

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440200

研究課題名(和文) 実験室耐熱進化系を用いた新規相互作用の出現・消失機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of interaction emergence and disappearance mechanism by experimental evolution

研究代表者

岸本 利彦 (KISHIMOTO, Toshihiko)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：90339200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,793,232円

研究成果の概要(和文)：通常大腸菌では致死温度となる45℃ 適応進化過程の初期において、相互作用依存的増殖が生じ、適応経過とともに濃度依存性が解消する現象が確認された。本研究では、45℃ 適応進化初期に固定される変異が段階的に蓄積した大腸菌株を単離し、蓄積変異と相互作用の対応を解析した。その結果、ストレスによる代謝モードの変更 2次代謝産物の蓄積 細胞の2次代謝産物利用 相互作用の発生 細胞内の秩序回復 代謝モードの回復 相互作用の消失 というストレス環境への適応進化と相互作用の相関が示唆された。

研究成果の概要(英文)：On the early process of *E. coli* 45℃ adaptive evolution, we have observed emergence and disappearance of interaction dependent growth. In this study, we first isolated *E. coli* clones with mutations correspond to thermo-adaptive evolution, and analyzed metabolic features (interaction dependence of growth, oxygen consumption, glucose consumption, and lactate production) of every mutant at 45℃. The results indicated adaptation pathway during 45℃ as following; 1st: alteration of mode of respiration, 2nd: accumulation of metabolites in growth media, 3rd: emergence of mutant with ability of utilization of metabolites as interactor, 4th: stabilization of intracellular environment with chaperonin mutation, 5th: recovery of mode of aspiration, and finally disappearance of interaction.

研究分野：分子細胞進化学

キーワード：実験室進化 高温適応進化 相互作用 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

相互作用は単細胞生物から多細胞生物への進化等、生物進化において大きな役割を果たしている。進化説はダーウィンによる自然選択、木村による遺伝子中立進化が一般的であるが、それだけでは相互作用が進化過程でどのように生じ、進化にどのように影響してきたかは説明できていない。このため進化を実験室で再現し、相互作用が進化にどのように影響するかを解析・考察することは非常に重要である。

我々は*E. coli* 耐熱進化実験系を構築し、45 適応進化過程で正選択から変異率上昇による中立進化に進化様式が変化する初めての例を示した(Kishimoto, T. *et al.*, *PLoS Genetics*, 2010)。同時に、45 適応進化初期の*E. coli* 集団において相互作用による適応促進を見いだした。この45 適応を促進する相互作用は、変異と細胞内ネットワーク、代謝ネットワークが関連し、その出現・減少が生じていることを示していた。そこで、この系を用い進化上未知の課題である進化過程での相互作用の出現・消失メカニズムを解明し、相互作用が進化に与える意義を検証することとした。

研究開始当初、実験室進化系を用いた相互作用の検出・解析例として、細胞性粘菌と*E. coli* の共生状態における遺伝子発現状態の変化による*E. coli* の適応 (K. Kihara, *et al.*, *BioSystems*, 96, 141-164 (2009))、グルタミン等の栄養物の分泌・受容を介した「競争の共存」による遺伝子多様性の保持 (A. Kashiwagi, *et al.*, *J. Mol. Evol.*, 52, 502, 2001)、インドールを介した利他的な抗生物質耐性機構 (H.H. Lee, *et al.*, *Nature*, 467, 82, 2010) が挙げられる。しかし、実験室進化系での相互作用分子分泌 協調的増殖誘導を介した適応進化を促進する相互作用やその出現・消失メカニズム解析例はなかった。また、細菌の相互作用としてクオラムセンシングが精力的に研究されているが、進化過程でのクオラムセンシング機能獲得に関しては、関連遺伝子の系統解析 (E. Lerat, N.A. Moran, *Mol. Biol. Evol.*, 21, 903, 2004) はあるが相互作用の起源は未知である。我々の*E. coli* はプラスミドのない単クローン*E. coli* であり、発見した相互作用は進化過程での純粋な獲得形質であり、相互作用起源の探索に適している。近年、合成生物学アプローチによりクオラムセンシングを利用して、生物時計の構築 (Danino *et al.*, *Nature*, 463, 326, 2010)、細胞挙動の自律制御 (Daniel *et al.*, *Nature*, 497, 619, 2013)、相互作用物質生産と集団挙動の同調 (Dandekar *et al.*, *Science*, 338, 264, 2013) 等、相互作用の集団挙動への重要性は示されたが、進化過程における相互作用の出現・消失メカニズムは未知である。*E. coli* 耐熱進化に関しては、完全培地で生育限界温度 3.0 上昇の報告がある (B. Rudlph, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 285, 19029, 2010)。

我々の系は、代謝経路がフル活動する最少培地で生育限界温度 4.7 上昇を実現し (T. Kishimoto, *et al.*, *PLoS Genetics*, 6, e1001164, 2010)、耐熱進化過程を解明する格好の材料となる。また 42 耐熱進化*E. coli* や 37 継代進化*E. coli* のゲノム解析・発現解析は行われているが (M.M. Riehle, *et al.*, *Physiol. Genomics*, 14, 47, 2003, J.E. Barrick, *et al.*, *Nature*, 461, 1243, 2009 他)、相互作用の面からのアプローチ例はない。本研究では、変異既知の 45 耐熱進化*E. coli* を用い、相互作用による表現型・代謝変化を進化過程で経時的に測定・解析し、相互作用の起源および進化への影響を明らかとすることが可能であると考えられた。

2. 研究の目的

細胞間の相互作用は生物進化において大きな役割を担っているが、どのように出現し進化にどのように寄与してきたかは未知の部分が多い。相互作用の出現とその役割 (進化促進等) を解明するため、45 への*E. coli* 適応進化過程の初期に見いだされた集団の適応度向上に働く新たな相互作用について、その進化過程における機能発現および作用機構を解析する。そのために

- 1) *E. coli* 相互作用に重要なゲノム変異の同定、
 - 2) 進化過程における相互作用応答性とゲノム変異との相関を解析
 - 3) 進化過程における相互作用物質出現、反応性獲得メカニズムの解析
- 相互作用の進化過程における出現・消失のメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

45 適応 0, 19, 39, 57, 78 日目の*E. coli* 集団を、限界希釈法により 1 細胞培養し、クローン*E. coli* を得た。これまでに判明している 45 適応進化過程で固定される変異のうち、45 149 日目までに固定される変異を対象として、クローン*E. coli* の保有する変異をサンガー法により同定した。

相互作用依存性は、45 適応初期の*E. coli* の培養上澄み 20% 添加した mM63 培地を用いて、変異解析の完了したクローン*E. coli* に関して培養上澄み依存的な増殖が見られるかを解析した。また各クローン*E. coli* に関して植菌濃度を変化させ経時的に菌濃度を測定することにより増殖の濃度依存性を解析した。45 適応進化過程における代謝活性の測定は、増殖速度、培地中溶存酸素、グルコース濃度、乳酸濃度を測定した。増殖速度の測定は、経時的な OD₆₀₀ の変化を分光光度計 (Ultrospec, GE Healthscience) により測定し求めた。溶存酸素の測定は、Fibox3 (Taiotec) を用いて培地中の溶存酸素を経時的にモニタリングした。グルコース濃度は、経時的にサンプリングした培地中のグルコースを HPLC (column: Unison UK-amino

75X4.6nm (3 μ m) (Imtakt))にて分離・定量 (detector: Model 300s ELSD (Softa))した。培地中の乳酸濃度は、経時的にサンプリングした培地を濃縮後、Glycolysis cell based assay kit (Cayman Chemical)を用いて定量し、ARVO (ABI)を用いて測定した。

4. 研究成果

相互作用関連変異の同定と相互作用応答性との相関解析

45 適応進化初期の相互作用出現時期の大腸菌集団から1細胞培養し、得られたクローン大腸菌に固定された変異を解析したところ、7変異が5段階に固定されていること、3番目にはシャペロニンGroEL/ESをコードするgroS/L promoter 変異、4番目がgroL 変異であることが判明した。groS/L promoter 変異では、GroEL/ESの発現が定常状態でも10倍近く上昇することを明らかとした。相互作用の出現・減少時期にシャペロニン遺伝子に発現上昇と機能変化が期待される2箇所の変異が固定されたことは、細胞内環境と相互作用の相関が予想される結果であった。また、groS/L promoter 変異の直前に固定されたlon 変異は有害変異であり、groS/L promoter 変異固定により適応度が大幅に改善した。最初に固定された変異は、fre, oxyR, rnr 変異であり、これらは変異固定の様子から43 適応集団内に既に存在し、45 環境への適応により選択された変異であると考えられた。

各変異固定株を用いて、相互作用依存的な増殖の見られる大腸菌培養液から調製した培養上澄みを培地に添加した、上澄み添加培養を行い、上澄み非添加培養とその増殖速度(適応度)を比較した。これにより相互作用と変異の相関を検討した。その結果、fre, oxyR, rnr 変異細胞では、若干の相互作用依存的な増殖が見られた。lon 変異固定細胞では、上澄み添加時のみ増殖が見られる強い相互作用依存的増殖が確認された。groS/L promoter 変異固定細胞では、上澄み無しでも増殖可能となり、相互作用依存性は弱くなっていた。groL 変異固定細胞では、全体的に適応度が上昇し、相互作用依存性はgroS/L promoter 変異固定細胞と大きくは変わらなかった。以上の結果より、有害変異lon 変異固定により相互作用依存性が強くなりシャペロニンの2箇所の変異により相互作用依存性が消失して行くことが示唆された。lon, groL 共に、細胞内のタンパク質機能の恒常性に関わる因子であり、細胞内ネットワークと相互作用に相関があることも示唆された。

進化過程における相互作用物質出現、反応性獲得メカニズムの解析

本研究までに我々は、45 適応初期の培養上澄みから相互作用候補分子を複数同定してきた。その中で乳酸が相互作用に関連している結果を得た。乳酸は、解糖系を中心とした嫌気呼吸により生じる代謝産物であるため、本研究では、上述の各変異型クローンと代謝

の相関の検討を行った。そのため、対象クローンの45での増殖速度、溶存酸素濃度、培地中のグルコース濃度、乳酸濃度の測定を行い、45での大腸菌の代謝と相互作用分子生産と適応度の相関を検討した。

検討により以下の結果が得られた。

- ・進化祖先株(Anc 株)は、増殖に伴うグルコース消費が最も少なく、OD600=0.7付近で溶存酸素が消費し尽くされた。また培地中の乳酸蓄積は、ほとんど見られなかった。

- ・43に完全適応した45未適応クローンでは、43ではグルコース消費と酸素消費がAnc株に比べ少し多く、乳酸蓄積はAnc株同様にほとんど見られなかった。45では、増殖が不安定になり、高菌密度条件で使用菌株では最も遅い増殖が認められた。増殖時のOD変化に対する酸素消費は、使用菌株の中で最も少なくなり、酸素を消費しないエネルギー獲得が主たるエネルギー獲得となった可能性が示唆された。グルコース消費は、非常に大きくなりOD600=1.0付近でグルコースが枯渇した。また、増殖に伴い乳酸の培地中への蓄積が見られた。これより、43完全適応株の45での増殖においては、嫌気呼吸によるエネルギー獲得に変化したと考えられた。

- ・45適応最初期に3変異(fre, oxyR, rnr)が固定した株では、増殖に伴う酸素消費がある程度回復し、グルコース消費も43完全適応株の43培養と同程度まで減少した。興味深いことに、乳酸は、OD600検出限界以下(<0.05)で培地中に40 μ M程度まで蓄積し、その後増殖に伴い減少した。培地中への低菌密度での乳酸蓄積は、程度の差はあるが、この後の変異蓄積株でも共通してみられた。

- ・lon 変異まで固定した株は、最もグルコース消費が激しく、酸素消費は、43完全適応株45培養に次いで少なかった。また増殖に伴う培地への乳酸蓄積は最も大きかった。

- ・groS/L promoter 変異株では、酸素消費が増加しグルコース消費が減少した。また低菌密度での増殖が可能となり、相互作用が減少した可能性が示唆された。その後の変異蓄積では代謝の指標に大きな変化は認められなかった。

以上の結果より、ストレス環境への変化は、好気呼吸から嫌気呼吸への変更を来とし、培地への代謝産物の蓄積を引き起こした。この蓄積された代謝産物が相互作用分子としての機能を発揮し、ストレス環境下での相互作用出現を可能とすることが考えられた。また細胞内の有害変異蓄積も外部環境ストレスと同様に呼吸様式の変更を引き起こすことが示唆された。これらのストレス応答は、シャペロニン変異により抑制され、同時に相互作用の減少を引き起こすことが判明した。

本研究で確認された現象は、組織中の癌細胞増殖におけるワールブルグ効果(嫌気環境のみならず好気環境でも、解糖系に偏ったブドウ糖代謝がみられる現象)と非常に似た現象と考えられる。過剰なストレス等の細胞内

部の秩序が乱れる状況では、酸素を用いた呼吸という秩序だった代謝フローが働けなくなり、その結果、解糖系に頼ったエネルギー獲得形式が優性となる。そこで生産された代謝産物が相互作用を引き起こすトリガーとなることが示唆された。

本研究でのストレス下で蓄積した乳酸が増殖に伴い減少したり増加しない例が観察された。このことは、乳酸が再度大腸菌に取り込まれ増殖に寄与したことを示しており、乳酸が細胞間の情報のやりとりに関与したことを示唆している。これらの観察から、ストレスによる代謝モードの変更 2 次代謝産物の蓄積 細胞の 2 次代謝産物利用 相互作用の発生 細胞内の秩序回復 代謝モードの回復 相互作用の消失 というストレス環境への適応進化と相互作用の相関が考えられた。

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)

1. B.-W. Ying, Y. Matsumoto, K. Kitahara, S. Suzuki, N. Ono, C. Furusawa, T. Kishimoto, T. Yomo, Bacterial transcriptome reorganization in thermal adaptive evolution, *BMC Genomics*, 16:802 DOI 10.1186/s12864-015-1999-x (2015) 査読有り
2. T. Kishimoto, B.-W. Ying, S. Tsuru, L. Iijima, S. Suzuki, T. Hashimoto, A. Oyake, H. Kobayashi, Y. Someya, D. Narisawa, T. Yomo, Molecular clock of neutral mutations in a fitness-increasing evolutionary process, *PLoS Genetics*, 11(7), e1005392, DOI: 10.1371/journal.pgen.1005392 (2015) 査読有り

[学会発表](計 12 件)

1. 寺井亮平、成澤大、大村真優子、岸本利彦 変異導入による高効率遺伝子機能破壊技術の検討 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30-12 月 2 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
2. 大村真優子、成澤大、花神彩香、四方哲也、岸本利彦 大腸菌高温適応進化における進化能力の解析 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30-12 月 2 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
3. 寺井亮平、成澤大、四方哲也、岸本利彦 多重変異導入による遺伝子機能破壊技術の検討 第 18 回日本進化学会大会 2016 年 8 月 25-27 日 東京工業大学(東京都目黒区)
4. 大村真優子、成澤大、花神彩香、四方哲也、岸本利彦 大腸菌高温適応進化における進化能力の解析 第 18 回日本進化学会大会 2016 年 8 月 25-27 日 東京工業大学(東京都目黒区)

5. 成澤大、岸本利彦、四方哲也 大腸菌高温適応進化系における高変異率進化機構の解析 第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

6. 岸本利彦、大村真優子、宇都真菜、成澤大、松浦梨恵、四方哲也 大腸菌高温適応進化におけるシャペロニン GroEL 遺伝子変異による有害変異緩衝効果の解析 第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

7. 成澤大、岸本利彦、四方哲也 大腸菌高温適応進化系における高変異率進化機構の解析 第 17 回日本進化学会大会 2015 年 8 月 22 日 中央大学(東京・文京区)

8. 岸本利彦、松浦梨恵、成澤大、宇都真菜、大村真優子、四方哲也 大腸菌高温適応進化におけるシャペロニン GroEL 遺伝子変異の機能解析 第 17 回日本進化学会大会 2015 年 8 月 22 日 中央大学(東京都・文京区)

9. 松浦梨恵、花神彩香、岸本利彦、四方哲也 高温適応進化における groL 変異の機能解析 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

10. 成澤大、花神彩香、岸本利彦、四方哲也 高温適応進化における高変異率進化メカニズムの解析 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

11. 松浦梨恵、亀田智美、鶴切真友美、花神彩香、岸本利彦、四方哲也 高温適応進化における groL 変異の機能解析 第 16 回日本進化学会大会 2014 年 8 月 21 日 高槻現代劇場(大阪府・高槻市)

12. 成澤大、花神彩香、岸本利彦、四方哲也 高温適応進化における高変異率進化メカニズムの解析 第 16 回日本進化学会大会 2014 年 8 月 21 日 高槻現代劇場(大阪府・高槻市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本利彦 (KISHIMOTO, Toshihiko)
東邦大学・理学部・教授
研究者番号: 90339200

(2)研究分担者

渡邊 総一郎 (WATANABE, Soichiro)
東邦大学・理学部・准教授
研究者番号： 10287550

津留 三良 (TSURU, Saburo)
大阪大学・大学院情報科学研究科・助教
研究者番号： 80594506
(平成 27 年 5 月 21 日追加)

四方 哲也 (YOMO, Tetsuya)
大阪大学・大学院情報科学研究科・教授
研究者番号： 80594506
(平成 27 年 5 月 21 日削除)