼して NGS 解析を行った。ゲノム解析データは Breseq Pipeline で変異解析を行った。RNAseq 解析は、TPM ファイル、RPM ファイルに変換後、それぞれ発現解析、Seurat 解析に使用した。

GroEL/ES complex の精製: アフィニティタグ分子として、Mm(opt) GroES (古細菌 Methanosarcina mazei (Mm) の groS 配列を大腸菌用コドンへ最適化した GroES) を用いた。Mm(opt) GroES 末端に His6 タグを付加した配列を Mm(opt) GroES His6/pGEX4T-1 を作成した。このプラスミドを、各変異型 GroEL を高発現する高温適応大腸菌株に導入し、IPTG にて発現誘導した。発現後大腸菌をスフェロプラスト化し、凍結融解した後、超遠心分離にて抽出液を取得した (参考文献 3)。複合体の精製は、TALON Beads を用いて行った。回収された複合体は、SDD-PAGE にて確認後、複合体濃度の濃いサンプルを慶應大学にて Proteome 解析に供した。

Luciferase assay: 野生型、変異型 grpE プロモーター領域を pLUX (法政大学山本先生より分与) に導入し、rpoH 野生型 (系統 1: 46.7 適応) 変異 (A264V) 型 (系統 1: 47.0 適応) 大

腸菌に導入し、Lusiferase 活性を測定した。

rpoH 変異機能の Growth assay : pASK-IBA3C プラスミド (テトラサイクリンによって発現誘導可能) に rpoH (wild, A264V) を導入した。rpoH 発現プラスミドを、Anc 株および 45d7B (45 適応) 株に導入し、100nM aTC にて発現誘導した後、増殖速度を測定した。

4. 研究成果

(1) 進化におけるプロテオスタシスネットワークの変化

高温適応進化株のゲノム解析の結果、プロテオスタシス系の変異率は、2 系統ともにゲノム全体の変異率の約 3.5 倍高く、必須遺伝子に限るとプロテオスタシス系で約 7.7 倍高くなっていた。このことから、プロテオスタシス系は、高温適応進化で変化しやすいこと、変化しにくい必須遺伝子で特に変異率が高いことから、プロテオスタシス機能の変化が高温適応進化では非常に重要であることが示唆された。また高温適応進化過程において、ゲノム変異率は継続して上昇していた。このことは、変異による多様性の創出が本研究の高温適応進化では重要である可能性を示していた。タンパク質折りたたみに機能するシャペロニン GroE の GroEL サブユニットをコードする必須遺伝子 groL においては、promoter 変異と、3 か所の ORF 変異 D41N, V126A, G9A) が生じ、特にその機能変化が重要である可能性が示された。RNAseq 解析の結果、45 適応において groSL promoter 変異後に、groS, groL 遺伝子発現が上昇し、その後高温適応進化においても継続的に上昇し続けた。この発現上昇は、全遺伝子で最も大きなものであった。このことからタンパク質折りたたみに機能するシャペロニン GroE 機能変化が高温適応進化に重要である可能性が強く示唆された。

(2) rpoH (野生型、変異型) の変異機能と転写制御能の解析

プロテオスタシス系の必須遺伝子であり、ヒートショック誘導型転写因子 32 をコードする rpoH は、高温適応進化において突然変異 (A264V) が固定された。32 は、ヒートショック応答遺伝子群の転写を制御する因子であり、その機能変化は、高温での遺伝子発現に大きな影響を与えることが考えられる。そこで、野生型、変異型の rpoH の発現ベクターを、進化前の Anc 株、45 適応過程で groSL promoter, groL (D41N) 変異型で高変異率進化直前の 45d7B 株、に導入し、その増殖速度を測定した。その結果、Anc 株では、37、41 において共に rpoH (A264V) は有害であった。一方、groL promoter 変異と groL (D41N) 変異を有する 45 適応株では、rpoH (A264V) は、有益な変異となっていた。このことから、rpoH 変異の有益性は、groL 変異に依存し、高温で機能を発揮している可能性が示唆された。RNAseq 解析結果より、rpoH 変異後において、プロテオスタシス系 8 遺伝子すべての発現が上昇していた。これらの結果より、rpoH 変異は、ヒートショック因子でもあるプロテオスタシス系の発現を高めることで、大腸菌の高温適応に機能していることが示唆された。

(3) シャペロニン GroE (野生型、変異型) のターゲットタンパク質の網羅解析

上記の解析より、高温適応進化において、groL 変異が重要な機能している可能性が示された。本高温適応進化では高変異率進化が継続して生じており、有害変異を含む 5-10 種類の変異が同時に固定されるヒッチハイク形式で進化が進んでいた。ORF に生じる非同義置換の 80%以上が有害変異であり (参考文献 4) その有害性の多くが変異配列による折りたたみの異常によるものと考えられている。このことから groL 変異により、タンパク質の折りたたみにどのような変化が生じるかを知ることが、高温適応進化メカニズム解明において重要であると考えた。そこで、折りたたみ基質タンパク質を内部に保持したシャペロニン GroE の精製を行い、基質タンパク質を網羅解析することで、groL 変異機能の解析を実施した。Kerner の方法 (参考文献 3) をベースに精製条件の最適化を行い、ほぼバックグラウンドのない複合体精製条件を確立した。これを用い、GroEL, GroEL (D41N), GroEL (D41N, V126A) を高発現する大腸菌株より、GroE 複合体を精製した。SDS-PAGE の結果、GroEL, GroEL (D41N) 株で複合体を効率よく取得することに成功した。GroEL 株の複合体をショットガンプロテオーム解析したところ、276 種類のタンパク質が同定されそのうち 80 種類が Kerner の複合体解析結果と一致した。菌株 (MG1655 と DH1)、進化の有無、培養条件 (完全培地と最少培地 など) が異なるため、発現しているタンパク質が管理異なることが想定されるため、複合体はかなり高い精度で精製できたと考えられた。そこで、GroEL, GroEL (D41N) 株から取得した複合体を SDS-PAGE で比較解析したところ、複合体に含まれる折りたたみ基質タンパク質の構成がかなり変化していることが判明した。現在この複合体もショットガンプロテオーム解析を行っている。今後、変異型 GroE の折りたたみ基質タンパク質の変化が同定され、その基質タンパク質における変異タンパク質の構成などから、シャペロニンによる多様性許容メカニズムに関する知見がわかれば、プロテオスタシス系を中心としたロバスタネスの機能の解明につながることを期待される。

(参考文献)

1. Kishimoto T, et al., Transition from positive to neutral in mutation fixation along with continuing rising fitness in thermal adaptive evolution, PLoS Genetics, 6 (10), e1001164 (2010)
2. Kishimoto T, et al., Molecular clock of neutral mutations in a fitness-increasing evolutionary process, PLoS Genetics, 11(7), e1005392, (2015)
3. Kerner, M. J. et al., Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in Escherichia coli, Cell, 122 (2), 209-20 (2005)
4. Eyre-Walker, A., Keightley, P. D. The distribution of fitness effects of new mutations, Nat Rev Genet, 8 (8), 610-8 (2007)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 岸本利彦	4. 巻 75
2. 論文標題 大腸菌を用いた長期実験進化への挑戦 ストレスを受け入れ生き延びる方法の探求	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生産と技術	6. 最初と最後の頁 35-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 外山 弘恵、松尾 萌、山内 長承、河野暢明、岸本 利彦
2. 発表標題 大腸菌の高温適応進化におけるGroEL機能変化とシャペロニンターゲット分子 の解析
3. 学会等名 日本進化学会第25回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岸本利彦
2. 発表標題 高温適応進化を題材としたロバストネス、変異率と進化について
3. 学会等名 第2 回総合微生物学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 外山弘恵、松尾萌、鈴木裕茄、飯田彩花、山内長承、河野暢明、岸本利彦
2. 発表標題 大腸菌の高温適応進化におけるプロテオスタシス系ネットワークとシャペロニン機能の変化
3. 学会等名 第46回分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岸本利彦、松尾萌、河野暢明、田村 武幸
2. 発表標題 大腸菌高温適応進化とその生き残り戦略
3. 学会等名 第1回総合微生物学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 外山弘恵、松尾萌、小西隆介、菅野暢、加瀬遥菜、鈴木裕茄、山内長承、河野暢明、岸本利彦
2. 発表標題 大腸菌の高温適応進化におけるプロテオスタシス系のネットワーク変化解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸本利彦
2. 発表標題 大腸菌の高温適応進化から見える生命の生き残り戦略
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸邊理佳、岡島美空、奈良井節、中山裕二、岸本利彦、古倉健嗣
2. 発表標題 EMTをモニターするレポーター細胞株の樹立
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西広翔, 山内長承, 木所恵利佳, 菅野暢, 小西隆介, 松尾萌, 古倉健嗣, 岸本利彦
2. 発表標題 大腸菌の高温進化における特性解析
3. 学会等名 第23回日本進化学会年大会、オンライン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西広翔, 菅野暢, 小西隆介, 松尾萌, 古倉健嗣, 山内長承, 岸本利彦
2. 発表標題 大腸菌高温適応進化過程における進化の変遷
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会、オンライン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西広翔, 木所恵利佳, 菅野暢, 小西隆介, 松尾萌, 古倉健嗣, 山内長承, 岸本利彦
2. 発表標題 高温適応進化大腸菌の特性解析
3. 学会等名 第22回日本進化学会年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小西隆介, 西広翔, 菅野暢, 松尾萌, 古倉健嗣, 山内長承, 岸本利彦
2. 発表標題 大腸菌の高温適応進化とシャペロニンGroELの進化の相関
3. 学会等名 第22回日本進化学会年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅野暢、西広翔、小西隆介、松尾萌、古倉健嗣、山内長承、岸本利彦
2. 発表標題 高温適応進化大腸菌におけるProteostasisの変異機能解析
3. 学会等名 第22回日本進化学会年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小西隆介、菅野 暢、西広 翔、松尾 萌、古倉健嗣、山内長承、岸本利彦
2. 発表標題 大腸菌の高温適応進化とシャペロニンGroELの進化の相関
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅野暢、山本椰香、西広翔、小西隆介、松尾萌、古倉健嗣、山内長承、岸本利彦
2. 発表標題 高温適応進化大腸菌におけるProteostasisの変異機能解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西広翔、木所恵利佳、小西隆介、菅野暢、松尾萌、古倉健嗣、山内長承、岸本利彦
2. 発表標題 高温適応進化大腸菌の適応戦略
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

科研費成果紹介 東邦大学理学部生物分子科学科 岸本利彦
<https://www.youtube.com/watch?v=q7KeL0Srt2k>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	河野 暢明 (Kono Nobuaki) (90647356)	慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・准教授 (32612)	
研究 分 担 者	古倉 健嗣 (Kokura Kenji) (30344039)	東邦大学・理学部・准教授 (32661)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------