

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26712011

研究課題名(和文) クローン細胞集団における一細胞レベルの不均一性の包括的理解とその応用技術の創成

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of cellular heterogeneity in a clonal microbial population

研究代表者

宮崎 亮 (Miyazaki, Ryo)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：80712489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年の細胞観察技術の進展により、クローナルな細菌細胞集団においても、個々の細胞レベルでは遺伝子発現レベルや表現型に多様性が存在することがわかってきた。しかし、このような不均一性を生み出すメカニズムや細胞間の生理状態の違いを解析する手法は発展途上にある。本研究では、細菌の遺伝子水平伝播をモデルとし、細胞間の遺伝子発現レベルの違いをゲノムワイドに解析することで、クローン集団内における細胞レベルの生理状態や遺伝子発現を網羅的に解明した。

研究成果の概要(英文)：Recent advanced single-cell studies increasingly reveals large variations in gene expressions or cellular phenotypes at individual cell level even in an isogenic population. However, a challenge is to develop systematic approaches to address the mechanisms to generate such cellular heterogeneities or to detect the physiological differences between individual cells. Using horizontal gene transfer between prokaryotic cells as a model, we here developed a genome-wide approach to analyze gene expression profiles between subpopulations in a clonal population, and uncovered specific cellular physiology and gene expressions in a particular cell fraction.

研究分野：微生物学

キーワード：遺伝子水平伝播 遺伝子発現 微生物

1. 研究開始当初の背景

生命の設計図が細胞内のゲノムにコードされていることが明らかとなって以来、目前の生命現象がどの遺伝子機能に起因しているのか、あるいは機能未知の遺伝子がどのような生理反応に関与するのか、これらを解明することが生物・生命科学の大目的とされてきた。本来、生命の最小単位である細胞のサイズは非常に小さく、一個一個の細胞をダイレクトにハンドリングするのはスケール的にも定量的にも非常に難しい。これらの課題を克服するべく、従来の微生物学では、外的条件を制御した実験室環境下において細胞を純粋培養し、得られたクローン細胞集団から細胞内成分 (mRNA やタンパク質等) を抽出することで様々な生命現象とそのメカニズムを解明してきた。つまり、生育環境と遺伝的バックグラウンドが同一であれば、全ての細胞は均一に振る舞うという前提である。しかし、このような培養集団から得られたデータはあくまで集団の“平均値”を表しており、厳密には個々の細胞における細胞内成分には、量的・質的なばらつきが存在するはずである。さらに、この分子レベルの不均一性に起因して、特異的な細胞機能や個性的な挙動を示す細胞が生まれ、均一と考えられていたクローン細胞集団の中にも質を異にしたサブ細胞集団が存在すると考えられる。実際に、これまでに我々は、細菌の染色体上に普遍的に存在する ICE (Integrative and Conjugative Element) と呼ばれる外来遺伝子領域の挙動を一細胞レベルで解析する研究を通じて、同一ゲノムのクローン細胞集団であっても表現型の異なるサブ細胞集団が存在することを世界に先駆けて実証してきた。ICE は通常、ホストとなる細菌の染色体上に潜伏しているが、特定の条件下で染色体から切り出され、隣接する他種細胞へ水平伝達される可動遺伝因子であり、同時に薬剤耐性、重金属耐性、植物共生など機能的に多様な遺伝子を運搬するため、生物の進化・適応を飛躍的に加速すると考えられている (Dobrindt et al. 2004. Nat Rev Microbiol)。申請者らは、分子遺伝学的手法、トランスクリプトミクス、単一細胞レベルでの遺伝子発現解析法を駆使して、ICE がクローン細胞集団のわずか 3-5% の細胞においてのみ活性化し、他細胞へ水平伝播することを証明した (Minoia et al. 2008. PNAS)。このサブ細胞集団の出現は、細胞の加齢や遺伝的変異に依存しない完全にランダムなイベントであり、残りの 95-97% の細胞では ICE は活性化しない。つまり、全ての細胞が遺伝子水平伝播活性を示すという従来の微生物学における定説を覆し、確率論的な表現型の不均一性が存在するという新たな事実を発見した。さらに、これまで培養細胞集団の“平均値”でしか解析されてこなかった定常期シグマ因子 (RpoS) の発現レベルが、実際は一細胞レベルで確率論的にばらつくことを発見し、RpoS をより

多く発現している一部の細胞においてのみ ICE が活性化していること、ならびに RpoS を遺伝学的に操作することでサブ細胞集団のサイズと遺伝子水平伝播効率を制御できることを証明した (Miyazaki et al. 2012. PLoS Genetics)。また、ICE が活性化した細胞において特殊な遺伝的プログラムが発動し、細胞が死滅するという新規現象を発見した (Reinhard and Miyazaki et al. 2013. Curr Biol)。

これらの先行研究から、細胞が示す生命現象の中には不確実性によって支配され、不均一な細胞集団となることで初めて機能するものがある、ということが明らかとなった。一方で、このような「不均一性」という概念そのものが新しいものであるが故に、未だ明らかになっていないことは多い。特に、インプットとしての遺伝子発現のばらつきとそれに起因する個性的な表現型を結びつける一連の分子メカニズムが解明された例は皆無である。

2. 研究の目的

本研究では、分子生物学、理論生物学、統計学、情報工学の技術を融合することで、細胞集団が本質的に有する不均一性を検出・解析する独自の手法を確立し、本手法を用いて不均一性が関わる生命現象の細胞内分子機構および生物学的意義を包括的に解明する。さらに、一細胞レベルの個性を利用・制御するという新しい発想に立脚した応用技術の開発に繋げる。具体的には、不均一性を一細胞レベルで可視化し、標的とするサブ細胞集団を特異的に分離・網羅的に解析することで、不均一性の根源となる因子とそれに付随する一連の細胞内分子カスケードを同定する。同時に、不均一性が細胞集団の機能や進化に与える影響を実験と理論の双方から見出す。本系を様々な産業微生物に拡張し、不均一性を生み出す因子を制御して集団のばらつきを人為的に操作するという新しい視点によって、微生物が関わる物質・エネルギー生産や医療現場での技術革新に資する。

3. 研究の方法

(1) トランスクリプトーム解析: 表現型の不均一性を解析するためのモデルシステムとして、グラム陰性菌 *Pseudomonas putida* の染色体上に存在する可動遺伝因子 ICE_{clc} を用いる。3-クロロ安息香酸 (3CBA) を唯一の炭素源とする最小培地で前培養した *P. putida* を同培地に植菌し、対数増殖期、および定常期細胞に 3CBA を追加投与して数時間培養した REG 期から菌体を回収し、RNA を抽出した。cDNA ライブラリーを構築し、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq を行った。また、ICE_{clc} の水平伝播能力が活性化した tc 細胞を蛍光タンパク質で特異的にラベルし、non-tc 細胞と差別化を行うことで、セルソーターを用いて両細胞集団を分取した。それぞ

れの細胞集団から RNA を抽出し、上記と同様に RNA-seq に供した。

(2) バイオインフォマティクス: (1) で得られたデータを用いて、*P. putida* のゲノムに対して Bowtie、Samtools 等を利用してマッピングを行った。サンプル間の遺伝子発現変動解析は edgeR 等を用いて行った。

(3) 1 細胞遺伝子発現解析: *P. putida* の染色体上に存在するプロファージ特異的プロモーターおよび ICE*clc* 特異的プロモーターをそれぞれ別の蛍光タンパク質遺伝子と連結し、*P. putida* の染色体に導入した。このレポーター株を培養し、顕微鏡下で両遺伝子の発現を 1 細胞レベルで定量した。

(4) 運動性試験: 3CBA を唯一の炭素源とする最小培地または LB で菌体を前培養した後、agar 濃度 0.3% の運動性試験培地にスポットし、25 °C で培養した。19 時間後に泳動リングを測定した。

(5) フィットネス解析: 3CBA を唯一の炭素源とする最小培地で菌体を前培養した後、同培地または LB 培地に植菌し、30 °C で振盪培養した。培養液の濁度 (OD₆₀₀) を経時的に測定した。

4. 研究成果

(1) トランスクリプトーム解析を行った結果、ICE*clc* 存在下で数百の染色体遺伝子が発現変動した。ICE*clc* の水平伝播能が最大化する REG 期にはより多くの遺伝子が発現変動した。さらに、ICE*clc* の水平伝播遺伝子の発現を制御している抑制因子 MfsR を欠損した変異体では、全染色体遺伝子の半数以上が発現変動した。このことから、ICE*clc* の細胞内挙動、特に遺伝子水平伝播に伴い、宿主細菌の染色体遺伝子もダイナミックに発現変動することが明らかとなった。発現変動した遺伝子とその機能に基づいて分類したところ、ICE*clc* の存在によって鞭毛合成経路が活性化し、ICE*clc* の水平伝播能の活性化によって様々な膜輸送経路が誘導される一方で、中央代謝経路や細胞分裂、核酸・アミノ酸合成など、細胞の増殖に必須な機能が低下することがわかった (図 1)。以上のことから、ICE*clc* の水平伝播能の活性化は、宿主細菌にとって強い負荷となっていることが示唆された。次に、蛍光タンパク質を利用して tc 細胞と non-tc 細胞を分取してトランスクリプトームを比較したところ、tc 細胞において ICE*clc* の遺伝子発現が non-tc 細胞のそれに比べ優位に上昇していることが示された。このことは、本手法が遺伝子発現の不均一性によって誕生したサブ細胞集団を適切に分離し、トランスクリプトーム解析を可能にしていることを裏付けている (図 2)。興味深いことに、

ICE*clc* の遺伝子だけでなく、十数個の染色体由来の遺伝子も発現変動していた。これらの遺伝子は tc 細胞の出現と機能に何らかの関連性があると考えられる。

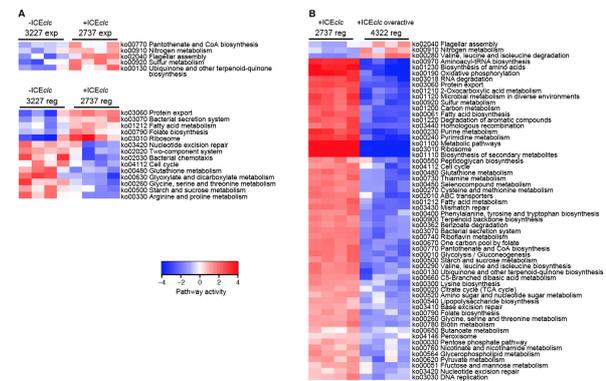


図 1. パスウェイ解析によるヒートマップ. A. ICE*clc* 保持/非保持の比較. B. ICE*clc* 野生株/*mfsR* 変異株の比較. パスウェイの活性の高低を赤色と青色の勾配で示す.

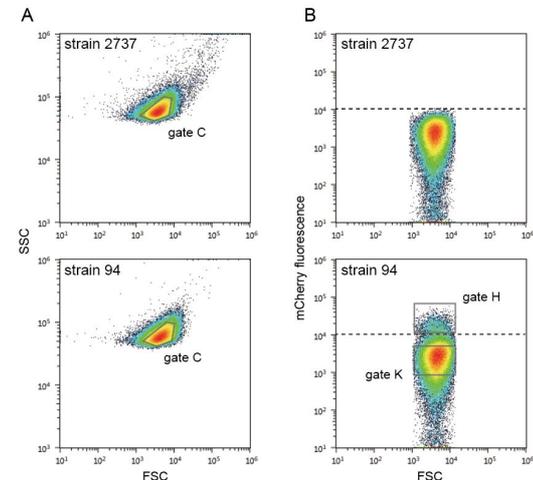


図 2. セルソーターを用いた tc 細胞と non-tc 細胞の分離. A. FSC と SSC の二次元プロット. B. FSC と蛍光輝度の二次元プロット. ICE*clc* が活性化した tc 細胞を蛍光タンパク質の発現で標識した (B 下段. 上段は未標識). 図中の gate H と K から tc 細胞と non-tc 細胞を分取した.

(2) トランスクリプトーム解析の結果、ICE*clc* 存在下では、宿主細菌の染色体上に存在する特定のプロファージ遺伝子が発現上昇することがわかった。そこで、本プロファージの活性と ICE*clc* の挙動の関連性を検証するために、それぞれに特異的なプロモーターを異なる蛍光タンパク質遺伝子と連結し、一細胞レベルでの発現解析を行った。その結果、トランスクリプトーム解析の結果と同様に、ICE*clc* 存在下ではプロファージのプロモーターがほぼ全細胞において活性化することがわかった (図 3)。一方で、プロファージ遺伝子の活性化は、ICE*clc* の活性化とは相関

性を示さないことが明らかとなった。以上のことから、プロファージ遺伝子の活性化は、ICEc/c の活性化ではなくその存在自体に依存するものと考えられた。

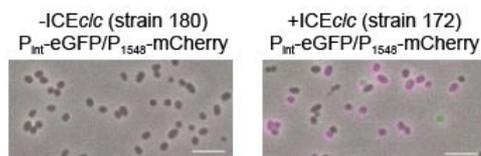


図 3. プロファージ関連遺伝子 (赤) と ICEc/c 遺伝子 (緑) の 1 細胞発現解析. ICEc/c 非存在下 (左図) ではプロファージ遺伝子は発現していないが、ICEc/c 存在下 (右) では活性化する。図は位相差、GFP、mCherry の 3 チャンネルを重ね合わせた像。スケールバーは 5 μm 。

(3) トランスクリプトーム解析から、ICEc/c 存在下で宿主の鞭毛合成経路が活性化することが示唆された。そこで、実験的に細胞の運動性を調べたところ、3CBA を唯一の炭素源とする最小培地で前培養した場合、ICEc/c 保持菌の運動性は ICEc/c 非保持菌のそれより高かった。しかし、LB で前培養すると、結果は逆転した。このことから、3CBA という選択圧がかかった状況において ICEc/c は宿主細胞の運動性を上昇させ、選択圧がない状況では逆に運動性を低下させることが示唆された。

(4) 上述の結果が示すように、ICEc/c の存在によって、多様な遺伝子発現変動や表現型の変化が宿主細胞に起きることから、ICEc/c の存在が宿主細胞にとって fitness cost になると考えられる。そこで、実験的に宿主細菌の fitness を測定した。その結果、ICEc/c が宿主細胞の fitness に与える影響は、培養環境依存的に異なることがわかった。すなわち、LB のように選択圧のない培養条件では、ICEc/c の存在は予想通り宿主の fitness 低下をもたらすが、3CBA を唯一の炭素源とする最小培地では、むしろ宿主の fitness を高めることがわかった。

以上のデータを統合し、まもなく論文を発表する。

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 1 件)

宮崎亮, 細菌クローン集団における個々の細胞が示す表現型のばらつき, *バイオサイエンスとインダストリー*, 査読無, 74 巻 2 号, 2016, 116-119

[学会発表](計 5 件)

宮崎亮, Bistability in a clonal population, 第 90 回日本細菌学会総会 (招待講演), 2017 年 3 月 30 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

宮崎亮, Collective functionality through microbial cellular individuality, 第 68 回日本細胞生物学会・第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会合同大会 (招待講演), 2016 年 6 月 17 日, 京都テルサ (京都府・京都市)

宮崎亮, 遺伝子発現のノイズと表現型のゆらぎ, 第 30 回日本微生物生態学会 (招待講演), 2015 年 10 月 19 日, 亀城プラザ (茨城県・土浦市)

宮崎亮, 世界で最初に単離された塩化芳香族化合物分解菌 *Pseudomonas knackmussii* B13 のゲノム解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (一般講演), 2015 年 3 月 28 日, 岡山大学 (岡山県・岡山市)

Ryo Miyazaki, Jan Roelof van der Meer. Fate of cells in horizontal gene transfer of an Integrative and Conjugative Element, ISME 15 (招待講演), 2014 年 8 月 25 日, Coex Convention Center (韓国・ソウル)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 亮 (MIYAZAKI, Ryo)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号: 80712489

(2) 研究協力者

Jan Roelof van der Meer (VAN DER MEER, Jan R.)

University of Lausanne・Fundamental Microbiology・Professor