

令和元年6月14日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08151

研究課題名(和文) グルコース濃度に応答した異種細菌間相互作用の解明～日和見感染症制御を目指して～

研究課題名(英文) Characterization of microbial interspecies interactions in response to a glucose concentration

研究代表者

浦井 誠 (URAI, Makoto)

東京農業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：20398853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはこれまで、低グルコース環境では抗菌物質産生により競合し、高グルコース環境ではバイオフィーム形成を誘導し共生する異種細菌の組み合わせをヒト表皮から分離した。そこで、グルコース濃度に応答した異種細菌間相互作用変化の分子機構を明らかにすることを目的とし、ヒト表皮分離細菌について、共培養物中の代謝産物解析、プロテオーム解析、ドラフトゲノム解析を行った。さらに、日和見感染症原因菌も加えて、異種微生物間相互作用を示す新たな菌種組み合わせを見出し、これら共培養物中の代謝産物解析、および、プロテオーム解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の分子機構を明らかにすることは、自然界で本来あるべき微生物群集の動態の理解を助けることだけに留まらず、感染症分野において常在菌が日和見感染を引き起こすトリガーとなる分子機構の解明にもつながると考えられる。微生物間相互作用の分子機構を明らかにすることで、これまでのような抗菌薬を用いた常在菌叢の破綻を伴う感染制御ではなく、常在菌同士の相互作用をうまくコントロールする、新しい日和見感染症制御法を確立できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： We isolated microbes that possess interspecies interactions in response to a glucose concentration from human skin. In this study, we performed metabolite analysis and proteome analysis of a co-culture of the isolates to characterize interspecies interactions. Draft genome sequence analysis of the isolates was also performed. Furthermore, we found that new interspecies interactions between the isolates and opportunistic pathogens.

研究分野：微生物学・糖質科学

キーワード：異種微生物間相互作用 細胞外マトリクス産生誘導 抗菌物質産生 構造解析 分子機構解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然界において微生物が単一種ではなく、複数種が競合、または、共生して生息していることが注目されるようになってきたが、このような相互作用の分子機構を明らかにすることは、自然界で本来起きている微生物叢の動態を理解するうえで重要である。また、近年、ヒトの消化管内または体表に生息する常在性菌に対する関心も高まってきている中で、日和見感染症発症の引き金となるヒト常在菌叢の均衡破綻メカニズムについても、人為的な抗菌薬投与以外の原因はいまだ不明な点が多い。

われわれはこれまで、異種生物間の様々な相互作用について、特に介在する分子に着目して解析してきた。その過程で、生育環境のグルコース濃度の変化に伴い、競合と共生の相反する相互作用を示す異種の細菌の組み合わせをヒト表皮から分離している。この細菌の組み合わせは、グルコース濃度が低い生育環境では、一方の細菌(A)が抗菌物質を産生し、他方の細菌(B)の生育を阻害する競合的な相互作用を示すのに対し、グルコース濃度が高い環境では細菌(B)が細菌(A)に細胞外マトリクスの生産を誘導し、抗菌物質産生も抑制され、共に重なり合ってバイオフィルム様の形態を示し共生する。生育環境の変化にตอบสนองして異種の微生物に対する相互作用のあり方を変える興味深い現象であるが、このような相互作用を制御する分子機構は不明である。

2. 研究の目的

グルコース濃度に応答した異種細菌間相互作用変化の分子機構を明らかにすることを目的とし、以下の検討を行う。

(1) ヒト表皮分離細菌2種を用いて、単独培養および共培養物中の代謝産物の解析、ドラフトゲノム解析、単独培養および共培養物のプロテオーム解析を行う。

(2) 日和見感染症原因菌種を用いて、異種微生物間相互作用を示す新たな菌種組み合わせの探索、新たな菌種組み合わせの単独培養および共培養物中の代謝産物の解析、新たな菌種組み合わせの単独培養および共培養物のプロテオーム解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 異種細菌間相互作用を示すヒト表皮分離細菌を用いた検討

単独培養および共培養物中の代謝産物の解析

異種細菌間相互作用のシグナル伝達物質、および、シグナル伝達の結果分泌される細胞外マトリクスを分画、精製し、構造解析を試みた。2種の分離株それぞれの単独培養、および、共培養を行い、その培養物から有機溶媒抽出などにより代謝産物を抽出した。得られた抽出物について、各種クロマトグラフィーにより分画、精製し、1菌種の単独培養系に添加することで、共培養時の表現型が再現されるかを検証した。

細胞外マトリクスについてはバイオフィルム様の共培養物から高分子成分を抽出し、各種クロマトグラフィーにより精製した。精製物に対して酸加水分解を行い、その構成成分をガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)により解析した。多糖成分のグリコシド結合様式については、メチル化法により部分メチル化アルジトールアセテートを得て、GC/MSにより解析した。また、600MHz 核磁気共鳴装置(NMR)を用いて、構造の決定を試みた。

ヒト表皮分離細菌のドラフトゲノム解析

異種細菌間相互作用を示すヒト表皮分離細菌について、次世代シーケンサー(MiSeq)によるドラフトゲノム解析とアノテーションを行った。

単独培養および共培養物のプロテオーム解析

異種細菌間相互作用を制御するタンパク質群を同定するため、2種の分離株それぞれの単独培養および共培養を行い、培養物からタンパク質を抽出した。SDS-PAGEで分離後、トリプシン消化し、高分解能液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用いて分析し、網羅的にタンパク質を同定・定量するショットガンプロテオームを行った。

(2) 日和見感染症原因菌を用いた検討

新たな菌種組み合わせの探索

上記のヒト表皮分離菌株の相互作用についての解析と並行して、これら菌株と、日和見感染症原因菌種とを交えた、新たな相互作用の組み合わせについても探索した。

新たな菌種組み合わせの単独培養および共培養物中の代謝産物の解析

新たな菌種組み合わせの異種微生物間相互作用のシグナル伝達物質、および、シグナル伝達の結果誘導される、表現型変化の原因物質を分画、精製し、構造解析を試みた。前述のとおり、

単独培養、および、2種の共培養を行い、培養物から有機溶媒抽出などにより代謝産物を抽出した。得られた抽出物について、各種クロマトグラフィーにより分画、精製し、1菌種の単独培養系に添加することで、共培養時の表現型変化が再現されるかを検証した。また、表現型変化の原因物質についても、共培養物から原因物質の抽出を試みた。

新たな菌種組み合わせの単独培養および共培養物のプロテオーム解析

新たな菌種組み合わせの異種微生物間相互作用を制御するタンパク質群を同定するため、前述のとおり培養物からタンパク質を抽出し、SDS-PAGEで分離後、トリプシン消化して高分解能LC-MS/MS分析し、網羅的にタンパク質を同定・定量するショットガンプロテオームを行った。

4. 研究成果

(1) 異種細菌間相互作用を示すヒト表皮分離細菌を用いた検討

単独培養および共培養物中の代謝産物の解析

我々がこれまでにヒト表皮から単離していた、異種細菌に対して細胞外マトリクス産生を誘導する細菌の培養物から、細胞外マトリクス産生誘導活性を指標に活性物質の抽出、および、精製を試みた。この活性物質は共培養時にのみ分泌されるものではなく、単一培養時においても、ある培養条件の際に分泌されることが示唆された。精製条件についても検討を進めた結果、活性物質は低分子の親水性物質であることが示唆されたが、まだ単一成分にまで精製できていない。現在さらなる精製と構造解析を進めている。

また、異種細菌の共培養により生産が誘導された細胞外マトリクスの成分や構造に関しても検討を進めた。細胞外マトリクス産生誘導に適した共培養条件、および、細胞外マトリクスの抽出、精製条件について検討し、精製細胞外マトリクスを得た。この細胞外マトリクスは共培養時にのみ分泌され、その主成分は多糖であった。得られた精製細胞外マトリクスについて、GC/MSによる構成成分分析、メチル化分析、および、600MHz NMR分析などによる構造解析を進めた。得られた精製細胞外マトリクスは溶媒への溶解性が低く、分析および解析に苦慮したが、その構造をほぼ決定し、これまでに報告のない新規の構造である可能性が示唆された。現在詳細な構造解析、および、その生物活性の解析を進めている。

ヒト表皮分離細菌のドラフトゲノム解析

異種細菌間相互作用を示すヒト表皮分離細菌について、ゲノムDNAを抽出、精製し、次世代シーケンサー(MiSeq)によるドラフトゲノム解析を行った。得られたデータについて、アノテーション解析を行っている。

単独培養および共培養物のプロテオーム解析

異種細菌間相互作用を制御するタンパク質群を同定するため、最適な共培養条件、および、分析、解析条件について検討した。検討した条件で単独培養および共培養を行い、培養物からタンパク質を抽出した。SDS-PAGEで分離後、トリプシン消化して高分解能LC-MS/MS分析し、網羅的にタンパク質を同定・定量するショットガンプロテオームを行った。現在、得られたデータの解析を行っている。

(2) 日和見感染症原因菌を用いた検討

新たな菌種組み合わせの探索

これまでに単離してきたヒト表皮由来微生物に加えて、ヒトに対して日和見感染症を引き起こすことが知られている病原性微生物も用いて、異種微生物間相互作用を示す新たな菌種の組み合わせを探索した結果、病原性微生物に対して固体表面への接着能を低下させる相互作用など、これまでに報告のない新たな微生物種の組み合わせを複数組見出した。

新たな菌種組み合わせの単独培養および共培養物中の代謝産物の解析

異種微生物間相互作用を示す新たな菌種組み合わせのうち、病原性微生物に対して表現型変化を誘導する微生物の培養物から、表現型変化誘導活性を指標に活性物質の抽出、および、精製を試みた。この活性物質は共培養時にのみ分泌されるものではなく、単一培養においても、ある培養条件の際に分泌されることが示唆された。精製条件についても検討を進めた結果、活性物質は低分子の親水性物質であることは示唆されたが、まだ単一成分にまで精製できていない。現在さらなる精製と構造解析を進めている。

また、異種微生物の共培養により誘導される表現型変化の原因物質に関しても検討を進めた。表現型変化誘導に適した共培養条件、および、表現型変化の原因物質の抽出条件について検討した結果、表現型変化の原因物質は微生物細胞に強く結合した物質であることが示唆された。現在さらなる解析条件を検討している。

新たな菌種組み合わせの単独培養および共培養物のプロテオーム解析

新たな菌種組み合わせの異種微生物間相互作用を制御するタンパク質群を同定するため、最適な共培養条件、および、分析、解析条件について検討した。検討した条件で培養物からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE で分離後、トリプシン消化して高分解能 LC-MS/MS 分析し、網羅的にタンパク質を同定・定量するショットガンプロテオームを行った。現在、得られたデータの解析を行っている。

5 . 研究組織

研究分担者

氏名：相澤 朋子

ローマ字氏名：(AIZAWA, Tomoko)

所属研究機関名：日本大学

部局名：生物資源科学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁) : 60398849

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、研究者個人に帰属されます。