

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570268

研究課題名(和文)大腸菌とRNAファージQ から成るモデル共進化系における宿主ゲノムの経時変化解析

研究課題名(英文)Characterization of a Escherichia coli strain that evolved in an experimental coevolution system

研究代表者

柏木 明子 (KASHIWAGI, AKIKO)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：40362652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：寄生者であるウイルスと宿主は共進化の中で変化する。申請者は実験室内モデル共進化系を構築し、RNAウイルスと宿主がいかに共進化するのかを研究してきた。本研究では宿主大腸菌のゲノム変化に着目し、その経時変化を大規模シーケンス解析を用いて分析・評価する。それにより、宿主がどのようなゲノムの変化を伴って共進化したのかを明らかにした。さらに、得られたFプラスミド上のtraQ遺伝子上への1箇所の非同義変異が大腸菌の示すQに対する部分抵抗性の責任遺伝子であることを強く示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：To examine the ongoing changes driven by host-parasite interactions, I have constructed a coevolution model consisting of Escherichia coli and the bacteriophage Qb. Whole genome analysis indicated that E.coli showed fixation of two mutations (in traQ and csdA) faster than in sole E.coli experimental evolution.

To elucidate the mechanism underlying this coexistence, I investigated how a mutation in TraQ changed the physiological state of E. coli. Overexpression of wild-type TraQ in the partially resistant strain of E. coli caused both TraA protein content, including propilin and pilin, and Qb amplification to recover to levels comparable with observed in the susceptible strain. These results suggest the possibility that the mutation in TraQ may cause heterogeneity within the E. coli population, with a small number of cells with F pili supporting the phage population and a large number of cells without F pili supporting the E. coli population.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：実験進化学 バクテリオファージ 大腸菌 共進化

1. 研究開始当初の背景

新型・変異型ウイルスの発生は社会問題の一つでありその多くがRNAウイルスであることを考えるとRNAウイルスの進化機構解明は重要である。また、寄生体であるウイルスは宿主との共進化の中で変化する。そこで、申請者は実験室内モデル共進化系を構築し、RNAウイルスと宿主がいかに共進化するのかについて研究を行ってきた。その結果、共進化によってRNAウイルスの分子進化が加速されること、短期間で宿主特異性や宿主に対する毒性が変化すること等を明らかとした。そこで、これらのRNAウイルスの変化はどのような宿主の変化に抗して変化したものであるのかを明らかにするために共進化した宿主の変化を解析することが重要である。

2. 研究の目的

本研究では宿主大腸菌のゲノム変化に着目し、その経時変化を大規模シーケンズ解析を用いて分析・評価する。それにより、宿主がどのようなゲノムの変化を伴って共進化したのかが明らかとなる。さらに、得られたゲノム上の変異が宿主の表現型を変える責任遺伝子(責任変異)であるのかを調べるために、その変異の機能解析を行う。

既に得ている表現型解析の結果と統合し、両者がいかに他方の変化に抗して進化するのかを遺伝子型と表現型の両面から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌ゲノムの解析について

共進化 54 日目(M163(C))の大腸菌の DNA ゲノムを DNeasy Blood & Tissue kit (キアゲン社)を用いて抽出した。抽出した DNA ゲノムの塩基配列を GAIIX(イルミナ社)を用いて解析した。18,718,549 リードが得られ、得られた配列を大腸菌 DH1 株のゲノム配列 (GenBank accession number CP001637.1) と F プラスミドの配列 (GenBank accession number NC\_002483.1) に対してマッピングした。次に、検出された変異箇所の確定を目的として、共培養開始時の大腸菌 Anc(C)、17 日目の M54(C)と M163(C)のゲノムの該当変異を含む領域を PCR で伸長し、サンガー法で塩基配列を解析した。

(2) traQ 遺伝子内変異が大腸菌の表現型へ及ぼす効果の解析について

M54(C) が示す部分抵抗性の責任遺伝子は traQ 遺伝子であるか否かを確かめた。1 非同義置換を持つ traQ<sub>mut</sub> 遺伝子と Anc(C) が持つ traQ<sub>Anc</sub> 遺伝子とを発現ベクター pASK-IBA3+ (IBA Biologics 社) に導入した。得られた pASK-traQ<sub>mut</sub> と pASK-traQ<sub>Anc</sub> で Anc(C) 株と M54(C) 株とを形質転換し、M54(C)/traQ<sub>mut</sub> と M54(C)/traQ<sub>Anc</sub> を得た。ドキシサイクリンによって TraQ タンパク質を高発現し、それらの株での Q ファージの増幅能と TraA タンパ

ク質量を測定した。Q ファージの増幅能は、感染直後と感染 4 時間後の遊離ファージ濃度比として求めた。TraA タンパク質量は Keyhole limpet hemocyanin 結合ペプチド (CDLMASGNTTVKATFGKDSS) に対して作製したポリクローナル抗体を 1 次抗体とし、西洋わさび結合ヤギ抗ウサギポリクローナル抗体を 2 次抗体として用いた。シグナルはケミルミワン(ナカライテスク株式会社)を用いて検出した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌ゲノムの解析について

共進化 54 日目(M163(C))の大腸菌の DNA ゲノムをイルミナ社の GAIIX で解析した。検出された点変異、欠失及び挿入箇所を共進化開始時の大腸菌(Anc(C))のゲノムと比較したところ、共進化によって F プラスミド上の traQ 遺伝子と大腸菌ゲノム上の csdA 遺伝子にそれぞれ非同義置換が 1 箇所ずつ検出された(表 1)。また、17 日目の M54(C)株のゲノムについても GAIIX で検出された点変異及び欠失挿入変異の有無を調べた。その結果、M54(C)株では F プラスミド上の traQ 遺伝子の中に 1 塩基置換が検出された(表 1)。これらの結果より、大腸菌ゲノムの分子進化速度は  $2.6 \times 10^{-9}$ /bp/replication と計算された。この値は大腸菌だけを 37 で継代培養を続けた場合に報告されている分子進化速度  $1.7 \times 10^{-10}$ /bp/replication<sup>(a)</sup> 及び  $1.6 \times 10^{-10}$ /bp/replication<sup>(b)</sup> と比べて約 10 倍大きな値であった。

表 1. 実験室内共進化系における宿主ゲノムの変化

	F プラスミド	ゲノム
Anc(C)	--	--
M54(C)	TraQ (Ser21Pro)	--
M163(C)	TraQ (Ser21Pro)	CsdA (D340N)

先に報告した Q ファージの分子進化速度の結果<sup>(c)</sup>と合わせると共進化によって、宿主と寄生者両者の分子進化速度が単独で継代した場合のの変化よりも大きくなることが明らかとなった。

(2) traQ 遺伝子内変異が大腸菌の表現型へ及ぼす効果の解析について

申請者が構築した大腸菌と RNA バクテリオファージ Q の実験室内共進化実験において、大腸菌が Q ファージに対して部分抵抗性を示すことが示された<sup>(c)</sup>。その部分抵抗性は、少なくとも共進化開始後 17 日目の M54(C)株においても察された。

部分抵抗性を示す大腸菌 M54(C)株に対して、共進化開始時の TraQ(TraQ<sub>Anc</sub>)タンパク質と TraQ<sub>Anc</sub> に 1 アミノ酸置換がある TraQ(TraQ<sub>mut</sub>)タンパク質を M54(C)内で高発現した株では、Q ファージの増幅率が回復するかどうかを解析した。まず、traQ 遺伝子が

導入されていないベクター（空ベクター）が Q 増幅能に与える影響を調べた。その結果、Anc(C) に空ベクターを導入した Anc(C)/vector に Q が感染した場合、Q の増幅率は約 20,000 倍であったのに対し、M54(C) 株に空ベクターを導入した M54(C)/vector では約 1.8 倍と増幅率が大幅に小さくなった。しかしながら、約 1.8 倍ではあるが Q が感染 4 時間で増幅したことは、M54(C) 株が持つ Q への部分抵抗性は空ベクターの導入によっても維持されることが示された（図 1）。

次に、Anc(C) 株が持つ *traQ* 遺伝子 (*traQ<sub>Anc</sub>*) を Anc(C) 株と M54(C) 株に導入したところ、Anc(C)/*traQ<sub>Anc</sub>* では Anc(C)/vector より増幅率が約 0.4 倍となったが、感染 4 時間で Q は約 10,000 倍増幅した。一方、部分抵抗性を示す M54(C) 株に *traQ<sub>Anc</sub>* 遺伝子を導入した M54(C)/*traQ<sub>Anc</sub>* においては、感染 4 時間で Q

は約 10,000 倍増幅し、この増幅率は Anc(C)/*traQ<sub>Anc</sub>* に匹敵するものであった。つまり、*traQ<sub>Anc</sub>* を部分抵抗性株で発現することにより部分抵抗性は回復した。また、興味深いことに、*traQ<sub>mut</sub>* 遺伝子を Anc(C) 株と M54(C) 株とに導入し、Q フェージの増幅率を解析したところ、Anc(C)/*traQ<sub>mut</sub>* は Anc(C)/*traQ<sub>Anc</sub>* と同程度の増幅率を示していたが、M54(C)/*traQ<sub>mut</sub>* では M54(C)/vector より約 900 倍大きく、M54(C)/*traQ<sub>Anc</sub>* の約 0.15 倍であった。このことは、S21P の変異を持つ TraQ タンパク質は菌体内のタンパク質濃度が増加することにより、Q の増幅率が上昇可能であるが、TraQ<sub>Anc</sub> を発現した株での増幅率には及ばないことが示された。

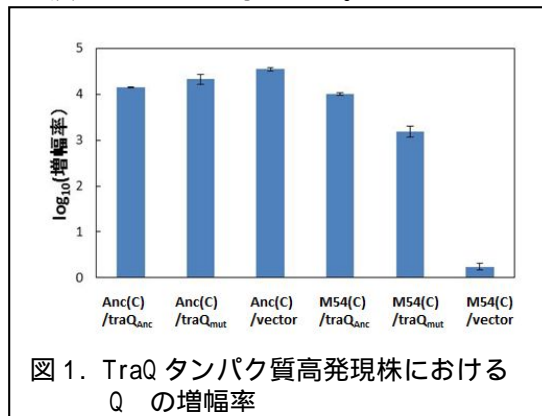


図 1. TraQ タンパク質高発現株における Q の増幅率

次に、Anc(C) 株では感染 1 時間以内に Q フェージの菌体への吸着が見られるが、M54(C) 株では感染 1 時間以内に Q の菌体への吸着が確認されなかった。Q の菌体への吸着は、感染後の遊離フェージ濃度の減少速度を測定することにより求めた。また、TraQ タンパク質の働きは、F 繊毛の構成タンパク質である TraA の前駆体であるプロピリンが細胞内膜に挿入される段階に関係すると報告されている<sup>(d)</sup>。これらのことより、部分抵抗性を示す M54(C) 株においては TraA タンパク質量が変化しているのではないかと仮説

を立て、TraA タンパク質量をウェスタンブロッティング法で解析した（図 2）。600 nm での濁度を基に菌体数を揃えて解析を行った。まず、Anc(C)/vector と M54(C)/vector での TraA タンパク質に対するシグナル強度を比較したところ、M54(C)/vector 株のシグナルが明らかに小さかった。このことは、*traQ* 遺伝子上の変異が細胞集団あたりの *traA* タンパク質量の減少をもたらした可能性を示している。次に、TraQ<sub>Anc</sub> タンパク質を発現するように導入した Anc(C)/*traQ<sub>Anc</sub>* 株と M54(C)/*traQ<sub>Anc</sub>* 株での *traA* に対するシグナル強度を比較すると、M54(C) 株での TraA 量が増加し、両者は同程度のタンパク質量であった。つまり、*traQ<sub>Anc</sub>* 遺伝子は M54(C) 株における TraA 量減少を相補する遺伝子であることが明らかとなった。

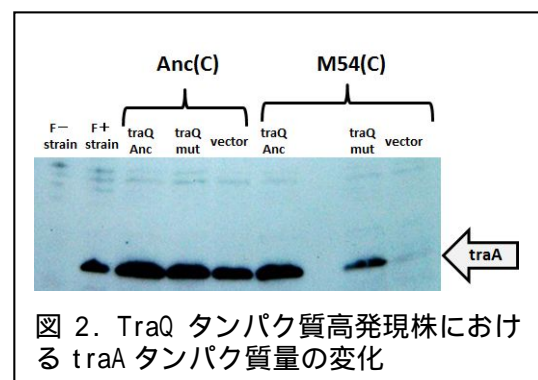


図 2. TraQ タンパク質高発現株における *traA* タンパク質量の変化

興味深いことに、M54(C) 株で TraQ<sub>mut</sub> を高発現した M54(C)/*traQ<sub>mut</sub>* 株では M54(C)/vector より TraA 量が増加した。この TraA タンパク質量は TraQ<sub>Anc</sub> を高発現とした M54(C)/*traQ<sub>Anc</sub>* より *traA* タンパク質量が少なく、M54(C)/vector が示す TraA タンパク質量より明らかに増加した。このことは、変異型の TraQ の細胞内量が増加することが部分抵抗性株集団の TraA 量増加につながったことを意味している。また、図 1 で示した Q の増幅率と照らし合わせると、TraA 量の多少と Q の増幅率に相関があることが示された。

### (3) まとめ

大腸菌と Q フェージとの実験室内共進化系における大腸菌のゲノム解析及び変異が検出された遺伝子の部分抵抗性に対する影響を評価した。その結果、大腸菌ゲノムの分子進化は、現在までに報告されている大腸菌の単独進化系における分子進化速度<sup>(a,b)</sup>と比べると約 10 倍大きいことが示された。また、本共進化系での Q フェージの分子進化速度が単独進化の場合より約 3.4 倍進化速度が大きいことを報告した<sup>(c)</sup>。これらより、実験室内共進化系では、宿主と寄生者の両者の分子進化速度が単独進化系と比べて大きくなること両者の全ゲノムレベルの解析によって明らかとなった。これらの研究成果は〔雑誌論文〕で報告した。

次に、部分抵抗性を示す大腸菌で検出され

た *traQ* 遺伝子への変異が部分抵抗性の責任遺伝子か否かを解析するために、部分抵抗性株に共進化開始時の配列を持つ *traQ* 遺伝子を導入した。その結果、Q に対する抵抗性は相補され、Q が共培養開始時と同程度増幅可能となった。また、*traQ* 遺伝子の変異が F 繊毛構成タンパク質の TraA タンパク質量の減少が観察された。TraQ タンパク質は TraA タンパク質の前駆体であるプロピリンに結合し、プロピリンが内膜に挿入されるステップに参与することや *traQ* 遺伝子ノックアウト株では細胞内でのプロピリンタンパク質の分解が報告されている<sup>(d)</sup>。また、TraQ タンパク質と TraA タンパク質の相互作用領域として報告されている領域内(引用 e)に今回変異が検出された 21 番目のアミノ酸が含まれる。そのため、本研究で得られた TraQ タンパク質内の 21 番目のセリンがプロリンに変わった変異体はプロピリンとの結合様式に変化が生じ、TraA タンパク質が減少した可能性が示唆された。また、F 繊毛の有無、長さや本数は細胞ごとにばらつきがあることが報告されている<sup>(f)</sup>。これらのことから、本研究で得られた部分抵抗性株集団は同一遺伝子型を持っているにも関わらず、TraQ タンパク質のプロピリンと相互作用をする領域に変異が導入されたために F 繊毛を持たない細胞の割合が増え、Q の増幅を支える少数の F 繊毛を持つ株と Q に感染されない大部分の F 繊毛を持たない株から成る表現型においてヘテロな集団となったことが考えられる。本研究によって大腸菌内の 1 遺伝子内の 1 塩基置換が宿主大腸菌の表現型におけるヘテロ性を生み出し、宿主大腸菌と寄生者 Q が長期間共存しながら進化する共進化が生じた可能性が示された。

#### (4) 引用文献

- a. Kishimoto, T., et al., PLoS Genetics, 6, e1001164, 2010.
- b. Barrick, J.E., et al., Nature, 461, 1243-1247, 2009.
- c. 柏木明子, 2009~2010 年度科学研究費補助金研究成果報告書
- d. Maneewannakul, K., J. Bacteriol., 175, 1384-1391, 1993.
- e. Harris, et al., Mol. Microbiol., 34, 1999.
- f. Clarke, M., et al., PNAS, 105, 17978-17981, 2008.

#### 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 3 件)

Tomonori Inomata, Hitomi Kimura, Haruki Hayasaka, Akinori Shiozaki, Yasuhiro Fujita, and Akiko Kashiwagi, 査読有, Archives of Virology, 2012,

vol.157(11), 2163-2169

Akiko Kashiwagi and Tetsuya Yomo, 査読有, 2011, PLoS Genetics, vol.7 (8), e1002188

Saburo Tsuru, Nao Yasuda, Yoshie Murakami, Junya Ushioda, Kotaro Mori, Akiko Kashiwagi, Shingo Suzuki, Bei-Wen Ying, and Tetsuya Yomo, 査読有, 2011, Molecular Systems Biology, volume 7, Article number 493

#### [学会発表](計 13 件)

柏木明子, 菅原竜, 熊谷知史, 對馬(佐野)文恵, 熊坂直也, 四方哲也, 第 65 回日本生物工学会大会, 広島国際会議場(広島県), 2013 年 9 月 18~20 日

柏木明子, 菅原竜, 對馬(佐野)文恵, 熊谷知史, 四方哲也, 日本進化学会第 15 回筑波大会, 筑波大学(茨城県), 2013 年 8 月 28~31 日

菅原竜, 對馬(佐野)文恵, 熊谷知史, 四方哲也, 柏木明子, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場・マリメッセ福岡(福岡県), 2012 年 12 月 11~14 日

Akiko Kashiwagi and Tetsuya Yomo, 日本進化学会 第 14 回 東京大会, 首都大学東京(東京都), 2012 年 8 月 21~24 日

菅原竜, 四方哲也, 柏木明子, 第 34 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県), 2011 年 12 月 13~16 日

柏木明子, 四方哲也, 日本遺伝学会 第 83 回大会, 京都大学(京都府), 2011 年 9 月 20~23 日

Akiko Kashiwagi and Tetsuya Yomo, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011), 札幌コンベンションセンター(北海道), 2011 年 9 月 6~10 日

Akiko Kashiwagi and Tetsuya Yomo, SMBE (Annual congerence of society for molecular biology and evolution), 京都大学(京都府), 2011 年 7 月 26~30 日  
柏木明子, 四方哲也, 日本進化学会第 13 回大会, 京都大学(京都府), 2011 年 7 月 29-31 日

#### [その他]

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/public/akiko-kashiwagi/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柏木 明子 (KASHIWAGI AKIKO)

研究者番号: 40362652