

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.

2022年7月

山本 宏輝  
Hiroki YAMAMOTO

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.

2022年7月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科  
電気・情報生命専攻 細胞分子ネットワーク研究

山本 宏輝  
Hiroki YAMAMOTO

<b>第一章 序論</b> .....	<b>5</b>
生物が形成する時空間パターン .....	5
バクテリアの形成する集団とコロニーパターン .....	5
バクテリアの運動機構 .....	7
シアノバクテリアのコロニー・パターンと運動機構 .....	8
<i>Pseudanabaena</i> sp. NIES-4403 株の単離とその背景 .....	10
バクテリアのコロニーパターンに関する数理モデルによる解析 .....	13
本論文の構成 .....	14
<b>第二章 <i>Pseudanabaena</i> sp. NIES-4403 株のコロニーパターンと運動, 集団形成</b> .....	<b>15</b>
要旨 .....	15
序論 .....	15
材料および手法 .....	18
結果 .....	24
<i>Pseudanabaena</i> sp. NIES-4403 のコロニーパターン .....	24
ランダムな乗算プロセスが散在的なコロニーパターンの裏側に潜んでいる .....	27
彗星状コロニー .....	29
円盤コロニー .....	36
束状コロニーと単個体 .....	41
細胞の増殖につれて線状・樹状コロニーから小集団へと変化 .....	46
コロニーパターンの遷移 .....	47
まとめ .....	48
<b>第三章 短個体長変異株との比較およびゲノム解析</b> .....	<b>51</b>
要旨 .....	51
序論 .....	51
材料および方法 .....	52

結果と考察.....	56
個体長変異株の分離, コロニーパターンと特徴.....	56
標準株 NIES-4403 の <i>de novo</i> ゲノム DNA 解析.....	58
短個体長変異株の変異解析と変異遺伝子の特徴.....	63
まとめ.....	66
<b>第四章 総合討論.....</b>	<b>69</b>
引用文献.....	74
謝辞.....	84
動画リスト.....	85

## 略語・用語一覧

CDF: Cumulative distribution function (累積分布関数)

CDS: Coding Sequence

COGs: Clusters of Orthologous Genes

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

EPS: Extracellular Polymetric substrate (文献によっては Extracellular polysaccharide)

hps: hormogonium polysaccharide

JPC: Junctional pore complex

KS: Kolmogorov-Smirnov (value)

NIES: National Institute of Environmental Science (Collection)

ORF: Open Reading Frame

PCR: Polymerase chain reaction

PDF: Probability distribution function

peg: protein encoding gene

pil: pilin

PIV: Particle image velocimetry

*Pseudanabaena* (後ろに種名が続かない場合) : *Pseudanabaena* sp. NIES-4403

RAST: Rapid Annotations using Subsystems Technology

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

TE: Tris-EDTA

## 第一章 序論

### 生物が形成する時空間パターン

生物は様々な時空間パターンを形成する。単体の生物に着目すると、高度に形成された細胞内機構、あるいは細胞同士の分業された機構の連携により生物個体は構成されている。結果として視覚的な空間パターンとしては、高等生物の発生過程に始まり (Stricker, 1996; Kondo, 1992), 魚の体表の模様 (Kondo and Arai, 1995; Inaba *et al.*, 2012), 蝶の翅模様 (Sekimura *et al.*, 2015), 葉序や花卉の順序 (Yonekura *et al.*, 2019; Kirie *et al.*, 2020) など様々なかたちとして表れる。これらのパターンは多くの因子や要因が絡み合うことが予想され、非常に複雑に見えるが、一部はチューリングモデルを始めとした数理モデルなどで再現されており (Kondo and Arai, 1995), 根底部分には単純だが洗練された機構が潜んでいる可能性がある。生物の呈する時空間パターンは単体の生物個体上に限らず、例えば渡り鳥の集団飛行 (Hayakawa *et al.*, 2010) や魚の群泳 (Weihs, 1973) など、複数個体が相互作用して示す事例も多い。実環境では多くの同種および異種の生物が混在し、影響しながら環境を構築している。このような個体間の相互作用によってもたらされる生物群集の研究は、個体内の機構に関する研究同様に重要である。生物の群行動は多個体間の相互作用の結果であり、生物の生存戦略や幅広い階層での群行動システムの解明が期待される。

### バクテリアの形成する集団とコロニーパターン

群行動、特に集団での運動は高等生物に限った話ではない。多くのバクテリアには運動能があり、運動を伴う集団行動は広い範囲で観測されている。たとえば大腸菌の液体培地中での鞭毛による集団遊泳は、単独遊泳の時に比べてエネルギーおよび速度の面から効率的と示唆されている (Ishikawa *et al.*, 2011)。また、多くのバクテリアはバイオフィーム (固体や液体の表面に多くの個体が集合して形成される膜状構造) を形成して好適環境に固着しつつ、外部刺激から身を守る防御行動をとる (Flemming and Wingender, 2010; O'Toole *et al.*, 2000; Schatz *et al.*, 2013)。この際、特定の個所に移動するためにも、あるいは逆に逃避するためにも、バクテリアはしばしば凝集した状態で移動する (Kobayashi *et al.*, 2016; Henriksen and Svendsen, 1946; Henriksen, 1972; Ingham and Ben-Jacob, 2008; Finkelshtein *et al.*, 2015; Fujihara *et al.*, 2009)。寒天培地上でバクテリアが呈するコロニーの形成過程は、これらの集団行動の特徴を、少なくとも部分的に示していると考えられる。

細菌のコロニーパターン形成は、自己組織化現象と捉えることができる (Wakita *et al.*, 1994; Ben-Jacob *et al.*, 1998; Matsushita *et al.*, 2004; Wakita *et al.*, 2015; Kobayashi *et al.*, 2016; Gibiansky *et al.*, 2013)。たとえば松下らの先駆的な研究によれば、枯草菌 *Bacillus subtilis* のコロニーは、養分濃度と寒天濃度によって様々な形態をとる (Fujikawa and Matsushita, 1989; Ohgiwari *et al.*, 1992)。 *Paenibacillus* 属ではさらに多様で複雑な形態が報告されており、 Ben-Jacob らにより詳細な形態観察と数理シミュレーションに基づく生物物理学的解析がなされてきた (Ben-Jacob *et al.*, 1994)。細菌の示すコロニーパターンは、しばしば電析など非生物の呈するパターンと類似することがあり、その根底には生物、非生物の区別に関わらない物理的なルールが存在する可能性も指摘されている (Ben-Jacob *et al.*, 1998; Matsushita *et al.*, 2004)。一方で細菌のコロニーパターンは、同時に生物としての生存戦略を反映していることが想像され、その生理学的ならびに生態学的な背景と併せて理解する必要がある。

一部の *Bacillus* 属の細菌は固相表面で数 mm におよぶ巨大な運動集団を形成する。それらは、しばしば彗星状 (ないし勾玉状) の形態をとりながら放浪するコロニー (wandering colony) や、一か所にとどまって回転するコロニー (rotating colony) として現れることがある (Henriksen and Svendsen, 1946; Henriksen, 1972; Gillert, 1975)。複雑な形態を呈する *Paenibacillus vortex* は、一般的な培養条件下では回転しながら移動する渦を形成するが、低濃度の抗生物質 Mitomycin C 存在下 (Ingham and Ben-Jacob, 2008)、あるいは大腸菌と共培養した時に (Finkelshtein *et al.*, 2015)、放浪するコロニーや回転するコロニーが出現する。 *Paenibacillus alvei* は放浪するコロニーを形成し (Fujihara *et al.*, 2009)、 *Paenibacillus* sp. NAIST15-1 は放浪するコロニーと回転コロニーをともに形成することが報告されている (Kobayashi *et al.*, 2016)。上記の *Bacillus* 属の呈する運動集団とは少し異なるが、粘液細菌 *Myxococcus xanthus* もまた、渦状、束状のコロニー、隣接した集団、筏状の集団 (ラフト) といった巨大な移動集団を形成する

(O'Connor and Zusman, 1989; Wu *et al.*, 2009)。この種では運動機構である IV 型線毛と協調した細胞外多糖 (EPS) の放出 (Li *et al.*, 2003; Black *et al.*, 2006)、細胞の運動軌跡 (Balagam and Igoshin, 2015)、運動方向の転換 (Wu *et al.*, 2009; Thutupalli *et al.*, 2015) が細胞間連絡を介して集団形成に寄与していると示唆されている。特に細胞外多糖をはじめとした粘液はしばしば様々な細菌の集団形成に寄与するとされ、細胞外多糖の他には細胞外 DNA 放出なども集団形成やバイオフィルムの形成に寄与する例も報告されている (Whitchurch *et al.*, 2002; Gloag *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2009)。回転コロニーや渦状コロニーを含

む閉軌道は、局所閉鎖環境ではさらに生じやすい。たとえば枯草菌や大腸菌は、寒天培地上の窪みやマイクロチャンバーなどで、そのサイズと細胞密度に依存して渦を形成する (Wakita *et al.*, 2015; Honda *et al.*, 2019; Wioland *et al.*, 2013; Lushi *et al.*, 2014)。このような協調的な動きは、精製された運動性タンパク質でも実験的に再構成される場合がある。ATP 存在下で基盤上に固定されたミオシンやキネシンの上に、アクチンフィラメントや微小管を添加すると、自己駆動力を持つフィラメントとして動き回ることができる。この系では自発的な渦の形成や空間全体で整列する様子が観察されている (Sumino *et al.*, 2012; Inoue *et al.*, 2015; Wada *et al.*, 2015)。また、これらの微小管同士に結合能力を付与し、あるいは光により結合能力を制御することで、複数の個体が一体となって動く様子が確認できる (Keya *et al.*, 2018)。

### 細菌の運動機構

細菌の代表的な運動様式は、Henrichsen により主に以下の 6 種類に分類された (Henrichsen, 1972; Harshey, 2003)。遊泳運動 (swimming) は周囲に液体が十分にある時に液中を移動する運動で、その運動はランダムに見える。Henrichsen らは鞭毛を用いると定義しているが、近年ではその他の運動機構、例えば鞭毛のない *Synechococcus* sp. WH-8102 株による遊泳運動も swimming と記述されている (Brahamsha, 1999; Ehlers and Oster, 2012)。遊泳運動を行う細胞は単独で動き、コロニーを形成しないことが多い。遊走運動 (swarming) は高密度の集団が物体表面を移動する運動で、細胞の長軸に沿って連続的に動く傾向がある。遊走運動も遊泳運動と同様に鞭毛を持つ細菌が行うと定義されるが、遊泳運動が液体中の移動に対して、遊走運動は液体で満たされてはいない、寒天培地のような物体表面で行われ、渦や束状など高度に組織化したコロニーを形成する点で異なる。遊走運動中の細菌は鞭毛の量が増加する。滑走運動 (gliding) は遊走運動に似て、表面滑走を行い渦や束状の集団を形成するが、鞭毛を持たない細菌に限定した現象として定義されている。*Mycoplasma mobile* や *Flavobacterium johnsoniae* などそれぞれ突起状の足のような滑走装置、および桿体の細胞上を螺旋状に動き回る接着タンパク質により滑走するなど、滑走運動のマシナリーは多岐にわたる (Miyata and Hamaguchi, 2016; Nakane *et al.*, 2013)。今回の研究対象である糸状性シアノ細菌の運動様相は滑走運動に含まれるが、詳細は後述する。単収縮運動 (twitching) は主に個々の細胞が、物体表面を這い回るようにぎくしゃくと動く運動で、滑走運動や遊走運動ほど複雑ではないが、様々なコロニーパターンを形成する。Henrichsen は単収縮運動が未知の運動



機構によると記述している一方、Harshey らは IV 型線毛を使った運動であると定義している (Harshey, 2003)。ほかにも能動的な運動をせずに細胞増殖により広がる押し出し運動 (sliding) や、細胞が集合から射出される投擲運動 (darting) などがある (Harshey, 2003)。

有名な運動マシナリー (運動に関わる生体内装置) としては、鞭毛 (flagella) や IV 型線毛 (type-IV pili) がよく知られている。鞭毛はフラジェリンが重合されてできる動的なタンパク質繊維であり、その基部に位置するモータータンパク質が ATP をエネルギー源として一方向に回転することで推進力を得て、バクテリアの遊泳行動を可能にする。また、寒天培地などの固相表面上では鞭毛が増加することで、遊走運動を担う (Harshey, 2003)。大腸菌をはじめ、コロニーパターン研究の主要な対象となってきた枯草菌 *Bacillus subtilis* や *Paenibacillus*、プロテウス属の *Proteus mirabilis*、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は、いずれも鞭毛を主な運動マシナリーとして使用するバクテリアである。一方の IV 型線毛もタンパク質性の繊維で、一般に鞭毛より短く細く、基部にてピリンを重合させて伸長、分解して短縮する。先端を他の細胞や物体表面に接着して伸長短縮を行うことで細胞体を滑走させる。単収縮運動では急激に方向と速度が転換する運動があるが、それを担うのも IV 型線毛であり (Jin *et al.*, 2011)、コロニーパターンにも影響を及ぼすことが示唆されている (Morikawa *et al.*, 2013)。鞭毛と線毛は互いに排他的ではなく、たとえば緑膿菌は鞭毛と線毛の両方を持ち、それらを使い分けることで固相表面での運動形態は 4 種類に分類される (Conrad *et al.*, 2011)。これらの運動機構以外にも近年、SprB や RemB などのアドヘシンが細胞壁上を螺旋状に回転する *Flavobacterium johnsoniae* の滑走運動などが報告されており (Shrivastava *et al.*, 2012; Nakane *et al.*, 2013)、今後も様々な運動機構が発見される可能性が高い。

## シアノバクテリアのコロニー・パターンと運動機構

シアノバクテリアは、酸素発生型 (水分解型) の光合成を行う一群の原核生物である。25 億年から 30 億年前に出現し、水を分解して還元力を得ることにより、ごく局所的にしか存在していなかった始原生物の生存圏を、水圏全般に一挙に拡大させた。それに伴い、還元的な原始地球環境を酸化させ、酸素分圧が 20% に達するまでに上昇させることで地球環境を一変させ、酸素呼吸を行う生物群の展開をもたらした。シアノバクテリアは真核植物の葉緑体の系統的起源とされている。私たちヒトの身体を構成する炭素も、もとはといえばほとんどが酸素発生型光合成に基づく炭酸固定過程に依存しているが、現在においてもシ

シアノバクテリアは地球上の炭酸固定の 4-5 割に寄与すると考えられている。このようなことから、シアノバクテリアは地球上で最も生存圏を拡大してきた巨大な生物群であり、極地や温泉、油田、砂漠にもそれぞれの環境に適応した代謝系を発達させながら生存してきた。形態的にも球体や桿体の単細胞性から細胞が連なった糸状性、さらに分岐を伴う網状のものまで多岐に富み、単細胞性および糸状性の中には運動性を示す種や、特徴的なコロニーパターンを示す種が報告されてきた。

分子遺伝学的に頻用されている単細胞シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 には走光性を示す研究室株が知られており、結果としてあたかも指が生えたような形状 (Finger-like pattern) のコロニーを寒天培地上で形成する (Levy and Requei, 2008; Galante *et al.*, 2012; Ursell *et al.*, 2013; Varuni *et al.*, 2017)。方向性を持った光の照射を伴わなくとも特徴的なコロニーの形態を示す例も度々報告されている。たとえば佐藤らによって単離された *Phormidium* sp. KS 株は、寒天培地上で渦状のコロニーパターンを形成する (Sato *et al.*, 2014)。また、カリフォルニアの brackfish mudflat から単離された *Pseudanabaena* 属のシアノバクテリアは、懸濁液中で網目状の凝集塊を形成する (Shepard and Sumner, 2010)。興味深いことに、別種の *Pseudanabaena* が、上述の枯草菌が呈するような彗星状の放浪するコロニーを形成することが、微生物の分類カタログ Bergey's manual 中に簡単に記載されているが、詳細な情報は不明であった (Castenholz *et al.*, 2001)。

シアノバクテリアの運動様式については、主として単収縮運動、遊泳運動、滑走運動が知られている (中根および西坂, 2018)。最も研究が進んでいるのは上述の *Synechococcus* sp. PCC 6803 株であり、IV 型線毛を持ち、単収縮運動を行う (Bhaya *et al.*, 1999; Yoshihara *et al.*, 2001)。既に述べたように多くのバクテリアの運動性には鞭毛が重要な役割を果たすが、シアノバクテリアでは鞭毛は確認されていない (Wilde and Mullineaux, 2015; Brahamsha and Bhaya, 2014)。シアノバクテリア (特に糸状性シアノバクテリア) の滑走運動は古くから観察されてきたが、そのメカニズムには未解明の部分が多い。いくつかの研究では Junction pore complex (JPC) と呼ばれる、細胞接合部付近に整列した細胞膜上の微小孔が観察されており、この JPC から粘液が放出される際の反動が駆動力となる可能性が指摘されている (Hoiczky and Baumeister, 1998; Sato *et al.*, 2014)。整列した JPC は渦状のコロニーを形成する *Phormidium* sp. でも観測されている (Sato *et al.*, 2014; Hoiczky and Baumeister, 1998)。一方、*Nostoc punctiforme* (以下 *N. punctiforme*) のホルモゴニア細胞 (分化し運動性を持つ細胞形態) では、JPC は IV 型線毛の基部が整列して並んだ円形

の機構であり, *pil* と *hps* 遺伝子がコードするタンパク質群によって構築される (Risser and Meeks, 2013; Risser *et al.*, 2014; Khayatan *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2017)。*pil* と *hps* 遺伝子はその制御を行うとされる *hmp* 遺伝子群を含めて, ほぼ全ての糸状性シアノバクテリアで保存されている (Risser and Meeks, 2013; Khayatan *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2017)。JPC より生えた線毛は同様に JPC より放出される EPS により細胞周辺に偏在し, 細胞の長軸沿いに伸長と縮退を繰り返すことで細胞を動かすと考えられている (図 1, Khayatan *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2017)。*N. punctiforme* のホルモゴニア細胞は, フィラメントが高密度に並列した筏状の集団 (ラフト) をしばしば形成し (Cho *et al.*, 2017), また *hmpW* 変異株では走光性を誘発する条件で, 放浪するコロニーのような移動する集団を生じることもある (Riley *et al.*, 2018)。

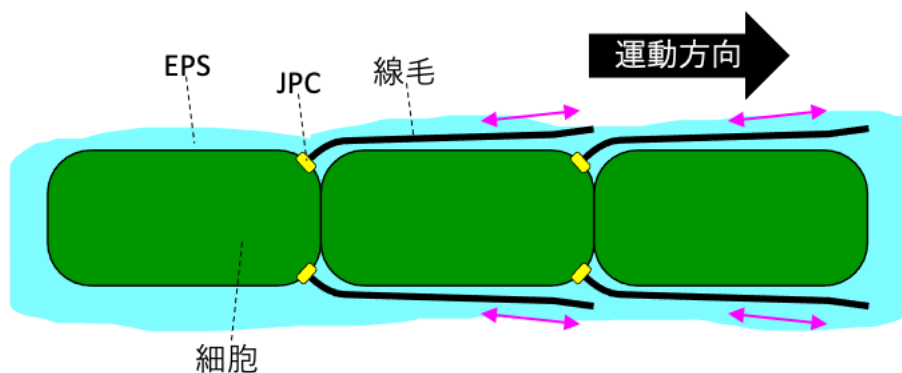


図 1. *Nostoc punctiforme* で提案された運動機構

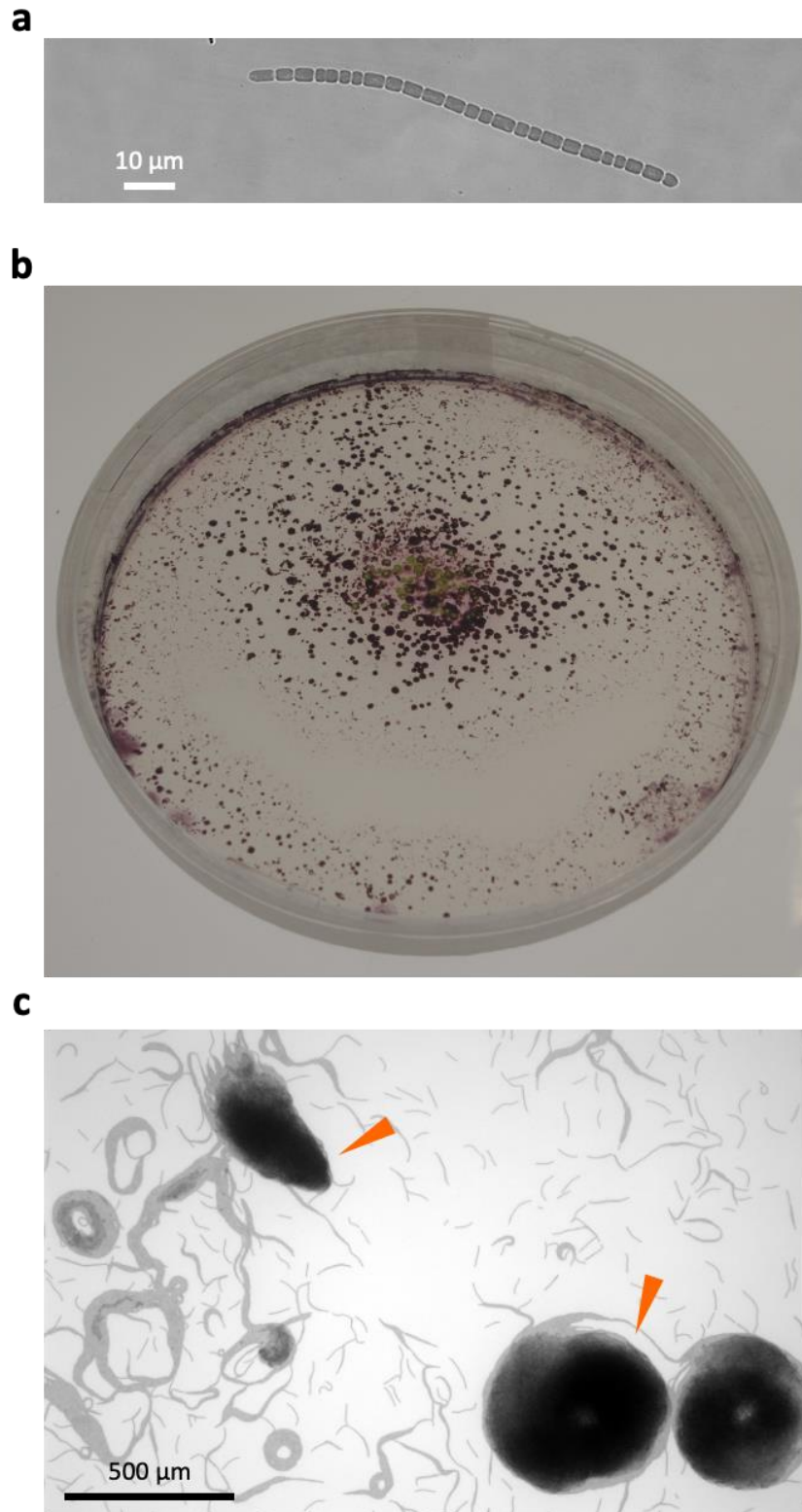
Khayatan *et al.*, 2015 を基に描画した, 糸状シアノバクテリアの運動機構モデル。赤矢印は線毛の伸縮, 緑色は細胞, 黄色は JPC, 水色は EPS を示す。

### *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 株の単離とその背景

この論文では放浪する彗星状のコロニー, および回転する円盤状のコロニーを寒天培地上で形成する糸状シアノバクテリア, *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 (以下 *Pseudanabaena*) について報告する。この糸状シアノバクテリアは岩崎により早稲田大学西早稲田キャンパスの池 (北緯 35.706008, 東経 139.707843) から 2007 年頃に単離された (図 2a, 久保田・岩崎, 2009)。単離当初は, バイオメディア・アートの素材として美学芸術学の実験の対象となり, その過程でコロニーパターンや補色馴化に関する萌芽的な知見が得られた。作品は国内外で多く展示され (たとえば Catts and Iwasaki, 2018; Iwasaki, 2020), 筆者も 2013 年のインターコミュニケーションセンター (ICC) での大規模な展示や東京デザイナーズウィークでの DIY バイオのワークショップなど, 多くの機会にスタッフとして従事した。同時に, 観察されるコロニーパター

ンの理学的解析も行われ、16S rRNA の系統樹解析により、この株は *Pseudanabaena* 属に近いことが明らかになったため、国立環境研究所の微生物コレクション (NIES collection) に *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 として登録した。この株は、円筒状の細胞が長軸方向に連なった糸状のシアノバクテリアで、白色光下では赤褐色を呈するが、赤色光下では緑色に変化する。与える光の波長に応じて細胞の色素組成を変えるこの現象は補色馴化 (chromatic acclimation) と呼ばれ、多くのシアノバクテリアに見られる。光合成系 II の集光アンテナタンパク質複合体のフィコビリソームの構成成分のフィコシアニンとフィコエリスリンの総体含量が可逆的に調節されることで起こる。白色光下で赤褐色であることは、この光条件では相対的にフィコシアニンの量が高いことを示している。

シアノバクテリアの標準培地として知られる BG-11 寒天培地上 (寒天濃度 1.5%) では、*Pseudanabaena* は様々なサイズの集団をランダムかつ散在的に形成した (図 2b)。これらの散在的なコロニーパターンは、上記の彗星状コロニー (放浪するコロニー) と円盤コロニー (回転コロニー) が移動しながら順次形成され続けることにより、自発的に形成される (図 2c, 動画 1)。



**図 2. *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 の形態**

a. 細胞形状の光学顕微鏡画像。b. 90 mm プレートに作成した BG-11 寒天培地(寒天濃度 1.5%) 中央に細胞を植菌し, 12 日間培養した後のコロニー画像。c. 寒天培地上で呈するコロニーの顕微鏡画像。植菌後 14 日目。矢頭は彗星状コロニー(左上)と円盤コロニー(右下)を示す。タイムラプスは動画 1 に示す。Yamamoto *et al.* (2021) の図 1 を一部修正して転載。

## 細菌のコロニーパターンに関する数理モデルによる解析

コロニーパターンの形成過程に対して、仮説に基づく規則を実装し検証を行うことは有効な手段であるが、現実系では難しい場合が多い。特に生物を用いた場合、様々な想定外の要素が加わってくることから、検証に至らない場合もある。一方、*in silico*での数理モデルを用いた検証はこのような仮説に対して計算的にルールを加えることが可能で、パラメーター調節など様々な条件を検討することが容易である。例えば松下らは枯草菌が呈するコロニーパターンの形状は、細菌の運動速度と増殖速度をパラメーターとして変化すると考え、パターンの寒天濃度・養分濃度依存性を示すモルフォロジーダイアグラムを実験的に提示した。この実験結果に対して反応拡散方程式を用いたモデルを構築し、養分濃度の初期値と細胞の拡散に関わる係数を変化させることで、最終的に現実のモルフォロジーダイアグラムに近い様相を再現した (Matsushita *et al.*, 2004, Mimura *et al.*, 2000)。この過程で細胞の活動状態に関するルールを取り入れることにより、更に再現度が高くなったことから、細胞の活動状態がコロニーパターンに影響することが示唆された (Mimura *et al.*, 2000)。このようにモデルを用いた研究は単なる現象の再現や仮説の検証にとどまらず、不足している要素の発見にも繋がる。枯草菌のコロニーパターンに関しては、Ben-Jacob らもまたモデルによる再現を試みているが、Ben-Jacob らは自発的な運動能力を有したエージェント、自己駆動粒子を用いてコロニーパターンの形成メカニズムの解明に取り組んだ (Ben-Jacob *et al.*, 1994, Czirik *et al.*, 1996)。シアノ細菌では *Synechococcus sp.*の指状パターンに関してモデルを用いた研究が多く行われている (Levy and Requei, 2008; Galante *et al.*, 2012; Ursell *et al.*, 2013; Varuni *et al.*, 2017)。指状パターンは走光性を持つ *Synechococcus sp.*が植菌位置から光の方向へと移動する際に、集団で生育領域の界面を拡大することで何本もの指状の軌跡を呈するコロニーパターンで、走性を伴う細菌のパターン形成として着目されている。糸状性シアノ細菌でも走光性を伴ったパターンや三次元的な網目状パターンに関する研究が行われ、Tamulonis らは糸状のシアノ細菌をばねで結合した質点とみなした力学的なモデルを構築し、照度の勾配で構築されるシアノグラフや網目状のバイオフィーム形成を定性的に再現した (Tamulonis *et al.*, 2011; Tamulonis and Kaandorp, 2014)。

本研究で用いられている *Pseudanabaena sp.* NIES-4403 株でもいくつかのモデルを用いた解析が行われている。ひとつは高松らによるモデルで、下山らによって提案された自己駆動粒子モデル (Shimoyama *et al.*, 1996) を基に個体間引力と粘液の効果を導入し、並進運動と回転運動をする集合を再現している (高松ら,

2014)。また、本論文には含めていないが久本との共同研究により、本研究で得られた成果の一部についてエージェントベースモデルを用いた再現を試みた (Yamamoto *et al.*, 2021)。このモデルの詳細については第四章の総合討論で記す。

## 本論文の構成

本論文はこの第一章の序論を含め、四章で構成される。第二章では *Pseudanabaena* のコロニーパターンとその形成過程、およびそれらに関わってくる細胞の運動を定性的並びに定量的に解析した結果を示し、コロニーパターンの時空間的遷移に関する議論を展開した。この第二章は筆者が筆頭著者として投稿した査読付き英語論文 (Yamamoto *et al.*, 2021) を基に改変し、新規の実験結果を追加し補強して記述している。第三章では継代培養の過程で得られた短個体長の変異株 (ILC 580 株) のコロニーパターン解析と、標準株の *de novo* ゲノムシーケンス、変異株のゲノム上の変異を探索したリシーケンス結果について説明する。これらの結果および最新の知見を踏まえ、第四章にて総合討論を記す。

## 第二章 *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 株のコロニーパターンと運動, 集団形成

### 要旨

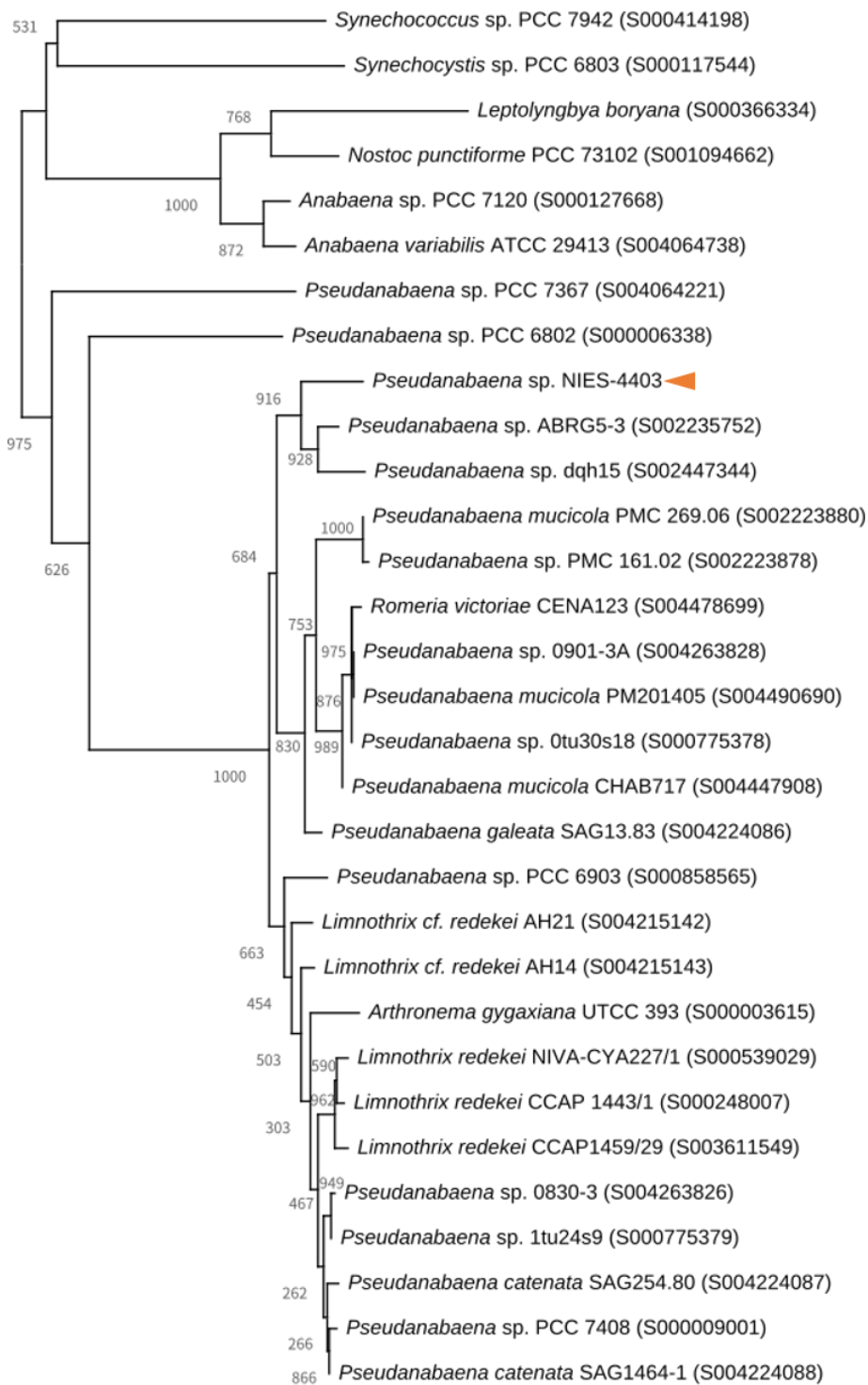
糸状性シアノバクテリア *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 株は, 寒天培地上で顕著な彗星状コロニーと円盤コロニーを形成し, 散在的なコロニーパターンを呈する。これらのコロニーおよびコロニーパターンを形成する機構を調べるため, コロニーパターンの形成過程を詳細に解析した。その結果, シアノバクテリアの個体 (フィラメント) が, 他の個体の軌跡を個体長に依存した速度で追従する傾向にあり, 個体同士が衝突する際にはほぼすべての場合で交差せずに整列する傾向にあることがわかった。この衝突による整列の結果, 束状の小集団が形成され, さらなる束同士の衝突と個体の増殖により彗星状コロニーが形成されることを観測した。彗星状コロニー内の個体は, 速度, 運動方向ともよく揃っており, 著しく斉一的な集団化が実現されていた。この彗星状コロニーが何らかの理由により円軌道に突入もしくは円軌道を形成すると自己の尾を追尾する形になり, 安定的に一箇所で回転運動を続ける円盤コロニーへと遷移した。円盤コロニーは数日間に渡り回転運動を続け, コロニー内部の個体の速度は内側から外側にかけて大きくなることが判明した。

### 序論

本研究で研究対象となる *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 株は, 元々バイオメディア・アートおよび生命美学プロジェクトのために岩崎が早稲田大学の池から単離した株である (久保田・岩崎 2009)。この株は, 固相表面上で彗星状のコロニーを形成して長距離を移動し, やがて円盤コロニーとなることで離散的にコロニーが散在するコロニーパターンを呈する。この散在的なコロニーパターンは, *Paenibacillus alvei* でごく簡単に報告されている星状パターン (stellar pattern : Cohen *et al.*, 2000) に似ているが, その形成機構は不明であった。NIES-4403 に遺伝的に近縁な種には, *Pseudanabaena* sp. ABRG 5-3 株が知られており (図 3, Nishizawa *et al.*, 2010), NIES-4403 株でも ABRG 5-3 株で報告されているような細胞の自発的な破裂現象 (Kitazaki *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2015) が確認された。一方, ABRG 5-3 株のコロニーパターンに関する報告は確認できていない。



筆者の所属する早稲田大学岩崎研究室および共同研究先の早稲田大学高松研究室では、この散在的なコロニーパターンの形成機構に迫るため、様々な実験を行ってきた。まず、寒天培地環境を操作しモルフォロジーダイアグラムを描くとともに運動解析を行い、コロニーパターンの基本的な分類を記載した。この分類を基に画像解析を行い、運動速度と個体長の関係や円盤コロニーの速度分布、表面構造、培地濃度によるコロニー形状の変化などを明らかにしてきた。これらの解析の一部を本論文でも紹介する。なお、遺伝学的な解析を行なうために形質転換法の開発も目指したが今のところ成功していない。第二章では、主に顕微鏡観察と画像解析の結果を紹介し、コロニーパターンの形成機構に関して記述する。



0.020

図 3. 16S rRNA 系統樹解析

NIES-4403 株の 16S rRNA シーケンス結果は Ribosomal Database Project (RDP) 内の、BLAST スコアの高かった 24 配列と代表的なシアノバクテリア種の 5 配列と比較を行った。分岐に描かれている数字は bootstrap value である。Yamamoto *et al.* (2021) の図 S1 を一部修正して転載。

## 材料および手法

### 株と培養条件

*Pseudanabaena* sp. NIES-4403 は早稲田大学西早稲田キャンパスの池の水から、BG-11 寒天培地上で単離された (久保田・岩崎, 2009) 。細胞は BG-11 寒天培地上で、白色蛍光灯 ( $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  前後の恒明条件下で、 $30^\circ\text{C}$  で培養された。BG-11 液体培地は  $\text{NaNO}_3$  1.5 g/l,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.036 g/l, Ferric ammonium citrate 0.006 g/l, EDTA 0.001 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.03 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.075 g/l,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.02 g/l, Citric acid 0.006 g/l,  $\text{H}_2\text{BO}_3$  2.86 g/l,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.81 g/l,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.222 g/l,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.390 g/l,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.079 g/l,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.049 g/l の割合で混合した (Rippka *et al.*, 1979) 。寒天培地を作る際には上記に加え Bacto Agar (BD) を加えた。Bacto Agar の濃度は特記しない場合 1.5% となるよう混合し、コロニーパターンの寒天濃度依存性を確認した実験 (図 5) ではそれぞれ寒天濃度 0%, 0.075%, 0.3%, 0.75%, 1.5%, 3% の培地を作製し培養した。継代培養は 2~3 週間程度に 1 度、寒天培地に広がったコロニーの先端部分  $2 \text{ mm}^2$  程度にある細胞を白金耳で採取、新しい BG-11 50  $\mu\text{l}$  に懸濁し、寒天培地上に細胞懸濁液を 4  $\mu\text{l}$  滴下することで継代を行った。

### 系統樹解析

16S rRNA 配列解析は既に筆者の所属する研究室で行われていたが、作成した 2010 年以降に近縁種の報告があったこと (Nishizawa *et al.*, 2010) などの理由から、当時シーケンスされた配列を基に再度系統樹の作成を行った。シーケンスに際しては 16S rRNA 遺伝子領域を 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1494R (5'-GTACGGCTACCTTGTTACGAC-3') の 2 種類のプライマーを用いてコロニー PCR により増幅した。増幅した DNA 断片は pGEM-T Easy vector (Promega) に導入し、*E. coli* JM109 株 (Takara Bio) に導入してクローニングを行った。この結果得られたプラスミドの PCR 由来の区間を、増幅時と同じプライマー 27F と 1494R を用いてサンガーシーケンス (Applied Biosystems 3730xl) を行った。得られた結果は、BLAST (blastn, version 2.2.28+ Camacho *et al.*, 2009) のスコアが高い順に選ばれた 24 種および代表的なシアノバクテリア 5 種の 16s rRNA 配列と比較した。比較対象となる 16S rRNA 配列のデータベースは Ribosomal Database Project (Cole *et al.*, 2014) から 2018 年 3 月 23 日にダウンロードし、"Uncultured Bacterium" は比較対象から除外した。アライメントには MUSCLE (version 3.8.31 Edgar, 2004) を用い、

ClustalW (version 2.1 Larkin *et al.*, 2007) で距離を計算し, Archaeopteryx (version 0.972 9m Han and Zmasek, 2009) で描画した。

## コロニーパターンの撮影

顕微鏡画像は CCD カメラ Retiga Exi Fast 1394 (QImaging) を倒立顕微鏡 IX71 (Olympus) に接続し, 対物レンズは PLAPON1.25x, UPlanFLN 4x と LUCplanFLN 20x (それぞれ Olympus) を用いて撮影した。顕微鏡システムはソフトウェアの Slidebook (Intelligent Imaging Innovations) で MAC5000 コントローラー (Ludl Electronic Products) を介して制御した。共焦点顕微鏡観察は, 早稲田大学先端生命医科学研究施設 (TWIns) の共通実験機器を利用した。顕微鏡 IX81 (Olympus) に接続された FV-1000D システムを用い, 対物レンズは LUCPlanFLN x20 (Olympus) を用い, FV10-ASW (Olympus) で制御した。細胞の観察には 555 nm レーザーを用いてシアノバクテリアの自家蛍光 (フィコビリソーム蛍光) を励起し可視化した。共焦点顕微鏡画像の撮影画像を鮮明にするため, 培地として 1.5%濃度のゲルライト (富士フィルム和光純薬) を含む BG-11 ゲルライト培地 2 ml を 35 mm のガラス底プレート (#3910-035, AGC テクノグラス) に入れ, その上で細胞を培養しプレート底面のガラス側より観察を行った。このゲルライト培地上でも Bacto Agar を使った通常の寒天培地上と同様, 彗星状コロニーや円盤コロニーを含むドット状のコロニーパターンを形成することを確認している。90 mm プレート内の寒天培地上のコロニーパターン全体の画像は, 一眼レフカメラ K-5 II (Pentax) で 1 時間に 1 枚撮影した。薄型 LED ライトパネル ARTON SMART TRACER Pro A4 (大日本美術工芸) を培養プレートの下に敷いて, 生育光および撮影用の透過照明として用いた。生育温度の保持と結露防止のため, 33 度に設定したマイクロウォームプレート MP-1000H (北里コーポレーション) をプレートの上に設置した。図 18 以外の観察では, 走光性の影響を可能な限り排除するため, 細胞は観察中も  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  になるような蛍光灯の均一な照明下で生育している。図 18 ではプレート上の細胞に対して水平方向から照明を照射して培養している。

## 画像処理と統計解析

画像の解析と処理は ImageJ 1.50b (NIH : Schneider *et al.*, 2012) および Fiji 2.0.0-rc-65 (Schindelin *et al.*, 2012) を用いた。統計解析には R-3.2.3 (R core team; Ihaka and Gentleman, 1996) を用いた。

## 通過回数の解析

画像のピクセル毎にコロニーが存在した時間（タイムラプス上の撮影数）を積算したものを、コロニーの通過回数と定義した。図 4b に示した通過回数の画像は、それぞれのタイムラプス画像を 2 値化した後合計処理を行い、対数変換した後に ImageJ の Temporal-Color Code plugin を用いて描画した。

## 彗星状コロニーと円盤コロニーの速度計測

図 6b, 8, 10b, 11 に示した各彗星状コロニーの速度は、タイムラプス画像での各集団の中心位置の変位をフレームレート（1 枚/1 時間）で割ることで算出した。図 7 に示したコロニーの辺縁領域の速度は、円盤コロニーは輪郭上の特徴的な形状、彗星状コロニーは先端の位置をタイムラプス画像で手動追跡することで得た位置の変位をフレームレートで割ることで算出した。

## 個別の個体の速度計測

顕微鏡下で撮影されたタイムラプス画像を基に、ImageJ で個体の先端を手動追跡し、各変位を時間で割った値を 3~4 データ用意し、これを個体ごとに平均し、図 14a の速度とした。観察中に方向転換を行った個体の情報は除外した。図 14a にプロットで示した速度と個体長のデータについて、ある個体長までは正の相関があるように見え、ある個体長以上では上昇が抑えられているように見えたため、設定した上限値以下（0 μm~上限値までの範囲）のデータを用いて原点を通過する回帰直線を描画した。図 14bc に示した上限値を変動させたときの調整済み決定係数（ $R^2$ ）と傾きの結果に基づいて最終的な上限値の決定を行い、調整済み決定係数が極大値をとるいくつかの条件内で、最大の個体長となる 95.98 μm を上限値として決定した。直線回帰には R の lm (linear model) を用い、調整済み決定係数は以下の式により算出された。

$$\text{adjusted. } R^2 = 1 - \frac{(1 - R^2)(n - 1)}{(n - k - 1)}$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(l - \hat{l})^2}{\sum l^2}$$

但し  $l$  を計測した個体長、 $\hat{l}$  を近似直線の式に従って計算された値、 $n$  をサンプルサイズ、 $k$  を説明変数の数とする。

## Particle Image Velocimetry(PIV)解析

PIV 解析は 2 枚の画像間で相互相関を計算することで場の変異を推定する手法であり、本来はトレーサーを含む流体の流速を測定する方法であるが、本研究では集団中の細胞の流動を解析するために用いた。

図 6e, 10d, 11 では細胞の流れを解析および可視化するために ImageJ の PIV plugin (Tseng, 2011; Tseng *et al.*, 2012) を使用した。10 秒間隔でタイムラプス撮影した画像のうち 2 枚を用いて、interrogation window size が 128 px, vector spacing が 64 px, correlation threshold が 0.6 となるように設定し解析を行った。PIV plugin から出力した結果を用いて、図 10e に示した流れの強度分布を  $\mu\text{m}/\text{sec}$  単位に換算し計算した。図 10e の中心位置は、真円を円板コロニーに対して手動でフィッティングすることで決定した。

## 衝突角度の解析

図 13d に示した衝突する個体同士のなす角度は手動で計測した。 $\theta_{in}$  は衝突点から 10 ピクセルの距離で衝突する個体に沿って引いた直線の角度、 $\theta_{out}$  は衝突点から 10 ピクセルの距離で各フィラメントの運動方向に引いた直線の角度を Fiji の Line tool を用いて計測した。

## コロニーサイズ分布の解析

図 4de に示したコロニーサイズ分布がべき乗則に従うかどうかの検討のため、図 4a に示した各時刻のコロニーの面積を測定した。Fiji で  $0.06 \text{ mm}^2$  以上のコロニーを抽出、面積を計測し、Clauset らが提案した方法 (Clauset *et al.*, 2009) に基づいて作成された R の `powerLaw` パッケージ (Gillespie, 2015) を用いて解析を行った。簡単に説明すると、まず実験データをべき乗分布にフィッティングした。推定したべき指数と切り捨て閾値を、実験値と推定値の Kolmogorov-Smirnov 統計値 ( $K_{Sd}$ ) が最小になるように設定した。次に goodness-of-fit 試験を行った。推定した式からいくつかの値を作成してデータセットとした。このデータセットは切り捨て閾値以上のデータ数とそれ以下のデータ数の比率が実験データと同様になるように用意した。切り捨て閾値以上のデータは推定した分布に従うようにランダムに選択し、切り捨て閾値以下のデータはランダムにカットオフ値以下の実験値から取得した。このように作成した各データセットについて、KS 値 ( $K_{ssim}$ ) を、 $K_{Sd}$  を計算した時と同様の段階を経て算出した。このプロセスを bootstrap 法により繰り返し計算し、 $K_{Sd}$  が  $K_{ssim}$  より大きくなる確率  $p$  を決定した。Clauset らは  $p$  が有意水準 0.1 以下

であれば仮説  $H_0$  (実験データがべき乗分布に従う) は棄却されるとしている。モデルとなる分布を選択するため、Kullback-Leibler criterion を使いモデル選択のための類似度を算定する Vuong's test を行った。この試験は帰無仮説  $H_0$  : どちらの分布も同程度実験値と離れている, に対し対立仮説  $H_1$  : 片方の分布は実験値により近い, を検定する。もし  $p$  値が 0.1 以上であれば, どちらの分布がより実験値に近いかを論ずることはできない (Clauset *et al.*, 2009)。

## 電子顕微鏡観察

電子顕微鏡写真については深澤の解析結果を掲載し, それを基に解析した。サンプルの調整はまず, 寒天培地上の細胞を 0.1M リン酸バッファーに溶解した 2.5%グルタルアルデヒドを用いて 4°C で固定し, リン酸バッファーで洗浄, さらに四酸化オスミウムを用いて 4°C で固定した。サンプルは 50% から 100% のエタノール系列で段階的に脱水し, 冷凍乾燥を行った。以降の観察は花市電子顕微鏡技術研究所に委託して行った。走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察では, 乾燥した細胞をオスミウムでコーティングし, JSM-6320FSEM (JEOL) で観察を行った。透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察では, 乾燥した細胞をエポキシレジン EPON812 (Shell Chemical) に埋め込み, 超薄膜化したサンプルを酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色した。区画を炭素で真空蒸着を行い, JEM1200EX (JEOL) で細胞の観察を行った。

## 原子間力顕微鏡観察

原子間力顕微鏡 (AFM) については, 試料は BG-11 100  $\mu$ l に寒天培地より白金耳で採取した菌体を懸濁し, 多糖類除去のために 5 M ヨウ化ナトリウム溶液を滴下, 常温で 30 分静置した。洗浄のため純水 850  $\mu$ l を加え 13,500 rpm で 1 分間遠心分離, 上清を除去後再度純水 1 ml を加え 13,500 rpm で 1 分間遠心分離し上清を除去した。なお, ヨウ化ナトリウム処理は多糖類除去にあまり効果がないことが後に示唆されたが, 解析した時には有効と考えて行っていたためそのまま掲載する。回収した菌体を純水 200  $\mu$ l にピペッティングにより懸濁後, スライドガラスに 10  $\mu$ l 滴下しデシケーターで 10 分以上乾燥した。作製したサンプルは原子間力顕微鏡 Dimension3100 (Bruker) を Nanoscope IV (Veeco) で制御し, タッピングモードを使用した。探針は AFM 用プローブ NCHV (Bruker) を使用し, Integral Gain 0.5-0.7 V, Proportional Gain 1.4-2.0 V,

Amplitude Set Point 0.8-1.3 V の範囲で観察を行った。原子間力顕微鏡は早稲田大学リサーチサポートセンターの機器を使用し、同センターより指導を受け計測を行った。

## 細胞外多糖の染色

細胞外多糖を染色するためにアルシアンブルー染色とインディアインクを用いたインク染色、およびレクチン染色を行った。アルシアンブルーは酸性ムコ多糖類の硫酸基とカルボキシル基に特異的に結合する試薬で (Steedman, 1950) , シアノバクテリアでも一部の細胞外多糖の染色が可能である (Soule *et al.*, 2016; Sugawara *et al.*, 2018) 。まず 20  $\mu$ l の細胞懸濁液をスライドガラス上に 30 分間静置した。浮遊している細胞と上清はろ紙で穏やかに吸着除去した。細胞を含むスライドガラス上に残った物を 20  $\mu$ l の 1.5% (w/v) Alcian blue 8GX (Sigma Aldrich) で染色し, Alcian blue を吸着除去後 20  $\mu$ l の BG-11 を滴下し, カバーガラスを液滴の上から被せた。倒立顕微鏡 IX-50 (Olympus) に UplanFLN 10x 対物レンズを接続し, カラーCMOS カメラ Moticam 5 (Motic) を用いて撮影した。

インク染色では, 一般的には浮遊したインクの粒子が粘性のある多糖類層の表面に付着し染色される (Orskov J, 1947; Hoiczky and Baumeister, 1998; Risser and Meeks, 2013) 。BG-11 寒天培地上で 10 日間培養したコロニーを染色した。2% (v/v) India ink (Winsor & Newton) , 4  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 0.05% (v/v) Triton X-100 (Sigma) を含む染色液 20  $\mu$ l を, 培地表面で彗星状コロニーが存在する周辺に滴下し (Risser and Meeks, 2013) , UplanFLN 4x 対物レンズ (Olympus) を接続した IX71 (Olympus) 顕微鏡で染色前と染色 2 分後に撮影した。

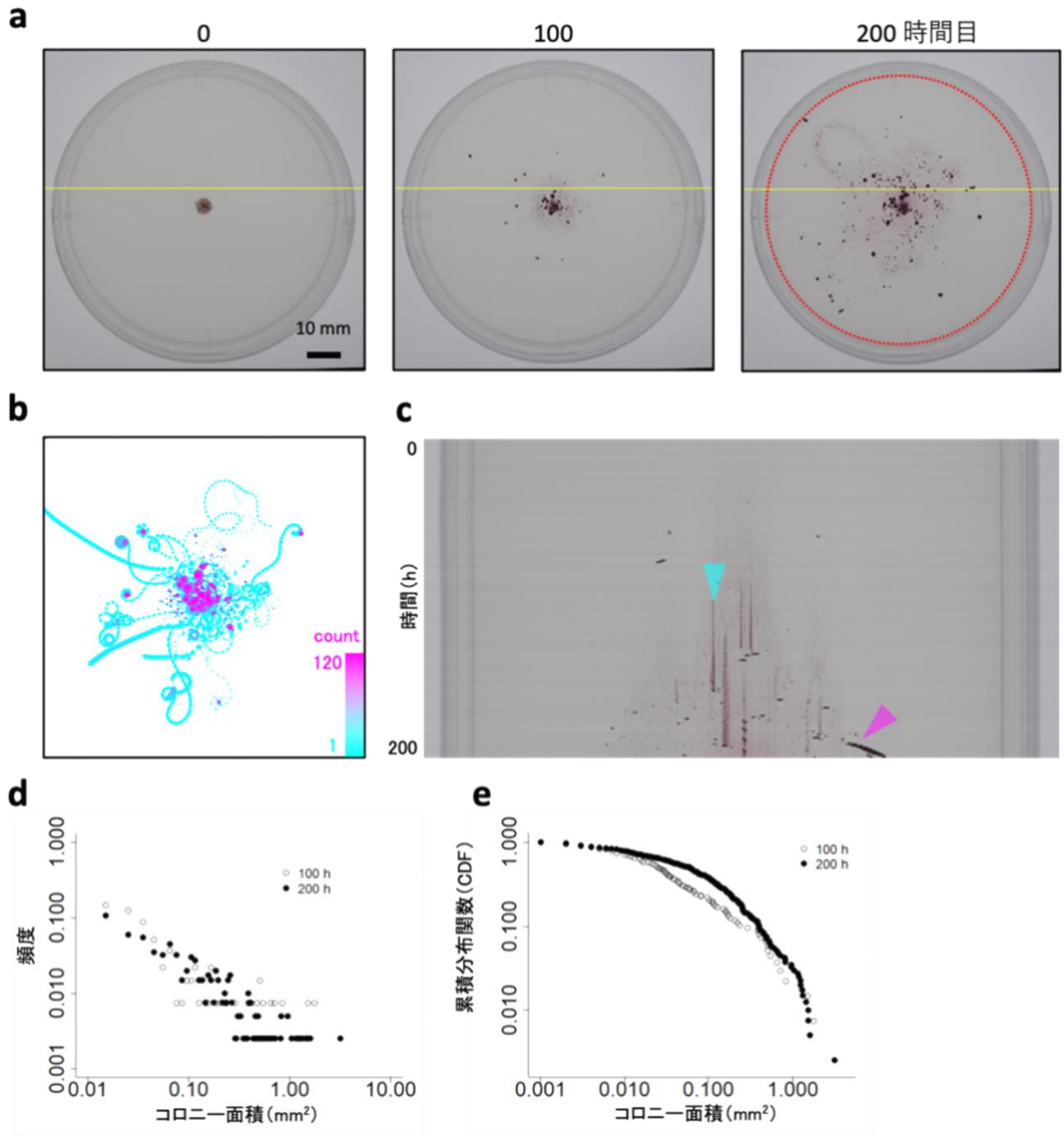
レクチン染色では, ガラクトースや N-アセチルガラクトサミン残基に結合する RCA120 に蛍光色素 Fluorescein を結合した RCA120-Fluorescein を使用した。BG-11 寒天培地で 10 日程度培養した後, 白金耳で採取した菌体を 200  $\mu$ l の BG-11 液体培地に懸濁した。懸濁液を 3500 rpm で 5 分間, 室温で遠心し, 上清を除去した。その後 BG-11 液体培地で希釈した RCA120-Fluorescein (Vector laboratories) 20  $\mu$ g/mL を 100  $\mu$ l 加え 30 分静置, 再び 3500 rpm で 5 分間, 室温で遠心後上清を除去し, BG-11 液体培地 100  $\mu$ l を加えて懸濁, この懸濁液をスライドガラスに 10  $\mu$ l 加えて観察を行った。



## 結果

### *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 のコロニーパターン

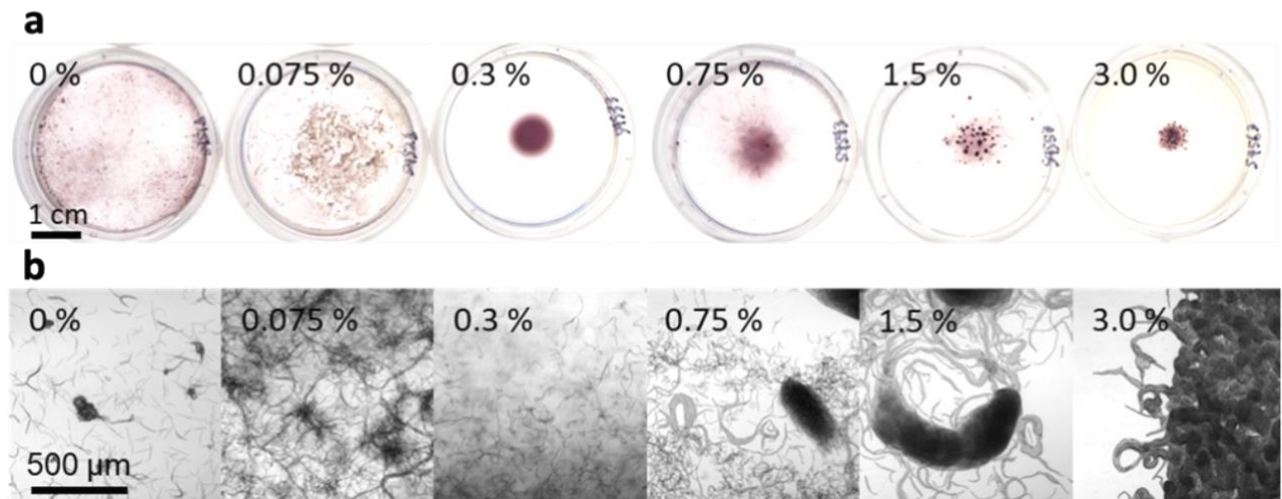
細胞懸濁液を 1.5%寒天培地（90 mm プレート）の中心に滴下して培養すると、成長した細胞は培地表面を滑走し、連続的で動的な集団運動を行う彗星状コロニー（**図 4a**, **動画 2**）を形成し、さらにその一部は円盤コロニーと呼ばれる渦を形成する。これらの集団のサイズは 1 mm にも達し、目視することができる。寒天培地上での散在的なコロニーパターンは、*Paenibacillus alvei* で簡単に報告されている星状パターン（Stellar pattern）に似ているように見えるが、その形成機構は不明な点が多い（Cohen *et al.*, 2000）。植菌（**図 4a** 左）からおよそ 1 日経過すると、高密度の彗星状の移動するコロニーが植菌位置から拡散し始め、寒天培地上を動き回った（**図 4a** 中央（100 時間目）と右（200 時間目））。いくつかの彗星状コロニーは小さな円軌道を形成し、さらにその一部は先頭と末端が結合し、回転する円盤コロニーへと遷移した。多くの円盤コロニーはそのまま回転を続けながら成長したが（**図 4b**）一部の細胞は彗星状コロニーに戻り再び培地上を動き回った。**図 4c** のカイモグラフ（1 次元上の時間経過を示した図）はこれらの集団形成と遷移の経時的なプロファイルを示している。突然出現する黒い点、または傾いた短い線（マゼンタの矢頭）は彗星状コロニーが通過したことを示し、垂直方向の線（シアンの矢頭）は同じ場所に留まりながら成長を続ける円盤コロニーを示している。この *Pseudanabaena* の円盤コロニーはカイモグラフ上の垂直線の、縦方向の長さとして確認できるように、一点に数日間留まるが、*Paenibacillus* や *Bacillus* で確認されている回転集団は徐々にその位置を変えることが報告されている（Kobayashi *et al.*, 2016; Henrichsen, 1972; Ingham and Ben-Jacob, 2008）。この長い垂直線が突然途切れている場合、円盤コロニーが分離または彗星コロニーへ遷移することを意味している。



**図 4. *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 の寒天培地上での散在するコロニーパターン**

a. 90 mm プレート上での *Pseudanabaena* のタイムラプス画像。0 時間目は撮影開始時刻を示し、植菌から約 10 時間目。1 時間毎に撮影し、図は 0, 100, 200 時間目の写真。タイムラプスは動画 2 参照。b. 動画 2 の 0 時間目から 120 時間目の間の通過回数。対数変換した通過回数(細胞がいたフレームを 1 回とカウント)を、1 回でシアン、120 回でマゼンタのグラデーションで示す。c. 図 4a の黄色線上の 200 時間目のカイモグラフ。シアンは円盤コロニー、マゼンタは彗星状コロニーを示す。d. 図 4a の赤円内にあるコロニーの面積分布を 100 時間目(136 コロニー)と 200 時間目(401 コロニー)で計測し示した両対数グラフ。e. 図 4a の 100 時間目と 200 時間目のコロニー面積の両対数グラフ上の累積分布関数。プレート中央にある最大のコロニーは除外している。Yamamoto *et al.* (2021) の図 2 を転載。

松下らによれば、枯草菌のコロニーは養分濃度と寒天濃度に依存してその形を大きく変化させる (Wakita *et al.*, 1994; Matsushita *et al.*, 2004)。この説に従い寒天濃度を 0%から 3%まで段階的に変化させたところ、NIES-4403 株のコロニーの状態も培地濃度に応じて変化し (図 5)，彗星状コロニーや円盤コロニーはおよそ寒天濃度 0.75 %から 1.5 %前後で観測された。より詳しく説明すると、0%から 0.075%にかけては、液体培地そのものもしくはそれに近い状態にあるため、細胞は培地全体に拡散し、培地中に浮遊していた。一定方向に向かう遊泳運動は確認できなかったが、フィラメント全体が自発的に緩やかに揺れるような動きを示し、局所的な凝集が確認できた。図 5b 中にも複数の凝集が確認でき、0%の時は塊状の凝集を確認したが、0.075%では凝集同士が繋がり太い束状になり、それが更に分岐または接続し網目状の構造を形成した。0.3%の場合も同様に、培地中に殆どの菌体が潜り込んでいることが確認できるものの、0%や 0.075%の時ほど培地中に拡散しているわけではなく、植菌位置を中心として等方的に円形に広がった。これは 0%や 0.075 %の時より寒天濃度が高いため滑走運動の際の抵抗が大きく、また培地自体も流動・拡散するほど柔らかくないため受動的な拡散が抑えられ、結果的にコロニーの拡がり低下すると考えられる。培地表面の個体、内部の個体とも長軸方向への運動が見られる。寒天濃度が 0.75%程度になると 0.3%の時同様に培地内部に個体が依然存在するものの、培地表面に個体が多く確認でき、表面では 1.5%時のような束状のパターンや彗星状コロニーも確認できることから、彗星状コロニーなどの高密度集団は培地表面においてのみ形成されると考えられる。これは培地内部では個体同士は三次元的に動くため衝突の機会が減るが、培地表面では二次元的に動くため個体同士が接触し整列しやすくなることで、結果的に高密度になることによると予想している。一方で 3.0%になるとコロニーパターンの拡がりは抑えられ、植菌位置付近で生育する。ほとんどの場所ではわずかに枝状に伸長するのみで、円盤コロニーは部分的に観測されるが、彗星状コロニーは形成されず、遠方への目立った放浪行動は観察できない。このため、円盤コロニーの出現も、植菌位置周辺での出現にとどまっている。これは個体が外部への進出時に受ける培地からの抵抗が、寒天濃度の上昇に伴って増加し、菌体が植菌位置付近から進出しにくくなっていると考えている。コロニーは主に増殖した菌体同士が押し出す形 (Sliding) で拡大し、能動的な運動 (Gliding) で広がっているわけではないように見える。



**図 5. コロニーパターンの寒天濃度依存性**

寒天濃度が 0%, 0.075%, 0.3%, 0.75%, 1.5%, 3.0% の寒天培地上で *Pseudanabaena* が呈する a. 35 mm プレート全体のコロニーパターン と b. その明視野顕微鏡画像。植菌してから 6 日目に撮影

ランダムな乗算プロセスが散在的なコロニーパターンの裏側に潜んでいる

プレート上のコロニーの面積の分布を撮影開始 100 時間目 (136 コロニー) 及び 200 時間目 (401 コロニー) に計測したところ、興味深いことに、分布は両対数グラフ上で、経過時間によらず右肩下がりに下降し、曲線、あるいは部分的には直線的にも見える分布を示した (図 4d)。このような分布はランダムな乗算過程が寄与する「べき乗」、あるいは履歴が乗算的に現在の値に影響を与える「対数正規分布」を彷彿させ、過去の様々な条件が影響する複雑系の挙動が根本にある可能性を考えた。群形成において集団のサイズにべき乗が見られることは魚群 (Niwa, 2004) や他種バクテリア (Peruani *et al.*, 2012) で報告があり、特に魚群の集団サイズの分布形状と類似した曲線形状および傾きに見える。丹羽らはこの分布に対して集団の合流と分離に基づいたモデルを提示し、類似した形状の分布を再現している。つまり、図 4d はランダムな乗算過程による、バクテリア集団の構築と崩壊を示唆していると想像した。この現象の更なる理解のため、集団サイズ分布の累積分布関数(CDF)を図 4e に示し、Clauset (2009) の判定方法に基づいて分布形状に関する判定を、べき乗分布と対数正規分布に対して行った。判定方法の詳細は材料および手法の項目に記した。この判定方法によって得られた  $p$  値は、bootstrap 法により基準精度を超えた割合であり、一般的に検定で用いられる  $p$  値とは意味合いが異なる。この値が高いほど各分布に近いことを示し、0.1 未満の時は分布形状として適さないと Clauset らは述べている。今回の実験結果に対してこの判定方法を行った

ところ、べき乗分布に対して  $p$  値はそれぞれ 100 時間目は 0.15, 200 時間目は 0.01 であった。同様に対数正規分布に対して判定を行ったところ、 $p$  値は 100 時間目は 0.12, 200 時間目は 0.89 となった。少なくとも 200 時間目での分布がべき乗分布である可能性は低い、100 時間目についてはどちらも 0.1 以上で、べき乗分布または対数正規分布でない判定することはできなかった。どちらの分布形状が近いかを決定する判定方法として、Kullback-Leibler 基準を用いた Vuong's test を行い、べき乗と対数正規分布のどちらかに実験データが近いといえるかを確認した。対立仮説  $H_1$  (べき乗分布あるいは対数正規分布のどちらかが実験データに近い) に対して帰無仮説  $H_0$  (べき乗分布, 対数正規分布ともに同等に実験データから遠い) が立てられ、Clauset ら (2009) によると Vuong's test の  $p$  値が 0.1 より大きい時には、どちらかの分布が近いということは難しいとされる。計算によると、100 時間目と 200 時間目の  $p$  値はそれぞれ 1.34E-03 および 1.02E-08 であり、ともに帰無仮説  $H_0$  が棄却された。これらをあわせて考えると、まず 200 時間目では対数正規分布に従うことが示唆された。100 時間目についてはべき乗分布により近いと判定されたが、 $p$  値が 0.1 以上でもその分布形状に従うとは限らないと Clauset らは述べている。仮に 100 時間目の結果がべき乗分布に従うとしたら、100 時間目では増殖というより合流と分散がコロニーのサイズに大きく影響することでべき乗に近い分布形状を呈するのかもしれない。後期になると細胞数の増殖がコロニーサイズの分布形状に対して支配的になり、成長を伴った事象に多く見られる対数正規分布になるのかもしれない。*Pseudanabaena* のコロニーパターンを再現したシミュレーションでは一見類似したコロニーサイズ分布を再現したが、分布形状を決定するには至らなかった (Yamamoto *et al.*, 2021)。このシミュレーションでは細胞の増殖が含まれていないことから、概ね合流と分裂により両対数軸グラフ上で右肩下がりになる傾向が再現される。これはモデルの設計自体は大きく異なるものの、集団同士の合流と分散に基づいた丹羽らの研究と齟齬がないように思われる (Niwa, 2004)。

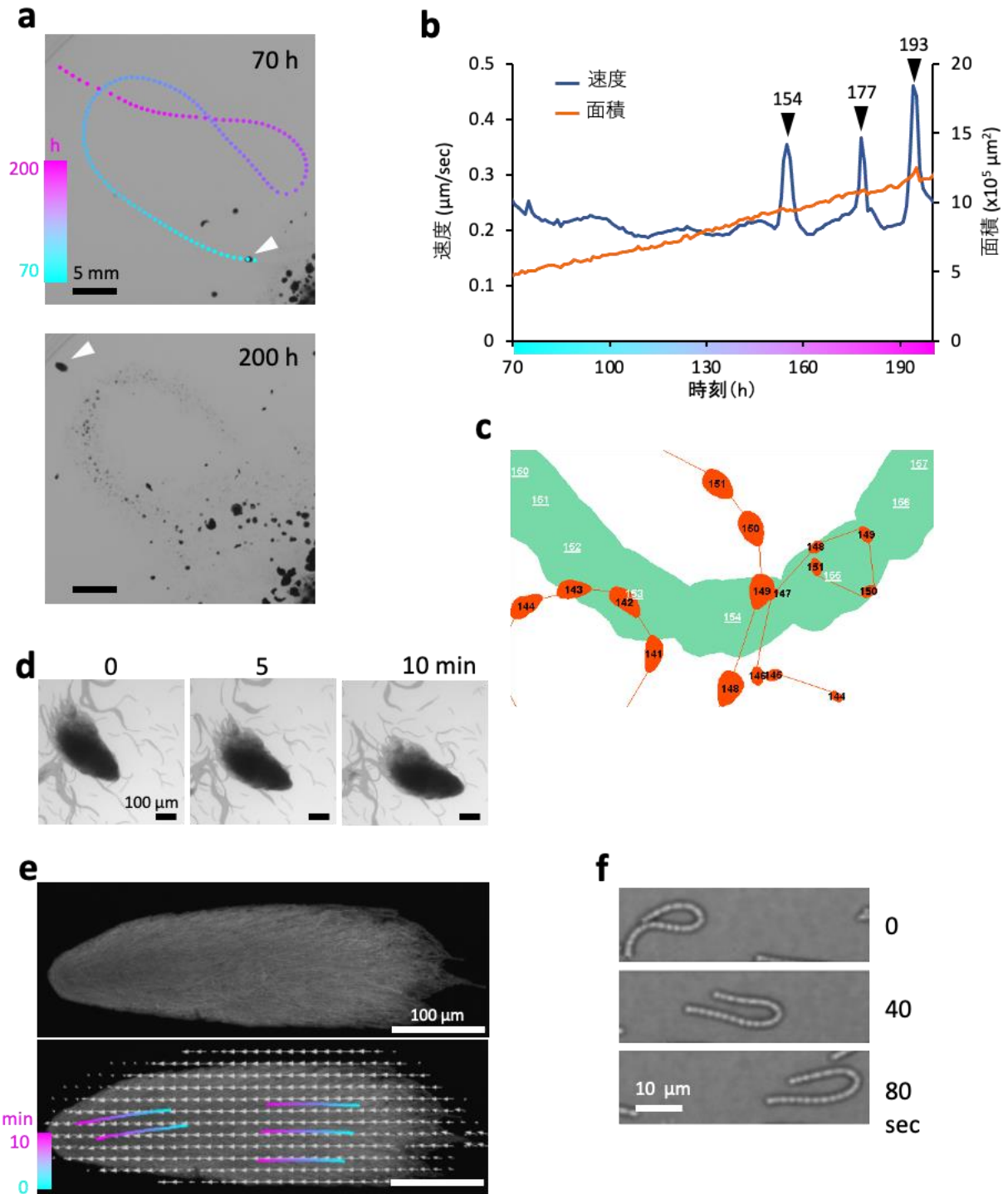
	べき乗	対数正規	Vuong's test
100 時間	0.15	0.12	1.34E-03
200 時間	0.01	0.89	1.02E-08

**表 2. べき乗分布と対数正規分布に対する各試験, 検定の  $p$  値**

図 4a 100 時間目と 200 時間目のコロニーサイズ分布に対する各分布モデルの妥当性を示す, bootstrap 法で算出された  $p$  値, およびべき乗と対数正規分布に対して評価を行った Vuong's test の  $p$  値を示す。

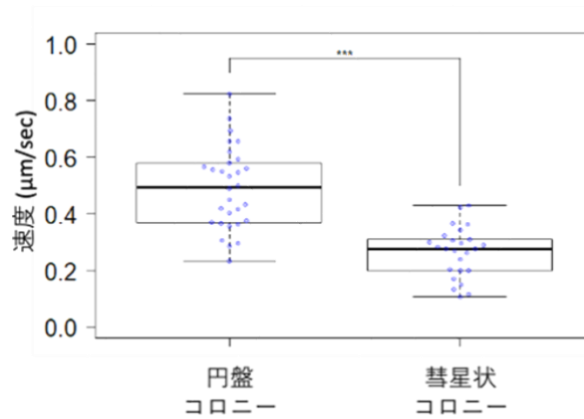
## 彗星状コロニー

**図 6a** に寒天培地上を滑走する彗星状コロニーの 130 時間での典型的な軌跡を示す。このコロニーはプレート中央付近（植菌位置）で発生し、点線で描かれたルートを通じた（**図 6a** シアン→マゼンタ，**動画 3**）。この移動中にコロニーの面積はほぼ線型に、2 倍になった（**図 6b**，オレンジ）。集団は(i) 複数の集団の合流，(ii) 細胞の増殖により成長することが考えられる。**図 6a-b** の解析から、少なくとも 70~130 時間目に他の集団と合流した様子は見られず、この期間にも成長していることから、彗星状コロニーはコロニー内の細胞の増殖により成長していることを示している。彗星状コロニーの速度は  $0.1 - 0.43 \mu\text{m}/\text{sec}$  で ( $n=55$ , **図 7, 表 1**) **図 6a** に示す彗星状コロニーはこの観察中はほぼ  $0.2 - 0.3 \mu\text{m}/\text{sec}$  の安定した速度で移動したが、154 時間目、177 時間目、193 時間目に急激に速度が上昇した（**図 6b**）。興味深いことに、177 時間目と 193 時間目では過去に自身が通過した場所を再度通過していた。過去に通過したコロニーによって局所的に環境条件が変化し、滑走速度が上昇したと思われる。環境変化とはたとえば粘液の放出による培地表面の水分環境の変化が挙げられる。特に *Paenibacillus* sp. NAIST15-1 では細胞外タンパク CmoA が、彗星状コロニーや円盤コロニー内で寒天培地から水分を吸い上げる役割をしていることが推測されている (Kobayashi *et al.*, 2016)。対して 154 時間目に起きた急激な速度上昇は自分の軌跡と交差した場所ではないが、少なくとも 3 つの他の彗星状コロニーが 154 時間目以前にこの場所を通過している（**図 6c**）。これらの 3 つの他の彗星状コロニーの軌跡が、177 時間目と 193 時間目の速度上昇と同じメカニズムで、今回観察した彗星状コロニーの速度上昇に影響している可能性が高い。再現性の確認のため、**図 8 (動画 4)** に、他のプレートで同様に観察した 3 つの彗星状コロニーの軌跡を示す。軌跡を通過する瞬間の急激な速度の上昇（矢頭で記す）について、よく似た傾向を示した。



**図 6. 彗星状コロニーは調和した運動方向と速度で運動する**

a. 図 4a 上の代表的な彗星状コロニーの軌跡。ドットの色は撮影開始後 70 時間目(シアン)から 200 時間目(マゼンタ)までの位置を示す。動画 3 を参照。 b. 図 6a に示した彗星状コロニーの速度(青色)と面積(オレンジ)の時間変化。黒い三角は急加速した時刻を示す。 c. 図 6a と同じ彗星状コロニーの、撮影 154 時間目の軌跡(緑)と他の 3 つの彗星状コロニーの軌跡(オレンジ)。数値は彗星状コロニーがその場所にいた時刻。緑で示したコロニーの速度は 152 時間目に上がり始め、156 時間目には下降を始めた。 d. 図 2c 上の彗星状コロニーの形状と挙動。タイムラプスは動画 1 参照。 e. 彗星状コロニーの自家蛍光を共焦点顕微鏡でタイムラプス撮影し、PIV 解析した解析結果。色線は 0 分(シアン)から 10 分(マゼンタ)まで手動追跡した細胞の位置、矢印は PIV 解析結果した場の速度と方向を示す。タイムラプスは動画 5 参照。 f. 1 個体の U 字型運動の様子。Yamamoto *et al.* (2021)の図 3 を一部修正して転載。



**図 7. 彗星状コロニーと円盤コロニー外周の速度分布**

植菌から 10 日目の培地上の、別個の彗星状コロニー 55 個、円盤コロニー 30 個について速度を計測した。彗星状コロニーは先端の位置を、円盤コロニーの速度は円周上の特徴的な部位を手動追跡することで測定した。\*\*\*は Wilcoxon の順位検定で  $p$  値が  $7.293 \times 10^{-9} < 0.001$  となり、きわめて有意に差があることを示す。Yamamoto *et al.* (2021) の図 S2 を一部修正して転載。

	最小値 ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	最大値 ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	中央値 ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	平均値 ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	標準偏差	計測数
円盤コロニー	0.231	0.824	0.494	0.491	0.142	30
彗星状コロニー	0.104	0.429	0.276	0.264	0.089	55

**表 1. 集団の速度の比較**

図 7 で測定した際の速度の統計値を表として示した。



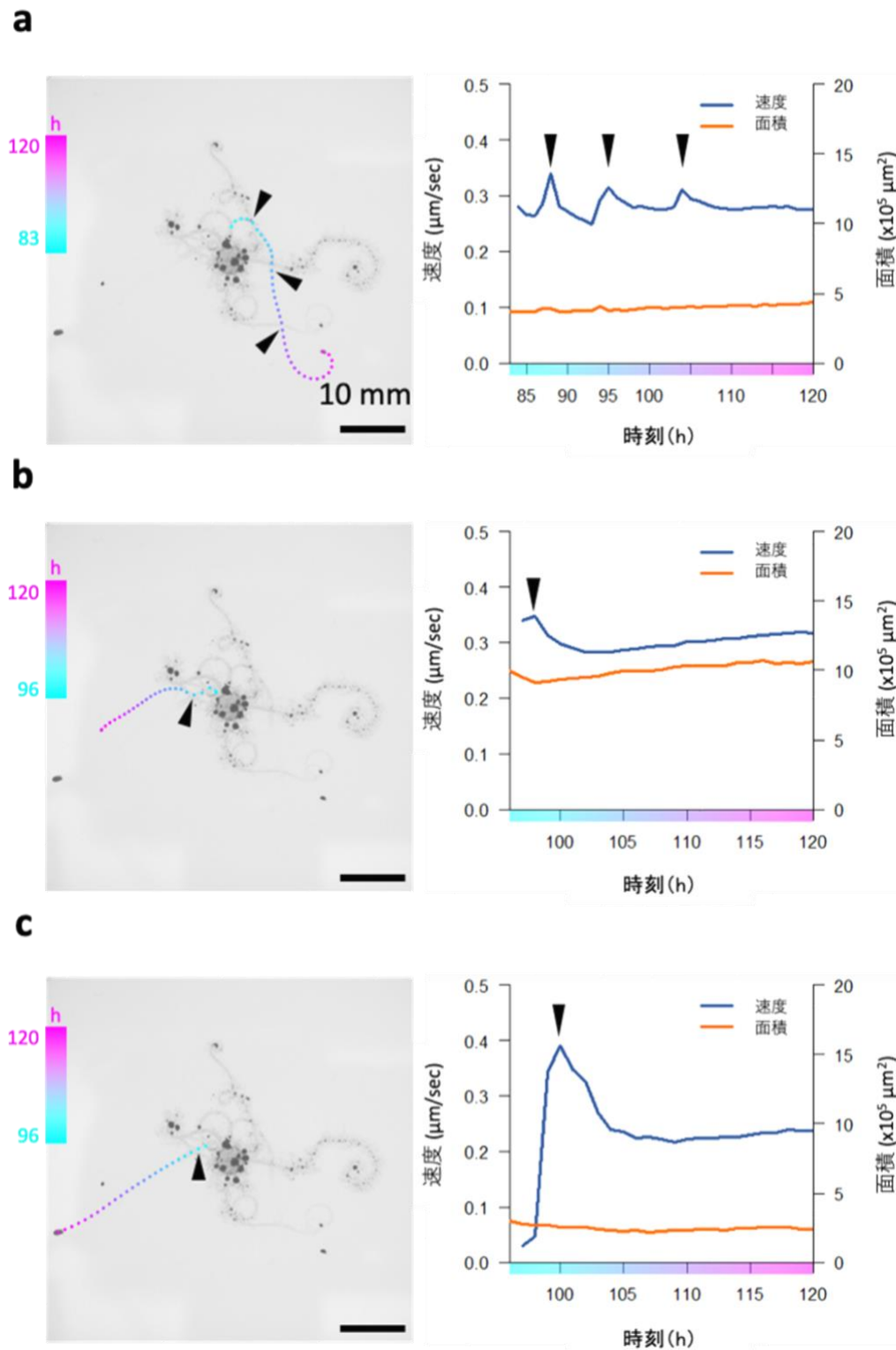
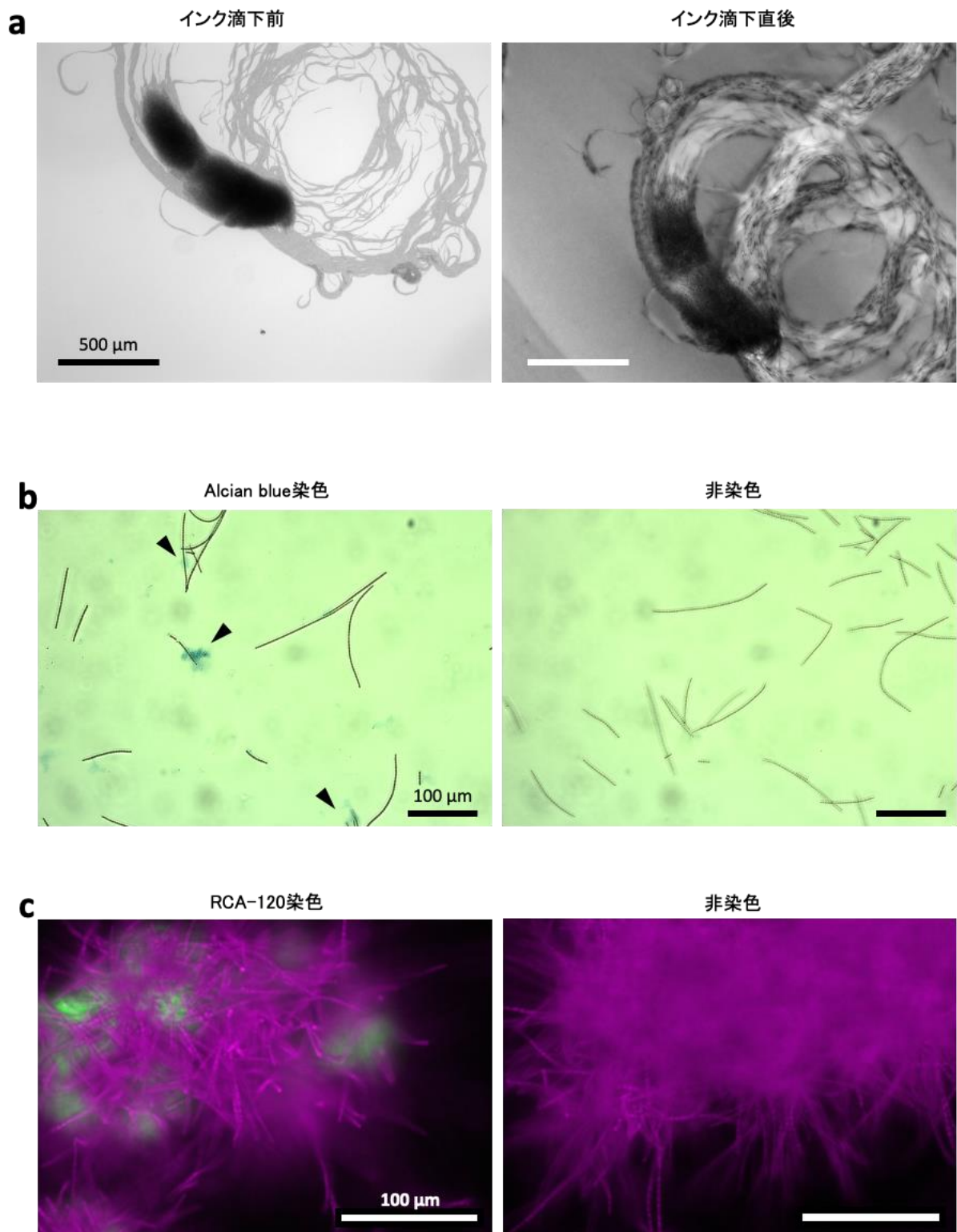


図 8. 彗星状コロニーの軌跡および速度と面積の遷移

a-c. 図 4a(動画 2)とは別のプレートで、図 6ab 同様の解析を行った結果。植菌から 10 時間目を撮影開始時刻(0 時間目)とした。左図のドットの位置は追跡した彗星状コロニーの中心位置を、ドットの色は時刻を示す。左右の図の三角形は急激な速度上昇が起きた位置を示している。タイムラプスは動画 4 を参照。Yamamoto *et al.* (2021)の図 S3 を一部修正して転載。

滑走するバクテリアでは細胞外多糖 (EPS)などを主成分とする分泌粘液が運動性を活性化することが提案されている (Thutupalli *et al.*, 2015; Adams, 2001; Burchard, 1982)。シアノバクテリアにおいても、*Oscillatoria*, *Mastigocladus*, *N. punctiforme* では、運動した細胞の軌跡が India ink で染色されている (Walsby, 1968; Hoiczky and Baumeister, 1998; Risser and Meeks, 2013; Hernandez and Stevens, 1987)。この染色方法は、液中で拡散運動しているインクのコロイド粒子が、粘液成分に粘着することで粘液が可視化される。*Pseudanabaena* の個体に対してもインク染色に挑戦したが、個体レベルの染色では再現性のある結果は得られなかった。その代わりに、培地上のコロニーレベルの染色ではインクで染色されない軌跡を観測できた。図 9a に寒天培地上のコロニー周辺にインク滴を落とす直前と、落として2分後の写真を示す。インク滴下後の写真を確認すると、細胞がない寒天培地上 (例えばスケールバー周辺) はインク粒子が存在し、薄く染色されている。画面中央に2つの連なった彗星状コロニーが存在するが、その軌跡と思われる培地上は他の寒天培地上より明るく見えている。インク滴下後の写真から推察すると、彗星状コロニーは写真右上から来た後に写真右下で2回円軌道を描き、一度左上に向かった後再度弧を描き最終的な位置にいると考えられる。つまりインクが軌跡から排除されている。インク滴下前後の写真を比べると、コロニーの運動によって軌跡からインクが押し除けられたわけではないことは明白である。この結果は、軌跡の表面構造が他の寒天培地上と異なることを示している。そこで次に、酸性ムコ多糖類を染色するアルシアンブルーと、蛍光物質フルオレセインを結合した多糖類認識性のレクチン (RCA-120 Fluorescein) で *Pseudanabaena* の EPS が染色されるか試験した。先行研究では *N. punctiforme* のホルモゴニアで、RCA-120 がフィラメント周辺に存在する EPS を染色できることを示している (Risser and Meeks, 2013)。図 9b, 9c に示すように、*Pseudanabaena* の場合、細胞が凝集した部分周辺で、RCA-120 とアルシアンブルー双方で染色が確認できた。India ink による粘液の直接の染色、および RCA-120 による個別のフィラメントレベルでの染色が見られなかった理由としては、*Pseudanabaena* の EPS が水に溶けやすい可能性があることや、EPS の放出量が *N. punctiforme* に比べて少ないこと、また今回使用した試薬では染まらない粘液の存在が考えられる。一方で過去に他種で行われた染色では、同様に個体同士の交差した点などに多糖類が存在する様子が報告されていて (Walsby, 1967)、粘液分泌様式としてはこちらの例により近い可能性がある。いずれにせよ、これらの結果は *Pseudanabaena* の細胞が EPS を放出し、軌跡の表面環境を変更する可能性を示唆している。



**図 9. インディアインクとアルシアンブルーでの染色**

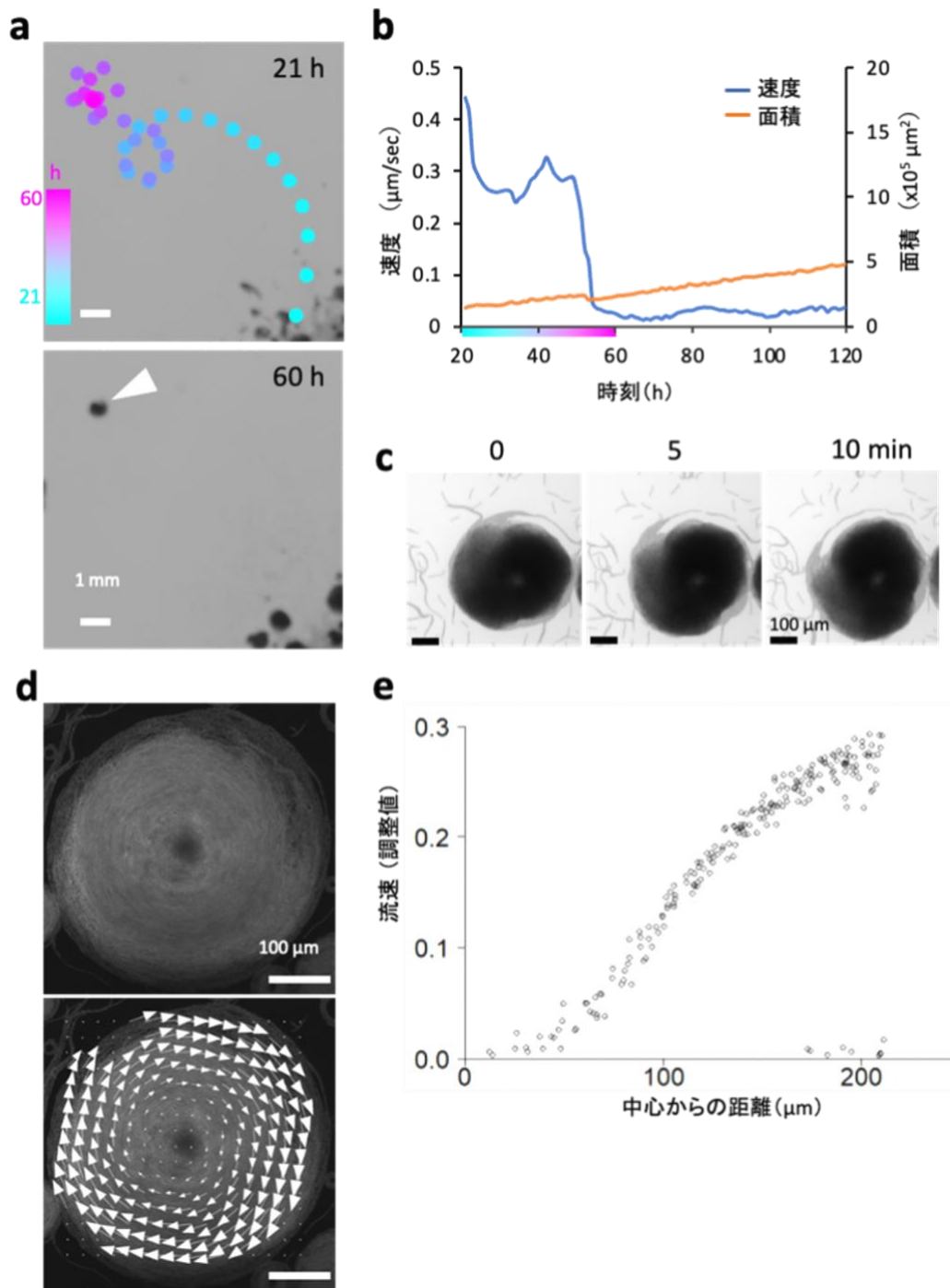
a. 彗星状コロニーの軌跡をインクで可視化した様子。滴下の際に視野が少し右上にずれたが、ほぼ同一地点の画像。  
 b. 細胞外多糖類をアルシアンブルーで可視化した様子。三角形の先端は EPS の凝集を示す。図 9ab は Yamamoto *et al.* (2021) の図 S4 を一部修正して転載。  
 c. RCA-120 染色を行った細胞の蛍光写真。自家蛍光をマゼンタ、EPS を緑で示す。Yamamoto *et al.* (2021) の図 3d を一部修正して転載。

彗星状コロニーがときに数日間に渡り集団を崩さずに培地を動き回することは既に述べたが、この安定性（**図 6d**, **動画 4**）はバクテリアの個体間に強い相互作用があることを示唆している。彗星状コロニー内の個別の細胞の挙動を調べるため、培地と接触しているコロニー底面の細胞を、レーザー共焦点顕微鏡を用いて観察した（**図 6e**, **動画 5**）。このコロニーは 590 秒間に約 100  $\mu\text{m}$  を進み、その間に細胞のコロニー内での相対的な位置はほぼ変わっていなかった。これは手動の細胞追跡結果（**図 6f** 色線）および PIV 解析で、コロニー内の細胞は周辺の細胞と同じ速度、方向に移動していることから見て取れる。手動追跡については特徴的な構造（隙間や曲がりくねった個体）を手動で追跡している。コロニー先端付近の個体などいくつかの例外はあるが、これらはコロニーの外周にいるためコロニーに強く結合していないのだと考えられる。松山と松下らの報告によれば枯草菌の指状コロニーでは、外周壁面の細胞は動かないが、内部の細胞はランダムに動き回り、先端を押して枝状コロニーを拡張する分業体制にある（Matsuyama and Matsushita, 2001）。*Pseudanabaena* の形成する彗星状コロニーの先端もまた何層にも重なっており、集団の長軸に沿って整列した内側の個体に押し出されているようにも見える。境界面、特に運動方向の先端にいる個体層が内側の細胞に押されて動いているのか、自己駆動力で動いているのかは明らかになっていない。但し、U字型の単個体が自発的に動いている様子は確認しており（**図 6f**）、彗星状コロニーの先端を覆うような個体でも進行方向へ自発的に運動している可能性は十分に考えられる。

彗星状コロニーの底面の細胞は安定して寒天培地に接しており、一方で上層の細胞は底面より上の位置にいたため、直接底面と接していないことになる。一般的に滑走運動は培地表面との接触が必要であり、すなわち *Pseudanabaena* では培地表面に接しない上層と接する下層での分業もまた存在するはずである。底面の個体は運動能力を効率的に伝えられるが、上層の細胞は能動的には動けない。さらに彗星状コロニーが成長すれば、コロニーは 2 次元的にもならず Z 軸方向にも拡大する。もし上層の細胞が運動に寄与していないのであれば、彗星状コロニーの滑走速度は抗力と推進力がいずれ拮抗し、飽和あるいは減少すると推測できる。しかし実際には増加、あるいは拮抗に留まっている（高松, 2014）ことから、上層の細胞も何らかの形で集団運動に関与していると考えている。例えば上層の細胞は下層の細胞に乗って動き、周囲の運動を拡張する EPS を放出し、後続の個体の運動を促進することができるといったことが考えられる。

## 円盤コロニー

**図 10a** に寒天培地を滑走する彗星状コロニーが円盤コロニーになる過程の 40 時間にわたる典型的な軌跡を示す (**動画 6**)。コロニーは 22 時間目にプレート中央から出現し、点線 (**図 10a**, シアン→マゼンタ) で描かれたルートを移動した。その後コロニーは小さな円軌道に侵入し、56 時間目前後には彗星状コロニーから円盤状コロニーへと変化した。コロニーの面積は彗星状コロニーでも確認されているように、円盤コロニーに変化する過程の 56 時間目付近でわずかに減少したが、61 時間目以降は線形的に上昇した (**図 10b** オレンジ線)。これは円盤コロニーになる時に一瞬凝集し、それ以降は円盤コロニーが成長していることを示している。この成長は彗星状コロニー同様細胞増殖による成長だと考えている。速度については、円盤コロニーは一点に留まっていることから非常に低くなっているが (**図 10b** 青線)、これは円盤コロニー内の細胞が動いていないということではない。細胞レベルで観察すると円盤コロニー中の個体は円起動の運動を維持している (**図 10c**, **動画 1**)。それどころか、外周部分の速度は彗星状コロニーよりも速く運動している (**図 7**)。この彗星状コロニーが円盤コロニーに遷移する過程の再現性は、別の寒天培地上の 3 例に関して計測を行い、似た傾向の面積、速度の遷移となることを確認している (**図 11**, **動画 7**)。直径 1 mm 程度の巨大な円盤コロニーは 10 日間以上回転を維持することもあり、非常に安定した形態だと言える。**図 4c** のカイモグラフ上の垂直線がこの定常的な回転を示している (シアン色の矢頭)。この円盤コロニーは *Paenibacillus* sp. NAIST 15-1 が形成する回転集団と似ているように見えるが、*Paenibacillus* sp. NAIST 15-1 は突然回転を止めてしまう点で異なる (Kobayashi *et al.*, 2016)。*Paenibacillus* sp. NAIST 15-1 を始めとした、円盤コロニーを形成する種の多くでは、散在的なコロニーパターンの形成を行うことが報告されている。



### 図 10. 円盤コロニー

a. 図 4a 上の、円盤コロニーに遷移する彗星状コロニーの軌跡。ドットの色は撮影開始から 21 時間目(シアン)から 60 時間目(マゼンタ)までの時間経過を示す。上は 21 時間目、下は 60 時間目の写真で、矢頭は円盤コロニーの位置を示す。タイムラプスは動画 6 を参照。 b. 図 10a に示したコロニーの速度と面積の時間変化。水平軸状のカラーバーは図 10a の色に準ずる。 c. 図 2c の写真の円盤コロニーの形状と運動。タイムラプスは動画 1 を参照。 d. 円盤コロニーの自家蛍光を共焦点顕微鏡で撮影し、PIV 解析した結果。矢印は PIV の結果を示す。タイムラプスは動画 8 を参照。 e. 円盤コロニー中心からの距離と PIV 計測した流速のプロット。位置関係は図 12 に示す。Yamamoto *et al.* (2021) の図 4 を一部修正して転載。

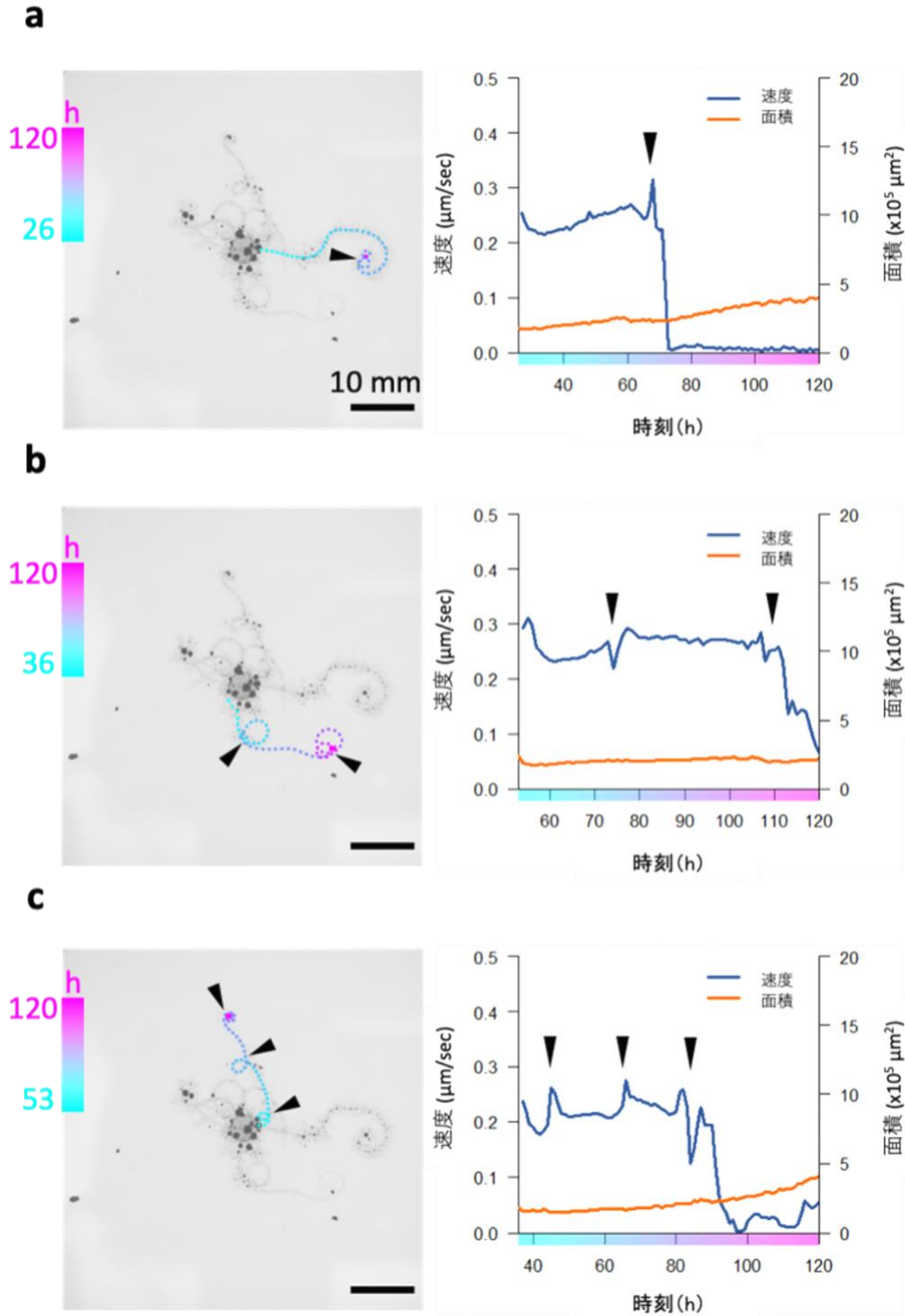


図 11. 円盤コロニーに遷移する彗星状コロニーの、軌跡および速度と面積の変化

a-c. 図 4a (動画 1) とは別のプレートで、図 10ab 同様の解析を行った結果。左図のドットの位置は追跡した、円盤コロニーに遷移した彗星状コロニーの中心位置を、ドットの色は時刻を示す。左右の図の三角形は急激な速度変化が起きた位置、または円盤状コロニーに遷移した位置を示す。タイムラプスは動画 7 を参照。Yamamoto *et al.* (2021) の図 S5 を一部修正して転載。

これらのバクテリアが形成する渦では、辺縁部の細胞が中心の細胞に比べて高い速度で運動する (Ben-Jacob *et al.*, 1998; Janulevicius *et al.*, 2015)。共焦点顕微鏡で撮影した動画の PIV 解析から、この傾向は *Pseudanabaena* でも確認できた (図 10d, 動画 8, 図 12)。共焦点顕微鏡を用いて、円盤コロニー内の培地と接する底面側の細胞の動きを観察したところ、観察した範囲において円盤コロニー内の細胞は形状をほぼ維持したまま一体となって回転している。円形の集団が一体となって動くということは角速度が揃っていて、速度は中心からの距離に従って上昇するはずである。そこで円盤コロニー内の速度分布を PIV 解析で求めた速度から確認した。図 10e は図 10d 及び図 12 で測定した、円盤コロニーの中心からの距離に対する速度の分布を示している。このプロットからは以下の結果を確認できる。(1) 中心からの距離 30  $\mu\text{m}$  以下の中央領域では低密度で、非常に遅いか、ランダムな方向に動いている。(2) 中心からの距離 100~180  $\mu\text{m}$  の回転領域では中心からの距離依存的に速度が上昇する。(3) 中心からの距離 180~220  $\mu\text{m}$  の外縁部では遅い部分 (0.02 以下) と速い部分 (0.2 以上) が混在している。もし回転する集団が完全に一体となっている場合、 $R$  を中心からの距離、 $\omega$  を円盤コロニーの回転速度として、回転速度  $v = \omega R$  に従うはずである。図 10e の速度分布では (2) 中心からの距離 100~180  $\mu\text{m}$  の回転領域について、完璧な直線にはなっていないものの、概ね中心からの距離に依存した速度分布をみせている。(3) 中心からの距離 200  $\mu\text{m}$  付近の速い部分も概ね同様の傾向で、遅い部分については、円盤コロニー外の個体を含んでいるためだと考えられる。一方で (1) 中心からの距離 30  $\mu\text{m}$  の領域では立ち上がりが遅れていて、実際に細胞が存在しない、あるいは一体的な運動にはなっていない部分がある。円盤コロニーは前述の通り彗星コロニーが円軌道に入って形成されると考えると、あくまで円盤というよりドーナツ状の円軌道なのかもしれない。なお、通常の培養では寒天 (Bacto agar) を使用したが、共焦点で観察した時は透明度確保のため 1.5% ゲルライトを使い、ゲルライトへの変更は集団形成と運動にはあまり大きな影響を与えないことを確認したが、集団の移動速度には若干影響した可能性がある。円盤コロニーの辺縁部の速度 ( $n=30$ ) を、彗星状コロニーの速度と比較した (図 7, 表 1) ところ、円盤コロニー辺縁部の速度は彗星状コロニーの速度を上回った。彗星状コロニーは培地からの摩擦の影響を先頭が受ける一方で、円盤コロニーは円に沿って並び、常に他のフィラメントの後を追いかけているため摩擦の影響が少ないかもしれない。また、もし EPS が摩擦を緩和するのであれば、一点に留まる円盤コロニーの周辺には EPS が溜まると想定でき、辺縁部の細胞はその恩恵を受けて彗星状コロニーよりも速度が上昇するとも想像できる。



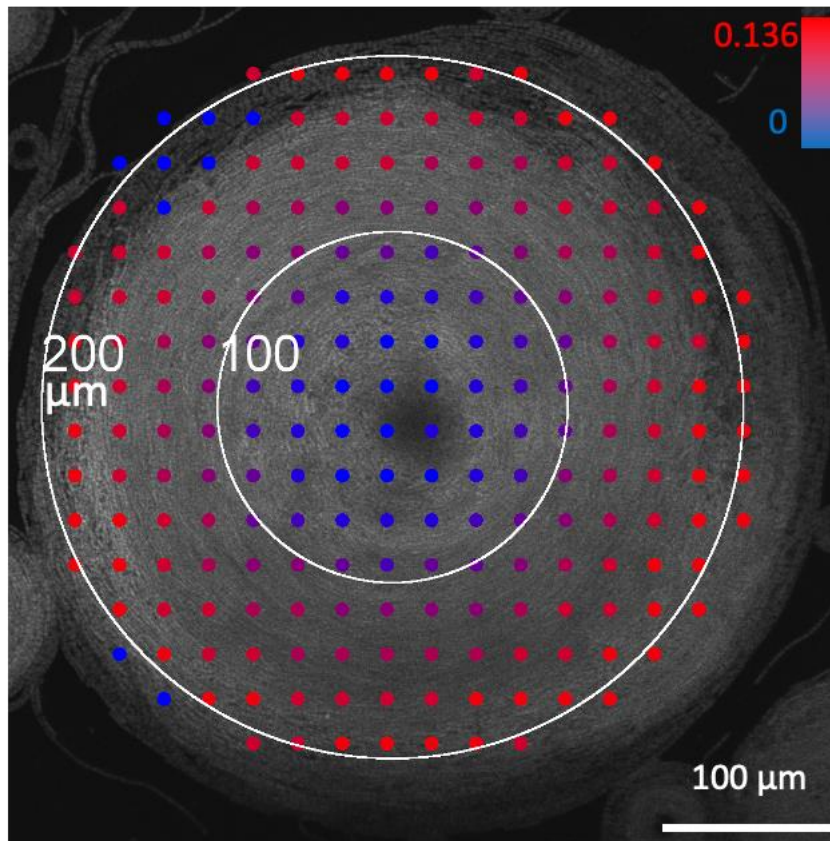


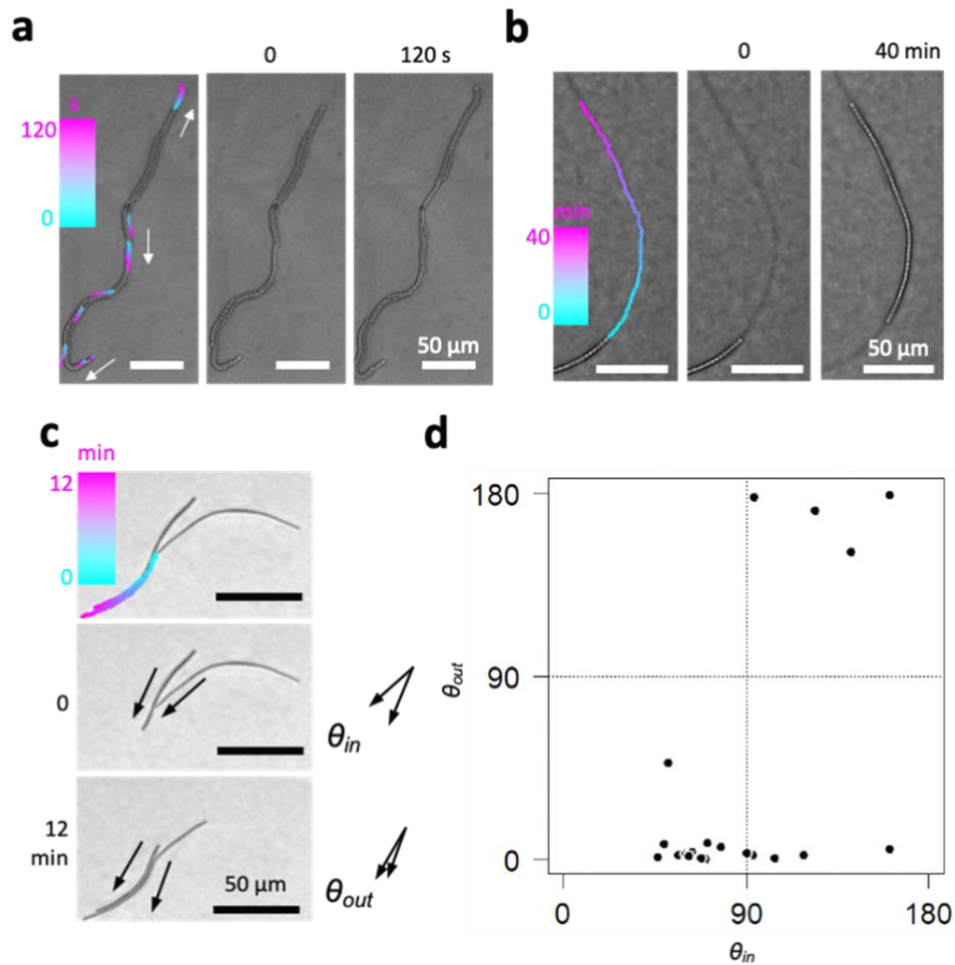
図 12. PIV 解析により算出した円盤コロニー内の速度の空間的な分布

図 10d(動画 8)の PIV 解析の結果を円盤コロニー上のみ、色で示した。色はフレーム間での移動距離を示し、青色が 0、赤色が最大値の 0.136 である。白色の円は中心からの距離を示す。Yamamoto *et al.* (2021)の図 S6 を一部修正して転載。

回転方向について上面から見た場合、時計回りと反時計回りは同程度に見えた。3つのプレートで各 10 個（合計 30 個）の円盤コロニーをランダムに確認したところ、時計回りのコロニー数と反時計回りのコロニー数の比はそれぞれ 6:4, 7:3, 4:6 で、全体としては時計回りが 56.7%、反時計回りが 43.3%であった。隣り合った円盤コロニーであっても同方向に回転するペアと逆方向に回転するペアが確認できた。回転方向は基本的に円盤コロニーの形成時から変わらないように見える。例外的に円盤コロニーが別の彗星状コロニーと合流して大きな摂動を受ける時に回転方向が変化することを確認している。回転方向は主に彗星状コロニーが曲がって円軌道を描き円盤コロニーになる際に曲がった方向で決定される。彗星状コロニーが曲がる方向に指向性は見られず、ランダムだと考えている。

## 束状コロニーと単個体

彗星状コロニーと円盤コロニー内以外では、殆どのバクテリアは単独で動いているか、あるいは束（**図 13a**）を形成している。束はいくつかの個体が長軸に沿って整列したコロニーである。彗星状コロニーや円盤コロニーでは近傍の個体と協調して動いていたが、束内の個体は安定的に整列せず、しばしば分離や合流を行う。たとえば**図 13a**の束を構成する個体の多くは下向きに進むが、端にある2つの個体は上端の方向に進んでいて、結果的に3つの束に分離することになる（**動画 9**）。単個体に着目すると多くの個体は長軸方向に進むが、運動方向が逆転することがある。このような反転運動は孤立した個体やコロニーの辺縁部で見られる一方、高密度な彗星状コロニーや円盤コロニーの内部で観測することは稀である。また、反転運動は短い個体に多い傾向が見受けられるが、本論文では定量的な解析は行っていない。また、既に記したようにいくつかの個体はU字型になり短軸方向に進む（**図 6f**）。これは個体内で必ずしも運動の方向が一致するわけではない（端と端では個体内で逆向きに運動している）ことを示している。個体が動いた跡には軌跡が確認できるが、この軌跡上を個体が移動する傾向にある（**図 13b**, **動画 10**）。詳細な機構は不明だが、寒天培地表面上に形成された溝、あるいは微生物の滑走運動を活性化すると推測されている（Thutupalli *et al.*, 2015; Burchard, 1982）細胞外多糖類（EPS）などの粘液を放出した跡だと思われる。どちらにしても、軌跡の追従は集団運動に関与すると思われる。既に記したとおり *Pseudanabaena* の細胞はEPSを放出するが、軌跡の形成との関係性を決定するにはより詳細な解析が必要である（Balagam and Igoshin, 2015）。2個体が衝突した時、それぞれは交差せず、お互いに整列して束を形成する（**図 13c**, **動画 11**）。**図 13d**に細胞の整列方向を、入射角の関数として示した。 $\theta_{out} \approx 0$  および  $\theta_{out} \approx 180$  のプロットは、衝突した個体が平行または逆並行に整列したことを示す。この「ネマティック配向」と呼ばれる整列は *Myxococcus xanthus* でも確認され（Starruß *et al.*, 2012）、*Pseudanabaena* の集団運動の鍵となると思われる。高密度の集団では近接した個体は、ほぼ相互に整列していることを記しておく。

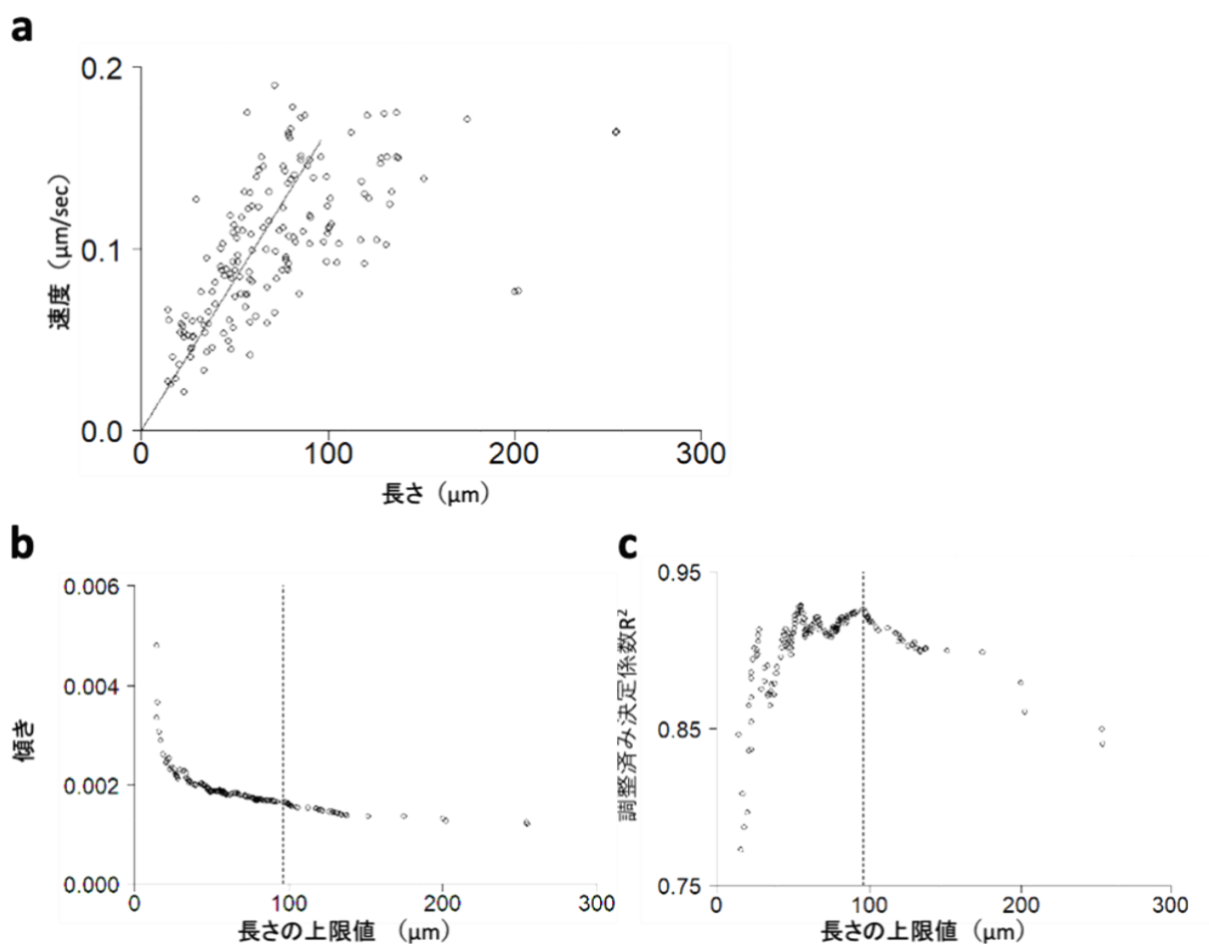


**図 13. 個体の軌跡追従と整列**

a. 束となった個体群の顕微鏡写真。色付きのドットは手動追跡した各個体の先端位置を 0 秒(シアン)から 120 秒(マゼンタ)まで示している。タイムラプスは動画 9 を参照。 b. 薄い線として見える軌跡を追従する個体。ドットは 0 分(シアン)から 40 分(マゼンタ)までの個体の先端位置を示す。タイムラプスは動画 10 を参照。 c. 衝突するフィラメントのタイムラプス撮影。端点を色付きのドットで 0 分(シアン)から 12 分(マゼンタ)まで示している。タイムラプスは動画 11 を参照。 d. 衝突する 2 個体の入射角と反射角。Yamamoto *et al.* (2021) の図 5a-d を一部修正して転載。

単個体の滑走速度は軌跡を追従しない場合、 $0.2 - 0.19 \mu\text{m}/\text{sec}$  まで様々であったが、個体長に依存して変化する傾向が見られた (図 14a)。 $100 \mu\text{m}$  以下の個体の速度は、ほぼ個体長に比例しているように見える。どの範囲で個体長に対する速度の上昇が線形に見えるかを確認するため、 $0 \mu\text{m}$  から上限値の長さの範囲のデータを用いて、上限値を変化させながら調整済み決定係数  $R^2$  とその時の近似直線の傾きを調べた (図 14bc)。調整済み決定係数は  $95.98 \mu\text{m}$  前後で極大値  $0.93$  を取り、その時のピアソンの積率相関係数は  $0.73$  である。これ以降は徐々に線形性が失われているように見える。第一章でも紹介した糸状性シアノバクテリア *Phormidium sp.* でも、平均速度が個体長に応じて増加すると報告されている (Sato *et al.*, 2014) が、この論文で著者が定義した平均速度とは、反転運動を含む移動距離を指しており、高い速度はすなわ

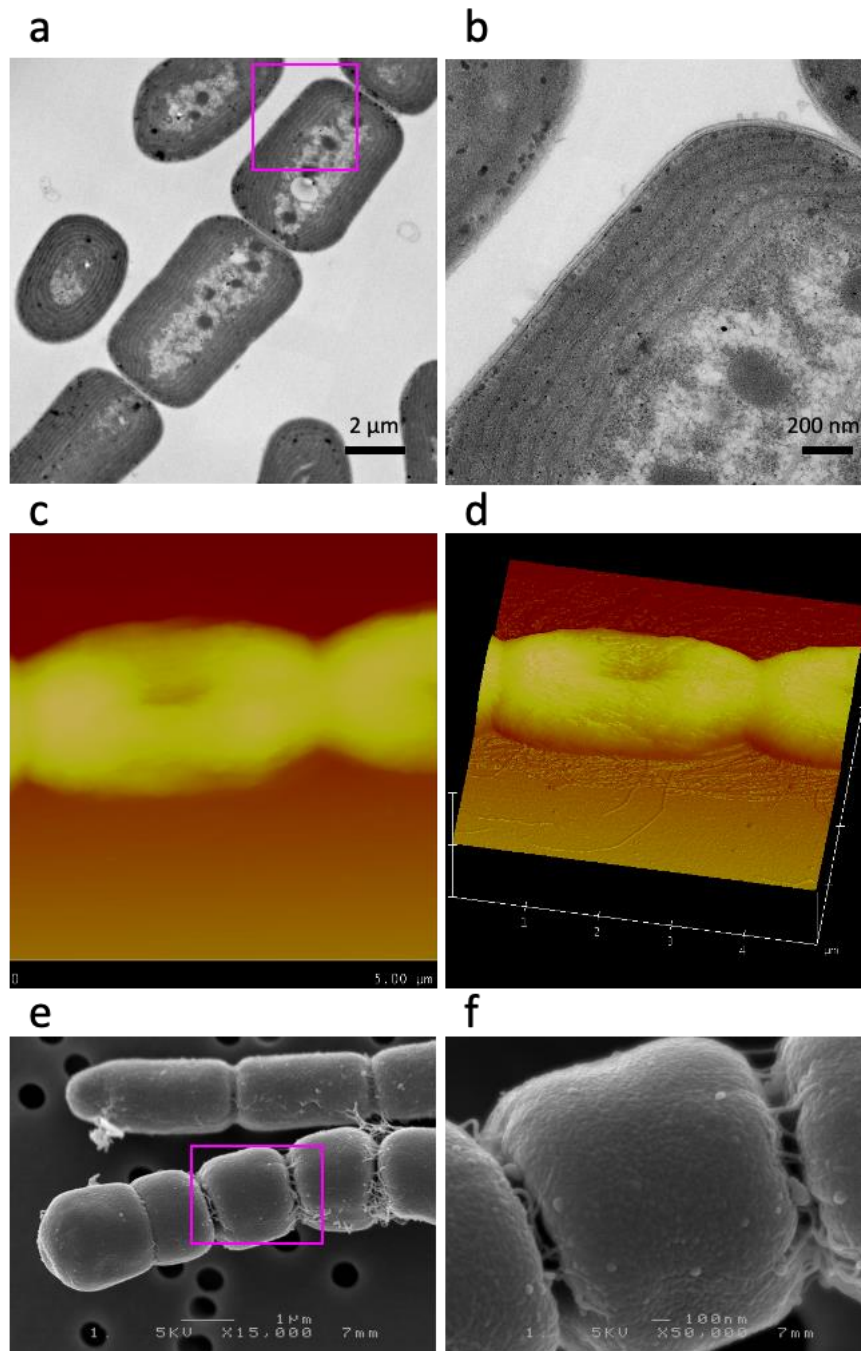
ち低い反転頻度を示す。一方で**図 14a** は反転運動を行っていない個体の速度と長さの関係を示し、*Phormidium* sp.の計測とは意味合いが異なる。これはそれぞれの細胞が運動マシナリーを持ち、一定の長さまではその運動マシナリーを同調させて有用に使えるためかもしれない。つまり運動マシナリーの駆動する方向が個体内で揃っているように見える。もし方向の同調がなければ長い個体でも短い個体と同等、あるいは遅いかもしれない。あるいは固体表面上で表面との摩擦を抑制する粘液を、長い個体のほうが放出するからかもしれない。数千細胞からなる彗星状コロニーが単個体の観測上での最高速度 (0.19  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) より速い速度で運動することを付記しておく。この速度は過去の軌跡を通過した時 0.5  $\mu\text{m}/\text{sec}$  にも増加する (**図 6bc**, **図 7**, **図 8**)。数千もの個体のネマティックな整列が運動を活性化し速度上昇を起こすことに加え、ネマティックな整列は運動方向と速度の同調にも関わっているのではないかと考えている。



**図 14. 個体長と運動速度の回帰**

a. 単個体の速度と長さのプロット。直線は 95.98  $\mu\text{m}$  以下の長さのデータを用いた回帰直線。Yamamoto *et al.* (2021) の図 5 を一部修正して転載。bc. 使用する実験データの上限值(閾値)に対する(b)傾きおよび(c)調整済み決定係数  $R^2$  値。各グラフの水平軸の値を上限, 0  $\mu\text{m}$  を下限とした範囲の実験値を基に直線回帰したときの各値をプロットした。図 14a の回帰直線には 95.98  $\mu\text{m}$ (垂直な点線で示す)の値を使用した。Yamamoto *et al.* (2021)の図 5e および S7 を一部修正して転載。

*Pseudanabaena* の滑走運動に用いられるマシナリーは現時点では不明であるが、糸状性シアノバクテリアの運動機構に関してはいくつかのモデルが提唱されていることは第一章で既に述べた。特に有力な *N. punctiforme* の運動モデルで運動機構の中心となる *hps*, *pil* 遺伝子については、改めて第三章のゲノム解読で論ずる。運動マシナリーの推定のため、まず TEM・AFM・SEM を用いて表面構造・形態解析を行った。TEM での観察の結果 (図 15ab), 細胞内には Bergey's manual に掲載された近縁種の *Pseudanabaena* (Castenholz, 2001) 同様に細胞壁に平行に多重のチラコイド膜があり、中央にカルボキシソームと思われる塊が整列していた。また、表面には細胞壁の層が確認でき、細胞表面には球形の付着物が複数存在していた (図 15abef)。この液滴状の付着物は他の *Pseudanabaena galeata* CHAB2916 や *Pseudanabaena minima* CHAB705 などでも確認でき (Yu *et al.*, 2015), DNA・RNA など細胞内物質を含んだマイクロベシクルではないかと考えている。シアノバクテリアのマイクロベシクルに関して、形成機構については未だ不明な点が多いものの、以前より観察の報告はされている (Lima *et al.*, 2020)。 *Pseudanabaena* のこの付着物もグラム陽性菌で確認される形態の、細胞壁の隙間から出現する小型のマイクロベシクルに似ている (Toyofuku *et al.*, 2017)。一方で、今回は示していないがグラム陰性菌のような、細胞全体が球体化したベシクルも確認されており (Turnbull *et al.*, 2016), 今後の解析が期待される。糸状シアノバクテリアの運動マシナリーとして提唱されている IV 型線毛 (TFP) や接合部の穴 (JPC) (Hoiczky and Baumeister, 1998), あるいは細胞壁下の整列した繊維 (Halfen and Castenholz, 1971; Adams, 2001) は TEM では確認できなかった。しかし、AFM による表面構造観察では細胞表面から生えているナノワイヤーを観測することができた (図 15cd)。ナノワイヤーの太さや構造は *Synechocystis* sp. や *N. punctiforme* で観察された線毛と太さや形状が類似しており (Dubrovin *et al.*, 2005; Duggan *et al.*, 2007; Sure *et al.*, 2016), このナノワイヤーは IV 型線毛だと推測している。これらの結果より、 *Pseudanabaena* の運動マシナリーは、 *N. punctiforme* 同様の滑走機構 (図 1) ではないかと推測している。さらに *Pseudanabaena* の集団形成にもこの運動機構が関わっているのではないかと推測しているが、高密度集団の形成を説明するには細胞間相互作用や細胞の物理的な性質をさらに理解することが必要である。



**図 15. 電子顕微鏡および原子間力顕微鏡による撮影像**

*Pseudanabaena* の細胞を各顕微鏡で撮影した画像。ab. 透過型電子顕微鏡画像。b は a の画像のマゼンタの四角形部分を倍率を変更し再撮影。cd. 原子間力顕微鏡画像。c は 2 次元画像で色は高さを示し、最大輝度を 2000  $\mu\text{m}$  とする。d は c を基に作成した 3 次元画像。ef. 走査型電子顕微鏡画像。f は e のマゼンタの四角形部分を倍率を変更し再撮影。(図 15abef 撮影: 深澤。図 15cd 撮影: 加藤, 筆者により再解析)

## 細胞の増殖につれて線状・樹状コロニーから小集団へと変化

マイクロメートル単位の幅の細胞がミリメートル単位の集団へと遷移する過程を観察するため、希釈した細胞懸濁液を寒天培地に滴下し一面に塗布、1.67 mm × 2.24 mm の顕微鏡視野内に1, 2 個体のみが存在する条件下で、植菌後 10 日間にわたり顕微鏡下でタイムラプス観察を行った（動画 12, 図 16 は動画 12 よりトリミング）。植菌直後には細胞は頻りに方向転換を繰り返しながら、細胞分裂して伸長し、結果として束状のコロニーパターンを形成した（～90 時間目）。この条件下では遠くへ移動する個体は観測されなかった。細胞密度が上昇するといくつかの枝分かれが生じた（～140 時間目, 図 16b 矢頭）。枝の伸長とともに内側では密度の上昇に伴い、個体が屈曲する様子が観測された。140 時間付近で急激なパターンの変化が生じ、培地全体を走り回る個体が出現し、周囲への拡散を始めた。この変化の後、細胞は視野全体に拡がっていく（～170 時間目）。この際、細胞は主に自他の細胞が動いた軌跡を通過し、通路に挟まれた隙間では小さな渦の形成が観測された（図 16c 矢頭）。さらに時間が経過すると小さな彗星状コロニーが現れ、渦は徐々に小集団に吸収されるなどして減っていく一方、彗星状コロニーは時間経過とともに大きく、高密度になっていく様子が確認された（～240 時間目, 図 16d 矢頭）。この視野内で観測した彗星状コロニーは高密度かつ一体的な運動を行うが、小型で安定性は比較的 low 低く、衝突などで容易に分裂する。この彗星状コロニーが成長するためには、細胞密度が少なく衝突が少ない植菌位置の外側へと脱出する必要があるかもしれない。また、160 時間前後で見られた小さな渦は成長とともに円盤コロニーになると想像していたが、200 時間目にはほぼ消滅して円盤コロニーには遷移せず、またこの視野内で円盤コロニー自体を確認することはできなかった。

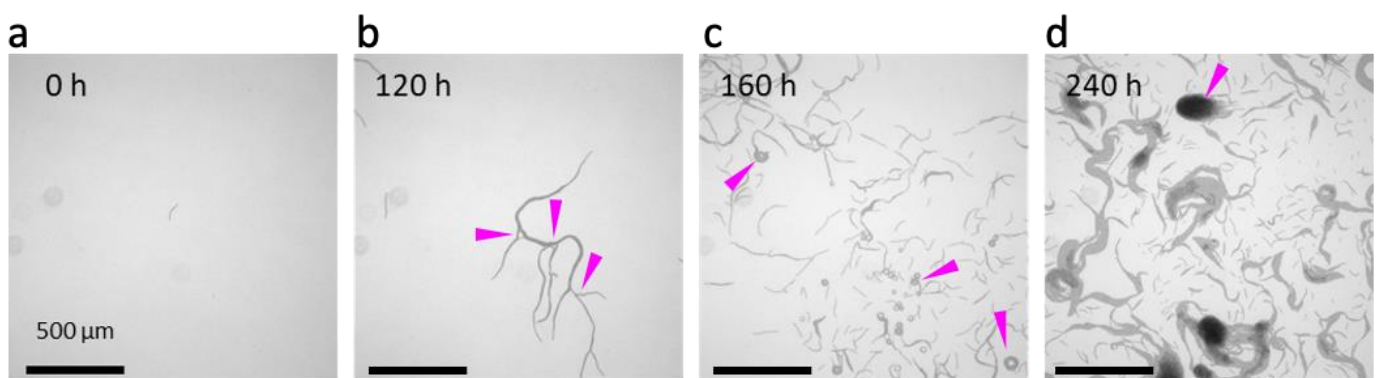


図 16. *Pseudanabaena* は線状のコロニーから散在的なコロニーに変化する

寒天培地状に少数の個体のみがいる状態から（視野内には 1 個体）、10 分間隔で 10 日間撮影した顕微鏡タイムラプス画像の一部。植菌から 1 時間以内に撮影を開始し、撮影開始時刻を 0 時間目とした。代表的なコロニーを示す時刻の画像を示す。マゼンタの矢頭は特徴的な構造（枝分かれ、渦、彗星状コロニー）を示す。タイムラプスは動画 12 を参照。

## コロニーパターンの遷移

培養過程で束、彗星状、円盤の各コロニーは互いにその形態を遷移させていくように見えた。植菌直後など細胞密度が相対的に低い時、前述のように個体は相互に衝突し整列する。**図 17a-f**に予想を含む、コロニーの形成過程を示す。彗星状コロニーの前駆体となる束の形成には**図 17ab**に示したような、先端を包み込む個体が必要だと思われる。**図 17a**の上側は並走する外側の個体が急に曲がることで他の個体に押しされ、先端を包み込むようになることを示している。下側は長軸に垂直な方向から衝突を受けた個体が先端を包み込み、彗星状コロニーの前駆体を形成する様子を描いている。被覆個体は、少なくとも初期段階で、個体の整列がバラバラにならないようにすることで一体的な運動を可能にすると考えている。そうでなければ**動画 9**のように個体はバラバラになってしまうだろう。被覆している個体はまた他の個体を受け止めることで、彗星状コロニー前駆体の成長を助けているとも考えられる。

私たちは、高密度のコロニー形成には集合を促進するための正のフィードバックが必要だと予想している。彗星状コロニーは細胞分裂および、**図 17g**や**動画 13**に示したような他の彗星状コロニーや束との合流で大きくなる(**図 17b-d**)。十分に成長した彗星状コロニーは時に急に曲がることもある。これは局所的な培地環境(荒れ具合や水分の含有量)の違いや軌跡への侵入により、集団内の細胞の速度に差が出るためだと思われる(**図 17e**)。このような屈曲により円軌道を描くようになった彗星状コロニーのいくつかは、円盤コロニーへと変化する(**図 17h**, **動画 14**)。既に記した通り、殆どの円盤コロニーは安定して回転を続けるが、**図 17i**や**動画 15**に示すように他の彗星状コロニーが衝突した時などには、円盤コロニーから彗星状コロニーへと戻ることがある。**図 4b**で言えば垂直線(円盤コロニー)が途切れている位置がそれにあたる。最終的に多くの安定した円盤コロニーと、いくつかの彗星状コロニーが寒天培地上に散在するコロニーパターンが形成される。



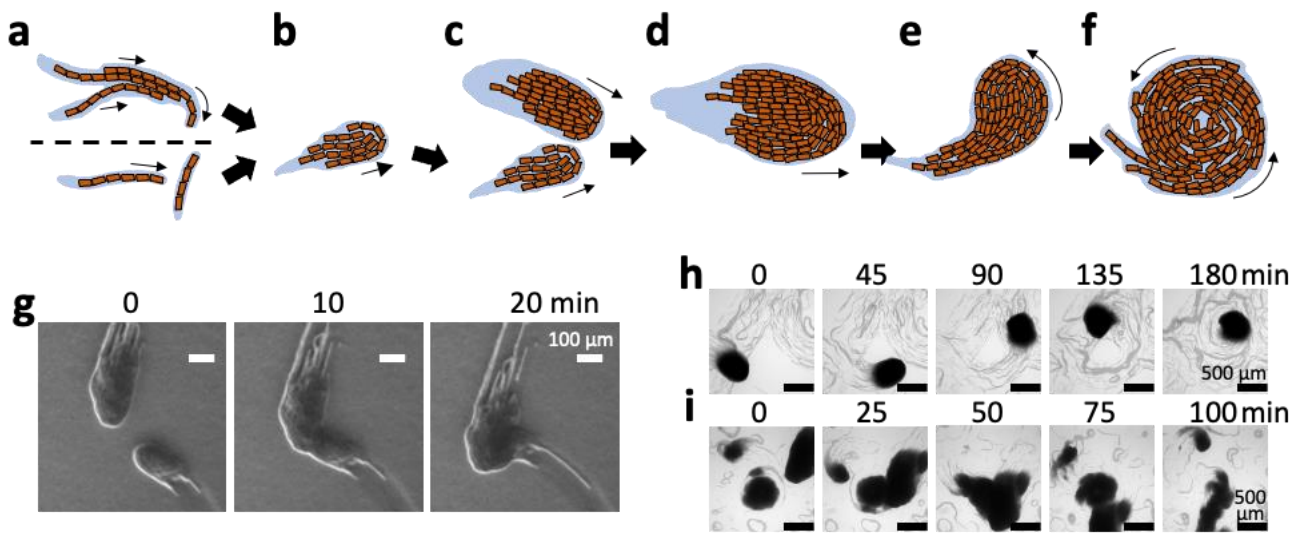


図 17. 単個体・束状コロニーから彗星状コロニー・円盤コロニーが形成される過程

a-f. コロニーパターンの遷移の概略図。個体は茶色、粘液は薄青色で示す。突然の先行する個体の屈曲(a 上)または個体同士の衝突(a 下)により、曲がった個体が進行方向先端を被覆している束となる(b)。これが彗星状コロニーの前駆体となる。彗星状コロニー同士の合流(c)や細胞分裂により彗星状コロニーは大きくなる(d)。運動方向の変化(e)で円軌道に入り、自己の尾に追従する形となり、やがて円盤コロニーとなる(f)。個体の脱落や衝突が起こると小さな集団や個体、束へと分裂する。g-i. 集団が遷移する様子のタイムラプス撮影。g. 2つの彗星状コロニーの衝突が衝突により合流する様子。タイムラプスは動画 13 を参照。h. 彗星状コロニーが円軌道に入り、円盤コロニーを形成する様子。タイムラプスは動画 14 を参照。i. 彗星状コロニーが円盤コロニーに衝突し、円盤コロニーが崩壊して彗星状コロニーになる様子。タイムラプスは動画 15 を参照。Yamamoto *et al.* (2021)の図 6 を一部修正して転載。

## まとめ

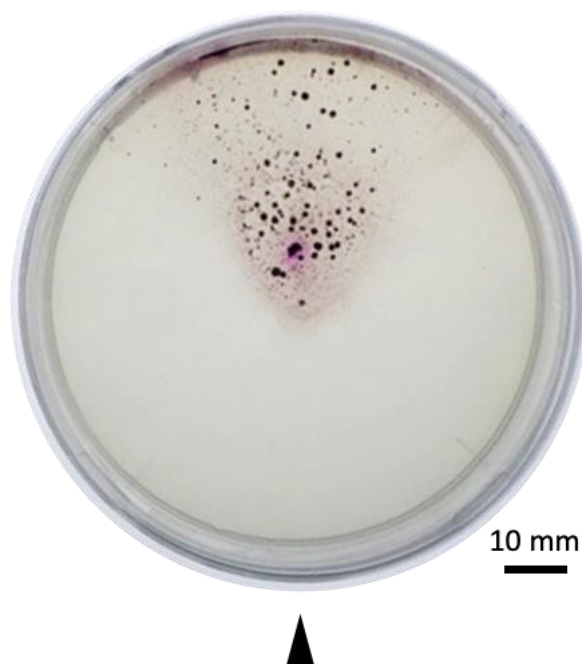
私たちは糸状シアノバクテリア *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 が集団運動により形成する散在的なコロニーパターンの形態について説明をしてきた。凝集した細胞は、彗星状コロニーと円盤コロニーからなる様々なサイズの散在的な集団を形成した。私たちの研究は以下のプロセスがこのコロニーパターンの形態に重要だと示唆した。(1) 固体表面上での粘液放出あるいは溝の形成による軌跡の形成とその追従、(2) ネマティックな整列による束の形成、(3) 束の先頭を被覆する個体が誘引する彗星状コロニーの形成、(4) 自己の軌跡を追従し円軌道を描く彗星状コロニーによる、円盤コロニーの形成、(5) 衝突などによるコロニー形態の遷移である。

彗星状コロニーは軌跡に何らかの細胞外物質を残しながら移動し、軌跡上を移動する時には速度が上昇する。培地との摩擦を軽減していると考えられるこの物質は多糖類または細胞外 DNA などである可能性が先行研究から示唆されるが、詳細は不明である。この細胞外物質の解析もまた、今後の解析が期待される。また、彗星状コロニーの中では細胞同士が整列し、お互いに相対的な位置を変えずに一体となって動

いていた (図 6e)。このように安定的かつ一体的な集団を形成するには、ネマティックな整列 (図 13cd) が重要であるものの、それだけでは難しいと思われる。たとえば複数の個体の先頭を被覆し得る U 字型の個体であったり (図 6f)、多糖類に代表される粘液であったり (図 9)、フィラメント同士をまとめる要素が必要だと予想される。その要素は特定できていないが、ひとつは線毛がその役割を果たしている可能性がある。今回の研究で *Pseudanabaena* の運動機構を特定するには至らなかったが、固体表面には多くの繊維があり (図 15cd)、これは IV 型線毛だと考えている。接着により一体的な運動を行う集団が形成されることは、微小管と DNA を融合させた *in vitro* アッセイでも示唆されている (Keya *et al.*, 2018)。これらの彗星状コロニーは一定の曲率軌道に入ると自己の軌跡を追尾することで円軌道に突入し、円盤コロニーとなる。円盤コロニーが非常に安定であることは、速度がコロニー中心からの距離に従って上昇することと無関係ではないと考えている。大腸菌の懸濁液の液滴で形成される渦では、このような中心からの距離に従った速度上昇が見られない場合もあり、この渦では一定周期で回転方向の反転が起こる (Liu *et al.*, 2021)。円盤コロニーで中心からの距離に従った速度の上昇を可能にしているのは、ひとつは彗星状コロニーと同様、他の個体との整列および接着によるもの、もう一つは一点に留まることで細胞外物質が蓄積し、通常より高い速度が出せることにある (図 7, 表 1) と考えている。仮に外周の速度が遅いと、内周の角速度に対して追いつくことができず、外周の細胞が乖離することが想定される。逆に言えば、この速度の上限値がコロニーの大きさを決めている可能性もある。

観察したコロニーパターンは人工的な環境で出現した形状ではあるが、列挙したような特徴を持つコロニーパターンは外環境での適応にも役立つと予想している。たとえば円盤コロニーのような一か所にとどまる高密度集団の形成は好適環境で安定したバイオフィルムを形成するのに役立つであろう。さらに彗星状コロニーとして集団で素早く移動することで、生息地の拡大や非好適環境から離脱することができる。言い換えれば、このシアノバクテリアはポジティブフィードバック的な凝集の成長と、生息地からの分散によりバイオフィルムを形成する生存戦略を取ったのであろう。人工的な平面での純培養で示すコロニーパターンは自然環境で示した生存戦略の一部を示していると思われる。もちろん自然環境は非常に複雑で、移動集団の特徴は走光性や走化性の影響を受けることは容易に想像できる。2007 年に株を単離した時は正の走光性を示したが、継代培養する過程で、恐らく変異が入り負の走光性を示すようになったことを記しておく (図 18)。この状態でも彗星状コロニーと円盤コロニーの形成は明確に確認することができ

た。負の走光性を示す集団の形は彗星状コロニーのように見え、この環境下では彗星状コロニーの移動方向が制限され、光源と反対の方向に向かう。更なる定量的および形態的な解析を行うことが、自然環境と実験室環境での集団の挙動を比較する上で必要である。



**図 18. 負の走光性を示す様子**

細胞懸濁液を 90 mm プレートに入れた寒天培地の中央に滴下し、10 日間培養した。三角形は生育光の方向を示している。Yamamoto *et al.* (2021) の図 S8 を一部修正して転載。

## 第三章 短個体長変異株との比較およびゲノム解析

### 要旨

第二章での実験結果から、彗星状コロニーや円盤コロニー、散在的なコロニーパターンの形成には細胞外物質による通路形成や凝集形成、衝突と整列などが重要だと推測された。標準株 NIES-4403 のコロニーパターンに関する性質が明らかになってきた一方、遺伝学的な観点から運動や集団形成のメカニズムに迫ることはできていなかった。このような中で *Pseudanabaena* を継代培養する過程で、彗星状コロニーや円盤コロニー、あるいは散在的なコロニーパターンを呈さない変異株 (ILC 580) が分離された。この株を改めて単コロニー単離し顕微鏡観察したところ、運動の様相が異なり、1 個体の長さが著しく短い表現型を示すことを確認した。同時に *Pseudanabaena* NIES-4403 標準株の全ゲノム解析を行う試みが行われ、変異株とゲノムの情報を比較することでコロニー形成に必要な遺伝学的要素を抽出できるのではないかと考えた。まず標準株のゲノム情報について、Miseq によるシーケンスとギャップ部位のダイレクトシーケンスを用いて、結果として一部の繰り返し配列を除いた 99.7%以上のゲノム配列を決定した。標準株の配列と同時に変異株のゲノム DNA も次世代シーケンサーで解読し、標準株の配列をテンプレートとして変異株の配列をマッピングし、影響が高く、かつ機能が推測された遺伝子上の変異を 3 箇所抽出した。この変異が入った 3 遺伝子が散在的なコロニーパターン形成に大きく関わっていると推測したが、現在まで *Pseudanabaena* の遺伝子を操作する形質転換系は確立できていない。今後はこの候補遺伝子群から絞り込むための研究が期待される。

### 序論

第二章では *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 の表現型について説明した。細胞が衝突・集合して一体となった彗星状コロニーが培地上を移動し、円盤コロニーとなって長期的に同位置で回転運動を続けた結果、離散的なコロニーパターンを形成するという内容である。これらは多くが観測事実となるが、詳細な遷移過程の一部は推測によるモデルである。実際にコロニーを形成する要素を探索するには、遺伝学的または環境操作や細胞の処理によりコロニーが出現しない条件と出現する条件を探索し、比較することが望まれる。そのような中で、筆者の所属する研究室で東海林らにより彗星状コロニーや円盤コロニー、あるいは散在的なコロニーパターンを呈さない変異株が分離された。この株を改めて単コロニー単離し顕微鏡観察

したところ、運動の様相が異なること、また、1 個体の長さが著しく短いことを確認した。また、運動速度についても標準株に比べて低くなる傾向にあることが示唆された。

そこで、豊橋技術科学大学の広瀬侑博士との共同研究により *Pseudanabaena* の全ゲノム解析を行った。Miseq によるシーケンスとギャップ部位のダイレクトシーケンスを用いて、一部の繰り返し配列を除いた 99.7% をカバーするゲノム DNA の塩基配列を決定した。標準株の配列と同時に変異株のゲノム DNA も次世代シーケンサーで解読したため、標準株の配列をテンプレートとして変異株の配列をマッピングし、変異を 40 箇所抽出した。この中より標準株内の塩基配列にもバリエーションがある箇所を除き、変異株にのみ固有の変異箇所、かつ遺伝子上に存在する影響の大きい変異は 5 箇所あり、これらの変異が入った遺伝子のうち明確な機能が示唆されたのは 3 遺伝子であった。特に影響の大きい変異として、ShlB ドメインを持つタンパク質をコードする ORF には終止コドンが挿入されていた。ShlB ドメインは、細胞外物質の放出を担う分泌系タンパク質に保存されるモチーフであることから、たとえば多糖類の分泌などに関与している可能性がある。

## 材料および方法

### 株と培地

短個体長変異株（以下変異株）は 2013 年 9 月頃に NIES-4403 株を継代培養しているプレートからコロニーパターンが変化した株として分離され、しばらく継代培養された後、単コロニー単離された。単離は BG-11 液体培地に白金耳で取った菌体を懸濁し、ピペッティングにより混合、OD 値（730 nm）が 2.0 になるように BG-11 液体培地を加えて調整を行った。これを原液とした 1000 倍希釈の懸濁液を作製し、90 mm プレートに作製した BG-11 寒天培地上に 50  $\mu$ l を滴下した後スプレッダーで培地全面に塗布した。コロニーが肉眼で見える植菌後 5 日程度で、単コロニーとなったものを、100  $\mu$ l の BG-11 液体培地に懸濁し、懸濁液を新しい寒天培地に 4  $\mu$ l 滴下することで 1 個体由来と思われる集団を得た。本実験では 3 系列採取したうちの 1 系列のみを実験に使用した。液体培地での振盪培養は、35 mm6 穴プレート（#3810-006, Iwaki）に 4 ml の液体培地を入れ、細胞懸濁液約 10  $\mu$ l を滴下し、振盪培養を行った。その他培養条件や培地条件、継代の方法については特筆しない限り第二章に記したものと同様に行った。

## 個体長の測定

図 19d に示した個体長の測定については、植菌から 10 日程度経過したプレートからコロニー（標準株は円盤コロニー、変異株は生育領域の端）を白金耳で採取、100  $\mu$ l の液体 BG-11 培地に懸濁し、寒天培地上に滴下して 10 分間クリーンベンチ内で乾燥させた後、倒立顕微鏡で観察を行った。顕微鏡の観察条件については第二章に準ずる。変異株については 1 プレートから採取した 81 個体、標準株については 1 プレートから採取した 101 個体についてデータを測定し、データ数を揃えるため標準株内の 101 個体のデータから 81 データを無作為に抽出した。

## 画像解析と統計処理

図 19d に示した個体長の分布については、R の Beeswarm プラグインを使用した。その他の画像解析、統計処理については特筆しない限り第二章に準ずる。

## ゲノム DNA 抽出

ゲノム DNA 抽出用のサンプルは、寒天培地から摂取した細胞を容量 1200 ml の角型ガラス製培養瓶内の液体 BG-11 培地 1000 ml に加えて通気培養し、2 週間程度培養した。培養後の細胞懸濁液を 50 ml 遠沈管に 50 ml 入れ、3500 rpm で 10 分間遠心を行い、上清を除去した後に 1.5 ml チューブに入れ替え、さらに 3500 rpm で 1 分間遠心を行うことで集菌を行った。菌体は液体培地 50 ml あたり 0.3 - 0.6 g 程度得られた。まず 5 M ヨウ化ナトリウム溶液を加えて摂氏 50 度で 1 分間加熱し、ボルテックスミキサーにかけ、TE バッファーを 500  $\mu$ l 以上加えて液体の比重を軽くした後、15000 rpm で 5 分間遠心を行い、上清を除去した。得られた細胞を TE バッファーに溶解し、3 mm ビーズ 4 粒程度が入った 2 ml スクリューキャップチューブに移し、3500 rpm で 5 分間遠心して上清を捨てた後、摂氏-80 度で凍結し、マルチビーズショッカー（安井器械）で 1800 rpm 60 秒の破碎処理を行うことで、多糖類の破碎を試みた。破碎したサンプルを 0.1 mm ビーズが約 50  $\mu$ l 入った 2 ml スクリューキャップチューブに移し、TE バッファー 400  $\mu$ l とリゾチーム溶液 100  $\mu$ l を入れて再度マルチビーズショッカーで 2500 rpm 60 秒の破碎処理を行い、細胞の破碎を行った。得られた細胞破碎液に 10 mg/ml RNaseA を 50  $\mu$ l 加え、65 度で 10 分間インキュベートし、RNA の分解を行った。さらに TE バッファーで飽和したフェノールを 250  $\mu$ l、クロロホルムを 250  $\mu$ l 加え

て 15000 rpm で 15 分間遠心し、上清に等量のクロロホルムを加えて 15000 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しいチューブに移した。この段階でほぼゲノム DNA が単離されていることが期待されるが、さらに純度を上げるために Cica genius DNA prep kit (関東化学) を用いた。上清に TE バッファーを加えて 400  $\mu$ l に調整後、Buffer PD を 140  $\mu$ l 加えて氷上に 5 分間静置し、EzSep filter に移し 14000 G で 2 分間遠心し、ろ液を 1.5 ml チューブに移して 1.5 倍量の Buffer BD を加えた。この液を GeneAll SV Column Type G に移して 10000 G で 30 秒間遠心後、ろ液を捨てて Buffer CW700  $\mu$ l をカラムに入れて再度 10000 G で 30 秒遠心する洗浄過程を 2 回繰り返した。カラムを取り出して 1.5 ml チューブにセットし、カラムの中央に Buffer AE を 100  $\mu$ l 加えて 5 分間静置し、10000 G で 1 分間遠心を行うことで精製されたゲノム DNA 溶液を得た。抽出したゲノムは分光光度計 Nanodrop2000 (Thermo scientific) を用いて吸光度を測定し、濃度および純度を推定した。また、電気泳動を行い、得られたゲノムの断片長を測定した。最終的にこの手法を用いて、50 ml の液体培地あたり約 8  $\mu$ g のゲノム DNA を得ることができた。

### **de novo ゲノムシーケンス**

得られたゲノム DNA を用い、広瀬侑博士 (豊橋技術大学) に依頼して *de novo* ゲノムシーケンスを行なった。まず Truseq PCR free library prep kit (Illumina) を用いてペアエンドライブラリを、Nextera Mate pair prep kit (gel-plus) (Illumina) を用いて 8 kb のインサートを持つメイトペアライブラリを作製し、MiSeq Reagent kit v3 600 cycle kit (Illumina) を用いてシーケンスが行われた。シーケンサーは MiSeq (Illumina) が用いられた。得られたリードは ShortReadManager (Ohtsubo *et al.*, 2012) でトリミングが行われ、Newbler (v2.9: Roche) にてアセンブルが行われた。発生したギャップは GenoFinisher および AceFileViewer (Ohtsubo *et al.*, 2012) を使用し、配列決定が行われた。環状ゲノムマップ (図 21) は DNAPlotter (Carver *et al.*, 2009) を用いて描画した。

### **ギャップ部位のシーケンス**

ギャップ部位の塩基配列は、PCR 産物をサンガー法を用いてダイレクトシーケンスすることで決定した。シーケンスは FASMAC 社に委託した。解析に利用したプライマーは、広瀬博士から送られた塩基配列情報をもとに作製した。各ギャップの上流域および下流域に相同な配列を持つプライマーを用い、ゲノ

ム DNA を鋳型とする PCR を行い、増幅産物のダイレクトシーケンスを行った。得られた波形データを解析ソフト A plasmid editor (Davis and Jorgensen, 2022) を用いて比較し、編集ソフト Bioedit (Hall, 1999) を用いて整列、解析した。さらにギャップが続く場合は同様のシーケンス解析を繰り返した。

### リシーケンス(変異解析)

変異株のゲノム DNA の塩基配列のリードは、標準株の *de novo* ゲノムシーケンス同様の手順で得た。得られたリードは FastX toolkit (Hannon, 2010) で Quality 値を基にリードのトリミングおよびフィルタリングを行い、bwa (Li, 2009) を用いて標準株のゲノムをテンプレートとしてマッピングした。samtools (Li *et al.*, 2009) を用いてソートおよびインデックスを作成し、picard (Broad Institute, 2019) を用いて ReadGroup の付与、GATK の UnifiedGenotyper (Auwera and O'Connor, 2020) を用いて変異箇所を抽出し、snpEff (Cingolani *et al.*, 2012) を用いて変異のアノテーションを行った。結果として得られた変異は、Integrative Genomic Viewer (Robinson *et al.*, 2011) を用いて目視で変異を再確認した。



## 結果と考察

### 個体長変異株の分離，コロニーパターンと特徴

NIES-4403 株由来の短個体長変異株 ILC 580 は、彗星状コロニーを形成しない自然変異株として分離された。ILC 580 は散在的なコロニーパターンを示さなくなり、植菌位置から等方的に広がる (図 19b)。これは一見すると枯草菌の呈する、低寒天濃度かつ養分が十分にある時に等方的に広がるフィッシャー様パターン (Matsushita *et al.*, 2004) に近いように見える。しかし枯草菌のフィッシャー様パターンは細胞が重ならず一層で広がり、各個体が単独で界面を超えて移動する特徴を持つが、この株はそれほど活発な動きは見られなかった。細胞が層状になり周期的にコロニーを拡大する同心円状パターンと、フィッシャー様パターンの中間的な印象を受けた。標準株では、彗星状コロニーが植菌位置から高速で遠方に移動するため、標準株の生育範囲の拡大速度は植菌後 6 日前後から急激に上昇する (図 19c)。今回の観察では 10 日前後で標準株の生育範囲の拡大速度上限に達したように見えるが、これは観察範囲が 90 mm プレーートの端に達したため、潜在的にはさらに生育距離を拡大する可能性がある。一方で変異株は標準株に比べて初期の拡大速度は早い、彗星状コロニーに起因する進出はなく、緩やかな拡大速度となる。このようなコロニーパターンの違いを生じている要素を確認するために顕微鏡観察を行ったところ、個体 (フィラメント) の長さが一見してわかるほど短くなっていた。標準株が平均 48.8  $\mu\text{m}$  であるのに対し、変異株は平均 10.8  $\mu\text{m}$  と著しく短く、また標準株の中には 200  $\mu\text{m}$  近くの長さの個体も存在したが、変異株は最大でも 30  $\mu\text{m}$  に達しない程度であった (図 19d)。また、液体培地で振盪培養した場合、標準株では細胞の凝集が見られるが (図 5)、変異株では少なくとも目視レベルの観察では、凝集を確認できなかった (図 19e)。また、個体長が短いと運動しないとの報告が他種の *Flexibacter* FS-1 で報告されているが (Costenbader and Burchard, 1978)、*Pseudanabaena* の変異株は短い個体でも運動性を示した。

変異株についてもコロニーパターンの寒天濃度依存性を確認した (図 20)。0–0.075%ではほぼ液体培地のような状態で、標準株では網目状に繋がった様子が顕微鏡下で確認できたが、変異株では凝集は確認できたものの、そのような架橋はほぼ見られなかった。0.3%では標準株との差異はあまり確認できなかった。培地内に潜り込むためお互いの接触が少なく、相互作用の影響があまりないと思われることは二章で説明したが、相互作用の少ない培地内部での運動では、走性などが無い限りコロニーパターンにあまり差はでないかもしれない。3.0%の時にも、ほとんど植菌位置の境界面から出ず、枝状のコロニーを形成して

いるのは標準株と同様であった。しかし標準株で見られた植菌位置辺縁部での円盤コロニーは見られず、枝も短く太いように見える。枝の形成はそのほとんどが運動ではなく、増殖を伴った個体の伸長に由来すると考えているが、増殖してもすぐ断片化する変異株に比べ、長く伸長できる標準株の枝の方が細長くなるのかもしれない。1.5%では既に述べたとおりだが、0.75%では非常に小さな集合が成長領域の界面で確認できている。これはラフトと呼ばれる *M. xanthus* の集団にも似ている (Kaiser and Warrick, 2014)。この集団が彗星状コロニーのような大きさに成長する様子は観測できなかった。

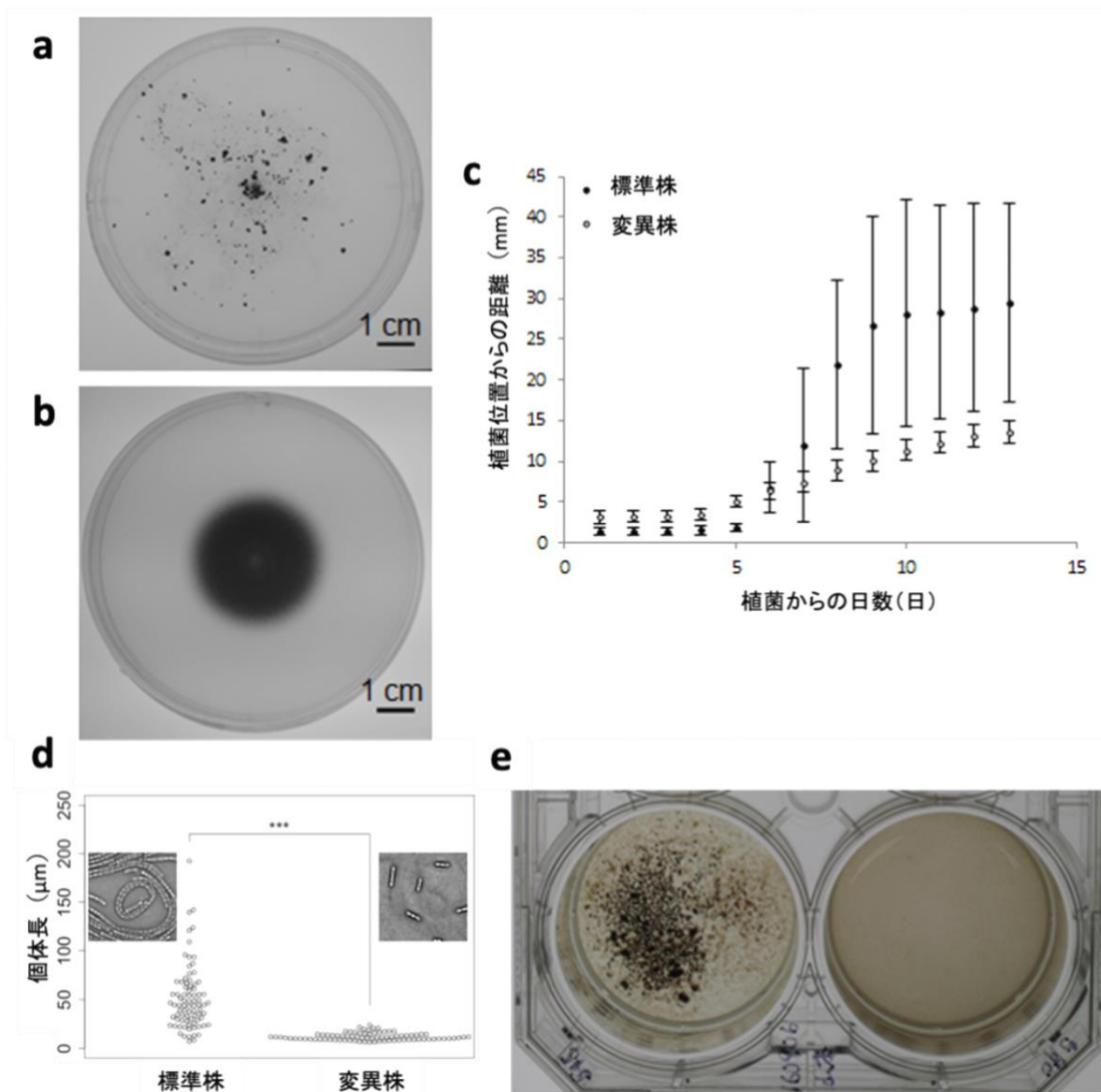
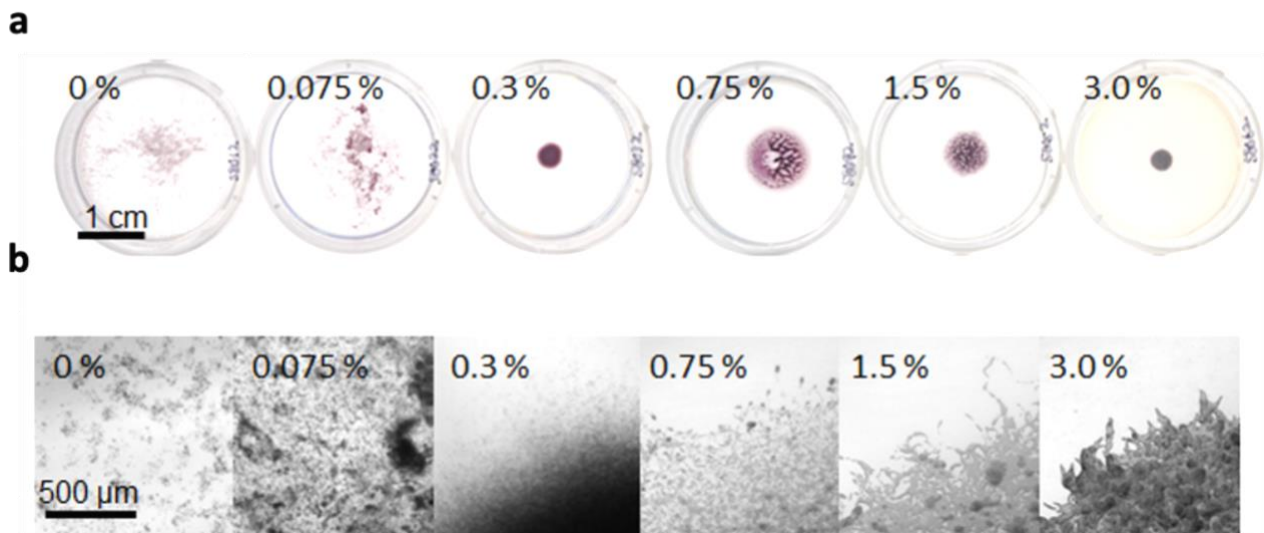


図 19. 短個体長変異株 ILC 580 は標準株と異なるコロニーパターンを呈する

標準株から単離された個体長変異株(以下、変異株)のコロニーパターン。90 mm プレートでの a. 標準株の写真(図 3a と同一写真, 比較のため再掲), b. 変異株の写真。植菌から 11 日目(250 時間)の画像。c. 標準株と変異株の植菌からの日数に対する, 植菌位置からの最大到達距離。各 3 プレートでの平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。d. 標準株と変異株の個体長の長さの測定結果。各 n=81。\*\*\*は Wilcoxon の順位和検定で p 値が 2.2E-16 未満<0.001 以下であることを示す。e. 標準株と変異株の液体培地での振盪培養結果。左が標準株, 右が変異株。植菌から 6 日目の写真。



**図 20. 変異株の寒天濃度依存的なコロニーパターンの変化**

寒天濃度が 0%, 0.075%, 0.3%, 0.75%, 1.5%, 3.0% の寒天培地上で変異株が呈する a. 35 mm プレート全体のコロニーパターン と b. その顕微鏡画像。植菌から 6 日目に撮影。

#### 標準株 NIES-4403 の *de novo* ゲノム DNA 解析

標準株と変異株の遺伝子レベルの相違を検討するため、ゲノム DNA の解読を試みた。まず、基準となる標準株について改めて単コロニー分離を行なったうえでゲノム DNA を抽出し、共同研究者の広瀬侑博士（豊橋技術科学大学）に依頼して、次世代シーケンサーによる *de novo* ゲノムシーケンス解析を行った。この際 3 つのコロニーについてシーケンスを行ったが、NIES-4403 のゲノム情報としてはそのうちの 1 株のみの情報を用い、残りの 2 株の情報については後述する変異解析の参考に用いた。シーケンスの結果、染色体のゲノムサイズは約 4.6 Mbp、5 個のプラスミドが存在した。塩基配列はゲノム全体の 99.7% を決定するに至ったが、ギャップが 9 箇所発生し、次世代シーケンサーの解析結果のみで完全ゲノム配列を構築するには至らなかった。次世代シーケンサーで解析できなかったギャップ部位の発生については、たとえばグアニンおよびシトシンの含有量が多くエマルジョン PCR 過程において DNA 断片が増幅しなかったり、繰り返し配列により整列が困難な場合が考えられる。ギャップ部位に対しては、両端に相補的なプライマーを用いた PCR とサンガー法によるシーケンス解析を用いて配列を決定した。その結果、9 か所のギャップ部位のうち 7 箇所については配列を決定することができた。残る 2 箇所のギャップには、それぞれ 69 bp、123 bp の配列が繰り返して存在していることが確認され、ギャップ部位の配列を埋めるには至らなかった。最終的に現在 5122018 bp の塩基配列を解読している。このゲノムマップを **図 21** に示す。

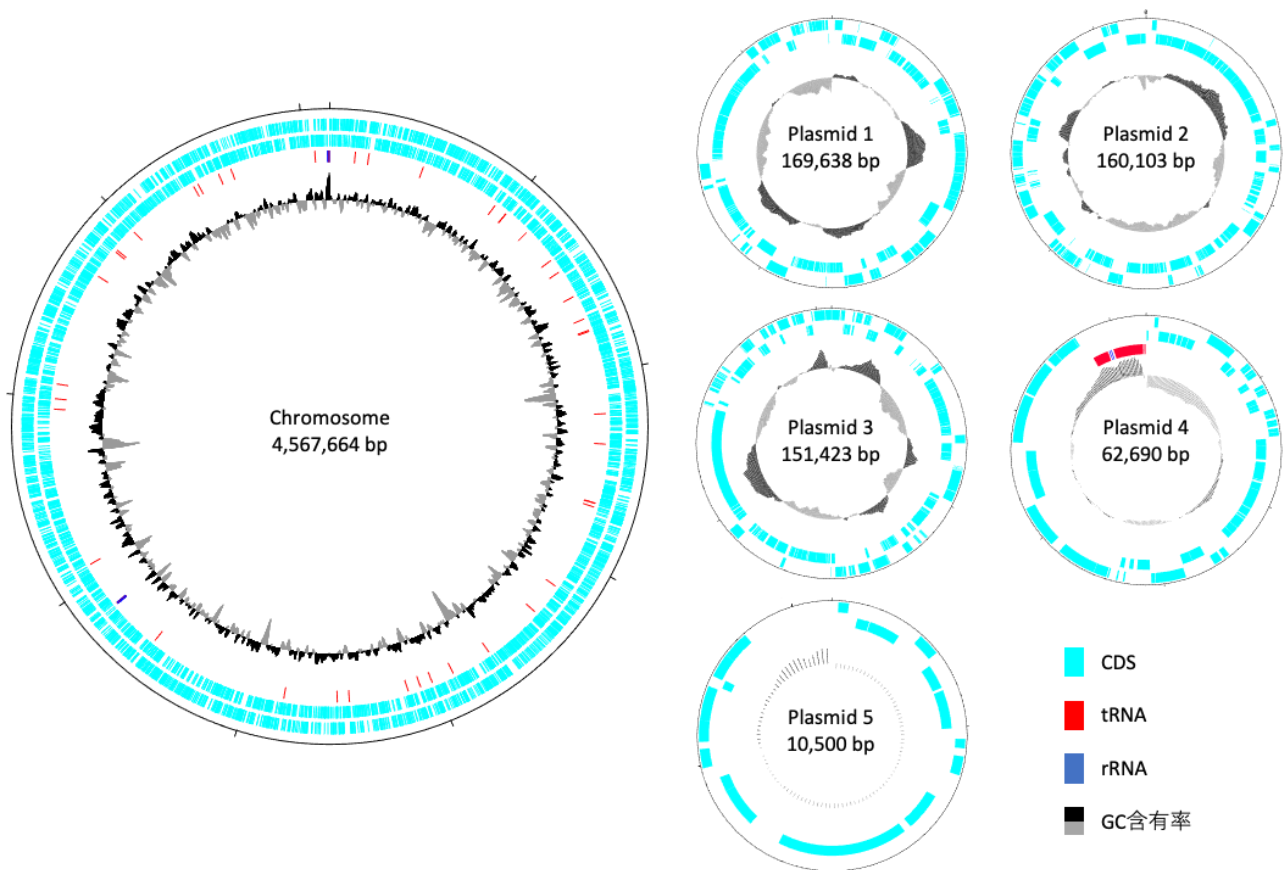
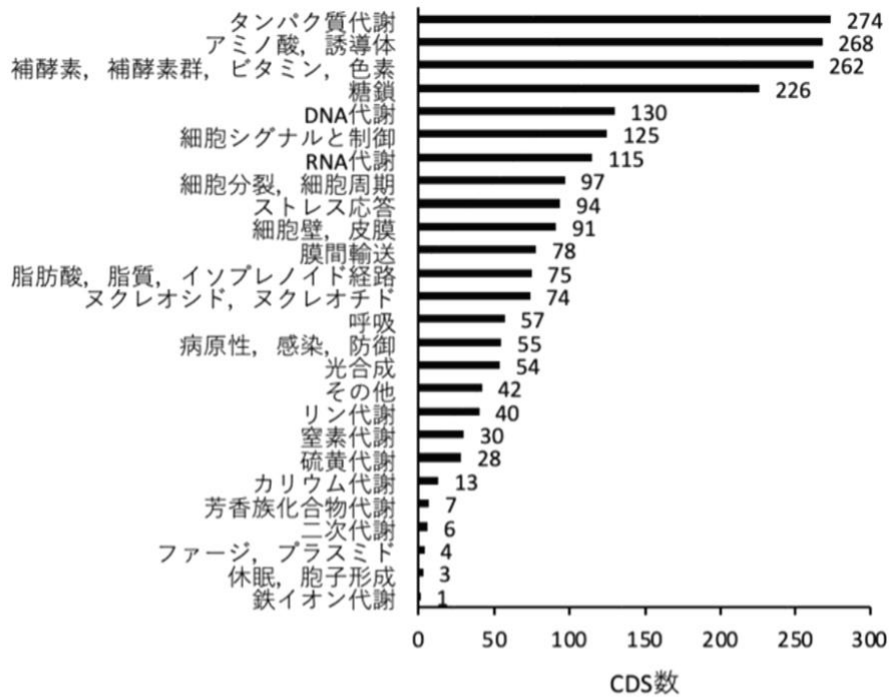


図 21. *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 標準株のゲノムマップ

シーケンス結果を基に描画した円形マップ。水色は Coding sequence でタンパク質に翻訳されると推定された配列で、内側と外側で互い逆向きの推定された転写方向を示す。赤色は tRNA 領域、青色は rRNA 領域、黒色と灰色は GC 含有量を示し、50%を基準に黒色は GC 含有量が高く、灰色は含有量が低いことを示す。染色体 DNA(最も大きい環状 DNA)は 4,567,664 bp(42% GC 含有率), 5221 の CDS, 48 の tRNA と 9 の rRNA を持つ。プラスミドを 5 つ所持する。

NIES-4403 標準株のゲノム DNA には、現在の配列情報を基にすると 5221 個の CDS (coding sequence) と 57 個の RNA 配列が含まれていた。この CDS に対してアノテーションとカテゴリ分類を行った。このアノテーションは詳細を検討したものではなく、またカテゴリの分類についても大掴なものであるため、探索後の詳細な調査が必要となることを記しておく。CDS に関して RAST (Aziz *et al.*, 2008) を用いてアノテーションを行った結果を図 22a に示す。RAST による分類上は、運動性のカテゴリーに分類される遺伝子は存在しなかった。一方で実際に遺伝子名を確認すると IV 型線毛をコードする *pil* 遺伝子とアノテーションされた遺伝子は 12 箇所存在し、これらは実際には運動性に関連する可能性が高いにも関わらず、膜輸送カテゴリとして位置づけられていた。そこで、別のデータベースとして Clusters of Orthologous Groups (COGs) を参照したところ、運動性関連遺伝子は 45 確認され、この中に *pil* 遺伝子群も含まれていた(図 22b)。一方で光合成などに関する分類は COGs にはないため、RAST と双方の結果を記載した。

a



b

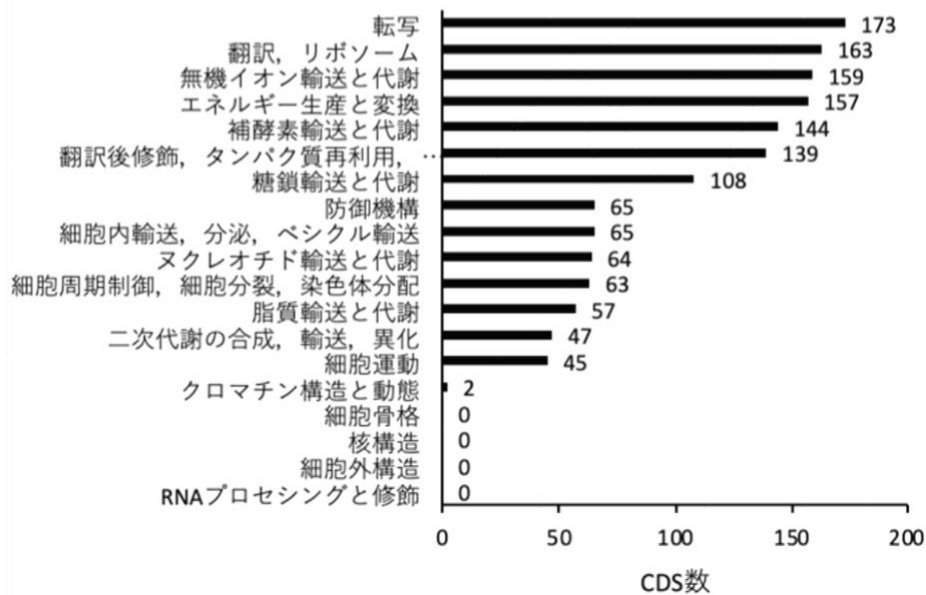


図 22. *Pseudanabaena* 標準株が保有する遺伝子の機能分類アノテーション

ゲノム解読により推定された 5221 の CDS のうち、機能推定された CDS に対してその機能を RAST 及び COGs のカテゴリーに分類した結果。それぞれで分類が若干異なる。a. RAST によりアノテーションされた CDS のうち、各カテゴリーに分類された数を示す。機能未知とされた CDS (数) を除く。b. RPS-BLAST+ でアノテーションされた CDS のうち、COGs の分類に割り振られた結果を示す。機能未知とされた CDS (数) を除く。

運動関連遺伝子についてさらにその詳細と相対的な位置について調べるため、シアノバクテリアで運動性に関連するとされる遺伝子のオルソログを手動検索した。特に滑走運動に関する先行研究が進んでいる *N. punctiforme* (元来共生性の糸状シアノバクテリアであり、共生初期に宿主の共生器官に到達するためにホルモゴニアと呼ばれる運動性細胞を分化させる) の運動性関連遺伝子群 (Khayatan *et al.*, 2015) のオルソログを、これら 5221 の CDS 内から Protein blast で探索した。探索対象は、*N. punctiforme* で多糖類合成・放出に関わる *hps* (*hormogonium polysaccharide*) 遺伝子群および IV 型線毛の合成や駆動を担う *pil* 遺伝子群である。結果を表 3 および図 23 に示す。一致度はアミノ酸配列を整列後に、完全に一致したアミノ酸残基の全アミノ酸残基数に対する割合を意味する。E 値はランダムな配列を生成した時に参照配列 (クエリ) と一致する確率を示し、0 に近いほど高い、すなわち相同性が高いことを示す。

*pil* と *hps* 遺伝子は近縁種の *Pseudanabaena* sp. PCC 7367 株でも保存されている遺伝子で (Khayatan *et al.*, 2015), NIES-4403 株にも殆どの遺伝子に対する、オルソログと言える遺伝子の存在が確認できた。さらに確認のため、NIES-4403 株で最有力候補となった遺伝子をクエリとして、*N. punctiforme* の全遺伝子を対象とした blast 検索を行ったところ、殆どの遺伝子に関しては元の *pil* または *hps* 遺伝子が最有力候補として挙げられた。例外として *hpsE* と *hpsF* については同一の遺伝子 *peg. 1063* に近いという結果が出ており、*peg. 1063* 遺伝子をクエリとして blast 検索したところ、*hpsF* は 2 番目、*hpsE* は 3 番目のヒットとなり、最有力候補としてヒットした遺伝子は *NpunF\_4849* であった。しかしこの三者は一致度や E 値があまり変わらないこと、翻訳後のアミノ酸残基もほぼ 300 前後で近かったことから今回はオルソログとして掲載した。*hpsI* に関しては *peg. 2372* 遺伝子が候補として挙げられたものの、*peg. 2372* 遺伝子をクエリとして blast 検索しても *hpsI* は候補に挙げられず、アミノ酸残基数も *hpsI* が 768 に対して *peg. 2372* は 220 しかなかったことから、オルソログではないと考え掲載しなかった。一方で *hps* 遺伝子群については E 値が高く、Identity (一致度) も *pil* に比べると低い値で、この遺伝子が *N. punctiforme* の *hps* 遺伝子群と同様の役割を果たすかは不明である。図 23 に示すようにオルソログが比較的分散していて、III 属のシアノバクテリア、*Arthospila platensis* に近いように思われる (Risser and Meeks, 2013)。一方で *pil* 遺伝子群については *hps* に比べると高い E 値や一致度を示す CDS が多く、特に線毛の伸長や短縮に関わる *pilB*, *pilT1*, *pilT2* は高い相同性を示した (Schuergers and Wilde, 2015)。第二章に記載した AFM の観察結果 (図 15cd) と併せて考えると、NIES-4403 株は少なくとも線毛を伴う運動マシナリーを持つと推察される。

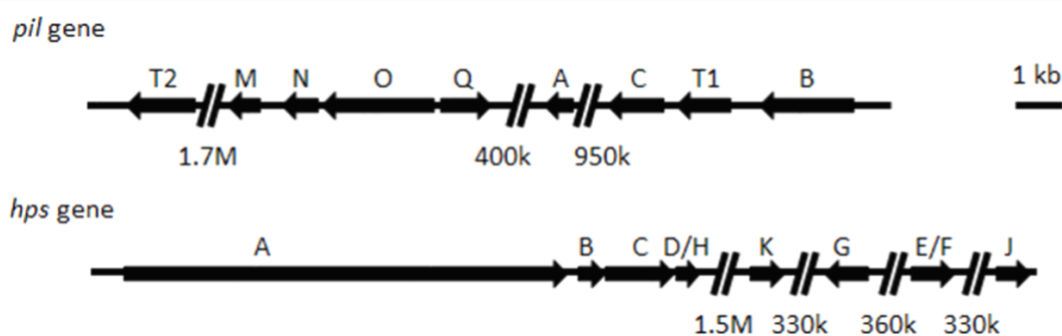


図 23. *Pseudanabaena* 標準株の運動関連遺伝子のオルソログ

表 3 に示した *Pseudanabaena* 標準株ゲノム上にある *pil*, *hps* 各遺伝子オルソログの遺伝子座の位置関係を示す。スラッシュ 2 本で区切られた場所は、下の数値に相当する長さの配列の省略を意味する。遺伝子および遺伝子間の長さは実際の塩基数に対応しており、右上のスケールバー相当の長さを 1000 bp とした。

<i>N. punctiforme</i>		<i>Pseudanabaena</i> sp.				E 値	一致度
遺伝子名	アミノ酸残基	遺伝子番号	アミノ酸残基	推定機能			
<i>hpsA</i>	1566	peg.3544	3152	機能未知	0	34	
<i>hpsB</i>	226	peg.3546	196	ピリン様タンパク質	5.99E-15	35	
<i>hpsC</i>	322	peg.3547	479	ピリン様タンパク質	1.61E-32	27	
<i>hpsD</i>	232	peg.3548	179	ピリン様タンパク質	8.40E-19	29	
<i>hpsE</i>	321	peg.1063	316	糖転移酵素	1.47E-20	29	
<i>hpsF</i>	329	peg.1063	316	糖転移酵素	9.57E-25	31	
<i>hpsG</i>	358	peg.690	313	糖転移酵素	1.60E-47	36	
<i>hpsH</i>	189	peg.3548	179	ピリン様タンパク質	5.31E-27	34	
<i>hpsI</i>	215	該当なし	-	-	-	-	
<i>hpsJ</i>	280	peg.1406	249	機能未知	0.23	24	
<i>hpsK</i>	302	peg.362	256	糖転移酵素	2.75E-26	30	
<i>pilA</i>	188	peg.3278	205	ピリン様タンパク	8.16E-30	47	
<i>pilT2</i>	424	peg.1074	493	線毛収縮 ATP 分解酵素	0	68	
<i>pilM</i>	368	peg.2894	369	内膜タンパク質	5.80E-123	50	
<i>pilN</i>	258	peg.2893	237	内膜タンパク質	1.98E-20	29	
<i>pilO</i>	258	peg.2892	250	内膜タンパク質	8.21E-22	29	
<i>pilQ</i>	792	peg.2891	796	外膜放出機構	1.28E-70	37	
<i>pilC</i>	407	peg.4249	404	内膜基盤	9.04E-167	57	
<i>pilT1</i>	375	peg.4250	387	線毛収縮 ATP 分解酵素	0	76	
<i>pilB</i>	668	peg.4251	672	線毛伸長 ATP 分解酵素	0	55	

表 3. *Pseudanabaena* 標準株が保有する、*N. punctiforme* で運動に関わる遺伝子のオルソログ

*N. punctiforme* で運動関連遺伝子として候補に挙げられた各遺伝子について、アミノ酸に翻訳後、それぞれ *Pseudanabaena* の全遺伝子から Protein Blast による相同性比較を行い、最も E 値が高い遺伝子を抽出した。

## 短個体長変異株の変異解析と変異遺伝子の特徴

標準株のゲノム配列を決定すると同時に、短個体長変異株のゲノム DNA についても同様にシーケンスを行い、標準株のゲノムをテンプレートとしてマッピングすることで、リシーケンス解析（変異解析）を行った。この際のゲノム DNA シーケンスは予め分離した 1 株についてのみ行ったが、その株は短個体長変異株の各形質が継代培養を経ても保持されていることを記しておく。その結果、計 40 箇所塩基配列の変更を伴う SNPs（一塩基多型）が検出された（表 4）。このうち、ORF 上に存在する変異が 20 箇所、遺伝子間領域に存在する変異が 20 箇所存在した。遺伝子間領域にある変異は翻訳後の配列に影響が少ない可能性が高いと考えられるため、今回は ORF 上の変異に着目した。これらの ORF 上の変異のうち、表 4 の変異分類の項目が示す内容はそれぞれ以下の通りとなる。同義置換は翻訳後のアミノ酸変異を伴わないと推測される塩基変異、非同義置換は翻訳後のアミノ酸が変化すると推定される塩基変異、終止コドン挿入は塩基の変異により終止コドンに変化し、途中で翻訳が終わると推定される変異、フレームシフト変異は塩基欠損/挿入による読み枠のずれを示す。従って一般的に変異の影響は終止コドン挿入とフレームシフト変異が高く、次いで非同義置換が高い。一方で同義置換は影響が低いと考えられるため、同義置換 5 箇所を除く 15 箇所の変異に着目した。更に変異株に固有の変異を抽出した。単コロニー単離した際に 3 系統のクローンをシーケンスし比較した際に、例えば *peg.5055* 上の複数の変異は標準株クローンの間でも変異が多く存在する領域であることがわかった。なお、プラスミド 3 上には CRISPR 関連遺伝子とアノテーションされた遺伝子が多く存在し、この領域が CRISPR 配列である可能性も存在した。これらの標準株間でも変異が入っている 8 箇所を取り除くと、5 つの ORF 上の 6 箇所の変異（うち 2 つは同一箇所のバリエーション）が残った。

これらの 5 つの ORF のうち、最も影響が大きいと思われる終止コドン挿入型の変異が入った ORF (*peg.4108*) は 579 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、BLAST を用いた相同検索では、ペプチド輸送を担う膜貫通タンパク質 ShIB/FhaC/HecB ファミリーと高い相同性を示した。*Serratia marcescens* では、ShIB は POTRA ドメインと ShIB ドメインを持ち、溶血毒素タンパク質ヘモリジン ShIA を細胞質内膜から外膜まで輸送するタンパク質である (Braun *et al.*, 1993, Poole *et al.*, 1988)。POTRA ドメインは蓋のようなドメインで、ヘモリジン分泌に必要であることが示唆されている (Pramanik *et al.*, 2014)。今回終止コドンが入った位置は POTRA2 ドメインの中で、POTRA ドメインの大部分およびそれに続く ShIB ドメインも



翻訳されなくなる変異と想定される。興味深いことに好熱性シアノバクテリアの *Thermosynechococcus vulcanus* では膜貫通タンパク質 XcsB を介したセルロース放出が細胞凝集に関わる (Maeda *et al.*, 2018)。したがって、*Pseudanabaena* の *peg.4108* 遺伝子がコードする蛋白質は、多糖類や細胞外 DNA あるいは未知のタンパク質など、何らかの物質の分泌を担うことを介して細胞同士の相互作用や運動時の摩擦低下などに影響を与えているかもしれない。このような分泌機構はしばしばバイオフィーム形成で主要な役割を果たすとされ、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 でも、XcsB を含む放出マシナリーとは別の II 型放出系の変異によりバイオフィーム形成を行うことが報告されている (Schatz, 2013)。短個体長変異株は液体培養時に、標準株に比べ凝集を形成しない傾向が確認されており (図 18e)、この *peg.4108* に入った変異が影響している可能性がある。同様に影響が大きい、塩基挿入により翻訳時の読み枠がずれるフレームシフト型の変異が入った ORF は、コバルトのキレート酵素を触媒する CobN のサブユニットと相同性のあるペプチドをコードすると判定された一方、この CDS がコードするペプチドは 39 アミノ酸残基しかなく、相同性は一部分に留まる。また、Nacht ドメインを持つ信号伝達遺伝子 (NTPase)、メチル基転移酵素にも SNP が入っている。NTPase については NACHT ドメインを持ち、ドメイン上には WalkerA (ATP/GTP 特異的 p-loop) と Mg<sup>2+</sup>結合モチーフを始めとする 7 つのモチーフが存在する (Koonin and Aravind, 2000)。一方で NACHT ドメインを持つ NTPase の作用は真核生物でのアポトーシスや MHC 転写などとされており、バクテリアでの役割は推測が難しかった。また、変異箇所は NACHT ドメインを外れた上流域であった。メチル基転移酵素については、正確にはコバラミン (ビタミン B12) の合成経路で働く precorrin-4 C11 メチル基転移酵素 CobM と推定された。*Pseudomonas aeruginosa* ではビタミン B12 はクラス II リボヌクレオチド還元酵素 (RNR) の補因子として働く (Crespo *et al.*, 2018)。現在のところ微生物の運動との関連は推測できていない。

上記理由より ShlB をコードする *Peg.4108* が運動や個体長に影響している可能性は高いものの、最終的に遺伝子間領域を含めた全ての変異が影響の可能性を残しているため、今回のリシーケンス結果では推測に留まっている。

	位置	標準株	変異株	ORF	アミノ酸 残基	変異分類	アミノ酸 変異	変異箇所の特徴
染色体	<b>2296200</b>	G	-	<b>peg.2367</b>	<b>40</b>	<b>読み枠変化</b>	<b>P17fs</b>	<b>機能未知</b>
プラスミド 3	125215	A	-	peg.5104*	199	読み枠変化	I184fs	機能未知
染色体	2848143	G	A	peg.2963*	163	終止コドン挿入	Q102STP	機能未知
染色体	<b>3962403</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>peg.4108</b>	<b>580</b>	<b>終止コドン挿入</b>	<b>E121STP</b>	<b>ヘモリシン様タンパク質</b>
染色体	<b>135595</b>	G	C	<b>peg.145</b>	<b>766</b>	<b>非同義置換</b>	<b>R49P</b>	<b>NTPase</b>
染色体	1569762	G	T	peg.1592*	601	非同義置換	Q347K	テトラトリコペプチド反復
染色体	1779533	C	T	peg.1845*	438	非同義置換	V201I	機能未知
染色体	<b>2345607</b>	A	T	<b>peg.2409</b>	<b>44</b>	<b>非同義置換</b>	<b>Q4L</b>	<b>機能未知</b>
染色体	<b>2345608</b>	A	T	<b>peg.2409</b>	<b>44</b>	<b>非同義置換</b>	<b>Q4H</b>	<b>機能未知</b>
染色体	<b>2345609</b>	A	T	<b>peg.2409</b>	<b>44</b>	<b>非同義置換</b>	<b>S5C</b>	<b>機能未知</b>
染色体	2579550	G	T	peg.2667*	108	非同義置換	P84T	CikA 様タンパク質
染色体	<b>3476975</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>peg.3588</b>	<b>263</b>	<b>非同義置換</b>	<b>R193S</b>	<b>メチル基転移酵素</b>
染色体	3852489	C	A	peg.4005*	438	非同義置換	T386N	機能未知
プラスミド 3	60899	C	A	peg.5055*	438	非同義置換	R166S	機能未知
プラスミド 3	61143	G	T	peg.5055*	438	非同義置換	R247L	機能未知
染色体	1779516	A	T	peg.1845	438	同義置換	P206	機能未知
染色体	2579551	G	A	peg.2667	108	同義置換	I83	CikA 様タンパク質
プラスミド 3	51248	C	T	peg.5043	589	同義置換	G380	機能未知
プラスミド 3	60634	G	A	peg.5055	438	同義置換	E77	機能未知
プラスミド 3	61144	G	C	peg.5055	438	同義置換	R247	機能未知
染色体	856616	C	T			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	891120	G	T			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	891121	A	T			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	891122	A	C			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	1341359	G	A			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3207585	T	G			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3207586	T	A			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3207587	C	A			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3472010	A	T			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3472011	A	T			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3472012	A	T			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3732059	T	G			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3732060	T	A			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3732061	C	A			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3790404	G	T			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3790405	A	T			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3790406	A	C			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3816777	T	G			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3816778	T	A			塩基置換		遺伝子間領域
染色体	3816779	C	A			塩基置換		遺伝子間領域

表 4. 変異箇所の詳細の一覧

*Pseudanabaena* の短個体長変異株のゲノム上で変異として抽出された全 40 箇所の詳細を示す。太字は変異株に固有の遺伝子を示す。位置は変異の入った塩基番号(ゲノム上の塩基配列の番号)を示す。\*は標準株のゲノム配列中(単離した 3 コロニーのシーケンスデータ)でも共通して変異が見られた 8 の遺伝子を示す。

## まとめ

この章では大きく分けて2つの研究課題に取り組んだ結果を紹介した。ひとつは短個体長変異株の単離とその特徴、もうひとつはゲノムシーケンス解析とリシーケンス解析である。最終的にこの2つの課題が合流し、継代培養過程で得られた短個体長変異株について、ゲノム解析と表現型解析の両面から解明を試みた章となった。

まず短個体長変異株の結果についてまとめると、変異株のコロニーパターンは標準株の特徴とも言える彗星状コロニーおよび円盤コロニーを形成せず、一様に拡散するようなコロニーを形成する。小集団は形成するものの彗星状コロニーのような大きさに成長することはない。ミクロに観察すると変異株の長さは平均値としても標準株の25%程度で、更に30  $\mu\text{m}$ 以上の長い個体がほぼ存在しないことから、顕微鏡下観察時の表現型は著しく異なった。この形質は単離以来、標準株と同じ培養環境下で数年間にわたる継代培養を経ても維持されていることから、非常に強固な変異であると推察できる。

では個体長とコロニーパターンが直接的あるいは間接的に関係しているのか、それとも全く別個の独立した事象なのか。コロニーパターン、個体長、ゲノム上の変異について、これらがどのように相互に関係しているかを改めて推測し、あるいは確認する。まず、個体長とコロニーの関係に類する先行研究として、自己駆動粒子を使ったシミュレーションから個体の縦横比が異なる桿体の方が集団化しやすいということが示唆され (Peruani, 2006)、アクチンフィラメントなどの無生物実験系でも渦形成時の安定性に影響することが示唆されている (Wada *et al.*, 2015)。 *Paenibacillus vortex* でも長い個体がコロニーの拡張や渦の形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている (Vallotton, 2013)。衝突した際にお互いに乗り越えない寒天培地上では、個体長が長いほど衝突して相互作用する機会が増え、また整列しやすくなるという予測は、 *Pseudanabaena* においても不自然ではないと思われる。このように考えれば個体長とコロニーパターンは相互作用の機会を介して互いに影響する可能性が考えられるが、一方で他の要素、たとえば多糖類などの放出量に集合を作らない原因を求めることもまた不自然ではない。そのため実験において標準株の個体長を操作することが求められ、これまでに標準株の個体長を制御する取り組みとして、ビーズ破碎や抗生物質添加の実験を行った。しかし一時的に短くすることは可能だが、その状態を維持しつつコロニー形成を確認する方法は現在のところ見つかっていない。

個体長が短くなる現象については、そのメカニズムは未知の部分が多い。現在は3つの原因を考えており、物理的な張力による分裂、破裂による断片化、細胞接合部の弱化である。まず物理的な張力については、特に運動時に培地からの摩擦を受けることで細胞間に張力がかかり、分裂することを想像している。実際 *Nostoc punctiforme* が形成する運動形態のホルモゴニアは個体長が短く (Herdman and Rippka, 1988; Tandeau de Marsac, 1994) , また *L. boryana* が運動性を獲得した場合、個体長が短縮化する傾向がある (戸井田, 未発表)。上記の例を見ると運動能と個体長の関係は十分に考えられる。次に細胞破裂などによる断片化であるが、鉄不足や UV 照射による酸化ストレスへの環境応答として断片化することが報告されている (Singh and Montgomery, 2011) 。*Pseudanabaena* は近縁種で報告されている細胞破裂に近い現象が NIES-4403 でも観察されている (Kitazaki *et al.*, 2013) ことから不自然ではない一方、顕微鏡下の観察では個体分裂時に頻繁に細胞破裂が起こっているという印象は薄い。最後に細胞接合部の弱化については、*Anaabena* sp.では *sepJ* 変異株および *sepI* 欠損株など特定条件下で変異体が断片化する変異も存在し、細胞分裂機構への影響を介して個体長が変化する可能性もある (Flores *et al.*, 2007; Springstein *et al.*, 2020) 。また、これらの複合的な事例として *Nostoc punctiforme* では窒素固定を行うヘテロシストとの細胞間隙で断片化する傾向にあることが報告されており (Meeks and Elhai, 2002) , 運動による張力がかかったときにより弱い異種細胞間の接合部で切断されるのかもしれない。現状ではこれらの仮説の検討は十分にできていないが、今後は実験系の検討も含めた検証が必要だと考えている。

この短個体長変異株について、標準株の *de novo* ゲノムシーケンスおよび短個体長変異株の変異解析から、40の変異を同定した。表4には全ての変異を掲載し、全ての変異が表現型に影響を与える可能性があるが、今回はその一部について結果の文章で紹介した。紹介しなかったその他の変異については、例えばプラスミド3の座標125215にあるフレームシフト変異は機能未知のORF上に存在するが、この遺伝子は非常に変異が入りやすい状態にあり、標準株同士のゲノムを比較してもバリエーションが多く、短個体長変異株特有の変異とは言い難いため今回は詳細について述べなかった。このプラスミド3上にはCRISPR関係遺伝子が多く存在し、CRISPRシステムに起因する変異の可能性もある。短個体長変異株に特有かつ大きな影響を及ぼすと着目している、変異株で変異した遺伝子は3つある。1つは既に記したヘモリシン様をコードすると推定された *peg.4108* 遺伝子で、更にメチル基転移酵素をコードする *peg.3508* 遺伝子、NTPaseをコードする *peg.145* 遺伝子である。これらの候補遺伝子のうちどの遺伝子の変異株の表現型に

関与しているのか、検証するためには形質転換を用いた分子遺伝学的解析が不可欠である。*Pseudanabaena* の形質転換系の確立は現在までに何度か挑戦を行っており、接合法や電気穿孔法を用いて、典型的なプラスミドあるいは内在性のプラスミドを導入する試みが行われたが、現在のところ確立にはいたっていない。そこで形質転換系が確立されている糸状のシアノバクテリア、*Leptolyngbya boryana* の運動性株を用いた。この運動性株は *Pseudanabaena* に似た彗星状や円盤状のコロニーを呈することが報告されている（戸井田，未発表）。この試みの詳細については第四章で改めて記述する。

## 第四章 総合討論

本研究では、*Pseudanabaena* の呈する運動集団およびコロニーパターンに関して研究を行った結果を提示した。単純とされる微生物が統率の取れた集団を形成し、その集団がまるで一つの多細胞生物の個体のように動き回る点が *Pseudanabaena* で見出したコロニーパターンの特徴の一つであった。こうしたコロニーパターンの形成メカニズムを読み解くためのアプローチは本来多岐に亘り、巨視的もしくは微視的な形態の観察、運動やコロニーパターンの変化に関する時系列解析、運動や個体間相互作用に関わる様々な分子の解析、数理モデルを援用したシミュレーションなどが挙げられる。本研究で展開できたのは一部に過ぎないが、*Pseudanabaena* のコロニーパターン形成に関する基礎的なデータや知見を明らかにすることができた。第二章に記した研究では、コロニーパターン自体の性質を様々なスケールから観察を行い、その形成過程の説明を提示した。この現象を遺伝学的に読み解くため、第三章で記した研究ではゲノム解析と変異株の比較解析を行った。

*Pseudanabaena* は、植菌位置からドット状の様子が拡散する「散在的なコロニーパターン」を呈した。このコロニーが培地上で拡大するのは、培地を動き回る巨大な彗星状コロニーが生育領域を拡げることによる。一方で、散在的なコロニーパターンが数日間に渡って概ねそのパターンを維持するのは、彗星状コロニーが円軌道に入って、その場で回転を続ける安定的な円盤コロニーを形成するためであった。回転する円盤状のコロニーは決して珍しいものではなく、例えば *Paenibacillus vortex* の回転しながら移動する渦コロニーはその最たる例であろう (Ben-Jacob *et al.*, 1994; Ben-Jacob *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 2000)。こうした固相培地上のコロニー以外にもバクテリアが生成する回転渦としては、閉鎖空間での渦形成が近年注目されている。例えば油中液滴 (Wioland *et al.*, 2013)、培地上の浅い窪み (Wakita *et al.*, 2015; Honda *et al.*, 2019)、あるいは培地上に滴下した液滴中 (Liu *et al.*, 2021) などでバクテリアの懸濁液が形成する渦、あるいはバクテリア以外にも卵母細胞 (Schroeder *et al.*, 1985) や卵母細胞抽出液の油中液滴 (Suzuki *et al.*, 2017) などでも微小な空間で渦が形成される。このような渦の形成過程は材料や細胞の性質によっても異なるため単純な比較は難しく、例えば Wioland や鈴木らは、辺縁部に端点を固定された細胞や微小管が渦の流れを作るとしている。ただし *Pseudanabaena* の円盤コロニーでは辺縁部は高速かつ、コロニーによって異なる速度で動いていることから、このモデルはあてはまりにくいと考えている。しかしこれらの研究、特に Liu らの実験と同様に、円盤コロニーは一種の閉鎖系として集合し、その中で渦を形成している

と考えている。閉鎖系を作り出しているのは細胞から出る多糖類や、あるいは単純に水などの液体かもしれない。小林らは、*Paenibacillus* sp. NAIST15-1 ではコロニー形成に必要な CmoA の働きが、培地上から水分を吸い上げることを示唆している (Kobayashi *et al.*, 2016)。*Pseudanabaena* でもこれらの液体の表面張力が円盤コロニーをまとめている可能性はあると考えている。これは彗星状コロニーに関しても同様に言えることかもしれない。本論文ではこの考えを検証することはできなかったが、示唆的な事例として水滴を彗星状、円盤状コロニーに滴下するとコロニーの一部の細胞が四散し崩壊する様子を観察している。ただし仮に表面張力が細胞をまとめるとしても、*Pseudanabaena* のコロニーが呈した同調的な動き (図 5e, 9d) を自発的に行うかは別である。プール内の枯草菌でも、同調的な運動が必ずしも密度依存的に起こっているわけではないことが示唆されている (Wakita *et al.*, 2015)。細胞同士が同調した運動を行うには、既に繰り返し述べたように、線毛や粘液を介した細胞間相互作用が重要な役割を果たすと考えている。

上記の細胞間同調、及び運動機構として示唆された線毛および粘液の存在についても、その存在と性質の解明に取り組んだ。まず粘液や細胞外物質については、レクチンとアルシアンブルーを用いて多糖類の部分的な染色に成功した (図 8)。一方で染色された粘液の量は集団全体を覆うというよりは、局所的に存在し細胞同士の接着に寄与する形に見えた。液体培地中の凝集やネットワーク状の枝形成 (図 4)、オルソログの存在 (図 22, 表 3)、変異株で変異した *peg.4108* 遺伝子の潜在的な効果の可能性を考えると、他の粘液成分も存在する可能性がある。今後は *N. punctiforme* の染色で実績のある UEA-I をはじめ他種のレクチン、あるいは試薬で確認すべきであると考えている。今回は多糖類に絞って確認を行ったが、粘液の成分として他には細胞外 DNA などがその役割を果たすとされる (Gloag *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2009)。

*Pseudanabaena* では Hoechst 33342 による染色を行ったが、十分な検討は行っていない。今後は SYTOX や TOTO-1 など、より細胞外 DNA の染色に関して実績のある試薬を用いて確認すべきだと考えている。また、細胞外 DNA が主要な役割を果たしているときは DNase I の添加で集団が崩壊することも報告されており (Whitchurch *et al.*, 2002; Gloag *et al.*, 2013)、こちらの手法の導入も進めたい。線毛についても AFM の観察で線毛のような構造を細胞周辺に確認し (図 14cd)、またオルソログ解析から線毛を構成する遺伝子の存在が示唆された (図 22, 表 3)。より詳細な解析としては TEM での観察が挙げられる。今回 TEM で撮影した像はエポキシ樹脂に包埋しスライスを作成する方法であったが、他種の先行研究ではスライスを作らずにリンタングステン酸 (Yoshihara *et al.*, 2001) や酢酸ウラニルによる陰性染色 (Dienst *et al.*, 2008)、あ

るいは白金コーティング (Duggan *et al.*, 2012) などを行った後乾燥して直接観察しており、これらの手法の導入に関しても今後の研究課題として残っている。また 本論文には掲載しなかったが、NHS ester (Skerker and Berg, 2001) や Avidin-FITC (Nakane and Nishizaka, 2017) で染色し蛍光顕微鏡で局在や動態を確認した先行研究があり、これらの染色を試みたところ Avidin-FITC では細胞接合部などが染色された。近年 DyLight488 Maleimide を用いた生細胞の染色と観察 (Ellison *et al.*, 2017; Ellison *et al.*, 2019; Nakane *et al.*, 2022) が報告されており、他種のシアノバクテリアでも線毛の動態が観察されていることから、*Pseudanabaena* でも線毛の実際の挙動や役割についての説明が期待できる。

今回の博論で提示できなかった主な研究として、シミュレーションモデルによる再現と遺伝学的操作の検討が挙げられる。投稿論文において筆者は久本との共同研究について *C.elegans* を模した自己駆動粒子モデル (Sugi *et al.*, 2019) を改変し、並進運動または円軌道を周回する集合を再現、さらに離散的なドット状のコロニーパターンを部分的に再現した (Yamamoto *et al.*, 2021)。メカニズムに対してある作業仮説を立てた時、それを検証する手段としてシミュレーションモデルは有用である。自己駆動粒子を用いた高松らのモデル (2014) や山本らのモデル (2021) が呈した集合は、彗星状コロニーや円盤コロニーの特徴をよく再現した。山本らのモデルは特に巨視的なコロニーパターンを再現したが、円盤コロニーに相当する形態は円軌道で安定性も低かった。これに対し高松らのモデルは粘液の実装により、粘液放出量が多い条件下では粘液の空間勾配が大きくなり粒子をトラップすることを示唆した。一方で自己駆動粒子モデルは単純なモデルであるが故に、例えば個体の形状や運動方向、分裂や増殖など細部に関する細部の影響を確認する目的には向いていない。例えば個体長変異株で見られた個体の長さを再現する場合、自己駆動粒子モデルではその長さを相互作用の範囲とみなすが、細かい曲率や形状などの情報を反映することは難しく、例えば **図 6f** で観測されたような U 字の運動、あるいは彗星状コロニーの先頭を覆うような個体の再現は難しい。Tamulonis や Janulevicius が用いた力学ベースのモデル (Tamulonis *et al.*, 2011; Tamulonis and Kaandorp, 2014; Janulevicius *et al.*, 2015) はこのような点を再現しやすく、本論文には掲載しなかったが、*Pseudanabaena* に関しても Tamulonis のモデルを改変し再現に取り組んだ。一方で力学モデルのように要素を増やすと複雑さが増し、パラメーターの緻密な調整も必要となる。今後は双方のモデルを目的に応じて使用し、特に個体長とコロニーパターンの関係についてモデルを用いた解析が望まれる。

三章では NIES-4403 株のゲノム情報を解読するとともに、変異株の特徴とゲノム上の変異を明らかにす



ることを通して、彗星状、円盤コロニー形成に必要な要素の推測を行った。ゲノム解読に対しては大きなスケールで広く解読していくアプローチがある一方、今回のように特定の種に関して掘り下げる場合は、その検証として形質転換の実践が有用である。形質転換系の開発は、研究室及び個人としても取り組んできたが、三章に述べたように現在のところ成功していない。現在の範囲で筆者が予想する、*Pseudanabaena* の性質による原因として、ひとつは細胞がまとっている粘液により形質転換に用いるプラスミドが細胞に届かないこと、もうひとつは細胞自体が脆弱なことである。細胞の脆弱さについては本論文では多くは取り上げなかったが、暗条件かつ一定以上の温度の時に頻繁に細胞破裂を起こすことが確認されている。これは北崎らが近縁種である ABRG5-3 株で報告をしている内容とほぼ同様の傾向にある (Kitazaki *et al.*, 2013)。また、これらの細胞破裂時に出現する細胞残渣は他の細胞に対しても生育を抑制する傾向が確認されており、細胞死がポジティブフィードバック的に起きると考えている。電気穿孔法をはじめとする形質転換方法には細胞膜を穿孔することがあることから、細胞がこれらの衝撃に対して生育する条件の検討が必要であろう。もちろん *Pseudanabaena* の特性に依存しない理由として、接合法時の DNA 取り込み、細胞内での DNA の制限酵素による切断、相同遺伝子組み換え効率の低さなどの理由による可能性も高い。細胞内で複製されるプラスミドの検討や CRISPR-Cas9 システムを用いた効率的な形質転換方法の導入などが期待される。一方で形質転換は必ずしも必須ではなく、すでに三章で簡単に記述した、近縁種のオルソログを用いた機能探索も代替手段のひとつといえる。*L. boryana* は *Pseudanabaena* と同じ III 属の糸状シアノバクテリアで、形質転換系が確立されていて、その運動性株は滑走運動を行い、*Pseudanabaena* に似た彗星状・円盤コロニーを形成する点から、コロニーパターンを遺伝学的に解析する対象として有用である。この運動性株を用いて各候補遺伝子のオルソログ欠損株を作製し、各候補遺伝子がコロニーパターンや運動性、個体長などに与える影響を調べることを試みた。この際 NTPase をコードする遺伝子のオルソログ欠損によりコロニーパターンに若干の変化が生じたが詳細な解析は行われておらず、今後の研究が期待される。

本論文で観察してきたようなコロニーやコロニーパターンは、第二章でも簡単に述べたが、外環境での適応に有利となる機能であることが推測される。彗星状コロニーは特に生息領域の拡大に寄与することが推測される。液中であれば運動性がなくても浮遊した細胞の拡散で生息領域を拡げることができるが (図 5, 図 20)、固相表面の上では難しく、運動性がある方が生育領域を拡大できると推測できる。更に彗星状コ

コロニーは固相表面の環境では生育領域を拡大することに有利に働くであろうことは、実験環境であるものの、短個体長変異株と比較したではその傾向も確認できた (図 19c)。このようなコロニーパターンは他の様々な生物現象、例えば彗星状コロニーであれば草食動物の集団移動や自転車競技の集団、円盤コロニーであれば魚群の形成する渦といった現象を彷彿とさせる。これらの行動と比較することでその根底にある、スケールにとらわれない共通の集団形成のメカニズムが解明できることが期待できるとともに、今後さらなる効率的な集団運動の形態や予測を行えるのではないかと考えている。

## 引用文献

- Adams DG. How do cyanobacteria glide? *Microbiol Today*. 2001;28:131–3.
- Auwerwa GA, O'Connor BD, *Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra* (1st Edition), O'Reilly Media. 2022
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, *et al*. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genom*. 2008 Feb 8;9:75. doi: 10.1186/1471-2164-9-75.
- Balagam R, Igoshin OA. Mechanism for collective cell alignment in *Myxococcus xanthus* bacteria. *PLoS Comput Biol*. 2015;11:1–20.
- Ben-Jacob E, Cohen I, Gutnick DL. Cooperative organization of bacterial colonies: from genotype to morphotype. *Annu Rev Microbiol*. 1998;52(1): 779–806. doi: 10.1146/annurev.micro.52.1.779.
- Ben-Jacob E, Schochet O, Tenenbaum A, Cohen I, Czirók A, Vicsek T. Generic modelling of cooperative growth patterns in bacterial colonies. *Nature*. 1994;368(6466):46–9. doi: 10.1038/368046a0.
- Bhaya D, Watanabe N, Ogawa T, Grossman AR. The role of an alternative sigma factor in motility and pilus formation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 16;96(6):3188–93. doi: 10.1073/pnas.96.6.3188.
- Black WP, Xu Q, Yang Z. Type IV pili function upstream of the Dif chemotaxis pathway in *Myxococcus xanthus* EPS regulation. *Mol Microbiol*. 2006;61(2):447–56. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05230.x.
- Brahamsha B. Non-flagellar swimming in marine *Synechococcus*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 1999 Aug;1(1):59–62.
- Brahamsha B, Bhaya D. Motility in unicellular and filamentous cyanobacteria. In: Flores E, Herrero A, editors. *The cell biology of cyanobacteria*. Poole: Caister Academic Press ; 2014:233–62.
- Braun V, Ondraczek R, Hobbie S. Activation and secretion of *Serratia hemolysin*. *Zentralbl Bakteriol*. 1993 Apr;278(2-3):306–15. doi: 10.1016/s0934-8840(11)80847-9.
- Burchard RP. Trail following by gliding bacteria. *J Bacteriol*. 1982;152(1):495–501.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, *et al*. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinform*. 2009;10(1):421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421.
- Carver T, Thomson N, Bleasby A, Berriman M, Parkhill J. DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics*. 2009 Jan 1;25(1):119–20. doi: 10.1093/bioinformatics/btn578.
- Castenholz RW, Rippka R, Herdman M, Wilmotte A. Form- *Pseudanabaena*. In: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology volume one* 2nd ed. New York: Springer New York;2001. p. 554–7.
- Catts O and Iwasaki H. The Biogenic Timestamp. in A Ginsberg *et al*. (eds), “Synthetic Aesthetics: Investigating Synthetic Biology’s Designs on Nature”. MIT Press, pp. 195–204.
- Clauset A, Shalizi CR, Newman MEJ. Power-law distributions in empirical data. *SIAM Rev*. 2009;51(4):661–703. doi: 10.1137/070710111.

- Cho YW, Gonzales A, Harwood TV, Huynh J, Hwang Y, Park JS, *et al.* Dynamic localization of HmpF regulates type IV pilus activity and directional motility in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Mol Microbiol.* 2017;106(2):252–65. doi: 10.1111/mmi.13761.
- Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012 Apr-Jun;6(2):80-92. doi: 10.4161/fly.19695.
- Cohen I, Ron IG, Ben-Jacob E. From branching to nebula patterning during colonial development of the *Paenibacillus alvei* bacteria. *Phys A Stat Mech its Appl.* 2000;286(1-2):321–36. doi: 10.1016/S0378-4371(00)00335-6.
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, *et al.* Ribosomal database project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(D1):D633–42. doi: 10.1093/nar/gkt1244.
- Conrad JC, Gibiansky ML, Jin F, Gordon VD, Motto DA, Mathewson MA, Stopka WG, Zelasko DC, Shrout JD, Wong GC. Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophys J.* 2011 Apr 6;100(7):1608-16. doi: 10.1016/j.bpj.2011.02.020.
- Costenbader CJ, Burchard RP. Effect of cell length on gliding motility of *Flexibacter*. *J Bacteriol.* 1978 Mar;133(3):1517-9. doi: 10.1128/jb.133.3.1517-1519.1978.
- Crespo A, Blanco-Cabra N, Torrents E. Aerobic Vitamin B12 Biosynthesis Is Essential for *Pseudomonas aeruginosa* Class II Ribonucleotide Reductase Activity During Planktonic and Biofilm Growth. *Front Microbiol.* 2018 May 15;9:986. doi: 10.3389/fmicb.2018.00986.
- Davis MW, Jorgensen EM. ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. *Front. Bioinform.* 2022;2:818619. doi: 10.3389/fbinf.2022.818619
- Dienst D, Dühring U, Mollenkopf HJ, Vogel J, Golecki J, Hess WR, Wilde A. The cyanobacterial homologue of the RNA chaperone Hfq is essential for motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology (Reading)*. 2008 Oct;154(Pt 10):3134-3143. doi: 10.1099/mic.0.2008/020222-0.
- Dubrovin EV, Kirik IA, Babykin MM, Yaminsky IV. Atomic force microscopy study of pili in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: editors. *From Cells to Proteins: Imaging Nature across Dimensions*; 2005. p. 405-14 doi: 10.1007/1-4020-3616-7\_20.
- Duggan PS, Gottardello P, Adams DG. Molecular analysis of genes in *Nostoc punctiforme* involved in pilus biogenesis and plant infection. *J Bacteriol.* 2007 Jun;189(12):4547-51. doi: 10.1128/JB.01927-06.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792–7. doi: 10.1093/nar/gkh340.
- Ehlers K, Oster G. On the mysterious propulsion of *Synechococcus*. *PLoS One.* 2012;7(5):e36081. doi: 10.1371/journal.pone.0036081.
- Ellison CK, Kan J, Dillard RS, Kysela DT, Ducret A, Berne C, Hampton CM, Ke Z, Wright ER, Biais N, Dalia AB, Brun YV. Obstruction of pilus retraction stimulates bacterial surface sensing. *Science.* 2017 Oct 27;358(6362):535-538. doi: 10.1126/science.aan5706.
- Ellison CK, Dalia TN, Dalia AB, Brun YV. Real-time microscopy and physical perturbation of bacterial pili using maleimide-conjugated molecules. *Nat Protoc.* 2019 Jun;14(6):1803-1819. doi: 10.1038/s41596-019-0162-6. Epub 2019 Apr 26. PMID: 31028374; PMCID: PMC7461830.
- Finkelshtein A, Roth D, Ben JE, Ingham CJ. Bacterial swarms recruit cargo bacteria to pave the way in toxic environments. *MBio.* 2015;6:1–10.

- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Sep;8(9):623-33. doi: 10.1038/nrmicro2415.
- Flores E, Pernil R, Muro-Pastor AM, Mariscal V, Maldener I, Lechno-Yossef S, Fan Q, Wolk CP, Herrero A. Septum-localized protein required for filament integrity and diazotrophy in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol.* 2007 May;189(10):3884-90. doi: 10.1128/JB.00085-07.
- Fujihara M, Maeda K, Sasamori E, Matsushita M, Harasawa R. Effects of chelating reagents on colonial appearance of *Paenibacillus alvei* isolated from canine oral cavity. *J Vet Med Sci.* 2009;71(2):147-53. doi: 10.1292/jvms.71.147.
- Fujikawa H, Matsushita M. Fractal growth of *Bacillus subtilis* on agar plates. *J Phys Soc Jpn.* 1989;58(11):3875-8. doi: 10.1143/JPSJ.58.3875.
- Galante A, Wisen S, Bhaya D, Levy D. Modeling local interactions during the motion of cyanobacteria. *J Theor Biol.* 2012;309:147-58. doi: 10.1016/j.jtbi.2012.06.013.
- Gibiansky ML, Hu W, Dahmen KA, Shi W, Wong GCL. Earthquake-like dynamics in *Myxococcus xanthus* social motility. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(6):2330-5. doi: 10.1073/pnas.1215089110.
- Gillert K-E. *Bacillus circulans* (Jordan) aufbau und verhalten beweglicher kolonien. Göttingen: Insitut fur den Wissenschaftlichen Film; 1975.
- Gillespie CS. Fitting heavy tailed distributions: the powerLaw package. *J Stat Softw.* 2015;64:1-16.
- Gloag ES, Turnbull L, Huang A, Vallotton P, Wang H, Nolan LM, Mililli L, Hunt C, Lu J, Osvath SR, Monahan LG, Cavaliere R, Charles IG, Wand MP, Gee ML, Prabhakar R, Whitchurch CB. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jul 9;110(28):11541-6. doi: 10.1073/pnas.1218898110.
- Halfen LN & Castenholz RW. Gliding Motility in The Blue-green Alga *Oscillatoria Princeps*. *Journal of Phycology*,1971;7(2), 133-145. doi: 10.1111/j.1529-8817.1971.tb01492.x
- Hall TA. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 1999;41, 95-98.
- Han MV, Zmasek CM. PhyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics. *BMC Bioinform.* 2009;10:1-6.
- Hannon GJ. FASTX-Toolkit. 2010, [[http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit)].
- Harshey RM. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:249-73. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.091014.
- Hayakawa Y. Spatiotemporal dynamics of skeins of wild geese. *EPL.* 2010;89 48004.
- Henrichsen J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev.* 1972;36(4):478-503. doi: 10.1128/BR.36.4.478-503.1972.
- Henriksen SD, Svendsen M. Rotating and wandering colonies in a strain of genus *Bacillus*. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1946;23:387-93.
- Herdman M, Rippka R. [22] Cellular differentiation: Hormogonia and baeocytes. In: Packer L, Glazer A. N, editors. *Methods in Enzymology Volume 167.* London: Academic Press;1988. p.232-42.

- Hernandez-Muniz W, Stevens SE. Characterization of the motile hormogonia of *Mastigocladus laminosus*. J Bacteriol. 1987;169(1):218–23. doi: 10.1128/JB.169.1.218-223.1987.
- Hoiczyk E, Baumeister W. The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. Curr Biol. 1998;8(21):1161–8. doi: 10.1016/S0960-9822(07)00487-3.
- Honda R, Umeda S, Wakita J. Cell–cell and Cell–noise Interactions of Bacterial Cells in a Shallow Circular Pool and Transitions of Collective Motions. J. Phys. Soc. Jpn. 2019; 88, 054005 doi: 10.7566/JPSJ.88.054005
- Ihaka R, Gentleman R. R: a language for data analysis and graphics. J Comput Graph Stat. 1996; 5(3), 299–314. doi: 10.2307/1390807
- Inaba M, Yamanaka H, Kondo S. Pigment pattern formation by contact-dependent depolarization. Science. 2012 Feb 10;335(6069):677. doi: 10.1126/science.1212821.
- Ingham CJ, Jacob E. Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus vortex* studied by imaging and tracking cells. BMC Microbiol. 2008;8(1):36. doi: 10.1186/1471-2180-8-36.
- Inoue D, Kabir AMR, Mayama H, Gong JP, Sada K, Kakugo A. Growth of ring-shaped microtubule assemblies through stepwise active self-organisation. Soft Matter. 2013;9(29):7061-8. doi: 10.1039/c3sm50704a
- Inoue D, Mahmot B, Kabir AM, Farhana TI, Tokuraku K, Sada K, Konagaya A, Kakugo A. Depletion force induced collective motion of microtubules driven by kinesin. Nanoscale. 2015 Nov 21;7(43):18054-61. doi: 10.1039/c5nr02213d. PMID: 26260025.
- Ishikawa T, Yoshida N, Ueno H, Wiedeman M, Imai Y, Yamaguchi T. Energy transport in a concentrated suspension of bacteria. Phys Rev Lett. 2011 Jul 8;107(2):028102. doi: 10.1103/PhysRevLett.107.028102.
- Iwasaki, H. Culturing <Paper>cut. Performance Res. 2020, 25: 72-73 doi: 10.1080/13528165.2020.1807763
- Janulevicius A, Van Loosdrecht M, Picioreanu C. Short-range guiding can result in the formation of circular aggregates in myxobacteria populations. PLoS Comput Biol. 2015;11(4):e1004213. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004213.
- Jin F, Conrad JC, Gibiansky ML, Wong GC. Bacteria use type-IV pili to slingshot on surfaces. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Aug 2;108(31):12617-22. doi: 10.1073/pnas.1105073108.
- Kaiser D, Warrick H. Transmission of a signal that synchronizes cell movements in swarms of *Myxococcus xanthus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Sep 9;111(36):13105-10. doi: 10.1073/pnas.1411925111.
- Keya JJ, Suzuki R, Kabir AMR, Inoue D, Asanuma H, Sada K, Hess H, Kuzuya A, Kakugo A. DNA-assisted swarm control in a biomolecular motor system. Nat Commun. 2018 Jan 31;9(1):453. doi: 10.1038/s41467-017-02778-5.
- Khayatan B, Meeks JC, Risser DD. Evidence that a modified type IV pilus-like system powers gliding motility and polysaccharide secretion in filamentous cyanobacteria. Mol Microbiol. 2015;98(6):1021–36. doi: 10.1111/mmi.13205.
- Kirie S, Iwasaki H, Noshita K, Iwata H. A theoretical morphological model for quantitative description of the three-dimensional floral morphology in water lily (*Nymphaea*). PLoS One. 2020 Oct 12;15(10):e0239781. doi: 10.1371/journal.pone.0239781.

- Kitazaki C, Numano S, Takanezawa A, Nishizawa T, Shirai M, Asayama M. Characterization of lysis of the multicellular Cyanobacterium *Limnothrix/Pseudanabaena* sp. strain ABRG5-3. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013;77(12):2339-47. doi: 10.1271/bbb.130409.
- Kobayashi K, Kanasaki Y, Yoshikawa H. Genetic analysis of collective motility of *Paenibacillus* sp. NAIST15-1. *PLoS Genet*. 2016;12:1–30.
- Kondo S. A mechanistic model for morphogenesis and regeneration of limbs and imaginal discs. *Mech Dev*. 1992 Dec;39(3):161-70. doi: 10.1016/0925-4773(92)90043-j
- Kondo S, Asai R. A reaction-diffusion wave on the skin of the marine angelfish *Pomacanthus*. *Nature*. 1995 Aug 31;376(6543):765-8. doi: 10.1038/376765a0.
- Koonin EV, Aravind L. The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci*. 2000 May;25(5):223-4. doi: 10.1016/s0968-0004(00)01577-2.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, *et al*. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947– 8. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
- Levy D, Requeijo T. Stochastic models for phototaxis. *Bull Math Biol*. 2008; 70(6):1684–706. doi: 10.1007/s11538-008-9314-5.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*. 2009;25:1754-60.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
- Li Y, Sun H, Ma X, Lu A, Lux R, Zusman D, *et al*. Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(9):5443–8. doi: 10.1073/pnas.0836639100.
- Lima S, Matinha-Cardoso J, Tamagnini P, Oliveira P. Extracellular Vesicles: An Overlooked Secretion System in Cyanobacteria. *Life (Basel)*. 2020 Jul 31;10(8):129. doi: 10.3390/life10080129.
- Liu S, Shankar S, Marchetti MC, Wu Y. Viscoelastic control of spatiotemporal order in bacterial active matter. *Nature*. 2021 Feb;590(7844):80-84. doi: 10.1038/s41586-020-03168-6.
- Lushi E, Wioland H, Goldstein RE. Fluid flows created by swimming bacteria drive self-organization in confined suspensions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 8;111(27):9733-8. doi: 10.1073/pnas.1405698111.
- Maeda K, Tamura J, Okuda Y, Narikawa R, Midorikawa T, Ikeuchi M. Genetic identification of factors for extracellular cellulose accumulation in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus*: proposal of a novel tripartite secretion system. *Mol Microbiol*. 2018 Apr 24. doi: 10.1111/mmi.13977.
- Matsushita M, Hiramatsu F, Kobayashi N, Ozawa T, Yamazaki Y, Matsuyama T. Colony formation in bacteria: Experiments and modeling. *Biofilms*, 2004;1(4):305-317. doi: 10.1017/S1479050505001626
- Matsuyama T, Matsushita M. Population morphogenesis by cooperative bacteria. *Forma*. 2001;16:307–26.
- Meeks JC, Elhai J. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002 Mar;66(1):94-121; table of contents. doi: 10.1128/MMBR.66.1.94-121.2002.

- Mimura M, Sakaguchi H, Matsushita M. Reaction–diffusion modelling of bacterial colony patterns. *Physica A*. 2000;282(1-2):283-303. doi:10.1016/S0378-4371(00)00085-6.
- Miyata M, Hamaguchi T. Prospects for the gliding mechanism of *Mycoplasma mobile*. *Curr Opin Microbiol*. 2016 Feb;29:15-21. doi: 10.1016/j.mib.2015.08.010.
- Morikawa R, Miyakawa T, Tamakoshi M, Takasu M. Simulation study of bacterial colonies formed by the twitching motility: The effect of slingshot-like motions of bacteria on the colony edge, AIP Conference Proceedings. 2013;1518, 590-593 doi: 10.1063/1.4794638
- Nakane D, Sato K, Wada H, McBride MJ, Nakayama K. Helical flow of surface protein required for bacterial gliding motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 2;110(27):11145-50. doi: 10.1073/pnas.1219753110.
- Nakane D, Nishizaka T. Asymmetric distribution of type IV pili triggered by directional light in unicellular cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jun 20;114(25):6593-6598. doi: 10.1073/pnas.1702395114.
- Nakane D, Enomoto G, Bähre H, Hirose Y, Wilde A, Nishizaka T. *Thermosynechococcus* switches the direction of phototaxis by a c-di-GMP-dependent process with high spatial resolution. *Elife*. 2022 May 10;11:e73405. doi: 10.7554/eLife.73405.
- Schuergers N, Wilde A. Appendages of the cyanobacterial cell. *Life (Basel)*. 2015 Mar 4;5(1):700-15. doi: 10.3390/life5010700.
- Nishizawa T, Hanami T, Hirano E, Miura T, Watanabe Y, Takanezawa A, Komatsuzaki M, Ohta H, Shirai M, Asayama M. Isolation and molecular characterization of a multicellular cyanobacterium, *Limnothrix/Pseudanabaena* sp. strain ABRG5-3. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(9):1827-35. doi: 10.1271/bbb.100216.
- Niwa HS. Space-irrelevant scaling law for fish school sizes. *J Theor Biol*. 2004 Jun 7;228(3):347-57. doi: 10.1016/j.jtbi.2004.01.011.
- O'Connor KA, Zusman DR. Patterns of cellular interactions during fruiting- body formation in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol*. 1989;171(11):6013–24. doi: 10.1128/JB.171.11.6013-6024.1989.
- Ohgiwari M, Matsushita M, Matsuyama T. Morphological changes in growth phenomena of bacterial colony patterns. *J Phys Soc Jpn*. 1992;61(3):816–22. doi: 10.1143/JPSJ.61.816.
- Ohtsubo Y, Hirose Y, Nagata Y. Algorithms used for in silico finishing of bacterial genomes based on short-read assemblage implemented in GenoFinisher, AceFileViewer, and ShortReadManager. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2022 May 24;86(6):693-703. doi: 10.1093/bbb/zbac032.
- Orskov J, Method for the demonstration of bacterial flagellum activity direct indian ink agar microscopy. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*. 1947;24: 181-183. doi: 10.1111/j.1699-0463.1947.tb00587.x
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49-79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49.
- Peruani F, Deutsch A, Bär M. Nonequilibrium clustering of self-propelled rods. *Phys Rev E - Stat Nonlinear, Soft Matter Phys*. 2006;74(3):1–4. doi: 10.1103/PhysRevE.74.030904.
- Peruani F, Starruss J, Jakovljevic V, Søgaard-Andersen L, Deutsch A, Bär M. Collective motion and nonequilibrium cluster formation in colonies of gliding bacteria. *Phys Rev Lett*. 2012 Mar 2;108(9):098102. doi: 10.1103/PhysRevLett.108.098102.
- Picard Toolkit. 2019. Broad Institute, GitHub Repository. [<https://broadinstitute.github.io/picard/>]



- Poole K, Schiebel E, Braun V. Molecular characterization of the hemolysin determinant of *Serratia marcescens*. J Bacteriol. 1988 Jul;170(7):3177-88. doi: 10.1128/jb.170.7.3177-3188.1988. PMID: 3290200.
- Pramanik A, Könninger U, Selvam A, Braun V. Secretion and activation of the *Serratia marcescens* hemolysin by structurally defined ShlB mutants. Int J Med Microbiol. 2014 May;304(3-4):351-9. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.11.021.
- Reynolds CW. Flocks, Herds, and Schools: A distributed behavior model, Computer Graphics. 1987;21-4, 25/34
- Riley KW, Gonzalez A, Risser DD. A partner-switching regulatory system controls hormogonium development in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. Mol Microbiol. 2018;109(4):555-69. doi: 10.1111/mmi.14061.
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Microbiology. 1979;111:1-61, 1, 1, doi: 10.1099/00221287-111-1-1.
- Risser DD, Meeks JC. Comparative transcriptomics with a motility-deficient mutant leads to identification of a novel polysaccharide secretion system in *Nostoc punctiforme*. Mol Microbiol. 2013;87(4):884-93. doi: 10.1111/mmi.12138.
- Risser DD, Chew WG, Meeks JC. Genetic characterization of the *hmp* locus, a chemotaxis-like gene cluster that regulates hormogonium development and motility in *Nostoc punctiforme*. Mol Microbiol. 2014;92(2):222-33. doi: 10.1111/mmi.12552.
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. Nat Biotechnol. 2011 Jan;29(1):24-6. doi: 10.1038/nbt.1754.
- Sato N, Katsumata Y, Sato K, Tajima N. Cellular dynamics drives the emergence of supracellular structure in the cyanobacterium, *Phormidium* sp. KS. Life. 2014;4(4):819-36. doi: 10.3390/life4040819.
- Schatz D, Nagar E, Sendersky E, Parnasa R, Zilberman S, Carmeli S, Mastai Y, Shimoni E, Klein E, Yeger O, Reich Z, Schwarz R. Self-suppression of biofilm formation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. Environ Microbiol. 2013 Jun;15(6):1786-94. doi: 10.1111/1462-2920.12070.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods. 2012;9(7):676-82. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to imagej: 25 years of image analysis. Nat Methods. 2012;9(7):671-5. doi: 10.1038/nmeth.2089.
- Schroeder TE, Battaglia DE. Spiral asters and cytoplasmic rotation in sea urchin eggs: induction in *Strongylocentrotus purpuratus* eggs by elevated temperature. J Cell Biol. 1985 Apr;100(4):1056-62. doi: 10.1083/jcb.100.4.1056.
- Sekimura T, Venkataraman C, Madzvamuse A. A model for selection of eyespots on butterfly wings. PLoS One. 2015 Nov 4;10(11):e0141434. doi: 10.1371/journal.pone.0141434.
- Shepard RN, Sumner DY. Undirected motility of filamentous cyanobacteria produces reticulate mats. Geobiology. 2010;8(3):179-90. doi: 10.1111/j.1472-4669.2010.00235.x.
- Shrivastava A, Rhodes RG, Pochiraju S, Nakane D, McBride MJ. *Flavobacterium johnsoniae* RemA is a mobile cell surface lectin involved in gliding. J Bacteriol. 2012 Jul;194(14):3678-88. doi: 10.1128/JB.00588-12.
- Soule T, Shipe D, Lothamer J. Extracellular Polysaccharide Production in a Scytonemin-Deficient Mutant of *Nostoc punctiforme* Under UVA and Oxidative Stress. Curr Microbiol. 2016 Oct;73(4):455-62. doi: 10.1007/s00284-016-1084-y.

- Springstein BL, Arévalo S, Helbig AO, Herrero A, Stucken K, Flores E, Dagan T. A novel septal protein of multicellular heterocystous cyanobacteria is associated with the divisome. *Mol Microbiol.* 2020 Jun;113(6):1140-1154. doi: 10.1111/mmi.14483.
- Starruß J, Peruani F, Jakovljevic V, Søgaard-Andersen L, Deutsch A, Bär M. Pattern-formation mechanisms in motility mutants of *Myxococcus xanthus*. *Interface Focus.* 2012;2(6):774–85. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2012.0034>.
- Steedman HF. Alcian blue 8GS: a new stain for mucin. *Q J Microsc Sci.* 1950 Dec;91(4):477-9.
- Stricker SA. Repetitive calcium waves induced by fertilization in the nemertean worm *Cerebratulus lacteus*. *Dev Biol.* 1996 Jun 15;176(2):243-63. doi: 10.1006/dbio.1996.0131.
- Sugawara T, Chinzei M, Numano S, Kitazaki C, Asayama M. Flocculation and pentadecane production of a novel filamentous cyanobacterium *Limnothrix* sp. strain SK1-2-1. *Biotechnol Lett.* 2018 May;40(5):829-836. doi: 10.1007/s10529-018-2525-4.
- Sugi T, Ito H, Nishimura M, Nagai KH. *C. elegans* collectively forms dynamical networks. *Nat Commun.* 2019 Feb 18;10(1):683. doi: 10.1038/s41467-019-08537-y.
- Sumino Y, Nagai KH, Shitaka Y, Tanaka D, Yoshikawa K, Chaté H, *et al.* Large-scale vortex lattice emerging from collectively moving microtubules. *Nature.* 2012;483(7390):448–52. doi: 10.1038/nature10874.
- Sure S, Torriero AA, Gaur A, Li LH, Chen Y, Tripathi C, Adholeya A, Ackland ML, Kochar M. Inquisition of *Microcystis aeruginosa* and *Synechocystis nanowires*: characterization and modelling. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2015 Nov;108(5):1213-25. doi: 10.1007/s10482-015-0576-2.
- Suzuki H, Daimon M, Awano T, Umekage S, Tanaka T, Kikuchi Y. Characterization of extracellular DNA production and flocculation of the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009 Aug;84(2):349-56. doi: 10.1007/s00253-009-2031-7.
- Suzuki K, Miyazaki M, Takagi J, Itabashi T, Ishiwata S. Spatial confinement of active microtubule networks induces large-scale rotational cytoplasmic flow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Mar 14;114(11):2922-2927. doi: 10.1073/pnas.1616001114.
- Tamulonis C, Postma M, Kaandorp J. Modeling filamentous cyanobacteria reveals the advantages of long and fast trichomes for optimizing light exposure. *PLoS One.* 2011;6(7):1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0022084
- Tamulonis C, Kaandorp J. A model of filamentous cyanobacteria leading to reticulate pattern formation. *Life.* 2014;4(3):433–56. doi: 10.3390/life4030433
- Tandeau de Marsac N. Differentiation of hormogonia and relationships with other biological processes. In : Bryant D.A, editor. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Boston: Kluwer Academic Publishers:1994. p. 825–42.
- Thutupalli S, Sun M, Bunyak F, Palaniappan K, Shaevitz JW. Directional reversals enable *Myxococcus xanthus* cells to produce collective one- dimensional streams during fruiting-body formation. *J R Soc Interface.* 2015; 12(109):20150049. doi: 10.1098/rsif.2015.0049.
- Toyofuku M, Cárcamo-Oyarce G, Yamamoto T, Eisenstein F, Hsiao CC, Kurosawa M, Gademann K, Pilhofer M, Nomura N, Eberl L. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. *Nat Commun.* 2017 Sep 7;8(1):481. doi: 10.1038/s41467-017-00492-w.
- Tseng Q, Duchemin-Pelletier E, Deshiere A, Balland M, Guilloud H, Filhol O, *et al.* Spatial organization of the extracellular matrix regulates cell-cell junction positioning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(5):1506–11. doi: 10.1073/pnas.1106377109.

- Tseng Q. Study of multicellular architecture with controlled microenvironment: Ph.D. dissertation, Saint-Martin-d'Hères: Université de Grenoble; 2011.
- Ursell T, Chau RMW, Wisen S, Bhaya D, Huang KC. Motility enhancement through surface modification is sufficient for cyanobacterial community organization during phototaxis. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(9):e1003205. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003205.
- Vallotton P. Size matters: Filamentous bacteria drive interstitial vortex formation and colony expansion in *Paenibacillus vortex*. *Cytometry A*. 2013 Dec;83(12):1105-12. doi: 10.1002/cyto.a.22354.
- Varuni P, Menon SN, Menon GI. Phototaxis as a collective phenomenon in cyanobacterial colonies. *Sci Rep*. 2017;7:1–10.
- Vicsek T, Czirók A, Ben-Jacob E, Cohen I, Shochet O. Novel type of phase transition in a system of self-driven particles. *Phys Rev Lett*. 1995 Aug 7;75(6):1226-1229. doi: 10.1103/PhysRevLett.75.1226.
- Wada S, Kabir AM, Ito M, Inoue D, Sada K, Kakugo A. Effect of length and rigidity of microtubules on the size of ring-shaped assemblies obtained through active self-organization. *Soft Matter*. 2015 Feb 14;11(6):1151-7. doi: 10.1039/c4sm02292k.
- Wakita J, Komatsu K, Nakahara A, Matsuyama T, Matsushita M. Experimental investigation on the validity of population dynamics approach to bacterial colony formation. *J Phys Soc Jpn*. 1994;63(3):1205–11. doi: 10.1143/JPSJ.63.1205.
- Wakita J, Tsukamoto S, Yamamoto K, Katori M, Yamada Y. Phase diagram of collective motion of bacterial cells in a shallow circular pool. *J Phys Soc Jpn*. 2015;84:1–6.
- Walsby AE. Mucilage secretion and the movements of blue-green algae. *Protoplasma*. 1968;65(1-2):223–38. doi: 10.1007/BF01666380.
- Weihls D. The mechanism of rapid starting of slender fish. *Biorheology*. 1973 Sep;10(3):343-50. doi: 10.3233/bir-1973-10308.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002;295(5559):1487. doi: 10.1126/science.295.5559.1487.
- Wilde A, Mullineaux CW. Motility in cyanobacteria: polysaccharide tracks and type IV pilus motors. *Mol Microbiol*. 2015;98(6):998–1001. doi: 10.1111/mmi.13242.
- Wioland H, Woodhouse FG, Dunkel J, Kessler JO, Goldstein RE. Confinement stabilizes a bacterial suspension into a spiral vortex. *Phys Rev Lett*. 2013 Jun 28;110(26):268102. doi: 10.1103/PhysRevLett.110.268102.
- Wu Y, Kaiser AD, Jiang Y, Alber MS. Periodic reversal of direction allows myxobacteria to swarm. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(4):1222–7. doi: 10.1073/pnas.0811662106.
- Yamamoto H, Fukasawa Y, Shoji Y, Hisamoto S, Kikuchi T, Takamatsu A, Iwasaki H. Scattered migrating colony formation in the filamentous cyanobacterium, *Pseudanabaena* sp. NIES-4403. *BMC Microbiol*. 2021 Aug 16;21(1):227. doi: 10.1186/s12866-021-02183-5.
- Yonekura T, Iwamoto A, Fujita H, Sugiyama M. Mathematical model studies of the comprehensive generation of major and minor phyllotactic patterns in plants with a predominant focus on orixate phyllotaxis. *PLoS Comput Biol*. 2019 Jun 6;15(6):e1007044. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007044.
- Yoshida S, Takahashi M, Ikeda A, Fukuda H, Kitazaki C, Asayama M. Overproduction and easy recovery of biofuels from engineered cyanobacteria, autolyzing multicellular cells. *J Biochem*. 2015 Jun;157(6):519-27. doi: 10.1093/jb/mvv011.

- Yoshihara S, Geng X, Okamoto S, Yura K, Murata T, Go M, Ohmori M, Ikeuchi M. Mutational analysis of genes involved in pilus structure, motility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 2001 Jan;42(1):63-73. doi: 10.1093/pcp/pce007.
- Yu G, Zhu M, Chen Y, Pan Q, Chai W, & Li R. Polyphasic characterization of four species of *Pseudanabaena* (*Oscillatoriales*, *Cyanobacteria*) from China and insights into polyphyletic divergence within the *Pseudanabaena* genus. *Phytotaxa.* 2015;192(1), 1–12. doi: 10.11646/phytotaxa.192.1.1
- 岩崎秀雄（2013）『<生命>とは何だろうか：表現する生物学，思考する芸術』講談社現代新書
- 岩崎秀雄（2018）「BioReality をめぐる生命美学的遍歴」日本バーチャルリアリティ学会誌，23:7-12.
- 久保田晃弘・岩崎秀雄（2009）「バイオメディア・アート」多摩美術大学論集，24:177-186
- 高松敦子，工藤亮太，齋藤拓，木村拓（2014）「運動性シアノバクテリア集団の遷移現象」交通流シミュレーションシンポジウム論文集，20
- 中根大介・西坂崇之（2018）「シアノバクテリアの運動」生物工学，96(5):244-247

## 謝辞

本研究を行うにあたり、テーマの提供および指導教官としてご指導、ご鞭撻いただきました早稲田大学の岩崎秀雄教授に深く感謝いたします。高松敦子教授には共同研究者として長年に渡り様々なアイデアやご提案を頂き、また副指導教官としてご指導いただきました。第二章で提言したコロニーの遷移に関しては、高松先生に頂きましたご示唆が基となっております。PIVによるコロニー内部の流体解析は高松先生、および高松研究室の田中慶太さんの研究にアイデアを頂いております。豊橋技術科学大学の広瀬侑博士にはゲノム解析に関して共同研究者として解析して頂くだけでなく、ご助言を頂き、また変異解析では丁寧なご指導を頂き、深くお礼申し上げます。また、岩崎研究室のメンバーにも非常にお世話になりました。先輩の深澤有貴氏は研究を立ち上げ、系統解析や運動解析、コロニーパターンの解析や電子顕微鏡観察、あるいはコロニーの遷移に関する基礎的な情報の解析や仮説の構築をして頂きました。現明治大学の久本博士には投稿論文の共著者として数理モデルによる解析をご担当頂き、論文の完成にご助力いただきました。また、投稿論文に対して様々なご意見とご指摘を頂きました。東海林祐氏には同学年として研究に関して協力や議論を重ね、個体の速度や変異株の基礎的な性質を始めとした様々な結果を残して頂きました。加藤久貴氏とはAFMやSEMによる解析を一緒に行い、表面構造について新しい知見を得ることができました。菊地智弘氏には特に集団中の個体の確認に取り組んで頂き、様々な方法を試していただきました。小林大晃氏には変異株の基礎的なデータを揃えて頂き、また個体長を調整する方法について様々な検討をして頂きました。その他本論文では紹介できませんでしたが、*Pseudanabaena*に関する研究には岩崎研究室の柳華音氏、諸石和馬氏、飯塚玲太氏、中嶋嵐氏、山内沙耶氏が携わっており、多くのご助力やアイデアを頂きました。その他の岩崎研究室のメンバーにも様々なアイディアやご指摘を頂き、活発な議論をさせて頂いたことで博士論文の執筆に辿り着けたと考え、感謝しております。

また、本研究には早稲田大学の共用機器を使わせていただいております。早稲田大学リサーチサポートセンターでは原子間力顕微鏡を利用し、指導や相談に乗っていただき、特に伊藤雅樹氏にはお世話になりました。共焦点顕微鏡は早稲田大学先端生命医科学センターの機器を使用いたしました。

最後に、支えて下さった友人、また博士課程の最後まで通わせてくれた家族に感謝いたします。

## 動画リスト

動画 1.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 12: Movie S4.

動画 2.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 9: Movie S1.

動画 3.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 10: Movie S2.

動画 4.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 11: Movie S3.

動画 5.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 13: Movie S5.

動画 6.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 14: Movie S6.

動画 7.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 15: Movie S7.

動画 8.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 16: Movie S8.

動画 9.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 17: Movie S9.

動画 10.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 18: Movie S10.

動画 11.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 19: Movie S11.

動画 12.

<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.20160674.v1>

動画 13.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 20: Movie S12.

動画 14.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 21: Movie S13.

動画 15.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5> Additional File 22: Movie S14.

## 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 <a href="https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5">https://doi.org/10.1186/s12866-021-02183-5</a> , 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