

NUMBER 27

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

**RESEARCH
COMMUNICATIONS**

2013

RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 27



2 0 1 3

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA (IFO)

Published by

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

17-85, JUSO-HONMACHI 2-CHOME

YODOGAWA-KU, OSAKA 532-8686, JAPAN

公益財団法人発酵研究所

理事長	波多野和徳		
常務理事	中濱 一雄		
理事	木村 光 富田 房男 原島 俊 別府 輝彦	武田 光子 中瀬 崇 古川 謙介 本田 武司	
監事	田浦 清	藤井 智幸	
評議員	今田 哲 北本勝ひこ 竹内 昌男 土屋 英子 吉田 敏臣	魚住 武司 下田 親 谷 吉樹 松原 謙一	
顧問	坂野 勲		

目 次

第7回助成研究報告会の開催	1
■ 平成23年度大型研究助成	
全ゲノム遺伝子情報を使った細菌の菌種の新しい定義の構築	江崎 孝行 … 5
複合系培養法による抗生物質生合成遺伝子の発現誘導	尾仲 宏康 … 17
増えずに生き続ける代謝戦略	
—地球炭素循環の鍵をにぎる微生物新機能—	堀 知行 … 27
レアメタル気化微生物の分離・同定と機能解析	山下 光雄 … 37
■ 平成23年度一般研究助成	
国内土壌中の <i>Bacillus cereus</i> group 菌種群の網羅的検索および	
分類同定と炭疽菌との鑑別法の確立	奥谷 晶子 … 47
超高分解能質量分析法を用いたミコール酸の構造解析に基づく	
<i>Corynebacterineae</i> 亜目の多様性解析	寺本華奈江 … 47
菌類-バクテリア共生体の網羅的な解析とその特性評価	成澤 才彦 … 48
海洋生物に付着する難培養性微生物の分離, 分類及び保存法の研究	能木 裕一 … 49
難培養真核微生物の進化系統学的解析	野田 悟子 … 49
転写装置アーキア RNA ポリメラーゼの機能進化に関する研究	平田 章 … 50
トランスポゾン分子進化に基づくマツタケ類の起源と種分化の解明	村田 仁 … 51
胞子に付属糸をもつ分生子果不完全菌類の新分類体系ならびに	
形態と寄生性の進化を ITS2 二次構造の解析から探る	渡辺 京子 … 52
コリネ型アミノ酸生産菌のもつ潜在的なグルコース輸送バイパスの	
解明と発酵への応用	池田 正人 … 53
脂質のクオリティーコントロールに働くシステイン/	
シスチン シャトルシステム	大津 巖生 … 53
スクリーニングと代謝工学によるバイオプロパノールの発酵生産	片岡 道彦 … 54
乳酸菌由来のN・C末端でリンクする環状抗菌ペプチド生合成機構の解明	川井 泰 … 55

枯草菌の胞子形成期および定常期におけるリボソームの活性調節と 構造変化の解明および特異的遺伝子高発現系への応用	河村富士夫	56
C ₁ 化合物を出発原料とした発酵生産系への応用に向けた C ₁ 耐性酵母の基盤構築	中川 智行	56
D-ソルビトールからのD-フルクトース発酵を可能にする 酢酸菌株のスクリーニングと育種	薬師 寿治	57
4つの光学異性体をもつ非天然アミノ酸の生産に有用な微生物酵素の 探索と改良	和田 大	58
酵母細胞を用いたトランス脂肪酸の安全評価系構築と作用機構の解析	井沢 真吾	58
有用土壌細菌のバイオフィーム形成を介した植物表面への定着能の改善	上田 晃弘	59
短鎖脂肪酸受容体と生活習慣病：腸内細菌を介した 食事性栄養認識受容体によるエネルギー調節機構の解明	木村 郁夫	60
マリアナ海溝に生育していた脱窒細菌の高圧環境適応機構	為我井秀行	61
病原性大腸菌の腸管内環境因子による病原性発現制御機構の解析	戸邊 亨	61
細菌と宿主相互作用における排出蛋白質の機能解明	西野美都子	62
シングルセルレベル解析が明らかにする海底下地下生命圏の 微生物生態	星野 辰彦	63
石灰化能を有する海洋細菌の探索と石灰化メカニズムの解明	安元 剛	64

第7回助成研究報告会の開催

平成25年6月7日千里ライフサイエンスセンター5階ホールにおいて第7回助成研究報告会を開催し、平成23～24年度2年間の助成を受けた大型研究助成4件の研究成果の口頭発表ならびに一般研究助成24件の研究結果のポスターによる発表がおこなわれた。参加者は、大学、国公立研究所の研究者に加えて企業研究者や大学院学生など合わせて総数192名であった。

報告会に先立ち波多野理事長から次のような挨拶があった。『公益財団法人発酵研究所の第7回助成研究報告会に多数の方々にご出席を頂き誠に有り難い。これも偏に当財団の事業について、皆様方のご理解とご支援の賜と感謝申し上げます。昨年は、生命科学の分野に携わっている私共にとりまして大変嬉しく、誇らしかったのが「山中伸弥教授」のノーベル医学・生理学賞の授賞ニュースであった。先生の受賞に至る研究の進展の陰には“山中先生が申請した研究助成に対して、ある目利きの選考委員が、その研究の斬新性を認め取り上げた事により研究が進展した”との話が伝えられている。私共の研究助成も是非そのようにありたい。当財団は、新たな微生物遺伝資源を見出したり、その機能などを開発したりするような基礎研究を行う研究者や、微生物の力を利用して豊かな社会を作り出すような応用研究を行う研究者を下支えする機関としてこれからも活動していくのでよろしくご理解いただきたい。今年の報告会は、4題の大型助成研究は口頭発表で、24題の一般助成研究についてはポスター発表という形式で行うことにした。ポスター発表には、1時間という発表時間を取ったので、心ゆくまでご議論ください。毎年、この報告会の挨拶の時に申し上げているように、この報告会には“微生物”というキーワードの下に色々な分野の研究者の皆様が集まっている。この報告会は単なる研究成果の報告だけでなく、多様な分野の微生物研究者の交流の場を設けることが、もう一つの目的になっている。懇親会にも出席して大いに交歓していただき、ご自身の研究をさらに進展させる一助として貰えれば主催した当財団として大変嬉しい。』

報告会では大型助成研究4件のうち「複合系培養法による抗生物質生合成遺伝子の発現誘導」(尾仲宏康)の1題は今中忠行立命館大学教授の座長のもとに、「増えずに生き続ける代謝戦略－地球炭素環境の鍵をにぎる微生物新機能－」(堀知行)および「レアメタル気化微生物の分離、同定と機能解析」(山下光男)の2題は桑原正章京都大学名誉教授の座長のもとに、また、「全ゲノム遺伝子情報を使った細菌の菌種の新しい定義の構築」(江崎孝行)の1題は西村和子千葉大学名誉教授の座長のもとに口頭発表がおこなわれた。各報告に対して活発な討議がなされ、示唆に富んだ意見も出るなど実りのある発表となった。発表の内容は全文が本報告集に収録されている。

引き続き一般研究助成24題はポスター展示による発表がなされた。各ポスターの前で熱心な質疑が交わされ、この後おこなわれた懇親会の時間にもお酒を片手に和やかに対話する

姿が見られて、十分に議論が尽くされたように思われる。一般助成研究の研究結果は本報告集ではページ数の関係で要約のみを掲載した。

懇親会には報告会参加者のほとんどが参加した。先ず古川謙介理事（九州大学名誉教授）の挨拶があり、次いで本田武司理事（大阪大学微生物病研究会技術顧問）のご発声で乾杯をおこなった。乾杯には東日本大震災からの東北地方の復興を祈念して、北里大学海洋バイオテクノロジー釜石研究所の瓦礫の中から救出復元された酵母株（石割桜）を使って「世嬉の一酒造株式会社」が開発醸造した「福香ビール」を供した。懇親会では、参加者の間で和やかに歓談が持たれたのに加えて、報告会では十分にできなかった質疑応答も行われ、また当財団からの寄付により設置された京大、北大、九大、阪大、東大、および石川県立大学（本年10月から）の寄付講座の各教授からの挨拶などもあって、異なる分野の研究者の間で賑やかな交歓が見られた。報告会と共に交流の場としても十分役立ったようで、参加された皆様のご協力に心から感謝します。

来年第8回の助成研究報告会は平成26年6月5日（木）に同じ会場で開催いたします。

以下に報告会、ポスター展示、懇親会の模様の一部を写真で紹介する。

RESEARCH COMMUNICATIONS



開会挨拶
波多野和徳 理事長



座長 西村 和子 先生



座長 今中 忠行 先生



座長 桑原 正章 先生



江崎 孝行 氏



尾仲 宏康 氏



堀 知行 氏



山下 光男 氏



司会
中濱 一雄 常務理事



報告会

RESEARCH COMMUNICATIONS

ポ
ス
タ
ー
発
表



挨拶 古川 謙介 理事



乾杯 本田 武司 理事



懇 親 会

平成23年度大型研究助成の研究報告

助成期間：平成23年4月～平成25年3月

全ゲノム遺伝子情報を使った細菌の菌種の新しい定義の構築

江崎 孝行

岐阜大学大学院医学系研究科再生医科学病原体制御分野
(岐阜大学医学部病原微生物遺伝子資源保存センター)

〒501-1194 岐阜市柳戸 1-1

Genome wide screening of bacterial genes applicable to define a new species concept.

Takayuki Ezaki

Department of Microbiology, Gifu University Graduate School of Medicine
Yanagido 1-1, Gifu, 501-1194, Japan

Members of family *Enterobacteriaceae* are biochemically well characterized through their long history. Among 230 species and 50 genera classified in the family, whole genome of almost half of the species are already determined. In this study, we collected their house keeping genes (HKG) commonly found in *Proteobacteria* and compared their amino acid sequence variation useful for their species level and genus level classification. Among three hundred HKG analysis of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Yersinia pestis*, top 22 variable HKG (C22HKG) were selected and the concatenated HKG were used for their phylogenetic analysis. Fifty one ribosomal proteins were also concatenated to compare the variation among members of family *Enterobacteriaceae*.

A concatenated 51 ribosomal proteins (C51RP) was more conserved than 16S rRNA among closely related species. However, the C51RP tree made reliable clade with high boot strap values among both closely related species and remotely related species.

E. coli and *Y. pestis* are phylogenetically most distant pathogenic species. The distance between the two species was 5.5% by 16S rRNA, 6.7% by the C51RP and 33.5% by the C22HKG.

The C22HKG variation among species of genus *Escherichia* was 4%, while 16S rRNA variation was 0.1%. From these data, the C22HKG is more useful for species differentiation and the C51RP is genus and family level classification.

Key words: species definition, taxonomy, ribosomal protein, house keeping gene, Enterobacteriaceae

緒言

Family *Enterobacteriaceae* に分類される菌種は 100 年以上の歴史があり、時代に応じて異なった基準で分類と同定が行われてきた (Konstantinidis & Tiede, 2005a). 最近では全ゲノム配列が安価で容易に決定できるようになったため、膨大な全ゲノム情報を使って分離株の

特性を解析することができる (Konstantinidis & Tiede, 2005b). その結果, *Escherichia coli* では菌株が保有する遺伝子の最大約 3 割が株に特異的な遺伝子を保有していると報告されている. 逆に残り 7 割の遺伝子が株で共有されている. Family *Enterobacteriaceae* 全体で見ると, 50 属 230 菌種が分類されているが, 約 2000 遺伝子 (約 4 割) が Family 内の菌種で共有されている. *Proteobacteria* 全体に目を向けると, 共通に保有している遺伝子はさらに少なくなり, 全遺伝子の 10% 以下しか共有されていない (Konstantinidis & Tiede, 2005). 本研究では *Gammaproteobacteria* に広く保有されている 300 個の遺伝子に着目し, 多型を計測し, Family *Enterobacteriaceae* 内の属, 種の分類の妥当性を解析し種と属

E-mail: tezaki@gifu-u.ac.jp

共同研究者: 林将大, 水野卓也, 名取達矢, 金沢泉, 張継偉, 大楠清文 (岐阜大), 黄地祥子, 細山哲, 青野英司, 山添敦司, 藤田信之 (NITE)

の定義を再構築することを目指した。16S rRNA の系統分析で Family *Enterobacteriaceae* 内で Genus *Escherichia* にもっとも近縁な属 (*Shigella* は除く) に Genus *Salmonella* がある。この両属に系統的に近い Genus *Citrobacter* 属内の菌種は系統的に Genus *Salmonella* と Genus *Escherichia* の外に位置する菌種と、両属の中間に来る菌種に二分されている。Genus *Citrobacter* の菌種の全ゲノム解析をおこない、300 個のゲノムの多型情報を比較した。また既に全ゲノム解析が蓄積されている Family *Enterobacteriaceae* の菌種の中で Genus *Escherichia* と 16S rRNA による系統が最も遠い Genus *Yersinia* と 300 個のゲノムのアミノ酸配列の多型を計測し、属レベル、菌種レベルで多型が大きい遺伝子を選択し、分類階級の種レベル、属レベルで現状の 16S rRNA による系統分類を比較した。

実験方法

研究を開始した時点で全ゲノム情報が不足している下記の14菌種のドラフトゲノムを Illumina HighSeq シークエンサーで決定した。

Citrobacter freundii GTC 09479, *Citrobacter farmeri* GTC 01319^T, *Citrobacter werkmanii* GTC 14913^T, *Citrobacter rodentium* GTC 14911^T, *Citrobacter amalonaticus* GTC 14882^T, *Citrobacter braakii* GTC 14884^T, *Citrobacter diversus* GTC 14886^T, *Citrobacter koseri* GTC 14908^T, *Citrobacter sedlakii* GTC 14912^T, *Escherichia albertii* GTC 14781^T, *Leclercia adecarboxylata* GTC 01267^T, *Escherichia vulneris* GTC 10613^T, *Escherichia hermanii* GTC 10612^T, *Escherichia blattae*, GTC 0778^T

上記データに加え、全ゲノム解析がすでに終了し、公開されている Family *Enterobacteriaceae* の28属 105 菌種

で遺伝子の配列多型を比較した。系統解析に利用する遺伝子の選択に当たって *Proteobacteria* の細菌には部分的にしか保有されない糖類の代謝遺伝子群は解析から除外した。リボソームタンパクは細菌種すべてに共通に存在するので遺伝子を解析対象とした。リボソームタンパク以外ではゲノム上に多コピー存在することがわかっている遺伝子は除外し、最終的に 300 個の遺伝子を比較対象として選択した。これらの遺伝子を *Escherichia coli* と系統的に最も近い属から *Salmonella enterica*, また *E. coli* と系統的に最も遠い Family *Enterobacteriaceae* の病原性菌種である *Yersinia pestis* でアミノ酸配列の株内多型を比較した。さらに属レベル、種レベルでの識別に有効なアミノ酸配列の多型が集積している遺伝子を検索した。

結 果

菌種内の株の遺伝子多型の計測

Family *Enterobacteriaceae* の菌種でゲノム配列が決定されている株が最も多い *Escherichia coli* (120 株), さらに 16S rRNA の解析で系統的に最も近い属から *Salmonella enterica* (80 株) を選択した。また *E. coli* と系統的に最も遠い Family *Enterobacteriaceae* の病原性菌種である *Yersinia pestis* (65 株) を使用し、300 個の遺伝子のアミノ酸レベルでの SAP (Single amino acid polymorphism) を計測した。

これらの 300 個の遺伝子のアミノ酸レベルでの菌種内の株の SAP の平均値は *Escherichia coli* で 0.75% (n=120), *Salmonella enterica* で 0.51% (n=80), および *Yersinia pestis* で 0.09% (n=65) であり、ほとんどの遺伝子で SAP は 1% 未満であった (Table 1)。このことから菌種内の株の SAP 情報からは菌種間の分類に有効な遺伝

Table 1 Intraspecies variation and distance of selected species from *E. coli*

	Distance (%)			
	400 proteins	C51RP	C15HKG	16S rRNA
Intraspecies variation				
<i>E. coli</i> (n=120)	0.75	/	/	1.16 (0-1.23)
<i>S. enterica</i> (n=80)	0.51	/	/	0.44 (0-1.22)
<i>Y. pestis</i> (n=65)	0.09	/	/	0.09 (0-0.13)
Interspecies variation				
<i>E. coli</i> - <i>E. fergusonii</i>	/	0.27	0.76	0.52 (0.39-1.03)
<i>E. coli</i> - <i>E. albertii</i>	/	0.31	1.22	0.95 (0.52-1.26)
<i>E. coli</i> - <i>E. hermani</i>	/	2.26	5.33	2.50 (2.01-2.59)
<i>E. coli</i> - <i>S. enterica</i>	/	1.77	3.20	2.78 (2.59-3.31)
<i>E. coli</i> - <i>C. rodenticum</i>	/	1.25	3.35	3.04 (2.79-3.31)
<i>E. coli</i> - <i>C. freundii</i>	/	1.89	3.96	3.62 (2.72-4.02)
<i>E. coli</i> - <i>E. vulneris</i>	/	2.07	5.48	3.73 (3.31-3.96)
<i>E. coli</i> - <i>S. blattae</i>	/	2.79	5.94	3.86 (3.50-4.02)
<i>E. coli</i> - <i>Y. pestis</i>	/	7.00	17.27	5.53 (5.31-5.83)

全ゲノム遺伝子情報を使った細菌の菌種の新しい定義の構築

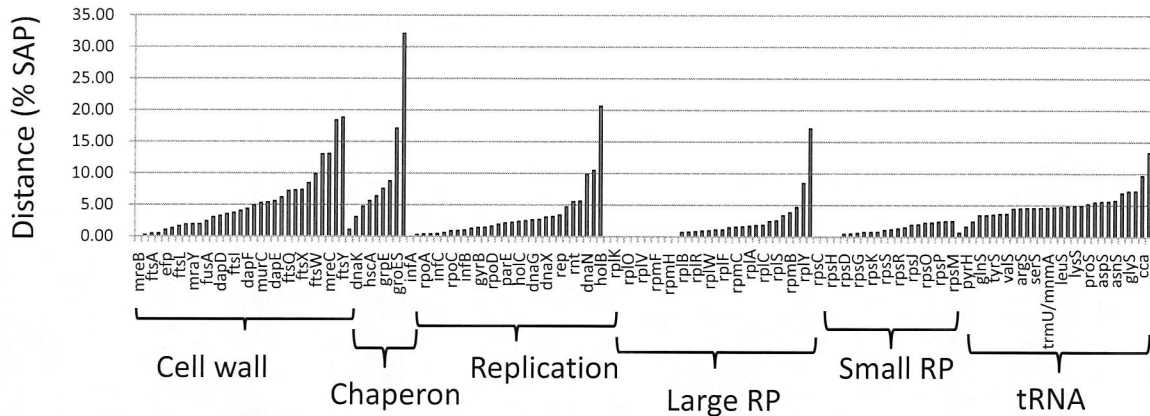


Fig. 1 Variation of house keeping genes (HKG) . Distance between *E. coli* and *S. enterica* was calculated by different category of house keeping genes. Finally top 22 hypervariable house keeping genes (Table 2) were selected from genes associated to cell wall synthesis, chaperon, ribosomal proteins, tRNA synthesis, and replication.

Table 2 Selected variable house keeping genes (22HKG)

Category	gene	Full name	Amino acid	<i>Escherichia coli</i> (n=120)	<i>Salmonella enterica</i> (n=80)	<i>Yersinia pestis</i> (n=65)	Distance between <i>Salmonella- Escherichia</i>	Distance between <i>Yersinia- Escherichia</i>
chaperonin	<i>dnaJ</i>	chaperone protein DnaJ (Hsp40)	376	2.10	0.27	0.27	4.79	11.17
replication	<i>gvrB</i>	DNA gyrase subunit B	804	0.07	0.05	0.00	3.48	13.15
replication	<i>gvrA</i>	DNA gyrase subunit A	891	0.15	0.21	0.05	9.00	15.91
replication	<i>rpoH</i>	RNA polymerase sigma-32 factor	284	0.09	0.09	0.00	3.52	16.02
chaperonin	<i>groES</i>	co-chaperonin GroES	97	0.00	0.00	0.00	17.14	18.57
chaperonin	<i>hscA</i>	chaperone protein hscA	616	0.81	0.97	2.60	5.68	20.46
cell wall	<i>ftsW</i>	cell division protein ftsW	414	0.00	0.24	0.00	9.90	21.50
cell wall	<i>mreD</i>	MreBCD transmembrane component MreD	163	1.84	1.23	0.00	4.94	24.69
cell wall	<i>pssA</i>	CDP-diacylglycerol-serine O-phosphatidyltransferase	451	2.22	0.67	0.00	6.21	25.72
replication	<i>holA</i>	DNA polymerase III, delta subunit	343	0.68	0.76	0.12	10.50	28.49
tRNA	<i>cca</i>	tRNA nucleotidyltransferase	412	1.21	1.46	0.00	9.69	28.64
cell wall	<i>mreC</i>	Rod shape-determining protein MreC	370	2.16	1.62	0.00	13.08	29.08
chaperonin	<i>lolA</i>	chaperone for lipoproteins	203	0.00	0.28	0.00	6.40	29.56
cell wall	<i>murF</i>	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide:D-alanyl-D-alanine ligase	452	3.32	0.66	0.18	13.05	30.35
chaperonin	<i>hscB</i>	chaperone protein HscB	171	0.00	0.49	0.00	8.77	34.48
cell wall	<i>ftsQ</i>	cell division protein FtsQ	276	1.09	1.09	0.01	7.22	35.13
cell wall	<i>ftsX</i>	membrane component of ABC superfamily	352	1.14	0.57	0.00	7.39	35.69
cell wall	<i>murB</i>	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase, FAD-binding	342	3.22	1.46	0.24	18.42	39.13
chaperonin	<i>grpE</i>	chaperone protein GrpE	197	0.00	0.00	0.01	7.61	40.10
cell wall	<i>ftsY</i>	cell division protein FtsY	497	3.26	0.60	3.26	18.85	41.12
replication	<i>holB</i>	DNA polymerase III, delta subunit	334	0.50	0.57	0.40	20.66	49.12
chaperonin	<i>hslJ</i>	heat shock protein HslJ	140	0.00	1.11	0.00	32.14	56.29

子を絞り込むデータは得られないと判断した。

そこで類縁の *E. coli* と、*S. enterica* のアミノ酸配列を比較し、配列の違いの数を% (distance として表記) で比較した (Fig. 1)。

この比較から両菌種の Distance が大きい遺伝子をトップから22個を選択し、配列を連結し、Concatenated 22 house keeping gene amino acid (C22HKG) として分類指標とした (Table 2)。選択した多型遺伝子は DNA 複製関連遺伝子、分子シャペロン (Zhang, *et al.*, 2011)、細胞壁の合成関連遺伝子 (リボソームたんぱくのアミノ酸配列は近縁種ほどよく保存されていた。RpsU (Small ribosomal protein S21) 蛋白では *E. coli* から *Y. pestis* ま

で Family レベルで全く SAP が存在せず、100%のアミノ酸配列が保存されていた (Fig. 2, Fig.)。一方、RplY (Large ribosomal protein L25) は多型が大きく、Genus *Escherichia* 内でしか保存されていなかった。そこで系統解析にはリボソームタンパク遺伝子51個のアミノ酸を連結して Concatenated 51 ribosomal proteins (C51RP) として系統分類に使用した (Table 3)。

属内の菌種間の多型

C51RPの多型は *E. coli*, *S. enterica*, および *Y. pestis* の同一菌種内の株間では distance は0%で Family *Enterobacteriaceae* の全ゲノム解析がされた他の菌種の株間で

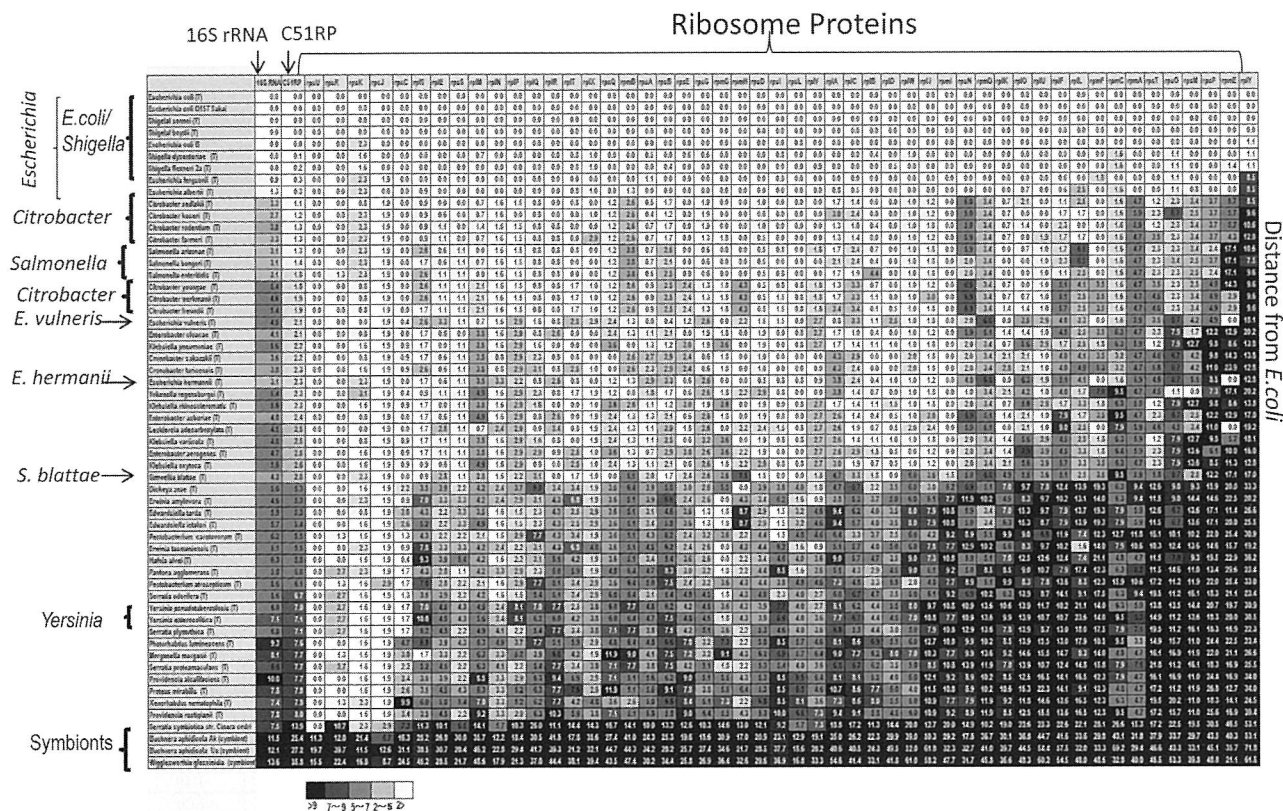


Fig. 2 Distance (%SAP) of members of family *Enterobacteriaceae* from *E. coli* was calculated. Each ribosome protein had different distant value.

も同様の結果が得られた。Genus *Escherichia*, Genus *Salmonella*, および Genus *Citrobacter* の類縁属内の各菌種に共通に保存されているアミノ酸配列が多く存在していた (Fig. 3)。C51RP の多型はこれら 3 属では小さく、16S rRNA の多型の方が大きい C51RP はより安定した配列情報を保有していた。

一方、多型の大きい順に選択した C22HKG の多型は菌種の識別に有用な配列情報を多数保有していた。*E. coli* からの distance が大きい遺伝子はシャペロンタンパク、DNA・RNA の複製と修飾、および細胞壁の合成にかかわる 3 つのカテゴリの HKG 遺伝子に集中していた (Table 2)。

環境細菌の分析には菌種内の株の 16S rRNA の多型が 1.5% 以内であれば同一種としてみなされている (Yarza, *et al.*, 2008; Konstantinidis & Tjeje, 2005b)。しかし *E. coli* には 7-8 個のリボソームオペロンがあり、その中の 16S rRNA の多型は一つの菌種内で 1.3% に達していた (Table 1)。このことは通常 PCR 法で遺伝子を決する際のデータの不正確さにつながる。*E. coli* から *Y. pestis* までの distance が 16S rRNA では 8% に対して 1.3% の誤差は菌種の同定に大きな影響を与える。一方、

C22HKG では 34% と大きく、多くのアミノ酸多型を含んでいた。C22HKG を使って *E. coli* からの distance を測定すると属内の類縁種である *E. albertii*, *E. fergusonii* では 4% の多型があり、識別できた。*E. vulneris*, *E. hermannii* は 16S rRNA および C22HKG のどちらの解析でも、独立属として分類されるべきと菌種と予測された。

一方、C51RP を 16S rRNA 配列と比較すると近縁なほど C51RP のほうが多型は小さく、16S rRNA 配列の多型はばらつきが多く、系統を反映していなかった (Fig. 3)。ところが 16S rRNA 配列の多型は系統が遠くなるほど、C51RP の多型とよく一致していた。

リボソームタンパクは配列の安定性から多くの論文で分類指標として利用されるようになってきている (Martini, *et al.*, 2007, Han, *et al.*, 2012)。しかし Family *Enterobacteriaceae* では同一属内の菌種では配列の多型はほとんど見られなかった。これらのデータから近縁種の識別には C22HKG がより信頼性が高いと結論した。

多型が大きい C22HKG に含まれる遺伝子に細胞壁の合成に関与する遺伝子が多く含まれており、分類学に

Table 3 Concatenated 51 ribosomal protein (C51RP) list

Full name	Amino acid	Gene
50S ribosomal protein L1	233	rplA
50S ribosomal protein L2	273	rplB
50S ribosomal protein L3	209	rplC
50S ribosomal protein L4	201	rplD
50S ribosomal protein L5	179	rplE
50S ribosomal protein L6	177	rplF
50S ribosomal protein L10	165	rplJ
50S ribosomal protein L7/L12	121	rplL
50S ribosomal protein L13	142	rplM
50S ribosomal protein L14	123	rplN
50S ribosomal protein L15	144	rplO
50S ribosomal protein L16	136	rplP
50S ribosomal protein L17	127	rplQ
50S ribosomal protein L18	117	rplR
50S ribosomal protein L19	115	rplS
50S ribosomal protein L20	118	rplT
50S ribosomal protein L21	103	rplU
50S ribosomal protein L22	110	rplV
50S ribosomal protein L23	100	rplW
50S ribosomal protein L24	104	rplX
50S ribosomal protein L25	94	rplY
50S ribosomal protein L27	85	rpmA
50S ribosomal protein L28	78	rpmB
50S ribosomal protein L29	63	rpmC
50S ribosomal protein L30	59	rpmD
50S ribosomal protein L31	70	rpmE
50S ribosomal protein L32	57	rpmF
50S ribosomal protein L33	55	rpmG
50S ribosomal protein L34	46	rpmH
50S ribosomal protein L35	65	rpmI
30S ribosomal protein S1	557	rpsA
30S ribosomal protein S2	241	rpsB
30S ribosomal protein S3	233	rpsC
30S ribosomal protein S4	206	rpsD
30S ribosomal protein S5	167	rpsE
30S ribosomal protein S6	131	rpsF
30S ribosomal protein S7	179	rpsG
30S ribosomal protein S8	130	rpsH
30S ribosomal protein S9	130	rpsI
30S ribosomal protein S10	103	rpsJ
30S ribosomal protein S11	129	rpsK
30S ribosomal protein S12	124	rpsL
30S ribosomal protein S13	118	rpsM
30S ribosomal protein S14	101	rpsN
30S ribosomal protein S15	89	rpsO
30S ribosomal protein S16	82	rpsP
30S ribosomal protein S17	84	rpsQ
30S ribosomal protein S18	75	rpsR
30S ribosomal protein S19	92	rpsS
30S ribosomal protein S20	87	rpsT
30S ribosomal protein S21	71	rpsU

も利用が広がっている (Faguy & Doolittle, 1998; Gupta, et al., 1998; Yee, et al., 2007; Piehofer, et al., 2008). しかし、多型が大きいためアノテーションが終了したデータには5末端、3末端の配列の信頼性が低いデータが多数蓄積されている。そのため遠い分類群との比較では精度が低い。現状では近縁種の解析に威力を発揮するので同一属の菌種の分類の評価に特に有用である。

全ゲノム情報から細菌の種の分類に有効な遺伝子情報の構築を目指した。指標に使用した Family *Enterobacteriaceae* には50属230菌種が分類されており、高度ヒト病原体、植物・動物病原体等、幅広い分野

の微生物学に影響を与える属・菌種が含まれている。本研究では細菌学では歴史的に最も古くから利用され、最新のゲノム情報も多く蓄積されている Genus *Escherichia*, Genus *Salmonella* に対して、この両属に近縁である Genus *Citrobacter* の菌種に着目し、全ゲノム配列を決定し、種の分類、属の分類に有効な情報を解析対象とした。また、これらの菌種と16S rRNAによる系統が最も遠い Genus *Yersinia* を選択し、Family *Enterobacteriaceae* としての科の分類体系の妥当性を検証した。全ゲノム情報から Family *Enterobacteriaceae* の菌種が共通に保有している2000種類の遺伝子を一次比較の対象に選択し、さらに不安定で株による欠損がある遺伝子、糖類の代謝遺伝子等を除外し、最終的に400種類の遺伝子を最終比較対象遺伝子として選択した。これらの遺伝子にはリボソームタンパク、DNA/RNAの複製・修飾、リボソームでのゲノムの翻訳・タンパク合成に参与する51個のリボソームタンパク、膜へのタンパクの輸送に参与するシャペロン分子、細胞壁の合成に参与する遺伝子群、tRNA合成遺伝子群が集約されていた。これらの遺伝子の多型を解析し、16S rRNAによる Family *Enterobacteriaceae* の菌種、属の分類体系の妥当性を検証した。その結果51種類のリボソームタンパクによる系統樹が高いブートストラップ値で属の分類に有効であり、種の識別にはHKGから選択した22種類の多型タンパク質のアミノ酸の比較が16S rRNAによる識別法より高い識別能力を示していた。C22HKGによるアミノ酸の系統樹を作成すると高いブートストラップ値で属を形成する菌種がまとまった (Fig. 4)。

属に保存されている配列の解析と Family *Enterobacteriaceae* の属間の比較

次に Family 内の属の分類体系に有用な情報を収集するため同属内の菌種に共通に保存されている配列を検索した。その中でリボソームタンパク質のアミノ酸配列が同一属内の菌種に共通なSAPが多数あり、属レベルでの分類体系の再構築に有効な情報が集約されていた。代表的な Family *Enterobacteriaceae* の属をC51RPによる系統樹を作成し16S rRNAの系統樹と比較した。

C51RPを使った系統樹では Family *Enterobacteriaceae* の菌種は3つの大きなグループに分かれた (Fig. 5)。 *E. coli* に最も近縁の菌群として *Salmonella-Citrobacter-Enterobacter* の一部と、 *Yersinia-Serratia-Providencia-Pectobacterium* の2番目のグループ、さらに *E. coli* から *Serratia* に近いとされていた細胞内寄生菌からなるグループの3つに分断された。このデータを使いC51RPとC22HKGで作成した系統樹ではいずれも Genus *Citrobacter* の菌種は二分された (Fig. 6および Fig. 7)。

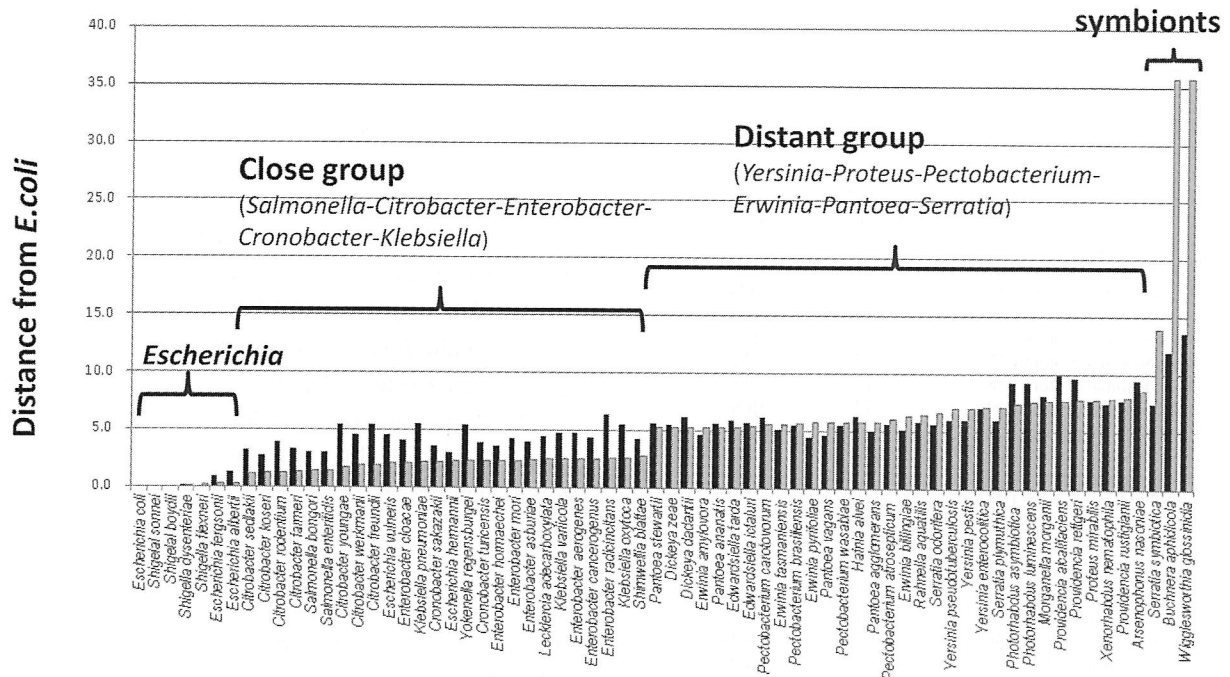


Fig. 3 Distance of members of family *Enterobacteriaceae* from *E. coli* calculated with 16S rRNA (black) and C51RP (gray). 16S rRNA values are more variable than C51RP among closely related *Salmonella*-*Citrobacter*-*Enterobacter* group. Symbionts classified in family *Enterobacteriaceae* have higher C51RP values than the 16S rRNA. Strains used in this figure are type strains except symbionts (*Serratia symbiotica* strain Cinara, *Buchnera aphidicola* strain Ua, and *Wigglesworthia glossinidia* endosymbiont)

Family *Enterobacteriaceae* 内で保存されている配列の解析

16S rRNA 配列を使った比較では各分類階級の違いを DNA 配列が何%違うと科や目が違うかと推測するしかなかった。リボソームタンパク質のアミノ酸配列が異なることは細菌が持つタンパク質の機能に影響を与える。タンパク翻訳装置を構成する 16S rRNA 配列と 51個のリボソームタンパク質を一つのセットとして上位系統を比較することにより、異なった翻訳装置をもった細菌の間で遺伝子の翻訳効率をどれだけ共有できるかを定量的に議論できるようになると推測される。

Family *Enterobacteriaceae* 内で 16S rRNA 配列と C22HKG を使って *E. coli* と *Y. pestis* の distance を計算すると 16S rRNA では 6% 未満, C22HKG では 34% と distance が大きく (Fig. 8), C22HKG は属レベルの鑑別にも有効な配列多型を含んでいた。

分類階級に生物学的な意味を持たせるための属レベル, あるいは科レベルで保存されているアミノ酸配列の多型はあらたな展望が開くと推測した。その代表的な RpsU タンパク配列は Family *Enterobacteriaceae* の菌種で 100% 保存されており, 近縁属間では 16SrRNA より保存されていた。しかし, Family *Enterobacteriaceae* から遠い属になると, この関係は逆転し, RpsU タンパク

配列の distance は大きくなり, *Proteobacteria* 内での多型は 60% に達した (Fig. 9)。

Genus *Escherichia*, Genus *Salmonella*, 及び Genus *Citrobacter* の種の再分類

従来 *Escherichia coli* に分類されていた *E. hermannii*, *E. vulneris* は 16S rRNA による系統でも Genus *Escherichia* の種から遠く, *E. hermannii* は Genus *Cronobacter* に最も近く, *E. vulneris* は Genus *Enterobacter*-*Klebsiella* グループの類縁であった。リボソームタンパクによる系統樹でも Genus *Escherichia* から離れており高いブートストラップ値で, Genus *Cronobacter* に近縁な位置に分類された。*E. vulneris*, および *E. hermannii* には新しい属を提案する計画でいる。

Genus *Citrobacter* の菌種は 16S rRNA による分類で 2つの系統にわかれていた。基準種 *C. freundii* を含むグループは Genus *Escherichia* と Genus *Yersinia* の外に位置し, 鼠の病原体として重要な *C. rodentium* を含む第二のグループは Genus *Escherichia* と Genus *Salmonella* の間に位置していた。この結果は C51RP および C15HKG による系統樹でも高いブートストラップ値で支持するデータが得られた。*C. rodentium* を含む第二のグループは新属として独立させる提案を準備している。

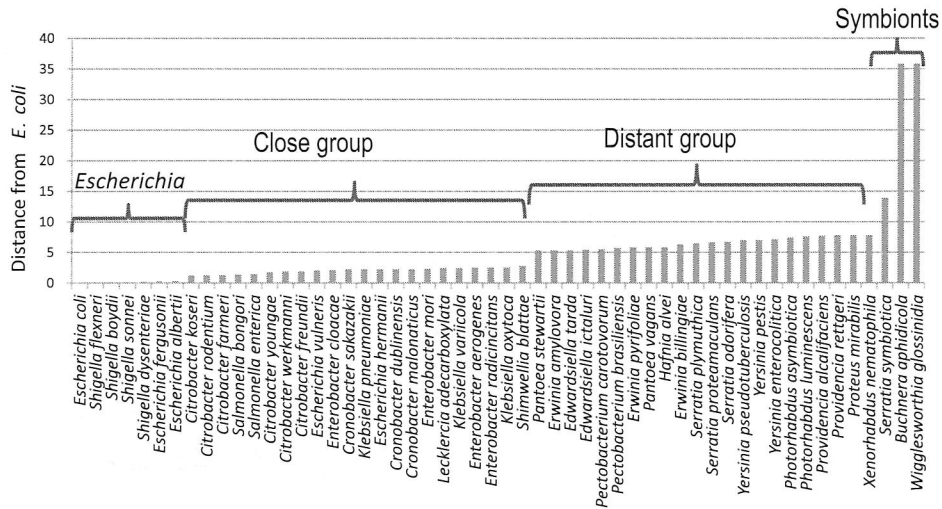


Fig. 4a Distance of members of family *Enterobacteriaceae* from *E. coli* calculated by concatenated 51 ribosomal proteins (C51RP). Members of family *Enterobacteriaceae* were separated into 3 groups. Distance values of symbionts from *E. coli* are more than 35%. Strains used in this figure are type strains as in Fig.3.

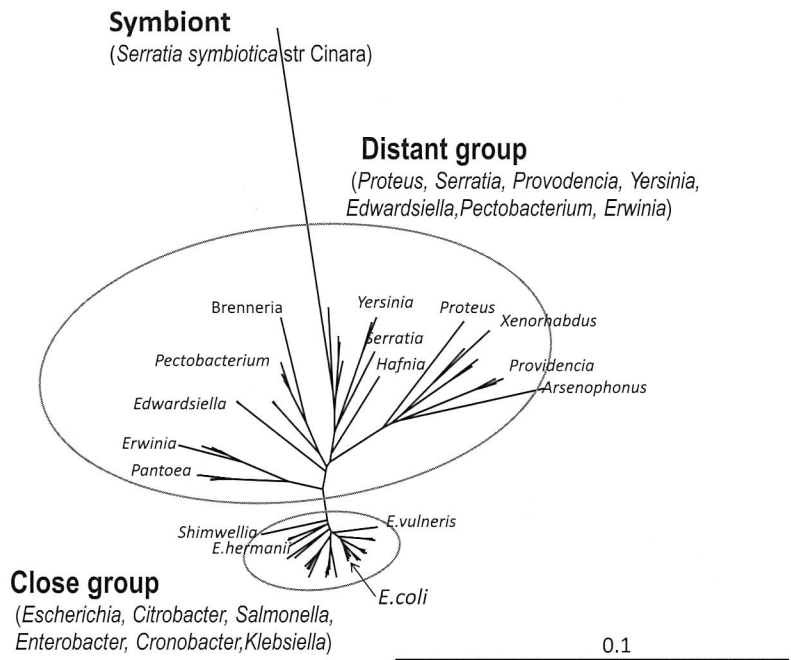


Fig. 4b Phylogenetic tree of family *Enterobacteriaceae* with same data set of Fig. 4a. Endosymbionts of Fig. 4a (*Buchnera*, and *Wigglesworthia*), were omitted from this Fig. 4b, because these species were too far from *E. coli*.

考 察

16S rRNAによる系統分類法ではFamily *Enterobacteriaceae* の近縁種の系統図は従来から低いブート

ストラップ値による系統樹しか書けなかった。それに対して51個のリボソームタンパク配列 (C51RP) は同一属の菌種の菌株間で保存された配列、属を構成する菌種に共通な配列の双方を保有していた。そのためC51RPのアミノ酸による系統樹は高いブートストラップ値で安定した系統樹が作成できた。このことから、

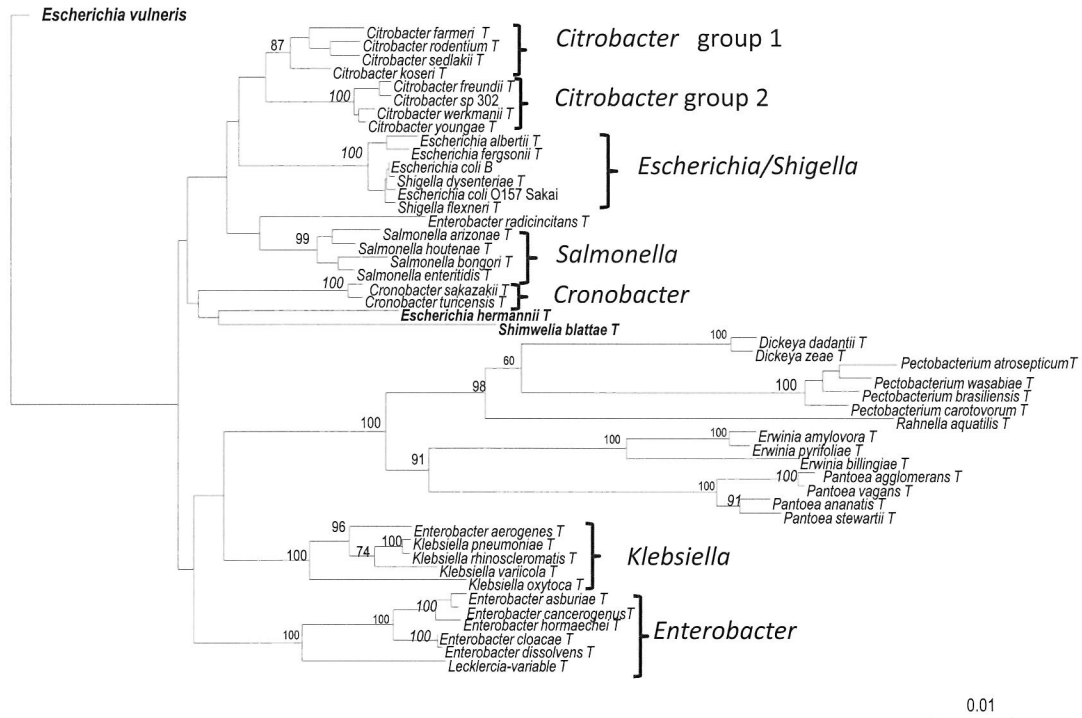


Fig. 5 Concatenated 22 variable HKG (C22HKG). *Citrobacter*, *Escherichia*, and *Salmonella* made clades with high boot strap values. *E. hermannii* and *E. vulneris* were distant from these clades.

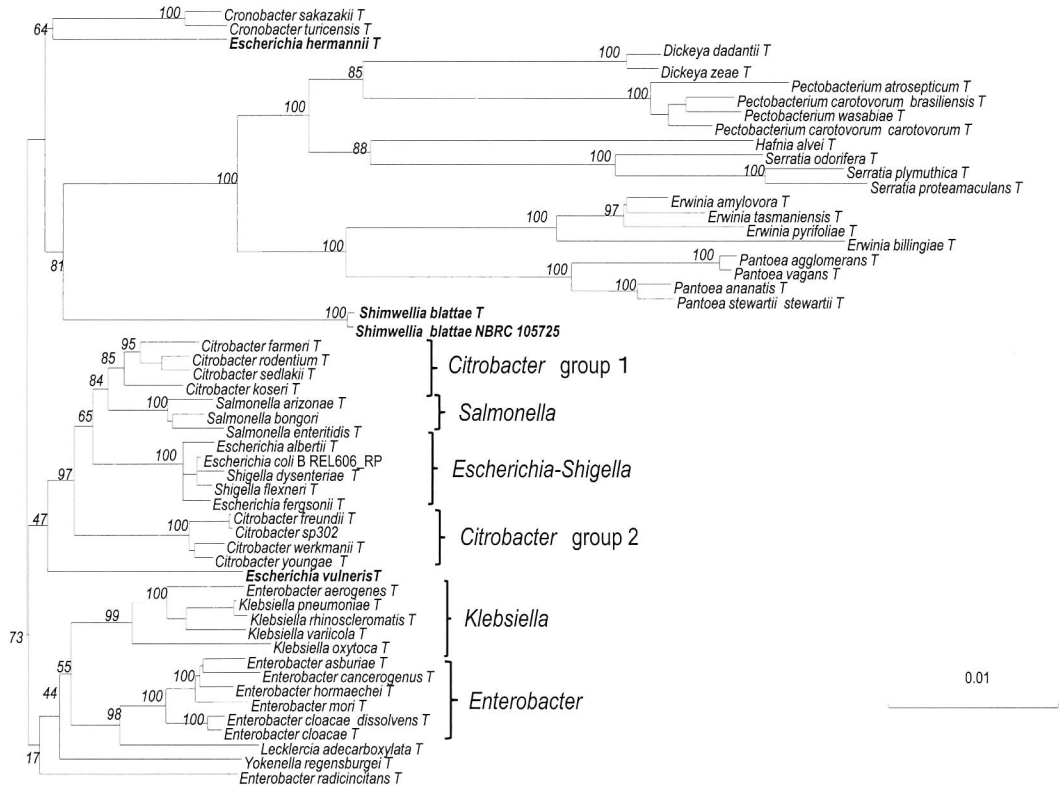


Fig. 6 Concatenated 51 ribosomal proteins (C51RP tree). *Citrobacter*, *Escherichia*, and *Salmonella* made clades with high boot strap values. *E. hermannii* and *E. vulneris* were distant from these clades.

全ゲノム遺伝子情報を使った細菌の菌種の新しい定義の構築

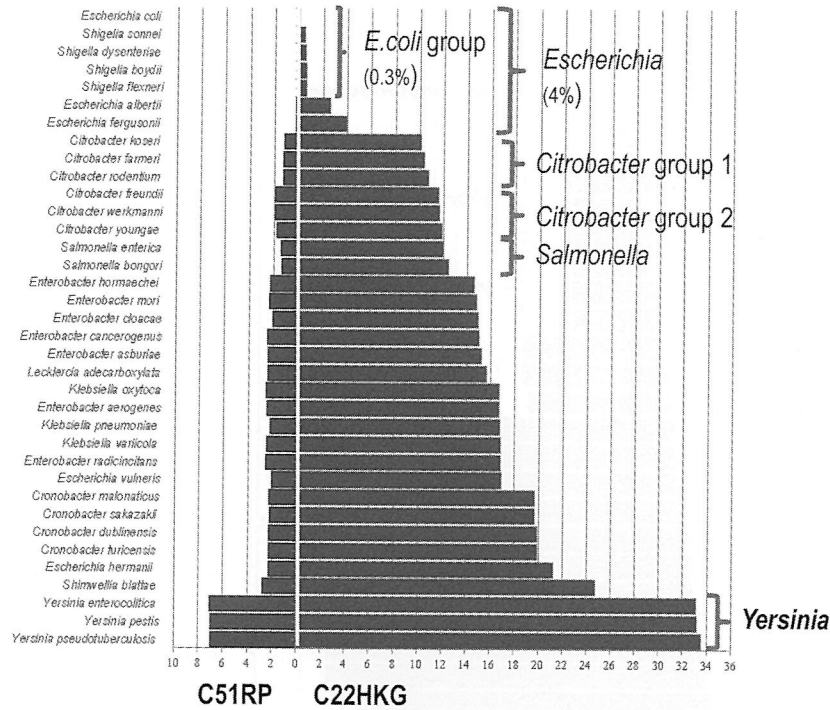


Fig. 7 Distance of members of family *Enterobacteriaceae* calculated by C51RP and C22HKG. Two groups of concatenated proteins were compared. All strains used in this Fig. 7 were type strains.

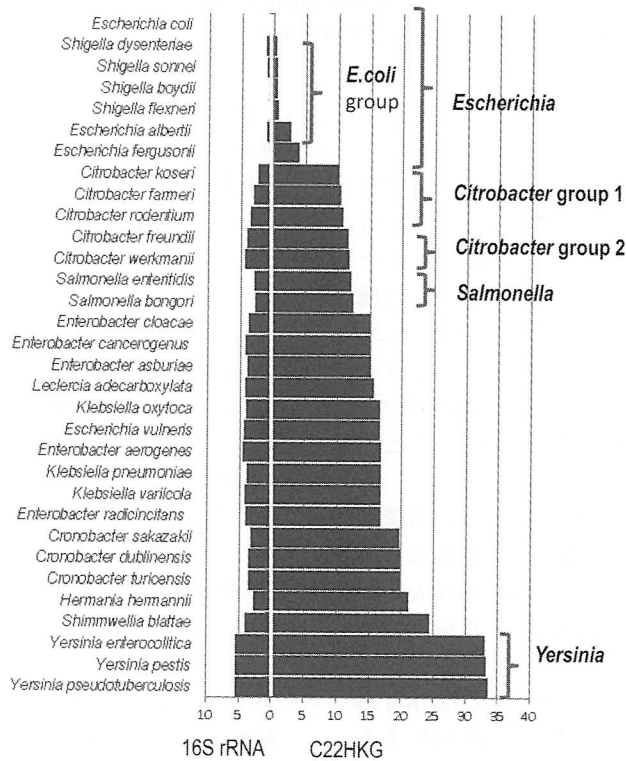


Fig. 8 Distance of members of family *Enterobacteriaceae* from *E. coli* calculated with both 16S rRNA and C22HKG. To differentiate members of the family *Enterobacteriaceae*, C22HKG was more informative than 16S rRNA. All strains used in this Fig. 8 were type strains.

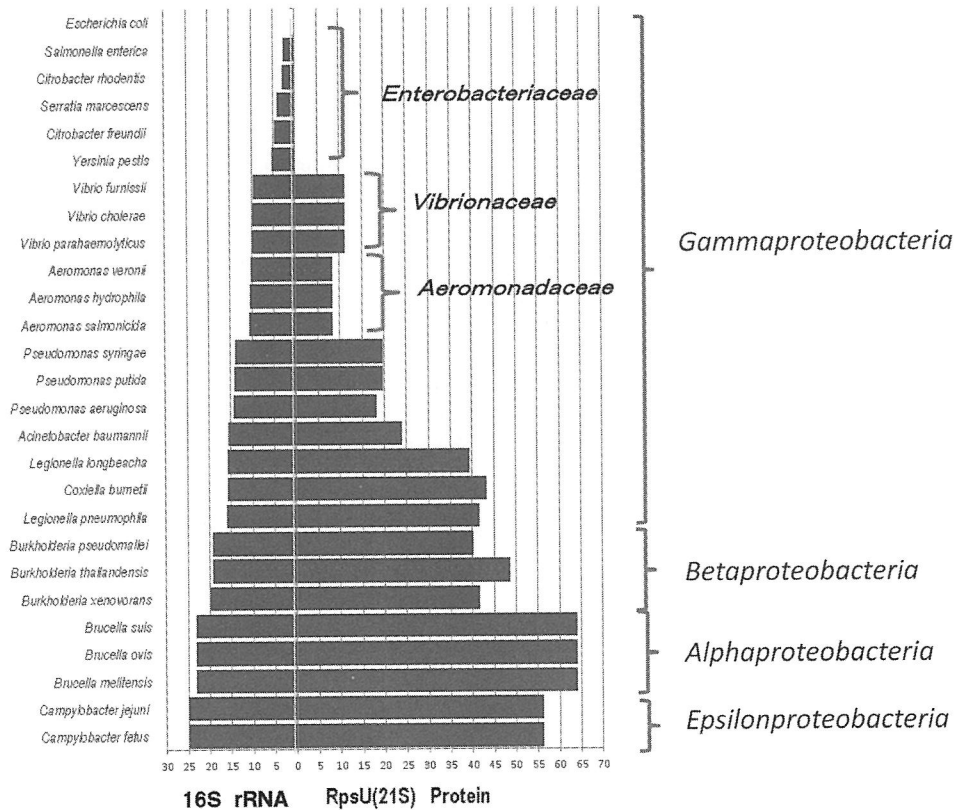


Fig. 9 Distance of proteobacteria from *E. coli*, calculated by RpsU and 16S rRNA. RpsU protein sequence was conserved among members of family *Enterobacteriaceae*. All strains used in this Fig. 9 were type strains.

C51RP は属を形成する菌種の種類に有効な情報を含んでいると結論した。

一方、種の種類に有効な遺伝子として Family *Enterobacteriaceae* の菌種が共通に保有している 300 遺伝子を選択し、その中から多型の大きい遺伝子 22 個を選択し、アミノ酸レベルで系統樹を作成した。この 22 種類の HKG を結合したアミノ酸系統樹 (C22HKG) は、16S rRNA による菌種の比較より、高いブートストラップ値で近縁種を識別した。このことから近縁菌種の種類識別には C22HKG のアミノ酸比較が有効であると結論した。

同じ解析を Family *Enterobacteriaceae* 以外の系統の菌種で実施してみると、多型の大きさは分類群によって大きく異なっていた。*Betaproteobacteria*, *Firmicutes*, および *Actinobacteria* で全ゲノムが決定され菌種では属内、あるいは科内のすべての菌種のゲノムが決定された分類群はほとんどないため、現状では C22HKG および C51RP の多型が何%の違いがあれば、独立種、あるいは同一属の菌種といった定量的な判断はできない。良く解析された Family *Enterobacteriaceae* でもまだ 50% 近い菌種の全ゲノム配列は決定されていない。

C51RP の構成リボソームタンパクの配列はゲノム解析が完了したほぼすべての菌種でデータが見つかるので比較が容易であった。しかし C15HKG の構成タンパクは多型が大きく、科内の菌種の比較でもアラインメント後の distance が 50% を越える場合がある。このことはアラインメントが不正確になり科を越して C15HKG の構成タンパクを比較することは困難になることを意味する。選択した C15HKG の構成タンパク質のゲノム情報は他の *Proteobacteria*, *Firmicutes* および *Actinobacteria* では多型が 50% 以上ある場合がほとんどで、配列情報の信頼性が低いため “Function unknown” として処理され、公共データベースには遺伝子名が特定されていないことが多い (データ未掲載)。従って科をこえた C22HKG の情報は遺伝子の 5 末端と 3 末端が正確に決定されているものだけを集積し、信頼性の高いデータセットで解析をスタートし、類縁菌種の解析を広げていく地道な分析の積み重ねが必要になってくる。Family *Enterobacteriaceae* で 100% 配列が保存されていた RpsU は類縁の Family *Vibrionaceae* の菌種では SAP が見られる。このような属を超えて、時には科を超えて広く保存されたタンパク質の配列情報が蓄積すれば 16S

rRNA とともに科以上の分類階級の構築に有効な情報となる。

要 約

全ゲノム情報から細菌の種の分類に有効な遺伝子情報の構築を目指した。指標に使用した Family *Enterobacteriaceae* には50属 230 菌種が分類されており高度人病原体, 植物・動物病原体等, 幅広い分野の微生物学に影響を与える属・菌種が含まれている。本研究では細菌学では歴史的に最も古くから利用され, 最新のゲノム情報も多く蓄積されている Genus *Escherichia*, Genus *Salmonella* に対して, この両属に近縁である Genus *Citrobacter* の菌種に着目し, 全ゲノム配列を決定し, 種の分類, 属の分類に有効な情報を解析対象とした。また, これらの菌種と 16S rRNA による系統が最も遠い Genus *Yersinia* を選択し, Family *Enterobacteriaceae* としての科の分類体系の妥当性を検証した。全ゲノム情報から Family *Enterobacteriaceae* の菌種が共通に保有している2000種類の遺伝子を一次比較の対象に選択し, さらに不安定で株による欠損がある遺伝子, 糖類の代謝遺伝子等を除外し, 最終的に400種類の遺伝子を最終比較対象遺伝子として選択した。これらの遺伝子にはリボソームタンパク, DNA/RNA の複製・修飾, リボソームでのゲノムの翻訳・タンパク合成に関与する51個のリボソームタンパク, 膜へのタンパクの輸送に関与するシャペロン分子, 細胞壁の合成に関与する遺伝子群, tRNA 合成遺伝子群が集約されていた。これらの遺伝子の多型を解析し, 16S rRNA による Family *Enterobacteriaceae* の菌種, 属の分類体系の妥当性を検証した。その結果51種類のリボソームタンパクによる系統樹が高いブートストラップ値で属の分類に有効であり, 種の識別には HKG から選択した22種類の多型タンパク質のアミノ酸の比較が 16S rRNA による識別法より高い識別能力を示していた。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) Ezaki, T. (2011). Survival strategy of *Salmonella enterica* serovar. Typhi during human infection. The first Harbin international symposium on Salmonella and other enteric bacteria: Genomes and Biology, Harbin, China, May. 16.
- 2) Ezaki, T. (2011). Quick respiratory panel assay for screening of bacterial and viral pneumonia; IUMS. Sapporo, Japan. Sep. 6.
- 3) Ezaki, T. (2011). Shall we spin out classical taxonomy of high risk pathogens even after complete genome era? IUMS 2011. Sapporo, Japan, Sep. 9.
- 4) 江崎孝行 (2011). 微生物検査法の新しい潮流. 多項目スクリーニング検査法の最近の世界の潮流と技術的進歩. Tokyo International Symposium of Clinical Microbiology, Tokyo, Sep. 11.
- 5) Ezaki, T. (2011). Screening of environmental human, animal and plant pathogens in soil and water. International Conference on Environmental OMICS, Guangzhou, Guangdong Province, China. Nov. 9.
- 6) Ezaki, T. (2011). Shuffling classification of genus *Escherichia* and *Shigella* for better identification of *E. coli* and *Shigella* spp. after complete genome era. US-Japan Cooperative Medical Science. Cholera & Other Bacterial Enteric Infections Program. Kolkata, India, Dec. 14.
- 7) 江崎孝行 (2012). MALDI-TOF-MAS を使った GTC 株の病原因子保有株の品質保証へ向けた取り組み, 第19回, 日本微生物資源学会総会, かずさ, June. 28.
- 8) Ezaki, T. (2012). Reconstruction of taxonomy of family *Enterobacteriaceae* after genome wide analysis of house keeping genes. 第35回, 日本分子生物学会年会, 博多, Dec.13.
- 9) Ezaki, T., Hayashi, M., Mizuno, T., Yoshida, S., Natori, T., Kanazawa, I., Zhang, J., & Ohkusu, K. (2013). DNA chromatography for rapid screening BSL 3 pathogens BioDefense Conference Washington DC, USA, Feb. 27.

論文原著・総説

- 1) Hung, P. A., Zhang, J., Hayashi, M., Yoshida, S., Ohkusu, K. & Ezaki, T. (2011). Genetic relatedness and identification of clinical strains of genus *Campylobacter* based on *dnaJ*, 16S rDNA, *groEL* and *rpoB* gene sequences. Microbiol. Cult. Coll. **27**: 1-12.
- 2) Zhang, J., Hung, P. A., Hayashi, M., Yoshida, S., Ohkusu, K. & Ezaki, T. (2011). DnaJ sequences of *Bacillus cereus* strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar to *Bacillus anthracis*. Diag. Microbiol. Infect. Dis. **70**: 307-315.
- 3) Yamada, Y., Ohkusu, K., Yanagihara, M., Tsuneoka, H., Ezaki, T., Tsuboi, J., Okabayashi, H. & Suwabe, A. (2011). Prosthetic valve endocarditis caused by *Bartonella quintana* in a patient during immunosuppressive therapies for collagen vascular diseases. Diag. Microbiol. Infect. Dis. **70**: 395-398.
- 4) Saito, H., Iwamoto, T., Ohkusu, K., Otsuka, Y., Akiyama, Y., Sato, S., Taguchi, O., Sueyasu, Y., Kawabe, Y., Fujimoto, H., Ezaki, T. & Butler, R. (2011). *Mycobacterium shinjukuense* sp. nov.; a slowly growing, nonchromogenic species isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **61**: 1927-1932.
- 5) 江崎孝行 (2012). 生物の分類と新しい分類体系; 原核生物の系統分類と細菌及びアーキア (1) 生物の科学 遺伝; **66**: 220-226.
- 6) 江崎孝 (2012). 生物の分類と新しい分類体系; 原核生物の系統分類と細菌及びアーキア (2) 生物の科学 遺伝; **66**: 340-347.
- 7) Hayashi, M., Hayashi, S. K., Natori, T., Mizuno, T., Miyata, M., Yoshida, S., Zhang, J., Kawamoto, K., Ohkusu, K., Makino, S. & Ezaki, T. (2013). Use of blood-

free enrichment broth in the development of a rapid protocol to detect *Campylobacter* in twenty-five grams of chicken meat. *Int. J. Food Microbiol.* **163**: 41–46.

本研究で決定されたドラフトゲノム決定株 (NBRP 公開株)

Citrobacter freundii GTC 09479, isolate from human clinical specimen

Citrobacter farmeri GTC 01319^T

Citrobacter werkmanii GTC 14913^T

Citrobacter rodentium GTC 14911^T

Citrobacter amalonaticus GTC 14882^T

Citrobacter braakii GTC 14884^T

Citrobacter diversus GTC 14886^T

Citrobacter koseri GTC 14908^T

Citrobacter sedlakii GTC 14912^T

Escherichia albertii GTC 14781^T

Escherichia vulneris GTC 10613^T

Escherichia hermannii GTC 10612^T

Leclercia adecarboxylata (旧名 *Escherichia adecarboxylata*) GTC 01267^T

Shimwellia blattae (旧名 *Escherichia blattae*) GTC 0778^T

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の大型研究助成金の支援により実施された。

文 献

- Faguy, D. M. & Doolittle, W. F. (1998). Cytoskeletal proteins: the evolution of cell division. *Curr. Biol.* **8**: R338–341.
- Gupta, R. S. (1998). Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1435–1491.
- Han, J. H., Cho, M. H. & Kim, S. B. (2012). Ribosomal and protein coding gene based multigene phylogeny on the family *Streptomycetaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* **35**: 1–6.
- Konstantinidis, K. T. & Tiedje, J. M. (2005a). Toward a genome-based taxonomy for Prokaryotes. *J. Bacteriol.* **18**: 6258–6264.
- Konstantinidis, T. & Tiede, J. M. (2005b). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 2567–2572.
- Lan, R. & Reeves, P. R. (2001). When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on Population genetics. *Trend in Microbiol.* **9**: 419–424.
- Martini, M., Lee, I. M., Bottner, K. D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N. A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A. J. & Osler, R. (2007). Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmata. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2037–2051.
- Pilhofer, M., Rappl, K., Eckl, C., Bauer, A. P., Ludwig, W., Schleifer, K. H. & Petroni, G. (2008). Characterization and evolution of cell division and cell wall synthesis genes in the bacterial phyla *Verrucomicrobia*, *Lentisphaerae*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes* and phylogenetic comparison with rRNA genes. *J. Bacteriol.* **190**: 3192–3202.
- Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., Ludwig, W., Glöckner, F. O. & Rosselló-Móra, R. (2008). The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst. Appl. Microbiol.* **31**: 241–250.
- Yee, B., Lafi, F. F., Oakley, B., Staley, J. T. & Fuerst, J. A. (2007). A canonical FtsZ protein in *Verrucomicrobium spinosum*, a member of the Bacterial phylum *Verrucomicrobia* that also includes tubulin-producing *Prostheco bacter* species. *BMC Evol. Biol.* **7**: 37.
- Zhang, V. H., Hayashi, M., Yoshida, S., Ohkusu, K. & Ezaki, T. (2011). DnaJ sequences of *Bacillus cereus* strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar to *Bacillus anthracis*. *Diag. Microbiol. Inf. Dis.* **70**: 307–315.

複合系培養法による抗生物質生合成遺伝子の発現誘導

尾 仲 宏 康

富山県立大学工学部生物工学科
〒939-0362 富山県射水市黒河5180

Inducible expression of antibiotic biosynthetic gene clusters by combined culture

Hiroyasu Onaka

Department of Biotechnology, Toyama Prefectural University
5180 Kurokawa, Imizu, Toyama 9390398

To date, various methods have been used to induce “silent” or “cryptic” gene clusters of the secondary metabolite biosynthesis in microorganism genomes. The combined culture method is one of co-culture method to activate such silent gene clusters. When mycolic acid-containing bacteria (MACB) were co-cultured with *Streptomyces*, MACB induced secondary metabolisms in *Streptomyces*, and the profiles of secondary metabolites changed. We used this finding to develop a new co-culture method called the “Combined culture” and discovered new antibiotics, Alchivemycins from *Streptomyces endus* S-522. Here, we will show “combined induction” method, that is, the combined culture method applied to develop a heterologous expression host to increase the production of antibiotics.

Streptomyces lividans is known to be a conditional producer of 2 types of red pigments, actinorhodins and undecylprodigiosins. We observed that *S. lividans* produces these 2 red pigments in the combined culture with *Tsukamurella pulmonis*, *Rhodococcus erythropolis*, or *Corynebacterium glutamicum*. This result indicates that the secondary metabolism of *S. lividans* is stimulated by MACB. We then transformed the biosynthetic gene clusters of staurosporine from *Streptomyces* sp. TP-A0274, rebeccamycin from *Lechevarielia aerocolonigenes*, and goadsporin from *Streptomyces* sp. TP-A0584 into *S. lividans* to construct heterologous expression strains, and the combined culture method was performed using with these heterologous strains and MACB. In the combined induction, the heterologous strains increased the production of each metabolite by 4.1 to 23.8-fold more than that observed for the pure cultures.

“Combined induction” in this study implied that *S. lividans* responds to the MACB-stimulated signal, and the signal is transmitted in the cell and activates the heterologous secondary metabolism as well as the endogenous secondary metabolism. We believe that the combined induction method will be a useful technology in isolating new secondary metabolites and improving the productivity.

Key words: combined culture, antibiotic biosynthesis, actinomycetes, gene recombination

緒 言

ゲノム解析技術の長足な進歩により、多数の放線菌

株のドラフトゲノム情報が容易に手に入るようになってきた。その結果、放線菌は1菌株あたり何種類の二次代謝産物を作るのかという長らく不明であった疑問に対する解答も得られることとなった。一例を挙げると *Streptomyces avermitilis* においては実に32種類の二次代謝生合成遺伝子クラスターがゲノム内に確認されている (Ikeda *et al.*, 2003)。つまり放線菌は一株あたり約30種類の二次代謝産物を生産できることが明らかとなった。もっとも、*S. avermitilis* のゲノム内には機能未知の遺伝子が半分程度存在していることを考慮すると、今後、未知の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが同定され追加されるであろうから、その数は更に多くな

E-mail: aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

現所属：東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻
113-8567 東京都文京区弥生 1-1-1

共同研究者：森夕希子 (富山県立大学工学部生物工学科)、伊沢真澄 (富山県立大学工学部生物工学科)、林昌平 (富山県立大学工学部生物工学科)、五十嵐康弘 (富山県立大学工学部生物工学科)、奥直也 (富山県立大学工学部生物工学科)、掛谷秀昭 (京都大学大学院薬学研究科)

と思われる。一方、実際に実験室で *S. avermitilis* の純粋培養を行っても、確認できる二次代謝産物の数はせいぜい5~6種類であり、ゲノム情報から見積もられる数には遠く及ばない。これは、ほとんどの二次代謝産物は純粋培養時には生産していないか、作っていたとしても生産量が少なく、同定するまでには至らないためである。また、この事実はゲノム内に確かに存在しているが実験室のような人工的な培養環境下では発現を確認できない、いわゆる眠っている遺伝子 (cryptic 遺伝子) が数多く存在していることを示している。以上のことから、放線菌の二次代謝能を最大限に生かすためには、これら cryptic 遺伝子を目覚めさせる新しい培養法が求められている。

複合培養法はミコール酸を細胞表層に有する mycolata 菌群と放線菌を同じフラスコ内で培養すると、放線菌の二次代謝が純粋培養時と異なるパターンに変化する現象を利用した抗生物質生産に適した共培養法である (Onaka *et al.*, 2011)。例えば、*Streptomyces lividans* を用いて複合培養を行うと、cryptic 遺伝子であるアクチノロージンとウンデシルプロディギオシンの二種類の赤色色素を作るようになる (Fig. 1)。赤色色素生産を誘導する培養条件を調べていくと、細胞表層にミコール酸を有している菌群であれば、一部の極例外を除いて、ほとんどの菌株が赤色色素生産誘導を行うことが明らかとなった。また、その際にミコール酸を抽出して添加培養したり、ミコール酸含有細菌を110℃ 10分間の高圧滅菌処理で死滅させて添加培養したり、培養液を濾過滅菌して添加培養しても赤色色素生産は誘導されない。間を透析膜やメンブレンフィルターで仕切った二槽式フラスコを用いて、その両槽にそれぞれ *S. lividans* と *Tsukamurella pulmonis* (ミコール酸含有細菌) を植菌して培養をしても赤色色素生産は誘導されない



Fig. 1 Liquid medium without bacteria (left), pure culture of *S. lividans* (center), and combined culture (right). The organisms were grown at 30°C for 3 days in A-3M medium.

(Fig. 2)。以上のことから、赤色色素生産誘導においては、ミコール酸を細胞表層に有する細菌を生きた状態で直接接触させることが必要であることが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、放線菌の二次代謝の活性化のためにミコール酸含有細菌と放線菌を共培養する培養法を筆者らは「複合培養」と命名している。

複合培養法は様々な放線菌の二次代謝パターンを変化させることが明らかになっている。これまでに112株の放線菌について *T. pulmonis* と複合培養を行い、その培養抽出液の HPLC プロファイルを純粋培養の培養抽出液と比較した結果、99株、実に88パーセントにおいて二次代謝産物のパターンに変化が見られ、変化がなかったものはたったの13株であった。その内訳は41株 (39%) においては純粋培養では見られなかった新たな二次代謝産物のピークが観察され、87株 (78%) においては二次代謝産物の増加もしくは減少が見られた。また、12株 (11%) においては純粋培養で観察されたピークが消失した (Fig. 3)。これらの結果は、複合培養がほとんどの放線菌の二次代謝活性化において有効であることを示している。そこで、筆者らは複合培養産物を用いて抗生物質スクリーニングを行った。97株の自然環境下より分離した放線菌を *T. pulmonis* と複合培養を行い、その培養抽出物を用いて抗菌活性を測定したところ、*Streptomyces endus* S522 の培養抽出液が *Micrococcus luteus* に対して特異的に作用することが明らかとなった。精製分離した結果、新規構造を持つ抗生物質・アルキベマイシンであった (Fig. 4) (Igarashi *et al.*, 2010)。Fig. 5 に *S. endus* と *T. pulmonis* の複合培養時と *S. endus* 純粋

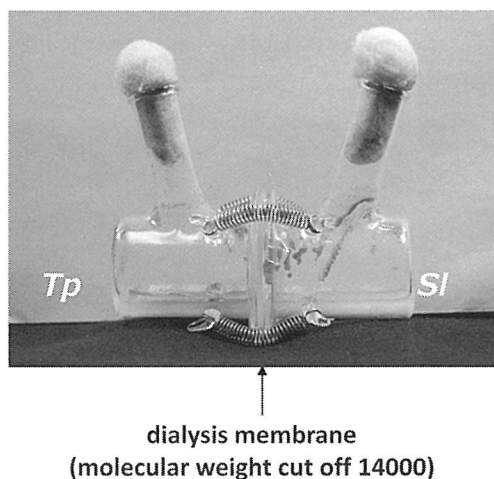


Fig. 2 Combined culture of *T. pulmonis* and *S. lividans* in a dialysis flask. *T. pulmonis* was grown in the left compartment and *S. lividans* in the right compartment at 30°C for 7 days. Red pigments were not detected in the broth.

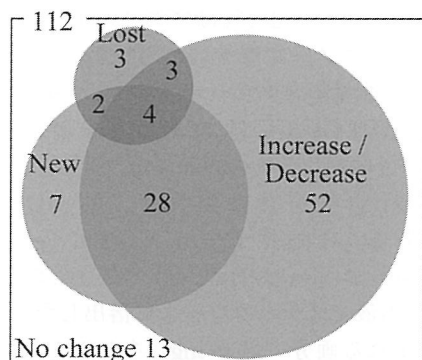


Fig. 3 The results of the comparison between the secondary-metabolite profiles of the pure and combined cultures are shown in a Venn diagram. Comparison between the HPLC profiles of a pure culture of *Streptomyces* and combined cultures.

Each profile was classified according to the increase/decrease in metabolite production, appearance of new metabolites, and disappearance of some secondary metabolites.

培養時の HPLC プロファイルを示す。両者のプロファイルは大きく異なることがわかり、アルキベマイシンのピークは純粋培養時には全く見えなかった。

以上のことから、複合培養は放線菌の二次代謝を活性化させる培養法であることを示すことができた。そこで、本研究では複合培養を更に拡張し、異種発現株においても複合培養法が有効であるかどうかを検討した。近年のゲノム解析技術の進歩によって、難培養性微生物や共生微生物のドラフトゲノム情報も容易に得られるようになってきている。難培養性微生物ゲノム内には既知の二次代謝とは異なる新規二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在している可能性がある。そして、これらの遺伝子を発現させるには異種発現株の構築が主流であるが、単に異種発現株を作製し純粋培養を行っただけでは目的の化合物が生産されない場合も多い。異種発現株においても複合培養が適用できれば、純粋培養以外の選択肢を与えることが期待できる。

実験方法

使用した菌株等

本実験においては *Streptomyces lividans* TK23 を複合誘導における宿主菌株として使用した。また、ミコール酸含有細菌としては *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596, *Rhodococcus erythropolis* JCM 3201, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 を使用した。異種発現に用いたゴールドスポリン生合成遺伝子 (Onaka *et al.*, 2005) は

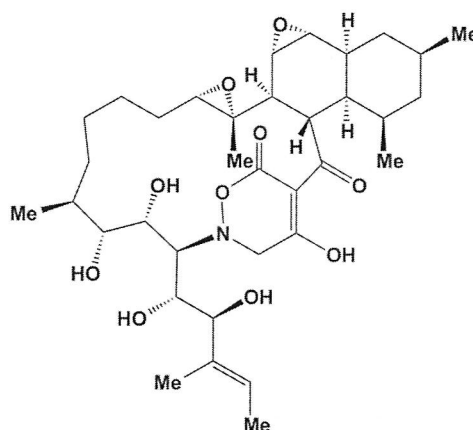


Fig. 4 Chemical structure of alchivemycin A.

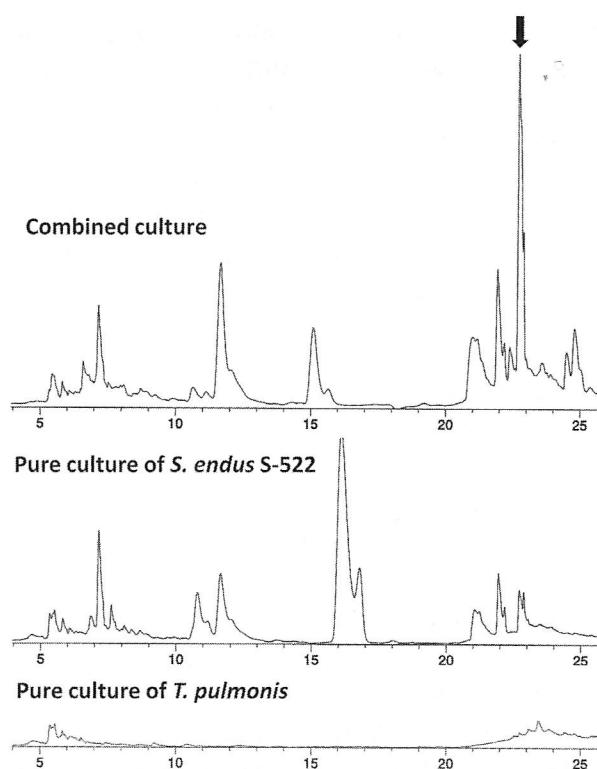


Fig. 5 HPLC profiles of the secondary metabolites produced by S-522 cultured with or without *T. pulmonis*. The arrow shows the peak for alchivemycin A.

Streptomyces sp. TP-A0584 より、スタウロsporin 生合成遺伝子 (Onaka *et al.*, 2002) は *Streptomyces* sp. TP-A0274 より、レベッカマイシン生合成遺伝子 (Onaka *et al.*, 2003b) は *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243 より、ラクタゾール生合成遺伝子は *Streptomyces lactacystinaeus* OM-6519 よりクローニングした。

異種発現株の作製

ゴードスפורリン生合成遺伝子, スタウロスפורリン生合成遺伝子, レベッカマイシン生合成遺伝子の異種発現株作製は著者らの以前の論文 (Onaka *et al.*, 2002; Onaka *et al.*, 2003a; Onaka *et al.*, 2005) に記載してある. ラクタゾール生合成遺伝子は *Streptomyces lactacystinaeus* OM-6519 ゲノムを pKU465 にクローニングしたコスミドライブラリーを北里大学池田治生博士より分与していただいた. *S. lactacystinaeus* OM-6519 ゲノム情報に基づいてオリゴプライマーを合成し, コスミドライブラリーより, ラクタゾール生合成遺伝子クラスターを PCR スクリーニングにより取得した. 得られたコスミドクローンを *S. lividans* TK23 に導入して異種発現株を作製した.

Streptomyces griseus IFO 13350 および *Frankia* sp. Cc13, *Streptomyces* sp. TP-A0584 におけるリボゾーム翻訳型ペプチド系抗生物質生合成遺伝子クラスター異種発現株の構築

Streptomyces griseus IFO 13350 の整列コスミドクローンよりチオペプチド生合成遺伝子と思われる遺伝子クラスター (SGR4408-SGR4421) (Ohnishi *et al.*, 2008) を含むコスミドクローンを日本大学, 上田賢志博士, 高野英晃博士より分与していただいた. 分与していただいたクローンを制限酵素でサブクローニングし, SGR4408-SGR4421 を含むクローンを制限酵素により切断し, pTYM19 にクローニングし, 接合移入により *S. lividans* を形質転換し異種発現株を構築した. *Frankia* sp. Cc13 のゲノム情報よりチオペプチド生合成遺伝子群が見つかったため, その領域を pTYM19 にクローニングして, *S. lividans* に導入して異種発現株を作製した. *Streptomyces* sp. TP-A0584 のドラフトゲノム情報より, ランチビオティックと相同性の高い遺伝子配列が発見されたので, その部分を染色体 DNA より PCR を用いて増幅し, pTYM19gt の *godA* プロモーター下流に連結して異種発現ベクターを構築し, *S. lividans* に形質転換して異種発現株を作製した.

S. lactacystinaeus 由来 cryptic チオペプチド生合成遺伝子産物によって生合成されるチオペプチド・ラクタゾールの単離精製

培養液 3L を等量のメタノールで 3 回抽出し, エバポレーターによって得られた抽出メタノール層のメタノールを蒸発させて水層を得る. この水層を 60% メタノールとジメチルメタンによって分液する. 60% メタノールに目的の化合物が分液されたので, この画分のメタノールをエバポレーターで蒸発させ, 等量のブタノールでさら

に分液した. 目的の化合物はブタノール層に存在していたので, ブタノール層を乾固し 1.6 g の固形物を得た. 固形物を少量のメタノールに溶かし, Sephadex LH-20 にて MeOH-CH₂Cl₂ (1:1) の溶液を用いて分画し HPLC にて目的の化合物の画分 0.2 g を同定した. 続いて目的の化合物を含む画分を逆相 ODS カラム (cosmosil 75C₁₈-PREP, 75 μm, Nakalai Teaque Inc., Kyoto Japan) に MeCN/H₂O (2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 v/v) の溶液でステップワイズに溶出した. 目的の化合物の含まれる画分 (約 49 mg) を分取 HPLC カラム cosmosil 5PE-MS (10 x 250 mm, 5 μm 4 mL min⁻¹ detection at 254 nm) を用いて 25% から 50% CH₃CN-0.1% HCOOH バッファーにて分取し, lactazole A (6.7 mg), B (2.7 mg), C (0.7 mg) を得た.

結 果

ゴードスפורリン, スタウロスפורリン, レベッカマイシン異種発現株の複合培養による生産量増加

Streptomyces lividans に異種放線菌由来の二次代謝生合成遺伝子クラスターを導入し, 異種発現株を構築し, これら異種発現株に対して複合培養を行うことによって, 異種放線菌由来二次代謝産物の生産が増大するかどうかを検討した. 異種発現に用いた二次代謝生合成遺伝子群は *Streptomyces* sp. TP-A0584 由来ゴードスפורリン生合成遺伝子群, *Streptomyces* sp. TP-A0274 由来スタウロスפורリン生合成遺伝子群, *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243 由来レベッカマイシン生合成遺伝子群を用いた. それぞれの生合成遺伝子群を染色体組み込み型ベクター pTYM19 にクローニングし, *S. lividans* 染色体上に組み込ませることによって異種発現株を作製した. 次に, これらの株とミコール酸含有細菌である *T. pulmonis*, *R. erythropolis*, *C. glutamicum* とを複合培養して, 培養液をブタノール抽出し, エバポレーターで乾固した後, DMSO に溶解して, HPLC にて生産量の測定を行った. ゴードスפורリン (Igarashi *et al.*, 2001; Onaka *et al.*, 2001) について経時変化を測定した結果を Fig. 6 に示す. *T. pulmonis* および *R. erythropolis* との複合培養は純粋培養に比べ生産量が増大した. 培養 170 時間において, 純粋培養の生産量が 30.5 mg/L であるのに対して *T. pulmonis* との複合培養においては 155.0 mg/L となり, 約 5.1 倍の生産量の増大が見られた. 同じような結果は *R. erythropolis* との複合培養でも見られ, 生産量が 126 mg/L となり純粋培養に比べ 4.5 倍の生産量を示した. しかし, *C. glutamicum* との複合培養では生産量の増大は見られず生産曲線は純粋培養

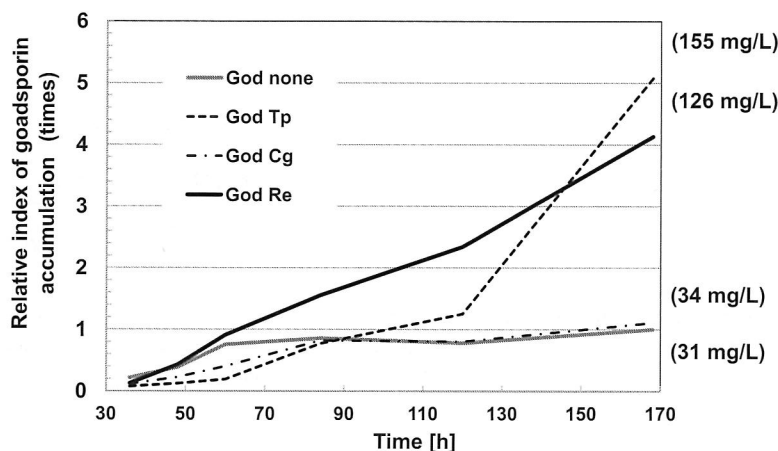


Fig. 6 Heterologous production of goadsporin in *S. lividans* between the pure culture and the combined culture. God, goadsporin biosynthetic gene cluster containing *S. lividans* (heterologous goadsporin producer); Tp, combined culture with *Tsukamurella pulmonis*; Cg, *Corynebacterium glutamicum*; Re, *Rhodococcus erythropolis*.

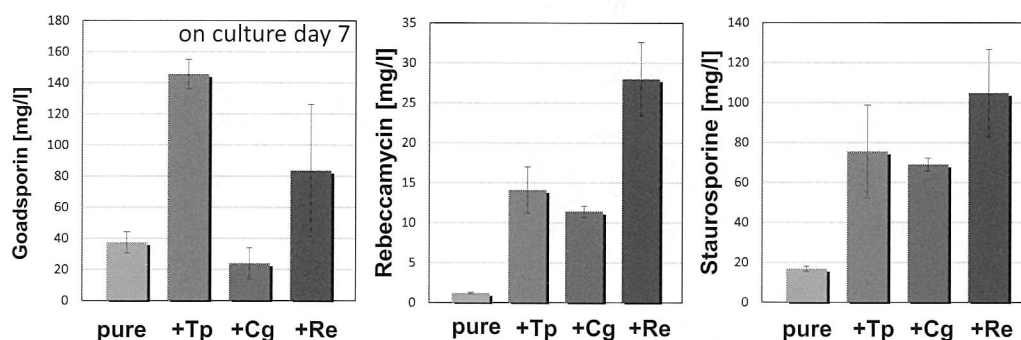


Fig. 7 Combined culture increases the heterologous production of *S. lividans* hosts.

とほぼ同じであった。

次にスタウロスポリン、レベッカマイシンの二つの異種発現株についての培養7日目の生産量のグラフをFig. 7に示す。レベッカマイシンは *Lechevarielia* 属の生産するインドロカルバズール化合物であり、純粋培養によっても生産は確認できるが、その生産量は少なく1.2 mg/Lであったが、3種のコルニク酸含有細菌と複合培養を行った結果、*T. pulmonis* において11.9倍、*C. glutamicum* において9.85倍、*R. erythropolis* において23.8倍に生産量が増大した。また、スタウロスポリン生産においては純粋培養において16.8 mg/Lであったのに対して複合培養では *T. pulmonis* において4.6倍、*C. glutamicum* において4.1倍、*R. erythropolis* において6.4倍に生産量が増大した。

以上のことから異種発現株においても複合培養を行うことにより生産量が増大することが明らかとなった。筆者らは複合培養によって異種発現の生産を誘導させることを「複合誘導」と呼称することにした。

リボゾーム翻訳型ペプチド系抗生物質をコードする **cryptic** 生合成遺伝子群の複合誘導

ゲノム解読により cryptic な遺伝子の異種発現による生産が報告されていないチオペプチド化合物に着目した。ラクタシスチン生産菌 *Streptomyces lactacystinaeus*、ストレプトマイシン生産菌 *Streptomyces griseus*、ゴードスポリン生産菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 及び *Frankia* sp. CcI3 のゲノムマイニングにより cryptic なチオペプチド生合成遺伝子群および TP-A0584 からランチビオチックス生合成遺伝子群を発見した。それぞれのコスミドライブラリーより遺伝子群を pTYM19 にクローニングし、*S. lividans* に導入した結果、*S. lactacystinaeus* の遺伝子クラスター形質転換株において新規チオペプチドの生産が確認された (Fig. 8)。他の三株由来の形質転換株では、チオペプチドおよびランチビオチックスの生産は認められなかった。それぞれの株について、複合誘導を行った結果、生産は認められなかった。また、*S. lactacystinaeus* 由来の cryptic チオペプチドに

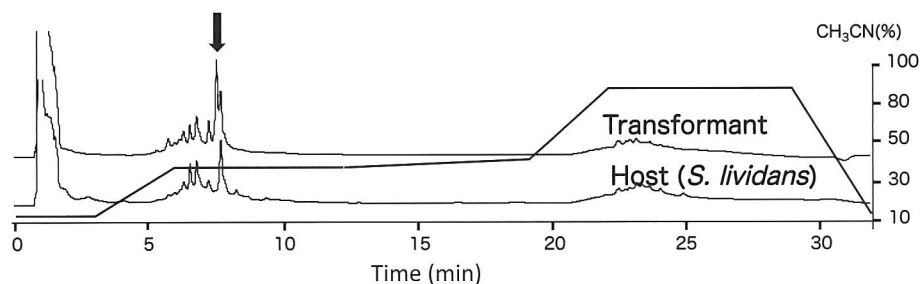


Fig. 8 HPLC profiles of the heterologous expression strain containing a cryptic thiopeptide biosynthetic gene cluster derived from *Streptomyces lactacystinaeus*. The arrow indicates the corresponding peaks to the unidentified thiopeptide compound.

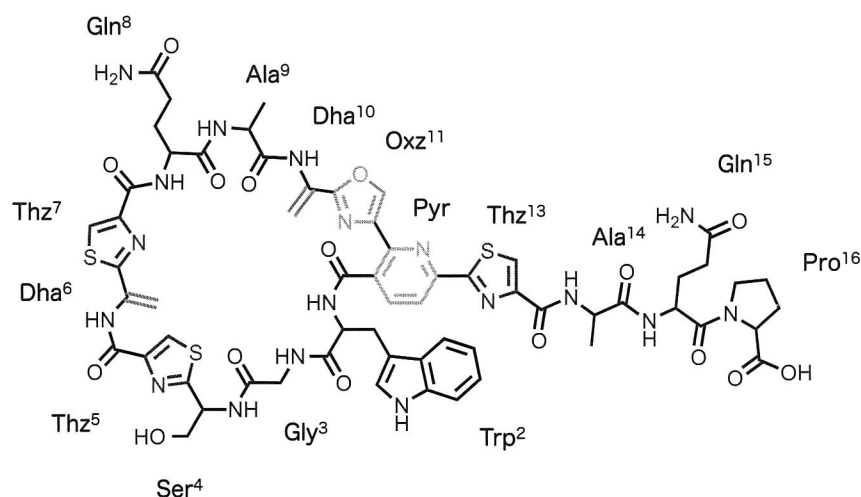


Fig. 9 The chemical structure of lactazole A.

においても生産量の増加が見られなかった。

S. lactacystinaeus 由来 cryptic チオペプチド生合成遺伝子産物によって生合成されるチオペプチド・ラクタゾールの単離精製

S. lactacystinaeus のチオペプチド生合成遺伝子クラスターで形質転換した *S. lividans* 株 3L を培養し、等量のメタノール、60%メタノールとジメチルメタンの二段階の溶媒分液を行い、得られた抽出画分をゲル濾過、逆相カラムにて分画した。最後に HPLC を用いて 3 つのチオペプチド化合物を精製した。これらのうち、もっとも量の多かった 6.7 mg のサンプルについて、NMR および MS を用いて構造決定を行った結果、化学式 $C_{61}H_{64}N_{18}O_{16}S_3$ 、分子量 1400.383 の新規構造を持つチオペプチドであった。ラクタゾール A と命名した本化合物は、これまでに知られているチオペプチドでは報告例のない 11 残基からなる大員環を持ち、内部配列にトリプトファンやグルタミンを含む特徴を有していた (Fig. 9)。

複合培養を用いた抗生物質スクリーニングによる *Streptomyces* sp. HEK616 由来 5-alkyl-THQ の発見

筆者らは石川県能登半島の北約 50 km の日本海上に浮かぶ舳倉島 (石川県輪島市) にて約 1,000 株の放線菌分離を行っている。これらの放線菌において、純粋培養と *T. pulmonis* との複合培養との培養抽出物ライブラリーを作製し、これを用いて分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の生体膜脂質に機能変調をきたす活性を指標にしたスクリーニングを行った結果、*Streptomyces* sp. HEK616 の複合培養液中に活性を見出した。興味深いことに、*Streptomyces* sp. HEK616 の純粋培養液中には本活性は見出されなかったため、本活性物質は *T. pulmonis* との複合培養によって発現する cryptic な二次代謝産物であることが明らかとなった。Fig. 10 に複合培養と純粋培養時の HPLC プロファイルおよび Fig. 11 に構造決定した化合物の構造を示す。本化合物について構造決定した結果、5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline であることが明らかとなった。本化合物は複合培養液中にのみ見出され、純粋培養液中には全く見出されな

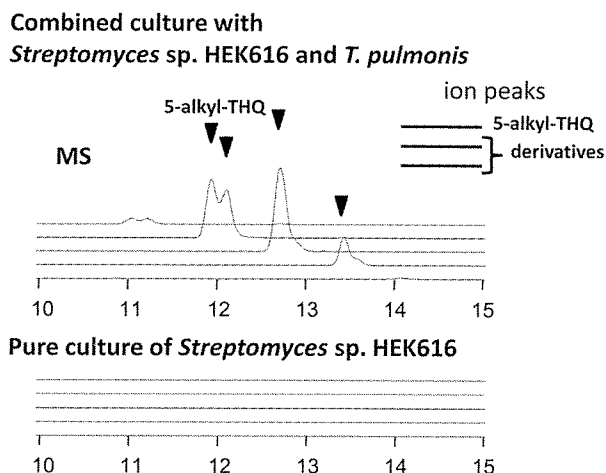


Fig. 10 LC-MS profiles in the combined culture with *Streptomyces* sp. HEK616 and *T. pulmonis* (upper), and pure culture of HEK616 (bottom).

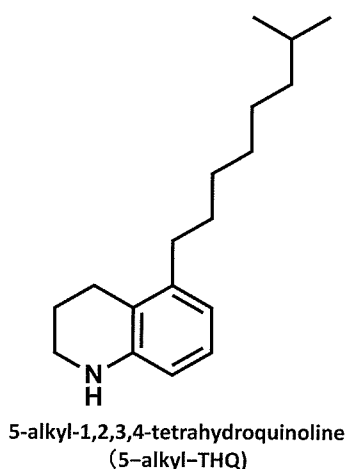


Fig. 11 The chemical structure of 5-alkyl-THQ.

かった。

また、本化合物はテトラヒドロキノリンにアルキル鎖が付加した比較的単純な構造からなるが、天然から発見された例はこれまで報告されていないことから、その生合成経路の解明には興味を持たれる。

考 察

ゲノム解析技術の進展により、ゲノム内にその生合成遺伝子が確かに存在している未発見二次代謝産物の存在がクローズアップされている。本研究は、これら未発見二次代謝産物をいかに効率よく発見するかに焦点を当てた研究である。筆者らの開発した複合培養法は

多くの放線菌の内在性二次代謝を活性化することが、本研究を含めたこれまでの研究によって明らかにされているが、外因性、つまり異種発現された生合成遺伝子については活性化できるかどうか不明であった。本研究において3種類の外因性二次代謝についても活性化されることが初めて明らかになった。本研究で異種発現させた二次代謝産物はゴドスポリン、ラクタゾール、スタウロスポリン、レベッカマイシンの4種であり、これらについてはラクタゾールを除き、いずれも複合誘導によって生産量の増大が見られた。そのうちゴドスポリンとラクタゾールは RiPPs (Ribosomally-synthesized and Post-translationally-modified Peptide, リボソームにより合成され翻訳後修飾を受けるペプチド化合物群) (Arnison *et al.*, 2013) に属する化合物群であり、その生合成機構はリボソーム翻訳系によって構造遺伝子が翻訳されて基質が合成されるなどの点が類似している。しかしながら、両者の遺伝子発現機構については異なっている。これはゴドスポリン生合成遺伝子クラスター内には *godR* と呼ばれる経路特異的な転写活性化因子が存在するのに対して、ラクタゾール生合成遺伝子クラスターは構造遺伝子と翻訳後修飾酵素遺伝子が同じ方向にタンデムに並んだシンプルな構造を取っており、転写活性化因子などの発現制御に関する遺伝子が一切存在していないためである。現時点ではどのようにして両生合成遺伝子クラスターの転写活性化が複合培養によってなされるのかは不明であるが、両遺伝子クラスターの発現制御機構が異なる点は、複合誘導による遺伝子発現活性化機構を考える上で重要な知見である。また、スタウロスポリンとレベッカマイシンはインドロカルバゾール化合物に分類される二次代謝産物である。両者の遺伝子発現機構についても詳細は不明であるが、両者には経路特異的な転写制御因子が存在している。特に *Lechevarielia* 属由来のレベッカマイシンの生産量が複合誘導によって20倍以上に生産量が増大したことは特筆すべき点である。このことは複合培養によって異属放線菌の二次代謝も活性化できることを示しており、複合培養が放線菌に広く対応できる培養法であることを裏付ける結果の一つである。以上の結果を踏まえると、異種発現株を使った二次代謝生産においても複合培養によって生産量の増加がおけると結論できる。

本研究においては cryptic な生合成遺伝子が複合誘導時にのみ発現する結果は得られなかったが、*S. lactacystinaeus* 由来の cryptic な RiPPs であるラクタゾールの生産においては異種発現により初めて構造の同定が可能となった。残念ながら複合誘導による生産量増大は叶わなかったが、上述したように生合成遺伝子クラ

スターの構造が一つのプロモーターによって制御される簡単な構造を有しているため、今後は複合誘導によって誘導のかかるプロモーターに交換するなどして生産量の増大が可能であると考えている。

複合培養によってのみ生産される *Streptomyces* sp. HEK616 由来 5-alkyl-THQ を新たに発見することができた。複合培養によってのみ生産が確認できた新規二次代謝産物はアルキベマイシンに続いて二例目であり、複合培養法の有用性を確認する結果となった。両化合物は純粋培養による培養液中には全く活性が見出されず、複合培養を行うことによって初めて発現する抗生物質である。この結果は、これまで人類によって分離された多数の放線菌について、純粋培養では特に有用な化合物を生産していないと見捨てられた株においても、再度複合培養を行うことによって見落としていた生理活性物質が発見できる可能性を示している。複合培養によってのみ活性化される二次代謝生成遺伝子クラスターがどのような遺伝子構造を持つものであるかを明らかにすることは重要であり、そのためには両者の生成遺伝子クラスターが複合培養時にどのように活性化されるかを分子生物学的手法を用いて明らかにすれば、手がかりが得られるであろう。

本研究によって、他者の刺激を介した二次代謝活性化機構を取り入れた、「複合培養」、「複合誘導」という新しい共培養系の概念が構築できた。どのような遺伝子構造を有する生成遺伝子クラスターに対して複合誘導が有効であるかが明らかになれば、今後更に天然資源へのアクセスが多様化し、これまで未発見だった新たな天然物資源の発見へとつながるだろう。

要 約

複合培養法は、ミコール酸を細胞表層に有する mycolata 菌群と放線菌を同じフラスコ内で培養すると、放線菌の二次代謝が純粋培養時と異なるパターンに変化する現象を利用した培養法であり、二次代謝生産に適した共培養法である。本研究では、異種発現と複合培養を組み合わせた複合誘導法を考案し、複数の二次代謝生成遺伝子を用いて異種発現遺伝子の効率的な発現に関して検証した。*Streptomyces lividans* に異種放線菌由来の二次代謝生成遺伝子を導入して異種発現株を作製し、これら異種発現株に対して複合培養を行うことによって、異種放線菌由来二次代謝産物の生産が増大するかどうかを検討した。異種発現に用いた二次代謝生成遺伝子群は *Streptomyces* sp. TP-A0584 由来ゴードスポリン生成遺伝子群、*Streptomyces* sp.

TP-A0274 由来スタウロスポリン生成遺伝子群、*Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243 由来レベッカマイシン生成遺伝子群、*Streptomyces lactacystinaeus* 由来の未同定 cryptic チオペプチド生成遺伝子群である。上記異種発現株 4 株を複合培養したところ、*S. lactacystinaeus* 由来を除く 3 種の化合物においては生産量が 4.1~23.8 倍程度増大した。以上のことから二次代謝生成遺伝子群異種発現株を複合培養して発現量を増大させる「複合誘導」法は有効であることを示した。さらに *S. lividans* 染色体に *Streptomyces lactacystinaeus* 由来の cryptic なチオペプチド生成遺伝子群を組み込み異種生産を行ったところ、未知のチオペプチドを 4 mg/l 生産することが確認されたため、構造決定をし、新規チオペプチド化合物ラクタゾール A を発見した。また、*Streptomyces griseus*, *Streptomyces* sp. TP-A0584 及び *Frankia* sp. CcI3 ゲノム内に cryptic チオペプチドを見出し、異種発現系を構築し複合誘導を試みたが、化合物の同定までは至らなかった。

本助成で得られた研究成果の報告

1. 特許出願 尾仲宏康, 二次代謝産物のスクリーニング方法, その製造方法, 及びその培養物 特願 2011-158843
2. 特許出願 掛谷秀昭, 西村慎一, 杉山龍介, 尾仲宏康, 新規抗真菌剤 特願 2012-170361
3. Onaka, H. "Combined culture, a new co-culture method for natural product screening", ICNPB 2012, 8th U.S.-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products, Jun. 19, 2012, Awaji island
4. 江畑一真, 富宿賢一, 浅野泰久, 五十嵐康弘, 尾仲宏康, 「放線菌由来ランチビオティック合成酵素の *in vitro* 反応解析」, 日本農芸化学会中部支部第 166 回例会, 福井, 2012年11月2日
5. 林昌平, 池田治生, 大村智, 奥直也, 五十嵐康弘, 尾仲宏康 「*Streptomyces lactacystinaeus* OM-6519 のリボソーム合成型新規チオペプチド lactazole A の生成遺伝子の解析」, 日本農芸化学会中部支部第 166 回例会, 福井, 2012年11月2日
6. 林昌平, 池田治生, 大村智, 奥直也, 五十嵐康弘, 尾仲宏康 「*Streptomyces lactacystinaeus* OM-6519 のリボソーム合成型新規チオペプチド lactazole A の生成遺伝子の同定」, 2012年度日本放線菌学会大会, 府中, 2012年9月6日
7. 江畑一真, 富宿賢一, 浅野泰久, 奥直也, 五十嵐康弘, 尾仲宏康, 「*Streptomyces* sp. TP-A0584 由来ランチビオティック合成酵素によるランチオン含有ペプチドの生産」, 2012年度日本放線菌学会大会, 府中, 2012年9月6日
8. 林昌平, 池田治生, 大村智, 奥直也, 五十嵐康弘, 尾仲宏康 「*Streptomyces lactacystinaeus* OM-6519⁺からの新規リボソーム合成型チオペプチドの同定と生成機能の解明」, 第4回北陸合同バイオシンポジウム, 黒部, 2011年11月11日
9. 江畑一真, 森夕希子, 奥直也, 五十嵐康弘, 尾仲宏康, 「複

合培養を用いた外来二次代謝産物の異種発現」, 第4回北陸合同バイオシンポジウム, 黒部, 2011年11月11日

10. Hayashi, S., Onaka, H., Oku, N., and Igarashi, Y., "Elucidation of biosynthesis gene cluster for ribosomal peptide in *Streptomyces lactacystinaeus* OM-6519", 16th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology, Sep. 14, 2011, Toyama

保存機関に寄託した菌株

Streptomyces sp. HEK616 · NITE AP-1395

謝 辞

本研究を行うにあたり, 研究助成をいただいた公益財団法人発酵研究所に深く感謝致します。

文 献

- Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J., Cotter, P.D., Craik, D.J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P.C., Entian, K.D., Fischbach, M.A., Garavelli, J.S., Goransson, U., Gruber, C.W., Haft, D.H., Hemscheidt, T.K., Hertweck, C., Hill, C., Horswill, A.R., Jaspars, M., Kelly, W.L., Klinman, J.P., Kuipers, O.P., Link, A.J., Liu, W., Marahiel, M.A., Mitchell, D.A., Moll, G.N., Moore, B.S., Muller, R., Nair, S.K., Nes, I.F., Norris, G.E., Olivera, B.M., Onaka, H., Patchett, M.L., Piel, J., Reaney, M.J., Rebuffat, S., Ross, R.P., Sahl, H.G., Schmidt, E.W., Selsted, M.E., Severinov, K., Shen, B., Sivonen, K., Smith, L., Stein, T., Sussmuth, R.D., Tagg, J.R., Tang, G.L., Truman, A.W., Vederas, J.C., Walsh, C.T., Walton, J.D., Wenzel, S.C., Willey, J.M. & van der Donk, W.A. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* **30**: 108-160.
- Igarashi, Y., Kan, Y., Fujii, K., Fujita, T., Harada, K., Naoki, H., Tabata, H., Onaka, H. & Furumai, T. (2001). Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. II. Structure determination. *J. Antibiot. (Tokyo)* **54**: 1045-1053.
- Igarashi, Y., Kim, Y., In, Y., Ishida, T., Kan, Y., Fujita, T., Iwashita, T., Tabata, H., Onaka, H. & Furumai, T. (2010). Alchivemycin A, a bioactive polycyclic polyketide with an unprecedented skeleton from *Streptomyces* sp. *Org. Lett.* **12**: 3402-3405.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. & Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**: 526-531.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. & Horinouchi, S. (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* **190**: 4050-4060.
- Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y. & Furumai, T. (2011). Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 400-406.
- Onaka, H., Nakaho, M., Hayashi, K., Igarashi, Y. & Furumai, T. (2005). Cloning and characterization of the goadsporin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584. *Microbiology* **151**: 3923-3933.
- Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y. & Furumai, T. (2001). Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **54**: 1036-1044.
- Onaka, H., Taniguchi, S., Igarashi, Y. & Furumai, T. (2002). Cloning of the staurosporine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0274 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*. *J. Antibiot. (Tokyo)* **55**: 1063-1071.
- Onaka, H., Taniguchi, S., Igarashi, Y. & Furumai, T. (2003a). Characterization of the biosynthetic gene cluster of rebeccamycin from *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 127-138.
- Onaka, H., Taniguchi, S., Ikeda, H., Igarashi, Y. & Furumai, T. (2003b). pTOYAMAcos, pTYM18, and pTYM19, actinomycete-*Escherichia coli* integrating vectors for heterologous gene expression. *J. Antibiot. (Tokyo)* **56**: 950-956.

増えずに生き続ける代謝戦略 —地球炭素循環の鍵をにぎる微生物新機能—

堀 知行

独立行政法人 産業技術総合研究所 環境管理技術研究部門
〒305-8569 茨城県つくば市小野川 16-1 つくば西

Microbial metabolic strategy for surviving under extreme energy limitation —The key function of microbes involved in the carbon and energy fluxes on earth—

Tomoyuki Hori

Research Institute for Environmental Management Technology,
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
16-1, Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japan

Iron is the fourth abundant element on earth and is distributed as forms of the Fe(II) and Fe(III) minerals not only on the earth's surface but also in the deep seafloor. The microbes involved in the reduction of crystalline Fe(III) oxides play important roles in the carbon and energy fluxes on earth. At first, we constructed the enrichment cultures with crystalline iron oxides as the electron acceptor, and thereafter characterized the microbial community structures by a combination of T-RFLP, deep sequencing, and clone library analyses based on the 16S rRNA gene. The novel bacteria affiliated in the class of *Deltaproteobacteria* were dominant in the enrichment cultures. Secondly, we isolated the novel iron(III)-reducing bacteria by subculturing the first enrichment cultures to soluble Fe(III) media. These microbial isolates grew slowly and had the distinct abilities to reduce crystalline iron oxides.

Key words: extreme energy limitation, crystalline iron(III) oxides, iron(III)-reducing bacteria, isolation, microbial community analysis

緒 言

嫌気環境における有機物分解は異なる代謝機能を持つ複数の微生物の共生関係により成立する (Conrad, 1996). 高次有機化合物は可溶化細菌と発酵性細菌により低級脂肪酸やアルコールに分解され, その後のプロピオン酸やエタノールなどの酸化は, 生じる還元力 (電子や H_2) が速やかに除去される条件下で進む. これらの分解の結果生じる酢酸や H_2/CO_2 は, 最終的にメタン生成菌や嫌気呼吸菌により分解される. 一方で, 物質酸化によって生じる還元力は, 熱力学の法則に従い, 酸化還元電位の高い電子受容体の還元反応から利用される (Zehnder & Stumm, 1988). これまでに純粋分離菌株を

用いて競合や共生等の微生物の関係性が解析され, 電子受容体の還元で得られるエネルギーの大きい微生物ほど電子供与体に対する親和性が高いことが分かっている (Kostsyurbenko *et al.*, 2001). しかしながら, 土壌のような自然環境では様々な還元反応が時空間的に並行して起こることがしばしば観察されてきた (Achtnich *et al.*, 1995; Chidthaisong & Conrad, 2000).

CO_2 を無機電子受容体とする最終還元反応「メタン生成」の約 70% は, 酢酸を起源にされると言われる (Rothfuss & Conrad, 1993). $[2-^{14}C]$ -酢酸の土壌トレーサー試験によって, メタン生成以外の嫌気呼吸が酢酸分解に関わっていることが示唆されていたが, その反応を担う微生物は全くの未知であった (Chidthaisong *et al.*, 1999). 私たちは, 安定同位体の取り込みを追跡することで未培養微生物の「系統」と「機能」を直接結びつける Stable Isotope Probing (SIP) を用いて, メタン生成条件下で結晶性酸化鉄の存在依存的に ^{13}C -酢酸を取り込む新規

な鉄還元微生物群を同定した (Hori *et al.*, 2010). これらの新規微生物は、絶対嫌気土壌において低速度ながらも結晶性酸化鉄を還元することにより、酢酸をめぐりメタン生成菌と基質競合する。地球上における嫌気土壌圏の広がりや鉄の膨大な存在量 (地球第4位の構成元素であること) を考えると、メタン生成の裏側で微かに起こる「結晶性酸化鉄の還元」は、マイナーな微生物代謝反応であったとしてもその総和は大きく、地球炭素・エネルギー循環に重要な役割を担っていることが強く示唆される。土壌圏には、オキシ水酸化物 (Goethite, Akaganeite, Lepidocrocite, Ferroxhyte) や酸化物 (Hematite, Ferrihydrite, Magnetite, Maghemite) などの様々な結晶性酸化鉄が存在する (Schwertmann & Cornell, 1991). これらの酸化鉄は結晶構造の違いにより安定性が異なることが知られているものの、そのほとんどが微生物による還元を受けるか否かについては明確な解が得られていない。

我々が SIP 法でその存在を見出した「結晶性酸化鉄を利用する微生物」は、極めて増殖の遅いことが予想される。例えば、Goethite を ^{13}C -酢酸とともに土壌に添加した場合、鉄を添加しない対照系と比べメタン生成量がそれ程変わらないものの (約9%減少するのみで)、鉄還元微生物による ^{13}C -酢酸の取り込みが検出される (Hori *et al.*, 2010). これは、メタン生成が第一の最終電子受容プロセスとして機能しているにも関わらず、僅かな炭素画分 (還元当量) を鉄還元菌がエネルギー源として利用していることを示す。メタン生成菌も一般的に増殖が極めて遅いとされる (エネルギー順位の低い基質を利用し緩やかに生育する) 微生物の一種であるが、それにも増して、結晶性酸化鉄を還元する微生物は過酷な貧栄養条件下 (エネルギー制限下) で生き延びている状況が垣間見える。近年、地下深部において多種多様な微生物が膨大なバイオマス量で存在し、地質学的時間スケールで有機物分解 (発酵的代謝等) を行っていることが明らかになってきた (Lipp *et al.*, 2008; Morono *et al.*, 2011). しかしながら、嫌気分解過程で必ず経由する中間代謝産物「酢酸」の分解様式は今のところ分かっていない。地殻中にも結晶性酸化鉄は豊富に存在するため、酢酸を還元力とする「結晶性酸化鉄の還元」が地下生命圏を支える最終電子受容プロセスとして働いている可能性もある。地球炭素循環を紐解く上で、結晶性酸化鉄を還元する微生物の「貧栄養条件下で生き続ける」という代謝戦略が重要な鍵を握っているかもしれない。

結晶性酸化鉄を還元する微生物およびその代謝戦略の解明に向けて大きな障壁になっているのは、当該微生物の代表的な分離菌株が得られていないことであ

る。溶解性 Fe(III) 培地を用いる通常の鉄還元菌培養法では、増殖の速い微生物が優占化してしまうため、低速度ながら酸化鉄還元を行う微生物の取得は難しい。そこで我々は、標的とする結晶性酸化鉄還元菌を効率的に取得すべく「選択的二段培養法」を考案した。本手法では、まず初めに、結晶性酸化鉄と酢酸を基質とする栄養源を極度に制限した培地を用い長期間集積培養を行うことで、標的菌以外の菌を死滅させる。結晶性酸化鉄を還元する微生物は、増殖が遅くとも貧栄養条件下で生き続けられるため、培養系内の相対存在量は増加する。次に、得られた集積系を栄養リッチな溶解性 Fe(III) 培地に植え継ぐ二代目培養を行うことで、標的菌の増殖を一気に促進させ純粋菌株としての分離を試みる。本研究では、選択二段培養法と分子生態学的手法を用いて「結晶性酸化鉄を還元する微生物」を網羅的に同定・分離培養し、生理学的に特徴づけることを目的とした。

実験方法

結晶性酸化鉄による微生物集積培養

微生物接種源として、水田土壌 (北海道, 岡山, イタリア), 森林土壌 (北海道), 湿地土壌 (北海道), 用水路底泥 (北海道), 海底コアを用いた。鉄還元菌を培養する基礎培地は、改変型 Widdel 培地および *Geobacter* 培地 (DSMZ 579) を用いた。それぞれの組成は以下の通りである。改変型 Widdel 培地 (per liter) : NH_4Cl , 0.535 g; KH_2PO_4 , 0.136 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.204 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.147 g; NaHCO_3 , 2.52 g; Widdel trace element solution (下記参照), 1 ml; Widdel vitamin solution (下記参照), 2 ml. Widdel trace element solution (per liter) : FeCl_2 , 1.27 g; CoCl_2 , 0.13 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.198 g; ZnCl_2 , 0.136 g; H_3BO_3 , 0.0062 g; NiCl_2 , 0.013 g; AlCl_3 , 0.0133 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0242 g; Na_2SeO_3 , 0.0017 g; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.0033 g; CuCl_2 , 0.0013 g. Widdel vitamin solution (per liter) : Biotin, 5 mg; *p*-Aminobenzoic acid, 5 mg; Pantothenate, 5 mg; Pyridoxine, 10 mg; Nicotinamide, 5 mg; Thiamine, 5 mg; Lipoic acid, 5 mg; Folic acid, 5 mg; Vitamin B_{12} , 5 mg; Riboflavin, 5 mg. *Geobacter* 培地 (per liter) : NaHCO_3 , 2.5 g; NH_4Cl , 1.5 g; NaH_2PO_4 , 0.6 g; KCl , 0.1 g; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.25 mg; *Geobacter* trace element solution (下記参照), 10 ml; *Geobacter* vitamin solution (下記参照), 10 ml. *Geobacter* trace element solution (per liter) : Nitrilotriacetic acid (NTA), 1.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.0 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; NaCl , 1.0 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.18 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.18 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g; $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g; H_3BO_3 ,

0.01 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.025 g; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mg. *Geobacter* vitamin solution (per liter) : Biotin, 2 mg; Folic acid, 2 mg; Pyridoxine, 10 mg; Thiamine, 5 mg; Riboflavin, 5 mg; Nicotinic acid, 5 mg; D-Ca-pantothenate, 5 mg; Vitamin B₁₂, 0.1 mg; *p*-Aminobenzoic acid, 5 mg, Lipoic acid, 5 mg. 電子受容体として結晶性酸化鉄 (Goethite [20 mM], Hematite [10 mM], Lepidocrocite [20 mM], または Magnetite [10 mM]), 電子供与体として酢酸 (20 mM) を用いた。なお, メタン生成菌の生育阻害剤である 2-プロモエタン スルホン酸塩 (BES, 20 mM) の添加区も用意した。培地の pH はそれぞれ 7.0 に調整した。培養には 50 ml ガラスバイアルを用い, 20 ml の培地を充填した後, 気相を N₂/CO₂ (80:20, vol/vol) で置換した。培養温度は 25°C に設定した。合計で 136 の条件で鉄還元微生物の集積培養を開始した。約 2 年間にわたり集積培養を継続し, 結晶性酸化鉄が還元を受けることで生じる培養系の色の変化を指標に 3 回の継代を行った。

微生物集積培養系の系統学的解析

微生物集積系からの DNA 抽出にはビーズによる細胞破砕法を用いた (Hori *et al.*, 2007)。得られる DNA 濃度が低く吸光度測定では検出不可能であったため, PCR 増幅により微生物存在の有無を確認した。16S rRNA 遺伝子 V1-5 領域 (約 850 bp) を標的として GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) により PCR を行った。プライマーとして B8f (5'-AGAGTTTGMTCMTGGCTCAG-3') と B907r (5'-CCGTC AATTCMTT RAGTT-3') を用い, PCR 条件は既報に従った (Hori *et al.*, 2007)。PCR 産物の有無をアガロース電気泳動により確認し, 結晶性酸化鉄を還元する 58 の微生物集積系を取得した。次に, これら微生物集積系の群集組成を比較するために, Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 解析を行った。16S rRNA 遺伝子を標的とする上記の B8F プライマーを蛍光 (Beckman D4) で標識し PCR に用いた。得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) によって精製し, 制限酵素 *Msp* I で消化した遺伝子断片を DNA シークエンサー GenomeLab GeXP (Beckman coulter) により解析した。制限酵素断片の塩基長 (bp) の決定は, DNA Size Standard kit-600 (Beckman coulter) との比較により行った。T-RFLP パターンを断片長 (bp) とその存在有無によるバイナリ・データに変換し, JMP version 5.1 (SAS Institute) による主成分分析に供した。主成分分析の結果は第一・第二主成分の二次元マップで示した。なお, 他のサンプルから大きく外れた集積系 5 条件 (Goethite 2 条件, Hematite 2 条件, Magnetite 1 条件) はマップ

から除外した。さらに微生物集積系の構成メンバーを系統学的に明らかにするために, 次世代シークエンサー MiSeq (Illumina) による 16S rRNA 遺伝子の大規模塩基配列解析およびサンガー法シークエンサーによる同遺伝子クローンライブラリ解析を行った。次世代シークエンサー解析では, 16S rRNA 遺伝子 V4 領域 (約 300 bp) を標的として Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) により PCR を行った。プライマーとして B515f (5'-GTGCCAGCMG CCGCGGTAA-3') と B806r (5'-GGACTACHVGGGTWT CTAAT-3') を用い, PCR 条件はメーカー使用説明書に従った。得られた PCR 産物を AMPure XP kit (Beckman coulter) および QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて二段階で精製し, その濃度を Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen) と VersaFluor Fluorometer (BIO-RAD; Excitation; 480 nm, Emission; 520 nm) を用いた蛍光定量および GoTaq qPCR Master Mix (Promega) と Real-Time-PCR Detection system MyIQ2 (BIO-RAD) を用いた定量 PCR により測定した。精製 PCR 産物を適当な濃度に調整し, MiSeq Reagent kit 300-cycles (Illumina) と次世代シークエンサー MiSeq (Illumina) を用いた大規模塩基配列解析に供した。各微生物集積系から約 10,000 リードの遺伝子断片の塩基配列を解読し, QIIME (<http://qiime.org/index.html>) による系統解析を行った。クローンライブラリ解析では, 16S rRNA 遺伝子 V1-5 領域を上記の条件で PCR 増幅および精製を行った後, pGEM-T vector systems (Promega) による TA クローニングを行った。得られたプラスミド DNA を ECOS competent *E. coli* JM109 (Nippon Gene) を用いた形質転換に供した。その後, BigDye Terminator (Applied Biosystems) と DNA シークエンサー 3130xl (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を解読した。集積系から合計で約 500 クローンの塩基配列を決定し, ARB (<http://www.arb-home.de>) による系統解析を行った。

鉄還元微生物の分離培養と生理学的解析

新規な鉄還元菌が高度に集積されていた 38 の培養系を対象にして, 栄養リッチな溶解性 Fe(III) 培地へと植え継ぐ二段目培養に供した。ここでは, 結晶性酸化鉄による集積培養時に設定した基礎培地 (改変型 Widdel 培地または *Geobacter* 培地) を継続して用い, 電子受容体として Fe(III)-NTA (10 mM), 電子供与体として酢酸 (20 mM) を採用した。限界希釈とロールチューブ法によるコロニーピックアップを経て, 6 菌株の純粋培養系を取得した。分離菌株の純度確認は, 蛍光顕微鏡 BX-51 (OLYMPUS) による細胞形態観察, T-RFLP による微生物群集構造解析により行い, フマル酸 (50 mM) と酢

酸 (10mM) を基質とする培養試験で他の菌の混入・増殖が無いことを確認した。分離菌株の 16S rRNA 遺伝子配列の解析には、B8f と B1525r (5'-AAGGAGGTF WTCCA RCC-3') をプライマーとした PCR を行い、前述の条件で TA クローニング、形質転換、塩基配列決定を行った。次に、それぞれの分離菌株の増殖特性を調べるために、Fe(III)-NTA を電子受容体とする溶解性 Fe(III) 培地 (前述) による培養試験に供し、鉄還元、酢酸分解、菌の増殖、タンパク質合成を経時的にモニタリングした。鉄濃度は、0.5N HCl による鉄抽出およびフェロジンアッセイに基づいて決定した (Lovley & Phillips, 1987)。酢酸濃度は、RSpak KC-811 カラム (Showdex) を取り付けた HPLC システム (Alliance e26951, Waters) および PDA 検出器 (2998, Waters) により測定した。菌の増殖は、DNA 抽出および定量 PCR (プライマー; B515f, B806r) を行い評価した (上述の方法)。タンパク質濃度の測定は、Bradford プロテインアッセイキット (BIO-RAD) とプレートリーダー SH-900Lab (CORONA ELECTRIC) を用いて行った。さらに、分離菌株の結晶性酸化鉄の還元能を調べるために、電子受容体を Goethite (20mM), Hematite (10mM), Lepidocrocite (20mM) または Magnetite (10mM)、電子供与体を酢酸 (20mM) とする培地でそれぞれの分離菌株を一ヶ月間培養し、鉄還元の結果生じる Fe(II) の濃度を 6N HCl による鉄抽出およびフェロジンアッセイに従って決定した (Braunschweig *et al.*, 2012)。

結果および考察

結晶性酸化鉄による微生物集積培養系の構築

結晶性酸化鉄 (Goethite, Hematite, Lepidocrocite, または Magnetite) を電子受容体、酢酸を電子供与体とした嫌気培地を用い、様々な環境試料 (水田土壌, 森林土壌, 湿地土壌, 用水路底泥, 海底コア) を微生物接種源として計 136 の条件で約 2 年間の長期間にわたり継代培養を続けたところ、鉄還元が観察される 58 の微生物集積培養系を取得することに成功した。それぞれの酸化鉄で 34 条件の培養を行ったが、集積系が得られたのは、Goethite で 14 条件, Hematite で 10 条件, Lepidocrocite で 16 条件, Magnetite で 18 条件であった。Goethite や Hematite は、結晶性が高く化学的に安定であるため (Schwertmann & Cornell, 1991)、微生物による還元を受けにくいと予想され、そのことがこれら酸化鉄培養で集積系の取得数が少ない理由であると考えられた。一方、Magnetite は 2 価鉄と 3 価鉄の混合物であるが、このことが微生物生存・生育に有利に働き、最終的に多

くの集積系が得られたと考察される。ただし、二価鉄の酸化と共役する還元反応基質 (酸化物: 硝酸や酸素等) は培養系内に存在しないため、鉄酸化呼吸に関与する微生物群が増殖したとは考えにくい。二価鉄の溶出により微生物の鉄同化反応が促進されたことが一つの要因と推測された。一方、微生物接種源 (環境試料) 別に見てみると、集積系が得られたのは、水田土壌では 48 条件中 40 条件, 森林土壌では 16 条件中 1 条件, 湿地土壌では 16 条件中 2 条件, 用水路底泥では 16 条件中 9 条件, 海底コアでは 40 条件中 6 条件であった。水田土壌では鉄還元反応がメタン生成に次ぐ第二の最終電子受容プロセスであるため (Yao *et al.*, 1999)、土壌微生物の鉄還元活性が強く、それが多くの集積系の取得に繋がったと考えられる。また用水路底泥試料では、結晶性鉄化合物と思われる茶褐色物質の析出が観察されている。環境試料の鉄定量試験は行っていないが、酸化鉄含有量の大きな試料ほど鉄還元菌が高密度に存在すると予想され、集積系の構築にはプラスに働くと考えられる。また、森林土壌や湿地土壌からも極少数ではあるが集積系が得られ、幅広い嫌気土壌圏で鉄還元反応が起こっていることが強く示唆された。このことは鉄還元菌がさまざまな環境・地域に生息しているというこれまでの報告と一致するものである (Lovley *et al.*, 2004)。

T-RFLP による微生物集積培養系の群集組成比較

取得された 58 の微生物集積培養系から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子に基づく T-RFLP 解析を行った。さらに T-RFLP データを主成分分析することで、集積系の群集組成の比較を行った (Fig. 1)。Fig. 1A には主成分分析マップ全体を、Fig. 1B には Fig. 1 の太字四角で囲ったマップ中央を拡大して示した。今回得られた集積系の群集組成パターンの 65.5% がマップ中央に集合することが明らかになり、これは集積系の群集構造が類似していることを表すものである。特に、高い結晶性を示す Goethite と Hematite の集積系は、それぞれ 71.4% と 80% がマップ中央に位置し、それぞれの基質の選択圧の大きさが伺える。一方で、Magnetite 集積系でマップ中央にプロットされたのは 44.4% に留まっており、Magnetite では他の酸化鉄とは異なる微生物群集が集積されていることが強く示唆された。先に述べた通り、Magnetite が今回採用した酸化鉄の中でも唯一 3 価鉄と 2 価鉄の混合物であることに起因していると考えられる。

微生物集積培養系の系統学的特徴

次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子 V4 領域の大規模塩基配列解読により微生物集積培養系の構成メンバーを分類門・綱レベルで定性的かつ定量的

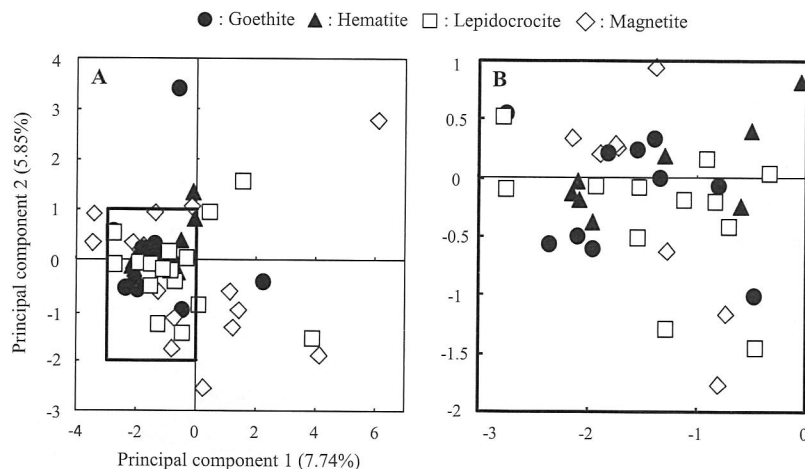


Fig. 1 Principal-component analysis of the T-RFLP data. (A) Whole PCA plot for the bacterial fingerprint of the enrichment culture. (B) The center area of the PCA plot. Symbols of ●, ▲, □, and ◇ represent the fingerprint of the enrichment with goethite, hematite, lepidocrocite, and magnetite, respectively.

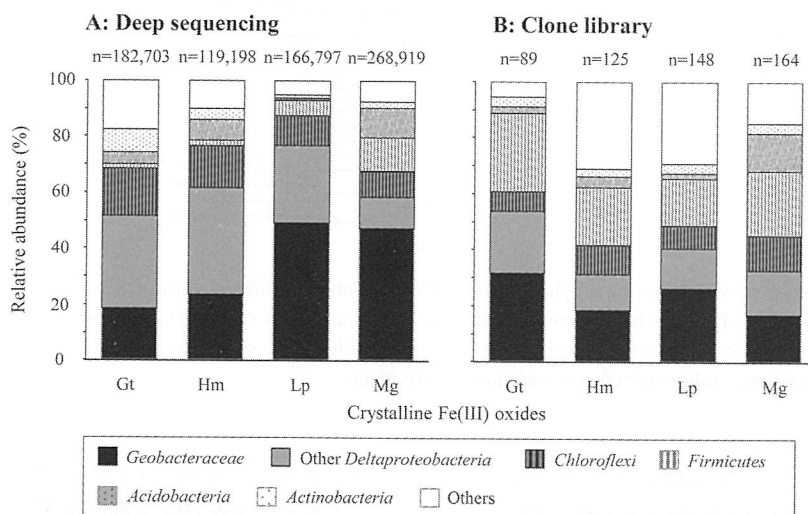


Fig. 2 Comparison of bacterial 16S rRNA gene sequences obtained from the enrichment culture with goethite, hematite, lepidocrocite, and magnetite. (A) Deep sequencing data. (B) Clone library data. “Other” represents *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Nitrospirae*, *Chlorobi*, *Bacteroidetes*, *Armatimonadetes*, *Spirochaetes*, *Planctomycetes*, *Cyanobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobia*, *Tenericutes*, *Synergistetes*, *Epsilonproteobacteria*, *Zetaproteobacteria*, *Caldiserica*, *Spirochaetes*, candidate divisions SPAM, SC4, WS3, WS1, OP8, NKB19, NC10, MSBL6, AD3, TM6, or GOUTA4 combined. n indicates the total numbers of reads (A) or clones (B) obtained in this study.

に明らかにした (Fig. 2). 各集積系から約 10,000 リードを系統解析し, Goethite 集積系では計 182,703 リード, Hematite 集積系では計 119,198 リード, Lepidocrocite 集積系では計 166,797 リード, Magnetite 集積系では計 268,919 リードを系統的に特徴づけた (Fig. 2A). その結果, いずれの結晶性酸化鉄を用いた集積系でも *Deltaproteobacteria* 網細菌が主要構成種であり, 全体の

50% 以上を占めた (Goethite; 57%, Hematite; 61%, Lepidocrocite; 77%, Magnetite; 58%). 中でも, *Geobacteraceae* 科細菌が著しく優占化しており, Lepidocrocite や Magnetite の集積系では全体の約 50%, Goethite や Hematite の集積系でも約 20% と高度な集積が検出された. *Deltaproteobacteria* 網には, *Geobacter* 属細菌, *Anaeromyxobacter* 属細菌など Fe(III) を唯一のエ

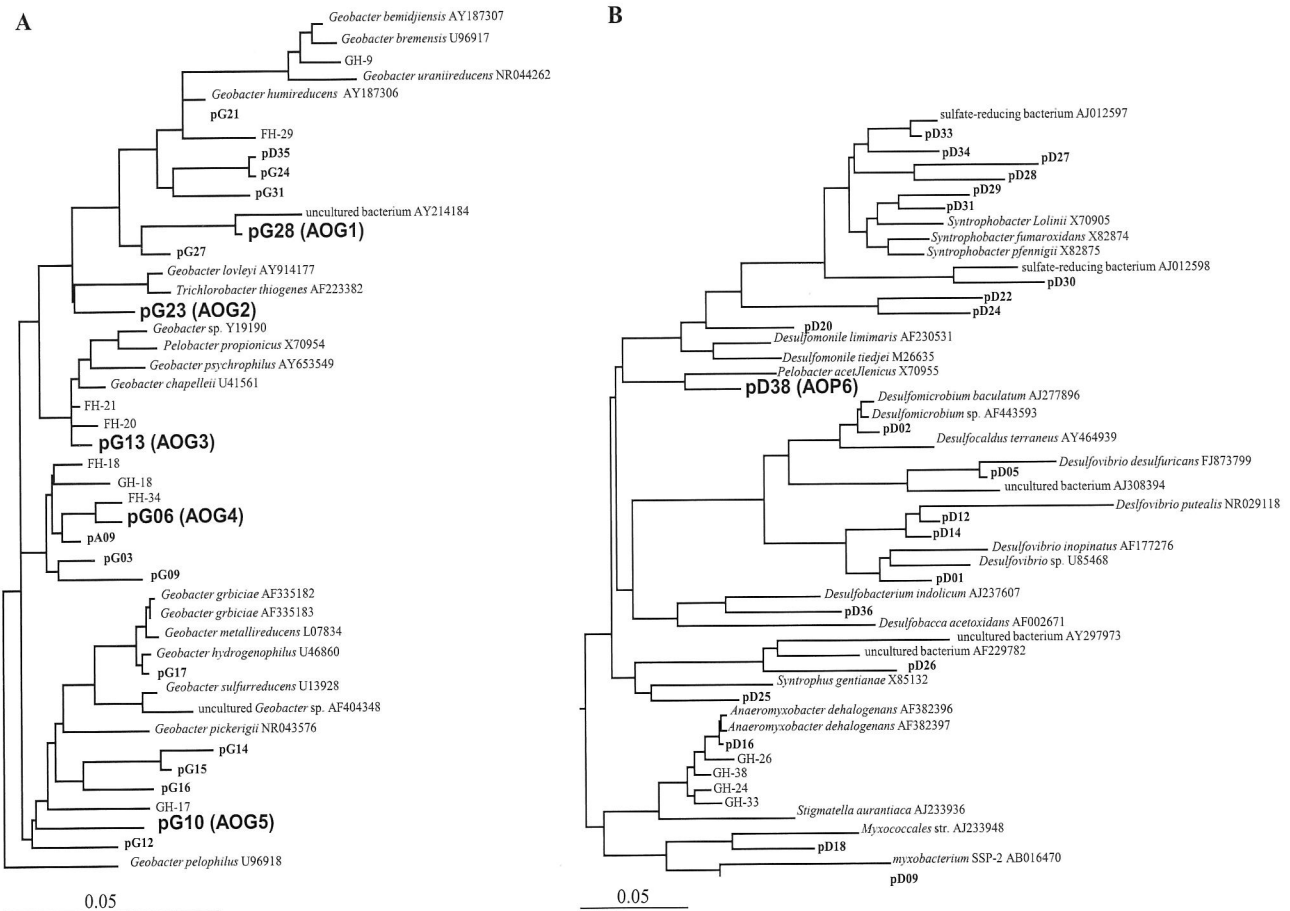


Fig. 3 Phylogenetic tree showing the relationships of 16S rRNA phylotypes affiliated with the *Geobacteraceae* (A) and the other *Deltaproteobacteria* (B). The basic tree of reference sequences was reconstructed using the maximum-likelihood method based on a comparison of more than 1,400 nucleotides. The scale bar represents 5% sequence divergence. GenBank accession numbers of reference sequences are given.

エネルギー源として生育する微生物が分類されている (Lovley *et al.*, 2004). *Deltaproteobacteria* 綱に続いて, *Chloroflexi* 門細菌 (全体の 9-17%), *Firmicutes* 門細菌 (全体の 2-12%), *Acidobacteria* 門細菌 (全体の 1-8%) が主要となった. *Firmicutes* 門や *Acidobacteria* 門に属する鉄還元菌は発酵的代謝や硫酸還元等で生育しながら鉄還元を行うものが報告されており (Nevin & Lovley, 2002; Ogg & Patel, 2009; Yoneda *et al.*, 2012), さらにごく最近では *Chloroflexi* 門に属する従属栄養性の鉄還元菌が分離培養されている (Kawaiichi *et al.*, in press). また, 我々の以前の研究で, Goethite 存在依存的に ^{13}C -酢酸を取り込む新規な *Betaproteobacteria* 綱細菌が同定されていたが (Hori *et al.*, 2010), マイナーな画分 (全体の 0-1%) ながらそれらの近縁種が検出されている. 以上から, 本解析で検出された多様な分類門・綱の未培養菌は鉄還元能を有している可能性が高い. このことは, 鉄還元菌がこれまでに考えられてきたより広範囲な系統分類群に

分布することを示唆するものである.

さらに, 16S rRNA 遺伝子 V1-5 領域のクローンライブラリ解析によって, 微生物集積系の優占微生物をより詳しく系統学的に特徴づけた (Fig. 2B and Fig. 3). 集積系から合計で約 500 クローンを取得し系統解析を行ったところ, 集積系の分類門・綱レベルでの構成メンバーは, 次世代シーケンズ結果とはほぼ一致し, *Deltaproteobacteria* 綱細菌がすべての酸化鉄集積系で主要となった (Fig. 2B). ここで, 集積系の最優占種として検出された *Geobacteraceae* 科細菌 (Fig. 3A) およびその他の *Deltaproteobacteria* 綱細菌 (Fig. 3B) に関して詳細な系統学的位置を同定した. 本解析で得られたクローンの多くは, 既知の分離菌株の 16S rRNA 遺伝子に対する塩基配列相同性が低く, さらに系統樹上で新しい分岐群を形成した. 特にクローン pG06 は, 分離菌株の存在しない未培養クレードに属し, 新規性の高い鉄還元菌であることが伺える. また以前の SIP 解析で見出し

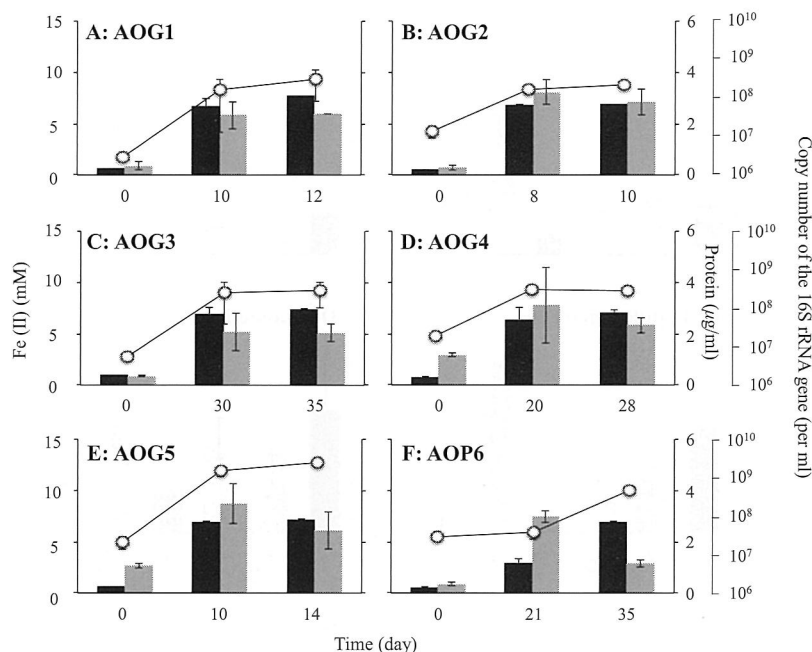


Fig. 4 Change in concentrations of Fe(II) (black bar) and microbial protein (gray bar), and change in copy number of the 16S rRNA gene (open circle) during anaerobic incubation of six isolates obtained in this study. (A) AOG1; (B) AOG2; (C) AOG3; (D) AOG4; (E) AOG5; and (F) AOG6. The error bars represent the standard deviations of three replications.

れた酸化鉄依存的に酢酸を取り込む新規微生物と近縁なクローンが多数検出され (Hori *et al.*, 2010), 本研究で分離培養の標的とする微生物が高度に集積されていることが確認された。特筆すべきは、結晶性酸化鉄の違いによって集積されるメンバーが異なることであり、4種全ての酸化鉄で集積されるクローン pG28, pG10や Magnetite の集積系で特異的に検出されるクローン pG23, pG13 などの興味深い鉄還元菌が検出された。この他にも、これまで鉄還元能を有することで知られる *Anaeromyxobacter* 属, *Pelobacter* 属, *Desulfovibrio* 属などに分類される新規微生物の高度集積化が確認された。

新規鉄還元微生物の分離培養

新規鉄還元菌の高度な集積が見られた38の培養系を対象に、溶解性 Fe(III) 培地に植え継ぐ二段目培養に供し、限界希釈およびロールチューブによるコロニー選抜を繰り返し行うことで、6菌株 (AOG1, AOG2, AOG3, AOG4, AOG5, and AOP6,) の分離培養に成功した (Fig. 3)。それぞれの分離菌株の最近縁種と 16S rRNA 遺伝子配列全長の相同性を以下に示す。AOG1 株 (分離源: 水田 [北海道]) は、クローン pG28 に対応し、ごく最近蓮池底泥からの分離が報告された *Geobacter luticola* (AB682759; Viulu *et al.*, 2013) に 98.1% の 16S rRNA 遺伝子配列相同性を示した。AOG2 株 (分離源: 水田 [岡山])

は、クローン pG23 に対応し、鉄還元・脱ハロ呼吸能を有しバイオレメディエーションに適用されている *Geobacter lovleyi* (NR074979; Sung *et al.*, 2006) に 96.4% の 16S rRNA 相同性を示した。AOG3 株 (分離源: 森林土壌 [北海道]) は、クローン pG13 に対応し、淡水集積培養物から分離された *Geobacter chapelleii* (NR025982; Straub *et al.*, 1998) に 96.7% の 16S rRNA 相同性を示した。AOG4 株 (分離源: 水田 [イタリア]) と AOG5 株 (分離源: 用水路底泥 [北海道]) は、それぞれクローン pG06 と pG10 に対応し、カオリン地層堆積物から分離された *Geobacter pickeringii* (NR043576; Shelobolina *et al.*, 2007) に各々 95.5% と 94.8% の 16S rRNA 相同性を示した。AOP6 株 (分離源: 海底コア) は、クローン pD38 に対応し、*Pelobacter acetylenicus* (NR029238; Evers *et al.*, 1993) に 95.5% の 16S rRNA 相同性を示した。このように、既知菌の 16S rRNA 遺伝子配列に対して相同性が低い新規鉄還元菌の純粋培養系を取得した。微生物接種源として用いた7つの環境試料全てより、いずれかの分離菌株が得られていることから、本研究において多様な微生物接種源を採用したのは新規鉄還元菌の分離に有効であったと考えられる。

分離菌株の生理学的特徴

溶解性 Fe(III) を基質とする培養試験によって、分離

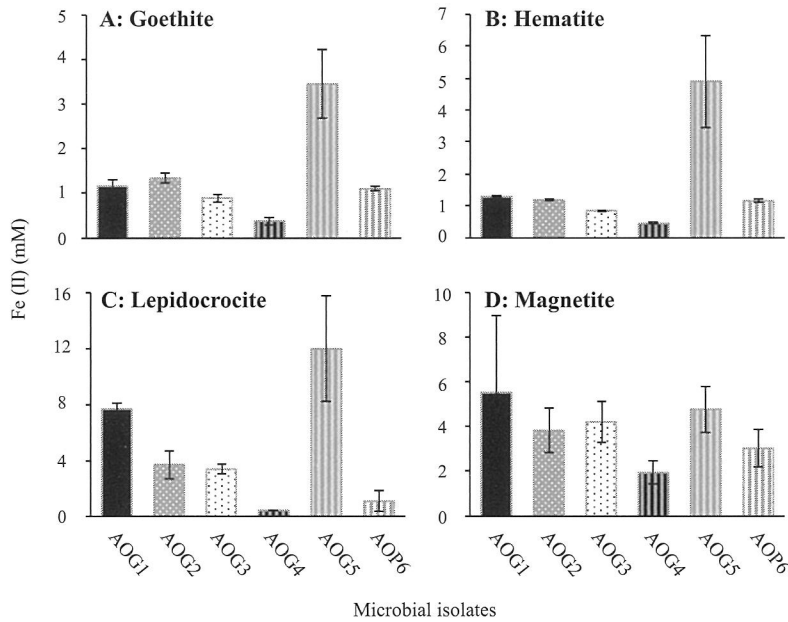


Fig. 5 Fe(II) formation during anaerobic incubation of the six isolates with crystalline Fe(III) oxides. (A) Goethite; (B) Hematite; (C) Lepidocrocite; and (D) Magnetite. The error bars represent the standard deviations of three replications.

菌株6種の生育特性を明らかにした (Fig. 4). 分離菌株全ての培養において, Fe(III)-NTA が還元されることで生じる Fe(II) 濃度の上昇が観察され, これに伴って酢酸濃度も減少した. 1 mmol の酢酸の減少でおよそ 8 mmol の Fe(II) の生成が観察されており, 酢酸酸化と鉄還元が化学両論的にほぼ一致していた. また鉄還元および酢酸酸化が見られる時に, 菌の増殖とタンパク質の生成が旺盛に起こっていることが明らかになった. ここで特筆すべきは, 全ての分離菌株は鉄還元を唯一のエネルギー源として生育可能だが, その増殖様式が異なることである. 例えば, AOG5 株は同じ量の基質を与えているにも関わらず菌の最終濃度が高いこと, AOG4 株は培養開始5日以内に増殖し切ってしまうその後菌数は一定を保つものの鉄還元が見られる時にタンパク質合成が見られること, AOP6 株は非常に増殖が遅く1ヶ月ほどかけて鉄還元が起こる (タンパク質も連動して上昇する) が鉄還元後はタンパク質濃度が一気に減少すること, などの興味深い事象が確認された.

次に, 結晶性酸化鉄4種を基質とした培養試験により, 分離菌株6種の結晶性酸化鉄の還元能を評価した (Fig. 5). 全ての酸化鉄集積系で優占化していた AOG1 株 (pG28), AOG5 株 (pG10) は, 結晶性酸化鉄4種の還元能が高いことが示され, 特に AOG5 株は他の分離菌株でも還元があまり見られなかった結晶性の高い Goethite や Hematite を効率的に還元することが可能で

あった. Magnetite 集積系で特異的に集積されていた AOG2 株 (pG23) や AOG3 株 (pG13) は, NTA-Fe(II) 培地での増殖速度は互いに全く異なっていたが (Fig. 4B and 4C), 結晶性酸化鉄の利用性はほぼ同一であった. 両菌株は, Goethite, Hematite, Lepidocrocite に対しては他菌と比較して還元活性が低かったが, Magnetite の還元は AOG1 株や AOG5 株と同レベルの高い活性を示した. 海底コアから唯一分離培養された AOP6 株は, Goethite と Hematite に対してのみ他菌 (AOG5 株以外) と同程度の還元能力を示し, 結晶性の高い酸化鉄の存在時には他菌と競合可能であると予想された. 以上から, 全ての分離菌株は結晶性酸化鉄の還元能を有するが, それぞれで鉄への利用率が異なり, これにより自然土壌環境において棲み分けを行っていることが強く示唆された. これまでに, 微生物が結晶性酸化鉄を利用するための多様な手段 (酸化鉄への接触による直接還元 [Childers *et al.*, 2002], 微生物ナノワイヤーを用いた電子伝達 [Reguera *et al.*, 2005], 電子シャトル分子を介した間接還元 [Lovley *et al.*, 1999]) が報告されている. 今後は, 本研究によって得られた結晶性酸化鉄を還元する微生物の代表菌株6種を用いて, 結晶性酸化鉄へのアクセス方法, さらには「貧栄養条件下で生き続ける」という代謝戦略をゲノムおよび遺伝子発現の観点から解明してゆく予定である.

要 約

鉄は第4位の地殻構成元素であり、地下深部に至るまで結晶性酸化鉄として分布している。地圏の大部分を占める嫌気環境において鉄還元反応は、酢酸をめぐるメタン生成と基質競合する。本研究では、実体の明らかでない「結晶性酸化鉄を還元する微生物」を選択的二段培養により分離培養し、生理学的に特徴づけることを目的とした。結晶性酸化鉄を電子受容体として用いた自然環境試料を接種源とする一段目培養を2年以上にわたり継続した結果、58の微生物集積系を取得した。集積系構成種を明らかにすべく16S rRNA 遺伝子の大規模塩基配列解析およびクローンライブラリ解析を行ったところ、*Deltaproteobacteria* 綱の新規細菌群の優占化が検出された。続いて、電子受容体を結晶性酸化鉄から溶解性のFe(III)に置き換える二段目培養に供することで、優占微生物の増殖を促し純粋菌株としての取得を試みた。限界希釈法とロールチューブ法を用いることで、分子系統樹上で新しい分類群を形成する *Geobacter* 属細菌5種、*Pelobacter* 属細菌1種の分離培養に成功した。これらの微生物は鉄還元を唯一のエネルギー源として生育するものの、結晶性酸化鉄の利用性が大きく異なっていた。

本助成で得られた研究成果の報告（口頭発表、原著論文、その他（総説など））

口頭発表

- 堀知行 (2011). 嫌気土壌においてメタン生成菌と基質競合する新しい鉄還元微生物群の同定. 第14回日本水環境学会シンポジウム (仙台).
- 青柳智, 成廣隆, 飯村洋介, 竹内浩士, 花田智, 鎌形洋一, 堀知行 (2011). 結晶性酸化鉄を還元する微生物集積系の系統学的特徴づけ. 第27回日本微生物生態学会大会 (京都).
- 堀知行 (2012). Population dynamics and functional flexibility of methanogenic consortia in anaerobic digesters. Japan-China International Symposium of Biotechnology on Agriculture and Environment (Tokyo, Japan).
- 青柳智, 成廣隆, 花田智, 田尾博明, 鎌形洋一, 堀知行 (2013). 選択的二段培養により得られた新しい鉄還元細菌群の系統と機能. 日本農芸化学会2013年度大会 (仙台).

原著論文

- Hori, T., Sasaki, D., Haruta, S., Shigematsu, T., Ueno, Y., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2011). Detection of active, potentially acetate-oxidizing syntrophs in an anaerobic digester by flux measurement and FTHFS expression profiling. *Microbiology* **157**: 1980–1989.

- Narihiro, T., Hori, T., Nagata, O., Hoshino, T., Yumoto, I. & Kamagata, Y. (2011). The impact of aridification and vegetation type on changes in the community structure of methane-cycling microorganisms in Japanese wetland soils. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**: 1727–1734.
- 堀知行 (2012). 結晶性酸化鉄を還元する土壌微生物群の同定と集積培養. *低温科学* **70**: 153–158.

解説文

- 青柳智, 堀知行 (2012). 結晶性酸化鉄を利用する微生物の獲得に向けた挑戦. *日本微生物生態学会誌* **27**: 13–14.
- 堀知行 (2013). IODP337「下北八戸沖石炭層生命圏掘削」に参加して—世界最大の「ちきゅう」微生物学研究室—. *日本微生物生態学会誌* **28**: 24–25.

保存機関に寄託した菌株

本稿で述べた分離菌株6種 (*Geobacter* spp. strains AOG1, AOG2, AOG3, AOG4, and AOG5, and *Pelobacter* sp. strain AOP6) は、さらに詳細に試験を継続しており、今後保存機関に寄託予定である (記載作業中)。

謝 辞

本研究に対し、2年間にわたりご助成いただきました公益財団法人発酵研究所に、心から感謝いたします。

文 献

- Achnich, C., F. Bak, & R. Conrad. (1995). Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fertil. Soils* **19**: 65–72.
- Braunschweig, J., Bosch, J., Heister, K., Kuebeck, C., & Meckenstock, R.U. (2012). Reevaluation of colorimetric iron determination methods commonly used in geomicrobiology. *J. Microbiol. Methods* **89**: 41–48.
- Chidthaisong, A., & Conrad, R. (2000). Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 73–86.
- Chidthaisong, A., Rosenstock, B., & Conrad, R. (1999). Measurement of monosaccharides and conversion of glucose to acetate in anoxic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2350–2355.
- Childers, S.E., Ciuffo, S., & Lovley, D.R. (2002). *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature* **416**: 767–769.
- Conrad, R. (1996). Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol. Rev.* **60**: 609–640.
- Evers, A., Weizenegger, M., Ludwig, W., Schink, B., & Schleifer, K.H. (1993). The phylogenetic positions of *Pelobacter*

- acetylenicus* and *Pelobacter propionicus*. Syst. Appl. Microbiol. **16**: 216–218.
- Hori, T., Noll, M., Igarashi, Y., Friedrich, M.W., & Conrad, R. (2007). Identification of acetate-assimilating microorganisms under methanogenic conditions in anoxic rice field soil by comparative stable isotope probing of RNA. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 101–109.
- Hori, T., Muller, A., Igarashi, Y., Conrad, R., & Friedrich, M.W. (2010). Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by ¹³C-acetate probing. ISME J. **4**: 267–278.
- Kawaichi, S., Ito, N., Kamikawa, R., Sugawara, T., Yoshida, T., & Sako, Y. (2013). *Ardenticatena maritima* gen. nov., sp. nov., a ferric iron- and nitrate-reducing bacterium of the phylum *Chloroflexi* isolated from an iron-rich coastal hydrothermal field, and description of *Ardenticatena classis* nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press). doi: 10.1099/ijs.0.046532-0
- Kostsyurbenko, O., Glagolev, M.V., Nozhevnikova, A.N., & Conrad, R. (2001). Competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea for hydrogen at low temperature. FEMS Microbiol. Ecol. **38**: 153–159.
- Lipp, J.S., Morono, Y., Inagaki, F., & Hinrichs, K.U. (2008). Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. Nature **454**: 991–994.
- Lovley, D.R., & Phillips, E.J. (1987). Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 1536–1540.
- Lovley, D.R., Holmes, D.E., & Nevin, K.P. (2004). Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. Adv. Microb. Physiol. **49**: 219–286.
- Lovley, D.R., Fraga, J.L., Coates, J.D., & Blunt-Harris, E.L. (1999). Humics as an electron donor for anaerobic respiration. Environ. Microbiol. **1**: 89–98.
- Morono, Y., Terada, T., Nishizawa, M., Ito, M., Hillion, F., Takahata, N., Sano, Y., & Inagaki, F. (2011). Carbon and nitrogen assimilation in deep seafloor microbial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108**: 18295–18300.
- Nevin, K.P., & Lovley, D.R. (2002). Mechanisms for Fe(III) oxide reduction in sedimentary environments. Geomicrobiol. J. **14**: 141–159.
- Ogg, C.D., & Patel, B.K. (2009). *Caloramator mitchellensis* sp. nov., a thermoanaerobe isolated from the geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia, and emended description of the genus *Caloramator*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **61**: 644–653.
- Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., & Lovley, D.R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. Nature **435**: 1098–1101.
- Rothfuss, F., & Conrad, R. (1993). Thermodynamics of methanogenic intermediary metabolism in littoral sediment of Lake Constance. FEMS Microbiol. Ecol. **12**: 265–276.
- Schwertmann, U., & Cornell, R.M. (1991). Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization. New York, NY: VCH.
- Shelobolina, E.S., Nevin, K.P., Blakeney-Hayward, J.D., Johnsen, C.V., Plaia, T.W., Krader, P., Woodard, T., Holmes, D.E., Vanpraagh, C.G., & Lovley, D.R. (2007). *Geobacter pickeringii* sp. nov., *Geobacter argillaceus* sp. nov. and *Pelosinus fermentans* gen. nov., sp. nov., isolated from subsurface kaolin lenses. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 126–135.
- Straub, K.L., Hanzlik, M., & Buchholz-Cleven, B.E. (1998). The use of biologically produced ferrihydrite for the isolation of novel iron-reducing bacteria. Syst. Appl. Microbiol. **21**: 442–449.
- Sung, Y., Fletcher, K.E., Ritalahti, K.M., Apkarian, R.P., Ramos-Hernandez, N., Sanford, R.A., Mesban, N.M., & Löffler, F.E. (2006). *Geobacter lovleyi* sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium. Appl. Environ. Microbiol. **72**: 2775–2782.
- Viulu, S., Nakamura, K., Okada, Y., Saitou, S., & Takamizawa, K. (2013). *Geobacter luticola* sp. nov., an Fe(III)-reducing bacterium isolated from lotus field mud. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **63**: 442–448.
- Yao, H., Conrad, R., Wassmann, R., & Neue, H.U. (1999). Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. Biogeochemistry **47**: 269–295.
- Yoneda, Y., Yoshida, T., Kawaichi, S., Daifuku, T., Takabe, K., & Sako, Y. (2012). *Carboxydotherrmus pertinax* sp. nov., a thermophilic, hydrogenogenic, Fe(III)-reducing, sulfur-reducing carboxydophilic bacterium from an acidic hot spring. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**: 1692–1697.
- Zehnder, A.J.B., & Stumm, W. (1988). Geochemistry and biochemistry of anaerobic habitats. Zehnder, A.J.B. (ed). *Biology of anaerobic microorganisms*. New York, NY: Wiley Interscience, pp. 1–38.

レアメタル気化微生物の分離・同定と機能解析

山下 光雄

芝浦工業大学工学部

〒135-8548 東京都江東区豊洲 3-7-5

Isolation, identification and functional analysis of rare metal volatilization microorganisms

Mitsuo Yamashita

College of Engineering, Shibaura Institute of Technology
3-7-5 Toyosu, Koto-ku, Tokyo 135-8548, Japan

Since rare metals have been often used in the advanced scientific industry in recent years, rare metals are called the vitamins of industry. In order to use metal resources continuously, a development of technologies is required to recover rare metals from wastewater and wastes, which contain rare metals at low concentrations mixed with various substances. However, the present technologies, such as coagulating sedimentation and adsorption are not easy to selectively enrich target rare metals from various impurities and therefore, are extremely high-cost. To overcome the problem, use of biotechnology can be proposed as an approach that enables rare metals recovery from wastewater and wastes. Among metal metabolisms by microorganisms, biological vaporization (bio-volatilization) is one of the expected applications of biotechnology. If isolation and application of microorganisms that catalyze this reaction are successful, it is believed that the development of the process that enables high purity rare metals enrichment and recovery as vapors is possible. We tried to isolate rare metal metabolic microorganisms and succeeded in isolation of seven tellurate and three selenate reducing bacteria. It is suggested that each one of them strains synthesize volatilized tellurium and selenium under aerobic culture conditions. Thus, we propose a sustainable process of rare metals recovery from wastewater and wastes by rare metal metabolic microorganisms.

Key words: rare metal, volatilization bacteria, selenium, tellurium, recovery

緒 言

レアメタルは、地殻中の存在量が比較的少なく、採掘や精錬、分離精製が技術的に困難な希少金属である。レアメタルは製品中に極少量しか使用されなくても、それが存在しないと製品の機能が有効に発揮されず、生活や経済に大きな影響をあたえるために、産業のビタミンといわれている。レアメタルは特定国に偏在し、囲い込みが起きているために、日本では安定供給に向けた対策が必要とされている。そこで、金属資源を持続的に利用するために、レアメタルが低濃度で多様な物質

と混在している排水や廃棄物からレアメタル回収を可能とする技術開発が求められている。

排水や廃棄物からのレアメタルの除去・回収は極めて重要な意義をもつにも関わらず、現状では実用的な経済性を持った技術が十分に確立されているとはいえない。なぜならば、既存の凝集沈殿、吸着等の物理化学的な金属類の分離・精錬技術では、目的のレアメタルを多様な不純物の中から選択的に濃縮することは容易ではなく、極めて高コストになってしまうからである。

この問題を克服するために、排水や廃棄物からのレアメタル回収を可能とするアプローチとして、バイオテクノロジーの利用が提案できる。我々は、特殊な金属類の代謝能力を有する微生物を活用する技術を、“メタルバイオテクノロジー”と称している。微生物反応は有機物の分解や合成に関わるものから、金属類を含めた

無機元素に対しても様々な代謝作用を触媒（酸化、還元、水素化、メチル化、蓄積、排出等）する。このような微生物作用が、液相からの金属類除去に結果として結びつく場合（固化・気化・吸着・濃縮）には、この反応を排水や廃棄物からの金属類回収に適用できる可能性がある。

微生物による金属代謝作用の中でも生物気化（バイオボラタリゼーション）は、メタルバイオテクノロジーの利用が期待されている作用の一つである。この反応を触媒する微生物の分離や応用に成功すれば、レアメタルを高純度に気化物として濃縮・回収を可能とするプロセスの開発が可能になると思われる。

本研究ではレアメタル代謝（主として気化）微生物を分離・同定後、その代謝能の機能解析を行うことを目的とした。その結果、新規な7株の海洋性テルル酸還元能と3株のセレン酸還元能を持つ細菌を単離した。テルル酸還元細菌の内 *Pseudoalteromonas marigultinosa* TK40 株は好気条件下でテルル酸を還元し、気化テルルを合成することが、またセレン酸還元細菌の内 *Pseudomonas mendocina* Bp14-1 株は同条件下でセレン酸を還元し気化セレンを極少量合成することが示唆された。微生物の代謝能を活用した排水・廃棄物からの浄化回収技術は、資源循環と環境保全という両視点から重要な意義があり、循環共生型社会の構築に大いに寄与するものであると考えている。

実験方法

レアメタル還元菌スクリーニング

土壌および水（海水・海底泥含む）試料を採取した。これらの環境試料 1g あるいは 1ml に 0.9% 滅菌生理食塩水 9ml を加え、ボルテックスにより混合し、懸濁液を作製した。この懸濁液をスクリーニングサンプルとして用いた。100ml 容量の三角フラスコに分注した Tryptic soy broth (TSB) 培地 50ml もしくは Marine 培地 50ml に適量のスクリーニングサンプルを添加した。各培地には基質としてセレン酸ナトリウム、もしくはテルル酸カリウムを終濃度 0.5mM になるように添加した。培養は 30℃、120rpm の条件に設定した回転振とう培養器で行われた。セレン酸ナトリウムまたはテルル酸カリウムを加えた培養液が赤くまたは黒くなった培養液 1ml を、各基質濃度を 1mM 加えた同培地に植菌した。同様の操作を基質濃度 2mM まで繰り返した。シングルコロニーを分離するために各基質を 1mM 加えた同平板培地を用いた。

16S rDNA のクローニングと塩基配列決定

単離株のゲノム DNA を ISOPLANT (株式会社ニッポンジーン) を用いて抽出した。抽出した DNA を鋳型にして、16S rDNA を F9 (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と R1541 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') のプライマーセットと TaKaRa Ex Taq® (タカラバイオ株式会社) を用いて PCR 増幅した。増幅された DNA は pGEM-T Easy Vector Systems (プロメガ株式会社) を用いてクローニングした。6種のプライマー F9, F515 (5'-GTGCCAG CAGCCGCGGT-3'), FM4 (5'-GTTTTCCAGTC ACGAC-3'), R1115 (5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3'), R1541, RRV (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') を用いて 3730xl DNA Analyzer (アプライドバイオシステム株式会社) で DNA 断片の塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、NCBI (米国立バイオテクノロジー情報センター) の提供する BLAST ソフトウェアプログラムと、UVA (ヴァージニア大学) が提供する FASTA ソフトウェアプログラムによる相同性検索を行った。Molecular Evolutionary Genetics Analysis ソフトウェアプログラムを使用して系統樹分析をした (Tamura *et al.*, 2011)。系統樹の作成は neighbor-joining method (Saitou & Nei, 1987) を用いた。

電子顕微鏡による菌体観察とエネルギー分散型 X 線解析装置による元素分析

培養液を遠心分離 (15,000rpm, 5分間, 20℃) して上清を除き、沈殿を 0.9% 生理食塩水で 2 度洗浄した。沈殿物を適量の生理食塩水で懸濁し、観察試料とした。この試料を顕微鏡観察用フィルターに滴下、吸引し、電子顕微鏡 (SEM) 観察を行った。観察は卓上型電子顕微鏡 (TM3000: 株式会社日立ハイテクノロジーズ) を用い、元素分析はエネルギー分散型 X 線解析装置 (EDX) (SwiftED3000: オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社, 解析ソフト Quantax70: ブルカー・エイエックスエス株式会社) を用いた。

元素分析

TSB 培地または Marine 培地を三角フラスコまたは 5L ジャーファーメンター (Bioneer-C500N: 株式会社丸菱バイオエンジ) にて調製した。基質としてテルル酸またはセレン酸を適当な濃度添加し、該当の菌株を植菌し培養を開始した。培養液のサンプリング試料を遠心分離 (15,000rpm, 5分間, 20℃) し、その上清を 0.2μm のフィルター (ステラディスク: クラボウ) を用いてろ過した。このろ液を培養上清測定試料原液とした。沈殿は超純水により 2 回洗浄し、濃硝酸 1ml にて完全に溶解した。これを沈殿測定試料原液とした。各測定試料原

液を超純水で1/10倍、1/100倍希釈し、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) (iCAP6300DUO:サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) により溶存元素の定量を行った。検量線はセレン標準溶液とテルル標準溶液 (和光純薬工業株式会社) を用いて作成した。濃度幅は0.01 mg/Lから10 mg/Lとし、高濃度から順次段階希釈して調製した。液性は各測定溶液と同じになる様に揃えた。1サンプルにつき3回繰り返し測定を実施し、その平均値を測定結果とした。

テルル酸濃度は、全可溶性テルル濃度をICP-AESによって測定し、その値から亜テルル酸濃度を差し引くことで求めた。亜テルル酸濃度は比色定量法で測定した (Turner *et al.*, 1992)。サンプル100 μ l、0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) 700 μ l、10 mM ジエチルジチオカルバミン酸 200 μ l を混合し、分光光度計 (V-600:日本分光株式会社) により340 nm の吸光度を測定した。1サンプルにつき3回繰り返し測定を実施し、その平均値と検量線から濃度を求めた。

測定試料中のセレン酸および亜セレン酸濃度は、イオンクロマトグラフィー (ICS-1100:ダイオネクス社、検出器 DS6 HEATED CONDUCTIVITY CELL、カラム IonPac AS12A、ガードカラム AG12A、サブプレッサー ASRS300、溶離液 3.0 mM 炭酸ナトリウム溶液、流速 1.5 ml/min) で定量した。

気相の元素分析にはガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS) (FocusGC DSQ II:サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を使用した。GC カラムは DB-624 (アジレントテクノロジー株式会社) を用いた。長さは30 m、内径は0.25 mm、樹脂肉厚は1.4 μ m である。スプリットレスモードで測定した。ヘリウムガスの流量は1.0 ml/min とした。昇温プログラムは40°C を5分間保持し、10°C/min の速度で130°C まで、130°C から240°C まで20°C/min で昇温させ、240°C で1.5分間保持させた。試料注入は250 μ l とした。

Pseudomonas stutzeri NT-I 株を用いたセレン回収実験

メチル化セレンを気化物として回収する場合は、5 L ジャーファーマンターに TSB 培地 3 L と最終濃度 0.5 mM になるようにセレン酸ナトリウムを加えモデル廃液とした。NT-I 株の前培養液を遠心分離により集菌し、OD₆₆₀ = 1.0 に調整後、懸濁液を 30 ml 接種した。本培養は培養温度 38°C、pH 9.0、攪拌速度 250 rpm、通気量 1 L/min で行った。発生する気化セレンは濃硝酸 150 ml を用いて捕集した。濃硝酸に含まれているセレン濃度は ICP-AES により定量した。

元素態セレンを固化物として回収する場合は、NT-I

株の前培養液を植菌後、同培養条件にて12時間培養した。その後最終濃度 5 mM セレン酸ナトリウムを加え、通気量を 0 L/min に変更して培養を続けた。培養液中の沈殿は超純水により2回洗浄し、濃硝酸 1 ml にて完全に溶解した。これを沈殿測定試料原液とした。測定試料原液を超純水で1/10倍、1/100倍希釈し、ICP-AES により沈殿中に溶存しているセレンの定量を行った。

休止細胞を用いたセレン還元能試験

Pseudomonas stutzeri NT-I 株を 3 L の TSB 培地で 38°C、pH 9.0、攪拌速度 250 rpm、通気量 1 L/min の条件で 5 L ジャーファーマンターを用いて 24 時間培養した。培養液から遠心分離 (5,000 rpm, 20 分間, 4°C) にて菌体を得た。菌体を 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) で 2 回洗浄し、菌体を OD₆₆₀ = 1 になるように同緩衝液にて再懸濁し、休止細胞とした。休止細胞を 5 L ジャーファーマンターに移し、基質として NT-I 株が生合成した元素態セレン (赤セレンと称す) を 600 mg 投入した時点から気化セレン合成反応を開始した。赤セレンは NT-I 株を 5 mM セレン酸含有 TSB 培地で培養を行い、沈殿を回収し、エタノール洗浄を 2 回行い、乾燥後の結晶化物として調製し、基質 (重量の 25% (w/w) は赤セレン) として用いた。気化セレンの捕集には濃硝酸 150 ml を用い、濃硝酸に含まれているセレン濃度は ICP-AES により定量した (Winkel *et al.*, 2010)。1 時間当たりの気化セレンの合成量を菌体量 (OD₆₆₀) で除したものを気化速度として計算した。

結果および考察

テルル還元微生物のスクリーニング

気化テルル合成菌を分離するために、まずはテルル酸から元素態テルルまで還元することができるテルル酸還元菌を海洋性の環境試料からスクリーニングを行った。テルル酸を終濃度 2 mM 添加した Marine 培地を好気条件で培養した。スクリーニングサンプルの内、数サンプルの培養液が黒く呈色した。これは培養液中のテルル酸が亜テルル酸を介して、黒色の元素態テルルを合成したために培養液が黒くなったと思われる (Kagami *et al.*, 2012)。次にテルル酸を含む TSB 平板培地上で、黒色に呈色した形態の異なるコロニーを 7 株単離した。その内、TK40 株と名付けた株を再度同様に培養し、生じた黒い沈殿物がテルルであるかどうかを調べるために、沈殿物を電子顕微鏡によって観察し、EDX によって元素分析した。その結果、バックグラウンドに比較して、沈殿物にはテルルとカルシウムが約 30%



A	Precipitation element	AN	norm. C [wt.%]	B	Back ground element	AN	norm. C [wt.%]
	Tellurium	52	34.29		Magnesium	12	57.30
	Calcium	20	32.97		Sodium	11	35.67
	Magnesium	12	11.58		Chlorine	17	5.75
	Sodium	11	9.31		Tellurium	52	0.32
	Chlorine	17	7.05		Calcium	20	0.32
	Sulfur	16	4.79		Potassium	19	0.32
	Potassium	19	0.01		Sulfur	16	0.32
Total: 100.00				Total: 100.00			

Fig. 1 Scanning electron microscopy (SEM) images of energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) analyses. A, precipitation in culture with 0.5 mM tellurate using *Pseudoalteromonas marinigultinosa* TK40 (circles point); B, back ground (dot circles point). AN; atomic number, norm. C; normalized concentration.

以上の高濃度で含まれていた (Fig. 1)。単離したその他 6 株も同様に沈殿物にはテルルが高濃度で含まれていた。これらの結果から、海洋性の環境試料から好気条件でテルル酸を元素態テルルまで還元できる菌を 7 株単離することに成功した。単離した株について 16S rDNA 解析等を行い分子生物学的に同定を行った。その結果、単離した 7 株を *Phaeobacter gallaeciensis* TK7 株, *Pseudoalteromonas lipolytica* TK8 株, *Vibrio harveyi* TK15 株, *Pseudoalteromonas marina* TK32 株, *Pseudoalteromonas marinigultinosa* TK40 株, *Vibrio harveyi* TK44 株, *Pseudoalteromonas elyakovii* TK47 株と名付けた (Fig. 2A)。系統樹解析の結果から、テルル酸還元能を持つ菌は広範囲に属していることが示唆された。

気化テルル合成能の解析

単離したテルル酸還元菌についてテルルの気化能を持っているかどうかを調べた。テルル酸は亜テルル酸を介して元素態テルルに還元され黒く呈色すると報告されている (Kagami *et al.*, 2012)。さらに元素態テルルから気化テルルを合成することによって、黒色は退色すると考えた。そこで元素態テルル由来の黒色から退色が速

かった *Pa. marinigultinosa* TK40 株をテルル酸含有 Marine 培地で培養を行い、各テルル濃度を経時変化で調べた。培養液中のテルル酸量の減少に従って、亜テルル酸を検出できなかったが、元素態テルル量が増加し 50 時間でピークに達した。その後、元素態テルルは培養時間 80 時間まで減少した (Fig. 3)。80 時間目の培養液はすでに黒色が退色していたことから、元素態テルルから気化テルルが合成されたと示唆された。亜テルル酸が培養中顕著に検出されないことから、亜テルル酸から元素態テルルへの還元速度が大きいと思われる。

調べた限りでは *Pseudoalteromonas* 属にはテルル酸を還元した菌株の報告はないことから、*Pa. marinigultinosa* TK40 株は好気培養条件でテルル酸還元能を有する新菌株であると思われる。またテルル酸の還元だけではなく、テルルの気化能も有していることが強く示唆された。今後は気化テルルがどのような化合物であるかを調べていく予定である。*Pa. marinigultinosa* TK40 株は海洋から単離された耐塩性菌で、塩濃度が高い排水や廃棄物中からテルルを回収するポテンシャルが高いと思われることから今後応用されることが期待できる。

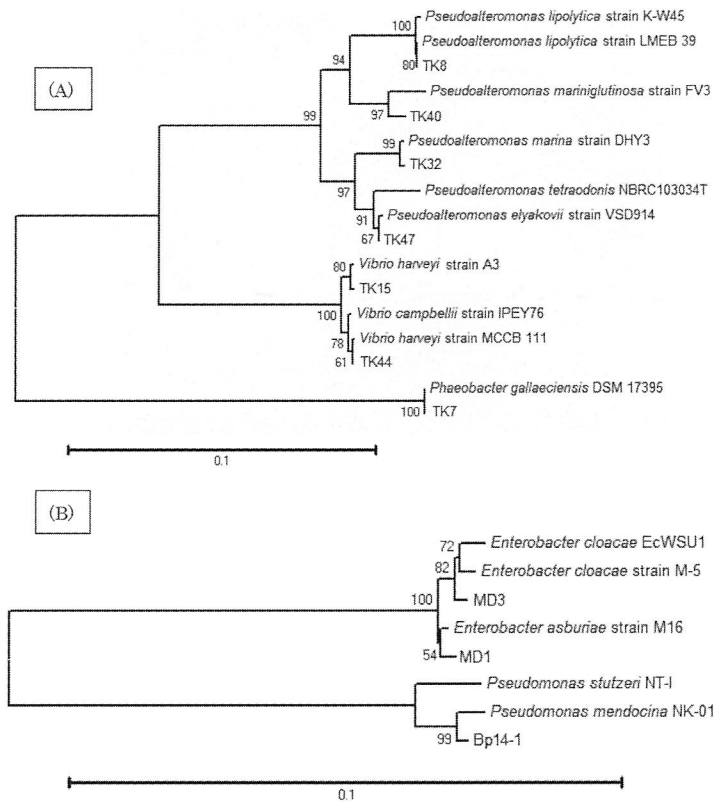


Fig. 2 Phylogenetic tree showing tellurate, (A) and selenate, (B) reducing bacteria with closely related strains. Both of trees were reconstructed with aligned 16S rDNA gene sequences using the neighbour-joining method. Scale bar; 0.1 nucleotide substitution per site.

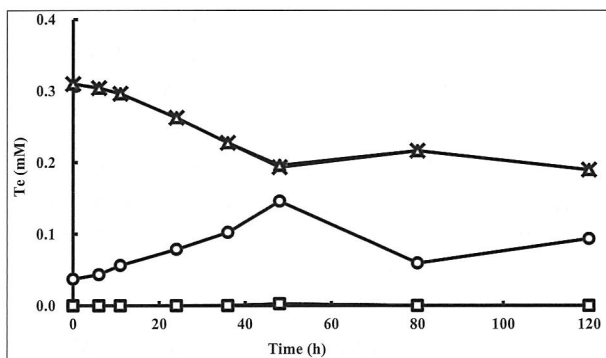


Fig. 3 Time course of aerobic tellurate reduction using *Pseudoalteromonas marigultinosa* TK40. Symbols: circles, elementary Te; triangles, dissolved Te; squares, tellurite; crosses, tellurate.

セレン還元微生物のスクリーニング

気化セレン合成菌を分離するために、まずはセレン酸から元素態セレンまで還元することができるセレン酸還元菌を多様な環境サンプルからスクリーニングを行った。セレン酸を終濃度 2 mM 添加した TSB 培地を好気条件下で培養を行ったところ、土壌サンプル中の

数サンプルの培養液が赤く呈色した。これは培養液中のセレン酸が亜セレン酸を介して、赤色の元素態セレンを合成したもので、培養液が赤くなったと思われる (Kuroda *et al.*, 2011)。セレン酸を含む TSB 平板培地上で、赤色に変化する形態の異なるコロニーをピックアップし、3 株を単離した。その内、Bp14-1 株と名付けた株を再度同様に培養し、培養液中にある赤い沈殿が元素態セレンかどうかを調べるために、沈殿物を電子顕微鏡観察と EDX による元素分析を行った。その結果、バックグラウンドに比べて沈殿物にはセレンと硫黄と塩素が多く約 20% 以上の高濃度で含まれていた (Fig. 4)。その他の 2 株の培養液沈殿物も同様に高濃度のセレンを含んでいた。以上の結果から、土壌の環境試料から好気条件下でセレン酸を元素態セレンまで還元できる菌を 3 株単離することができた。単離した株について 16S rDNA 解析等を行い分子生物学的に同定を行った。各々 *Enterobacter asburiae* MD1 株、*Enterobacter cloacae* MD3 株、*Pseudomonas mendocina* Bp14-1 株と名付けた (Fig. 2B)。本系統樹解析の結果と既知の報告から、セレン酸を還元できる菌は *Enterobacter* 属 (Yee *et al.*, 2007)、*Pseudomonas* 属 (William *et al.*, 2009) と *Bacillus* 属 (Souidi

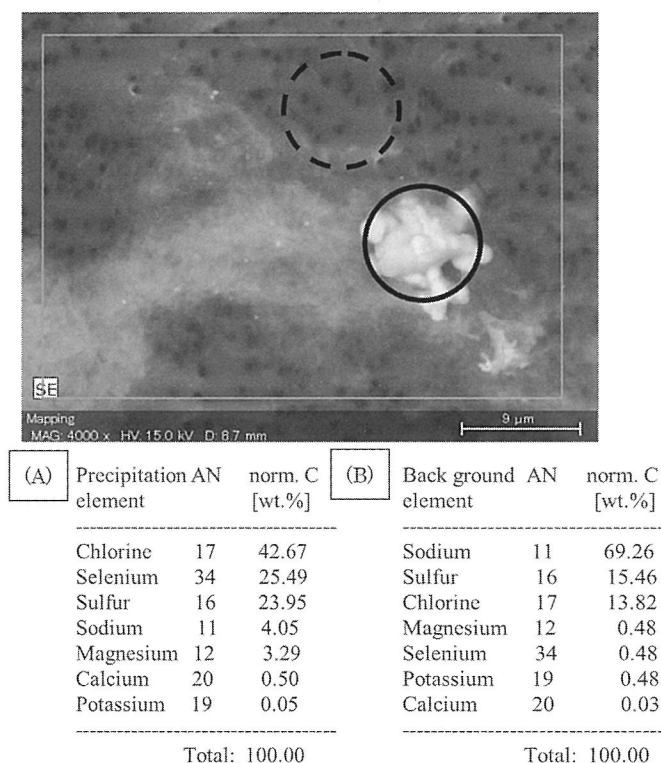


Fig. 4 Scanning electron microscopy (SEM) images of energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) analyses. (A) precipitation in culture with 0.5 mM selenate using *Pseudomonas mendocina* Bp14-1 (circles point); (B) back ground (dot circles point). AN; atomic number, norm. C; normalized concentration.

et al., 2009) に多いことが分かった。以上から、セレン酸を好氣的に還元できる菌はテルル酸還元菌と比較して限定された属種域に分布していると思われる。

気化セレン合成能の解析

セレンの気化能を有する *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株 (Kagami *et al.*, 2013) はセレン酸含有 TSB 培地で好気培養を行うと、セレン酸は亜セレン酸を介して元素態セレンに還元する。次に元素態セレンは還元されて気化セレンに合成されることが経時変化の観察から分かった (Fig. 5)。初期溶存セレン 0.55 mM のモデル廃水から、培養60時間後には 0.31 mM の気化セレンを回収できた。好気培養を行うだけで約 56% のセレンを回収することに成功した。そこで新たに単離した 3 株 *E. asburiae* MD1 株, *E. cloacae* MD3 株, *P. mendocina* Bp14-1 株が気化セレンを合成するかどうかを調べるために、NT-I 株での実験と同様にセレン酸含有 TSB 培地で長時間好気培養し、各セレン濃度の経時変化を調べた。

E. asburiae MD1 株は培養液中の 0.5 mM セレン酸を 50 時間で約 60% 元素態セレンに還元した (data not shown)。培養液中からは亜セレン酸も気化セレンを検

出できなかった。調べた限りでは、*E. asburiae* は好気条件下でセレン酸を元素態セレンまで還元できるという報告がなく、MD1 株は気化セレンを合成しない新規のセレン酸還元菌であると思われる。

E. cloacae MD3 株は培養液中の 0.5 mM セレン酸を 50 時間で約 90% 元素態セレンに還元した (Fig. 6)。MD1 株と同様に、MD3 株の培養液中にも亜セレン酸を検出できなかった。また元素態セレンは 120 時間経過しても有意な減少が見られず、気化セレンを検出することができなかった。同じ *Enterobacter* 属ではあるが、MD3 株のセレン酸還元能力は MD1 株より高いと思われる。

P. mendocina Bp14-1 株は培養液中の 0.5 mM セレン酸を 50 時間で約 90% 元素態セレンに還元した (Fig. 7)。Bp14-1 株は、NT-I 株と同様に培養液中に亜セレン酸のピークが見られた。培養液中のセレン酸の約 90% が元素態に還元が行われたが、120 時間培養を行っても有意に元素態セレンは減少しなかった。しかし 14 日間後の培養液気相を GC-MS 分析したところ、極少量のジメチルセレンイド (DMSe) を検出できた (Fig. 8)。NT-I 株を同条件で培養したところ、合成する気化セレンは主にジメチルジセレンイド (DMDS) であることから (Kagami *et*

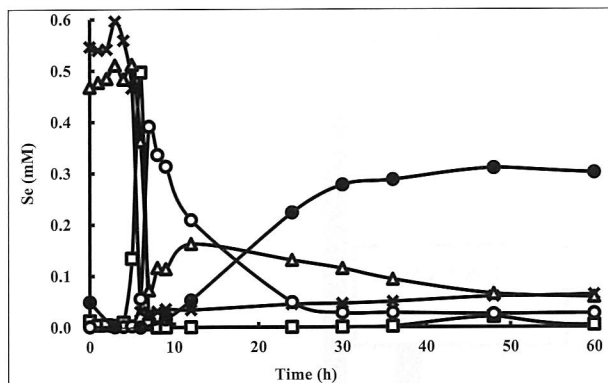


Fig. 5 Time course of selenate reduction by *Pseudomonas stutzeri* NT-I under an aerobic condition. Symbols: open circles, elementary Se; triangles, dissolved Se; squares, selenite; crosses, selenate; closed circles, volatile Se.

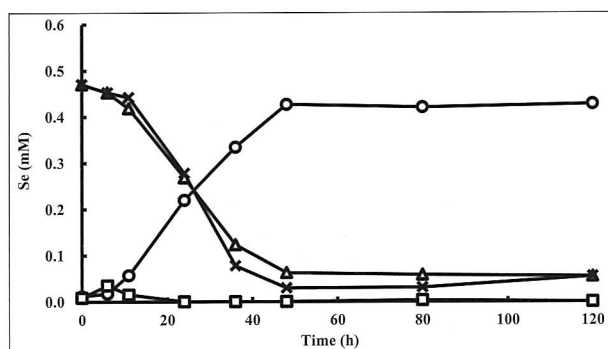


Fig. 6 Time course of aerobic selenate reduction by *Enterobacter cloacae* MD3. Symbols: circles, elementary Se; triangles, dissolved Se; squares, selenite; crosses, selenate.

al., 2013), Bp14-1 株は NT-I 株とはセレン気化機構が異なることが示唆された。調べた限りでは, *Pseudomonas mendocina* では好気条件下でセレン酸を元素態セレンまで還元し, 気化セレンを合成した菌株の報告は見当たらない。以上の事から *P. mendocina* Bp14-1 株は新規のセレン酸還元菌であり, 気化セレン合成菌であると思われる。

Enterobacter 属の亜セレン酸還元菌で *P. stutzeri* NT-I 株と比較して亜セレン酸から元素態セレンへの還元速度が大きい株が報告されている (Prakash *et al.*, 2010)。本研究で単離した *Enterobacter* 属のセレン還元菌は亜セレン酸のピークがなかったことから, 既報と同様に亜セレン酸から元素態セレンへの還元速度が大きいことが考えられる。一方で *Pseudomonas* 属である *P. mendocina* Bp14-1 株や *P. stutzeri* NT-I 株は亜セレン酸のピークが確認でき, 還元速度はセレン酸から亜セレン酸への還

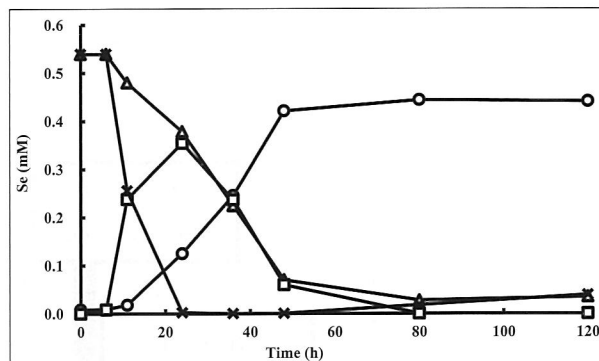


Fig. 7 Time course of aerobic selenate reduction by *Pseudomonas mendocina* Bp14-1. Symbols: circles, elementary Se; triangles, dissolved Se; squares, selenite; crosses, selenate.

元速度の方が大きかった。このことから, *Pseudomonas* 属と *Enterobacter* 属ではセレン酸の還元機構などが異なっている可能性が示唆された。

元素態セレンを用いた気化試験

気化セレン合成経路はセレン酸がセレノシステイン等のアミノ酸に取り込まれ気化セレンが合成される経路 (Neumann *et al.*, 2003) や, 亜セレン酸から直接気化セレンが合成される経路 (Reamer & Zoller, 1980) 等が推定されている。*P. stutzeri* NT-I 株は気化セレンとしてジメチルジセレニドを合成することは報告されているが (Kagami *et al.*, 2013), 代謝経路は不明である。そこで元素態セレンから気化セレンを合成する経路を調べることを試みた。

菌体の増殖に依存せずに調べるために, *P. stutzeri* NT-I 株の休止細胞を調整した。そこに基質として赤セレンを添加し, 通気を 1L/min で行い, 気化セレンを硝酸で捕集した。硝酸中のセレン濃度を分析した結果からセレン気化速度 $0.13 \mu\text{M}/\text{h} \cdot \text{OD}$ を得た (Table 1)。対照実験として NT-I 株を加えずに赤セレンだけを添加して同条件で実験を行ったが, セレンは硝酸中に検出できなかった。このことから NT-I 株は赤セレンを基質として気化セレンを合成していることがわかった。以上のことから, NT-I 株はセレン酸を亜セレン酸, 赤セレンに還元し, 赤セレンを介して気化セレンを合成することが考えられる。NT-I 株の基質特異性を調べるために, 市販されている粉末セレン (黒セレンと称する) を基質にして気化セレンを合成できるかを調べた。NT-I 株は赤セレンと同条件下で実験を行ったにも関わらず黒セレンから気化セレンを合成できなかった。次に本研究にて単離したセレン酸還元細菌 *P. mendocina* Bp14-1 株由来の赤セレンから気化セレンを合成するこ

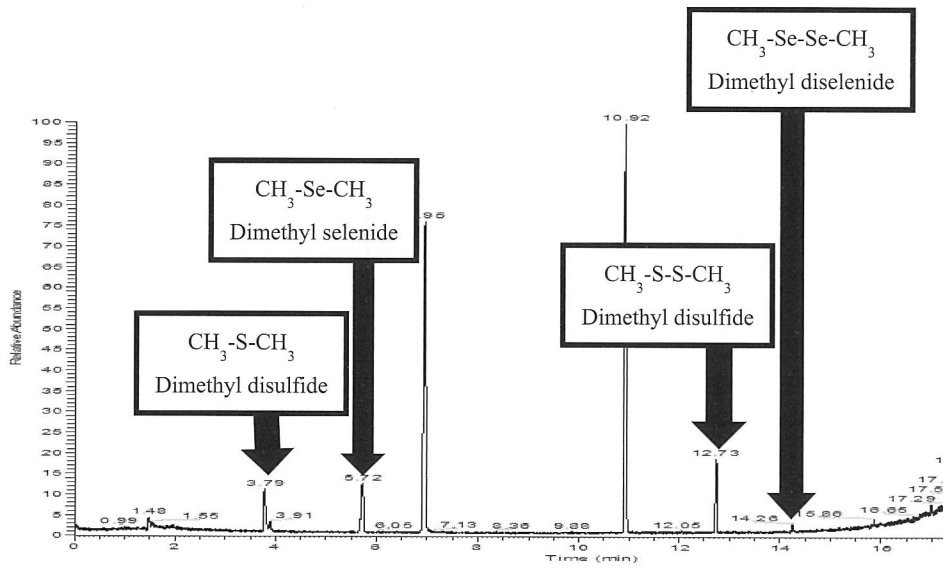


Fig. 8 GC-MS chromatogram of the headspace gas of *Pseudomonas mendocina* Bp14-1 culture with 0.5 mM selenate in 100ml Erlenmeyer flask at 14 d. The retention times of the reference dimethyl sulfide (DMS), dimethyl selenide (DMSe), dimethyl disulfide (DMDS), and dimethyl diselenide (DMDSe) were 3.8 min, 5.7 min, 12.7 min, 14.3 min, respectively.

Table 1 Volatilization rates with elementary Se by the resting cells of *Pseudomonas stutzeri* NT-I

substrate + culture condition	volatilization rates ($\mu\text{M}/\text{h} \cdot \text{OD}_{660}$)
Elementary selenium (Red)	0.13
Elementary selenium (Black)	0.03
Elementary selenium (Red) + Methionine 100 ppm	1.28
Elementary selenium (Red) synthesized by <i>P. mendocina</i> Bp14-1	0.08
Elementary selenium (Red) + anaerobic condition	0.01

とができるかを調べた。NT-I 株は Bp14-1 株由来の赤セレンを基質にして気化速度 $0.08 \mu\text{M}/\text{h} \cdot \text{OD}$ で、自己由来の赤セレンと同様に気化セレンを合成した。以上の結果から NT-I 株はセレン酸還元細菌が合成するバイオ赤セレンから気化セレンを合成するが、市販の黒セレンから気化セレンを合成しなかった。非晶質のセレンは赤色、結晶セレンは黒色をしていることから、バイオ赤セレンは非晶質だと考えられる。NT-I 株は非晶質な赤セレンから気化セレンを合成できたが、結晶黒セレンからは気化セレンを合成できなかった。以上のことから NT-I 株の気化セレン合成にはセレンの結晶構造の違いが関わっていると推測される。

次にメチル化に関与する知見から気化セレン合成を促進する因子をアミノ酸やビタミン類から調べた。メチオニンを添加した場合の気化速度は $1.28 \mu\text{M}/\text{h} \cdot \text{OD}$ であり、無添加の場合の気化速度より約10倍大きかった (Table 1)。システインや S-アデノシルメチオニン (SAM) を添加した場合は、無添加の場合の気化速度 ($0.13 \mu\text{M}/\text{h} \cdot \text{OD}$) とほぼ同じであった。シアノコバラミンを添加した場合、セレンの気化が行われず阻害された。以上の結果から、セレンの気化にはメチオニンが強く関与していると示唆された。SAM を基質としたメチル基転移酵素がジメチルジセレニドの合成に関与しているという報告がある (Ranjard *et al.*, 2003)。NT-I 株

もメチオニンによって気化セレンの合成が強く促進されたことから、メチオニンを元に合成されるSAMを基質とするメチル基転移酵素が関与しているものと考えられた。しかし本研究ではSAMを添加しても気化反応が促進されなかった。このことからNT-I株はメチオニンをSAMに合成して利用するのではなく、メチオニンを他の方法で利用し気化反応を促進していると推測される。今後はメチオニンが気化セレンの合成にどのように関与しているかを調べていくつもりである。

最後に、通気を止めた条件下で気化セレンの合成能を調べたところ、気化セレンを検出できなかった (Table 1)。本実験では溶存酸素を測定してないが、気化セレンを合成するためには酸素が必要であると思われる。以上の事から、通気を制御することより気化セレンと気化セレンの合成を制御できると示唆された。

モデル廃水からのセレン回収

P. stutzeri NT-I株は通気培養下ではセレン酸から気化セレンを合成し (Fig. 5)、通気を止めると気化セレンを合成しない、つまり元素態セレンで存在することが分かった (Table 1)。そこで菌体増殖後に通気を止めることにより、培養液中のセレン酸を元素態セレンとして回収することができると試みた (Fig. 9)。溶存セレン初期高濃度5.6mMのモデル廃水から、培養開始168時間目には元素態セレンが4.4mM回収できた。初期投入量の約79%のセレンを固化物として回収することに成功した。以上の結果より、細菌のセレン還元代謝を解析することにより廃水・廃棄物からレアメタルの回収の可能性が示唆された。

要 約

本研究では標的レアメタルとしてセレンとテルルを選択し、これらを代謝する微生物のスクリーニングを行った。これらの元素は水溶液中ではオキソアニオンとして存在し、*Escherichia coli*を含む多くの細菌に対する最小発育阻止濃度は1-5 μ g/ml程度であり、強い毒性を示す (Bebien *et al.*, 2002; Mansouri & Nayebeeaghaei, 2005)。そこで、多様な元素を含む土壌や水環境試料中 (海底泥・海水含む) に存在する微生物は金属代謝能が高いと考え、これらの試料からのスクリーニングを試みた。その結果、7株の海洋性テルル酸還元細菌と、3株のセレン酸還元細菌を単離することができた。特にテルル酸還元細菌は広い属種に分布していることが分かった。分離株の1株である *Pa. marinigultinosa* TK40株は好気条件下の培養でテルル酸を還元し、気化テル

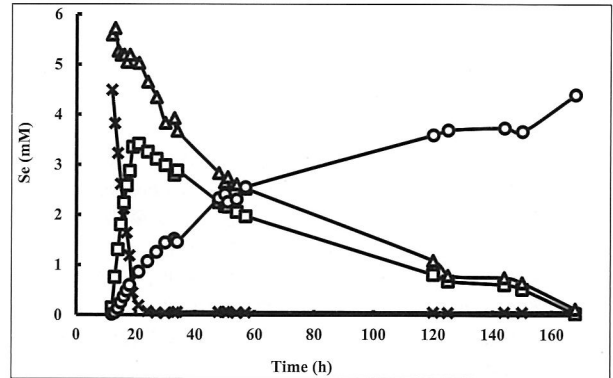


Fig. 9 Time course of selenate reduction by *Pseudomonas stutzeri* NT-I under an anaerobic condition. Symbols: circles, elementary Se; triangles, dissolved Se; squares, selenite; crosses, selenate.

ルを合成することが示唆された。テルル酸還元菌の分布範囲に比較して、セレン酸還元細菌の分布は狭く、気化セレンを合成する微生物はもっと少ないと思われる。調べた限りでは *P. stutzeri* NT-I株の気化セレン合成能は非常に高いと言える (Kagami *et al.*, 2013)。NT-I株はバイオで合成された元素態セレン (赤セレン) を基質として気化セレンを合成することを初めて見出した。*Pseudomonas mendocina* Bp14-1株は好気条件下でセレンを還元し、ジメチルセレニドを極少量合成するという、新規のセレン気化微生物であった。*Pseudomonas*属のセレン酸還元細菌と *Enterobacter*属のセレン酸還元細菌ではセレン還元メカニズムが異なるように思える。セレン酸還元能が高い *Enterobacter*属の細菌を反応に用いれば元素態セレンを固体物として得られる。*Pseudomonas*属のセレン酸還元細菌を用いればメチル化セレンを気化物として得られる。セレンだけでなく、他の微生物のレアメタル代謝メカニズムを解明すれば、元素態 (固体) やメチル化・水素化 (気体) で反応を制御することができるかもしれない。本研究ではNT-I株のセレン還元機構の一部を解析することにより、微生物を用いて初めてモデル廃水からセレンの回収に成功した。研究成果の先には、多様なレアメタルを含む排水・廃棄物から固体または気体としてレアメタルを回収できるプロセスの構築がある。

排水・廃棄物中のレアメタルは多量に存在すると毒性物質としても注目され、レアメタル汚染という新たな環境汚染が懸念される。微生物を用いた回収技術は、排水・廃棄物からの浄化処理技術を兼ねるものであり、資源循環と環境保全の一石二鳥な技術として重要な意義を持ち、循環共生型社会の構築に大いに寄与するものであると考えている。

本助成で得られた研究成果の報告（口頭発表、原著論文など）

- 1) 成田尚宣, 鏡つばさ, 黒田真史, 惣田訓, 池道彦, 山下光雄. (2012). セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I を用いたセレン酸および亜セレン酸還元の最適化. 日本農芸化学会2012年度大会 (京都).
- 2) 大塚治, 長谷川智美, 坂本康太, 生田裕馬, 池道彦, 山下光雄. (2013). テルル酸還元細菌 *Ochrobactrum anthropi* Ti-3 株のテルル酸還元能の解析. 日本農芸化学会2013年度大会 (仙台).

保存期間に寄託した菌株

なし

謝 辞

本研究の遂行にあたり、助成いただきました公益法人発酵研究所とその関係者の皆様に厚くお礼申し上げます。貴重な研究材料、情報を提供していただきました大阪大学大学院工学研究科・池道彦教授、及び東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科・今田千秋教授に深く感謝いたします。また本研究を進めるにあたり有益な示唆を頂いた本学 SIT 総合研究所レアメタルバイオリサーチセンターの研究員の方々（大塚治, 小野雪穂, 堀池巧, 成田尚宣）に感謝します。

文 献

- Bébian, M., Kirsch, J., Méjean, V. & Verméglio, A. (2002). Involvement of a putative molybdenum enzyme in the reduction of selenate by *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**: 3865–3872.
- Kagami, T., Fudemoto, A., Fujimoto, N., Notaguchi, E., Kanzaki, M., Kuroda, M., Soda, S., Yamashita, M. & Ike, M. (2012). Isolation and characterization of bacteria capable of reducing tellurium oxyanions to insoluble elemental tellurium for tellurium recovery from wastewater. *Waste Biomass Valor.* **3**: 409–418.
- Kagami, T., Narita, T., Kuroda, M., Notaguchi, E., Yamashita, M., Sei, K., Soda, S. & Ike, M. (2013). Effective selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from the aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. *Water Res.* **47**: 1361–1368.
- Kuroda, M., Notaguchi, E., Sato, A., Yoshioka, M., Hasegawa, A., Kagami, T., Narita, T., Yamashita, M., Sei, K., Soda, S. & Ike, M. (2011). Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. *J. Biosci. Bioeng.* **112**: 259–264.
- Mansouri, S. & Nayebeeaghaei, S. M. (2005). Screening 469 *Escherichia coli* isolates from south east of Iran for tellurite resistance phenotype. *J. Med. Sci.* **5**: 316–319.
- Neumann, P. M., de Souza, M. P., Pickering, I. J. & Terry, N. (2003). Rapid microalgal metabolism of selenate to volatile dimethylselenide. *Plant Cell Environ.* **26**: 897–905.
- Prakash, D., Pandey, J., Tiwary, B. N. & Jain, R. K. (2010). Physiological adaptations and tolerance towards higher concentration of selenite (Se+4) in *Enterobacter* sp. AR-4, *Bacillus* sp. AR-6 and *Delftia tsuruhatensis* AR-7. *Extremophiles* **14**: 261–272.
- Ranjard, L., Nazaret, S. & Cournoyer, B. (2003). Freshwater bacteria can methylate selenium through the thiopurine methyltransferase pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3784–3790.
- Reamer, D. C. & Zoller, W. H. (1980). Selenium biomethylation products from soil and sewage sludge. *Science* **208**: 500–502.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406–425.
- Soudi, M. R., Ghazvini, P. T. M., Khajeh, K. & Gharavi, S. (2009). Bioprocessing of seleno-oxyanions and tellurite in a novel *Bacillus* sp. strain STG-83: A solution to removal of toxic oxyanions in presence of nitrate. *J. Hazard. Mater.* **165**: 71–77.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731–2739.
- Turner, R. J., Weiner, J. H. & Taylor, D. E. (1992). Use of diethylthiocarbamate for quantitative determination of tellurite uptake by bacteria. *Anal. Biochem.* **204**: 292–295.
- William, J., Hunter, D. & Manter, K. (2009). Reduction of selenite to elemental red selenium by *Pseudomonas* sp. strain CA5. *Curr. Microbiol.* **58**: 493–498.
- Winkel, L., Feldmann, J. & Meharg, A. A. (2010). Quantitative and qualitative trapping of volatile methylated selenium species entrained through nitric acid. *Environ. Science Technol.* **44**: 382–387.
- Yee, N., Ma, J., Dalia, A., Boonfueng, T. & Kobayashi, D. Y. (2007). Se(VI) reduction and the precipitation of Se(0) by the facultative bacterium *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 are regulated by FNR. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1914–1920.

平成23年度一般研究助成の研究報告

助成期間：平成23年4月～平成25年3月

国内土壌中の *Bacillus cereus* group
菌種群の網羅的検索および
分類同定と炭疽菌との鑑別法の確立

奥谷 晶子

国立感染症研究所獣医学部
okutani@nih.go.jp

目的：炭疽は人および草食動物に重篤な症状を引き起こす人獣共通感染症であり、世界中で発生がみられる。現在、日本国内では発生のみられない疾患であるが、炭疽の起原菌である *Bacillus anthracis* (炭疽菌) は芽胞として数十年間は土壌中に生存出来ると考えられている。このため、過去に炭疽の発生していた国内の土壌中に炭疽菌の芽胞がどの程度存在するかについて調査することは国内における炭疽発生リスクを考える上で非常に重要である。また、土壌中には、炭疽菌や、炭疽菌と遺伝的に非常に近縁である *B. cereus* (セレウス菌) を含む、いわゆる *B. cereus* group を構成する菌種群の芽胞が多数存在している。セレウス菌の中には炭疽菌の病原性プラスミド由来の遺伝子を持ち、人に炭疽類似の症状を起こすものがあることが報告されていることから、非定形な病原性を示すセレウス菌と炭疽菌との切り分けは鑑別診断において非常に重要であるものの、これまでにこれらの菌種群の土壌中での分布についての詳しい知見は得られていない。さらに、菌の培養を阻害する物質が多く含まれる土壌から効率良く *B. cereus* group 構成菌種群を分離同定する方法について選択培地の選択、培養法の検討などが必要である。本研究では、国内各地から土壌を採取・収集し、土壌中の *B. cereus* group 菌種群の網羅的検索および分離同定と炭疽菌芽胞および炭疽菌との鑑別法の確立を行うことを目的とした。

方法：国内各地域(18都道府県)より土壌を採取・収集した。採取した土壌は、同体積の生理食塩水に懸濁して遠心分離後、上清を回収し芽胞のみを抽出するため65℃、15分の熱処理を行った。上清の一部は炭疽菌の病原性遺伝子特異的プライマーを用いて炭疽菌遺伝子の有無を検索した。残りの上清はセレウス菌選択培地

(NGKG 培地) で32℃一晩培養した。得られたコロニーは羊血液寒天培地での純培養を行い、溶血性の有無を確認した。また、菌種特異的 *gyrB* プライマーを用いたコロニー PCR により菌種の同定を行った。セレウス菌および *B. thuringiensis* (チュリンゲンシス菌) と同定された菌株は7種類の遺伝子による Multilocus Sequence Typing (MLST) による系統解析を行った。

結果・考察：本研究では土壌から炭疽菌および炭疽菌特異的遺伝子は検出されなかったものの、*B. cereus* group 菌群の分離同定法を確立することができた。18都道府県から採取された土壌から総計111株のセレウス菌とチュリンゲンシス菌が分離同定された。MLSTの結果、これら111株は、1) 土壌由来チュリンゲンシス菌、2) 土壌由来セレウス菌、3) 土壌由来および臨床由来セレウス菌の3つのクラスターに分類された。クラスター3) に分類された土壌由来セレウス菌は臨床由来セレウス菌と遺伝学的に非常に近縁であり、炭疽菌の病原性遺伝子の一部を保有していることが確認された。土壌から分離されたセレウス菌の中に、人に病原性を示すセレウス菌と非常に近縁なものが含まれていたことから、環境からの感染や汚染のリスクについて今後検証を進めていくことが重要であると思われる。

超高分解能質量分析法を用いた
ミコール酸の構造解析に基づく
Corynebacterineae 亜目の多様性解析

寺本 華奈江

日本電子株式会社開発部
kteramot@jeol.co.jp

目的：ミコール酸(MA)は、*Corynebacterineae* 亜目に属する菌群に存在する2-アルキル3-ヒドロキシ脂肪酸で、その有無や炭素鎖長分布は、化学分類の指標になっている。また、*Mycobacterium* 属菌に含有されるMAの総炭素数は60-90程度と大きく、細胞壁の疎水性、抗酸性、および薬剤耐性等との関連が指摘されているため、MAの生合成や代謝経路は、抗結核薬開発分野で注目さ

れている。MA は、薄層クロマトグラフィー (TLC)、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー質量分析などにより分析される。しかし、これら従来の MA 分析法は、煩雑で長時間を要するため、詳細な分析は結核菌およびその類縁菌など一部の菌群でしか進んでいない。そこで我々は、迅速簡便に MA を分析するために、質量分解能が高い MALDI Spiral-TOFMS を用いた総脂肪酸メチルエステル (Me) 画分の直接測定による分析手法の開発と、MA の多様性解析を試みた。

方法：総脂肪酸 Me 画分の直接測定により、各サブクラス MA の炭素鎖長分布や組成を詳細に解析できるのかを調べるために、既に様々な手法で構造解析が行われている *M. tuberculosis* H37Rv の総脂肪酸 Me 画分を測定した。本手法による解析結果を検証するために、同試料から TLC 処理により得られた各サブクラス MA Me 画分の解析結果と比較した。迅速簡便に解析結果を得るために、複雑なマススペクトル解析を支援するソフトの開発を試みた。*Corynebacterineae* 亜目に属する 10 属の総脂肪酸 Me 画分を測定して、総 MA のキャラクター化を行った。

結果・考察：*M. tuberculosis* H37Rv の総炭素鎖長分布や組成比は、総脂肪酸 Me 画分の解析結果と、各サブクラス MA Me 画分の解析結果が一致し、本手法により得られた解析結果の信頼性の高さが示された。マススペクトル処理支援ソフトを利用することで、測定後わずか数分で解析結果が得られるようになった。また、総 MA の解析結果を等高線図として可視化し、結核菌の比較解析に適用した。これら手法で *Corynebacterineae* 亜目に属する約 10 属を解析し、各菌群の総炭素鎖長分布、不飽和結合数、およびそれらの組成比の多様性を明らかにした。また、これら解析結果を利用して *Dietzia* 属、*Rhodococcus* 属、および *Gordonia* 属の分類を試み、平均炭素鎖長、平均不飽和結合数、および偶数鎖 MA 含有率に基づき、分けられることを明らかにした。本手法は迅速簡便に MA を詳細に解析できるため、化学分類に利用できる情報を与える手法として期待できる。

菌類-バクテリア共生体の網羅的な解析と その特性評価

成澤 才彦

茨城大学農学部
kan-moc@mx.ibaraki.ac.jp

目的：生態系において菌類は、種や生育環境によって、有機物の分解者、動物や植物に対する病原菌、または植物根圏で菌根を形成する共生菌など多様な役割を果たすことが知られている。そのため、菌類と内生細菌が相互に様々な影響を及ぼし合っていれば、その関係性についての知見を得ることは極めて重要である。本研究では菌類においても細菌との関係が普遍的に見られる現象であるとの仮説を提唱し、内生細菌と宿主菌類間における関係成立に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

方法：*Mortierella* 属菌から 15 種 21 菌株を選び、さらに近縁の *Modicella* 属から 2 種 2 菌株、合計 17 種 23 菌株、また牧場をサンプリングサイトに選び、家畜の糞、土壌および牧草など複数種の基質から菌類を新たに分離し、内生細菌の有無を調査した。それぞれの菌株から DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR を行った。また、細菌の検出された菌株について蛍光観察を行ない、菌糸細胞内への定着を確認した。

結果：*Mortierella* 属菌および *Modicella* 属菌 23 菌株中、少なくとも 4 菌株 (17%) において DNA の増幅が確認された。*Mortierella* cf. *kuhlmanii*、*M. exigua*、および *M. ambigua* から既報の *M. elongata* の内生細菌と近縁の細菌が検出された。一方、*Mortierella vesiculosa* からはマダニの偏性細胞内共生細菌 *Diplorickettsia massiliens* と近縁の細菌 (相同性 88%) が同定された。また、牧場からの分離菌株では、供試した合計で 176 菌株中、少なくとも 19 菌株 (11%) で DNA の増幅が確認された。特にウシの糞から分離された *Mucor circinelloides* およびブタ放牧地の牧草根部分から分離された *Fusarium* sp. から *Enterobacter* sp. が検出された。

考察：動物遺体を嗜好する *M. vesiculosa* から節足動物の共生細菌と近縁の内生細菌が検出された。また、牧場

からの分離菌株では、腸内細菌として知られている *Enterobacteriaceae* に属する細菌が内生していた。今後詳細な研究を行う必要があるが、本研究により菌類には細菌が内生し、さらにその生態的特性によって異なる内生細菌を保有する可能性があることが示唆された。

海洋生物に付着する難培養性微生物の分離、 分類及び保存法の研究

能 木 裕 一

独立行政法人海洋研究開発機構
nogy@jamstec.go.jp

目的：深海に棲息する底生生物には非常に多くの微生物が付着共生している。これらの中には海綿に付着共生している抗菌物質・抗腫瘍物質生産菌やサツマハオリムシなどの化学合成生物群集と共生し生育を支える菌などが知られている。前者の有用物質生産微生物は色々な微生物が報告されているが、放線菌を分離する事を目的とした。後者ではハオリムシ類のように幼生期には共生菌を持たず、成熟と共に環境から細胞内に取り込まれ、細胞内器官として働き硫化水素を利用する菌、これは16SrRNA解析からプロテオバクテリアに属すると分かっている細菌の分離を目的とした。しかし両者とも、多くは難培養か増殖が遅い微生物で従来の方法では分離する事が出来なかった。これらを分離培養するための前処理法、培地の検討等を行い新奇微生物の分離培養法の開発を目的とした。

方法：深海サンプルから通常の方法で微生物分離を行うと増殖の早いグラム陰性菌が多く分離され、増殖の遅い細菌や深海放線菌の分離は困難である。放線菌の分離に関しては陸上由来の放線菌の優先分離法を参考に予備実験を行ったが、深海由来の放線菌を分離するには適していなかった。そのためサンプルの前処理方法から検討を行った。分離条件確定後、沖縄トラフおよび相模湾沖サンプルから分離を試みた。また、細胞内共生菌の分離については硫黄酸化細菌の分離培地を改良した培地を中心に、鹿児島湾から採取したサツマハオリムシと相

模湾沖から採取したヒバリガイ、シロウリガイ、ハオリムシの栄養体、鰓、棲息コロニーの堆積物から菌の分離を試みた。

結果：深海放線菌の分離方法を検討するために、マリアナ海溝から分離した放線菌 *Dermaococcus* 属, *Williamisia* 属と広く環境に生息する *Streptomyces* 属, 生育を抑える対象の海洋から良く分離されるグラム陰性菌 *Pseudomonas* 属, *Pseudoalteromonas* 属, *Marinobacter* 属の菌を指標に用いた。陸由来の放線菌分離に用いられているサンプルの前処理を参考に熱処理, SDS 処理, 乾燥などを行った。グラム陰性菌の生育を抑制するレベルの SDS 濃度や乾燥処理ではマリアナ海溝から分離した放線菌の生育を著しく抑制した。50℃, 10 分間の熱処理がグラム陰性菌の増殖を抑え放線菌の生育に大きな影響を与えず最適な方法であった。分離培地に添加するグラム陰性菌の生育を抑える抗菌物質で、放線菌の生育に大きな影響を与えず、グラム陰性菌の生育を抑制するのはナリジクス酸で添加した場合のみであった。この方法により深海サンプルから新種と推定される放線菌を複数分離することに成功した。細胞内共生菌の分離に関しては目的とする細胞内共生している硫黄酸化細菌の分離には成功しなかったが、生物の成育に必須のポリアミンを作る能力が欠失し、共生相手から貰って生育する細菌など複数の新属、新種の細菌を分離する事に成功した。

難培養真核微生物の進化系統学的解析

野 田 悟 子

山梨大学大学院医学工学総合研究部
nsatoko@yamanashi.ac.jp

目的：自然環境中には培養が難しい未知微生物が数多く生息していることが明らかにされてきた。これら培養が難しい微生物はゲノム情報が整備されていないことから、その進化的・分類学的位置が不明のままとなっている種も多い。そこで本研究では主に、食材性昆虫の腸

内に共生する難培養の真核単細胞微生物の進化的位置を複数のマーカー遺伝子の複合データを用いて解析を試みた。

方法：野外から採集した食材性昆虫シロアリの腸内内容を顕微鏡で観察し、微小キャピラリーを用いて共生原生生物の細胞を分取した。分取した細胞から phi29DNA ポリメラーゼにより全ゲノム DNA を増幅し、一部は逆転写酵素によって cDNA を合成した。細胞骨格系の actin, tubulin やペプチド鎖伸長因子 EF-1 α , EF 2, Hsp90 遺伝子等を PCR で増幅してクローニングし、塩基配列を決定して最尤法, Bayes 法で系統解析を行った。

結果・考察：パラバサリア門原生生物のほとんどは食材性昆虫の消化管に共生しており、6つの綱に分類されている。この中 Spirotrichonympha 綱は、宿主シロアリ腸内の生息数が少ないことや細胞が比較的小さいために実験が難しく、これまでにほとんど配列情報が報告されていなかった。そこで、本綱の4属13種から16S rRNA 遺伝子を取得して、系統解析を行った。Holomastigotoides 属, Holomastigotes 属はそれぞれ単系統群となり、グループ化は高い統計値で支持された。しかし、Spirotrichonympha 属, Spirotrichonympha 属は単系統群を形成せず、多系統群となっていた。統計学的検定 (SH テスト) の結果からも、これらの属の単系統性は棄却された。電子顕微鏡観察を行ったところ、基底小体と鞭毛の複合体の構造や配置等、細胞内部の微細構造の形態学的特徴は、これまでに報告されている各属と同じであることが明らかになった。このことから、現在の形態学的特徴に基づく属レベルの分類は適切ではないことが示唆された。今後、新たな形態学的特徴の探索や、遺伝子情報に基づいた再分類が必要であると考えられる。

鳥などの動物に寄生するトリコモナス類 (Trichomonad) も含めて、複合データセットを用いて系統解析を行った。この結果は、最近になって見直されたパラバサリア門の6綱の分類を支持するものであった。また、広範な真核生物の系統群を含めた系統解析を行ったところ、パラバサリア門は他の真核生物とは独立した単

系統群を形成した。系統解析に用いる系統群の数をえて解析を行ったところ、サンプル数が多い方がより精度の高い解析結果を得られると推定されたことから、今後難培養性の種からも多くの配列データを取得して解析を行うことで、真核生物の初期進化に関する詳細な知見も得られるものと期待される。

転写装置アーキアRNAポリメラーゼの 機能進化に関する研究

平 田 章

愛媛大学大学院理工学研究科
ahirata@eng.ehime-u.ac.jp

目的：アーキアは1種類の転写装置である RNA ポリメラーゼ (RNAP) を用いて、DNA を鋳型にすべての種類の RNA を合成している。マルチサブユニットで構成されたアーキア RNAP の D サブユニットは、L サブユニットと D/L ヘテロ 2 量体を形成し、RNAP が会合するための「足場」として機能することが知られている。RNAP は、生命活動に必須の普遍的な転写装置であるにもかかわらず、D サブユニットの特異的なアミノ酸配列 (ドメイン 3) は、アーキア間で相同性が低く、進化的多様性が生じている。そこで本研究ではドメイン 3 の構造と機能を解析することで、ドメイン 3 の生物学的意義について調べることにした。

方法：NCBI に登録されたすべてのアーキアゲノム DNA を比較対象にし、ドメイン 3 のパイオインフォマティクス解析を行った。グループ 1 に属するメタン生成アーキア *Methanosarcina acetivorans* (Mac) 由来の D/L ヘテロ 2 量体の組換え体に、嫌気的条件下で鉄硫黄クラスターを導入し、また、ドメイン 3 を欠損させた変異体 Δ D3 も構築して、それぞれのタンパク質の電子スピン共鳴法などによる生化学的解析を行った。一方、グループ 5 に属する超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* (Tko) 由来の D/L ヘテロ 2 量体の組換え体および Tko RNAP の X 線結晶構造解析を行った。X 線源に放射光施設 (SPring-8) を使用した。

結果・考察：ドメイン3は、[4Fe-4S]クラスターの結合に関与するシステイン残基の有無や保存位置の違いで、6つのグループに分類することができた。グループ1に属するMac D/Lヘテロ2量体を解析した結果、ドメイン3に保存された8つのシステイン残基が2つの[4Fe-4S]クラスターの保持に重要であることが明らかになった。また、2つの[4Fe-4S]クラスターは、酸素に曝されると崩壊し、Mac D/Lヘテロ2量体がオリゴマー会合体を形成した。これらの結果と今までの知見を合わせると、Macドメイン3における2つの鉄硫黄クラスターが酸素センサーとして機能し、RNAPを構成するサブユニットの会合を調節することで、遺伝子発現制御を行っている可能性が考えられた。一方、グループ5に属するTko D/Lヘテロ2量体およびTko RNAPのX線結晶構造を1.6Å及び3.2Å分解能で決定した。 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ の2次構造で構成されたTkoドメイン3は、活性部位を形成するのに重要なBサブユニットと相互作用していた。このことから、Tkoドメイン3は、RNAPの会合体形成を促進することで、RNAPの構造の安定性に寄与していることが示唆された。上記の一連の結果から、おそらく、ドメイン3は独自の機能を獲得するために分子進化したものと考えられる。

トランスポゾン分子進化に基づく
マツタケ類の起源と種分化の解明

村田 仁

独立行政法人森林総合研究所きのこ・微生物研究領域
murmur@ffpri.affrc.go.jp

目的：マツタケ (*Tricholoma matsutake*) 及びその近縁種 (=マツタケ類) は、樹木と共生する担子菌で、地域固有性が高いが、この種群の類縁関係は未だ解明されていない。本研究では、トランスポゾン (TE) を指標に、マツタケ類の起源と種分化の解明に取り組んだ。

方法：今回、その素性がほとんど知られていない南欧のオウシュウマツタケ (*T. caligatum*) を現地 (イタリア) で採集し、その分離菌株を NBRC に寄託するとともに、

この種を含むマツタケ類を試料に用いた。そして、rDNA, *tef*, *gpd* 等の遺伝子の塩基配列、担子菌門に特異的な SINE と呼ばれる TE の配置、及びマツタケ類特異的な TE の分布を基に解析した。

結果・考察：塩基配列に基づく系統解析から、広葉樹と共生するバカマツタケ (*T. bakamatsutake*) (極東からニューギニア) やニセマツタケ (*T. fulvocastaneum*) (極東) が、針葉樹と共生する *T. matsutake* (極東・北欧)、アメリカマツタケ (*T. magnivelare*) (北米)、アナトリアマツタケ (*T. anatolicum*) (南欧・北アフリカ)、及びメキシコマツタケ (*Tricholoma* sp. Mex) よりも早い段階で種分化したと推察された。なお、上記針葉樹共生菌は互いに近縁であった。一方、南欧の針葉樹に共生する *T. caligatum* は、他の針葉樹に共生するマツタケ類とは遠縁で、広葉樹と共生するマツタケ類よりもさらに昔に種分化したと予測された。しかし、この *T. caligatum* と他のマツタケ類との系統は bootstrap 値が低く不明瞭であった。同様に *T. fulvocastaneum* の系統学的位置づけも不明瞭であった。そこで short interspersed nuclear elements (SINE) の配置やその他の TE の分布を解析し、マツタケ類の系統関係をさらに詳細に調べた。その結果、マツタケ類は、早い段階で種分化したグループと遅い段階で種分化したグループに分けられた。前者には、*T. bakamatsutake* や *T. fulvocastaneum*、及び *T. caligatum* が含まれ、後者には、*T. magnivelare*, *Tricholoma* sp. Mex, *T. anatolicum*, *T. matsutake* が含まれた。そして、*T. bakamatsutake* がマツタケ類全体で最も昔に種分化し、*T. fulvocastaneum*, *T. caligatum* と続き、*T. caligatum* が針葉樹共生マツタケの中で最も早く種分化したとの結果に至った。特に広葉樹共生マツタケから針葉樹共生マツタケへの種分化の過程において担子菌門に特異的な SINE の配置特異性に大きな変化があり、その後、針葉樹に共生するマツタケ類では、この SINE の配置特異性の変化は無くなった。また、マツタケに特異的な TE は、*T. caligatum* から *T. magnivelare*, *Tricholoma* sp. Mex, *T. anatolicum*, *T. matsutake* への種分化の過程においてそのコピー数が増大し

ており、針葉樹共生マツタケにおいてゲノムが劇的に進化したことが推察された。なお、白い子実体が特徴的な *T. magnivelare* は、*T. caligatum* から派生し、北米で独特の進化を経たことが明らかになった。以上から、マツタケ類は、広葉樹から針葉樹共生への移行の過程、特に現在南欧から北中米で生息するマツタケ類において劇的な種分化があったと推察された。

胞子に付属糸をもつ分生子果不完全菌類の
新分類体系ならびに形態と寄生性の進化を
ITS2 二次構造の解析から探る

渡辺京子

玉川大学農学部
wkyoko@agt.tamagawa.ac.jp

目的：*Pestalotiopsis* 属関連菌群は分生子層から形成される分生子が複数の細胞で構成され、頂部と尾部に付属糸を有することが特徴である。属の設立は、この細胞数や付属糸の数の違いなど形態的な特徴の違いを指標としている。本研究では属を分子系統学的に再編成することを目的に ITS2 領域の塩基配列と二次構造を指標に系統解析を行った。

方法：関東近郊のほか、北海道、徳之島、カナダなどから、分生子が複数細胞で構成され、付属糸を有することを指標に *Pestalotiopsis* 属関連菌群を採集した。菌は定法により分離培養して形態的特徴を記録するとともに、DNA を抽出し ITS4 と ITS5 をプライマーとして ITS 領域 (ITS1, 2-5.8S rRNA) を増幅させた。この ITS 領域の塩基配列を基に NJ 法により系統樹を作成した。また WEB 上の ITS2 data base (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>) を用いて二次構造を基にした ITS2 塩基のアライメントを行い、ProfDis (フリーソフト) を用いて NJ 法にて系統解析を行った。

結果・考察：本助成による採集により *Pestalotiopsis* 属 41 菌株、*Discosia* 属 1 菌株、*Seiridium* 属 4 菌株、*Bartalinia* 属 1 菌株、*Synnemapestaloides* 属 1 菌株を得た。いずれも植物を宿主とする菌である。これに加え

研究室保存菌株やデータベース上の *Seimatosporium* 属菌、*Truncatella* 属菌など、合計 115 データを用いて分子系統解析を行った。その結果、ITS 領域や ITS2 二次構造による分子系統樹では、80%以上の BT 値で支持されるクレードに複数の属がグルーピングされていた。特に *Seimatosporium* 属 1 菌株 (5 細胞分生子) と *Synnemapestaloides* 属 (6 細胞分生子) 7 菌株は 100%BT 値で支持されるクレードに所属した。両者の違いは、分生子の形成が分生子柄束あるいは分生子層から発生する点と、本菌群の属の基準である分生子の細胞数に違いがあった。また、*Pestalotiopsis* 属菌は 3 つの大きなクレードに分けられたが、これらの間には他の属も入り組んでいた。一部の *Pestalotiopsis* 属菌株 (5 細胞分生子) は *Pestalotiopsis* 属間よりも、*Seiridium* 属 (6 細胞分生子) の一部の菌株により近縁だった。

本菌群の ITS 領域による系統解析は 2011 年には否定された (Maharachchikumbura *et al.* 2011) が、2012 年には ITS 領域、 β -tubulin, *EF-1* それぞれが有効な遺伝子であり、これらを結合させた配列による系統樹が最適であると、同一の研究者が報告している。このように本菌群の見解には変遷があり、属や種が不安定である。その理由が、属の設立の基準である分生子の形態が系統を反映していない点にあるといえるのかもしれない。本研究においても、同一のクレードに異なる細胞数をもつ菌株が属した。以上のことから、本菌群を整理するにあたり、さらに慎重な議論が必要であるものの、この関連菌群を 1 属として、分生子の形態の違いなどを種レベルに格下げした特徴として取り扱える可能性が示唆された。また形態的な相違は収斂進化と考えるのが妥当と考えられた。

コリネ型アミノ酸生産菌のもつ潜在的な グルコース輸送バイパスの解明と発酵への応用

池田 正人

信州大学農学部
m_ikeda@shinshu-u.ac.jp

目的: 代表的なアミノ酸生産菌である *Corynebacterium glutamicum* はグルコース (Glc) を PTS と呼ばれるホストトランスフェラーゼシステムによって取り込みリン酸化を行う。それ以外の Glc 輸送系は知られていない。我々は最近、本菌種には潜在的に PTS とは別の Glc 輸送系が、しかも複数存在することを示唆する結果を得た。それらの「Glc 輸送バイパス」は、実体は不明ながら自然突然変異によって容易に目覚めるので、発酵への応用も容易である。実際、予備的にバイパスによるリジン生産を試みると、発酵収率や高温発酵能など、幾つかの面で PTS 株を凌ぐ有利な特性が認められた。本研究は、本菌種に眠る Glc 輸送バイパスの実体を解明するとともに、PTS に代えて同バイパスを発現する菌株の育種技術を開発することを目的とする。

方法: 目的とする Glc 輸送バイパス遺伝子の特定は、ホモロジー検索や遺伝学的なアプローチにより行った。遺伝学的なアプローチとしては、PTS 破壊株から Glc で生育するサプレッサー変異株を誘導し、同株の有するサプレッサー変異を同定することを通して目的遺伝子に迫った。同変異の同定は、DNA アレイ解析や全ゲノム解析を交えて行った。

結果・考察: 大腸菌で Glc 輸送を担う *galP* とのホモロジー検索により、コリネゲノムからバイパスの候補遺伝子 *iolT1* および *iolT2* (ともにイノシトール輸送体遺伝子) を抽出した。これらの発現実験と破壊実験により、両遺伝子産物ともグルコースの取り込み活性を有していることが検証された。次いで、PTS 破壊株から Glc 培地で生育するサプレッサー株 SPH2 のゲノム解析を行い、Glc 生育を可能にするサプレッサー変異が調節遺伝子 *iolR* 内のフレームシフト変異であること、さらにトランスクリプトーム解析で、同変異が *iolT1* の高発現を

もたらし、これが PTS 非依存的な Glc 輸送を可能にしていることを明らかにした。この知見をリジン生産菌に適用してバイパスでグルコースを代謝するリジン生産菌を育種した結果、育種株では PTS 株よりリジン発酵収率が有意に向上し、物質生産におけるバイパス利用の有用性が示唆された。一方、サプレッサー株の中に、*iolT1* および *iolT2* の両イノシトール輸送体遺伝子を破壊してもなお Glc で生育する株が存在することを見出した。そのような株 SPH1 の全ゲノム解析で、本株が有するサプレッサー変異が Glc 輸送体 EII^{Glc} と高いホモロジーを有する新規遺伝子の上流に見出された。この新規遺伝子は、周辺の遺伝子構成から β -グルコシドの取り込みを担う PTS の EII^{bd} 遺伝子と推察された。同遺伝子の発現実験と破壊実験により EII^{bd} がそれぞれ単独で Glc パーミアーゼ活性を有することが検証された。本結果は、PTS の輸送体タンパク質コンポーネント (この場合は EII^{bd}) が PTS ではなく Non-PTS ルートとして Glc 輸送に機能しうることを示す最初の知見である。本研究ではさらに、細胞内 Glc のリン酸化に公知の 2 種のキナーゼに加えて第 3 のキナーゼが関わっていることを見出し、それがこれまで機能未知であった Cgl2647 遺伝子産物であることを明らかにした。

脂質のクオリティーコントロールに働く システイン/シスチン シャトルシステム

大津 巖生

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科
iohtsu@bs.naist.jp

目的: 大腸菌においてシステイン (Cys) とシスチン (CySS) が、Cys トランスポーター YdeD と CySS 結合タンパク質 FliY 依存的な CySS インポーターの働きによって細胞質とペリプラズムを循環しながら過酸化水素 (H₂O₂) を非酵素的に水へと還元するユニークな酸化ストレス防御機構を見出し、「Cys/CySS シャトルシステム」と名付けた。そこで本研究では、1) ペリプラズムから細胞質への FliY 依存的な CySS インポーターの同

定, 2) CySS インポーターの H_2O_2 耐性への関与の解明, 3) Cys/CySS シャトルシステムによる H_2O_2 消去の生理的意義の解明を目的に解析を行った.

結果: 1) CySS トランスポーターの同定: *ydjN* 遺伝子は *cysB* レギュロンに属し, CySS の輸送に関与する可能性が報告されていた. また, ラクトバチルス属細菌において CySS 取り込みに関与するタンパク質をコードする遺伝子群は, *cyu* オペロンを形成しており, 大腸菌にも *fliY*, *yecS*, *yecC* の3つの遺伝子とそのホモログとして見出された. 以上のことから, YdjN と FliY-YecSC は, CySS インポーターである可能性が考えられた. そこで, これらの欠損株を用いて [^{14}C]-CySS の細胞内取り込み量を測定した. その結果, YdjN ($K_m=1060$ nM) は FliY と独立した CySS インポーターであり, FliY-YecSC ($K_m=106$ nM) は FliY と共同して高親和的に CySS を取り込む ABC インポーターであると示唆された. さらに大腸菌における CySS 取り込み系は, YdjN と FliY-YecSC による2つの系しか存在しないことも明らかとなった.

2) CySS インポーターの H_2O_2 耐性への関与: H_2O_2 存在下で2つの CySS インポーター欠損株 ($\Delta ydjN \Delta yecS$) は, 野生株と比べて生育遅延が見られた. また, 2つの CySS 取り込み系に関与する遺伝子の転写量は H_2O_2 で誘導され, CySS 取り込みは H_2O_2 消去に重要な役割を果たすことを見出した.

3) H_2O_2 消去に働く Cys/CySS シャトルシステムの生理的意義: 野生株及び, Cys/CySS シャトルシステム欠損株 ($\Delta ydeD \Delta ydjN \Delta fliY$) を用いて過酸化脂質量を測定した. その結果, 野生株と比べて $\Delta ydeD \Delta ydjN \Delta fliY$ 株では, 過酸化脂質量が約2倍増加した.

考察: 以上のことから, 細胞膜を構成している脂質の酸化を未然に防ぐために Cys/CySS シャトルシステムが必要であると示唆された. Cys/CySS シャトルシステムにおける酸化ストレス耐性の発揮には, CySS 取り込みから獲得される Cys の循環が重要であると考えている.

スクリーニングと代謝工学による バイオプロパノールの発酵生産

片岡道彦

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科
kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp

目的: 代表的汎用ポリマー原料であるプロピレンをバイオマスから製造することを目的とし, その前駆体となるプロパノールの発酵生産を代謝工学的手法により実現しようと試みた. これまでに, 微生物では本来生合成経路を持たない1-プロパノールを生産させるための人工生合成経路を設計し, これに必要な酵素遺伝子を組み込んだ組換え大腸菌を構築した結果, 1-プロパノールを微量ながら生産させることに成功している. そこで, 本研究ではさらなる1-プロパノールの生産性向上を検討した.

方法: 1-プロパノール生合成酵素系を最適化するために, 反応初発となるジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) から中間物質である1,2-プロパンジオール (1,2-PD) に至る3段階の反応を触媒する酵素をいくつか選抜し, 各反応を触媒する酵素の最適な組み合わせを選ぶため, 様々な組み合わせで大腸菌に導入した.

また, 1-プロパノール生合成経路中の1,2-PDから1-プロパノールへの変換反応を担う酵素遺伝子を持つ *Escherichia blattae* のゲノムシーケンス情報から, 本菌ではラムノースはラクトアルデヒド (LA) と DHAP に分割され資化されると推測された. これらの化合物は1-プロパノール生合成経路の中間物質であり, *E. blattae* がラムノースから1-プロパノールを生産することが可能であると考えられた. そこで, *E. blattae* を用いたラムノースからの1-プロパノール発酵生産についても検討を行った.

結果・考察: 1,2-PD に至る3段階の酵素遺伝子の組み合わせの違いにより1,2-PDの生成量に大きな差が見られた. 大腸菌由来のメチルグリオキサール合成酵素, 2,5-ジケト-D-グルコン酸還元酵素 B, グリセロール脱水素酵素を用いた際に最も高い1,2-PD生成量を示し

た。それぞれの菌株における各反応の酵素活性を測定したところ、最大の1,2-PD生成量を示した組み合わせは単純に各酵素の菌体内活性が最も高い組み合わせとはならないことが明らかとなった。

E. blattae による1-プロパノール生産に関しては、*E. blattae* への1-プロパノール生合成経路導入の有無によらず、ラムノースからの1-プロパノール生成が確認できた（消費ラムノース約20mMに対して、生成1-プロパノール約15mMが生成）。1-プロパノール生合成経路を導入していない野生株でも1-プロパノール生成が認められ、このように非組換え体で著量の1-プロパノール生産に成功した例は報告されておらず、本例が初めてとなる。一方で、1-プロパノール生合成経路導入の有無によらず生産量があまり変化していないことから、導入した経路がうまく機能していないことが考えられた。経路遺伝子の導入法を含めてさらに検討を行うことで効率的な生産が可能になると期待している。

乳酸菌由来のN・C末端でリンクする
環状抗菌ペプチド生合成機構の解明

川 井 泰

東北大学大学院農学研究科
ykawai@bios.tohoku.ac.jp

目的：N末端とC末端でペプチド結合した環状ペプチドは、そのコンパクトな形状から、熱やpH、特にエキソタイプのペプチダーゼにより切断を免れることで、高い安定性を有している。また、これまで微生物からヒトを除く哺乳類まで100種類を超える環状ペプチドが見出されているものの、微生物における環状化形成機構については解明されていない。筆者は、ヒト乳児由来の乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* (ガセリ菌) LA39株の生産する抗菌ペプチド(ガセリシンA:GA)が、世界で2例目の微生物由来環状抗菌ペプチドであることを見出した。本研究では、GAの生合成遺伝子上の環化に関与する遺伝子(群)の特定と変異導入により、GAの環状化機構について解明することを試みた。

方法：GAの生合成遺伝子 *gaaBCADITE* (*gaaBC* 推定リーダー切断酵素遺伝子, *gaaA* 構造遺伝子, *gaaDI* 自己耐性遺伝子, *gaaTE* 推定ABC-トランスポーター遺伝子)を組み込んだ発現ベクター(pGAA2)を鋳型として作成した各種変異プラスミドを *L. gasseri* JCM1131^T またはGA自然耐性獲得株1131GARに形質転換した。各培養上清中の抗菌活性については、*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002^T (pSYE2)を指標菌に用いた寒天拡散法により測定し、抗菌活性が得られた株については質量分析(FAB-MS)およびN末端アミノ酸配列解析により環化形成の有無を検証した。

結果・考察：GaaA(GA前駆体)のリーダーペプチドN末端領域の欠損により、上清中の抗菌活性は大幅に低下した。また、GAのN末端やC末端とそれら近傍のアミノ酸の変更では、N末端と比較してC末端のアミノ酸残基がGAの環状化と抗菌活性提示に重要であることが明らかになった。

各生合成遺伝子欠損株のうち、*L. gasseri* JCM 1131GAR(pGAA2Δ*gaaTE*)の培養上清に抗菌活性が認められた。本改変株の培養上清から活性成分を精製し、質量分析に供して得たm/z値5,671は環状型GAのm/z値5,651と比較して約20(水1分子)高値であり、非環状型と推定された。N末端アミノ酸配列解析結果から、1131GAR(pGAA2Δ*gaaTE*)のGAは*gaaBCADI*から生産された非環状化構造であり、GaaTEが環化形成に関与する因子であることを原核生物で初めて見出すことが出来た。

GaaBの分子内に各1残基のみ存在するCys97およびHis83、および菌体内側で1残基存在するGlu144のアミノ酸置換を行っても、培養上清中の抗菌活性は維持されていた。本結果から、GaaBがシステインプロテイナーゼおよびHis・Glu残基を触媒残基とするセリンプロテイナーゼではないリーダー切断酵素と推定された。

枯草菌の孢子形成期および定常期における
リボソームの活性調節と構造変化の解明
および特異的遺伝子高発現系への応用

河村 富士夫

立教大学理学部
kawamura@rikkyo.ac.jp

目的: *Bacillus subtilis* (枯草菌) の孢子形成期と非孢子形成 (定常) 期における翻訳系の制御, 特にリボソームの不活性化に伴う二量体化の形成と分解の制御機構の解明を目的として研究を行った.

方法: 野生株の孢子形成期の各過程の細胞と非孢子形成培地における定常期の細胞のリボソームプロファイルを 10%–40% ショ糖密度勾配超遠心法により求め, *hpf* (*yvyD*) や, σ^H , σ^B の単一欠失株と二重欠失変異株のリボソームプロファイルと比較し解析を行った.

結果・考察: 孢子形成期の初期に 70S リボソームが不活性化され, 次に休眠促進因子 (Hibernation promoting factor, Hpf) により不活性型リボソームのダイマーが形成される. 孢子形成期中期には rRNA が切断・分解され始め, 孢子形成過程の進行につれ後期にはダイマーリボソームが分解され消失することを見出した. この *hpf* 遺伝子は孢子形成開始期に活性化される σ^H とストレス応答時に活性化される σ^B により認識される 2 つのプロモーターを持ち, 孢子形成開始期には, *hpf* の σ^H 依存のプロモーターから強く転写が誘導されていた. 栄養増殖期の細胞で Hpf を過剰発現させても 70S リボソームのダイマーは形成されないことから, まず 70S リボソームが何らかの因子により不活性型 70S リボソームとなり, 次に Hpf によりダイマーリボソームが形成されると考えられる. 孢子形成過程の進行に伴い母細胞で形成されたダイマーリボソームの 16SrRNA が特異的な部位で切断され, 後期にはダイマーリボソームが分解される. これらの分解物は, 孢子形成後期に大量に合成されるスポアコートタンパク質の合成に再利用されるものと考えられる. 一方, 有用物質やタンパク質の生産発酵には, 枯草菌が殆ど孢子形成を行わない培地が

よく使用される. 非孢子形成培地 (LB) の定常期の細胞において形成されるダイマーリボソームは, 孢子形成初期の細胞や全 ppGpp 合成酵素欠失株で *ywaC* を誘導した時に σ^H 依存のプロモーターから *hpf* の転写が行われる経路と異なり, ストレス応答時に活性化される σ^B により *hpf* の転写が行われていることを見出した. 従って, 孢子形成を開始しない定常期の細胞では, 既知の反応経路とは異なる経路で *hpf* の転写制御, つまりダイマーリボソーム形成の制御, が行われていることが示唆された. 非孢子形成培地では形成されたダイマーリボソームは分解されることはなく, 新たな再増殖に備えて貯蔵されており, ダイマー形成のできない変異体は定常期細胞から対数増殖細胞への転換に長時間要することも見出した.

C₁ 化合物を出発原料とした発酵生産系への
応用に向けた C₁ 耐性酵母の基盤構築

中川 智行

岐阜大学応用生物科学部
t_nakaga@gifu-u.ac.jp

目的: CH₄ や CO₂ から直接生産できるメタノールは, 水と CO₂ に完全酸化されることから環境負荷の少ない次世代炭素源とされている. つまり, メタノールを用いた高生産・高効率な発酵生産系が実現できれば, 安価かつカーボンニュートラルな物質循環システムへの寄与が期待できる. しかし, 現在, 高濃度のメタノールに耐えられる C₁ 微生物は存在せず, 高生産・高効率な発酵生産のためには C₁ 微生物に高メタノール耐性能を付与することが必要である. 本研究課題ではメチロトロフ酵母の C₁ 代謝制御機構の詳細を明らかにし, 高生産・高効率な発酵生産系への応用を見据えた高メタノール耐性酵母の分子育種の基盤作りを目指した.

方法: メチロトロフ酵母 *Pichia pastoris* および *P. methanolica* を用いて, メタノール生育限界およびメタノール生育段階での培地中のホルムアルデヒド (FA) 濃度の推移を測定した. また, メタノール代謝酵素群の発

現誘導も経時的に追跡した。

高メタノール耐性酵母の育種はメタンスルホン酸エチル (EMS) による薬剤変異法にて行った。変異株の選抜は 7.5%メタノール培地で良好な生育を示す株を集積培養により獲得した。

結果・考察：メチロトロフ酵母はメタノール濃度が 2.5%以上で生育阻害が観察され始め、7.5%ではほとんど生育できなかった。また、本酵母のメタノール生育時の FA の挙動を観察したところ、1%メタノールでは培地中に 0.15 mM の FA の蓄積が観察され、FA の消費とともにメタノール生育を示した。一方、メタノール濃度が高くなると、蓄積する FA 濃度が上昇し、その FA の消費は明らかに遅く、FA 消去がメタノール生育における鍵段階であることが示された。また、培地中に FA を添加すると誘導期が延長され、FA の消費とともにメタノール生育が開始された。また、本酵母はメタノール濃度の上昇に応じて FA 脱水素酵素 (FLD) の発現量を増加させ、さらにはメタノール生育の初期段階で FLD を、それに遅れて FA 生産系であるアルコール酸化酵素を発現させていた。このように、メチロトロフ酵母は FA の毒性に応じた統括的な代謝制御系を持ち、その FA 毒性耐性機構の強化が高メタノール生育の改善のための鍵であると考えられた。

また、*P. pastoris* の高メタノール耐性株の分子育種を試み、7.5%メタノールでも生育を示す SH1 株を獲得した。本株は FA を添加したメタノール培地において野生株よりも良好な生育を示した。これら結果から、SH1 株は FA 耐性能を獲得することで高メタノール生育能を獲得しているものと結論づけた。

今回、SH1 株を獲得し、高生産・高効率発酵生産系への応用に向けた第一歩を踏み出すことができた。本研究成果は更なる耐性能を付与したスーパーメチロトロフ酵母の分子育種の可能性を示すものである。

D-ソルビトールからの D-フルクトース発酵を可能にする酢酸菌株のスクリーニングと育種

薬師 寿治

山口大学大学院医学系研究科
juji@yamaguchi-u.ac.jp

目的：甘味料などとして広く用いられている D-フルクトース (D-Fru) は、デンプンを D-グルコース (D-Glc) に加水分解した後、グルコースイソメラーゼにより D-Fru に異性化する方法によって製造するのが一般的である。イソメラーゼによる反応は、出発物質と生成物が約 1:1 となる時点で見かけの反応が終了し、果糖ブドウ糖液糖と呼ばれる D-Glc と D-Fru の混合物が製造される。D-Glc をほとんど含まない D-Fru の安価な生産が可能であれば、果糖ブドウ糖液糖に取って代わる新しい甘味料を提供できる。これは、効率よく甘味料をつくるだけでなく、カロリーを抑えた甘味料となる。酢酸菌はアルコール、糖や糖アルコールを酸化し、その酸化生産物をほぼ定量的に蓄積するユニークな代謝系「酸化発酵」を営む。本研究の目的は、酢酸菌の物質酸化能を利用して D-ソルビトール (D-Sor) から D-Fru を酸化発酵的に生産させることである。

方法：本研究では 2 通りの方法で D-Sor から D-Fru を生産することを試みた。まず、酢酸菌の D-Fru 生産性 NAD⁺ 依存型ソルビトール脱水素酵素 (SLDH) を大腸菌に発現させた。この組み換え大腸菌で D-Sor から D-Fru への生産を試みた。次に、酢酸菌株のスクリーニングを行った。多くの酢酸菌は強力なポリオール脱水素酵素 (GLDH) を持つため、ほとんどの D-Sor は L-ソルボースへと酸化される。すなわち、微弱な D-Fru 生産を見逃す可能性がある。そこで、D-Sor に類似した立体構造を持ちながら、GLDH の基質にならないズルシトール (Dul) を用いて、Dul からケトースを生産する酢酸菌をスクリーニングした。

結果・考察：酢酸菌の SLDH を大腸菌に発現させたところ、無細胞抽出液で約 $6 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$ の D-Sor 酸化活性を持つほど高発現を行うことができた。

L-ソルボース還元活性よりも D-Fru 還元活性の方が強かったため、D-Sor の酸化産物は D-Fru であると考えられた。しかしこの組み換え大腸菌による D-Fru 生産効率は約 1% であり、ほとんど生産できなかった。酢酸菌を用いたスクリーニングでは、Dul をケトースに変換する菌株を、*Gluconobacter* 属から 3 株、*Gluconacetobacter* 属から 1 株見いだした。最も優れた菌株で約 45% の変換効率でケトース生産を行った。その酸化速度は、D-Sor から L-ソルボースへのそれと比べると約 10 分の 1 ほどであった。Dul からのケトースは D-タガトースか L-タガトースのいずれかが考えられる。現在ケトースの精製を行い、同定を試みている。

4つの光学異性体をもつ非天然アミノ酸の 生産に有用な微生物酵素の探索と改良

和田 大

北海道大学大学院農学研究院
wada@chem.agr.hokudai.ac.jp

目的：アスパラギン酸のアナログである 3-ヒドロキシアスパラギン酸 (HA) は分子内に 2 つの不斉炭素を持ち、4 種類の立体異性体が存在する。4 種類の HA 異性体のうち、L-threo-HA に特異的に作用する L-threo-HA デヒドラターゼと、L-erythro-HA 及び D-threo-HA に作用する D-threo-HA デヒドラターゼがすでに報告されている。一方で、D-erythro-HA に作用する酵素の報告例はほとんどない。また、既知の 2 つの HA 分解酵素は、アミノ酸配列が全く異なっている。本研究では、D-threo-HA デヒドラターゼの発現系の改良、および D-threo-HA デヒドラターゼを用いた光学分割を行った。さらに新規な D-erythro-HA 分解酵素を探索し、その諸性質を既知の HA 分解酵素と比較した。

方法：*Escherichia coli* における D-threo-HA デヒドラターゼの発現量が不十分であったため、発現宿主を放線菌 *Rhodococcus erythropolis* に変更することで発現量を増加させ、光学分割に用いた。また、DL-erythro-HA を単一窒素源とした土壌スクリーニングにより D-

erythro-HA 分解酵素を持つ微生物を探索し、酵素精製を行った。

結果・考察：酵素的光学分割の結果、理論最大収率 50% に対し、それぞれ 38.9%、48.9% の高い収率で、L-threo 体と D-erythro 体を取得した。本研究は酵素的光学分割を用いて HA の異性体を調製した初の例であり、この方法は、結晶化以外の精製ステップを必要としない効率的なものである。

一方、*Pseudomonas sp.* N99 株に D-erythro-HA デヒドラターゼ (D-EHA DH) 活性を見出した。N99 株は HA の 4 種類の異性体すべてに対してデヒドラターゼ活性を持っていた。D-erythro-HA 分解酵素の性質を調べるために、N99 株より D-EHA DH の精製を行った。各種クロマトグラフィー及び硫酸分画により、目的の酵素をほぼ均一に精製することができた。精製酵素は L-threo-HA、D-erythro-HA に高いデヒドラターゼ活性を示し、L-erythro-HA には活性を示さなかった。このことより、D-EHA DH は HA の 3 番目の炭素の立体配置を厳しく認識していることが示唆された。さらに縮重 PCR、インバース PCR 法により全長の推定アミノ酸配列を取得した。既知の HA 分解酵素と比較すると、L-threo-HA デヒドラターゼとは約 68% の高い相同性を示したが、D-threo-HA デヒドラターゼとは有意な相同性を示さなかった。これらの相同性解析の結果から、D-EHA DH はセリン/スレオニンデヒドラターゼに属する酵素であり、また L-threo-HA デヒドラターゼのホモログであることが明らかになった。本酵素は D-erythro-HA に作用するデヒドラターゼとして、初めての報告である。

酵母細胞を用いたトランス脂肪酸の 安全評価系構築と作用機構の解析

井 沢 真 吾

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科
thioredoxin@kit.ac.jp

目的：不飽和脂肪酸は置換基の配置によりシス型とトランス型に分類され、天然の植物油に含まれているのは

シス脂肪酸だが高温下での精製・脱臭処理や硬化処理などによってトランス脂肪酸が生成する。トランス脂肪酸の過剰摂取はLDLコレステロールレベルの上昇とHDLコレステロールレベルの低下を引き起こし、冠動脈性心臓病などのリスクを増大させる危険性が報告されている。そのため2003年以降、食品中のトランス脂肪酸レベル明記の義務化や使用規制が各国で行われるようになった。トランス脂肪酸の生体への影響は疫学調査や病理学的解析を中心に議論されてきたが、分子・細胞レベルでの解析データは非常に乏しいのが現状であり、作用機構や細胞応答機構等はほとんど未解明のままである。そこで、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いてトランス脂肪酸の摂取および代謝時における細胞内の応答機構について解析を行い、作用機構に関する新しい情報の収集と安全評価系の構築に取り組んだ。

方法：出芽酵母は脂肪酸を炭素源として生育することが可能なため、トランス脂肪酸が真核細胞に与える影響を分子・細胞レベルで解析する上で優れたモデル生物である。本研究では、オレイン酸 (18:1 *cis*-9) とエライジン酸 (18:1 *trans*-9) をそれぞれ炭素源とする培地 (0.3% 酵母エキス, 0.5% ペプトン, 0.5% Tween 80, 0.125% 脂肪酸, 5 mM リン酸バッファー, pH 6.0) で酵母細胞を培養し両者の違いを検討した。ペルオキシソームなどのオルガネラ形態や各種ストレス応答性タンパク質の局在を検討するために、GFP タグを融合したタンパク質を発現するゲノム組込み型プラスミドを構築して利用した。

結果・考察：DNA マイクロアレイ解析により、エライジン酸での培養によって複数の遺伝子の転写レベルが有意に上昇することを見出した。さらに、GFP fusion を使った蛍光顕微鏡解析やウェスタンブロット解析により、これらの遺伝子がコードするタンパク質の発現レベルもエライジン酸培地中では高いことを確認した。これらの結果は、オレイン酸とそのトランス異性体であるエライジン酸が遺伝子発現制御に関しては全く異なる影響を与えることを強く示唆している。また、エライジン酸培地では生育できない遺伝子破壊株や、エライジン酸濃度に依存して発現レベルが上昇する膜タンパク質の

存在を確認した。膜タンパク質についてはトランス脂肪酸による膜流動性の低下を感知するセンサータンパク質である可能性が考えられたため、レポーターアッセイ系としての活用を現在検討している。

有用土壌細菌のバイオフィーム形成を介した植物表面への定着能の改善

上 田 晃 弘

広島大学大学院生物圏科学研究科
akiueda@hiroshima-u.ac.jp

目的：ある種の有用土壌細菌は植物表面に定着することで植物の生長を促進させうることが知られている。しかしながら自然環境下では有用土壌細菌は他の細菌などとの競合により、土壌中や植物表面で優占種となることが容易ではない。よって有用土壌細菌の土壌への単なる接種では、植物の生長促進効果を安定的には期待することができない。そのような問題の解決を目指すために、本研究では細菌のバイオフィーム形成に着目した。バイオフィーム構造は細菌の物質表面への定着をより安定させる働きを持つ。よって細菌のバイオフィーム形成機構を解明し、またバイオフィーム形成能を向上させる方法を開発することを目的として研究を行った。

方法：細菌のバイオフィーム形成機構を理解するために、モデル土壌細菌である *Pseudomonas protegens* Pf-5 (*P. fluorescens* Pf-5) にトランスポゾン変異を導入した変異体ライブラリーを作成し、バイオフィーム形成能が変化した変異体のスクリーニングを行った。選抜された変異体においてトランスポゾン変異の導入により機能が失われた遺伝子の同定を行った。また広島県東広島市と竹原市の貧栄養土壌や沿岸・汽水域に自生する植物根圏から細菌を単離し、そのバイオフィーム形成能と植物根圏での定着能について調査を行った。

結果・考察：LB 培地におけるバイオフィーム形成能を指標にして *P. protegens* Pf-5 の変異体のスクリーニングを行った。単離された変異体の原因遺伝子の同定の結果、バイオフィーム形成を正に制御する因子としては

histidine kinase やヘマグルチニン様タンパク質, 負に制御する因子としては AraC 型転写因子, GGDEF ドメインタンパク質, aerotaxis レセプター等が単離された. 最終的に 13 種類の変異体からバイオフィーム形成を制御する遺伝子群を 9 種類同定した. バイオフィーム形成能が向上したトランスポゾン変異体のいくつかはその運動性が低下しており, バイオフィーム形成能と運動性は負の相関があることが示唆された. 次にバイオフィーム形成に影響を及ぼす物質の探索を行った. グリセロールやショ糖の添加はブドウ糖の添加よりも *P. protegens* Pf-5 のバイオフィーム形成量を約 10 倍向上させることが分かった. さらに広島県下の自然環境に自生する環境細菌を植物根圏より単離し, 植物に耐塩性や低リン耐性を付与しうる細菌の選抜を行った. これらの有用細菌のバイオフィーム形成能を調べたところ, 培養時の栄養条件を制御することによってバイオフィーム形成量を安定的に向上させることができた. このような条件を用いて植物根圏に接種した場合, 植物根圏での定着能が 100 倍以上改善された. このことから細菌のバイオフィーム形成能の改変は植物根圏での定着能に大きく寄与していることが明らかとなった.

短鎖脂肪酸受容体と生活習慣病：
腸内細菌を介した食事性栄養認識受容体による
エネルギー調節機構の解明

木村 郁夫

京都大学大学院薬学研究科
ikimura@pharm.kyoto-u.ac.jp

目的：近年, 食事由来繊維より腸内細菌によって産生される生体内エネルギー短鎖脂肪酸の細胞膜上受容体として GPR41 と GPR43 が発見された. この短鎖脂肪酸受容体に関して, 我々は独自に GPR41 が交感神経節, GPR43 が脂肪組織に高発現するという知見を得た. したがって, GPR41 については交感神経系を介したエネルギー調節, GPR43 に関しては直接的な脂肪組織に対する GPR43 によるエネルギー調節機構に着目し, それ

ぞれの受容体における相互作用ネットワークに焦点することにより, 腸内細菌-短鎖脂肪酸によるエネルギー調節機構を解明する. このことにより, これら短鎖脂肪酸受容体を分子標的とする, 食と医を結びつけた全く新たな生活習慣病の治療薬開発への糸口の解明を目的とする.

方法：GPR41, 43 の関与が示唆される交感神経系, 脂肪・腸内細菌でのそれぞれにおける相互作用ネットワークに焦点し, それぞれの組織における GPR41, 43 によるエネルギー調節機構の解明を行う. これら組織が腸内細菌叢変化を基点として, お互いに協調することによってネットワークを形成し, GPR41, 43 はエネルギー制御を行うという仮説を基に, 全く独自の視点により研究を行う. さらにこの GPR43 によるエネルギー調節メカニズムと GPR41 による交感神経を介したエネルギー調節メカニズムとの関連を明らかにし, 短鎖脂肪酸自体が腸内細菌を介し, エネルギー調節にどのように関わっているのかを解明する.

結果・考察：GPR41 が, 腸内細菌により産生されるエネルギー源である短鎖脂肪酸を認識し, 交感神経系を調節することにより生体内のエネルギーバランスを維持していることを明らかにした (Kimura *et al.* PNAS. 2011), さらにその作用機序について, より詳細な細胞内シグナル伝達機構を明らかにした (Inoue *et al.* FEBS Lett. 2012). また, GPR43 に関しては脂肪組織に発現する GPR43 の腸内細菌叢を介した活性化が脂肪の蓄積を抑制し, さらには体全体のエネルギー消費を高めることにより肥満を抑制することを, GPR43 遺伝子欠損マウスや脂肪組織特異的 GPR43 過剰発現マウス, さらに無菌マウスなどを用いた実験により証明した (Kimura *et al.* Nat Commun. 2013. in press.). したがって, GPR43 を活性化することや, 腸内細菌そのものが, 抗肥満, 生活習慣病予防に非常に有用であることが予想される.

以上のことから, 我々は短鎖脂肪酸と腸内細菌叢との GPR41, GPR43 を介したエネルギー調節機構を明らかにし, それは食事によるエネルギー調節機構の解明に繋

がる知見を提供した。また、腸内細菌叢を標的とすることから GPR41, GPR43 の研究はプロバイオティクス、プレバイオティクスの観点からも非常に有用な知見を与えると考えられる。GPR41, GPR43 のエネルギー調節機構の解明は医・薬・農、全てを統合した新たな発見を導き、全く新たなタイプの生活習慣病治療薬への応用も可能であると期待される。

マリアナ海溝に生育していた 脱窒細菌の高圧環境適応機構

為我井 秀行

日本大学文理学部化学科
htamegai@chs.nihon-u.ac.jp

目的：*Pseudomonas* sp. strain MT-1 はマリアナ海溝（深度 11,000 m）の底泥から単離された深海脱窒細菌である。現在までのところ脱窒の初発段階を担う膜結合型硝酸塩還元酵素遺伝子 (*nar*)、ペリプラズム型硝酸塩還元酵素遺伝子 (*nap*) と最終段階を担う N_2O 還元酵素遺伝子 (*nos*) が見いだされている。*nar* 遺伝子クラスター中には既知の *Pseudomonas* 属遺伝子よりも他属海洋細菌のものと高い相同性を示す遺伝子が見いだされている。また *nos* 遺伝子も 16S rDNA による系統樹とは異なった様相を示した。本細菌にはこのように深海で独自に進化してきた脱窒系の一端をかいま見ることができる。

また硝酸塩還元酵素関連遺伝子のうち *nap* 遺伝子は圧力による発現量の変化は見られないが、*nar* 遺伝子の中には高圧下において強く発現誘導されるものがあり、深海環境への適応との関連において大変興味深い。しかし高圧下において *nap* ではなく *nar* が誘導されることの意義は明らかではない。

本研究では深海由来の脱窒細菌を用いて、深海における脱窒を分子レベルで解明することを目的とする。本研究により深海という未知の環境に生育する細菌のエネルギー代謝の一環が明らかになるものと思われる。

方法：次世代シーケンサーによるドラフトシーケン

スにより、*Pseudomonas* sp. strain MT-1 のゲノム情報を得た。そこから脱窒に関与する遺伝子、およびその周辺遺伝子に関する情報を得た。

嫌気かつ硝酸塩存在下で培養した菌を破碎し、超遠心分離によって可溶性画分を得た。これを用いて亜硝酸塩還元酵素活性を測定した。電子供与体としては人工基質を、電子受容体としては亜硝酸塩の代わりに酸素を用いた。高圧分光光度計を用いて高圧下における酵素活性も測定した。

また一方、相同的遺伝子組み換えを用い、本細菌の *nar* および *nap* 破壊株を作製した。

結果・考察：ドラフトゲノム解析の結果、亜硝酸塩還元酵素遺伝子 (*nir*)、 NO 還元酵素遺伝子 (*nor*) を同定した。その結果、本細菌の脱窒系は近縁の *Pseudomonas* 属のものと非常に類似していることが明らかとなった。

また亜硝酸塩還元酵素の活性測定の結果、本細菌の酵素は陸上由来の類縁菌に比べて比較的高い耐圧性を有することが示唆された。このことは本細菌の高圧環境適応に寄与するものと思われる。これまで深海由来の好圧性細菌の酵素が陸上由来の非好圧性細菌の酵素よりも耐圧性を示すことは知られていたが、深海由来の非好圧性細菌の酵素も耐圧性を持つという報告は初めての報告であり、細菌の高圧環境適応機構を考える上で興味深い発見であると言える。

また硝酸塩還元酵素遺伝子の遺伝子破壊株の実験の結果、*nap* 破壊株、*nar* 破壊株の構築に成功した。

病原性大腸菌の腸管内環境因子による 病原性発現制御機構の解析

戸邊 亨

大阪大学大学院医学系研究科
torutobe@sahs.med.osaka-u.ac.jp

目的：腸管出血性大腸菌 EHEC の感染に関与する病原因子の発現は、腸管内の様々な環境因子の変化により調節されている。なかでも腸管環境内において欠乏する鉄イオンは細菌の増殖に必須であると同時にその濃度変

化は環境シグナルとして利用されていると考えられる。これまでに、EHECにおいては、志賀毒素の発現が鉄イオンの欠乏により活性化されることが報告されていたが、感染初期の段階に重要な腸管上皮細胞への付着・定着に関与する因子の発現に対する効果はほとんど報告されていなかった。そこで鉄イオンのEHECの細胞付着に関与する病原因子の発現に対する影響について詳細に解析した。

方法：EHECにはEHEC O157:H7 Sakai株を用いた。遺伝子の欠失株は相同組み替えにより薬剤耐性遺伝子と置き換えて作成した。TranscriptomeにはAffymetrixのEcoli ver2 DNA chipを用いた。プロモーター活性は、luciferaseの上流にプロモーターDNA断片を挿入したプラスミドを用いて測定した。蛋白質の産生量は、特異的な抗体をもちいたウエスタンブロット法により比較した。

結果・考察：EHECをDME培地(0.25 μM 硝酸鉄)で培養するとLB培地(約6.5 μM 鉄化合物)で培養したときに比べ、細胞付着に関与するLEE遺伝子群の発現が上昇することが知られていた。そこで、DME培地に異なる濃度の硝酸鉄を添加してLEEの発現を検討したところ、鉄濃度が上昇すると発現が低下した。外界の鉄イオンの濃度に応答する制御系の中心的な制御因子はFurである。

そこで、*fur* 遺伝子欠失株における発現を詳細に検討したところ、LEE遺伝子群の発現は鉄濃度が低くてもFurに依存していることが明らかとなった。Furレギュロンに属する鉄利用関連遺伝子群の発現は鉄濃度の上昇に伴いFurにより抑制され、EHECにおいてもFurが正常に機能していたことから、LEE遺伝子群の発現はこれとは異なる機構による可能性が考えられた。Fur欠失変異によりLEE遺伝子群の発現制御因子をコードする*ler* 遺伝子の発現が影響を受けていること、Furに依存した発現は転写後の制御段階であることを明らかにした。さらに、この制御には*ler*の翻訳と下流領域の配列が必須であることが明らかとなった。一方、Furの欠失による*ler*の発現抑制の原因について検討した

ところ、菌体内の遊離鉄イオンの濃度の上昇によることが強く示唆された。以上の結果から、EHECの細胞付着に重要な役割を担うLEE遺伝子群の発現は、鉄の存在量に敏感に応答し制御されていること、その感知システムは鉄利用遺伝子群の制御系であるFurを介した転写段階の制御ではなく、菌体内の鉄イオンの変化を感知して転写後の段階において制御される新規の制御系であることが明らかとなった。

細菌と宿主相互作用における 排出蛋白質の機能解明

西野 美都子

大阪大学産業科学研究所
mnishino@sanken.osaka-u.ac.jp

目的：近年、多剤耐性細菌の出現が医療現場において大きな問題となっている。一方で、細菌ゲノム配列が次々と解読され、細菌染色体上には、異物排出蛋白質をコードしている遺伝子が数多く潜在していることが明らかとなってきた。異物排出蛋白質は抗菌薬や細胞障害性異物を菌体外に排出することにより、細菌を様々な化合物に対して耐性化させる。また、異物排出蛋白質は異物排出のみならず、代謝産物の輸送、情報伝達物質の排出、および細菌病原性の発現に関与していることが明らかになってきた。本研究は、細菌と宿主相互作用における排出蛋白質の機能を解明することを目的とする。

方法：宿主自然免疫応答に対するサルモネラ異物排出蛋白質の役割を明らかにするため、抗菌ペプチドに対する各種サルモネラ異物排出蛋白質遺伝子欠損株の感受性を測定した。また、LPS構造維持にサルモネラ異物排出蛋白質がおよぼす影響について、MALDI-TOF MSを用いて解析した。

結果・考察：抗菌ペプチドは自然免疫の重要な因子であり、両生類、昆虫、哺乳類など、様々な生物に保存されている感染防御システムである。ポリミキシンBはカチオン性抗菌ペプチドであり、細菌膜に対して傷害性がある。宿主内で、細菌が生存するためには、このよう

な宿主からの攻撃因子に対して自身を防御しなくてはならない。サルモネラの全ての異物排出蛋白質を欠損させた株は、野生株に比べ、ポリミキシン B への感受性が 100 倍以上高くなっていることを明らかにした。また、排出蛋白遺伝子単独欠損株を用いた解析の結果、サルモネラ特異的な排出蛋白質がポリミキシン B 耐性に関与していることが明らかになった。ポリミキシン B のターゲットである LPS の構造について MALDI-TOF MS を用いて解析した結果、サルモネラ野生株と排出蛋白遺伝子欠損株との間で、LPS の lipid A 部分に構造的な違いがあることが判明した。異物排出蛋白質は、薬剤耐性化だけではなく、宿主の自然免疫から逃れるという生理機能を担っていることが示唆される。

シングルセルレベル解析が明らかにする
海底地下生命圏の微生物生態

星野辰彦

海洋研究開発機構高知コア研究所
hoshinot@jamstec.go.jp

目的：培養を伴わない分子生物学的手法による環境中の微生物生態の解析はここ 20 年にわたり大きな力を発揮して来た。しかしながら、それらのほとんどは PCR に基づいた手法であり、その原理に起因するバイアスから逃れることは出来ない。実際に、PCR による解析で得られる微生物群集は真のポピュレーションの 1/2 程度であるという報告もある。我々がターゲットにしている海底下に広がる地下生命圏はかつて分析された事がないことから性状未知の細菌が多く存在すると思われ、既存の方法ではその真相が捉えられない事が十分にあり得る。そこで本研究では、地下生物圏における微生物生態の解明に資するバイアスレスなシングルセルレベルでの分析方法を開発することを目的として研究を行った。

方法：

シングルセルの分取

Escherichia coli を LB 培地で 18 時間培養し、その 100

μ l を回収し DNA を蛍光染色後、遠心分離により菌体ペレットを獲得した。ペレットを PBS で洗浄、50%、70%、100%エタノールで脱水し、フィルムスライド(Leica)に塗布し乾燥した。乾燥したスライドを蛍光顕微鏡で観察し、レーザーマイクロダイセクションにより細菌細胞 1 個を PCR チューブのキャップ上に分取した。

シングルセルからの遺伝子増幅

分取した細胞は、KOH 溶液により溶解し、その細胞溶解液に Multiple Displacement Amplification (MDA) の反応溶液を加え、30°C で 48 時間インキュベートすることにより DNA の増幅を行った。さらに増幅産物をテンプレートとして 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした PCR を行い、シングルセルからの遺伝子増幅が行われていることを確認した。

結果・考察：まず、テンプレート無しのネガティブコントロールについて MDA 反応を 48 時間時間行い、増幅を ViiA7 リアルタイム PCR システム (ライフテクノロジージャパン) でモニタリングした結果、増幅が全く起こっていないことが分かった。また、今回の実験では、MDA のプライマーとして DNA ランダムエキサマーでは無く、RNA を用いたためプライマーダイマーの形成も全く確認されなかった。

シングルセルからの DNA 増幅を蛍光によりモニタリングしたところ、およそ 12 時間後に増幅が確認され始め、増幅曲線はおおよそ 14 時間後にプラトーに達した。その MDA 増幅産物から増幅した PCR 産物を EcoRI で切断したところ、*E.coli* の 16S に特異的な DNA 断片が得られ、*E.coli* 一個の細胞に含まれる 1 コピーのゲノム DNA から PCR に用いるのに十分な量の DNA が得られることが分かった。今後、本研究で確立したプロトコルを海底下堆積物中に生息する微生物に応用し、その生態・生理学的特性について明らかにしていく予定である。

石灰化能を有する海洋細菌の探索と 石灰化メカニズムの解明

安元 剛

北里大学海洋生命科学部
yasumoto@kitasato-u.ac.jp

目的：ある種の海洋細菌はカルシウムイオン (Ca^{2+}) を含んだ培地で培養すると、菌体外にダンベル状や球状の特徴的な炭酸カルシウム (CaCO_3) 顆粒を形成する。この現象は 20 世紀初頭には報告があり、古くから知られている。この CaCO_3 顆粒形成のメカニズムは、硫酸還元菌、尿素分解菌またはシアノバクテリアなどの特定の菌種が有する代謝機構によって説明されてきた。しかし、上記の菌種以外でも同様の現象が確認されており明確な機構解明は未だなされていない。海洋生物の CaCO_3 骨格形成機構もいまだ不明な点が多く、この海洋細菌の石灰化機構を明らかにすることでより普遍的な石灰化機構の確立を目的とした。

方法：北里大学海洋バイオテクノロジーより分与された海洋細菌株を用いて、 CaCO_3 形成能を検討した。空気とより接触するような培養条件で、 CaCO_3 形成が促進されたことから、工業的な CO_2 吸収に利用されているアミン系化合物に着目した。環状ジアミンであるピペラジンと塩化カルシウム (CaCl_2) 各 10 mM の混合溶液を室温で一晩静置し、 CaCO_3 結晶の有無を調べた。また、アミンによる CaCO_3 形成と温度との関係を検討した。

生体内に多量に存在するアミンとしてポリアミンに着目し、各種ポリアミンを 10 mM CaCl_2 と混合し一晩静置後、生じた CaCO_3 結晶を顕微鏡下で観察した。同時に、ポリアミンの塩基性と CaCO_3 形成の関係を考察するため、10 mM CaCl_2 を調整時のポリアミン溶液と同等の pH 11 に NaOH および NH_3 を用いて調整し、 CaCO_3 形成量を比較した。

海洋細菌にみられるダンベル状や球状の CaCO_3 結晶の形成メカニズムを検証するため、様々な培地成分が CaCO_3 結晶に与える影響を検証した。

結果・考察： α および γ -プロテオバクテリア、バチル

スまたは放線菌といった広範な種で CaCO_3 形成を確認した。特に増殖が活発な菌種において CaCO_3 形成が生じること、空気とよく触れるような培養条件が CaCO_3 形成には重要であることがわかった。

各種ポリアミンと CaCl_2 の混合溶液からも多量の CaCO_3 が生じることが確認できた。NaOH を用いてポリアミンと同じ pH に調整した CaCl_2 溶液からは CaCO_3 はほとんど生じなかった。同様に NH_3 で pH 調整した CaCl_2 溶液からはわずかに CaCO_3 形成が見られた。この結果から、ポリアミン存在下での顕著な CaCO_3 形成反応は、アミン系化合物が高濃度 CO_2 を吸収する機構と同様に、アミノ基が空気中の CO_2 と結合してカルバメイト誘導体となり、カルバメイト誘導体が徐々に水と反応し、重炭酸イオン (HCO_3^-) が生じて CaCO_3 が沈殿するというメカニズムが強く示唆された。

海洋細菌の培地上に生じる特徴的な形状をしたカルサイトを、培地成分であるクエン酸三ナトリウムやペプトンを添加することで再現することに成功した。

本研究により全く新しい CaCO_3 形成機構を推定することができた。このことは、海洋細菌が地球史における炭素循環にこれまで考えられているよりも大きくかわってきたことを示唆している。

発酵研究所助成研究報告 第27号【非売品】

平成25年12月10日 印刷

平成25年12月16日 発行

編集委員長 中瀬 崇
編集委員 伊藤忠義, 桑原正章
永井和夫, 坂野 勲
横田 明

発行人 中濱一雄

発行所 公益財団法人 発酵研究所
大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

TEL. 06 - 6300 - 6555

FAX. 06 - 6300 - 6814

印刷所 日本印刷出版株式会社
大阪市福島区吉野1丁目2番7号