

令和元年6月12日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14896

研究課題名(和文) 自然環境下でゆらぐ遺伝子発現の網羅的同定

研究課題名(英文) Identification of genes heterogenously expressing in a natural microbial population

研究代表者

宮崎 亮 (Miyazaki, Ryo)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：80712489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、同一環境下で培養したクローン細胞集団であっても個々の細胞レベルでは表現型に多様性があり、それが細胞集団全体の機能やフィットネスにアドバンテージをもたらすことがわかってきた。本研究では細菌のクローン培養集団を用いて、このような表現型の不均一性を自然環境下で観察・モニタリングし、その進化生物学的意義の解明に挑んだ。解析に必要な顕微鏡システム、画像解析手法を独自に確立し、特定の自然環境中で発現のばらつきが高い遺伝子を複数見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壌や海水、動植物体内などいわゆる環境中の微生物研究は、特定の遺伝子やゲノム情報を利用したオミクス解析、あるいはFISH (Fluorescence in situ hybridization) 法など固定試料を使ったスナップショットの解析が中心で、ダイナミックな微生物集団の動態をリアルタイムに解析した例はほとんどない。本研究成果はまさにこの微生物生態学のギャップを埋め、自然環境中の細菌一細胞およびそこから派生するクローン細胞集団の動態を定量的かつリアルタイムに観察し、表現型の不均一性が微生物の進化・適応に及ぼす影響の解明に綱がる極めて重要な内容といえる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have revealed that an isogenic bacterial population can contain phenotypically distinct subpopulations, which benefit the survivability and fitness of the population. We here aim to visualize and detect such heterogeneity in a clonal bacterial population in natural ecosystems. By developing time-lapse microscopy and automated image analysis system, we found that specific bacterial genes of which expression levels were highly variable among cells in a particular natural environment.

研究分野：微生物学

キーワード：微生物 遺伝子発現 ライブイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

同一環境で培養したクローン細胞集団であっても、一細胞レベルで精密に観察するとその表現型 (遺伝子発現、形態、酵素活性等) には必ず個体差が存在する (図 1)。この「表現型の不均一性」は、個々の細胞の生理反応効率が細胞内成分 (タンパク質、mRNA 等) の濃度や状態に依存して確率的にばらつくことが原因で起こり、全生物に共通する現象である (Elder. 2010. *Nature*)。微生物学においてもクローナルな単細胞生物集団の中で個性的な挙動を示すサブ細胞集団の存在が徐々にわかってきており、申請者の先行研究である遺伝子水平伝播に関する不均一性 (Miyazaki et al. 2012. *PLoS Genet*, Reinhard et al. *Curr Biol*) を筆頭に、遺伝的変異を伴わない抗生物質耐性菌の出現 (Lewis. 2010. *Annu Rev Microbiol*, Wakamoto et al. 2013. *Science*) や、孢子形成に関わる遺伝子発現のばらつき (Locke et al. 2011. *Science*) などの研究がハイランクジャーナルに発表されている。また、病原菌の感染過程においても、宿主の免疫応答に対応するサブ集団と、組織内での増殖を担当するサブ集団の分業システムが報告されている (Ackermann et al. 2009. *Nature*)。しかし、これらの研究は、実験の定量性・解像度・再現性を担保するために実験室環境のモデルシステムで行われており、実際の自然生態系において表現型の不均一性がどの程度微生物集団の進化・適応に貢献しているのか、その真偽と実態は明らかにされていない。

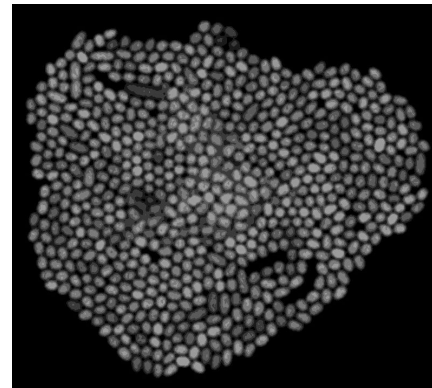


図 1: 表現型の不均一性の例。III 型分泌系の遺伝子発現を蛍光ラベルした緑膿菌の共焦点レーザー顕微鏡像。同一環境で増殖するクローン集団でも、個々の細胞では遺伝子発現レベル (細胞の明暗) が異なる。

2. 研究の目的

上述の背景をふまえ、本研究では顕微鏡システムとマイクロデバイスを統合した独自の定量的ライブイメージング法を構築し、実際の自然環境下におけるクローナルな細菌集団内の表現型の不均一性をモニタリングする。さらに、本システムを用いたゲノムワイドなスクリーニング系と不均一性を操作した変異株の作製により、実環境下の一細胞レベルで不均一な発現を示す遺伝子を網羅的に同定し、それら遺伝子発現のばらつきが集団全体の生存・適応に与える影響を解明する。

3. 研究の方法

本研究では、多様な生態系に生息することが知られ、かつ全ゲノム配列が解読されている *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) を環境細菌のモデルとして用いることとした。緑膿菌の生息が確認されている生態系のうち、本研究で用いるマイクロデバイスの設置に適した海水、湖底汚泥、および哺乳類培養細胞 (気管支上皮細胞) の 3 種を環境サンプルとして用いる。

まず、発現レベルのばらつきを測定する遺伝子プロモーターの下流に蛍光タンパク質遺伝子 (*egfp*) を連結させたレポーターコンストラクトを緑膿菌に導入する。このレポーター細胞集団を希釈し、 μm^3 スケールの micro-well が約 10^5 並んだ micro-chip (8 x 35 mm) に供し、各 well に一細胞ずつ格納する (図 2)。本 micro-chip は、well 底部に直径約 $0.2 \mu\text{m}$ の特殊な微細管加工が無数に施されている。chip を環境サンプル上に設置して培養することで、各 well に格納された単一細胞は chip 底部から毛細管現象によって吸い上げられた栄養素や環境因子を取り込んでクローナルに増殖することができる。本 chip を固定基盤とともに海水、湖底汚泥、培養した気管支上皮細胞の上に設置して培養し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた長時間 time-lapse イメージングにより各 well のレポーター細胞の増殖および遺伝子発現をモニタリングする。なお、chip の構造上、環境サンプル自体の自家蛍光は遮断される。また、構成的に発現する別の蛍光タンパク質遺伝子 (*mcherry*) を同細胞に導入し、レポーター細胞の検出とトラッキングを簡便化する。

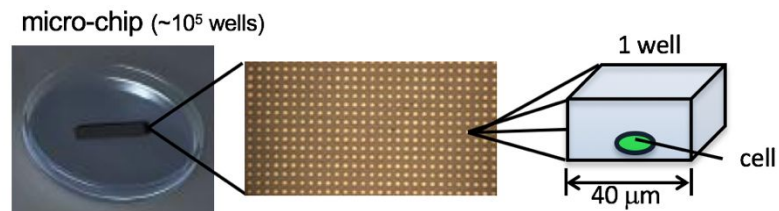


図 2: 本研究で用いた micro-chip の構造。約 W40 x D40 x H10 μm の micro-well が約 10^5 並ぶ。レポーター株の培養液を希釈し、1 cell/well となるように格納する。

次に、画像解析ソフトと統計ソフト R で作製した独自のプログラムで蛍光画像の解析を行い、遺伝子発現のばらつき (CV: coefficient of variation) を算出し、その値が全 well の平均 CV より顕著に大きい well を探索する。当該 well からマイクロキャピラリーを用いてレポーター細胞を回収・培養し、ゲノム DNA を抽出してレポーター領域をシーケンシングし、不均一な発現を示す遺伝子 (プロモーター) を同定する。

最後に、上記のスクリーニングで得られた遺伝子が、実際に自然環境中のクローン集団の中で不均一に発現することで細菌の生存戦略に貢献するかどうかを検証する。具体的には、当該遺伝子発現のばらつきを遺伝学的操作によって変化させた変異株を作製し、上記のスクリーニングで用いた環境サンプルに直接接種して、その増殖や生存率を野生株と比較する。さらに、野生株と変異株を等量同時に接種した環境サンプルも用意し、両者の生存競争をモニタリングする。本研究の「自然生態系において微生物は表現型にばらつきを持たせることで生存・適応している」という仮説が正しければ、変異株の成長速度や生存率は低く、野生株との生存競争に敗れるはずである。なお、遺伝子発現のばらつきが変化させた変異株の作製は、当該遺伝子の発現を制御する制御因子のコピー数を増減させることで可能となることが申請者の先行研究で明らかになっている (Miyazaki et al. 2012. *PLoS Genet*)。この原理に従い、本研究ではスクリーニングで得られた遺伝子の中から、アノテーション情報に基づいてその発現制御機構が十分明らかになっている遺伝子に焦点を絞り、それら制御因子のゲノム上のコピー数を相同組換えまたはミニトランスポゾンで増加させた変異株を作製する。作製した変異株の遺伝子発現のばらつきは、上記の time-lapse イメージングで確認する。また、環境サンプル中での野生株と変異株の増殖・成長率・生存競争は、両者に特異的な遺伝子を鋳型とした qPCR で経時的に測定、あるいは両者を異なる蛍光タンパク質で標識し、同じく time-lapse イメージングシステムでモニタリングする。

4. 研究成果

まず予備実験として、緑膿菌の III 型分泌系遺伝子のプロモーターと構成的に発現するプロモーターを別々の蛍光タンパク質遺伝子と連結し、同一細胞内で両者を検出するためのレポーターコンストラクトをミニトランスポゾン上に作製した。本コンストラクトを導入したレポーター株を作製し、micro-chip に配置した後、海水、湖底汚泥、および気管支上皮細胞 (培養細胞) の上で培養したところ、湖底汚泥を用いた場合に最も安定してレポーター株の挙動を顕微鏡観察することができた。そこで、III 型分泌系遺伝子プロモーターの代わりに、緑膿菌の推定プロモーター領域を網羅的に導入したレポーターライブラリーを構築し、湖底汚泥上で同様の実験を行なった。time-lapse イメージングの過程で、一部レポーター株の成長遅延や環境サンプルの自家蛍光などの問題点が見られたが、培養条件等を変更することで克服した。また、画像解析アルゴリズムにも改良を重ね、半自動的に time-lapse イメージを解析することが可能となった。レポーター遺伝子の発現のばらつきが全集団の平均よりも高いクローンを選び、標的遺伝子の配列を確認したところ、再現性高くスクリーニングされる遺伝子が複数得られた。現在は、当該遺伝子の発現制御系を分子生物学的手法により操作し、遺伝子発現のばらつきの人為的操作を試みているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) Sotaro Takano, Akiko Koto, [Ryo Miyazaki](#), Dynamics of bacterial cell proliferation inhibited by specific proteins for effective horizontal transmission of the integrative and conjugative element ICEc/c, bioRxiv, 2019, 査読無, <https://doi.org/10.1101/512285>
- (2) Shota Suenami, [Ryo Miyazaki](#), Takeo Kubo, Detection of Phospholipase C activity in the brain homogenate from the honeybee, Journal of Visualized Experiments, 139, e58173, 2018, 査読有, DOI:10.3791/58173
- (3) [Ryo Miyazaki](#), Hirokazu Yano, Vladimir Sentchilo, Jan Roelof van der Meer, Physiological and transcriptome changes induced by *Pseudomonas putida* acquisition of an integrative and conjugative element, Scientific Reports, 8, 2018, 査読有, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23858-6>
- (4) 高野壮太郎、[宮崎亮](#)、表現型のばらつきが作り出すクローン細胞集団の多様性と社会性、化学と生物、56,461-468, 2018, 査読無, DOI:10.1271/kagakutoseibutsu.56.461
- (5) [Ryo Miyazaki](#), Phenotypic heterogeneity - cellular individuality and collective functionality, Microscopy, 66, i13, 2017, 査読無, https://academic.oup.com/jmicro/article/66/suppl_1/i13/4627857

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 高野壮太郎、梅谷実樹、中岡秀憲、若本祐一、[宮崎亮](#)、大腸菌クローン集団の不均一な飢餓応答と生存への影響、第 13 回日本ゲノム微生物学会年会、2019 年
- (2) [宮崎亮](#)、Phenotypic heterogeneity - cellular individuality and collective functionality、日本顕微鏡学会第 60 回記念シンポジウム (招待講演) 2018 年
- (3) [宮崎亮](#)、Bistability in a clonal microbial population、第 90 回日本細菌学会 (招待講演) 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://staff.aist.go.jp/ryo.miyazaki/index.html>

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Jan Roelof van der Meer

ローマ字氏名：Jan Roelof van der Meer

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。