

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710228

研究課題名(和文)変動環境に適応する大腸菌の一細胞レベルの解析

研究課題名(英文)Analysis of bacteria in a fluctuating environment at the single-cell level

研究代表者

津留 三良(Tsuru, Saburo)

大阪大学・情報科学研究科・助教

研究者番号：80594506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、顕微鏡下でリアルタイムに観測可能で、培地交換が速い微細培養装置を開発することを目的としている。この装置は、細胞の流出を防ぐ小部屋と、培地成分濃度を様々な周波数で供給する発振流路から構成される。培地中の蛍光色素を指標に、小部屋の培地交換速度を計測した。その結果、当初目標の半分以下の10秒程度で培地交換が可能な微細培養装置を完成させた。蛍光タンパク質を合成する大腸菌をこの装置で培養・観察した結果、蛍光タンパク質の濃度が増殖と運動しつつも確率的に変化するが分かった。培地交換速度が速い微細培養装置を開発し、蛍光タンパク質の細胞内合成量が時々刻々と変化し、細胞ごとに多様性が現れることを示した。

研究成果の概要(英文)：We tried to construct a tiny chamber which enables rapid medium replacement under microscope to observe living cells at the single-cell level in real time. This micro chamber consists two parts: a small room for cell growth without washout from the fluid; a channel providing various concentrations of medium to the room by oscillating flow speeds of multiple inlets. Using fluorescent beads and pigment in the medium, we measured the speed of medium replacement in the room. As a result, the chamber replaced the medium in the room within 10 sec, less than half time of our expectation. Subsequently, the bacterial cells producing fluorescence proteins were loaded to the chamber and proliferated in the room by feeding the fresh medium. The protein concentrations fluctuated overtime accompanied with cell growth and varied among isogenic sister cells as a consequence. Thus, the micro chamber with rapid medium replacement revealed the cellular individuality even in the constant environment.

研究分野：ゲノム科学

科研費の分科・細目：システムゲノム科学

キーワード：一細胞観察 遺伝子発現の確率性 マイクロ流路

## 1. 研究開始当初の背景

生物の遺伝情報である DNA 配列は、転写反応・翻訳反応を経て RNA (転写産物) やタンパク質 (複製産物) の合成に用いられている。これらの生化学反応は全て分子スケールで行われているため、分子の熱揺らぎによる影響を受ける。すなわち、生化学反応は確率的な進行を余儀なくされている。その結果として、遺伝情報に変化がなくとも、RNA やタンパク質の合成量は、時々刻々と変化している[1]。これらの生体高分子のほとんどは、高々1000個程度しか細胞内に存在していないため、生化学反応の確率性の影響を大きく受けている。従って、全く同じ遺伝情報を持つ姉妹細胞間でも転写量・翻訳量が異なり、多様な性質や機能が生じている。

近年の研究から、生物はこの分散する性質を巧みに調節し、様々な周期で変動する環境へも迅速に適応していると考えられている[2]。一つの例は、両賭け戦略による変動環境への適応である。この戦略をとる集団内には、異なる適応状態を持つ細胞が生じており、その状態が確率的にスイッチしている。ある環境では、そのうちのより適応的な状態を持つ細胞が優先的に増えるが、環境が変化すると、別の適応的な状態を持つ細胞が優先的に増えるようになる。つまり、遺伝情報を変えることなく、複数の適応状態を確率的に生み出せることで、集団としての生存確率が高められている。

このような変動環境への適応性は、環境の周期に強く依存することが指摘されている[3]。つまり、環境変動の周期をコントロールし、適応現象の周期依存性を確かめる検証実験が求められている。先の例では、遅い周期で変動する環境では、適応状態間の遷移確率が低い集団の方が、集団としての増殖には有利である。低い適応状態をとる細胞の存在頻度が抑えられるためである。

しかしながら、従来の細胞培養技術では、環境となる培地の交換速度に大きな制限があるため、目的とする変動環境下での個体間のばらつきが変化の様子や、適応時の実際の役割については多くが明らかとなっていない。具体的には、細胞の増殖速度を超える流速で培地供給・排出すると、培養槽から細胞が完全に流出してしまい、観察ができないという問題を解決する必要がある。

[1] *Science*, 2002, vol. 297, pp. 1183-6

[2] *Science*, 2005, vol. 309, pp. 2075-8

[3] *Nat. Genet.*, 2008, vol. 40, pp. 471-5

[4] *Science*, 2011, vol. 333, pp. 1315-9

## 2. 研究の目的

本研究では、従来の mL(ミリリットル)スケールの小型の培養槽を大幅にスケールダウンし、pL(ピコリットル)スケールの微細な培養装置を開発することで、培地の交換速度を飛躍的に改善させる(課題1)。さらに、この微細培養装置を用いて、顕微鏡下で細胞を直接観察し、細胞内のタンパク質濃度が確率的に変動していることを確かめる(課題2)。

## 3. 研究の方法

課題1: 数十秒以内に培地を交換できる微細培養装置の開発

半導体素子等の集積回路の開発・製造に用いられるフォトリソグラフィ設備を用い、pLスケールの培養装置を開発した。光硬化樹脂によって作製した鋳型に対して透明な樹脂 polydimethylsiloxane (PDMS) で型どりして作製した。顕微鏡観察ステージに設置し、観察できるように、培養装置全体は、透明かつ小型にした。この培養装置は、細胞をトラップするための小部屋 (pLスケール) と、複数の培地を様々な周波数で切り替えて小部屋へ供給する発振流路 (幅 100  $\mu\text{m}$  程度) から構成される (図1, [4])。発振流路は、培地流入口1と2、余剰な培地を廃棄する廃液流出口で構成される。培地流入口は、それぞれマイクロチューブで外部のシリンジに接続し、ポンプによる圧力制御を施した。ポンプの圧力差に応じて、二液の流量比を定めた。本研究では、どちらかの培地のみが供給されるようにポンプの圧力を調節し、二液混合などの複雑な混合比は用いない。二種の内、片方の培地には、蛍光色素 Fluorescein を加え、両方の培地に直径 1  $\mu\text{m}$  の蛍光ビーズを封入した。蛍光色素は小部屋へ拡散流入・拡散流出するタイムスケールの計測に用いた。蛍光ビーズは流路の流速計測や流れの方向の確認に用いた。

課題2: 微細培養装置を用いた大腸菌の培養とタンパク質濃度の一細胞時系列観察

大腸菌は *Escherichia coli* MDS42  $\Delta\text{galK}::\text{ptet\_gfpuv5}$  を用いた。この細胞は、緑色蛍光タンパク質 GFP を発現する。培地には、最小培地 M63 を用いた。細胞は、実験開始時に細胞流入口からロードし、拡散で小部屋内へ入れた。小部屋の天井は、大腸菌 1細胞幅 (0.75  $\mu\text{m}$ ) まで低くされており、細胞をトラップし、増殖によって小部屋から流路へ溢れた細胞のみが廃棄される。このため、小部屋内に滞在する細胞の流出が防がれている。小部屋にトラップした細胞の蛍光画像を蛍光顕微鏡でタイムサンプリングした。画像解析によって、個々の細胞の蛍光強度、すなわち蛍光タンパク質濃度を計測した。

## 4. 研究成果

### 課題 1 の結果

作製した微細培養装置(図 1)の培地交換のタイムスケールがどの程度高速化できるかを調べた。

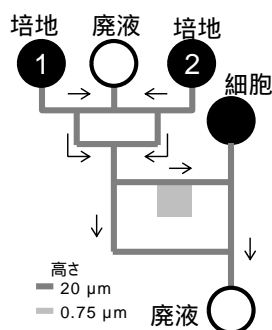


図 1 微細培養装置の概略 流入口は黒・流出口は白の円で示した。流路はグレーの線、小部屋は四角はで示した。矢印は培養時の流れの向きを示している。

発振流路の流量比を変化させて、蛍光色素を含んだ流入口 2 側の培地が周期的に小部屋の流路に供給した。拡散によって小部屋へ流入・流出した色素の蛍光強度を図 2 に示した。ポンプの流量比切り替えは msec 以下であり、原理上そのタイムスケールは越えられない。色素(拡散係数:  $100 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ )の小部屋への流入・流出がポンプの流量比切り替えに完全に追従する場合、図 2 の波形は完全な矩形となるが、流体の圧力変化などの遅延によって実際には、ズレが生じ、曲形の性質が表れた。波形から明らかかなように、小部屋の蛍光値は、10~20 sec 以内に上昇(下降)することが分かった。すなわち、培地交換速度が数十秒以内に完了する微細培養装置が完成した。

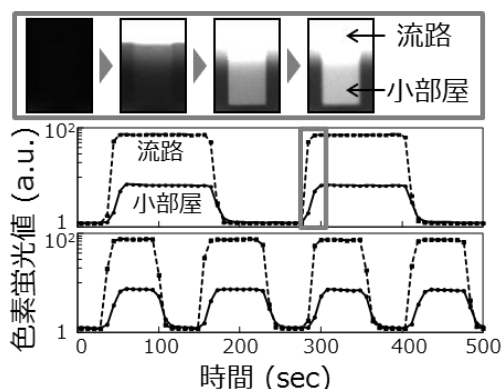


図 2 色素蛍光強度の時系列 上段パネルは蛍光写真(白は蛍光)の典型例である。中段(2 min 周期)と下段(1 min 周期)は流路と小部屋の蛍光値の時間変化を示している。中段の四角の領域は上段写真に対応する。

### 課題 2 の結果

完成させた微細培養装置を用いて、大腸菌を培養し・顕微鏡下で観察した。小部屋内の細胞ごとに緑色蛍光タンパク質 GFP の蛍光強度を調べた結果、増殖に伴って個々の細胞の蛍光強度が時間とともに変化することがわかった(図 3)。同じ母細胞由来の姉妹細胞間でも、じきに GFP 濃度が変化することがわかった。また、集団の中で特に GFP 濃度が高い細胞では、その体積成長速度が遅く、細胞内の GFP の希釈が遅いことが分かった。

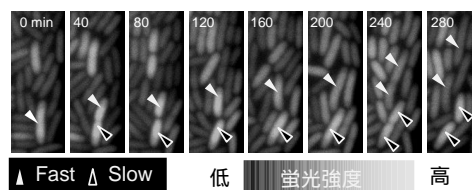


図 3 GFP 蛍光画像の時系列 時間は画像上側に示した。蛍光強度はグレースケールで示した。体積成長速度が違う姉妹細胞を三角で示した。

次に、個々の細胞の GFP 蛍光値に基づいて、その時間の小部屋に在る全細胞のプロファイル調べた(図 4)。小部屋には、増殖と流出によって、定常的に数百余りの細胞が存在している。個々の細胞のデータから得た集団分布を調べたところ、1 細胞から培養開始してから 200 min には、GFP 蛍光値の集団平均が定常に達し、その後は、おおよそ一定になった。また、変動係数(標準偏差を平均値で規格化した量)を指標に集団内の細胞の蛍光値のばらつきを調べたところ、同様に、定常に達することが分かった。すなわち、微細培養装置を用いることで、古い培地を置換新鮮な培地に高速に置換され続け、細胞が定常環境で増殖できていることが確認できた。

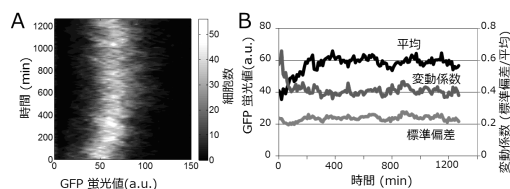


図 4 GFP 蛍光値分布の時間変化 (A) GFP 蛍光値の集団分布の時系列。細胞数はグレースケールで示した。(B) 分布の平均値・標準偏差と変動係数。

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)

Bei-Wen Ying, Saburo Tsuru, Shigeto Seno, Hideo Matsudab, Tetsuya Yomo., Gene expression scaled by distance to the genome replication site. Mol. BioSyst., 2014, 10, 375-379.

Yuki Matsumoto, Yoshie Murakami, Saburo Tsuru, Bei-Wen Ying, Tetsuya Yomo., Growth rate-coordinated transcriptome reorganization in bacteria., BMC Genomics 2013, 14, 2013, 1-10.

[学会発表](計 8件)

Yuki Matsumoto, Yoshie Murakami, Saburo Tsuru, Bei-Wen Ying, Tetsuya Yomo., Growth rate dependent effect on gene expression under environmental perturbation., International Workshop on Quantitative Biology 2013 (IWQB2013), Icho-kaikan, Suita Campus Osaka University, 2013, Nov. 25

村上由衣, 松本悠希, 津留三良, Ying Bei-wen, 四方哲也, ゲノム再編大腸菌における表現型及び全遺伝子発現の変化と適応, 第 36 回日本分子生物学会年会神戸ポートアイランド, 2013 年 12 月 3 日-6 日

Bei-Wen Ying, Saburo Tsuru, Tetsuya Yomo., Disturbing native regulations by a synthetic promoter reduced the noise in gene expression., COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCE Synthetic Biology, Suzhou Dushu Lake Conference Center, China, 2012 Nov. 26-30

應蓓文, 津留三良, 瀬尾茂人, 松田秀雄, 四方哲也, Reduced noise in gene expression caused by a replaced foreign promoter., 日本進化学会第 14 回東京大会, 首都大学東京南大沢キャンパス, 2012 年 8 月 21 日-24 日

松本悠希, 津留三良, インベイウエン, 四方哲也, Growth rate correlated genome-wide gene expression pattern in *E. coli*., 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 2012 年 12 月 11 日-14 日

明野優也, 三田弘道, 伊藤洋一郎, 津留三良, 應ベイウエン, 四方哲也, 遺伝子発現の確率性による環境適応, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 2012 年 12 月 11 日-14 日

高橋佑輔, 津留三良, 應ベイウエン, 四方哲也, 大腸菌の増殖抑制におけるストレス因子間の相乗・相殺効果, 第 35 回日本分子生物学

会年会, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 2012 年 12 月 11 日-14 日

村上由衣, 津留三良, 應ベイウエン, 四方哲也確率的環境適応をもたらす遺伝子発現パターンの再編, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 2012 年 12 月 11 日-14 日

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者 津留 三良  
(情報科学研究科・助教)

研究者番号: 80594506

(2)研究分担者 ( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号: