

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22297

研究課題名（和文）緩やかに繋がらう微生物 可視化とマルチオミックス解析により真の姿を照らし出す

研究課題名（英文）Visualization of loosely connected microbial community

研究代表者

稲葉 知大（Inaba, Tomohiro）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・主任研究員

研究者番号：90760439

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、環境中に存在する微生物の生存形態について、その実際を明らかにすることを目的とした。環境中のほとんどの微生物はバイオフィームと呼ばれる集団を形成していると考えられているが、その実態は不透明だった。本研究では環境サンプル中の微生物群集を可視化解析し、細胞同士が物理的に緩くつながったコミュニティが存在する可能性を明らかにした。この知見は微生物生態における微生物の社会性、群集生態に新しい洞察を与えるものであり、さらなる詳細な研究が待たれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物の代謝・生理機能は非常に多岐にわたり、生命誕生以来、現在までの地球環境の形成に大きな影響を与えてきたと言われている。そうした微生物の機能は、複数の微生物が集合してできるコミュニティによって発現することが多い。しかしながら環境中における微生物集団の実像はよくわかっていなかった。本研究課題は非破壊的な可視化解析を環境サンプルに実施することで、これまで集団だと捉えられてこなかった、緩いつながりを持つ微生物コミュニティの存在可能性を示すことで、微生物機能の理解と利用に寄与した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate the actual behavior of microorganisms in the natural environment. Most of microorganisms in the natural environment are thought to form multi-cellular community called biofilms, but the actual conditions of these biofilms have been still unclear. In this study, non-destructive visualization analysis of microbial communities in environmental samples revealed the possibility of the existence of communities in which cells are loosely connected to each other physically. This finding provides new insights into microbial sociality and community ecology in microbial ecology, and awaits further detailed study.

研究分野：微生物学

キーワード：バイオフィーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物が自然環境中でどういった形態で存在しているのかはその生理機能と密接に関係している。同じ種類の微生物であっても、水中で自由に泳ぎ回る、もしくは浮遊状態にある個体と、水中の石など何らかの物質表面に付着している個体とでは、発現している遺伝子の種類や発現の強さが異なり、別種の微生物のように振る舞うことが知られている。こうした理由から、微生物の真の生態を理解するためには、微生物が環境中でどのような姿で存在しているのかを知ることが必須である。

2. 研究の目的

物質表面に付着して生存している微生物の解析が比較的容易である一方、水中を浮遊、もしくは遊泳している微生物は、特定孔径のフィルターを使用して捕集してから解析を実施する必要がある。この方法では水中の微生物を網羅することができるが、バイオフィームと呼ばれる微生物細胞の凝集体の存在が無視されてしまう。特に構造的に弱く、微生物同士が緩やかに寄り添い形成された「ゆるい」バイオフィームは、フィルターに捕集された時点で元の環境における存在形態(立体構造)を失ってしまう。地球上の大多数の微生物は自然環境中でバイオフィームを形成していると考えられているため、「ゆるい」バイオフィームの解析は微生物の生態を解き明かすためにも必要となる。本研究は、水環境中の「ゆるい」バイオフィームを対象として非破壊的な構造解析および微生物群集解析、遺伝子発現解析を行うことで、水環境において微生物が如何様に存在するのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

これまで広く一般的に行われてきたフィルターを用いた微生物学的な手法に加え、本研究の目的である「ゆるい」バイオフィームの捕集や非破壊的な解析を実施するために、レーザー光を透過する支持体を使用したサンプルの固定方法を検討した。サンプルには粒子を含む下水処理水や魚類を飼育する水槽の水を用い、微細な構造物の可視化、微生物学的な解析を試みた。非破壊的な構造解析には、非侵襲的な顕微鏡法である反射顕微鏡法を用い、共焦点顕微鏡と作動距離の長いレンズを使用することで深度を確保しての立体構造可視化を試みた。また、微生物学的な解析として、サンプル全体に対する微生物群集構造解析を実施し、構造の形成や維持に寄与する、もしくは特定の構造に結びついた微生物群の特定を試みた。これらの解析を通して、「ゆるい」バイオフィームにおける立体構造と微生物生態的特徴についての基礎的な知見を蓄積し、「ゆるい」バイオフィームの実態に関する理解を深める。また挑戦的な実験として、水中の緩やかな構造体を分級、さらには分取するために、セルソーティングシステムをはじめとした分級技術を利用した「ゆるい」バイオフィーム解析手法の構築を目指した。

4. 研究成果

はじめに、水処理リアクターの運転を行い「ゆるい」バイオフィームサンプルの取得を行った。都市下水の処理場より活性汚泥サンプルを取得し、濁度のある上清を得た。まずこの上清について、遠心分離によって懸濁物質を取得した。懸濁物質を使いプレパラートを作成して顕微鏡観察したところ、その多くが微生物細胞であることがわかったが、遠心分離およびプレパラート作成の過程で「ゆるい」バイオフィームの存在は確認できないほど立体的な構造が失われることが改めてわかった。そこで、1000 xg 程度の弱い遠心によってある程度集積し、透明度のある支持体を使用して処理水サンプルを固定した。このサンプルについて蛍光色素を用いた生死判定を行ったところ大部分が生菌であり、非破壊的に構造を維持したまま「ゆるい」バイオフィームを固定できた可能性が示唆された。このサンプルについて、共焦点顕微鏡を使用した反射顕微鏡法による可視化を行った(図1)。その結果、多くの微生物は単一個体として遊泳、もしくは浮遊していることが示された。一方で、複数の個体が集まって小さな凝集体を形成している様子も可視化された。その凝集体の直径は10 μm程度で、細胞数としては10個体程度の非常に小さなものだった。細胞の形状から複数種の微生物が存在している可能性があり、この凝集体はこれまで見落とされてきた「ゆるい」バイオフィームである可能性が示唆された。

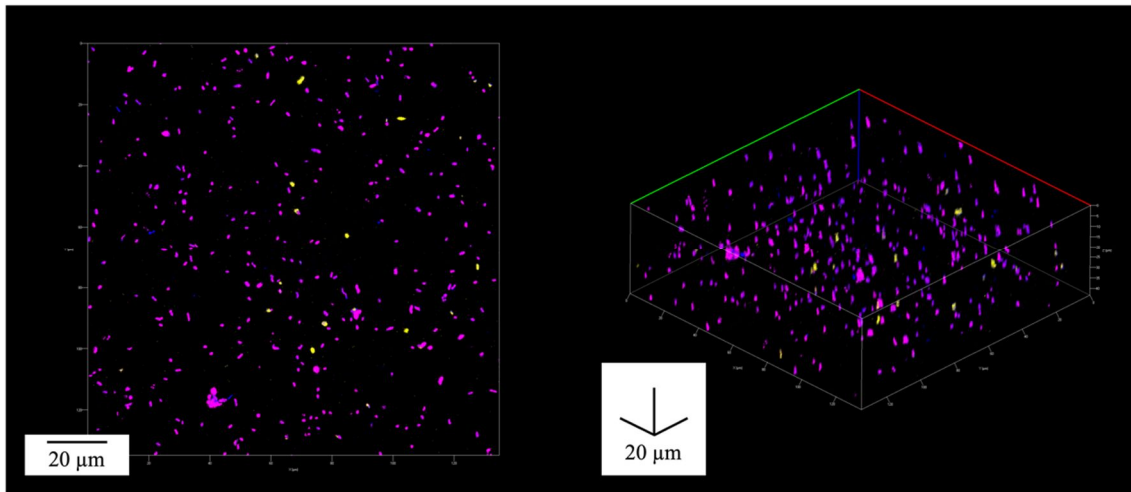


図 1. 活性汚泥サンプルの顕微鏡像（左）XY 平面像、（右）三次元画像

次に、環境中に実際に存在する「ゆるい」バイオフィルムを想定し、魚類を飼育する水槽の水をサンプルとした実験を実施した。はじめに水族館に設置された水槽から水サンプルを取得した。水槽は河川を模して作成されており、水槽内を流れる水は循環していた。この水サンプルについて、活性汚泥時と同様にゆるやかな遠心による集積と支持体による予定を行い、顕微鏡解析を実施した。その結果、数十 μm 程度の構造を持った凝集体の存在が確認された。この凝集体についても、成熟したバイオフィルムよりもサイズが小さいため、未成熟段階のバイオフィルム、もしくは「ゆるい」状態で存在するバイオフィルムである可能性が示唆された。

こうした「ゆるい」バイオフィルムについて、微生物学的な解析を実施するためそれらを単一の個体と区別して取得するための手法開発も試みた。はじめに、数十 μm 程度の孔径を持つフィルターを使用しての分取を試みたが、自然ろ過、加圧濾過ともに数十 μm 程度のバイオフィルムを選択的に分取することができなかった。そこで現在は大きなノズルを装着したセルソーターを用い、~十数 μm 程度の凝集体を機械的に分取することを試みている。本研究課題においては、顕微鏡を用いた解析によって、これまで存在があいまいだった「ゆるい」状態で存在するバイオフィルムの、自然環境中における実在を示唆する結果を得ることができた。一方で、「ゆるい」状態で存在するバイオフィルムが通常のバイオフィルムや単一の個体とどの程度異なった生理状態を有するのかは依然として不明である。そこで今後は、「ゆるい」状態で存在するバイオフィルムを選択的に分取し、他の状態にある群集、個体との比較を行うことで微生物生態における新しい、「ゆるい」バイオフィルムという状態を定義したい。

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 2件）

1. 著者名 Sato Yuya, Zhao Yan-Jie, Hori Tomoyuki, Aoyagi Tomo, Inaba Tomohiro, Aizawa Hidenobu, Ogata Atsushi, Habe Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Transition of microbial community structures after development of membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13568-020-0959-2	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 -

1. 著者名 Inaba Tomohiro, Obana Nozomu, Habe Hiroshi, Nomura Nobuhiko	4. 巻 35
2. 論文標題 Biofilm Formation by Streptococcus mutans is Enhanced by Indole via the Quorum Sensing Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME19164	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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