

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02877

研究課題名(和文) もっとも普遍的なクオルモン・CO<sub>2</sub>によるグローバルな微生物群集の制御研究課題名(英文) Global control of microbial community based on the role of CO<sub>2</sub>, the most general quorumone

研究代表者

上田 賢志 (UEDA, Kenji)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：00277401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：微生物同士の相互作用に介在する因子として、CO<sub>2</sub>に着目した研究を行った。RNAseqによる転写解析を行った複数の細菌について、高濃度CO<sub>2</sub>の導入により大幅な遺伝子発現の変動が認められること、一方、菌株間で変動する遺伝子には共通性が認められないことを認めた。Symbiobacteriumに近縁の*C. microaerophilus*について、それが微好気性を示すこと、CO<sub>2</sub>の添加が増殖に必須であること、ゲノムにカルボニックアンヒドラーゼ遺伝子を保有しないことを明らかとした。約500株の自然界分離株について、その性状に対するCO<sub>2</sub>の影響の有無を検定し、約30株について明確な差を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物が築く共生体系に重要な意義があることは、昨今一般にも広く認識され始めている。特に、ヒトの免疫系に対して腸内細菌叢が果たす役割に注目が集まっている。一方、菌群集の中で菌どうしがどのような影響を及ぼし合っているかについての知見は乏しい状態にある。本研究では、CO<sub>2</sub>が微生物の共生関係に果たす役割に焦点をあてた検証を行った。CO<sub>2</sub>は普遍的かつガス性の分子であることから、その重要性が認識されてこなかったが、様々な生物群集構造において複雑な役割を有することが明確になりつつあり、新たな微生物学の基礎を築くと予想される。また、種々の環境の構造を理解しその保全や制御に繋げる点で社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the role of CO<sub>2</sub> as a factor that mediates the mutualistic association between microorganisms. RNAseq analysis of multiple bacteria revealed a drastic change in their transcriptional profile, but no common mechanism has not been identified. *C. microaerophilus*, a close relative of *Symbiobacterium*, was shown to be microaerophilic depending on CO<sub>2</sub> supply for its growth. Its genome did not retain any carbonic anhydrase gene. The CO<sub>2</sub>-dependence of the colonial phenotype was studied for approximately 500 natural bacterial isolates and about 30 strains were shown for their dependence on CO<sub>2</sub>.

研究分野：応用微生物学

キーワード：CO<sub>2</sub> バクテリア 遺伝子発現 群集構造 セカンドメッセンジャー

## 1. 研究開始当初の背景

人類に多大な恩恵をもたらしている微生物は自然環境中にあまねく分布し、その多様な能力を発揮しながら生命活動を行っている。微生物は諸処の環境を形作るいわば縁の下の力持ちであり、最も古くから地球上に存続し続けている生物である。しかし、直接人の目には見えないことから、その実態についての科学的理解は高等生物に対するそれに比較して遅れている。そうした知識の欠如は、人類がこれまでに分離培養した微生物が、実在する菌のほんの一部にすぎないという事実の原因である技術上の限界と少なからず関連している。独の R. コッホが寒天固体培地を用いたコロニー分離法を確立して以来 150 年が経つ今日にも、未だに微生物の分離には同手法が用いられるが、それは微生物の実際の生存環境を反映したものになっていない。

一方、近年では、細菌細胞の間においても特定の化学物質を信号とする情報伝達が広く起こっていることが明らかになっている。特に、クオラムセンシングと呼ばれる、細胞密度の感知とそれに応答した特異的な遺伝子発現制御のメカニズムが細菌に広く存在していることは、今や一般常識のレベルの知見になった。ラクトン化合物群をはじめとする特定の化学物質の合成と受容を介したこのシステムは、細菌が互いの細胞の存在に基づいて集団性を発揮し、高次の群集構造を形成していることを強く示唆している。単細胞で増殖する微生物といえども、細胞間の情報伝達が関与する複雑な活動を行っていることが、具体的な分子の役割を通じて詳しく理解されようとしている。

では、こうした特異的な信号物質を介した細胞間情報伝達システムは、こういった環境要因が引き金となって作動しているのだろうか？それらはおそらく、菌が集団として適応する意義のある栄養物質の枯渇や温度、湿度、pH などの物理化学的な環境因子の変動に対応しているものと考えられるが、これまでにそうした普遍的な環境因子の作用に焦点を当てた包括的な検証はほとんどなされてこなかった。

(1) *Symbiobacterium* の増殖因子：*Symbiobacterium* は、*Geobacillus* 細菌と混合した状態で堆肥から分離された菌である。本菌は、液体培地で後者と共培養すると顕著な増殖を行うが、単独ではそうした増殖はみられないことから、微生物どうしの中の共生相互作用に依存して増殖する特性をもつと推測された。その後の申請者らによる解析から、本菌の増殖を支持する主要因は CO<sub>2</sub> の供給であることが明らかになった。

高濃度の CO<sub>2</sub> を要求する性質は、病原性を示す細菌等においてその存在が広く知られていたが、その理由は明らかになっていなかった。その後、ゲノム解読の進展と必須遺伝子のリスト化の取り組みにより、いくつかのモデル微生物においてカルボニックアンヒドラーゼ遺伝子を欠損させると、高濃度の CO<sub>2</sub> の供給が増殖に必要なことが発見された。そこで、同酵素遺伝子のゲノム分布を調査したところ、それを保有しない細菌株が広く存在することが見いだされ、*Symbiobacterium* 同様に他の生物の増殖に伴って生成する炭酸を取り込むことで増殖する菌が多数潜在するものと推測された (BBB 32:4937; JME 68:90; IJEB 2012:324549 他)。

(2) 高濃度 CO<sub>2</sub> 要求性を示す微生物：高濃度の CO<sub>2</sub> を増殖に要求する菌は従来の微生物スクリーニングでは分離されない可能性が考えられたことから、その探索を行ったところ、予想通り高濃度 CO<sub>2</sub> の通気によって増殖が顕著に促進される菌が多く分離できること、その中には分類学的に新しいものが見つかることが明らかになった。また、増殖とは別に、遊走性や色素の生産性などの特定の形質が CO<sub>2</sub> 通気によって促進されるものも

認められた。

(3) CO<sub>2</sub> 濃度に対応した遺伝制御: *Symbiobacterium* では、増殖を支持する濃度よりさらに高い濃度の CO<sub>2</sub> によってトリプトファナーゼの活性が誘発されることも明らかになった。*Symbiobacterium* のトリプトファナーゼオペロンのプロモーター領域には<sup>54</sup> の認識配列が存在し、その上流には PAS ドメインを有する<sup>54</sup> 依存的転写活性化蛋白質 (EBP) が隣接してコードされている。同様の EBP は他のアミノ酸代謝関連遺伝子の近傍にもコードされていることから、高い濃度の重炭酸がこのタイプの EBP による調節を介して一連のアミノ酸代謝遺伝子の転写を一斉に誘起する制御体系を構築しているものと予想された (AEM, 73:6159; AMB, 98:10177 他)。

以上の成果から、環境中の CO<sub>2</sub> 濃度が微生物の動態に多面的な影響を及ぼすことが強く示唆され、特に転写レベルでの応答がグローバルに作動していること、それが微生物群集の構築に関わる一つの共通因子となっている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、CO<sub>2</sub> の濃度が微生物群集の構築に対して有する意義を多面的に検証することを目的とする。上述のように、これまでに次のことが判明している。

- (1) 栄養因子としての CO<sub>2</sub> を外部に依存する菌がいる
- (2) 高 CO<sub>2</sub> 濃度下で特異的な形質を発現する菌がいる
- (3) CO<sub>2</sub> の利用性を介したグローバルな共生体系が存在する

栄養因子としての CO<sub>2</sub> は、主にカルボキシラーゼの基質として要求される。カルボキシラーゼには、脂肪酸合成の初発であるアセチル CoA カルボキシラーゼのように重炭酸イオン (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) を基質とするものがある。カルボニックアンヒドラーゼ (炭酸脱水酵素) を有する菌はその活性により CO<sub>2</sub> を HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> に変換しこれらの酵素に供給できる。一方、炭酸脱水酵素を持たない菌は通常大気下では増殖できないが、炭酸濃度が高い環境では自然平衡によって生成する HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> を取り込むことで増殖できる。すなわち、カルボニックアンヒドラーゼを持たない菌は代謝活性が高い環境におかれることで増殖を開始する特性をもつといえる。

増殖とは独立に、発芽や細胞分化、遊走性など特定の形質が高濃度の CO<sub>2</sub> によって誘発される微生物が知られており、申請者は *Janthinobacterium* に属する分離株が CO<sub>2</sub> 添加によってピオラセイン生産を誘導生産する現象を見いだした。さらに、いくつかの菌においてはそうした現象のもとにある遺伝調節メカニズムが調べられており、たとえば *Citrobacter rodentium* では、RegA、*Vibrio cholerae* では ToxT、*Bacillus anthracis* では AtxA と呼ばれる転写調節蛋白質が、それぞれの菌における重炭酸に応答した転写制御を担っていることが報告されている。また、申請者らが扱った共生細菌 *Symbiobacterium* では、アミノ酸分解に関与する遺伝子群の<sup>54</sup> 依存的な転写が高濃度の重炭酸イオンによって誘発されると考えられている。一方、*Candida* や *Cryptococcus* などの病原性真菌においては、重炭酸要求性のアデニル酸シクラーゼが cAMP の合成を介して病原性に関与する遺伝子群の発現を制御していることも知られつつある。

微生物を扱う生態学は、今日においてもなお依然として特定の菌における生理的特性ならびに群集構造の変動についての限定的な観察に基づいた議論の上に成り立ち、そこに統一的な原理を見いだすまでには至っていない。それに対し、本研究では CO<sub>2</sub> が微生物に多面的に及ぼすと予想される諸影響を網羅的に解析し、一つの普遍的環境因子が微

生物コミュニティに対して及ぼす影響の多様性を統一的な視点から理解する。普遍的かつ有効な代謝活性の指標である CO<sub>2</sub> が、最も単純な生物群集の指標として作用する可能性に着眼している点でこれまでに例がなく、全く新しい微生物生態学の知識体系を築くことができる。

### 3. 研究の方法

CO<sub>2</sub> 濃度変化に対する細菌細胞の応答を網羅的に解析することを目的として、通常大気 (Air) と高濃度 (5 %) CO<sub>2</sub> 大気下 (high-CO<sub>2</sub>) でインキュベートした細胞について、転写レベルならびにタンパクレベルでの発現比較解析を行った。転写解析では、培養後 24 h の細胞から抽出した RNA について、RNAseq ならびに RT-PCR を用いた試験を実施した。一方、タンパク質の発現解析には、より短時間の応答を観察する目的で、前培養した細胞を、両条件で 1 h 栄養培地中でインキュベートしたものを細胞内と細胞外に分け、質量分析による網羅的な比較解析に供した。モデル細菌株として、転写解析には *Bacillus* を含む 5 つの細菌属の代表株について、タンパク解析には枯草菌 *Bacillus subtilis* を用いた。

また、CO<sub>2</sub> 濃度変化に対する細菌応答の多様性を検証することを目的として、Air と high-CO<sub>2</sub> で異なる形質を示す細菌株の探索を実施した。高濃度 CO<sub>2</sub> 条件下で主として水圏試料から単離した自然界分離株について、栄養培地にレプリカしたものを両条件で 28 日で培養後、コロニー形態を比較した。上記の試験に用いた培地は、いずれもバッファーを添加することで高濃度の CO<sub>2</sub> 添加による pH への影響が無い状態で実施した。

*Caldinitratiruptor microaerophilus* を用いた解析では、Fardeau ら (Extremophiles, 14:241, 2010) の記述をもとに、微好気で 60 °C・3 日静置培養を行った。その際、炭酸水素ナトリウムの添加や pH 調整の影響を条件を変動させることで検証した。また、得られた細胞からキットを用いた染色体の回収を行い、PacBio を用いた全ゲノム解読を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 転写解析

CO<sub>2</sub> 濃度に依存して形質の変化を示すことが予備的に観察されているグラム陽性および陰性菌合計 6 株について、通常大気下と 5% CO<sub>2</sub> 大気下の間における転写プロファイルの違いを観察した結果、いずれの株についても Air と high-CO<sub>2</sub> のそれぞれで 20-50 個の遺伝子について有為な転写量の増加が認められた。一方、その構成は多様で、共通した遺伝子を見いだすことはできなかった。また、それらの発現に共通して作動していると考えられる調節系についても現在までにその推定には至っていない。特に、当初予想した cAMP 依存性の転写変動への明確なリンクは認められなかった。一方で、*B. subtilis* において見いだされた CO<sub>2</sub> に正および負の依存性を示した遺伝子のうちいくつかについて、RT-PCR によりその再現を確認することができた。それらの中にはアミノ酸代謝に関するものが含まれていた。上記の RNAseq で見いだされた遺伝子群にも様々な一次代謝遺伝子が含まれていたことから、CO<sub>2</sub> の濃度上昇は代謝調節に連動するシグナルネットワークを形成している可能性が考えられた。

#### (2) タンパク質解析

(1) の転写解析において、複雑な転写プロファイルへの影響が観察されたことを受け

て、短時間での直接の応答を観察する目的でタンパク質レベルの観察を試みた。同一の枯草菌の細胞を Air と high-CO<sub>2</sub> で 1 h インキュベートした細胞について、その細胞外画分に含まれるタンパク質を質量分析で網羅的に比較した。その結果、存在量に有為な差のあるタンパク質が複数検出されたが、特に high-CO<sub>2</sub> で多く認められたタンパク質の中には、リボソームタンパクをはじめとする、細胞内タンパクが複数存在していたことから、本条件にさらすことで一部の細胞に損傷が起こりその内容物が漏出した可能性が考えられた。一方、特定の細胞壁結合タンパク質が high-CO<sub>2</sub> で顕著に減少するなど、特異的な発現抑制の結果と捉えられる現象も観察された。

### (3) CO<sub>2</sub> 応答株の探索

およそ 500 株の自然界分離株について、その主にコロニー性状に対する CO<sub>2</sub> の影響の有無を検定したところ、約 30 株について明確な差が生じていることが観察された。影響を受けた主な形質には、多糖と考えられる粘性物質の生産、色素生産、コロニー形状が認められた。上記の解析で主として用いた *Bacillus* 属の細菌においてもこれらの表現形質に顕著な影響が認められた。

### (4) *C. microaerophilus* の解析

新たなモデルとして *C. microaerophilus* を対象とした試験を開始した。本菌は、本研究の出発点である *Symbiobacterium* に近縁の高温性細菌であり、グラム陽性のクロストリジアに含まれているが、微好気性を示す。本菌の培養に対する CO<sub>2</sub> の効果を検討したところ、*Symbiobacterium* 同様にその添加が増殖に必須であることが判明した。さらに全ゲノムを解読し、3,599,694 塩基からなる環状ゲノムの完全配列を決定することに成功した。GC 含量は *Symbiobacterium* 同様に高かった (71%)。アノテーションの結果、3,618 の蛋白質コード領域と 62 の機能性 RNA のコード領域が同定され、予想通りカルボニックアンヒドラーゼをコードする遺伝子が存在しないことも明らかにした。

### (5) 結語

これまでの検証から、様々な細菌が高濃度の CO<sub>2</sub> に多面的な影響を受けることがほぼ明らかである。その影響には、CO<sub>2</sub> 濃度の変化を信号とする特異的な遺伝子発現制御を介したシグナルネットワークを基板とする適応応答が推測されるが、一方、今回の一連の結果は、CO<sub>2</sub> 濃度の変化は pH の変動のほかにも、細胞構造への物理的な影響や、例えば炭素の付加や脱離の酵素反応効率に対する影響を介した代謝フローの変動など、間接的かつ細胞の恒常性に大きく関わる要因を引き起こし、それに対する応答の信号伝達も誘発する可能性を想起させた。CO<sub>2</sub> スティミュロンは、それらの副次的な応答も全て包含するグローバルな調節体系として捉えられる必要があり、その全貌の解明には個々の介在要因とそれに対する特異的な応答ネットワークを確定する取り組みが必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 CJ Hurst, KM Noll, J Pan, J Schimel, DW Griffin, JM Goordial, TL Kieft, V Klaban, MG Klotz, LY Stein, A Oren, S Kang, DR Montgomery, X Mayali, V Klaban, KM Oliver, CHV Higashi, C Cuellar-Gempeler, K Ueda, et al.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 685
3. 書名 Microbes: The Foundation Stone of the Biosphere	

〔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
研究分担者	高野 英晃  (TAKANO Hideaki)  (50385994)	日本大学・生物資源科学部・准教授   (32665)	
研究分担者	西山 辰也  (NISHIYAMA Tatsuya)  (10759541)	日本大学・生物資源科学部・助教   (32665)	

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