

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20903

研究課題名(和文)放線菌様形態を示す未知の系統「クテドノバクテリア」叢の解析及び生理活性物質の探索

研究課題名(英文) Analyzing of microbiome of a poor understanding group 'Ktedonobacteria' with Actinomycetes-Like Morphology and exploration of new bioactive compounds from the group.

研究代表者

矢部 修平 (Yabe, Shuhei)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60564838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：「クテドノバクテリア」が放線菌に次ぐ新たな有用菌群となり得るとした新しい視点に基づき、本系統の開拓に取り組んだ。その結果、クテドノバクテリアは身近な土壌環境に存在比が低いながらも多様に棲息していることが分かり、見出した半選択培地を用いることで既報の3科に属する新たに多様な菌種の分離に成功した。さらにその培養物から抗MRSA活性を有する推定新規のアントラキノン系化合物を見出した。この菌群の開拓は従来法による化合物探索研究に新たな展開を生み出し、感染症拡大防止に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have research on Ktedonobacteria based on a point of view that they have the potential to become a new sustainable source from which new and improved drugs can be produced, as has historically been the case with actinomycetes. As results of this study, it was revealed that Ktedonobacteria lives diversely at low abundances in common environments. And we were succeeded in isolating several diverse ktedonobacterial strains from various environments using selective medium that we developed, and we are proposing them as two new genera and six novel species in the family Ktedonobacteria. Furthermore, unique anthraquinone compounds having anti-MRSA activity was found from culture liquid extracts of the ktedonobacterial strains.

The exploitation of this group can create new developments in the field of natural products exploration by the traditional methods and may contribute to the prevention of spread of infectious diseases.

研究分野：応用微生物学

キーワード：クテドノバクテリア 二次代謝産物

1. 研究開始当初の背景

微生物から発見された抗生物質の多くは放線菌が由来であり、これらが様々な感染症を克服してきた。しかし現在でも多剤耐性菌による感染症は日々拡大し続けており、新薬開発と耐性の獲得の競争が続いている。他方、不幸なことに半世紀以上放線菌を中心に探索研究が行われたため、従来法による新規抗生物質の発見頻度は著しく低下している。この窮状を打破するため、最近では抗生物質合成に関わる潜在遺伝子を活性化させる研究や、植物など土壌以外の環境由来の希少放線菌類から新しい生理活性物質を探索する研究などがなされており、さらなる新手法の開発や新しい創薬微生物資源の開拓が期待されている。

我々は新しい系統「クテドノバクテリア(綱)」が放線菌群とは系統が離れているが共通して放線菌様の形態を示し、多剤耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)含むグラム陽性菌に対して抗菌活性を示すなど「放線菌」様の有益な特徴を持つ菌群であることを見出した。我々は本菌群が放線菌に次ぐ魅力的な創薬微生物資源と成り得ると見込み、分離、系統分類、生態解析、化合物探索に取り組んできた。研究開始当初は、放線菌(綱)は2,410種提唱されているのに対してクテドノバクテリア綱は僅か5種の未開拓資源であり、ほとんど認知されていなかった。

2. 研究の目的

研究開始当初は、放線菌(綱)は2,410種提唱されているのに対してクテドノバクテリア綱は僅か5種の未開拓資源であり、ほとんど認知されていなかった。この知見の乏しいクテドノバクテリアが放線菌に匹敵する有益な微生物資源として利用されるためには、放線菌と同様に身近な環境に多様に棲息し、培養可能なこと、分離株の系統分類学的知見が集積され、それらが多様な生理活性を示すことが重要であるため、以下の4つの課題に取り組んだ。

- (1) 環境中のクテドノバクテリア叢解明
- (2) 選択的分離培養法の確立
- (3) 分離株の分類学的性質の解明と提唱
- (4) 分離株からの生理活性物質の探索

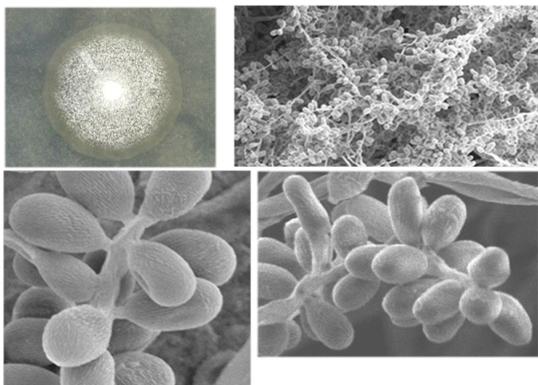


図1 クテドノバクテリアの形態

3. 研究の方法

(1) クテドノバクテリア(綱)の棲息環境を調べるため本綱に特異的プライマーを設計し、国内の身近な陸上環境(森林土壌、河川の砂、畑の土壌)及び既に我々によって好熱性クテドノバクテリア(*Thermogemmatipora* 属及び*Thermosporothrix* 属)の分離報告のある宮城県鬼首温泉地熱地帯の落葉とハザカプラントとよばれる発酵処理施設で製造されたコンポストから直接抽出したDNAを鋳型として、16S rRNA遺伝子をターゲットとした真正細菌共通のユニバーサルプライマー及びクテドノバクテリア綱特異的プライマーを用いたPCRアンプリコンをMiseqにより解読し、それらの微生物叢を解析した。

(2) 次に選択的培地を開発するため、本分類群と類似環境で増殖する栄養競合微生物を阻害し、本菌群を阻害しない阻害剤を検討し、半選択培地を開発した。

(3) ところで、昔、群馬県や長野県の標高1000m以上の火山帯に棲息し、「修験者が食べていた」「飢餓の時と食べた」とされる「天狗の麦飯」と呼ばれる微生物の塊がある。「天狗の麦飯」の微生物叢の研究は100年以上前から実施されており、6種の藻類と僅かな糸状菌が構成生物とされてきたが、最近京都大学の宮下教授によって分子生態解析が実施され、クテドノバクテリア(綱)が優占することが報告された。

そこで、開発した半選択培地を用いて群馬県湯の丸山に棲息する「天狗の麦飯」(図2)や宮城県の地熱地帯(図3)から多様なクテドノバクテリア株の分離を試みた。分離株は16S rRNA遺伝子配列に基く分子系統を解析し、新しい系統に属する菌種は培養生理学的、化学分類学的試験を実施した。



図2 採取した「天狗の麦飯」



図3 宮城県鬼首温泉地熱地帯

(4) 生理活性物質の探索は、保有するクテドノバクテリア株をイオン交換樹脂HP20を含む培地にて振とう培養を行い、菌体とHP20のアセトン抽出物を用いて各種被験菌に対

する抗菌活性をペーパーディスク法及び MIC 法にて測定した。活性画分は各種クロマトグラフィーにより精製し、NMR に供試した。

4. 研究成果

森林土壌や樹皮などの身近な環境に推定種数 (Chao1) 約 2500 - 5600 種、多様性指数 (Shannon) 4.2-6.4 と多様に棲息している事が明らかとなった。ユニバーサルプライマーを用いたアンプリコン解読によって本系統の存在比率を調べたところ、土壌や樹皮などで 0.01~0.1%程度と低く、地熱地帯は 13%と高い事が分かった。また森林土壌や樹皮、砂などで優占した OTU の系統はこれまで分離培養されたものが存在せず、高次分類群で新規の系統であることが示唆された。一方で地熱地帯から検出された OTU のほとんどは *Thermogemmatispora* 属に位置し、コンポストから検出されたものの多くは *Thermosporothrix* 属に属していることが分かり、各種環境中に特徴的なクテドノバクテリア叢が形成されていることが明らかとなった。

続いて、東京大学の塚原らによってインドネシアの水田土壌から分離された未分類の *Ktedonobacteriales* S27 株を寄託機関 NBRC から分譲頂き、筆者らが系統分類学的試験を実施した。その結果、最近縁種は *Ktedonobacter racemifer* であり、16S rRNA 遺伝子の相同性は 89.6%であった。また中温性、グラム陽性、分岐菌糸を形成し、その他のクテドノバクテリアと同様、セルロースなどの繊維質分解能を持ち、GC 含量は 55.7%、主要脂肪酸は C17:0 iso 及び C16:1 2OH、主要キノンは MK-9(H2)であった。また細胞壁ペプチドグリカンに β -アラニンが含まれた。これらの分類学的特徴から本菌種は *Ktedonobacteraceae* 科の新属・新種 *Dictyobacter aurantiacus* として命名し、提唱した。

次に選択培地として、クテドノバクテリア綱に属する細菌は共通して低栄養条件下でも生育し、ゲランガムを好み、微好気環境で旺盛に生育することに着目し、1/10 濃度の R2A ゲランガム培地に呼吸阻害剤であるアジ化ナトリウムを添加した培地を用いることとした。対照としてアジ化ナトリウムを含まない培地も並行して用いた。

まず、「天狗の麦飯」から上記培地を用いて分離を試みた結果、アジ化ナトリウムを含まない培地では培養数日間で黒や灰色のカビや放線菌がプレートを覆ってしまいクテドノバクテリア様コロニーは全く出現しなかった。一方でアジ化ナトリウムを含む培地ではそれらの競合微生物の生育は抑制され、橙色で独特の香りがあるクテドノバクテリア様コロニーが数多く出現した。任意にそれら 16 株を単離して 16S rRNA 遺伝子配列を解読し、分子系統解析を行ったところ、すべて *Ktedonobacteria* 綱に属していることが判明した。この結果はアジ化ナトリウムを分離

培地に含ませることで本菌群を半選択的に分離できることを強く示唆している。

「天狗の麦飯」から分離したクテドノバクテリア 16 株の分子系統解析の結果、*Ktedonobacteriales* 目のクラスター内に 4 つのクレードを形成した。各クレードから任意に選抜した Uno3, Uno11, Uno16, Uno17 株は最近縁の S-27 株との相同性が 91.3, 96.4, 95.5, 95.0%であり、新しい系統であることが推察されたため、系統分類学的試験を実施した。これら 4 株はグラム陽性、分岐菌糸を形成し 11~37 と比較的低温でも生育し、GC 含量は 50.7~53.3%であった。Uno3 株はその他 3 株とは化学分類学的性質が異なった。Uno3 の主要キノンは MK9 (H₀)であるが、その他は MK9 (H₂)であった。また主要脂肪酸は iso-C_{16:0} であるが、その他は C_{16:1}-2OH であった。その他の詳細な解析から Uno3 株は *Ktedonobacteraceae* 科の新属・新種として、Uno11, 16, 17 株は *Dictyobacter* 属の新種として提唱準備中である。

また「天狗の麦飯」から分離した Uno11 株を長期間培養すると図 4 のような橙色のコロニー形状を示す。これは一部の「天狗の麦飯」自体と色や質感が類似しており、本菌群は優占菌であると同時に「天狗の麦飯」の構造体の主体である可能性も示唆された。従って、絶滅の危機とされ、一部天然記念物として指定されている「天狗の麦飯」の保全への貢献が期待できる。

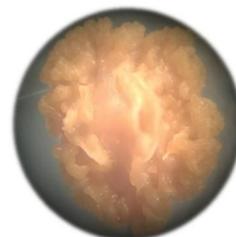


図 4 「天狗の麦飯」から分離した Uno11 株の実体顕微鏡写真

宮城県の鬼首温泉地熱地帯から新たに分離したクテドノバクテリア 2 株 (A1-2 株及び A3-2 株) を分子系統解析した結果、*Thermogemmatispora* 属に属し、既知種との相同性が 98%以上と高いが、DNA-DNA 相同性試験の結果、70%以下であったため種で区別すべきと考え、*Thermogemmatispora* 属から新たに 2 新種を提唱準備中である。

次に当研究室で保有するクテドノバクテリア株から各種被験菌に対する抗菌活性を指標に新規二次代謝物の探索を行った結果、MRSA に対して抗菌活性を有する複数の二次代謝物が見出され現在構造解析中である。

以上、筆者らはこれまでクテドノバクテリアが放線菌に匹敵する新たな探索源となり得るとした新しい視点に基づき、本系統の開拓に取り組んできた。本研究では、「クテドノバクテリア」は放線菌と同様身近な環境に

存在比が低いながらも多様に棲息していることが明かとなり、地熱地帯や「天狗の麦飯」から半選択培地を用いて新たに多様なクテドノバクテリア株の分離に成功し、2新属、6新種を提唱または提唱準備中である。さらに抗 MRSA 活性を有する新規と推定される二次代謝物を見出した。本系統のさらなる開拓は、従来法による化合物探索研究に新たな展開を生み出し、感染症拡大防止に貢献できる可能性がある。

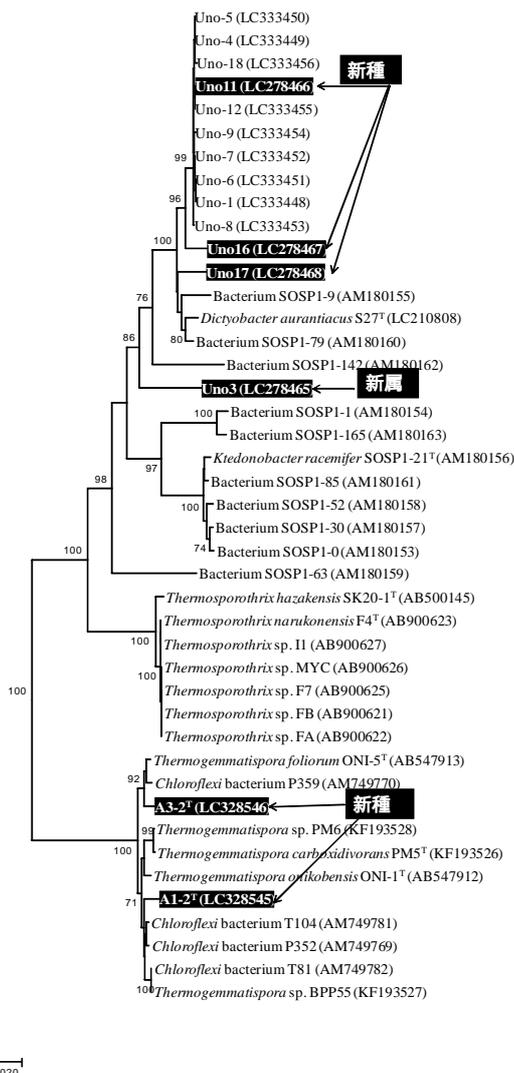


図 1. クテドノバクテリアの分子系統樹
黒ボックスは新しい系統として提唱準備中の菌種

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Dictyobacter aurantiacus gen. nov., sp. nov., a member of the family *Ktedonobacteraceae*, isolated from soil, and emended description of the genus *Thermosporothrix*.

Yabe, S., Sakai, Y., Abe, K., Yokota, A., Také, A., Matsumoto, A. and Sudiana, I. M. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67: 2615-2621, 2017 査読有

doi:10.1099/ijsem.0.001985

Diversity of *Ktedonobacteria* with Actinomycetes-Like Morphology in Terrestrial Environments.

Yabe, S., Sakai, Y., Abe, K. and Yokota, A. *Microbes and environments*, 32, 61-70, 2017

<https://doi.org/10.1264/jjsme2.ME16144>

〔学会発表〕(計 4 件)

鄭 宇、「クテドノバクテリア(綱)」のゲノム解析が明かにした新規二次代謝産物合成の潜在能力、日本農芸化学会 2018 年度年次大会、2018 年 3 月 17 日

矢部 修平、コンポストから分離された次世代放線菌「クテドノバクテリア」の魅力 2017 年度日本生物工学会北日本支部 札幌シンポジウム「生物プロセスによるモノづくり・資源循環を目指して」(招待講演)、2017 年 10 月 23 日

王 瓊漢、*Ktedonobacterales* 目の新しい系統に属する中温性細菌の分類 2017 年度 環境微生物系合同大会、2017 年 8 月 29、30 日

鄭 宇、好熱性クテドノバクテリア (*Thermogemmatissporaceae* 科) の分離と系統分類、2017 年度 環境微生物系合同大会、2017 年 8 月 29、30 日

6. 研究組織

1) 研究代表者

矢部 修平 (Y A B E, S h u h e i)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 6 0 5 6 4 8 3 8