

論文審査報告書

氏名	たかはし さわこ 高橋 沙和子
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博生第30号
学位授与日	令和3年3月20日
論文題目	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
論文審査委員	(主査) 富山県立大学 教授 西田 洋巳 教授 五十嵐 康弘 准教授 日比 慎 准教授 大島 拓 日本大学 教授 上田 賢志

内容の要旨

バクテリアは細胞分裂によって同じ遺伝情報を持つクローンを生産し、増殖する。それにもかかわらず、バクテリアは極めて多様な遺伝情報を持ちながら地球に存在している。その背景には遺伝情報の変化があり、その変化には突然変異の蓄積だけではなく、異なる細胞間における遺伝情報の水平伝播が大きな役割を果たしてきた。クロモソームよりも少ない遺伝情報を持つプラスミドやウイルスを介した水平伝播は観察されるが、クロモソームのような長鎖DNAの水平伝播は観察されず、自然界で生じている頻度は極めて低い、あるいはないと考えられる。現在、分子生物学におけるバクテリアの形質転換は、プラスミドやウイルスを用いて行うため、1度の操作によって、クロモソームのような長鎖DNAによる形質転換はできない。よって、宿主のバクテリアに遺伝情報の異なる異種ゲノムを導入した際、宿主はそれにどのように対応するのかを知るべきがない。

マイクロインジェクションは微小ガラス管をマイクロマニピュレーター操作によって細胞に突き刺し、物質導入する方法である。そこで、バクテリア細胞を巨大化し、その巨大細胞へマイクロインジェクションする方法を確立し、異種クロモソームなどの長鎖DNAを宿主バクテリア細胞へ導入し、その影響を調べるのが本研究の目的である。

最初に、バクテリア細胞の巨大化に取り組んだ。バクテリア細胞は通常1~2 μ m程度の直径であり、そのサイズを10倍以上にしなければ、マイクロマニピュレーターを使った導入操作はできない。まずバクテリア細胞の大きさや形状に大きな影響を与えている細胞壁を構成しているペプチドグリカン層を

リゾチームによって溶解し、プロトプラストやスフェロプラストを作製した。次に、リゾチーム処理細胞を細胞壁合成阻害剤であるペニシリン存在下で細胞が維持される浸透圧条件下でインキュベーションすることによって、バクテリア細胞を巨大化した。当初は、それぞれのバクテリアの増殖に使用する培地に糖や塩を加えることによって浸透圧を調整していたが、海水と同じ金属塩組成を持つマリン培地を使用することによって、海洋性バクテリアに限定されず、海洋性ではない多くのバクテリアのプロトプラストやスフェロプラストも巨大化できることがわかり、本研究における巨大化実験に使用する基本培地はペニシリンを含むマリン培地とした。

バクテリアのプロトプラストやスフェロプラストの巨大化では、細胞分裂が生じることはない。そこで、スフェロプラスト化直後のバクテリア細胞と巨大化したスフェロプラストにおける遺伝子発現を網羅的に比較した。その結果、異なるバクテリアの種間において共通に存在しているオルソログ遺伝子の発現を比較したところ、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が、同じような発現変動パターンを持つ遺伝子も存在した。次にDNAの構造維持や細胞表層の形成にかかわる遺伝子の発現レベルを比較するため、レリオットィア・アムニゲナの通常の分裂増殖細胞、スフェロプラスト化直後の細胞、巨大スフェロプラスト、線維化した細胞の4つの異なる細胞における転写産物を逆転写定量PCRによって定量した。その結果、スフェロプラストの巨大化と細胞分裂の異常による線維化では、遺伝子の発現パターンが異なっていることなどを明らかにした。なお、本研究では特定のバクテリアに対しての遺伝子操作による巨大化の誘導は行っていない。

そこで、巨大化に影響を与える要因を明らかにするため、インキュベーション時における金属塩組成について検討したところ、デイノコッカス・グランディスのスフェロプラストがカルシウムイオンあるいはマグネシウムイオンを巨大化に必要とすることを明らかにした。しかし、バクテリアの種によって、各金属イオンの影響は違っており、共通性はなかった。興味深いことに、金属塩組成を変えることによって、細胞膜の強度が変化し、マイクロインジェクションの効率を飛躍的に上昇させることが可能であった。

さらに、プロトプラストやスフェロプラストの巨大化にともなって、DNAの複製が生じており、その複製をノボピオシンで阻害したところ、巨大化が強く抑制されることを明らかにした。このことは、細胞分裂を生じていない巨大化においても複製が細胞膜の伸張に必要であることを示す。さらに、マイクロインジェクション可能な20 μm 直径を超えるまで巨大化した細胞内には液胞が形成され、その形成様式は生物種によって異なることを明らかにした。すなわち、DNAの複製、細胞膜の伸張、液胞形成には共通する機構があると考えられる。

外膜を持っていないグラム陽性の乳酸菌であるエンテロコッカス・フェカリスの巨大プロトプラストを用いて、異種ゲノムDNAのマイクロインジェクションの実験を行った。コントロールとしてマイクロインジェクション操作をしていない20の巨大細胞を用い、エンテロコッカス・フェカリス自身のゲノムを導入した17の細胞、および系統進化上大きく離れている7種のバクテリア（ラクトコッカス・ラクティス、ラクトバチルス・カルバタス、枯草菌、大腸菌、レリオットィア・アムニゲナ、エリスロバクター・リトラリス、デイノコッカス・グランディス）のゲノムを導入した合計109の細胞に対してプロトプラストの巨大化における細胞直径の変化をマイクロインジェクション後1時間毎、20時間にわたってタイムラプス観察し、測定した（図1）。

その結果、大半の細胞は巨大化を停止させることなく、継続して巨大化した。このことから、異種ゲ

ノムの導入によっても宿主細胞は死ぬことなく、生命活動を続けたことを示す。そこで、その巨大化の変化がコントロールと比較して違っているかどうかをクラスター解析および統計学的検定によって調べたところ、エンテロкокカス・フェカリス自身のゲノムおよび7の異種ゲノムの中4ゲノム（ラクトバチルス・カルバタス、枯草菌、大腸菌、レリオツティア・アムニゲナ）においては、コントロールと有意に違っており、多くの細胞の巨大化のレベルが低下していた。それに対して、7の異種ゲノム中3ゲノム（ラクトコッカス・ラクティス、エリスロバクター・リトラリス、デイノコッカス・グランティス）については、導入後もコントロールと変わりなく巨大化したことを示した。すなわち、エンテロкокカスと同じグラム陽性であるラクトバチルスと枯草菌はエンテロкокカスのゲノム導入と類似の巨大化パターンであったが、グラム陽性であるラクトコッカスは異なる巨大化パターンであった。また、グラム陰性である大腸菌とレリオツティアがエンテロкокカスと同じ巨大化パターンであったが、エリスロバクターとデイノコッカスは異なる巨大化パターンであった。この結果より、異種ゲノムによってプロトプラスト巨大化における影響が違っていたが、その違いは導入したゲノムの生物進化を反映したものではないことを明らかにした。

本研究では、これまでに不可能であった1度の操作によって、バクテリアのゲノムサイズの長鎖DNAを導入することに成功した。その成功率を上げるための巨大細胞の調整方法の確立も行い、短期間において、100を超える巨大細胞への長鎖DNAのマイクロインジェクションを成功させた。本研究成果は、ゲノム工学および細胞工学における一里塚となった。

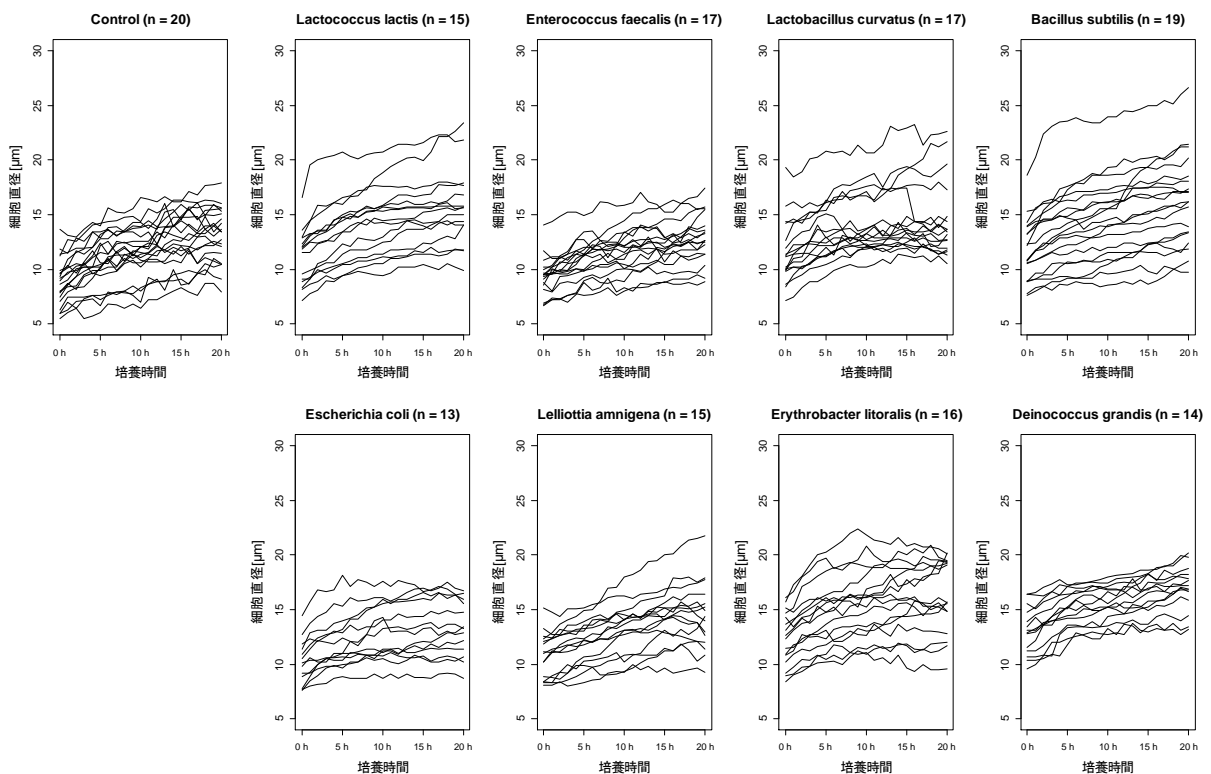


図1 バクテリアのゲノムをエンテロкокカス・フェカリスの巨大プロトプラストに導入してからの細胞直径の変化

審査の結果の要旨

高橋沙和子さんは、2020年11月4日に開かれた予備審査会の段階で原著論文8報（第一著者4報）を発表しており、その中の3報（下記に引用しているもの）を論文目録に記載した。さらに、予備審査会で指摘された課題を公聴会までに解決し、そこで発表した。

高橋さんは、遺伝子操作を用いることなく、バクテリアのプロトプラストあるいはスフェロプラストを巨大化する方法を確立した。さらに、巨大細胞がマイクロインジェクションにおける微小ガラス管の挿入に耐えうる細胞膜強度を有するために、インキュベーションにおける培地の金属塩組成を調整することが有効であることを明らかにした。

このバクテリア細胞の巨大化において、細胞は分裂しないにもかかわらず、DNAの複製が行われていることを示し（Takahashi and Nishida, *J Gen Appl Microbiol* 61, 262-265）、さらにDNAの構造維持や細胞表層に関連する遺伝子の巨大化による発現変動を逆転写定量PCRによって調べた（Takahashi et al., *Gene Rep* 7, 87-90）。また、マイクロインジェクションが可能なサイズまでバクテリア細胞を巨大化した場合、必ず細胞内部に液胞が形成されることを明らかにし、その形成様式はバクテリアの種によって異なっていることを明らかにした（Takahashi et al., *Sci Rep* 10, 8832）。バクテリアのプロトプラストやスフェロプラストの巨大化機構を明らかにしつつ、それらの細胞へのマイクロインジェクションの成功率を上げた。グラム陽性およびグラム陰性のバクテリアのそれぞれの巨大細胞の細胞質へ蛍光タンパク質をマイクロインジェクションし、蛍光顕微鏡によって導入した蛍光タンパク質を確認した（Takahashi et al., *Sci Rep* 10, 8832）。ここまでの予備審査会での報告であったが、予備審査会において、その技術を用いて実際にゲノムサイズのDNAの導入実験を行うという課題が指摘された。

そこで、高橋さんは予備審査会后、グラム陽性バクテリアである乳酸菌エンテロコッカス・フェカリスを宿主巨大細胞として、その細胞質に、自身のゲノムおよび7種の系統進化上異なるバクテリアのゲノムのマイクロインジェクションを行い、その総数は126細胞におよんだ。バクテリア細胞へのマイクロインジェクションの成功は蛍光タンパク質導入の報告が初めであったが、実際にゲノムサイズの長鎖DNAを1度の操作によって、簡便にバクテリア細胞に導入できることを示した意義は極めて大きい。ゲノム導入後の126の細胞巨大化の様子を経時的に顕微鏡観察し、エンテロコッカス自身のゲノムおよび7種の異種ゲノム中4種において、何もインジェクションしていないコントロールと有意に巨大化のレベルやスピードが違っていることを明らかにした。また、3種の異種ゲノムにおいては、コントロールとの有意差はなかった。これら有意差が生じたものとしていないものを比較したところ、導入したゲノムのバクテリアの系統進化的な違いが細胞の巨大化に影響していないことを明らかにした。導入したゲノムDNAの宿主細胞内における動態などの課題も残るが、ゲノムサイズの長鎖DNAを遺伝子操作していないバクテリア細胞へ1度の操作によって導入し、その細胞が死ぬことなく生きて巨大化したことを実験によって観察し、確認したことは間違いのないことであり、画期的な成果である。本成果は直ちに原著論文としてまとめ、高橋さんの9報目として現在投稿中である。

2021年1月20日に博士論文の審査及び最終試験を実施し、高橋沙和子さんは当該分野および周辺分野に関して博士としての十分な全般的知識を持ち、学術研究にふさわしい討論ができ、独立して研究を遂行する能力を有するものと判定し、博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。