

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14437

研究課題名(和文) 種間遺伝学的相互作用解析法の確立と宿主-微生物相互作用研究への適用

研究課題名(英文) Development of en masse inter-species genetic interaction analysis using a pooled *E. coli* gene knockout strains

研究代表者

佐藤 昌直 (Sato, Masanao)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：20517693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：微生物・宿主は感染する・感染される生物として互いに影響を及ぼしながら進化してきた。その進化過程で両者が感染に関わる分子メカニズムを幾重にも変化させ、結果としてそれぞれが複雑な遺伝子ネットワークを構築していると考えられる。このような複雑な宿主-微生物相互作用を解明するには、宿主-微生物相互作用に関わる両者の遺伝子ネットワーク、そして両者の遺伝子ネットワークの相互作用ダイナミクスを理解する必要がある。
本研究では網羅的な大腸菌の遺伝子破壊株プールと遺伝学的に阻害を導入したショウジョウバエの組合せで種の間での遺伝子間相互作用をハイスループットに、且つ en masse (一度に) 解析する系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Microbes and hosts have been co-evolved as they have repeatedly developed a better strategy to infect/defend in infection processes and to counter it. Such coevolution processes result in development of highly complex gene network in both host and microbes. To elucidate the gene network in host or microbe for their interaction, high throughput molecular profiling and genetic interaction analyses have identified thousands of genes in host or microbe. A major next challenge in research on host-microbe interactions is to elucidate interactions between host and microbial gene networks.
In this study, I aimed at development of a method to efficiently collect genetic information on how host and microbial gene networks interact in a seamlessly integrated manner. The developed protocol and data analysis pipeline accurately collect readouts in an inter-species genetic interactions en masse.

研究分野：システム生物学

キーワード：種間遺伝学的相互作用 DNAバーコード アンブリコンシーケンシング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物、その宿主は感染する・感染される生物として互いに影響を及ぼしながら進化してきた。その進化過程では両者が感染に関わる分子メカニズムを幾重にも適応・最適化させ、結果としてそれぞれが複雑な遺伝子ネットワークを構築していると考えられる。また、両者の遺伝子ネットワークが相互作用し、お互いのネットワーク状態に応じて綱引きのように相互作用の状態

(表現型)が変化すると考えられる。このような複雑な宿主-微生物相互作用を解明するには、宿主-微生物相互作用に関わる両者の遺伝子ネットワーク、そして両者の遺伝子ネットワークの相互作用ダイナミクスを理解する必要がある。従来の研究では各生物が持つ遺伝子ネットワークの理解を目指し、遺伝子ネットワークの構成遺伝子の同定が目指されてきた。

宿主-微生物相互作用に関わる遺伝子を同定する方法は大きく2つのアプローチに分けられる。①トランスクリプトーム等の両者の遺伝子発現プロファイリングによって感染時に発現・蓄積が変化する遺伝子群を同定し、それらの機能を調べる方法がある。このような遺伝子発現プロファイリングは比較的少ないサンプル数から現象と関係を持つ遺伝子群を特定できるメリットがある。一方で発現・蓄積が変化する遺伝子が宿主-微生物相互作用に直接関わる遺伝子とは限らず、遺伝子と現象の間の因果と相関を切り分けられない。②宿主-微生物相互作用における表現型に因果関係のある遺伝子を同定する方法として、遺伝学的解析が用いられてきた。順遺伝学的解析では変異原処理等を行った個体を相互作用解析に用い、表現型が変化した個体を単離し、その個体を材料に相互作用に関わる遺伝子を同定する。一方、逆遺伝学的解析では標的遺伝子の変異体等を用いて相互作用表現型を解析する。現在はハイスループットに遺伝子機能を阻害、もしくは変異体作製する手法が開発されており、網羅的に特定の表現型について解析を行う研究がなされている。

ここまで述べた手法によって、宿主、微生物の遺伝子ネットワークを構成する遺伝子が同定されてきた。しかしながら、それらの研究では宿主、微生物の遺伝学的・生理学的条件は一定の元で解析がなされており、遺伝子ネットワーク間の相互作用ダイナミクスについての情報は集められていない。相互作用ダイナミクスを研究するには、宿主、微生物のそれぞれについて相互作用に関わる機能に摂動を与え、その上で相互作用表現型を解析する必要がある。宿主-微生物相互作用研究では相互作用ダイナミクスについて注目はなされていたが、両者に摂動を与え、相互作用表現型を観察する研究には着手されていなかった。

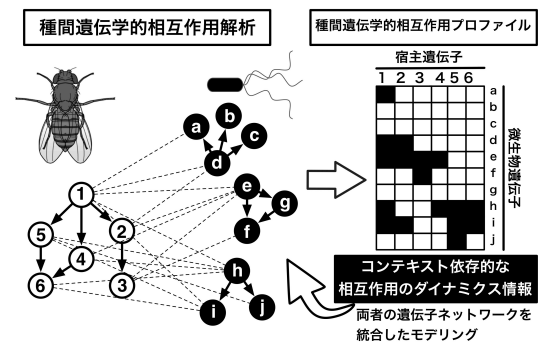
2. 研究の目的

これまでの研究では、宿主、微生物、あるいは両方について変異体を用い、両者のトランスクリプトームによって相互作用ダイナミクスを解析する試みがなされてきた。しかし、前述したように遺伝子発現プロファイリングのみでは変異遺伝子-発現変動遺伝子-相互作用の間の因果関係を直接同定することはできない。

そこで本研究では因果関係を直接的に同定するために宿主、微生物の両者について変異体を用い、それをハイスループットに行える新規遺伝学的スクリーニング系を開発し、相互作用ダイナミクスを解析する実験・解析手法を構築する。宿主・微生物の両者に遺伝学的阻害を導入し、宿主・微生物の遺伝子間での両者の遺伝学的相互作用を解析する「種間遺伝学的相互作用解析」を行い、コンテキスト依存的な相互作用ダイナミクスに関わる遺伝子群の効率的な同定を可能にすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では種間遺伝学的相互作用解析の proof-of-concept として、ショウジョウバエをモデル宿主、大腸菌をモデル微生物として選択した。ショウジョウバエ、大腸菌共に既存の変異体が充実しており、それらを利用することにより速やかに種間遺伝学的相互作用解析の概念を実証できると考えた。研究計画申請時には網羅的な大腸菌遺伝子破壊株リソースとして Keio Collection の使用を計画したが、第二世代シーケンサーによる大量シーケンシングによる株同定・定量が容易な ASKA Collection を利用することに变更した。トランスポゾンによる網羅的な変異体作製が微生物では可能であり、今後、種間遺伝学的相互作用の展開は可能であると考えられる。



4. 研究成果

本研究では *en masse* フィットネスプロファイリングを効率よく行うために、メタゲノム解析用に開発された Lundberg et al. (2013) Nature Methods の方法を改良したシーケンス技術を確認し、解析を進めている。

4-(1). タギングプライマーの設計

プロトコルの簡便性とシークエンスの正確性を重視し、少ない工程数の PCR と産物生成でシークエンスライブラリーを作るプロトコルを立案した。ASKA Collection 株が有するバーコード周辺配列からプライミングする際に①テンプレートとなった DNA を定量するための PCR 産物への unique molecular identifier 付加、②PCR 産物シークエンスの際に生じる読み始め配列の均一性を低下させるためのフレームシフトのための配列、③サンプルごとのインデックス配列を持つプライマー「タギングプライマー」を利用したが、タギングプライマーを ASKA Collection 用に改変するためのシミュレーションを行った。シミュレーションの結果、タギングプライマーに導入するフレームシフト塩基数は 5 塩基までの組み合わせとし、実験を進めた。

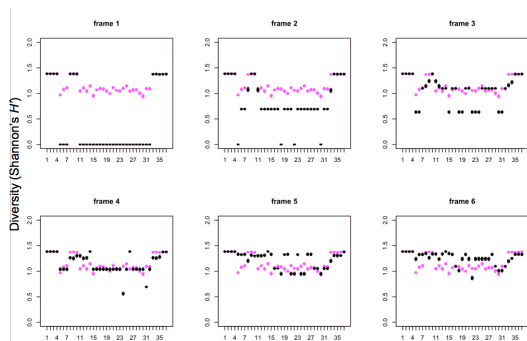


図 2. タギングプライマーに導入するフレームシフト塩基数のシミュレーション結果。フレームシフトを行わず、10% PhiX スパイイクイン DNA をライブラリーに混合した場合（マゼンタ）をコントロールとし、フレームシフトによって配列多様性を作った場合（黒）の結果を評価した。

4-(2). プロトコルの検証

設計したタギングプライマーと Lundberg et al. の方法を元にしたプロトコルによる *en masse* フィットネスプロファイリングの精度を検証するために、同一大腸菌プールから抽出した DNA を *en masse* フィットネスプロファイリングと qPCR の両方で解析を行った (図 3)。qPCR の標的とする株 (配列) は *en masse* フィットネスプロファイリングの結果から約 1000 倍の増殖量が想定された株からプライマー配列の T_m 値が同等なものを選定した (図 3A)。両測定結果の決定係数は 0.91 (図 3B) と高く、本研究で開発した *en masse* フィットネスプロファイリングの定量性は高いことが示された。

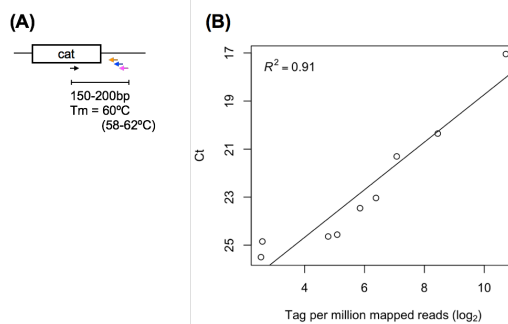


図 3. 本研究で開発した *en masse* フィットネスプロファイリングの定量性。シークエンスによって得られたデータを qPCR によって検証した。(A) qPCR プライマーデザインの概略。cat, chloramphenicol acetyltransferase。(B) シークエンスカウント-qPCR Ct 値散布図。

4-(3). 大腸菌に対するショウジョウバエの大腸菌への応答、相互作用解析への *en masse* フィットネスプロファイリングの適用

本研究では種間遺伝学的相互作用解析の proof-of-concept として、宿主側変異体間での大腸菌株のフィットネスを宿主の微生物感染に対する応答と微生物側遺伝学的背景の関係性 (綱引き) を定量する指標として測定した。ショウジョウバエ雄個体に ASKA コレクションプールを注射後 24 時間でサンプリングし、これらの個体から DNA を抽出し、*en masse* フィットネスプロファイリングを行い、解析を進めている。また、種間遺伝学的相互作用を測定する簡便な系としてショウジョウバエ培養細胞と RNAi を用いた系を構築した。自然免疫シグナル伝達経路、代謝・細胞増殖・発生に関わるシグナル伝達経路に関わる遺伝子に対する二本鎖 RNA を細胞に処理後、グラム陰性菌由来成分で刺激し、細胞培養液を回収することで細胞から放出された抗菌ペプチド等の宿主細胞の応答によって細胞外に分泌される因子を収集した。宿主細胞由来因子を大腸菌培養プールに加え、大腸菌各株の増殖を測定することにより、宿主の微生物応答の変化と微生物の宿主分泌因子に対する感受性の評価を進めている。

現在、これらの結果の評価を進めている段階であるが、本研究では種間遺伝学的相互作用解析の解析基盤を構築した。今後、この技術基盤を用い、宿主-微生物相互作用ダイナミクスについて新たな研究を展開していく。

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 0 件)

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 昌直 (SATO, Masanao)
北海道大学・農学研究院・助教
研究者番号：20517693

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()