

微生物が作り出す化合物は創薬の現場でいまだ重要な役割を果たしている。**大部分の微生物は未探索な状況 (Microbial dark matter) であり**、これら微生物の培養方法の確立と生理活性探索の方法を確立することが求められている[Rinke *et al.* Nature. 2013. 499:431.]. 本研究では、多様な土壌サンプルからの微生物複合培養液の調製と、がん細胞移植ゼブラフィッシュクリーニング系を組み合わせることを立案する。

本研究を通して、マイクロドロップレットを活用した微生物複合培養による難培養微生物の培養系を確立することで、従来の手法では分離できなかった未解明な微生物の培養・単離を達成する。また、複合微生物培養系中の微生物間相互作用により未知の生理活性化合物生産システムの発現が観察できる可能性がある。

特に、マイクロドロップレットを活用して多様性を保持した状態での土壌微生物複合培養系を確立することが本研究の1つの重要な技術基盤であるが、すでにこれが実現できることを確認している。加えて、本研究で掲げるゼブラフィッシュを活用した *in vivo* 抗がん活性評価を実現できることも確認している。

以上、本研究では**難培養微生物を含めた多様な微生物の複合培養とゼブラフィッシュ *in vivo* スクリーニングを組み合わせることで、細胞の増殖を抑制する新規化合物を見出す**ことを目的とする。

土壌微生物をマイクロドロップレット内に包埋し、複合培養する。増殖の速い細菌を含むドロップレットを検出してセルソーターで除く。その後1ヶ月複合培養を継続することで、増殖の遅い難培養微生物を含む複合微生物培養液を取得する。がん細胞移植ゼブラフィッシュ系を用いることで、土壌微生物培養液の抗がん活性の *in vivo* での有効性を評価する。複合培養液中のがん細胞増殖抑制活性を持つ微生物を、菌叢解析情報をもとに条件を検討しながら単離し、ゲノム解析を行う。得られたゲノム情報を元に、抗がん活性に関係する二次代謝産物合成遺伝子群を推定する。ここまですべて着目した難培養微生物培養液の液液抽出や HPLC などによって化合物を取得する。取得した化合物について、ゼブラフィッシュ系内での大腸がん細胞増殖抑制活性に関する薬理学的特性を決定する。最終的に化合物の構造を NMR や質量分析などによって決定する (図1)。

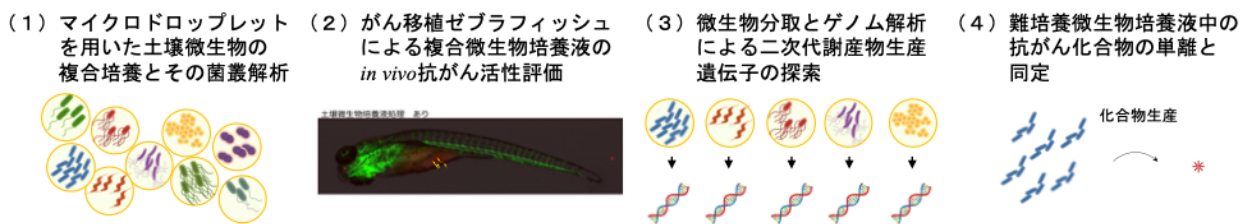


図1：本研究戦略の概要

近年の大規模な系統分析によって、難培養微生物の膨大な多様性が示された [Hug *et al.* Nat. Microbiol. 2016. 1:16048.]. 1g の土壌中には数百万種の多様な細菌が存在している [Gans *et al.* Science. 2005. 309:1387.]. 一方で、これらのほとんどは固体培地上でコロニー形成せず、これまで単離され生理活性が評価されている微生物はごく一部である。したがって**大部分の微生物は未探索な状況 (Microbial dark matter) であり**、これら微生物の培養方法の確立と生理活性探索の方法を確立することが求められている[Rinke *et al.* Nature. 2013. 499:431.].

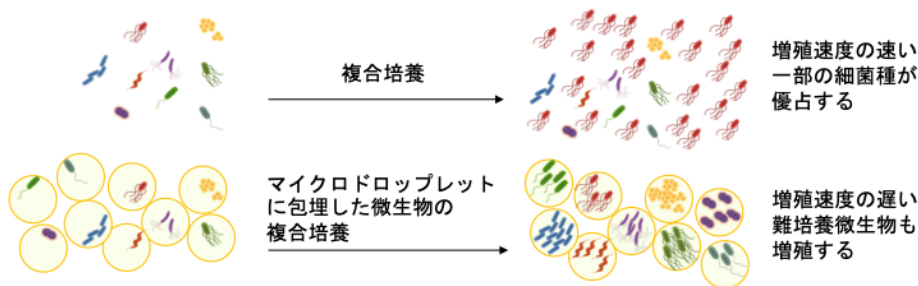
1928 年に Alexander Fleming によって *Penicillium notatum* 培養液からペニシリンが発見されて以来、多くの研究機関や製薬会社が微生物培養液から多様な天然化合物を探索し、その結果多くの医薬品が市場に導入されてきた。現在上市されている低分子医薬品の 6 割が天然物に由来しており、微生物が作り出す化合物は創薬の現場でいまだ重要な役割を果たしている。生理活性を示す化合物は土壌中から単離された放線菌より見出されることが多かったが、**純粋培養条件では多くの二次代謝産物合成遺伝子群は発現せず未探索な機能が多く残されている**ことが分かっている。

新規の創薬シーズ化合物の取得を達成するためには、ユニークなスクリーニングサンプルと生理活性を評価する系が必要となる。本研究では、**多様な土壌サンプルからの微生物複合培養液の調製と、がん細胞移植ゼブラフィッシュ系を組み合わせる**ことを立案する (図 1)。

マイクロドロップレット内に土壌微生物を封入して培養することで、難培養微生物を含めた多様な微生物の複合培養系を確立する。がん移植ゼブラフィッシュモデルをスクリーニングに利用することで、土壌微生物培養液の *in vivo* での抗がん活性や生体毒性などの特徴を多角的に評価する。抗がん活性を示す土壌微生物複合培養液のメタゲノム解析・シングルセルゲノム解析、および目的微生物の単離とゲノム解析を行うことで、培養液中の微生物組成や二次代謝産物合成遺伝子群を推定する。最終的に候補の微生物培養液より、抗がん化合物を単離・同定し、その薬理学的特性を決定する。以上のことより、本研究では**難培養微生物を含めた多様な微生物を複合培養し、大腸がん細胞の増殖を抑制する新規化合物を見出す**ことを目的とする。

多くの細菌は増殖が遅く、また他の微生物由来の化合物を必要とするために、培養することが難しい。本研究では新規微生物機能を探索するために、細菌の複合培養を試みる。単純に液体培地の細菌を複合培養した場合、増殖の早い特定の細菌が菌叢の大部分を占めてしまうため、増殖の遅い細菌ポピュレーションを維持して複合培養できる手法の開発が必要となる。ドロップレットへの微生物包埋と複合培養は、微生物間の化合物相互作用を維持しながら、液体培地中で多種の細菌を分離培養できるために、難培養微生物を培養するための方法として期待されている [馬目ら. 2003. 日本農芸化学会誌. 77:154.]. 本研究では、**土壌細菌のマイクロドロップレットへの包埋とドロップレットソーティングを活用することで、特定の細菌の優占を防いで多様性を保持した菌叢をもつ複合培養培養液の調製することに独自性がある (図2)。**

本研究では、がん細胞増殖抑制活性をもつ土壌微生物培養液のスクリーニングを、ガン移植ゼブラフィッシュを用いて行う。ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は、ヒトと同様の組織器官を有している。繁殖力が高く、安価でサイズが小さいので多個体を用いて実験することができる。これらの特徴から、化合物の有効性と毒性を評価するための費用対効果の高い代替ヒト疾患モデルとして、過去十年間にわたり用いられてきた。ゼブラフィッシュのがんモデルは、がんの進行、転移などに関して、ヒトと共通した特徴を示している [Shimada *et al.* 2014. *Methods Mol. Biol.* 1165:223.]. 幼魚は体が透明であるため、蛍光標識と組み合わせた *in vivo* イメージングにより、がん細胞の増殖を評価することができる。本研究では、**ゼブラフィッシュモデルをスクリーニングに用いることで複合微生物培養液の抗がん活性、毒性、血管新生への影響などの薬理学的特性を *in vivo* 評価できることに特色がある。**



**図2 :**  
マイクロドロップレットを  
活用した複合微生物培養