

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15427

研究課題名（和文）画像解析と機械学習を組み合わせた新技術で解き明かす微生物集団構築プロセス

研究課題名（英文）The process of biofilm development investigated by the novel imaging method combined with machine-learning

研究代表者

高部 響介（TAKABE, Kyosuke）

国立感染症研究所・細菌第一部・研究員

研究者番号：60821907

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：多くの細菌はバイオフィルムを形成し生活している。本研究では、バイオフィルム内の個々の細胞から発せられる自家蛍光が多様化し、その多様性がバイオフィルムの成熟に伴って変化することを明らかにした。また、変異株の自家蛍光を解析した結果、細胞の自家蛍光プロファイルがその細胞の機能を反映していることが示唆された。これらの結果は、自家蛍光解析が非破壊、非染色で、表現型の不均一性のモニタリングに利用できることを示唆している。さらに、本研究で構築した画像処理手法により、脱窒過程における緑膿菌バイオフィルムの構築プロセスが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオフィルム内では同一遺伝子型の細菌でさえ遺伝子発現等に不均一性が生じることが知られているが、その時空間的な発展プロセスにはまだ不明点が多い。本研究の成果は、従来の手法にとらわれず、非染色で蛍光タンパク質導入などの遺伝子工学技術を必要としない、バイオフィルム内で生じる不均一性を直接可視化する技術の実現可能性を示唆している。1細胞レベルでの解析を通じた集団の振る舞いを理解することは、正負両面で社会とかかわりのある細菌バイオフィルムを深く理解することに繋がり、高効率な排水処理技術の開発や、薬剤耐性菌への対応の新たな戦略となることも期待される。

研究成果の概要（英文）：Many bacteria have the ability to form a biofilm. In this study, it was revealed that the autofluorescence emitted from the individual cells in biofilm diversified, and the degree of diversity changed with biofilm maturation. Additionally, the analysis for autofluorescence of mutant indicated that autofluorescent properties of cells would reflect the function of the cells. These results suggested that autofluorescent analysis could be utilized for monitoring of the phenotype heterogeneity in a non-destructive, non-staining and unlabeled manner. Additionally, the image processing method constructed in this study revealed the the aspects of development mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in denitrification process.

研究分野：細菌学

キーワード：バイオフィルム ライブイメージング 自家蛍光 画像解析 機械学習

### 1. 研究開始当初の背景

多くの微生物は、環境中で集団(バイオフィーム)を形成し生活しており、外的なストレスや薬剤などから生き残るための生存戦略として採用している。微生物バイオフィームは人間社会と正負両面で関連が深く、排水処理等の環境浄化など産業面で重要である一方、抗生物質投与など病原性細菌による感染症治療に対しては除去を困難にする。したがって、微生物バイオフィームを制御・活用するためにはバイオフィームへの深い理解が重要となる。

近年、バイオフィーム内に存在する微生物を 1 細胞レベルで見ると、バイオフィームは単なる均一な単細胞生物の集合体ではなく、同一遺伝子型のバクテリア集団でさえ、個々の細胞の表現型(機能)に違いが生じ、多数の機能的な亜集団が形成される、つまり役割分担を集団内で行っていることが分かってきた。しかしながら、集団形成過程において、いつ・どこで機能分化が生じるのかといった詳細なプロセスには不明点が多く存在する。従来の手法である遺伝子改変すなわち蛍光タンパク質を使ったラベル標識等は、煩雑な前処理が必要であり、多数の表現型を評価することが困難であることも一因である。

一方で、バクテリアは蛍光タンパク質の導入をしなくても、光を照射すると、様々な細胞内物質の発する蛍光(自家蛍光)によって光ることが知られている。1 細胞から発せられる自家蛍光がその細胞の細胞内物質情報を反映することに着目し、所属研究グループでは 1 細胞毎に網羅的な自家蛍光パターンを取得する技術を開発し、個々の細胞の自家蛍光パターンと機械学習手法を組み合わせることによって、それぞれの細胞の種類や生理状態が自家蛍光パターンに反映されることを明らかにしてきた。自家蛍光パターンにより様々な細胞の機能などを非破壊的に評価できると期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、集団内での機能分化はいつ・どこで・どのように生じるのかを明らかにするための手段として、バイオフィーム内で出現する役割分担の様子を直接観察可能な手法の開発を目指し、自家蛍光と機能性の関係性を明らかにすることを目的とした。バイオフィーム構築過程には不明点が多く、個々の細胞がどのように集団を構築していくのかについても知見が蓄積されていなかったことから、バイオフィーム構築プロセスを 1 細胞レベルでの解明し、微生物の集団構築プロセスを包括的な理解を目指した。本研究では特に、嫌気脱窒過程の緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)バイオフィームに注目した。さらに、構築した画像解析手法による自家蛍光解析と機械学習手法を組み合わせる技術を用いて、微生物から対象を拡大させ、他の細胞診断技術等の開発も試みた。

### 3. 研究の方法

(1) バイオフィーム内の非標識細胞を 1 細胞レベルで認識するための画像解析手法の開発

まず初めに、複雑な 3 次元構造体であるバイオフィーム構築過程を直接観察するために、共焦点レーザー顕微鏡システムとフローセルシステムを組み合わせる観察・計測系の構築を試みた。構築した観察系を用いて、バイオフィーム研究におけるモデル細菌である緑膿菌を培養し、経時観察を行った。従来行われてきた、個々の細胞を GFP などの蛍光タンパクで標識し認識することは自家蛍光シグナルの取得の大きな障壁となる。したがって、非染色および非標識でのバイオフィーム内の個々の細胞領域を決定するために共焦点反射顕微鏡法によって細胞画像を取得した。バイオフィーム等のバクテリアが密集した集団内の 1 細胞領域から発せられる自家蛍光シグナルを抽出することは困難なため、画像解析手法の開発が必要であった。そこで、本研究ではまずバイオフィーム内の個々の細胞を 1 細胞レベルで解析可能な画像解析手法の開発を行った(図 1)。

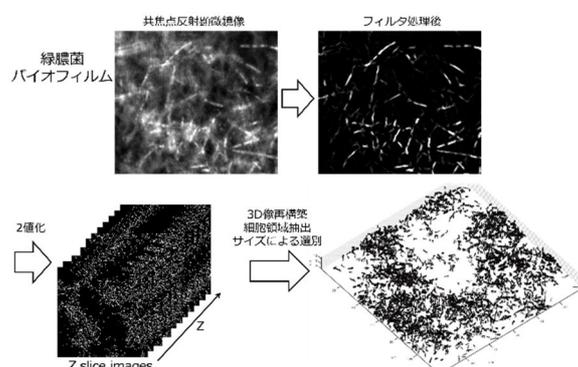


図 1. 画像解析手法

(2) バイオフィーム内の個々の細胞の自家蛍光解析

上述の通り、バイオフィーム内では個々の細胞が異なる機能性を発揮し、役割分担を行って生活していると予想されている。しかしながら、バイオフィーム構築過程のどこでそのような表現型の多様性が生じるのかはよくわかっていなかった。そこでまず、バイオフィームの自家蛍光画像を取得し、個々の細胞の自家蛍光に多様性が生じるのかを調べた。具体的には、4 つのレーザー(波長は 405 nm, 488 nm, 561 nm, 640 nm)を照射した際の蛍光画像をスペクトルとして取得し、(1)

で開発したバイオフィルム画像解析手法を用いて、個々の細胞の自家蛍光プロファイルを経時的に取得した。スペクトルは各レーザーで蛍光波長 10 nm 毎 32 個の検出器で取得した。したがって自家蛍光プロファイルは[4 レーザー × 32 検出器]の 128 次元データとして 1 細胞毎付与される。128 次元の自家蛍光プロファイルデータを基に、集団における自家蛍光プロファイルの多様度をコサイン類似度に基づいて計算した。

### (3) 細胞外多糖産生株と非産生株での自家蛍光プロファイルの比較

緑膿菌のバイオフィルム構築において、細胞外多糖が構造体の骨格として重要な役割を果たすことが知られている。そこで、細胞外多糖産生機能を発揮している細胞と他の細胞の自家蛍光に違いがあるのかを検証した。具体的には、細胞外多糖産生能欠失株 (pel psl 株) の自家蛍光と野生株 (細胞外多糖産生能有) の自家蛍光画像を取得し、1 細胞毎の自家蛍光プロファイル解析を行った。加えて、機械学習的手法を用いて分類可能かの検討も行った。ここではニューラルネットワークと線形判別分析 (LDA) による分類を試行した。

### (4) 嫌気脱室過程における緑膿菌バイオフィルムの 1 細胞解析

緑膿菌は、好気的環境と嫌気的環境によって異なるバイオフィルム形状を呈することが知られており、異なる構築プロセスを経ることが予想されるが、詳細は不明であった。そこで、嫌気環境の緑膿菌バイオフィルムを経時的に観察し、(1) で開発した画像解析手法により 1 細胞レベルでの解析を行った。

### (5) 自家蛍光プロファイルによる細胞診断技術の構築

これまでに構築した自家蛍光画像解析手法および機械学習的手法を組み合わせ、細胞診断技術の構築を試みた。具体的には、研究室内で維持された培養細胞においてしばしばコンタミネーションが問題となる *Mycoplasma fermentans* が感染した VERO 細胞と非感染 VERO 細胞を自家蛍光プロファイルによって区別可能かを調べた。レーザーは 6 種類 (405, 458, 488, 514, 543, 633) を使用した。分類にはサポートベクターマシーン (SVM) もしくはニューラルネットワークを用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 緑膿菌バイオフィルム内の個々の細胞の自家蛍光の多様性

緑膿菌バイオフィルムの経時的な自家蛍光変化を解析するために、マイクロ流体デバイスと共焦点レーザー顕微鏡を組み合わせた観察系を構築した。緑膿菌をマイクロ流体デバイス内の流路で培養した結果、嫌気脱室過程で構築されるバイオフィルムの特徴を持ったバイオフィルムの形成を確認できた。しかしながら、完全な嫌気脱室過程をデバイス内で維持できる頻度は低かったため、嫌気培養キットを用いて培養し、1~数時間毎の自家蛍光観察を行うこととした。その結果、バイオフィルム形成初期から成熟する過程において、個々の細胞が示す自家蛍光的特徴には多様性が生じることが明らかとなった (図 2)。

次に、効率は低いものの、マイクロ流体デバイス内でのバイオフィルムの構築させることには成功したことから、網羅的に自家蛍光情報を得るために 4 種類のレーザーを照射し経時変化の計測を試みた。しかしながら、レーザーの侵襲によりバイオフィルムの成長を観察することができなかつたため、レーザー強度の最適化を行った。その結果、バイオフィルムの成長過程を、自家蛍光

画像を取得しながら観察することに成功した (図 3)。画像解析により 1 細胞毎の自家蛍光プロ

ファイル抽出し、多様性の評価を行った結果、その多様性はバイオフィルム構築プロセス内で変化することが明らかとなった (図 3)。これらのことは、バイオフィルム構築プロセスで生じる役割分担、表現型の多様性を反映していると考えられるが、今後のさらなる研究が必要となる。

### (2) 細胞外多糖産生能の有無と自家蛍光との関係性

緑膿菌は主に 3 つの多糖類を産生し、細胞外へ分泌している。細胞外多糖産生株と非産生株の自家蛍光プロファイルに違いがあるのかを調べるために、野生株と細胞外多糖産生を制

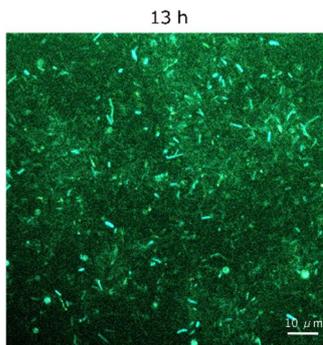
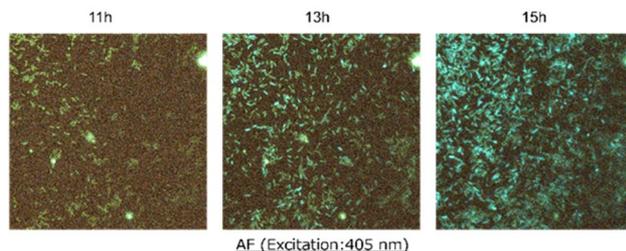


図 2. バイオフィルム自家蛍光



コサイン類似度を基に、多様性の指標 (多様度) を定義 (下式)

$$\text{Heterogeneity} = 1 - \frac{1}{N^2} \sum_i \sum_j \frac{\bar{X}_i \cdot \bar{X}_j}{|\bar{X}_i| |\bar{X}_j|} \quad \bar{X}_i = \begin{bmatrix} x_{i1} \\ x_{i2} \\ \vdots \\ x_{i128} \end{bmatrix}$$

自家蛍光プロファイル

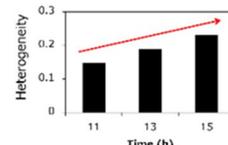


図 3. バイオフィルム自家蛍光の経時変化

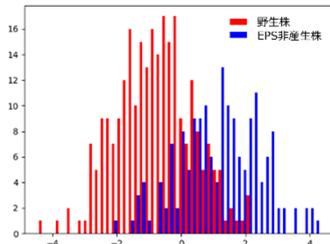


図 4. LDA 解析結果

御している 3 つの遺伝子のうち *psl* (polysaccharide synthesis locus) と *pel* (pellicle formation locus) を欠損した株の自家蛍光観察を行い、1 細胞毎の自家蛍光プロファイル解析した。自家蛍光プロファイルに基に LDA を行った結果、65% ~ 70% ほどの正答率で区別でき (図 4)、ニューラルネットワークによる分類モデルでは 70% ~ 75% ほどの正答率で区別可能であることがわかった。このことは、自家蛍光プロファイルを利用すれば、遺伝子工学的に蛍光タンパク標識処理を施したレポーター株を使用せずとも、細胞集団内の役割分担の時空間分布を評価できることを示唆しているが、分類モデルの精度の向上や他の

機能性細胞の検出など、さらなる研究が必要である。

### (3) 嫌気脱室過程の緑膿菌バイオフィーム構築プロセス

先行研究により緑膿菌は、好気的環境と嫌気的環境では構築するバイオフィームの形状が異なり、嫌気的環境では細胞が非常に長く、マット状の細胞集団を構築することが知られていた。

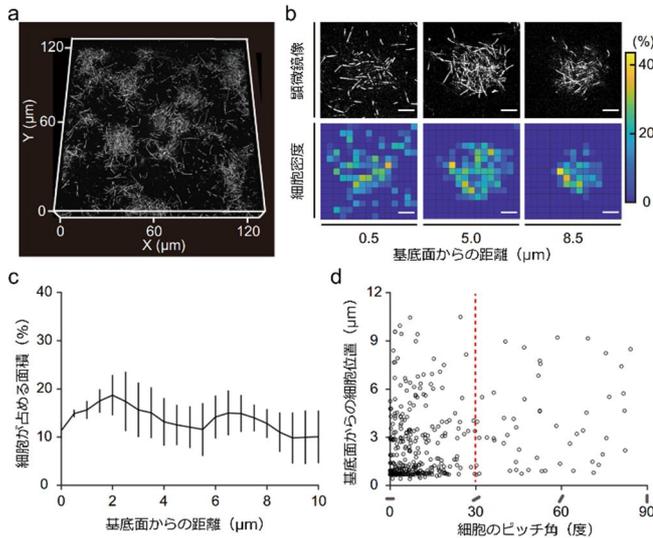


図 5. 緑膿菌バイオフィームの形状解析結果

しかしながら、そのプロセスはよくわかっていなかった。そこで、バイオフィームを経時的に観察し、1 細胞レベルでの詳細な形状・幾何学的パラメータの定量計測を行った。その結果、嫌気的環境では基底面から徐々に細胞が積み重なっていき、多くの細胞は基底面に平行に配置していることがわかった (図 4a, d, Sci Rep, 2021 改変)。また、一つのマイクロコロニー内では細胞密度の不均一性があることがわかった (図 4b, c, Sci Rep, 2021 改変)。嫌気脱室過程のバイオフィームへの深い理解は、排水処理などを含め、地球上の窒素循環を考えるうえで重要である。今後、どのように細胞間で制御しながら集団構築を行っているのか、そのメカニズムの解明に向けた研究が望まれる。

### (4) 自家蛍光プロファイルによる細胞診断技術の構築

これまでの研究によって自家蛍光プロファイルが個々の細胞の機能や状態を反映し、機械学習的手法を組み合わせることによって、細胞を区別可能であることがわかってきた。そこで、微生物のみならず、動物細胞を対象を拡張することを発想した。ここでは、モデル細胞として VERO 細胞を採用した。VERO 細胞はこれまで様々な分野で研究の発展に貢献してきたが、その中で細胞の維持や品質管理についても重要な議題である。Mycoplasma の細胞感染はしばしば研究室内でみられ、VERO 細胞など培養細胞を使用する際に問題となり、非破壊的に Mycoplasma のコンタミネーションを検出する技術が求められていた。そこで、Mycoplasma 感染 VERO 細胞と非感染細胞の自家蛍光プロファイルと比較した。その結果、特に 405 nm レーザーによって発せられた自家蛍光に差があることがわかり (Mycoplasma 感染細胞の自家蛍光強度が減少)、SVM ではおよそ 77%、ニューラルネットワークによって構築したモデルでは 82% 程度の正答率で識別可能であることがわかった (図 6, Sens Diagn, 2024 改変)。このことは、VERO 細胞においても細胞の生理状態が自家蛍光プロファイルに反映されることを示しており、実際に NADH 量を定量したところ、感染細胞の方が低下していたため、蛍光を発することが知られている NADH 量の低下によ

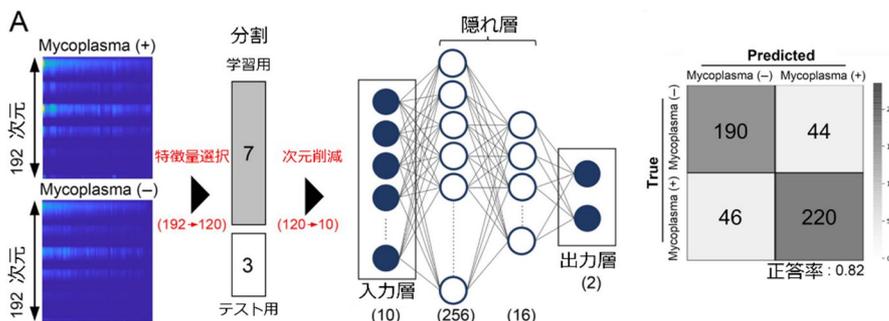


図 6. 感染細胞診断モデルと予測結果

て自家蛍光に差が生じたことが示唆された。今後、精度の向上や手順の効率化についての研究によって、よりハイスループットな診断技術の開発が可能だと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kenzo Bamba, Kyosuke Takabe, Hiroaki Daitoku, Yoshikazu Tanaka, Azusa Ohtani, Midori Ozawa, Akiyoshi Fukamizu, Nobuhiko Nomura, Arihiro Kohara and Tatsuki Kunoh	4. 巻 3
2. 論文標題 Discrimination of mycoplasma infection using machine learning models trained on autofluorescence signatures of host cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Sensors & Diagnostics	6. 最初と最後の頁 287-294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d3sd00175j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kunoh Tatsuki, Yamamoto Tatsuya, Ono Erika, Sugimoto Shinya, Takabe Kyosuke, Takeda Minoru, Utada Andrew S., Nomura Nobuhiko	4. 巻 89
2. 論文標題 Identification of lthB, a Gene Encoding a Putative Glycosyltransferase Family 8 Protein Required for Leptothrix Sheath Formation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01919-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/aem.01919-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okano Chigusa, Takabe Kyosuke, Hirayama Tomohiro, Nomura Nobuhiko, Yawata Yutaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Three-dimensional morphology of bacterial community developed on the index-matched materials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98943-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高部響介, 野村暢彦, 八幡穣
2. 発表標題 Diversity of innate fluorescent signatures in biofilm.
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐野千佳歩, 高部響介, 八幡穰, 豊福雅典, 野村暢彦
2. 発表標題 自家蛍光に基づいたQSシグナル応答株の網羅的解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回札幌大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡野千草, 高部響介, 平山智弘, 野村暢彦, 八幡穰
2. 発表標題 低酸素環境下における緑膿菌バイオフィルムの3次元形態
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回札幌大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡野千草, 高部響介, 平山智弘, 野村暢彦, 八幡穰
2. 発表標題 インテックスマッチング材料に形成した緑膿菌バイオフィルムの三次元形態
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原克樹, 張譚云, 平山智宏, 高部響介, 野村暢彦, 八幡穰
2. 発表標題 海洋細菌の遊泳持久力の実測とその多様性の解明
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 野村暢彦他	4. 発行年 2023年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 372
3. 書名 バイオフィルム革新的制御技術	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------