

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14876

研究課題名(和文) 新たな微生物生育因子、コプロポルフィリン-亜鉛錯体の機能と生理作用

研究課題名(英文) Action mechanism and physiological function of coproporphyrins, novel bacterial growth factors

研究代表者

重富 顕吾 (Shigetomi, Kengo)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：20547202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では異種微生物間で働く新規増殖因子であるコプロポルフィリン類の作用機序ならびに活性の普遍性・有効性について検証した。コプロポルフィリン類は生育因子要求株である *Leucobacter* sp. ASN212の不完全なヘム合成系を外因性の中間体として補うことで純粋培養を可能にしていることを明らかにした。また、本化合物によりFirmicutes門ならびにgamma-Proteobacteria門に属する一部の種の生育が刺激されうることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実験室において培養できない微生物(難培養微生物)は環境微生物全体の99%以上と見積もられ、それらの中には人類に有用なものが存在すると推定される。難培養微生物を培養可能とするため、我々は微生物間でやりとりされる増殖因子としてコプロポルフィリン類を見出した。本課題では、それらがどのような機構で増殖を刺激し、どの程度その活性に普遍性があるのかを検証した。得られた成果は、難培養微生物の培養研究と技術開発において将来に大きく寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：In this research, the action mechanism and physiological effectivities of coproporphyrins, novel bacterial growth factors were investigated. The results revealed that coproporphyrins function as the exogenous biosynthetic intermediate in the incomplete heme biosynthesis of *Leucobacter* sp. strain ASN212. Moreover, the growth factors were proved to stimulate a part of strains belonging to Firmicutes and gamma-Proteobacteria in bacterial flora.

研究分野：天然物化学

キーワード：Leucobacter Growth factor Bacteria Firmicutes Actinobacteria Coproporphyrin

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

1. 研究開始当初の背景 我々が“薬”として利用している化合物はそのほとんどが微生物由来のもの、もしくは微生物の代謝産物を基本骨格としたものであり、抗生物質を例にとってもその60%が放線菌由来とされている。これらの微生物は土壌をはじめとする様々な環境サンプルから単離され、実験室で培養された後、所望の生物活性に元づいてスクリーニングされる。しかしながら、そもそも我々が実験室で培養できている微生物は、環境サンプル中に含まれる微生物のわずか0.01-0.1%に過ぎない。このことは、換言すれば、99%以上の未利用微生物資源が未だ地球上に眠っているということである。これを示すように、難培養微生物であった *Eleftheria terrae* から、2015年、新たな作用機序を持つ抗生物質テイキシバクチンが発見されている (Wrightら, 2015)。

申請者は、研究室内で培養できないこれら未培養微生物を培養可能とする重要な要素として、微生物間でやりとりされる「生育因子」に着目した。環境中ではヘテロな共生状態として生育できている微生物も、純粋培養系では他者からの生育因子供与が欠落するため、生育できない。*Leucobacter komagatae* 近縁種 ASN212 株は、*Sphingopyxis* sp. GF9 株によって生産される生育因子を受け取ることで初めて実験室条件下で培養可能となる細菌類である。申請者はこの2種間で授受される生育因子の同定を試み、その正体がコプロポルフィリン III-亜鉛錯体を中心とするコプロポルフィリン類 (以下コプロポルフィリン I、III を Cop. I、Cop. III と略す。またそれらの金属錯体はそれぞれに Zn-などを付して記載する) であることを突き止めた。驚くべきことに、その活性はサブナノモラーレベルにおいても顕著に示され、既知のどの生育因子と比べても明らかに強力なものであった。さらに、このように門のレベルを超えてやり取りされる生育因子はこれまで報告が無く、本化合物は新たなクラスの生育因子であった。一方、このような興味深い結果にも関わらず、未だその生育促進機構や共生系における寄与は未解明であり、解明すべき課題となっていた。

2. 研究の目的 本課題では、この新たな微生物生育因子が引き起こす生命現象の謎に迫るため、その“機能”と共生系における“生理”の解明を目指した。研究開始時には5つの課題を設定したが、研究で得られた成果に合わせて研究計画を練り直し、このうち4課題に絞って検討した。すなわち、(1) 構造活性相関による中心亜鉛の必要性についての検討;(2) インフォマティクスを組み合わせた生育因子作用機序の解明;(3) Actinobacteria 門ならびに Firmicutes 門細菌類に対する Cop. III 活性の検証;(4) 各種菌叢に対する Cop. III 活性の評価 を本課題の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 構造活性相関による中心亜鉛の必要性についての検討

Cop. 類における中心亜鉛の必要性を検証するため、市販の Cop. I ならびに Cop. III 塩酸塩に対して各種金属 (Zn, Co, Fe, Cu, Ni, Mg, Mn) の導入を検討した。反応は HPLC ならびに LC-MS により追跡した。得られた金属錯体を HPLC により精製した後、*Leucobacter* sp. ASN212 株に対する増殖促進活性を評価した。活性評価は CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega) キットを用いた ATP 定量により行った。

(2) インフォマティクスを組み合わせた生育因子作用機序の解明

ASN212 株を Cop. III 共存下で適量培養した後、ゲノム DNA を抽出した。得られた DNA に対して TruSeq Nano DNA Library Prep Kit (Illumina) を用いて標準プロトコル (350 bp Insert) にてライブラリを調製した後、次世代シーケンサ (Illumina HiSeq) を用いて Paired-End 法 100 塩基読み取りにより塩基配列データを取得した。アダプタートリミングの後 Velvet を用いた *de novo* アセンブリを行った。最終的に得られたアセンブリデータに対して、RAST server を用いてアノテーションを行った。得られたアノテーション結果からヘム合成関連遺伝子を探索した。アノテーションにより見出されなかった遺伝子 (*hemb*, *hemc*, *heme*, *hemy*) については、NCBI データベースに登録されている細菌類の当該酵素のアミノ酸配列をクエリとして BLASTp による同源性検索を行った。また、ASN212 近縁種である *Leucobacter komagatae* VKM ST 2845L 株についても同様にヘム関連遺伝子を探索し、ASN212 の配列との比較を行った。

(3) Actinobacteria 門ならびに Firmicutes 門細菌類に対する Cop. III 活性の検証

Actinobacteria である3種の *Leucobacter* 属細菌 (*Leucobacter komagatae* NBRC15245 株、*Leucobacter albus* NBRC103070 株、*Leucobacter denitrificans* NBRC106039 株) ならびに研究室保有の生理活性物質産生放線菌である *Actinomyces* sp. TA0403 株、*Streptomyces* sp. TA0403 株、Firmicutes である *B. subtilis* ATCC 70385 株に対する Cop. III による生育刺激活性を評価した。菌体の定量には ATP 法を用い、それぞれ Cop. III 未添加条件の生育に対する Cop. III 添加条件の相対生育量を評価した。さらに各種菌叢における Actinobacteria ならびに Firmicutes の Cop. III 添加に対する増殖の影響を評価するため、Actinobacteria 特異的プライマー (Farris, Olson, 2007; Sterch, et al., 2003) 及び Firmicutes 特異的プライマー (Guo ら, 2008; Yang ら, 2008) を用いて、Tks GFlex[™] Polymerase (TAKARA Bio) による end-point PCR を行った。得られた PCR 産物をアガロースゲルにより泳動した後、モレキュラーイメージ

ヤー-ChemiDoc MP (BIORAD) でアンプリコンの定量を行った。

(4) 各種菌叢に対する Cop. III 活性の評価

北海道ならびに宮崎県各地より採取した土壌、エゾシカ大腸ならびに盲腸内容物、札幌市新川浄水場の活性汚泥から菌叢サンプルを調製した。これらについて Cop. III (13 μM) 添加もしくは未添加の Mueller Hinton II 培地にて 28 °C、5 日間、114 rpm にて振盪培養した。培養後、濁度 (595 nm) 測定を行い、生育量とした。回収した菌体について NucleoSpin®Soil (Takara Bio) を用いてゲノム DNA の抽出を行った。DNA 溶液調製後、NanoDrop™ Lite spectrophotometer を用いて溶液の DNA 濃度、及び純度を計測した。然る後に MiSeq を用いた細菌叢解析を行った。得られたリードについて Qiime 2.0 を用いて配列解析を行い、EzBioCloud 16S database を用いて系統推定を行った。

4. 研究成果

(1) 構造活性相関による中心亜鉛の必要性についての検討

錯体調製を行った結果、Zn²⁺及び Cu²⁺錯体は室温条件で速やかに Cop. 類と錯体を形成した。また、Fe²⁺、Co²⁺、Ni²⁺に関しては、100 °C の加温条件でのみ錯体を形成した (収率 57–88%)。一方で Mn²⁺、Mg²⁺については 100 °C の加温条件においても錯体形成が見られなかった。調製した錯体について生育刺激活性を評価したところ、Cop. I、III いずれにおいても遊離の Cop. ならびに Zn–Cop. が高い活性を示し、Fe–Cop. 錯体も中程度の活性を示した。また、Cop. III 錯体は Cop. I 錯体に比べ 10 倍程度の高い活性を示した。Cop. III ならびに Fe–Cop. III 錯体は Actinobacteria 門ならびに Firmicutes 門細菌特有のヘム生合成 (non-canonical pathway) における重要中間体であることが知られている。このため、上記実験結果から ASN212 株のヘム生合成が生育刺激に関与することが推定された。また、先行研究において、Zn 錯体が金属錯体のみが増殖因子として見出された理由としては、培地中の亜鉛イオンが能動的に遊離の Cop. 類と結合した結果であると推測された。本構造活性相関研究により作用機序に関する示唆的な結果を得るに至った。

(2) インフォマティクスを組み合わせた生育因子作用機序の解明

(1) において、ヘム生合成系の関与が示唆されたため、ASN212 株のゲノムを解読し、ヘム生合成関連遺伝子の解析を行った。先ず ASN212 株ゲノムにアノテーションを付与したところ、*hema*、*hemd*、*hemh*、*hemq* の存在が確認された。*hemy* に相当する配列も確認されたものの、配列中に 116 塩基からなる挿入が見られた。次いで存在が確認されなかった *hemb*、*hemc*、*heme* について BLAST 解析による探索を行った。NCBI 上の HemB (prophobilinogen synthase (EC 4.2.1.24))、HemC (prophobilinogen deaminase (EC 2.5.1.61)) 及び HemE (uroporphyrinogen III decarboxylase (EC 4.1.1.37)) のアミノ酸配列をクエリとして BLASTp による相同性検索を行ったところ、それぞれに該当するヒットは見られた (Identify: 46.9–63.1%) もの、*e-value* は 0.024–0.094 と高く、またいずれにおいても活性中心のアミノ酸残基の多くが性質の異なる残基に置換されていた。以上の結果から、ASN212 株においては HemB、C、E、Y の全てもしくはいずれかが機能していないと推定された。このため、Cop. III は ASN212 株の不完全なヘム生合成系における外因性の生合成中間体として機能し、増殖を可能にしていると結論づけた。一方、比較対象として解析した *L. komagatae* においても *hemy* の欠損が認められたため、Cop. III の作用を検証したところ、Cop. III 添加により 2.4 倍程度の増殖が確認された。この結果はヘム生合成系の関与を支持するものである。

(3) Actinobacteria 門ならびに Firmicutes 門細菌類に対する Cop. III 活性の検証

Cop. III ならびに Fe–Cop. III を要するヘム生合成は Actinobacteria 門ならびに Firmicutes 門細菌に特有のものであったことから、これらの細菌類の中に Cop. III による増殖刺激を受ける株が存在すると予想し、その検証を菌株レベルで行った。検討した菌株のうち、*L. denitrificans* は Cop. III 添加でも未添加と同等の増殖を示したが、他の *Leucobacter* 株ならびに放線菌である *Actinomyces* sp. TA0403 株、*Streptomyces* sp. TA0403 株、Firmicutes である *B. subtilis* ATCC 70385 株の増殖はいずれも Cop. III 添加により抑制された。Cop. ならびに Zn–Cop. は光増感剤として、活性酸素種生成能を示すことが知られている。Cop. 類供与者である *Sphingopyxis* sp. GF9 においても高濃度の Cop. 類で生育が抑制されることが知られているため、同様の作用によりこれらの菌株の生育が阻害されたと考えられる。

(4) 各種菌叢に対する Cop. III 活性の評価

(3) における菌株レベルでの検証では増殖刺激を受ける株の発見が叶わなかったため、菌叢に対する影響を、次世代シーケンサーを用いた網羅的菌叢解析により評価した。複数の菌叢サンプルを Cop. III の存在、非存在下にて培養した。培養後の生育量を評価したところ、多くの試料で Cop. III 添加条件の生育が非添加条件に比べて劣っていた。一方、活性汚泥サンプルでは Cop. III 添加条件において優位な生育の上昇が確認された。これは活性汚泥が高度に曝気された環境であり菌叢中には catalase や SOD など活性酸素を解毒するシステムを発達させた細菌群が多く存在するためと考えられる。得られた 5 種の菌叢培養物 (M1, M2, M5, M8, M9) からゲノム

DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析を行った。

先ず門レベルの作用について検証した。エゾシカ盲腸由来の試料 (M1) では菌叢の 34.5% を占めていた Actinobacteria が、Cop. III 処理により 0% まで低下していた。その他の土壌由来試料 (M2, M5, M8) では Cop. III を含まない条件においても Actinobacteria の存在が認められなかった。Firmicutes 門細菌は Cop. III 処理により M1, M8 で相対的に増加し、M2 で減少していた。活性汚泥由来の試料 (M9) では各門の構成に他ほどの大きな変化は見られなかった。次いで個別の種に着目し、OTU に基づいてその個体数の増減を確認したところ、右表に示した複数の株が Cop. III 処理により増加していた。Cop. 類の作用機序より Actinobacteria 門ならびに Firmicutes 門細菌に対する作用を予想していたが、予想に反していくつかの Proteobacteria が増加していた。これらの作用が Cop. 類による直接的な刺激なのか、競合種の死滅などによる間接的な作用の結果なのかは不明であるが、一部の γ -Proteobacteria 門細菌も non-canonical pathway によりヘムを合成することから、中には直接的な生育促進効果の結果も含まれると予想される。

Bacteria	Sample	OTU counts (Occupancy in samples)	
		without Cop. III	with Cop. III
Actinobacteria		not found	
Firmicutes			
<i>Lysinibacillus</i> sp.	M2	1857 (8.9%)	3768 (15.7%)
<i>Bacillus</i> sp.	M2	2260 (10.9%)	8797 (37.5%)
<i>Paenibacillus sussonhensis</i>	M5	269 (0.8%)	2331 (13.1%)
<i>Paenibacillus CP009279</i>	M5	150 (0.4%)	360 (2.0%)
β-Proteobacteria			
<i>Burkholderia</i> sp.	M2	not detected	6482 (27.7%)
<i>Comamonas testosteroni</i>	M9	310 (1.1%)	2451 (9.7%)
<i>Paraburkholderia ginsengisol</i>	M5	not detected	750 (4.2%)
γ-Proteobacteria			
<i>Escherichia</i> KE701379	M1	6084 (19.1%)	31876 (78.2%)
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	M5	not detected	2348 (4.8%)
<i>Serratia fonticola</i>	M5	not detected	5646 (31.7%)
<i>Pseudomonas gessardii</i>	M5	not detected	1294 (7.3%)
<i>Pectobacterium betavasculori</i>	M5	not detected	201 (4.2%)
<i>Serratia</i> CP015613	M8	29206 (79.6%)	33916 (92.4%)
<i>Proteus hauseri</i>	M9	2 (0.0%)	635 (2.5%)
<i>Kluyvera intermedia</i>	M9	1627 (5.6%)	2015 (7.9%)
<i>Acinetobacter rudis</i>	M9	458 (1.5%)	1881 (6.9%)
<i>Enterobacter kobei</i>	M9	386 (1.3%)	582 (2.3%)
<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	M9	119 (0.4%)	333 (1.3%)

本課題で得られた結果は、1)ヘム合成という生物に必須とされる機能でさえも欠損している微生物が環境中に生存していること、2)その生合成能の欠失が門を超えた異種微生物のサポートによって補填されていること、3)生育因子が必ずしも単一の生物活性を持つのではなく、このために微生物“叢”で複雑な相互作用を齎していることを示している。これらの知見は現在 99%以上と見積もられている難培養微生物の培養研究と技術開発において将来に大きく寄与するものである。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

高井亮吾、重富顕吾、生方信、難培養放線菌 *Leucobacter* sp. ASN212 株が要求する増殖因子の探索 -難培養微生物を培養可能にする新たな増殖因子の発見、化学と生物、査読有り、57号、2019、143-145

高井亮吾、重富顕吾、鎌形洋一、生方信、Growth Mechanism of Uncultured Actinobacterial Strain *Leucobacter* sp. ASN212 by Zinc Coproporphyrin, Heterocycles、査読有り、95号、2017、145-151

[学会発表](計5件)

Takai R., Bhuiyan M. I. N., Shigetomi K., Mitsuhashi S., Kamagata Y. & Ubukata M., Coproporphyrins, novel interphylum growth factors released by *Sphingopyxis* sp.enable laboratory cultivation of previously uncultured *Leucobacter* sp、ACS Spring 2019 National Meeting in Orlando、2019年

Takai R., Bhuiyan M. I. N., Shigetomi K. Kamagata Y. & Ubukata M., *Leucobacter komagatae* strain ASN212, a previously uncultured actinobacterium, require Coproporphyrin III as its growth factor、The International Conference on Beneficial Microbes (ICOBM 2018)、2018年

Takai R., Bhuiyan M. I. N., Shigetomi K. Kamagata, Y. & Ubukata M., Analysis of mechanism of Zinc coproporphyrins, novel growth factors for previously uncultured *Leucobacter* sp. ASN212 strain、2017年度農芸化学会京都大会、2017年

Takai R., Bhuiyan M. I. N., Shigetomi K. Kamagata, Y. & Ubukata M., *Leucobacter* 属 ASN212 株に対する coporphyrin 金属錯体の増殖活性評価、2016年度農芸化学会北海道支部会、2016年

Takai R., Bhuiyan M. I. N., Shigetomi K. Kamagata, Y. & Ubukata M., *Leucobacter* 属 ASN212 株に対する coporphyrin 金属錯体の増殖活性評価、2016年度農芸化学会北海道大会、2016年

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
該当なし

6．研究組織
研究代表者のみで該当なし。

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。