

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05804

研究課題名(和文) 難培養性微生物の覚醒シグナルに応答する遺伝子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of genes that respond to awakening signals in previously uncultured microorganisms

研究代表者

村上 千穂 (MURAKAMI, Chiho)

安田女子大学・薬学部・助教

研究者番号：50649077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：難培養性微生物Nitrospira ND株のRNAを抽出し、次世代シーケンスすることで全遺伝子の発現量を網羅的に調べた。その結果、ND1には、休眠状態と増殖状態の間に両者とはことなる第三の状態である覚醒を示す状態があることがわかった。さらに、これらの現象がNitrospira NJ1株(実環境中でもND1近傍に存在することが知られている別種の株)でも同様に、休眠・覚醒現象を起こすことが分かった。さらに、ND1とNJ1の代謝物は、互いの休眠からの覚醒現象を誘導していることがわかった。これらの結果から、実環境中でこれらの株が互いの増殖を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境中の多くの微生物が人工培養できない(難培養性)理由についてはほとんど明らかになっていない。本研究結果は、申請者らが世界で初めて純菌株の獲得に成功した難培養性亜硝酸化細菌(Nitrospira)を用いることで環境中の微生物の増殖をコントロールする新しい原理の発見につながる。すなわち、休眠状態にある環境微生物を覚醒させて増殖させるには、代謝物に含まれる覚醒シグナルが必要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The expression levels of all genes were comprehensively investigated by extracting RNA from the previously uncultured Nitrospira strain ND1 and performing next-generation sequencing. As a result, it revealed that ND1 has a third state, awakening, between the dormant and growing states.

Furthermore, it was found that dormant/awakening phenomena are also caused in the Nitrospira strain NJ1 (a different strain known to exist in the vicinity of ND1 in the natural environment). The metabolites of ND1 and NJ1 also induced awakening from each other's dormant state. These results suggested that these strains regulate each other's growth in the natural environment.

研究分野：応用微生物

キーワード：難培養性微生物 亜硝酸化細菌 Nitrospira 休眠と覚醒 RNA-seq 覚醒シグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環境中の多くの微生物が人工培養できない(難培養性)理由についてはほとんど明らかになっていない。本研究では、申請者らが世界で初めて純菌株の獲得に成功した難培養性亜硝酸化細菌(*Nitrospira*)を用いることで、「なぜ今まで多くの研究者が培養に成功しなかったのか」という観点での解析が初めて可能になる。本研究で得られる成果は、他の多くの未培養微生物の獲得につながる知見が得られるだけでなく、環境中の微生物の増殖をコントロールする新しい原理の発見にもつながることが期待できる。

2. 研究の目的

「環境中に存在する微生物をなぜ培養できないのか」その原因を解明することを目的とする。難培養性微生物が休眠状態から覚醒する遺伝子発現の変化を RNA-seq によって網羅的に解析して覚醒シグナルに応答する遺伝子を明らかにする。

3. 研究の方法

Nitrospira ND-を 3L スケールで培養し、RNA-seq 解析に必要な量の菌体(RNA 量)を確保できる確かめた。その後、休眠と覚醒現象が大量培養スケールでも再現できるか検証した。検証後、休眠状態、増殖状態、覚醒(増殖開始)状態の3状態の菌体を準備し、それぞれの RNA を抽出した。rRNA の除去を行い、RNA-seq 解析を行い、発現量差の解析を行った。また、規格化することにより、各状態で平均発現量、例えば 1000 カウント以上発現している遺伝子の数によって分類し、各状態で発現している遺伝子が異なることを確認した。また、発現量差の解析から各状態間の各遺伝子の発現量の違いの相関をとったところ、増殖状態や休眠状態とも異なる第三の状態である覚醒しても増殖していない状態があることが分かった。

また、発現量差の解析結果の内、環境の刺激に応答する遺伝子として、RNA ポリメラーゼの σ 因子と二成分制御系のヒスチジンキナーゼに着目した。3 状態で発現量に差のある σ 因子とヒスチジンキナーゼを絞り込んだ。同時に、別種の *Nitrospira* NJ1 も ND1 と同様な休眠覚醒現象を起こすことを確かめた。

4. 研究成果

難培養性微生物の各状態の RNA を抽出し、次世代シーケンズすることで全遺伝子の発現量を網羅的に調べた。その結果、難培養性微生物である亜硝酸化細菌の休眠状態、増殖状態、覚醒(増殖開始)状態の3状態の全遺伝子の 4105 個の遺伝子発現状態が明らかとなった。各状態で高発現する遺伝子を調べたところ、状態の違いによって発現している遺伝子が異なることが分かった。特に、栄養飢餓による休眠状態と増殖状態との間で、高発現している遺伝子が異なることが分かった。さらに、休眠状態と増殖状態とは別に、休眠状態の細胞に栄養となる亜硝酸を入れて、増殖を開始する前の状態(覚醒状態)では、他の遺伝子が高発現していることが分かった。また、遺伝子発現量の差解析によっても、休眠状態と増殖状態の間に両者とはことなる第三の状態である覚醒を示す状態があることを確認することができた。以上により、3 状態の遺伝子発現の変化が明らかとなった。

その内、未知の覚醒シグナルに応答する遺伝子として、微生物が持つ普遍的な環境応答機構に着目した。具体的には、二成分制御系の構成成分の一つであり、シグナルを感知すると予想されるヒスチジンキナーゼに着目して解析した結果、3 個の候補が得られた。これらの遺伝子発現変化は、休眠・覚醒状態で覚醒シグナルを感知して、増殖状態では覚醒シグナルを感知しない(増殖速度に影響を与えない)という表現型と良く一致していることがわかった。ヒスチジンキナーゼは、膜結合型と細胞内在型があることから、膜貫通領域の有無を解析した。その結果、全て膜貫通領域をもつことが分かった。さらに、3 個の遺伝子の内、1 個が 1 回膜貫通型 1 個、2 個が 3 回膜貫通型であることがわかった。また、ヒスチジンキナーゼのセンサー部分の配列を調べた結果からは、機能未知であり何をシグナルとして感知しているのかは不明である。これにより、未知の覚醒シグナルとそれを感知する受容体の候補が得られた。

また、環境の刺激に対して応答する σ 因子の遺伝子発現量の差解析の結果、16 個の推定 σ 因子において、5 つの σ 因子の遺伝子発現量に差があることが分かった。増殖と非増殖状態間では

増殖する際に発現量が増えている σ 因子が 1 個あった。また、増殖状態と比較して、増殖状態で上方制御されるのは 2 個、休眠から覚醒する際に下方制御される σ 因子が 2 個あった。この 3 状態の内、それぞれの状態で 1 個ずつの σ 因子、大腸菌では *rpoD* に相当するハウスキーピングな σ 因子であり、それぞれの状態が独立した状態であることが示唆された。また、飢餓ストレスからの非増殖状態では大腸菌の *rpoE* に相当する σ 因子の発現が見られた。興味深いことに、飢餓ストレスによる休眠状態から亜硝酸が添加されることによって、鞭毛を発現するための σ 因子が減少し、栄養状態が良くなると鞭毛の発現が抑制されることが示唆された。これは、栄養状態が良くなると、移動する必要性がないためと考えられる。以上により、3 状態の遺伝子発現の変化が明らかとなり、休眠・覚醒現象を遺伝子の発現で説明可能になった。

さらに、これらの現象が *Nitrospira* NJ1 株(実環境中でも ND1 近傍に存在することが知られている別種の株)でも同様の現象が見られるか確認した。実験の結果、NJ1 も休眠・覚醒現象を起こすことが分かった。すなわち、ND1 同様に、飢餓によって休眠状態になり、自身の培養上清中に覚醒シグナルを出して、亜硝酸により増殖を開始した。さらに、ND1 と NJ1 の培養上清は、互いの休眠状態からの覚醒現象を誘導していることがわかった。これらの結果から、実環境中でこれらの株が互いに近くに存在し、その増殖を制御していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murakami Chiho, Machida Koshi, Nakao Yoichi, Kindaichi Tomonori, Ohashi Akiyoshi, Aoi Yoshiteru	4. 巻 14
2. 論文標題 Mutualistic relationship between <i>Nitrospira</i> and concomitant heterotrophs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology Reports	6. 最初と最後の頁 130 ~ 137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1758-2229.13030	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 Murakami Chiho, Tanaka Arowu R., Sato Yuichiro, Kimura Yasuhiro, Morimoto Kinjiro	4. 巻 189
2. 論文標題 Easy detection of siderophore production in diluted growth media using an improved CAS reagent	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 106310 ~ 106310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2021.106310	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12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shingo Sadahiro, Atsushi Tamura, Chiho Murakami, Setsu Kato, Yutaka Nakashimada, Tomonori Kindaichi, Akiyoshi Ohashi, Yoshiteru Aoi
2. 発表標題 Linking uncultivability of <i>Nitrospira</i> to their environmental adaptation
3. 学会等名 International Conference on Nitrification, 2021-ICoN7 2021.7.19 (U.S.A. online) (国際学会)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 定廣晋吾、田村淳、村上千穂、加藤節、中島田豊、金田一智規、大橋晶良、青井議輝
2. 発表標題 <i>Nitrospira</i> の生存戦略から難培養性の本質を紐解く
3. 学会等名 第24回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 村上千穂、荒川沙織、木村聡美、青井議輝
2. 発表標題 難培養性微生物の覚醒シグナルに応答する遺伝子の解明
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 定廣晋吾、田村淳、村上千穂、加藤節、中島田豊、金田一智規、大橋晶良、青井議輝
2. 発表標題 亜硝酸酸化細菌 <i>Nitrospira</i> の環境適応戦略から難培養性の本質に迫る
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 定廣晋吾、田村淳、村上千穂、加藤節、中島田豊、金田一智規、大橋晶良、青井議輝
2. 発表標題 なぜ培養困難なのか？ <i>Nitrospira</i> の生存戦略と難培養性の関係性を解き明かす
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 村上千穂 荒川沙織 木村聡美 赤木玲子 青井議輝
2. 発表標題 難培養性微生物の覚醒シグナルに応答する遺伝子の解明
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中四国支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 定廣真吾 田村淳 村上千穂 加藤節 中島田豊 金田一智規 大橋晶良 青井議輝
2. 発表標題 なぜ難培養なのか？難培養性微生物Nitrospiraの未知増殖制御機構に迫る
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水弘美 村上千穂 三上あい 玉岡聖菜 小佛さとみ 木村康浩 赤木玲子
2. 発表標題 希釈培地を用いたシデロフォア産生微生物の培養・検出法の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上千穂 金田一智規 町田光史 中尾洋一 大橋晶良 青井議輝
2. 発表標題 難培養性微生物Nitrospiraの共存微生物による増殖促進メカニズムの解明
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村弥美 木村聡美 村上千穂 寺地裕康 木村康浩 青井議輝
2. 発表標題 難培養性微生物Nitrospiraの覚醒シグナルに応答する遺伝子の解明
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村淳 寺地裕康 村上千穂 金田一智規 大橋晶良 青井議輝
2. 発表標題 なぜコロニーをつくらないのか？液体でしか増殖しない難培養性微生物Nitrospiraにコロニーを作らせる
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村淳 寺地裕康 村上千穂 加藤節 中島田豊 金田一智規 大橋晶良 青井議輝
2. 発表標題 なぜコロニーをつくらないのか？難培養性の亜硝酸酸化細菌Nitrospiraの増殖制御機構に迫る
3. 学会等名 第54回日本水環境学会大会(2019年度)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>医療免疫学分野と広島大学による研究成果が掲載されました https://www.yasuda-u.ac.jp/course/pharmacy/news/page/environmental_microbiology_report.html 医療免疫学分野及び臨床薬学分野、機能形態学分野による研究成果が掲載されました https://www.yasuda-u.ac.jp/course/pharmacy/news/page/journal_of_microbiological_methods.html</p>
--

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	青井 議輝 (Aoi Yoshiteru) (40386636)	広島大学・統合生命科学研究科(先)・准教授 (15401)	

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