

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：56301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06230

研究課題名(和文) 菌叢中の“単離できない微生物”の役割を可視化する革新的菌叢解析技術の開発

研究課題名(英文) Development of analysis technology to visualize the role of microorganisms in bacterial consortium

研究代表者

喜多 晃久(Kita, Akihisa)

新居浜工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授

研究者番号：00555162

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)：菌叢中の微生物の役割を可視化するため、モデル菌叢であるアルギン酸菌叢中で RHa-RCA-FISHによる遺伝子発現の可視化を試みた結果、アルギン酸分解を担うMangrovibacterium菌体内で蛍光顆粒が観察され、可視化に成功した。また、キチン分解メタン発酵菌叢から、付着担体として海洋底泥を必要としない有機酸発酵菌叢の取得に成功し、顕微鏡観察により、キチン結晶の周りに多数の菌が付着している様子を初めて観察することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たに分離に成功したキチン分解有機酸発酵菌叢は、微生物付着担体としての海洋底泥を必要としないため、キチンが分解されていく過程も観察できるようになった。一方、菌叢による嫌氣的キチン分解がいかに行われているのかを解明するためには、菌叢中の個々の微生物が「何を」やっているのか明らかにする必要がある。RHa-RCA-FISHを適用することにより、本菌叢だけでなく様々な菌叢中の微生物の役割を特異的に可視化することが可能となり、これまで未知であった微生物共生関係の解明が加速することが大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to visualize the role of microorganisms in the bacterial consortium, we attempted to visualize gene expression by RHa-RCA-FISH in alginate degrading bacterial consortium as a model bacterial consortium. As a result, fluorescent granules were observed and visualized in Mangrovibacterium cells responsible for alginate degradation. In addition, we succeeded in obtaining an organic acid-fermenting consortium that does not require marine sediment from the chitin-degrading methane-fermenting consortium. Microscopic observation revealed that a large number of bacteria adhered around the chitin crystals.

研究分野：微生物工学

キーワード：RHa-RCA-FISH

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エビやカニの水産加工の際に大量に生じる甲殻類キチン含有廃棄物(エビ殻やカニ殻)は、世界で毎年 600~800 万トン排出されると推定される有望な再生可能資源であるが、そのほとんどが利用されずに廃棄されている (Ning et al., Nature, 2015)。

そのような中で、我々は未処理のキチン粉末や甲殻類キチン含有廃棄物を安定かつ高効率に嫌気分解し、有機酸やメタンを生産することができる海洋性キチン分解菌叢を海洋底泥中から取得することに成功した。これまでに「未処理のキチン粉末や甲殻類キチン含有廃棄物」の安定かつ高効率な微生物変換に成功した例は報告されていない。それは、キチンが難分解性であり、大腸菌や酵母など一般的に工業利用されている微生物では分解できないためである。そのため、本菌叢を詳細に解析することでキチン分解メカニズムが解明され、キチンバイオリファインリーに向けた代謝制御や菌叢制御への応用が期待される。

しかし、一般に、菌叢を形成する個々の微生物は、物質をやりとりする「栄養共生」状態にあり、単離培養が難しい。申請者はこれまでに、メタゲノム解析および RNAseq によって遺伝子および mRNA 情報を収集してきたが、菌叢全体のキチン代謝経路の推定にとどまり、どの微生物が何の遺伝子を持ち、何を欠損しているかのリンク付けができず、未だに単離培養に至っていない。もし、本海洋性菌叢からキチン分解に関与する上記未知微生物群を単離することができれば、嫌氣的キチン分解における未知微生物群の生理生態学的解析や微生物共生系の一端を明らかにできるなど、学術的に価値の高い研究を展開することが可能となる。さらに、その微生物共生系を応用することによって、人工的に合成菌叢を構築することによる菌叢維持の安定化や、キチン代謝酵素遺伝子セットを発酵微生物に直接導入してキチン原料から直接有用物質に変換することも可能となる。そのため本海洋性菌叢(微生物共生系)における嫌氣的キチン分解において、「いったい誰が何をやっているのか」、そしてそれらの微生物群は「なぜ単離できないのか」という「問い」は、海洋嫌気環境中におけるキチン含有物質の分解に関与する微生物群の生理生態学的観点からみても大変興味深い。さらに、その共生系や分解機構の「解明」は未処理キチン含有廃棄物の有効な処理法および物質生産への応用にとっても極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究は研究分担者らが新たに開発した RNase H-assisted rolling circle amplification (RHa-RCA)法を *in situ* に応用することにより、キチン分解における菌叢中の個々の微生物の役割を視覚化して明らかにするとともに、キチン分解に関与する未知微生物群を単離し、その共生メカニズムを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 菌叢中の特異的な細胞の可視化

既に取得しているメタゲノム情報と RNA-seq 情報から代謝経路マッピングによって、本菌叢におけるキチン分解経路を明らかにするとともに、*in situ* RHa-RCA 法の Padlock probe の設計のために、キチン分解経路に関与する遺伝子から発現した mRNA 配列を抽出した。そして、上記 mRNA の情報をもとに、各遺伝子に特異的な Padlock probe を設計した。菌叢は細胞膜厚が個々に異なる細菌で構成されていることが容易に想像されるため、Padlock probe および 反応基質の細胞内導入のための膜透過処理と *in situ* RNase H-assisted RPRCA 反応の最適化を行った。その後、*in situ* RHa-RCA 法 および FISH 法によって菌叢中の特異的な細胞を可視化した。

(2) 菌叢中の未知微生物群の単離

菌叢の培養は無機塩基本培地に 5g/l のキチンを単独炭素源として添加したキチン培地を用いた。培養に海洋底泥を必要とするキチン分解メタン発酵菌叢から、海洋底泥を必要としないキチン分解有機酸発酵菌叢を取得する際には、蓄積する有機酸による pH の低下を防ぐために、炭酸水素ナトリウム溶液を 5g/l となるように添加した。微生物を単離は、無機塩基本培地に炭素源として N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) やグルコース、ペプトンなどを添加し、ロールチューブ法により嫌氣的に行った。

(3) 有機酸の測定

キチン分解有機酸発酵菌叢により生産される有機酸の測定は、HPLC (RI 検出器) を用いた。移動相は 0.1% H_3PO_4 を用い、流速は 0.7ml min^{-1} だった。分離カラムには RSpack KC-811(Shodex) を用いた。

4. 研究成果

(1) 菌叢による嫌氣的キチン分解がいかにして行われているのかを解明するためには、菌叢中の個々の微生物が「何を」やっているのか明らかにする必要がある。そのため、本研究において、任意の配列の mRNA を特異的に増幅・検出する RNase H-assisted rolling circle amplification

(RHa-RCA)法の最適化を行った。RHa-RCA 法を微生物細胞に応用し、mRNA を細胞内蛍光検出することで、キチン分解関連遺伝子を発現している微生物の特異的検出が可能になる。また、菌叢には細胞壁構造の異なる多様な細菌が共存していると考えられるため、細菌種に依存せず、プロープや酵素を導入し細胞内反応を可能にする、細胞壁透過方法が必要となる。そこで、細胞壁構造の異なる 2 種のモデル細菌混合物に対して、細胞透過方法の検討を行った。その結果、エタノールとリゾチームによる処理後に反応を行った際、いずれの細菌細胞からも高い効率で特異的蛍光を得た。このことから、細菌種によらず菌叢の mRNA 特異的蛍光標識が可能であるとわかり、今後、菌叢内のキチン分解を行う個々の微生物を蛍光標識し、栄養共生関係を可視化することが可能だと考えられた。

(2) 一方、キチンを唯一の炭素源にすると、キチン分解菌叢の構成種は、海洋底泥などの付着担体表面にバイオフィルムを形成しないと菌叢が維持できないため、付着担体なしの液体培養ができない。おそらく近接場で物質のやり取りが菌叢維持に必須なのである。従って、キチン分解菌叢の機能の可視化 (RHa-RCA-FISH) は、付着担体が邪魔をしてしまい、蛍光ラベルとその観察が困難であることが予想された。そこで、まずは以前の研究で有明海の海洋底泥から取得した、液体培養可能な菌叢であるアルギン酸分解菌叢を、RHa-RCA-FISH 法のモデル菌叢として使用することとした。この菌叢は 3 属の細菌で構成されており、優占種の *Mangrovibacterium* は単独でアルギン酸分解能を示さなかった。しかし、ゲノム解析からアルギン酸代謝経路の遺伝子をすべて保持しており、途中経路の機能が欠損していることが示唆され、他の菌由来の中間代謝物に助けられている可能性が示唆された。さらに、モデル菌叢であるアルギン酸菌叢中で RHa-RCA-FISH による遺伝子発現の可視化を試みた結果、アルギン酸分解を担う *Mangrovibacterium* 菌体内で蛍光顆粒が観察され、可視化に成功した。

本研究で確立した RHa-RCA-FISH を適用することにより、本菌叢だけでなく様々な菌叢中の微生物の役割を特異的に可視化することが可能となり、これまで未知であった微生物共生関係の解明が加速することが大いに期待される。

(3) 本研究で用いたキチン分解菌叢は海洋底泥から取得されたメタン発酵を伴う菌叢である。そのため、メタン発酵菌の維持には付着単体としての海洋底泥が必要であり、海洋底泥が菌叢機能の可視化の邪魔となってしまうことが予想された。そこで、キチン分解メタン発酵菌叢から、海洋底泥を必要としない有機酸発酵菌叢の取得を試みた。有機酸の生産による pH の低下を防ぐために、炭酸水素ナトリウムを添加し、キチン分解メタン発酵菌叢を 5% 植菌したところ、培養 1 週間でキチン分解が観察された。HPLC により生産物を測定した結果、酢酸および少量のプロピオン酸の生産が確認された。継代培養を数世代行ったところ、安定的にキチン分解および有機酸生産が確認された。キチン分解有機酸発酵菌叢を顕微鏡観察したところ、キチンの結晶の周りに多数の菌が付着している様子が観察され、この菌がキチン分解に大きく関与している可能性が示された (図 1)。さらに、菌叢解析の結果、本菌叢には *Christensenella*、*Clostridium* が優占種として存在しており、これらの菌がキチン分解に関与していると考えられた。特に *Christensenella* は、以前のキチン分解メタン発酵菌叢においても優占種として存在していたため、キチン分解において重要な役割を担っていることが示唆された。そのため、*Christensenella* の 16S rRNA 遺伝子配列に特異的なプロープを作成し、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 解析を行ったところ、菌叢培養液中に確かにこれらの微生物が存在していることが明らかとなった。さらに、キチン分解菌叢を好気条件で培養したところ、キチン分解が観察されなかったことから、キチン分解に関与する微生物は偏性嫌気性菌であることが明らかとなり、上記優占種の条件と一致した。

(4) キチンの分解物である N-アセチルグルコサミンを資化することが出来る微生物の単離に成功した。本菌はグラム陰性の桿菌であり、単独で GlcNAc を資化して増殖することが出来るが、培養 1 カ月の OD_{600} が約 0.1 と、増殖速度が非常に遅かった。本菌の分子系統解析を行ったところ、全て *Bacillus* であることが明らかとなった。また、本菌はキチンを単独で資化することはできなかった。このことから、今回単離した菌は、共生系によるキチン分解において、GlcNAc 以降の代謝に関与している可能性が示唆された。さらに、GlcNAc だけでなくグルコースやペプトンなど様々な炭素源で菌叢構成菌の単離を試みたところ、*Vibrio* や *Cutibacterium* が単離されたが、これら微生物はキチンを単独で分解することができなかった。したがって、キチンの嫌気的分解には他の微生物との共生関係が必要であり、キチン分解に関与する微生物を単離することは困難であることが考えられた。

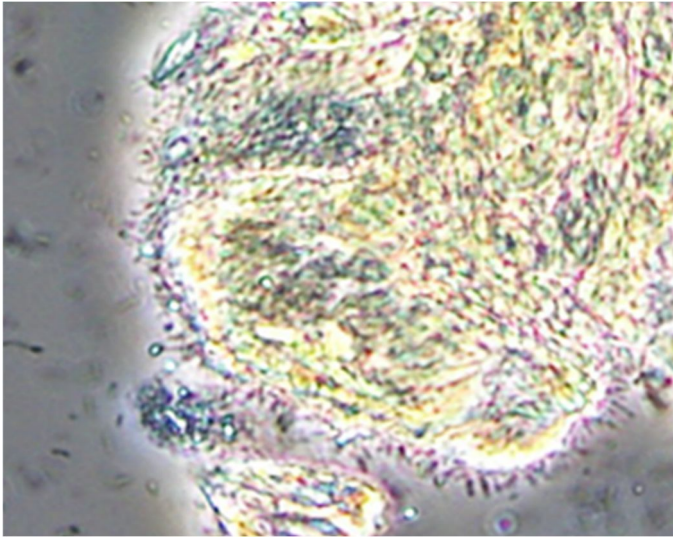


図1 キチン結晶に付着する微生物

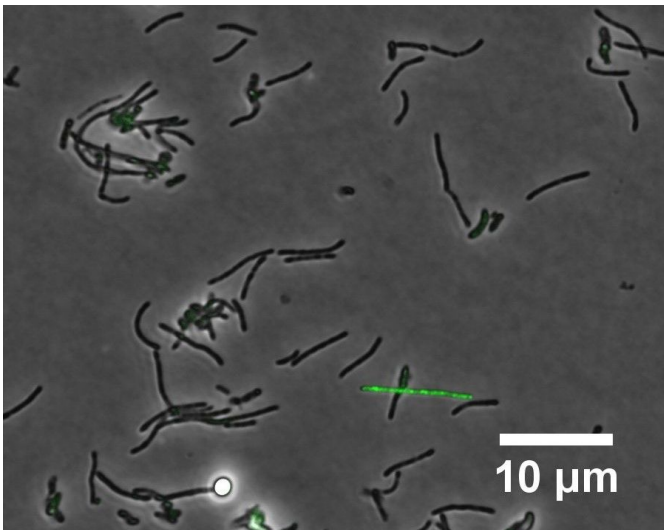


図2 FISH法による *Christensenella* 近縁種の観察

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Takahashi Hirokazu, Horio Kyohei, Kato Setsu, Kobori Toshiro, Watanabe Kenshi, Aki Tsunehiro, Nakashimada Yutaka, Okamura Yoshiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Direct detection of mRNA expression in microbial cells by fluorescence in situ hybridization using RNase H-assisted rolling circle amplification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65864-7	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 堀尾京平、喜多晃久、高橋宏和、渡邊研志、秋庸裕、中島田豊、岡村好子
2. 発表標題 海洋性アルギン酸分解菌叢におけるアルギン酸分解の分子メカニズム
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 平田さや、小笠原豪、岡村好子、中島田豊、堀尾京平、早瀬伸樹、喜多晃久
2. 発表標題 海洋底泥からのみかん外皮分解菌叢の探索
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 Kyohei Horio, Hirokazu Takahashi, Setsu Kato, Toshiro Kobori, Tsunehiro Aki, Yutaka Nakashimada, Yoshiko Okamura
2. 発表標題 In Situ RNA Detection Toward Elucidation of Functional Consortium
3. 学会等名 8th IWA Microbial Ecology and Water Engineering Specialist Conference (MEWE2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyohei Horio, Hirokazu Takahashi, Setsu Kato, Toshiro Kobori, Tsunehiro Aki, Yutaka Nakashimada, Yoshiko Okamura
2. 発表標題 in situ detection of mRNA toward fluorescence-labelled cells
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (MBC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 脇 滉、早瀬 伸樹、中島田 豊、喜多 晃久
2. 発表標題 河口底泥からの海洋性キチン分解菌叢の探索とVFAs生産
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀尾 京平、高橋 宏和、加藤 節、小堀 俊郎、秋 庸裕、中島田 豊、岡村 好子
2. 発表標題 微生物細胞内mRNA検出法による遺伝子発現の可視化
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	岡村 好子 (Okamura Yoshiko) (80405513)	広島大学・統合生命科学研究科(先)・教授 (15401)	

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
---------	---------