

表現型不均一性が生み出す微生物の集団環境適応戦略

尾花 望

はじめに

実環境中において多くの微生物は単独で生きているわけではなく、物質表面に付着してバイオフィームと呼ばれる3次元構造を形成して生活している。バイオフィーム細胞は、せん断応力や薬剤といった物理的および化学的ストレスに対する耐性が向上することから、バイオフィーム形成は微生物の環境適応および生き残り戦略の一つと考えられている¹⁾。つまり、微生物を利用および制御するためには、微生物を個ではなく集団として捉える必要がある。筆者らのグループでは、バイオフィーム内における遺伝子発現の不均一性に着目し、これを生み出す因子の探索と、その分子制御メカニズムの理解することによって、新しい微生物制御の基盤構築を目指している。本稿ではバイオフィーム中の不均一性について概説するとともに、筆者らが最近明らかにしたバイオフィーム中の不均一性の制御機構について紹介する。

バイオフィーム形成による環境適応

バイオフィームの構造 バイオフィーム中の細胞は自身が産生する細胞外マトリクスである Extracellular polymeric substrate (EPS) に覆われており、自由に浮遊・遊泳する状態の細胞とは異なる性質（遺伝子発現・薬剤耐性）を有している¹⁾。EPSマトリクスは主に細胞外多糖や細胞外タンパク質、そして細胞外DNA (eDNA) から構成されており、これらはバイオフィーム中の細胞-細胞間や細胞-基質表面間付着に寄与する。また、EPSの組成によってバイオフィームの3次元構造が変化し、その結果バイオフィームの“機能”も変化する。たとえば、緑膿菌では外界の鉄イオンや電子受容体濃度に応答してバイオフィームの構造や厚みが増加し、その結果、バイオフィーム中の細胞の鉄恒常性や酸化還元状態を保っていると考えられている^{2,3)}。つまり微生物は周囲の環境に応答してEPS産生を制御し、その結果バイオフィーム構造を変化させ、巧みに環境に適応して生存していると考えられる。

バイオフィーム中の不均一性 微生物は単一種のモノクローナル（遺伝的同一）な集団の中でも遺伝子発

現には確率的ゆらぎがあり、個々の細胞の性質は均一でなく、集団中からは異なる表現型を有する細胞が生じることが知られている（表現型多型；phenotypic heterogeneity）。また、バイオフィーム中は高菌体密度であり、細胞外マトリクスが存在することから、栄養や代謝産物の拡散が妨げられ、内部には化学物質の濃度勾配が生じている⁴⁾。つまり、バイオフィーム内環境は不均一性であり、さらにモノクローナルな集団で構成されていたとしても、その内部には遺伝子発現の異なる亜集団が含有されると考えられる。

不均一性が生み出す協調行動 細胞集団中の表現型多型は、単細胞である微生物が多細胞様にふるまうことを可能にし、集団中の役割分担や両掛け戦略といった集団的協同行動を生み出すと考えられている。たとえば、枯草菌の集団中では芽胞形成細胞と細胞外マトリクス産生細胞、プロテアーゼ産生細胞、および運動性細胞の亜集団がそれぞれ存在することが明らかとなっている。プロテアーゼは一部の細胞のみで産生されるが、プロテアーゼによるタンパク質の分解はプロテアーゼ非産生細胞の栄養獲得にも有益となる⁵⁾。また、枯草菌バイオフィーム中では一部の細胞集団のみが細胞外多糖を産生し、これが細胞集団全体をバイオフィームとして定着させることに寄与している⁶⁾。このような遺伝子変異に依存しない表現型多型で生じた形質は次世代に受け継がれず一時的であるが、次世代のクローナルな集団内でも再現性良く、さまざまな性質を有する亜集団を生み出すことが可能である。微生物はこのような性質を利用して、多様な環境に適応し生存していると考えられる⁷⁾。

不均一性の解析手法 バイオフィームの3次元構造やその内部の表現型不均一性を解析するためには、細胞を培養してその中身を破壊し定量するような分子生物学的手法では難しい。このような技術では、細胞集団中の遺伝子発現やタンパク質量の「平均」を解析することになるため、各々の細胞の状態を把握することは不可能である。そこで現在は、顕微鏡を用いて一細胞レベルで細胞の状態を解析する方法が主流となっている。たとえば、標的遺伝子の下流に蛍光タンパク質遺伝子を導入し、細胞の蛍光強度を定量することで、1細胞レベルの遺伝子

発現量を定量することができる。さらに共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を組み合わせることによって、バイオフィルムの3次元構造と遺伝子発現の局在性を同時に生きたまま解析することが可能となる。

自然環境中には多種多様な微生物が存在し、それぞれ固有の環境中でバイオフィルムを形成し、生息している。微生物の生きざまを知るためには、その自然界の存在形態であるバイオフィルム、そして、その3次元構造、細胞外マトリクス、表現型多型を理解する必要がある。また、微生物が本来生息する環境に近い状態で解析することが望ましいと考えられる。

嫌気性細菌が形成するバイオフィルム

温度に応答したバイオフィルム形態制御 上述の蛍光タンパク質発現系とCLSMを用いる観察技術によって生きたままのバイオフィルムを経時的に観察することが可能となり、バイオフィルムの構造やその形成過程について数多くの知見が得られてきた。しかし、この技術の利用は、形質転換系が確立している株に限られ、さらに蛍光タンパク質が正常に機能する環境条件に制限される。たとえば、GFPやDsRedなど多くの蛍光タンパク質はその蛍光発色団の形成に酸素を必要とするため、嫌気環境下におけるイメージングにはこれらの蛍光タンパク質は使用することができない。実環境中には嫌気性細菌も多く存在しており、特に、ヒトに共生・感染する細菌は嫌气的条件で生育していることが多い。昨今、ヒトの健康や疾患との関連が多く報告されている腸内細菌はその最たる例といえる。これらの嫌気性細菌もバイオフィルムを形成して生育していることが予想されるが、前述の通り、蛍光タンパク質の使用に制限があるため、嫌气的バイオフィルムの生きたままのイメージングや、その内部の遺伝子発現の不均一性についての研究例は乏しい。

筆者らは反射顕微鏡法 (confocal reflection microscopy: CRM)^{8,9)}を用いることによって、偏性嫌気性細菌であるウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) が形成する嫌気条件下バイオフィルム3次元構造形成のライブセルイメージングに成功した。ウェルシュ菌はグラム陽性の偏性嫌気性腸内細菌であり、食中毒やガス壊疽などの感染症の原因となる。日本における2019 (平成30) 年の食中毒患者数のうち、細菌性食中毒では、ウェルシュ菌が原因の患者数は1位となっており、本菌の環境ストレスに対する耐性獲得機構の理解および感染症の予防は医学面と産業面で重要であるといえる¹⁰⁾。ライブセルイメージングの結果、興味深いことにウェルシュ菌のバイオフィルムは外界の温度に応答してその形態が変化するこ

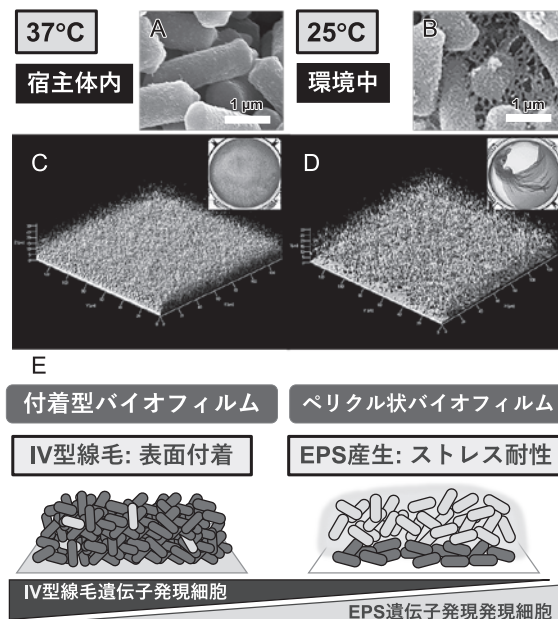


図1. ウェルシュ菌の温度に応答したバイオフィルム形態変化。37°Cにおける付着型バイオフィルム形成 (A, C) と25°Cにおけるペリクル状バイオフィルム形成 (B, D)。 (A, B) 走査型電子顕微鏡による糸状細胞外マトリクスの観察。 (C, D) 共焦点反射顕微鏡法によるバイオフィルム細胞の3次元構造観察。 (E) ウェルシュ菌のバイオフィルム形態変化のモデル図。

とを見いだした (図1)。宿主体内の温度である37°Cでは、物質表面に細胞が密に付着したバイオフィルムを形成する。一方で、25°Cでは物質表面への付着性が低下する。さらにバイオフィルム中の細胞密度が低下している様子が観察され、細胞と細胞の間は繊維状細胞外マトリクスによって架橋された状態となっている。その結果、弾性の高い膜 (ペリクル) 状バイオフィルムを形成する¹¹⁾。バイオフィルム形態変化のメカニズムを探るため、温度に応答して発現が変動する遺伝子を探したところ、以下のことが明らかとなった。37°CではIV型線毛遺伝子の発現量が上昇し、細胞が物質表面に付着する。それに対して25°CではIV型線毛遺伝子発現量が減少し、逆にEPS遺伝子の発現量が上昇する。その結果EPS生産性が向上し、バイオフィルムの形態がペリクル状に変化する。温度変化は宿主内外を認識する環境シグナルの一つであり、温度に応答したバイオフィルム形態変化は本菌の病原性に関与すると予想される。つぎに、この温度依存的なバイオフィルム形態制御に必須であるEPS生産について、その詳細な制御機構を知るためにバイオフィルム中遺伝子発現を1細胞レベルで解析することとした。

バイオフィルム中の遺伝子発現の空間分布 前述の通り、蛍光タンパク質を用いることによってバイオフィ

ルム中の1細胞レベルの遺伝子発現解析が可能であるが、嫌気条件下では通常の蛍光タンパク質は使用することができない。筆者らは蛍光発色団形成に酸素を必要としない嫌気蛍光タンパク質の発現系を改変することで、バイオフィーム中のウェルシュ菌の1細胞レベルの遺伝子発現を可能とした。共焦点レーザー顕微鏡の観察とFACS解析の結果、集団中にはEPS遺伝子発現細胞と非発現細胞の2種の亜集団が存在することが明らかとなった。集団中に占めるEPS発現細胞数は温度が低下(37°C→25°C)すると増加した。さらにバイオフィーム中におけるEPS遺伝子発現の空間分布を解析したところ、EPS遺伝子“非”発現細胞は物質表面に付着し、EPS遺伝子発現細胞はそれを覆うように上部に局在していた(図1E)。ウェルシュ菌が生産するEPSは酸素や抗生物質耐性に寄与することから、EPS遺伝子発現の不均一性は、集団中の役割分担を生み出すと考えられた(Obana *et al.* 2020, 投稿中)。

転写後制御を介したバイオフィーム形態制御 上述の通り、ウェルシュ菌集団中では物質表面に付着した細胞はEPS遺伝子を発現していなかった。つまり、本菌では、表面へ付着することと、EPSを生産することは逆相関している。ここで筆者らは細胞外構造であるIV型線毛に着目することとした。その理由を以下にあげる。1) ウェルシュ菌のIV型線毛は宿主細胞への付着に必須であるとの報告があった¹²⁾。2) IV型線毛遺伝子の発現はEPS遺伝子発現と逆相関していた。3) IV型線毛遺伝子*pilA2*を過剰発現させるとベリクル型バイオフィーム形成を阻害した。以上のことから、IV型発現制御がバイオフィーム形態の決定に重要な因子であると考えられた。*pilA2*はIV型線毛の繊維構造の主成分であるpilinをコードしており、他のIV型線毛生合成遺伝子とともにオペロンを形成している(図2)。筆者らは温度の上昇に応答して*pilA2* mRNA 5' UTR (非翻訳領域)の切断が誘導されることよりmRNAが安定化し、発現量が上昇することを明らかにした。またこの*pilA2* mRNAの切断と安定化にはエンド型リボヌクレアーゼであるRNase Yを介することを見いだした¹³⁾。一般的にRNaseはmRNAの分解に関与しているが、*pilA2* mRNAの場合はRNase Yによって切断されることによってその蓄積量が上昇し、PilA2タンパク質量が増加する珍しい例であった。切断された*pilA2* mRNAの5'末端配列の二次構造予測の結果、ステムループ構造が予測されたことから、RNase Yによる*pilA2* mRNAの切断はステムループ構造の形成を介してmRNAの安定化を引き起こしていると考えられる¹³⁾。RNase Yによる*pilA2* mRNAの切断および安

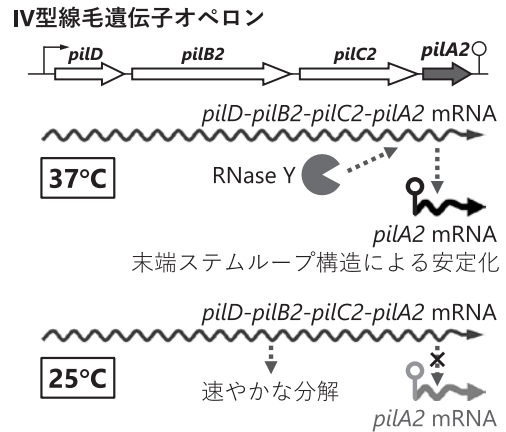


図2. IV型線毛遺伝子*pilA2*の転写後制御メカニズム

定化は感染シグナルである温度変化(25°C→37°C)によって活性化される。つまり本菌は温度(感染)依存的にRNA切断を制御し、IV型線毛産生(宿主への付着)を制御していることが明らかとなった。*pilA2* mRNAの切断と安定化を阻害したところ、EPS遺伝子発現細胞の亜集団の割合が温度に依存せず固定されたことから、このような*pilA2*の転写後制御は集団の不均一性の調節にも関与することが予想された(Obana *et al.* 2020, 投稿中)。

ウェルシュ菌はアミノ酸生合成遺伝子を持たないため、宿主細胞を毒素で破壊することによって生育に必須な栄養を獲得している。宿主体内温度である37°CではIV型線毛を産生し、宿主細胞に付着する生き方を選択していると考えられる。一方で、25°Cは宿主外に排出された状況であると考えられ、細胞外マトリクスを産生することによって酸素などの環境ストレスから逃れていると予想される。ウェルシュ菌は外界の温度を通して周囲の環境を認識し、集団中の亜集団の割合をコントロールして、環境適応していると思われる。

おわりに

細菌は単細胞であるが、バイオフィームを形成することで集団を形成し、さらにその内部では機能的に分化することがわかってきた。このようなバイオフィーム中における各細胞の役割分担は、さまざまな細菌に普遍的であるように見える。微生物集団を制御するためには集団から生み出される亜集団をコントロールする技術が必要であるが、その機能とメカニズムは非常に多様かつ巧みであり、個々の細菌の例をつぶさに理解する必要がある。上記のウェルシュ菌の例では、IV型線毛遺伝子の配列を数塩基改変するだけで、亜集団の出現頻度の温度応答性を劇的に変化させることが可能であり、本菌の集団を

制御するための基盤になると考えられる。

本稿ではバイオフィーム中における遺伝型によらない表現型多型について解説したが、バイオフィーム中では突然変異株の出現頻度が増幅するという報告もあり¹⁴⁾、また、自然環境中ではバイオフィームは複数種から形成され、その相互作用はバイオフィームの構造や性質に影響を与えている¹⁵⁾。つまり実際のバイオフィームを理解する上では遺伝的な多様性も考慮に入れる必要がある。このような事象の発見、解明には既存の蛍光タンパク質発現系とCLSMの組み合わせだけでなく、新しいイメージング技術の開発が必要であると考えられる。野村集団微生物制御プロジェクトでは、このようなさまざまな細胞の多様性を観察するための新規イメージング技術の開発にも成功している（本特集後編の八幡らの項目を参照）。微生物集団をあるがままの状態で解析するさまざまな技術を開発・駆使することによって、微生物の集団が有する独自かつ巧妙な生命現象の理解につながると期待している。

謝 辞

本稿における成果の一部は科学研究費助成事業（18K15143）と戦略的創造研究推進事業（JPMJER1502）の助成を受けて実施いたしました。

文 献

- 1) Flemming, H. C. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **14**, 563 (2016).
- 2) Banin, E. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11076 (2005).
- 3) Dietrich, L. E. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **195**, 1371 (2013).
- 4) Stewart, P. S. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 199 (2008).
- 5) Veening, J. W. *et al.*: *Mol. Syst. Biol.*, **4**, 184 (2008).
- 6) Chai, Y. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **67**, 254 (2008).
- 7) Martins, B. M. *et al.*: *Curr. Opin. Microbiol.*, **24**, 103 (2015).
- 8) Yawata, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 377 (2010).
- 9) Kiyokawa, T. *et al.*: *Microbes Environ.*, **32**, 88 (2017).
- 10) 厚生労働省: <https://www.mhlw.go.jp/content/H30jokyo.xls> (2020/3/13).
- 11) Obana, N. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **196**, 1540 (2014).
- 12) Rodgers, K. *et al.*: *Infect. Immun.*, **79**, 3096 (2011).
- 13) Obana, N. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **199**, e00703-16 (2017).
- 14) Boles, B. R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16630 (2004).
- 15) Nakanishi, Y. *et al.*: *Microbes Environ.*, **33**, 455 (2018).