

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15544

研究課題名（和文）自然環境再生を実現する微生物生態系形成プロセスの解明

研究課題名（英文）The stability and maintenance mechanisms of the microbial ecosystem

研究代表者

鈴木 研志（Suzuki, Kenshi）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任助教

研究者番号：80870188

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は微生物生態系の形成、維持、変遷メカニズムの解明を目指した。そのために5種の異なるフェノール分解菌を用いた培養系の解析を行なった。その結果、5種の植菌順序が最終的な群集構造に影響を及ぼし複数の平衡点を持つことが示された。RNA-seq解析により群集構造変遷メカニズムを検討した結果、早期に群集構造が安定した培養系では優占種がフェノールを独占し、他の菌株は培養液中に分泌された代謝物に依存して増殖することが示唆された。一方で、不安定な培養系では複数種がフェノールを競合する状態にあることが示唆された。以上の結果から、微生物生態系は代謝ネットワーク形成により安定化することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では微生物生態系の形成過程が最終的な微生物群集構造を変化させることを示した。また、微生物間で代謝ネットワークが形成できるか否かがシステムの安定性に重要であることを示唆しており、微生物生態系の形成、維持変遷に関わる根幹的知見を得ることができたと判断できる。また、複合微生物群のデザイン、制御において、微生物種だけでなく形成される代謝ネットワークを考慮する重要性を示し、微生物利用技術の発展そして地球環境保全および再生に寄与できることから社会的意義も高いと評価できる。

研究成果の概要（英文）：The maintenance mechanisms of a microbial ecosystem and its stability were investigated in this study. Since the natural microbial community is too complex to analyze, five different phenol-degrading bacteria were incubated in phenol-fed chemostat culture as a model microbial community. Several equilibrium points of microbial communities were observed when the five strains were sequentially inoculated with several patterns. RNA-seq analysis suggested that phenol was occupied by the dominant strain and others utilized metabolites from the dominant strain when the community structure stabilized at an early incubation phase. On the other hand, it was more competitive for phenol in unstable culture. These results suggested that the emergence of metabolic network among microbial strains were significantly important in stabilizing a microbial community structure. Thus, the design of the metabolic network is essential to design and to control microbial community.

研究分野：微生物生態学

キーワード：微生物生態系 代謝ネットワーク 環境保全

### 1. 研究開始当初の背景

「持続可能な発展」は環境保全と社会発展を両立し人間社会を維持するための枠組みとして世界中で議論されるようになった一方で、社会の発展に伴い自然環境は減少の一途を辿っている。即ち、生命維持と社会発展を成し遂げるためには環境保全に加え、崩壊した自然環境を再生する取り組みが必要不可欠である。汚染あるいは資源の枯渇によって崩壊した環境を再生するためには、原因物質の分解や窒素・炭素等の循環系の再構築が必須である。微生物は他の生物が分解できない汚染物質の分解や窒素・炭素循環といった機能を発揮し生態系の基盤形成を担うことから、自然環境再生にはまず、微生物生態系の再生が重要である。

微生物生態系はその群集構造と発揮する機能を解析することで研究が行われてきた。特に遺伝子情報の網羅的解析と統計学的アプローチによって、群集構造の全貌を描画し種間の関係性を示すに至っている。しかし、「無」の状態から微生物生態系が形成されていく過程を、実際の生きた微生物を用いて実証した前例はない。

微生物は限られた資源を競合するため、種多様性は資源の種数に依存すると考えられてきた。しかし、実際には極めて多種多様な微生物が共存しており、種多様性の維持機構は概念の域を超えず、その本質は捉えられていないのが実情である。しかも、微生物生態系の安定性が議論されているにも関わらず定量性がないことから、微生物生態系の具体的な設計・制御の方法の確立には至っていない。

これまでの研究で、複数の分離株と単一基質からなる混合培養系(モデル微生物生態系)を用いて、微生物の多種共存機構の解明を行ってきた。そして、互いに基質競合状態にある微生物が、徐々に代謝物を相互利用するネットワークを形成していることを明らかにしてきた。また、各微生物がわずかな環境変化に対して瞬時に応答することで安定に多種共存していることを示してきた。つまり、微生物群集構造を連続的な酵素反応として捉えることで、その安定性を熱力学的に表現できる可能性を示唆した。

### 2. 研究の目的

本研究では、微生物生態系の形成プロセスを、微生物間代謝ネットワークに注目することで解明し、群集構造の安定性を定量評価することを目的とした。そのために、モデル微生物生態系における新規微生物の定着プロセスを解析した。また、代謝ネットワークを化学反応式に落とし込み、その安定性を熱力学的に評価する方法を構築することを目指した。

### 3. 研究の方法

(1)上記目的を達成するためには、微生物生態系における群集構造変遷を捉えつつ、細胞外に分泌された代謝産物を解析する必要がある。そこで、本研究では、*Pseudomonas* sp. LAB-08 株、*Cupriavidus* sp. P-10 株、*Comamonas thiooxydans* R2 株、*Variovorax* sp. HAB-30 株および *Acinetobacter* sp. c26 株を用いてフェノールを唯一の炭素源とする連続集積培養系をモデル微生物生態系と位置づけて解析を行なった。まず、上記5種の菌株を様々な順序で植菌しその群集構造変遷を解析した(Table 1)。植菌順序は全ての組み合わせを考えると120通りあるが、全てを試すには途方もない時間が必要となる。そこで本研究では、フェノールを唯一の炭素源とした場合における上記5菌株の競争力を算出し競争力が高い順に植菌した。また、P-10株およびR2株の2菌株を組み合わせると、R2株が優占化しつつ共存すること、LAB-08株はP-10株およびR2株と共存しR2株と共に優占化できることから、R2株およびP-10株を第1種目および第2種目とし、残りの3菌株の植菌順序を入れ替えたパターンを解析した。

Table 1 Inoculation patterns

		Order of inoculation					Reactor No.
		1	2	3	4	5	
Pattern	1	R2	C26	P-10	HAB-30	LAB-08	1, 2, 3
	2	R2	P-10	LAB-08	C26	HAB-30	4, 5, 6
	3	R2	P-10	HAB-30	C26	LAB-08	7, 8, 9
	4	R2	P-10	C26	HAB-30	LAB-08	10, 11, 12
	5	R2	P-10	LAB-08	HAB-30	C26	13, 14, 15
	6	R2	P-10	HAB-30	LAB-08	C26	16, 17, 18

(2)微生物間に形成される代謝ネットワークを解析するため、培養期間中に培養上清を回収し代謝産物の分析を実施した。培養液を10 mL回収し0.2 μm-pore sizeメンブレンフィルターで濾過することで培養上清とし、PPL固相カラムで代謝産物の抽出および濃縮を行なった。抽出した代謝産物はOrbitrap-MSで分析した。

(3)モデル微生物生態系における各菌株の代謝状態を把握するために、メタトランスクリプトーム解析を実施した。その際、各菌株の純粋培養系をコントロールとし、5種が混在する培養系と比較した。また、植菌順序を変えた実験では、培養ごとに異なる群集構造変遷を見せ、再現性が低いことから、5種を同じ菌密度で培養初期から同時に培養したものを用いた。代謝ネットワークの安定性を熱力学的に評価するためには、各菌株の代謝経路を正確に把握し、起こり得る反応を抽出する必要がある。そこで、各菌株のゲノム情報に基づき代謝経路の再構築を実施した。また、より正確性を高めるため、ゲノムシーケンスが完全でない菌株については一部再解析を行なった。

#### 4. 研究成果

##### (1) 植菌順序による微生物群集構造変遷の変化

モデル微生物群の形成過程を解析するため、前述の5菌株を様々な順序で植菌し、群集構造変遷を解析した。その結果、一部の培養系を除き R2 株が優占化することが明らかとなった。前述のように P-10 株、R2 株および LAB-08 株を用いたモデル微生物生態系では3種の安定な共存が確認できていた。それにも関わらず、競争力の弱い種を増やすことで共存状態が著しく変化することが本研究によって示された。R2 株が優占化する一方で、パターン1および4において P-10 株、HAB-30 株および c26 株が培養に伴い増加し共存することが明らかとなった (Figure 1)。しかも、パターン1では HAB-30 株および c26 株が最終的に淘汰される場合もあり、不安定な共存状態にあることが示唆された。パターン1および4の違いは P-10 株および c26 株の植菌順序のみであることから、これら2菌株の間に形成される代謝ネットワークが共存には重要であることが示唆された。

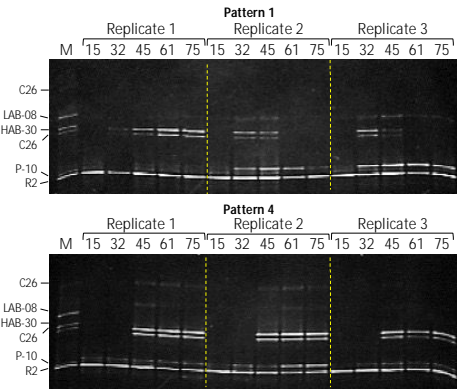


Figure 1 パターン1および4における群集構造変遷。各レーンの数字は培養時間を示した。マーカーには各菌株純粋培養物のDNAから増幅したPCR産物を混合したものを用いた。

##### (2) モデル微生物群におけるフェノール競合と代謝ネットワーク

パターン1で微生物群集構造が不安定化した原因を解明するため、培養期間中の培養上清に含まれる代謝産物を分析した。検出された代謝産物のプロファイルを用いて、多成分分析 (MDS) による評価を実施した結果、培養75日目まで R2 株、P-10 株、HAB-30 株および c26 株が共存した Replicate 1 では培養13日目から30日にかけて、そのプロファイルが大きく変化し、その後は変化しないことが示された。一方で、HAB-30 株および c26 株が淘汰される場合では、培養45日目までは異なる変化を示し培養61日目以降には Replicate 1 とは異なるプロファイルで安定化することが示された。即ち、微生物群集構造と代謝ネットワークには密接な関係があり、代謝ネットワーク形成プロセスを理解することが重要であると考えられた。

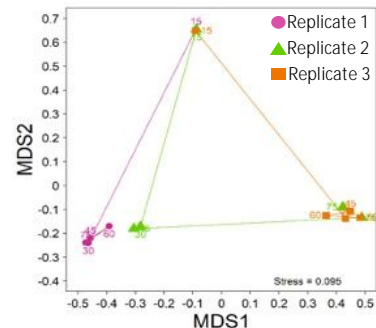


Figure 2 パターン1における各Replicateの代謝産物プロファイル変化

##### (3) RNA-seq による共存機構解析

微生物生態系の形成、維持において植菌順序に加え代謝ネットワークの形成が極めて重要であることが示唆されたため、代謝産物の分析に加え遺伝子転写解析を行なった。上記の植菌順序を変えた実験では、同じ植菌順序にも関わらず複数の平衡点を持つことが示されたため、本実験では全ての菌株の菌密度を揃えて同時に植菌し、培養経過に伴う群集構造変遷、代謝産物の変化および遺伝子転写を解析した。実験は3連で実施した。まず、群集構造を解析した結果、3つの Replicate の内、#2 および #3 では大きな変化はなく R2 株が優占種となった (Figure 3)。一方で、#1 では培養15日目に c26 株が優占種となり、R2 株の相対存在比は約1%まで減少した。この結果から、#1 では代謝ネットワークが変化していると考えられて。そこで、代謝産物の解析を実施した (Figure 4)。その結果、代謝産物レベルでは #1 および #3 が類似し、#2 は異なる変遷をしていたことが示された。次に、遺伝子転写解析を実施した結果、培養5日目および10日目における遺伝子転写プロファイルは #2 および #3 で類似する一方で、#1 では大きく異なることが示された。培養15日目では #1 および #2 で同様のパターンを示す一方で、#3 は異なることが示された。本培養系ではフェノールを唯一の炭素源として供給したことから、フェノール分解を中心に代謝のネットワークが形成されていくことが考えられることから、まず、各培養系の phenol hydroxylase の large subunit をコードする遺伝子の転写に注目した結果、#2 および #3 では常に R2 株の転写量が高いことが示された。興味深いことに、#1 では培養5日目において R2 株の転写量が高く c26 株の転写量も高いことが示された。しかも、培養10日目および15日目でも

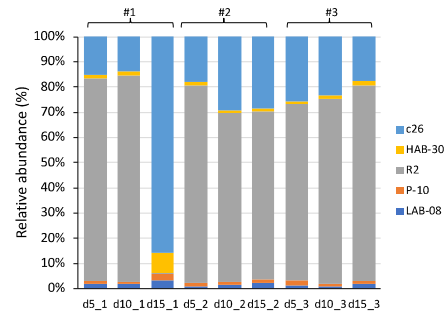


Figure 3 群集構造変遷。#1、#2、#3はReplicateを示した

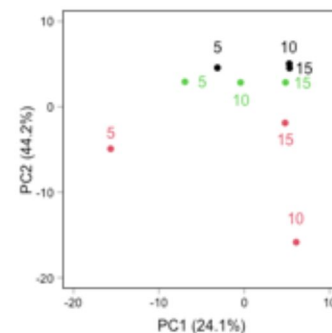


Figure 4 主成分分析による代謝産物プロファイルの比較。黒、赤、緑はそれぞれ#1、#2および#3を示した

c26 株が高い転写量を維持しており、HAB-30 の転写量も徐々に増加することが示された。したがって、#2 および#3 では R2 株がフェノールを分解し他の菌株がその代謝産物を利用するようなネットワークが形成されたのに対し、#1 では培養 15 日目でも複数種がフェノールを競合する状態が維持されていたことが考えられた。以上の結果から、複合微生物群の安定化には円滑な代謝ネットワーク形成が重要であり、群集構造が同じでも代謝ネットワーク構造は異なることが示唆された。

#### (4) R2 株のゲノム解析および代謝モデルの構築

本研究の目標である、微生物生態系の安定性の定量的評価のためには代謝ネットワークを酵素反応レベルに落とし込み、熱力学的に評価する必要がある。そのためには、5 菌株の代謝モデルを作成し、種間のつながりを何らかの形で表現する必要がある。代謝モデルの構築は KEGG 等のデータベースおよび同属の株で構築されたモデルをベースにし、特にゲノム解析が進んでいる P-10 株、R2 株および LAB-08 株についてまず行なった。これら 3 菌株のゲノムから起こり得る反応を抽出したところ、P-10 株、R2 株および LAB-08 株はそれぞれ、1702、1561 および 1661 の反応を有することが予測された。また、これらの反応には、1895、1223 および 1560 遺伝子が関与することが予測された。本研究では完全な代謝モデルの構築には至らなかったが、微生物間で共有される反応や特異的な反応の抽出に成功しており、前述の代謝産物の結果と結びつけることで、実際に動いていた代謝経路を特定し、その自由ギブズエネルギーを算出することで代謝ネットワークの安定性を評価できると考えられた。モデルをより正確なものにするためには、ゲノム情報の正確さが極めて重要である。そこで、5 菌株のゲノムの完全化を進め、LAB-08 株および R2 株のゲノム解析が完了した。

#### < 引用文献 >

Aziz FAA, Suzuki K, Ohtaki A, Sagegami K, Hirai H, Seno J, Mizuno N, Inuzuka Y, Saito Y, Tashiro Y, Hiraishi A, Futamata H. " Interspecies interactions are an integral determinant of microbial community dynamics " *Front Microbiol* Vol. 6. 1148-1148, 2015  
Aziz FAA, Suzuki K, Honjo M, Amano K, Mohd Din ARJB, Tashiro Y, Futamata H, " Coexisting mechanisms of bacterial community are changeable even under similar stable conditions in a chemostat culture " *Jour. Biosci. and Bioeng.* Vol. 131. 77-83, 2021

## 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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mohd Din Abd Rahman Jabir, Suzuki Kenshi, Honjo Masahiro, Amano Koki, Nishimura Tomoka, Moriuchi Ryota, Dohra Hideo, Ishizawa Hidehiro, Kimura Motohiko, Tashiro Yosuke, Futamata Hiroyuki	4. 巻 36
2. 論文標題 Imbalance in Carbon and Nitrogen Metabolism in &lt;i>Comamonas testosteroni&lt;/i>; R2 Is Caused by Negative Feedback and Rescued by L-arginine	5. 発行年 2021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/j sme2.ME21050	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 Abdul Aziz Fatma Azwani, Suzuki Kenshi, Honjo Masahiro, Amano Koki, Mohd Din Abd Rahman Jabir Bin, Tashiro Yosuke, Futamata Hiroyuki	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Abdul Aziz Fatma Azwani, Suzuki Kenshi, Honjo Masahiro, Amano Koki, Mohd Din Abd Rahman Jabir Bin, Tashiro Yosuke, Futamata Hiroyuki	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13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 M. Honjo, K. Suzuki, K. Amano, Y. Saito, K. Takeda, M. Kimura, H. Ishizawa, Y. Tashiro, H. Futamata
2. 発表標題 Fluctuation of Bacterial Interactions Enables Coexistence of Different Bacterial Strains in Chemostat Conditions
3. 学会等名 World Microbe Forum, American Society for Microbiology, Federation of European Microbiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Mohd Din, K. Suzuki, K. Amano, M. Kimura, H. Ishizawa, Y. Tashiro, H. Futamata
2. 発表標題 Collapse of Phenol-utilizing Bacterium <i>Comamonas testosteroni</i> Strain R2 Under a Chemostat Condition Supplied with Phenol as Sole Carbon Source
3. 学会等名 World Microbe Forum, American Society for Microbiology, Federation of European Microbiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 研志、上原 悠太郎、栗栖 太、野尻 秀昭
2. 発表標題 基質競合下における微生物間代謝ネットワーク形成と多種共存
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本莊雅宏、鈴木研志、天野光喜、齋藤保久、武田和宏、木村元彦、石澤秀紘、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 微生物群集の創造に向けた共存系における微生物間相互作用の理解
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木研志、上原悠太郎、栗栖太、野尻秀昭
2. 発表標題 基質競合下における代謝ネットワークの進化と微生物共存
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 本荘 雅宏, 鈴木 研志, 天野 光喜, 齋藤 保久, 武田 和宏, 木村 元彦, 石澤 秀紘, 田代 陽介, 二又 裕之
2. 発表標題 ケモスタット培養系における微生物間相互作用の揺らぎが生み出す異属三菌株の共存機構
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 鈴木 研志, 上原 悠太郎, 栗栖 太, 野尻 秀昭
2. 発表標題 代謝ネットワーク形成プロセスと微生物共存
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本荘雅宏、鈴木研志、齋藤保久、武田和宏、木村元彦、石澤秀紘、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 複合微生物群集における安定的共存の理解に向けた合成微生物群集の解析
3. 学会等名 日本土壌微生物学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本荘雅宏、鈴木研志、齋藤保久、武田和宏、木村元彦、石澤秀紘、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 複合系の好適制御のために：Dry & Wet解析から見えてきた三菌株の安定的共存系の仕組み
3. 学会等名 日本生物工学会中部支部2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田麗、天野光喜、本莊雅宏、高橋宣博、鈴木研志、栗栖太、木村元彦、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 Functional stability and instability observed in engineered microbial complex systems, 人工的微生物複合系において観察された機能的安定性と不安定性
3. 学会等名 日本生物物理学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田麗、天野光喜、本莊雅宏、高橋宣博、鈴木研志、栗栖太、木村元彦、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 微生物群集の好適制御に向けた複合微生物系の機能的構造解析
3. 学会等名 日本生物工学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田麗、天野光喜、本莊雅宏、高橋宣博、鈴木研志、栗栖太、木村元彦、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 複合微生物系の好適制御に向けた微生物群集の機能的構造解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本莊雅宏、鈴木研志、齋藤保久、武田和宏、木村元彦、石澤秀紘、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 複合微生物群集における安定的共存には微生物間相互作用の変化が重要
3. 学会等名 日本微生物生態学会2022年度大会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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