

バクテリア細胞の巨大化方法の確立と巨大細胞への
マイクロインジェクションに関する研究

2021年3月

高橋 沙和子

目次	項
第 1 章 序論	1
第 2 章 バクテリア細胞の巨大化方法の確立	5
2.1 序論	5
2.2 実験方法	6
2.2.1 培地・バッファー	6
2.2.2 <i>Bacillus subtilis</i> のプロトプラスト培養	9
2.2.3 <i>Deinococcus grandis</i> のスフェロプラスト培養	9
2.2.4 <i>Enterobacter hormaechei</i> のスフェロプラスト培養	10
2.2.5 <i>Enterococcus faecalis</i> のプロトプラスト培養	10
2.2.6 <i>Erythrobacter litoralis</i> のスフェロプラスト培養	11
2.2.7 <i>Escherichia coli</i> のスフェロプラスト培養 1	11
2.2.8 <i>Lelliottia amnigena</i> のスフェロプラスト培養 (リゾチーム処理あり)	11
2.2.9 <i>Lelliottia amnigena</i> のスフェロプラスト培養 (リゾチーム処理なし)	11
2.2.10 <i>Rhodospirillum rubrum</i> のスフェロプラスト培養	12
2.2.11 膜と DNA 染色	12
2.2.12 <i>Lelliottia amnigena</i> の外膜の蛍光ラベル	12
2.2.13 <i>Lelliottia amnigena</i> 巨大化スフェロプラストの DNA 染色	13
2.3 結果と考察	14
2.3.1 バクテリア細胞巨大化への金属塩の影響	14
2.3.2 マイクロインジェクション可能な細胞の作製	15
2.4 小括	17
図表	19

第3章	バクテリア巨大細胞の形態と液胞形成	30
3.1	序論	30
3.2	実験方法	31
3.2.1	トランスクリプトーム解析	31
3.2.2	リアルタイム定量 RT-PCR	33
3.2.3	膜と DNA 染色	34
3.2.4	透過型電子顕微鏡観察	34
3.3	結果と考察	36
3.3.1	異種バクテリアスフェロプラストのトランスクリプトーム解析	36
3.3.2	4種類の形態の遺伝子発現比較	37
3.3.3	巨大化スフェロ／プロトプラストの DNA 局在	39
3.3.4	巨大化過程における液胞形成	40
3.4	小括	43
	図表	45
第4章	バクテリア細胞巨大化と DNA 複製の関係	68
4.1	序論	68
4.2	実験方法	69
4.2.1	<i>Escherichia coli</i> のスフェロプラスト培養 2	69
4.2.2	<i>Escherichia coli</i> スフェロプラストのリアルタイム定量 PCR	69
4.2.3	<i>Lelliottia amnigena</i> 巨大化スフェロプラストの低張液でのふるまい	70
4.2.4	<i>Lelliottia amnigena</i> 巨大化スフェロプラスト 1 細胞のリアルタイム定量 PCR	70
4.2.5	全ゲノムリシーケンス	71
4.2.6	全ゲノムリシーケンスデータ解析	72
4.2.7	<i>Enterococcus faecalis</i> のリアルタイム定量 PCR1	72
4.2.8	ノボビオシン添加による DNA 複製阻害	73

4.2.9	<i>Enterococcus faecalis</i> のリアルタイム定量 PCR2	73
4.3	結果と考察	75
4.3.1	スフェロプラスト巨大化に伴う DNA 複製	75
4.3.2	巨大化スフェロプラスト 1 細胞における DNA 複製	75
4.3.3	巨大細胞の全ゲノムリシーケンス解析	77
4.3.4	DNA 複製阻害による巨大化（膜合成）の停止	80
4.4	小括	82
	図表	84
第 5 章	バクテリア巨大細胞へのマイクロインジェクション	106
5.1	序論	106
5.2	実験方法	107
5.2.1	マイクロインジェクションワークステーション	107
5.2.2	微小ガラス管（フェムトチップ II）への BFP 溶液の充填	107
5.2.3	BFP 溶液導入のマイクロインジェクション操作	107
5.2.4	導入溶液の検討	107
5.2.5	導入ゲノム DNA の用意	108
5.2.6	微小ガラス管（フェムトチップ II）へのゲノム DNA 溶液の充填	108
5.2.7	ゲノム DNA 溶液導入のマイクロインジェクション操作	109
5.2.8	ゲノム DNA 導入後のクラスター解析	109
5.3	結果と考察	110
5.3.1	青色蛍光タンパク質溶液の導入	110
5.3.2	マイクロインジェクション操作による液胞の形成	111
5.3.3	導入溶液の検討	111
5.3.4	ゲノム DNA の導入による巨大化への影響	112
5.4	小括	116

図表	118
第6章 総括	130
参考文献	132
謝辞	140

第1章 序論

バクテリアにおける遺伝情報の水平伝播は、その進化の原動力となってきた^{1,4}。水平伝播は、プラスミドやウイルスを介して遺伝情報の一部が宿主細胞に取り込まれることを指す^{1,4}。これによって、バクテリア種の生態学および病原性の特徴は効率的に変化してきた¹。一方、私の知る限りにおいて、これまでにバクテリアのクロモソームが水平伝播された報告はなく、バクテリア細胞は、異種クロモソームを取り込んだ際にどのような振る舞いをするのか、遺伝情報をコントロールできるのかどうか明らかではない。

これまでの研究では、特定の遺伝子や限られた数の遺伝子を用いた遺伝子工学の方法を中心とした実験が行われてきており、ゲノム全体を使った実験を行うのは困難であった。プラスミドなど小さいサイズの DNA の導入は、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、プロトプラスト PEG 法といった遺伝子工学的手法によって行われているが、それらの方法では数 Mbp のような長鎖 DNA を導入できない。ただし、PEG 法によると 1 Mbp までは導入できるが、それが現時点での限界である。一方、バクテリア間の DNA の水平伝播方法として、2つのバクテリアを融合するプロトプラスト融合方法がある。この方法は、主に同属間で用いられており⁵⁻¹⁰、異種属間での融合に成功した報告もあるが、得られた融合株は非常に不安定である¹¹。また、遺伝物質の DNA だけではなく、細胞膜および細胞質も混ざり合うため、宿主がどちらかが明確ではない。

一方、遺伝子工学の方法を繰り返すことによって、外来性のゲノム DNA を特定のバクテリア細胞内に導入する研究は、慶応義塾大学の板谷光泰らによって行われた¹²。2005年に板谷らは、ゲノムを丸ごと水平伝播させることを目的とし、枯草菌を宿主とした細胞のゲノム (4.2 Mbp) にシアノバクテリアのゲノム (3.5 Mbp) を挿入したシアノバチルス (7.7 Mbp) を創った¹²。この研究は、外来 DNA の取り込み能力に長けている枯草菌のゲノムをベクターとして用いて、シアノバクテリアのゲノム断片を一つ一つ組み込ませる方法で達成された¹²。しかし、その完成には7年の歳月がかかっている

る¹³。また、枯草菌の特徴を活かした形質転換であるため、それ以外のバクテリアへの導入方法に適用できない。

また、ポリエチレングリコール (PEG) 媒介形質転換方法によって、外来性のゲノム DNA を特定のバクテリア細胞内に導入する研究は、アメリカの Venter 研究所で行われている¹⁴⁻¹⁶。これらの研究は、生命体の構成を最小限までそぎ落とし、ゼロから生命体を設計することを目的としている¹⁴⁻¹⁶。2007年に Carole Lartigue らは、*Mycoplasma mycoides* 由来のインタクトなゲノム DNA (1.08 Mbp) を PEG 媒介形質転換方法によって、同属の *Mycoplasma capricolum* に導入し、*M. mycoides* の表現型を持つ細胞の創生に成功した¹⁴。2010年には、Daniel G. Gibson らによって、*M. mycoides* の配列に基づく化学合成した DNA (JCVI-syn1.0, 1.08 Mbp) を *M. capricolum* に導入した人工細胞が創られた¹⁵。彼らはそれを達成するまでに、約40億円と15年の歳月を費やした^{15,17}。2016年には、2010年に築き上げた方法に基づき、Clyde A. Hutchison III らによって、*M. mycoides* の最小ゲノム (JCVI-syn3.0, 531 kbp) がデザインおよび合成され、JCVI-syn1.0 と 3.0 の生育の特徴が比較された¹⁶。このように、Venter 研究所では、ゲノムのデザイン・構築・テストの3つのサイクルが構築され、6年の間に少なくとも2回以上のサイクルを回している。しかし、この方法は宿主細胞がマイコプラズマに限られているため、それ以外のバクテリアへの導入方法に使用できない。よって、現在、ゲノム移植が可能なバクテリアは、枯草菌や *Mycoplasma* のような特定のバクテリア種に限られており、多種多様なバクテリア細胞に適用できない。例えば、枯草菌に大腸菌のゲノムを導入し、導入ゲノムからどの遺伝子が発現するかを調べることは板谷らの方法で行えるが、宿主を大腸菌に換えて枯草菌のゲノムを導入し、同様の解析を行う方法はない。

私は、特定の宿主細胞ではなく、全てのバクテリアを宿主として用い、様々なゲノムサイズの DNA を導入することを目指した。そのため、どのような宿主にも適応できるように、遺伝子操作によって適当な細胞を構築する方法ではなく、物理的に細胞を巨大化し、その巨大細胞へ DNA をマイクロインジェクションする方法を選択した。

マイクロインジェクションは、宿主細胞に対し、DNA 溶液を直接注入でき、一度の操作で長鎖 DNA の導入が可能であるため極めて有効な方法である。この方法は、マイクロマニピュレータ装置を用いて、微小ガラス管を細胞内に挿入する必要があるため、真核生物の卵細胞など直径が数十 μm を超える細胞に対して行われている。一般的なバクテリア細胞の大きさは数 μm であるため、マイクロインジェクション操作に適用できなかった。マイクロインジェクションによって DNA や RNA、タンパク質をバクテリア細胞に導入した報告はない。現在、マイクロインジェクション実験は、装置の自動化が進み、初心者でも扱いやすくなっている。使用する微小ガラス管も販売されており、用途に合わせて選択することができる。私は、細胞の大きさの課題を乗り越えれば、様々なバクテリア種に対して適用できる画期的な方法になると考えた。

バクテリア細胞の巨大化実験は、パッチクランプ法による膜輸送タンパク質の活性測定などを目的に行われている^{18,19}。バクテリア細胞をリゾチームやペニシリンで処理すると細胞壁が壊れ、球状のスフェロプラストあるいはプロトプラストになる。本研究では、細胞膜と外膜で囲まれた細胞をスフェロプラストと呼び、細胞膜のみで囲まれた細胞をプロトプラストと呼ぶ。これらスフェロプラストおよびプロトプラストをペニシリンなどの細胞壁合成阻害剤を含む、適度な浸透圧下の培地で培養すると巨大化する。この方法により、大腸菌のスフェロプラストや枯草菌のプロトプラストは直径 15 μm 程度に巨大化し、パッチクランプ法に適用された^{18,19}。パッチクランプ法は、微小ガラス管を膜に接触させ、膜電位を計測する方法である。よって、微小ガラス管を細胞内に挿入し、溶液を注入するマイクロインジェクションとは大きく異なる。パッチクランプ法に適用された巨大細胞をマイクロインジェクションに適用した報告はないため、微小ガラス管の挿入に耐えられる細胞の大きさや膜の強度などの条件は不明であった。

本研究では、バクテリア細胞に様々な異種ゲノム DNA を導入し、どのようなゲノム DNA が宿主の生命活動に影響するのかを調べることを目的とした。そのための効率的な方法の確立に向けて、マイクロインジェクション可能なバクテリア細胞の作製方法の確立と巨大細胞へのマイクロインジェクションに取り組んだ。本論文の主要な内容は、

次の4つの章で構成した：第2章バクテリア細胞の巨大化方法の確立（細胞巨大化に対する浸透圧、金属塩の影響）、第3章バクテリア巨大細胞の形態と液胞形成（DNA局在、巨大化に伴う液胞形成、遺伝子発現解析）、第4章バクテリア細胞巨大化とDNA複製の関係（スフェロプラスト巨大化に伴うDNA複製、DNA複製阻害剤による巨大化のコントロール）、第5章バクテリア巨大細胞へのマイクロインジェクション（蛍光タンパク質溶液の導入、マイクロインジェクション操作による液胞形成、導入溶液の検討、異種ゲノムDNAの導入）。

第2章 バクテリア細胞の巨大化方法の確立

2.1 序論

バクテリアのスフェロプラストやプロトプラスト（ここでは、バクテリアスフェロ／プロトプラストと記す）の巨大化は、矢部勇博士を中心とした研究チームのスフェロプラスト培養法を参考にした^{18,19}。この方法は、リゾチームによって細胞壁を構成するペプチドグリカン进行を溶かし、スフェロ／プロトプラストにした細胞を、細胞壁合成阻害剤であるペニシリンを含む浸透圧調整した培地で培養する方法である²⁰。また、スフェロ／プロトプラスト化は、リゾチームを用いず、ペニシリンのみを用いた方法でも行われている²¹⁻²³。スフェロ／プロトプラストは、細胞壁をもたないため、浸透圧に高い感受性を持ち、低浸透圧の水中で破裂する^{18,21-23}。培地中の浸透圧を調整することによってスフェロ／プロトプラストの状態を維持することが可能であり、浸透圧の調整には、スクロースのような糖やCaCl₂、MgCl₂、MgSO₄、KClおよびNaClといった金属塩が使用されている¹⁸⁻²³。よって、これまでに報告されている巨大化方法は、浸透圧の調整が中心であった。この方法によって巨大化した大腸菌や枯草菌のスフェロ／プロトプラストは、パッチクランプ法による膜輸送タンパク質の活性測定に用いられた^{18,19}。一方、マイクロインジェクション実験を行った報告はなく、バクテリアスフェロ／プロトプラストが微小ガラス管の挿入に耐えられるのかどうか明らかではなかった。また、スフェロ／プロトプラスト培養において浸透圧調整が重要であることは報告されていたが、その他の巨大化に影響を与える因子は明らかになっておらず、細胞の大きさや膜の強度を調整する方法はなかった。

本章では、スフェロ／プロトプラストの巨大化をコントロールする方法を知るために、スフェロ／プロトプラストの培養における浸透圧の影響を詳細に調べた。その際に、浸透圧の調整を糖で行った場合と金属塩で行った場合を比較することで、金属塩は巨大化に必要であること、さらに細胞の大きさや膜の強度を調整できることを明らかにした。

2.2 実験方法

2.2.1 培地・バッファー

本研究において使われた試薬は特に記載のない限り、和光純薬、ナカライテスク社製を使用した。

MRS 培地

BD Difco™ Lactobacilli MRS Broth (BD, Franklin Lakes, NJ) : 55 g/L

Proteose Peptone No. 3	10 g	Ammonium Citrate	2 g
Beef extract	10 g	C ₂ H ₃ NaO ₂	5 g
Yeast extract	5 g	MgSO ₄	0.1 g
Dextrose	20 g	MnSO ₄	0.05 g
Polysorbate 80	1 g	K ₂ HPO ₄	2 g
H ₂ O			1 L

LB 培地

LB Broth (BD, Franklin Lakes, NJ) : 20 g/L

Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Tryptone	10 g
H ₂ O	1 L

R. rubrum 培地

Yeast extract	2 g
Hipolypepton	10 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
H ₂ O	1 L

TGY 培地

Yeast extract	3 g
Tryptone	5 g
Glucose	1 g
H ₂ O	1 L

DMB (Difco Marine Broth)

Difco Marine Broth 2216 (BD, Franklin Lakes, NJ) : 37.4 g/L

Bacto peptone	5 g	NaHCO ₃	0.16 g
Bacto yeast extract	1 g	KBr	0.08 g
Fe(III)citrate	0.1 g	SrCl ₂	34 mg
NaCl	19.45 g	H ₃ BO ₃	22 mg
MgCl ₂ (anhydrous)	5.9 g	Na-silicate	4 mg
Na ₂ SO ₄	3.24 g	NaF	2.4 mg
CaCl ₂	1.8 g	(NH ₄)NO ₃	1.6 mg
KCl	0.55 g	Na ₂ HPO ₄	8 mg
H ₂ O			1 L

MMB (Modified Marine Broth)

Name	Components
MMB0	5 g/L peptone, 1 g/L yeast extract, 0.1 g/L ferric citrate
MMB1Ca	MMB0, 16.2 mM CaCl ₂
MMB1K	MMB0, 7.4 mM KCl
MMB1Mg	MMB0, 62 mM MgCl ₂
MMB1Na	MMB0, 333 mM NaCl
MMB2CaK	MMB0, 16.2 mM CaCl ₂ , 7.4 mM KCl
MMB2CaMg	MMB0, 16.2 mM CaCl ₂ , 62 mM MgCl ₂
MMB2CaNa	MMB0, 16.2 mM CaCl ₂ , 333 mM NaCl
MMB2KMg	MMB0, 7.4 mM KCl, 62 mM MgCl ₂
MMB2KNa	MMB0, 7.4 mM KCl, 333 mM NaCl
MMB2MgNa	MMB0, 62 mM MgCl ₂ , 333 mM NaCl
MMB3CaKMg	MMB0, 16.2 mM CaCl ₂ , 7.4 mM KCl, 62 mM MgCl ₂
MMB3CaKNa	MMB0, 16.2 mM CaCl ₂ , 7.4 mM KCl, 333 mM NaCl
MMB3CaMgNa	MMB0, 16.2 mM CaCl ₂ , 62 mM MgCl ₂ , 333 mM NaCl
MMB3KMgNa	MMB0, 7.4 mM KCl, 62 mM MgCl ₂ , 333 mM NaCl
MMB	MMB0, 16.2 mM CaCl ₂ , 7.4 mM KCl, 62 mM MgCl ₂ , 333 mM NaCl
eMMB3CaKMg	MMB0, 62 mM CaCl ₂ , 7.4 mM KCl, 16.2 mM MgCl ₂

※寒天培地には、Bacto Agar (Difco) 15 g/L を追加

※オートクレーブ滅菌：121 度、15 分間

PS バッファー (pH 7.0)

KH ₂ PO ₄	4.56 g
Na ₂ HPO ₄	4.73 g
sucrose	171 g
H ₂ O	1 L

エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液

EDTA (Dojindo) を 0.5 M になるように蒸留水に溶かし、水酸化ナトリウムを用いて、pH を 8.0 に調整した。

リゾチーム溶液 I

0.1 M EDTA (Dojindo)	6.5 μ L
0.5 M EDTA (Dojindo)	5.6 μ L
lysozyme (Wako)	2.6 mg
PS buffer	111 μ L

リゾチーム溶液 II

0.3 M スクロースを含む 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) にリゾチーム (Wako) を溶かし、使用。※0.3 M スクロースを含む 0.1 M Tris-HCl は、121 度で 15 分間オートクレーブ。

2.2.2 *Bacillus subtilis* のプロトプラスト培養

B. subtilis 168 株を使用した。LB 寒天培地で 30°C で培養し、1~2 日後に生えてきたシングルコロニーを LB 培地に植菌し、150 rpm、30°C で一晩培養した。一晩培養液 500 μ L を 10 mL の LB 培地に植菌し、OD₆₀₀=1.4 まで 150 rpm、30°C で培養した。その後、培養液 1 mL を 11,000 $\times g$ で 1 分間集菌し、得られた細胞を DMB 1 mL で懸濁した。この懸濁液 40 μ L をペニシリン濃度 300 μ g/mL を含む DMB 2 mL に加え、室温 (24~25°C) ・暗条件下で静置培養した。

2.2.3 *Deinococcus grandis* のスフェロプラスト培養

Deinococcus grandis ATCC 43672 株を使用した。TGY 寒天培地で 30°C で培養し、2~3 日後に生えてきたシングルコロニーを TGY 培地に植菌し、150 rpm、30°C で一晩培養した。一晩培養液を 10 mL の TGY 培地に植菌し、OD₆₀₀=0.7 まで 150 rpm、30°C で培養した。その後、培養液 6 mL を 7,000 rpm で 5 分間集菌し、PS バッファー 6 mL で懸濁後、7,000 rpm で 5 分間集菌した。上清を捨て、PS バッファー 1.2 mL を加え、懸濁後、リゾチーム溶液 I を加え、穏やかに振盪させた (37°C、60-70 rpm、6 時間)²⁴。

その後、8,000 rpm で5分間遠心し、得られた細胞を DMB で懸濁した。この懸濁液 10 μ L をペニシリン濃度 300 μ g/mL を含む DMB 2 mL に加え、室温 (24~25°C) ・暗条件下で静置培養した。DMB の他に、MMB0、MMB および MMB0 にそれぞれ異なった濃度の金属塩を加えた培地を使用した。また、位相差顕微鏡 (OLYMPUS CKX41) 観察写真に基づいて、細胞膜直径を cellSens Standard 1.11 imaging software (Olympus) で計測した。R (<http://www.r-project.org/>) でそれぞれの培地における細胞直径のボックスプロットを作成した。

2.2.4 *Enterobacter hormaechei* のスフェロプラスト培養

E. hormaechei NBRC105718 株を使用した。LB 寒天培地で 30°C で培養し、1~2 日後に生えてきたシングルコロニーを LB 培地に植菌し、150 rpm、30°C で一晩培養した。一晩培養液 500 μ L を 10 mL の LB 培地に植菌し、OD₆₀₀ = 1.5 まで 150 rpm、30°C で培養した。その後、培養液 1 mL を 11,000 $\times g$ で 1 分間集菌し、得られた細胞を DMB 1 mL で懸濁した。この懸濁液 2 μ L をペニシリン濃度 300 μ g/mL を含む DMB 1 mL に加え、室温 (24~25°C) ・暗条件下で静置培養した。

2.2.5 *Enterococcus faecalis* のプロトプラスト培養

E. faecalis NBRC100480 株を使用した。MRS 寒天培地で 37°C で培養し、1~2 日後に生えてきたシングルコロニーを MRS 培地に植菌し、37°C で一晩培養した。一晩培養液 500 μ L を 10 mL の MRS 培地に植菌し、OD₆₀₀ = 0.7~0.8 になるまで、37°C で静置培養した。その後、培養液 1 mL を 11,000 $\times g$ で 1 分間集菌し、1 mL のラビアーゼ溶液²⁵ (終濃度 5 mg/mL) あるいは、リゾチーム溶液 II (終濃度 5 mg/mL) で懸濁し、37°C で 3 時間静置培養した。菌液を 7,000 rpm で 5 分間遠心し、DMB 1 mL で懸濁した。この懸濁液 10 μ L をペニシリン濃度 300 μ g/mL を含む DMB 2 mL に加え、室温 (24~25°C) ・暗条件下で静置培養した。

2.2.6 *Erythrobacter litoralis* のスフェロプラスト培養

E. litoralis NBRC102620 株を使用した。DMB 寒天培地で 25°C で 3 日間培養した菌体 (1~3 mg) を、1 mL のリゾチーム溶液 II (終濃度 200 µg/mL) に懸濁し、37°C で 15 分間静置培養した。その後、3,000 rpm で 5 分間遠心し、得られた細胞をペニシリン濃度 600 µg/mL を含む DMB 1 mL で懸濁した。この懸濁液 2 µL をペニシリン濃度 600 µg/mL を含む DMB 1 mL に加え、室温 (24~25°C) ・暗条件下で静置培養した。

2.2.7 *Escherichia coli* のスフェロプラスト培養 1

E. coli SCS1 株 (strategene) を使用した。DMB 寒天培地で数日間培養した菌体 (1~3 mg) を、1 mL のリゾチーム溶液 II (終濃度 200 µg/mL) に懸濁し、37°C で 15 分間静置培養した。その後、3,000 rpm で 5 分間遠心し、得られた細胞をペニシリン濃度 300 µg/mL を含む DMB 1 mL で懸濁した。この懸濁液 2 µL をペニシリン濃度 300 µg/mL を含む DMB 1 mL に加え、室温 (24~25°C) ・暗条件下で静置培養した。

2.2.8 *Lelliottia amnigena* のスフェロプラスト培養 (リゾチーム処理あり)

L. amnigena NBRC105700 株を使用した。DMB 寒天培地で 25°C で 3 日間培養した菌体を、OD₆₀₀=1.0 になるように 1 mL のリゾチーム溶液 II (終濃度 200 µg/mL) に懸濁し、37°C で 15 分間静置培養した。その後、3,000 rpm で 5 分間遠心し、得られた細胞をペニシリン濃度 300 µg/mL を含む DMB 1 mL で懸濁した。この懸濁液 2 µL をペニシリン濃度 300 µg/mL を含む DMB 1 mL に加え、室温 (24~25°C) ・暗条件下で静置培養した。

2.2.9 *Lelliottia amnigena* のスフェロプラスト培養 (リゾチーム処理なし)

L. amnigena NBRC105700 株を使用した。LB 寒天培地で 30°C で培養し、1~2 日後に生えてきたシングルコロニーを LB 培地に植菌し、150 rpm、30°C で一晩培養した。一晩培養液 500 µL を 10 mL の LB 培地に植菌し、OD₆₀₀=0.7~0.8 まで 150 rpm、30°C

で培養した。その後、培養液 1 mL を $11,000 \times g$ で 1 分間集菌し、得られた細胞を DMB 1 mL で懸濁した。この懸濁液 2 μ L をペニシリン濃度 300 μ g/mL を含む DMB 1 mL に加え、室温 (24~25°C)・暗条件下で静置培養した。DMB の他に、MMB0、MMB および MMB0 にそれぞれ異なった濃度の金属塩を加えた培地を使用した。

2.2.10 *Rhodospirillum rubrum* のスフェロプラスト培養

R. rubrum NBRC3986 株を使用した。*R. rubrum* 寒天培地で数日間培養した菌体 (1~3 mg) を、1 mL のリゾチーム溶液 II (終濃度 200 μ g/mL) に懸濁し、37°C で 15 分間静置培養した。その後、3,000 rpm で 5 分間遠心し、得られた細胞を DMB 1 mL で懸濁した。この懸濁液 2 μ L をペニシリン濃度 12 μ g/mL を含む DMB 1 mL に加え、室温 (24~25°C)・明暗条件下 (白色光蛍光灯 12 時間照射と照射なし 12 時間の繰り返し) で静置培養した。

2.2.11 膜と DNA 染色

細胞膜と DNA を同時に染色するため、*D. grandis* スフェロプラスト化直後の溶液、に FM4-64 (Invitrogen) と DAPI (Dojindo) をそれぞれ終濃度が 5 μ M および 0.5 μ M になるように加え、24°C で 10 分間染色した。位相差および蛍光顕微鏡観察は、Olympus BX51 (Olympus) を使用した。

2.2.12 *Lelliottia amnigena* の外膜の蛍光ラベル

緑色の蛍光色素である AlexaFluor 488 (Invitrogen) に結合した *N*-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルは、外膜のタンパク質、ペプチドおよび他のアミン含有分子を架橋することができる²⁶。外膜のラベル化は、Ranjit と Young²⁶ の方法に従って行った。桿状細胞を PBS (pH 8.0) で一度洗浄した後、NHS-AlexaFluor 488 (50 μ g/mL) を含む PBS (pH 9.0) で再懸濁し、暗所・室温で 10 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS (pH 8.0) で洗浄し、懸濁液を 2 つに分注し、1 つは DMB に再懸濁し、

OD₆₀₀が1.5に増加するまでチェイスした。もう一方は、2.2.8の方法に従ってリゾチーム処理を行い、ペニシリン濃度300 µg/ mLを含むDMBで室温(24~25度)・暗条件下で巨大化培養した。細胞は、GFP フィルターセットを用いて顕微鏡(OLYMPUS BX51)で観察した。

2.2.13 *Lelliottia amnigena* 巨大化スフェロプラストのDNA染色

2.2.8の方法に従って巨大化した培養液2 mLに対して、DAPI (Dojindo) 1 mg/mLを0.5 µL 加え、約1時間後、蛍光顕微鏡BZ-X710 (Keyence)で観察した。

2.3 結果と考察

2.3.1 バクテリア細胞巨大化への金属塩の影響

本研究では、スフェロ／プロトプラストの培養にペニシリン含有 Difco Marine Broth (DMB) を使用した。海水には、NaClをはじめとした複数の金属塩が含まれているため^{27,28}、海水の金属塩組成を再現した DMB は、浸透圧調整が不要であると考え、スフェロ／プロトプラスト用の培地として選択した。その結果、ペニシリン含有 DMB で海洋性のバクテリアも海洋性ではないバクテリアも巨大化することができた²⁹⁻³⁴ (図 1)。一方、同じ培地を使用したにも関わらず、バクテリアの種によって異なる巨大化の形態を示した。そこで、巨大化したバクテリアの一つである放射線抵抗性、グラム陰性の *Deinococcus grandis* を用いて、巨大化に影響を与える因子を調べた。*D. grandis* は通常、DMB ではなく、TGY (Tryptone glucose yeast extract) 培地で培養している。スフェロ／プロトプラストの浸透圧の調整は、糖と塩で行っているため、TGY 培地にスクロースとペニシリンを添加した培地、および TGY 培地に金属塩とペニシリンを添加した培地で巨大化培養を行った。金属塩は、DMB に含まれている 4 つの主要な金属塩である CaCl₂、KCl、MgCl₂ および NaCl を使用した。その結果、スクロースを添加したペニシリン含有 TGY 培地では巨大化せず、金属塩を添加したペニシリン含有 TGY 培地では巨大化した³³ (図 2)。したがって、スフェロ／プロトプラスト巨大化には、浸透圧だけではなく、金属塩が関与していることが明らかになった。金属塩の影響をさらに調べるため、金属塩の組成を変化させた Modified Marine Broth (MMB) を用いて、巨大化の様子を比較した。その結果、*D. grandis* スフェロプラスト巨大化は、「62 mM の Mg²⁺」あるいは「16.2 mM の Ca²⁺と 333 mM の Na⁺」を要求することが明らかになった³³ (図 3-A)。また、MMB には、Mg²⁺と Ca²⁺の二価陽イオンがそれぞれ 62 mM、16.2 mM と異なる濃度で含まれており、16.2 mM の Ca²⁺ (MMB1Ca) では巨大化しなかったことから、2 つのイオンの濃度を検討した。その結果、16.2 mM の Mg²⁺では巨大化せず、62 mM の Ca²⁺では巨大化した³³ (図 3-B)。また、膜染色および DNA 染色より、MMB1Ca は、細胞膜が破れていたのに対し、MMB2CaNa、MMB1Mg および

MMB2MgNa は細胞膜が維持されていた³³ (図 4)。よって、16.2 mM の Ca^{2+} は浸透圧が低く、細胞膜を維持できなかつたこと、および Na^+ は浸透圧調整として必要であったことが示された。これらの結果から、*D. grandis* スフェロプラスト巨大化は、 Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} を要求することが明らかになった。さらに、 Ca^{2+} を含む培地で培養すると、外膜融合が生じ、この現象は Mg^{2+} では生じなかつた^{35,36} (図 5)。よって、*D. grandis* の外膜の巨大化において、 Ca^{2+} と Mg^{2+} は、異なる機能を示し、金属イオンが浸透圧調整とは別に、巨大化において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

また、スフェロ/プロトプラストの巨大化に伴い、細胞のリン脂質組成は変化し、通常分裂細胞と巨大化スフェロ/プロトプラストの膜の性質は異なっていることが考えられる³³。したがって、スフェロ/プロトプラストは、膜合成の制御を伴って巨大化することを明らかにした。すなわち、スフェロ/プロトプラストの巨大化には、浸透圧の調整が重要だが、巨大化は、単純に水を取り込むことによる膨張ではない。

2.3.2 マイクロインジェクション可能な細胞の作製

D. grandis スフェロプラスト巨大化への金属塩の影響を調べることにより、金属イオンがスフェロ/プロトプラスト巨大化に重要であることがわかった。一方、*D. grandis* スフェロプラストは、外膜の伸張スピードが細胞膜に比べて圧倒的に速く、ペリプラズム空間が巨大化し、それに比べて細胞質の容積の増加はあまりないため細胞質へのマイクロインジェクションは困難である³³。本研究室で巨大化に成功したバクテリアの中で、グラム陰性の *Lelliottia amnigena* スフェロプラストおよびグラム陽性の *Enterococcus faecalis* プロトプラストは、DMB によってマイクロインジェクション可能な大きさ (> 15~20 μm) に巨大化し、細胞質の容積も増加していた (図 1-B)。よって、これら 2 種類のバクテリアを用いて、マイクロインジェクション実験に取り組んだ。DMB で巨大化した *E. faecalis* プロトプラストへのマイクロインジェクションは可能だった³⁷ (第 5 章参照)。一方、DMB で巨大化した *L. amnigena* は、微小ガラス管の挿入に耐えられない細胞膜強度の巨大細胞がほとんどであった。*L. amnigena* の巨大化スフェロ

ラストは、*D. grandis* ほどではないが、外膜の伸張スピードが細胞膜に比べて速いため、巨大なペリプラズム空間を形成した^{30,38} (図 6)。そこで、*D. grandis* スフェロプラスト巨大化で報告された金属塩の影響に基づいて、16 種類の条件下で *L. amnigena* の巨大化培養を行った (2.2.1 参照)。その結果、MMB3CaKMg において細胞膜の伸張が活性化され、巨大なペリプラズム空間の形成を阻止した³⁷ (図 7, 8)。また、驚くべきことに、MMB3CaKMg における巨大化速度はとても速く、スフェロプラストの崩壊も速かった。*D. grandis* スフェロプラスト巨大化において、 Mg^{2+} よりも Ca^{2+} の方が影響力が大きかったことから、*L. amnigena* スフェロプラスト巨大化における Ca^{2+} と Mg^{2+} の濃度を検討した。その結果、 Mg^{2+} よりも Ca^{2+} の方が巨大化し、62 mM および 100 mM の Ca^{2+} では細胞膜直径 20 μm を超えた (図 9)。そこで、MMB3CaKMg を改変し、新しく eMMB3CaKMg (62 mM $CaCl_2$ 、7.4 mM KCl 、16.2 mM $MgCl_2$) を作製したところ、巨大化の促進効果は、eMMB3CaKMg の方が MMB3CaKMg よりも大きかった³⁷ (図 10)。また、MMB3CaKMg では、培養 24 時間以内に細胞が崩壊し始めていたが、eMMB3CaKMg では、培養 24 時間以降も巨大化が進行した (図 10)。さらに、eMMB3CaKMg で巨大化したスフェロプラストは、微小ガラス管の挿入に耐えることができ、マイクロインジェクションが可能であった (第 5 章参照)。これらの結果から、金属塩の組成は、細胞膜の伸張および強度にも影響することを明らかにした。また、大腸菌のスフェロプラスト巨大化においても、eMMB3CaKMg は巨大化を促進した (図 11)。このことは、科レベルの分類グループごとに、金属イオンの影響が似ている可能性を示唆している。

2.4 小括

本研究は、特定のバクテリア細胞だけではなく、様々な種類のバクテリアを扱うことを目的としているため、それぞれのバクテリアに対し培地の浸透圧を調整する必要があると考えていたが、DMB を用いて複数のバクテリア種を巨大化できた。DMB の組成を調べることにより、バクテリアスフェロ／プロトプラスト巨大化には、浸透圧および金属イオンが関与していることが明らかになり、培地中の金属塩の組成を変化することでマイクロインジェクション可能な巨大化スフェロ／プロトプラストを作製できた。*L. amnigena* 巨大化スフェロプラストは、DMB では微小ガラス管の挿入に耐えられなかったのに対し、eMMB3CaKMg では可能であった。また、*D. grandis* においては、 Ca^{2+} を含む培地で培養すると巨大化スフェロプラストの外膜融合が生じた。これらの結果は、金属イオンが細胞膜および外膜の性状を変化させたということを示唆している。

金属イオンに対するスフェロ／プロトプラスト巨大化への影響は、バクテリアの種類によって異なっていた。グラム陰性の *D. grandis* のスフェロプラスト巨大化には、 Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} を要求していたが、同じくグラム陰性の *L. amnigena* のスフェロプラスト巨大化は、 Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} あるいは Na^+ を要求した。興味深いことに、 Na^+ を含む全ての MMB において、*L. amnigena* 巨大化スフェロプラストは細胞膜と外膜が乖離し、DMB と同様の巨大化をした。マイクロインジェクション可能な巨大化スフェロプラストを作製した eMMB3CaKMg には、 Na^+ が含まれていない。これらの結果から、*L. amnigena* 巨大化スフェロプラストにおいて、 Na^+ が細胞膜の伸張抑制に関与している可能性がある。一方、*D. grandis* および *L. amnigena* の両方において、 Mg^{2+} より Ca^{2+} の方がスフェロプラスト巨大化に影響を与えた。しかし、*D. grandis* では、外膜の伸張に影響したのに対し、*L. amnigena* では細胞膜の伸張に影響した。グラム陽性の *E. faecalis* のプロトプラスト巨大化には、 Ca^{2+} あるいは K^+ あるいは Na^+ を要求した³⁷。*L. amnigena* では、 Na^+ の存在下で細胞膜と外膜が乖離し、細胞膜の伸張が抑制されたのに対し、*E. faecalis* では、 Na^+ を含む全ての MMB において巨大化し、細胞膜が伸張した³⁷。また、*E. faecalis* プロトプラストが最も巨大化したのは DMB であった³⁷。

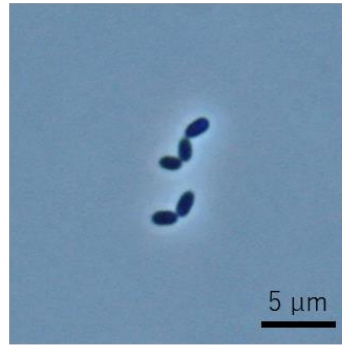
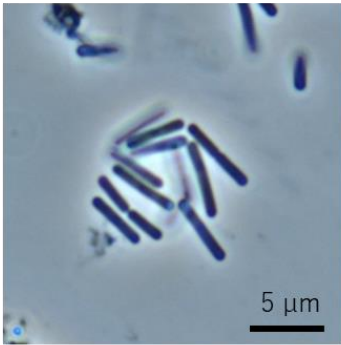
細菌の種類によってスフェロ／プロトプラスト巨大化に影響する金属イオンが異なっていた一方で、腸内細菌科に属する *L. amnigena* と *E. coli* はどちらも eMMB3CaKMg で細胞膜伸張が促進され、細菌種の分類グループごとに、金属イオンの影響が似ている可能性が示唆された。したがって、それぞれの分類グループから代表的な細菌を選択し、最適な金属イオン組成を見つけることで、分類グループと金属イオン組成の対応表を作成できるかもしれない。一方、金属イオンが細胞膜および外膜伸張に影響するメカニズムは明らかではない。

A

グラム陽性細菌

Bacillus subtilis

Enterococcus faecalis

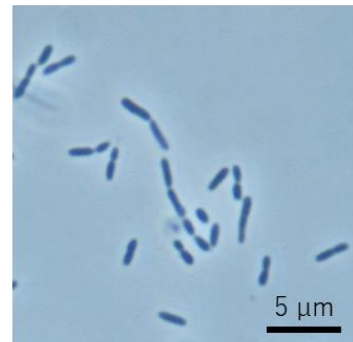
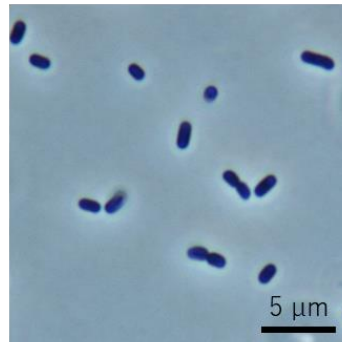
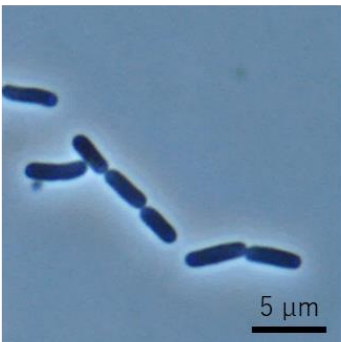


グラム陰性細菌

Deinococcus grandis

Enterobacter hormaechei

Erythrobacter litoralis※



Escherichia coli

Lelliottia amnigena

Rhodospirillum rubrum

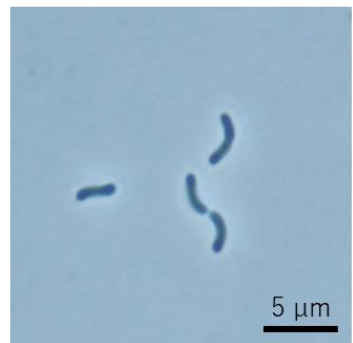
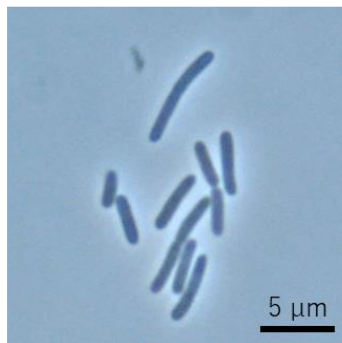
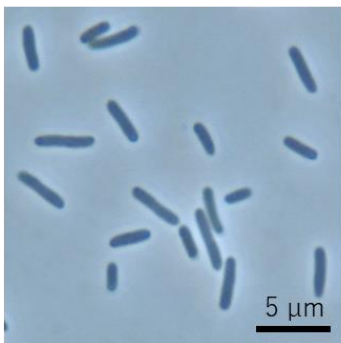
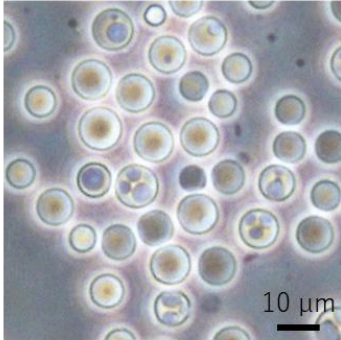


図1. DMBで巨大化に成功したバクテリア
(A) 通常細胞の顕微鏡観察写真。※海洋性のバクテリア

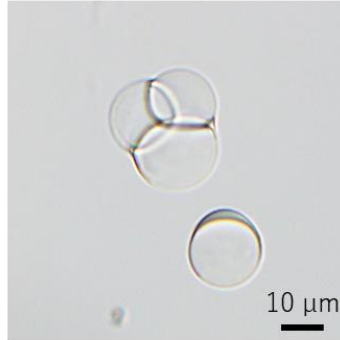
B

グラム陽性細菌

Bacillus subtilis

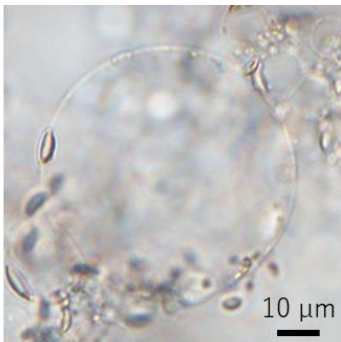


Enterococcus faecalis

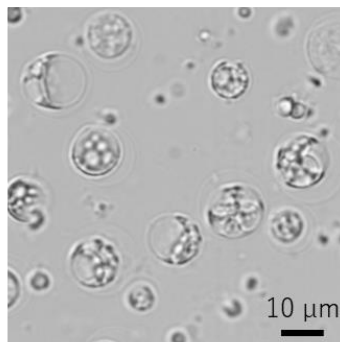


グラム陰性細菌

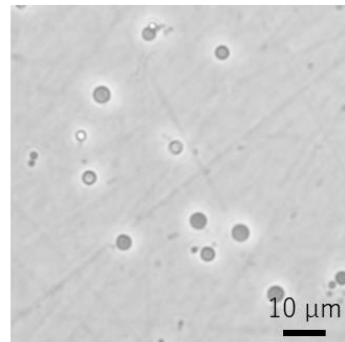
Deinococcus grandis



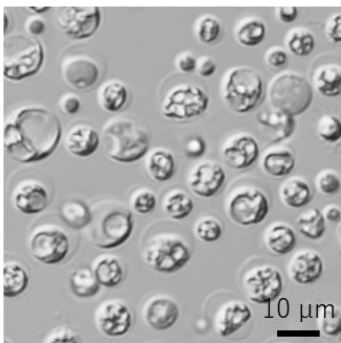
Enterobacter hormaechei



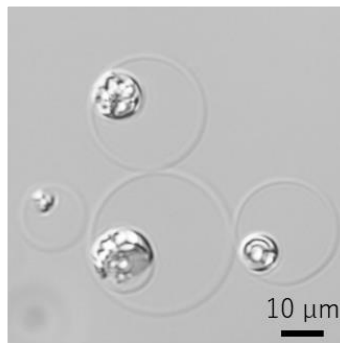
Erythrobacter litoralis※



Escherichia coli



Lelliottia amnigena



Rhodospirillum rubrum

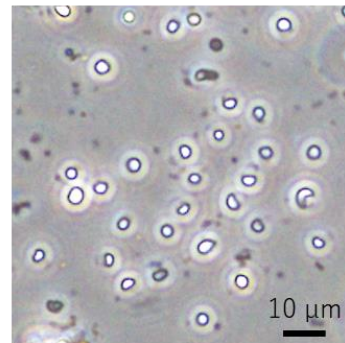


図1. DMBで巨大化に成功したバクテリア
(B) 巨大化スフェロ/プロトプラストの顕微鏡観察写真。※海洋性のバクテリア

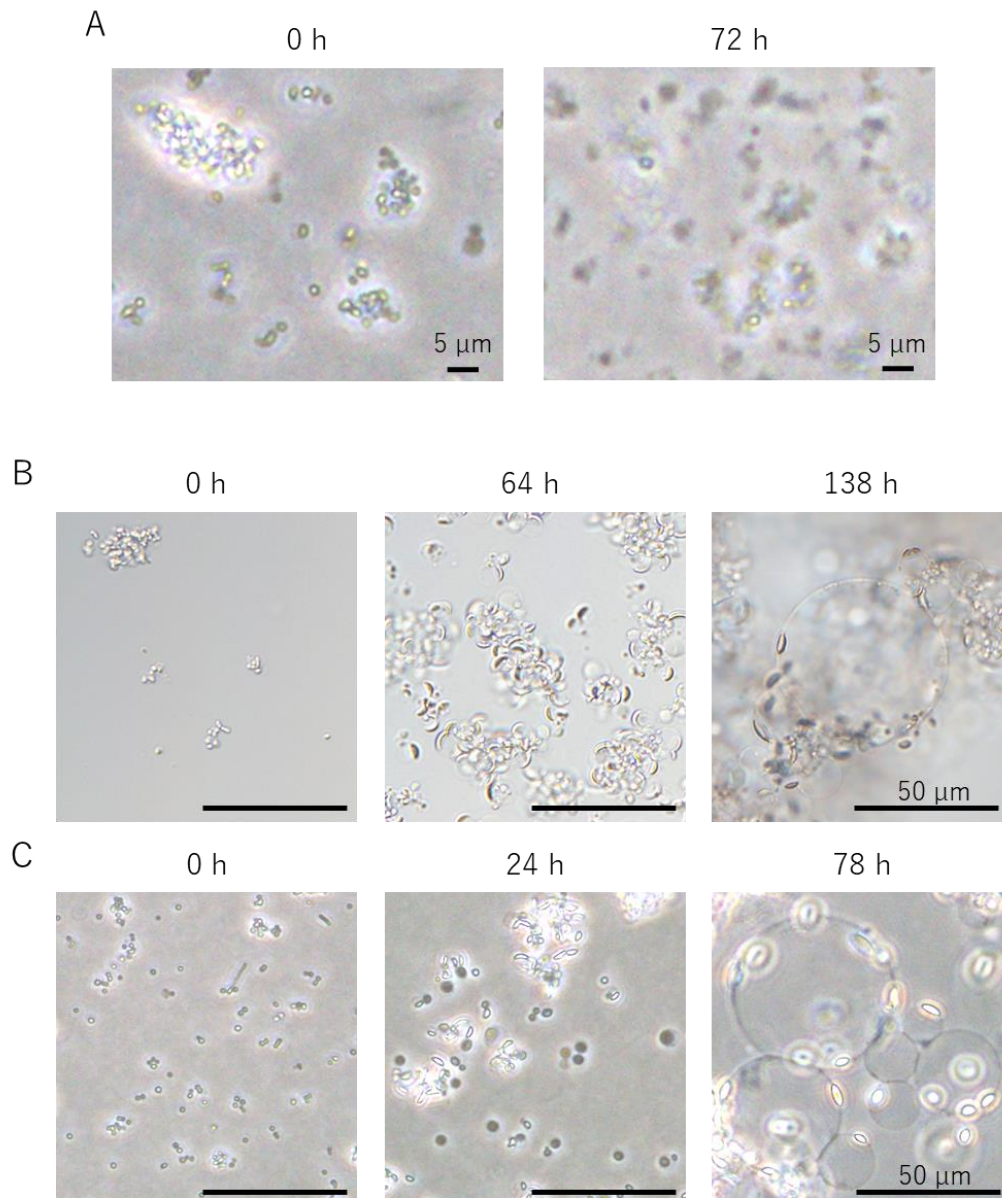


図2. *D. grandis*スフェロプラストの顕微鏡観察写真

(A) ペニシリンを含む0.5 Mスクロースで浸透圧調整を行ったTGY培地で*D. grandis*スフェロプラストを培養した。位相差顕微鏡Olympus CK X41を使用。(B) ペニシリンを含むDMBで*D. grandis*スフェロプラストを培養した。微分干渉顕微鏡Olympus IX73を使用。

(C) ペニシリンおよび19.45 g/L NaCl、5.9 g/L MgCl₂、1.8 g/L CaCl₂、0.55 g/L KClを含むTGY培地で*D. grandis*スフェロプラストを培養した。位相差顕微鏡Olympus CK X41を使用。

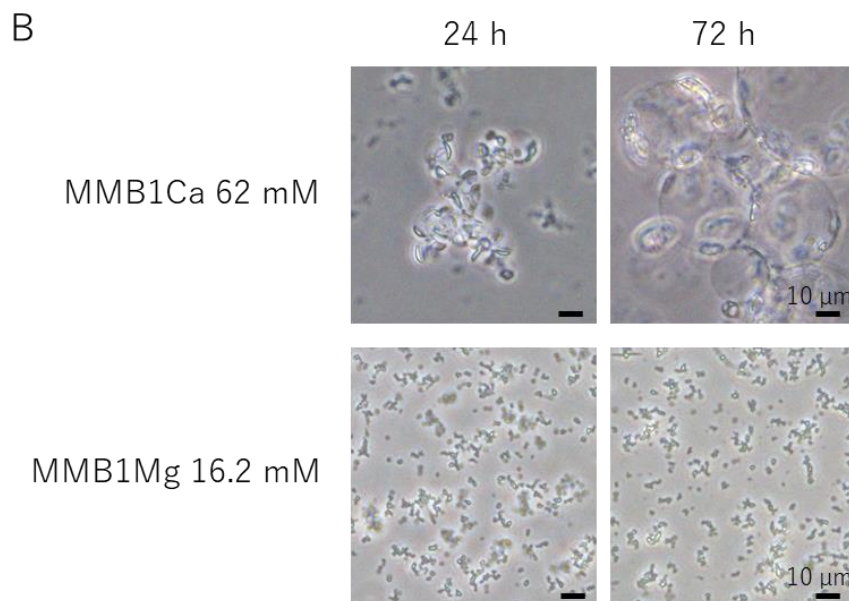
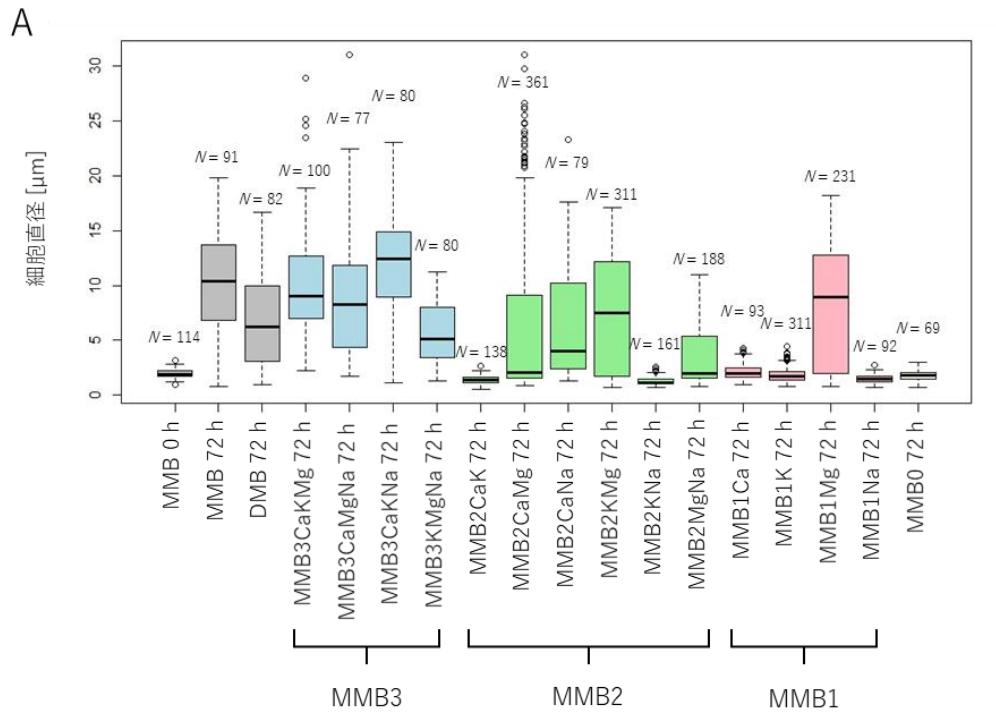


図3. *D. grandis*スフェロプラスト巨大化への金属塩の影響

(A) DMBおよびModified Marine Broth (MMB) における *D. grandis*スフェロプラストの細胞直径のボックスプロットによる比較。(B) 異なる濃度の金属塩 (CaCl_2 , MgCl_2) を含むMMBにおける *D. grandis*スフェロプラストの顕微鏡観察写真。位相差顕微鏡Olympus CK X41を使用。

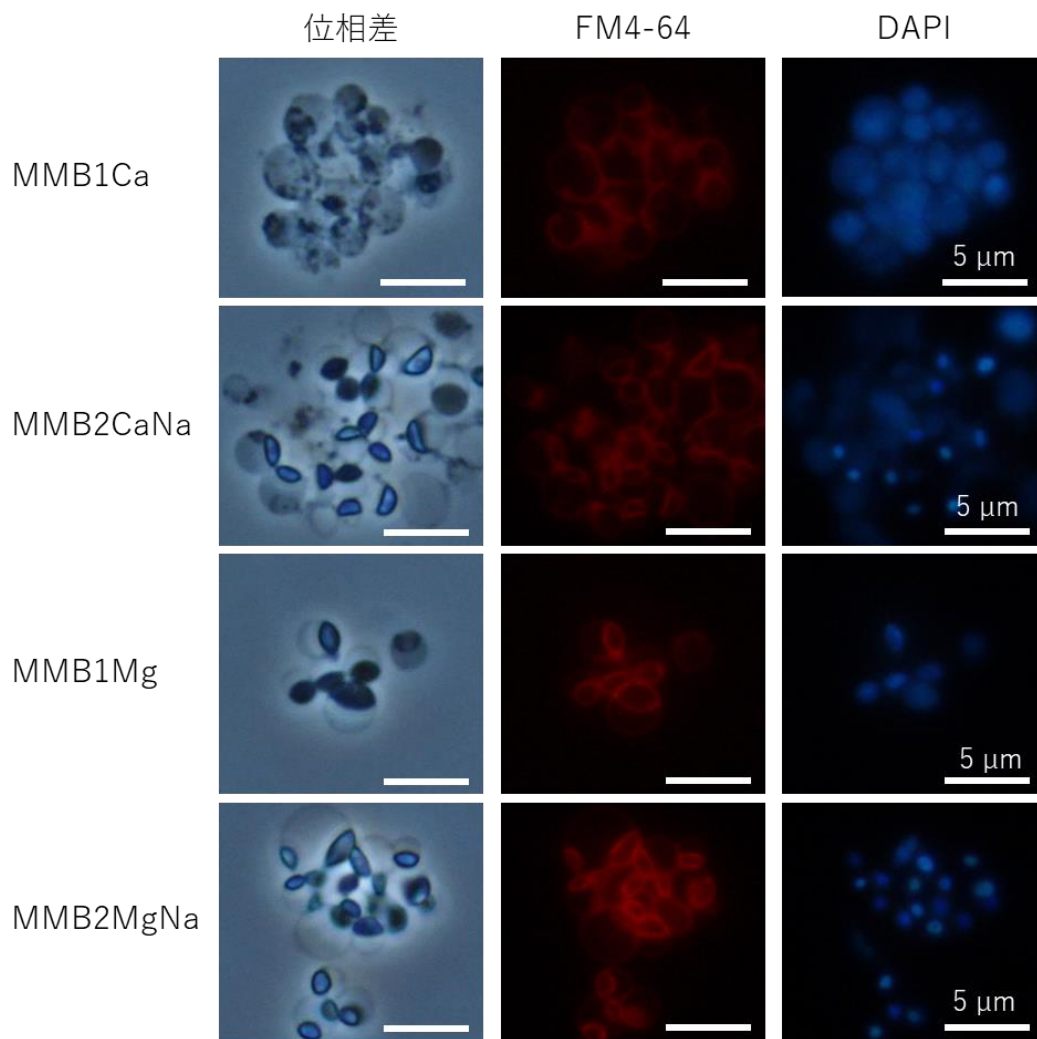


図4. 初期の *D. grandis* スフェロプラストの染色
 リゾチーム処理直後のスフェロプラストを MMB1Ca、MMB2CaNa、MMB1Mg
 および MMB2MgNa でそれぞれ懸濁した。膜を FM4-64 で染色し、DNA を DAPI で
 染色した。位相差および蛍光顕微鏡写真は、Olympus BX51 で撮影。

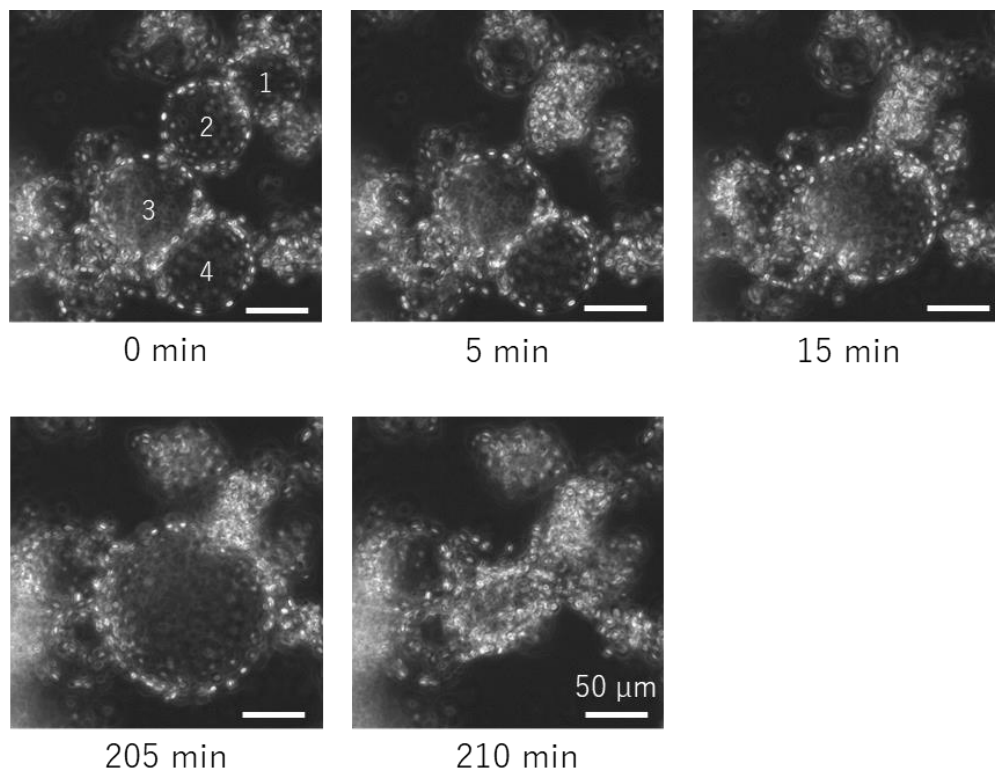


図5. *D. grandis*巨大化スフェロプラストの外膜融合
 ペニシリンを含む MMB0 に 200 mM の CaCl_2 を添加した培地で *D. grandis* スフェ
 ロプラストを培養し、タイムラプス観察した³⁵。培養50 時間のものを使用。スフェ
 ロプラスト1と2は、5分後に崩壊した。3と4は、15分後に融合し、210分後に崩壊
 した。蛍光顕微鏡 Keyence BZ X710 を使用。

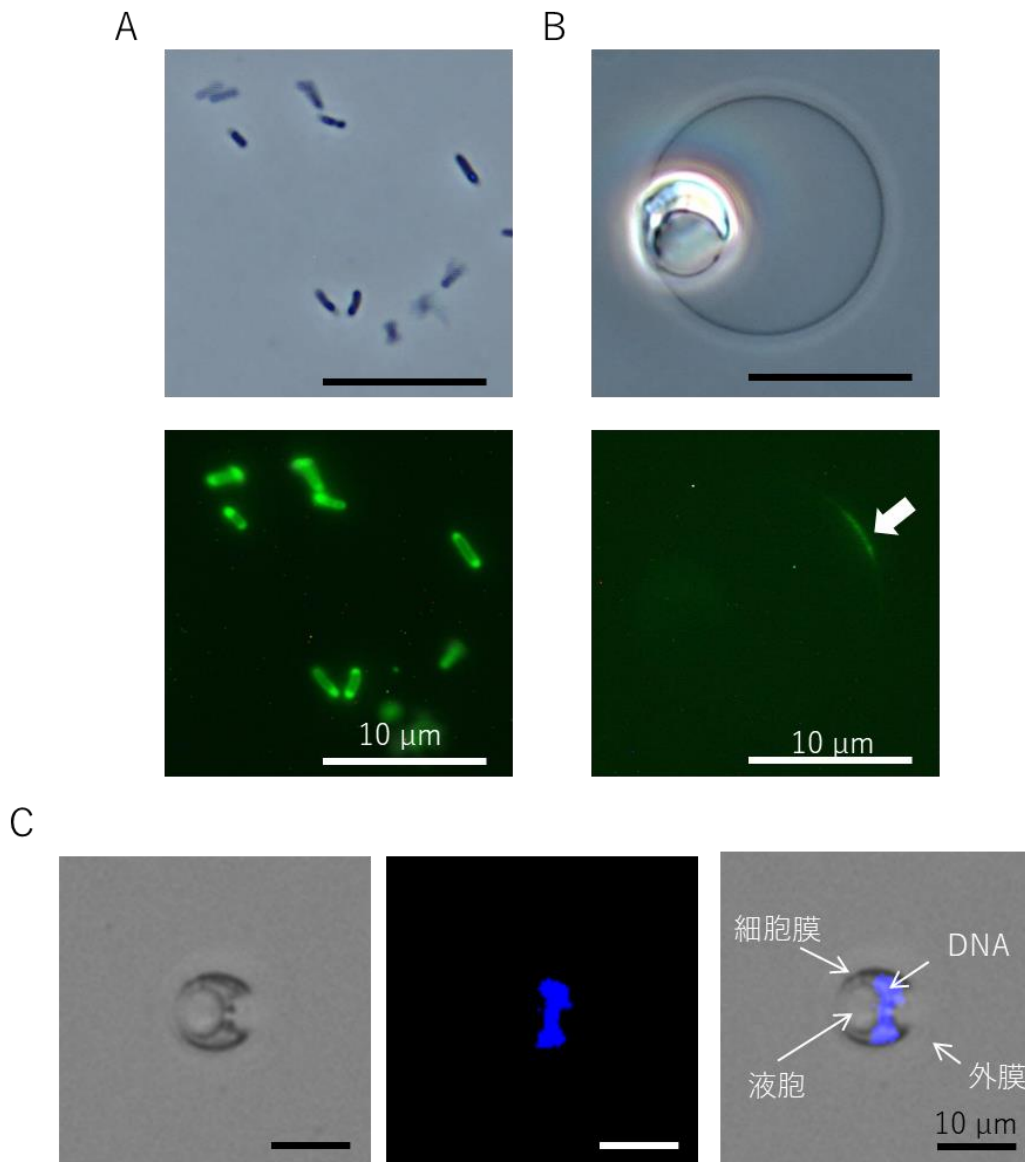


図6. *L. amnigena*の通常細胞と巨大化スフェロプラスト

(A,B) 外膜タンパク質は、NHS-Alexa Fluor 488でラベルした後、スフェロプラスト化した (Ranjit and Young, 2013)。上段は、位相差顕微鏡写真、下段は、蛍光顕微鏡写真である。どちらもOLYMPUS BX51を使用。(A) 桿状細胞。(B) DMBで培養48時間の巨大化スフェロプラスト。外膜タンパク質の位置を矢印で示した。(C) *L. amnigena*巨大化スフェロプラストのDNAをDAPIで青色に染色した様子。蛍光顕微鏡KEYENCE BZ-X710を使用。

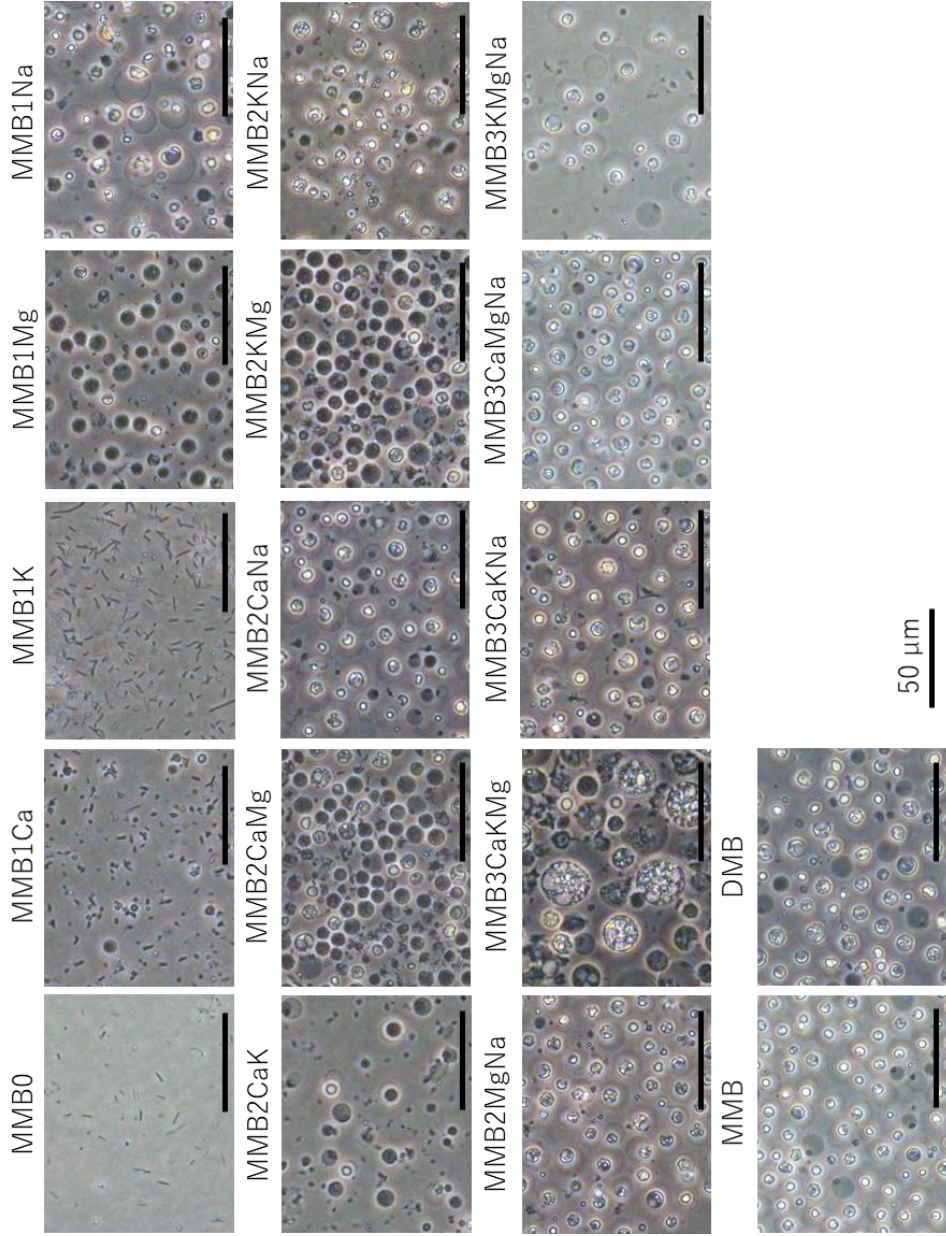


図7. MMBで培養した*L. amnigena*スフェロプラスト
 ペニシリン含有MMBでスフェロプラストを20時間培養した位相差顕微鏡観察写真。
 Olympus CK X41で撮影。

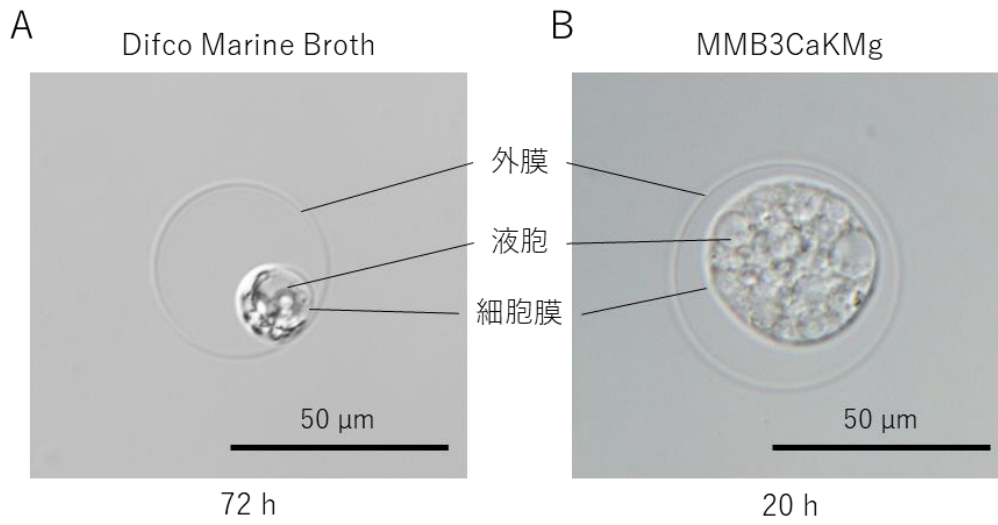


図8. *L. amnigena*巨大化スフェロプラストの培地による違い
(A) ペニシリン含有DMBで72時間培養した巨大化スフェロプラスト。(B) ペニシリン含有MMB3CaKMgで20時間培養した巨大化スフェロプラスト。微分干渉顕微鏡Olympus IX73で撮影。

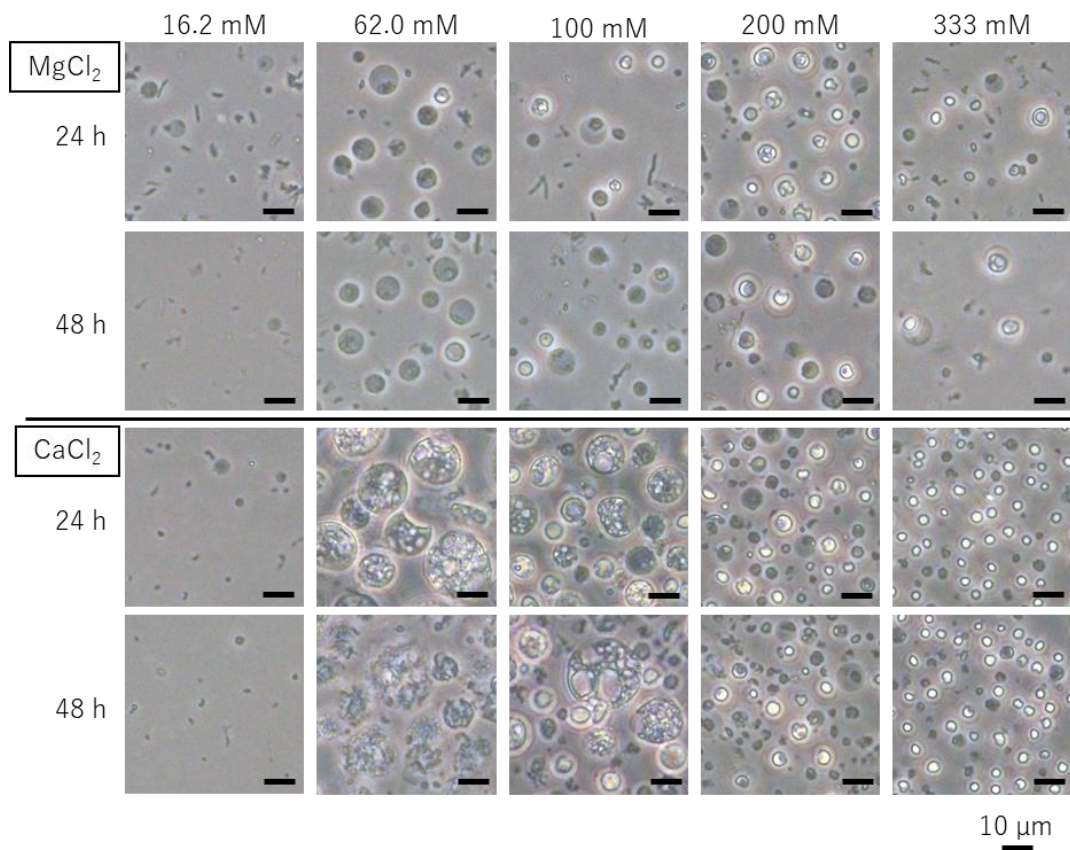


図9. *L. amnigena*スフェロプラストにおけるMg²⁺とCa²⁺の影響の違い
MMB0にMgCl₂およびCaCl₂をそれぞれの濃度添加した培地で24時間培養したスフェロプラストと48時間培養したスフェロプラスト。位相差顕微鏡Olympus CK X41で撮影。

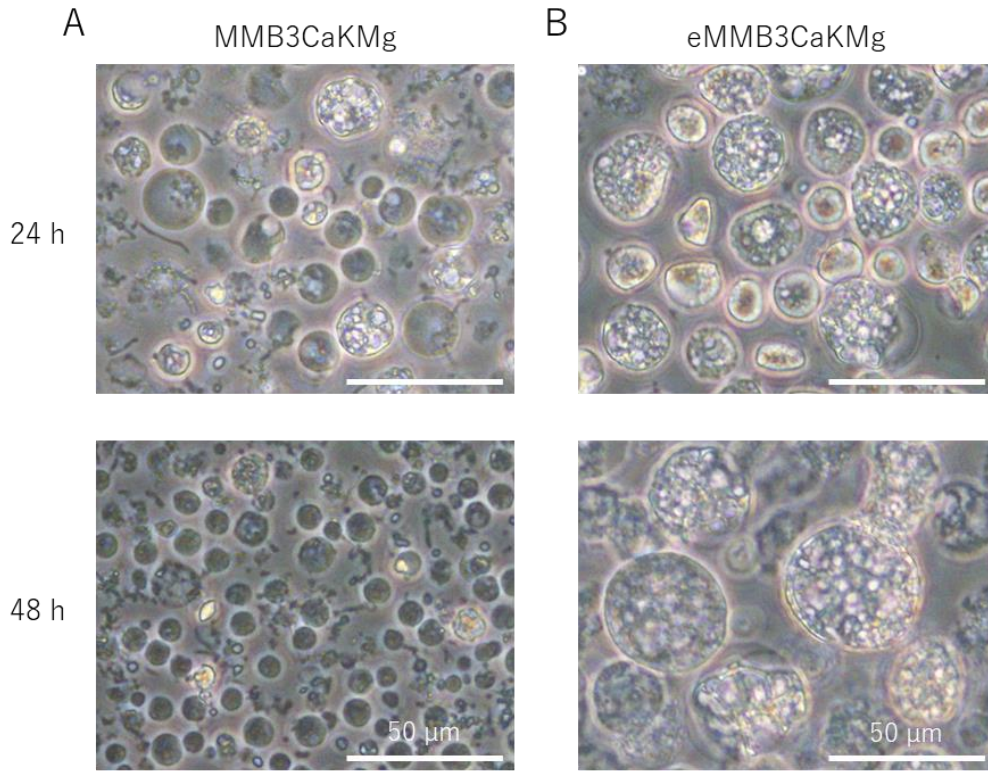


図10. MMB3CaKMgおよびeMMB3CaKMgで培養した*L. amnigena*スフェロプラスト
 ペニシリン含有MMB3CaKMgおよびeMMB3CaKMgで24時間培養したスフェロプラ
 ストと48時間培養したスフェロプラスト。位相差顕微鏡Olympus CK X41で撮影。

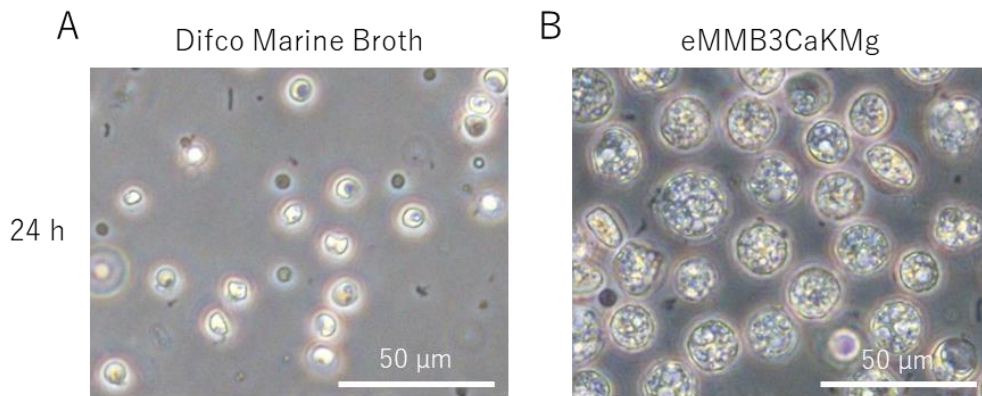


図11. *E. coli*スフェロプラストの培地による違い
 ペニシリン含有DMBおよびeMMB3CaKMgで24時間培養した*E. coli*スフェロプラ
 スト。位相差顕微鏡Olympus CK X41で撮影。

第3章 バクテリア巨大細胞の形態と液胞形成

3.1 序論

第2章では、培地中の金属塩組成を考慮することでスフェロ／プロトプラストの巨大化をコントロールできること、およびバクテリア種によって金属イオンの影響が異なることが明らかになった。一方、金属イオンが細胞膜および外膜伸張に影響するメカニズムや液胞を形成するメカニズムを始めとした巨大化機構は明らかではない。そこで、巨大化の特徴が異なる2種類のバクテリアスフェロプラストを用いて、トランスクリプトーム解析を行った。また、*L. amnigena* のスフェロプラストは、ペニシリン含有 DMB で培養すると巨大化するが、ペニシリンを含まない DMB で培養すると細胞壁を再合成し、線維化する³⁰。このことは、大腸菌のスフェロプラストで観察されたことと一致する²⁹。そこで、脱スフェロプラスト化した線維化細胞と巨大化スフェロプラストの遺伝子発現パターンの違いを知ることが巨大化機構解明への手がかりになると考え、トランスクリプトーム解析から抽出した10個の遺伝子に対し、定量 RT-PCR を行った。

また、DMB で複数のバクテリアを巨大化した際、バクテリアの種によって異なる巨大化の形態を示した(図 1-B)。一般的なバクテリア細胞や、直径が 6-7 μm の *E. litoralis* 巨大化スフェロプラストや *R. rubrum* 巨大化スフェロプラストは液胞を形成しなかったが^{31,32,38}、直径が 7 μm を超え始めると液胞を形成し始め、15 μm にまで達すると細胞内には顕微鏡で確認できるレベルの液胞が存在した^{18,19,37} (図 1-B)。大腸菌および枯草菌の巨大化プロトプラストは、細胞質に液胞を形成し、液胞内には DNA が存在しないことが報告されているが^{18,19}、巨大化スフェロ／プロトプラストにおける液胞の機能は明らかではない。マイクロインジェクションによって DNA などの物質を導入する領域は、細胞質であるため、DNA を持たない液胞はマイクロインジェクション時に不要である。本章では、巨大化過程における液胞形成について調べ、スフェロ／プロトプラスト巨大化における液胞の役割を考察した。

3.2 実験方法

3.2.1 トランスクリプトーム解析

3.2.1.1 トランスクリプトーム解析用サンプル調製

L. amnigena と *E. litoralis* を使用した。*L. amnigena* は、スフェロプラスト培養 0 時間と培養 43 時間を使用した。*E. litoralis* は、スフェロプラスト培養 0 時間と培養 96 時間を使用した。培養 0 時間のサンプルは、*L. amnigena* および *E. litoralis* を DMB 寒天培地で培養した菌体 (1~3 mg) を 1 mL のリゾチーム溶液 II (終濃度 200 µg/mL) に懸濁し、*L. amnigena* は 37°C、*E. litoralis* は室温 (24~25°C) で 15 分間培養したものを使用した。培養 43 時間および 96 時間のサンプルは、リゾチーム処理後、3,000 rpm で 5 分間遠心し、ペニシリン 600 µg/ml 含有 DMB 1 mL で懸濁した菌液を、*L. amnigena* は、6 穴プレートにペニシリン含有 DMB 4 mL と菌液 11 µL を加えたものを 87 ウェル分作成し、*E. litoralis* は、角シャーレにペニシリン含有 DMB 50 mL と菌液 150 µL 加えたものを 19 枚作成し、室温 (24~25°C) ・暗条件下で静置培養した。

各培養時間の細胞から NucleoSpin RNA キット (Macherey-Nagel) を使用し、RNA を抽出した。次に、Ribominus™ Transcriptome Isolation Kit (invitrogen) を使用し、rRNA を除去した。最後に、NucleoSpin® RNA Clean-up XS (Macherey-Nagel) を使用し、mRNA を精製した。

3.2.1.2 トランスクリプトーム解析

NEXTflex qRNA-Seq kit (BIOO SCIENTIFIC) を使用し、cDNA ライブラリーを製作し、Agilent 2200 TapeStation の High Sensitivity D1000 で確認した。次に、Ethachinmate (Wako) を用いたエタノール沈殿を行い、LightCycler Nano system (Roche) で Kapa SYBR Fast qPCR Kit (KK4824) を用いてライブラリーの濃度を定量した。これらのライブラリーを Miseq (Illumina) で 75 bp のペアエンドシーケンスを行った。

3.2.1.3 遺伝子発現レベルの数値化

インデックスを基に、QIIME を使用し、Sample ID を振った後、統計ソフト R を用いて (<http://www.r-project.org/>)、Sample ID に基づきデータをサンプルごとに分割した。次に、CLC Genomics Workbench 7.0.4 (CLC bio) を使用し、RNA-Seq Analysis でマッピングを行った。マッピングの条件を以下に示す。Gene track で指定された領域だけでなく、遺伝子間領域にもマッピングした。リードアライメントの条件は、Mismatch cost : 2、Insertion cost : 3、Deletion cost : 3、Length fraction : 0.5、Similarity fraction : 0.8、Maximum number of hits for a read : 10 である。発現レベルは、ペアリードを 2 本としてカウントし、発現値は、Total counts (non-specific reads を含む、各遺伝子またはリファレンス配列にマップされた全リード数) とした。

E. litoralis のスフェロプラスト作製直後 (培養 0 時間) からは 78934 本、巨大化スフェロプラスト (培養 96 時間) からは 62870 本のリード数を得た。全体のリード数から、rRNA 遺伝子にマップした RNA 配列 (スフェロプラスト直後 : 61767、巨大化スフェロプラスト : 31412) とゲノム DNA にマップされなかった RNA 配列 (スフェロプラスト直後 : 10565、巨大化スフェロプラスト : 8902) を除いた。最終的にスフェロプラスト作製直後からは 6602 本、巨大化スフェロプラストからは 22556 本の RNA 配列がマップされた。

L. amnigena のスフェロプラスト作製直後 (培養 0 時間) からは 6921404 本、巨大化スフェロプラスト (培養 43 時間) からは 957576 本のリード数を得た。全体のリード数から、rRNA 遺伝子にマップした RNA 配列 (スフェロプラスト直後 : 6532071、巨大化スフェロプラスト : 701391) とゲノム DNA にマップされなかった RNA 配列 (スフェロプラスト直後 : 330459、巨大化スフェロプラスト : 174806) を除いた。最終的にスフェロプラスト作製直後からは 58874 本、巨大化スフェロプラストからは 81379 本の RNA 配列がマップされた。

遺伝子発現レベルを比較するため、RPKM (reads per kilobase of gene per million mapped sequence reads) を算出した。rRNA 遺伝子にマップされた配列をすべて除き、

全リード数を算出し、各遺伝子におけるリード数をその遺伝子の長さで割った数値を全リード数で割り、各遺伝子の発現レベル (RPKM) とした。

3.2.1.4 オルソログ遺伝子の同定

BLASTp (E -value < 0.001) を用いて Reciprocal Best Hit を行った。*E. litoralis* と *L. amnigena* でアミノ酸配列類似検索を双方について行い、双方ともトップヒットしたペアを選択した。発現の差は、Fisher's exact test³⁹ で調べた。*E. litoralis* および *L. amnigena* のトランスクリプトームデータは、accession number : DRA004675 で DDBJ に登録し、公開した。

3.2.2 リアルタイム定量 RT-PCR

L. amnigena の通常 2 分裂細胞、繊維化細胞、スフェロプラスト培養 0 時間と 43 時間を使用した。通常 2 分裂細胞は、DMB 寒天培地で培養した菌体 (1~3 mg) を使用した。繊維化細胞は、DMB 寒天培地で培養した菌体 (1~3 mg) を、1 mL のリゾチーム溶液 II (終濃度 200 μ g/mL) に懸濁および 37°C で 15 分間培養し、その後、3,000 rpm で 5 分間遠心し、DMB 培地 1 mL で懸濁した。DMB 培地 1 mL に対し、懸濁液を 4 μ L ずつ加え、室温 (24~25°C) ・暗条件下で 9 時間静置培養した。スフェロプラスト培養 0 時間およびスフェロプラスト培養 43 時間は、3.2.3.1 と同様の方法で行い、ペニシリン含有 DMB 400 mL と菌液 1 mL を使用して巨大化培養した。全てのサンプルの mRNA の精製は、3.2.3.1 と同様の方法で行い、BioDrop μ Lite (Berthold Japan) で濃度を測定した。全てのサンプルを 0.1 ng/ μ L に希釈し、2 μ L を定量 RT-PCR に使用した。

定量 RT-PCR の内部コントロールとして、トランスクリプトーム解析により、*E. litoralis* と *L. amnigena* の両方において、巨大化に伴い発現レベルが変化しなかった 3-phosphate dehydrogenase をコードしている遺伝子 (*g3pd*) を用いた³⁸ (表 1)。一方、トランスクリプトーム解析では、*L. amnigena* CHS78 に対し、RNA マッピングを行っ

た。しかし、*L. amnigena* NBRC105700 のゲノム配列は、*L. amnigena* CHS78 と同じではなかった。そこで、*L. amnigena* NBRC105700 のゲノム DNA 配列に基づいて、10 個のプライマーをデザインした（表 1）。mRNA は、LightCycler Nano system (Roche) を用いて、One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (TaKaRa) で増幅した。PCR は、次のサイクル条件下で行った：①逆転写反応（45°C で 300 秒間、95 度で 10 秒間）、② PCR 反応（95°C で 5 秒間、60°C で 30 秒間）を 40 サイクル、③融解曲線（0.1°C/s で 60°C から 95°C まで）。Cq 値は、Light Cycler Nano Software (Roche) で得た。

発現した RNA の相対的な量は、Livak と Schmittgen⁴⁰ による方法を用いて計算した。また、統計ソフト R を用いて (<http://www.r-project.org/>) 分散分析を行い、ホルム補正のペアワイズ *t* 検定を行った。

3.2.3 膜と DNA 染色

細胞膜と DNA を同時に染色するため、2.2.5 の方法に従って巨大化した *E. faecalis* および 2.2.9 の方法に従って巨大化した *L. amnigena* の培養液に FM4-64 (Invitrogen) と DAPI (Dojindo) をそれぞれ終濃度が 5 μM および 0.5 μM になるように加え、24°C で 10 分間染色した。ペニシリン結合タンパク質を染色するため、2.2.5 の方法に従って巨大化した *E. faecalis* の培養液に Bocillin FL penicillin (Invitrogen) を終濃度 10 μg/mL になるように加え、24°C で 10 分間染色した。位相差および蛍光顕微鏡観察は、Olympus BX51 (Olympus) を使用した。

3.2.4 透過型電子顕微鏡観察

E. faecalis は、2.2.5 の方法に従い DMB で巨大化した培養 65 時間の細胞を使用し、*L. amnigena* は、2.2.9 の方法に従い eMMB3CaKMg で巨大化した培養 24 時間の細胞を使用した。サンプル調製は、株式会社東海電子顕微鏡解析の浮遊系培養細胞の固定方法に従い、解析を株式会社東海電子顕微鏡解析に委託した。透過型電子顕微鏡写真に基

づいて細胞膜と液胞の直径および液胞数を計測し、Python で散布図とヒストグラムを作成した。

3.3 結果と考察

3.3.1 異種バクテリアスフェロプラストのトランスクリプトーム解析

L. amnigena 巨大化スフェロプラストは、細胞膜と外膜が乖離し、液胞を複数形成するのが特徴である (図 12)。他方、光合成細菌 *E. litoralis* の巨大化スフェロプラストは、液胞を形成しない³¹ (図 12)。また、大きさも直径 6-7 μm が最大である³¹。そこで、構造的に大きく異なる 2 種類のバクテリア巨大化スフェロプラストを用いて、全遺伝子の発現レベルの変動を RNA-seq 法によって網羅的に解析した³⁸。

スフェロプラスト化直後と巨大化スフェロプラストの reads per kilobase of gene per million mapped sequence reads (RPKM) をそれぞれ計算し、RPKM の比を算出することで遺伝子発現レベルを比較した。異なる細胞種の遺伝子発現レベルを比較するために、オルソログ遺伝子を抽出し、アミノ酸配列類似検索で双方ともトップヒットした 1100 ペアをオルソログ遺伝子とした。1100 ペアの中から、*E. litoralis* (以下 E.1) と *L. amnigena* (以下 L.a) 共に発現が 2 倍より高くなったものを発現が増加したとし、0.5 倍より低くなったものを発現が減少したと定義した (図 13)。

1100 ペアのうち、E.1 と L.a で同じ挙動を示したオルソログ遺伝子は、127 個であり、全体の約 12%であった。共に発現が増加した 76 個のオルソログ遺伝子のうち、リポ多糖合成・輸送関連およびペプチドグリカン合成関連を含む膜タンパク質をコードしている遺伝子ホモログが全体の 33%を占めた (図 14; 表 2)。また、共に発現が減少した 51 個のオルソログ遺伝子のうち、鞭毛タンパク質を含む、膜タンパク質をコードしている遺伝子ホモログが全体の 14%を占めた (図 14; 表 3)。この結果は、スフェロプラスト巨大化に伴い、膜の性状が変化することと一致した。

1100 ペアのうち、E.1 と L.a で逆の挙動を示したオルソログ遺伝子は、106 個であり、全体の約 10%であった。E.1 と L.a で逆の発現をしたオルソログ遺伝子においても、膜タンパク質をコードしている遺伝子ホモログが全体の 20% (L.a で減少-E.1 で増加) および 39% (L.a で増加-E.1 で減少) を占めた (図 14; 表 4,5)。その中でも、細胞分裂関連遺伝子 *ftsA* と *ftsZ* のホモログの発現は、L.a で増加した (*ftsA*: 2.6 倍、

ftsZ: 4.65 倍) が、E.1 では減少した (*ftsA*: 0.2 倍、*ftsZ*: 0.32 倍) (表 5)。スフェロプラストは、分裂増殖を行わないにも関わらず、L. a では発現が増加した。また、外膜タンパク質の転位酵素 *secA* のホモログの発現も、L. a で増加した (*secA*: 8.1 倍) が、E.1 では減少した (*secA*: 0.28 倍) (表 5)。Kuroda らの以前の研究では、Sec 複合体の主な構成要素の一つである SecY が、大腸菌巨大化スフェロプラストの液胞膜で強く検出された¹⁸。今回、*secY* ホモログの発現レベルも、L. a で増加した (1.5 倍) が、E.1 では減少した (0.84 倍)。L. a は液胞を形成し、E.1 は液胞を形成しないことから、L. a の巨大化に伴い発現が増加し、E.1 の巨大化に伴い発現が減少した遺伝子は、液胞形成に関わる遺伝子の候補であると考えられる。よって、液胞形成に関わる遺伝子の候補として、36 の遺伝子を抽出した。

E.1 と L. a で逆の発現をしたオルソログ遺伝子の中には、金属イオンへの応答の違いを示唆する結果も得られた。例えば、magnesium ion influx-related gene *corA* は、E.1 で増加した (RPKM: 0→185) が、L. a では減少した (0.25 倍)。対称的に、magnesium ion efflux-related gene *corD* は、E.1 で減少したが (0 倍)、L. a では増加した (5.43 倍)。この結果は、E.1 スフェロプラスト巨大化の維持に Mg^{2+} を必要としているが、L. a スフェロプラスト巨大化では必要としないことを示唆している。

3.3.2 4 種類の形態の遺伝子発現比較

L. amnigena のスフェロプラストは、ペニシリン含有 DMB で培養すると巨大化するが、ペニシリンを含まない DMB で培養すると細胞壁を再合成し、線維化するため³⁰、脱スフェロプラスト化した線維化細胞と巨大化スフェロプラストの遺伝子発現パターンの違いを知ることが巨大化機構解明への手がかりになると考えた。桿状細胞からスフェロプラストが作製され、そのスフェロプラストが巨大細胞あるいは線維化細胞へと変化するため、以上の 4 種類の細胞を用いて、それぞれの形態における遺伝子発現を比較した⁴¹ (図 15)。遺伝子発現比較は、トランスクリプトーム解析から抽出した 10 個の遺伝子に対し、定量 RT-PCR を行った (表 1, 6)。その際、内部コントロールとして、

L. aminigena と *E. litoralis* の双方において巨大化に伴い発現が変動しなかったグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 *g3pd* を用いた。スフェロプラストは、細胞壁を欠き、分裂できないことから、細胞分裂と細胞壁合成に関連した遺伝子に着目した。また、スフェロプラスト巨大化において DNA 複製は生じていることから、DNA の構造維持に関わる遺伝子にも着目した。

4つのサンプル間で分散分析を行ったところ、全てのプライマーセットに対し有意差があった。次に、どのサンプル間で有意差があるかを調べるため、ホルム補正のペアワイズ *t* 検定を行ったところ、ほとんどのサンプル間で有意差があり ($p < 0.05$)、有意差がなかったのは7組であった (表7; 図16)。よって、それぞれの細胞形態で異なる発現パターンを示した。

ftsA の発現レベルは、スフェロプラストの巨大化に伴い変動しなかったのに対し、スフェロプラストの線維化に伴い減少した。また、*ftsZ* の発現レベルは、スフェロプラストの巨大化に伴い増加したのに対し、スフェロプラストの線維化に伴い減少し、発現パターンは大きく異なっていた。

巨大化スフェロプラストと線維化細胞における *recA* と *topA* の発現レベルは、共にスフェロプラスト作製直後の細胞より低かった。一方、*hupA* の発現レベルは、スフェロプラストの巨大化に伴い減少したのに対し、スフェロプラストの線維化に伴い増加し、発現パターンは大きく異なっていた。

巨大化スフェロプラストと線維化細胞における *pspA* と *spy* の発現レベルは、共にスフェロプラスト作製直後の細胞より低かった。一方、*clpB* の発現レベルは、スフェロプラストの巨大化に伴い増加したのに対し、スフェロプラストの線維化に伴い減少し、発現パターンは大きく異なっていた。

巨大化スフェロプラストと線維化細胞における *ompA* の発現レベルは、共にスフェロプラスト作製直後の細胞より低かった。一方、*pbp1b* の発現レベルは、スフェロプラストの巨大化に伴い変動しなかったのに対し、スフェロプラストの線維化に伴い減少し、発現パターンは異なっていた。

よって、巨大化スフェロプラストと線維化細胞において発現パターンが大きく異なっていたのは、細胞分裂に関する *ftsZ*、DNA の構造維持に関する *hupA*、ストレス応答に関する *clpB*、細胞表層に関する *pbp1b* であり、選択した 4 種類の機能全ての遺伝子が含まれた。その中でも、最も発現レベルが異なっていたのは、細胞分裂に関する *ftsZ* であった。スフェロプラストは分裂できないにも関わらず、巨大化スフェロプラストにおける *ftsZ* の発現レベルは、線維化細胞の約 8 倍高かった。さらに、*ftsZ* の発現レベルは、4 つのサンプル間においても最も高くなり、スフェロプラスト作製直後の約 5 倍、桿状細胞の約 20 倍であった。*FtsZ* は、細胞の中心で細胞膜の内側に Z リングを形成し、細胞分裂を開始するため収縮する^{42,43}。巨大化スフェロプラストにおいては、細胞膜の陥入によって液胞を形成した際に Z リングを形成し、細胞膜の陥入を終了するために収縮しているかもしれない。

3.3.3 巨大化スフェロ／プロトプラストの DNA 局在

DMB および MMB によって様々な種類のバクテリアスフェロ／プロトプラストを巨大化できたが、その中でも、*E. faecalis* と *L. amnigena* の巨大化スフェロ／プロトプラストは、微小ガラス管の挿入が可能である。そこで、マイクロインジェクションによって物質を導入する細胞質の領域を特定するため、DNA を DAPI、細胞膜を FM4-64 で蛍光標識し、*E. faecalis* および *L. amnigena* の巨大化スフェロ／プロトプラストにおける特徴を調べた³⁷ (図 17)。その結果、*E. faecalis* および *L. amnigena* は、細胞質に液胞が存在し、液胞膜が FM4-64 によって細胞膜と同様に染色された。どちらの液胞も DNA を含まず、DNA は、液胞の外側の細胞質に存在していた。これらの結果は、大腸菌および枯草菌巨大化プロトプラストにおける特徴と一致した^{18,19}。よって、細胞質に様々な物質をマイクロインジェクションするためには、液胞を避けて導入しなければならない。一方、*Listeria* L-form は、局所的なリン脂質の蓄積あるいは膜の陥入によって細胞質成分 (DNA やタンパク質) を含む生存可能な小胞を形成する^{44,45}。巨大化スフェロ／プロトプラストにおける液胞は、DNA を欠き、リン脂質の蓄積も生じていない

め、*Listeria*L-form における生存可能な小胞とは異なる方法で形成されたことを示唆している。

3.3.4 巨大化過程における液胞形成

E. faecalis および *L. amnigena* の巨大化スフェロ／プロトプラストは、細胞質に DNA を含まない液胞を形成し、マイクロインジェクションの視点から見ると不要な存在である。一方、直径が 7 μm を超え始めると液胞を形成し始め、15 μm にまで達すると顕微鏡で確認できるレベルの液胞を形成する^{18,19,37}。そこで、液胞形成は、巨大化機構に関わる要因の一つであると考え、巨大化過程における液胞形成について調べた。

L. amnigena は、DMB で巨大化すると複数の液胞を形成していたが、eMMB3CaKMg で巨大化すると DMB よりもさらに多い数の液胞を形成し、これまでに巨大化したバクテリアの中で最も多い数の液胞を形成した (図 1-B, 17-B)。他方、*E. faecalis* 巨大化プロトプラストは、これまでに巨大化したバクテリアの中で最も大きい液胞を形成した³⁴ (図 1-B, 17-A)。そこで、*L. amnigena* と *E. faecalis* のスフェロ／プロトプラスト巨大化に伴う液胞形成を比較した。透過型電子顕微鏡によって、*E. faecalis* 巨大化プロトプラストには複数の平板状の構造体が見つかった (図 18-A)。このような構造体は、*L. amnigena* 巨大化スフェロプラストや他のバクテリア巨大細胞では観察されなかった^{18,19,33} (図 18-B)。次に、*E. faecalis* 巨大化プロトプラスト培養 65 時間および *L. amnigena* 巨大化スフェロプラスト培養 24 時間の透過型電子顕微鏡観察写真に基づいて、細胞と液胞の直径、および液胞数を計測し、散布図とヒストグラムで表した³⁷ (図 19)。*E. faecalis* では、細胞直径と液胞数($r = 0.46$, $n = 48$)および細胞直径と液胞直径($r = 0.59$, cell; $n = 48$, vacuole; $n = 82$)で相関が見られた。他方、*L. amnigena* では、細胞直径と液胞数($r = 0.62$, $n = 154$)で相関が見られたが、細胞直径と液胞直径($r = 0.2$, cell; $n = 19$, vacuole; $n = 506$)では相関は低いレベルであった。これらの結果は、スフェロ／プロトプラスト巨大化過程において、*E. faecalis* の液胞は数および大きさが増加し、*L. amnigena* の液胞は数が増加する傾向を示した。

また、*E. faecalis* プロトプラスト巨大化のタイムラプス観察より、後につくられた液胞 (second vacuole) の成長速度が先につくられていた液胞 (first vacuole) よりも速く、最終的に同じ大きさになる様子が観察された³⁷ (図 20)。この結果は、それぞれの液胞の巨大化のレベルや速度は一定ではないことを意味している。よって、液胞は、細胞膜の伸張に影響を与えているかもしれない。

直径が 15 μm を超えるほどに大きくなった巨大化スフェロ／プロトプラストは液胞を形成するが、その役割は明らかになっていない^{18,19,37}。考えられている液胞の機能は、細胞質の体積を減らし、膜の表面積を増やすことである¹⁸。通常は、球の直径が 2 倍になると表面積は 2 の 2 乗、体積は 2 の 3 乗増加し、表面積対体積比の値は、球の大きさが大きくなるほど小さくなる。ほとんどのバクテリアは、細胞膜に存在する ATP 合成装置で ATP を生産するため、表面積対体積比が小さくなると ATP が不足する。よって、表面積対体積比を一定に保つために、細胞膜を増産する必要がある。また、反対膜構造の液胞膜には、ATP 合成酵素が存在しており、高いプロトン活性を確認できたことから¹⁸、もし、これらの ATP 合成が巨大細胞で生じている場合には、液胞内ではなく、細胞質において ATP が生産されることとなる。

興味深いことに、自然界に存在する巨大なバクテリアも、細胞質に液胞を形成している⁴⁶⁻⁴⁹。例えば、自然界で最も大きいバクテリアである *Thiomargarita namibiensis* は、細胞質に巨大な液胞をもち、液胞内に硝酸を蓄積している^{46,47}。*T. namibiensis* と同じ硫黄細菌である *Beggiatoaceae* では、液胞内の硝酸の還元によって、液胞膜でプロトン濃度勾配が生じ、ATP が細胞質で生成されるモデルも提唱されている⁵⁰。*T. namibiensis* の液胞は、細胞質の希釈防止、表面積対体積比の増加、エネルギー貯蔵および細胞質に存在する硫黄と硝酸を分ける機能を担っている⁴⁶。スフェロ／プロトプラストの巨大化培地は硫黄を含んでいないため、*T. namibiensis* の液胞と巨大化スフェロ／プロトプラストの液胞の機能は異なっていることが考えられるが、細胞質の体積を減らし、膜の表面積を増やすという類似点も見られた。一般的に、通常のバクテリア細胞では液胞は観察されないが、分裂している巨大バクテリアにおいて液胞が観察されることから、分裂

の有無ではなく、バクテリアの細胞のサイズが大きくなると液胞が必須となっている可能性がある。

次に、液胞の形成が細胞膜由来かどうかを調べるため、細胞膜に存在するペニシリン結合タンパク質を Bocillin FL penicillin で蛍光標識した³⁷ (図 21)。その結果、液胞膜にペニシリン結合タンパク質が存在していることが示された。一方、*E. faecalis* 巨大化プロトプラストの細胞膜が破れた際、液胞は維持されていたことから、細胞膜と液胞はつながっていないことが示された (図 21)。また、*E. faecalis* 巨大化プロトプラストにマイクロインジェクションによって BFP 溶液を注入すると、細胞内が変化し、小さな球状の模様が複数現れた (図 22)。電子顕微鏡観察写真で確認できた平板状の構造体が、マイクロインジェクションによる細胞内の圧力変化によって、一時的に球状化したものではないかと考えている。よって、平板状の構造体は、球状の液胞の前駆体である可能性が高い。

3.4 小括

E. faecalis および *L. amnigena* の巨大化スフェロ／プロトプラストは、細胞質に DNA を含まない液胞を形成した。液胞膜は、FM4-64 によって細胞膜と同様に染色され、ペニシリン結合タンパク質も検出されたことから、細胞膜由来であることが示唆された (図 17, 21)。大腸菌および枯草菌の巨大化スフェロ／プロトプラストの液胞膜からも、細胞膜に存在する呼吸鎖タンパク質や F_0F_1 -ATPase が存在していたことが報告されており、液胞膜の構成成分が細胞膜と同じ、あるいはとても良く似ていることを示した^{18,19}。さらに、大腸菌および枯草菌の巨大化スフェロ／プロトプラストは、反転膜であることが報告されており、液胞は、細胞膜のエンドサイトーシスによって形成されたことが強く示唆されている^{18,19}。一方、巨大化スフェロ／プロトプラストからの液胞の単離が可能であることや *E. faecalis* 巨大化プロトプラストの細胞膜が破れた際、液胞は維持されていたことから、細胞膜と液胞はつながっていないことを示した^{18,19,37} (図 21)。したがって、液胞は、細胞膜からつくられ、スフェロ／プロトプラスト巨大化初期の液胞膜は細胞膜とつながっており、その後、細胞膜から独立して成長することが考えられる。

E. faecalis プロトプラストと *L. amnigena* スフェロプラストは、異なる種類の液胞形成を伴いながら巨大化した。*L. amnigena* 巨大化スフェロプラストでは、金属塩の組成を検討することで細胞膜の伸張が活性化されたが、同時に液胞数も増加し、金属塩が細胞膜伸張だけではなく、液胞形成にも影響することが示された。金属塩の組成を検討することで、異なった形態の液胞形成を誘導できるかもしれない。スフェロ／プロトプラスト巨大化の初期では液胞は形成されず、直径が 6-7 μm と小さい *Erythrobacter* や *Rhodospirillum* の巨大化スフェロプラストも液胞を形成しない^{31,32} (図 1-B)。よって、液胞形成は、大きさが 15 μm を超えるようなスフェロ／プロトプラスト巨大化に必要であることが示唆される。また、*Listeria* L-form においても、L-form のサイズが大きいほど細胞質に小胞を多く形成し、細胞膜の伸張と小胞膜の合成が関連していた⁴⁴。したがって、細胞膜および液胞膜の生合成はスフェロ／プロトプラスト巨大化と同調していることが強く示唆された。

大腸菌巨大化スフェロプラストの液胞は、*L. amnigena* 巨大化スフェロプラストと形態的によく似ており、枯草菌巨大化プロトプラストの液胞は、*E. faecalis* 巨大化プロトプラストとよく似ている（図 1-B）。グラム陰性細菌かグラム陽性細菌であるかの違いは、液胞形成に関係しているかもしれない。一方、大腸菌の液胞の数は *L. amnigena* より少なく、枯草菌の液胞は、*E. faecalis* より細胞膜を押し力が弱い（枯草菌のプロトプラストはきれいな球状を保っている）。また、グラム陰性の *D. grandis* は液胞を形成せず、大腸菌や *L. amnigena* と完全に異なっている。したがって、液胞の種類は、異なるバクテリア種間で、形態的なバリエーションをもっている。上述したように、細胞膜および液胞膜の生合成は巨大化に伴い同調していることが示唆されたことより、液胞の形態は細胞膜の特徴に依存しているかもしれない。

トランスクリプトーム解析より、スフェロプラスト巨大化に伴い、発現変動する遺伝子が生物種によって異なることがわかった。このことは、細胞膜における脂質組成の変化と合わせて、制御されながら巨大化していることを示しており、その方法は生物種によって異なることを意味している。一方、異種生物間で同じ挙動を示した遺伝子も見られたことより、巨大化する際に共通の制御システムが存在する可能性がある。しかし、上記の結果からは、巨大化制御における必須遺伝子は特定できなかった。本研究では、液胞を形成するグラム陰性の *L. amnigena* と液胞を形成しない *E. litoralis* の比較をしたため、比較する生物種（液胞を形成するグラム陽性の *E. faecalis* や液胞を形成しないグラム陰性の *D. grandis* など）を追加することで必須遺伝子を絞ることができると考える。現時点のデータからは、*L. amnigena* と *E. litoralis* の双方において、シャペロンや DNA 修復に関する遺伝子の発現が巨大化に伴い増加し、アミノ酸合成・代謝関連の遺伝子の発現が巨大化に伴い減少したことから、巨大化スフェロプラストでは、代謝の速度を低下し、細胞内の DNA やタンパク質の構造維持を中心に行っていることが考えられる。

菌名	プライマー名	配列 (5'→3')	PCR産物	参考文献
L. a	ftsZ-F	GATGAGTTCGAAACGGTGGG	92	本研究 ⁴¹
	ftsZ-R	TTCATTTCCGGGTCAAGGGA		
	ftsA-F	CCAAAGTGATCCCGTACGCT	97	
	ftsA-R	TGACGGACTTTGATCGCCTC		
	hupA-F	ATTGCGGACAAGGCTGATCT	98	
	hupA-R	ACAGCATCGCCTTCTTTCAGA		
	recA-F	AGAAAGCGAACCCGTGGAGA	97	
	recA-R	ATTGCTTTTCGATCTGGCCC		
	topA-F	GCAAGTACTCGTCTGGGCTT	99	
	topA-R	CGTCGAGTCAGTACGCATGT		
	clpB-F	CTTTACCTGCCCCGACCATT	95	
	clpB-R	GCGTCTGAAAGGGTTCTGA		
	pspA-F	TGAACGCCAACATCAACTCA	96	
	pspA-R	CTTCAACCAGCGTGTCTTCC		
	spy-F	AGATGAAACGTCCTCCGCTG	109	
	spy-R	TGCTCAGCCATCTTGTGAT		
	ompA-F	TATGCCGCTGGCTGAGTTAC	109	
	ompA-R	GTGACAACGTGAAACCTCGC		
	pbp1b-F	CCCTGATGGCGATTTACGGT	102	
	pbp1b-R	TCACCATGCGGCCATATAACC		
g3pd-F	GCGTCGTACCAAAGAAGGGA	96		
g3pd-R	AACGACAGCTCACCCTTTCC			

表1. 定量RT-PCRに使用したプライマー一覧
プライマーは、Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) で設計した。

表2. *L. amnigena*と*E. litoralis*の巨大化に伴い発現が共に2倍以上増加したオルソログ遺伝子

<i>Erythrobacter litoralis</i>					<i>Lelliottia amnigena</i>				
Protein ID	スフェロプラスト化直後のRPKM	巨大化スフェロプラストのRPKM	RPKMの比	機能	Protein ID	スフェロプラスト化直後のRPKM	巨大化スフェロプラストのRPKM	RPKMの比	機能
シャペロン遺伝子ホモログ									
KEO89606.1*	0	623.74	/	molecular chaperone GroES	KDM56993.1*	347	1300	3.75	chaperonin
KEO92782.1*	0	4575.93	/	phage shock protein	KDM46724.1*	4670	27100	5.8	phage shock protein A
KEO93197.1*	0	2039.77	/	ATP-dependent protease	KDM53259.1*	178	608	3.42	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
KEO93350.1*	588.91	6885.08	11.69	ATPase AAA	KDM51144.1*	449	1660	3.7	chaperone ClpB
KEO98976.1*	265.47	587.82	2.21	molecular chaperone DnaJ	KDM57339.1*	267	751	2.81	chaperone dnaJ
DNA複製・修復関連遺伝子ホモログ									
KEO92279.1*	304.84	659.99	2.17	ATPase AAA	KDM53654.1*	0	8.08	/	Mg chelatase-like protein
KEO92303.1*	0	255.35	/	chromosomal replication initiator protein DnaA	KDM52760.1*	280	617	2.2	chromosomal replication initiator protein dnaA
KEO92620.1*	1142.64	8813.23	7.71	recombinase RecA	KDM50414.1*	401	893	2.23	protein recA
リポ多糖合成・輸送関連遺伝子ホモログ									
KEO89583.1*	0	224.27	/	ABC transporter ATP-binding protein	KDM54743.1*	46.8	339	7.24	lipopolysaccharide export system ATP-binding protein LptB
KEO90699.1*	309.18	1369.19	4.43	D-arabinose 5-phosphate	KDM54739.1*	34.4	74.7	2.17	arabinose 5-phosphate isomerase
KEO92387.1*	0	693.72	/	permease	KDM54753.1*	201	458	2.28	lipopolysaccharide export system permease lptF
KEO96424.1*	321.43	901.51	2.8	ABC transporter	KDM55137.1*	29.1	91.3	3.14	lipid A export ATP-binding/permease MsbA
KEO98632.1*	0	130.74	/	MFS transporter	KDM50532.1*	0	10.3	/	lysophospholipid transporter lptI
ペプチドグリカン合成関連遺伝子ホモログ									
KEO92316.1*	0	1429.28	/	MitA	KDM50514.1*	46.4	123	2.65	membrane-bound lytic murein transglycosylase A
KEO93302.1*	0	801.96	/	peptidoglycan transglycosylase	KDM54749.1*	0	16.9	/	monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylase
KEO93307.1*	0	252.66	/	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	KDM55076.1*	20.4	118	5.78	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiD
KEO93413.1*	0	408.49	/	peptidoglycan glycosyltransferase	KDM57390.1*	115	452	3.93	peptidoglycan synthase ftsI
KEO93417.1*	0	193.99	/	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	KDM57394.1*	116	802	6.91	UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamate ligase
他の膜タンパク質遺伝子ホモログ									
KEO89306.1*	1090.43	2253.52	2.07	membrane protease subunit HflC	KDM56960.1*	135	599	4.44	protein HflC
KEO89307.1*	535.14	3554.84	6.64	peptidase	KDM56961.1*	431	1380	3.2	protein HflK
KEO89575.1*	0	225.11	/	flagellar biosynthesis protein FliR	KDM48637.1*	0	31.3	/	flagellar biosynthetic protein fliR
KEO89580.1*	0	221.23	/	mechanosensitive ion channel protein MscS	KDM55515.1*	68.2	188	2.76	miniconductance mechanosensitive channel
KEO92762.1*	0	194.41	/	membrane protein	KDM51940.1*	0	16.2	/	hypothetical protein
KEO93138.1*	0	505.31	/	ABC transporter	KDM55480.1*	321	823	2.56	hypothetical protein
KEO93143.1*	0	301.81	/	proline:sodium symporter PutP	KDM51759.1*	495	1180	2.38	sodium/proline symporter
KEO96616.1*	0	211.59	/	membrane protein	KDM48736.1*	116	568	4.9	hypothetical protein

KEO96782.1*	0	281.12	/	MarC family transcriptional regulator	KDM46654.1*	0	37.9	/	UPF0056 membrane protein yhcE
KEO96802.1*	0	526.58	/	hypothetical protein	KDM51307.1*	54.8	674	12.3	manganese transporter mntH
KEO98444.1*	159.95	613.91	3.84	protoheme IX farnesyltransferase	KDM55407.1*	612	1340	2.19	protoheme IX farnesyltransferase
KEO98495.1*	0	1075.18	/	hypothetical protein	KDM55130.1*	24.5	70.9	2.89	UPF0702 transmembrane protein ycaP
KEO98569.1*	201.21	3148.42	15.65	histidine kinase	KDM51863.1*	0	16.8	/	sensor protein phoQ
KEO98609.1*	288.1	612.4	2.13	membrane protein	KDM57482.1*	316	742	2.35	outer membrane protein assembly factor yaeT
KEO99117.1*	0	227.97	/	membrane protein	KDM54035.1*	14.1	51.1	3.62	hypothetical protein
その他									
KEO89324.1*	0	339.26	/	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	KDM46222.1*	118	1610	13.64	mannose-1-phosphate guanylyltransferase
KEO89954.1*	0	1086.92	/	taurine dioxygenase	KDM57053.1*	19.9	115	5.78	alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase
KEO89994.1*	0	480.32	/	aminomethyltransferase	KDM49721.1*	264	696	2.64	aminomethyltransferase
KEO90662.1*	0	165.87	/	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	KDM55484.1*	0	138	/	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthase
KEO90672.1*	0	261.97	/	succinyl-CoA synthetase subunit beta	KDM55689.1*	480	1360	2.83	succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta
KEO91012.1*	0	329.01	/	glutamyl-tRNA synthetase	KDM57451.1*	0	13.8	/	glutamyl-Q tRNA(Asp) synthetase
KEO92307.1*	0	1173.54	/	2-octaprenylphenol hydroxylase	KDM52399.1*	41.4	112	2.71	2-polyprenylphenol 6-hydroxylase
KEO92322.1*	1243.7	5084.1	4.09	allyl hydroperoxide reductase	KDM55608.1*	108	706	6.54	allyl hydroperoxide reductase subunit F
KEO92357.1*	0	486.82	/	hypothetical protein	KDM55447.1*	0	44.5	/	maltose O-acetyltransferase
KEO92389.1*	0	1032.4	/	Clp protease ClpS	KDM55108.1*	212	689	3.25	ATP-dependent Clp protease adapter protein ClpS
KEO92432.1*	0	225.11	/	acetyl-CoA acetyltransferase	KDM49670.1*	0	10.4	/	hypothetical protein
KEO92626.1*	0	371.92	/	transcription elongation factor GreB	KDM53922.1*	0	25.9	/	transcription elongation factor greB
KEO92766.1*	0	499	/	pseudouridine synthase	KDM54709.1*	53.6	142	2.65	tRNA pseudouridine synthase B
KEO92773.1*	238.61	1937.27	8.12	translation initiation factor IF-2	KDM54711.1*	645	1330	2.06	translation initiation factor IF-2
KEO92898.1*	0	183.68	/	oxidoreductase	KDM50444.1*	0	20.2	/	formate hydrogenlyase subunit 2
KEO92901.1*	0	211.59	/	metallophosphoesterase	KDM54593.1*	123	267	2.17	protein ioc
KEO93029.1*	0	1061.69	/	Fur family transcriptional regulator	KDM55662.1*	494	1760	3.56	ferric uptake regulation protein
KEO93118.1*	0	351.2	/	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	KDM57359.1*	86	299	3.48	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase
KEO93158.1*	0	513.67	/	ubiquinone biosynthesis protein UbiH	KDM49723.1*	43.2	93.8	2.17	2-octaprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase
KEO93247.1*	0	269.73	/	TetR family transcriptional regulator	KDM55557.1*	86.7	564	6.51	HTH-type transcriptional regulator BetI
KEO93375.1*	0	357.49	/	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	KDM57347.1*	53.6	142	2.65	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase
KEO93411.1*	0	566.68	/	16S rRNA methyltransferase	KDM57388.1*	162	1000	6.17	ribosomal RNA small subunit methyltransferase H
KEO95480.1*	303.62	627.48	2.07	methionine sulfoxide reductase B	KDM51893.1*	41	208	5.07	peptide methionine sulfoxide reductase msrB
KEO96529.1*	0	210.35	/	phosphoribosylamine-glycine ligase	KDM52454.1*	92	380	4.13	phosphoribosylamine-glycine ligase

KEO96539.1*	0	696.27	/	hypothetical protein	KDM51989.1*	200	435	2.18	FeS cluster assembly protein sufD
KEO96580.1*	0	486.03	/	PTS IIA-like nitrogen-regulatory protein PtsN	KDM54746.1*	0	150	/	nitrogen regulatory protein
KEO96608.1*	0	1394.71	/	translation factor Sua5	KDM53819.1*	0	42.9	/	tRNA threonylcarbamoyladenosine biosynthesis protein RimN
KEO96752.1*	97.51	359.85	3.69	integrase	KDM51758.1*	94.3	425	4.51	putA protein
KEO98470.1*	0	124.49	/	hypothetical protein	KDM51955.1*	11.8	59.6	5.05	UPF0061 protein ydiU
KEO98596.1*	0	814.69	/	LysR family transcriptional regulator	KDM57341.1*	37.7	81.9	2.17	transcriptional activator protein nhaR
KEO98607.1*	0	192.91	/	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	KDM57478.1*	42.5	1230	28.94	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase
KEO98608.1*	0	1552.72	/	peptidase	KDM57481.1*	264	854	3.23	RIP metalloprotease RseP
KEO98641.1*	0	1679.78	/	LysR family transcriptional regulator	KDM53240.1*	130	321	2.47	hydrogen peroxide-inducible gene activator
KEO98759.1*	0	157.99	/	3-dehydroquinate synthase	KDM53905.1*	46.8	192	4.1	3-dehydroquinate synthase
KEO98794.1*	0	345.72	/	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	KDM57421.1*	744	6140	8.25	dihydrolypoyllysine-residue acetyltransferase
KEO98866.1*	0	196.33	/	farnesyl-diphosphate synthase	KDM55391.1*	75.5	519	6.87	farnesyl diphosphate synthase
KEO98882.1*	0	473.35	/	rRNA methyltransferase	KDM51417.1*	107	496	4.64	tRNA (cytidine/uridine-2'-O)-methyltransferase TrmJ
KEO98935.1*	0	3161.33	/	transcriptional regulator	KDM55471.1*	0	120	/	HTH-type transcriptional regulator CueR
KEO98999.1*	0	246.42	/	nucleoside triphosphate hydrolase	KDM50489.1*	85.8	233	2.72	nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase
KEO99007.1*	0	538.76	/	2-C-methyl-D-erythritol_2,4-cyclodiphosphate_synthase	KDM50467.1*	70.8	154	2.18	2-C-methyl-D-erythritol_2,4-cyclodiphosphate_synthase
KEO99009.1*	0	388.83	/	cyclase	KDM51170.1*	35.6	155	4.35	hypothetical protein
KEO99027.1*	0	95.59	/	transketolase	KDM57420.1*	1130	10900	9.65	pyruvate dehydrogenase E1 component
KEO99055.1*	0	1388.6	/	hypothetical protein	KDM55136.1	0	5.43	/	hypothetical protein

表3. *L. amnigena*と*E. litoralis*の巨大化に伴い発現が共に0.5倍以下に減少したオルソログ遺伝子

<i>Erythrobacter litoralis</i>					<i>Lelliottia amnigena</i>				
Protein ID	スフェロプラスト化直後のRPKM	巨大化スフェロプラストのRPKM	RPKMの比	機能	Protein ID	スフェロプラスト化直後のRPKM	巨大化スフェロプラストのRPKM	RPKMの比	機能
アミノ酸合成・代謝関連遺伝子ホモログ									
KEO88954.1*	616.47	136.5	0.22	L-asparaginase	KDM51897.1*	33.4	0	0	L-asparaginase 1
KEO89592.1*	365.66	143.94	0.39	S-adenosylmethionine synthetase	KDM49649.1*	1070	255	0.24	S-adenosylmethionine synthase
KEO89916.1*	363.48	0	0	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-carboxylate_N-succinyltransferase	KDM57471.1*	1050	432	0.41	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate_N-succinyltransferase
KEO90596.1*	298.26	88.06	0.3	threonine aldolase	KDM55097.1*	509	172	0.34	low specificity L-threonine aldolase
KEO92299.1*	201.21	0	0	4-hydroxy-tetrahydronicotinate reductase	KDM57348.1*	269	14.9	0.06	dihydronicotinate reductase
KEO92640.1*	250.39	0	0	argininosuccinate synthase	KDM54714.1*	2220	219	0.1	argininosuccinate synthase
KEO92798.1*	507.05	149.7	0.3	3-isopropylmalate dehydratase	KDM57378.1*	196	60.8	0.31	3-isopropylmalate dehydratase small subunit
KEO93106.1*	831.23	245.41	0.3	serine acetyltransferase	KDM52905.1*	331	149	0.45	serine acetyltransferase
KEO93391.1*	1078.83	318.51	0.3	glutamine synthetase	KDM53324.1*	385	174	0.45	glutamine synthetase
KEO93480.1*	1248.41	595.39	0.48	3-phosphoglycerate dehydrogenase	KDM49615.1*	964	369	0.38	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
KEO98853.1*	596.53	0	0	ketol-acid reductoisomerase	KDM53647.1*	3330	450	0.14	ketol-acid reductoisomerase
KEO99046.1*	292.53	0	0	anthranilate synthase component I	KDM46686.1*	1870	7.86	0	anthranilate synthase component I
KEO99050.1*	459.56	45.23	0.1	anthranilate phosphoribosyltransferase	KDM46685.1*	2870	53.9	0.02	anthranilate synthase component II
鞭毛タンパク質遺伝子ホモログ									
KEO89561.1*	22111.9	337.67	0.02	flagellin	KDM48656.1*	124	44.9	0.36	hypothetical protein
KEO90993.1*	740.22	0	0	flagellar basal body rod protein FigC	KDM51808.1*	41.9	0	0	flagellar basal-body rod protein figC
KEO92484.1*	806.97	79.42	0.1	flagellar motor protein MotB	KDM51720.1*	24600	1390	0.06	outer membrane protein A
スクレオチド合成・ペントースリン酸経路関連遺伝子ホモログ									
KEO91063.1*	325.03	95.96	0.3	phosphoribosylpyrophosphate synthetase	KDM47000.1*	985	298	0.3	ribose-phosphate pyrophosphokinase
KEO93239.1*	414.76	61.23	0.15	glucose-6-phosphate dehydrogenase	KDM48740.1*	345	150	0.43	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
KEO93278.1*	293.09	0	0	aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit	KDM56880.1*	1090	65.9	0.06	aspartate carbamoyltransferase
KEO96500.1*	688.3	0	0	ribose-phosphate 3-epimerase	KDM53902.1*	200	54.4	0.27	ribose-phosphate 3-epimerase
KEO96518.1*	349.69	103.24	0.3	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	KDM57413.1*	57	27.5	0.48	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]
KEO98799.1*	610.9	45.09	0.07	transketolase	KDM49630.1*	844	278	0.33	transketolase 1
他の膜タンパク質遺伝子ホモログ									
KEO92879.1*	12676.2	0	0	membrane protein	KDM46678.1*	80.5	0	0	outer membrane protein W
KEO93429.1*	12522.2	4363.68	0.35	membrane protein	KDM54978.1*	216	86.8	0.4	inner membrane protein YbhL
KEO98493.1*	726.95	268.28	0.37	ABC transporter ATP-binding protein	KDM57319.1*	479	192	0.4	hypothetical protein
KEO99262.1*	1240.06	162.72	0.13	hypothetical protein	KDM52093.1*	131	11.8	0.09	AI-2 transporter tqsA

その他									
KEO89629.1*	824.47	121.71	0.15	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	KDM46348.1*	116	16.9	0.15	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase
KEO90016.1*	338.03	49.9	0.15	hypothetical protein	KDM52077.1*	18.6	0	0	HTH-type transcriptional regulator AbgR
KEO90690.1*	737.52	0	0	enoyl-ACP reductase	KDM46715.1*	495	156	0.32	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]
KEO92246.1*	756.79	111.72	0.15	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	KDM46209.1*	58.8	28.3	0.48	glucose-1-phosphate thymidyltransferase 2
KEO92477.1*	572.94	0	0	molybdopterin biosynthesis protein B	KDM54974.1*	232	47.9	0.21	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
KEO92492.1*	852.18	125.8	0.15	oxidoreductase	KDM46695.1*	312	80.6	0.26	hypothetical protein
KEO92638.1*	479.48	0	0	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	KDM52012.1*	148	0	0	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase
KEO92662.1*	1438.43	212.34	0.15	50S ribosomal protein L17	KDM53831.1*	354	128	0.36	50S ribosomal protein L17
KEO92699.1*	771.18	113.84	0.15	LysR family transcriptional regulator	KDM50509.1*	37	0	0	glycine cleavage system transcriptional activator
KEO93102.1*	223.37	0	0	bifunctional N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase/glucosamine-1-phosphate acetyltransferase	KDM52744.1*	372	108	0.29	glmU protein
KEO93190.1*	831.23	409.01	0.49	single-stranded DNA-binding protein	KDM56126.1*	679	140	0.21	single-stranded DNA-binding protein
KEO93395.1*	438.05	64.66	0.15	cytosol aminopeptidase	KDM51408.1*	158	47.7	0.3	peptidase B
KEO96463.1*	111.07	32.79	0.3	glutamate-ammonia-ligase adenyltransferase	KDM54608.1*	214	64.5	0.3	glutamate-ammonia-ligase adenyltransferase
KEO96716.1*	396.13	116.95	0.3	GntR family transcriptional regulator	KDM52778.1*	68.2	0	0	hypothetical protein
KEO96769.1*	581.14	171.57	0.3	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	KDM46350.1*	481	130	0.27	ribonucleoside-diphosphate reductase 1 subunit beta
KEO98584.1*	1114.39	0	0	transcriptional regulator HU subunit alpha	KDM52452.1*	2050	630	0.31	DNA-binding protein HU-alpha
KEO98612.1*	1352.13	0	0	50S ribosomal protein L31	KDM53254.1*	159	0	0	50S ribosomal protein L31
KEO98687.1*	228.14	84.19	0.37	phosphoenolpyruvate carboxylase	KDM53245.1*	621	236	0.38	phosphoenolpyruvate carboxylase
KEO98733.1*	470.03	173.46	0.37	DNA topoisomerase I	KDM46698.1*	569	255	0.45	DNA topoisomerase 1
KEO98800.1*	603.63	0	0	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	KDM51892.1*	2900	1360	0.47	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
KEO98996.1*	96.21	0	0	methionine--tRNA ligase	KDM46274.1*	576	115	0.2	methionyl-tRNA synthetase
KEO99011.1*	473.88	139.91	0.3	carbonate dehydratase	KDM52008.1*	26.7	0	0	hypothetical protein
KEO99037.1*	378.39	0	0	inorganic polyphosphate kinase	KDM51166.1*	96.6	0	0	hypothetical protein
KEO99041.1*	4328.46	2008.15	0.46	heat-shock protein	KDM52775.1*	41.3	0	0	small heat shock protein ibpA
KEO99260.1*	277.08	81.8	0.3	aminotransferase	KDM51415.1*	1540	637	0.41	cysteine desulfurase

表4. *L. amnigena*の巨大化に伴い発現が0.5倍以下に減少し、*E. litoralis*の巨大化に伴い発現が2倍以上増加したオルソログ遺伝子

<i>Erythrobacter litoralis</i>					<i>Lelliottia amnigena</i>				
Protein ID	スフェロプラスト化直後のRPKM	巨大化スフェロプラストのRPKM	RPKMの比	機能	Protein ID	スフェロプラスト化直後のRPKM	巨大化スフェロプラストのRPKM	RPKMの比	機能
膜タンパク質遺伝子ホモログ									
KEO89564.1*	0	106.93		hypothetical protein	KDM48649.1*	40.4	14.6	0.36	flagellar M-ring protein
KEO89607.1*	0	129.05		multidrug transporter	KDM52010.1*	150	45.1	0.3	multidrug resistance protein mdtK
KEO89895.1*	0	634.32		biopolymer transporter ExbB	KDM55699.1*	564	177	0.31	protein tolQ
KEO89973.1*	0	184.81		magnesium transporter CorA	KDM52382.1*	661	168	0.25	magnesium transporter CorA
KEO92632.1*	0	146.76		hypothetical protein	KDM46187.1*	175	72.3	0.41	inner membrane transporter YeeF
KEO92658.1*	0	1301.72		hypothetical protein	KDM57464.1*	136	39.4	0.29	UPF0126 inner membrane protein yadS
KEO92812.1*	0	172.56		type VI secretion protein	KDM54463.1*	51.9	12.5	0.24	hypothetical protein
KEO93024.1*	262.72	2171.79	8.27	iron transporter	KDM53929.1*	413	171	0.41	Fe/S biogenesis protein nfuA
KEO93116.1*	0	227.97		organic solvent tolerance protein	KDM57361.1*	483	224	0.46	LPS-assembly protein lptD
KEO93384.1*	352.12	1143.53	3.25	MttB family protein	KDM52402.1*	220	15.9	0.07	sec-independent protein translocase tatC
KEO98525.1*	0	128.22		hypothetical protein	KDM52772.1*	118	38	0.32	D-galactonate transporter
KEO98837.1*	0	215.39		phosphate ABC transporter permease	KDM52748.1*	724	152	0.21	phosphate transport system permease pstA
KEO98838.1*	0	194.41		phosphate ABC transporter permease	KDM52747.1*	1310	230	0.18	phosphate transport system permease pstC
KEO98907.1*	243.77	539.78	2.21	3,4-dihydroxy-2-butanone_4-phosphate_synthase	KDM54605.1*	1220	432	0.35	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase
その他									
KEO88945.1*	1061.88	3056.67	2.88	peptide deformylase	KDM53823.1*	699	313	0.45	peptide deformylase
KEO88946.1*	0	300.9		recombinase RecR	KDM55460.1*	336	101	0.3	recombination protein recR
KEO88958.1*	0	546.11		argininosuccinate lyase	KDM53241.1*	1610	116	0.07	argininosuccinate lyase
KEO88960.1*	484.06	1822.1	3.76	diaminopimelate decarboxylase	KDM50540.1*	780	19.5	0.03	diaminopimelate decarboxylase
KEO89297.1*	0	160.53		histidinol-phosphate aminotransferase	KDM46192.1*	240	92.6	0.39	histidinol-phosphate aminotransferase
KEO89579.1*	0	507.45		tRNA (guanine-N7)-methyltransferase	KDM54472.1*	802	154	0.19	tRNA (guanine-N(7))-methyltransferase
KEO89635.1*	0	207.2		formyltetrahydrofolate deformylase	KDM46646.1*	80.6	14.6	0.18	formyltetrahydrofolate deformylase
KEO89998.1*	0	437.71		ArsR family transcriptional regulator	KDM55050.1*	52.9	0	0	hypothetical protein
KEO90041.1*	0	118.57		hypothetical protein	KDM48627.1*	48	0	0	DNA-cytosine methyltransferase
KEO90698.1*	0	438.68		3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase	KDM55141.1*	91	0	0	3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase
KEO91020.1*	0	391.37		molecular chaperone DnaK	KDM57452.1*	5740	2210	0.39	DnaK suppressor protein
KEO91036.1*	0	883.47		molecular chaperone Hsp33	KDM53917.1*	77.3	28	0.36	chaperonin
KEO91037.1*	0	191.92		ornithine carbamoyltransferase	KDM56877.1*	16.9	0	0	ornithine carbamoyltransferase catabolic
KEO92302.1*	0	465.99		molybdopterin biosynthesis protein MoeB	KDM52444.1*	112	16.3	0.15	sulfur carrier protein ThiS adenyltransferase
KEO92334.1*	113.82	285.62	2.51	aconitate hydratase	KDM46701.1*	305	152	0.5	aconitate hydratase 1
KEO92372.1*	0	272.18		phosphomethylpyrimidine kinase	KDM46258.1*	42.4	15.3	0.36	hydroxymethylpyrimidine/phosphomethylpyrimidine kinase
KEO92402.1*	0	190.3		glutamyl-tRNA synthetase	KDM51312.1*	216	86.8	0.4	glutamyl-tRNA synthetase

KEO92434.1*	0	266.53		2-hydroxyacid dehydrogenase	KDM52411.1*	69.7	25.2	0.36	glyoxylate/hydroxypyruvate reductase B
KEO92503.1*	0	462.99		inosine-5-monophosphate dehydrogenase	KDM51383.1*	417	117	0.28	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase
KEO92549.1*	0	490.81		30S ribosomal protein S6	KDM56939.1*	944	217	0.23	30S ribosomal protein S6
KEO92597.1*	0	368.72		tryptophan synthase subunit beta	KDM46689.1*	3260	134	0.04	tryptophan synthase beta chain
KEO92634.1*	0	460.61		oxidoreductase	KDM52065.1*	23.5	0	0	dihydrofolate reductase folM
KEO92667.1*	0	278.51		adenylate kinase	KDM55462.1*	1950	914	0.47	adenylate kinase
KEO92711.1*	0	424.08		3-isopropylmalate dehydrogenase	KDM57380.1*	280	113	0.4	3-isopropylmalate dehydrogenase
KEO92758.1*	0	1060.85		DNA-binding protein	KDM51729.1*	7260	966	0.13	heat shock protein hspQ
KEO92776.1*	0	1339.41		ribosome maturation protein RimP	KDM54713.1*	187	81.4	0.44	ribosome maturation factor rimP
KEO92780.1*	0	511.79		ATPase AAA	KDM46723.1*	52.1	25.1	0.48	psp operon transcriptional activator
KEO92795.1*	0	399.2		thioesterase	KDM55422.1*	298	61.6	0.21	long-chain acyl-CoA thioesterasesC
KEO92811.1*	0	81.47		polyphosphate kinase	KDM51368.1*	437	107	0.24	polyphosphate kinase
KEO93025.1*	499.56	1179.89	2.36	malonic semialdehyde reductase	KDM51751.1*	57.5	20.8	0.36	hypothetical protein
KEO93125.1*	0	144.29		succinylarginine dihydrolase	KDM51916.1*	89.7	27.8	0.31	N-succinylarginine dihydrolase
KEO93177.1*	0	687.39		aromatic amino acid aminotransferase	KDM55151.1*	385	124	0.32	aspartate aminotransferase
KEO93181.1*	0	286.5		riboflavin synthase subunit alpha	KDM52011.1*	317	76.6	0.24	riboflavin synthase alpha chain
KEO93285.1*	1214.49	3764.87	3.1	bacterioferritin	KDM53859.1*	463	77.3	0.17	bacterioferritin
KEO93379.1*	0	350.17		beta-hexosaminidase	KDM51842.1*	248	71.9	0.29	beta-hexosaminidase
KEO93387.1*	0	283.79		threonine dehydratase	KDM54671.1*	51.5	0	0	threonine dehydratase catabolic
KEO93441.1*	0	293.53		cystathionine beta-lyase	KDM54516.1*	285	92.9	0.33	cystathionine beta-lyase
KEO93476.1*	0	3077.91		hypothetical protein	KDM54633.1*	68.6	24.8	0.36	hypothetical protein
KEO96380.1*	0	130.17		protein-Pil1 uridylyltransferase	KDM57472.1*	108	32.1	0.3	[protein-Pil1] uridylyltransferase
KEO96408.1*	0	407.9		GTP cyclohydrolase	KDM46702.1*	287	104	0.36	GTP cyclohydrolase-2
KEO96434.1*	131.11	377.39	2.88	glutamate synthase	KDM54762.1*	2310	320	0.14	glutamate synthase [NADPH] large chain
KEO96435.1*	0	156.26		glutamate synthase	KDM54763.1*	1780	320	0.18	glutamate synthase [NADPH] small chain
KEO96528.1*	0	211.7		exodeoxyribonuclease VII large subunit	KDM51384.1*	74.2	0	0	exodeoxyribonuclease 7 large subunit
KEO96545.1*	0	814.69		AsnC family transcriptional regulator	KDM51416.1*	2800	150	0.05	HTH-type transcriptional regulator isoR
KEO98460.1*	0	1164.32		50S ribosomal protein L27	KDM54727.1*	1840	667	0.36	50S ribosomal protein L27
KEO98556.1*	0	200.94		citrate lyase	KDM54480.1*	19.4	0	0	citrate lyase subunit beta
KEO98575.1*	300.92	1066.1	3.54	farnesyltransferase	KDM54729.1*	175	25.3	0.14	octaprenyl-diphosphate synthase
KEO98712.1*	0	412.01		thioredoxin reductase	KDM55115.1*	351	88.8	0.25	thioredoxin reductase
KEO98796.1*	0	1374.78		5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	KDM49727.1*	85.4	41.2	0.48	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase
KEO98834.1*	0	260.35		chemotaxis protein CheY	KDM55825.1*	2140	142	0.07	phosphate regulon transcriptional regulatory protein phoB
KEO98839.1*	0	180.36		histidine kinase	KDM55824.1*	380	47.4	0.12	phosphate regulon sensor protein phoR
KEO98906.1*	0	424.68		6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	KDM55386.1*	325	157	0.48	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
KEO98922.1*	0	653.71		50S ribosomal protein L25	KDM46330.1*	477	129	0.27	50S ribosomal protein L25
KEO98968.1*	0	712.85		nucleoside-triphosphate diphosphatase	KDM54467.1*	57.2	0	0	nucleoside-triphosphatase rdgB
KEO98978.1*	0	229.8		DNA repair protein RadA	KDM57315.1*	282	106	0.38	DNA repair protein radA
KEO99042.1*	0	438.68		CTP synthase	KDM50488.1*	871	353	0.41	CTP synthase

表5 *L. amnigena*の巨大化に伴い発現が2倍以上増加し、*E. litoralis*の巨大化に伴い発現が0.5倍以下に減少したオルソログ遺伝子

<i>Erythrobacter litoralis</i>					<i>Lelliottia amnigena</i>				
Protein ID	スフェロプラスト化直後のRPKM	巨大化スフェロプラストのRPKM	RPKMの比	機能	Protein ID	スフェロプラスト化直後のRPKM	巨大化スフェロプラストのRPKM	RPKMの比	機能
膜タンパク質遺伝子ホモログ									
KEO89304.1*	629.44	247.78	0.39	penicillin-binding protein	KDM57456.1*	296	1010	3.41	penicillin-binding protein 1B
KEO89573.1*	405.64	59.88	0.15	flagellar biosynthesis protein fljP	KDM48639.1*	0	16.7	/	flagellar biosynthetic protein fljP
KEO90985.1*	453.73	133.96	0.3	hypothetical protein	KDM51816.1*	0	22.5	/	flagellar hook-associated protein 1
KEO90987.1*	2625.04	163.16	0.06	flagellar P-ring protein FlgI	KDM51814.1*	15.5	56	3.61	flagellar P-ring protein
KEO90994.1*	859.4	0	0	flagellar basal body rod protein FlgB	KDM51807.1*	0	147	/	flagellar basal-body rod protein flgB
KEO92489.1*	458.87	135.47	0.3	ABC transporter	KDM51852.1*	72.6	175	2.41	lipoprotein-releasing system ATP-binding protein LoID
KEO92547.1*	320.92	0	0	ABC transporter	KDM48630.1*	0	13.5	/	inner membrane protein yedI
KEO92700.1*	2204.56	0	0	magnesium transporter ApaG	KDM57357.1*	89.9	488	5.43	protein ApaG
KEO93367.1*	2069.58	111.09	0.05	secretion system protein	KDM53908.1*	0	9.92	/	hypothetical protein
KEO93416.1*	284.06	0	0	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	KDM57393.1*	204	817	4	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase
KEO93419.1*	495.89	109.8	0.22	UDP-diphospho-muramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase	KDM57396.1*	79.7	415	5.21	undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase
KEO93424.1*	682.13	134.26	0.2	cell division protein FtsA	KDM57400.1*	865	2250	2.6	cell division protein ftsA
KEO98787.1*	1321.3	373.84	0.28	preprotein translocase subunit SecA	KDM57404.1*	69	559	8.1	protein translocase subunit secA
KEO98980.1*	184.72	54.53	0.3	major facilitator transporter	KDM46178.1*	64.5	159	2.47	shikimate transporter
その他									
KEO89313.1*	2157.65	0	0	peptide methionine sulfoxide reductase	KDM56920.1*	0	19.1	/	peptide methionine sulfoxide reductase msrA
KEO89605.1*	7190.86	2640.13	0.37	molecular chaperone GroEL	KDM56992.1*	1220	4660	3.82	chaperonin
KEO89995.1*	402.88	33.98	0.08	5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase	KDM55766.1*	111	223	2.01	methionine synthase
KEO90687.1*	897.43	132.48	0.15	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	KDM52037.1*	0	37.4	/	pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase
KEO91004.1*	607.24	0	0	hypothetical protein	KDM49677.1*	375	1380	3.68	protein yciF
KEO91044.1*	382.68	0	0	glucose-methanol-choline oxidoreductase	KDM55555.1*	51	185	3.63	choline dehydrogenase
KEO91076.1*	644.55	190.3	0.3	phosphomannomutase	KDM46221.1*	99.1	1120	11.3	phosphomannomutase
KEO92378.1*	1931.61	855.42	0.44	RNA polymerase sigma70	KDM51449.1*	2570	7420	2.89	RNA polymerase sigma-E factor
KEO92529.1*	224.36	66.24	0.3	hypothetical protein	KDM57043.1*	0	6.34	/	hypothetical protein
KEO92652.1*	1365.79	554.44	0.41	succinate--CoA ligase	KDM55690.1*	566	1450	2.56	succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha
KEO92654.1*	2162.76	141.89	0.07	dihydrolipoamide succinyltransferase	KDM55688.1*	415	1100	2.65	hypothetical protein
KEO92656.1*	2572.76	822.87	0.32	dihydrolipoamide dehydrogenase	KDM57422.1*	775	3320	4.28	dihydrolipoamide dehydrogenase
KEO92681.1*	1049.06	206.48	0.2	50S ribosomal protein L16	KDM53849.1*	537	2360	4.39	50S ribosomal protein L16
KEO93425.1*	1877.96	607.24	0.32	cell division protein FtsZ	KDM57401.1*	1180	5490	4.65	cell division protein ftsZ

KEO93475.1*	113.94	0	0	ATPase AAA	KDM55119.1*	88.5	311	3.51	replication-associated recombination protein A
KEO96455.1*	712.48	35.06	0.05	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	KDM54731.1*	162	351	2.17	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase
KEO96456.1*	1034.79	101.84	0.1	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	KDM46650.1*	206	678	3.29	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
KEO96517.1*	762.48	0	0	chemotaxis protein CheY	KDM46276.1*	0	68.3		hypothetical protein
KEO96548.1*	291.41	86.03	0.3	dihydroorotate dehydrogenase	KDM51709.1*	16.8	72.9	4.34	dihydroorotate dehydrogenase
KEO98611.1*	618.35	0	0	3-hydroxyacyl-ACP dehydratase	KDM57485.1*	74.5	350	4.7	(3R)-hydroxymyristoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase
KEO99053.1*	249.16	73.56	0.3	molybdopterin biosynthesis protein	KDM55029.1*	68.9	149	2.16	molybdopterin molybdenumtransferase
KEO99263.1*	1114.39	0	0	glutamine amidotransferase	KDM54696.1*	327	852	2.61	protein yhbO

機能	標的遺伝子
細胞分裂	<i>ftsA</i>
	<i>ftsZ</i>
DNA修復・組換え	<i>hupA</i>
	<i>recA</i>
	<i>topA</i>
ストレス応答	<i>clpB</i>
	<i>pspA</i>
	<i>spy</i>
細胞表層	<i>ompA</i>
	<i>pbp1b</i>
コントロール	<i>g3pd</i>

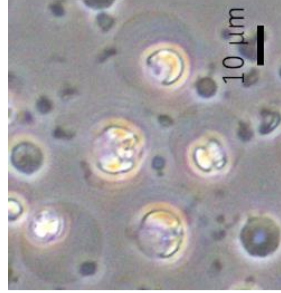
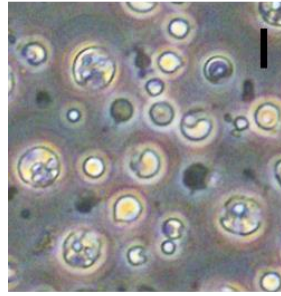
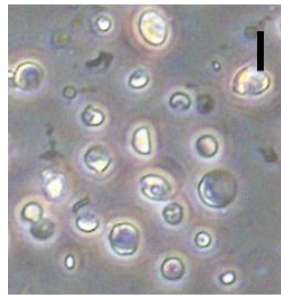
表6. 遺伝子発現比較に使用したターゲット遺伝子

トランスクリプトーム解析より得られた結果から、巨大化に関連していると考えられる遺伝子を10個選択した。*L. amnigena*と*E. litoralis*の双方において巨大化に伴い発現が変動しなかったグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子をコントロールとして用いた。

<i>ftsA</i>			
	Divided cells	Spheroplasts at 0 h	Spheroplasts at 43 h
Spheroplasts at 0 h	0.095		
Spheroplasts at 43 h	0.682	0.135	
Elongated cells	3.8×10^{-6}	5.3×10^{-5}	5.1×10^{-6}
<i>ftsZ</i>			
	Divided cells	Spheroplasts at 0 h	Spheroplasts at 43 h
Spheroplasts at 0 h	4.5×10^{-5}		
Spheroplasts at 43 h	6.1×10^{-14}	3×10^{-13}	
Elongated cells	0.0054	0.0076	1.4×10^{-13}
<i>hupA</i>			
	Divided cells	Spheroplasts at 0 h	Spheroplasts at 43 h
Spheroplasts at 0 h	2.8×10^{-6}		
Spheroplasts at 43 h	0.0013	0.0013	
Elongated cells	3.5×10^{-10}	1.3×10^{-7}	4.6×10^{-9}
<i>recA</i>			
	Divided cells	Spheroplasts at 0 h	Spheroplasts at 43 h
Spheroplasts at 0 h	2.6×10^{-8}		
Spheroplasts at 43 h	0.00028	3.9×10^{-6}	
Elongated cells	0.27493	5.4×10^{-8}	0.00121
<i>topA</i>			
	Divided cells	Spheroplasts at 0 h	Spheroplasts at 43 h
Spheroplasts at 0 h	5.5×10^{-10}		
Spheroplasts at 43 h	8.8×10^{-11}	0.003	
Elongated cells	6.1×10^{-11}	1.2×10^{-5}	0.003
<i>clpB</i>			
	Divided cells	Spheroplasts at 0 h	Spheroplasts at 43 h
Spheroplasts at 0 h	1.8×10^{-7}		
Spheroplasts at 43 h	3.5×10^{-9}	0.00021	
Elongated cells	0.09142	4.7×10^{-8}	1.3×10^{-9}
<i>pspA</i>			
	Divided cells	Spheroplasts at 0 h	Spheroplasts at 43 h
Spheroplasts at 0 h	9.9×10^{-10}		
Spheroplasts at 43 h	0.0004	3×10^{-8}	
Elongated cells	0.36166	6.8×10^{-10}	0.00014
<i>spy</i>			
	Divided cells	Spheroplasts at 0 h	Spheroplasts at 43 h
Spheroplasts at 0 h	3.2×10^{-9}		
Spheroplasts at 43 h	3.1×10^{-8}	0.00499	
Elongated cells	4.4×10^{-6}	4.4×10^{-6}	0.00024
<i>ompA</i>			
	Divided cells	Spheroplasts at 0 h	Spheroplasts at 43 h
Spheroplasts at 0 h	2×10^{-7}		
Spheroplasts at 43 h	0.00808	1.8×10^{-8}	
Elongated cells	0.00075	2.8×10^{-5}	1.4×10^{-5}
<i>pbp1b</i>			
	Divided cells	Spheroplasts at 0 h	Spheroplasts at 43 h
Spheroplasts at 0 h	0.00038		
Spheroplasts at 43 h	0.00047	0.78208	
Elongated cells	2.3×10^{-6}	0.00322	0.00292

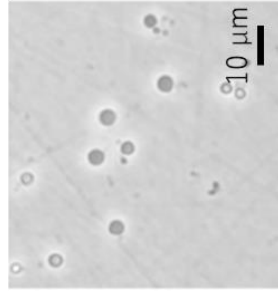
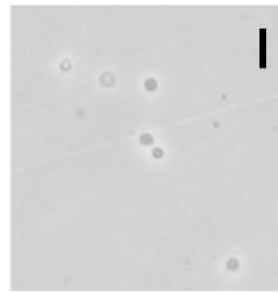
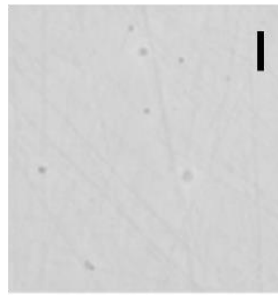
表7. ホルム補正のペアワイズ検定のP値（定量RT-PCR）

腸内細菌科
Lelliottia
amnigena



- 液胞形成○
- 内膜と外膜乖離○
- >10 μm

紅色光合成細菌
Erythrobacter
litoralis



- 液胞形成×
- 内膜と外膜乖離×
- <10 μm

図12. *L. amnigena*および*E. litoralis*巨大化スフェロプラストの比較

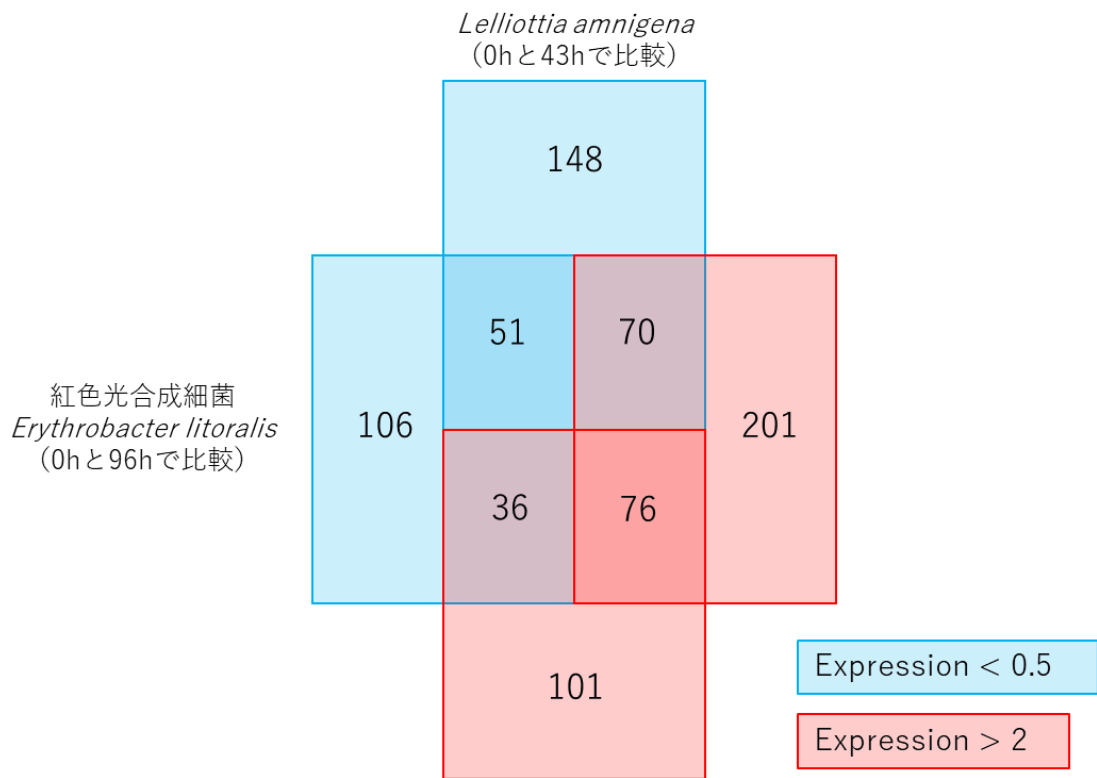
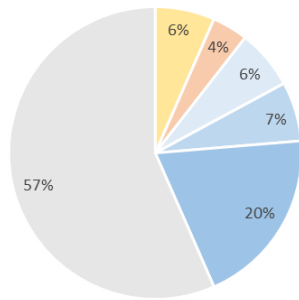
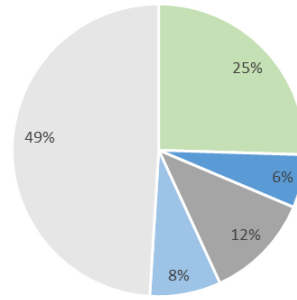


図13. *L. amnigena*と*E. litoralis*の巨大化に伴い発現が変動した1100の共通遺伝子の遺伝子発現解析
 発現が0.5倍以下に減少したものは青色、発現が2倍以上増加したものは赤色で示した。*L. amnigena*と*E. litoralis*共に発現が2倍以上になったものは76個、共に0.5倍以下に減少したものは51個、*L. amnigena*では2倍以上増加し、*E. litoralis*では0.5倍以下に減少したものは36個、*E. litoralis*では2倍以上増加し、*L. amnigena*では0.5倍以下に減少したものは70個あった。

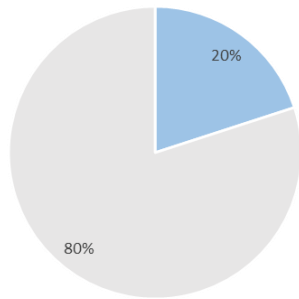
L. a、E. l共に2倍以上増加



L. a、E. l共に0.5倍以下に減少



L. a : 0.5倍以下に減少 E. l : 2倍以上増加



L. a : 2倍以上増加 E. l : 0.5倍以下に減少

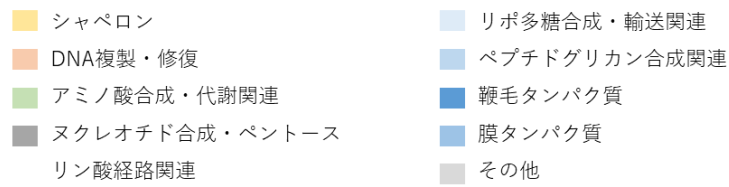
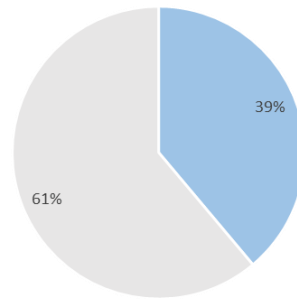


図14. *L. amnigena*と*E. litoralis*の巨大化に伴い発現が変動したオルソログ遺伝子の構成

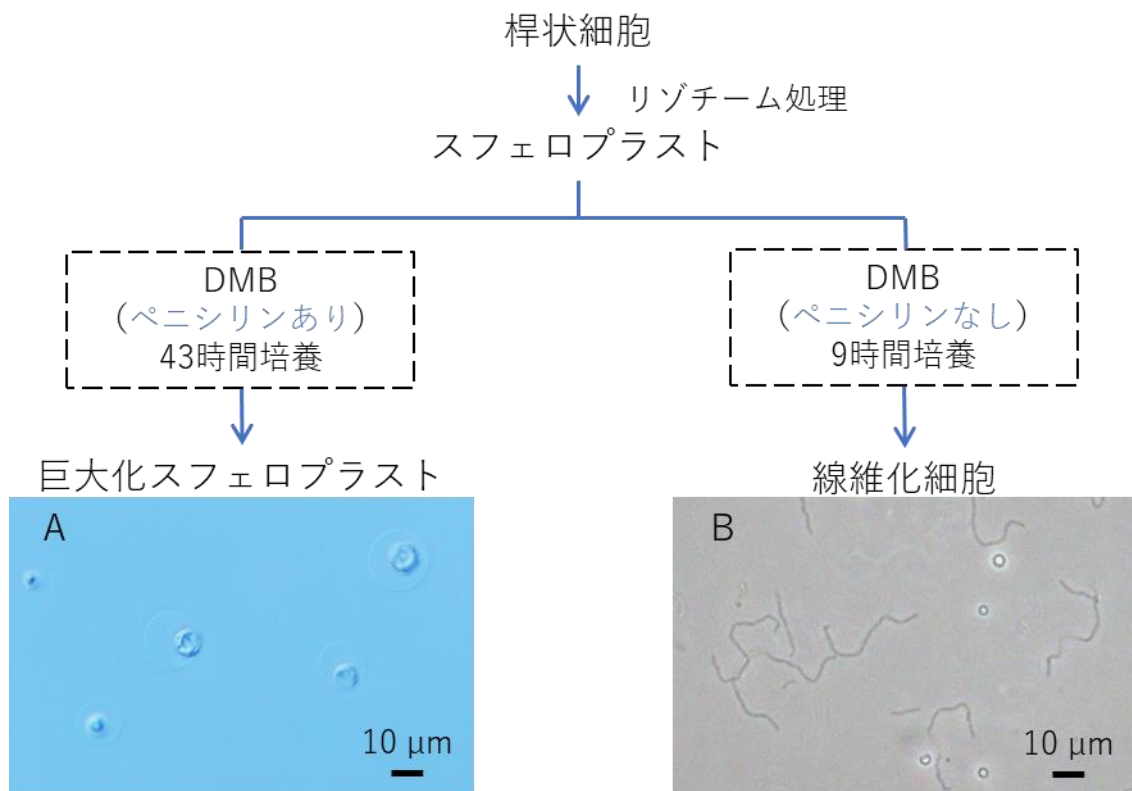


図15. 遺伝子発現比較に使用した細胞

桿状細胞、スフェロプラスト直後、巨大化スフェロプラスト、線維化細胞の遺伝子発現を比較した。(A) ペニシリン含有DMBで43時間培養した *L. amnigena* 巨大化スフェロプラストの微分干渉顕微鏡写真 (Olympus IX73) (B) ペニシリンを含まないDMBで9時間培養した *L. amnigena* 線維化細胞の位相差顕微鏡写真 (Olympus CKX41)。1細胞を点線で囲った。

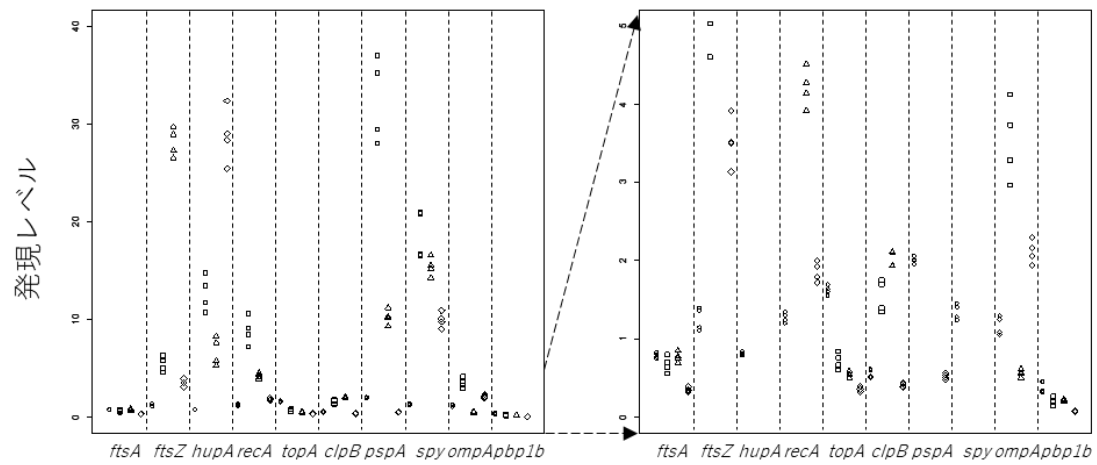


図16. 相対的なRNA発現レベル

コントロールからそれぞれのCq値を引いた値を指数にした値を発現レベルとした。丸 (○) は桿状細胞、四角 (□) はスフェロプラスト直後 (培養0時間)、三角 (△) はスフェロプラスト培養43時間の巨大化スフェロプラスト、菱形 (◇) は線維化細胞を示す。右は左のグラフを拡大したグラフである。右のグラフには、有意差がない7個の組み合わせを示した ($p > 0.05$)。

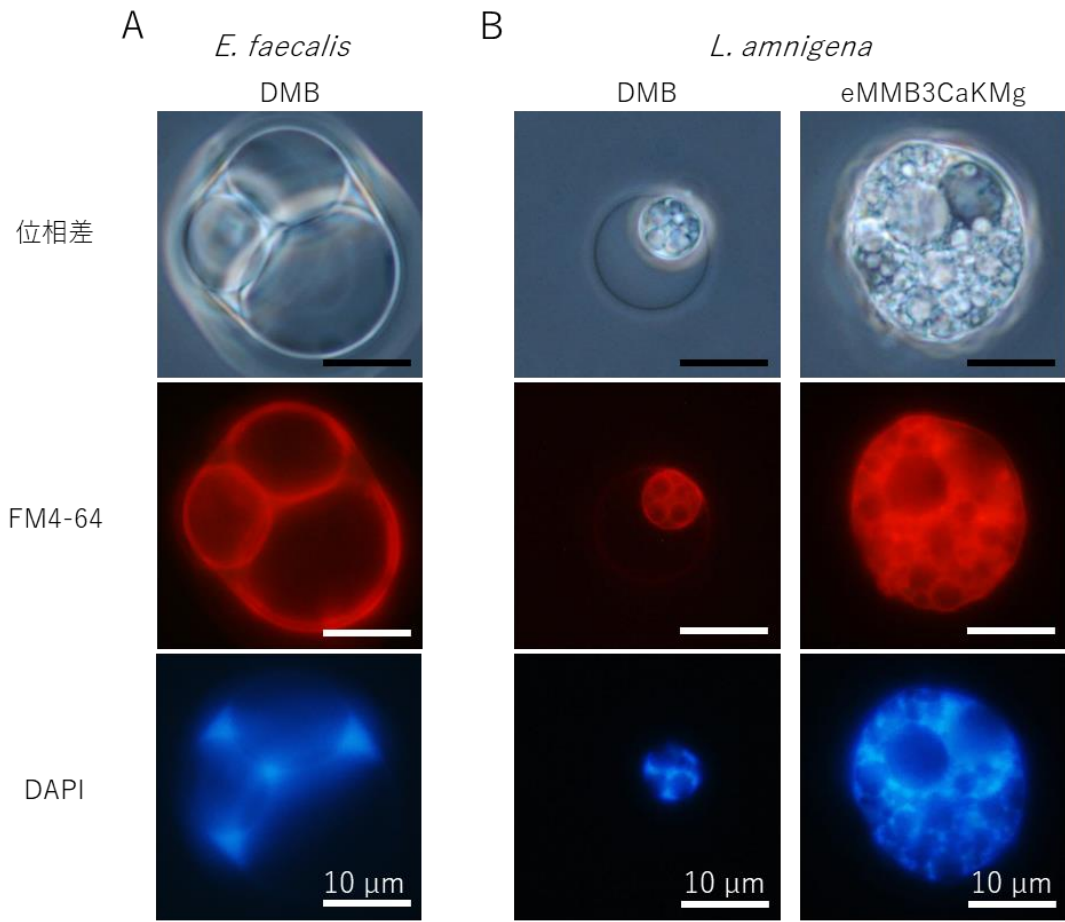


図17. *E. faecalis*巨大化プロトプラストおよび*L. amnigena*巨大化スフェロプラストの染色
 (A) ペニシリン含有DMBで144時間培養した*E. faecalis*プロトプラスト。
 (B) ペニシリン含有DMBおよびeMMB3CaKMgで20時間培養した*L. amnigena*スフェロプラスト。膜をFM4-64で染色し、DNAをDAPIで染色した。位相差および蛍光顕微鏡写真は、Olympus BX51で撮影。

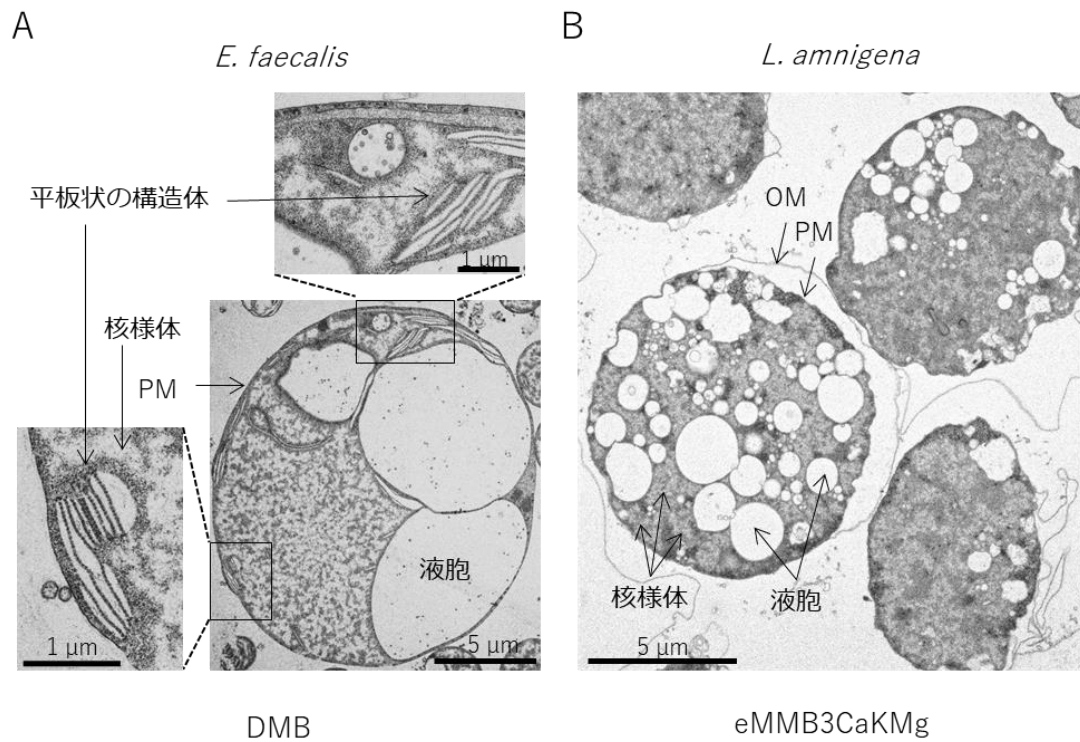


図18. *E. faecalis*巨大化プロトプラストおよび*L. amnigena*巨大化スフェロプラストの透過型電子顕微鏡観察
 (A) ペニシリン含有DMBで65時間培養した*E. faecalis*プロトプラスト。(B) ペニシリン含有eMMB3CaKMgで24時間培養した*L. amnigena*スフェロプラスト。
 OM：外膜、PM：細胞膜。

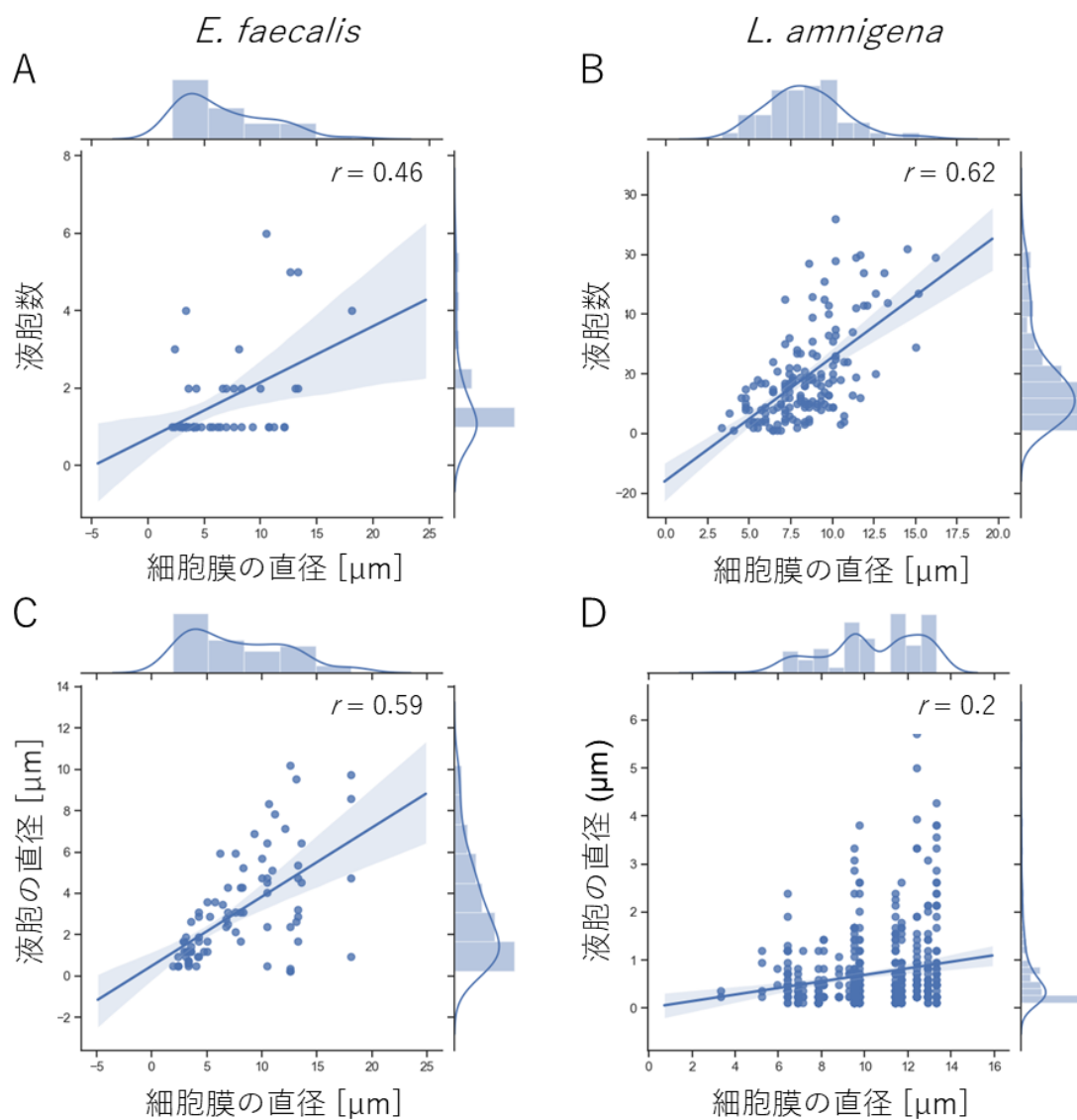


図19. *E. faecalis*プロトプラストおよび*L. amnigena*スフェロプラストの細胞サイズと液胞合成の関係
 透過型電子顕微鏡写真に基づいて、細胞膜と液胞の直径および液胞数を計測した。(A) *E. faecalis*における細胞直径と液胞数の関係 ($n=48$) (B) *L. amnigena*における細胞直径と液胞数の関係 ($n=154$) (C) *E. faecalis*における細胞直径と液胞直径の関係 (細胞数: $n=48$ 、液胞数: $n=82$) (D) *L. amnigena*における細胞直径と液胞直径の関係 (細胞数: $n=19$ 、液胞数: $n=506$)

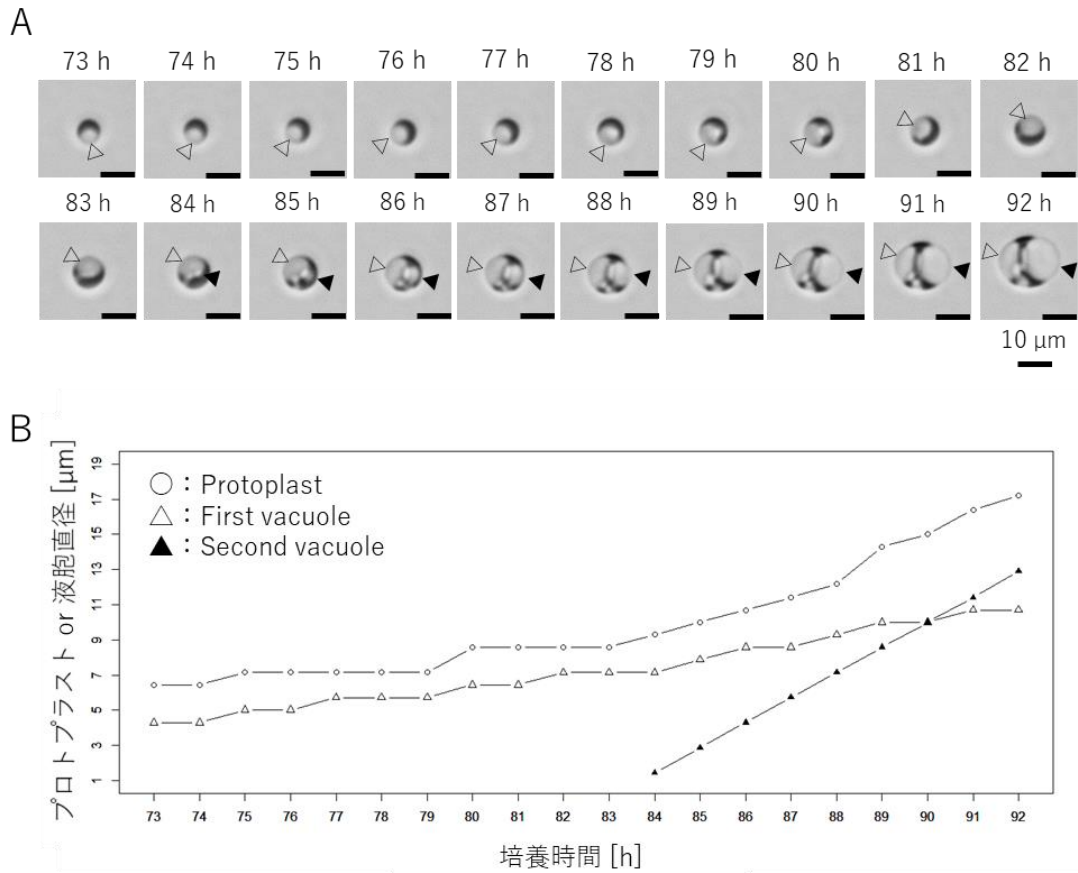


図20. *E. faecalis*プロトプラスト巨大化のタイムラプス観察
 ペニシリン含有DMBでプロトプラストを73時間培養した細胞を使用した。
 (A) タイムラプス観察の明視野顕微鏡写真。白色の矢印頭は、1つ目の液胞を示し (First vacuole)、黒色の矢印頭は、2つ目の液胞 (Second vacuole) を示した。(B) 培養時間とプロトプラストおよび液胞直径の関係。明視野顕微鏡写真は、Keyence BZ-X710で撮影。

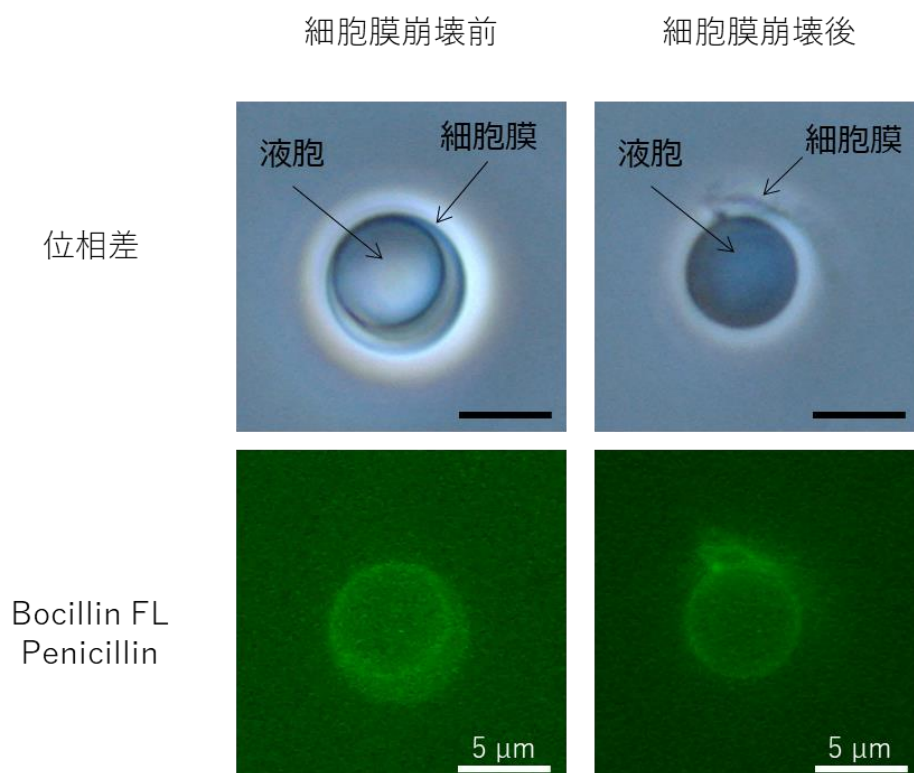


図21. Bocillin FL penicillin染色
 ペニシリン含有DMBで72時間培養した*E. faecalis*巨大化プロトプラスト。
 ペニシリン結合タンパク質をBocillin FL penicillinで染色した。位相差および
 蛍光顕微鏡写真は、Olympus BX51で撮影。PM：細胞膜。

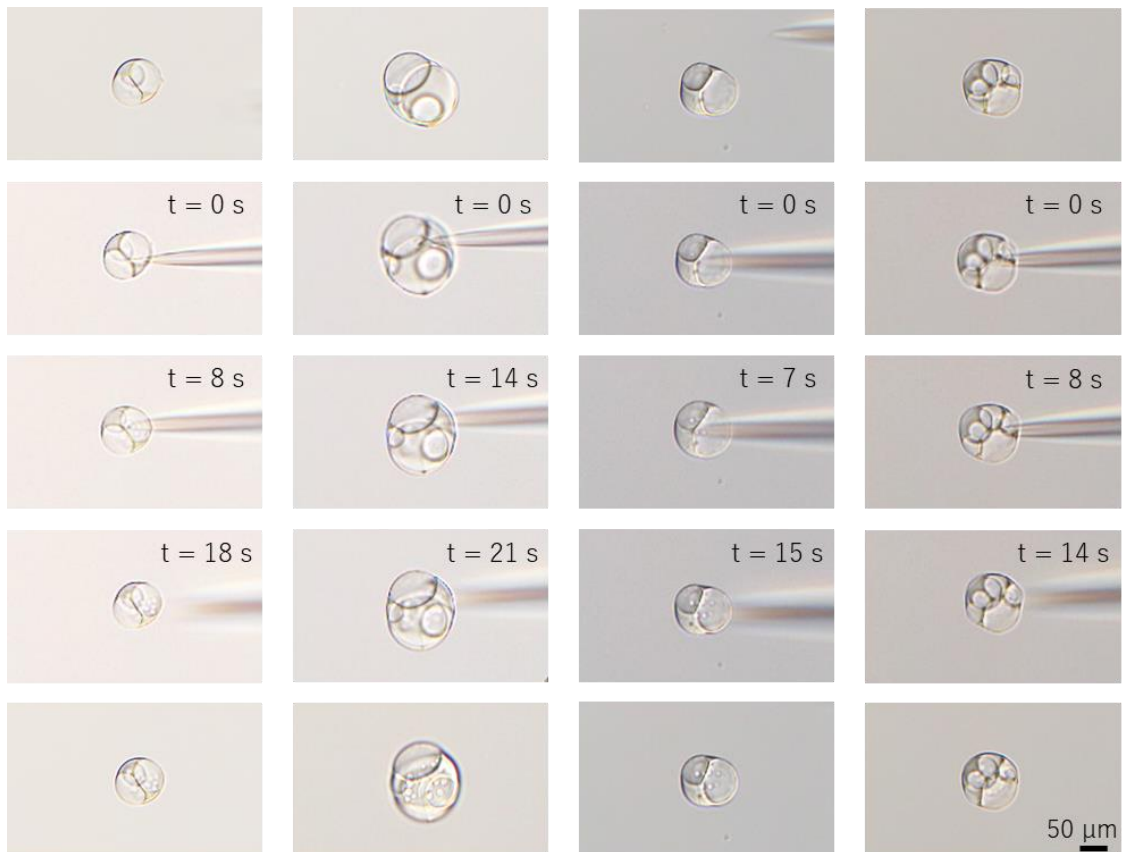


図22. *E. faecalis*巨大化プロトプラストにおけるマイクロインジェクションによる細胞内の変化
 ペニシリン含有DMBで96時間培養した*E. faecalis*巨大化プロトプラスト。
 導入開始時間を0秒とした。微分干渉顕微鏡Olympus IX73で撮影。

第4章 バクテリア細胞巨大化と DNA 複製の関係

4.1 序論

第3章では、トランスクリプトーム解析より、スフェロプラスト巨大化は、細胞膜における脂質組成の変化と合わせて、遺伝子発現を制御しながら巨大化していることが示された。また、巨大化スフェロプラストは、細胞質に DNA を含まない液胞を形成しており、巨大な細胞の大きさに対し、DNA の領域は限られている。一方、巨大化と DNA 複製の関係は調べられていない。

細胞壁を壊され、その合成を阻害されたスフェロプラストおよびプロトプラストは、細胞分裂できない⁵¹。遺伝情報である DNA の複製は、細胞分裂の前に行われるため、分裂しない細胞における複製は必要ないように考えられる。しかし、大腸菌および枯草菌の巨大化プロトプラスト内には、数百コピーのクロモソーム DNA が存在していると報告されている^{18,19}。また、大腸菌をペニシリン存在下で培養すると、不完全な細胞分裂面において細胞膜だけで覆われたバルジを形成するが、複製阻害剤の添加によってバルジ形成が抑制される⁵²。本章では、DNA 複製がスフェロ/プロトプラスト巨大化の際に必要なかどうか調べた。スフェロ/プロトプラストは、分裂できないため、培養しても細胞数は変化しておらず、全 DNA 量を測定することによって、複製の頻度を知ることができる。そこで、経時的に DNA を抽出し、リアルタイム定量 PCR によって Cq (Cycle of quantification) 値を得ることで DNA 量を測定した。Cq 値が n 減少すると DNA 量は約 2^n 倍に増加する。また、複製阻害剤の添加および除去による巨大化への影響を調べ、DNA 複製と細胞膜伸張が同調していることを明らかにし、浸透圧と金属塩に続いて、複製阻害剤も巨大化をコントロールできることがわかった。

4.2 実験方法

4.2.1 *Escherichia coli* のスフェロプラスト培養 2

*E. coli*SCS1 株 (strategene) をプラスミド pHRP311⁵³ (14 kbp; GM^r, SP^r/SM^r, IncQ グループの RSF1010⁵⁴⁻⁵⁹ のレプリコンをもつ) で形質転換した株を使用した。ストレプトマイシン存在下の DMB 寒天培地で数日間培養した菌体 (1~3 mg) を、1 mL のリゾチーム溶液 II (終濃度 200 µg/mL) に懸濁し、37°C で 15 分間静置培養した。その後、500 µL ずつ分注し、3000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。一方は、ペニシリン濃度 600 µg/mL を含む DMB 500 µL で懸濁し、懸濁液 2 µL をペニシリン濃度 600 µg/mL を含む DMB 500 µL に添加した。もう一方は、ペニシリンを含まない DMB 500 µL で懸濁し、懸濁液 2 µL をペニシリンを含まない DMB 500 µL に添加した。その後、室温 (24~25°C) ・暗条件下で静置培養した。

4.2.2 *Escherichia coli* スフェロプラストのリアルタイム定量 PCR

大腸菌のスフェロプラスト培養 0、3、6、9、12、24 時間において、全培養液 500 µL から NucleoSpin Tissue XS キット (Macherey-Nagel) を用いて DNA を抽出した (20 µL, $n=3$)。大腸菌クロモソーム DNA を検出するためにシングルコピー遺伝子 *uidA* を増幅するプライマー *uidA-F*、*uidA-R*⁶⁰ (表 8) およびプラスミド pHRP311 を検出するために *repA* と *repC* に対して設計したプライマー *repA-F*, *repA-R*, *repC-F*, *repC-R* (表 8) を使用した。DNA 抽出液 5 µL を定量 PCR に使用し、DNA は、LightCycler Nano system (Roche) を用いて FastStart Essential DNA Green Master キット (Roche) で増幅した。PCR は、次のサイクル条件下で行った：①最初の変性 95°C で 600 秒間、②変性 (95°C で 10 秒間)、アニーリング (55°C で 10 秒間)、伸張 (72°C で 15 秒間) を 45 サイクル、③融解曲線 (0.1°C/s で 60°C から 97°C まで)。C_q 値は、LightCycler Nano Software (Roche) で得た。培養時間ごとの C_q 値に対し、統計ソフト R を用いて (<http://www.r-project.org/>) 分散分析を行い、ホルム補正のペアワイズ *t* 検定を行った。また、培養 0

時間の Cq 値からそれぞれの培養時間の Cq 値を引いた値を、 ΔCq 値とし、R で散布図を作成した。

4.2.3 *Lelliottia amnigena* 巨大化スフェロプラストの低張液でのふるまい

巨大化は、2.2.8 と同様の方法で行った。手動マイクロインジェクター CellTram vario とマイクロマニピュレータ TransferMan 4r (eppendorf) を使用し、Piezo Drill Tip ES (eppendorf) で *L. amnigena* 巨大化スフェロプラストを吸引し、滅菌水中で放出した。

4.2.4 *Lelliottia amnigena* 巨大化スフェロプラスト 1 細胞のリアルタイム定量 PCR

巨大化は、2.2.8 と同様の方法で行った。培養 0、24、48、72、96 時間の時点で、CellTram vario と TransferMan 4r を用いて 1 細胞ずつ分注した。培養 0 時間のスフェロプラストは、Piezo Drill Tip Mouse ICSI (内径: 6 μm 、eppendorf) で分注し、培養 24、48、72、96 時間のスフェロプラストは、Piezo Drill Tip ES (内径: 15 μm) で分注した。DNA は、細胞膜に囲まれた部分に存在するため、細胞膜の大きさを一定にし、直径 9~15 μm の細胞を選択した (培養 0 時間は、1~2 μm)。1 細胞を吸引し、DMB 3 μL に移動した後、滅菌水 3 μL を分注してある 8 連チューブに移した (水に移すとスフェロプラストは破裂し、DNA が出てくる)。全量 6 μL をリアルタイム定量 PCR に使用した。全ての細胞を分注する操作時間は、1 時間以内とした。

PCR には、クロモソーム DNA の *ftsZ* に対してデザインしたプライマー *ftsZ*-F, *ftsZ*-R を使用した (表 1)。DNA は、LightCycler Nano system (Roche) を用いて FastStart Essential DNA Green Master kit (Roche) で増幅した。PCR は、次のサイクル条件下で行った: ①最初の変性 95°C で 600 秒間、②変性 (95°C で 10 秒間)、アニーリング (55°C で 10 秒間)、伸張 (72°C で 15 秒間) を 45 サイクル (培養 0、24 時間) or 50 サイクル (培養 48、72、96 時間)、③融解曲線 (0.1°C/s で 60°C から 95°C まで)。Cq 値は、LightCycler Nano Software (Roche) で得た。培養時間ごとの Cq 値に対し、統計ソフト R を用いて (<http://www.r-project.org/>)、分散分析を行った。

細胞膜直径および外膜直径は、観察写真を撮影した Olympus DP21 で計測した。細胞膜および外膜の短軸と長軸を図り、平均値をプロットした。それぞれ分散分析を行い、細胞膜直径は培養時間で有意差がなく、外膜直径は有意差が出たためホルム補正のペアワイズ t 検定をした。ボックスプロットは、R で作成した。

4.2.5 全ゲノムリシーケンス

L. amnigena を使用し、全 8 種類のサンプルを用意した。通常細胞の対数増殖期（サンプル名：log-phase）および定常期（サンプル名：stationary）をコントロールとし、スフェロプラスト化直後（サンプル名：DMB0h）、DMB でのスフェロプラスト巨大化培養 4、8、24、48、72 時間（サンプル名：DMB4h、DMB8h、DMB24h、DMB48h、DMB72h）を経時的にサンプリングした。巨大化は、2.2.8 と同様の方法で行い、巨大化培地には DMB をそれぞれ使用した。

log-phase は、 $OD_{600}=0.7$ まで培養したものを使用し（培養約 2~2.5 時間）、stationary は、15 時間培養したものを使用した。また、log-phase は Nucleo Spin Tissue XS キットを使用し、残りの 7 サンプルは Nucleo Spin Tissue キット（Macherey-Nagel）を用いてゲノム DNA を抽出した。全てのサンプルは、DNA 抽出前に微分干渉顕微鏡 Olympus IX73 (Olympus, Japan) で観察写真を撮影した。

log-phase および DMB24h のライブラリー作製およびシーケンスは、株式会社ジーンベイの細菌全ゲノムシーケンスを利用し、PCR-Free ライブラリー作製および 150 bp のペアエンドシーケンスを行った (illumina HiSeq X)。残りの 6 サンプルのライブラリー作製およびシーケンスは、文部科学省科学研究費 新学術領域研究「先進ゲノム支援」で行い、Nextera DNA Flex Library Prep キット (illumina) によるライブラリー作製および 50 bp のシングルエンドシーケンスを行った (Illumina HiSeq 2500)。

4.2.6 全ゲノムリシーケンスデータ解析

シーケンスリードは、Boetie 2⁶¹ を用いて、*L. amnigena* (アクセッション番号：NZ_CP023529.1) のリファレンスゲノム配列にマッピングした。各サンプルのリード数とアライメント率を表9に示した。また、*rrn* オペロン内では、高い配列同一性のため、リードはランダムに割り当てられるようにした。次に、25ヌクレオチド領域ごとにマップされたリード数の平均値を igvtools (IGV_2.3.40)⁶² で計算し、25ヌクレオチドごとのシーケンス数を得た。25ヌクレオチドごとのそれぞれのリード数は、総リード数が100万だった場合に補正し (per million mapped reads)、正規化したリード数を Excel (Microsoft) で視覚化した。その際、ゲノム上の位置 2423677~2424500 の領域 (*rpoS* から *nlpD* にまたぐ領域) はマップされなかったため除いて正規化を行った。次に、*oriC* 付近と *ter* 付近のシーケンス数の比を求めるため、マップの山形のトップを *oriC* 付近とし、谷型のボトムを *ter* 付近とした。それぞれを中心とした前後 50 kb の領域 (合計 100 kb) のリード数の平均を *oriC* および *ter* のリード数とした。*oriC* は、全 8 サンプル共通でゲノム上の 3500001~3600001 の領域とし、一方、*ter* は、log-phase と DMB24 は 1200001~1300001 の領域、残りの 6 サンプルは 950001~1050001 の領域とした (ゲノム支援でシーケンスした 6 サンプルはクロモソーム内で組み換えが生じており、マップの様子が異なったため)。また、シーケンスに使用したサンプルの微分干渉顕微鏡観察写真に基づいて、細胞膜直径を cellSens Standard 1.11 imaging software (Olympus) で計測した。さらに、細胞膜直径を計測した観察写真の中で、計測できた細胞を細胞膜維持細胞とし、計測できなかった細胞を細胞膜損傷および崩壊細胞とし、細胞全体の割合を調べた。グラフは、Excel (Microsoft) で作成した。

4.2.7 *Enterococcus faecalis* のリアルタイム定量 PCR1

巨大化は、2.2.5 と同様の方法で行った。*E. faecalis* のプロトプラスト培養 0、24、48、72、96、120、168、192、216、240 時間において、全培養液 1 mL から NucleoSpin

Tissue XS キット (Macherey-Nagel) を用いて DNA を抽出し、定量 PCR を行った。プライマーは、複製開始点付近に存在する *dnaA* (chromosomal replication initiator protein DnaA) を増幅するプライマー-dnaA-F、dnaA-R (表 8) を使用した。DNA 抽出液 1 μ L \times 3 を定量 PCR に使用し、DNA は、LightCycler Nano system (Roche) を用いて FastStart Essential DNA Green Master キット (Roche) で増幅した。PCR は、次のサイクル条件下で行った：①最初の変性 95°C で 600 秒間、②変性 (95°C で 10 秒間)、アニーリング (55°C で 10 秒間)、伸張 (72°C で 15 秒間) を 45 サイクル、③融解曲線 (0.1°C/s で 60°C から 95°C まで)。Cq 値は、Light Cycler Nano Software (Roche) で得た。培養時間ごとの Cq 値に対し、統計ソフト R を用いて (<http://www.r-project.org/>) 分散分析を行い、ボンフェローニ補正のペアワイズ *t* 検定を行った。また、位相差顕微鏡 (OLYMPUS CKX41) 観察写真に基づいて、細胞膜直径を cellSens Standard 1.11 imaging software (Olympus) で計測した。R で Cq 値と細胞サイズの散布図を作成した。

4.2.8 ノボビオシン添加による DNA 複製阻害

巨大化は、2.2.5 と同様の方法で行った。培養 24 時間にノボビオシン (終濃度 50 μ g/mL) を添加し、位相差顕微鏡 OLYMPUS CKX41 で経時的に観察した。ノボビオシンの除去は、培養 48 時間で行い、ペニシリン含有 DMB で培養 48 時間の培養液をフィルター滅菌した液で 50 倍希釈した。

4.2.9 *Enterococcus faecalis* のリアルタイム定量 PCR2

定量 PCR で得られる Cq 値を細胞数に変換するため、通常細胞を用いて検量線を作製した。スフェロ/プロトプラストは、分裂増殖しないため、1 細胞あたり 1 クロモソームとし、細胞数を DNA 数として扱った。培養液 1 mL あたりの細胞数を計測するため、OD₆₀₀=0.7 まで培養した培養液を希釈し、コロニー数をカウントした。リゾチーム処理後、原液、10 倍希釈、100 倍希釈のリゾチーム処理培養液から NucleoSpin Tissue XS キット (Macherey-Nagel) を用いて DNA を抽出し、定量 PCR を行った。プライマ

ーは、複製開始点付近に存在する *dnaA* とその反対の位置に存在する *parC* (DNA topoisomerase IV subunit A) を増幅するプライマー *dnaA*-F、*dnaA*-R、*parC*-F、*parC*-R (表 8) を使用した。DNA 抽出液 1 μ L \times 4 を定量 PCR に使用し、DNA は、LightCycler Nano system (Roche) を用いて MyGo Green Mix Universal ROX キット (ILS) で増幅した。PCR は、4. 2. 7 と同様の方法で行った。コロニーカウントおよび定量 PCR は、3 回行った。*dnaA* と *parC* のそれぞれのプライマーに対し、検量線を作成し、*dnaA* は、 $y = 4E + 11e^{-0.697x}$ 、*parC* は、 $y = 2E + 11e^{-0.647x}$ となった。

巨大化は、2. 2. 5 と同様の方法で行った。*E. faecalis* のプロトプラスト培養 0、24、48、72、96 時間および培養 24 時間でノボビオシン (終濃度 50 μ g/mL) またはマイトマイシン C (終濃度 25 μ g/mL、Sigma) を添加した培養 48、72、96 時間において、全培養液 1 mL から NucleoSpin Tissue XS キット (Macherey-Nagel) を用いて DNA を抽出した。定量 PCR は、上記と同様の方法で行った。得られた C_q 値を *dnaA* と *parC* それぞれの式に当てはめ、1 mL あたりの細胞数 (DNA 数) を算出した。ボックスプロットは、R (<http://www.r-project.org/>) で作成し、細胞数は対数で示した。

4.3 結果と考察

4.3.1 スフェロプラスト巨大化に伴う DNA 複製

プラスミド pHRP311⁵³ (IncQ グループの RSF1010⁵⁴⁻⁵⁹ をレプリコンにもつ) を導入した大腸菌を用いて、巨大化に伴い、クロモソームおよびプラスミド DNA が複製されるかどうか調べた²⁹。大腸菌は、ペニシリン含有 DMB およびペニシリンなしの DMB で 24 時間培養し、培養時間ごとに全培養細胞から DNA を抽出した (図 23)。定量 PCR は、クロモソーム DNA の *uidA* とプラスミド pHRP311 の *repA*、*repC* を標的として行った。どちらもスフェロプラスト培養時間が長くなるとともに Cq 値が低下した (表 10, 11)。また、培養 0 時間の Cq 値から各培養時間の Cq 値を引いた値を ΔCq 値とし、プロットした (図 24)。 ΔCq 値は、n 増加すると DNA 量は約 2^n 倍に増加したことを意味する。よって、巨大化スフェロプラスト培養に伴い、24 時間で、クロモソーム DNA は約 8 倍、プラスミド pHRP311 は、約 3~4 倍増加した。このことは、大腸菌スフェロプラストの巨大化とともに、クロモソームだけではなく、導入したプラスミドも複製したことを示す。ペニシリンなしの DMB では、細胞壁を再合成し、時間とともに線維化しているため、24 時間でクロモソーム DNA は約 9 倍、プラスミド pHRP311 は、約 5~8 倍増加した。また、プラスミド pHRP311 は、耐性の抗生物質を含まない培地で培養した細胞内において維持された。プラスミド pHRP311 は、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシンの耐性遺伝子を保有している。しかし、本実験では、ペニシリンのみを添加し、上記の 3 つの抗生物質は添加していない。また、ペニシリンを添加していない条件下でも pHRP311 の DNA 量は増加した。

4.3.2 巨大化スフェロプラスト 1 細胞における DNA 複製

大腸菌のスフェロプラスト培養 24 時間において、リアルタイム定量 PCR を用いて、全培養細胞のクロモソーム DNA とプラスミド DNA を定量したところ、DNA 量はどちらも増加していた²⁹。一方、大腸菌のスフェロプラスト培養 5 日間における DNA 量を 24 時間おきに調べたところ、DNA 量は時間と共に増加せず、むしろ 3 日目くら

いから減少した（データ示さず）。巨大化している細胞内で DNA を複製する一方で、死んでいく細胞もあり、時間の経過とともに細胞死の増加および死細胞の DNA 分解が進み、全培養細胞から DNA を抽出すると DNA 量が減少したような結果になったと考えられる。また、培養 24 時間の間では DNA 量が増加しているため、24 時間程度で DNA を複製し終えたとも考えられる。そこで、巨大化培養 24 時間以降についても DNA 複製は生じているかどうかを明らかにするため、マイクロマニピュレータを用いて、スフェロプラスト 1 細胞を単離し、1 細胞における DNA 量を定量した。

L. amnigena のスフェロプラストは、水中（低浸透圧下）で破裂し、細胞内の DNA が出てくる（図 25）。よって、分注した細胞は水中に移し、破裂させてから定量 PCR を行った。また、*L. amnigena* の巨大化スフェロプラストは、細胞膜と外膜が乖離し、巨大なペリプラズム空間を形成するが、ペリプラズム空間には DNA が存在しないため、細胞膜直径に基づいて 1 細胞を選択した。その際に、培養 24 時間から 96 時間にかけて、外膜直径は伸張し続けるが、細胞膜直径は伸張が止まり、最大で直径 9-15 μm の細胞が共通して多く見られたため、細胞膜直径 9-15 μm のスフェロプラストを選択した（図 26）。

スフェロプラスト培養 0、24、48、72 時間は 20 個、スフェロプラスト培養 96 時間は、16 個を単離した（表 12, 13）。培養 0、24 時間の細胞に対しては、45 サイクルの PCR 反応を行った。理論上、DNA が 1 分子ある場合、Cq 値は 45 程度になる。しかし、培養 24 時間の時点でも、Cq 値は 40 を超えるものがあつた。培養 24 時間で DNA を複製していることは大腸菌でわかっていたが、48 時間以降は DNA 量が増加する細胞と減少する細胞、変化しない細胞の存在が考えられたため、サイクル数を増やし 50 サイクルの PCR 反応を行った。その結果、培養 0 時間では 20 個中 0 個、培養 24 時間では 20 個全て、培養 48、72 時間では 20 個中 16 個、96 時間では 16 個全ての細胞の DNA 量を測定できた（表 12；図 27-A）。培養 0 時間は、20 個全ての細胞の DNA 量を測定できなかった。通常、1 細胞あたりの DNA 数は 1~2 分子であるため、培養 0 時間の 1 細胞においても DNA 分子は、理論上 1~2 分子である。45 サイクルで 1~2 分子の

DNA を検出するためには、1 サイクル目に DNA とプライマーが出会い、増幅されなければならない。よって、培養 0 時間の Cq 値を検出できなかったため、45 より高いと判断した。培養 24 時間の Cq 値は、30.8~41.8 であったため、巨大化スフェロプラスト内において、クロモソーム DNA が培養 24 時間で複製された（表 12；図 27-A）。

一方、培養 24 時間から 96 時間までの DNA 量には有意差がなかった。このことは、培養 24 時間以降、巨大化スフェロプラストの DNA 複製が停止したことを示す。しかし、ボックスプロットを見ると、培養 24 時間の 20 個の細胞だけでも、Cq 値に幅があり、DNA 量がばらばらであった。最小値と最大値で Cq 値は約 10 異なり、このことは、DNA 量が 2 の 10 乗も異なることを示す。培養 48、72 時間になるにつれてボックスの幅が広がり、さらに DNA 量にばらつきがでた。培養 96 時間になると、ボックスの幅が狭くなったが、そもそも細胞を維持している細胞が少ないため、ばらつきが小さくなったと考えられる。それぞれの培養時間で分注した 20 個の細胞は、細胞膜直径 9~15 μm の見た目は同じ細胞であるにも関わらず、DNA 量は異なることが 1 細胞の DNA 量測定より明らかになった（図 27-A, B）。

巨大化スフェロプラスト 1 細胞における定量 PCR 結果より、培養 24 時間以降、DNA 複製と細胞膜の伸張は停止したにもかかわらず、外膜は伸張し続けた（図 27；表 14； $p < 0.05$ ）。一方、培養 48 時間から崩壊し始める細胞が現れ、培養 96 時間でも 16 個の巨大化スフェロプラストを単離できたが、ほとんどの細胞は、培養 96 時間までに崩壊した。巨大化スフェロプラストの観察中、外膜が壊れ、細胞膜のみで囲まれた細胞を多く観察している。1 細胞のタイムラプス観察からも、細胞膜の伸張は停止し、外膜は伸張し続け、最終的に細胞が崩壊する様子が捉えられた（図 28）。

4.3.3 巨大細胞の全ゲノムリシーケンス解析

大腸菌および *L. amnigena* の巨大化スフェロプラストの DNA 量測定より、巨大化に伴い DNA 複製は行われているが、ある時間を超えると複製が停止することが明らかとなった。また、1 細胞における DNA 量測定より、細胞ごとに DNA 量にばらつきがあ

ることがわかった。本節では、培養時間で細胞を区切り、細胞集団の平均した DNA 複製の状態をモニタリングし、正常な複製が行われているのか、活発な複製および複製停止の様子を捉えられるのかどうか調べた。

ゲノム塩基配列が公開されている *L. amnigena* を使用し、全ゲノムリシーケンスを行った。ゲノム DNA を経時的に抽出し、それらの塩基配列を決定し、シーケンスリードをゲノムにマップすることによって、複製開始点 (*oriC*) および終結点 (*ter*) を示す方法で取り組んだ。複製が活発に行われている対数増殖期の細胞では、*oriC* の DNA 量が *ter* の DNA 量より多いため、*oriC* を頂点として V 字 (山形) のグラフになり、複製が活発ではない定常期の細胞では、平らに近いグラフになることが報告されている⁶³。予備実験として、*L. amnigena* の対数増殖期の細胞 (サンプル名: log-phase) および DMB での巨大化培養 24 時間の細胞 (サンプル名: DMB24h) のシーケンスを行った。得られたシーケンスリードをリファレンスゲノムである *L. amnigena* にマップし、ゲノム中の一定領域ごと (25 ヌクレオチド) のリード数をプロットした。その結果、log-phase では *oriC* および *ter* がそれぞれ 1 つ確認でき、対数増殖期で見られる特徴的な V 字のグラフが得られた (図 29)。また、log-phase における *oriC* と *ter* のリード数の比 (*oriC/ter*) は、2.61 となり、複製が活発な様子を表す指標を得た。一方、DMB24h では、平らなグラフが得られ、定常期を表すグラフに近い様子を示した (図 30)。*oriC/ter* も、1.09 となり、*oriC* と *ter* の DNA 量はほとんど同じであった。よって、巨大化培養 24 時間の細胞は、複製を活発に行っていないことが示唆され、上述の定量 PCR による DNA 量測定の結果と一致した。これらの結果から、*oriC* と *ter* のリード数の比を調べることによって、DNA 複製の様子をモニターできることがわかった。

次に、*L. amnigena* の巨大化に伴う DNA 複製の経時的な変化を捉えるため、追加で 6 サンプルの全ゲノムリシーケンスを行った。追加したサンプルは、定常期の細胞 (サンプル名: stationary)、スフェロプラスト化直後の細胞 (サンプル名: DMB0h)、DMB での巨大化培養 4、8、48、72 時間の細胞 (サンプル名: DMB4h, DMB8h, DMB48h, DMB72h) である。定常期の細胞とスフェロプラスト化直後の細胞は、コントロールと

して追加した。DMB での巨大細胞は、複製が活発な様子を捉えるため、複製が停止している 24 時間より前の細胞および複製停止後の様子を捉えるため、24 時間より後の細胞を追加した (4.3.2 参照)。

しかし、シーケンスした結果、前回とはマップの様子が異なり、山が二つに分かれたような形になった (図 29, 30)。そこで、不自然な断面を調べたところ、16S-23S-5S の順に並んだ rRNA のオペロン構造が存在していることがわかった (図 29, 30; *rrn1* と *rrn6*)。これらの配列は似ているため組み換えが生じたことが示唆された。一方、解析の目的は、*oriC* と *ter* のリード数の比によって複製の活発さを調べることであるため、それぞれのサンプルの *oriC/ter* を算出し、培養時間ごとにプロットした (図 31; 表 15)。まず、コントロールである log-phase と stationary の *oriC/ter* は、それぞれ 2.61 と 1.33 となった。定常期は、細胞全体の中で DNA 複製を行っている細胞数が少ないため水平に近いグラフになることがわかっているが、DNA 複製を行っている細胞も存在するため、完全な水平にはならない。よって、stationary の *oriC/ter* が 1 より高いことは、DNA 複製を行っている細胞が一部で存在していることを示している。DMB で巨大化した細胞の *oriC/ter* の最大値は、log-phase に及ばず、また、最小値は stationary を下回った。*oriC/ter* は培養 4 時間で最大になり、その後、時間の経過と共に減少し、1 に近づいて行った。また、DMB のマップの様子から、巨大細胞においても通常細胞と同様に複製開始点および終結点は 1 つであり、正常な複製が行われていることがわかった。一方、スフェロプラスト化直後 (DMB0h) の *oriC/ter* は、0.94 となり、stationary を下回った。stationary は、培養 15 時間のものを使用し、0 h は、固体培地で 3 日間培養したものをスフェロプラスト化した細胞である。よって、DNA 複製を行っている細胞が stationary より少なく、複製を停止した細胞が大半を占めていることを示す。本実験では、固体培地で 3 日間培養したものをスフェロプラスト化し、巨大化培養した。したがって、*oriC/ter* を調べることによって、DNA 複製を停止していた状態から、活発な複製を行い、徐々に複製停止に向かっていく様子を捉えることができた。

また、全ゲノムリシーケンスは、全培養液から DNA を抽出したものを使用している

ため、各培養時間の細胞膜直径を計測し、細胞サイズの全体の割合を調べた（図 32-A；表 16）。その際に、細胞膜が維持されている細胞と細胞膜が損傷および崩壊している細胞の割合も調べた（図 32-B, 33；表 17）。時間の経過とともに、細胞サイズのバリエーションが増加し、細胞膜損傷および崩壊細胞も増加した。

4.3.4 DNA 複製阻害による巨大化（膜合成）の停止

巨大化と DNA 複製の関係をさらに調べるため、培養 24 時間以降も細胞膜が伸張し続けるグラム陽性の *E. faecalis* を使用した。まず、*E. faecalis* の巨大化に伴う DNA 量の変化を定量 PCR によって調べた。その結果、培養 0 時間から 120 時間にかけて巨大化および Cq 値が減少し、細胞の巨大化の間、DNA 複製が行われていることがわかった⁶⁴（図 34；表 18, 19）。120 時間以降は、Cq 値も細胞直径も変化しなかった（図 34；表 18, 19）。

次に、DNA 複製阻害剤であるノボビオシン⁶⁵の添加によって巨大化が停止するかどうかが調べた。ノボビオシンは、DNA ジャイレースを阻害することによって DNA 複製を阻害する^{65,66}。また、DNA を分解せず、可逆的な作用であることが報告されている⁶⁷。ノボビオシンは、*E. faecalis* プロトプラスト巨大化培養 24 時間で添加した。その結果、ノボビオシンを添加した細胞は、巨大化および液胞形成が停止した^{34,64}（図 35）。また、ノボビオシンを除去することによって巨大化および液胞形成が再開された⁶⁴（図 36）。よって、スフェロ／プロトプラスト巨大化において、DNA 量あるいは複製機構は、細胞膜の生合成と関連していることが強く示唆された。バクテリア細胞では、細胞分裂の間、DNA は正確に分配されるために細胞膜に結合しており⁶⁸⁻⁷³、DNA の結合が細胞膜の安定性に関わっている可能性がある。このことは、細胞膜の伸張に合わせて必要な DNA を複製する必要があると考えられる。しかし、グラム陰性の *L. amnigena* および *D. grandis* のスフェロプラスト巨大化において、ノボビオシンを添加すると外膜伸張も停止し、複製は外膜伸張にも関与していることが示唆された（データ示さず）。

次に、ノボビオシンを処理したプロトプラストと別の DNA 複製阻害剤であるマイト

マイシン C で処理したプロトプラストの経時的な DNA 量を定量 PCR によって測定した。ノボビオシンは、DNA ジャイレースを阻害し、DNA を分解しない一方で、マイトマイシン C は、DNA のアルキル化および架橋形成⁷⁴⁻⁸⁰、活性酸素による DNA 鎖切断⁸⁰⁻⁸⁵によって DNA 合成を阻害する。また、マイトマイシン C による DNA の分解も報告されている⁸⁷⁻⁹⁵。DNA 分解の原因としては、DNA 分解酵素の活性化が考えられている^{93,94,96}。その結果、マイトマイシン C を処理したプロトプラストでは DNA が分解されたのに対し、ノボビオシンを処理したプロトプラストでは DNA が分解されなかった⁶⁴ (図 37)。よって、巨大細胞におけるノボビオシンとマイトマイシン C の影響は、通常細胞で報告されているものと一致した。これらの結果から、ノボビオシンは、DNA を分解することなく複製を阻害することで *E. faecalis* プロトプラスト巨大化をコントロールできることを示した。

興味深いことに、自然界に存在する巨大なバクテリアは、1 細胞内に複数のゲノムをもっている^{49,97,98}。また、枯草菌および *Epulopiscium* では、細胞サイズとゲノムのコピー数は、正の相関があることが示されている^{97,99}。前章において、バクテリアにおける液胞形成が細胞サイズと関連があることを示したように、本章では、複製が細胞サイズと関連があることを示した。これらの結果は、細胞膜の伸張（巨大化）が複製および液胞形成と関連していることを示している。

4.4 小括

バクテリアスフェロ／プロトプラストは、分裂増殖できないが、複製を行っていることを経時的な DNA 定量および全ゲノムリシーケンス、DNA 複製阻害剤の添加によって示した。このことは、巨大化スフェロ／プロトプラストの 1 細胞内に複数のクロモソームを保有していることを意味する。まず、プラスミドを導入した大腸菌を用いて、クロモソーム DNA だけではなく、導入したプラスミド DNA も巨大化に伴い複製されることを示した。プラスミド DNA は、耐性の抗生物質を含まない環境下において維持され、クロモソーム DNA と同調して複製されたことが示唆された。この結果は、宿主細胞の複製システムが認識できる DNA が導入された場合、マイクロインジェクションで導入する DNA が巨大細胞内で複製される可能性を示した。

一方、巨大化の進行および DNA 複製はある時間を超えるとどちらも停止した。*L. amnigena* 巨大化スフェロプラスト 1 細胞における DNA の定量結果より、培養 24 時間以降、DNA 複製と細胞膜伸張が停止した。一方、外膜は伸張し続け、最終的に細胞は崩壊した。また、全ゲノムリシーケンス解析によってもスフェロプラスト培養初期では通常細胞の定常期よりも *oriC/ter* が大きく複製を活発に行っていることが示されたが、スフェロプラスト培養後期になると、*oriC/ter* が 1 に近づき複製が活発に行われていないことが示され、1 細胞における DNA の定量結果と一致した。さらに、*E. faecalis* の巨大化に伴う DNA の定量結果においても、DNA 量の増加は培養 120 時間で停止した。これらの結果から、バクテリア種によってタイミングは異なるが、通常細胞の生育曲線と同様に、巨大化と複製を活発に行う期間から停止期間に入り、最終的に細胞が崩壊することがわかった。巨大化が進行している間は、複製をはじめとした生命活動が活発に行われていることが考えられるため、マイクロインジェクションは巨大化途中で行う必要があると考える。

スフェロプラスト培養初期の *oriC/ter* が通常細胞の定常期を上回った一方で、通常細胞の対数増殖期を下回った。大腸菌のスフェロプラスト巨大化に伴う DNA 量の測定においても、分裂増殖の場合よりも巨大化の方が複製の速度は低かった。これらの結果

から、バクテリア細胞は、自身の細胞形態に合わせて複製の速度を調節している可能性がある。

DNA 複製と細胞膜伸張の関係をさらに調べるため、グラム陽性細菌である *E. faecalis* の巨大化に伴う DNA 量を定量した。その結果、DNA 量の増加と細胞膜の伸張はどちらも培養 120 時間で停止し、DNA 量と膜伸張が同調していた。また、DNA 複製阻害剤であるノボビオシンを添加すると、巨大化および液胞形成は停止し、ノボビオシンを除去するとどちらも再開し、巨大細胞においても通常細胞と同様に可逆的な作用を示した。よって、スフェロ／プロトプラスト巨大化において、DNA 量あるいは複製機構は、細胞膜の生合成と関連していることが強く示唆された。さらに、ノボビオシンとマイトマイシン C 処理したプロトプラストの経時的な DNA 量測定より、ノボビオシンは DNA を分解することなく複製を阻害することで、*E. faecalis* プロトプラスト巨大化の進行をコントロールできることを示した。

上記の結果より、実際に、宿主のゲノムや異種ゲノムを巨大細胞へ導入し、その後の巨大化の様子を観察することで、DNA そのものが巨大化に影響するのか、複製することが巨大化に影響するのかがわかると考えた。もし、DNA 分子の増加が巨大化に影響している場合には、宿主ゲノムを導入すると数が増えるため、巨大化は促進されると予測した。しかし、複製することが影響している場合には、細胞内のゲノム DNA の急激な増加による DNA ポリメラーゼの不足や、導入ゲノムと宿主ゲノムのハイブリダイゼーションなどによって複製は停滞すると予測され、その場合には巨大化は抑制されると考えられた。これらの仮説を実験で確かめるため、同種および異種ゲノム DNA の導入実験を行った（第 5 章）

菌名	プライマー名	配列 (5'→3')	PCR産物	参考文献	
E. c	uidA-F	CAACGAACTGAACTGGCAGA	130 bp	Chern et al., 2011 ⁶⁰	
	uidA-R	CATTACGCTGCGATGGAT			
	repA-F	CCACATCGAGGAAGAAAACG	91 bp	本研究 ²⁹	
	repA-R	CACGATAGAGCACCCGGTAT			
	repC-F	AATGCCATGTGGTCAAAGGT	99 bp		
	repC-R	CGATGCAGTCCTGTATGTGC			
E. f	dnaA-F	TGAATCAACCAGATGCCAAA	98 bp		本研究 ³⁴
	dnaA-R	CCGAAATTGTTCCGGATGTCT			
	parC-F	GTACAACGCCGCATTCTCTT	96 bp		
	parC-R	CCCCATAATGTTTCCGACAG			

表8. 定量PCRに使用したプライマー一覧
 プライマーは、Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) で設計した。

サンプル名	リード数	アライメント率
log-phase	3288105	98.18%
stationary	12866852	99.73%
DMB0h	12151802	99.74%
DMB4h	11261819	99.75%
DMB8h	11188207	99.74%
DMB24h	2924467	98.64%
DMB48h	10504271	99.68%
DMB72h	11423194	99.62%

表9. 全ゲノムシーケンスのマッピング結果

A

Presence of penicillin					
	<i>uidA</i> (0 h)	<i>uidA</i> (3 h)	<i>uidA</i> (6 h)	<i>uidA</i> (9 h)	<i>uidA</i> (12 h)
<i>uidA</i> (3 h)	0.973				
<i>uidA</i> (6 h)	0.815	0.493			
<i>uidA</i> (9 h)	0.247	0.102	0.973		
<i>uidA</i> (12 h)	0.064	0.028	0.493	0.973	
<i>uidA</i> (24 h)	0.0003	0.00015	0.0022	0.011	0.046
	<i>repA</i> (0 h)	<i>repA</i> (3 h)	<i>repA</i> (6 h)	<i>repA</i> (9 h)	<i>repA</i> (12 h)
<i>repA</i> (3 h)	1				
<i>repA</i> (6 h)	1	1			
<i>repA</i> (9 h)	1	1	1		
<i>repA</i> (12 h)	0.379	1	0.603	1	
<i>repA</i> (24 h)	0.014	0.066	0.023	0.089	0.651
	<i>repC</i> (0 h)	<i>repC</i> (3 h)	<i>repC</i> (6 h)	<i>repC</i> (9 h)	<i>repC</i> (12 h)
<i>repC</i> (3 h)	1				
<i>repC</i> (6 h)	1	1			
<i>repC</i> (9 h)	0.48	1	0.48		
<i>repC</i> (12 h)	0.369	0.904	0.369	1	
<i>repC</i> (24 h)	0.0013	0.0043	0.0013	0.036	0.055

B

Absence of penicillin					
	<i>uidA</i> (0 h)	<i>uidA</i> (3 h)	<i>uidA</i> (6 h)	<i>uidA</i> (9 h)	<i>uidA</i> (12 h)
<i>uidA</i> (3 h)	1				
<i>uidA</i> (6 h)	1	1			
<i>uidA</i> (9 h)	1	1	1		
<i>uidA</i> (12 h)	0.172	0.172	0.334	0.793	
<i>uidA</i> (24 h)	0.032	0.032	0.072	0.172	1
	<i>repA</i> (0 h)	<i>repA</i> (3 h)	<i>repA</i> (6 h)	<i>repA</i> (9 h)	<i>repA</i> (12 h)
<i>repA</i> (3 h)	1				
<i>repA</i> (6 h)	1	1			
<i>repA</i> (9 h)	1	1	1		
<i>repA</i> (12 h)	0.409	0.691	0.409	1	
<i>repA</i> (24 h)	0.058	0.107	0.058	0.406	1
	<i>repC</i> (0 h)	<i>repC</i> (3 h)	<i>repC</i> (6 h)	<i>repC</i> (9 h)	<i>repC</i> (12 h)
<i>repC</i> (3 h)	1				
<i>repC</i> (6 h)	1	1			
<i>repC</i> (9 h)	0.606	1	0.795		
<i>repC</i> (12 h)	0.105	0.42	0.149	1	
<i>repC</i> (24 h)	0.018	0.073	0.025	0.420	1

表11. ホルム補正のペアワイズ *t* 検定のP値（定量PCR）
 得られたCq値をペアワイズ *t* 検定した。（A）スフェロプラストをペニシリン600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有DMBで培養した細胞のCq値の検定結果。
 （B）スフェロプラストをDMBで培養し、線維化した細胞のCq値の検定結果。

	培養0時間	培養24時間	培養48時間	培養72時間	培養96時間
1	>45	33.6	30.7	43.6	37.3
2	>45	30.8	29.9	34.6	39.1
3	>45	39.2	32.5	33.1	38.6
4	>45	35.0	34.0	44.3	34.4
5	>45	33.9	37.0	37.5	38.9
6	>45	33.7	33.9	29.9	45.6
7	>45	32.8	35.1	33.2	38.7
8	>45	41.5	31.5	29.8	32.4
9	>45	41.8	36.4	>50	37.5
10	>45	37.1	35.7	>50	41.5
11	>45	38.6	43.5	46.7	46.4
12	>45	31.9	36.5	42.7	37.8
13	>45	31.5	>50	29.9	33.7
14	>45	31.7	30.0	34.1	31.1
15	>45	38.8	>50	47.0	46.3
16	>45	37.9	>50	36.0	36.9
17	>45	34.4	>50	>50	
18	>45	40.4	45.4	37.7	
19	>45	35.3	43.6	44.0	
20	>45	31.5	46.3	>50	

表12. 培養時間ごとの*L. amnigena*巨大化スフェロプラスト1細胞のCq値

	培養24時間		培養48時間		培養72時間		培養96時間	
	PM [μm]	OM [μm]	PM [μm]	OM [μm]	PM [μm]	OM [μm]	PM [μm]	OM [μm]
1	13.5	18.4	11.1	26.0	11.3	23.7	11.4	26.1
2	13.1	16.7	11.5	24.9	11.8	22.4	9.6	19.4
3	10.5	16.3	10.2	21.3	10.5	26.2	9.6	17.8
4	11.9	15.5	10.1	17.9	12.2	24.9	11.0	18.8
5	11.8	16.9	10.1	20.3	12.5	16.8	10.5	13.9
6	10.5	16.1	13.9	25.7	11.7	16.1	12.8	17.5
7	11.0	16.9	10.4	19.9	13.0	26.0	10.4	13.3
8	10.8	15.0	10.7	17.8	11.6	24.9	10.0	N.D
9	10.8	15.3	11.7	23.9	11.2	20.3	9.2	11.4
10	11.6	16.7	12.3	19.4	11.7	22.4	9.3	28.9
11	12.7	15.3	10.0	17.8	13.4	24.2	9.6	20.9
12	10.2	14.3	10.0	25.1	11.9	19.0	9.3	16.2
13	11.5	14.6	10.9	14.7	11.7	21.1	11.5	25.5
14	9.8	13.3	11.6	21.3	13.6	23.4	15.5	23.9
15	12.9	16.8	9.5	21.6	10.4	24.4	13.2	21.5
16	10.7	13.2	12.3	19.8	11.3	17.3	13.2	23.1
17	10.3	12.2	10.1	24.9	12.4	18.6		
18	10.6	12.6	11.8	23.7	11.4	21.3		
19	12.0	15.1	9.5	24.8	12.1	28.8		
20	10.4	13.8	13.6	20.0	11.9	25.1		

表13. *L. amnigena* 巨大化スフェロプラストの培養時間ごとの細胞膜直径と外膜直径
PMは細胞膜直径、OMは外膜直径を表す。

	培養24時間	培養48時間	培養72時間
培養48時間	1.50E-06	-	-
培養72時間	1.80E-07	0.58407	-
培養96時間	0.00082	0.22708	0.10716

表14. 外膜直径のペアワイズ検定のP値
表の外膜直径をホルム補正でペアワイズ検定した。

サンプル名	ori	ter	ori/ter
log-phase	8.78	3.37	2.61
stationary	6.32	4.75	1.33
DMB0h	5.58	5.93	0.94
DMB4h	7.47	4.24	1.76
DMB8h	6.77	4.60	1.47
DMB24h	5.92	5.45	1.09
DMB48h	5.92	5.48	1.08
DMB72h	5.88	5.50	1.07

表15. *oriC*と*ter*のリード数の比

全ゲノムリシーケンスのマップの山形のトップを*oriC*付近とし、谷型のボトムを*ter*付近とした。それぞれを中心とした前後50 kbの領域（合計100 kb）のリード数の平均を*oriC*および*ter*のリード数とした。*oriC*のリード数を*ter*のリード数で割った値を表にした。

サンプル名	0~<2μm	≧2μm~<3μm	≧3μm~<4μm	≧4μm~<5μm	≧5μm~<6μm	≧6μm~<7μm	≧7μm~<8μm	≧8μm~<9μm	≧9μm~<15μm	合計
DMB0h	87	0	0	0	0	0	0	0	0	87
DMB4h	72	109	0	0	0	0	0	0	0	181
DMB8h	6	173	45	0	0	0	0	0	0	224
DMB24h	0	3	16	27	21	39	21	17	9	153
DMB48h	2	18	42	18	16	23	22	13	18	172
DMB72h	0	12	16	15	11	23	26	24	38	165

表16. *L. amnigena*スフェロプラストの各培養時間の細胞膜直径の分布
全ゲノムリシケンスに使用したサンプルの観察写真から細胞膜直径を測定したものをサイズごとに分類した。

サンプル名	細胞膜維持	細胞膜損傷および崩壊	合計
DMB0h	87	0	87
DMB4h	181	0	181
DMB8h	224	3	227
DMB24h	153	18	171
DMB48h	172	87	259
DMB72h	165	105	270

表17. *L. amnigena*スフェロプラストの各培養時間の細胞状態の分布

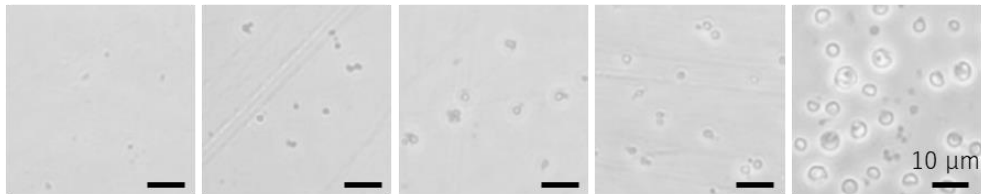
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	168 h	192 h	216 h
24 h	1								
48 h	0.03843	0.00435							
72 h	0.00977	0.00042	0.00221						
96 h	0.00637	0.0002	0.0004	0.02576					
120 h	0.00033	0.00017	0.00189	0.01182	0.06034				
168 h	0.00148	4.10E-05	0.00013	0.00104	0.00646	1			
192 h	0.00241	5.30E-05	8.00E-05	0.00069	0.00446	1	1		
216 h	0.00152	7.50E-05	0.00048	0.0075	0.15061	0.4254	0.10069	0.11339	
240 h	0.00039	0.00162	0.01579	0.1158	0.9473	1	0.84134	1	1

表18. Cq値のボンフェローニ補正のペアワイズt検定のP値（定量PCR）
 得られたCq値をペアワイズt検定した。*E. faecalis*プラストをペニシリン含有DMBで培養した細胞のCq値の検定結果。

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	168 h	192 h	216 h
24 h	< 2E-16								
48 h	< 2E-16	3.70E-11							
72 h	< 2E-16	< 2E-16	4.80E-08						
96 h	< 2E-16	< 2E-16	9.40E-10	1					
120 h	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	0.0014	0.6284				
168 h	< 2E-16	< 2E-16	1.20E-12	0.0463	1	1			
192 h	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	0.0021	1	1	1		
216 h	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	6.30E-06	0.0129	1	1	1	
240 h	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	0.0002	0.1207	1	1	1	1

表19. 細胞直径のボンフェローニ補正のペアワイズt検定のP値（定量PCR）
 CellSensで計測した細胞直径をペアワイズt検定した。*E. faecalis*プラストをペニシリン含有DMBで培養した細胞の細胞直径の検定結果。

A ペニシリン含有DMB



B DMB

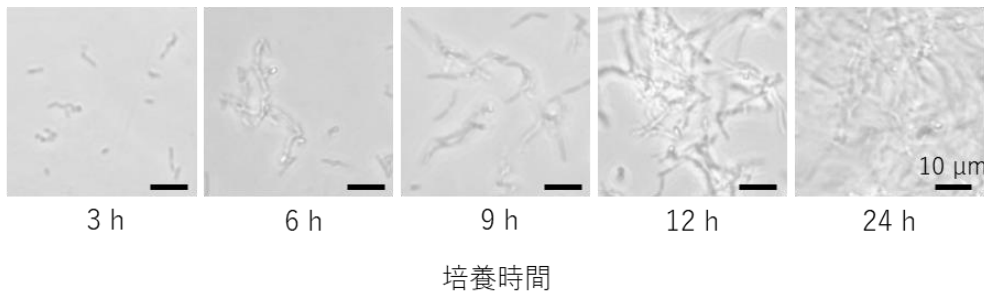


図23. 大腸菌のスフェロプラスト培養観察

(A) スフェロプラストをペニシリン600 μg/mL含有DMBで培養し、巨大化した様子。

(B) スフェロプラストをDMBで培養し、線維化した様子。位相差顕微鏡OLYMPUS CKX41で撮影。

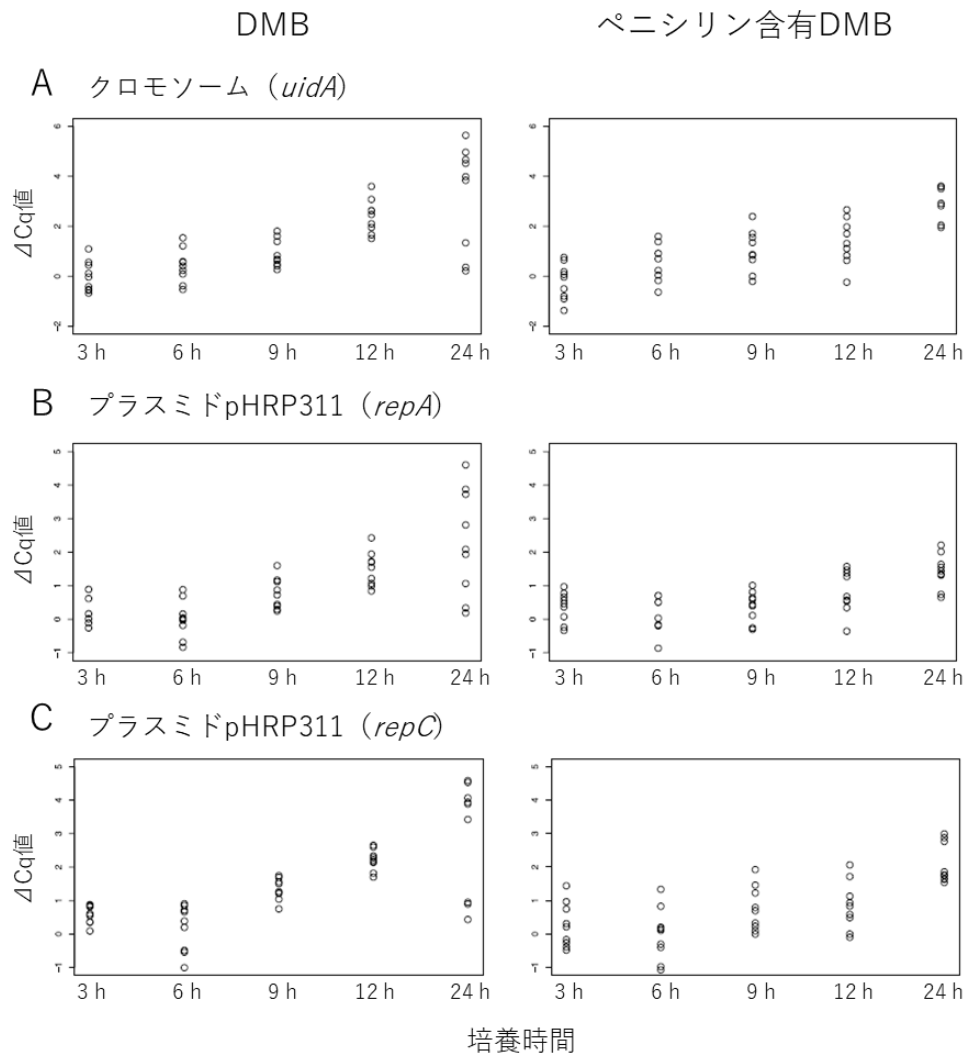


図24. 大腸菌のスフェロプラスト培養におけるDNA量の変化
 縦軸の ΔCq 値は、培養0時間のCq値から、各培養時間のCq値を引いたものである。 ΔCq 値がn異なるとDNA量が 2^n 倍異なることを示す。左のグラフが、スフェロプラストをDMBで培養し、線維化増殖した細胞の ΔCq 値、右のグラフがスフェロプラストをペニシリン600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有DMBで培養した細胞の ΔCq 値である。(A) クロモソームDNA (*uidA*) (B) プラスミドpHRP311 (*repA*) (C) プラスミドpHRP311 (*repC*)

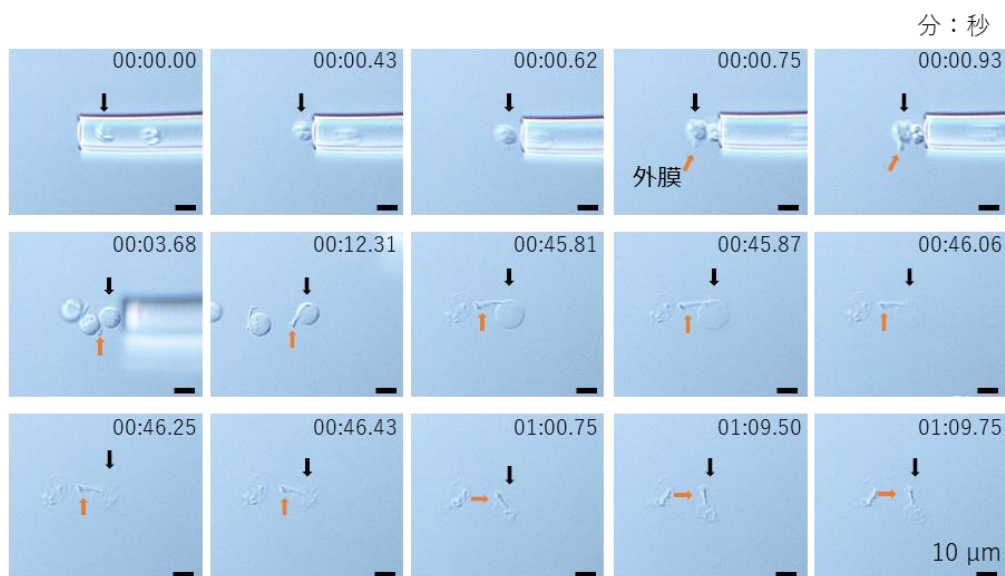


図25. *L. amnigena*巨大化スフェロプラストの低張液でのふるまい
*L. amnigena*巨大化スフェロプラストをペニシリン含有DMBから水中に移した様子。
 細胞の吸引および放出にPiezo Drill Tip ES (内径: 15 μm) を使用。黒色の矢印の細胞に注目した。赤色の矢印は、外膜を示した。微分干渉顕微鏡Olympus IX73を使用。
 00:00は、分:秒である。

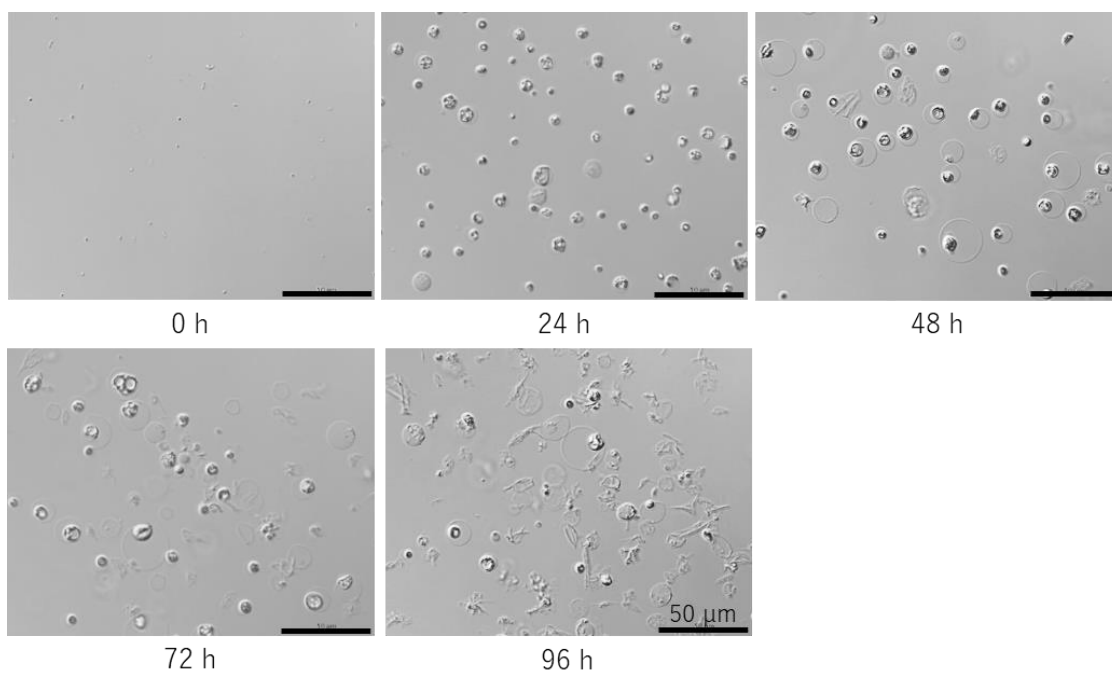


図26. *L. amnigena*のスフェロプラスト巨大化の全体写真
ペニシリンを含有DMBで*L. amnigena*スフェロプラストを0、24、48、72、96時間培養した観察写真。微分干渉顕微鏡Olympus IX73を使用。

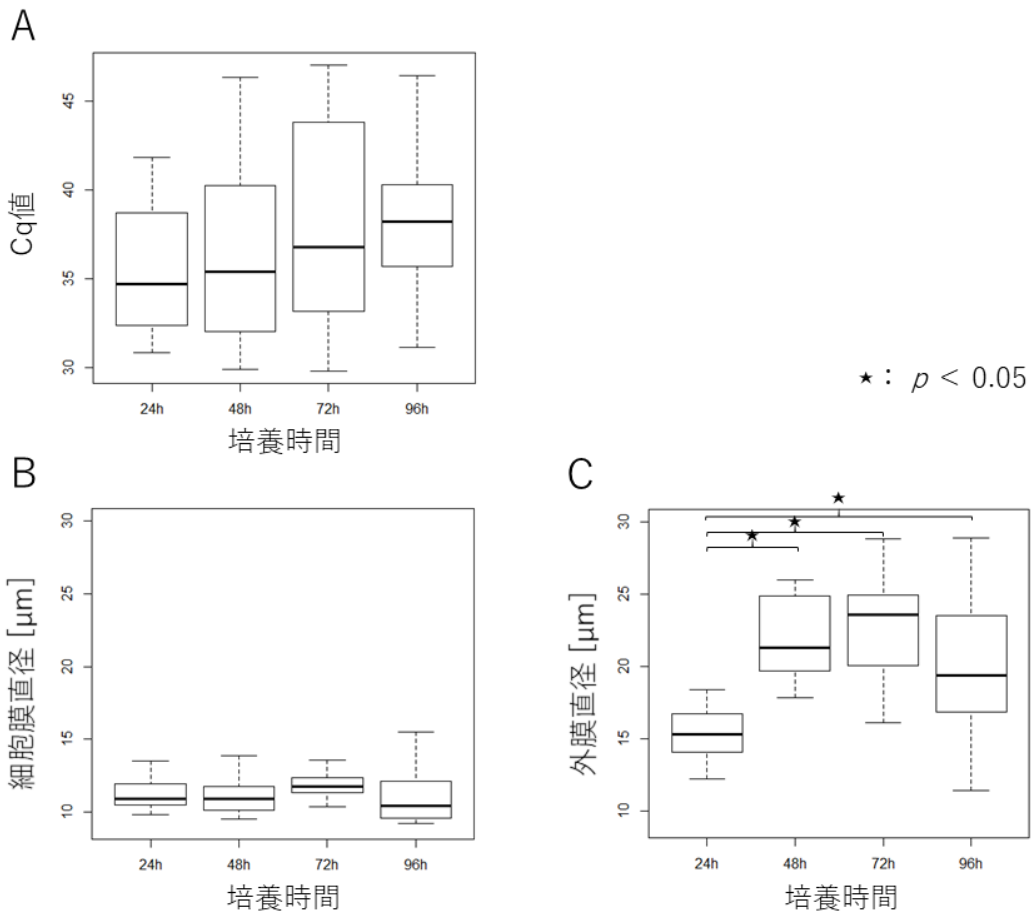


図27. DNAの複製と膜の伸長

(A) 使用した *L. amnigena* スフェロプラストの培養時間ごとのCq値のボックスプロット (B) 使用した *L. amnigena* スフェロプラストの細胞膜直径のボックスプロット (C) 使用した *L. amnigena* スフェロプラストの外膜直径のボックスプロット。

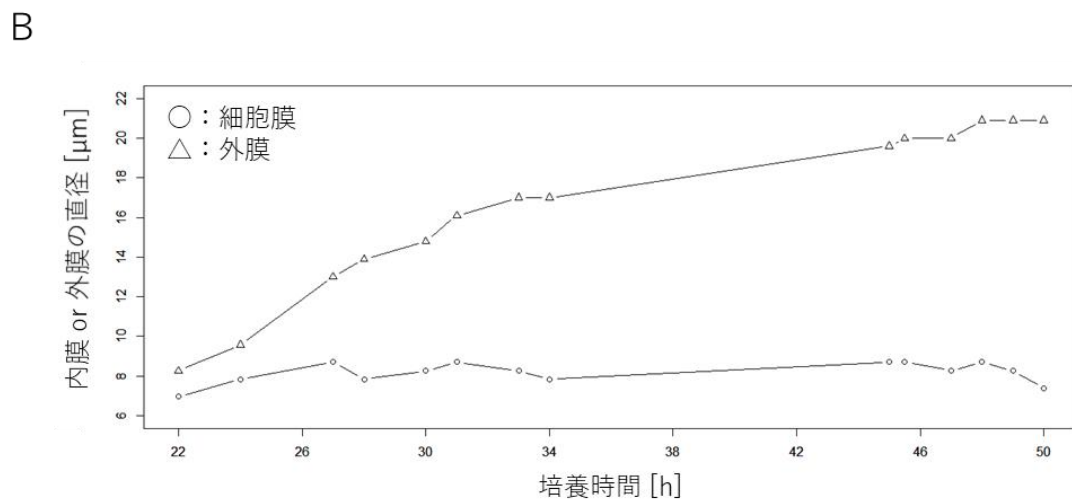
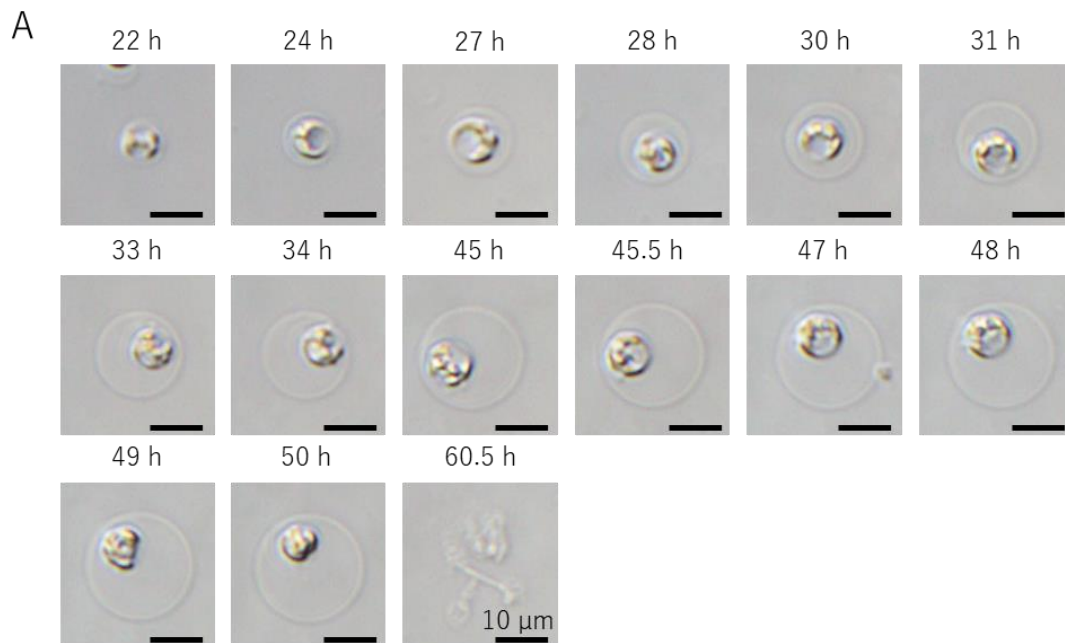


図28. *L. amnigena*スフェロプラスト巨大化のタイムラプス観察
 (A) *L. amnigena*スフェロプラストのタイムラプス観察写真。ペニシリン含有DMBで培養。微分干渉顕微鏡Olympus IX73を使用。(B) 培養時間と細胞膜あるいは外膜直径の関係。

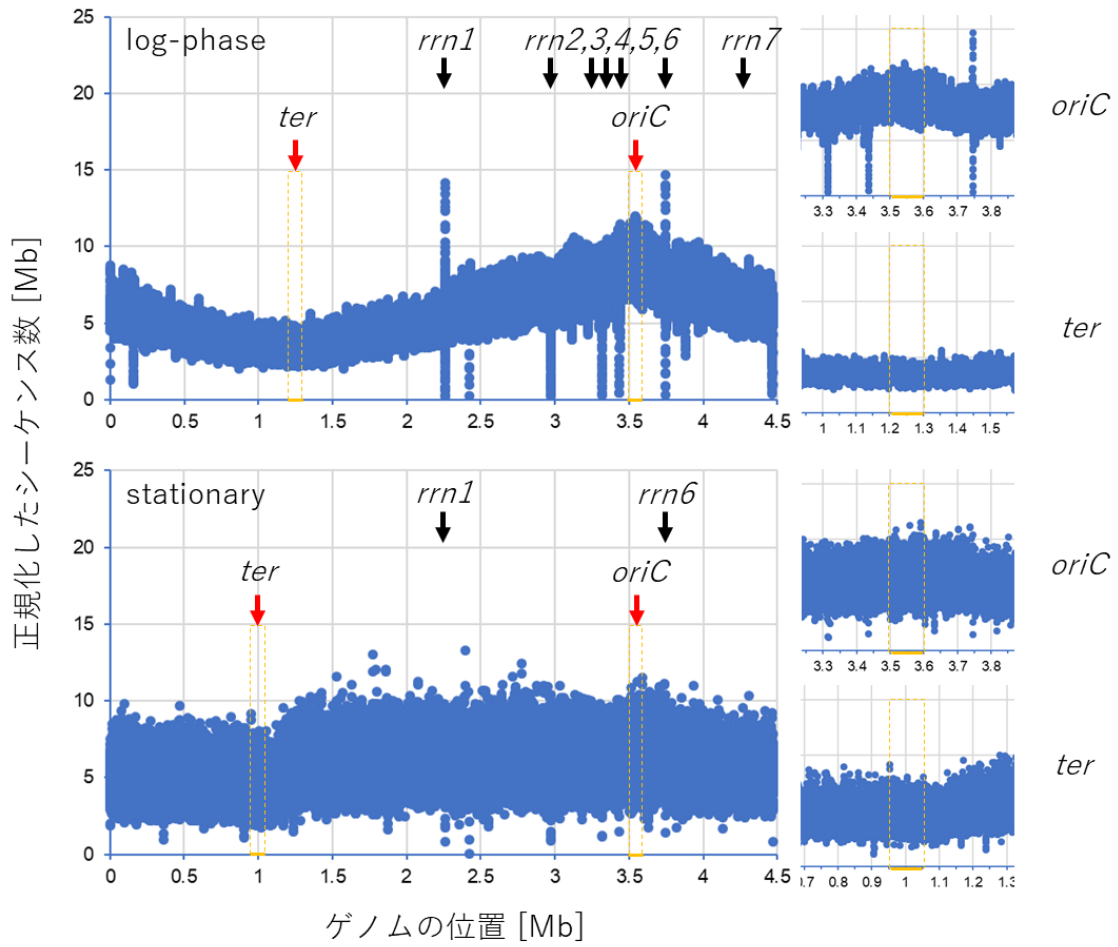


図29. *L. amnigena*の全ゲノムリシーケンス解析
*L. amnigena*の通常細胞の対数増殖期と定常期の細胞のマッピングの様子。ゲノム上の位置 (Mb) を横軸に、25ヌクレオチドごとのリード数を縦軸にプロットした。*oriC*、*ter*、*rrn1*~*7*を矢印で示し、*oriC*と*ter*のシーケンス数を算出するため、黄色で囲った領域の平均値をそれぞれのシーケンス数とした。

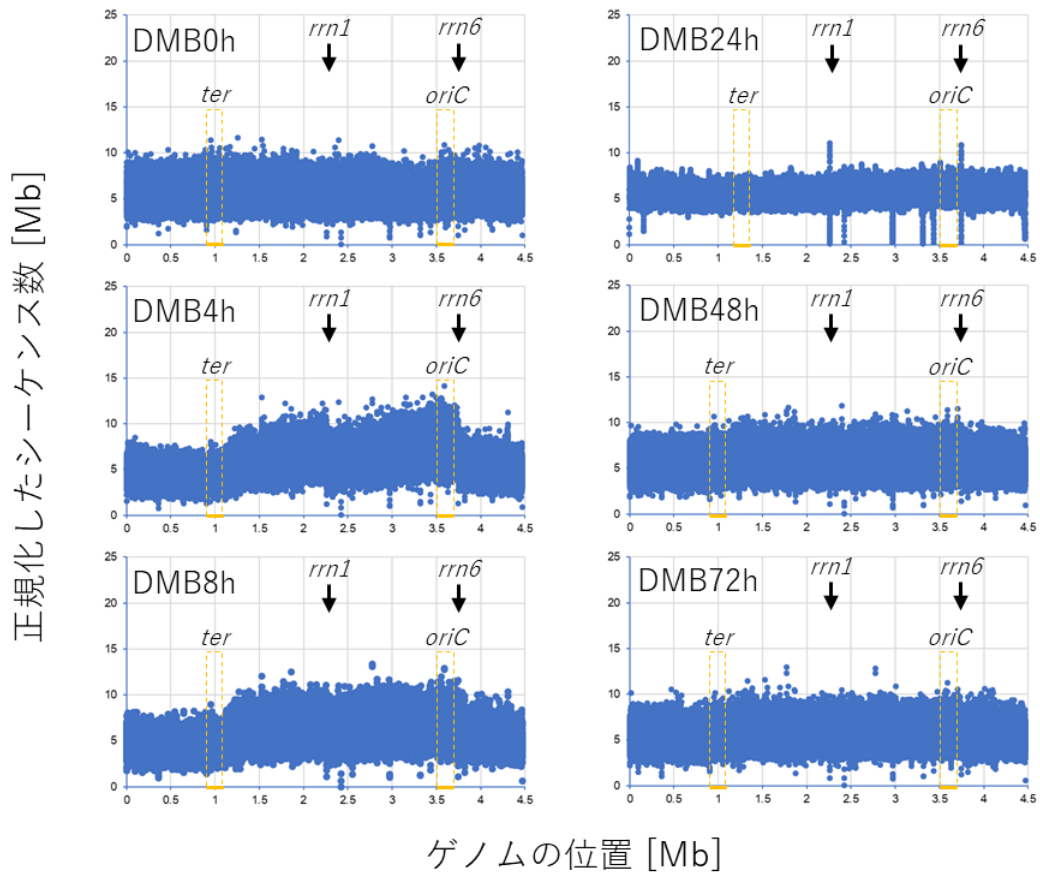


図30. *L. amnigena*スフェロプラスト巨大化の全ゲノムリシーケンス解析
*L. amnigena*をDMBで巨大化した細胞の経時的なマッピングの様子。DMB0h、4h、8h、48h、72hは、*rrn1*と*rrn6*で組み換えが生じている。

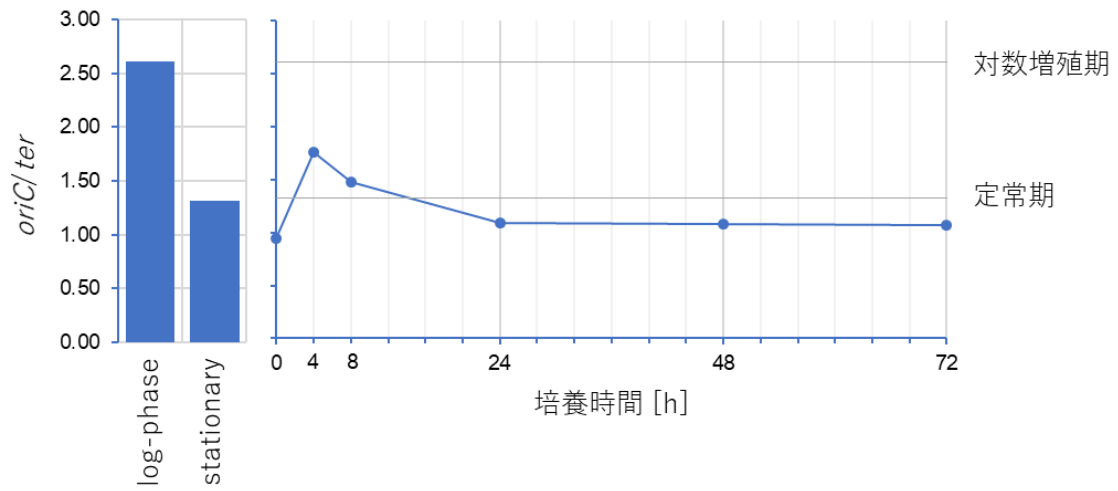


図31. *L. amnigena*スフェロプラスト巨大化の *oriC*と *ter*の比
 全ゲノムリシーケンスのマッピング結果から *oriC*と *ter*のリード数を算出し、
oriC/*ter*をプロットした。左の棒グラフは、コントロールである通常細胞の
 対数増殖期と定常期の *oriC*/*ter*。

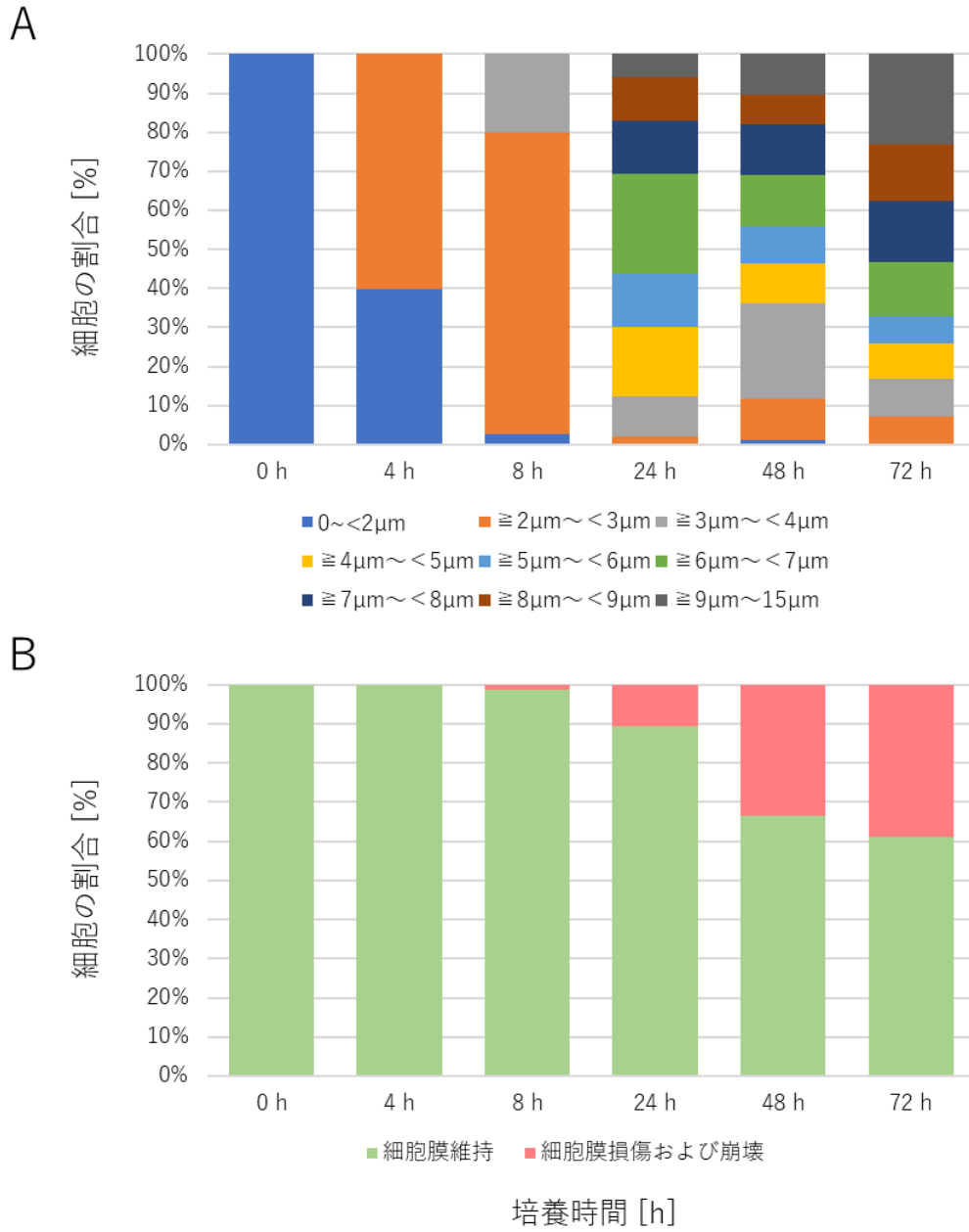


図32. *L. amnigena*スフェロプラスト巨大化の細胞状態

(A) 各培養時間の細胞膜直径を計測し、細胞サイズで分類した。(B) 各培養時間の細胞膜維持細胞と細胞膜損傷および崩壊細胞の割合を示した。横軸は培養時間、左の縦軸はそれぞれの細胞サイズおよび細胞状態の割合。

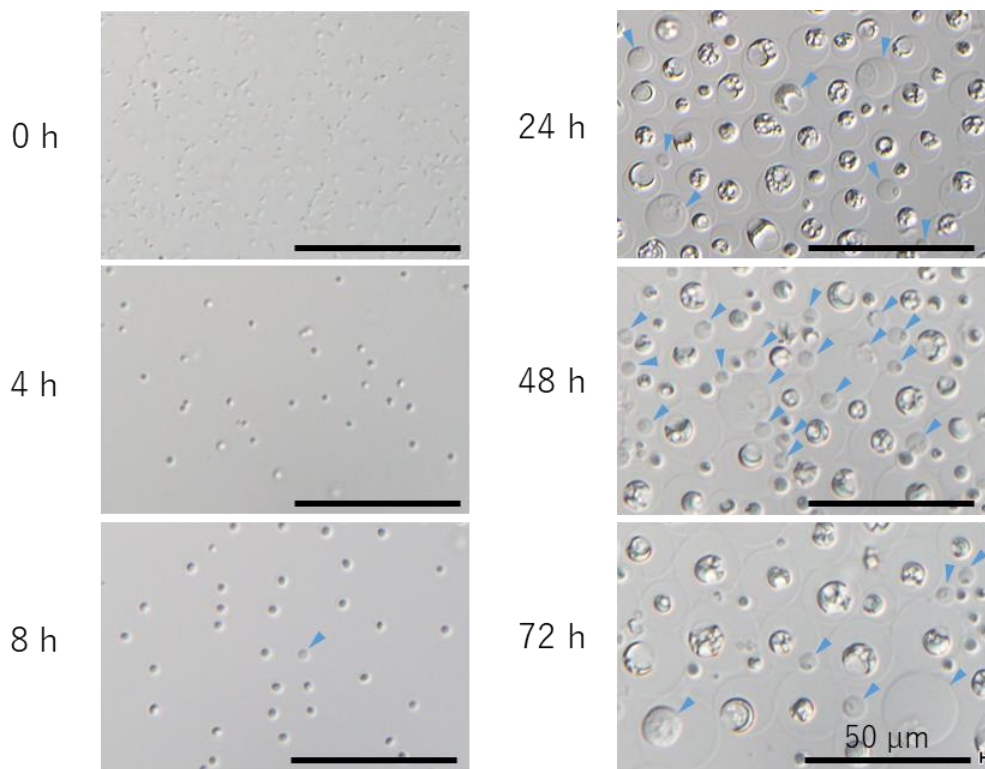


図33. 細胞膜維持細胞と細胞膜損傷および崩壊した細胞の選別
 全ゲノムリシーケンスに使用した各サンプルの顕微鏡観察写真の一部。この
 写真をもとに、細胞膜直径を計測し、細胞膜損傷および崩壊した細胞を選別
 した。青色の矢印頭は、細胞膜損傷および崩壊した細胞を指している。0 hは、
 巨大化培養する前の原液を観察したものであり、菌数が多い。

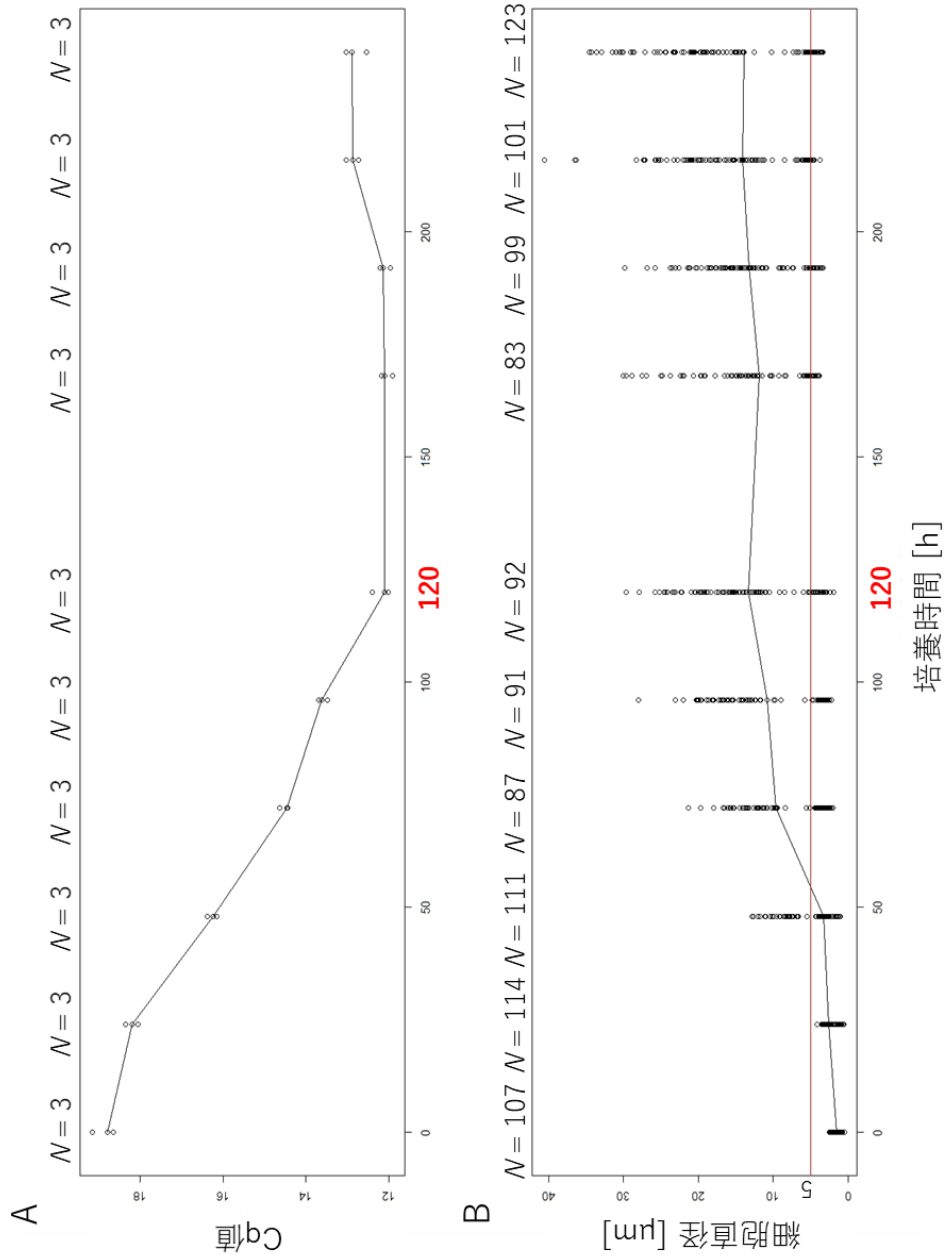


図34. *E. faecalis*プロトプラスト巨大化におけるDNA量の変化
*E. faecalis*プロトプラスト培養0, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 216, 240時間の
 Cq値 (A) と細胞直径 (B)。

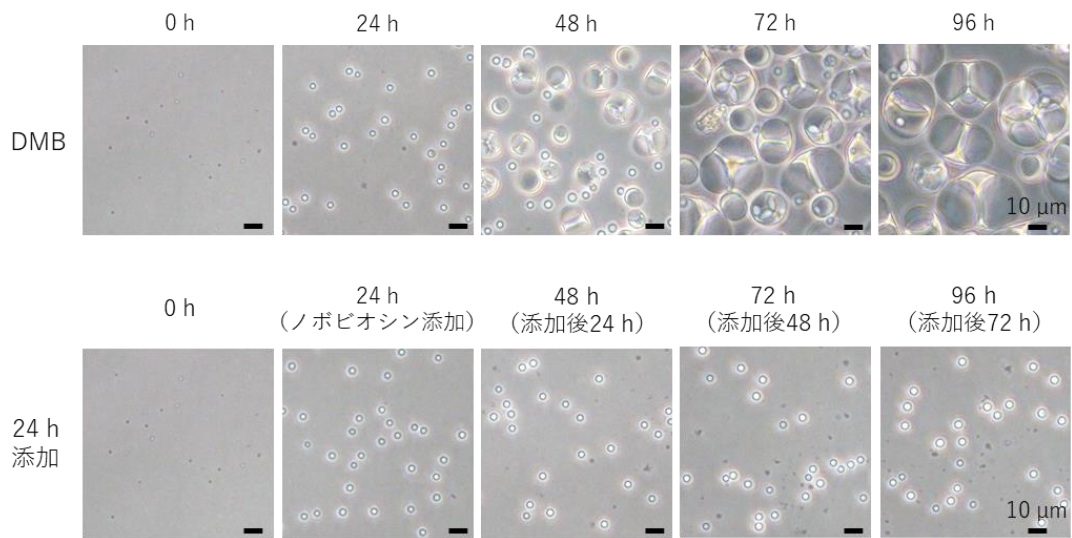


図35. ノビオシン添加によるDNA複製阻害の巨大化への影響 (*E. faecalis*)
*E. faecalis*プロトプラスト巨大化培養24時間でノビオシン (終濃度50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、観察した³⁴。DMBは、ノビオシンを添加していないコントロールである。位相差顕微鏡OLYMPUS CKX41を使用。

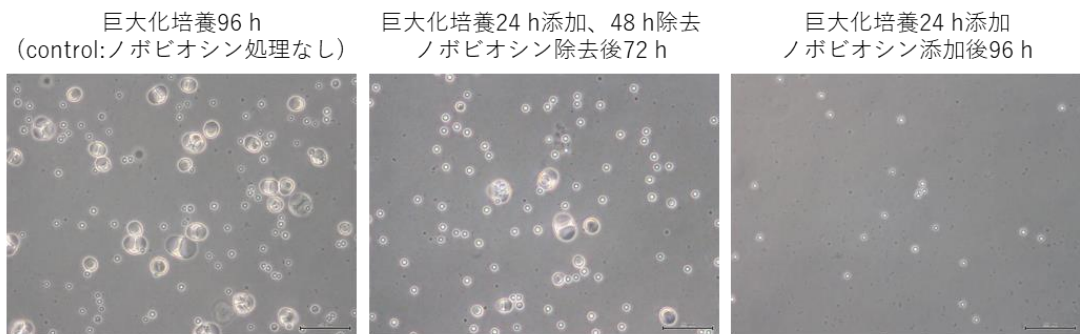


図36. ノビオシン除去による巨大化の再開
*E. faecalis*プロトプラスト巨大化培養24時間でノビオシン (終濃度50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、24時間後 (培養48時間) に除去した後、ペニシリン含有DMBで72時間培養した³⁴。位相差顕微鏡OLYMPUS CKX41を使用。

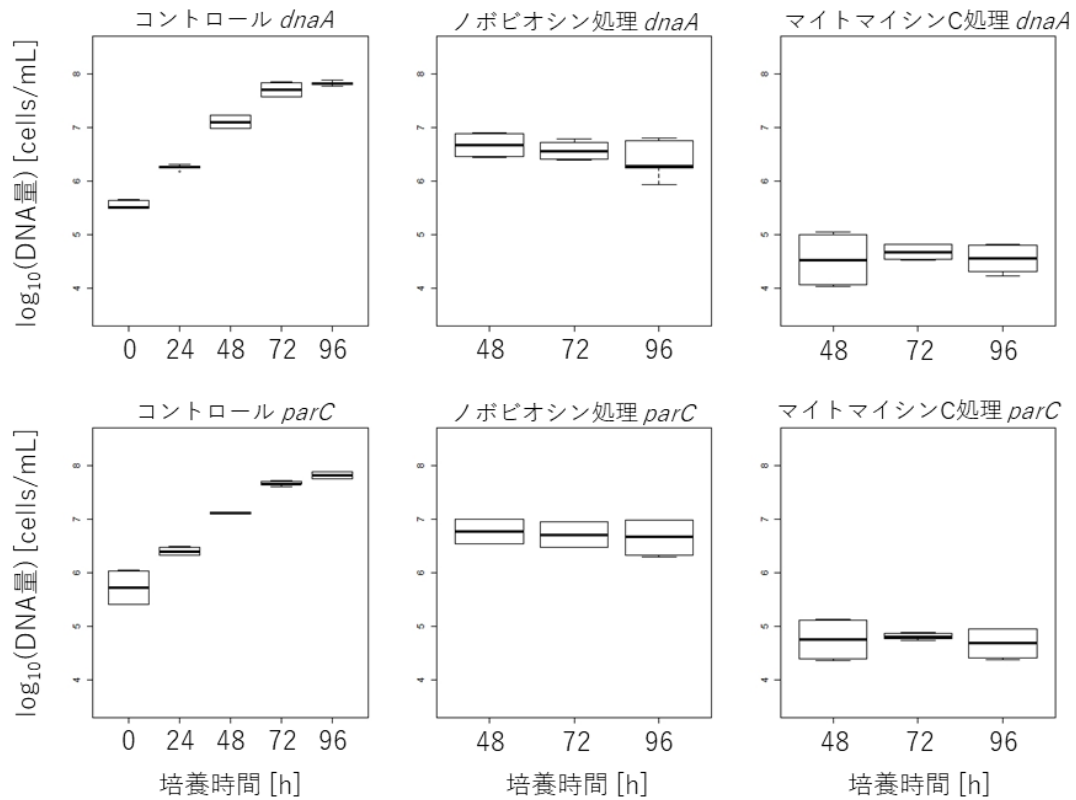


図37. *E. faecalis*プロトプラストのDNA量のボックスプロット
*E. faecalis*プロトプラスト巨大化培養24時間でノビオシン（終濃度50 $\mu\text{g/mL}$ ）およびマイトマイシンC（終濃度25 $\mu\text{g/mL}$ ）を添加し、24時間処理（培養48時間）、48時間処理（培養72時間）、72時間処理（培養96時間）した。コントロールは、DNA複製阻害剤で処理していない。 $n = 8$

第5章 バクテリア巨大細胞へのマイクロインジェクション

5.1 序論

第2章では、バクテリア細胞の巨大化方法を確立し、グラム陽性の *E. faecalis* とグラム陰性の *L. amnigena* において、微小ガラス管の挿入が可能な巨大化スフェロ／プロトプラストを作製した。一方、第3章では、液胞の存在により、*E. faecalis* と *L. amnigena* 巨大化スフェロ／プロトプラストの細胞質の領域は狭く、限られていることが明らかになった。本章では、これらの巨大化スフェロ／プロトプラストの細胞質へのマイクロインジェクションが可能であるかどうかを、蛍光タンパク質溶液の導入によって調べた。

第4章では、*E. faecalis* プロトプラストの巨大化とゲノム DNA の複製が関連し、複製が停止すると巨大化も停止することがわかった。この要因としては、2つ考えられる。1つは、複製したゲノム DNA が直接、細胞膜の伸張に関わっている場合である。もう1つは、複製のシステムと細胞膜合成のシステムがリンクしており、両者が関連しながら成り立っている場合である。すなわち、前者の場合、*E. faecalis* 巨大化プロトプラストに自身のゲノム DNA が導入された場合、伸張しやすい状況になることが考えられる。一方、後者の場合、ゲノム DNA の導入によって、宿主細胞の複製システムに影響が生じると、細胞膜の伸張にも影響することが考えられる。そこで、マイクロインジェクションによって、*E. faecalis* 自身のゲノム DNA および7種の異種ゲノム DNA (*Bacillus subtilis*、*Deinococcus grandis*、*Erythrobacter litoralis*、*Escherichia coli*、*Lelliottia amnigena*、*Lactobacillus curvatus*、*Lactococcus lactis*) を *E. faecalis* 巨大化プロトプラストに導入し、その巨大化への影響を調べた。

5.2 実験方法

5.2.1 マイクロインジェクションワークステーション

マイクロインジェクションワークステーションは、微分干渉顕微鏡 Olympus IX73 (Olympus) に設置されている。顕微鏡には、手動マイクロインジェクター CellTram Air と CellTram vario あるいはプログラム可能なマイクロインジェクター Femtojet 4i を組み合わせたマイクロマニピュレータ TransferMan 4r が備わっている。マイクロインジェクション関連の製品は、全て eppendorf 社製のものを使用した。

5.2.2 微小ガラス管（フェムトチップ II）への BFP 溶液の充填

青色蛍光タンパク質（BFP、Wako）溶液を 4°C、11,000×*g* で 15 分間遠心後、上清 1~2 μL をマイクロローダーで吸引し、フェムトチップ II（孔径：0.5 μm）に充填した。

5.2.3 BFP 溶液導入のマイクロインジェクション操作

巨大化培養液をスライドガラスに添加し、顕微鏡ステージの上に載せた。細胞固定用として、Piezo Drill Tip ES（内径：15 μm）を CellTram Air のキャピラリーホルダーに設置した。フェムトチップ II に充填した BFP 溶液は、CellTram vario を用いて放出した。導入の確認は、スライドガラスを蛍光顕微鏡 BZ-X710（Keyence）に移動し、蛍光を観察した。

5.2.4 導入溶液の検討

SP バッファー（25 mM Tris-HCl、pH7.4、0.3 M Sucrose）に ATP（終濃度 5 mM）を添加したバッファー¹⁰⁰（SPA バッファーと呼ぶ）をフェムトチップ II に充填し、導入した。導入後、蛍光顕微鏡 BZ-X710（Keyence）に移動し、タイムラプス観察を行い、巨大化するかどうか確認した。

5.2.5 導入ゲノム DNA の用意

使用した菌は、*Bacillus subtilis* 168 株、*Deinococcus grandis* ATCC43672 株、*Enterococcus faecalis* NBRC100480 株、*Erythrobacter litoralis* NBRC102620 株、*Escherichia coli* MG1655 株、*Lelliottia amnigena* NBRC105700 株、*Lactobacillus curvatus* NBRC15884 株、*Lactococcus lactis subsp. lactis* NBRC100933 株である。*D. grandis*、*E. faecalis*、*E. litoralis*、*E. coli*、*L. amnigena*、*L. curvatus*、*L. lactis* は、DNeasy Blood & Tissue キット (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。溶出液は、SP バッファーを使用した。

B. subtilis の DNA 抽出は、Saito と Miura 由来の方法¹⁰¹ を改変したもので行った。LB 寒天培地で 37°C で一晩培養し、生えてきたシングルコロニーを 4 mL の LB 培地に植菌し、OD₆₀₀ = 0.4~0.7 まで 170 rpm、37°C で培養した。その後、15,000 rpm で 3 分間集菌した。上清を捨て、1 mg/mL リゾチームと 100 µg/mL RNaseA (Qiagen) を含む 500 µL の 1×TKE (100 mM Tris、1M KCl、200 mM EDTA、pH 8.0) で攪拌した後、37°C で 10 分間インキュベートした。その後、10% SDS を 50 µL 加え、よく混ぜ、70°C で 10 分間インキュベートした。氷上で冷ました後、300-500 µL の Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (Nippon gene) を加え、攪拌した。15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清約 400 µL を新しいチューブに移した。上清の 2 倍量 (800 µL) の 100% エタノールを加え、攪拌し、15,000 rpm で 10 秒間遠心した。上清を捨て、100% エタノールを 700 µL 加え、リンスした。その後、15,000 rpm で 1 分間遠心し、乾燥させ、20 µL の SP バッファーに溶解した。

抽出したゲノム DNA は、アガロースゲル電気泳動で確認した。

5.2.6 微小ガラス管 (フェムトチップ II) へのゲノム DNA 溶液の充填

DNA 溶液は、SP バッファーで 100 ng/µL に調製後、ATP (終濃度 5 mM、Thermo Fisher Scientific) を添加した。その後、4°C、11,000×g で 15 分間遠心し、上清 1~2 µL をマイクロローダーで吸引し、フェムトチップ II に充填した。

5.2.7 ゲノム DNA 溶液導入のマイクロインジェクション操作

E. faecalis 巨大化プロトプラスト培養 48 時間の培養液をカバーガラスに添加し、顕微鏡ステージの上に載せた。フェムトチップ II に充填した DNA 溶液は、Femtojet 4i を用いて 50~100 hPa で放出し、細胞内が変化するまで 10~60 秒間導入した。その後、カバーガラスを蛍光顕微鏡 BZ-X710 (Keyence) に移動し、タイムラプス観察を 1 時間おきに 20 時間まで行った。

5.2.8 ゲノム DNA 導入後のクラスター解析

タイムラプス観察写真に基づいて、各細胞の 0 時間から 20 時間までの細胞膜直径を cellSens Standard 1.11 imaging software (Olympus) で計測した。各培養時間の細胞直径から 0 時間の細胞直径を引き、細胞直径の変化量を算出した。ゲノム DNA の導入を行っていないコントロール細胞 20 個と 8 種の異なるバクテリアのゲノム DNA をそれぞれ導入した細胞 126 個の合計 146 細胞の細胞直径の増減パターンを、クラスター解析した。クラスターリングは、R (<http://www.r-project.org/>) で“dist”と“hclust”を使用した。それぞれのバクテリアのゲノム DNA を導入した細胞におけるクラスターの構成を、カイ 2 乗検定およびフィッシャー正確確率検定を行った。

5.3 結果と考察

5.3.1 青色蛍光タンパク質溶液の導入

巨大化スフェロプラストおよびプロトプラストがマイクロインジェクション可能かどうかを調べるため、マイクロマニピュレータ（エッペンドルフ社製）を用いて、青色蛍光タンパク質（BFP）溶液をフェムトチップII（エッペンドルフ社製）に充填し、*E. faecalis* および *L. amnigena* 巨大細胞の細胞質に導入した（図 38）。

E. faecalis は、DMB で巨大化した細胞を使用した。*E. faecalis* 巨大化プロトプラストは、スライドガラスあるいはカバーガラスに細胞が接着したため、細胞を固定せずに操作できた（図 39-A）。蛍光顕微鏡観察によって、青色の蛍光を観察し、BFP 溶液を *E. faecalis* 巨大化プロトプラストの細胞質に導入したことを確認した（図 39-B）。また、BFP は、細胞質のみに存在し、液胞は染まらなかった（図 39-B）。

L. amnigena は、*E. faecalis* と異なり、DMB で巨大化したスフェロプラストは、フェムトチップIIの挿入に耐えられない細胞がほとんどであった。そこで、培地中に含まれる金属塩の組成を変化させたところ、eMMB3CaKMg で巨大化した細胞は、フェムトチップIIの挿入に耐えられた。よって、*L. amnigena* は、eMMB3CaKMg で巨大化した細胞を使用した。スフェロプラストは、浮遊しているため、固定ピペットによって細胞を固定して操作した（図 40）。巨大化スフェロプラストの外膜をフェムトチップIIで除去し、プロトプラストの状態にしたところ、プロトプラストの状態になった細胞は、*E. faecalis* 巨大化プロトプラストと同様にガラスに付着したため、細胞を固定せずに操作できた（図 40, 41-A）。蛍光顕微鏡観察によって、青色の蛍光を観察し、BFP 溶液を *L. amnigena* 巨大化プロトプラストの細胞質に導入したことを確認した（図 41-B）。また、BFP は、細胞質のみに存在し、液胞は染まらず、マイクロインジェクション中に崩壊した細胞も蛍光を示さなかった（図 41-B）。

これらの結果は、*E. faecalis* および *L. amnigena* の巨大細胞へのマイクロインジェクションが成功したことを意味している。これは、バクテリア細胞へのマイクロインジェクションの適用として世界初のことであった。

5.3.2 マイクロインジェクション操作による液胞の形成

エンドサイトーシスは、細胞膜の陥入によって細胞外の物質を取り込むシステムである。バクテリア細胞巨大化における液胞もエンドサイトーシスで生成すると考えられている^{18,19}。*L. amnigena* 巨大化スフェロプラストの細胞膜に BFP 溶液を放出した際、液胞が形成された (図 42)。*L. amnigena* は、MMB3CaKMg で巨大化した細胞を使用した。フェムトチップ II によって外膜を除去した後、BFP 溶液を放出しながらフェムトチップ II を細胞膜に近づけたところ、細胞膜が細胞質側に陥入し、膨らんでいった (図 42-A, B, C)。その後、細胞内に液胞が形成された。液胞は、26 秒間で 13.9 μm から 18.8 μm に大きくなった (図 42-C)。これは、BFP 溶液がフェムトチップ II から約 0.08 pL/s の速度で放出されていたことになる。液胞は、フェムトチップ II を細胞から抜いた後も存在した (図 42-D)。最終的に、プロトプラストは崩壊した (図 42-E)。しかし、驚くべきことに、プロトプラストの崩壊後、液胞は培地中で維持された (図 42-F)。このことは、液胞が細胞膜とつながっていないことを示している。また、蛍光顕微鏡観察によって、BFP が液胞内に存在することが確認された (図 42-G)。したがって、MMB3CaKMg で巨大化した *L. amnigena* の細胞膜は、内部に陥入して独立した液胞を形成できることを示した。一方、*E. faecalis* 巨大化プロトプラストを用いたマイクロインジェクション実験では、細胞膜の陥入による液胞形成は見られなかった。

これらの結果から、*L. amnigena* 巨大化スフェロプラストは、*E. faecalis* 巨大化プロトプラストと細胞膜のリン脂質組成が異なり、強度が異なっていることが示唆された。電子顕微鏡観察写真からも、*E. faecalis* 巨大化プロトプラストの膜表層はシャープなのに対し、*L. amnigena* 巨大化スフェロプラストの膜表層はゆがんでいる様子が捉えられ、上記の結果をサポートする。

5.3.3 導入溶液の検討

巨大化スフェロ／プロトプラストに DNA を導入した際、細胞を殺さないためにどの溶液に溶かすか重要である。真核細胞へのマイクロインジェクションで DNA の溶液と

して使われているものは、水、Tris-EDTA、リン酸緩衝液および培地である¹⁰²⁻¹⁰⁶。本研究では、バクテリアプロトプラストと微小容器を融合する実験で使用されている SP バッファー (25 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.3 M Sucrose, 5 mM ATP) を使用した¹⁰⁰。生存の確認は、巨大化するかどうかで判断した。全部で 21 個の細胞に対して SP バッファーを導入した結果、12 個巨大化した (図 43)。また、ゲノム DNA を水に溶かしたものを巨大化培養液中で放出すると、DNA が析出し、フェムトチップ II がつまったのに対し、SP バッファーに溶かした方は、つまることなく放出できた。これらの結果から、SP バッファーを DNA の溶液として使用することにした。

5.3.4 ゲノム DNA の導入による巨大化への影響

E. faecalis プロトプラストの巨大化とゲノム DNA の複製が関連し、複製が停止すると巨大化も停止することがわかったが、そのメカニズムは明らかではない。要因として、複製したゲノム DNA が直接、細胞膜の伸張に関わっていること、あるいは、複製のシステムと細胞膜合成のシステムがリンクしていることが考えられる。そこで、実際に、宿主のゲノムや異種ゲノムを導入し、その後の巨大化の様子を観察することで、DNA 複製が巨大化に影響する要因がわかると考え、マイクロインジェクションによって、*E. faecalis* 自身のゲノム DNA および 7 種の異種ゲノム DNA を *E. faecalis* 巨大化プロトプラストに導入し、その巨大化への影響を調べた。

マイクロインジェクションに使用したバクテリアのゲノムを表 20 および図 44 に示した。*E. faecalis* 巨大化プロトプラストに同種および異種ゲノムを導入しても、大半の細胞は巨大化を停止せず、巨大化した (図 45, 46)。このことは、*E. faecalis* 巨大化プロトプラストは、ゲノム DNA を導入されてもプロトプラストの状態で生き残ることができることを意味している。次に、ゲノム DNA の導入を行っていないコントロール細胞 20 個と 8 種の異なるバクテリアのゲノム DNA をそれぞれ導入した細胞 126 個の合計 146 細胞の細胞直径の増減パターンをクラスター解析したところ、大きく 3 つのクラスターに分かれた (図 47)。そこで、3 つのクラスターの細胞直径の増減パターンの特徴

を調べた (図 48)。18 細胞からなるクラスター1 は、巨大化のレベルが大きいもので構成され、48 細胞からなるクラスター2 は、3 つのクラスターの中で巨大化レベルが小さいもので構成された (図 48)。20 個のコントロール細胞のうち 16 細胞を含むクラスター3 は 83 細胞から構成され、クラスター1 とクラスター2 の中間の巨大化レベルを持っていた (図 48)。

E. faecalis 自身のゲノムを導入した場合、クラスター1 とクラスター3 の数が減少し、クラスター2 の数が増加したことより、多くの細胞において巨大化が抑制される傾向にあることを示している。*E. faecalis* のプロトプラスト巨大化には、DNA 複製が必要であり、複製を阻害すると巨大化が抑制されることがわかっている^{34,64}。その際、ゲノム DNA が直接、細胞伸張に必要である可能性が考えられたが (例：細胞膜への接着による膜の安定化)、*E. faecalis* のゲノム導入によって細胞膜伸張は促進されなかった。このことは、巨大化における複製が DNA の量産ではなく、細胞膜伸張と DNA 複製が関連しながら成立しているシステムであり、それぞれが独立に成立していないことを強く示唆している。よって、導入ゲノムの影響として、*E. faecalis* のゲノムの複製システムを阻害した可能性が高いと考えられる。

また、*E. faecalis* のゲノム導入によって、急激に細胞内のゲノム DNA が増加し、巨大化の終期の状況になった可能性もある。しかし、クラスター2 の数がゲノム導入によって増加する傾向は、*E. faecalis* とは異なる種のゲノムに対しても同様の傾向が見られたことから、導入したゲノム DNA が宿主のゲノムの複製システムを直接阻害することが考えられる。複製システムの阻害原因としては、導入したゲノム DNA が宿主のゲノム DNA とハイブリダイゼーションし、細胞内にもともと存在しているインタクトなゲノムの複製を妨害している場合が考えられる。また、ゲノム DNA は、孔径 0.5 μm のフェムトチップ II から放出されるため、細胞内に導入された時には断片化した状態であることが想定される。導入ゲノムの長さによって複製および巨大化への影響が異なるかもしれない。DNA 断片がある短さを下回ると DNA 伸長の材料として使われ、複製および巨大化が促進され、ある長さを上回るとハイブリダイゼーションする領域が大きく

なり、複製および巨大化が停止するといったことが考えられる。

一方、ゲノム DNA の導入によって巨大化が促進される場合も見られた。コントロール細胞における 15%がクラスター1 に属し、これらの細胞は、その細胞集団の平均よりも高い巨大化レベルを示している。自身のゲノムの導入によって、クラスター1 の割合は 6%に減少し、巨大化抑制の傾向が表れている。それに対し、*B. subtilis* のゲノムを導入した際、クラスター1 の割合は 26.3%と高く、巨大化が促進された細胞がある程度存在していることを示している。この原因として、導入ゲノムが、ゲノム複製におけるヌクレオチドの供給源として使用され、*E. faecalis* のゲノムの複製を促進し、巨大化が促進されたかもしれない。

それぞれのバクテリア DNA を導入した細胞におけるクラスターの構成をカイ 2 乗検定およびフィッシャー正確確率検定を行ったところ、コントロールと有意に違っていた細胞は、宿主の *E. faecalis*、グラム陽性の *L. curvatus*、*B. subtilis* およびグラム陰性の *E. coli* と *L. amnigena* のゲノムを導入した 5 種であった (表 21, 図 49)。一方、コントロールと有意差がなかった細胞は、グラム陽性の *L. lactis* とグラム陰性の *E. litoralis* と *D. grandis* のゲノムを導入した 3 種であった (表 21, 図 49)。これらのゲノム DNA は、導入後、細胞内において DNA が凝集し、DNA としての振る舞いができなかつた可能性が考えられる。すなわち、ゲノム DNA の導入によって違いが生じたもの、および違いが生じなかつたもののいずれにもグラム陽性と陰性のものが含まれ、グラム陽性である *E. faecalis* と進化系統の関係が影響していないという結果であった。

また、ゲノム DNA の GC 含量については、*E. faecalis* の 37.5%に対し、コントロールと有意差があつた *L. curvatus* は 42%、*B. subtilis* は 43.5%、*E. coli* は 50.8%、*L. amnigena* は 52.9%であり、有意差がなかつた *L. lactis* は 35%、*E. litoralis* は 65.2%、*D. grandis* は 69.9%であった。先のクラスター解析より、ゲノム DNA の導入による巨大化への影響は、巨大化が抑制される傾向であつた。その要因として、大量の導入 DNA が類似配列領域に交雑したためと考えられる。この考えに基づくと、GC 含量が大きく異なっている場合には交雑が困難であるため、影響がでないと考えられる。しかし、*E.*

litoralis と *D. grandis* においてはそのことに合致しているものの、*L. lactis* についてはそれに合致していないため、巨大化抑制の機構については、1つの要因だけではない可能性が高い。

5.4 小括

DMB で巨大化した *E. faecalis* および eMMB で巨大化した *L. amnigena* スフェロ／プロトプラストは、マイクロインジェクション可能であった。どちらの細胞も BFP 溶液の導入により、液胞内は青色に染まらなかったことから、液胞膜は、物質選択機能を有していることが示唆された。一方、*E. faecalis* と *L. amnigena* の細胞膜の特徴は異なっていた。*L. amnigena* では、液を放出しながらフェムトチップ II を細胞膜に近づけると、膜が細胞質に陥入しエンドサイトーシスが生じた。対照的に、*E. faecalis* では、マイクロインジェクション実験中に膜の陥入やエンドサイトーシスは一度も観察されなかった。巨大化スフェロ／プロトプラストとマイクロインジェクションは、膜の性状について調べる新しい方法として使える。

E. faecalis 巨大化プロトプラストに 8 種類のバクテリアのゲノム DNA をそれぞれ導入し、合計 126 細胞の巨大化への影響を調べ、バクテリア細胞はゲノム DNA を導入されてもプロトプラストの状態で生き残ることができることを示した。一方、ゲノム DNA 導入後の巨大化パターンは、3 つのタイプに分かれた。*E. faecalis* 自身のゲノムを導入した場合、巨大化のレベルが小さいグループの数が増加し、多くの細胞において巨大化が抑制された。このことから、*E. faecalis* プロトプラストの巨大化とゲノム DNA の複製が関連している要因は、複製したゲノム DNA が直接、細胞膜の伸張に関わっているのではなく、複製のシステムと細胞膜合成のシステムがリンクしていることが示唆された。

巨大化抑制の傾向は、*E. faecalis* とは異なる種のゲノムに対しても見られ、導入したゲノム DNA が宿主のゲノムの複製システムを直接阻害することが考えられる。複製システムの阻害原因としては、導入したゲノム DNA が宿主のゲノム DNA とハイブリダイゼーションし、細胞内にもともと存在しているインタクトなゲノムの複製を妨害している場合が考えられる。他方、巨大化に影響を与えなかったゲノム DNA もあった。これらのゲノム DNA は、導入後、細胞内において DNA が凝集し、DNA としての振舞いができなかった可能性が考えられる。また、影響を与えたゲノムからは遺伝子発現

が生じ、影響を与えなかったゲノムからは遺伝子発現が生じていない可能性があるため、導入ゲノムの遺伝子発現や細胞内動態についてはさらなる研究が必要である。

また、8種類のバクテリアのゲノム DNA の導入により、ゲノム DNA の導入によって違いが生じたもの、および違いが生じなかったもののいずれにもグラム陽性と陰性のものが含まれ、グラム陽性である *E. faecalis* と進化系統の関係が影響していないことが示された。ゲノム DNA は、孔径 0.5 μm のフェムトチップ II から放出したため、細胞内に導入された時には断片化され、ゲノム DNA として認識されていない可能性もある。環状のインタクトなゲノム DNA を導入すると、ゲノム DNA として認識され、進化系統の関係が複製および巨大化に大きく影響してくるかもしれない。

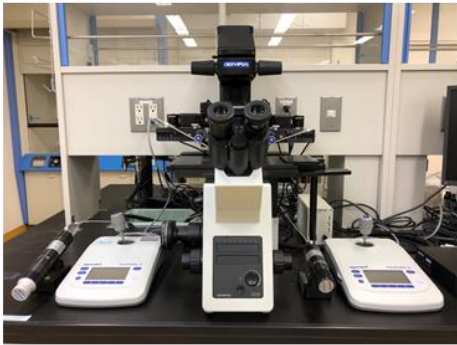
バクテリア種	グラム染色	ゲノムサイズ [Mbp]	GC含量 [%]
<i>Lactococcus lactis</i>	positive	2.6	35%
<i>Enterococcus faecalis</i>	positive	2.8	37.5
<i>Lactobacillus curvatus</i>	positive	1.8	42
<i>Bacillus subtilis</i>	positive	4.2	43.5
<i>Escherichia coli</i>	negative	4.6	50.8
<i>Lelliottia amnigena</i>	negative	4.4	52.9
<i>Erythrobacter litoralis</i>	negative	3.3	65.2
<i>Deinococcus grandis</i>	negative	4.0	69.9

表20. *E. faecalis*プロトプラストへのマイクロインジェクションに使用したゲノム

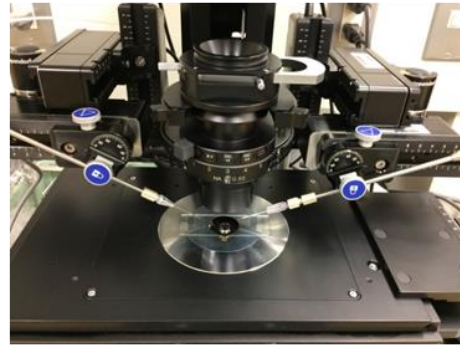
Control vs.	Chi-square test	Fisher's exact test
<i>L. lactis</i>	0.599	0.616
<i>E. faecalis</i>	0.00463	0.00223
<i>L. curvatus</i>	0.0489	0.0476
<i>B. subtilis</i>	0.0143	0.0146
<i>E. coli</i>	0.0148	0.0120
<i>L. amnigena</i>	0.0128	0.0123
<i>E. litoralis</i>	0.226	0.309
<i>D. grandis</i>	0.0710	0.0883

表21. カイ2乗検定およびフィッシャー正確確率検定のP値

A



B



C

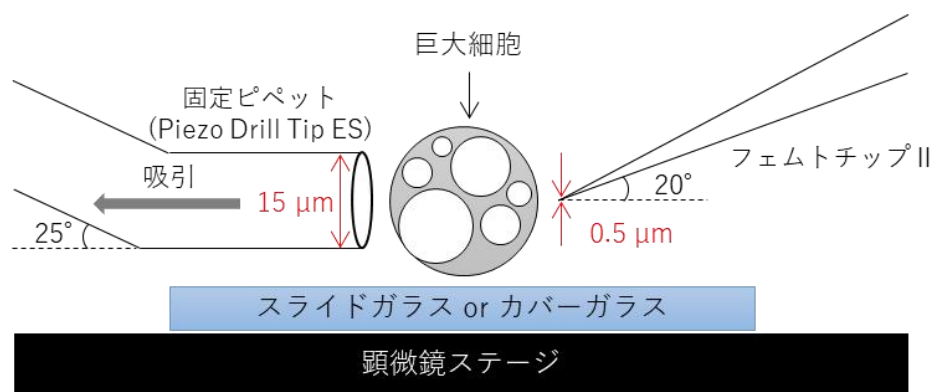


図38. 本研究で使用したマイクロマニピュレーションシステム

(A) 手動マイクロインジェクターCellTram AirとCellTram varioと組み合わせたTransferMan 4rマイクロマニピュレータセット (エッペンドルフ社製)。(B) マイクロインジェクションワークスペースのイメージ。(C) 巨大細胞へのマイクロインジェクションのイメージ図。

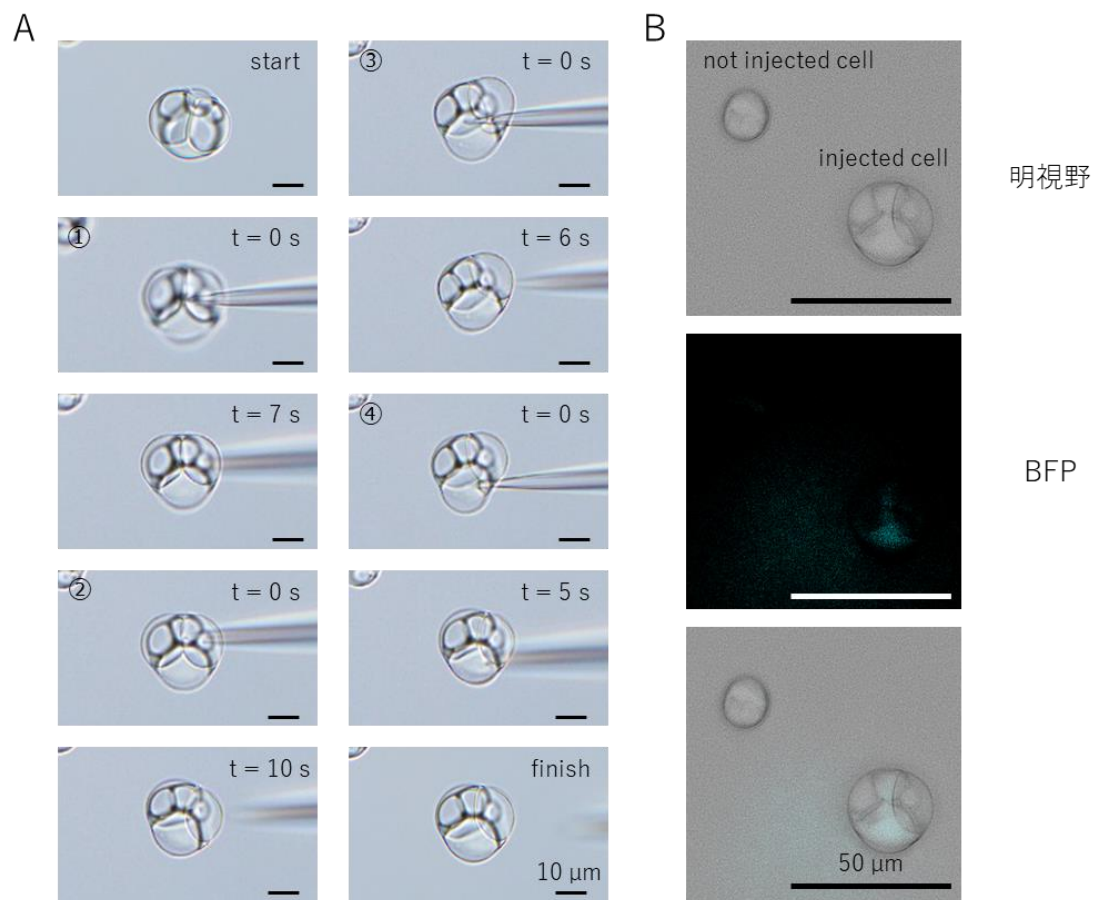


図39. *E. faecalis*巨大化プロトプラストへのBFP溶液のマイクロインジェクション
 ペニシリン含有DMBで96時間培養した*E. faecalis*プロトプラスト。(A) マイクロインジェクションのタイムラプス観察写真。導入開始時間を0秒とし、合計で4回導入した。微分干渉顕微鏡Olympus IX73で撮影。(B) BFPの蛍光顕微鏡観察写真。マイクロインジェクションした細胞としていない細胞を示した。Keyence BZ-X710で撮影。

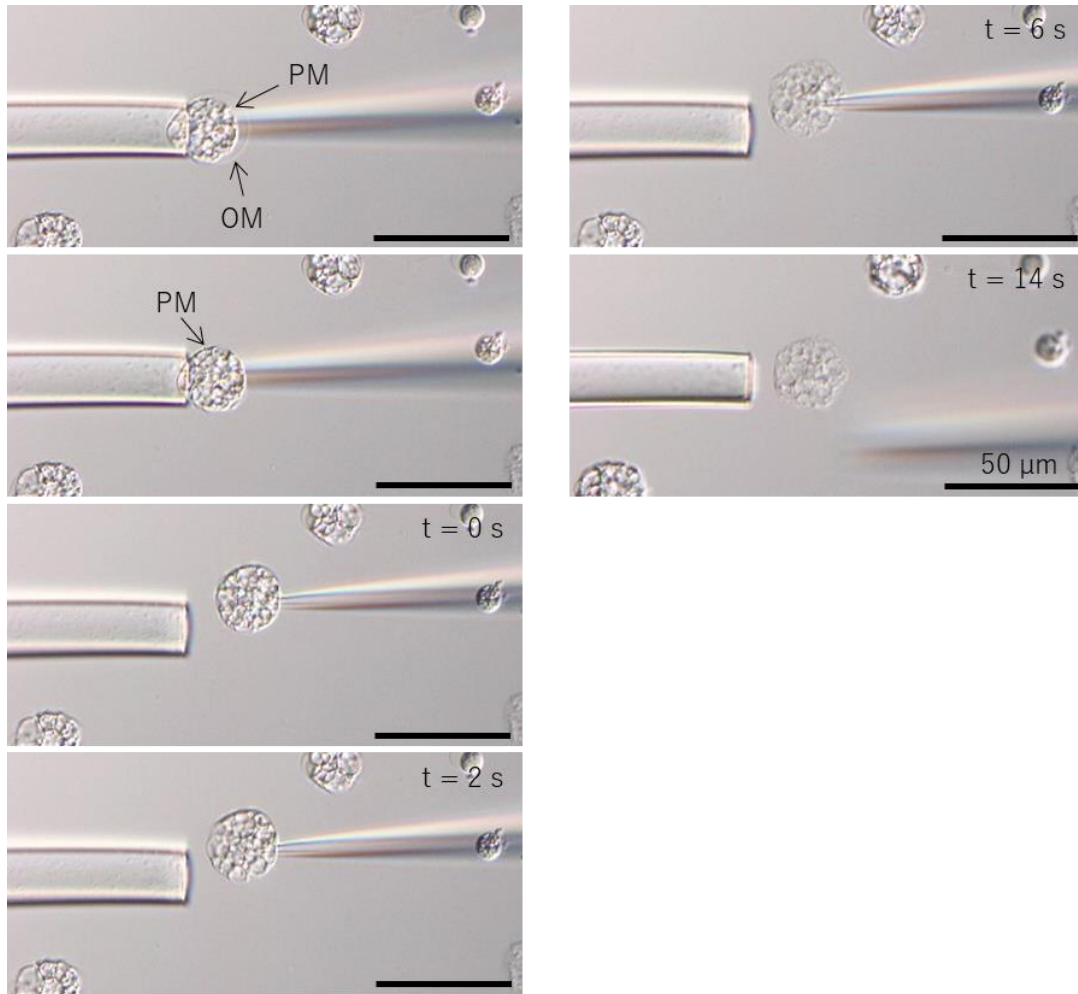


図40. *L. amnigena*巨大化スフェロプラストのマイクロマニピュレーション
 ペニシリン含有eMMB3CaKMgで24時間培養した*L. amnigena*巨大化ス
 フェロプラスト。マイクロインジェクションの一連の流れのタイムラプス
 観察：マイクロインジェクション針によって外膜を除去。プロトプラスト
 になった細胞がスライドガラスに付着。ホールディングピペットなしでマ
 イクロインジェクション。導入開始時間を0秒とした。微分干渉顕微鏡
 Olympus IX73で撮影。OM：外膜、PM：細胞膜。

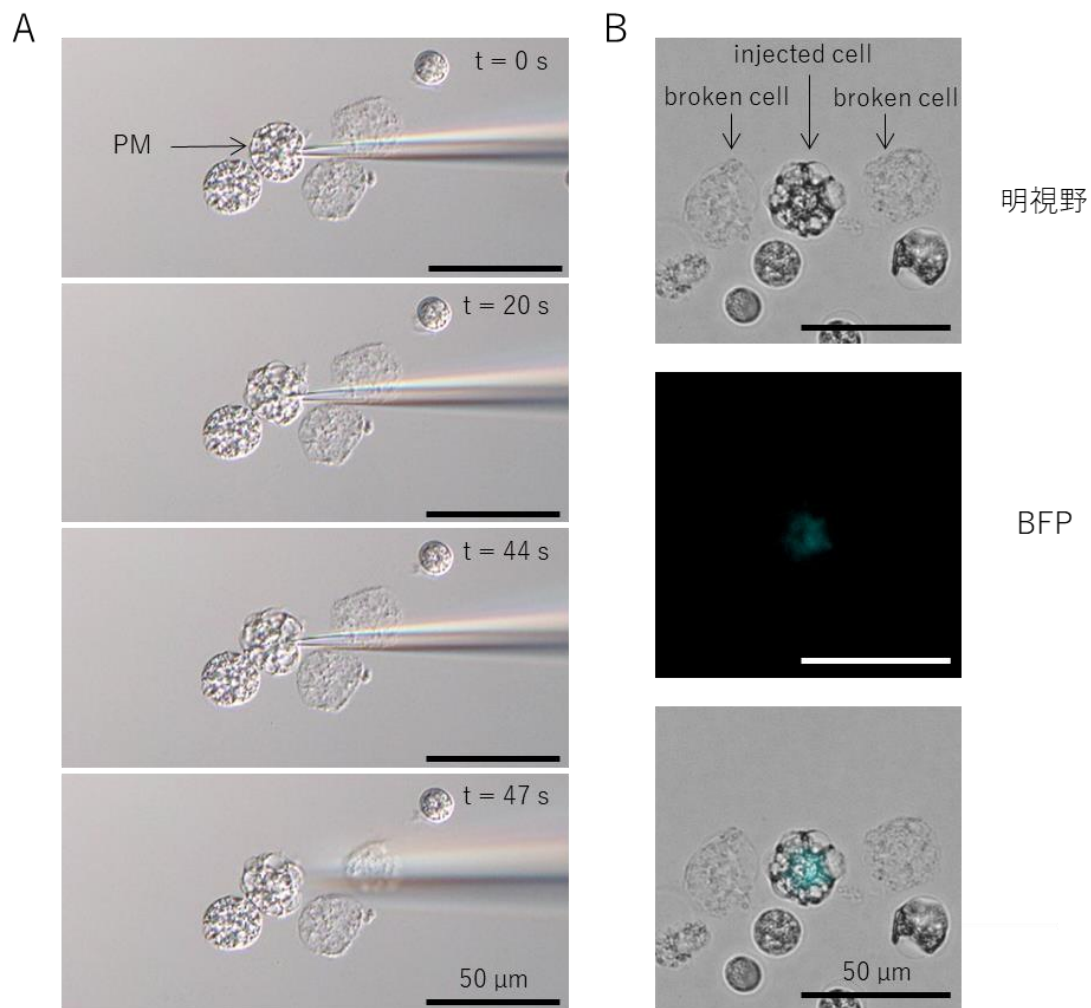


図41. *L. amnigena*巨大化スフェロプラストへのBFP溶液のマイクロインジェクション
 ペニシリン含有eMMB3CaKMgで28時間培養した*L. amnigena*プロトプラスト（細胞膜のみの状態）。（A）マイクロインジェクションのタイムラプス観察写真。導入開始時間を0秒とし、44秒間導入した。微分干渉顕微鏡 Olympus IX73で撮影。（B）BFPの蛍光顕微鏡観察写真。マイクロインジェクションした細胞とマイクロインジェクションによって崩壊した細胞を示した。Keyence BZ-X710で撮影。PM：細胞膜。

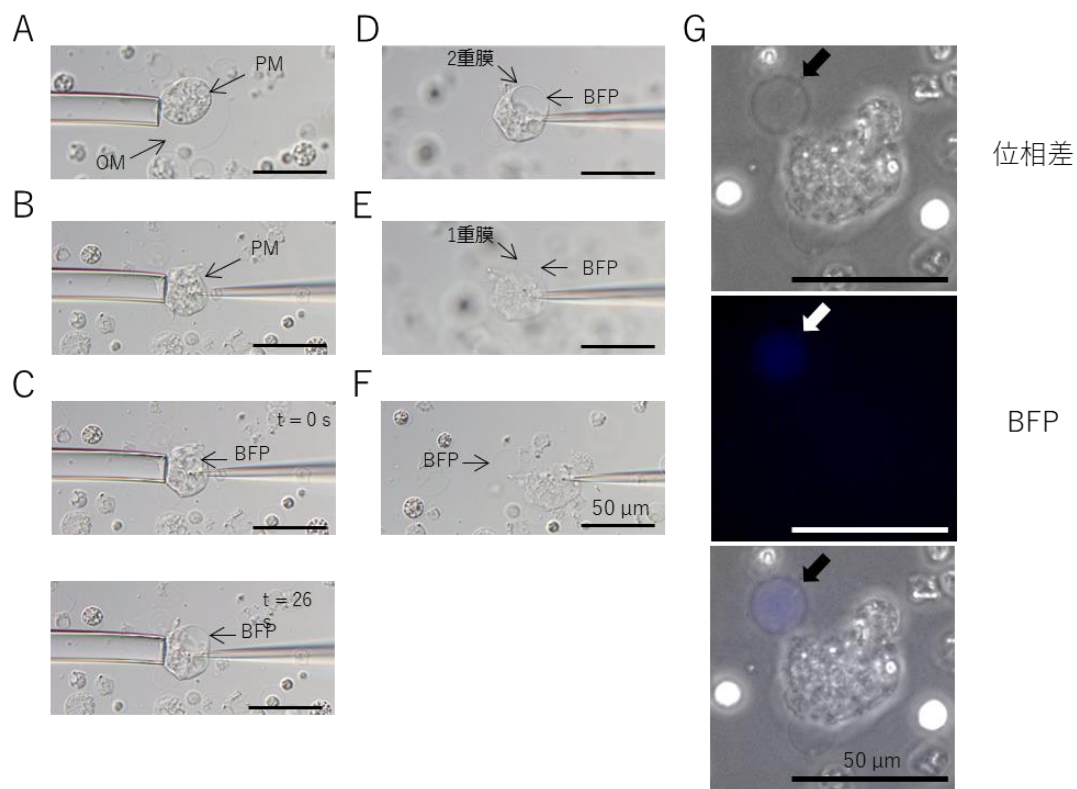


図42. マイクロマニピュレーターによるBFP含有液胞の形成
 ペニシリン含有MMB3CaKMgで20時間培養した*L. amnigena*スフェロプラスト。(A) ホールディングピペットによる*L. amnigena*巨大化スフェロプラストの固定。(B) マイクロインジェクション針による外膜の除去。液胞が現れた。(C) BFP含有液胞が生成し、巨大化する様子のタイムラプス観察。(D) BFP含有液胞巨大化プロトプラストの最終段階 (E) BFP含有液胞生成によるプロトプラストの崩壊 (F) BFP含有液胞の単離 (G) BFP含有液胞の蛍光顕微鏡観察。微分干渉顕微鏡写真は、Olympus IX73で撮影し、位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡写真は、Keyence BZ-X710で撮影した。

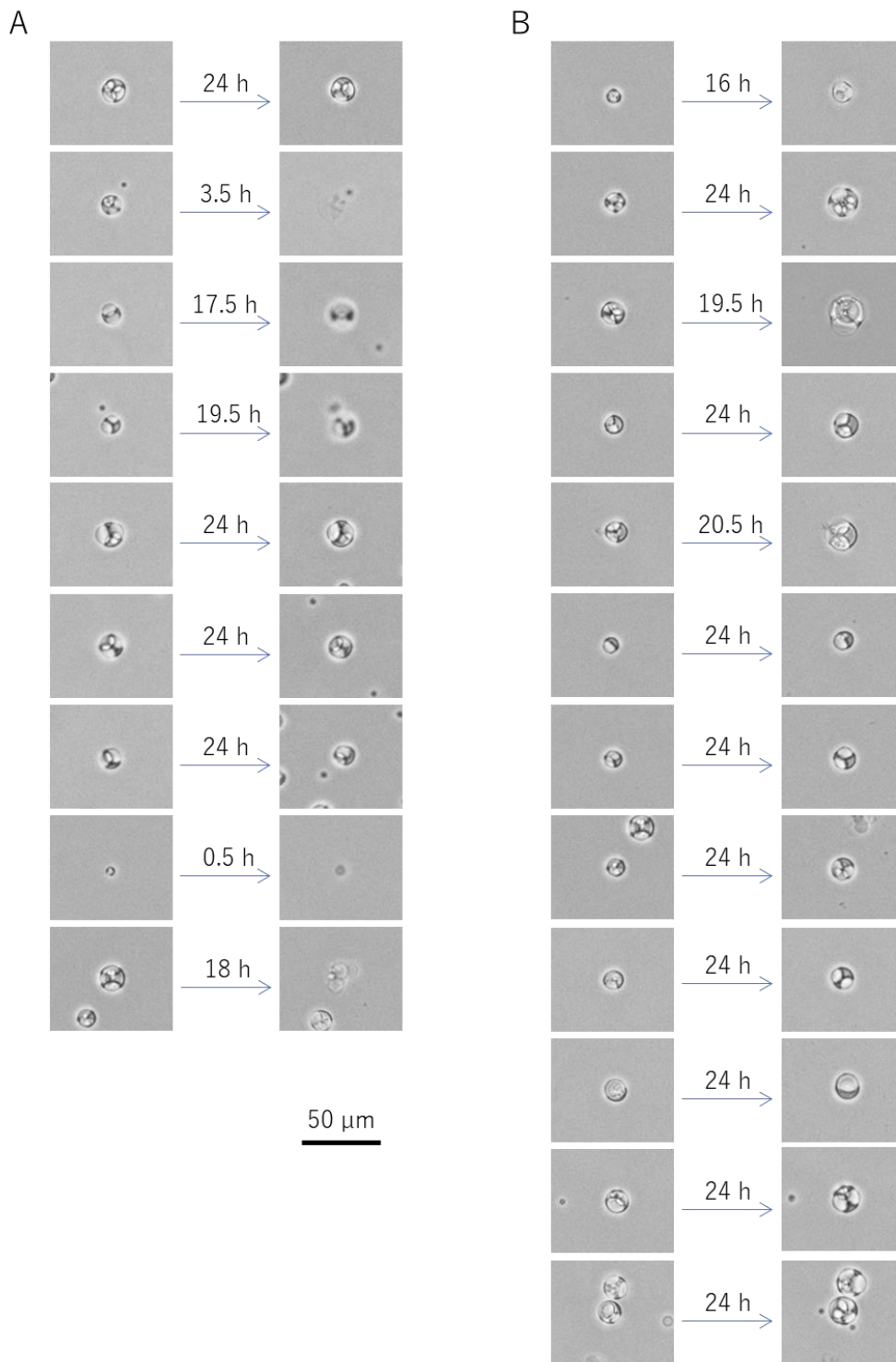


図43. SPバッファの巨大化への影響
 ペニシリン含有DMBで48時間培養した*E. faecalis*プロトプラストにSPバッファを導入し、その後の巨大化を観察した様子。(A) 導入後、巨大化しなかった細胞。(B) 導入後、巨大化した細胞。Keyence BZ-X710で撮影した。

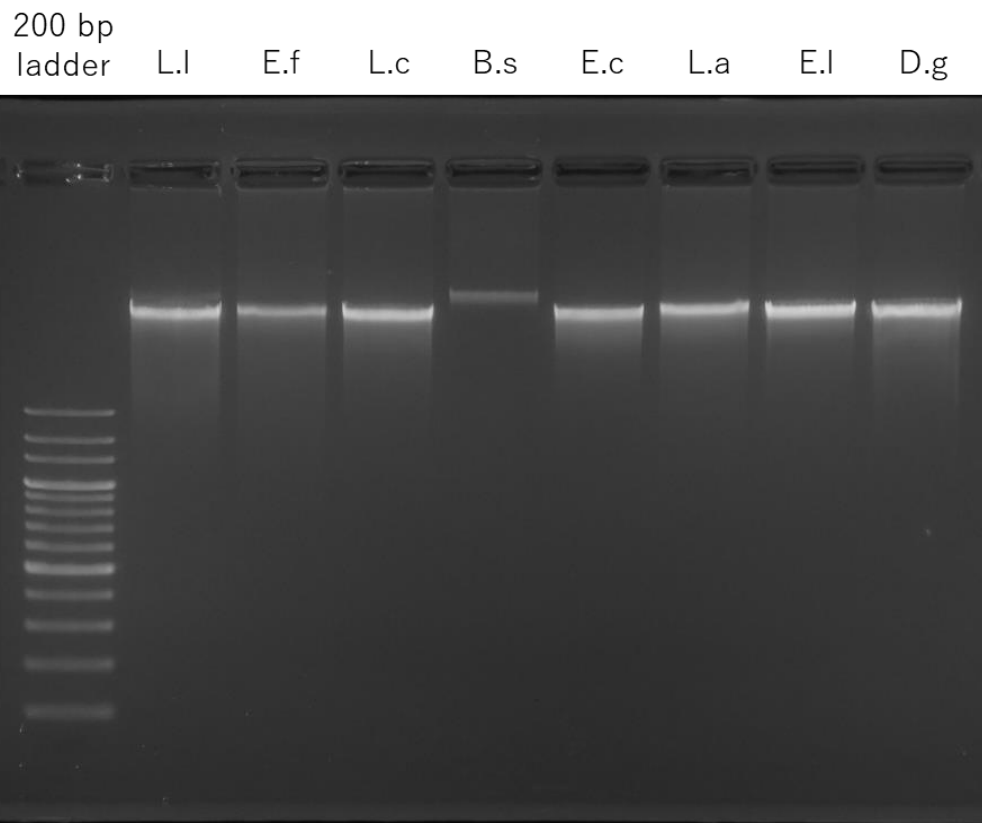


図44. *E. faecalis*プロトプラストに導入したゲノムDNAのアガロースゲル電気泳動結果

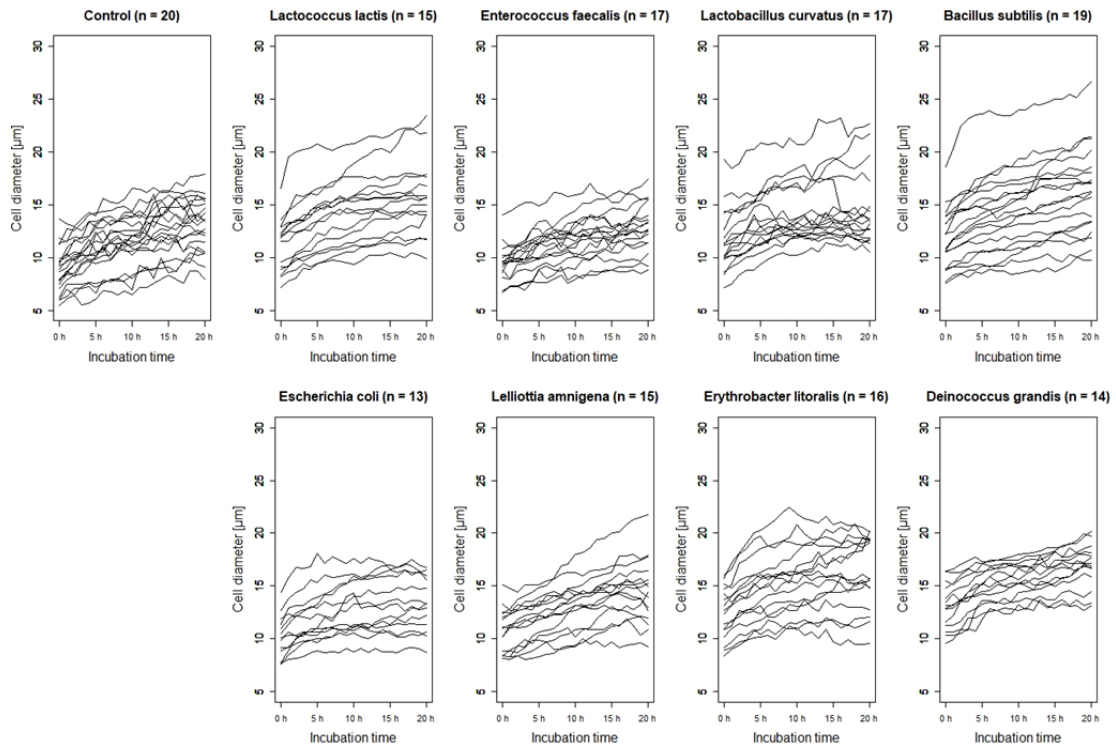


図45. *E. faecalis*プロトプラストの細胞直径の変化
 ペニシリン含有DMBで48時間培養した*E. faecalis*プロトプラストにゲノムDNAを
 導入し、タイムラプス観察を1時間おきに20時間行った。コントロールは、マイク
 ロインジェクションしていない細胞。Keyence BZ-X710で撮影した。

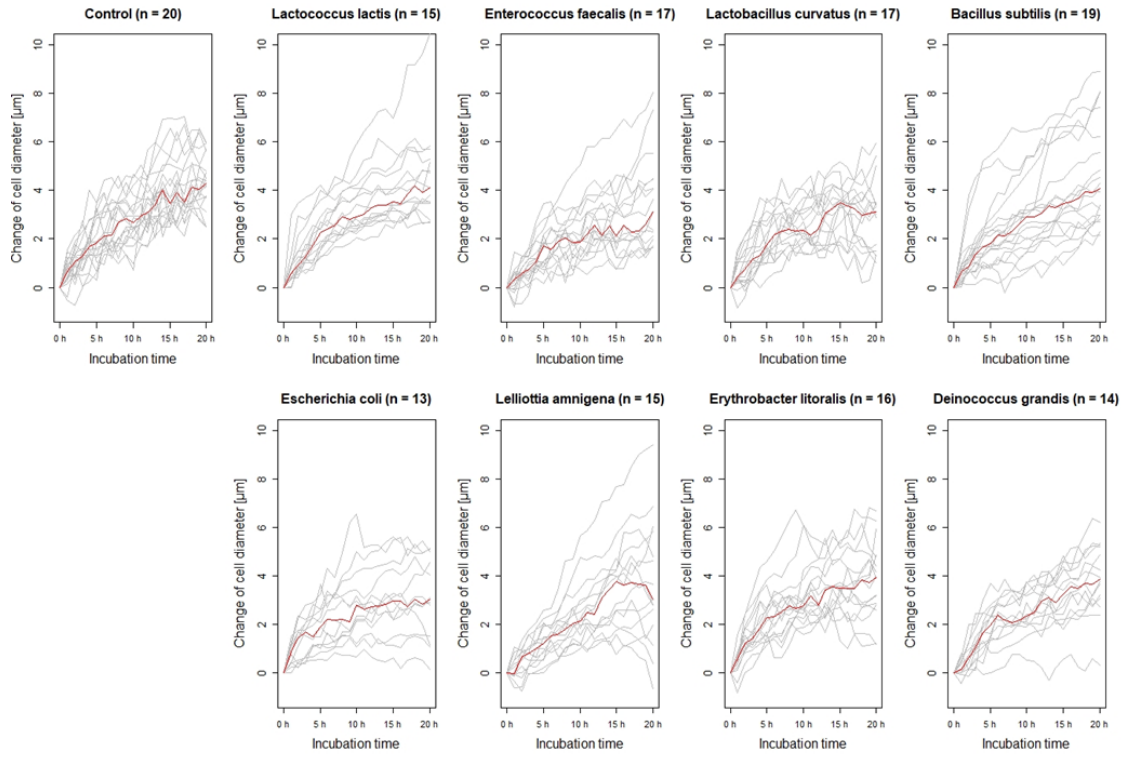


図46. *E. faecalis*プロトプラストの細胞直径の増減パターン
 各培養時間の細胞直径から0時間の細胞直径を引いたもの。赤色の線は、中央値を示す。

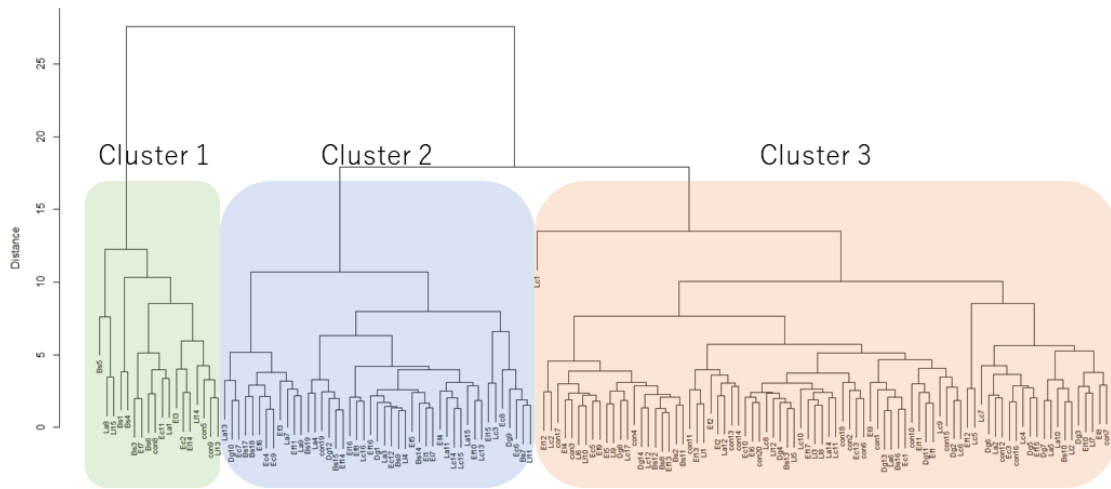


図47. 146個の *E. faecalis* プロトプラストの細胞直径の増減パターンの系統関係

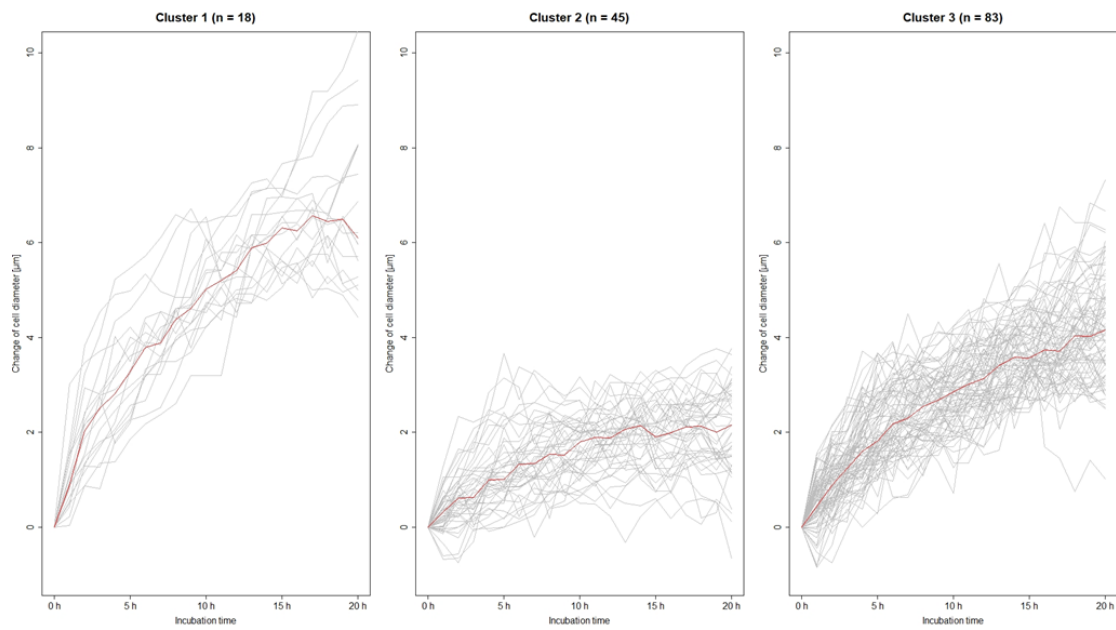
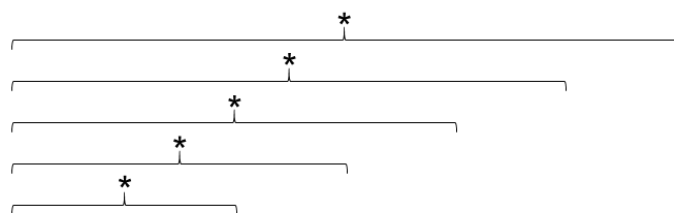


図48. 3つのクラスターの細胞直径の増減パターン



	Control	<i>L. lactis</i> G(+)	<i>E. faecalis</i> G(+)	<i>L. curvatus</i> G(+)	<i>B. subtilis</i> G(+)	<i>E. coli</i> G(-)	<i>L. amnigena</i> G(-)	<i>E. litoralis</i> G(-)	<i>D. grandis</i> G(-)
Cluster 1	3	3	1	0	5	2	2	2	0
Cluster 2	1	2	9	5	7	6	7	4	4
Cluster 3	16	10	7	12	7	5	6	10	10

* : $p < 0.05$
 G(+) : グラム陽性
 G(-) : グラム陰性

図49. 各バクテリアのゲノムDNAを導入した細胞におけるクラスターの構成
 カイ2乗検定およびフィッシャー正確確率検定を行った。

第6章 総括

本研究では、通常は数 μm のサイズのバクテリア細胞をマイクロインジェクションが可能な 15~20 μm サイズに巨大化させ、その巨大細胞へのマイクロインジェクション方法を確立し、遺伝子操作ができないバクテリアへの形質転換を可能とした。

第2章から第4章にかけて、巨大化に影響を与える因子は、浸透圧、金属塩、液胞およびDNA複製阻害剤であることを明らかにした。金属塩の組成は、細胞膜の伸張および強度に影響し、その影響は、進化的に近縁なバクテリア間で似ている可能性を示した。一方、金属塩が巨大化に必要な理由、および細胞膜の伸張を活性化する機構は明らかではない。また、スフェロ/プロトプラストは細胞分裂を伴わないDNA複製を行い、DNA複製は巨大化に必要であることが示されたが、巨大化の進行には限界があり、巨大化と複製を活発に行う期間、停止期間そして細胞崩壊へと段階があることもわかった。さらに、*E. faecalis* において、DNA複製阻害剤であるノボビオシンを添加すると巨大化および液胞形成が停止し、ノボビオシンを除去するとどちらも再開し、スフェロ/プロトプラスト巨大化において、DNA複製は細胞膜の生合成と関連していることが明らかとなった。スフェロ/プロトプラストが巨大化する過程は、通常のバクテリア細胞が細胞周期に従って分裂するように、巨大化周期が存在するかもしれない。

第5章では、バクテリアの巨大化スフェロ/プロトプラストは、マイクロインジェクション実験が可能であること示した。*L. amnigena* では、eMMBで巨大化したスフェロプラスト、*E. faecalis* では、DMBで巨大化したプロトプラストに対し、マイクロインジェクションが可能であった。このように、マイクロインジェクションに適した巨大化スフェロ/プロトプラストを作製する培地はバクテリア種によって異なっていた。また、マイクロインジェクション可能な細胞は、細胞質に液胞を形成するため、液胞が導入の妨げになると考えていた。しかし、実際に操作してみると、液胞は微小ガラス管が刺さりやすく、特に問題なかった。

この方法によって *E. faecalis* 巨大化プロトプラストに8種類のバクテリアのゲノム

DNA をそれぞれ導入し、合計 126 細胞の巨大化への影響を調べ、短時間・低労力で長鎖 DNA の導入が可能であることを示した。巨大化に影響を与えたゲノムは、宿主細胞と進化系統の関係が影響しておらず、また、ゲノム DNA の導入による巨大化への影響は、巨大化が抑制される傾向であった。その要因として、大量の導入 DNA が類似配列領域に交雑したためと考えられるが、これを確かめるためには導入ゲノムの細胞内動態を調べる必要がある。また、影響を与えたゲノムからは遺伝子発現が生じ、影響を与えなかったゲノムからは遺伝子発現が生じていない可能性があるため、導入ゲノムからの転写の有無を調べる必要がある。

しかし、巨大細胞のままの研究では、転写や翻訳を始めとしたすべての実験を 1 細胞レベルで行う必要があり、難易度が高い。そのため、異種ゲノムを導入した巨大細胞を脱巨大化して分裂増殖できる細胞へ戻す研究が重要になると考えている。もし、巨大細胞が分裂増殖できる細胞に戻ることができれば、デザインしたゲノムを搭載したバクテリアの創出およびデザインしたゲノムの検証を次々に行うことができる。遺伝子工学では、個々の遺伝子の導入であったが、ゲノムレベルになるとそこに搭載されているシステムそのものを導入することになるため、そのシステムが宿主細胞において発現し、機能するかどうかわからない。この方法は、宿主細胞における導入ゲノムの機能の検証を可能とするため、将来的に、期待する機能をもつバクテリアの創出を実現可能なものにするだろう。

参考文献

1. Ochman, H., Lawrence, J. G. & Groisman, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**, 299–304 (2000).
2. Garcia-Vallve, S., Romeu, A. & Palau, J. Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes. *Genome Res.* **10**, 1719–1725 (2000).
3. Koonin, E. V., Makarova, K. S. & Aravind, L. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 709–742 (2001).
4. Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 711–721 (2005).
5. Schaeffer, P., Cami, B. & Hotchkiss, R. D. Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 2151–2155 (1976).
6. Gomi, S. *et al.* Isolation and structure of a new antibiotic, indolizomycin, produced by a strain sk2-52 obtained by interspecies fusion treatment. *The Journal of Antibiotics* vol. 37 1491–1494 (1984).
7. Yamashita, F., Hotta, K., Kurasawa, S., Okami, Y. & Umezawa, H. New antibiotic-producing *Streptomyces*, selected by antibiotic resistance as a marker I. New antibiotic production generated by protoplast fusion treatment between *Streptomyces griseus* and *S. tenjimariensis*. *J. Antibiot.* **38**, 58–63 (1985).
8. Hotta, K., Yamashita, F., Okami, Y. & Umezawa, H. New antibiotic-producing *Streptomyces*, selected by antibiotic resistance as a marker II. Features of a new antibiotic-producing clone obtained after fusion treatment. *J. Antibiot.* **38**, 64–69 (1985).
9. Okanishi, M., Suzuki, N. & Furuta, T. Variety of hybrid characters among recombinants obtained by interspecific protoplast fusion in *Streptomyces*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1233–1238 (1996).
10. Imada, C., Ikemoto, Y., Kobayashi, T., Hamada, N. & Watanabe, E. Isolation and characterization of the interspecific fusants from *Streptomyces* obtained using a liquid regeneration method. *Fish. Sci.* **68**, 395–402 (2002).
11. Zhang, E., Imada, C., Kobayashi, T., Hamada-sato, N. & Kamata, M. Protoplast fusion between marine bacterium and *Escherichia coli* with reference to the distribution of parental characteristics in fusants. *Nippon Suisan Gakkaishi* **72**, 743–745 (2006).
12. Itaya, M., Tsuge, K., Koizumi, M. & Fujita, K. Combining two genomes in one cell: Stable cloning of the *Synechocystis* PCC6803 genome in the *Bacillus subtilis* 168 genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15971–15976 (2005).
13. 板谷光泰. 生きものの多様性を支えるゲノムの水平伝播. 生命誌ジャーナル (2008).
14. Lartigue, C. *et al.* Genome transplantation in bacteria: Changing one species to another.

- Science* **317**, 632–638 (2007).
15. Gibson, D. G. *et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* **329**, 52–56 (2010).
 16. Hutchison, C. A. *et al.* Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* **351**, (2016).
 17. Sleator, R. D. The story of *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0. *Bioeng. Bugs* **1**, 231–232 (2010).
 18. Kuroda, T. *et al.* Patch clamp studies on ion pumps of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*: Formation, preparation, and utilization of giant vacuole-like structures consisting of everted cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* **273**, 16897–16904 (1998).
 19. Nakamura, K. *et al.* Patch clamp analysis of the respiratory chain in *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**, 1103–1107 (2011).
 20. Kusaka, I. Growth and division of protoplasts of *Bacillus megaterium* and inhibition of division by penicillin. *J. Bacteriol.* **94**, 884–888 (1967).
 21. Lederberg, J. Bacterial protoplasts induced by penicillin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **42**, 574–577 (1956).
 22. Lederberg, J. & Clair, J. S. T. Protoplasts and L-type growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **75**, 143–160 (1958).
 23. Hurwitz, C., Reiner, J. M. & Landau, J. V. Studies in the physiology and biochemistry of penicillin-induced spheroplasts of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **76**, 612–617 (1958).
 24. G, A.-B. Genetic studies on *Deinococcus* spp. using spheroplasts and gene cloning. (University of Edinburgh, 1985).
 25. Oana, K., Kawakami, Y., Hayashi, T. & Ohnishi, M. Simple broad-spectrum protocol using labiase for bacterial cell lysis to prepare genomic DNA for pulsed-field gel electrophoresis analysis. *Microbiol. Immunol.* **53**, 45–48 (2009).
 26. Ranjit, D. K. & Young, K. D. The Rcs stress response and accessory envelope proteins are required for *de novo* generation of cell shape in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **195**, 2452–2462 (2013).
 27. Dittmar, W. Report on researches into the composition of ocean water, collected by H. M. S. Challenger, during the years 1873-1876. in *In Report on the Scientific Results of the Voyage of HMS Challenger* (ed. Murray, J.) 1–251 (1884).
 28. Lyman, J. & Fleming, R. H. Composition of sea water. *J. Mar. Res* **3**, 134–146 (1940).
 29. Takahashi, S. & Nishida, H. Quantitative analysis of chromosomal and plasmid DNA during the growth of spheroplasts of *Escherichia coli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **61**, 262–265 DOI: 10.2323/jgam.61.262 (2015).
 30. Takahashi, S. & Nishida, H. Growth of *Enterobacter amnigenus* and *Escherichia coli*

- spheroplasts in marine broth containing penicillin. *Bull. Toyama Pref. Univ.* **26**, 27–30 (2016).
31. Takayanagi, A., Takahashi, S. & Nishida, H. Requirement of dark culture condition for enlargement of spheroplasts of the aerobic anoxygenic photosynthetic marine bacterium *Erythrobacter litoralis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **62**, 14–17 DOI: 10.2323/jgam.62.14 (2016).
 32. Nakazawa, M. & Nishida, H. Effects of light and oxygen on the enlargement of spheroplasts of the facultative anaerobic anoxygenic photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Jacobs J. Biotechnol. Bioeng.* **3**, 014 (2017).
 33. Nishino, K. *et al.* Enlargement of *Deinococcus grandis* spheroplasts requires Mg²⁺ or Ca²⁺. *Microbiol.* **164**, 1361–1371 DOI: 10.1099/mic.0.000716 (2018).
 34. Kami, S., Tsuchikado, R. & Nishida, H. DNA replication and cell enlargement of *Enterococcus faecalis* protoplasts. *AIMS Microbiol.* **5**, 347–357 DOI: 10.3934/microbiol.2019.4.347 (2019).
 35. Nishino, K. & Nishida, H. Calcium ion induces outer membrane fusion of *Deinococcus grandis* spheroplasts to generate giant spheroplasts with multiple cytoplasm. *FEMS Microbiol. Lett.* **366**, 1–7 DOI: 10.1093/femsle/fny282 (2019).
 36. Nishino, K., Tsuchikado, R. & Nishida, H. Sugar enhances outer membrane fusion in *Deinococcus grandis* spheroplasts to generate calcium ion-dependent extra-huge cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **366**, 1–6 DOI: 10.1093/femsle/fnz087 (2019).
 37. Takahashi, S., Mizuma, M., Kami, S. & Nishida, H. Species-dependent protoplast enlargement involves different types of vacuole generation in bacteria. *Sci. Rep.* **10**, 1–11 DOI: 10.1038/s41598-020-65759-7 (2020).
 38. Takahashi, S., Takayanagi, A., Takahashi, Y., Oshima, T. & Nishida, H. Comparison of transcriptomes of enlarged spheroplasts of *Erythrobacter litoralis* and *Lelliottia amnigena*. *AIMS Microbiol.* **2**, 152–189 DOI: 10.3934/microbiol.2016.2.152 (2016).
 39. Fisher, R. A. On the Interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. **85**, 87–94 (1922).
 40. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
 41. Takahashi, S. & Nishida, H. 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 DOI: 10.1016/j.genrep.2017.02.005 (2017).
 42. Bi, E. & Lutkenhaus, J. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**, 161–164 (1991).

43. Erickson, H. P., Anderson, D. E. & Osawa, M. FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 504–528 (2010).
44. Briers, Y. *et al.* Intracellular vesicles as reproduction elements in cell wall-deficient L-form bacteria. *PLoS One* **7**, (2012).
45. Studer, P. *et al.* Proliferation of *Listeria monocytogenes* L-form cells by formation of internal and external vesicles. *Nat. Commun.* **7**, 1–11 (2016).
46. Schulz, H. N. *et al.* Dense populations of a giant sulfur bacterium in namibian shelf sediments. *Science* **284**, 493–495 (1999).
47. Cunningham, J. A. *et al.* Experimental taphonomy of giant sulphur bacteria: Implications for the interpretation of the embryo-like Ediacaran Doushantuo fossils. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **279**, 1857–1864 (2012).
48. Salman, V. *et al.* Calcite-accumulating large sulfur bacteria of the genus *Achromatium* in Sippewissett Salt Marsh. *ISME J.* **9**, 2503–2514 (2015).
49. Ionescu, D., Bizic-Ionescu, M., De Maio, N., Cypionka, H. & Grossart, H. P. Community-like genome in single cells of the sulfur bacterium *Achromatium oxaliferum*. *Nat. Commun.* **8**, 1–12 (2017).
50. Beutler, M. *et al.* Vacuolar respiration of nitrate coupled to energy conservation in filamentous *Beggiatoaceae*. *Environ. Microbiol.* **14**, 2911–2919 (2012).
51. Mercier, R., Kawai, Y. & Errington, J. Excess membrane synthesis drives a primitive mode of cell proliferation. *Cell* **152**, 997–1007 (2013).
52. Schwarz, U., Asmus, A. & Frank, H. Autolytic enzymes and cell division of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**, 419–426 (1969).
53. Parales, R. E. & Harwood, C. S. Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for Gram⁻ bacteria. *Gene* **133**, 23–30 (1993).
54. Guerry, P., Van Embden, J. & Falkow, S. Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes. *J. Bacteriol.* **117**, 619–630 (1974).
55. Grinter, N. J. & Barth, P. T. Characterization of SmSu plasmids by restriction endonuclease cleavage and compatibility testing. *J. Bacteriol.* **128**, 394–400 (1976).
56. Scherzinger, E., Bagdasarian, M. M., Scholz, P., Lurz, R. & Rückert, B. Replication of the broad host range plasmid RSF1010: Requirement for three plasmid-encoded proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 654–658 (1984).
57. Haring, V. *et al.* Protein RepC is involved in copy number control of the broad host range plasmid RSF1010. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 6090–6094 (1985).
58. Scholz, P. *et al.* Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* **75**, 271–288 (1989).

59. Honda, Y. *et al.* Functional division and reconstruction of a plasmid replication origin: Molecular dissection of the *oriV* of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 179–183 (1991).
60. Chern, E. C., Siefring, S., Paar, J., Doolittle, M. & Haugland, R. A. Comparison of quantitative PCR assays for *Escherichia coli* targeting ribosomal RNA and single copy genes. *Lett. Appl. Microbiol.* **52**, 298–306 (2011).
61. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359 (2012).
62. Robinson, J. T. *et al.* Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **29**, 24–26 (2011).
63. Watanabe, S. *et al.* Light-dependent and asynchronous replication of cyanobacterial multi-copy chromosomes. *Mol. Microbiol.* **83**, 856–865 (2012).
64. Tsuchikado, R., Kami, S., Takahashi, S. & Nishida, H. Novobiocin inhibits membrane synthesis and vacuole formation of *Enterococcus faecalis* protoplasts. *Microb. Cell* **7**, 300–308 DOI: 10.15698/mic2020.11.735 (2020).
65. Gellert, M., O’Dea, M. H., Itoh, T. & Tomizawa, J. I. Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 4474–4478 (1976).
66. Sugino, A., Higgins, N. P., Brown, P. O., Peebles, C. L. & Cozzarelli, N. R. Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States* **75**, 4838–4842 (1978).
67. Smith, D. H. & Davis, B. D. Mode of action of novobiocin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **93**, 71–79 (1967).
68. Marvin, D. A. Control of DNA replication by membrane. *Nature* **219**, 485–486 (1968).
69. Sueoka, N. & Quinn, W. G. Membrane attachment of the chromosome replication origin in *Bacillus subtilis*. *COLD SPRING Harb. Symp. Quant. Biol.* **33**, 695–705 (1968).
70. Earhart, C. F., Tremblay, G. Y., Daniels, M. J. & Schaechter, M. DNA replication studied by a new method for the isolation of cell membrane-DNA complexes. *COLD SPRING Harb. Symp. Quant. Biol.* **33**, 707–710 (1968).
71. Leibowitz, P. J. & Schaechter, M. The attachment of the bacterial chromosome to the cell membrane. *Int. Rev. Cytol.* **41**, 1–28 (1975).
72. Garner, J. & Crooke, E. Membrane regulation of the chromosomal replication activity of *E.coli* DnaA requires a discrete site on the protein. *EMBO J.* **15**, 2313–2321 (1996).
73. Boeneman, K. & Crooke, E. Chromosomal replication and the cell membrane. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 143–148 (2005).
74. Iyer, V. N. & Szybalski, W. A molecular mechanism of mitomycin action: Linking of complementary DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States* **50**, 355–362 (1963).

75. Szybalski, W. & Iyer, V. N. Crosslinking of DNA by enzymatically or chemically activated mitomycins and porfiromycins, bifunctionally 'alkylating' antibiotics. *Fed. Proc.* **23**, 946–957 (1964).
76. Moore, H. W. Bioactivation as a Model for drug design bioreductive alkylation. *Science* **197**, 527–532 (1977).
77. Tomasz, M. & Lipman, R. Reductive metabolism and alkylating activity of mitomycin C induced by rat liver microsomes. *Biochemistry* **20**, 5056–5061 (1981).
78. Kohn, H. & Zein, N. Studies concerning the mechanism of electrophilic substitution reactions of mitomycin C. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 4105–4106 (1983).
79. Danishefsky, S. J. & Egbertson, M. The characterization of intermediates in the mitomycin activation cascade: a practical synthesis of an aziridinomitosenone. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 4648–4650 (1986).
80. Tomasz, M. *et al.* Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science* **235**, 1204–1208 (1987).
81. Lown, J. W., Begleiter, A., Johnson, D. & Morgan, A. R. Studies related to antitumor antibiotics. V. Reactions of mitomycin C with DNA examined by ethidium fluorescence assay. *Can. J. Biochem.* **54**, 110–119 (1976).
82. Ueda, K., Morita, J., Yamashita, K. & Komano, T. Inactivation of bacteriophage ϕ X174 by mitomycin C in the presence of sodium hydrosulfite and cupric ions. *Chem. Biol. Interact.* **29**, 145–158 (1980).
83. Ueda, K., Morita, J. & Komano, T. Induction of single strand scission in bacteriophage ϕ X174 replicative form I DNA by mitomycin C. *J. Antibiot.* **34**, 317–322 (1981).
84. Ueda, K., Morita, J. & Komano, T. Actions of mitomycin C reduced with sodium borohydride on bacteriophage ϕ x174 and its single- and double-stranded DNAs. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1695–1697 (1982).
85. Ueda, K., Morita, J. & Komano, T. Phage inactivation and DNA strand scission activities of 7-*N*-(*p*-hydroxyphenyl)mitomycin C. *J. Antibiot.* **35**, 1380–1386 (1982).
86. Hamana, K. *et al.* DNA strand scission by enzymatically reduced mitomycin C: evidence for participation of the hydroxyl radical in the DNA damage. *Biochem. Int.* **10**, 301–309 (1985).
87. Reich, E., Shatkin, A. & Tatum, E. Bacteriocidal action of mitomycin C. *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 608–610 (1960).
88. Reich, E., Shatkin, A. & Tatum, E. Bacteriocidal action of mitomycin C. *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 132–149 (1961).
89. Kersten, H. & Rauen, H. Degradation of deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli* cells treated with mitomycin C. *Nature* **190**, 1195–1196 (1961).

90. Gause, G. F., Kochetkova, G. V. & Vladimirova, G. B. Mutants with impaired respiration in *Staphylococcus afermentans*. *J. Gen. Microbiol.* **30**, 29–33 (1963).
91. Kersten, H. Action of mitomycin C on nucleic acid metabolism in tumor and bacterial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 558–560 (1962).
92. Kersten, H. On the mode of action of mitomycin C. Influence on deoxyribonucleic acid (DNA)-degradation in resting bacterial cells. *Z. physiol. Chem* **329**, 31 (1962).
93. Kersten, H. & Kersten, W. On the mechanism of action of mitomycin C, II. Effect of mitomycin C, chloramphenicol and MG2 on RNA and DNA metabolism in bacteria. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* **334**, 141–153 (1963).
94. Nakata, Y., Nakata, K. & Sakamoto, Y. On the action mechanism of mitomycin C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **6**, 339–343 (1961).
95. Shatkin, A. J., Reich, E., Franklin, R. M. & Tatum, E. L. Effect of mitomycin C on mammalian cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 277–289 (1962).
96. Kersten, H., Kersten, W., Leopold, G. & Schnieders, B. Effect of mitomycin C on DNAase and RNA in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta - Spec. Sect. Nucleic Acids Relat. Subj.* **80**, 521–523 (1964).
97. Mendell, J. E., Clements, K. D., Choat, J. H. & Angert, E. R. Extreme polyploidy in a large bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6730–6734 (2008).
98. Levin, P. A. & Angert, E. R. Small but mighty: Cell size and bacteria. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, 1–11 (2015).
99. Sharpe, M. E., Hauser, P. M., Sharpe, R. G. & Errington, J. *Bacillus subtilis* cell cycle as studied by fluorescence microscopy: Constancy of cell length at initiation of DNA replication and evidence for active nucleoid partitioning. *J. Bacteriol.* **180**, 547–555 (1998).
100. Moriizumi, Y. *et al.* Hybrid cell reactor system from *Escherichia coli* protoplast cells and arrayed lipid bilayer chamber device. *Sci. Rep.* **8**, 1–6 (2018).
101. Saito, H. & Miura, K. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 619–629 (1963).
102. Crossway, A. *et al.* Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *MGG Mol. Gen. Genet.* **202**, 179–185 (1986).
103. Reich, T. J., Iyer, V. N. & Miki, B. L. Efficient transformation of alfalfa protoplasts by the intranuclear microinjection of Ti plasmids. *Nat. Biotechnol.* **4**, 1001–1004 (1986).
104. Toyoda, H., Matsuda, Y., Utsumi, R. & Ouchi, S. Intranuclear microinjection for transformation of tomato callus cells. *Plant Cell Rep.* **7**, 293–296 (1988).
105. Morikawa, H. & Yamada, Y. Capillary microinjection into protoplasts and intranuclear localization of injected materials. *Plant Cell Physiol.* **26**, 229–236 (1985).

106. Masani, M. Y. A., Noll, G. A., Parveez, G. K. A., Sambanthamurthi, R. & Prüfer, D. Efficient transformation of oil palm protoplasts by PEG-mediated transfection and DNA microinjection. *PLoS One* **9**, 1–11 (2014).

謝辞

本書は、富山県立大学工学部生物工学科応用生物情報学講座 西田洋巳 教授のご指導の下、約6年半の間、研究に取り組んできた成果をまとめたものです。西田教授には、研究や日々の生活を通じて、謙虚になること、考え抜くこと、くじけない気持ちの大切さを、魂を込めて教えていただきました。心より厚く御礼申し上げます。

また、大島拓 准教授には、日頃の研究室にて、実験操作から論文の執筆に至るまで幅広く助言を賜り、ディスカッションする機会を多く与えていただきました。心より感謝いたします。

本研究にあたり、バクテリア細胞のスフェロ／プロトプラスト培養法に関して助言を賜りました矢部勇 博士、*Deinococcus grandis* を分譲していただきました東洋大学 鳴海一成 教授、トランスクリプトーム解析および全ゲノムシーケンス解析をサポートしていただきました近藤伸二 博士、リポドミクス解析を行っていただきました株式会社島津テクノリサーチ 落合良介さん、近藤千恵さんに御礼申し上げます。また、本論文の副査をしていただきました日本大学 上田賢志 教授、富山県立大学 五十嵐康弘 教授、富山県立大学 日比慎 准教授に御礼申し上げます。

全ゲノムリシーケンス実験では、先進ゲノム支援 JSPS 科研費 191349 (PAGS) の助成を受けました。本課題を担当していただきました、九州大学拠点の林哲也先生、後藤恭宏先生、中村佳司さん、谷口愛樹さんに深く感謝いたします。

バクテリア細胞の巨大化研究は、1 学年上の野尻茜さんと杉村奈津希さんから始まり、同期の高柳綾奈さん、後輩の加藤遼弥さん、玉村慎さん、中澤舞さん、西野弘起さん、梅村幸佑さん、森田裕介さん、吉田真妃さん、奥村真衣さん、水間真鈴さん、上慧さん、土門麟太郎さん、大島理佐さんと多くの方々によって大切に引き継がれてきました。これまでの研究成果の積み重ねがあったからこそ、ここに博士論文をまとめることができました。また、マイクロインジェクション実験では、水間真鈴さんと上慧さんと共に励み、心強いパートナーとして支えていただきました。心より深く感謝いたします。

約6年半の研究室生活は、多くのことを学び、考え、人と出会い、決して忘れることのできない、かけがえのないものになりました。研究室で共に過ごし、喜怒哀楽を共有してきた先輩方、同期の皆、後輩たちに深く感謝いたします。その中でも約6年半共に学び、時には励まし合い、支え合ってきた同期の寺嵯桃香さんに深く感謝いたします。

博士後期課程3年間にわたる研究は、日本学術振興会特別研究員 DC1 および JSPS 科研費 JP 18J20258 の助成を受けたものです。心より深く感謝申し上げます。

最後に、

27年間、一番近くで見守り、応援し続けてくれた両親に心より感謝いたします。研究生活の中で辛い時もありましたが、いつも支えていただき、両親のおかげで安心して学生生活を送ることができました。改めて心より深く感謝いたします。

本研究は、エンテロコッカス・フェカリスとレリオットィア・アムニゲナを筆頭とする細菌との出会いがなければ成し遂げることはできませんでした。数えきれないほどの驚きと感動を与えてくれた細菌たちに心より深く感謝いたします。

高橋 沙和子