

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370008

研究課題名(和文) 鞭毛シグナルを介した微生物間相互作用の解明

研究課題名(英文) Analyses of microbial interspecies interactions mediated by flagella

研究代表者

渡辺 一哉 (Watanabe, Kazuya)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：40393467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円、(間接経費) 4,170,000円

研究成果の概要(和文)：異種微生物間相互作用、及びそれを基に発現される創発的集団機能は、微生物生態系がその役割を果たす上での重要な因子であるが、それらに関する知見は非常に乏しい。本研究では、メタン発酵に関わる微生物共生系について、その中で重要な役割を果たすことが示された鞭毛を介した異種微生物間シグナル伝達やそれを基に発現される創発的集団機能に関する理解や、自然発生的に集積されたメタン発酵微生物群集における鞭毛の役割の解明を目指した。その結果、人工的に形成された共生培養系だけでなく、自然に形成される生物膜におけるメタン生成微生物群集においても鞭毛を介した相互作用の重要性を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Interspecies interactions and resultant emergent functions are essential for microbial communities to play their roles in a variety of ecosystems, such as global element cycles, fermentative production, and water treatment. In modern microbiology that has developed based on pure-culture studies, however, knowledge on interspecies interactions is limited. This study was conducted to deepen our understanding of interspecies interactions, signal transduction, and emergence of community functions in methanogenic syntrophic consortia with particular focus on recently discovered flagellum-mediated interactions. We also investigated roles of flagella on the establishment of naturally occurring methanogenic communities. We found that flagellum-mediated symbiosis is important for establishing not only artificially assembled methanogenic consortia but also naturally occurring biofilm communities.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物生態学 微生物ゲノム 環境微生物

1. 研究開始当初の背景

純粋培養を基盤に発展してきた現在の微生物学において、異種微生物間の相互作用に関する知見は乏しい。本来単一種で存在する微生物などほとんど存在しないことを考えると、環境中には様々な異種微生物間相互作用があって然るべきであり、そのような相互作用が微生物生態系の生産性や進化に大きく影響を及ぼすことが推測される。特に興味深いのは、微生物生態系から発現される集団機能が、個々の微生物の機能の単純な足し算にならない点である。微生物生態系の機能を予測することは様々な分野(地球上の元素循環、醸造、水処理など)において重要であるが、それを難しくしている原因として、異種微生物間相互作用や非線形的・創発的集団機能についてほとんど解っていないことが挙げられる。

我々は、メタン発酵生態系内で相利共生関係を形成する水素発生型有機酸酸化共生細菌とメタン生成アーキアからなるモデル共生系を試験管内に構築し、ゲノム情報を基に、共生システムが形成される際の分子メカニズムに関する研究を行ってきた。共生関係が形成されて初めて有機酸からメタンの生成が可能になることから、この系は創発的集団機能のモデルと考えることができる。さらに、共生により環境ストレスに対する耐性が上がるというデータも得ている。この研究において最近、共生関係構築の際に、共生菌が鞭毛を用いて相手となるメタン菌を特異的に認識・補足し、さらに鞭毛蛋白質の結合がシグナルとなりメタン菌内の多数の遺伝子の発現が活性化される現象を発見した(Shimoyama et al. 2009 Science)。これは、世界で初めて発見された特定異種微生物へのシグナル伝達機構と考えられる。さらに我々は、共生菌とメタン菌を繋ぐ鞭毛に導電性があることをアメリカのグループと共同で発見した(Gorby et al. 2006 PNAS)。この研究においては、鉄還元菌や光合成細菌なども導電性繊維(ナノワイヤー)を作り出すことが示され、ナノワイヤーネットワーク(ナノワイヤーを介した電気エネルギーや電気シグナルのやり取り)が微生物界に広く分布する細胞間相互作用の一形態であると考えられるようになってきた。

2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究ではメタン発酵共生系において創発的集団機能が発現される

までの分子機構に関する理解を深めることを目的とする。また、試験管内のモデル共生系において示唆された鞭毛を介した微生物間相互作用が、実際のメタン発酵微生物群集内にも存在するかを明らかにすることも目指す。

3. 研究の方法

(1) 共生に伴う代謝ネットワークの融合プロセスの解析

共生細菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* (Pth) 及びメタン菌 *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (MT) に対するマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により、連携(鞭毛結合)開始時から共生的代謝(有機酸からのメタン生成)確立時までの両者内の遺伝子発現変動を詳細に経時的モニタリングする。それぞれの微生物に対するマイクロアレイはすでに作成済みで、またその有用性も確認済みである(Kato et al. 2008 Environ. Microbiol.; Kato et al. 2009 Microbiol. biotechnol.)。様々な環境条件下で経時的トランスクリプトーム解析を行い、各条件間の相関および各遺伝子間の相関を求める。この際に、共生菌の遺伝子とメタン菌の遺伝子発現変動を統合して解析する。

基質(プロピオン酸、酪酸、乳酸、プロパノール、エタノール)や培養条件(攪拌の有無、培養開始時の菌濃度、など)を変え、各種条件で経時的トランスクリプトーム解析を行う。これらにより得られるトランスクリプトームデータを統合二次元クラスター解析にかけ、そこから同調的に発現する遺伝子を両者の微生物から抽出する。次に、同調発現する遺伝子がコードする機能を考慮し、遺伝子が同調発現する生態学的・生理学的意味を考察する。

(2) メタン発酵微生物群集の解析

ジャー培養槽(容積1L)に炭素繊維の担体を充填し、固定床型のメタン発酵槽とした。これに嫌気消化汚泥を植菌後、酢酸を基質とする培地を随時添加しながら発生するバイオガスを水上置換法により補修し、そこからメタン生成量を決定した。運転は55で行った。メタン発生量が安定した後、液中に浮遊した微生物(PT)および担体に付着した微生物(BF)を別々に回収し、それらからDNAおよびRNAを抽出した。これらの配列をIllumina社のHiSeq2000シーケンサーにより解読し、以下のメタゲノム及びメタトランスクリプトーム解析に用いた。これらの解析においては、HiSeq2000から得られたリードをアセンブルしてコンティグを作成した。次に、それらをcoverageとGC contentを軸としたbubble chartにマップして同種微生物由来のコンティグを仕分けし、bin genomeの作成を行った(Ishii et al. 2013 Nat.

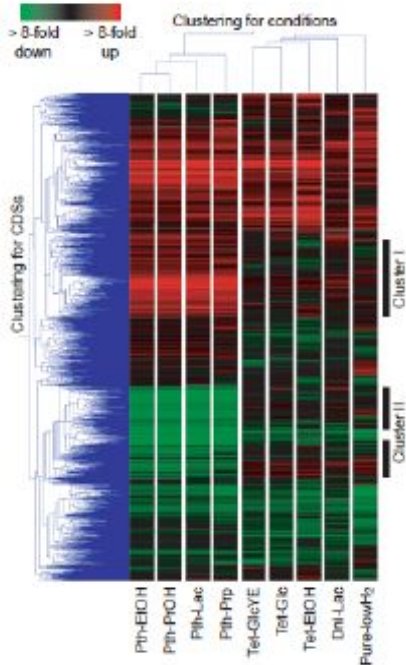


図1 .各培養条件でのトランスクリプトームのクラスター解析による比較。水素が十分にある単一培養条件と比較して発現上昇した遺伝子を赤で、発現低下した遺伝子を緑で示した。

Commun.)。また、構築された bin genome 上に RNA 由来のリードを貼り付け、メタトランスクリプトーム情報を得た (Ishii et al. 2013 Nat. Commun.)。

4 . 研究成果

(1) 共生に伴う代謝ネットワークの融合プロセスの解析

MT がどのように Pth を認識し、その生理学的状態を変化させるのかを調査するため、PT/MT の共生系を様々な基質 (エタノール、プロパノール、プロピオン酸、乳酸) を用いて培養し、水素を基質とした MT の単一培養におけるトランスクリプトームと比較解析した。また、MT のパートナーとなる発酵細菌を替えた場合 (*Thermoanaerobacter ethanolicus* [Tet]、または *Desulfotomaculum nigrificans* [Dni]) との比較も行った。その結果、Pth をパートナーにしたとき、MT のトランスクリプトームパターンは基質を替えても似通っており、それらのパターンは他の共生パートナーとの共生培養や単一培養のパターンと大きく異なっていた (図 1)。Pth との共生培養時に特に発現上昇した遺伝子として、細胞外多糖の合成系およびいくつかの二成分制御系の遺伝子が挙げられた。これらがコードする機能は Pth との間で共生関係を形成し、共生系としての機能を発現していくうえで重要な因子と考えられた。Pth との構成培養時に Pth/MT は共凝集体を形成する。これを多糖類に結合する蛍光色素存在下に観察したところ、顕著な多糖類の蓄積が観察された。このことは、MT が Pth と共生関係

を構築するために多糖を生産する可能性を示唆している。また、トランスクリプトームにより検出された二成分制御系は MT が Pth を認識する際に使われるものである可能性があると考えられた。

(2) メタン発酵微生物群集の解析

高温固定床型メタン発酵槽を運転し、メタン生成が安定した時点で、PT および BF に対するメタゲノム及びメタトランスクリプトーム解析を行った。メタゲノム (各サンプルについての総リード長は約 5 Gb) から bin-genome の構築を行った際の bubble chart によるコンティグのマッピングを図 2 に示す。この解析から、約 20 種の微生物に対する bin-genome が構築され、house-keeping gene の解析からこの中のいくつかのものの完成度は 90% を超えていることが示された。構築された bin-genome のうち、メタン生成菌の *Methanosarcina* や *Methanothermobacter* と思われるものは BF から特に高頻度で検出された。発酵細菌としては *Clostridium* や *Coprothermobacter* が検出され、これらは BF と PT のどちらにも存在していた。メタトランスクリプトーム解析からは、*Coprothermobacter* の鞭毛構造タンパク質の遺伝子が BF 中で高発現していることが示された。このことは、鞭毛がバイオフィーム形成やその中での共生的機能発現において重要な役割をしていることを示すものと考えられた。

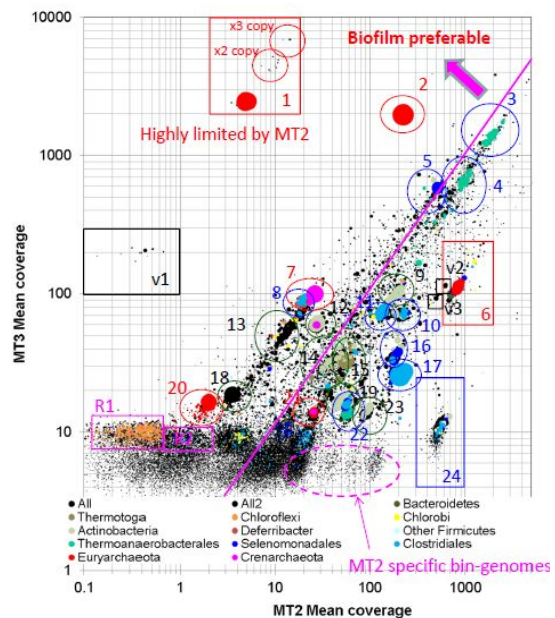


図 2 . メタゲノムコンティグからの bin-genome の作成。このグラフにおいて、MT2 は PT を、MT3 は BF を示す。約 20 種の微生物に対する bin-genome が構築できている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Kato S, Sasaki S, Watanabe K, Yumoto I, Kamagata Y (2014) Physiological and transcriptomic analyses of a thermophilic, aceticlastic methanogen *Methanosaeta thermophila* responding to ammonia stress *Microbes Environ.* In press.

Kouzuma A, Watanabe K (2014) Microbial ecology pushes frontiers in biotechnology. *Microbes Environ.* In press.

Kato S, Hashimoto K, Watanabe K (2013) Iron-oxide minerals affect extracellular electron-transfer paths of *Geobacter* spp. *Microbes Environ.* 28:141-148.

Inoue K, Ito T, Kawano Y, Iguchi A, Miyahara M, Suzuki Y, Watanabe K (2013) Electricity generation from cattle-manure slurries by cassette-electrode microbial fuel cells. *J. Biosci. Bioeng.* 116:610-615.

Kouzuma A, Kasai T, Nakagawa G, Yamamuro A, Abe T, Watanabe K (2013) Comparative metagenome analyses of anode-associated microbiomes developed in rice paddy-field microbial fuel cells. *PLoS One* 8:e77443
Ohno, S., H. Okano, Y. Tanji, A. Ohashi, K. Watanabe, K. Takai and H. Imachi (2012). A method for evaluating the host range of bacteriophages using phages fluorescently labeled with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95:777-788.

Abe K, Ueki A, Ohtaki Y, Kaku N, Watanabe K, Ueki K (2012) *Anaerocella delicata* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium in the phylum Bacteroidetes isolated from a methanogenic reactor of cattle farms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58:405-412.

Kato, S., K. Hashimoto and K. Watanabe (2012) Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals. *Environ. Microbiol.* 14:1646-1654.

Ueki A, K. Abe, Y. Ohtaki, N. Kaku, K. Watanabe, and K. Ueki (2011) *Bacteroides paurosaccharolyticus* sp. nov., isolated from a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61:488-453.

〔学会発表〕(計5件)

Electrochemical selection and characterization of *Shewanella oneidensis* mutants with enhanced capability for electricity generation, 高妻篤史, 大場瞳, 渡邊一哉, FEMS2013(ドイツ, ライプツィヒ), 2013年7月23日

Differential transcriptional regulation of outer-membrane cytochromes in *Shewanella oneidensis* MR-1, 笠井拓也, 高妻篤史, 渡邊一哉, FEMS2013(ドイツ, ライプツィヒ), 2013年7月23日

Electric current and metabolite production from glucose in engineered *Shewanella oneidensis* MR-1, 中川元, 高妻篤史, 渡邊一哉, FEMS2013(ドイツ, ライプツィヒ), 2013年7月23日

共生の極み(招待講演) 渡邊一哉, 極限生物学会(東京), 2012年12月1日

Electric syntrophy(招待講演) 渡邊一哉, Bioelectrochemical systems Minisymposium(韓国、光州), 2012年5月24日

〔図書〕(計1件)

渡邊一哉(監修)微生物燃料電池による廃水処理システム最前線, NTS出版

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊一哉(WATANABE, Kazuya)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号: 40393467

(2)研究分担者

高妻篤史(KOUZUMA, Atsushi)
東京薬科大学・生命科学部・助教
研究者番号: 20634471