

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05735

研究課題名(和文) 微生物共生の真の姿～異属細菌間相互作用により誘導される細胞表面構造の変化の解析

研究課題名(英文) Characterization of the changes of cell surface structure induced by the microbial interspecies interactions.

研究代表者

浦井 誠 (Urai, Makoto)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：20398853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自然界において微生物は複数種で共存しているが、異種微生物間相互作用の分子機構は未だ不明な点が多い。これまでに、共培養することにより病原性菌などのコロニー形態を変化させる異属細菌の組み合わせを複数組分離している。コロニー形態は細胞表面構造に起因し、薬剤耐性や病原性などに関わる重要な表現型であるが、異種細菌の共存による変化を示した研究例は少なく、新しい分子機構が存在する可能性がある。そこで、コロニー形態変化を誘導するシグナル分子の解析、コロニー形態変化の原因となる細胞表面の分子構造の解析をおこない、さらに、変化した細胞表面構造により生じる接着能などの機能性の変化や、その生物活性について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コロニー形態は微生物細胞表面の構造に起因し、環境ストレスや薬剤への耐性、病原性、バイオフィーム形成能などに関わる重要な表現型である。しかし、異種細菌間相互作用によるコロニー形態変化に着目した研究例はほとんどないことから、新しい分子機構が存在する可能性がある。また、誘導されたコロニー形態変化の原因となる細胞表面の分子についても、新規構造の物質である可能性が高く、その機能性や生物活性に興味もたれる。本研究により、自然界で本来起こっている異種細菌間相互作用の一端を理解することができると同時に、実際の臨床現場における病原性菌の薬剤耐性や、接着、バイオフィーム形成などの制御に応用できると考える。

研究成果の概要(英文)：We isolated microbes that exhibits diverse changes of the colony morphology induced by the microbial interspecies interactions. In this study, we characterized the chemical structures and the biological functions of metabolites produced by co-cultures of the isolates to understand interspecies interactions. Draft genome sequence analysis and proteome analysis of the isolates were also performed. Furthermore, we found that new interspecies interactions between the isolates and opportunistic pathogens.

研究分野：生物分子化学

キーワード：異属微生物間相互作用 コロニー形態変化 細胞表面構造 構造解析 分子機構解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、微生物がシグナル分子を用いてコミュニケーションをとることが注目されている。特に、クオラムセンシングのように同種(または近縁種)間の相互作用に関する研究は精力的に行われている。一方、自然界においては微生物が単一種ではなく、複数種で共存しており、近傍の他種微生物が分泌する様々な分子を感知して、競合、または、共生に適した表現型に適宜変化していると予想されるが、その現象を捉えた研究報告は少なく、未だ詳細な分子機構は明らかでない。われわれはこれまで、微生物細胞表層の構造や機能に関する研究を行っており、病原性菌などのコロニー形態を変化させる異属細菌の組み合わせを、ヒト表皮などから複数組分離しており、予備的な実験から、新規の分子機構の存在が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、異属細菌に対してコロニー形態変化を誘導する分子機構の解明を目的として、以下の検討をおこなう。(1) 異属細菌に対してコロニー形態変化を誘導するシグナル分子を明らかにし、(2) コロニー形態変化の原因となる細胞表層の分子を明らかにする。さらに、(3) 変化した細胞表層構造により生じる機能性および生物活性について検討する。これらを検証することにより、自然界で本来起きている異属微生物間のコミュニケーションについて理解を深めると同時に、有害微生物の制御技術の開発にも貢献できると考える。

3. 研究の方法

(1) 異属細菌に対してコロニー形態変化を誘導するシグナル分子の解析

コロニー形態変化を誘導する細菌の代謝産物を分画、精製し、構造解析を試みた。各相互作用の菌種組合せ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、各種カラムクロマトグラフィーを用いて分画、精製し、ペーパーディスク法によるコロニー形態変化誘導活性を指標に精製を進めた。精製物について核磁気共鳴装置(NMR)や質量分析装置(MS)を用いた構造解析を試みた。

(2) コロニー形態変化の原因となる細胞表層構造の変化の解析

異属細菌間相互作用によるコロニー形態変化の原因物質についても、共培養物から抽出、精製し、構造解析を試みた。菌体外多糖についてはバイオフィー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、その構成成分を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により解析した。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、ガスクロマトグラフ質量分析計(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。また、低分子物質については、単独および共培養時のコロニーから有機溶媒抽出画分を得て、TLC および LCMS 分析により比較解析した。共培養時に顕著に生産量の変化した物質について各種カラムクロマトグラフィーを用いた精製と NMR などを用いた構造解析をおこなった。

(3) 変化した細胞表層構造により生じる機能性および生物活性の解析

異属細菌間相互作用によりコロニー形態変化を引き起こす分離株の組み合わせを用いて、単独および共培養時のコロニーから得られた各種菌体について、物質表面への接着能や細胞表面疎水性の変化を比較検討した。また、コロニー形態変化の原因物質については、相互作用の相手側の細菌、および、代表的な病原性菌などに対して添加し、抗菌活性やバイオフィーム形成阻害活性などの生物活性を検討した。さらに、異属細菌間相互作用によりコロニー形態変化を引き起こす分離株の組み合わせについて、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。また、コロニー形態変化に関わるタンパク質群を同定するため、単独および共培養時のコロニー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。

(4) 共培養によりコロニー形態変化を誘導する新たな微生物の組み合わせの探索

ヒト常在性菌や、土壤中、植物表面などのさまざまな環境中から新たな相互作用の組み合わせを示す微生物を探索した。

4. 研究成果

(1) 異属細菌に対してコロニー形態変化を誘導するシグナル分子の解析

我々がこれまでに様々な環境中から単離してきた、共培養することによりコロニー形態を変化させる異属細菌の組み合わせ複数組について、コロニー形態変化を誘導する細菌の代謝産物を分画、精製し、構造解析を試みた。その結果、相互作用の種類により種々の物性のシグナル分子が得られてきており、最終精製程度まで進められた活性物質については、非常に親水性の高い糖質であることが示唆されるデータを得た。現在、構造解析を進めている。

(2) コロニー形態変化の原因となる細胞表層構造の変化の解析

上記細菌との共培養により誘導されたコロニー形態変化の原因となる細胞表層分子の解析を

試みた。その結果、共培養によりこれまでに報告のない新規構造の多糖を分泌することが示唆された菌種や、脂質の生産が促進している菌種など、様々な菌種の存在が示唆された。現在、新規物質について構造解析を進めている。また、これら細胞表層分子について、新しい生物活性も見出だした。

(3) 変化した細胞表層構造により生じる機能性および生物活性の解析

共培養によりコロニー形態変化を誘導された細菌について、接着能や薬剤感受性の変化を検討した結果、単独培養時と比較して変化が認められた。また、共培養により新規構造の多糖を生産する細菌、および、これを誘導する細菌について、ゲノム DNA を抽出、精製し、次世代シーケンサーによるドラフトゲノム解析を行った。さらに、この異属細菌の組み合わせについて、高分解能 LC/MS/MS システムを用いたプロテオーム解析により、共培養時と単独培養時におけるタンパク質発現の比較も試みている。

(4) 共培養によりコロニー形態変化を誘導する新たな微生物の組み合わせの探索

これまでに単離してきた微生物種に加えて、土壤中、植物表面などのさまざまな環境中から微生物を単離し、ヒト常在性菌や病原性菌も含めて、新たな相互作用を示す微生物種の組み合わせを探索した。その結果、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だした。現在、これらについても相互作用を介在する分子の解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aizawa T, Urai M.	4. 巻 498
2. 論文標題 Structural analysis of an aluminum-binding capsular polysaccharide produced by <i>Acidoceella aluminii</i> strain AL46, an aluminum-tolerant bacterium isolated from plant roots in a highly acidic swamp in actual acid sulfate soil.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 108163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浦井 誠
2. 発表標題 カンジダ属真菌の細胞表層多糖の解析
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山 雄太郎, 渡邊 潤一郎, 浦井 誠
2. 発表標題 <i>Bacillus</i> sp. NB4株との共培養により分泌が誘導される <i>Paenibacillus</i> sp. NB2株の菌体外多糖の解析
3. 学会等名 第35回日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 潤一郎, 丸山 雄太郎, 浦井 誠
2. 発表標題 <i>Paenibacillus</i> sp. NB2株の菌体外多糖分泌を誘導する <i>Bacillus</i> sp. NB4株の代謝産物の解析
3. 学会等名 第35回日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 保田 貴成, 相澤 朋子, 浦井 誠
2. 発表標題 酸耐性アルミニウム耐性菌Acidoceella aluminiiidurans AI46株のアルミニウム耐性機構の解析
3. 学会等名 第35回日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 多糖、多糖の生産方法、細菌およびその利用	発明者 浦井 誠	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-152182	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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 分 担 者	相澤 朋子 (Aizawa Tomoko) (60398849)	日本大学・生物資源科学部・講師 (32665)	

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
---------	---------