

# バクテリアの細胞表層構造と細胞の巨大化

西田 洋巳  
(工学部生物工学科)

**要約：**私は本学に来て以降、5年余りの間、バクテリア細胞の巨大化の研究に取り組んでいる。その目的は、通常の細胞サイズではマイクロインジェクションが不可能なバクテリア細胞を巨大化し、その細胞へDNA, RNA, タンパク質などをマイクロインジェクションすることにある。マイクロインジェクションが可能となれば、デザインしたゲノムDNAを持つ生物を創生する。この研究は、バイオテクノロジーの範疇に入ると認識しているが、マイクロインジェクションを成功させるために行った数々の工夫を通して、バクテリアの細胞表層に関する基礎的な知見を得つつある。ここでは、われわれが本学で行ってきたことをまとめ、この研究の意義について述べる。

**キーワード：**バクテリア, 細胞表層, スフェロプラスト, プロトプラスト, 巨大化細胞

## 1. グラム染色

グラム染色はバクテリアの細胞表層の特徴を知ることに使われている。すなわち、外膜、細胞壁（ペプチドグリカン層）、内膜（細胞膜）で構成されているグラム陰性バクテリアと、外膜を欠き細胞壁と細胞膜で構成されているグラム陽性バクテリアに大きく2つのタイプに分けられている。しかし、例外もあり、例えば、*Deinococcus*の一部の種は、細胞表層構造はグラム陰性タイプであるにもかかわらず、分厚い細胞壁を持っているため、グラム染色では陽性となる。細胞表層の構造に関するポイントは、グラム染色による分類ではなく、外膜を持つか否かということが最重要である。

## 2. 外膜

地球に最初に存在したバクテリアには、外膜が存在していたであろうか。生命は高温環境下において生じたとする仮説が有力であり、バクテリアの種の進化系統樹においては、進化の初期から分岐しているバクテリアの大半が高度好熱性バクテリアである。温泉や海底火山から分離される*Aquifex*は95度においても生育可能であり、グラム陰性であり外膜を持つ（Burggraf et al. 1992）。また、*Thermotoga*も進化の初期から分岐しているが、この細菌は、極めて特徴的な細胞表層構造を持っている。すなわち、本バクテリアはグラム陰性であり、外膜を有する。しかし、通常のグラム陰性バクテリアとは異なり、桿菌である本バクテリアの両端は、内膜と外膜が大きく乖離し、広いペリプラズム

空間を有している（Achengach-Richter et al. 1987）。このバクテリアの細胞分裂は細胞の中央で生じており、その部分は外膜、細胞壁、内膜が極めて接近している状態にあり、細胞分裂のためには、これらの3つの構造体が連携する必要があることを示唆している。また、両端領域における内膜と外膜の乖離は、その状態においても細胞として生きていることを意味している。

最近、細胞の形をつくり、それを維持することに、細胞壁だけではなく、外膜が強く関わっていることが発表され、外膜の役割が見直されつつある（Rojas et al. 2018）。内膜と外膜の違いは、脂質2重層における2層の構造非対称性を外膜が有することにあり、細胞の形の維持や細胞分裂における役割の違いは、この構造的違いによると考えられる。すなわち、外膜における外層においては、リボ多糖が存在している。リボ多糖は、脂質であるリピドAに糖鎖が結合した構造を持つ。この糖鎖領域は、コア多糖および末端にO抗原を有する構造となっている。リボ多糖は2価陽イオンであるカルシウムイオンやマグネシウムイオンが結合して構造を安定化させている（Clifton et al. 2015; Lam et al. 2014）。リピドAが疎水的であるのに対してコア多糖領域は親水性であるが、カルシウムイオンが結合することによって、水分子を外に出す傾向にあることが報告されており、その効果はマグネシウムイオンにはないと報告された（Clifton et al. 2015）。

特筆すべきことには、われわれが実験に用いている*Deinococcus*の外膜にはリボ多糖が存在していない（Gupta 2011; Raetz and Whitfield 2002）。

### 3. 細胞壁

多くのバクテリアの細胞壁はペプチドグリカンで成り立っている。よって、リゾチームによってアセチルグルコサミンとアセチルムラミン酸の結合が切断され、分解される。ペプチドグリカンが分解された細胞は、プロトプラストあるいはスフェロプラストと呼ばれるが、それらは細胞壁を持たないため、構造が不安定となる。

また、多くのバクテリアは、ペニシリンやホスホマイシンなどの細胞壁合成阻害剤の誘導によって、細胞壁を持たない細胞が生じる。このことは、バクテリアの細胞壁を標的とした抗生物質への耐性バクテリアが、必ずしも耐性を付与するプラスミドなどの遺伝情報の獲得によるものだけではなく、細胞壁合成を停止させたL型バクテリアタイプの出現によっても生じることを意味している (Kawai et al. 2018)。

われわれは細胞壁を失ったスフェロプラストを海水の塩組成を持つマリン培地に細胞壁合成阻害剤を添加した培地でインキュベートすることによって、細胞壁を持たない状況で巨大化させている (Nakazawa and Nishida 2017a; 2017b; Nishino and Nishida 2017; 2019; Nishino et al. 2018a; 2018b; Takahashi and Nishida 2015; 2016; 2017; Takahashi et al. 2016; Takayanagi et al. 2016)。この方法によって、本研究室で巨大化したバクテリアの様子を図1に示す。

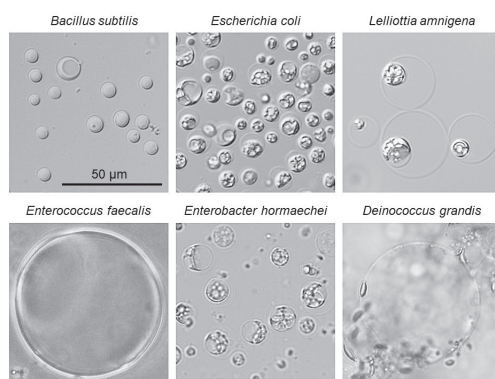


図1 応用生物情報学研究室において巨大化に成功したバクテリアのスフェロプラスト

### 4. 細胞膜

細胞膜 (グラム陰性バクテリアでは内膜とも呼ばれる) は細胞の内外を区別し、生物の最小単位である細胞の維持に最も重要な構造体である。様々なチャネルやトランスポーター、電子伝達系など生命活動に極めて重要なシステムが細胞膜に埋め込まれている。

抗生物質であるポリミキシン類は、外膜のリポ多糖に結

合して、カルシウムイオンやマグネシウムイオンを排除することによって、外膜構造を不安定にする (Trimble et al. 2016)。その後、ペリプラズム空間を渡って、細胞膜に到達し、そこに結合することによって細胞膜の機能を阻害し、細胞を死に追いやる (Trimble et al. 2016)。外膜は、この抗生物質を呼び寄せ、効率よく細胞膜へ導いていると考えられる。しかし、グラム陽性バクテリアやリポ多糖を外膜にもたない *Deinococcus* においてもポリミキシン類が効くことがわかっている。われわれが行っている *Deinococcus* の研究は (Morita and Nishida 2018; Morita et al. 2018; Nishino and Nishida 2019; Nishino et al. 2018)、この抗生物質の作用機序についての新たな知見をもたらす可能性がある。

また、われわれによるバクテリアのスフェロプラストの巨大化研究より、外膜だけではなく、細胞膜の伸張においても金属イオンが強く影響していることを明らかにしつつある (Mizuma et al. 投稿準備中; Takahashi and Nishida 投稿中)。グラム陰性バクテリアである *Lelliottia* のスフェロプラストの巨大化においては、外膜と内膜の伸張速度が大きく異なり、その結果、巨大化なペリプラズム空間を持っている (図1参照)。このバクテリアを用いることによって、外膜と内膜の合成のバランスに関する研究を展開できると考えている (後述)。また、*Deinococcus* の巨大化スフェロプラストにおける巨大化前と巨大化後のリポミクスを行ったところ、脂質の組成に違いがあることを示したことにより、巨大化細胞は単にスフェロプラストが巨大化したのではなく、秩序を持った巨大化機構が備わっていると考えられる (Nishino et al. 2018b)。

### 5. 光合成細菌

当初、われわれは、光合成細菌を巨大化し、その光合成をパッチクランプによって測定することを目指したが、細胞膜に光合成装置を有するバクテリアの巨大化には限界があり、パッチクランプを行うことができる直径15  $\mu\text{m}$  以上の細胞を造ることができていない。われわれは当初大きな失敗を巨大化実験において経験した。それは細胞の確認を怠ったことによる。通常の2分裂増殖するバクテリアの形態を顕微鏡で観察し、実験に使用しているバクテリアであることを多くのひとは確認している。しかし、そのスフェロプラストやプロトプラストを観察して、それらを確認できる研究者はおそらくいないであろう。図1に示しているように巨大化スフェロプラストにも種多様性があることはわかる。しかし、その形態的な特徴が変化することもあり、形態観察から生物種を確認するためには、相当な経験を必要とするように感じる。重要なことは、バクテリアの

スフェロプラストが巨大化した際に、それが実験で使われたバクテリアであることを確認する方法を持つ必要がある。例えば、PCRによるDNA塩基配列に基づくゲノムDNAのチェックなどが必要となる。

酸素を発生する光合成はシアノバクテリアにおいては、細胞内に光合成装置を持っており、細胞膜における光合成の測定には向いていない。他方、紅色光合成バクテリアは、酸素発生型ではない光合成を行っており、細胞膜における活性を測定できる可能性があった。紅色光合成バクテリアには、好気性のものと通性嫌気性のものが存在している。好気性では、*Erythrobacter*、通性嫌気性では、*Rhodospirillum*のスフェロプラストの（ある程度の）巨大化に成功した（Nakazawa and Nishida 2017a; 2017b; Nishino and Nishida 2017; Nishino et al. 2018a; Takayanagi et al. 2016）。*Erythrobacter*は通常、酸素がない状況では光合成はしない。しかし、本バクテリアは、スフェロプラストにおいては、酸素がない状況で光照射を行うことによって巨大化することがわかり、酸素がない状況でも光合成をおこなっている可能性が極めて高いことを示した（Nakazawa and Nishida 2017a）。また、光の色によってその効果が違うことより、光受容体が機能していることを示している（Nishino and Nishida 2017; Nishino et al. 2018a）。

前述したように、これらの紅色光合成バクテリアのスフェロプラストをパッチクランプが可能なサイズにすることに成功していない。しかし、*Deinococcus*のスフェロプラストの巨大化から判明したカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンの巨大化への影響（後述）を考慮した条件を設定することによって、パッチクランプに適した細胞を創出できる可能性がある。

## 6. *Lelliottia*

*Lelliottia amnigena*は系統進化上*Enterobacter*に近いグラム陰性バクテリアであり、われわれによる巨大化スフェロプラストにおける網羅的転写産物情報など多くのデータの蓄積がある（Takahashi and Nishida 2016; 2017; Takahashi et al. 2016）。このバクテリアの巨大化スフェロプラストの特徴として、外膜と内膜の大きな乖離をとまない、巨大なペリプラズム空間を持つことにある（図1参照）。これは、外膜伸張が内膜伸張よりも速く生じていることを意味している。さらに、内膜内において液胞様構造体を複数造る特徴を持つ。この特徴は、グラム陽性バクテリアである枯草菌やグラム陰性バクテリアである大腸菌の巨大化スフェロプラストにおいても観察されている（図1参照）。

現在、論文投稿中であるが、インキュベーション時にお

ける金属イオンの組成を調整することによって、内膜と外膜の伸張を同調的に行うことに成功し、その細胞質への青色蛍光タンパク質のマイクロインジェクションを成功させた（Takahashi and Nishida 投稿中）。われわれの知る限り、バクテリアの内膜へのチップ先の陥入による、細胞質へのマイクロインジェクションの成功は世界初である。この成功により、マイクロインジェクションに適した細胞膜を有するスフェロプラストあるいはプロトプラストの作製が可能となり、一連のバクテリア細胞の巨大化研究が大きな山を越えたと感じる。

## 7. *Deinococcus*

われわれの研究室において使用しているバクテリアの多くは、遺伝子操作ができない（報告されていない）。もちろん、必要と判断した場合には、遺伝子操作を確立して、実施する覚悟はあるが、そうしないまでも多くの興味深いことが明らかになっている状況にある。もちろん、われわれは、遺伝子操作ができないバクテリアを研究対象として選んでいるわけではない。*Deinococcus*は、われわれの研究室で使用している遺伝子操作が可能なバクテリアである（Funayama et al. 1999; Nishida and Narumi 2002）。

*Deinococcus*の特徴は放射線への抵抗性がまず挙げられるが、細胞表層構造（Farci et al. 2014）のユニークさは特筆に値する。まず、前述したように、外膜はリポ多糖を持たない（Gupta 2011; Raetz and Whitfield 2002）。さらに細胞膜には糖脂質や糖リン脂質が含まれ、バクテリアでは一般的に見られるホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルグリセロールを欠いている（Anderson and Hansen 1985; Huang and Anderson 1989; Nishino et al. 2018b）。

また、前述したように、*Deinococcus*属には、球菌と桿菌が入り混じっており、さらに、グラム陽性と陰性も入り混じっている。そこで、*Deinococcus*に属する種における桿菌関連遺伝子群の分布に注目して、分子進化学的アプローチによって解析したところ、本属の祖先は桿菌であったと結論付けた（Morita and Nishida 2018）。われわれが巨大化実験に使用している*D. grandis*はグラム陰性の桿菌であり、細胞壁のアミノ酸成分としてオルニチンを持つ（Oyaizu et al. 1987）。

われわれのバクテリア細胞巨大化の方法は、まずはスフェロプラスト化をしなければならないが、*Deinococcus*はそのユニークな細胞表層構造より、リゾチーム処理が簡単ではなかった。OD<sub>600</sub>が0.7の細胞を37度で6時間の処理をしてはじめてスフェロプラストとなった（Nishino et al. 2018b）。



*Deinococcus*のスフェロプラストは、通常の培地である TGY (トリプトン, グルコース, 酵母エキス) にショ糖を入れて浸透圧を調整しても巨大化せず、海水の金属塩成分を有するマリン培地では巨大化した。そこで、TGY に金属塩成分をショ糖の代わりに加えたところ巨大化したことから、金属塩が巨大化にかかわっていることがわかった (Nishino et al. 2018b)。詳細に実験した結果、*D. grandis* のスフェロプラスト巨大化には、カルシウムイオンあるいはマグネシウムイオンが必要であることを明らかにした (Nishino et al. 2018b)。

バクテリアのスフェロプラストの巨大化には、適当な浸透圧および金属イオンが必要である。マリン培地の役割は、その双方にかかわっていたことになる。そこで、カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンのみで濃度を変えて巨大化への影響を調べた結果、カルシウムイオンには、スフェロプラストの外膜を融合させる作用があり、マグネシウムイオンにはないことがわかった (Nishino and Nishida 2019)。カルシウムイオンにおける外膜融合が生じる際、内膜は融合せず、融合細胞内には、独立した内膜 (細胞膜) で囲まれた細胞質が複数存在している状況になり、共有するものは、外膜とペリプラズム空間となった (Nishino and Nishida 2019)。この融合細胞は、超巨大化し、直径が 1 mm を超えるものも観察された。現在、浸透圧調整方法を検討することによって、肉眼で確認できる超巨大化融合細胞の創出に成功している (Nishino et al. 投稿中)。

## 8. おわりに

*Deinococcus* で発見したスフェロプラストの巨大化への金属イオンの関与は、*Deinococcus* の外膜伸張および外膜融合という結果をもたらしたが、内膜伸張は生じず、内膜へのマイクロインジェクションはできない。しかし、金属イオンの影響を *Lelliottia* に適用したところ、内膜伸張の誘導を行うことができ、その結果、内膜へのマイクロインジェクションに成功した。現在、グラム陽性バクテリアへのマイクロインジェクションにも成功している。このシンプルな実験経緯から多くのことを学ぶことができる。それは、バクテリアの多様性を研究に活かすという極めて教育的な事例となっていること、さらに、応用科学は基礎科学に基づいているということは一側面だけの話であり、実験の現場では、応用科学から基礎科学が展開し、さらにその基礎科学から応用科学へフィードバックするということが生じているという事実である。この研究を通して、「微生物は裏切らない」ということばをしみじみと感じており、微生物から学ぶ謙虚さが重要であると再認識している。

## 謝辞

本研究成果は、2013年10月から今までのものであり、すべて応用生物情報学研究室に所属した学生が行った。本研究室に所属し、研究テーマとして、バクテリア細胞の巨大化を選択した、野尻茜さん、杉村奈津希さん、高橋沙和子さん、高柳綾奈さん、西野弘起さん、中澤舞さん、加藤遼弥さん、玉村慎さん、森田裕介さん、梅村幸佑さん、吉田真妃さん、白谷周作さん、奥村真衣さん、水間真鈴さんに厚くお礼申し上げます。また、本研究室の准教授である大島拓先生には、貴重なご助言を多々いただき、勇気をもって本研究を展開することができています。ここに深く感謝いたします。最後になりましたが、バクテリアの巨大化研究のきっかけを与えていただきました矢部勇先生、*Deinococcus* については、東洋大学の鳴海一成先生に多大なるご指導、ご助言をいただきました、深く感謝いたします。

## 引用文献

- Achenbach-Richter L, Gupta R, Stetter KO, Woese CR (1987) Were the original eubacteria thermophiles? Syst Appl Microbiol 9, 34-39
- Anderson R, Hansen K (1985) Structure of a novel phosphoglycolipid from *Deinococcus radiodurans*. J Biol Chem 260, 12219-12223
- Burggraf S, Olsen GJ, Stetter KO, Woese CR (1992) A phylogenetic analysis of *Aquifex pyrophilus*. Syst Appl Microbiol 15, 352-356
- Clifton LA, Skoda MW, Le Brun AP, Ciesielski F, Kuzmenko I, Holt SA, Lakey JH (2015) Effect of divalent cation removal on the structure of Gram-negative bacterial outer membrane models. Langmuir 31, 404-412
- Farci D, Bowler MW, Kirkpatrick J, McSweeney S, Tramontano E, Piano D (2014) New features of the cell wall of the radio-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. Biochim Biophys Acta 1838, 1978-1984
- Funayama T, Narumi I, Kikuchi M, Kitayama S, Watanabe H, Yamamoto K (1999) Identification and disruption analysis of the recN gene in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. Mutation Research/DNA Repair 435, 151-161
- Gupta RS (2011) Origin of diderm (Gram-negative)

- bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100, 171–182
- Huang Y, Anderson R (1989) Structure of a novel glucosamine-containing phosphoglycolipid from *Deinococcus radiodurans*. *J Biol Chem* 264, 18667–18672
- Kawai Y, Mickiewicz K, Errington J (2018) Lysozyme counteracts  $\beta$ -lactam antibiotics by promoting the emergence of L-form bacteria. *Cell* 172, 1038–1049
- Lam NH, Ma Z, Ha B-Y (2014) Electrostatic modification of the lipopolysaccharide layer: competing effects of divalent cations and polycationic or polyanionic molecules. *Soft Matter* 10, 7528–7544
- Morita Y, Narumi I, Nishida H (2018) Transformation efficiency of spheroplasts and normal cells of *Deinococcus radiodurans*. *Bulletin of Toyama Prefectural University* 28, 41–43
- Morita Y, Nishida H (2018) The common ancestor of *Deinococcus* species was rod-shaped. *Open Bioinformatics Journal* 11, 252–258
- Nakazawa M, Nishida H (2017a) Effects of light and oxygen on the enlargement of *Erythrobacter litoralis* spheroplasts. *Journal of General and Applied Microbiology* 63, 58–61
- Nakazawa M, Nishida H (2017b) Effects of light and oxygen on the enlargement of spheroplasts of the facultative anaerobic anoxygenic photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Jacobs Journal of Biotechnology and Bioengineering* 3, 014
- Nishida H, Narumi I (2002) Disruption analysis of *DR1420* and/or *DR1758* in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology* 148, 2911–2914
- Nishino K, Nishida H (2017) Blue light inhibits the enlargement of *Erythrobacter litoralis* spheroplasts. *Journal of General and Applied Microbiology* 63, 203–206
- Nishino K, Nishida H (2019) Calcium ion induces outer membrane fusion of *Deinococcus grandis* spheroplasts to generate giant spheroplasts with multiple cytoplasm. *FEMS Microbiology Letters* 366, fny282
- Nishino K, Takahashi S, Nishida H (2018a) Comparison of gene expression levels of *appA*, *ppsR*, and *EL368* in *Erythrobacter litoralis* spheroplasts under aerobic and anaerobic conditions, and under blue light, red light, and dark conditions. *Journal of General and Applied Microbiology* 64, 117–120
- Nishino K, Morita Y, Takahashi S, Okumura M, Shiratani S, Umemura K, Narumi I, Kondo C, Ochiai R, Oshima T, Nishida H (2018b) Enlargement of *Deinococcus grandis* spheroplasts requires  $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$ . *Microbiology* 164, 1361–1371
- Oyaizu H, Stackebrandt E, Schleifer KH, Ludwig W, Pohla H, Ito H, Hirata A, Oyaizu Y, Komagata K (1987) A radiation-resistant rod-shaped bacterium, *Deinobacter grandis* gen. nov., sp. nov., with peptidoglycan containing ornithine. *Int J Syst Bacteriol* 37, 62–67
- Raetz CRH, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71, 635–700
- Rojas ER, Billings G, Odermatt PD, Auer GK, Zhu L, Miguel A, Chang F, Weibel DB, Theriot JA, Huang KC (2018) The outer membrane is an essential load-bearing element in Gram-negative bacteria. *Nature* 559, 617–621
- Takahashi S, Nishida H (2015) Quantitative analysis of chromosomal and plasmid DNA during the growth of spheroplasts of *Escherichia coli*. *Journal of General and Applied Microbiology* 61, 262–265
- Takahashi S, Nishida H (2016) Growth of *Enterobacter amnigenus* and *Escherichia coli* spheroplasts in marine broth containing penicillin. *Bulletin of Toyama Prefectural University* 26, 27–30
- Takahashi S, Nishida H (2017) Comparison of gene expression among normally divided cells, elongated cells, spheroplasts at the beginning of growth, and enlarged spheroplasts at 43 h of growth in *Lelliottia amnigena*. *Gene*

Reports 7, 87-90

Takahashi S, Takayanagi A, Takahashi Y, Oshima T, Nishida H (2016) Comparison of transcriptomes of enlarged spheroplasts of *Erythrobacter litoralis* and *Lelliottia amnigena*. AIMS Microbiology 2, 152-189

Takayanagi A, Takahashi S, Nishida H (2016)

Requirement of dark culture condition for enlargement of spheroplasts of the aerobic anoxygenic photosynthetic marine bacterium *Erythrobacter litoralis*. Journal of General and Applied Microbiology 62, 14-17

Trimble MJ, Mlynářčik P, Kolář M, Hancock REW (2016) Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. Cold Spring Harb Perspect Med 6, a025288

## Bacterial cell surfaces and their expansion

Hiromi Nishida

Department of Biotechnology

*Keywords:* bacteria, cell surface, spheroplast, protoplast, enlarged cell