

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 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：24658072

研究課題名(和文) 微生物捕食の嗜好性及び貪食作用の分子機構の解明とその応用研究

研究課題名(英文) Elucidation and application of molecular mechanism of preference in microbial predation and phagocytosis

研究代表者

足立 博之 (Adachi, Hiroyuki)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00211699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：96ウェルプレートを用いて細菌が細胞性粘菌により捕食されてハ口を形成する能力を調べる実験系を構築し、大腸菌網羅的遺伝子破壊株ライブラリーKeio collection約5,000株を対象に2回行った。その結果、2回に共通してハ口形成速度が著しく小さい8株を同定した。9 cmプレートで再確認したところ、いずれの株でも再現性が見られたが、さらにプレート上の大腸菌の生育が悪いほど速度の減弱が大きく、生育が良いほど好んで補食される傾向が明らかになった。破壊遺伝子には生育に関わるものに加え機能未知遺伝子が含まれていた。また、細胞性粘菌側の遺伝子で貪食作用に関わるものを1つ同定した。

研究成果の概要(英文)：An assay system was constructed, to examine the ability for bacterial cells to be predated by Dictyostelium cells and form plaques using 96-well plates. By means of this assay system, Keio library, the comprehensive library of knockout mutants of E. coli, was examined twice. As a result, eight mutants were reproducibly identified that showed greatly reduced speed to form plaques. By using 9-cm plates, the results were reproduced for all mutants, and it was also revealed that the slower the mutant cells grew, the slower the plaque spread, suggesting that Dictyostelium cells preferentially predate bacteria that grow faster. The disrupted genes included not only the ones involving growth but also ones whose function is unknown. In addition, a protein of Dictyostelium involving phagocytosis was identified.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：microbial predation

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は、これまでモデル真核微生物の細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* (以下粘菌) を用いて細胞骨格の再構築に関わる細胞機能である細胞質分裂、細胞遊走、貪食作用、飲作用について、現象に関わる因子の同定及び機能解析を行ってきた。特に細胞質分裂に関しては、当時粘菌で初めて用いられた REMI 法を改良して用い、ほ乳類まで保存された IQGAP 様タンパク質、RhoGDI などのタンパク質が細胞質分裂に関わることを世界で初めて明らかにした。

(2) 研究代表者は、発見した細胞質分裂に関わる因子が同様に細胞骨格再構築を含む貪食作用にも関わるかおよびその関わり方も調べてきた。方法としては、従来通り大腸菌 B/r 株または *Klebsiella aerogenes* を餌とした二員培養でのハ口形成の検討や、蛍光標識した酵母細胞の取込み速度解析を用いた。解析の過程での、大腸菌でも K12 株は餌にならないという研究者情報、滅菌した酵母菌体は取込まれるがそのまま吐き出され、また生きた酵母でも細菌の場合のようなハ口(クリアゾーン)が形成されないという自身の観察、ラテックスビーズも取込むという報告などから、研究代表者は、粘菌の細菌捕食では餌の何が認識されまたは機能して、取込みだけでなく食胞が消化して増殖するための栄養となるかに興味を持った。さらに、粘菌側の因子とその機能だけでなく、餌側の因子とその機能も合わせて理解して初めて微生物の捕食全体が理解できるという考えに至った。しかもこのような解析はあまりなされておらず、科学的貢献も大きいと考えられた。

(3) 本研究申請当時、粘菌が餌としていた細菌を孢子塊に入れ、孢子がそれを伴って移動先でそれを植え、増殖後捕食して自らも増殖するという原始農耕を行っているという報告 (Nature 469,393-396 (2011)) があった。この報告には、種(たね)として持ち歩く細菌の解析も含まれ、粘菌が細胞レベルの食の嗜好性を持っていることが示された。この細胞レベルの食の嗜好性の理解は、人間の食の嗜好性といったより普遍的な食の嗜好性の理解や、高等動物まで保存された貪食作用、食胞への分解酵素のターゲティング、食胞での分解、吸収など捕食の各段階の分子機構解明の意味から有用であるだけでなく、いわば「捕食工学」により食作用を人為的にコントロールし、本来食べない細菌、粒子を取込み、消化し、栄養源とする粘菌を作出して環境浄化や物質生産につながるものと考えた。

(4) (2) で紹介した大腸菌をモデルとして用いる系を想定し、申請前に大腸菌を餌にした二員培養でハ口を形成させる予備的実験を行った。研究者情報に反し、大腸菌は B/r 株のみならず遺伝学的解析手法、リソースにお

いて優れる K12 株であり、その野生株に近い W3110 株ではハ口が形成された。一方、組換え DNA でよく用いられる K12 株由来の JM109 株ではハ口は形成されず、変異により餌が餌でなくなることがわかった。この結果より、同じ大腸菌でも遺伝子背景の違いで捕食される、されないの違いが生じることがわかり、そのことにより、変異により粘菌に捕食されなくなる遺伝子、すなわち粘菌に捕食されるのに必要な細菌の遺伝子を同定することがわかった。

(5) 貪食作用に関わる粘菌側の遺伝子の解析も微生物捕食全体の理解に引き続き必要である。研究代表者は、申請時に粘菌の細胞質分裂に関わるタンパク質として D411-2p と CD1B を同定および解析していたが、同じアクチン細胞骨格再構築を含む現象である貪食作用にも上記タンパク質が関わる、または関わる可能性があるため、これらタンパク質の貪食作用における機能解析や分子レベルでの機能解析は、餌の細菌側の解析と組合せて行なう粘菌側からの解析としても必要である。また、(3) で説明したように粘菌側の遺伝子操作により捕食現象を操作することも可能ではないかと考えており、これらの解析はその第一歩にもなる。

2. 研究の目的

(1) 捕食型の真核モデル微生物である細胞性粘菌を材料に、微生物捕食において餌になるのに必要な細菌側の因子 / 遺伝子を各種細菌株ストック及び大腸菌の変異株ライブラリーを利用して解明する。

(2) (1) で同定された因子 / 遺伝子から、餌の細菌が粘菌細胞に吸着して貪食作用で取込まれ、できた食胞内で消化吸収されるまでの過程が餌になり得るかを定めるのに必要かを推定する。

(3) (2) の推定の是非を、粘菌側の遺伝子を破壊または高発現させた粘菌変異株を作製し、特定の細菌や大腸菌変異株が餌から餌でなくなる、またはその逆になる粘菌が作出できるかにより検討する。

(4) 既に貪食作用に関わるとわかっているかその可能性のある粘菌のタンパク質について、貪食作用への関与の有無の検討、貪食作用における機能解析、分子レベルの機能解析を行なう。

(5) 得られた情報を総合して、細菌だけでなく、酵母のような真核微生物を餌とするような粘菌のデザインも目指す。

3. 研究の方法

(1) 9 cm プレート上の二員培養によるハ口拡大試験。特定の大腸菌株が細胞性粘菌に捕食

されるかどうかは、9 cm シャーレに作製した 20 ml DM (ペプトン、グルコース、リン酸緩衝液) プレートを用いて以下のような従来法で調べた。グリセロールストックから LB 液体培地で 30 で一夜振盪培養した培養液 700 μ l を予め乾燥した DM プレートに塗布して乾燥させた後、HL5 培地 (ペプトン、グルコース、酵母エキス、リン酸緩衝液) で懸濁培養し、対数増殖期 (約 5×10^6 /ml) になった細胞性粘菌 AX2 株の培養液を 5 μ l ずつ 3 カ所スポットし、さらに同培養液 50 μ l を入れた丸底 96 穴プレートからピペットチップで 3 カ所植菌して乾燥させ、パラフィルムでシールして 22 で静置培養した。培養 3-7 日目のプレートを毎日 1 回観察し、ハ口の直径とハ口内部の子実体、多細胞体の有無、大腸菌ロンの濃さを調べるとともに、透過型のイメージスキャナーを用いてプレートを撮影し、photoshop を用いてハ口がコントラストよく見えるように画像処理した。ハ口が拡大しないか拡大が対照株 (親株等) に対して有意に遅い場合、捕食に欠損があると考えた。

(2) 96 穴プレート上の二員培養によるハ口拡大大規模スクリーニング。大腸菌の網羅的遺伝子破壊株ライブラリーである Keio Collection をハ口拡大スクリーニングするには、本研究の多くの時間をかけて開発した以下の方法を用いた。48 枚の 96 穴プレート大角形プレート上のグリッド状 96 コロニーとして分与される Keio Collection より、剣山状 96 ピンプレートを用いてグリセロール入り LB 培地に植菌し、37 で一夜静置培養し、これをそのままディープフリーザーに移してグリセロールストックとした。スクリーニングは、1 回でストック 24 枚ずつ 2 回に分けて行なった。以下 1 回の操作を示す。植菌操作は二日で行なった。植菌一日目には、丸底 96 穴プレートに LB 液体培地を分注し、96 ピンプレートを用いてグリセロールストックより Keio Collection を植菌し、37 で一夜静置培養した。一方、DM プレートを平底 96 穴プレートに作製し、パラフィルムでシールして 22 で保存した。植菌二日目には、保存した 96 穴 DM プレートに大腸菌一夜培養液を植菌して乾燥させた。その後、(1) と同様に準備した AX2 液体培養液を丸底 96 穴プレートに分注し、(1) のチップ法で穴の中央に植菌し、22 で静置培養した。ハ口の拡大は、植菌二日目を 0 日目とし、3-7 日目の植菌時刻に (1) の方法で撮影して画像処理し、第 4 日目と第 6 日目の画像をパソコン上で観察してハ口の大きさと大腸菌の濃さを記録した。ハ口形成の最も悪い株は、4 日で全くハ口が見えず、6 日でもハ口がわずかにしか見えない程度であるが、親株と同じと考えられるほとんどの株は 4 日で穴の直径の半分以上、6 日ではハ口が穴のふちまでゆき渡った。

(3) 粘菌の酵母取り込み速度の測定。特定の粘

菌遺伝子が貪食作用に関わるかを調べるために、親株 AX2 と当該遺伝子の破壊株を用いて従来法で以下の通り行なった。オートクレーブ滅菌した酵母をローダミンイソチオシアネートで蛍光標識したものを粘菌と混合して取り込ませ、経時的にサンプリングした。サンプルには素早くトリパンブルーを加えて取り込まれなかった酵母を消光させ、細胞内の蛍光を蛍光光度計により測定した。親株に対して取り込み速度が小さい場合、貪食作用に欠損がある、すなわち破壊した遺伝子が貪食作用に関わると考えた。

4. 研究成果

(1) 大腸菌 K12 株由来 JM109 株における粘菌の餌にならない原因遺伝子変異の解析。背景で説明した通り JM109 株は、9 cm DM プレートでの二員培養でハ口が拡大しないことを申請前に確認してあった。JM109 株は組換え DNA 実験の宿主として用いられてきた大腸菌株で、その目的に重要なのは相同組換えを抑えるために最後に導入された *recA* 変異である。この株は、親である JM101 株からこの目的のために変異を順次導入しつつ改良されたため、JM101 まで 4 株変異導入を遡った株を入手可能だった。これらを全て入手し、JM109 株と共に 9 cm プレートでハ口拡大試験を行なった。JM101 株は、申請前に K12 株がハ口形成可能であることを確認するのに用いた K12 の野生株に近い W3110 株と同等の正常な子実体を持つハ口形成能を示し、その後の段階で導入された変異 (群) が餌にならないことに寄与していることがわかった。しかし、その段階は当初予想した *recA* 変異が導入された最終段階ではなくそれ以前であり、その段階では同時に DM プレート上での大腸菌の生育 (ロンの濃さ) が落ちていたことがわかった。その段階で導入された変異は複数あり、これらが候補遺伝子と考えられた。そのうち 1 つの遺伝子は Keio Collection に K0 株 (F 株) があったので、そのハ口拡大試験を行なったところほぼ正常だった。JM109 株での原因変異 (群) が点変異 (群) でなければならぬ可能性もあり、単独 K0 株による目的遺伝子の同定はできなかったが、(2) でも示す通り、DM プレートでの生育と餌になることが関係している可能性は示唆された。

なお、時間の関係で大腸菌以外の細菌株のハ口拡大試験については、*Klebsiella aerogenes* についてハ口拡大能があることを再確認するとどまり、今後の課題とした。

(2) 大腸菌の粘菌の餌にならない変異の網羅的同定。国立遺伝研より大腸菌 ORF 網羅的破壊株ライブラリー (Keio コレクション) を取り寄せ、96 穴プレート上の二員培養によるハ口拡大大規模スクリーニングを行なった。スクリーニングに先立ち、Keio コレクションの親株である BW25113 株が 9 cm プレートで

ハ口拡大を示すことを確認し、また、(1)の F 株を含むライブラリーのプレート 1 枚を使って予備実験を行い、観察方法を含む条件を 3・(2)のように決定した。なお、撮影システムについては、延長した年度に、最新機種 of イメージスキャナー、最新のドライバーソフト、最新の mac パソコン、最新の photoshop に変更することで作業の効率化と画質の向上を計ろうとし、購入前のデモで 9 cm では同じ画質で 5 枚分同時撮影できることを確認して導入したが、購入後 96 穴では画質が旧システムに及ばないことがわかり、旧システムに戻すことになったことを記しておく(今後の画像処理の改善を期待して新システムの画像も並行して取得はしている)。一方、予備実験の過程で、偶然検討に使った F 株を含むプレート内にハ口拡大の遅い株 (E 株) をスクリーニングに先立って見出すことができ、これをスクリーニングのポジコンとして使うことができた。

スクリーニングはライブラリーを 2 回に分けて行い、それを 2 回繰り返し、2 回で共通して、大腸菌はハ口が見分けられる以上に濃く、かつハ口形成速度が著しく小さい(4 日目にハ口が全く見えず、6 日目にハ口が穴のふちまでゆきわたらない程度に広がるかそれ以下) 8 株を同定した。8 株には上述の E 株が含まれる。上記 8 株を LB プレートでのシングルコロニーアイソレーションで純化した上で、親株とともに 9 cm プレートで再確認したところ、いずれの株でも再現性が見られた。その程度は、7 日目でもほとんど拡大しないものから 3 日目で親株と近い拡大を示すものまでまちまちだったが、プレート上の大腸菌の生育が悪いほど拡大速度が小さく、時間をかけてある程度大腸菌が濃くなるとハ口も拡大し始める傾向にあった。このことから、DM プレート上での生育が良いほど好んで補食される傾向が明らかになった。破壊遺伝子には生育に関わるものに加え機能未知遺伝子が含まれていた。

本研究では、時間の関係でこの 8 株についてこれ以上の解析はできなかったため、DM プレート上での生育以外の要因とハ口拡大能の関係を明らかにできなかったが、今後、第一に、DM 以外の組成のプレートでこれらの株が親株同様に濃くなりかつハ口拡大が見られる組成を見つけてハ口拡大試験をし、さらにその組成でスクリーニングをし直すこと、第二に、この 8 株について生育した大腸菌を、細胞密度を揃えてリン酸緩衝液中に懸濁し、粘菌を加えて液体中での大腸菌の濁度減少と粘菌の細胞数増加により貪食作用を定量することで、同量の大腸菌の捕食による粘菌の増殖そのものを測定してさらに候補を絞り込むこと、第三に、今回得た 2 回の画像データからもう少し条件を甘くして、より多くの候補から DM プレート上での生育が親株と同等でかつハ口拡大速度の小さい株を同定する、といった方法により餌の生育という要

因を取り除くことで捕食されるための因子を追求することが可能であると考え。

(3) 貪食作用に関わる粘菌の遺伝子の同定と解析。大腸菌側の遺伝子をもとに、粘菌側の遺伝子を推定することはできなかったが、並行して細胞性粘菌の貪食作用に関わると予想された CD1B タンパク質の貪食作用に関する解析を行なった。CD1B は、すでに貪食作用に関わることがわかっている D411-2p タンパク質との関連から解析していたタンパク質で、既にその遺伝子破壊株を作製してあったので、これを用いて蛍光酵母の取込み実験を行なった。その結果、遺伝子破壊株では、親株の AX2 に比べ明らかに取込み速度が減少しており、CD1B が貪食作用に関わることが明らかになった。また、GFP を融合した CD1B を粘菌細胞に発現させ、その蛍光酵母に対する貪食作用における細胞内局在を調べたところ、CD1B は phagocytic cup の先端部に強く局在することがわかり、このタンパク質が貪食作用に関わることが強く支持された。加えて、D411-2p タンパク質のアクチン結合能についても解析した。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

稲葉弘哲、細胞性粘菌の GflB は増殖期アメーバ細胞の仮足形成を制御する、第 65 回日本細胞生物学会大会、2013 年 06 月 20 日、ウイック愛知(愛知県、名古屋市)

稲葉弘哲、細胞性粘菌の細胞質分裂に関わるタンパク質 nenkyrin(D411-2p)と相同領域を持つタンパク質の機能解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 03 月 26 日、東北大学(宮城県・仙台市)

Hironori Inaba, Analyses on the roles of two actin-binding domains of D411-2p protein involved in cytokinesis of *Dictyostelium*, 第 64 回日本細胞生物学会大会、2012 年 05 月 29 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 博之 (ADACHI, Hiroyuki)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 002211699

(4) 研究協力者

稲葉 弘哲 (INABA, Hironori)

寺澤 夏実 (TERAZAWA, Natsumi)