HOKKAIDO UNIVERSITY

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［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	髙井, 亮吾
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13597号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74337
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryogo_Takai_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称：博士（農学）

氏名　　髙井　亮吾

学 位 論 文 題 名

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

【背景】

地球上に存在する微生物種のうち、99%以上の種は、実験室条件において培養が不可能である難培養微生物とされる。難培養微生物が実験室条件において増殖しない原因の一つとして、環境中で他種から供給される増殖因子が再現されていないことが挙げられるが、このような増殖因子の特定は、難培養微生物の培養技術の発展につながる重要な課題である。当研究室では活性汚泥より見出された *Sphingopyxis* sp. GF9 株が生産する 3 種の増殖因子に対して探索を行ってきた。同じく活性汚泥試料より単離された *Leucobacter* sp. ASN212 株、*Catellibacterim nectariphilum* AST4 株及び *Bosea minatitlanensis* 近縁種である ASTN45 株は、GF9 株が生産するそれぞれ異なった増殖因子を要求する難培養微生物である。このうち ASN212 株が要求する増殖因子は coproporphyrin（Cop.）類であることが先行研究において明らかにされている。見出された Cop. 類はすべてサブナノモーラーからナノモーラーレベルで活性を示す強力な増殖因子である。本研究では第一に、未だ明らかにされていない ASTN45 株ならびに AST4 株に対する増殖因子の解明を目的とした。また第二に、ASN212 株の増殖因子として見出された 6 種の Cop.類について、Cop. 類の金属錯体の調製および ASN212 株に対する構造活性相関研究によって、Cop.類の作用機序を明らかにすることを目的とした。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 Actinobacteria 及び 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。

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

調製した 210 L の GF9 株培養上清より、各種クロマトグラフィーを用いて ASTN45 株に対する増殖因子の精製を行った。精製の終盤において、逆相 HPLC による精製を試みたが、非吸着画分に対して活性が見られたため、ODS による精製が困難な高極性化合物であることが示唆された。このため、HILIC による精製を行った。結果として 0.4 μg/mL の濃度で活性をもつ画分の部分精製を達成した。得られた 0.9 mg の画分に対して NMR による構造解析を試みたが、なお夾雑物を含むことを示唆する煩雑なスペクトルが得られた。ASTN45 株もまた、2 種の微生物増殖因子と同様に、GF9 株培養上清にごく微量含まれる化合物を増殖因子として要求していることが明らかとなった。

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

調製した 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 AST4 株に対する増殖因子の精製を行った。疎水性相互作用クロマトグラフィー（HP20）、逆相 HPLC などによる精製を行い、最終的に 35 ng/mL で活性を示す活性画分まで部分精製を達成した。得られた画分は His-Pro 環状ジペプチドを主として含有していたが、これは活性を示さなかった。AST4 株に対する増殖因子もまた、極めて低濃度で活性を有することが明らかとなった。

3. Cop. III 金属錯体を用いた構造活性相関研究及び作用機序の解明

Cop. I 及び Cop. III に対して調製を行った金属錯体のうち、Zn 及び Cu が室温条件での錯体形成を示す一方、Fe、Cu、Co 及び Ni は 100^{o}C の加温条件においてのみ錯体を形成した。調製された金属錯体に対して増殖活性評価を行った結果、Zn 及び Fe の金属錯体について増殖活性が見られた。また、Cop. III 金属錯体の増殖活性は Cop. I の金属錯体と比較して、より高い活性を示した。構造活性相関研究の結果、通常の培養条件において、Cop. III は培地中の Zn^{2+}及び Cu^{2+}と容易に錯体を形成するが、Zn 錯体のみが ASN212 株に対して増殖活性を示すため、Zn 錯体のみが増殖因子として見出されたと推定された。Cop. III 及び Cop. III-Fe 錯体は、ASN212 株を含む Actinobacteria 及び Firmicutes に特異的な heme 生合成経路における中間体である。よって Cop. III の作用機序はシグナル物質というよりむしろ ASN212 株の heme 生合成経路に関係すると考え、ASN212 株についてゲノムの抽出及び解析を行った。解析の結果、ASN212 株の HemB、HemC、HemE 及び HemY について機能の欠損が確認された。このことから、Cop. III は生合成前駆体として、欠損した heme 生合成経路を補うことで ASN212 株の protoporphyrin 生合成を可能とし、増殖を促進しているものと考えられる。

4. Cop. III が細菌叢に与える影響

Cop. III 添加条件で培養を行った各種細菌叢から抽出された DNA に対し、Actinobacteria 及び Firmicutes 特異的プライマーを用いた PCR による増殖活性評価を行った。その結果、通常の培地条件と比較して、Cop. III の添加条件においてこれら細菌群の増殖が抑制されることが示唆された。また、7 種の細菌株に対してそれぞれ Cop. III 増殖活性評価を行った結果、ASN212 株の近縁種である *L. komagatae* 含む 2 種に対して増殖を促進することがわかった。*L. komagatae* の heme 生合成経路解析の結果から、ASN212 株と同様に heme 生合成経路の機能の欠損が予想された。一方で、他の 5 種に対しては増殖抑制が認められた。増殖が抑制された原因として Cop. III の光条件下において、活性酸素種を生成することが報告されており、活性酸素がしめす細胞毒性により増殖を抑制していることが予想される。

以上、本研究により、異種微生物間に於ける増殖因子の授受が、多く場合で極めて低濃度で達成されていることが明らかとなった。また、新規増殖因子 Cop.類の作用機序の解明は、heme 生合成経路が欠損した難培養微生物の培養法の確立および、環境中における微生物間相互作用の解明の一助となるものである。今後、Cop. III を用いた培養法による、新たな難培養微生物の培養法の確立が期待される。