

平成 29 年 4 月 16 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440194

研究課題名(和文) RNAバクテリオファージQ の高温適応実験進化における適応機構の解明

研究課題名(英文) Thermal adaptation mechanism of RNA bacteriophage Qb

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：進化生物学において、適応進化に大きく貢献する遺伝子(責任遺伝子)や塩基の同定、及び、それらの適応度上昇への貢献度を定量評価することは重要な課題である。そこで、実験代表者らが構築したRNAバクテリオファージQ の高温適応進化実験で得られた変異体の表現型変化に対する定量評価とゲノム情報とを比較することにより、Q の高温適応において重要な働きを示す責任遺伝子と責任変異を同定し、また、それらが表現型にどのようにどの程度影響を及ぼすのかを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the evolutionary biology, it is very important issue to identify genes and mutations that are responsible for the adaptation. We performed a thermal adaptation experiment using the single-stranded RNA bacteriophage Q in which the culture temperature was increased from 37.2 to an inhibitory temperature of 43.6 in a stepwise manner in three independent lines. And we obtained three kinds of mutants that were able to amplify at 43.6. In this study, we measured their fitness and infection cycle quantitatively, and identified the responsible genes and substitutions for thermal adaptation of Q.

研究分野：実験進化学

キーワード：適応進化 RNAバクテリオファージ 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

進化生物学において、適応進化に大きく貢献する遺伝子(責任遺伝子)や塩基の同定、及び、それらの適応度上昇への貢献度を定量評価することは重要な課題である。しかしながら、現存の生物を比較する手法では多くの変異が複数の遺伝子上で同時に検出されることにより、責任遺伝子の同定が難しい。また、異なる変異間の相互作用が表現型に影響を表す(エピスタシス)が存在することも責任遺伝子や責任塩基の同定及びそれらの適応度上昇への貢献度を明らかにすることを難しくしている。しかしながら、実験進化の手法を用いれば、適応過程の始点、中間点、終点と変化する過程を追跡することが可能であるため、どの変異がいつ集団中に固定された(若しくはその変異を持つ個体の割合が増えたのか)ということが明らかである。また、得られた変異を始点の個体のゲノムに戻すことにより、それぞれの変異の適応度への貢献度と定量評価することが可能になる。

実験進化の手法を用いた適応進化における責任遺伝子の同定、責任変異の同定は、モデル生物である酵母、大腸菌、DNA ウイルス、RNA ウイルスを用いて国内外で数多く研究されている。酵母や大腸菌を用いた先行研究では、独立複数系列で同じ環境変化に対する適応実験を行った結果、同一点変異が複数系列で見られるのではなく、遺伝子やオペロンにおいて共通の変異が見られた。一方、研究代表者らは、37 で最も高い増幅率を示す Q が元来増殖できない高温条件(43.6)で増殖可能となるまで、段階的に培養温度を上げながら継代を続ける実験室内高温適応進化を行った。この適応において、独立3系列で共通した点変異が8箇所、系列特異的な変異が5~10箇所見られた。このことより、研究代表者らが構築した系を用いることによって Q の適応進化に貢献する責任遺伝子と責任塩基の同定及びそれらの適応度上昇への貢献度を定量評価することが可能になると考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者らは Q をモデルとし、野生型が増幅できない高温環境(43.6)で増幅可能となる過程を追跡可能な高温適応実験進化を行った。独立3系列で行った進化実験のゲノム解析の結果、全系列に共通する塩基置換を含む複数の塩基置換の蓄積が明らかになった。独立複数系列で共通塩基置換が検出されたことは、これらが Q の高温適応に大きく貢献する可能性を示唆している。本研究は、共通塩基置換だけを持つ Q と系列特異的な変異を共通変異に加えて持つ変異体の 43.6 での適応度、宿主への吸着から子孫 Q 放出までの複数の段階から成る生活環のどの段階をどのように変え高温環境に適応したのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 高温適応変異体の作製と適応度の測定

3種類の高温適応変異体を持つ 13, 17, 18 箇所の点変異及び1塩基挿入を Q ファージ RNA ゲノムの cDNA に In-Fusion cloning kit (タカラバイオ株式会社)を用いて導入した。既に作製していた3系列に共通して見られた8箇所の変異点を有する cDNA (p_8mut) に1度の反応毎に1~2箇所の変異を何回かに分けて導入した。また、17mut と 18mut が有するファージゲノム 5' 末端の1塩基挿入は、1塩基挿入配列を含む約400塩基の配列をファスマック株式会社に人工合成を依頼し、それを鋳型として PCR を行った。得られた cDNA から3種類の高温適応変異体 13mut, 17mut, 18mut を作製した。得られた3種類の変異体と3系列に共通した変異を持つ変異体(8mut)と適応進化実験開始時の Q (Anc) に対して適応度を測定した。適応度はファージ感染後5時間後の遊離ファージ濃度の増加率として定義した。

(2) Q の 43.6 での残存力価の測定

Q はファージ由来の3種類のタンパク質(coat, A2, A1)で外殻を作り、その中に1分子の RNA ゲノムが含まれる。そのため、高温条件下ではタンパク質の熱変性等が生じるため、適応度を測定する5時間の培養時間の中で Q の力価が低下する可能性が考えられた。そこで、残存力価をサーマルサイクラーで 43.8 で5時間保温した後の力価と氷中に5時間置いたものの力価の比として求めた。

(3) 高温適応変異体の生活環の定量解析

Q の生活環(感染サイクル)は大きく3段階に分けられる。それらは i) Q の宿主大腸菌への吸着、ii) 宿主大腸菌内での Q の3種類のタンパク質の合成と Q ゲノムの複製、及びそれらのアッセムブリ、iii) 宿主より子孫 Q 粒子の放出、である。

Q の宿主大腸菌への吸着段階は吸着速度定数を求めることによって定量解析を行った。吸着速度定数は宿主のレセプターに吸着することによる未感染ファージの減少速度から求めた。未感染ファージの減少は、 $-d[P]/dt = k[B][P]$

で示される。ここで、[P]は時間 t における未感染の遊離ファージ濃度(PFU/ml)、k は吸着速度定数(ml/cell/min)、[B]は未感染宿主濃度(CFU/ml)を示している。43.6 でファージを対数増殖期の大腸菌に加えた後、継時的にサンプリングした培養液を 0.2 μm のシリンジフィルターを通すことによって、遊離ファージを得た。この遊離ファージ濃度は二重寒天重層法を用いて求めた。遊離ファージ濃度の減少速度から k を求めた。

ii), iii) の段階は one-step growth experiment (引用)を行うことにより、感染後に子孫ファージを放出し始めるまでの潜伏期と感染菌あたりの子孫ファージ数を求めた。

4. 研究成果

(1) 高温適応変異体の作製と適応度の測定

p_8mut に対し、多段階で高温適応変異体を持つ系列特異的な変異（5 箇所、9 箇所、10 箇所）を導入した 3 種類の cDNA (p_13mut, p_17mut, p_18mut) を作製し、これら cDNA が 3 種類の変異体 (13mut, 17mut, 18mut) を調製した。得られた 3 種類のファージと 8mut 及び Anc の適応度を測定した (図 1)。その結果、3 系列で共通した変異だけではなく系列特異的に固定された変異が高温での増殖に重要であることが示された。

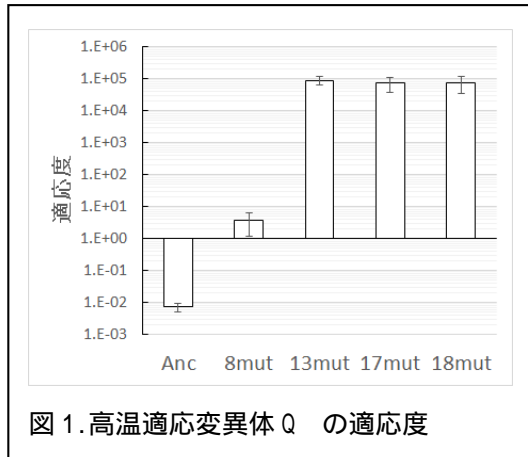


図 1. 高温適応変異体 Q の適応度

(2) Q の 43.6 での残存力価の測定

Q はファージ由来の 3 種類のタンパク質 (coat, A2, A1) で外殻を作り、その中に 1 分子の RNA ゲノムが含まれる。そのため、高温環境下で高温適応変異体が増殖可能となったのは高温での熱安定性が上昇した可能性が考えられる。そこで、Q を 5 時間 43.8 で保温した後に残る残存力価を測定した (図 2)。Anc では保温 5 時間での力価の低下が認められなかったが、高温適応変異体では保温 5 時間で力価が約 35~50%に減少した。この結果から、高温適応変異体が高温で適応度が上がったのは、Q の耐熱性が上昇したのではなく、感染サイクルのどこかのステップが変化した可能性が示唆された。

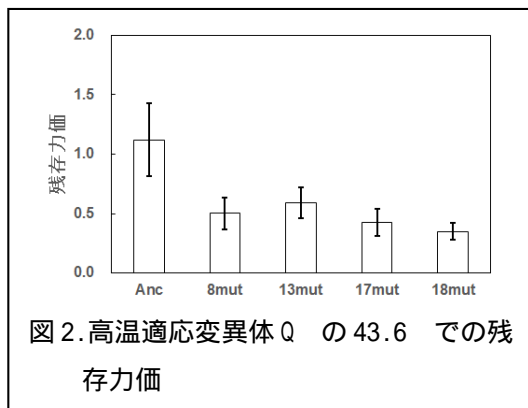


図 2. 高温適応変異体 Q の 43.6 での残存力価

(3) 高温適応変異体の生活環の定量解析 吸着速度定数の決定

Q の感染サイクルの第一段階は大腸菌の F 繊維毛への吸着である。そこで、各変異体と Anc の吸着速度定数を測定した (図 3)。Anc の 37.2 と 43.6 での吸着速度定数は $8 \times 10^{-10} \pm 1 \times 10^{-10}$ 及び $4 \times 10^{-11} \pm 1 \times 10^{-11}$ (ml/cell/min) であり、43.6 では吸着速度が減少した。次に、8mut と 3 種類の高温適応変異体の吸着速度定数は、Anc のそれよりも増加傾向にあった (図 3)。つまり、高温適応変異体には高温環境下での吸着速度が大きくなるという表現型の変化が見られた。8mut と Anc のファージ粒子を形成する 3 種類のタンパク質の中でアミノ酸配列の違いが見られたのは A2 タンパク質中の Asp342Gly だけであったことからこの 1 アミノ酸置換の吸着速度上昇への寄与が明らかになった。

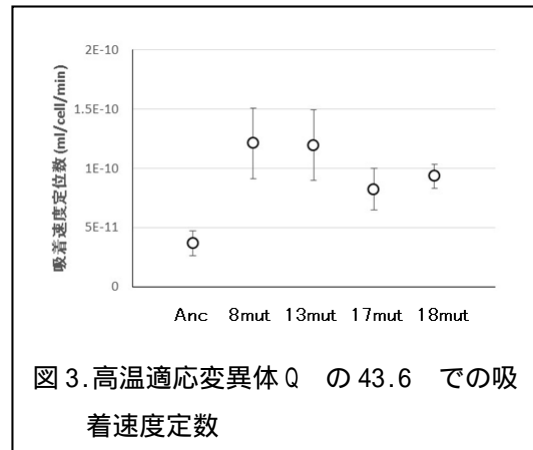


図 3. 高温適応変異体 Q の 43.6 での吸着速度定数

潜伏期と子孫ファージ放出数の決定

Q の感染サイクルの第 2 と第 3 段階は、感染後子孫ファージを放出するまでの潜伏期間と感染菌あたりの子孫ファージ放出数として定量評価した。感染後 30 分間をファージと宿主の吸着時間とし、その後遠心分離により非吸着ファージを除去した。放出された子孫ファージによる感染を防ぐため感染菌を希釈し、経時的に力価を測定した。得られたファージの増幅曲線を 4 パラメーターロジスティック式で回帰し、上記 2 つのパラメーターを求めた (表 1)。

表 1. 43.6 での潜伏期と放出数

	Anc	8mut	13mut	17mut	18mut
潜伏期 (分)	160-170	80-120	40-50	70-80	80-90
放出数 (PFU)	2	15	45	45	45

Anc に比べて 8mut, 13mut, 17mut, 18mut では潜伏期が短くなり、放出数が大きくなっていた。これらのことから、共通した 8 箇所の変異は潜伏期の短縮と放出数の増加に寄与していることが明らかとなったが、各系列での変異は更なる両パラメーターの改善に貢献したことが明らかとなった。また、8mut と Anc を比較すると A2 と Q 複製酵素を構成

するファージ由来の サブユニットが1アミノ酸異なっていた(主な発表論文)。そのため、8mutでAncより潜伏期が短くなったことと放出数が増加したことは、サブユニット上の変異Val142Alaによるものであることが示唆された。

(4)考察

この研究では、研究代表者らは高温適応進化実験で得られた変異体の適応度と感染サイクルにおけるパラメーターの定量評価を行った。変異体間の塩基配列の結果と定量評価の結果とを比較することにより、Qの高温適応に寄与した責任遺伝子と責任変異を同定した。

吸着速度の増加に対する責任遺伝子はA2タンパク質であり、責任変異はA1088G(Asp342Gly)であると考えられた。近年、Qのクライオ電子顕微鏡解析によってA2タンパク質のシート豊富な部分がハンドルのようにファージ外殻から突き出していることが報告され(引用)。また、QのA2タンパク質の結晶構造解析が報告された(引用)。結晶構造からAsp342は周辺のcoatタンパク質二量体と相互作用していることが強く示唆されている部位である。そのため、レセプターであるF繊維と吸着するであろうシートに富む領域の構造の安定性等がこれらのアミノ酸が変わることにより影響を受け、吸着速度を増した可能性が考えられる。更に、coatタンパク質二量体と相互作用する箇所に変異が入ったことにより、粒子の構造等が変わることによって8mutは粒子耐熱性が下がった可能性が考えられる。

潜伏期の短縮と子孫ファージの放出にはQ複製酵素の変化が強く関与していることが示唆された。

以上の結果より、Qの高温適応メカニズムは、吸着速度の増加と子孫ファージを放出するまでの時間の短縮、及び、放出する子孫ファージ数の増加によるものであることが明らかとなり、またその表現型の変化に寄与する責任遺伝子と責任変異を同定した。

<引用文献>

Inomata, T., Kimura, H., Hayasaka, H., Shiozaki, A., Fujita, Y., Kashiwagi, A., Quantitative comparison of the RNA bacteriophage Q infection cycle in rich and minimal media, Arch.Virol., 157, 2012, 2163-2169.

Gorzelnik, K.V., Cui, Z., Reed, C.A., Jakana, J., young, R., Zhang, J., Asymmetric cryo-EM structure of the canonical allovivivirus Q reveals a single maturation protein and the genomic ssRNA in situ, PNAS, 113(41), 2016, 11521-11524.

Rumnieks, J., Tars, K., Crystal Structure of the Maturation Protein from Bacteriophage Q, JMB, 429(5), 2017, 688-696.

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 2件)

Akiko Kashiwagi, Hikari Kitamura, Fumie Sano Tsushima, Characterization of a single mutation in TraQ in a strain of *Escherichia coli* partially resistant to Q infection, *Frontiers in Microbiology*, 6号, 2015, 124, doi: 10.3389/fmicb.2015.00124

Akiko Kashiwagi, Ryu Sugawara, Fumie Sano Tsushima, Tomofumi Kumagai, and Tetsuya Yomo, Contribution of silent mutations to thermal adaptation of RNA bacteriophage Q, *Journal of Virology*, 査読有, 88号, 2014, 11459-11468, doi: 10.1128/JVI.01127-14.

[学会発表](計19件)

柏木 明子、実験室内進化系でのRNAファージQの適応度進化、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

角谷珠実、熊谷知史、熊坂直也、菅原竜、柏木 明子、高温適応変異体Qファージの吸着速度定数の比較、ファージ・環境ウイルス研究会 合同シンポジウム、2016年10月21日、JAMSTEC 横須賀本部(神奈川県・横須賀市)

柏木 明子、微生物を用いたフラスコの中での実験進化、2015年度日本生物工学会北日本支部札幌シンポジウム、2016年3月26日、北海道大学フロンティア応用科学研究棟 2階 鈴木章ホール(北海道・札幌市)

Akiko Kashiwagi、Rapid adaptation of RNA bacteriophage to environmental changes、異分野融合ワークショップ「微生物生命システム研究と合成生物学の融合」、2016年3月18日、奈良先端科学技術大学院大学(奈良県・生駒市)

柏木 明子、実験室内進化系でのRNAバクテリオファージのゲノム変化、化学工学会第47回秋季大会、2015年9月9日、北海道大学(北海道・札幌市)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)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