

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14906

研究課題名（和文）微生物生態系における自己組織化と機能の安定化機構の解明

研究課題名（英文）Self-organization and functional stability of microbial community

研究代表者

鈴木 研志（Suzuki, Kenshi）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任助教

研究者番号：80870188

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）：Comamonas thiooxydans R2株個体群内における代謝物授受を解析した結果、少なくとも51種の代謝物を再分配する代謝ネットワークを構築し、その形を変えつつ個体群を維持することが示唆された。また、培養上清中の代謝物の増殖への影響を解析した結果、増殖を促進・抑制する物質が含まれることが示された。つまり、これらの物質が個々の細胞の代謝状態を変化させることで不均質な集団となることが考えられた。さらに複雑な微生物群における代謝ネットワークを解析するため、5種からなる微生物群の代謝物解析を実施した結果150以上の代謝物からなる複雑なネットワークが形成されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにした個体群内あるいは群集内で生じる代謝ネットワークと機能的安定化に関する知見は、如何にして微生物が集団として自己組織化し機能を発揮・維持するのかを、代謝物の授受という観点から明らかにできることから、微生物生態学的に極めて重要な知見である。また、これまで個体群でさえ理論的な制御は難しく、その方法確立や微生物群のデザインが微生物利用技術におけるボトルネックとなっていた。本研究で得られた知見に基づき、代謝ネットワークをデザイン・制御するという切り口から微生物制御理論を確立することで、より効率的な物質生産や環境浄化が期待されることから、社会的意義が極めて高いと判断できる。

研究成果の概要（英文）：Analysis of metabolite cross-feeding within the Comamonas thiooxydans R2 population revealed the establishment of a metabolic network capable of sharing at least 51 metabolites. Furthermore, phenol, supplied to the culture as the sole carbon source, was degraded by a part of cells, and other cells probably utilized metabolites from phenol-degrading cells. It was suggested that the population of strain R2 was maintained while the network structure was altered. Investigation of the effects of metabolites on the growth of strain R2 revealed that enhancement or inhibition of growth was observed. Thus, these metabolites would alter the metabolic state of individual cells, resulting in a heterogeneous population. A model microbial community using five strains was constructed to analyze the metabolic network in a more complex microbial community. Metabolite analysis revealed that more than 150 metabolites were shared among the five strains.

研究分野：微生物生態学

キーワード：微生物生態系 代謝ネットワーク 環境保全 自己組織化 個体群内不均一性

1. 研究開始当初の背景

「持続可能な発展」は環境保全と社会発展を両立し人間社会を維持するための枠組みとして世界規模の到達目標と認識されている一方で、自然破壊は加速の一途にある。即ち、生物資源を維持しつつ社会発展を成し遂げるには、環境保全に加え崩壊した自然を再生する取り組みが必要不可欠である。汚染あるいは資源枯渇によって崩壊した環境を再生するためには、原因物質の分解や窒素・炭素等の物質循環系の再構築が必須である。微生物は物理化学的処理では分解が困難な物質の分解や窒素・炭素循環といった機能を発揮し生態系の基盤形成を担う。しかも、単一菌株でも機能を発揮できるが、多種多様な微生物が相互作用しつつ自己組織化することで、微生物生態系としてより複雑な機能を安定に発揮できると考えられている。従って、崩壊した自然の再生にはまず、最適な微生物生態系を設計し制御することが重要である。

微生物生態系はその群集構造(生息する微生物の種類や量)と発揮する機能を解析することで研究が行われてきた。特に遺伝子情報に基づいたバイオインフォマティクスは群集構造の全貌と種間の関係性を描画するに至っている。しかし、これらの研究は既知情報に基づく予測の域をでないのが実情で、実用的な微生物群の制御技術の確立に有用な知見とはなり得ない。しかも、すでに形成された微生物生態系を対象とすることから、その形成過程を捉えることはできていない。

微生物は一般に均質な細胞集団であると考えられてきたが、実際には様々な表現型からなる複雑な集団であると捉えられ、他の微生物との関係性が変化することも明らかにされつつある。それにも関わらず、依然として微生物が持つ機能や増殖の評価は、全細胞の平均値として求められており、まして、より複雑な微生物生態系における個々の細胞の評価はほとんどが謎に包まれている。

これまでの研究で、複数のフェノール分解菌を用いたモデル微生物生態系では、代謝ネットワークを形成し系全体として機能を発揮することを明らかにしてきた。しかも、フェノールを競合するにも関わらず、代謝物を利用し増殖する複数の表現型の細胞が混在していることが示唆されてきた。つまり、本モデル微生物系における個体群内の不均一さがどのように生じ、系全体の機能に影響を及ぼすのかを解析することで、微生物生態系の形成から機能の安定化までのプロセスを解明できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、微生物生態系が持つ機能的な安定性を、微生物個体群内に生じる表現型の不均一性に注目して解明することである。そのために、複数種のフェノール分解菌を用いたモデル微生物系における自己組織化による役割分担を代謝レベルで解析した。また、個体群内に生じる多様な表現型の細胞の存在を確認しつつ代謝のつながりを捉えることで、どの様に機能を発揮するのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 上記目的を達成するためには、微生物生態系における群集構造変遷と培養液中の代謝物を解析することでどのような代謝ネットワークが形成されていたのかを解析することが重要である。そこで、フェノールを唯一の炭素源として増殖できる *Acinetobacter* sp. c26 株、*Comamonas thiooxydans* R2 株、*Cupriavidus* sp. P-10 株、*Pseudomonas* sp. LAB-08 株および *Variovorax* sp. HAB-30 株を用いて連続培養系を構築した。R2 株、c26 株、P-10 株、HAB-30 株および LAB-08 株の順に 15 日毎に植菌し、培養期間中、各菌株の菌密度、培養上清中の代謝物および遺伝子転写解析を行なった。

(2) R2 株純粋連続培養系を構築し、フェノール分解細胞および非分解細胞の割合を希釈平板法による菌密度測定で解析した。希釈平板法には 1/10 TSA 培地および 0.2 mM のフェノールを唯一の炭素源とした無機塩培地を用いることで全菌数およびフェノール分解細胞を計測した。培養期間中に細胞を回収しトランスクリプトーム解析を実施することで、個体群としての代謝を推定した。培養上清を回収し再び R2 株を培養することで、消費される代謝物を解析した。R2 株の代謝変動を誘導する自身の代謝物を検討するため、培養上清を分画し R2 株に与えることでその影響を評価した。また、増殖抑制を示す代謝物に関して、その同定および生合成経路の特定を試みた。フェノール分解細胞および非分解細胞を識別するため phenol hydroxylase 遺伝子と協調的に発現する様に GFP 遺伝子を導入した R2 株を作成し、フェノール培養条件下における細胞観察を行なった。

4. 研究成果

(1) モデル微生物における代謝ネットワークの形成

5 種の微生物を順に植菌した結果、R2 株のみでは少なくとも 78 種の代謝物を細胞外に放出していることが示された。また c26 株を植菌することで、78 種の内 33 種の代謝物が利用され新たな

に 13 種の代謝物が放出されることが示された。次に P-10 株を植菌した結果、8 種の代謝物が消費され、新たに 22 種が放出されることが示された。HAB-30 株を植菌したところ、11 種の代謝物が消費され 21 種が放出された。最後に LAB-08 株を植菌したところ、2 種が消費され新たに 27 種が放出されていることが示された。興味深いことに P-10 株を植菌した後、培養液中のカテコール濃度が著しく増加していた。これらの結果から、本 5 菌株培養系では極めて複雑な代謝ネットワークが形成されており、しかも、カテコールのようなフェノール代謝で比較的上流に位置する様な代謝物でさえ再分配されていることが示唆された。

(2) R2 株における個体群内不均一性と機能維持

R2 株はフェノールを唯一の炭素源として連続培養すると、その集団内で極一部の細胞のみがフェノール分解に関与することが示唆されてきた。そこで、連続培養系を新たに構築し、希釈平板法によるフェノール分解細胞および非分解細胞の存在比を確認した結果、フェノール分解細胞は全体の 1%以下まで減少しその割合が変動することが明らかになった(図 1)。しかも、顕微鏡観察の結果から 93%以上の細胞が生細胞であり、非フェノール分解細胞は培養系内に放出された自身の代謝物を利用して生残していることが示唆された。そこで、培養上清に含まれる代謝物およびその利用性を解析した結果、R2 株は自身が放出した代謝物の内少なくとも 51 種を利用することが示された。以上の結果から、R2 株はフェノール分解という機能を発揮する上で、細胞レベルで分化し機能的な役割分担をしていることが示唆された。

R2 株連続培養系における遺伝子転写を解析した結果、培養に伴い phenol hydroxylase 遺伝子群の転写が低下することが示された。一方で、培養に伴ったその他の代謝経路に関連する遺伝子の転写量の増加や変動は確認できず、不均一さは生じているがそのサブ集団のサイズは大きくなく、さまざまな表現型のサブ集団が多数出現していることが推察された。

R2 株における表現型の不均一化が遺伝的変異によるのかどうかを検討するため、フェノール分解細胞および非分解細胞を用いて再び連続培養系を構築した。その結果、どちらの細胞を用いて培養を開始しても、フェノールを分解し不均一さが生じることが示された。従って、本研究で確認された不均一さは遺伝的な変異によらないことが示された。

表現型の不均一さを生み出す要因を検討するため、R2 株培養上清に含まれる代謝物が R2 株の増殖に及ぼす影響を解析した。その結果、R2 株培養上清には R2 株の細胞密度を増加させる程の炭素源および栄養源はない一方で、増殖を促進あるいは阻害する代謝物が含まれることが明らかとなった(図 2)。即ち、これらの R2 株の増殖を変化させる物質が表現型の多様性を生み出すことが示唆された。これまでの研究から、増殖抑制を示す代謝物は phenol hydroxylase および catechol 2,3-dioxygenase のフェノールおよびカテコールに対する親和性を直接低下させることがわかっている。従って、本代謝物は R2 株の代謝変動に強く関与していると考えられるが、その同定や生産メカニズムは不明であった。そこでまず、フェノール、ピルビン酸、クエン酸およびコハク酸を唯一の炭素源とした培地で R2 株を培養し、その上清を用いて増殖活性の評価を行なった。その結果、フェノール、クエン酸あるいはコハク酸を添加し 5 日間以上培養することで、その培養上清が抑制活性を示すことが明らかとなった。一方で、ピルビン酸を用いた場合、増殖促進をすることが示された。これらの結果から、R2 株の自己抑制物質はフェノール代謝時に特異的に生産されるわけではなく、二時代代謝物である可能性が高いことが示唆された。

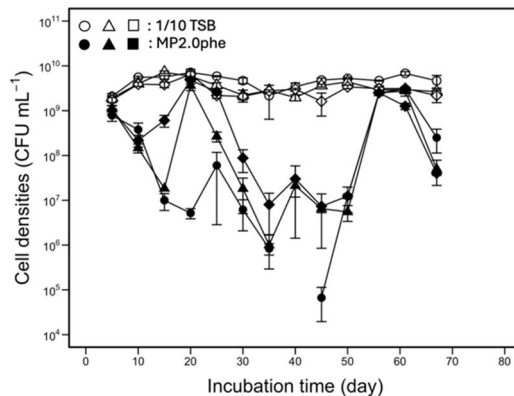


図1. R2株集積培養系におけるCFUの変遷

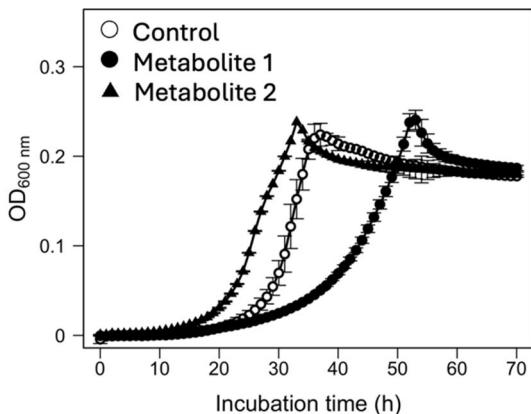


図2. 代謝物によるR2株増殖への影響

フェノール分解細胞および非分解細胞を視覚的により正確に判別するため、phenol hydroxylase 遺伝子群と同調して転写されるように GFP 遺伝子を導入した R2-GFP 株を作成した。GFP が phenol 代謝時にのみ発現するかどうかを検討するため、R2-GFP 株を phenol あるいはコハク酸を唯一の炭素源とする無機塩培地で培養した結果、phenol を含む培地で培養した時のみ GFP 蛍光を示すことが確認された(図3)。現在 R2-GFP 株を用いて集積培養系を構築しフローサイトメータで細胞を分取することで、フェノール分解細胞と非分解細胞それぞれの遺伝子転写を解析することを進めている。

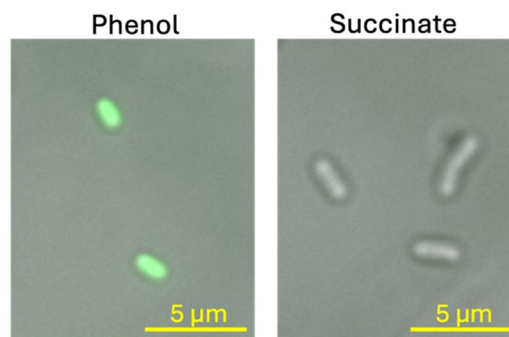


図3. R2-GFP株における選択的GFP発現

<引用文献>

- Faikowski P, Fenchel T, DeLong E., The microbial engines that drive Earth's biogeochemical Cycles, *Science* Vol. 320. 2008, 1034-1039
- Thompson JN, Cunningham BM. Geographic structure and dynamics of ecoevolutionary selection *Nature*. Vol.417. 2002, 735-738
- Toju H., High-throughput DNA barcoding for ecological network studies, *Population Ecology*. Vol. 57. 2015, 37-51
- Martins BMC, Locke JCW., Microbial individuality: how single-cell heterogeneity enable populations level strategies, *Curr. Opin. Microbiol.* Vol. 24. 2015, 104-112
- Aziz FAA and Suzuki K, Honjo M, Amano K, Mohd Din ARJ, Tashiro Y, Futamata H., Coexisting mechanisms of bacterial community are changeable even under similar stable conditions in a chemostat culture, *J. Biosci. Bioeng.* Vol. 131. 2021, 77-83
- Mohd Din ARJ, Suzuki K, Honjo M, Amano K, Nishimura T, Moriuchi R, Dohra H, Ishizawa H, Kimura M, Tashiro Y, Futamata H., Imbalance of carbon and nitrogen metabolisms in *Comamonas testosteroni* R2 is caused by negative feedback and rescued by L-arginine, *Microbes Environ*, Vol. 36, ME21050

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 Honjo Masahiro, Suzuki Kenshi, Katai Junya, Tashiro Yosuke, Aoyagi Tomo, Hori Tomoyuki, Okada Takashi, Saito Yasuhisa, Futamata Hiroyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Stable States of a Microbial Community Are Formed by Dynamic Metabolic Networks with Members Functioning to Achieve Both Robustness and Plasticity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/j sme2.ME23091	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本荘雅宏、鈴木研志、齋藤保久、武田和宏、木村元彦、石澤秀紘、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 複合微生物群集における安定的共存の理解に向けた合成微生物群集の解析
3. 学会等名 日本土壤微生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本荘雅宏、鈴木研志、齋藤保久、武田和宏、木村元彦、石澤秀紘、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 複合系の好適制御のために：Dry & Wet解析から見えてきた三菌株の安定的共存系の仕組み
3. 学会等名 日本生物工学会中部支部
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田麗、天野光喜、本荘雅宏、高橋宣博、鈴木研志、栗栖太、木村元彦、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 Functional stability and instability observed in engineered microbial complex systems, 人工的微生物複合系において観察された機能的安定性と不安定性
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田麗、天野光喜、本莊雅宏、高橋宣博、鈴木研志、栗栖太、木村元彦、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 微生物群集の好適制御に向けた複合微生物系の機能的構造解析
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田麗、天野光喜、本莊雅宏、高橋宣博、鈴木研志、栗栖太、木村元彦、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 複合微生物系の好適制御に向けた微生物群集の機能的構造解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本莊雅宏、鈴木研志、齋藤保久、武田和宏、木村元彦、石澤秀紘、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 複合微生物群集における安定的共存には微生物間相互作用の変化が重要
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenshi Suzuki, Yutaro Uehara, Futoshi Kurisu, Hiroyuki Futamata, Hideaki Nojiri
2. 発表標題 Metabolite cross-feeding contributes to stabilizing multispecies coexistence in a substrate-limiting synthetic bacterial community
3. 学会等名 American Society for Microbiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 研志、上原 悠太郎、水口 千穂、栗栖 太、二又 裕之、野尻 秀昭
2. 発表標題 Comamonas thiooxydans R2株のフェノール分解における個体群内形質不均一性と機能維持機構
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 研志、上原 悠太郎、水口 千穂、栗栖 太、二又 裕之、野尻 秀昭
2. 発表標題 フェノール分解条件下におけるComamonas thiooxydans R2株の形質不均一性と機能維持
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2023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
研究協力者	二又 裕之 (Futamata Hiroyuki)		
研究協力者	栗栖 太 (Kurusu Futoshi)		

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