

二国間交流事業 共同研究報告書

令和4年4月1日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[代表者所属機関・部局]
神戸大学・科学技術イノベーション研究科
[職・氏名]
教授・吉田健一
[課題番号]
JPJSBP1 20195708

1. 事業名 相手国: 英国 (振興会対応機関: The Royal Society) との共同研究

2. 研究課題名

(和文) 微生物集団の形質転換: 遺伝子水平伝搬が微生物集団に与える影響

(英文) Transforming functional bacterial communities: how does horizontal genetic transfer impact the functional society of bacteria?

3. 共同研究全実施期間 2019年4月1日 ~ 2022年3月31日 (3年0ヶ月)

4. 相手国代表者(所属機関・職・氏名【全て英文】)

Newcastle University, Professor, WIPAT Anil

5. 委託費総額(返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		3,770,002 円
内訳	1年度目執行経費	1,870,001 円
	2年度目執行経費	1,900,001 円
	3年度目執行経費	円

6. 共同研究全実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	3名
相手国側参加者等	2名

* 参加者リスト(様式 B1(1))に表示される合計数を転記してください(途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

7. 派遣・受入実績

	派遣		受入
	相手国	第三国	
1年度目	4	0	1 (0)
2年度目	0	0	0 (0)
3年度目	-	-	- (-)
4年度目	-	-	- (-)

* 派遣・受入実績(様式 B1(3))に表示される合計数を転記してください。

派遣: 本委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績(延べ人数)。

受入: 相手国側参加者等の来日実績(延べ人数)。カッコ内は本委託費で滞在費等を負担した内数。

8. 研究交流実績の概要・成果等

(1)研究交流実績概要(全期間を通じた研究交流の目的・研究交流計画の実施状況等)

液体培養中であっても高効率な接合伝達を誇るグラム陽性菌プラスミド pLS20 の能力を最大限に応用して、植物の生育を促進する機能をもつ微生物集団 (Plant Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR) をモデルに、接合伝達プラスミドが異種微生物間でどのように水平伝搬され、また維持されるか、加えてプラスミド水平伝搬が微生物集団の機能にどのような影響を与えるかについて解析する。これを実現するために、プラスミドの水平伝搬を受容した微生物を追跡定量化する技術を日英で共同開発し、応用微生物学と情報科学の異分野融合によって微生物集団内でのプラスミド接合伝達の水平伝搬という現象を新たな視点で数理的に理解解明することを究極の目的とする。

pLS20 接合伝達システムは、液体培養中でプラスミド供与菌および受容菌を 15 分間混合するだけで確立され、様々な細菌種間のプラスミド移動を可能にするので、微生物集団内での遺伝子水平伝搬を解析するために極めて有効なツールとなる。神戸大学では、既にヘルパープラスミド pLS20catΔoriT によって小型の可動プラスミド pGR16 を枯草菌から接合伝達させて、細菌種を超えて少なくとも受容菌集団の 1%程度を形質転換するという高効率なシステムを開発している。通常、可動プラスミドを獲得する受容菌は、抗生物質などの選択的な圧力下で選択されるため、非選択的条件下で水平に送達される可動プラスミドが如何に維持または排除されるかについて現在のところは全く理解されていない。

そこで本研究では、pGR16 を改変して構成的に発現する GFP 遺伝子を持つ新しい可動プラスミドを構築し、PGPR において選択圧の無い条件でのプラスミド接合伝達のダイナミズムを観測する。GFP 発現プラスミドの獲得により形質転換された微生物種の割合、組成および動態を、蛍光活性化細胞選別、蛍光顕微鏡によって分析した。Newcastle 大学は PGPR 微生物集団モデル内におけるプラスミド水平伝搬の解析を担当した。

2019 年度は日英両サイドに本共同研専属チームを編成し、それぞれが分担する実験研究を開始した。神戸大チームは主として GFP 発現可動プラスミドの作成とその接合伝達の基礎データを集積し、Newcastle 大チームは GFP 発現可動プラスミドの微生物集団における挙動ならびに微生物集団機能の変化の計測方法論を確立した。神戸大チームは 6 月に Newcastle 大を訪問し共同研究のキックオフ会議を行った。また、Newcastle 大からの大学院生 1 名を神戸大へ約 2 か月間受け入れて共同実験で GFP 発現可動プラスミドの有効性を確認すると共に受容菌を RFP (mKATE2)で標識し識別する実験系を確立した。また、寒天プレートに現れるコロニーの薬剤耐性の獲得状況による接合伝達効率の測定方法を当該プラスミドの実験系に適合させる基礎を固めた。11~12 月に約 1 か月間、神戸大より Newcastle 大へ大学院生 1 名を派遣して、こうして確立された実験方法論を蛍光活性化細胞選別および蛍光顕微鏡による細胞レベルの解析へと発展させた。

ところが、2020 年度初頭、新型コロナウイルス感染パンデミックに見舞われた。従って、2020 年度に予定していた 2 度目の Newcastle 大学院生の神戸への受け入れも、神戸大学院生の Newcastle 派遣も、何れも中止を余儀なくされた。しかし、これまで準備推進してきた共同研究を継続するために、まず神戸大側の蛍光活性化細胞選別装置を整備し、これによって計測されるデータを Newcastle 大のクラウドを利用した共有して毎月 1 度のオンライン会議を定例化する方策をとった。Newcastle 大の院生は博士論文をまとめる必要があり、このために 2019 年度に作成したプラスミドを様々な PGPR 微生物集団モデルに接合伝達して微生物種ごとに伝達効率が異なることを明らかにするとともに、やはりバチルス属細菌へ一定の確率で自発的に遺伝子水平伝搬が起こることを捉え、またそれが PGPR 微生物集団の人為的な改良のために有効な手段となることを見出した。一方、神戸大学院生は修士論文研究にて、pLS20 による接合伝達を定量的に解析する方法論を寒天プレート上のコロニー形成法と蛍光活性化細胞選別法の両方で評価比較し、選択圧の無い条件で細胞レベルに接合伝達を解析するには蛍光活性化細胞選別法でなければ正確な解析ができないことや複数の細胞が相互作用して初めて高い効率の遺伝子水平伝搬が起こる可能性など、従来の細胞が 1 対 1 で選択的に結合することを前提とするモデルでは説明できない新たな視点を見出した。さらに、この接合伝達を巧みに応用して、従来は形質転換が困難な微生物の染色体コンテキストを自在にデザインして改変する新たな方法を開発することにも成功し、予想以上の研究成果を収めた。また、これらの成果はオンラインの国際会議 1 件ならびに国内会議 1 件にて発表公開された。

上述の通り、2020 年度は未曾有のパンデミックという逆境の中にもそれを跳ね返す収穫を得たのではあるが、これらの成果を論文発表することはできなかった。その理由は共同実験のよって相互に結果を確認することができなかったからである。従って、1 年間の研究期間延長を日英双方が申請、了承を受け、様々な追加実験をそれぞれに工夫して実施することで、最終的に当該分野の一流学術雑誌へ 2 報の共著論文を発表する

ことができた。この際には、pLS20 研究の第一人者であるマドリード自治大学の研究者を共同著者に迎えてディスカッションを充実させた。(Microorganisms 9(9). 2021. 1931. doi: 10.3390/microorganisms9091931. PMID: 34576826.; Microb Cell Fact. 21(1). 2022. 34. doi: 10.1186/s12934-022-01759-8.)

頭かに、本二国間協定共同研究は充実した成果を得るに至ったが、得られた実験データを数理モデルへと導くには共同実験の機会が不十分であったため、その実現に至ることはできなかった。しかし、Newcastle 大の研究代表者は神戸大にて収集したデータを最大限活用して当該分野の研究を現在も継続しており、早晚その具体化を急いでいる。日英の研究代表者 2 名は本事業終了後も独自に共同研究を継続する予定であり、上述の新たな研究者を加えて一層メンバーを充実した国際共同研究への発展が予見されている。

(2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

GFP 標識プラスミドを様々な PGPR 微生物集団モデルに接合伝達して微生物種ごとに伝達効率が異なることを明らかにするとともに、やはりバチルス属細菌へ一定の確率で自発的に遺伝子水平伝搬が起こることを捉え、またそれが PGPR 微生物集団の人為的な改良のために有効な手段となることを見出した。

pLS20 による接合伝達を定量的に解析する方法論を寒天プレート上のコロニー形成法と蛍光活性化細胞選別法の両方で評価比較し、細胞レベルに接合伝達を解析するには GFP 標識プラスミドと RFP 標識受容菌を用いる蛍光活性化細胞選別法でなければ正確な解析ができないことや、選択圧の無い条件下で複数の細胞が相互作用して初めて高い効率の遺伝子水平伝搬が起こる可能性など、従来の細胞が 1 対 1 で結合することを前提とするモデルでは説明できない新たな視点を見出した。さらに、この接合伝達を巧みに応用して、従来は形質転換が困難な微生物の染色体コンテキストを自在にデザインして改変する新たな方法を開発することにも成功し、予想以上の研究成果を収めた。最終的に日英の研究代表者 2 名で協力して当該分野の一流学術雑誌へ 2 報の原著論文を発表するに至った (Microorganisms 9(9). 2021. 1931. doi: 10.3390/microorganisms9091931. PMID: 34576826.; Microb Cell Fact. 21(1). 2022. 34. doi: 10.1186/s12934-022-01759-8.)。

(3)相手国との交流(両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

上記の学術的価値は全てが両国の研究者の協力によって初めて達成されたものであり、それに加えて双方のネットワークを共有することで、マドリード自治大学やスイス Neuchatel 大の新たな研究者が輪に加わり、一層メンバーを充実した国際共同研究への発展が予見されるに至ったことも特筆に値する。

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

この二国間協定事業は純粋に科学的な共同研究であり、この 3 年間の成果をもって直接的な社会的貢献を図ることはできない。しかし、新たな微生物の遺伝子操作や機能改善のつながる進路が示されており、長い目でみれば将来的に何らかの社会的インパクトもあり得ると考える。

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取り組み、成果)

神戸大にて滞在して共同研究を実施した Newcastle 大の院生は日本国内の研究職に応募するほどの親日家となった。この点、本事業によるマインドセットの変化、影響は決して無視できない。一方、Newcastle 大へ派遣された神戸大の院生は 2021 年 3 月に修士課程を修了して酒造会社の研究職に就いた。清酒の欧州における普及は近年目覚ましく、短期間ではあるが本事業によって得た英国滞在の経験を活かし、将来は欧州向けの商品開発や高付加価値化を狙いたいと抱負を語っている。

(6)将来発展可能性(本研究交流事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

日英の研究代表者 2 名は本事業終了後も独自に共同研究の継続を予定しており、マドリード自治大学やスイス Neuchatel 大の新たな研究者がその輪に加わることで、一層メンバーを充実した国際共同研究への発展が予見され、Horizon Europe などの欧州側の研究プロジェクトとして展開が望まれる。

(7)その他(上記(2)~(6)以外に得られた成果があれば記述してください)

例: 大学間協定の締結、他事業への展開、受賞、産業財産権の出願・取得など
該当なし。

