

海綿内微生物の微生物間ケミカルコミュニケーションの解明

研究代表者 町田 光史
(理工学術院総合研究所 次席研究員)

1. 研究課題

ほとんどの環境微生物は難培養性といわれている。微生物の培養を必要としない次世代シーケンサーなどの遺伝子解析技術により、それら難培養性微生物の多様性が示されてきた。この未利用で多様な難培養性微生物を培養可能にすることは、微生物学的に大きな課題として関心を集めてきた。環境微生物の伝統的な培養手法で用いられる寒天平板培地は、微生物のコロニーを獲得するために播種する微生物の細胞密度を限界希釈にしながらも、プレート数は人手の数に制限されてしまう。これらの問題を解決するために、微生物を物理的に分離する手法や、ゲル化剤の種類、抗酸化物質の使用、共培養などの新しい培養手法が開発されてきた。それにもかかわらず、環境中のほとんどの微生物は未培養のままである。したがって、環境微生物を培養するための必須因子は、人工的に構成される培養条件に含まれない可能性が高い。先行研究では、生きてはいるが培養不可の状態(VBNC)、ほぼ増殖しない状態(NZG)、休眠状態など、様々な微生物の非増殖状態が報告されており、これらの非増殖状態から目覚めさせるような化合物が環境中に存在するのではと考えた。

このような背景のもと、難培養性微生物の一つとして海綿内共生微生物をモデルとした。これまで海綿からは医薬的・試薬的に価値のある二次代謝産物が得られており、最近の研究ではそれら二次代謝産物の真の生産者は共生微生物であることが示唆されている。より多くの海綿内共生微生物を分離培養することができれば、微生物学的意義および化合物の供給源としての高い価値が見込める。

2. 主な研究成果

このような背景のもと、海綿内共生微生物の生息環境を模倣した分離培養方法を開発した。平板培地に直接播種する従来の培養法(SDP法)と本培養法(DC法)でそれぞれ無作為に60株を選択し、16S rRNA遺伝子解析によって分離株の同定を行った。その結果、SDP法では13種の分離株(*Bacteroidetes*, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*)が単離されたのに対し、DC法では37種の分離株(*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Alphaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*)が単離されていた。SDP法では、新規性の高い菌株は1株であったのに対し、本培養法では18株が既存株に対して97%以下の相同性を示した。次に、休眠させた分離株(DC28株、SDP11株)に対して海綿抽出エキスへの応答を調べたところ、SDP株は海綿抽出エキスの添加によるコロニー形成数の増加は認められなかったが、DC法によって獲得された28株のうち15株に海綿抽出エキスの添加によるコロニー数形成の増加が顕著に認められた。また、これら菌株について、海綿抽出エキスの添加による非増殖速度と飽和細胞密度への影響を調べた結果、海綿抽出エ

キスの添加は DC 法および SDP 法で得られた両菌株に対して促進する傾向は認められなかった。これらの結果は、休眠している微生物を覚醒させるシグナル分子が、これまで未培養であった微生物を培養可能にする重要な因子であることを示唆している。(研究業績 4.1)

3. 共同研究者

中尾 洋一 (先進理工学部・化学・化生命科・教授)

青井 議輝 (広島大学・大学院統合生命科学研究科・准教授)

4. 研究業績

4.1 学術論文

Dawoon Jung; Koshi Machida; Yoichi Nakao; Tomonori Kindaichi; Akiyoshi Ohashi; Yoshiteru Aoi Triggering Growth via Growth Initiation Factors in Nature: A Putative Mechanism for in situ Cultivation of Previously Uncultivated Microorganisms *Front. Microbiol.* **12**, 53 (2021)

4.2 総説・著書

特になし

4.3 招待講演

特になし

4.4 受賞・表彰

特になし

4.5 学会および社会的活動

化学 A 経営 講師担当

5. 研究活動の課題と展望

これまでいくつかの菌株を獲得し、コロニー形成数の応答実験を行ってきたが、継代を重ねるごとに応答が鈍くなってきており、シグナル分子を探索する実験に支障をきたしている。今後は、新しく DC 法によって獲得した海綿内共生微生物については、-80℃の冷凍保存を行うことで、シグナル分子に良好な応答を示す菌株を保管する。今後は、まだ試していない組み合わせの増殖促進試験を行い、増殖促進活性が認められた培地上清から、活性物質の単離・精製を行い、MS、NMR 分析等を用いて分子構造を明らかにしていくとともに、微生物間のケミカルコミュニケーションを解明していく。