

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650156

研究課題名(和文)1細胞計測系を用いたシアノバクテリアにおける窒素固定と毒生産の表現型可塑性解析

研究課題名(英文)The analysis of phenotypic plasticity between the nitrogen fixation and the toxic production abilities in cyanobacteria using a single-cell device

研究代表者

大林 夏湖(OHBAYASHI, Kako)

東京大学・総合文化研究科・学術研究員

研究者番号：20448202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアは、共通祖先が獲得した原始的形質として窒素固定能と毒生産能をもつ。しかしDNA分子系統解析により多くの分類群で両機能が失われつつあることが明らかになってきた。この理由として、両機能を保持するコストが生じているという仮説を立てシアノバクテリアの遺伝的変異系統を用いて検証した。ネンジュモ目の野外系統株を用い一細胞培養計測系での細胞計測手法の確立、遺伝子組み換え体の作成、および培地中の栄養塩濃度と毒遺伝子発現量の関連について解析を行った。その結果、毒遺伝子発現量は、窒素制限下でもっとも多く発現し、リン制限下では実験経過時間とともに減少することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Cyanobacteria have both nitrogen fixation and toxin production abilities which are acquired by their ancestral species, and those abilities are thought to be primitive characteristics. However, according the phylogenetic analysis these abilities have been lost in many taxonomic groups of cyanobacteria. We hypothesized that there might be some kind of cost to maintain both abilities in a species. We analyzed this hypothesis using a cyanobacterial strain, *Cuspidothrix issatschenkoi* RM6 strain with non-nitrogen fixing and toxin (anatoxin-a) producing abilities. We measured cell size using a single-cell device and tried to make a genetic modified strain of RM6 and analyzed the amount of anatoxin-a gene expression under different nutrient conditions. Increased anatoxin-a gene expressions were observed under non nitrogen conditions, though these expressions were observed to decrease under non phosphate conditions.

研究分野：進化生態学

キーワード：シアノバクテリア 表現型可塑性 窒素固定能 毒生産能 シアノトキシン アナトキシン

1. 研究開始当初の背景

窒素固定生物は原核生物に広く分布し、シアノバクテリア(ラン藻類)では、共通祖先が獲得した原始的な形質と考えられているものの、多くの分類群で失われつつある。この理由として、窒素固定に関わるニトロゲナーゼは酸素に弱く、酸素発生型光合成を行うラン藻類にとって窒素固定能の維持が難しいことが挙げられる(Horne and Goldman, 1994)。ネンジュモ目のラン藻類では、窒素源がなくなると糸状体(トリコーム)を構成する細胞の一部が数日でヘテロサイト(窒素固定細胞)に分化し窒素固定を行う(図1)。

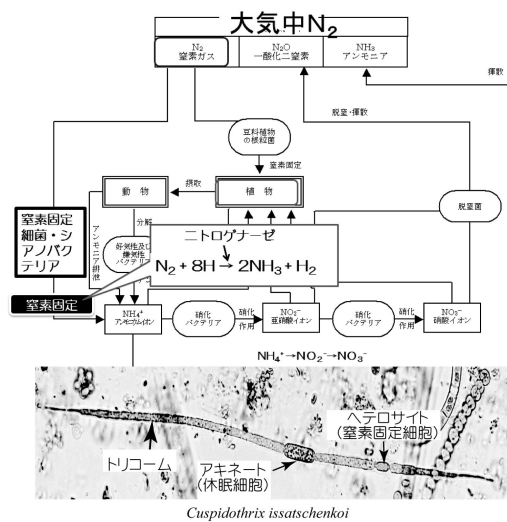


図1 上図:シアノバクテリアによる窒素固定の模式図  
下図:Cuspidothrix issatschenkoi 株頭顕微鏡写真

ヘテロサイトは光化学系 II がなく呼吸速度が極めて高い。このため、窒素源が十分にある環境下では、窒素固定能の発現は増殖の点から「コスト」となると考えられる。また、シアノバクテリアはシアノトキシンと呼ばれる肝臓毒・神経毒を生成する(Codd 1999)が、毒生産の機能については不明な点が多い。分子系統学的に祖先形質で毒生産能を獲得したと考えられるが、ネンジュモ目では多くが毒生産能を失いつつある。以上ふまえて下記の2仮説を立てた。

仮説 1: 窒素源が十分ある環境下では、ヘテロサイトの分化は「コスト」となるため、窒素固定能を失う方向へ進化する・窒素固定能維持コスト仮説

仮説 2: 毒生産には窒素源を必要とするため、枯渇環境下ではコストとなる・毒生産コスト説

国内・国外の研究動向としては、シアノバクテリア Anabaena 属でのヘテロサイト形成にかかわる遺伝子発現機構 (Ehira et al 2003, Asai et al 2009) やシアノトキシンの化学組成については知見があるが、表現型可塑性の

進化の観点からこれらを保持/放棄するプロセスに焦点を合わせた研究は皆無である。対象とする *C. issatschenkoi* は窒素固定能および毒生産能に種内変異がみられ、窒素固定能と毒生産能を有する株は海外で1例報告があるものの、その両機能の欠失株はこれまで報告がない。また、申請者らはアジアで初めて本種の有毒株の存在を報告しており (Hodoki, Ohbayashi et al 2013) 遺伝的変異系統株を培養している。

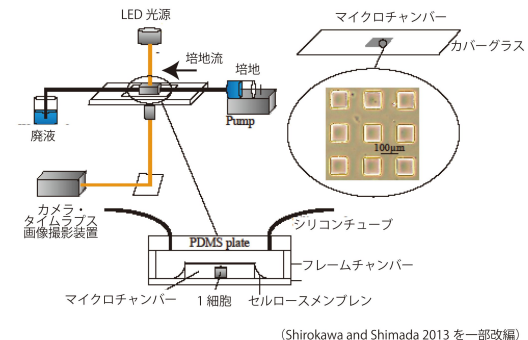
2. 研究の目的

環境中の窒素濃度と窒素固定能/毒生産能に着目し、ネンジュモ目 *Cuspidothrix issatschenkoi* が環境変化に対して示すトレードオフのパターンがどのように表現型可塑性と多様な進化をもたらすのかについて1細胞計測マイクロ流路培養系を用い解析を行う。まず毒遺伝子の発現を定量化するための野外株遺伝子形質転換体作成を試み、また栄養塩濃度を変更したときの毒遺伝子発現量の定量を行う。

3. 研究の方法

(1) マイクロ流路を用いた1細胞培養系統の条件検討

*C. issatschenkoi* RM6 株1細胞を用い、マイクロ流路装置の改変及び条件検討を試みる。(下図)



(Shirokawa and Shimada 2013 を一部改題)

(2) 毒遺伝子 (ato) 遺伝子発現定量化のための遺伝子組み換え体作成

*C. issatschenkoi* 毒遺伝子発現量の定量化のため、シアノトキシン-a およびホモシアノトキシン-a 合成に関与するポリケチドシンターゼ遺伝子(ato)に特異的な領域を使用し(Hodoki et al 2013)、ここに GFP 配列を組み込み、遺伝子発現を定量的に測定することを試みる。形質転換体の作成には、シアノバクテリア *Anabaena* 属 (Asai et al 2009) の方法を改変して行う。最終的に野外単離株から組み換え体 *C. issatschenkoi* 株を作成することを目標とする。

(3) 反応基準を測定する培地栄養塩濃度の検討と遺伝子発現量の定量。

既存のネンジュモ目での培養実験条件

(Ehira et al 2003, Hodoki et al 2013)及び培養株が単離された湖沼の栄養塩濃度を調査し、培地中のリン濃度および窒素濃度を変更したときの毒遺伝子の発現量を定量 PCR で計測する。

#### 4. 研究成果

##### (1) マイクロ流路を用いた 1 細胞培養計測系の条件検討

1 細胞培養系計測系を用い、*C. issatschenkoi* RM6 株(以下 RM6 株と明記)の寒天培地上での細胞伸長の様子を撮影し撮影条件検討を行った。シアノバクテリアの保持する捕集色素フィコビリソーム蛍光を用いることにより、細胞の増殖を止めるような染色剤を用いることなく、トリコーム(糸状体)の増殖過程を蛍光顕微鏡下で撮影することが可能であった。検討の結果、撮影した細胞については TRITC filter を使用することで細胞増殖の様子を撮影可能であり、レンズの倍率は 10 倍程度(Nikon Plan Fluor 10 X / 0.30 / 1.2 WD 15.2) が最適であった。(図 2)

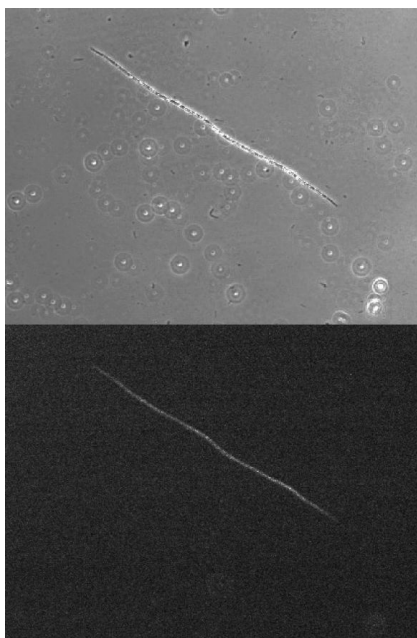


図 2 一細胞計測系を使用した RM6 株撮影条件の検討。上：明視野、下：Tritc filter (による撮影) 細胞全体)

##### (2) 毒遺伝子 (ato) 遺伝子発現定量化のための遺伝子組み換え体作成

###### 毒遺伝子プロモーター領域の探査

*C. issatschenkoi* の生理生態については未解明な点が多いため、近縁種の既知アナトキシン遺伝子配列領域のプライマーを用い、primer walking 法を用いた Universal GenomeWalkerTM2.0(クロンテック社)を使用し説明書にしたがって実験をすすめプロモーター遺伝子領域の推定を行なった。当該領

域と思われる部分が見つかったことから、この遺伝子配列をプロモーター領域と判断し、の実験に使用した。

###### 遺伝子組み換え体作成の試行

遺伝子組み換え体の作成には、シアノバクテリア *Anabaena* 属 (Asai et al 2009) の方法を改変して行った。Elhai & Wolk (1988) および Cai & Wolk (1990) の手法では、*Anabaena* 属の遺伝子操作手法として 3 種の親株を用いた接合によって形質転換を行う。これは、(1)接合に必要なプラスミドをもつ大腸菌、(2)カーゴプラスミド・ヘルパープラスミドを保持する大腸菌、および(3)形質転換されるシアノバクテリア(本研究では、RM6 株)を混ぜ合わせて形質転換を行う方法である(得平・佐藤 2001)。この手法によって野外系統株にプラスミドを組み込んで抗生物質耐性をもたせ、抗生物質入り寒天培地上で増殖したシアノバクテリアを形質転換体として選抜することが可能である。

この実験の前準備として、野外から単離した RM6 株を固体培地上(寒天培地)で培養できるかどうかについて既存の知見が存在しない。このことから、寒天培地の濃度を 2 段階に分け、上記 *Anabaena* 属で使用されている BactoAgar(Defco 社)で寒天培地を作成し、培養の可否を検討した。また培養に使用するフィルターの検討も行い、ニトロセルロースフィルターおよびポリカーボネートフィルター上での培養を行った。明条件 12 時間暗条件 12 時間温度 24 °C の恒温室で実験を行い、BactoAgar (Defco 社) 0.5 % および 0.3 % を作成し、それぞれ、100  $\mu$ L、300  $\mu$ L の RM6 培養株(プレ培養 14 日後)を播種した。実験開始後 10 日程度から目視で確認できる大増殖が見られ、特に 0.3 % の方が増殖密度が高かった(図 3)。

さらに 0.3 % パクトアガー寒天培地を用い、RM6 株が完全に死滅する抗生物質濃度を検討した。これは、先述のプラスミドを取り込んだシアノバクテリアは、プラスミドに組み込まれた抗生物質耐性を獲得するため、形質転換した細胞はこれら抗生物質入りの寒天培地上で増殖することが可能になる。このことからこれらを培養すれば、形質転換体を得ることが可能である。2 回、寒天培地中に含まれる抗生物質濃度検討の予備実験を行った後、カナマイシン 30  $\mu$ g/mL、ネオマイシン 40  $\mu$ g/mL、スペクチノマイシン 5  $\mu$ g/mL、ストレプトマイシン 10  $\mu$ g/mL を含む寒天培地で培養した。その結果、実験開始後 4 日後にはすべての細胞が溶解している様子が顕微鏡下で確認できた。このことから RM6 株の選抜には上記 4 種類の抗生物質濃度が適用可能であることがわかった。しかし、現在、上記のプラスミドを取り込んだシアノバク

テリア形質転換体の培養に時間がかかっており、試行錯誤を続けている最中である。実験室内で長期培養されている系統株とは異なり、野外系統株には細胞内に多くの制限酵素が存在していることから、これらが形質転換を妨げている可能性が否定できず、今後次世代シーケンサーを用いて遺伝子配列を明らかにしこれらの酵素を失活させて形質転換を行うことを検討中である。

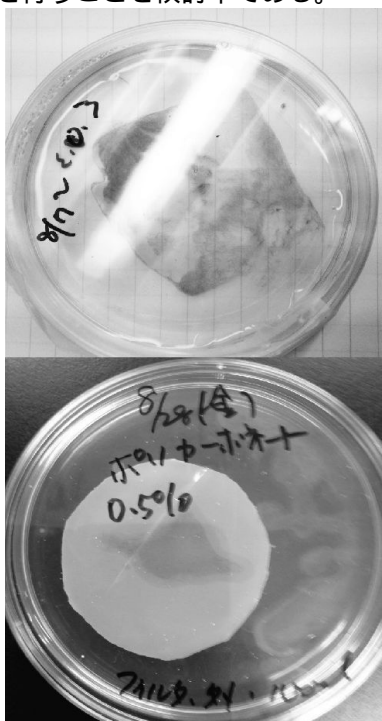


図3 寒天培地を用いたRM6株の培養実験。

上：接種後10日(0.3%寒天)  
下：接種後11日(0.5%寒天)

### (3) 反応基準を測定する培地栄養塩濃度の検討と遺伝子発現量の定量

栄養塩濃度の変更に伴うRM6株の毒遺伝子発現量を定量化するため、CT培地を使用して実験を行った。生物増殖に必要な窒素とリンに着目し、これら2種類を培地中から除いた培地を作成し、コントロール(通常培地)、リン制限培地、窒素制限培地を作成し各々3回の繰り返しで実験を行った。なお、栄養塩制限培地処理では培地中での細胞の浸透圧変化を避けるため、窒素やリン供給源として添加していた物質と化合していた塩を持つ代替試薬を入れることにより補いでは塩化ナトリウム、は塩化カルシウムと塩化カリウムを入れて実験に使用した。実験には300mLフラスコをもちい1度予備実験を行った後、下記の手順で実験を行った。すべてのフィルター洗浄作業には、CT培地を構成する物質のうち、窒素・リン物質をとりのぞき、代わりに塩化ナトリウム・塩化カルシウム・塩化カリウムをいれた培地を作成

して使用した。CT培地200mlで10日培養したRM6株を、減圧下でNuclepore(直径:47mm、pore size:2 $\mu$ m)に16mlろ過し液体培地上的懸濁態を捕集した。このフィルター上のRM6株細胞を、上記3条件のフラスコの中に入れ実験を開始した。実験開始後、24時間後、48時間後にサンプルを回収し、各時間ごとに直ちにRNA抽出を行った。RNAの抽出は、植物用RNA抽出キット(ISOSPIN PLANT RNA ニッポンジーン)を使用し、先に抽出バッファーを氷中1.5mlチューブに分注しておき、ここにフィルター上に捕集したサンプルを入れてペッスルですりつぶし、説明書にしたがって抽出作業を行った。抽出したRNAはNano dropを用いて濃度を測定し、定量PCR解析まで80で保存した。

毒遺伝子発現量(アナトキシン a)の定量には定量的PCRを使用した(Hodoki et al 2013)。この種の毒遺伝子クラスターに特異的なプライマーを使用した毒遺伝子発現の定量と、抽出効率(実際の細胞密度)を補正するため、シアノバクテリアに特異的な16SrRNAのプライマーを使用して(Hodoki et al., unpublished)定量PCRをおこなった。両定量とも、それぞれに特異的なプライマーとTaqManプローブを用いてCT法で解析を行った。反応液20 $\mu$ Lに、2 $\times$  One step RT-PCR buffer III 10.0 $\mu$ L, Rox reference Dye (50 X) 0.4 $\mu$ L, Takara Extaq HS (5U/ $\mu$ L) 0.4 $\mu$ L (Takara社)と、0.9 $\mu$ Mの各種プライマー、0.2 $\mu$ M TaqMan プローブおよびTotal RNA溶液を2 $\mu$ L、RNase Free dH<sub>2</sub>O 2.4 $\mu$ L 加え、ABI 7300 Real Time PCR instrument (Applied Biosystems社)により解析を行った。結果は比率に変換して示した。

その結果、コントロール培地では、培養48時間後の方が24時間後より毒遺伝子発現量が多くなったが、窒素制限の培地では、2日とも遺伝子量が高く、一方リン制限培地では、48時間後のほうが24時間後よりも低くなる傾向が見られた(図4)。

これはシアノバクテリアのシアノトキシンの毒遺伝子発現量に関する初めての知見である。これらの実験で、窒素制限状況下で、毒遺伝子は他の2条件よりもより多く発現していた。これは仮説2の予測とは異なる示唆であるが、環境に応じて毒遺伝子発現の変化が起きていること、また栄養塩制限により、細胞の生理活性状態が決して良くないときに毒遺伝子の発現量が変化していることが世界で初めて明らかになった。今後、窒素固定遺伝子および毒遺伝子発現と栄養塩の関連についてさらに実験を進める予定である。

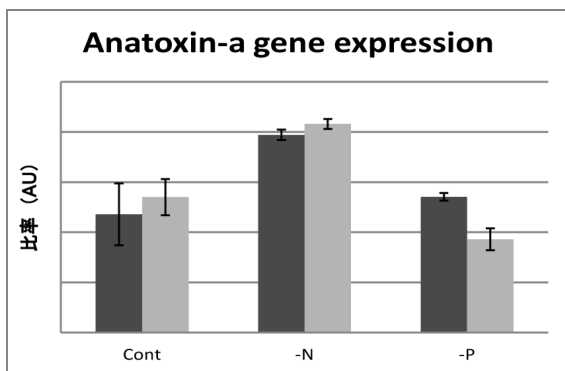


図4 培地栄養塩濃度と毒遺伝子発現量。Cont: コントロール (CT 培地)、-N: 窒素制限培地、-P: リン制限培地。黒が24時間後、灰色が48時間後の遺伝子発現量を示す。Error bar  $\pm$ S. D. (N=3)。軸は毒遺伝子発現量 / 16srRNA 量の比で示した。

## 5. 主な発表論文等

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大林 夏湖 (OHBAYASHI, Kako)

東京大学・大学院総合文化研究科・学術研究員

研究者番号: 20448202

### (2)連携研究者

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

若本 祐一 (WAKAMOTO, Yuichi)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号: 30517884

程木 義邦 (HODOKI, Yoshikuni)

京都大学・生態学研究センター・特定准教授

研究者番号: 60632122