

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20569

研究課題名（和文）線虫共生微生物が生産する微生物間シグナル分子の存在意義の解明とその産業利用

研究課題名（英文）Elucidation of the role of the microbial signal molecules produced by nematode symbionts and its industrial applications

研究代表者

今井 優 (Imai, Yu)

信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・助教（特定雇用）

研究者番号：20964042

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：微生物は環境中において、それらが生産するシグナル分子を介して相互作用していると考えられている。本研究では、線虫共生微生物から他微生物の表現型（二次代謝など）に影響を及ぼすシグナル分子を探索した。これまでに線虫共生細菌の一群である *Xenorhabdus szentirmaii* DSM 16338 をはじめとする複数の *Xenorhabdus* 属細菌の培養物中から、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) の色素性抗生物質アクチノロジンの生産を抑制する化合物が存在することを見出し、これらから2つの化合物の単離・精製に成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでに放線菌の抗生物質生産を調節する微生物シグナル分子を発見することに成功している。今後、本研究から様々なシグナル分子を発見し、それらを有効活用することができれば、微生物を利用した物質生産（抗生物質など）の効率化につなげることが期待できるなど、産業分野における波及効果は大きい。

研究成果の概要（英文）：It is known that microbes interact each other through signal molecules. In this study, we explored signal molecules from nematode symbionts that affect the phenotype of other bacteria, such as secondary metabolites production or cell development. We discovered compounds that suppress the pigmented antibiotic actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) from culture of several *Xenorhabdus* strains, including *Xenorhabdus szentirmaii* DSM 16338. Subsequently, we successfully isolated two compounds from culture of *X. szentirmaii* DSM 16338 that inhibit actinorhodin production in *S. coelicolor* A3(2).

研究分野：応用微生物学

キーワード：線虫共生微生物 シグナル分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物は様々な生理活性物質を生産することが知られている。微生物が生産する生理活性物質の多くは、抗菌活性や細胞毒性などを指標に発見された抗生物質が多く、それ以外の活性を示す化合物の多くは見過ごされている。一方、環境中において微生物は、他微生物に影響を及ぼす化合物（微生物シグナル分子）を利用することで相互作用していると考えられている。これらシグナル分子を有効利用することができれば、微生物産業分野における物質生産の調節や、環境微生物叢およびヒト腸内細菌叢における特定の微生物の生育の制御につなげることが期待できる。

近年では、線虫共生微生物の一群である *Photorhabdus* 属細菌や *Xenorhabdus* 属細菌が新しい生理活性物質の探索源として注目されている。これら細菌は、多様な二次代謝産物合成遺伝子クラスターをゲノム中にコードしている。そのため、*Photorhabdus* 属細菌と *Xenorhabdus* 属細菌を探索源とすることで、新しい微生物シグナル分子を発見できるのではないかと考えた。また線虫は土壤中に遍在する動物であることから、線虫に共生する微生物は、土壤微生物叢を構成する微生物間においても重要な役割を占めていると考えられる。そこで本研究では、*Photorhabdus* 属細菌と *Xenorhabdus* 属細菌にとどまらず、“線虫共生微生物全体”を新しい生理活性物質の探索源としてとらえ、これらを環境中から分離することで、線虫共生微生物ライブラリーを構築し、新しい微生物シグナル分子の探索へと利用することとした。

2. 研究の目的

本研究では、以下に示す 2 つの目的を設定した。

環境中からの線虫共生微生物の分離とライブラリー化

カルチャーコレクションや共同研究者から分譲を受けた *Photorhabdus* 属細菌および *Xenorhabdus* 属細菌に加え、環境中から線虫共生微生物を分離することで、線虫共生微生物ライブラリーの拡張を目指した。

微生物シグナル分子を生産する線虫共生微生物のスクリーニングとシグナル分子の単離

線虫共生微生物と他微生物（検定菌）を共培養し、検定菌の表現型（二次代謝や形態分化など）に影響を及ぼす化合物を生産する線虫共生微生物を見つけ出し、これらからシグナル分子の単離を目指す。本研究では検定菌として、色素性抗生物質アクチノロージンを生産し、複雑な形態分化を示す放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) を用いることとした。共培養下で *S. coelicolor* A3(2) のアクチノロージン生産や形態分化に影響を及ぼした線虫共生微生物については、これら培養物中から活性物質の単離を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、以下の 3 つの項目について検討を行った。

線虫共生微生物の分離

ベイルマントレー法により土壤中から線虫を回収し、線虫表面を 0.1-1% の次亜塩素酸ナトリウムで殺菌した。滅菌水で線虫を洗浄した後、ホモジナイザーにより線虫を破碎し、線虫体内に共生する微生物を溶出し、これを線虫共生微生物懸濁液とした。この懸濁液を、LB、NB、SMS、R2A またはマッコンキー寒天培地上に塗布し、出現したコロニーを線虫共生微生物として単離した。得られた線虫共生微生物の 16S rRNA 遺伝子または 18S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行い、ライブラリー化した。

共培養による微生物シグナル分子を生産する線虫共生微生物の探索

線虫共生微生物を LB 液体培地で培養後、3 μ L の培養液を MR5 寒天培地上にスポットした。その近傍に、放線菌 *S. coelicolor* A3(2) を接種し、30 $^{\circ}$ C で 6-10 日間培養後、*S. coelicolor* A3(2) のアクチノロージン生産への影響を評価した。アクチノロージン生産への影響が認められた線虫共生微生物については、MR5 寒天培地 (25 mL) で 8 日間培養後、寒天培地を 1 cm 角に切断し、等量のメタノールまたは酢酸エチルに浸漬後、一晚振とうすることで、培養抽出物を作製した。これを乾固後、MR5 寒天培地に接種した *S. coelicolor* A3(2) の近傍にスポットし、アクチノロージン生産性を評価することで、シグナル分子抽出の可否および抽出至適溶媒の検討を行った。

線虫共生微生物培養物中からのシグナル分子の単離

において、*S. coelicolor* A3(2) のアクチノロージン生産へ影響を及ぼすことが認められた *Xenorhabdus* DMS 16338 を、MR5 寒天培地 (25 mL) で 4 日間または 8 日間培養した。寒天培地を 1 cm 角に切断後、これを等量の酢酸エチルに浸漬し、一晚振とうすることで、活性物質を抽出した。これを乾固後、1 mL の 100% メタノールに溶解し、高速液体クロマトグラフィー分析 (HPLC) に供した。カラムは Shim-pack Scepter C18-120、粒径 5 μ m、250 x 10 mm を使用し、移動相として MilliQ 水+0.1% (v/v) ギ酸 (移動相 A) およびアセトニトリル+0.1% (v/v) ギ酸 (移動相 B) を使用した。毎分 3 mL で移動相を流し、60% の移動相 B で 5 分間保持した後、移動相 B の濃度を 60% から 90% へと 15 分間かけてリニアグラジエントで上昇

させた。保持時間 12 分 (化合物 1) および 17 分 (化合物 2) で溶出したシングルピークを回収し、これを乾固した。乾固したサンプルを DMSO に溶解後、MR5 寒天培地に接種した *S. coelicolor* A3(2) の近傍にスポットし、アクチノロージン生産への影響を評価した。

化合物 1 および 2 の純度の確認には、Shim-pack Scepter C18-120, 粒径 5 μm , 250 x 4.6 mm を使用し、移動相として MilliQ 水+0.1% (v/v) ギ酸 (移動相 A) およびアセトニトリル+0.1% (v/v) ギ酸 (移動相 B) を用いた。毎分 1 mL で移動相を流し、40% の移動相 B で 5 分間保持した後、移動相 B の濃度を 40% から 100% へと 20 分間かけてリニアグラジエントで上昇させた。

4. 研究成果

線虫共生微生物の分離とライブラリー化

これまでに長野県内の 4 地点から線虫共生微生物を分離しており、地点 A から採取したサンプルからは 69 菌株、地点 B のサンプルからは 14 菌株、地点 C のサンプルからは 33 菌株、地点 D のサンプルからは 23 菌株を分離し、ライブラリー化している。またその中には *Xenorhabdus* 属細菌である *Xenorhabdus* sp. YIM0001 や *Xenorhabdus nematophila* YIM0006 などが含まれている。これまでに *Xenorhabdus* 属細菌が土壌から分離されたという報告はない。そのためこれら *Xenorhabdus* 属細菌が分離できたという事実は、本検討で分離した微生物が線虫の体内から得られたことを裏付けるデータとなると考えている。また本検討で分離された微生物の中には、*Paenibacillus* sp. YIM0056 のように、既知細菌との 16S rRNA 遺伝子の相同性が 94.2% (1389/1474 塩基) と極めて低い細菌も存在しており、新種の細菌の分離にも成功している。

線虫共生微生物が生産する化合物が *S. coelicolor* A3(2) の表現型に及ぼす影響の評価

これまでにカルチャーコレクションや共同研究者から分譲を受けた *Photorhabdus* 属細菌 (30 菌株) と *Xenorhabdus* 属細菌 (34 菌株) に加え、本研究で分離した線虫共生微生物 (106 菌株) を *S. coelicolor* A3(2) と寒天培地上で共培養し、アクチノロージン生産への影響を評価している。カルチャーコレクション由来の *Photorhabdus* 属細菌では、4 菌株が *S. coelicolor* A3(2) のアクチノロージン生産を活性化し、8 菌株がその生産を抑制する効果を示した。一方、*Xenorhabdus* 属細菌においては、アクチノロージン生産を活性化する菌株は認められなかったのに対し、16 菌株がその生産を抑制する効果を示した。また本研究で分離した線虫共生微生物においては検討した 106 菌株の内、9 菌株がアクチノロージン生産を活性化し、11 菌株がその生産を抑制する効果を示した。

カルチャーコレクションや共同研究者から分譲を受けた菌株の内、アクチノロージン生産の活性化を示した *Photorhabdus* 属細菌 3 菌株を MR5 寒天培地で培養後、この培養物からメタノールまたは酢酸エチルを用いて培養抽出物を作製した。これを寒天培地に接種した *S. coelicolor* A3(2) の近傍にスポットし、アクチノロージン生産への影響を確認したところ、*Photorhabdus luminescens* Y-28 のメタノール抽出物中にアクチノロージン生産を活性化する化合物が存在することを見出した。またアクチノロージン生産を低減した菌株 (*Photorhabdus* 属細菌 2 菌株および *Xenorhabdus* 属細菌 7 菌株) について同様の検討を行ったところ、*Xenorhabdus szentirmaii* DSM 16338, *Xenorhabdus stockiae* DSM 17904, および *Xenorhabdus mauleonii* DSM 17908 から調製した酢酸エチル抽出物中に、活性化化合物を見出した。

Xenorhabdus szentirmaii DSM 16338 から調製した酢酸エチル抽出物を高速液体クロマトグラフィー分析に供し、保持時間 12 および 17 分に出現したシングルピークを回収した [それぞれ化合物 1 および 2 (図 1 に純度の確認に用いた HPLC クロマトグラムを示した)]。これを乾固後、DMSO に再溶解し、MR5 寒天培地に接種した *S. coelicolor* A3(2) を用いたバイオアッセイに供した。その結果、これら化合物の存在下では、*S. coelicolor* A3(2) のアクチノロージン生産が確かに抑制されることが判った。またこれら化合物は、*S. coelicolor* A3(2) に対して抗菌活性を示さないことから、アクチノロージン生産の減少が生育阻害に起因するものではないことも確認している。今後は、化合物の構造解析を進めるとともに、「これら化合物がいかんして放線菌の抗生物質生産を調節しているのか？」を明らかにしていく。

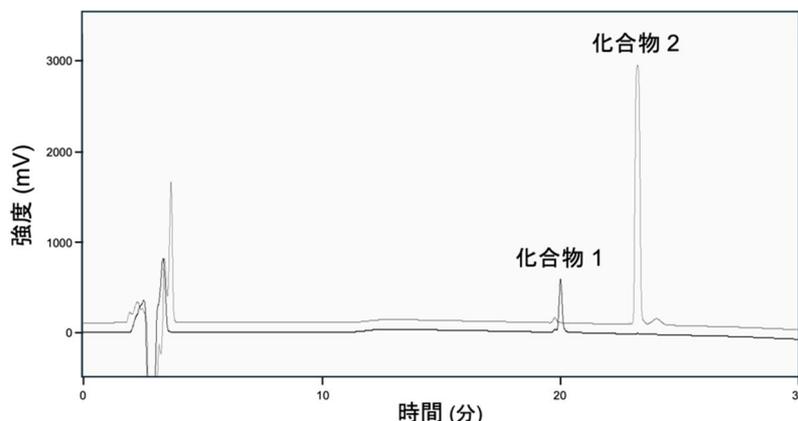


図1 化合物 1 および 2 の HPLC クロマトグラム

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 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今井 優
2. 発表標題 種特異的活性を指標としたスクリーニングから見出されたグラム陰性細菌を選択的に殺す抗生物質ダロバクチン
3. 学会等名 第23回 日本蛋白質科学会年会 ワークショップ（現在の取り組みとして紹介）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今井 優
2. 発表標題 昆虫病原性細菌を利用した抗生物質探索研究
3. 学会等名 藤田医科大学 感染症研究センター セミナー（現在の取り組みとして紹介）（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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