

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18820

研究課題名（和文）マイノリティ微生物によるマジョリティ機能の誘導機構の解明

研究課題名（英文）A minority population bacterium enhances the activity of a majority population bacterium

研究代表者

伊藤 司（Ito, Tsukasa）

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：80431708

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）：Enterococcus faecalis T6a1株の培養にBacillus subtilis S4ga株を1%以下（～0.01%）の存在割合で共存させることでT6a1株の活性が向上した。これには少なくとも次の3つの理由があった。1）S4ga株1%共存下では過酸化水素の分解が速くなり、過酸化水素によりT6a1株の細胞損傷が軽減されたこと。2）1%以下のS4ga株が培養液中の溶存酸素を消費し続け、T6a1株の活性維持しやすい無酸素環境を長時間にわたり作りだしたこと。3）T6a1株に「細胞分裂 自己溶解による内容物の溶出 プロテアーゼなどによる溶出物の分解および利用」のサイクルが生じたこと。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然環境中ではほとんどの微生物は様々な微生物が共存した“微生物群集”を形成して存在している。そのため微生物群集や群集中の個々の微生物の機能を評価・制御する上で生物学的因子についての理解は重要である。しかしながら、これまでの考慮されてきた微生物の制御因子は、温度や圧力などの物理的因子とpHや酸素や基質濃度などの化学的因子であり、微生物群集としての理解や制御には繋がりにくい。本研究の成果は、こくわずに存在割合の微生物が系全体に与えることを明らかにしたものであり、微生物の機能を評価・制御する上で考慮すべきあらたな生物学的因子になり得ると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The activity of Enterococcus faecalis T6a1 was enhanced by culturing with Bacillus subtilis S4ga at a population rate of 1% or less (0.01%). There are at least three reasons for this. 1) In the presence of 1% S4ga, the degradation of hydrogen peroxide was accelerated, reducing the damage to T6a1 cells caused by hydrogen peroxide. 2) S4ga at a population rate of 1% or less consumed dissolved oxygen in the culture medium, creating an anoxic environment for a long period of time that made it easier for T6a1 to maintain its activity. 3) A cycle of "cell division elution of cellular contents due to autolysis dissolution and utilization of the cellular materials eluted by protease." occurred in T6a1.

研究分野：微生物生態学

キーワード：相互作用 多様性 Bacillus 持続可能性 微生物

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人間にとって多種類の食材の食事が薬より健康維持に良いことは、微生物も同じではないだろうか。社会で微生物を機能させるためには、特定の物質に着目するより、僅かでも多種類の物質を供給する食事に相当するものが重要であり、それを担えるのもまた微生物(微生物間作用)ではないかと考えている。たとえば、微生物 A は特定物質 Z を薬品投与されるより、微生物 B が生成する複数の微量物質の方が微生物 A 内の多様な活性が誘導され高活性を長期持続できる可能性が高い。微生物が産生する物質には複雑な化学構造も多く、個別に薬品投与するにはコスト高になる。

申請者はこれまで、系内の微生物全体の 1% 以下の微生物 A が存在することで 99% 以上を占める微生物 B の機能が誘導される現象を見出した(参考文献 1)。この現象を明らかにすることは、微生物群集内で働く微生物間相互作用の解明であり、微生物群集に循環型の持続性を生み出す制御技術の開発に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

存在割合 1% 以下の微生物 A が存在割合 99% 以上の微生物 B の機能向上効果(速度向上、早期機能発現、持続性向上)をもたらすメカニズムを解明する。アンバランスに思える 1:99 の存在比における A・B 両微生物の細胞内外代謝と相互作用に着目し、少数の微生物 A の存在により無関係に見える大多数の微生物 B の細胞全体の代謝活性がどのように高まり、微生物 B の機能発現に繋がっているのかを機構解明することが本研究の目的である。ここで微生物 A は非脱色細菌 *Bacillus subtilis* S4ga 株(以降 S4ga 株)、微生物 B はアゾ染料 Congo Red(以降 CR)の脱色活性を持つ脱色細菌 *Enterococcus faecalis* T6a1 株(以降 T6a1 株)である。

3. 研究の方法

「培養液中の過酸化水素濃度」、「培養液中の溶存酸素濃度」、「細胞外溶出物の利用」の 3 つの観点から検討を行った。実験条件は、T6a1 株単独培養、共培養、Blank の 3 条件で行った。LB50% 液体培地を用いて細菌懸濁液を作成した。細菌懸濁液を試験管に全量 5mL となるように入れた。培養 0 時間における T6a1 株単独培養での T6a1 株の生菌数は 8 log CFU/mL、共培養では T6a1 株の生菌数が 8 log CFU/mL、S4ga 株の生菌数が 6 log CFU/mL とした。各試験管に CR 溶液を染料濃度が 40 mg/L となるよう添加した。その後、37 °C で 23 時間静置培養した。培養中に培養液中の溶存酸素濃度および過酸化水素濃度の測定と細胞外アデニレート量の測定を行った。過酸化水素による細胞の損傷評価を行うため、培養 0 時間における培養液中の細胞に対して LIVE/DEAD 染色を行った培養 24 時間における T6a1 株単独培養と共培養での遺伝子発現量の変化を見るために遺伝子発現解析(RNA-seq)を行った。

4. 研究成果

本研究では、T6a1 株の活性が S4ga 株と共培養することによって向上および維持されるメカニズムを解明することを目的に研究を行った。*Enterococcus faecalis* T6a1 株の培養に *Bacillus subtilis* S4ga 株を 1% 以下(～0.01%)の存在割合で共存させることで T6a1 株の活性が向上した。これには少なくとも 3 つの理由があった。1) S4ga 株 1% 共存下では過酸化水素の分解が速くなり、過酸化水素により T6a1 株の細胞損傷が軽減されたこと。2) 1% 以下の S4ga 株が培養液中の溶存酸素を消費し続け、T6a1 株の活性維持しやすい無酸素環境を長時間にわたり作りだしたこと。3) T6a1 株に「細胞分裂 自己溶解による内容物の溶出 プロテアーゼなどによる溶出物の分解および利用」のサイクルが生じたこと。これらは微生物の機能を評価・制御する上で考慮すべきあらたな生物学的因子であると考えられた。

以下はその詳細である。

4.1. 過酸化水素の生成および分解

T6a1 株単独培養における培養液中の過酸化水素濃度は、培養 0 時間で最も高い値を示し、培養約 6 時間まで減少を続け、その後は低い値を維持し続けた(図 1A)。共培養の過酸化水素濃度の推移は T6a1 株単独培養と同様の傾向を示した。しかし、過酸化水素の分解速度は共培養の方が T6a1 株単独培養よりも速く、分解量についても共培養の方が T6a1 株単独培養よりも多かった。LIVE/DEAD 染色を行った結果、死細胞と評価される細胞と損傷細胞と評価される細胞が共培養の方が T6a1 株単独培養よりも少なかった(図 2)。以上のことから、S4ga 株と共培養することで培養系における過酸化水素の分解が向上し、過酸化水素によって T6a1 株の細胞が損傷することを軽減していると考えられた。

4.2. 培養液中の溶存酸素濃度と脱色活性

アゾ染料は嫌気性環境で分解されやすい。当然ながら試験管の気相部分を窒素置換した T6a1 株単独培養では脱色速度が向上した。

通常の T6a1 株単独培養では培養 2~4 時間で溶存酸素濃度が約 0 mg/L となり、その後、上昇し続けた。一方、共培養では培養 2~4 時間で溶存酸素濃度が約 0 mg/L となり、その後も約 0mg/L を維持した(図 1B)。このことから S4ga 株が培養液中の溶存酸素を消費し、無酸素環境を作り出したと考えられた。

4.3. 細胞外溶出物の利用による活性の持続

試験管の気相部分を窒素置換した T6a1 株単独培養では培養時間の経過とともに、脱色速度が低下したが、共培養では培養 143 時間まで脱色速度が維持された。このことから S4ga 株と共培養することで T6a1 株の脱色活性が持続することが示された。T6a1 株単独培養では T6a1 株の生菌数が減少したが、共培養では T6a1 株の生菌数を維持していた。遺伝子発現解析の結果、培養 24 時間における共培養の遺伝子発現量が T6a1 株単独培養と比較して 4 倍以上である遺伝子が 46 種見られた。発現量が多かった遺伝子は、タンパク質の合成、細胞分裂、溶菌、プロテアーゼなどの機能を持つ遺伝子が見られた。遺伝子培養 24 時間における細胞外アデニレート量(ATP+ADP+AMP)は T6a1 株単独培養よりも共培養の方が多かった。このことから、共培養では細胞分裂 自己溶解による内容物の溶出 プロテアーゼなどによる溶出物の分解および利用のサイクルによって T6a1 株の活性が持続したと考えられた(図 3)。

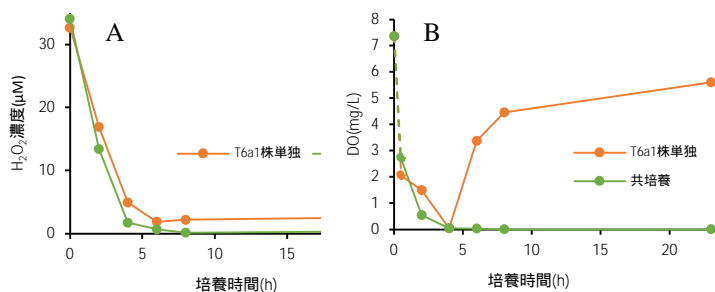


図 1. 培養液中の過酸化水素濃度(A)と溶存酸素濃度(B)

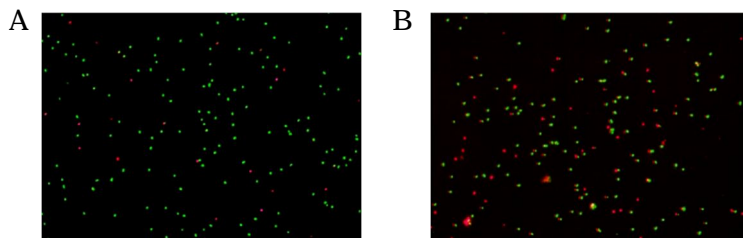


図 2. LIVE/DEAD 染色による細胞の損傷評価。T6a1 株単独培養(A)および共培養(B)の培養直後。緑色の細胞は生細胞、赤色と緑赤両方の細胞を死細胞もしくは損傷細胞として評価した。

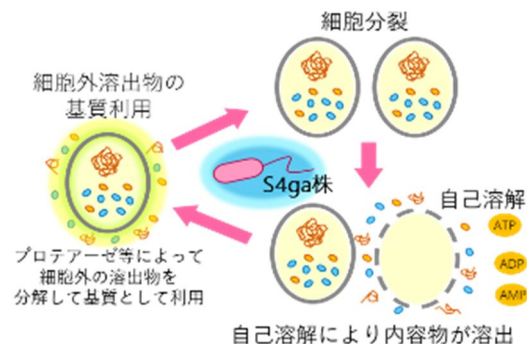


図 3. 細胞外溶出物の基質利用による T6a1 株の活性の持続メカニズム

参考文献

- 1) Yamanashi Y and Ito T, (2022) A minority population of non-dye-decolorizing *Bacillus subtilis* enhances the azo dye-decolorizing activity of *Enterococcus faecalis*. *Microbes and Environments* 37(2), ME21080.

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamanashi Yu, Ito Tsukasa	4. 巻 37
2. 論文標題 A minority population of non-dye-decolorizing <i>Bacillus subtilis</i> enhances the azo dye-decolorizing activity of <i>Enterococcus faecalis</i>	5. 発行年 2022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.ME21080	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤司、尾崎晃基、山梨由布
2. 発表標題 マイノリティの非脱色細菌によるマジョリティ細菌の脱色活性の向上
3. 学会等名 第25回 日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾崎晃基、尾池佑太、岩田滉平、伊藤司
2. 発表標題 少数の非脱色細菌による脱色細菌の活性向上機序の解明
3. 学会等名 第36回 日本微生物生態学会
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
---------	---------