

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657014

研究課題名(和文) マイクロ流路長期培養系を用いた大腸菌の細胞伸長における表現型可塑性の解析

研究課題名(英文) Analysis on cell filament and phenotypic plasticity of Escherichia coli using microfluid system

研究代表者

嶋田 正和 (Shimada, Masakazu)

東京大学・大学院情報学環・教授

研究者番号：40178950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：一細胞培養系を用いて、大腸菌の細胞伸長に関わる3要因を解析した。(仮説A)「捕食回避説」、(仮説B)「低密度良好説」、(仮説C)「環境ストレス説」である。細胞密度・増殖環境変化に伴う細胞伸長作用とrecA遺伝子発現の関連性を調べた。その結果、一部細胞でrecA遺伝子プロモーター活性が高くなり、recAを強く発現する細胞("高recA発現細胞")は細胞サイズの大きい伸長細胞であった。また、細胞密度が高まると伸長細胞頻度や高recA発現細胞数が増加した。細胞密度の増加は、老廃物の蓄積や栄養塩の枯渇をもたらし、環境ストレスが増加することで、細胞伸長とrecA遺伝子発現をもたらしている。

研究成果の概要(英文)：Using the single cell incubation, we analyzed three potential factors affecting the cell filament formation of Escherichia coli; (A) the enemy avoidance hypothesis, (B) the cell performance enhanced at a low density, and (C) the environmental stress. We analyzed relationship of cell filament to cell density and recA gene expression in the batch incubation. Results showed that recA gene was highly expressed in some cells ("high recA cell") and that they were elongated. The higher the cell density became, the higher frequencies of filament cells and high recA cells showed. Increase of cell density results in increasing wastes and insufficient trophic matters, then environmental stress increases, following the cell filament formation and the recA gene expression.

研究分野：生物学

キーワード：一細胞培養系 大腸菌 細胞伸長 表現型可塑性 細胞密度 recA遺伝子発現 環境ストレス

1. 研究開始当初の背景

ある種の細菌種では、低密度で栄養条件がよくなったり、捕食者の原生動物と共に培養すると、細胞の長さが通常の4~5倍にも伸長する現象(フィラメントの形成)が集団中20%ほどの細胞で観察されている。この細胞伸張は表現型可塑性であると考えられているが、従来は細胞集団の1匹ごとの定量的データは取得できなかった。マイクロ流路長期培養系の技術を利用すれば、大腸菌1匹ごとの個体変異のデータが取れるので、これにより細菌の表現型可塑性と環境変化への反応基準を観測する。さらに反応基準の大きな差を示す細菌株を確立することで、表現型可塑性の遺伝的順応(West-Eberhard, 2003)や促進的変異理論(Kirshner & Gerhart, 2005)の手掛かりを得たい。いくつかの細菌種では、ストレス環境に置かれたり、低密度で栄養条件がよくなったり、捕食者の原生動物と共に培養すると、細胞が通常の4~5倍にも伸長する現象(フィラメントの形成)が集団中20%~50%の細胞で観察されている。このメカニズムは3つの仮説に分けられる。

(仮説1)捕食者の原生動物が存在していると、その分泌物がカイロモンとなって、細菌が細胞を伸長し食われにくく変えている。つまり、細菌のフィラメント形成は、対捕食への誘導防御として進化した表現型可塑性である(Corno and Jurgens, 2006).....「捕食回避説」

(仮説2)ケモスタットで培養液置換率を2倍に上げると、フィラメント形成が促された。長い細胞の方が増殖率が高く(メカニズムは不明)、相対的に低密度で栄養条件が良くなることで生じられた表現型可塑性である(Hahn et al, 1999).....「低密度良好説」

(仮説3)環境にストレスを与えると、大腸菌は簡単に細胞を伸長する。これは、多くの大腸菌の細胞生物学者が示している.....「環境ストレス説」

個々の細胞でどんな代謝過程や遺伝子発現の変異がフィラメント形成に関与しているかは、細菌集団の平均値の変化を見ている、長くなったメカニズムは分からない。細胞伸張を理解するときには、細菌1匹1匹の定量的なデータが大量に必須である。よって今回はマイクロ流路長期培養系の自動計測技術を導入して、大腸菌伸長の表現型可塑性の解析を行う。

多くの分子細胞生物学者がレーザー微細加工を用いたマイクロ流路による1細胞培養計測系を急速に使い始め、確率的遺伝子発現(stochastic gene expression)や不等分裂などの1細胞計測のデータを発表し始めた。しかし、進化生態学者はほとんど無関心である。本研究は以下の点で、斬新なアイデアやチャレンジ性を有している。

(1) レーザー微細加工技術(マイクロフ

アプリケーション)を利用して、我々のグループの若本研ではスライドガラス上にマイクロ流路長期培養系を構築し、長期的(現時点で百数十世代まで可能、1週間程度)に大腸菌クローンの個体ごとのデータを取得する系を開発した(特許2011-156767)。これによって、表現型可塑性としてクローン内の細菌1匹ごとの差異、環境条件の違いを組み合わせた遺伝子型ごとの反応基準を、定量的データとして記録できる。進化生態学でこの技術を使った研究は、世界でも例がない。

(2) 培養液を新鮮にした時や貧栄養の環境に置くと大腸菌は伸長することを分子生物学者や細胞生物学者はしばしば観察しているが、単なる環境変異として気に留めていなかった。一方、マイクロコズムの実験生態学者は、大腸菌と捕食者テトラヒメナを混合培養すると、大腸菌の伸長(フィラメント構造)が触発されることをしばしば観測していたが、彼らは大腸菌1匹1匹の振舞いがどのように異なるのかを観測する技術を持っていなかった。大腸菌のフィラメント構造の進化的研究は、世界でも2~3のグループが細々と行っていたに過ぎず、彼らはマイクロ流路長期培養系の技術をまだ導入してはいない。

2. 研究の目的

1細胞培養計測系を使用し、大腸菌の細胞伸長に関わる3つの仮説(仮説1:捕食者回避説、仮説2:低密度良好説、仮説3:環境ストレス説)を検証する。仮説1については、先行研究により、テトラヒメナ非存在下でも大腸菌の細胞伸長が起こることが明らかとなったため、残り2仮説、低密度良好説および環境ストレス説の検証を行った。

3. 研究の方法

マイクロ流路長期培養系を用いた3つの仮説の実験アプローチで我々のグループは挑戦的萌芽研究(平成22年~23年度)に採択され、これは大腸菌の細胞伸長に関する表現型可塑性の短期間1細胞培養計測系の確立であった。この間に、若本祐一准教授の研究室は大腸菌を用いたマイクロ流路長期培養系での細胞伸長自動計測システムを完成させた(図1)。これにより、1週間以上もの連続培養で細胞伸長を自動計測できるようになった。この技術は画期的なものであり、これによって、表現型可塑性が遺伝系に取り込まれる「遺伝的同化」の分析が可能となった。本研究では1細胞培養計測系を用いて、細胞伸長細胞の有無、および環境ストレスに反応して発現すると考えられるrecA遺伝子(SOS応答およびDNA組換えにかかわる遺伝子)のプロモーター活性を測定することにより、環境応答に対する細胞伸張作用と遺伝子発現の関連を調べた。実験には、recA遺伝子プロモーター領域を組み込んだプラスミド(Zaslaver et al., 2006)を使用し

た。このプラスミドを大腸菌系統株 (K12 株由来一部遺伝子改変系統) に取り込ませ、*recA* 遺伝子のプロモーター活性を蛍光シグナルを利用して検出できるようにした。大腸菌系統株は、M9 培地で前日から 37 で振盪培養したのち、実験当日に必要な前処理を行い実験に使用した。上記 2 仮説を検証するため、一細胞培養計測系を使用し、(1) 寒天培地上での細胞伸長作用と *recA* 遺伝子発現の関連性、および (2) 細胞密度・増殖環境変化に伴う細胞伸長作用と *recA* 遺伝子発現の関連性を調べた。

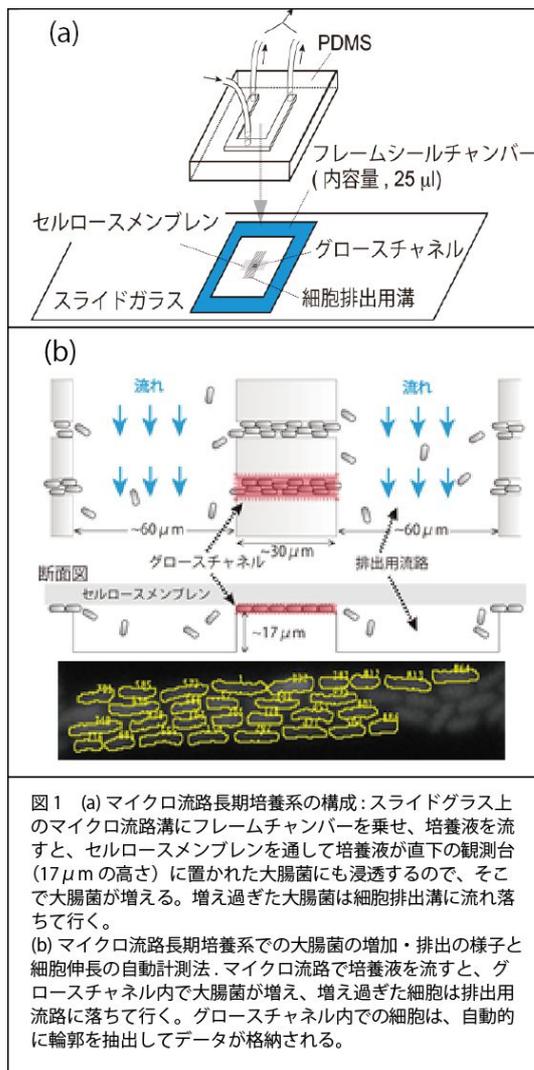


図1 (a) マイクロ流路長期培養系の構成: スライドガラス上のマイクロ流路溝にフレームチャンパーを乗せ、培養液を流すと、セルロースメンブレンを通して培養液が直下の観測台 (17 μm の高さ) に置かれた大腸菌にも浸透するので、そこで大腸菌が増える。増え過ぎた大腸菌は細胞排出溝に流れ落ちて行く。(b) マイクロ流路長期培養系での大腸菌の増加・排出の様子と細胞伸長の自動計測法。マイクロ流路で培養液を流すと、グロースチャンネル内で大腸菌が増え、増え過ぎた細胞は排出用流路に落ちて行く。グロースチャンネル内での細胞は、自動的に輪郭を抽出してデータが格納される。

4. 研究成果

1 細胞培養計測系を用い、寒天培地上での細胞伸長作用と *recA* 遺伝子プロモーター活性の関連性を調べた。その結果、一部細胞で、増殖に伴い *recA* 遺伝子プロモーター活性 (以下、"recA") が高くなり、*recA* を強く発現する細胞 (以下、"高 *recA* 発現細胞") は細胞サイズの大きい伸長細胞であることが明らかになった (図 2、図 3)。この結果から、細胞の密度増加とともに高 *recA* 発現細胞が増える「密度依存仮説」をたて、バッチ培養系で特定時間培養後のクローン細胞を捕集し、細胞伸長と *recA* 発現量の解析を行った。

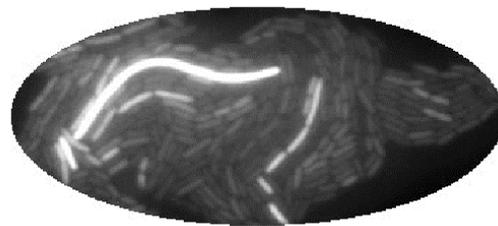


図2. 細胞内で *recA* 遺伝子が強く発現した伸長細胞の一例。 *recA* 遺伝子発現を GFP 蛍光で検出。

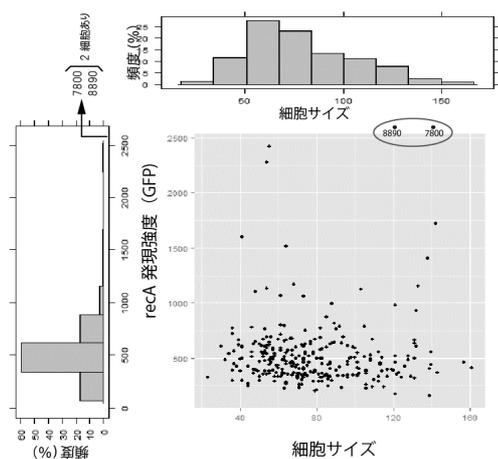


図3 寒天培地を用いた一細胞培養計測系での高 *recA* 発現細胞および伸長細胞の関連 (培養後 250 分)

この実験に使用した大腸菌培養細胞の成長曲線は図 4 で示すとおりである。

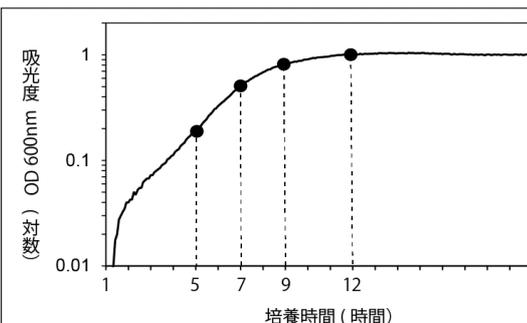


図4 液体培地でバッチ培養した大腸菌の増殖曲線。図中丸の時点でサンプリングを行い 1 細胞培養系を用い伸長細胞および高 *recA* 発現細胞の解析を行った。

液体培地での 5 時間、7 時間、9 時間、12 時間培養後の高 *recA* 発現細胞 (輝度 > 1000 と定義) は、それぞれ、3/217, 1/202, 5/233, 27/212 (高 *recA* 発現細胞数/全細胞数、表 1) であった。また伸長細胞 (細胞サイズ > 200 と定義) は、10/217, 2/202, 47/233, 35/212 (伸長細胞数/全細胞数、表 2) であった。伸長かつ高 *recA* 発現細胞は 9 時間後で 2 細胞、12 時間後で 3 細胞であり、5 時間、7 時間後には観察されなかった。以上の結果から、(1) 伸長細胞頻度は培養時間とともに増加、(2) 高 *recA* 発現細胞頻度も培養時間とともに増加したことから「密度依存仮説」が支持された。一方、(3) 伸長かつ高 *recA* 発現細胞の数はわずかであり、必ずしも両者の相関は強くなかった。一方、寒天培地を用いた 1 細胞

表1 液体培地培養後の recA 発現細胞数。recA 発現強度は輝度を表す。(recA 発現強度 ≤ 数値)

| recA発現細胞 | バッチ培養(時間) | | | |
|----------|-----------|-----|-----|------|
| | 5hr | 7hr | 9hr | 12hr |
| 500 | 166 | 153 | 204 | 141 |
| 1000 | 48 | 48 | 24 | 44 |
| 1500 | 1 | 1 | 2 | 17 |
| 2000 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| 2500 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 3000 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 3500 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 4000 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4500 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5000 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| >5000 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| Total | 217 | 202 | 233 | 212 |

計測系では、細胞内で高い recA 発現が持続する間は細胞分裂が抑制されて伸長が続き、細胞内の recA 発現が弱まると分裂を再開する様子が観察され、高 recA 発現と細胞伸長の間には関連性があることが推測された。この結果は伸長状態と高 recA 発現の相関が 1 細胞計測系とバッチ培養系で異なる可能性を示唆している。低密度良好仮説は、培養時間が短く栄養塩も多くある状況で伸長細胞が増えることを予測している。しかし、本研究の結果はこの仮説を支持せず、この仮説は棄却された。一方、細胞密度が高まると伸長細胞頻度や高 recA 発現細胞数が増加した。細胞密度の増加は、老廃物の蓄積や栄養塩の枯渇をもたらす、環境ストレスが増加している状況と考えられる。このことから、本実験結果は環境ストレス仮説を支持していると考えられるのが妥当と思われる。

表2 液体培地培養後の細胞サイズ分布 (細胞サイズ ≤ 数値)

| 細胞サイズ | バッチ培養 (時間) | | | |
|-------|------------|-----|-----|------|
| | 5hr | 7hr | 9hr | 12hr |
| 50 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 | 59 | 79 | 14 | 13 |
| 150 | 83 | 98 | 87 | 91 |
| 200 | 65 | 23 | 85 | 73 |
| 250 | 6 | 1 | 36 | 26 |
| 300 | 3 | 1 | 8 | 7 |
| 350 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 400 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 450 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 500 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 550 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 600 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 650 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 700 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Total | 217 | 202 | 233 | 212 |

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)

Shiroyawa Y. and Shimada M. (2013) Sex

allocation pattern of the diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Proceedings - Royal Society. Biological sciences*, 280 査読有

DOI:10.1098/rspb.2013.0503.

Wakamoto Y., Dhar N., Chait R., Schneider K., Signorino-Gelo F., Leibler S., McKinney JD. (2013) Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. *Science*, 339:91-95 査読有

DOI:10.1126/science.1229858

[学会発表](計2件)

Wakamoto Y. Inconsistency between population and single cell growth rates revealed by dynamics cytometer., 第50回日本生物物理学会, 2012年09月23日, 名古屋大学(愛知県名古屋市)

Wakamoto Y. Phenomenological rules behind clonal proliferation of bacteria., 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

[その他]

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/shimada-lab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

嶋田 正和 (SHIMADA MASAKAZU)
東京大学・大学院情報学環・教授
研究者番号: 40178950

(2)連携研究者

若本 祐一 (WKAMOTO YUICHI)
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号: 30517884

吉田 丈人 (YOSHIDA TKEHITO)
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号: 40447321

大林 夏湖 (OHAYASHI KAKO)
東京大学・大学院総合文化研究科・特任研究員
研究者番号: 20448202