

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19181

研究課題名（和文）なぜ多くの微生物は培養困難なのか？未知増殖制御メカニズムの発見と解明

研究課題名（英文）Growth controlling mechanism of previously uncultivated microorganisms

研究代表者

青井 議輝（Aoi, Yoshiteru）

広島大学・統合生命科学研究科（先）・准教授

研究者番号：40386636

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では難培養性微生物の未知増殖制御メカニズム、具体的には、休眠から覚醒状態（増殖）に移行させる相互作用の発見と解明を目標とした。難培養性微生物のモデルとしてNitrospiraの純粋菌株を用いて検討した結果以下の成果が得られた。1）休眠と覚醒現象の発見：ハイスループットアッセイ法を確立し、Nitrospiraの休眠からの覚醒を検出することに成功した。2）Nitrospira自身の培養上清に覚醒させる因子が含まれていることを見出した。3）休眠・覚醒・増殖、それぞれの状態で遺伝子発現パターンが異なることを見出した。4）休眠しにくい、または覚醒因子に反応しない変異株を獲得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来法では獲得できなかったNitrospiraという難培養性微生物の純粋菌株を用いることで、初めて難培養性微生物の増殖制御機構に迫ることができた。特に、休眠という現象が難培養性の大きな理由の一つであることが明らかになり、さらに人為的に覚醒させることができる可能性が見出された。環境中のほとんどの微生物は培養困難であることが知られており、環境微生物の理解や利用を大きく妨げている。しかし「培養できない理由」は全く解明されていない。したがって、本研究の成果は、現状では歯が立たなかった未培養微生物の培養化という課題に対する新しい新戦略を導き出す糸口になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to reveal the mechanism controlling growth of environmental microorganisms using Nitrospira as a model. We examined Nitrospira pure culture (Nitrospira sp. ND1) in order to find out factors making them dormant and inducing resuscitation, and its effect on gene expressions. As a result, Nitrospira goes dormant by starvation, while the cell number was not significantly decreased. The dormant Nitrospira was hardly recovered when they were incubated in the medium for more than a few months. On the contrary, significantly higher recovery was observed when the dormant cells were incubated with the medium containing supernatant of Nitrospira culture. These results suggested that, Nitrospira goes dormant in response to the environmental condition to prevent from extinction and awoken by intra-species interactions via chemicals. The majority of microorganisms should possess similar system to survive and keep their diversity in nature, and thus they resist cultivation.

研究分野：微生物生態学

キーワード：難培養性微生物 休眠・覚醒 バイオアッセイ

## 1. 研究開始当初の背景

環境中のほとんどの微生物は培養困難であることが広く知られており、環境微生物の理解や利用の重大な妨げとなっている。なぜ培養困難なのか？もし普遍的な理由が存在し、そのメカニズムを解明できれば、現状では有効技術のない難培養性の未知微生物を培養化するための画期的な新戦略を導き出せる。しかし「培養できない理由」や「難培養性をつかさどるメカニズム」については全く解明されていない。なぜなら、容易に培養できる微生物をそのまま解析しても答えは得られないというジレンマが存在するからである。そこで、我々は、過去に他の多くの研究者がトライしたが誰も分離に成功しなかった本菌株のような難培養性微生物をモデルとして用いることで、初めて難培養性の本質に迫れるものと着想した。さらに、多くの微生物の培養が難しい普遍的な理由として、休眠と覚醒現象に着目した。これまでに、大腸菌などを用いた休眠(覚醒はない)やグラム陽性菌の発芽に関する研究例はあるが、難培養性微生物の「休眠と覚醒」に関する研究はこれまで全くない。

## 2. 研究の目的

本研究では、門レベルで難培養性を示す *Nitrospira* の純粋菌株を難培養性微生物のモデルとして用いて、未知増殖制御メカニズムを発見し解明することを目的にした。

*Nitrospira* は独立栄養性の亜硝酸酸化細菌であり、本研究で用いる純菌株 (*Nitrospira* sp. ND1 株) は申請者が新規分離培養手法を開発して世界で初めて獲得した難培養性微生物である。申請者は事前の検討によって、*Nitrospira* は、飢餓環境において休眠状態に陥り、自身の培養上清の添加によって覚醒することを部分的に見出していた。そこで本研究では以下の作業仮説に基づいて研究を進めた。

- 1) 環境中の微生物(難培養性微生物)は好ましくない条件下(エネルギー源や栄養源の枯渇など)では容易に非増殖状態(休眠状態)に移行する。
- 2) 環境状況が好転しても、それだけでは休眠状態からは容易に脱却しない。
- 3) 休眠状態から覚醒するためには、シグナル物質(覚醒因子)が必要である。そしてそれは増殖状態の細胞から分泌される。

本研究では、上記の仮説を証明すべく、休眠状態から覚醒状態(増殖状態)に移行させる微生物間相互作用(覚醒因子)の発見と制御機構の解明を解明することを最終目標とした。

## 3. 研究の方法

### 3.1 *Nitrospira* の覚醒(増殖)を検出するハイスループットアッセイ方法

セルソーターを用いて植菌、培養、検出をハイスループットに行い、休眠から覚醒した割合、覚醒効率(増殖が見られた well / 全 well)を正確かつ簡易に測定する方法を構築した。また、セルソーターを用いずに限界希釈をベースとした方法で植菌、アッセイする方法も確立した。

セルソーターを用いて休眠状態の *Nitrospira* を所望の細胞数ずつ培地で満たされている 96well plate の各 well に植菌した (Single Cell Sorting)。その後、培養を行った。限界希釈に基づいて植菌する場合、10 倍ずつ希釈系列を作成して、培養を行った(アッセイでは希釈系列ごとにコントロールと比較評価することが可能である)。

増殖の有無は基質である亜硝酸の消費をザルツマン法(比色分析)で検出して判別した。



図 1. アッセイ方法および解析方法の流れ

### 3.2 天然物化学的アプローチによる覚醒因子の探索

*Nitrospira* の培養上清に含まれている覚醒因子を分離・精製(最終的に構造決定を目指した)を試みた。その際、上記のバイオアッセイを指標にして、覚醒因子が含まれている画分を判別し

ながら進めた。

培養上清に含まれる有機物について各種分離カラムを用いて分画する。各画分はバイオアッセイ結果を参照しながら選別し、精製を繰り返す。

最終的に、LC-MS、NMR を用いて物質の化学構造を決定することを試みた。

### 3.3 Total RNA シーケンス解析による遺伝子発現パターンの比較解析

休眠状態、増殖状態、覚醒した直後の状態の3つの状態の *Nitrospira* の培養サンプルから全 RNA を抽出し、Total RNA sequence 解析により遺伝子発現を網羅的に比較解析する。

## 4. 研究成果

### 4.1 *Nitrospira* の休眠および覚醒

休眠状態の *Nitrospira* を覚醒因子あり/なしの二つの条件で培養した結果、覚醒因子を添加した方が、明らかに休眠から回復した well の割合（覚醒、増殖して亜硝酸を消費した well の割合）が高かった（図2）。以上の結果は、培養上清（覚醒因子）を添加した系では、飢餓期間後も亜硝酸酸化活性の回復が確認されることから、1）飢餓期間によって、*Nitrospira* が休眠すること（死滅しない）、2）自身の培養上清には自身の覚醒を促す因子が含まれることを示唆している。次に、休眠状態と覚醒状態の *Nitrospira* の亜硝酸消費を比較したところ、覚醒状態では培養開始後速やかに亜硝酸酸化活性が見られたものの、休眠状態では非常に低い亜硝酸酸化活性を発現するに留まった（図2）。以上の結果は、一度休眠すると、基質が豊富にある条件下（増殖には理想的な条件）でも、覚醒因子が存在しなければ容易には覚醒して増殖を開始しないことを示している。

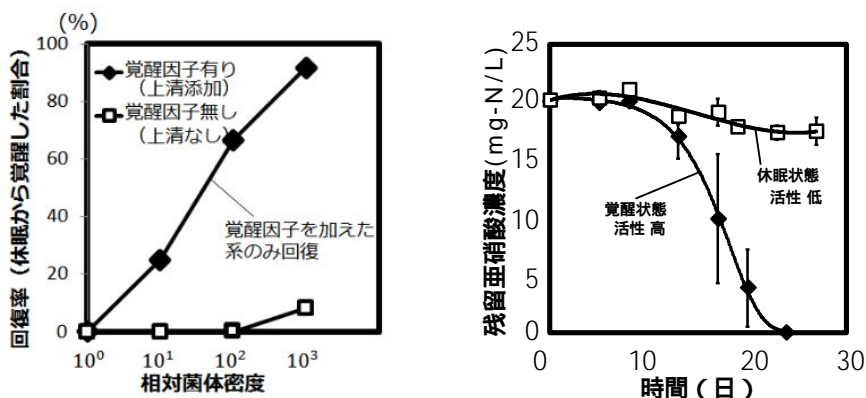


図2. 休眠覚醒試験の結果および休眠状態の亜硝酸消費の比較

### 4.2 天然物化学的アプローチによる覚醒因子の探索

*Nitrospira* の培養上清に含まれている覚醒因子を各種カラムを用いて分離・精製を試みた。その際、上記のバイオアッセイを指標にして、覚醒因子が含まれている画分を判別しながら進めたが、覚醒因子と思われる成分はC18 カラムなど疎水性のカラムにはトラップされない、非常に親水性の高い物質、特に極性の強い物質ではないかと推察された。上記の理由から水相から取り除けず、塩類と分けることができずに構造決定には至っていない。

### 4.3 Total RNA シーケンスによる休眠・覚醒・増殖期における遺伝子発現パターンの比較

休眠状態・覚醒直後・増殖状態の3つの状態における遺伝子発現パターンをそれぞれ比較したところそれぞれの状態で特異的に発現する遺伝子群が存在することが明らかになった。

### 4.4 まとめ

*Nitrospira* は増殖に不適な環境（飢餓など）では休眠して死滅を回避し、環境条件が好転したことを、同種の個体が算出する覚醒因子をシグナルとして受け取ることで初めて覚醒・増殖を開始する。つまり環境条件が好転しただけでは増殖を開始しないという二重のロックがかけられている状態という生存戦略に基づいた、新しい増殖制御機構（図3）の存在が示唆され、これは多くの難培養性微生物の難培養性を説明できるのではないかと考えられる。

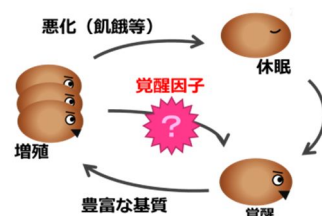


図3. 想定される増殖制御機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshiteru Aoi, Chiho Murakami, Hiroyasu Terachi, Tomonori Kindaichi, Akiyoshi Ohashi
2. 発表標題 Growth controlling mechanisms of Nitrospira -dormancy and resuscitation-
3. 学会等名 17th International Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiho Murakami, Tomonori Kindaichi, Koshi Machida, Yoichi Nakao, Akiyoshi Ohashi, Yoshiteru Aoi
2. 発表標題 Symbiotic relationship between Nitrospira and co-existing heterotrophs
3. 学会等名 17th International Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青井 議輝
2. 発表標題 なぜ多くの微生物は培養困難なのか？休眠・覚醒現象から迫る
3. 学会等名 バイオインダストリー協会 “未来へのバイオ技術” 勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青井 議輝
2. 発表標題 なぜ多くの微生物は培養困難なのか？
3. 学会等名 第65回日本放線菌学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青井 議輝
2. 発表標題 微生物ダークマターへのアクセス：培養手法の革新と未知増殖制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第71回日本生物工学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青井 議輝、田村 淳、寺地 裕康、村上 千穂、加藤 節、中島田 豊、金田一 智規、大橋 晶良
2. 発表標題 難培養性微生物とは何か？ 休眠・覚醒・自己増殖阻害
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村淳、寺地裕康、村上千穂、金田一智規、大橋晶良、青井議輝
2. 発表標題 なぜコロニーを作らないのか？液体培地でしか増殖しない難培養微生物（Nitrospira）にコロニーを作らせる
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村淳、寺地裕康、村上千穂、加藤節、中島田豊、金田一智規、大橋晶良、青井議輝
2. 発表標題 なぜコロニーを作らないのか？難培養性の亜硝酸酸化細菌Nitrospiraの増殖制御機構に迫る
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 青井 議輝
2. 発表標題 分離培養手法の革新に向けて：さみしがり屋だけど人込みは嫌い
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度仙台大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 定廣 晋吾、田村 淳、村上 千穂、加藤 節、中島田 豊、金田一 智規、大橋 晶良、青井 議輝
2. 発表標題 なぜ培養困難なのか？難培養性微生物Nitrospiraの未知増殖制御機構に迫る
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度仙台大会
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	中尾 洋一  (Nakao Yoichi)  (60282696)	早稲田大学・理工学術院・教授   (32689)	

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
---------	---------