

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02872

研究課題名（和文）定常期から死滅期までの微生物生理状態の遷移

研究課題名（英文）Transition from stationary phase to death phase in microbial cells

研究代表者

加藤 節（Kato, Setsu）

広島大学・統合生命科学研究科（先）・准教授

研究者番号：80762070

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000 円

研究成果の概要（和文）：微生物は自然環境中のいたるところに存在する。しかしながら研究室環境とは異なり、自然環境において微生物が対数増殖を行うための富栄養条件に長時間さらされることはまれである。つまり、微生物はそのほとんどの時間において栄養飢餓条件下にあり、細胞数の増加を伴わない定常期（もしくは死滅期）にあると言える。本研究では、自然界により関連性の高い状態である定常期の細胞の生理状態が死滅期にかけてどう変化していくのかを大腸菌をモデルとして1細胞レベルで解析し評価した。その結果、再び増殖できるかどうかという指標で判定した死細胞の一部は細胞膜の恒常性や細胞内エネルギー状態を生細胞と同程度に維持することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然界において微生物細胞が栄養豊富な増殖環境に存在することはまれである。そのため、対数増殖期だけでなく他の生育期の情報を集めることは微生物機能のさらなる利用向上や微生物制御法（病原菌に対する対処法など）の新規開発に役立つ。本研究では、大腸菌細胞は栄養飢餓条件において増殖能力を失いながらもエネルギーを保持した場としては存在しうることが示唆され、このような細胞を用いた物質生産系の構築などに将来貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）：Microbial cells exist all across the natural world. However, it is uncommon that those cells are exposed to nutrient-rich environments to support their exponential growth. In this study, we aimed to understand how microbial cells would change their physiological conditions from stationary phase to death phase. We decided to use *Escherichia coli* as a model organism for this purpose and evaluated physiological conditions at a single cell level. It was shown that some of dead cells, which lost their ability to proliferate even when nutrients were replenished, were able to maintain cell-membrane homeostasis and cellular energy status at a level comparable to that of living cells.

研究分野：微生物学

キーワード：大腸菌 1細胞解析 定常期 出芽酵母 細胞死

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

細菌は自然環境中のいたるところに存在する。土壌や河川、植物や動物体内、そしてもちろん人体内にも存在する。しかしながら研究室での環境とは異なり、これらの自然環境において対数増殖を行うための富栄養条件に微生物細胞が長時間さらされることはまれである。つまり、微生物はそのほとんどの時間において栄養飢餓などの条件下にあり、細胞数の増加を伴わない定常期（もしくは死滅期）にあると言える。これまでの微生物学研究では、細胞の生理状態や代謝活性を評価するにあたり対数増殖期の細胞を使うことが一般的であった。それでは自然界により関連性の高い状態である定常期の細胞の代謝生理はどうなっているのだろうか。そしてその後、細胞はどのようにして死滅していくのだろうか。対数増殖期だけでなく、他の生育期の情報を集めて初めて微生物の生態を理解できるのではないだろうか。そうすることで微生物機能のさらなる利用向上や、微生物制御法（病原菌に対する対処法など）に対する新たなアイデアが出うるのではないかと考えた。このような考えのもと、本研究を提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では定常期から死滅期にいたるまでの微生物の代謝生理状態の遷移を 1 細胞レベルで定量的に解析することで、細菌がどのような状態で自然界に存在するのかを理解するための基礎的知見を得ることを目的とした。また、細胞死を引き起こす要因の同定をも試みた。

3. 研究の方法

モデル細菌として大腸菌を用い、富栄養培地である LB 培地を用いた回分培養により栄養飢餓状態を引き起こすことにした。回分培養中に経時的にサンプリングし、定常期から死滅期に至るまでの細胞を解析対象とした。また、原核生物に対する比較対象として出芽酵母を用いた実験を行った。出芽酵母については下記項目のうち、細胞膜・液胞膜の恒常性評価と細胞死について解析を行った。

(1) 細胞の培養

大腸菌細胞、出芽酵母細胞どちらもシングルコロニーから前培養をはじめ、その後に 20 mL スケールでの本培養を行った。大腸菌は LB 培地に植菌して 37 度で振とう培養し、出芽酵母細胞は SDG 培地を用いて 30 で振とう培養を行った。

(2) 1 細胞レベルでの細胞生理状態検出

・細胞内代謝状態

細胞内の還元力については染色試薬 CTC を用いて測定した。細胞を染色後に個細胞ごとの蛍光輝度を抽出・定量化し、生菌細胞集団と比較した。

細胞内 ATP 量については 1 細胞レベルではなく集団レベルでの解析を行った。BacTiter-Glo を用いて発光法により細胞集団中の ATP 濃度を算出し、生菌細胞集団と比較した。

・新規タンパク質合成能力

gfp 遺伝子をアラビノース誘導型プロモーター下に置いた配列を有するプラスミドを作製し、大腸菌に形質転換した。この GFP 発現株を LB 培地で培養し、経時的にサンプリングした。ならし培地内でのタンパク質発現能力を評価するため、サンプリング後に一部の培養液をフィルターを通過することでならし培地を得た。このならし培地にアラビノースを添加し、細胞を戻すことで定常期におけるタンパク質発現能力を個細胞ごとに評価した。同一細胞で GFP 発現能力と再増殖能力を測定する際には、細胞をマイクロ流体デバイスに導入し同様の試験を行った。

・細胞膜恒常性

細胞膜の恒常性については Propidium Iodide (以下 PI) 染色により個細胞ごとに評価した。対数増殖期の細胞についても同様の実験を行い、その細胞集団の蛍光輝度 95 パーセンタイルを染色の有無の閾値とした。

・液胞膜形状

出芽酵母については、FM4-64 染色を行い液胞膜を可視化した。

(3) 細胞の生死判定

大腸菌、出芽酵母ともに細胞の生死判定は 1 細胞レベルで顕微鏡下において行った。新鮮な栄養培地で作製したアガロースパッドの上に細胞を植菌し、少なくとも 1 回の細胞分裂を行う能力があるかどうかで細胞の生死を判定した。

4. 研究成果

(1) 回分培養における大腸菌の細胞死

本研究は、微生物細胞が回分培養され栄養飢餓状態に陥った時、どのような過程（生理状態の変遷）を経て死に至るのかを明らかにしようとするものである。まず、大腸菌細胞を LB 培地で定常期になるまで培養した。定常期以降に定期的に細胞培養液をサンプリングし、細胞内の生理状態がどのように変化しているか、細胞膜の恒常性は保たれているかを検証した。同時に新鮮な LB 培地に再植菌したときに何%の細胞が再増殖を開始できるかを測定し、生菌率を得た。その結果、生菌率は培養 2 日目にすでに 20%以下と急激に低下することに対し、細胞内還元力や細胞内 ATP 量の低下率は比較的緩やかなものであった。つまり、再増殖能力の喪失で定義した細胞死は、これら因子に依存しない可能性が考えられた。一方で、PI を用いて細胞膜恒常性が維持されているのかどうかを検証したところ、死菌のすべてが PI によって染色されるわけではないことがわかった。この結果は前述の結果と矛盾せず、細胞は再増殖能力を失ったとしてもエネルギーを保持した場としては存在しうることが示唆された。

続いて、細胞の新規タンパク質発現能力の評価を行うため、GFP を誘導型のプロモーターから発現できる菌株の作製を行った。はじめは IPTG 誘導型プロモーターを用いたが、プロモーターのまれにより回分培養中に非誘導条件でも GFP 発現が確認されてしまい、計画したような測定は不可能であった。そこで GFP 発現遺伝子をアラビノース誘導型プロモーターの下に組み込んだところ、非誘導条件での GFP 蛍光はほとんど観察されず、上記のような測定が可能となった。作製した GFP 発現大腸菌株を培養し、各サンプリング時点における生菌率とならば培地にアラビノースを添加したときに GFP 発現を誘導できる細胞の存在率を測定した。この株は比較に用いた標準株とは異なり、3 日間で生菌率を 20%以下へと変化させていた。GFP の発現を誘導できる細胞の割合は生菌率とほぼ同様の低下曲線を示したが、どのサンプリング時点においても生菌率よりもわずかに高い値を示した。つまり、タンパク質合成能力を維持する細胞が死細胞集団中に存在することが示唆された。

以上の結果をまとめると、再増殖能力の喪失で定義される死細胞は、その細胞膜はインタクトな状態であったり、細胞内代謝に関わる因子が生細胞と同等に保持されていたり、またはタンパク質の発現能力ですら保持している細胞も少数ではあるが存在するようであった。再増殖できないながらもタンパク質を発現できる細胞の表現型に興味を持ち、このような細胞の挙動を詳細に観察した。その結果、このような細胞の一部に細胞伸長を行いながらもその後伸長が停止し、分裂できず死細胞として検出される細胞がいる様子が観察された。つまり、タンパク質を合成することはできるけれども細胞伸長に支障があり、結果として自己複製できない細胞がいることが明らかになった。

細胞伸長能力が、ここで定義した細胞の生死決定に大きく寄与する可能性が示唆され、細胞伸長に注目して様々な解析を行った。その結果、定常期以降に再増殖を始める細胞集団において、低頻度ではあるが細胞形状に異常を持ちながらも再増殖を行う細胞が存在することを明らかにした。この結果から、定常期以降に桿状を維持するための細胞伸長に関与するタンパク質群の働きが不活化されることが予想された。そこで生菌数がおよそ 100%、20%となる定常期細胞集団の比較転写解析を行ったところ、予想に反して細胞伸長に関わる遺伝子の大きな発現量変化は見られなかった。一部の細胞伸長に関わるタンパク質や脂肪酸合成酵素については 20%ほどの転写量変動が確認されたため、今後はタンパク質レベルでのこれら酵素の発現量変化の解析が必要と思われる。

(2) 回分培養における出芽酵母の細胞死

原核生物における細胞死の過程と真核生物における細胞死の過程を比較しその共通点・相違点を知るために、出芽酵母における解析に着手した。出芽酵母を回分培養して定常期へと移行させ、定常期以降に細胞を経時的にサンプリングして生菌率測定と細胞状態の検出を行うことにした。まず初めに定常期以降の細胞の死菌率と PI 染色率を比較したところ、大腸菌の結果とは異なり、出芽酵母 W303-1A 株については死菌率と PI 染色率がほぼ一致することが明らかになった。つまり、大腸菌では死細胞とされた細胞において膜の恒常性が失われていない細胞が多く存在したことに対し、出芽酵母では細胞死が起こると膜の恒常性は失われるということになる。

そこで細胞死の前後での細胞の様子をタイムラプスで観察したところ、細胞は細胞死のタイミングで細胞サイズを変化させる様子が観察された。定量的にサイズ変化を数値化したところ、細胞は初期の細胞サイズに関わらず一定して 25%程度面積比で細胞サイズを小さくさせることが明らかとなった。この表現型が用いた酵母や染色試薬に特有の現象かどうかを検証するため、異なる実験室出芽酵母株 (BY4741) を用いて同様の解析を行ったところ、同じく細胞が死ぬ際に細胞サイズが減少する様子が観察された。また、異なる死細胞指示薬 phloxine B を用いても同様の実験結果が得られ、細胞が死ぬ際に細胞サイズが小さくなる現象にはある程度の一般性があることが示唆された。

細胞死とともに細胞が収縮する現象が試したすべての観察条件で見られたことから細胞内構造の変化に興味をもたれ、蛍光染色と電子顕微鏡による観察を行った。細胞死に依存した細胞収縮と相関して細胞内オルガネラの構造が変化するかどうかをタイムラプスで観察した。その結果、FM4-64 染色で検出した液胞膜に由来する蛍光シグナルが細胞収縮の前に消失する現象が観察された。また、電顕観察においても初期定常期には明確に観察された液胞の境界面が、死菌率の増える後期定常期では判別のつかない構造になっている様子が観察された。以上の結果より、酵母の細胞では何らかの理由で液胞が損傷し、その内容物が細胞内に流出することで細胞死と細胞収縮を結果的に引き起こすのではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato Setsu, Suzuki Kenta, Kenjo Taiki, Kato Junya, Aoi Yoshiteru, Nakashimada Yutaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Single-Cell Time-Lapse Observation Reveals Cell Shrinkage upon Cell Death in Batch Culture of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.03094-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 6件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 節、鈴木健太、権丈泰希、青井議輝、中島田豊
2. 発表標題 定常期における出芽酵母の細胞死と細胞収縮
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 節、川畑 龍司、青井 議輝、中島田 豊
2. 発表標題 定常期における大腸菌細胞の生理状態の解析
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 節
2. 発表標題 Life and death of <i>Escherichia coli</i> cells in batch culture
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1．発表者名 加藤 節
2．発表標題 時空間的な環境制御が解き明かす細菌細胞の新たな性質
3．学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会（招待講演）
4．発表年 2022年

1．発表者名 川畑 龍司、青井 議輝、中島田 豊、加藤 節
2．発表標題 大腸菌の定常期から死滅期におけるタンパク質発現能力の1細胞定量解析
3．学会等名 日本農芸化学会中四国支部第57回講演会
4．発表年 2020年

1．発表者名 加藤 節
2．発表標題 1細胞レベルでみる微生物細胞の生死
3．学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4．発表年 2020年

1．発表者名 加藤 節
2．発表標題 「微生物細胞の生死」を観察することの可能性と課題
3．学会等名 日本遺伝学会第92回大会（招待講演）
4．発表年 2020年

1．発表者名 加藤 節
2．発表標題 栄養飢餓による微生物細胞の死
3．学会等名 日本農芸化学会2021年度仙台大会（招待講演）
4．発表年 2021年

1．発表者名 鈴木健太、青井議輝、中島田豊、加藤節
2．発表標題 出芽酵母における経時寿命の一細胞解析
3．学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4．発表年 2020年

1．発表者名 権丈泰希、青井議輝、中島田豊、加藤節
2．発表標題 出芽酵母の細胞死過程における液胞動態の解析
3．学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第55回研究報告会
4．発表年 2022年

1．発表者名 加藤 節
2．発表標題 異常な形状を示す大腸菌細胞とその増殖
3．学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4．発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------