

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12228

研究課題名(和文)微生物生態系における発現機能の多様性と調和機構の解明

研究課題名(英文) Diversity and harmonization of expressed functions in microbial ecosystems

研究代表者

二又 裕之(Futamata, Hiroyuki)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：50335105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：微生物生態系における発現機能の多様性と調和機構の解明するため、複合微生物系における微生物群集の動態を決定する因子について多面的に解析を実施した。複数の分離菌株を用いた合成微生物生態系を構築し供試菌株の挙動を、動力学的パラメーターに基づくJ値、および比増殖活性値に基づく菌株間相互作用の観点から調べた。その結果、これまで重要視されてきた純粋培養における基質の分解特性では、複合微生物における微生物群集の動態を説明することができず、むしろ相互作用が極めて重要な作用であることが示された。また、増殖に及ぼす相互作用物質の特定を試みた結果、水溶性で500 Da以下の物質であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the factors that determine the dynamics of bacterial communities in a complex system using multidisciplinary methods. Three phenol-degrading, phylogenetically different bacterial strains were used. Two metrics, J parameter based on kinetic parameters and 'interspecies interaction', were compared to predict which strain would become dominant in a SME. Population densities of strains used in SMEs were enumerated by real-time PCR techniques and were compared to predictions made from those two metrics. These results demonstrate that the effects of interspecies interactions within microbial communities contribute to determining the dynamics of the microbial ecosystem. The supernatant of strain C8 (C8SP) repressed significantly the growth of strains R2. Of the C8SP fractionated with different molecular weight and organic solvents, the fraction less than 500 Da in the H<sub>2</sub>O-soluble components repressed the growth of strain R2.

研究分野：微生物生態学

キーワード：微生物生態系 微生物間相互作用 微生物動態 増殖 微生物群集 合成微生物生態系 制御 数理モデル

### 1. 研究開始当初の背景

微生物を用いた環境浄化、農業、排水処理、物質生産あるいは健康など、安定性あるいは健全性の維持に微生物生態系が深く関与する事が示され、微生物生態系の好適制御が希求されている。これまで、微生物間相互作用物質や基質に対する動力学的特性を利用した微生物生態系の制御技術が示されてきた。それら研究の深化に伴い、そもそも微生物生態系の恒常性はどのような機構で維持されているのか、また、微生物集団のダイナミックな変化を引き起こしているドライビングフォースとは何か、それらのメカニズムに関して高い関心が持たれている。

これまでに我々は3菌株混合連続集積培養系をモデル系として、微生物生態系の制御に関する研究を進めてきた。その過程で、1) 基質に対する動力学的因子だけでは微生物集団の挙動を説明できず、2) 微生物間相互作用が重要な因子であり、また、3) 純粋培養系で観察された菌株間相互作用の関係性が微生物複合系では成立しない場合があるなど、既存の知見だけでは制御不能であることが示された。更には、1菌株由来の純粋連続集積培養系では微生物の増殖量と相互作用の活性が周期的に変動する事が見出された。

これまでの知見を総合的に考えると、これまでの多くの研究では、微生物の特性を固定されたものとして扱っている。根本原理の理解を図る為には、微生物特性の動的な変化を解明する必要がある。以上を踏まえ、要素である個々の振る舞いとシステム全体の相互依存的関係を明らかにするためには、まず単一微生物の連続集積純粋培養系における細胞レベルでの発現機能の多様性出現とシステムの恒常性を評価・解析する事が重要と考えられている。

### 2. 研究の目的

微生物生態系は、多種多様な微生物の単なる集まりでは無く、相互に関連し合い、機能を有するシステムであることが明らかとなってきた。しかも興味深い事に、環境の変化に対し、構成微生物集団がダイナミックに変動しながら、システムの恒常性を維持している。すなわち、要素である個々の微生物の振る舞いとシステム全体は相互依存的な関係にある(引用文献①~④)。本研究の究極の目標は、この様な微生物生態系の根本原理(個と全体の関係)に係る分子機構を理解する事である。しかし、実際の環境サンプルでは、あまりの複雑さ故に混迷を深める事になりかねない。そこで本研究では、分離菌株を利用した合成微生物生態系を構築し、相互作用の観点から微生物の動態を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

土壌や活性汚泥などの環境サンプルを接

種源として構築されたバイオリアクターなどの培養物では、膨大な種類の微生物が生息しているため、例えば、「何が」、「どのようにして」、「何に」、「どのような影響を及ぼしたのか」といった解析が曖昧になる可能性が非常に高い。実際、環境サンプルを用いた微生物生態系の解析が実施されているが、微生物の種類と数が詳細に把握できる一方で、例えば「微生物AとBが 相互作用の関係をもち、生態系が安定している」といった具体的な解析は、残念ながら、現状では非常に困難である。そこで本研究では、供給炭素源を1種類とし、生理学的特性の異なる分離菌株を連続集積混合培養して構築する合成微生物生態系をモデル微生物生態系として、恒常性維持機構の解明を図る。そのため、分離菌株を用いた合成微生物生態系を構築し、相互作用の観点から解析を進めた。

(1) 供試菌株としてフェノール資化性細菌である *Pseudomonas* sp. P-8、*Pseudomonas* sp. LAB-06、*Acinetobacter* sp. c26、*Ralstonia* sp. chemo32、*Variovorax* sp. HAB-24 および *Variovorax* sp. HAB-30 を用いた。異属菌株を組み合わせた合成微生物生態系(SME: synthetic microbial ecosystem)を構築した。SME-I は P-8 株、c26 株、および HAB-24 を用いた。SME-II は LAB-06 株、c26 株および HAB-24 株、SME-III は LAB-06 株、chemo32 株および HAB-30 を用いた。フェノールを唯一の炭素源およびエネルギー源とする培地(フェノール濃度  $1500 \text{ mg L}^{-1}$ )を連続供給( $10.4 \text{ mL h}^{-1}$ )し、SMEs を連続集積培養した。滞留時間は6日間である。時系列的に培養液を回収し菌体からDNAを抽出し、各供試菌株の動態を把握するため、phenol hydroxylase 遺伝子を標的とした real-time PCR を実施した。

(2) 各菌株を上記の連続集積培養条件で培養し、ODが安定した時点で上清を回収し  $0.2 \mu\text{m}$  のフィルターで濾過した。供試菌株間の相互作用を調べる為、濾過上清を 10% (v/v) となる様に添加した培養系で増殖曲線を測定し、下記式を用いて比増殖活性値を産出した。 $U = (\mu \times \text{細胞密度}) / (1U \times \text{誘導期時間})$   $1U$  は滞留時間6日間において細胞密度を  $109 \text{ cells mL}^{-1}$  維持できる能力と設定した。また、 $\mu$  は増殖速度定数 ( $\text{h}^{-1}$ ) である。これを濾過上清未添加系における比増殖活性値に対する相対的な値として算出した。

(3) 相互作用活性が極めて高い *Pseudomonas* sp. C8 株について、その物質を同定する為、C8 株を上記と同様に連続集積培養し培養上清を回収した。分子量分画および溶媒抽出を行い活性の有無を調べた。

### 4. 研究成果

菌株間相互作用および増殖特性の異なる

分離菌株を組み合わせた合成微生物生態系を複数構築し、供試菌株の動態とその機構について、動力学的パラメーターおよび相互作用に基づく増殖力の観点から解析した。

(1) SME-I、SME-II および SME-III における供試菌株の動態を調べた結果、最終的な優占種となった株は、それぞれ c26 株、HAB-24 株 および HAB-30 株であった (図 1)。

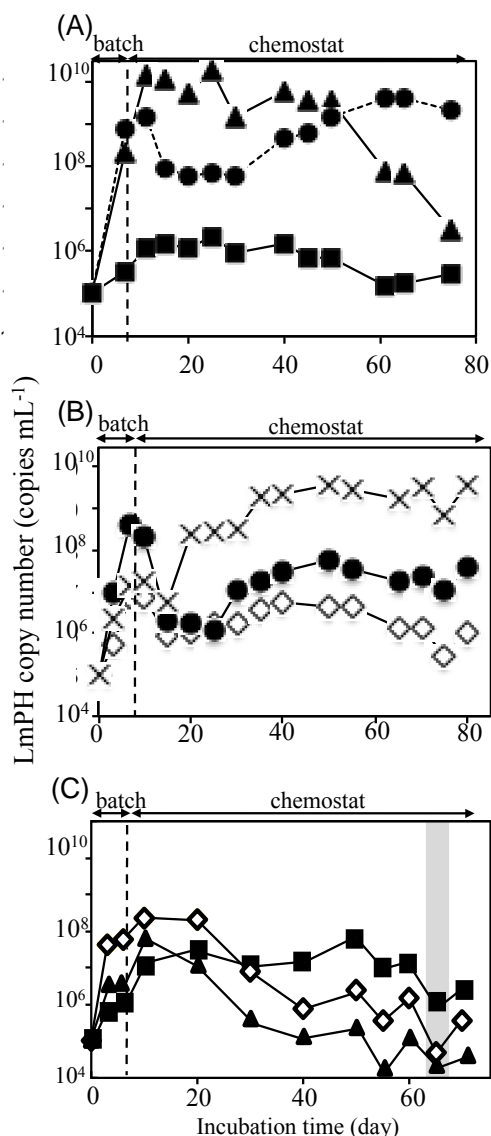


図 1 合成微生物生態系における供試菌株の動態 (A)SME-I、●:c26 株、▲:P-8 株、■:HAB-24 株、(B)SME-II、●:HAB-24 株、○:c26 株、◇:LAB-06 株、(C)SME-III、●:HAB-30 株、◇:LAB-06 株、□:chemo32 株 編みかけ部分はリアクターにフェノールが蓄積下期間を示す。

これまで単一基質を巡る微生物間の競合において、どの微生物が優占種となり得るのかは、動力学的パラメーターに基づいた  $J$  値に依存するとされてきた。実際、SME-I の供試菌株においては、 $J$  値 (引用文献) に基づく推測と実際の優占種とが一致した。しかし、SME-II および SME-III では、全く異なる

結果となった。一方、菌株間の相互作用を観点から供試菌株の動態を解析すると、総合的に最も高い増殖活性を有する微生物が最終的な優占種となっていたことが判明した (表 1 ~ 3)。この結果は、複数の微生物が共存している系においては、純粋培養に基づく情報だけでは全体の中の個々の挙動を理解できないことを示している。また、これまで重要視されてきた動力学的パラメーター以上に増殖に及ぼす多菌株間の影響を把握する必要性が強く示唆された。

表 1 SME-I における供試菌株間の相対的増殖活性値

strains	supernatant of strains		
	P-8	c26	HAB-24
<i>Pseudomonas</i> sp. P-8	140 ± 35	105 ± 11	40 ± 5.0
<i>Acinetobacter</i> sp. c26	180 ± 90	100 ± 3.0	160 ± 90
<i>Variovorax</i> sp. HAB-24	7.4 ± 1.3	38 ± 8.6	153 ± 8.9

表 2 SME-II における供試菌株間の相対的増殖活性値

strains	supernatant of strains		
	LAB-06	c26	HAB-24
<i>Pseudomonas</i> sp. LAB-06	93 ± 7.3	105 ± 11	77 ± 8.4
<i>Acinetobacter</i> sp. c26	71 ± 6.8	100 ± 3.0	160 ± 90
<i>Variovorax</i> sp. HAB-24	180 ± 90	38 ± 8.6	153 ± 8.9

表 3 SME-III における供試菌株間の相対的増殖活性値

strains	supernatant of strains			
	LAB-06	chemo32	HAB-30	Mixed supernatant
<i>Pseudomonas</i> sp. LAB-06	93 ± 7.3	103 ± 41	87 ± 12	103 ± 8.5*
<i>Ralstonia</i> sp. chemo32	75 ± 6.3	100 ± 50	48 ± 17	85 ± 16*
<i>Variovorax</i> sp. HAB-30	22 ± 6.4	160 ± 35	140 ± 33	105 ± 4.8*

\*: c32株とHAB-30株の上清が使用された。

†: LAB-06株とHAB-30株の上清が使用された。

‡: LAB-06株とchemo32株の上清が使用された。

(2) 相互作用物質の同定に係る研究に着手した。供試菌株として一般環境微生物であり強い層が作用を示す *Pseudomonas* sp. C8 株を用いた。*Ralstonia* sp. R2 株の増殖に及ぼす影響を調べた結果、連続集積培養 30 日目 ~ 50 日目における培養上清のみが増殖阻害効果を示した。このことから、C8 株は恒常的に相互作用物質を生産している訳ではないことが明らかとなった。上清から分子量分画と有機溶媒抽出を繰り返した結果、およそ 500 Da 前後の水溶性画分に相互作用物質が含まれることが判明した。

#### < 引用文献 >

- Fernandez, A. S., Hashsham, S. A., Dollhopf, S. L., Raskin, L., Glagoleva, O., Dazzo, F. B. et al. (2000). Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4058-4067.
- Hashsham, S. A., Fernandez, A. S., Dollhopf, S. L., Dazzo, F. B., Hickey, R. F., Tiedje, J. M. et al. (2000). Parallel processing of substrate correlates with greater functional stability in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4050-4057.

Little, A. E. F., Robinson C. J., Peterson S. B., Raffa, K. E., Handelsman, J. (2008). Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**:375-401.  
Klitgord, N., and Segre, D. (2010). Environments that induce synthetic microbial ecosystems. *PLoS Comput. Biol.* **6**:e1001002.  
doi: 10.1371/journal.pcbi.1001002  
Hansen, S.R., and Hubbell, S.P. (1980). Single-nutrient microbial competition: Qualitative agreement between experimental and theoretically forecast outcomes. *Science* **207**:1491-1493.

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計2件)

鈴木研志、Fatma Azwani Abdul Aziz、二又裕之 (2017) 微生物生態系の理解に向けた挑戦 ～微生物を用いた環境浄化の取り組みを緒として～(Challenge of understanding microbial ecosystem for appropriate control -from remediation of polluted environments using microbes-) 土と微生物, 71:6-12, 査読有  
Fatma Azwani Abdul Aziz\*, Kenshi Suzuki, Akihiro Ohtaki, Keita Sagegami, Hidetaka Hirai, Jun Seno, Naoko Mizuno, Yuma Inuzuka, Yasuhisa Saito, Yosuke Tashiro, Akira Hiraishi and Hiroyuki Futamata\* 2015. Interspecies interactions are an integral determinant of microbial community dynamics. *Frontiers in Microbiology*. Oct20; 6: 1148. 査読有  
doi: 10.3389/fmicb.2015.01148

### 〔学会発表〕(計6件)

本荘雅宏、鈴木研志、田代陽介、二又裕之、共存って何だろう? ～物質を介したやりとりで生まれる生態系の恒常性～、静岡ライフサイエンスシンポジウム 2017年3月5日 静岡大学(静岡県静岡市)  
鈴木研志、アズワニ ファティマ、犬塚友麻、本荘雅宏、田代陽介、二又裕之、*Pseudomonas* sp. C8 株が生産する増殖抑制物質の特定とその生産機構、日本生物工学会 2016年9月28日～30日、富山大学(富山県富山市)  
Kenshi Suzuki, Fatma Azwani, Yuma Inuzuka, Masahiro Honjyo, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata, Coexisting System in synthetic microbial ecosystems、ISME-16、2016年8月21日 Montreal, Canada.  
鈴木研志、ファティマ アズワニ、犬塚友麻、本荘雅宏、齊藤保久、田代陽介、二又

裕之、モデル微生物生態系における異種微生物の共存システム、環境バイオテクノロジー学会 2016年6月13日 広島県民文化センター(広島県広島市)  
二又裕之、日本土壌微生物学会大会シンポジウム「微生物生態系の理解(解析と制御)に向けた挑戦～微生物を用いた環境浄化の取り組みを緒として～」、2016年6月11日 岐阜大学(岐阜県岐阜市)  
Kenshi Suzuki, Fatma Azwani, Yuma Inuzuka, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata, Flexible metabolic changes caused by cell-to-cell interaction have relevance to community succession, self-organizing mechanism, and stability of microbial ecosystem. 2015.5.30-6.2 ASM2015 (New Orleans, Louisiana, USA)

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

### 〔その他〕

ホームページ等  
<http://cheme.eng.shizuoka.ac.jp/wordpress/futamatab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

二又 裕之 (FUTAMATA, Hiroyuki)  
静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授  
研究者番号: 50335105

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し

(4)研究協力者  
無し