

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82108

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14778

研究課題名(和文)代謝モデルを利用した休眠細胞覚醒メカニズムの解明

研究課題名(英文) Exploring resuscitation mechanism of starving bacteria by metabolic simulation

研究代表者

高野 壮太郎 (TAKANNO, Sotaro)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・高分子・バイオ材料研究センター・NIMSポスドク研究員

研究者番号：90896979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、休眠状態にある細菌の覚醒プロセスにおける確率性と基質依存性を明らかにすることを目的とした。初めに飢餓状態にある数千のクローナルな大腸菌の増殖を、1細胞観察系を用いて長期間観察し、新たに炭素源を与えてから再増殖するまでの時間と増殖履歴との関係性を調べたところ、速やかに増殖を再開する細胞が、特徴的な増殖履歴を有する特定の系譜に偏って存在することを明らかにした。また、ゲノムスケール代謝モデルを基に、休眠覚醒に対する基質至適性を検証したところ、各炭素源の至適性が、ごく一部の代謝物のフラックスと強い相関を示すことが明らかとなり、炭素源の至適性を代謝反応と関連付けて理解することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球上に存在する微生物のうち増殖活性を示す微生物は1%にも満たないと言われ、有用微生物の分離培養を妨げる一つの要因となっている。飢餓状態からの覚醒には、個々の細胞の生理状態のばらつきや、増殖基質の至適性の影響が予想されていたが、技術的な難しさからこれらの関係性を詳細に明らかにすることは困難であった。本研究では、細胞毎の再増殖の様子を1細胞レベルで長期間観察し、従来見逃されていた休眠覚醒過程に潜む増殖履歴の影響を高い解像度で明らかにした。また、増殖基質の至適性をゲノム情報を基に解析する手法を確立し、代謝ネットワークの観点から休眠覚醒プロセスを理解可能なプラットフォームの構築を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to elucidate stochasticity and substrate dependence in the resuscitation of dormant bacterial cells. We first observed the growth dynamics of thousands of clonal *E. coli* exposed to nutrient-poor environments at single-cell level and explored the relationship between the growth-history and lag-time upon nutrient upshift in individual cells, and found that the cells that quickly resumed growth were biased to a specific lineage exhibiting specific growth dynamics at the start of starvation. To examine the effect of the type of carbon source given as a substrate on the growth resumption, we explored growth optimality of carbon sources as growth substrates using a genome-scale metabolic model. The metabolic reactions determining the optimality are strongly correlated with the fluxes of specific metabolites located in the core of metabolic network.

研究分野：システムゲノム科学

キーワード：代謝モデル 休眠 1細胞観察 不均一性 履歴 細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球上に存在する微生物のうち、増殖活性を示す微生物は1%にも満たないと言われ、有用微生物の分離培養を妨げる一つの要因となっている。飢餓状態からの覚醒には、個々の細胞の生理状態のばらつきや、増殖基質の至適性の影響が予想されていたが、微生物集団に見られる不均一性に焦点を当て、飢餓環境からの再増殖メカニズムに迫った研究は未だに少なく、休眠覚醒プロセスを、微生物が持つ代謝能力と結び付けて理解した研究は皆無である。

2. 研究の目的

本研究課題では、飢餓環境に存在する微生物が、どのような環境変化(基質の到来)にいち早く応答し、自身の増殖活性を回復させるかを、1細胞観察系と代謝モデルを使ったアプローチによって明らかにする。さらに、細菌の増殖関わる基質依存性を、ゲノム情報を基に推定することで、代謝ネットワークの観点から休眠覚醒プロセスを種ごとに予測する技術へと発展させる。

3. 研究の方法

飢餓環境での微生物の生理状態は、クローナルな集団中であっても、細胞ごとに大きなばらつきが見られるため、個々の細胞の違いを精度良く解析する技術が求められる。本研究では、マイクロ工学と1細胞ライブイメージングを駆使し、細胞毎の再増殖の様子を長期間にわたって観察・定量し、従来の微生物学研究で見逃されていた、休眠覚醒過程に潜む確率性を従来にない解像度と深度で明らかにする。また、ゲノムスケール代謝モデルを基に炭素源の増殖基質としての至適性を調べることで、休眠状態からの迅速な再増殖を促す基質をゲノム情報から推定可能なプラットフォームの構築を行う。

4. 研究成果

(1) 1細胞観察系を用いた休眠細胞覚醒ダイナミクスの可視化と定量

初めに飢餓状態にある数千のクローナルな大腸菌の増殖を、1細胞観察系を用いて長期間観察し、休眠覚醒のタイミングが細胞ごとにどの程度ばらついているのかを検証した(図1)。観察結果に対して細胞系譜を用いた解析を実施したところ、新たに炭素源を与えてから再増殖するまでの時間(lag-time)が短い細胞が特定の系譜に偏って存在することが明らかとなり、休眠覚醒プロセスに系譜依存性があることが示唆された。また、新たに炭素源を与えてから再増殖するまでの時間と増殖履歴との関係性を調べたところ、速やかに増殖を再開する細胞が、特徴的な増殖履歴を有する特定の系譜に偏って存在することを明らかにした。また、飢餓開始時点での細胞の生理状態と再増殖の関連性に着目し、両者の相関関係について解析を行った。既報よりストレス応答に対する細胞周期の関連性が報告されていたため、飢餓からの再増殖に対する細胞周期の関連性について解析を行なったところ、細胞周期と飢餓開始直後の増殖ダイナミクスの間に相関関係は見られたものの、飢餓後の再増殖との間に強い関連性を確認することはできなかった。他の生理学的パラメータが影響している可能性が高いと考えられる。

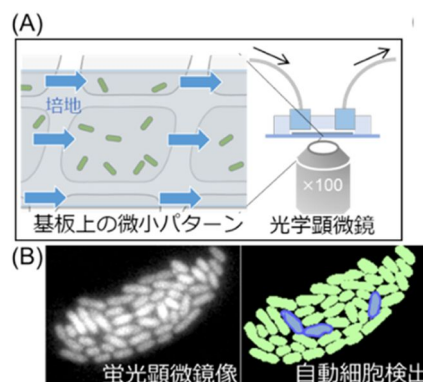


図1 (A) マイクロデバイスと顕微鏡を組み合わせた1細胞観察系の模式図。(B) 蛍光顕微鏡像と自動画像解析技術により検出された細胞イメージ。

(2) 細菌の増殖における基質依存性とその可変性の検証

続いて、基質として与える炭素源の種類が、大腸菌の休眠覚醒プロセスに与える影響を検証するため、ゲノムスケール代謝モデルを使って、増殖基質として利用可能な数十種類の炭素源の至適度を予測する手法の確立に取り組んだ。その結果、各炭素源の増殖基質としての至適性が、それらを代謝するために利用される代謝経路のコストに依存することが明らかとなった。また、様々な微生物を対象として炭素源の至適性を調べたところ、ゲノムから構築された代謝ネットワークの中でも、特定の代謝経路の類似度が高い微生物ほど、似通った炭素源の至適性を示す傾向にあることが分かり、特定の代謝遺伝子セットとの間に強い関連性があることが明らかとなった。また、これらの知見を基に炭素源の至適性に大きく影響を与える代謝反応をスクリーニン

グする手法を確立し解析を行なったところ、非常に少数の代謝反応や遺伝子によって炭素源至適性が左右されている可能性が示唆された。また、これらの重要な代謝反応の性質をネットワークの観点から解析したところ、ネットワークのハブに位置するごく一部の代謝物のフラックスと強い相関を示すことが明らかとなり、炭素源の至適性を代謝反応と関連付けて理解することが可能となった(図2)。また、炭素源の至適性は代謝状態の変化や多様性が生じたとしても非常に変わりにくいことが明らかとなり、ネットワーク構造に起因する至適炭素源の保存性を示唆する結果を得ることができた。

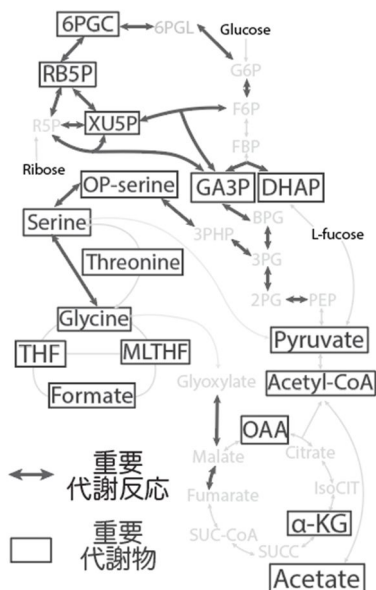


図2 代謝シミュレーションにより明らかになった、増殖至適性に重要な代謝反応と代謝物を代謝経路上にマップしたものの。

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 Takano Sotaro, Takahashi Hiromi, Yama Yoshie, Miyazaki Ryo, Furusawa Chikara, Tsuru Saburo	4. 巻 13
2. 論文標題 Inference of transcriptome signatures of Escherichia coli in long-term stationary phase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-32525-4	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 Takano Sotaro, Vila Jean C C, Miyazaki Ryo, Sanchez Alvaro, Bajic Djordje	4. 巻 40
2. 論文標題 The Architecture of Metabolic Networks Constrains the Evolution of Microbial Resource Hierarchies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molbev/msad187	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sotaro Takano
2. 発表標題 On the evolvability of microbial metabolic hierarchies in an empirical genotype-phenotype map
3. 学会等名 2022 Meetings in Microbial Ecology & Evolution（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野 壮太郎
2. 発表標題 炭素源利用順位の進化的可塑性と共存への影響
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回浜松大会（招待講演）
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
---------	---------