

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19221

研究課題名（和文）メタゲノム情報からの難培養菌が要求する因子の特定と利用による培養可能化

研究課題名（英文）Cultivation of the uncultured symbiotic bacteria based on the metagenomic information

研究代表者

藤田 雅紀（Fujita, Masaki）

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：30505251

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：有用海洋天然物産生菌の分離培養技術開発のため、Mycale属海綿をモデルとして生産菌のメタゲノム解析と共生様式の解析を行った。その結果、有用物質生産菌の完全長環状ゲノム配列を決定した。単独培養可能な近縁種と比較し、ゲノムの縮小が確認されたが、基礎的な代謝能を維持している事が明らかになった。また、生産菌は胚の段階から共生する、親世代からの垂直伝播により獲得される事が確認された。さらに胚の段階で既に細胞外共生であるが、バクテリオサイト様の膜構造に包まれた状態で親世代から移行する事が示唆された。これらの知見は代謝制御および共生確立機構に基づき、有用細菌の分離培養の実現につながると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海綿からVerrucomicrobium門に属する有用物質生産共生菌の詳細なゲノムおよび共生確立機構について初めて明らかにすることができた。ゲノム情報から代謝能や発現タンパク質の解析が可能になり、また共生機構からは宿主中で選択的に獲得および維持される仕組みの解明が可能になる。これらの情報から今後の分離培養への具体的な取り組みが可能となった。今回解明した細菌群は共生細菌や環境細菌として普遍的に存在するが、ほとんど培養できていないグループであった。しかし、今回の知見から合理的な分離培養法の開発、そしてその機能の活用と、未利用遺伝資源の開拓に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a methodology for isolation and cultivation of the useful marine natural products producing bacteria, we conducted metagenomic and symbiotic condition analysis of the mycalolide producing bacterium using marine sponge genus Mycale as a model organisms. As a result, complete cyclic genome of mycalolide producer was determined. Although the genome size was shrunk compared to that of the related culturable species, the basic metabolic capacity was conserved. It was also confirmed that the producing bacterium is extracellular symbiont existing from the embryonic stage by vertical transmission from the previous generation. In addition, it was also observed that the bacterium was transferred from the parental generation through a bacteriocyte-like structure. These findings are expected to lead to development of isolation and cultivation techniques of valuable bacteria based on the metabolic control and symbiosis mechanisms.

研究分野：海洋天然物化学

キーワード：海洋天然物 生合成 共生細菌 垂直伝播 マクロライド 海綿

1. 研究開始当初の背景

海洋無脊椎動物からは数多くの有用生理活性物質が得られているが、大半は微量成分であり有効利用には至っていない。また、その多くは共生微生物が生産すると考えられているが、海洋無脊椎動物からの目的物質生産菌の分離培養例はこれまでに報告がない。難培養の目的物質生産菌を合理的に培養可能化する技術の開発は、99%以上が未培養である微生物の活用という点で大きな進展となる。また、成功すれば有用物質の生産のみならず、未分離未解析の環境微生物や病原微生物の機能や生態の解析およびその利用や対策の検討にもつながるものである。

有用物質生産共生細菌の分離培養技術の開発を目標に、ブルーフォブコンセプトとして細胞毒性物質であるマイコライド類の生産菌を *Mycale* 属海綿から探索する事とした。研究開始時点において、*Mycale* 属海綿の共生細菌メタゲノム解析によりその生合成遺伝子を含むコンティグを得ていた。また、その情報から生産菌は *Verrucomicrobium* 門細菌に属する新規性の高い細菌である事が明らかになっていたが、詳細な代謝情報や共生様式などは全く不明であった。

2. 研究の目的

目的共生細菌を分離培養するためには単独生育するために欠損している因子を特定し補う方法、人工的な環境で生育可能とするためのゲノム改変を行う方法、海綿の中での共生様式を明らかにしそれを模倣する方法などが考えられる。

上記目標を達成するために、目的物質生産菌ゲノムを含めた主要な共生菌の完全長ゲノムを決定する、単独培養可能な近縁種とゲノムを比較する事で欠損因子を明らかにする、目的菌の伝播および共生の様式を明らかにする事を目的とした (図1)。

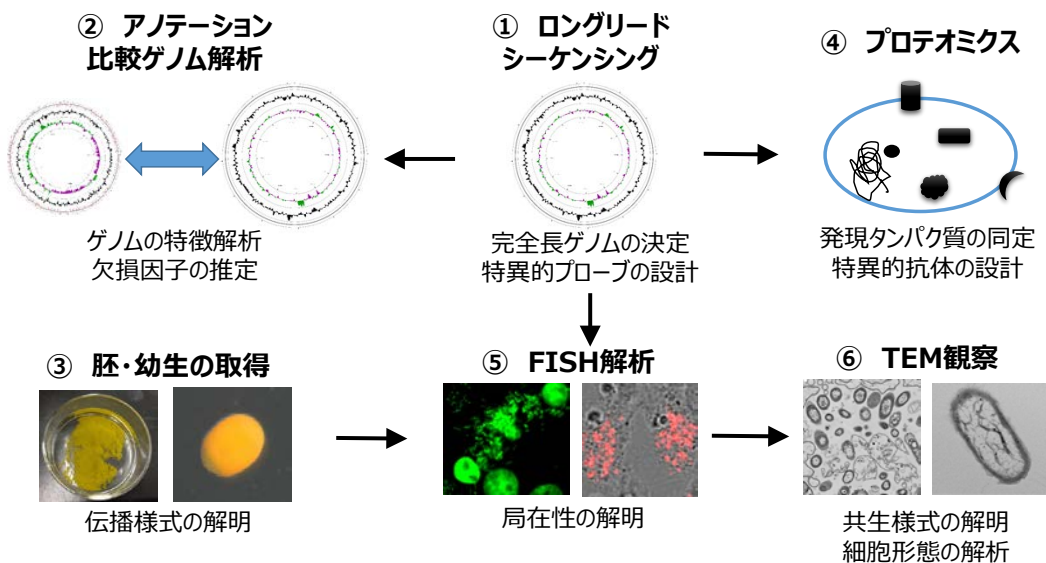


図1. 本研究計画の概要。完全長ゲノムを決定し共生様式の解明までを目指す。

3. 研究の方法

(1) ロングリード NGS 解析を行い、これまでに得ているショートリード配列とハイブリッドアセンブルする事で、マイコライド生産菌およびその他の主要な共生細菌の詳細なゲノム配列情報を取得する。また得られたゲノム配列情報から各種バイオインフォマティクスツールを用いてアノテーションし、培養可能な近縁種と比較ゲノム解析を行う (図1-①②)。

(2) *Mycale* 属海綿の胚および幼生の分離方法を確立し、それぞれのライフステージにおけるマイコライド類の有無および微生物叢の解析を行い、共生細菌の獲得様式が垂直伝播なのか水平伝播なのかを明らかにする (図1-③)。

(3) 共生細菌画分のメタプロテオミクス解析を行い、目的物質生産菌で発現しているタンパク質を明らかにし、今後の検出および分離のための抗体作成の情報とする (図1-④)。

(4) 決定したゲノム情報から特異的なハイブリダイゼーションプローブをデザインし、各ライフステージにおける目的細菌の共生様式を可視化する。それにより、目的細菌の局在や他の細菌との関係について明らかにする (図1-⑤)。

(5) 透過型電子顕微鏡による観察により、宿主組織中での共生様式の詳細を明らかにする。また、宿主細胞との関係について明らかにする (図1-⑥)。

#### 4. 研究成果

##### (1) マイコライド生産菌の完全長ゲノムの決定

MinION を用いて取得したロングリードデータ合計約 14 Gb を Flye でアセンブルした後に、Pilon を用いてショートリードデータによる修正を行った。さらに、ショートリードのマッピング結果をゲノムビューワで確認し、最終的に手動で補正する事でマイコライド生産菌の環状完全長ゲノム 2.53 Mb を得た。合わせて主要な共生細菌 4 株の完全長ゲノムを明らかにした。本細菌ゲノムを antiSMASH で解析したところ、マイコライド生合成以外の複数の大型 PKS-NRPS ハイブリッド生合成遺伝子クラスターが確認された。また、その一つは他の *Mycale* 属海綿から見いだされているマイカポリオール類の生合成遺伝子クラスターと推測された。これらの事から本共生菌が *Mycale* 属海綿の中で主要な二次代謝産物の生産菌であると考えられた。

##### (2) 培養可能近縁種との比較ゲノム解析

生産菌ゲノムを RAST でアノテーションを行ったところ、合計 2987 個の CDS が見いだされた。また、ゲノムが解読された細菌の中で最近縁のものは *Verrucomicrobium* 門に属する *Coraliomargarita akajimensis* であることが明らかになった。しかし、16S rRNA 配列の相同性は 87% であり、*Verrucomicrobium* 門に属するが新網の細菌であると推測された。

生産菌ゲノムは *C. akajimensis* のゲノムサイズ 3.75 Mb の 67% のサイズである一方、CDS 数は 97% であった。しかし、*C. akajimensis* では 4 個しか存在しない transposase や mobile element protein などの可動遺伝因子に関連するものが、マイコライド生産菌では 291 個存在していた。またアミノ酸配列長が 100 未満の CDS が *C. akajimensis* では 326 個であるのに対して、マイコライド生産菌では 844 個であった。これらの事から、マイコライド生産菌においては単独培養可能な近縁種と比較して、ゲノムサイズの縮小と遺伝子の欠損が進行している事が示唆された。

CDS を機能別にみると、細胞壁関連、細胞周期・細胞分裂関連遺伝子がそれぞれ 4 個および 0 個と近縁細菌群と比較して極端に少なく、単独培養できない理由の一つと推測された。一方、二次代謝関連、病原性関連遺伝子はそれぞれ 8 個および 20 個と近縁種と比較して多く、宿主内での役割を示唆するものであった (表 1)。

表 1. 培養可能 *Verrucomicrobium* 門細菌とのゲノム比較結果

	annotation result	Mycalolide Producer	<i>Coraliomargarita akajimensis</i>	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	<i>Methylacidiphilum infernum</i> V4
Genome Size		2.53 Mb	3.75 Mb	2.66 Mb	2.29 Mb
Total CDS		2987	3081	2323	2572
Subsystems		162	251	272	267
RNAs		51	50	59	49
CDS		60	101	170	146
	Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments	4	32	81	40
	Cell Wall and Capsule	20	15	31	44
	Virulence, Disease and Defense	1	13	3	10
	Potassium metabolism	0	0	0	0
	Photosynthesis	8	19	21	4
	Miscellaneous	2	1	2	0
	Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	20	30	23	21
	Membrane Transport	0	1	17	0
	Iron acquisition and metabolism	34	105	122	106
	RNA Metabolism	37	54	50	66
	Nucleosides and Nucleotides	59	153	184	147
	Protein Metabolism	0	24	11	29
	Cell Division and Cell Cycle	0	3	0	0
	Motility and Chemotaxis	2	10	9	6
	Regulation and Cell signaling	7	4	4	5
	Secondary Metabolism	33	50	92	39
	DNA Metabolism	18	49	61	55
	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	7	23	3	13
	Nitrogen Metabolism	1	3	1	1
	Dormancy and Sporulation	45	75	53	84
	Respiration	10	41	32	32
	Stress Response	1	4	1	1
	Metabolism of Aromatic Compounds	133	196	205	185
	Amino Acids and Derivatives	11	52	24	10
	Sulfur Metabolism	6	31	32	31
	Phosphorus Metabolism	44	169	129	162
Carbohydrates	147	4	0	14	
Transposase Related	124	0	0	0	
Mobile Elemental Protein	20	0	3	0	
Integrase Related					

##### (3) *Mycale* 属海綿の胚および幼生の取得と化合物および細菌叢の解析

*Mycale* 属海綿の幼生発生時期である初夏に胚発生が進んだ成体を採集し、実験室で維持する

ことで放出された幼生をただちに個別に採集する環境を構築した。また、合わせて成体からカルシウム-マグネシウムフリー緩衝液で処理することで胚を精製する方法を確立した。

それぞれについてマイコライド類の有無を HPLC により分析したところ、いずれのライフステージに置いても検出され、その類縁対比も成体と同様であることを明らかにした。また、16S rRNA アンプリコン解析の結果、全てのライフステージで生産菌の存在を確認し、その割合は20%程度と成体(13%)と比較し高いものであった。これらの結果は、生産菌は胚の段階で既に共生している垂直伝播であり、またその際に選択的に伝播することを示唆するものであった。

#### (4) *Mycale* 属海綿の共生細菌画分のメタプロテオミクス解析

*Mycale* 属海綿の共生細菌画分から総タンパク質を抽出し nanoLC-MS を用いたメタプロテオミクス解析を行い、上記で取得したゲノムデータを元にマイコライド生産菌で発現しているタンパク質を同定した。今回はマイコライド生産菌の割合が1%以下と極めて低く、同定できたタンパク質は45個にとどまった。その中でも複数のポリケタイド生合成酵素やグルタミン合成酵素等の生合成酵素が複数確認された。今後の抗体作成のための基礎情報として期待される。

#### (5) *Mycale* 属海綿の胚および幼生の FISH 解析

取得した胚および幼生を直後に固定し、パラフィン包埋切片を作成した。またゲノム情報からマイコライド生産菌の 16S rRNA 配列特異的な蛍光 DNA プローブを設計した。真正細菌の FISH 解析に汎用されるプローブ EUB388 配列と比較し、マイコライド生産菌は2塩基の変異が確認されたため、EUB388 をマイコライド生産菌型にした EUBV2 プローブも合わせて設計している。

まず、DAPI 染色を行ったところ、幼生および胚の中で共生細菌は直径 6-10  $\mu\text{M}$  程度の範囲に数十-数百細胞が密集する存在形態である事が明らかになった。その様な細菌が密集した領域が、胚あるいは幼生の内部に点在する様子が観察された。これは他の海綿で報告のある細菌を共生させるための細胞であるバクテリオサイトに類似した形状と考えられた。また、EUB388 およびマイコライド生産菌特異的プローブで染色を行ったところ、マイコライド生産菌もその細菌が密集する領域に存在する事が明らかとなった(図2A)。しかし、全ての細胞がマイコライド生産菌では無く、数十%程度と細菌叢解析の結果をほぼ同等の割合と考えられた。

#### (6) *Mycale* 属海綿の胚および幼生の透過型電子顕微鏡観察

FISH 解析の結果、マイコライド生産菌を含む共生細菌類はバクテリオサイトに局在する事が示唆されたため、その共生様式を明らかにするために、透過型電子顕微鏡による観察を行った。その結果 FISH での観察結果と同様に胚および幼生内で複数の細菌種が密集した領域が確認された。また、胚においては宿主細胞の密度も低く、孤立した状態で存在していた。胚では細菌密集領域を囲む様に膜構造状のものが確認できるが、断片化しており既に分離膜としての機能は持たないと判断できる(図2B)。この様な観察結果から、共生細菌は親世代においてバクテリオサイト様の特殊な共生のための器官にいったん取り込まれ、それが胚発生の途中で胚に侵入し、胚の中で細胞膜が破綻する事で細胞外共生が成立する機構が推測された。また、細菌密集領域には生存細菌がいる一方、死細菌様の形態も多く観察された。この事から、バクテリオサイト様の細胞はランダムに細菌を取り込んだのちに、殺菌作用を示しマイコライド共生菌などの一部の耐性を持つ菌が生残り選択的に次世代に受け継がれる仕組みが推測された。この仮説は細菌叢解析の結果とも一致するものである。

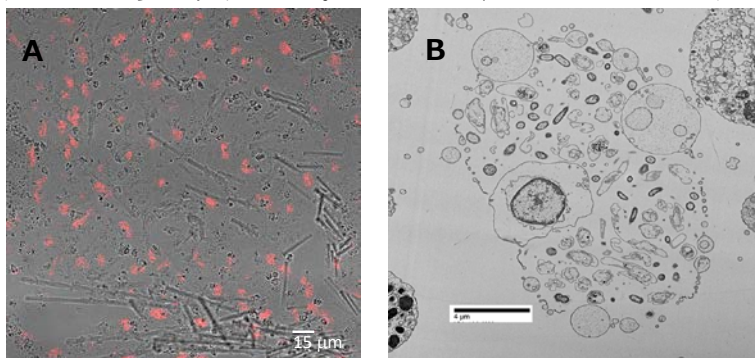


図2. 幼生のマイコライド生産菌特異的プローブによる FISH 画像(A)。胚の細菌密集領域の透過型電子顕微鏡画像(B)。

<参考文献>

① Some like it fat: Comparative Ultrastructure of the embryo in two Demosponges of the genus *Mycale* (order Poecilosclerida) from Antarctica and the Caribbean Ana Riesgo, Sergio Taboada, Laura Sanchez-

Vila, Joan Sola, Andrea Bertran, Conxita Avila *PLoS ONE* **2015**, 10 (3): e0118805.  
doi:10.1371/journal.pone.0118805.

② Complete genome sequence of *Coralimargarita akajimensis* type strain (04OKA010-24<sup>T</sup>)  
Konstantinos Mavromatis et al. *Stand. Genomic. Sci.* **2020**, 2, (3), 290-299.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Masaki J. Fujita, Yusuke Goto and Ryuichi Sakai	4. 巻 16
2. 論文標題 Cloning of the Bisucaberin B Biosynthetic Gene Cluster from the Marine Bacterium <i>Tenacibaculum mesophilum</i> , and Heterologous Production of Bisucaberin B	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mar. Drugs	6. 最初と最後の頁 342-353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/md16090342	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 Saki Umetsu, Mamoru Kanda, Ichiro Imai, Ryuichi Sakai and Masaki J. Fujita	4. 巻 24
2. 論文標題 Questiomycins, Algicidal Compounds Produced by the Marine Bacterium <i>Alteromonas</i> sp. D and their Production Cue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4522-4532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules24244522	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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤田雅紀
2. 発表標題 メタゲノム・メタプロテオーム・メタボローム情報を利用した未培養共生細菌の培養可能化法の確立
3. 学会等名 北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田雅紀
2. 発表標題 Mycale Sponge Inherits Mycalolide Producers Through
3. 学会等名 第4回 部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田雅紀
2. 発表標題 有用海綿共生菌の同定と培養可能化の検討
3. 学会等名 第6回北海道大学部局横断シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masaki Fujita
2. 発表標題 Identification of mycalolide biosynthetic genes and producing bacterium
3. 学会等名 Pacifichem2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 藤田雅紀 分担	4. 発行年 2018年
2. 出版社 KAIBUNDO	5. 総ページ数 11
3. 書名 海をまるごとサイエンス	

1. 著者名 藤田雅紀 分担	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本生物工学会	5. 総ページ数 1
3. 書名 日本生物工学会誌	

〔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
研究協力者	五十嵐 健輔  (Igarashi Kensuke)		
研究協力者	高田 健太郎  (Takada Kentaro)		
研究協力者	木村 信忠  (Kimura Nobutada)  (30344162)	産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員   (82626)	

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