

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19075

研究課題名(和文)微生物の機能を活用した簡便な嫌気性微生物培養システムの構築

研究課題名(英文) Development of a simple anaerobic microbial culture system utilizing the functions of microorganisms

研究代表者

岸野 重信 (Kishino, Shigenobu)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：40432348

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)：近年、腸内細菌への関心が高まっている。しかし、応用微生物学分野の研究の多くは酸素が存在する「好気条件」で行われており、腸内細菌が生息する酸素が存在しない「嫌気条件」での研究はほとんどされていない。そのため、研究者が新たに腸内細菌に関する研究を行おうとすると、「嫌気条件」を作るための装置の導入が必要となり、大きな障壁となる。そこで、本研究では、容易に「嫌気条件」を作り出すことができるシステムの構築に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌などの嫌気性微生物を扱う研究は、設備投資がいること、嫌気性を維持するためのスキルが必要であること、などの理由からあまり進んでいない。本研究成果では、研究者が容易に扱うことができる大腸菌を用いた形質転換体を用いることで、好気性細菌を扱うかの如く嫌気性微生物を扱うことが可能となることから、嫌気性微生物に関する研究分野が飛躍的に発展する可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：In recent years, interest in gut bacteria has been increasing. However, most research in the field of applied microbiology is conducted under "aerobic conditions" where oxygen is present. There is little research done under "anaerobic conditions," where gut bacteria actually exist and oxygen is absent.

As a result, researchers attempting to study gut bacteria face significant barriers, such as the need to introduce equipment that can create "anaerobic conditions." Therefore, this study focuses on developing a system that can easily create "anaerobic conditions."

研究分野：応用微生物学

キーワード：腸内細菌 嫌気性微生物 嫌気反応 嫌気

1. 研究開始当初の背景

これまでの農芸化学応用微生物学分野における有用微生物の探索において、好気性微生物を用いた研究報告例は多数存在するが、嫌気性微生物を用いた研究報告は好気性微生物を用いた研究に比べてはるかに少ない。これは、嫌気環境を維持するための装置導入や特殊な消耗品購入などの初期投資が必要であること、嫌気環境を維持するためのスキル習得が必要であることなどから、容易に嫌気性微生物や腸内細菌などを扱うことができないことに起因する。我々はこれまでに嫌気環境を維持するための装置(嫌気チャンバー)を活用し、多種多様な嫌気性微生物や腸内細菌から有用な機能を有する微生物を探索し、選抜した有用な微生物の機能評価などを数多く行ってきた。我々のこれまでの研究において、嫌気性微生物や腸内細菌から新規な代謝を数多く見いだせたことは、未だ発見されていない新規な代謝や酵素が嫌気性微生物や腸内細菌に多く存在していることを示唆している。さらに、腸内細菌が様々な疾病に関与している報告が多く存在することから、腸内細菌を用いた研究や、腸内細菌の機能解析研究が急務となってくる。より多くの研究者が、嫌気性微生物や腸内細菌を簡便に扱うことが可能となれば、嫌気性微生物や腸内細菌の研究分野がさらに盛んになり、新しい機能や代謝、酵素の発見へと繋がる。そこで多くの研究者が、嫌気性微生物や腸内細菌を扱う研究分野に容易に参画できるようにするために、簡便な酸素除去システムの開発を考えた。簡便な酸素除去システムの構築によって、多くの研究者が容易に嫌気性微生物や腸内細菌を扱えるようになり、本研究分野がさらに発展することが期待される。

2. 研究の目的

我々の主たる研究分野である農芸化学応用微生物学分野において、嫌気性微生物を扱った研究成果は、好気性細菌を扱う研究成果に比べ、はるかに少ない。その原因として、嫌気環境の整備の難しさ、嫌気性微生物を扱うための特殊な装置や消耗品の確保、さらには嫌気環境を維持するためのスキルが必要であることなどが挙げられる。現状の嫌気環境の整備には、嫌気チャンバーが必須であり、大型機材(嫌気チャンバー)のスペース確保や高額な購入資金、さらには嫌気チャンバーを使用する際に必要となる水素ポンペの導入、嫌気性微生物を培養するためのハンゲートチューブなどの特殊な消耗品購入にかかる資金など、容易に研究を始めることが難しい障壁がある。そこで本研究では、水溶液中から酸素を容易に除去することで、特殊な大型装置である嫌気チャンバーや水素ポンペを使用しなくても、嫌気性微生物を簡便に扱うことが可能となるシステムの構築を目的とした。

本研究で得られる成果によって、好気環境下でも容易に無酸素状態の水溶液を作製することが可能になることから、特殊な設備がなくとも嫌気性微生物を培養することが可能となる。これにより、より多くの研究者が嫌気性微生物研究分野へ参入することが可能となり、それにより嫌気性微生物や腸内細菌を用いたさらなる応用研究が飛躍的に発展する潜在性を有する挑戦的研究であると言える。

3. 研究の方法

本酸素除去システムでは、2種類の微生物機能を活用する。それぞれの役割等に関しては後日再提出するファイルにて詳細を記載する予定である。それぞれの微生物機能に対して最適な微生物の探索を行い、酵素の特定、形質転換株の作製を行った。最終的に2種類の形質転換株を用いて、溶液中の酸素が速やかに除去されるかを、溶存酸素計を用いて評価した。

4. 研究成果

本酸素除去システムにおいて必要な微生物機能が2種類存在することから、それぞれについて検討を行った。まず一つ目の機能に関して、必要となる機能を有する微生物の探索を行った結果、ある種の乳酸菌が、目的の活性を有し、かつ、望まない副反応を有さないことを見いだした。そこで、選抜した乳酸菌を用いて、選抜菌の無細胞抽出液より目的の活性に関与する酵素を精製し、N末端アミノ酸配列解析などを行い特定した。得られた情報をもとに、選抜株のゲノムを用いて目的酵素をコードする遺伝子の増幅を行い、大腸菌を用いた形質転換株を作製した。得られた形質転換株について、IPTGによる目的タンパク質の発現誘導条件の検討等を行い、機能解析を行った結果、本酸素除去システムにおいて必要な機能の一つを担うことを明らかにした。

また、二つ目の機能に関与する酵素についても同様に、目的の活性を有する酵素を特定し、大腸菌による形質転換株を作製した。得られた形質転換株について、IPTGによる発現誘導条件の検討を行い、機能解析を行った結果、本酸素除去システムにおいて必要なもう一つの機能を担うことを明らかにした。

以上のことから、作製した2種類の形質転換株それぞれが、本酸素除去システムにおいて必要な機能を有していたため、次に2種類の形質転換株の菌体を同時に用いて、酸素除去が可能かを検討した。2種類の形質転換株の菌体を用いて、0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.0 および pH 7.0)

中の溶存酸素が除去されるかを評価した。その結果、2種類の形質転換株の菌体を添加した溶液中において、pH 6.0 および pH 7.0 の両条件下でほとんど差異がなく、溶存酸素を10分弱で除去することを確認した(図左)。よって、2種類の形質転換株を培養し菌体を添加するだけで、溶液中の酸素を容易に除去することが可能となった。

一方で、培地中の溶存酸素除去を行うにあたり、形質転換株の菌体を培地に添加すると、培地の栄養素により形質転換株が生育し、本来の嫌気性微生物の培養に必要な栄養素が減少してしまう懸念が生じる。そこで、形質転換株の菌体を用いるのではなく、菌体を破砕することにより得られる無細胞抽出液を活用した酸素除去システムの構築を試みた。2種類の形質転換株を、それぞれの最適の培養条件で培養することにより得られた菌体を緩衝液に懸濁し、超音波破砕処理にて無細胞抽出液をそれぞれ作製した。得られた2種類の無細胞抽出液を用いて、上述した菌体を用いた検討時と同様の手法にて、酸素除去が可能かを検討した。その結果、図右に示すように無細胞抽出液を用いても菌体を添加した場合と同様に、pH 6.0 および pH 7.0 の両条件下でほとんど差異がなく、溶液中の酸素を除去することに成功した。また、2種類の無細胞抽出液を用いることにより2分弱で酸素を除去できたことから、菌体を用いた酸素除去システムよりも酸素除去効率が高まることが判明した。これは本システムに関わる酵素を発現する形質転換株を無細胞抽出液にすることにより、細胞膜の透過性などの障壁が解消され、より効率的に酵素と酸素が反応したためと推測される。現在、無細胞抽出液による酸素除去システムを用いて、好気条件下での嫌気性微生物の培養が可能であるかを検討している。

本研究成果は、多くの研究者が容易に取り扱える大腸菌による形質転換株を2種類培養し添加するだけで、設備投資や高度なスキルを要する嫌気性微生物を、あたかも好気性微生物を扱うかの如く取り扱うことが可能となるものであり、嫌気性微生物に関する研究分野が飛躍的に発展する可能性を秘めたインパクトの高い成果と言える。

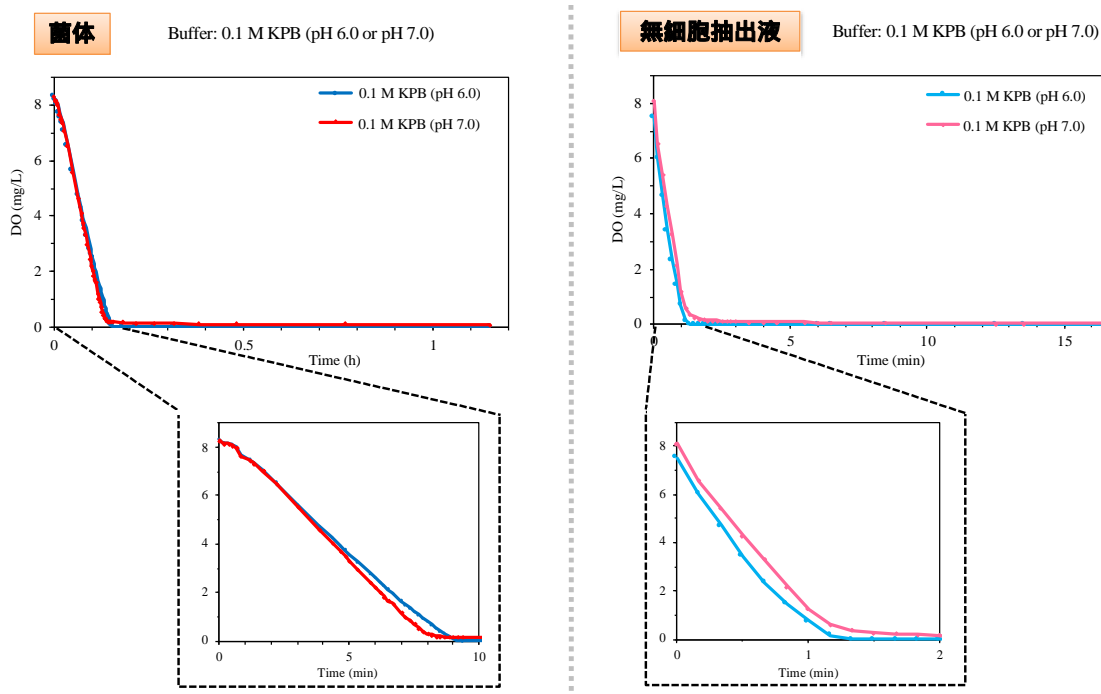


図 形質転換株を用いた酸素除去(左:菌体、右:無細胞抽出液)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------