

## 2-6 バクテリア走化性を利用した溶液評価法の開発

### 2-6 Development of Solution Evaluation Method Using Bacterial Chemotaxis

田中裕人 數田恭章

TANAKA Hiroto and KAZUTA Yasuaki

化学物質には、味、香り、など様々な働きがある。こうした化学物質の働きは、生き物の生命活動維持に大きな役割を果たしている。微生物の一種、バクテリア大腸菌は生きるために、化学物質を検出し化学物質の特性により水中でその行動を変化させる。我々は、大腸菌の化学物質(溶液)に依存した行動変化に注目し、“化学物質溶液を識別(評価)する”基盤技術の開発を行った。微生物を化学物質特性の可視化デバイスとして使い、可視化された特性から“化学物質(溶液)を統計手法により識別・評価する”技術である。有用な情報を統計処理により抽出するため、多様な評価目的を設定することが可能となり、様々な化学物質溶液が対象となる。化学物質に由来する、溶液特性、味、毒性、環境評価などへの応用が期待される。本稿ではこの技術開発の、背景、技術要素及び今後の展望を紹介する。

Chemical substances have various functions such as taste and aroma. The functions of these chemicals play a major role in maintaining life activity of living things. One of microorganisms, bacteria *Escherichia coli*, detects chemicals and changes their behavior in water depending on the characteristics of the chemicals in order to survive. We focused on behavioral changes depending on the chemicals (solution) of *E. coli* and developed a basic technology to "identify (evaluate) chemical substance solution." This technology uses microorganisms as a device for visualizing characteristics of chemicals, and "evaluates chemicals by statistical methods" from the visualized characteristics. Since useful information is extracted by statistical processing, various evaluation purposes can be set, and various chemical solutions can be targeted. It is expected to be applied to solution characteristics, taste, toxicity, environmental evaluation, etc., which are derived from chemical substances. We, in this paper, introduce the background, technological elements, and future prospects of this technological development.

#### 1 はじめに 「開発研究の背景」

我々ヒトを含む生き物は、生命活動を維持するため、外界から化学物質(分子)を取り入れたり、外界へ化学物質を放出したりしている。こうした化学物質は、生命を維持する栄養になることはもちろん、細胞内・生体内・生体間で情報伝達や情報通信を行うための分子シグナルの役割も担っている。こうした化学物質分子を使った情報のやり取りは分子情報通信とも呼ばれ、微生物からヒトに至るまで生命活動の基盤となっている。生命活動の現場において、化学物質分子のやり取りは、生き物が生存のためその行動や形態(状態)を変化させる要因の一つであり、別の見方をすれば、生き物の行動や形態の変化により、化学物質情報(環境、活性、効果など)を可視化(数値化)できる可能性がある、

というわけである。一例として、指標生物を使った(河川に生息する生き物の種と数を調べる)河川の水質評価を考えると、(化学物質により行動や形態が変化した結果とも言える)生物存在に注目した、化学物質情報(河川のきれいさ)の可視化(溶液評価)とも言える。

我々は現在、こうした生物を活用した溶液評価法の応用を目指した研究を進めており、本稿では「バクテリア走化性を利用した溶液評価法」を紹介する。

(手法1) 微生物の応答挙動変化(時系列データ)を観察することで溶液の化学物質情報を迅速に可視化(数値化)する手法を開発し、

(手法2) “意味(ラベル)付けされた溶液”の数値化データベースを構築し、

(手法3) 統計的手法を応用し、ブラインドサンプルの“意味(ラベル)”を推定する手法を開発、

と三つの手法を基盤に、溶液評価を実現した手法である。

## 2 化学物質検出デバイスとしての微生物の選択

生き物を化学物質検出器として利用するという事は、生き物に作用(“生物活性”)のある化学物質が検出されることになる。ここで、我々は化学物質検出デバイスとしてバクテリア大腸菌を選択した。先行研究で多くの知見が蓄積されており [1]、

(生物特性 1) 大腸菌は多様な化学物質の種類と濃度により泳ぎの様子を変化させること [2]、  
 (生物特性 2) 培養(デバイス作製)が容易であること、  
 (生物特性 3) 観察手法が確立されていること [3]、  
 をメリットとした選択である。ここでデメリットは、我々が評価したいターゲット溶液に、大腸菌が応答しない可能性があることである。生物種により生物活性にはバリエーションがあるため、実際の運用では、大腸菌の挙動変化の有無を事前確認しておく必要がある。応答として何らかの挙動変化があれば、数値化を経て後述する統計的手法と組み合わせることで、様々な溶液評価の可能性が期待される。

また、生き物を化学物質検出器として利用する場合、目的に応じてその検出特性を考慮することが重要となる。検出特性の代表的なものに、基質化学物質への“特異性と高感度性”などが挙げられるが、我々が今回利用しているのは、基質化学物質への“あいまいな結合”

と言える [1][2]。“あいまいな結合”で多様な化学物質を検出対象とし、統計的手法を用いることで、ヒトにとって有用な情報を選択・抽出する(実施例は後述)。バクテリア大腸菌はその走化性応答において、“あいまいな結合”を提供する微生物デバイスと言える。特定の化学物質の検出を目的とするのではなく、多様な化学物質検出を前提とすることで、ヒト(生き物)への効果・影響(例えば、味・薬効・毒性など)という価値軸で多種の化学物質をカテゴライズできるかもしれない可能性を付け加えておきたい。

## 3 化学物質溶液情報の数値化とデータベース構築

デバイスとして使用する微生物を決めると、次は、化学物質溶液情報データベース構築へ向けた、「微生物を活用した化学物質溶液情報数値化法の開発」である。生物をデバイスとして、化学物質溶液情報を数値化する際に課題となるのは、

- (課題 1) 一定状態の微生物をどう準備するのか(再現性)
- (課題 2) 生き物からの信号出力をどう読み出すのか(可視化、数値化)
- (課題 3) 生き物の個体差による応答のばらつきをどう処理するのか(安定性)

などが挙げられる。我々は大腸菌の生物学的知見を参考にして、課題を解決した。課題 1 には培養操作を改良することで細胞状態の再現性を高め、課題 2 には大

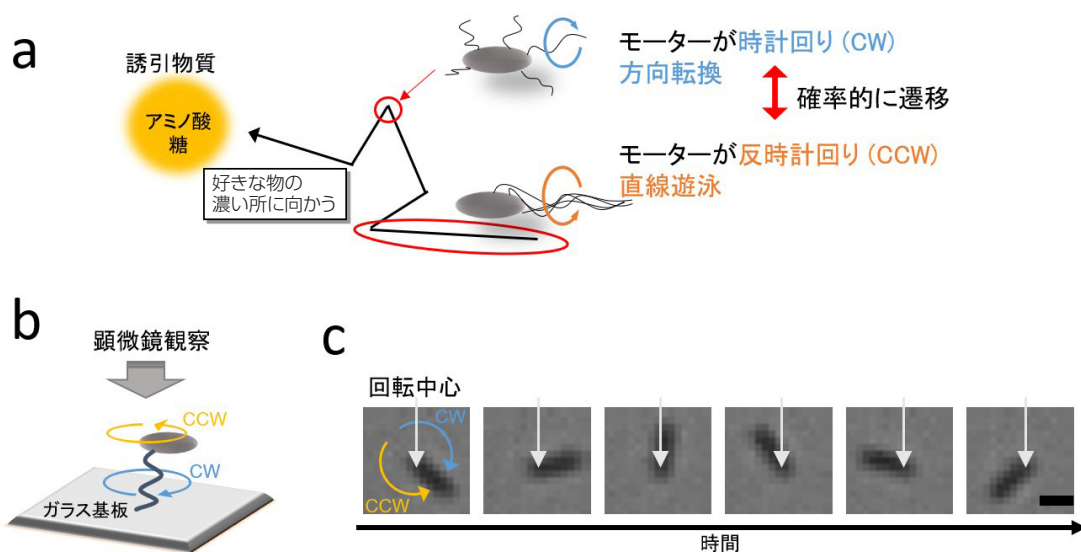


図 1 化学物質情報可視化のための生物学的基盤

(a) 大腸菌走化性応答模式図。べん毛を使って泳ぐ大腸菌細胞(〜数ミクロン)は、べん毛の根本にある回転モーターの回転方向を確率的に変えることで、誘引物質に向かって泳いで行く(忌避物質から逃げる)。また、定常的な環境(濃度勾配の無い状態)では、適応によりその環境に慣れる。(b) テザードアッセイの模式図。ガラス基板に吸着した細胞の回転方向を観察する。溶液交換することで細胞に化学物質刺激を与えることが可能になる。(c) 細胞の顕微鏡観察像(位相差像、スケールバー=1 μm)。数〜数十ヘルツで回転する細胞体の動きを高速カメラで記録する。画像解析により回転方向の時間変化を定量評価することで化学物質情報を可視(数値)化する。写真は1秒間の回転の様子。

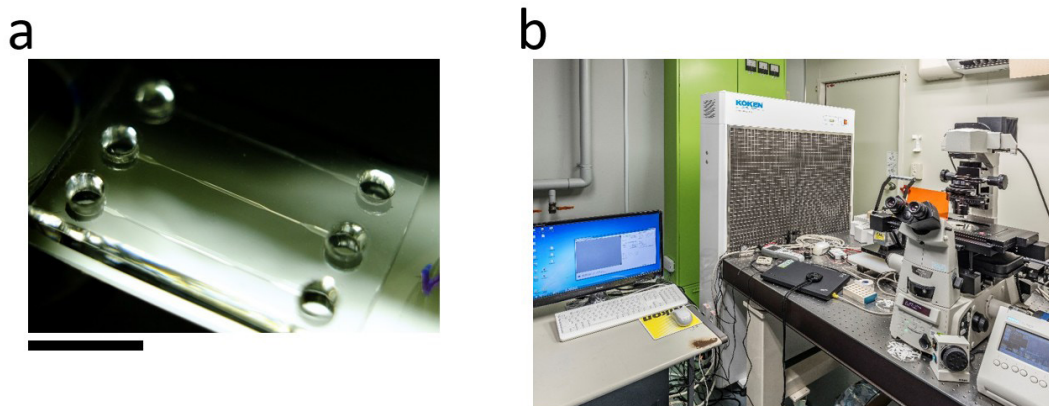


図2 走化性応答測定による化学物質情報の数値化

(a) 計測用チャンバ。自作PDMS マイクロ流路をカバーガラス (24 mm × 32 mm) に密着させチャンバを作製する (図は3本の流路、スケールバー=1 cm)。マイクロ流路の形状に工夫を加え流速を遅くすることで安定した計測を実現している [5]。  
(b) 計測システム (主に、顕微鏡、高速カメラ、コンピュータより構成される)。写真は研究開発用の顕微鏡であるが、現在小型簡易版を開発中。

腸菌走化性応答を顕微観察し動きの変化を画像解析で数値化し、課題3には細胞集団の運動を平均化することで個体差ばらつきを減らした安定出力を得た (手法1の開発)。大腸菌走化性応答とは、大腸菌細胞の化学物質に対する、“好き”・“嫌い”、“慣れる”、(誘引・忌避応答、適応) という水溶液中での応答である (図1 a)。大腸菌細胞は(環境)化学物質情報を泳ぐ様子に変換して信号出力するデバイスといえる。テザードアッセイ (大腸菌走化性応答の研究の1つの代表的手法 [4]) を利用し、泳ぐ様子の変化を数値化する (泳ぎを細胞体の回転動態として観察・定量する (図1 b、c)、観察時間10分間)。与える化学物質 (溶液) に応じて細胞体の回転方向が変化する (時計回り (CW) と反時計回り (CCW) の出現頻度が変化する) ことを利用し、化学物質 (溶液) 情報の数値化を実現した [5]。また、マイクロ流路を (図2 a) 利用することで、化学物質溶液交換時 (図2 b) の流速に影響を受けずに運動を観察できるようにする工夫も加えた。これらの工夫は、生き物を検出デバイスとして利用するうえで、検出器としての性能 (安定性) を確保する工夫と言える。この計測システムの開発により、大腸菌を検出器とした化学物質情報の数値化及び化学物質入力・応答出力データの大量取得を実現し、データベース構築を可能とした (手法2の構築)。データベース構築に際しては、識別目的に合わせた形で対象サンプルを設定する必要がある。ここでは、次節の統計処理で説明する“利き化学物質”の識別対象が設定されていることになる。

#### 4 ヒトに役立つ情報の抽出 (化学物質識別の統計処理・化学物質識別器としての利用)

データベース構築の次は、データベースを参照して、

微生物の化学物質認知からヒトに役立つ情報の抽出 (変換) 操作である。この操作には統計処理を利用する [6]。繰り返しになるが、バクテリア大腸菌は化学物質を検出して泳ぎの様子を変える。つまり、泳ぎの様子が変われば、そこに何らかの化学物質が存在していることはわかる (検出)。では、その化学物質は何なのか? 識別には困難が伴う。例えとして、“利き酒”のイメージが分かりやすいかもしれない。我々の化学物質識別では、概念的には、“化学物質の銘柄当て”を大腸菌と統計手法を使って実現しているイメージと言える。人間の行う“利き酒”ならぬ、大腸菌と統計手法を使った“利き化学物質”により、化学物質種を当てる (識別する) というわけである (図3)。“利き化学物質”の手順概要は、①ブラインド化学物質溶液を検出して、②出力応答を統計手法によりデータベースからマッチングを検索し、③要素のマッチングが最も高い化学物質種をブラインドサンプルの候補として推定することとなる (手法3の開発)。計測システムと統計解析手法を基盤とした、『微生物を用いた化学物質溶液の識別法 (デバイス)』と言える。“利き酒”に経験データが必要なように、“利き化学物質 (溶液)”にもデータベースが必要となる。前章で触れたように識別対象となる標準 (ラベル付けされた) サンプルを準備し、あらかじめデータベースを構築しておくことが前提とはなるが、基礎研究として、アミノ酸を標準サンプルとしてテストした結果、我々の手法がうまく機能し、アミノ酸を識別できることが分かった。識別の精度は、識別対象の組合せに依存するが、2種類のアミノ酸の組合せでは90%以上の正解率を示す組合せもある。識別精度の向上には、質の良いデータベース作成が要となるため、現在も改良を続けている。

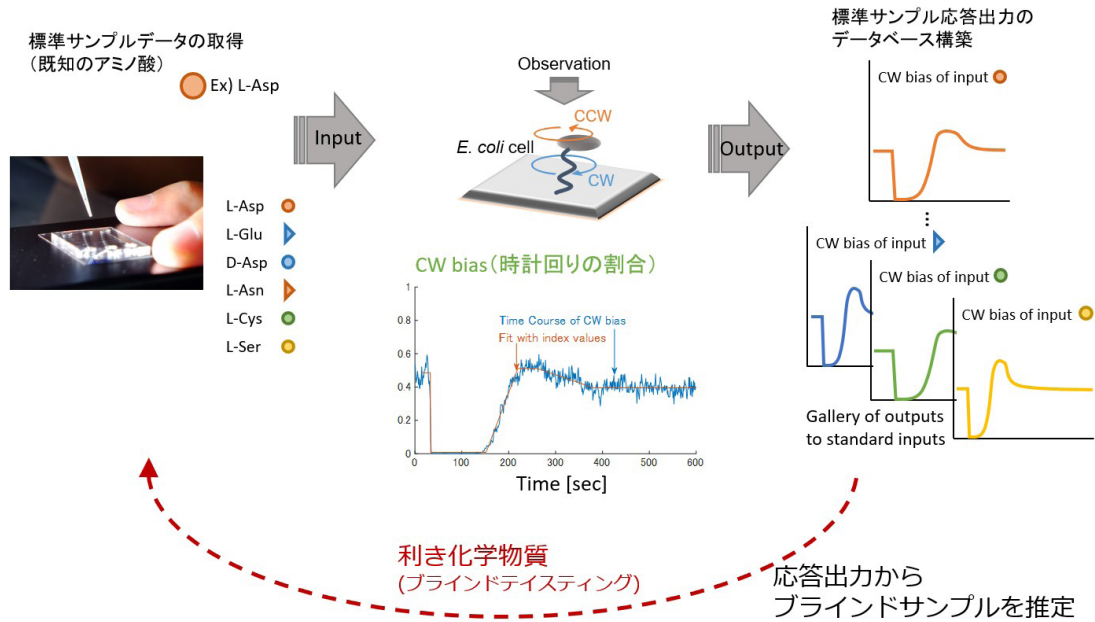


図3 バクテリア大腸菌を使った化学物質情報のデータベース構築と“利き化学物質”

識別対象となる標準（ラベル付けされた）サンプルを大腸菌に与え、10分間の応答出力を数値化したものが一つのデータとなる。化学物質種・濃度を変えた様々なサンプルの応答出力を集め、データベースを構築する。入力化学物質と応答出力の関係データベースを参照し、統計処理を使って、応答出力から入力化学物質を推定する関数を作成する。“利き化学物質”（化学物質の識別）では、化学物質種・濃度を隠した標準サンプルの一つを含む溶液（ブラインドサンプル）を準備し、その応答出力を取得する。応答出力から関数を使って、化学物質種を当てる（推定する）。

## 5 溶液“ラベル”評価の可能性（溶液サンプルの“ラベル”推定への利用）

化学物質溶液を評価・識別することは、現代社会において重要な事項である。河川水からの環境評価、尿や唾液からの健康状態評価、など様々な事例が考えられる。化学物質識別器としての利用だけでなく、生物を用いたデバイスを利用して、溶液評価（溶液サンプルの“ラベル”推定）できないか？ 現在、その可能性を検討中である。飲料であれば、“メーカー”、“味”、“効果”といったラベルを、また、尿や唾液であれば“疾患（予測）”、“健康状態”といったラベルを、溶液識別の手法を応用してできないか？ という取組である。前節までの、化学物質識別デバイスとしての利用は、“アミノ酸種（名）”というラベルを識別した例と言え、ここではそのラベルを識別目的に応じて変更することが狙いである。簡易試験として、メーカーの異なる飲料（市販の麦茶）を2種用意し、データベースを構築し、ブラインドサンプルからメーカー名を当てるテストを行った。プレリミナリではあるが、ほぼ確率1.0でブラインドサンプルのメーカー名を当てることが可能であった（組合せに依存するので、全てのメーカーを識別できるわけではない）。我々の微生物を利用したデバイスが、化学物質名という“ラベル”を識別するだけでなく、溶液の任意の“ラベル”を推定（評価）できる可能性を示す結果と言える。

## 6 おわりに

生き物を検出デバイスとして利用することにより、生物活性をフィルターとして化学物質の識別が可能であることを示した。ここで紹介した話題は、生き物の行動変化を“情報”とし、化学物質の識別や、ヒトへの影響予測の可能性を示した。我々の得意分野が生き物の動きの定量測定であったため、挙動を可視化情報としたまでである。この手法の可能性は、生き物の行動変化だけに縛られるものではなく、例えば、細胞の形状や密度、増殖速度と言った変化も“可視化情報”となり得る。必要なのは、検出用生物デバイスの応答変化を、ヒトの価値観へと変換するラベル付けである。生物活性フィルターを通した化学物質検出の将来像としては、味、毒性、熟成、腐敗など我々生き物が違いを感じる（検出する）化学物質（による効果）等の検出が期待される。我々の手法では、化学物質の元素組成や構造などの情報ではなく、化学物質の“生き物にとっての意味”という情報を処理していると言える。化学物質の“意味”の理解により、生き物から化学物質情報処理の手法を学ぶ。情報処理のバイオメテイクスという分野を切り拓く一助に貢献できればと期待している。

## 謝辞

本研究にあたり、統計処理に関して有益なご討論ご

助言を頂いた、NICT CiNet の成瀬康室長、梅原広明研究マネージャー、東京大学の岡田真人先生、また、大腸菌計測に関して有益なご討論ご助言を頂いた法政大学の川岸郁朗先生、曾和義幸先生に感謝の意を表す。また、本研究にあたり、研究室の各位には研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言を頂いた。ここに感謝の意を表す。

#### 【参考文献】

- 1 川岸 郁朗, 枝泰樹, 坂野聡美, 走化性シグナル伝達機構: タンパク質局在と相互作用を中心に, 物性研究, vol.85, no.5, pp.668-684, 2006.
- 2 Sourjik, V. & Wingreen, N. S., "Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis," Current opinion in cell biology, vol.24, pp.262-268, doi:10.1016/j.ceb.2011.11.008, 2012.
- 3 Berg, H. C. "E. coli in Motion," Springer-Verlag New York, Inc., 2004.
- 4 Block, S. M., Segall, J. E. & Berg, H. C. "Adaptation kinetics in bacterial chemotaxis," Journal of bacteriology, vol.154, pp.312-323, 1983.
- 5 田中裕人、小嶋寛明、富成征弘、田中秀吉、川岸郁朗、曾和義幸、特許第 6631771 号 微生物分析装置及び微生物分析方法
- 6 Bishop, C. M., "Pattern Recognition and Machine Learning (Information Science and Statistics)," Springer-Verlag New York, Inc., 2006.

#### 田中裕人 (たなか ひろと)

フロンティア創造総合研究室  
主任研究員  
博士(理学)  
生体デバイス、大腸菌走化性、機械学習、生体運動計測

#### 數田恭章 (かずた やすあき)

フロンティア創造総合研究室  
有期研究技術員  
博士(理学)  
大腸菌走化性、生体運動計測