

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2020

課題番号：16KT0169

研究課題名(和文)大腸菌と溶菌ファージとのモデル生態系による寄生から共生への移行・発展の実証的研究

研究課題名(英文)The study of transition and development from parasitism to symbiosis by model ecosystem of Escherichia coli and lytic phage

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：共生関係等の生物間相互作用はどのような場合にどのように生じ安定な状態へ発展するのだろうか。上の問いへの答えは既存の生物をそれらが経験したことがない未知の相互作用の状態に置き、どう変化するかという過程を解析する中から抽出可能だと考えられる。特に、未知の相互作用の状態に置かれた生物が増殖可能となるように系を構築する段階は元とは異なる新たな遺伝子間や種間等の相互作用が現れる時であると考えられる。そこで、本申請では、大腸菌と大腸菌に感染する溶菌性RNAファージQを用い、大腸菌の増殖にQもしくはそのRNAゲノムが不可欠となるようにデザインに取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、国内外では、自然界で観察される共生関係がいかに安定に維持されているのか、ということに対する研究は多くなされている。一方、本研究は、そのような関係がいかに創出され得るのか、また、それらが安定に発展し得るのか、という創出原理を明らかにしようとしている点で他の研究とは大きく異なる。本研究成果は、寄生関係にある大腸菌と溶菌ファージによる共存系を実験室内で合成生物学の手法で構築した。本システムを長期間継代することにより、生物間相互作用の創生やそれが持続発展するしくみが明らかになることは、現存する生物解析から得られることとは違う視点で、生物の自然法則に知見を与えることに貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：When and how do biological interactions such as symbiotic relationships occur and develop into a stable state? One of the methods to obtain an answer to the above question is that we observe the process from the unstable relationship to stable relationship. In particular, when an organism placed in an unknown interaction state becomes able to reproduce stably, it is considered that new interactions such as between genes and species will appear. Therefore, in this study, Escherichia coli and lytic RNA phage Q that infects Escherichia coli are used. We worked on the design so that Q or its RNA genome is essential for their growth.

研究分野：実験進化学

キーワード：大腸菌 RNAバクテリオファージ 共生 共存

1. 研究開始当初の背景

新しい生物間相互作用はどのような場合にどのように生じ安定な状態へ発展するのだろうか。生物は遺伝子間、細胞間や種間等あらゆる階層で相互作用し、それらが連鎖したシステムである。そのため、新たな生物間相互作用の創生やそれが持続発展するしくみを知ることは生物を構成する自然法則に対する知見を与える。上の問いへの答えは現存の生物をそれらが経験したことがない未知の相互作用の状態に置き、そこからどう変化するかという過程を解析する中から抽出可能だと考えられる。特に、未知の相互作用の状態に置かれた生物が増殖可能となるように系を構築する段階は、元とは異なる新たな遺伝子間や種間等の相互作用が現れる時であると考えられる。

2. 研究の目的

本申請では、単独で増殖可能な大腸菌と大腸菌に感染後大腸菌のタンパク質合成機能等を使い子孫を作り、大腸菌を死滅させる溶菌性ファージを用い、大腸菌の増殖に溶菌性ファージもしくはそのゲノムが不可欠となるようにデザインする。つまり、寄生関係にある両者をそれらの増殖に互いが不可欠となる環境に置く。本申請ではこのモデル実験系の構築と両者が新しい安定な状態へ発展、移行する過程を実験科学として示す(図1)。そして、上の問いに対する知見を得ることを目的とする。

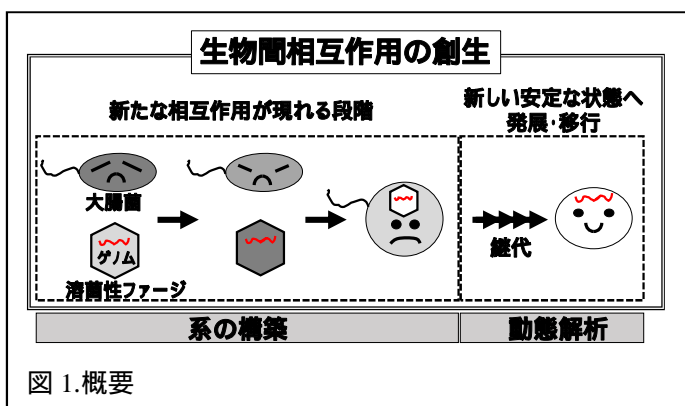


図1.概要

本申請期間内において、次の2点を明らかにすることを目的とした。

1. 大腸菌の増殖に溶菌性 RNA ファージもしくはそのゲノムが不可欠となる系の構築
2. 1. で得られた系の独立複数系列での継代とその動態解析

3. 研究の方法

本申請では、大腸菌と大腸菌に感染する溶菌性 RNA ファージ Q を用い、大腸菌の増殖に Q もしくはその RNA ゲノムが不可欠となるようにデザインした。

Q 複製酵素は、Q 由来の サブユニットと大腸菌由来の因子 (EF-Tu, EF-Ts, S1) とが会合して機能を持つ。そこで、サブユニットの供給源として(1)プラスミドから サブユニットを供給する系と(2)Q ファージから サブユニットを供給する系を構築した。

- (1) Q ファージが自身の RNA ゲノム複製に用いている RNA を鋳型として RNA を複製する RNA 複製酵素によって大腸菌の増殖に必要な遺伝子 (図2の *geneA*) が複製され、大腸菌が増殖できるようになる系を構築した (図2-(a))

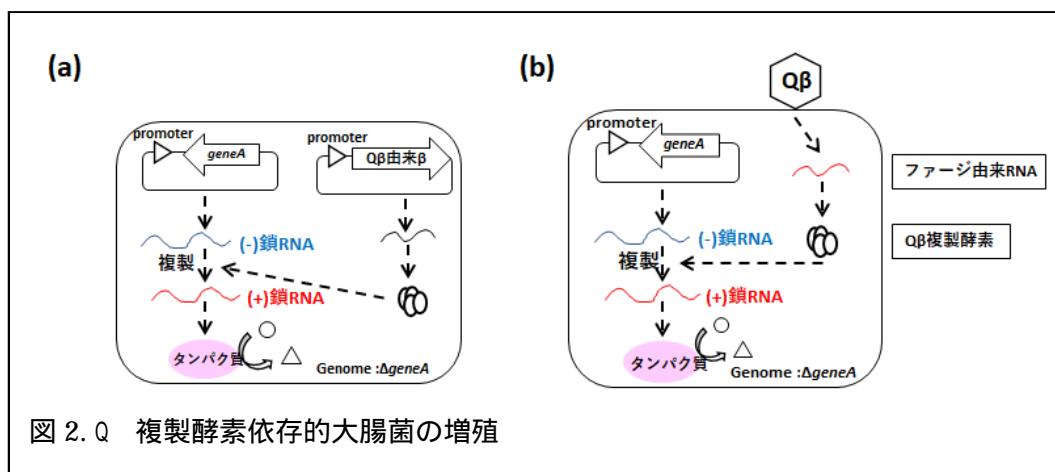


図2. Q 複製酵素依存的大腸菌の増殖

- (2)(1)では、サブユニットの供給をプラスミド DNA 上の サブユニット遺伝子から供給した。次に、この サブユニットの供給を Q ファージとなるようにデザインした (図2(b))。そのためには、以下の ~ の準備を行った。Q ファージ感染の第一段階として、Q の RNA ゲノム

に対する cDNA から を供給することによって、大腸菌が増殖するようになるのか、を解析した。

Q フェージ感染には、*geneA* のタンパク質をコードした鎖の相補鎖を転写するプラスミド(図 2(b) のプラスミド) を持ち、且つ、F 繊毛を持ち Q フェージ感染が生じる大腸菌を作製した。

4. 研究成果

(1) Q 複製酵素の認識配列間に目的とする遺伝子がタンパク質をコードしている向きの総補鎖として転写されるように挿入したプラスミドを作製した(センサープラスミド)。この目的とする遺伝子は、この遺伝子から翻訳されたタンパク質が大腸菌の増殖に必須である遺伝子を用いた(論文を投稿中であるため、*geneA* として具体的な遺伝子名を明らかにすることは控えた)。図 3 に示したように サブユニットを供給した場合だけ、大腸菌の増殖が観察された。

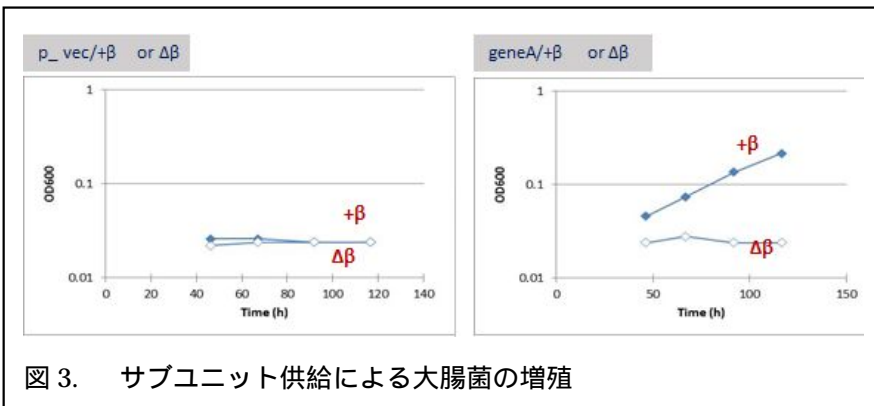


図 3. サブユニット供給による大腸菌の増殖

つまり、大腸菌内で転写された *geneA* の転写産物は、タンパク質をコードしている鎖の相補鎖 (() 鎖) であるが、サブユニットが供給された大腸菌では、大腸菌由来の 3 因子と サブユニットが会合し Q 複製酵素が作られ、それによって、() 鎖からタンパク質をコードしている鎖 ((+) 鎖) が複製され、そこから翻訳によって *geneA* のタンパク質が生じ、大腸菌の増殖が確認されたものである。

(2) Q の RNA ゲノムの cDNA を持つプラスミド DNA から サブユニットを供給した。この場合、大腸菌内では サブユニットが供給されるだけでなく、Q フェージも生じる系である。その結果、21 ~ 30 において、大腸菌の増殖が観察された(図 4)。温度と比増殖速度の関係から、通常の Q の増幅にとっての最適温度である 37 では、大腸菌の増殖が見られていない。このことから、菌体内で生じた子フェージによる大腸菌の溶菌と大腸菌の増殖とがせめぎあっている可能性が示唆された。

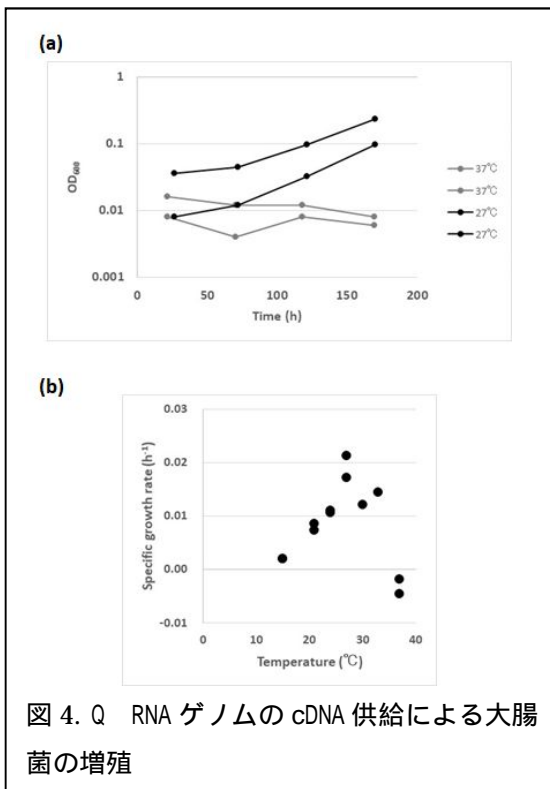


図 4. Q RNA ゲノムの cDNA 供給による大腸菌の増殖

センサープラスミドを持つ F⁻大腸菌株と F⁺大腸菌を接合し、センサープラスミドを持ち、且つ F⁺の大腸菌株を作製した。この大腸菌が Q の宿主になり得るかどうかを調べるため、*geneA* にコードされたタンパク質がなくても増殖可能な培地で、調べた。その結果、このセンサープラスミドを持ち、且つ F⁺である大腸菌で、Q は感染後 5 時間で約 100 倍の増幅量を示した。Q の宿主として通常用いる A/株を用いた場合と比べて、約 10000 倍小さい値ではあるが、今回作製した大腸菌は、宿主となり得ることが分かった。

次に、この F⁺株を使い、Q 感染によって大腸菌が増殖するか否かを調べた。その結果、図 5 の灰色で示したように大腸菌の増殖が見られなかった。これは、大腸菌の増殖と、Q による溶菌とのせめぎあいによるものではないかと仮定を立てた。Q の溶菌は、Q が持つ溶菌タンパク質 A2 がペプチドグリカン層合成を阻害することによって生じる。また、Bernhardt らは Q による溶菌耐性株を単離し、それはペプチドグリカン合成系を触媒する MurA への 1 アミノ酸置換によるものであることを示した (Bernhardt et al., Science, 2001)。そこで、MurA を大腸菌内

で発現し、Q 増幅による溶菌を抑制できるのではないかと考えた。その結果、MurA 発現株では、Q 感染によって大腸菌が増殖することが示された(図5 と)

次に、この MurA 発現株で Q 感染によって増殖可能となった大腸菌を継代した。その結果、大腸菌とは Q は約 800 時間共存し得ることが示された(図6)。この中で、Q を保有する大腸菌と放出された Q とともに、継代系から Q は wash out されず、また、大腸菌も継代しても系から wash out されなかった。

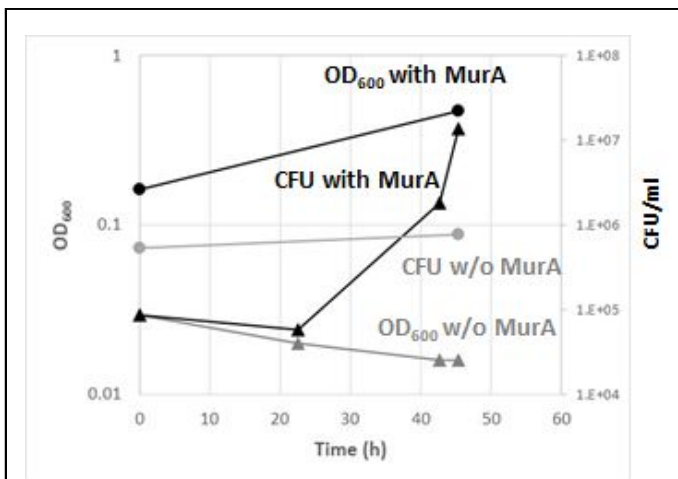


図 5. Q 感染による大腸菌の増殖

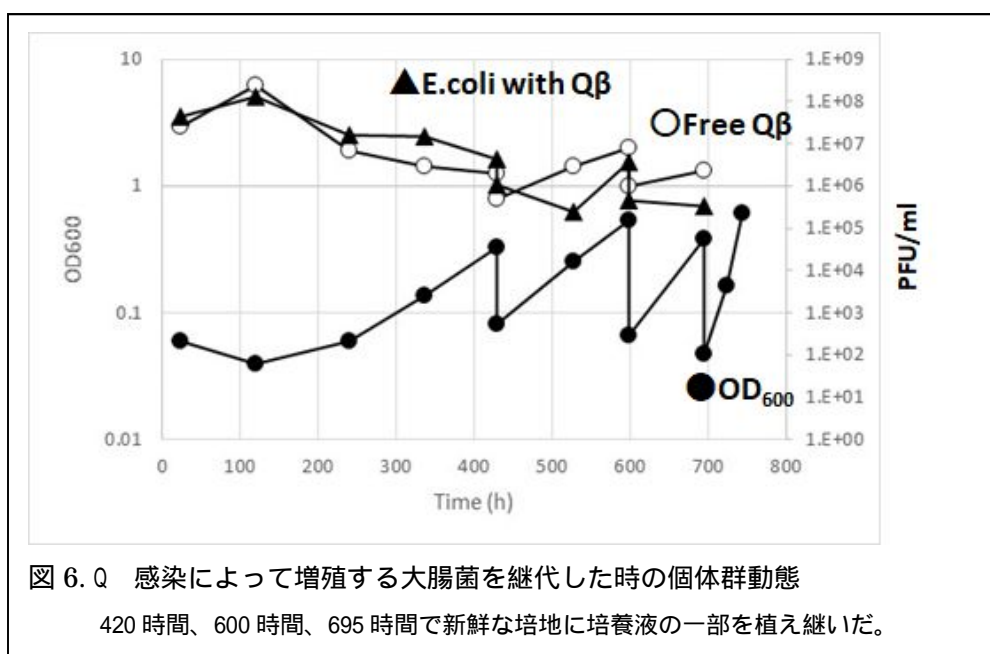


図 6. Q 感染によって増殖する大腸菌を継代した時の個体群動態

420 時間、600 時間、695 時間で新鮮な培地に培養液の一部を植え継いだ。

以上のように、本研究によって、本研究開始時の目標としていた 1 . 大腸菌の増殖に溶菌性 RNA フェージもしくはそのゲノムが不可欠となる系の構築、及び、2 . 1 . で得られた系の独立複数系列での継代とその動態解析の解析に成功した。

現在、国内外では、自然界で観察される共生関係がいかに安定に維持されているのか、ということに対する研究は多くなされている。一方、本研究は、そのような関係がいかに創出され得るのか、また、それらが安定に発展し得るのか、という創出原理を明らかにしようとしている点で他の研究とは大きく異なる。本研究成果は、寄生関係にある大腸菌と溶菌フェージによる共存系を実験室内で合成生物学の手法で構築した。本システムを長期間継代することにより、生物間相互作用の創生やそれが持続発展するしくみが明らかになることは、現存する生物解析から得られることとは違う視点で、生物の自然法則に知見を与えることに貢献するものである。

< 引用文献 >

Thomas G. Bernhardt¹, Ing-Nang Wang¹, Douglas K. Struck, Ryland Young, A Protein Antibiotic in the Phage Q Virion: Diversity in Lysis Targets, Science, 2001

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Md. Tanvir Hossain, Toma Yokono and Akiko Kashiwagi	4. 巻 12
2. 論文標題 The single-stranded RNA bacteriophage Q adapts rapidly to high temperatures: an evolution experiment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v12060638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 柏木 明子	4. 巻 4
2. 論文標題 プラスコの中で変異と選択を繰り返す実験進化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本農芸化学会誌 化学と生物	6. 最初と最後の頁 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiko Kashiwagi, Tamami Kadoya, Naoya Kumasaka, Tomofumi Kumagai, Fumie Sano Tsushima, Tetsuya Yomo	4. 巻 163
2. 論文標題 Influence of adaptive mutations from thermal adaptation experiment on infection cycle of RNA bacteriophage Q	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 2655-2662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柏木 明子
2. 発表標題 実験室内進化系でのRNAファージQ の適応進化
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanvir Md. Hossain, Toma Yokono, Akiko Kashiwagi
2. 発表標題 The single-stranded RNA bacteriophage Q adapts rapidly to high temperature: an evolution experiment
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柏木明子
2. 発表標題 実験進化によるRNAウイルスの偽遺伝子への変異蓄積速度の評価
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柏木明子
2. 発表標題 RNAバクテリオファージQ のA2相補系でのゲノム変化
3. 学会等名 第7回ファージ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮塚暢子、小林操妃、加藤美紗子、柏木明子
2. 発表標題 宿主大腸菌の増殖速度上昇に寄与する寄生者Q 由来RNA複製酵素の進化分子工学的改変
3. 学会等名 日本進化学会第20回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiko Kashiwagi
2. 発表標題 Rapid adaptation of RNA bacteriophage to environmental changes
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akiko Kashiwagi, Hikari Kitamura, Fumie Sano Tsushima
2. 発表標題 Characterization of a single mutation in TraQ in a strain of Escherichia coli partially resistant to Q infection
3. 学会等名 IUMS2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮塚暢子、小林操妃、柏木明子
2. 発表標題 大腸菌の比増殖速度を指標とした高機能化Q RNA複製酵素取得系の構築
3. 学会等名 2017年度日本生物工学会北日本支部 福島シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柏木 明子、角谷 珠実、熊坂 直也、熊谷 知史、對馬 (佐野) 文恵
2. 発表標題 RNAバクテリオファージQ の適応進化実験で見られた複数経路での適応
3. 学会等名 日本進化学会 第19回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柏木 明子
2. 発表標題 実験室内進化系でのRNAファージQ の適応度進化
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 柏木明子
2. 発表標題 Q ファージのRNA複製酵素に依存する宿主増殖系の確立
3. 学会等名 ファージ・環境ウイルス研究会 合同シンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 柏木明子
2. 発表標題 Q ファージ感染に依存する宿主増殖系の確立
3. 学会等名 日本進化学会第18回東京大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

弘前大学農学生命科学部作成webページ http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/archives/staff/akiko-kashiwagi/ 弘前大学研究者総覧 http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/html/634_ja.html 研究機関作成ホームページ http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/staff/akiko-kashiwagi/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------