

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文概要

論文題目

糸状シアノバクテリア *Pseudanabaena* sp. NIES-4403が形成する運動
集団とコロニーパターンの解析

Analysis on moving clusters and colony pattern of the filamentous
cyanobacterium, *Pseudanabaena* sp. NIES-4403.

申請者

山本 宏輝

Hiroki YAMAMOTO

電気・情報生命専攻 細胞分子ネットワーク研究

2022年5月

生物は高度に秩序化された細胞内機構あるいは個体内の統御機構を持つが、環境中では同種あるいは異種の生物が多数混在する中で生命活動を営んでいる。結果として、微生物から高等生物まで様々な生物群と、水、空気、養分などの環境要因が時空間的に遷移していく複雑な生態系を構成する。独立した個々の生命がそれぞれの利益を求めるため、ときに競争し捕食し捕食され、ときに共生するなど直接的または間接的な相互作用により結ばれている。さらに長い時間スケールでは、交配や世代継代に伴う環境適応が加わり、個々の生命が持つ能力は多種多様に変化する。また、鳥の編隊飛行や魚の群泳といった群行動に代表されるように、生物は同種または他種を交えた群衆や集団を形成する。群衆が一体となり行動するためには、多個体間の調和した相互作用、さらに調和した相互作用を生み出す各個体の機構や仕組みが必要となる。素朴には、調和した相互作用には広範な時空間の認識能力や計算能力、あるいはそれを俯瞰するリーダーなどの高度な機能が必要だと感じられるが、これらの群行動の多くは簡素なモデルでも模倣や再現できる場合がある。群行動は微生物から高等生物、さらにはソフトマターやロボットなど幅広い対象で研究されており、その多様性と背後に潜む類似した構造の解明が期待されている。

微生物もまた、生物群集を形成する。例えば単一または複数種の微生物が細胞外物質を介して形成するバイオフィルムは、外環境からの刺激を防ぎ、好適環境に長期間滞在することを可能にする。さらに、微生物集団が土壌や砂を巻き込んで長期的に成長すると、ストロマトライトなどの高次の構造体を形成することもある。バクテリアなどの微生物が寒天培地上で描くコロニーパターンもまた、実験環境中で微生物が行う群行動の結果と考えることが可能である。バクテリアは高等生物に比べ微小かつ世代時間が短く、群全体の観察や環境操作が容易なため、群行動の研究に適している。本研究で扱う光独立栄養生物、シアノバクテリアは光合成を行う原核微生物で、地球上の炭酸固定の5割近くを担っており、形態や機能も多岐にわたる。そのため、特徴的なコロニーパターンを呈する種が少なくない。

筆者の所属する研究室で独自に単離された *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 株（以下、NIES-4403 株）は、特徴的なコロニーパターンを呈する株として早稲田大学構内から岩崎により分離された株で、寒天培地上では目視可能なミリメートル単位の細胞集団が動き回る。この巨大な集合体は、長距離を移動する彗星状コロニーと、定点で回転し続ける円盤コロニーに大きく分類される。単独の個体（フィラメント）でも滑走運動を行い、数個体が集合して束を形成したり、小規模の渦を形成したりする場合もある。本研究は、この NIES-4403 株が呈する巨大な運動性コロニーの挙動や形成過程、個々の個体の振る舞いを解析し、集団の形成機構やその特徴を解明することを目指すとともに、コロニーパターンが大きく変化する変異体の分離とゲノム DNA 解析を行い、遺伝学的な解析の基礎を構

築することを目指した。

本論文は四章で構成される。第一章では序論として、本研究を遂行する上での目的を明確にするため、生物集団、特に微生物集団の先行研究で得られている知見について述べた。さらに具体的に、微生物集団の形態に大きく関わる運動機構やコロニーパターンについて述べ、最後に本研究で用いられる NIES-4403 株を用いた背景について述べた。

第二章では、主に顕微鏡観察と画像解析を用いて、NIES-4403 株が呈するコロニーパターンの特徴や、そのパターン形成に関わる現象について報告した。NIES-4403 株を寒天培地中央に植菌すると菌体は増殖し、一定期間後に複数の彗星状コロニーが発生して植菌位置から遠方へと移動した。さらに一部の彗星状コロニーは回転する円盤コロニーへと遷移し、結果として散在的に円盤コロニーが存在するドット状のコロニーパターンを呈した。枯草菌の一種 (*Bacillus circulans* や *Paenibacillus*) でも類似したコロニーパターンが報告されており、近縁種の *Pseudanabaena galeata* でもごく簡単な報告はあるが、これらのコロニーパターンの形成過程やメカニズムはあまり明らかになっていない。そこでまず、NIES-4403 株で見られる巨大な運動性コロニーの性質を詳しく解析した。共焦点顕微鏡によるタイムラプス撮影画像を粒子画像流速測定法 (PIV) により解析したところ、彗星状コロニー内全体で個々の個体 (フィラメント) の運動方向と速度は斉一化されており、集団として著しく一体化されていることがわかった。円盤コロニーでは、中心からの距離に従って流速が上昇すること、つまり角速度が全体で揃う傾向があることを確認した。これは彗星状コロニー、円盤コロニーどちらの内でも菌体は整列しながら運動し、コロニー内での相対的な位置が変化しないことを示唆している。結果としてコロニーの形状は非常に安定しており、特に円盤コロニーは数日間同じ位置で回転運動を続ける様子も確認された。原子間力顕微鏡による観察により、細胞表面に線毛らしき繊維が確認されたことから、フィラメント同士が線毛により接着している可能性も考えられる。

個体の速度を測定したところ、条件により幅広い速度分布を示すことが示唆された。単独の個体は個体長に応じて速度が上昇した。彗星状コロニーの速度は最大で単一個体の 2 倍近くに達し、円盤コロニーの外周の速度の最大値は、さらに彗星状コロニーの 2 倍近くに達した。このような幅広い速度分布を許容する機構には幾つかの可能性があるが、その一つとして運動時に培地表面との摩擦を軽減する細胞外物質の存在が考えられた。実際、彗星状コロニーや個体が移動した跡には、何らかの物質が残留することが示唆され、先行する個体集団が通過した軌跡を後続の集団が通過する時には急激に速度が上昇することが分かった。レクチンやアルシアンブルーによる染色結果から、特に彗星状コロニー近傍には、多糖類が多く分泌されていることが示唆された。

以上の結果から、単個体から円盤コロニーまでの遷移について以下の仮説を導

いた。まず個体同士は衝突を介して整列化し，さらに進行方向を被覆する個体を得て小さな彗星状の集団を形成する。この小さな集団同士が衝突による合流を繰り返してより大きな彗星状コロニーへと成長する。彗星状コロニーは，確率的に，もしくは局所的な培地環境の影響を受けて進行方向が揺らぐ。このため，しばしば円軌道を形成する場合がある。一旦円軌道を形成すると，多くの場合それは安定であり，最終的に閉起動内のコロニーの先頭と尾が繋がって安定的な回転運動を続ける円盤コロニーへと遷移する。こうしたコロニー形成の背後に潜むメカニズムについて，さらに議論と予測を行い，コロニーの形成が実環境で微生物に与える意義を議論した。

第三章では，コロニーパターン形成に寄与する要因を分子レベルで探索する一助として，コロニーパターンが大きく変化する自然変異株の分離と，標準株と変異株のゲノム解析および一塩基多型（SNPs）の探索を試みた。まず，NIES-4403株から，彗星状コロニーや円盤コロニーを形成しない変異株の分離を報告した。興味深いことに，その個体の長さは標準株の1/4程度と短く，液体培地中でも標準株に比べて凝集が少ない。そこで，標準株の *de novo* ゲノムシーケンスと変異株ゲノムのシーケンス解析を行い，ゲノム DNA 上の変異箇所の抽出と，原因遺伝子の探索を試みた。まず，標準株のゲノム DNA 配列を次世代シーケンサーによる *de novo* ゲノムシーケンスを行ったのち，確定できなかった部位をダイレクトシーケンスにより補完的に解析することで，99.7%以上のゲノム DNA の塩基配列を決定した。変異株のゲノム DNA には多くの SNPs を確認したが，このうち，タンパク質の配列に影響を及ぼすと予測された変異は5箇所あり，それぞれ膜間輸送タンパク質 Sh1B，メチル基転移酵素，NTPase をコードする遺伝子上などにマッピングされた。現状では NIES-4403 株の形質転換系は開発できておらず，分子遺伝学的にこれらのどの変異がコロニーパターンや個体長に影響するかを検討することはできないが，ありうる可能性について議論した。

第四章では，最新の微生物を含むアクティブマターやバイオフィルムの研究成果を踏まえ，第二章と第三章に記述した知見から，シアノバクテリアの運動，集団形成の意義について総合的に議論した。また，今後行っていくべき解析について述べ，今後の展望として，微生物全般のみならず，高等生物や非生物の自己組織化現象を解明する一助となることを期待する旨まとめた。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名： 山本 宏輝

印

(2022年 4月28日現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
原著論文	○Yamamoto H, Fukasawa Y, Shoji Y, Hisamoto S, Kikuchi T, Takamatsu A, Iwasaki H. "Scattered migrating colony formation in the filamentous cyanobacterium, <i>Pseudanabaena</i> sp. NIES-4403." BMC Microbiol. 21, 227 https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5 , 2021年8月
国際学会発表	○Yamamoto H, Fukasawa Y, Shoji Y, Kikuchi T, Kobayashi H, Hirose Y, Iwasaki H. "Morphological and genome analysis of cluster forming cyanobacterium <i>Pseudanabaena</i> sp. NIES-4403." 11th European Workshop on the Biology of Cyanobacteria. Porto, 2020年9月
学会発表	馬橋博太, 山本宏輝, 広瀬侑, 岩崎秀雄「運動性シアノバクテリア <i>Pseudanabaena</i> と <i>Geitlerinema</i> のゲノム解析」 藍藻の分子生物学2015, 木更津, 2015年11月
学会発表	山本宏輝, 東海林祐, 深澤有貴, 小林大晃, 広瀬侑, 岩崎秀雄「糸状性シアノバクテリア <i>Pseudanabaena</i> sp.の集団形成パターンに対する個体長の影響」 「細胞を創る」研究会8.0, 吹田市, 2015年11
学会発表	山本宏輝, 小林大晃, 深澤有貴, 岩崎秀雄「運動性シアノバクテリア <i>Pseudanabaena</i> sp.のコロニーパターン解析」 微細藻類研究会2014, 岡崎, 2014年12月
学会発表	東海林祐, 山本宏輝, 深澤有貴, 岩崎秀雄「運動性シアノバクテリア <i>Pseudanabaena</i> sp. ILC 545 の「彗星状コロニー」の形成ダイナミクス」 第52回日本生物物理学会年会, 札幌市, 2014年9月
学会発表	山本宏輝, 深澤有貴, 岩崎秀雄「運動性シアノバクテリア <i>Pseudanabaena</i> sp. ILC 545の集団パターン形成ダイナミクス」 第55回日本植物生理学会年会, 富山市, 2014年3月