

令和 4 年 10 月 17 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02278

研究課題名（和文）海綿動物内の有用化合物産生菌獲得・保存に向けた新規種特異的生細胞染色識別技術開発

研究課題名（英文）Establishment of a novel species specific live cell staining approach for the preservation and isolation of metabolically active microbes from marine sponges

研究代表者

MORI TETSUSHI (MORI, TETSUSHI)

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：00590100

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：海綿動物内には有用化合物を産生する細菌種が多く共生し、その分離培養が求められている。しかし、海綿動物の細菌叢は多様多種、そして多くは未知・難培養性であるため、従来の技術ではこれらの細菌を生細胞として特異的に分離することが非常に困難である。この問題を解決すべく、本研究では、膜透過性ペプチドを用いた核酸細胞内導入手法を原理とした新規種特異的生細胞染色識別単離法（LIVE-FISH法）の開発を行った。さらに、分離した細菌からその遺伝的特性や性質をドラフトゲノムレベルで解明可能な手法も確立した。本研究成果より、海綿動物の細菌叢から今までアクセスしにくい希少および有用性細菌の分離が大いに期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

産業および医療分野においては、プロセスの高速化・最適化あるいは新薬開発には微生物は不可欠である。また次世代シーケンサーの解析により海綿動物内を初め、環境にはまだ開拓されていない有用性微生物が多く生息している。しかし、環境微生物の多くは未知あるいは難培養性であることから、従来の技術ではこれらの有用性細菌はアクセスできない。本研究で開発したLIVE-FISH法は生細胞かつ種特異的にターゲットの細菌を識別できることから、今まで課題とされていた環境微生物の有効利用を解決できると期待される。

研究成果の概要（英文）：Marine sponges hosts numerous natural compound producing microbes that are crucial to industry and pharmaceuticals. Although highly diverse, majority of these microbes are uncultivable, their genetic features unknown and are inaccessible using conventional methods. To overcome this challenge, in this research, we established a live cell species specific staining technique, termed as LIVE-FISH targeted to identify and promote the isolation of such microbes. Furthermore, we also established a pipeline to elucidate the genetic traits of these microbes. We believe that LIVE-FISH will revolutionize the exploitation of natural compound producing microbes in the near future.

研究分野：バイオテクノロジー、微生物生態学、生物工学（微生物）

キーワード：難培養性微生物 微生物の単離

## 1. 研究開始当初の背景

海綿動物からは、生理活性の高いそして有望なリード化合物が多く単離されている。しかし、天然に存在している海綿動物から直接これらの化合物を獲得するには量的に限りがある。さらに自然環境変化による種絶滅の進行が天然からの採集をますます困難とさせ深刻な問題となってきた。一方で、メタゲノム解析技術により、多くの有用化合物の生合成遺伝子クラスターが海綿動物の細菌叢から発見され、これらの有用化合物の真の生産者は海綿動物内の共生細菌であると示唆された。すなわち、これらの化合物の産生菌を単離し、さらに培養が可能となれば、天然資源に頼らない有用化合物の安定的生産や重要な資源の確保と長期的保存が可能であると考えられる。

しかし、海綿動物内の共生細菌は多種多様であり、また多くが未知そして難培養性であることから、メタゲノム解析技術だけでは、細菌叢から有用化合物産生菌を特定し単離することは困難である。近年、細菌を単一レベルで解析、そして単離可能、フローサイトメーター (FACS) を用いた単離法を原理とした単一細胞解析技術が注目をあびている。単一細胞解析技術が応用され始め、難培養細菌叢からあらゆる有用化合物産生菌の発見やその特性・性質が報告されるようになってきた。またこの技術がより多くの産生菌の発見やゲノム解読に直結するため、ハイstrupトスクリーニングシステムの開発として研究が勢力的に進められている。

しかしながら、単一細胞解析技術を含め、従来の技術のほとんどは特異的に生細胞のまま目的の細菌を単離できないことから、多くの新規有用化合物産生菌の発見はゲノムレベルでとどまってしまう、その菌の分離培養ができない。

## 2. 研究の目的

上記の背景をもとに、海綿動物内の有用化合物産生菌を生きたまま単離・獲得し、さらに培養および長期的保存に向けた新たなブレイクスルー技術の開発を目指して、本研究では新規種特異的生細菌染色識別単離手法、名付けて LIVE-FISH 法の開発に取り組んだ。本手法は培養可否を問わず、ターゲット細菌を殺さずに染色することができる特長を持っているため、新規、未知、希少などといったアクセスしにくいそして性質が未解明の細菌の単離を可能にする。この方法は細菌単離に関わるあらゆる分野に応用ができ、世界に革命的なインパクトを与えられる技術となることが大いに期待できる。次に、LIVE-FISH 法を用いて単離した細菌の遺伝的特性や性質をドラフトゲノムレベルで解明できる手法を確立した。

## 3. 研究の方法

### (1) LIVE-FISH 法の確立

膜透過性ペプチド (CPP) は細胞を殺さず様々な生体分子のキャリアとして膜を透過できる。またペプチド核酸 (PNA) は低温で安定的に RNA と結合できる特徴を持つ。LIVE-FISH 法は CPP および PNA を組み合わせることで、細菌を生きた状態で簡便に染色できる手法である。本手法を実現させるために次の研究項目を実行した。

#### ① CPP の細胞内への透過効率の評価

まず、LIVE-FISH 法を多様多様な細菌に対して応用できるように、様々な細菌に対して CPP の導入効率を評価した。CPP 単体を蛍光物質 (5,6-Carboxylfluorescein (5,6-FAM)) で修飾し、グラム陰性およびグラム陽性細菌のモデル細菌に対し、CPP の膜透過を質的・定量的に評価し、CPP の導入可能を証明した。本研究では両親媒性の性質を持つ膜透過性ペプチド(KFF)<sub>3</sub>K を用いた。また、グラム陰性細菌やグラム陽性細菌のモデル細菌をそれぞれ *Escherichia coli* (大腸菌) と *Lactobacillus plantarum* (乳酸菌) とした。次に、様々な細菌種を選定し、その透過効率を蛍光顕微鏡及び FACS で観察・解析した。

#### ② CPP-PNA プローブの細菌の 16S rRNA との特異的結合の検証 (*in vitro*)

本手法では PNA がターゲット細菌種の 16S rRNA に特異的に結合することが必須条件である。そこで、公開された細菌の遺伝子データベースやツールを利用し PNA の配列のデザインを行った。モデル細菌は *Pantoea agglomerans* とした。デザインした PNA 配列はペプチドの固相合成法を用いて CPP に結合させ、CPP-PNA プローブを合成した。合成した CPP-PNA プローブが特異的に目的の 16S rRNA へ結合することを証明するためには、人工 RNA を用いて行い、リアルタイム PCR (RT-PCR) 法を用いて評価した。

#### (2) CPP-PNA プローブでラベル化されたターゲット細菌の検出および応用 (*in vivo*)

本実験では、②と同様 *P. agglomerans* をターゲットとした。②で合成した CPP-PNA プローブを 3 つのモデル細菌種、*P. agglomerans*、*Acinetobacter radioresistens* および大腸菌に導入した。プローブインキュベート後、細胞を洗浄し、最終的に蛍光顕微鏡を用いてその特異性を評価した。

### (3) 細菌のゲノム解読法の確立

まず、分離した細菌を凍結保存し、長期的に維持可能であるかどうかの検証を行った。また、これらの細菌をデータベース化し、カルチャーコレクションとして保管した。次に、保管した細菌からゲノム抽出を行い、Oxford Technologies 社の Nanopore 次世代シーケンサーを用いてゲノム解読を行った。得られた Nanopore のリードは情報科学的に処理し、ドラフトゲノムをアセンブルした後、遺伝子の同定を行った。最終的に獲得した遺伝子情報をデータベース化した。

## 4. 研究成果

### (1) CPP の細胞内への透過効率の評価および最適化

大腸菌および乳酸菌に対して FAM 修飾された (KFF)<sub>3</sub>K ((KFF)<sub>3</sub>K-FAM) のプローブを導入した結果、大腸菌は 48%、乳酸菌は 10% 程度の導入効率だった。それぞれの細菌に対して、(KFF)<sub>3</sub>K-FAM プローブの導入効率が低かったため、その導入効率を高めるために、CPP の導入条件の最適化を行った。結果、温度および浸透圧は CPP への細胞の導入効率に大きく関与することがわかり、大腸菌においては CPP の導入効率を 48% からほぼ 100% に上昇することに成功した。さらに、本研究で得られた導入条件を 10 種類のグラム陰性細菌に対して行った結果、ほとんどの細菌種において、高い CPP の導入効率を得られた。

また、いずれの細菌においても CPP の毒性は認められなかった (図 1)。このことから CPP は様々なグラム陰性細菌に対する汎用性が高いことがわかった。一方、(KFF)<sub>3</sub>K-FAM プローブの最適化された条件で導入実験を行った結果、その導入効率は 10% のままにとどまっていた。グラム陰性とグラム陽性細菌は異なる膜構造を持っているため、細胞への導入効率は膜の組成および構造が大きく関与していることがわかった。

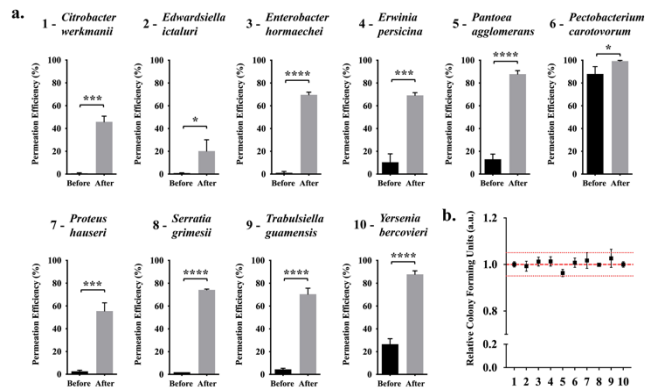


図 1 細菌への CPP の導入検証。a. 多様な細菌に対する CPP の導入確認、b. CPP の細胞に対する毒性評価。

### (2) グラム陽性細菌への CPP の導入効率の改善

グラム陽性細菌への CPP の導入効率の向上に向けて、本研究では新たな CPP の開発を試みた。CPP は膜を透過する過程において、そのカチオン性が重要と言われているため、本研究ではカチオン性が高い人口アミノ酸である、オリニチン (Orn)、2,4-ジアミノ酪酸 (Dab) および 2,3-ジアミノプロピオン酸 (Dap) に着目した。Orn、Dab および Dap の連鎖配列 (n=6, 9, 12) からなる CPP-FAM プローブをグラム陽性細菌である *Staphylococcus saprophyticus* に対して導入し、蛍光顕微鏡および FACS で評価したところ、Dab<sub>12</sub>-FAM においては最も高い導入効率である 99.7% が得られた (図 2)。ここでは、グラム陰性細菌に続き、グラム陽性細菌に対する汎用性が高い CPP の開発に成功した。また、Dab<sub>12</sub>-FAM を乳酸菌に対して導入評価を行った結果、その導入効率も 99% 程度であった。本結果により、CPP は導入しにくい細菌種への応用も期待できると示唆された。

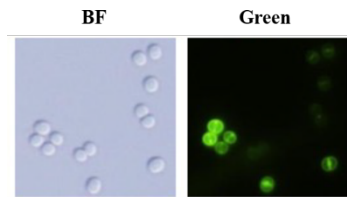


図 2 Dab<sub>12</sub>-FAM を用いた *S. saprophyticus* への導入。BF: 明視野、G: 緑蛍光

### (3) CPP-PNA プローブの細菌の 16S rRNA との特異的結合の検証 (in vitro)

次に、目的の細菌種を特異的に識別できるためには PNA 配列の特異性の検討及び評価を行った。合成した *P. agglomerans* の 16S rRNA の可変領域をターゲットとした CPP-PNA プローブを様々な細菌の人工 RNA に対して検証を行った結果、*P. agglomerans* のサンプルのみにおいて蛍光が認められ、CPP-PNA プローブの特異性が確認された (図 3)。in vitro の系において、LIVE-FISH 法が実証されたことから in vivo の系においても同様な結果が得られることが期待された。

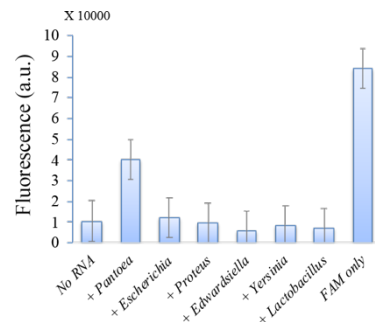


図 3 in vitro での CPP-PNA プローブの配列特異性の検証。ターゲット分子は多細菌種の 16S rRNA の人工 RNA を用いた。

### (4) CPP-PNA プローブでラベル化されたターゲット細菌の検出および応用 (in vivo)

*P. agglomerans* の特異的 CPP-PNA プローブを 3 つの細菌種に導入した結果、(3)の結果と同様、*P. agglomerans* のみからの蛍光が認められ、in vivo の系において目的の細菌を特異的に検出できることが示唆された (図 4)。得られた in vitro および in vivo の結果より、ターゲットの細菌を生きている状態、識別できることから、LIVE-FISH 法の開発を成功したと判断できた。しかし、in vitro の系に比べ、in vivo の系での再現性が低いことが確認されている。in vivo の系では生細胞

胞を対象に特異的染色を行っているため、細胞内の環境の違い、ターゲット分子 (16S rRNA) の立体構造などが考えられ、これらの要因を考慮したプローブの設計が今後必要となる。

#### (5) LIVE-FISH 法の応用に向けた取り組み

本研究の当初の計画では環境サンプルに対して LIVE-FISH 法を実証する予定だったが、新型コロナウイルスの影響により、サンプルの採集が不可能になったため、モデル細菌での実証にとどまってしまった。ここで、LIVE-FISH 法の最適化に向けて新たな取り組みとして、LIVE-FISH 法の利用率をさらに高めるために、CPP-PNA プローブのモジュール化の可否を試みた。

上記の (1)と(2)で得られた研究成果から CPP の導入効率はグラム陰性およびグラム陽性細菌によって異なっていることがわかった。環境サンプルには多様多様な微生物が生息しているため、つまり、一つの CPP 配列のみを利用してしまうと、利用した CPP-PNA プローブは必ずしもターゲットとなる細菌を染色できるとは限らない。そこで、一つの PNA 配列 (ターゲット細菌に結合可能なもの) に対して複数の CPP の組み合わせ、例えば CPPA-PNA1、CPPB-PNA1 などを作成すれば、多様多様な細菌のピュレーションからより簡便そして迅速に識別できると考えられる。本研究では、ペプチド固相合成法を用いて CPP および PNA を分けてモジュール化し、ネーティブケミカルライゲーション (NCL) 法を用いて結合させた。その結果、CPP および PNA の結合が可能であることが示唆された。そして作製した CPP-PNA プローブをモデル細菌の *P. agglomerans* に導入したところ、(4)と同様に *P. agglomerans* から蛍光が確認された。このように CPP-PNA プローブをモジュール化することで LIVE-FISH 法の利用率を高めることができた。しかし、NCL 法で作製した CPP-PNA プローブの回収率が悪いいため、本手法の最適化あるいは新たな結合方法の検討が必要と考えられた。

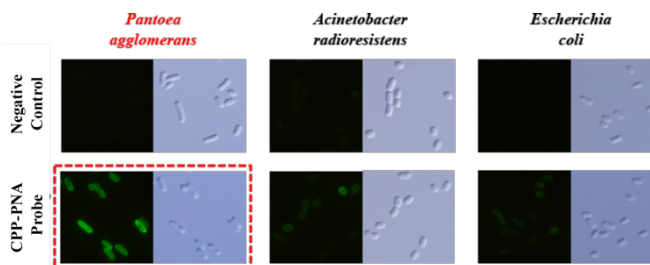


図4 細菌種別、細胞内での CPP-PNA プローブの特異性の検証。赤枠は *P. agglomerans*。

#### (6) 細菌のゲノム解読法の確立

こちらの検証、本来は LIVE-FISH 法を利用し、海綿動物から分離された細菌に対して行う実験だったが、本研究期間中でのサンプルの採集ができなかったため、本研究課題開始以前、すでに研究室で保管された単離細菌株を利用した。本実験はクロイソカイメン (*Halichondria okadai*) から分離した新規 *Streptomyces* sp.AKML14 株に対して行った。*Streptomyces* sp.AKML 株のゲノムを Nanopore によりシーケンスし、Flye v2.8.2 および Medaka v1.2.1 を用いてドラフトゲノムをアセンブルした。得られたゲノムサイズは 7.8Mbp であり、遺伝子数は 7,700 程度だった。またゲノムの完成度を調べるために細菌のコアの遺伝子セットを BUSCO により確認したところ、約 97%の完成度が示唆された。さらに獲得した遺伝子から二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを antiSMASH より探索した結果、23 個のクラスターが確認できた。このように、本研究より環境から単離された新規微生物の信頼が高いドラフトゲノムおよび遺伝子情報の獲得が可能となった。今後、実際に LIVE-FISH 法を用いて海綿動物から様々な新規、難培養性微生物の分離が可能になった場合、本研究で確立したゲノム解読法をこれらの分離細菌に対して応用し、その特性および性質を解明する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toyohara Daichi, Yokoi Yasuhito, Inoue Go, Muraoka Takahiro, Mori Tetsushi	4. 巻 10
2. 論文標題 Abiotic Factors Promote Cell Penetrating Peptide Permeability in Enterobacteriaceae Models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 2534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2019.02534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mizutani Yukino, Iehata Shunpei, Mori Tetsushi, Oh Ryota, Fukuzaki Satoshi, Tanaka Reiji	4. 巻 8
2. 論文標題 Diversity, enumeration, and isolation of Arcobacter spp. in the giant abalone, Haliotis gigantea	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MicrobiologyOpen	6. 最初と最後の頁 e890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mbo3.890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Go, Toyohara Daichi, Mori Tetsushi, Muraoka Takahiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Critical Side Chain Effects of Cell-Penetrating Peptides for Transporting Oligo Peptide Nucleic Acids in Bacteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 3462 ~ 3468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsabm.1c00023	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Toyohara D, Yokoi Y, Inoue G, Muraoka T, Mori T
2. 発表標題 Cell-penetrating-peptides potentially enhances biomolecule delivery in bacteria
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shibuya Y, Toyohara D, Ryu Y, Muraoka T, Mori T
2. 発表標題 Identification of factors hindering cell-penetrating peptide permeabilization
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamazaki H, Kashitani M, Yokoi Y, Itoi S, Mori T
2. 発表標題 The hunt for tetrodotoxin producers from the flatworm, <i>Planocera multitentaculata</i>
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yokoi Y, Shibata T, Tanaka R, Miyake H, Mori T
2. 発表標題 Elucidation of macroalgae-microbe relationships via macroalgae related bacterial isolates
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上豪、豊原大智、モリテツシ、村岡貴博
2. 発表標題 大腸菌の膜透過性を有するペプチドの探索と評価
3. 学会等名 第99回日本化学会春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊原大智、横井泰仁、村岡貴博、モリテツシ
2. 発表標題 膜透過性ペプチドを用いた細菌への新規生体分子導入技術の開発
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mori T, Toyohara D, Yokoi Y, Inoue G, Muraoka T
2. 発表標題 Enhancing cell-penetrating-peptide permeation via optimization of abiotic factors
3. 学会等名 International Union of Microbiology Societies IUMS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toyohara D, Kawahisa M, Kato E, Morita S, Mori T
2. 発表標題 Purification of bacteria from environmental samples using a cell collection system, PixeeMo
3. 学会等名 International Union of Microbiology Societies IUMS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 プローブ複合体、特定微生物の検出剤、特定微生物の検出方法、及び前期プローブ複合体の使用	発明者 モリテツシ、村岡貴博	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-142078	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 微生物膜透過性物質	発明者 村岡貴博、モリテツシ	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-13373	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------