

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570043

研究課題名(和文) ゲノム情報に基づくシアノバクテリアの立体的構造パターン形成の研究

研究課題名(英文) Spatial pattern formation of cyanobacteria

研究代表者

佐藤 直樹 (Sato, Naoki)

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：40154075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：生物が作る構造は基本的には動的なもので、ある意味では一過性のものである。細胞が動きながら分裂を繰り返すことで、生物体全体としての構造が作られる過程は、創発と考えることができる。本研究では、シアノバクテリアの一種が前後に規則的な運動を行いながら、寒天培地上で渦巻き構造を生ずることを超細胞構造と考え、生物構造の創発の単純なモデル系として解析した。

電子顕微鏡観察、タイムラプス観察、ゲノム解析の結果、この細胞の運動は粘液銃モデルで説明できると考えられ、前後運動の際に、細胞体が回転していることもわかった。これらの結果に基づき、細胞と寒天との相互作用に依存した渦巻き形成モデルを提案した。

研究成果の概要(英文)：The spiral formation of a filamentous cyanobacterium was analyzed as a model of supracellular structure, which is considered as an emergent structure. The results of electron microscopic observation, time-lapse analysis of cellular motion, and genomic analysis suggest that the motility of this cyanobacterium can be accounted for by the slime gun model. Based on these results, a model of spiral formation was proposed.

研究分野：生命基礎論

キーワード：シアノバクテリア 超細胞構造 ゲノム解析 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

生物は個体や細胞ごとに生きているばかりでなく、集団として構造形成を行うことができる。人間の体も多細胞体として、複雑な組織化の結果として成り立っているが、もっと原始的で基本的には単細胞の生物であっても、たとえば、細胞性粘菌の子実体形成のように、化学物質によって誘導・媒介される細胞集合体形成は、活発な生物物理学の研究対象となっている。シグナル物質に依存した系の他に、細胞の接触や運動によって形成される構造体やパターンもある。たとえば、クラミドモナスの細胞が多数集まって作る生物対流がある。これは必ずしも個別の遺伝子に依存しない現象でありながら、創発的な現象である。**創発的(emergent)**というのは、多数の分子や細胞などの集団があるときに、その中に自発的に構造が形成されることを指しており、生物の「生き物らしさ」の象徴である。

こうした点について注目することは、生物現象を機械論的に、つまり分子レベルで理解する科学的な態度に反すると考えられてきた一面もある。しかし、分子レベルの現象でも創発的なものはあり、そもそも化学進化によって生命が誕生したのは、自己組織化による自己増殖系が創発したことによっている。創発的現象では、一方で大きなエネルギーを消費しながら、こうした自己組織化が可能になっている。これについての基本的な理論は公表した(論文)。これからの生命科学の応用では、創発をいかにうまく利用するのが課題である。

本研究で扱うのは、運動性のシアノバクテリアで、細胞が連なったフィラメントが多数移動するときに、束になって、渦巻き構造(図1)やシート状構造(図2)を形成するものである。

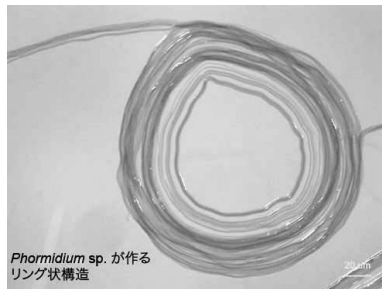


図1 渦巻き構造

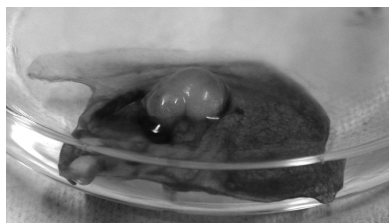


図2 泡を含むバイオフィーム

こうした現象は、もともと、Nägeli(論文)が1860年に記載していたが、その後ほとんど顧みられることがなかった。シアノバクテリアの運動に関しては、滑走や

twitching などが知られ、それぞれに異なるタンパク質の関与が考えられている。しかし、細胞が集まって作る立体的な構造に関しては、パターンの記載程度しか行われておらず、詳しい仕組みの解明、特に、数理的な説明ができていないままである。本研究の目的は、創発的な現象の代表として、シアノバクテリアの構造形成を取り上げ、それに関わる遺伝子の解明とともに、運動の力学的解析を通じて、構造形成の数理的な解明を目指すものである。この研究を通じて、細胞レベルでの創発的現象の存在を広くアピールすること、生命世界における創発的現象の本質的な意義の理解を広めることなどを目指している。

材料としては、独自に単離した *Phormidium* sp. KS を用い、そのゲノム解析によって、運動やシグナル伝達に関わる因子を調べ上げる。次に、運動の特性をビデオ撮画像の解析によって調べ、個々のフィラメントの運動と、束になったフィラメントの運動の特性を明らかにする。そうしたデータをもとに、細胞間の相互作用に基づく構造形成の原理を明らかにすることを目指す。

シアノバクテリアのゲノム解析は既に40種以上について行われ、データが公開されている。しかし、このグループは、ゲノム解析が手薄なシアノバクテリアということができる。私がこれまで行ってきたシアノバクテリアの比較ゲノム解析においても、これらの種を取り入れることは非常に意味がある。*Phormidium* のゲノムは、既知のシアノバクテリアの中でもかなり大きな方に属し、そうした点で遺伝子セットの内容にも興味もたれる。

2. 研究の目的

多数の物質や細胞の集団の中に自発的に秩序構造が形成されることを創発と呼び、これは生物の「生物らしさ」の本質である。本研究は、これまで研究が手薄な創発的な現象の代表として、運動性シアノバクテリアのフィラメントが集団で形成する二次元または三次元の構造(渦巻き、シートなど)を取り上げ、その形成に関わる遺伝子の解明とともに、運動の力学的解析を通じて、構造形成の数理的な解明を目指すものである。この細胞レベルでの創発的現象の研究を通じて、生命世界における創発的現象の本質的な意義の理解を広めるとともに、創発性を利用することによってエネルギー生産を一カ所に集中する新たな研究の創出も目指している。

3. 研究の方法

(1) 細胞の培養

Phormidium KS 株は、もともと自宅の金魚鉢の中に繁茂していたシアノバクテリアから単離し、BG-11 培地を用いて、約 $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光照射下、30-32°C で培養した。コロニーはできないので、増殖する先端部に相当す

る部分の寒天を切り取り、新たな培地に植え込むという形で増殖させた。寒天培地の場合、前培養は0.5%の寒天を含むものを用い、1.5%寒天培地にうえたのち、フィラメントの増殖とともに増殖先端部付近に生じた短いフィラメントを選んで、運動の観察を行った。

(2) *Phormidium* KS 株のゲノム解析

当初の rDNA 配列決定においては、原核生物の 16S rDNA 増幅用として知られるプライマーセットを用いて DNA を増幅し、プラスミドにクローニングした上で、塩基配列を決定した。これは AB510147 として登録した。

Phormidium を大量培養して、CsCl 密度勾配遠心法で DNA を精製した(論文)。Solexa (Illumina) によるシーケンス解析を外注により行った。アセンブルは、Velvet ソフトウェアを利用して、自前の Linux サーバーを用いて行った。

Nostoc punctiforme において、既に運動に関わることが知られているタンパク質のホモログを、Blast 検索によって探し出した。登録番号は AB992254, AB992255, AB992256, AB992257 である。

(3) 電子顕微鏡観察

寒天培地上で生育している細胞フィラメントをグルタルアルデヒドとオスミウム酸で二重固定し、エタノールシリーズで脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色し、日本電子製 1200EX を用いて透過像を観察した。

(4) 細胞増殖の記録と解析

寒天培地上における短い細胞フィラメントの運動を正立型の顕微鏡(オリンパス BX-60)によって観察し、CCD カメラ(オリンパス DP70)で数秒おきに連続的に撮影してゆくことにより、動画を得た。より速い動きの記録には、CCD カメラとして Rolera-XR を用い、StreamPix ソフトウェアを利用して、コンピュータのハードディスクに直接書き込む形で記録した。

このほか、変異株の作製や運動のシミュレーションも、研究に加えることを検討していたが、今回の研究期間の中では実現できなかった。

4. 研究成果

(1) *Phormidium* KS 株の単離と系統分類

水槽から取り出した細胞塊は、BG-11 寒天培地上で育て、必要に応じて殺菌剤を併用しながら、純化した。細胞から取り出した DNA を利用して、16S rDNA を増幅し、配列を調べた。近縁種の配列と比較した結果、*Phormidium tergestinum* CCALA1 55 SAG 75.79 に最も近いことがわかった(図3)。

この株はもともと水槽内で、林のように生えていたもので、水流によって立体的な形を作ることできる。液体培地で培養すると、

表面に膜状に広がり、一部は、内部に気泡を生じた。短いフィラメントは、約5分から10

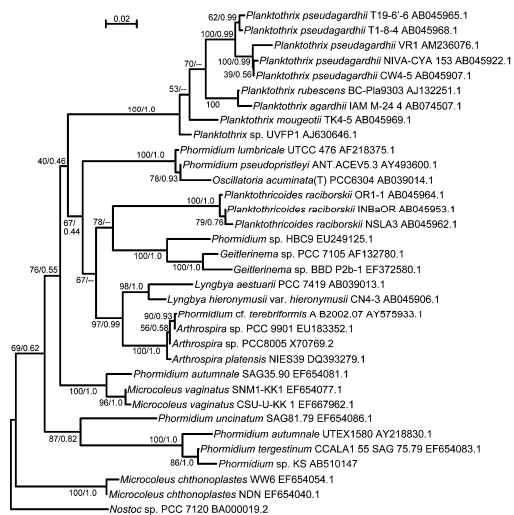


図3 単離した株の系統樹 (雑誌論文 より改変)

分の間隔で方向転換する繰り返しの前後運動をした。寒天培地上では、フィラメントの増殖につれて、やがて渦巻き構造を生じた。これらについては、研究の背景の項目でも示した通りである。よく観察すると、前進するときに、フィラメントは右回りに回転していた。

(2) 電子顕微鏡観察

この株の運動の仕組みを知るため、電子顕微鏡観察を行った。細胞フィラメントのまわりには鞘と呼ばれる多糖類の構造物が存在していた。フィラメントを構成する細胞の隔壁の外側の部分の鞘が膨らんでおり、隔壁のところから粘液が噴射されているという従来の観察を裏付けていた。

細胞隔壁の両側には小さな穴が多数一列に並んでいることがわかった(図4)。これは junctional pore と呼ばれているものに相当すると考えられる(論文)。

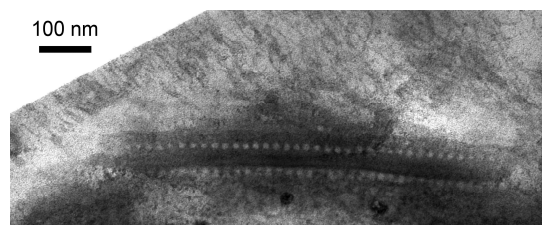


図4 隔壁の両側にならぶ粘液噴出口(junctional pores)を示す電子顕微鏡像 (雑誌論文 より改変)

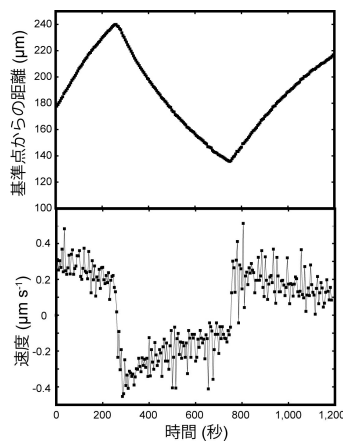
これらの結果は、*Xanthomonas* で提唱されている slime gun model (粘液銃モデル) による運動機構を示唆している(論文)。

(3) 寒天培地上での増殖

寒天培地で増殖したフィラメントを含む

寒天プラグを、新たな寒天培地の中央におくと、フィラメントが周辺部に向かって増殖した。このとき、寒天濃度が0.7、0.9%の場合、フィラメントは寒天内部に潜り込み、渦巻きを形成しなかった。しかし、1.1%以上の寒天濃度の場合には、フィラメントは表面で増殖を続け、やがて渦巻きを生じた。このことは、フィラメントと寒天表面との相互作用が渦巻き形成に必要であることを示している。

(4) フィラメントの運動の観察



フィラメントの前後往復運動をタイムラプス観察し、その運動を詳細に解析した(図5)。往復運動において、方向転換直後の速度が最も速く、その後の速度が指数関数的に減少することがわかった。

図5 細胞の往復運動
(雑誌論文より改変)

この結果も、粘液銃モデルを支持していると考えられた。

(5) 運動に関わる遺伝子群の同定

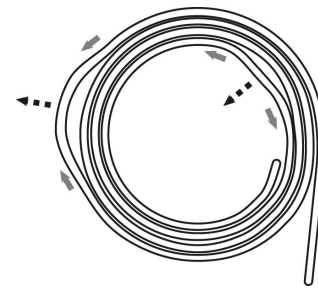
すでに *Nostoc punctiforme* では、ホルモゴニアの運動に関わる遺伝子群が同定されており、粘液産生に関わる *hps* 遺伝子群とシグナル伝達に関わる *hmp* 遺伝子群がある(論文)。 *Phormidium* KS 株でも、ゲノム解析の結果、これらのすべてがそろっていることが確認された。これらについては、方法に述べたとおりの番号でデータベースに登録してあるが、*N. punctiforme* の対応するタンパク質との間での相同性は極めて高かった。遺伝子の並び順も比較的良好に保存されていたが、*hpsI*、*hpsJK* などは、他の遺伝子とは離れて存在していた。

別の *Phormidium* では、*oscillin* と呼ばれるタンパク質が細胞の表面に斜めに整列し、これにより粘液の流れが斜めになることによって、細胞の回転運動が起きるとされていた(論文)。しかし、*oscillin* と相同なタンパク質の遺伝子を KS 株で見つけることはできなかった。*oscillin* 自体きわめてグリシンに富むタンパク質で、他の生物にも相同なタンパク質はない。仮に細胞運動における *oscillin* の役割が重要なものだとしても、KS 株では別のタンパク質がそれに代わる役割を果たしていると考えられる他はない。

(6) 運動と渦巻き形成のモデル

まず、運動のしくみとして、粘液銃モデルが当てはまると考えられる根拠は次のようなものである。(a) 運動の反転が起きた時の最初の速度が最も速く、そのあと速度が指数関数的に減衰すること。これは、ピリ繊毛などによる機械的なしくみで運動する場合には考えにくい性質である。(b) 寒天濃度が高いと運動速度が遅くなること。これは粘液をためるノズルの中で粘液物質が水和して膨潤する際に、寒天濃度が高いと脱水されてしまうことにより説明できる。(c) 粘液を一度噴射すると、ノズルに粘液を充填するまで、しばらくは次の噴射は起こらない。これも粘液銃モデルで説明される。しかし周期的に運動方向が反転することについては、何か特殊なシグナル伝達機構があると考え他なく、今のところ、はっきりとしたしくみはわからない。

細胞の運動に基づく渦巻き形成モデルとして、次のようなものを提案した(雑誌論文)。(a) 寒天濃度が1.1%よりも高いと、増殖過程で、それぞれのフィラメントが寒天表面上で左巻きのカーブを描くように伸びていくが、これは次のように考えられる。鞘の内部でフィラメントが動いているときには、運動の道筋は変わらないが、細胞の増殖に伴い、先端部が既存の鞘から飛び出すことが起きる。そのときフィラメントは寒天表面と直接接し、粘液の移動方向と反対方向に力を受けるため、寒天表面を上から見た場合に左巻きにカーブする。フィラメントが鞘から飛び出すたびに少しだけ左向きに旋回した軌跡を描くため、フィラメントが入った鞘もその形になる。(b) フィラメントが伸長してゆき、他のフィラメントと衝突すると、ぶつかったところでやはり左向きに旋回する。その後障害物なしに伸長できれば、全体として枝分かれ構造のような形になり、それを元に戻すと、メッシュワークからなる膜状のバイオフィルム構造になる。(c) フィラメントが衝突したあとで、さらに束縛される条件がある場合には、そのままカーブを続け、渦巻きを生ずる。(d) ひとたび渦巻きができると安定に保持されると考えられるが、その理由は次の通りである。長いフィラメントにおける運動は、



全体として同期しておらず、局所的に違った運動を示すことがある。しかし渦巻きであれば、こうした局所的な運動の食い違いを、半径の増減によって吸収

図6 渦巻き構造の頑健さの説明
局所的な運動の不揃い(灰色矢印)があっても、渦の半径の増減(点線矢印)により、全体の構造は保たれる。(雑誌論文より改変)

することができ、結果として、渦巻き構造が維持される(図6)。すなわち、渦巻き構造は複雑系におけるアトラクターのような状態に相当し、一度できると解消することはない。

(7) 超細胞構造と創発

本研究において、糸状性シアノバクテリアの渦巻き構造形成を、細胞運動のダイナミクスから理解するモデルを提出した。個々の細胞の構造とは別の上の階層で作られる創発的な構造(雑誌論文)という意味で、こうした構造を超細胞構造と名付けることにする(雑誌論文)。超細胞構造は単細胞生物でも見られ、生物対流も、細胞運動のダイナミクスにより作られる構造という意味で、超細胞構造と言うことができる。多細胞生物の構造は、はじめから発生プログラムが存在するという意味で、これとは異なるように見える。しかし、生物の構造が動的な形態形成運動によって作られることは、多細胞生物でも変わらない。多くの生物学者は、生物の構造が、ゲノムに書き込まれた発生プログラムの情報から作られると信じている。しかし、構造が動的なものであり、常に作り続けているものである以上、これが完成形という構造は存在せず、発生プログラムは機械の設計図とは異なる。それにもかかわらず、多細胞生物の構造がほぼ決まったものになり、親と子の間で類似している理由は、こうした創発的な構造形成の過程が何世代にもわたって繰り返されてきた結果として、いつも同じような構造を作るようなインストラクションのセットが固定化されたためと考えられる。

<引用文献>

Sato, N.; Scientific élan vital: Entropy deficit or inhomogeneity as a unified concept of driving forces of life in hierarchical biosphere driven by photosynthesis. *Entropy*, **2012**, *14*, 233-251.

Nägeli, C. *Beiträge zur Wissenschaftlichen Botanik*; Verlag von Wilhelm Engelmann: Leipzig, Germany, 1860; Volume 2, pp. 89-95. (In German)

Tajima, N.; Sato, S.; Maruyama, F.; Kaneko, T.; Sasaki, N.V.; Kurokawa, K.; Ohta, H.; Kanesaki, Y.; Yoshikawa, H.; Tabata, S.; *et al.* Genomic structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain GT-S. *DNA Res.* **2011**, *18*, 393-399.

Hoiczyk, E.; Baumeister, W. The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. *Curr. Biol.* **1998**, *8*, 1161-1168.

Mauriello, E.M.F.; Mignot, T.; Yang, Z.; Zusman, D.R. Gliding motility

revisited: How do the *Myxobacteria* move without flagella? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 229-249.

Risser, D.D.; Meeks, J.C. Comparative transcriptomics with a motility-deficient mutant leads to identification of a novel polysaccharide secretion system in *Nostoc punctiforme*. *Mol. Microbiol.* **2013**, *87*, 884-893.

Cozy, L.; Callahan, S.M. The *hmp* chemotaxis cluster regulates gliding in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Mol. Microbiol.* **2014**, *92*, 213-216.

Risser, D.D.; Chew, W.G.; Meeks, J.C. Genetic characterization of the *hmp* locus, a chemotaxis-like gene cluster that regulates hormogonium development and motility in *Nostoc punctiforme*. *Mol. Microbiol.* **2014**, *92*, 222-233.

Hoiczyk, E.; Baumeister, W. Oscillin, an extracellular, Ca²⁺-binding glycoprotein essential for the gliding motility of cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* **1997**, *26*, 699-708.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)(すべて査読有)

Sato, N.; Katsumata, Y.; Sato, K.; Tajima, N. Cellular dynamics drives the emergence of supracellular structure in the cyanobacterium, *Phormidium* sp. KS. *Life* **2014**, *4*, 819-836.
doi:10.3390/life4040819

Sakurai, K.; Moriyama, T.; Sato, N. Detailed identification of fatty acid isomers sheds light on the probable precursors of triacylglycerol accumulation in photoautotrophically grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* **2014**, *13*, 256-266.
10.1128/EC.00280-13

Awai, K.; Ohta, H.; Sato, N. Oxygenic photosynthesis without galactolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 13571-13575.
doi: 10.1073/pnas.1403708111

Tajima, N.; Sato, S.; (6名略); Sato, N. Analysis of the complete plastid genome of the unicellular red alga *Prophyridium purpureum*. *J. Plant Res.* **2014**, *127*, 389-397. doi: 10.1007/s10265-014-0627-1

佐藤直樹. 生物学的説明の二元論: 生物学的文脈の中の還元論, 非還元論. 生物科学 **2013**, *65*, 54-63

Sato, N.; (他4名) The *all0458/lti46.2* gene encodes a low temperature-induced Dps protein homolog in the cyanobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 and *Anabaena variabilis* M3. *Microbiology* **2012**, *158*, 2527-2536. doi: 10.1099/mic.0.060657-0

Kanesaki, Y.; (4名略) Sato, N.; Ikeuchi, M; Yoshikawa, H. Identification of substrain-specific mutations by massively parallel whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* **2012**, *19*, 67-79. doi: 10.1093/dnares/dsr042

Sato, N.; Tajima, N. Statistics of N-terminal alignment as a guide for refining prokaryotic gene annotation. *Genomics* **2012**, *99*, 138-143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.12.004>,

〔学会発表〕(計 8 件)

佐藤直樹, 田島直幸 シアノバクテリアにおける細胞運動ダイナミクスによる超細胞構造の創発 日本植物生理学会 2015年03月16日~2015年03月18日 東京農業大学(東京都・世田谷区)

佐藤直樹, 勝又勇太郎, 佐藤薫, 田島直幸 シアノバクテリアの超細胞構造形成: ミクロからマクロへ 細胞を創る研究会 2014年11月13日~2014年11月14日 東京大学(東京都・文京区)

佐藤直樹 One strain, one genome sequence: 研究室株のシーケンス ラン藻ゲノム交流会 2014年07月19日~2014年07月19日 東京大学(東京都・目黒区)

佐藤直樹 *Limnothrix* ABRG5-3 株のゲノム配列決定とシアノバクテリアの中での系統関係 ラン藻の分子生物学 2013年11月22日~2013年11月23日 かずさDNA研究所(千葉県・木更津市)

佐藤直樹 動的な創発概念による生命理解の提案 生物学基礎論研究会 2013年09月07日~2013年09月08日 総研大(神奈川県・逗子市)

Sato, N. Dynamic notions of emergence: interplay of entropic driving principle and environmental/genetic constraints over the hierarchy of life ISHPSSB2013 2013年07月07日~2013年07月12日 Montpellier (France)

佐藤直樹 哲学から見た生命の起源論 マラテールの議論をめぐって 生物学基礎

論研究会 2012年09月02日~2012年09月02日 名古屋大学(愛知県・名古屋市)

佐藤直樹 生命がもつ駆動力としての不均一性を物質生産につなげる鍵としての創発性 日本光合成学会 2012年06月01日~2012年06月02日 東京工業大学(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 3 件)

佐藤直樹. しくみと原理で解き明かす植物生理学. 裳華房, 2014, 202.

クリストフ・マラテール著, 佐藤直樹訳. 生命起源論の科学哲学 創発か, 還元的説明か みすず書房, 2013, 400.

佐藤直樹. エントロピーから読み解く生物学 - めぐりめぐむ わきあがる生命 - 裳華房, 2012, 232.

〔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

研究室ホームページ

<http://nsato4.c.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤直樹 (SATO, Naoki)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号: 40154075

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし