

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：53101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K04414

研究課題名(和文) 環境微生物を生菌状態でモニタリングできる次世代シングルセル解析技術の開発

研究課題名(英文) Development of next generation single cell analysis technology for monitoring the live bacterial cells in environment microorganisms.

研究代表者

川上 周司 (Kawakami, Shuji)

長岡工業高等専門学校・環境都市工学科・准教授

研究者番号：00610461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によりアプタマーを用いて生菌状態の微生物をモニタリングできる技術の開発に成功した。アプタマーは系統学的に狭い範囲での検出も可能であり、また広い範囲での検出も可能である。このような性質を持つアプタマーを用いれば標的の微生物を任意に決定でき、その微生物をDNA抽出を伴わない方法で追跡することが可能になると思われる。本研究ではreal-time PCR法への応用を検討したが、これらをフローサイトメトリーへ応用することで未培養微生物の分離培養にもつなげることができると思われる。今後の研究の進展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アプタマーによる生菌検出技術が開発されることで、複数種の微生物同士による競合、共生の様子など、時間を追って変遷していく微生物の生態をモニタリングすることが可能になる。また、環境中の任意の微生物を生菌状態でラベル化できれば、マニピレーター等で回収すれば分離培養につなげることも可能となる。このようなコンセプトで利用できるシングルセル解析技術は今のところなく、本研究はシングルセル解析を次のステージに押し上げる極めて重要な技術になると思われる。

研究成果の概要(英文)：This study has successfully developed a technique for monitoring viable microorganisms using aptamers. Aptamers can be detected in a phylogenetically narrow or broad range. Aptamers with such properties could be used to arbitrarily determine the target microorganisms and track them in a manner that does not involve DNA extraction. In this study, we examined the application to real-time PCR, and we believe that the application to flow cytometry will lead to the isolation and cultivation of uncultivated microorganisms. Further progress in this research is expected.

研究分野：水環境工学

キーワード：シングルセル解析 遺伝子工学的手法

1. 研究開始当初の背景

微生物を用いたバイオテクノロジーは、今日の我々の生活の中で欠かすことのできない技術である。また、近年ではバイオマスの有効利用に必要なセルロース分解酵素や環境衛生の保全に有用なウイルス吸着タンパク質などの微生物由来の有用遺伝子が環境中から見つかり、環境中にはまだ多くの未利用遺伝子資源が多数存在すると思われる。さらに地球規模の物質循環の多くは微生物活動が深く関わっており、特に地殻や深海などの極限環境下では未だその詳細な循環機構は分かっていない。こうした現状から、我々が新たな微生物資源を獲得する、あるいは環境動態を把握するには、微生物をより深く理解することが求められている。

微生物の生態を調べる方法としてもっとも有効な方法は、標的の微生物を分離培養することである。単一の微生物種にすることで、栄養要求性や増殖時間などの詳細な生態を調べることができる。しかしながら、これまでの研究から人工的に培養可能な微生物は全体の1%にも満たないという報告があり、分離培養法にも限界があることが広く知られている。このような現状において、多くの研究者は培養法に依存しない分子生物学的手法を用いた微生物解析方法を利用している。現在では、これまで利用されてきた rRNA アプローチにとどまらずメタゲノム解析やプロテオーム解析、シングルセル解析などが用いられ、微生物が分離培養できなくても、その生態が把握できるようになりつつある。申請者は特に微生物を視覚的に検出可能なシングルセル解析において、その手法開発に力を入れて研究をしてきており、これまで微生物の機能遺伝子を検出可能な超高度 FISH 法の開発や細胞壁不要の高度 FISH 法の開発などを行い、シングルセル解析技術の様々な技術的課題を解決してきた。しかし、それでもこれら解析は微生物を一旦死滅させてから行うものであり、環境中で起きている一連の出来事の一部を切り取った解析でしかない。特にバイオフィルムの形成などのような複数種の微生物が時間を追って変遷する場合においては、切り取った一部は理解できてもその後の様子を追跡できないという問題がある。また、死滅させた状態での解析では、仮にマニピレーターやレーザーピンセットなどで個々の細胞を回収することができても、それを分離培養法につなげることができない。

本研究ではこれら課題を解決するために微生物を生きたままの状態でもモニタリングできないかと考え研究を行ってきた。そこで着目したのがアプタマーである。アプタマーは、一本鎖核酸がより安定的な構造を取るために自分自身で高次構造を形成することで、特定の物質と高い親和性をもって結合できる機能をもった物質である。アプタマーは、従来の抗原抗体法に比べ小さい分子量で作成でき、抗体よりも高い親和性を発揮するなどの利点が報告されている (Bunka et al., 2006)。これまでにアプタマーは特定の物質を検出するためのバイオマーカーなどに用いられてきた。申請者は、このアプタマーを用いて微生物を生きたままシングルセルレベルで検出する技術開発を目指し、研究を行ってきた。これまでの研究により、アプタマーを用いて微生物を可視化するところまでは成功したが、系統分類学的に近縁な微生物同士を識別して検出するまでには至らなかった。しかし、2014年に Gedi ら Cell-SELEX 法を用いて高い特異性をもって微生物を検出できるアプタマーを報告した (Gedi et al., 2014)。この Cell-SELEX 法は、アプタマー製造方法の一つである SELEX 法に非対象の細胞を混ぜ合わせるステップを加えることで特異性を飛躍的に高めた方法である。この方法を用いれば、これまでの FISH 法の様に系統分類学的に識別して目的の微生物を検出できるアプタマーが合成可能と思われる。

2. 研究の目的

これら背景を受け、本研究では、標的微生物をラベルし生菌状態でその挙動をモニタリングできる次世代シングルセル解析技術の開発を目的とした。具体的には、Cell-SELEX 法を用いた方法で標的微生物に特異的に結合するアプタマーを合成し、標的微生物を生菌状態で培養しながら、その挙動を追跡できる技術を開発する。その挙動の追跡には real-time PCR 法を用いる。

アプタマーによる生菌検出技術が開発されることで、複数種の微生物同士による競合、共生の様子など、時間を追って変遷していく微生物の生態をモニタリングですることが可能になる。また、環境中の任意の微生物を生菌状態でラベル化できれば、マニピレーター等で回収すれば分離培養につなげることも可能となる。この様なコンセプトで利用できるシングルセル解析技術は今のところなく、本研究はシングルセル解析を次のステージに押し上げる極めて重要な技術になるとと思われる。

3. 研究の方法

(1) 短い DNA 断片の適切な PCR 条件の検討

新規 SELEX 法を開発するにあたり、既存の SELEX 法のプロトコルを参考に実験条件の検討を始めたが、PCR 増幅が十分に反応せず、充分量の PCR 産物が確保できなかった。アプタマーは、プライマーが結合する領域とランダム配列領域の約 80 塩基ほどの短い DNA 断片であり、通常の PCR の条件では反応が起こりにくいと考えた。そこで PCR の反応温度、プライマー濃度や Mg 濃度などの諸条件を検討したところ、プライマーの濃度が最も重要であり、濃度を既報の 2 倍に上昇させると PCR 産物の収量が大幅に増加することがわかった。

(2) 希釈された細菌の最適な DNA 抽出方法の検討

新規 SELEX 法では、細菌とアプタマーが結合した状態で如何に少量の状態まで希釈できるかが重要になってくる。そこでどの DNA 抽出キットを用いて、どのくらいの希釈サンプルで DNA が抽出可能か検討した。市販されている DNA 抽出キットの中から特に少量の細胞を対象としているものをいくつか選び、 10^5 cell から 10^0 cell までの希釈サンプルを作成し、DNA 抽出後、V4 領域のプライマーペアで PCR を行い、抽出限界を模索した。結果、Macherey-Nagel 社の NucleoSpin®Tissue を用いることで 10^2 cell のサンプルでも DNA が抽出可能であった。

(3) 微生物の選定

DNA 抽出が難しい細菌群であり尚且つ Biosafety Level の低いものを目的微生物とし、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NBRC) で *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus sp.* の 3 種類の微生物を購入し、培養した。また 3 種類の微生物に結合することがわかっている既報のアプタマ - として STC-03、STC-012 を購入し実験を行った。

(4) 各微生物の PCR 増幅条件について

PCR は TaKaRa の TB Green Fast qPCR Mix のプロトコールに準拠した。PCR サイクル条件は以下に示す方法で行った。まず熱変性を 95 で 7 分行った後、95 30 秒、60 90 秒、72 60 秒のステップを 35 回サイクル行い、72 で 10 分の伸長反応を行なった。各微生物の反応条件は PCR 反応のアニーリング温度の条件を変えることで行った。*Pseudomonas putida* の場合は 60 で、*Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus sp.* の場合は 50 で行った。

4. 研究成果

(1) *Staphylococcus epidermidis* の追跡

Staphylococcus epidermidis を培養し、段階希釈したサンプルを用いて、それらを DNA 抽出を行わずにアプタマーで検出する実験系を作成した。結果、*Staphylococcus epidermidis* をアプタマーで検出することが可能であった。次に検出限界を調べるために段階希釈のどの段階まで検出可能か検討した。結果を図 1 に示す。結果、PCR での検出では 10^1 cell/mL のサンプルでも増幅は見られたが、検量線からは大きく外れる結果となった。これら結果から検出限界は 10^2 cell/mL とした。また検量線から $C_p=3.87\log(q)+36.56$, $E=1.813$, $r^2=0.9979$ の結果を得た。

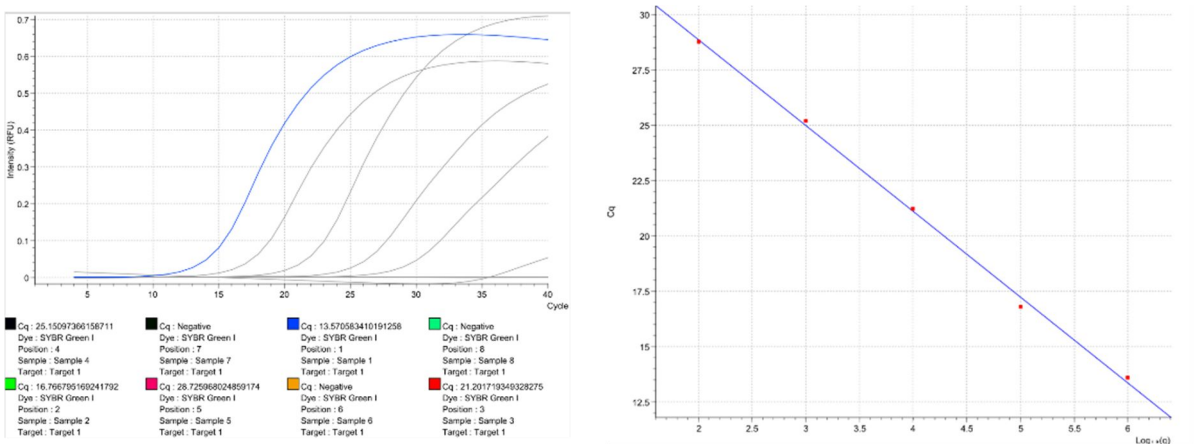


図 1 *Staphylococcus epidermidis* の段階希釈における Real-time PCR 法での検出

(2) *Pseudomonas putida* の追跡

Pseudomonas putida を培養し、段階希釈したサンプルを用いて、それらを DNA 抽出を行わずにアプタマーで検出する実験系を作成した。結果、*Pseudomonas putida* をアプタマーで検出することが可能であった。次に検出限界を調べるために段階希釈のどの段階まで検出可能か検討した。結果、PCR 増幅の確認から検出限界は 10^2 cell/mL とした。

(3) *Bacillus sp.* の追跡

Bacillus sp. を培養し、段階希釈したサンプルを用いて、それらを DNA 抽出を行わずにアプタマーで検出する実験系を作成した。結果、*Bacillus sp.* をアプタマーで検出することが可能であった。次に検出限界を調べるために段階希釈のどの段階まで検出可能か検討した。結果を図 2 に示す。検討の結果から検出限界は 10^2 cell/mL とした。また検量線から $C_p=4.77\log(q)+46.53$, $E=1.621$, $r^2=0.9837$ の結果を得た。

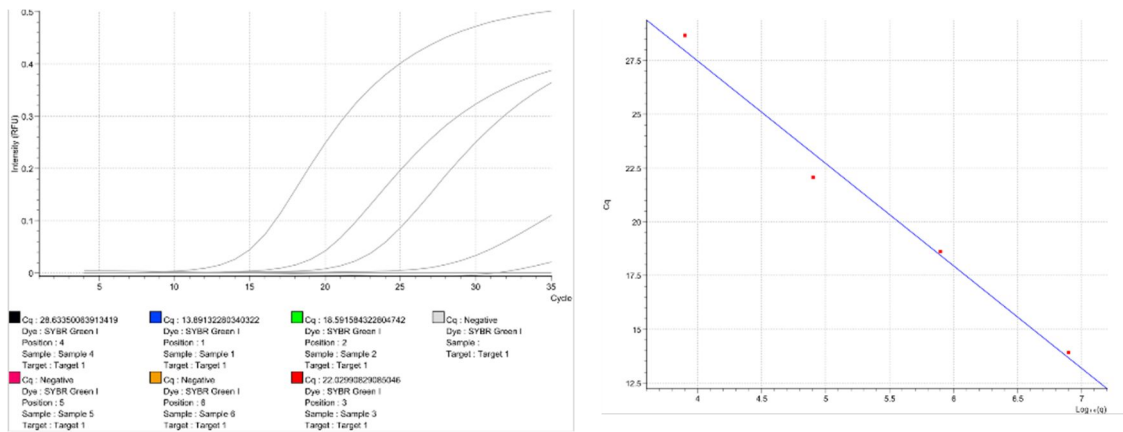


図 2 *Bacillus sp.* の段階希釈における Real-time PCR 法での検出

(4) まとめ

本研究によりアプタマーを用いて生菌状態の微生物をモニタリングできる技術の開発に成功した。アプタマーは系統的に狭い範囲での検出も可能であり、また広い範囲での検出も可能である。このような性質を持つアプタマーを用いれば標的の微生物を任意に決定でき、その微生物を DNA 抽出を伴わない方法で追跡することが可能になると思われる。本研究では real-time PCR 法への応用を検討したが、これらをフローサイトメトリーへ応用することで未培養微生物の分離培養にもつなげることができると思われる。今後の研究の進展が期待される。

<引用文献>

- 1) Bunka DH, Stockley PG. Aptamers come of age - at last. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Aug;4(8):588-96. doi: 10.1038/nrmicro1458. PMID: 16845429.
- 2) Gedi V, Kim YP. Detection and characterization of cancer cells and pathogenic bacteria using aptamer-based nano-conjugates. *Sensors (Basel).* 2014;14(10):18302-18327. Published 2014 Sep 29. doi:10.3390/s141018302
- 3) Song MY, Nguyen D, Hong SW, Kim BC. Broadly reactive aptamers targeting bacteria belonging to different genera using a sequential toggle cell-SELEX. *Sci Rep.* 2017;7:43641. Published 2017 Mar 8. doi:10.1038/srep43641

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 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuyoshi Yamaguchi & Shuji Kawakami	4. 巻 2
2. 論文標題 Single Cell Imaging and Sequencing-Based Detection of Microorganisms Using Highly Sensitive Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Ecology: Current and Future Developments	6. 最初と最後の頁 161-176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Yamaguchi, S. Nakamura, M. Hatamoto, E. Tamura, D. Taniwaka, S. Kawakami, A. Nakamura, K. Kato, A. Nagano and T. Yamaguchi	4. 巻 102
2. 論文標題 A novel approach for toluene gas treatment using a down-flow hanging sponge (DHS) reactor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 5625-5634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-018-8933-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡崎祐輝, 川上周司, 大門裕之, 山田剛史
2. 発表標題 生物学的廃水処理内の硝化菌を標的とする機能性核酸分子の選別と機能性評価
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡崎祐輝, 川上周司, 大門裕之, 山田剛史
2. 発表標題 生物学的廃水処理プロセス内の硝化菌を特異的に識別する機能性核酸分子の選別
3. 学会等名 令和2年度公益社団法人日本水環境学会中部支部研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川上周司, 北野晴哉, 山口剛士, 渡利高大, 幡本将史, 山口隆司, 山田剛史
2. 発表標題 分離株のない細菌種からDNAアプタマーを合成する新規SELEX法の開発
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野間拓也, 幡本将史, 渡利高大, 山口隆司, 荒木信夫, 川上周司, 青木仁孝
2. 発表標題 嫌氣的硫黄酸化反応が発生する条件における中間代謝物の調査
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林直央, 幡本将史, 牧慎也, 渡利高大, 山口隆司, 川上周司, 荒木信夫, 押木守
2. 発表標題 嫌氣的硫黄酸化反応進行時のUASBリアクター内における微生物菌叢解析
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福島巧己, 渡利高大, 幡本将史, 牧慎也, 山口隆司, 押木守, 川上周司
2. 発表標題 微細藻類-細菌共生系プロセスとバフフルドリアクターによる新規窒素除去システムの開発
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡利高大, 石川千遥, Nguyen Thu Huong, 川上周司, 山口隆司
2. 発表標題 DHS-緩速ろ過システムによる開発途上国向けの生活用水浄化プロセスの開発
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川上周司, 北野晴哉, 山口剛士, 渡利高大, 幡本将史, 山口隆司, 山田剛史
2. 発表標題 分離株のない細菌種からDNAアプタマーを合成する新規SELEX法の開発
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川上周司, 石川千遥, 西岡卓馬, 幸泉有里
2. 発表標題 Miseqを用いた合併浄化槽の細菌群集構造解析
3. 学会等名 第33回全国浄化槽技術研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川千遥, 川上周司
2. 発表標題 タイ国都市スラムにおける飲料水中のトリハロメタン含有量の実態調査
3. 学会等名 令和元年度土木学会四国支部研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林直央, 川上周司, 幡本将史, 牧慎也, 渡利高大, 惣中英章, 山口隆司, 荒木信夫, 押木守
2. 発表標題 UASBリアクターにおける硫黄酸化遺伝子に着目した微生物解析
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sofia Imana, S. Kawakami, T. Yamaguchi, T. Yamada, T. Watari, S. Maki, M. Hatamoto, T. Yamaguchi
2. 発表標題 Selection of DNA Aptamers Targeting Environmental Bacteria Cells
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萩原達也, 川上周司, 大門裕之, 山田剛史
2. 発表標題 機能性核酸分子によるアンモニア酸化細菌のオンサイト検出技術の開発
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------