

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660078

研究課題名(和文)大腸菌のサブポピュレーションの可視化に基づいたトランスクリプトームの解析

研究課題名(英文) Visualization, sorting, and transcriptome analysis of Escherichia coli subpopulations with different generations of poles.

研究代表者

陶山 哲志 (SUYAMA, Tetsushi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：10357311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌の様な桿菌は、古い極の極齢が異なるサブポピュレーションの集合であり、其々は異なった生理的特徴を有している。本研究では大腸菌細胞の極に局在する走化性レセプターTarに光変換蛍光蛋白質を連結した融合蛋白質を発現させ、分裂にともなった極齢の可視化に成功した。可視化細胞の分取とトランスクリプトーム解析を目指した研究を推進し、細胞にダメージを与えない光変換条件を確立した。極齢と細胞の比重に相関を見出した他、マイクロ流路と顕微鏡・マルチチャンネル分光器からなる自動分取システムを整備した。今後はより多くの細胞を分取し分裂速度の違いやVBNC化のメカニズムを明らかにしたい。

研究成果の概要(英文)：Rod-shaped bacteria (e.g., Escherichia coli) are the gathering of subpopulations with multi-generations of their older poles and their physiological traits are different to each other. In this study, we constructed an E. coli with a photoconvertible fluorescent protein conjugated to a chemoreceptor protein Tar localized to their poles, and the generations of poles were successfully visualized. We have further investigated the method of sorting, and established a protocol of photo-labeling without damaging the cells. Specific weight of the cells was found to be a promising method for differentiating the subpopulations with different generations of poles. We have also composed an automatic cell-sorting system utilizing a microfluidic chip, a fluorescent microscope, and a photonic multichannel analyzer for collecting more variety of subpopulations to clarify the mechanisms of modulating growth rate and entering VBNC state in the subsequent studies.

研究分野：環境微生物学

キーワード：大腸菌 細胞分裂 サブポピュレーション 蛍光蛋白質 光変換 LED バイオイメージング 分取

1. 研究開始当初の背景

(1) 環境中の微生物の多くは VBNC (Viable But Non-Culturable) と呼ばれる「死滅はしていないものの増殖しない状態」で存在している。その中には、培養方法が確立されているにもかかわらず何らかの理由で増殖を停めている細菌も含まれ、あるきっかけで増殖を再開する可能性が示唆されている。例えば VBNC の状態にある大腸菌 O157 や赤痢菌、ビブリオ属細菌等が潜在的な病原体として環境中に存在しているという仮説が提唱されている。実際には実験的にストレスを与えて増殖を停めた細胞を VBNC のモデルとしたり、環境サンプルから増殖が遅いものを選別するなどの手法を用いて VBNC の研究が行われてきたが、客観的な指標をもって細胞のサブポピュレーションを VBNC であると特定し、VBNC 状態への移行や増殖の再開を研究することは従来の技術では非常に困難であった。

(2) 大腸菌のような桿菌が分裂すると個々の娘細胞は分裂によって生じた新しい細胞極と、親細胞から受け継いだ古い細胞極の二つの細胞極を持つことになる。こうして生まれた細胞がさらに分裂を繰り返すことから、自然により古い細胞極を持つ細胞からより新しい細胞極を持つ細胞の複数のサブポピュレーションが生じてくる。近年の研究から、より古い極齢の細胞極を代々受け継いできた娘細胞は分裂速度が遅く、VBNC 状態に移行し易いことが明らかになってきた(引用論文 1)。一方で新しい細胞極の側を受け継ぎ続けた娘細胞は世代を重ねるごとに分裂速度が速くなる、いわゆる「若返り」を見せることも報告されている。しかし、これらの研究では顕微鏡を用いたタイムラプスにより分裂の頻度に関する解析が成されているだけであり、サブポピュレーションを分取して実際に分裂速度の違いや VBNC 状態への移行に関する因子を特定するような研究には至っていない状況であった。

2. 研究の目的

(1) VBNC は環境の微生物の動態を知る上できわめて重要なテーマである。しかし客観的な指標をもって細胞のサブポピュレーションを特定し、VBNC 状態への移行や増殖の再開を研究することは従来の技術では非常に困難であった。近年の研究により、細胞分裂によって生じた極の新旧が細胞の増殖速度や VBNC 状態への移行に大きく関与することが明らかになってきた(引用論文 1)。一方で蛍光観察により生きた細胞を扱う技術が発達したため、例えば光変換蛍光タンパク質で細胞極を標識することにより、様々な極齢を持つサブポピュレーションの細胞を蛍光の違いを指標に分別することが原理的には可能になった。そこで挑戦的萌芽研究の助成のもと、光変換蛍光タンパク質で大腸菌の細胞極を標識し、様々な極齢の細胞極を持った細胞

を分画してトランスクリプトーム解析を行うことから増殖速度の違いに関係する遺伝子の洗い出し、ひいては VBNC への移行や増殖の再開のメカニズムを明らかにすることを目的として研究を推進した。

3. 研究の方法

(1) アスパラギン酸の走化性レセプターである Tar は大腸菌の細胞極に局在する蛋白質である。Tar の C 末端に EGFP を融合・発現させた既往研究(引用論文 2)を参考に、本研究では *tar* 遺伝子に光変換型蛍光蛋白質の一種である Kaede (<http://www.amalgaam.co.jp>) の遺伝子を融合させた。図 1 に示すように PCR 増幅した大腸菌 K12 株由来の *tar* 遺伝子を終止コドンの位置にイン・フレームで Kaede 遺伝子が繋がるように pKaede-S1 ベクター (Amalgaam・MBL) の BamHI サイトに挿入し、大腸菌 DH5α に形質転換した。また、37℃ 付近の温度帯で良好な蛍光を示すとされる単量体の光変換蛍光蛋白質 mKikume についても Tar との融合蛋白質を発現する大腸菌株を作成し、同様の検討を行った。

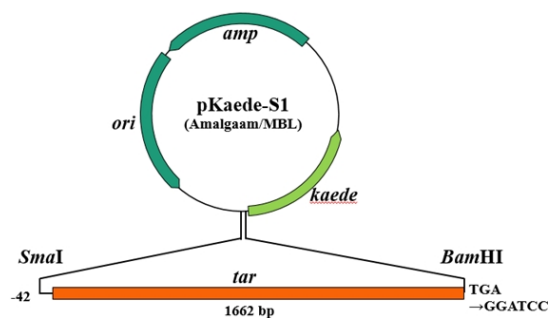


図1 Tar-Kaede の構築

(2) 初期の実験では、光変換は日立の FL15BL ブラックライト蛍光灯 (ピーク波長 369 nm) の照射下、液体振盪培養条件にて行った。また、培養液を充填したガラスキャピラリーを用いて光変換の条件を検討した。ブラックライトや各種 LED を照射したさいの距離と照射時間、緑色蛍光と赤色蛍光を発する極の割合、退色の速さ、さらに新しい培養液に再接種した時の成長速度への影響などを調べた。

(3) 光変換前後の細胞極の蛍光を観察したほか、一様に光変換を行った後一定時間培養を行い、再び新規な細胞極が形成され細胞が分裂する過程を観察した。また、細胞の極が示す蛍光の特徴に従って細胞を分画し、特定の特徴を示すグループ毎に集める方法を検討した。観察には Zeiss の LSM 510 META 共焦点レーザー・スキャン顕微鏡システムを使用し、未変換型の緑色蛍光には 488 nm 励起・505-530 nm 蛍光、変換型の赤色蛍光には 543 nm 励起・>560 nm 蛍光の各条件を用いた。

4. 研究成果

(1) 顕微鏡観察により Kaede 融合蛋白の緑色蛍光が細胞極に局在する大腸菌株を取得し、T3 株と名付けた。T3 株は暗条件で培養することにより緑色蛍光を呈した。また、ブラックライト、または共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡の視野の中で青色レーザー (405 nm) の励起光を照射することによって Kaede の赤色蛍光型への変換が観察された (図 2)。

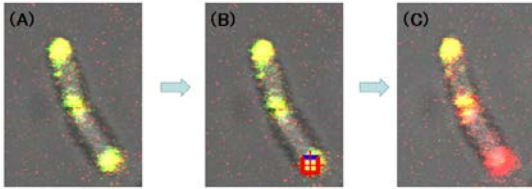


図2 暗条件で培養した細胞(A)と青色レーザー照射位置(B) 光変換後の細胞極が示す赤色蛍光(C)

またブラックライト照射によって予めすべての細胞極が一様に赤色蛍光を発するようラベルした細胞の成長する過程を観察したところ、赤緑両方の蛍光を観察して重ね合わせるにより、細胞極の新旧が見分けられるようになった。例えば図 3 に於いて赤色蛍光を発しているのはブラックライトを照射した時点で存在していた極であり、緑色蛍光のみを発しているのはその後の分裂によって生じた新しい極である。

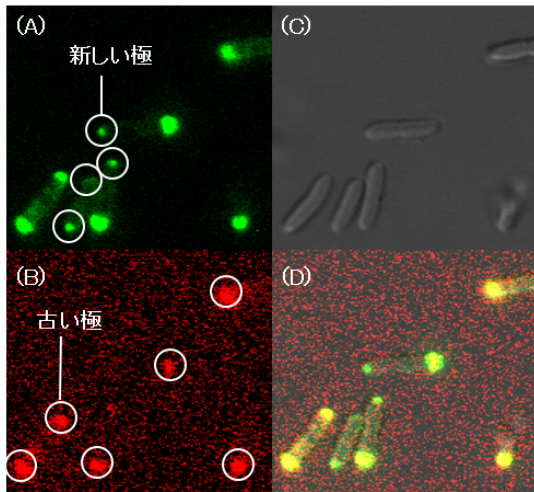


図3 緑色(A)および赤色(B)蛍光による細胞極の観察 明視野(C)と重ね合わせ画像(D)

以上の様にして、従来判別が出来なかった大腸菌の細胞極の新旧をある程度判別することが可能になった。

一方、mKikume を用いた株では、暗所培養をした段階で細胞極に集まる Tar-mKikume の融合蛋白が比較的弱い蛍光しか示さなかった。また一度光変換により赤色蛍光でラベルしたはずの細胞極が容易にその特性を失い、緑色蛍光のみを示すようになる傾向があった。以上の点から、本研究の目的には使用できず、以後の研究は Tar と Kaede の融合蛋白を発現

する T3 株を対象に進めることとなった。

(2) 光変換の条件については当初よりブラックライトの照射では効率が悪く長時間の照射が必要である一方で細胞に毒性を示す懸念があった。実際に確認したところ完全な変換には 25 分以上の照射を要し、同時に変換後の赤色蛍光にも一部で退色が起きていることが分かった。また 10~25 分間ブラックライトを照射した細胞は同じ時間暗所で培養した細胞と比較して新たな培養液に接種した後の増殖速度が著しく低下していることがわかった。

より良好な光変換条件を確立するため、新たに単一波長の照射が可能な高出力 LED 光源を検討した。図 4 は 385 nm の LED (シーシーエス、HLV-24UV385-4WNRBT) で 15 cm の距離から照射後の細胞の蛍光像である。非常に速やかに緑から赤への光変換が起こるが、5 分間も照射していると緑色蛍光・赤色蛍光とも完全に退色してしまうことが分かった。

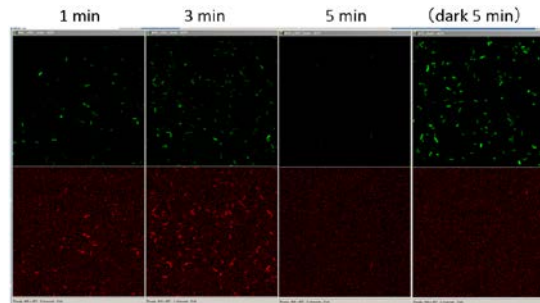


図4 LED (385 nm) による光変換と退色

図 5 は 405 nm の LED (シーシーエス、HLV-24VL405-4WHI) に対して同様の検討を行ったものである。変換の効率は悪いものの、緑色および赤色いずれの蛍光もほとんど退色しないことが分かる。405 nm の変換光を照射した後の培養液を新しい培地に接種して T3 株の増殖速度の違いを検討したところ、図 6 に示すように変換光照射の影響は確認できなかった。したがって、当研究の目的では 405 nm LED による変換光を照射して細胞極を一様に赤色蛍光でラベルするという手順が最も好ましいと考えられる。

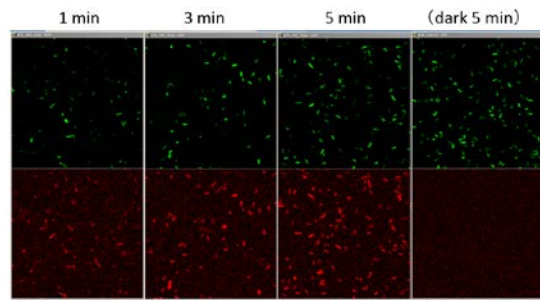


図5 LED (405 nm) による光変換

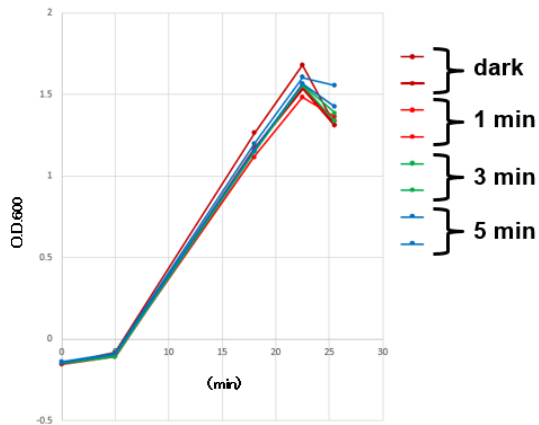


図6 LED (405 nm) 照射後の増殖曲線

(3) 光変換後一定時間培養した細胞には図3に示したように両方の極が緑、一方の極が赤でもう一方の極が緑、両方の極が赤の3種類のバリエーションが含まれている。この3者の分画を検討したところ、従来型のセルソーター（ベクトン・ディッキンソン、BD FACS Vantage SE）では十分に分けられないことが判明した。そこで図7に示すようなマイクロ流路、顕微鏡、マルチチャンネル分光器からなる自動分取システムを整備した。まだ十分な細胞数を分取する性能に至っていないが、現在も改良を続けている。



図7 マイクロ流路、顕微鏡、マルチチャンネル分光器からなる蛍光自動分取システム

また光変換後の細胞を一定時間培養し、3種類の極の蛍光ラベルのバリエーションが共存する培養液を Percoll の密度勾配 (30 mL) に重層して 43, 200×*g* で 30 分間遠心分離を行った。分離後のサンプルを低密度側から高密度側まで少量の画分に分けて、含まれる細

胞の極の蛍光を観察したところ、両方の極が緑の細胞は全体に分布しているのに対し、一方の極が赤・一方の極が緑である細胞は最も比重が軽い画分、両方の極が赤である細胞は最大のピークよりやや軽い比重の画分に局在する傾向が見られた (図8)。以上のことから、分裂にともなって生じる細胞のバリエーションと細胞の比重には相関があり、密度勾配遠心は細胞の分裂によって生じるサブpopulationを分画する一手段として利用可能であることが示唆された。

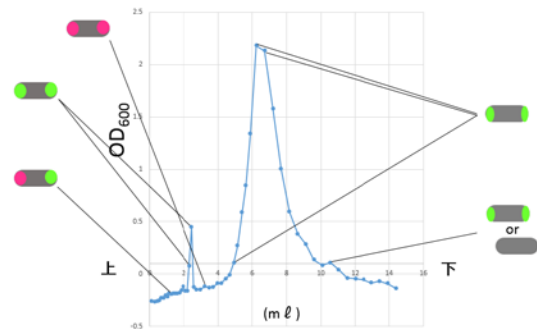


図8 Percoll 密度勾配遠心の画分

以上の様にして大腸菌の細胞極を光変換蛍光蛋白質で標識し、光変換ラベルと培養の後分画する手法が確立できた。これらの方法を利用して VBNC 化や増殖速度の違いを探る手段を得ることが出来た。今後はこの成果を応用した研究をさらに進める予定である。

<引用文献>

- ① Stewart E. J., Madden R., Paul G., and Taddei F. Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. PLoS Biol. 3, e45 (2005).
- ② Homma, et al. Attachment binding alters arrangement of chemoreceptor dimers within its cluster at a cell pole. PNAS 101:2462-7.

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 陶山哲志、水野敬文、光変換型蛍光蛋白質 Kaede を用いた大腸菌の細胞分裂と極齢の観察、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 03 月 28 日、岡山大学 (岡山県・岡山市)
- ② 陶山哲志、水野敬文、Conditions for Photoconversion and Characterization of *Escherichia coli* Strains Labeled with Photoconvertible Fluorescent Proteins、日本農芸化学会 2015 年度大会、2016 年 03 月 30 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

陶山 哲志 (SUYAMA, Tetsushi)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・
バイオメディカル研究部門・主任研究員
研究者番号：10357311

(2) 研究分担者

水野 敬文 (MIZUNO, Takafumi)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・
バイオメディカル研究部門・主任研究員
(平成27年9月・退職)
研究者番号：40344163

野田 尚宏 (NODA, Naohiro)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・
バイオメディカル研究部門・研究グループ
リーダー (平成27年9月より研究分担
者)
研究者番号：70415727