

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19360

研究課題名(和文)高温適応進化大腸菌ゲノムネットワーク解析による高温適応進化戦略の解明

研究課題名(英文)Elucidation of thermo-adaptive evolution strategy by genome network analysis of thermo-adapted E. coli

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文): 実験室高温適応進化により最小培地で48℃以上で安定増殖(世界最高温度での安定増殖)する、至適増殖温度45℃の高温菌の特性を持つ2系統の大腸菌の構築に成功した。この進化過程の大腸菌をゲノム解析した結果、変異率は進化と共に上昇し進化後半で頭打ちになり、GC含量は進化に伴い漸減していた。プロテオスタシスネットワーク因子遺伝子領域は、その他の領域に比べて塩基置換の変異率が3倍程度高かった。高温適応進化で必須遺伝子の一部は、高温菌と同じアミノ酸に変化する変異が固定され、groL変異は大腸菌進化系統での先祖返り変異であった。高温適応進化ではプロテオスタシスネットワークの変化の重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、細菌の高温適応進化戦略の一端が明らかになる。また、本研究で得られた高温適応進化大腸菌と、好熱菌・超好熱菌のゲノム情報と比較解析することで、進化の普遍性、可逆性、多様性に関する知見が得られる。今回明らかとなった大腸菌高温適応戦略をもちいて、更なる高温で安定増殖し、遺伝子操作可能な物質生産宿主等としての高温適応大腸菌の創出が可能となる。本研究成果に、他のストレス適応進化させた大腸菌の情報を統合することで、様々な外部ストレスへの適応戦略が考察可能となり、新しい抗生物質ターゲットの探索等が可能となる。

研究成果の概要(英文): In this research, we have developed two independent thermophilic E. coli strains by experimental thermo-adaptive evolution and analyzed them. Genome analyses showed that mutation rate of strains increased and peak out later in evolution. Interestingly, GC contents of genome DNA were gradually decreased with evolution. In the gene region of proteostasis network factors, mutation rate was about 3 times higher than in other regions. All 4 essential genes in proteostasis network were mutated in thermo-adaptive evolution. A part of mutations in essential genes of thermo-adapted E. coli included the change to the same amino acid with the homologous genes of thermophilic bacteria. These essential genes were global regulator genes. Mutation of groL (coded chaperonin GroEL) was throwback mutation in E. coli species evolution. These results indicated that proteostasis network change was important for E. coli thermo-adaptive evolution.

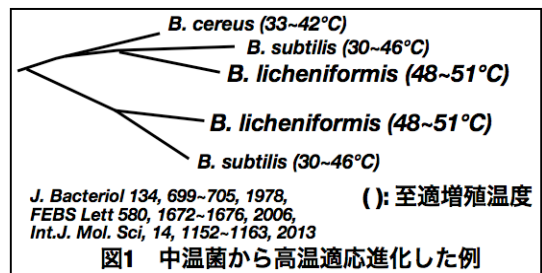
研究分野：分子細胞進化学

キーワード：高温適応進化 大腸菌 ゲノム解析 必須遺伝子 プロテオスタシス シャペロニン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命は、これまでの解析から「高温環境で誕生し進化した」と考えられている。近年のゲノム解析技術の発展により、高温環境で進化した好熱菌・超好熱菌の解析から、高温環境で生育するための特性が明らかにされている (GC 含量, タンパク質の疎水性コア安定性や表面電荷の増加, ゲノム安定化遺伝子等)。また、一度、低・中温菌まで進化した後、再度好熱菌に適応進化したと考えられる細菌も存在する (図1)。このような、再び高温適応進化した細菌には、どのような特性が獲得されるのか? 好熱菌・超好熱菌への逆行進化が起こるのか? 等、興味深い命題が提示される。しかし、これらの命題に対する実験進化研究は、ほとんどなされていなかった。



2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、大腸菌高温適応進化系を構築し、致死温度とされる 43°C を超える 47°C 以上で安定増殖可能な、至適増殖温度が 41°C 以上の大腸菌の作製に成功し、現在も進化実験を継続している。本研究では、高温適応進化した大腸菌のゲノム解析・遺伝子発現解析を行い、自然界で高温適応進化したと考えられる細菌との比較解析を行う。これらの情報をまとめ、高温適応進化ゲノムネットワークを構築し、細菌の高温適応戦略を解析する。

3. 研究の方法

本研究を実施するにあたり、図2に示す解析で、本研究目的である高温適応進化ゲノムネットワークの解明を目指した。

(1) 大腸菌高温適応進化: 高温適応進化大腸菌の創出

高温適応進化大腸菌の創出においては、従来の方法を用いた (Kishimoto, et al., PLOS Genet, 6, e100614, 2010)。44.8°C 完全適応株 (Kishimoto, et al., PLOS Genet, 6, e100614, 2010) から 2 系統に分けて独立して高温適応進化を行った 2 系統を本研究期間においても継続して高温適応進化させた。

(2) Thermal Nitch 解析: 44.8, 46.0, 47.0, 47.3, 47.4, 47.9°C の各温度に完全適応した高温適応進化大腸菌 (47.3°C は第一系統, 47.4°C は第二系統のみ) を用いて、mM63 最少培地で 15~50°C での増殖速度を測定した (n=3, 2 回)。測定に際して、グリセロールストックから起こした大腸菌を 43°C (先祖株のみ 37°C) で前培養し、対数増で OD600=0.1~0.4 の大腸菌を用いて、植菌後 24 時間後に OD600=0.1~0.4 になるように希釈して植菌し、24 時間後の OD600 を測定し、増殖速度を求めた。非常に増殖が悪いもしくは増殖できない温度では、OD600=0.1 で植菌し、OD600=0.2~0.6 の状態で OD600 を測定し、増殖速度を求めた。増殖速度は、 $\mu = \ln(C1/C0)/T$ (C1: 24 時間培養後の OD600, C0: 植菌時の OD600, T: 培養時間) で求めた。

(3) ゲノム解析・遺伝子発現解析: Thermal Nitch 解析に用いた大腸菌株について次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行った。また、47.9°C 株以外の株について、RNA seq 解析を行った。

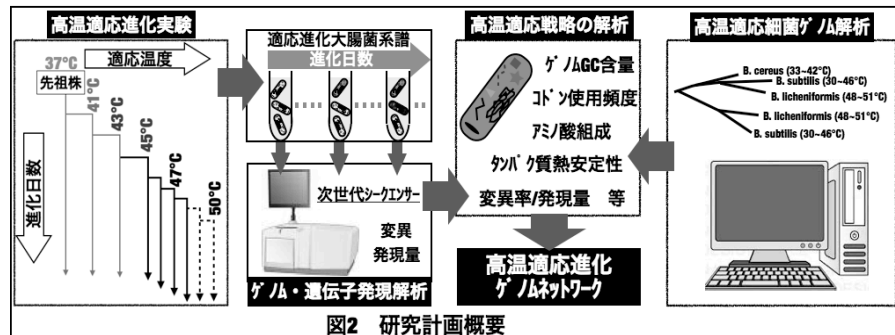
(4) 高温菌との相同性解析: ゲノム情報が取得可能な真正細菌の高温菌候補 158 種類から至適増殖温度、ゲノム配列情報などを基に、13 種類の細菌に絞り込み、高温適応進化大腸菌の変異必須遺伝子と相同な遺伝子配列を取得した。この遺伝子配列を基に、大腸菌必須遺伝子の野生型および変異型配列を COBALT により高温菌の相同部位配列と比較した。

4. 研究成果

(1) 高温適応進化大腸菌の創出

これまで報告されている高温適応進化は、最少培地で 48°C 未満 (Blaby et al., Appl. Env. Microbiol., 78, 144~145, 2012) であるが、本研究により、48.0°C 完全適応株 ($\mu > 0.35$ 1/hr) の樹立に成功した。これは、最少培地で世界最高温度で安定増殖可能な大腸菌を高温適応進化で樹立に成功したことを示している。本研究期間終了時には、48.1°C で $\mu > 0.3$ (1/hr) まで進化が進んでおり、培養を継続することで適応度の増加が観察されることから、今後も更に進化が進むと考えられる。今後は、LB などの栄養培地での安定増殖が可能な株を構築し、本高温適応大腸菌を高温での物質生産などに応用する可能性検討などを行う予定である。

(2) 高温適応進化大腸菌の解析



高温適応進化大腸菌がどのような進化をしてきたかを表現型レベルと分子レベルで解析し、進化により大腸菌の特性がどのように変化してきたかを知ることは重要である。さらに進化により生じた変化が現在地球上に存在する高温菌と似る方向に進化しているのか、それとも全く異なる高温菌に向けて進化してゆくのかなど、非常に興味深い。本研究では、高温適応進化により、① 大腸菌の増殖温度特性がどのように変化してきたか (Thermal Nitch 解析)、② 高温適応進化大腸菌の各進化段階での変異蓄積の解析 (ゲノム解析)、③ 高温適応進化大腸菌の遺伝子発現変化の解析 (RNA seq 解析) を行った。得られた結果を用いて、④ 高温菌との比較解析を行い、高温適応進化によるゲノムネットワーク進化について検討を行った。

① Thermal Nitch 解析では、下記の結果が得られた。15~50°Cの増殖速度を進化株と比較した結果、47.9°C適応株の第二系統は、至適増殖温度がほぼ45°Cとなり、高温菌の特性を有することが示された。最高増殖温度は、47°Cで増殖し48°Cでは増殖しなかった。実際には、47.9°C完全適応株は、進化において完全適応達成翌日には、48.0°Cで増殖している。この差は、48.0°C培養直前の大腸菌の生育温度が、進化では47.9°C、Thermal Nitch 解析では43°Cであることが影響していると考えられる。また47.9°C完全適応株第一系統は、43~45°Cではほぼ増殖速度が同じで最も高いため、ほぼ高温菌と考えても良い状況であった。この結果より、47.9°C株第二系統は、高温菌として、後の比較解析を検討可能であると考えた。現在は、物質生産への応用なども考え、栄養培地でのThermal Nitch 解析を検討している。次に、44.8~47.9°C適応進化株の比較解析で、15°C、20°Cの低温域では、高温適応進化に伴い適応度が漸次的に減少した。逆に43°C以上の通常の大腸菌では生存ができないとされる高温域では、高温適応進化に伴い、第一系統の43°C以上で、第二系統の46°C以上で適応度が漸次的に増加した。以上のことから、高温適応進化による高温域での適応度獲得と低温域の適応度喪失はトレードオフの関係にあることが示された。これまでの研究で、因果関係のはっきりしたトレードオフが計測された例はほとんどない。

② 44.8°C~47.9°C適応株のゲノム解析を行い、下記の結果が得られた。本研究の高温適応進化は、44.8°C適応中に mutH 変異により高変異率化し進化が継続してきたものである。高温適応進化に伴い、47.5°Cまでの進化では、両系統ともに塩基置換から求められる変異率は、漸次増加していた。しかし、両系統ともに47.9°Cまでの進化過程では、変異率が若干低下し、頭打ちとなっていた。この結果は、高温適応進化が起こるには、ある程度の変異率の上昇は有益だが、進化を促進する変異率の上昇には上限があることを示唆している。長期間の継続進化において、変異率の上限を示唆するデータが得られたのは、初めてである。

変異固定数に関して、47.5°Cまでの進化では、それぞれの系統で723, 984箇所の塩基置換が固定されていた。この時点までは両系統に SNP では共通の塩基置換はなかったが、47.9°Cまでの進化で両系統に共通の塩基置換が出現した。この変異は、シャペロニン GroEL に生じた V126A 変異であった。この結果は、偶然の一致か、GroEL V126A が高温適応進化に重要な機能を有する可能性があるか、現在解析を継続している。

高温における DNA の安定性と高温適応性の議論は、ゲノム GC 含量を中心としてこれまでも多くなされている。しかし、全く異なる種間のゲノム DNA の比較であり、直接的な事実はない。また、高温菌は、ゲノム DNA の GC 含量が高いものから低いものまで多様であることがわかっており、GC 含量との比較はできない。高温菌は、Reverse Gyrase と呼ばれる DNA のリンキング数を増加させる酵素が存在し、GC 含量に依存しない DNA 二重螺旋安定化機構が備わっている。そこで、高温適応進化大腸菌の進化過程におけるゲノム DNA の GC 含量の変化傾向を解析した。その結果、先祖株から47.9°C適応株に至るまで、両系統で GC 含量は単調減少することがわかった。この結果は、大腸菌が高温に適応進化する際には、GC 含量が低下するような選択圧がかかっている可能性を示唆した。今後、GC 含量低下に関わる要因の解析を実施予定である。

細胞内でネットワークを構成している遺伝子に関してどのネットワークに変異が蓄積しているかを解析したところ、プロテオスタシスネットワークの因子が他の領域より3倍以上変異率が高く、8遺伝子中4つの必須遺伝子がすべて進化過程で変異していた。この結果は、プロテオスタシスネットワークの進化が高温適応進化で重要であることを示唆している。

③ 高温適応進化により固定された変異に関して高温菌との比較解析を行った。解析対象として主観を超えて保存されている可能性の高い、必須遺伝子の変異に注目した。高温菌としては、真正細菌の高温菌に着目し、その中でも種内で高温適応進化が生じたと思われる系列を含

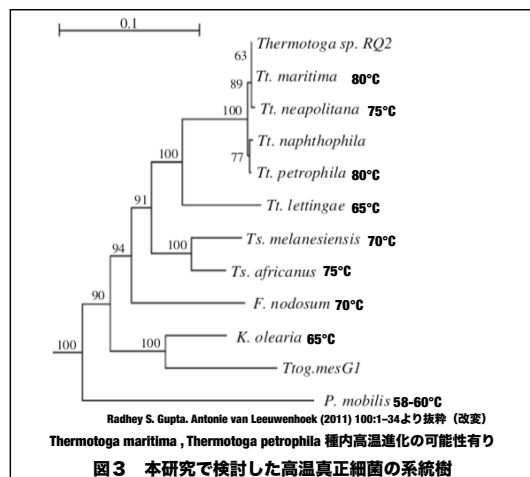


図3 本研究で検討した高温真正細菌の系統樹

めて対象を選択した(図3)。また中温菌から高温適応進化して高温菌の性質を持つようになった菌も対象とした(図4: *B. licheniformis*)。選んだ高温菌の大腸菌必須遺伝子相同遺伝子をデータベースより抽出し、高温適応進化で生じた変異部位の比較解析を行った。

その結果からアミノ酸配列比較をして、変異により高温菌で普遍的なアミノ酸に変化するものを検索、3つの必須遺伝子変異(*rpoC*, *rho*, *groL*)を発見した。

rpoC (RNA polymerase subunit

β' 遺伝子)は、変異型アミノ酸が、解析に使用したすべての高温菌のアミノ酸と一致した。*rho* (transcription termination factor Rho 遺伝子)は、*Pseudothermotoga* の1種を除いて、*Thermotoga*, *Thermosiphon*, *Kosmotoga*, *Pseudothermotoga*, *Thermus* のアミノ酸と変異型アミノ酸が一致した。野生型アミノ酸は、全く一致しなかった。*groL* (シャペロニン GroEL 遺伝子)は、*Pseudothermotoga* のうち1種、*Thermosiphon*, *Thermus* のアミノ酸と変異型アミノ酸が一致した。野生型のアミノ酸は、*Bacillus* 属のアミノ酸と一致した。これらの結果は、高温菌に似る変異が生じた3つの必須遺伝子は、転写(*rpoC*)、転写終結(*rho*)とタンパク質の折りたたみ(*groL*)に関するGlobal regulator系の遺伝子であった。またここでも、*groL* 遺伝子変異が高温菌と相関することが示唆され、高温適応進化とプロテオスタシスネットワーク進化が機能的に相関している可能性をより強める結果となった。また、*groL* 変異は、先の解析で2系統で同じ変異が発生したGroEL V126Aであり、大腸菌の系統内進化でDH1の先祖が分岐する直前にアラニンからバリンに変化していた(DH1はバリン)。このことは、高温適応進化におけるGroEL V126A変異は、すなわち先祖返りの進化が生じていることとなった。

逆に*gyrA* (DNA gyrase 遺伝子)では、野生型アミノ酸が今回使用したすべての高温菌・中温菌のアミノ酸と一致し、変異型アミノ酸のみが異なる結果となった。この結果は、DNA gyraseの変異部位は、中温菌、高温菌で非常に高く保存されている部位であり、重要な機能に関わっている可能性が高いことを示している。また変異により、その機能が損なわれる可能性が高いことも示唆している。この変異により、DNAの二重らせんリンキング数を減少させ、二重らせんをほどくDNA gyraseの機能が低下することは、細胞内で二重らせん構造がほどけにくくなる可能性を示唆しており、高温菌でreverse gyraseが存在する代わりとなる変異になっている可能性がある。

以上のとおり、高温適応進化大腸菌の系統解析と高温菌との比較解析により、大腸菌は、ランダムに変異蓄積して進化しているが、グローバルレギュレーターを中心に高温菌に似る変異が蓄積し、特にシャペロニンなどを介したタンパク質安定性を向上させるプロテオスタシスネットワークに変化が生じて、進化が進んだと考えられた。

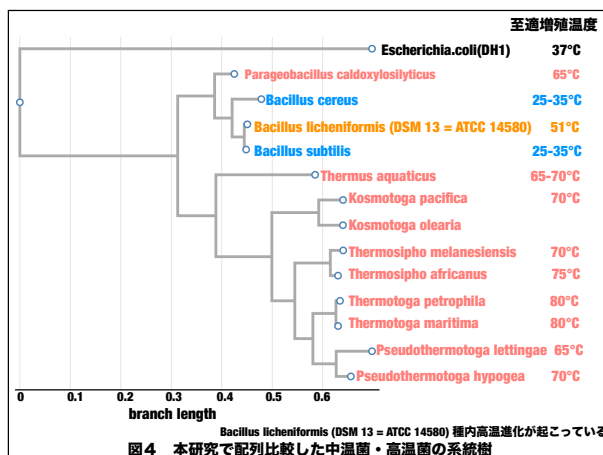


図4 本研究で配列比較した中温菌・高温菌の系統樹

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wakai, R., Ishitsuka, M., Kishimoto, T., Ochiai, T., Nacher, J. C.	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of genes and critical control proteins associated with inflammatory breast cancer using network controllability	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0186353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0186353	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小西 隆介、菅野 暢、鎌田 萌、古倉 健嗣、山内 長承、岸本 利彦
2. 発表標題 高温適応進化大腸菌を用いた進化の発散・収束性の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野 暢、小西 隆介、鎌田 萌、西広 翔、古倉 健嗣、山内 長承、岸本 利彦
2. 発表標題 実験進化による大腸菌の高温適応進化メカニズム解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西隆介、菅野暢、松尾萌、古倉健嗣、山内長承、岸本利彦
2. 発表標題 大腸菌の高温適応進化に伴う増殖速度の温度依存性の変化とその要因解析
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 菅野暢, 小西隆介, 松尾萌, 古倉健嗣, 山内長承, 岸本利彦
2. 発表標題 実験進化による大腸菌の高温適応進化メカニズム解析
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 松尾萌, 菅野暢, 小西隆介, 古倉健嗣, 岸本利彦
2. 発表標題 高温適応進化大腸菌を用いた適応進化と変異率, ロバストネスの相関
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 岸本利彦
2. 発表標題 細胞はどこまでストレスに対して進化できるのか ~大腸菌高温適応進化を可能とするゲノムネットワークの解析~
3. 学会等名 Escherichia coli Systems Biology Workshop 2018 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌田萌, 岸本利彦
2. 発表標題 大腸菌の高温適応進化を加速する相互作用の解明
3. 学会等名 2018年度 先進ゲノム支援拡大班会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸本利彦、大村真優子、廣瀬文音、松尾萌
2. 発表標題 大腸菌高温適応進化における進化能力と変異率、ロバストネスの相関
3. 学会等名 第20回日本進化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大村真優子、寺井亮平、郡駿介、成澤大、四方哲也、岸本利彦
2. 発表標題 大腸菌高温適応進化における進化能力の解析
3. 学会等名 第19回日本進化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 郡駿介、大村真優子、寺井亮平、成澤大、四方哲也、岸本利彦
2. 発表標題 高温適応大腸菌における変異率と進化速度の相関解析
3. 学会等名 第19回日本進化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 寺井亮平、成澤大、四方哲也、岸本利彦
2. 発表標題 変異型シャペロニンが進化能力に与える影響
3. 学会等名 第19回日本進化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大村真優子、寺井亮平、郡駿介、成澤大、四方哲也、岸本利彦
2. 発表標題 大腸菌高温適応進化における進化能力の解析
3. 学会等名 ConBio 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 寺井亮平、成澤大、四方哲也、岸本利彦
2. 発表標題 変異型シャペロニンが進化能力に与える影響
3. 学会等名 ConBio 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 郡駿介、大村真優子、寺井亮平、成澤大、四方哲也、岸本利彦
2. 発表標題 高温適応大腸菌における変異率と進化速度の相関解析
3. 学会等名 ConBio 2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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