

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657006

研究課題名（和文） マイクロ流路での大腸菌の細胞伸長の表現型可塑性の解析：迅速な適応性

研究課題名（英文） Analysis on cell filament formation and phenotypic plasticity of *Escherichia coli* using micro fluid system: rapid adaptation

研究代表者

嶋田 正和 (SHIMADA MASAKAZU)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：40178950

研究成果の概要（和文）： マイクロ流路を使って、大腸菌の細胞伸長に関わる3つの要因を解析した。（仮説1）「捕食回避説」、（仮説2）「低密度良好説」、（仮説3）「環境ストレス説」である。各要因を、単独および複数を組み合わせて検証することにした。まず、増殖しすぎた細胞を自動的に取り除けるように工夫した1細胞計測系を構築した（特願2011-156767）。この計測系を捕食者テトラヒメナ・被食者大腸菌の混合培養系に応用したところ、テトラヒメナ用の二種類の標準的な培地 1/10PYG、および CDM 最小培地中では、テトラヒメナが存在しなくても大腸菌が伸長してしまうことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Using the on-chip one cell micro fluid system, we analyzed three potential factors affecting the cell filament formation of *Escherichia coli*; (1) the enemy avoidance hypothesis, (2) the cell performance enhanced at a low density, and (3) the environmental stress. Either one factor or their combinations has/have been analyzed. First of all, we developed the device, so that too many growing cells can be automatically removed from the incubating area (Patent 2011-156767). Applying the device to the *Tetrahymena* -*E. coli* co-incubation system, we observed that the cell filament of *E. coli* forms when we used for two standard mediums for *Tetrahymena* (1/10PYG and CDM), even though we did not add *Tetrahymena*'s pheromones at all.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	0	2,200,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	240,000	3,240,000

研究分野：生物

科研費の分科・細目：生態・環境

キーワード： 1細胞培養計測系、マイクロ流路、大腸菌、細胞伸長、表現型可塑性、捕食回避説、低密度良好説、環境ストレス説

1. 研究開始当初の背景

ある細菌種では、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。

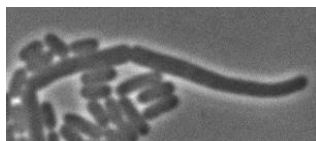


図1 伸長した大腸菌と通常の大腸菌

(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起さ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も、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。

国内・国外の動向としては、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。

本研究が斬新なアイデアやチャレンジ性を有しているかについては、以下が挙げられる。

(1) レーザー微細加工技術 (マイクロファブリケーション) 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 (特許申請中)。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

マイクロ流路長期計測系で、環境条件を組み合わせ大腸菌の細胞伸長の表現型可塑性と反応基準を解析し、細胞伸長にかかわる変異株と野生株とを比較して遺伝子発現の調節機構を明らかにする。

これにより、マイクロ流路による1細胞培養系での細菌の表現型可塑性の機構が解明されると、細菌を用いた実験進化に大きな変革がもたらされると期待される。

3. 研究の方法

本研究課題で使うのは、以下のマイクロ流路である。

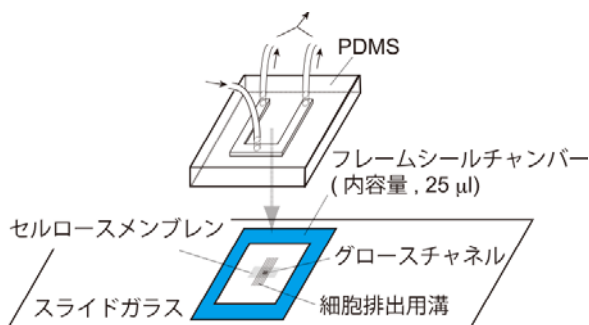


図2 マイクロ流路長期培養系の構成

スライドガラスの表面にレーザーでマイクロ流路の溝が切つてある。フレームチャンバーをこのマイクロ流路の上に乗せて、フレームチャンバーに培養液を流すと、セルロースメンブレンを通して培養液が直下の観測台(17µm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。

(仮説1)「捕食回避説」(Corno and Jurgens, 2006)・・・捕食者のテトラヒメナと共に培養すると、同様に、細胞の長さが通常の4~5倍にも伸長し、細胞伸長(フィラメント形成)を示す現象が見られる。よって、テトラヒメナの細胞だけ除去した培養液をマイクロ流路長期培養系に流せば、テトラヒメナ分泌の化学物質がカイロモンとなり、大腸菌が細胞を伸長させ、食われにくくする誘導防衛が発揮されるデータを取れる。

(仮説2)「低密度良好説」(Hahn et al, 1999)・・・大腸菌の連続培養系(ケモスタット)で培養液置換率を上げてやると、集団中の20%~50%もがフィラメント形成(細胞は2倍くらいに伸長する)し始める傾向があるが、培養液置換率をあげると栄養条件が良好になるようだ。よって、マイクロ流路長期培養系で細胞伸長のデータを取る。

(仮説3)「環境ストレス説」(多くの大腸菌研究者の考え)・・・貧栄養条件や温度上昇などストレス環境に置くと、容易に4~5倍の伸長を持つフィラメント形成が生起される報告が多い。マイクロ流路長期培養系でストレス環境下でのデータを取る。

4. 研究成果

捕食者テトラヒメナのカイロモンがバクテリアの形状などの表現型に及ぼす影響を調べるための1細胞計測系を構築した。当初

の計画では、ガラス基板上に微細加工により作製したマイクロチャンバ中にバクテリアを閉じ込めることを計画していた。しかしこの方法では、細胞の増殖によりチャンバ中の細胞密度が上昇し、長時間の影響評価が難しいことから、増殖しすぎた細胞を自動的に取り除けるように工夫した1細胞計測系を構築した(特願2011-156767)。

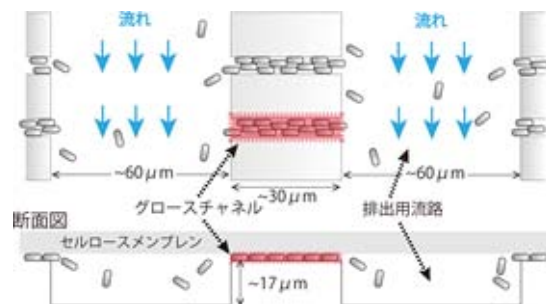


図3 マイクロ流路長期培養系での大腸菌の増加・排出の様子と細胞伸長の自動計測法

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(上図)。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(下図)データが格納される。

この計測系は、細胞の輪郭を計算して自動的に細胞伸長のデータを格納するものである。この計測系を、捕食者テトラヒメナ・被食者・大腸菌の混合培養系に応用したところ、テトラヒメナ用の二種類の標準的な培地1/10PYG、およびCDM最小培地中では、テトラヒメナが存在しなくても大腸菌が伸長してしまうことを明らかにした。これらの標準培地ではカイロモンの影響評価が難しいため、改変培地の作製に取り組み、1/10PYGに0.5% NaClを加えた培地では大腸菌の伸長を抑えられることを確認した。

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3件)

- ① Wakamoto, Y., Grosberg, A. Y., Kussell, E. (2012) Optimal lineage principle for age-structured populations. *Evolution*. 66: 115-134

DOI:10.1111/j.1558-5646.2011.01418.x

査読有

- ② 若本祐一 (2011) 確率的表現型変化によるがん細胞構成比の安定性. 実験医学 29: 2980-2981 査読無
- ③ Tomita, T., Sugawara, T., Wakamoto, Y. (2011) Multitude of morphological dynamics of giant multilamellar vesicles in regulated nonequilibrium environments. *Langmuir*. 27: 10106-10112 DOI: 10.1021/la2018456 査読有

〔学会発表〕 (計 4 件)

- ① Wakamoto, Y., Bacterial persistence based on epigenetically correlated stochastic gene expression, 第 85 回日本細菌学会総会, 2012 年 3 月 28 日, 長崎ブリックホール
- ② Wakamoto, Y., Natural selection based on stochastic gene expression and generality of phenotypic adaptation, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 15 日 パシフィコ横浜
- ③ Wakamoto, Y., Bacterial persistence based on epigenetically correlated gene expression, 5th International Conference on Analysis of Microbial Cells at the Single Cell Level, 2011 年 11 月 6 日, Carry-Le-Rouet (France)
- ④ Wakamoto, Y., Single-cell measurement toolbox for studying evolution of restriction-modification systems, The 11th HFSP Awardees Meeting, 2011 年 6 月 6 日, Montreal (Canada)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 細胞培養装置、細胞培養方法、および細胞培養観察方法

発明者: 若本祐一、橋本幹弘

権利者: 科学技術振興機構 (100%)

種類: 特許

番号: 特願 2011-156767

出願年月日: 2011 年 7 月 15 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 正和 (SHIMADA MASAKAZU)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号: 40178950

(2) 連携研究者

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

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