

## 単一菌体の時間的・空間的連続観察から得られた新知見と将来展望

## Novel Insights and Perspectives in Microbiology Obtained from Time-Lapse and Spatial Serial Observation of Single Bacterial and Yeast Cells

山 田 博 之

Hiroyuki Yamada

公益財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌部

キーワード：single-cell analysis, time-lapse microscopy, 蛍光顕微鏡, 超薄連続切片, 透過電子顕微鏡

光学顕微鏡が発明された時点から微生物はその観察対象の主役であったに違いない。顕微鏡が発明される以前、われわれが肉眼で確認できる最も小さな生き物は昆虫などの小動物であったのではないだろうか。肉眼で確認できない微小な世界に、生命が存在するという事自体、想像されていなかったことだろう。

17世紀、オランダの商人レーウェンフックは純粋に興味に基づいて自作の顕微鏡で湖水、海水、雨水などを観察し、そこに肉眼では観察できない様々な微小な生物が生きていることを発見した。それらの中には、繊毛虫、原虫、そして細菌と思われるものが含まれていたと考えられている<sup>1)</sup>。

微生物と顕微鏡の結びつきは強いが、顕微鏡観察の多くは対象の特徴的な形態の鑑別のために用いられてきた。すなわち、微生物を対象にした場合に限らないが、顕微鏡観察およびその解釈は多くの場合、もっぱら定性的であり、定量的な分析手段として用いられることは極めて少なかった。また、細菌の研究においては、ロベルト・コッホが純粋培養の技術を確立した後、同一の形質を持った菌の集団（クローン）を対象とすることが多くなった。

ここで、いくつかの誤った前提が設定されることになった。すなわち、純粋培養された集団中に存在する①全ての細胞は生きている（死細胞の存在は無視されている）、②全ての細胞はあらゆる点で同一である、そして③細胞数は容易に計算（想定）できる、という前提である。これらの前提は菌の集団全体の特徴から集団を構成する個々の細胞の形質を、単純に想定された細胞数で平均することにより容易に推測できるというさらに誤った前提を設けることになった。しかし、集団内の個々の細胞は完全に同一ではないので、この手法による計算・推測から得られる結果は実態から乖離する可能性がある。

すなわち、細菌の集団を構成する各細胞は、短い時間枠で見れば種の枠を超えない範囲で柔軟な多様性を示すが、その枠を超える形質の変異が起き、それが保存されると新しい種が生まれる展開になると考えられる。そこで、集団内に存在する多様性を持つ複数の単一菌体を詳細に観察し、その結果に基づいて全体を推測する手法を用いると、より正確に母集団の形質を推測することが可能になる。これはまさに、統計学の一般的な手法である。

今回の特集は、いずれも数千個の生きた細胞あるいは数百枚の超薄切片を時間的、空間的に連続観察した単一菌体の分析データから母集団を推測するものである。まず初めは、1分子蛍

光イメージング、遺伝子発現過程の蛍光プローブ法、ハイスループット解析プラットフォームを用いたゲノムワイド解析手法と自作の装置を使って、数千の大腸菌菌体における各菌体の遺伝子発現とタンパク質合成を経時的に観察したデータを谷口雄一先生に紹介して頂くことにした<sup>2)</sup>。次に、主に抗酸菌や大腸菌を対象として、1,000以上の単一菌体を培養条件の調節が可能なマイクロ流体デバイス環境で培養しながら蛍光顕微鏡で最長200世代以上にわたり連続観察して追跡し、集団内の一細胞が示す表現型が集団の平均的な表現型と異なることがあることを若本祐一先生に紹介頂くことにした<sup>3)</sup>。これらの研究は、生きた細菌細胞集団はたとえその遺伝学的背景が同一であるとしても、構成する細胞が多様な表現型を示しうることを、また表現型の違いにより細胞の生死、増殖速度の違い等が決定されることを示しており、このような可視化を伴った手法が、微生物学的研究において今後さらに重要な役割を果たす可能性が示唆される。

次いで、急速凍結・凍結置換した結核菌5菌体をカバーする計200枚以上の超薄連続切片観察から得られた三次元的定量解析であるストラクチャー解析データ（形態計測データとリボソーム計数データ）を山田が紹介する<sup>4)</sup>。最後に、世界に先駆けてストラクチャー解析法を提唱した山口正視先生に、酵母サッカロミセス・セレビシエ6菌体を約250枚の超薄連続切片で観察して、超微細構造を三次元的、定量的に分析した新知見を紹介して頂いた<sup>5)</sup>。従来、電子顕微鏡観察データ解析は定性的、二次元的な解釈が主であったが、急速凍結・凍結置換法による標本作製と超薄連続切片観察により得られたこれらのストラクチャー解析データは、多方面に有用な基礎情報を提供することが期待され、今後、基礎生物学、特に微生物学の分野における研究手法としての重要性が示唆される。

最後に本特集は2014年11月22日、東京池袋の帝京平成大学で開催された微生物の超微形態解析研究会主催研究会で講演をお願いした先生方にご執筆頂いたことを付記させて頂く。

## 文 献

- 1) 天児和暢：日本細菌学会誌, 69, 315-330 (2014)
- 2) Taniguchi, Y. *et al.*: *Science*, 329, 533-538 (2010)
- 3) Wakamoto, Y. *et al.*: *Science*, 339, 91-95 (2013)
- 4) Yamada, H. *et al.*: *PLoS ONE*, 10, e0117109 (2015)
- 5) Yamaguchi, M. *et al.*: *J. Electron Microsc.*, 60, 321-335 (2011)