

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15409

研究課題名（和文）未利用な海綿内共生微生物からの生物活性物質探索

研究課題名（英文）Search for bioactive compounds from unutilized microbes of marine sponge

研究代表者

町田 光史（Machida, Koshi）

早稲田大学・理工学術院・次席研究員（研究院講師）

研究者番号：30778163

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）：海綿内共生微生物は、医薬品の候補となるリード化合物の探索源として注目されてきた。しかし近年、培養される環境微生物は全体の1%程度であり、残りの99%以上は培養できておらず、環境微生物のほとんどが未利用な探索資源であることが明らかとなってきた。本研究では、海綿内に共生する難培養性微生物を特殊な培養デバイスを用いて培養し、そこから新規天然化合物を精製し、その化合物の構造や生物活性を明らかにすることを目的とする。活性化化合物を同定した場合は、その化学特性の測定、類縁体の探索を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然化合物の探索研究において、既知化合物にいきついてしまうことを回避するには、従来にない新しい生物活性を指標とするか、未開拓な生物資源から探索する戦略が有効と考えられる。本研究成果は、海綿からこれまで培養されてこなかった微生物を分離培養したことで、生物活性物質の新たな探索源開拓につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Symbiotic microorganisms in marine sponge have been attractive as a source of lead compounds for medical and pesticide candidates. Recently, it has become clear that only about 1% of all environmental microorganisms can be cultured, and more than 99% of the remaining microorganisms cannot be cultured, indicating that most environmental microorganisms are underutilized resources. The objective of this study is to cultivate difficult-to-culture microorganisms in sponges using special culture devices, purify novel natural compounds from them, and elucidate the structure and biological activity of the compounds.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：海綿 天然化合物 微生物

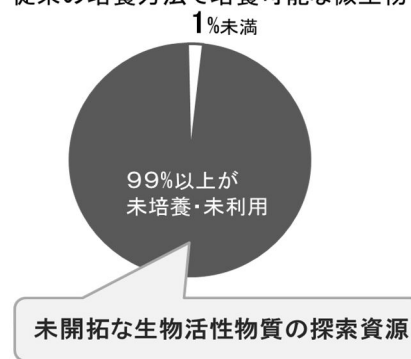
1. 研究開始当初の背景

天然化合物の探索研究において、既知化合物にいきついてしまうことを回避するには、従来にない新しい生物活性を指標とするか、未開拓な生物資源から探索する戦略が有効と考えられる。本研究では、後者の戦略に注目し、海綿内に共存する難培養性微生物を探索源とした生物活性物質の探索を行う。

基本的に、微生物の純粋培養には寒天平板培養や限界希釈培養といった古典的培養法が用いられるが、環境に生息する微生物の99%以上は“難培養性微生物”と言われている。そこで、従来の純粋培養法とは異なる、新しい概念を取り入れた培養方法によって、難培養性微生物を可培養化する試みが行われている。そのひとつに、微生物間相互作用の概念を取り入れた diffusion chamber (DC) 法が Epstein らのグループによって開発された。DC 法とは、メンブレンフィルターで微生物細胞を培養デバイス内部に閉じ込め、微生物間相互作用因子(生育因子や代謝産物など)のみがフィルターを通してデバイス内外を自由に行き来することのできるデバイス(diffusion chamber)を利用した培養方法であり、本デバイスを環境中に設置して培養することによって、従来法では培養の困難な新規微生物の分離に成功している(*Science*, 2002)。申請者も、これまでの研究においてこの DC 法を海綿内微生物に供することで、新規性の高い海綿内共存微生物群を獲得することに成功しており、また、それら微生物群が有する化合物群は、従来培養法で獲得した微生物群のそれとは大きく異なっていることを報告してきた(第 68 回日本生物工学会大会)。

しかし、これら新規性の高い海綿内共存微生物群に含まれる化合物の構造やその生物活性については、依然不明のままである。

従来の培養方法で培養可能な微生物



2. 研究の目的

本研究では、海綿内に教材する難培養生物から生物活性物質を単離・構造決定することを目的とした。これまで海綿に微生物間相互作用を維持した培養方法を適用して、新規性の高い微生物を分離培養した例はほとんどなかった。しかし、申請者の予備実験において、DC 法を用いた培養方法で海綿から新規性の高い微生物群を獲得していた。

3. 研究の方法

本研究の方法は、以下のステップである。

- 従来培養法では獲得困難な海綿内共生微生物を DC 法で獲得
- スクリーニングサンプルの調製とその生物活性評価試験
- 生物活性物質の単離と構造解析

従来培養法では獲得困難な海綿内共生微生物を DC 法で獲得

採集した海綿の一部を切り取り、ホモジナイズしたものを寒天とともにメンブレンフィルターでシリコン枠内に封入し、diffusion chamber を作成し、海綿に戻すことで1次培養した。この1次培養した微生物を寒天平板培養(2次培養)することで、微生物の分離培養を行った。

スクリーニングサンプルの調製とその生物活性評価試験

得られた微生物株の培養液を有機溶剤で抽出した培養抽出物をスクリーニングサンプルとする。調製したスクリーニングサンプルについて、ヒストン修飾レベル制御活性と細胞毒性について調べていく。培養細胞が入った96ウェルプレートの各ウェルに、スクリーニングサンプルを添加し、培養後、ヒストン分子各部位の修飾選択的なモノクローナル抗体で免疫染色を行う。抗体はそれぞれ異なる傾向色素で標識されており、同時に多重免疫染色が可能である。染色後各ウェルについて、各蛍光波長で写真を撮影し、解析ソフト(セルプロファイラー)を用いて、各ヒストン修飾レベルに対する促進・抑制作用を評価する。

生物活性物質の単離と構造解析

生物活性を指標にして、活性が認められた菌株の抽出エキスから生物活性物質を液液分配および各種クロマトグラフィーを用いて単離する。単離した活性化合物について、MS および各種 NMR スペクトルを解析することで、本化合物の構造を決定する。

4. 研究成果

従来法では培養不可能であった新規性の高い微生物群を獲得した。これら DC 法で獲得した微生物群の抽出物について、LC-MS を用いたメタボローム解析を行ったところ、DC 法で獲得した分離株はそれぞれ異なる化合物群を含んでおり、また、それら化合物群は従来の培養法で獲得した微生物群とは大きく異なる化合物群を有していることが明らかとなった。

しかしながら、研究室の火災により本研究は再度微生物株の再構築から行うこととなった。
1年延長の結果、海綿から微生物株を獲得することができた。

本研究では、これまで培養できなかった微生物を培養することで、天然化合物の新たな探索源となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Jung Dawoon, Machida Koshi, Nakao Yoichi, Kindaichi Tomonori, Ohashi Akiyoshi, Aoi Yoshiteru	4. 巻 12
2. 論文標題 Triggering Growth via Growth Initiation Factors in Nature: A Putative Mechanism for in situ Cultivation of Previously Uncultivated Microorganisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 537194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.537194	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 Jung Dawoon, Machida Koshi, Nakao Yoichi, Owen S. Jeffrey, He Shan, Kindaichi Tomonori, Ohashi Akiyoshi, Aoi Yoshiteru	4. 巻 9
2. 論文標題 Cultivation of previously uncultured sponge-associated bacteria using advanced cultivation techniques: A perspective on possible key mechanisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	6. 最初と最後の頁 963277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmars.2022.963277	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------