

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08355

研究課題名(和文) シデロフォアの網羅的多様性解析と難培養性細菌の増殖培養への応用に関する研究

研究課題名(英文) Study on comprehensive diversity analysis of siderophore and its application to growth culture of refractory bacteria

研究代表者

河村 好章 (Kawamura, Yoshiaki)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：80262757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発したHybrid-CAS培地により、常法のCAS培地では不可能であったグラム陽性菌のシデロフォア産生も検出できるようになり、多くのグラム陽性菌もシデロフォアを産生していること、シデロフォアを産生する嫌気性菌も見出すことができ、新知見を得ることができた。環境から分離した菌株もシデロフォアを産生している株が多数存在していた。分類学的に新規の細菌も見出すことができ、現在新菌種提案の論文化を行っている。その新菌株が産生するシデロフォアの分子種特定も現在行っており、今後も分子種決定まで進めたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物の発育に鉄は必須の元素である。環境中の鉄を効率よく利用するため多くの細菌では、シデロフォアと呼ばれる鉄キレート物質を産生している。シデロフォアの役割を詳細に解明することは、微生物の増殖あるいは発育抑制にも利用できる。

本研究では、シデロフォア研究の基礎となる、シデロフォアの検出系、鉄含有量を制御した培地の作成方法を確立した。さらに環境中に生息する細菌の多くがシデロフォアを使って鉄獲得競争を行っている一端が見られた。今まで以上に多様なシデロフォアが存在していると考えられ、それらを詳細に検討することで、今後鉄の制御により細菌の制御ができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The Hybrid-CAS medium we developed makes it possible to detect siderophores production of Gram-positive bacteria, which has not been possible with conventional CAS medium. We could detect many Gram-positive bacteria are producing siderophores. We also found firstly that the anaerobic bacterium produced siderophores. These new knowledges were able to be obtained, in this study.

Many strains isolated from the environment also produced siderophores. New taxonomic bacteria can also be found, and a new bacterial species proposal is currently being prepared. We are currently identifying the molecular species of the siderophore produced by the new strain, and we would like to proceed to molecular species determination in the future.

研究分野：細菌一般、系統分類学

キーワード：シデロフォア 鉄 細菌生存戦略

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難培養性細菌の培養およびシデロフォア研究の現状

微生物は培養を基礎に発展し、現在に至っている。1990年代以降、分子生物学的アプローチがなされ、自然界には膨大な数の微生物資源が眠っていることが指摘された(Ward DM et al, Nature, 345:63, 1990)。現在培養に成功し、分類学的に名の付いている細菌は約15,000種存在するが、実際に存在する細菌の1%にも満たないと報告もある。一例として、土壌1g中には 10^9 個の原核生物が存在し、種の数としては100万種以上が存在していると言われている(Gans J et al, Science, 309: 1387, 2005)。しかし、これまでの人工培地を駆使しても、この土壌からは、せいぜい100種類の微生物しか培養できない。培養に成功していない難培養性細菌には、1)生育速度が著しく遅い、2)寒天でコロニー形成しない、3)一定濃度の細胞濃度が必要、4)共培養生物が必要、5)濁度として認識できないレベルで静止期に移行する、などの様々なタイプが存在する。2)寒天に関しては、近年、agar中の発育阻害物質 - フランカルボン酸が見出された(Hara S et al, PLOS One 7: e41142, 2012)。我々もこれに着目し、agarを使わず、ゲランガム(Tamaki H et al, Environ Microbiol, 11: 1827, 2009)やカラジナンといったゲル化剤を使用した培地を作成したが、その効果は非常に限定的であった。5)のような要因をもつ微生物は、今のところ培養不能菌として位置付けざるを得ないが、3)や4)については、クオラムセンシングの考慮や他の微生物の代謝物を補完する事により、増殖培養可能となる可能性が高い。このような状況のもと、近年、周囲環境から鉄を取り込むための鉄キレーターとしてのシデロフォアに注目が集まっている。

2010年以降、シデロフォア産生菌との共培養による培養できなかった細菌の増殖(D'Onofrio et al, Chem Biol 17: 254, 2010)やシデロフォアを含む土壌成分添加による難培養性細菌の増殖培養の成功とそこからの新規抗菌物質単離(Ling LL et al, Nature, 517: 455, 2015)などの報告が相次いでいる。一方でヒトの好中球分泌顆粒中の分子がシデロフォアに結合することから、感染制御に応用(Goetz DH et al, Mol Cell, 10:1033, 2002)、細菌細胞との親和性を利用した新薬シデロフォアセファロスピリンの開発、などシデロフォア研究がますます盛んに行われている。

2. 研究の目的

シデロフォアは、一般に産生する菌種に固有であり、他の菌種は利用できないとされている。しかし一部の分子(desferrioxamineなど)については複数の菌種が利用でき、近年D'Onofrioら(Chem Biol 17: 254, 2010)は、環境から単離した細菌が産生するシデロフォアを他の菌種が利用している事を小規模ながら示した。このことは、少なくともある種のシデロフォア分子は、複数の菌種が利用可能な事を示している。しかし、この点を精査した報告例は、ほとんどない。

本申請研究では、各種シデロフォアの産生菌/受容菌の網羅的な関係を分類学のレベルで明らかにしたカタログを作成し、それをもって、難培養性細菌の増殖培養を可能にすること、さらに、培養可能となったりリソースから有用物質を探索する道筋をつけることを目指す。

3. 研究の方法

シデロフォア産生菌の検出法の確立

研究当初は、すでに論文化されているCAS培地により、グラム陰性菌のみならずグラム陽性菌も増殖およびシデロフォアを検出可能であると考えていたが、グラム陽性菌は発育阻害物質の影響により、CAS培地では発育できないことが明らかとなり、グラム陽性菌も効率よく検出できる培地の開発を行った。具体的には、グラム陽性菌の発育を支持する部分とシデロフォア検出部分を1枚のプレートに融合した、Hybrid-CAS培地を作成した。

鉄欠乏培地の作成と鉄欠乏条件下での大腸菌の発育状況

培地成分における鉄の含有量を、原子吸光度計およびメタロアッセイ鉄(メタノジョニクス社)キットを用いて測定し、さらに鉄キレート剤により鉄除去を行い、細菌が発育に要する鉄濃度以下の培地を作成した。

大腸菌におけるシデロフォア関連遺伝子の保有状況およびEntC欠損株の作成

他の細菌の産生するシデロフォアを受容する細菌のモデルとして、もっとも研究の進んでいる大腸菌を選び、シデロフォア関連遺伝子の保有状況について調べ、さらにその中で遺伝子1種類のみを保有している菌株を選定し、その欠損株の作成を試みた。欠損株の作成方法は常法に従い、entC遺伝子上流ならびに下流を結合してフラグメントを作成、相同組み換えにより、遺伝子欠損株を得た。

ライブラリーを使ったシデロフォア産生性の確認

当研究室ライブラリーPAGUおよび岐阜大学ライブラリーGTCを使用し、多様な細菌のうち、どのような菌種がシデロフォアを産生しているかを上述のCAS培地およびHybrid-CAS培地を使い、スクリーニングした。

環境分離株におけるシデロフォア産生菌の探索と分類学的検討

湖沼および土壌からのシデロフォア産生菌を検出し、単離したのち、その分類学的位置の検討を行った。

環境菌の産生するシデロフォアの分子種の決定

環境由来のシデロフォア産生菌で分類学的に新菌種と予想されて菌株は、未知のシデロフォアを産生している可能性が高い。そこで、環境菌が産生しているシデロフォア画分を生成し、その分子種の決定を行った。

4. 研究成果

シデロフォア産生菌の検出法の確立

グラム陰性菌については、既報の CAS 培地にて、菌の増殖ならびにシデロフォアの産生を検出することが可能であった。一方でグラム陽性菌のその多くが、CAS 培地上では発育が阻害され、増殖しなかったためシデロフォアの産生も確認できなかった。そこで、多様なグラム陽性菌の発育を支持しつつ、色調変化が容易に観察できるように、透明～半透明で色の薄い基礎培地に血清添加をした「発育支持部」と、CAS 成分による「シデロフォア検出部」を 1 枚の平板に融合した Hybrid-CAS 培地を作成した。この Hybrid-CAS 培地において菌の発育が十分にみられ、一部は CAS 検出部まで発育が及んでいた。CAS 検出部での菌の発育ならびに発育部と検出部の境界線付近において、シデロフォア産生の有無が観察できた。

以上の 2 つの培地、CAS 培地および Hybrid CAS 培地を使うことによりグラム陰性菌～陽性菌に渡る広範囲の細菌でのシデロフォア産生を検出する系が出来上がった。

鉄欠乏培地の作成と鉄欠乏条件下での大腸菌の発育状況

各種培地構成成分（糖類、タンパク質、寒天など）には、一定量の鉄が含まれている。十分量の鉄が存在する場合、シデロフォア産生菌であってもシデロフォア産生量は限られてくる。この問題を解決するため、各種の培地構成成分の鉄含有量を測定した。その結果をもとに鉄欠乏状態を作り出すため、鉄キレート剤を使用し、培地中に含まれている鉄を可能な限り除去する系を確立した。更にガラスに付着している鉄分を混入させないため可能な限りプラスチック容器を使用するなど、鉄の混入にも細心の注意を払った。このようにして作成した培地上では大腸菌の発育が著しく抑制されていることから、鉄の除去による発育への影響が見て取れた。また各種鉄濃度に調整した培地に大腸菌を接種した時のシデロフォアの相対的な量を観察したところ、鉄濃度が少ないほどシデロフォアが産生されていることがわかった。

以上のことから、鉄含有量を制御した培地の作成、ならびに、シデロフォアを多く産生させるための培地の条件を設定することができた。

大腸菌におけるシデロフォア関連遺伝子の保有状況および EntC 欠損株の作成

大腸菌は、シデロフォアとして enterobactin, salmochelin, yersiniabactin, aerobactin の 4 種を有していることが知られている。それぞれ遺伝子配列から PCR 検出系を構築、保有状況を確認したところ、当講座 PAGU ライブラリーにある大腸菌 9 株のうち、1 株が 4 種全て、2 株が 3 種のシデロフォア、残る 6 株は enterobactin のみを保有していることが分かった。その enterobactin のみ保有する菌株を使い、enterobactin 遺伝子 EntC をノックアウトして、シデロフォア産生能を欠いた菌株の構築を試みた。相同組み換え用のフラグメントの作成には成功したが、最終的な相同組み換えにて、シデロフォア産生能を減じる兆候は見られなかった。

ライブラリーを使ったシデロフォア産生性の確認

当講座の菌株ライブラリー-PAGU および岐阜大学医学部の菌株ライブラリーの菌株、グラム陰性菌 170 株およびグラム陽性菌 220 株を試験したところ、グラム陰性菌 88 株、グラム陽性菌 53 株においてシデロフォア産生を検出した。シデロフォア産生率としてはグラム陰性菌が 51.8%、グラム陽性菌が 24.1%であり、多様なグラム陰性菌がシデロフォアを産生している傾向が見られた。今まで多様なグラム陽性菌でシデロフォア産生をスクリーニングした知見はなく、今回初めて、グラム陰性菌の方がより多くのシデロフォア産生をしていることを明らかにすることができた。また、この中には、これまで知られていなかった嫌気性菌でシデロフォアを産生している菌も含まれており、新知見を見出すことができた。

環境分離株におけるシデロフォア産生菌の探索と分類学的検討

土壌並びに湖沼水より、合計 360 株ほどを分離した。その多くはシデロフォアを産生していた。分離株の中には、分類学的に新菌種に相当する菌株が複数含まれており、それらは *Pseudomonas* 属、*Chryseobacterium* 属、*Pantoea* 属などに類縁であった。すでに whole genome sequence も決定しており、新種であることが確定していることから、早急に新種提案を行う予定である。

環境菌の産生するシデロフォアの分子種の決定

環境分離の新菌種候補株でシデロフォアを大量に産生している菌株があり、新しいシデロフォア分子種である可能性が高いことから、大量抽出を行い、種々精製方法を繰り返し、NMR による解析を行った。未だ精製が不十分であり、分子種の特定に至らなかったが、今後さらに精製を繰り返し、分子種特定まで進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Murakami Koichi, Maeda-Mitani Eriko, Kimura Hirokazu, Honda Mikiko, Ikeda Tetsuya, Sugitani Wakana, Konno Takayuki, Kawano Kimiko, Etoh Yoshiki, Sera Nobuyuki, Mizukoshi Fuminori, Saitoh Takehito, Kawamura Yoshiaki, Ishioka Taisei, Ohnishi Makoto, Oishi Kazunori, Fujimoto Shuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Non-biogroup 1 or 2 Strains of the Emerging Zoonotic Pathogen <i>Escherichia albertii</i> , Their Proposed Assignment to Biogroup 3, and Their Commonly Detected Characteristics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01543	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 -
1. 著者名 Tomida Junko, Fujiwara Nagatoshi, Naka Takashi, Morita Yuji, Sawabe Etsuko, Tojo Naoko, Kikuchi Ken, Kawamura Yoshiaki	4. 巻 63
2. 論文標題 <i>Spodiobacter cordis</i> gen. nov. sp. nov., a member of the family Flavobacteriaceae isolated from patients with infective endocarditis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 111 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/1348-0421.12673	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 -
1. 著者名 Masuzawa T, Saito M, Nakao R, Nikaido Y, Matsumoto M, Ogawa M, okoyama M, Hidaka Y, Tomita J, Sakakibara K, Suzuki K, Yasuda S, Sato H, Yamaguchi M, Yoshida S, Koizumi N, Kawamura Y.	4. 巻 63
2. 論文標題 Molecular and phenotypic characterization of <i>Leptospira johnsonii</i> sp. nov., <i>Leptospira ellinghausenii</i> sp. nov., and <i>Leptospira ryugenii</i> sp. nov. isolated from soil and water in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 89-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/1348-0421.12671	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 -
1. 著者名 Kuchibiro T, Hirayama K, Houdai K, Nakamura T, Ohmura K, Tomida J, and Kawamura Y	4. 巻 5
2. 論文標題 First case report of sepsis caused by <i>Rizobium pusense</i> in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JMM Case Reports	6. 最初と最後の頁 e005135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmmcr.0.005135	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 -

1. 著者名 Kawamura Y, Tomida J, Miyoshi-Akiyama T, Okamoto T, Narita M, Hashimoto K, Cnockaert M, Vandamme P, Morita Y, Sawa T, and Akaike T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Proposal of <i>Helicobacter canicola</i> sp. nov., previously identified as <i>Helicobacter cinaedi</i> , isolated from canines.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Syst Appl. Microbiol	6. 最初と最後の頁 307-312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.syapm.2016.06.004	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 -

1. 著者名 Goto T, Hirakawa H, Morita Y, Tomida J, Sato J, Matsumura Y, Mitani A, Niwano Y, Takeuchi K, Kubota H, Kawamura Y	4. 巻 4
2. 論文標題 Complete genome sequence of <i>Moraxella osloensis</i> strain KMC41, a producer of 4-methyl-3-hexenoic acid, a major malodor compound in laundry.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/genomeA.00705-16,	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 -

1. 著者名 古垣内美智子、江成博、吉田敦、奥住捷子、河村好章、戸田宏文、宇都宮孝治、松浦宏美、山口逸弘、上碓俊法	4. 巻 26
2. 論文標題 MALDI-TOF MS 2機種とVITEK 2におけるnutritionally variant streptococci (NVS)の同定精度の比較と同定に重要な生化学性状の検討	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日本臨床微生物学雑誌	6. 最初と最後の頁 223-233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 河村好章
2. 発表標題 症例 1.83歳男性 (Case-Based Research Oriented Seminar : CABROS)
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河村好章
2. 発表標題 細菌の分類・命名最新情報
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河村好章、富田純子
2. 発表標題 腸肝在位ヘリコバクター属菌種感染症　すでに判っていること、近頃判ったこと、そしてまだ判っていないことー
3. 学会等名 第29回日本臨床微生物学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河村好章
2. 発表標題 嫌気性菌の分類の現状
3. 学会等名 第28回日本臨床微生物学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河村好章、富田純子、森田雄二、秋山徹
2. 発表標題 網羅的ゲノム比較による微生物分類の新しい展開
3. 学会等名 第65回日本感染症学会東日本学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 富田 純子, 秋山 徹, 田中 香お里, 林 将大, 久網 僚, 河村 好章
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatum5 亜種の菌種への再編成および F.watanabei sp.nov の提案
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地賢、古垣内美智子、長島遼、井口成一、板倉泰朋、蒲田啓祐、古田敦、鶴澤豊、新井裕子、秋山徹、河村好章
2. 発表標題 Gemella属の再分類
3. 学会等名 第51回レンサ球菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増澤 俊幸、中尾 亮、榊原 佳子、齋藤 光正、富田 純子、河村 好章
2. 発表標題 土壌由来レプトスピラ新種候補株の全ゲノム解析
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榊原佳子、増澤俊幸、小川みどり、二階堂晴彦、松本正広、齋藤光正、富田純子、河村好章、柳原保武、日高悠介
2. 発表標題 日本全国の土壌からのレプトスピラの検出と性状解析
3. 学会等名 第90回日本細菌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 口広智一、大沼健一郎、中村竜也、富田純子、河村好章
2. 発表標題 血液培養より分離された <i>Rhizobium pusense</i> による敗血症の1例
3. 学会等名 第28回日本臨床微生物学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増澤俊幸、榊原佳子、小川みどり、松本正広、二階堂靖彦、横山満、齋藤光正、富田純子、河村好章、柳原保武、日高悠介、吉田真一
2. 発表標題 土壌由来レプトスピラの性状解析と新種としての可能性
3. 学会等名 第28回微生物シンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 岸井こずゑ、菊池賢、富田純子、河村好章、吉田敦、奥住捷子、森屋恭爾
2. 発表標題 “close to 13 TU” 菌血症を引き起こした <i>Acinetobacter seifertii</i> の同定解析
3. 学会等名 第27回日本臨床微生物学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 古垣内美智子、江成博、吉田敦、奥住捷子、河村好章、戸田宏文、宇都宮孝治、松浦宏美、山口逸弘、上裕俊法
2. 発表標題 MALDI-TOF MS 2機種とVITEK 2におけるnutritionally variant streptococci (NVS)の同定精度の比較と同定に重要な生化学性状の検討
3. 学会等名 第27回日本臨床微生物学会総会
4. 発表年 2016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
連携研究者	田中 香おり (Tanaka Kaori) (20242729)	岐阜大学・生命科学総合支援センター・教授 (13701)	
連携研究者	安池 修之 (Shuji Yasuike) (10230210)	愛知学院大学・薬学部・教授 (33902)	