

フローサイトメトリーを用いた放線菌休眠細胞の解析

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 基礎環境微生物学 長倉美琴

1. はじめに

微生物には非分裂状態で長期間生存し続けるものがある。この状態は「休眠」と呼ばれており、増殖に適さない環境への適応戦略の一つと考えられる。休眠した微生物は、環境の改善や Resuscitation-promoting factor (Rpf) と呼ばれるタンパク質に応答して覚醒することが知られる。休眠の例として *Bacillus* 属などが形成する芽胞が有名だが、近年放線菌等で芽胞を形成しないまま休眠する微生物も報告されており、休眠が広く保存される生残機構であると考えられている。無芽胞休眠細胞は通常の分裂細胞や死細胞との形態的差異が小さく、その生理状態や分子機構の解析が極めて困難となっている。

そこで本研究では、これら無芽胞休眠細胞の解析のため、フローサイトメトリー (FCM) 及び代謝活性依存的な蛍光染色試薬を用いた分裂・休眠及び死細胞の識別・分取法の開発を試みた。

2. 方法

本研究ではゲノム解析で Rpf 遺伝子の存在も明らかになっている放線菌 *Rhodococcus erythropolis* を用いた。芽胞を形成しない本菌に対し、休眠誘導法の検討、FCM 解析、CFU 計測及び Rpf タンパクによる効果の確認を行った。FCM に使用した蛍光試薬は、電子伝達鎖における還元反応の指示薬で代謝活性のある細胞のみを染色する RedoxSensor Green (RSG) と、細胞膜透過性がなく膜に損傷がある死細胞のみを染色する Propidium iodide の計 2 種類を用いた。休眠誘導は、先行研究にて報告されている *Tomitella biformata* の例を参考に、酸素制限条件下での長期培養試験を試みた。栄養培地での前培養後、生理食塩水にて洗浄した菌体をフルクトース含有最少培地に懸濁した。密閉したバイアル瓶に菌体を移し、2 日間の振盪培養で酸素を消費させた後、長期の静置培養を行った。これらをサンプリングし、上述の実験を行った。

3. 結果と考察

静置培養開始直後、FCM により RSG での染色が 98.5% の細胞で確認され、CFU は 1.0×10^6 /mL となった。静置開始後 2 週間で、RSG に染色される細胞集団は 81.3%、CFU は 3.9×10^2 /mL に低下した。また、6 週間で同細胞集団が 79.4%、CFU は 0 となったサンプルに対し、Rpf 過剰発現株の培養上清を加えてプレート培養を行ったが、*T. biformata* の結果とは異なりその覚醒促進効果は確認できなかった。

培養が長期化するにつれ、代謝活性を示す細胞数と、プレート上で培養が回復する細胞数に大きな乖離が生じたことから、酸素制限条件により大多数の細胞が休眠状態に至ったと考えられる。一方で、今回の FCM の条件では休眠細胞と分裂細胞との明確な識別ができなかった。今後は、この二者を顕著に染め分けられる他の染色試薬を使用するなど、再度の条件検討が必要である。