

ERATO野村集団微生物制御プロジェクトについて ～細菌の集団形成と社会性の創発～（後編）

特集によせて

野村 暢彦

サイエンスとテクノロジー

先月号から、野村ERATOについて紹介させていただいている。後編はテクノロジー（イメージング、デバイス、AI）の展開とそれらを用いたサイエンス成果について、Utada GLには、時空間制御を可能にするデバイス開発とそのイメージング解析による細菌挙動の解析について、重藤SGLには、ラマン分光イメージングを用いた1細胞およびバイオフィルムの機能解析について、田岡SGLには、高速AFMを用いた細菌細胞外膜粒子（メンブレンベシクル、MV）の物性評価について、八幡GLには、1細胞自家蛍光分析技術（confocal reflection microscopy-assisted single-cell innate fluorescence analysis: CRIF）を用いた非破壊1細胞解析について、竹下GLには、超解像顕微鏡による細胞伸張と麹の破精込みのイメージング解析について紹介していただいている。みな、非破壊で生きたまま微生物をとらえて理解しようとするものである。

ファーブルが生きた昆虫の動態をずっと観察しながらその昆虫を理解しようとしたように、微生物も1細胞から集団までを生きたまま観察し、そして理解したい。しかし、微生物は動物・植物と違い、目に見えないのでフィールドでの観察はほぼ無理である。そこで、目的の微生物（群）の動態をデバイスという疑似環境空間の中で、顕微鏡を使ってじっと観察するのである。それは、微生物行動学とでも言えば良いのか。微生物細胞を1細胞からどのように、そしてどのような立体構造の集団になるのか、さらに集団の中の1細胞ごとの行動をずっと観察することで、細胞間の相互作用そして機能の変化（代謝変化）までを生きたまま知りたい。そのような背景から、野村ERATOの「細菌の集団形成と社会性の創発」の探求が始まった。

そのためのキーテクノロジーが以下である。

- ・1細胞から集団への動態→Continuous-optimizing confocal reflection microscopy (COCRM)
- ・代謝→ラマン分光イメージング
- ・機能（変化）と評価→CRIF・AI
- ・細胞外膜粒子（MV）の物性→高速AFM
- ・細胞内外の微小解析→超解像顕微鏡
- ・それらの観察・解析に適したデバイス開発

なぜイメージング解析にこだわっているか？それは、今から17年前、当研究室でバイオフィルム研究を始めようと、当時修士1年生の山田滋君（現：オリエンタル酵母）がバイオフィルムの顕微鏡解析に初めて挑んだ。するといきなり山田君から「先生、すごいびっくりするようなものが観えました」と（蛍光）顕微鏡画像を見せられた。なんと、細菌個々の細胞が集団になり、さらに集団同士がつながりネットワークを形成していたのである（図1左）。それまで、分子生物学の遺伝子発現制御に興味があり研究を進めてきた。つまり、主に試験管・フラスコで液体培養し、集菌し細胞を壊してDNA、RNA、タンパク、代謝産物を対象にさまざまな解析を行い、セントラルドグマ（の界限）を解き明かせば真理にたどり着けると思っていたのである。しかし、単細胞なのに集団になり、さらにその集団が神経細胞のニューロンみたいなものを伸ばしてつながっている画像は、筆者の微生物に対する考えを180°転換させるほどの衝撃を与えた。細菌は単細胞だけど集団行動していると強く実感させられた。この一つの画像から、細胞（集団）を壊さずに、ありのまま観ることの大切さを、身をもって感じたのである。そして、これまでの細胞を壊して解析する研究法と、壊さずに解析するイメージング解析技術などの研究法と両方の研究法をあわせることで、真の理解に近づくと直感した。さらに、よりリアルな3次元でバイオフィルムを見てみたくなった。その思いが通じたのか、レー

著者紹介 筑波大学生命環境系（教授） E-mail: nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp
筑波大学微生物サステナビリティ研究センター（副センター長）、東京大学（客員教授）
JST ERATO野村集団微生物制御プロジェクト（研究総括）

ザー共焦点顕微鏡を研究室に導入することができ、観察を行った。すると、マッシュルーム様のリアルな3次元構造が撮れ（図1右）、なんでこんな構造をとるのかWhy, Howの両方でさまざまな疑問が湧き、そこからERATOへとつながったのである。

図1は緑膿菌単菌のバイオフィームであるが、実環境では複数種の微生物からなる複合系バイオフィームである。それにはGFP一色では数が足りない。染色剤を使うと経時的な構造変化を追うことができない。しかしそんな時、当時博士課程の学生であった八幡穰君（現：ERATOシミュレーションGL）が、そのレーザー共焦点顕微鏡で遊んでいるうちに？微生物細胞の表層があるレーザーの波長を反射することに気づき、サンプルを無処理で、つまりGFPや染色剤を使わず1細胞から複合微生物系バイオフィームまでを観察できるようになった（図2）。そして、そのイメージング解析手法をCOCRMと命名した。

そして、ERATOのおかげでさらに検出器の感度が高いレーザー共焦点顕微鏡が入り、これまた当時博士課程の清川達則君（現：住友重機械工業）がそれで遊んでいると？1細胞内の自家蛍光プロファイルが検出できるようになり、それがCRIFの出発点になった。以上のように、当研究室のイメージング解析技術の発展は、山田君、八幡君、清川君らのおかげである。彼らのセンスと探究心と引きの良さがそれらを成功に導いたのである。探究心と遊び心が楽しく研究するための大事なエッセ

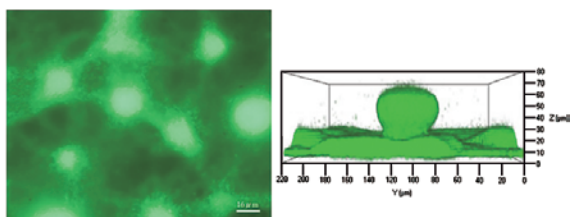


図1. バイオフィーム画像。(左) 蛍光顕微鏡画像。(右) レーザー共焦点顕微鏡画像

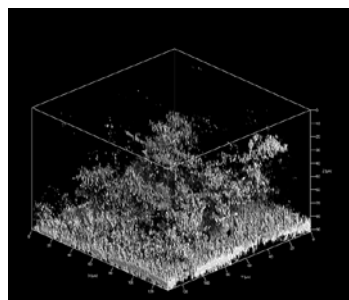


図2. 人工歯上の口腔細菌群による複合バイオフィーム

スである。うまくいくかは、引きの良さ、つまり運も必要であるが、彼らは、センス「気づく能力」があったからこそ、舞い降りた運を逃さずつかめたのである。

現在CRIFは、八幡GLによりAIなどが組み込まれ、より実用的に改良され、NEDOスマートセルプロジェクト（PO：久原哲九州大名誉教授）にて育種細胞の非破壊ハイスループット1細胞評価などへの応用にも利用されている。さらに、CRIFは微生物細胞のみならず、植物細胞や動物細胞の解析・評価技術としても注目されている。医学分野の新学術領域「予防を科学する炎症細胞社会学」の領域代表をされている松島綱治教授〔東京大・医（現：東京理大・生命医科学研）〕グループとCRIFを用いた非破壊1細胞解析についても共同研究を進めている。松島先生の新学術では、ヒト細胞における不均一性が細胞社会を形成しているというコンセプトでプロジェクトが推進されている。本ERATOも1種の細菌が集団形成すると細胞不均一性が生まれ微生物の細胞社会を創発することを探究しており、扱う生物の界が動物と細菌と異なるが、界を越えた生物の細胞不均一性の共通解と一緒に追うと言うことでサイエンスとテクノロジーの両面で連携している。

このように、細胞の不均一性は単細胞の微生物から動物などまで、すべての生物において注目され、その集団（個体）との関係性などの探究は、基礎から応用まで重要な研究領域となっている。そのような流れの中で、細菌（細胞）同士の相互作用・コミュニケーションの研究は集団性を理解するためにも益々重要視されている。古典的な細菌間コミュニケーションのモデルはシグナル化合物が連続的に自由拡散し、「近くの細胞」の遺伝子発現を同調させる機構である（アナログなシグナル伝達）。それに対し、豊福GLを中心した研究により、MVによってシグナル化合物が濃縮されたまま伝達されることで、シグナルが「離散的に離れた細胞」に伝わる機構が解明され、さらに細胞特異性も付与されるといった細菌間コ



図3. 大隅先生とディスカッション（2018年7月）

コミュニケーションの新しい概念(デジタルなシグナル伝達)を提唱した。それは、長距離間やシグナル化合物が無限希釈される開放系、つまり地球環境での水圏・土壌でのMVを介したシグナル伝達の新たな機構を提示するものである。

そのMVの生成機構は、集団中の一部の細胞が細胞死することで形成されることが明らかになり、細胞死を経ることでMVにシグナルのみならずDNA, RNA, 種々タンパクや代謝物質が含まれることが明らかになった。これこそ、まさに微生物細胞の不均一性の奥深い事象と言える。その成果を発表した後に、細胞内膜小胞オートファジーでノーベル賞を受賞された大隅先生が来られ、GL達とともにディスカッションさせていただいた。そして、大隅先生から、MV受容機構の解明など、さらなる展開への期待など温かい励ましのお言葉をいただいた(図3)。

MVと動物の関連については、尾花GLを中心に進められ、腸内細菌(ウェルシュ菌)MVにより、TLR2経路を介して炎症性サイトカインが誘導されることが示され、MVにより宿主細胞の自然免疫が誘導されることが示された。さらに、MVのマウス鼻腔接種により血清IgGやIgA産生が引き起こされるだけでなく、分泌型のIgA産生が全身で誘導されることも明らかとなった。このように腸内細菌が産生するMVは免疫優性抗原の運び屋として機能し、自然免疫および獲得性免疫の誘導能を有することから、ワクチン開発のシーズとなり得ることが示された。このように、細菌由来MVは細菌同士のみならず、動物にも深く関与していることを示されつつある。そのような背景から、細菌MV研究が基礎から応用まで世界で盛り上がっている中、なんと、MVに関する初の国際学会となるEMBO(欧州分子生物学機構)ワークショップを2021年11月24-26日に“Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions and medical

applications”と題して、欧州でなく、つくばで開催させていただくことになった。さらに大変光栄なことに、大隅先生に基調講演をしていただくことになった。21世紀に細菌MV分野を益々発展されるべく、実行委員7名の中でもっとも若い豊福GLを大会委員長として、みなで力を合わせて準備しますので、ご参加いただければ幸いです。

ポストERATOを見据えて

独自のテクノロジーを利用したライブセルイメージングにより、既存の概念を覆すような大きな成果が得られ、微生物学におけるライブセルイメージングの新たな潮流を形成し、真の微生物の生き様を捉えることで、微生物のイメージを一新させつつある。これらのテクノロジーを広く普及させることで、さらなる知のフロンティアの開拓が期待される。そこで筑波大学では、本プロジェクトの終了後を見据え、2018年度に微生物サステナビリティ研究センター(MiCS)(センター長:高谷直樹,副センター長:野村暢彦)が設置された。本ERATOの種々顕微鏡など最先端機器ファシリティを学内のみならず、学外の研究者さらに企業の方々にも使えるように、微生物研究を担うコアファシリティとして、オープンファシリティ化する計画である(図4)。

その背景の一つに、悲しいことに各大学のオープンファシリティの共通機器は、コンタミネーションの懸念から微生物試料に対する利用制限が散見される。また、



図4. イメージング解析のための種々顕微鏡機器

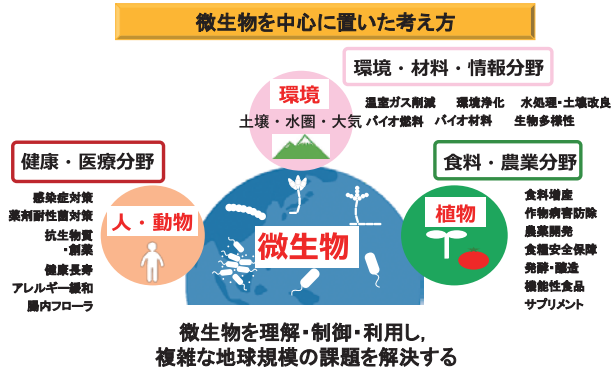
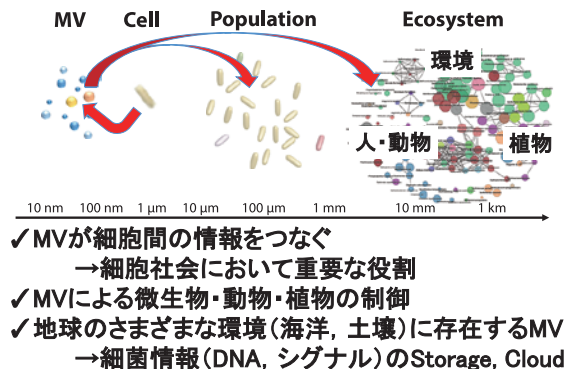


図5. 微生物による環境・食・健康への貢献。(左)MVと細胞間相互作用とEcosystem。(右)微生物と環境・食・健康。

微生物1細胞から集団形成までの観察は数日間かかるが、そのような観察はなおさらオープンファシリティーでは無理となる。そこで、そのような各微生物試料・長期間解析を希望する大学・企業などすべての研究機関の研究者に対応可能な開かれたオープンファシリティーを目指している。またCOCRMやCRIFなど、ここで生まれた種々の新規イメージング解析技術を、講習会などを通じて、オープンイノベーション化することもその責務と考えている。そのため、MiCSでは、本プロジェクトのグループリーダーなどをMiCS専任教員として配置することで、本プロジェクトの成果やノウハウを最大限に活かす環境がすでに整えられている。

また、2019年度に高谷直樹MiCSセンター長が領域代表の「超地球生命体を解き明かすポストコッホ生態学」が採択され、さらに同じく同年に発足した「ERATO深津共生進化機構」の深津武馬研究総括（産総研・筑波大連携大学院教授）および福田真嗣副研究総括（慶応大学・筑波大学客員教授）もMiCS協力教員となっている。高谷新学術領域（個の微生物学）、野村ERATO（集団微生物学）、深津ERATO（共生微生物学）と、微生物の重要な要素である個、集団、共生の3つの大型研究プロジェ

クトがMiCSに集結しており、それら3つが連携することでMiCSをさらに発展させたい。すでに、MiCSは、つくば地区内の産総研、物質材料研、理研などの国研のみならず、“T構想”（つくばのT）として北関東地区（茨大、宇大、群大）やTX沿線（東京理大、東大・大気海洋研）の各研究機関との連携を進めている。

ERATOを推進することで、MVを介した動物への関与などから、微生物が地球の動物・植物の生態系にこれまで以上により深く関与していることがわかってきた（図5左）。環境・食・健康を守るには、それらに直接関係する人・動物・植物（作物）に関わる微生物の理解と制御が重要である（図5右）。日本生物工学会は、それらに関与するサイエンスとテクノロジーがそのまま受け入れられる学会であり、生物工学、分子生物学、工学、情報などさまざまな分野に対して幅広くアフィニティがあるところが特徴だと思っている。本学会が、それぞれの分野の優秀な若手研究者を育てるための、そしてさらに分野を越えた研究者を育てるための大きなゆりかごであることを望むべく、野村ERATOメンバーが微力ながら貢献できれば幸いである。