

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660054

研究課題名(和文)環境微生物のシングルセルメタボローム解析方法の開発と応用

研究課題名(英文)The development and application of single-cell metabolic analytical techniques for environmental microbes

研究代表者

木原 久美子(kihara, kumiko)

東京工業大学・生命理工学研究科・産学官連携研究員

研究者番号：50622916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：環境中で微生物は種同士が混在しながら緊密な関係性を築いており、局所的な微小領域での物質を介した細胞間相互作用は、生態系の物質循環の基盤であり解明が期待されている。しかし、具体的な物質を微量で網羅的に観測する方法は確立されていない。本研究では、環境微生物の例としてシロアリ腸内微生物共生系を対象とし、共生原生生物1細胞でのメタボローム解析が可能となる手法の開発と、共生微生物の生産物質の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Environmental microbes have tight interaction between many species in regional small space and they produce metabolite and exchange it each other. That is the source of matter cycle in the ecosystem, therefore detection of slight and small amount of metabolite from environmental microbes is important issue. However there are not still enough techniques to detect metabolite comprehensively from environmental biological small amount sample. In our research, we used symbiotic microbes living in termite gut that is one of good example of complicated environmental microbe system and we tried to establish single-cell metabolic analytical techniques. We succeeded in detecting metabolite from small amount sample and single microbe cell. It will be helpful to unravel specific materials that may be related to develop symbiotic relationship in the ecosystem.

研究分野：共生進化、システム生物学

キーワード：シングルセル メタボローム 共生 原生生物 シロアリ

1. 研究開始当初の背景

環境微生物は、複数種の生物が混在する中で、種の特性を反映した生体物質を消費生産し、異種間でやり取りしている。例えば、サンゴや軟体動物と渦鞭毛虫、動物の腸内環境、バイオフィーム中の環境などの共生系では、局所的微小領域中で隣接する細胞間に複雑な種間関係性を維持している。

このような生態系では、混在する局所的微小領域の集合が生態環境を創り出す源になっていることから、各領域での現象観察や解析が環境微生物の生態進化的理解へつながる。特に、物質を介した相互作用は最も基本的な関係性であり、どの種の微生物がどの物質の生産消費に関わっているのかを明らかにする事は、微生物間相互作用の理解に直結する。

生物間相互作用を物質的側面から観測する手法として、細胞集団の核磁気共鳴法(NMR)を用いたメタボローム解析や2次元電気泳動によるプロテオーム解析の適用が考えられるが、これらの手法には十分なサンプル量が必要である上に、細胞個々の特性を無視した細胞集団全体としての解析しか出来ない。その欠点を克服する為には、シングルセルレベルでの解析手法の開発が必要である。メタボローム解析については、細胞が大きい神経細胞や藻類細胞の液胞等や、ごく一部の培養細胞に限ってシングルセルレベルでの観測が報告されている。

これに対し環境微生物は、異種の細胞や夾雑物が混在した状態で存在する上に、培養不能なものがほとんどであるため、大型の細胞や単一種から構成される培養細胞での先行研究をそのまま当てはめた方法によって状態を解析する事は難しい。環境微生物が生態系の中で果たす役割を解明する為には、汎用的な「シングルセルメタボローム解析手法の確立」が必要である。

2. 研究の目的

環境微生物は複数種が混在しており、局所的微小領域では特定の種が緊密な関係性を築いている事が多い。しかし微生物集団を集合体として解析する現行の方法では、微小領域の細胞間相互作用を観測する事は出来ない。そこで、本研究では局所的微小領域で環境微生物の相互作用の本体を担う物質を観察する為のシングルセルメタボローム解析手法を確立し、実際に環境微生物のメタボライトを測定することによって、環境中の微生物間相互作用を明らかにする事を目的とする。

本研究でシングルセルメタボローム解析結果が得られれば、シングルセルトランスク

リプトーム解析、シングルセルプロテオーム解析情報と、シングルセルメタボローム解析情報を合わせることで、シングルセルレベルで細胞の状態を記述でき、環境中の局所的な相互作用状態を明らかにできる可能性がある。このことは、環境微生物の生態進化を明らかにする上で最も基本的な相互作用物質本体を明らかにできるばかりでなく、将来的に望まれる統合シングルセルオミックス解析の布石となりうる。

3. 研究の方法

本研究では、数十ナノリットルでインジェクションできるキャピラリー電気泳動質量分析計(CE-MS)を使用することでシングルセルメタボロミクスが可能になると考えた。CE-MSメタボロミクスシステムは連携者・慶応義塾大学で実用化した技術で、イオン性化合物の分析に優れ、中心代謝系の代謝系をほぼ網羅して一度に500物質まで同時計測できる(Soga, et al. 2009)。イオン性以外の糖や脂質も高速液体クロマトグラフィー(LC-MS)で分析可能である。この計測システムを統合すれば、これまで未知であった環境微生物のメタボライトの特定が可能と考えられた。

測定方法の確立では、難易度の高い極小の生物ではなく、一般的な原生生物に近い大きさで代謝産物を十分含むサンプルを用いる必要がある。本研究では培養細胞ではなく環境微生物を用いて方法開発を行い、主にシロアリ腸内共生微生物群や特定の原生生物を対象とした。シロアリ腸内共生原生生物は多重共生体としても注目されており、その細胞表面や細胞内にはバクテリアやスピロヘータが複数種共生している点で、シングルセルレベルでの状態解析が望まれており、本研究の対象として望ましいと考えられた。

対象とするサンプル(ごく少量の微生物群や1細胞)から代謝産物を抽出し、キャピラリー電気泳動質量分析計(CE-MS)によってイオン性化合物の計測を、高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)によって非イオン性化合物の計測を行い、それぞれのステップでプロトコルを確立し、最良の条件を求めた。シングルセルメタボローム解析手法の確立と併せて、環境微生物の実際の代謝産物状態を解析した。

4. 研究成果

イオン性化合物はCE-MS、非イオン性化合物はLC-MSを用いた測定と条件検討を行った。

CE-MSを使用したシングルセルメタボロームの簡易的な測定では、シングルセルでの測定は無謀ではないかという当初の予想を裏返す良い結果が得られ、シングルセルでも

メタボローム解析が可能である事が明らかとなった。

環境微生物の例として、シロアリ腸内に共生する原生生物で検討を行ったところ、マイクロマニピュレーションで取得した原生生物1匹のメタボローム解析から、20種類のアミノ酸を含む約70種類以上のメタボライトの検出に成功した。さらに、抽出法やインジェクションシステムを改良する事で、検出感度を上げてより多くの物質の計測が可能であることからこの検討を進めた。多変量解析により種ごとや共生体の有無の違いによる代謝プロファイルを分析することによる、共生関係の状態を局所的微小領域ごとに観察する事を目的としている。

複数のシングルセルでの測定情報は、細胞ごとの個性、細胞集団内に存在するばらつきを表す事になる事から、細胞集団内の遺伝子発現レベルでのばらつきは代謝産物のばらつきとどのような関係があるのかといった問題に答える事が可能となる事から、現在測定結果の解析をすすめている。

本研究では、これまで一定サイズ以上の集団として観察せざるを得なかった局所的微小領域における個々の細胞の振る舞いを、物質の動きまで含めて包括的に眺め渡す事が可能となる足がかりを築いた。その一方で現状では、同一のシングルセルから同時に遺伝子発現情報と代謝産物情報を抽出する事は出来ないため、そのような実験・解析方法の開発は次の研究課題として取り組む事を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Gaku Tokuda, Yuuri Tsuboi, Kumiko Kihara, Seikou Saitoh, Shigeharu Moriya, Nathan Lo and Jun Kikuchi, Metabolomic profiling of ¹³C-labelled cellulose digestion in a lower termite: insights into gut symbiont function, Proc. R. Soc. B, 査読有, 281, 1789, 2014, doi:10.1098/rspb.2014.0990

Tomoyuki Sato, Hirokazu Kuwahara, Kazuma Fujita, Satoko Noda, Kumiko Kihara, Akinori Yamada, Moriya Ohkuma and Yuichi Hongoh, Intranuclear verrucomicrobial symbionts and evidence of lateral gene transfer to the host protist in the termite gut, The ISME Journal, 査読有, 8, 2014, 1008-1019, doi:10.1038/ismej.2013.222

Paul Guichard, Virginie Hachet,

Norbert Majubu, Aitana Neves, Davide Demurtas, Natacha Olieric, Isavelle Fluckiger, Akinori Yamada, Kumiko Kihara, Yuichiro Nishida, Shigeharu Moriya, Michel O. Steinmetz, Yuichi Hongoh and Pierre Gonczy, Native Architecture of the Centriole Proximal Region Reveals Features Underlying Its 9-Fold Radial Symmetry, Current Biology, 査読有, 23, 2013, 1-9, http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.06.061

〔学会発表〕(計13件)

木原久美子、山田明德、Nathan Lo、本郷裕一、運動共生系の共生体のゲノム解析: *Mixotricha paradoxa* の細胞表面共生バクテロイデスを対象として、環境微生物系合同大会 2014、2014年10月21~24日、アクトシティ浜松(静岡県)

伊澤和輝、桑原宏和、木原久美子、雪真弘、Nathan Lo、伊藤武彦、大熊盛也、本郷裕一、新規 *Elusimicrobia* 門細胞内共生細菌のドラフトゲノム配列取得と比較解析、環境微生物系合同大会 2014、2014年10月21~24日、アクトシティ浜松(静岡県)

木原久美子、中西裕美子、Nathan Lo、本郷裕一、福田真嗣、守屋繁春、原生生物1細胞のメタボロミクス解析の現状~シロアリ腸内共生原生生物を例に~、第3回マトリョーシカ型生物学研究会、2014年7月11~13日、神戸大学(兵庫県)

Paul Guichard, Virginie Hachet, Norbert Majubu, Aitana Neves, Davide Demurtas, Natacha Olieric, Isabelle Fluckiger, Akinori Yamada, Kumiko Kihara, Michel Steinmetz, Yuichi Hongoh, Pierre Gonczy, Native Architecture of the Centriole Proximal Region Reveals Features Underlying Its 9-Fold Radial Symmetry, FEBS-EMBO 2014, August 30 - September 4th, France (Paris)

木原久美子、シロアリ腸内共生系のシングルセル解析、新学術領域研究 植物細胞壁の情報処理システムシンポジウム 寄生共生インシデント・異種生物共存の現場で何が起きているか、2014年4月28日、東京大学(東京都)

木原久美子、観光客と地元住民と研究者の三者協同による研究とアウトリーチの相乗の共益産出ロールモデルの確立、亜熱帯性動植物に関する調査研究・技術開発研究会、2013年12月18~19日、沖縄男女共同参画センター(沖縄県)

木原久美子、原生生物をシングルセルで解析する意味と手法について、第 46 回日本原生動物学会大会、広島 2013 年 11 月 8～10 日、広島大学（広島県）

木原久美子、山田明德、吉村剛、木材への腐朽菌侵入とシロアリ侵入の関係、平成 25 年度京大生生存圏研究所・DOL/LSF 共同利用研究成果発表会、2014 年 2 月 18 日、京都大学（京都府）

徳田岳、坪井裕理、木原久美子、斎藤星耕、守屋繁春、菊地淳、オオシロアリのセルロース消化共生系における代謝物の動態、第 29 回日本微生物生態学会大会、2013 年 11 月 23～25 日、鹿児島大学（鹿児島県）

木原久美子、中西裕美子、Nathan Lo、本郷裕一、福田真嗣、守屋繁春、環境微生物の代謝産物をシングルセルで観察できるか～ムカシシロアリの腸内共生原生生物ミクソトリカを例に～、第 29 回日本微生物生態学会大会、2013 年 11 月 23～25 日、鹿児島大学（鹿児島県）

木原久美子、山田明德、本郷裕一、守屋繁春、シロアリ腸内原生生物 *Trichonympha agilis* のシングルセルトランスクリプトーム解析の速報、第 2 回マトリョーシカ型生物学研究会、2013 年 7 月 24～26 日、ホテル京都ガーデンパレス（京都府）

山田明德、樋口真士、Warin Booriam、木原久美子、本郷裕一、シロアリによる木材劣化の時空間パターンから見えてくる潜在的害虫種～熱帯林における倒木の分解とシロアリ相との関係から～、第 29 回日本木材保存協会年次大会、2013 年 5 月 28～29 日、メルパルク東京（東京都）

木原久美子、山田明德、池原研、藤田一磨、木村信博、五十嵐敬幸、守屋繁春、本郷裕一、シロアリが丸太材へ侵入・定着する過程の CT スキャンを用いた非破壊的観察、第 29 回日本木材保存協会年次大会、2013 年 5 月 28～29 日、メルパルク東京（東京都）

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕

<執筆記事等>

木原久美子；微生物の共存・共生と相互作用 環境中の共生系をシングルセルで観察する意義～シロアリ共生系を例に～；日本乳酸菌学会誌、査読無、2013、24、42-42

木原久美子、研究トピックス シロアリ界のゆるキャラ、機関誌しるあり、査読無、160、2013、37-40

<アウトリーチ活動>

早川昌志、木原久美子；マトリョーシカフェ 12；自作スマホ顕微鏡で”微生物”を撮ろう！～マトリョーシカ生物の不思議～；東京都；2015 年 3 月 6 日

木原久美子；クラブ未来館；日本科学未来館；おとなのためのシロアリ解剖観察 ヒトにとっての害虫は、地球にとっての益虫？；東京都；2015 年 2 月 11 日

木原久美子；横浜市立幸ヶ谷小学校・6 年生課外授業；研究者という職業；神奈川県；2015 年 1 月 17 日

松崎素道、木原久美子；マトリョーシカフェ 11；貝の中で暮らすマトリョーシカ生物；東京都；2015 年 1 月 31 日

松崎素道、木原久美子；マトリョーシカフェ 10；貝の中で暮らすマトリョーシカ生物；東京都；2015 年 1 月 30 日

金子修、木原久美子；マトリョーシカフェ 09；赤血球をイボイボするマトリョーシカ生物 ～マラリア原虫～；長崎県；2014 年 5 月 24 日

金子修、木原久美子；マトリョーシカフェ 08；赤血球をイボイボするマトリョーシカ生物 ～マラリア原虫～；長崎県；2014 年 5 月 23 日

永井宏樹、木原久美子；マトリョーシカフェ 07；ばいきんまんの毒針；大阪；2013 年 7 月 26 日

永井宏樹、木原久美子；マトリョーシカフェ 06；ばいきんまんの毒針；大阪；2013 年 7 月 27 日

原清敬、木原久美子；マトリョーシカフェ 05；マトリョーシカのカラクリ工作；大阪；2014 年 3 月 2 日

木原久美子；第 16 回日本ジャンボリー / 第 30 回アジア太平洋地域ジャンボリー；シティーオブサイエンス；シロアリと考える環境とエネルギー；山口；2013 年 8 月 3 日～4 日

早川昌志、木原久美子；マトリョーシカフェ 04；プレデター vs マトリョーシカ 弱肉強食から共生へ；京都；2013 年 7 月 27 日

洲崎敏伸、木原久美子；マトリョーシカフェ 03；クロレラと生きる動物たち；京都；2013 年 7 月 26 日

本郷裕一、木原久美子ら；清水小学校 3 年生(東京都大田区)・課外授業；2013 年 7

月3日

木原久美子；水と森のエコプロジェクト・みんなでモリモリサイエンス@西阿木名中学校(徳之島)・1-3年生課外授業；2013年5月14日

木原久美子；水と森のエコプロジェクト・みんなでモリモリサイエンス@西阿木名小学校(徳之島)・1-6年生課外授業；2013年5月14日

木原久美子；水と森のエコプロジェクト・みんなでモリモリサイエンス@伊仙中学校(徳之島)・3年生課外授業；2013年5月14日

木原久美子；水と森のエコプロジェクト・みんなでモリモリサイエンス@わくわくクラブ・ほーらい館(徳之島)；2013年5月13日

木原久美子；水と森のエコプロジェクト・みんなでモリモリサイエンス@伊仙小学校(徳之島)・5-6年生課外授業；2013年5月13日

木原久美子；水と森のエコプロジェクト・みんなでモリモリサイエンス@伊仙小学校(徳之島)・3-4年生課外授業；2013年5月13日

㉑ 木原久美子；水と森のエコプロジェクト・みんなでモリモリサイエンス@沖縄こどもの国(沖縄)・ワンダーミュージアム(沖縄)；2013年5月5日

㉒ 木原久美子；水と森のエコプロジェクト・みんなでモリモリサイエンス@浦添大公園(沖縄)；2013年5月4日

㉓ 木原久美子；水と森のエコプロジェクト・みんなでモリモリサイエンス@浦添大公園(沖縄)；2013年4月20日

㉔ 木原久美子；水と森のエコプロジェクト・みんなでモリモリサイエンス@沖縄こどもの国・ワンダーミュージアム(沖縄)；2013年4月6日～7日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木原 久美子 (KIHARA, Kumiko)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
産学官連携研究員
研究者番号：50622916

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

守屋 繁春 (MORIYA, Shigeharu)
理化学研究所・基幹研究所・専任研究員
研究者番号：00321828

中西 裕美子 (NAKANISHI, Yumiko)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・
研究員

研究者番号：10614274

福田 真嗣 (FUKUDA, Shinji)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特
任准教授

研究者番号：80435677