

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19365

研究課題名(和文)細菌における細胞内共生の人工再構築と初期生命研究への応用

研究課題名(英文)Analysis of bacterial endosymbiosis and its relationships to the early life.

研究代表者

柿澤 茂行(KAKIZAWA, SHIGEYUKI)

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：10588669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：マイコプラズマをベースとして作成されたミニマムゲノム細菌は、細胞骨格や細胞分裂に関する多くの遺伝子が削除されているため細胞サイズが制御できず、巨大細胞を作る。本研究ではこのミニマムゲノム細菌の細胞を顕微鏡下で観察中に、巨大細胞の内部に他の細胞が入り込む現象を見出した。本研究は細菌における細胞内共生を実験的に再現した可能性があり、またミニマムゲノム細菌を初期生命のモデル細胞として提案できる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回認められた現象は、「細胞内共生の再現」と言えるのではと考えられた。細胞内共生は、真核生物の誕生などの初期生命の進化過程において重要であったと言われており、真核生物は太古の細菌とアーキア(古細菌)との細胞内融合によって生じたとする説が有力である。しかし、細菌やアーキアにおいて細胞内共生を実験的に再現した例はほとんどない。本研究は、ゲノム縮小により極めてシンプルな生命を作成したことで細胞サイズが制御できなくなり、それによって細胞内共生能が生じたことを示しており、すなわち生存に必要な因子のみを持った原始的な細胞においても、同様に細胞サイズ制御がうまくできなかった時期があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The minimal mycoplasma has been created from wild type Mycoplasma cells using synthetic biology approaches. Since the minimal cells lack a lot of genes related to cell division and cell cytoskeleton, they could not control cell size, thus they produces a lot of giant and tiny cells during growth. We observed that small cells existed in the large minimal cells, and it was thought to be "cell in cell" or an endosymbiosis of bacteria. In early life, endosymbiosis was thought to be important and frequently happened. For example, Eukaryote was suggested to be derived from endosymbiosis of Archaea and Bacteria. We would suggest the minimal cell as a model cell of the early life.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌 遺伝子 進化

1. 研究開始当初の背景

生命がもつ基幹システムの理解に向け、これまで数多くの研究が行われてきた。微生物のゲノム解読や遺伝子機能の解明等もこれに通ずるが、中でもマイコプラズマという、ゲノムおよび細胞サイズの極めて小さな細菌を用いた研究の進展は顕著である。マイコプラズマを用いた合成生物学の研究は、主に米国のベンター研究所において開発されてきた。その例としては、細菌ゲノムの全合成・全ゲノムクローニング・ゲノム移植・人工ゲノム細菌の作成 (Science 317:632-8, 2007; Nature 448: 32-3, 2007; Science 325:1693-6, 2009; Science 329:52-6, 2010)、ミニマムゲノム細菌の作成 (Science 351:aad6253, 2016) などが挙げられる。ミニマムゲノム細菌は、もうこれ以上の遺伝子の削減ができないほど遺伝子を削ったゲノムを持つマイコプラズマであり、ほぼ必須遺伝子のみを持つため、生命の基幹システムの解明に一役を担うと考えられた。作成されたミニマムゲノム細菌は、細胞のサイズが正確に制御できず、10 μm を超える大きな細胞を作ることが知られている (Science 351:aad6253, 2016)。

一方、初期生命の進化過程において細胞内共生は重要な役割を果たしてきたと言われており、初期生命は他の細胞を取り込むことで多様化・高機能化してきた可能性が論じられてきた。例えば真核生物はアーキア(古細菌)とバクテリアとの細胞内共生に由来し、葉緑体はシアノバクテリア、ミトコンドリアはプロテオバクテリアの細胞内共生に由来するとの説が有力であり(Phil. Trans. R. Soc. B 370: 20140330, 2015)、初期生命においては細胞内共生が頻繁に起こったはずである。これまで真核生物の細胞中に細菌等が入り込む現象は多数報告されており、またカイガラムシ(昆虫)に共生する細菌の細胞中にさらに細菌が共生している例は確認されているが(Nature 412:433-6, 2001; Cell 153:1567-78, 2013)、細菌において細胞内共生を人工的に再現した例はほとんどない。加えて、初期生命は遺伝子数の少ない単純な生命であったと仮定すると、ミニマムゲノム細菌と類似点があると考えられる。

初期生命のある段階においては「細胞サイズが制御できないが生存できる」という状況が起こり得たと考えられる。その状況においては細胞内共生が頻繁に起こり、その後の遺伝子獲得により細胞内共生能を失ったという進化過程が推測される。すなわち、ミニマムゲノム細菌は、初期生命との類似点があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究はミニマムゲノム細菌(ゲノムを最少化した細菌)における細胞内共生現象に端を発し、この細胞内共生の性状を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

まず細胞内共生現象を再現し、それを詳細に解析する。これら一連の研究によりミニマムゲノム細菌を初期生命のモデル細胞として提案する。

(1) 細胞内共生現象の解析: 様々な細胞の取り込み能の検証

他の細菌がミニマムゲノム細菌中に入り込むことを検証する。ミニマムゲノム細菌はマイコプラズマ由来であるため細胞壁を持たず1層のリン脂質膜のみで囲まれているため、他の微生物も容易に取り込むことができると推測される。

(2) 蛍光観察

様々な染色試薬で染色して観察すると共に電子顕微鏡観察などを行う。また異なる蛍光マーカーを導入した菌体同士を細胞内共生させる系により細胞内共生の現象をより詳細に解析する。

4. 研究成果

(1) 細胞内共生現象の解析: 様々な細胞の取り込み能の検証

まず、様々な細胞の取り込み能を検証し、ミニマムゲノム細菌中に入り込むことが可能な微生物を調べた。その結果、ミニマムゲノム細菌に加え、野生型のマイコプラズマや、大腸菌などが巨大細胞に入ることが確認された。ミニマムゲノム細菌はマイコプラズマ由来であるため細胞壁を持たず、1層のリン脂質膜のみで囲まれていることから、これらの細菌が容易に取り込まれたと推測された。

(2) 蛍光観察

細胞膜やゲノムDNAを染める染色試薬等を用い、巨大細胞および通常サイズの細胞を染色し、細胞の状態を詳細に解析した。

加えて、蛍光タンパク質を発現させる系を用いた。mCherry等を発現させたミニマムゲノム細菌を用い、巨大細胞が発する蛍光を詳細に観察した。また、異なる蛍光マーカーを導入した菌体同士を細胞内共生させる系を構築することで、細胞内共生の現象をより詳細に解析した。蛍光マーカー遺伝子としては、マイコプラズマ細胞内においてはmCherryおよび、CFP(シアン色:青色) YFP(黄色)が有効であることから、mCherryに加え、CFPとYFPの派生マーカーであるVenusおよびCerulean遺伝子を用い、これらの組み合わせを同時に発現させ解析した。まずミニマムゲノム細胞の巨大細胞の細胞全体に1つの蛍光タンパク質を発現させ、これに異なる蛍光タン

パク質を発現した細胞を混ぜることで、細胞内共生の性状を詳細に解析した。

さらに、細胞内共生が起こった細胞のみ生存できるよう、2細胞間で機能を相補する系の構築を試みた。この目的のため、まずはミニマムゲノム細菌（巨大細胞）にテトラサイクリン（抗生物質）を排出する耐性遺伝子を組み込み、その耐性能を検証した。その結果、低濃度の耐性ではあるが、排出ポンプ系の耐性遺伝子がきちんと機能することが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 冥王代類似環境微生物の炭酸固定・エネルギー生成とミニマムゲノム細菌の機能解析
3. 学会等名 日本進化学会 第20回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 ミニマムゲノム細菌におけるCRISPRi の導入と 細胞内共生
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会 11.0
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柿澤茂行
2. 発表標題 Enzymatic analysis of Wood-Ljungdahl pathway from Hadean analogue and Endosymbiosis of minimum cell
3. 学会等名 Hadean Bioscience International Symposium 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kakizawa S.
2. 発表標題 Functional analysis of the minimal genome mycoplasma
3. 学会等名 Annual Meeting of Systems and Synthetic Bacteriology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kakizawa S.
2. 発表標題 Functional analysis of the minimal genome mycoplasma
3. 学会等名 ExCELLS (生命創成探究センター) シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kakizawa S.
2. 発表標題 Toward understanding of the Fundamentals of Life: minimal bacterium and inducible CRISPRi
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kakizawa S., Suzuki Y.
2. 発表標題 "Cell in Cell" in the minimal genome bacterium
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----