

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14953

研究課題名（和文）ゲルマイクロドロップレットによる難培養微生物の培養と抗がん化合物の探索

研究課題名（英文）Exploration and cultivation of unculturable microorganisms for anticancer compound discovery via gel microdroplets

研究代表者

市川 俊輔 (Ichikawa, Shunsuke)

三重大学・教育学部・准教授

研究者番号：50781118

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：環境中の大部分の微生物は未探索な状況（Microbial dark matter）である。多くの細菌は増殖が遅く、また他の微生物由来の化合物を要求するために、培養することが難しい。ドロップレットへの微生物包埋と複合培養は、微生物間の化合物相互作用を維持しながら、液体培地中で多種の細菌を分離培養できるために、難培養微生物を培養するための方法として期待されている。本研究では、土壌細菌のマイクロドロップレットへの包埋を活用することで、特定の細菌の優占を防いで均等度を保持した菌叢をもつ複合培養液を調製できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わたしたちは食品・健康・農業・環境などあらゆる場面で微生物の力を活用してきた。一方でいまだ未探索な環境微生物が膨大に存在していることがわかっている。これら微生物を培養して特徴を明らかにすることで、新しい微生物価値を見出すことが可能となる。本研究では、マイクロドロップレットを活用した微生物培養法によって、多様な微生物を複合培養できることを明らかにした。本研究成果をもとに、さらに応用性の高い目的に沿ったスクリーニング系を開発することによって、期待する機能をもつ微生物を探索できるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：The majority of environmental microorganisms remain unexplored, existing as microbial dark matter. Most bacteria grow slowly and require compounds derived from other microbes, making them difficult to cultivate. The encapsulation of microbes in droplets and their co-cultivation allows for the isolation and cultivation of diverse bacterial species in liquid media while maintaining inter-microbial compound interactions. This study demonstrated that using microdroplet encapsulation of soil bacteria can prevent the dominance of specific bacteria and maintain an even microbial community in a co-culture medium.

研究分野：応用微生物学、生化学

キーワード：土壌微生物 マイクロドロップレット 複合培養 菌叢解析 生理活性化合物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環境微生物のほとんどは固体培地上でコロニー形成せず、これまで単離され生理活性が評価されている細菌は1%程度しかない。したがって大部分の微生物は未探索な状況 (Microbial dark matter) であり、これら微生物の培養方法の確立と生理活性探索の方法を確立することが求められている [Rinke *et al.* *Nature*. 2013. 499:431.]. また、これまで生理活性を示す化合物は土壤中から単離された放線菌より見出されることが多かったが、純粋培養条件では多くの二次代謝産物生産遺伝子群は発現せず未探索な機能が多く残されていることが分かっている。

2. 研究の目的

多くの細菌は増殖が遅く、また他の微生物由来の化合物を要求するために、培養することが難しい。本研究では新規微生物機能を探索するために、細菌の複合培養を試みる。単純に液体培地で細菌を複合培養した場合、増殖の早い特定の細菌が菌叢の大部分を占めてしまうため、増殖の遅い細菌ポピュレーションを維持して複合培養できる手法の開発が必要となる。ドロップレットへの微生物封入と複合培養は、微生物間の化合物相互作用を維持しながら、液体培地中で多種の細菌を分離培養できるために、難培養微生物を培養するための方法として期待されている [馬目ら. 2003. 日本農芸化学会誌. 77:154.]. 本研究では、**マイクロドロップレットへの土壤微生物封入・複合培養の、微生物培養への有用性を検証**することを目的とした (図1)。

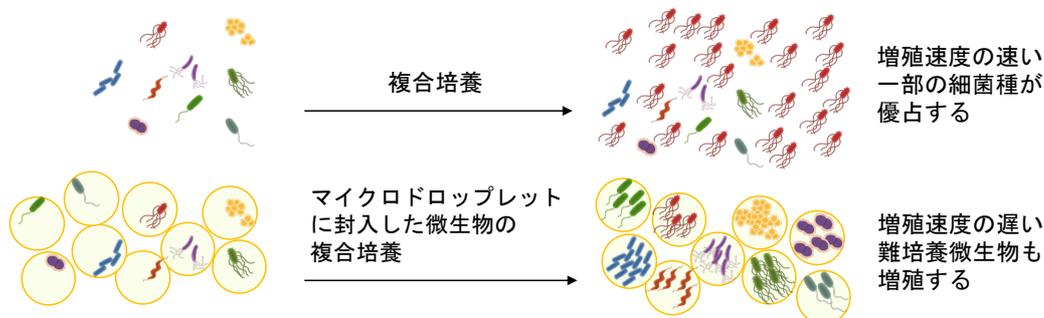


図1 : マイクロドロップレットを活用した環境微生物複合培養のコンセプト

3. 研究の方法

(1) 土壤微生物のマイクロドロップレットへの封入と培養

土壤に冷却 PBS(-) を添加し、ボルテックス処理および超音波処理をおこなった。遠心分離とシリンジフィルターを用いて、土壤微生物を含む画分を回収し、10 倍希釈 YM 培地に懸濁した。調製した土壤微生物懸濁液、微生物増殖を検出するためのプローブ FNAP-FAM [Ota *et al.* *PLoS ONE*. 2019. 14:e0214533.], YM 培地などを混合し、株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズの On-chip Droplet Generator によって、Water in oil (W/O) ドロップレットまたはゲルマイクロドロップレット (Gel Microdroplet: GMD) を作製した。マイクロドロップレットに封入した土壤微生物を、1.5mL チューブ内で混合したまま、室温 25 度で 7 日間培養した。

(2) 土壤微生物培養液の菌叢解析

各土壤微生物培養液を 10,000xg, 2min で遠心分離し、その沈殿画分を PBS に再懸濁した。土壤微生物 DNA を、NucleoSpin® Soil (TaKaRa) を用いて抽出・精製した。DNA 溶液を用いて、16S rRNA V3/V4 領域(341f-805r)を PCR 増幅した。ライブラリ作製し、MiSeq システムと MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いて、2×300 bp の条件でシーケンシングを行った。Greengene と EzBioCloud をデータベースとして用いた。菌叢解析用パイプライン Qiime2.0 を用いて解析を行い、データの可視化を行った。

4. 研究成果

(1) マイクロドロップレット中での RNA プローブの安定性

本研究では、マイクロドロップレット中での微生物増殖を、微生物から分泌される RNase の活性を蛍光として検出する系 (FNAP-sort) により評価した [Ota *et al.* *PLoS ONE*. 2019. 14:e0214533.]. 7 日間 25°C でのインキュベーションを行なったが、10 倍希釈 YM 培地を含むマイクロドロップレット中で RNA プローブの自己分解や減衰は見られなかった。したがって、マイクロドロップレット中での微生物の長期間培養を、FNAP-sort 系により評価できるものと考えられた。

(2) マイクロドロップレット封入した土壤微生物の複合培養とその菌叢解析

W/O ドロップレットおよび GMD 中に土壤微生物を封入し、25°Cで培養した。培養7日目の一部のドロップレットで微生物増殖が確認された(図2)。つづいて、培養前および培養7日目での各培養液中の細菌叢を比較した。土壌中には多様な細菌が存在していることを確認できた。一方で、**マイクロドロップレットなしでの単純な複合培養では、土壤微生物の多様性は失われてしまうことが確認できた。**一方で、W/O ドロップレットおよび GMD への封入により、**複合培養時の細菌叢の多様性はある程度保持される**ことがわかった(図3)。

ドロップレット封入に用いた土壌は、*Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Janthinobacterium*, *Flavobacterium* を含む多様な細菌で構成されていた。一方で、ドロップレット封入をせず複合培養した場合、Enterobacteriaceae, Bacillales, *Pseudomonas* が優占していた。W/O ドロップレット封入して複合培養した場合、*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Delftia* などが、GMD 封入して複合培養した場合、*Mucilaginibacter*, *Pseudomonas*, Streptomycetaceae, *Acinetobacter*, *Escherichia* などが多く検出された(表1)。ベータ多様性解析の結果、各マイクロドロップレットを用いた複合培養で形成された菌叢は、それぞれクラスタを形成することがわかった(図4)。以上の通り、W/O ドロップレットまたは GMD を用いることで、異なる菌叢で構成された複合微生物培養液を調製できる可能性があることがわかった。

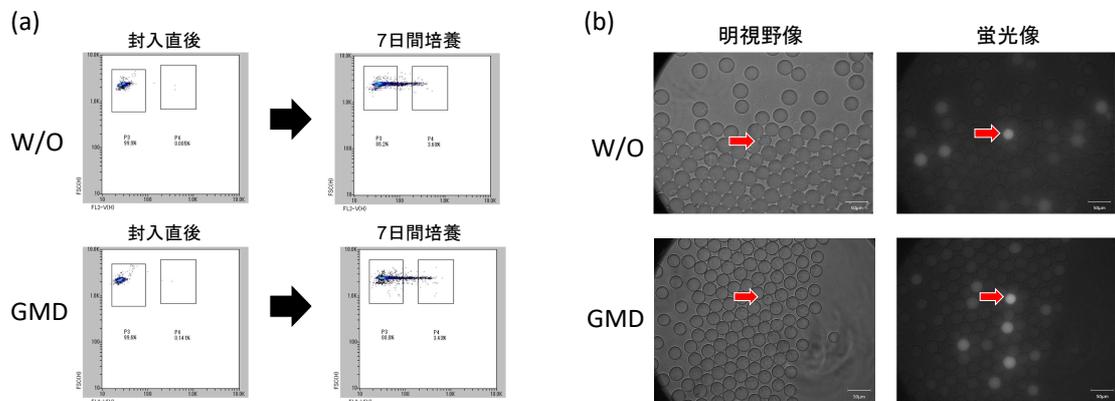


図2：マイクロドロップレット内での微生物の増殖

(a) ソーターを用いて、マイクロドロップレットを解析した。縦軸はマイクロドロップレットのサイズ、横軸は蛍光強度を反映している。7日間の培養処理によって、一部のマイクロドロップレットで顕著な蛍光強度の増加を検出できた。(b) 培養7日目のマイクロドロップレットの様子を顕微鏡下で観察した。強い蛍光を検出できた代表的なドロップレットを赤矢印で示している。

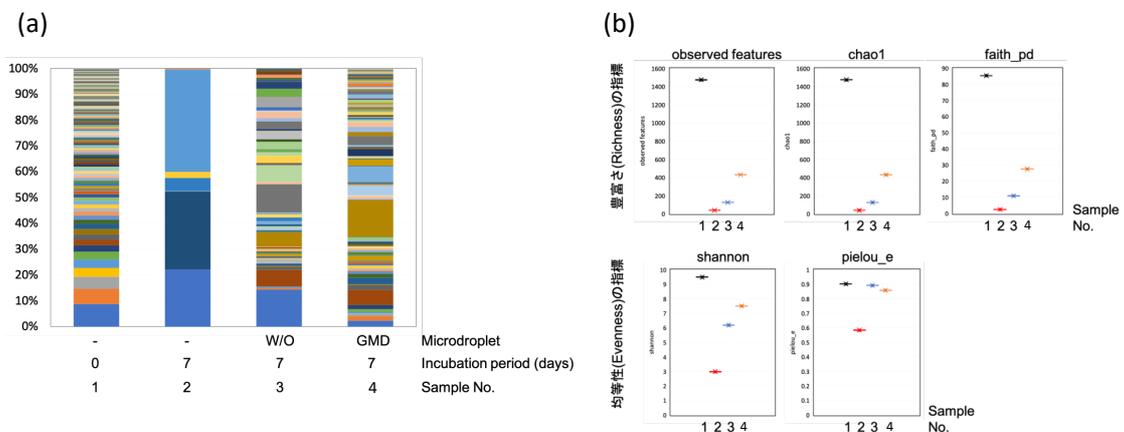


図3：マイクロドロップレットを用いた微生物複合培養液の菌叢解析

(a) 用いた土壌 (No. 1) および、マイクロドロップレットなし (No. 2)、W/O ドロップレット (No. 3)、GMD (No. 4) での複合培養液の、菌叢解析を行なった。(b) 各菌叢のアルファ多様性指標を示す。

表 1 : 各培養液の菌叢を構成する細菌とその存在割合

土壌 (No.1)						
存在率 (%)	#ASV ID	Phylum	Class	Order	Family	Genus
5.14	ASV_003	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
2.66	ASV_001	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
0.95	ASV_036	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	Arthrobacter
0.92	ASV_024	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	Arthrobacter
0.90	ASV_175	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales		
0.80	ASV_185	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Janthinobacterium
0.72	ASV_254	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium
0.69	ASV_140	Firmicutes	Bacilli	Bacillales		
0.59	ASV_299	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales		
0.56	ASV_266	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Janthinobacterium

マイクロドロブレットなし培養液 (No. 2)						
存在率 (%)	#ASV ID	Phylum	Class	Order	Family	Genus
25.59	ASV_007	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	
24.83	ASV_008	Firmicutes	Bacilli	Bacillales		
20.89	ASV_001	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
10.64	ASV_027	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	
3.11	ASV_026	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia
2.83	ASV_073	Firmicutes	Bacilli	Bacillales		
2.37	ASV_042	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Citrobacter
1.47	ASV_060	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	
1.47	ASV_041	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia
0.91	ASV_186	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	

W/Oドロブレット培養液 (No. 3)						
存在率 (%)	#ASV ID	Phylum	Class	Order	Family	Genus
7.71	ASV_003	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
4.32	ASV_001	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
3.47	ASV_005	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter
3.21	ASV_046	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	Arthrobacter
3.00	ASV_030	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium
2.85	ASV_004	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Delftia
2.65	ASV_010	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium
2.54	ASV_016	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Rhodocyclus
2.47	ASV_029	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Mucilagibacter
2.46	ASV_011	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia

GMD (No. 4)						
存在率 (%)	#ASV ID	Phylum	Class	Order	Family	Genus
7.60	ASV_029	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Mucilagibacter
5.55	ASV_003	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
5.27	ASV_044	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	
4.89	ASV_006	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter
4.66	ASV_011	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia
3.93	ASV_018	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
2.95	ASV_004	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Delftia
2.90	ASV_021	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Brevundimonas
2.68	ASV_005	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter
2.59	ASV_012	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	

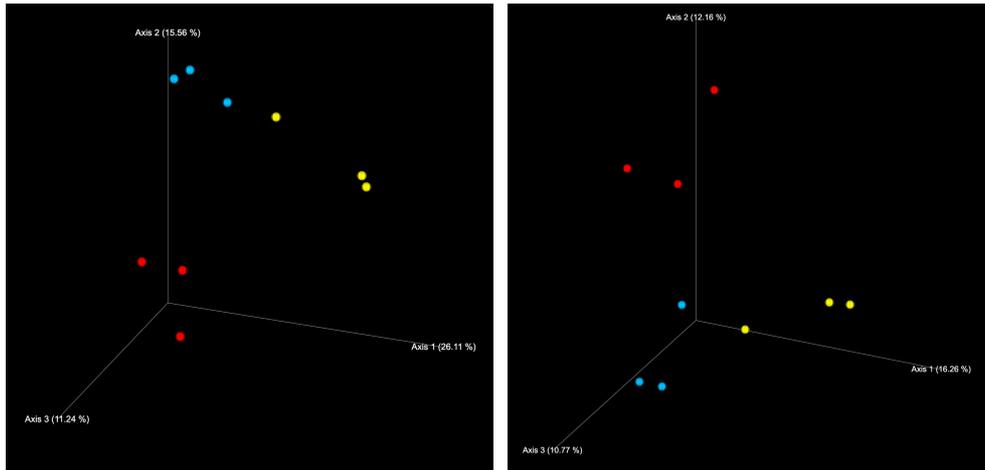


図4：複合微生物培養液菌叢のベータ多様性

左図は Jaccard、右図は Bray_curtis での解析結果を示す。赤点はドロップレット封入なしでの複合培養、黄点は W/O ドロップレット封入での複合培養、青点は GMD 封入での複合培養でのデータを表している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ichikawa Shunsuke, Abe Reimi, Fujimoto Haruka, Higashi Koushi, Zang Liqing, Nakayama Hiroko, Matsuoka Izumi, Shimada Yasuhito	4. 巻 14
2. 論文標題 Paraburkholderia sabiae administration alters zebrafish anxiety-like behavior via gut microbial taurine metabolism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1079187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2023.1079187	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 -

1. 著者名 Ichikawa Shunsuke, Ito Daisuke, Asaoka Sayuri, Abe Reimi, Katsuo Norito, Ito Toshiyuki, Ito Daichi, Karita Shuichi	4. 巻 156
2. 論文標題 The expression of alternative sigma-17 factor induces the transcription of cellulosomal genes in the cellulolytic bacterium Clostridium thermocellum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology	6. 最初と最後の頁 110002 ~ 110002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.enzmictec.2022.110002	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 Ichikawa Shunsuke, Okazaki Mika, Okamura Mina, Nishimura Norihiro, Miyake Hideto	4. 巻 231
2. 論文標題 Rare UV-resistant cells in clonal populations of Escherichia coli	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology	6. 最初と最後の頁 112448 ~ 112448
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphotobiol.2022.112448	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 中西理紗、平島円、荻原彰、市川俊輔、村田晋太郎、後藤太郎、磯部由香	4. 巻 73
2. 論文標題 科学的リテラシーの育成を目指すカフェインを題材とした家庭科授業の実践	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 三重大学教育学部研究紀要	6. 最初と最後の頁 383-391
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 無
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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 市川俊輔、岡崎美香、藤本晴香、アヴンシャル恵利子、西村訓弘、三宅秀人
2. 発表標題 UV-LED光処理後に生存する環境水中の細菌 <i>Priestia</i> のUV耐性発現
3. 学会等名 日本水環境学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市川 俊輔、本間 宣行、勝尾 徳斗、石毛 真行
2. 発表標題 マイクロドロップレットを用いた土壌微生物複合培養とその菌叢解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市川 俊輔、勝尾 徳斗、岡崎 文美、中山 寛子、西村 訓弘、島田 康人
2. 発表標題 ウシ胎児血清成分による <i>Bacillus</i> 属細菌の抗がん活性誘導とRNA-seq解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市川 俊輔、岡崎 美香、岡村 実奈、西村 訓弘、三宅 秀人
2. 発表標題 大腸菌クローン集団中のUV耐性細胞の存在とそのUV殺菌条件の確立
3. 学会等名 日本水環境学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市川 俊輔、岡崎 美香、岡村 実奈、三宅 秀人
2. 発表標題 大腸菌クローン集団中に存在する希少なUV耐性細胞
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shunsuke Ichikawa
2. 発表標題 Cellulose degradation mechanism of a cellulolytic bacterium Clostridium thermocellum
3. 学会等名 International Conference on Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市川 俊輔、勝尾 徳斗、岡崎 文美、中山 寛子、西村 訓弘、島田 康人
2. 発表標題 三重県土壌由来Bacillus属細菌の抗がん活性とそのゲノム解析
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い夏のオンラインセミナー
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
---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	University of Delaware			