

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06088

研究課題名(和文)新規Armatimonadetes門細菌の機能・生態の解明に関する研究

研究課題名(英文)Studies on the function and ecology of a novel Armatimonadetes bacterium

研究代表者

殿内 暁夫(TONOUCHI, AKIO)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：50302021

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)：難培養性で4種しか記載されていないArmatimonadetes門細菌のCapsulimonas corticalis AX-7を用いて、その解析からC. corticalis 機能と生態の予測を試みた。その結果、C. corticalis は生息の場としてスギ樹皮を好みヤマナラシ樹皮を忌避することが、メタゲノム解析と培養解析で示された。乾燥に高い耐性能を有しており、乾燥しやすい樹皮環境に適応していることが示唆された。C. corticalisの生産する高分子多糖はグルコース・ガラクトース・マンノース・キシロースを構成糖とする中性糖であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Armatimonadetes門細菌は12のサブグループで構成される系統的に多様な門であり、様々な環境に見出される細菌グループであるが、わずか4種しか分離・記載されておらず、その生態や機能は不明である。本研究では、本門のCapsulimonas corticalis AX-7を用いて、その生態解明を非培養法(メタゲノム解析)と培養法の両面から明らかにすることを試み、当該種は中性多糖生産性で乾燥耐性を有し、生息の場としてスギ樹皮を好みヤマナラシ樹皮を忌避することを明らかにした。これは本門細菌に関しての生態解明に関しては初めての例である。また、本研究を通じて多糖の利用研究に発展させることができた。

研究成果の概要(英文)：The phylum of Armatimonadetes bacteria, which is difficult to culture, and only four species have been described; thus, their ecologies and functions have been unclear. Therefore, from its analysis, we attempted to predict the function and ecology of C. corticalis, one of the described species belonging to the phylum Armatimonadetes. Metagenomic and culture analyses revealed that C. corticalis prefers cedar bark as a habitat and rejects porcupine bark. In addition, C. corticalis had a high tolerance to desiccation, suggesting that they are adapted to a desiccating bark environment. The high molecular weight polysaccharide produced by C. corticalis was neutral, consisting of glucose, galactose, mannose, and xylose.

研究分野：環境微生物

キーワード：難培養性細菌

1. 研究開始当初の背景

Armatimonadetes 門 (2021 年に *Armatimonadota* 門に改められた) は 12 のサブグループで構成される系統的に多様な門であるが、現在までに分離・培養されているのは本研究の対象とする *Capsulimonas corticalis* を含めて僅か 4 種で、それら以外の全て (600 以上) が環境から回収された未培養株の SSU rRNA 遺伝子配列に基づく系統型である。そのため、土壌・温泉・根圏・動物の腸管など様々な環境に生息し、各環境における細菌群集構造の数%程度を占めることが示唆されているものの、分離菌株の少なさから本門細菌の生態・機能については未解明である。

2. 研究の目的

本門のグループ 2 (*Armatimonadia* 目) に所属する唯一の種であり、白神山地のブナ樹皮表面から分離した *Capsulimonas corticalis* AX-7 株を用い、*Capsulimonas corticalis* 種細菌の詳細な特徴 (生育・生理・生化学・代謝能・環境適応) とゲノム情報、および生息環境の細菌叢解析による *C. corticalis* およびその類縁種の動態情報を組合せて *C. corticalis* の機能と生態を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1). 細菌叢解析

ブナ・ミズナラ・ホオノキ・ヤマナラシ・ウダイカンバ・オオヤマザクラ・カラマツ・スギを対象とし、それらの樹皮・葉・根圏土壌・周辺土壌の細菌叢解析 (網羅的な SSU rRNA 遺伝子配列解析) を行い、*C. corticalis* の細菌叢における存在比と動態を明らかにする。

(2). 生育特性解析

無機塩培地をベースにした AX-7 株培養の最小培地の設計を行った上で生育特性解析を進める。*C. corticalis* AX-7 株の炭素源および窒素源の異化・同化に関する諸性質、生育促進物質や生育に必須な物質、生育に及ぼす環境要因 (pH、温度、酸素濃度)、栄養素濃度の影響、代謝産物などを解析することにより、生息環境であるブナなどの樹皮における生態を代謝的・生理的・生化学な面から解明する。

(3). 環境適応解析

C. corticalis AX-7 株の乾燥耐性、UV 耐性、固体表面への附着能、酸化ストレスや飢餓に対する応答を解析する。また、以上の解析を通じて比較的低栄養環境で日光の照射や乾燥などにより周囲からの影響を受けやすい環境であるブナなどの樹皮に AX-7 株がどのように適応しているのかを解明する。

(4). 全ゲノム配列解析

C. corticalis AX-7 株の全ゲノム配列を PacBio 次世代シーケンスで決定、KEGG データベース (<http://www.genome.jp/kegg/>) などを用いて遺伝子産物の機能、エネルギー代謝や同化代謝の経路、物質の取込や分泌のシステム・情報伝達システムを予測し、AX-7 株の機能推定を行う。

4. 研究成果

(1). 樹皮細菌群集構造における *Armatimonadetes* 門細菌の *C. corticalis* AX-7 株の位置づけ

Armatimonadetes 門細菌は樹皮表面細菌群集の 0.8~2.4% を構成していた。図 1 に示した細菌群集の構成は同一樹種では生息場所に関わらず類似している (個体間に大きな差がない) ことに加え、同一個体での群集構造は安定していた (図 1)。*C. corticalis* AX-7 と種レベルで一致する OTU は針葉樹で多く検出され、広葉樹で少ない傾向にあった。ヤマナラシ樹皮では *Capsulimonadales* 目の配列が極端に少ないことに加えて *C. corticalis* AX-7^T と種レベルで一致する OTU (*C. corticalis*) が検出されなかった。スギの樹皮表面では *Armatimonadetes* 門の中で *C. corticalis* が高い比率で検出されたことが特徴的であった (表 1)。

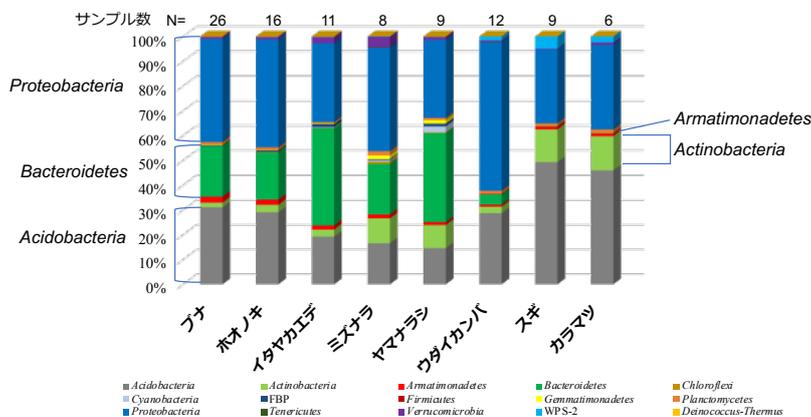


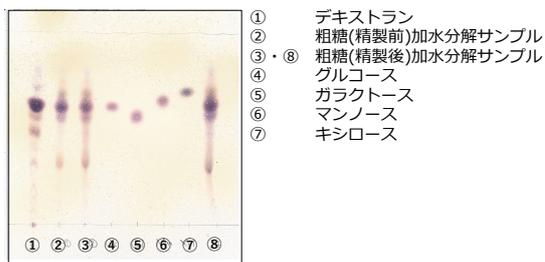
図 1. 樹皮細菌群集における *Armatimonadetes* の位置づけ

表 1. 樹皮細菌群集における *C. corticalis* の位置づけ

分類・項目	樹皮細菌群集の16S アンプリコン解析における <i>Armatimonadetes</i> 門に分類される OTU の平均リード数							
	フナ	ホオノキ	イタヤカエデ	ミズナラ	ヤマナラシ	ウダイカンバ	スギ	カラマツ
<i>Armatimonadetes</i> 門	1,584	1,191	1,304	1,103	1,107	262	311	378
<i>Armatimonadia</i> 綱	1,519	981	897	616	638	239	305	354
<i>Capsulimonadales</i> 目	1,307	905	580	413	18	220	303	350
<i>C. corticalis</i> AX-7 と種レベルで一致する配列	76	186	24	63	0	34	183	117
<i>C. corticalis</i> AX-7 と種レベルで一致する配列の <i>Armatimonadetes</i> 門における比率 (%)	4.8	15.6	1.8	5.7	0	13.0	58.8	31.0

(2). *C. corticalis* AX-7 の生育特性

C. corticalis AX-7 は好気性で中温・中性を好み、有機酸やアルコールなどの代謝産物は検出されなかった。種々の糖質に加えて酵母エキスで増殖したが、ペプトン・カザミノ酸では増殖しなかった。高栄養の Tryptic Soy Broth (TSB) では増殖せず、10 倍希釈した TSB では増殖した。一方で、肉エキス培地と 10 倍希釈した肉エキス培地では増殖せず、栄養条件が限定されることが示唆された。無機窒素源としてはアンモニウム態窒素は利用するが硝酸態窒素は利用しなかった。有機窒素源は酵母エキス、カザミノ酸、ペプトンを利用し、このうちカザミノ酸とペプトンでの生育が良好であったことから、アミノ酸またはペプチドを窒素源として好むことが示唆された。炭素源としてはグルコース・マルトース・ラクトースなどの単糖・二糖を好み、デンプン・セルロース・キシランなどの利用性は確認されなかった。また、樹皮に生息しているのにも関わらず、樹皮に検出されるキシリトールやソルビトールの利用性がないことが特徴的であった。*C. corticalis* AX-7 の特筆すべき性質は大量の多糖生産能である。本研究では多糖生産に関する特性解析も行った。*C. corticalis* AX-7 の生産する多糖はマンノースを基質とする培地で最も多く生産され、その構成糖はグルコース・ガラクトース・マンノース・キシロースであり(図 2)、エタノールを用いて調製した粗糖は同濃度のキサンタンガムやタマリンドシードガムよりも粘度が高いという特徴を示した(表 2)。粘度が高すぎてゲル濾過での分子量予測は不可能であった。



TLC分析条件

ゲル シリカゲル(濃縮なし)
 溶媒 水:1-ブタノール:2-プロパノール=4:3:12
 発色試薬 オルシノール硫酸
 アプライ量 サンプル・標準物質 各1 µl
 標準物質 0.2% Glc, Gal, Man, Xyl

図 2. *C. corticalis* AX-7 の生産する多糖の構成糖

表 2. *C. corticalis* AX-7 多糖と他の多糖との粘度比較

多糖類	粘度(cP)
<i>C. corticalis</i> AX-7 培養上清	2.8
<i>C. corticalis</i> AX-7 粗糖 0.01%	4.5
タマリンドシードガム0.01%	n.d.
タマリンドシードガム0.1%	1.5
プロテオグリカン 0.01%	1.5
グアーガム 0.01%	n.d.
グアーガム 0.1%	4
キサントタンガム 0.01%	1.8
キサントタンガム 0.1%	18

(3). *C. corticalis* AX-7 の環境適性

C. corticalis AX-7 は UV 耐性・固体への附着能を示さなかったが、乾燥に対しては非常に強く、乾燥条件に一月以上おいても生残した。この生残性には保水能力の高い多糖を大量に生産することとの関連性が考えられた。1の結果(表1)で *C. corticalis* はヤマナラシ樹皮では検出されないのに対してスギ樹皮の *Armatimonadetes* 門内での存在比率は 58.8%と高く、*C. corticalis* は生息環境としてヤマナラシ樹皮を忌避し、スギ樹皮を好むことが考えられたため、樹皮抽出物の *C. corticalis* AX-7 の増殖に対する影響を調べたところ、ヤマナラシ樹皮抽出物は *C. corticalis* AX-7 の増殖を阻害し、一方、スギ樹皮抽出物は *C. corticalis* AX-7 の増殖を促進した(図3)。以上のことから、*C. corticalis* は樹皮を生息の場とする場合に何らかの樹皮成分が関与しているが示唆された。

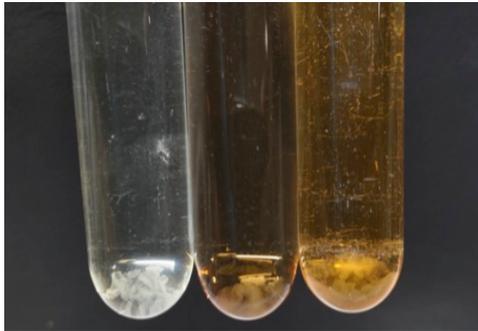


図 3. 樹皮抽出物の *C. corticalis* AX-7 の生育に対する影響
左: コントロール; 中: ヤマナラシ樹皮抽出物; 右: スギ樹皮抽出物

(4). *C. corticalis* AX-7 のゲノムの特徴

C. corticalis AX-7 の基本ゲノム情報を表3に示す。ゲノムサイズが約 7.65 Mbp と細菌としては比較的大きいこと以外には特筆すべきことは見出されず、期待された多糖合成系についても KEGG 解析ではゲノムから特定することは出来なかった(図4)。

表 3. *C. corticalis* AX-7 のゲノム基本情報

Total Length (bp)	7,645,051
No. of Sequences	1
GC Content (%)	60.30%
N50	7,645,051
Gap Ratio (%)	0.00%

Annotation data [View](#) | [Download](#)

Summary 2203 entries (33.7%) annotated

Functional category

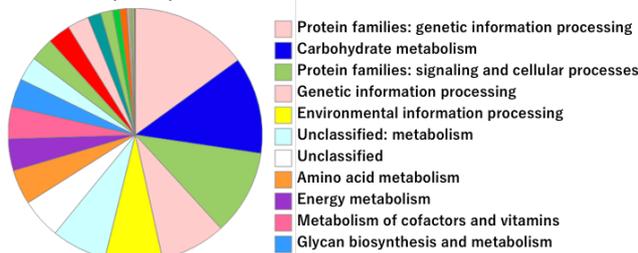


図 4. *C. corticalis* AX-7 ゲノムの KEGG 解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飛石ゆうき, 殿内暁夫
2. 発表標題 白神山地のイタヤカエデ樹皮表面から分離した新規Gemmatimonadetes 門細菌の系統分類学的研究
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 殿内暁夫, 飛石ゆうき, 李娟, 吉田孝
2. 発表標題 白神山地樹木表面におけるArmatimonadetes門 細菌について
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Capsulimonas corticalis AX-7の生産する高分子中性多糖は保湿能に優れていることが予想されたため、民間会社とMTAを結び、2023年度から多糖構造の解明と利用に関する研究を進めることが決まっている。</p>
--

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