

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05406

研究課題名(和文)「クテドノバクテリア」は放線菌に匹敵する新たな有用菌群となりうるか？

研究課題名(英文) Could "Ktedonobacteria" be a new group of useful bacteria comparable to actinomycetes?

研究代表者

矢部 修平 (Shuhei, Yabe)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、発酵工業にとって新たな有益生物資源と成り得る放線菌様の形態を示す分類群「クテドノバクテリア(綱)」に着目しているが、利用できる純粋培養株が少なく分類及び生理学的知見が乏しかった。本研究では、本系統の分離株を拡充し、ゲノム解析などから有益性を評価した。分離・分類学的研究により、本分類群に新たに2新科・3新属・11新種を創設した。そしてそれらのゲノム解析は、本分類群が新奇二次代謝物や木質系バイオマス利用における新しい酵素群の有益な生物資源であることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、多剤耐性菌による感染症が拡大する中、創薬資源「放線菌」からの新規抗生物質の創出は急減しており、新たな生物資源の開拓が急務である。クテドノバクテリアが放線菌に匹敵する新資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。本研究により本分類群が飛躍的に拡充され、ゲノム解析により有益資源としてのポテンシャルが示されたことは、我が国の発酵工業を活気づける要因と成り得る成果である。

研究成果の概要(英文)：We have focused on a taxon, Ktedonobacteria, that shows an actinomycete-like morphology that could be a new beneficial bioresource for the fermentation industry, but few pure culture strains were available, and little is known about their taxonomy and physiology. This study described two new families, three new genera, and 11 new species in this taxon. The genome analysis revealed that they represent a valuable resource of novel secondary metabolites and new enzymes for woody biomass utilization.

研究分野：微生物学

キーワード：クテドノバクテリア 放線菌 難培養微生物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、創薬資源である「放線菌」に由来する新規抗菌薬の発見頻度が急減するなか、次の世代の有用菌群と成り得る新奇系統「クテドノバクテリア(綱)」が発見された。この細菌は、2006年に Cavaletti らによって初めて純粋分離され、2010年まで1綱1種から成る希少系統であった[1]。その後、研究代表者は堆肥や火山地帯からクテドノバクテリアの分離に成功し綱内に新たな系統を創設し分類学的特徴を明らかとした[2](図1A)。その結果、この分類群は驚くことに、共通して放射状の菌糸に胞子を形成し、強い抗菌活性を示すなど第二の放線菌とも言うべき特徴を有することが明らかとなった[2](図1B)。しかしながら本研究開始当時は、クテドノバクテリア綱は僅か7種から成り、放線菌の基準株(2918種)と比較すると圧倒的に少なく依然として希少系統であった。他方、本菌群の棲息環境を分子生態解析により調べた結果、森林土壌などの身近な環境に推定種数約3000-4000種(Chao1)と多様に棲息している事が明らかとなったことから、クテドノバクテリアは多様な未培養菌群を含む巨大な分類群であることが推測された。そこで、研究代表者はクテドノバクテリアが発酵工業において放線菌に匹敵する有益な生物資源になり得るのではないかとその着想に至った。

### 2. 研究の目的

研究代表者は、これまでに国内の国内の火山地帯から多種のクテドノバクテリア(綱)に属する細菌を純粋分離し、保存してきた。また、本綱の創設者であり学名の起源であるイタリアの製薬会社クテドジェンの Dr. Donadio と Dr. Cavaletti らの協力を得て、そのグループが保有する種未記載のクテドノバクテリア菌株(SOSPシリーズ)を分譲頂いた。本研究は、分譲頂いた菌株も含めて保有する未分類株の分類学的特徴の解明と種記載を実施し、本綱の分類体系を構築することを目指すものである。

同時に、本系統の培養抽出物からの抗菌物質の探索する培養学的アプローチとゲノムからの二次代謝物遺伝子群やバイオマス利用に資する酵素群を探索する *in silico* アプローチにより新しい有用微生物資源としてのポテンシャルを検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 分類学的研究

宮城県蔵王山の山頂付近から分離した W12 株、同県鬼首地熱地帯から分離した A1-3 及び A3-2 株、群馬県の火山地帯に棲息する微生物塊「天狗の麦飯」から分離した Uno3、Uno11、Uno16、Uno17 株、及び Cavaletti らから分譲頂いた SOSP シリーズを分類学的試験に供試した。なお、SOSP シリーズの内訳は、ホンジュラスのアリの巣の土壌から分離された SOSP1-1、SOSP1-9 株、黒アカシアの土壌から分離された SOSP1-30、SOSP1-85、スペインの松土壌から分離された SOSP1-52、及びフランスの土壌から分離された 150040 株である。

分類学的試験は 16SrRNA 遺伝子配列及びゲノム配列に基づく分子系統解析、培養生理学的試験、化学分類学的試験及び電子顕微鏡を用いた形態観察を行い、それらの分類学的位置を確定した。

#### (2) 抗菌物質の探索

保有するクテドノバクテリア菌株をポリマーである HP20 を添加した様々な培地で液体培養後、ポリマー吸着物をアセトン等の溶媒で抽出し、培養抽出物として各種生理活性試験に供試した。各種被験菌に対する抗菌活性は当研究室で実施し、抗腫瘍活性やその他の生理活性試験は外部研究機関に依頼した。活性が認められた培養抽出物を各種クロマトグラフィーにより活性物質を精製し、HR-MS や NMR により構造を決定した。

#### (3) ゲノムに基づく有用性評価

クテドノバクテリア菌株のゲノム配列を PacBio と Illumina により解読し、antiSMASH を用いて二次代謝産物合成遺伝子群を、dbCAN により糖質関連酵素群(CAZyme)を *in silico* 解析し、発酵工業における有用性を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 新しい系統の創設と分類学的特徴

分類学的試験の結果、蔵王山から分離された W12 株は、クテドノバクテリア綱の *Dictyobacter* 属に属する新種であることが明らかとなり、新種 *Dictyobacter vulcani* を記載した[3]。鬼首地熱地帯から分離された A1-3 株及び A3-2 株は各々 *Thermogemmatisspora* 属の新種であることが分かり、新種 *Thermogemmatisspora aurantia* と *Thermogemmatisspora argillosa* として提唱した[4]。「天狗の麦飯」から分離した Uno-3 株はクテドノバクテリア目の新科に属することが判明し、

新科 *Dictyobacteraceae* 科の新属・新種 *Tengunoibacter tsumagoiensis* として記載した[5]。同分離源の Uno11、Uno16 及び Uno17 株は *Dictyobacter* 属の新種に属すると判明し、*Dictyobacter kobayashii*、*Dictyobacter alpinus* 及び *Dictyobacter arantiisoli* と命名し提唱した[5]。そして、ホンジュラスのアリの巣の土壌から分離された SOSP1-1 と SOSP1-9 株は各々クテドノバクテリア科の新属及び *Dictyobacter* 属の新種であることが分かり、各々、新属・新種 *Ktedonospora formicarum* 及び新種 *Dictyobacter formicarum* と命名し提唱した。黒アカシアの土壌から分離された SOSP1-30、SOSP1-85 とスペインの松土壌から分離された SOSP1-52 は *Ktedonobacter* 属の新種に属するが、分子系統解析によると同種であることが強く示唆された。そのため SOSP1-30 を基準株と定め、*Ktedonobacter robiniae* と命名して記載した。フランスの土壌から分離された 150040 株はクテドノバクテリア目の新科に属することが明らかとなり、新科 *Reticulibacteraceae* 科を創設し、新属・新種 *Reticulibacter mediterranei* を提唱した[6]。以上の通り、本研究によってクテドノバクテリア綱に新たに 2 新科・3 新属・11 新種が創設され、本系統を飛躍的に拡充させることに成功した。

本系統の化学分類学的性質は比較的類似しており原核生物としてユニークであった。細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸は、グルタミン酸、グリシン、オルニチン、アラニンから構成され、興味深いことにアラニンは D 及び L 型の他、共通して  $\gamma$ -アラニンが含まれていた。これは原核生物としてユニークな特徴であり、本系統の分類学的マーカーと成り得る。極性脂質は共通して phosphatidylinositol、phosphatidylglycerol と複数の糖脂質を有し、多くは diphosphatidylglycerol を有すること特徴であった。細胞膜脂肪酸組成としてクテドノバクテリア目は共通してヒドロキシ脂肪酸の比率が高く、*Thermogemmatissporales* 目は共通して、原核生物としては珍しく 12,17-dimethyloctadecanoic acid を有した。呼吸鎖は共通してメナキノン 9 であり、飽和型と不飽和型が混在した[6]。

注目すべきことに、既知種と同様に共通して放線菌様の放射状菌糸と孢子を形成するが、*Dictyobacteraceae* 科に属する系統の多くは孢子嚢を形成した(図 1B)。孢子嚢を形成する原核生物は放線菌と粘液細菌でのみ報告されており、本系統は 3 例目の発見である。現在までのデータによると本綱に属する細菌は例外無く放射状菌糸を形成する放線菌様形態を示す。放線菌群の中にはコリネバクテリアの様に菌糸を形成しない系統も存在することを考えると、この様な形態分化の起源はクテドノバクテリアである可能性が示唆された。形態分化の関連遺伝子が未同定であるため、分子進化学的な特定には至っていない。

## (2) 有用性の評価

クテドノバクテリア株の培養抽出液は、多剤耐性結核菌や多剤耐性黄色ブドウ球菌を含む多様な被験菌に対する抗菌活性や抗腫瘍活性を有することが明らかとなった。しかしながら、多くの活性画分から活性物質の精製を試みたが、生産物が微量または構造が複雑で多くは構造決定に至らなかった。一部、構造解析まで至った化合物は既知であった。

他方、ゲノム解析の結果、孢子嚢を形成する新種 *Dictyobacter formicarum* は PolyKetide Synthase (PKS)、NonRibosomal Peptide Synthetase (NRPS)、Lantipeptide などの二次代謝産物合成遺伝子群が 17 個と既知種である *Thermosporothrix* 属と同様に多く検出された。同様に、新属・新種 *Ktedonospora formicarum* は 15 個、新科・新属・新種 *Reticulibacter mediterranei* においては 18 個も有した。これらの遺伝子は分子系統的に既知のものとは区別され、新奇性が高いことが明らかとなった。これらの結果は、クテドノバクテリア目が共通して新奇二次代謝物の有益な探索源として高いポテンシャルを有することを示している[7]。

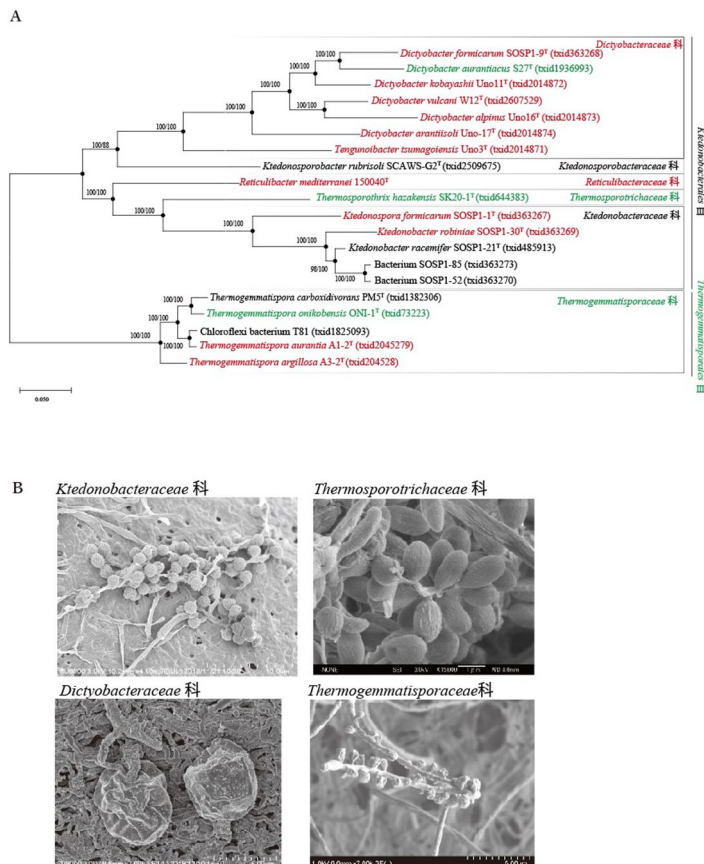


図1 クテドノバクテリアの系統樹と形態  
A コア遺伝子配列に基づく最尤法によるゲノム系統樹  
赤字は本研究により新しく創設した系統、緑字は研究代表者らが過去に創設した系統  
B 走査型電子顕微鏡写真

図1 クテドノバクテリアの系統樹と形態

糖質関連酵素群（CAZymes）をゲノムから探索したところ、本系統は特にセルラーゼやヘミセルラーゼを含む糖質加水分解酵素に属する遺伝子が63～139個と多数存在した。この結果は、本網が木質バイオマス利用の酵素の探索源として高いポテンシャルを有することを示している[8]。

- [1] L Cavaletti et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (2006)
- [2] S Yabe et al., *Int. J. Syst. Environ. Microbiol.*, 60 (2010)
- [3] Y Zhen, S Yabe et al., *Int. J. Syst. Environ. Microbiol.*, 70 (2020)
- [4] Y Zhen, S Yabe et al., *Int. J. Syst. Environ. Microbiol.*, 69 (2019)
- [5] C Wan, S Yabe et al., *Int. J. Syst. Environ. Microbiol.*, 69 (2019)
- [6] S Yabe et al., *Int. J. Syst. Environ. Microbiol.*, 71 (2021)
- [7] Y Zhen, S Yabe et al., *Front. Microbiol.*, 26 (2019)
- [8] Y Zhen, S Yabe et al., *J. Biosci. Bioeng.* 131 (2021)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yabe Shuhei, Zheng Yu, Wang Chiung-mei, Sakai Yasuteru, Abe Keietsu, Yokota Akira, Donadio Stefano, Cavaletti Linda, Monciardini Paolo	4. 巻 71
2. 論文標題 Reticulibacter mediterranei gen. nov., sp. nov., within the new family Reticulibacteraceae fam. nov., and Ktedonospora formicarum gen. nov., sp. nov., Ktedonobacter robiniae sp. nov., Dictyobacter formicarum sp. nov. and Dictyobacter arantiisoli sp. nov., belonging to the class Ktedonobacteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.004883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Zheng Yu, Maruoka Mayumi, Nanatani Kei, Hidaka Masafumi, Abe Naoki, Kaneko Jun, Sakai Yasuteru, Abe Keietsu, Yokota Akira, Yabe Shuhei	4. 巻 131
2. 論文標題 High cellulolytic potential of the Ktedonobacteria lineage revealed by genome-wide analysis of CAZymes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 622 ~ 630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.01.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Zheng Yu, Wang Chiung-Mei, Sakai Yasuteru, Abe Keietsu, Yokota Akira, Yabe Shuhei	4. 巻 69
2. 論文標題 Thermogemmatispora aurantia sp. nov. and Thermogemmatispora argillosa sp. nov., within the class Ktedonobacteria, and emended description of the genus Thermogemmatispora	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 1744 ~ 1750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.003388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zheng Yu, Saitou Ayana, Wang Chiung-Mei, Toyoda Atsushi, Minakuchi Yohei, Sekiguchi Yuji, Ueda Kenji, Takano Hideaki, Sakai Yasuteru, Abe Keietsu, Yokota Akira, Yabe Shuhei	4. 巻 10
2. 論文標題 Genome Features and Secondary Metabolites Biosynthetic Potential of the Class Ktedonobacteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.00893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yabe Shuhei, Wang Chiung-mei, Zheng Yu, Sakai Yasuteru, Abe Keietsu, Yokota Akira	4. 巻 65
2. 論文標題 Formation of sporangiospores in <i>Dictyobacter aurantiacus</i> (class <i>Ktedonobacteria</i> in phylum <i>Chloroflexi</i> )	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 316 ~ 319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2019.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wang Chiung-mei, Zheng Yu, Sakai Yasuteru, Toyoda Atsushi, Minakuchi Yohei, Abe Keietsu, Yokota Akira, Yabe Shuhei	4. 巻 69
2. 論文標題 <i>Tengunoibacter tsumagoiensis</i> gen. nov., sp. nov., <i>Dictyobacter kobayashii</i> sp. nov., <i>Dictyobacter alpinus</i> sp. nov., and description of <i>Dictyobacteraceae</i> fam. nov. within the order <i>Ktedonobacterales</i> isolated from Tengu-no-mugimeshi, a soil-like granular mass of micro-organisms, and emended descriptions of the genera <i>Ktedonobacter</i> and <i>Dictyobacter</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 1910 ~ 1918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.003396	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zheng Yu, Wang Chiung-Mei, Sakai Yasuteru, Abe Keietsu, Yokota Akira, Yabe Shuhei	4. 巻 69
2. 論文標題 <i>Thermogemmatispora aurantia</i> sp. nov. and <i>Thermogemmatispora argillosa</i> sp. nov., within the class <i>Ktedonobacteria</i> , and emended description of the genus <i>Thermogemmatispora</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 1744 ~ 1750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.003388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 齋藤 彩菜、白石 太郎、葛山 智久、新谷 尚弘、工藤 雄大、山下 まり、阿部 敬悦、横田 明、矢部 修平
2. 発表標題 「天狗の麦飯」から分離されたクテドノバクテリア ( <i>Dictyobacter alpinus</i> Uno16) からの抗菌化合物の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鄭 宇、王 瓊漾、齋藤 彩菜、酒井 康輝、阿部 敬悦、横田 明、矢部 修平
2. 発表標題 「クテドノバクテリア（綱）」クテドノバクテリアDictyobacter aurantiacus S27株の形態分化とゲノム及び二次代謝の特徴
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zheng, Y., Saito, A., Wang C. M., Toyoda, A., Minakuchi, Y., Sakai, Y., Abe, K., Yokota, A. and Yabe, S.
2. 発表標題 Novel natural products biosynthetic potential of the class Ktedonobacteria
3. 学会等名 The 8th FEMS Conference ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢部修平
2. 発表標題 クテドノバクテリアの魅力～複雑な形態分化とゲノムに潜在する多様な機能～
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部70周年シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鄭 宇、王 瓊漾、酒井 康輝、阿部 敬悦、横田 明、矢部 修平
2. 発表標題 クロロフレクサス門に属する放線菌様細菌「クテドノバクテリア（綱）」のゲノムの特徴
3. 学会等名 日本微生物生態学会32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王 瓊漾、鄭 宇、酒井 康輝、宮下 英明、阿部 敬悦、横田 明、矢部 修平
2. 発表標題 蔵王山の土壌と「天狗の麦飯」から新しいクテドノバクテリアの分離および系統分類
3. 学会等名 日本微生物生態学会32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢部 修平、鄭 宇、王 瓊漾、酒井 康輝、阿部 敬悦、横田 明
2. 発表標題 放線菌様の孢子嚢を形成するクテドノバクテリア綱に属する新しい系統「Dictyobacteraceae科」の特徴
3. 学会等名 2018年度放線菌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuheii Yabe, Yu Zheng, Atsushi Toyoda, Yohei Minakuchi, Chang-Mei Wang, Yasuteru Sakai, Keietsu Abe, Akira Yokota
2. 発表標題 Identification of Secondary Metabolites Gene Clusters in the Class Ktedonobacteria with Actinomycetes-Like-Morphology
3. 学会等名 ASM microbe 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
イタリア	NAI CONS Srl	FIIRV		