

メゾスコピック微生物学の夜明け

The Dawn of Mesoscopic Microbiology

豊福 雅典^{1,2*}, 森永 花菜³, 野村 暢彦¹

MASANORI TOYOFUKU^{1,2*}, KANA MORINAGA³ and NOBUHIKO NOMURA¹

¹ 筑波大学生命環境系 〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

² チューリッヒ大学 CH8008, ツォリカーストラッセ 107, チューリッヒ, スイス

³ 筑波大学大学院生命環境科学研究科 〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

* TEL: 029-853-5079

* E-mail: toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp

¹ Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

² Department of Plant and Microbial Sciences, University of Zurich, Zollikerstrasse 107, CH-8008 Zürich, Switzerland

³ Department of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

キーワード: 微生物間コミュニケーション, メンブランベシクル, マイクロデバイス

Key words: cell to cell communication, membrane vesicle, microdevice

(原稿受付 2016年8月20日/原稿受理 2016年8月27日)

1. はじめに

微生物学はその対象範囲の広さから、系の大きさが非常に富む学問である。環境中の細菌を研究することを考えた場合、メタ解析や物質フロー解析のようなマクロなアプローチと、興味のある細菌を単離培養してその性質を調べていくミクロなアプローチとがある。技術的な発展も相まって、微生物学におけるミクロとマクロな知見は急加速的に蓄積している。しかしながら、依然としてこの両者を繋ぐ、メゾスコピック領域に関する知見は乏しい。複合微生物系の中で何が起きているのか?について扱うのはまさにこのメゾスコピック領域であり、チャレンジングな課題である。我々は、単細胞(個)から一つ上の階層である、バイオフィームや微生物間コミュニケーション(集団)において、個と集団の関係性の理解を得ることで、このブラックボックス領域の理解を目指している。その理解の先には次の階層である、群集・複合微生物系がある。本総説では、これまで我々の行ってきた研究を中心にして、バイオフィームや微生物間コミュニケーション、メンブランベシクル(MV)における知見と、それらがどのように複合微生物系制御に応用できるのかについて紹介する。

2. 微生物間コミュニケーションによる複合系の制御

ヒトが言葉を介してコミュニケーションを行うように、細菌同士もシグナル物質を介して情報伝達を行って、形質を変化させる。微生物間コミュニケーションは、細菌同種間のみならず異種間でも行われ、動物や植

物との相互作用にも関わる。環境中で細菌の多くは、複数種が混在する複合微生物系として存在することからも、環境細菌の生態を理解し、さらには制御を行う上でも、微生物間コミュニケーションを理解することは重要である。ここでは、複合微生物系として活性汚泥を例にとり、微生物間コミュニケーションの役割と活性汚泥制御への展望を紹介する。

2.1 微生物間コミュニケーション

微生物間コミュニケーションは、1970年にダンゴイカ(*Euprymna scolopes*)内に生息する海洋性細菌 *Vibrio fischeri* が密度依存的に発光することが発見されて以降、様々な細菌において研究が進んできた¹⁹⁾。その後、日和見感染細菌 *Pseudomonas aeruginosa* を筆頭に、微生物間コミュニケーションと病原性に関する研究が顕著に発展した。しかしながら、海洋性細菌の例のように、環境中でも多くの細菌がシグナル伝達を行い、その様式も多様性に富むと考えられる。ゲノム情報から、グラム陰性細菌では150種以上がアシル化ホモセリンラクトン(AHL)合成酵素LuxIのホモログ遺伝子を有している⁹⁾。その上、シグナル合成酵素を保持していない²⁵⁾、あるいはシグナル合成遺伝子に変異が入っており機能しない³⁷⁾、つまりは、受容タンパクだけを保持して他細胞のシグナル物質を利用する細胞も存在する¹³⁾。一方で、シグナル合成酵素のみを有する細菌も存在する。これらのことより、細菌は複合系内で様々なシグナル伝達機構を発展させ、相互作用していることが考えられる。

微生物間コミュニケーションで用いられるシグナル物質としては、先ほど紹介したAHLがグラム陰性細菌に

においては多く用いられ、グラム陽性細菌ではペプチドが主要なシグナル物質として用いられる。さらにグラム陰性、陽性細菌共通のシグナルとして AI-2 と呼ばれる低分子化合物も用いられている。シグナルが最終的に遺伝子発現制御を行うためには、何らかの方法によって細胞内に情報が伝わる必要がある。これは、細胞質内でシグナルが認識される場合と、細胞膜上でシグナルが認識される場合とがある。LuxR 型受容体に代表されるような受容タンパク質はその多くが細胞質内に局在するとされ、シグナルと複合体を形成することで構造や安定性が変化し、転写因子として働く。この他に、二成分制御系、つまりは膜上に存在するセンサーキナーゼによってシグナル物質が認識され、リン酸化リレーによって、細胞内のレスポンスレギュレーターに情報が伝わって、転写制御される場合もある³⁾。多くの場合、シグナル合成酵素と受容タンパク質をコードする遺伝子は同一オペロン上に存在し、シグナル物質-受容タンパク質の複合体によりポジティブフィードバックを受けるため、菌体密度が高まることで、個体あたりのシグナル産生量が加速的に増加する。その結果、ある一定以上の菌体量に達した際に蓄積したシグナル物質が一斉に遺伝子発現制御を行い、集団行動（バイオフィーム形成、毒素生産、運動性など）を同調させる。このような、菌体濃度依存的な微生物間コミュニケーションをクォラムセンシングと呼ぶ¹¹⁾。

2.2 活性汚泥中における微生物間コミュニケーション

近年最も成功している環境バイオテクノロジーとして活性汚泥法が挙げられるのではないだろうか。活性汚泥法においては、微生物の活性を利用して排水中の有機物分解や窒素、リン等の除去を行う。活性汚泥そのものは、数十 μm から数 mm の粒径の微生物の凝集体である。この中には数百種類の微生物が高密度で存在することから、微生物間コミュニケーションが盛んに行われているとされる。多くの活性汚泥からはシグナル生産菌の単離が報告されており、日本においても複数の活性汚泥場から *Aeromonas* 属細菌を始めとしたシグナル生産菌、さらには *Bacillus* 属や *Acinetobacter* 属細菌などのシグナル分解菌が単離されている²⁰⁾。これらの細菌が実際に汚泥中でシグナル伝達を行っているのかについては検証する必要があるものの、我々は活性汚泥のメタボローム解析によって、複数種のシグナル物質様の低分子化合物を検出した（未公開データ）。

こうした、活性汚泥中における微生物間コミュニケーションの状況証拠が集まってくるなかで、その役割について示唆する報告もいくつかある。興味深い点として、活性汚泥からシグナル生産菌として単離される細菌の中には、微生物間コミュニケーションによりバイオフィーム形成を制御する細菌（*Pseudomonasa* 属細菌、*Aeromonas* 属細菌、*Xhansomonas* 属細菌等）が多数存在する²³⁾。活性汚泥の自己凝集メカニズムは未解明な部分が多いが、シグナル伝達は活性汚泥の凝集を保つ因子であると考えられる。例えば、活性汚泥の中でも強固な凝集体として知られるグラニュールにおいては、シグナル物質の添加により、凝集体の形成に深く関与する細胞外多糖量が増加することや、グラニュールにシグナル伝達阻害剤を添

加することで細胞外タンパク質量が減少し、ポリスチレンへの付着性が低下することが示されている^{16,26)}。また、排水処理過程で使用されるろ過膜へのバイオフィーム形成にも微生物間コミュニケーションが関与することが示されている³⁸⁾。これらの報告からも、微生物間コミュニケーションは、活性汚泥の凝集体形成において重要な意味を持つと考えられる。

微生物間コミュニケーションの活性汚泥への影響は汚泥の形成に留まらず、その機能にも影響を与えている。ある活性汚泥においては、AHL の一種である 3oxoC6-HSL 及び C6-HSL を添加することで、フェノールの分解活性が長期的に維持された³⁶⁾。また、異なる報告では、3oxoC6-HSL を添加した活性汚泥では難分解性物質であるキチンの分解活性が向上し、さらにその活性汚泥から単離された *Aeromonas* 属細菌の一部は、シグナル伝達によりキチナーゼ活性を促進させることが示されている⁸⁾。この活性汚泥からは *Aeromonas* 属細菌が多数単離されたため、活性汚泥内で *Aeromonas* 属細菌はシグナル伝達を介してキチン分解活性を上昇させることで、栄養獲得を行うと考えられている。

2.3 微生物間コミュニケーションによる脱窒の調節

ここまで紹介したように、微生物間コミュニケーションは活性汚泥の種々の活性を制御できる可能性を秘めている。多くの場合は、凝集性や栄養の取り込みなどが改善された結果の副次的な影響であることが示唆されている。一方で、我々は活性汚泥による窒素処理をシグナル物質によって直接的に制御できる可能性を見出した³⁴⁾。

活性汚泥を用いた排水処理中の窒素処理において、最終的に水中の窒素を大気中に戻す役割を担っているのが、脱窒菌による脱窒である。この脱窒が完全に進むと、 NO_3^- が N_2 まで還元されて、大気中に放出される。 NO_3^- から N_2 まで還元する細菌は完全脱窒菌と呼ばれ、完全脱窒菌以外にも、例えば、 NO_2^- を N_2 に還元する、不完全な脱窒を行う細菌が存在する。複合微生物系においては、これら不完全な脱窒菌はお互いを補完し合う形で存在することが考えられる¹⁵⁾。また、脱窒で生じる N_2O は温室効果ガスとして問題視されるため、水処理過程において滞りなく N_2O が N_2 に還元される必要がある。

この水処理、あるいは、地球上の窒素循環にとって重要な反応は、細菌自身にとってはエネルギーを獲得するための呼吸代謝であり、酸素の代わりに窒素酸化物を還元することでエネルギーを得ている。従って、脱窒酵素の発現は、酸素と窒素酸化物を感知することで制御されて、無駄な酵素が発現しないように巧みに調節されている¹⁾。それに加えて我々は、脱窒細菌のモデル菌としてよく研究されている *P. aeruginosa* において、微生物間コミュニケーションが脱窒活性に関与することを明らかにした^{30,31,34)}。*P. aeruginosa* はシグナル物質として、側鎖の異なる 2 種類の AHL、すなわち C4-HSL と 3oxoC12-HSL を産生する。さらには、キノロン誘導体の *P. aeruginosa* 特有のシグナル物質である *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) を産生する。これらのシグナル物質はそれぞれ異なる受容体によって認識され、200 以上もの遺伝子発現に影響を与えているグローバルな転写因子である。一般的には、これらの

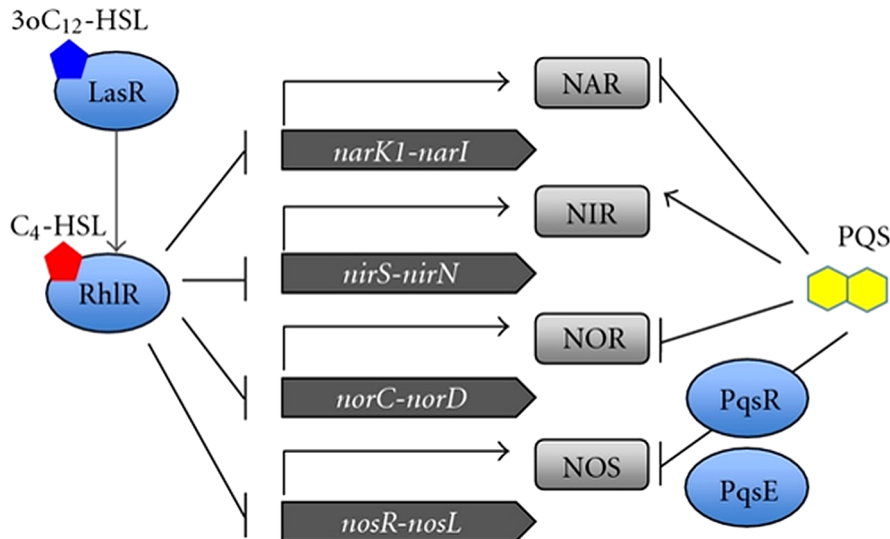


図1. 微生物間コミュニケーションによる脱窒の制御。文献 34) より転載。

シグナル物質は二次代謝産物の制御に関わっており、*P. aeruginosa* においては毒素生産等に関わることが知られていた。AHL 類と PQS の脱窒への影響に関して、両シグナルとも脱窒を抑制するものの、そのメカニズムは異なる。AHL 類は受容体を介して脱窒遺伝子の抑制に働く一方で、PQS は受容体を介さずに直接的に酵素活性に影響を与える (図1)。この PQS の作用は *P. aeruginosa* 以外の細菌の脱窒活性や生育に影響を与えることを示唆しており、他種の生育に影響を与えることが確認された²⁹⁾。シグナル物質を介した異種間相互作用のもう一つの例として、*Paracoccus denitrificans* が自身の産生しない AHL によって脱窒を制御されることが最近報告された⁷⁾。微生物間コミュニケーションによる脱窒制御がどこまで普遍的な現象であるのか、今後の研究が楽しみである。

2.4 微生物間コミュニケーションによる硝化の調節

排水の脱窒処理を行う前段階として、アンモニウム態窒素を硝酸態窒素に酸化しなければならないが、その反応は硝化菌が行う。硝化細菌は、酸化する基質に応じて二種類に分類される。すなわち、アンモニアを酸化し亜硝酸に還元するアンモニア酸化細菌 (AOB) と、亜硝酸を酸化し硝酸に還元する亜硝酸酸化細菌 (NOB) である。これらの硝化細菌は生育速度が遅いことや、純粋分離培養が困難であることなどから、その生態に関する詳細な解析は進んでおらず、硝化活性をコントロールすることは難しいとされている。一方で、硝化細菌の多くはマイクロコロニーを形成していることから、細胞間でシグナル伝達を行いやすいと考えられ、そのことを示す研究がいくつか報告された。活性汚泥から頻りに検出される AOB である *Nitrosomonas europaea* は複数種のシグナル物質を産生し、ゲノム上にはグラム陰性細菌が使用する AHL 合成酵素のホモログの LuxI ファミリーとは異なる、珍しいシグナル合成酵素遺伝子 *hdtS* のホモログ遺伝子を保持している⁹⁾。また、AOB の 1 種である *Nitrospira multififormis*、NOB の 1 種である *Nitrobacter winogradskyi* は、ゲノム上に *luxI* ファミ

リーのホモログ遺伝子を保持している^{12,18,24)}。*N. multififormis* の *luxI* ホモログ遺伝子を *Escherichia coli* で発現させることで、長鎖 AHL を産生することや、*N. winogradskyi* は菌体密度依存的にシグナル物質を産生することから、本遺伝子は機能性を有することが示されている。

硝化菌において、どのような遺伝子群がシグナル物質に制御されるのかについては全く分かっていないものの、表現型に関していくつか報告がある。*N. europaea* においては、飢餓状態のバイオフィルムに対して、基質となるアンモニアとシグナル物質を同時に添加することで、シグナル物質の無添加区と比較して誘導期が短くなり、アンモニア飢餓からの回復が速くなる⁴⁾。さらに、硝化細菌と嫌気性アンモニア酸化細菌の混合リアクターでシグナル物質による硝化活性の向上も報告されている¹⁰⁾。この報告によると、硝化細菌と嫌気性アンモニア酸化細菌の混合リアクターからは長鎖 AHL が検出され、同様の長鎖 AHL をリアクターに添加することで、嫌気性のアンモニア酸化つまりはアナモックス活性が約 1.5 倍上昇する。我々も、硝化汚泥にシグナル物質を添加すると、硝化活性が上昇することを観察しており (投稿準備中)、そのメカニズムについて解明中である。

3. メンブランベシクルを介した細胞間相互作用

微生物間コミュニケーションは多くの細菌にとって重要であり、時には我々に役立つ表現型も制御する。これらの知見を応用するにあたって、ここで課題となるのが微生物間コミュニケーションの制御である。人為的な制御に関して一定の研究成果が挙げられているものの、多くの研究例は微生物間コミュニケーションの阻害を念頭にしており、微生物間コミュニケーションを促進させるような研究例はほとんどない。とりわけ複合系内における微生物間コミュニケーションの制御は知見が乏しい。我々は微生物間コミュニケーションを制御できる可能性のあるツールの一つとしてメンブランベシクル (MV) に着目している。まだその全貌は明らかになっていない

ものの、MV は細胞間相互作用において多様な機能を持っていることで近年注目を浴びている³³⁾。

3.1 MV を介したシグナル伝達

細菌の上清を調べると、本来細胞内にあるはずのものが外に放出されているのをしばしば見かける。これらについて、何か特別な排出経路が存在すると思われていたが、多くの場合において MV が関与していることが明らかとなってきた。MV は 20 から 400 nm 程度の膜小胞であり、ほとんどの細菌が生産すると言われている。また、海洋などの実環境中からも同定されている^{5,33)}。我々は活性汚泥中からも MV 様粒子を同定しており、その由来を解析中である。MV は DNA や RNA、タンパクなどを含んでおり、遺伝子の水平伝播や毒素因子を宿主細胞に運搬することで、細胞間相互作用を仲介していることがこれまでに分かっている。さらに、MV の表層は細胞と同様であるため、ファージなどのおとりとなって細胞の生存率を高めることが知られている。Mashburn らの報告によって、MV が微生物間コミュニケーションにも関与することが *P. aeruginosa* において明らかとなった¹⁷⁾。ここで、PQS が膜に配位する一つの理由はその疎水性の高さであるため、PQS 以外の疎水性の高いシグナル物質についても MV に含まれる可能性が出てくる。グラム陰性細菌の一般的なシグナル物質である AHL の場合、その疎水性は側鎖の長さが関係する。*P. aeruginosa* において C4-HSL と 3oxoC12-HSL は MV にほとんど含まれていなかったものの、AHL の側鎖は細菌種によって異なり、長い場合には C18 にも及ぶ例もある。こうした背景の中、我々は世界で初めて MV によって運搬される AHL を同定した (投稿中)。*P. denitrificans* は活性汚泥中から頻繁に同定される脱窒細菌で、C16-HSL を産生する。C16-HSL は PQS よりも疎水性が高く、産生されたものの多くは細胞膜に留まっていることが示唆されていた²²⁾。従って、どのようにして C16-HSL が細胞外に放出され、水環境中に分散するのが疑問であった。*P. denitrificans* を解析したところ、MV を生産し、C16-HSL が MV に強固に付随していることが明らかとなった (投稿中)。重要なことに、MV に含まれる C16-HSL は細胞に受け渡され、QS 制御下の遺伝子発現を制御することから、MV はシグナル伝達を仲介している。MV 生産を誘導すると、それに伴って細胞外の C16-HSL 濃度は上昇するため、C16-HSL の放出の多くは MV に依存していると考えられる。これらの結果を踏まえると、MV は微生物間コミュニケーショ

ンを制御するための有効なターゲットになることが期待される。

P. denitrificans が生産する MV が興味深いもう一つの点は、細胞特異性がある程度付与されていることである。*P. denitrificans* の MV は同種の細胞には速やかに吸着されるが、*Pseudomonas* 属細菌などにはほとんど吸着されず、シグナルも伝達されづらい。この MV-細胞間の相互作用がどのような機構で行われているのか、現在解析中である。その機構を解明することは、ドラッグデリバリーに代表されるような特定の細胞あるいは細菌種をターゲティングする技術の開発基盤に繋がる可能性がある。MV をシグナル伝達のツールとして考えた場合に有効なのは、シグナル伝達以外の付加機能を比較的簡単にパッケージングできることである。このような技術は今後腸内細菌を含め、あらゆる複合微生物系の制御を踏まえた場合に、ますます需要が高まることが見込まれる。

3.2 細胞死を伴う MV の新奇形成機構

MV の応用への需要が高まるにつれ、必須となってくるのがその生産機構の解明である。MV の形成機構についてはグラム陰性細菌で主に研究されており、グラム陽性細菌の形成機構に関する知見については皆無である。我々はグラム陽性細菌の MV 形成機構も解明しているが (投稿中)、その紹介についてはまたの機会にさせていただく。グラム陰性細菌に関してはこれまでに MV 形成に関するいくつかのモデルが立てられている。それらに共通するのは、出芽するような形で細胞外膜が外にたわみ、くびれて切れることで MV が形成されるという点である²⁷⁾。細胞外膜が外にたわむきっかけとなる機構がいくつか提唱されており、例えば、ペリプラズムにおけるストレスや外膜-ペプチドグリカン-内膜間の架橋の損失などが挙げられる。我々は *P. aeruginosa* を用いて、世界で初めて MV が形成される瞬間をライブセルイメージングすることに成功し、従来の出芽モデルと全く異なる MV 形成モデルに辿り着いた (図 2)。そのモデルとは、細胞が破裂することで、敗れた膜が再構成し、MV を形成するというものである。この現象は細胞の溶菌を伴うことから、explosive cell lysis (ECL) と名付けている。これまでに MV 形成は溶菌、あるいは細胞死を伴わないと主張されていたことから³⁵⁾、ECL の発見は従来の MV 研究に一石を投じることになった²⁾。

MV 形成は溶菌、あるいは細胞死を伴わないというこれまでの主張は、電子顕微鏡写真で細胞の周囲に MV

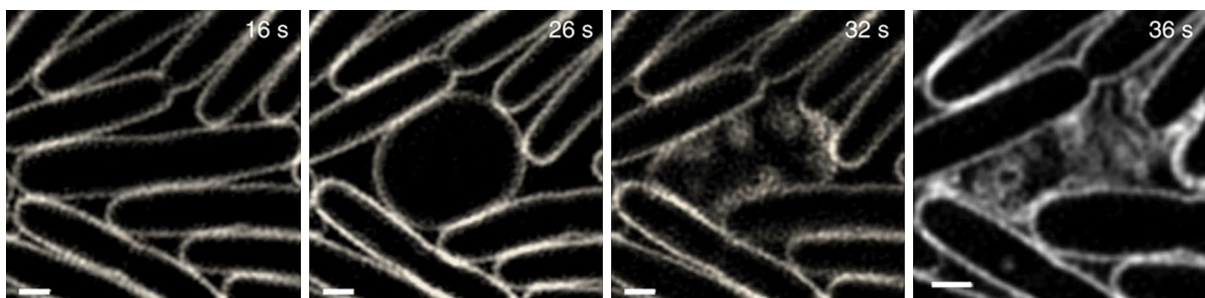


図 2. 細胞が破裂して MV を形成する様子。文献 35) より転載。

が付着している観察をもとになされてきた。一方で、MV 中には核酸が含まれることは多くの細菌で報告されているにも関わらず、核酸が MV に含まれる機構については説明がなされていなかった。特に、グラム陰性細菌は細胞内膜を有しており、細胞外膜の出芽で MV が形成されるとすると、どのようにして核酸が内膜を通るのが大きな疑問であった。それに対し、ECL では膜が破裂し、その際に核酸が放出され MV に取り込まれる様子が観察されている。従って、多くの細菌が生産する MV に関して、ECL が関与している可能性がある。

3.3 ECL のメカニズム

ECL を発見する上でもう一つの鍵となったのはそれを誘導する遺伝子の解明である³⁵⁾。前述の通り、MV 中には RNA や DNA といった核酸が含まれることが知られていたが、その中身を詳細に解析した研究例はほとんどなかった。我々は、MV には MV が形成される時点で転写されている RNA が含まれているはずであり、もしそうだとすると、MV 形成に関わる遺伝子の同定に繋がるかもしれない、と考えた。そこで、MV 由来の RNA をシーケンシングし、細胞由来の RNA と比較した結果、ストレス応答に関わる転写産物が MV では濃縮されていることが明らかとなった³⁵⁾。一方で、DNA はランダムに含まれており、特定の領域が濃縮されていることはなかった。RNA-seq の結果を参考にして、ストレス応答と MV 形成の関係について詳細に調べたところ、ペプチドグリカン分解酵素 (Lys) が MV 形成に関わることが明らかとなった。この *lys* 遺伝子はファージを細胞から放出するために、宿主を溶菌することで知られており、多くの細菌がその遺伝子をゲノム上に保持している。興味深いことに、集団において、この *lys* 遺伝子は通常の浮遊培養条件下では全体の 1% 以下という少ない割合で発現している。溶菌は個々の細胞にとっては死を意味するが、集団の一部で発現するからこそ、全体の利益に繋がり、長い進化の歴史の中でその機能が淘汰されなかったと考えられる。では、ECL は集団にどのような影響を与えるのだろうか？

3.4 ECL から垣間見る細菌の階層性の創発

ECL においては細胞が破裂することから、細胞内の物質のほとんどは細胞外に撒き散らされることになる。その中には当然 DNA も含まれる。DNA の細胞内での機能はよく知られているが、実は細胞外においても重要な役割を果たしている。その一つがバイオフィーム形成である。バイオフィームは細菌集団が形成する高次構造体で、浮遊細胞と決定的に異なるのが細胞外マトリクスの存在である。細胞外マトリクスはバイオフィーム形成において細胞間や細胞-基質間を繋ぎ止める架橋の役割を果たし、一般的には多糖やタンパクに加えて DNA から成る。また、MV も細胞外マトリクス中に観察される³²⁾。*P. aeruginosa* において、バイオフィーム形成の初期段階を観察すると、一部の細胞で ECL が誘導されて、細胞外に DNA が放出される。さらには、その放出された DNA を軸にして、マイクロコロニーが形成されるため、*lys* 遺伝子欠損株においては、マイクロコロニー形成は観察されなかった³⁵⁾。つまり、ECL はバイ

オフィームの高次形成において極めて重要な役割を担っており、集団の一部の細胞で引き起こされる細胞死が集団形成のパターンを決定している、と言える。細胞死がバイオフィーム形成を司るとなると、どれくらいの割合で細胞が死ぬのかとそれがどのようにコントロールされているのかは重要な課題となってくる。この、集団中における細胞死がどこまでコントロールされたプロセスなのかは、細菌の階層性を知る上でも興味深い点であり、そこを理解することはバイオフィーム形成あるいは高次構造の制御に繋がる可能性がある。

4. メゾスコピック領域の解析に向けて

個々の細胞の働きが集団全体に波及することを、ECL を例に紹介した。ここから導き出せることは、バイオフィームや活性汚泥程度の系におけるメゾスコピック領域を解析するにあたって、個々の細胞あるいは細菌種の働きを集合体の中で捉え、その因果関係を明らかにする必要がある点である。そのためには、これまでの分子生物学的手法に加えて、バイオイメージング技術が必要不可欠となってくる。百聞は意見に如かずという言葉に代表されるように、今後微生物学分野におけるバイオイメージングとその画像解析技術は益々重要になってくると思われる。そのため、我々はこれまで積極的にイメージングやイメージングとの適合性の高い技術を開発、導入してきた。

4.1 マイクロデバイス

近年、生物学分野で特に注目を浴びている技術分野といえばマイクロデバイスではないだろうか。マイクロデバイスはその名の通り、小型のデバイスで、顕微鏡のステージに載せられるサイズの培養器 (チャンバー) に様々な機能を持たせることができる。その結果、段階的に環境条件を制御しながら、細胞の挙動をシングルセルレベルで観察でき、代謝産物等のモニタリングによって細胞あるいは集団の状態の変化を同時に追うことも可能となった。さらに、単なる空っぽの部屋から様々な障害物を置いた部屋まで様々なパターンを持ったチャンバーの形成も可能であるため、物理的なパラメーターがどのように個々の細胞とその集団形成に影響を与えるのかが解析できる。その結果、より環境に近い条件や微小環境中で細菌がどのような挙動を示すのかについて、これまでにない精度で把握できる²¹⁾。これまでに我々は 18 mm × 18 mm のチャンバー中に電極を固定することで、顕微鏡観察しながらアンモニウムイオンをリアルタイムでモニタリングする系を確立した (図 3)²⁸⁾。このデバイスを利用することで、活性汚泥などの構造と活性の関係を解析することが可能となった。さらには、反射顕微鏡を細菌に応用することで、細菌を染色することなく観察できる Continuous-Optimizing Confocal Reflection Microscopy (COCRM) を開発した。COCRM の優れ点は、光を反射するものであれば細胞に限らず、例えばバイオフィームが付着した基質の構造も同時に観察が可能という点である (図 4)。そのため、バイオフィームと基質表面の相互作用を解析することができる。この技術を応用して、歯の表面を模倣したハイドロキシapatite 基質を

Streptococcus mutans が溶かす様子の観察に成功している¹⁴⁾。また、活性汚泥を非染色で観察し、蛍光観察と両立できることも確認済みである。前半で紹介したように、活性汚泥中で微生物間コミュニケーションが行われていることが示唆されているが、その実態は分かっていない。そこで、活性汚泥中での微生物間コミュニケーションを可視化する系を構築中である。これによって、活性汚泥中におけるシグナル伝達をシングルセルレベルで可視化すると同時に、微小電極などを用いて汚泥の活性を同時にモニタリングし、その両者の関係性を解析することが可能となる。

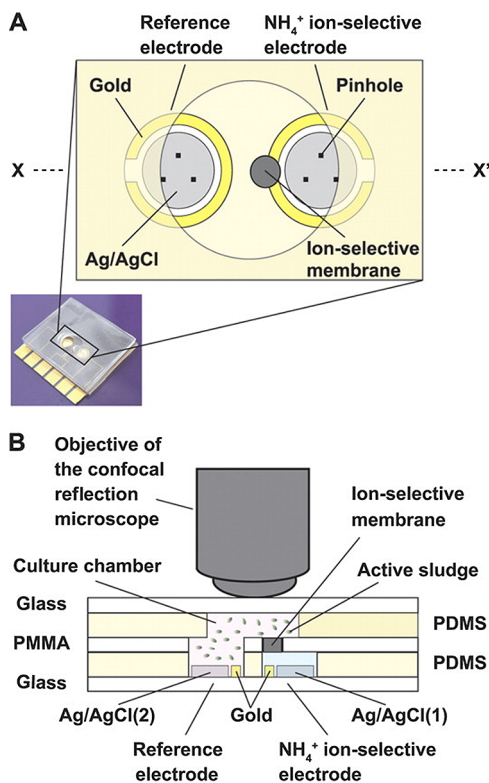


図3. NH_4^+ 測定型マイクロデバイス。文献 28) より転載。

5. おわりに

本稿では我々が得た知見を中心に、細菌間相互作用、バイオフィーム、そしてそれらの解析技術について簡単に紹介させて頂いた。近年の目覚ましい技術発展のおかげもあり、微生物学はこれまでにない知的興奮に満ちた分野となっている。ラボ内での研究とフィールド研究には隔たりが存在したが、これの両者の溝を埋めることを可能にする技術革新がおきている。例えば、環境中での細菌の細胞レベルでの挙動についてはその多くがブラックボックスのままであるが、マイクロデバイスを用いることで、いわゆる痒いところに手が届くようになった。そこから得られるデータによって実環境中の現象が説明でき、モデリングも可能となってくる。さらに、ECLによる1細胞の細胞外DNAの放出が集団行動に与えるインパクトを考慮すると、細菌の個々の挙動というのは無視できず、その個々の動きと集合体との階層性を明らかにしていく必要がある。これまで微生物学は多くのマイクロとマクロな知見を蓄積してきた。今はまさに、メゾスコピック領域に挑むための機が熟している。

文 献

- 1) Arai, H., T. Kodama, and Y. Igarashi. 1997. Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 25: 1141–1148.
- 2) Attar, N. 2016. Have exploding cells blown up MV dogma? *Nature Rev. Microbiol.* 14: 334–335.
- 3) Bassler, B.L., M. Wright, R.E. Showalter, and M.R. Silverman. 1993. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.* 9: 773–786.
- 4) Batchelor, S.E., M. Cooper, S.R. Chhabra, L.A. Glover, G. Stewart, P. Williams, and J.I. Prosser. 1997. Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2281–2286.
- 5) Biller, S.J., F. Schubotz, S.E. Roggensack, A.W. Thompson, R.E. Summons, and S.W. Chisholm. 2014. Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science* 343: 183–186.
- 6) Burton, E.O., H.W. Read, M.C. Pellitteri, and W.J. Hickey. 2005. Identification of acyl-homoserine lactone signal molecules produced by *Nitrosomonas europaea* strain Schmidt.

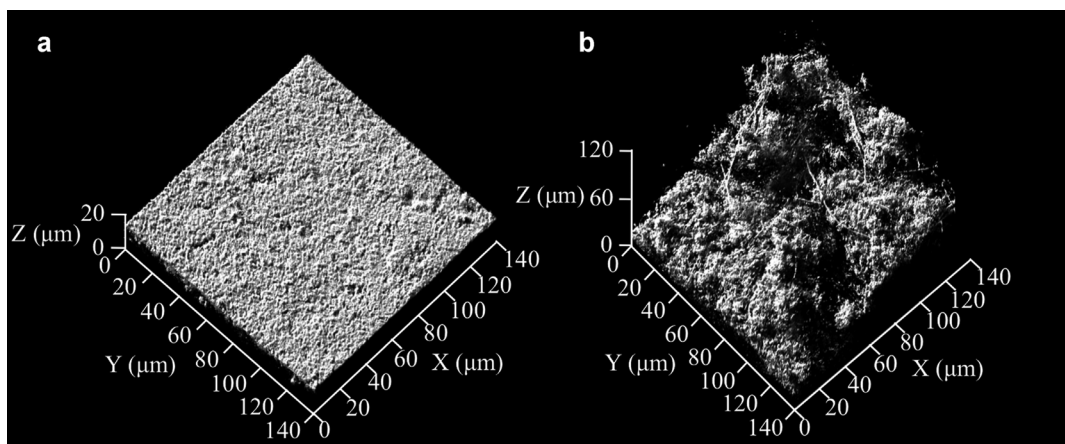


図4. COCRM による基質とその上に形成された複合バイオフィームの様子。文献 14) より転載。

- Appl. Environ. Microbiol. 71: 4906–4909.
- 7) Cheng, Y., Y. Zhang, Q. Shen, J. Gao, G. Zhuang, and X. Zhuang. Effects of exogenous short-chain *N*-acyl homoserine lactone on denitrifying process of *Paracoccus denitrificans*. J. Environ. Sci. In press.
 - 8) Chong, G., O. Kimyon, S.A. Rice, S. Kjelleberg, and M. Manefield. 2012. The presence and role of bacterial quorum sensing in activated sludge. Microb. Biotech. 5: 621–633.
 - 9) Churchill, M.E.A. and L. Chen. 2011. Structural Basis of Acyl-homoserine Lactone-Dependent Signaling. Chemical Rev. 111: 68–85.
 - 10) De Clippeleir, H., T. Defoirdt, L. Vanhaecke, S.E. Vlaeminck, M. Carballa, W. Verstraete, and N. Boon. 2011. Long-chain acylhomoserine lactones increase the anoxic ammonium oxidation rate in an OLAND biofilm. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90: 1511–1519.
 - 11) Fuqua, W.C., S.C. Winans, and E.P. Greenberg. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J. Bacteriol. 176: 269–275.
 - 12) Gao, J., A. Ma, X. Zhuang, and G. Zhuang. 2014. An *N*-Acyl Homoserine Lactone Synthase in the Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosospira multiformis*. Appl. Environ. Microbiol. 80: 951–958.
 - 13) Gonzalez, J.F. and V. Venturi. 2013. A novel widespread interkingdom signaling circuit. Trends. Plant Sci. 18: 167–174.
 - 14) Inaba, T., T. Ichihara, Y. Yawata, M. Toyofuku, H. Uchiyama, and N. Nomura. 2013. Three-dimensional visualization of mixed species biofilm formation together with its substratum. Microbiol. Immunol. 57: 589–593.
 - 15) Lu, H., K. Chandran, and D. Stensel. 2014. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. Water Res. 64: 237–254.
 - 16) Lv, J.P., Y.Q. Wang, C. Zhong, Y.C. Li, W. Hao, and J.R. Zhu. 2014. The effect of quorum sensing and extracellular proteins on the microbial attachment of aerobic granular activated sludge. Bioresource Technol. 152: 53–58.
 - 17) Mashburn, L.M. and M. Whiteley. 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. Nature 437: 422–425.
 - 18) Mellbye, B.L., P.J. Bottomley, and L.A. Sayavedra-Soto. 2015. Nitrite-Oxidizing Bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Produces *N*-Acyl-Homoserine Lactone Autoinducers. Appl. Environ. Microbiol. 81: 5917–5926.
 - 19) Nealson, K.H., T. Platt, and J.W. Hastings. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. J. Bacteriol. 104: 313–322.
 - 20) Ochiai, S., T. Morohoshi, A. Kurabeishi, M. Shinozaki, H. Fujita, I. Sawada, and T. Ikeda. 2013. Production and Degradation of *N*-Acylhomoserine Lactone Quorum Sensing Signal Molecules in Bacteria Isolated from Activated Sludge. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77: 2436–2440.
 - 21) Rusconi, R., M. Garren, and R. Stocker. 2014. Microfluidics expanding the frontiers of microbial ecology. Annu. Rev. Biophys. 43: 65–91.
 - 22) Schaefer, A.L., T.A. Taylor, J.T. Beatty, and E.P. Greenberg. 2002. Long-chain acyl-homoserine lactone quorum-sensing regulation of *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent production. J. Bacteriol. 184: 6515–6521.
 - 23) Shrout, J.D. and R. Nereng. 2012. Monitoring bacterial twitter: Does quorum sensing determine the behavior of water and wastewater treatment biofilms? Environ. Sci. & Technol. 46: 1995–2005.
 - 24) Starkenburg, S.R., P.S.G. Chain, L.A. Sayavedra-Soto, L. Hauser, M.L. Land, F.W. Larimer, S.A. Malfatti, M.G. Klotz, P.J. Bottomley, D.J. Arp, and W.J. Hickey. 2006. Genome sequence of the chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. Appl. Environ. Microbiol. 72: 2050–2063.
 - 25) Subramoni, S., D.V.F. Salcedo, and Z.R. Suarez-Moreno. 2015. A bioinformatic survey of distribution, conservation, and probable functions of LuxR solo regulators in bacteria. Front. Cell. Infect. Microbiol. 5:16. 10.3389/fcimb.2015.00016.
 - 26) Tan, C.H., K.S. Koh, C. Xie, M. Tay, Y. Zhou, R. Williams, W.J. Ng, S.A. Rice, and S. Kjelleberg. 2014. The role of quorum sensing signalling in EPS production and the assembly of a sludge community into aerobic granules. ISME J. 8: 1186–1197.
 - 27) Tashiro, Y., H. Uchiyama, and N. Nomura. 2012. Multi-functional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ. Microbiol. 14: 1349–1362.
 - 28) Toda, K., Y. Yawata, E. Setoyama, J. Fukuda, N. Nomura, and H. Suzuki. 2011. Continuous monitoring of ammonia removal activity and observation of morphology of microbial complexes in a microdevice. Appl. Environ. Microbiol. 77: 4253–4255.
 - 29) Toyofuku, M., T. Nakajima-Kambe, H. Uchiyama, and N. Nomura. 2010. The effect of a cell-to-cell communication molecule, *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), produced by *P. aeruginosa* on other bacterial species. Microbes Environ. 25: 1–7.
 - 30) Toyofuku, M., N. Nomura, T. Fujii, N. Takaya, H. Maseda, I. Sawada, T. Nakajima, and H. Uchiyama. 2007. Quorum sensing regulates denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J. Bacteriol. 189: 4969–4972.
 - 31) Toyofuku, M., N. Nomura, E. Kuno, Y. Tashiro, T. Nakajima, and H. Uchiyama. 2008. Influence of the *Pseudomonas* quinolone signal on denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 190: 7947–7956.
 - 32) Toyofuku, M., B. Roschitzki, K. Riedel, and L. Eberl. 2012. Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. J. Proteome Res. 11: 4906–4915.
 - 33) Toyofuku, M., Y. Tashiro, Y. Hasegawa, M. Kurosawa, and N. Nomura. 2015. Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications. Adv. Colloid Interface Sci. 226: 65–77.
 - 34) Toyofuku, M., H. Uchiyama, and N. Nomura. 2012. Social behaviours under anaerobic conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Microbiol. 2012: 405191.
 - 35) Turnbull, L., M. Toyofuku, A.L. Hynen, M. Kurosawa, G. Pessi, N.K. Petty, S.R. Osvath, G. Carcamo-Oyarce, E.S. Gloag, R. Shimon, U. Omasits, S. Ito, X. Yap, L.G. Monahan, R. Cavaliere, C.H. Ahrens, I.G. Charles, N. Nomura, L. Eberl, and C.B. Whitchurch. 2016. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. Nat. Commun. 7: 11220.
 - 36) Valle, A., M.J. Bailey, A.S. Whiteley, and M. Manefield. 2004. *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) affect microbial community composition and function in activated sludge. Environ. Microbiol. 6: 424–433.
 - 37) Wang, M.Z., A.L. Schaefer, A.A. Dandekar, and E.P. Greenberg. 2015. Quorum sensing and policing of *Pseudomonas aeruginosa* social cheaters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112: 2187–2191.
 - 38) Yeon, K.M., W.S. Cheong, H.S. Oh, W.N. Lee, B.K. Hwang, C.H. Lee, H. Beyenal, and Z. Lewandowski. 2009. Quorum sensing: a new biofouling control paradigm in a membrane bioreactor for advanced wastewater treatment. Environ. Sci. Technol. 43: 380–385.