

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18662

研究課題名（和文）大腸菌実験室進化を通じた生物の元素利用に対する進化的可塑性の検討

研究課題名（英文）Evolution Experiment of Escherichia coli in the Presence of Abiotic Metal Ions

研究代表者

川上 了史（Kawakami, Norifumi）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・講師

研究者番号：60566800

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：水素、炭素、窒素、酸素、リン、硫黄の6つの元素は、細胞の主要成分である水、脂質、核酸、タンパク質に利用されるため、基本的にはあらゆる生命に共通の元素と考えられる。一方、生命はこれらの元素に加えて金属イオンも利用する。金属イオンは電子移動や反応の触媒としての役割を持つが、初めに挙げた6元素とは異なり、生物種ごとに利用される金属イオン種に多様性がある。本研究では、生命がどの金属イオンを利用するのかという選択メカニズムを解明するため、大腸菌をモデルとして利用能がないと思われる金属イオン存在下で実験室進化を実施した。結果、添加金属イオンの性質を反映した変異の蓄積傾向を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物が生存できる限界についての研究は、極限環境と言われる過酷な環境で生存する生物を対象に行われるのが一般的である。本研究では、地球上には存在しないような元素環境を人為的に作り、その環境で大腸菌の進化を検討した。その結果、元素にはその性質によって、特定の方向に進化を促すことができる可能性があることを見出した。したがって、生命の生存できる環境の限界を拡張するための基礎的な知見を得ることができたという観点で、学術的な意義がある。また、多くの有用酵素が金属酵素であることも踏まえると、これまでには見られなかったような新たな金属酵素の開発を生物進化を通じて開発できる可能性にもつながる。

研究成果の概要（英文）：Six elements-hydrogen, carbon, nitrogen, oxygen, phosphorus and sulphur-make up the main cell components (water, lipids, nucleotides and proteins) that are essential for life. Additionally, metal ions are required for various physiological processes, such as electron transfer and signal transduction, and can act as catalysts for reactions. However, the choice of metal ions used by organisms varies greatly even if the physiological function is virtually identical.

To understand the mechanisms underlying the selection of metal ions, we conducted an adaptive evolution experiment (ALE) with Escherichia coli in the presence of abiotic metal ions. Genome analysis of the evolved E. coli cells revealed that mutations had accumulated in specific genes depending on the added metal ion's property. This suggests that metal ions bias the evolutionary direction.

研究分野：生命金属進化工学

キーワード：金属イオン 大腸菌 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物が利用する金属元素は、有機物を構成する元素(水素、炭素、窒素、酸素、リン、硫黄)ほどの普遍性はなく、生物種ごとにある程度ばらつきがあることが知られている。例えば、呼吸に鉄を使う生物や銅を使う生物など、機能的に近い過程でも利用する元素が異なる例がある。また、重金属のカドミウムは人体に毒性があると知られるが、微生物の中にはこれを利用するものも存在する。このような特異な元素の利用能は、生育環境にある元素組成に適応的に進化したことで獲得されたと考えられている。実際に、生命が誕生した当時の地球環境、および元素の組成は現代とは大きく異なるものであり、環境変化に合わせて元素の利用能を獲得、変化させていったのではないかという仮説はわかりやすく、また魅力的である。しかし、実際に生物の利用する金属元素が進化プロセスで変化したことを実証した例はない。この仮説を検証する目的で、大腸菌に様々な金属を添加し、長期間に渡る培養を行ってきた。

2. 研究の目的

申請者が培養してきた大腸菌群のうち、金属イオン種に応じた 5 系統(リチウム、ルテニウム、タングステン、ネオジウム、ユーロピウム)に着目し、添加した元素の利用能を示す株の単離を検討すること、そして、株が得られた場合にはそのメカニズムの解明を進めることとした。

3. 研究の方法

5 系統の大腸菌群をそれぞれの金属イオンの入った寒天培地で培養し、複数のコロニーを形成させたのちに、各コロニーを該当する金属イオンの入った培地と入っていない培地で培養する方法で、金属イオンを要求する株の選抜から検討した。4. 研究成果に示すように、狙ったような明確な要求性を示す株の発見には至らなかったため、要求性ではなく、金属イオンが進化に及ぼす影響を評価する方向に切り替えた。ゲノム解析データから、特にユーロピウム添加系列には特徴的な変異パターンが見出されたことから、そのデータに基づいた大腸菌群の特徴を解析した。

4. 研究成果

本研究では、当初、進化培養実験中に添加した金属イオンを要求する株が生じている可能性を検討したが、結果的にはそのような株の単離には至らなかった。しかし、ゲノム解析結果より、ユーロピウム添加系統で、細胞膜構成分子のメタボリズムに関連する遺伝子群に多数の変異が入っていることがわかった。これらの変異は、全体の遺伝子の変異数から見ても統計的な偏りが見出され、したがって、添加した金属イオンに対して有利な変異として蓄積している可能性が示唆された。そこで、この集団についての分析を進めることとした。

集団の細胞膜の安定性について、多角的な評価を行うため、温度に対する細胞の安定性、抗生物質であるバンコマイシンへの感受性の違い、化学的安定性の立場から界面活性剤への抵抗性などを評価した。これらを先祖の株である **Oday** と比較した結果、温度については **Oday** の方が高温で生育できること、バンコマイシンへの耐性も **Oday** の方が高いこと、界面活性剤である **SDS** に対しても **Oday** の方が耐性があることがわかり、ユーロピウム培養系統ではいずれの項目から見ても細胞膜の不安定化が生じている可能性が示唆された。

細胞膜の不安定化が引き起こされる原因として考えられるのは、細胞膜を構成する脂質組成が変化した可能性である。例えば低温環境のように、分子運動が抑制される環境に生育する生物には、あえて膜流動性を上げるために、不飽和脂肪酸を増加させている例がある。不飽和脂肪酸による、折れ曲がり構造が膜脂質の密な充填を妨げ、結果的に流動性が向上すると考えられている。また、ゲノム解析データで脂質メタボリズムに影響がある可能性も示唆されていたことから、脂質の抽出を行い組成の分析を行うこととした。この際比較として **Oday** の脂質も抽出し、ヘッドグループと不飽和度に着目した分析を行った。

結果、**Oday** と比較すると、ユーロピウム培養群からは、不飽和脂肪酸の検出量が少なくなっており、相対的には飽和脂肪酸が多いという傾向が見えた(図)。これは、膜の安定性に関する評価での膜の不安定化を示唆する結果とは大きく矛盾する結果となった。一方、ヘッドグループに着目すると、電気的に中性なフォスファチジルエタノールアミン(**PE**)よりも、アニオン性を示すフォスファチチルグリセロール(**PG**)がユーロピウム系統で増加傾向にあった。一連の結果より、膜上のアニオン性の増加が反発を生み、膜流動性を高めている可能性が示唆された。通常これらの電荷的反発はマグネシウムイオンなどで中和されるが、マグネシウムイオンが 2 価であるのに対して、用いたユーロピウムイオンが 3 価であることから、進化プロセスで膜自体がユーロピウムに適合するような組成に変わった可能性がある。

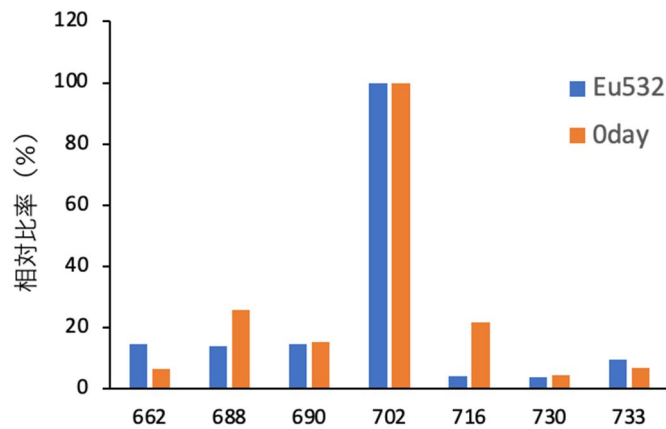


図: 大腸菌から抽出した膜脂質の LC-MS による分析結果。主成分である PE C16:0/cyC17:0 で Eu 添加培養群と、Oday の脂質量を正規化し、相対比率を示した。横軸の数値が検出された脂質膜分子の分子量に相当する。先行研究による帰属を参照すると、733 だけが PG に由来し、その他は全て PE に由来すると考えられる。662 が飽和脂肪酸のみで構成されていると考えられ、先祖株よりも進化系統で増加が認められた。逆に不飽和脂肪酸を含んだピークとして帰属される 688 や 716 では、進化株の方が減少傾向が認められる。

不飽和度の低下についてもユーロピウムによる過酸化生成が原因ではないかと考えられた。先行研究ではユーロピウムイオンが細胞膜脂質の特に不飽和脂肪酸を対象として過酸化物を生成することが知られていた。これは酸化ストレスとして細胞毒性を示す。このような反応が恒常的に起き続ける環境で大腸菌を培養し続けたことにより、徐々に不飽和脂肪酸を多く含む大腸菌が排除されるような環境になり、生き残った大腸菌群には飽和脂肪酸の比率が高くなるという傾向が生じたのではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 川上了史
2. 発表標題 大腸菌の実験室進化を通じたルテニウムイオンへの適応
3. 学会等名 第1回生命金属科学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上了史
2. 発表標題 大腸菌のルテニウムイオンへの進化的適応過程の解析
3. 学会等名 第33回日本微量元素学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 2. 川上了史、堀内祐貴、関田美沙、山口紘武、寺家大輔、大石悠起子、松木里紗、安達拓、春日原大地、多田夏奈子、宮本憲二
2. 発表標題 バナジウムを濃縮するホヤの研究から着想した大腸菌の実験室進化
3. 学会等名 第34回海洋生物活性談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 N. Kawakami, T. Adachi, K. Miyamoto
2. 発表標題 Long-term evolution experiment of Escherichia coli in the presence of neodymium and europium ions
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 D. Kasugahara, N. Kawakami, Y. Horiuchi, H. Yamaguchi, K. Miyamoto
2. 発表標題 Analysis of genomic mutation trends in Escherichia coli populations cultured in the presence of ruthenium for long-term
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Tada, N. Kawakami, Y. Horiuchi, Y. Hiromu, R. Matsuki, K. Miyamoto
2. 発表標題 A study of iron uptake ability and respiratory pathway of a laboratory-evolved catalase deficient Escherichia coli strain
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上了史
2. 発表標題 生命の元素に対する進化的適応過程の解明
3. 学会等名 新学術領域研究「生命金属科学」領域会議 第4回地方巡業(東京)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大津博規、川上了史、堀内祐貴、安達拓、宮本憲二
2. 発表標題 ユーロピウム存在下で長期培養した大腸菌群からの特徴的表現系の選抜
3. 学会等名 第2回生命金属科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------