

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22451

研究課題名（和文）アメーバ共生系を基盤とする新規微生物の探索

研究課題名（英文）Identification of novel microbes using cocultivation with Acanthamoeba

研究代表者

永井 宏樹（Hiroki, Nagai）

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80222173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、共生菌研究や巨大ウイルス研究において宿主として利用されているアカントアメーバをモデル宿主として利用し、環境中より新たなアメーバ寄生・共生微生物を探索した。残念ながら CPR細菌に代表されるような、新門ダークマター微生物を単離することはできなかったが、新種・新属以上の新規性をもつ放線菌門細菌および巨大ウイルスを複数、単離・解析することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で単離したアメーバ寄生・共生微生物は、これまで培養不能であることなどから記載されることがなかった新規微生物である。本研究の成果は、アメーバ寄生性の病原微生物や巨大ウイルスの進化の理解を新たに方向づけるだけでなく、地球上の生命の起源や進化について新たな光明を照らすものになると期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study utilized Acanthamoeba, which is commonly used as a host in symbiotic microorganism and giant virus research, as a model host to explore new amoeba-parasitic and symbiotic microorganisms from the environment. Unfortunately, we were unable to isolate novel phylum "dark matter" microorganisms such as CPR bacteria. However, we were able to isolate and analyze several Actinobacteria and giant viruses that have novelty at the level of new species/genera or higher.

研究分野：細菌学

キーワード：アカントアメーバ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこの25年、ヒト病原細菌でありアメーバを自然宿主とするレジオネラの宿主細胞内生・増殖機構の研究を続けてきた(1-7)。レジオネラの病原性・細胞内寄生性には、レジオネラが持つIV型分泌系が必須である。今日までに、レジオネラは全タンパク質のおよそ1割に相当する300以上のエフェクターを持つことが明らかにされているが、8割方のエフェクターは既知のタンパク質と相同性を欠き、機能や進化的起源が明らかでない。一方で、2003年に初めて報告されたアカントアメーバ巨大ウイルスは、多数の細菌・ウイルス・真核生物由来遺伝子を持ち、このことはアメーバが遺伝子の水平伝播の場を与えていることを示唆している。これらのことから、レジオネラエフェクターの起源におけるミッシングリンクが、未知のアメーバ寄生・共生微生物に求められるのではないかと考えた。さらに2010年台以降の急速な次世代シーケンシング技術の発展が明らかにしたCPRクレードの存在は、培養系が存在しないためこれまで全く知られていなかった膨大な数のダークマター微生物が存在していることを示唆している。我々はレジオネラの自然宿主としてアカントアメーバを日常的に利用しており、レジオネラや共生細菌研究で培った共培養技術を活用することによって、未知のダークマター微生物が単離・培養できるのではないかとこの着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究は、共生菌研究や巨大ウイルス研究において宿主として利用されているアカントアメーバをモデル宿主として利用し、環境中より新たなアメーバ寄生・共生微生物を探索し、CPR細菌に代表される新規ダークマター微生物を単離・培養・解析することより「新たな生命観」を確立することを目的とする。

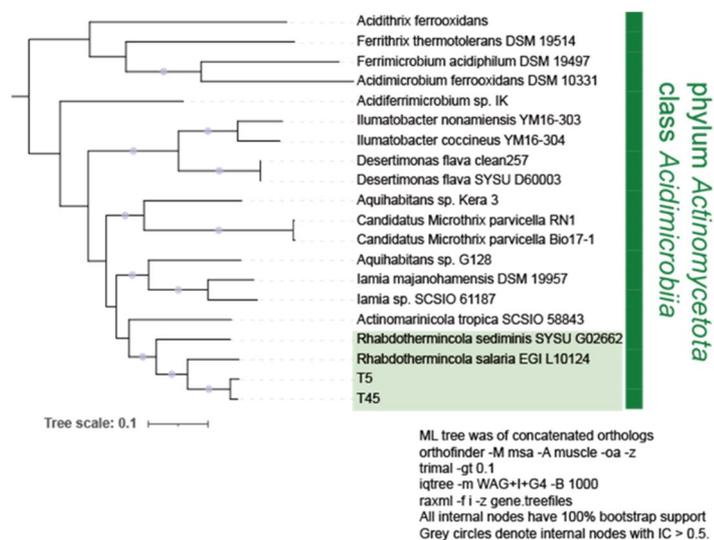
### 3. 研究の方法

本研究では、まずアカントアメーバに寄生・共生することによってのみ増殖できる微生物を環境から分離する。サンプルはアメーバが生息する淡水環境(河川、湖水)、生活環境(下水、空調設備冷却塔)、土壌環境から収集し、低濃度の抗真菌剤(アムホテリシン B)に馴化させたアカントアメーバ株と緩衝液中で共培養する。この共培養サイクルを複数回繰り返すことにより現れてくる微生物があれば、自立増殖能を検定するため固形寒天培地等での増殖能を検定し、増殖するものは研究の対象としない。単離されたアメーバ寄生・共生微生物について、まずアメーバ共培養下での限界希釈によりクローンを得る。得られたクローンについて、電子顕微鏡観察によりウイルスあるいは細菌に特徴的な構造の探索を行う。またPCR法により、細菌16S rDNAあるいは既知の巨大ウイルス特異的配列の検出を試みる。検出された場合、PCR断片のサンガーシーケンシングにより分類決定を行う。以上の解析によっても分類不能な場合、あるいはCPR細菌であることが予想される場合、コンプリートゲノムを決定する。これらにより得られた配列情報を利用して系統解析を行い、生物あるいはウイルス系統樹における位置を決定する。

### 4. 研究成果

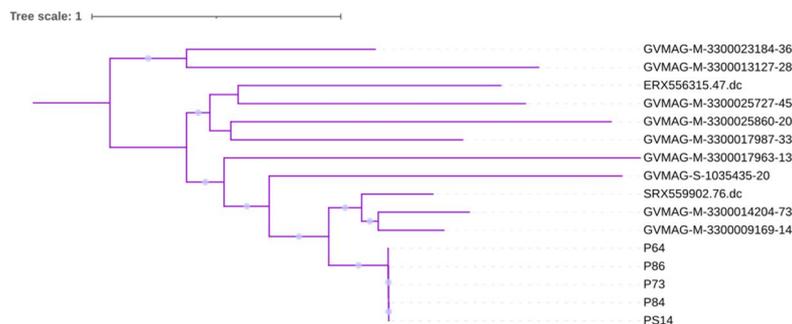
環境中より分離した候補微生物約150について、まずはPCRによる同定を行った。その9割弱は細菌であり、ほとんどがプロテオバクテリア門細菌と一部バクテロイデス門細菌で占められていた。この結果は土壌・淡水環境中の細菌叢を構成する細菌として、これまでの知見に矛盾しない。例外として、2種の放線菌門細菌(T5, T45)を見出した。これらはSSU rRNAの解析において既知の細菌との相同性が95%を下回っていたことから、次世代シーケンシングにより完全ゲノムを決定した。系統樹解析の結果、アシディミクロビウム綱

*Rhabdotherrhincola* 属と同クレードに属する新規細菌であることが明らかとなった。ANI(Average Nucleotide identity)解析で相互間のスコアは90.8%、原核生物 refseq ゲノム



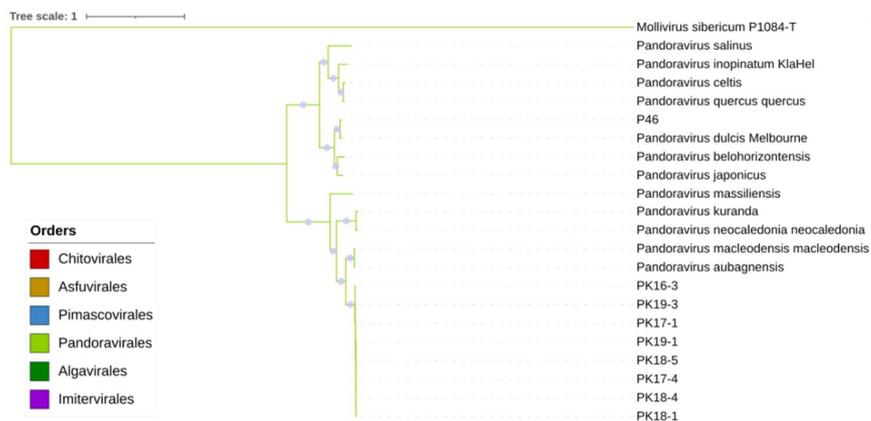
中最も高いスコアを示す細菌との間は 81.4%であり、このことは当該菌株が新属以上の新規性を有していること、2 株は同属異種であることと矛盾しなかった。

残る 1 割強は巨大ウイルスと推定されたため、特異的なプライマーセットによる PCR 解析を行ったところ、8 割 (15) はアメーバを宿主とする既知のミミウイルス科 (Mimiviridae) に属することが明らかとなった。同様の解析により、1 つは新規パンドラウイルス(後



述 P46)であることが明らかとなった。PCR で帰属不明の 5 株 (P64, P86, P73, P84, PS14) については次世代シーケンシングにより完全ゲノムを決定したところ、全てが長大な末端配列 (~285kbp) を持つ、全長約 1.6Mbp の線状ゲノム構造を持つことが示唆された。系統解析の結果、*Imitervirales* 目クレード IM\_14 に属する新規クレードを構成することを明らかにした。IM\_14 に属する他のウイルスゲノムは全てメタゲノム解析から得られたものであり、単離されたウイルスとしては初めてのものと考えられる。

並行研究として行っていた新学術領域において、モデル圃場土壌中に多くのパンドラウイルスが存在することが予想されたため、



パンドラウイルスの物理的性状を利用し、パンドラウイルスに特化したスクリーニング法を確立した。実際にスクリーニングを行った結果、これまでに 8 株の新規パンドラウイルス (PK 株群) の単離することができた。先に分離していた新規パンドラウイルス (P46) とともに次世代シーケンシングを行い、すべての完全ゲノムを決定した。系統解析の結果、先に分離していた P46 はパンドラウイルスクレード A に属しており、*Pandoravirus dulcis* Melbourne に非常に近縁 (ANI 99.1%) であることが明らかとなった。一方で本領域モデル圃場から同定した 8 株はパンドラウイルスクレード B に属しており互いに近縁であったが、既知株との間の ANI (Average nucleotide identity) は最大でも 85%にとどまり、この今回単離したグループの新規性が示唆された。今回の解析により、これまでゲノムが報告されているパンドラウイルス株と同数程度の新規パンドラウイルスを単離・解析できたことになる。この結果は、既存の研究は自然界に存在するパンドラウイルスを量的に過小評価していることを示唆している。

#### 引用文献

1. Nagai H, Kagan JC, Zhu X, Kahn RA, Roy CR. A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on Legionella phagosomes. Science (1979). 2002;295(5555):679–82.
2. Nagai H, Cambronne ED, Kagan JC, Amor JC, Kahn RA, Roy CR. A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the Legionella RalF protein to host cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(3):826–31.
3. Kubori T, Shinzawa N, Kanuka H, Nagai H. Legionella Metaeffector Exploits Host

- Proteasome to Temporally Regulate Cognate Effector. Stebbins CE, editor. PLoS Pathog [Internet]. 2010 Dec 2;6(12):e1001216. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1001216>
4. Kubori T, Koike M, Bui XT, Higaki S, Aizawa SI, Nagai H. Native structure of a type IV secretion system core complex essential for Legionella pathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(32):11804–9.
  5. Kitao T, Taguchi K, Seto S, Arasaki K, Ando H, Nagai H, et al. Legionella Manipulates Non-canonical SNARE Pairing Using a Bacterial Deubiquitinase. Cell Rep [Internet]. 2020 Sep;32(10):108107. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124720310962>
  6. Kubori T, Lee J, Kim H, Yamazaki K, Nishikawa M, Kitao T, et al. Reversible modification of mitochondrial ADP/ATP translocases by paired *Legionella* effector proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet]. 2022 Jun 7;119(23). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2122872119>
  7. Warren GD, Kitao T, Franklin TG, Nguyen J V., Geurink PP, Kubori T, et al. Mechanism of Lys6 poly-ubiquitin specificity by the *L. pneumophila* deubiquitinase LotA. Mol Cell [Internet]. 2023 Jan;83(1):105-120.e5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276522011352>

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 0件）

1. 著者名 Yamagishi Junya, Hayashida Kyoko, Matsuo Junji, Okubo Torahiko, Kuroda Makoto, Nagai Hiroki, Sekizuka Tsuyoshi, Yamaguchi Hiroyuki, Sugimoto Chihiro	4. 巻 65
2. 論文標題 Complete genome and bimodal genomic structure of the amoebal symbiont Neochlamydia strain S13 revealed by ultra-long reads obtained from MinION	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 41 ~ 48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-019-0684-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroki Nagai
2. 発表標題 Identification of novel microbes using cocultivation with Acanthamoeba
3. 学会等名 第35回日本微生物生態学会札幌大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永井宏樹
2. 発表標題 病原菌の細胞内寄生の分子基盤とその進化
3. 学会等名 第50回東海乳酸菌研究会研究報告会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永井宏樹
2. 発表標題 Identification of novel microbes using cocultivation with Acanthamoeba
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永井宏樹
2. 発表標題 Identification of novel microbes using cocultivation with Acanthamoeba
3. 学会等名 日本細菌学会第95回総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永井宏樹
2. 発表標題 病原菌の細胞内寄生の分子基盤とその進化
3. 学会等名 第49回東海乳酸菌研究会研究報告会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久堀智子、北尾公英、永井宏樹
2. 発表標題 Vacuole manipulation by Legionella deubiquitinases
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北尾公英、久堀智子、永井宏樹
2. 発表標題 細菌の病原性制御システム
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北尾公英、田口馨一郎、瀬戸真太郎、新崎恒平、安藤弘樹、永井宏樹、久堀智子
2. 発表標題 宿主SNARE pairing を操作するレジオネラエフェクターの解析
3. 学会等名 第56回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoe Kitao, Kohei Arasaki, Shintaro Seto, Kyoichiro Taguchi, Hiroki Nagai, Tomoko Kubori
2. 発表標題 Legionella manipulates non-canonical SNARE pairing by the function of a bacterial deubiquitinase
3. 学会等名 Microbial Adhesion and Signal Transduction, Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室webページ <a href="https://sites.google.com/view/nagai-lab/home">https://sites.google.com/view/nagai-lab/home</a> 所属部局研究紹介webページ <a href="https://www.med.gifu-u.ac.jp/research/grad/legionella/">https://www.med.gifu-u.ac.jp/research/grad/legionella/</a>
---

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
---------	---------