

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22927

研究課題名（和文）微生物生態系のシステム崩壊と再安定化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of collapsing and re-stabilizing mechanisms in microbial ecosystems

研究代表者

二又 裕之（Futamata, hiroyuki）

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：50335105

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：微生物生態系は深海底土圏からヒトの腸内とあらゆる場所で形成され、場の様々な機能を担っており、好適な制御が希求されています。しかし、制御に関する知見はまだまだ十分とは言えず経験則に依存しているのが実情です。本研究では、微生物生態系の形成メカニズムの解明に向けて、異なる3種の微生物を用いてモデル微生物生態系を構築し、その形成機構に関する解析を実施しました。その結果、安定した微生物生態系の構築は、微生物間の代謝ネットワークとそのネットワークを変化させ得る微生物間の相互作用の変化が重要であることが示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物生態系の形成原理の理解は、微生物生態学における非常に大きな課題の1つでもあります。本研究では、代謝ネットワークが微生物生態系の安定形成因子であることを見出し、さらに微生物間相互作用の揺らぎが代謝ネットワークを固定せず異種微生物の安定共存に重要であることを実験的に示唆しています。分離株を用いた本研究から、相互作用の揺らぎを見出せたことは、細胞レベルでの代謝活性や遺伝子発現の差異といったこれまで実態としては捉え難かった課題に、今後直接的に解析可能であることを示唆し学術的意義が非常に高いと判断されます。また、より適切に制御する上でも重要な知見を得る可能性があり社会的意義も深いと考えられます。

研究成果の概要（英文）：Microbial ecosystems form everywhere from the deep-sea sediment to the human intestine, and are responsible for various functions of the field, for which optimal control is sought. However, knowledge on their regulation is still insufficient and relies on empirical rules. In this study, we constructed a model microbial ecosystem using three different species of bacterial strains and analyzed the forming mechanism of the microbial ecosystem. The results suggest that the establishment of a stable microbial ecosystem depends on the metabolic network among bacterial strains and changes in interactions among bacterial strains that can alter that network.

研究分野：微生物生態学

キーワード：微生物生態系 合成微生物群集 代謝ネットワーク 微生物間相互作用 共存 揺らぎ 制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球規模での物質循環から農業、工業、医療、食品産業、廃水処理や環境浄化等において、微生物は極めて深く関与しており、好適制御技術の確立が希求されている。単一微生物の場合と異なり、複数種の微生物で構成される微生物集団では、微生物同士が相互に作用し合い、1つのシステム(複合微生物系)として機能を発揮する(図1)。そのため、複合微生物系の好適制御を図る為には、どのような仕組みでシステムが成立しているのかを理解する必要がある。

実際に多くの現場では経験値に基づく制御が実施されているが、システムの不調や安定的機能維持の理由が不明な場合も少なくない。その為、世界中で様々な複合微生物系の群集構造(どのような微生物が生息しているか)と機能が解析されている。また、システム全体を把握する為、網羅的な遺伝子・タンパク質解析技術(オミックス)の開発や数理モデルも大いに進展している。

オミックス解析は複合微生物系の全体的な動態把握に有効な手法の一つであるが、何故そのような生命現象が生じ得るのかを理解する為には、生息している個々の微生物の反応を理解する必要がある。しかし、実際の環境サンプルは多種多様な微生物が生息する極めて複雑な系であるため、オミックス解析結果を個々の微生物の反応として捉えることは困難である。また、各要素を取り出しその機能を調べ、全体像の理解を図る還元論的手法のみでも限界があるのが実情である。そこで、微生物の共存機構を理解するため、供試した微生物が共存しシステムの機能的安定性が維持される合成微生物群集系(SMC)の構築を目指した。複数種の微生物を用いて検討した結果、系統学的および phenol / catechol の分解特性が異なる *Pseudomonas* sp. LAB-08 株、*Cupriavidus* sp. P-10 株、および *Comamonas testosteroni* R2 株の3菌株から成る SMC を構築した。この SMC の特徴は、攪乱を与えるために phenol 供給を約 10 日間停止した前後においても群集構造の再現性が得られること、そのような攪乱を与えたにも関わらず約 800 日間以上の運転期間中、phenol の蓄積が観察されない機能的安定性を示しかつ供試菌株が共存したこと、LAB-08 株と R2 株の2菌株が同時に優占種となり、P-10 株はそれらの約 1/100 程度の菌密度で常に希少種という群集構造を示したことである。システムの機能的安定性をより理解するため、経時的に phenol および catechol の最初の変換物質である catechol の分解に対する動力学的パラメーターを、酸素電極を用いて測定した。その結果、phenol 供給停止の前後で両物質に対する K_s 値の動的平衡点がシフトしていたことが見いだされたこの結果は微生物群集構造に大きな差はないものの、共存機構に変化が生じたことを示唆していた¹⁾。

2. 研究の目的

そこで本研究では、微生物生態系の最大の特徴である恒常性維持機構の理解を究極の目標として、微生物間代謝ネットワークを切り口に複数菌株を用いた合成微生物生態系の安定化機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 合成微生物群集系の構築

LAB-08、R2、P-10 株にフェノールを添加し、連続集積培養条件下で、唯一の炭素・エネルギー源として構築した。6.25 mL h⁻¹の流速でフェノールを含む BSM 培地(1500 mg L⁻¹)を連続的に供給した。滞留時間は 10 日間とした。培養液中のフェノールは、フェノールテストワコー(富士フイルム株式会社製)を用いて比色法で確認した。運転期間中、phenol の蓄積は確認されなかった。時系列的にサンプリングした。

(2) qPCR による供試菌株のモニタリング

各株の個体数密度はフェノール水酸化酵素(PH)のラージサブユニットをコードする遺伝子を標的とした qPCR により、各株の個体密度をモニタリングした。PH 遺伝子はすべての株で 1 コピーしか存在しないことが示されているため、各アンプリコンのコピー数は、LightCycler のソフトウェアバージョン 3.52 を用いて算出し菌数を求めた。

(3) 機能性遺伝子の転写レベル

すべての供試菌株に PH 遺伝子、P-10 株と R2 株にカテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ(C230)遺伝子、LAB-08 株と P-10 株にはカテコール 1,2-ジオキシゲナーゼ(C120)遺伝子が存在した。これらの機能性遺伝子は、ゲノム中に 1 コピー存在していた。RT-qPCR により定量した。供試菌株細胞は適時 4 で遠心分離して回収し、80 °C で保存した。凍結した細胞ペレットから Total RNA を抽出した。各サンプルについて、逆転写酵素を含まない逆転写反応を行った。mRNA 量は内因性ハウスキーピング遺伝子の mRNA 量に正規化することができる。原核生物では、ハウスキーピング遺伝子の発現が劇的に変化することが観察されている。そこで、転写レベルは、細胞密度に関連して評価された。各株の細胞密度を定量するために、同じ日に採取した細胞から抽出したゲノム DNA に PH 遺伝子を標的とした qPCR アッセイを適用した。

4. 研究成果

(1) 代謝ネットワークという共存機構

供試菌株の共存機構を解明するため、3 菌株のゲノム解析を行った²⁻⁴⁾。R2 株は phenol 分解酵素遺伝子 (PH) と catechol の分解酵素遺伝子 (C230) が 1 つのオペロン下で制御されており、これは phenol 分解微生物の一般的な遺伝子座と一致していた。一方 LAB-08 株では、catechol 分解酵素遺伝子が別のタイプ (C120) であり、これは PH と制御が分かれていた。P-10 株では、R2 株と同様の分解遺伝子に加えて別制御の下で C120 が存在していた (図 1-1)。各機能遺伝子の転写量を、phenol 供給停止の前後で逆転写 qPCR 法により測定した。その結果、phenol 供給停止前では、3 菌株間の PH 転写量に著しい差は観察されず、供給 phenol の分配により共存していることが示唆された (図 1-2)。一方、phenol 供給再開後では、R2 株が phenol 分解を担い、代謝産物である catechol の一部を LAB-08 株および P-10 株が利用する代謝ネットワークの形成が示唆された (図 1-3)。このような役割分担の柔軟な形成が異属微生物の共存を可能とし、結果的にシステムの機能を安定的に維持したと考えられた¹⁾。

Phenol 供給再開後では、P-10 株の C120 の転写レベルが他の菌株よりも 5 倍から 10 倍高いことを考えると、P-10 株が有害物質でもある catechol の分解負荷を担っていると見ることが可能である。さらには、P-10 株は希少種であった一方で、LAB-08 株と R2 株が共に優占種であったことから、P-10 株の catechol 分解に伴い産出されと考えられる代謝産物を他の 2 菌株が利用していることが推定された (図 1-3)。さまざまな微生物が生育に利用可能な代謝産物は common goods と呼ばれるが、どのような物質なのかは世界的に見てもよく分かっておらず今後の課題の 1 つである。このように P-10 株は catechol 分解の負荷を担い、かつ、common goods の供給を行い、結果として菌密度が低いものの、この SMC の機能的安定性と共存にとって重要な役割を担っていると見ることが可能である。これらの結果は、複合微生物系を理解するうえで、これまであまり考慮されてこなかった希少種の重要性和利用性を示唆している¹⁾。

(2) 不完全代謝補完システムという見方

3 菌株 SMC 系で見られた機能的安定性の基盤である共存機構は、供試 3 菌株とも phenol を完全資化できるにも関わらず、遺伝子転写が制御されている (図 1) 点で興味深い。供試菌株の 1 つである R2 株は回分培養や短期間の連続集積培養では phenol を唯一の炭素源として生育可能であるにも関わらず、長期間の連続集積培養では突然 phenol が集積し機能的安定性が崩壊する。この崩壊は増殖抑制を引き起こす代謝産物の蓄積に基づくことが分かっている⁵⁾。他の phenol 分解細菌においても、同様の知見が得られており、環境微生物の多くは完璧な代謝を持っていないと想起される。微生物の共存を可能にする微生物間代謝ネットワークの 1 つとして微生物間で生育に必要な物質の供給と受給の関係が指摘されている⁶⁻⁸⁾。3 菌株 SMC 系が超長期間機能的安定性を発揮できた要因の 1 つとして、3 菌株間における不完全な代謝の補完が想定された。今後、遺伝子転写の制御も含めて、相互作用誘発物質の特定や代謝制御の理解が必要である。

(3) 複合微生物系をどうやって捉えるか

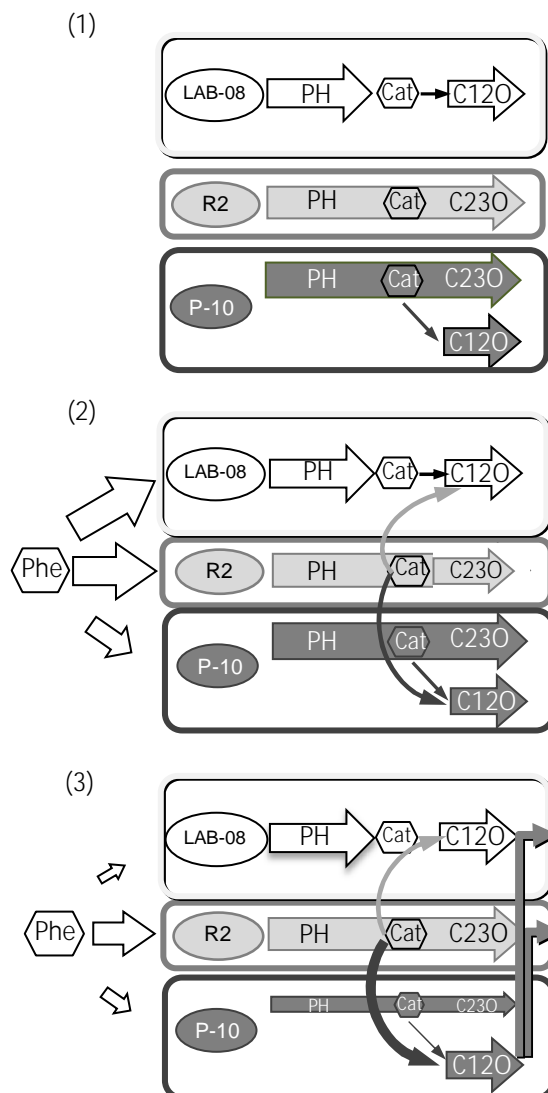


図1. 3菌株SMCにおける代謝ネットワークの概念図¹⁾

Phe: phenol; Cat: catechol; PH: phenol hydroxylase; C120: catechol 1,2-dioxygenase; C230: catechol 2,3-dioxygenase. 横向き矢印はオペロンを、矢印の太さは転写量の大きさを示す。(1)ゲノム情報に基づく各微生物のphenolおよびcatechol分解遺伝子の種類と配座。(2) Phenol供給停止前における共存機構。各微生物はPH, C120およびC230を転写しており、緩やかな代謝ネットワークと供給されたphenolを分配する共存形態を示す。(3) Phenol供給再開後における共存機構。R2株由来のcatecholを介した代謝ネットワークによる共存形態を示す。P-10株のC120からLAB-08株およびR2株への矢印はcommon goodsの供給を示す。

分離菌株を用いる SMCs は、複合微生物系をボトムアップ的に理解するうえで有効である。留意点として、一般的に供試菌株数の増加に伴い、微生物間の関係性はより複雑となる。そのため、菌株数 X の系で見いだされた共存機構や考え方を菌株数 $X+1$ の系に適応するのは困難になる (higher order effect と呼ばれる)。それでは、ボトムアップ的に複合微生物系の理解を目指す時、SMC 構築の必要最小菌株数とは幾つだろうか。Friedman らは 8 菌株で構成される合成微生物群集系の最終的な群集構造の予測には、2 菌株間の相互作用と群集構造の結果からでは不十分である一方、3 菌株間の情報があれば、高い確率で予測可能であることを示している⁹⁾。土壌やバイオフィルなどの構造的に不均一な場における複合微生物系の理解を図るうえで、少数の種による微生物群集を基本単位とする見方は現実的にも適していると考えられる。群集間の繋がりがりや higher order effect をどのように理解し解決するのが、今後の課題の 1 つである。一方で、SMC 系によるボトムアップ的な複合微生物系の理解にも当然限界がある。そのため、より複雑な系、たとえば土壌を接種源とする複合微生物系の機能的安定さや不安定さを種々の網羅的解析と組み合わせる必要がある。この際、上述した不完全代謝補完機構の視点が、おそらく重要になると考えられる。

(4) 不均一さや揺らぎの実態を捉える

複合微生物系の機能的安定性が維持される一方で、構成メンバーである微生物群集の変遷が生じる。この変遷は変化した環境に対する応答の結果であるため、微生物間の相互作用も変化し、同時に次の環境変化の起点となり得る¹⁰⁾。この一連の変化の中で、相互作用や増殖の揺らぎが共存を可能にしていると考えられている¹¹⁾。では、これらの揺らぎの起因は何だろうか。共存や機能的安定性が維持される、あるいは、崩壊に至る揺らぎ幅を、どのようにすれば見いだせるのだろうか。数理的アプローチとの融合によって複合微生物系における不均一さや揺らぎの実態を理解し、新しい切り口を見いだすことが求められている。

< 引用文献 >

- 1) Aziz, F. A. A. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **131**, 77 (2021).
- 2) Suzuki, K. *et al.*: *Genome Announc.*, **4**, e00948 (2016).
- 3) Suzuki, K., *et al.*: *Microbiol. Resour. Announc.*, **7**, e01009 (2018).
- 4) Azwani, F. *et al.*: *Genome Announc.*, **5**, e00875 (2017).
- 5) Jabir Mohd, A. R., *et al.*: *Microbes Environ.* 36 ME21050 (2021).
- 6) Seth, E. C., and Taga, M. E.: *Front. Microbiol.*, **5**, 350 (2014).
- 7) Cao, X. *et al.*: *Biochemistry*, **58**, 94 (2019).
- 8) Bachmann, H., *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 14302 (2013).
- 9) Friedman, J. *et al.*: *Nat. Ecol. Evol.*, **1**, 0109 (2017).
- 10) Mee, M. T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E2149 (2014).
- 11) Huisman, J. and Weissing, F. J.: *Nature*, **402**, 407 (1999)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fatma Azwani Abdul Aziz, Kenshi Suzuki, Masahiro Honjo, Koki Amano, Abd Rahman Jabir Bin Mohd Din, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata	4. 巻 131
2. 論文標題 Coexisting mechanisms of bacterial community are changeable even under similar stable conditions in a chemostat culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 77-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.09.009	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 該当する

1. 著者名 Fatma Azwani, Kenshi Suzuki, Ryota Moriuchi, Hideo Dohra, Yosuke Tashiro, Hiroyuki Futamata	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft genome sequence of phenol-degrading Variovorax boronicumulans strain HAB-30	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01478-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01478-19	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 二又裕之	4. 巻 99
2. 論文標題 複合微生物系の好適制御に向けた共存機構の理解	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34565/seibutusukogaku.99.12_1	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kenshi Suzuki, Fatma Azwani Abdul Aziz, Masahiro Honjo, Abd Rahman Jabir Mohd Bin, Kensei Masuda, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata
2. 発表標題 Crossfeeding network is capable of coexistence and functional stability in a synthetic microbial ecosystem
3. 学会等名 ASM2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Futamata
2. 発表標題 A Mechanism of Bacterial Coexistence: How is a metabolic network formed?
3. 学会等名 11. Research meeting "Principle of Microbial Ecosystems -how interactions interactions shape community assembly-" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jabir Mohd Din, Tomoka Nishimura, Ayaka Minoura, Kenshi Suzuki, Masahiro Honjo, Yosuke Tashiro, Hiroyuki Futamata
2. 発表標題 Metabolite-based coexistence enhances functional stability in a two species microbial population
3. 学会等名 微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野光喜、鈴木研志、本莊雅宏、Azwan Fatma、齋藤保久、木村元彦、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 資源競合条件下における異属三菌株共存を可能とする菌株間相互作用の数理学的解析
3. 学会等名 微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenshi Suzuki, Azwan Fatma, Masahiro Honjo, Kensei Masuda, Koki Amamo, Yosuke Tashiro, Hiroyuki Futamata
2. 発表標題 The microbial coexistence and functional stability corresponding to flexible metabolic network in a synthetic microbial ecosystem
3. 学会等名 微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本荘雅宏、鈴木研志、天野光喜、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 Pseudomonas sp. LAB-08株由来増殖抑制物質に対する大腸菌の代謝スイッチングによる適応機構
3. 学会等名 微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fatma Azwani, Kenshi Suzuki, Masahiro Honjo, Kensei Masuda, Yasuhisa Saito, Yosuke Tashiro, Hiroyuki Futamata
2. 発表標題 esource-competitive microbes can stably coexist by flexible metabolic network in a synthetic microbial ecosystem
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 Jabir Mohd Din, Tomoka Nishimura, Ayaka Minoura, Kenshi Suzuki, Masahiro Honjo, Kensei Masuda, Yosuke Tashiro, Hiroyuki Futamata
2. 発表標題 Self-Growth Inhibiting Mechanism of Comamonas testosteroni R2 grown on phenol
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 本荘雅宏、鈴木研志、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 Pseudomonas sp. LAB-08株由来増殖抑制物質による解糖系抑制の可能性
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 鈴木研志、本荘雅広、ファティマアズワニ、増田健誠、ジャビエルモハマド、天野光喜、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 モデル微生物生態系における時空間的不均一性と生態系機能維持機構
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 Abd Rahman Jabir Mohd Din, Kenshi Suzuki, Masahiro Honjo, Yosuke Tashiro, Hiroyuki Futamata
2. 発表標題 haracterization of inhibitory compound from Comamonas testosteroni strain R2 that induces cooperation and create metabolic dependency with Stenotrophomonas sp. strain Y
3. 学会等名 ISFAR-SU2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiro Honjo, Kenshi Suzuki, Koki Amano, Ryoya Hayashi, Yosuke Tashiro and Hiroyuki Futamata
2. 発表標題 How Does Pseudomonas sp. strain LAB-08 Repress the Growth of Other Microbes?
3. 学会等名 SFAR-SU2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 K. Suzuki, R. Owen, A. Yui, S. Ando, Y. Kudo, K. Yasuike, Y. Tashiro, and H. Futamata	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Tayler & Francis Group	5. 総ページ数 168
3. 書名 Green Science and Technology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

環境微生物生態工学研究室
<http://cheme.eng.shizuoka.ac.jp/wordpress/futamatalab/>

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