

# 博士論文審査報告書

## 論 文 題 目

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

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

申 請 者

山本 宏輝

Hiroki YAMAMOTO

電気・情報生命専攻 細胞分子ネットワーク研究

2022年7月

多数の個体が群集を形成し、集団的な振る舞いを示すことは多くの生物種で知られている。群行動は、多くの場合特定の先導者がいるわけではなく、比較的シンプルな個体間の局所的相互作用に基づき、全体として揺らぎと統一性を持つ群行動が創発される。こうした群行動は生態系の中で、効率的な移動や探索行動、外敵からの防御など様々な機能を担い、群知能として解釈される場合もある。群行動は、高等動物や昆虫のみならず、プランクトンやバクテリアなどの微生物にも一般的に見られる。

バクテリアは単独個体で生存することは稀であり、通常はコロニーと呼ばれる集団を形成しながら増殖する。歯垢や水回りのぬめりに見られるバイオフィームは代表的なバクテリアの集合形態である。運動能を持つ種は、特にしばしば特徴的な群行動を示す。寒天培地上では、運動性バクテリアの群行動は、それぞれの種に固有のコロニーパターン（形態、模様）の形成をもたらす。バクテリアでコロニーパターンないし群行動を解析する利点の一つは、他個体間の複雑な相互作用や群集形成を、実験室環境の狭い空間範囲で観察・解析することができることにある。また微生物学的には、コロニーパターン形成の理解は、それぞれの種特有の行動様式を理解することに繋がるだけでなく、多種多様な種と共存する本来の生存環境における生きざまを推測するための基礎情報にもなる。本論文の対象となったシアノバクテリアは、酸素発生型光合成を創出し、地球を分子状酸素に富む惑星に作り替え、酸素呼吸生物の反映とその炭素骨格の供給をし続けている、生態学的に極めて重要な生物群である。それゆえに海洋を含む地表の多くに生存圏を持ち、その多彩な生存環境に応じた多様な代謝系や形態を持つ。形態的にも多様だが、ごく限られた種を除き、コロニーパターンの形成過程についての研究はあまり行われてこなかった。

申請者は、大学構内から単離された糸状性シアノバクテリア *Pseudanabaena* sp. NIES-4403 株（以下 *Pseudanabaena*）を用い、この種が生み出す特徴的なコロニーパターンの形成過程に関して詳細な観察および画像解析を行うとともに、コロニーパターンの変異株の分離とゲノム解析を行った。

本論文は4章から構成されている。第1章（序論）では、バクテリアのコロニーパターンや運動機構に関する知見についてまとめられている。続いて、シアノバクテリアの運動機構の知見がより詳しく紹介され、今回の研究対象となった *Pseudanabaena* の分離と同定の経緯について述べられている。

第2章では、*Pseudanabaena* のコロニーパターンとその形成過程、運動様式に関する、主として顕微鏡観察や画像解析に基づく結果が述べられている。まず、*Pseudanabaena* を寒天培地上で培養すると、様々な大きさの運動性の集団が多数出現する散在的なコロニー分布を示すことを報告している。目視できるような巨大な細胞集団は、彗星状の形状をとって比較的直線的に移動する「彗星状コロニー」と、同じ場所で回転し続けるディスク状の「円盤コロニー」に大別され

た。申請者は、光学顕微鏡および共焦点顕微鏡を用いた彗星状コロニーのタイムラプス画像解析から、集団内では多数の個体が整列し、その運動方向や運動速度が斉一的に揃っていることを明らかにした。円盤コロニーについても内部の細胞の運動速度分布を解析したところ、円盤の中心から外延部にかけて距離依存的に運動速度が上昇し、大局的には角速度が揃って回転していることを示している。さらに、これらのコロニー間の遷移についても報告されている。彗星状コロニーは、植菌位置から外側への生存範囲の拡大を先導するように動くが、その進行方向には揺らぎもあり、何らかのきっかけで閉起動に入ると自らを追尾することでやがて円盤コロニーに変化した。円盤コロニーの回転運動の安定性は高く、しばしば彗星状コロニーが衝突すると巻き込んで円盤コロニーが生長する様子も報告している。彗星状コロニー同士が衝突した際に融合してさらに大きな彗星状コロニーに生長する場合や、衝突によって集団が崩壊する様子も報告されており、コロニー間の極めて動的な遷移過程を明らかにした。

こうした斉一的に運動が統制される巨大な細胞集団の形成には、個体間の強い相互作用が必要なはずである。申請者は、集団を形成していない個体同士が出会うと交差することなく並行もしくは逆並行に整列化する「ネマティック相互作用」の特性を持つことや、ある個体が通過した軌跡上を別の個体が通過する頻度が高いこと（追尾性を持つこと）も示している。さらに成熟した運動性コロニーでは、自分もしくは別コロニーが通過した軌跡を交差する際には運動速度が上昇することも示した。滑走運動を行なうバクテリアでは、細胞外多糖を主成分とする粘液上の分泌物質が、摩擦の低減などを介してしばしば運動性を亢進することが提案されている。そこで申請者は、複数の生体染色技術を併用し、

*Pseudanabaena* の運動性コロニーが通過した軌跡部分には何らかの物質が分泌されていること、高密度の細胞集団中には多糖類が分泌されていることを示した。運動マシナリー自体については、シアノバクテリアは鞭毛を持たず、未知の要素が多いが、IV型線毛の収縮の関与を示唆する先行研究がある。申請者は電子顕微鏡および原子間力顕微鏡を用いて細胞表面の微細構造の観察を試み、細胞表面から多数の毛状のナノワイヤーが伸びている様子を捉えた。申請者は、*Pseudanabaena* ではIV型線毛が滑走運動のみならず個体間の相互作用にも関係している可能性を指摘している。

第三章では、遺伝学的な観点から行った、*Pseudanabaena* のコロニーパターン形成や運動能に関わる研究の成果がまとめられている。申請者は、継代培養中に、上述の散在的なコロニーパターン（円盤コロニーや彗星状コロニー）を示さない変異株を分離した。興味深いことに、変異株では標準株に比べて個体長が著しく短いことが分かった。申請者は標準株と変異株のゲノムDNAの *de novo* シーケンシングを行い、*Pseudanabaena* が4.6 Mbpからなる染色体と5個のプラスミドを持つことを明らかにした。申請者は、同じ糸状性シアノバクテリアで運

動性に関する先行研究が行われている *Nostoc punctiforme* の運動関連遺伝子群のオルソログの多くが *Pseudanabaena* にも保存されていることを報告している。また、変異株ゲノムには多くの一塩基多型 (SNPs) が存在することを認めた。このうちタンパク質の機能に特に大きな影響をもたらすと考えられる原因遺伝子候補を 5 つに絞り、表現型との関連性について考察を加えている。

第四章 (総合討論) では、以上の結果をまとめるとともに、今後の課題や研究の展望が述べられている。例えば、第三章に示した単個体長変異株の原因遺伝子の特定のためには形質転換系の開発が不可欠であるが、いまだそれに至っていない。そこで申請者は、形質転換可能で運動性を示す変異体を得られた糸状性シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* 株を用いたオルソログ遺伝子の機能解析を提案している。また、数理モデルを取り入れたシミュレーション研究の重要性についても議論している。

予備審査会では、研究の質は認められるものの、論文全体の構成やデータ解析の解釈、研究手法の記述の不備を指摘し、多くの改善を求めた。公聴会では、再提出された博士論文の修正箇所を確認するとともに、質疑応答を行い、申請者が十分に学識を備えていることを確認した。質疑応答でさらに指摘した項目については再度微修正した博士論文が提出され、修正箇所を確認した。

本研究は、糸状性シアノバクテリア集団が作り出すコロニーパターンの動的形成過程に焦点を当て、画像解析と遺伝学的解析を駆使してメカニズムに迫ろうとしたものである。画像観察については、忍耐強く詳細なデータ取得・解析を行っており、コロニー形成過程のメカニズムについて多くの知見を与えた。ゲノム解析においては、野生株、変異株の比較によりシアノバクテリアの運動機構、細胞間相互作用、環境との相互作用の実体について、発展途上ではあるが、有用な情報を与えている。非モデル生物である、身近な環境から分離したシアノバクテリアを用いて新規性の高い研究を行った点もユニークである。以上のことから、本論文は博士 (理学) の学位論文にふさわしいものと判断する。

2022 年 7 月

審査員

(主査) 早稲田大学教授 博士 (理学) 名古屋大学 岩崎 秀雄  
(署名)

(副査) 早稲田大学教授 博士 (理学) 東京工業大学 高松 敦子  
(署名)

早稲田大学教授 博士 (理学) 東京大学 坂内 博子  
(署名)