

## 第6期第6回創発セミナー報告 「最新の研究から見えてくる微生物の世界」

大隅基礎科学創成財団は2023年3月8日午後4時から「最新の研究から見えてくる微生物の世界」と題した創発セミナーをオンライン形式で開催しました。講師は、現在日本の微生物学をリードする筑波大学の野村暢彦氏、東京大学の野尻秀昭氏のお二人で、微生物の世界とそのインパクトについて語って頂きました。以下にその要旨を報告します。

東京大学大学院農学生命科学研究科  
微生物コンソーシアム アカデミア会員  
水口千穂

### 講演1 健康・食・環境にかかわる微生物の制御を目指して ～微生物も群れて会話する～

筑波大学生命環境系 教授  
微生物サステナビリティ研究センター センター長  
JST ACT-X 環境とバイオテクノロジー 研究総括  
京都大学化学研究所 客員教授 野村 暢彦 氏

地球上の生物というと動物や植物が注目されることが多いが、微生物は炭素量換算で地球上の生物の約2割を占める主要な生物である。微生物は、教科書的には生態系を支える分解者として知られる一方で、私達の健康・食・環境にも幅広く関与している。微生物の存在を認識し、上手に利用することが21世紀の課題解決に繋がると言っても過言ではない。本講演では、微生物を制御し、利用するために重要となる微生物間相互作用について、**1. 微生物の集団形成**、**2. 微生物の会話**、に焦点を当てて紹介する。



#### 1. 微生物の集団形成

微生物は浮遊状態で描かれることが多いが、実際には環境中の微生物の8割以上がバイオフィーム形態で存在することが知られている。バイオフィームとは微生物が固相表面に形成した集合体のことであり、排水口のぬめりや歯垢などはバイオフィームの典型例である。環境中で微生物は浮遊状態（放浪）とバイオフィーム状態（定住）を繰り返しながら生活している。このようなバイオフィームの経時的な変化を観察する手法として、我々はContinuous Optimizing Confocal Reflection Microscopy (COCRM) 法を開発した。本手法はレーザーによる細胞の反射光を利用した顕微鏡観察法であり、試料の染色や蛍光タンパク質を使用することなく、非破壊で経時的な観察を行うことができる。「観る」ことで初めてわかることは多く、例えば緑膿菌のバイオフィーム形成は嚢胞性線維症と呼ばれる肺の病気と強い関連性があるが、我々はCOCRM法を使用することで緑膿菌のバイオフィームを崩壊させる薬剤の開発に成功した。この薬剤は緑膿菌を殺すものではないため、バイオフィームの観察手法があって初めて薬剤としての効能が明らかになった例と言える。

バイオフィームの中では、様々な自然変異株が出現することが知られている。例えば、細菌のDNA修復に関与する遺伝子 *recA* の高発現細胞がバイオフィーム中に出現することが知られているが、そのような細胞が出現する場所はバイオフィーム底面部に集中していた。このような変異株が集団内で生存しているのは、集団としての環境適応のために、変異した一部の細胞を集団内でストックしておき、環境が変化した際には新たな環境に適応できる変異体が集団を守るという仕

組みが働いているためと考えることができる。すなわち、バイオフィームは微生物の多様性と不均一性を生み出す装置であると言える。

## 2. 微生物の会話

微生物は自ら生産する化学物質を言語として、細胞間でコミュニケーションを取ることができる。この「会話」で使用される化学物質には様々な種類があり、その化学物質の受容体を持っているか否かで、相手からのシグナルを受け取れるか否かが決まる。例えばアシル化ホモセリンラクトンのように、多くの細菌が生産し受容体を持つ化学物質を使用することで、同種だけでなく異種間でもコミュニケーションを取ることがあれば、特定の細菌のみが生産・受容できる化合物を使用することで同種のみでコミュニケーションを取る場合もある。我々は微生物集団中でこのような化合物を生産しなくなる変異体や、受容できなくなる変異体が出現することを見出した。このような、言わば「しゃべらない個体」「話を聞かない個体」が集団中から排除されないのも、微生物が高い環境適応能力を持つ理由と言えるだろう。

さらに我々は、微生物の「会話」で使用される化合物がメンブレンベシクルに含まれることを明らかにした。メンブレンベシクルとは細胞外に放出される細胞膜小胞であり、その中に含まれるタンパク質や核酸、低分子化合物等を細胞から細胞へと運搬する役割があると考えられている。メンブレンベシクルは細胞選択性が高いことを考えれば、微生物は「重要な話は相手を選んで伝えている」と言えるかもしれない。

昨今、人間社会でも多様性が大事だと言われているが、微生物の社会では集団を守るための仕組みとして多様性が維持されており、多様性の維持には周囲の寛容さが必須であることがわかる。微生物の社会から我々人間が学ぶべきことは多いのかもしれない。

## 講演2 分解菌研究からのスピノフ課題に挑む

東京大学大学院農学生命科学研究科  
附属アグロバイオテクノロジー研究センター  
環境保全工学研究部門 教授 野尻 秀昭 氏

プラスミドは細菌細胞間を水平伝播する遺伝因子であり、宿主に薬剤耐性や難分解性物質分解能などの形質を付与することが知られている。従来の考え方では、プラスミド由来の形質が宿主由来の形質に付加されるイメージで様々なことが議論されてきたが、最近の研究からは、プラスミドの獲得が宿主染色体そのものの機能も変化させることが明らかとなっている。この過程にはプラスミドと宿主染色体間の相互作用が重要な役割を果たす。本講演では、分解プラスミドの獲得が宿主に与える影響について、**1. プラスミド保持による負荷の実態解明**と、**2. プラスミド非感受性株の発見と非感受性メカニズムの解析**、に焦点を当てて紹介する。



### 1. プラスミド保持による負荷の実態解明

プラスミドが宿主に与える負荷について議論される際に、プラスミドの安定性がその指標として用いられることがある。一般に「プラスミドの安定性」として議論されているものには、以下の二種類の現象が混在していることがあるため注意が必要である。一つは、細胞分裂の過程で染色体が娘細胞に分配されていく際に、プラスミドが同調的に分配されるという、プラスミド自身の「安定性」である。プラスミドの安定性が低い場合、細胞分裂の過程でプラスミド非保持株が出現する確率が高くなる。もう一つは、プラスミド保持株集団内に出現したプラスミド非保持株

との競合培養の過程で、プラスミド保持株がどの程度優占化できるかを指標とする「生残性」である。本講演では「安定性」と「生残性」を区別して使用する。

我々はカルバゾール分解プラスミド pCAR1 を用いて、pCAR1 保持が宿主である *Pseudomonas* 属細菌に与える影響について調べてきた。*P. putida* KT2440 株、*P. aeruginosa* PA01 株、*P. fluorescence* Pf0-1 株に pCAR1 を保持させ、カルバゾールで生育させると、*P. fluorescence* Pf0-1 (pCAR1) 株のみで生育遅延が観察され、pCAR1 の構造変化が起きていることが確認された。これは細胞に毒性を示す代謝中間体であるカテコールの蓄積に起因しており、カテコールの蓄積を回避するために pCAR1 の安定性が低下したと考えられた。一方、pCAR1 が宿主に付与するカルバゾール分解能とは無関係なコハク酸を炭素源として生育させた場合には、pCAR1 の安定性への影響は見られなかったが、プラスミド非保持株との競合培養で pCAR1 保持株の生残性に違いが見られた。トランスクリプトーム解析や Phenotype Microarray の結果からは、宿主間で共通の影響が見られたことから、プラスミド保持による類似の影響を引き起こす共通の染色体因子の存在が示唆された。一方で、宿主特異的な影響も見られたことから、宿主とプラスミドの間には相性があることも示唆された。3 株の中で最も pCAR1 保持株の生残性が低下した *P. putida* KT2440 株について進化実験を行ったところ、進化株では pCAR1 上のカルバゾール分解遺伝子群の欠失と、染色体上の *mexT* 遺伝子内に点変異が見出された。MexT は転写制御因子であり、MexT が制御する下流の遺伝子が pCAR1 保持に伴う負荷に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 2. プラスミド非感受性株の発見と非感受性メカニズムの解析

もしプラスミド保持による負荷を受けない宿主がいれば、そのメカニズムを調べることで、プラスミド保持による負荷が生じる仕組みと、負荷を回避する方法がわかるはずである。我々はプラスミド保持による負荷を受けない宿主（本講演では「プラスミド非感受性株」と呼ぶ）を探すため、プラスミドの「オリジナルホスト」に着目した。オリジナルホストとは、あるプラスミドが最初に発見された際の宿主のことを指す。プラスミド保持細菌は、薬剤耐性や難分解性物質分解能などを指標に選抜されてきた経緯があるため、単離過程で競合培養を経ていることが多い。競合培養内で優占化できたということは、プラスミド保持による負荷を受けにくいと考えられる。事実、トルエン分解プラスミド pWW0 をオリジナルホストである *P. putida* KT2440 株に、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 をオリジナルホストである *P. resinovorans* CA10 株に保持させたところ、いずれも高い生残性を示した。しかし意外なことに、*P. resinovorans* CA10 株は他の様々なプラスミドを保持させても生残性が低下せず、プラスミド非感受性株であることが明らかとなった。

そこで *P. resinovorans* CA10 株のトランスポゾン変異ライブラリを作製し、プラスミド非感受性を示さなくなる変異株をスクリーニングしたところ、二種類のトランスポゾン変異株で pCAR1 保持時の生残性が低下することが確認された。これら変異株のトランスクリプトーム解析からは、硫黄代謝系遺伝子（*CysB* レギュロン）の転写量の変化が見出され、プラスミド非感受性への関連が考えられた 3 つの転写制御因子のうち *spiR3* の機能が最も重要であることが示された。細菌がプラスミドを獲得すると、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームレベルで様々な変化が生じ、これが宿主細菌にとっての負荷となる。*P. resinovorans* CA10 株では *spiR3* の機能により、このような変化が適切に調節されることでプラスミド保持による宿主への負荷が軽減されることが明らかとなった。

プラスミドは薬剤耐性菌の問題とも関連が深く、近年、世界各国から報告が相次いでいる。一方で、新たに得られたプラスミドの塩基配列を既存の公的データベースで調べてみても、そこから得られるプラスミドの分類や宿主に関する情報は必ずしも正しくないのが現状である。この状況を打開するため、我々は大隅基礎科学創成財団の事業として「プラスミド学の学術基盤再構成」を実施することにした。第一段階として、*Pseudomonas* 属細菌のプラスミドデータベースの構築を行う予定である。研究者が取得したプラスミド DNA 情報を入力すると、正しい分類、宿主域、搭載遺伝子、過去の文献情報等が容易に取得可能なものを想定している。将来的には、他のデータベースとの連携・融合や、運営体制の確保、プラスミド研究者・微生物研究者との連携を進め、対象を全ての種類のプラスミドへと拡張したデータベースの構築を目指したい。