

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2018

課題番号：15KT0078

研究課題名(和文) 変異に対して頑強なゲノムの進化的構築

研究課題名(英文) Evolutionary improvement of mutational robustness at the genomic scale

研究代表者

津留 三良 (tsuru, saburo)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任助教

研究者番号：80594506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高頻度に変異が生じる条件で大腸菌を長期間培養し、蓄積したゲノム変異を解析した。得られた数千個の変異を解析した結果、ストレス応答に関わる遺伝子群に変異が集中しやすいことが分かった。また、増殖低下の要因は、有害変異の蓄積だけではなく、変異率増加そのものに起因することを突き止めた。さらに、変異は任意の塩基配列に完全にランダムに生じるのではなく、数塩基で構成される特定の塩基配列のモチーフに生じやすいことが分かった。これらの発見は、生じた変異への頑強さを付与する遺伝子の同定だけでなく、変異そのものが生じにくいゲノムを設計する上で重要な基礎的知見であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変異は、遺伝情報に生じるエラーであり、病気の原因となるだけでなく、有用物質の生産性を低下させる原因になるなど、私たちの日常生活と深い関わりがあります。そのため、変異や変異の影響を抑制する原理の発見や技術開発が多くの学術分野で望まれています。本研究で得られた成果は、変異が細胞の増殖に与える悪影響に注目し、どのような遺伝子群が変異の有害作用の抑制に関わっており、どのような塩基配列であれば変異そのものが生じにくくなるかについて、示唆に富む情報を提供しています。本研究で得られた情報を基礎として発展させれば、変異に頑強でより安定な人工ゲノムを開発するなどの応用が可能になると期待されます。

研究成果の概要(英文)：Using *Escherichia coli*, a model bacterium, an evolution experiment was performed under highly mutagenic environment for several years. Analyzing genomic mutations revealed that mutations tends were enriched in genes related to stress response. In addition, growth reduction under highly mutagenic environment was derived not only by deleterious load of the accumulated mutations, but also by another harmful effect associated with mutagenic physiology. Moreover, mutations were likely to be accumulated at a specific sequence motif which consists of few nucleotide at least. These evidence would help us identify specific genes responsible for growth robustness against deleterious mutations at the genomic scale and design mutationally stable genome.

研究分野：システムゲノム科学

キーワード：ゲノム 変異 遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変異の大部分は、秩序だった遺伝子配列を無作為に変更し、遺伝子の機能を破壊するため、生存に有害な作用を及ぼすことが知られている。変異に対して頑強なゲノムとはどのような配列で、如何にして形成されるのだろうか？生物の頑強性を探求する過程で、高い変異率を持つ生物の適応進化過程を解析すればこの謎が解明されると期待されてきた。

2. 研究の目的

そこで本研究は、高い頻度で変異が生じる条件で大腸菌を長期間培養し、変異に対して頑強なゲノムへと進化していく適応進化していく過程を解析する。進化実験の過程でゲノムに蓄積した変異を調べることで、変異の有害作用を防ぐ原理・技術の基礎的知見が得られる。

3. 研究の方法

高い頻度で変異が生じる条件の一つとして、修復遺伝子を欠損させた大腸菌を用いた。別の条件として、紫外線照射を繰り返す培養環境を構築した。これらの条件で大腸菌を長期間培養し、得られた進化株のゲノムに蓄積した変異を全ゲノムシーケンシングによって調べた。得られた変異情報を解析し、どのような遺伝子・配列に変異が生じやすいかを明らかとした。

4. 研究成果

- (1) まず、DNA の変異修復関連遺伝子 *mutS* や校正関連遺伝子 *dnaQ* を欠損させた高変異性大腸菌を用いて長期間継代培養を行った。得られた進化型大腸菌と祖先型大腸菌について全ゲノムシーケンシングを行い、培養過程でゲノムに蓄積した変異を同定した。その結果、生じうる塩基置換変異の全てが等確率に生じるのではなく、少数の塩基置換のパターンのみが高頻度に生じやすいことが分かった。また、進化型大腸菌を得るまでに継代した世代数を考慮することで、ゲノムの平均的な変異率を求めることができた。様々な栄養条件で同様の方法で変異率を求めた結果、塩基置換のパターンは変わらないまま、栄養条件依存的に変異率のみが変化することが分かった。これらの結果は、細胞の生理状態の変化に応じて、ゲノム全体の変異率が変動しうることを示唆している。
- (2) 上記の結果を受けて、解決すべき2つの問題点が見えてきた。第一の問題点として、塩基置換変異のバリエーションが極めて少ないことから、目的とする進化自体が生じないことが予想された。この問題に対処するため、より多様な変異を発生させる技術が必要となった。そこで、人為制御が容易な変異源である紫外線に着目し、紫外線の照射量によってどのような塩基置換変異がどのような頻度で生じるかを調べた。その結果、紫外線照射によって発生する塩基置換変異は、高変異性大腸菌のそれと比べて多様になることを発見し、第1の問題点が解決された。
- (3) この問題点の解決を図る過程で、紫外線の照射量に依存して変異の発生頻度が増加することが分かったが、同時に、細胞の増殖率が低下することも分かった。この現象は、高変異性大腸菌でも見られる現象であり、ゲノムレベルでの変異率と増殖率が負の相関関係にあることが示唆された。そこで、これまでに得られた変異率と増殖率の関係に理論モデルを当てはめた結果、増殖率の低下のメカニズムが複数あることが見積もられた。すなわち、高変異条件での増殖率の低下は、有害変異の蓄積によってもたらされる増殖低下だけでなく、変異率が高い生理状態に付随するなんらかの作用によって引き起こされることを突き止めた。また、後者に対する耐性は、長期間の継代を経てもほとんど進化しないことが分かった。
- (4) これらの結果を踏まえると、第二の問題点として、高変異性の的大腸菌を単純に培養するだけでは、継代培養中の変異率を高い状態で維持できないことが予想された。従って、高い変異頻度を維持した条件で長期的な進化実験を行うために、紫外線照射による変異発生頻度を高いまま維持することができる実験条件の構築が必要となった。そこで、変異率の低下に応じて紫外線照射量が自動で増加するフィードバック制御を組み込んだ培養装置を開発した。この培養装置を用いることで変異頻度の低下に対抗でき、数年に及ぶ継代培養の結果、ゲノム上に数千個の変異を蓄積させることに成功した。つまり、第二の問題点も解決された。
- (5) 長期の継代進化によって得られた大腸菌に対して全ゲノムシーケンシングを行い、ゲノムに蓄積した変異を同定した。その結果、変異はランダムに生じるのではなく、任意の塩基配列に完全にランダムに生じるのではなく、少なくとも2~3塩基で構成される特定の塩基配列のモチーフに変異が生じやすいことが分かった。また、変異が集中して蓄積する遺伝子群を同定できた。これらの遺伝子群はストレス応答に関わるものであり、変異に対する頑強性に密接に寄与する可能性が高いことが分かった。
- (6) 以上の研究成果から、変異に対して頑強なゲノムは、複数の階層で構成されることが読み

取れた。階層の一つとして、変異そのものが生じにくい塩基配列もしくは修復されやすい塩基配列という、塩基配列レベルで付与される頑強性である。別の階層の一つとして、修復されずに残った変異が持つ増殖に有害な作用を緩和させる遺伝子機能を強化させるという表現型レベルで付与される頑強性である。本研究で得られたこれらの知見を基礎にし、発展させることで、変異に関して頑強でより安定な人工ゲノムを開発するなどの応用が可能になると期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Komori T., Shibai A., Saito H., Akeno Y., Germond A., Horinouchi T., Furusawa C. and Tsuru S. (2018) Enhancement of K-strategy evolution in histidine utilization using a container with compartments. *Genes to Cells*, Vol. 23(10), pp. 893-903, doi: 10.1111/gtc.12640. 査読有

Shibai A., Tsuru S., Yomo T. (2018) Development of an automated UV irradiation device for microbial cell culture. *SLAS Technology*, Vol. September 10, pp. 1-7. doi: 10.1177/2472630318800283. 査読有

Shibai A., Takahashi Y., Ishizawa Y., Motooka D., Nakamura S., Ying B.W., Tsuru S. (2017) Mutation accumulation under UV radiation in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, Vol. 7(1), 14531, pp. 1-12. doi: 10.1038/s41598-017-15008-1. 査読有

Takano S., Pawlowska B.J., Gudelj I., Yomo T., Tsuru S. (2017) Density-Dependent Recycling Promotes the Long-Term Survival of Bacterial Populations during Periods of Starvation. *mBio*, Vol. 8:e02336-16, pp. 1-14, DOI: 10.1128/mBio.02336-16. 査読有

Baumstark R., Hänzelmann S., Tsuru S., Schaerli Y., Francesconi M., Mancuso F.M., Castelo R., Isalan M.(2015) The propagation of perturbations in rewired bacterial gene networks. *Nature Communications*, Vol. 6,10105, pp.1-11, doi: 10.1038/ncomms10105. 査読有

Tsuru S., Ishizawa Y., Shibai A., Takahashi Y., Motooka D., Nakamura S., Yomo T.(2015) Genomic confirmation of nutrient-dependent mutability of mutators in *Escherichia coli*. *Genes to Cells*, Vol. 20(12), pp. 972-981. doi: 10.1111/gtc.12300. 査読有

Ying B.W., Honda T., Tsuru S., Seno S., Matsuda H., Kazuta Y., Yomo T.(2015) Evolutionary Consequence of a Trade-Off between Growth and Maintenance along with Ribosomal Damages. *PLoS ONE*, Vol. 10(8),e0135639, pp. 1-19 doi: 10.1371/journal.pone.0135639. 査読有

Kishimoto T., Ying B.W., Tsuru S., Iijima L.,Suzuki S., Hashimoto T., Oyake A., Kobayashi H., Someya Y., Narisawa D., Yomo T.(2015) Molecular Clock of Neutral Mutations in a Fitness-Increasing Evolutionary Process. *PLoS Genetics*, Vol. 11(7),e1005392, pp. 1-18, doi: 10.1371/journal.pgen.1005392. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

Tsuru S. A persisting constraint on the rate of protein sequence evolution, 46th Naito Conference, Sapporo, 2018年10月

津留三良, 分子進化速度の発現量依存性, 新学術領域:進化制約方向性理論情報交換会, 岡崎, 2018年12月

芝井厚, 石澤裕佳, 高橋祐輔, 元岡大祐, 中村昇太, 津留三良, 細胞の増殖能力は変異に対してどれほど頑強か, 日本進化学会第19回大会, 京都, 2017年8月

高野壮太郎, Pawlowska Bogna J., Gudelj Ivana, 四方哲也, 津留三良, バクテリアの長期定常期における密度依存的なリサイクリング活動, 第55回日本生物物理学学会年会, 熊本, 2017年9月

津留三良, 芝井厚, 堀之内貴明, 古澤力, タンパク質の進化速度における進化的制約の持続性, 第12回日本ゲノム微生物学会年会, 藤沢, 2018年3月

津留三良, タンパク質の進化速度における進化的制約の持続性, 第43回生命の起源および進化学会学術講演会, 埼玉, 2018年3月

津留三良, 石澤裕佳, 芝井厚, 高橋祐輔, 元岡大祐, 中村昇太, 栄養依存的な変異率のゲノムワイドな実証, 第10回日本ゲノム微生物学会年会, 目黒, 2016年3月

Tsuru S., Directed evolution of bacterial cell size, QBiC Symposium 2015, Suita, Japan, 2015年8月

Tsuru S., Shibai S., Mutation accumulation of bacterial genome toward genomic inactivation, 第53回日本生物物理学会, 金沢, 2015年9月

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/testsab6/>

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。