

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号： 14401

研究種目： 基盤研究（B）

研究期間： 2009～2011

課題番号： 21360401

研究課題名（和文） 全ゲノム一塩基レベル変異解析に基づくストレス耐性細胞の創製

研究課題名（英文） Creation of stress tolerant strain based on single nucleotide mutational analysis of in whole genome

## 研究代表者

清水 浩（SHIMIZU HIROSHI）

大阪大学・大学院情報科学研究科・教授

研究者番号： 00226250

## 研究成果の概要（和文）：

本研究においては、進化工学に基づき長期植え継ぎ培養を行って、5%濃度のエタノールに耐性を示す大腸菌の細胞 6 株を取得した。DNA マイクロアレイを用いてストレス耐性株と親株の遺伝子発現量を網羅的に比較した。全ての遺伝子の発現量データを主成分解析したところ、ストレスに耐性を示す株は共通的にアミノ酸合成に関与する遺伝子の発現量が特徴的に変化していることが確認された。培地中にこの遺伝子発現変化に基づくアミノ酸を添加したところ、ストレス環境下において、増殖速度が大きくなることが示された。また、全ゲノム一塩基レベルの変異解析を行ったところ変異の数は小さくなくまた独立に得られた進化株に共通性がないことなどから、変異のストレス耐性への寄与は大きくないことが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We performed experimental evolution under (5%) ethanol stress condition in *Escherichia coli* and six ethanol stress tolerant evolved strains were independently obtained. Transcriptomic analysis of evolved strains was performed. As a result of principal component analysis (PCA), gene expression in biosynthesis pathways of some amino acids were extracted and these are commonly up-regulated in the tolerant strains, suggesting that activating these pathways were involved in the achievement of ethanol tolerance. In support of this hypothesis, the supplementation of these amino acids to the culture medium increased the specific growth rate under ethanol stress. Mutational analysis was also performed by high-density oligonucleotide microarray and it was suggested that mutation does not significantly contribute to ethanol stress tolerance because there few common mutations among evolved strains.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：代謝工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：ゲノム・DNA マイクロアレイ・変異解析・ストレス耐性・進化学・バイオプロダクション・発現プロファイル・比増殖速度

### 1. 研究開始当初の背景

持続可能な社会の構築を目的として微生物によるバイオ化学品やバイオ燃料の生産に対する期待が高まっている。これらの生産においては、生産物濃度の蓄積が宿主細胞へのストレスとなるため、ストレス耐性を有する細胞の構築法の確立は工学的に重要である。ストレス環境下で生物の持つ進化や適応といった特性を利用して増殖能の高い株を取得し、さらに、細胞状態変化を追跡する技術の開発が望まれている。従来の変異育種においては優れた形質をもつ株を選択する際に、多くの変異、細胞内状態変化が同時に引き起こされるものであったため、得られた株を解析しても、どの変化が有用形質付与のために重要であったかを解析することは困難であった。本研究では、大腸菌の進化学実験に基づく長期植え継ぎ培養によってエタノールストレス耐性株を取得し、その進化過程を高密度タイリング DNA マイクロアレイを用いて一塩基レベルで変異を検出および遺伝子発現量の変化を検出することにより、明らかにしようとした。変異検出においては高速シーケンサの技術革新が目覚ましい状況を受けて、研究途中から高速シーケンサによる解析も行うこととした。

### 2. 研究の目的

本研究では、大腸菌によるバイオエタノール生産に向けて、進化学実験により、5%エタノールストレス環境下で細胞を長期間植え継ぎ、優れた株（増殖速度の高い株）を選択的に取得する方法を開発することを初期目的とした。次に、複数独立に得られた株を用いて、高密度タイリング DNA マイクロアレイにより遺伝子配列や遺伝子発現がどのように変化したかを解析し、ストレス耐性能賦与のためにどのような変化が必要であったのかを議論することを目的とした。また、ストレス耐性を有する株の全ゲノム変異解析と網羅的遺伝子発現解析を行い、重要因子を探索することを目的とした。変異検出においては、高密度タイリングアレイによる方法の評価を行うとともに、高速シーケンサの技術革新が目覚ましい状況を受けて、研究途中から高速シーケンサによる解析も行った。

### 3. 研究の方法

本研究では、5%エタノールを含む合成培地 (M9 培地) で大腸菌 *Escherichia coli* W3110 株の長期植え継ぎ培養を行って、このストレス

条件で比増殖速度を上昇させる進化株の取得を行った。進化学実験により、得られたストレス耐性株を一塩基レベル変異解析、DNA タイリングマイクロアレイにより遺伝子発現解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) エタノールストレス耐性株の進化学による取得

本研究では、大腸菌 *Escherichia coli* W3110 をストレス非存在条件に対して適応させた株を親株として用い、5%エタノールストレス環境下において、6 系列の異なる大腸菌植え継ぎ培養を長期間行った。培養開始直後に比較して増殖速度の高い株をいずれの系列についても取得することに成功した。比増殖速度の変化は植え継ぎ期間に対して図 1. に示すように緩やかに上昇した。得られた株のうち、ストレス適応進化株 (A、F 株)、非ストレス適応株 (親株) の比増殖速度の比較を図 2. に示す。

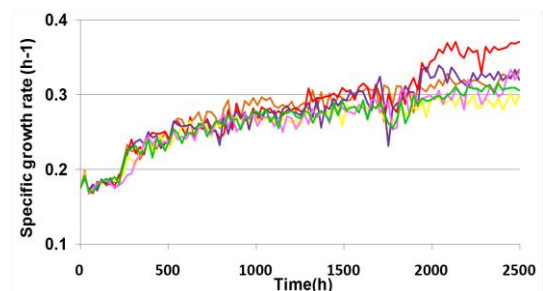


図 1. 進化学実験における適応株 (A-F 株) の比増殖速度の変化

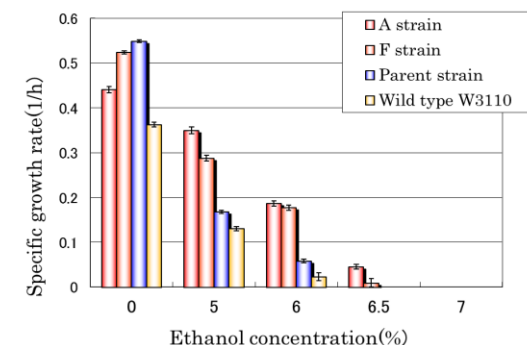


図 2. ストレス適応株 (A、F 株)、親株の比増殖速度の比較

得られたすべてのエタノールストレス耐性株(A株-F株)および親株(P株)について網羅的遺伝子発現解析、および6耐性株のエタノールストレス耐性株に対して全ゲノム変異解析を行った。

### (2) 取得されたエタノール耐性株の網羅的遺伝子発現解析

取得された6株のエタノールストレス耐性株(A株-F株)および親株(P株)の合計7株についてエタノールストレス環境下、非環境下においてDNAマイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析を行った。得られた遺伝子発現データを主成分分析(PCA)に供し、エタノール耐性に関与する因子の探索を行った。

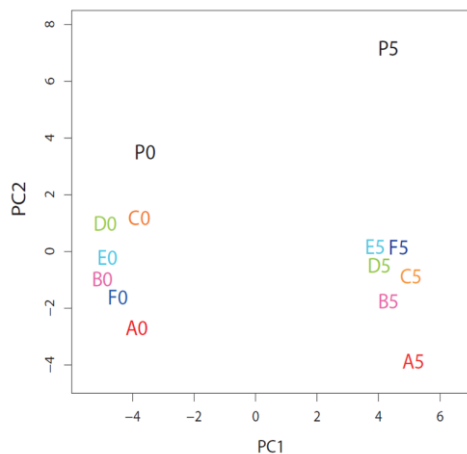


図3 取得された6株のエタノールストレス耐性株(A株-F株)および親株(P株)のPCA解析結果。アルファベットは株名を、0は非ストレス環境下、5は5%エタノール環境下におけるデータを示す。第一主成分(PC1)はエタノールストレスに対する応答を示しており、第二主成分(PC2)はエタノールストレス環境下における長期進化適応による変化を示していることが分かる。

この解析結果から、PCAにより、エタノールストレスに対する応答とエタノールストレス環境下における長期進化適応を別々に捉えることに成功していることが分かる。進化適応に対応する第二主成分のローディングスコアが高い遺伝子を調査したところ、トリプトファン、ロイシン、イソロイシンといったアミノ酸合成に関する遺伝子の発現が進化株において、ストレス環境下、非環境下いずれにおいても上昇していることが明らかとなり、この発現上昇がエタノールストレスの耐性に何らかの関与を示すものと考えられた。

### (3) アミノ酸添加によるエタノール耐性の賦与

前項で得られた解析結果をもとに、トリプ

トファン、ロイシン、イソロイシンをそれぞれ培地に添加した培養を行い、5%エタノールストレス環境下において親株の増殖速度を上昇させる効果があることが明らかとなった。進化適応株にこのアミノ酸添加を行っても効果は無く、進化適応株は、すでにこれらのアミノ酸合成経路の遺伝子発現上昇による代謝の強化がストレス耐性をもたらしているものと考えられた。

図4. に一例として、5%エタノールストレス環境下においてイソロイシンを添加した際の比増殖速度の比較を示す。

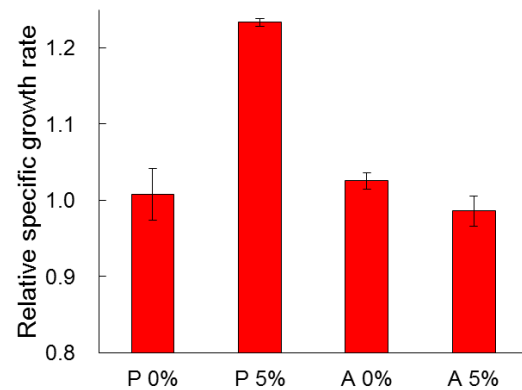


図4. イソロイシンを添加した際の親株(P)と進化株(A株)の比増殖速度の比較。

比増殖速度はそれぞれ、イソロイシンを培地に添加した時としない時の比として表している。進化株にはストレス環境下においてアミノ酸添加の効果は無いが親株ではアミノ酸の添加時にエタノールストレス環境下で増殖速度を上昇させることからこのアミノ酸の添加がストレス耐性に寄与していることがわかる。また、エタノールストレス非環境下では増殖速度の上昇がみられないことから、栄養源としての効果でないことが分かる。

### (4) 取得されたエタノール耐性株の全ゲノム変異解析

取得された6株のエタノールストレス耐性株(A株-F株)の全ゲノムリシーケンスにより変異解析を行った。

研究当初は、高密度タイリングDNAマイクロアレイを用いて、変異解析を行った。その後、次世代シーケンサを用いた変異解析を行った。発見された変異の個所はサンガー法により確認を行った。高密度タイリングDNAマイクロアレイを用いて発見された一塩基置換は、高速シーケンサおよびサンガー法により同一であることが確認され、この方法が精度良く一塩基置換を発見できる方法であることが確認された。同定された全ゲノム変異を表1にまとめて示す。

表1. 高速シーケンサによる全ゲノム変異解析

Type of mutation	A株	B株	C株	D株	E株	F株
Single base substitution	119	4	5	5	5	5
Insertion	0	1	1	1	1	0
Deletion	2	0	1	0	0	0

進化適応した6株に共通して起きた変異は少なく、進化適応に対する変異の寄与は大きくないことが示唆された。A株の変異数が他の株に比べて多いのは、1800時間付近のA株の大きな比増殖速度の変化と関連性があると考えられ、今後、比増殖速度の時系列変化と細胞内の遺伝子配列、遺伝子発現、代謝物質濃度の高次元システムの時系列変化との関係を詳細に解析していくことにより微生物のストレス環境適応メカニズムが明らかになっていくものと期待される。

#### 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8件)

- ① Takaaki Horinouchi, Kuniyasu Tamaoka, Chikara Furusawa, Naoaki Ono, Shingo Suzuki, Takashi Hirasawa, Tetsuya Yomo, Hiroshi Shimizu. (2010) Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress, BMC Genomics, 査読有, 11:579 DOI:10.1186/1471-2164-11-579

[学会発表] (計25件)

- ① Hiroshi Shimizu, Integration of *in silico* and experimental approaches for creation of microbial cell factories, 14th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering (APCChE 2012), Feb. 24, 2012, Suntec Singapore International Convention & Exhibition Center, Singapore
- ② 小野直亮, 堀之内貴明, 玉岡邦康, 鈴木真吾, 平沢敬, 古澤力, 四方哲也, 清水浩, 大腸菌エタノール耐性進化株の次世代シーケンサを用いた全ゲノム解析, 第64回日本生物工学会大会, 2011.9.28, 東京農工大学
- ③ 小野直亮, 堀之内貴明, 玉岡邦康, 鈴木真吾, 平沢敬, 古澤力, 四方哲也, 清水浩, Whole genome resequencing of experimentally evolved *Escherichia*

*coli* using a next generation sequencer, 日本生物物理学会第49回年会, 2011.9.16, 兵庫県立大学

- ④ 堀之内貴明, 玉岡邦康, 古澤力, 小野直亮, 鈴木真吾, 平沢敬, 四方哲也, 清水浩, エタノールストレス環境下の進化実験により得られた大腸菌のゲノムワイドな変異解析と遺伝子発現解, 化学工学会第43回秋季大会, 2011.9.15, 名古屋工業大学
- ⑤ 小野直亮, Roche, SOLiD, illumina を用いた大腸菌全ゲノムリシーケンシング, NGS (次世代シーケンサ) 現場の会第1回研究会, 2011.5.29, 熱海ニューフジヤホテル, 静岡県
- ⑥ Naoaki Ono, Chikara Furusawa, Takaaki Horinouchi, Kuniyasu Tamaoka, Shingo Suzuki, Takashi Hirasawa, Tetsuya Yomo, Hiroshi Shimizu, Genome-Wide Mutational and Expression Analyses of Evolved *Escherichia Coli* Strains under Ethanol Stress, Asian Congress on Biotechnology (ACB-2011), May 13, 2011, Shanghai, China
- ⑦ 堀之内貴明, 玉岡邦康, 古澤力, 小野直亮, 鈴木真吾, 平沢敬, 四方哲也, 清水浩, 人工進化工学と網羅的遺伝子発現情報解析によるストレス耐性細胞の創製, 化学工学会第76年会, 2011.3.23, 東京農工大学
- ⑧ 堀之内貴明, 玉岡邦康, 古澤力, 小野直亮, 鈴木真吾, 平沢敬, 四方哲也, 清水浩, エタノール環境下での長期植え継ぎ培養によって得られた耐性大腸菌株の遺伝子発現・ゲノム変異解析, 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 (BMB2010), 2010.12.10, 神戸ポートピアアイランド, 兵庫県
- ⑨ 堀之内貴明, 古澤力, 清水浩, 四方哲也, 小野直亮, 人工進化実験における発現制御ダイナミクスの進化的シミュレーション, 定量生物学の会第三回年会, 2010.11.27, 東京大学生産技術研究所
- ⑩ 堀之内貴明, 玉岡邦康, 古澤力, 平沢敬, 小野直亮, 鈴木真吾, 四方哲也, 清水浩, 大腸菌エタノールストレス人工進化株の網羅的解析によるエタノール耐性付与, 定量生物学の会第三回年会, 2010.11.27, 東京大学生産技術研究所
- ⑪ 小野直亮, 鈴木真吾, 古澤力, 清水浩, 四方哲也, 次世代シーケンサを用いた大腸菌 DH1 株の全ゲノム解析, 第62回日本生物工学会大会, 2010.10.28, 宮崎シーガイアワールドコンベンションセンターサミット
- ⑫ 堀之内貴明, 玉岡邦康, 古澤力, 小野直亮, 鈴木真吾, 平沢敬, 四方哲也, 清水

- 造, 人工進化実験によって得られたエタノール耐性大腸菌株の網羅的遺伝子発現解析とゲノム異変解析, 2010.10.28, 宮崎シーガイアワールドコンベンションセンターサミット
- ⑬ 堀之内貴明, 玉岡邦康, 古澤力, 小野直亮, 鈴木真吾, 平沢敬, 四方哲也, 清水浩, 複数時間スケールを持つ環境適応ダイナミクス: エタノールストレス環境下での大腸菌人工進化実験における網羅的表現型/遺伝子型解析, 第48回生物物理学会年会, 2010.9.20, 東北大学
- ⑭ Hiroshi Shimizu, Systems Biotechnology for Creation of Microbial Cell Factory, 2010 International Symposium on Advanced Biological Engineering (ISABE'2010), July 25, 2010, Beijing, China
- ⑮ Chikara Furusawa, Genome-wide analysis of ethanol stress tolerant strains of *Escherichia coli* obtained by evolution experiments, Metabolic Engineering VIII, June 14, 2010, Jeju Island, South Korea
- ⑯ 堀之内貴明, 玉岡邦康, 古澤力, 平沢敬, 小野直亮, 鈴木真吾, 四方哲也, 清水浩, 大腸菌エタノールストレス人工進化株の全ゲノム変異解析・遺伝子発現解析, 定量生物学の会第二回年会, 2010.1.9, 大阪大学
- ⑰ Takaaki Horinouchi, Kuniyasu Tamaoka, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa, Naoaki Ono, Shingo Suzuki, Tetsuya Yomo, Hiroshi Shimizu, Genome-Wide Mutational and Expression Analyses of Evolved *Escherichia Coli* Strains Under Ethanol Stress, The 20th International Conference on Genome Informatics (GIW 2009), Dec.14, 2009, Yokohama, Japan
- ⑱ Naoaki Ono, Shingo Suzuki, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu, Tetsuya Yomo, A model-based analysis method for detection of single-base substitution using resequencing microarrays, Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC'09), Nov. 25, 2009, Kobe, Japan
- ⑲ 小野直亮, 鈴木真吾, 古澤力, 清水浩, 四方哲也, 次世代シーケンサにおけるメイトペアの距離情報を利用した配列解析アルゴリズムの開発, 第47回生物物理学会年会, 2009.11.1, 徳島文理大学
- ⑳ 小野直亮, 鈴木真吾, 古澤力, 清水浩, 四方哲也, メイトペア情報に基づいた次世代シーケンサによる resequencing 解析アルゴリズムの開発, 第61回日本生物工学会大会, 2009.9.24, 名古屋大学
- ㉑ 玉岡邦康, 堀之内貴明, 古澤力, 平沢敬, 小野直亮, 鈴木真吾, 四方哲也, 清水浩, タイリングアレイを用いたエタノール耐性大腸菌株のゲノム変異解析, 第61回日本生物工学会大会, 2009.9.24, 名古屋大学
- ㉒ 清水浩, システムバイオテクノロジーによる生物生産, 第61回日本生物工学会大会, 2009.9.25, 名古屋大学
- [図書] (計1件)
- ① 古澤力, 堀之内貴明, 清水浩, 財団法人国際高等研究所, 高等研報告書1005 生物進化の持続性と転移(研究代表者 津田一郎) 第2章 大腸菌の長期植え継ぎ培養における表現型・遺伝子型の網羅的解析, (2011), 19-29
- [その他]  
ホームページ等  
<http://www-shimizu.ist.osaka-u.ac.jp/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
清水 浩 (SHIMIZU HIROSHI)  
大阪大学・大学院情報科学研究科・教授  
研究者番号: 00226250
- (2) 研究分担者  
古澤 力 (FURUSAWA CHIKARA)  
大阪大学・大学院情報科学研究科・准教授  
研究者番号: 00372631
- 平沢 敬 (HIRASAWA TAKASHI)  
大阪大学・大学院情報科学研究科・助教  
研究者番号: 20407125
- 小野 直亮 (ONO NAOAKI)  
大阪大学・大学院情報科学研究科・特任准教授  
研究者番号: 60395118
- (3) 連携研究者 ( )  
研究者番号: