

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06141

研究課題名（和文）難培養真菌のミニメタゲノム解析法の確立と新規遺伝子の探索

研究課題名（英文）Establishment of a method for mini-metagenomic analysis of unculturable fungi and search for novel genes

研究代表者

梅山 大地（Umeyama, Taichi）

九州大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：30706370

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）：真菌は微生物叢の中でも存在量が少ないだけでなく、遺伝情報が複数の染色体に分かれてコードされているため、メタゲノムデータから全ゲノムを再構築できない。そのため従来のゲノム解析では単離培養が不可欠であり、培養できない真菌のゲノムは解析できなかった。そこで本研究ではそのような難培養真菌のゲノム解析を目指して、微生物叢から真菌を分離濃縮してゲノム解析を行うミニメタゲノム解析手法の確立に取り組み、(1)磁気分離やFACSソーティングで用いるプローブの作製と蛋白質工学的な手法による親和性の向上、(2)密度勾配遠心法による真菌を濃縮する条件の最適化、(3)細菌特異的な溶菌酵素の取得と反応条件の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のシーケンス技術の進歩により微生物叢から直接細菌のゲノムを完全に解読することが可能になったことで、培養不可能な細菌のゲノム解析が精力的に進められるようになった。しかしこの手法は、複数の線状ゲノムをもつ真菌に対しては適用できないため、真菌のゲノム解析はいまだに単離培養が可能な種に限定されている。本研究を基に難培養真菌のゲノム解析が可能になれば、新規の真菌種や遺伝子の発見につながるため学術的に大きな意義がある。また真菌は宿主の免疫や神経発達に影響するため、共生微生物叢の生体防御や認知機能への影響がより詳細に理解できるようになれば、社会的に大きな意義がある。

研究成果の概要（英文）：Fungi are not only rare in the microflora, but their genetic information is encoded on multiple chromosomes, making it impossible to reconstruct the entire genome from metagenomic data. For this reason, isolation culture is essential in conventional genome analysis, and the genomes of fungi that cannot be cultured cannot be analyzed. In this study, I aimed to establish a mini-metagenomic analysis method for genome analysis of fungi that cannot be cultured, by isolating and enriching fungi from the microflora, and I developed the following methods: (1) creation of probes for magnetic separation and FACS sorting and improvement of their affinity using protein engineering methods, (2) Optimization of conditions for fungal enrichment by density gradient centrifugation, and (3) Acquisition of bacteria-specific bacteriolysis enzymes and investigation of reaction conditions.

研究分野：ゲノム微生物学

キーワード：ミニメタゲノム解析 蛋白質工学 センサー 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

微生物叢には様々な細菌や真菌が含まれており、培養可能な微生物のゲノムについては四半世紀前には既に報告されている。しかし 99%以上を占める培養不可能な微生物のゲノムの多くは未解明のままである。近年のロングリードシーケンスや疑似ロングリードシーケンス手法の登場によって、メタゲノム解析により微生物叢に含まれる細菌ゲノムを複数完全解読した例も報告されている。このような技術的な進歩により、培養不可能な細菌の全ゲノム解読が飛躍的に進むことが期待されている。しかし、これらの研究で用いられている環状ゲノムを再構築するアプローチは、遺伝情報が通常一つの環状染色体にコードされている細菌に対しては有効であるものの、核内に複数の線状染色体があり多倍体も存在する真菌には利用できない。またヒトと共生する微生物叢に占める真菌の割合は細菌よりも一桁以上低く、さらに微生物叢からのゲノム抽出法は細菌からの DNA 抽出効率を指標に最適化されているため、通常メタゲノム解析では真菌由来のゲノム情報はほとんど得られない。そこで本研究では、このようなほぼ未解明のまま見過ごされてきた難培養真菌のゲノムを解読することを目的として、微生物叢から真菌叢を単離・濃縮したプールを作製してゲノム解析を行う「ミニメタゲノム解析」手法を確立する。

2. 研究の目的

微生物叢から真菌叢を分離・濃縮するためには、真菌を回収するアプローチと微生物叢の大半を占める細菌を分解するアプローチが考えられる。そこで、まず真菌特異的に結合するプローブの作製を行い、磁気分離や FACS ソーティングを用いた真菌の濃縮に取り組んだ。次に細菌と真菌では比重が異なることを利用して細菌と真菌を分離するために、密度勾配遠心法の条件検討に取り組んだ。また、微生物叢から細菌を特異的に溶菌することで除去するために細菌特異的に作用する溶菌酵素の探索と反応条件の検討にも取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 真菌特異的に結合するプローブ作製と親和性が向上した改変体の作出

真菌の細胞表面には β -グルカンや α -グルカンなどの様々な糖鎖が存在し、これらは真菌と細菌を識別する細胞表面マーカーとして利用できる。さらに β -グルカンの中には β -1,3 や β -1,6 といった異なる分岐パターンが存在し、真菌種はそれぞれ細胞表面におけるそれらの糖鎖の含有率が異なることから、真菌を種ごとに識別する細胞表面マーカーとしても利用できるはずである。そこで、 β -グルカン結合ドメイン、 β -1,3 グルカン結合ドメイン、 β -1,3 および β -1,6 グルカン結合ドメインの 3 種類の結合ドメインを用いて蛍光プローブを作製した。モデル系として分裂酵母を用いて、細胞の洗浄の過程におけるプローブの解離を蛍光強度でモニタリングすることで結合親和性を評価した。その結果、ネガティブコントロールの蛍光蛋白質単独と比較してプローブラベルした細胞の蛍光は高く維持されていたが、洗浄の過程でプローブが脱落することが分かった。そこで、これらのプローブの結合親和性の向上を目指してドメインの繰り返し数の検討、ドメインを連結するリンカー配列の検討、シャペロン融合、コドン最適化、翻訳促進配列の挿入などのプローブ配列の最適化を行い、分裂酵母との結合親和性の評価を行った。磁気分離プロトコールについても、磁気ビーズの粒径の検討、マグネットスタンドの磁場の強度などを検討した。実サンプルとしてヒトの糞便を用いて、プローブを添加して洗浄した後に磁気ビーズを加えてマグネットに吸着させた。ゲノム DNA を抽出し、磁気分離前後の細菌と真菌の存在量をそれぞれ 16S rDNA と ITS 領域の qPCR で定量し、真菌の収率と精製度を算出した。

(2) 密度勾配遠心法の検討

真核生物である真菌は原核生物である細菌よりも大きいことから、密度の違いを利用して分離することが可能であると考えられる。そこで、密度勾配遠心法の条件検討に取り組んだ。スクロース、Percoll、Nycodenz の不連続密度勾配を作製し、ヒトの糞便懸濁液を重層して遠心分離を行い、各フラクションの細菌と真菌の存在量をそれぞれ 16S rDNA と ITS 領域の qPCR で定量し、収率と真菌の精製度を算出した。

(3) 細菌特異的な溶菌酵素の探索

微生物叢から細菌を特異的に溶菌することで、微生物叢に含まれる細菌を除去するための酵素の探索を行った。細菌の溶菌で頻りに利用される卵白由来リゾチームは、キチナーゼ活性を示すため真菌を溶菌することが知られている。そこで、細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカン分解するアミダーゼや DL-エンドペプチダーゼなどを利用することを考えた。各酵素でヒトの糞便を処理し、細菌と真菌の存在量をそれぞれ 16S rDNA と ITS 領域の qPCR で定量した。一部の酵素は補因子として Zn^{2+} を必要とすることから、反応系への $ZnCl_2$ を添加や反応時間の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 真菌特異的に結合するプローブ作製と親和性が向上した改変体の作出

β -1,3 グルカン結合プローブ (β -glucan BD1)、 β -1,3 および β -1,6 結合プローブ (β -glucan

BD2), β -グルカン結合プローブ(β -glucan BD)の洗浄操作におけるプローブの細胞からの脱落は、改変前はそれぞれ76%, 84%, 40%であり、多くのプローブが解離していたが、改変後はそれぞれ4%, 6%, 3%に低下しており親和性の向上したプローブが得られた(表1)。またヒト糞便からの磁気分離効率を検討したところ、改変前は真菌の収率が2%以下でありほとんどの真菌が回収できていなかったが、改変後は、42%から70%の収率を示しており多くの真菌細胞が回収できるようになった(表1)。また、3種類のプローブをすべて混合してヒト糞便と混合し、洗浄後に磁気ビーズを加えて回収し蛍光顕微鏡観察を行ったところ、真菌様の細胞が多く観察された。(図1)

表1.真菌特異的な蛍光プローブの結合親和性と真菌の磁気分離効率

	分裂酵母からの解離(%)	磁気分離収率(%)		真菌の精製度
		細菌	真菌	
β -glucan BD1	76	0.28	1.4	5.0
β -glucan BD1 (改変型)	4.0	2.0	42	21
β -glucan BD2	84	0.31	1.9	6.3
β -glucan BD2 (改変型)	6.0	1.8	70	39
α -glucan BD	42	0.31	0.60	11
α -glucan BD (改変型)	3.0	1.9	63	33

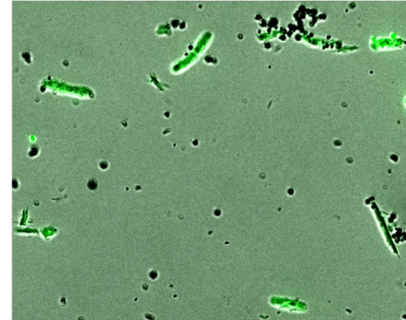


図1. ヒト糞便の磁気分離

(2)密度勾配遠心法の検討

担体としてスクロース、Percoll、Nycodenz を用いてそれぞれ不連続密度勾配遠心を行ったところ(図2(A))、細菌と真菌の含量は各フラクションで異なっており、Nycodenz を用いたフラクションで最も高い真菌の濃縮がみられ(図2(B))、遠心前と比較して真菌と細菌の比率は51倍に上昇していた(図2(C))。

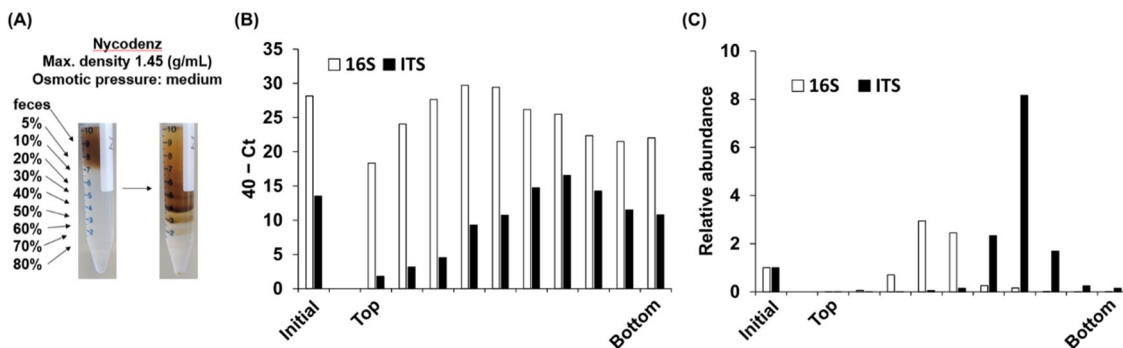


図2. ヒト糞便の密度勾配遠心. (A)代表的な遠心前後のヒト糞便サンプル. (B)qPCR による各フラクションの細菌と真菌の定量結果. (C)正規化後の各フラクションの細菌と真菌の濃縮効率

(3)細菌特異的な溶菌酵素の探索

ヒト糞便を緩衝液のみ、DL-endopeptidase、アミダーゼ、界面活性剤(SDS)でそれぞれ処理し、上清に含まれる16SとITSの含量をqPCRで定量したところ、DL-endopeptidaseとアミダーゼでは緩衝液のみの条件よりも多くの16S rDNAが検出されたが、SDSでは16SだけでなくITSも検出された。またこの細菌特異的なアミダーゼの酵素活性はシャペロン融合や反応系への $ZnCl_2$ の添加でそれぞれ4倍程度上昇した。また反応30分、60分、120分で行ったところ、30分でアミダーゼ非存在下と比較して細菌特異的な溶菌が40倍程度増加し、それ以上伸ばしても変化は見られなかった。これらのことから、酵素処理による細菌特異的な分解が起きており、微生物叢から真菌叢を分離・濃縮するプロトコールにDL-endopeptidaseやアミダーゼが有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------