

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21455

研究課題名（和文）細菌個体生態学：細菌個体隔離・観察アプローチ

研究課題名（英文）Microbial individual ecology based on cell isolation and observation

研究代表者

横川 太一（Yokokawa, Taichi）

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門（超先鋭研究開発プログラム）・副主任研究員

研究者番号：00402751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、従来の微生物生態学が実施できなかった「微生物個体の隔離およびその多角的な観察」手法を確立し、微生物個体生態学の基盤を築くことを目的とした。具体的には、フェムトリッタードロプレットアレイデバイスを用いて微生物群集内の一個体を一液滴ずつに隔離し、細菌密度、細胞サイズ、核酸量、酵素活性の測定を行った。実験結果から、細菌個体の形質のはらつきや、異なる培養条件下での形質および応答の差異を検出することが可能となり、個体レベルでの詳細な生態系構造解析に新たな知見を提供した。本研究の成果は、微生物個体生態学の発展に重要な役割を果たすことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来まで測定不可能であった環境細菌個体間の性状の差異（形態、機能、生理活性）および特定機能を持った環境細菌個体群と他の個体群との差異（形態、機能、生理活性、系統属性）を解析することは、ブラックボックスとして扱われていた環境細菌群集動態の内部構造を理解することにおいて極めて重要である。本研究によりこの個体観察基盤が完成した。この方法の汎用化により、より多くの研究者が細菌個体観察を実施することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish a method for "isolating individual microorganisms and observing them from multiple perspectives," which has not been possible with conventional microbial ecology methods, and to lay the groundwork for individual microbial ecology. We used a Femtoliter Droplet Array (FemDA) device to isolate a single cell in a microbial community and measure bacterial density, cell size, nucleic acid content, cell-attached enzymatic activity, and extracellular free enzymatic activity. The experimental results revealed heterogeneities in the characteristics of individual bacteria and differences in characteristics and responses under different culture conditions, providing new insights into detailed ecosystem structure analysis at the individual level. The results of this study are expected to play an essential role in the development of microbial individual ecology.

研究分野：微生物生態学

キーワード：細菌個体生態学 細菌個体隔離・観察アプローチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般的に生態学では、対象とする生物群を「個体-個体群-群集」と異なるレベルで観察し、それぞれでの知見を集積することにより全体の生態系を理解してきた。しかし、微生物生態学では、方法的制限により、捉えることができる環境中の集団の解像度は群集レベルが限界で、網羅的に個体群・個体を把握する術がほとんどない。特に海洋環境中に生息する微生物個体を隔離し、その細胞を生きたまま性状測定を試みる場合、その細胞の小ささ、多様性や難培養性といった特徴のため、従来の細胞操作や観察方法を適用できないことが知られている。この状況を人間に例えると、疫学的な調査により、集団内で発生する病気やその原因を探ることはできるが、個人に対する健康診断が実施できない状態である。個人健康診断の不適用は、個人の性質や病気への理解が進まず、対策を立てることができない状況と言える。

環境中に生息する微生物の個体差が微生物生態系あるいは生態系内物質循環にどの程度の影響を与えるのかを定量的に把握することは、非常に挑戦的な課題であるが、生態系物質循環の理解に重要な知見を与えると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、当該研究分野が従来まで実施できなかった「微生物個体の隔離およびその多角的な観察」手法を確立し、微生物個体生態学の基盤を築くことを目的とする。具体的には、超微小液滴作製技術を用いて微生物群集内の一個体を一液滴ずつに隔離して個体性状測定を実施することを目指す。

3. 研究の方法

本研究で用いる超微小液滴作製デバイス [フェムトリッター・ドロプレット・アレイ (Femtoliter droplet array, FemDA)] は、薄板ガラスに微細加工技術を用いて 10^2 fL の微小反応容器を 50 万個/cm² 整列したものである (図 1)。このデバイスに細菌細胞懸濁液を注入する。その際、個々の細菌細胞は平均 1 容器あたり 1 細胞以下となるように、各微小反応容器にランダムに隔離されていく。

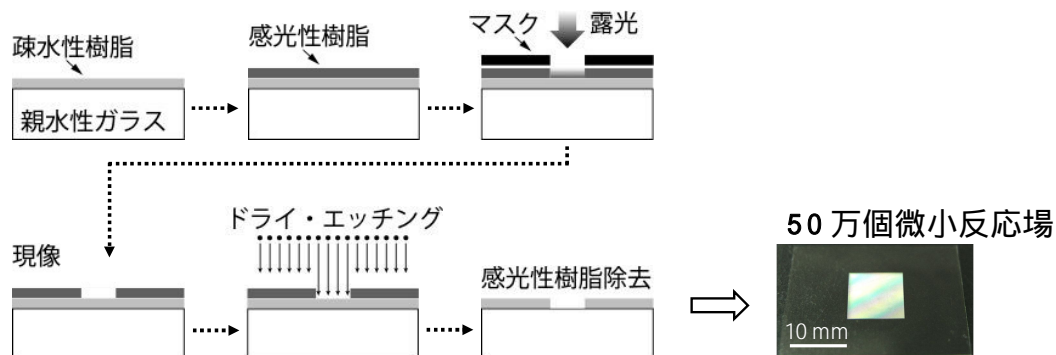


図 1. FemDA 作成のための微細加工工程。それぞれのフェムトリッターチャンバーは、親水性のガラス底面と撥水性のフッ素樹脂の側面で構成される。このチャンバーは対象細胞のサイズおよび性状に応じて自由に寸法や形状を設計し加工することが可能である。

このデバイス内に隔離された細胞を倒立蛍光位相差顕微鏡で網羅的に観察し、そこに隔離された細胞の性状を測定する。測定項目は「細菌密度」、「酵素活性」の 2 点である。本研究では下記 2 点について実験を行った。

- (1) 微生物 1 細胞の微小反応容器での隔離の最適化：条件検討した項目は注入する試料の細胞密度および微小反応容器の寸法である。微小反応容器に隔離された細胞に対し、位相差、核酸染色 (SYBR Green I)、および酵素活性 (蛍光基質 6,8-difluoro-4-methylumbelliferyl phosphate [DiFMUP]) 観察・測定を行った。
- (2) 細菌培養の増殖タイミングに応じた細菌群集個体の性状測定：本実験では大腸菌単離培養株を使用した。大腸菌懸濁液 (1L) を振盪培養器を使って培養し光学密度の常時測定を行った。培養は 30 時間行い、培養 0, 2, 4, 6, 24, 30 時間の 6 点で 1mL の試料を採取し、フローサイトメーターによる細菌細胞数計測 (SYBR Green I 染色液を使い、細胞内 DNA を染色、蛍光を有した細胞を計数する) および FemDA での解析に供した。FemDA 観察では、自動画像解析ソフトウェアを開発し、細菌菌数、容器ごとの菌数、細胞酵素活性といった膨大なデータを自動抽出するシステムを構築した。

4. 研究成果

この FemDA に細菌懸濁試料を注入すると 0 から数細菌個体（細胞）が一つの容器ごとに分配されることが、細菌細胞像・核酸のそれぞれの観察から確認できた（図 2）。使用した細胞の形状に応じて微小反応容器の寸法の最適化を行った。定量計測に資するこの取り組みをすることで、撮影時全ての細胞がフォーカスアウトにならないようにすることができた。これにより自動画像解析を可能にした。

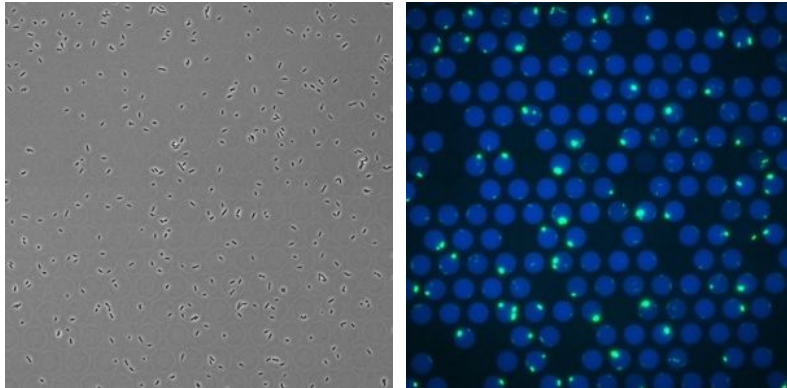


図 2. FemDA に隔離された細菌細胞の位相差画像（左）。細菌細胞の核酸染色（緑色に蛍光を発する細胞）およびフォスファターゼ活性（微小容器全体が青く光る部分）観察画像（右）。

培養株を用いた実験では、細胞培養の増殖タイミング（誘導期、対数期、静止期）それぞれから細菌を採取しデバイスでの観察・測定を行った。培養 0、2 時間目が停滞期、培養 4、6、24 時間目が対数期、培養 30 時間目が静止期に対応していることを光学密度測定およびフローサイトメーターを用いた細菌細胞密度測定によって確認した。

FemDA によって網羅的に得られたデータは「細菌密度」、「酵素活性」の 2 項目である。このうち「酵素活性」は、「各個体の極近傍に存在する酵素活性」と「群集が生産する細胞外酵素活性」に分類することができた。この酵素活性の 2 つのパターンの識別は FemDA によって初めて得られる知見である。本実験では、このように細菌群集の平均値ではなく、個体の性状に基づいたデータを得られたことが特筆すべき点である。FemDA を単離培養株の観察に用いることによって、同一クローン内での「個体の形質のばらつき」、および「異なる増殖タイミングにおいて発現する形質の差異」を捉えることが可能になった（図 3）。

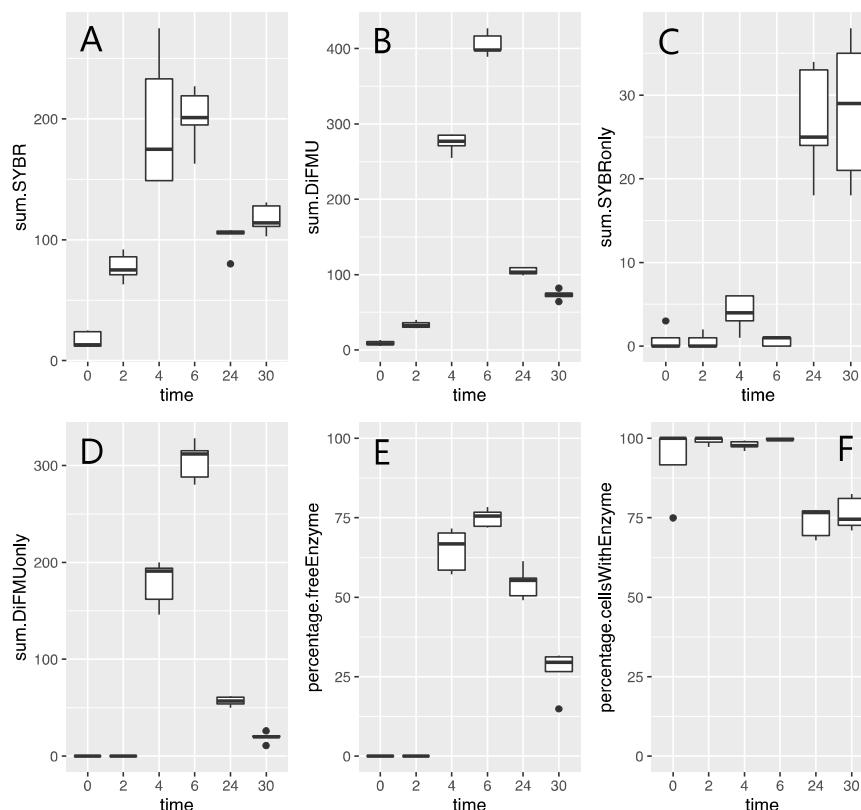


図 3. DNA 染色細胞数 (A)。フォスファターゼ酵素反応があった微小反応容器数 (B)。酵素反応が無く、DNA 染色細胞のみが確認された微小反応容器数 (C)。DNA 染色細胞がなく、酵素反応のみが確認された微小反応容器数 (D)。酵素反応があった微小反応容器の中で、細胞が無く酵素反応のみが確認された微小反応容器数の割合 (E)。細胞が存在するウェルの中で、酵素反応が同時に起きている微小反応容器の割合 (F)。

「各個体の極近傍に存在する酵素活性」と「群集が生産する細胞外酵素活性」の量や比率が、細菌の増殖のタイミングで大きく変化することが明らかになった。とくに細胞培養期間中で顕著に観察されたのは、静止期における酵素反応を伴わない細胞割合の増加（図 3CF）と、対数期における酵素活性全体に対する細胞外酵素活性の増加（図 3BDE）である。

これらの結果は、細菌個体の性状がこれらの酵素活性の総体を制御している可能性を強く示唆している。「各個体の極近傍に存在する酵素活性」を細菌個体自身の基質利用に関わる酵素、「群集が生産する細胞外酵素活性」を細菌個体自身とは離れた場所での基質利用に関わる酵素（同一クローン内のどの細胞でも利用できる酵素）と仮定した場合、個体間に生じる機能的に異なる種類の酵素の産出は、群集全体の基質利用特性を決定づける可能性が高いと考えられる。

今後は、本研究で存在が明らかになった酵素の 2 種類の機能（「各個体の極近傍に存在する酵素活性」と「群集が生産する細胞外酵素活性」）の詳細な観察や分子生物学的な解析が、細菌個体の性状とそれが生態系全体に与える影響の評価につながると期待される。

本研究では、FemDA を用いた解析により、従来測定不可能であった細菌個体間の性状（形態、機能、生理活性）の差異を明らかにした。これにより、ブラックボックスとされていた細菌群集の内部構造への理解が進展し、細菌個体観察の基盤が整ったと考えられる。

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 Zhang Yi, Takaki Yoshihiro, Yoshida-Takashima Yukari, Hiraoka Satoshi, Kurosawa Kanako, Nunoura Takuro, Takai Ken	4. 巻 8
2. 論文標題 A sequential one-pot approach for rapid and convenient characterization of putative restriction-modification systems	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 e00817-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/msystems.00817-23	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横川太一
2. 発表標題 細菌個体隔離デバイスの海洋学への応用
3. 学会等名 日本海洋学会秋季大会
4. 発表年 2020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	張 翼 (Zhang Yi) (40795358)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究プログラム)・副主任研究員 (82706)	

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