

複合微生物群が有する代謝浄化能の多変量解析技術による見える化

山澤 哲^{1,3}・伊達 康博^{2,3}・菊地 淳^{2,3,4,5}

¹鹿島・技研, ²理研・PSC, ³横市院・生命, ⁴理研・BMEP, ⁵名大院・生命農

〒182-0036 東京都調布市飛田給 2-19-1

E-mail: akira@kajima.com

Home Page: <http://www.kajima.co.jp/>

複雑な微生物群が超有機体として反応を触媒するバイオプロセスの理解はますます重要性を増している一方、既知遺伝子の解析から未知微生物を含む系全体の代謝プロセス推定と理解は困難であり、未知微生物を含む複雑微生物系プロセスの“見える化”はバイオエンジニアリング分野のイノベーション技術として期待されている。本研究ではモデル系として、(1) 塩素化エテンの嫌気性バイオレメディエーション系、(2) セルロースなどの嫌気消化系を選び多変量解析データマイニングを適用することで特定の代謝物分解と特徴的 DGGE バンドとの時系列変動の関係を“見える化”することに成功した。これにより未同定微生物の機能推定が可能である。嫌気消化系への適用では更に、異種基質に対するそれぞれの代謝シーケンスを特徴づける違いについても議論することができた。

1. はじめに

複雑な微生物群が超有機体として反応を触媒するバイオプロセスの理解はますます重要性を増しており、特定の微生物種や機能遺伝子に着目した遺伝子評価手法¹⁾が一般化している。一方で、それら複雑微生物系プロセスには未知種を含む多様な微生物叢が存在しており、刻々と変化する代謝物濃度や菌叢が反映される代謝ネットワークの理解は十分とは言えない。未知微生物を含む複雑微生物系プロセスの“見える化”はバイオエンジニアリング分野のイノベーションに通じる基幹技術としてますます期待が高まっている^{2,3,4,5)}(図1)。

本研究ではモデル系として、塩素化エテンの嫌気性バイオレメディエーション系、あるいはセルロースなどの嫌気消化系について、統計的解析手法を適用した“見える化”を試み、未知微生物の機能推定が可能となったので報告する。嫌気消化系においては更に、異種基質に対して多変量解析を適用、比較し、それぞれの代謝シーケンスを特徴づけている違いについても議論することができた⁶⁾。

2. 実験及びデータ解析方法

(1) 土壌地下水浄化カラム実験

200 mL の土壌カラムに地下水 (1 L) を循環させ、基質としてテトラクロロエチレンまたは *cis*-1,2-ジクロロエチレンを添加し、分解過程を観察した。微生物活性化剤として EDC (エコサイクル (株)) を併用した。

(2) 嫌気消化バイアル実験

1 L のガラス容器に 500 mL の高温メタン発酵液を入れ 55 °C で緩やかに攪拌した。基質としてグルコース、スターチ、セルロースをそれぞれ添加し、分解過程とバイオガスの発生を観察した。

(3) 代謝物と微生物叢の解析

経時的に採取したサンプルを用い機器分析による代謝物の定量を行った。同一サンプルよりそれぞれ DNA 抽出を行い、バクテリア用ユニバーサルプライマーを使用して DGGE 解析を行った。DGGE 画像は、ゲル撮影装置 (Gel-Doc; BIO-RAD (株)) を用いてバンド強度と移動度 (Rf) を数値化し解析に用いた。

(4) 多変量解析データマイニング

統計解析ソフトウェア”R”を使用し、代謝物変動と微生物叢変動についてマトリックス化したデータの主成分分析、相関解析を行った。得られた結果から相関ヒートマップを作成し評価に用いた。

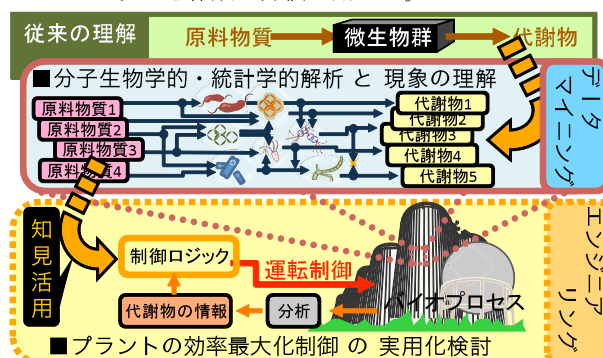


図 1. 複雑微生物系プロセスを“見える化”する意義。

3. 結果と考察

(1) 塩素化エチレンのバイオレメディエーション

土壌地下水バイオレメディエーション系は、微生物活性化剤（補助基質）の添加により系内の微生物濃度が非常に大きく変動することから、DGGE バンド強度をレーンごとに標準化した後、抽出 DNA の濃度を乗じてサンプル液中の微生物濃度をより反映した微生物叢データとして解析に用いた。また、代謝物と微生物叢のマトリックスデータは基質の STAGE1~4 とした。DGGE 画像からは微生物の集積が十分進行し、微生

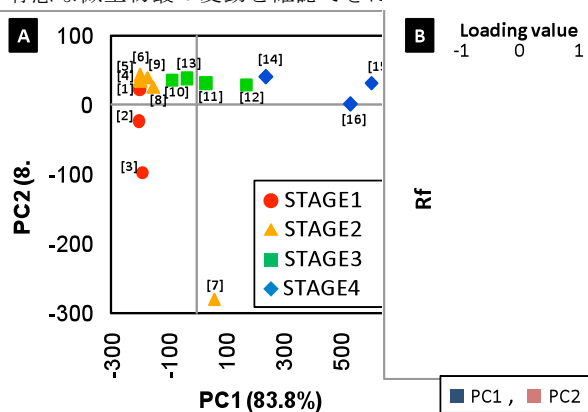


図 2. 微生物叢の主成分分析スコアプロット(A)とローディングプロット(B)。[1]~[16]はサンプル番号を示す。

速やかなテトラクロロエチレン (PCE)、トリクロロエチレン (TCE) の分解が観察された STAGE1-2 について相関ヒートマップを作成した結果、PCE、TCE と特徴的な相関を示す DGGE バンドが確認され、*cis*-1,2-ジクロロエチレン (*cis*-1,2-DCE)、塩化ビニル (VC) についても速やかな分解が見られた STAGE3-4 からは *cis*-1,2-DCE、VC と特徴的な相関を示すものが見出され、また、STAGE1-4 の相関解析からは、実験全体を通して代謝物との普遍的な相関を示すバンドを見出すことが出来た (図 3)。以上を総括し、DGGE バンド微生物の代謝機能を見える化した結果、図 4 に示す代謝シーケンスを推定することが出来た。

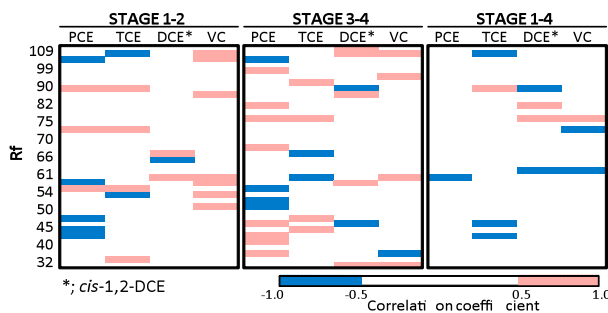


図 3. 微生物叢と代謝物の相関ヒートマップ。

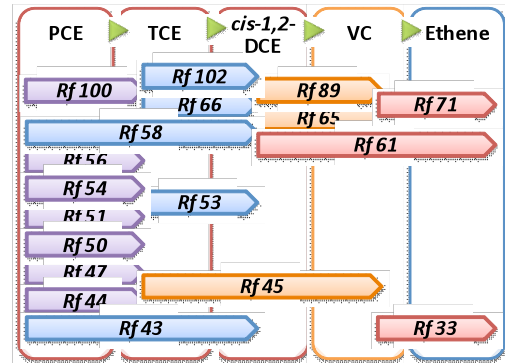


図 4. 未同定微生物バンドの推定代謝シーケンス。

(2) セルロース、スターチ、グルコースの嫌気消化系解析

それぞれの基質の嫌気消化過程について、主成分分析と代謝物-微生物叢間の相関解析を行ったところ、系によって基質の代謝経路が異なることが示唆された。例えばグルコース系、スターチ系においてはプロピオン酸の生成と Band 8、Band 9 が相関を示したが、セルロース系では Band 7 であった。このように代謝物変動と微生物叢間の相関関係を網羅的に解析することで、嫌気消化プロセスの上流反応と位置づけられる低分子化と酸生成反応に関わる複雑微生物系代謝プロセスを推定することに成功し、基質の分子構造の違いと分解過程について微生物の挙動と代謝物の動態を評価することが出来た⁶⁾。

4. 今後の展望

もちろん、本手法のみによって未同定微生物の機能を断定的に論じることはできない。しかし、その断定を経ずとも複雑微生物系である腸内環境では有益微生物や難分解性多糖類の投与でバイオプロセスの改善ができることは周知の事実であり、今後は工業プロセスへも同様のアプローチが適用されるであろう。これまで見出されていない微生物と代謝物との関係性を推定することによって、複雑微生物系の反応場への制御ロジックを見出すツールとしての展開が期待できる⁶⁾。

参考文献

- [1] Johnson, D. R., Lee, P. K. H., Homes, V. F. and Alvarez-Cohen, L., *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:7, 3866-3871, (2005).
- [2] Date, Y., Nakanishi, Y., Fukuda, S., Kato, T., Tsuneda, S., Ohno, H. and Kikuchi, J., *J. Biosci. Bioeng.*, 110:1, 87-93, (2010).
- [3] Everroad, C. R., Yoshida, S., Tsuboi, Y., Date, Y., Kikuchi, J. and Moriya, S., *J. Vis. Exp.*, 7:62, e3163, (2012).
- [4] Kikuchi, J., Ogata, Y. and Shinozaki, K., *J. Ecosys. Ecogr.*, S2 e001, (2011).
- [5] Ogata, Y., Chikayama, E., Morioka, Y., Everroad, C. R., Shino, A., Matsushima, A., Haruna, H., Moriya, S., Toyoda, T. and Kikuchi, J., *PLoS ONE.*, 7, e30263, (2012).
- [6] Date, Y., Iikura, T., Yamazawa, A., Moriya, S. and Kikuchi, J., *J Proteome Res.*, (preliminary accepted).