

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011年度～2012年度

課題番号：23770021

研究課題名（和文） 共生成立に寄与する表現型可塑性の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of a phenotypic adaptation to establishment of a synthetic bacterial mutualism

研究代表者

細田 一史 (HOSODA KAZUFUMI)

大阪大学・大学院情報科学研究科・招へい准教授

研究者番号：30515565

研究成果の概要（和文）：相利共生は自然界のいたるところに存在し、その成立と進化は生態学において重要な問いである。生物はいかにして他の生物との初遭遇に適応し、共生を成立させ、進化するのか？これには実験的に共生の成立と進化を再構成することが効果的である。これまでに私達は、2種の大腸菌により人工的に相利共生の成立を模倣することで、迅速な表現型変化が共生成立に寄与していることを示した。本研究では、この共生成立に寄与する表現型変化の分子機構解明だけでなく、この相利共生の進化まで実験的に示した。

研究成果の概要（英文）：Mutualism is ubiquitous in nature, and its establishment and evolution are important issues in ecology. To understand how organisms adapt to the first encounter with another organism to establish and evolve mutualism, experimental reconstruction of these processes is a useful strategy. Previously, we experimentally simulated the establishment of mutualism using two genetically-engineered auxotrophic strains of *Escherichia coli*, and found that one strain rapidly changed its phenotype, eventually leading to the establishment of the mutualism. Here we show not only the molecular basis of the observed phenotypic change, but also the experimental evolution of this mutualism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：個体群、実験室内共生系

1. 研究開始当初の背景

生物はいかにして異種との初遭遇に適応し、共生関係を成立させるのか？生物の適応には、(1)自然選択による適応と、(2)環境に応答した一世代内の適応（特に順応という）の2種類がある。(1)は主に遺伝子配列の変化を伴うため、系統解析による研究が進んでいる。(2)は主に表現型可塑性によるもので

あり、環境変化への迅速な適応として重要な役割を持つ。また偶然の適応も含め、初めての環境変化への順応も注目されている。共生が成立（両者が継続的に増殖）した後は、主に(1)によって適応していこう。一方、(1)は増殖に依存するため、継続的増殖が起こる前の共生成立には、(2)の順応の寄与が特に重要になるだろう。

共生成立に寄与する順応の研究には、以下の2つの困難さがある。①その寄与を示すには、表現型変化と個体群動態の関係を調べる必要があるが、既に成立した天然の共生系の成立時は観測できない。②順応の機構は分子レベルまで掘り下げる必要があるが、表現型を決める分子機構はとても複雑である。①には天然では共生関係に無い2生物により共生成立を模倣する手法で、また②には極力単純である大腸菌や酵母をモデルとすることでアプローチすることができる。

私達はこれまでに、2種の大腸菌栄養要求性株を用いて共生成立を模倣し、順応が共生成立に寄与することを示した。具体的には、Ile を要求する I-株と、Leu を要求する L-株による、相利の栄養共生であり、少なくとも一方が順応しなければ絶滅する実験系にした。結果、共培養後9時間以内にL-株のIle漏洩量が50倍程度増加するよう順応することで、両者が継続的に増殖(共生成立)することを示した。

2. 研究の目的

このL-株の順応は、透過性膜により2種大腸菌間の直接接触を排除した共培養でも観察されるため、2種大腸菌間の生化学分子を介した相互作用が重要と考えられる。よって本研究では、共培養における2種から漏洩される分子の測定や、化学合成したそれら分子を加えたときの大腸菌の挙動を調べること、分子機構の解明を目的とした。

さらに、予定より研究が早く進んで上記の研究開始当初の目的が達成されたため、より一歩進めて、順応(2)により共生成立が把握できた後の、相利共生の進化的適応(1)の解明も目的とした。

3. 研究の方法

図1の実験生態系に関して研究を行った。2種類の遺伝子組み換え大腸菌が、互いにIleとLeuを供給しあって初めて増殖することができる人工相利共生である(図1左)(遺伝子組み換えコンストラクトにより発表論文2にもつながった)。これを共培養すると、L-がまだ増殖していない間にL-からのIle供給量が増加するという表現型変化があり、これによってI-が増殖し、最終的には両者が増殖した。これは安定に継代培養することができ、相利共生が成立したと言える。

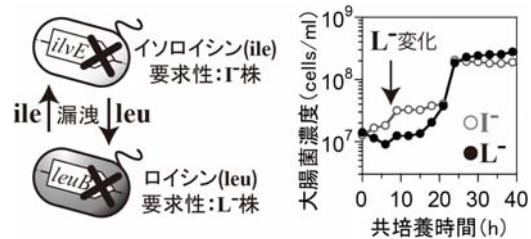


図1：用いた実験生態系

この実験生態系を、図2のように透過性膜で仕切ること、2種それぞれを別々に採取し、DNA microarrayによってトランスクリプトーム解析を行った。また、培地中成分を測定するために、液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)によってメタボローム解析を行った。これらに関して、共培養の比較サンプルとして、単独培養も測定した。

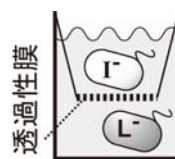


図2：透過性膜を用いた分離共培養

4. 研究成果

私たちはまず、以下の仮説を立てた。2種類の大腸菌が、代謝反応回路を部分的に結合させることで、互いに必要な栄養素を供給しあい、これが最終産物の供給量増加という表現型変化として観察されるというものである。これは、L-株から相手へのIle供給量が増加したという表現型変化は、Ile供給量が増加しただけでなく、他の部分も変化しており、分子レベルで2種類の大腸菌の代謝回路を考えれば説明できるという発想である。

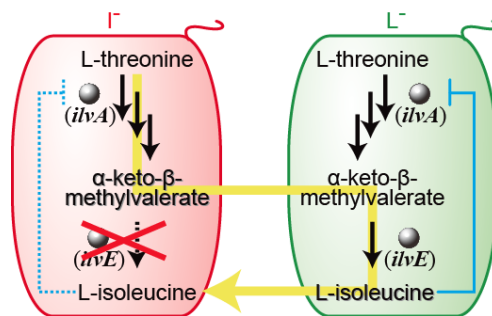


図3：分子機構の仮説

具体的には、図3に示すように、I-株は*ilvE*を欠損しているため、Ileを合成できずに、Ileの前駆体 α -keto- β -methylvalerate (α KMV)まで合成して代謝回路は止まる。しかし、I-はIleを不足しているため、酵素阻害による調整機構(青線)が働かず、大量に α KMV

がたまっていく。大量にたまった α KMVは細胞膜および環境培地を経て、L-株に供給される(黄線)。L-株は α KMVをIleに変換する酵素を持っているため、大量に供給された α KMVは大量のIleへと変換される。この時、L-ではIleが大量に存在するため、Ile合成を抑制する、酵素阻害による調整機構が働くが、それは上流の反応(*ilvA*が担う反応)に影響するため、途中から入ってきた α KMVを押さえることは無い。つまり、既存の制御機構をかくぐって、2種類の大腸菌によって新しい代謝回路ができ、それがIleを大量に供給するというL-株の表現型変化の分子機構であるという仮説である(発表論文4)。

トランスクリプトーム解析により、L-株の共培養前後では、IleやLeu関連の分子の膜輸送に関連するABC輸送系のペリプラズム結合タンパク質の発現量が有意に(4倍程度)高まっているなど、細胞間相互作用が強まっていることが示唆された。これは、上記仮説を支持している。

また、メタボローム解析により、I-から α KMVが培地環境中に過剰に供給されていることが確認された(遺伝子欠損していない株の1000倍以上)。さらに、共培養では α KMVが培地環境中にあまり存在しないことから、 α KMVがL-によって使用されていることが示唆された。これらのことは、上記仮説を強く支持している。

そのうえ、上記仮説を検証するために、化学合成した α KMVをL-株の単独培養における培地環境に加えて、L-からのIle供給量の測定を行うと、加えた α KMVの量に比例して、Ileが供給されることが確認され、量的にも説明可能であることがわかった。以上により、表現型変化の分子機構は、上記仮説のように、2種大腸菌により、新しい代謝回路ができるというものであることが実験的に強く示唆された(論文作成中)(相利共生の成立方法が発表論文1につながった)。

予定よりも早く、上記のように研究開始当初の目的が達成されたため、さらにより一歩進めて、この迅速な表現型変化による適応(2)により共生が成立した後の、進化による適応(1)も実験室内進化によって調べた。相利共生は自然選択による進化競争において脆弱であることが知られており、生態学や進化生物学において相利共生の進化は大きな間になっている。背景に記述した、(1)自然選択による適応と、(2)環境にตอบสนองした一世代内の適応において、上述のように(2)を明らかにしたので、さらに(1)を調べて統合的に理解することが重要である。

具体的には、図1にある人工生態系を、1,000世代ほど継代培養した。結果、多くの研究により、グループセレクションなどの特殊な機構のための空間構造などがなければ、相利共生は進化において衰退していくと予想されていたにもかかわらず、実験進化によってむしろ発達していくことが示された(図4)(論文作成中)。

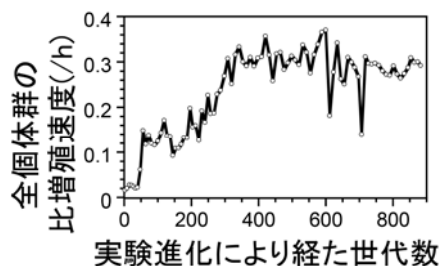


図4：人工相利共生の実験室内進化

自然界には多種多様な生物が存在し、互いに遭遇することで共生成立の機会を持つ。この共生成立に寄与する表現型可塑性の分子機構の概要を、初めて実験的に示すことができた。さらにこの進化についても重要な結果が得られた。人工的であり一例であるが、大きな意義があり(国際会議受賞)、今後一般化にも繋がるだろう。

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) I. Kubo, K. Hosoda, S. Suzuki, K. Yamamoto, K. Kihara, K. Mori, T. Yomo, Construction of bacteria-eukaryote synthetic mutualism. *BioSystems* (accepted, 2013). (査読有)
DOI: 10.1016/j.biosystems.2013.05.006
- (2) I. Kumano, K. Hosoda, H. Suzuki, K. Hirata, T. Yomo, Hydrodynamic trapping of *Tetrahymena thermophila* for the long-term monitoring of cell behaviors. *Lab on a chip* 12, 3451 (Sep, 2012). (査読有)
DOI: 10.1039/C2LC40367F
- (3) K. Hosoda, A. Asao, S. Suzuki, T. Yomo, Experimental evolution of an artificial bacterial mutualism. *Proceedings of Artificial Life 13 (MIT press)*, 523 (Jul, 2012). (査読有, 国際会議論文)
ISBN: 9780262310505

<http://mitpress.mit.edu/books/artificial-life-13>

- (4) K. Hosoda, T. Yomo, Designing symbiosis. *Bioengineered bugs* 2, 338 (Nov, 2011). (査読有)
DOI: 10.4161/bbug.2.6.16801

[学会発表] (計 11 件)

- (1) 細田一史, 浅尾晃央, 鈴木真吾, 四方哲也, 協力の進化について実験進化が出てきた一つの解, 第 28 回個体群生態学会大会, 2012 年 10 月 20 日~21 日, 東邦大学.
- (2) K. Hosoda, M. Sueyoshi, A. Asao, I. Kumano, S. Suzuki, T. Yomo. Experimental evolution of synthetic microbial symbioses. *Joint meeting of the 28th Annual Meeting of the Japanese Society of Microbial Ecology (JSME2012), and the 4th Japan-Korea International Symposium on Microbial Ecology (JK-ISME 2012)*. 2012/09/19-22, Toyohashi University, Japan. (招待講演)
- (3) K. Hosoda, A. Asao, S. Suzuki, T. Yomo. Experimental evolution of an artificial bacterial mutualism. *The Thirteenth International Conference on the Synthesis and Simulation of Living Systems (Artificial Life XIII)*, 2012/07/19-22, Michigan State University, USA.
- (4) K. Hosoda, Experimental evolution of an artificial bacterial mutualism, 複雑系生命システム研究センターセミナー, 2012 年 3 月 29 日, 東京大学. (招待講演)
- (5) K. Hosoda, A. Asao, S. Suzuki, T. Yomo. Synthesizing symbiosis. *Joint Meeting of The 59th Annual Meeting of the Ecological Society of Japan and the 5th EAFES International Congress*, 2012/3/17-21, Ryukoku University, Japan.
- (6) 細田一史, なぜ生物は共生するのか? 実験的に再構成して考える, 第 23 回計測自動制御学会 SI 部門共創システム部会研究会・第 6 回内部観測研究会, 2012 年 3 月 17-18 日, 神戸大学. (招待講演)

- (7) K. Hosoda, A. Asao, S. Suzuki, T. Yomo. Synthesizing symbiosis. *International Symposium on Synthesizing life and biological Systems*, 2011/10/24-26, Life Science Center, Japan.

- (8) 細田一史, 浅尾晃央, 鈴木真吾, 四方哲也, 細菌によるモデル相利共生 (協力系) は空間構造等が無くとも進化した, 第 27 回個体群生態学会大会, 2011 年 10 月 14-16 日, 岡山大学.

[その他]

- (1) 国際会議受賞: K. Hosoda, Evolution in action Best Poster (2012)

(2) Web ページ

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=2939>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細田 一史 (HOSODA KAZUFUMI)

大阪大学・大学院情報科学研究科・招へい准教授

研究者番号: 30515565