



Title	Sphingopyxis属GF9株が生産する異種微生物増殖因子に関する研究
Author(s)	高井, 亮吾
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第13597号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13597
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91552
Type	theses (doctoral)
File Information	Ryogo_Takai.pdf



[Instructions for use](#)

Sphingopyxis 属 GF9 株が生産する
異種微生物増殖因子に関する研究

応用生物学専攻

博士後期課程

高井 亮吾

目次

緒言

1. 難培養微生物	1
2. 難培養微生物研究の意義	3
3. 既存の難培養微生物の培養技術	4
4. 微生物増殖因子として作用する化合物	5
5. GF9 株と 3 種の微生物	9
6. ASN212 株が要求する増殖因子	10
7. 本研究の目的	12

1 章 *Bosea minatitlanensis* 近縁種 ASTN45 株に対する増殖因子の探索

1. 目的	13
2. 実験方法	
2.1 試薬	13
2.2 培地組成	13
2.3 微生物種	13
2.4 使用装置	13
2.5 ASTN45 株に対する増殖因子の精製	14
2.6 ASTN45 株の増殖活性評価	15
2.7 ASTN45 株に対する増殖活性画分の構造解析	15
3. 結果と考察	
3.1 ASTN45 株に対する増殖因子の精製	15
3.2 ASTN45 株に対する増殖活性画分の構造解析	17
4. 結論	18

2 章 *Catellibacterim nectariphilum* AST4 株に対する増殖因子の探索

1. 目的	19
2. 実験方法	
2.1 試薬	19
2.2 使用装置	19
2.3 培地組成	20
2.4 微生物種	20

2.5 GF9 株培養上清の取得	20
2.6 AST4 株に対する増殖因子の精製	21
2.7 AST4 株の増殖活性評価	22
2.8 AST4 株に対する増殖活性画分の構造解析	22
2.9 Cyclo (D-His-L-Pro) の合成	22
3. 結果と考察	
3.1 GF9 株培養上清からの AST4 株増殖因子の精製	26
3.2 AST4 株に対する増殖活性画分の構造解析	31
4. 結論	34
3 章 新規微生物増殖因子 coproporphyrin 類の作用機序の解明と細菌叢への影響	
1. 目的	35
2. 実験方法	
2.1 試薬	35
2.2 使用装置	35
2.3 培地組成	36
2.4 微生物種	37
2.5 環境中の細菌叢サンプルの採取	38
2.6 Cop. I 金属錯体の調製	38
2.7 Cop. III 金属錯体の調製	39
2.8 Cop. 類の金属錯体の質量分析	40
2.9 ASN212 株の増殖活性評価	40
2.10 Spartan'14 を用いた Cop. III 金属錯体の化学計算	40
2.6 ASN212 株ゲノムの回収	41
2.12 ASN212 株のゲノム解析	41
2.13 ASN212 株及び <i>Leucobacter komagatae</i> VKM ST4845 株に における heme 生合成遺伝子の解析	42
2.14 環境中の細菌叢からの DNA の抽出	42
2.15 Actinobacteria 門及び Firmicutes 門特異的プライマー を用いた PCR	43
2.16 モレキュラーイメージャーによる PCR 産物の定量	45
2.17 Cop. III 添加条件での微生物増殖評価	45

3.結果と考察	
3.1 Cop.類金属錯体の調製	46
3.2 Cop. III 金属錯体の計算化学による比較	48
3.3 Cop.類金属錯体の増殖活性評価	51
3.4 ASN212 株ゲノムの解析	56
3.5 Cop.III 添加条件における ASN212 株以外の微生物増殖 活性評価	69
3.6 Cop. III が細菌叢サンプルに与える影響	71
4. 結論	76
結言	79
参考文献	80
謝辞	88
Summary	90

緒言

1 難培養微生物

微生物は多様な環境に存在しており、土壌や海洋、あるいは通常生物が生存できないと考えられるような極限環境においても試料中からその存在が見出されてきた。地球上の微生物種全体の種数を把握することは非常に困難ではあるが、一例として Gans らは 16S rRNA の解析および DNA の解離温度曲線の解析により、土壌試料 1 g には、 10^6 のオーダーの微生物種が存在すると予想している (Gans, *et al*, 2005)。一方で、これら微生物の多くの種は、実際に試料を既存の寒天培地あるいは液体培地に供したとしても増殖が確認されない。Colwell らは、*Vibrio cholerae* が代謝活動を行っているにもかかわらず、一般的な培養条件において培養ができない状態をとることを報告し、このような微生物の生理状態を viable but noncultureble (VBNC) 状態であると提唱した (Colwell, *et al*, 1985; Ue, 2014)。また Liesack らは上記の VBNC 状態の微生物と、顕微鏡下では認められているが未だ培養されていない微生物をまとめて難培養 (unculturable) 微生物であると述べている (Liesack, Stackebrandt, 1992)。難培養微生物は、一般的な組成の寒天培地上に形成されるコロニーから求められる菌数よりも、顕微鏡観察による直接計測値が圧倒的に大きいことからその存在は認識されていた。環境によって異なるが、全微生物種のうち、実に 99% から 99.9% 以上が難培養微生物であるとされている。(Amann, *et al*, 1995)。

既存の手法では見落とされてきた難培養微生物の例として、Kamagata は以下の特徴を挙げている (Kamagata, 2010)

1.1 生育速度が著しく遅い微生物

大腸菌の実験室条件での平均世代時間は 30 分であるが、1 週間程度の平均世代時間を要する微生物も存在する。また生育開始までに要する時間が数週間に及ぶ微生物種も存在する (Yan, *et al*, 2004 ; Sakai *et al*, 2007)。このような微生物は通常の培養条件においては増殖の確認が困難であると考えられる。

1.2 寒天でコロニーを形成しない微生物

微生物を単離する際、寒天培地で試料の培養を行い、形成したコロニーに対して解析を行うことが一般的である。しかし、微生物種の中にはゲル化剤として寒天を用いた場合には生育せず、ジェランガムを用いた場合に生育可能な種も存在することが報告されている (Tamaki, *et al*, 2005)。さらに原らは、ゲル化剤としての寒天に含まれる極微量のフランカルボン酸類が微生物の遊走を阻害し、結果としてコロニーの広がりを抑制することを明らかにしている (Hara, *et al*, 2012)。また、

寒天培地を作成する際にリン酸と混合してオートクレーブ処理を行った培地は、それぞれオートクレーブ処理を行った後に混合した培地と比較してコロニーの形成数が減少する (Tanaka, et al., 2014)。上記のように一般的な手法を用いる中でも、試料中の微生物種に対して予期せぬ選択圧がかかり、結果として見落とされている種が存在することを示唆している。

1.3 他の微生物が生産する生育因子を必要とする微生物

微生物は環境中において異種微生物間の相互作用を介した複雑なコミュニティを形成している。このような相互作用についての精緻な解明がなされている例は少ないが、その中で存在している微生物種の中には自身の増殖に必須である増殖因子を他種微生物の供給に依存している例もある。詳細は 4. 微生物増殖因子として作用する化合物の項にて述べる。

1.4 種間水素伝達を行う共生微生物

多くの嫌気性微生物は脂肪酸やアルコール類を酸化する過程で水素を発生する (Nakashimada, Nishio, 2007)。しかし、一定濃度以上の水素の蓄積は、微生物の嫌氣的酸化反応を阻害する。環境中においては、これらの微生物群は単独では生育が困難であり、発生する水素を速やかに除去する微生物を必要としている。実際に環境中の菌叢を *in situ* hybridization などの手法で観察すると、水素発生を行う微生物の周囲を取り囲むように水素資化性メタン生成古細菌が存在し、共生している例がある (Sekiguchi, et al, 1999)。これらの水素発生型嫌気性微生物の中には、特殊な基質を用いることによって純粋培養が可能な種も存在するが、完全に水素資化性メタン生成古細菌に依存した生活環しか持たない、嫌気共生細菌と呼ばれる種も存在する (Imachi, et al, 2006)。

1.5 昆虫や動物などに共生する微生物

昆虫をはじめとする動物の体内には様々な微生物が共生している。特徴的な例としてアブラムシの体内に存在する菌細胞と呼ばれる特殊な細胞内の中に存在している *Buchanera* 属が挙げられる。この微生物はアブラムシと高度な共生関係を築いており、宿主が合成できないアミノ酸合成経路を持つ一方、宿主が合成可能なアミノ酸の生合成経路や、膜を構成するリン脂質、あるいは環境応答に対応する制御遺伝子系を欠損しているなど、宿主との共生を前提とした生活環を持っている (Shigenobu, et al., 2000)。このような微生物種は、宿主が存在しない実験室条件において純粋に培養することは困難であり、難培養微生物とされている。

Kamagata は、上記の他に、生育に一定以上の細胞濃度を必要とする微生物や、そもそも環境中で非優占的な微生物も難培養微生物の特徴の一つとして挙げている。何

れにしても、難培養微生物の存在は、その種が存在している環境において増殖に必要な存在（増殖期間、増殖に必須な化合物の有無、他種微生物、共生している生物など）が実験室条件において再現されていないことが原因であり、これらを考慮入れた難培養微生物の培養技術の開発が検討されなければならない。

2 難培養微生物研究の意義

難培養微生物を培養可能にする意義の一つとして、天然物ライブラリの発展につながる事が挙げられる。多くの不斉中心を持つ構造や複雑な環構造など、多様な構造を有した生理活性物質が天然物より多数見出されており、これら天然物は医薬品のリード化合物として重要である。実際に 2010 年に認可された医薬品のうち、天然物及び天然物からのリード化合物は全体の 50%を占めており（Newman and Cragg, 2012）、天然物ライブラリの拡大はさらなる新規医薬品開発につながる。しかし、環境破壊による植物の絶滅によってもたらされる生物多様性の縮小や、それらを保護するため 1993 年に締結された生物多様性条約は、従来の方法論による天然物探索を困難にしている。

このような問題を解決するためには、さらなるリード化合物の探索領域の拡大が重要な課題である。難培養微生物の培養技術の確立はこの課題に対して知見を与えることが可能であると考えられる。これまでに多くの生理活性物質が、微生物の二次代謝物質から見出されてきていることから、難培養微生物の培養技術の確立を行うことで、さらなる生理活性物質の探索領域が広がる。その結果として新たな医薬品リード化合物の発見につながる事が期待される。

実際に、土壌の難培養微生物である *Eleftheria terrae* より新規抗生物質である teixobactin が近年見出されている（Ling, *et al.*, 2015）。Teixobactin は既存の抗生物質に耐性をもつ黄色ブドウ球菌（MRSA）に対しても 0.25 µg/mL の最少有効濃度で阻害活性が認められており、新たな医薬品として期待されている。

3 既存の難培養微生物の培養技術

近年、PCR 法やメタゲノム解析技術の発展により、培養を介さずに微生物のゲノムに直接アクセスし、細菌叢の全体像を解析することが可能になった。しかし一方で、新たな微生物の機能発見や微生物由来の生理活性物質の取得のために、難培養微生物を実際に純粋培養可能にする技術の確立は、今なお重要な課題である。この課題を解決するために、これまでにいくつかの難培養微生物を純粋培養するための手法が報告されている。

Kaeberlein らは、0.3 μm のメンブレンフィルターと金属のワッシャーを用いた diffusion growth chamber (Fig. 1.1) を用いた培養方法を開発した。通常のペトリ皿を用いた培養法では播種細胞数から 6%程度しかコロニーを形成しなかったのに対し、diffusion growth chamber を用いることにより最大で 40%近くコロニーの形成数が増加することを報告している (Kaeberlein, *et al.*, 2002)。

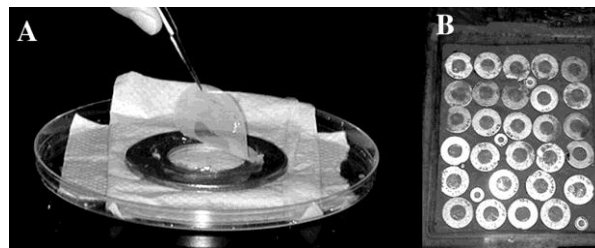


Fig. 1.1 Kaeberlein らによる diffusion growth chamber を用いた培養方法。海洋の堆積物から採取した微生物サンプルを 0.3 μm のメンブレンフィルターで挟むことにより、下層の同環境中の海水を用いた寒天培地との間で化合物のみが交換される。図は論文中より抜粋。

また Nichols らは diffusion growth chamber を用いた培養方法をさらにハイスループット化するために、ichip を用いた培養を行っている (Fig. 1.2) (Nichols, *et al.*, 2010)。

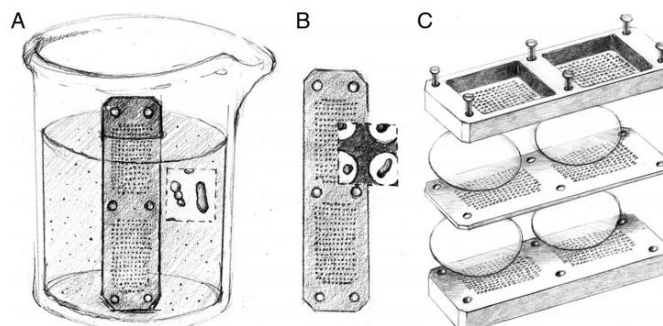


Fig. 1.2 Nichols らによる ichip を用いた培養方法。192 穴を有する ichip プレートに微生物サンプルを格納し、メンブレンフィルターで挟んだ後に培養することによって diffusion growth chamber を用いた培養をよりハイスループットに行うことができる。図は論文より抜粋。

また、Manome らや Zengler らは、gel microdroplet (GMD)法を用いた難培養微生物の培養方法を報告している。GMD 法とは環境中の微生物試料をゲルとともに混合し、エマルジョン化させて、小さな液滴中に個々の細胞が内包されたものを、カラム内に充填した培養液中で培養を行い、ゲル内で増殖が認められたものをフローサイトメトリーでソーティングし、解析を行う手法である。Zengler らは GMD 法を用いて海洋試料中の微生物に対する培養を行い、GMD 法によってコロニーを形成した微生物の中には新規な微生物が含まれていることを報告している (Manome, *et al.*, 2001; Zengler, *et al.*, 2002)。

上記の難培養微生物を培養するための手法は、いずれも難培養微生物が存在する環境中の、化合物を介した相互作用を実験室条件で再現するための試みである。これらの研究は一般的な培地条件には含まれていない、微生物が生産する化合物の存在が難培養微生物の培養に重要であることを示唆している。

4 微生物増殖因子として作用する化合物

節 1.3 で述べたように、環境中の微生物は周囲の微生物との化合物を介したコミュニティを形成しており、その化合物を自身の増殖因子として要求する難培養微生物が存在する。以下に例を挙げる。

4.1 *Symbiobacterium thermophilum* が要求する増殖因子

偏好気性微生物である *Symbiobacterium thermophilum* (*S. thermophilum*) は、堆肥試料より熱安定性のトリプトファンゼおよびβ-チロシナーゼ生産菌のスクリーニング中に見出された。*S. thermophilum* は単独では増殖せず、*Bacillus* や他の細菌の培養上清を添加すると著しく増殖が促進することが報告されている (Suzuki, *et al.*, 1988; Ohno, *et al.*, 1999)。*S. thermophilum* に対する増殖因子の研究により、*S. thermophilum* はペプチド性因子、NH₄⁺で代替できるカチオン、及び炭酸ガスの少なくとも 3 種の因子を増殖因子として要求することが明らかになっている (Ueda, Beppu, 2007)。

4.2 増殖因子としてのキノン類

キノンは一般的に電子伝達系における電子受容体として、生体内において必須の化合物である。微生物種の中には、自身の増殖因子として他種が生産するキノン類を要求する種も存在する。

Propionibacterium freudenreichii ET-3 株 (*P. freudenreichii*) が生産する

2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone (Fig. 1.3) は、*Bifidobacterium longum* (*B. longum*) の呼吸経路に対して電子伝達体として機能することで増殖促進因子として働くことが知られている (Mori, *et al.*, 1997)。また、*P. freudenreichii* が生産する 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (Fig. 1.4) が *Bifidobacterium* に対して広く増殖促進因子として作用することが報告されている (Isawa, *et al.*, 2002)。

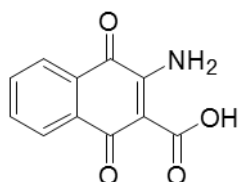


Fig. 1.3 *P. freudenreichii* が生産する *B. longum* に対する増殖因子。

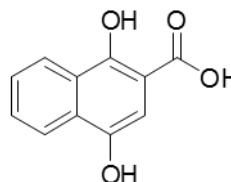


Fig. 1.4 *P. freudenreichii* が生産する *Bifidobacterium* に対する増殖因子。

ピロロキノリンキノン (PQQ) は酸化還元補酵素として見出された化合物であるが、多くの微生物の増殖を促進することで知られている。Amemiya らは少なくとも 4 種の微生物種 (*Acetobacter aceti*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acetobacter rances*, *Awamori yeast*) について、PQQ 添加条件において増殖が促進されることを報告している (Amemiya, *et al.*, 1984)。

4.3 *Frateuria* sp. ECK130 株が要求する増殖因子

Xyris complanata の根圏に存在する *Frateuria* sp. ECK130 株は、同環境中より見出された *Sphingomonas* sp. ECK085 株培養液に含まれる linear (*R,R,R,R*)-3-hydroxybutyrate tetramer (HB4) (Fig. 1.5) によって増殖が促進される (Ogita, *et al.*, 2006)。

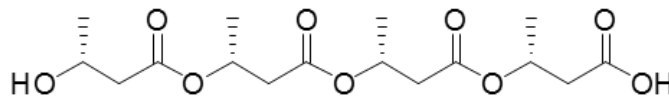


Fig. 1.5 *Sphingomonas* sp. ECK085 株が生産する *Frateuria* sp. ECK130 株に対する増殖因子。

4.4 増殖因子としてのシデロフォア

シデロフォアとは、主に Fe^{3+} と錯体を形成する比較的低分子の化合物で、微生物が環境中より Fe^{3+} を獲得し、利用するために生産される化合物である (Neilands, 1995)。生体内において、鉄は多くの代謝や DNA 合成など重要な生命活動に利用さ

れており、 Fe^{3+} を外部から獲得することは自身の微生物の生命活動に重要である。そのため、多くの微生物種が多様なシデロフォアを生産していることが知られている (Fig. 1.6) (Willson, *et al.*, 2016)

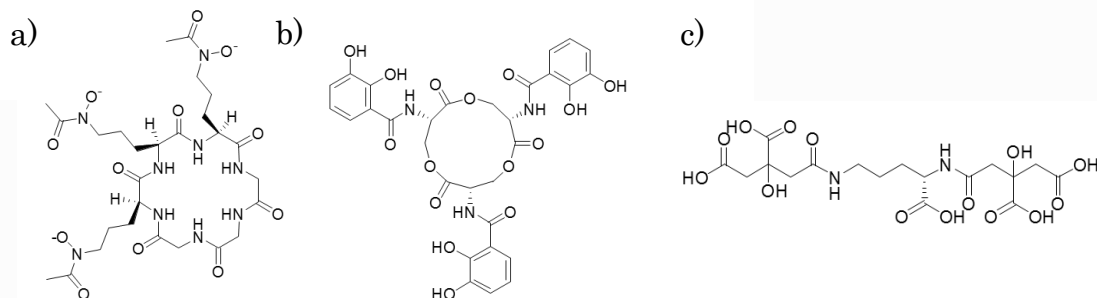


Fig. 1.6 報告されている微生物が生産するシデロフォアの例。a) *Ustilago sphaerogenay* より見出されたフェリクロームの構造 (Neilands, 1952) b) *Escherichia coli* などのグラム陰性菌が生産するエンテロバクチンの構造 (Brein and Gibson, 1970) c) *Staphylococcus aerius* が生産するスタフィロフェリン A の構造 (Konetschny-rapp, *et al.*, 1989)。

こ

れらのシデロフォアは、 Fe^{3+} を獲得するために生産者自身が生合成可能な例であるが、環境中には、必要なシデロフォアを他の微生物種に依存している種も存在する。D'Onofrio らは、潮間帯に生息する難培養微生物である *Maribacter polysiphoniae* KLE1104 (*M. polysiphoniae*) が、固体培地上で *Micrococcus luteus* KLE1011 (*M. luteus*) の周辺においてのみ良好に生育することを見出した。この2種間の相互作用を媒介する化合物の探索を行った結果、*M. polysiphoniae* は *M. luteus* が生産する5種のシデロフォアを自身の増殖に要求していることが明らかとなった (Fig. 1.7) (D'Onofrio, *et al.*, 2010)。

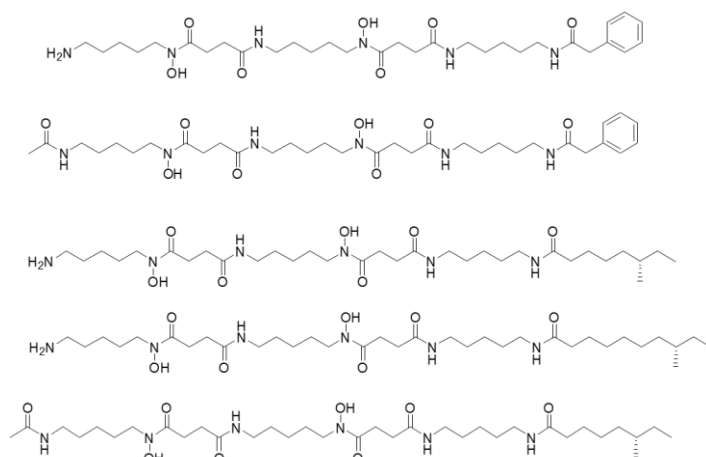


Fig. 1.7 *M. luteus* が生産するシデロフォアの構造。 *M. polysiphoniae* は自身の増殖に *M. luteus* が生産するシデロフォアを要求する。

4.5 Resuscitation promoting factor (Rpf)

Micrococcus luteus は飢餓状態に入った静止期を、室温条件においてさらに長時間維持することによって多くの細胞が VBNC 状態になることが知られている (Votyakova, *et al.*, 1994)。Mukamolova らは、VBNC 状態の *M. luteus* に対して増殖後期の *M. luteus* 培養液に含まれる 16–17 kDa のタンパク質を与えることで、*M. luteus* の休眠状態から再び増殖可能な状態に蘇生することを報告している (Mukamolova, *et al.*, 1999)。Mukamolova はこのような VBNC 状態の微生物に対して増殖活性を示すタンパク質を Resuscitation promoting factor (Rpf) と命名し、*M. luteus* から見出された Rpf が他種微生物 (*Mycobacterium avium*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium kansasii*、*Mycobacterium smegmatis*、*Mycobacterium tuberculosis*) に対しても同様の増殖促進活性を示すことを明らかにしている。

以上に述べたように、環境中において多様な種類の化合物が難培養微生物に対する増殖因子として見出されている。これら増殖因子の探索は、難培養微生物の培養技術の確立に大きな知見を与えるものと考えられる。

5 GF9 株と 3 種の微生物

産業技術総合研究所生物資源情報基盤研究グループの Tanaka らは、微生物間の相互作用を媒介する難培養微生物増殖因子に対する探索を行い、活性汚泥試料から増殖因子の供給者として *Spingopyxis* sp. GF9 株、要求株として 3 種の微生物 (ASTN45 株、ASN212 株、*Catellibacterim nectariphilum* AST4 株) を発見した (Tanaka, *et al.*, 2004)。ASTN45 株及び ASN212 株はそれぞれ *Bosea minatitlanensis* および *Leucobacter komagatae* と近縁種である。AST4 株、ASTN45 株及び ASN212 株は、GF9 株が生産する、それぞれ異なった増殖因子を受け取ることで増殖が促進される (Fig. 1.8)。

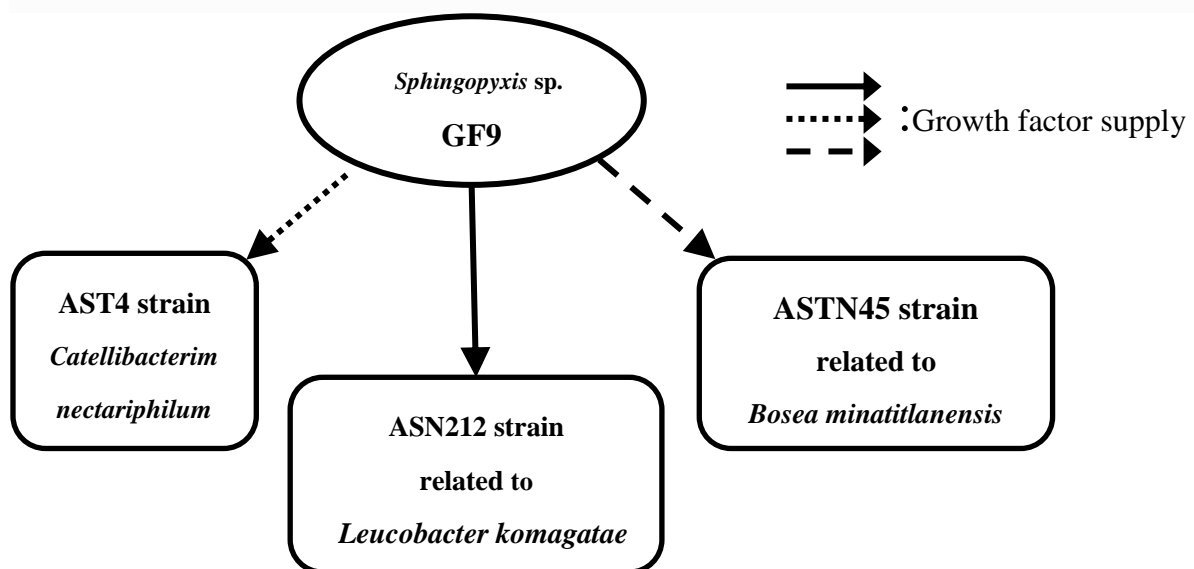


Fig. 1.8 GF9 株と 3 種の菌株。AST4 株、ASN212 株、ASTN45 株はそれぞれ GF9 株が供給する異なった増殖因子を自身の増殖に要求している。

6 ASN212 株が要求する増殖因子

3種の難培養微生物のうち、*Leucobacter* sp. ASN212 株は Actinobacteria 門に属し、Proteobacteria 門に属する GF9 株とは分類が大きく異なる。このような門レベルを超えた微生物間相互作用はこれまで知られておらず、難培養微生物の培養技術の確立に大きな知見を与えることができると考えられる。ASN212 株に対する増殖因子の探索を行った探索の結果、6種の coproporphyrin I (Cop. I) 及び coproporphyrin III (Cop. III) 類縁化合物が ASN212 株に対する増殖因子として見出された (Bhuiyan, *et al.*, 2016) (Fig. 1.9)。Cop. III は *Staphylococcus aureus* に対してバイオフィーム形成及び凝集因子としては報告されていた (Wollenberg, *et al.*, 2014) が、増殖因子としては今回初めて見出された。

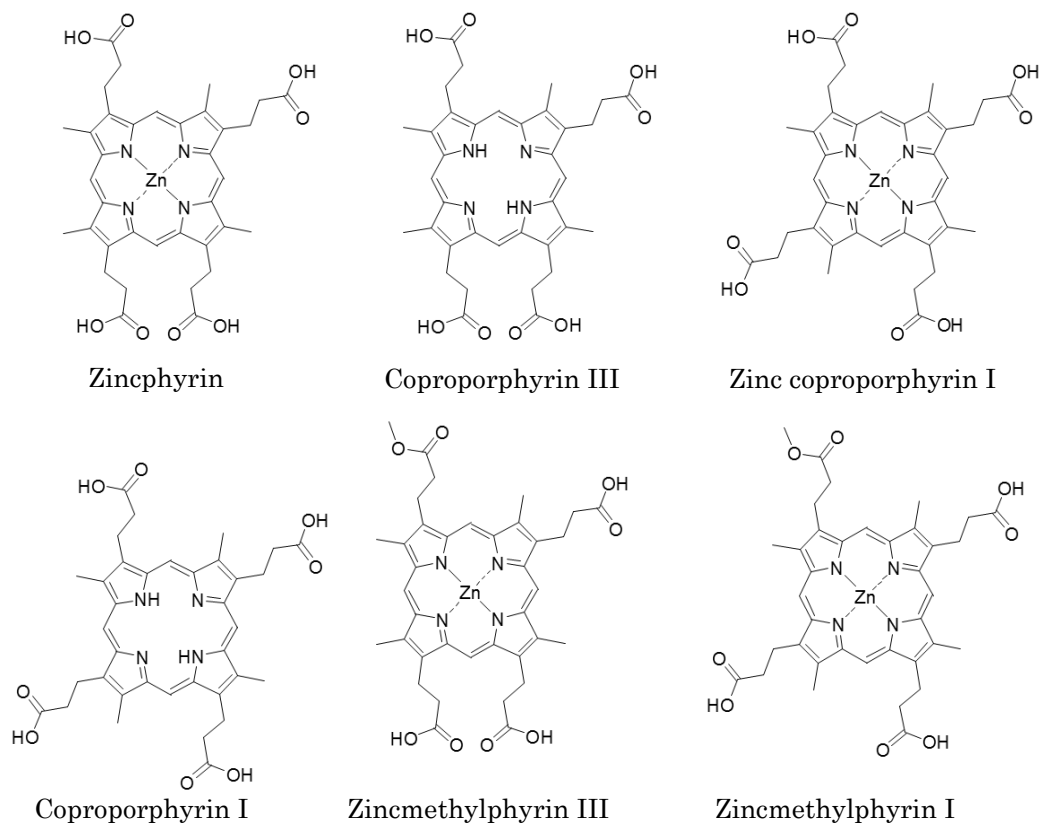


Fig. 1.9 GF9 株培養上清より見出された ASN212 株に対する増殖因子。

これら 6 種の Cop.類は、GF9 株培養上清 210 L からわずか 0.3 mg から 8 mg 程度しか単離されておらず、これは環境中においても極めて低濃度で ASN212 株に対して作用していることを示している。実際に得られた増殖因子はすべてサブナノモラーからナノモラー程度の濃度で ASN212 株に対して増殖活性を示した。一方で、市販の heme 類縁体は、ASN212 株に対して増殖活性を示さない、あるいは低い活性しか示さないことも明らかにしている (Table 1.1)。

Table 1.1. GF9 株から見出された増殖因子と市販の heme 類縁体の MEC。

Growth factor (from GF9)	MEC (nM)	Commercial porphyrins compound	MEC (nM)
Zinc coproporphyrin I	2.0×10	Hematin	2.4×10 ³
Coproporphyrin I	3.8×10	Hemin	1.2×10 ³
Zincphyrin	1.4×10 ⁻²	Other porphyrins	n.a.*
Coproporphyrin III	1.5		
Zincmethylphyrin I	9.6		
Zincmethylphyrin III	4.8		

n.a.* : no activity even at 1.0 mg/mL

このように既知の微生物増殖因子とは異なった特徴をもつ Cop.類は、あらたなクラスの微生物増殖因子である。Cop.類に対する作用機序と活性の普遍性について検討を行うことで、難培養微生物の培養技術に新たな知見を与えることができると期待される。

7 本研究の目的

本研究では、GF9 株が生産する異種微生物に対する増殖因子についての未解明な事項の解明を目的とし、各章において以下の点について検討した。1 章では、GF9 株が生産する ASTN45 株に対する増殖因子の単離及び精製を目的として先行研究により部分精製された 40 mg の活性画分に対して、HPLC による精製を行った。2 章では、GF9 株が生産する AST4 株に対する増殖因子の単離及び精製を目的として、50 L の GF9 株培養上清より各種クロマトグラフィーを用いた精製を行った。3 章では、ASN212 株の増殖因子として見出された Cop.類のうち、金属錯体として Zn 錯体が見出されたことに注目し、各種金属錯体についての構造活性相関研究と ASN212 株のゲノム解析によって、その作用機序を明らかにすることを目的とした。さらに、Cop. III の示す増殖活性について普遍性を検証するため、細菌叢における Actinobacteria 門と Firmicutes 門を中心に Cop. III に対する応答を検証した。

1 章 *Bosea minatitlanensis* 近縁種 ASTN45 株に対する

増殖因子の探索

1. 目的

筆者が先行研究において 210 L の GF9 株培養上清から部分精製を進めて得た 40 mg の ASTN45 株に対する活性画分は、夾雑物が含まれていたため、増殖因子の特定には至らなかった。本章では、先行研究で得られた活性画分に対してさらなる精製を行うことで ASTN45 株に対する増殖因子の特定を目的とした。

2. 実験方法

2. 1 試薬

本研究において用いた試薬は、特に言及がない限り富士フィルム和光純薬社製の試薬を無精製のまま使用した。

2. 2 培地組成

NPB 培地 :

10.0 g Bacto Tryptone (Difco)、2.0 g Yeast extract (Difco)、1.0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.0 g K_2HPO_4 、0.5 g KH_2PO_4 、5.0 g D-glucose、1 L Milli-Q 水
各成分を混合した後、121°C、15 分間オートクレーブ処理を行って使用した。

2. 3 微生物種

本章で用いた微生物種である *Bosea minatitlanensis* 近縁種 ASTN45 株は、産業技術総合研究所より供与され、当研究室で 10%DMSO、-82°C でストックされたものを使用した。

2. 4 使用装置

HPLC SC762 system (GL Science): Interface: SC762; Column oven: CO705;
UV-VIS detector: UV702; Pump: PU714.

HPLC Chromaster system (HITACHI): Interface box; Organizer; Diode array

detector: 5430; Column oven: 5310; Pump: 5110.

質量分析 : Exactive (Thermo Fisher Scientific)

プレートシェイカー : MS 3 ベーシック (IKA)

プレートリーダー : SUNRISE REMOTE (TECAN)

2. 5 ASTN45 株に対する増殖因子の精製

本研究における精製に供した活性画分は、Fig. 2.1 に示した手順によって先行研究で筆者が生成した 40 mg の活性画分である (Takai, 2015)。

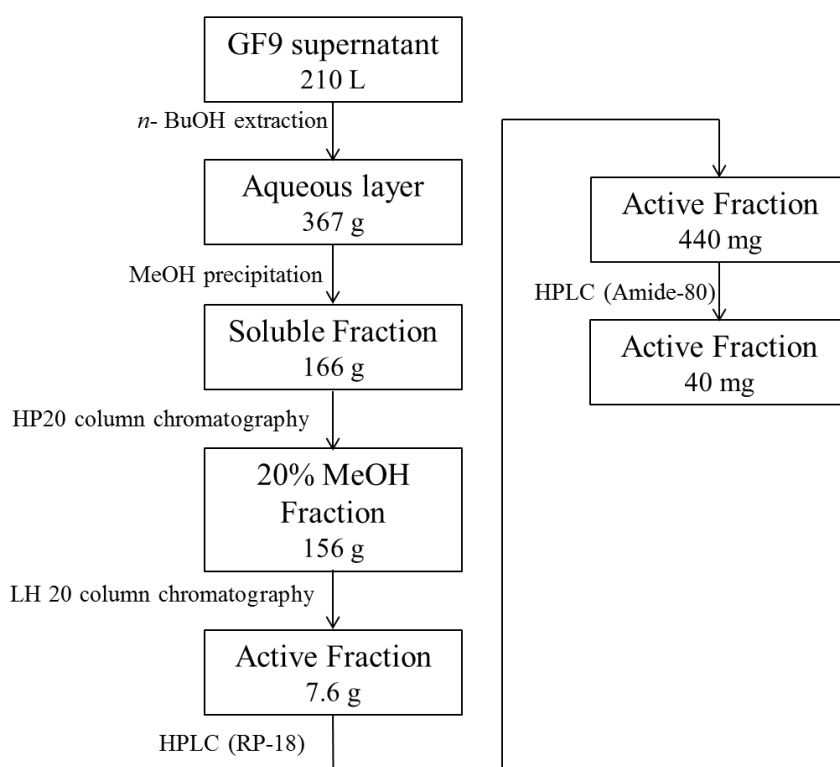


Fig. 2.1 先行研究において行われた、GF9 株からの ASTN45 株の精製過程。

先行研究にて最終的に得られた 40 mg の活性画分に対して、HPLC SC762 system を用いて以下の条件で精製を行った。

使用カラム : TSKgel Amide-80 215-30 mm (10 μm) ;

移動相 : H₂O/ MeCN (MeCN77-75 %を 0-30 min で gradient);

流速 : 15.0 mL/min; 検出波長 : 210 nm 及び 245 nm; 注入量 : 500 μL

分画後、得られた 3.0 mg の活性画分に対して、HPLC Chromaster system を用いて以下の条件でさらに精製を行った。

使用カラム : InertSustainAQ-C18 250×4.6 mm (3 μm) (GL science)

移動相 : H₂O、流速 : 1.5 mL/min、検出波長 : 210 nm、注入量 : 25 μL

2. 6 ASTN45 株の増殖活性評価

精製によって得られた画分の ASTN45 株に対する増殖活性評価は、以下の条件で行われた。48 穴マイクロプレート (BD falcon) の各ウェルに対して 320 μL NPB 培地、40 μL 評価サンプル、40 μL ASTN45 株ストックを加えたものを 1 試料あたり 3 ウェル調製し、プレートシェーカー上で 37°C、48 時間、600 rpm の条件で培養を行った。培養後、100 μL を採取し 96 穴プレートに分注したのち、プレート吸光度測定器を用いて 595 nm の波長で濁度を測定し、増殖量を評価した。また、得られた活性画分量を元の培地 (210 L) で除した値を equivalent concentration (E.C.) と定義し、各評価サンプルは E.C. の 10 倍濃度に調整して添加した。

2. 7 ASTN45 株に対する増殖活性画分の構造解析

精製によって得られた活性画分に対して、NMR 及び質量分析による構造解析を行った。NMR に関して、D₂O (関東化学) を用いて試料を作成し北海道大学 GC-MS/NMR 測定室に依頼し、Bruker AMX-500 で測定した。質量分析は Exactive を用いて Dual ESI 法でイオン化を行ない、測定を行った。

3. 結果と考察

3. 1 ASTN45 株に対する増殖因子の精製

先行研究において得られた活性画分に対して Amide-80 カラムを用いた HPLC による分画を行った結果を Fig. 2.2 に示す。

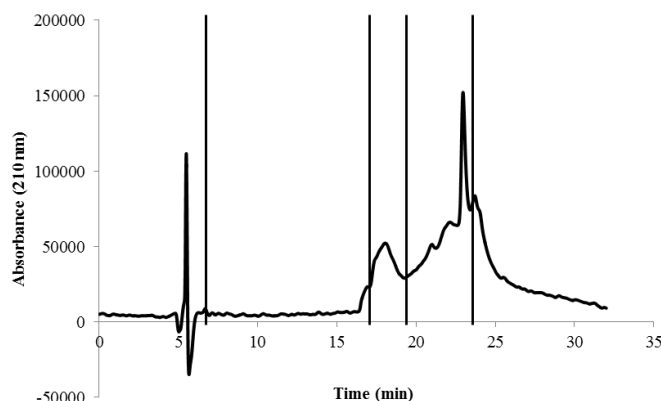


Fig. 2.2 ASTN45 株増殖活性画分の Amide-80 HPLC クロマトグラム。

得られたクロマトグラムにしたがって、Fr. 0 (0–5.8 min)、Fr. 1 (5.8–16.6 min)、Fr. 2 (16.6–19.0 min)、Fr. 3 (19.0–23.3 min)、Fr. 4 (23.3–30 min) の5画分に分画した。得られた画分の一部を減圧乾固した後、10 x E.C.となるように再溶解して、ASTN45 株に対する活性評価を行った。活性評価の際、control として評価サンプルとして水を与えたものも測定した (Fig. 2.3)。

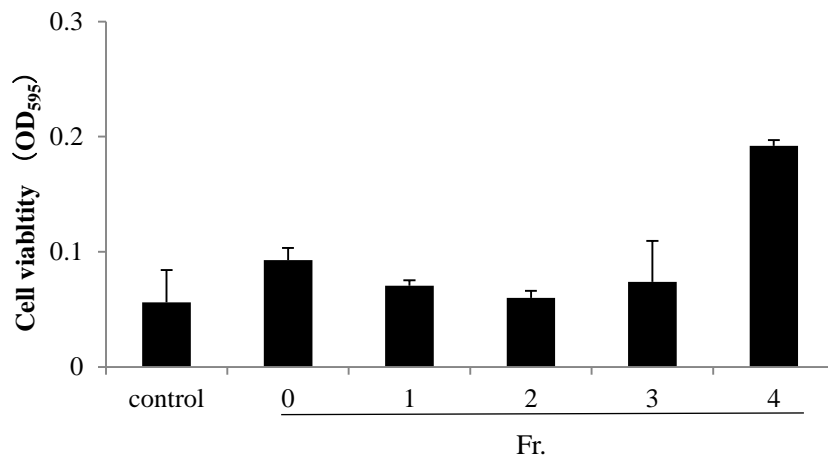


Fig. 2.3 Amide-80 HPLC によって得られた画分の、ASTN45 株に対する活性評価。

活性評価の結果、Fr. 4 に対して最も高い活性がみられた。得られた 3.0 mg の Fr. 4 について、さらなる分画を行った。Fr. 4 に対して InertSustainAQ-C18 を用いた HPLC による分画を行った結果を Fig. 2.4 に示す。

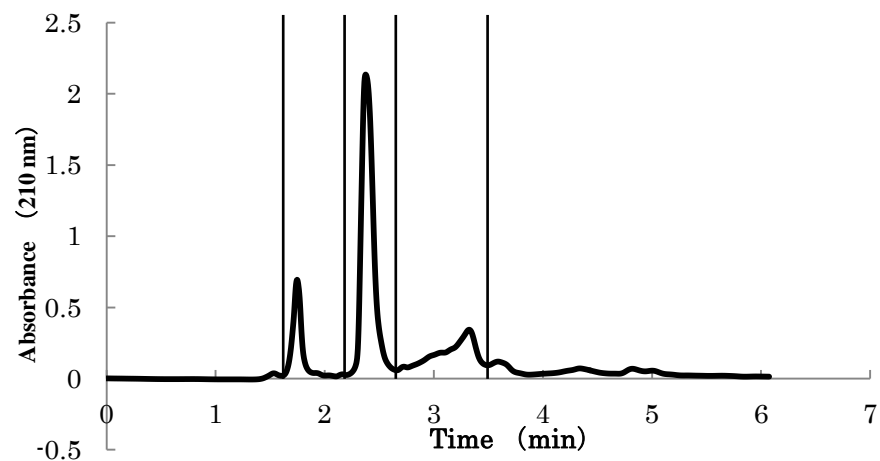


Fig. 2.4 InertSustainAQ-C18 HPLC のクロマトグラム。

得られたクロマトグラムにしたがって、Fr. 0 (0–1.6 min)、Fr. 1 (1.6–2.1 min)、Fr. 2 (2.1–2.8 min)、Fr. 3 (2.8–3.5 min)、Fr. 4 (3.5–6 min) の 5 画分に分画した。得られた画分の一部を減圧留去した後、10 x E.C.となるように再溶解して、ASTN45 株に対する活性評価を行った。(Fig. 2.5)。活性評価の結果、Fr. 1 について最も高い活性が見られた。

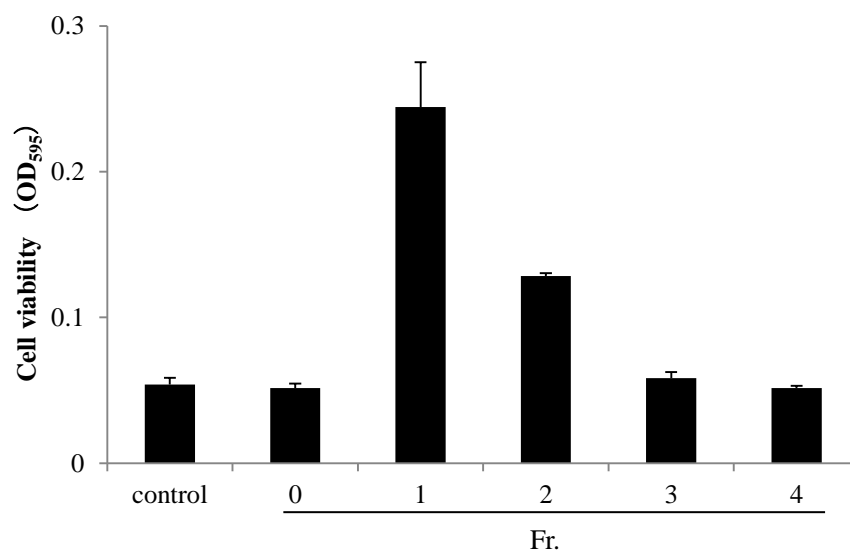


Fig. 2.5 InertSustainAQ-C18 HPLC によって得られた画分の ASTN45 株に対する活性評価。

3.2 ASTN45 株に対する増殖活性画分の構造解析

活性が見られた 0.9 mg の活性画分に対して、質量分析を用いた構造解析を行った。質量分析の結果、positive mode で見られた $[M+Na]^+ = m/z 465.17$ および negative mode で見られた $[M-H]^- = m/z 441.18$ のピークから予想される $m/z 442$ の分子量をもつ化合物、および positive mode で見られた $[M+H]^+ = m/z 264.16$ および negative mode で見られた $m/z 262.15$ のピークから予想される $[M-H]^- = m/z 263$ の分子量をもつ化合物が含まれていることを示唆する結果が得られたが、NMR による解析では活性画分にはいまだ夾雑物が含まれていると思われる結果を得た (Chart1 及び 2)。

4. 結論

本研究において、先行研究において行われた 210 L の GF9 株培養上清よりの精製によって得られた、40 mg の ASTN45 株に対する増殖活性画分に対して、HPLC による精製を行った。先行研究においても、ASTN45 株増殖因子は GF9 株培養上清より *n*-BuOH によって抽出されない高極性化合物であり、ODS を用いた精製においても非吸着画分に含まれる物質であることがわかっていた。そこで、Amide-80 を用いた親水性相互作用クロマトグラフィーによって極性物質の精製を行った。最終的に 210 L の GF9 株培養上清より 0.4 µg/mL で活性を示す 0.9 mg の画分の部分精製に成功した。ASTN45 株も、ASN212 株と同様にごく低濃度で活性を示す物質であり、また、*n*-BuOH によって抽出されない高極性物質であり、一般的な逆相カラムを用いた HPLC などでは精製が困難な化合物であると考えられ、親水性相互作用クロマトグラフィー (Amide-80) による分画を用いたが、特定には至らなかった。難培養微生物の増殖因子の探索には、培養条件中に存在するごく微量の増殖因子の探索が重要であると考えられる。

2 章 *Catellibacterim nectariphilum* AST4 株に対する

増殖因子の探索

1. 目的

AST4 株に対する増殖因子の探索は、当研究室の先行研究 (Boey, 2009) において 1 L の GF9 株培養上清より精製行われたが、特定には至らなかった。そこで本研究では、大量培養によって得られた 50 L の GF9 株培養上清から精製を行うことで、AST4 株に対する増殖因子を特定することを目的とした。

2. 実験方法

2. 1 試薬

本研究において用いた試薬は、特に言及がない限り富士フィルム和光純薬社製の試薬を無精製のまま使用した。

2. 2 使用装置

100 L 容ジャーファメンター : MPF-U 型 100 L (丸菱)

連続高速遠心分離機 : H-2000B (KOKUSAN)

HPLC SC762 system (GL Science): Interface: SC762; Column oven: CO705;
UV-VIS detector: UV702; Pump: PU714.

HPLC Chromaster system (HITACHI): Interface box; Organizer; Diode array
detector: 5430; Column oven: 5310; Pump: 5110.

質量分析: Exactive (Thermo Fisher Scientific); LTQ-Orbitrap XL (Thermo
Fisher Scientific)

プレートシェイカー : MS 3 ベーシック (IKA)

プレートリーダー : SUNRISE REMOTE (TECAN)

2. 3 培地組成

本研究において使用した培地は、以下の成分を混合した後 121°C、15 分間オートクレーブ処理を行って使用した。

GF9 株大量培養培地：

5.0 g Bacto Tryptone (Difco)、2.0 g Yeast extract (Difco)、1.0 g MgSO₄ · 7H₂O、
1.0 g K₂HPO₄、1 L Milli-Q 水

NPB 培地：前章に記載

2. 4 微生物種

本章において用いた微生物種を以下に記載する。

- ・ *Catellibacterim nectariphilum* AST4 株
- ・ *Sphingopyxis* 属 GF9 株

AST4 株および GF9 株は、産業技術総合研究所より供与され、当研究室で 10%DMSO、-82°C でストックされたものを使用した。

2. 5 GF9 株の培養上清の取得

GF9 株大量培養培地 60 L に対して、前培養を行った GF9 株(600 mL)を播種し、700 rpm、35°C、72 時間、1 vvm の通気量条件で培養を行った。培養後、8000 rpm の条件で連続高速遠心分離機を用いて菌体を除去し、50 L の GF9 株培養上清を得た。

2. 6 AST4 株に対する増殖因子の精製

AST4 株に対する増殖因子について以下の過程で精製を行った (Fig. 3.1)。

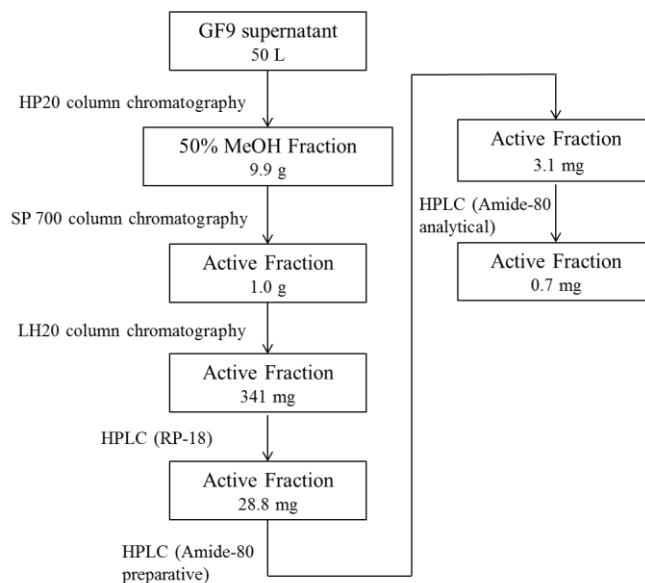


Fig. 3.1 AST4 株に対する増殖因子の精製の過程。

得られた GF9 株培養上清を減圧留去後、10 L HP20 (三菱化学) を用いたカラムクロマトグラフィーに供した。水を用いて充填したカラムにサンプルをアプライ後、10% MeOH、50% MeOH 及び MeOH をそれぞれ 30 L ずつ移動相として用いて分画を行った。先行研究に従って 50% MeOH 画分を回収し、減圧留去して 9.9 g の活性画分を得た。9.9 g の活性画分に対して、700 mL SP700 (三菱化学) を用いたカラムクロマトグラフィーに供した。25% MeOH を用いて充填したカラムにサンプルをアプライ後、水、25% MeOH、50% MeOH、MeOH をそれぞれ 3 L ずつ移動相として用いて分画を行った。活性が見られた 1.0 g MeOH 画分に対して、800 mL LH20 (Shodex) を充填したカラムを用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供した。15% MeOH を用いて平衡化したカラムにサンプルをアプライ後、15% MeOH を移動相として用いて 100 mL ごとに 8 画分に分画した後 50% MeOH を移動相として用いて 400 mL ごとに 2 画分に分画した。

活性が見られた 341 mg の活性画分に対して HPLC SC762 system を用いて以下の条件で精製を行った。

使用カラム : Mightysil RP-18 250-20 (5 μ m) (関東化学) ;

移動相 : 9% H₂O/ 91% MeOH (関東化学) ;

流速 : 10.0 mL/min; 検出波長 : 210 nm 及び 245 nm; 注入量 : 500 μ L

分画後得られた 28.8 mg の活性画分に対して HPLC SC762 system を用いて以下の条件で精製を行った。

使用カラム：TSKgel Amide-80 215-30 mm (10 μ m) (東ソー)；

移動相：19% H_2O / 81%MeCN (関東化学)；

流速：10.0 mL/min; 検出波長：210 nm 及び 245 nm; 注入量：500 μ L

分画後得られた 3.1 mg の活性画分に対して HPLC chromaster system を用いて以下の条件で精製を行った。

使用カラム：TSKgel Amide-80 15-4.6 mm (3 μ m) (東ソー)；

移動相：10% H_2O / 90%MeCN;

流速：1.0 mL/min; 検出波長：210 nm; 注入量：10 μ L

2. 7 AST4 株の増殖活性評価

各精製によって得られた画分の AST4 株に対する増殖活性評価は以下の条件で行われた。48 穴マイクロプレートに対して 260 μ L NPB 培地、100 μ L 評価サンプル、40 μ L AST4 株ストックを加え、プレートシェーカー上で 37°C、48 時間、600 rpm の条件で培養を行った。培養後、100 μ L とり 96 穴プレートに分注したのちプレート吸光度測定器を用いて 595 nm の波長で濁度を測定し、増殖量を評価した。また、得られた活性画分量を元の培地 (50 L) で除した値を equivalent concentration(E.C.) と定義し、各評価サンプルは E.C.に調整して添加した。

2. 8 AST4 株に対する増殖活性画分の構造解析

GF9 株培養上清からの精製によって得られた活性画分に対して、以下の条件で NMR 及び質量分析による構造解析を行った。NMR による解析は DMSO- d_6 (Acros) を用いて試料を調製し、北海道大学 GC-MS/NMR 測定室に依頼し、Bruker AMX-500 で測定した。本研究における質量分析およびタンデム質量分析はすべて、北海道大学共用機器管理センター委託分析部門に依頼して測定を行った。質量分析は Exactive を用いて Dual ESI 法でイオン化を行った。タンデム質量分析に関して、以下の条件で分析を行った。

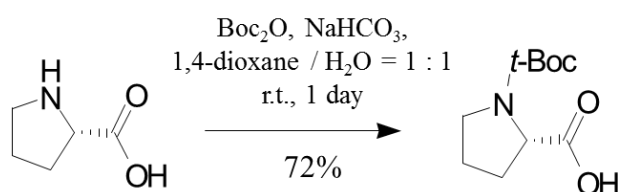
使用機械：LTQ-Orbitrap XL; イオン化法：Dual ESI; スプレー電圧：4.0 V;

キャピラリー電圧：15 V; チューブレング電圧：55 V

2.9 Cyclo (D-His-L-Pro) の合成

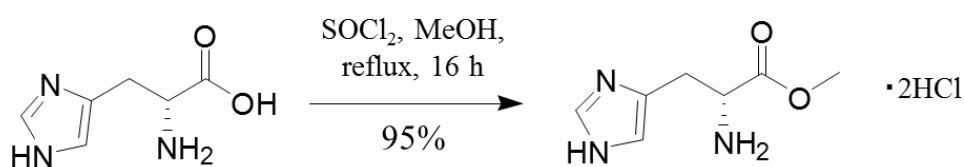
Cyclo (D-His-L-Pro) の合成は先行文献の反応条件に従って以下の条件で行った (Kukula, *et al.*, 1985)。TLC は K6F SilicaGel 60A (Merck) を使用した。カラムクロマトグラフィーには関東化学株式会社 Silica Gel 60N (spherical, neutral) (40-50 μm) を使用した。 ^1H NMR (270 MHz) スペクトルは JEOL-GX270 を使用して測定を行った (Chart 3-5)。

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-proline の合成



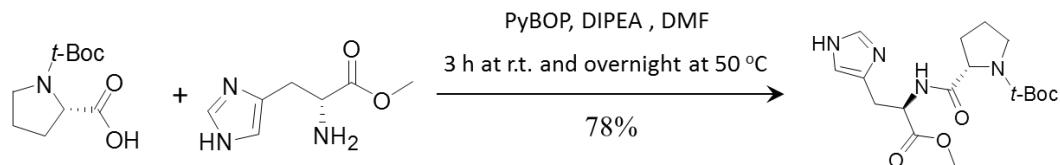
L-Proline 1.50 g (13.0 mmol) を 25.0 mL 1,4-dioxane (関東化学) : $\text{H}_2\text{O} = 1:1$ 溶液に溶かし、2.70 g (32.5 mmol) の NaHCO_3 を加えた。溶液を 0°C に冷却したのち、3.40 g (15.6 mmol) の di-*tert*-butyl dicarbonate (東京化成工業) を滴下し、一晩反応させた。反応後、1N 塩酸、酢酸エチル (関東化学) を用いて順次分液操作を行い、75%の収率で目的の物質を得た。 ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): δ 1.43–1.48 (9H, m, *t*-BOC), 1.91–2.24 (4H, m, H-2 and H-3), 3.39–3.48 (2H, m, H-4), 4.25–4.34 (1H, m, H-5)。

D-Histidine methyl ester dihydrochloride の合成



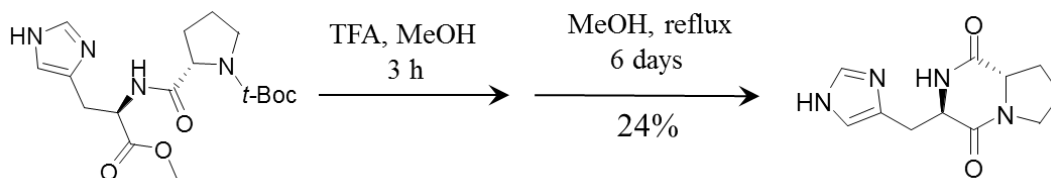
D-Histidine 1.49 g (10.0 mmol) を脱水した 15.0 mL MeOH (関東化学) に溶かし、 0°C に冷却した。その後 1.60 g (13.0 mmol) SOCl_2 (東京化成工業) をゆっくりと滴下した後、一晩還流しながら反応させた。反応後、溶媒留去を行い 2.3 g の目的物を 95%の収率で得た。 ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): δ 3.29–3.31 (3H, m, $-\text{NH}_2$ and H1a), 3.34–3.46 (1H, m, H1b), 3.85 (3H, s, OMe), 4.44–4.46 (1H, m, H-2), 7.51 (1H, s, aromatic), 8.84 (1H, s, aromatic)。

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-prolil-D-histidine methyl ester の合成



D-Histidine methyl ester dihydrochloride 290 mg (1.41 mmol)を 4.0 mL DMF (Sigma-Aldrich) 溶液とし、0°C に冷却しながら攪拌した。その後、300 mg (1.39 mmol) の *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-proline を 4.0 mL DMF 溶液、1.0 g (1.9 mmol) の PyBOP (東京化成工業) および 0.9 mL (5.8 mmol) の *N,N*-ジイソプロピルエチルアミンを加えたのち、50°C に加温して一晩反応させた。反応後、CHCl₃、brine を用いて順次分液操作を行い、得られた有機層を減圧留去したものをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH:H₂O = 65:23:4) で精製し、401 mg の生成物を得た (78%)。¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): δ 1.40–1.49 (9H, s, Boc), 1.89 (2H, m, H-2a and H-3a), 2.13–2.16 (2H, m, H-2b and H-3b), 3.12 (2H, m, H-4a and H-5a), 3.51 (2H, m, H-4b and H-5b), 3.69 (3H, s, OMe), 4.32 (1H, s, H-7), 4.76 (1H, s, H-8), 6.78 (1H, s, aromatic), 7.49 (1H, s, aromatic)。

L-Prolil-D-histidine methyl ester および Cyclo(D-His-L-Pro)の合成



N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-prolil-D-histidine methyl ester 401 mg (1.09mmol) を 5.0 mL の MeOH に溶かし、0.5 mL (6.5 mmol) のトリフルオロ酢酸 (富士フィルム和光純薬) を加えて室温条件で 3 時間反応させた。TLC (CHCl₃:MeOH:H₂O = 65:23:4) で出発物質のスポットが消えたことを確認した後、溶媒を減圧下留去した。得られた粗生成物のうち 100 mg (0.376 mmol) を 5.0 mL MeOH に溶かし、1.0 mL *N,N*-ジイソプロピルエチルアミンを加えて、6 日間還流した。反応後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH:CHCl₃ = 1:4) を用いて精製を行い、目的の化合物を 11.1 mg の目的物質を 24%の収率で得た。¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz): δ

1.71–1.79 (2H, m, H-5a and H-6a), 1.93 (1H, m, H-6b), 2.12 (1H, m, H-5b), 3.00–3.04 (2H, m, H-2), 3.11–3.16 (1H, m, H-4), 3.39–3.48 (2H, m, H-3), 4.25–4.28 (1H, t, 2.7MHz, H-1), 6.93 (1H, s, aromatic), 7.69 (1H, s, aromatic). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -20.3$ (*c* 0.1, H₂O)

3. 結果と考察

3. 1 GF9 株培養上清からの AST4 株増殖因子の精製

GF9株培養上清に含まれるAST4株に対する増殖因子の特定のために、50 LのGF9株培養上清より精製を行った。先行研究(Boey, 2009)に従い、GF9株培養上清に対してHP20を用いた樹脂カラムクロマトグラフィーによる精製を行い、5 gの50% MeOH画分を活性画分として得た。得られたHP20活性画分に対して、SP700を用いた樹脂カラムクロマトグラフィーを用いた精製を行った。条件検討のために100 mLのSP700を用いた樹脂カラムクロマトグラフィーに500 mgの活性画分をアプライし、50%MeOHを移動相として、40 mL×9画分を分画した。分画後、300 mL MeOHを用いてカラムの洗浄を行い、MeOH画分とした。得られた10画分の一部をとって減圧乾固し、各サンプルを最初のGF9株培養上清の体積で除した濃度(Equivalent Concentration = E.C.)となるように水を用いて再溶解を行い、AST4株に対する活性評価を行った(Fig. 3.2)。

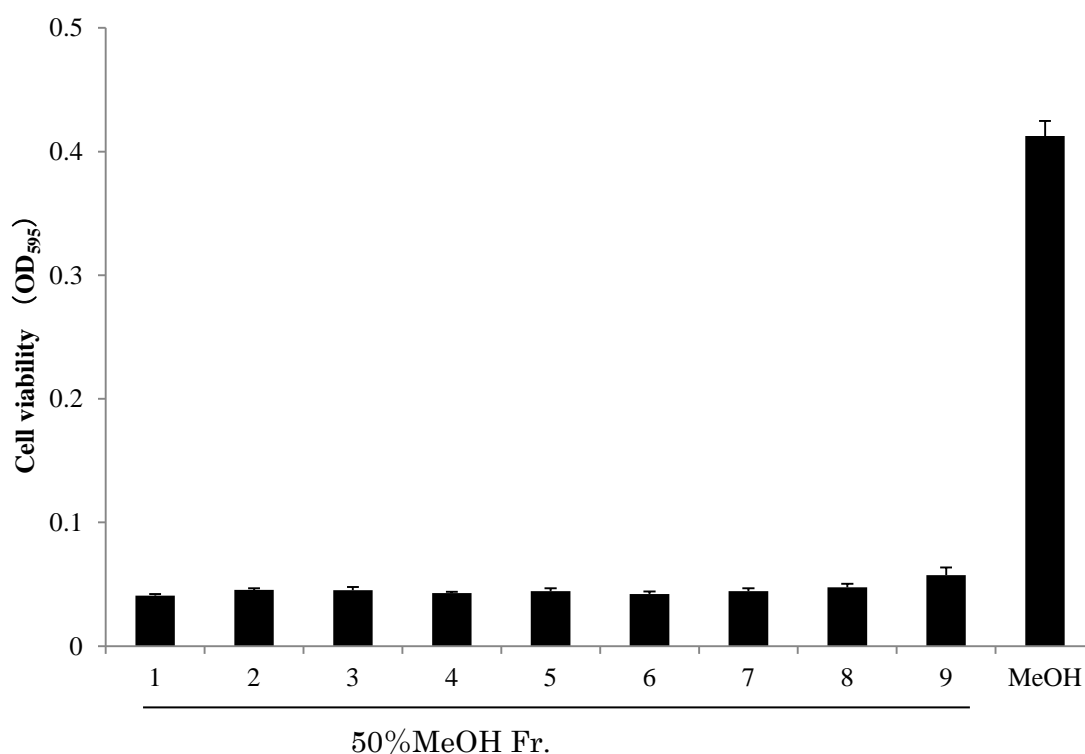


Fig. 3.2 SP700樹脂カラムクロマトグラフィーを用いた各画分の、AST4株増殖活性評価。

活性評価の結果、MeOH画分に最も高い活性が見られた。最終的に得られたMeOH

画分の重量は 154 mg であった。同様に 9.4 g の HP20 活性画分を 700 mL SP700 を用いた樹脂カラムクロマトグラフィーに供した。サンプルをカラムにアプライした後、2.1 L の 50%MeOH、2.1 L の MeOH を移動相として順次用いて溶出させ、1.0 g の MeOH 画分を活性画分として得た。

得られた SP700 活性画分に対して 800 mL LH20 を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供した。サンプルをカラムにアプライした後、800 mL 15% MeOH を 8 画分、800 mL 50%MeOH を移動相として用いてそれぞれ 8 画分、3 画分に分画した。得られた 11 画分の一部を採取し減圧乾固した後、E.C.となるように再溶解して AST4 株に対する活性評価を行った (Fig. 3.3)。

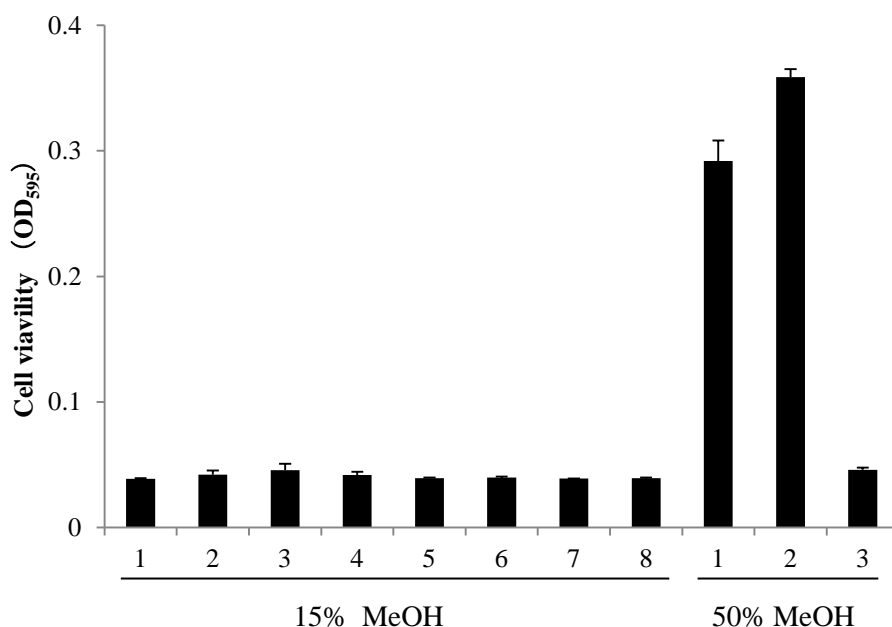


Fig. 3.3 LH20 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いた各画分の、AST4 株増殖活性評価。

活性評価の結果、50% MeOH の 2 画分に対して最も高い活性が見られた。この結果を基に 50% MeOH-1 及び 2 を活性画分として回収し、341 mg の活性画分を得た。

得られた LH20 活性画分に対して、逆相 HPLC による分画を行った。
HPLC によって得られたクロマトグラムを Fig. 3.4 に示す。

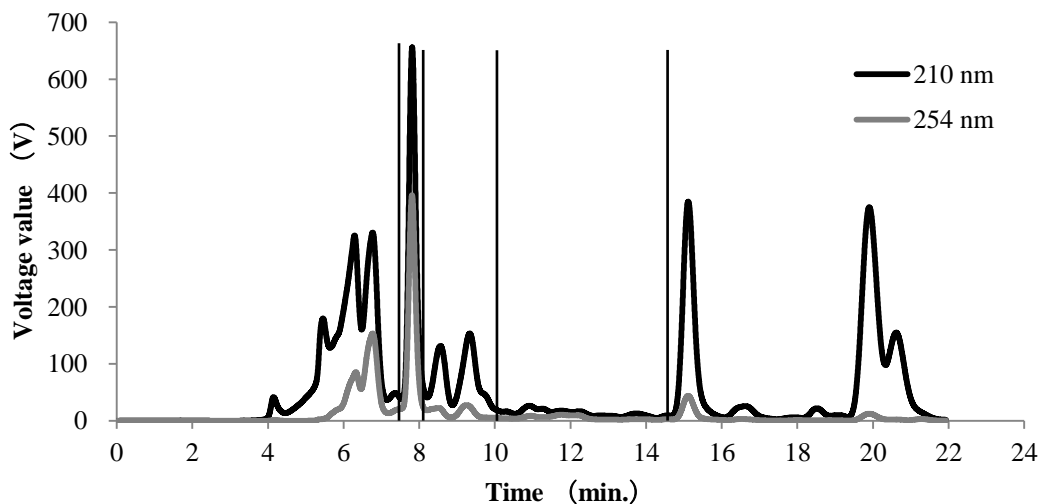


Fig. 3.4 LH20 活性画分に対して、RP-18 を用いた HPLC クロマトグラム。

得られたクロマトグラムにしたがって、Fr. 1 (0–6.9 min)、Fr. 2 (6.9–8.1 min)、Fr. 3 (8.1–10.3 min)、Fr. 4 (10.3–14.3 min)、Fr. 5 (14.3–22.0 min) の 5 画分に分画した。得られた画分の一部を減圧留去した後、E.C.となるように再溶解して、AST4 株に対する活性評価を行った (Fig. 3.5)。

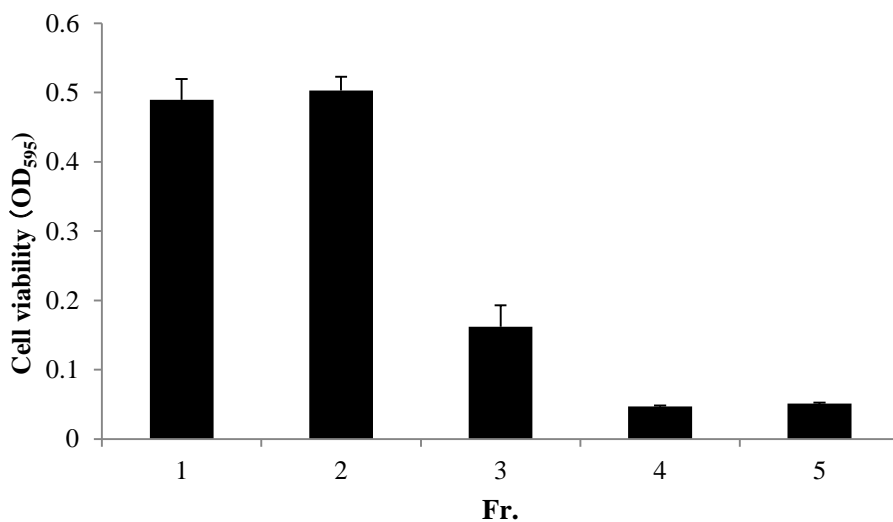


Fig. 3.5 RP-18 を用いた HPLC によって分画された画分の、ASTN4 株に対する増殖活性評価。

活性評価の結果、Fr. 1 及び Fr. 2 に最も高い活性が見られた。分画後の重量について Fr. 1 が 28.8 mg、Fr. 2 が 1.6 mg だったため、Fr.1 を主要な画分であると考え、

Fr. 1 についてさらなる精製を行った。逆相 HPLC によって得られた活性画分に対して、Amide-80 を用いた親水性相互作用 HPLC による分画を行った。HPLC によって得られたクロマトグラムを Fig. 3.6 に示す。

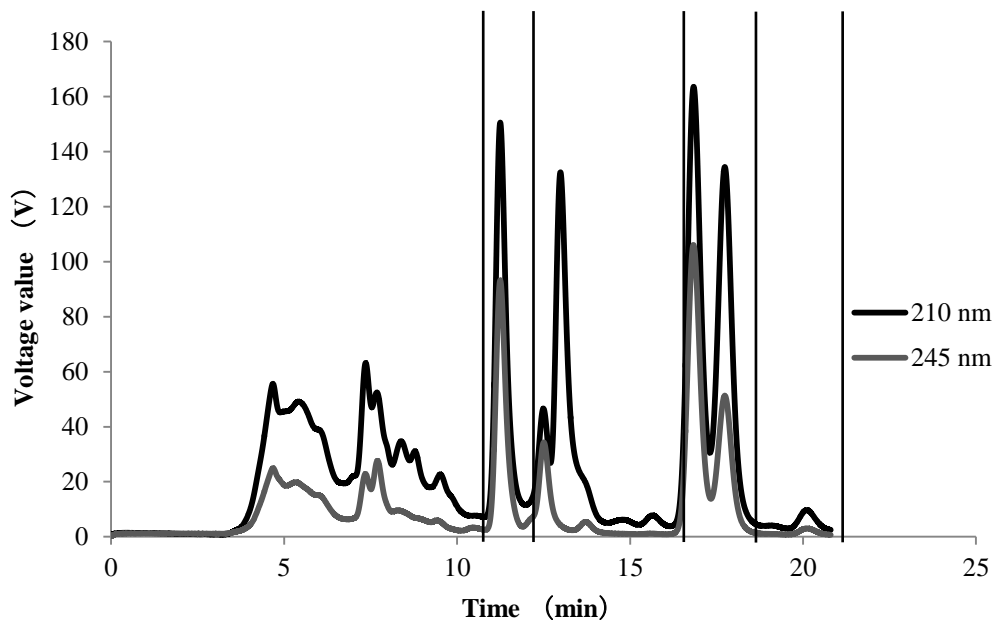


Fig. 3.6, RP-18 活性画分に対して Amide-80 を用いた HPLC によって得られたクロマトグラム。

得られたクロマトグラムにしたがって、Fr. 1 (0–9.6 min)、Fr. 2 (9.6–11.7 min)、Fr. 3 (11.7–16.4 min)、Fr. 4 (16.4–17.2 min)、Fr. 5 (17.2–20.5 min) の 5 画分に分画した。得られた画分の一部を E.C. となるように調整し、AST4 株に対する活性評価を行った (Fig. 3.7)。

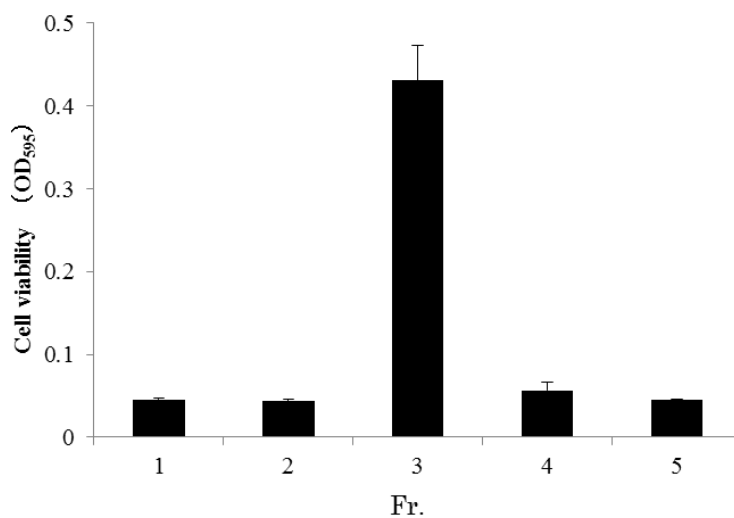


Fig. 3.7 Amide-80 を用いた HPLC によって分画された画分の、ASTN4 株に対する増殖活性評価。

活性評価の結果、Fr. 3 に対して最も高い活性が見られた。Amide-80 を用いた HPLC によって得られた 3.1 mg の活性画分に対して、分析用 Amide-80 カラムを用いた分画を行った (Fig. 3.8)。

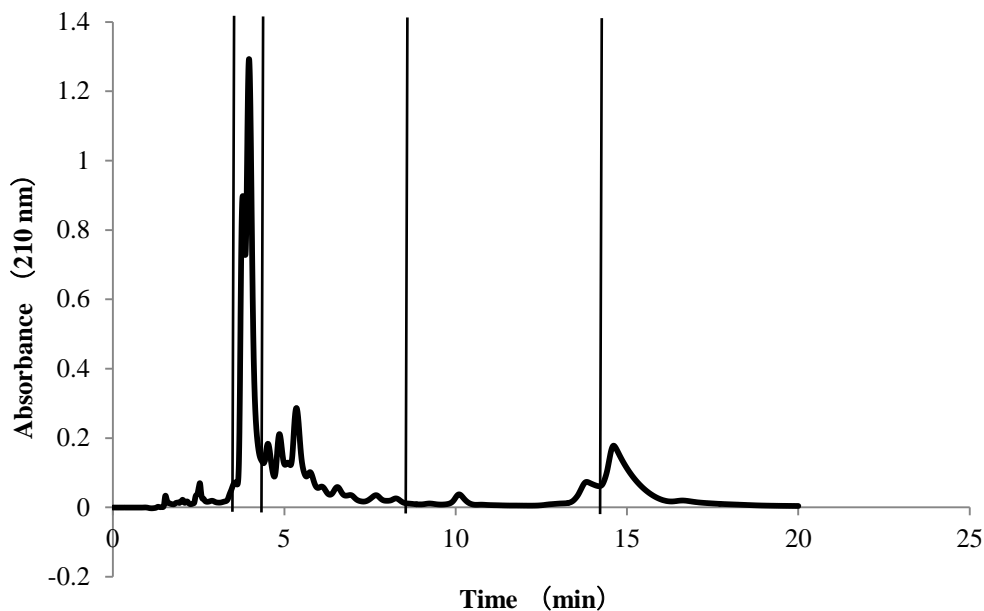


Fig. 3.8 分析用 Amide-80 を用いた HPLC によって得られたクロマトグラム。

得られたクロマトグラムに従って、Fr. 1 (0–3.6 min)、Fr. 2 (3.6–4.2 min)、Fr. 3 (4.2–8.1 min)、Fr. 4 (8.1–13.6 min)、Fr. 5 (13.6–20.0 min) の 5 画分に分画した。各画分を E.C. となるように再溶解し、AST4 株に対する活性評価を行った (Fig. 3.9)。活性評価の結果、最も高い活性を示した Fr. 4 を 0.7 mg の活性画分として得た。

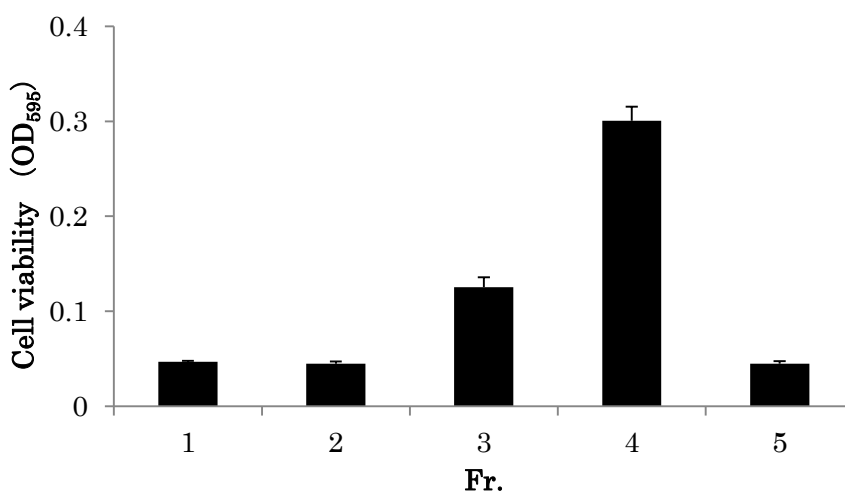


Fig. 3.9 分析用 Amide-80 を用いた HPLC によって分画された画分の、ASTN4 株に対する増殖活性評価。

3. 2 AST4 株 に対する増殖活性画分の構造解析

前頁画分 4 について質量分析による成分解析を行った。得られたスペクトルを付録 Chart 6 に示した。さらに、得られた結果より、基準ピークであった 235.12 のピークに関してタンデム質量分析を行った (Chart 7)。

タンデム質量分析の結果得られた娘イオンは、235.1184 を基準ピークとして 235.1183 (100%)、217.1080 (24%)、207.1237 (68%)、190.0972 (18%)、166.0608 (78%)、162.1023 (96%)、138.0660 (8%)、110.0711 (42%) であった。分子量 234 を持つ既知の化合物について詳細に文献検索を行ったところ、このフラグメントパターンは Huvenne の報告における cyclo(His-Pro)ジペプチドのタンデム質量分析の結果と良い一致を示していた (Huvenne, *et al.*, 2008)。

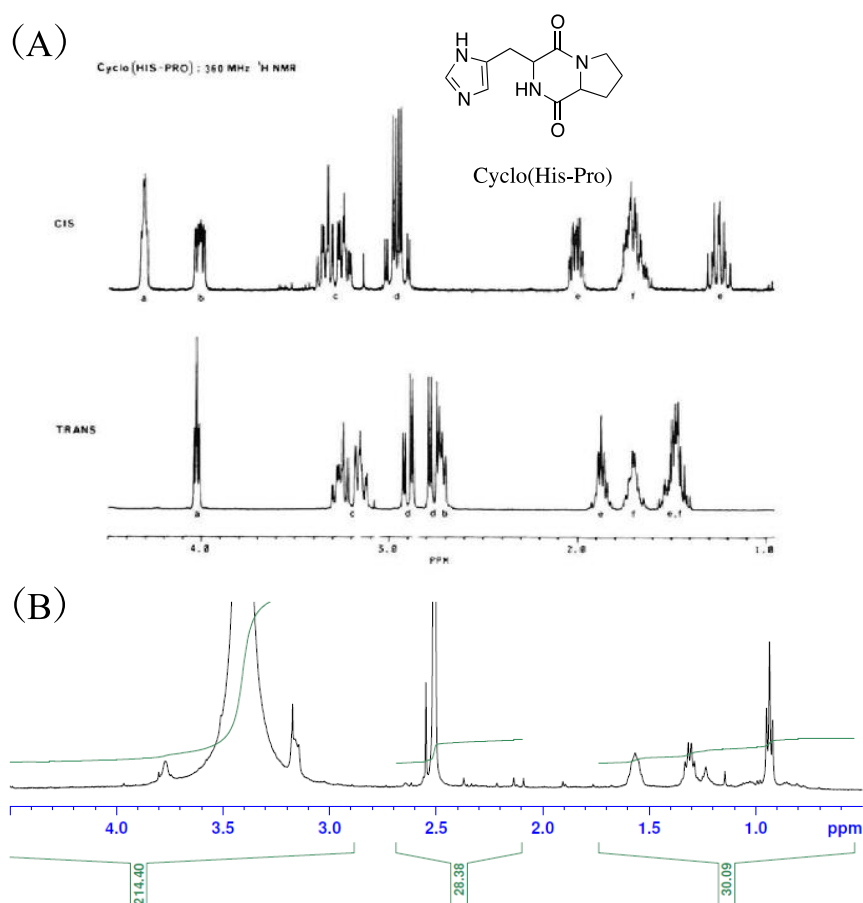


Fig. 3.10 Cyclo(His-Pro)の構造と ¹H NMR スペクトル: (A)先行文献(Kukula, *et al.*, 1985) における *cis* 型 (上段)及び *trans* 型 (下段); (B)本研究において得られた活性画分。

さらに NMR による構造解析を検討したところ、 ^1H NMR では溶媒由来のシグナルとオーバーラップが多く見られたため詳細な解析は不能であったが、プロリン環由来と考えられるシグナルが観察された (Fig. 3. 10, 1.0–1.6 ppm) (Kukula, *et al.*, 1985)。また、 ^{13}C NMR においては cyclo(His-Pro)を示すシグナルが観察された (Table 3.1)。以上のことから、取得した活性画分に含まれる cyclo(His-Pro)が増殖因子であると考え、市販の cyclo(L-His-L-Pro) (BACHEM) を用いた増殖活性評価を行ったが、検討した 25 ng–2.5 mg/mL のいずれの濃度においても活性が認められなかった。

この結果を受け、再度 NMR スペクトルを解析したところ、 ^{13}C NMR において His α 位炭素のシフトに cyclo(L-His-L-Pro)標品と大きな差 ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 6.96 ppm) が認められた。 ^1H NMR においても *cis* 型 (cyclo(L-His-L-Pro)) に見られるようなジケトピペラジン由来の 2 種のシグナル観察されなかったため、次いでジアステレオマーである cyclo(D-His-L-Pro)の活性評価について検討した。

Table 3.1. 活性画分ならびに L-His-L-Pro 標品の ^{13}C NMR ピークリスト. 斜字体は His 骨格由来。

Active fraction (125 MHz DMSO- <i>d</i> ₆)	Authentic L-His-L-Pro (67.5 MHz, D ₂ O)	<i>Dd</i> _C
176.625		
169.447	162.83	6.62
159.620	158.11	1.51
151.506		
136.609		
128.715	127.68	1.04
126.951		
126.575		
123.479	123.48	0.00
122.592		
122.348		
121.465		
115.344		
112.793		
111.950	109.64	2.31
57.538	50.58	6.96
43.330	46.88	-3.55
Solvent signal	36.91	
23.066	20.25	2.82
19.213	19.6	-0.39
13.496	13.16	0.34

Cyclo(D-His-L-Pro)は市販で入手不可能であったため、D-His ならびに L-Pro から合成した後、増殖活性評価を行った。合成を行った cyclo(D-His-L-Pro)について、AST4 株に対する増殖活性評価を行ったが、25 ng–2.5 mg/mL の濃度において増殖活性は示さなかった。

以上の通り、AST4 株に対する増殖因子について、50 L 培養物より精製を行ったが、得られた粗精製物は活性を示さない cyclo(His-Pro) ジペプチドを主として含むものであった。

4. 結論

本研究において、50 L の GF9 株培養上清より HP20、SP700、逆相 HPLC、Amide-80 による HPLC による精製を行い、最終的に 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で活性を示す活性画分の部分精製に成功した。質量分析により、活性画分には $\text{cyclo}(\text{His-Pro})$ が含まれていることがわかったが、試薬の $\text{cyclo}(\text{L-His-L-Pro})$ 及び合成された $\text{cyclo}(\text{D-His-L-Pro})$ は活性を示さなかった。

本研究では 50 L の GF9 株から最終的にわずか 0.7 mg の活性画分が得られた。このことから、AST4 株に対する増殖因子もまた、ASN212 株に対する増殖因子と同様に極めて低濃度で活性を有することがわかった。

3章 新規微生物増殖因子 coproporphyrin 類の作用機序の解明

と細菌叢への影響

1. 目的

Coproporphyrin(Cop.)類は Bhuiyan ならびに筆者らによって GF9 株から単離された、新たなクラスの微生物増殖因子である (Bhuiyan, *et al.*, 2016)。Cop.類の作用機序は未だ不明であるが、この作用機序の解明は難培養微生物の新たな培養技術開発において重要な知見を与えると期待される。Cop.類の作用機序として3つが想定される。すなわち、1) シデロフォアのように金属輸送のためのキレーター様物質として機能している、2) 何らかの生物機能を誘起するシグナル物質として機能している、3) ヘム関連化合物の生合成材料として要求されている、というものである。先行研究においては、Cop.-金属錯体のうち、Zn 錯体のみが活性物質として単離されており、さらに Cop. III-Zn 錯体である zincphyrin は卓越した活性を示している。このため、想定されるいずれの作用機序においても金属錯体形成が鍵になっていると考え、Cop.-金属錯体の構造活性相関を検討することにより、作用機序解明を解明することとした。特に本研究では培地中に含まれることが予想される金属 (Grant and Pramer, 1962) 中から Zn、Fe²⁺、Fe³⁺、Cu、Co、Ni、Mn 及び Mg の金属と Cop.類の金属錯体について検討した。さらに得られた作用機序に関する知見に基づいて、Cop.III がいくつかの細菌株や Actinobacteria および Firmicutes を中心とした細菌類の増殖に与える影響について検討した。

2. 実験方法

2. 1 試薬

本研究において用いた試薬は、特に言及がない限り富士フィルム和光純薬社製の試薬を無精製のまま使用した。

2. 2 使用装置

HPLC SC762 system (GL Science): Interface: SC762; Column oven: CO705; UV-VIS detector: UV702; Pump: PU714.

HPLC Chromaster system (HITACHI): Interface box; Organizer; Diode array detector: 5430; Column oven: 5310; Pump: 5110.

質量分析 : JMS-T100LP (JEOL)

プレートシェイカー : MS 3 ベーシック (IKA)

Microplate Luminometer: Veritas™ Microplate Luminometer (Turner biosystems)

プレート吸光度測定器: SUNRISE REMOTE (TECAN)

遠心分離機: Himac CT 13R (HITACHI)

核酸濃度測定: NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

振とう培養器: BR-3000LF (TAITEC)

Voltex: VTX-3000L (LMS)

サーマルサイクラー : GeneAmp PCR system 9700 (Thermo Fisher Scientific)

アガロースゲル撮影装置 : FAS-III (TOYOBO)

モレキュラーイメージャー : ChemiDoc MP (BIORAD)

2. 3 培地組成

本研究において使用した培地の組成を以下に示す。以下の成分を混合した後、すべて 121°C、15 分間オートクレーブ処理を行って使用した。

Bennet 培地 :

10 g D-glucose、1.0 g meat extract (コスモバイオ)、2.0 g Bacto Peptone (Difco)、1.0 g yeast extract、1 L Milli-Q 水

Leucobacter sp.培養培地 :

10.0 g Bacto Peptone、2.0 g yeast extract、1.0 g MgSO₄ · 7H₂O、1 L Milli-Q 水

Mueller-Hinton II 培地 :

17.5 g Bacto Peptone、3.0 g meat extract (コスモバイオ)、1.5g starch、1 L Milli-Q 水

NPB 培地 :

1 章に記載

2. 4 微生物種

本章において使用した微生物種を以下に示す。

- *Actinomyces* sp.TA0403 株
- *Bacillus subtilis* ATCC 70385 株
- *Escherichia coli* ATCC 8739 株
- *Leucobacter* sp. ASN212 株
- *Leucobacter albus* NBRC103070 株
- *Leucobacter denitrificans* NBRC106039 株
- *Leucobacter komagatae* NBRC15245 株
- *Streptomyces* sp.TA0403 株

ASN212 株は産業技術総合研究所より、*B. subtilis* 及び *E. coli* は American Type Culture Collection より、*L. albus*、*L. denitrificans*、*L. komagatae* は製品評価技術基盤機構よりそれぞれ譲渡を受けた株を、当研究室で 10%DMSO、-82°C でストックされたものを使用した。

2. 5 環境中の細菌叢サンプルの採取

細菌叢サンプルの詳細を Table 4.1 に示す。土壌サンプルは、土壌表面の落ち葉やゴミを除去し、深さ 3–10 cm 程度の土壌を 5–8 mL 程度採取した。採集した土壌サンプルに約 10 mL の Milli-Q 水を加えて激しく攪拌し、綿栓濾過により夾雑物を除去した。濾過物に DMSO (10%, v/v) を加えたものを細菌叢サンプルとした。エゾシカの腸内細菌叢サンプルについては、北海道登別市、(株)伊那不動産 エゾジカ活用事業部において解体されたエゾジカ消化器内の未消化物より採取した。活性汚泥のサンプルについては札幌市新川水処理センターの第一活性汚泥槽より採取した。

Table 4.1. 細菌叢サンプルの採取条件。

Sample	Date	Location	Detail
M1	2018/2/25	Noboribetsu, Hokkaido	Caecum of Dear
M2	2018/5/4	Tomamae, Hokkaido	Forest floor
M3	2018/2/25	Noboribetsu, Hokkaido	Colon of Dear
M4	2018/7/9	Kamikawa, Hokkaido	Leaf mold
M5	2018/6/24	Kobayashi, Miyazaki	Fellin bunboo area
M6	2018/6/24	Kobayashi, Miyazaki	Field area
M7	2018/7/9	Shimukappu, Hokkaido	Leaf mold
M8	2018/7/28	Sarufutsu, Hokkaido	Wood root area
M9	2018/10/17	Sapporo, Hokkaido	Activated sludge tank, Shinkawa Wastewater Treatment Center

2. 6 Cop. I 金属錯体の調製

Coproporphyrin I dihydrochloride (Sigma–Aldrich) 3.0 mg (4.1 μmol) を 4.0 mL の DMSO に溶かして Cop. I 溶液とした。0.5 mL の Milli-Q 水に 2.0 mg の $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 $\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (Strem chemicals)、 $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (関東化学)、 $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 FeCl_3 (Sigma–Aldrich) をそれぞれ加えて水溶液を調製し、その水溶液を Cop. I 溶液に加え、室温、遮光条件で一晩攪拌した。攪拌後、D7000 system を用いて HPLC による分析を行った。分析条件は以下の条件である。

使用カラム : Mightysil RP-18 GP Aqua 250-20 (5 μm) (関東化学) ;

移動相 : 53% H_2O / 47% MeCN (+0.1%酢酸) ;

流速 : 5.0 mL/min; 検出波長 : 400 nm; 注入量 : 10 μL

Zn および Cu 添加以外の試料については 100°C に加温し、一晩攪拌した後、同条件で分析を行った。金属錯体由来であると予想されるピークに関して、HPLC SC702 system を用いて分取を行った。分取条件に関しては以下の条件である。

使用カラム：Mightysil RP-18 GP Aqua 250-20 (5 μ m)

移動相：53% H_2O / 47% MeCN (+0.1%酢酸)；

流速：5.0 mL/min；検出波長：400 nm；注入量：10 μ L

2. 7 Cop. III 金属錯体の調製

Coproporphyrin III dihydrochloride (Frontier scientific) 3.0 mg (4.1 μ mol) を 4.0 mL の DMSO に溶かして Cop. III 溶液とした。0.5 mL の Milli-Q 水に 2.0 mg の $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 $\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ をそれぞれ加えて水溶液を調製し、その水溶液を Cop. III 溶液に加えた。Zn 及び Cu を添加した条件については室温、その他の金属については 100°C に加温し、遮光条件で一晩攪拌した。攪拌後、2. 6 と同様の条件で HPLC による分析および分取を行った。回収した画分を減圧乾固し、Cop.類金属錯体をそれぞれ得た。

2. 8 Cop. 類の金属錯体の質量分析

Cop.類金属錯体を数滴の DMSO に再溶解し、質量分析によって構造の確認を行った。質量分析の条件は以下の表に表す (Table 4.2)。またすべての試料に関して、イオン化モードはデュアル ESI+、リングレンズ電圧は 10 V、イオンガイド RF 電圧は 2500 V で分析を行った。

Table 4.2. Cop.類金属錯体の質量分析の条件。

Sample	mobile phase	Needle voltage(V)	Orifice I voltage(V)	Orifice II voltage(V)	Detector voltage(V)
Cop.I-Zn	MeCN	2,000	80	5	2,300
Cop.I-Co	MeOH	2,500	80	5	2,200
Cop.I-Fe ²⁺	MeOH	2,000	80	5	2,200
Cop.I-Cu	MeOH	2,000	80	5	2,200
Cop.I-Fe ³⁺	MeOH	1,500	160	10	2,200
Cop.I-Ni	MeCN	2,000	160	10	2,200
Cop.III-Zn	MeCN	1,900	160	10	2,300
Cop.III-Co	MeCN	2,000	160	10	2,200
Cop.III-Fe ²⁺	MeCN	2,000	160	10	2,200
Cop.III-Cu	MeCN	2,500	120	10	2,300
Cop.III-Ni	MeCN	1,500	160	10	2,200

質量分析の結果、目的の化合物と思われるピークについて、金属同位体が含まれている場合の同位体ピークのパターンならびに精密質量の結果から錯体形成を確認した。

2. 9 ASN212 株に対する増殖活性評価

NPB 培地を 18.0 mL とり、ASN212 株ストックを 200 μ L 加えたものを 96 穴白色プレート (Greiner microlon) に 75 μ L 分注した。その後 0.1%DMSO に溶解した試料を 25 μ L 加え、最終濃度が 250 nM、25 nM、2.5 nM となるように調整した。プレートシェーカー上で 600 rpm、48 時間振とう培養を行った。培養後、各ウェルに CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を 100 μ L 分注し、600 rpm、2 分間振とうした後、10 分間室温で静置した。静置後、Microplate Luminometer を用いて発光量を測定し、ASN212 株の増殖量を評価した。

2. 10 Spartan'14 を用いた Cop. III 金属錯体の化学計算

Spartan'14 を用いて Cop. III、Cop. III-Zn、Cop. III-Fe、Cop. III-Cu、Cop. III-Co、及び Cop. III-Ni の分子モデルを作成した。作成したモデルに対して、Equilibrium Geometry at ground state in gas の構造最適化条件において Molecular Mechanics (MMFF)、Hartree-Fock (6-31G*)、Density Functional (B3LYP /6-31G*) の計算方法で順次計算を行った。

2. 11 ASN212 株ゲノムの回収

ASN212 株ゲノム抽出は ISO PLANT II (ニッポンジーン) のプロトコルに従って行った。以下に手順を示す。

Cop. III を 13 μ M の濃度になるように NPB 培地(10.0 mL)に加えた。続いて ASN212 株ストックを 100 μ L 加え、5 日間培養を行った。培養後、遠心分離機を用いて、13,000 rpm、15 分間、4°C の条件で菌体を分離・回収した。回収した菌体に対して、1.0 mL ISOPLANT II Solution I を加え、先を切ったチップで懸濁した。懸濁後、エッペンドルフチューブに 360 μ L 分注し、150 μ L の ISOPLANT II Solution II を加え、チューブを上下にして攪拌し、50°C、10 分間インキュベートを行った。その後、100 μ L ISOPLANT II Solution III-A 及び 120 μ L ISOPLANT II Solution III-B を加え、チューブを上下にして攪拌した後、氷上で 10 分間静置した。静置後、13,000 rpm、10 分間、4°C で遠心分離し、上清を 300 μ L 回収した。回収した上清に 600 μ L の 99.5%エタノール (Sigma-Aldrich) を加えて、先を切ったチップで静かに攪拌した。得られた溶液に対して 13,000 rpm、5 分間、4°C で遠心分離した後、上清を取り除いて白色の沈殿物を回収した。回収した沈殿に対して、100 μ L RNase 溶液 (600 μ L TE buffer に 2 μ L RNase を加えたもの) を加え、静かに攪拌した後、37°C、1 時間加温した。加温後、溶液をまとめ、phenol/chloroform/isoamyl alcohol 溶液を同体積加えた後、静かに攪拌し、水層を回収した。水層に再び同じ操作を行い、最終的に得られた水層に chloroform/isoamyl alcohol 溶液を同体積加え、13,000 rpm、5 分間、4°C で遠心を行った。遠心後、水層を回収し、2 倍体積のエタノールを加え DNA を析出させたのち、再び 13,000 rpm、5 分間、4°C で遠心分離を行った。遠心後、水層を取り除き、70%エタノール溶液を 1.0 mL 加え静かに攪拌した後、水層を取り除いた。最終的に得られた沈殿を室温で 20 分間乾燥させた後、Milli-Q 水を 60 μ L 加え、37°C、30 分間振とうして DNA 溶液とした。

2. 12 ASN212 株のゲノム解析

ASN212 株のアセンブリ解析については北海道システムサイエンス株式会社に依頼し、解析を行った。ゲノム解析について、以下の手順で行われた。ASN212 株に対して TruSeq Nano DNA Library Prep Kit (Illumina) を用いて標準プロトコル (350 bp Insert) に従い下記の要領でシーケンスライブラリ調製を行った。1 : ASN212 株ゲノム DNA 断片化。2 : 末端修復。3 : ビーズ精製によるサイズ選択 (350 bp Insert)。4 : 3'A 付加。5 : アダプターライゲーション。6 : PCR 増幅。

得られた DNA に対して次世代シーケンサ (Illumina HiSeq) を用いて Paired-End

法 100 塩基読み取りにより塩基配列データを取得した。得られた塩基配列データに対して cutadapt (Martin, 2011) を用いて Illumina アダプター配列のトリミングを行った。アダプタートリミング条件は以下の通りである。1: リード配列の末端で当該配列と最低 1 塩基以上オーバーラップする領域をトリミング (ミスマッチ許容率 10%)。2: アダプター配列である Read1、Read2 (付録 Chart 10.5) の少なくともいずれか一方に N を含むリードが存在する場合、Read1、Read2 を主に除去。得られたリードデータについて、Trimmomatic (Bolger, *et al.*, 2014) を用いて低 QV 領域のトリミングを行った。QV トリミング条件は以下の通りである。1: 20 塩基の window を 5'側からスライドさせていき、平均 QV が 20 未満となった領域をトリミング。2: トリミング後、Read1/Read2 とともに 50 塩基以上残存したリードのみを出力。

トリミング後のリードデータについて、Velvet (Zerbino and Birney, 2008) を用いた *de novo* アセンブリを行った。アセンブルの結果得られたスキファールドについて Platanus (Kajitani, *et al.*, 2004) に含まれる gap_close ツールを使用したギャップクロージングを行った。

最終的に得られたアセンブリデータに対して、RAST server (Aziz, *et al.*, 2008) を用いてアノテーションを行った。

2. 13 ASN212 株及び *Leucobacter komagatae* VKM ST4845 株におけるヘム生合成遺伝子の解析

L. komagatae VKM ST4845 株のアミノ酸配列、アセンブリデータ及びアノテーションデータは NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より取得した。ASN212 株及び *L. komagatae* VKM ST4845 株に付与されたアノテーションデータより、HemA、HemB、HemC、HemD、HemE、HemY、HemH 及び HemQ をコードする遺伝子について探索を行った。アノテーション情報が得られなかった遺伝子については、NCBI に登録されている、該当するアミノ酸配列との BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いた相同性検索を行うことによって探索を行った。

2. 14 環境中の細菌叢からの DNA の抽出

培養チューブ (ASONE) に 2.0 mL Mueller Hinton II 培地及び環境中の細菌叢ストックを 20 μ L 加えたものを各 4 本用意した。各サンプルの内 2 本については、最終濃度が 13 μ M になるように Cop. III を加え、残りの 2 本をコントロールとした。各

試料を振とう培養器中で 28°C、114 rpm、5 日間培養を行った。培養後、遠心分離 (13,000 rpm、15 分間、4°C) により菌体を回収した。回収した菌体について、NucleoSpin®Soil (Takara Bio) を用いて DNA の抽出を行った。以下にその手順を示す。

回収した菌体を NucleoSpin Bead Tube に加え、700 µL Buffer SL1 及び 150 µL Enhancer SX を加えた。NucleoSpin Bead Tube を Voltex で 5 分間、室温で激しく混合した。混合後、11,000 rpm、2 分間、4°C で遠心し、150 µL Buffer SL3 を加え、Voltex で 5 秒間混合し、氷上で 5 分間静置した。静置後、遠心分離機で 11,000 rpm、1 分間、4°C で遠心を行い、溶液を NucleoSpin Inhibitor Removal Column をセットしたチューブに加えた。チューブを遠心分離機で 11,000 rpm、1 分間、4°C で遠心を行い、ろ液に 250 µL Buffer SB を加えて 5 秒間 Voltex で混合した。混合後、溶液を NucleoSpin Soil Column をセットしたチューブに加えて 11,000 rpm、1 分間、4°C で遠心した。遠心後、ろ液を捨てた NucleoSpin Soil Column のチューブに 250 µL Buffer SB を加え、11,000 rpm、1 分間、4°C で遠心して NucleoSpin Soil Column を洗浄した。続いて、700 µL Buffer SW2 を加えて遠心分離を行う操作を 3 回を行い、column を洗浄した。洗浄後、11,000 rpm、1 分間、4°C で遠心を行い、Column を新しいチューブに移し替えて、30 µL Buffer SE を加えて 1 分間インキュベーションを行った。最後に 11,000 rpm、1 分間、4°C で遠心を行い、DNA を溶出させて DNA 溶液とした。DNA 溶液作成後、NanoDrop™ Lite Spectrophotometer を用いて溶液の DNA 濃度、及び純度を計測した。

2.15 Actinobacteria 並びに Firumicutes 特異的 primer を用いた PCR

Actinobacteria 特異的 primer (Farris, Olson, 2007; Sterch, *et al.*, 2003) 及び Firumicutes 特異的 primer (Guo, *et al.*, 2008; Yang, *et al.*, 2008) の塩基配列を以下に示す (Table 4.3)。本研究で使用した primer はすべて Thermo Fisher Scientific 株式会社に、50 nmol、カードリッジ精製のグレードで作製を依頼した。

Table 4.3. 本研究で使用した Primer

Primer	Target	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
Actino Specific R	Actinobacteria	CCGTACTCCCCAGGCGGGG	≈ 650
Actino Specific F	Actinobacteria	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG	
Firm-1040 R	Firmicutes	ACCATGCACCACCTGTC	126
Firm-928 F	Firmicutes	TGAAACTTAAAGGAATTGACG	

サーマルサイクラーおよび Tks GFlex™ Polymerase (TAKARA) を用いて以下の条件で PCR を行った。Template として、DNA 濃度が 10 ng/μL となるように調整した細菌叢の DNA サンプルを用いた (Table 4.4, Table 4.5)。アニーリング温度は Actinobacteria 特異的 primer は 72°C、Firmicutes 特異的 primer は 61.5°C に設定した。

Table 4.4. PCR 反応液の組成

	Volume (μL)	Final concentration
2xGflex buffer	15.0	
Template	10.0	100 ng/30 μL
Primer-F	1.5	0.2 μM
Primer-R	1.5	0.2 μM
DNA polymerase	1.0	1.25 U/30 μL
Water	1.0	

Table 4.5. PCR の反応条件

Temperature (°C)	Time (Sec.)	
94	60	
98	10	} 25 cycles
72 or 61.5	15	
68	60	
68	300	
4	∞	

PCR 反応後、反応液を 2 μL 採取し、2 μL 5×DNA Loading Buffer Blue (BIOLINE) および 6 μL 滅菌水と混合して、アガロースゲル電気泳動に供した。本実験におけるアガロースゲル電気泳動はすべて Mupid®-2plus (ADVANCE) を用いて行った。条件に関しては Table 4.6 に示す。

Table 4.6. アガロース電気泳動の条件

Target	Agarose	Gel concentration (%)	Marker
Actinobacteria	Agarose KANTO (KANTO CHEMICAL)	2	Hyper ladder I (BIOLINE)
Firmicutes	Agarose XP (NIPPONGENE)	3	50 bp DNA Ladder (TAKARA)

アガロース電気泳動は以下の手順で行った。蒸留水 1 L に、242 g Trizma® base (SIGMA)、57.1 mL 酢酸 (東京化成工業) 及び 18.6 g EDTA・2Na (2H₂O) (同仁化学) を加えた後、121°C、15 分間オートクレーブ処理を行い 50×TAE buffer を調製した。50×TAE buffer を用時 50 倍希釈して TAE buffer とし、アガロースを加えて電子レンジで加熱しながら溶解させた。溶解後、ゲルメーカースタンドにセットしたゲルトレイに流し込み、室温で固化させ、厚さ 3 mm のゲルを作成した。作成したゲルを 350 mL TAE buffer で満たした Mupid®-2plus にセットし、8 μL の泳動サンプル及び 5 μL のマーカーをアプライした。アプライ後、室温にて Actinobacteria 特異的 primer を用いた PCR 産物には 100 V、Firmicutes 特異的 primer を用いた PCR 産物には 50 V の条件で電気泳動を行い、Loading Buffer Blue の Dye がゲルの下部に達したことを確認して泳動を停止した。その後、0.5 μg/mL 臭化エチジウム

(SIGMA) 溶液にゲルを浸し、15 分間静かに振とうしながら染色を行った。染色後、ゲル撮影装置を用いてバンドの確認を行った。

2. 16 モレキュラーイメージャーによる PCR 産物の定量

PCR 反応液 3 μL に 3 μL の 6 \times Loading buffer (TAKARA) 及び 9 μL の滅菌水を加えた溶液を調製した。調製した各溶液を 6 μL ずつアガロースゲルの 3 ウェルに分注し、電気泳動を行った。泳動後、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 臭化エチジウム (SIGMA) 溶液にゲルを浸漬し、15 分間静かに振とうしながら染色させたのち、モレキュラーイメージャーに供した。解析に必要なゲルの撮影は、Fiant Band 検出設定で自動露光を行い、High Band Detection Sensitivity の設定で蛍光しているバンドを自動検出し、バンドの蛍光量を定量した。

2. 17 Cop. III 添加条件での微生物増殖評価

Actinomyces sp. TA0403 株、*B. subtilis* ATCC 70385 株、*E. coli* ATCC 8739 株、*L. komagatae* NBRC15245 株、*L. albus* NBRC103070 株、*L. denitrificans* NBRC106039 株、*Streptomyces* sp. TA0403 株及びの Cop. III 存在条件下での増殖活性評価方法を以下に示す。

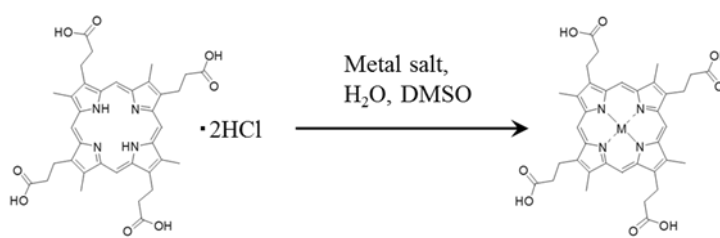
Leucobacter sp.については *Leucobacter* sp.培養培地、*B. subtilis* ATCC 70385 株および *E. coli* ATCC 8739 株については Mueller-Hinton II 培地、*Actinomyces* sp. TA0403 株及び *Streptomyces* sp. TA0403 株については Bennet 培地を用いた。18.0 mL の培地に微生物培養ストックを 200 μL 加え、96 穴白色プレートに 75 μL 分注した。その後 0.1%DMSO に溶解した Cop. III 溶液を 25 μL (最終濃度 13 μM) を加えた。プレートシェーカー上で 600 rpm にて *B. subtilis* ATCC 70385 株、*E. coli* ATCC 8739 株については 24 時間、その他の微生物種については 48 時間振とう用培養を行った。培養後、各ウェルに CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay を 100 μL 分注し、600 rpm、2 分間振とうした後、10 分間室温で静置した。静置後、Microplate Luminometer を用いて発光量を測定し、各微生物種の増殖量を評価した。

3. 結果と考察

3.1 Cop. 類金属錯体の調製

Cop.-金属錯体の構造活性相関に向けて、最初に Cop. I 金属錯体の調製を検討した。調製に用いた金属塩と反応温度、収率を Table 4.7 に示す。また、逆相 HPLC による Cop. I 及び各金属錯体の保持時間 (rt) ならびに、組成式から計算される分子量及び質量分析によって得られた化合物の分子量を以下に示す (Table 4.8)。調製後分取した試料の質量分析に関するチャートおよびデータは付録に記載した (Chart 9)。

Table 4.7. Cop.I 金属錯体の調製条件と収率



M	Metal salt	Temperature (°C)	Yield (%)
Zn	Zn(CH ₃ COO) ₂ · 2H ₂ O	rt	66
Fe ²⁺	Fe(CH ₃ COO) ₂	100	67
Co	Co(CH ₃ COO) ₂	100	73
Cu	Cu(CH ₃ COO) ₂	rt	57
Ni	Ni(CH ₃ COO) ₂ · 4H ₂ O	100	70
Mn	Mn(CH ₃ COO) ₂ · 4H ₂ O	100	no reaction
Mg	Mg(CH ₃ COO) ₂ · 4H ₂ O	100	no reaction
Fe ³⁺	FeCl ₃	100	no reaction

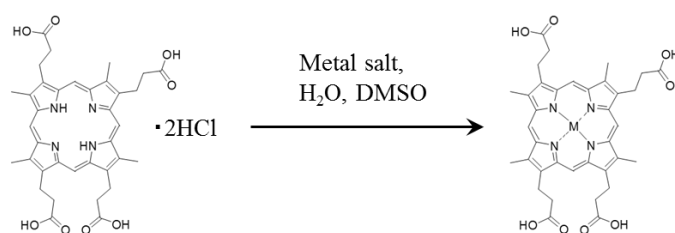
Table 4.8. Cop. I 及び各金属錯体の HPLC の保持時間と、組成式から計算される分子量と質量分析によって得られた実際の分子量

	rt (min)	Calculated for <i>m/z</i>	Found
Cop. I	17.7	–	–
Cop. I–Zn	15.6	[M+Na] ⁺ = C ₃₆ H ₃₆ N ₄ O ₈ Zn, 716.18	716.18
Cop. I–Co	6.9	[M] ⁺ = C ₃₆ H ₃₆ N ₄ O ₈ Co, 711.16	716.16
Cop. I–Fe	6.9	[M] ⁺ = C ₃₆ H ₃₆ N ₄ O ₈ Fe, 708.18	708.17
Cop. I–Cu	6.4	[M+Na] ⁺ = C ₃₆ H ₃₆ N ₄ O ₈ CuNa, 738.19	738.16
Cop. I–Ni	24.7	[M] ⁺ = C ₃₆ H ₃₆ N ₄ O ₈ Ni, 710.18	710.16

錯体調製を行った結果、Zn 及び Cu 錯体は室温条件で速やかに Cop. I と錯体を形成した。また、Fe²⁺、Co、Ni に関しては、100°C の加温条件でのみ錯体を形成した。一方で Mn、Mg については 100°C の加温条件においても錯体形成が見られなかった。また、Fe³⁺錯体調製の条件において形成した錯体は、質量分析の結果、Fe²⁺が配位した錯体であることが予想された。

次に Cop. III と Zn、Fe²⁺、Co、Cu、及び Ni 金属塩を用いた錯体の調製を行った。反応条件と収率を Table 4.9 に示した。逆相 HPLC による Cop. III 及び各金属錯体の保持時間 (rt) と組成式から計算される分子量及び質量分析によって得られた化合物の分子量を Table 4.10 に示す。調製後分取した試料の質量分析に関するチャートおよびデータは付録に記載した (Chart 10)。

Table 4.9. Cop. III 金属錯体の調製条件と収率。



M	Metal salt	Temperature (°C)	Yield (%)
Zn	Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	rt	75
Fe ²⁺	Fe(CH ₃ COO) ₂	100	88
Co	Co(CH ₃ COO) ₂	100	82
Cu	Cu(CH ₃ COO) ₂	rt	71
Ni	Ni(CH ₃ COO) ₂ ·4H ₂ O	100	85

Table 4.10. Cop. III 及び各金属錯体の HPLC の保持時間と、組成式から計算される分子量と質量分析によって得られた実際の分子量

	rt(min)	Calculated for <i>m/z</i>	Found
Cop. III	20.0	–	–
Cop. III–Zn	16.7	[M] ⁺ = C ₃₆ H ₃₆ N ₄ O ₈ Zn, 716.18	716.18
Cop. III–Co	6.7	[M] ⁺ = C ₃₆ H ₃₆ N ₄ O ₈ Co, 711.16	716.15
Cop. III–Fe	7.2	[M] ⁺ = C ₃₆ H ₃₆ N ₄ O ₈ Fe, 708.18	708.17
Cop. III–Cu	33.2	[M] ⁺ = C ₃₆ H ₃₆ N ₄ O ₈ CuNa, 715.18	738.15
Cop. III–Ni	26.9	[M] ⁺ = C ₃₆ H ₃₆ N ₄ O ₈ Ni, 710.18	710.16

調製を検討した結果、Cop. I 金属錯体と同様、Zn 及び Cu 錯体のみが室温条件で錯体を形成し、Fe、Co、Ni 錯体については 100°C の加温条件で錯体を形成した。

3. 2 Cop. III 金属錯体の計算化学による比較

Cop. III 金属錯体の調製の結果、Zn 及び Cu 錯体が室温条件で錯体を形成し、Co、Fe、Cu 及び Ni 錯体が加温条件で錯体を形成することが実験的に明らかになった。この結果について、分子の構造および計算化学の観点から考察を行うことを目的として Spartan'14 を用いた化学計算を Cop. III 及び各金属錯体に対して行った。

計算の結果得られた各分子の構造 (Fig. 4.1) と、各金属錯体の E HOMO/LUMO、及びポルフィリン環の、金属と共有結合している 2 つの窒素原子の距離 (N_1-N_3) と他の 2 つの窒素原子の距離 (N_2-N_4)、およびピロール環に挟まれた対角線上の炭素と中心の金属がなす角度 ($C_{10}-M-C_{20}$ 、 $C_{15}-M-C_{21}$) Table 4.11 に示す。

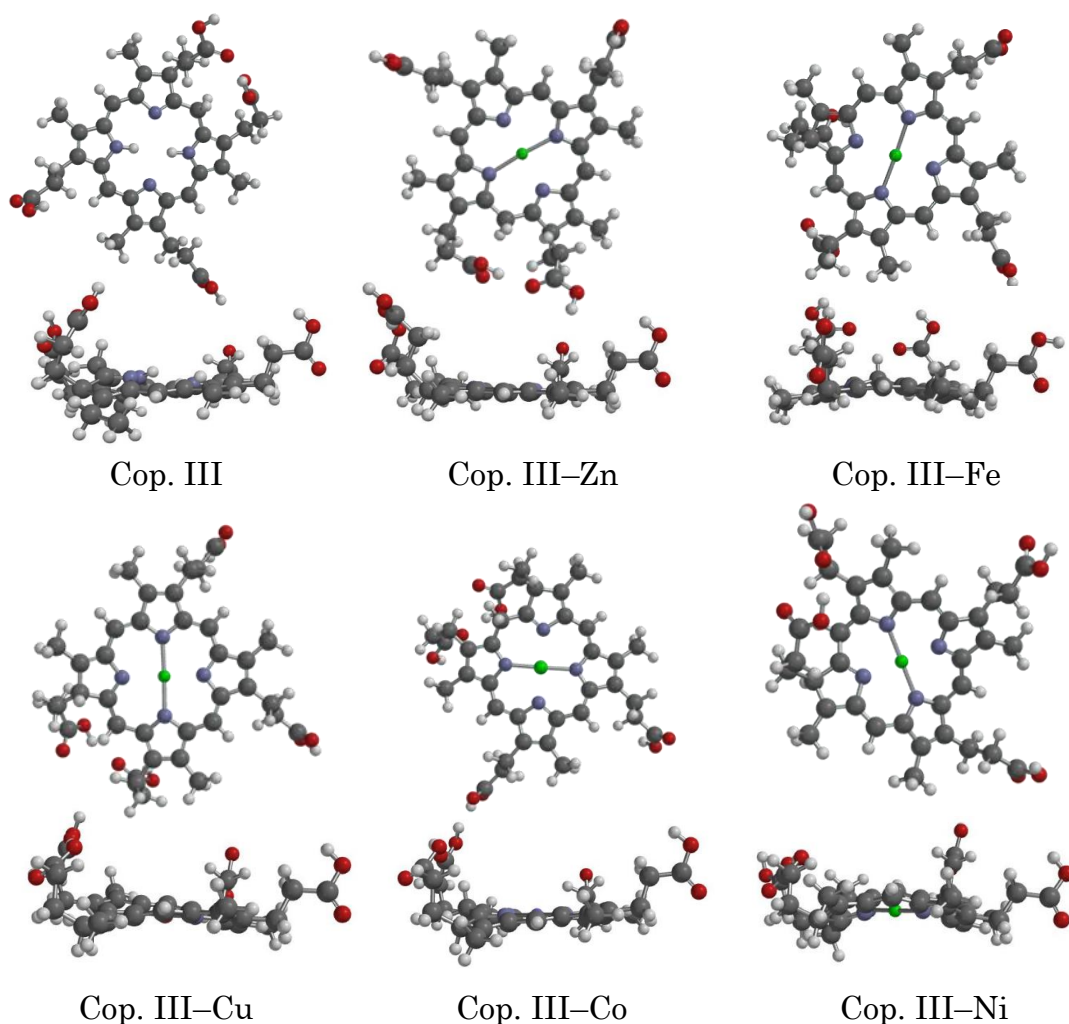


Fig. 4.1 密度汎関数法(B3LYP/6-31G*)によって計算された、Cop. III 及び本研究で調製した各 Cop. III 金属錯体のモデル。

Table 4.11 密度汎関数法(B3LYP/6-31G*)によって計算された、E HOMO/LUMO 及びポルフィリン環の対角線上の窒素原子の距離と二つのピロール環をつなぐ対角線上の炭素と中心の金属がなす角度。

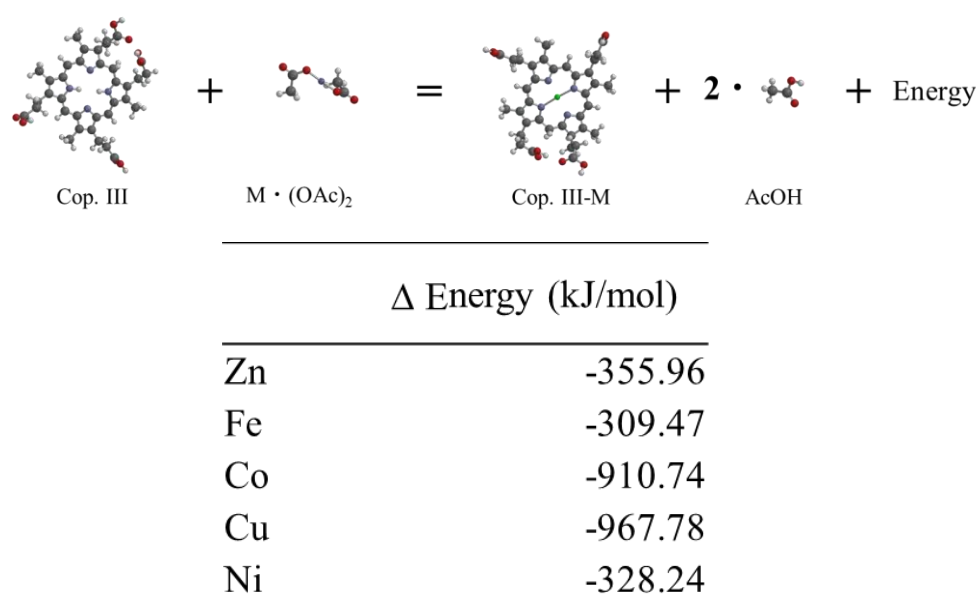
	E		Distance(Å)		Angle (°)		
	HOMO(kJ/mol)	LUMO(kJ/mol)	N ₁ -N ₃	N ₂ -N ₄	C ₁₀ -M-C ₂₀	C ₁₅ -M-C ₂₁	
Cop.III	-404.06	-213.99	<u>4.249</u>	<u>4.137</u>	Cop. III	172.01	176.17
Zn	-396.93	-203.77	4.031	4.241	Cop. III-Zn	173.90	175.24
Fe	-387.86	-196.69	4.090	4.208	Cop. III-Fe	168.15	172.27
Co	-395.39	-200.34	4.042	4.183	Cop. III-Co	171.35	172.01
Cu	-393.41	-200.80	3.974	4.107	Cop. III-Cu	168.72	164.77
Ni	-321.96	-148.37	<u>3.838</u>	<u>3.865</u>	Cop. III-Ni	152.69	150.17

Fig. 4.1 に示す分子モデルから、Zn 錯体および Co 錯体が平面に近い構造で錯体を形成していることが観察された。また、Ni 錯体に関しては Cop. III に比べてポルフィリン環がひずんだ構造をとっていることが見られた。これは Cop. III に比べ Ni 錯体の N₁-N₃ ならびに N₂-N₄ 間距離が短いことおよび、環を構成する炭素と金属がなす角度からも見て取れる。また、他の窒素原子間の距離に関しては、Fe 錯体が最も Cop. III に近似した数値を示し、次いで Co、Zn、Cu 錯体の順番に Cop. III と近い数値を示した。

形成した錯体の構造に関して、ポルフィリン環の窒素間の距離及び平面構造を Cop. III と比較することにより、各金属との錯体の形成しやすさを考察した。Zn 錯体に関しては、中心の金属と環がなす角度が Cop. III に近く、またポルフィリン環の窒素原子の結合距離も比較的 Cop. III に近い結果を示したため、構造的に無理なく配位することが可能であると考えられる。一方、Zn 錯体と同様に室温条件で錯体を形成した Cu 錯体については、計算化学によって予想される構造は、加温条件でのみ錯体を形成する他の金属錯体と差異のない結果となった。

続いて、Cop. III と各金属酢酸塩から、金属錯体と 2 分子の酢酸が形成する反応について、反応前後の各分子の熱力学的エネルギーの総和を比較することで、錯体の形成が吸熱的な反応であるのか、あるいは発熱的な反応であるのかを検討した。298.15 K における、各金属錯体形成の反応前後の分子の熱力学的エネルギー差を Table 4.12 に示した。

Table 4.12 密度汎関数法(B3LYP/6-31G*)によって計算された
各金属錯体調製反応の反応前後の熱力学的エネルギー差



計算の結果、各金属錯体調製反応は、すべて発熱的な反応によって進行することが解った。実験によって室温条件で錯体を形成した Zn 及び Cu 錯体を形成する反応と、その他の加温条件で錯体を形成する反応との間には、反応前後のエネルギー差の相関が見られなかった。このことから Cop. III と金属酢酸塩から Cop. III 金属錯体を形成する反応は、熱力学的支配よりも速度論的な支配を受けて進行する反応であると推測された。

3. 3 Cop.類金属錯体の増殖活性評価

ASN212 株は、48 穴プレート内で増殖した時、ウェル内で菌体が凝集し、フロックを形成しながら増殖する (Fig. 4.2)。

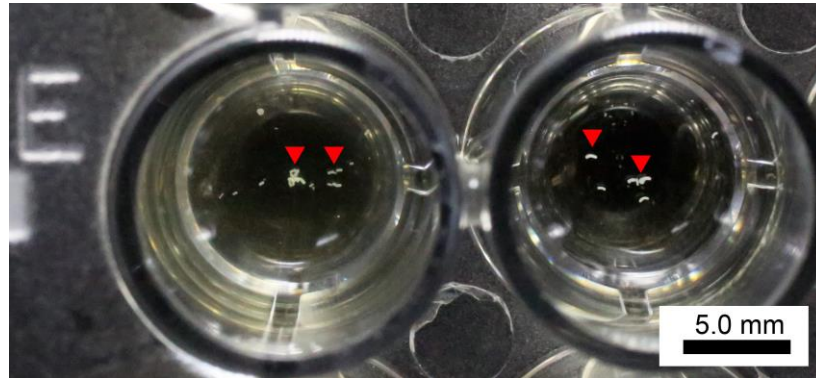


Fig. 4.2 48 穴プレート内における ASN212 株の増殖の様子。ASN212 株が形成するフロックを、図中赤矢印で示した。

そのため、ASN212 株の菌体数を従来の OD₅₉₅ を用いて評価する方法では、正確な増殖量を定量することは困難であると考えた。

そこで本研究では、CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kit を用いて、生菌の内在性の ATP 量を測定することで、より正確に増殖量を評価することとした。

金属錯体の調製によって得られた Cop. I 金属錯体 (250 nM、25 nM、2.5 nM) の、ASN212 株に対する増殖活性評価の結果を Fig. 4.3 に示した。増殖活性評価において、0.1%DMSO 溶液を試料として与えて評価したものを negative control とし、すべての生育量は negative control に対する相対比として評価した。

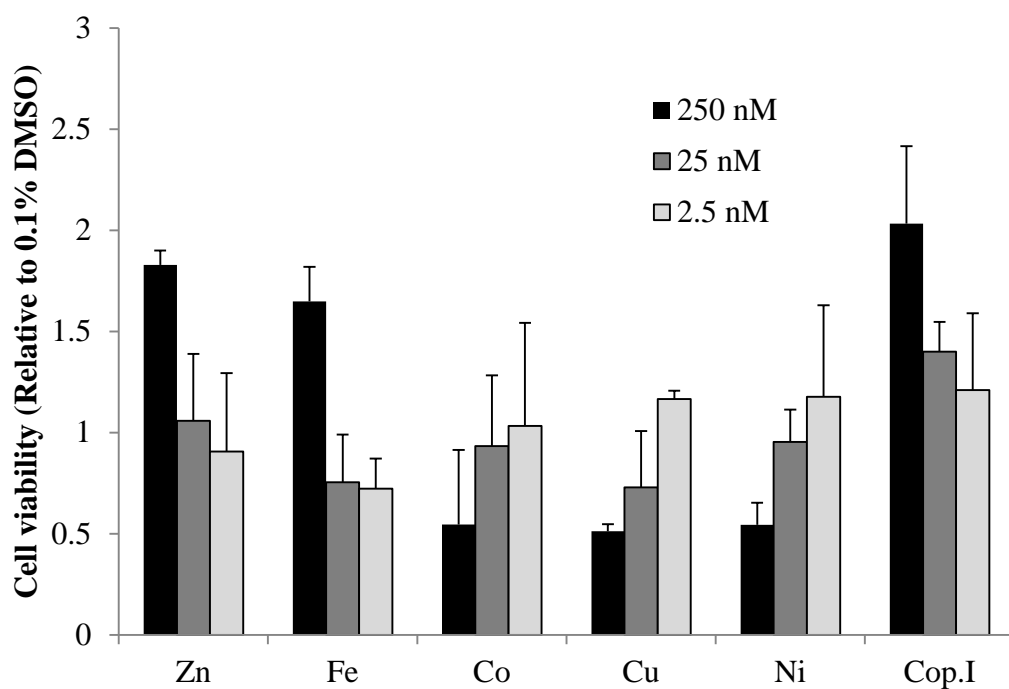


Fig. 4.3 Cop. I 金属錯体の ASN212 株に対する増殖活性評価

活性評価の結果、先行研究で増殖因子として見出されていた Cop. I、Cop. I-Zn 錯体の他に、Cop. I-Fe 錯体に対しても増殖活性が認められた。また、一方で Cop. I-Co、Cop. I-Cu、Cop. I-Ni 錯体に関しては、増殖を阻害することを示唆する傾向が観察された。

次に Cop. III 金属錯体 (250 nM、25 nM、2.5 nM) の、ASN212 株に対する増殖活性評価を行った。結果を Fig. 4.4 に示す。

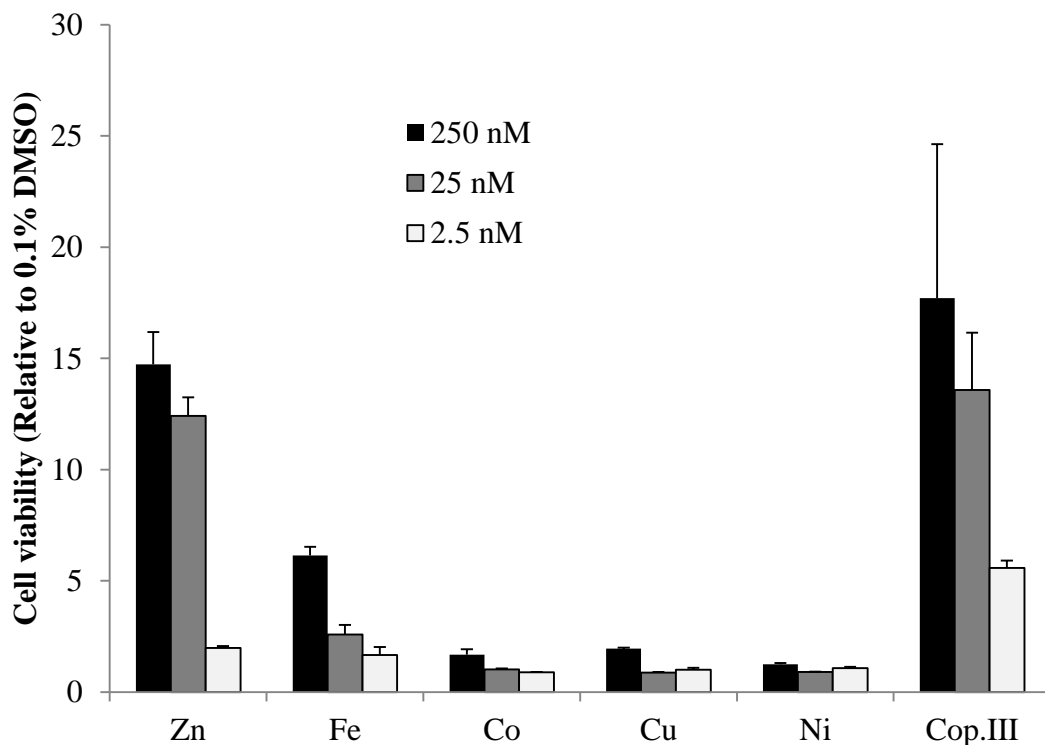


Fig. 4.4 Cop. III 金属錯体の ASN212 株に対する増殖活性

活性評価の結果、Cop. I の結果と同様に、Cop. III、Cop. III–Zn 錯体の他に Cop. III–Fe 錯体が ASN212 株に対して増殖促進活性を示した。また、それぞれの増殖促進活性は、Cop. I 金属錯体の増殖活性と比較して、4–10 倍程度高い活性を示すことが明らかになった。

金属錯体の調製及び ASN212 株の増殖活性との構造活性相関研究結果より、室温条件で Cop.類と錯体を形成する金属のうち、Zn 錯体のみが ASN212 株に対して増殖活性を示した。この結果から、先行研究において、Zn 錯体が金属錯体のみが増殖因子として見出された理由は以下のように考察される。すなわち、GF9 株から分泌された Cop.類は、通常の培養条件においては Zn^{2+} 及び Cu^{2+} と自発的に錯体を形成する。そして、Zn 錯体のみが ASN212 株に対して増殖活性を示すため、増殖活性物質として Zn 錯体のみが見出されたと考えられる。

また、Cop.–Fe 錯体についても Zn 錯体と比較して低いながらも ASN212 株に対する増殖活性を示した。また、この場合も Cop. III 錯体は Cop. I 錯体と比較して 250 nM の濃度において 3.8 倍高い活性を示した。増殖活性における Cop. III の優位性と Fe 錯体の活性は、以下に述べる理由により、Cop.類がキレーター様物質やシグナル物質

というよりむしろヘム生合成における基質として作用することを示唆している。

微生物に限らず、多くの生物は生体内で多様な金属を利用している(Boyed, *et al.*, 2018 ; Truong, *et al.*, 2018)。中でもポルフィリン環は多様な金属と結合し、呼吸鎖における protoheme やクロロフィルとして、あるいは cobalamin (Xu, *et al.*, 2018) としてごく微量で活性を示す重要な化合物である。ポルフィリンとその Fe 錯体であるヘムの生合成は、glycine 及び succinyl-CoA を出発物質とする(Fig. 4.5)。最初に HemA が glycine と succinyl-CoA をカップリングすることで 5-aminolevulinic acid (ALA) を合成し、次いで HemB が ALA を 2 量化して porphobilinogen (PBG) が形成される。PBG は HemC によって 4 量化されて hydroxymethylbilane (HMB) へと変換され、HMB はさらに HemD の閉環反応によりテトラピロール環である uroporphyrinogen (Uro'gen) へと変換される。次いで Uro'gen が HemE によって脱炭酸反応を受けることで coproporphyrinogen (Copro'gen) が合成されるが、以降の反応は真核生物および Proteobacteria もしくは、Actinobacteria および Firmicutes で異なる経路を辿る (Dailey, *et al.*, 2015)。

真核生物および Proteobacteria では続いて Copro'gen が HemF あるいは HemN によって protoporphyrinogen (Proto'gen) へと酸化され、Proto'gen は HemJ、HemG、HemY のいずれかによってテトラピロール環(protoporphyrin)への酸化を受ける。最終的に HemH による Fe 導入によって protoheme が形成される canonical な経路をへて、呼吸鎖などの重要な代謝に利用される (Fig. 4.5 右経路, canonical pathway)。

一方で、Actinobacteria および Firmicutes では先に Copro'gen が HemY によって酸化され、Cop. III へと変換される。その後、HemH によって Fe が導入され、HemQ によって 2 か所の末端プロピオン酸がビニル基へと酸化される noncanonical な経路を経ることで protoheme へと代謝される (Fig. 4.5 左経路, noncanonical pathway; Fig. 4.9 も参照)。

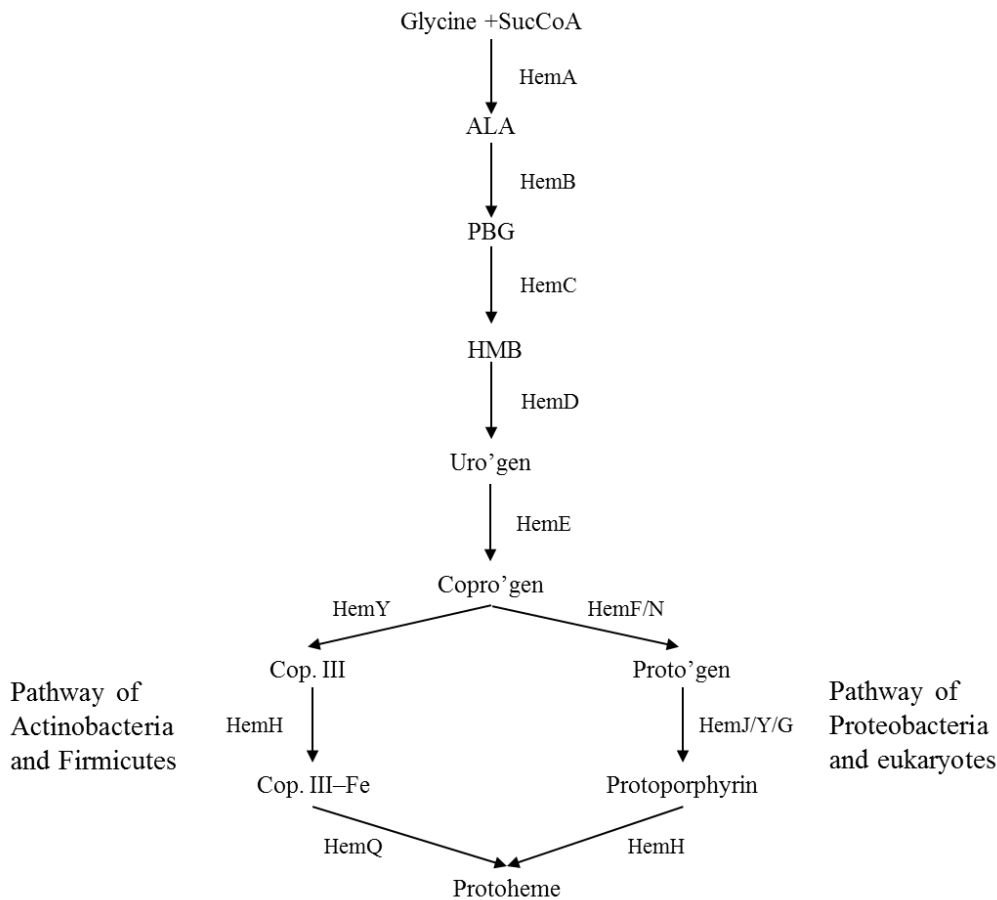


Fig. 4.5 真核生物およびプロテオバクテリアにおけるへム生合成経路と Actinobacteria 及び Firmicutes に特異的にみられるへム生合成経路。一般的な生合成経路は Copro'gen から Proto'gen 及び protoporphyrin を経由して protoheme に代謝される（右経路）のに対して、Actinobacteria 及び Firmicutes における生合成経路では、Copro'gen より Cop. III 及び Cop. III-Fe 錯体を經由して protoheme へと代謝される（左経路）

ASN212 株が属する Actinobacteria は Cop. III ならびに Cop. III-Fe 錯体をへム生合成の重要中間体としている。構造活性相関から得られた結果は、へム生合成経路との関連性を示唆している。すなわち、ASN212 株のへム生合成経路に機能的欠損があり、Cop. III もしくは Cop. III-Fe が外部から投与されることで増殖が可能となっていると考えられる。この仮説に基づき、筆者は次いで ASN212 株のへム生合成関連遺伝子について検証を行った。

3.4 ASN212 株ゲノムの解析

Cop. 類の金属錯体を用いた構造活性相関研究の結果、Cop. III の作用機序は ASN212 株のヘム生合成に関係していると考えられた。そこで Cop. III の増殖促進活性の作用機序に対して、ASN212 株のヘム生合成経路関連遺伝子から検証を行うため、ASN212 株ゲノムの解析を行った。

ASN212 株ゲノムに対するアセンブリの詳細な結果については付録に記載した (Chart 11)。ASN212 株および NCBI に登録されている近縁種である *Leucobacter komagatae* VKM ST 2845L 株の総ゲノム長および GC 比を Table 4.13 に示した。ASN212 株のゲノム長は *Leucobacter komagatae* VKM ST 2845L 株と比較して約 590 kbp 短い数値を示した。

Table 4.13. ASN212 株及び *Leucobacter komagatae* VKM ST 2845L のゲノム長と GC

Strain	Genome size (bp)	GC (%)
ASN212 strain	3,082,465	62.23
<i>Leucobacter komagatae</i> VKM ST 2845L	3,669,365	66

次に、ASN212 株ゲノムに対して RAST server によるアノテーションを行った。その結果見出されたヘム生合成関連遺伝子を示す (Table 4.14)。アノテーションが付与された領域の塩基配列は付録に記載した (Chart 12)。

Table 4.14. ASN212 株ゲノムに対して RASTserver によるアノテーションを行った結果

Gene	Contig id	Start	Stop	Strand	Function
<i>hema</i>	scaffold21_cov31	66558	65380	-	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase (EC 2.3.1.29)
<i>hemb</i>	not detected				
<i>henc</i>	not detected				
<i>hemd</i>	scaffold38_cov31	6771	5986	-	Uroporphyrinogen-III methyltransferase (EC 2.1.1.107) / Uroporphyrinogen-III synthase (EC 4.2.1.75)
<i>heme</i>	not detected				
<i>hemy</i>	scaffold38_cov31	8004	7684	-	Protoporphyrinogen IX oxidase, aerobic, HemY (EC 1.3.3.4)
	scaffold38_cov31	9484	8120	-	Protoporphyrinogen IX oxidase, aerobic, HemY (EC 1.3.3.4)
<i>hemh</i>	scaffold13_cov62	31637	32767	+	Ferrochelatase, protoheme ferro-lyase (EC 4.99.1.1)
<i>hemq</i>	scaffold13_cov62	32783	33496	+	Hemoprotein HemQ, essential component of heme biosynthetic pathway in Gram-positive bacteria

アノテーションの結果、ASN212 株ゲノム内において *hemb*、*henc* 及び *heme* がアノテーションされる領域は見出だされず、また *hemy* がアノテーションされた領域については、領域の途中に 115 塩基の挿入配列が確認された。

次にアノテーション結果から発見されなかった *hemb*、*henc* 及び *heme* についてアミノ酸配列に基づいた探索を行った。ASN212 株の総アミノ酸配列を問い合わせ配

ノ酸がコードされている、もしくはギャップとなっていることが明らかとなった。以上の結果から、ASN212 株は HemB の機能は欠損していると推定される。

続いて同様の方法で NCBI データベースに登録されている 870 件の HemC アミノ酸配列をクエリとして相同性検索を行った結果、*Cronobacter turicensis* z3032 株の HemC 配列が最も相同性が高い配列として見出された。(Identify : 54.29%、E-value : 0.092、Bitscore : 30.4)。得られた *C. turicensis* の配列と比較した ASN212 株のアミノ酸配列、近縁種である *L. komagatae* VKM ST 2845L、及び *B. subtilis* の HemB 配列を比較した結果を次ページに示した (Fig. 4.7)

アミノ酸配列を比較した結果、比較した 3 種の微生物に対して保存されている活性部位である 31 番目、223 番目及び 353 番目のアルギニン、373 番目のシステインが、ASN212 株のアミノ酸配列では異なるアミノ酸がコードされていることが明らかになった。特に 31 番目のグルタミン、273 ならびに 297 番目のグリシン、425 番目のシステインは異なる性質のアミノ酸となっている。以上のことから HemB ほど顕著ではないが、HemC に関しても ASN212 株における機能の欠損が示唆された。

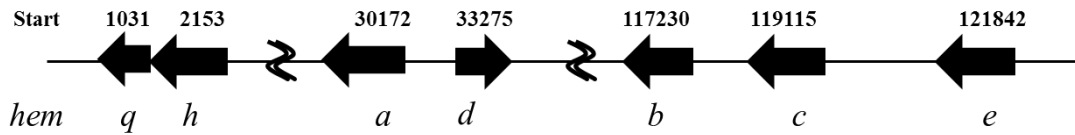
最後に NCBI に登録されている 729 件の HemE アミノ酸配列をクエリとして相同性検索を行った結果、*Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155 株の HemE 配列が最も相同性が高い配列として見出された。(Identify : 46.88%、E-value : 0.094、Bitscore : 30.8)。得られた *M. smegmatis* の配列と比較した ASN212 株のアミノ酸配列、近縁種である *L. komagatae* VKM ST 2845L、及び *B. subtilis* の HemE 配列を比較した結果を次ページに示した(Fig. 4.8)。

いた。以上の結果より HemE に関しても、ASN212 株における機能の欠損が示唆された。

次いで比較対象として ASN212 株の近縁株である *Leucobacter komagatae* VKM ST 2845L について、同様にヘム合成関連遺伝子を解析した。アノテーション情報及び BLAST による相同性検索より、*hema*、*hemb*、*hemc*、*hemd*、*heme*、*hemh* 及び *hemq* の遺伝子が確認された。確認されなかった *hemy* に関して、*Leucobacter komagatae* VKM ST 2845L の総アミノ酸配列を問い合わせ配列とし、NCBI データベースに登録されている 278 件の HemY (Protoporphyrinogen IX oxidase) のアミノ酸配列をクエリとした BLASTp によって解析を行った。解析の結果、identify の数値が高かった *Frankia alni* ACN14a HemY 配列 (Identify:63.14%、E-value:0.024、Bit score:33.5) 及び先行研究によって活性部位が報告されている *B. subtilis* (Sun, *et al.*, 2008) HemY のアミノ酸配列を比較した (Fig. 4.9)

L. komagatae VKM ST 2845L と ASN212 株のヘム合成関連遺伝子の解析結果を Fig. 4.10 に要約する。

Leucobacter komagatae VKM ST2845



Strain ASN212

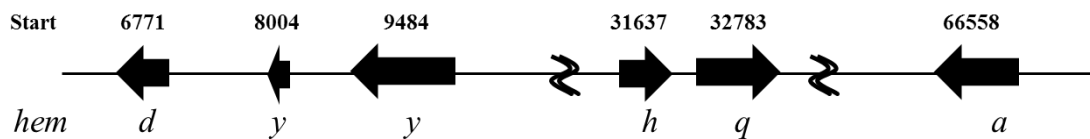


Fig. 4.10 *L.komagatae* 及び ASN212 株におけるヘム生合成遺伝子。

ASN212 株において機能の欠損が予想された *hemb*、*hemc* 及び *heme* は、近縁種である *L. komagatae* において近傍に位置し、クラスター様の配列を形成していた。ASN212 株と *L. komagatae* のゲノム長を比較しても、ASN212 株の方が約 590 kbp 短く、このことから ASN212 株は *L. komagatae* の遺伝子の一部が欠損した変異株であると考えられる。

以上の結果は ASN212 株においてヘム生合成経路における HemB、HemC、HemE、HemY の全てもしくは少なくとも一部の機能が欠損していることを示している。また、HemA ならびに HemB の基質である ALA 及び PBG は、いずれも ASN212 株の生育を刺激しなかった (Fig. 4.11)。このことは少なくとも HemB のみに機能的欠損があるわけではないことを示している。

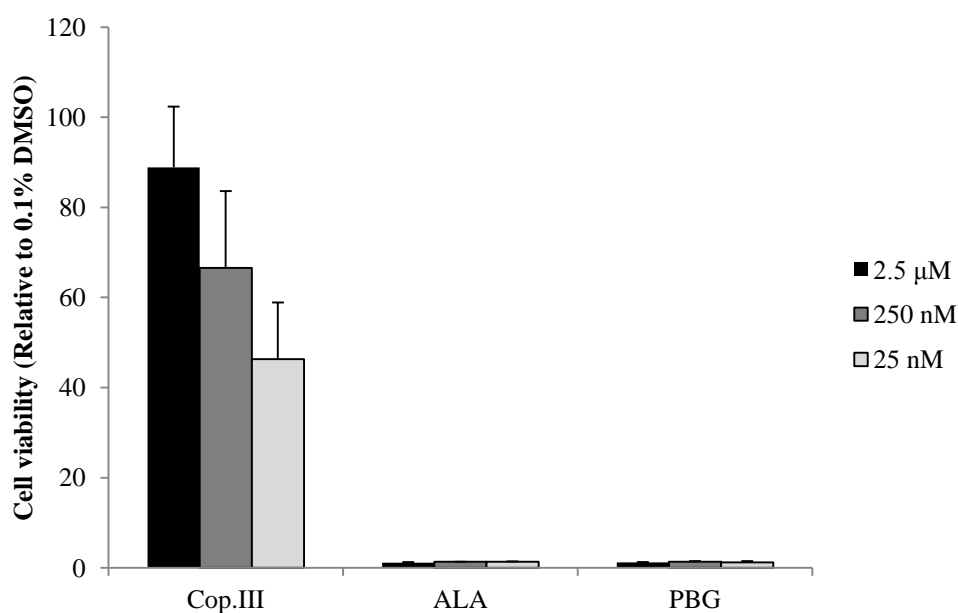


Fig. 4.11 ALA、PBG 及び Cop. III を用いた ASN212 株に対する増殖活性評価。

これらの酵素はヘム合成経路において、特に Cop. III 合成の上流に位置する酵素である (Fig. 4.12)。以上のことから Cop. III は ASN212 株における外因性のヘム合成前駆体として protoporphyrin の合成を可能にし、ASN212 株の増殖を促進しているものと考えられる。

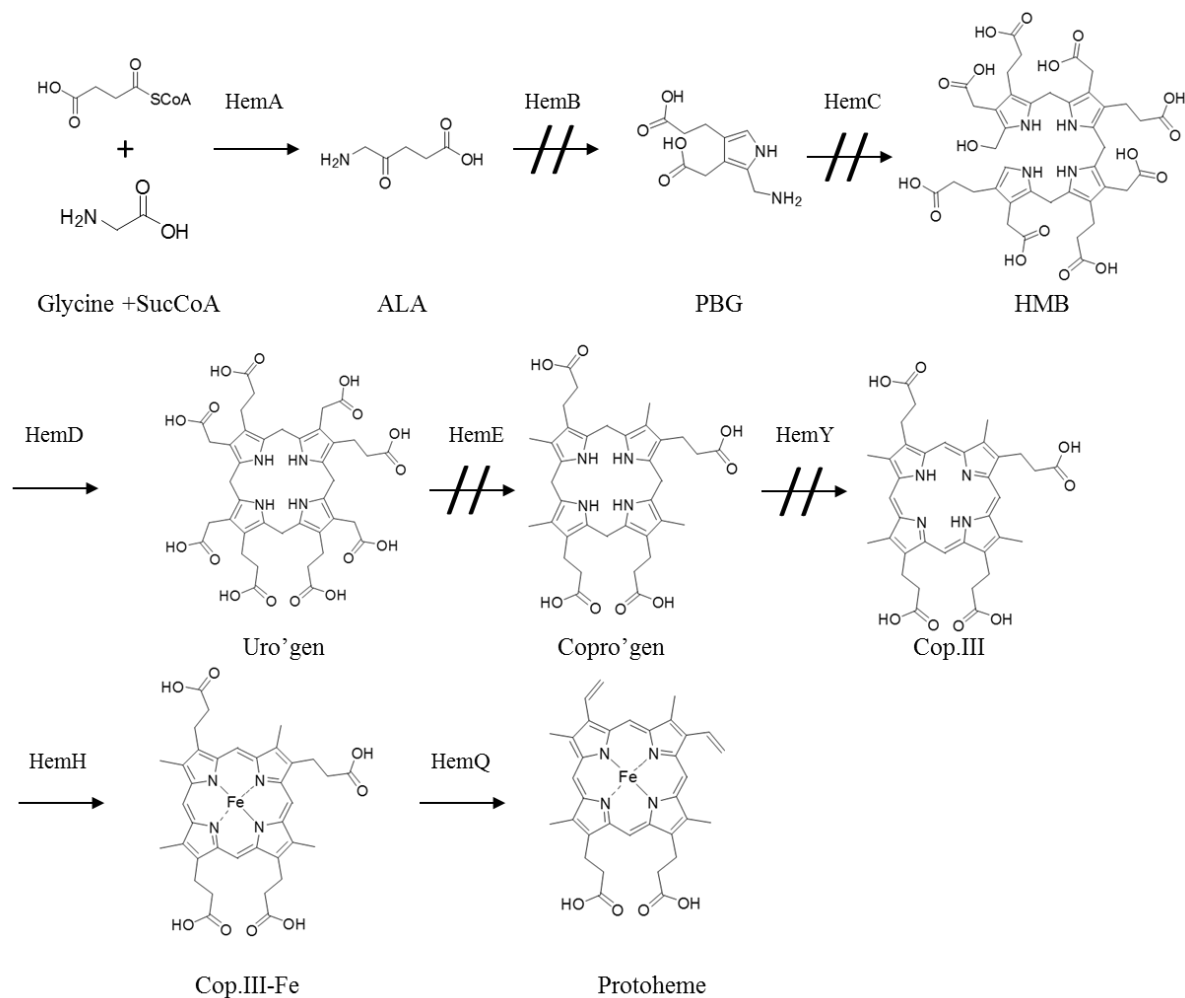


Fig. 4.12 ヘム合成遺伝子解析の結果から推定される ASN212 株のヘム合成経路の機能欠損。

最後に先行研究で見出された6種の増殖因子の活性について考察する。第一に遊離の Cop. 類よりも Zn 錯体が高い増殖活性を示す理由である。本項で行った熱力学的計算からは、金属錯体形成が大きな発熱を伴う過程であることが示され、同時に金属の取り込みは熱力学的支配よりもむしろ速度論的支配に依存していることが示唆された。Cop. III-Fe 錯体は Cop. III-Zn 錯体に比べ 46.49 kJ/mol 高いエネルギー準位を持つが、これは遊離の Cop. III との差ほどではない (Table 4.12)。遊離の Cop. III に対しては HemH によって Fe の導入がなされるが、これに先んじて速度論的に優位な Zn 錯体を経ることで、(吸熱的な過程を経たとしても) 低い活性化エネルギーによって容易に Fe 錯体に変換されていると予想される。

また、同様に先行研究では Cop. I ならびに Cop. III のメチルエステルである zincmethylphyrin I (Fig. 1.9) ならびに zincmethylphyrin III (Fig. 1.9) が単離されている。少なくとも C_4 回転対称性の無い Cop. III について単一のモノメチルエステルが単離されていることから、これらはアーティファクトでは無い。筆者はメチルエステルが活性を示す理由として、HemQ の副反応によるメチルエステルの切断を予想している。これは HemQ と基質の結合が、過酸化水素によって切断されるという Daily らの予想と、flavinmononucleotide (FMN) 存在下において、HemQ が Cop. III-Fe を protoheme に変換するという報告に基づく (Dailey, *et al.*, 2015)。予想される反応機構を Fig. 4.13 に示す。即ち、Cop. III-Fe に配位した Fe^{2+} が H_2O_2 および FMN によって発生したヒドロペルオキシラジカルによって、 Fe^{3+} に酸化され、続くホモリシスにより生じたヒドロキシラジカルによってメチルエステルのカルボン酸への分解が進行するというものである。実態の解明には過酸化水素のソースや、Fenton 反応関与の可能性など、さらなる検証の必要がある。

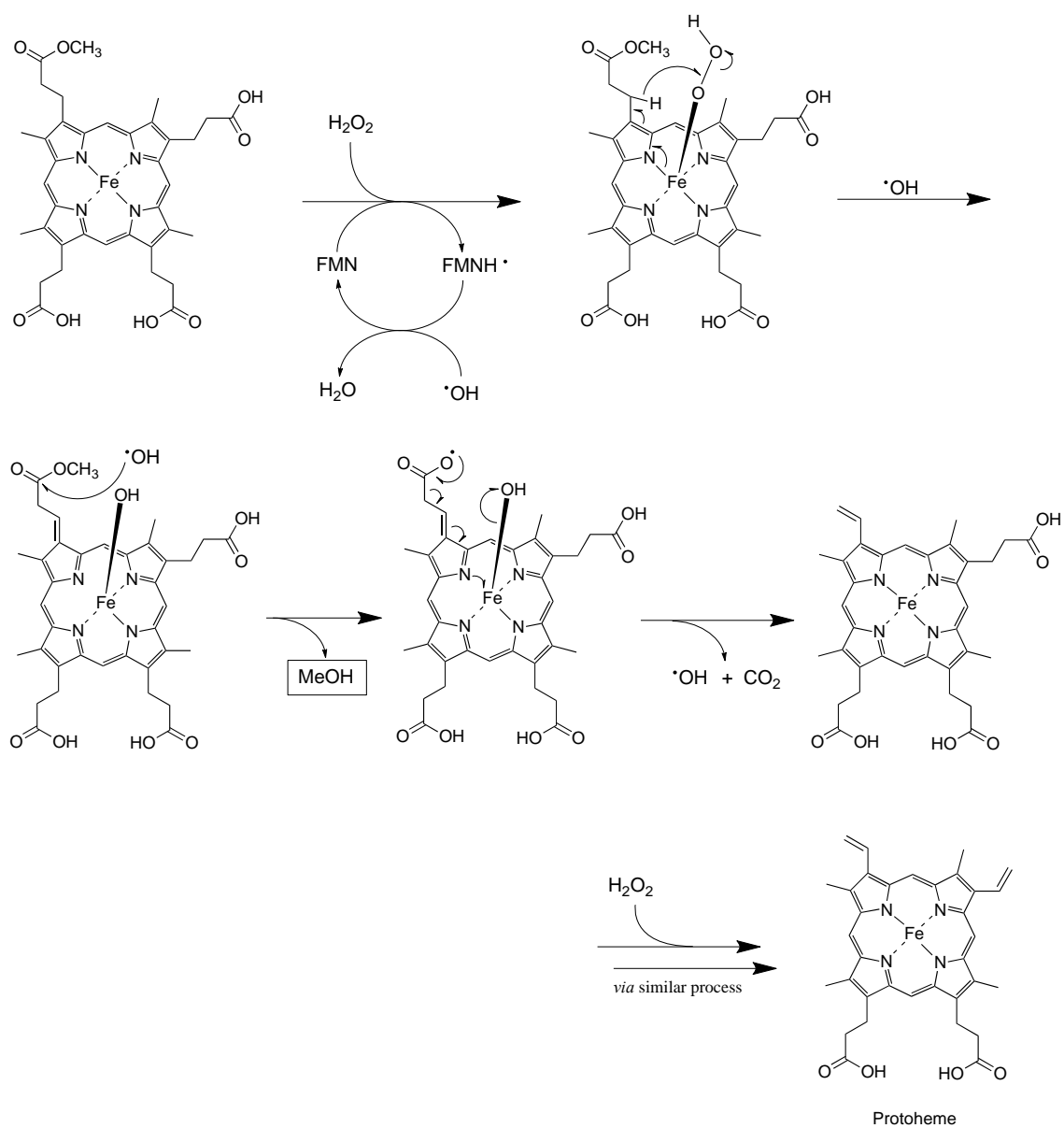


Fig. 4.13 Dailey らの報告結果より推測される、zincmethylphyrin 類のデメチル化と HemQ による Cop. III-Fe から protoheme への変換機構。

3.5 Cop. III 添加条件における ASN212 株以外の微生物増殖活性評価

Cop. III の増殖促進活性について、その普遍性を検証するため、続いて ASN212 株以外の微生物株に対して Cop. III の増殖活性を評価した。対象として、それぞれ Actinobacteria である *L. komagatae* NBRC15245 株、*L. albus* NBRC103070 株、*L. denitrificans* NBRC106039 株、*Actinomyces* sp. TA0403 株、*Streptomyces* sp. TA0403 株、Firmicutes である *B. subtilis* ATCC 70385 株及び γ -Proteobacteria である *E. coli* ATCC 8739 株の計 7 種の菌株を用いた。*L. komagatae* VKM ST 2845L においては前述の通り、HemY の機能に瑕疵が見込まれた。このため同種である *L. komagatae* NBRC15245 株に対する活性を評価することで、作用機序の裏付けをとることも企図した。それぞれの 13 μ M Cop. III 添加条件における増殖量を無添加条件の生育量に対する比として Fig. 4.14 に示した。

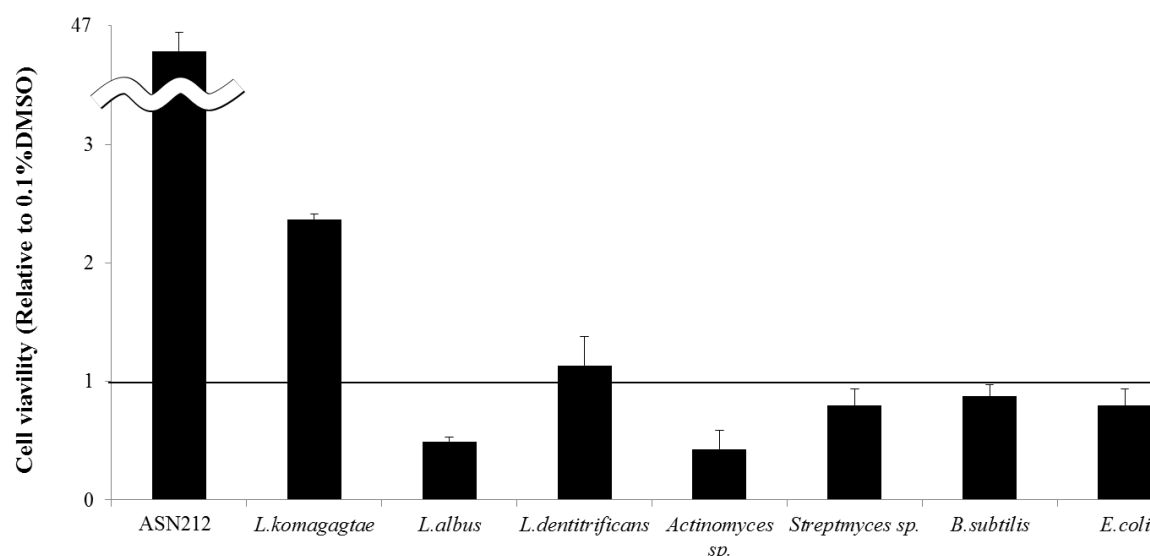


Fig. 4.14 8 種の菌体に対して、Cop.III 添加条件下における増殖活性評価。

活性評価の結果、ASN212 株の近縁種である *L. komagatae* NBRC15245 株において 2.4 倍程度の増殖促進が見られた。この結果は Cop. III が外因性の生合成中間体として作用しているという結論を裏付け得るものである。*L. komagatae* NBRC15245 株ならびに VKM ST 2845L 株は難培養微生物ではなく、純粋培養が可能であるが、これは HemY が触媒する酸化反応が、酸素共存により非酵素反応的にも進行しうることで説明できる (Kwon *et al*, 2003)。外因性の Cop. III 投与は、律速となっている空気酸化反応をバイパスし、*L. komagatae* 株の生育を促進していると考えられる。

一方で、*L. albus* NBRC103070 株、*Actinomyces* sp. TA0403 株については顕著な、*Streptomyces* sp. TA0403 株についてはわずかな増殖抑制が見られた。これは、Cop.

III の活性酸素生成能が原因であると考えられる。Cop. III は光増感物質として働き、活性酸素種を生成していることが知られている (Arakane, *et al.*, 1996)。紫外線の長波長領域 (320–400 nm) や可視光線の光エネルギーにより、Cop. III を含むポルフィリン類は光増感作用を持ち基底状態の三重項酸素を励起させて一重項酸素を生成する。発生した一重項酸素は生体内においてデオキシリボース環の酸化による開裂、塩基の欠失、DNA の欠失などに由来する細胞毒性を有する。前節の化学計算の結果から、Cop. III と Cop.–Zn 錯体は近しい HOMO/LUMO エネルギー準位を有していることが明らかになった (Table 4.11)。このことから遊離の Cop. III と Zn 錯体である zincphyrin は同程度の光増感活性を示すと推定される。本実験によって観察された増殖阻害活性は、Cop. III から発生した一重項酸素が、細菌叢中の微生物に対してダメージを与えたことによると考えられる。

3.6 Cop. III が細菌叢サンプルに与える影響

Cop. III が一部の菌株に対して増殖促進もしくは増殖阻害といった、2面的な活性を示すことを明らかにした。筆者はさらに菌叢を対象とし、特に noncanonical ヘム生合成経路を持つ Actinobacteria 門及び Firmicutes 門に対する Cop. III の影響を検証した。

2種のエゾシカ腸内未消化物から採取されたサンプル (M1、M3)、6種の北海道および宮崎県の土壌より採取されたサンプル (M2、M4、M5、M6、M7、M8) 及び活性汚泥から採取されたサンプル (M9) の計9種の細菌叢サンプルに対し、13 μ M Cop. III 添加もしくは未添加条件で菌叢全体の増殖量を評価した。増殖量を OD₅₉₅ で評価した結果を Fig. 4.15 に示した。

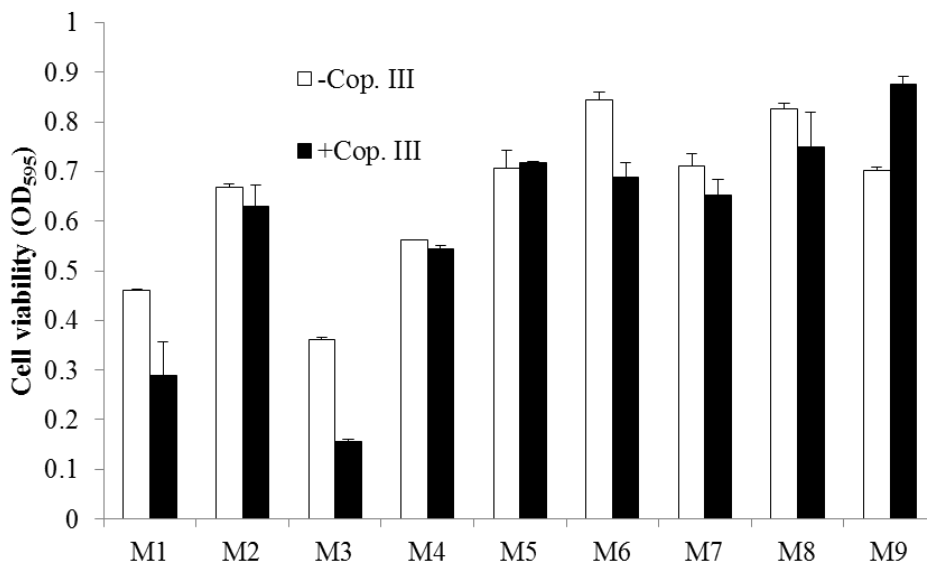


Fig. 4.15 Cop. III 存在下における細菌叢サンプルの増殖量評価の結果。

増殖量評価の結果、Cop. III 存在下において6種のサンプル (M1、M2、M3、M6、M7、M8) については、未添加条件と比較して増殖の抑制が観察された。一方で M9 については Cop. III 存在下において増殖量の増加が認められた。

培養を行った各サンプルより NucleoSpin®Soil を用いて DNA を抽出した。DNA の濃度及び純度 (A₂₆₀/A₂₈₀) を Table 4.15 に示す。

Table 4.15. 細菌叢より抽出された DNA の濃度と、その純度

Sample		DNA A260/220	
		ng/ μ l	
M1	+	300.1	1.80
	-	163.1*	1.84
M2	+	64.5*	1.80
	-	283.4	1.84
M3	+	2.0	1.03
	-	17.5	1.77
M4	+	344.4	1.86
	-	486.9	1.81
M5	+	343.9	1.85
	-	392.8	1.85
M6	+	597.4	1.85
	-	575.6	1.80
M7	+	493.6	1.84
	-	552.0	1.80
M8	+	468.2	1.83
	-	451.4	1.83
M9	+	425.6	1.82
	-	450.4	1.59

* : Eluted in 60 μ L of TE buffer

得られた各サンプルの DNA 溶液が 10 ng/ μ L となるように濃度調整し、Actinobacteria 特異的なプライマーを用いた PCR およびアガロースゲル電気泳動を行った。結果を Fig. 4.16 に示す。ゲルの全体像については付録に記載した (Chart 13)。

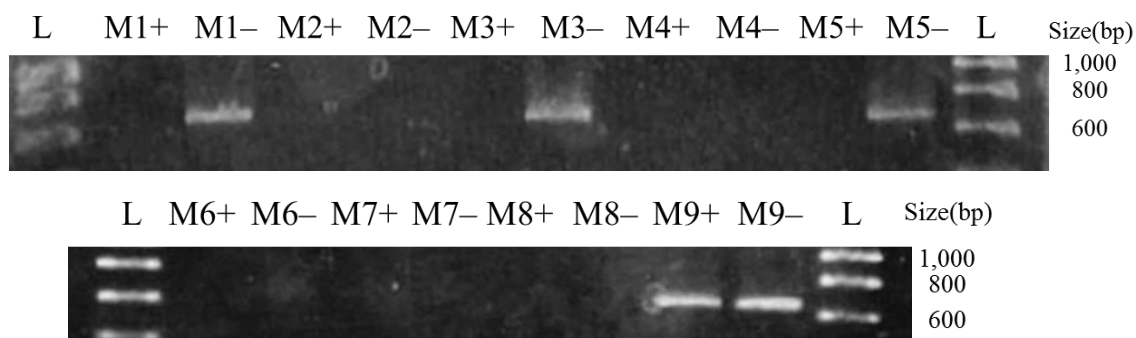


Fig. 4.16 Cop. III 添加条件で培養を行った細菌叢サンプルの DNA サンプルに対して Actinobacteria 特異的プライマーを用いた PCR 及びアガロースゲル電気泳動を行った結果。M+: Cop. III 添加条件で培養を行ったサンプルの DNA、M-: 各サンプルの Control の DNA、L : マーカー

電気泳動の結果を目視で確認したところ、エゾシカ盲腸ならびにエゾシカ大腸内生菌サンプル (M1、M3) 及び土壌より採取したサンプルである M5 において、Cop. III 添加条件で Actinobacteria の増殖抑制が見られた。また、土壌サンプルである M2、M4、M6、M7、M8 サンプルに関しては、有意なバンドが検出されなかった。活性汚泥サンプルである M9 に関しては、Cop. III 添加条件、未添加条件ともに、明瞭なバンドが確認された。続いて、モレキュラーイメージャーを用いて、PCR によって得られたバンドの定量を行った (Chart 14)。結果を Fig. 4.17 に示す。

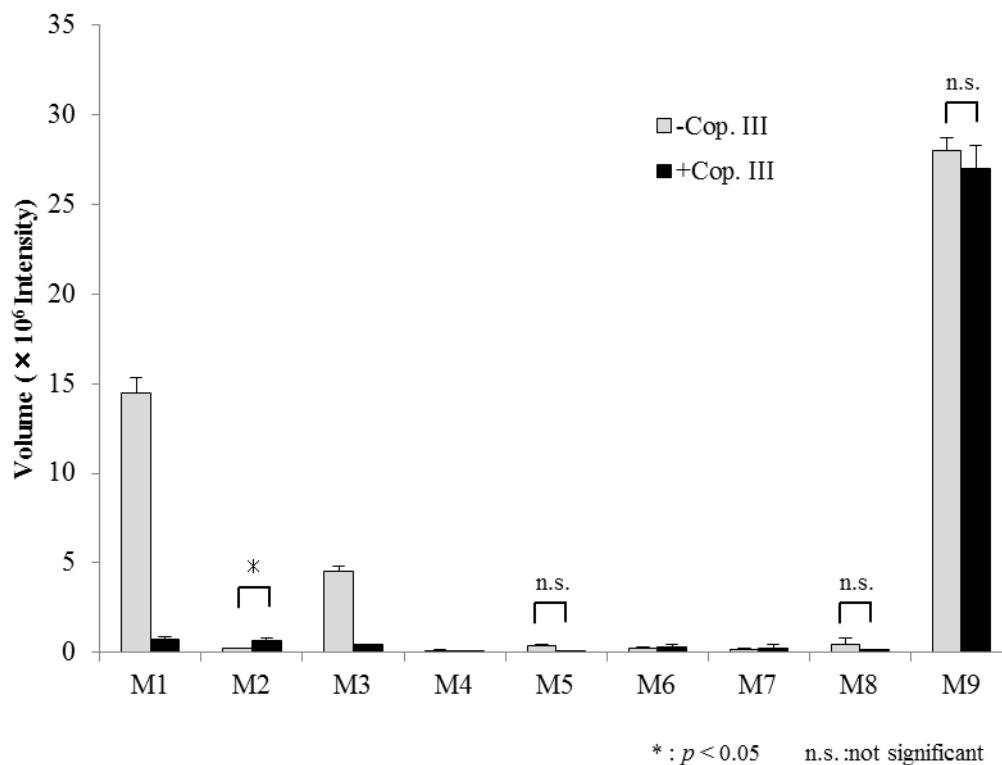


Fig. 4.17 Actinobacteria 門特異的プライマーを用いた PCR 産物を、アガロースゲル電気泳動に供し、検出されたバンドの蛍光量を定量した結果。有意検定は student の t -検定で行った。

定量の結果、2 種のエゾシカ内生菌サンプル (M1、M3) において、Cop. III 添加条件において Actinobacteria の増殖が抑制されることを示唆する結果が得られた。一方、土壌サンプルである M2 に関して、微弱ながらも Cop. III 添加条件において Actinobacteria の増殖が促進されることを示唆する結果が得られた。

次に Firmicutes 特異的プライマーを用いて PCR 反応およびアガロースゲル電気泳動を行った。結果を Fig. 4.18 に示した。ゲル全体の写真は Chart 15 に記載した。

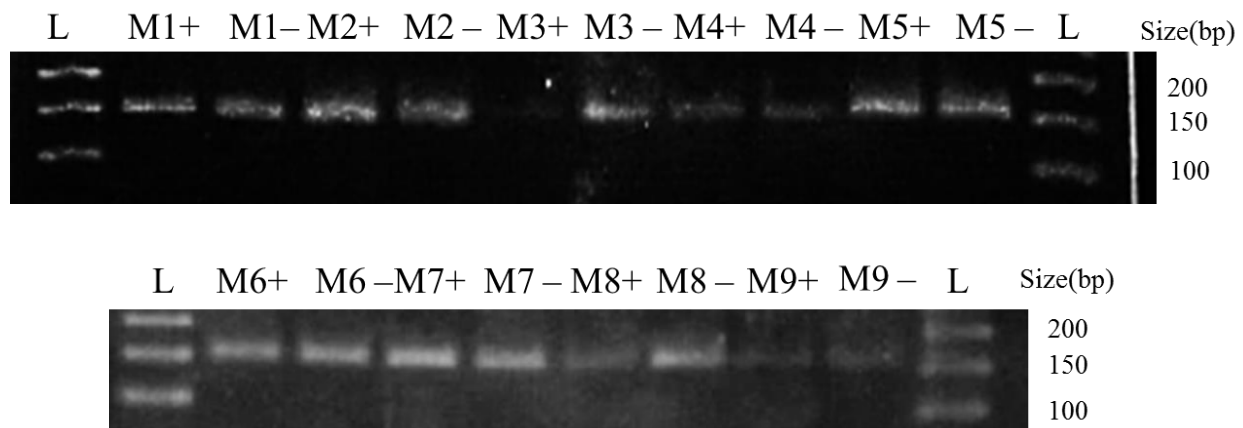


Fig. 4.18 Cop. III 存在下で培養を行った細菌叢サンプルの DNA サンプルに対して Firmicutes 特異的プライマーを用いた PCR 及びアガロースゲル電気泳動を行った結果。

電気泳動の結果を目視で確認した結果、エゾシカ大腸内生菌サンプルである M3 及び土壌より採取したサンプルである M8 において、Cop. III 添加条件で Firmicutes の増殖が阻害されていることを示唆する結果が得られた。M1、M2、M4、M5、M6、M7、M9 サンプルについては、目視によるバンドの差は確認できなかった。

以上の通り、各種菌叢サンプルの中で Actinobacteria 門ならびに Firmicutes 門に該当する PCR 産物が確認できたもののうち、多くが増殖抑制を受けている様子が観察された。増殖抑制の理由として、前述同様に活性酸素の関与が示唆される。OD₅₉₅ による増殖量評価では、Cop. III 添加により 2 種のエゾシカ内生菌サンプルで有意な生育量の減少が見られた。これは、通常嫌気的条件下で生育している菌叢が活性酸素の生成に影響を受けやすいためだと考えられる。逆に、高濃度酸素に馴化している活性汚泥サンプル (M9) においては、Cop. III 添加条件でとりわけ高い増殖が見られた (Fig. 4.15)。活性汚泥は、培養中に常に曝気されており、高い溶存酸素下で細菌叢が形成されている。そのような環境中において生育する微生物種は、スーパーオキシドディスムターゼなど、活性酸素を分解する機構を発達させていると考えられる。一方で、M9 サンプルにおいて Actinobacteria に該当する PCR 産物量に大きな差異は認められなかった。このことから、Cop. III 添加により Actinobacteria に属する菌種以外が増殖刺激を受けた可能性が考えられる。

本研究において用いた細菌叢試料の多くが Cop. III 添加により増殖が抑制される結果を示していたが、土壌サンプルである M2 に関して、わずかではあるか Cop. III 添加条件において Actinobacteria の増殖が促進されることを示唆する結果が得られた。この結果から、M2 サンプルには、ASN212 株と同様に Cop. III によって増殖促進される難培養微生物が存在している可能性がある。今後、リアルタイム PCR による精密な定量や、次世代シーケンサーによる菌叢解析などを用いて、より詳細な解析を行うことで、Cop. III を自身の増殖に要求する新たな難培養微生物（群）の発見を達成できる可能性がある。

4. 結論

本研究において行った構造活性相関研究の結果、coproporphyrin-Zn 錯体のみならず Fe 錯体が ASN212 株に対して増殖活性を示すことが明らかになった。また、Cop. III 及びその Zn、Fe 錯体は Cop. I に比べ有意に高い活性を示した。この結果から、Cop.類が金属輸送体やシグナル物質としてではなく、ヘム生合成の前駆体として作用していると推定された。そこで ASN212 株のヘム生合成関連遺伝子について検証したところ、Cop. III よりも上流の経路の反応に関わる HemB、HemC、HemE および HemY の機能欠損が示唆された。以上から、Cop. III の ASN212 株に対する増殖促進活性の作用機序は、Cop. III が外因性の生合成前駆体として ASN212 株のヘム生合成の機能欠損を補うことで、増殖に必要なヘムの生産を可能にしていることによると結論づけた。

Cop.類の活性について、その普遍性を検証するため Actinobacteria である *L. komagatae* NBRC15245 株、*L. albus* NBRC103070 株、*L. denitrificans* NBRC106039 株、*Actinomyces* sp. TA0403 株、*Streptomyces* sp. TA0403 株、Firmicutes である *B. subtilis* ATCC 70385 株及び γ -Proteobacteria である *E. coli* ATCC 8739 株の計 7 種について増殖活性を評価した。Actinobacteria ならびに Firmicutes は Cop. III を中間体とする noncanonical pathway によりヘム生合成を行う。このうち *L. komagatae* NBRC15245 は有意な増殖促進を示したが、*L. albus* NBRC103070 株ならびに *Actinomyces* sp. TA0403 株では有意な増殖の抑制が見られた。先行研究において Cop. III の供給者である GF9 株もまた、一定濃度以上の Cop. III 添加条件において増殖が阻害されることを報告している。これらの増殖抑制は Cop. III の活性酸素種産生能に起因すると考えられる。Cop.類のこのような 2 面的な生理活性は、共存する他の金属イオンや、光条件、培地中の濃度によって影響を受けやすいものだと考えられる (Bhuiyan, *et al.*, 2016)。今後、培養条件やそれに伴う濃度の閾値などについて詳細な検討が必要とされる。

さらに、様々な環境より採取した菌叢試料について、Cop. III 添加による増殖の応答を評価した。その結果、濁度による評価では嫌気的環境由来のエゾシカ内生菌叢は Cop. III によって強く生育阻害を受け、好気的環境である活性汚泥試料は増殖促進を示した。一方、Actinobacteria および Firmicutes 特異的プライマーを用いた PCR 産物量では、ほとんどの試料でこれら細菌群の増殖抑制を示した。本研究において用いたサンプルの中で、土壌サンプルの 1 つに Actinobacteria 特異的 primer を用いた PCR 条件において、Cop. III によって増殖が促進することを示唆する結果が得られた。

この結果は環境中の細菌叢においても Cop. III の存在下においてのみ増殖が可能な微生物が存在することを示唆しており、サンプルに存在する微生物種の具体的な探索を行うことで既存の手法において見逃されてきた新たな難培養微生物の発見につながると考えられる。一部の試料において、Actinobacteria もしくは Firmicutes 以外の細菌類が刺激を受けたことを示唆する結果も観察された。今後、その属性を明らかにすることを目的にメタゲノムによる菌叢解析を行う必要がある。

ASN212 株は、本来ほとんどの生物に必須であるヘム合成経路を欠損しながらも環境中において生存している。このことは Morris らが提唱した Black Queen Hypothesis (BQH) に基づいた生存戦略であるとも考えられる (Morris *et al.*, 2012; Mass *et al.*, 2016)。BQH とは、進化の過程で遺伝子欠損した菌株が環境中で生き残る理由として提唱された仮説である。ある化合物を分泌している微生物が存在している環境中において、自身でその化合物を生産して利用している菌株と、分泌された化合物を利用して化合物生産遺伝子欠損株を比較した場合、後者は化合物生産のために消費するエネルギーを必要としない。その結果として遺伝子欠損株のほうが生存に有利であるという仮説である (Fig.4.19)。

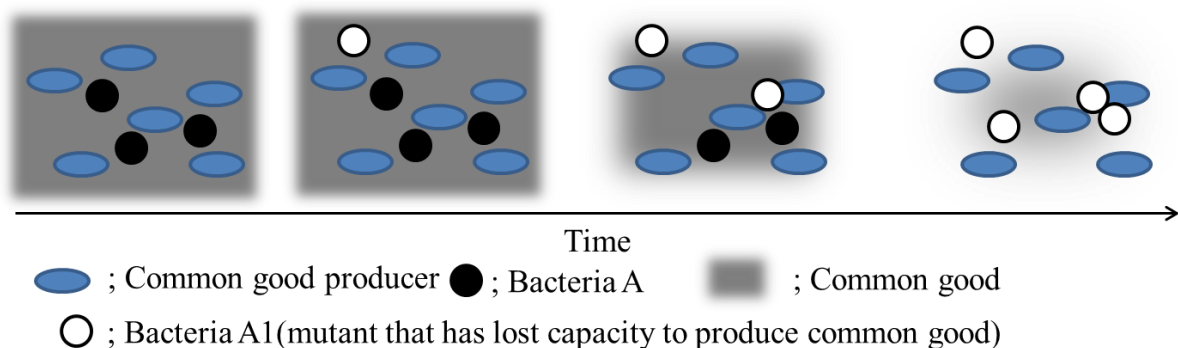


Fig. 4.19 BQH の概要図。ある化合物生産菌 (Common good producer) が存在している環境において、自身で化合物を生産し、利用している微生物 (Bacteria A) よりも、環境中のその化合物を利用して化合物生産機能を欠損した微生物 (Bacteria A1) の方が、エネルギー消費が少ないため、結果として優位に生存が可能である。(図は Mass, *et al.*, 2016 を参考に作成した。)

BHQ に基づくと、Cop. III を生産する微生物 (GF9 株) が存在する環境下において、自身で protoheme を生産して利用している微生物よりも、ヘム合成遺伝子の一部が欠損した変異株である ASN212 の方がより少ないエネルギーで protoheme を生産することができるため、結果として生存に有利であると考えられる。ヘム合成能の

欠失は、好氣的条件下で ASN212 株が見出した生存戦略であるとも言える。本研究の結果は、現在難培養微生物とされている微生物の中には、自身の生命活動に必須であるような一次代謝物さえも、環境中の他種に依存する種も存在していることを反映したものとも言える。

結言

ASTN45 株及び AST4 株の増殖因子の探索を行った結果、ASTN45 株、AST4 株の増殖因子は、それぞれ 210 L 中 0.9 mg、50 L 中 0.7 mg 以下である結果が得られ、何れも通常の精製過程では見落とされがちな超微量物質である。ASN212 株の増殖因子である Cop. III も同様に GF9 株培養上清中にごく微量のみ含まれていた。技術の発展によって、培養を介さずわずかな細胞数の微生物から研究が可能になったが、本研究で行ってきた微生物の大量培養や大規模な精製などのある種、古典的な手法は、このような微量物質の探索には未だ重要な技術である。通常の培養及び精製過程では見落とされがちな化合物を探索する視点が、難培養微生物増殖因子のさらなる研究発展につながることを期待する。また、本研究により明らかとなった Cop. III の難培養微生物に対する増殖機序の解明は、難培養微生物の培養技術の発展に新たな知見を与えるものである。今後、Cop. III を用いた培養法によって、新たな微生物種の有用な活用につながることを期待される。

参考文献

- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. Phylogenetic Identification and *in situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol Rev.* **59** (1), 143–169 (1995).
- Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K. & Adachi, O. Growth Stimulation of Microorganisms by Pyrroloquinoline Quinone. *Agric. Biol. Chem.* **48** (11), 2909–2911 (1984).
- Andreev, S. V., Zverev, S. A., Zamilatskov, I. A., Kurochkina, N. M., Ponomarev, G. V., Fitch, A. N. & Chernyshev, V. V. Polymeric Structure of a Coproporphyrin I Ruthenium(II) Complex: a Powder Diffraction Study. *Acta Crystallogr. C. Struct. Chem.* **73**, 47–51 (2017).
- Arakane, K., Ryu, A., Hayashi, C., Masunaga, T., Shinmoto, K., Mashiko, S., Nagano, T. & Hirobe, M. Singlet Oxygen ($1\Delta_g$) Generation from Coproporphyrin in *Propionibacterium acnes* on Irradiation. *Biochem Biophys Res Commun.* **223** (3), 578–582 (1996).
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., Dejongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., Mcneil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. & Zagnitko, O. The RAST Server: Rapid Annotations Using Subsystems Technology. *BMC Genomics* **9**, 75–90 (2008).
- Bhuiyan, M. N., Takai, R., Mitsushashi, S., Shigetomi, K., Tanaka, Y., Kamagata, Y. & Ubukata, M. Zincmethylpyrins and Coproporphyrins, Novel Growth Factors Released by *Sphingopyxis* sp., Enable Laboratory Cultivation of Previously Uncultured *Leucobacter* sp. through Interspecies Mutualism. *J. Antibiot.* **69** (2), 97–103 (2016).
- Boey, A. Growth Promoting Compound for *Catellibacterium nectarophilum* Produced by *Sphingomonas* sp. 北海道大学大学院 2009 年度修士論文, (2009).
- Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics.* **30** (15), 2114–2120 (2014).
- Boyd, S. D., Calvo, J. S., Liu, L., Ullrich, M. S., Skopp, A., Meloni, G. & Winkler, D. D. The Yeast Copper Chaperone for Copper-zinc Superoxide Dismutase (CCS1)

Is a Multifunctional Chaperone Promoting All Levels of SOD1 Maturation. *J. Biol Chem.*, doi: 10.1074/jbc.RA118.005283(2018).

Bykhovsky, V. Y., Zaitseva, N. I., Mironov, A. F., Osin, N. S., Pecherskikh, E. V., Rumyantseva, V. D. & Sukhin, G. M. Coproporphyrins, Uroporphyrins, and Their Metal Complexes: Biosynthesis and Application to Immune Analysis and Diagnostic Methods. *Appl. Biochem. Microbiol.* **37** (9), 561–568 (2001).

Choi, E.J., Nam, S.J., Paul, L., Beatty, D., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. & Fenical, W. Previously Uncultured Marine Bacteria Linked to Novel Alkaloid Production. *Chem. Biol.* **22** (9), 1270–1279 (2015).

Cleary, J. L., Kolachina, S., Wolfe, B. E. & Sanchez, L. M. Coproporphyrin III Produced by the Bacterium *Glutamicibacter arilaitensis* Binds Zinc and Is Upregulated by Fungi in Cheese Rinds. *mSystems.* **3** (4), doi: 10.1128/mSystems.00036-18 (2018).

Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Hug, S. A. & Palmer, L. M. Viable but Non-culturable *Vibrio cholera* and Related Pathogenes in the Environment: Implications for Release of Genetically Engineered Microorganisms. *Bio/Technology* **3**, 817–820 (1985).

Dailey, H. A., Gerdes, S., Dailey, T. A., Burch, J. S. & Phillips, J. D. Noncanonical Coproporphyrin-dependent Bacterial Heme Biosynthesis Pathway that Does Not Use Protoporphyrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112** (7), 2210–2215 (2015).

D'Onofrio, A., Crawford, J.M., Stewart, E.J., Witt, K., Gavrish, E., Epstein, S., Clardy, J. & Lewis, K. Siderophores from Neighboring Organisms Promote the Growth of Uncultured Bacteria. *Chem. Biol.* **17** (3), 254–264 (2010).

Farris, M. H. & Olson, J. B. Detection of Actinobacteria Cultivated from Environmental Samples Reveals Bias in Universal Primers. *Lett. Appl. Microbiol.* **45** (4), 376–381 (2007).

Gans, J., Wolinsky, M. & Dunbar J. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. *Science* **309** (5739), 1387–1390 (2005).

Grant, C.L. & Pramer, D. Minor Element Composition of Yeast Extract. *J. Bacteriol.* **84**, 869–870 (1962).

Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J., Zhao, H. & Wang, K. Development of a Real-time PCR Method for Firmicutes and Bacteroidetes in Faeces and its

Application to Quantify Intestinal Population of Obese and Lean Pigs. *Let. Appl. Microbiol.* **47** (5), 367–373 (2008).

Hara, S., Isoda, R., Tahvanainen, T. & Hashidoko Y. Trace Amounts of Furan-2-carboxylic Acids Determine the Quality of Solid Agar Plates for Bacterial Culture. *PLoS One.* **7** (7), doi: 10.1371/journal.pone.0041142 (2012).

Hino, M. 腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)の"生きているが培養できない"(VBNC)状態とその誘導因子に関する研究 九州大学2014年度博士論文 (2014).

Huvenne, H., Goeminne, G., Maes, M. & Messens, E. Identification of Quorum Sensing Signal Molecules and Oligolignols Associated with Watermark Disease in Willow (*Salix* sp.). *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **872** (1-2), 83–92 (2008).

Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Loy, A., Qiu, Y.L., Hugenholtz, P., Kimura, N., Wagner, M., Ohashi, A. & Harada, H. Non-sulfate-reducing, Syntrophic Bacteria Affiliated with Desulfotomaculum Cluster I Are Widely Distributed in Methanogenic Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (3), 2080–2091 (2006).

Isawa, K., Hojo, K., Yoda, N., Kamiyama, T., Makino, S., Saito, M., Sugano, H., Mizoguchi, C., Kurama, S., Shibasaki, M., Endo & N., Sato, Y. Isolation and Identification of a New Bifidogenic Growth Stimulator Produced by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66** (3), 679–681 (2002).

Kaeberlein, T., Lewis, K. & Epstein, S. S. Isolating "Uncultivable" Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science* **296** (5570), 1127–1129 (2002).

Kajitani, R., Toshimoto, K., Noguchi, H., Toyoda, A., Ogura, Y., Okuno, M., Yabana, M., Harada, M., Nagayasu, E., Maruyama, H., Kohara, Y., Fujiyama, A., Hayashi, T. & Itoh T. Efficient *de novo* Assembly of Highly Heterozygous Genomes from Whole-genome Shotgun Short Reads. *Genome Res.* **24** (8), 1384–1395 (2014).

Kamagata Y. 難培養微生物の実態に迫る *化学と生物* **46** (9), 600–607 (2008).

Konetschny-Rapp, S., Jung, G., Meiwes, J. & Zähler H. Staphyloferrin A: a Structurally New Siderophore from *Staphylococci*. *Eur. J. Biochem.* **191** (1), 65–74 (1990).

Kukla, M. J., Breslin, H. J. & Bowden, C. R. Synthesis, Characterization, and

Anorectic Testing of the Four Stereoisomers of Cyclo(histidylproline). *J. Med. Chem.* **28** (11), 1745–1747 (1985).

Kwon, S. J., de Boer, A. L., Petri, R. & Schmidt-Dannert, C. High-level Production of Porphyrins in Metabolically Engineered *Escherichia coli*: Systematic Extension of a Pathway Assembled from Overexpressed Genes Involved in Heme Biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** (8), 4875–4883 (2003).

Liesack, W. & Strackebrandt, E. Unculturable Microbes Detected by Molecular Sequences and Probes. *Biodivers. Conserv.* **1**, 250–262 (1992).

Lin, Y. C., Uemori, K., de Briel, D. A., Arunpairojana, V. & Yokota, A. *Zimmermannella helvola* gen. nov., sp. nov., *Zimmermannella alba* sp. nov., *Zimmermannella bifida* sp. nov., *Zimmermannella faecalis* sp. nov. and *Leucobacter albus* sp. nov., Novel Members of the Family Microbacteriaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54** (5), 1669–1676 (2004).

Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., Mueller, A., Schäberle, T. F., Hughes, D. E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V. A., Cohen, D. R., Felix, C. R., Fetterman, K. A., Millett, W. P., Nitti, A. G., Zullo, A. M., Chen, C. & Lewis, K. A New Antibiotic Kills Pathogens without Detectable Resistance. *Nature* **517** (7535), 455–459 (2015).

Mas, A., Jamshidi, S., Lagadeuc, Y., Eveillard, D. & Vandenkoornhuyse, P. Beyond the Black Queen Hypothesis. *ISME J.* **10** (9), 2085–2091 (2016).

Manome, A., Zhang, H., Tani, Y., Katsuragi, T., Kurane, R. & Tsuchida, T. Application of Gel Microdroplet and Flow Cytometry Techniques to Selective Enrichment of Non-growing Bacterial Cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **197** (1), 29–33 (2001).

Martin, M. Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-throughput Sequencing Reads. *EMBnet journal* **17** (1), 10–12 (2011).

Mori, H., Sato, Y., Taketomo, N., Kamiyama, T., Yoshiyama, Y., Meguro, S., Sato, H. & Kaneko, T. Isolation and Structural Identification of Bifidogenic Growth Stimulator Produced by *Propionibacterium freudenreichii*. *J. Dairy Sci.* **80** (9), 1959–1963 (1997).

Mukamolova, G. V., Kormer, S. S., Kell, D. B. & Kaprelyants, A. S. Stimulation of the Multiplication of *Micrococcus luteus* by an Autocrine Growth Factor. *Arch.*

Microbiol. **172** (1), 9–14 (1999).

Morris, J. J., Lenski, R. E. & Zinser, E. R. The Black Queen Hypothesis: Evolution of Dependencies through Adaptive Gene Loss. *mBio* **3** (2), doi: 10.1128/mBio.00036-12 (2012).

Nakashimada, Y. & Nishio N. Microbial Hydrogen Production from Organic Resources. *水素エネルギーシステム* **32**, 16–21 (2007).

Neiland, J. B. A Crystalline Organo-iron Pigment from a Rust Fungus (*Ustilago sphaerogena*). *J. Am. Chem. Soc.* **74** (19), 4846–4847 (1952).

Neiland, J. B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* **270** (45), 26723–26726 (1995).

Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **75** (3), 311–335 (2012).

Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E. M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K. & Epstein, S. S. Use of Ichip for High-throughput *in situ* Cultivation of "Uncultivable" Microbial Species. *Appl. Environ. Microbiol.* **76** (8), 2445–2450 (2010).

O'Brien, I. G. & Gibson, F. The Structure of Enterochelin and Related 2,3-dihydroxy-*N*-benzoylserine Conjugates from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **215** (2), 393–402 (1970).

Ogita, N., Hashidoko, Y., Limin, S.H. & Tahara, S. Linear 3-Hydroxybutyrate tetramer (HB4) Produced by *Sphingomonas* sp. Is Characterized as a Growth Promoting Factor for Some Rhizomicrofloral Composers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70** (9), 2325–2329 (2006).

Ohno, M., Okano, I., Watsuji, T., Kakimura, T., Ueda, K., Beppu, T. Establishing the Independent Culture of a Strictly Symbiotic Bacterium *Symbiobacterium thermophilum* from its Supporting *Bacillus* Strain. *Biosci. Biotechnol., Biochem.* **63** (6), 1083–1090 (1999).

Ohno, M., Shiratori, H., Park, M.J., Saitoh, Y., Kumon, Y., Yamashita, N., Hirata, A., Nishida, H., Ueda, K. & Beppu, T. *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov., a Symbiotic Thermophile that Depends on Co-culture with a *Bacillus* Strain for Growth. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1829–1832 (2000).

Porra, R. J. & Ross B. D. Haem Synthase and Cobalt Porphyrin Synthase in Various Micro-organisms. *Biochem. J.* **94**, 557–562 (1965).

Qiu, Y. L., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Tseng, I. C., Cheng, S. S., Ohashi, A. & Harada, H. Identification and Isolation of Anaerobic, Syntrophic Phthalate Isomer-degrading Microbes from Methanogenic Sludges Treating Wastewater from Terephthalate Manufacturing. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (3), 1617–1626 (2004).

Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Ohashi, A., Harada, H. & Kamagata, Y. Isolation of key Methanogens for Global Methane Emission from Rice Paddy Fields: a Novel Isolate Affiliated with the Clone Cluster Rice Cluster I. *Appl. Environ. Microbiol.* **73** (13), 4326–4331 (2007).

Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A. & Harada, H. Fluorescence *in situ* Hybridization Using 16S rRNA-targeted Oligonucleotides Reveals Localization of Methanogens and Selected Uncultured Bacteria in Mesophilic and Thermophilic Sludge Granules. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (3), 1280–1288 (1999).

Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y. & Ishikawa, H. Genome Sequence of the Endocellular Bacterial Symbiont of Aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* **407** (6800), 81–86 (2000).

Stach, J.E., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M. & Bull, A.T. New Primers for the Class Actinobacteria: Application to Marine and Terrestrial Environments. *Environ. Microbiol.* **5** (10), 828–841 (2003).

Sun, L., Wen, X., Tan, Y., Li, H., Yang, X., Zhao, Y., Wang, B., Cao, Q., Niu, C. & Xi, Z. Site-directed Mutagenesis and Computational Study of the Y366 Active Site in *Bacillus subtilis* Protoporphyrinogen Oxidase. *Amino Acids.* **37** (3), 523–530 (2009).

Suzuki, S., Hirahara, T., Horinouchi, S. & Beppu, T. Purification and Properties of Thermostable Tryptophanase from an Obligately Symbiotic Thermophile, *Symbiobacterium thermophilum*. *Agric. Biol. Chem.* **55** (12), 3059–3066 (1991).

Suzuki, S., Hirahara, T., Horinouchi, S. & Beppu, T. Growth of a Tryptophanase-producing Thermophile, *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov. sp. nov., is Dependent on Co-culture with a *Bacillus* sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **134**, 2353–2362 (1988).

Takai, R. *Sphingomonas* sp. GF9 株の異種バクテリアに対する増殖因子の単離・構造解析 北海道大学大学院 2015 年度修士論文 (2015).

Takai, R., Shigetomi, K., Kamagata, Y. & Ubukata, M. Growth Mechanism of Uncultured Actinobacterial Strain *Leucobacter* sp. ASN212 by Zinc Coproporphyrin. *Heterocycles* **95** (1), 145–151 (2017).

Tamaki, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Nakamura, K., Nomura, N., Matsumura, M. & Kamagata, Y. Comparative Analysis of Bacterial Diversity in Freshwater Sediment of a Shallow Eutrophic Lake by Molecular and Improved Cultivation-based Techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (4), 2162–2169 (2005).

Tanaka, T., Kawasaki, K., Daimon, S., Kitagawa, W., Yamamoto, K., Tamaki, H., Tanaka, M., Nakatsu, C. H. & Kamagata Y. A Hidden Pitfall in the Preparation of Agar Media Undermines Microorganism Cultivability. *Appl Environ Microbiol.* **80** (24), 7659–7666 (2014).

Tanaka, Y., Hanada, S., Manome, A., Tsuchida, T., Kurane, R., Nakamura, K. & Kamagata, Y. *Catellibacterium nectariphilum* gen. nov., sp. nov., which Requires a Diffusible Compound from a Strain Related to the Genus *Sphingomonas* for Vigorous Growth. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54** (3), 955–959 (2004).

Tominaga, Y. & Nakabeppu, Y. 活性酸素による核酸の酸化損傷とその防御機構 *化学と生物* **39** (4), 223–231 (2003).

Truong, P. T., Broering, E. P., Dzul, S. P., Chakraborty, I., Stemmler, T. L. & Harrop, T. C. Simultaneous Nitrosylation and N-nitrosation of a Ni-thiolate Model Complex of Ni-containing SOD. *Chem Sci.* **9** (45), 8567–8574 (2018).

Ue, H. *Leucobacter exalbidus* sp. nov., an Actinobacterium Isolated from a Mixed Culture from Compost. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **57** (1), 27–33 (2011).

Ueda, K. & Beppu, T. Lessons from Studies of *Symbiobacterium thermophilum*, a Unique Syntrophic Bacterium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71** (5), 1115–1121 (2007).

Votyakova, T. V., Kaprelyants, A. S., Kell, D. B. Influence of Viable Cells on the Resuscitation of Dormant Cells in *Micrococcus luteus* Cultures Held in an Extended Stationary Phase: the Population Effect. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (9), 3284–3291 (1994).

Watsuji, T. O., Kato, T., Ueda, K. & Beppu, T. CO₂ Supply Induces the Growth of *Symbiobacterium thermophilum*, a Syntrophic Bacterium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70** (3), 753–756 (2006).

Weon, H. Y., Anandham, R., Tamura, T., Hamada, M., Kim, S. J., Kim, Y. S.,

Suzuki, K. & Kwon, S. W. *Leucobacter denitrificans* sp. nov., Isolated from Cow Dung. *J. Microbiol.* **50** (1), 161–165 (2012).

Wilson, B. R., Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K. & Tsuji, Y. Siderophores in Iron Metabolism: from Mechanism to Therapy Potential. *Trends Mol. Med.* **22** (12), 1077–1090 (2016).

Wollenberg, M. S., Claesen, J., Escapa, I. F., Aldridge, K. L., Fischbach, M. A., & Lemon, K. P. *Propionibacterium*-Produced Coproporphyrin III Induces *Staphylococcus aureus* Aggregation and Biofilm Formation. *mBio.* **5** (4), doi: 10.1128/mBio.01286-14 (2014).

Xu, Y., Xiang, S., Ye, K., Zheng, Y., Feng, X., Zhu, X., Chen, J. & Chen, Y. Cobalamin (Vitamin B12) Induced a Shift in Microbial Composition and Metabolic Activity in an in vitro Colon Simulation. *Front Microbiol.* **16** (9), doi: 10.3389/fmicb.2018.02780 (2018).

Yamamoto, M., Nagano, T., Okura, I., Arakane, K., Urano, Y. & Matsumoto, K. Production of Singlet Oxygen on Irradiation of a Photodynamic Therapy Agent, Zinc-coproporphyrin III, with Low Host Toxicity. *Biometals* **16** (4), 591–597 (2003).

Yamazaki, S., Kano, K., Ikeda, T., Isawa, K., & Kaneko, T. Role of 2-Amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone, a Strong Growth Stimulator for Bifidobacteria, as an Electron Transfer Mediator for NAD(P)(+) Regeneration in *Bifidobacterium longum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1428** (2-3), 241–250 (1999).

Yang, Y. W., Chen, M. K., Yang, B. Y., Huang, X. J., Zhang, X. R., He, L. Q., Zhang, J. & Hua, Z. C. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Mouse Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **81** (19), 6749–6756 (2015).

Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M. & Keller, M. Cultivating the Uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (24), 15681–15686 (2002).

Zerbino, D. R. & Birney, E. Velvet: Algorithms for *de novo* Short Read Assembly Using de Bruijn graphs. *Genome Res.* **18** (5), 821–829 (2008).

謝辞

本研究を行うにあたり、長きに至ってご指導いただいた生方信名誉教授、そして重富顕吾講師には深く感謝いたします。微生物生育因子に関する研究に取り組ませていただいた鎌形洋一教授に深く感謝いたします。また、遺伝子解析の実験についてご指導いただいた北海道大学院農学院 応用菌学研究室の曾根輝雄教授、阿部歩氏にも深く感謝いたします。日々の生活、研究において多くの刺激を与えてくれた、木質生命化学研究室的メンバーに感謝いたします。

最後になりますが、これまで何一つ不自由なく支えていただいた両親に心から感謝いたします。

Summary

Microorganisms comprise the bulk of density in environment and various species of microorganisms play significant role in our society. Unfortunately, overwhelming 99% of microbial species are unculturable on synthetic media or any artificial culture conditions, thus remains unexplored. To date, several bacteria are known to require specific growth factors or other diffusible components supplied by neighboring bacteria grown in the same environment. These factors sometimes help to access non-dividing microbial cells whose nature have not yet been understood. Identification of novel growth factor is necessary to develop resources of uncultured microorganisms.

Leucobacter sp. strain ASN212, *Bosea* sp. strain ASTN45, *Catellibacterim nectariphilum* strain AST4 and *Sphingopyxis* sp. strain GF9 were found in activated sludge. Strain ASN212, strain ASTN45 and strain AST4 did not grow in any artificial conditions, however grow in the presence of strain GF9 supernatant. The author conducted separation of growth promoting fractions for strain ASTN45 and strain AST4 from 210 L and 50 L of strain GF9 supernatant. After separation, 0.9 mg of growth promoting fractions for strain ASTN45 and 0.7 mg growth promoting fractions for strain AST4 were found. Growth promoting fraction for strain ASTN45 show activity in 0.4 µg/mL and growth promoting fraction for strain ASTN4 show activity in 35 µg/mL. Unfortunately, we could not determine both structure of growth promoting factor due to the presence of contaminant, however these results suggest that the growth promoting factors for each bacteria have potent growth promoting activities.

In our previous study, coproporphyrin I (Cop. I) and III (Cop. III) produced by strain GF9 were found to act as growth factors for strain ASN212.

Cop. III in particular is a potent growth factor for strain ASN212 at picomolar level. The purpose of this study is to analyze the mechanism of growth promoting activity of Cop. I and Cop. III and to study the effect of Cop. III in environmental microbiota.

The author prepared Zn, Fe, Co, Cu, Ni complexes of Cop. I and Cop. III, and tested their growth promoting activity for strain ASN212. As a result, Zn and Fe complexes of Cop. I and Cop. III showed growth promoting activities. The growth

promoting activity of Zn- or Fe-Cop. III complex was 4–10 fold higher than corresponding Cop. I complex. Cop. III and Fe-Cop. III complex are both important intermediate in noncanonical heme biosynthesis pathway of Actinobacteria and Firmicutes. Therefore, the result suggested that strain ASN212 has truncated heme biosynthesis pathway. Subsequent genome analysis of strain ASN212 confirmed the deletion in *hemb*, *hemc*, *heme* and *hemy*. Heme (protoheme) is essential for aerobic respiration, thus strain ASN212 cannot grow because of truncation in its heme biosynthesis pathway. Addition of Cop. III or Fe-Cop. III complex to the culture media makes strain ASN212 possible to use as a precursor of protoheme. It was considered that Zn-Cop. III can be a substrate for Hem H to produce coproheme (Fe-Cop. III), which is converted to protoheme via Hem Q in noncanonical heme biosynthesis pathway. Analysis of *L. komagatae* VKM ST 2845L genome registered in NCBI indicated that the strain has truncated in *hemy*. The author investigated the growth activity of Cop. III on 7 bacterial species. As a result, 2 bacterial species (*Leucobacter denitrificans* strain NBRC106039 and *Leucobacter komagatae* strain NBRC15245 related to strain ASN212) showed growth promoting activity under the Cop. III presence conditions. On the other hand, Cop. III was found to have growth inhibition activity in the other 5 bacterial species (*Leucobacter albus* strain NBRC103070, *Actinomyces* sp. strain TA0403, *Streptomyces* sp. strain TA0403, *Bacillus subtilis* strain ATCC 70385 and *Escherichia coli* strain ATCC 8739). This result suggested that singlet oxygen species produced by Cop. III has cytotoxicity against these microorganisms, which are assumed to have a complete heme biosynthetic pathway.

To study the effects of Cop. III for various environmental microbiota, the author cultured microbiota in the presence or absence of Cop. III and then extracted genomic DNA from each culture. The DNA samples from the culture with Cop. III were compared to the DNA samples obtained from Cop. III absence conditions by PCR using Actinobacteria specific primer and Firmicutes specific primer. In the microbiota from the most soil samples, the growth of Actinobacteria and Firmicutes were suppressed by Cop. III, one sample from a soil sample collected from the forest floor of Tomamae, (Hokkaido, Japan) showed weak growth promoting activity of Cop. III for Actinobacteria.

From the above observations, it was concluded that the growth promoting activity of Cop. III for strain ASN212 was due to compensating Cop. III for protoheme production of strain ASN212 having incomplete heme biosynthetic pathway. Therefore, Cop. III also shows growth promoting activity in other bacteria in which the heme biosynthesis pathway is truncated.

This study could reveal the profile of uncultured bacteria defective in heme biosynthesis.

付録

Cart 1 ASTN45 株に対する増殖因子の精製によって得られた活性画分の質量分析の結果

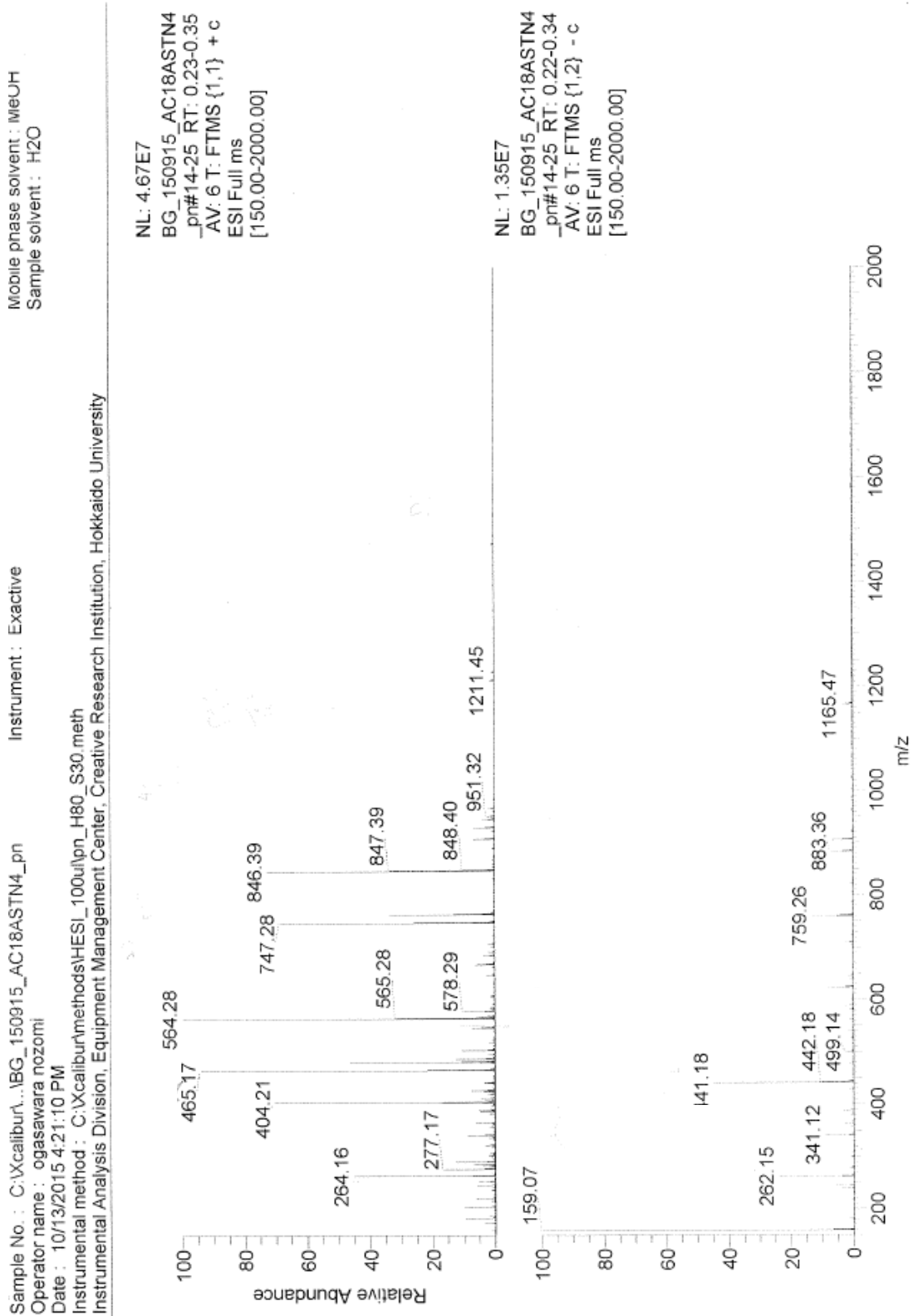
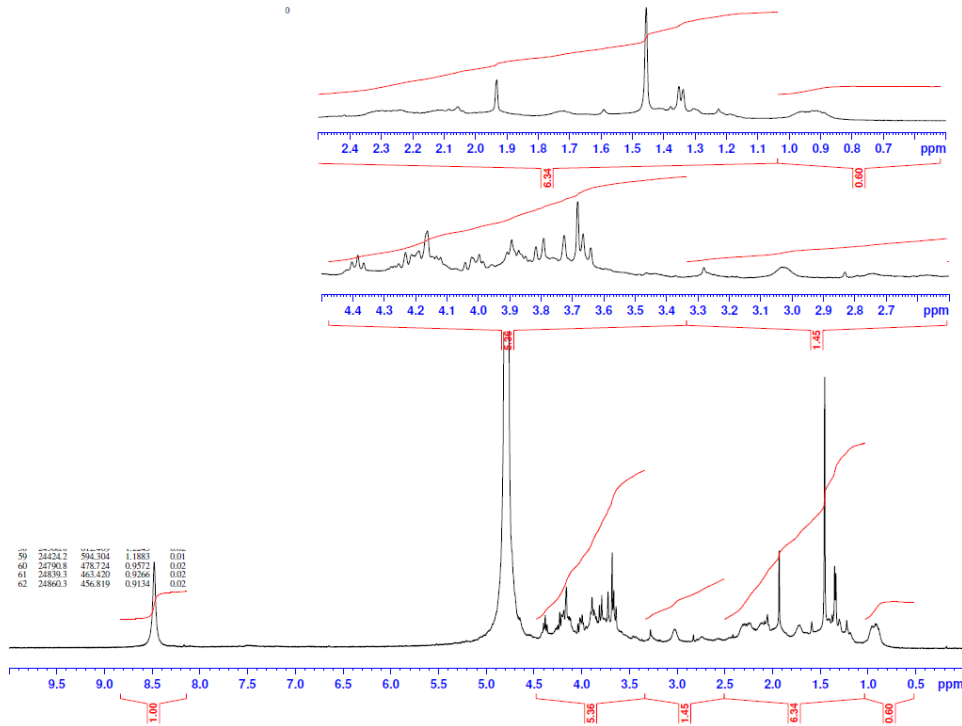


Chart 2 ASTN45 株に対する増殖因子の精製によって得られた活性画分の ¹H NMR および ¹³C NMR のスペクトル

2818 Takai / ASTN45-2



2818 Takai / ASTN45-2

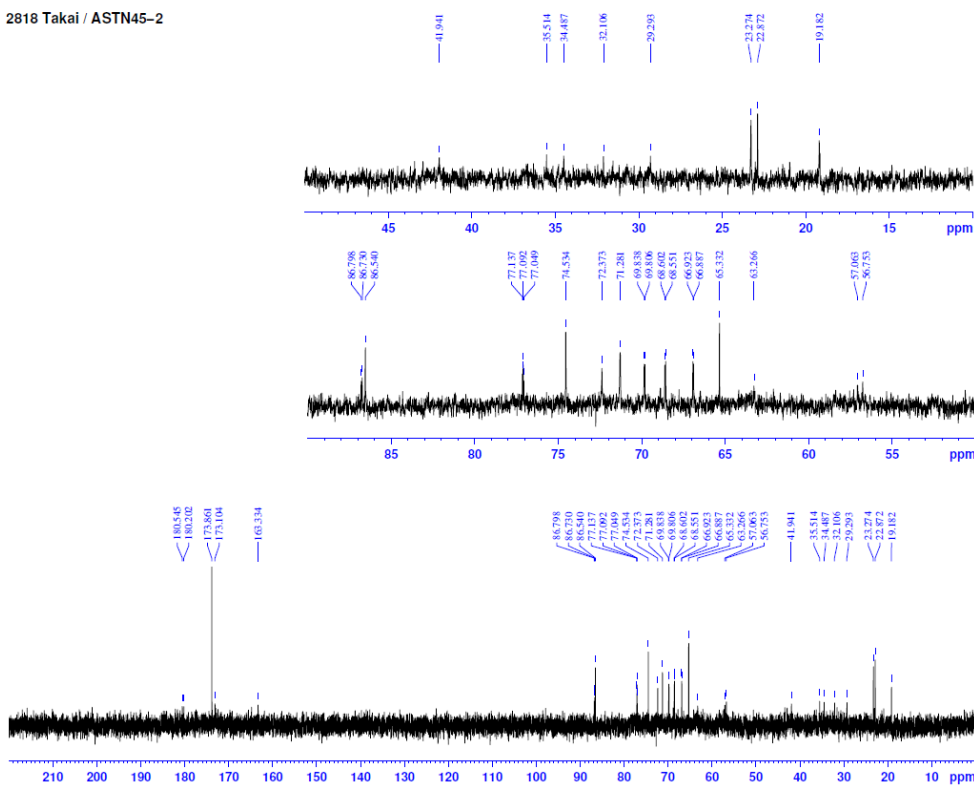


Chart 3 *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-proline の ^1H NMR のスペクトル

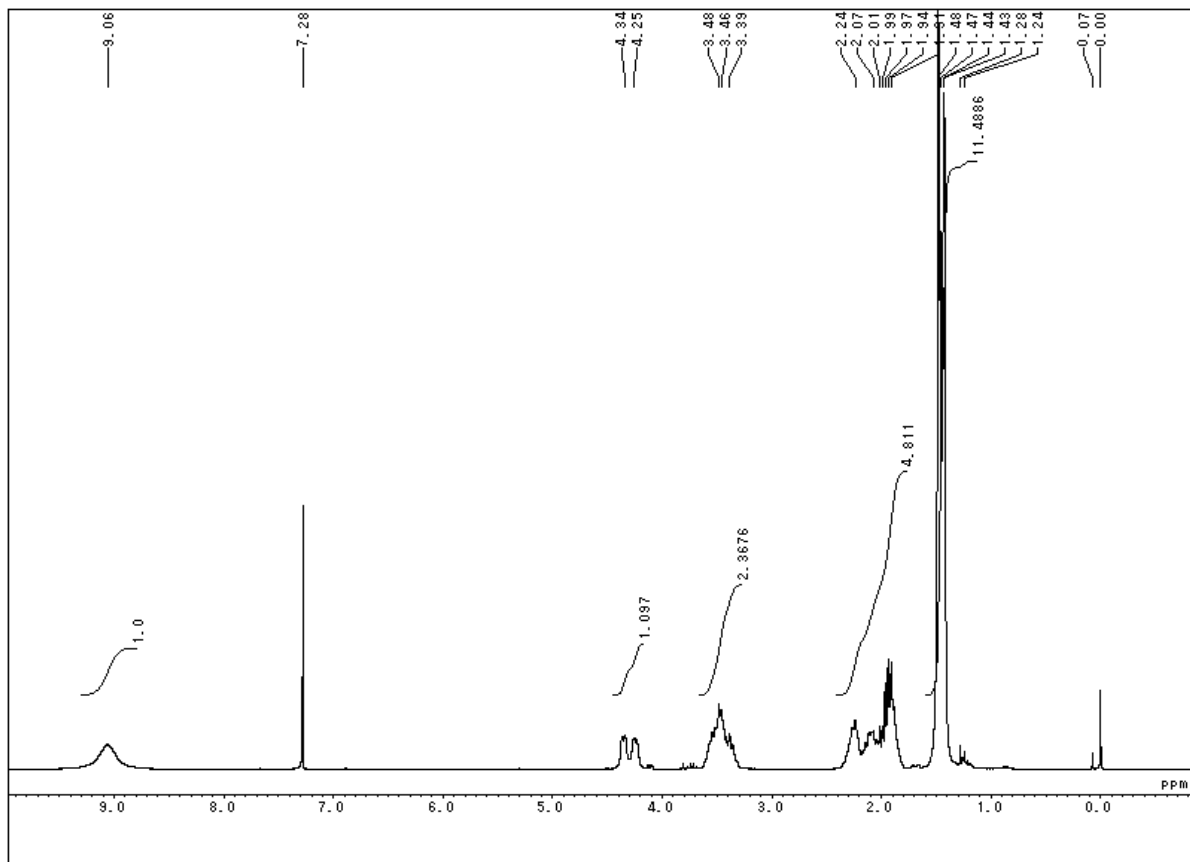


Chart 4 D-Histidine methyl ester dihydrochloride の ^1H NMR のスペクトル

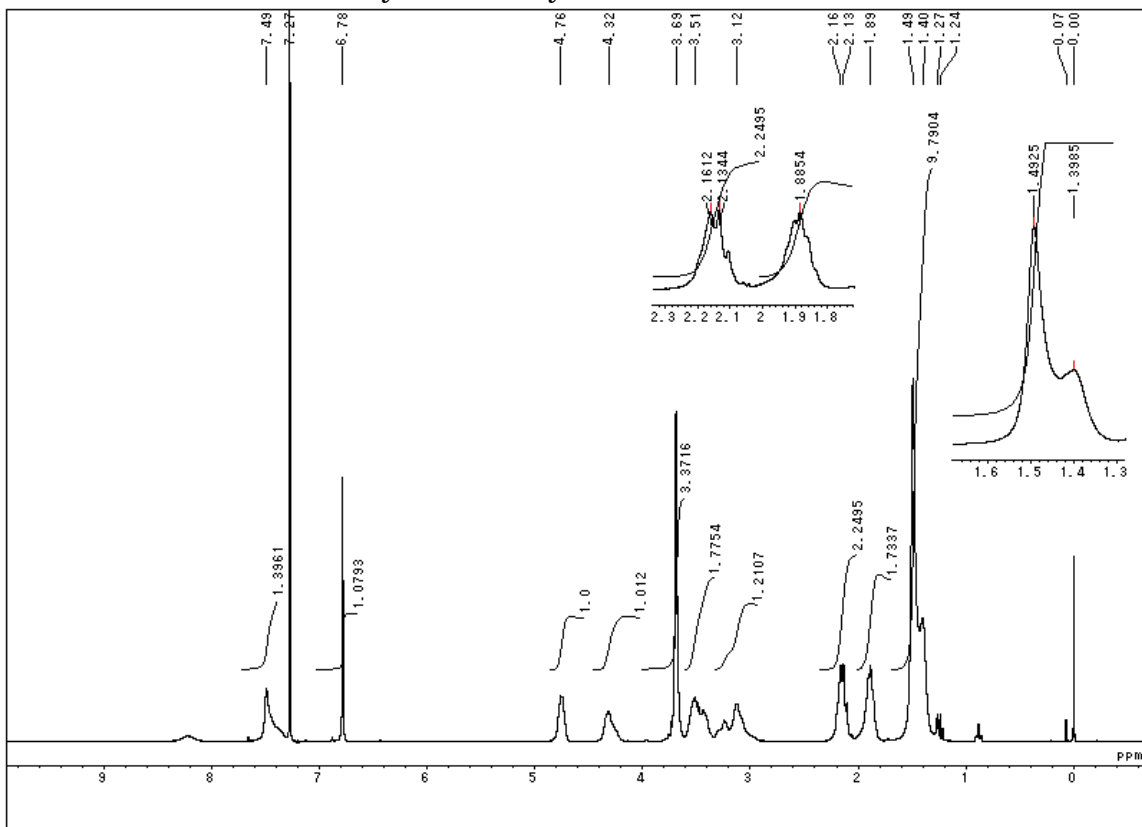


Chart 5_Cyclo(D-His-L-Pro)の¹H NMR のスペクトル

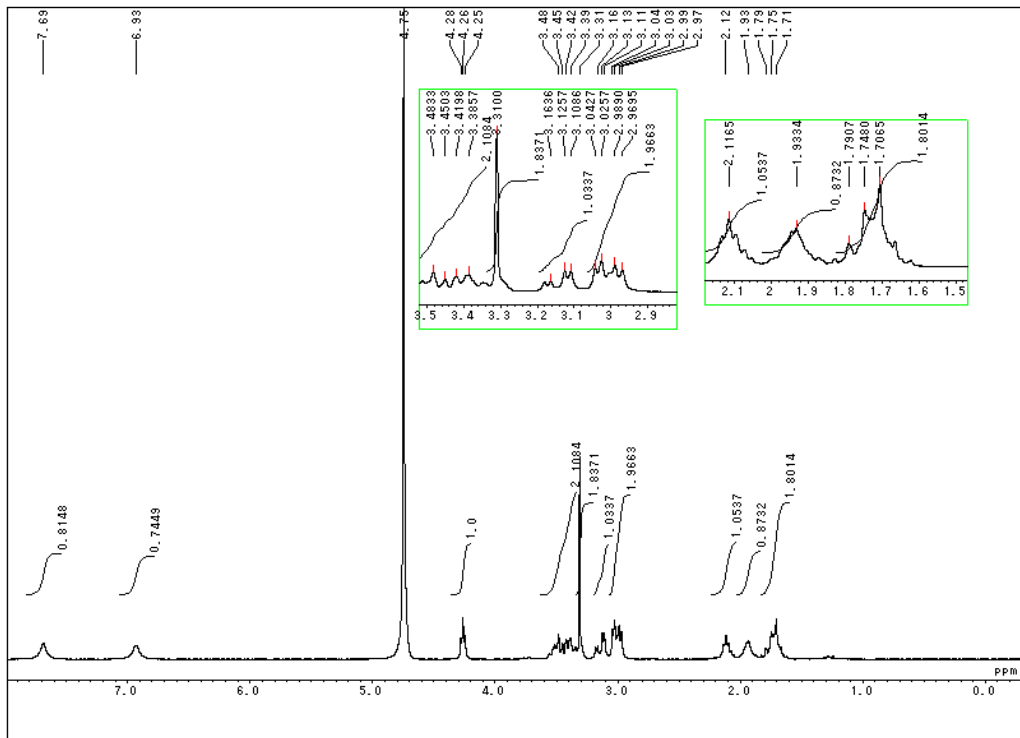


Chart 6 AST4 株に対する増殖因子の精製によって得られた活性画分に対して行った質量分析の結果 (測定方法 : ESI)

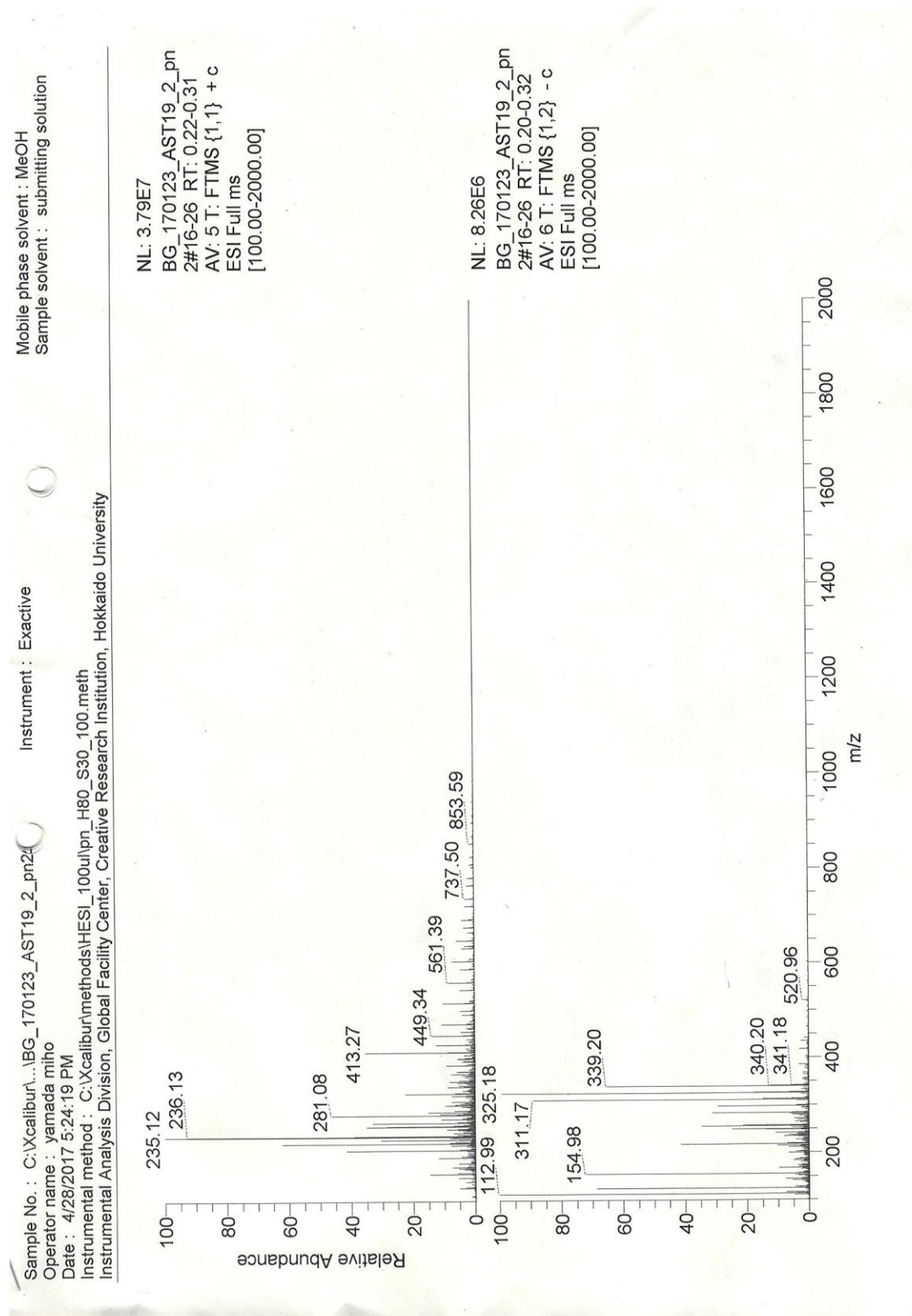
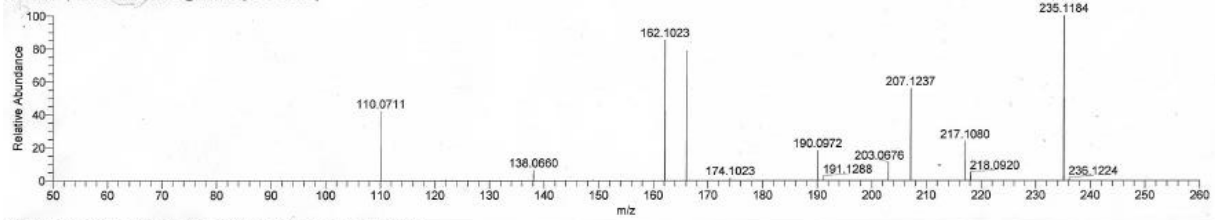


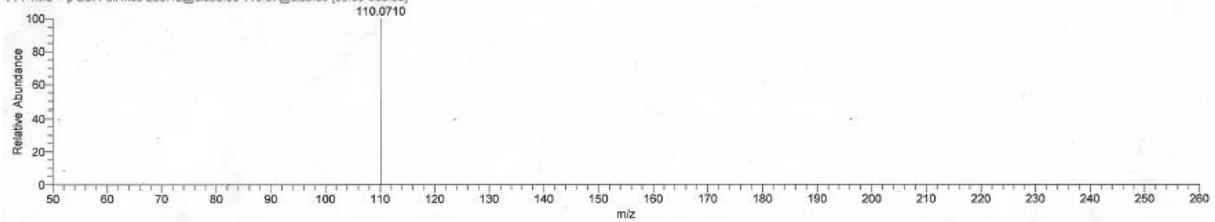
Chart 7 Chart 6 において見られた分子量 235.12 のピークに対してタンデム質量分析を行った結果(測定方法：ESI)

Instrumental Analysis Division, Global Facility Center, Creative Research Institution, Hokkaido University

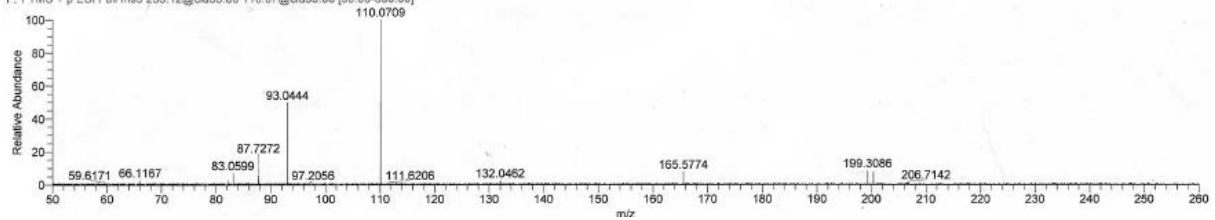
20170524-m170143_ast21-5235_#76-108 RT: 1.19-1.76 AV: 33 NL: 2.02E8
F: FTMS + p ESI Full ms2 235.12@cid35.00 [60.00-600.00]



20170524-m170143_ast21-5235_#245-248 RT: 4.60-4.66 AV: 4 NL: 8.65E5
F: FTMS + p ESI Full ms3 235.12@cid35.00 110.07@cid0.00 [50.00-600.00]

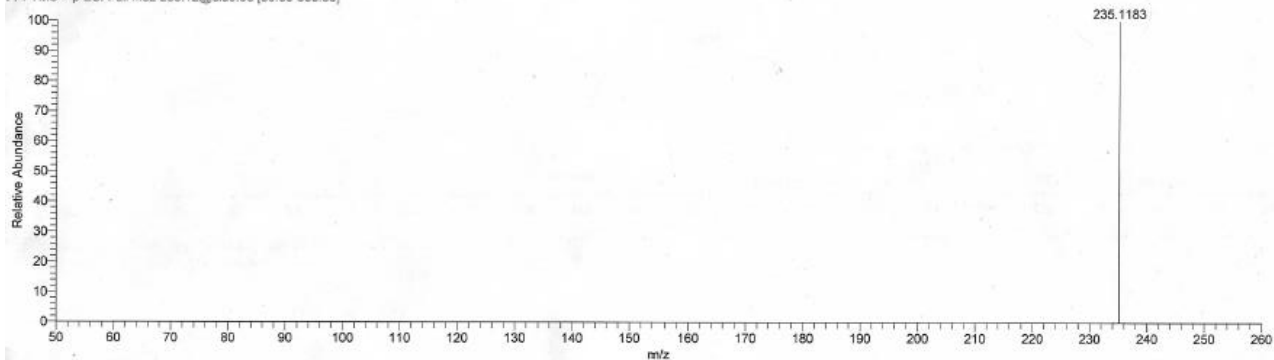


20170524-m170143_ast21-5235_#251-260 RT: 4.72-4.90 AV: 10 NL: 2.43E4
F: FTMS + p ESI Full ms3 235.12@cid35.00 110.07@cid35.00 [50.00-600.00]

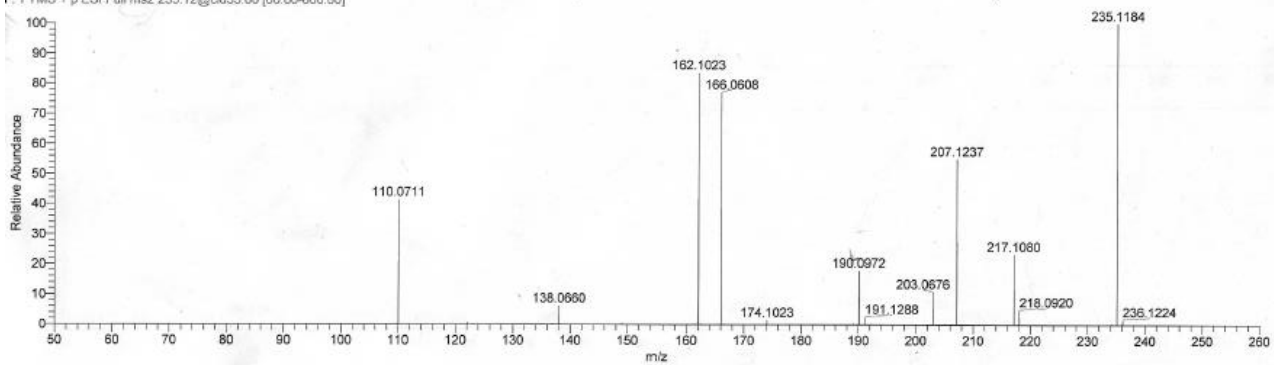


Instrumental Analysis Division, Global Facility Center, Creative Research Institution, Hokkaido University

20170524-m170143_ast21-5235_#58-63 RT: 0.89-0.98 AV: 5 NL: 1.30E7
F: FTMS + p ESI Full ms2 235.12@cid0.00 [60.00-600.00]

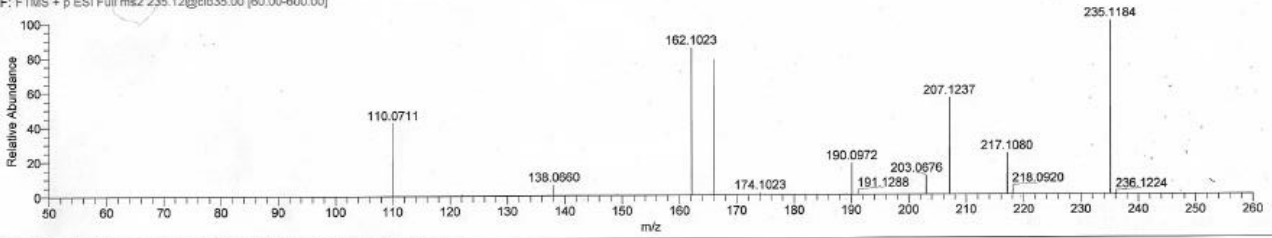


20170524-m170143_ast21-5235_#78-110 RT: 1.23-1.80 AV: 33 NL: 2.06E8
F: FTMS + p ESI Full ms2 235.12@cid35.00 [60.00-600.00]

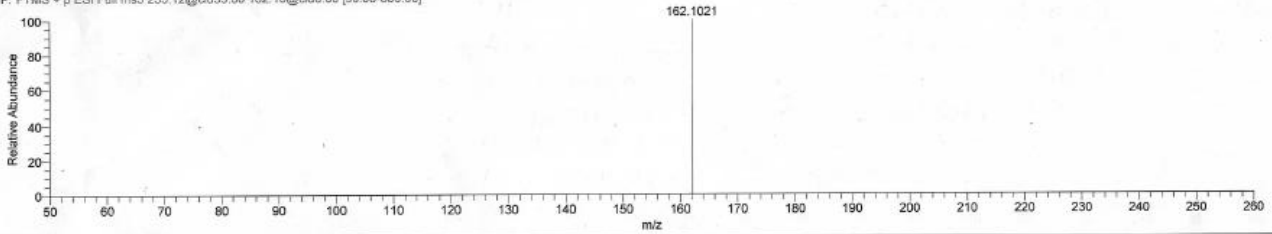


Instrumental Analysis Division, Global Facility Center, Creative Research Institution, Hokkaido University

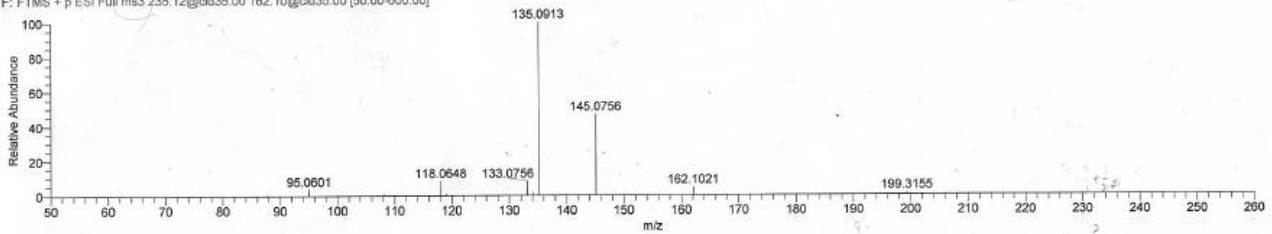
20170524-m170143_ast21-5235_#76-108 RT: 1.19-1.78 AV: 33 NL: 2.02E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 235.12@cid35.00 [60.00-600.00]



20170524-m170143_ast21-5235_#203-207 RT: 3.72-3.80 AV: 5 NL: 2.57E6
F: FTMS + p ESI Full ms3 235.12@cid35.00 162.10@cid0.00 [50.00-600.00]

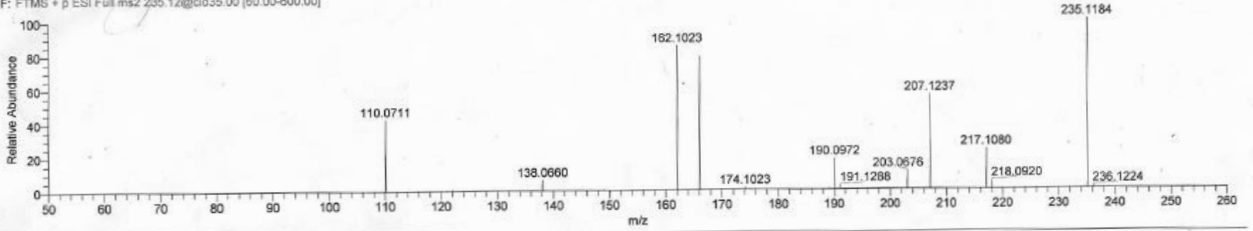


20170524-m170143_ast21-5235_#210-216 RT: 3.86-3.98 AV: 7 NL: 3.73E5
F: FTMS + p ESI Full ms3 235.12@cid35.00 162.10@cid35.00 [50.00-600.00]

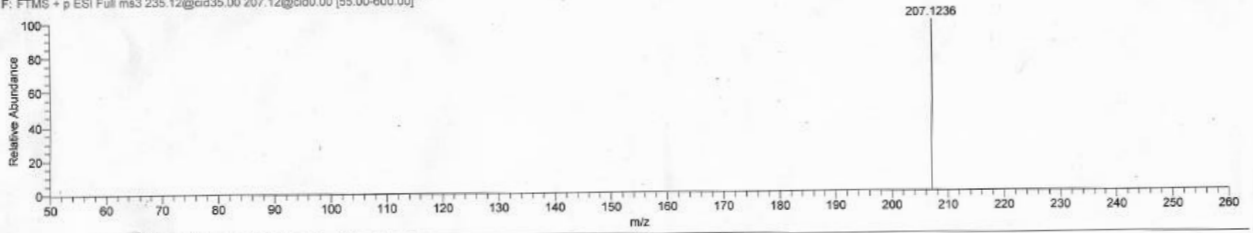


Instrumental Analysis Division, Global Facility Center, Creative Research Institution, Hokkaido University

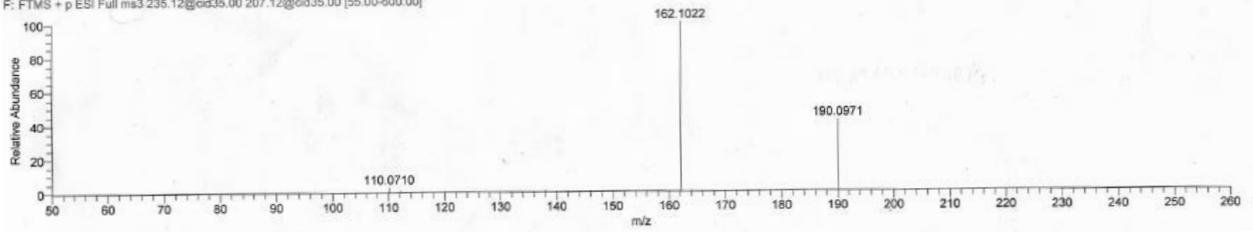
20170524-m170143_ast21-5235_#76-108 RT: 1.19-1.78 AV: 33 NL: 2.02E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 235.12@cid35.00 [60.00-600.00]



20170524-m170143_ast21-5235_#123-128 RT: 2.04-2.13 AV: 6 NL: 1.24E6
F: FTMS + p ESI Full ms3 235.12@cid35.00 207.12@cid0.00 [55.00-600.00]

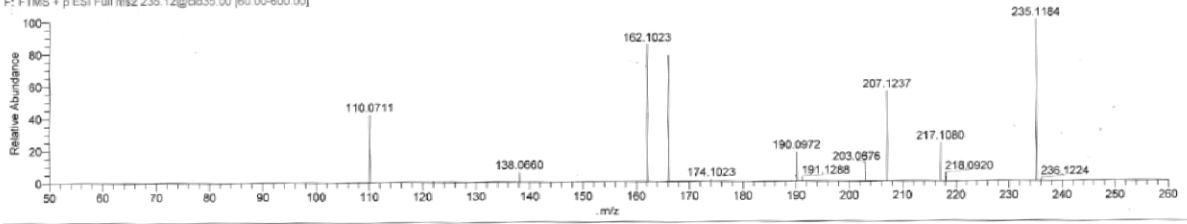


20170524-m170143_ast21-5235_#131-137 RT: 2.19-2.31 AV: 7 NL: 6.37E5
F: FTMS + p ESI Full ms3 235.12@cid35.00 207.12@cid35.00 [55.00-600.00]

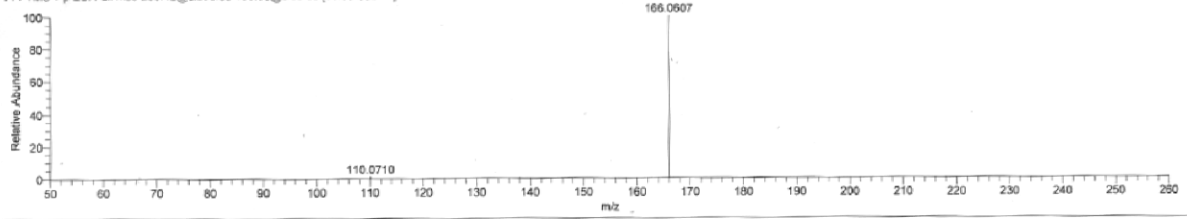


Instrumental Analysis Division, Global Facility Center, Creative Research Institution, Hokkaido University

20170524-m170143_ast21-5235_#78-108 RT: 1.19-1.76 AV: 33 NL: 2.02E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 235.12@cid35.00 [60.00-600.00]



20170524-m170143_ast21-5235_#171-175 RT: 3.05-3.11 AV: 4 NL: 1.11E6
F: FTMS + p ESI Full ms3 235.12@cid35.00 166.06@cid0.00 [50.00-600.00]



20170524-m170143_ast21-5235_#173-181 RT: 3.13-3.26 AV: 7 NL: 3.46E5
F: FTMS + p ESI Full ms3 235.12@cid35.00 166.06@cid35.00 [50.00-600.00]

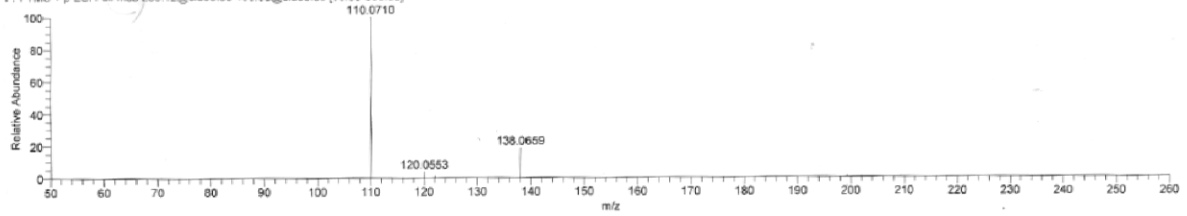
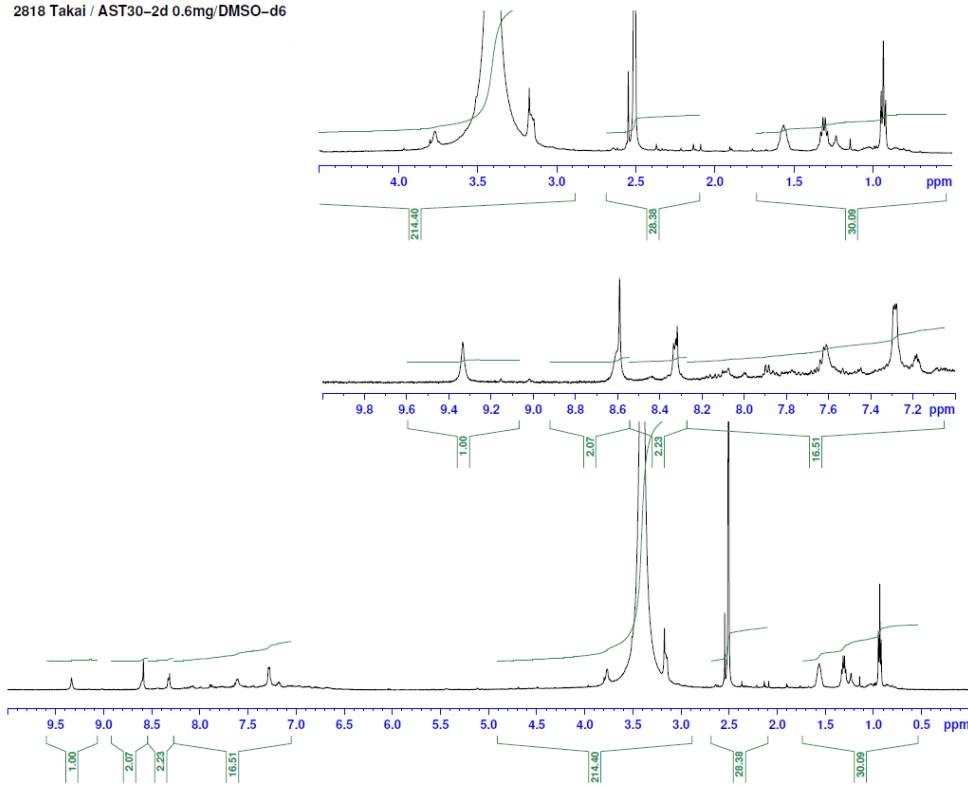


Chart 8 AST4 株に対する増殖因子の精製によって得られた活性画分の NMR スペクトル

2818 Takai / AST30-2d 0.6mg/DMSO-d6



2818 Takai / AST30-2d 0.6mg/DMSO-d6

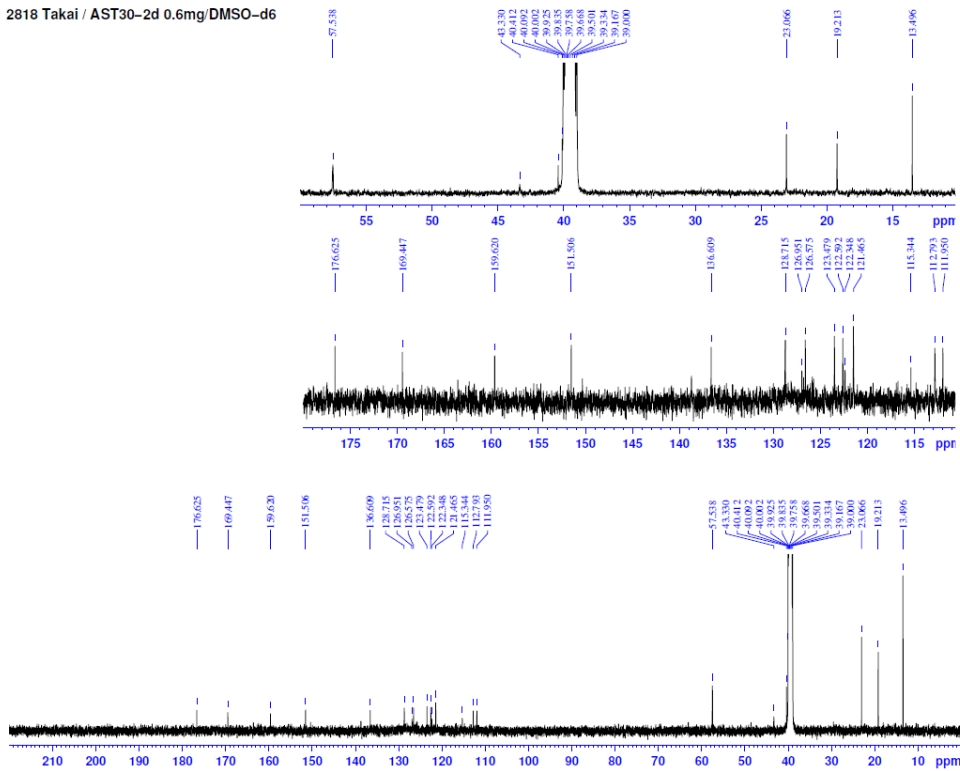
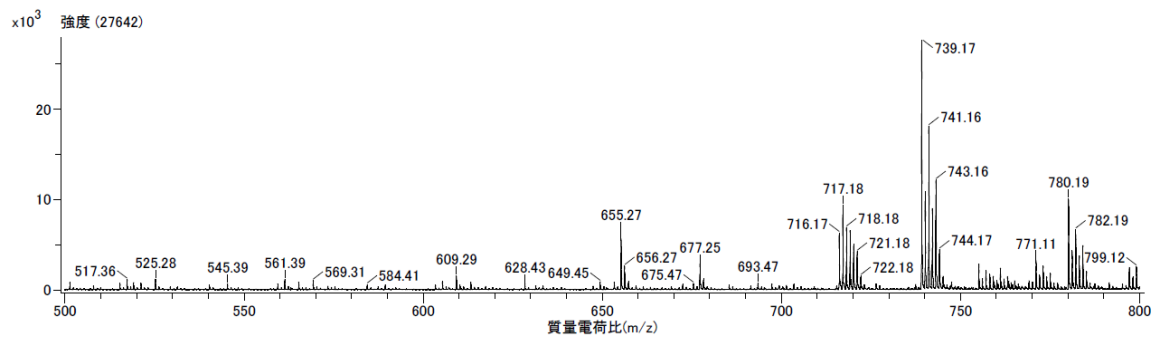
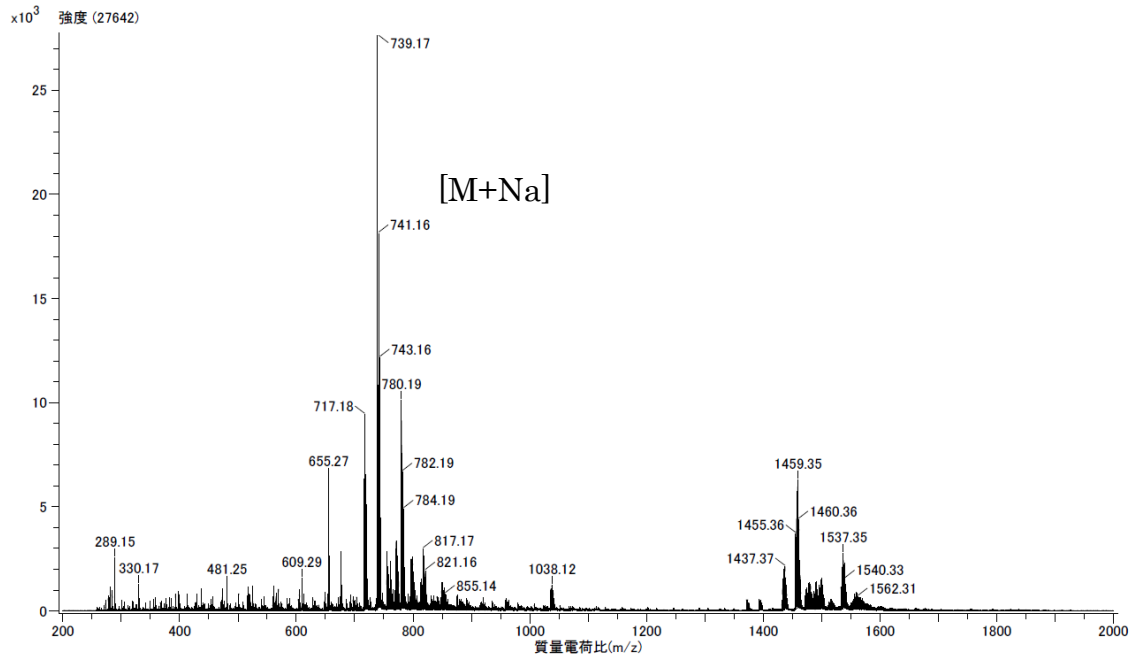


Chart 9 Cop.I 金属錯体の質量分析の結果 (測定方法 : ESI)

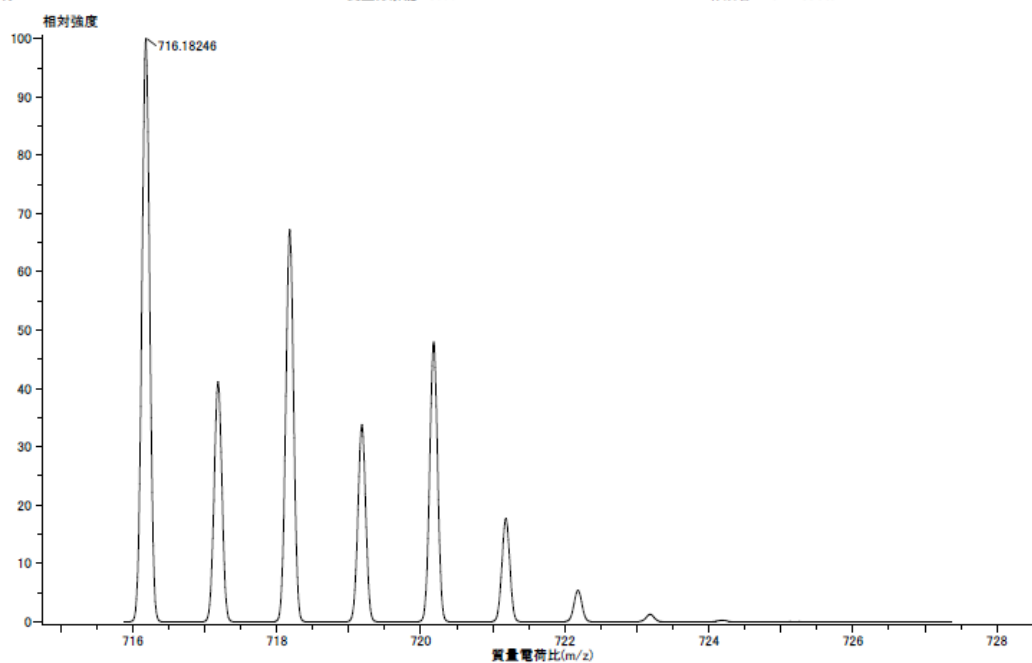
Cop. I-Zn の質量分析の結果



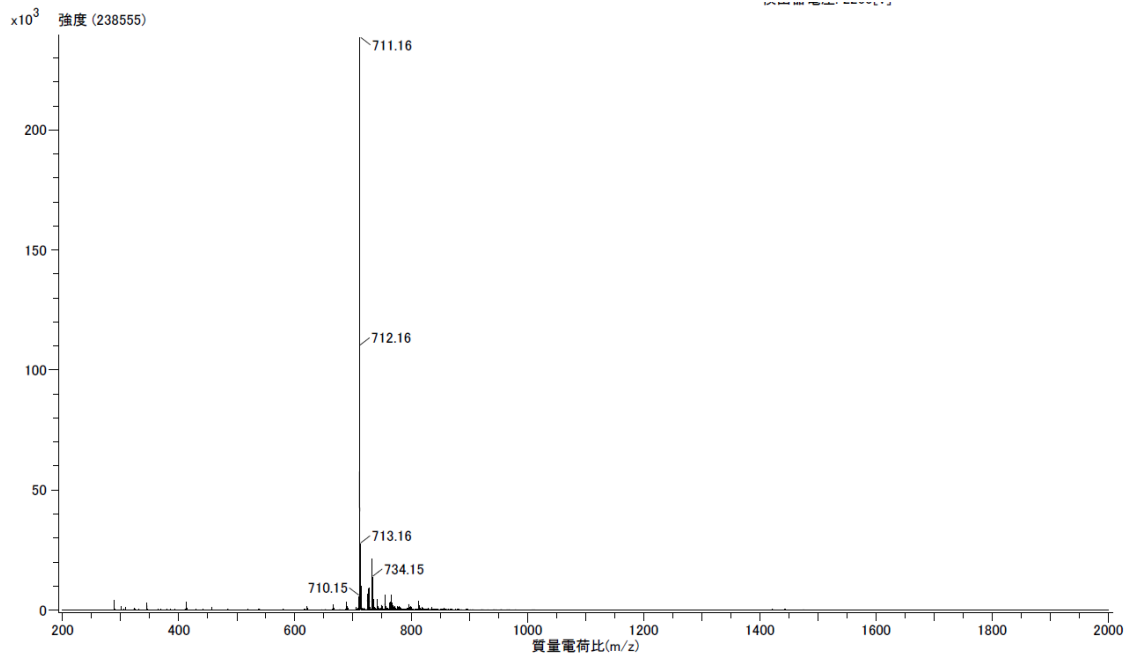
組成式: $C_{23}H_{26}O_4NiZn$
モノアイソトピック質量: 716.18246
説明:

付加/脱離イオン: なし
平均質量: 718.08320
質量分解能: 6000

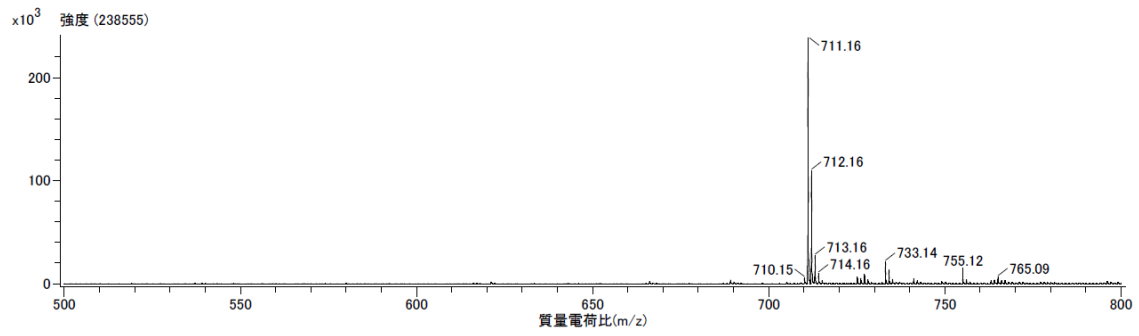
作成日時: 2018/12/13 9:12:15
整数質量: 717
作成者: Administrator

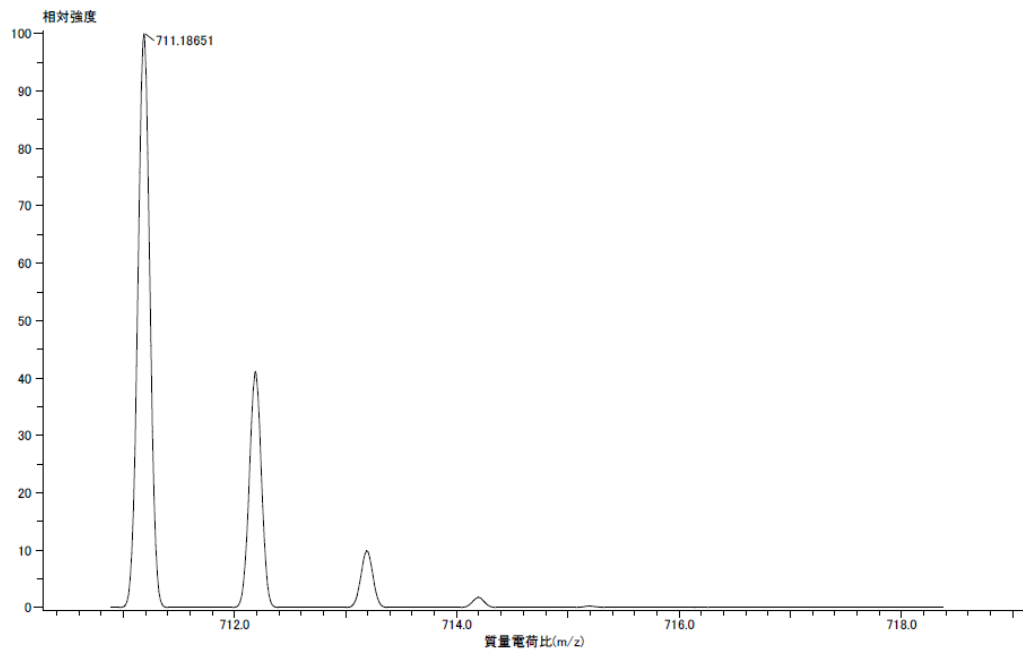


Cop. I-Co の質量分析の結果

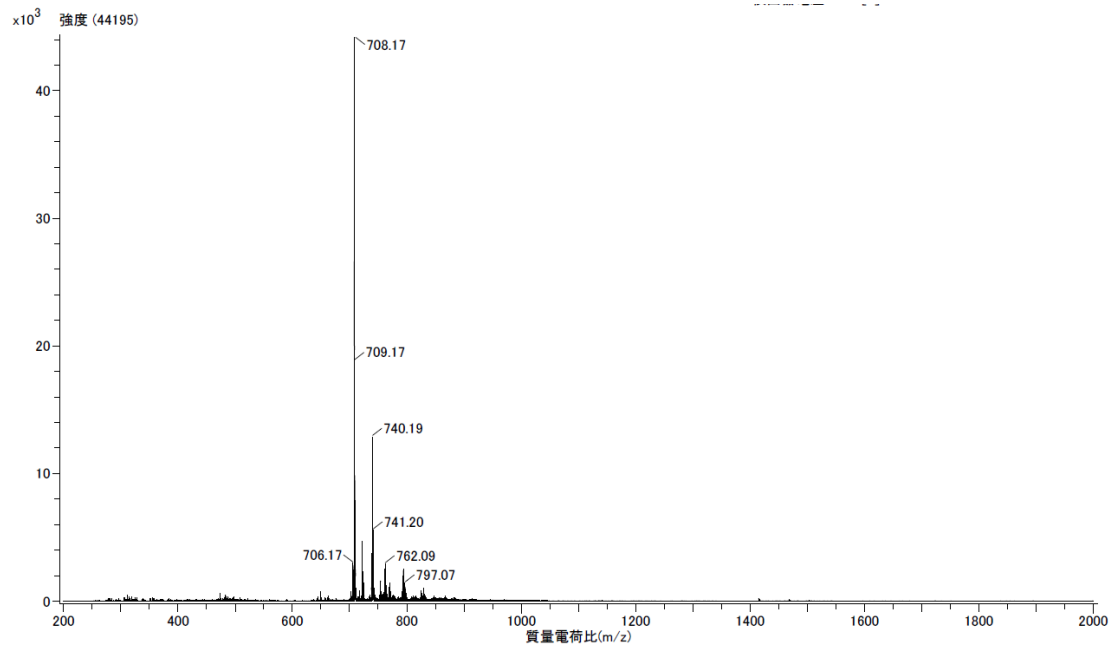


Instrumental Analysis Division, Global Facility Center, Creative Research Institution, Hokkaido University

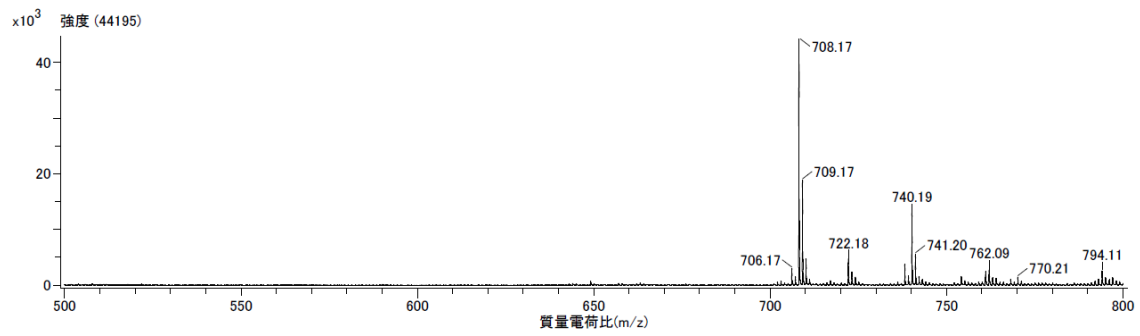




Cop. I-Fe²⁺の質量分析の結果



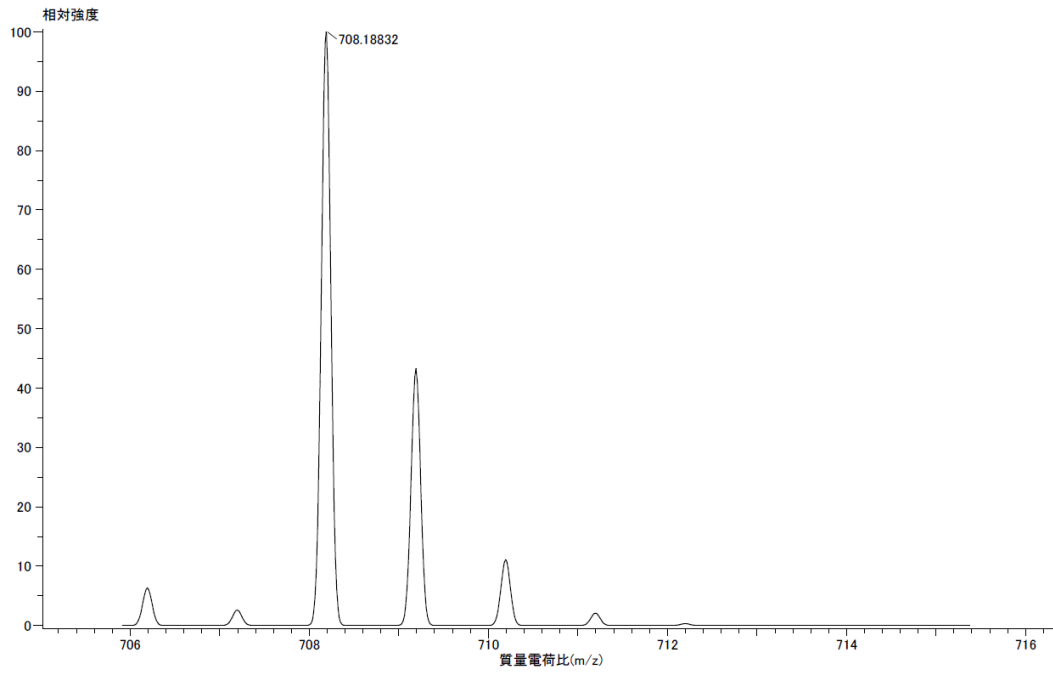
Instrumental Analysis Division, Global Facility Center, Creative Research Institution, Hokkaido University



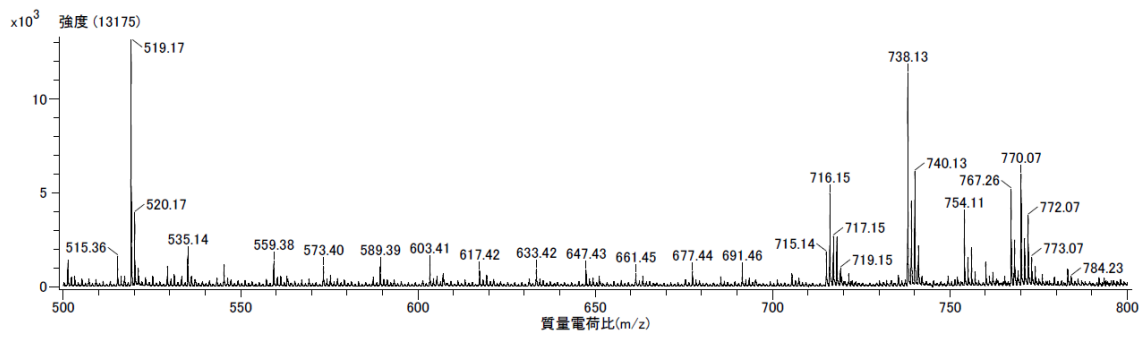
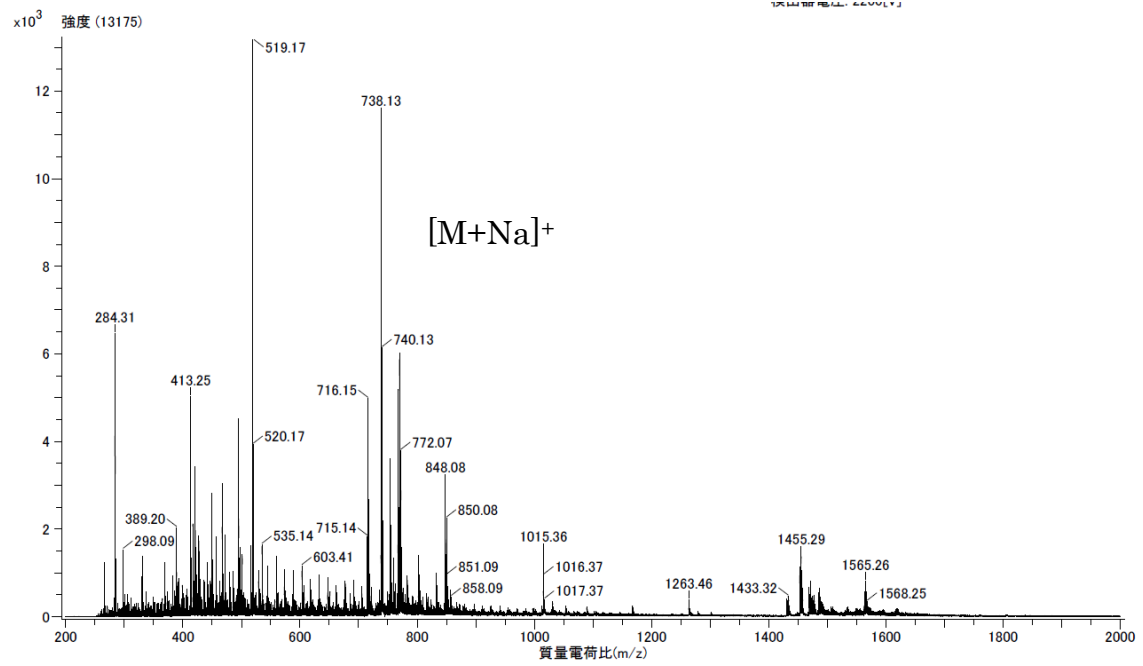
組成式: $C_{38}H_{36}O_4N_4Fe$
モノアイソトピック質量: 708.18825
説明:

付加/脱離イオン: なし
平均質量: 708.53820
質量分解能: 6000

作成日時: 2018/12/12 17:28:18
整数質量: 708
作成者: Administrator



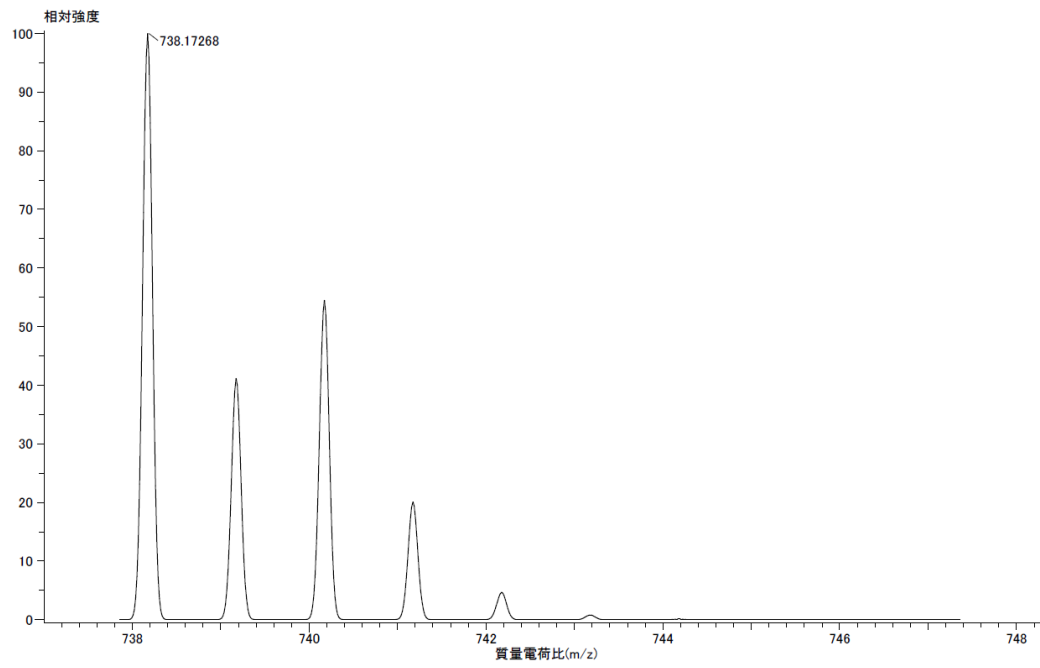
Cop. I-Cu の質量分析の結果



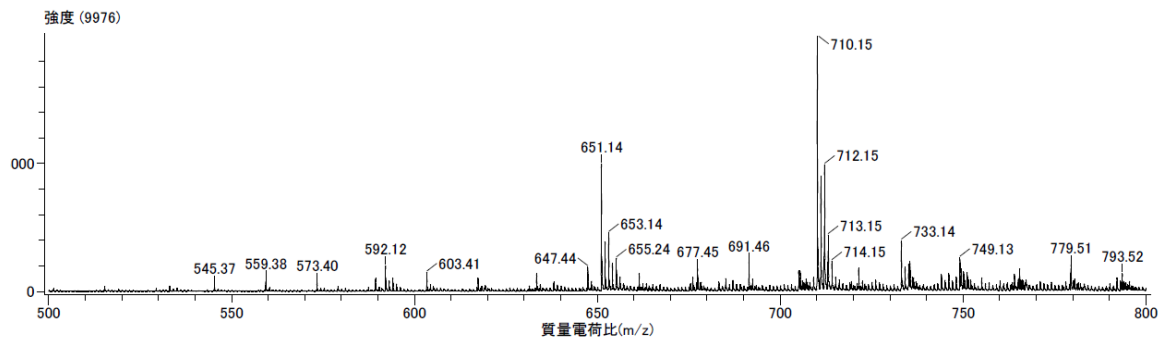
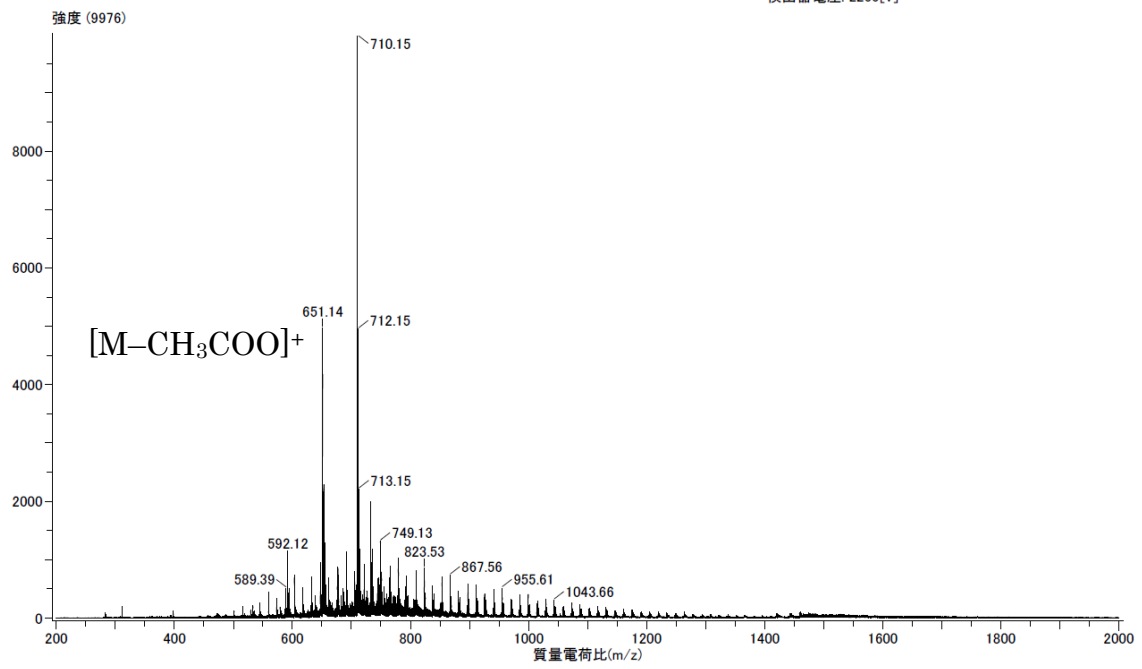
組成式 : $C_{38}H_{30}O_8NaCu$
モノアイソトピック質量 : 738.17268
説明 :

付加イオン : $+Na^+$
平均質量 : 739.22897
質量分解能 : 6000

作成日時 : 2018/12/13 9:39:12
整数質量 : 739
作成者 : Administrator



Cop. I-Ni の質量分析の結果



組成式: C₃₈H₃₈O₈N₄NI
モノアイソトピック質量: 710.18866
説明:

付加/脱離イオン: なし
平均質量: 711.38660
質量分解能: 6000

作成日時: 2018/12/13 9:28:08
整数質量: 711
作成者: Administrator

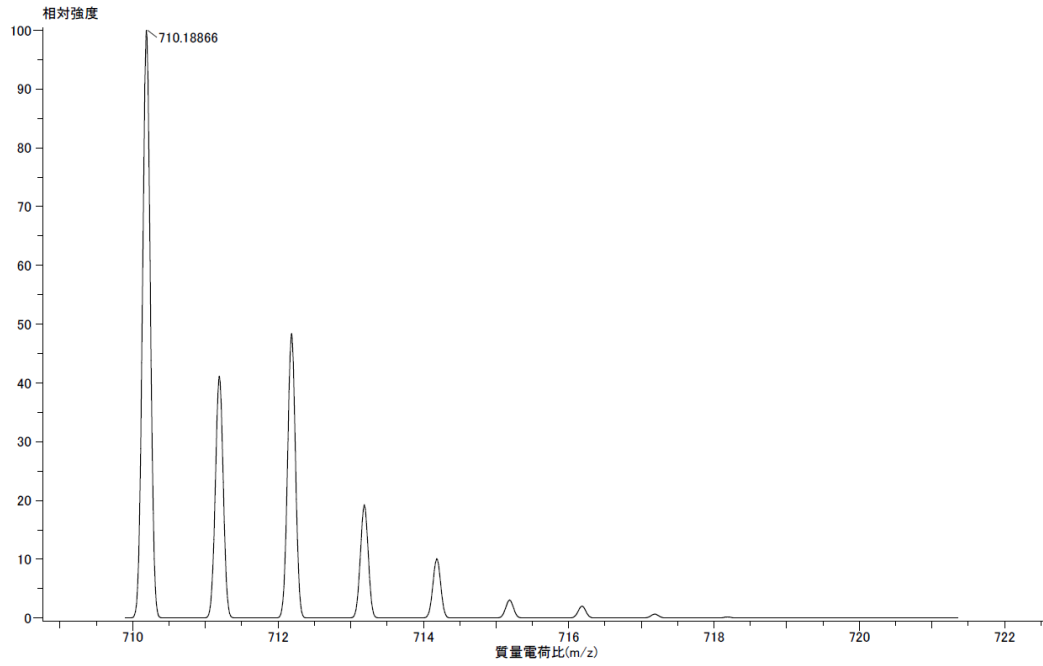
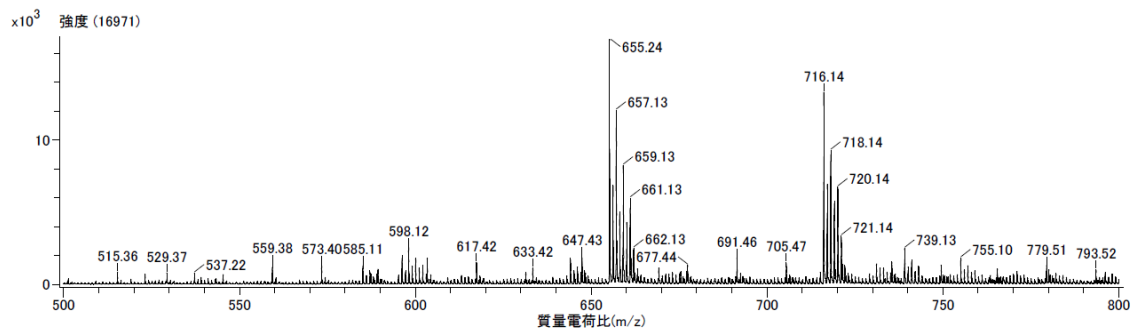
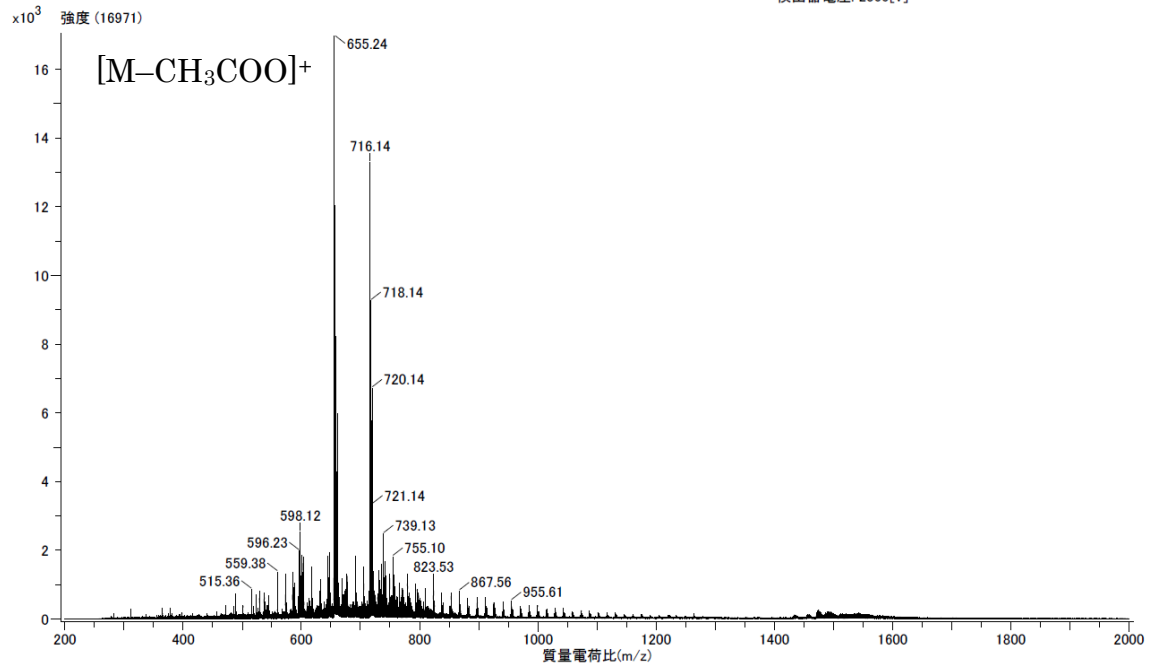


Chart 10 Cop.III 金属錯体の質量分析の結果

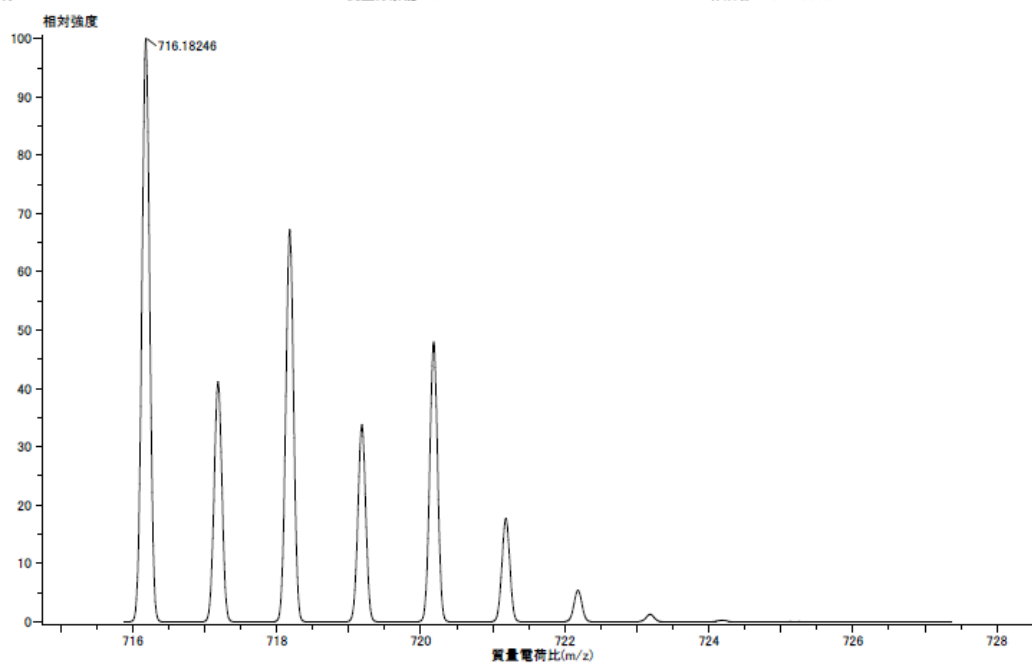
Cop. III-Zn の質量分析の結果



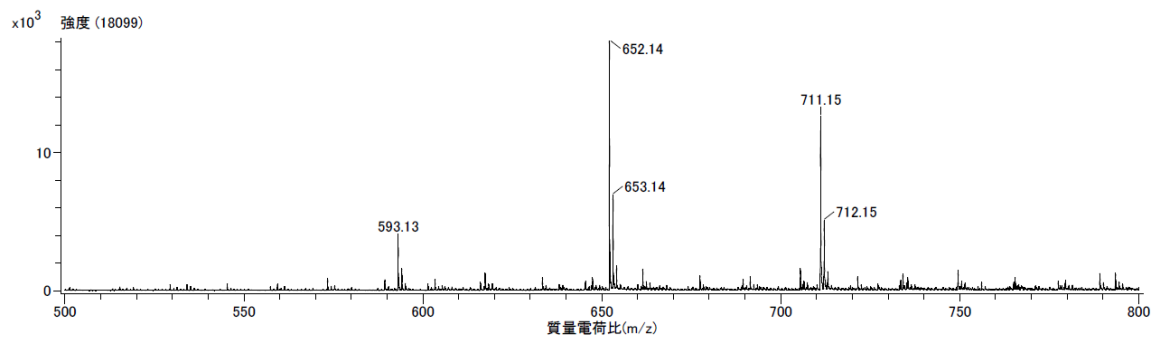
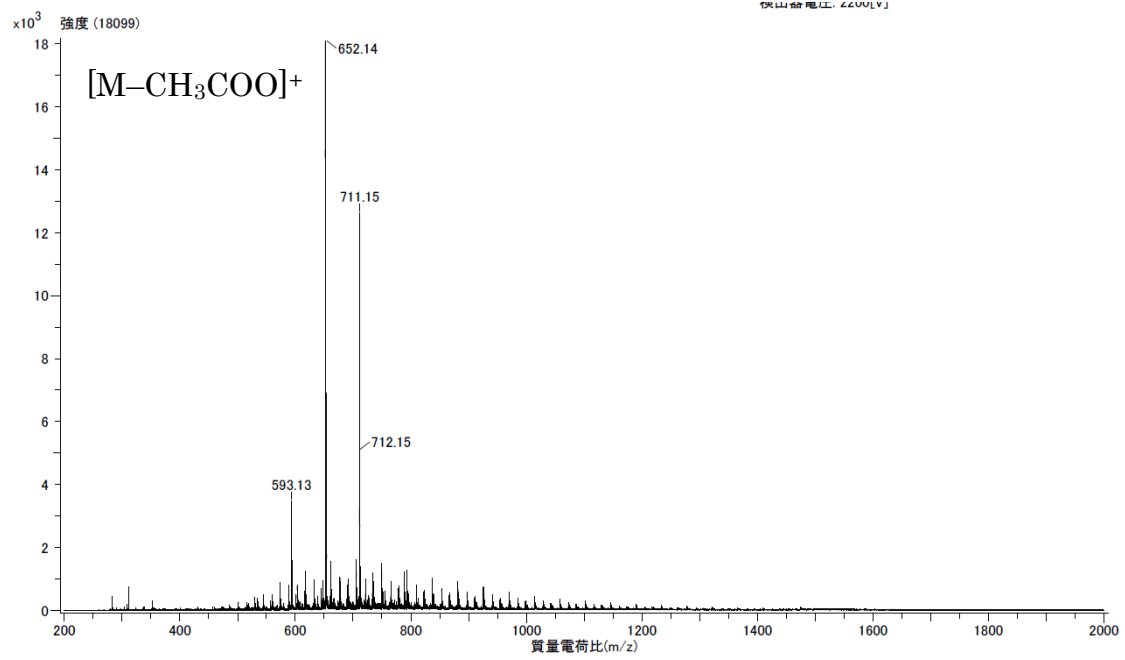
組成式: $C_{23}H_{26}O_4NiZn$
モノアイソトピック質量: 716.18246
説明:

付加/脱離イオン: なし
平均質量: 718.08320
質量分解能: 6000

作成日時: 2018/12/13 9:12:15
整数質量: 717
作成者: Administrator



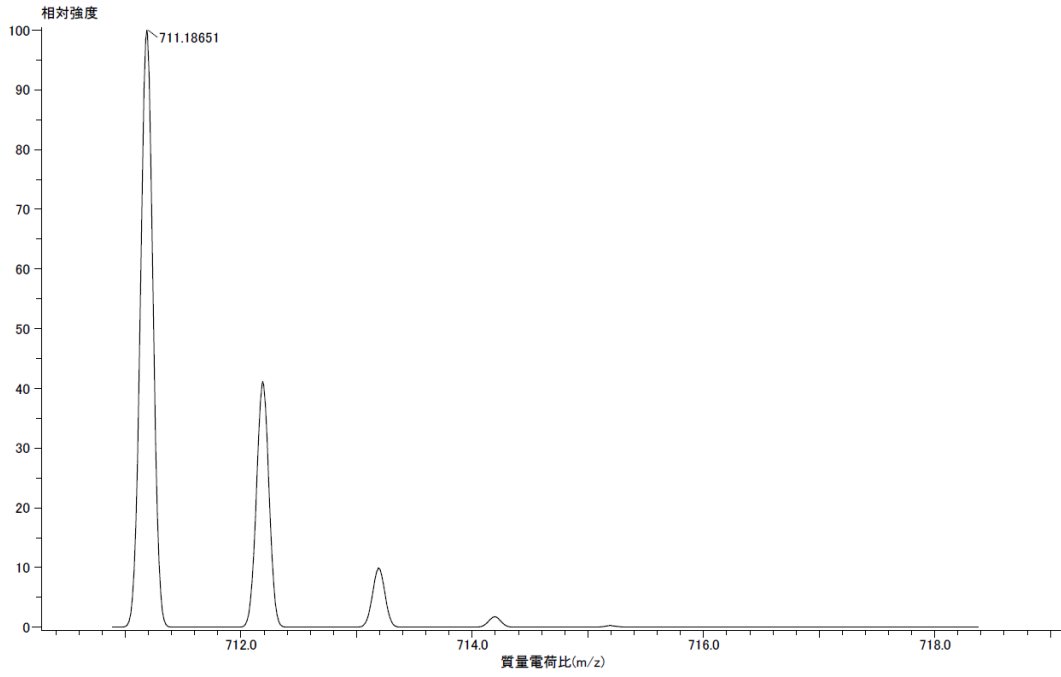
Cop. III-Co の質量分析の結果



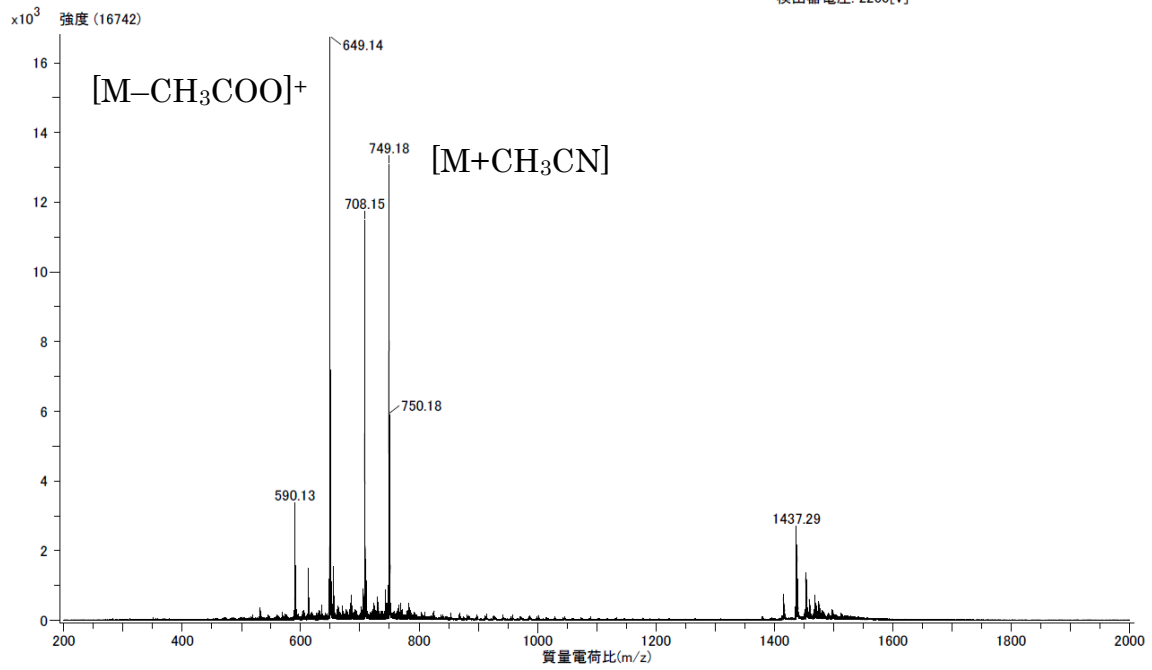
組成式: $C_{98}H_{98}O_8Na_4Co$
モノアイソトピック質量: 711.18651
説明:

付加/脱離イオン: なし
平均質量: 711.62640
質量分解能: 6000

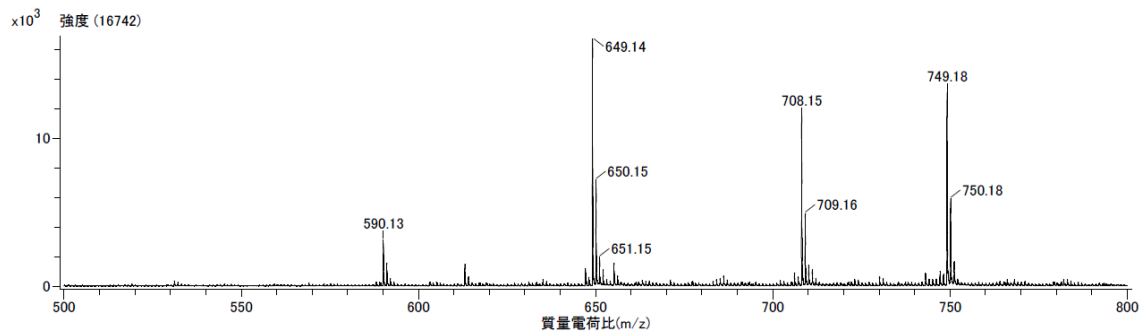
作成日時: 2018/12/12 17:55:10
整数質量: 711
作成者: Administrator



Cop. III-Fe の質量分析の結果



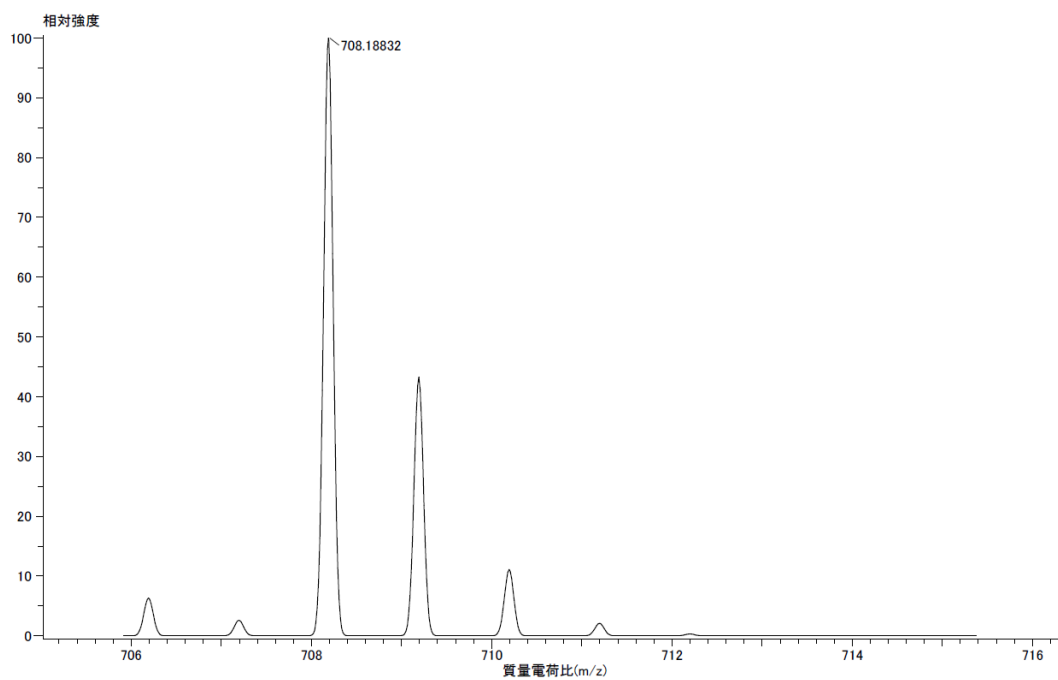
Instrumental Analysis Division, Global Facility Center, Creative Research Institution, Hokkaido University



組成式 : C₃₈H₃₆O₈N₄Fe
モノアイソトピック質量 : 708.18825
説明 :

付加/脱離イオン : なし
平均質量 : 708.53820
質量分解能 : 6000

作成日時 : 2018/12/12 17:28:18
整数質量 : 708
作成者 : Administrator

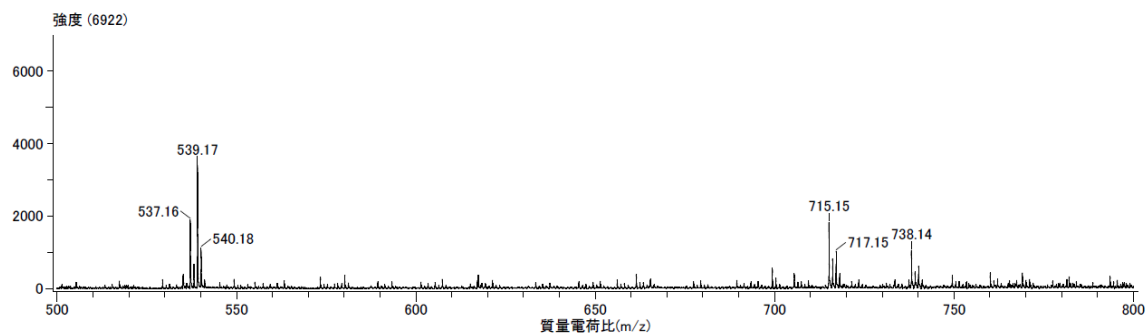
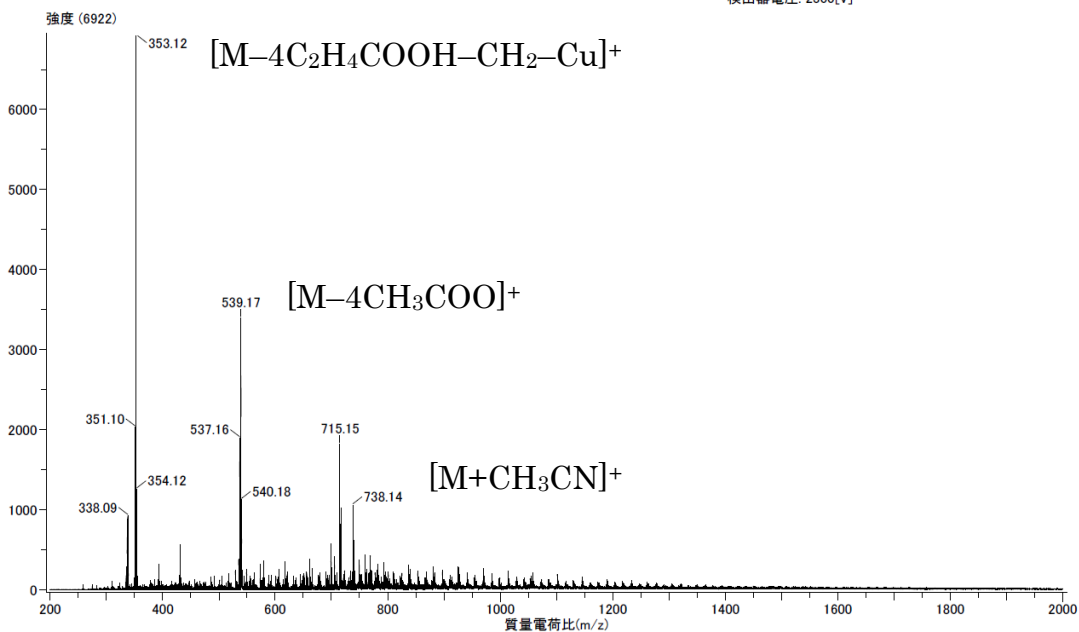


Cop. III-Cu の質量分析の結果

測定データ名: 160126-L003
試料名: Cop3 Cu
測定担当者: Hirose Tomohiro
実験日時: 2016/04/21 13:55:41
代表測定経過時間: 0.581[min]

装置構成: JMS-T100LP
イオン化モード: 1-デュアルESI+
質量電荷比範囲: 100.00, 2000.00
試料溶解溶媒: submitting solution
移動相溶媒: CH3CN

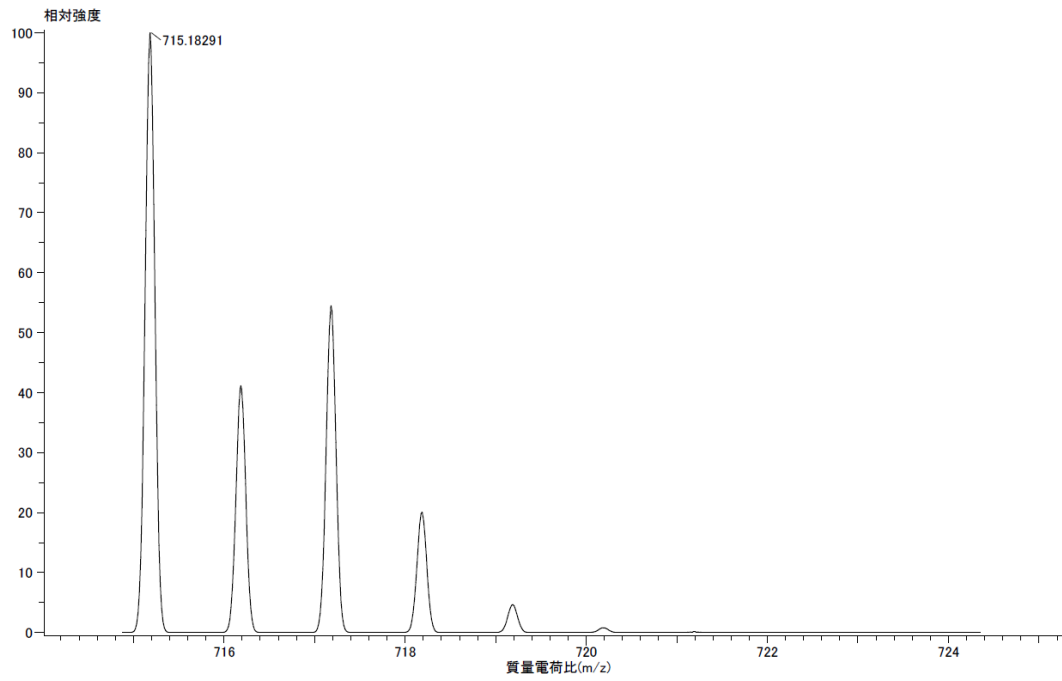
ニードル電圧: 2500[V]
リングレンズ電圧: 10[V]
オリフィス1電圧: 120V
オリフィス2電圧: 10[V]
イオンガイドRF電圧: 2500V
検出器電圧: 2300[V]



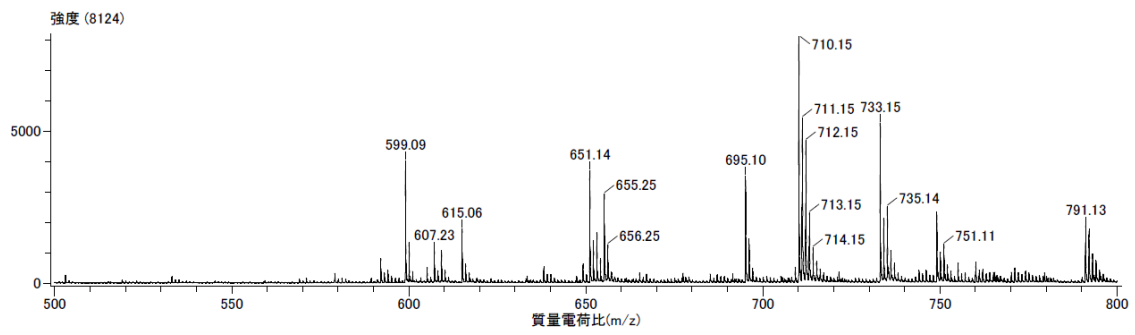
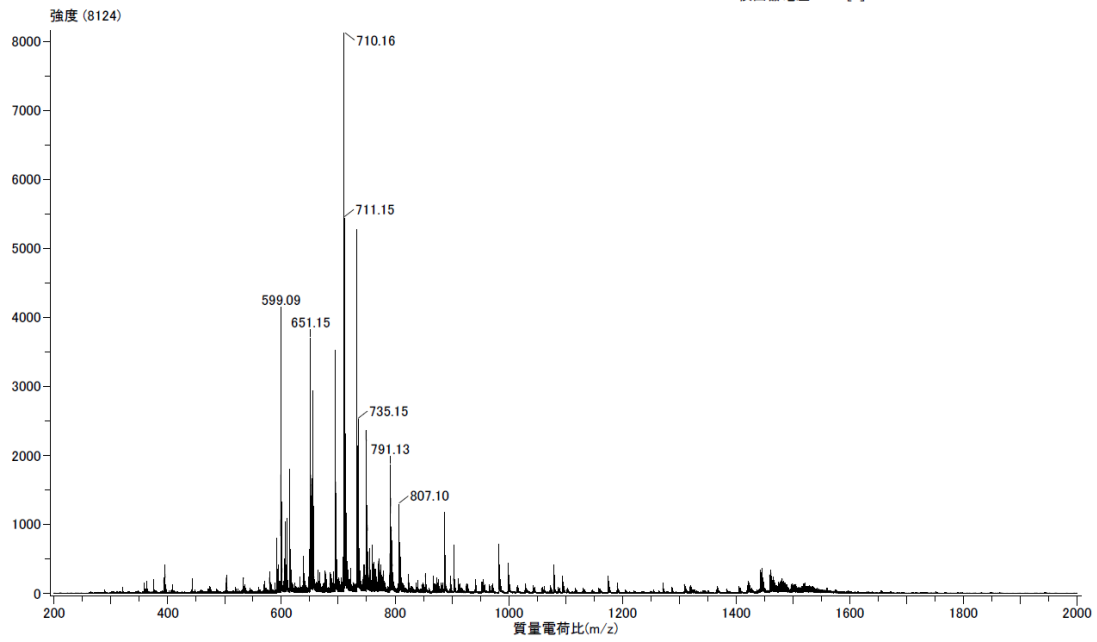
組成式: C₃₈H₃₆O₈N₄Cu
モノアイソトピック質量: 715.18291
説明:

付加/脱離イオン: なし
平均質量: 716.23920
質量分解能: 6000

作成日時: 2018/12/12 17:47:42
整数質量: 716
作成者: Administrator



Cop. III-Ni の質量分析の結果



組成式: $C_{38}H_{36}O_2N_4Ni$
モノアイソトピック質量: 710.18866
説明:

付加/脱離イオン: なし
平均質量: 711.38660
質量分解能: 6000

作成日時: 2018/12/12 17:02:12
整数質量: 711
作成者: Administrator

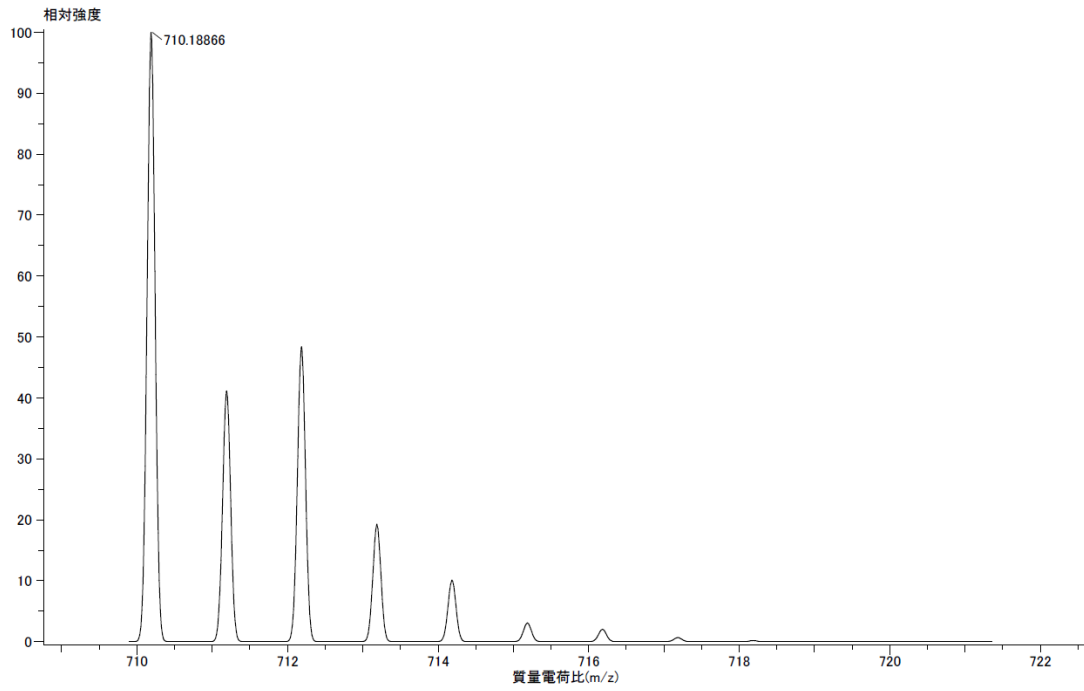


Chart 11 ASN212 株ゲノム解析の結果

Chart 11.1 ASN212 株ゲノムライブラリの調製に用いられたアダプターの配列

Sequence(3'-)	
Read 1	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC
Read 2	AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

Chart 11.2 Illumina Hiseq による ASN212 株ゲノム解析の結果

Sample Name	Yield (Mbases)	# Reads	% of >= Q30 Bases	Mean Quality Score
ASN212 genomic DNA	2,228	22,058,314	79.01	32.37

Yield (Mbases); Chastity フィルタリング後の取得総塩基数(Mbp)

Reads; Chastity フィルタリング後の総リード数

% of >= Q30 Bases; Chastity フィルタリング後の総塩基数に占める Q30 以上の HighQualityBase の割合

Mean Quality Score; Chastity フィルタリング後の Quality の平均値

Chart 11.3 ASN212 株ゲノムライブラリ調製後に行った、アダプター配列トリミングの結果

Sample_Name	# Reads	# Reads (Trimmed PE)	Avg. Length (Trimmed PE)
ASN212 genomic DNA	22,058,314	20,385,244	98.2

Reads;アダプター配列トリミング処理前の総リード数

Reads (Trimmed PE);トリミング処理後に Read1/Read2 がどちらも 50 塩基以上残っているリードの本数

AVg.Length (Trimmed PE);Read1/Read2 がどちらも 50 塩基以上残っているリードの平均リード長

Chart 11.4 アダプター配列トリミング後の ASN212 株ゲノムライブラリに対してアッセンブリ処理を行った結果

hash length	# using reads	# scaffolds	total	average	max	n50	n90	min
95	16080758/ 20385244	98	3,082,465	31,454	257,597	90,558	25,578	190

hash length : Velvet 実行時に指定した hash 長

using reads : Velvet によるアセンブルに使用され、コンティグ作成に寄与したリード本数

scaffolds : 作成されたスキヤフォールドの総数

total : スキヤフォールドの合計長

average : スキヤフォールドの平均長

max : 最大スキヤフォールドの長さ

n50 : スキヤフォールド長を長い順に足していき、合計長の 50%を超える時のスキヤフォールド長

n90 : スキヤフォールド長を長い順に足していき、合計長の 90%を超える時のスキヤフォールド長

min : 最小コンティグの長さ

Chart 11.5 ASN212 株ゲノムアッセンブリによって生成されたスキヤフォールドの詳細。

No.	Contig_Name	Length	Cov	GC(%)
1	scaffold1_cov29	12,717	29.00	65.24
2	scaffold2_cov94	2,572	94.00	61.28
3	scaffold3_cov31	23,897	31.00	62.34
4	scaffold4_cov31	46,550	31.00	63.39
5	scaffold5_cov149	4,462	149.00	62.42
6	scaffold6_cov32	56,280	32.00	60.83
7	scaffold7_cov31	25,716	31.00	63.64
8	scaffold8_cov31	9,842	31.00	58.92
9	scaffold9_cov31	16,959	31.00	63.44
10	scaffold10_cov29	4,455	29.00	63.77
11	scaffold11_cov29	9,911	29.00	63.54

12	scaffold12_cov615	1,426	615.00	68.23
13	scaffold13_cov62	34,838	62.00	63.78
14	scaffold14_cov64	1,098	64.00	58.65
15	scaffold15_cov61	42,857	61.00	63.54
16	scaffold16_cov30	41,722	30.00	63.52
17	scaffold17_cov31	172,338	31.00	63.58
18	scaffold18_cov30	48,459	30.00	64.31
19	scaffold19_cov29	29,691	29.00	63.63
20	scaffold20_cov74	9,968	74.00	63.37
21	scaffold21_cov31	86,224	31.00	62.69
22	scaffold22_cov89	961	89.00	58.27
23	scaffold23_cov30	25,578	30.00	63.27
24	scaffold24_cov31	79,042	31.00	62.30
25	scaffold25_cov66	1,677	66.00	61.60
26	scaffold26_cov64	11,107	64.00	61.99
27	scaffold27_cov30	21,341	30.00	62.19
28	scaffold28_cov30	8,063	30.00	59.79
29	scaffold29_cov119	426	119.00	60.33
30	scaffold30_cov32	27,183	32.00	61.74
31	scaffold31_cov31	141,820	31.00	64.51
32	scaffold32_cov31	26,459	31.00	62.94
33	scaffold33_cov88	5,929	88.00	68.97
34	scaffold34_cov31	19,542	31.00	60.56
35	scaffold35_cov30	77,032	30.00	63.38
36	scaffold36_cov31	116,982	31.00	62.78
37	scaffold37_cov61	2,222	61.00	61.75
38	scaffold38_cov31	17,512	31.00	62.96
39	scaffold39_cov30	93,394	30.00	62.77
40	scaffold40_cov30	57,222	30.00	63.08
41	scaffold41_cov31	72,602	31.00	63.57
42	scaffold42_cov105	5,473	105.00	53.83
43	scaffold43_cov33	24,306	33.00	59.65

44	scaffold44_cov33	60,818	33.00	60.11
45	scaffold45_cov31	52,383	31.00	63.75
46	scaffold46_cov32	25,657	32.00	62.69
47	scaffold47_cov190	1,430	190.00	59.79
48	scaffold48_cov30	104,284	30.00	63.93
49	scaffold49_cov55	888	55.00	59.91
50	scaffold50_cov31	15,776	31.00	64.20
51	scaffold51_cov28	26,097	28.00	66.36
52	scaffold52_cov28	6,630	28.00	64.59
53	scaffold53_cov329	1,173	329.00	58.06
54	scaffold54_cov56	3,687	56.00	62.95
55	scaffold55_cov31	17,933	31.00	63.59
56	scaffold56_cov67	564	67.00	60.28
57	scaffold57_cov30	93,576	30.00	64.21
58	scaffold58_cov96	1,129	96.00	61.38
59	scaffold59_cov30	44,216	30.00	64.19
60	scaffold60_cov29	2,386	29.00	65.47
61	scaffold61_cov311	197	311.00	60.41
62	scaffold62_cov31	79,802	31.00	63.25
63	scaffold63_cov30	49,767	30.00	63.78
64	scaffold64_cov30	257,597	30.00	63.05
65	scaffold65_cov28	1,622	28.00	62.02
66	scaffold66_cov30	7,828	30.00	62.49
67	scaffold67_cov33	1,106	33.00	61.39
68	scaffold68_cov101	204	101.00	68.14
69	scaffold69_cov140	603	140.00	62.52
70	scaffold70_cov30	2,171	30.00	65.13
71	scaffold71_cov129	568	129.00	62.85
72	scaffold72_cov30	115,246	30.00	64.72
73	scaffold73_cov17	437	17.00	61.33
74	scaffold74_cov85	397	85.00	61.46
75	scaffold75_cov31	1,303	31.00	59.55

76	scaffold76_cov66	451	66.00	62.97
77	scaffold77_cov42	240	42.00	70.42
78	scaffold78_cov64	417	64.00	58.51
79	scaffold79_cov31	73,079	31.00	62.36
80	scaffold80_cov31	101,655	31.00	62.13
81	scaffold81_cov30	38,829	30.00	63.19
82	scaffold82_cov79	281	79.00	56.58
83	scaffold83_cov36	986	36.00	57.30
84	scaffold84_cov30	2,415	30.00	60.58
85	scaffold85_cov31	13,550	31.00	64.41
86	scaffold86_cov29	100,597	29.00	64.32
87	scaffold87_cov81	242	81.00	43.39
88	scaffold88_cov63	241	63.00	59.34
89	scaffold89_cov31	90,558	31.00	61.82
90	scaffold90_cov29	161,300	29.00	63.78
91	scaffold91_cov66	205	66.00	61.95
92	scaffold92_cov308	252	308.00	61.11
93	scaffold93_cov184	209	184.00	61.24
94	scaffold94_cov57	222	57.00	62.61
95	scaffold95_cov179	389	179.00	61.18
96	scaffold96_cov30	192	30.00	64.06
97	scaffold97_cov11	635	11.00	60.00
98	scaffold98_cov25	190	25.00	61.05

Chart 12 RAST server によって ASN212 株ゲノムに heme 生合成遺伝子としてアノテーションされた領域の塩基配列

hema (scaffold13_cov62_31637_32767)

atgtacgcatctttcaaggagcactgcgggcccagctcgcgatgggattgccgcccaggggtgacgaagaacgagcgtgggatcctcggggc
ccagggggcccagatcgccgtgggttcggcgaatgtgctcaacttctgcaccaacaactatctcggccttgccgaccaccccgcgattgtcgag
gctgcccataaggcgtcgcgattggggatacggcctcgaagcgtgcgcttatactcggcacgcagcagcagcatctcgacctcgagcgc
cgtctctcgagtttctcggcacggatgagacgatcctcttctctctgtgtttgacgcgaacggaggcgtgttcgagacgctcttcggtaccgaa
gacgcgatcatctctgacgcgctgaaccacgcgtgatcatcgacggcatcaggctctcgaaggcgcgaggctgcgctacgcaaaccgtgac
atggccgagcttgagcagcggcttctcaggcccggacgcgaggttcagggtgatcgttaccgacggcgtcttctcgatggacggctacgctc
gccccgctcagggcgatctgtgatcttgcgagcgtacgacgcaactgtgctcgtgatgactcgcacgcccgtgggcttctgggtgagggcg
gcccggcacaccgagctgtgcggggtggccgagcgtgtcgcacattctaccggcactttcggcaaggcgtcgggtggggcctcgggcggtt
acgtctcgggtcggcgagatcgtcgcgctcgcgcgagccaggccgtaccttctcgaacacgctcgtcctctcgatcgtggcaggc
acgcttcccgcgctcgatctggctgaatcggcgggcatgctcgtgagcggctacgttcgaacgctcgtgttcaggctctctcatgactgctga
aaggttcgagctgttccgggggagcaccgcatcgttcccgtgatgttcggcgaccccgtcaccgagcaggttcccggcgagatgcagcg
gcagggtgttctcgtgacggcgttcagctatcccgtcgtgcccaaggcgaggcgcgcatccgcgtgcagctctcggcggcacacaccgagga
acaggttcgtcctgcgtcgcggcgttctgtggccgcgcgcgacgcgagcgtgtga

hemd (scaffold38_cov31_6771_5986)

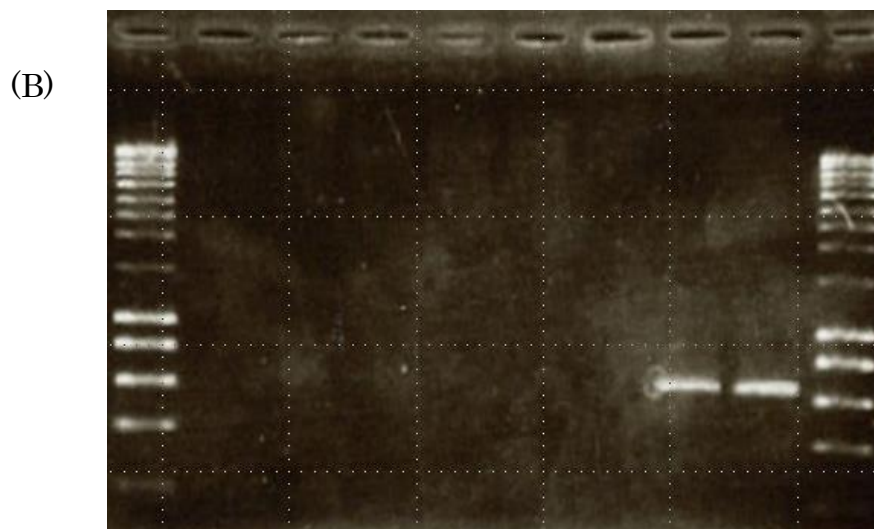
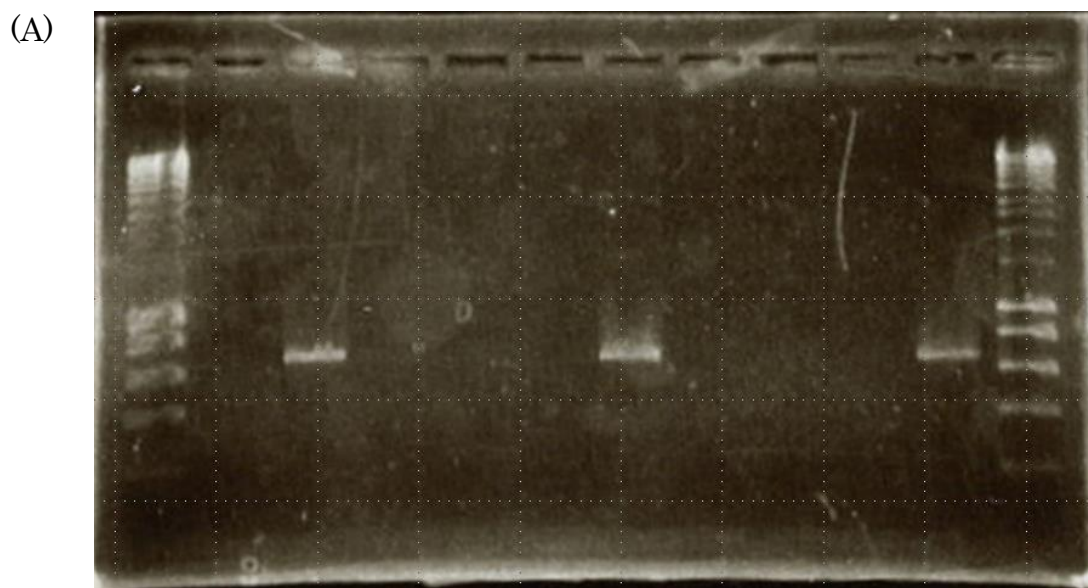
atgtcgatcgagcagaagcactaaatgggttgcgctgctcgtgccccgggtggcactggggcgagatcgtggcgaggtctcgcgaga
gcagggcgcaaacacggtgattgcaccctcgtagacttcgccatacgcgcaagaagatcggcttgtgatcgcctgcacgctcgaag
aaggttactacgactggatcaccgcgacgagcgcgaccgttgcgatgtgttggcgcatcacaaggcgaagattcatgagcgtactcgcgctc
cggttgcggtgaggcaaccgagcaggcgttcattgaggctggctatcaagtgcgacgcccgcgagtcgaacatcagaccgaggggt
ctgcttcaggatggccccgagattgatcggggtgaggttctgaaggtgcttacctcgggtgacgtggcgaagccggtgctcacctcagggc
ttatcgatcgaggccacgacgtgactcaggtcgtcgcgtttcgcaaatcggcgtgcccgtctcagccatattcgtgaagacgtcgaatcggg
tcgatcaacgcgttgcgtgacctcgcgcgcatcggtaaagaggttgcggcgcagttccgggtgcttcccgaagaaacctcgtggcctgt
gtcggcccgcacaccacgaagagactgtcgcggcaggactcaagcacaaccgagcggggcatcgtcgcgcaaaaagcgtgcgctgatcg
agacggtcagtcggccatcgatcagagtgacatgctcgcgactag

hemy (scaffold38_cov31_8004_7684)

atgaaggcgaagatcgcttttgcgcttggagctgcggctggctacgtactcggatcgcgcgccggtcgccagcggtagcagcagatcaagcgc
ggcgcgcaaacagcttgaacaccgaaccggtgcagaagggtgctggcgcagtcgaagggtgcaatcgatgagcgtcccgcgagatgaag
gcattcattcggcgcgttctcgtcgcgcatcattgcaaacatcgcaaacgagcggccccgcagcctcaacaaaagcctgaagccgccacccc

cggatgattggggcaaccgcaactggcaccggtataccgtcgatactctgcgcgatgcgagcgcgttcggggcgaggcgtgtgctcacgctc
taacaagcgcctatgcctcgtactccggcagccgccagtagccgcgagcacctcgcggcagcacggctccagcttggcgagcccgcctgaga
tcgacgtgcttcgccccttctcaacgacccgggtttgtcggggaacgctgcagcgatctccgatgccggcagcgcctcgagggaggcctc
gccggcgcgcacatcgtgtatgtgactcactcgattccagacacaatgcaagaggcgtcggcggtgacagggcctggctaccgcgagcagca
cgaagacgtgcgcgcgtgatcgattcgatgctctcgtcgggctcgcgccgtattcgactcctccctggcctactgctccaggtctggcgacc
ccgggtgccatggcttgaaccgatgtgaacgatcacatcgaggcgcctcgcgccgagggcgtcaagaagatcatcattgccccgatcggtt
catcagcgatcatatggaggtggcgttcgatctcgacattgaggccatcgagacagcagccgagcaggtatcgacgcggtgagggcggcg
acggtgggggtgcaccccgagttcgtgagtgaggatcgttgacatggtgattgaacgcgcggcgcgcgagcgcggcatggcggttgaagcgc
gacgacgggcgcgttcgaggcgtttgacgatatcgcgcccgggcagttgccgaatgcggcacggcgaggtgaccgggatcccggtgctc
cgggcgaacaggattaa

Chart 13 Actinobacteria 門特異的プライマーを用いた PCR 産物をアガロース電気泳動に供した結果

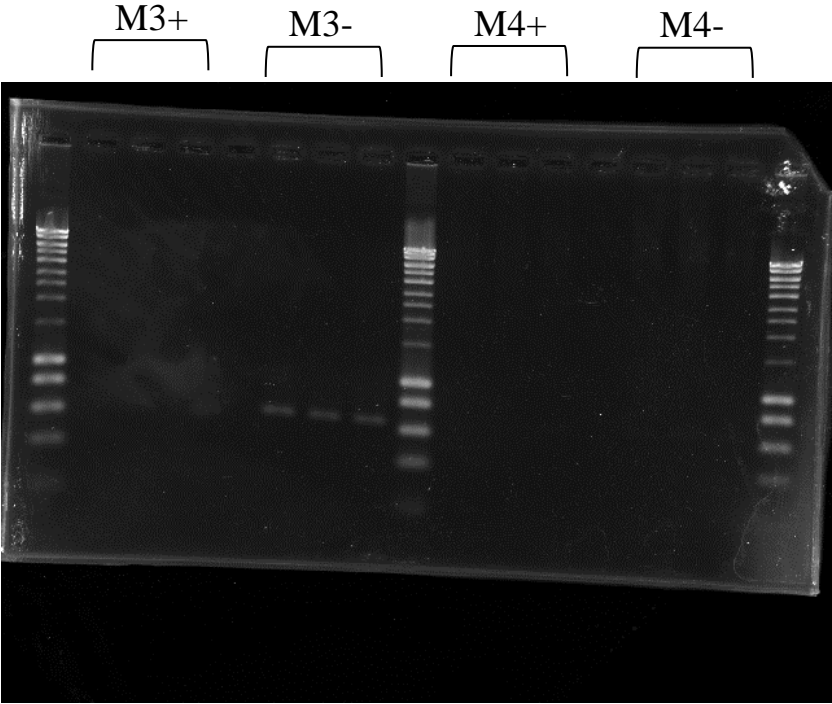
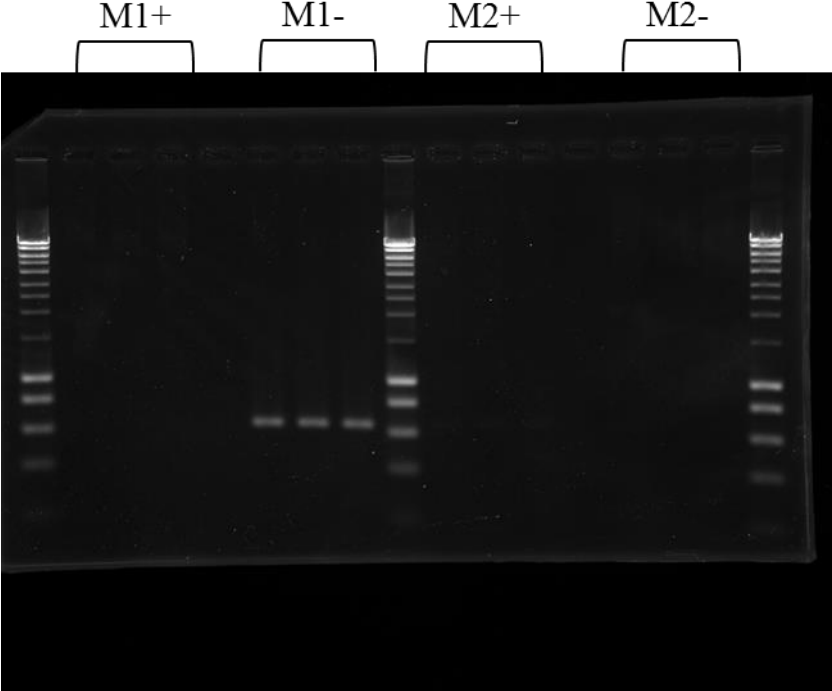


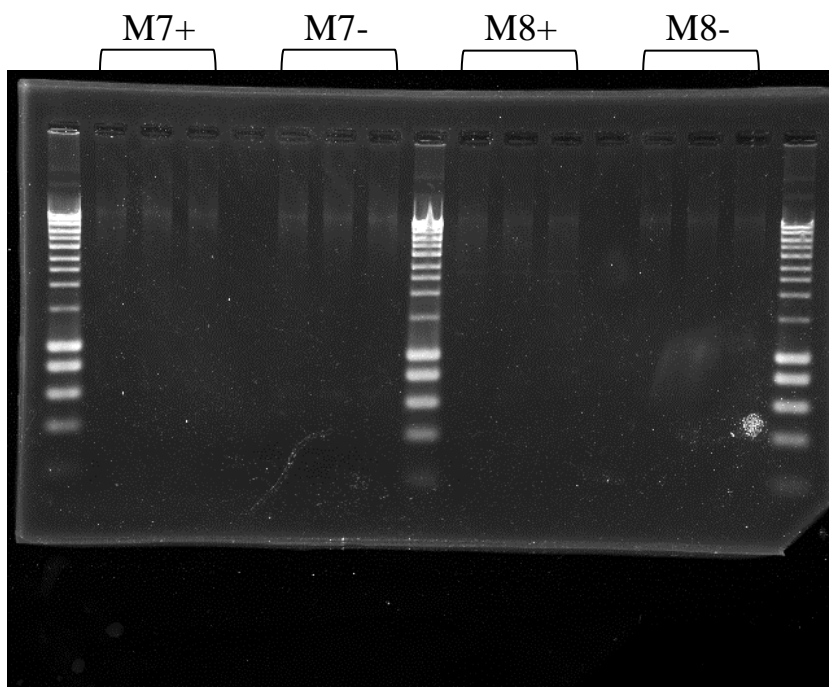
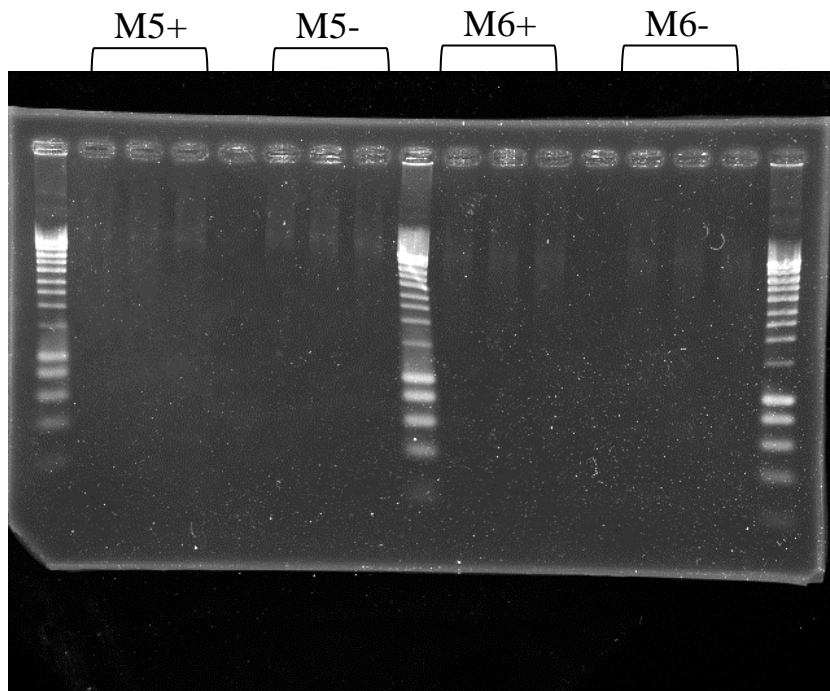
各レーンにアプライしたサンプル

(A): Ladder ,M1+, M1-,M2+,M2-,M3+,M3-,M4+,M4-,M5+,M5-, Ladder

(B): Ladder ,M6+, M6-,M7+,M7-,M8+,M8-,M9+,M9-,Ladder

Chart 14 モレキュラーイメージャーで撮影したゲルの写真





M9+

M9-

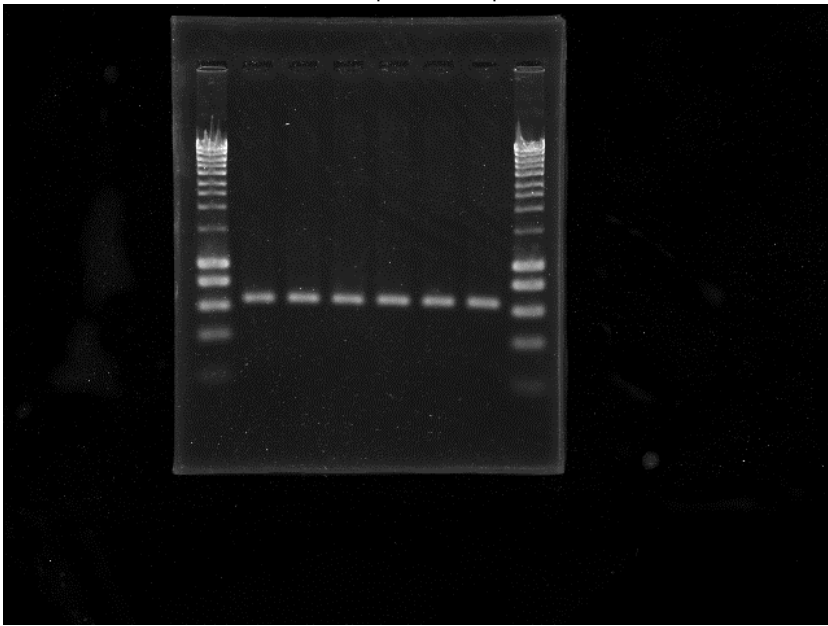
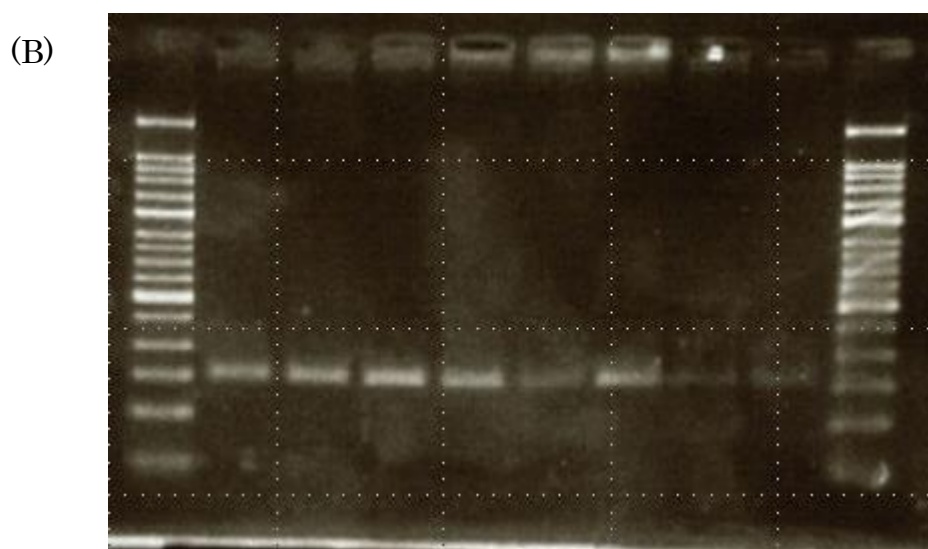
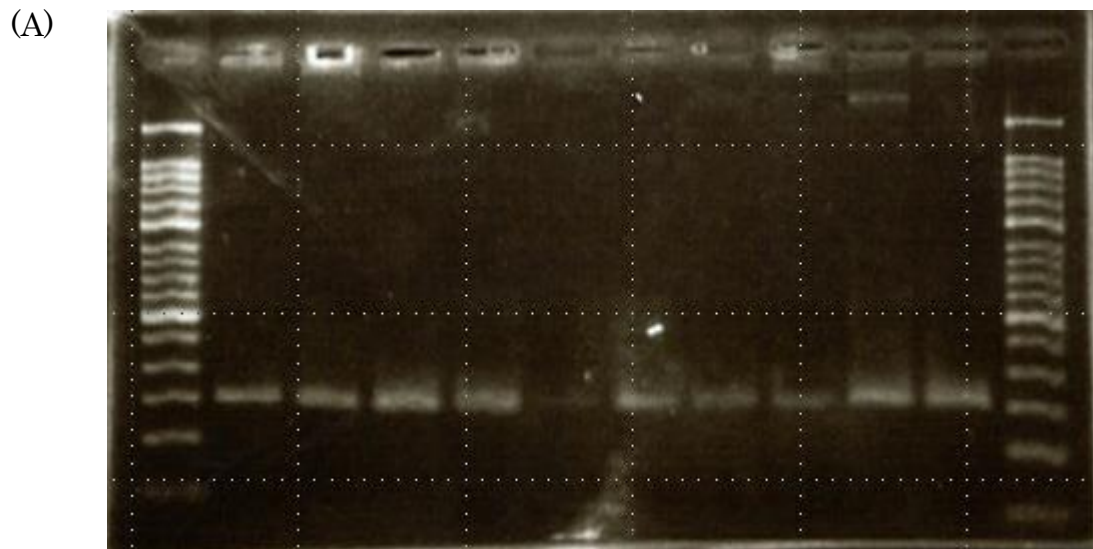


Chart 15 Firmicutes 門特異的プライマーを用いた PCR 産物をアガロース電気泳動に供した結果



各レーンにアプライしたサンプル

(A): Ladder ,M1+, M1-,M2+,M2-,M3+,M3-,M4+,M4-,M5+,M5-, Ladder

(B): Ladder ,M6+, M6-,M7+,M7-,M8+,M8-,M9+,M9-,Ladder