

新規生理活性物質生産株の超ハイスループット

スクリーニングプラットフォーム構築

Development of platform for ultra high-throughput screening of novel bioactive compound producers

課題番号：17H06158

竹山 春子（HARUKO, TAKEYAMA）

早稲田大学・理工学術院・教授



研究の概要（4行以内）

本研究では、環境中の未知微生物から生理活性物質生産株をハイスループットにスクリーニングする技術の確立を目的としている。微生物二次代謝産物のラマンスペクトラムデータベースを構築し、シングルセルレベルで微生物のラマンスペクトラムを取得し生理活性物質生産者を探索する。また、シングルセルゲノム解析から生理活性物質産生遺伝子機構を獲得する。

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：ラマン分光、データベース、生理活性物質、シングルセル解析、難培養微生物

1. 研究開始当初の背景

創薬に資するリード化合物として、現在までに 20000 種以上の生理活性物質が微生物から発見されている。例えば、海綿動物からは数多くの生理活性物質が発見されるが、これらの多くは、海綿に共生している微生物が生産したものである。このような生理活性物質生産株の解析のために単離培養が試みられてきたが、未だ多くの共生微生物は難培養であり、その特性には多くの謎が残されている。生理活性物質生産に関与する代謝遺伝子群を理解することが出来れば、新たな創薬リード化合物の獲得や生産に繋げることができる。このためには、多様な微生物から新規の生理活性物質の生産者を効率よく探索し、ハイスループットに培養または代謝遺伝子群の取得を試みることができる新たなプラットフォームが求められる。

2. 研究の目的

本研究では、陸由来、海洋由来の豊富な生理活性物質生産微生物のライブラリーを元に微生物二次代謝産物のラマンスペクトラムデータベースを構築する。さらに、環境中の未知微生物から生理活性物質生産株をハイスループットにスクリーニングするために、ドロップレットを基礎としたシングルセルラマンスペクトラム取得と微生物単離の機構を統合する。また難培養微生物については、シングルセルからゲノム情報を取得する。得られた新規生理活性物質遺伝子群の機能解析を進め、新しい創薬リード化合物スクリーニング技術として確立する（図1）。

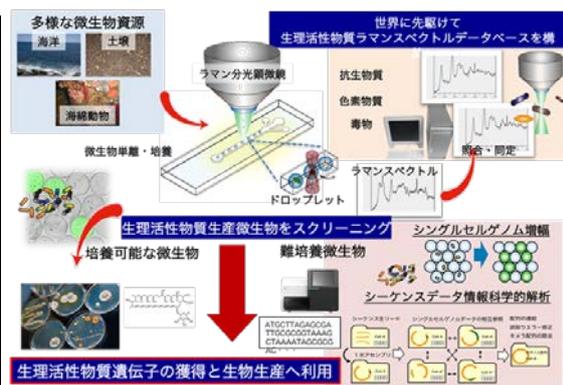


図1 生理活性物質生産微生物の高速スクリーニングと利活用

3. 研究の方法

初年度から陸由来、海洋由来の豊富な生理活性物質生産微生物のライブラリー（連携研究者保有）を元に微生物二次代謝産物のラマンスペクトラムデータベースの構築を開始し、検索インターフェース、解析ツール等の開発も同時に進めた。さらに、環境中の未知微生物から生理活性物質生産株をハイスループットにスクリーニングするために、要素技術を個別に開発し、3年目までにラマンスペクトラム取得・培養・ゲノム解析の技術を統合し、難培養微生物の解析に適用する。情報科学的解析法は、モデルゲノムを対象に開発を進め、上記システム完成次第、実サンプルに適用した。

4. これまでの成果

1) 微生物二次代謝産物のラマンスペクトラムデータベースの構築

本年度までに 350 種類の化合物の計測を行

い、ウェブベースで試験運用 DB へのデータ拡充を行った。また、市販の顕微ラマン分光計を分子同定に汎用的に活用するため、測定機器の設定やスペクトル標準化のためのプロトコル策定を行い、標的化合物スペクトルの正確な波数及び強度の校正を行うプロトコルの構築および自動化を行った。さらに、未知スペクトルの同定においても同定分子の候補、スペクトル、合致度などを表示できるウェブインターフェースを整備した。

また、生体試料を対象としたラマン分光測定に向け、多変量スペクトル分解 (MCR) を適用し、混合物由来の重畳したスペクトルから構成分子各々のスペクトルの分離・抽出・同定を可能にした。さらに、類似の骨格を持つ生理活性物質でも、官能基などの違いによるスペクトルの変化を捉え、混合物中での各成分の分子同定ができるシステムを構築した。

2) シングルセル解析のためのドロップレットマイクロフローシステム構築

真菌・放線菌を標的とした *in situ* シングルセル測定に応用した。真菌 *Penicillium chrysogenum* を対象とした解析の結果、各生体分子に由来する純粋なスペクトル成分が分離・抽出され、タンパク質や脂質の影響によりこれまで分離検出が困難であった生理活性物質 penicilin G の同定および菌体内での局在分布を可視化することに初めて成功した。

さらに、国際共同研究として、カイメン共生微生物を標的とした *in situ* シングルセルラマン解析およびシングルセルゲノム解析を組み合わせた解析を行った。標的微生物に対してラマンスクリーニングを行い、二次代謝産物 aurantoside を蓄積する微生物を特定した。続いて、シングルセルゲノム解析を行うことで、該当微生物が aurantoside 生合成遺伝子群を有することが確認された。さらに、aurantoside 産生微生物の全ゲノム情報を用いて性状解析を行った結果、該当微生物が新規系統分類に属する未培養 *Chloroflexi* 門細菌であることが明らかとなり、カイメン内での生き残り戦略の一端が明らかになった。

3) シングルセルゲノミックスによる新規生理活性物質遺伝子群の解析

微生物の高精度な性状解析手法として、ドロップレットを用いた新しいシングルセルゲノム解析技術 SAG-gel (Single-cell amplified genome in the gel beads) 法を開発した (発表論文 2, 4)。本手法では、微生物を封入したドロップレットをゲル化させ、内部に DNA を保持しながら多段階の溶菌処理を行うことで、効率的な溶菌・全ゲノム増幅が行われる。本手法により、多様かつ大規模な解析が可能になり、他大学や他の研究機関・企業を含め、当初の予定を超えた幅広い環境微生物への応用が展開された。具体的な応用例として、

ヒト・マウス由来腸内細菌、サンゴ・昆虫共生細菌、土壌(土漠・海泥・根圏)細菌、海洋性細菌、感染性細菌、空中浮遊細菌などが挙げられる。また、得られた配列情報を効率的に解析する手法の開発にも並行して取り組んでいる。

5. 今後の計画

確立した技術を未知微生物解析に適用させ、生理活性物質の新規遺伝子クラスターの取得とその機能解析などを進める。本技術の有用性を環境サンプルの解析から実証する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む) 【論文・著書・雑誌】

1. Miyaoka R., Ando M., Harada R., Osaka H., Samuel A. Z., Hosokawa M., Takeyama H., Rapid inspection method for investigating the heat processing conditions employed for chicken meat using Raman spectroscopy., *J. Biosci. Bioeng.*, S1389-1723(19)30990-9., 2020 年
2. Chijiwa R.†, Hosokawa M.†, Kogawa M., Nishikawa Y., Ide K., Sakanashi C., Takahashi K., Takeyama H. (†equally contributed), Single-cell genomics of uncultured bacteria reveals dietary fiber responders in the mouse gut microbiota., *Microbiome*, 8(1) 5, 2020
3. Kogawa M., Hosokawa M., Nishikawa Y., Mori K., Takeyama H., Obtaining high-quality draft genomes from uncultured microbes by cleaning and co-assembly of single-cell amplified genomes., *Sci. rep.*, 8(1) 2059, 2018 年
4. 細川正人、小川雅人、竹山春子、実験医学増刊「マイクロバイオームのシングルセル解析」、Vol.37 No.20、羊土社、2019 年(分担執筆)
5. 細川正人、小川雅人、竹山春子、バイオサイエンスとインダストリー (B & I) 「環境微生物を対象としたシングルセルゲノム解析の最前線」、Vol76 no.5、バイオインダストリー協会、2018 年
他 10 件

【特許・新聞掲載】

- ・産業財産権：PCT/JP2019/ 17952 および TW108114660、シングルセル解析を行う方法およびそのための装置、平成 31 年 4 月 26 日 他 6 件
- ・新聞報道：日経産業新聞 2020 年 1 月 31 日

7. ホームページ等

竹山研究室ホームページ

[http:// www.f.waseda.jp/haruko-takeyama/](http://www.f.waseda.jp/haruko-takeyama/)