

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14768

研究課題名（和文）マイクロフルイディクスで多環式芳香族炭化水素分解複合微生物間相互作用を解明する

研究課題名（英文）To elucidate the microbial interactions of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading communities by using microfluidics system

研究代表者

YANG CHONGYANG (YANG, CHONGYANG)

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：50882411

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：微生物の相互作用は、強力な複合微生物系の構築に貢献し、効率的かつ制御可能な生物修復を実現するのに役立ちます。したがって、微生物菌叢の相互作用を解明することは重要です。しかし、環境中には培養が難しい微生物や複雑な微生物相互作用が存在し、伝統的な培養法では多様な天然菌叢を得ることが困難です。この研究では、微小空間システムであるマイクロデバイスとマイクロドロップを構築し、環境サンプルから微生物を培養・スクリーニングすることができた。ナフタレンを単一の炭源として培養した結果、多様なナフタレン分解菌叢をもらえた。同時に、異なる菌叢のナフタレン分解能力を評価し、菌叢中の微生物の組成成分も分析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、マイクロフルイディクス技術を利用して多様な複合微生物系を獲得し、複雑な微生物系内の微生物間相互作用を包括的に検出した点にある。この研究は従来の分離培養法の制約を克服し、自然環境から収集した様々な組み合わせの微生物を培養することができることから、特定の機能を持つ微生物を効率的に探索するための手段として有効であり、新たな生物資源の創造に寄与し、環境保全や農作物生産拡大など幅広い領域での技術革新に貢献することが期待された。

研究成果の概要（英文）：Microbial interactions contribute to constructing robust microbial consortia, achieving highly efficient and controllable bioremediation. Therefore, it is of great significance to investigate the interactions in consortia. However, there are many difficult-to-culture microorganisms and complex microbial interactions in environment, resulting in hardness to obtain diverse natural consortia by traditional enrichment culture. In this study, we constructed two micro-spatial culture systems: microwell array devices and microdroplets for culturing and screening microorganisms from environmental samples. Diverse naphthalene degrading communities were obtained by culturing with naphthalene as a sole carbon source. We also evaluated the naphthalene degradation capacity of different consortia and analyzed the composition of microorganisms in the consortia.

研究分野：応用微生物

キーワード：複合微生物 ナフタレン分解 マイクロフルイディクス

1. 研究開始当初の背景

微生物の働きを利用して環境浄化などの技術開発が行われている。ただし、実際の応用で機能的な単離菌は複合微生物系より効果が大幅に減少する。それは複合微生物系は単離菌だけが実行できない複雑な機能を実行できるし、加えて環境変動に対して頑健性を持つため環境に素早く適応することができるためである。そこで、この技術を安定かつ健全に利用し、さらなる高効率化を実現するためには、対象とする複合微生物系を正確に捉え、種間相互作用を完全に理解することが必要不可欠である。しかし、既存の分離培養技術で獲得できる微生物種は全体の1%にも満たず、実際の環境で生じる相互作用の殆どが見落とされているのが実情である。マイクロフルイディクス技術は微小空間で化学反応や生体反応を個別に実行することができることから、物理学、化学そして生物学といった幅広い分野での応用が期待されている技術である。また、一度に数万から数十万の反応を並列に行えることから、ハイスループットな解析を可能にしている。

本人所属する研究室では、難分解性化合物の一種である多環芳香族炭化水素 (PAH) の分解に関する研究を実施してきた。PAH を唯一の炭素源として集積培養し、分解微生物を単離することでその能力を評価してきた。ただし、実際のバイオレメディエーションでは、単離菌株は分解活性が低いことが多く、汚染された現場でも生き残ることは困難である。その一方で、集積培養物は高い分解活性を示すことが明らかとなってきた。このことから、微生物が最大限の機能を発揮するためには、分解における主要機能を担う微生物の他に補助的機能を発揮する微生物の存在が重要であることがうかがえる。すなわち、集団内の相互作用を残した頑健な分解菌群を構築できれば、高効率で制御可能なバイオレメディエーション技術の実現に寄与できると期待される。しかし、既存の方法では難培養性微生物が多いため補助微生物の分離には困難が伴い、主要微生物との相互作用も未知である。そこで、マイクロフルイディクス技術を応用することで、環境サンプル中に存在する微生物に対して大規模スクリーニングを実現し、これまで単離・解析できなかった微生物の検出とその相互作用の解明が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、新規マイクロフルイディクス法を用いて、土壌由来の PAH 分解複合微生物群集における分解微生物を特定し、それを取り巻く微生物間相互作用を明らかにすることを目的とし、下記の2項目を実施する。

- (i). マイクロフルイディクス技術を用いた PAH 分解微生物の単離。
- (ii). 集積あるいは単離された微生物の機能解析を実施し、微生物間相互作用を解明する。

3. 研究の方法

ゲル充填マイクロウェルアレイデバイスは、小さなウェルにゲルを充填することができる固体培地装置である。細菌は各ウェルで別々に増殖することができ、他の微生物からの影響を排除することができる【図1】。一方、植菌する培養液の濃度を調整することで、各ウェル内の菌のメンバーを調整し、互いの相互作用を調べることが可能である (Duran et al., 2022)。各ウェルには、環境試料 (SNR: 佐鳴湖沿岸堆積物抽出菌, SEA: 浜名湖沿岸堆積物抽出菌) から分離した細菌をランダムに組み合わせさせて充填した。微生物の増殖は、顕微鏡観察により評価した。微生物コロニーが形成されたウェルを選んでスケールアップ培養を行い、ナフタレン分解能力および微生物菌叢組成を調査した。これらのマイクロコンソーシア間の微生物間相互作用は、メタゲノム解析とトランスクリプトーム解析によって行われている。

マイクロドロップレットは、油中にマイクロスケールの水滴を形成し、その中で微生物を培養することができる【図2】。マイクロドロップレットは細菌の増殖のための独立した空間を形成し、他の微生物との競合を排除することができる。環境試料 (EXT: 土壌抽出菌, CON: 土壌菌の3代目集積培養) から分離した細菌をランダムに組み合わせ、ドロップレットに封入し増殖を検出する。蛍光共鳴エネルギー移動に基づく RNA プローブは、微生物が生産する RNase によって切断されることで蛍光を示す。そこで、RNA プローブを共にドロップレット内に封入することで微生物の増殖 (に伴う RNase 活性の増加) を蛍光強度の増加に基づいて評価する。菌叢の増殖が確認された液滴を回収し、96 ウェルプレートに分注してスケールアップ培養を行う。

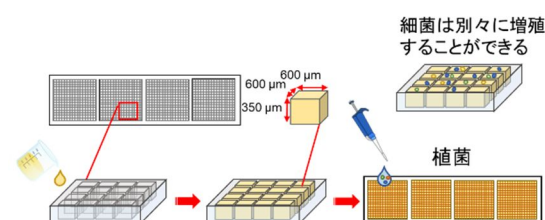


図1. ゲル充填マイクロウェルアレイデバイス

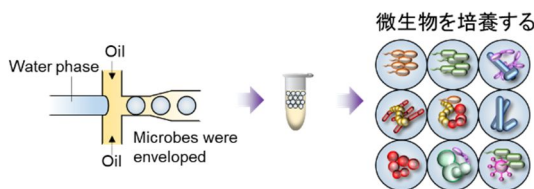


図2. マイクロドロップレット

これらのマイクロコンソーシア間の微生物間相互作用は、メタゲノム解析とトランスクリプトーム解析によって行われている。

ルアップ培養を行った。同様に、ナフタレン分解能力と微生物菌叢組成を解析した。これらのマイクロコンソーシアム間の微生物間相互作用は、メタゲノム解析とトランスクリプトーム解析によって行っている。

4. 研究成果

(1) ゲル充填マイクロウェルアレイデバイス

- マイクロデバイスで細菌の培養とスケールアップ培養

抽出した SNR と SEA の細菌をマイクロデバイスに植菌し、一定時間ごとに顕微鏡で観察した。8日間培養した、SNR と SEA の試料を接種したマイクロデバイスには 56 個のコロニーが生育していました。このコロニーを 96 ウェルプレートに移し、静置培養を行ったところ、SEA から 26 個のマイクロコンソーシアと SNR から 21 個のマイクロコンソーシアのスケールアップ培養を成功した【図 3】。

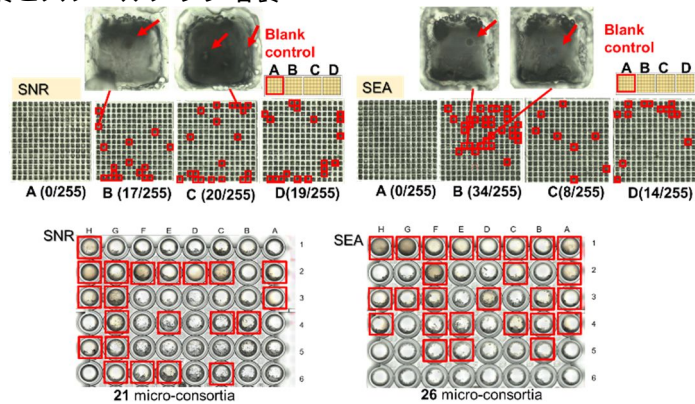


図3. マイクロデバイスで細菌の培養と96ウェルプレートでスケールアップ培養

- ナフタレン分解能力

SEA では、15日間培養後、7つのマイクロコンソーシアが 20%以上、2つのマイクロコンソーシアが 40%以上のナフタレンを分解した。SNR では、15日間培養後、2 個のマイクロコンソーシアが 20%以上のナフタレンを分解し、6 個が 40%以上のナフタレンを分解した。特に、SEA-F4 と SNR-D2 は、並外れたナフタレン分解能力を示した【図 4】。

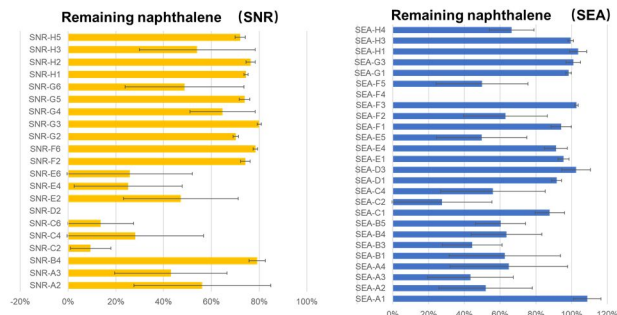


図4. SNRとSEAのマイクロコンソーシアのナフタレンの分解能力

- 微生物菌叢組成

SNR からマイクロコンソーシアの優占細菌属は *Cellulomonas*、*Pseudomonas*、*Oceanibaculum*、*Rhodococcus* であり、集積培養の優占細菌属は *Thalassospira* と *Pseudomonas* である。SEA では、マイクロデバイスがスクリーニングした 26 のマイクロコンソーシアにおける優勢属は、*Cellulomonas*、*Pseudomonas*、*Thalassospira*、*Oceanibaculum*、*Rhodococcus* であり、集積培養における優勢属は、*Thalassospira*、*Shingomicrobium*、*Alcanivorax* でした。【図 5】。

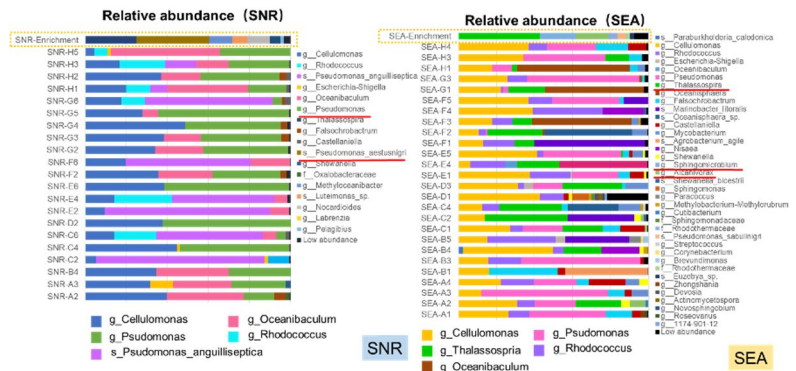


図5. SNRとSEAのマイクロコンソーシアの微生物菌叢組成

(2) マイクロドロップレットの結果

- マイクロドロップレットの制作とスケールアップ培養

環境試料 (EXT と CON) を用いてドロップレット生成を行う、 λ を 1、5、10 に設定した (λ : 1 個ドロップレット中の細胞数)。蛍光ドロップレットは On-chip Droplet Selector でソーティングされた、96 ウェルプレートに直接分注することができる。EXT の 30 個マイクロコンソーシアと CON の 35 個マイクロコンソーシアの 96 ウェルプレートへのスケールアップ培養に成功した【図 6】。

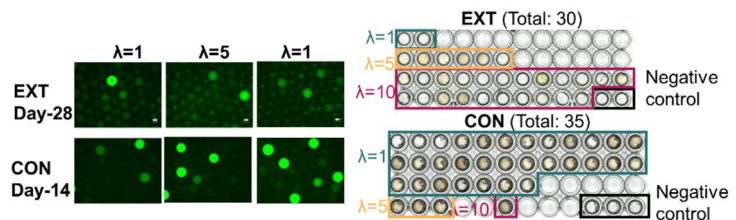


図6. マイクロドロップで細菌の培養と96ウェルプレートでスケールアップ培養

- ナフタレン分解能力

EXT の 14 個マイクロコンソーシアと CON の 28 個マイクロコンソーシアが、ナフタレンを

含む 14 日間の培養で 20% 以上のナフタレン分解能力を示した。さらに、CON の 15 個マイクロコンソーシアが高いナフタレン分解能力(80%以上)を示した【図 7】。

• 微生物菌叢組成

EXT のマイクロコンソーシアは CON のマイクロコンソーシアよりも多様性が高く、微生物組成も大きく異なっていた。EXT のマイクロコンソーシアでは、*Escherichia-Shigella*、*Rhodococcus*、*Acinetobacter_baumannii* が優勢属であった。CON のマイクロコンソーシアでは、*Paraburkholderia caledonica* と *Pseudomonas luyeola* が優勢属であった。そして、*Rhodococcus* 属はナフタレン分解能を有することが報告されている (Larkin et al., 2005)。*Paraburkholderia* 属は芳香族炭化水素分解菌として報告されている (Lee et al., 2018)。高いナフタレン分解性を示したマイクロコンソーシアには、*Paraburkholderia caledonica* の割合が顕著であった【図 8】。

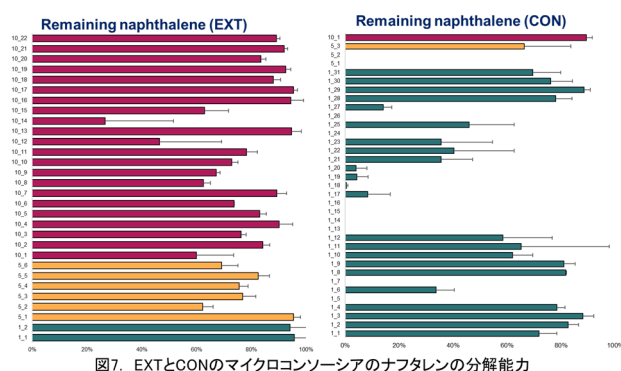


図7. EXTとCONのマイクロコンソーシアのナフタレンの分解能力

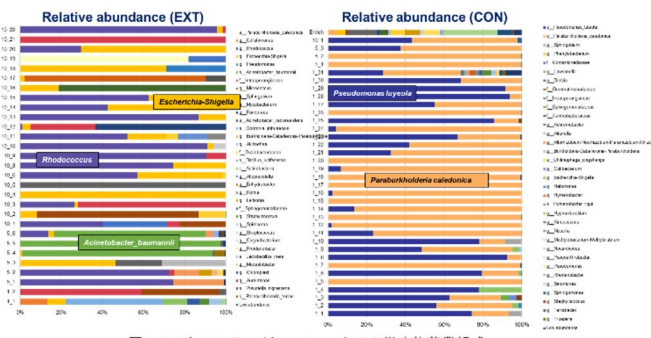


図8. EXTとCONのマイクロコンソーシアの微生物菌叢組成

以上 2 つのプラットフォームにより、環境試料からナフタレン分解性マイクロコンソーシアを得ることに成功した。さらに、ナフタレン分解能力および微生物菌叢組成を解析した。その結果では、ナフタレン分解マイクロコンソーシアは、多様な分解能力と微生物群集の組成を示すことがわかった。メタゲノム解析とトランスクリプトーム解析により、ナフタレン分解コンソーシアにおける微生物間相互作用を解明する研究を進めている。

参考文献：

Duran, Clelia, et al., Low-cost gel-filled microwell array device for screening marine microbial consortium. *Frontiers in Microbiology* 13 (2022): 1031439.

Larkin, Michael J., Leonid A. Kulakov, and Christopher CR Allen. "Biodegradation and *Rhodococcus*—masters of catabolic versatility." *Current opinion in Biotechnology* 16.3 (2005): 282-290.

Lee, Yunho, and Che Ok Jeon. "*Paraburkholderia aromaticivorans* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium, isolated from gasoline-contaminated soil." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68.4 (2018): 1251-1257.

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Clelia Duran, Shiyi Zhang, Chongyang Yang, Maria Lorena Falco, Cristiana Cravo-Laureau, Chiho Suzuki-Minakuchi, Hideaki Nojiri, Robert Duran, Fumihiro Sassa	4. 巻 13
2. 論文標題 Low-Cost Gel-Filled Microwell Array Device for Screening Marine Microbial Consortium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 01-09
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.1031439	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岸上 佳保里、楊 重陽、大田 悠里、森田 雅宗、松倉 智子、陶山 哲志、水口 千穂、岡田 憲典、野田 尚宏、野尻 秀昭
2. 発表標題 Water-in-oilドロップレット培養の多環芳香族炭化水素分解菌群取得への応用
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 岸上 佳保里、楊 重陽、大田 悠里、森田 雅宗、松倉 智子、陶山 哲志、水口 千穂、岡田 憲典、野田 尚宏、野尻 秀昭
2. 発表標題 オイル相からの基質供給によるwater-in-oilドロップレットを用いたナフタレン分解菌群の取得
3. 学会等名 第19回微生物研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸上 佳保里、楊 重陽、水口 千穂、岡田 憲典、佐々 文洋、野尻 秀昭
2. 発表標題 微生物培養用ゲル充填マイクロウェルアレイを用いたナフタレン分解菌の培養と取得
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 CHONGYANG YANG, Kahori KISHIGAMI1, Yuri OTA, Tetsushi SUYAMA, Masamune MORITA2, Satoko MATSUKURA2, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Naohiro NODA, Hideaki NOJIRI
2. 発表標題 Microdroplet-based system for cultivation and acquisition of naphthalene-degrading bacteria
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 Yuxin LIU, Chongyang YANG, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Fumihiro SASSA, Hideaki NOJIRI
2. 発表標題 Isolation of naphthalene-degrading bacterial consortia by the gel-filled microwell array device
3. 学会等名 第20回微生物研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chongyang Yang, Yuxin Liu, Satoko Matsukura, Chiho Suzuki-Minakuchi, Kazunori Okada, Naohiro Noda, Hideaki Nojiri
2. 発表標題 The efficient development of various naphthalene-degrading consortia via droplet-based microfluidics
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 劉禹忻，楊重陽，張詩芸，水口千穂，岡田憲典，佐々文洋，野尻秀昭
2. 発表標題 劉禹忻，楊重陽，張詩芸，水口千穂，岡田憲典，佐々文洋，野尻秀昭
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023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
---------	---------