

	ホサイン モハンマド タンビール
氏 名	HOSSAIN, Md. Tanvir
本籍（国籍）	バングラデシュ人民共和国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研 780 号
学位授与年月日	令和 2 年 9 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学
学位論文題目	Studies on the adaptation of single-stranded RNA virus to novel environments using thermal adaption experimental evolution of RNA bacteriophage Qβ as a model system (RNA バクテリオファージ Qβ の高温適応進化実験をモデルとして用いた一本鎖 RNA ウルスの新規環境への適応に関する研究)
学位審査委員	主査 弘前大学准教授 柏木 明子 副査 佐野 輝男(弘前 教授),山田 美和(岩手 准教授),小関 卓也 (山形 教授)

論 文 の 内 容 の 要 旨

The dissertation related to evolution experiment has been presented in two parts. The larger part of this thesis is devoted for investigating adaptation of single-stranded (ss)RNA virus to novel environments using thermal adaptation of ssRNA bacteriophage Q β as a model system. The second and smaller part of this thesis is studied for investigating the growth characteristics of Q β mutants.

ssRNA viruses change at high mutations rates to maintain the integrity of genetic information, which allows them to find the beneficial mutations needed for adaptation quickly. In spite of the fact that it has been considered that ssRNA virus can adapt readily to changes in the environment, it remains unclear how quickly they can adapt to a novel environment and/or how many and what types of mutation are required to facilitate evolution. To elucidate the mechanisms underlying ssRNA virus adaptations to the novel environment, I conducted thermal adaptation evolution experiments of ssRNA bacteriophage Q β as a model system. The ssRNA bacteriophage Q β , of the family *Leviviridae*, which infects *Escherichia coli* strains expressing the F-pili that acts as the virus receptor. The Q β has short generation time and a genome of 4217 nucleotides in length that encodes only four proteins: the A2 protein for bacterial lysis and entry, the coat protein, the A1 protein, which is expressed through incorrect reading of the stop codon of the coat protein and present in low amounts in the capsid, and the β subunit for Q β replicase. These make us understand the relationship between genotypic and phenotypic changes easily. In addition, evolution experiments with thermal selection of pressure is suitable for analyzing the process of adaptation because vital living processes, such as energy transduction, reproduction, and growth, are affected by temperature change and the temperature is precisely controllable in the laboratory. Previously, a thermal adaptation experiment using Q β as a model of ssRNA virus was conducted in our laboratory, in which the culture temperature was increased in a stepwise manner from 37.2°C to

43.6°C in three independent lines using *E. coli* 43BF' as the host strain that could grow in temperatures up to 43.6°C. The effect of synonymous and nonsynonymous changes on the fitness and life history of Q β were evaluated. To investigate the thermal adaptation of phages at higher temperatures, it is necessary to use a host strain that is capable of growth at higher temperatures. Recently, Kishimoto et al. in Toho University, Japan isolated a strain of thermally adapted *E. coli* 46L-1 that was capable of growing at temperatures up to 46°C by thermal adaptation evolution experiment. This technical advance made it possible to evaluate Q β adaptation to thermal changes at higher temperatures.

To monitor thermal adaptation of Q β , I used the thermally adapted *E. coli* strain 46L-1F' as the host, which was constructed via conjugation with strain 46L-1 and HB2151, and Q β 18 mut as the starting phage, which was one of three replicates that had adapted to 43.6°C and was prepared from cDNA. Because the growth of Q β depends on the growth of the *E. coli* host and the specific growth rate of *E. coli* 46L-1F' was almost identical between 37.2°C and 44.8°C but decreased by 7% and 26% at 45.3°C and 45.9°C, respectively. Therefore, I conducted the present thermal adaptation experiments at temperatures up to 45.3°C using the *E. coli* 46L-1F' strain as the host. After adaptation at 45.3°C, the culture temperature was reverted back to 37.2°C to investigate whether the ancestral sequence became dominant in the population. In this study, I explored the adaptation process of ssRNA bacteriophage Q β via stepwise increases to the highest known growth temperature, 45.3°C and showed that Q β can grow and replicate at this temperature within 52 days (616-638 generations) when the Q β 18 mut variant was used as the starting material and within 114 days (1238-1260 generations) when Q β ancestral was used as the starting material. Fitness analysis revealed that Q β adapted to growth and replication at 45.3°C had an overall increased temperature range because these populations could grow with equivalent fitness at 37.2°C. Intriguingly, the reverse-adapted Q β populations showed little to no decrease in fitness after adaptation of the 45.3°C adapted populations to 37.2°C for 8 days (122–124 generations). These results clearly indicate that Q β gained the potential for growth at higher temperatures without showing trade-off in the lower ranges. The 45.3°C-adapted population had at most 21 substitutions from Q β 18 mut and 39 substitutions from ancestral Q β . In addition, the mutation introduced during this adaptation tend to increase the frequency in NCR and A1 but not randomly in all the genes. These results suggest that Q β could adapt to these elevated temperatures with only point mutations; these mutations account for 0.8% – 0.9% of the total RNA genome.

Finally, in order to investigate the improved growth characteristics of 43.7°C-adapted endpoint populations, four kinds of mutant (18 mut-A1781C, -U3784C, -C3879G, and -combined of three) were prepared through site-directed mutagenesis of the Q β expression vector pACYCQ β _18 mut. The fitness assay was performed for four mutants and 18 mut at 43.6°C using the host strains 43BF' and 46L-1F' and at 43.7°C using the host strain 46L-1F' and compared to determine the selective pressure of 43.7°C-adaptation using 46L-1F' and Q β 18 mut. The fitness of four mutants and 18 mut at 43.6°C using the host strain 43BF' and 46L-1F' showed no statistically significant difference in mean fitness but the mean fitness at 43.7°C is comparatively lower than that of at 43.6°C. The slightly deleterious and/or natural mutants (A1781C and U3784C) and beneficial mutant (C3879G) cannot reach the maximum fitness

value separately but combined mutants showed maximum fitness at 43.7°C. These results suggest that the adaptation temperature 43.7°C acts as a selective pressure for Q β 18 mut, the mutations were introduced due to thermal adaptation, and the natural and/or slightly deleterious mutations are important as well as the beneficial mutations for thermal adaptation.

The evolution experiment results of ssRNA bacteriophage Q β performed with thermally adapted *E. coli* underscore the observation regarding the rapid adaptation of ssRNA bacteriophage to novel environments. This evolution experiments focus on temperature on ssRNA bacteriophage Q β , displaying the adaptation mechanism that can be readily explored for applications in tracking the emergence of new type of virus. Studies like these are not only critical for the field related to evolutionary biology but also for the field of control of epidemic diseases by viruses for humans, livestock, and plants.

(和訳)

本論文は、緒論と実験に関連する 2 つの章、総括で構成されている。本論文は、ssRNA バクテリオファージ Q β (Q β) を RNA ウイルスのモデルとした実験室内進化系を用いて、Q β の高温適応過程解析を遺伝子型と表現型の両面から追跡した内容であり、更に、得られた Q β 変異体における各変異の適応度の効果を明らかにしたものである。

一本鎖 RNA をゲノムとして持つ ssRNA ウイルスは、変異率が高いため、高速で環境変化に適応可能であると考えられる。しかしながら、実際にどのくらいの速さで、どの程度のゲノム変化を伴って適応し得るのか、ということに関しては、十分に解明されていない。そこで、本研究では、ssRNA の新規環境への適応機構を明らかにするために、環境条件をコントロールできる実験室内進化系を用いて、大腸菌に感染する ssRNA ウイルス Q β の高温適応進化実験を行った。Q β は、全長 4,217 塩基の 1 本鎖 RNA ゲノムに 4 つのタンパク質をコードする。それらは、宿主大腸菌への感染と、子ウイルス放出時に菌体を溶菌する作用を持つ A2 タンパク質、外殻タンパク質、外殻タンパク質から読み通されて発現する A1 タンパク質、Q β 複製酵素の 1 つの構成因子である β サブユニットである。

Q β の増殖は宿主大腸菌の存在が必須であり、Q β の高温適応進化実験には、高温で増殖可能な大腸菌株が必要である。東邦大学の岸本利彦教授らは、大腸菌の高温適応進化実験を行い、46°C まで増殖可能な大腸菌株の取得に成功している。そこで、この高温適応大腸菌株を分与いただき、その大腸菌に Q β の感染に必要な F 因子を接合により導入することによって、宿主大腸菌 (46L-1F'株) を準備した。次に、本研究での出発 Q β は、先行研究 (Q β の 37.2°C から 43.6°C への高温適応進化実験) で得られた Q β ゲノムに 18 か所の点変異が導入された Q β 18 mut 株を用いた。46L-1F'株の比増殖速度を測定したところ、37.2°C から 44.8°C まではほぼ同じ比増殖速度を示したが、45.3°C では約 7% 小さく、45.9°C では約 26% 小さかった。そのため、本研究では、45.3°C までは培養温度を上げられると判断し、高温適応進化実験を行った。独立 3 系列で Q β 18 mut 株の培養温度を 43.7°C、44.1°C、44.8°C、45.3°C と段階的に上げた。その結果、Q β は、62 日間で元来増殖不可能な培養温度である 45.3°C でも増殖可能となった。37.2°C から 43.6°C までの高温適応に要した日数と合わせると、114 日 (1,238~1,260 世代) という短期間で 45.3°C に適応した。ゲノム変化を解析したところ、全ゲノムの約 0.8~0.9% に相当する位置において点変異が生じており、RNA ゲノムの 2 次構造予測においては、ほとんど 2 次構造に変化が見られなか

った。つまり、Q β は大規模なゲノム構造変化を伴うことなく、適応したことが明らかとなった。次に、野生型の配列（37.2°Cが至適培養温度）に戻るのかどうかを解析するため、45.3°Cに適応した集団を 37.2°Cに戻して継代した。その結果、興味深いことに野生型の配列には戻らず、新たな点変異の蓄積が見られた。各温度で得られた適応集団の適応度を 37.2°C、43.7°C、44.1°C、44.8°C、45.3°Cで測定したところ、各温度での適応度を測定したところ、低温側での適応度が下がることなく、高温で増殖可能となっていた。つまり、トレードオフを伴わず、増殖可能温度域が拡大可能であることが明らかとなった。また、37.2°Cに培養温度を戻して継代した集団においても、高温側での適応度の有意な減少は見られず、増殖可能温度域は維持されていた。次に、43.7°Cに適応した集団でみられた 3 か所の変異のそれぞれの適応度への貢献を調べた。3 か所の変異それぞれを持つ変異体、3 変異全てを持つ変異体を調製し、適応度を測定したところ、3 つの変異の内 2 つの変異それぞれを持つ変異体は Q β 18 mut 株よりも適応度が小さかったが、3 つの変異全てを持つ変異体は Q β 18 mut 株よりも適応度が大きかった。つまり、少なくとも Q β 18 mut の遺伝的背景に導入された場合に適応度が下がった 2 つの変異は、どのような遺伝的背景に導入されるかによって、適応度への貢献が正負逆になるという sign epistasis を示した。このことは、適応変異がゲノムに導入される順番が重要であることを示唆するものである。

以上より、ssRNA ウイルスは、その短いゲノムの中に今まで遭遇したことのない新しい環境にも素早く適応できる柔軟性が内包されていることが明らかになった。本論文は進化生物学分野だけではなく、ヒト、家畜や植物に病気をもたらす ssRNA ウイルスの制御分野においても重要な基礎的知見を与え貢献するものである。

論文審査の結果の要旨

一本鎖 RNA をゲノムとして持つ RNA ウイルスは、変異率が高く、素早く環境変化に適応すると考えられるが、実際に、どれぐらいのスピードで、どの程度のゲノム変化を伴って適応し得るのか、ということは十分に解明されていない。その適応過程を解析するには、様々な地域から時系列を追って分離した RNA ウイルスを解析する手法や、実験進化の手法でフラスコの中での適応過程を解析することによって、これまでに研究されてきた。

第 1 章 緒論、第 2 章は、大腸菌を宿主とする RNA ウイルスのモデルの一つである RNA バクテリオファージ Q β (Q β) を用い、実験室内進化実験系で、高温環境への適応過程を遺伝子型と表現型の両面から追跡・解析したものである。Q β の増殖には宿主大腸菌が必要であるが、本論文では、高温適応進化実験で培養温度を段階的に上げながら 537 日間 (7780 世代) 継代して得られた高温適応大腸菌株を用いることにより、通常、Q β が経験し得ないであろう高温 45.3°Cまでの高温適応過程を明らかにすることに成功した。これは、他に報告例がない結果である。先行研究において、Q β の培養温度を 37.2°Cから 43.6°Cまで段階的に上げながら継代し 43.6°C適応 Q β 変異体(Q β 18 mut)が得られていた。そこで、本論文では、Q β 18 mut を開始ファージとし、43.7°C、44.1°C、44.8°C、45.3°Cと培養温度を段階的に上げながら、独立 3 系列で、継代した。その結果、Q β は、114 日 (1260 世代) 以内に野生型の Q β が増殖し得ない 45.3°Cで増殖可能となった。各温度での適応度を測定したところ、低温側での適応度が下がることなく、高温で増殖可能となっていた。つまり、トレードオフを伴わず、増殖可能温度域が拡大可能であることが示された。また、ゲノム配列の解析から、大規模なゲノム変化等は伴わず、点変異の蓄積のみで、

45.3°Cに適応し得ることが明らかとなった。更に、45.3°Cに適応した Q β 集団を 37°Cに戻し継代を行った結果、高温側での適応度は下がらず、また、塩基配列は野生型に戻らないという興味深い結果が得られた。

第3章では、第2章で得られた点変異それぞれの適応度への効果を測定することを目的としたものである。その中で、43.7°Cでの適応実験で得られた3か所の点変異それぞれを持つ変異体と全てを持つ変異体を作製し、適応度を測定した結果、これらの変異間には sign epistasis の関係性があることが示された。

本論文は、RNA ウィルスはゲノムサイズが小さいながらも、野生型が増殖できないような高温に対し、短期間で、点変異の蓄積だけで適応可能であるという柔軟さを持つことをコントロールされた実験室内環境下で明確に示したものである。

本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. **Md. Tanvir Hossain**, Toma Yokono, and Akiko Kashiwagi (2020)

The single-stranded RNA bacteriophage Q β adapts rapidly to high temperatures: an evolution experiment

Viruses, 12 (6), 638