

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 27日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23760755

研究課題名（和文） 単一細胞技術を用いた海綿内で共存する天然化合物生産細菌の特定およびその培養

研究課題名（英文） Identification of marine biocompound producers within sponges using the single-cell approach and their *in vitro* cultivation

研究代表者

モリ テツシ (MORI TETSUSHI)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：00590100

研究成果の概要（和文）：海洋カイメンからは多くの有用天然化合物が発見されており、本研究では、これらの化合物を作成しているバクテリアを探索・同定するために、新たなアプローチとして、単一細胞解析技術を基盤とした研究を試みた。結果、Onnamide A 化合物の生産菌の同定に成功し、難培養微生物からの化合物の同定を初めて達成した。更に、ゲノム解析を行った結果、この細菌は *Pseudomonas*、*Bacillus* や放線菌に並び、数十種類以上の化合物合成遺伝子クラスターを保有していた。

研究成果の概要（英文）：Marine sponges are considered as the largest producers of highly significant natural compounds. In this research, the goal was to apply the single cell analytical approach to identify the real producers of such important compounds. Targeting the compound Onnamide A, the research was successful in identifying the true producer and reported the first identification of a natural compound producer from uncultivated bacteria. Further genomic analysis also revealed that this bacterium harbored numerous biosynthetic pathways, similar to that of its cultivable counterparts such as *Pseudomonas*, *Bacillus* and actinomycetes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス・化学工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：微生物、海洋資源、生態学

### 1. 研究開始当初の背景

環境中には多くの微生物が存在し、そして、それぞれの環境で生息している微生物がユニークまた多様で有り、その環境に重要な役割を担っている。更に、環境中のみならず、生物の腸内や体内に共生している微生物も多く報告され、宿主と共生関係を保っている。海にも海洋生物から多くの微生物が発見されており、これらの微生物は様々な活性物質や有用化合物の遺伝子資源として注目されてい

る。海洋生物中、特に無脊椎動物であるカイメン（ポリフェラ門、約 15,000 種）からは、産業や医療分野において非常に重要な生理活性を持つ二次代謝産物であるポリケチド、抗生物質、抗腫瘍物質、免疫抑制剤が多く発見されている。カイメンは身体的な防衛機構を欠如しているが珊瑚礁等のような競争的や厳しい環境で生息しており、このような生態系に生き残るためには化学防衛機構を備えている事が知られている。カイメンが多数の細菌

と共生関係にあることから、近年ではカイメンの化学防衛機構に関わっている生理活性物質や二次代謝産物が共生細菌由来であると考えられており、実際にメタゲノム解析により多くの有用物質やこれらを合成する新種のポリケチドシンターゼ (PKS) がカイメン共生細菌から発見されつつある。そのため、これらの共生微生物の特定および培養は、様々なアプローチ (メタゲノム研究、スクリーニングアッセイ等) によって行われてきたが、いずれの手法においても非効率である。

## 2. 研究の目的

共生細菌を取得にあたり、新たな手法が必要とされている。この課題をチャレンジするために、新たなアプローチとして単一細胞解析に着目した。単一細胞解析とは細胞集団内の個々の細胞における状況や機能を解明する解析アプローチであり、今ではフローサイトメトリーやマイクロ流体デバイス等を用いた解析法が主流になっている。しかしながら、単一細胞解析技術を用いた研究のターゲットは多くが酵母や動物細胞で有り、微生物、特にバクテリアでの応用はそれほど盛んに行われていない。

そこで、本研究では、より高効率にカイメン内の共生微生物の特定や培養を行うために、単一細胞技術を用いたアプローチを提案した。単一細胞解析技術を用いる事によって、より迅速にターゲットとしている強制微生物の特定が可能になる。更に、単一細胞レベルでの解析を行うことで、遺伝子解析などがより簡便になり、特定した微生物の特徴および培養条件などを見いだしやすくなる

## 3. 研究の方法

本研究では、*Theonella swinhoei* (黄色および白ケモタイプ) をモデルカイメンとした (図1)。また、このカイメンからすでに多く



黄色ケモタイプ 白ケモタイプ

図 1 モデルカイメンとなった *Theonella swinhoei*

のポリケチドが発見されており、特に *T. swinhoei* からは抗腫瘍物質である Onnamide A または Misakinolide A が検出されている。また、メタゲノム解析を用いた近年の研究で、これらの化合物がカイメン共生細菌由来であることが判明した。

これを基に、初年度は Onnamide A を生産する共生細菌の探索および同定を行った。まず、*T. swinhoei* 内部組織を破壊し、遠心分離によってバクテリア画分を取得した。得られたバクテリア画分をフローサイトメーターで解析した後、単一細胞を 96 穴ウェルプレートにソートした。続いて、ソートした単一細胞に対し、細胞破碎を行い、Multiple displacement amplification (MDA) 法によりホールゲノム増幅を行った。ここで、Onnamide A 生産共生細菌の探索や同定を行うために、ゲノム増幅後のサンプルに対し、先に、Nested-PCR により Onnamide A 合成 PKS 遺伝子断片の増幅を行った。最後に Onnamide A 合成 PKS 遺伝子断片が確認されたサンプルに対し、16S rRNA 解析を行い、Onnamide A 生産共生細菌を同定した。Misakinolide A 生産菌の探索においては上記と同様に行った。

次年度では Onnamide A 生産菌の培養条件を見いだすためには、次世代シーケンサーを用いて、バクテリアのゲノムの解読を試みた。

## 4. 研究成果

初年度には、Onnamide A および Misakinolide A の生産菌の同定を行うためには、*T. swinhoei* から得られたバクテリア画分に対し、フローサイトメーターを解析した事で、*T. swinhoei* には数十マイクロメートルのフィラメントバクテリアや数マイクロメートルの単一バクテリア集団が生息することが確認された。ここで、それぞれの細胞集団に対し、フローサイトメーターで単一細胞をソートした後、MDA 法および Nested-PCR で Onnamide A 合成 PKS 遺伝子断片の増幅を行った。その結果、48 ウェル中、16 ウェルから PCR 産物の増幅が確認され、また、シーケンス解析により、全ての増幅断片が Onnamide A 合成 PKS 遺伝子の配列と一致した。Onnamide A 合成 PKS 遺伝子のポジティブウェルを 16S rRNA 解析で確認した所、全てのウェルから “*Candidatus Entotheonella* sp.”であるフィラメントバクテリアが同定された。このように、単一細胞解析を行うことで Onnamide A を生産する菌体に直接関連付ける事に成功し、また、16S rRNA 解析により、その生産菌の同定にも成功した (図 2)。しかしながら、Misakinolide A の生産菌の探索は本研究期間中に未だに見つかっておらず、本化合物を作成しているバクテリアはおそらく *T. swinhoei* バクテリア画分内の非常に小さな割合を占めている事が考えられる。現在でも、Misakinolide A の生産菌の探索を継続している。

次年度には、Onnamide A の生産菌が同定されたことにより、次世代シーケンサーを用いて、この細菌のゲノムの解読を行った。本解析の結果から、驚くことにこの細菌は *T. swinhoei* から検出されている、天然化合物の多くの合成遺伝子クラスターを保有していたことが示唆された。難培養微生物から、*Bacillus*, *Pseudomonas* や放線菌に並ぶ、多く天然化合物合成遺伝子クラスターを保有しているバクテリアの発見は初めてである。

本研究では、単一細胞解析技術を導入することで、より迅速に細胞のスクリーニング

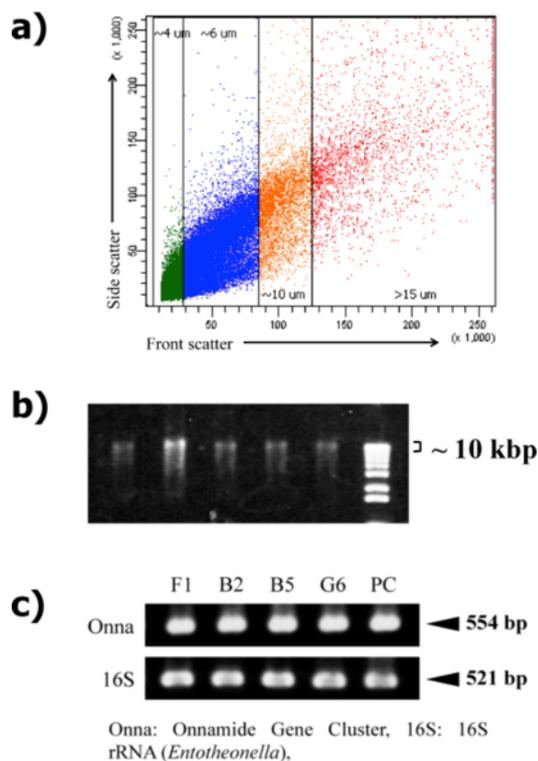


図2 Onnamide A 生産菌の探索・同定。a) フローサイトメーターを用いたバクテリア画分の解析、b) MDA 法による単一細胞からのゲノム増幅の確認、c) Nested-PCR による、Onnamide A 合成遺伝子および 16S rRNA の増幅の確認。こちらでは 16 ウェルの内 4 ウェルの結果のみを示す。

を行う事が可能になっただけでなく、細胞からの遺伝子情報も取得することが可能である。今後の展望としては、解読したゲノム情報を基に、本研究で発見した Onnamide A の生産菌の性質を見だし、培養を試みる予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- Hosokawa M, Hayashi T, **Mori T**, Yoshino T, Nakasono S, Matsunaga T: “Microfluidic device with chemical gradient for single-cell cytotoxicity assays.” *Anal Chem.* 83(10): 3648-54. Epub 2011 Apr 28. (2011)

[学会発表] (計 6 件)

- Mori T**, Matsunaga S, Piel J, Takeyama H. Identification of marine natural compound producers using flow cytometry, *International Joint Symposium on Single-Cell Analysis*, Kyoto, JAPAN,

November 2012 (ポスター発表)

研究者番号 : 00590100

2. **Mori T**, Hoch M, Takeyama H. Establishment of a bacterial engineering and analysis system, *German-Japanese Joint Summer Symposium on Health Span Dynamics*, Bonn, GERMANY, September 2012 (口頭発表)
3. **Mori T**, Sawada Y, Matsunaga S, Piel J, Takeyama H. Defining the producers of marine natural compounds using the single-cell approach, *The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference*, Kouchi, JAPAN, July 2012 (口頭発表)
4. **Mori T**, Loch G, Piel J, Hoch M, Takeyama H. Understanding microbial ecosystems by applying quantitative and single-cell analytical techniques, *German-Japanese Joint Symposium for Diamond Researchers on Sustainable Life Science Innovation and Biomedical Research*, Bonn, GERMANY, December 2011 (口頭発表)
5. **Mori T**, Piel J, Matsunaga S, Takeyama H. Identification of polyketide synthase gene clusters from bacterial cells isolated from a marine sponge, *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress*, Sapporo, JAPAN, September 2011 (口頭発表)
6. **Mori T**, Hoch M, Piel J, Takeyama H. Single-cell analysis and its application in analyzing microbial ecosystems, *2011 International joint meeting of Bonn University, Waseda University, University of Yamanashi and Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT)*, Tokyo, JAPAN, June 2011 (口頭発表)

[図書] (計 1 件)

1. 竹山春子、**モリテツシ**、庄子習一: 「ナノ融合による先進バイオデバイス」 民谷栄一 監修、(分担執筆: 第 2 編 応用技術、第 14 章 マイクロ流体デバイスのバイオ計測への応用の項), シーエムシー出版, 258-267 (2011)

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

モリ テツシ (MORI TETSUSHI)  
所属: 早稲田大学 理工学術院