

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06338

研究課題名（和文）好熱糸状性細菌の新規細胞間コミュニケーション機構の解明

研究課題名（英文）Cell-to-cell communication in thermophilic filamentous bacteria

研究代表者

春田 伸（HARUTA, Shin）

東京都立大学・理学研究科・教授

研究者番号：50359642

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）：本研究では、陸上高温環境に広く分布する始原的系統の滑走運動細菌 *Chloroflexus aggregans* の細胞間コミュニケーションシグナル物質を同定し、その作用機構を明らかにすることを目的とした。*C. aggregans* の培養液から各種クロマトグラフィーを用いて、滑走運動を促進する細胞外シグナル分子を分離した。分光分析等から、シグナル分子はリン酸基を含む低分子量炭化水素と推定でき、これまでに知られている細菌細胞間シグナル分子とは異なることが分かった。シグナル分子添加後の転写変化を調べたところ、既知の化学走性関連遺伝子の転写量に顕著な変化は検出されず、新規のシグナル応答機構があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象とした *Chloroflexus aggregans* は進化的に古い系統に属していることから、本菌で得られた知見は細胞間コミュニケーションの起源を探ることに貢献する。また、本菌は数百の桿状細胞が一つにつながった糸状体を形成しており、細胞間コミュニケーションは個々の細胞が連携して糸状体の運動性を決定するのにも重要であると考えられる。本菌の細胞間シグナル伝達・応答機構に関する研究成果は、生物の多細胞化の理解にもつながる。

本菌で見出した細胞間シグナル分子による代謝制御は、好熱菌に広く適用できることが期待され、産業応用上有用な好熱菌の機能開発・高度利用にも活用できる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to identify cell-to-cell communication signaling molecules in a deeply branching gliding bacterium, *Chloroflexus aggregans*, widely distributed in terrestrial thermal environments, and to elucidate the mechanisms of action of the signaling molecule. We applied liquid chromatography to extract extracellular signaling molecules that promote the gliding motility of *C. aggregans*. Spectroscopic analyses revealed that the signal molecule was low molecular weight hydrocarbons containing phosphate groups and was different from known bacterial intercellular signal molecules. Transcriptional changes in *C. aggregans* by the signal molecule were examined, and no significant changes in the transcript levels of known chemotaxis-related genes were detected, suggesting a novel signaling response mechanism.

研究分野：微生物生態学

キーワード：好熱性細菌 細胞間コミュニケーション シグナル伝達 滑走運動

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌の細胞間コミュニケーションは、バイオフィーム形成、二次代謝物生産、ストレス応答など様々な微生物機能の制御に関わっている。このようなコミュニケーションシグナルは細菌の集団生存戦略に必須と考えられている。中温菌では、シグナル分子の合成・制御を含む作用機構が明らかになってきており、シグナル関連遺伝子および化合物データベースも構築されている。しかし、好熱菌において、シグナル分泌の有無やその作用機構は未解明である。

陸上温泉などの高温環境でも細胞外シグナル物質を介して細胞外多糖生産や細胞凝集形成を制御していると予想されている。ただし、中温菌で見つかったようなシグナル物質は熱に不安定であり、高温環境で機能しているとは考えにくい。また好熱菌のゲノム情報からは、中温菌のシグナル分子の合成に関連する遺伝子は見つかっていない。

本研究で対象とした糸状性細菌クロロフレクサス *Chloroflexus* は、70°Cまで生育する好熱性の光合成細菌で、直線的な滑走運動能を有する。研究当初、*Chloroflexus aggregans* の培養上清に自身の細胞運動を促進する作用があることを見出していた。

2. 研究の目的

陸上高温環境に広く分布する始原的系統の好熱性細菌 *C. aggregans* を対象とし、未発見の細胞間コミュニケーションシグナル物質を同定し、そのシグナル物質の合成、制御、作用機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

「シグナル分子の同定・構造解析」とともに、「シグナル分子の合成・分泌機構の解明」および「シグナルの受容・伝達経路の解明」に取り組んだ。

(1) シグナル分子の活性評価

C. aggregans の滑走運動による細胞集塊の形成速度を測定し、形成速度の有意な促進作用をシグナル分子の活性として評価した。集塊形成速度は以下のようにして測定した。指数増殖期の細胞を回収し、トリス緩衝液 (pH 8.0) に懸濁した。1.36 mL の細胞懸濁液を被験試料 0.04 mL とともに 1.5 mL 容量のポリプロピレンチューブに入れ、55°C、照射条件 (10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、ハロゲンランプ) でインキュベートし、集塊の形成を経時的に観察した (下図)。



図 *C. aggregans* 細胞懸濁液のマイクロチューブ内での集塊形成の様子
(a) 活性画分の添加無し、(b) 活性画分の添加有り

(2) シグナル分子の精製

C. aggregans の培養液から遠心分離およびフィルターろ過により細胞外画分を回収した。分子量分画には限外ろ過膜を用いた。強陽イオン交換クロマトグラフィーには、イオン交換樹脂として TOYOPERAL MegaCapII SP-550EC (東ソー) を使用し、コハク酸-塩酸液 (pH 3) を移動相として吸着させ、塩化ナトリウムで溶出した。ゲルろ過クロマトグラフィーには、TOYOPERAL HW-40S (東ソー)、アンモニア-酢酸液 (pH 6.8) を使用した。活性画分の透析による脱塩には、分画分子量 1 kDa の透析膜 (Spectra/Por 6, Repligen) を用いた。

(3) シグナル分子の化学的性質の解析

- ・元素分析 UNICUBE (Elementar)
- ・紫外・可視吸収スペクトル UV-1800 (Shimadzu)
- ・赤外スペクトル Spectrum Two FTIR Spectrometer (PerkinElmer)
- ・質量分析 LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific)

(4) 転写解析

全 RNA を抽出後、riboPool (siTOOLs Biotech) で rRNA を除去した。ライブラリーを調製し、DNBSEQ-G400 (MGI Tech) で塩基配列情報を取得した。収集データは参照ゲノム (*C. aggregans* DSM 9485) に対してマッピングし、Transcripts Per Million (TPM) を算出した。

4. 研究成果

(1) シグナル分子の分泌

増殖期や細胞密度の異なる培養液から細胞外画分を回収し、シグナル分子の活性を比較したところ、それぞれの活性に大きな違いは見られず、これらの条件に関わらず恒常的に分泌していると考えられた。これまでに見つかっている中温性細菌の細胞間コミュニケーションでは、細胞外シグナル分子を感知しその分泌量を増大させるものも知られている。しかし、本菌ではそのようなシグナル分子による自身の分泌促進は見られなかった。

シグナル分子の分泌と応答に関する種特異性を解析したところ、同属他種である *Chloroflexus aurantiacus* からはシグナル分子の活性が検出されず、また *C. aggregans* のシグナル分子に対する応答性も観察されなかった。

(2) シグナル分子の構造

C. aggregans の培養液から細胞外画分を回収し、各種クロマトグラフィーでの精製条件を決定していった。検討の結果、限外ろ過により分画分子量 1 kDa 以下の画分を集め、強陽イオン交換クロマトグラフィー (TOYOPERAL MegaCapII SP-550EC、東ソー)、ゲルろ過クロマトグラフィー (TOYOPERAL HW-40S、東ソー) から活性画分を得ることができた。活性画分は超純水に対して透析し、脱塩した。

得られた活性画分の紫外・可視吸収スペクトル解析から、220 nm と 280 nm に吸収が確認できた。シグナル分子はペプチド性の化合物であることも予想していたが、ペプチダーゼ等の酵素処理による失活はみられなかった。元素分析の結果からは、シグナル分子は窒素元素を含まないと考えられた。また、フーリエ変換赤外分光分析から C-H 結合および C-O 結合に加え、リン酸基の存在が示唆された。質量分析の結果を合わせ、精製した活性分子は、リン酸基を含む低分子量炭化水素 ($C_{18}H_{30}O_9P_2$) と推定できた。これらの解析結果は、本菌のシグナル分子が、細菌細胞間コミュニケーションシグナルとして知られる既報の化学物質とは異なることを示している。

(3) シグナル分子の合成

(2) の結果から、本シグナル分子はイソプレンを含む関連化合物であると推定された。*C. aggregans* は光捕集色素としてガンマカロテンを合成することが知られている。カロテノイドの生合成はテルペン合成を経ており、テルペンの合成前駆体としてイソペンテニルリン酸 ($CH_2=CCH_3-CH_2-CH_2-PO_4^{2-}$) が知られている。*C. aggregans* の細胞外シグナル分子は、その推定化学構造から、イソペンテニルリン酸やその類縁化合物を起点として合成されている可能性が強く示唆された。

(4) シグナルの受容・伝達経路

シグナル分子による遺伝子転写変化を解析した。*C. aggregans* の細胞懸濁液に精製したシグナル分子を添加して 10 分後の細胞から全 RNA を抽出し、rRNA 除去処理の後、RNA-Seq 解析に供した。Transcripts per million (TPM) 値を比較すると、シグナル分子非添加条件に比べ、シグナル分子添加条件で 2 倍以上の TPM 値を示した遺伝子は、全 3814 遺伝子中、10 遺伝子のみであった。またハウスキーピング遺伝子 *rpoB* に対して転写量の多かった遺伝子として、11 遺伝子がシグナル分子添加条件特異的に検出された。ただし、これら遺伝子の産物は、いずれも細胞間シグナルの受容や伝達に直接関わっているとは考えられなかった。*C. aggregans* のゲノムには化学走性関連遺伝子も見られるが、これら遺伝子の転写量にも顕著な変化は検出されなかった。

シグナル分子の作用は種特異的であり、同種内での細胞の集団行動に関わっていると考えられた。*C. aggregans* のシグナル分子の生理機能のひとつは、細胞運動を活発化して自己集合を促し、細胞集塊の形成を促進することである。細胞集塊の形成は環境ストレス抵抗性の向上に寄与すると考えられる。過去の研究で、細胞溶菌酵素によってシグナル分子の分泌が誘導され、*C. aggregans* の集塊形成が促進されることを報告している。本研究課題の成果を踏まえ、*C. aggregans* の細胞間コミュニケーションとして以下のような作用機構が考えられた：細胞膜の障害を伴うような環境ストレスによりシグナル分子の分泌が促され、糸状体間の細胞表面相互作用が変化し、滑走運動による細胞集塊の形成を促進する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角濱日向
2. 発表標題 好熱性細菌Chloroflexus aggregansの細胞凝集促進因子の同定
3. 学会等名 日本生物工学会第17回学生発表討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂庭真吾、春田伸
2. 発表標題 高熱性光合成細菌Chloroflexus aggregansの高温での増殖に与える他細菌の影響
3. 学会等名 第35回日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shin Haruta (分筆)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Humana New York, NY	5. 総ページ数 402
3. 書名 Bacterial and Archaeal Motility	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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		
米国	ワシントン大学	Pacific Northwest国立研究所	