

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19338

研究課題名（和文）多細胞シアノバクテリアが持つ水陸両用運動装置の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the amphibious locomotion system of multicellular cyanobacteria

研究代表者

白石 英秋（Shiraishi, Hideaki）

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：90202118

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）： *Arthrospira platensis*（通称：スピルリナ）は、多細胞の繊維状シアノバクテリアである。この生物は、陸上でも水中でも細胞運動を行い、移動することができる。この生物の個体は数百個の細胞が1列に並んで形成されているが、これらの細胞がどのようにして協調してスムーズな個体の運動をもたらしているのかは謎である。本研究では、運動能に欠損が生じた突然変異体を効率よく選別する系を確立し、運動のできなくなった *A. platensis* の自発突然変異体を多数単離した。それらの突然変異体のゲノムにある突然変異部位を次世代シーケンサーで解析し、運動に關与する遺伝子の候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A. platensis の構成細胞がどのようにして協調してスムーズな個体の運動をもたらしているのかは謎であり、その運動の元となる運動装置の実体もわかっていない。本研究で、運動能に欠損をもたらす突然変異の原因遺伝子の候補を明らかにし、それによって、運動装置の実体を解明するための大きな手がかりを得ることができた。これは、運動装置の解明を通じてナノマシンの構築や新たな生物模倣技術の創生に繋がる成果である。また、使用した生物は世界中で利用されている有用な食用藍藻で、本研究で得た変異はこの生物の遺伝学的手法の整備のための有用な遺伝マーカーとして利用でき、この生物の研究の基本ツールともなるものである。

研究成果の概要（英文）： *Arthrospira platensis*, popularly known as spirulina, is a multicellular, filamentous cyanobacterium. This organism is capable of cell movement and migration both on land and in water. Hundreds of cells in a row form this organism, but how these cells work together to provide smooth movement is a mystery. In this study, a system to efficiently select mutants with defective locomotion was established, and many spontaneous *A. platensis* mutants that were unable to move were isolated. Analysis of the mutation sites in the genomes of these mutants by the next-generation sequencer revealed a set of candidate genes possibly involved in this organism's movement.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：細胞運動 シアノバクテリア 微細藻 スピルリナ 微生物

1. 研究開始当初の背景

Arthrospira platensis は、アフリカや中米のアルカリ塩湖を原産地としており、原産地の周辺で古くから食用にされてきた多細胞シアノバクテリアである。このシアノバクテリアはもともと食用にされていた上に大量培養が簡単に行えるため、1970年代から産業的な大規模生産が行われて、「スピルリナ」という名称で食品や食品添加物の原料として利用されてきた。*A. platensis* は産業的に有用なシアノバクテリアだが、基礎的な分子生物学・細胞生物学の研究材料としてはあまり使われてこなかった。

A. platensis の有用性に着目して野生株を取り寄せて培養してみると、盛んな細胞運動が観察された。この生物の運動は1927年に簡単な記載がされているが、その後、この運動の研究はおこなわれていなかった。そこでこの生物を使って実際に基礎的な研究を進めようとしてみたが、無菌化や凍結保存のような基本的な操作すらこの生物ではうまくいかず、過去にもこの生物ではそれらがうまくいかないことが報告されていたことがわかった。そこで申請者は、まず、この生物を基礎的な実験の材料として使う際の問題点の克服を試みることにした。その結果、この10年ほどの間に、簡便な無菌化法の確立、クローンとしての取り扱い方法の確立、凍結保存方法の確立、内在性制限酵素の解析、培養液の改良等を行うことができ、徐々に実験系を整備することができた。さらに、このような研究の過程で、細胞運動や形態に異常を持つ突然変異体を多数単離し、維持してきた。

2. 研究の目的

A. platensis は、水中で運動できるとともに、陸上の固体表面上でもスムーズな滑走運動を行える。この生物は数百個の細胞（細胞数は個体ごとにばらつきがある）が1列に並び、全体として繊維状で螺旋形の形態をしているが、個体を構成する多数の細胞がどのようにして協調して個体のスムーズな運動をもたらしているのかは謎である。電子顕微鏡による観察では、細菌によく見られる鞭毛や線毛のような構造は細胞表面に見られない。そのため、これまでに知られていないタイプの、水陸両用の運動装置がこのシアノバクテリアの運動能を担っている可能性が高いと考えられた。本研究は、申請者が維持してきた運動能に欠損のある突然変異体の解析や、新たに単離した運動能欠損変異体の解析を通じて、*A. platensis* の細胞運動に関わる未知の運動装置の実体を解明しようとするものである。

3. 研究の方法

A. platensis NIES-39 株を突然変異原で処理し、運動能を失った突然変異体を多数単離して維持していた。これらはいずれもそれぞれが遺伝的に独立に単離されたものなので、それぞれ異なる突然変異を持っていることが期待された。しかしながら、これらは突然変異原で処理して得られた突然変異体のため、運動能の欠損をもたらしている突然変異の他に、運動能とは無関係な中立的な変異もかなり入っているものと予想された。そこで、本研究では、突然変異原処理していない個体群から、運動能欠損突然変異体を新たに自発突然変異体として単離する。単離した自発突然変異体のゲノム塩基配列を次世代シーケンサーで調べ、突然変異部位を同定する。それによって、この生物の運動に関わる遺伝子に関する情報を得て、運動装置を構成する分子の実体に関する情報を得る。

4. 研究成果

野生型の *A. platensis* NIES-39 を親株として運動能を失った自発突然変異体を新たに単離した。また、野生型の *A. platensis* NIES-39 は螺旋状の形態をしているが、形態が直線状になった突然変異体を親株としても、運動能を失った自発突然変異体を単離した。

新たに単離された自発突然変異体はいずれも、固形培地上でも液体培地中

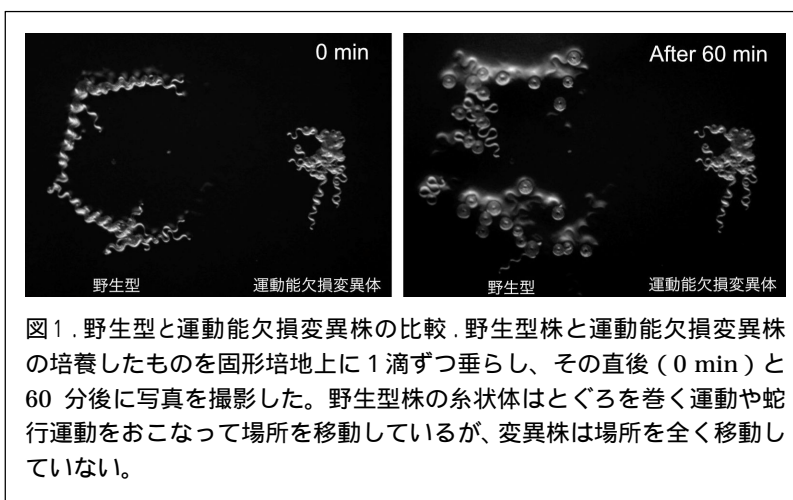


図1. 野生型と運動能欠損変異株の比較. 野生型株と運動能欠損変異株の培養したものを固形培地上に1滴ずつ垂らし、その直後(0 min)と60分後に写真を撮影した。野生型株の糸状体はとぐるを巻く運動や蛇行運動をおこなって場所を移動しているが、変異株は場所を全く移動していない。

でも運動能を完全に失っていた。得られた自発突然変異体のうちの4株について次世代シーケンサーでゲノム塩基配列を解析したところ、その4株のゲノムに合計15箇所の変異が見いだされた。しかし、4株すべてに共通する遺伝子の変異は無かった。この結果は、*A. platensis*の細胞運動には、複数の遺伝子の産物が関与していることを示唆している。ゲノムの解析をおこなった4株について透過型電子顕微鏡で糸状体の表層の構造を観察したところ、いずれの変異体でも、表層の構造に野生型との違いが観察された。このことは、変異体では表層にある運動装置に実際に異常が生じていることを示している。

突然変異体で変異が入っていた遺伝子の産物の中には、単細胞のシアノバクテリアで遊泳運動に関わっていることが過去に示されている遺伝子の産物と、一部に強い相同性のみられるものがあった。タンパク質の全体の構造はその遊泳に関わるタンパク質とは異なっているため、両者は同一のタンパク質ではないが、遊泳に関わるタンパク質と強い相同性のある領域が見られることから、*A. platensis*の滑走運動と単細胞シアノバクテリアの遊泳運動の間に共通するメカニズムがある可能性も考えられた。また、興味深いことに、ゲノムを解析した突然変異体の中には、線毛に関連するタンパク質の遺伝子に変異が入っていた株もあった。線毛は、単細胞のシアノバクテリアでは「twitching」と呼ばれる間歇的な運動に関わっていることが知られている。*A. platensis*はスムーズな滑走運動をおこない、これは運動の様式としてはtwitchingとは異なっているが、単細胞シアノバクテリアでtwitchingに関わっているようなタンパク質が、それとは異なる様式で*A. platensis*の滑走運動に関与している可能性も考えられる。

以上のように、運動に関わる遺伝子の有力な候補を同定することができた。今後、これらの遺伝子やその関連遺伝子をターゲットとして研究を進めることができるので、これは、運動装置の実体の解明のための大きな前進となる成果である。

なお、過去に単離していた運動能欠損変異体の中には復帰突然変異を起こしやすい易変性の株が2株あり、それらの株を元にして復帰突然変異体を取得した。これらの復帰突然変異体の解析は現在進行中であるが、その副次的な成果として、野生型株の中から運動能に欠損を持つ変異体を効率良く単離・同定する方法と、運動能欠損変異体の中から運動能が回復した株を効率良く単離する方法の両者を確立できた。この方法を使えば、運動に関わる遺伝子をネガティブ・セレクションとポジティブ・セレクションの両方に使える遺伝マーカーとして利用できるため、今後、*A. platensis*の遺伝学的手法の整備に役立つはずである。

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 0件）

1. 著者名 Hideaki Shiraishi and Akiko Toyoda	4. 巻 85
2. 論文標題 The use of a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide-based colorimetric assay in the viability analysis of the filamentous cyanobacterium <i>Arthrospira platensis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosci. Biochem. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 739-742
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbaa050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 白石英秋
2. 発表標題 食用藍藻 <i>Arthrospira</i> （スピルリナ）の培養と遺伝的取扱い
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白石英秋
2. 発表標題 突然変異体を用いた繊維状シアノバクテリアの細胞運動の解析
3. 学会等名 第21回 生命科学研究科シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shota Hayashi, Hideaki Shiraishi
2. 発表標題 Does <i>Arthrospira platensis</i> have strong non-specific deoxyribonucleases?
3. 学会等名 The 17th Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology among National Taiwan University, the University of Tsukuba, and Kyoto U（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林翔太、白石英秋
2. 発表標題 Arthrospira platensis の細胞抽出液に含まれるDNA分解酵素の解析
3. 学会等名 京都大学植物縦横無尽の会 第14回ワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白石英秋
2. 発表標題 アフリカ産のシアノバクテリアの現在・過去・未来
3. 学会等名 京都大学植物縦横無尽の会 第14回ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 翔太, 白石 英秋
2. 発表標題 食用藍藻 Arthrospira platensis の持つ DNA 分解酵素の解析
3. 学会等名 日本藻類学会第43回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白石英秋、木村仁美、高井舞香
2. 発表標題 藍藻 Arthrospira platensis (スピルリナ) の実験系の整備とその代表的な可視突然変異
3. 学会等名 日本遺伝学会第92回大会
4. 発表年 2020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
---------	---------