

Department: 環境・生命工学専攻		Contact faculty 紹介教員	平石 明
Applicant's name 氏名	飯塚 俊		

Abstract  
論文内容の要旨 (博士)

Title of Thesis 博士学位論文名	医薬生産資源としての新規粘液細菌の探索と特性評価 (Isolation and characterization of novel myxobacteria and their significance as biomedical resources)
----------------------------	---

(Approx. 800 words)

(要旨 1,200 字程度)

粘液細菌は、デルタプロテオバクテリア (*Delataproteobacteria*) 綱のミクソコックス (*Myxococcales*) 目に属するグラム陰性、好気性の従属栄養細菌であり、飢餓ストレスによって栄養細胞が集合する子実体 (fruiting body) に変化し、そこから栄養細胞が再び増殖する生活環を有する。本菌群は古くから土壌、動物の糞、腐朽木などから分離される陸生菌として位置づけられてきたが、分離や純粋培養が比較的困難な菌が多く、生息域や分類学的多様性については未解明な部分が多い。粘液細菌は産業的応用についても注目されているが、抗生物質生産菌としてよく知られる放線菌と比較して研究は遅れている。また、粘液細菌は原核生物の中では最大のゲノムサイズをもつ菌群である(最大約 15 Mb)。以上のように、粘液細菌は、その特異な生活環とともに生物多様性や生態学的役割に興味をもたれているばかりでなく、新規二次代謝産物の探索源としても注目されている。しかしながら、前述のように分離困難なことが多く、探索源として開拓の余地が大きい。以上の背景をふまえて本研究は、海洋、汽水、温泉などのより広い環境を対象として新規粘液細菌の探索と特性評価を行なうこと、およびそれらから新規二次代謝産物を見出すことを目的として実施した。

まず、日本各地の海岸や河口域で採取した試料から、海水あるいは汽水の成分組成を模した寒天培地を用いて粘液細菌を分離した。分離した中で 24 株は、先行研究で分離した菌株と同様、浅く陥没したクレーター状もしくは薄膜状の溶菌性 swarm を形成し、外見上は既知の *Nannocystis* 属や *Chondromyces* 属粘液細菌と似ていた。これらの溶菌性 swarm 形成菌について、先行研究で得た未同定の swarm 形成菌 25 株も加え、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統解析を行なった。それらは既知の陸生粘液細菌から属レベルで隔たり、*Nannocystineae* 亜目中の新規な分類群を形成した。その内の 2 菌株は、NaCl や海水中カチオン ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  および  $K^+$ ) が生育に必要で、最適 NaCl 濃度は 2-3% (w/v) であり、これらについて新属新種名 *Plesiocystis pacifica* を提唱した。ほかの 6 株も NaCl や海水中カチオン ( $Mg^{2+}$  または  $Ca^{2+}$ ) を生育に要求し、最適 NaCl 濃度は 1-2% であり、これらについて新属新種名 *Enhygromyxa salina* を提唱した。汽水環境からは、海水より低塩分の環境に適応した溶菌性粘液細菌として 2 株を分離した。その 1 株、SYR-2<sup>T</sup> 株は NaCl 濃度範囲 0-2% (至適濃度 0.5-1%) で生育し、カチオン ( $Mg^{2+}$  と  $Ca^{2+}$ ) を要求した。この菌に対し新属新種名 *Pseudenhygromyxa salsuginis* を提唱した。さらに SMH-27-4 株は、分子系統上は既知の海洋性粘液細菌や SYR-2<sup>T</sup> 株とも異なることから、新属新種名 "*Paraliomyxa miuraensis*" を提唱した。

つぎに、新規な粘液細菌の分離源開拓をめざし、50℃以上で生育する高温性菌株の分離を試みた。温泉由来試料を接種源とする 50℃での集積培養によって、27 点から粘液細菌様の滑走細菌が出現した。しかし、集積培養物には他の滑走細菌が混在し、純粋分離は困難だった。集積培養物の系統的位置を推定するため、粘液細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に特異的なプライマーを用いた nested PCR とアンプリコンの系統解析を行った結果、新規な粘液細菌と考えられる 6 クロオンを検出した。このように温泉環境由来の粘液細菌の純粋分離に至らなかったが、温泉環境に特異的に適応した新規な高温性粘液細菌の存在が示唆された。

さらに、上記の新規粘液細菌分離株からの抗真菌物質の探索を行った結果、“*Paraliomyxa miuraensis*” SMH-27-4 株に新規な抗真菌物質を見いだした。構造解析の結果、この抗菌物質を新規 19 員環ハロゲン化デブシペプチドと同定し、miuraenamide と命名した。本物質は、植物疫病卵菌 *Phytophthora capsici* に対し強力な抗菌性を示した。また、化学構造中に  $\beta$ -methoxyacrylate 残基を含み、酵母ミトコンドリア呼吸鎖の NADH オキシダーゼを強く阻害することから、作用点はミトコンドリア呼吸鎖と推定された。

以上のように、本研究では、分類学的に新規な粘液細菌を多数分離し、その 1 株から抗菌活性を有する新規二次代謝産物を発見し、新たな生物遺伝資源としての海洋性および汽水性粘液細菌の生物学的、産業的意義を証明した。

Date of Submission:

平成 28 年 1 月 13 日

Department: 環境・生命工学専攻			
Applicant's name 氏名	飯塚 俊	Contact faculty 紹介教員	平石 明

Abstract  
論文内容の要旨 (博士)

Title of Thesis 博士学位論文名	医薬生産資源としての新規粘液細菌の探索と特性評価 (Isolation and characterization of novel myxobacteria and their significance as biomedical resources)
----------------------------	---

(Approx. 800 words)

(要旨 1,200 字程度)

Myxobacteria are Gram-stain-negative bacteria that belong to a monophyletic phylogenetic group as the order *Myxococcales* in the class *Deltaproteobacteria*. Cells move by gliding across solid surfaces and form spreading colonies or so-called "swarms". They show complex cellular life cycles with cell to cell signaling networks and conspicuous morphogenetic abilities including fruiting-body formation. Within the maturing fruiting body, the vegetative cells convert into short, optically refractive myxospores. The myxospores are resistant to desiccation or starvation and allow myxobacteria to survive under unfavorable environmental conditions. With respect to physiology, myxobacteria are categorized into two nutritional groups, one of which is of the predatory type decomposing cells of other microorganisms, and one of which is of the cellulolytic type feeding on rotten plant materials. Both groups of the myxobacteria produce secondary metabolites. Myxobacteria have large genome sizes compared to other phylogenetic groups of bacteria. The largest genome size (15 Mb) among the prokaryotes has been reported for a strain of *Sorangium cellulosum*. Such large genomes allow to have many functions of proteins resulting in the production of diverse secondary metabolites.

Although myxobacteria have for long time been described as soil and terrestrial bacteria, our previous study revealed that coastal marine environments yield slightly halophilic myxobacteria. Therefore, the main purposes of this study are to isolate novel myxobacteria from more diverse habitats including marine environments and hot springs and to characterize them from phylogenetic and taxonomic viewpoints. In addition, I tried to find out novel secondary metabolites from these isolates and evaluated the significance of the novel myxobacteria as the biomedical resources.

A total of 24 strains of myxobacteria that formed swarms on agar solid media with viable cells of Gram-negative bacteria were isolated from coastal samples collected from different areas in Japan. No cellulolytic marine myxobacteria were isolated. Out of the 29 isolates, 5 seemed to be halotolerant myxobacteria. The remaining 24 isolates were phylogenetically analysed together with 25 strains previously isolated in our laboratory. 16S rRNA gene sequence comparisons showed that the 49 test strains could be classified into 7 operational taxonomic units designated as OTU-1 to OTU-7 within the suborder *Nannocystineae*. None of the 7 OTUs could be assigned to established genera of myxobacteria; that is, all the OTUs detected were taxonomically new at the generic level. Among the 7 OTUs, 4 OTUs (OTU-1 to OTU-4) were phenotypically characterized in detail from taxonomic viewpoints. Based on these phenotypic data, I proposed 4 novel genera and species, *Plesiocystis pacifica*, *Enhygromyxa salina*, *Pseudenhygromyxa salsuginis*, and *Paraliomyxa miuraensis* to accommodate the strains of OTU-1, OTU-2, OTU-3, and OTU-4, respectively. *Plesiocystis pacifica* and *Enhygromyxa salina* were marine myxobacteria that exhibited optimal growth in a NaCl range of 1 to 2%. On the other hand, *Pseudenhygromyxa salsuginis* and *Paraliomyxa miuraensis* are brackish water myxobacteria that grew best at lower concentration of NaCl (0.5-1.0%).

Both marine and brackish water myxobacteria isolated in this study were mesophilic, showing the highest growth temperature up to 45°C. Therefore, I further tried to isolate thermophilic myxobacteria as additional biomedical resources. Cultivating hot spring samples on solid media at 50°C resulted in the formation of swarm-like colonies. However, it was very hard to purify myxobacteria from these cultures because of the co-existence of other gliding bacteria. Thus, I attempted to detect myxobacteria in the thermophilic cultures by PCR cloning and sequencing of 16S rRNA genes. A clone library constructed

by nested PCR using myxobacteria-specific primers and the bulk DNA from the thermophilic cultures generated 6 clones that represent new lineages within the suborders *Sorangineae* and *Nannocystineae*.

In order to find out novel secondary metabolites, I prepared culture extracts from the 49 isolates of myxobacteria and tested them for anti-fungal activity. As the results, one sample prepared from *Paraliomyxa miuraensis* SMH-27-4<sup>T</sup> showed significant inhibitory activity against the oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. A novel cyclic depsipeptide compound was retrieved from the culture extract of strain SMH-27-4<sup>T</sup> and was named miuraenamamide. This compound inhibited NADH oxidase activity of yeast mitochondria. Recently, miuraenamamide was also demonstrated to have anticancer activity by another group of researchers.

Based on the aforementioned results, it is logical to conclude that myxobacteria are widely distributed in marine and hot spring environments and are promising resources of novel bioactive compounds applicable for biomedical use.