

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05170

研究課題名(和文)人工的な複合微生物反応場の構築と難培養性微生物の取得

研究課題名(英文) Development of artificial microbial complex and its application to the cultivation of unculturable microbes

研究代表者

尾島 由紘(Ojima, Yoshihiro)

大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：20546957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ポリオール添加により大腸菌のフロック形成が促進する機構の解明と、フロックを足場とした複合微生物化ならびに難培養性微生物の可培養化を目的として検討した。促進機構に関しては、培地の粘度変化や忌避応答は関与せず、ポリオール添加により外膜小胞の生産が増加し、フロック内の生細胞数が大きく減少することから、膜ストレスを介して細胞に損傷が与えられ促進すると結論付けた。さらに、フロック構造を強化する*Bacillus licheniformis* RK14株や蘇生因子を産生する*Micrococcus luteus*との複合微生物化に成功したが、共培養により難培養性微生物を取得することはできず課題として残った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ポリオール類の添加が大腸菌の細胞に物理的なダメージを与え、外膜小胞と呼ばれる細胞外小胞の生産促進を介して、フロック形成を促進させることを明らかにした。ポリオールが外膜小胞現象を介してフロック形成に関連することを明らかにしたのは本研究が初めてであり、学術的に意義があるものである。また、難培養性微生物の可培養化は達成できなかったが、複合微生物化によりフロック構造の強化や機能化に成功した。このようなボトムアップアプローチにより、微生物複合系を構築する内容はこれまでに例が少ないことから、微生物が関与する分野・産業への波及効果は大きく、得られた研究成果の社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, the mechanism of enhanced floc formation of *Escherichia coli* by polyols was elucidated and floc formation was applied to culture unculturable bacteria. Floc formation was not promoted by increasing the medium viscosity with glycerol addition. However, the addition of ethylene glycol also significantly promoted floc formation. The addition of short-chain polyols decreased the number of viable *degP* cells in the floc structure and enhanced outer membrane vesicle (OMV) production by *degP* cells; polyols-induced damage to the outer membrane in *degP* cells may contribute to the promoted floc formation. As for the culturing of unculturable bacteria, *Bacillus licheniformis* RK14 or *Micrococcus luteus* was cocultured with *E. coli* to function the floc. However, it failed to culture the unculturable bacteria derived from activated sludge using functionalized *E. coli* flocs. A further trial is required for the culturing of unculturable bacteria.

研究分野：細胞工学

キーワード：大腸菌 フロック グリセロール ポリオール *degP* OMV 難培養性微生物 複合微生物化

1. 研究開始当初の背景

微生物凝集体であるフロックは、活性汚泥法による水処理技術において、産業的に利用されてきた。フロック形成能力は活性汚泥の性質を左右するが、その自己凝集メカニズムは明らかとなっていない点が多い。またフロック形成能力は、活性汚泥等から単離された特殊な環境微生物に限られ、発酵生産で用いられる工業生産菌に関しては、一部の酵母を除きほとんど報告がない。一方で大腸菌はアミノ酸や組換えタンパク質生産の宿主として広く利用され、遺伝子組換えおよび培養工学技術が最も進んだ微生物の1つである。大腸菌のフロック形成を誘導する技術としては、カチオン性のポリマーや、ポリ塩化アルミニウムなどの凝集剤が利用されるが、菌体生存率を著しく低下させ、人体にも有害なものが多く、不要な微生物の回収・除去を目的とするものである。

研究代表者はこれまでに、大腸菌のセルロース合成関連遺伝子 *bcsB* を過剰発現する、もしくは、ペリプラズムプロテアーゼをコードする *degP* 遺伝子を欠損すると、グルコース存在下の懸濁培養において、図1に示すような直径数 mm 程度の大腸菌の自発的なフロックを形成することを発見した。同時に、自発的なフロック形成には大腸菌の細胞外小胞の産生促進が深く関連していることも明らかにした。その後の研究成果で、大腸菌フロックはタンパク質性であり、主構成タンパク質である Tsf に目的タンパク質を融合させることで、フロックの基盤構造体に組換えタンパク質を固相分泌可能であること、培地中へのグリセロールなどのポリオール添加でフロック形成が著しく促進することも実証している。フロック利用はこれまで活性汚泥法による廃水処理などに限定されていたが、以上の先行的研究成果を受けて、人工的な機能改変により微生物反応場として幅広い目的で応用できる可能性が見えてきた。

そこで本研究では、ポリオール添加によってフロック形成が促進するという新たな結果に基づき、大腸菌の自発的なフロック形成機構の更なる解明を行うことと、フロックの人工的な機能化に基づき複合微生物反応場を構築することで、最終的に難培養性微生物の共生培養による取得を目指す。

2. 研究の目的

本研究課題では、代表者が世界に先駆けて発見した現象である大腸菌の自己集合体(フロック)形成に関して、これまで明らかにしてきた知見を基に、さらなるフロック形成機構の解明と機能化による複合微生物化を通じて、人工的な微生物反応場の構築を提案する。具体的には、グリセロールなどポリオールの添加によるフロック形成機構の解明、フロックの複合微生物化による難培養性微生物の共生と取得、の項目について検討する。フロック形成機構については、これまで外膜小胞と呼ばれる大腸菌の細胞外小胞の産生促進がトリガーとなることを報告してきたが、最新の研究成果でグリセロールなどのポリオールを培地中

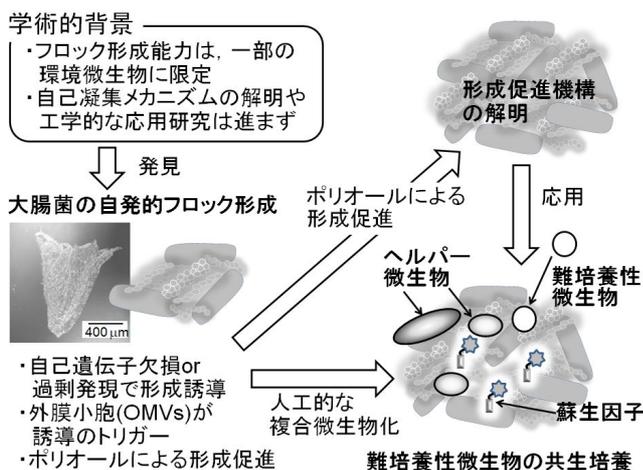


図1 大腸菌フロックの形成機構の解明ならびに複合微生物化による難培養微生物の取得

も実証している。フロック利用はこれまで活性汚泥法による廃水処理などに限定されていたが、以上の先行的研究成果を受けて、人工的な機能改変により微生物反応場として幅広い目的で応用できる可能性が見えてきた。

そこで本研究では、ポリオール添加によってフロック形成が促進するという新たな結果に基づき、大腸菌の自発的なフロック形成機構の更なる解明を行うことと、フロックの人工的な機能化に基づき複合微生物反応場を構築することで、最終的に難培養性微生物の共生培養による取得を目指す。

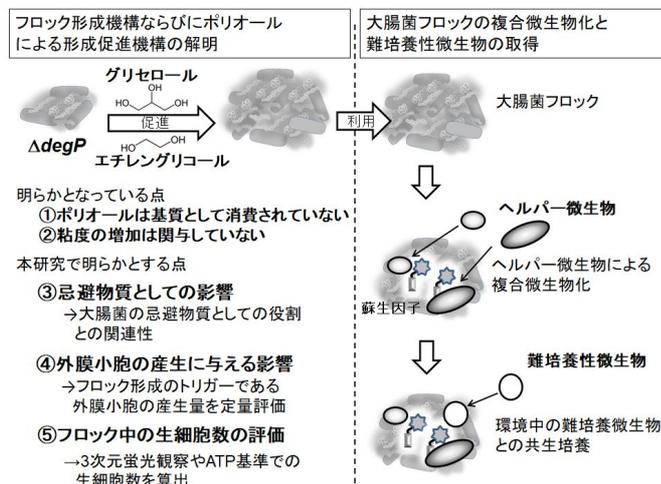


図2 本研究の目的および流れ

に添加した場合だけ、劇的な形成促進が確認されたため、形成機構との関連性について明らかにする。また、フロック表面上に組換えタンパク質を提示する技術や他種の微生物を共培養する手法を開発してきた。そこで、ヘルパー微生物と呼ばれる蘇生因子を産生する微生物を大腸菌フロック上で共培養し、環境中の難培養微生物との共生を可能にすることで取得し、環境中に眠る微生物資源の有効活用ツールを開発する。

3. 研究の方法

(1) フロック形成機構ならびにポリオールによる形成促進機構の解明

グリセロールによるフロック形成促進の機構に関して、明らかとなっている点として、図2に示すようにフロック形成には、グルコースを十分量添加したLB培地と呼ばれる一般的な天然培地を用いている。培養前後の培地成分の分析により、グリセロールやエチレングリコールなどのポリオール類は基質として消費されず、培地中にそのまま残存していること、残存するグリセロールが培地粘度を増加させることは関与していないことを、同等の粘度を与える高分子化合物を用いた実験で確認している。そこで、下記の観点に着目しポリオールによるフロック形成促進機構の解明を目指した。

忌避物質としての影響

グリセロールやエチレングリコールなどのポリオールは、大腸菌の忌避物質として知られており、べん毛を用いた遊泳によりポリオールから遠ざかる行動(化学走化性)をとる(参考文献 J Bacteriol, 157(2), 576-581, 1984)。この忌避行動をとる際にメチル基受容化学走性タンパク質の脱メチル化などのストレス応答反応が誘導されることがわかっている。そこで *degP* 遺伝子欠損株に忌避応答に関連する遺伝子(*tar*, *cheA*, *cheW*, *cheZ*, *fliG*, *fliM*, *fliN*)の欠損を重ねることで、フロック形成量を評価した。

外膜小胞の産生に与える影響、フロック中の生細胞数の評価

代表者の先行研究により、フロック形成には外膜小胞と呼ばれる細胞外小胞が重要な役割を果たすことを報告している(AEM, 81, 5900-5906, 2015)。そこで、フロック形成後の培養液から超遠心分離によって回収した外膜小胞をタンパク質量ならびに脂質量基準で定量評価し、グリセロールなどポリオール有無の条件で外膜小胞の産生量を比較した。さらに、*degP* 欠損株に GFP を発現させ、フロック構造中の生細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると同時に、ATP 基準でのフロック単位重量当たりの生細胞数を算出した。

(2) 大腸菌フロックの複合微生物化と難培養性微生物の取得

微生物においても動物細胞におけるサイトカインと同じカテゴリーのタンパク質が存在することが発見されている(PNAS. 95:8916, 1998)。この微生物サイトカインは、細胞表面の受容体を刺激することで、ピコモル濃度で休眠状態の難培養性微生物の増殖能や代謝活性を促進することがわかっている。微生物サイトカインである蘇生因子を産生する *Micrococcus luteus* をヘルパー細胞としてフロック中に共培養した。また、プロテアーゼで分解されやすい問題点がある大腸菌フロックに関して、当研究グループが土壌より単離したポリグルタミン酸生産菌である *Bacillus licheniformis* RK14 株と共培養することで、フロックの分解が抑制され、構造安定性を増加させることを試みた。さらに、複合微生物化で機能や構造安定性が向上した大腸菌フロックを足場として、難培養性微生物との共培養を行い、共生による取得を試みた。具体的には、前培養で大腸菌とヘルパー微生物である *M. luteus* や RK14 株の共培養により形成したフロックを回収し、民間工場排水処理施設の曝気槽に含まれる細菌群との共培養を行った。この曝気槽の活性汚泥中には、未培養系統群 OD1 が存在することが事前のアンプリコンシーケンス解析により明らかになっていた。OD1 は、ろ過膜を透過する細胞サイズを持ち、ゲノムサイズは大腸菌の 10 分の 1 程度で、遺伝子は 400 ほどしか持たないため、アミノ酸、ヌクレオチド、脂肪酸などの生合成が欠けているものが多く、他の生物に寄生もしくは細胞外共生体として生活していると推測されている。そこで、各種フロックとの 1 週間の共培養を行った後に、16SrRNA の V3/V4 領域を対象にしたアンプリコンシーケンス解析により存在比率を確認した。

4. 研究成果

(1) フロック形成機構ならびにポリオールによる形成促進機構の解明

これまでに、大腸菌 $\Delta degP$ 株が形成するフロックについて、温度、pH などの種々の培養パラメータや炭素源、窒素源など培地成分の検討を行ったところ、唯一グリセロールを培地中に添加したときのみ、飛躍的にフロック形成量が増加することを明らかにしていた。その際に、添加するグリセロールの濃度とフロック形成量との間には、はっきりとした濃度依存性が確認され、10%の濃度で添加した際に最大のフロック形成量を示した。そこで、フロック形成前後で培地中のグリセロール濃度を測定したところ、グリセロールは大腸菌によって消費されておらず基質として利用されていなかった。この結果から、グリセロール添加による培地の粘度上昇がフロック形成を促進した可能性が考えられた。増粘剤として用いられるカルボキシメチルセルロース(CMC)とポリビニルピロリドン(PVP)を添加することで、グリセロールを添加した培地と同等の粘度を再現しフロック形成を行ったところ、粘度の増加に伴うフロック形成の促進は確認できなかった。続いて、グリセロールと同じ低分子のポリオールであるエチレングリコールを添加した培地でフロック形成を行ったところ、図3に示すようにグリセロールと同様に濃度依存

的な形成量の増加が確認された。また、2つのポリオール添加時に共通して、最もフロック形成量が増加した濃度までは細胞は正常に増殖したが、それより高い濃度では増殖阻害が見られた。このことから、フロック形成は増殖阻害が起こらない上限の添加濃度において最も促進されることがわかった。よってフロック形成促進効果は、2つのポリオールが持つ、細胞の増殖阻害作用と関係している可能性が考えられた。

次に、忌避応答に関連する遺伝子を $\Delta degP$ 株に重ねて欠損させフロック形成量を評価したところ、欠損の重ね合わせによるフロック形成量の変化は確認されず、忌避応答は直接的に関与していないことが判明した。さらなる検討では、先行研究においてフロック形成との関連が示唆されている外膜小胞(OMVs)に着目した。ポリオールを添加した培地で培養した $\Delta degP$ 株の OMVs 分泌量を評価したところ、5~10 倍程度の OMVs 分泌量の増加が見られた(図4)。OMVs 分泌の生理的役割として、外部環境からの膜ストレス応答に関与することが報告されており、ポリオールの添加によって大腸菌細胞に膜ストレスが生じていることが考えられた。

続いて、これらポリオールの添加によって、形成したフロックにどのような性質の変化が見られるかを調べた。緑色蛍光タンパク質 GFP を発現させた大腸菌にフロックを形成させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、ポリオール存在下で形成したフロック内では生細胞数が減少している様子が確認された。ATP 量を指標としてフロック中の生細胞数を定量的に評価したところ、図5に示すように顕微鏡観察の結果と一致してポリオール存在下で形成したフロックに含まれる生細胞数は100分の1程度に減少していた。さらにフロックの表面構造を走査型電子顕微鏡で観察したところ、潰れた形状の大腸菌細胞が多数確認され(データ省略)、ポリオールは大腸菌細胞に物理的なダメージを与え、 $\Delta degP$ 株のフロック形成を促進したと結論付けた。

最後に、ポリオールが引き起こすストレスについてさらに詳しく検討を行った。浸透圧ストレスなどの先行研究で報告されているポリオールの作用についての検討を行ったが、これらはフロック形成の促進に関与していないことがわかった。そこで DNA マイクロアレイ解析を実施し、グリセロール添加の有無における大腸菌の網羅的な遺伝子発現の比較を行った。その結果、グリセロールの添加によって大腸菌の遊泳運動を行う鞭毛に関する遺伝子発現量が顕著に増加していることが明らかとなった。この応答は、フロック形成の促進とは無関係であることが確認されたグリセロールに対する大腸菌の忌避応答を反映するものであると考えられ、グリセロールの大腸菌細胞に対する直接的な作用に関しては、現在も引き続き解析を進めている。

以上の結果より、グリセロールによる大腸菌フロック形成の促進は、低分子のポリオール特異的かつ、外膜小胞の分泌増加などこれまでに報告されていない膜ストレスによって引き起こされた可能性が高いと考えられる。

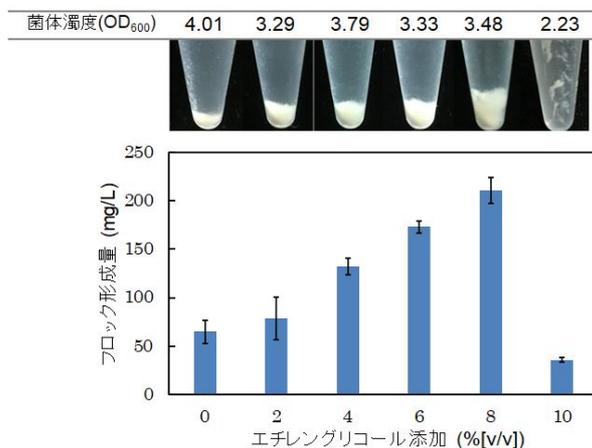


図3 エチレングリコールの添加が大腸菌フロックの形成量に与える影響

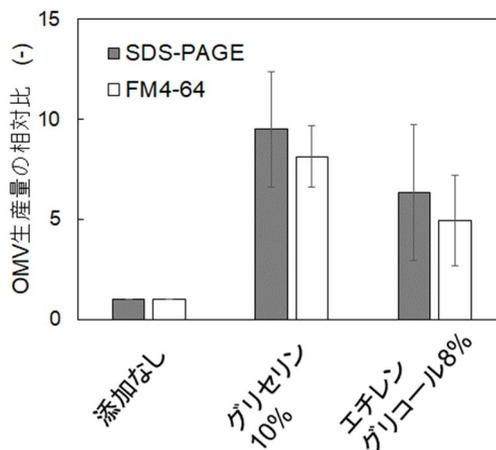


図4 ポリオール添加時の大腸菌の OMVs 分泌量の相対比

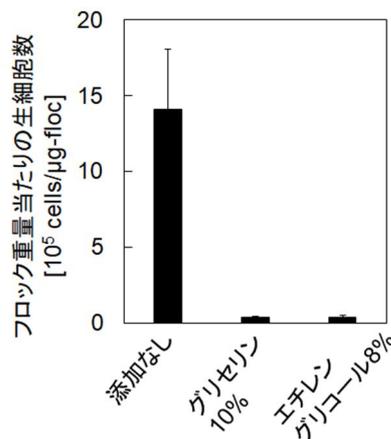


図5 ポリオール添加時の大腸菌フロック中の生細胞数

(2)大腸菌フロックの複合微生物化と難培養性微生物の取得

大腸菌フロックの人工的な複合微生物化に関しては、酵母などのモデル微生物と共培養した際のqRT-PCRを用いた生細胞数の定量評価方法の構築と、蘇生因子を放出するヘルパー微生物である *M. luteus* のフロック構造上への定着化に成功した(図6)。また、分解されやすい問題点がある大腸菌フロックに関して、当研究グループが土壌より単離したポリグルタミン酸生産菌である *Bacillus licheniformis* RK14 株と共培養することで、フロックの分解が抑制され、構造安定性が増加することを確認した(データ省略)。

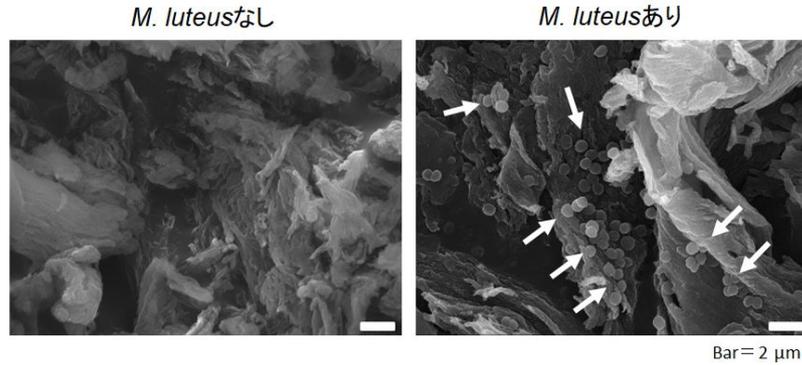


図6 大腸菌フロック上に付着した *M. luteus* . 矢印は、*M. luteus* を示す。

そこで続いて、複合微生物化で機能や構造安定性が向上した大腸菌フロックを足場として、難培養性微生物との共培養を行い、共生による取得を試みた。前培養で大腸菌と *M. luteus* や RK14 株の共培養により形成したフロックを回収し、民間工場の排水処理施設の曝気槽に含まれる細菌群との共培養を行った。この曝気槽の活性汚泥中には、未培養系統群として知られる OD1 が存在することが予備検討時のアンプリコンシーケンス解析により明らかになっていた。各種フロックを形成し、曝気槽の細菌群と1週間の共培養を行った後に、アンプリコンシーケンス解析を行い、共培養前の存在比率を確認したところ、どのフロック共培養条件においても OD1 の存在比率が極端に減少しており、共生関係を確認することはできなかった(図7)。一方で、OD1 が含まれる元の活性汚泥から別途単離した酵母様真菌と共培養した際には、OD1 の存在比率が保てることが確認されたため、今後はこの酵母様真菌も含めた複合微生物化を行うことで、大腸菌フロック上で OD1 を安定的に共培養できるかの検討を行う予定である。

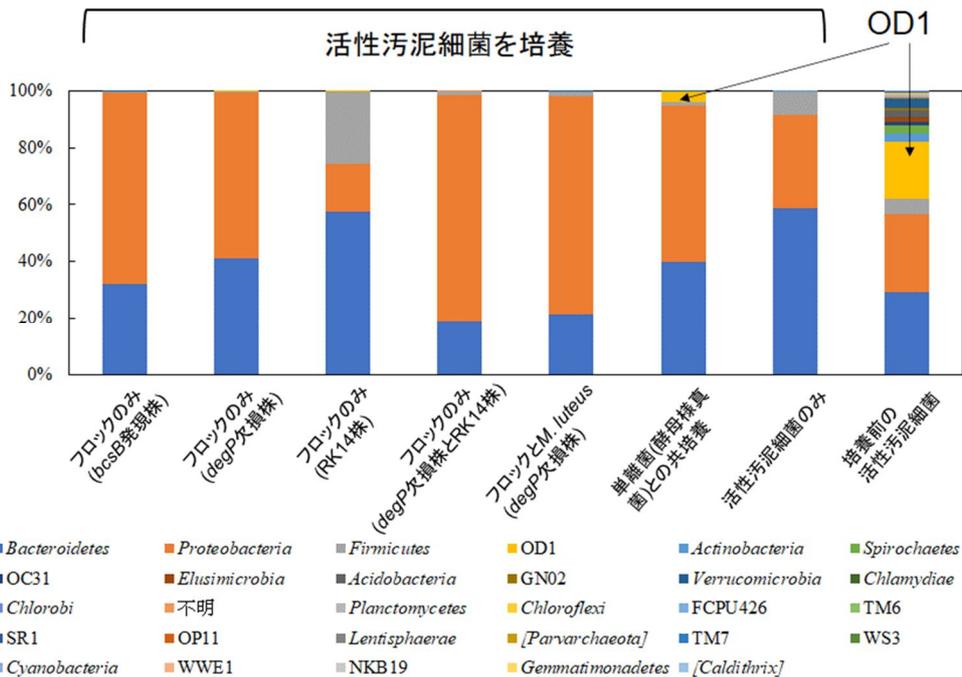


図7 活性汚泥細菌を各種フロックと共培養した際のアンプリコンシーケンス解析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Yoshihiro Ojima, Hiroaki Honma, Mio Otsuka, Satsuki Matano, Masayuki Azuma | 4. 巻 131 |
| 2. 論文標題 Enhanced floc formation by degP-deficient Escherichia coli cells in the presence of glycerol | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering | 6. 最初と最後の頁 33-38 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.09.001 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Yoshihiro Ojima, Tomomi Sawabe, Mao Nakagawa, Yuhei O. Tahara, Makoto Miyata, Masayuki Azuma | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Aberrant membrane structures in hypervesiculating Escherichia coli strain mlaE nlpI visualized by electron microscopy | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology | 6. 最初と最後の頁 706525 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.706525 | 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8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshihiro Ojima, Tomomi Sawabe, Mao Nakagawa, Yuhei O. Tahara, Makoto Miyata, Masayuki Azuma |
| 2. 発表標題 Aberrant membrane structures in hypervesiculating Escherichia coli strain mlaE nlpI visualized by quick-freeze deep-etch electron microscopy |
| 3. 学会等名 EMBO Biologists Workshop Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions and medical applications（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 俣野 沙月, 尾島 由紘, 東 雅之 |
| 2. 発表標題 土壌より単離したBacillus licheniformis RK14株の自発的な凝集体形成 |
| 3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 尾島 由紘, 澤邊 朋美, 中川 真緒, 田原 悠平, 宮田 真人, 東 雅之 |
| 2. 発表標題 電子顕微鏡により可視化された大腸菌の外膜小胞高生産株 mlaE nlpIの異常な膜構造 |
| 3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 俣野 沙月, 大塚 未音, 本間 裕章, 尾島 由紘, 東 雅之 |
| 2. 発表標題 大腸菌フロックの複合微生物化の検討 |
| 3. 学会等名 日本生物工学会関西支部 2020年度学生オンライン発表会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 尾島 由紘, 東 雅之 |
| 2. 発表標題 大腸菌の外膜小胞高生産株の生産促進機構 |
| 3. 学会等名 生物工学Webシンポジウム2020(日本生物工学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 本間 裕章, 尾島 由紘, 東 雅之 |
| 2. 発表標題 外膜小胞に誘発される大腸菌フロックのグリセロールによる形成促進機構の解析 |
| 3. 学会等名 膜シンポジウム2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma |
| 2. 発表標題 Outer membrane vesicles of Gram-negative bacteria and its application to microbial biotechnology |
| 3. 学会等名 ICGEB-IMBT Workshop2019 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hiroaki Honma, Mio Otsuka, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma |
| 2. 発表標題 Efficient formation of Escherichia coli flocs by glycerol addition |
| 3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE 2019) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>研究者総覧 https://kyoiku-kenkyudb.omu.ac.jp/html/100000027_ja.html 研究室ホームページ https://www.bioa.eng.osaka-cu.ac.jp/bie/index.html</p> |
|---|

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|