# 時空間的な制御技術が生み出す細菌挙動解析

高橋 晃平・久能 樹・Andrew S. Utada<sup>\*</sup>

## 細菌が棲む世界

地球上には、おおよそ1.0 × 10<sup>30</sup>匹の細菌が存在し、人 の腸内、植物の葉、土壌、海水などさまざまな環境に棲 んでいる<sup>1)</sup>. このような環境は、慣性力よりも粘性力が 支配していたり、大小さまざまな粒子が存在していたり、 液体の流れがあるなど複雑である.流れ一つを考えても、 栄養供給や物質拡散,剪断力などさまざまな要素があり、 それらがダイナミックに変化することで、環境中の化学・ 物理的因子を支配している<sup>2)</sup>.

このような環境で細菌は、鞭毛・繊毛を駆使して運動 したり、基質表面に付着したりする.また、細菌は単独 で存在しているのではなく、バイオフィルムと呼ばれる 細菌が密になった集団を形成して生存している.現在ま でに、バイオフィルムに関するさまざまな研究が行われ てきたが、「細菌は、実際の環境でどのように集団を形 成し、その中で何をしているのか?」という疑問は未解 明な部分が多い.そこで筆者らは、生物学的アプローチ に捉われず、工学・化学・物理学などさまざまな技術や 論理を駆使し、集団を形成する1細胞の挙動を時空間的 に追跡することで、この根本的な疑問に迫ろうとしてい る.本稿では細菌の観察技術の変遷をたどるとともに、 筆者らが明らかにした細菌の挙動を紹介していく.



図1. 代表的な細菌の観察手法である(A) ガラスボトムディッシュ,(B) フローセル,(C) マイクロ流体デバイス.(上) 実際に顕微鏡に設置した様子,(中) イメージ図,(下) 細菌の生育環境の模式図を示す.

## ガラスボトムディッシュ

魚の挙動を調べるなら,魚を「透明な水槽」に入れて 観察する.同様に細菌の挙動もガラスボトムディッシュ などの「透明な水槽」に培養液を入れて顕微鏡観察する (図1A).ガラスボトムディッシュでは細菌を培養させ ながら経時的な観察が可能であるが,細菌の増殖に伴い 栄養は枯渇してしまう.さらに,細菌は三次元的な増殖 するため,底面から集団内の1細胞の挙動を解析するに は限界がある.また,ディッシュ内において,流れなど の環境要素の再現は難しく,細菌が生きている実際の環 境とは異なる.

## フローセル

細菌が棲む環境には普遍的に流れがあり,流れは環境 中の化学・物理的因子を支配している.そこで,フロー セルと呼ばれる小型チャンバーを用いて,細菌の観察が 行われてきた(図1B).フローセルはmm単位で構成さ れている流体系であり,接続したチューブを介して培地 を連続的に供給することで,恒常的に流れのある環境を 作り出す.しかも,栄養を枯渇させることなく経時的に 観察することが可能であるため,流れのある実環境に近 い状態でのバイオフィルム形成過程の観察も行われてき た<sup>3)</sup>(次の項目で,筆者らが実際に行った観察例を紹介 する).フローセルは既製品としてさまざまなタイプが 市販され,細菌の挙動を観察する簡便な手段となってい るが,自由に流体系を調整できない難点がある.

## 高時間分解能解析によるコレラ細菌の挙動

ここでは、フローセルと高速カメラを用いることで、細 菌の基質表面での運動を解析した例を紹介する. 筆者ら は、下痢の原因となる病原性コレラ細菌 Vibrio cholerae のバイオフィルム形成初期段階における1細胞レベルで の挙動を明らかにした<sup>4)</sup>. V. cholerae は基質表面で運動 し、やがて不可逆的な付着によってバイオフィルムの形 成を開始する. したがって、基質表面での付着を理解す ることはきわめて重要である. 筆者らは、1秒間に200 回撮影できる高速カメラを用いることで、V. choleraeの

<sup>\*</sup>**著者紹介** 筑波大学生命環境系(准教授) E-mail: utada.andrew.gm@u.tsukuba.ac.jp ERATO野村集団微生物制御プロジェクト デバイス開発・イメージンググループ(グループリーダー) 微生物サステイナビリティ研究センター 次世代微生物制御部門



図2. 基質表面における *V. cholerae*の挙動. (A) 200枚/秒で高速トラッキングした1細胞の運動軌跡. それぞれ (B)「周回運動」と (C)「放浪運動」を示す. (D) 1細胞の回転運動半径 ( $R_{gyr}$ )の分布.  $R_{gyr} < 8$ の「周回運動」,  $R_{gyr} > 8$ の「放浪運動」に区別できる. 赤線は $R_{gyr}$ の曲線回帰を示す.

デバイス表面の動きを正確に追跡することを可能にした (図2A). この解析から*V. cholerae*の野生型株は,一定 の領域をクルクルと回る「周回運動 (orbiting)」(図2B) と遠くに離れて行く「放浪運動 (roaming)」(図2C)の 異なる運動パターンの亜集団があった.そこで,これら 運動パターンを定量的に解析するため,以下の数式(1) より,1細胞の運動軌道の広がりを示す $R_{gyr}$ (回転運動 半径)を求めた(図2D).

ここで, N:追跡回数, R<sub>i</sub>:任意時間における細菌の 座標, R<sub>cm</sub>:細菌運動全体の座標の重心とした.

$$R_{\rm gyr}^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} (\vec{R}_i - \vec{R}_{cm})^2$$
(1)

その結果、それぞれ $R_{gyr} < 8 \mu m$ のとき「周回運動 (orbiting)」、 $R_{gyr} > 8 \mu m$ のとき「放浪運動(roaming)」 の亜集団に定量的な区別が可能となった.一方、V. choleraeの鞭毛・繊毛欠損株のデバイス表面での運動パ ターンは、このような亜集団に区別されなかった.この ことから、デバイス表面での運動には鞭毛・繊毛の関与 が示唆された.また、数学的なシミュレーションと長期 観察(タイムラプスイメージング)から、「周回運動」 する亜集団では、鞭毛・繊毛によって生じる摩擦力が 「放浪運動」する亜集団よりも大きく、最終的に不可逆 的に付着する可能性が高かった.これらの結果は、基質 表面での運動パターンには鞭毛・繊毛が関係しており、 不可逆的な付着に影響していることを示す.

#### マイクロ流体デバイス

細菌の棲む90%以上の環境は、土壌・堆積物などの

生物工学 第98卷 第7号 (2020)

多孔質な環境であり、μm単位で区切られた微小空間で 構成されている<sup>5)</sup>.近年,マイクロ流体デバイスを用い ることで、制御された微小空間で細菌の挙動を解析する 研究が進んでいる<sup>6-8)</sup>.マイクロ流体デバイスは、µm単 位の空間で構成されている流体系であり、半導体微細加 工技術・精密機械加工技術などを用いて作製されている (図1C). 当初は、液体クロマトグラフィーの微小化・ 高速化などを目的とした研究が主流であったが、近年は 細胞の挙動を観察するための技術として応用されてきて いる. 基盤の設計には, computer-aided design (CAD) などの図面設計ツールを使用することで、複雑な流路を 自由にデザインすることを可能にし、基盤の作製には ICチップを作るソフトフォトレジストの技術が用いら れている.マイクロ流体デバイスは、完成した基盤に polydimethylsiloxane (PDMS) と呼ばれるシリコーン を流し込み硬化させ取り出し、カバーガラスと接着させ ることで完成する. これらの手法から作製されるマイク ロ流体デバイスを用いた細菌観察には、以下の大きなア ドバンテージがある.

①実環境の再現 冒頭でも述べた通り,細菌の棲む空間は、さまざまな形態的な特徴がある.たとえば、多 孔質な空間や凹凸のある表面などがある.このような細 菌が実際に棲んでいるような環境を模倣することを可能 とする<sup>9,10)</sup>.

②次元圧縮 細菌は三次元的な広がりをもって増殖 するため、集団内の細菌を1細胞レベルで観察するのは 難しい.そこで、細菌を一・二次元的な広がりしかない 空間に制限することで、制限した次元内での細菌の挙動 を観察することを可能とする<sup>7,11</sup>(次の項目で、筆者らが 実際に行った観察例を紹介する).

③物理・化学的な要因の制御 細菌は物理・化学的 な要因によってさまざまな影響を受ける.たとえば、細 菌には誘引物質の濃度勾配に影響され移動する走化性と いう性質がある.マイクロ流体デバイス内で,誘引物質 とバッファーをデバイス両端から流し濃度勾配を作るこ とで、細菌の生育する空間に誘引物質の濃度勾配を作り、 細菌の走化性を1細胞レベルで解析を可能とする<sup>12,13)</sup>.

#### 二次元空間による糸状細菌挙動

ここでは、マイクロ流体デバイスを用いて二次元的 な空間に圧縮することで細菌の挙動観察を行った例を紹 介する.筆者らは、糸状細菌 Leptothrix cholodniiがフィ ラメントを形成する過程を明らかにした<sup>14)</sup>(図3A). L. cholodniiは、鎖状に分裂した細胞フィラメントの周囲に 分泌ナノ繊維から構成される鞘と呼ばれる構造を作り、



図3. 二次元空間でのL. cholodniiの挙動. (A) マイクロ流体デ バイス内に配置した,縦:横:高さ=100 µm:100 µm:1.3 µm の空間を有する 2D-チャンバー. (B) 三次元的な広がりをある 空間におけるL. cholodniiの細胞集団. (C) 2D-チャンバー内で のL. cholodniiの挙動. チャンバー壁に衝突後の(D)「屈曲」,(E) 「反転」による細胞フィラメントの継続的な伸長. 矢印は固定 端(黒),衝突後の固定端(青),伸長端(白)を示す. (F)衝突 角角度と屈曲・反転の関係. 棒グラフは実際の出現頻度,実 線と点線はシミュレーションによる出現頻度を示す.

酸化鉄粒子に覆われたマイクロチューブを形成する<sup>15)</sup>. しかしながら、チューブ同士が絡まった三次元構造を作 るため(図3A)、細胞フィラメントの1細胞の挙動や分 泌ナノ繊維の空間分布の観察は困難であった. そこで, 高さを1.3 μmに制限した2D-チャンバーを持つマイク ロ流体デバイス用いることで、L. cholodniiのフィラメン ト形成過程のリアルタイムな観察を可能にした(図3B. C).野生型株は、デバイス表面に付着後に細胞フィラ メント形成する一方,ナノ繊維非分泌株は表面に付着で きず,フィラメントを伸長しなかった.このことから, ナノ繊維を介した表面付着が細胞フィラメントの伸長の 鍵であることが分かった. さらに、細胞フィラメントは チャンバー壁など障害物に衝突しても,「屈曲 (bending)」または「反転 (reversal)」して伸長を継続し た(図3D, E). 数学的なシミュレーションの結果, こ の異なる現象は衝突時に発生する反発力を受ける角度に よって起こることが示唆された(図3F). これらの結果

は, *L. cholodnii*は狭い空間内でも継続的にフィラメン トを形成する能力を有することを示している.

### まとめと今後の展望

本稿では、これまでの細菌の挙動を観察する手法の変 遷をたどるとともに、高時間分解能解析によるコレラ細 菌の挙動および二次元空間による糸状細菌の挙動を紹介 した.細菌の挙動を観察するには、物理・化学的な要因 の制御や適切な時間・空間で解析することが重要である. これらの制御が可能なマイクロ流体デバイスは、大きな ブレークスルーを生み出し、研究を進展させることが期 待される. 今後の筆者らの研究でも、マイクロ流体デバ イスを駆使して、細菌の挙動をより詳細に明らかにして いく.

#### 謝 辞

本研究は、文部科学省の科学研究費補助金若手研究 (B) (17K15410)、科学技術振興機構 ERATO野村集団微生物制御 プロジェクト (JPMJER1502)の一環として行われたものです. また、多くの共同研究者の方々に感謝申し上げます.

## 文 献

- Flemming, H. C. and Wuertz, S.: Nat. Rev. Microbiol., 17, 247 (2019).
- 2) Persat, A. et al.: Cell, 161, 988 (2015).
- 3) Foster, J. S. and Kolenbrander, P. E.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4340 (2004).
- 4) Utada, A. S. et al.: Nat. Commun., 5, 4913 (2014).
- 5) Raynaud, X. and Nunan, N.: PLoS One, 9, e87217 (2014).
- Volfson, D. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 15346 (2008).
- 7) Liu, J. et al.: Nature, 523, 550 (2015).
- 8) Sanfilippo, J. E. et al.: Nat. Microbiol., 4, 1274 (2019).
- Drescher, K. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110, 4345 (2013).
- Coyte, K. Z. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 114, E161 (2017).
- 11) Balaban, N. Q. et al.: Science (80-.), 305, 1622 (2004).
- 12) Yawata, Y. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111, 5622 (2014).
- 13) Salek, M. M. et al.: Nat. Commun., 10, 1877 (2019).
- 14) Kunoh, T. et al.: ACS Nano, 14, 5288 (2020).
- 15) Emerson D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 4001 (1992).