

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02280

研究課題名(和文) 海綿動物内の細菌叢から有用細菌を予測・特定可能な新規細菌形質解明システムの開発

研究課題名(英文) Establishment of a novel characterization system for identification of talented bacteria from marine sponge

研究代表者

MORI TETSUSHI (MORI, TETSUSHI)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00590100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：海綿動物からは、生理活性の高いそして有望なリード化合物が数多く単離されている。そこで、近年の研究では、海綿動物から発見された多くの化合物は共生細菌由来と示唆され、これらの細菌の単離および培養に注目が集まっている。よって、本研究課題では、海綿動物内の細菌叢から有用細菌を予測・特定可能な新規細菌形質解明システムの開発を行った。本研究で作成した予測システムは細菌のゲノム情報に基づいて細菌の形質や有用性を明らかにすることだけではなく、研究担当者の細菌識別・単離手法と組み合わせることにより多くの有用性細菌の発見や単離を促進できると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

産業および医療分野においては、プロセスの加速化・最適化あるいは新薬開発には微生物は不可欠である。また、次世代シーケンサーの解析により海綿動物内を初め、環境にはまだ開拓されていない有用性細菌が多く生息している。しかし、環境微生物の多くは未知あるいは難培養性であることから、従来の技術ではこれらの有用性細菌はアクセスできない。この問題を解決すべく、研究担当者が2018年度から科研費研究を通して、微生物を識別・単離できる手法の開発を開始した。しかし、本手法は環境から有用性細菌の特定できないため、本研究では環境細菌叢から有用性細菌を特定できる技術の開発を目指した。

研究成果の概要(英文)：Marine sponges are rich resources for countless natural compounds applicable for drug development. In recent years, these compounds are known to be produced by bacterial symbionts residing within these sponges. However, current technologies are insufficient to fully identify the true producers of these natural products, thus the necessity for new approaches to efficiently identify the true producers is required. In this work, with the aid of bioinformatics, we established a novel approach to elucidate the characteristics of bacteria, hence allowing us to identify the true natural compound producers within a bacterial population. Coupling this approach with a recent techniques for bacterial isolation established by the principal investigator, we believe that we can promote the exploitation of talented bacteria not only from marine sponges but also from the environment.

研究分野：バイオテクノロジー、微生物生態学、生物工学(微生物)

キーワード：細菌形質解明システム 難培養微生物 有用性細菌

## 1. 研究開始当初の背景

海綿動物からは、生理活性の高いそして有望なリード化合物が数多く単離されている。しかし、天然に存在している海綿動物から直接にこれらの化合物を獲得するには物量的・時間的に限りがある。さらに自然環境変化による種絶滅の進行が天然からの採集をますます困難とし深刻な問題となってきている。一方で、メタゲノム解析技術により、多くの有用化合物の生合成遺伝子クラスターが海綿動物の細菌叢から発見され、これらの有用化合物の真の生産者は海綿動物内の共生細菌であることが示されてきた。すなわち、これらの化合物の産生菌を単離し、さらに人為的制御下で保存・増殖利用を可能とする培養ができれば、天然資源に頼らない有用化合物の安定生産や重要資源の確保と長期的保存が可能である。

しかし、海綿動物内の共生細菌は多種多様であり、また多くが未知そして難培養性であることから、細菌叢から有用化合物産生菌を特定し単離培養することは非常に困難である。つまり、環境中に生息する難培養性微生物をより有効に利用するには、その有用微生物を 1) 探索、単離そして最終的に 2) 培養して生きたまま保存することが極めて重要である。しかし、これらの課題を直接解決できる技術は未だに開発されていない。そこで研究担当者はいち早くこれらの問題の解決を目指し、独自のアプローチで、難培養性細菌叢から、生細胞そして種特異的細菌を識別できる手法を開発した。

この発明により、研究担当者は細菌を識別可能な新規ブレイクスルー技術の開発に成功したが、本手法を実際環境サンプルに応用する際には、ひとまず、環境サンプルからどの細菌が有用性を示すか、つまり有用性細菌の特定ができない問題に面した。さらに、研究担当者の細菌識別手法は多様多様な細菌への汎用性を欠けており、より多くの有用性細菌の識別・単離ができるよう、本手法のさらなる改良が求められている。

## 2. 研究の目的

上記を踏まえ、本研究では海綿動物内の難培養微生物叢からより多くそして効率的に有用細菌の獲得・培養化に向けて、有用細菌を予測・特定可能な新規細菌形質解明システムの開発を試みた。本システムは研究担当者が開発した細菌識別手法の応用性を活かした独自のシステムであり、1) 環境中から難培養細菌の単離および長期保存に向けた菌体ライブラリーの樹立、2) 単離した難培養細菌をゲノム・遺伝子レベルで解読、データベース化、そして 3) 単離細菌の遺伝情報や公開ゲノム情報を統合させた性質・特性予測できる系の構築、から構成されている。次に、研究担当者の細菌識別手法は多様多様な細菌への汎用性を高めるために、本手法の簡略化およびマルチプレックス化の可能性を探った。

## 3. 研究の方法

### (1) 環境中から微生物の単離・長期保存に向けた菌体ライブラリーを樹立および遺伝情報のデータベース化。

環境中から微生物の単離・長期保存に向けた菌体ライブラリーを樹立するには、研究担当者が開発した種特異的細菌を識別できる手法を実際に環境サンプルへの汎用・応用性の検証が必要だった。そのため、ひとまず、本研究では、海綿動物である *Halichondria okadai* の共生細菌叢をモデルとし、*H. okadai* 内に共生している細菌の単離を試みた。*H. okadai* に共生している微生物を特定するため、ナノポアシーケンシング技術を用いて、16S rRNA 解析を行った。共生細菌を特定後、それぞれの細菌に対する特異的プローブを合成し、*H. okadai* の微生物画分の染色を行った後、フローサイトメーター (FACS) を用いてそれぞれの目的の細菌を単離した。単離した生細菌の一部をゲノム解読用に採集し、残りのサンプルは細菌ライブラリーの樹立用に凍結保存した。次に、種特異的細菌を識別できる手法で単離したそれぞれの細菌種からゲノム DNA および RNA を抽出し、上記と同様次世代シーケンサーを用いて解読を進めた。本研究では最終的に高い (>20%)、中程度 (5-20%) そして小さい (<5%) 割合を占める菌種をターゲットとし、得られた遺伝情報のデータベースを作成した。

### (2) 細菌形質解明・予測システムの開発。

従来の多くのオンラインデータベースまたは予測ソフトウェアは細菌のゲノム上の遺伝子情報や保有する一次、二次代謝経路についての情報のみを提供する。そこで本システムを独創・次世代のシステムとして特徴付けるために、遺伝的情報に加え、細菌の形質および培養化に繋がる情報 (利用する代謝経路など) を予測可能なシステムの構築を試みた。本システムは、メインとなる情報処理のパイプラインはバイオインフォマティクス手法を用いて in-house で立ち上げ、ゲノム解読、トランスクリプトーム解析ツールなどは既存のオープンソースファイルを用いてメインのパイプラインに組み込む形式でプロトタイプ版を構築した。本システムの検証方法と

して、すでに培養可能、そして形質がわかっている有用性細菌である *Cereibacter sphaeroides* および *Synechocystis* sp. PCC6803 の全ゲノム情報に基づいて行った。最終的に環境から単離した細菌のゲノム情報を利用し、それぞれの細菌の形質を予測した。

### (3) 新規細菌識別手法の簡略化およびマルチプレックス化の可能性

研究担当者が開発した細菌識別手法は特異的プローブを利用し、特定の細菌を染色できるといった原理からなる。現在、本手法はモデル細菌や環境サンプルに対して実証されており、特定の細菌の特異的識別・単離には優れているが、用いたプローブの細菌への導入効率はまだ悪く、その導入率が低いことが大きな欠点が挙げられる。そこで、本系で用いたプローブの簡略化が必要となっており、本研究項目では、用いたプローブに使用している蛍光物質に着目し、プローブの合成方法の再検討および新しく改良された系の可能性を探った。

## 4. 研究成果

### (1) 環境中から微生物の単離・長期保存に向けた菌体ライブラリーを樹立および遺伝情報のデータベース化。

本研究項目は初年度から開始し、研究担当者の種特異的細菌を識別できる手法を利用し、環境サンプルである *H. okadai* の微生物画分から多様多種の微生物の単離の実証を試みた。本検証の結果、計画した目的の細菌を識別可能である 16S rRNA 遺伝子をターゲットにした特異的プローブの設計および微生物の染色を行ったが、安定的に目的の細菌種の識別をできなかった。そこで研究担当者は環境サンプルに含まれる夾雑物が本手法の安定性に大きく影響していると考え、新たに細菌のペプチドグリカンの染色や誘電泳動を利用した、サンプル浄化方法を考案した。本浄化方法の導入により、*H. okadai* の細菌叢に含まれる微生物種が明確になったことだけではなく、今まで検出できなかった細菌種の検出も可能となった(図1)。さらに、上記に加え、新たな細菌を識別可能な領域も探索を行い、最終的に目的の細菌を選別できるように成功した。新たな細菌を識別可能な領域を探索し、最終的に安定的に目的の細菌を選別できるように成功した。次に、単離した細菌から得られるゲノム・遺伝子情報のデータベース作成に向けて、次世代シーケンサーであるナノポアシーケンシング技術をベースとした解析パイプラインを樹立した。このように、上記のきれいな微生物の画分の獲得方の考案、細菌の識別する新条件やゲノム・遺伝子情報の解析パイプラインを開発することで環境サンプルから希少・難培養性微生物の単離がより確実になった。

本研究項目は最終年度まで継続行い、環境からの微生物のサンプル収集およびその遺伝的情報のデータベース化を進めた。現在、複数種の海洋海綿内の共生細菌群を初め、無脊椎動物やエビ等からも共生細菌群を収集し、菌体ライブラリーや微生物のデータベースの遺伝情報を拡大する。

### (2) 細菌形質解明・予測システムの開発。

本研究項目では開発した細菌形質・予測システムのプロトタイプ版を利用し、2種のモデル細菌や環境から単離した10種の細菌に対してその形質および有用性を特定可能であることを確認した。その結果、それぞれの細菌のゲノム情報から一次及び二次代謝に関わる経路が多く検出され、また各細菌において特徴となる形質も確認できた(図2)。さらに本システムにより完全あるいは未完全な代謝経路を特定することができ、各細菌における進化経路や細菌間の関連

TABLE 1 Distribution of bacteria from nanopore sequencing results.

Name of Genus	Number of reads		
	Centrifuged bacteria sample	DEP-captured bacteria sample	FDAA-stained bacteria sample
<i>Acidibacter</i>	0	0	204
<i>Aeromonas</i>	3,802	216	0
<i>Bradyrhizobium</i>	0	0	606
<i>Brevundimonas</i>	297	0	2,391
<i>Buttiauxella</i>	1,308	277	1,270
<i>Chryseobacterium</i>	652	0	0
<i>Clostridium</i>	6,800	0	58,438
<i>Exiguobacterium</i>	0	253	0
<i>Gelidibacter</i>	278	0	0
<i>Paenibacillus</i>	0	0	280
<i>Pseudomonas</i>	32,037	70,366	1,926
<i>Psychrobacter</i>	71,933	42,934	5,438
<i>Saccharosporillum</i>	0	0	7,409
<i>Serratia</i>	0	257	0
<i>Shewanella</i>	245	405	0
<i>Stenotrophomonas</i>	4,870	0	1,549
<i>Thalassolituus</i>	259	0	0
Final read count	122,481	114,708	79,511
Number of detected bacterial genera	11	7	10

\*Results showing distributions below 0.1% were considered contaminants and removed from subsequent analysis.

図1 細菌のペプチドグリカンの染色や誘電泳動を利用した、サンプル浄化方法から検出した細菌種。



図2 本研究で開発した細菌形質解明・予測システムの実施例

性も見いだせることも示唆された。そして、本システムを環境サンプルに対して試しに実証し、イワガニの表面から単離された *Kangiella* sp. TOML190 株のゲノム情報から本細菌のイワガニとの共生関係の可能性を見いだせることができた。今後、本システムのさらなる改良を重ね、最終的に代謝経路と栄養源そして栄養源と培養条件の関連性を予測できるシステムの開発を目指す。

### (3) 新規細菌識別手法の簡略化およびマルチプレックス化の可能性

研究担当者が開発した細菌識別手法は今まで 5,6-Carboxylfluorescein (5,6-FAM) を蛍光物質として使用したが、本研究項目では、新たな性質を持つ蛍光物質に変更することで、本手法で用いる特異的プローブの分子量低減可能かどうかを検証した。その結果、新規特異的プローブの合成に成功し、図3で示唆されたようプローブの導入が認められた。今後、新規合成した特異的プローブを用いて、引き続き、本細菌識別手法の簡略化やマルチプレックス化の可能性を探っていきたい。

上記の様に本研究課題で計画したほとんどの研究項目の目標を達成したが、研究項目(3)である特異的プローブの簡略化では、新規プローブの合成に苦戦した結果、その改良した効果は研究期間中に検証できなかった。本研究項目に関しては本研究課題が終了後、継続的に検証する予定である。また、本研究課題で構築した細菌形質解明・予測システムは今後環境サンプルへの応用が期待され、そのさらなる改良および最適化も行う。

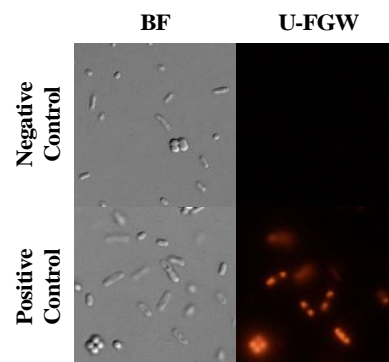


図3 新規特異的プローブの細菌への導入結果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Zulmajdi Abdullah Adham, Okazaki Tatsuru, Mori Tetsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Draft Genome of <i>Kangiella</i> sp. Strain TOML190, Isolated from the Surface of the Striped Shore Crab, <i>Pachygrapsus crassipes</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00437-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00437-22	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 Yokoi Yasuhito, Kawabuchi Yugo, Zulmajdi Abdullah Adham, Tanaka Reiji, Shibata Toshiyuki, Muraoka Takahiro, Mori Tetsushi	4. 巻 27
2. 論文標題 Cell-Penetrating Peptide?Peptide Nucleic Acid Conjugates as a Tool for Protein Functional Elucidation in the Native Bacterium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 8944 ~ 8944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27248944	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 Kogawa M., Miyaoka R., Hemmerling F., Ando M., Yura K., Ide K., Nishikawa Y., Hosokawa M., Ise Y., Cahn J.K.B., Takada K., Matsunaga S., Mori T., Piel J., Takeyama H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Single-cell metabolite detection and genomics reveals uncultivated talented producer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 pgab007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pnasnexus/pgab007	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 該当する
1. 著者名 Yu Jaeyoung, Kawahisa Marika, Kinoshita Aya, Zulmajdi Abdullah Adham, Mori Tetsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Approaches for attaining clean bacterial fractions from complex environmental samples	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	6. 最初と最後の頁 1354979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmars.2024.1354979	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18件(うち招待講演 1件/うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Tetsushi Mori, Daichi Toyohara, Yasuhito Yokoi, Yugo Kawabuchi, Go Inoue, Takahiro Muraoka
2. 発表標題 Cell-penetrating peptides: an alternative approach for efficient biomolecule delivery in bacteria
3. 学会等名 APMBC2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Abdullah Adham Zulmajdi, Yuki Kurita, Masayoshi Wada, Tetsushi Mori
2. 発表標題 Targeted identification of potentially useful bacteria from the environment via genomics analysis
3. 学会等名 APMBC2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yugo Kawabuchi, Yasuhito Yokoi, Abdullah Adham Zulmajdi, Reiji Tanaka, Toshiyuki Shibata, Takahiro Muraoka, Tetsushi Mori
2. 発表標題 Exploring Protein Functionality in Native Bacteria using Cell-Penetrating Peptide-Peptide Nucleic Acid conjugates
3. 学会等名 APMBC2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jaeyoung Yu, Abdullah Adham Zulmajdi, Marika Kawahisa, Aya Kinoshita, Tetsushi Mori
2. 発表標題 Preparation of Pure Bacterial Fractions for Enhancing Bacterial Isolation from Environmental Samples
3. 学会等名 APMBC2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川淵佑悟、横井泰仁、Abdullah Adham Zulmajdi、田中礼士、柴田敏行、村岡貴博、モリテツシ
2. 発表標題 野生型細菌における膜透過性ペプチド-ペプチド核酸複合体を用いた未知機能タンパク質の機能解明
3. 学会等名 第23回マリンバイオ学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jaeyoung Yu, Abdullah Adham Zulmajdi, Aya Kinoshita, Marika Kawahisa, Tetsushi Mori
2. 発表標題 The potential of dielectrophoresis and fluorescent D-amino acids as approaches for isolating bacteria from environmental samples
3. 学会等名 第23回マリンバイオ学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Abdullah Adham Zulmajdi, Yuki Kurita, Tetsushi Mori
2. 発表標題 Development of a tool to elucidate bacterial traits for the discovery of useful bacteria from environmental microflora
3. 学会等名 第23回マリンバイオ学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川淵佑悟、富田杏実、周防玲、糸井史朗、村岡貴博、モリテツシ
2. 発表標題 細菌内の代謝経路解明手法の開発に向けた膜透過性ペプチド-ペプチド核酸重合体の応用
3. 学会等名 第23回マリンバイオ学会大会
4. 発表年 2023年

1 . 発表者名 Y. Kawabuchi, Y. Yokoi, A. Zulmadji, R. Tanaka, T. Shibata, T. Muraoka, T. Mori
2 . 発表標題 Cell penetrating peptides-protein nucleic acid conjugates as a tool for characterization of unknown protein
3 . 学会等名 IUMS2022 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 A. Kinoshita, D. Toyohara, G. Inoue, T. Okazaki, Y. Yokoi, Y. Kawabuchi, T. Muraoka, T. Mori
2 . 発表標題 Application of cell-penetrating peptides in diverse bacterial strains for biomolecule delivery
3 . 学会等名 IUMS2022 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Y. Kawabuchi, T. Okazaki, T. Muraoka, T. Mori
2 . 発表標題 Simple and efficient biomolecule delivery using cell-penetrating peptides in gram-positive bacteria
3 . 学会等名 ISME18 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 T. Okazaki, N. HOnma, M. Ishige, T. Muraoka, T. Mori
2 . 発表標題 Rapid, simple and accurate detection of bacterial endospores using cell-penetrating peptides
3 . 学会等名 ISME18 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2022年



1. 発表者名 A. Kinoshita, M. Kawahisa, E. Kato, S. Morita, T. Mori
2. 発表標題 Employing dielectrophoresis as an alternative approach for bacterial purification from environmental samples
3. 学会等名 ISME18 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 T. Mori, D. Toyohara, G. Inoue, Y. Yokoi, A. Kinoshita, T. Okazaki, Y. Kawabuchi, T. Muraoka
2. 発表標題 Cell-penetrating peptides as biomolecule carriers and its application in bacteria
3. 学会等名 ISME18 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎遥香、木下彩、周防玲、糸井史、モリテツシ
2. 発表標題 オオツノヒラムシに共生するテトロドトキシン産生微生物の探索および解明
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大橋勝太、渋谷由希、新家弘也、モリテツシ
2. 発表標題 膜透過性ペプチド-ペプチド核酸複合体を用いたハプト藻の遺伝子操作技術の開発
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡崎達、井上豪、村岡貴博、モリテツシ
2. 発表標題 膜透過性ペプチドを利用したグラム陽性菌に対する生体分子導入技術の開発
3. 学会等名 第34回日本微生物生態学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下彩、川久真里佳、加藤英子、森田智士、モリテツシ
2. 発表標題 誘電泳動法を用いた環境微生物の回収
3. 学会等名 第34回日本微生物生態学会大会
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
---------	---------