

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：23201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14891

研究課題名(和文) バクテリア巨大化細胞への異種ゲノムDNAの導入方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of method for injection of heterologous genomic DNA into bacterial giant cells

研究代表者

西田 洋巳(Nishida, Hiromi)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：60301115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：現在の方法では、バクテリア細胞に数メガ塩基対のクロモソームサイズのDNAを導入することができない。よって、バクテリアのゲノムをデザインし、その設計図に基づいてDNAを合成できたとしても、細胞への導入ができない。そこで、細胞にマイクロチップを突き刺して、外来の長鎖DNAを導入する方法を確立することを研究の目的とした。目的を達するためには、細胞を15マイクロメートル程度まで巨大化する必要があった。これまでに複数のバクテリア細胞の巨大化に成功し、マイクロマニピュレーション操作を行った。特に*Lelliottia amnigena*の巨大化細胞においては、特筆すべき成果を挙げることができた。

研究成果の概要(英文)：Injection of foreign DNA into bacterial cells has limitation in size and it is impossible to inject chromosome size DNA (> 1 Mbp). Even if genome of bacteria is designed and DNA can be synthesized based on its design drawing, injection of the DNA into the cell is impossible. So, we aimed to establish a method to inject foreign long DNA by piercing the microchip into the cell. In order to achieve the objective, it was necessary to enlarge the bacterial cells of 1-2 μm up to >15 μm . We succeeded in enlarging several bacterial cells so far and carried out micromanipulation operation. Particularly in the giant cells of *Lelliottia amnigena*, noteworthy results could be raised.

研究分野：応用微生物学

キーワード：スフェロプラスト 巨大化細胞 マイクロマニピュレーション操作 金属イオン *Lelliottia amnigena*
光合成細菌 *Deinococcus grandis* マイクロインジェクション

1. 研究開始当初の背景

エレクトロポレーション法、コンピテントセル・塩化カルシウム法、パーティクルガン法など細菌に DNA を導入する方法は様々に存在しているが、いずれの方法においても、数 Mbp のクロモソームサイズの長鎖 DNA を導入することはできない。そこで、細菌細胞にマイクロマニピレータを用いてマイクロインジェクション(マイクロチップを細胞に突き刺して物質を導入する方法)することを考えた。実験で使用されている細菌は、細胞サイズが 1~2 μm 程度のため、サイズを 15 μm 以上にする必要がある。細菌細胞の巨大化の方法は、細胞をスフェロプラスト化し、その細胞に対して、細胞壁合成を阻害した条件でインキュベート、培養することによって巨大化させるものがある。

2. 研究の目的

細菌細胞を巨大化させ、その巨大化細胞に対してマイクロマニピレータ操作を行う。特に、マイクロインジェクションによって、クロモソームサイズの DNA を導入する方法を確立させることを目的とする。

3. 研究の方法

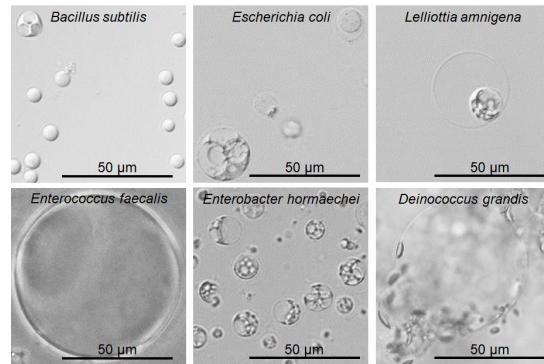
細菌細胞をリゾチーム処理によってスフェロプラストにし、その細胞を、細胞壁合成阻害剤(ペニシリンなど)を添加した培地で培養(インキュベーション)することによって、細胞を巨大化した。本研究で用いた培地は、海水の金属塩の成分を反映させたマリン培地(Difco Marine Broth 2216)を使用した。本培地を用いた理由は、浸透圧の調整にあったが、本研究の成果の一つとして後述するが、特定の金属イオンが巨大化に影響していたことを明らかにした。

巨大化した細胞に対して、マイクロマニピレータ(TransferMan 4r, エッペンドルフ社)を用いて、一細胞操作を行った。

なお、巨大化細胞の特徴を明らかにし、細菌のスフェロプラストの巨大化メカニズムに関する基礎的な研究も行った。

4. 研究成果

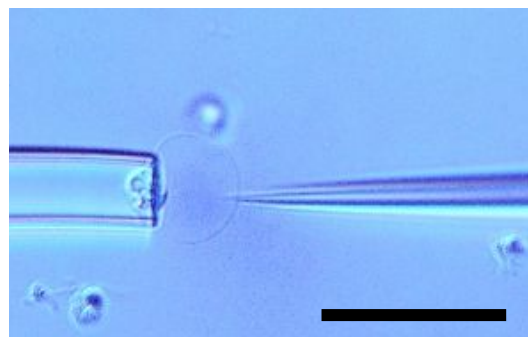
細胞の表層構造は細菌によって異なるため(例えばグラム陽性と陰性など)、リゾチーム処理によるスフェロプラスト化にはそれぞれに適した条件を見つける必要があった。その結果、細胞直径が 15 μm を超えるまでに巨大化した細菌は、枯草菌 *Bacillus subtilis*、放射線抵抗性細菌 *Deinococcus grandis*、*Enterobacter hormaechei*、*Enterococcus faecalis*、大腸菌 *Escherichia coli*、*Lelliottia amnigena* であった(下図参照)。



細胞直径が 15 μm を超えない細菌としては、好気性紅色光合成細菌である *Erythrobacter litoralis* および通性嫌気性紅色光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* であり、これらのスフェロプラストには内部に液胞様構造体形成が見られず、液胞様構造体形成が細菌のスフェロプラストの巨大化に関与している可能性を示唆している。これらの光合成細菌は、スフェロプラストの巨大化においても光および酸素の影響を受けることを明らかにした。通常、*E. litoralis* は酸素が存在している環境下においてのみ光合成を行うことが知られている。しかし、そのスフェロプラストの巨大化においては、酸素が存在していない条件においても光照射によって巨大化することを確認できた。さらに、赤色光や緑色光では巨大化するにもかかわらず、青色光では巨大化が阻害されることを明らかにし、本スフェロプラストにおいても光に対するアンテナが機能していることを示した。

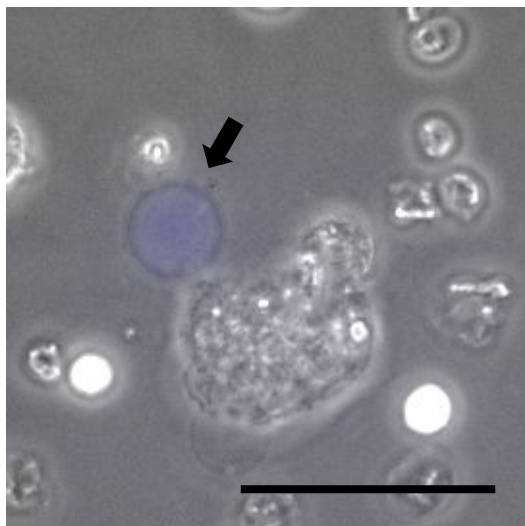
また、通性嫌気性の *R. rubrum* のスフェロプラストは、酸素も光照射もない条件下でも巨大化することを確認し、発酵あるいは嫌気呼吸によって ATP をつくっていることが示唆された。

15 μm を超えるまでに巨大化した *L. amnigena* を用いて、マイクロインジェクションを行った。本細菌の巨大化スフェロプラストは内膜と外膜が乖離しており、マイクロインジェクションの実験は、外膜に孔径 0.5 μm のフェムトチップを差し込み、墨汁をペリプラズム領域へ導入したことを確認した(下図参照、スケールバーは 50 μm)。



さらに、外膜を剥いだ細胞に対して、青色

蛍光タンパク質を含む溶液を流しながら接触させて、内部に液胞様構造体を構築し、さらにその構造体を細胞外へ出した(下図参照、矢印が作製した人工液胞様構造体、この構造物を造るための膜を提供したのは、その下に存在している崩壊した細胞、スケールバーは50 μm)。



最大の細胞直径が300 μmを超えた *D. grandis* については、その要因を探る実験を行った。本バクテリアは、通常の培養に使用される TGY 培地では巨大化しないことがわかっており、そこにショ糖などを添加し、浸透圧を調整しても巨大化しない。しかし、マリン培地を使用した際には、そのスフェロプラストはペニシリンを添加しなくても(もちろん添加しても)巨大化した。そこで、培地成分に要因があると考え、金属塩を別々に添加することによって、巨大化の有無を確認した。その結果、培地にマグネシウムイオンあるいはカルシウムイオンとナトリウムイオンが存在することが巨大化の要因であることを明らかにした。TGY 培地にそれぞれの条件の金属イオンを添加した際にも巨大化を確認できたことより、これらの金属イオンが本バクテリアのスフェロプラスト巨大化に要求されていることを示した。この成果は、現在、論文投稿中である。

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 2件)

Nishino K, Takahashi S, Nishida H (2018) Comparison of gene expression levels of *appA*, *ppsR*, and *EL368* in *Erythrobacter litoralis* spheroplasts under aerobic and anaerobic conditions, and under blue light, red light, and dark conditions. *Journal of General and Applied Microbiology* 64 [advance publication, in press]

Nakazawa M, Nishida H (2017) Effects of light and oxygen on the enlargement of spheroplasts of the facultative anaerobic anoxygenic photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Jacobs Journal of Biotechnology and Bioengineering* 3, 014

〔学会発表〕(計 8件)

西田洋巳; バクテリアのスフェロプラスト巨大化; 日本農芸化学会2018年度大会シンポジウム「バクテリア細胞膜の機能および構造研究の新展開」; 名古屋; 2018年3月18日

梅村幸佑, 森田裕介, 西野弘起, 白谷周作, 鳴海一成, 大島拓, 西田洋巳; *Deinococcus* のスフェロプラストに関する研究; 第10回北陸合同バイオシンポジウム; 富山; 2017年11月10日

Sawako Takahashi, Hiroimi Nishida; Quantitative analysis of DNA and RNA in enlarged spheroplasts of the bacterium *Lelliottia amnigena*; FEMS 2017, 7th Congress of European Microbiologists; Valencia, Spain; July 12, 2017

西野弘起, 中澤舞, 西田洋巳; 好気性紅色光合成細菌スフェロプラスト巨大化における呼吸と光合成の影響; 日本農芸化学会2017年度大会; 京都; 2017年3月20日

高橋沙和子, 西田洋巳; バクテリア巨大化スフェロプラストは、線維化を経て2分裂細胞に戻るか?; 日本農芸化学会2017年度大会; 京都京都; 2017年3月20日

西田洋巳; 細菌スフェロプラスト巨大化; 第3回東京大学・富山県立大学生物工学合同セミナー; 東京; 2016年11月22日

中澤舞, 西田洋巳; 好気性紅色光合成細菌 *Erythrobacter litoralis* のスフェロプラスト成長における光と酸素の影響; 第9回北陸合同バイオシンポジウム; あわら; 2016年11月4日

高橋沙和子, 西田洋巳; 腸内細菌科の *Lelliottia amnigena* 巨大化スフェロプラストの遺伝子発現解析; 第9回北陸合同バイオシンポジウム; あわら; 2016年11月4日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西田洋巳 (NISHIDA, Hiromi)
富山県立大学・工学部・教授
研究者番号：60301115