

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380044

研究課題名(和文) バクテリアのコロニーを作らない変異株を用いたコロニー形成の機構解析

研究課題名(英文) GENETIC STUDY ON BACTERIAL COLONY FORMATION USING A COLONIZATION-DEFECTIVE MUTANT

研究代表者

正木 春彦 (MASAKI, HARUHIKO)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：50134515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝資源の宝庫であるバクテリアの大半はコロニーとして分離培養できない。その障壁の原因を探るため、大腸菌のコロニー形成不全変異株を分離し、変異株と原因遺伝子の特徴を調べようとした。再現性よく優先的に得られたのは不飽和脂肪酸合成の欠損株だった。この変異体はオレイン酸の供給で生育するが、供給が不十分だと液体培養に比べ固体培養が強く抑制され、コロニー頻度が落ちる。野生株でも脂肪酸合成を遺伝的あるいは化学的に抑制することによりコロニー頻度が落ちた。また飢餓状態の環境ではおそらく脂肪酸欠乏に陥り、コロニー頻度が落ちることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Colony formation is a basic method for bacterial isolation and counting. But most natural live bacteria cannot be cultured due to low colony formation. Obviously being alive does not mean being able to form colonies, however, the difference is little understood in terms of gene expression. To gain a genetic insight into colony formation, we isolated a colonization-defective Escherichia coli mutant. The mutant was unable to synthesize unsaturated fatty acids. This mutant requires oleic acid for growth, but with a limited supply of oleic acid, its growth on solid medium was more sensitively and seriously impaired than in liquid medium. Enzymatical inhibition of fatty acid synthesis by cerulenin also impaired growth more seriously in solid cultures than liquid cultures of both wild-type E. coli and Bacillus subtilis. The depletion of fatty acids in the environment is probably one of the causes of low colony formation, which can be improved by fatty acid supplementation.

研究分野：農芸化学、微生物学、生化学

キーワード：バクテリア 大腸菌 温度感受性変異 コロニー 増殖 固体培養 液体培養 不飽和脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

(1) 歴史的考察

天然標品を寒天などの固体培地に広げてコロニーを形成させ菌を分離・培養する純粋培養法を Koch が確立して以来、コロニー分離は微生物研究の基礎である。バクテリアはコロニー形成能をもって事後的に生菌数が定義され、特に実験微生物学では生きていることとコロニー形成能があることは同一視されてきた。公衆衛生や食品微生物でも微生物はコロニーで検出される。

一方、土壌や海水などでは、顕微鏡で観察される細菌様の粒子数に比べて、生じるコロニー数が何桁も少ないことが以前より指摘されていたが、Kogure らが direct count of viable bacterial cells (DVC) を提唱して新局面が開けた(1979)。海水に微量の酵母エキスと DNA 合成阻害剤を加えると、細胞分裂能のある細胞は細長い細胞を生じる。固定後、顕微鏡でこれを計数して分裂能をもっていた細胞とみなす。環境サンプルでは一般にこの DVC がコロニー形成能よりはるかに多く、生きている菌の一部しかコロニーを作れないことが判った。

ついで Colwell ら(1982, 1984)は、大腸菌やコレラ菌を低温飢餓に曝すと、日数とともに DVC に比べてコロニー形成能 (CFU) が大きく減少していく viable but non-culturable (VBNC) 状態に陥ることを示した。大腸菌のような培養の容易なバクテリアでもコロニー形成能の低い生きた状態になることを実演した点で重要であり、自然界のバクテリアのモデルと考えられている。コロニーを形成せず分離できていない細胞が本当に VBNC 状態なのか検証はできないが、VBNC 概念は拡張され、自然界のバクテリアは VBNC 状態にあると理解されることが多い。

(2) 本研究の前提となる活動

コロニー形成とは何か遺伝学的に明らかにするため、コロニー形成能を欠く大腸菌変異体の取得を試みた。そのためにはコロニーを作る細胞も作らない細胞も数えられるコロニー法以外の計数法が必要である。我々は海水からバクテリアを分離する際、液体培地でコロニーより 10 倍多くの菌が分離できる経験

をもち()、土壌でも同様の経験をもつ。従って液体培養を基本とすればコロニー形成を相対化できる。そこで、「液体培養できるが固体培地にコロニーを形成しない変異株」を分離しようと考えた。まずトランスポゾン変異体の集団を液体培地で展開し、寒天培地でコロニーを作らない株をレプリカ法で得ようとしたが、液体培地を濁らせた株はすべてコロニーを形成した。目的遺伝子が必須遺伝子のためこの方法では取れず、leaky 変異を想定するべきだと考えた。ある遺伝子の働きで天然の細菌のように固体培養と液体培養の生えやすさに 10 倍の差が出るならば()、そこが変異するとコロニー形成頻度も落ちるであろう。このようなコロニー形成頻度に関わる変異は定性的なレプリカ法では得ることが難しい。

なお、液体培地限界希釈培養法は、通常少数の試験管を用いる最確法 (most-probable number 法、MPN 法) と同じ原理なので、以降これを MPN 法、これで得た菌数を MPN と呼ぶ。これに対し、固体培地上のコロニー数から得られる菌数を CFU (colony-forming unit) と呼ぶ。

2. 研究の目的

(1) コロニー不全大腸菌変異株の分離に基づくコロニー形成の再検討(研究代表者正木):

自然状態で多くのバクテリアが生きていてコロニーを作らない現象の生物学的実体に迫るには「コロニー形成とは生きている以上の何なのか」を遺伝学的に明らかにしなければならない。そのためにコロニー形成できない変異体を得る必要がある。我々は、遺伝学が使える大腸菌を用いた。大腸菌のコロニー形成率は常に高いと思われがちだが野生株でもストレスに曝すとコロニー形成率は低下する。さて、今までのすべての大腸菌変異体はコロニーとして分離された。どうやってコロニーを作れない変異株を得るか? 本研究では固体培養と液体培養の差を用い、どの遺伝子が変異すると液体培地で増えるのにコロニーを作れなくなるのか、を明らかにする。

しかし、液体培養に比べて「コロニー形成頻度の低下した株」をスクリーニングする必要があり、母集団の一株ずつの頻度を見てゆ

かなければならないので、大腸菌の温度感受性変異 (ts) 株コレクションからの分離を試みる。これは国立遺伝学研究所の故広田幸敬教授らがニトロソグアニジン処理で作成したもので、西村昭子博士より譲り受けた ()。ts 株は 30 でコロニーを作るが例えば 41 ではコロニーを作らない株で、生育にとって重要な遺伝子産物が高温失活するため増殖できないと考える。ts コレクションは 30 で正常に生育し、41 ではコロニー形成できないが、液体培養できるか否かは調べられていない。つまり 41 で液体培養できるクローンがあれば、41 で「液体培養できるがコロニーを作れない」変異株を得たことになる。1200 株を調べると、ほぼ重要な遺伝子をカバーされるとされる。

目的の ts 株が得られたら、野生株から当該遺伝子だけ変異した株を作製し、その表現型を正確に分析してコロニー形成に関する知見を得る。しかし、自然界のバクテリアは変異株ではなく、我々の最終的な興味も野生株にある。研究の後半ではコロニー不全変異体の性質をもとに、野生株がどういう状態になるとコロニー形成能を落とすのか明らかにし、さらに大腸菌に限らない天然のバクテリアのコロニー形成に関する性質をどう説明し応用するかを展開する。

(2) コロニー形成能に及ぼす培養環境と遺伝背景の影響の解析 (研究分担者: 重松):

我々の開発した MPN 法の原理に基づく 960 ウェルマイクロプレートを用いる液体培地希釈法 () を基準として、培養環境と遺伝背景の影響を解析する。培養環境では、固化剤の種類と濃度を検討し、遺伝要素としては低酸素濃度下での電子伝達系の cytochrome *bd-1* terminal oxidase 遺伝子 (subunit II) 欠損変異の影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株・プラスミドと培地 (説明に必要な点のみ記す)

Escherichia coli K-12 PA3092 : F⁺; ts コレクションの親株

Escherichia coli K-12 MG1655 : F⁻; 大腸菌の野生株 (標準株)

Escherichia coli K-12 BW25113 : 重松標準株
Escherichia coli JW0723 : BW25113 の Δ *cydB* (cyt *bd-1* ox subunit II) を *kan* で置換 *Bacillus subtilis* 168 枯草菌の野生株 (標準株)

L-broth : 1% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 0.5% NaCl。

M9 培地とう最少培地に 0.5% カザミノ酸と 0.4% D-glucose を加えた培地を M9CAGIc と呼ぶ。

LB 培地 : 固化剤/呼吸鎖変異の影響を調べた培地の固化では、国産化学の寒天末、Difco の Bacto Agar, タカラバイオの AgaroseL03 を使用。L-broth を含んだ各固化平板を L-agar, L-agarose, M9CAGIc-agarose 等と呼ぶ (正木)。重松は寒天 (和光) Difco Agar Noble、アガロース S (和光)、ゲランガム (和光) を使用。

(2) コロニー形成頻度の低下した ts 遺伝子のスクリーニング

スクリーニング (1 回目) : 1432 個のコレクション株を 96 穴プレートの L-broth に接種し、30 で培養後各液を 2 段階希釈し、それぞれ 2 μ L を L-agar と L-broth に接種し 41 で培養。L-agar にコロニーを作らず L-broth に濁りを生じた株に注目し、希釈と 41 における固体・液体培養の比較を繰り返し、コロニー形成頻度と L-broth 中増殖に大差のある 1 株を得た。

マッピング : 固・液培養の頻度の違いを生じる責任 ts 遺伝子のマッピングは、大腸菌の全 ORF の接合による相補性試験で行った ()。30 培養した ts 株と 株を混ぜ、プラスミド上の ORF を接合伝達させると、ts 性が相補された時だけ 41 でコロニーを生じる。41 でのコロニー形成を可能にした野生型 ORF を *fabB* と同定した。

fabB-1 変異体の性質 : 得られた ts 株の *fabB* 遺伝子の配列を決定すると、FabB に Ala \rightarrow Val 変異を生じていた。*fabB* は、脂肪酸合成で脱炭酸縮合を行う 3-oxoacyl-ACP synthase I (FabB) をコードし不飽和脂肪酸の合成に必須である。変異遺伝子を *fabB-1*、元の株を *fabB-1* 株とした。

コロニー形成頻度の低下した ts 株のスクリーニング、2 回目 : 得られたのが *fabB* 1

個というのは再現性/必然性に疑問を残す。*fabB-1* 株を検討して 41 は選択条件として厳しすぎたことが判り、同じ *ts* コレクションの別株から、41 と 39 の 2 選択条件で 2 回目のスクリーニングを丁寧な希釈段階設定で行った。30 で培養した 1167 株から 1 次選択で 51 株、2 次選択で 13 株が候補として残った。接合による *ts* 変異の相補性試験を行い、*ts* 性の責任遺伝子が 7 株となり、これには 3 株の *fabB* と 1 株の *fabA* が含まれていた。単コロニー分離して選択を繰り返し、4 株が 39 でのコロニー形成と液体培養の大きな差を再現性よく示した。ここに 1 株の *fabB* 変異体が含まれ、*fabB-2* と呼ぶ。これは *fabB-1* と別の Gly→Glu となる変異が入っていた。

以上のようにさらに 3 つの *fabB* の *ts* 変異が得られたことから、このスクリーニングで *fabB* が優先的に取得されることが確認された。また *fabB* よりコロニー形成を抑制する程度は低いが、*fabA* の *ts* 遺伝子も分離され、脂肪酸合成欠損一般がこのような性質を示す可能性が考えられた。

4. 研究成果

(1) *fabB* 遺伝子の変異株の性質：

大腸菌野生株由来の欠失変異株の作製：*ts* 株の染色体には多数の不特定変異が入っているので、オレイン酸の存在下で野生株から *fabB* だけをカナマイシン耐性遺伝子に相同組換えで置換した *fabB* 株欠失株を作製した。*fabB* の 2 つの *ts* 変異体と欠失変異体について、固体培地でのコロニー形成能 (CFU) と液体培地での増殖度 (MPN) を比較した。*fabB-1* 株と *fabB-2* 株を 30 で培養すると CFU と MPN に差はなく、親株 PA3092 と同差がないが、39 では MPN の大きな低下がないのに CFU が大きく低下し、39 で「コロニーを作りにくい」表現型を示した。さらに *fabB* 欠失株では、オレイン酸添加で液体・固体培養とも良く生育するが、不添加ではコロニーは生じないのに液体培養である程度増殖する。欠失変異では *ts* 変異より生育不良の程度が強いが、「全くコロニーを作らない」表現型が得られた。

L-broth 固体培地と液体培地における *fabB* 欠失株の増殖：*fabB* 欠失株でコロニーが見えなくてもマイクロコロニーを作っている可能性

は残る。コロニーが観察されるか否かにかかわらず、固体・液体培地での増殖度を定量化するため、オレイン酸中で前培養、洗菌した一定量の細胞を、一定時間、固体培地、液体培地でインキュベートしたのち回収し、十分量のオレイン酸を含むプレートでコロニーを作らせて増殖度を比較した。その結果、L-agarose でほとんど増えないのに L-broth では脂肪酸供給なしで 10^5 cells/mL 以上に増えた。これは、不飽和脂肪酸合成停止が固体培地での増殖で液体培地より深刻な抑制を招くことを示す。しかし脂肪酸合成しないのになぜ L-broth ではそこまで増殖するのか？酵母エキスに微量の脂肪酸が含まれ L-broth では消費できるのに、L-agarose では持ち込みの脂肪酸量を利用できないのではないかと推定した。

合成培地における *fabB* 欠失株の増殖の不飽和脂肪酸依存性：そこで、L-broth の代わりに酵母エキスを含まない合成培地 M9CAGlc を用い、M9CAGlc-agarose 及び M9CAGlc 液体培地に各種濃度オレイン酸を加えて効果を比較した。M9CAGlc 液体培地ではオレイン酸 0.075~20 $\mu\text{g/mL}$ の 3 濃度条件では何れも増殖し、とくに初期は増殖速度がほとんど濃度に影響しない。それに対し固体培地では非常に強い増殖抑制がかかる。0.075 $\mu\text{g/mL}$ オレイン酸の液体培地では 10^6 cells/mL 以上まで伸びるのに固体培地では全く増殖しない。以上から、*fabB* 欠失株に微量の不飽和脂肪酸を与えると、液体培地に比べて固体培地での増殖が強く抑制され、コロニー頻度の低下を招くと理解された。類似の現象は *fabA* 欠失株でも観察された。

(2) 大腸菌野生株における固体・液体培養の比較と不飽和脂肪酸添加効果

不飽和脂肪酸合成不全株は、コロニーを生じにくいことが判ったが、最終目標は自然のバクテリアの説明である。しかし大腸菌野生株は通常の生育条件で脂肪酸要求性を示さずオレイン酸添加効果もない。対数期の大腸菌では脂肪酸合成能力が十分高いためであろう。そこで野生株でも、脂肪酸合成が抑制されるとコロニー形成に影響が現れるかどうかを調べた。

fabB 遺伝子をアラビノースによる発現制御の可能な mini F プラスミドに挿入したものを *fabB* 欠失株に導入し、*fabB* 遺伝子のみ制御できる株を作製した。高濃度のアラビノース添加で CPU と MPN に有意差がないが、アラビノース濃度を下げると MPN に比べて CFU が低下していく。野生型でも、不飽和脂肪酸合成量が少ないとコロニー形成能が落ちうることを意味する。

セルレニンによる FabB の阻害に伴うコロニー形成能の低下：セルレニンは大腸菌の FabB 活性を阻害する抗生物質であるが、大腸菌以外でも広く不飽和脂肪酸合成を阻害する。これを野生株に半致死量与えると CFU が MPN の 1/100 以下に低下する。これから、不飽和脂肪酸合成酵素の阻害でも、CFU/MPN 比が大きく落ちることが判明した。さらに、枯草菌は大腸菌よりも感受性が高く、かつ広い範囲で CFU が MPN より低くなりある条件でコロニー形成だけが抑えられた。これは不飽和脂肪酸の不足が枯草菌でもコロニー形成の制限要素となることを示す。

(3) 研究代表者（正木）の本研究の総括：大腸菌をモデルとして、飢餓ストレス下でのコロニー形成頻度の低さの原因の一部が脂肪酸の供給不足にあり、脂肪酸欠乏条件では液体培養よりも固体培養の方が強い増殖抑制を受ける現象を発見した。そして、大腸菌だけでなく脂肪酸の添加が多くのバクテリアのコロニー形成頻度の上昇に寄与する可能性を示した。脂肪酸添加効果の最適条件の検討は今後行うが、コロニー形成能への効果は最終的に大きくなる可能性がある。

(4) 研究分担者（重松）の研究成果：

固化剤の種類と濃度のコロニー形成への影響：対数期（培養 2h）の BW25113 株の MPN を 100%とした、寒天と Agar Noble を固化剤に使ったコロニー形成率は、1.5%濃度の時それぞれ 23%, 25%なのに対し 0.5%濃度の時、87%, 78%と、固化剤濃度の低下に従い CFU が上昇した。この傾向は定常期（12h）でも同様であった。アガロース S は対数期の細胞で差はなかったが定常期の細胞では濃度低下に伴い CFU が上昇した。寒天系固化剤にはコロニー形成を阻害

する要因が含まれていることが示唆された。ゲランガムにはそのような濃度依存の傾向は見られなかったが、MPN に比較した CFU は寒天 3 種と同等かそれ以下だった。

呼吸鎖末端酸化酵素欠損の影響：基準株の BW25113 では、培養 2h（対数期）と 24h（定常期）いずれでも 0.5%の Agar Noble を用いると MPN の 90%以上のコロニー形成率を示した。それに対し JW0723 株 ($\Delta cydB$) は、濁度で見た生育が親株より遅いがそれとは別に、MPN に対する CFU が 40-50%と低く、呼吸鎖複合体 IV の不完全さにより、液体培養に比べたコロニー形成能も低くなることが推定された。

< 引用文献 >

- Shigematsu, T., Ueno, S., Tsuchiya, Y., Hayashi, M., Okonogi, H., Masaki, H. and Fujii, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 3093-3097 (2007).
- Shigematsu, T., Hayashi, M., Kikuchi, I., Ueno, S., Masaki, H. and Fujii, T. *FEMS Microbiol. Lett.* 293, 240-247 (2009).
- Isono, K., Krauss, J. and Hirota, Y. *Mol. Gen. Genet.* 149, 297-302 (1976).
- Saka, K., *et al.* *DNA Res.* 12, 63-68 (2005).

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 4 件）

- Shigematsu, M., Ogawa, T., Tanaka, W., Takahashi, K., Kitamoto, H.K., Hidaka, M. & Masaki, H. “Evidence for DNA cleavage caused by a transfer-tRNA-targeting toxin.” *PLoS ONE*, 8, e75512, 1-9, 2013.
- 正木春彦 “コロニー形成の遺伝学” *IFO Res. Commun.* 28, 15-20, 2014.
- Nanba, M., Nomura, K., Nasuhara, Y., Hayashi, M., Kido, M., Hayashi, M., Iguchi, A., Shigematsu, T., Hirayama, M., Ueno, S. & Fujii, T. “Importance of cell-damage causing growth delay for high-pressure inactivation of

Saccharomyces cerevisiae” *High Pre. Res.* 33, 299-307, 2013.

Nomura, K., Iwahashi, H., Iguchi, A. & Shigematsu, T. “Barosensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* is closely associated with a deletion of the *COX1* gene” *J. Food Sci.* 80, M1051-M1059, 2015.

[学会発表](計 15 件)

正木春彦「バクテリアのコロニー形成能と増殖能を再考」第11回微生物研究会 (2012 東京)

三井智玄, 納庄一樹, 高丸玲子, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦「大腸菌のコロニー形成能を失った変異株の性質」日本農芸化学会2013年度大会 (3/28/2013 仙台)

高丸玲子, 森本亜希子, 西尾優宏, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦「大腸菌のVBNC化を緩和する遺伝子のスクリーニング」日本農芸化学会2014年度大会(3/29/2014 東京)

納庄一樹, 三井智玄, 池端佑仁, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦「固体培地での生育能の低下した大腸菌変異株の分析」日本農芸化学会2014年度大会 (3/29/2014 東京)

納庄一樹, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦「コロニーを形成しにくい大腸菌変異株の分析」日本農芸化学会2014年度関東支部大会 (10/18/2014 埼玉)

正木春彦「微生物の多様性と生き様を考える」第41回 化学と生物シンポジウム「生き物の仕組みを化学する楽しさ」 (3/26/2015 岡山)

納庄一樹, 三井智玄, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦「大腸菌における脂肪酸供給不全とコロニー形成能の関係」日本農芸化学会2015年度大会 (3/29/2015 岡山)

西尾優宏, 高丸玲子, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦「VBNC 化を緩和する遺伝子の解析」日本農芸化学会2015年度大会 (3/29/2015 岡山)

福嶋凡子, 高丸玲子, 西尾優宏, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦「大腸菌の VBNC 化を緩和する 2 つの遺伝子の共働効果」日本農芸化学会 2015 年度大会 (3/29/2015 岡山)

納庄一樹, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦「コロニー形成にとって重要な遺伝子機

能」日本農芸化学会2015年度関東支部大会 (9/26/2015 東京)

納庄一樹, 三井智玄, 池端佑仁, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦「コロニー形成における脂肪酸合成の重要性」日本微生物生態学会第30回大会(10/19/2015 土浦)

正木春彦「大腸菌のコロニー形成能における遺伝子関与」日本微生物生態学会第30回大会

福嶋凡子, 西尾優宏, 高丸玲子, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦「低温飢餓条件下でのコロニー形成能の低下を抑える大腸菌遺伝子の解析」日本農芸化学会 2016 年度大会 (3/30/2016 札幌)

伊藤俊輔, 佐藤寛美, 古寺和人, 中島加奈子, 木戸みゆ紀, 林真由美, 井口晃徳, 重松亨「*Escherichia coli* のコロニー形成能に及ぼす培養条件および遺伝子欠損の影響」新潟県生物教育研究会第 50 回新津大会 (12/7/2014 新潟薬科大学)

伊藤俊輔, 佐藤寛美, 古寺和人, 中島加奈子, 林真由美, 野村一樹, 山口利男, 井口晃徳, 重松亨「固化剤濃度および呼吸機能関連遺伝子が大腸菌のコロニー形成に及ぼす影響」日本農芸化学会 2016 年度大会 (3/30/2016 札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正木 春彦 (MASAKI, Haruhiko)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 5 0 1 3 4 5 1 5

(2) 研究分担者

重松 亨 (SHIGEMATSU, Toru)
新潟薬科大学・応用生命科学部・教授
研究者番号: 1 0 3 1 5 2 8 6