

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770255

研究課題名（和文）大腸菌と RNA バクテリオファージ Q β を用いた実験室内共進化系の確立研究課題名（英文）Analysis of bacteriophage Q β genome evolution in an experimental coevolution system

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

研究成果の概要（和文）：

寄生体のゲノム進化は進化様式にいかに関与しているのか。このことを明らかにするために実験室内で共進化系と単独進化系を構築し塩基配列変化を比較した。大腸菌とそれに感染する溶菌性 RNA バクテリオファージ Q β (Q β ファージ) を用いた共進化系と Q β ファージだけを進化させる単独進化系とで約 170 ファージ世代継代培養を行った。Q β ファージゲノム配列の経時変化解析より、共進化系は単独進化系に比べて約 3.4 倍塩基固定速度が大きい等の特徴が見出された。

研究成果の概要（英文）：

How does evolution affect changes in parasite genome sequences? To elucidate the effects of coevolution, we constructed an experimental coevolution system and sole parasite evolution system consisting of *Escherichia coli* and the lytic RNA bacteriophage Q β (Q β phage). We passaged Q β phage in both systems for approximately 170 phage generations. Comparison of sequential (time-dependent) changes in the Q β phage genome sequence in both evolution systems revealed that the coevolution system showed about 3.4-fold higher fixation rate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：実験進化学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：共進化、実験進化、Q β ファージ、大腸菌

1. 研究開始当初の背景

新型ウイルスや変異型ウイルスが毎年の

ように発生することは社会問題の 1 つであり、これらの発生予測法確立は急務である。

新興ウイルスの多くが RNA ウイルスである (Domingo&Holl *Annu. Rev. Microbiol.* 1997) ことを考えると、RNA ウイルスがいかに変化するかという RNA ウイルスの進化機構を解明することは重要である。また、単独では増殖できない寄生者である RNA ウイルスは宿主と寄生者が他方の変化に抗して互いに変化を繰り返す「敵対的な共進化」の中で進化すると思われる。拮抗的な共進化により (i) 宿主に対して寄生者の特殊化が起こるのか。 (ii) 寄生者は弱毒化の方向へ進化するのか。 (iii) どのような遺伝的变化を伴うのか。を明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

上記の質問 (i) ~ (iii) に答えるために、RNA ウイルスを用いた「敵対的な共進化のモデル実験系」を用い遺伝子型と表現型の変化を解析することが重要であると考えた。本研究では申請者が構築に成功した大腸菌と RNA バクテリオファージ Q β (Q β ファージ) を用いた「継代共培養系」を長期間続け両者の変化過程を遺伝子型と表現型の両面から解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験室内共進化系の個体群動態解析について

大腸菌に Q β ファージを感染後、両者を含む培養液の一部を毎日新鮮な培地に移す継代培養を行った (共進化系)。また、コントロールとして、感染後の Q β ファージを分離し、新鮮な大腸菌に感染することを繰り返すファージ単独進化系を並行して行った。共進化系での大腸菌の個体群動態は寒天培地上でのコロニー形成数で計測し、Q β ファージの個体群動態は遊離ファージのプラーク形成数で計測した。

(2) 大腸菌と Q β ファージの適応度測定について

① 共培養液から Q β ファージ粒子は、培養液をポアサイズ 0.2 μ m のフィルターを用いてろ過によって分離した。また、大腸菌は、低マグネシウム濃度培地で継代培養することによりファージの再感染を抑制することにより分離した。

② 共培養開始時、54、163 世代後の大腸菌と Q β ファージを全組み合わせで培養し、大腸菌と Q β ファージの適応度を測定した。

(3) Q β ファージのゲノム解析について

共培養開始時、54、109、163 世代後のファージ粒子からゲノム RNA を抽出した。

5' -RACE 法と 3' -RACE 法を用い、ファージゲノム全長の塩基配列を解析した。

4. 研究成果

(1) 共進化系での個体群動態

大腸菌と Q β ファージを混合し継代培養を 54 日間 (163 ファージ世代) 繰り返したところ、両者は 54 日間共存した (図 1)。また、Q β ファージの個体群動態は振動した (図 1)。

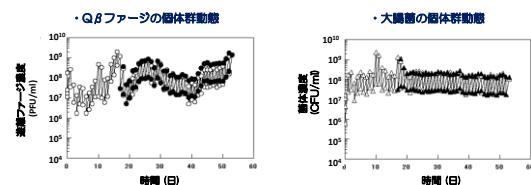


図 1. 実験室内共進化系での個体群動態
1 つの系列から 59 世代後に 2 系列に分けた。白丸と黒丸はそれぞれの系列を示す。

(2) 表現型変化

共培養液から分離した大腸菌と Q β ファージを混合し、適応度を測定した (図 2)。大腸菌は、54 世代後には Q β ファージに対する partial resistance を示すように変化した。また、163 世代後の大腸菌は、共培養開始時及び 54 世代後の大腸菌と比べて比増殖速度

が増加していた。次に、Qβファージの適応度解析より、Qβファージは共培養開始時の大腸菌に対しては弱毒化し、遊離ファージ増幅能が減少していた。しかしながら、Qβファージに対して partial resistance を示す進化型大腸菌においては、共培養開始時の Qβファージに比べて増幅率が高いことが示された (図 2)。

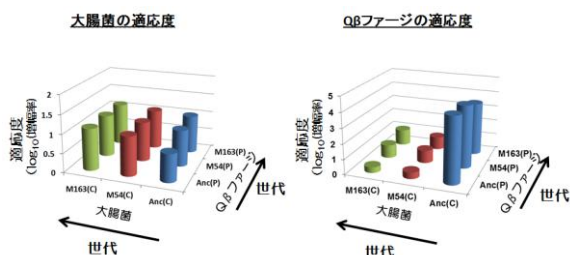


図 2. 大腸菌と Qβファージの適応度
大腸菌の適応度は初期と 7 時間後の OD₆₀₀ 値の比として求め、Qβファージの適応度は初期と 7 時間後もしくは 24 時間後の遊離ファージの比として求めた。

(3) Qβファージの分子進化

共培養開始時、54、109、163 世代目の Qβファージゲノムの配列を解析した。また、Qβファージ単独進化系の 94、169 世代目の Qβファージゲノムの配列を解析した。その結果、共進化系は Qβファージ単独進化系に比べて 2 つの特徴が見られた。(a) 塩基置換固定速度が約 3.4 倍大きかった (図 3)。(b) Qβファージゲノム内で変異固定される遺伝子に偏りがあった (図 4)。

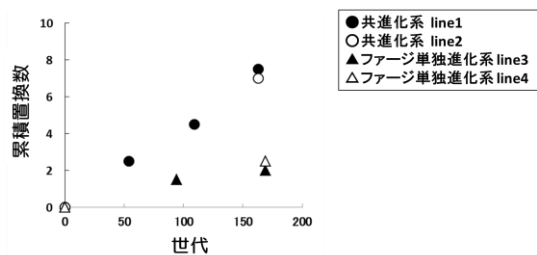


図 3. Qβファージゲノムの累積塩基置換数

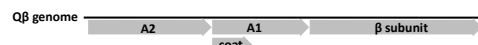
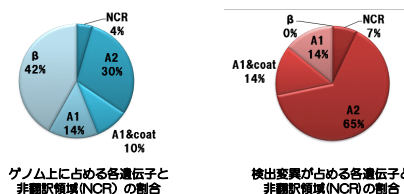


図 4. 検出変異の各遺伝子に占める割合
Qβゲノムは 4 つの翻訳領域を含む。(左) 全ゲノムに占める各遺伝子長の割合を示す。(右) 全検出変異の占める割合を示す。

Qβファージは溶菌性バクテリオファージであり、またその生活環に DNA の状態を持たない RNA バクテリオファージである。そのため、大腸菌と共存することが難しいと考えられた。しかしながら、本研究で示したように、大腸菌は部分抵抗性を示し、また Qβファージは元の大腸菌に対しては弱毒化するという変化を伴い、両者は長期間共存することが可能であった。また、表現型解析より、軍拡競争が起こったのではないかと考えられる。このことより、本モデル系は RNA ウイルスが共進化の中でどのような変化をするのかということに対する基礎的知見の構築に貢献できるものであると考えられる。

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 5 件)

- ① Kazufumi Hosoda, Shingo Suzuki, Yoshinori Yamauchi, Yasunori Shiroguchi, Akiko Kashiwagi, Naoaki Ono, Kotaro Mori, Tetsuya Yomo, 査読有, PLoS ONE, 2011, volume 6, issue 2, e17105
- ② Kumiko Kihara, Kotaro Mori, Shingo Suzuki, Kazufumi Hosoda, Akito Yamada,

Shin'ichi Matsuyama, Akiko Kashiwagi,
and Tetsuya Yomo, 査読有, BioSystems,
2011, vol. 13, 342-347

- ③ Kotaro Mori, Akiko Kashiwagi, Tetsuya
Yomo, 査読有, The Journal of
Eukaryotic Microbiology, vol. 58 (1),
pp. 37-42, 2011
- ④ Toshihiko Kishimoto, Leo Iijima, Makoto
Tatsumi, Naoaki Ono, Ayana Oyake,
Tomomi Hashimoto, Moe Matsuo, Masato
Okubo, Shingo Suzuki, Kotaro Mori,
Akiko Kashiwagi, Chikara Furusawa,
Bei-Wen Ying, Tetsuya Yomo, 査読有,
PLoS Genetics, 2010, vol. 6(10),
e1001164
- ⑤ Saburo Tsuru, Junya Ichinose, Akiko
Kashiwagi, Bei-Wen Ying, Kunihiko
Kaneko, and Tetsuya Yomo, 査読有,
Physical Biology, 2009, vol. 6,
036015(9pp)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 柏木明子、四方哲也、第 62 回日本生物工
学会、ワールドコンベンションセンター
サミット フェニックス・シーガイア・
リゾート (宮崎県山崎町浜山)、2010 年
10 月 27 日～10 月 29 日
- ② 柏木 明子、四方 哲也、日本遺伝学会
第 82 回大会、北海道大学 (札幌市)
2010 年 9 月 20-22 日
- ③ 柏木明子、四方哲也、第 12 回 日本進化
学会大会、東京工業大学 大岡山キャン
パス、2010 年 8 月 2 日～8 月 5 日
- ④ 柏木 明子、四方 哲也、第 11 回日本進
化学会大会 (札幌大会)、北海道大学高等
教育機能開発総合センター、2009 年 9 月
2 日～4 日
- ⑤ Akiko Kashiwagi, Takahiro Sakurai,

Saburo Tsuru, Bei-Wen Ying, Kotaro Mori,
Tetsuya Yomo, APBioChEC' 09, Kobe, JAPAN,
2009 年 11 月 24 日～28 日

- ⑥ Akiko Kashiwagi
International Symposium on COMPLEX
SYSTEMS BIOLOGY, The University of Tokyo,
Hongo Campus, 2009 年 9 月 29 日～10 月 1
日

[その他]

ホームページ等

[http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/kohou
2/public/oyo/a.kashiwagi/index.htm](http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/kohou2/public/oyo/a.kashiwagi/index.htm)

6. 研究組織

(1) 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