

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15443

研究課題名(和文)新規の増殖因子としての細胞外鉄イオウクラスターと微生物との相互作用の解明

研究課題名(英文) Analysis of the interactions between microorganisms and extracellular Fe-S clusters as novel growth factors

研究代表者

五十嵐 健輔 (Igarashi, Kensuke)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：90759945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、培養が困難な微生物の種類として細胞外から鉄イオウクラスターが供給されないと増殖できないような未知微生物を想定し、それらの単離と生理の解明を行うことを目的とした。様々な自然環境から採取したサンプルを元に、鉄イオウクラスターに結晶構造が類似している硫化鉱物(グライグイト、Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>)の存在下で培養を継続し、グライグイトによって増殖促進を示す複数の微生物群集、および酢酸生成菌やメタン生成菌などの複数の単離株を取得することに成功した。一連の研究過程で培養・単離が困難とされるVerrucomicrobiota門に属する新規株(新属レベル)の取得にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、グライグイト存在下で増殖が促進される微生物群集と単離株を複数取得することに成功した。そのような特異的な生理を示す微生物の単離手法を確立できたとともに、細胞外鉄イオウクラスター依存的な微生物の生理解明に繋がる知見を示したと期待される。そして、これまで未培養であり、抗生物質生産などに関わる二次代謝経路をもつ新規性の高い株の取得にも成功した。これらの成果により、微生物代謝の根幹の解明や、CO<sub>2</sub>の資源化なども含めた微生物の産業利用を促す知見を得られたと期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to isolate and elucidate the physiology of unknown microorganisms that are difficult to culture and which cannot grow without an extracellular supply of Fe-S clusters.

Cultivation from various natural environments were conducted in the presence of greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>), which has a similar crystal structure to Fe-S clusters. Microbial communities and isolates such as acetogens and methanogens that showed growth promotion by greigite were successfully obtained. New strains belonging to the phylum Verrucomicrobiota (new genus level), which are considered difficult to culture and isolate were also successfully obtained.

研究分野：微生物生態学

キーワード：難培養微生物 環境微生物 硫化鉄 独立栄養性微生物 酢酸生成菌 生理活性物質 鉄イオウクラスター

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

環境中の多くの微生物は、実験室内で培養・単離することが困難である。難培養性であることの理由の一つとして、他の微生物や鉱物によって与えられる補因子や生理活性物質が実験室内では供給されないことが挙げられる。しかし、そのような生理活性がある鉱物を用いた環境微生物を培養した例はほぼ存在せず、関連知見も限られることから、環境微生物の真の理解を妨げる要因となっている。

研究代表者はこれまでの研究により、磁硫化鉄の一種であるグライタイト( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ )がメタン菌の代謝を促進する生理活性をもち、増殖能力を著しく向上させることを明らかにした<sup>1</sup>。グライタイトは、その結晶構造中に生物がもつ鉄イオウクラスターに極めて類似した構造を有していることから、初期の生命は環境中のグライタイトなどから代謝に必要な鉄イオウクラスターを調達していたと推定されている<sup>2</sup>。

大腸菌のようなモデル微生物において、鉄イオウクラスターは、鉄やイオウ原子から専用の代謝経路により *de novo* 合成されることが知られている。そして近年、ある種の細菌は細胞外に存在する鉄イオウクラスターをその構造を保ったまま直接取り込み代謝に利用できることが報告されている<sup>3</sup>。このように、微生物による金属クラスターの取り込みは普遍的な現象である可能性があるものの、それを実証した例は非常に限られ、自然環境中の広範な微生物種を対象とした研究はこれまで成されていない。このことから、未培養微生物の中には、鉄イオウクラスターを細胞外から取り込むことでしか調達できないものが存在し、彼らが難培養性である理由は鉄イオウクラスターを適切に供給できていないためと考えた。そのような微生物であっても、鉄イオウクラスターが十分供給できる培養環境におくことで、これまで不可能であった培養と単離ができ、生理の解明につながる研究が可能になると期待した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、微生物の細胞外に存在する鉄イオウクラスターが微生物の増殖を支える全く新しい因子であることを示し、それに依存して増殖する未知微生物を対象に、単離、生理解明、および増殖の制御技術を確立することである。

鉄イオウクラスターに結晶構造が類似している硫化鉱物(グライタイト)の存在下で、環境中の微生物群集を集積培養し、細胞外の鉄イオウクラスター依存的に増殖する新規な微生物を取得する。そしてそのような微生物の生理を、培養とバイオフィォーマティクスをつうじて解明することで、細胞外に存在する鉄イオウクラスターが微生物の増殖をコントロールする全く新しい増殖因子であることを示す。加えて、産業利用に資するような新規微生物の取得と生理解明を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) グライタイトにより増殖が促進される微生物群集の取得と解析

硫化鉄が存在すると考えられる環境試料(水田土壌、森林土壌、河川底泥など)を主な微生物源とし、グライタイトの存在下で集積培養を行った。増殖に必要な各種基質、および培養条件を変化させ多様な微生物源から異なる菌叢を含む集積培養を得た。グライタイトを既報の手法<sup>1</sup>により合成した。グライタイト結晶をリン酸緩衝液中で嫌氣的に加熱することで、増殖促進性の成分の抽出を試みた。種々の嫌気環境由来の微生物源を、グライタイト(添加濃度 20 g/L)、または、その抽出物を添加した液体培地を用い、独立栄養条件( $\text{H}_2+\text{CO}_2$ 、比率 80:20)および従属栄養条件(酢酸またはエタノール)で集積培養(静置、20~60°C)した。グライタイトによる促進効果の評価は、菌密度の直接計数法と各種クロマトグラフィーによる代謝産物(メタン、有機酸など)の定量により行った。集積培養物の菌叢解析は、16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を対象とした次世代シーケンシング(MiSeq または iSeq100)により行った。

### (2) グライタイトにより増殖が促進される微生物の単離

上記(1)で得られた集積培養物、または集積前の元の環境試料を微生物源として用い、グライタイトによる増殖促進を示す微生物の単離を行った。単離培養では、グライタイト粒子、および、その抽出物を添加したアガーまたはゲランガム平板培地を用いた。形成されたコロニーから微生物を単離し、同定とキャラクタライゼーションを行った。単離後の微生物を、グライタイトの添加条件を変えて培養し、鉄イオウクラスターの供給による増殖促進効果を検証した。

### (3) 細胞外鉄イオウクラスター依存性の検証

単離できた微生物を対象に、グライタイトの存在の有無や、既知の微生物との共培養、そして培養上清の相互添加実験を行い、増殖に細胞外鉄イオウクラスターを要求するかについて評価した。細胞外鉄イオウクラスターの利用に必要な遺伝子と代謝経路の特定を目的として、細胞外鉄イオウクラスター依存的な増殖を示す複数の微生物のゲノムのシーケンシングを行った。比較ゲノム解析から、細胞外鉄イオウクラスターの取込みや、鉄イオウタンパク質の構築に関与する可能性のある遺伝子群の推定を試みた。更に、代表的な単離株に対して、トランスクリプトー

μ解析 (RNA-Seq) を行い、細胞外鉄イオウクラスターの供給下で発現の上昇が見られる遺伝子群の特定を試みた。

#### (4) 既報の難培養微生物単離手法の応用

グライガイドによる増殖促進手法と、難培養微生物の単離効率を上昇させる既存の手法とを組み合わせ、単離効率の更なる向上を試みた。好気条件においては、グライガイドから溶出した、あるいはその抽出物由来の鉄イオンと酸素による反応から過酸化水素などの活性酸素種が発生する。過酸化水素は多くの微生物を難培養にする主要な要因である<sup>4</sup>。そのため、好気条件においては活性酸素種への感受性が高いために、外部から鉄イオウクラスターを供給しても増殖に至らない可能性を考慮し、培養中に活性酸素種 (特に過酸化水素) の発生を抑制する培養手法を取り入れる実験を行った。具体的には、培地調整時に過酸化水素の発生を抑制する手法<sup>4</sup>、および発生した過酸化水素を分解により素早く除去する新規な手法<sup>5</sup>を採用し単離培養を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) グライガイドにより増殖が促進される微生物群集の取得と解析

自然環境由来の微生物源から、グライガイド存在下で増殖促進を示す微生物の集積と単離培養を行った。まず、水田土壌、森林土壌、河川底泥などの嫌気環境から、グライガイド存在下で集積培養を行い、グライガイドによる増殖の促進と菌叢への影響を調査した。

いずれの環境サンプルを接種した培養でも、特に独立栄養条件では、グライガイド添加時に増殖の促進効果が見られた。図1に水田土壌を用いた培養 (集積3代目) の例を示す。集積培養物の菌叢解析の結果、いずれの環境サンプル由来の独立栄養培養においても、グライガイド添加時には、継代するごとに酢酸生成菌 (*Acetobacterium*、*Sporomusa*、*Clostridium* など) が徐々に優占化していく傾向が見られた (図2)。グライガイドを添加した固体培地上で各種環境サンプルからの平板培養を行った結果、特に水田土壌でのコロニー形成数の増加が確認された。またこの傾向は、グライガイドのリン酸緩衝液中での抽出液を添加した際にも観察された。

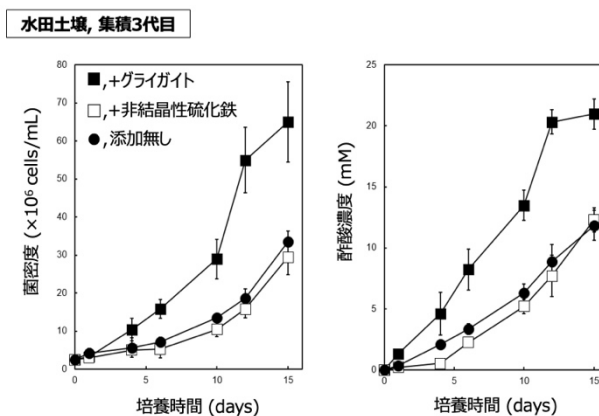


図1 グライガイド添加による集積培養 (水田土壌由来、独立栄養条件) の増殖への影響

#### (2) グライガイドにより増殖が促進される微生物の単離

上記集積培養物、または元の微生物源からの単離を試みた結果、16S rRNA 遺伝子ベースで既知の株と比較的低い相同性を示す複数の株、即ち代表例として *Tepidibacter formicigenes* (95%) や、*Aquipluma nitroreducens* (96%) に近縁の単離株を取得することに成功した (表1)。これらの株は、グライガイド存在下で増殖促進を示した。また、集積培養物から単離した株の多くは、既知の株と相同性が高く (例えば、*Clostridium magnum* strain FM5、相同性 99%)、グライガイド存在下で著しい増殖促進を示した (図3)。

更に、微生物の単離源をアルカリ環境、そして高温環境に拡大し更なる菌

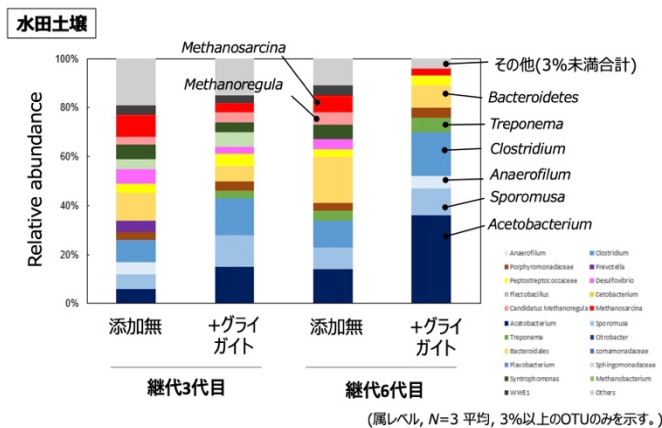


図2 グライガイド添加による集積培養 (水田土壌由来、独立栄養条件) の菌叢への影響

表1. 既知の株と比較的低い相同性を示した分離株

Strain	Origin	Phylogenetic group (Phylum)	Closest relative (Similarity, %)
RP-51	Rice paddy soil	Firmicutes	<i>Tepidibacter formicigenes</i> (95)
RS-79	River sediment	Bacteroidetes	<i>Aquipluma nitroreducens</i> (96)
RP-103	Rice paddy soil	Firmicutes	<i>Aneurinibacillus soli</i> (97)
RP-309	Rice paddy soil	Firmicutes	<i>Aneurinibacillus tyrosinisolvens</i> strain LL-002 (96)

株の取得を試みた。その結果、グライグイト存在下で増殖促進を示す複数の株をアルカリ性鉱泉 (pH8-9) 由来の微生物群集から、そして堆肥 (約 60-70°C) 由来の微生物群集から取得することに成功した。新規取得株は主に Firmicutes 門、Proteobacteria 門、そして Fusobacteria 門に属し、生理解明の対象となる微生物株の多様性を拡大できた。加えて、嫌気性酸性土壌、嫌気性高温油層水から同様の性質を示す微生物取得を試みた。その結果、油層水由来の微生物群集からグライグイトによる増殖促進を示すメタン菌を含む複数の株を取得することができた。より物質の授受に伴う栄養共生関係が強い微生物群集を想定し、シロアリの腸管内微生物群集から同様の性質を示す株の単離を試みた。しかし、明瞭な促進効果を示す株の取得には至らなかった。

### (3) 細胞外鉄イオウクラスター依存性の検証

上記の実験で取得した微生物株を対象に、他の微生物株から細胞外鉄イオウクラスターの授受が可能かを検証するために、各々の単離株、およびカルチャーコレクションから取得した既存株を用い、共培養、および培養上清の相互添加による増殖への影響を評価した。その結果、共培養条件では明瞭な増殖促進が観察されなかったものの、培養上清の添加条件では、特にいくつかのメタン菌の培養上清を用いた場合、単離した酢酸生成菌に微弱ながら促進効果が観察された。増殖促進が見られた各種株に対して、特に鉄イオウタンパク質に着目した比較ゲノム解析とトランスクリプトーム解析を行った。しかしながら、明瞭な共通性を有した経路や遺伝子クラスターの同定には至らなかった。

### (4) 既存の難培養微生物単離手法の応用

既に報告されている活性酸素種の除去手法を平板培養時に採用することで、コロニー形成効率を上昇させることに成功した。単離実験の過程で、一般的に単離培養が困難とされる Verrucomicrobiota 門に属する複数の新規株 (16S rRNA ベースでの相同性比較において、*Opitutae* 綱に属するとされる) の取得に成功した。それらの株はグライグイトによる増殖促進が明瞭に見られなかったものの、もっとも近縁とされる既知の単離株 (*Alterococcus agarolyticus*) との相同性が 93%未満であるものが含まれていた。それらのうち、代表的な株 (寄託株名、ASA1) については、各種生理解析の結果を総合的に考慮して新属の提案レベルに値する新規性を有することが示唆された (図 4)。また、当該株は特に非リボソームペプチドに関わる独特の二次代謝経路を有し、抗生物質などの生理活性物質生産への応用利用性も示唆された。当該株については、既にコンプライートゲノムの取得済みであり<sup>6</sup>、公的カルチャーコレクション機関への寄託を完了し、現在、新属提案にむけた記載論文の投稿準備中である。

C. magnum 近縁株 (独立栄養条件)

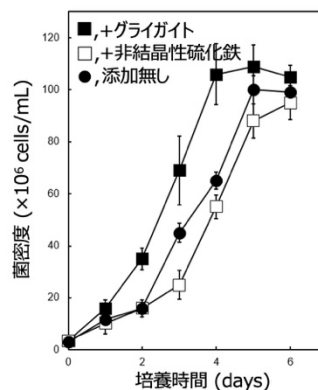


図 3 グライグイトの添加による単離株 (*Clostridium magnum* 近縁株) の増殖促進 (独立栄養条件)



図 4 (左) 16S rRNA ベースの系統樹(近隣結合法)における新規株 ASA1(朱色)の系統学的位置 (右) ASA1 株の位相差顕微鏡像 Bar, 10 μm

## 総括

本研究により、鉄イオウクラスターに構造が類似する硫化鉄であるグライグイトの存在下で環境微生物群集を培養することで、グライグイトにより増殖が促進される微生物のグループとそこからの単離株を取得できることが示された。増殖促進を示した主な単離株は酢酸生成菌やメ



タン生成菌であった。それらの共通性質として鉄イオウタンパク質がキー酵素として働く還元のアセチル CoA 経路をもつことから、グライガイトの添加効果と代謝促進との相関が示唆された。一連の研究から、グライガイトを用いた微生物群集の活性化とそれを利用した単離法についての基礎技術が確立したと考えられる。

酢酸生成菌やメタン生成菌は CO<sub>2</sub> 固定による物質生産(有機酸、アルコール、メタン生産など)のポテンシャルを有し、特に近年、その産業応用が社会実装されつつある。そのため、本研究の成果は、そのような産業利用に資する微生物資源の拡充に寄与すると期待される。今後は、本研究で取り扱った培養と単離技術を洗練化するとともに、取得した微生物の生理をこれまでとは異なるアプローチ(例えばプロテオーム解析)により明らかにしていく方針である。また、本研究の付随的な成果として抗生物質生産に関する有望な二次代謝経路を有する新規株が得られた。今後はこの微生物株の産業応用性を念頭に置いた生理解明を行う方針である。

## 引用文献

- (1) Igarashi K, et al, (2016) *Geochim. Cosmochim. Acta*, 191: 47-57
- (2) Russell MJ and Martin W, (2004) *Trends Biochem. Sci.*, 29(7): 358-363
- (3) Mosbahi K, et al, (2018) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 115 (26): 6840-684
- (4) Kato S, et al, (2018) *Appl. Environ. Microbiol.*, 84(19): e00807-18
- (5) 五十嵐 健輔, 渡辺 統之, 北川 航, (2021) 日本微生物生態学会第 34 回大会要旨集
- (6) Islam MS, et al, (2024) *Microbiol. Resour. Announc.* 13(3): e0103223

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 1件）

1. 著者名 Islam Md. Samiul, Yamamoto Kyosuke, Morita Naoki, Yumoto Isao, Kato Souichiro, Nakai Ryosuke, Igarashi Kensuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Complete genome sequence of Opiritales bacterium strain ASA1, isolated from soil	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01032-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.01032-23	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 五十嵐 健輔、渡辺 統之、北川 航
2. 発表標題 固体触媒により過酸化水素フリーな平板培地調製を可能にする手法の確立
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

〔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
---------	---------