

第5回研究助成

海洋を漂うプラスミド DNA が生物進化に与える影響

プロジェクトリーダー

西田洋巳 富山県立大学 生物工学科

プロジェクトメンバー

高橋裕里香 富山県立大学 生物工学科

畠俊郎 富山県立大学 環境・社会基盤工学科

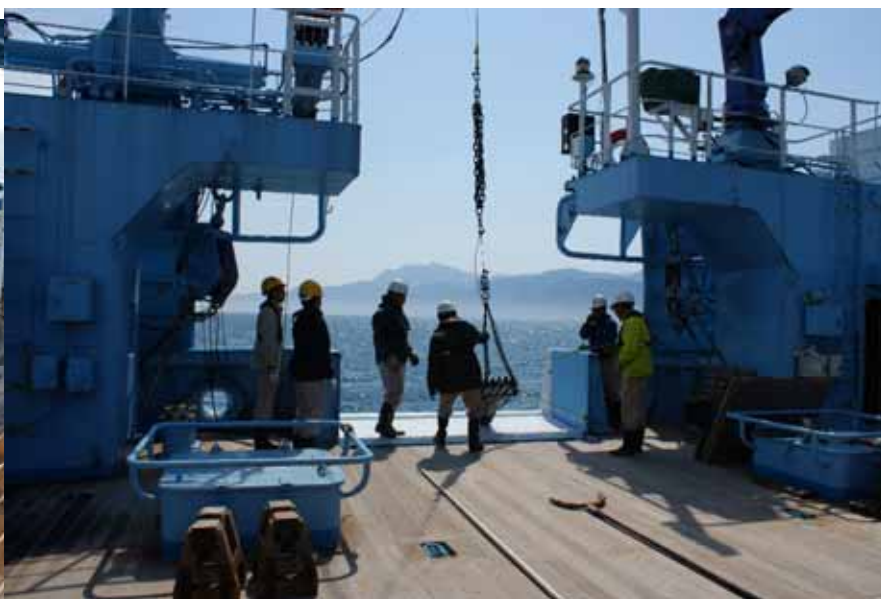
野尻秀昭 東京大学 生物生産工学研究センター



左写真
サンプル



右写真
の様子
(の長崎丸)



1. 研究の背景と達成目標

約40億年前に生命は海で生まれ、それ以降途絶えることなく継承されている。よって、DNAレベルにおいても進化は進行し、生物情報はDNAの塩基配列に刻まれ続けている。また、遺伝情報の水平伝播がなければ、生物多様性は実現していないと考えている。バクテリアのような微生物における水平伝播はプラスミドとウイルスが中心的役割を担っている。多くのプラスミド研究が宿主細胞内に存在しているプラスミドを研究対象としているが、本研究では、細胞外DNAに注目し、海における細胞外DNAの動態を明らかにして、ゲノムおよび生物の進化とのかかわりを明らかにする。そのため、富山湾より海水および海泥サンプルを採取して、そこから細胞、ウイルス、細胞外面分に分け、それぞれのDNAを抽出、精製し、それらの塩基配列を網羅的に決定し、比較する。さらに、細胞外DNAの機能解析のため、バクテリア細胞を巨大化し、その細胞にマイクロインジェクションによって、細胞外DNAを導入する。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

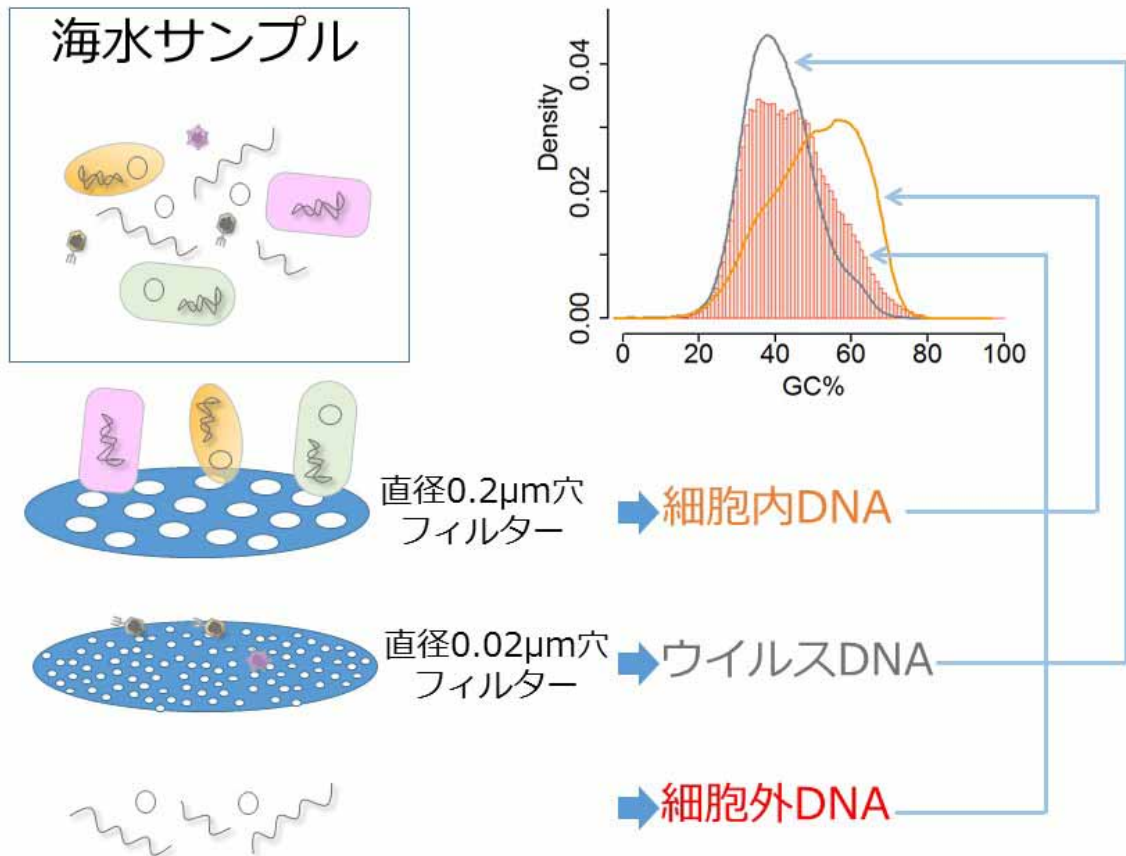
- 富山湾は約500種の魚介類が生息する「天然の生け簀」であり、蜃気楼や埋没林といった珍しい自然現象から「神秘の海」とも称される。2014年には世界で36湾目となる「世界で最も美しい湾クラブ」への加盟も果たしている。急峻な海底地形が特徴で、最大水深は1000メートルを超え、湾からわずか数10キロメートルの距離に位置する立山連峰との高低差は4000メートルに達する。富山湾の海水は層構造をとっており、海表面から水深300メートルでは、日本海を北上する対馬暖流が流動しており、南方の魚介類を運ぶとともに、沿岸部では立山連峰に源を発する栄養豊富な河川水と混じり合い、藻類や光合成細菌が繁殖しやすい環境を作っている。一方で、水深300メートル以深には1年を通して水温1~2℃の日本海固有水(深層水)が横たわり、深海性の生物のすみかとなっている。このように富山湾では狭い範囲に多様な海中環境が作り出されている。毎年5月に行われる長崎丸の富山湾での調査航海において、3年間で14地点からサンプリングを行い、各地点より海水サンプルおよび海泥サンプルを得た。
- 孔径0.2マイクロメートルの限外ろ過フィルター上に残ったものを細胞、孔径0.02マイクロメートルの限外ろ過フィルター上に残ったものをウイルス、そこを通過したものを細胞外の分画として、DNAを分けた。同一地点からのサンプルを3つに分画し、それらの比較を行ったことは意義深い。
- それぞれのDNAを網羅的に大量並列型DNAシーケンサーMiSeq(本研究助成によって購入)で塩基配列を決め、73の異なるDNAシーケンスデータを得た。
- DNAシーケンス断片における塩基組成(グアニン・シトシン含量、GC含量)やゲノムシグネチャー(数塩基シーケンスの出現頻度)から、細胞外DNAの95%以上がデータベースに登録されている塩基配列に類似性がなく、また細胞およびウイルス由来のDNAとはパターンが違っていた。ただ、海水サンプルでは、細胞外DNAはウイルスDNAに、海泥サンプルでは、細胞外DNAは細胞DNAに近い傾向にあった。
- グラム陰性細菌である*Lelliottia amnigena*をスフェロプラストにして、その細胞を細胞壁合成阻害剤であるペニシリンを含むマリン培地で培養し、その外膜直径を36マイクロメートルまで巨大化した。ただし、内膜は15マイクロメートルで伸長が止まった。
- この巨大化スフェロプラストに対して、墨汁をマイクロインジェクションした。これは、バクテリア細胞に対する世界で初のマイクロインジェクションの成功であると考えている。

3. 研究成果

3-1. 富山湾サンプルからの DNA の網羅的シーケンス解析

本研究では、海水 15 リットル～20 リットルより限外ろ過を行い、DNA を濃縮、脱塩した。また、海泥については、リン酸緩衝液を加えて懸濁し、遠心によって細胞や鉱物粒子を沈殿させ、上澄みに対してフィルターによる分画を行った。下図に実験の方法および DNA シーケンス結果からの GC 含量の分布の一例を示す。

海水サンプル中のDNAの分画



この例では、細胞外 DNA の GC 含量の分布は細胞内 DNA よりもウイルス DNA のそれに近いことを示す。この傾向は海水サンプルでは一般的であったが、海泥サンプルからの細胞外 DNA の GC 含量の分布は、細胞内 DNA のそれに近い結果であった。また、ゲノムシグネチャー解析においても、その傾向を確認できた。また、異なるサンプル地点における細胞外、細胞内、ウイルス DNA の類似度を比較したところ、海水における細胞外 DNA の流動性は海泥よりも極めて高いことを確認できた。

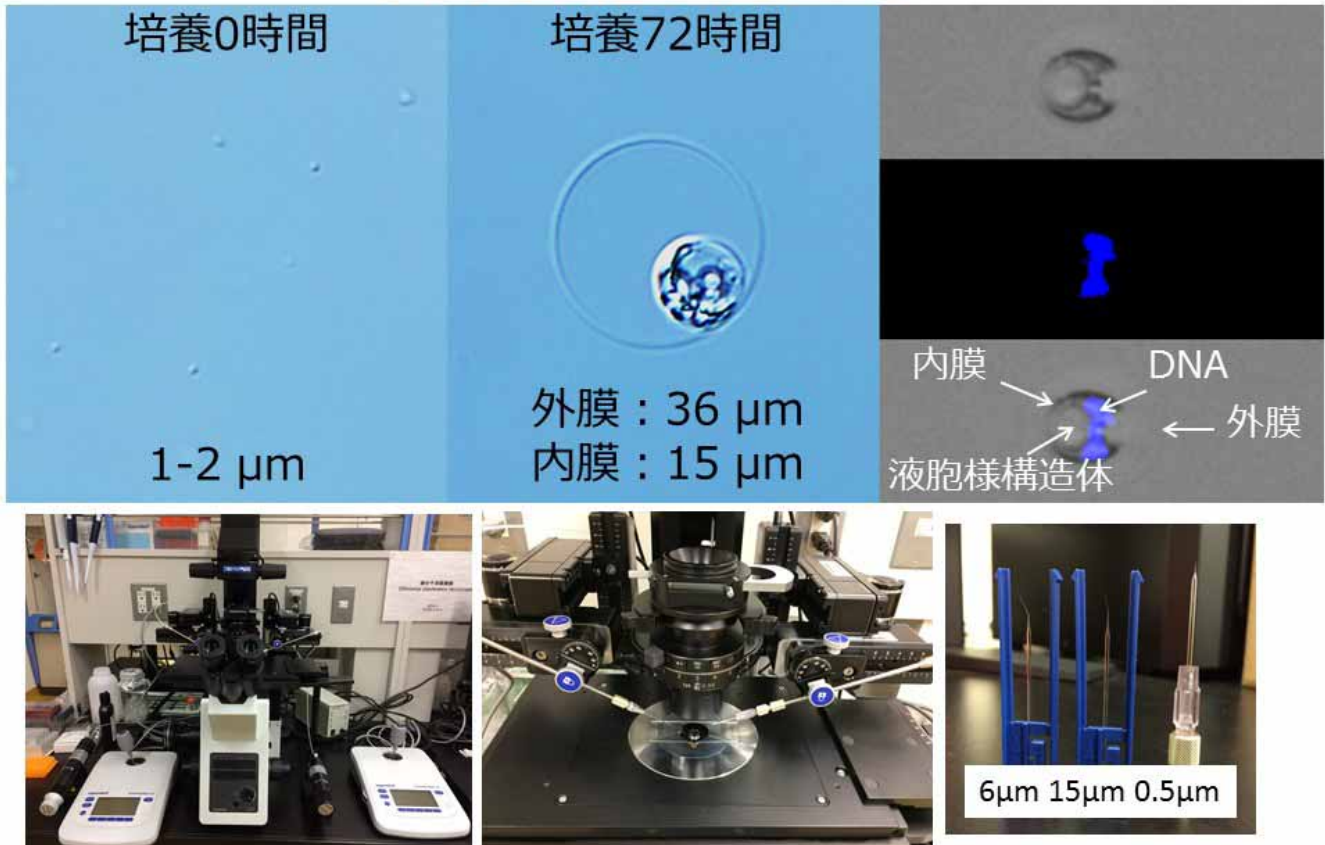
DNA 塩基配列をデータベースで検索したところ、細胞外 DNA の 95% 以上が既知の配列と類似性を持たないことがわかった。これらの DNA も細胞内で合成されたと考えられることより、細胞外 DNA には生物進化の鍵なる DNA (例えば、何億年も海を漂っている古代 DNA など) が存在している可能性が高いと考えている。

DNA シーケンス解析において、プラスミドやウイルスなどの転移性因子に関してさらに解析したところ、海水中の細胞外 DNA には細胞内よりも多様な転移性因子由来の配列が含まれていることが明らかになった。特にプラスミド関連遺伝子は、同じサンプルの細胞内に検出された種類と大きく異なっていた。

3-2. 細胞外 DNA 導入に向けたバクテリア細胞の調整

細胞外 DNA の機能を探るためには、それらの DNA がバクテリア等の細胞内において機能を持つか否かを判断する実験系を持つ必要がある。そこで、バクテリア細胞を巨大化して、そこにマイクロマニピュレーターを用いて、細胞外 DNA を導入するシステムの構築を行った(下図参照)。

スフェロプラスト巨大化と マイクロマニピュレーター



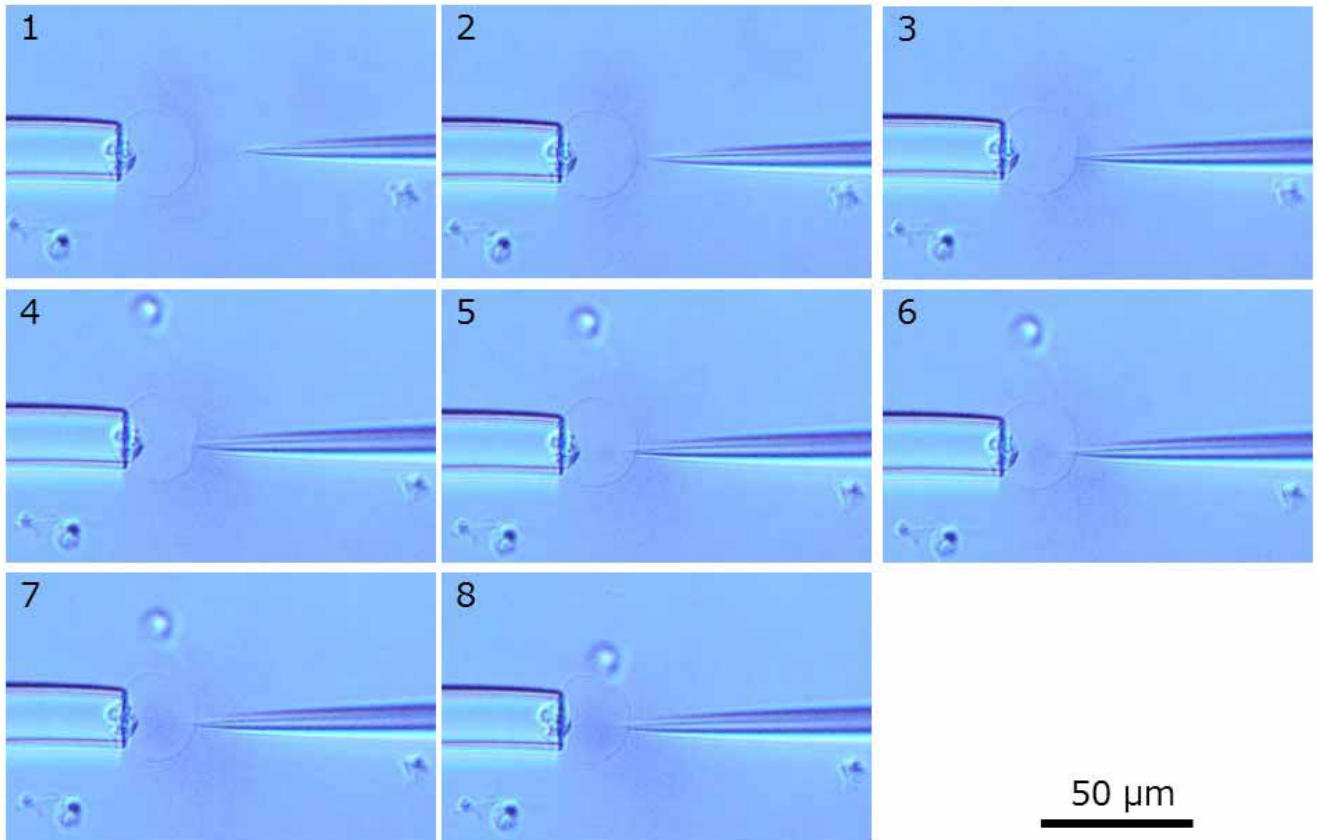
通常のバクテリア細胞は、1-2 マイクロメートル程度のサイズを持っている。他方、マイクロマニピュレーター操作でのマイクロチップ(フェムトチップ)の先端の孔径は 0.5-0.7 マイクロメートルである。よって、通常の 2 分裂している大腸菌や枯草菌などのバクテリアに対して、マイクロインジェクションを行うことはできない。

そこで、バクテリア細胞をリゾチーム処理によってスフェロプラスト化し、そのスフェロプラストを高浸透圧かつペニシリンなどの細胞壁合成阻害剤存在下で培養し、巨大化させた。高浸透圧条件は海水と同じ塩濃度に調整されているマリン培地を用いた。この方法で培養した細胞は、2 分裂することなく、それぞれの細胞が巨大化する。これまでに、大腸菌 *Escherichia coli*、腸内細菌科に属する *Lelliottia amnigena*、紅色光合成細菌であり好気性の *Erythrobacter litoralis* および通性嫌気性の *Rhodospirillum rubrum* のスフェロプラストの巨大化に成功した。上図は、*L. amnigena* の巨大化スフェロプラストを示す。われわれが実験に用いたバクテリアはすべてグラム陰性細菌であり、外膜と内膜を持つ。上図の *L. amnigena* のように巨大化とともに内膜と外膜が乖離し、ペリプラズム領域が巨大化したものはほかにない。例えば、大腸菌の場合には、15 マイクロメートル直径程度で巨大化は停止し、顕微鏡で観察する限りにお

いて、内膜と外膜の乖離は見られない。

L. amnigena の 30 マイクロメートル直径を超える巨大化スフェロプラストに対して、墨汁の導入実験を行った(下図参照)。図において紫色に見えるものが墨汁である。写真の 4 と 5 において、外膜にフェムトチップが突き刺さったことを示し、6 から 8 にかけてペリプラズム領域に墨汁が導入されたことを示す。この実験結果より、巨大化スフェロプラストに対するマイクロインジェクションができることがわかった。

巨大化細胞へのマイクロインジェクション



4. 今後の展開

現在、富山湾から収集した DNA の網羅的シーケンス解析の結果を総括している。また、シーケンスデータの一部を原著論文としてまとめ、投稿中である。今後は、データベースへの塩基配列の登録、公開とともに原著論文として、適宜まとめて発表する予定である。

富山湾には、黒部川、常願寺川、神通川、庄川、小矢部川の 5 つの一級河川が注ぎ込んでいる。今後、これらの河川における DNA 解析を行い、富山湾における細胞外 DNA の多様性と河川との関連について考察する。

海における進化の中心に細菌が存在していると考えている。よって、現在においても、細胞外 DNA が細菌細胞に取り込まれ、細菌の多様性、進化が生じていると考えている。今回の実験結果より、細菌細胞をスフェロプラスト化し、その細胞を巨大化することによって、マイクロインジェクションによる細胞外 DNA の導入が可

能な段階までできている。富山湾から抽出、精製した細胞外 DNA をバクテリア細胞に導入することによって、それらの機能解析を行う。そのためには、巨大化し、細胞外 DNA を導入した細胞が脱巨大化して、もとの 2 分裂する細胞に戻ることが望ましい。これまでの予備実験より、巨大化培養時間が長くなればなるほど、寒天培地上におけるコロニー形成の頻度が下がることがわかっており、脱巨大化が困難になっていることを示した。このような基礎的な実験検証を行いながら、確実に実験、研究を発展させる所存である。

また、本研究課題とは異なるが、巨大化バクテリア細胞へのマイクロインジェクション技術は、ゲノム DNA などの長鎖 DNA をバクテリア細胞へ導入することを可能とする。この技術は、バクテリアにおける細胞工学とゲノム工学の発展に大きく寄与すると考えている。

5. 発表実績

- Nishino K, Nishida H (2017) Blue light inhibits the enlargement of *Erythrobacter litoralis* spheroplasts. Journal of General and Applied Microbiology [in press]
- Takahashi S, Nishida H (2017) Comparison of gene expression among normally divided cells, elongated cells, spheroplasts at the beginning of growth, and enlarged spheroplasts at 43 h of growth in *Lelliottia amnigena*. Gene Reports 7, 87-90
- Nakazawa M, Nishida H (2017) Effects of light and oxygen on the enlargement of *Erythrobacter litoralis* spheroplasts. Journal of General and Applied Microbiology 63, 58-61
- Takahashi S, Takayanagi A, Takahashi Y, Oshima T, Nishida H (2016) Comparison of transcriptomes of enlarged spheroplasts of *Erythrobacter litoralis* and *Lelliottia amnigena*. AIMS Microbiology 2, 152-189
- Takahashi S, Nishida H (2016) Growth of *Enterobacter amnigenus* and *Escherichia coli* spheroplasts in marine broth containing penicillin. Bulletin of Toyama Prefectural University 26, 27-30
- Takayanagi A, Takahashi S, Nishida H (2016) Requirement of dark culture condition for enlargement of spheroplasts of the aerobic anoxygenic photosynthetic marine bacterium *Erythrobacter litoralis*. Journal of General and Applied Microbiology 62, 14-17
- Takahashi S, Nishida H (2015) Quantitative analysis of chromosomal and plasmid DNA during the growth of spheroplasts of *Escherichia coli*. Journal of General and Applied Microbiology 61, 262-265
- 高橋裕里香, 中野椋太, 宮西謙弥, 畠俊郎, 西田洋巳; 遺伝子水平伝播への細胞外プラスミドの寄与の可能性; 日本農芸化学会 2016 年度大会シンポジウム「環境中の遺伝情報トランスポーズと細菌ゲノム進化について考える」; 札幌; 2016 年 3 月 30 日
- 高橋沙和子, 高柳綾奈, 西田洋巳; 細菌のスフェロプラスト培養時における多様性 [優秀ポスター賞受賞]; 第 8 回北陸合同バイオシンポジウム; 加賀; 2015 年 10 月 30 日
- 野尻茜, 西田洋巳; 紅色細菌の細胞巨大化および脱巨大化 [カッティング・エッジ賞受賞]; 第 7 回北陸合同バイオシンポジウム; 富山; 2014 年 11 月 28 日