

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：12501
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K15151
研究課題名(和文) ラマン散乱分光計測を援用した多細胞性シアノバクテリアの分化決定ダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Analysis of a mechanism of heterocyst differentiation in a multicellular cyanobacterium by measuring Raman spectra

研究代表者
石原 潤一 (Ishihara, Jun-ichi)

千葉大学・真菌医学研究センター・特任助教

研究者番号：40732409
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： 研究申請者は、多細胞性シアノバクテリアでヘテロシストがほぼ10細胞おきに分化するメカニズムを解析した。まず栄養細胞やヘテロシストからラマンスペクトルを計測し、そこに含まれる20個以上のラマンバンドが4つの光合成タンパク質に帰属されることを示した。特に、フィコシアニンのラマンバンド強度は、分化する過程で徐々に減少することを見出した。さらに、このようなラマンバンドの変化は、隣接した複数の栄養細胞で見られ、いずれか1つの細胞が分化すると、残りの細胞のラマンバンド強度が可逆的に上昇することも分かった。つまり、光合成色素のラマンバンドの変化を通じて、ヘテロシストの位置が調節的に決定されることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の生体分子の濃度や局在を計測するとき、例えば蛍光タンパク質などで標識化する方法が主流である。しかし、この方法を用いた場合、その分子の機能が失われたり、また合成や分解を時間差なくトレースすることが難しい。本研究では、ラマンスペクトル計測がこれらの問題点を克服し、標的分子のダイナミクスを非標識かつリアルタイムで解析できることを示した。さらに、ラマンスペクトルには多数の分子に帰属されるラマンバンドが含まれるため、1回の計測でこれらの分子のダイナミクスを同時に得ることができる。したがって、研究代表者は、ラマンスペクトル解析が生命科学の研究に有効であり、次世代の手法になりうる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)： I studied about “how heterocyst cells are differentiated at almost every 10 cells along a filament in a multicellular cyanobacterium”. First, I measured Raman spectra from vegetative and heterocyst cells, and found that Raman bands were assigned to four kinds of photosynthesis proteins. Especially, the Raman bands assigned to phycocyanin were gradually decreased during the heterocyst differentiation. Second, such changes in the Raman band intensities were observed in adjacent several vegetative cells. When any one cell was selected to be differentiated, the Raman bands assigned to phycocyanin were reversely increased in other cells. That is, we showed that the cellular fate is determined thorough the cellular interaction by measuring the Raman bands assigned to the photosynthesis proteins.

研究分野：生物物理学

キーワード：ラマン散乱分光 ラマンスペクトル シアノバクテリア ヘテロシスト 光合成色素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者が本研究で使用した多細胞性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 (以下、*Anabaena*) は、栄養細胞とよばれる光合成に特化した細胞を一次元状に連ねる。*Anabaena* を窒素飢餓条件で培養すると、ヘテロシストとよばれる窒素固定に特化した細胞がほぼ十細胞おきに分化する。一般的に、光合成と窒素固定は両立する反応ではないので、ヘテロシストでは光合成を担う光化学系が分解されている。しかし、(1)どのように位置情報が形成されるのか、(2)光化学系の分解がどのタイミングで始まるのか(すなわち、栄養細胞の光合成のシステムが、どのタイミングで窒素固定のシステムに置き換わるのか)といったことは詳細に調べられていなかった。先行研究によれば、分化過程の初期に発現する遺伝子群が、複数の隣接する細胞でほぼ同時に誘導されるものの、細胞間相互作用を通じて、最終的に分化する細胞は一つだけ不可逆的に決定される。しかし、これらの遺伝子の発現は、ヘテロシストの形態変化(肥大化)や窒素固定の引き金になるものの、光化学系の分解に直接関与しない。そのため、光化学系の分解は、ヘテロシストの位置情報が形成されるまでの可逆的な分化過程で引き起こされる可能性も残る。いまいちど、「ヘテロシストの代謝的な変化は、不可逆的に分化した後に引き起こされる」という従来の考え方を見直し、個々の細胞レベルの代謝的变化とフィラメントレベルの位置情報の形成の繋がりを検証する必要がある。

一般に、光合成を担うタンパク質は標識化が難しく、その細胞内濃度や局在を解析する方法はほとんど存在しなかった。そのため、光化学系の分解が高精度にトレースされず、分化の可逆的な(もしくは不可逆的な)段階で起こるのか判断され難かった。したがって、研究代表者は、新規に光合成タンパク質のダイナミクスを計測する手法を構築するところから始めなければならなかった。

2. 研究の目的

ヘテロシスト分化する細胞はどのように選ばれるのか、また分化する過程で光化学系の分解はどのように起こるのかを明らかにする。そのため、光合成タンパク質の発現や分解を非標識で計測する手法を確立するところから始める。最終的に、分化する過程で光合成タンパク質の量がどのように変化するかを一細胞ずつタイムラプス解析し、細胞の運命決定と光化学系の変化(代謝機能の変化)の連関を明らかにする。

3. 研究の方法

研究代表者は、この研究計画が実施される以前に、785 nm の励起レーザーを使用することで、栄養細胞やヘテロシストから 25 個の共鳴ラマンバンドを含むラマンスペクトルを得ていた。他の励起波長のレーザーも試したが、785 nm の励起レーザーにより最も多い共鳴ラマンバンドを得ることができた。なお、ヘテロシストは栄養細胞よりも顕著に肥大化するため、明視野画像でそれぞれの細胞を容易に区別することができる。

本研究計画では、まず、この 25 個のラマンバンドがどのような分子の挙動に帰属されるのかを明らかにする。そこで、候補となりうる生体分子を抽出し、また市販の分子を購入することで、それらのラマンスペクトルを個別に計測し、細胞由来の共鳴ラマンバンドと対応付ける。そのうえで、栄養細胞とヘテロシストで振幅(強度)が異なるラマンバンドを見つけ出し、それを分化マーカーとする。

次に、独自に開発した *Anabaena* の微小培養チャンバーを援用し、顕微鏡下で長期培養およびタイムラプス観察をしながら、狙ったタイミングでラマンスペクトルを計測できる実験系を構築する。これにより、*Anabaena* の個々の細胞の生長や分化といった形態観察をしながら、そのときの生体分子の濃度や局在変化を、ラマンバンドの変化としてリアルタイムで解析することが可能となる。多くのフィラメントを計測対象とし、各細胞から任意の時間おきにラマンスペクトルを計測することを目指す。

最終的に、栄養細胞からヘテロシストが分化する過程を遡ることで、分化マーカーのラマンバンド強度がどのように変化するかを解析する。また、分化した細胞の近隣の細胞にも注目し、標的のほかの細胞が分化していく過程で、この近隣細胞のラマンバンド強度がどのように変化するかを網羅的に解析する。これにより、新しく分化する細胞が、両側を挟む既存のヘテロシストの中間領域に、一細胞だけ選ばれるメカニズムを解析することができる。

4. 研究成果

まず、細胞由来のラマンスペクトルから得られた 25 個の共鳴ラマンバンドが、クロロフィル a、カロテン、フィコシアニン、アロフィコシアニンの 4 つの光合成タンパク質に帰属されることを明らかにした。栄養細胞とヘテロシストのラマンスペクトルを比較すると、共鳴ラマンバンドが見られた波長域はほとんど変化しないことが分かった。さらに、クロロフィル a やカロテンに帰属されたラマンバンドの強度は、栄養細胞とヘテロシストの間で有意差がなかったが、フィコシアニンやアロフィコシアニンのラマンバンドの強度は、ヘテロシストで有意に低下することが分かった。フィコシアニンとアロフィコシアニンは、光化学系のフィコビリソームを構成するため、これらのラマンバンド強度に注目することで、目的としていた光化学系の量的な変化を解析することができる。特に、フィコシアニンに帰属される 1629 cm^{-1} のラマンバンド強度が、フィコビリソームに帰属されたラマンバンドの中で最も大きいため、このラマンバンド

を分化マーカーとして使用することに決定した。

次に、微小培養チャンバーに *Anabaena* を閉じ込め、液体培地を灌流させながらラマンスペクトルを計測した。このときの細胞分裂の時間や生長の様子は、既存の手法で用いられている方法（例えば、寒天培地での静置培養）と変わらないことを確認した。また、細胞にとってストレスの少ないレーザー強度や焦点の大きさなどを探索し、レーザー照射が細胞の生長や運命決定に影響しないことも確認した。そのうえで、*Anabaena* を窒素飢餓条件下で培養しながら、一細胞ずつラマンスペクトルを計測した。その結果、 1629 cm^{-1} のラマンバンド強度は、ヘテロシト間で差がないものの、栄養細胞間で有意な差が確認された。これは、栄養細胞の中に分化途中の細胞が含まれていたためと予想された。一般に、細胞の肥大化が始まった段階から不可逆的な分化過程と見なされるが、 1629 cm^{-1} のラマンバンド強度が低下した栄養細胞は肥大化していなかった。つまり、光化学系Ⅱの分解は、可逆的な分化過程（分化の準備に入ったものの、必ず分化するか決定されていない段階）から始まることを示唆しており、先行研究で報告されていたよりも早い分化段階から始まることがわかった。このような 1629 cm^{-1} のラマンバンド強度が低下した細胞は、既存のヘテロシトから数細胞離れたところに確認された。面白いことに、一細胞だけ出現することもあれば、数細胞が並んで出現することもあった。

そこで、肥大化せずに 1629 cm^{-1} のラマンバンド強度が低下した細胞に注目し、予後にどのような運命を辿るのかタイムラプス解析を行った。その結果、これらの細胞は、のちにヘテロシトに分化する細胞か、もしくは再び 1629 cm^{-1} のラマンバンド強度が増加し、分化せずに分裂する細胞のいずれかに二分されることが分かった。前者の細胞の場合、 1629 cm^{-1} のラマンバンド強度と細胞の大きさに相関関係があることが分かった。つまり、 1629 cm^{-1} のラマンバンド強度を解析することで、その細胞がどの程度の分化段階にあるかを推測することができる。一方、このような細胞はすべて分化するわけではなく、可逆的に 1629 cm^{-1} のラマンバンド強度が上昇し、後に分裂する細胞も確認された。このような現象は、 1629 cm^{-1} のラマンバンド強度が低下した細胞が複数個にわたって隣接する場合に見受けられ、この中のいずれかの細胞が分化すると、他の細胞は分裂することが分かった。つまり、分化する細胞の位置情報は、細胞間相互作用によって調節的に決定されており、分化した細胞から窒素化合物が供給されることで、それをもとにフィコシアニンやアロフィコシアニンが合成され、 1629 cm^{-1} のラマンバンド強度が上昇し、細胞が分裂すると推察される。

以上の研究課程により、研究代表者は、光化学系Ⅱを構成する光合成タンパク質の分解や合成を、ラマン散乱分光により高精度で計測することに成功した。それにより、光化学系Ⅱの分解が、可逆的な分化段階から始まっていることを明らかにし、従来の予想より早い分化段階から光化学系Ⅱの分解が始まることを新たに示した。特に、この光化学系Ⅱの分解は可逆的であり、周囲の細胞の運命決定を受けて、再び光化学系Ⅱが合成されることを明らかにした。この結果を受けて、「ヘテロシト分化する細胞がどのように一細胞だけ選ばれるのか」という問題提起に対し、光化学系Ⅱのタンパク質の濃度変化を一細胞ごとにタイムラプス解析することで、「分化細胞は複数の細胞間相互作用によって調節的に決定される」と結論付けた。

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 1件）

1. 著者名 Mohammad Vahed, Jun-ichi Ishihara, Hiroki Takahashi	4. 巻 14(8): e0220207
2. 論文標題 Dipartite: A tool for detecting bipartite motifs by considering base interdependencies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0220207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Jun-ichi Ishihara, Tomohiro Mekubo, Chikako Kusaka, Suguru Kondou, Naotake Ogasawara, Taku Oshima, Hiroki Takahashi
2. 発表標題 Mathematical Analysis of Copper Efflux system in Escherichia coli
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原潤一、高根沢聡太、岩崎秀雄、盛田伸一
2. 発表標題 Raman Microscopic Analysis of Differentiation Process of Multi-Cellular Cyanobacterium
3. 学会等名 日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 盛田伸一、石原潤一
2. 発表標題 Discussion about Pretreatments of Bio-Raman Spectra
3. 学会等名 日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----