

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K04843

研究課題名(和文) マイクロ流体ロボティクスで可視化して解明する微生物のin-situ増殖動態

研究課題名(英文) Bacterial foraging under turbulent mixing

研究代表者

八幡 穰 (Yawata, Yutaka)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：10586457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の活発な遊泳行動は、海や湖、あるいは工業プラントなどの水圏環境において、餌となる有機物を得るのに役立っていると考えられている。乱流は微生物と餌との出会いに様々な影響を与えると予想されてきたが、乱流により複雑に運動する水の中で微生物と餌とが出会う様子を観察することはこれまで技術的に難しく、乱流は遊泳微生物による栄養獲得にプラスの影響を与えているのか、あるいはマイナスの影響を与えているのかについて、実証的な知見が存在しなかった。本研究では、新たに開発したマイクロ流体ロボティクス技術により、こうした乱流のなかでの微生物と餌との相互作用を直接可視化することに成功して分析すること成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、海洋など水圏において微生物が媒介する炭素化合物循環に乱流が影響を与えていることを示す証拠となる。また工業プラントにおける適切な攪拌についても新たな知見を提供する。例として、適切な強度の乱流は遊泳微生物の餌との会合確率を高める一方で、強すぎる、あるいは弱すぎる強度の乱流はマイナスの影響を与えることが明らかになった。また、餌(溶存態有機物)の塊が乱流によって引き延ばされる現象と、遊泳微生物が群がる様子をリアルタイムで可視化することができるマイクロ流体ロボティクス装置は、今後の実現場・実環境における微生物動態解明の基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Turbulent mixing in the marine environment stretches millimeter-scale patches of dissolved organic matter (DOM) into tangled webs of ephemeral thin filaments, fundamentally altering nutrient landscapes for motile marine bacteria that exploit DOM by chemotaxis. Here, using a novel milli-fluidic experimental arena in which a robotic arm reproducibly stirs a patch of polypeptide into filaments with a chaotic pattern akin to turbulent mixing, we have directly visualized bacterial interaction with the temporally evolving nutrient landscape and analyzed its effect on nutrient exploitation by bacteria. By performing experiments in conditions representing a range of turbulent intensities occurring in the natural environment, we found that chemotaxis enables bacteria to exploit DOM patches even under turbulence. This study provides the first imaging-based insight for bacterial foraging under the turbulent conditions that characterize many microbial habitats.

研究分野：微生物生態学

キーワード：微生物生態学 ロボティクス マイクロ流体工学 運動性 走化性 ビデオ顕微鏡 乱流 拡散

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コップの水は静かに対流しているが、海洋などの水圏環境では、水は激しく動き、渦を巻いている (=乱流)。海洋だけでなく湖沼や産業用リアクターなどでもこうした乱流は普遍的に見られる特徴であり、環境上また産業上重要な様々な微生物が乱流の中で生息している。こうした乱流は、特に運動性を持つ微生物の栄養獲得と増殖に複雑な影響を与えると予測されているものの、乱流が環境微生物の増殖を促進しているのか、それとも抑制しているのかについて、実証的な研究は殆ど存在しない。その理由として、乱流を作り出すには水を激しく動かさなければならないが、激しく動く水の中で、顕微鏡スケールの微生物を直接観察することは至難の業である、という根本的な技術的ジレンマがあった。

水圏微生物の栄養は、溶存態の有機物(DOM)である。多くの環境で DOM の分布は均一ではなく、まだら状に分布している。自然環境では、こうしたミリメートルサイズの DOM ホットスポットは、植物プランクトンや動物プランクトンから数多く放出されるほか、それらの死骸を機転として発生する。DOM が豊富な環境に住む微生物の多くは、多くが活発な運動性と、鋭敏な嗅覚 (走化性) を持っており、DOM ホットスポット=餌場の周囲に発生する化学濃度勾配をたどって、増殖に適した環境へと自らを誘導することができる。乱流は、こうした DOM を探し求める行動に複雑な影響を与えると考えられている。Taylor と Stocker は、ある程度の乱流は DOM ホットスポット周囲の化学濃度勾配を強め、微生物にとって見つけやすくするが、一方で強すぎる乱流は微生物が DOM と相互作用する時間を奪うと DNS(数値シミュレーション)から予測している (JR Taylor and R Stocker, 2012, Science)。

コーヒーにミルクを垂らした様子の 3 次元版を想像されたい。乱流は DOM のホットスポットをミリメートル以下の幅のリボン状に引き延ばし、長く絡まった編み目のように変形させる。DOM のホットスポットの周囲は、分子拡散により“にじんで”おり、化学勾配が存在している。微生物はこの化学勾配を手がかりに DOM ホットスポットに中心に向かうが、分子拡散が進んで化学勾配がゆるむと、微生物は (分子ノイズ効果により) 化学勾配をたどることができなくなる (Brumley et al., 2019, PNAS)。乱流 (流速の歪み) による引き延ばし変形は、拡散にあらがってこの化学勾配を引き締め、微生物がセンシング可能な時間を延長する。一方で、引き延ばしが進み、およそ 0.1mm 程度の幅 (Batchelor scale) になると、拡散の影響により化学勾配は存在できなくなり、微生物にとっても“見えなく”なる。しかし、こうした乱流の影響下において、実際に微生物が走化性行動を發揮しているのか、また微生物の増殖を促進するような乱流の強度は

存在するのといった点については、実際の観察に即した知見は存在しなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、顕微鏡のステージ上に乱流の存在する環境を再現良く作り出す方法を開発し、この”マイクロ流体ロボティクス装置”を用いることで乱流が微生物の採餌行動に与える影響を実証的に分析することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、新たにロボティクス技術を用いることで、水圏で起こっている“餌の引き伸ばし現象”を再現した。新しく開発した装置は (Fig. 1)、静止した細胞懸濁液中に直径 1-6 mm 程度の溶存態有機物のホットスポットを注入し、これをロボットアームが保持するガラス製の攪拌棒で一定のパターン(8の字を90度ずらして2個重ねたパターン、この全体が一サイクルごとに公転する)で引き伸ばす。この攪拌棒は注入ノズルを兼ねており、レーザー加工によりガラスキャピラリ側面に開口部を精密加工する方法を開発し、製作した。部品は3DCADソフトウェアで設計し、部品の製作には3Dプリンタ、レーザー加工機、3次元切削器を用いた。ロボットアームの動作速度を変えることで、エネルギー投入量、端的には異なる激しさの乱流を再現することができる。ロボットアームの動作はXとYそれぞれを担当するリニアアクチュエータにより動作する。攪拌棒の軌道は極座標を直交座標に変換する一連の計算と、座標系の回転に関する計算をリアルタイムで実行するプログラムにより制御されており、移動速度は座標間の微小移動の待ち時間を制御することで行われる。

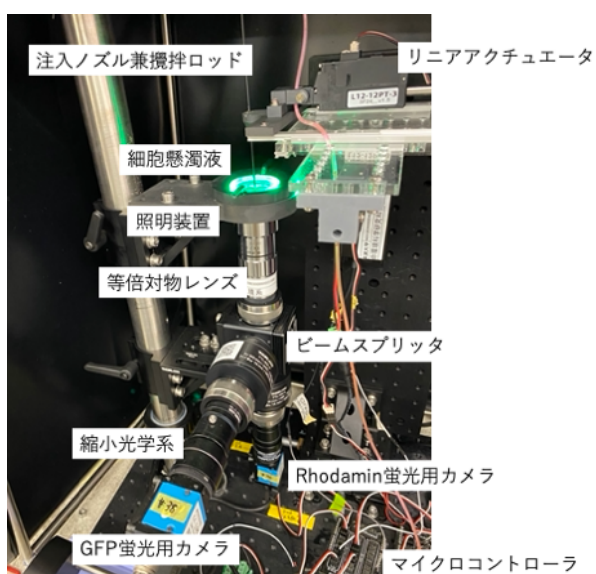


Fig. 1 マイクロ流体ロボティクス装置。全体は暗環境に置かれる。注入ノズルはシリンジポンプに接続される。カメラとマイクロコントローラは制御/記録用 PC に接続される。

こうした中で引き伸ばされる DOM と、これに群がる微生物の分布を蛍光顕微鏡により記録した。攪拌は直径 30mm の範囲でおこなうが、これを通常の顕微鏡光学系で捉えることは難しい。そこで縮小顕微鏡光学系を作成することで、これを解決した。また、

新たにビームスプリッター光学系を導入することで、餌の分布と微生物の分布を同時に取得し、これを比較することを可能にした。これらの一連のロボットアームの動作と、カメラのトリガー、LED 照明装置は同期しており、その同期信号送出には Arduino 言語で作成したプログラムと Arduino マイクロコントローラーを使用している。モデル微生物として海洋細菌 *Vibrio ordarii* を用い、 10^4 倍の範囲の動作速度で、モデル DOM(トリプトン)に対する採餌行動を記録した。

4. 研究の成果

マイクロ流体ロボティクス装置は Exponential decay を再現する

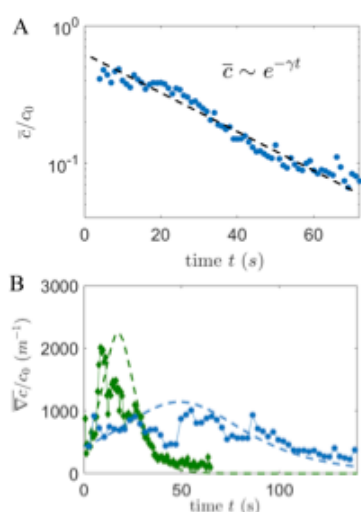


Fig. 2 A フィラメント内の平均栄養濃度の経時変化（青実測値、点線 予測値）。**B** フィラメント内の平均濃度勾配の時間変化（緑 攪拌速度 12 mm/sec, 攪拌速度青 3 mm/sec）。データ解析: Tanguy Le Borgne (国際共同研究、レンヌ第一大学)。

水圏における乱流による DOM ホットスポットの引き延ばし現象では、平均栄養濃度が指数的に減衰する Exponential Decay が起こると考えられている。Fig.2A は画像解析により得たフィラメント内の平均栄養濃度の経時変化の実測値と予測値であり、この予測モデルと良く一致する。また、引き延ばし現象は DOM ホットスポットの周縁に発生する濃度勾配を強化すると予測されている。Fig.2B は、特に攪拌速度が高い場合には、予測通り一時的に濃度勾配が強化されることを示している。これらの結果は、マイクロ流体ロボティクスによって作り出された DOM ホットスポットの引き延ばしが、自然界で起こるものの重要な特徴を再現していることを示している。

微生物は乱流下でも走化性を発揮する

水圏において、微生物の走化性が炭素化合物の循環を促進する重要な役割を果たす可能性はかねて指摘されてきたが、流速が複雑に分布する実環境中で有効な走化性行動が可能であることを示す直接的な証拠はこれまでなかった。Fig. 3 は、マイクロ流体ロボティクス装置によって微生物の分布と DOM の分布を可視化したものである。赤でしめした DOM の中央部分に、時間と共に微生物が集合することが示されている。この結果

から、微生物が確かに DOM の引き延ばしが動的に起こる環境においても、走化性を発揮して採餌することが確かめられた。

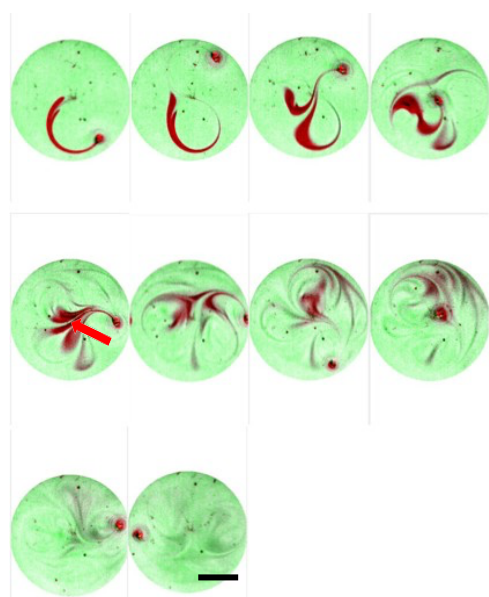


Fig. 3 微生物の分布（緑—黒のカラーマップ）と餌（溶存態有機物：赤のカラーマップ）の経時的可視化。餌が引き伸ばされると共に、引き伸ばされた餌の中心部分(赤矢印)に黒い部分（微生物の濃度が高まった領域）が出現する。時間は左上から右下に進む。スケールバーは10 mmを示す。

中強度の乱流は走化性の発揮を促進する

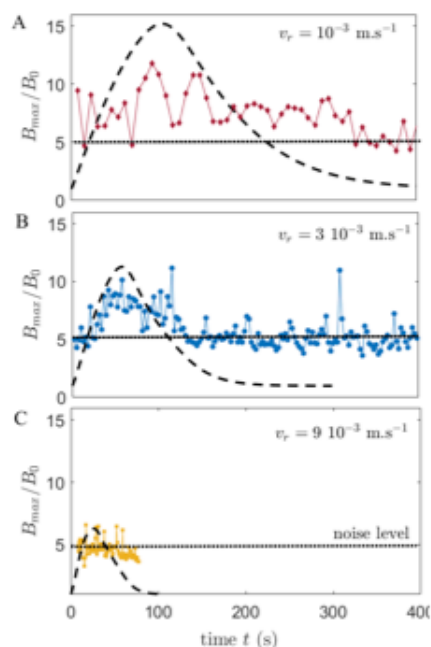


Fig. 4 微生物の比空間密度の時間変化。それぞれ **A** 低い、**B** 中程度、**C** 高いエネルギー投入量の場合を示す。点線は理論値。データ解析: Tanguy Le Borgne (国際共同研究、レンヌ第一大学)。

様々なエネルギー投入量（乱流の程度、攪拌棒の速度）の場合で微生物の DOM への集合の程度を比較した(Fig. 4)。その結果は、中程度の場合に、最も強い集合が見られることを示している。

まとめと将来展望

本研究の結果から、運動性と走化性が自然環境に見られる乱流の中でもDOMの獲得に貢献することが確かめられた。中程度の乱流が微生物の運動性によるDOM獲得を促進することを示す結果は、例えばリアクター内における攪拌のためのエネルギー投入の最適値を考える上で、新しい知見をもたらす。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yutaka Yawata, Tanguy Le Borgne, Douglas R Brumley, Roman Stocker
2. 発表標題 Experimental evidence of bacterial foraging under turbulent mixing
3. 学会等名 International Society of Microbial Ecology 18th Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八幡 穰
2. 発表標題 日本微生物生態学会奨励賞 受賞講演 「様々な時間軸と微生物の行動生態」
3. 学会等名 日本微生物生態学会奨励賞（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡 穰
2. 発表標題 微生物の行動生態学 とライブ可視化技術
3. 学会等名 新学術領域研究「超地球生命体を解き明かすポストコッホ機能生態学」第1回公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原克樹、Zhang Yiyun, 平山智宏、高部響介、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

1. 発表者名 八幡 穰
2. 発表標題 微生物の行動生態学 とライブ可視化技術
3. 学会等名 新学術領域研究 超地球生命体を解き明かすポストコッホ機能生態学 第1回 公開シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八幡 穰
2. 発表標題 微生物の行動生態学 とライブ可視化技術
3. 学会等名 マリンバイオテクノロジー学会 若手の会 「秋のシンポジウム」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yutaka Yawata
2. 発表標題 Single-Cell Innate Fluorescence Analysis by Confocal Microspectroscopy
3. 学会等名 TSB2019(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaka Yawata
2. 発表標題 Single-Cell Innate Fluorescence Analysis by Confocal Microspectroscopy
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第62回シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八幡 穰
2. 発表標題 CRIF: 一細胞自家蛍光解析の新展開
3. 学会等名 微生物ウィーク2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八幡穰
2. 発表標題 マイクロ流体テクノロジー、ロボティクス、非破壊細胞分析の統合: 1細胞解像度のライブ生態学に向けて
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八幡 穰
2. 発表標題 マイクロ流体テクノロジー、ロボティクス、低侵襲細胞イメージング評価技術の融合
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

八幡穰研究室 https://yawatalab.jp 筑波大学HP https://www.tsukuba.ac.jp/notes/119/index.html
--

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			
スイス	ETH Zurich			
フランス	レンヌ第一大学			
オーストラリア	メルボルン工科大学			