ISSN 0073－8751

NUMBER 29

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

RESEARCH COMMUNICATIONS

2015

公益財団法人 発 酵 研 究 所

RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 29

2 0 1 5

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	武田　光子
	冨田　房男	永井　和夫
	中瀬　崇	原島　俊
	古川　謙介	本田　武司
監　　事	下元　高文	藤井　智幸
評 議 員	今田　哲	魚住　武司
	北本勝ひこ	下田　親
	関　達治	竹内　昌男
	武田　直久	谷　吉樹
	土屋　英子	吉田　敏臣
顧　　問	坂野　勲	

目　次

微生物株の保存とバックアップ
～発酵研究所設立当時の理事会議事録から～……………………………中濱　一雄　1

第９回助成研究報告会の開催……………………………………………横田　明　11

■ **平成25年度大型研究助成**

ケイ酸添加による活性汚泥中の *Bacillus* 属優占化ならびに余剰汚泥
低減メカニズムの解析…………………………………………………池田　丈　15

生産物を鋭敏に分析する方法を活用した低栄養な環境で優占する
微生物の新規計数法の開発と未知微生物の分離………………………諏訪　裕一　25

コネクター分子 SafA による、大腸菌酸耐性情報伝達ネットワークの
制御機構…………………………………………………………………内海龍太郎　37

■ **平成21年度寄付講座助成**

眠れる微生物を覚醒させ機能を発現する機構の活用学………………鎌形　洋一　51

新規放線菌 *Tomitella bioformata* に休眠と覚醒をもたらす条件の解明
北川　航，加藤創一郎，菊池　義智，田中みち子，鎌形　洋一………………　59

寒天培養における微生物の生育手法の問題点に関する解析
鎌形　洋一，田中みち子，北川　航，菊池　義智，加藤創一郎………………　77

未培養微生物に対する生育因子の単離と同定
三橋　信也，鎌形　洋一……………………………………………………　85

■ **平成25年度一般研究助成**

原生動物の細胞外分泌物にて集積可能な細菌の探索およびそれら
細菌の生理的諸性質の解明……………………………………………多羅尾光徳　91

門を超えて分布する脱ハロゲン化呼吸細菌の分離および分類学的
特性評価…………………………………………………………………吉田奈央子　91

環境工学的手法を用いたメタン酸化に関与する未培養微生物の
集積培養と系統分類……………………………………………………幡本　将史　92

東北地方菌類の Epitype 標本および分離菌株の確立 ………………本橋　慶一　93

リボソームタンパク質をバイオマーカーとした質量分析法による
Aspergillus 属真菌の新しい系統分類法の開発 ……………………………… 佐藤　浩昭　94

断片化した DNA の増幅とシーケンスによる本郷ハーバリウム未同定種
の再同定と分類学的記載の促進 ……………………………………………… 今村　彰生　94

藻類を細胞内共生させる原生動物における、共生藻保有の意義に
関する研究 ……………………………………………………………………… 保科　亮　95

水生昆虫の腸内寄生菌ハルペラ目の網羅的探索と系統解明 ……………… 佐藤　大樹　96

ピロリ菌における内在性バクテリオファージの保有状況の検討と
それらの分類学的・生態学的解析 …………………………………………… 松崎　茂展　97

植物根を『選択圧の場』として利用する新規な放線菌選択分離法の開発 …… 山村　英樹　98

微好気培養法を用いた水生菌類の探索と系統進化の解明 ………………… 中桐　昭　99

黒麹菌および *Aspergillus niger* のカビ毒産生、分生子形態および
ゲノムデータに基づく類縁関係の解明 ……………………………………… 清水　公徳　99

放線菌におけるイミノ糖生合成系の解明と大量生産システムの開発 ……… 炭谷　順一　100

放線菌線状プラスミドを利用した高分子遺伝子導入法の開発と応用 ……… 小松　護　101

海洋性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* の菌体外 RNA 生産
メカニズムの解明による効率的 RNA 発酵生産手法の開発 ……………… 梅影　創　102

放線菌 *Streptomyces ficellus* による効率的寄生雑草防除剤生産法の開発 …… 原田　和生　103

未利用バイオマスからの水素生産を目指した超好熱菌の分子育種 ………… 折田　和泉　103

微生物代謝産物多様化のメカニズム解析と有用代謝物の医薬利用に
関する基礎研究 ………………………………………………………………… 蓮見　惠司　104

メタン生成アーキアの水素依存的な発現制御機構の解明 ………………… 新里　尚也　105

アカパンカビの重複配列を変異させる分子機構の全容解明とその
遺伝子工学的応用 ……………………………………………………………… 本田　信治　106

相同組換え酵素の細胞内直接導入による相同組換え効率上昇技術の
開発を目指した基盤研究 ……………………………………………………… 水谷　治　107

新規発見「白麹菌特異的スフィンゴ脂質」の発酵における挙動・局在
及びその意義の解析 …………………………………………………………… 北垣　浩志　107

生体機能分子 Anti-sense RNA による細菌の Quorum sensing
情報伝達の抑制 ………………………………………………………………… 平川　秀忠　108

腸内細菌の共生機構……………………………………………………………………高橋　恭子　109

感染時細菌の遺伝子発現変動と病原性発揮に関する研究………………………白土　明子　110

乳幼児期における口腔常在フローラの成立過程の解明…………………………竹下　　徹　110

ポリ乳酸ステレオコンプレックスの高効率生分解システム開発に資する
D乳酸ポリマー分解酵素生産菌の探索とカクテル分解酵素製剤開発　………田口　精一　111

ダイオキシン受容体による細菌感染に対する宿主免疫応答の制御機構………木村　彰宏　112

杯細胞特異的オートファジー欠損マウスにおける腸内フローラの
変化と大腸炎増悪化の分子機構…………………………………………………川島　博人　113

エピジェネティック制御に基づく天然物探索法を利用した植物内生
糸状菌からの多様な新規有用天然物の創出……………………………………浅井　禎吾　113

下水処理システムにおける薬剤耐性菌の消長と水系への拡散実態の
解明および対策方法の提案………………………………………………………古川　隼士　114

酵母遺伝学的解析系を用いた植物病原菌宿主感染戦略の分子レベル
での解明……………………………………………………………………………田淵　光昭　115

■ 平成26年度若手研究者助成

サンゴと共生藻の共生関係が成立する際の藻体内におけるグルコース
代謝の変化……………………………………………………………………………丸山真一朗　117

IFO Res.Commun. 29
1-9, 2015

微生物株の保存とバックアップ
～発酵研究所設立当時の理事会議事録から～

中　濱　一　雄

日本では地震，津波，台風は避けることができないので，これらによる被害を回避するため，バックアップとして微生物株を保存することが必要である．発酵研究所（Institute for Fermentation, Osaka, 略称 IFO）が微生物株保存機関であった時は，地震，津波，台風の被害を受けることがほとんどなく日本でもっとも安全と思われる山口県にある武田薬品光工場に約15,000株の１セットを保存していた．さらにさかのぼって，戦時中には微生物株の死滅，散逸を防ぐため，微生物株の疎開が行われていた．貴重な研究の成果である微生物株を守ることは現代の我々にも通じるものがある．その参考とするため，設立当時の財団法人発酵研究所の議事録を紹介したい．

東日本大震災の翌年，発酵研究所の元評議員である駒形和男先生（東京大学名誉教授）からお電話があり，「東京大学では，太平洋戦争中に坂口謹一郎先生が空襲を避けるため教室の菌株を盛岡農林専門学校と高田農学校に疎開させた．発酵研究所では，当時，菌株をどこに疎開させたのか」とのご質問をいただいた．財団設立当時の理事会議事録を調べたところ，菌株の疎開に関することが書かれてあったので，同議事録のコピーを駒形先生にお送りした．この理事会議事録には，上記の菌株の疎開のほかにも事業内容，役員など終戦前後の我が国の微生物研究の状況を知る上でたいへん貴重な事柄が記載されていた．その後，駒形先生から「この時期の理事会議事録は貴重な資料であるので，何らかの形で公表してはどうか」とのご提案をいただいた．また，2014年３月に開催した理事会および同年６月に開催した評議委員会で設立当時の理事会議事録を紹介したところ，理事および評議員の先生方から「興味ある内容なので，学会誌などに投稿するとよい」とのご意見をいただいた．

そこで本稿において，当財団設立当時の第一回から第四回までの理事会議事録を紹介する．その補足説明として微生物株の保存を中心に記述する．理事会議事録は，縦書きを横書きに変えた以外は原文のまま記載したが，補足説明の中で引用する場合は読みやすくするためなるべく現代文にした．戦時下で紙質も印刷も不良のため判読できない文字は●で表示した．

設立当時の理事会議事録を紹介する前に，当財団の沿革を簡単に示す．

1944年12月　内閣技術院と武田薬品工業株式会社との共同出資により，有用微生物の収集・保存・分譲と航空用燃料，航空用薬品，航空用食品の開発研究を目指して「財団法人航空醗酵研究所」として設立された．
1945年11月　「財団法人醗酵研究所」に改称した．
1960年６月　応用研究部門を武田薬品工業株式会社へ移管し，微生物株の収集・保存・分譲業務に特化した．
1961年５月　「財団法人発酵研究所」に改称した．
1984年５月　動物細胞株の収集・保存・分譲業務を追加した．
2001年４月　動物細胞株および所員をヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク（現　独立行政法人医薬基盤研究所）へ移した．
2002年７月　微生物株および所員を独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー分野（NBRC）へ移した．
2003年４月　研究助成事業を開始した．
2011年４月　「公益財団法人発酵研究所」へ移行した．

財團法人航空醱酵研究所第一回理事會議事録

一．開催日時　昭和二十年一月二十四日午後二時
一．會合場所　大阪市東淀川區十三西之町四丁目
　　　　　　　武田薬品工業株式會社大阪工場研究所
一．出 席 者　理事十二名　監事二名
　　　　　　　（缺席者四名　但委任狀受領）

生物工学会誌　第93巻　第３号　139－145．2015　から転載

中　濱　一　雄

一. 議　　事

本財團寄附行爲第二十五條ニ基キ理事長武田長兵衛氏議長トナリ左ノ提案ニ就キ審議決定セリ

第一號案　本研究所創立日制定ノ件

本財團設立許可申請書ヲ内閣總理大臣宛提出セル昭和十九年十一月一日ヲ以テ本研究所創立日ト爲ス旨滿場一致可決セリ

第二號案　昭和十九年度事業計畫

武田理事長ノ指名ニ依リ中澤理事ヨリ別紙初年度事業計畫ニ就キ説明スル所アリ原案通リ決議セリ

第三號案　昭和十九年度歳出入豫算ノ件

別紙原案審議ノ結果滿場一致可決セリ

第四號案　寄附行爲施行細則ノ件

別紙原案通リ滿場一致可決セリ

第五號案　議事録代表署名理事決定ノ件

右ハ理事會開催ノ都度決定スベキモノナリトノ理由ノ下ニ本日ノ署名人ヲ左ノ二氏ニ依頼セリ

理事長　武　田　長兵衛

理　事　坂　口　謹一郎

第六號案　顧問，參與，評議員推薦ノ件

寄附行爲第十三條ニ基キ評議員推薦ノ件ヲ諮リタル所別紙諸氏滿場一致ニテ推薦セラル

寄附行爲第三十二條ニ基キ別紙諸氏ヲ顧問並ニ參與ニ理事長ヨリ推薦セリ

一. 雜　　件

左記四項ノ申合ハセアリタリ

（イ）寄附行爲施行細則第十七條に關聯シ本研究所ニ於テ爲セル研究成果ノ工業化試験ヨリ更ニ企業化ノ段階ニ入ル場合其ノ生産ノ敏速ヲ期シ且本研究所トノ緊密ナル連絡ト●●點ヲ置キ武田藥品工業株式會社ノ諒解ヲ得テ可及的ソノ施設ヲ利用スルコト

（ロ）本財團ノ理事長ハ財團設立當初の經緯ニ鑑ミ其ノ事業運營ノ圓滑且●力ヲ期シ財團將來ノ發展ヲ庶幾スル爲初期理事長武田藥品工業株式會社社長ノ重任ヲ希望ス

（ハ）本研究所ノ敷地及ビ建物ハ鋭意物色シタルモ目下適當ノモノナキヲ以テ取敢ヘス武田藥品工業株式會社大阪工場ノ一部ヲ借用シツツアルモ可及的速ヤニ適當ナルモノヲ入手スルコト而モ研究連絡上同社大阪工場ノ近隣地ヲ選●ヲ最適トスルコト

右入手方ニ就テハ内閣技術院並ニ大阪府當局ニ於テ極力斡旋サルル旨同關係理事ヨリ意志表示アリタリ

（ニ）本研究所關係者ノ宿舎並ニ本研究所災害時ノ臨時事務所トシテ左記建物ヲ之ニ充ツ

兵庫縣芦屋市西芦屋町三十八番地所在　竹田義蔵氏所有建物

右決議錄ハ適法ナルヲ認メ署名捺印ス

昭和二十年一月二十四日

議事録署名人

理事長　武田長兵衛

理　事　坂口謹一郎

財團法人航空醱酵研究所初年度事業計畫

本研究所ハ寄附行爲第三條及ビ第四條ニ揚ゲタル事業ヲ遂行スルタメ初年度ニ於テハ基礎研究以下各部門ニ亘リ研究員及ビ研究設備ノ充實ヲ圖リ研究ヲ實施セントスルモノナリ.

一. 研究施設ノ整備

一　土　地　　　　五〇〇〇坪

一　建　物　　　　　七五〇坪

一　設　備

當初ハ建物及ビ設備トシテ武田薬品工業株式會社大阪工場研究所ノ一部ヲ借用シ，叉研究並ニ事業整備ノ都合ニヨリ理事會ノ議ヲ經テ分室ヲ設ケ，研究ノ促進ヲ圖ルト共ニ本財團トシテ必要ナル諸設備ノ整備ヲナス

二．研究要員ノ整備

一　研 究 員　　六名
一　研究員補　　一二名
一　助　　手　　二四名
一　工　　員　　一〇名
一　事 務 員　　五名
一　傭　　員　　一〇名

三．菌種ノ蒐集，保管並ニ頒布

有用菌種ノミナラズ既知種タル定型種ヲモ蒐集シ之ヲ整理シ，且適當ノ條件ノ下ニ保管シ，原則トシテ希望者ニ對シテ之ヲ頒布スルト共ニ之等ニ附随スル研究ヲ行フ．

四．研究事項

（一）菌類ノ基礎的研究

蒐集セル菌種ノ形態學的並ニ生理學的研究ヲ行ヒ，以テ有用菌種ノ定型ヲ明ラカニシ，又新シク諸種ノ菌種ヲ分離シテ新シキ用途ノ發見，検索ヲナス．特ニ航空燃料或ハ航空糧食ニ關係スル諸種ノ有用菌種ニ就テ検索シ，以テソノ性能ノ向上ヲ期スルト共ニ又自然界ニ於ケル之等ノ菌種ノ分布状態ヲ調査シテ所菌種ノ發見ニ資セントス

（二）菌類ニヨル有機酸ノ製造ニ關スル研究

諸種ノ「バクテリア」ニヨル蟻酸，●酸，「プロピオン」酸，酪酸，琥珀酸，「グルコン」酸ノ製造ニ就テノ研究，或ハ絲狀菌ニヨル蓚酸，「フマル」酸，酒石酸，クエン酸ノ製造ニ關スル研究ヲ行フ．

（三）菌類ヲ利用スル「ビタミン」剤ノ製造ニ關スル研究

「ビタミン」B_2ヲ生産スル「エレモテシウム・アシビ」，「デバリオミセス」屬酵母，「アセトン」菌等ニ就テ，又「ビタミン」A及ビDノ給源ヲナス赤色酵母，紅色絲狀菌ニ就テ研究シ諸種ノ「ビタミン」剤ヲ製造セントス．

（四）菌類ノ拮抗能ニ關スル研究

化膿性球菌，肺炎球菌ニ對スル青黴屬ノ拮抗能，又ハ結核菌，「チフス」菌ニ對スル枯草菌，「メセンテリクス」菌，色素生産菌等ノ拮抗能ノ如キ諸種ノ非病原菌ノ有スル動植物病原菌ニ對スル拮抗作用ヲ検索シ，以テ之等ノ病原菌ニ對スル薬剤ヲ製造セントス．

（五）菌類ヲ利用スル醫薬品ノ製造ニ關スル研究

例エバ麥角菌ノ人工培養法ニヨル麥角有効成分製剤ノ製造ノ如ク，ソノ他諸種ノ菌類ヲ利用シテ醫薬品ヲ製造スル研究ヲ行フ．

五．其ノ他研究上必要ナル事項

（一）文献類ノ出版
（二）研究成績ノ發表

当財団は，第二次世界大戦の末期に近い昭和19年（1944年）に「財団法人航空醗酵研究所」として設立された．理事長は武田長兵衛（武田薬品工業株式会社取締役社長），所長は中澤亮治（武田薬品工業株式会社顧問）．

第一回理事会は，昭和20年（1945年）1月24日に武田薬品大阪工場研究所（大阪市淀川区十三）で開催された．当時の理事は12名で，このうち８名が出席し，議長は理事長である武田長兵衛が務めた．

議事の第一号案では，創立日は昭和19年（1944年）11月1日と記載されている．

第二号案は昭和十九年度事業計画である．その初年度事業計画の内容を見ると，「一．研究施設の整備」に，「建物及び設備として武田薬品工業株式会社大阪工場研究所の一部を借用し」とある（図１）．「三．菌類の収集，保存並に分譲」には「有用菌種のみならず既知種である定型種をも収集しこれを整理し，且つ適当な条件の下に保管し，

原則として希望者に対してこれを分譲すると共にこれらに付随する研究を行う」としている.これは微生物株保存機関(カルチャーコレクション)としての業務を明確に示しており,当財団は昭和19年(1944年)から平成14年(2002年)までの約60年間この業務を続けることになる.「四.研究事項」では,(一)菌類の基礎的研究,(二)菌類による有機酸の製造に関する研究,(三)菌類を利用する「ビタミン」剤の製造に関する研究,(四)菌類の拮抗能に関する研究,(五)菌類を利用する医薬品の製造に関する研究,とある.上記(一)菌類の基礎的研究に「特に航空燃料あるいは航空食料に関係する諸種の有用菌種について検索し」とある.航空燃料の生産を目的とする研究としては,アセトン・ブタノール発酵,エタノール発酵などが考えられる.最近はバイオエネルギーの生産研究が盛んに行われているが,発酵研究所は70年前にこのような研究を立案し,着手していた.

当理事会の議事録署名人は,武田長兵衛および坂口謹一郎(東京帝国大学教授).

図1　発酵研究所が入居していた武田薬品研究所

財團法人航空醱酵研究所第二回理事會議事録

一.開催日時　昭和二十年五月十日午後二時

一.會合場所　大阪市東淀川區十三西之町四丁目
　　　　　　武田藥品工業株式會社大阪工場研究所

一.出 席 者　理事九名　監事一名
　　　　　　(缺席者八名　但七名ヨリ委任狀受領)

一.議　　事

本財團寄附行爲第二十五條ニ基キ理事長武田長兵衛氏議長トナリ左ノ提案ニ就キ審議決定セリ

第一號案　昭和十九年度收支決算ノ件

昭和十九年度ニ於ケル收支計算書,財産目錄,決算調書並ニ支出内容明細書ニ就キ審議シ滿場一致コレヲ承認セリ

又本審議ニ於テ特別積立金額ノ決定並ニ剰餘金ヲ次年度豫算ニ繰越ノ件ヲ可決セリ尚武田藥品工業株式會社ヨリ借用中ノ研究用器具並ニ調度品ノ一部ヲ購入ノ件ヲ可決セリ

第二號案　昭和十九年度事業報告ノ件

武田理事長ノ指名ニ依リ中澤理事ヨリ別紙昭和十九年度事業報告ニ就キ説明シ承認ヲ得

第三號案　昭和二十年度收支豫算ノ件

別紙昭和二十年度收支豫算書ノ通リ可決セリ

第四號案　昭和二十年度事業計畫ノ件

武田理事長ノ指名ニ依リ中澤理事ヨリ別紙昭和十九年度事業計畫ニ就キ説明シ滿場一致可決セリ

尚他ノ研究機關ニ對シ「アルコール」製造ニ關スル指導ノ件並ニ菌類ノ「ポルフキリン」体ニ關スル研究者ニ對シ研究費補助ノ件ヲ可決セリ

右決議錄ハ適法ナルヲ認メ署名捺印ス

昭和二十年五月十日

議事錄署名人
理事長　武田長兵衛
理　事　伊藤　正夫

昭和十九年度事業報告書

一．技術院指令第一二二號
一．補助金交付額金參拾萬圓也
一．事業實施狀況

整備狀況

本研究所ノ設立ハ武田藥品工業株式會社大阪工場研究所ニ所屬セル醱酵科部門ノ要員施設並ニ實績ヲ其事業体ノ中核トセルニ甫マル處ニシテ，初年度タル昭和十九年度ハ事業態勢ノ急速ナル整備進捗ヲ圖ル上ニ最モ便宜ナル前記武田藥品工業株式會社大阪工場研究所（大阪市東淀川區十三西之町四丁目五十四番地所在）ノ一部ヲ借用スルコトトシ，尚本研究所ニ課セラレタル事業計畫達成ニ必要ナル研究施設ノ充實ヲ期スルタメ他ニ適當ナル土地家屋ヲ設定スベク極力コレガ物件入手ニ努メツツアリ　本研究所ニハ中澤所長室佐藤研究室平研究室植村研究室阿部研究室ヲ置キ夫々研究事項ヲ分掌ス　本研究所ノ重要事業ノ一タル菌種保存ニ對シテハ諸般ノ災害ヲ顧慮シテ本研究所所在地ノ他ニ大阪府高槻市大字郡家，兵庫縣武庫郡住吉村，京都市東山區山科御陵中内町，京都市上京區坂田町ニ菌種保管所ヲ設ケタリ

研究所要員

研究要員ノ現況並ニ移動ハ左ノ如シ

（職名）	（現在員數）	（入營・應召者數）	（退職者數）
研究職員	一二名	二一名	一名
研究補助員	九名	五名	一名

研究課題着手中ニシテ應召セル要員ノ補充トソノ研究繼續に對シテハ鋭意コレガ對策ヲ講ジツツアリ

事務要員ノ現況ハ左ノ如シ

事務職員　　四名

事業狀況

昭和十九年度事業計畫ニ關聯セル課題ニシテ本研究所員ガ前任武田藥品工業株式會社大阪工場研究所ヨリ繼承セル研究業績中當年度ニ於テ完成セルモノ左ノ如シ

（一）粉末納豆ト其利用ノ研究

大豆ニハ四〇％大豆粕ニハ五〇％内外ノ蛋白質ヲ含有シコレニ蛋白質分解力强キ細菌ヲ作用セシムル時ハ，ソノ三〇－四〇％ハ吸收サレ易キ「ペプトン」及ビ「アミノ」酸ニ變ズ

而シテ大豆蛋白ハ榮養ニ必須ノ「アミノ」酸，例ヘバリジン，バリン，トリプトフアン，ヒスチヂン，フエニールアラニン，ロイシン，イソロイシン，アルギニン及メチオニン（「トレオニン」ノ存在ハ未ダ研究ナシ）等ヲ比較的多ク含有シ榮養失調症殊ニ戰時浮腫ニ適用セラル

本研究所ノ平友恒，松村親ノ爲セル研究ハ大豆粕ノ粉末ニ一種ノ納豆菌ヲ繁殖セシメ適當ノ時期ニ六〇－七〇度ニテ乾燥粉碎シテ納豆特有ノ風味アル淡黄色ノ粉末ヲ得タリ

右ハ蛋白榮養補給源トシテ吸收佳良且ツ貯藏ニ堪エ非常時用ニ適ス

尚强力ナル「アミラーゼ」「プロテアーゼ」及ビ「リバーゼ」等ノ酵素ヲ含有スルヲ以テ消化劑ニ用ヒラレ又工業的ニハ脫糊劑，解繭劑及ビ皮革ノ脫毛並ニ脫灰劑トシテ利用セラル

（二）菌種ノ拮抗作用ニ關スル研究

特ニ「ペニシリン」製造ノ研究

本研究所ノ植村定治郎，兒玉禮次郎ハ「ペニシリン」ヲ生産スル「あをかび」菌種ヲ蒐集シ之等菌種ノ中化膿性球菌ニ對スル戰力ナルモノヲ選擇シタル後ソノ培養條件ヲ檢索セリ

ソノ結果最適ノ培養條件ニ於テ强力菌種ノ培養液ハ基質球菌ニ對シ六百二十五の一乃至一〇〇〇の一ノ有効稀釋度ヲ呈シタリ

尚工業的ニ使用シ得ル培養基ヲ決定シ且該培養基ヲ使用シテ有効菌種ノ生産スル「ペニシリン」ヲ石灰塩又ハ「バリウム」塩トシテ單離セリ

其　ノ　他

（一）昭和十九年度事業計畫ノ研究事項並ニ本研究所所長中澤亮治ニ對スル第一海軍燃料廠，陸軍燃料技術研究所ヨリノ委託研究ハ着手中ナリ

（二）昭和十九年度ニ於テ本研究所ガ他ノ研究機關ヘ頒布セル菌種ハ九種ニシテ又本研究所保存菌種ノ増加數ハ七十二種ナリ

第二回理事会は昭和20年（1945年）5月10日に開催された．戦時下でもあり，理事9名のうち出席は2名であった．

第二号案は「昭和十九年度事業報告の件」である．その「昭和十九年度事業報告書」には興味深いことが書かれている．「一．事業実施状況」に「本研究所の重要事業の一つである菌種保存に対しては諸般の災害を考慮して本研究所所在地の他に大阪府高槻市大字郡家，兵庫県武庫郡住吉村，京都市東山区山科御陵中内町，京都市上京区坂田町に菌種保管所を設けた」とあるように，当研究所所在地の他に4個所の菌株保管所を設けたことが記載されている．また，研究所要員として，研究職員の現在人員は12名，入営・応召は21名，研究補助員として，現在人員は9名，入営・応召は5名となっている．入営・応召には緒方浩一（元京都大学教授），長谷川武治（元発酵研究所所長），武田六郎（元和光純薬会長）が含まれている．事業状況として，（一）粉末納豆とその利用の研究および（二）菌種の拮抗作用に関する研究がある．このうち（二）はペニシリンの製造の研究であり，植村定治郎（東北大学名誉教授）および兒玉禮次郎が担当した．本研究では，ペニシリン生産菌を収集し，高生産株を選択したのち培養条件を検討している．その最適条件で培養し，ペニシリンを石灰塩またはバリウム塩として単離している．当年度では他の研究機関へ分譲した菌種は9種で，本研究所の保存菌種の増加は72種と記載されているが，保存している全菌種数については残念ながら記載がなく不明である．

財団法人航空醗酵研究所第三回理事会議事録

一．開催日時　昭和二十年八月二十五日

一．会合場所　大阪市東淀川区十三西之町四丁目五十四番地
　　　　　　　武田薬品工業株式会社研究所

一．出 席 者　　全員

一．議　　事

　第一号案　本財団名称の財団法人航空醗酵研究所を財団法人醗酵研究所と変更の件
　　原案通り決議せり

　第二号案　本財団の目的たる寄附行為第二章第三条を左の通り変更の件
　　本財団法人ハ菌類ノ蒐集保存ヲナスト共ニ菌類ヲ重要資材ノ製造ニ応用スル研究並ニ其ノ生産化研究ヲナスヲ以テ目的トス
　　右の審議の結果可決せり

右決議録は適法なるを認め署名捺印す

　昭和二十年八月二十五日

議事録署名人
理事長　武田長兵衛
理　事　伊藤　正夫

第三回理事会は終戦直後の昭和20年（1945年）8月25日に開催された．理事は全員が出席した．

第一号案として「財団法人航空醗酵研究所」を「財団法人醗酵研究所」に変更することが決議された．また，第二号案では寄附行為第二章（目的および事業）の第三条「本財團法人ハ政府ノ科學技術ノ刷新向上方策ニ旣應シ菌類ノ蒐集保存ヲナスト共ニ菌類ヲ重要資材特ニ航空關係資材ノ製造ニ應用スル研究並ニ其ノ生產化研究ヲナシ航空戰力ノ增强ニ貢獻スルヲ以テ目的トス」から「特ニ航空關係資材」および「航空戰力ノ增强ニ貢獻スル」を削除することが可決された．戦後になり，航空関係の研究を行う必要がなくなったための変更である．

財團法人醱酵研究所第四回理事會議事錄

一．開催日時　昭和二十一年十月二十九日午前十時
一．會合場所　大阪市東淀川區十三西之町四丁目五十四番地
　　　　　　　武田藥品工業株式會社大阪工場研究所
一．役員現在數　理事　十二名　　監事　二名
一．出 席 者　理事　九名　　監事　一名
一．議　　事
本財團寄附行爲第二十五條ニ基キ理事長武田長兵衞氏議長トナリ左ノ提案ニ就キ審議決定セリ
第一號案　昭和二十年度收支決算ノ件
昭和二十年度ニ於ケル收支計算書ト其ノ支出明細書並ニ財産目錄ニ就キ審議シ全員コレヲ承認セリ
第二號案　昭和二十年度事業報告ノ件
主ナル研究業績ノ報告並ニ蛋白分解細菌應用ニヨル必須アミノ酸製劑「ニウトリン」ノ製造ヲ武田榮養化學株式會社ヘ依託及ビ麥角菌製劑「エルゴブトール」ノ製造ヲ武田藥品工業株式會社ヘ依託ノ件ヲ報告シ全員ノ承認ヲ得タリ
第三號案　昭和二十一年度收支豫算ノ件
別紙昭和二十一年度收支豫算書ノ通リ全員コレヲ可決セリ
第四號案　昭和二十一年度事業計畫ヲ說明シテ全員ノ承認ヲ得タリ尚菌種頒布事業ヲ積極的ニ行フベキ旨坂口理事ヨリ發言アリ全員コレヲ可決セリ
第五號案　武田藥品工業株式會社ヨリ委託研究ノ件
武田藥品工業株式會社委託ノ別紙大研究課題ニ對シ昭和二十一年七月ヨリ昭和二十二年三月迄ニ委託研究費金三十三萬圓ヲ●受契約ノ件ヲ審議シ全員コレヲ可決セリ

右決議錄ハ適法ナルヲ認メ署名捺印ス
昭和二十一年十月二十九日

議事錄署名人
理事長　武田長兵衞
理　事　伊藤　正夫

昭和二十年度事業報告書

事業ノ狀況
當研究所事業ノ主要目的タル醱酵研究ニ必要ナル黴，細菌，酵母等ノ菌種ノ蒐集並ニ保存ハ前年度ヨリ繼續シコレ等ノ菌種ヲ常ニ良好ナル狀態ニ保存スル事ヲ努ムルト共ニ一般菌類ノ基礎的研究ヲ行ヒタリ
マタ醱酵研究ノ便益ニ資スルタメ醱酵ニ關スル文獻ヲ蒐集調査シソノ表題，著者名，掲載書目ヲ輯錄文獻ノ索引ヲ作成セリ本事業ハ次年度ヘ繼承ス
主ナル業績トシテ（A）蛋白分解細菌應用ニヨル榮養剤調製ノ研究（B）抗細菌性物質ノ検索トソノ治療的應用研究（U）麥角菌ノ人工培養ニヨル麥角アルカロイド生成ノ研究トソノ治療的應用研究アリ
右ノ ABU 三研究ハ何レモ武田藥品工業株式會社大阪工場研究所ニ於ケル研究業績ヲ繼承セルモノシテ（A）研究ハ大豆ニ蛋白分解菌ヲ作用セシメテ必須アミノ酸ヲ含有スル一新生成体ヲ得タリ，榮養失調等ニ用ヒラル（B）研究ハ主トシテ「ペニシリン」ニ就テ研究セラレタルモノニシテ本年度末ニハソノ工業的生産研究ニ着手セリ（C）研究ハ既ニ製品完成ノ域ニ達シ近ク治療●ニ提供セラレントスル段階ニアリ，子宮緊縮剤トシテ醫界ニ繁用セラル，「麥角」ノ輸入杜絶ノ時ニアタリ本研究ノ完成ハ治療界ニ貢獻スル所尠カラザルベシ
「アルコール」製造ニ關スル研究ハ前年度ヨリ続行セラレ屢々諸方面ノ製造者に對シテ實地指導ニ當リタリ其他ソルビット醱酵菌ノ研究，高温性乳酸菌ノ研究，纖維素分解菌ノ研究，アクチノミセス屬菌ノ拮抗作用ニ對スル研究アリ
處務ノ概要
本年度ノ事業經營ハ前年度繰越金並ニ技術院，文部省ノ研究補助金ニ依レルモ，ソノ收入ノミニテハ到底所期ノ

事業目的ヲ達成シ得ザルヲ以テ，研究所建物施設，機械器具ヲ武田薬品工業株式會社大阪工場研究所ヨリ無償貸與ヲ受クルト共ニ，研究上ニ於テモ理化學，分析化學，生物學，生薬學等ノ諸領域ニ亘リテ前記武田研究所ノ援助ヲ受ケタリ　當研究所ノ主要事業タル菌種保存並ニ研究用器具ニ對スル災害對策トシテ京都市東山區京都薬學専門學校内ニ設ケタル研究分室ハ昭和廿年九月廃止セリ

一．役員ニ關スル事項

昭和二十年度末現在役員

役名	氏名	略歴
理　事	武田長兵衛	武田薬品工業株式會社取締役社長
〃	武田二郎	武田薬品工業株式會社取締役副社長　薬學博士
〃	朝比奈泰彦	東京帝國大學名譽教授　薬學博士
〃	坂口謹一郎	東京帝國大學教授　農學博士
〃	重成　格	兵庫縣内政部長
〃	竹田義藏	武田薬品工業株式會社専務取締役
〃	小西新兵衛	武田薬品工業株式會社常務取締役
〃	三木孝造	武田薬品工業株式會社取締役　薬學博士
〃	桑田　智	武田薬品工業株式會社取締役　薬學博士
〃	中澤亮治	武田薬品工業株式會社顧問　農學博士
〃	佐藤喜吉	武田薬品工業株式會社参事　農學博士
〃	伊藤正夫	武田薬品工業株式會社
監　事	森本寛三郎	武田薬品工業株式會社常務取締役
〃	小島敏之	武田薬品工業株式會社常任監査役
評議員	石館守三	東京帝國大學教授　薬學博士
〃	西門義一	大原農業研究所　農學博士
〃	細谷省吾	東京帝國大學教授　医学博士
〃	片桐英郎	京都帝國大學教授　農學博士
〃	嘉納毅六	菊正宗研究所
〃	加藤辨三郎	協和産業株式會社社長　工學博士
〃	高木誠司	京都帝國大學　薬學博士
〃	高田亮平	京都帝國大學教授　工學博士
〃	中村　靜	大阪帝國大學教授　工學博士
〃	中濱敏雄	鐘淵工業山科理化學研究所所長　農學博士
〃	山田正一	大藏省醸造試験所醸造技術課長　農學博士
〃	山崎何惠	九州帝國大學教授　農學博士
〃	松山茂助	大日本麥酒科學研究所所長　農學博士
〃	佐々木酉二	北海道帝國大學教授　農學博士
〃	茂木和三郎	野田産業科學研究會會長
〃	鈴木三千代	昭和農産化工會社社長
〃	住江金之	東京農業大學教授　農學博士

第四回理事会は昭和21年（1946年）10月29日に開催された．理事は12名で，このうち９名が出席した．

第二号案は「昭和二十年度事業報告の件」である．その「昭和二十年度事業報告書」の「事業の状況」の冒頭に「当研究所事業の主要目的である醗酵研究に必要な黴，細菌，酵母等の菌種の収集並に保存は前年度より継続し，これらの菌種を常に良好な状態に保存するよう努める共に一般菌類の基礎的研究を行った…」とある．また，主な業績として（A）蛋白分解細菌応用による栄養剤調製の研究，（B）抗細菌性物質の検索とその治療的応用研究，（C）麦角菌の人工培養による麦角アルカロイド生成の研究とその治療的応用が挙げられている．

「庶務の概要」に「当研究所の主要事業である菌種保存並に研究用器具に対する災害対策として京都市東山区京都薬学専門学校内に設けた研究分室は昭和20年９月廃止した」と記載されていることから，当財団は米軍による空襲を避けるため，本研究所（十三）のほかに京都市東山区山科（現在は京都市山科区）にある京都薬学専門学校（現

京都薬科大学）に菌株を保管していたことがわかった．第二回理事会議事録の昭和十九年度事業報告書には４個所に菌株保管所を設けたことが記載されているが，実際に保管していたのは京都薬学専門学校であった．疎開先として当専門学校を選択した理由は不明であるが，当財団に比較的近いこと，当専門学校には菌株の保存に必要な低温設備があること，当専門学校がある山科は，現在は市街地であるが，当時はほとんどが田畑であったため空襲を受ける可能性が低いことなどが考えられる．

「一．役員に関する事項」には，理事として武田長兵衛，朝比奈泰彦（東京帝国大学名誉教授），坂口謹一郎らが，評議員として片桐英郎（京都帝国大学教授），加藤辨三郎（協和産業株式会社社長），高田亮平（京都帝国大学教授），佐々木酉二（北海道大学教授），住江金之（東京農業大学教授）らが名を連ねている．「2．職員に関する事項」では，昭和20年（1945年）度末現在職員として研究部34名，事務部５名とあり，かなり充実した人員である．

上述のように，当財団は戦時下の昭和19年（1944年）に空襲を避けるため，貴重な菌株を当研究所（十三）のほかに京都薬学専門學校に保管（疎開）していた．昭和19年（1944年）７月にサイパン島が陥落してから米軍の爆撃機B29による空襲が本格化し，大阪も30回におよぶ空襲を受けた．このうち昭和20年（1945年）６月７日の大空襲で阪急十三駅が全焼したが，幸いにも当財団がある武田薬品大阪工場には被害がなく[1]，結果的には菌株を疎開させなくてもよかったことになる．しかし，国の存亡がわからない戦時下にあっても危機管理として菌株を疎開させたことは驚くべきことである．それだけ微生物株を大切にする意識が高かったためであろう．オランダのウェステルディーク女史は，第二次世界大戦中にバールンにある研究所に保存している約6000株の同一のセットを二つ作り，一つをユトレヒト大学に移し，一つはこの研究所に置いた[2]．

東日本大震災後，日本微生物資源学会（鈴木健一朗会長[当時]）では，機関会員として同学会に参加している保存機関（23機関）に対して震災による被害の状況，危機回避の方策などについてアンケートを実施した．その回答結果の一つとして，試料を複数の系統で凍結保存を行っている機関は18機関であり，このうち７機関が地理的に同時に地震は発生しない距離で保存していることが報告された[3]．

大学では多数の貴重な微生物株を保存している研究室が多いと思われるが，危機管理のためは他の研究室と微生物株を相互に保存し合うとよい．研究室の責任者（教授）が退任することによって微生物株のライブラリーが継承されないことがある．また，菌株を分離した研究者が退職することによって，保存していた菌株が失われることもある．とくに学術論文等で発表した貴重な菌株はNBRC[注1]やJCM[注2]などの公的保存機関に寄託しておくことが必要である．財団法人発酵研究所の菌株を継承しているNBRCでは，震災の経験を受け，中小企業や大学の研究室など，自ら菌株の分散保存ができない機関の微生物資源バックアップを支援するため，生物遺伝資源長期保存施設の建設を進めており，平成27年度より事業を開始する予定と聞く．このような機関や設備を活用し，貴重な微生物資源の保全が行われることが期待される．

当財団は2003年（平成15年）から微生物の研究に対する助成を行っており，募集で採択された研究者には当財団からの助成に関わる研究で得られた菌株を学術論文などに投稿する場合は，投稿前に菌株をNBRC，JCMなどの公的保存機関に寄託し，その寄託番号で投稿するよう勧めている．５年先，10年先になっても，その論文を読んだ国内外の研究者がその菌株を容易に入手し，研究に用いることができるからである．

発酵研究所は，1944年（昭和19年）から約60年間にわたって微生物株保存機関として国内外の研究を支援してきた．2003年（平成15年）からは微生物の研究に対する研究助成事業を行っているが[注3]，それまでに培ってきた微生物株保存事業の精神を生かして，今後とも微生物学の進歩発展に寄与していきたい．その精神とは「微生物をこよなく愛し，大切にすること」である．

謝　辞

本稿の執筆をご提案いただきました駒形和男先生（東京大学名誉教授）に感謝申し上げます．また，有益なご意見，ご助言をいただきました原島俊先生（大阪大学大学院工学研究科教授）に感謝いたします．

文　献

1）武田二百年史，昭和58年５月11日発行．
2）坂口謹一郎：世界の酒，岩波書店（1957）．
3）鈴木健一朗：日本微生物資源学会誌，**27**，31（2011）．

注1）NBRCの連絡先：独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター生物資源課
〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
TEL. 0438-20-5763　E-mail: nbrc@nite.go.jp
http://www.nbrc.nite.go.jp/

注2）JCMの連絡先：独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室
〒305-0074茨城県つくば市高野台 3-1-1
電話．029-836-9556　E-mail: inquiry@jcm.riken.jp
http://jcm.brc.riken.jp/

注3）IFO公益財団法人発酵研究所のホームページを参照
http://www.ifo.or.jp

第9回助成研究報告会の開催

平成27年6月5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9回助成研究報告会を開催し，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，5.5年間の助成を受けた寄付講座助成1件の研究成果の口頭発表，ならびに2年間の助成を受けた一般研究助成32件および1年間の助成を受けた若手研究者助成1件の研究成果のポスターによる発表が行われた．参加者は，大学，国公立研究所，企業の研究者や大学院学生など総数200名であった．

報告会に先立ち波多野和徳理事長から挨拶があった．報告会では大型研究助成4件のうち「琉球弧および東南アジアにおける大型高等菌類インベントリーの構築」（寺嶋芳江）の1題は鈴木健一朗製品評価技術基盤機構技監の座長のもとに，「ケイ酸添加による活性汚泥中の*Bacillus*属優占化ならびに余剰汚泥低減メカニズムの解析」（池田　丈）の1題は今中忠行立命館大学教授の座長のもとに，「生産物を鋭敏に分析する方法を活用した低栄養な環境で優占する微生物の新規計測法の開発と未知微生物の分離」（諏訪裕一）および「コネクター分子SafAによる，大腸菌酸耐性情報伝達ネットワークの制御機構」（内海龍太郎，代理発表江口陽子）の2題は大竹久夫早稲田大学客員教授の座長のもとに，口頭発表が行われた．また，寄付講座助成の1題「眠れる微生物を覚醒させ機能を発現する機構の活用学」（鎌形洋一）は木村　光京都大学名誉教授の座長のもとに口頭発表が行われた．各研究発表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．なお，寄付講座助成の報告は総論1報と各論3報に分けて報告されている．

引き続いて一般研究助成32件および若手研究者助成1件はポスター展示による発表がなされた．各ポスターの前で参加者と熱心な質疑が交わされた．さらにこの後行われた懇親会の時間にもお酒を片手にポスターの前で討論する姿が見られて，ポスター発表内容について十分に議論されたようであった．一般助成研究および若手研究者助成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．先ずは魚住武司評議員（東京大学名誉教授）の挨拶があり，次いで吉田敏臣評議員（大阪大学名誉教授）のご発声で乾杯を行った．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，報告会では十分に出来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首都大学東京の寄付講座の花田智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換が見られた．報告会と共に交流の場としても十分役だったようで，参加された皆様のご協力に心から感謝致します．

来年第10回助成研究報告会は平成28年6月10日(金)に同じ会場で開催致します．

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．

（文）横田　明

開会挨拶
波多野和徳 理事長

座長　鈴木健一朗 先生

座長　今中　忠行 先生

座長　大竹　久夫 先生

座長　木村　光 先生

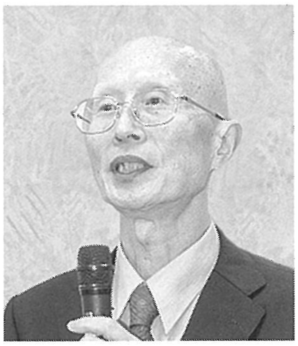
寺嶋　芳江 氏

池田　丈 氏

諏訪　裕一 氏

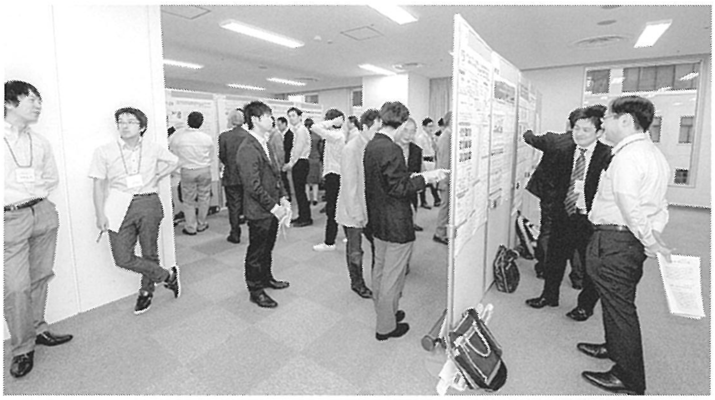
江口　陽子 氏
（内海龍太郎 氏の代理）

鎌形　洋一 氏



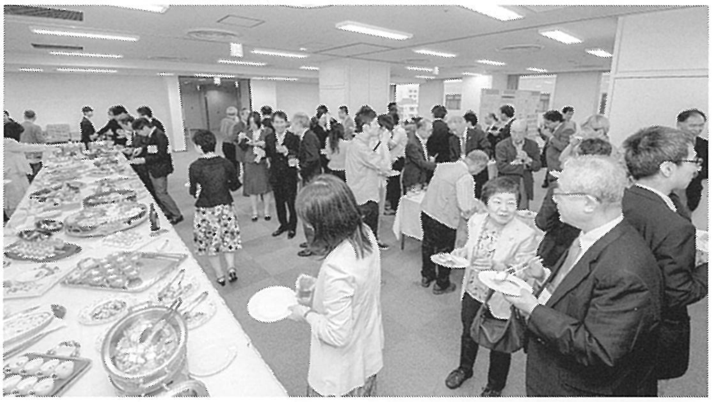
司会
中濱　一雄 常務理事

講　演　会



ポスター発表

挨拶　魚住　武司 評議員



乾杯　吉田　敏臣 評議員

懇　親　会

平成25年度大型研究助成の研究報告

助成期間：平成25年４月～平成27年３月

IFO Res.Commun. 29
15-23, 2015

ケイ酸添加による活性汚泥中の *Bacillus* 属優占化ならびに余剰汚泥低減メカニズムの解析

池　田　　丈

広島大学大学院先端物質科学研究科
〒739-8530　広島県東広島市鏡山 1-3-1

Mechanism underlying silicate-induced dominance of *Bacillus* species in activated sludge and the related excess sludge reduction

Takeshi Ikeda

Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University
1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530, Japan

We have previously reported that silica is deposited in and around the spore coat layer of *Bacillus cereus* and its close relatives. Several peptides and proteins, including silaffin and silacidin peptides in diatom, are involved in silica biomineralization in eukaryotes. A homologous sequence search revealed a silacidin-like sequence in the C-terminal region of CotB1, a spore coat protein of *B. cereus*. The negatively charged silacidin-like sequence is followed by a positively charged 14-amino-acid arginine-rich sequence, which is remarkably similar to the sequence of silaffins. In this study, we demonstrate that the C-terminal arginine-rich sequence of CotB1 plays an essential role in prokaryotic silica biomineralization. We hypothesized that silica deposition in *Bacillus* spores plays an important role in silicate-induced dominance of *Bacillus* species in activated sludge. Since some wastewater treatment plants use hypochlorite in addition to silicate to facilitate the predominance of *Bacillus* species, we investigated the mechanism underlying this and found that silica deposition enhances spore resistance to hypochlorite. We also investigated the potential application of *B. cereus* CotB1 in biotechnology and found that the C-terminal arginine-rich sequence and its shorter derivative function as silica-binding tags. Using these tags, we developed a novel affinity purification method in which silica particles and L-arginine are used as the adsorbent and eluent, respectively.

Key words: *Bacillus cereus*, activated sludge, biomineralization, silica, spore coat

緒　　言

ケイ素（シリコン，Si）は酸素に次いで地殻上に二番目に多く存在する元素であり，主に鉱物の主成分として存在している．一部の生物においても重要な役割を果たしており，珪藻や放散虫，一部の海綿や一部の植物などはケイ素を積極的に取り込み，不溶性の二酸化ケイ素（シリカ，SiO_2）の形で骨格や殻などとして利用している．これまで真核生物におけるケイ素の蓄積・利用については精力的に研究が進められていたが，原核生物におけるケイ素の利用についてはほとんど知られていなかった．そこで当研究室では，ケイ素が豊富に存在する土壌よりケイ素蓄積細菌のスクリーニングを試み，*Bacillus cereus* とその近縁種が胞子形成期にケイ酸を多量に取り込み，シリカとして蓄積していることを発見した（Hirota *et al.*, 2010）．以下にその概要を記載する．

上に挙げた既知のシリカ蓄積生物は，ケイ素を可溶性のケイ酸（$Si[OH]_4$）の形で取り込み，細胞内で重合してシリカとして蓄積する．そこで，我々はケイ酸の取り込みを指標としてシリカ蓄積細菌のスクリーニングを行った．その結果，水田土壌から単離した240株中29株という意外なほどの高頻度で，培地に添加した

E-mail: ikedatakeshi@hiroshima-u.ac.jp

ケイ酸の取り込みが観察された．ケイ酸の取り込みが見られた株は全て *Bacillus* 属に属し，特に *B. cereus* に近縁なものが多かった．ケイ酸取り込み量が特に多かった *B. cereus* YH64 株をモデルとして解析を行ったところ，ケイ酸の取り込みは胞子形成期に起こること，また，取り込まれたケイ酸が細胞内で何らかの作用を受けて重合され，胞子表面にシリカとして蓄積されることを発見した．*B. cereus* 胞子の表層部は内側から，cortex と呼ばれるペプチドグリカン層，多数のタンパク質で構成される胞子殻（spore coat），そして最外層となる exosporium からなるが（Henriques & Moran, 2007），シリカは胞子殻内部とその外縁部に蓄積されていた．シリカが蓄積された胞子の各種ストレスに対する耐性を調べたところ，熱や紫外線に対する耐性はシリカを蓄積していない場合と変わらなかったが，塩酸や硝酸に対する耐性が顕著に向上していた．もともと胞子は栄養細胞に比べ各種ストレスに対する耐性が高いが，さらに表面に「シリカの殻」を纏うことで酸に対する耐性を一層向上させたと考えられる．

上述の研究とは別に，活性汚泥を利用した廃水処理において，活性汚泥にケイ酸を含む薬剤を添加することで，汚泥中の *Bacillus* 属細菌の割合が増加し，廃水処理の効率が向上するとともに，余剰汚泥の低減や臭気の抑制などの効果が得られることが報告されている（Choi *et al.*, 2002; 川北ら, 2010; 李ら, 1996; Mori *et al.*, 2004; 村上ら, 1995）．澱粉・タンパク質・油脂などの分解能力に優れた *Bacillus* 属細菌が優占化することで，有機物の分解効率が向上すると考えられている（村上ら, 1996）．活性汚泥を用いた廃水処理では，廃水からの有機物の除去に伴って，汚泥中の微生物が増殖し，産業廃棄物である余剰汚泥が生じる．一方，*Bacillus* 属細菌は通常の細菌とは異なり，栄養源の枯渇などによって胞子を形成する．胞子は生育に適した環境に置かれると，発芽して再び栄養細胞として生育を開始する．この胞子形成と発芽のプロセスの前後で細胞数は変化しない（増殖を伴わない）ため，*Bacillus* 属細菌は他の細菌に比べ，細胞数が増加しにくく，余剰汚泥が発生しにくいと予想されている（土井ら, 1996; 川北ら, 2010）．また，*Bacillus* 属細菌は，胞子形成初期において細胞外に毒性タンパク質などを分泌し，周囲の細菌を溶菌させ，放出される栄養源を利用することで，（胞子形成を中止して）再度栄養細胞としての生育を続行しようとすることが報告されている（Ellermeier *et al.*, 2006; González-Pastor *et al.*, 2003）．このような溶菌機構も余剰汚泥低減の要因のひとつではないかと予想されている（川北ら, 2010）．しかし，ケイ酸を含む薬剤の添加によって，活性汚泥中の *Bacillus* 属細菌の割合が増加するというのは，あくまで廃水処理現場における経験的な知見であり，そのメカニズムについては不明な点が多い．

前述のシリカを蓄積する *Bacillus* 属細菌の知見と合わせて考えると，活性汚泥に添加されたケイ酸を *Bacillus* 属細菌が取り込み，胞子にシリカとして蓄積することで，活性汚泥中における胞子の生存率を高め，優占化しているのではないかという仮説が浮かび上がった．つまり，*Bacillus* 属細菌によるシリカの蓄積は，ケイ素というありふれた元素を利用した新奇の生存戦略であり，活性汚泥における *Bacillus* 属優占化はその顕著な例ではないかと予想した．この仮説の検証に向けて，本研究では，*Bacillus* 属細菌によるシリカ蓄積メカニズムの解析と，シリカ蓄積が活性汚泥中の *Bacillus* 属細菌の優占化に寄与しているかどうかの検証の二点について研究を行った．

実験方法

菌株および培養条件

シリカ蓄積メカニズムの解析には，*B. cereus* NBRC 15305 株（ゲノムが解読されている ATCC 14579 株 [Ivanova *et al.*, 2003] に相当）を野生株として用いた．胞子の塩素耐性の評価にはシリカ蓄積量が多い *B. cereus* YH64 株（Hirota *et al.*, 2010）を用いた．通常，*B. cereus* は LB 培地中で 28℃ で培養した．胞子を形成させる際は，R2A 培地（Reasoner & Geldreich, 1985）に 0.6 mM $CaCl_2$, 0.03 mM $MnCl_2$, 0.05 mM $ZnCl_2$, 0.05 mM $FeSO_4$ を加えた培地（mR2A 培地）中で 28℃ で60時間培養した．遺伝子操作用宿主には *Escherichia coli* JM109 株を用い，2× YT 培地（Green & Sambrook, 2012）中で 37℃ で培養した．必要に応じて終濃度 250 μg/mL のスペクチノマイシン，10 μg/mL のエリスロマイシン，または 50 μg/mL のカルベニシリンを培地に添加した．

遺伝子破壊株の構築

cotB1B2 破壊株の構築は，既報（Arnaud *et al.*, 2004）に基づいて以下のように行った．まず，標的となる *cotB1B2* 遺伝子の上流領域・下流領域それぞれ約 1 kb を PCR によって増幅し，得られた産物をそれぞれ制限酵素 *Bgl*II と *Sal*I によって消化した（制限酵素サイトはプライマーに付加した）．また，プラスミド pIC333（Steinmetz & Richter, 1994）上のスペクチノマイシン耐性（Sp^R）遺伝子カセットを PCR によって増幅し，*Bgl*II と *Sal*I による同時消化を行った（制限酵素サイトはプライマーに付加した）．得られた 3 種の断片を

T4 DNAリガーゼによってライゲーションした後，ライゲーション産物の末端に相補的なプライマーを用いたPCRによって産物全体を増幅した．得られたPCR産物を制限酵素*Mlu*Iによって消化した後（制限酵素サイトはプライマーに付加した），温度感受性プラスミドpMAD（Arnaud *et al.*, 2004）の*Mlu*Iサイトに挿入することで，pMADΔ*cotB1B2*を構築した．エレクトロポレーション法（Turgeon *et al.*, 2006）によってpMADΔ*cotB1B2*を*B. cereus*野生株に導入した．以降の操作は既報（Arnaud *et al.*, 2004）に従ったが，目的とする破壊株の選抜方法は，抗生物質によるスクリーニングではなく，PCRによる遺伝子破壊の確認に変更した．*cotG*破壊株も同様の方法で構築した．

ケイ酸取り込み量の評価

R2A液体培地中で28℃で一晩培養した*B. cereus*の前培養液を，100 μg/mLのケイ酸を含むmR2A培地に5%植菌し，28℃で培養した．経時的に培養液のサンプリングを行い，遠心分離によって菌体を除いた培養液上清のケイ酸濃度をSilicate Test Kit（Merck）を用いて測定した．

胞子の酸耐性・熱耐性の評価

遠心分離によって回収した*B. cereus*の胞子を，OD_{600}が1.0になるように滅菌水に懸濁した（約10^8 CFU/mLに相当）．酸耐性の評価の際は，胞子を再度遠心分離によって回収した後，等量の0.4 N HClに懸濁した．経時的に胞子懸濁液のサンプリングを行い，得られたサンプルを適宜冷滅菌水で希釈してR2A寒天培地上にプレーティングした．熱耐性の評価の際は，滅菌水に懸濁した胞子を65℃で30分間加熱した後，適宜冷滅菌水で希釈してR2A寒天培地上にプレーティングした．28℃で24時間培養した後，プレート上のコロニーを計数し，生存率を算出した．

相補性試験

相補性試験のために，*cotB1B2*遺伝子ならびにその推定プロモーター領域・ターミネーター領域を含むDNA断片をPCRにより増幅した．得られた断片を*Bam*HIと*Eco*RIで消化後（制限酵素サイトはプライマーに付加した），プラスミドpHT304（Arantes & Lereclus, 1991）の*Bam*HI-*Eco*RIサイトに挿入することで，プラスミドpHT-cotB1B2を構築した．pHT-cotB1B2を鋳型としたインバースPCRによって，*cotB2*遺伝子を除いたpHT-cotB1と，*cotB1*遺伝子を除いたpHT-cotB2を構築した．CotB1のC末端欠失変異体の遺伝子を有するプラスミドはpHT-cotB1を鋳型としたインバースPCRにより構築した．構築したプラスミドはpHT-cotB1-141（CotB1の142－171残基を欠失）およびpHT-cotB1-157（158－171残基を欠失）の2種である．構築したプラスミドをエレクトロポレーションによって*cotB1B2*破壊株に導入し，終濃度10 μg/mLのエリスロマイシンを含むLB寒天培地上で培養することで形質転換体を得た．

シリカ重合試験

CotB1の塩基性領域に相当する14残基の合成ペプチドは，ユーロフィンジェノミクス社より購入した．Tetramethyl orthosilicateを終濃度1 Mになるよう1 mM HClと混合し，室温で15分間静置して加水分解することでケイ酸溶液を用時調製した．終濃度50 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0），100 mMケイ酸，および適当量の合成ペプチド（またはウシ血清アルブミン[BSA]）を計50 μLになるよう混合し，25℃で10分間静置した．ケイ酸が重合することによって形成されたシリカを遠心分離によって回収し，Milli-Q水で2回洗浄した後，50 μLの1 N NaOH中で95℃で30分間加熱することでケイ酸へと溶解した．得られた溶液のケイ酸濃度を前述の通り測定することで，形成されたシリカ量を求めた．

胞子の塩素耐性の評価

塩素耐性の評価は，既報（Young & Setlow, 2003）に基づいて以下のように行った．遠心分離によって回収した*B. cereus* YH64株の胞子を終濃度50 μg/mLの次亜塩素酸ナトリウムと0.05%のTween 80を含む50 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）に懸濁した．経時的に胞子懸濁液のサンプリングを行い，得られたサンプルを10 mg/mLのチオ硫酸ナトリウム水溶液で10倍希釈することにより，次亜塩素酸を分解した．その後，PBSで適宜希釈してLB寒天培地上にプレーティングした．37℃で24時間培養した後，プレート上のコロニーを計数し，生存率を算出した．

*CotB1*断片とGFPの融合タンパク質の発現

B. cereus ATCC 14579株の*cotB1*遺伝子全長をPCRにより増幅した．また，pGFPuv（Clontech Laboratories）を鋳型にしたPCRによって，GFPをコードする遺伝子を増幅した．それぞれの産物を*Hin*dIIIと*Xho*I，*Sac*IIと*Eco*RIの組み合わせで消化し（制限酵素サイトはプライマーに付加した），pET-47b（Novagen）中の対応する制限酵素サイトに挿入することで，pET-GFP-CotB1を構築した．pET-GFP-CotB1を鋳型としたインバースPCRにより，SB7融合GFP（結果および

考察参照）を含む各種CotB1断片とGFPとの融合タンパク質の発現プラスミドを構築した．得られたプラスミドを*E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS株（Novagen）に導入し，終濃度50 μg/mLのカナマイシンと30 μg/mLのクロラムフェニコールを含む2×YT培地中で37℃で培養した．培養液のOD_{600}が約0.5になった時点で，終濃度0.2 mMのIPTGを培養液に添加することで，目的タンパク質の発現誘導を行った．37℃でさらに3時間培養後，遠心分離によって集菌した．

シリカ粒子を利用したアフィニティー精製

SB7融合GFPを発現させた菌体を，0.5% Tween 20を含む25 mM Tris-HCl緩衝液（pH 8.0）に懸濁し，超音波処理によって菌体を破砕した．遠心分離後の菌体破砕液の上清に適当量のシリカ粒子（添川理科学）を添加して，室温で5分間混合することで，目的タンパク質をシリカ粒子に吸着させた．遠心分離によって粒子を回収し，粒子を同緩衝液で2回洗浄した．洗浄後の粒子を，0.5 Mのʟ-アルギニンを含む25 mM Tris-HCl緩衝液（pH 8.0）に懸濁することで目的タンパク質を溶出させ，遠心分離後の上清を回収した．この溶出操作をもう一度繰り返し，得られた2回分の画分をまとめて溶出画分とした．

結果および考察

既知のシリカ重合ペプチドとの相同性検索による候補タンパク質の探索

シリカが蓄積される胞子殻は50種類以上の多数のタンパク質で構成されていることから（Henriques & Moran, 2007），ケイ酸の重合ならびにシリカの蓄積には胞子殻タンパク質が関与している可能性が高いと予想された．そこで，胞子殻タンパク質と珪藻の既知のシリカ重合ペプチドとの配列を比較した．珪藻はシリカの殻をもつ単細胞の藻類であり，シリカの重合に関与するペプチドとして塩基性アミノ酸が豊富なsilaffinや酸性アミノ酸が豊富なsilacidinが知られている（Kröger *et al.*, 1999; Kröger *et al.*, 2001; Wenzl *et al.*, 2008）．相同性解析の結果，胞子殻タンパク質であるCotB1のC末端領域に珪藻のsilacidinに似た領域が存在することが判明した（Fig. 1）．また，その下流にはアルギニン残基とセリン残基が豊富な領域（以下塩基性領域）が存在した．塩基性アミノ酸とセリン残基が多いという特徴は，珪藻のsilaffinと共通しているが，silaffinでは塩基性アミノ酸としてアルギニンではなくリジン残基が多いという違いがある（Fig. 1）．

興味深いことに*cotB1*遺伝子の20 bp下流には*cotB1*に相同な*cotB2*という遺伝子が並んで存在していた．*cotB1*遺伝子の上流には胞子形成後期において活性化されるσ^Kプロモーター領域と予想される配列（Eichenberger *et al.*, 2004）が存在していたが，*cotB2*の上流には典型的なプロモーター配列は認められなかったことから，これらの遺伝子はオペロンを形成していることが強く示唆された．CotB1とCotB2のアミノ酸配列は互いによく似ているが，CotB1の方がC末端が長く，相同性検索によって発見されたsilacidin様領域とその下流の塩基性領域はCotB1のみに存在していた（Fig. 1）．

```
A
CotB1    1  -MSLFHCDFLKDLIGSFVRVNRGGPESQKGTIISVCQDYFVLKNEKGELYYYQLKHLKSI  59
CotB2    1  MENVLCCDQIKCLVGETVKVNLRGPESRVGELVSLGKDYLTLQLPHGELVYYQLKHVKSL  60
              .:: ** :* *:*. *:**  ****: * ::*: :**:.*:  :*** ******:**:

CotB1   60  TKNAKECGSSDCEWEDCACAED-FEALLESFKYCWVKINRGGPEKVEGILQDVSCDFVTL  118
CotB2   61  VKKVKESKCGDCYSSCFCSDEDTFLDILKDLKYKWVKINRGGPECVEGLLSEVHHGCITL  120
            .*:.**. ..**   .   .. ** *  :*:.:** ********** ***:*.:*   . :**

CotB1  119  IVKEEIILIAIKHIKSVNYNALACGESDESDDSKESSDNSGRARAQRQSSRGR        171
CotB2  121  VNGDEVIYVIKSHIKSVSQVVKCKKNEDE------------------------        149
            :  :*:* :  .*****.  . .  :.**

B  CotB1         137  HIKSVNYNALACGESDESDDSKESSDNSGRARAQRQSSRGR  171
   Silacidin A     1  ------SSSEDSGDSPPSDESEESEDSVSSEDED-------   28
                            .:  .*:*  **:*:**.*. .     :

   Silaffin-1A1                                 SSKKSGSYSGSKGSK
```

Fig. 1　Pairwise alignment of *B. cereus* CotB1 and CotB2 and primary structure of *Thalassiosira pseudonana* silacidin A. Alignments of CotB1 with CotB2 (A) and with silacidin A (B) were performed using the ClustalW program at GenomeNet (http://www.genome.jp/) with default parameters. Asterisks, colons, and periods indicate identical, highly similar, and moderately similar residues, respectively. The boxed sequence of CotB1 (CGESDESDDSKESSDN) was identified by a local BLAST search for sequences with significant similarity to silacidin A (SGDSPPSDESEESEDS). The black-shaded sequence indicates the arginine-rich region of CotB1. The amino acid sequence of *Cylindrotheca fusiformis* silaffin-$1A_1$ is given for comparison.

*cotB1B2*遺伝子の破壊

これらの遺伝子が胞子表面上へのシリカ蓄積に関与しているかを調べるために*cotB1B2*破壊株を構築した．この破壊株では*cotB1B2*遺伝子がまとめてSp^R遺伝子カセットに置換されている．また，比較のため，別の胞子殻タンパク質であるCotγ（別名ExsB）をコードする*cotG*遺伝子（Todd *et al.*, 2003）を同様にSp^R遺伝子カセットに置換した*cotG*破壊株を構築した．構築した破壊株の生育速度や胞子形成率は野生株とほぼ同等であり，細胞分裂や胞子形成に対しては遺伝子破壊による影響はないと考えられた（data not shown）．100 μg/mLのケイ酸を含むmR2A培地で培養した際の

培養液上清のケイ酸濃度を経時的に測定したところ，野生株では培養開始から12時間を過ぎるとケイ酸濃度が減少する様子が観察され，ケイ酸の取り込みが生じていることが確認された（Fig. 2A）．*cotG*破壊株は野生株と同等のケイ酸取り込みを示したのに対し（data not shown），*cotB1B2*破壊株では野生株に比べケイ酸取り込み量が顕著に減少していた（Fig. 2A）．これらの結果から，*cotB1B2*遺伝子の少なくともいずれか一方はシリカ蓄積に関与していることが示された．

これまでの研究で，表面にシリカが蓄積された胞子は酸耐性が向上していることが分かっている（Hirota *et al.*, 2010）．*cotB1B2*遺伝子の破壊による胞子の酸耐性への影響を調べるため，培地にケイ酸を添加した場合と添加しない場合での胞子の酸耐性を評価した．野生株では，過去の報告（Hirota *et al.*, 2010）と同様にケイ酸添加によって胞子表面にシリカが蓄積されることで酸耐性が向上していた（Fig. 2B）．また，*cotG*破壊株も同様の結果を示した（data not shown）．一方，*cotB1B2*破壊株ではケイ酸を添加しても，胞子の酸耐性の向上は見られなかった．また，*cotB1B2*破壊株胞子の酸耐性はシリカを蓄積していない野生株胞子とほぼ同等であった（Fig. 2B）．胞子の熱耐性を比較したところ，65℃で30分間熱処理した場合の生存率は，野生株と*cotB1B2*破壊株でそれぞれ74±6%と77±7%（いずれもn=3）であり，有意な差は認められなかった．

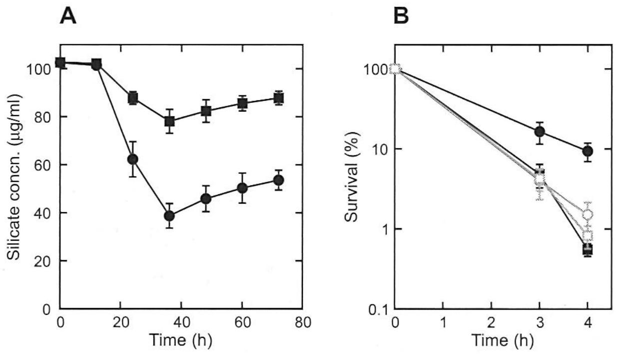


Fig. 2 Silicate uptake and spore acid resistance of the *B. cereus* wild type and Δ*cotB1B2* mutant. (A) Silicate concentrations in the culture supernatant of the wild-type (circles) and Δ*cotB1B2* (squares) strains were measured at the indicated times after inoculation into mR2A medium supplemented with 100 μg ml^{-1} silicate. (B) Viability of wild-type (circles) and Δ*cotB1B2* (squares) spores in 0.4 N HCl. Spores were produced in the presence (closed symbols) or absence (open symbols) of silicate. Data represent the mean and standard deviation values of the results of three independent experiments.

これらの結果は，*cotB1B2*破壊株では胞子は正常に形成されているものの，胞子表面へのシリカの蓄積が起きていないことを支持するものであった．

*cotB1, cotB2*遺伝子の相補性試験

破壊した*cotB1, cotB2*遺伝子のうち，シリカ蓄積に関与している遺伝子を特定するために相補性試験を行った．*cotB1B2*遺伝子のプロモーター領域の下流に*cotB1*遺伝子，*cotB2*遺伝子，またその両方の遺伝子を組み込んだプラスミド（それぞれpHT-cotB1, pHT-cotB2, pHT-cotB1B2）を構築し，*cotB1B2*破壊株に導入した．その結果，pHT-cotB1またはpHT-cotB1B2を*cotB1B2*破壊株に導入した場合は，ケイ酸の取り込みは野生株と同程度まで回復した（Fig. 3A）．一方，pHT-cotB2を*cotB1B2*破壊株に導入しても，ケイ酸取り込みの回復は見られなかった（Fig. 3A）．これらの結果からCotB1のみがシリカの蓄積に関与していることが示された．

前述の通り，CotB1とCotB2の大きな違いとして，前者のみがC末端にsilacidin様領域と塩基性領域を有していることから（Fig. 1），これらの領域がシリカ蓄積に重要であることが強く示唆された．そこで，これらの領域を欠失させたCotB1変異体をコードする2種

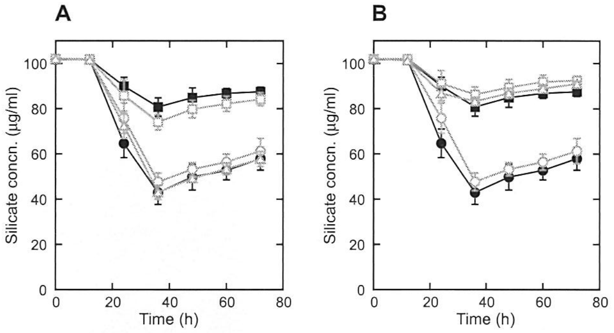


Fig. 3 Complementation analysis of Δ*cotB1B2*. (A) Silicate concentrations in the culture supernatant of the *B. cereus* wild-type strain carrying pHT304 (closed circles), Δ*cotB1B2* carrying pHT304 (closed squares), pHT-cotB1 (open circles), pHT-cotB2 (open squares), or pHT-cotB1B2 (open triangles) were measured at the indicated times after inoculation into mR2A medium supplemented with 100 μg ml^{-1} silicate. (B) The same experiment was performed for the wild-type strain carrying pHT304 (closed circles), Δ*cotB1B2* carrying pHT304 (closed squares), pHT-cotB1 (open circles), pHT-cotB1-141 (open squares), or pHT-cotB1-157 (open triangles). Data represent the mean and standard deviation values of the results of three independent experiments.

のプラスミド（pHT-cotB1-141, pHT-cotB1-157）を構築した．pHT-cotB1-141 は silacidin 様領域と塩基性領域の両方を欠失した変異体，pHT-cotB1-157 は塩基性領域のみを欠失した変異体をそれぞれコードしている．これらのプラスミドを *cotB1B2* 破壊株に導入しても，いずれの場合もケイ酸取り込みの回復は見られなかったことから（Fig. 3B），CotB1 の C 末端に存在する塩基性領域がシリカ蓄積に必須であることが示された．

合成ペプチドを用いたシリカ重合試験

シリカ蓄積に必須な CotB1 の塩基性領域が，ケイ酸を重合してシリカを形成する能力を有するかを調べるために，塩基性領域に相当する14残基の合成ペプチド（SGRARAQRQSSRGR）を用いて試験管内でのシリカ重合試験を行った．ケイ酸溶液に合成ペプチドを添加したところ，pH 7，25℃ という温和な条件でシリカの形成が観察された（Fig. 4）．一方，比較として BSA を添加した場合にはシリカは形成されなかった．

以上の結果から，胞子表面へのシリカ蓄積には胞子殻タンパク質 CotB1 が関与しており，その C 末端に存在する塩基性領域が胞子表面でケイ酸を重合してシリカを形成していると考えられた．これは，原核生物においてシリカ蓄積に関与するタンパク質を同定した初めての例である．なお，合成ペプチドによって形成されたシリカの粒径は 100–300 nm 程度であり（Fig. 4B），胞子殻にて形成されるシリカ（数 nm 程度；Hirota *et al.*, 2010）よりも大きかった．ケイ酸の重合によって

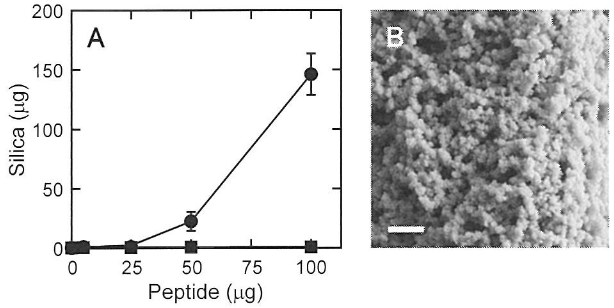


Fig. 4　Silica formation by a synthetic peptide of the C-terminal region of CotB1. (A) Correlation between the concentration of peptide and the amount of precipitated silica. The reaction mixture contained 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM silicic acid, and the synthetic peptide SGRARAQRQSSRGR (circles); bovine serum albumin was used as the control protein (squares). Data represent the mean and standard deviation values of the results of three independent experiments. (B) SEM images of silica precipitates. Scale bar, 2 μm.

形成されるシリカの粒径や形状は反応条件に大きく影響されることが知られており（Belton *et al.*, 2012），このサイズの違いは反応条件の違いによるものであると考えられた．

CotB1 の塩基性領域がシリカ形成を促進するメカニズムは不明だが，正電荷が多いことから以下のようなメカニズムが推測される．ケイ酸の pK_a は 9.8 であり，中性条件ではごく一部ではあるがイオン化した状態で存在する．このようなケイ酸イオンは別のケイ酸分子と容易に反応し，ケイ酸オリゴマーを形成する（Belton *et al.*, 2012）．ケイ酸の重合が進むとオリゴマーの表面は負に帯電する．オリゴマー同士は静電的に反発するため沈殿しないが，強く正に帯電した CotB1 の塩基性領域が複数のケイ酸オリゴマーを静電的に引き寄せることでさらなる重合を促進し，シリカ粒子を形成している可能性が考えられる．相同性解析によって発見された silacidin 様領域の機能は現時点では不明だが，生体内でなんらかの翻訳後修飾を受けて機能する可能性や，別の正電荷を持つ分子と静電的に相互作用することで間接的にシリカ形成に関与している可能性が考えられる．

ラボスケールでの *Bacillus* 属優占化の再現の試み

上述のシリカ蓄積メカニズムの解析と並行して活性汚泥中における *Bacillus* 属優占化メカニズムの解析を行った．これまで，ケイ酸を含む薬剤添加による *Bacillus* 属優占化に関する報告は多くあるものの（Choi *et al.*, 2002; 川北ら, 2010; 李ら, 1996; Mori *et al.*, 2004; 村上ら, 1995），そのほとんどは廃水処理施設の現場における知見である．ラボスケールで *Bacillus* 属優占化を再現することができれば，（人工）廃水の組成の調整や，細かな条件設定，さらには遺伝子破壊株を用いた詳細な解析が可能になる．そこで，ラボスケールの活性汚泥装置 2 台を作製し，片方にケイ酸溶液を添加することで，*Bacillus* 属の優占化を試みたが，残念ながら優占化する様子は観察されなかった．本研究以前にも *Bacillus* 属優占化の再現を試みた例はあるようだが，やはり実験室での再現が難しく，その理由は分かっていない（大阪工業大学・古崎康哲，私信）．スケールの違いやそれに起因するなんらかの要因が *Bacillus* 属優占化に関与している可能性が考えられたが，その原因を特定するには至らなかった．そこで，やむなくラボスケールでの *Bacillus* 属優占化を断念し，既存の *Bacillus* 属優占化プロセスにおいて想定されるストレスに対する胞子の耐性の評価を行うことで，優占化のメカニズムに関する知見を得るべく研究方針を変更した．

胞子の塩素耐性の評価

既存の*Bacillus*属優占化プロセスのひとつとして，千代田工販株式会社が開発したバイオ・デオリダクタ（B-DR）システムがある（川北ら, 2010）．本システムの特徴として，返送汚泥とは別に処理水の約10%を曝気槽に返送するが，その際に返送する処理水に次亜塩素酸ナトリウムを混合するとともに，ケイ酸や各種ミネラルを含むセラミックを充填したタンクを通過させることで，セラミックよりケイ酸などを徐放させ，*Bacillus*属細菌の優占化を促すというものである（川北ら, 2010）．シリカ蓄積により胞子が塩素処理に対する耐性を向上させることで本プロセスにおける生存率を高めていることが，*Bacillus*属の優占化につながっているのではないかと予想し，胞子の塩素耐性の評価を行った．

50 μg/mlの次亜塩素酸ナトリウムを含むpH 7.0の緩衝液中での胞子の生存率を評価したところ，シリカ蓄積に伴い，胞子の生存率が向上していることが判明した（Fig. 5）．この塩素耐性の向上が前述の優占化プロセスにおける*Bacillus*属の優占化に寄与していることが示唆された．ただし，塩素処理を行わない*Bacillus*属優占化プロセスも多くあることから，優占化には塩素耐性以外の要因も関与していると考えられるため，更なる研究が必要である．

CotB1の応用展開1：シリカ結合タグとしての利用

本項および次項は，本研究で発見したCotB1の機能を利用した応用展開について述べる．前述のシリカ形成のような，生物による無機鉱物の形成はバイオミネラリゼーション（biomineralization）と呼ばれている．バイオミネラリゼーション作用を有するペプチドは，形成した鉱物に対する結合能を併せ持つことも多いため，CotB1の塩基性領域がシリカに対する結合能を示すかを以下のように検証した．GFPのC末端にCotB1全長を融合したタンパク質（GFP-CotB1），ならびに塩基性領域のみを融合したタンパク質（GFP-CotB1p）をそれぞれ大腸菌内で発現し，その菌体破砕液にシリカ粒子を添加して室温で15分間混合した．遠心分離によってシリカ粒子を沈殿させ，紫外線照射下で観察したところ，GFPを単独で発現した場合は，上清にGFPの蛍光が見られたのに対し，GFP-CotB1やGFP-CotB1pの場合は，シリカ粒子の部分にGFPの蛍光が見られ，上清には蛍光が観察されなかった（data not shown）．これらの結果から，CotB1，特にその塩基性領域が予想通りシリカ結合能を有することが判明した．シリカは溶液中で負に帯電するため，正に帯電するアルギニン残基を多く含む塩基性領域が静電的に結合していると考えられる．また，これらの結果は，塩基性領域が，目的とするタンパク質にシリカ結合能を付与するタグ配列として機能することを示すものであった．

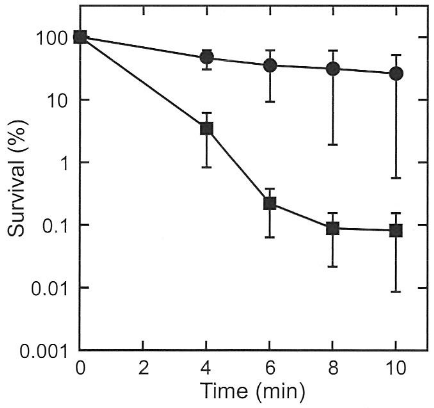


Fig. 5 Viability of *B. cereus* YH64 spores in the presence of 50 μg/mL sodium hypochlorite. Spores were produced in the presence (circles) or absence (squares) of silicate. Data represent the mean and standard deviation values of the results of three independent experiments.

CotB1の応用展開2：タグ配列の小型化とアフィニティー精製法の開発

特定の物質に対する親和性を有するタグ配列はアフィニティータグ（affinity tag）と呼ばれ，結合対象（リガンド）に対する親和性を利用したアフィニティー精製法に広く利用されている．代表的な例として，連続した6～10個のヒスチジン残基から成り，Ni^{2+}やCo^{2+}などの二価金属イオンと親和性を示すHis-tagがある．他にも様々なアフィニティータグが開発されており，各種タグ配列に対応した精製用担体が多くのメーカーから販売されている．目的や処理量に応じて適宜利用することができるが，担体表面にはタグ配列との親和性を有するリガンドが固定化されており比較的高価である．

シリカ結合タグとして働くCotB1の塩基性領域を精製用のアフィニティータグとして利用できれば，安価なシリカ粒子をそのまま精製用の担体（兼リガンド）として利用できるため，低コストのアフィニティー精製が可能になると期待された．そこで，塩基性領域を利用したアフィニティー精製法の開発を試みた．アフィニティー精製を行うためには，タグ配列とリガンドの相互作用により担体表面に吸着した目的タンパク質を回収するために，タグ配列とリガンドの結合を解離させて溶出させる必要がある．また，融合相手となる

タンパク質への影響をなるべく少なくするため，タグ配列のサイズは小さい方が望ましい．そこで，まずタグ配列の小型化を試み，続いて小型化したタグ配列がシリカより解離する条件の探索を行った．

塩基性領域の一部のアミノ酸を欠失させた変異体とGFPの融合タンパク質を大腸菌内で発現し，その菌体破砕液にシリカ粒子を添加して室温で15分間混合した．上清に残存するGFP蛍光強度を測定することで，結合効率を比較した．その結果，後半7残基のみに相当する変異体（以下SB7; RQSSRGR）でも，元の14残基に遜色ない結合能を示すことが判明した（data not shown）．

続いて，SB7がシリカより解離する条件の探索を行った．シリカとの結合には配列中のアルギニン残基が重要な役割を果たしていることが示唆されていたため，L-アルギニン溶液を添加することで競合的に溶出させる方法を検討したところ，0.5M程度のL-アルギニン溶液（pH 8.0）によって，SB7がシリカより解離することを見出した．

SB7を融合したGFPをモデルとして以下の通りシリカ粒子を精製用担体としたアフィニティー精製を行った．融合タンパク質を発現した大腸菌の菌体破砕液にシリカ粒子を添加して室温で15分間混合することで，SB7融合GFPをシリカ粒子に吸着させた．粒子を洗浄後，0.5MのL-アルギニン溶液を含むTris-HCl緩衝液（pH 8.0）で溶出したところ，目的タンパク質を高純度（90%）・高収率（80%）で回収することができた（Fig. 6）．市販のシリカ粒子をそのまま精製用担体として利用できるため，従来のアフィニティー精製法に比べ非常に低コストながら，従来法と遜色ない純度・収率を達成できた．また，本精製法で溶出に用いるL-アルギニンにはタンパク質の凝集を抑制し，安定化させるという

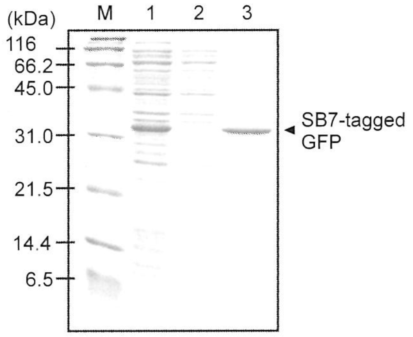


Fig. 6　SDS-PAGE analysis of affinity purification fractions of SB7-GFP using silica particles and L-arginine as the adsorbent and eluent, respectively. Lane 1, cell extract; lane 2, silica-unbound fraction; lane 3, L-arginine-eluted fraction; lane M, molecular mass markers.

効果があるため（Tsumoto *et al.*, 2004），目的タンパク質を機能的に精製するための優れた手法になりうると考え，本精製法の実用化に向けてさらなる研究を進めている．

要　約

胞子形成期にケイ酸を取り込み，シリカとして蓄積する*B. cereus*のシリカ蓄積メカニズムの解析を行い，シリカ蓄積には胞子殻タンパク質CotB1が関与していることを明らかにした．特にCotB1のC末端に存在する塩基性領域が，ケイ酸の重合によるシリカ形成を促進していることが強く示唆された．また，この胞子表面へのシリカ蓄積が，ケイ酸添加による活性汚泥中での*Bacillus*属細菌の優占化に関与していると予想し，その検証を試みた．一部の*Bacillus*属優占化プロセスに次亜塩素酸による処理が組み込まれていることに着目し，胞子の塩素耐性を評価したところ，シリカ蓄積に伴い塩素耐性が向上していることを発見し，このことが*Bacillus*属優占化に関与している可能性を示した．

また，CotB1のC末端の塩基性領域が，シリカ表面に結合することを発見し，シリカ結合タグとして利用できることを示した．このタグ配列のサイズを7残基まで短くすることに成功し，得られたタグ配列を利用することで新規のアフィニティー精製法を開発した．本精製法では市販のシリカ粒子を精製用の担体として利用するため，非常に低コストで精製を行うことができる．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1) 本村圭，池田丈，小西浩司，Mohamed A.A. Abdelhamid，廣田隆一，黒田章夫，2013．*Bacillus cereus*のシリカ蓄積機構に関与する胞子タンパク質の同定．日本生物工学会第65回大会，広島

原著論文

1) Abdelhamid, M.A.A., Motomura, K., Ikeda, T., Ishida, T., Hirota, R. & Kuroda, A. 2014. Affinity purification of recombinant proteins using a novel silica-binding peptide as a fusion tag, Appl. Microbiol. Biotechnol. **98**: 5677–5684.

特許出願

1) 池田丈，本村圭，黒田章夫，ペプチドおよびその利用，特願2013–173945
2) 黒田章夫，池田丈，舟橋久景，精製方法，および，当該精製方法に用いられる酸化ケイ素結合タグ，特願2014-215789

保存機関に寄託した菌株

なし

謝　辞

本研究の遂行にあたり，多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に深く感謝いたします．また，*Bacillus* 属優占化プロセスに関して貴重なご助言を賜りました大阪工業大学の古崎康哲先生に感謝いたします．

文　献

Arantes, O. & Lereclus, D. 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. Gene **108**: 115–119.

Arnaud, M., Chastanet, A. & Débarbouillé, M. 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 6887–6891.

Belton, D.J., Deschaume, O. & Perry, C.C. 2012. An overview of the fundamentals of the chemistry of silica with relevance to biosilicification and technological advances. FEBS J. **279**: 1710–1720.

Choi, Y.S., Hong, S.W., Kim, S.J. & Chung, I.H. 2002. Development of a biological process for livestock wastewater treatment using a technique for predominant outgrowth of *Bacillus* species. Water Sci. Technol. **45**: 71–78.

土井幸夫，村上弘毅，青木満，入江鐐三，建石耕一 1996. 好気性無臭し尿処理において優占する *Bacillus* sp. に対する金属イオンの影響. 日本水処理生物学会誌 **32**: 111–121.

Eichenberger, P., Fujita, M., Jensen, S.T., Conlon, E.M., Rudner, D.Z., Wang, S.T., Ferguson, C., Haga, K., Sato, T., Liu, J.S. & Losick, R. 2004. The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. PLoS Biol. **2**: e328.

Ellermeier, C.D., Hobbs, E.C., Gonzalez-Pastor, J.E. & Losick, R. 2006. A three-protein signaling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin. Cell **124**: 549–559.

González-Pastor, J.E., Hobbs, E.C. & Losick, R. 2003. Cannibalism by sporulating bacteria. Science **301**: 510–513.

Green, M.R. & Sambrook, J. 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, fourth edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Henriques, A.O. & Moran, C.P., Jr. 2007. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. Annu. Rev. Microbiol. **61**: 555–588.

Hirota, R., Hata, Y., Ikeda, T., Ishida, T. & Kuroda, A. 2010. The silicon layer supports acid resistance of *Bacillus cereus* spores. J. Bacteriol. **192**: 111–116.

Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Ehrlich, S.D., Overbeek, R. & Kyrpides, N. 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. Nature **423**: 87–91.

川北護一，藤原和弘，浦上逸男，古屋政彦，山本孝夫 2010. 常温微生物方式脱臭・汚泥減容化システム「バイオデオ」のしくみ．環境浄化技術 **9**: 19–24.

Kröger, N., Deutzmann, R. & Sumper, M. 1999. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. Science **286**: 1129–1132.

Kröger, N., Deutzmann, R. & Sumper, M. 2001. Silica-precipitating peptides from diatoms. The chemical structure of silaffin-1A from *Cylindrotheca fusiformis*. J. Biol. Chem. **276**: 26066–26070.

李文生，青木満，入江鐐三，村上弘毅，建石耕一 1996. 好気性無臭し尿処理に優占する細菌相の変化. 日本水処理生物学会誌 **32**: 93–104.

Mori, K., Iriye, R., Hirata, M. & Takamizawa, K. 2004. Quantification of *Bacillus* species in a wastewater treatment system by the molecular analyses. Biotechnol. Bioprocess Eng. **9**: 482–489.

村上弘毅，土井幸夫，青木満，入江鐐三 1995. 好気性し尿処理槽における *Bacillus* spp. の優占化とそれらの生化学的性質. 水環境学会誌 **18**: 97–108.

村上弘毅，李文生，土井幸夫，青木満，入江鐐三，建石耕一 1996. 好気性無臭し尿処理において優占化する *Bacillus* sp. の種の同定. 日本水処理生物学会誌 **32**: 105–110.

Reasoner, D.J. & Geldreich, E.E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl. Environ. Microbiol. **49**: 1–7.

Steinmetz, M. & Richter, R. 1994. Easy cloning of mini-Tn*10* insertions from the *Bacillus subtilis* chromosome. J. Bacteriol. **176**: 1761–1763.

Todd, S.J., Moir, A.J.G., Johnson, M.J. & Moir, A. 2003. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. J. Bacteriol. **185**: 3373–3378.

Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J.S. & Arakawa, T. 2004. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. Biotechnol. Prog. **20**: 1301–1308.

Turgeon, N., Laflamme, C., Ho, J. & Duchaine, C. 2006. Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATCC 14579. J. Microbiol. Methods **67**: 543–548.

Wenzl, S., Hett, R., Richthammer, P. & Sumper, M. 2008. Silacidins: highly acidic phosphopeptides from diatom shells assist in silica precipitation in vitro. Angew. Chem. Int. Ed. **47**: 1729–1732.

Young, S.B. & Setlow, P. 2003. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. J. Appl. Microbiol. **95**: 54–67.

IFO Res.Commun. 29
25-36, 2015

生産物を鋭敏に分析する方法を活用した低栄養な環境で優占する微生物の新規計数法の開発と未知微生物の分離

諏 訪 裕 一

中央大学理工学部生命科学科
〒112-8551 東京都文京区春日 1-13-27

Development of novel MPN method employing ^{15}N tracer technique for sensitively detecting gaseous metabolites, N_2 and N_2O, and attempts on isolation of oligotrophic denitrifiers and ammonia oxidizers

Yuichi Suwa

Department of biological sciences, Chuo University
1-13-27, Kasuga, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-8551, Japan

Our previously developed ^{15}N tracer technique, which allows sensitive determination of N_2 and N_2O mainly for ecological and physiological studies, was further modified for MPN enumeration and isolation of denitrifying bacteria (DB) and aerobic ammonia-oxidizing microorganisms (AOM). As both MPN enumeration and dilution-extinction procedures for bacterial isolation require a lot of replicates, and our developed ^{15}N tracer technique is relatively time-consuming, we down-sized the assay system without sacrificing its sensitivity. By employing the newly developed procedure, DB in a sediment of stream and marsh, surface water of river and lake and enrichment culture for anammox microorganisms were MPN enumerated using sterile environmental water or spent medium (effluent) obtained from anammox enrichment culture. Although DB were MPN enumerated with media employing environmental water, MPN estimates did not clearly exceed those with conventionally used medium for oligotrophic DBs, NB/100. However, MPN estimates of DB in an anammox enrichment with spent medium were much greater than those with NB/100, and, notably, 24.0% of total bacterial cells in the sample were recovered, indicating the high applicability of this method. The developed methods were especially useful when the medium containing NO_2^- (and/or NO_3^-) was used for MPN enumeration of AOM. Soil extract, which contained NO_3^-, was amended to basal mineral medium with a smaller amount of $^{15}NH_4^+$ for enumerating oligotrophic AOM from a forest soil. ^{15}N-labeled NO_2^- produced by AOM was clearly detected from NO_3^- background by converting $^{15}NO_2^-$ to ^{15}N-labled N_2O with denitrifying bacterial, and appreciably high MPN estimates were obtained.

Key words: denitrifiers, ammonia oxidizers, gas metabolism, GCMS, MPN enumeration

緒　言

実験室での微生物培養技術は，大腸菌や酵母のように，栄養物が豊富な培地で非常に速い速度で増殖する微生物の取り扱いのために確立されてはいるが，これとは生理学的な性質が大きく異なる自然界の微生物の多くを培養するにはさまざまな工夫が必要である．古典的だが，その好例は選択培地を使って特定の機能を持つ微生物を集積培養することであろう．この手法は好気的なアンモニア酸化細菌をはじめとする化学合成無機栄養細菌の純粋分離の成功をもたらした．選択培地を使用した場合，その培地で生育できない微生物は排除される．残った微生物は基質に対して他の微生物と競合し，与えられた環境条件で競り勝った微生物が集積される．純粋分離のターゲットとしない微生物の

E-mail: y-suwa@bio.chuo-u.ac.jp

排除と，ターゲットとする微生物間の競合を組み合わせたこの方法は，特定の微生物を高度に選択するが，多様な微生物を分離する目的には，必ずしも合致しない．多くの微生物種を排除せず，競合させないようにするには，どんな方法が考えられるだろうか．たとえば，試料中で優占する微生物を分離するために用いられてきた限界希釈法では，培養開始時点での培養中の微生物（種）数は少なく，微生物間の競合は起こりにくいと考えられる．また，培地中の栄養分の濃度を下げることで，培地がより選択的でなくなることが1970年代から知られており（Hattori, 1976），現在では，より希薄な栄養分を含む培地を用いることが環境微生物学では一般的である．

この考えを推し進めると，微生物の分離源で採取される環境水そのものを培地として用いる発想に至る．このアプローチでは，Connon & Giovannoni (2002) の研究がよく知られている．また，先駆的な研究としては，Ishida & Kadota (1979) による琵琶湖の湖水を培地として使用した細菌の計数および分離の試みがある．彼らは湖水を培地にすることで，人工的な培地を使用するよりも数倍高い計数値を得た．この結果は，新規性の高い微生物種が捕えられている可能性が考えられるが，Ishida & Kadota (1981) は実際に低栄養（oligotrophic）細菌を分離し，豊富な栄養を含む培地に生育しない生理的性質を有していることを記述している．しかし，分子生物学的手法が存在しない時代の研究であり，どのような系統に属する種であったかは不明であるが，大きな興味を感じる．環境水そのものを培地として用いる方法も含め，培地中の電子供与体濃度を環境に合わせて低くして培養するアプローチにおいて実験上で問題となるのは，どのようにして微生物の増殖を検出するかであろう．Connon & Giovannoni (2002) は直接検鏡法で細菌数を計数しており，Ishida & Kadota (1979) は ^{14}C で標識した Glucose を微量添加して，これを資化する微生物が呼吸により排出する $^{14}CO_2$ の検出と MPN 法とを組み合わせ，低栄養細菌を計数，分離することを試み，その取り込みを測定した．原理的には前者では，細菌密度がより低い場合，比較的多くの培養が測定に必要となり，後者は，放射性同位元素を用いる欠点を伴う．最近の総説（Stewart, 2012; 玉木・鎌形, 2012）でも指摘されているように，未知微生物の分離では環境自体を模倣した培地あるいは培養方法の開発は重要なアプローチのひとつである．これを推し進めるには，培地や培養方法に加え，微生物の検出方法の開発も重要な課題である．しかも，少量の試料で低濃度の微生物活性や増殖を推定でき，放射性同位元素を用いない方法が求められる．

本研究では，地球化学的な窒素循環に関わる脱窒と硝化という機能を担う微生物の計数と純粋分離のために，極低濃度の培地の使用，あるいは，微生物が棲息する環境から採取した環境水を培地として用いて微生物を計数・分離することを試みる．ここでは，コロニーの検出や，液体培地の濁度の検出など，従来の微生物の検出方法を適用することは困難である．そこで，当研究室で開発した気体を鋭敏に検出する GC/MS 法（Isobe *et al.*, 2011a）を，低栄養条件下に棲息する微生物の検出に適用することを試み，MPN 計数および純粋分離の手法を提案する．これを用いることは，上記した２つの要求；少量の試料であることと，放射性同位元素を用いないこと，にも合致する．一般に，液体や溶液中の物質の分析に比べると気体を分析対象とする GC/MS の感度と精度は高く，さらに，安定同位体トレーサーを組み合わせることにより，検出対象とする代謝を特定でき，感度を向上させることが可能となる．微生物の代謝で生産される気体，特に N_2 および N_2O を対象とし，安定同位体 ^{15}N で標識された化合物をトレーサーとして使用する．

アンモニア酸化を行う好気性微生物としてアンモニア酸化細菌（ammonia-oxidizing bacteria; AOB）とアンモニア酸化古細菌（ammonia-oxidizing archaea; AOA）が知られている．AOB と AOA とをまとめて，アンモニア酸化微生物（ammonia-oxidizing microbes; AOM）と呼ぶこととする．

実験方法

試料

脱窒菌の MPN 計数用の試料として，茨城県取手市の利根川の河川水，千葉県我孫子市の手賀沼の湖沼水，および東京都八王子市にある中央大学多摩キャンパスを流れる小川の堆積物とそこを流れる水を採取し，氷冷しながら研究室に運搬した．また茨城県阿見町の谷津田の堆積物を採取し，氷冷しながら研究室へ運搬した．同時に，堆積物採取地点付近の湧水を培地として使用するために採取した．当研究室で上向流式の連続培養装置で維持しているアナモクス（嫌気性アンモニア酸化細菌）集積培養バイオマスを採取し，超音波破砕機で非常に短い時間処理して分散した．試料採取と同時に，集積培養装置からの排出水を培地として使用するために採取した．

AOM の MPN 計数用の試料として，霞ケ浦の一部である北浦の KU6 地点（Yoshinaga *et al.*, 2011）で堆積物の表層（10 cm）を採取し，氷冷で保存しながら，研究室へ運搬した．さらに，堆積物採取地点直上水を

培地として使用するために採取した．北海道大学標茶演習林，および東京大学千葉演習林において，いずれも表層土壌を採取し，常温で研究室まで運搬した．

上記試料はいずれも計数を行うまで4℃，暗所で保存した．また，培地として使用するための環境水は，研究室に運び込まれたのち直ちに，氷上でGF/Fフィルター（孔径0.7 μm相当；Whatman，450℃，3 h加熱処理）でろ過し，実験開始まで4℃，暗所で保存した．これらの環境水は，研究室に運び込まれたのち直ちに，NO_3^-，NO_2^-，NH_4^+濃度をイオンクロマトで定量した．

脱窒菌用の培地

NB/100；逆浸透（RO）水を用いてNB粉末を規定の濃度で作成し，これをRO水で100倍に希釈し，NB/100培地を調製した．これを耐圧瓶へ移し，環境水中のNO_3^-量に応じて脱窒菌の電子受容体として，NO_3^-を添加した．パージ管を刺したゴム栓で耐圧瓶に封をし，培地をArでパージし無酸素化した．無酸素化した培地を嫌気箱へ移し，新しいゴム栓を付け替え，オートクレーブ滅菌（121℃，60 min）した．嫌気箱内で所定量の$^{15}NO_3^-$を添加し，よく混和した．

NB/10^3；NB/100をRO水でさらに10倍希釈し耐圧瓶に移した．その後の操作はNB/100の調製と同様にして行った．

アセチレン阻害実験用NB/100；NB/100を調製し，耐圧瓶に移した．Hashimoto *et al.* (2006) に従い，NO_3^-を終濃度31 mg/Lになるように添加し，上記の方法と同様にArをパージした．オートクレーブ滅菌（121℃，60 min）した．

脱窒菌のMPN計数の対象とする環境試料の採取地点でえた環境水をそのまま培地として使用した．その調製方法をTable 1に示す．

AOM用の培地

AOMのMPN計数に使用した培地の組成をTable 2に示す．近年は基質であるアンモニウム塩を1 mM程度にして計数分離する場合が多いが，筆者らは，これまで100 mg/L硫酸アンモニウム（0.76 mM）を含む培地で計数および分離してきた．これ以下の濃度でアンモニウム塩を添加する場合，それが微生物によって酸化されて生成するNO_2^-およびNO_3^-の濃度は非常に低いと考えられるため，場合によっては^{15}N-標識したアンモニウム塩をトレーサーとして添加し，^{15}N-標識NO_2^-およびNO_3^-を，後述の脱窒菌法で定量した．

脱窒菌のMPN計数のための培養

各試料をオートクレーブ滅菌したmilli-Q水で120 ml容バイアルに全量が100 mlとなるように段階希釈し，ゴム栓で密封した．ゴム栓を通してArを培地に送るチューブと排気チューブを通し，Arパージして無酸素化した．Arは孔径0.2 μmの滅菌済みシリンジフィルターを通して送り込んだ．無酸素化した希釈試料水を嫌気箱へ移し，所定の培地で10倍ずつ系列希釈した．嫌気箱の気相にはAr : H_2 = 95 : 5の混合気体を用いた．

Table 1 Composition of media prepared with environmental water or effluent from the anammox enrichment reactor

Site and preparation of basal medium with environmental water	Electron donor	Electron acceptor*
Tone River (autoclaved water)	Organic (1.2 mg L^{-1} TOC) and inorganic compounds in surface water.	0.43 mM nitrate (0.75)
Lake Tega-numa (autoclaved surface water)	Organic (1.7 mg L^{-1} TOC) and inorganic compounds in surface water.	0.31 mM nitrate (0.75)
Stream water at Chuo U, Tama (filter-sterilized; 0.20 μm pore-size)	Organic (1.7 mg L^{-1} TOC) and inorganic compounds in stream water.	0.21 mM nitrate (0.75)
Ravine marsh at Ibaraki Prefecture (1/4 dilution with RO water)	Organic (1.0 mg L^{-1} TOC) and inorganic substances in 1/4 marsh water. ^{13}C-UL algal amino acid mixture was amended at 0.75mg L^{-1}.	0.44 mM nitrate (0.75)
Effluent (spent medium) from anammox enrichment reactor (1/4 dilution of with RO water)	Exudate from anammox community in 1/4 diluted effluent and 1.5 mg L^{-1} ^{13}C-UL algal amino acid mixture (2.0 mg L^{-1})	0.40 mM nitrate (0.50) +0.76 mM nitrite (0.50)

* ^{15}N labeling ratio is shown in brackets.

Table 2 Media for MPN enumeration and isolation of AOM in this study

Component	Concentration ($mg\ L^{-1}$) in medium							
	BH	BL	LL	CL	CUL	CULN	CSL	CEX
KH_2PO_4	155	155		725	725	725	725	725
Na_2HPO_4				1136	1136	1136	1136	1136
$(NH_4)_2SO_4$	5000	100	100	100	10		45.5	
$(^{15}NH_4)_2SO_4$						10		45.5
$NaNO_2$						3.45		
$NaNO_3$						8.5		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	50	50		50	50	50	50	50
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	20	20		20	20	20	20	20
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1	1						
Fe-EDDHA				1	1	1	1	1
Trace elements mixture*	0.6 mL	0.6 mL		0.6 mL	0.6 mL	0.6 mL	0.6mL	0.6 mL
Lake water (Kitaura)			1 L					
Soil extract (Shibecha)								100 mL

* Trace elements mixture of ATCC medium #1573 (×1.66) : $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 10 mg ; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 20 mg ; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg ; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.2 mg ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2 mg, in 60 mL distilled water

沸石を入れた24.5 mL容バイアルに各希釈液を22 mL，8連で分注し，滅菌したブチルゴム栓で密封し嫌気箱から取り出し，さらにアルミシールで封じた．ヘッドスペースガスを高純度（G1）Heで置換した．ガス置換時には，滅菌済みのディスポサブル注射針を無菌的にブチルゴム栓に差し込み，Heは孔径0.2 μmの滅菌済みシリンジフィルターを通して送り込んだ．ヘッドスペースをHeに置換後，20℃暗所にて培養し，ヘッドスペース中の^{15}N-標識N_2あるいはN_2Oを経時的GC/MS（Shimadzu QP2010 PLUS）で定量した．定量は検量線法で行った．

^{15}N-標識N_2あるいはN_2OをGC/MSで検出することで脱窒活性を高感度で検出するには，培養の容積を大きくして，ヘッドスペースの容積を小さくすることが求められる．そのとき，培地に溶解する気体の量も多くなる．したがって，発生した気体のモル濃度からブンゼンの吸収係数をもとに培地に溶解する量を計算し，ヘッドスペースに蓄積される気体濃度を最適化する必要がある．こうした理論計算の結果，24.5 mL容バイアルに培地を22 mL入れて培養するのが最適であることが求められた．

本研究でのN_2Oの検出感度は1 ppmであり，10 ppmで精度高く定量できることを確かめた．バイオマス生産を含めた脱窒の物質収支式（Ebeling, *et al.*, 2006）および大腸菌1細胞の重さ約9.5×10^{-13} gを用いると，この方法では，10^3 cells/mLの脱窒菌が生産するN_2Oを検出可能である．この感度はConnon & Giovannoni (2002) の方法と同等である．ただし，疑陽性判定を避けるため，N_2あるいはN_2Oが10 ppm以上を陽性（+）と判定した．

GC/MSで検出する^{15}N-標識N_2あるいはN_2Oの検出感度を高く保つために，培地中の全$NO_2^- + NO_3^-$の^{15}N比を0.5あるいは0.75とした．試料水そのものを培地として用いる場合，または試料水自体に比較的多くの$NO_2^- + NO_3^-$が含まれる場合，本研究では，トレーサーとして^{15}N標識試薬を添加することで培地中の$NO_2^- + NO_3^-$が高くなりすぎることを避け，むしろ，試料水自体を滅菌RO水で希釈した（Table 1）．この場合，培地中の電子供与体濃度は低くなり，環境自体より，さらにoligotorophicな条件となっている．こうした条件でも脱窒菌が計数できるかどうかを検討することで，このアプローチの有効性をより厳しく判定することにした．

環境試料中の NO_2^-，NO_3^- および NH_4^+ の定量

環境水中の NO_2^-，NO_3^- および NH_4^+ は，TSK gel Super IC-AZ を装着したイオンクロマトグラフ（IC-2010，TOSOH）で定量した．必要に応じて，試料を孔径 0.45 μm のシリンジフィルターでろ過した．

アセチレン還元法による脱窒活性の検出

Hashimoto *et al.* (2006) による，NB/100 培地を基礎培地として用いて，アセチレン還元法で oligotrophic な脱窒菌を MPN 計数した．この方法で計数し，本研究でデザインした MPN 計数法の結果と比較した．アセチレン阻害法ではアセチレンによって脱窒系の N_2O 還元酵素が特異的に阻害され，脱窒の最終産物が N_2O となるが，本研究では，一般的に用いられる ECD 付きの GC ではなく，GC/MS で N_2O を検出した．本研究で用いた GC/MS と ECD 付きの GC による N_2O の感度はほぼ同等である．

AOM の MPN 計数法

それぞれの培地は，乾熱滅菌した試験管（16×100 mm）に 4.0 mL ずつ分注し，アルミキャップを付した．試料は，基礎培地で系列希釈し，0.5 mL ずつを分注した 4.0 mL 培地に分注した．培養は 25℃，暗所で行った．

一定期間培養したのち，試料を約 500 μL 採取し，オートアナライザー（Technicon/Bran-Luebbe TrAAcs 2000）で NO_2^-，NO_3^- を定量し，アンモニア酸化によって NO_2^-，NO_3^- が増加したかどうかを検討した．特に培地中に $NO_2^- + NO_3^-$ が含まれるとき，AOM が生成するごく微量の ^{15}N-標識された $NO_2^- + NO_3^-$ の検出および定量は，脱窒菌法（Isobe *et al.*, 2011b）で行った．ただし，10 mL 容のバイアルを使用して，ヘッドスペース容積を小さくすることで N_2O の検出感度を上げ，0.01 mM の $NO_2^- + NO_3^-$ を含む培養液が 500 μL あれば，$NO_2^- + NO_3^-$ を検出できるように改良した．これによって，より容易に多数の検体を取り扱うことができるようになり，脱窒菌法の MPN 法への適用が可能となった．

結果と考察

栄養物濃度が低い培地による脱窒菌の MPN 計数

さまざまな環境試料およびアナモクス集積培養の脱窒菌の MPN 計数値を Table 3 に示す．同じ試料について，栄養分の少ない培地での脱窒菌での MPN 計数も比較した（Table 3）．GC/MS による ^{15}N-標識された N_2 あるいは N_2O の検出による脱窒菌の検出感度は十分に高く，環境水を培地としても脱窒菌を計数できることが示された．ただし，その計数値は，NB/100 を基礎培地として脱窒菌を計数した場合と同程度か，それを若干下回ることもあった．ただし，アナモクスの集積培養バイオマス中の脱窒菌を，その排出水を基礎培地に使用した場合の MPN 計数値は，NB/100 を基礎培地とした場合の 100 倍となった．このように，計数の対象としている環境試料そのものを培地として使用することで，MPN 計数値が大きく増える場合があることが示された．

Table 3 MPN estimates of denitrifiers using ^{15}N tracer technique developed in this study

Sample	Acetylene inhibition	^{15}N tracer technique			Incubation (days)
	NB/100	NB/100	NB/10^3	Environmental water or effluent from enrichment	
Water from Tone River (/mL)	3.5×10^3	3.5×10^3	1.3×10^3	2.4×10^3	60
Surface water of Lake Tega-numa (/mL)	2.4×10^3	5.4×10^3	2.4×10^3	2.4×10^3	56
Sediment in a stream, Chuo U, Tama (/g dry weight)	2.2×10^7	3.1×10^7	3.7×10^6	3.7×10^7	53
Biomass in anammox enrichment (/SS g/L^{-1})	4.1×10^5	6.0×10^4	8.3×10^3	6.0×10^6	12
Sediment of ravine marsh (/g dry weight)	2.6×10^7	1.7×10^7	Not tested	5.8×10^6	16

NB/100を基礎培地として，２つの脱窒菌の検出方法によるMPN計数値を比較した．２つの方法とは，古典的なアセチレン阻害法と $^{15}NO_3^-$ をトレーサーとしてGC/MSで ^{15}N-標識された N_2 あるいは N_2O を検出する方法である．その結果，これら５種類の試料では，これら２つの方法でのMPN計数値にはまったく差が認められなかった（Table 3）．いずれの方法でも同様に，濁度が目視できない培養からも，十分高い脱窒活性が検出された．NB/100培養の濁度が目視で認められる培養の数をもとにしたMPN計数値と，脱窒で生成される気体を検出することを基盤とするMPN計数値をそれぞれ比較した．その結果，差の小さかった利根川河川水および茨城県の谷津田の湧水でも，それぞれ，後者は前者より15倍および16倍高く，中央大学多摩キャンパスの小川の水では420倍であった．アセチレン阻害法は N_2O という気体を検出することで脱窒活性を判定する方法であり，その検出感度が濁度の目視に比べてはるかに高いことがわかる．また，本研究によって，アセチレンは脱窒代謝系での特定の酵素に対する特異性が高く，それ以外の代謝に対しての影響がほぼ認められないことが推定された．

いずれの試料についても，NB/10^3 を基礎培地としたときの脱窒菌のMPN計数値がNB/100より低かったことは，栄養物濃度を下げることでMPN計数値を上げることができるとは限らないことを示唆する．また，本研究でも認められた環境水を用いることで得られたより高いMPN計数値が単に栄養物濃度が低かったためであるとは限らず，何らかの質的な要因があることをも示唆する．栄養物濃度がおそらく２桁低かったにもかかわらず，環境水を基礎培地とした計数値がNB/100を基礎培地とした計数値と同等であったことは，環境水培地が質的に適合していた可能性を示唆する．本研究では，^{15}N トレーサー法による脱窒菌の感度を維持するために，環境水をRO水で希釈したが，無希釈の培地を使用し，電子供与体を量的質的に環境と同等に与えた場合どのような計数結果が得られるのか，今後検討する必要があろう．

アナモクス集積培養バイオマスでMPN計数の対象となった微生物の検討

アナモクス微生物は培養が困難であり，純粋培養が得られておらず，多くはこの集積培養のように，連続培養系で培養されるが，われわれはすでに回分培養でも増殖する可能性があることを示している（Yasuda *et al.*, 2011）．このMPN計数のための培養でも，アナモクス微生物が ^{15}N で標識された N_2 の生成に寄与していたのかどうかを，N_2 の各isotopomerの由来と物質収支から推定した．$^{30}N_2$ はもっぱら脱窒から生じるが，$^{30}N_2$ 生成量と，培地中の全 $NO_2^- + NO_3^-$ の $^{15}N/^{14}N$ 比から，脱窒由来の $^{28}N_2$ および $^{29}N_2$ 量を計算でき，アナモクス由来の $^{28}N_2$ および $^{29}N_2$ 量の比も同様に培地中の $^{15}N/^{14}N$ 比から計算できる．さらに，大気からの混入分の $^{28}N_2$ および $^{29}N_2$ 量の比は N_2 の自然同位体比から計算できる．このことからアナモクス由来の $^{29}N_2$ と大気由来の $^{29}N_2$ を変数とする $^{28}N_2$ および $^{29}N_2$ の総量についての次の連立方程式を立てて，それを解くことでアナモクス由来の $^{29}N_2$ 量を求めることができる．

$$\mathrm{A} = \text{全}\,^{28}N_2 = \text{大気由来}\,^{28}N_2 + \text{脱窒由来}\,^{28}N_2 + \text{アナモクス由来}\,^{28}N_2 \quad ①$$

$$\mathrm{B} = \text{全}\,^{29}N_2 = \text{大気由来}\,^{29}N_2 + \text{脱窒由来}\,^{29}N_2 + \text{アナモクス由来}\,^{29}N_2 \quad ②$$

$$\mathrm{C} = \text{全}\,^{30}N_2 = \text{脱窒由来}\,^{30}N_2 \quad ③$$

$^{29}N_2$ と $^{30}N_2$ の発生がもっぱら脱窒だけによるならば，この実験での $NO_2^- + NO_3^-$ の ^{15}N 標識率は50%なので，発生 $^{30}N_2/^{29}N_2$ 比は50%となる．この値が50%を下回った場合，脱窒以外の過程，すなわち，アナモクス由来か大気由来の $^{29}N_2$ が含まれたことになる．ところで，大気由来の $^{29}N_2$ は上記①～③の連立方程式を解く過程で消去されるためこの可能性はなく，発生 $^{30}N_2/^{29}N_2$ 比を低下させた $^{29}N_2$ はアナモクス由来と推定できる．この収支計算をMPN計数のために行った排出水を基礎培地として用いた12の培養について行った結果，10培養でアナモクス由来の $^{29}N_2$ 生成があった可能性が推定され，うち，３培養でその可能性がより高かった（Table 4）．この結果は，この実験系では，従属栄養細菌だけでなくアナモクスがMPN計数されていることを示唆し，高いMPN計数値はアナモクスが検出されたことにも因ると考えられる．アセチレンはアナモクス活性を阻害することが知られており（Jensen *et al.*, 2007），アナモクス微生物の検出も目指すのであれば，^{15}N 標識化合物を用いたトレーサー法でMPN計数することが求められる．

栄養物濃度が非常に低い培地でも微生物は増殖するか

微生物を分離するには，対象とする微生物が与えられた培養条件下で増殖すること，つまりバイオマスを増やし，細胞が分裂して数を増すことが必要である．アナモクス集積培養の排出水を用いた脱窒菌のMPN計数に使用し，脱窒活性が認められた培養のうち，もっとも高い希釈率で希釈した試料懸濁液を接種した培養を，同じ培地に1/4希釈となるように移植して培養した．もし，培養が増殖せず，活性が維持されるだけ

Table 4 Contribution of anammox in $^{29}N_2$ emission in MPN tubes (incubated for 124d) for enumerating denitrifiers in an anammox enrichment culture

dilution	Vial	N_2 isotopomers determined (gross; ppm)			N_2 isotopomers calculated as; (ppm)				$^{30}N_2$ / biotic $^{29}N_2$ (%)	Contribution[2), 3)] of Anammox
					$^{28}N_2$	$^{29}N_2$				
		$^{28}N_2$	$^{29}N_2$	$^{30}N_2$	not via denitrification	not via denitrification	via AMX[1)]	from ambient air		
		A	B	C	D =A-C	E =B-2C	F =(D·f -E)/(f -1)	G =E-F	H =C/(B-G)	
10^7	1	50798	9181	4333	46465	515	173	342	49	+
	2	40443	7708	3652	36791	405	134	271	49	+
	3	144267	1823	243	144024	1337	275	1062	32	++
	4	33728	10176	4920	28809	337	125	212	49	+
	5	43897	33680	17054	26843	-429	-632	203	51	-
10^8	1	27361	7049	3381	23980	288	111	176	49	+
	2	39861	3723	1662	38199	399	117	281	48	+
	3	22960	140	0	22960	140	-30	170	0	-
	4	32613	3033	1385	31227	263	32	231	49	+
	5	36857	32350	16497	20360	-644	-801	156	51	-
10^9	1	22209	233	25	22183	182	18	164	37	++
	2	32999	2643	1165	31834	314	79	235	48	+
	3	23924	203	81	23843	41	-136	177	314	-
	4	22993	190	581	22412	-973	-1147	174	3702	-
	5	39316	328	0	39316	328	38	290	0	++

1) f, natural abundance (ratio) of $^{29}N_2/^{28}N_2$= 0.00739.

2) Contribution of anammox is positive, if F >0 and $^{30}N_2/^{29}N_2$ < 50%.

3) ++, < 40%; +, 40-50%; -, > 50% or F<0.

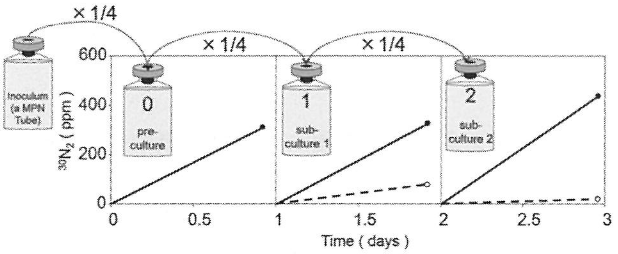


Fig. 1 Denitrifiers from anammox enrichment grown on effluent in a MPN tube were successfully sub-cultured. Cultures were incubated at 30℃ in the dark. If no growth occurs but biomass of denitrifiers stays constant in a sub-culture, $^{30}N_2$ produced in the sub-culture would be 1/4 as that in the previous cultures, when 1/4 of the culture is transferred to freshly prepared medium, as indicated by broken lines. Amount of $^{30}N_2$ determined in the sub-cultures, as indicated by solid lines exceeded over the broken lines.

なら，移植後の培養の活性はもとの培養の活性の1/4になるはずである．Fig. 1に示すように，移植した培養の活性は培養1日後，もとの培養の活性と同等かそれ以上であった．この活性の回復は細胞の増殖ではなく，枯渇した基質を補ったためである可能性も考えられる．そこで，活性を測定した培養を，ただちに新鮮な培地に再び1/4に希釈されるような割合で移植し培養した．その結果，移植後の培養の脱窒活性は，一世代前の培養と同じかそれ以上であった．この結果はこの培養が増殖し，継代できる可能性を示唆する．

低濃度 0.15 mM の NH_4^+ を含む培地を使った AOM の MPN 計数方法の確立

湖水に 0.76 mM 硫酸アンモニウムを添加した培地（LL 培地，Table 2）を作成し，同じ地点で採取した堆積物中の AOM を MPN 計数した．AOM が生産した NO_2^- + NO_3^- をオートアナライザーで定量することで MPN 計数を行った．培地とした湖水には，はじめから NO_2^- が 0.5 μM 含まれていたが，陽性と思しき培養では十分な NO_2^- 生成（100 μM 以上）が確認されたため，0.70 × 10^5 MPN/g wet sediment という計数値を得た．ただし，塩類溶液を基礎培地として，同じく 0.76 mM 硫酸アンモニウムを含む培地（BL 培地，Table 2）での MPN 計数値の方が 3.4 倍高く，前者がより多くの AOM を検出したとは言えない．また，37.9 mM の硫酸アンモニウムを含む培地（BH, Table 2）での MPN 結果は 0.45 × 10^2 MPN/g wet sediment であ

り，LL培地及びBL培地においてoligotrophicな菌が集積されている可能性が高いことが示唆された．

BL培地のさらに1/42濃度の18 μM硫酸アンモニウムを含む培地でAOMをMPN計数した．その結果，より低い希釈率で試料を希釈した懸濁液を接種した培養でNO_2^-＋NO_3^-が検出されなかったにもかかわらず，より高い希釈率の試料懸濁液を接種した培地でNO_2^-＋NO_3^-が検出された．NO_2^-＋NO_3^-が検出された培養の出現パターンが統計学的に予測されるパターンとは異なるため，得られたスコアがMPN表に存在せず，MPN計数値を求めることができなかった．同時に同じ希釈系列を用いて行ったMPN計数ではこのようなスコアが出現しなかったことは，培地の入った試験管への接種が正常ではなかったとは考えられにくく，それ以外の要因が存在したことが示唆される．

可能性としては，培養中に生成されたNO_2^-＋NO_3^-が，何らかのメカニズムによって消費されたことが考えられる．もしそうであれば，解決策として；①基質として^{15}N-標識アンモニウムを使用し，②NH_4^+が消費し尽されないようにアンモニウム（^{15}N-標識の）濃度を若干高めておき，③NO_2^-およびNO_3^-が消費し尽されないように予め培地にNO_3^-を入れておくことが考えられる．そこで，0.15 mMのNH_4^+と，さらに0.15 mMのNO_2^-＋NO_3^-を含む培地（CULN培地，Table 2）を用いて，森林土壌（東大千葉演習林）のAOMをMPN計数したところ，MPN計数値を得ることができた．同時に，NO_2^-＋NO_3^-を添加していない培地（CUL培地，Table 2）で同じ試料をMPN計数したが，AOMによるNO_2^-＋NO_3^-の生成はまったく検出されず，AOMをMPN計数することはできなかった．この結果は，非常に低い濃度のNH_4^+でAOMをMPN計数する際，培地に予めNO_2^-＋NO_3^-を添加しておくことが有効であることを示す（Table 5）．ただし，AOMが生成するNO_2^-＋NO_3^-の検出感度は必然的に低くなり，それを示す結果も得られた．この欠点は^{15}N-NH_4^+を基質として用い，AOMが生産した^{15}N-標識NO_2^-＋NO_3^-を脱窒菌法（Isobe *et al.*, 2011b）で検出することで解決した．

Table 5 MPN scores and estimates of aerobic ammonia-oxidizers in a forest soil obtained from the Chiba experimental station, the University of Tokyo, with various media. MPN tubes are incubated at 25℃ in dark

Dilution rate of the sample	Appreciable increases in nitrite + nitrate on	
	CUL[1)] (30)[3)]	CULN[2)] (40)
2×10^3	－－－－－	＋＋＋＋＋
2×10^4	－－－－－	－－－－－
MPN (/g soil)[4)]	nd[5)]	0.75×10^4

1) Nitrite and nitrate were determined colorimetrically with a flow-cell analyzer.
2) Nitrite and nitrate were determined with a tracer method, so-called the denitrification method.
3) Days of incubation are shown in brackets.
4) Dry weight.
5) nd, not determined.

MPN計数用の培地に少量のNO_2^-＋NO_3^-を添加することと，$^{15}NH_4^+$から生成した微量の^{15}N-標識されたNO_2^-＋NO_3^-を脱窒菌法で検出する技法を組み合わせることで，AOMの電子供与体として添加した75 μMレベルの極低濃度のNH_4^+のアンモニア酸化活性を検出する方法を確立することができた．この方法は，基質あるいは生産物が消費されやすい条件下でも有効であった．CUL培地での培養の中には，それをCUL培地で継代できるが，CL培地（Table 2）で継代培養できないものがあった．この結果は，非常に低い濃度のNH_4^+でしか生育しない株が存在する可能性を示唆し，現在，この培養が継代できるかどうかを検討中である．こうした培養からは新規なAOMが純粋分離される可能性が期待され，本研究で確立したMPN法の有用性は高いと考える．この方法は，NO_2^-＋NO_3^-を含む湖沼水，あるいは土壌抽出液などの環境試料そのものを培地とすることも可能とし，次のような研究展開に有用である．

土壌抽出液を含む培地を用いた森林土壌中のAOMの計数

AOAの分離の際，有機物（ピルビン酸）が培地に加えられている．分離されたAOAのゲノムの検討から，ある種のAOAは混合栄養性であることが示された（Tourna *et al.*, 2011）．このことは，新規なAOAを分離するには，ピルビン酸などの有機物を添加することが有用であることを示唆する．しかし，ピルビン酸が常にAOAのエネルギー源となりうるのか，また本質的に混合培養であるMPN計数での培養や，MPN計数を含むAOAの集積培養において，共存する従属栄養細菌が先にピルビン酸を使い尽くしてしまい，AOAの代謝に利益をもたらさないのではないか，という懸念がある．つまり，実際にAOMの計数および純粋分離の実験を計画する際，有機物を添加することの利益あるいは必要性を理解できるが，それを具体化することは容易でない．

こうした問題を解決する際に，微生物学での常套手段のひとつは成分の分かった合成培地ではなく複合培

Table 6 MPN scores and estimates of aerobic ammonia-oxidizers in a forest soil obtained from the Shibecha experimental station in Hokkaido University, Hokkaido, with various media

Dilution rate of the sample	Appreciable increases in nitrite + nitrate on		
	CH[1] (22)[3]	CSL[1] (62)	CEX[2] (52)
2×10^2	−−−−−	+++++	+++++
2×10^3	−−−−−	+++++	+++++
2×10^4	−−−−−	−−−−−	−−+−+
MPN (/g soil)[4]	nd[5]	0.98×10^4	0.20×10^5

1) Nitrite and nitrate were determined colorimetrically with a flow-cell analyzer.
2) Nitrite and nitrate were determined with a tracer method, so-called the denitrification method.
3) Days of incubation are shown in brackets.
4) Dry weight.
5) nd, not determined.

地を使用することであり，土壌を対象とした場合の現実的な選択枝のひとつは土壌抽出液の使用であろう．本研究では，すでに，$NO_2^-+NO_3^-$を含む湖沼水を培地として使用してAOMをMPN計数する方法を確立した．MPN計数の対象とする森林土壌から土壌抽出液を既存の方法（日本土壌微生物学会編，1992）で作成し，そこに含まれる$NO_3^-+NO_2^-$が計数を妨害しない程度まで希釈して使用した．

その結果をTable 6に示す．土壌抽出液と345 μM NH_4^+を含む基礎培地であるCEX培地（Table 2）での培養52日目のAOMの計数値は，土壌（乾燥重量）1 gあたり0.20×10^5 MPN，同じく345 μM NH_4^+を含む土壌抽出液を含まない培地（CSL）での計数値は0.98×10^4 MPNであった．これらのMPN値に有意な差はないが，前者では，後者よりも希釈率の高い試料懸濁液を接種した培養管で陽性（＋）の結果が得られており，AOMを純粋分離しようとするとき，より高い希釈段階の使用懸濁液由来の培養を分離源とすることができる．純粋分離の経過については後述する．

AOMの数をそれ以外の細菌の細胞数が上回る場合のAOMの純粋分離

土壌抽出液を基礎培地とし，345 μM NH_4^+を含む培地でのMPN計数用の培養のうち，最も高い希釈率で希釈した試料（北海道大学標茶演習林の土壌）の懸濁液を接種した培養からのAOMの純粋培養を試みる．土壌抽出液には有機物が含まれているため，従属栄養細菌が増殖する可能性がある．実際に，血球計算盤で計数したこの培養の全菌数を測定した結果，8×10^6 cells/mLであった．この培養液を3×10^6倍希釈したとき，希釈菌液の菌密度は1 mL中に8/3個となり，280 μL中には56/75個となる．すなわち，希釈菌液280 μLを多数回繰り返し採取した場合，75回に56回で従属栄養細菌細胞が含まれ，残りの19回では細胞が含まれないことを意味する．したがって，培養管に入った培地にこの希釈菌液を分注した際，培地が従属栄養細菌陰性になる確率は19/75である．

一方，これまでの経験から，6 mMレベルのNH_4^+を含む培地で培養したときのAOMの細胞密度（生菌数）は5×10^6 cells/mL程度であると考えられる．分離源とする培養に用いた培地に含まれるNH_4^+濃度はそれより低い345 μMであり，共存する微生物がNH_4^+を消費するため，AOMが利用できるNH_4^+は345 μMより少ない．こうした条件を考え，AOMの細胞密度（生菌数）は5×10^5 cells/mL程度であると仮定する．AOMの菌数を5×10^5 cells/mLと仮定すると3×10^6倍希釈菌液のAOMの菌密度は280 μLあたり7/150となり，確率的には，稀な事象になる．従ってAOM陽性の培養を得るための統計的予測にはポアソン分布を利用することが適切である．ポアソン分布はある事象がX回起きる確率$P_{(X)}$を

$$P_{(X)}=\frac{\lambda^x\times e^{-\lambda}}{x!} \qquad \cdots\cdots(1)$$

λ=Np（N；試行回数，
p；ある事象が起きる確率） ……(2)

で表す．λはこの場合，多数の培養を行った時，AOM

陽性であった培養管X_N本の代数学的平均値である．例えば，100連で培養を行った場合のX_{100}の平均値は，希釈菌液中のAOMの菌密度が280 μLあたり7/150で，280 μLの希釈菌液を多数回培地の入った培養管に移した場合，培地にAOMが接種できる確率は7/150になる．この値を (2) に代入するとAOM陽性であった培養管の代数学的平均値は100×7/150 = 4.66本となる．ある培養連数におけるλが決定したら (1) にλの値を代入しX = k（kは自然数）のときの確率$P_{(k)}$を求める．すなわち，N = 100のときのλは4.66本なのでX = 4のとき，$P_{(3)}$は，

$$P_{(4)}=\frac{4.66^4\times e^{-4.66}}{4!}=0.186=18.6\%$$

と計算できる．以上の計算をN = 150連，200連，300連，400連についても行うとFig. 2のようになる．これら結果のうち，実際にAOMが接種される試験管の本数のうち3%未満の確率で接種される場合は無視できると仮定する．N = 100，150，200，300，400のポアソン分布を調べたところ，$P_{(X)} \geqq 3\%$になるXの条件の確率の総和が常に90%以上になったため，この仮定は妥当であると考えられる．すなわちN = 100連の場合，X = 0，1の場合は，

$$P_{(0)}=\frac{4.66^0\times e^{-4.66}}{0!}=0.009=0.9\%$$
$$P_{(1)}=\frac{4.66^1\times e^{-4.66}}{1!}=0.044=4.4\%$$

と計算でき，AOMが接種される培養管の本数は，1

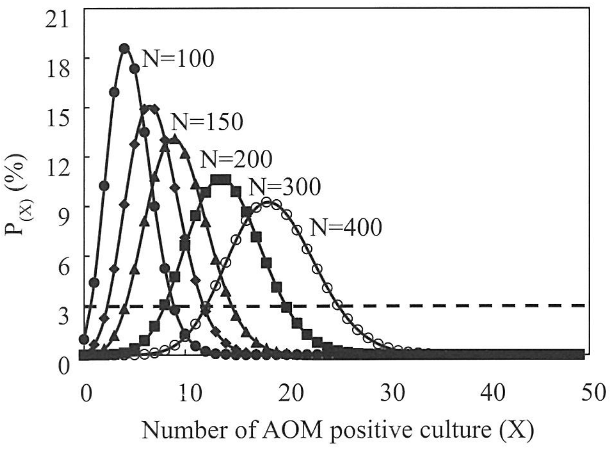


Fig. 2 Poisson distribution of number of AOM positive culture in N replicated culture tubes for isolation of microorganisms using the dilution-extinction principle. The dashed line indicates 3% of $P_{(X)}$.

本は確率的に十分ありえるが，0本は確率が3%未満なので無視できる．同様に，X = 8，9の場合は

$$P_{(8)}=\frac{4.66^8\times e^{-4.66}}{8!}=0.052=5.2\%$$
$$P_{(9)}=\frac{4.66^9\times e^{-4.66}}{9!}=0.016=2.7\%$$

と計算でき，AOMが接種される培養管の本数は，9本は確率的に十分ありえるが，10本は確率が3%未満なので無視できる．AOMの純粋培養，すなわちAOM陽性かつ従属栄養細菌陰性の培養が得られる培養管の本数は，すでに求めた接種した培地が従属栄養細菌陰性である確率と，AOM陽性の培養管の本数の共集合である．例えば，100連で培養する場合，AOMの純粋培養が得られる確率は

$$\frac{19}{75}\times\frac{1\sim8}{100}=\frac{0.3\sim2.0}{100}$$

と計算できる．したがって，100連の場合は0.3から2.0本のAOMの純粋培養が得られると考えられる．以上の計算を同様にN = 150連，200連，300連，400連について行うとTable 7のように計算できる．Table 7に示したAOMの純粋培養が得られる確率から統計的に確実にAOM純粋培養が得られる培養連数の最小値を調べる．まず100連，150連の場合は，AOM純粋培養が得られる本数の最小値が1を下回っているため統計的にAOM純粋培養が1本も得られない可能性が考えられる．200連以上はAOM純粋培養が得られる本数の最小値が1以上であるため，統計的に確実にAOM純粋培養が得られる．従ってAOM純粋培養を得るための培養連数の最小数は200連であると考えられる．

以上の考え方にしたがって，実際に，分離源とする培養をCEX培地および，CSL培地で3×10^6希釈し，96穴プレート2枚分に各192連で280 μLずつ分注した．暗所25℃で47日間培養したのち，192連の各ウェル中の培養について，次の2つの試験を行った．まず，AOMによる$NO_2^-+NO_3^-$の生成があったウェルを特定した．そのために，本研究でMiranda *et al.* (2001) の方法をマイクロプレート中の多くの検体に利用できるように改良し，それを用いた．この方法では，しばしばNO_2^-が過小評価されるが，われわれは，それがNO_3^-をNO_2^-に還元するために添加したバナジウム溶液がNO_2^-を気体状のNOにまで還元し，それが試料溶液から失われるためであることを実証した．この問題は

Table 7 Statistical calculations on probability of occurrence of AOM pure culture, when 100-400 replicated cultures (280 μL) prepared with 3 × 10^6 dilution of sample (bacterial suspension)

Culture property	N* = 100	N = 150	N = 200	N = 300	N = 400
Heterotroph negative (A)	$\frac{19}{75}$	$\frac{19}{75}$	$\frac{19}{75}$	$\frac{19}{75}$	$\frac{19}{75}$
AOM positive (B)	$\frac{1 \sim 8}{100}$	$\frac{3 \sim 11}{150}$	$\frac{5 \sim 14}{200}$	$\frac{8 \sim 19}{300}$	$\frac{13 \sim 25}{400}$
AOM pure (A×B)	$\frac{0.3 \sim 2.0}{100}$	$\frac{0.8 \sim 2.3}{150}$	$\frac{1.3 \sim 3.5}{200}$	$\frac{2.0 \sim 4.8}{300}$	$\frac{3.3 \sim 6.3}{400}$

* N; total number of culture tubes.

バナジウムを添加する前にGriess試薬を添加することで解決することが出来た．この方法はGarcia-Robledo *et al.* (2014) でも行われている．また，従属栄養細菌の共存を調べるため，各ウェル中の培養から100 μLを96穴マイクロプレートのウェルに180 μLずつ分注された7/9 FTG培地に接種し，25℃，暗所で7日間培養した．その結果，限界希釈法によるCEX培地を用いたAOMの純粋分離の試みでは，192培養中7培養でNO_2^- + NO_3^-の生成が検出され，うち1つの培養で従属栄養細菌が検出されなかった．この結果は上記の方法による予想どおりであった．また，従属栄養細菌の増殖が抑制されるCSL培地をAOMの純粋分離に使用した場合，192培養中17培養でNO_2^- + NO_3^-の生成が検出され，うち7つの培養で従属栄養細菌が検出されず，予想通りの結果となった．現在，純粋分離の操作を進めている．

要　　約

地球化学的な窒素循環に関わる機能である脱窒と硝化を担う微生物の計数と純粋分離のために，栄養物を極めて低い濃度で含む培地の使用を前提に，さまざまな実験技法を改良，あるいは最適化した．それらを組み合わせて実際の環境試料を対象に，脱窒菌と好気的アンモニア酸化微生物を計数し，分離に着手した．

当研究室で開発した気体を鋭敏に検出するGC/MS法を，低栄養環境に棲息する脱窒菌が発生するごく微量のN_2およびN_2Oを高感度で検出するために，アッセイ系をデザインし，N_2およびN_2O分析法を最適化した．その結果，環境水を培地とした場合でも脱窒活性を検出し，それに基づくMPN計数ができた．環境水培地と従来の培地でのMPN計数値には差が認められない場合もあったが，アナモクス微生物の集積培養中の脱窒菌を集積培養の排出水で計数した結果，直接検鏡法で計数した全菌数の24.0%にあたるMPN計数値を得た．これは従来法のちょうど100倍の計数値であった．この結果はここで開発した計数法の有用性を示す．現在，優占微生物の分離を進めているが，このアナモクス集積培養は，メタゲノム解析をすすめており，ゲノム情報とも対応させてゆく．

ごく低濃度のNH_4^+を含む培地で好気性アンモニア酸化微生物をMPN計数したところ，培養中に生成したはずのNO_2^-やNO_3^-が消失し，MPN計数できない場合があった．この問題は，培地に予め少量のNO_3^-を添加し，さらに$^{15}NH^+$を用いたトレーサー技法で，アンモニア酸化微生物が生産した$^{15}NO_2^-$を検出することで解決した．MPN計数にこれを適用するため，感度を犠牲にせずにこのトレーサー技法を小型化した．また，この技法は，土壌抽出液を含む培地（予めNO_3^-を含む）でのアンモニア酸化微生物のMPN計数に利用することができ，従来法よりも高い計数値を得る場合があった．こうした培地を利用したアンモニア酸化微生物の計数分離例はなく，現在，新規性が期待される微生物の純粋分離を試みている．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1) 三保谷峻，高橋大貴，勝山千恵，諏訪裕一 2015 安定同位体トレーサーを利用した脱窒菌のMPN計数法の確立と応用．日本土壌微生物学会2015年度大会（つくば）
2) 石川裕士，磯部一夫，浅野智之，福原康平，黒岩恵，諏訪裕一 2015 湖堆積物および森林土壌からのoligotrophicな*Nitrosospira* sp. の純粋分離．日本微生物生態学会第30回大会（土浦）
3) 堺奎介，石川裕士，黒岩恵，磯部一夫，諏訪裕一 2015 非常に低い濃度のNH_4^+（36-150 μM）を含む培地による好気性アンモニア酸化微生物（AOM）のMPN計数．

謝　辞

本研究に対し，研究助成を頂いた公益財団法人発酵研究所に深く感謝いたします．また中央大学大学院理工学研究科生命科学専攻の三保谷峻君，石川裕士君，高橋大貴君，福原康平君の助力に感謝いたします．最後に，本研究に携わっていただいたすべての方々に厚く御礼申し上げます．

文　献

Connon, S. A. & Giovannoni, S. J. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. Appl. Environ. Microbial. **68**: 3878–3885.

Ebeling, J. M.,Timmons, M. B. & Bisogni, J. J. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. Aquaculture. **257**: 346–358.

Garcia-Robledo, E., Corzo, A., & Papaspyrou, S. 2014. A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. Marine Chem. **162**: 30–36.

Hattori, T. 1976. Plate count of bacteria in soil on diluted nutrient broth as a culture medium. Rep. Inst. Agr. Tohoku Univ. **27**: 23–30.

Hashimoto, T., Whang, SK. & Nagaoka, K. 2006. A quantitative evaluation and phylogenetic characterization of oligotrophic denitrifying bacteria harbored in subsurface upland soil using improved culturability. Biol. Fertil. Soils. **42**: 179–185.

Ishida, Y. & Kadota, H. 1979. A new method for enumeration of oligotrophic bacteria in lake water. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. **12**: 77–85.

Ishida, Y. & Kadota, H. 1981. Growth patterns and substrate requirements of naturally occurring obligate oligotrophs. Microb. Ecol. **7**: 123–130.

Isobe, K., Koba, K., Ueda, S., Senoo, K., Harayama, S. & Suwa, Y. 2011a. A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites. J. Microbiol. Methods **84**: 46–51.

Isobe, K., Suwa, Y., Ikutani, J., Kuroiwa, M., Makita, T., Takebayashi, Y., Yoh, M., Otsuka, S., Senno, K., Ohmori, M. & Koba, K. 2011b. Analytical techniques for quantifying $^{15}N/^{14}N$ of nitrate, nitrite, total dissolved nitrogen and ammonium in environmental samples using a gas chromatograph equipped with a quadrupole mass spectrometer. Microbes Environ. **26**: 46–53

Jensen, M. M., Thamdrop, B. & Dalsgaad, T. Effects of specific inhibitors on anammox and denitrification in marine sediments. 2007. Appl. Envion. Microbial. **73**: 3151–3158.

Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide **5**: 62–71.

Stewart, E. J. 2012. Growing unculturable bacteria. J. Bacteriol., **194**: 4151–4160.

Tourna. M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schloter, M., Wagner, M., Richter, A. & Schleper, C. 2011. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A. **108**: 8420–8425.

Yasuda, T., Waki, M., Yoshinaga, I., Amano, T., Suzuki, K., Tanaka, Y., Yamagishi, T. & Suwa, Y. 2011. Evidence of exponential growth of an anammox population in an anaerobic batch culture. Microbes Environ. **26**: 266–299.

Yoshinaga, I., Amano, T., Okuda, K., Ueda, S., Sako, Y. & Suwa, Y. 2012. Distribution and diversity of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria in the sediment of a eutrophic freshwater lake, Lake Kitaura, Japan. Microbes Environ., **26**: 189–197.

玉木秀幸，鎌形洋一 2012 環境ゲノム情報時代の未知微生物探索研究． 化学と生物 **50**: 730–741.

日本土壌微生物研究会編. 1992. 新編土壌微生物実験法. 養賢堂.

IFO Res.Commun. 29
37-50, 2015

コネクター分子 SafA による，大腸菌酸耐性情報伝達ネットワークの制御機構

内　海　龍太郎

近畿大学農学部バイオサイエンス学科
〒631-8505　奈良市中町 3327-204

Regulation of signal transduction network conferring acid resistance to *Escherichia coli*, mediated by connector SafA

Ryutaro Utsumi

Department of Bioscience, Graduate School of Agriculture, Kinki University
3327-204 Nakamachi, Nara, 631-8505

Two-component signal transduction systems (TCSs) in bacteria perceive environmental stress and transmit the information via phosphorelay to adjust multiple cellular functions for adaptation. In *Escherichia coli*, activation of the EvgS sensor of the EvgS/EvgA TCS induces the expression of a large group of acid resistance genes and confers acid resistance to the cells. Activation of the EvgS/EvgA system also induces the expression of SafA, which is a connector between the EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP systems, and activates the sensor PhoQ by direct SafA-binding. PhoQ/PhoP activation triggers a network of transcriptional regulation of acid resistance genes, thus enhancing the acid resistance of *E. coli*. We searched for signals activating EvgS and found that a high concentration of alkali metals (Na^+, K^+, Li^+) in addition to acidic pH was essential for the activation. The periplasmic region of EvgS was necessary for EvgS activation, and Leu152, locating in the periplasmic region, was involved in the activation. Furthermore, chimeras of EvgS and PhoQ histidine kinases suggested that alkali metals were perceived at the periplasmic sensor region, whereas the cytoplasmic linker domain, connecting the transmembrane region and the histidine kinase domain, was required for acid pH perception.
The activation mechanism of the sensor PhoQ by the connector SafA was also investigated. Analyses of the crystal structures of the PhoQ periplasmic domain revealed a pocket (SD pocket) adjacent to the dimer interface. Alanine scanning of the PhoQ periplasmic domain resulted in some mutants with repressed activation by SafA. Many of these mutants mapped to the vicinity of the SD pocket, which strongly supported our assumption that SafA bound to the SD pocket. Since the SD pocket located near the dimer interface of the PhoQ periplasmic domain, we performed *in vivo* site-directed photo-cross-linking analyses within the $\alpha 1$ helix at the dimer interface. As a result, SafA caused a difference in the cross-linking efficiencies of Leu58, Leu52 and Lys46-Phe49, indicating a conformational change at the dimer interface. This change is considered to be transduced via the transmembrane region to the cytoplasmic region for increasing the autophosphorylation activity of PhoQ.

Key words: histidine kinase, EvgS, PhoQ, SafA, connector

緒　　言

地球上の至るところに生息する細菌は，高等生物と比較すると環境適応力がかなり高い．環境適応とは，環境変化をシグナルとして認識し，その情報を細胞内に伝達し，環境変化に適切に対応するために必要な遺伝子群の発現をコントロールすることである．酸化還元状態，温度，pH，塩濃度，浸透圧，金属イオンなどの外界のさまざまな変化をシグナルとして認識するために，細菌には二成分制御系（two-component signal transduction system; TCS）という環境適応機構が広く保存されており，複数のシグマ因子や転写因子などと

E-mail: utsumi@nara.kindai.ac.jp
共同研究者：城　宣嗣（理化学研究所播磨研究所），吉川博文（東京農業大学応用生物科学部），川岸郁郎（法政大学生命科学部），江口陽子（近畿大学大学院農学研究科，現所属：近畿大学生物理工学部）

ともに環境適応に関わる遺伝子群の発現制御を行っている．

通常，TCSはセンサーとして働くヒスチジンキナーゼ（histidine kinase; HK）と転写因子として働くレスポンスレギュレーター（response regulator; RR）の二成分から構成される．モデル生物である大腸菌には29種類のHKと32種類のRRが報告されている（Mizuno, 1997）が，個々のTCSがそれぞれのシグナルに個別に応答する以外に，複数のTCSがクロストークやカスケードを形成することでTCS間の情報伝達が行われて情報伝達ネットワークが形成されるものと予想されている．カスケード型の情報伝達は異なるTCSが縦につながる場合であり，あるTCSが別のTCSの発現を誘導する場合と，コネクターを介して別のTCSの活性を調節する場合がある．コネクターはHKを修飾するものもRRを修飾するものも見つかっている（Eguchi *et al.*, 2012a）．

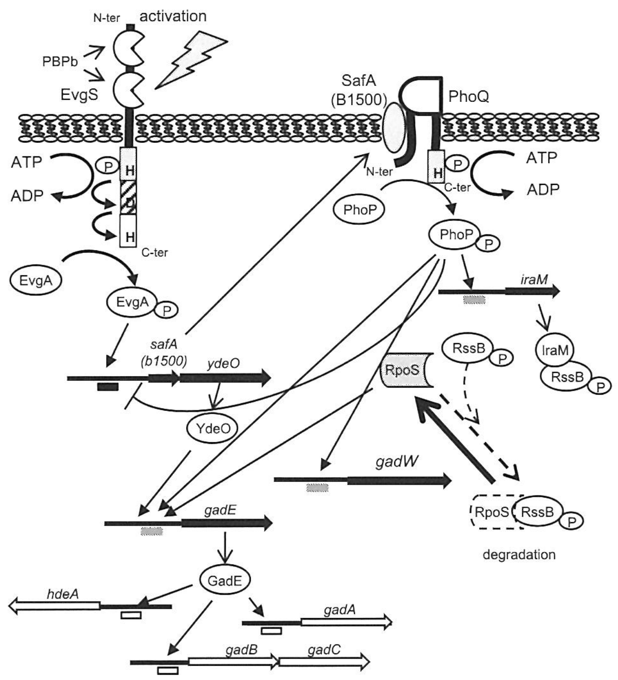


Fig. 1　Model of regulation network of acid resistance (AR) genes initiated by EvgS/EvgA system. EvgS/EvgA induces the EvgA-YdeO-GadE cascade of AR gene regulation, and a branched pathway via SafA activates the PhoQ/PhoP system, leading to an enhanced level of cellular RpoS via IraM. RpoS induces *gadE*, the central regulator of AR genes, enforcing the acid-resistant phenotype. The black bar in the *safA* promoter is the inverted repeat for EvgA binding, grey bars in the *iraM*, *gadE*, and *gadW* promoters are PhoP boxes, and white bars in the *gadA*, *hdeA*, and *gadB* promoters are GadE boxes. N-ter, N-terminal end; C-ter, C-terminal end.

我々は，大腸菌が酸性環境に適応するために必要な酸耐性能を誘導するTCSであるEvgS/EvgA系が，コネクターSafAを介してMg^{2+}イオン応答性TCSであるPhoQ/PhoP系を活性化していることを見出した（Eguchi *et al.*, 2007）．このカスケード型情報伝達が起きることで，3種類のTCS，複数の転写因子，RpoSなどから構成される複雑な転写制御系（Fig. 1）が働き，大腸菌の酸耐性能がより強化されることを示した（Eguchi *et al.*, 2011）．本系は，センサーEvgSの活性化とSafAによるセンサーPhoQの活性化が重要な駆動力になるが，膜タンパク質であるヒスチジンキナーゼセンサーの活性化メカニズムは不明の部分が多く残されている．EvgSに至っては，活性化シグナルも曖昧であった．そこで，本助成研究では，まず，EvgSの活性化に必要なシグナルとその活性化メカニズムを検討し，次にコネクターSafAによるPhoQの活性化メカニズムを検討した．さらに，EvgSの細胞内局在とPhoQ以外のSafAの標的についても検討したので，これらの結果について報告する．

実験方法

培養条件

本研究で使用した菌は好気的に培養し，LB培地（1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl, pH 7.5）あるいはM9培地（pHは5.5あるいは7.5に調整し，0.2% glucose, 0.0001% vitamin B1, 0.004% casamino acidsを添加; Miller, 1992）を使用した．必要に応じて抗生物質（100 μg/mL ampicillin, 25 μg/mL kanamycin, 25 μg/mL chloramphenicol）を添加した．アラビノースプロモーターを持つプラスミドを形質転換した株には，0.002%あるいは0.2%アラビノースを添加して誘導をかけた．

EvgS変異株およびキメラセンサーの作成

EvgS L152の他のアミノ酸残基への変異，PhoQ-SD（PhoQのペリプラズム領域）のアミノ酸残基のアラニンへの変異，PhoQ-SD α1ヘリックス内のアミノ酸残基のamberコドンへの変異等は部位特異的変異法を用いた．変異を挿入したプライマーとPrime STAR HS DNA polymerase（TaKaRa），鋳型として変異を挿入したいプラスミドを用いてPCRで増幅し，DpnI（NEB）処理後，DH5α株に形質転換して変異をかけた．pBADevgSΔSDはPCR法で，EvgS-PhoQキメラはPCR増幅産物をblunt ligationして作成した（Eguchi & Utsumi, 2014）．得られたプラスミドの変異はシーケンスによって確認した．

β-ガラクトシダーゼ活性の測定

適当な抗生物質を添加したLB培地を用いて菌を37℃で一晩前培養した．この前培養液を，誘導に必要なアラビノースと適当な抗生物質を添加した培地に1/100量接種し，対数増殖期中期まで振とう培養した．その後，β-galactosidase活性を測定し，活性をMiller unitsとして算出した（Miller, 1972）．データは，3回以上の独立した培養系の活性値の平均値と標準誤差で示した．有意差検定は，unpaired t-tests（Prism®, GraphPad）で行った．

結晶化用タンパク質の調製

結晶化用タンパク質の調製には，pETphoQ (43-190)-TEVおよびpETphoQ (43-190) D179R-TEVを形質転換したKRX株（Promega）を，カナマイシンを添加したTerrific broth（1.2% tryptone, 2.4% yeast extract, 0.72% glycerol, 17 mM KH_2PO_4, 72 mM K_2HPO_4）を用いて37℃で振とう培養した．対数増殖期中期でラムノースを終濃度0.1%になるよう添加し，25℃でさらに18時間振とう培養して誘導をかけた．その後集菌し，Lysis buffer（50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0）で洗浄した．洗浄した菌はLysis bufferに懸濁し，超音波破砕後，2300×gで遠心した．得られた上清をNi(II)-NTA agarose（Qiagen）でアフィニティー精製し，TEV proteaseを用いてHis-tagを切断した．得られた精製サンプルをさらにゲルろ過（Superdex75 column, GE Healthcare）によって精製した．

結晶化と構造解析

精製したタンパク質の結晶化は，MRC 2-wellプレートを用いて，PhoQ (43-190)は，0.1 M CHES pH 9.2, 26% PEG3350, 0.2 M Ammonium tartrate，PhoQ (43-190) D179Rは，0.1 M CHES pH 9.2, 32% PEG3350, 0.2 M Ammonium tartrateの条件にてシッティングドロップ蒸気拡散法で調製した．得られた結晶のX線回折データをSpring-8 BL41XUで収集した．結晶は液体窒素で凍結し，100 Kの窒素気流下でX線回折実験を行った．回折イメージはプログラムHKL2000で積分およびスケーリングの処理を行い，プログラムMolrepによる分子置換法で構造因子の位相決定をおこなった．構造モデル精密化はRefmac5で行った．

In vivo 部位特異的光架橋法

In vivo 光架橋法はChin *et al.* (2002)の方法で行った．宿主の中でamberコドンの位置に*p*-ベンゾイルフェニルアラニン（pBPA）が取り込まれるようにするプラスミド（pEVOL-pBPF）およびPhoQ-SDにamber変異が入ったプラスミド（pBAD-phoQ, pBAD-phoQ-safA由来）の両者をCU141 *phoQ*株に同時に形質転換した．得られた形質転換体を1 mM pBPAを添加したLB培地を用いて37℃で振とう培養した．対数増殖期中期でアラビノースを添加し（pBAD-phoQ由来プラスミドの形質転換株，0.002%; pBAD-phoQ-safA由来プラスミドの形質転換株, 0.08%），37℃で2時間振とう培養して誘導後，培養液500 μLをシャーレに移し，B-100AP UV lamp（Ultraviolet Products）を用いて4 cmの距離から10分間UV照射（365nm）した．照射後の培養液を回収し，等量の10% TCAを加えて攪拌後，氷上に20分間静置してタンパク質サンプルを沈殿させた．遠心（20,400×g, 15 min, 4℃）により集めたタンパク質サンプルをアセトン500 μLで洗浄後，SDS-PAGE用のサンプルバッファー100 μLで懸濁し，37℃で30分間保温してタンパク質を可溶化した．調製したサンプルは，抗PhoQ抗血清を用いてウェスタンブロッティングにより解析した．

ウェスタンブロッティング解析

タンパク質サンプルはSDS-PAGEで分離後，PVDF膜（polyvinylidene difluoride membrane, Immobilon P, Millipore）に転写し，抗EvgSあるいは抗PhoQ抗血清を用いて検出した．二次抗体にはECL Peroxidase-labelled anti-rabbit antibody（GE Healthcare），発色液にはLuminata™ Forte Western HRP substrate（Millipore）を使用した．シグナルはImageQuant 400 Imagerで検出し，ImageQuant TL software（GE Healthcare）で測定した．

大腸菌RNAseq解析

コントロールとしてMG1655/pBAD18株を，SafA過剰発現株としてMG1655/pBADsafA株を，*phoQ*欠損株に関してもコントロールとしてMG1655 *phoQ*/pBAD18株を，SafA過剰発現株としてMG1655 *phoQ*/pBADsafA株を使用した．菌は0.002%アラビノースを添加したLB培地で対数増殖期中期まで培養し，集菌後RNAを調製し，東京農業大学生物資源ゲノム解析センターにおいてRNAseq解析を行った．シーケンスにはIlluminaシーケンサーHiseq 2000を使用し，解析ソフトウェアCLC Genomics Workbenchを用いてRNA-seq解析を行った．

結果および考察

EvgS活性化シグナル

センサーEvgSはハイブリッド型のヒスチジンキナ

ーゼであり，ヒスチジンキナーゼ（HisKA, HATPase_c），レシーバー，Hpt トランスミッターの 3 種のドメインから構成される．EvgS が活性化すると，ヒスチジンキナーゼドメイン内の保存されたヒスチジンがリン酸化され，このリン酸基がレシーバードメインのアスパラギン酸へ，そして Hpt ドメインのヒスチジンへと分子内転移する．続いて Hpt ドメインからレスポンスレギュレーター EvgA のアスパラギン酸へとリン酸基が転移して EvgS/EvgA 系が活性化する（Perraud *et al.*, 1998; Fig. 1）．EvgS のペリプラズム側には PBPb（bacterial periplasmic solute-binding protein）ドメインが 2 個つながっており，この大きなペリプラズム領域が EvgS の一つの特徴となっている．また，N-末端にシグナルペプチドが推定されるため，N-末端がペリプラズム領域に突き出た一回膜貫通型の膜タンパク質であることが予想される（Fig. 1）．

大腸菌を弱酸性（pH 5.5）の最少培地で培養すると EvgS/EvgA 系が活性化することが報告されている（Burton *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2004）．そこで，この条件でセンサー EvgS が実際に活性化されるかを検討した．活性化の測定には，EvgA によって発現が直接制御される *ydeP* の直後に *lacZ* を染色体上で挿入したレポーター株（MG1655 *ydeP-lacZ*）を使用した．この菌を pH 5.5 に調整した minimal A 培地（0.2% glucose, 0.0005% vitamin B1, 0.004% casamino acids を添加; Miller, 1992）で培養すると EvgS/EvgA 系が活性化したのに対し，同じく pH 5.5 に調整した M9 培地では活性化しなかった（Eguchi & Utsumi, 2014）．この二つの最少培地の組成を比較すると，M9 培地の方が [Na^+] が高く，[K^+] が低かった．そこで，[K^+] の影響を検討するために M9 培地に KCl を添加して EvgS/EvgA 系の活性を測定した．Fig. 2 に示したように，M9 pH 5.5 に KCl を50あるいは 100 mM の濃度で添加すると活性化が認められたが，M9 pH 7.5 に KCl を添加しても活性化は認められなかった．我々の予想に反して，M9 pH 5.5 に NaCl あるいは LiCl を添加しても KCl と同様に活性化が認められたが，同じ塩化物である $MgCl_2$ の添加では活性化が認められなかった．以上の結果より，EvgS の活性化には酸性 pH 以外に Na^+ や K^+ などのアルカリ金属イオンが高濃度（final conc. 150 mM 以上，M9 に含まれる濃度と添加分の濃度の和）存在することが必要であることを見出した．この活性化は浸透圧とは関係が無く，また，センサー EvgS に依存した活性化であることも確認している（Eguchi & Utsumi, 2014）．EvgS の活性化に必要な pH の範囲は pH 5.0 から 6.0 であった．

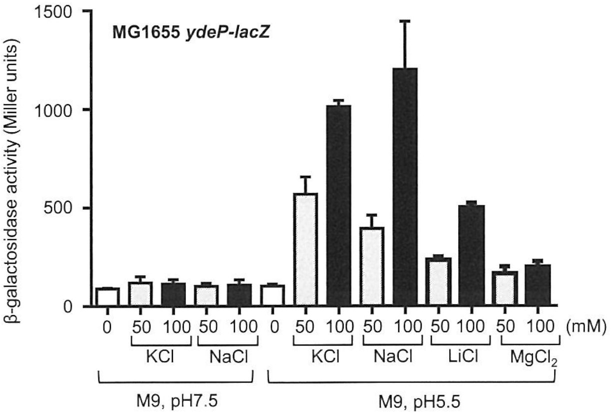


Fig. 2 Alkali metals and acidic pH are required for EvgS/EvgA activation. Transcriptional activities of *ydeP* in strain MG1655 *ydeP-lacZ* were measured to examine EvgS/EvgA activity. β-Galactosidase activity was measured in cultures grown to mid-exponential phase. Addition of KCl, NaCl, and LiCl to M9 medium (pH 5.5) at a final concentration of 50 and 100 mM induced transcriptional activity of *ydeP*, but $MgCl_2$ did not induce transcription. Columns represent the mean of three independent experiments ± standard errors.

EvgS のペリプラズム領域は活性化に関わる

当研究室において EvgS/EvgA 系のレポーター株として以前に作成した KMY1 株は MC4100 株由来であり，EvgA が直接制御する *emrK* のプロモーターの下流に *lacZ* が挿入されている（Kato *et al.*, 2000）．そこで，KMY1 株を KCl を添加したM9培地（pH 5.5）で培養したところ，EvgS/EvgA 系の活性化は認められなかった．ところが，同じ *emrK* の発現を測定するレポーター株を MG1655 株由来で作成すると（MG1655 *emrKY-lacZ*），KCl を添加した M9 培地（pH 5.5）で活性化が認められた．そこで，KMY1 株と MG1655 *emrKY-lacZ* 株の *evgS* の塩基配列を調べたところ，MG1655 *emrKY-lacZ* 株の Leu152 をコードする “CTT” が KMY1 株では “TTT” に変異しており Phe152 に変化していることを見出した．このアミノ酸残基は EvgS ペリプラズム領域の最初の PBPb ドメインに位置する．この変異によって EvgS がシグナルに応答しなくなったのかを確認するために，MG1655 型 EvgS を発現するプラスミド（pBADevgS）と KMY1 型 EvgS を発現するプラスミド（pBADevgS L152F）を作成し，MG1655 *evgS ydeP-lacZ* 株に形質転換して KCl を添加した M9 培地（pH 5.5）で活性を測定した．Fig. 3A に示したように，EvgS の活性化は pBAD evgS で相補したときにだけ認められ，L152F の変異によって KMY1 株の EvgS がシグナルに応答しなくなったことを明ら

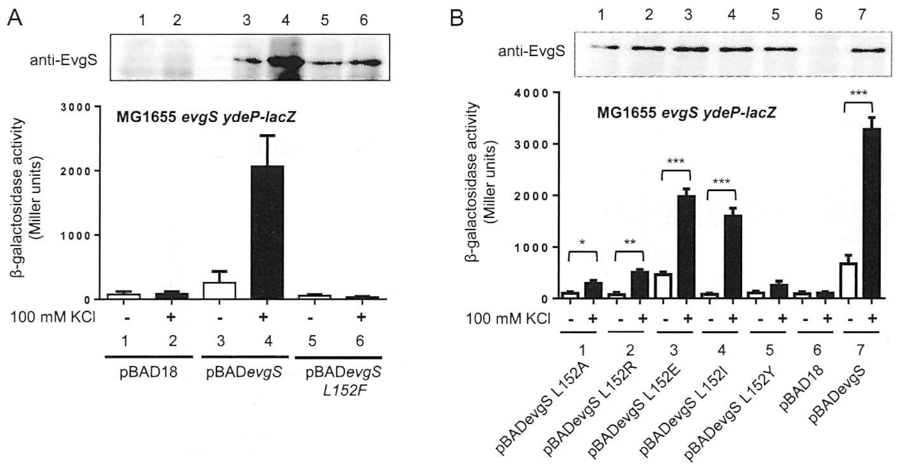


Fig. 3 L152 in the periplasmic region is involved in EvgS activation. (A) Transcriptional activity of *ydeP* in strain MG1655 *evgS ydeP-lacZ* transformed with plasmids pBAD18, pBADevgS, and pBADevgS L152F was grown in M9 medium (pH 5.5) with and without the addition of KCl at a final concentration of 100 mM and 0.002% arabinose for induction. The inset shows a western blot using anti-EvgS antiserum against the cells used for the β-galactosidase assay. Numbers indicated above the lanes correspond to those shown below the columns. (B) Activity of EvgS L152-substituted mutants. The transcriptional activity of *ydeP* in strain MG1655 *evgS ydeP-lacZ* transformed with plasmids pBADevgS L152A, pBADevgS L152R, pBADevgS L152E, pBADevgS L152I, pBADevgS L152Y, pBAD18, and pBADevgS was measured as in (A). The inset shows western blots as in (A). Expression levels of EvgS and its mutants were examined only in cells grown in the presence of 100 mM KCl. Columns represent the mean of at least three independent experiments ± standard errors. Statistical significance is indicated by asterisks: *P<0.05, **P<0.005, *** P<0.0005.

かにした．さらに，pBADevgS の L152 を Ala, Arg, Glu, Ile, Tyr に置き換えて MG1655 *evgS ydeP-lacZ* 株に形質転換して測定したところ，L152E および L152I では比較的強い活性化が，L152A および L152R では中程度の活性化が認められた．しかし，L152F および L152Y では活性化が認められなかった（Fig. 3B）．この結果より，L152 に Phe や Tyr のような側鎖に芳香環を持つアミノ酸残基が入ると，シグナルによる EvgS の構造変化が立体障害により阻害されるのかもしれないと考えた．EvgS L152 は EvgS を持つ大腸菌や赤痢菌に高く保存されている．データベースを調べたところ，L152F の変異は大腸菌の MC4100 と DH1 の 2 株にしか存在しなかった．

L152 が位置する EvgS のペリプラズム領域がシグナルの認識に必要であるかを検討するために，ペリプラズム領域（EvgS $_{30\text{-}530}$）を欠失させた EvgS を発現するプラスミド（pBADevgSΔSD）を MG1655 *evgS ydeP-lacZ* 株に形質転換して測定した．Fig. 4B に示したように，pBADevgSΔSD では活性化が全く認められず，EvgS の活性化にはペリプラズム領域が必須であることが見出された（Eguchi & Utsumi, 2014）．同様の結果を Johnson *et al.*,（2014）も報告している．

酸性 pH の認識にはリンカー領域も関わる

次に，ペリプラズム領域のみで EvgS がシグナルを認識できるかどうかを検討するために，EvgS のペリプラズム領域を異なるヒスチジンキナーゼセンサーである PhoQ の細胞質領域に融合させたキメラセンサーを用いた．Fig. 4A に示したように，EvgS 1-558 を PhoQ 215-486 に融合させた PvgS-A と，EvgS 1-710 を PhoQ 267-486 に融合させた PvgS-B の二種類のキメラセンサーを作成した．両キメラの違いは，PvgS-B は EvgS のリンカー領域（PAS domain と推定されている）を有するのに対し，PvgS-A はリンカー領域の代わりに PhoQ の HAMP domain を有する点である．これらのキメラセンサーの活性は，ヒスチジンキナーゼ領域（HisKA, HATPase_c）が PhoQ 由来であることから PhoQ/PhoP 系のレポーター株（MC4100 *phoQ PmgtA-lacZ*）で発現させて測定した．本レポーター株は MC4100 由来であり，EvgS はシグナルに応答しない

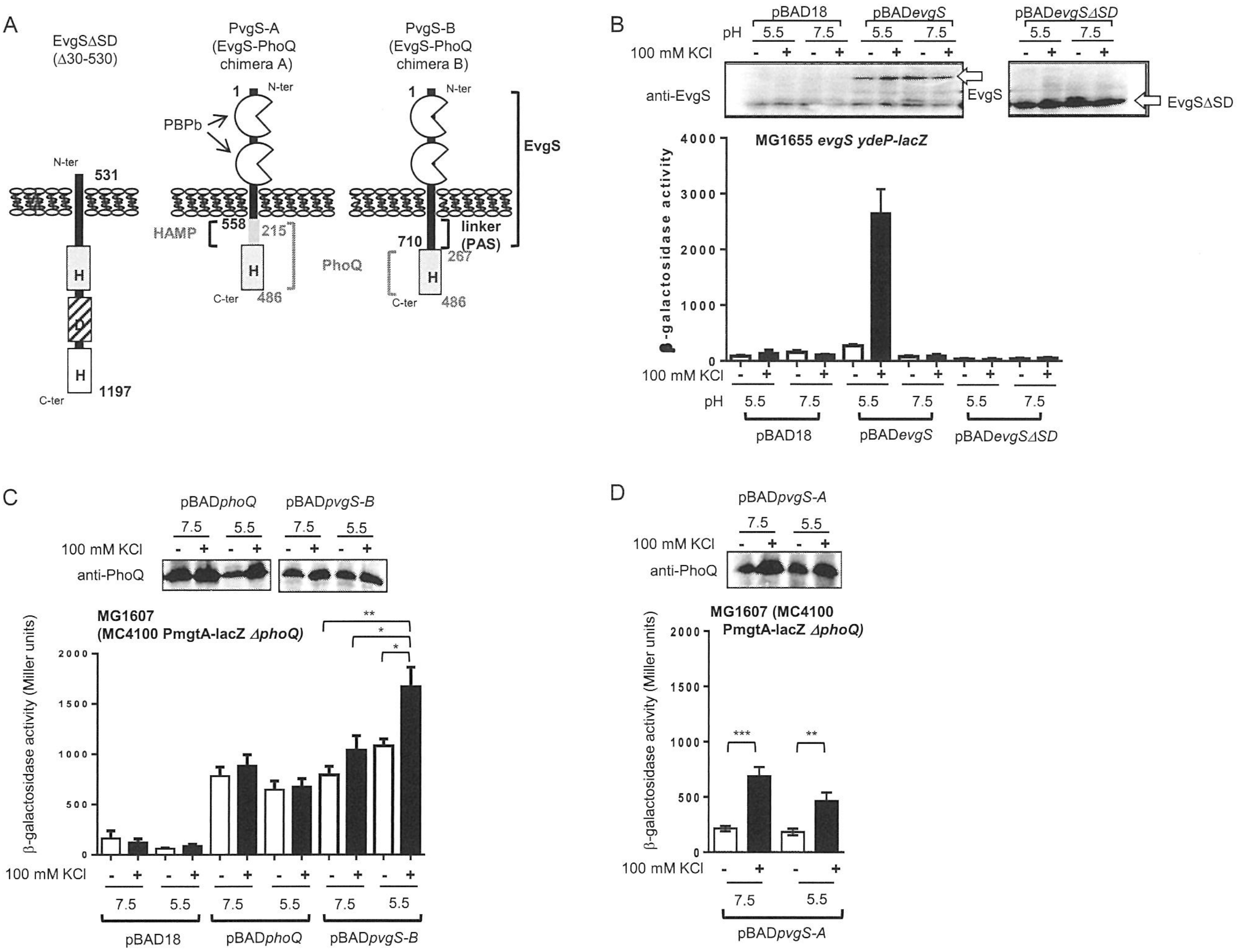


Fig. 4 The periplasmic and the linker region of EvgS is necessary for activation by acidic pH. (A) Diagram of EvgSΔSD, PvgS-A, and PvgS-B. Residues 30-530 were deleted in EvgSΔSD, residues 1-558 of EvgS were fused to residues 215-486 of PhoQ in chimera PvgS-A, and residues 1-710 of EvgS were fused to residues 267-486 of PhoQ in the chimera PvgS-B. (B) Transcriptional activities of *ydeP* in strain MG1655 *evgS ydeP-lacZ* transformed with plasmids pBAD18, pBADevgS, and pBADevgSΔSD were measured in M9 medium (pH 5.5 and 7.5) with and without the addition of KCl at a final concentration of 100 mM and 0.002% arabinose for induction. The insets show western blots using anti-EvgS antiserum against the cells used for the β-galactosidase assay. White arrows indicate the EvgS and EvgSΔSD bands. (C, D) Transcriptional activities of *mgtA* in strain MG1607 transformed with plasmids pBAD18, pBADphoQ, pBADpvgS-B, and pBADpvgS-A were measured as in (A). Cells in (C) were induced with 0.002% arabinose, and those in (D) were induced with 0.2% arabinose. The insets show western blots using anti-PhoQ antiserum against the cells used for the β-galactosidase assay. Columns represent the cells used for the β-galactosidase assay. Columns represent the mean of at least three independent experiments ± standard errors. Statistical significance is indicated by asterisks: *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$.

L152F 型である．

Fig. 4C に示したように，野生型の PhoQ を発現させた株では酸性 pH やアルカリ金属イオンに応答しなかったが，EvgS のリンカー領域までを含む PvgS-B キメラでは酸性 pH と KCl の添加によって活性が認められた．この結果は，シグナルによって EvgS のペリプラズム領域およびリンカー領域に生じた構造変化が PhoQ HisKA と HATPase_c を活性化しうることを示しており，ヒスチジンキナーゼセンサーに共通する活性化メカニズムを示唆するものである．一方，PvgS-A キメラは酸性 pH による活性化が認められなかった (Fig. 4D)．しかしながら，pH 5.5 も pH 7.5 においても KCl の添加によって活性化が認められたことより，K^+ は EvgS のペリプラズム領域（あるいは膜貫通領域）で認識されることが示唆された．酸性 pH の認識には，ペリプラズム領域，膜貫通領域に加えて細胞質内のリ

ンカー領域が必要であった（Eguchi & Utsumi, 2014）.

環境中の pH 変化は，細菌が頻繁に遭遇する変化であり，また，生死に関わる重大な変化である．pH の変化を感知するシステムの報告は多く，大腸菌においても弱酸を認識する CadC や PhoQ センサーが知られている．CadC は細胞膜に局在する転写因子であり，センサー，情報伝達，DNA 結合能をあわせ持つ複合型のセンサーである．CadC が活性化すると，リジンを用いた酸耐性機構（AR system 4）が働いて大腸菌が酸耐性化する（Meng & Bennett, 1992; Watson *et al.*, 1992）．CadC はリジンの存在下で pH 6.6 以下の弱酸性条件で活性化し，pH は CadC のペリプラズム領域で認識される（Tetsch *et al.*, 2011）．一方，PhoQ センサーは 2 価の陽イオンによって活性が抑制され，抗菌性ペプチドおよび酸性 pH によって活性化されるが，これらのシグナルも PhoQ のペリプラズム領域で認識される（Prost *et al.*, 2007）.

ところが，本研究では EvgS が酸性 pH を認識するために細胞質内領域のリンカー領域が必要であることが示唆された．本研究では M9 培地の pH を下げるのに塩酸を使用した．強酸を用いて弱酸性にした培地では，大腸菌のホメオスタシスが働き細胞内 pH は中性付近に保たれることが報告されている（Wilks & Slonczewski, 2007）．塩酸で pH 6 に調整した M9 培地で MG1655 *ydeP-lacZ* 株を培養すると，細胞内 pH は約 7 であった．一方，弱酸である酢酸を用いて pH 6 に調整した M9 培地で培養した MG1655 *ydeP-lacZ* 株の細胞内 pH は約 6 であった．このとき，培地の pH が 6 にも関わらず，KCl を添加しても EvgS は活性化しなかった（Eguchi, data not shown）．膜を透過する弱酸は，細胞内で解離することで細胞内と細胞外の pH を平衡化し，細胞内の pH ホメオスタシスを損なうことが一般に知られている．食品の保存料として安息香酸やソルビン酸が使用されるのはこの現象のためである．弱酸は細胞の緩衝能やイオン輸送に作用していると考えられているが，その詳細は解明されていない．EvgS の活性化に関する塩酸と酢酸の系の違いは，大腸菌の内膜をはさんだ pH 勾配の有無であり，EvgS の酸性 pH の認識にリンカー領域が必要であることを併せて考えると，EvgS の酸性 pH の認識には膜をはさんだ pH 勾配が関与することが示唆された．このような酸性 pH 認識機構は新しく，詳細なメカニズムの検討を続けている.

EvgS の局在

EvgS の細胞内局在を検討するために，MG1655 *evgS ydeP-lacZ* / pTrcHisB-*evgS-egfp* および MG1655 *evgS ydeP-lacZ* /pTrcHisB-*evgS1-egfp* を M9 pH 5.5 培地で培養し，KCl の添加の有無における細胞上での EvgS-EGFP 局在を蛍光顕微鏡で観察した．pTrcHisB-evgS-egfp と pTrcHisB-evgS1-egfp は，それぞれ野生型 EvgS と活性型 EvgS1 を発現するプラスミドである．Fig. 5 に示すように，どのサンプルにおいても EvgS のクラスタリングが認められた．EvgS と TorS のクラスタリングに関しては，Sommer *et al.*,（2013）も報告している．EvgS の活性化とクラスタリングに直接の関連はなさそうであるが，KCl の添加の有無とクラスタリングの度合いに相関が認められるため，さらに検討が必要である.

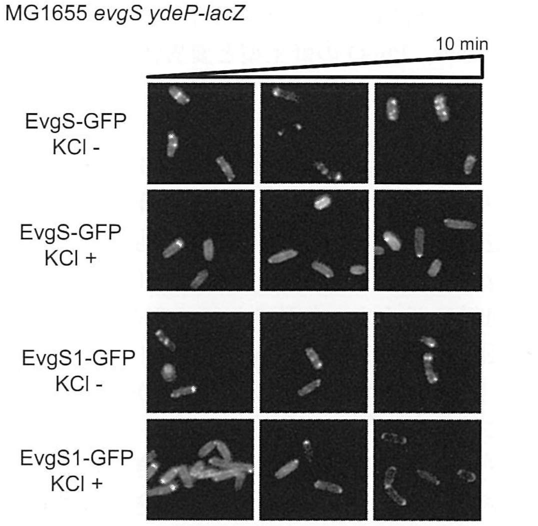


Fig. 5 Clustering of EvgS. Strains MG1655 *evgS ydeP-lacZ* / pTrcHisB-evgS-egfp and MG1655 *evgS ydeP-lacZ* / pTrcHisB-evgS1-egfp were grown in M9 (pH 5.5) with and without the addition of 100 mM KCl, and observed with a fluorescent microscope. EvgS1 is a constitutively active mutant of EvgS.

PhoQ のペリプラズム領域における SafA 作用領域の解析

EvgS/EvgA 系が活性化するとコネクター SafA の発現が誘導され，PhoQ/PhoP 系のセンサー PhoQ のペリプラズム領域（センサードメイン，PhoQ-SD）にその C 末端側が直接結合することで，PhoQ の自己リン酸化を活性化する（Eguchi *et al.*, 2012b; Ishii *et al.*, 2013）．PhoQ-SD の Asp179 を Arg に置換した変異体 D179R では，SafA による活性化が失われ，SafA の結合も著しく低下することを，我々はすでに SPR 解析や NMR 解析で明らかにしている（Eguchi *et al.*, 2012b）．SafA の結合において Asp179 は非常に重要な残基である.

そこで，変異体 PhoQ D179R のどのような構造変化

によって SafA との結合が阻害されているのかを解析するため，PhoQ の野生型と変異体 D179R のセンサードメイン（SD, 41-190aa）を精製し，X 線結晶構造解析を行った．PhoQ-SD の立体構造として，ダイマーを形成している構造（PDB, 3BQ8）がすでに報告されているが（Cheung *et al.*, 2008），本研究より得られた結晶構造では野生型も変異体もどちらもモノマーであった（Fig. 6）．大腸菌内膜上での PhoQ は，他の多くの HK と同様にダイマーを形成していると考えられている．全長の PhoQ のセンサードメイン（ペリプラズム領域）は，その両端が膜貫通領域につながっていることから膜に対する向きが固定されている．ところが，センサードメインのみだとモノマーの向きが固定されず，より安定した形でモノマー同志が引き合って結晶を形成する可能性がある．この点を，本研究においてモノマーの構造しか得られなかった理由の一つとして考えている．Cheung 等（2008）の野生型 PhoQ-SD はダイマーの結晶構造であるが，同じ論文に発表された変異型 PhoQ-SD（酸性クラスター変異）は本研究と同様にモノマーの構造であった．Cheung 等の野生型 PhoQ-SD の立体構造と我々の野生型 PhoQ-SD の立体構造は，次に述べる点以外は，ほぼ重なった．

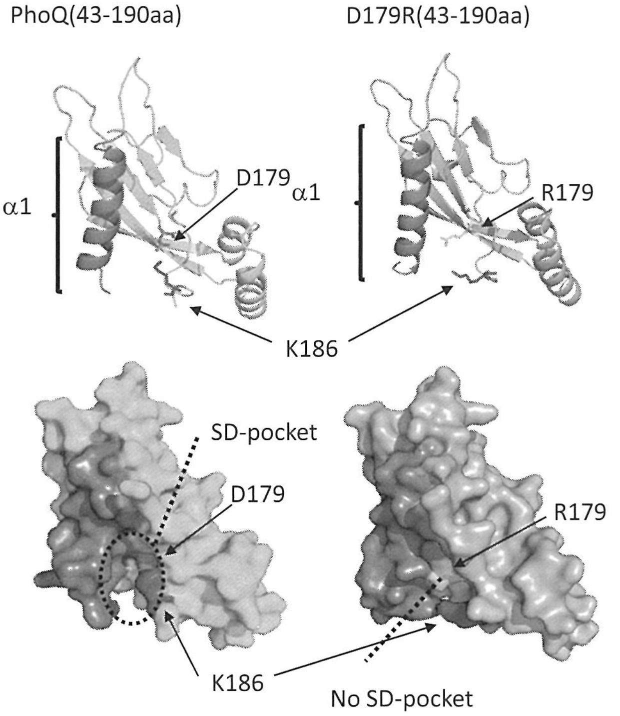


Fig. 6　Structures of the wild-type and D179R mutant of the PhoQ sensory domain (PhoQ-SD). Crystal structures are shown as cartoon (upper figures) and surface (lower figures) models.

本研究で得た野生型 PhoQ-SD の立体構造は，Asp179, Lys186 の側鎖間の距離が 2.7Å で塩橋が形成されており，表面立体構造において，ダイマー境界面の α1 ヘリックスと Asp179, Lys186 周辺領域の間に，α1 ヘリックスに沿うようにポケット（SD ポケット）が存在した.一方，変異体 PhoQ-SD D179R の構造では，Arg179 と Lys186 の側鎖間の距離が離れ，両側鎖が α1 ヘリックスに近づくことからポケットが消失していた（Fig. 6）．二つの PhoQ-SD 立体構造を重ね合わせて比較したところ，Asp179-Lys186 間に形成される塩橋の形成に伴う SD ポケットの有無以外に顕著な構造変化はなかった．さらに，SD ポケットは PhoQ-SD の N-末端と C-末端付近に位置し，ポケットの開口部を内膜に向けている．SafA は内膜に局在する 1 回膜貫通型タンパク質であり，ペリプラズム側に25アミノ酸残基の α ヘリックスを突き出した構造が予想される（ROBETTA Beta, Full-chain Protein Structure Prediction Server, www.robetta.bakerlab.org）ので，PhoQ-SD の SD ポケットへの結合が可能であると考えられる．以上の結果より SD ポケットが SafA 結合領域であることが示唆された．

Cheung 等のダイマー構造では，Asp179 とダイマーの相手側の R50' 間に塩橋が形成されるため，SD ポケットの入り口が塞がれた状態である．本研究ではモノマー構造を解析したことが幸いして SD ポケットの発見につながったものと考える．PhoQ が内膜上にモノマーの状態で存在することがあるのかどうかは不明であるが，他の HK において，野生型と変異型とのヘテロダイマーを用いたリン酸化実験から HK はダイマーを形成する相手を頻繁に交換しているということが示唆されている（Eguchi, data not shown）．そこで，PhoQ-SD がモノマーの状態で存在する瞬間はあるものと考える．

PhoQ-SD の SD ポケットが SafA の結合に関与しているか否かをさらに検討するため，PhoQ-SD の43個のアミノ酸残基に対してアラニン置換を行い，ポケット周辺の変異体において SafA による活性化が低下するかを測定した．PhoQ あるいは PhoQ と SafA を発現するプラスミド（pBADphoQ, pBADphoQ-safA）の *phoQ* にそれぞれ部位特異的変異法を用いてアラニン置換を行い，PhoQ/PhoP 制御下遺伝子である *mgtA* のプロモーターの下流に *lacZ* を融合させたレポーター株である MG1655 *phoQ safA* PmgtA-lacZ に形質転換して β-galactosidase 活性を測定した（Fig. 7A）．野生型の PhoQ では SafA によって活性が約 3.2 倍上昇したことから，SafA による活性化が 2.5 倍以下に低下した変異体を選び，野生型の結晶構造の表面にマッピングした

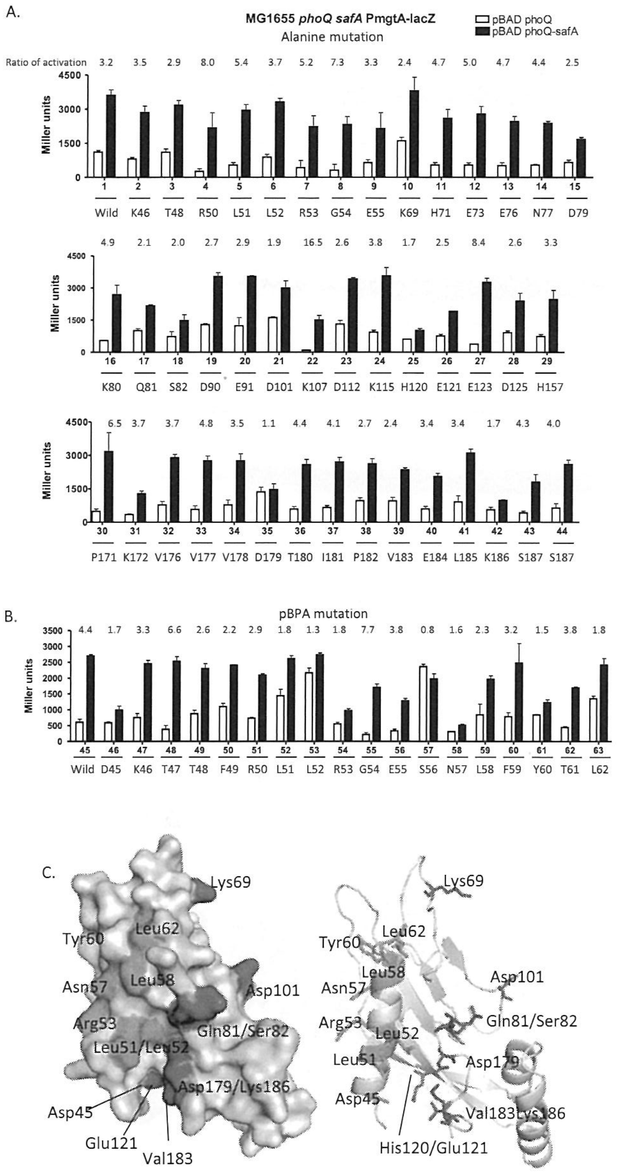


Fig. 7 Identification of mutants impaired in SafA-mediated activatin. (A, B) Alanine and pBPA mutations in the PhoQ-SD were inserted in pBAD-phoQ and pBAD-phoQ-safA plasmids, and transformed into MG1655 *phoQ safA PmgtA-lacZ*. Transcriptional activity of *mgtA* in these transformants was measured in mid-exponential phase cells grown at 37° C with aeration in LB medium with the addition of 0.01% arabinose. Open columns show transformants with pBAD-phoQ derived plasmids and solid columns show transformants with pBAD-phoQ-safA derived plasmids. Columns represent the mean ± standard error of three independent experiments. Numbers above the columns indicated ratios of SafA-mediated activation (β-galactosidase activity in the presence vs absence of SafA). (C) Residues relevant to SafA-mediated activation were mapped onto the PhoQ-SafA monomeric structure.

(Fig. 7C). これらの変異のうち，Q81A, S82A, D179A, V183A, K186AはSDポケットを囲むように位置し，H120AとE121AはSDポケットの奥側に位置した．Asp79は本研究で得られたPhoQ-SDの構造では位置が決められなかったが，既報のダイマー構造（3BQ8）からSDポケットの近辺に位置することが予想された．これらの結果もSafAがSDポケットに結合することを強く支持した．

In vivo 部位特異的光架橋法による α1 ヘリックスの動き

ダイマー境界面の α1 ヘリックスに隣接するSDポケットにSafAが結合するのであれば，PhoQのダイマー境界面に何らかの影響があると考えられる．一般に，ダイマー境界面はセンサーの活性に大きく関与することが知られており，Fig. 7Aでは，R50A, G54AにおいてPhoQ/PhoPの活性が低下している．そこで，全長のPhoQにおいてSafAによるPhoQのダイマー境界面の構造変化を測定するために，***in vivo*** 部位特異的光架橋法（Chin *et al*., 2002）で検討した．この方法では *Methanococcus jannaschii* 由来のamber suppressor tRNAとtyrosyl-tRNAの変異体を用いて，大腸菌内でamberコドンの位置にpBPAを挿入する．pBPAのベンゾフェニル基は350-365 nmの紫外線照射によって3Å以内に存在するC-H結合に反応し，共有結合で架橋する．この方法は，森らによって大腸菌膜上でのSecY-SecAの相互作用解析に応用されたため（Mori & Ito, 2006），本研究ではSafAによるPhoQのダイマー境界面の構造変化の検討に用いた．

In vivo 部位特異的光架橋法を行うため α1 ヘリックスを形成するアミノ酸残基をamberコドン（TAG）に置換した．これらの置換体をLB + pBPA培地で培養した際，発現した変異体PhoQの活性およびSafAによる活性化が保持されているかを確認するため β-galactosidase活性を測定した．Fig. 7Bに示したように，pBPAに置換された変異体PhoQは程度の差はあるものの，全てが活性を保持していた．SafAによる活性化率も変異体PhoQ間で異なり，SafAによる活性化率が2.5倍以下のものは，D45pBPA, F49pBPA, L51pBPA, L52pBPA, R53pBPA, S56pBPA, N57pBPA, L58pBPA, Y60pBPA, L62pBPAの10種であった．これらの残基も野生型の結晶構造の表面にマッピングした（Fig. 7C）．Leu51およびLeu52は側鎖をSDポケットの方向に向けているのに対し，Asp45, Phe49, Arg53, Asn57, Tyr60は側鎖をSDポケットとは反対の方向に向けていた．また，L52pBPAおよびS56pBPAはSafAの無い状態でも高い活性を示した（Fig. 7B）．この高い活性は，L52Aでは認められなかったが，L52FおよびL52Yで

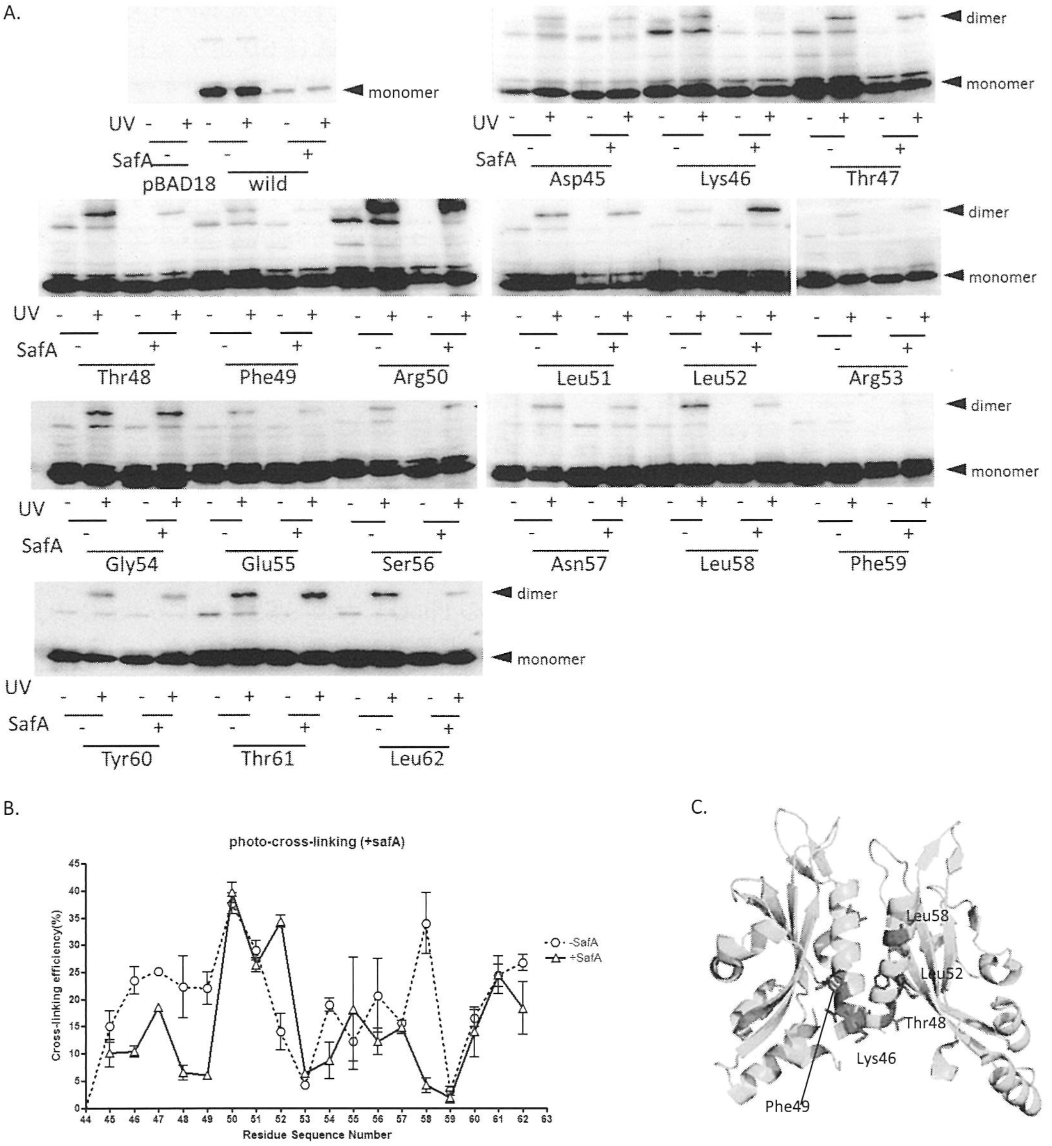


Fig. 8 SafA-mediated changes in *in vivo* photo-cross-linking at the PhoQ-SD dimer interface. (A) Difference in cross-linking of samples from cells expressing pBPA incorporated PhoQ derivatives. Cells in the absence or presence of SafA (indicated as SafA, - or +) were UV-irradiated (indicated as UV, +) and analyzed by anti-PhoQ immunoblotting. (B) Photo-cross-linking efficiencies of the pBPA mutants within the α1 helix in the absence (dotted line) and in the presence (solid line) of SafA. Efficiencies were obtained by quantification of the monomer and dimer bands measured with ImageQuant 400 Imager and ImageQuant TL software. Values are shown as mean ± standard error of three independent experiments. (C) X-ray structure of the PhoQ-SD dimer (3BQ8) with the α1 helix (residues 45-62) shaded according to the SafA-mediated changes in cross-linking efficiency.

も認められたことから，Leu52の位置に大きな側鎖を持つ残基が入ることで，SDポケットの構造の変化やα1ヘリックスの移動が生じ，PhoQが活性化するものと考えられた．この活性化メカニズムは，SafAによるPhoQの活性化と共通するのかもしれない．

次に，α1ヘリックスにamber変異を入れたpBAD phoQおよびpBAD phoQ-safAをpEVOL-pBPFと一緒にCU141 *phoQ*株に形質転換した．形質転換体をpBPA存在下で培養し，集菌後UV照射を行うと，PhoQのダイマー間で架橋される．Fig. 8Aに示すように，UV照射を行ったサンプルでは，PhoQのダイマーに相当する110 kDaのバンドが得られた．PhoQを発現させないコントロールのpBAD18形質転換株やpBPAを置換していない野生型のPhoQを発現させた

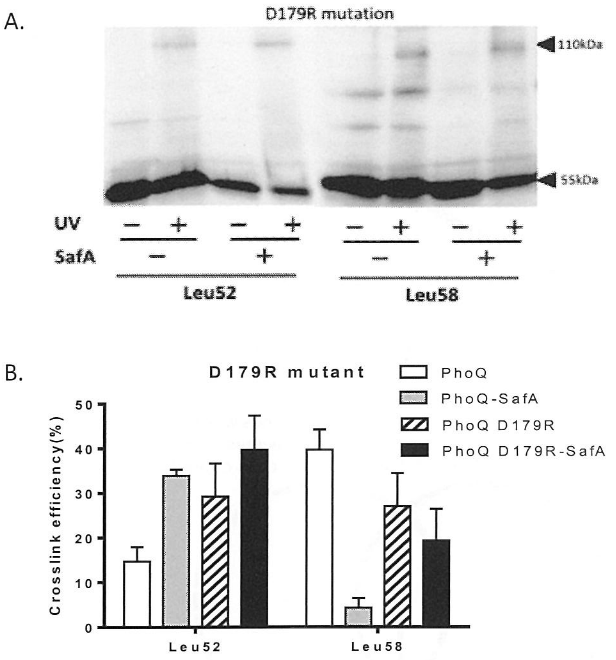


Fig. 9 SafA-mediated changes in cross-linking do not occur in PhoQ D179R mutants. (A) Difference in cross-linking of samples from cells expressing pBPA incorporated PhoQ D179R mutants. Cells in the absence or presence of SafA (indicated as SafA − or +) were UV-irradiated (indicated as UV +) and analyzed by anti-PhoQ immunoblotting. (B) Cross-linking efficiencies of pBPA mutants of PhoQ D179R in the presence and absence of SafA.

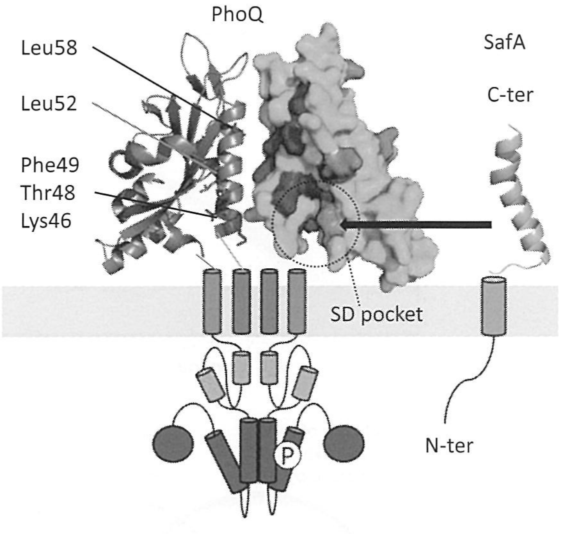


Fig. 10 Model of SafA-mediated activation of PhoQ

株ではUV照射をしてもPhoQダイマーバンドは認められなかった．PhoQのモノマーとダイマーバンド強度の和に対するダイマーバンド強度の百分率を架橋形成効率として算出し，変異を挿入した残基番号に対してプロットしたところ（Fig. 8B），25%以上の比較的高い架橋形成効率がT47pBPA, R50pBPA, L51pBPA, L58pBPA, L62pBPAで認められた．これらの残基の側鎖はダイマー境界面を向いている．Goldberg *et al.*,（2008）のPhoQ-SDに対するCys-scanning disulfide cross-linking studyでもThr47, Arg50, Leu51, Leu58に関して高い架橋形成効率が報告されていることから，PhoQ-SDに対する *in vivo* 部位特異的光架橋法の有効性が確認された．

SafAの有無による架橋形成効率を比較すると，SafAによってK46pBPA, T48pBPA, F49pBPA, L58pBPAで架橋形成効率が低下し，L52pBPAで増大した（Fig. 8B）．これらのことより，SafAがPhoQに作用した際，Lys46, Thr48, Phe49はそれらが形成する領域自体がダイマー境界面から離れ，Leu52はSafAが結合することで側鎖がダイマー境界面に近づくように，Leu58は側鎖がダイマー境界面から離れるように動いていることが示唆された．これらの残基を野生型の結晶構造の表面にマッピングした（Fig. 8C）．さらに，L52pBPAとL58pBPAの発現プラスミドにD179Rの変異を入れて光架橋を行った．PhoQ D179RはSafAが結合しない変異体である．Fig. 9に示すように，L52pBPA D179RもL58pBPA D179RもSafAの有無によって架橋形成率は変化しなかった．この結果はSafAの結合によってPhoQ-SDのダイマー境界面に構造変化が生じることを支持するものである．

以上の結果から予想されるPhoQ活性化モデルをFig. 10に示した．まず，大腸菌内膜上でコネクターSafAがPhoQのSDポケットに結合する．SafAが結合することで，PhoQダイマー境界面に位置するα1ヘリックスのLeu58, Leu52, Lys46 − Phe49の領域が動き，その動きが膜貫通領域と細胞内領域のHAMP domainを介してヒスチジンキナーゼ領域の自己リン酸化能を活性化する．PhoQの膜貫通領域およびHAMP domainの情報伝達メカニズムについては，最近，論文が発表されている（Goldberg *et al.*, 2010; Matamouros *et al.*, 2015; Molnar *et al.*, 2014）．本研究で得られた成果を併せると，センサーPhoQの全体としての活性化メカニズムが予想される段階に入ったと考えられる．

SafAを介する情報伝達ネットワークの広がり

大腸菌の二成分制御系間をつなぐコネクターSafAについて，既知のターゲットPhoQ以外のターゲット探索を試みた．コントロールとしてMG1655/pBAD18

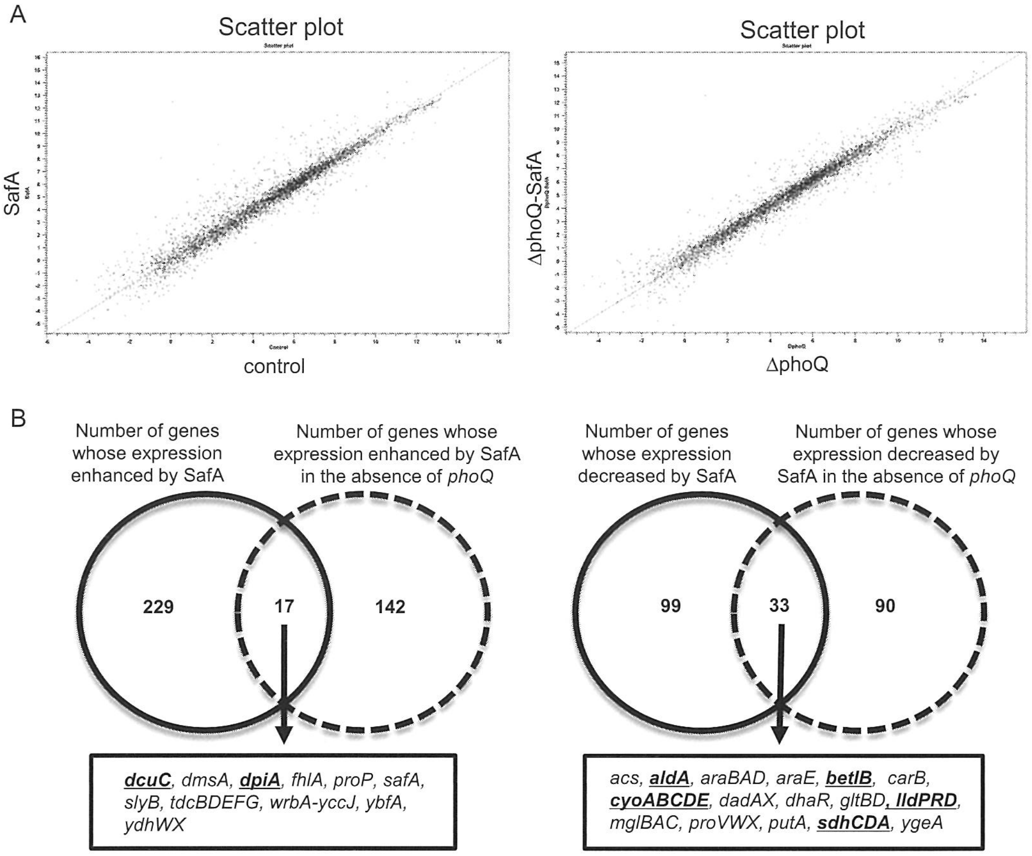


Fig. 11 Up-regulated and down-regulated genes by SafA in the absence of *phoQ*. (A) Scatter plots of genes affected by SafA over-production in wild type and *phoQ* deleted cells. (B) Number of genes whose expression was enhanced or repressed by SafA over-production. Genes in boxes are those with changes in expression by SafA in the presence and absence of *phoQ*. Underlined genes in bold characters have been reported to be regulated by the ArcB/ArcA TCS.

株，SafA過剰発現株としてMG1655/pBADsafA株を，*phoQ*欠損株に関しても同様のペア（MG1655 *phoQ*/pBAD18, MG1655 *phoQ*/pBADsafA）を使用してRNAseq解析を行った結果，SafAの過剰発現は嫌気状態で発現する複数の遺伝子の発現を誘導し，好気状態で発現する複数の遺伝子の発現を抑制した（Fig. 11）．この結果より，SafAのターゲットとして同じ内膜上に存在する嫌気センサーであるArcBを候補として挙げた．ArcBはEvgSと同じようにハイブリッド型のヒスチジンキナーゼセンサーである．SafAを介する情報伝達ネットワークの広がりを検討するために，ArcBとSafAの関連を，今後，解析する．

要　　約

細菌の二成分制御系（TCS）は，環境変化をシグナルとして認識し，その情報を細胞内に伝達し，環境適応に関わる遺伝子群の発現制御を行う．大腸菌の酸耐性能を誘導するTCSであるEvgS/EvgA系が活性化すると，種々の酸耐性遺伝子の発現を誘導するとともに，コネクターSafAの発現を介して異なるTCSであるPhoQ/PhoP系を活性化する．PhoQ/PhoP系の活性化によって複雑な転写制御系が働き，大腸菌の酸耐性能が強化される．センサーEvgSを活性化するシグナルを探索したところ，酸性pHとともに高濃度のアルカリ金属イオン（Na^+, K^+, Li^+）が必要であることを見出した．これらのシグナルを感知する領域を検討したところ，EvgSのペリプラズム領域が必須であり，この領域内のLeu152が活性化に関与することが明らかになった．キメラセンサーを用いた解析からはアルカリ金属イオンはペリプラズム領域で認識されていたが，酸性pHの認識にはペリプラズム領域も細胞質内のリンカー領域も必要であることが示唆された．また，コネクターSafAによるPhoQの活性化メカニズムを検討

した．PhoQのペリプラズム領域の結晶構造解析から，ダイマー境界面に隣接した位置にSDポケットを発見した．部位特異的変異実験においてSafAによる活性化が抑制される変異の多くがSDポケット周辺に集まったことからも，SafAがPhoQのSDポケットに結合することが強く示唆された．さらに，*in vivo* 部位特異的光架橋法によってSafAが結合したときのPhoQのダイマー境界面に位置する $\alpha 1$ ヘリックスの動きを検討したところ，SafAの結合によってLeu58, Leu52, Lys46－Phe49の動きを捉えた．この動きが膜貫通領域を介して細胞質内領域へと伝達され，PhoQの自己リン酸化を活性化すると考えられる．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1) 江口陽子，山中芽衣，内海龍太郎．酸応答性ヒスチジンキナーゼセンサーEvgSの活性化と細胞内pH，日本農芸化学会2015年度大会，岡山，2015年3月
2) Eguchi, Y., Yoshitani, K. & Utsumi, R. Structural changes of the sensory domain of PhoQ histidine kinase upon activation, Cold Spring Harbor Asia, "Mechanisms of Transmembrane Signaling", Oct. 27-31, 2014, Suzhou, China.
3) Eguchi, Y., Yamanaka, M. & Utsumi, R. Signal recognition sites of the acid responding EvgS histidine kinase sensor in *Escherichia coli*, Gordon Research Conference on Microbial Stress Response, July 27-Aug 1, 2014, South Hadley, MA, USA.
4) 江口陽子，山中芽衣，内海龍太郎．EvgSのシグナル認識領域の解析，第11回21世紀大腸菌研究会，盛岡，2014年6月
5) 吉谷亘平，江口陽子，石井英治，内海龍太郎．コネクター因子SafAによるセンサーPhoQ活性化機構，日本農芸化学会2014年度大会，東京，2014年3月27-30日
6) 江口陽子．酸応答性ヒスチジンキナーゼセンサーEvgSの解析，2013年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの細胞構築・運動・増殖機構の研究」，三島，2014年3月1日
7) 吉谷亘平，江口陽子，内海龍太郎．大腸菌センサータンパク質PhoQとコネクター分子SafAの相互作用領域，日本分子生物学会2013年度大会，神戸，2013年12月3-6日

原著論文

1) Eguchi, Y. & Utsumi, R. 2014. Alkali metals in addition to acidic pH activate the EvgS histidine kinase sensor in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **196**: 3140-3149.
2) Ishii, E., Eguchi, Y. & Utsumi, R. 2013. Mechanism of activation of PhoQ/PhoP two-component signal transduction by SafA, an auxiliary protein of PhoQ histidine kinase in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **77**: 814-819.

その他

1) Eguchi, Y., & Utsumi, R. Chapter 16.3. Two-component systems in sensing and adaptation to acid stress in *Escherichia coli*. In Stress and Environmental Control of Gene Expression in Bacteria, de Bruijn, F. J. (ed.), Wiley-Blackwell Publishers. (in press)

謝　辞

本研究におけるPhoQ活性化機構の解析は，吉谷亘平（近畿大学大学院農学研究科，現所属：京都大学ウィルス研）の研究成果に基づくものです．結晶構造解析には杉本宏（理化学研究所播磨研究所），*in vivo* 部位特異的光架橋法には秋山芳展，森博幸，檜作洋平，石井英治（京都大学ウィルス研）の各氏のご指導を受けました．諸氏に感謝いたします．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申し上げます．

文　献

Burton, N.A., Johnson, M.D., Antczak, P., Robinson, A. & Lund, P.A. 2010. Novel aspects of the acid response network of E. *coli K*-12 are revealed by a study of transcriptional dynamics. J. Mol. Biol. **401**: 726-742.

Cheung, J., Bingman, C.A., Reyngold, M., Hendrickson, W.A. & Waldburger, C.D. 2008. Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. J. Biol. Chem. **283**: 13762-13770.

Chin, J.W., Martin, A.B., King, D.S., Wang, L. & Schultz, P.G. 2002. Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**: 11020-11024.

Eguchi, Y., Itou, J., Yamane, M., Demizu, R., Yamato, F., Okada, A., Mori, H., Kato, A. & Utsumi, R. 2007. B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**: 18712-18717.

Eguchi, Y., Ishii, E., Hata, K. & Utsumi, R. 2011. Regulation of acid resistance by connectors of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **193**: 1222-1228.

Eguchi, Y., Ishii, E. & Utsumi, R. 2012a. Molecular mechanism of bacterial two-component signal transduction networks via connectors. In Two Component Systems in Bacteria, R. Gross & D. Beier (eds.), pp 149-162, Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Eguchi, Y., Ishii, E., Yamane, M. & Utsumi, R. 2012b. The connector SafA interacts with the multi-sensing domain of PhoQ in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **85**: 299-313.

Eguchi, Y. & Utsumi, R. 2014. Alkali metals in addition to acidic pH activate the EvgS histidine kinase sensor in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **196**: 3140-3149.

Goldberg, S.D., Soto, C.S., Waldburger, C.D. & DeGrado, W.F. 2008. Determination of the physiological dimer interface of

the PhoQ sensor domain. J. Mol. Biol. **379**: 656–665.

Goldberg, S.D., Clinthorne, G.D., Goulian, M. & DeGrado, W.F. 2010. Transmembrane polar interactions are required for signaling in the *Escherichia coli* sensor kinase PhoQ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **107**: 8141–8146.

Ishii, E., Eguchi, Y. & Utsumi, R. 2013. Mechanism of activation of PhoQ/PhoP two-component signal transduction by SafA, an auxiliary protein of PhoQ histidine kinase in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **77**: 814–819.

Johnson, M.D., Bell, J., Clarke, K., Chandler, R., Pathak, P., Xia, Y., Marshall, R.L., Weinstock, G.M., Loman, N.J., Winn P.J. & Lund, P.A. 2014. Characterization of mutations in the PAS domain of the EvgS sensor kinase selected by laboratory evolution for acid resistance in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **93**: 911–927.

Kato, A., Ohnishi, H., Yamamoto, K., Furuta, E., Tanabe, H. & Utsumi, R. 2000. Transcription of *emrKY* is regulated by the EvgA-EvgS two-component system in *Escherichia coli* K-12. Biosci. Biotechnol. Biochem. **64**: 1203–1209.

Ma, Z., Masuda, N. & Foster, J.W. 2004. Characterization of EvgAS-YdeO-GadE branched regulatory circuit governing glutamate-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **186**: 7378–7389.

Matamouros, S., Hager, K.R. & Miller, S.I. 2015. HAMP domain rotation and tilting movements associated with signal transduction in the PhoQ sensor kinase. mBio. **6**: e00616-15.

Meng, S.Y. & Bennett, G.N. 1992. Regulation of the *Escherichia coli* cad operon: location of a site required for acid induction. J. Bacteriol. **174**: 2670–2678.

Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.

Miller, J.H. 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherchia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.

Mizuno, T. 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. DNA Res. **4**: 161–168.

Molnar, K.S., Bonomi, M., Pellarin, R., Clinthorne, G.D., Gonzalez, G., Goldberg, S.D., Goulian, M., Sali, A. & DeGrado, W.F. 2014. Cys-scanning disulfide crosslinking and bayesian modeling probe the transmembrane signaling mechanism of the histidine kinase, PhoQ. Structure **22**: 1239–1251.

Mori, H. & Ito, K. 2006. Different modes of SecY-SecA interactions revealed by site-directed *in vivo* photo-cross-linking. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**: 16159–16164.

Perraud, A.L., Kimmel, B., Weiss, V. & Gross, R. 1998. Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by the C-terminal HPt domains of the sensor proteins. Mol. Microbiol. **27**: 875–887.

Prost, L.R., Daley, M.E., Le Sage, V., Bader, M.W., Le Moual, H., Klevit, R.E. & Miller, S.I. 2007. Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. Mol. Cell. **26**: 165–174.

Sommer, E., Koler, M., Frank, V., Sourjik, V. & Vaknin, A. 2013. The sensory histidine kinases TorS and EvgS tend to form clusters in *Escherichia coli* cells. PLoS One. **8**: e77708.

Tetsch, L., Koller, C., Donhofer, A. & Jung, K. 2011. Detection and function of an intramolecular disulphide bond in the pH-responsive CadC of *Escherichia coli*. BMC Microbiol. **11**: 74.

Watson, N., Dunyak, D.S., Rosey, E.L., Slonczewski, J.L. & Olson, E.R. 1992. Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *Escherichia coli* cad operon by external pH. J. Bacteriol. **174**: 530–540.

Wilks, J.C. & Slonczewski, J.L. 2007. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. J. Bacteriol. **189**: 5601–5607.

平成21年度寄付講座助成の研究報告

助成期間：平成21年４月～平成27年３月

IFO Res.Commun. 29
51-57, 2015

眠れる微生物を覚醒させ機能を発現する機構の活用学

鎌　形　洋　一

北海道大学大学院農学研究院微生物新機能開発学分野
〒060-8589　札幌市北区北 9 条西 9 丁目

Insights into dormancy of bacterial cells: its applications to uncover uncultivated organisms

Yoichi Kamagata

Graduate School of Agriculture, Division of Applied Bioscience, Hokkaido University
Sapporo, Hokkaido 060-8589, Japan

What are dormant cells, how dormant cells can be resuscitated, how actively dividing cells enter dormant (non-dividing) state, and what triggers dormant cells to enter a dividing state have been controversial for decades. One of the key findings that added fuel to the controversy was that several microorganisms within the phylum *Actinobacteria* including *Mycobacterium tuberculosis* produce a resuscitation promoting factor (RPF), a kind of muralytic enzyme. Recent cumulative genome sequence data suggest that not only a limited species of microorganisms but a large variety of *Actinobacteria* species have similar proteins characterized by an RPF domain. We tested whether an environmental isolate, *Tomitella biformata*, within the phylum *Actinobacteria* can enter the dividing state after the dormant cells are treated by its RPF. Dormant cells induced by limited nutrient and oxygen for an extended period of time were found to be resuscitated after cells were exposed to RPF, suggesting that RPF functions in the organism and functional RPFs may be widespread among *Actinobacteria*. Colony formation is the only available and reliable indication that the microorganisms are in the dividing-state. However, considering that most of microbial species remain uncultivated, more specifically, they do not form colonies on agar media, we attempted to find the reason why agar medium hinders colony formation. Our series of studies showed that agar autoclaved with phosphate, an essential ingredient for organisms, formed hydrogen peroxide that does lethal damage to vulnerable cells in environments whereas medium in which phosphate and agar were separately autoclaved and mixed right before solidification do not form hydrogen peroxide. We found that most of medium recipes available in culture collections do not refer to this fatal effect. We therefore conclude that such hidden pitfall in the preparation of agar media undermines the cultivability of a large portion of organisms. Finally, attempts were made to identify an unknown growth factor produced by an organism in the family *Sphingomonadaceae*. The underlying idea was that microorganisms are living in complex communities, hence organisms should be interacting together by producing or receiving small chemicals that trigger the growth and community structuring. Without understanding those signal networks, one could not understand how microorganisms can make a living, thus how we can grow them in laboratory media. In our study, we found that coproporphyrin derivatives produced by a *Sphingopyxis* strain significantly stimulate the growth of *Leucobacter*, that is phylogenetically quite distant from *Sphingopyxis*.

第 1 章　研究の背景と研究課題の設定

微生物細胞は単純な生と死以外に，生きていても増殖しない状態（viable-but-non-culturable）が存在し，生きている細胞は増殖する状態と増殖しない状態を行き来しており，そこにはさまざまな生育環境要因がこうした状態を規定していると考えられている（Fig. 1）．北海道大学大学院農学研究院寄付講座・微生物新機能開発学分野では微生物細胞が「休眠しているのか，すでに細胞死しているのか」をいかに見極めるか，さらには「覚醒状態の微生物細胞（dividing cell）を人為的に休眠誘導する方法はあるのか」「休眠細胞（dormant

E-mail: y.kamagata@aist.go.jp

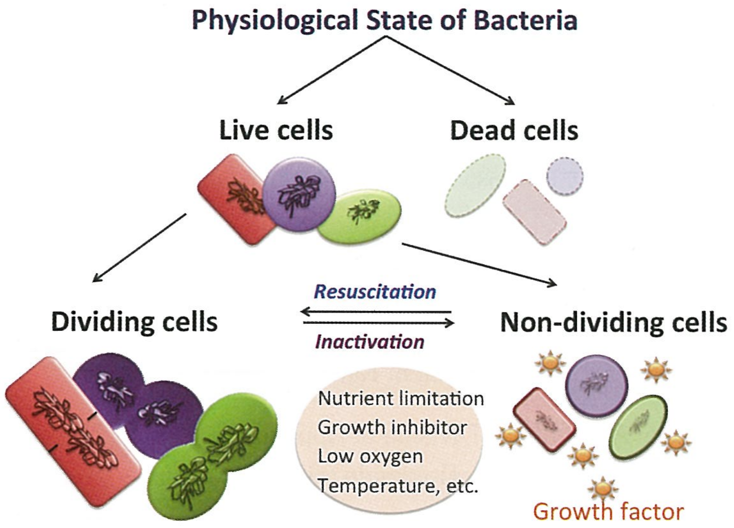


Fig. 1 Summarized concepts of typical physiological states of cells. Cells fluctuate between the states of active growth and no growth because of a number of factors that can cause inactivation and resuscitation. Cells from both these states can contribute to the fraction of uncultivable cells in laboratory experiments.

cell）を再び人為的に覚醒状態に戻すことは可能か」，「そもそも休眠や覚醒を明確に定義づけることは可能か」という近年の微生物学研究が看過してきた課題に取り組んできた．

この課題は古くから微生物学者の関心を集めてきたものであるが，休眠の定義それ自体が明確ではないこと，死細胞と生細胞の識別に決定的な手段がないこと，などが，大きな研究の障壁となっている．近年，一細胞レベルでの解析手法として原子間力顕微鏡，非破壊で観察可能な電子顕微鏡，高速に一細胞を大きさや蛍光で選別できるフローサイトメトリーが登場し，一細胞レベルで生死判定あるいは休眠覚醒判定に使いうる技術が発展しつつある．しかしながら，これらの装置を用いるにあたり，何を標的に生死や休眠覚醒の識別をするか，という明確な指標がない限り適用が困難である．生死の判定に使える遺伝子・タンパク質・表面構造などの標的が明確になればそれらに対して特異的に結合する抗体や化学物質を用いて上述の装置を利活用できる可能性がある．

1）第一主要研究課題の設定

しかしながらこうした標的を定めるのは現時点では極めて困難であることから，本研究において先ずは従来的な手法を用いて休眠と覚醒という現象を捉えうるか，ということを第一の目標とした．1990年代に *Mycobacterium tuberculosis* が生産するタンパク質が当該細菌の休眠状態を覚醒状態に変化させることが見出され，このタンパク質は resuscitation promoting factor: Rpf = 休眠覚醒因子と命名された（詳細各論参照のこと）．Rpf タンパク質はリゾチーム様タンパク質であり，ペプチドグリカンを分解し，その部分分解物が覚醒因子として機能しているという推定がなされた．このタンパクは極微量で作用することから微生物における一種のサイトカインとして注目を集めた．その後，ゲノム生物学が飛躍的な進歩を遂げ，非常に多くの微生物ゲノム情報が蓄積した結果，*rpf* 類似の遺伝子配列が多数の *Actinobacteria* 門微生物に存在していることが明らかになってきた．しかし，Rpf 研究はごく特定の病原性 *Actinobacteria* 門微生物などで進んだだけで，こうした Rpf 様遺伝子を持つ全く異なる *Actinobacteria* 門内の微生物でも Rpf が覚醒作用を持つタンパク質として機能し得るか否かは未知であった．

そこで本寄附講座の第一主要研究課題「新規放線菌 *Tomitella biformata* に休眠と覚醒をもたらす条件の解明」として以下の研究を設定した．1）Rpf 様遺伝子を持ち，かつこれまで良く研究されてきた *Mycobacterium* 属等とは全く異なる *Actinobacteria* 門内の微生物においても Rpf が覚醒作用を持つタンパク質として機能しうるか？材料としては当寄附講座の田中らによってアラスカ氷楔（ひょうせつ）中から分離された *Tomitella* 属微生物を材料として用いた．当然のことながら，本研究においては材料として用いる微生物を何らかの手法で休眠状態に移行させることが覚醒実験を行う上で必要不可欠な研究課題であったことか

ら，休眠化への条件探索とともに，Rpfタンパク質の異種大量発現系の構築を同時に進めた．こうした実験系が確立したのちに高度に精製されたRpf様タンパク質による休眠細胞の覚醒実験を行った．続いて2）上記のRpf様タンパク質を用いて多様な微生物を含む環境試料を処理した際，コロニー形成率を向上させることができるかどうか，すなわちRpfは環境中で休眠していると思われる微生物群を覚醒させる作用を持つか否か？を検証した．

2）第二主要研究課題の設定

ある微生物の細胞が覚醒状態にあるのか，休眠状態にあるのか，の判定にあたって，上述の実験系においては「寒天培地上でコロニーを形成するものを覚醒細胞」，「コロニーを形成しないが，既存のLive-or-Dead染色法でLiveと判定されるものを休眠細胞」と定義して実験を行った．しかし，Live-or-Dead染色法には厳密な染色条件設定が必要である，という議論もあり，すべての微生物に画一的なプロトコールを適用することには一定の危険を伴う．もしLiveとして判定された一細胞を生きたまま取り出し，覚醒処理を行ったのちにコロニー形成能を認めることができれば，間違いなくその細胞は休眠細胞と定義づけられる．しかし，こうした方法論には技術上絶対的な限界がある．現時点において一細胞を完全に損傷を与えずに操作できる技術は一切存在しない．また覚醒細胞か休眠細胞かの判定に用いる寒天培地の信頼性には本質的な問題がある．所定の方法で調製した寒天培地で確実にコロニーを形成する微生物を扱う限りにおいてはこの問題は存在しないが，そもそも環境微生物の大部分が培養困難微生物であるという多くのデータ（Table 1）を勘案した場合，寒天培地そのものでの判定に果たしてどこま

Table 1 The cultivation efficiency of cells from various environmental samples

Habitat	Cultivation efficiency[1] (%)	Media for cultivation[2]	Method for direct counts[3]
Desert	0.0007–0.02	R2A	PLFA
	0.02–0.15	R2A	PLFA
	0.05–0.1	TSA	PLFA
Permafrost sediment	0.001–10	Poor and rich media	AO
	0.03	R2A	SYTO9/PI
Metal-contaminated soil	0.08–2.27	R2A	DTAF
	0.03–1.48	TSBA	DTAF
Soil	2.4–19	VL55	DAPI, AO
Marine sediment	2.5[M]	ABW	DAPI
Sea water	0.25[M]	ABW	DAPI
	0.003	Marine R2A	DAPI
	0.01–0.98	1/10 Marine R2A	DAPI
	0.01–0.15	Marine R2A	DAPI
Lake sediment	0.1	PE03-7A	EtBr
	1.3	PE03-7G	EtBr
	0.007–0.017	ABM	SYTO9/PI
Fresh water	0.1–5.59[M]	Synthetic fresh water	DAPI
Activated sludge	13.86	LB agar	DAPI
	0.24–0.38	TSA	DAPI
	1.67–3.68	R2A	DAPI
Human feces	54	Medium 10	DAPI
	14.28	BBA	DAPI
	36.5	BBA	DAPI
	58	Medium 10	n.r.

n.r.: not reported
[1]Cultivation efficiency was calculated from the percentage of cultivable cells from colony forming units or MPN counts[M] in proportion to total number of live cells from direct counts. [2]Cultivation was performed aerobically except for human feces that were grown anaerobically. [3]Direct counts were made microscopically after staining with AO (Acridine orange), DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), DTAF (5-(4,6-dichlorotriazin-2-yl)aminofluorescein), ethidium bromide (EtBr) or SYTO9/PI (SYTO9 and propidium iodide) except for estimations made from phospholipid fatty acid (PLFA) analysis.

での信頼度があるのか，という本質的議論をせずに，「環境中の微生物のどれだけが休眠状態なのか，どれだけが覚醒状態にあるのか」，と言った議論は困難となる．

そこで本寄附講座の第二主要研究課題「微生物のコロニー形成のための固体培地調製法の本質的な問題点の解明」としてまず以下の研究を設定した．1）微生物の多くはなぜ寒天培地でコロニーを形成しないのか？この問いに答えるにあたり，培地成分は同じでも，寒天培地では生育しないものの，他のゲル化剤上では良くコロニーを形成するという微生物株を用い，なぜこの微生物が寒天よりも他のゲル化剤を好むのかを調べることとした．この研究にあたっては我々の先行研究において寒天上での生育が著しく悪く，ゲランガム上では良好なコロニー形成能を持つ *Gemmatimonas aurantiaca* を用いた．本菌はかつてBD門と呼ばれていた未培養微生物群からなる一門に属するもので，2003年に世界に先駆けて我々が純粋培養に成功した細菌であり，我が国における初めての新門（*Gemmatimonadetes* 門）提案に至った微生物である（詳細各論参照のこと）．現在 *Gemmatimonadetes* 門は広く知られた門となり，提案以降，無数の論文の系統樹に登場する門となっており，最近になってわずかではあるが新たな分離株が得られている．この微生物がなぜ寒天で生育しないのかについて極めて根本的な培地組成検討を行う過程で，リン酸塩が阻害要因として浮かび上がってきた．特にリン酸塩を寒天と同時滅菌する時にコロニー形成が妨げられ，別滅菌をした時にはゲランガム同様の生育を示すことを見出した．良好な生育をするゲランガムにおいてでも，リン酸濃度を高くすると同じようなコロニー形成阻害を見出した．そこで次に2）固体培地に含まれるリン酸塩は環境試料中の微生物のコロニー形成に負の影響をもたらすのか？という，これまで多くの微生物研究者が看過してきた研究課題を設定した．本研究ではリン酸塩と寒天の同時滅菌，別滅菌，リン酸塩そのものを加えない実験系を設定し，土壌，河川，底泥等を環境試料として，そこに存在する微生物群集構造を次世代シークエンサーによって解析したのち，上述のような条件でコロニー形成数やコロニー形成する微生物種の違いを精緻に解析した．

3）第三主要研究課題の設定

微生物が増殖するかしないか，換言すれば，微生物が本当に生きていて覚醒状態にあるのか否かについて議論するにあたり，上述のような培養手法そのものの問題点とともに特記すべき重要な点は，自然界においては多くの微生物は他の微生物（あるいは動物や植物といった宿主）と共存しながら，生命体を維持しているという事実である．単一種の微生物だけが存在する環境は極めて特異な環境であると推定され，ほぼすべての自然環境においては膨大な微生物種が同時に存在している．こうした中において微生物-微生物間，微生物–昆虫，微生物–植物間で物質のやりとりを含めた種間ネットワークを想定することは極めて自然な発想と言える．微生物が単一種として取り出され，人工培地で生育させることが，今日の微生物学，分子生物学，発酵工学技術を大きく発展させてきたことは言うまでもない．しかし，微生物を単一種として取り扱うことの限界性は，微生物の大部分が人工培地上で生育しないという多くの実験的事実を見れば自明である．微生物細胞が休眠しているのか覚醒しているのかを判断するためには第二の研究課題設定同様，微生物に特定の環境を与えれば増殖するのかしないのか，という普遍的な問いとその答えを用意しなければ，より絞り込んだ議論は不可能である．

これまでに微生物の生育因子，微生物間相互作用，微生物間共生に関する研究は一定の進歩があるものの，「ある微生物の生育が他の微生物，あるいは他の微生物の生産する微量物質に高度に依存する」現象を精緻に突き詰める研究例は決して多くはない．そこで本寄附講座の第三主要研究課題「微生物の生育を助長する未知生育因子の解明」として，どのような生育因子が異種微生物間でやりとりされているのか?を明らかにする研究課題を設定した（Fig. 2）．我々は *Sphingomonadaceae* 科に属する微生物群の培養上清に含まれる未知成分が *Actinobacteria*，*Proteobacteria* 門内の微生物の生育を著しく促進することを見出していた．本研究課題ではとりわけ *Sphingopyxis* 属細菌が分泌する生育促進因子のアッセイシステムを確立し，当該生育促進因子の完全精製ならびに構造決定を目指すことを目的にした．

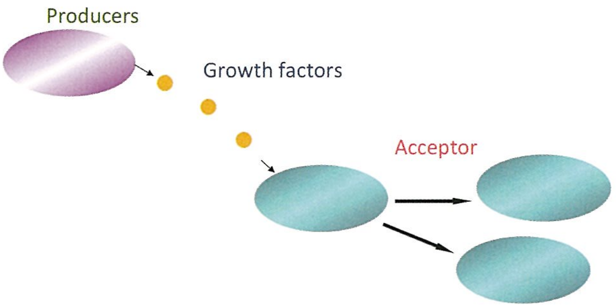


Fig. 2 Interspecies growth factor transfer between two different microbial species.

第2章　研究成果の概要

1) 新規放線菌 *Tomitella biformata* に休眠と覚醒をもたらす条件の解明

本研究においては我々の先行研究で得られた *Actinobacteria* 門に属する新属新種細菌 *Tomitella biformata* と *Glaciibacter superstes* を用いた．これらの微生物はアラスカの永久凍土氷楔中から分離したものである．このうち *T. biformata* については種々の条件を検討した結果，約60日間にわたり酸素・栄養源制限条件下におくことによって99% 以上の細胞が休眠状態に入ることが全細胞の直接計数，Live-or-Dead 染色，ならびにコロニー形成試験から明らかになった．

続いて *rpf* の保存領域を標的とする PCR の結果から，*T. biformata* には上述した Rpf 類似タンパク質をコードする遺伝子が自身のゲノム上に存在することを見いだした．そこで当該遺伝子を大腸菌や *Rhodococcus* にクローニング・発現・部分精製した標品を調製し，まず *T. biformata* の通常細胞（休眠していない細胞）を処理したところ，明らかな生育促進効果が認められた．次に上述したような休眠処理を行った細胞を Rpf 処理したところ，明らかに生育の開始（覚醒）が認められた．また，Rpf を微生物の代謝活性が著しく低下していると思われる永久凍土氷楔を無菌的に融解させた試料に添加し培養したところ，特定の異種微生物群の生育を誘導することが初めて観察された．

T. biformata の全ゲノム配列を決定した後，休眠状態と覚醒状態における *T. biformata* 細胞の全タンパク質を対象としたプロテオミクスによる網羅的解析を行ったところ，両生理的条件下において発現しているタンパク質群に顕著な差異が認められた．特に carbon monoxide dehydrogenase と推定される遺伝子発現上昇が認められた．このことは，休眠状態における *T. biformata* は増殖こそできないものの，覚醒時にはほとんど用いることのない代謝系を用いて，細胞の生命装置を維持するための最低限のエネルギー獲得システムを発現させていることを示唆するものである．ただし，この点についてはいっそうの検証が必要である．

2) 微生物のコロニー形成のための固体培地調製法の本質的な問題点の解明

Robert Koch 以来，現代微生物学は寒天培養による純粋分離・純粋培養を基本にめざましい発展を遂げてきた．しかし，自然界試料を寒天で培養したときに形成されるコロニー数は，試料中に含まれる全微生物のごく一部であることは古くから知られていた．Great Plate Count Anomaly という言葉で表現されるこの現象については多くの推論はあるものの，その明確な原因を示す研究はほとんど行われてこなかった．微生物の休眠と覚醒を識別する上で，寒天培地上でコロニーを形成するものを覚醒細胞と定義づけることが現在のところ最も確からしい方法である以上，寒天でコロニーを作らないことが休眠状態にあるのか，寒天培地という固体培地に何らかの欠陥があるのかを峻別しておくことは必須である．

我々の先行研究において寒天上での生育が著しく悪く，ゲランガム上では良好なコロニー形成能を持つ *Gemmatimonas aurantiaca* を材料に，まず寒天培養のどこに問題が潜んでいるのかを探った．培地成分は寒天培地でもゲランガム培地でも同様であることから，培地成分の一つ一つと寒天との関係を精査していったところ，培地成分に含まれているリン酸塩を寒天と同時滅菌する時にコロニー形成が妨げられ，別滅菌をした時にはゲランガム同様の生育を示すことを見出した．コロニー形成率はリン酸塩濃度が高くするほど急激に低下する傾向が認められた．

リン酸塩の阻害効果についてはいくつかの研究機関や研究室で経験的に知られているという伝聞は得たものの，過去の膨大な研究報告を精査した結果，こうした現象を系統的に解析した例は見いだせなかった．ただし，半世紀前の論文にグルコースをリン酸塩と高温処理したときに過酸化水素（H_2O_2）の発生が認められるとの報告があったことから，寒天培地の自由水成分中の H_2O_2 濃度を測定したところ，H_2O_2 が検出された．H_2O_2 の濃度は添加するリン酸塩の濃度に比例して増加し，かつ作成した寒天培地を室温等で放置することにより，濃度が経時的に高まることも見いだした．リン酸塩と寒天を滅菌した培地にカタラーゼを塗布したところ，コロニー形成に改善が認められたことから，少なくとも H_2O_2 の生成がコロニー形成阻害と深く関わっていることが強く示唆された．

そこで，微生物の培養に用いられている ATCC，DSMZ，NBRC で登録されている膨大な培地成分一覧をすべて検索したところ，いずれの培地にも 2-40 mM 程度のリン酸塩が含まれており，しかも培地調製方法に寒天とリン酸塩を別滅菌する事，等の注意書きがなされているものを見いだせなかった．微生物保存機関に登録されている培地ならびに保存機関に寄託されている微生物にはカタラーゼ等の活性があることからこうした問題が直接浮かび上がることがないと言えるが，翻って微生物種のごくわずかしか寒天上でコロニーを形成しないという事実は，こうした培地調製法の

本質的部分に深く関わっていることが示唆された．

多様な微生物が生息する環境試料においてこうした寒天培地の調製手法が環境微生物のコロニー形成能にどのような影響を与えるかを調べるため，土壌，河川，底泥等を環境試料として用い，一定程度希釈した試料をリン酸塩同時滅菌あるいは別滅菌培地（培地組成は同一）に塗布し，コロニー形成数（CFU）を比較した．その結果，試料によって違いはあるものの，いくつかの試料においては著しい CFU 差を見いだした．また，寒天上に出現したコロニーを数千個拾い，DNA を抽出，16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅してそれぞれの微生物の系統的位置を明らかにした．その結果，リン酸塩と寒天を同時滅菌した場合，出現する微生物がリン酸塩と寒天を別滅菌したときと著しく異なっていることが明らかとなった．とりわけ，*Actinobacteria* 門の微生物はリン酸塩と寒天を同時滅菌した培地で高頻度に出現することが判明した．次世代シークエンサーによって，用いた環境試料中に含まれる微生物相を詳細に解析し，門レベルでの微生物の多様性と，寒天培地上に出現したコロニーの系統群を比較したところ，リン酸塩と寒天を同時滅菌した培地のほうが，別滅菌した培地よりも構成種において著しいバイアスがかかることを見出した．

H_2O_2 の生成濃度は市販の寒天の種類や Lot # によっても大きく異なった．これらの知見は，微生物学者が従来注意を払ってこなかった培地調製法そのものが，コロニー形成率に決定的な影響をもたらすことを初めて示した成果と言える．

3）微生物の生育を助長する未知生育因子の解明

我々は予備的な検討からさまざまな *Proteobacteria* 門 *Sphingomonadaceae* 科に属する微生物群の培養上清がさまざまな微生物の生育を促進することを見いだした．本研究においては *Sphingopyxis* 属細菌 GF9 株の培養上清で生育が著しく促進される *Actinobacteria* 門に属する *Leucobacter* 属細菌 ASN212 株，*Proteobacteria* 門に属する *Catellibacterium* 属細菌 AST4，同じく *Proteobacteria* 門に属する *Bosea* 属に近縁な細菌 ASTN45 を被験菌株として，未知の生育因子の解明を網羅的に試みた．GF9 株を 100 L スケールの大量培養に供し，溶媒抽出，各種カラムクロマトグラフィーによって，さまざまな低分子物質画分を得た．これらの画分についてマイクロプレート上で被験微生物の生育を促進する極めて安定かつ低分子の物質画分を得た．上記の三つの被験菌株に対する生育促進効果はそれぞれ異なる画分に存在していたことから，*Sphingopyxis* 属細菌 GF9 株は複数の生育促進物質を菌体外に分泌していることが示唆された．このうち *Leucobacter* 属細菌 ASN212 株の増殖を促進する画分の生成を進め，最終的に NMR ならびに各種質量分析法によって zinc coproporphyrin III（zincphyrin）ならびにその誘導体を同定した．次に porphyrin の各種関連物質を合成し，ASN212 株に対する増殖促進効果を調べたところ，zinc-coproporphyrin III において 10 pg/ml のレベルで著しい効果が認められ，他の誘導体（例えば zinc coproporphyrin I, coproporphyrin I, coproporphyrin III, hemin, hematin など）に比べ，はるかに低濃度で生育を促すことが判明した．Zincphyrin については微生物での研究例は少なく，少なくともこうした生育促進効果については世界で初めての知見である．

第 3 章　終わりに

本研究は微生物の「休眠」と「覚醒」とは何か，覚醒細胞をいかにして休眠細胞へ導くことができるか，休眠細胞をいかにして覚醒細胞へと誘導できるか，を主たる目的として出発した．環境中から新たに分離した *Actinobacteria* 門細菌に従来から知られていた覚醒因子に似た遺伝子の配列を見つけたことから，この微生物を「眠らせ」，覚醒因子によって眠りから「起こす」ことが可能であることを証明できた．他方，この研究を通じて，一貫して「休眠」と「覚醒」を明確な根拠をもって定義づける困難さに直面し続けた．最も大きな問題は「休眠状態」か「覚醒状態」かを判断するにあたって「一細胞」が寒天培地上で生育するかしないかを根拠にすることにあった．上述の *Actinobacteria* 門の細菌は確かに固形培地上でコロニーを形成することから，この判断は一見正しいものに思われた．しかし，いかに大部分の細胞を「休眠状態と思われる生理状態」にできたにしても，確率論的に一定の覚醒状態にある細胞を含む以上，形成されたコロニーが「休眠状態から覚醒した細胞なのか」「もともと覚醒していた細胞なのか」を完全に証明することの困難さを克服することができなかった．仮にこの *Actinobacteria* について一定の証明ができたとしても，この事実をどこまで他の微生物種に普遍化できるのかは判然としないままである．なぜならば大部分の微生物種がそもそも固形培地上で生育しないという多くの実験的事実から，微生物そのものが「休眠」と「覚醒」，「生」と「死」の端境が希薄な生命体だからである．

そこで上述の実験と並行して「なぜ微生物の多くは固体培地で生育しないのか」という問題に取り組み始めた．それに適した材料として，同じ固体培地でも寒天上ではコロニーを形成しないが，別のゲル化剤では

コロニーを形成する微生物を用いた．この微生物はたまたまそういう種として単離したものだったが，当初ゲル化剤の違いによる生育の差異はゲル化剤の表面の物理的特性の違いによるものと考えていた．しかし，結果的に通常の培地調製法に思わぬ落とし穴が存在していることを発見するに至った．過酸化水素などの活性酸素種がリン酸を触媒として寒天から多量に発生することを見出したのである．これは文献上，世界で初めての発見であった．ただ，こうした現象は多くの分離培養を行ってきた職業研究者の間では経験的に知られていた事実であった．誰もそれを精緻に分析し，原因を突き止めなかっただけに過ぎない．それでもこの研究は論文発表した際，世界の多くの研究者から注目され，多くの問い合わせを受けた．同じ寒天でもメーカーやロットによっても大きな違いがあることを見出した（投稿準備中）．少なくとも，この研究からいくつかの重要な考察が導出できる．第一に休眠状態と判断されかねない多くの微生物が，活性酸素種が発生しない培地で培養すればコロニーを作ることができる「覚醒細胞」だということである．第二に活性酸素種が多量に存在しても，カタラーゼ等のシステムを持つ微生物にとっては全く問題にならず，それゆえこれまでの分離培養法によってたやすく分離されてきたということである．大腸菌も例外ではなく，特段の注意を払うことなく作られた培地の上で，何事もなかったかのように生育する．大腸菌が分子生物学の礎となり得たのは，まさしくこうした理由によるものと言える．第三に環境中の微生物の生理学的状態は実験室に持ち込まれて長い間飼い慣らされた微生物の細胞とは似ても似つかない可能性が高いということである．各論の章でも詳細は論じてはいないが，活性酸素種が生じないように作られた寒天培地でしか生えてこなかった微生物種でも，実験室で維持してゆくうちに活性酸素種を含む寒天培地でも生えてくるようになるからである．活性酸素種が生成しないように注意深く作られた培地でしか生えなかった細胞はまったく違った意味で「休眠細胞」だったと言えるのではないか．土壌のような貧栄養環境において微生物はほとんど活発な生育をしておらず，一種の飢餓条件下にあって，さまざまな遺伝子の発現が抑えられ，細胞も一種の損傷状態にあると言える．環境微生物を扱うことは，すなわち上述の意味における「休眠細胞」を扱っている可能性が高い．

同様のことは第2章の「微生物の生育を助長する未知生育因子の解明」においてもあてはまる．これについても各論の章では述べていないが，微生物Aの培養上清液を入れた時にのみ初めて生育する微生物Bのスクリーニングは長い年月をかけて行ってきた．その結果，高い再現性のある *Sphingopyxis* 属細菌が分泌する増殖因子の発見につながった．しかし，スクリーニングの過程で，微生物Aの培養上清液を要求するのは環境試料から分離する最初のステージだけで，そののち微生物Bは微生物Aの培養上清液を全く必要としないものになる株が多数得られることを見出してきた．これも上述同様，環境中に存在しているときの細胞の生理状態と，実験室に持ち込まれた細胞の生理状態が大きく異なっていることを示唆するものである．

微生物における「休眠」と「覚醒」，「生」と「死」の究極の解析は一細胞操作技術ができるようになってこそ，初めて新たな段階に到達できる課題である．現時点におけるレーザーピンセット，フローサイトメトリー，原子間力顕微鏡などの最先端技術でもこの問題を扱うことはできない．一細胞を損傷させることなく拾い，覚醒処理あるいは休眠処理ができ，その細胞の生理状態，遺伝子発現状態を見ることができるようになって初めてこれらの諸問題の本質に迫ることができる．

こうした問題点を痛感しながらも5年半にわたる本研究課題への取り組みを通して微生物の生き様の一端に触れることができ，微生物細胞の「休眠」と「覚醒」，「生」と「死」を考える上で大きな経験と知を積むことができたことはこれ以上望み得ない喜びであった．

謝　辞

本研究は，公益財団法人発酵研究所の寄付金によって成し得た成果である．ここに厚く御礼申し上げます．また，本研究は北海道大学大学院　浅野行蔵教授，生方信教授，曾根輝雄准教授，重冨顕吾助教のご支援とご協力，当研究室に在籍した多くの大学院学生の皆さん，産業技術総合研究所の川崎公誠・玉木秀幸研究員，山梨大学大学院の田中靖浩助教の協力なくして成し得なかったことを付記すると共に深く感謝申し上げます．

IFO Res.Commun. 29
59-75, 2015

新規放線菌 *Tomitella biformata* に休眠と覚醒をもたらす条件の解明

北川　航，加藤創一郎，菊池義智，田中みち子，鎌形洋一

北海道大学大学院農学研究院微生物新機能開発学分野
〒060-8589　札幌市北区北9条西9丁目

Induction of dormancy and its resuscitation of an actinomycete, *Tomitella biformata* AHU 1821^T

Wataru Kitagawa, Souichiro Kato, Yoshitomo Kikuchi, Michiko Tanaka, Yoichi Kamagata

Graduate School of Agriculture, Division of Applied Bioscience, Hokkaido University
Sapporo, Hokkaido 060-8589, Japan

Resuscitation promoting factor (Rpf) is a protein that promotes the growth of active dividing cells and resuscitates dormant non-dividing cells. An exclusive and wide distribution of *rpf* gene homologs within the phylum *Actinobacteria* suggested that Rpf may have an important role in the life cycle of this group, in which little is known about the mechanisms controlling dormancy and re-growth. However purified and functionally tested *rpf* genes from three species vary in length, genetic structure, and in host specificity and activity. To understand the roles played by Rpf and to cultivate a diverse array of *Actinobacteria*, perhaps in the dormant state, searching for other functional Rpf within this group is requisite. Previous studies in our laboratory revealed that *Tomitella biformata* AHU 1821^T, a novel non-spore forming *Actinobacteria* isolated from a permafrost ice wedge, possessed *rpf* gene homologs. The deduced amino acid sequence was 44.9% identical to known RpfB in *Mycobacterium tuberculosis*, the closest functionally tested one. The objectives of this study were to determine the function of Rpf in *T. biformata*. The preparation of dormant non-dividing cells of *T. biformata* was imperative for the biological activity determination. Incubation of *T. biformata* in oxygen-limited conditions in modified minimal medium (mMMF) for 60 days resulted to the formation of non-dividing cells, in which approximately 99% of the cells lost cultivability on agar medium but retained membrane integrity and exhibited a distinct morphological characteristic in TEM. Recombinant Rpf (rRpf) of *T. biformata*, expressed in *Escherichia coli* and *Rhodococcus erythropolis*, showed activity to promote the growth of dividing cells and resuscitating non-dividing cells by reducing the lag phase in mMMF culture. However, higher concentrations was required to express the activity compared to other known functional Rpf, indicating that this Rpf is active but not identical to previously studied Rpfs. Messenger RNA corresponding to the *rpf* gene homolog was detected by RT-PCR throughout the exponential growth phase of *T. biformata* cells, indicating that this gene was being expressed in growing cultures. Phylogenetic analysis using all known and putative Rpf proteins from all other species with publically available genome sequences showed that *T. biformata* Rpf was placed in monophyletic branch within the RpfB subfamily. The genomic structure of Rpf in *T. biformata* also differed from *M. tuberculosis* RpfB in the number of DUF348 domain and length of linker region between the second DUF348 domain and the G5 domain. These differences may contribute to the functional variation of *T. biformata* Rpf. Recombinant Rpf in *E. coli* or *R. erythropolis* was used for the cultivation of permafrost ice wedge sample. The colony formation unit on plates amended with rRpf increased rapidly and colonies appeared earlier than on non-amended plates. Two prominently increasing colony types that appeared on Rpf amended plate were related to *Brevibacterium* sp. and *Arthrobacter rhombi* F98 based on partial 16S rRNA analysis. This result indicated that Rpf from *T. biformata* had a cross species activity. This research exhibited that Rpf from *T. biformata* had a cytokine-like activity but

E-mail: w-kitagawa@aist.go.jp, s.katou@aist.go.jp,
y-kikuchi@aist.go.jp, y.kamagata@aist.go.jp
共同研究者：Indun Dewi Puspita，上原萌，不野健太郎（北海道大学大学院農学院），寺島美亜（北海道大学低温科学研究所），C. H. Nakatsu（Purdue University）

functionally and genetically different from other functionally known Rpfs. It also shows cross species recognition within other member of *Actinobacteria*. This study provides the evidence of functional differentiation of Rpf produced by the member of *Actinobacteria* and possibility of using Rpf as a growth factor for isolation of *Actinobacteria* from environmental sample. Genome sequence analysis of *T. biformata* demonstrated that this strain has 6 copies of *rpf*-like genes in addition to the first identified *rpf* gene. Of these Rpfs, only the first Rpf belongs to the RpfB subfamily that is demonstrated to have main activity for resuscitation in *Mycobacteria*. Proteome analysis identified some up-regulated proteins in the non-dividing cells of *T. biformata*. The carbon monoxide dehydrogenase (CODH) proteins abundantly found in non-dividing cells indicated that this strain had changed the metabolic system to adapt the stress to survive in the environment.

Key words: dormant, viable but not culturable (VNC), resuscitation promoting factor (Rpf), *Tomitella*

緒　言

環境由来の培養できない微生物細胞の存在は，最初に寒天プレートにおけるコロニー形成数（CFU）と顕微鏡直接観察による細胞数に大きな差があることから確認された（Staley & Konopka, 1985）．これら細胞は(i) 生きているが研究室の環境でこれまで培養できていないもの（dividing cells），(ii) これまで培養できた履歴のある細胞が，生きてはいるが分裂·増殖しなくなった状態のもの（非分裂細胞=non-dividing cells）（Amann *et al.*, 1995）の２つのカテゴリーに分類できる．

Non-dividing cellsとされる状態のひとつに，viable but not culturable（VNC）と呼ばれるものがある．元々実験環境下で培養できたものであったため，これら微生物は正しくその存在を認識されていたが，なんらかの要因のために生きているものの，もはや分裂·増殖しなくなったものである（Xu *et al.*, 1982）．VNCは細胞が生きていても，通常用いられる液体培養，固体培養のいずれにおいても生育が認められない（Oliver, 2000）．Non-dividing cellsとされる状態には休眠状態のものも考えられている．自然環境でも研究·実験環境においてもその大部分は一定·安定な状態では無く，微生物の生育にとって好ましくないストレスとなりうる（Roszak & Colwell, 1987）．このようなストレスを耐えぬくため微生物によって使われる１つの戦略は休眠あるいは静止状態に入り，状況がより有利になったら生育を再び始めることである（Dworkin & Shah, 2010）．内生胞子は休眠細胞で最も研究された典型例である（de Hoon *et al.*, 2010; Errington, 2003; Henriques & Moran, 2007）．しかし最近では非胞子形成細菌が類似した休眠状態に入るということが知られている．Non-dividing cellsの大多数の研究は健康·衛生に関する観点から，病原菌のVNC細胞で行われてきた（Oliver, 2010; Oliver, 2000）．

非胞子形成細菌による非分裂細胞の形成は，グラム陰性のみならずグラム陽性細菌でも報告されている（Oliver, 2000）．胞子形成と非胞子形成細菌の休眠状態の間には多くの共通点がある．ストレス要因として栄養素，温度および酸素（Shleeva *et al.*, 2004），pH（Shleeva *et al.*, 2011），及び浸透圧（Panutdaporn *et al.*, 2006）の変化などは，非胞子形成細菌が非分裂状態に入るためのトリガーであることが示されており，細胞は非常に過酷な条件を長期間生き残る事が示されている（Vorobyova *et al.*, 1997）．このため芽胞形成する細胞と同様，非分裂状態は過酷な条件の下で生存するための非胞子形成細菌の戦略の一つであるといえる．

非胞子形成細菌は内生胞子を形成しないが，それらの非分裂状態においては形態学的な変化・特徴が見られる．細胞壁の肥厚は，非分裂状態のグラム陽性菌，*Mycobacterium* sp.（Cunningham & Spreadbury, 1998）およびグラム陰性 *Vibrio cholerae*（Kondo *et al.*, 1994）で観察されている．また，細胞壁を分析したところ，グラム陰性及びグラム陽性の両方において非分裂時にはペプチドグリカンの3→3架橋が増加している（Lavollay *et al.*, 2008; Signoretto *et al.*, 2000; Signoretto *et al.*, 2002）．3→3架橋の増加は加水分解酵素への耐性を高め（Lavollay *et al.*, 2008），また物理的破壊への耐性を高めると考えられている（Signoretto *et al.*, 2000）．*Mycobacterium* 属細菌では非分裂状態において細胞壁生合成に関与する遺伝子の発現上昇が報告されている（Asakura *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008）．

非分裂細胞が死んでいるのではなく，生存している

事を実証するには，それらの細胞の生育が再開する可能性を示すことが必要不可欠である（Oliver, 2000）. このプロセスは覚醒因子などによって休眠状態から回復し，続いて細胞分裂を行うという２段階の活性化を意味している．この過程においてサイトカインのような "Bacterial communication compounds" がこのような生育・増殖を開始するためのシグナルとして作用することが知られている．

増殖促進に関与するシグナル化合物，自己分泌成長因子，サイトカインなどは一般に生育因子（=growth factor）と呼ばれている（Kell & Young, 2000）．こうした生育因子は非分裂細胞を覚醒させ，また環境試料から生育させる細胞の数を増加させることが示されている．最も広く研究されている生育因子は，環状アデノシン一リン酸（cAMP），及びN-アシルホモセリンラクトン（AHLs）である．これら生育因子の多くの研究は専ら病原性微生物を材料に行われてきた（Dworkin & Shah, 2010; Keep *et al.*, 2006b）．しかしこうした生育因子の存在は病原体に限定されるものではない．休眠状態から覚醒するために必要な未知の生育因子を理解することで，環境試料からの培養効率を高めるための培養戦略に役立てることができると期待される．

Resuscitation Promoting Factor（Rpf）は，休眠細胞の覚醒（Mukamolova *et al.*, 1998）と増殖細胞のさらなる生育を促進するタンパク質である．細菌によって作られるRpfは，それ自身の生育に影響を及ぼすだけでなく，異種微生物に対しても活性も示す例が報告されている（Mukamolova *et al.*, 1998; Mukamolova *et al.*, 2002b; Shleeva *et al.*, 2002）．Rpf が休眠細胞の覚醒に関与する詳細なメカニズムは知られていないが，おそらく生育開始のためのシグナル分子として機能するペプチドグリカンフラグメントを生成することに関わっていると考えられている（Kana & Mizrahi, 2010）．Rpf のペプチドグリカン加水分解活性は，その保存領域である Rpf ドメインが担うとされ，この領域はＣタイプ・リゾチームと低いながらも配列相同性を示している（Cohen-Gonsaud *et al.*, 2004; Cohen-Gonsaud *et al.*, 2005）．しかしながらリゾチームと Rpf には機能的に有意な生化学類似性がないこと，あるいは Rpf の保存領域と高い類似性を示す既知のタンパク質がないことから，Rpf は新しい細菌のサイトカイン（Keep *et al.*, 2006a）であるととらえられている．

これまで，*rpf* 遺伝子を持つ細菌の培養後の培養上清の休眠覚醒活性を調べた例はいくつかあるが（Schroeckh & Martin, 2006），Rpf タンパク質を精製して試験した例は，*Micrococcus luteus*（Mukamolova *et al.*, 1998），*Mycobacterium tuberculosis*（Mukamolova *et al.*, 2002b）と *Corynebacterium glutamicum*（Hartmann *et al.*, 2004）の３つの種のみである．様々なバクテリアで見いだされる *rpf* 遺伝子はその構造に多様性があるが，その全てにおいて約70アミノ酸からなる保存領域（Rpf ドメイン）を含んでおり（Ravagnani *et al.*, 2005）それ以外の領域の保存性は高くはない．

Rpf の研究には２つの異なる重要な意義があると言える．ひとつは病原性微生物の生活様式である．特に *Mycobacterium* が原因菌である結核病においてその潜伏期（休眠状態）では抗生物質等の対処が有効でなく，それを覚醒させる技術の確立が重要である（Kana *et al.*, 2008; Mukamolova *et al.*, 1998; Wayne, 1994）．次に環境微生物学上の重要性である．上述のように環境資料には休眠細胞などの非分裂状態の微生物細胞が多数含まれているが，Rpf を含む培地においてはその培養効率が高くなるといった報告がある（Schroeckh & Martin, 2006）．このメカニズムの詳細を知ることにより，幅広く微生物の培養効率を向上させる技術開発が期待される．従って様々な微生物由来の多様な Rpf についてその遺伝子・機能について詳細に研究を進めることは非常に有意義である．

これまでの北海道大学の研究において 25,000 年前に形成された永久凍土層の氷楔中に，多数の細菌が保存される事を報告している．そしてこれらの系統分類解析において，大部分の分離株が *Actinobacteria* に属することが示されている（Katayama *et al.*, 2007）．また解析を進めた23株の *Actinobacteria* のうち，少なくとも17株においては，*Micrococcus luteus* の Rpf ドメインの遺伝子領域と類似の遺伝子を保有する事が推定されている（Katayama, 2009）．

本研究で用いられた *Tomitella biformata* AHU 1821^{T}（グラム陽性，非胞子形成細菌，放線菌）は上記永久凍土層の氷楔から得られた新属新種の細菌である．本菌株には *M. luteus* の Rpf タンパクの Rpf ドメインと 74% の相同性がある遺伝子が認められたため（Katayama, 2009），その周辺配列の解析を行い，全372アミノ酸からなる ORF を取得することに成功した．このタンパクの推定アミノ酸配列から，Ｃ末に Rpf ドメイン（Cohen-Gonsaud *et al.*, 2005），Ｎ末に30アミノ酸からなるシグナルペプチド，２つの DUF348 ドメイン（未知機能の領域），G5 ドメイン（推定細胞壁接着剤機能ドメイン）（Ravagnani *et al.*, 2005），を含むと予想された．このように既知の Rpf タンパクとの類似性が認められたことから，この遺伝子を本菌株の *rpf* 遺伝子として以降に用いた．

本研究では *Tomitella biformata* AHU 1821^{T} を対象に，休眠（非分裂状態）を誘導する条件について検討し，

また本株の覚醒因子と予測される新規の Rpf タンパクの自身に対する，あるいは異種微生物に対する活性・機能について研究を進めた．さらに非分裂状態の生理について知見を得るためゲノムおよびプロテオーム解析も試みた．

実験方法

培養条件

Tomitella biformata AHU 1821ᵀの栄養培養では Tryptic Soy Broth にフルクトースを加えた TSBF を用いたが，栄養制限培養では最小培地にフルクトースを添加したもの（MMF）に植え継ぎ，20℃ で10日間振盪培養し，その後静置培して培養を続けた．氷点下培養では TSBF 培地，20℃ で定常期まで培養した菌体を −4℃ に移し，静置した．酸素制限培養では TSBF 培地で生育した菌体を MMF に移し，酸素指示薬であるメチレンブルーを培地に添加し，密栓して20℃ で振盪培養を行った．振盪培養はメチレンブルーの青色が透明に変わるまで行い（おおよそ10日間），この時点で酸素が消費されたと推定して静置培養に切り換えた．実際に酸素が消費されたことをガスクロマトグラム（GC-2014; Shimadzu, Japan）でも確認した．

細胞数測定

分裂細胞の数はコロニー形成数（CFU）にて推定した．試料中の総細胞数，あるいは非分裂の生菌数は顕微鏡観察，Live/Dead Baclight staining kit（Invitrogen, USA）を用いて推定した．非分裂細胞数の計算は下記の式の通り行った．

$$\textit{Non dividing cells}\ (\%) = \frac{\textit{number of live cells} - \textit{number of culturable cells}}{\textit{number of live cells}} \times 100$$

透過型電子顕微鏡観察：増殖細胞の対数増殖期，定常期，酸素制限60日の非分裂細胞について電子顕微鏡で観察した．固定化した試料は ultramicrotome（Ultracut-N; Leichert-Nissei）で切片を作製・染色し観察した（80kV; H-7600; Hitachi, Japan）.

組換え Rpf（recombinant Rpf=rRpf）の発現

Escherichia coli を宿主とした場合は *E. coli* TOP10 および pBAD/gIII B expression vector（Invitrogen）をもちい，シグナルペプチドはベクターに準備されている *E. coli* 用のものに置換した（*T. biformata* の元の推定シグナル配列を削除し，ベクターに連結した）．*Rhodococcus* 属細菌を宿主にしたものは *Rhodococcus erythropolis* M1218 および pTip expression vector（Nakashima & Tamura, 2004）を用い，*T. biformata* の元来のシグナル配列をそのままクローニングした．また両発現系において，C 末端には His-tag 配列を付加している．*Rhodococcus* 属細菌は利用できる宿主ベクター系の中では最も *Tomitella* に近縁の微生物である．発現誘導は *E. coli* および *R. erythropolis* の系でそれぞれ終濃度アラビノース 1 mM，チオストレプトン 0.1 mg/l を増殖した培養液中に添加する事で行った．発現したタンパクは *E. coli* では菌体破砕物から抽出し，*Rhodococcus* 属細菌は培養液に放出されると推定できるため培養上清から濃縮した．いずれの手法も His-tag を利用し，Ni アフィニティーによる精製を行った．

RNA の抽出と RT-PCR

T. biformata を栄養培地で増殖させ，8, 72, 96, および 144 時間の時点でサンプリング，RNAprotect Bacteria Reagent（Qiagen, USA）および RNeasy Mini Kit（Qiagen）を用いて RNA 抽出を行った．また同時に生育曲線を作製して時間毎の培養ステージを明確にした．RT-PCR は *T. biformata rpf* 遺伝子の特異的配列を Primer に用い（J2TF2, 5'-CGCCGTCGTCGTCGGATTCCA-3' および J2TR2, 5'-ACGCGGAGGCCAAGCTTGCTG-3'），One-Step RT-PCR Kit（Qiagen）を用いて付属のプロトコール通りに行った．RNA の鋳型は全て一反応あたり 20 ng に調製した．

rpf 様遺伝子の収集と系統解析

M. luteus の Rpf ドメインのアミノ酸配列のみを用いて BLASTp による検索を行い，E-value で $1e^{-5}$ 以上の高い相同性が見られたものを選択し，その全アミノ酸配列（Rpf ドメインのみでは無く）を対象に ClustalW2, Neighbor-Joining 法，bootstrap 値 1,000 で配列解析，系統樹の作製を行った．

氷楔試料の調製と培養

T. biformata が単離されたアラスカの氷楔試料（氷塊）の表面をエタノールで洗浄，さらに引火させてエタノールを飛ばし，同時に表面の全体を溶かして内側を露出させた．これを室温放置し，溶け出した液体試料を接種源とした．培地は R2A 寒天培地を用い，抗カビ試薬としてナイスタチン 0.05 g/l とシクロヘキシミド 0.01 g/l を添加し，接種源を段階希釈したものを塗布して15℃ で 2 週間培養した．rRpf は希釈した接種源に塗布前に加え，試料と同時に培地に塗布した．

ゲノム解析

T. biformata AHU 1821^{T}のゲノムは，北海道システム・サイエンス株式会社（札幌）により提供されるイルミナ HiSeq 2000 ペアエンド技術を用いて決定した．この 101-bp のペアエンドシーケンシングによる配列決定において，高精度にフィルタ済みの全 19,282,552 配列による約 410 倍のゲノムカバレッジを取得した．ゲノムは Velvet のアセンブラバージョン 1.1.02（ハッシュ長，75塩基対）を使用してアセンブルを行ない，最終的に GC 含量 69.3%，N50 長 230,132 bp，合計 113 contig からなる全 4,709,534 bpを取得した．ゲノム配列の CDS 予測とアノテーションは MetaGeneAnnotator (http//www.migap.org/) を利用した．

プロテオームサンプル調製

T. biformata の分裂増殖期の細胞として，栄養培地（TSBF 培地）で対数増殖期後期まで生育した細胞を調製した．また非分裂状態の細胞として，第 2 節で確立した酸素制限による手法で調製した．細胞はスクリューキャップチューブにガラスビーズを入れ，ビーズビートにより破砕した（MPbio lysing matrix B 2ml tubes 0.1mm silica spheres）．タンパクの調製は FOCUS™ Bacterial Proteome（gbiosciences, USA）のキットを用い，プロトコール通りに行った．タンパク調製後の SDS-PAGE では 1 つのレーンに 40-50 μg ロードした．SDS-PAGE で分画したタンパクはそれぞれ分子量毎に 5 つのフラクションに分割した．これらのフラクションは非分裂細胞（Dormant）由来のサンプルを大きいものから D1_1－D1_5 とし，増殖期（Active）のサンプルを同様に大きい方から A1_1－A1_5 とした．これをゲル内トリプシン消化し，更に調製したサンプルを分子量解析した．得られた質量データをドラフトゲノムデータと全推定タンパクのデータと付き合わせることで，検出した分子量のタンパクを同定した．質量分析は北海道大学分析センターで行い，検出機材はリニアイオンイオントラップ電場型 FT 質量分析装置，LTQ Orbitrap Discovery（Thermo Fisher Scientific）を用いた．

結果および考察

休眠（非分裂状態）の誘導

栄養制限培養，氷点下培養，酸素制限培養の 3 つの条件で *T. biformata* AHU 1821^{T}の非分裂細胞の誘導を試みた．しかし栄養制限培養，氷点下培養では休眠細胞は誘導されず，酸素制限培養のみで非分裂細胞と思われる状態に誘導された（Fig. 1）．酸素制限の後，おおよそ30日から60日で 99% の生細胞が非分裂状態であると推定される．この株が単離された氷楔では低温，低栄養であるが，これらの 1 つの単純な条件では非分裂状態に誘導されないことは興味深い．また氷楔環境は酸素制限条件でもあり，実際に氷楔中で本株が休眠あるいは非分裂状態であったことも考えられる．また電子顕微鏡観察においては酸素制限60日の試料において特徴的な構造も見られた（Fig. 2）．対数増殖期においてはほぼ桿菌であり，細胞質の密度も高い様に思わ

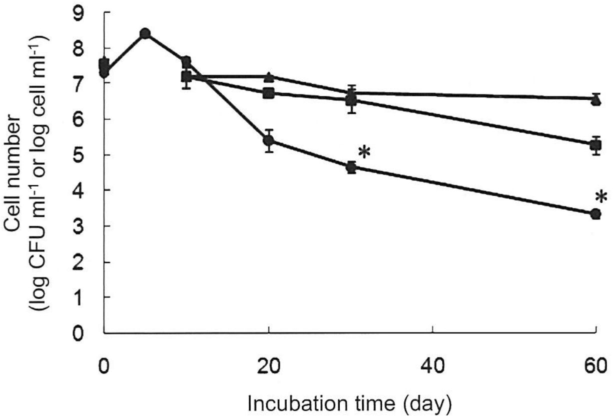


Fig. 1 Induction of *Tomitella biformata* cells into a non-dividing state by prolonged incubation in mMMF under oxygen limited conditions at 20℃. Number of total cells in population (▲), live cells determined by PI impermeability (■), and CFU count on TSBF agar medium (●). Bar depict standard deviations (n=3).
* Significantly different ($p<0.05$) number of dividing cells compare to number of live cells based on paired t-test.

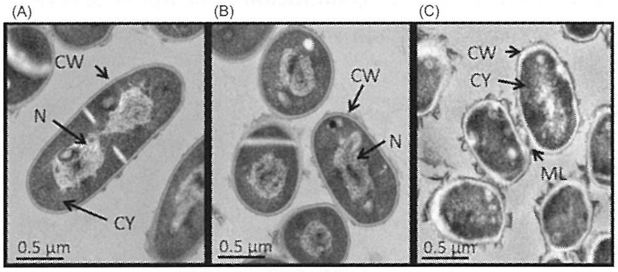


Fig. 2 Representative transmission electron micrographs (TEM) of *Tomitella biformata* cells in different growth phase. (A) Early logarithmic-phase cells (TSBF medium, 48 h). (B) Early stationary-phase cells (TSBF medium, 72 h). (C) Oxygen expended cells (MMF medium, hypoxic condition, 60 days). CY: cytoplasm, N: nucleoid, CW: cell wall, ML: mucosal layer.

れる（Fig. 2A）．また核様体もはっきりしている．定常期細胞においても核様体ははっきりしており，更に実体不明の封入体が大きな割合を占めている事が分かる（Fig. 2B）．対照的に酸素制限60日の細胞は密度が薄く，核様体もはっきりしない（Fig. 2C）．このような状態は他の微生物 *Rhodococcus rhodochrous*, *Mycobacterium smegmatis*（Anuchin *et al.*, 2009; Shleeva *et al.*, 2002）などの非分裂状態でも報告されている．またこの試料は細胞壁の肥厚が見られるが，これも *M. tuberculosis* の酸素制限下の非分裂細胞での報告と一致している（Cunningham & Spreadbury, 1998）．これらの結果，本菌株は酸素制限下で非分裂状態に誘導されると結論づけた．バイアルのヘッドスペースの経時的な酸素消費，および培養液中の指示薬の色の変化から，明らかに本菌株が酸素を自身で消費したと考えられる．この過程において定常期の細胞が非分裂細胞になると推定される．好気性の放線菌である本菌株が酸素制限下で非分裂状態になり，生残率を高めようとする戦略は理にかなっている様に思われる．興味深いことに，酸素を菌自身に消費させるのでは無く，人為的に酸素を急激に除去すると非分裂細胞は誘導されない．このことからも徐々に変化する周辺の環境に適応して非分裂細胞となるように思われる．

T. biformata AHU 1821^{T} Rpf の異種発現

Rpf が分裂細胞を活性化させ，また非分裂細胞を覚醒させる正確なメカニズムは知られておらず，おそらく細胞壁分解によって生じるペプチドグリカンの断片がシグナルとなって細胞分裂を引き起こすと考えられている（Mir *et al.*, 2011; Kana & Mizrahi, 2010）．Rpf の活性の検出は組換えタンパクによって行われ，*M. luteus* と *M. tuberculosis* からの Rpf は *E. coli*（Mukamolova *et al.*, 2002b; Mukamolova *et al.*, 2006）をホストに，また *C. glutamicum* では Rpf は変異体 *C. glutamicum*（Hartmann *et al.*, 2004）をホストに用い，発現・試験されている．

本研究では上記実験方法に示した方法で *rpf* 遺伝子を発現ベクターにクローニングし *E. coli* および近縁の *R. erythropolis* を宿主に発現を試みた．まず *E. coli* から生産した rRpf（=rRpf-E）タンパクを SDS-PAGE に供したところ，32, 39, 42, 49 kDa の 4 サイズにバンドが認められた（Fig. 3A）．その中で His 抗体による Western 解析で強いシグナルが得られたものは39と42 kDa のバンドであった（Fig. 3B）．配列から推定される rRpf のサイズは 38 kDa であり，どちらも一致はしないが近い値であった．これら 4 バンドの全ての N 末アミノ酸配列解析を行ったところ，全て推定 rRpf と部分的に一致する配列で有り，それぞれ部分的に分解されたタンパクである事が示された．それぞれ別々の位置で N 末が削除されていると考えられ，推定シグナル配列切断部位で切れているもの（42 kDa）もあったが，シグナルが全て残っているもの（49 kDa）もあった．その他の 2 つは推定シグナル配列切断部位よりも下流配列で切断されている事が示された．これらはこれ以上精製で分離することはかなり難しいと考えられるため，活性の検出にはこれらが混合した状態で用いた．

R. erythropolis から生産した rRpf（=rRpf-R）は SDS-PAGE においては 2 本のバンドが得られた（Fig. 3C）．さらに N 末アミノ酸配列解析を行ったところどちらも *E. coli* で得られた 39 kDa のバンドと同じ配列が得られ，この位置で切断されるタンパクである事が推定された．サイズの異なるタンパクが同じ N 末配列を有する理由については解明出来無かったが，*R. erythropolis* において翻訳後修飾が行われた可能性が考えられる．*C. glutamicum* の RpfB の研究ではマンノース，ガラクトースによる修飾が報告されている（Mahne *et al.*, 2006）．*E. coli* と *R. erythropolis* で同じ位置で切断された rRpf が得られたため，元来この位置で切断されるタンパクである事が考えられる（潜在的な自己消化機

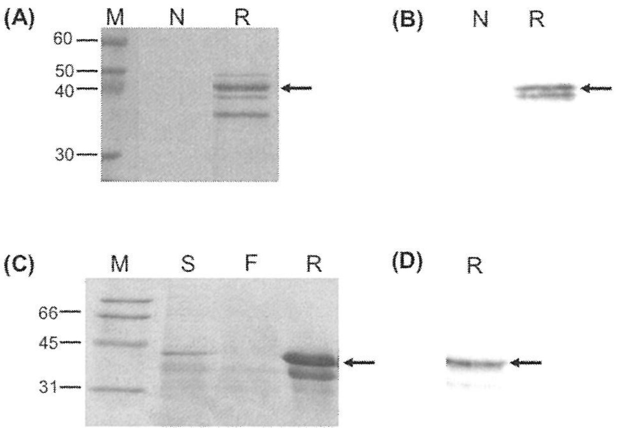


Fig. 3 Expression and purification of histidine tagged recombinant Rpf (rRpf) protein from *Escherichia coli* TOP 10 (A, B) and *Rhodococcus erythropolis* M1218 (C, D) confirmed by SDS-PAGE (A, C) and Western blot hybridization analysis using anti-His antibody (B, D). Arrow in panel A, B shows the 42-kDa rRpf variant protein (expected calculated size 38 kDa); in panel C,D shows the 39 kDa rRpf variant protein. M; molecular weight standard, N; non-induced *E. coli* cells lysate fraction, R; histidine-tagged recombinant Rpf protein fraction, S; culture supernatant, F; flow through fraction in purification step.

能）．*R. erythropolis* の場合も活性の検出にはこれら 2 バンドのタンパクが混合した状態で用いた．

rRpf の増殖促進，分裂開始促進活性

E. coli で調製した組換え Rpf（=rRpf-E）および *R. erythropolis* で調製した組換え Rpf（=rRpf-R）による *T. biformata* の分裂細胞の生育促進効果（液体培養）について調べた．rRpf-E においては 6.4 あるいは 128 nM の濃度で，12日間の lag phase を10日間あるいは 5 日間に短くする活性が得られた（Fig. 4A）．rRpf-R においても同様に lag phase を短くする活性が得られ，100 nM において20日を16日にする効果が得られた（Fig. 4B）．これらから rRpf-E，rRpf-R ともに増殖細胞の生育促進活性がある事が示された．

次に非分裂細胞に対する Rpf の分裂開始効果について調べた．試験開始の時点で，非分裂細胞は計算上 9.3 cell/ml を植菌している．500 nM および 50 nM の rRpf-E を加えた系において，15日目および18日目で生育が観察され，何も入れないコントロールは24日目まで生育が認められなかった（Fig. 5A）．rRpf-R の場合（非分裂細胞は計算上 37.2 cell/ml を植菌），1 および 10 nM の系では特に効果が見られなかったが，0.1 nM の系では有意に生育が早い事が観察された（Fig. 5B）．このことから rRpf-E，rRpf-R ともに非分裂細胞の分裂を開始させる機能があると考えられる．この時 rRpf-E よりも rRpf-R でより低い濃度での活性が観察された．これはタンパクの精製度の違いによるものとも考えられる．また各系において分裂細胞は計算上 0 cell であるが，コントロールにおいても最終的には増殖が確認されている．このことは生育細胞が実際にはわずかに

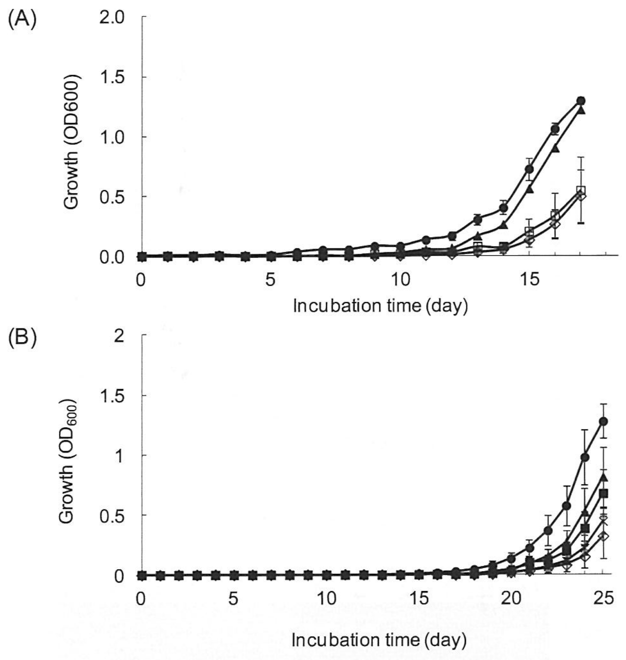


Fig. 4 Growth promoting activity of *Tomitella biformata* recombinant Rpf expressed in *Escherichia coli* TOP 10 (A) and *Rhodococcus erythropolis* M1218 (B) system on *T. biformata* culture. Logarithmic phase of *T. biformata* cells grown in TSBF medium were washed properly diluted and transferred to mMMF medium with addition of rRpf fraction to the final concentration of 128 nM (●) and 6.4 nM (▲) in (A); and 100 nM (●), 10 nM (▲), 1 nM (■), and 0.1 nM (×) in (B). Culture added with sterilized distilled water (◇) and non-induced cell lysate fraction (□) in (A); and (mMMF) in (B) were served as control. Initial cell concentration of *T. biformata* in mMMF culture was 6.76×10^2 CFU mL^{-1} (A) and 3.10×10^2 CFU mL^{-1} (B).

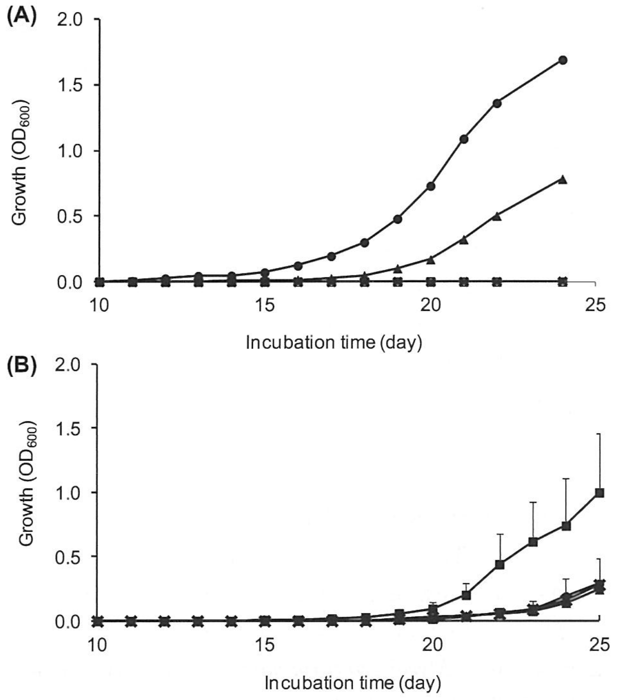


Fig. 5 Resuscitation of *Tomitella biformata* AHU1821^T in liquid medium in the presence of recombinant Rpf expressed in *Escherichia coli* TOP 10 (A) and *Rhodococcus erythropolis* M1218 (B) system. *T. biformata* cells from 60 days oxygen limited cultures were washed and diluted prior to inoculation into mMMF medium containing final concentrations of 500 nM (●) and 50 nM (▲) of rRpf in (A); and 10 nM (●), 1 nM (▲), 0.1 nM (■) in (B). Controls were culture added with sterilized distilled water (◇), non-induced cell lysate fraction (□) (in A), or mMMF medium (□) (in B). Initial non-dividing cell concentration of *T. biformata* in mMMF culture was 9.3 cell mL^{-1} (A) and 37.2 cell mL^{-1} (B) (with no dividing cells present theoretically).

含まれていたか，あるいは非分裂細胞がRpfなしでもランダムに非分裂状態から回復し分裂を開始する可能性を示している．またRpfの分裂増殖開始活性については寒天固体培地についても試験した．この試験では128 pMのrRpf-E，300 pMのrRpf-Rを用いたが，目立った活性を得る事は出来無かった．このことは液体培地と寒天培地の物理的な違いが影響したことが考えられる．液体培地中での細胞はRpfと反応するチャンスが何度もあり得るが，寒天上の細胞は一旦うまく反応しないとRpfが寒天内に取り込まれ反応しにくくなる，あるいは表面が乾いてしまう，などによる影響が考えられる．これら寒天培地上でRpfの活性が失われるという知見は他にも報告されている（Kaprelyants *et al.*, 1994; Mukamolova *et al.*, 2002a）．

これらの結果からRpfに上記の様な活性がある事が示されたが，これまでの報告のRpfとはいくつか異なる点が見いだされる．まず機能する濃度であるが，*M. luteus*の場合，pMのオーダーであったが，本研究ではnMのオーダーであった．また*T. biformata*のRpfは低濃度で植菌した場合に生育促進効果があったが，*M. tuberculosis* rRpfBでは近縁種の*M. bovis*に対する生育促進効果は得られなかった．

今回の結果からRpfが全ての非分裂細胞に機能し分裂を再開させた訳では無い事が推定される．もし植菌した全ての非分裂細胞が生育を開始したならlag phaseはかなり短くなるはずである．このことからRpfの機能は限定的であるか，非分裂細胞にもRpfに反応して分裂するものとしないものがある事が考えられる．

*rpf*遺伝子の発現解析（RT-PCR）

上記の試験において*T. biformata*由来の組換えRpfに活性がある事が確認された．しかし元の菌株における発現についてはこれまで確認されていない．*M. tuberculosis*や*Mycobacterium bovis*では野生株の培地中にRpfがWesternで検出できるレベルで発現していることが示されている．そこで本研究では実際に*T. biformata*のRpfが発現しているか，またそれはどのタイミングであるか，を調べるため，RT-PCR解析を行った．

Fig. 6に生育曲線，培養時の細胞数，およびRT-PCRの結果を示した．この結果から*rpf*遺伝子が実際に*T. biformata*で発現している“Active”な遺伝子である事，また培養初期よりも後期，対数増殖期の初期よりも中後期で発現量が多い事が示された．盛んに分裂している状態でRpfが発現している事が確認されたが，これが非分裂状態の細胞に作用すると仮定すると，現在の状況が増殖に適切な状態である事を知らせるシグナルになるという考えと矛盾しない．

T. biformata AHU 1821^T Rpfの系統的な特徴

これまでRpfは*Actinobacteria*（高GCグラム陽性細菌）からのみ見いだされている．これまでに研究に用いられた遺伝子の他に，ゲノム解析から様々な推定*rpf*遺伝子の存在が示唆されているが，他の分類群におけるRpfについてはその存在自体が詳しく調べられていない．これらの*rpf*様遺伝子も含め，*T. biformata*のRpfが系統発生上どのような位置づけになるのかを調べた．

データベース上の全ての配列を対象にRpfの検索を行ったが，今回の条件で得られたRpf様タンパクの配列は全て*Actinobacteria*由来であった．検索した時点で306の*Actinobacteria*ゲノムが利用出来たが，このうち202株においてRpf様配列が見いだされ，そのコピー数は1から7であった．このことから*Actinobacteria*においてはRpfが広く保存され，重要な

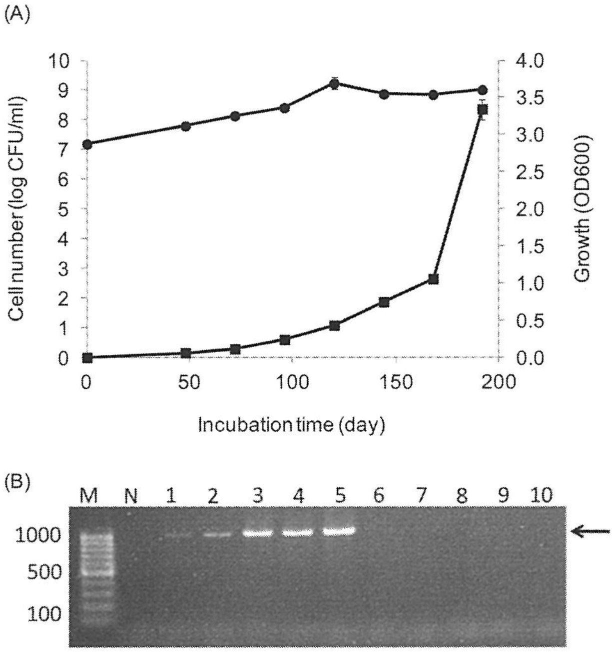


Fig. 6 Expression of *rpf* homolog gene in *Tomitella biformata* during growth phase. (A) Cell concentration (●) and OD value at 600 nm (■) of *T. biformata* culture grown in MMF medium at 20℃ 140 rpm. (B) RT-PCR products obtained from *Tomitella biformata rpf* gene. RNA was extracted from *T. biformata* cells during bacterial growth in MMF medium (120 rpm, 20℃) for lane 1; 0 h, lane 2; 48 h, lane 3; 72 h, lane 4; 96 h, and lane 5; 144 h. Lane 6-10; DNA detection of sample in lane 1-5, respectively, M; DNA 100 bp ladder, N; Negative control. Arrow shows the product (994 bp).

役割を持つものと推定される．系統樹を Fig. 7 に示した．この系統樹からアミノ酸配列全体による分析でも *T. biformata* の Rpf が RpfB サブファミリーに属する事が示された．またこの中でも *T. biformata* の Rpf は独立したブランチを形成している事が認められる．最も近縁の Rpf は *Rhodococcus opacus* B4 ゲノム由来のものであるが，Rpf の研究はされていない．これまでに研究されている *M. tuberculosis* の RpfB（NP_215525）とは 46% identity, 61% similarity であり，*C. glutamicum* の Rpf2（NP_600137）とは 43% identity, 59% similarity であった．ドメイン構造はそれぞれ異なり，機能未知である DUF348 ドメインは *M. tuberculosis* の RpfB では

Fig. 7 Neighbor-joining tree of ClustalW2 aligned deduced amino acid sequence from *T. biformata rpf* gene and related proteins from completed genome sequences of *Actinobacteria*. Potential Rpf subfamilies based on relatedness to *Mycobacterium tuberculosis* sequences in which functional analyses have been performed (Mukamolova *et al.*, 2002b). Asterisks indicate proteins whose functional activities have been tested.

その分子内に3回重複し，*T. biformata* Rpf と *C. glutamicum* RpfB は2回重複であった．また *M. tuberculosis* と *T. biformata* Rpf では G5 ドメインがあり，*C. glutamicum* RpfB には認められず，さらにそれぞれのドメインを結ぶ接続領域の長さなども異なっていた．このことからも Rpf には大きな多様性が有り，*T. biformata* Rpf は特にユニークなタイプである事が示された．

T. biformata AHU 1821^T Rpf の異種微生物・環境微生物群に対する効果

RPF 配列を有する細菌の由来は，特定の環境に限定されるものではなく，ヒトの微生物群集，植物の根圏，汚染土壌，深海の海洋堆積物，温泉流出水，および下水汚泥を含む様々な場所から単離されている．これらの微生物の Rpf が自身のみではなく，他種微生物の生育や増殖に広く影響することも考えられる．本研究でのこれまでの結果は *T. biformata* の Rpf が機能的であることを実証し，それは自身の生育促進，または非分裂細胞を分裂させる効果であった．ここでは *T. biformata* Rpf の種を超えた活性（cross species activity）を調べるため，*T. biformata* が単離された永久凍土の氷楔環境の試料を対象に試験を行った．

ここでは *E. coli* で調製した Rpf-E を用い，*T. biformata* の単離源である氷楔試料の CFU 増大効果について調べた．2回の独立した試験を行っているが，それぞれ氷塊としては別のものを用いている（採集した地点としてはアラスカのフォックストンネルで一致している）．そのため氷塊によって土砂や土壌の含まれる割合，また微生物の含量も差があることがある．今回試験した1回目は 3.25 CFU，2回目は 60.3 CFU/plate であった（Rpf を加えないコントロールのシャーレ，培養8日目）．Rpf の効果を調べた結果を Fig. 8 に示す．1回目の結果として，Rpf-E を 1,000 または 1,500 pM 添加した系では加えないコントロールと比較し，明らかに CFU の数が増えており，その差は10日目の時点で 2.5 から 3.5 倍となっていた．しかし低濃度 54 pM では CFU 数の増大は認められなかった（Fig. 8A）．2回目も同様の結果が得られ，1,500 または 1,000 pM の Rpf を加えた系においてコロニーは明らかに多数生育しており，8日目の時点でコントロールに比べ4から5倍の CFU が認められた（Fig. 8B）．生育したコロニーの 16S rRNA の部分遺伝子配列を解析した結果，CFU の増大に主に貢献していたもの（コントロールよりも Rpf 培地で多く出現した微生物）は *Brevibacterium* 属および *Arthrobacter* 属である事が示された．この分析を行う上で，*Tomitella* 属と思われる微生物のコロニーは新たに見いだされなかった．本菌株は元々の単離時にも数多くは得られておらず，環境中に多数存在する種ではない事が考えられる．また同じサンプリング地でも異なる氷塊を溶かして用いるため，微生物群も異なっていたと思われる．

今回得られた結果により，Rpf が環境試料の CFU 増大に効果を示し，新たな微生物探索の方法の1つとしても可能性を示した．今回の活性が増殖促進効果によるものであるか，または非分裂細胞の覚醒活性による

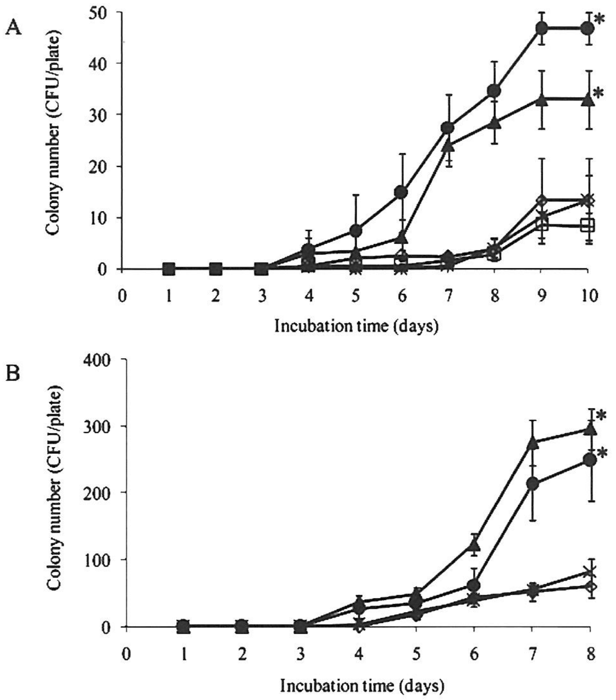


Fig. 8 Addition of rRpf-E fraction increased the colony formation from melted ice wedge samples on agar medium. Melted ice was serially diluted and plated on 10-fold-diluted LB agar medium with antibiotics. (A) Total colony number from 10^{-2} diluted sample counted on 1/100 LB agar media plates. Media were amended with various concentration of rRpf fraction (diluted with sterilized distilled water) to the final concentration of 54 pM (×); 1000 pM (▲); and 1500 pM (●). The same volume of sterilized distilled water (◇) and non-induced cell lysate fraction (□) were served as control. (B) Total colony number from 10^{-4} diluted sample counted on 1/100 LB agar media plates. Media were amended with various concentration of rRpf fraction (diluted with 0.85% NaCl) to the final concentration of 500 pM (×); 1000 pM (▲); and 1500 pM (●). The same volume of 0.85% NaCl (◇) was served as control. Plates were incubated at 15℃ for indicated days. (n=3). * $p<0.05$; compared with the corresponding colony number of control plates.

ものかは明らかではないが，可能性は双方考えられる．前者であれば長い時間をかければコロニーが現れる場合でもより短い培養期間でコロニーが得られ，後者であれば通常の培地で生育しないものが得られると期待される．今回得られた *Brevibacterium* 属および *Arthrobacter* 属は共に *Actinobacteria* であり，Rpfとの関連が深い．これらが *T. biformata* Rpfの活性で実際に生育促進されたのか，非分裂状態から分裂を開始したのか，についてはさらなる研究が必要である．結果としてRpfが cross species activity を示す事が強く示された．

T. biformata AHU 1821^T のゲノム解析

Tomitella biformata AHU 1821^T はこれまでゲノム情報は解析されておらず，また新属新種として単離され，さらにUnclassified family（科として未定）であるため，近縁種のゲノム情報を利用することが出来なかった．そこで今後の遺伝学的研究を推進するため，本菌株のゲノム解析を行うこととした．またゲノム情報が得られた後には，さらにプロテオーム解析を行うこととした．非分裂状態の細胞でどのような遺伝子が発現しているかについて情報を得る事で，非分裂（休眠時）の細胞の生理状態について知る事が可能になると思われる．

T. biformata の推定ゲノムサイズは約4.7Mであり，近縁の微生物の中では *Corynebacterium*（約3M程度）よりも大きく，*Rhodococcus* や *Mycobacterium*（約7-8M）よりも小さかった．ドラフトゲノム配列は4464の推定タンパクコード領域（coding sequence = CDS），50の推定tRNAが含まれていた．またアノテーションによって，これまで研究に用いてきたrpf遺伝子に加えRpfドメインを持つと思われる推定タンパクの遺伝子がさらに6つ見いだされた．しかしRpfBのサブファミリーに含まれるものは，本実験で研究対象としたものの他には無かった．*Mycobacterium* 属細菌においてはRpfBは5つのRpfコピーのなかでも主として機能しているRpfと考えられており，*T. biformata* でもクローニングし活性試験を行ったRpfが主として機能すると推定している．今回全7コピーのRpf様タンパク遺伝子が認められたが，*Rhodococcus* 属でも7コピー見いだされており，これと共に1つのゲノム中の数としては最大数となった．また，ゲノムには潜在的に低温適応に関連する役割を持ついくつかの遺伝子が存在する事が確認され，それらは，chaperoninのGroEL，Gro ES，RecA，コールドショックタンパク質の遺伝子であった．

本結果は氷楔試料の分離株の最初のドラフトゲノム配列の報告となる．この情報は低温適応菌のドラフトゲノムとしてだけでなく，その他の特殊環境条件での適応または生存メカニズムについての新たな情報を提供すると期待される．また新属新種である事から系統発生，比較ゲノム，メタゲノム，および機能研究のための重要な情報源となる．今後 *T. biformata* での詳細な遺伝学的な研究が可能になった事は非常に有利な点となった．

このドラフトゲノムの塩基配列はアクセッション番号BAVQ00000000としてDDBJ/ EMBL/ GenBankに寄託された．

プロテオーム解析

SDS-PAGEによって，分裂細胞だけで無く，長期間無酸素状態で静置された細胞もタンパクがほとんど分解されずに細胞内に保存されている様子が認められた(Fig. 9A)．質量分析によって多数のペプチドマスを同定することに成功した．それぞれ5つに分画（Fig. 9B）したサンプルは別個に質量分析を行い，得られたデータはそれぞれ結合して非分裂細胞（Dormant）からのサンプルをD1あるいは増殖期細胞（Active）からのサンプルをA1とした．D1は全15,471スペクトル，1,002のタンパクを検出･同定した．A1からは全15,872スペクトル，1,454のタンパクを検出･同定した．これら観測されたスペクトルの中には上記の異種発現に用いたRpfはD1に1スペクトルが1回得られたのみで，A1からは全く得られなかった．Rpfタンパクは菌体外

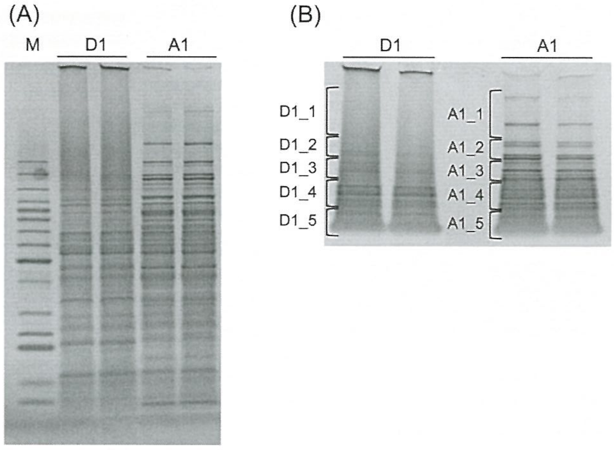


Fig. 9 SDS-PAGE analysis of proteins prepared from dormant (D1) and active (A1) cells of *T. biformata*. (A) Full-run electrophoresis of the proteins (50 μg/lane). M; molecular weight standard. (B) Partial-run electrophoresis of the proteins for excision (40 μg/lane).

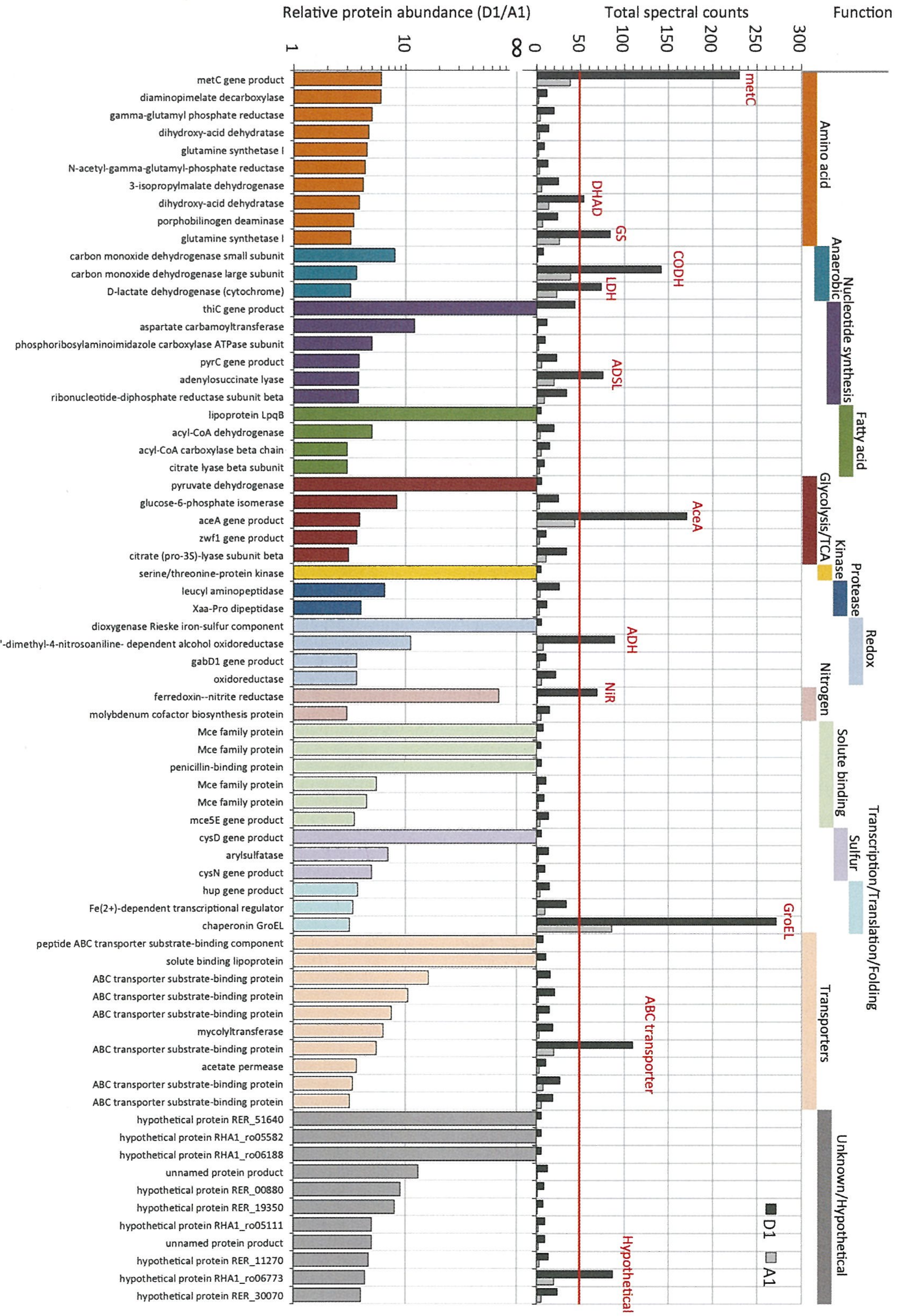


Fig. 10 Proteins identified in dormant cells of *T. biformata*. Proteins were grouped according to its deduced function (top). Total spectral count obtained from both D1 and A1 were indicated at the middle. Horizontal line indicates the threshold of 50. Relative protein abundance (D1/A1) of the proteins were indicated at the bottom. Twelve proteins that are induced in dormant cells (over 3 for D1/A1 value) and are highly abundant (over 50 counts in D1) were also indicated at the middle (abbreviation, in red letters).

に排出されると予想され，今回の菌体のみから調製した試料にはほとんど含まれなかった事が考えられる．また発現していても細胞中に占める Rpf タンパク量は非常に低いとも考えられる．またゲノム解析で見いだされた他の Rpf 様タンパクは A1, D1 のどちらにも全く検出されなかった．

これらの中から検出頻度が高く検出されたタンパクを抽出するため，各タンパクについて個別の 2 種以上のペプチドが全部で 5 スペクトルカウント以上得られたもののみを選抜した．その結果 D1 は全 14,322 スペクトル，465 のタンパク，A1 からは全 13,656 スペクトル，568 のタンパクを検出･同定した．これらのタンパクの中から非分裂細胞で特異的に，あるいは増殖期細胞と比較して多く検出されるタンパクに集中して解析するため，465 のタンパクについてその検出スペクトル数の D1/A1 値を求め，グラフ化した（Fig. 10）．これらの中から D1/A1 値が 3 以上のもので，D1 のトータルスペクトルカウントが50以上のものをさらに選抜して表にまとめたものが Table 1 であり，12のタンパクが得られた．

これらの12タンパクの中にはグリオキシル酸回路あるいは糖新生に関与するイソクエン酸リアーゼ（AceA）が見いだされた．本非分裂細胞は長期間にわたって酸素制限を行い，同時に栄養制限状態となっていることから，D1 サンプルに比較的多く AceA が検出されたことは合理的であるように思われる．また glutamine synthetase（GS）も D1 で多く見られている．GS は通常の栄養培地では発現が抑えられており，厳しい窒素源制限下（アンモニア制限下）あるいは窒素源がグルタミン酸しか利用出来ない場合に強く発現することが報告されている（Woolfolk *et al.*, 1966）．本試料も非分裂状態の誘導時に窒素源の枯渇といった状況が想定され，GS が高く発現したことも合理的と考えられる．シスタチオニンベータリアーゼ（MetC）はシステインからメチオニンを産生するステップに関わる酵素であり，その過程ではアンモニアを生じる．さらに

Table 1 Twelve proteins abundantly identified in dormant cells of *T. biformata*

Abbreviation	Database protein annotation
MetC	gi|379707227|ref|YP_005262432.1| *metC* gene product [*Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2]
DHAD	gi|226305882|ref|YP_002765842.1| dihydroxy-acid dehydratase [*Rhodococcus erythropolis* PR4]
GS	gi|226307110|ref|YP_002767070.1| glutamine synthetase I [*Rhodococcus erythropolis* PR4]
CODH	gi|111021943|ref|YP_704915.1| carbon monoxide dehydrogenase large subunit [*Rhodococcus jostii* RHA1]
LDH	gi|111025096|ref|YP_707516.1| D-lactate dehydrogenase (cytochrome) [*Rhodococcus jostii* RHA1]
ADSL	gi|111021758|ref|YP_704730.1| adenylosuccinate lyase [*Rhodococcus jostii* RHA1]
AceA	gi|379711227|ref|YP_005266432.1| *aceA* gene product [*Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2]
ADH	gi|226305266|ref|YP_002765224.1| N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline-dependent alcohol oxidoreductase [*Rhodococcus erythropolis* PR4]
NiR	gi|111018261|ref|YP_701233.1| ferredoxin--nitrite reductase [*Rhodococcus jostii* RHA1]
GroEL	gi|111023153|ref|YP_706125.1| chaperonin GroEL [*Rhodococcus jostii* RHA1]
ABC transporter	gi|226303552|ref|YP_002763510.1| ABC transporter substrate-binding protein [*Rhodococcus erythropolis* PR4]
Hypothetical	gi|111023731|ref|YP_706703.1| hypothetical protein RHA1_ro06773 [*Rhodococcus jostii* RHA1]

ferredoxin-nitrite reductase（NiR）はアンモニアと亜硝酸を変換する酵素である．また adenylosuccinate lyase（ADSL）はプリンリボヌクレオシド合成（再合成）系酵素である．これらからアミノ酸，核酸または窒素化合物の代謝，同化あるいは再利用に関する酵素が非分裂細胞に多く存在していた事が示されたが，いずれも低栄養環境の場合に機能する酵素として合理的であるように思われる．また非分裂細胞ではストレスレスポンスであるタンパクとして知られるシャペロンの GroEL が高く発現していたが，*Mycobacterium* の場合でも嫌気環境下の培養 2 週間での発現が報告されている（Gopinath *et al.*, 2015）.

興味深いタンパクとして，carbon monoxide dehydrogenase（CODH，D1/A1 値 3.6）があった．12 のタンパクの中では Large subunit のみが選抜後に残っていたが，この CODH は Large, Medium, Small の 3 サブユニット酵素であり，詳細に調べたところ Medium, Small サブユニットも D1/A1 値がそれぞれ 2.1, および 8 で，トータルスペクトルカウントが44および 8 となっている事が分かった．分子量の大きいタンパクはトータルカウントも大きく出る事になるため，今回の CODH のケースでも Large サブユニットのみが12のタンパクに残ったが，実際には全てのサブユニットが非分裂細胞に比較的多く存在していた事が示された．CODH の機能は CO から CO_2 に変換する事であり，CO を唯一の炭素源，エネルギー源として利用できる Carboxidotroph（=carboxidotrophic bacteria or carboxydobacteria）とされる微生物が持つ機能の遺伝子である．近年好気微生物の CODH の研究が進んでおり，*Tomitella* も含まれる order *Corynebacteriales*（コリネバクテリア目）にこの遺伝子が広く存在する事も示されている．また *Mycobacterium* においてはその詳細な機能も明らかになりつつある（Kim & Park, 2012）．これは好気条件下で（おそらく極度に低栄養条件で），CODH が ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase（RuBisCO）と共同して炭酸固定を行うというものである．しかし *Mycobacterium* の場合は構成的発現であるとされており，*Tomitella* で非分裂細胞に比較的多く見いだされた事と一致するかどうかは不明である．*Tomitella* が炭酸固定を行う Carboxidotroph であるかどうか現在のところ明確に出来てはいないが，極度に栄養制限が起こった状態で CODH が発現して炭酸固定系を駆動し，環境順応を試みたとする予想は極めて合理的である．今後のさらなる研究において低酸素状態あるいは低栄養状態での非分裂細胞の生理状態について重要な情報が得られると期待している．

要　約

60日間の酸素制限条件により *T. biformata* が非分裂状態になることが示された．この状態で生存している細胞のうち，寒天培地上でその99%がコロニー形成能を失っている．TEM による観察では膜の構造は保持されているものの，形態的には細胞壁の肥厚など特徴的な変化が見られた．異種発現した *T. biformata* の Rpf は増殖促進効果，また非分裂細胞に対する分裂促進効果が認められた．しかしその有効濃度は他の Rpf の報告例と比べかなり高かった．また Rpf のドメインはリゾチームと類似性を示すとされているが *T. biformata* の Rpf にはリゾチーム活性は認められなかった（市販のリゾチーム活性検出キットによる，データなし）．Rpf の系統学的解析では *T. biformata* の Rpf がかなり新規性の高いものであることが明らかになった．新属新種である *T. biformata* からユニークな Rpf が見いだされ，機能・活性としてもユニークである事が考えられた．また *T. biformata* の Rpfはcross species activity があると考えられた．ゲノム解析においては約 4.7 M の配列が解読され，この中には異種発現に用いた RpfB サブファミリーに属する *rpf* 遺伝子の他にさらに 6 コピーの Rpf 様タンパク遺伝子の存在が明らかになった．これはこれまでに報告のある単一ゲノム中のコピー数として最大級であった．プロテオームの解析からは増殖時と休眠時において発現するタンパクのいくつかに明確な差異が見られた．特に carbon monoxide dehydrogenase と推定される遺伝子の発現上昇が認められた．このことは，休眠状態における *T. biformata* が生存戦略を切り換えて環境適応を試みたことを示唆するものであるが，この実態の解明にはさらなる研究が必要である．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1) 山岸卓弥，片山泰樹，田中みち子，福田正己，Brouchkov Anatoli，浅野行蔵 2010．永久凍土氷楔からのメタン資化菌単離の試み．日本農芸化学会2010年度大会（東京）
2) 上原萌，片山泰樹，田中みち子，鎌形洋一，浅野行蔵 2010．アラスカ永久凍土氷楔単離株の覚醒因子について．日本農芸化学会2010年度大会（東京）
3) 上原萌，Indun Dewi Puspita，片山泰樹，田中みち子，北川航，浅野行蔵，鎌形洋一 2010．氷楔単離株の覚醒因子様蛋白質は自己の増殖を促進した．日本農芸化学会2011年度大会
4) Indun Dewi Puspita, Moe Uehara, Taiki Katayama,

Michiko Tanaka, Yoichi Kamagata, Kozo Asano 2011. Rpf-like protein from *Tomitella biformata* promotes the growth and resuscitates from non-dividing state. IUMS2011, および日本放線菌学会2011年度大会（札幌）（ポスター賞受賞）

5) Indun Dewi Puspita, 上原萌, 片山 泰樹, 田中みち子, 北川 航, Cindy H. Nakatsu, 鎌形 洋一, 浅野行蔵 2012. Rpf protein from *Tomitella biformata* AHU 1821^T increase the number of cultivable bacteria from permafrost ice wedge. International Symposium on Microbial Ecology (ISME 2012)（コペンハーゲン）
6) 不野健太郎, Indun Dewi Puspita, 上原萌, 北川航, 田中みち子, 鎌形洋一 2012. Induction of dormancy in ice wedge isolates and characterization of dormant cells. International Symposium on Microbial Ecology（ISME 2012)（コペンハーゲン）
7) 上原萌, Indun Dewi Puspita, 片山泰樹, 田中みち子, 北川航, 浅野行蔵, 鎌形洋一 2012. 氷楔単離株由来の覚醒因子は同環境下細菌のコロニー形成を促す. 日本農芸化学会2012年度大会（京都）
8) Indun Dewi Puspita, Moe Uehara, Taiki Katayama, Michiko Tanaka, Wataru Kitagawa, Kozo Asano, Yoichi Kamagata 2012. Induction of non-dividing cell in *Tomitella bifomata* AHU 1821^T and its characterization. 日本農芸化学会2012年度大会（京都）
9) 不野健太郎, Indun Dewi Puspita, 北川航, 田中みち子, 曾根輝雄, 浅野行蔵, 鎌形 洋一 2013. 氷楔単離細菌の休眠状態への誘導と覚醒に関する研究. 日本微生物生態学会2013年度大会（鹿児島）

原著論文

1) Katayama, T., Kato, T., Tanaka, M., Douglas, T. A., Brouchkov, A., Abe, A., Sone, T., Fukuda, M. & Asano, K. 2010. *Tomitella biformata* gen. nov., sp. nov., a new member of the suborder *Corynebacterineae* isolated from a permafrost ice wedge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 2803–2807.
2) Puspita, I. D., Kamagata, Y., Tanaka, M., Asano, K. & Nakatsu, C. H. 2012. Are uncultivated bacteria really uncultivable? Microbes Environ. **27**: 356–366.
3) Puspita, I. D., Uehara, M., Katayama, T., Kikuchi, Y., Kitagawa, W., Kamagata, Y., Asano, K., Nakatsu, C. H. & Tanaka, M. 2013. Resuscitation promoting factor (Rpf) from *Tomitella biformata* AHU 1821^T promotes growth and resuscitates non-dividing cells. Microbes Environ. **28**: 58–64.
4) Funo, K., Kitagawa, W., Tanaka, M., Sone, T., Asano, K. & Kamagata, Y. 2014. Draft genome sequence of *Tomitella biformata* AHU 1821^T, isolated from a permafrost ice wedge in Alaska. Genome Announcements **2**: e00066-00014.
5) Puspita, I. D., Kitagawa, W., Kamagata, Y., Tanaka, M. & Nakatsu, C. H. 2015. Increase in bacterial colony formation from permafrost ice wedge dosed with a *Tomitella biformata* recombinant resuscitation promoting factor protein. Microbes Environ. **30**: 151–156.

総説

1) Katayama, T, & Tanaka, M. 2013. Microorganisms in a permafrost ice wedge and their resuscitation-promoting factors, *In* Yumoto I, editor (ed.), Cold-adapted Microorganisms, pp. 177-188, Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.

保存機関に寄託した菌株

Tomitella biformata AHU1821^T = DSM 45403^T = NBRC 106253^T

謝　辞

本研究の遂行にあたり，寄付講座助成によりご支援頂きました公益財団法人発酵研究所に深く感謝致します．

文　献

Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**: 143–169.

Anuchin, A. M., Mulyukin, A. L., Suzina, N. E., Duda, V. I., El-Registan, G. I. & Kaprelyants, A. S. 2009. Dormant forms of *Mycobacterium smegmatis* with distinct morphology. Microbiology **155**: 1071–1079.

Asakura, H., Ishiwa, A., Arakawa, E., Makino, S., Okada, Y., Yamamoto, S. & Igimi, S. 2007. Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. Environ. Microbiol. **9**: 869–879.

Cohen-Gonsaud, M., Barthe, P., Bagneris, C., Henderson, B., Ward, J., Roumestand, C. & Keep, N. H. 2005. The structure of a resuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes. Nat. struct. Mol. biol. **12**: 270–273.

Cohen-Gonsaud, M., Keep, N. H., Davies, A. P., Ward, J., Henderson, B. & Labesse, G. 2004. Resuscitation-promoting factors possess a lysozyme-like domain. Trends Biochem. Sci. **29**: 7–10.

Cunningham, A. F. & Spreadbury, C. L. 1998. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton α-crystallin homolog. J. Bacteriol. **180**: 801–808.

de Hoon, M. J., Eichenberger, P. & Vitkup, D. 2010. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. Curr. Biol. **20**: R735–745.

Dworkin, J. & Shah, I. M. 2010. Exit from dormancy in microbial organisms. Nat. Rev. Microbiol. **8**: 890–896.

Errington, J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nat. Rev. Microbiol. **1**: 117–126.

Gopinath, V., Raghunandanan, S., Gomez, R. L., Jose, L., Surendran, A., Ramachandran, R., Pushparajan, A. R., Mundayoor, S., Jaleel, A. & Kumar, R. A. 2015. Profiling the

proteome of *Mycobacterium tuberculosis* during dormancy and reactivation. Mol. Cell. Proteomics **14**: 2160–2176.

Hartmann, M., Barsch, A., Niehaus, K., Puhler, A., Tauch, A. & Kalinowski, J. 2004. The glycosylated cell surface protein Rpf2, containing a resuscitation-promoting factor motif, is involved in intercellular communication of *Corynebacterium glutamicum*. Arch. Microbiol. **182**: 299–312.

Henriques, A. O. & Moran, C. P., Jr. 2007. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. Annu. Rev. Microbiol. **61**: 555–588.

Kana, B. D., Gordhan, B. G., Downing, K. J., Sung, N., Vostroktunova, G., Machowski, E. E., Tsenova, L., Young, M., Kaprelyants, A., Kaplan, G. & Mizrahi, V. 2008. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth *in vitro*. Mol. Microbiol. **67**: 672–684.

Kana, B. D. & Mizrahi, V. 2010. Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **58**: 39–50.

Kaprelyants, A. S., Mukamolova, G. V. & Kell, D. B. 1994. Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin lysis and by resuscitation in cell-free spent culture medium at high dilution. FEMS Microbiol. Lett. **115**: 347–352.

Katayama, T. 2009. Studies on microorganism preserved within permafrost ice wedge in Alaska. Doctor Thesis. Hokkaido University.

Katayama, T., Tanaka, M., Moriizumi, J., Nakamura, T., Brouchkov, A., Douglas, T. A., Fukuda, M., Tomita, F. & Asano, K. 2007. Phylogenetic analysis of bacteria preserved in a permafrost ice wedge for 25,000 years. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 2360–2363.

Keep, N. H., Ward, J. M., Cohen-Gonsaud, M. & Henderson, B. 2006a. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. Trends Microbiol **14**: 271–276.

Keep, N. H., Ward, J. M., Robertson, G., Cohen-Gonsaud, M. & Henderson, B. 2006b. Bacterial resuscitation factors: revival of viable but non-culturable bacteria. Cell. Mol. Life Sci. **63**: 2555–2559.

Kell, D. B. & Young, M. 2000. Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. Curr. Opin. Microbiol. **3**: 238–243.

Kim, S. Y., Lee, B. S., Shin, S. J., Kim, H. J. & Park, J. K. 2008. Differentially expressed genes in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv under mild acidic and hypoxic conditions. J. Med. Microbiol. **57**: 1473–1480.

Kim, Y. M. & Park, S. W. 2012. Microbiology and genetics of CO utilization in mycobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek **101**: 685–700.

Kondo, K., Takade, A. & Amako, K. 1994. Morphology of the viable but nonculturable *Vibrio cholerae* as determined by the freeze fixation technique. FEMS Microbiol. Lett. **123**: 179–184.

Lavollay, M., Arthur, M., Fourgeaud, M., Dubost, L., Marie, A., Veziris, N., Blanot, D., Gutmann, L. & Mainardi, J. L. 2008. The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation. J. Bacteriol. **190**: 4360–4366.

Mahne, M., Tauch, A., Puhler, A. & Kalinowski, J. 2006. The *Corynebacterium glutamicum* gene *pmt* encoding a glycosyltransferase related to eukaryotic protein-*O*-mannosyltransferases is essential for glycosylation of the resuscitation promoting factor (Rpf2) and other secreted proteins. FEMS Microbiol. Lett. **259**: 226–233.

Mir, M., Asong, J., Li, X., Cardot, J., Boons, G. J. & Husson, R. N. 2011. The extracytoplasmic domain of the *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknB binds specific muropeptides and is required for PknB localization. PLoS Pathogens **7**: e1002182.

Mukamolova, G. V., Kaprelyants, A. S., Young, D. I., Young, M. & Kell, D. B. 1998. A bacterial cytokine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95**: 8916–8921.

Mukamolova, G. V., Murzin, A. G., Salina, E. G., Demina, G. R., Kell, D. B., Kaprelyants, A. S. & Young, M. 2006. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. Mol. Microbiol. **59**: 84–98.

Mukamolova, G. V., Turapov, O. A., Kazarian, K., Telkov, M., Kaprelyants, A. S., Kell, D. B. & Young, M. 2002a. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. Mol. Microbiol. **46**: 611–621.

Mukamolova, G. V., Turapov, O. A., Young, D. I., Kaprelyants, A. S., Kell, D. B. & Young, M. 2002b. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol. Microbiol. **46**: 623–635.

Nakashima, N. & Tamura, T. 2004. A novel system for expressing recombinant proteins over a wide temperature range from 4 to 35 degrees C. Biotechnol. Bioeng. **86**: 136–148.

Oliver, J. 2000. The public health significance of viable but nonculturable bacteria. *In* Colwell, R. & Grimes, D. J. (eds.), Nonculturable Microorganisms in the Environment, p. 277-300, Springer US.

Oliver, J. D. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **34**: 415–425.

Panutdaporn, N., Kawamoto, K., Asakura, H. & Makino, S. I. 2006. Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella Typhimurium* strain LT2. Int. J. Food Microbiol. **106**: 241–247.

Ravagnani, A., Finan, C. L. & Young, M. 2005. A novel firmicute protein family related to the actinobacterial resuscitation-promoting factors by non-orthologous domain displacement. BMC Genomics **6**: 39.

Roszak, D. B. & Colwell, R. R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol. Rev. **51**: 365–379.

Schroeckh, V. & Martin, K. 2006. Resuscitation-promoting factors: distribution among actinobacteria, synthesis during life-cycle and biological activity. Antonie Van Leeuwenhoek **89**: 359–365.

Shleeva, M., Mukamolova, G. V., Young, M., Williams, H. D. & Kaprelyants, A. S. 2004. Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to

growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. Microbiology **150**: 1687–1697.

Shleeva, M. O., Bagramyan, K., Telkov, M. V., Mukamolova, G. V., Young, M., Kell, D. B. & Kaprelyants, A. S. 2002. Formation and resuscitation of "non-culturable" cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. Microbiology **148**: 1581–1591.

Shleeva, M. O., Kudykina, Y. K., Vostroknutova, G. N., Suzina, N. E., Mulyukin, A. L. & Kaprelyants, A. S. 2011. Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification. Tuberculosis (Edinburgh, Scotland) **91**: 146–154.

Signoretto, C., Lleo, M. & Canepari, P. 2002. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. Curr. Microbiol **44**: 125–131.

Signoretto, C., Lleo, M. M., Tafi, M. C. & Canepari, P. 2000. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 1953–1959.

Staley, J. T. & Konopka, A. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annu. Rev. Microbiol. **39**: 321–346.

Vorobyova, E., Soina, V., Gorlenko, M., Minkovskaya, N., Zalinova, N., Mamukelashvili, A., Gilichinsky, D., Rivkina, E. & Vishnivetskaya, T. 1997. The deep cold biosphere: facts and hypothesis. FEMS Microbiol. Rev. **20**: 277–290.

Wayne, L. G. 1994. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **13**: 908–914.

Woolfolk, C. A., Shapiro, B. & Stadtman, E. R. 1966. Regulation of glutamine synthetase: I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys. **116**: 177–192.

Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J. & Colwell, R. R. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and Vibrio cholerae in the estuarine and marine environment. Microb. Ecol. **8**: 313–323.

IFO Res.Commun. 29
77-84, 2015

寒天培養における微生物の生育手法の問題点に関する解析

鎌形洋一，田中みち子，北川　航，菊池義智，加藤創一郎

北海道大学大学院農学研究院微生物新機能開発学分野
〒060-8589　札幌市北区北９条西９丁目

A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines cultivability of microorganisms

Yoichi Kamagata, Michiko Tanaka, Wataru, Kitagawa, Yoshitomo Kikuchi, Souichiro Kato

Graduate School of Agriculture, Division of Applied Bioscience, Hokkaido University
Sapporo, Hokkaido 060-8589, Japan

Microbiologists have been using agar growth medium for over 120 years. It revolutionized microbiology in the 1890s when microbiologists were seeking effective methods to isolate microorganisms, which led to the successful cultivation of microorganisms as single clones. However, there has been a disparity between total cell counts and cultivable cell counts on plates, often referred to as the "great plate count anomaly," that has long been a phenomenon that still remains unsolved. Here, we report that a common practice microbiologists have employed to prepare agar medium has a hidden pitfall: when phosphate was autoclaved together with agar to prepare solid growth media (PT medium), total colony counts were remarkably lower than those grown on agar plates in which phosphate and agar were separately autoclaved and mixed right before solidification (PS medium). We used a pure culture of *Gemmatimonas aurantiaca* T-27^{T} and three representative sources of environmental samples, soil, sediment, and water, as inocula and compared colony counts between PT and PS agar plates. There were higher numbers of colony forming unit (CFU) on PS medium than on PT medium using *G. aurantiaca* or any of the environmental samples. Chemical analysis of PT agar plates suggested that hydrogen peroxide was contributing to growth inhibition. Comparison of 454 pyrosequences of the environmental samples to the isolates revealed that taxa grown on PS medium were more reflective of the original community structure than those grown on PT medium. Moreover, more hitherto-uncultivated microbes grew on PS than on PT medium.

Key words: agar, cultivability, phosphate, colony, hydrogen peroxide

緒　　言

Robert Koch 以来，現代微生物学は寒天培養による純粋分離・純粋培養を基本にめざましい発展を遂げてきた．本寄附講座の主要課題である「微生物の休眠と覚醒」を論じる際，覚醒細胞（すなわち活発に増殖する菌細胞）がどれだけの数で存在するかを判定するにあたっては固体培地を用いたコロニー形成数を根拠にしている．しかし，自然界試料を寒天で培養したときに形成されるコロニー数は，試料中に含まれる全微生物細胞数のごく一部であることは古くから知られていた．Great Plate Count Anomaly（Staley & Konopka, 1985）という言葉で表現されるこの現象については多くの推論はあるものの，その本質的な原因を究明する研究はほとんど行われていない．

我々が最初に注目したのは，先行研究において寒天固体培地上でのコロニー形成能が著しく低く，ゲランガム固体培地上では良好なコロニー形成能を持つ *Gemmatimonas aurantiaca* である（Zhang *et al.*, 2003; Tamaki *et al.*, 2009）．本菌はかつて BD 門と呼ばれていた未培養微生物群からなる一門だったが，2003年に世界に先駆けて我々が純粋培養に成功した細菌であり，我が国における初めての新門（*Gemmatimonadetes*

E-mail: y.kamagata@aist.go.jp, w-kitagawa@aist.go.jp, y-kikuchi@aist.go.jp, s.katou@aist.go.jp
共同研究者：川崎公誠，田中智裕，大門世理奈，玉木秀幸，山本京祐，C. H. Nakatsu

門）提案に至った微生物である．この細菌がなぜ寒天上で生育しないのかについて極めて根本的な培地組成検討を行う過程で，リン酸塩が阻害要因として浮かび上がってきた．特にリン酸塩を寒天と同時滅菌する時にコロニー形成が妨げられ，別滅菌をした時にはゲランガム同様の生育を示すことを見出した．そこで本研究では培地の調製法によって細菌のコロニー形成能がどのように変わるのかを，上述の *Gemmatimonas* 属細菌を用いて解明するとともに，実際の環境試料を用いて培地調製法の違いがどのようなコロニー形成能の差をもたらすか，さらには出現する微生物構成種にどのような差が現れるのかを精緻に検討した．

材料および実験方法

菌株ならびに培養方法

Gemmatimonas aurantiaca T-27^T を用いた．同菌の前培養はPYG液体培地（0.5gペプトン，0.5g酵母エキス，0.5gグルコース/L）を用いて30℃で振とう条件下で行った．PYG培地を基礎として，これに最終濃度で0.5mMから10mMの範囲で Na_2HPO_4-KH_2PO_4 (pH7.0）と寒天15g/Lを加えた培地を調製した．この際，PYG培地，リン酸塩，寒天を別々に滅菌し，温度が下がってから三者を混合する方法で作成した培地（S培地：S=separate）ならびにPYG培地とリン酸塩・寒天同時滅菌液を混合する方法で作成した培地（T培地：T=together）を用いた．いずれの培地も各成分の最終濃度は同一である．これらの培地に液体培養で生育させた *G. aurantiaca* を $1/10^5$–$1/10^6$ 程度希釈したものを100μlずつ培地上に塗布，30℃で2週間培養した．カタラーゼを塗布させた培地を作成する際には，フィルター滅菌したbovine liver catalase（10mg/ml)を10μl培地中央部分に塗布した．

過酸化水素濃度の測定

寒天培地中で発生した過酸化水素は以下のように測定した．寒天培地を-80℃で凍結させ，その後室温に放置，融解させると凍豆腐状になるため，寒天を注意深く取り出し遊離水を絞り出した．この遊離水中の過酸化水素をJiangらの方法（Jiang et al., 1990）で比色定量した．

環境試料の採取

微生物の培養ならびに全ゲノム抽出に用いた環境試料は豊平川（札幌市南区），北海道大学農学部横の森林土壌，北海道大学構内の池底泥から採取した．採取した試料は4℃で接種前まで保管し，試料の一部はDNA抽出のため-20℃で保存した．

寒天培地の調製

環境試料中の微生物の培養は1）リン酸塩と寒天を同時滅菌した培地（PT培地: T=together），2）リン酸塩と寒天を別滅菌した培地（PS培地: S=separate）ならびに3）リン酸塩無添加の培地（PW培地: W=without）の三種を用いた．培地は多種類ある培地の中から環境微生物の培養に用いられ比較的選択性が低いと思われる低栄養培地を選定した．培地は溶液A，B，Cに分けて調製し，最終的に混合したときの濃度が以下のようになるよう設定した．溶液A: 2.27mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.2mM $MgSO_4$, 45μM $CaCl_2$, 15g Bacto agar; 溶液B: 10mM KH_2PO_4, 10mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; 溶液C，0.1g Bacto peptone, 0.1g Bacto yeast extract, 0.1gグルコース（gramで示したものは1L中の最終含量).

PT培地を調製する際には溶液AとBを混合して滅菌，そののち滅菌した溶液Cを寒天が固まらない程度に冷えた段階で混合，寒天培地を調製した．PS培地については溶液A，B，Cをそれぞれ別個に調製し，滅菌後に混合し，寒天培地を調製した．PW培地についてはA液とC液を滅菌し，滅菌水を加え最終培地とした．PW培地は溶液Bを加えておらず，リン酸塩は一切入っていないことになるが，ICP-AEC（inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy）とOptima 4300DVによって，作成した寒天培地の酸加水分解物を測定したところ，およそ6μMのリンを含むことが明らかになった．これは各試薬，Bacto yeast extract, Bacto agar由来の微量リン酸塩が持ち込まれた結果と思われる．

環境試料の寒天培地による培養

河川水試料，森林土壌試料，底泥試料は滅菌水を用いて10倍希釈を重ね，1/10–$1/10^6$ になるように希釈し，100μlの希釈試料を上述したPT，PS，PW培地に接種した．各希釈段階における接種にはそれぞれ5枚の寒天培地を用い，統計処理が可能な条件設定を施した．接種した培地は25℃暗所で一週間培養し，毎日ほぼ定時に培地上に出現するコロニー数をカウントした．低い希釈倍数のものは計数不能なほど多数のコロニーが出現し，また希釈倍数の高いものにはコロニー数が非常に低いものもあったことから，培地一枚あたり30から300のコロニー形成数（CFU）を与えた培養のみ計数の対象とした．最終的な計数値は希釈倍数を乗じた数字で表した．また，培養の過程で出現したコロニーを極力無作為に釣菌し，すべての培地から合計6,528個のコロニーを釣菌し，コロニーPCRによって16S

rRNA遺伝子の部分配列を決定し，分子系統的分類位置を解析した（後述）.

DNA抽出

森林土壌，底泥試料のDNAはExtrap Soil DNA Plus kit, version 2（Nippon Steel and Sumikin Eco-Tech Corporation）を用いて行った．河川水についてはFuhrmanらの方法に従った（Fuhrman *et al.*, 1988）.

Sanger法ならびに次世代シークエンシング法によるDNAの塩基配列決定法

釣菌したコロニーの16S rRNA遺伝子のPCR増幅には以下のプライマーを用いた.
27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'). 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). PCRはKOD FX Neo kit（Toyobo）を用い，増幅条件，DNA精製，Sanger sequencingは常法通り行った.

また，次世代シークエンシング (454 pyrosequencing Roche FLX Titanium) においてはforward primer 519F (5'-CAG CMG CCG CGG TAA TWC-3') にRoche sequence adaptorをつけたものを，reverse primerには907R (5'-CCG YCA ATT CMT TTR AGT T-3') を用いてPCRを行った．試料のmultiplex化は10 bpのbar codeを用いて常法通り行った．詳細は本研究結果を報告した論文を参照されたい（Tanaka *et al.*, 2014）.

塩基配列決定後の解析

Sanger sequencingで得られた配列はABI 3730xl base callerならびにDecipherを用いてquality checkならびにキメラチェックを行い，キメラ配列ならびに400 bp以下の配列は排除した．また，配列の新規性についてはRibosomal Database Project (RDP) Classifierを用い，80%のconfidence threshold条件下で解析した．配列の新規性はRDP databaseとの配列比較により97%以下の配列相同性のものを新規配列（新規微生物）と定義した．多様性解析はQIIME pipelineを用いた．PyrosequencingのデータはQIIME pipeline V1.7を用い，denoise処理を行った後，97%以上の相同性のある配列についてUCLUSTを用いて各OTUにクラスタリングした．OTUはPyNASTを用いてアラインメントを行った．キメラ配列はChimera Slayerを用いて除去し，それぞれのphylotypeの同定はGreengenes taxonomyならびにGreengene reference database (version 13.5)をもとにRDP Classifierを用いて行った．Alpha diversity, Beta-diversity解析は常法通り行った.

結　　果

*Gemmatimonas aurantiaca*の寒天培地上での生育と寒天中の過酸化水素濃度

Fig. 1の写真に示したように寒天とリン酸塩を同時滅菌した寒天培地（T培地）と寒天とリン酸塩を別滅菌した寒天培地（S培地）ではコロニー形成に顕著な違いが認められた．すなわちT培地においてはリン酸塩濃度が1.5 mMまで増やした段階でコロニーは全く認められなくなった．一方，S培地においては10 mMのリン酸塩存在下でも3 mMの時に比べおよそ60%程度のCFUになったものの，コロニー形成が認められた．3 mMのリン酸塩を含むT培地では完全にコロニー形成は抑制されたが，寒天培地中心にカタラーゼを塗布したところ，その部分のみにコロニーの形成が認められた．これらの事実からT培地においては過酸化水素が培地調製中に生成していることが強く示唆された.

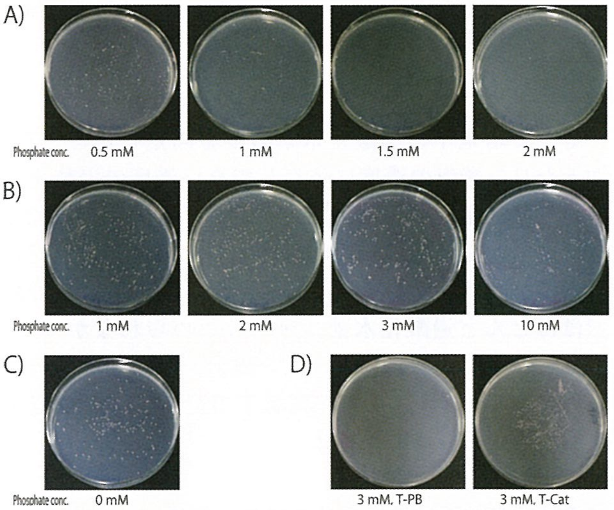


Fig. 1 Inhibitory effect of growth medium preparation method on *Gemmatimonas aurantiaca* T-27 colony formation. Liquid pre-cultures [OD_{600} of 0.055, diluted (5.5 x 10^3)-fold] were spread onto PYG medium with phosphate buffer and agar autoclaved together (A) or separately (B) or with no phosphate addition (C). (D) Restoration of colony formation on PYG plates made by autoclaving phosphate and agar together (3 mM; T-PB) and by adding catalase to the center of plates (3 mM; T-Cat). A culture of *G. aurantiaca* (OD_{600} of 0.045, diluted 10^3-fold) was spread onto agar medium and then either filter-sterilized bovine liver catalase solution (10 mg/ml) (T-Cat) was placed onto the center of the plate or just phosphate buffer was used for controls (T-PB). Plates were incubated at 30℃ for 14 days.

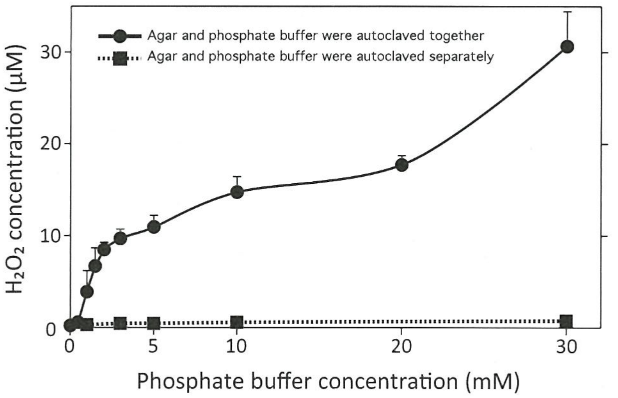


Fig. 2 Hydrogen peroxide generation from agar with increasing phosphate concentrations after autoclaving agar and phosphate either together or separately. Two preparation methods are represented: 0.75 g of Bacto agar was suspended in 50 ml of buffer with phosphate concentrations ranging from 0 (i.e., pure H_2O) to 30 mM (Na_2HPO_4-KH_2PO_4, pH 7.0), and agar and phosphate were autoclaved together; alternatively, 0.75 g of agar was suspended in 50 ml of water and autoclaved, and then autoclaved phosphate buffer (100 mM Na_2HPO_4-KH_2PO_4 stock, pH 7.0) was added to final concentrations ranging from 1 to 30 mM. Means of at least five independent experiments with standard deviations are shown.

そこで培地中の過酸化水素濃度を測定したところ，加えたリン酸塩の濃度に依存して高い濃度の過酸化水素がT培地中の寒天の遊離水中に認められた（Fig. 2）．また，培地を室温に一週間放置することにより過酸化水素は経時的に増加することもわかった．一方S培地ではほとんど過酸化水素の発生は認められなかった．これらの事実から，寒天はリン酸塩を触媒として滅菌条件である121℃，10分の高温下で過酸化水素を発生することが明らかになった．

環境試料の寒天培地によるコロニー形成

希釈した森林土壌試料，底泥試料，河川水試料をPT培地（寒天とリン酸塩同時滅菌培地），PS培地（別滅菌培地），ならびにPW培地（リン酸塩を添加しなかった培地-実際にはごく微量のリン酸塩を含む）に接種したときのCFUの経時変化をFig. 3に示した．本結果から明らかなように1) 森林土壌試料では明らかにPT培地におけるCFUは低く，PS培地ならびPW培地ではほぼ同じようなCFUを示した．2) 底泥試料においてはPT培地でのCFUは極端に低く，PS培地はPT培地を上回ったものの，PW培地が最も高いCFUを与えた．3) 河川水については三種の培地で顕著な差異が認められない試料もあったが，それでもPT培地が最も低いCFUを与えた．これらの結果から，PT培地は環境試料中の微生物の生育にとって顕著な阻害効果を持つこと，PS培地は明らかにPT培地よりも優れていること，ただし，リン酸塩をごく微量（6μM）しか含まないPW培地の方がさらに優れている可能性が高いことが明らかになった．

寒天培地の調製法の違いによる出現するコロニーの系統的差異と大規模シークエンシングで見える環境試料中の微生物構成種と培養法で見える構成種の差異

それではPT，PS，PW培地を用いて森林土壌，底泥，河川水から得られた微生物はどのような種類で，同じ試料でも出現する微生物種に培地間でどのような違いが認められるであろうか．すべての培養実験を通して合計6,528個のコロニーを釣菌し，PCRを経て16S rRNA遺伝子の部分配列を決定した．この過程で，PCRで増幅が認められなかったもの，Sanger sequencingの結果，信頼性が低いと判断された配列を除いた結果，4,763個のコロニーについてのみ結果を得ることができた．その内訳は試料別では，森林土壌，底泥，河川水からはそれぞれ1,134，1,573，2,056個（合計4,763個），培地別では，PT，PS，PW培地からはそれぞれ1,258，1,863，1,642個（合計4,763個）であった．

Fig. 4にそれぞれの試料から得られた微生物の門レベルでの系統的帰属を培地別に示している．各試料ならびに各培地から得られているコロニー数は異なるため，ここでは得られた門レベル別の相対量（%割合）で示している．ちなみに本図では各試料においてPT，PS，PWで出現したコロニーの門別割合に続いて，454 pyrosequencingによる大規模解析を行った結果を併せて示している．これは分離された微生物のデータではなく，試料中の全DNAを抽出・解析して環境中に生息している微生物の門レベルでの割合を示したものであり，環境中にもともと存在している微生物の種類と量を概ね反映したデータであると言える．

Pyrosequencingはコロニーのデータより100倍近い数のデータであり，試料別では，森林土壌試料ではreplicate 1, 2, 3の順に114,616, 117,502, 106,076 reads，底泥試料ではreplicate 1, 2, 3の順に119,340, 114,714, 137,867 reads，河川試料ではreplicate 1, 2, 3の順に128,505, 135,779, 0 readsであった．河川試料のreplicate 3では必要十分なDNAが抽出できなかったことから，データを得ることができなかった．Fig. 4では上述のreplicates 1-3の合計値から門レベルの割合を算出し示している．

河川試料に着目した場合，PT，PS，PW培地のいず

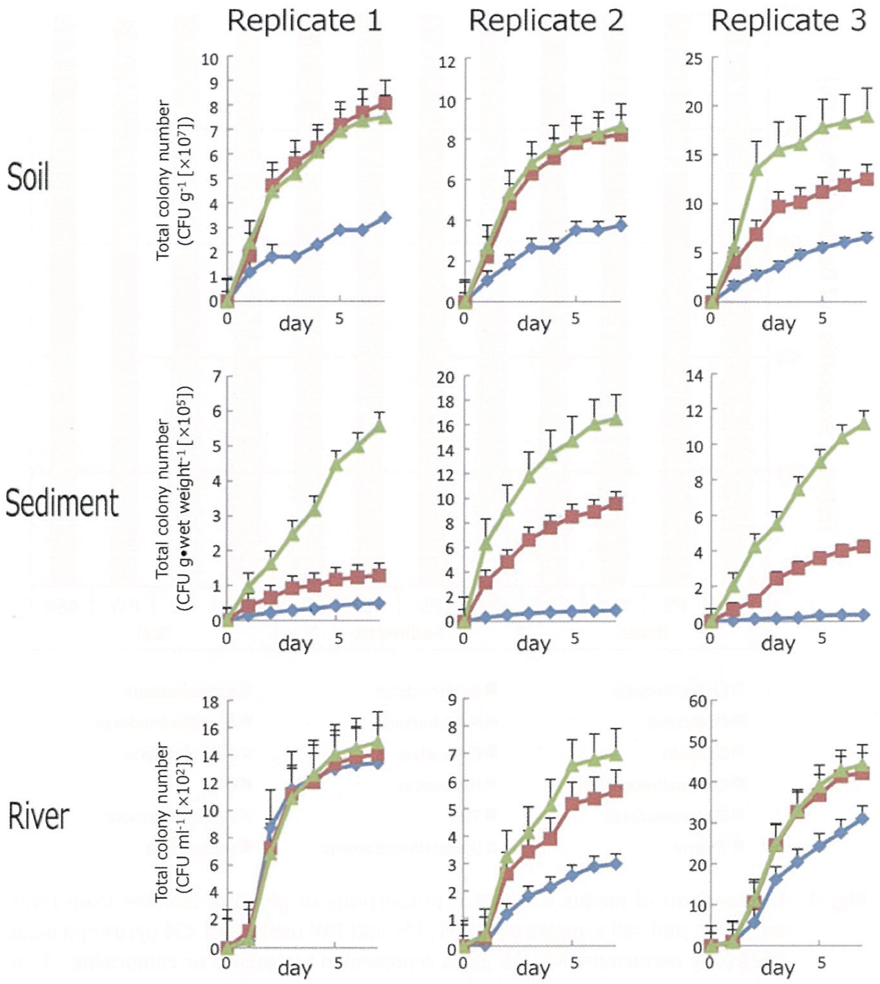


Fig. 3 Total colony counts from three environmental sources (soil, sediment, and river water; three replicates at each site) on three different media (diamond, PT; square, PS; triangle, PW). The numbers of CFU on PT, PS, and PW media were counted daily for 7 days. CFU counts reported were averages from 1 to 5 plates on which 30 to 300 colonies were formed. Plates were excluded from colony counts if overgrown by a few colonies spreading across the entire plate. Error bar shows standard errors of averages calculated from two to five plates.

れにおいても *Proteobacteria* 門（青で示した）の微生物が半数以上を占めていたが，最も大きな違いは PT 培地では *Actinobacteria* 門（緑で示した）の割合が顕著に高くなっていることである．これは底泥試料，森林土壌試料においても同様の傾向が見られた．PT 培地は放線菌の生育にとって好ましい条件であると言える．河川試料についてさらに興味深いのは PT 培地では *Bacteroidetes*（赤で示した）の割合が低いのに対して PS，PW では高かったことである．この傾向は森林土壌の PT，PS，PW でのそれに近い．

底泥試料に着目した場合，*Proteobacteria* の割合は PT<PS<PW の順で高くなり，逆に *Actinobacteria* は PT>PS>PW の順で低くなった．*Bacteroidetes* の割合は PT，PS，PW ではほぼ変わらなかった．

土壌試料に着目すると *Proteobacteria* の割合は PT，PS，PW でほぼ変わらないが，河川試料同様，*Actinobacteria* で PT>PS>PW，*Bacteroidetes* で PT<<PS<PW の順であった．

これらのデータと 454 pyrosequencing のデータと比べるとさらに興味深い知見が得られた．上述のように pyrosequencing のデータ量はコロニーをもとにしたデータ量よりも圧倒的に大きいため，解像度ははるかに高い．培養では見えない多数の門の微生物の存在が見てとれる．河川，底泥，森林土壌に共通しているのは

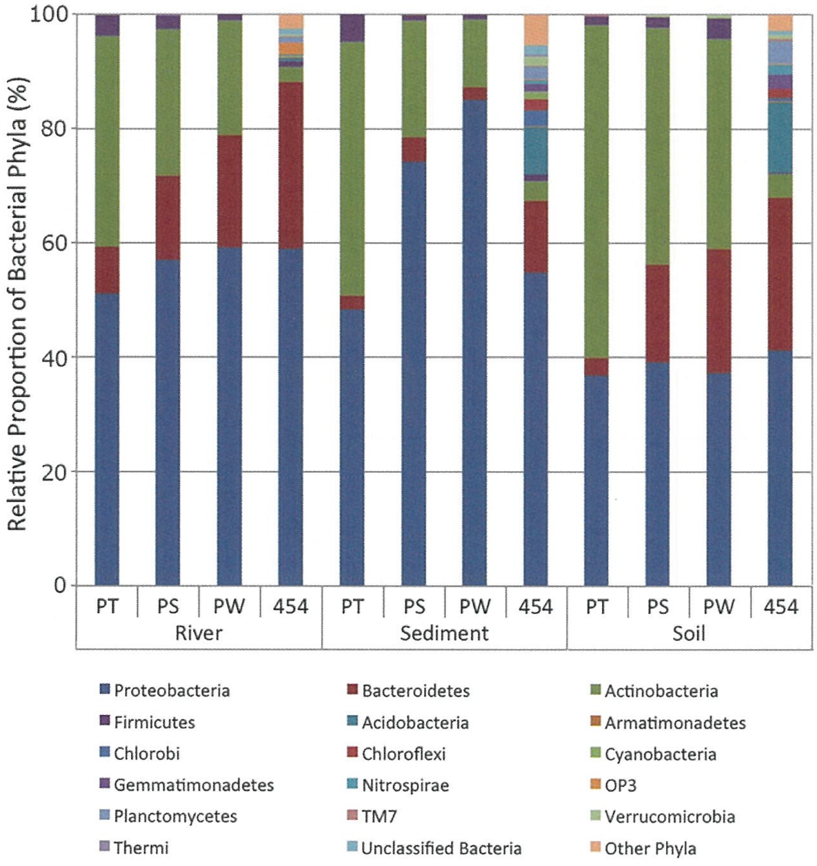


Fig. 4　Comparison of means of relative proportions of phyla of isolates from river, sediment, and soil samples using PT, PS, and PW media and 454 pyrosequencing of directly extracted DNA. All phyla represented by isolates or comprising >1% of pyrosequences in at least one environmental source are included. An additional 40 phyla from pyrosequencing are included as "other" phyla.

Proteobacteria の次に優占しているのは *Bacteroidetes* で，*Actinobacteria* の割合は培養による結果とは対照的に圧倒的に少ない．本実験は複数の培地成分で培養を試みているわけではないため，培地成分そのものの選択圧の可能性は否定できないが，少なくともこの培養条件では *Actinobacteria* の優先的生育に有利であり，さらに PT 培地はバイアスをいっそう増幅していることがわかる．底泥と森林土壌で共通しているのは *Acidobacteria*（明るい青で示した）が *Proteobacteria* と *Bacteroidetes* に次いで優占種であるにも拘わらず，培養では一つも得られなかった．*Acidobacteria* は土壌環境に広く分布している門として有名であるが，難培養性であることも知られており，今回の培養条件では，PT，PS，PW いずれの培地でもコロニーとして捕捉することはできなかった．培養法と大規模シークエンシングによって様々な情報が得られたが，もう一度，PT，PS, PW と pyrosequencing のデータを俯瞰して見ると，PS ならびに PW 培地で出現するコロニーの門レベルでの割合は，PT 培地で出現するそれにくらべると，より環境中のもともとの構成種に近いと言える．培養による構成種のバイアスは PT の場合最も顕著である，と結論することができる．

寒天培地の調製法の違いによる新規微生物コロニーの出現割合

あらためて PT，PS，PW 培地を用いて森林土壌，底泥，河川水から得られた微生物種をより高い解像度で解析した結果を Fig. 5 に示す．この結果は，それぞれの試料から三つの培地を用いた時に出現した微生物の系統的新規性が高い微生物の割合を示したものである．ここで明らかなように，底泥試料，河川水試料においては明らかに PS，PW 培地でより系統的に新しい微生物が分離できる確率が高いことを示している．過酸化水素などの酸化ストレスの低い培地ではより多様

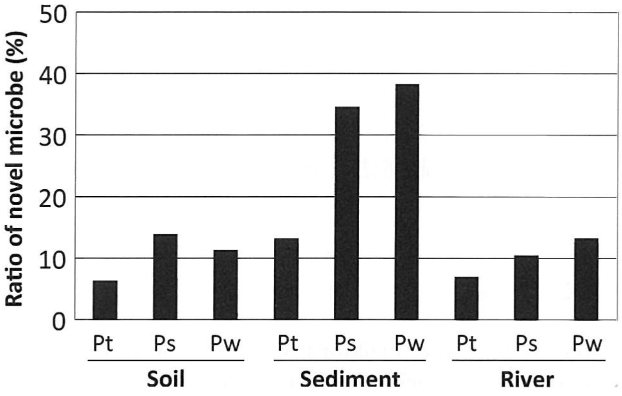


Fig. 5 The ratio of novel microbes isolated on the three different growth media from each environmental sample. The isolates were defined as novel microbes if their sequences had less than 97% similarity to known species. Taxonomic identity of each phylotype was determined using the RDP Classifier at 80% confidence.

で新しい微生物が取得できる可能性を示唆する重要な結果であるといえる．

考　察

本結果は寒天培地調製法，特に寒天とリン酸塩の別滅菌という行程がいかに微生物の固体培養・分離培養に重要かを示している．微生物の培養に用いられる培地は無数に存在するが，代表的な微生物菌株保存機関であるATCC，DSMZ，NBRCの菌株カタログならびに培地カタログを調査したところ，ほぼすべての培地に2mMから40mMに及ぶリン酸塩が含まれていた．しかも培地調製にあたって，リン酸塩を寒天と別滅菌するよう指示が書かれているものは一覧した限りにおいては見出し得なかった．これらの培地は寄託された特定の微生物を生育させるための培地であることから，そのためには特段の問題は生じないと考えられる．しかし，環境中から新規に微生物を単離することを考えたとき，活性酸素種となる過酸化水素を生じない培地調製がいかに重要であるかが本研究で示唆されたことになる．

こうした事実は意外にも全く報告例がなくこれが初めての報告例である．ただし，半世紀前の研究（Finkelstein & Lankfor, 1957）でグルコースとリン酸塩の同時滅菌で液体培地中に微生物の生育阻害因子が発生することが示唆されており，寒天に含まれている遊離糖もしくは熱分解過程で生成する遊離糖から上述のような反応によって過酸化水素が発生している可能性が高い．過酸化水素の発生の化学反応過程については現在鋭意検討中である．

本研究において培地調製法の違いによるコロニー形成率の差異を明らかにすることができたことと共に，環境試料を用いた培養と大規模シークエンシング技術を用いた環境試料中の微生物構成種との関係を解析することによって，酸化ストレスが培養できる微生物の構成種に著しいバイアスをもたらすことを明らかにできた点で，微生物の培養手法の大幅な改善，さらには寄附講座の主要課題であった「覚醒細胞と休眠細胞の判別」に大きな礎を築くことができたと考える．

要　約

Robert Koch以来，現代微生物学は寒天培養による純粋分離・純粋培養を基本にめざましい発展を遂げてきた．しかし，自然界試料を寒天で培養したときに形成されるコロニー数は，試料中に含まれる全微生物のごく一部であることは古くから知られていた．先行研究において寒天上での生育が著しく悪く，ゲランガム上では良好なコロニー形成能を持つ *Gemmatimonas aurantiaca* を材料に，まず寒天培地のどこに問題が潜んでいるのかを探った．その結果，培地成分に含まれているリン酸塩を寒天と同時滅菌する時にコロニー形成が妨げられ，別滅菌をした時には良好な生育を示すことを見出した．コロニー形成率はリン酸塩濃度が高くするほど急激に低下する傾向が認められた．さらに詳しく調べたところ，寒天をリン酸塩と高温処理したときに過酸化水素の発生が認められ，少なくとも過酸化水素の生成がコロニー形成阻害と深く関わっていることが強く示唆された．

多様な微生物が生息する環境試料においてこうした寒天培地の調製手法が環境微生物のコロニー形成能にどのような影響を与えるかを調べるため，土壌，河川，底泥等を環境試料として用い，リン酸塩同時滅菌あるいは別滅菌培地（培地組成は同一）に接種し，コロニー形成数を比較した．その結果，試料によって違いはあるものの，いくつかの試料においては著しいCFU差を見いだした．また，各寒天培地上に出現したコロニーを数千個拾い，DNAを抽出，16S rRNA遺伝子を決定し，それぞれの微生物の系統的位置を明らかにした．その結果，リン酸塩と寒天を同時滅菌した場合，出現する微生物がリン酸塩と寒天を別滅菌したときと大きく異なっていることが明らかとなった．とりわけ，*Actinobacteria* 門の微生物はリン酸塩と寒天を同時滅菌した培地で高頻度に出現することが判明した．次世代シークエンサーによって，用いた環境試料中に含まれる微生物相を詳細に解析し，門レベルでの微生物の多

様性と，寒天培地上に出現したコロニーの系統群を比較したところ，リン酸塩と寒天を同時滅菌した培地のほうが，別滅菌した培地よりも著しい構成種バイアスがかかることを見出した．

これらの知見は，微生物学者が従来注意を払ってこなかった培地調製法そのものが，コロニー形成率に決定的な影響をもたらすことを初めて示した成果と言える．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1) 大門世理奈，北川航，田中みち子，Cindy H. Nakatsu，鎌形洋一 2013．バクテリアはどの寒天がお好き？日本微生物生態学会2013年度大会（鹿児島）
2) Serina Daimon, Tomohiro Tanaka, Wataru Kitagawa, Michiko Tanaka, Cindy H. Nakatsu, & Yoichi Kamagata 2014. What agar do bacteria like? International Symposium on Microbial Ecology (ISME 2014) (Seoul)
3) Yoichi Kamagata 2014. Agar medium: its drawback and pitfall. International Symposium on Microbial Ecology (ISME 2014) (Seoul)
4) 大門世理奈，北川航，田中みち子，Cindy H. Nakatsu，鎌形洋一 2014．培地調整法×寒天＝？　日本微生物生態学会2014年度大会（浜松）（ポスター賞受賞）
5) 山岸彩沙，大門世理奈，住谷恵理子，玉木秀幸，加藤創一郎，北川航，Cindy H. Nakatsu，鎌形洋一 2014．培地調製法がもたらす分離生物種の差異と新規微生物の探索．日本微生物生態学会2014年度大会（浜松）

原著論文

1) Tanaka, T., Kawasaki, K., Daimon, S., Kitagawa, W., Yamamoto, K., Tamaki, H., Tanaka, M., Nakatsu, C.H. & Kamagata, Y. 2014. A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganisms cultivability. Appl. Environ. Microbiol. **80**: 7659–7666.（本論文は同誌のspotlightに選ばれた）．

謝　辞

本研究の遂行にあたり，寄付講座助成によりご支援頂きました公益財団法人発酵研究所に深く感謝致します．

文　献

Finkelstein, R.A. & Lankford, C.E. 1957. A bacteriotoxic substance in autoclaved culture media containing glucose and phosphate. Appl. Microbiol. **5**: 74–79.

Fuhrman, J.A., Comeau, D.E., Hagström, Å. & Chan, A.M. 1988. Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. Appl. Environ. Microbiol. **54**:1426–1429.

Jiang, Z.Y., Woollard, A.C.S. & Wolff, S.P. 1990. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. FEBS Lett. **268**: 69–71.

Staley, J.T. & Konopka, A. 1985. Measurement of in situ activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annu. Rev. Microbiol. **39**: 321–346.

Tamaki, H., Hanada, S., Sekiguchi, Y., Tanaka, Y. & Kamagata, Y. 2009. Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. Environ. Microbiol. **11**: 1827–1834.

Tanaka, T., Kawasaki, K., Daimon, S., Kitagawa, W., Yamamoto, K., Tamaki, H., Tanaka, M., Nakatsu, C.H. & Kamagata, Y. 2014. A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganisms cultivability. Appl. Environ. Microbiol. **80**: 7659–7666.

Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y. & Nakamura, K. 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**: 1155–1163.

IFO Res.Commun. 29
85-90, 2015

未培養微生物に対する生育因子の単離と同定

三橋　進也[1)]，鎌形　洋一

北海道大学大学院農学研究院微生物新機能開発学分野
北海道大学大学院農学研究院木質生命化学研究室
〒060-8589　札幌市北区北９条西９丁目

Isolation and identification of growth factors for uncultured bacteria

Shinya Mitsuhashi[1)], Yoichi Kamagata

Graduate School of Agriculture, Division of Applied Bioscience, Hokkaido University
Sapporo, Hokkaido 060-8589, Japan

We have thousands of bacterial species in hand but numerous numbers of organisms have eluded laboratory cultivations. Why do most bacteria refuse to grow on laboratory media? This is a profound question that many microbiologists and chemists have been trying to answer for years. To date, several bacteria are known to require growth-promoting factors or specific diffusible components supplied by a neighbor or partner bacteria in the same environment. In our previous studies, we had found that the supernatant of *Sphingopyxis* sp. strain GF9 isolated from an activated sludge significantly stimulated the growth of three previously uncultured bacterial strains, *Leucobacter* sp. strain ASN212, *Bosea* sp. strain ASTN45 and *Catellibacterium nectariphilum* strain AST4. Here we report the attempts for purification and identification of growth factors for these strains. The results showed the growth factors for strain ASN212 were a new class of porphyrin-type growth factors, which included two structurally new porphyrins, designated as zincmethylphyrins I and III. Among them, coproporphyrin III derivatives induced the vigorous growth for strain ASN212 even at pico- to nanomolar. It was also shown that the coordination of zinc ion with coproporphyrins enhanced the activity. Even more surprisingly, the ASN212 growth factors showed self-toxicity against the growth factors-producing bacterium strain GF9 at the higher concentrations than the minimum effective concentrations of growth promotion for strain ASN212. The phenomena may implicate a mutualistic interaction between these strains over a boundary at phylum level. Our present findings can not only provide a new insights and techniques in the cultivation of uncultured microorganisms, but also unveil the microbial interactions occurring in natural complex ecosystems. The growth factor for strain AST4 was found to be very labile after purification, which precluded further structure elucidation, while the growth factor for strain ASTN45 was successfully partially purified. Further structural investigation of ASTN45 growth factor is currently underway.

Key words: microbial interaction, growth factor, *Sphingopyxis*, *Leucobacter*

緒　　言

地球上に存在する微生物は一説には１億種以上にのぼるとも言われているが，現在我々は，このうちわずか１万種程度を手中にし，さらにその一部を利用できているに過ぎない．環境試料中で観察することのできる微生物の多様性は，一度それらを寒天培地に移した途端に失われてしまう．古くから“Great Plate Count Anomaly”（Staley *et al.*, 1985）とも呼ばれるこのギャップは，微生物の多様性を示すと同時に微生物培養の難しさを突きつける象徴的な現象である．寒天培地上でコロニーを形成しない微生物は微生物全体の99%以上を占めており，その大部分が単純な培養条件の改善だけでは培養できない「難培養」微生物であると考えられている．

実験室条件においてこうした微生物が生育を示さな

E-mail: Shinya.Mitsuhashi@uthct.edu, y.kamagata@aist.go.jp
[1)] 現　University of Texas Health Science center
共同研究者：Bhuiyan Mohammad Nazrul Islam，髙井亮吾（北海道大学大学院農学院），重冨顕吾，生方信（北海道大学大学院農学研究院）

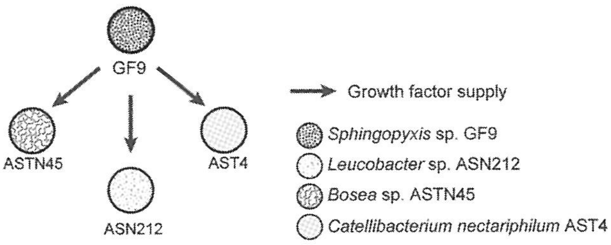


Fig. 1　Growth factor supply from *Sphingopyxis* sp. strain GF9 to three different bacterial strains.

い要因として，培養の物理的条件（pHや温度など），栄養条件（基質，C/N比，微量金属，溶存ガス濃度など），ゲル化剤などの影響が挙げられるが，これらは単純に我々が意識せずにかけてきた選択圧であるとも言える．一方で，これまで既存の純粋培養法ではほとんど顧みられなかった「微生物間相互作用」は，より本質的な要因である．自然環境中においては多様な微生物が複雑なコンソーシアムを形成して共存している一方，実験室条件における純粋培養系ではそれらの相互作用現象が無視される．もし微生物の生育そのものに影響を与える異種生物間相互作用が存在するならば，そのメカニズムの解明は難培養微生物の培養に必要不可欠な因子となる．実際に，クォラムセンシングのように微生物間には拡散しうる分子の授受によってその遺伝子発現が制御されるメカニズムの存在自体は古くから知られている（Eberhard *et al.*, 1981; Schauder & Bassler, 2001）．

我々は以前の研究において，このような生育因子の供給者，ならびに受容者の関係にある細菌類の探索を行い，「微生物間相互作用」を示すいくつかの組み合わせを見出した（Fig. 1）．*Bosea* sp. ASTN45株（*Proteobacteria* 門），*Leucobacter* sp. ASN212株（*Actinobacteria* 門），*Catellibacterium nectariphillum* AST4株（*Proteobacteria* 門）（Tanaka *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2005）はそれぞれ実験室条件における単独培養では数日間の培養をもってしても有意な生育を示さない難培養微生物であるが，*Sphingopyxis* sp. GF9株との共培養，もしくはその培養上清を培地に添加した条件では，3種の菌株はともに明瞭な生育を示す（unpublished data）．これらはGF9株の生産する代謝産物が3種の属の異なる菌株に対して生育促進作用を持つことを示している．また，詳細な検討の結果，これら3菌株に対してGF9株が供給する生育因子はそれぞれ異なる物質であることが確認されている．これらを背景に，本研究では難培養微生物の培養について新たな知見を得ることを目的に，*Sphingopyxis* sp. GF9株の生産する生育因子の同定について検討を行った．

材料および実験方法

菌株

Bosea sp. ASTN45株，*Leucobacter* sp. ASN212株，*Catellibacterium nectariphillum* ASN212株　，*Sphingopyxis* sp. GF9株は産業総合研究所・生物プロセス研究部門・生物資源情報基盤研究グループより供与を受け，当研究室において−80℃，グリセロールストックとしたものを使用した．

Sphingopyxis sp. GF9株の生育因子生産条件の最適化

生育因子の単離に向けた大量培養に先立ち，培養条件の最適化を検討した．これまでGF9株の培養に用いていたNPB培地（トリプトン10g; 酵母エキス2.0g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0g; K_2HPO_4 1.0g; KH_2PO_4 0.5g; グルコース5.0g/L）を標準条件とし，その組成，培養温度，撹拌速度条件の異なるGF9株培養物を調製した．培養はジャーファーメンター（ABLE社BMJ-01P1）を用いて1Lスケールで行った．各条件より得られた培養物から上清を調製した後，受け手の3菌株に対する生育促進活性を評価し，得られた結果を元に培養条件の決定を行った．

Sphingopyxis sp. GF9株の大量培養

条件検討により得られた培養条件を用いて100L容ジャーファーメンター（B.E. MARUBISHI MPF-100L）による80Lスケールの培養を複数回行った．

生育促進活性の評価

培養上清ならびに各精製段階における精製サンプルの生育促進活性評価は微量液体培養法により行った．48穴マイクロウェルプレートに100μlの評価サンプル，260μlのNPB培地，40μlの菌株ストック（ただしASTN45株においてはそれぞれ40, 320, 40μl）を分注し，600rpmで48時間，37℃下で振盪培養（ただしASN212については30℃）を行った後，595nmにおける濁度（OD_{595}）を測定し，生育量とした．また，評価サンプルの濃度は精製の段階にかかわらず「元々のGF9株培養物中における試料濃度」に調整した．すなわち各画分重量を最初の培養上清量（210L）で除した濃度である．以下，これを当量濃度（EC: equivalent concentration）とし，その10倍高濃度を10×EC，5倍希釈濃度を0.2×ECと表す．

生育因子の単離・構造決定

得られたGF9培養上清（210L）について，液液分

配ならびに各種クロマトグラフィー（HP20，LH20，HPLC など）を用いて活性画分の精製を行った．前述の 3 菌株に対する生育因子はいずれも異なる画分に含まれていたため，適宜精製フローを分岐させ，それぞれの生育因子を探索した．活性成分の構造決定には各種 NMR 測定（Transformative Bio-Molecules, Nagoya University, JEOL Resonance Inc. GC-MS & NMR Laboratory, Faculty of Agriculture, Hokkaido University）ならびに質量分析（Instrumental Analysis Division, Equipment Management Center, Creative Research Institution, Hokkaido University）を用いた．

結果および考察

Sphingopyxis sp. GF9 株の生育因子生産条件の最適化と大量培養

生育因子の増産を目的とし，GF9 株培養条件の最適化を検討した．最初にジャー培養における撹拌速度について 300, 500, 700 rpm を検討したところ，3 種の菌株の生育はいずれも 700 rpm 撹拌下で培養した GF9 株上清によって著しく誘導され，特に ASTN45 株の生育は 300 rpm 時の 2 倍に高められた．この際，GF9 自体の生育量も増加していたことから，生育因子の増産は，元々活性汚泥由来の GF9 株の代謝が好気条件下で高められたことに因ると考察される．次いで培地組成のうち，ペプトン濃度，酵母エキス濃度について検討したところ，ペプトン量を 5.0 g/L に減らしても活性に影響が無いこと，酵母エキスを 3.0 g/L とすると AST4 株の EC における生育が抑制されることが明らかとなった．AST4 株の生育因子は高濃度において逆に生育阻害に働くことが確認されていたため，後者の現象は生育因子の減少ではなく増量によるものであると考えられた．実際に，同じ上清を 5 倍希釈した 0.2×EC においては AST4 の生育は顕著に促進された．さらに，ペプトン，酵母エキスのメーカーによる違いを検討したところ，両者とも Difco 社製の製品が生育因子の生産に最適であることを見出した．同様に，温度条件についても検討し 35℃ が最適であると結論づけた．以上の結果を元に，続いて 100 L ジャー培養を用いて大量培養を行った．繰返しの培養により合計 210 L の培養物を得た後，遠心分離とろ過により菌体を取り除き 160 L の GF9 株培養上清を得た．

Bosea sp. ASTN45 株に対する生育因子の探索

ASTN45 株に対する生育因子の精製は以下の流れで行った（Fig. 2）．すなわち，① GF9 株培養上清（160 L）の n-ブタノールを用いた液液抽出（4 回），② 活性の認められた水層（乾燥個体重量約 900 g）のメタノール沈殿処理，③ メタノール可溶部（540 g）の HP20 カラムクロマトグラフィー，④ HP20 非吸着画分（50 g）に対する 2 度の LH20 カラムクロマトグラフィー，⑤ 活性を示した画分（7.6 g）の逆相 HPLC（Mightysil RP-18GP Aqua），⑥ ODS 非吸着画分に対する親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）である．HILIC の後，最終的に 4.0 mg の活性画分を得ることに成功した．精製物は EC 換算で 2.5 μg/ml という低濃度においても ASTN45 株の生育を刺激し，本生育因子の高い活性が示された．現在，NMR 分析を検討し，既に得られている高分解能 MS の結果（2 種類のイオンピーク *m/z* 183.06330; 233.07793）と併せて活性物質の同定を進めている．

また，本活性物質のように ODS 逆相 HPLC にすら吸着しない高極性物質の精製の難しさについて，その解決を図ることを目的に，粗精製物の誘導体化と分離精製について検討を行った．HP20 粗精製物についてアセチル化，トリエチルシリル化，t-ブトキシカルボニル（Boc）化，ベンジルカルボニル化処理をそれぞれ行い，さらに各種脱誘導体化処理を行った後，ASTN45 株生育促進活性評価を行った．検討した誘導体のうち Boc 化処理を行ったものは，順相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画が可能であり，得られた画分は一部活性の低下は見られたものの，脱 Boc 化後にも活性を示すことが明らかとなった．今回検討した手法は一般に分離の困難な高極性物質の新たな精製法として応用可能であると考えられる．

Leucobacter sp. ASN212 株に対する生育因子の探索

ASN212 株に対する生育因子の単離・精製は以下の流れで行った．すなわち，ASTN45 株生育因子精製過程で示した ③ HP20 カラムクロマトグラフィーにおける 100% メタノール溶出活性画分（25.0 g）の回収，④ 当該画分の LH20 カラムクロマトグラフィー，⑤ 80% メタノール溶出画分（125.0 mg）の逆相 HPLC 分画（Mightysil RP-18GP Aqua）である．LH20 カラムクロマトグラフィーにおいてピンク色のバンドがカラム中で確認され，これらの画分に生育促進活性が認められたため，ポルフィリン系の化合物が疑われた．実際に最終段階の HPLC により得られた画分はいずれもポルフィリン構造を有する類縁体であり，フォトダイオードアレイの検出において特徴的な Soret 帯の吸収を示した．

分取 HPLC によって単離した 6 種の活性画分 A－F から，各種機器分析によってそれぞれ，zinc coproporphyrin I（0.8 mg），coproporphyrin I（0.3 mg），

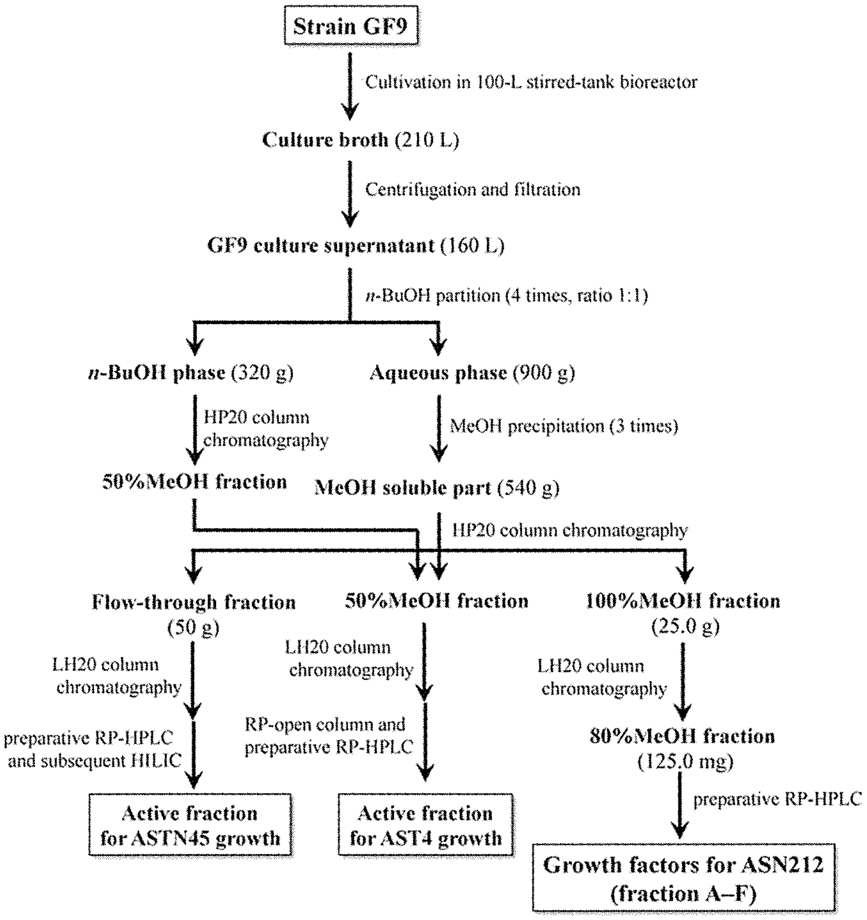


Fig. 2　The isolation and purification procedures of growth factors for strain ASTN45, ASN212 and AST4.

zincphyrin（3.0 mg），coproporphyrin III（1.2 mg），zinc coproporphyrin I monomethyl ester（0.8 mg），zinc coproporphyrin III monomethyl ester（2.0 mg）が同定された（Fig. 3）．（ ）内はそれぞれの収量を表す．このうち，２種の monomethyl ether（E および F）は新規物質であったため，zincmethylphyrin I および III と命名した．ポルフィリンに対する Zn^{2+} イオンの配位は質量分析の同位体ピークより確認された．また，市販の coproporphyrin I ならびに III から Zn^{2+} 錯体を調製した後，HPLC の保持時間，吸光パターン，高分解能 MS の結果を単離品と比較することで構造の裏付けを得ることができた．さらに，coproporphyrin I を用いて，TMS ジアゾメタンによるモノメチルエステル化，続く Zn^{2+} 錯体形成を行ったところ，生成物は単離した zincmethylphyrin I の高分解能 MS の結果と良い一致を示した．

それぞれの活性物質の収量の低さは，同時にこれら生育因子の活性の高さを反映している．実際にこれらの最小有効濃度（MEC）を測定したところ，およそ 10 pg/ml－25 ng/ml という極めて低い濃度において ASN212株の生育促進活性を示した（Table 1）．とりわけ zincphyrin は 10 pg/ml（=14 pM）という驚くべき MEC を示し，Zn^{2+} を持たない coproporphyrin III に比べて 100 倍高い活性を持つことが明らかとなった．一方で，C_4 対称構造を有する coproporphyrin I シリーズは Zn^{2+} の有無によって活性に大きな差異を示さず，coproporphyrin III シリーズに比べても 1/10 倍程度のいくぶん弱い活性を示した．ポルフィリン誘導体によって細菌の生育が刺激される例は，hemin，hematin に関するきわめて古い報告が存在するのみであり（Gibbons & Macdonald, 1960），coproporphyrin 類の活性，Zn^{2+} の寄与については報告が無い．本研究においても hemin，hematin の活性を評価したところ，ともに ASN212 の生育を刺激したものの，その MEC は 10 mg/ml，50 mg/ml と，coproporphyrin シリーズに比べ $1/10^5$－$1/10^6$ 倍の弱い活性を示すのみであった．本研究により coproporphyrin 類という新たなクラスの生育促進活性が属さらには門を超え，他の微生物種に対して極めて効果的にその生育を促進している事実が示された．

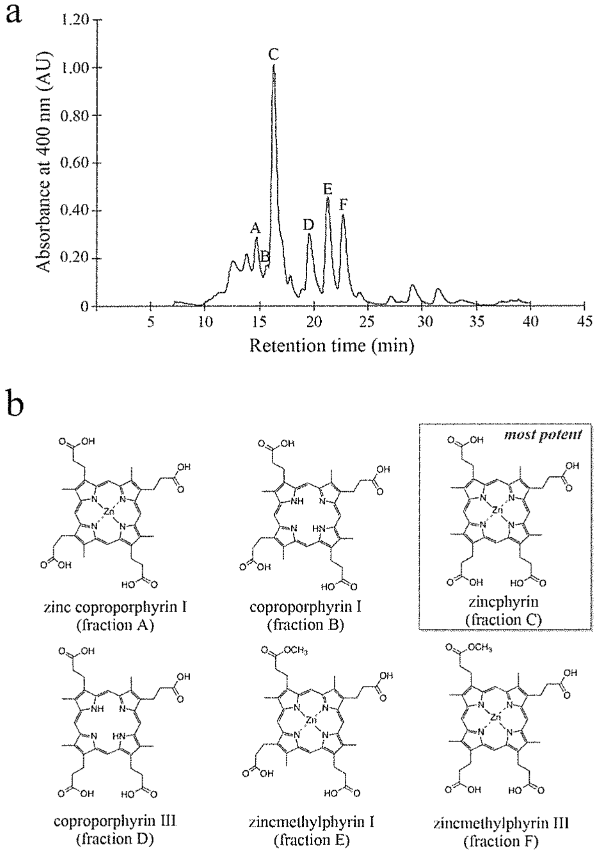


Fig. 3 The identification of growth factors for strain ASN212. a) Reverse-phased HPLC chromatogram (Mightysil RP-18 GP Aqua, eluting with $MeCN/H_2O$ = 53:47 containing 0.1% AcOH) of LH20 active fraction. Alphabets indicate active fractions for the growth of strain ASN212; b) Structures of ASN212 growth factors identified from fractions A–F.

次いで，これらの生育因子が GF9 株自体に及ぼす影響について検討を行った．これらの化合物は GF9 株自体が生産するものであり，他者の生育因子として機能していることから，GF9 株自身の生育に影響しない，もしくは増殖を促進する効果を示すと予想していたが，予想に反して，coproporphyrin 類は GF9 株の生育阻害作用を示した．その IC_{50} は 35 pg/ml - 535 ng/ml と幅があるものの，いずれの化合物においても ASN212 株に対する MEC の数倍-数十倍の値であった．この結果は，これら生育因子が低濃度では他者の生育因子として機能する一方，高濃度では生産者自体に対して毒性を示すことを意味する．さらなる詳細な検討が必要であるものの，この現象は，ASN212 株が生育因子を受け取ることが供給者である GF9 株にとっても有益な結果を与える「相利共生性」が門レベルを超えて存在する可能性を示唆している．

なお Zincphyrin については *Streptomyces* sp. AC8007 (= FERM BP-10537) の生成物として同定されたのが初めての報告であり (Toriya *et al.*, 1993) この時にはラットマスト細胞からのヒスタミン放出を抑制する物質の探索過程で見いだされた．Zincphyrin が上述のように微生物における生育促進微量因子として機能することを見いだしたのは本報告が初めてである．

Table 1 Minimum Effective Concentrations (MEC) of isolated or commercial porphyrins for ASN212
*Isolated porphyrins from strain GF9.

Name of porphyrins	MEC (ng/ml)
Zincphyrin*	0.01
Coproporphyrin III*	1
Coproporphyrin III-hydrochloride	1
Zincmethylphyrin III*	5
Zinc coproporphyrin I*	10
Coproporphyrin I*	50
Coproporphyrin I-hydrochloride	50
Coproporphyrin III tetramethylester	100
Zincmethylphyrin I*	500
Hemin	10,000
Hematin	50,000
Hematoporphyrin (2^{nd} diastereomer)	100,000
Hematoporphyrin (1^{st} diastereomer)	150,000
Protoporphyrin IX	200,000

*Isolated porphyrins from strain GF9.

Catellibacterium nectariphillum AST4 株に対する生育因子の探索

AST4 株に対する生育促進活性は液液分配の際の *n*-ブタノール層ならびに水層の両者において認められたため，*n*-ブタノール層ならびに水層の両方からその精製を検討した．なお，水層については他の 2 菌株と異なり，活性が HP20 カラムクロマトグラフィーの 50% メタノール溶出画分に認められたため，これを精製に用いた．前述の 2 菌株と同様に HP20 カラムクロマトグラフィー，LH20 カラムクロマトグラフィーを行った後，逆相オープンカラム，次いで逆相 HPLC に供することで精製を行った．しかしながら，HPLC によって単一のピークに精製された画分であっても再び HPLC に供した際に複数のピークを与えるなど，物質の分解が起きていることが示唆された．また，NMR，質量分析においても明瞭なピークが観察されない，クロマトグラムの再現性が得られないなど類似の現象が認められた．AST4 に対する生育因子の精製には，今回行った処理よりもいっそうの慎重さが必要であることが明らかとなった．

要　　約

Proteobacteria 門 *Sphingomonadaceae* 科に属する微生物の培養上清がさまざまな微生物の生育を促進することを見いだした．本研究においては *Sphingopyxis* 属細菌 GF9 株の培養上清で生育が著しく促進される *Actinobacteria* 門に属する *Leucobacter* 属細菌 ASN212 株，*Proteobacteria* 門に属する *Catellibacterium* 属細菌 AST4，同じく *Proteobacteria* 門に属する *Bosea* 属に近縁な細菌 ASTN45 を被験菌株として，未知の生育因子の解明を網羅的に試みた．*Sphingopyxis* 属細菌 GF9 株を 100 L スケールの大量培養に供し，溶媒抽出，各種カラムクロマトグラフィーによって，さまざまな低分子物質画分を得た．これらの画分についてマイクロプレート上で被験微生物の生育を促進する極めて安定かつ低分子の物質画分を得た．上記の三つの被験菌株に対する生育促進効果はそれぞれ異なる画分に存在していたことから，*Sphingopyxis* 属細菌 GF9 株は複数の生育促進物質を菌体外に分泌していることが示唆された．このうち *Leucobacter* 属細菌 ASN212 株の増殖を促進する画分の生成を進め，最終的に NMR ならびに各種質量分析法によって zinc coproporphyrin III (zincphyrin) ならびにその誘導体を同定した．次に porphyrin の各種関連物質を合成し，ASN212 株に対する増殖促進効果を調べたところ，zinc coproporphyrin III において 10 pg/ml のレベルで著しい効果が認められ，他の誘導体（例えば zinc coproporphyrin I, coproporphyrin I, coproporphyrin III, hemin, hematin など）に比べ，はるかに低濃度で生育を促すことが判明した．Zincphyrin については微生物での研究例は少なく，少なくともこうした生育促進効果については世界で初めての知見である．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1) Boey Andrew，重冨顕吾，三橋進也，鎌形洋一，生方信 2011. Isolation of growth promoting factor for *Catellibacterium* nectariphilum from *Sphingomonas* sp. 日本農芸化学会2011年度大会
2) 三橋進也，風間祐介，阿部知子，生方信 2013. 重イオンビームによる担子菌の変異株作製に関する研究．日本農芸化学会2013年度大会（仙台）
3) 三橋進也，Bhuiyan Mohammad Nazrul Islam，重冨顕吾，髙井亮吾，鎌形洋一，生方信 2014. *Sphingomonas* sp. GF9 株の生産する *Catellibacterium nectariphilum* AST4^T 株生育因子の単離．日本農芸化学会2014年度大会（東京）
4) 髙井亮吾，Bhuiyan Mohammad Nazrul Islam，三橋進也，鎌形洋一，生方信 2014. *Sphingomonas* sp. の異種バクテリアに対する増殖因子の探索．日本農芸化学会平成２６年度北海道・東北合同学術集会（札幌）
5) Bhuiyan Mohammad Nazrul Islam，三橋進也，重冨顕吾，鎌形洋一，生方信 2015. Porophyrins as required growth promoting compound(s) for uncultured bacteria ASN212 strain. 日本農芸化学会2015年度大会（岡山）
6) 髙井亮吾，重冨顕吾，Bhuiyan Mohammad Nazrul Islam，三橋進也，鎌形 洋一，生方信 2015. *Sphingomonas* sp. の異種バクテリアに対する増殖因子の探索．日本農芸化学会2015年度大会（岡山）

原著論文

1) Bhuiyan, M. N. I., Takai, R., Mitsuhashi, S., Shigetomi, K., Tanaka, Y., Kamagata Y. & Ubukata, M. 2015. Zincmethylphyrins and coproporphyrins, novel growth factors released by Sphingopyxis sp., enable laboratory cultivation of previously uncultured Leucobacter sp. through interspecies mutualism. J. Antibiot. *In press*. doi:10.1038/ja.2015.87.

謝　　辞

本研究の遂行にあたり，寄付講座助成によりご支援頂きました公益財団法人発酵研究所に深く感謝致します．

文　　献

Eberhard, A., Burlingame, A. L. Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H. & Oppenheimer, N. J. 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. Biochemistry **20**: 2444–2449.

Gibbons, R. J. & Macdonald, J. B. 1960. Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides metaninogenicus*. J. Bactriol. **80**: 164–170.

Schauder, S. & Bassler, L. B. 2001. The language of bacteria. Genes Develop. **15**: 1468–1480.

Staley, J. T. & Konopka, A. 1985. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annu. Rev. Microbiol. **39**: 321–346.

Tanaka, Y., Hanada, S., Manome, A., Tsuchida, T., Kurane, R., Nakamura, K. & Kamagata, Y. 2004. *Catellibacterium nectariphilum* gen. nov., sp. nov., which requires a diffusible compound from a strain related to the genus *Sphingomonas* for vigorous growth. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **54**: 955–959.

Tanaka, Y., Hanada, S., Tamaki, H., Nakamura, K. & Kamagata, Y. 2005. Isolation and identification of bacterial strains producing diffusible growth factor(s) for *Catellibacterium nectariphilum* strain AST4^T. Microb. Environ. **20**: 110–116.

Toriya, M., Yaginuma, S., Murofushi, S., Ogawa, K., Muto, N., Hayashi, M., & Matsumoto, K. 1993. Zincphyrin, a novel coproporphyrin III with Zinc from *Streptomyces* sp. J. Antibiot. **46**: 196–200.

平成25年度一般研究助成の研究報告

助成期間：平成25年４月～平成27年３月

原生動物の細胞外分泌物にて集積可能な細菌の探索およびそれら細菌の生理的諸性質の解明

多羅尾　光　徳

東京農工大学大学院農学研究院
tarao@cc.tuat.ac.jp

目的：原生動物は細胞外にさまざまな代謝物を分泌するが，それらが他の微生物群に及ぼす機能はいまだ不明である．この細胞外分泌物（ECE）をシグナル物質または増殖促進因子として利用する細菌が自然細菌群集のなかには存在するとの仮説を立て，原生動物との共培養によって集積が可能な細菌を分離することを目的とした．分離された細菌の系統学的位置づけや生理的諸性質を調べた．

方法：中央を孔径0.1 μmのメンブレンフィルターで隔てた二槽培養器を用いて淡水から採取した細菌群集を原生動物 *Tetrahymena thermophila* と共培養した．細菌や原生動物はこのメンブレンフィルターを通過しないが，原生動物のECEはろ過するため，細菌は原生動物の捕食の影響を受けず，かつECEの影響を受ける．集積した細菌群集から抽出したDNAの，16S rDNA領域を増幅した後，DGGE法により増幅したDNAを塩基配列の違いに基づいて分離し，細菌群集構造を解析した．また，*T. thermophila* を10日間，無菌培養した培養液を用いて平板寒天培地を作成した．この培地に適宜希釈した淡水試水を塗抹し，暗所25℃にて20日間培養し，出現するコロニー数の経時変化を観察した．また，出現したコロニーをランダムにピックアップし，細菌株を分離した．

結果・考察：二槽培養器を用いて，細菌群集を *T. thermophila* のECEに暴露して集積培養した結果，細菌群集の多様性は，ECEに暴露しなかったときよりも低下した．細菌種の中には，*T. thermophila* のECEによって生育が阻害されるものが存在することが考えられた．また，興味深いことに，細菌群集は *T. thermophila* と共培養されたときは肉眼で観察できるほどのフロックを形成したが，細菌群集のみを培養したときはフロックを形成しなかった．すなわち，*T. thermophila* のECEは細菌の生理活性に影響を及ぼす可能性が考えられた．淡水試水12試料のうち，*T. thermophila* のECEを含む平板寒天培地に塗抹した結果，ECEを含まない培地よりも多くのコロニーが形成された場合（$p<0.05$）が2例，少なかった場合（$p<0.05$）が2例であった．原生動物のECEによってコロニー形成が促進される細菌と，阻害される細菌のあることが示された．ECEを含む平板寒天培地から分離した細菌のうち，*Flavobacterium johnsoniae* と高い相同性（16S rDNAの相同性で94%以上）を示す細菌株が複数の試水から分離された．原生動物のECEによってコロニー形成を促進される細菌は系統的に近い可能性が考えられた．分離した細菌株のうち，*Roseococcus sudyntuyensis* と96%以上の相同性を示した細菌を細胞外分泌物を含む液体培地にて培養すると，フロックを形成し且つ赤色を呈した．このことからも，*T. thermophila* のECEは細菌の生理活性に影響を及ぼすと考えられた．

門を超えて分布する脱ハロゲン化呼吸細菌の分離および分類学的特性評価

吉　田　奈央子

豊橋技術科学大学，現 名古屋工業大学
yoshida.naoko@nitech.ac.jp

目的：有機ハロゲンは土壌・地下水汚染の原因物質であるとともに，陸生および海洋性の生物活動から3,500物質以上が産生されることが報告されている．本研究は，特に有機ハロゲンの消失に重要な役割を果たすものの，培養が困難な理由から純粋分離株が数少ない脱ハロゲン化呼吸細菌に着目し，新たな脱ハロゲン化呼吸細菌の分離を行うとともに生理学的特徴およびゲノム塩基配列解析を通して，これまで限定的と考えられてきた系統学的分布について再考することを目的とした．

方法：新たな脱ハロゲン化呼吸細菌の探索にあたり，分離源として，メタゲノム解析により脱ハロゲン化呼

吸細菌の存在が示唆されるものの分離報告例がない深海堆積物に着目し，新たな脱ハロゲン化呼吸細菌の分離を試みた．10 mM 乳酸ナトリウムおよび 1 mM テトラクロロエチレン（PCE）を補填したマイクロコズム培養の後，継代培養を繰り返し，アガーシェイク培養を行った．また，申請者がこれまでに分離した脱ハロゲン化呼吸細菌の中で著しく脱ハロゲン化活性の高い *Geobacter* sp. AY 株について生理学的特性評価およびゲノム解析を行った．

結果・考察：深海堆積物から PCE をトリクロロエチレン（TCE）へと脱ハロゲン化し増殖する脱ハロゲン化呼吸細菌として *Gammaproteobacteria* 綱の *Acinetobacter venetianus* に 99% の 16S rRNA 遺伝子相同性を有する NT11 株，さらに TCE を 1,2-シスジクロロエチレンに脱ハロゲン化し *Desulfomonile chloroethanica* に 95% の 16S rRNA 遺伝子相同性を有した NT8 株を分離した．また，1,2-ジクロロエタン（DCA）をエチレンに無毒化する脱ハロゲン化呼吸細菌として分離した *Geobacter* sp. AY 株について生理学的特性評価およびゲノム解析を行った結果，本株は PCE 脱ハロゲン化呼吸細菌として分離された *Geobacter lovleyi* に属する株と判断されたものの，脱ハロゲン化速度が基準株である SZ 株に比べ 2 オーダー高い 3×10^{-7} μmol cell^{-1} h^{-1} を示した．例えば，OD=0.1 程度の細胞懸濁液中に 10 mM の DCA を補填すれば 1 日で全てエチレンに脱ハロゲン化する活性である．ゲノム解析の結果，SZ 株の脱ハロゲン化酵素遺伝子が染色体上に 2 コピー存在するのに対し，AY 株の脱ハロゲン化酵素遺伝子は幅広い脱ハロゲン化スペクトラムを有する *Dehalobacter* 属細菌から水平伝播された 1 細胞あたり 10～30 コピーのプラスミド上に存在することが示された．これまでにプラスミド上に脱ハロゲン化遺伝子を有する分離株は存在せず，さらに AY 株が著しく高い脱ハロゲン化呼吸活性を有することから，DCA のみならず他の有機ハロゲンの脱ハロゲン化呼吸活性の異種発現宿主としても応用展開が期待できる．

環境工学的手法を用いたメタン酸化に関与する未培養微生物の集積培養と系統分類

幡 本 将 史

長岡技術科学大学工学部
hatamoto@vos.nagaokaut.ac.jp

目的：土壌では温室効果ガスであるメタンが生成されるが，一方でメタンが消費される事もわかっている．最近，嫌気環境下でのメタン酸化の電子受容体として硫酸，硝酸や亜硝酸だけではなく，鉄やマンガンも還元される反応が確認された．また大気濃度の極低濃度のメタンも酸化分解されることが分っている．しかしながら，実際の反応を担う微生物については，16S rRNA 遺伝子配列にもとづく系統的位置さえよくわかっていないのが現状である．そこで本研究ではこれらメタン酸化微生物を集積培養し，その系統分類学的位置を明らかにすることを目的とした．

方法：集積培養は，連続培養法を用い容積 255 cm^3 の円筒形ガラスカラム内部に汚泥保持担体あるいは土壌サンプルを詰めたバイオリアクターを用いた．運転温度は 30℃ とし，培地には無機塩培地を用いた．電子受容体として用いた鉄は塩化第二鉄を用いた．極低濃度のメタンを酸化する微生物の集積培養には 8.9 ppmv のメタンを含む空気を基質として供給した．

結果・考察：鉄を電子受容体として用いたメタン酸化微生物の集積培養の後，細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析を行った結果，一般的に鉄還元細菌と知られている *Geobacter* 属や *Shewanella* 属と考えられる細菌は検出されなかった．しかし，主に二種の *Rhodocyclaceae* 科の細菌が優占的に検出された．その内の一種は未培養の細菌であった．古細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析も行ったが，古細菌は検出されなかった．以上のことから，鉄を電子受容体とした嫌気的メタン酸化反応に古細菌は関与しておらず，*Rhodocyclaceae* 科の細菌がメタン酸化と鉄還元反応に関与している可能性が考えられた．極低濃度のメタンを酸化する微生物の集積培養には，土壌

を対象とした *pmoA* 遺伝子の検出とメタン酸化活性の測定を行い，メタン酸化細菌の存在を確認した植生の異なる2種類の土壌を培養に使用した．低濃度のメタンをカラムに連続的に供給しメタン酸化細菌の培養を行った結果，メタン酸化活性が 3.1-5.3 ng-CH_4・hr^{-1}・g-$soil^{-1}$ 程度と培養前の土壌と比較して著しい活性の増加が確認できた．*pmoA* 遺伝子を標的としたクローン解析を行った結果，*Methylocystis* sp. 0510-P-6 の *pmoA* 遺伝子配列と95%程度の相同性を示したものと，*Methylocystis* sp. Pi5/4 の *pmoA* 遺伝子配列と97%程度の相同性を示した配列が優占して検出された．*Methylocystis* sp. 0510-P-6 は台湾の畑土壌，*Methylocystis* sp. Pi5/4 はフィリピンの水田から検出されたものであった．これらは，type II と呼ばれるメタン酸化細菌でありこのグループのメタン酸化細菌が低濃度メタンの酸化に関与していることがわかった．

東北地方菌類の Epitype 標本および分離菌株の確立

本　橋　慶　一

東京農業大学地域環境科学部
k3motoha@nodai.ac.jp

目的：澤田兼吉は戦後間もなく東北地方において植物寄生菌の調査を行って「東北地方菌類調査報告」をまとめ，多くの新種を含む800余種の記載を行った．これは世界的にも重要な植物寄生菌類誌として知られる．それから60年が経過し，形態的特徴および分子系統解析手法の導入による分類体系の再編が行われ，それら多くの所属が現在不詳とされており，再検討が必要となっている．また，Type 標本が現存しても，分離菌株が存在しないことから近年の分類学的研究においては必須である分子系統関係が未詳となっている．そこで本研究では，これらの菌類の再検討を可能とするため，Lectotype 標本を選定すると共に Epitype 標本の作製とその分離菌株の確立を目的とする．

方法：澤田兼吉による「東北地方菌類調査報告」に記載された植物病害標本のリストに基づいて，東北地方を中心に植物寄生菌による植物病害標本の採集を行った．標本は一部を切り取り，徒手切片を作製した後，シェアー液で封入し，プレパラート標本とした．作製したプレパラート標本は光学顕微鏡にて観察し，菌種同定のため各器官の形態的特徴および大きさの測定値を記録した．一方で，得られた標本からは単胞子分離法による分離を行い，純粋培養株を確立した．得られた分離菌株から ITS および 28S rDNA のシークエンス配列を決定し，最大節約法，最尤法および Bayesian 法による分子系統解析を行い，系統学的位置の把握を行った．これらの植物寄生菌による植物病害標本，分離菌株および DNA は東京農業大学地域環境科学部電子顕微鏡室にラベリングして保管した．

結果・考察：東北地方を中心とした植物寄生菌の病害標本を採集した結果，76標本を採集し，25属を同定，50分離菌株を得た．そのうち，澤田兼吉が新種記載したヒノキ科アスナロ属およびヒノキ属に寄生する植物病原菌である *Phoma pilospora* と形態学的特徴が一致する病害標本2点が得られた．これらの形態学的特徴に基づく分類学的再検討を行ったところ，本菌は狭義 *Phyllosticta* 属菌に転属すべき種である事が判明した．また，分離菌株の ITS および 28S rDNA を用いた分子系統解析から *Phyllosticta* 属菌のなかでも単系統を形成し，独立した種であることが推定された．一方，澤田兼吉が *Pho. pilospora* の新種記載に用いた Syntype 標本7点も再検討した結果，やはり，形態学的特徴から *Pho. pilospora* は *Phyllosticta* 属菌に転属すべき種であることが明らかとなった．本研究により本菌の新たな所属が明らかになったと共に分類学上重要な Epitype 標本および分離菌株が確立された．今後は，本菌によるヒノキ科植物の病原性の理解および分類学的研究の発展が期待される．

リボソームタンパク質をバイオマーカーとした質量分析法による *Aspergillus* 属真菌の新しい系統分類法の開発

佐　藤　浩　昭

産業技術総合研究所環境管理研究部門
sato-hiroaki@aist.go.jp

目的：カビ等の真菌は，これまで形態学および有性生殖能に基づいて分類されてきたが，真菌の多くは有性世代を持たないため，最近では分子進化系統に基づいた分類への移行が検討されている．真菌の新しい同定・分類法の開発が求められているなか，マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI-MS）が迅速同定の手段として注目されている．しかし，固い細胞壁を有する真菌の分析においてはバイオマーカータンパク質の抽出やマススペクトルの再現性が悪く，同定結果の信頼性が低いという課題があった．本研究では，ハウスキーピングタンパク質であるリボソームサブユニットタンパク質群（以下，リボソームタンパク質）を指標とした，MALDI-MS による *Aspergillus* 属真菌の新しい系統分類法の開発を試みた．

方法：試料菌株には，ゲノム解読された *Aspergillus* 属真菌７種８株（*Aspergillus fumigatus* 2 株, *Aspergillus oryzae, Aspergillus niger, Aspergillus nidulans, Aspergillus kawachii, Aspergillus clavatus, Neosartorya fischeri* 各１株）を用いた．各菌株をポテトデキストロース液体培地（PDB）あるいは寒天培地（PDA）に接種し，25℃あるいは37℃で４日間培養した後に，菌体を回収して破砕及び遠心分離によりリボソームタンパク質画分を得た．マススペクトルは，マトリックス剤にシナピン酸を用い，島津製 AXIMA CFR plus のリニア—モードで観測した．

結果・考察：マススペクトルのピーク質量とゲノム配列から予測されるタンパク質の計算質量を比較しながら，リボソームタンパク質を帰属し，同定用のバイオマーカーリストを作成した．その過程で，公共データベースに登録されている翻訳アミノ酸配列には，遺伝子配列のイントロン部分の誤判定により誤って登録されているものがあることを明らかにした．次に，菌体破砕法とリボソームタンパク質の簡易精製法を最適化して得られたマススペクトルで，ピークが明瞭に観測できる質量が２万以下のリボソームタンパク質49種類について，*Aspergillus* 属真菌のマススペクトルの比較を行った．遺伝学的に類縁性が高いとされている *A. fumigatus* と *N. fischeri* では約６割のサブユニットタンパク質に，*A. niger* と *A. kawachii* では約３割のサブユニットタンパク質に違いがみられ，リボソームタンパク質の差異は分子系統をある程度反映していることが示唆された．それ以外のサブユニットタンパク質の質量は菌種に固有であり，リボソームタンパク質のピークに着目すれば，培養条件が大きく異なる菌株についても正確に同定することができた．以上のように，リボソームタンパク質の調製法を最適化し，信頼性の高いバイオマーカーリストを作成することにより，MALDI-MS を用いて，*Aspergillus* 属真菌を種レベルで分類・識別することが可能であることが示された．

断片化したDNAの増幅とシーケンスによる本郷ハーバリウム未同定種の再同定と分類学的記載の促進

今　村　彰　生

北海道教育大学教育学部旭川校
ginryou715@yahoo.co.jp

目的：本邦菌類分類学の泰斗，本郷次雄氏の Hongo herbarium の標本約6500点は，没後自宅にて保管されていたが，2011年に大阪市立自然史博物館に移管された．これには *Amanita* spp., *Boletus* spp.（広義），*Cortinarius* spp. などの未同定標本が多数含まれるが，未同定種や未記載種の形態的特徴についても詳細に記述されている．本研究は，本郷標本の DNA シーケンスデータの蓄積と形態情報との統合によって，標本に立脚した菌類分類学の進展に寄与する事を目指した．

方法：標本燻蒸に用いられたパラホルムアルデヒドによりDNAが断片化していると考えられたため，本研究では通常のDNAバーコーディングのプロトコルを用いず，既知の塩基配列を用いて属ごとに特異的プライマーを設計し，短い領域を対象としたPCRおよびDNAシーケンスを試みた．DNAデータベースARSA（DDBJ，http://ddbj.nig.ac.jp/arsa/）を用いて，*Boletus* 属から42種，*Cortinarius* 属から80種のITS領域の配列を取得し，ClustalWによりアライメントを行い，ITS1領域およびITS2領域のそれぞれから属内での相同性の高い領域を抽出した．得られた配列を目視で確認し相同性の高い領域の塩基配列を抽出し，Primer3（http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/）を用いてプライマーペア同士のアニーリング，セルフアニーリングを回避し，かつTm値を考慮したプライマーを設計した．*Boletus* 属ではforward primerを6, reverse primerを1設計し，*Cortinarius* 属ではforward primerを3, reverse primerを2設計した．

結果・考察：PCR条件などを検討した．これまでの研究からPCR増幅の成功率が低いと考えられ，本研究ではnested PCRを基本プロトコルとした．その上で，増幅サイクルにおけるアニーリング温度を段階的に変化させることや，DNAテンプレートの希釈率について重点的に検討した．さらに結果の信頼性を担保するため，PCRの結果が比較的良好だった，ITS2領域を対象としたプライマーペア（1st PCR: Bol2mvF/ITS4, 2nd PCR: Bol2l2F/ITS4 Bol inner）を用いて *Boletus* 属の4標本に対して，一連のPCRとシーケンスを複数回繰り返し，DNAライブラリとの照合を行った．とくに，断片化したDNAを扱う観点からnested PCRを実施しているため，PCRサイクルごとのアニーリング温度の段階的変化と各サイクルの反復を重点的チェック対象として条件の検討と変更を加えた．

その結果，*Boletus* 属の10標本，*Cortinarius* 属の3標本について120 bp前後（範囲96 – 264 bp）の塩基配列が得られ，DDBJ BLASTとの照合が可能であった．

短い領域を対象にnested PCRを実施しているためfalse positiveの危険性も残されていたが，一連のPCRとシーケンスを複数回繰り返したことによって，再現性のある配列が得られることが示されたと考えられる．一方で，ライブラリとの照合結果には *sensu* Hongoの同定とは異なる点も見られたが，これらの成果は種の分類や同定における傍証的データとして，または近年の分類体系の中での帰属の検討などに活用できる可能性があり，プライマーの追加設計により解読範囲を拡大することが望まれる．

藻類を細胞内共生させる原生動物における，共生藻保有の意義に関する研究

保科　亮

長浜バイオ大学バイオサイエンス学科
r_hoshina@nagahama-i-bio.ac.jp

目的：細胞内共生を通じた葉緑体の並行移動は，真核生物の様々な系統に光合成生物を出現させた．いわゆる二次共生による葉緑体獲得へと至るステップとして，環境中の藻類を取り込み短期的に維持する第一段階，共生体を継続的に維持する第二段階，共生体の核が矮小化する第三段階が提示されている．淡水域では多数の球状緑色藻を細胞内に保有する原生生物（MARP: Multi-algae retaining protist）が散見される．これらの共生レベルはかねがね第一段階ととらえられているが，実態はわかっていない．本研究ではMARPの共生実態を探るべく，繊毛虫を中心として総合的な研究をおこなった．

方法：琵琶湖に定点ポイントを設定し，2年間，出現するMARPをサンプリングし，共生藻のITSと18S rDNAの解析をおこなった．併せて，同所的に出現する緑色藻のフロラ解析をおこなった．

MARPのモデル生物である繊毛虫ミドリゾウリムシ（*Paramecium bursaria*）において，共生藻の置換実験，および培養環境に関する反応を探った．

結果・考察：定点に出現した共生藻のrDNA解析をおこなったところ，4種の繊毛虫種（以下4C）で興味深

い結果を得た．共生繊毛虫から直接緑色藻rDNAをターゲットとしたPCR産物をダイレクトシークエンスすると，4Cではきれいなピークが得られることから，ほぼないし完全な形で共生藻のクローン化が起きていると思われる．また，4Cがもつ共生藻は同一種であり，我々は“ChlorB”と呼んでいる．ChlorBはオーストリアからも数種の繊毛虫共生藻として報告があり，グローバルな共生藻である可能性がある．4C各種がもつChlorBは進化速度の速いITS領域やイントロンの相違から宿主ごとに識別できた．さらに，これら変異領域が2年間のサンプリングで変化が見られないことから，4Cは外部から共生藻を取り込むのではなく，共生体を長期的に維持，すなわち共生の第二段階にあると判断できる．なお，同時におこなった周辺の藻類フロラ解析からChlorBは出現していない．

島嶼，湿原，その他の湖沼からも共生繊毛虫を得ているが，宿主・共生種とも4Cと一致するものがなく，細胞内共生の状況が一般化できるかどうかは，今後のさらなるサンプリングが鍵となろう．

ミドリゾウリムシの共生藻の置換実験をおこなった．光合成産物を細胞外に放出する本来の共生藻（*Chlorella variabilis* あるいは *Micractinium reisseri*）を持つ場合，放出しない自由生活の藻（*C. sorokiniana*）を共生させた場合，また藻類なしの4条件において，ミドリゾウリムシの増殖率には変化が見られず，光合成産物の供出が宿主の成長に直接寄与するわけではなさそうだ．また，ミドリゾウリムシ培養環境に関する反応を探ったところ，低温・暗黒下において共生藻が多くの油滴を産生，また宿主細胞の大型化がみられた．このレスポンスは，MARPが共生藻を保有する意義の根幹にかかわる可能性もあり，今後とも注目していきたい．

水生昆虫の腸内寄生菌ハルペラ目の網羅的探索と系統解明

佐 藤 大 樹

森林総合研究所森林昆虫研究領域
hirokis@ffpri.affrc.go.jp

目的：ハルペラ目（キクセラ亜門）は，主に渓流に生息する水生昆虫の腸壁に付着生活する．本目は系統学的に混乱している旧接合菌類の再整理の鍵となる分類群の一つである．既知種約250種の内，日本では17種の記録に限られる．海外では約200菌株が保存されているが日本にはない．本邦産は殆どがハエ目由来種であるため宿主範囲を広げ網羅的に探索し，菌株の確立と共に本邦の代表的ハルペラ目相を解明することを目的とした．

方法：筑波山，帯広市，上田市，川崎市，西郷村（福島県），桧原村（東京都）等において，秋から春に沈水した落葉等からカゲロウ目，カワゲラ目，ハエ目の幼虫を採集した．鋭利なピンセットで腸を摘出して水封入のプレパラートを観察し，ラクトフェノールを用いて保存した．一部は，菌の付着した腸を滅菌水で洗浄し，抗生物質を添加した10倍希釈の牛脳心臓抽出物液体培地で分離した．確立菌株の28S rRNAのD1/D2領域の系統解析を行った．

結果・考察：10種以上の未記載種を含む14属26種が採集された．過去の記録と合わせ本邦産は16属35種となった．特に未探査の宿主に着目し，世界で初めてチラカゲロウ科，ミドリカワゲラ科，ヒロムネカワゲラ科，アミカ科から菌を記録できた．得られた種を列挙する．**1.** *Bojamyces repens*，**2.** *Capniomyces* sp.，**3.** *Ephemerelomyces* sp. 1.，**4.** *Ephemerelomyces* sp. 2. 上田市（チラカゲロウ科），**5.** *Genistelloides* 属菌種2種，**6.** *Ejectosporus* 属菌種4種，**7.** *Harpella melusinae*，**8.** *Harpella* sp.，**9.** *Lancisporomyces* sp.，**10.** *Orphella haysii*，**11.** *Pennella angustispora*，**12.** *Simuliomyces microsporus*，**13.** *Smittium imitatum*，**14.** *Smittium simulii*，**15.** *Stachylina* sp. 1.（アミカ科），**16.** *Stachylina*

sp. 2., **17.** *Trichozygospora chironomidarum*, **18.** *Zanchudomyces culisetae*, **19.** レゲリオミケス科（Legeriomycetaceae）菌種 1., **20.** レゲリオミケス科（Legeriomycetaceae）菌種2., **21.** レゲリオミケス科（Legeriomycetaceae）菌種3.（ミドリカワゲラ科), **22.** レゲリオミケス科（Legeriomycetaceae）菌種 4.（ヒロムネカワゲラ科）．筑波山から11種，クロカワゲラ科から７種が記録された．また，ブユ科では４種/頭の混合感染例があった．

Zanchudomyces culisetae（２株），*Smittium imitatum*（４株）を確立し，日本初保存の菌株としてNBRCに寄托した．*S. imitatum* は分子系統解析により近縁種と区別できた．

今回，短期間で多くの菌種を採集できた理由として，日本は地形が複雑で，狭い範囲の様々な生態的ニッチに宿主となる幅広い分類群の昆虫種が生息していることが考えられた．各地域フロラの比較のための定点として，筑波山では集中的に採集した．容易に採集できる宿主を用いたので，得られた11菌種は筑波山の代表的なフロラ構成種だと考えられる．一方，ブユ科を宿主として *Harpella melusinae* は筑波と帯広で採集されたが *Harpella* sp. は帯広のみで採集され，菌種による生息環境の志向性が考えられた．

今後，得られた各種の記載を行い，さらには季節による菌の感染率の変動や宿主の系統関係と菌の系統関係の対応など，菌と宿主を併せた研究に発展させたいと考えている．

ピロリ菌における内在性バクテリオファージの保有状況の検討とそれらの分類学的・生態学的解析

松崎茂展

高知大学医学部
matuzaki@kochi-u.ac.jp

目的：最近我々は，ピロリ菌に感染するバクテリオファージ２株（KHP30，KHP40）を分離し報告した．これらのファージはいずれも尾部を保有しない球形ファージで，約 26 kbp の２本鎖 DNA をゲノムとして保有していた．更に，これらのゲノム塩基配列は相互に高い相同性を示すことから，KHP30 と KHP40 は近縁のファージと考えられた．また，少なくとも KHP30 は，その DNA がピロリ菌ゲノムに挿入されることなく，エピゾームとして細胞質に内在していると予想され，いわゆる偽溶原性を示すと考えられた．その一方で，これらのファージのゲノム上には，ファージの溶原性（宿主菌ゲノムへのファージゲノム挿入）に関与するインテグラーゼ遺伝子（*orf2*）が存在すると予想された．本研究では，KHP30，KHP40 に関連するファージ（KHP30 様ファージ）のピロリ菌株における分布状況を検討し，宿主ゲノムへのファージゲノムの挿入の可能性を検討した．

方法：上記２株のファージを遊離しているピロリ菌２株を含む 177 株についてゲノム DNA を抽出し，KHP30 様ファージゲノム上に存在すると予想されるビリオンタンパク質遺伝子 *orf13*, *orf14*, *orf15* をターゲットにして PCR を行なった．また，*orf13* のみ PCR 陽性を示した NY40 株について，次世代シークエンサーにより全ゲノム配列を解読した．

結果・考察：ピロリ菌 177 株中，上記プライマーすべてで陽性であったのは，KHP30 遊離株 NY43 と KHP40 遊離株 KMT83 のみであった．このことから，活性ファージを保有しているピロリ菌株は，1.1%（2/177）程度であると考えられた．一方，NY40 株は *orf13* のみが陽性であったものの，本菌株の培養上清中への活性ファージの放出は認められなかった．

次に，NY40 株の全ゲノム塩基配列を解読した結果，本菌株のゲノムサイズは約 1.7 Mbp で，ゲノムの一箇所に約 24-25 kbp の KHP30 様ファージの DNA の挿入が認められた．その挿入部位（*attL*, *attR*）は，データベース検索の結果，ヨーロッパ株 B38 のゲノムにおける KHP30 様ファージの場合とほとんど同じであることが明らかとなった．以上から，KHP30 様ファージの DNA は，部位特異的に挿入されると考えられた．

しかし，NY40株に挿入されたKHP30様ファージDNA領域内には，逆位，欠失，およびトランスポゼース遺伝子の挿入などが見られ，著しいファージゲノムの再編が生じていた．このファージゲノムの再編のため，NY40株からは活性ファージが産生されないと予想された．さらに，既報のピロリ菌ゲノムのデータベースの解析により，KHP30様ファージゲノムが挿入されている他の菌株の多くでも，挿入ファージゲノムの再編が認められた．このことから，KHP30様ファージは，そのゲノムを菌ゲノムに部位特異的に挿入できるものの，挿入されたファージDNAは，速やかに不活性化されると考えられた．

以上から，KHP30様ファージの主要な生活環は，溶菌サイクルと偽溶原サイクルであり，溶原サイクルも存在するが，それは極めて不安定であると考えられた．

植物根を『選択圧の場』として利用する新規な放線菌選択分離法の開発

山　村　英　樹

山梨大学医学工学総合研究部
hyamamura@yamanashi.ac.jp

目的：従来の放線菌の選択分離法は「熱」や「薬剤」による選択圧を土壌や培地といった『場』に加えることで優占種を抑制し，目的放線菌の選択的な生育を促すものである．しかし，従来法では選択的に分離できない放線菌属種が存在するため，新たな視点から分離法を発想する必要がある．そこで，劇的な環境変化を付与できる『場』として土耕から水耕栽培に移植した植物根を選び，希少放線菌の選択分離を試みた．

方法：市販の培養土3点，畑地土壌9点，林土壌6点と河川土壌2点の計20点の土壌を用いて30℃の植物インキュベーターでコマツナの土耕栽培を1週間行い，一方は土耕栽培を継続し，もう一方の株は水耕栽培へ移植した．その後，さらに1週間栽培を行い，土耕栽培を継続したコマツナについては根圏土壌および根を，水耕栽培へ移植した株については根を回収した．回収した各サンプルを希釈平板法にて放線菌及び一般細菌の菌数計測を行った．放線菌分離株については，16S rDNA配列による属種の簡易同定を行った．分離株の有用性検証の一環として希少放線菌分離株38株についてインドール酢酸（IAA）生産試験を行い，数株についてはコマツナ水耕栽培に施用し，植物生長促進効果があるのかを調査した．

結果・考察：土耕－水耕移植栽培した植物根は土耕栽培根と比べて，*Streptomyces* 属が減少し，一方で希少放線菌の割合が増加していた．また，分離株の16S rDNAを用いた属種の簡易同定を行ったところ，土耕－水耕移植栽培した植物根からは *Pseudonocardia* 属や *Kribbella* 属が多く分離され，選択的に分離可能である事が確認できた．選択分離ができた属のうち *Pseudonocardia* 属は *Pseudonocardia carboxydivorans* が最も多く分離され，次いで *Pseudonocardia dioxanivorans*, *Pseudonocardia halophobica* など13種を分離する事が出来た．また，*Kribbella* 属は *Kribbella shirazensis* など9種を分離する事が出来た．一方，IAA生産試験では *Pseudonocardia alni* So4-333株および *P. carboxydivorans* So3-305株が高IAA生産性を示し，これら2株についてコマツナの水耕栽培試験に施用したところ，顕著な生育促進効果が見出された．

本研究では，選択圧を与える『場』として土耕から水耕栽培に移植した植物根を選ぶことによって土壌放線菌の主要属である *Streptomyces* 属の出現を抑えると共に希少放線菌 *Pseudonocardia* 属および *Kribbella* 属の出現頻度を上げることに成功した．今後は，栽培する作物を変えることにより分離される放線菌に違いが出るのか，さらに放線菌と植物との関係性について解明していきたい．

微好気培養法を用いた水生菌類の探索と系統進化の解明

中 桐 昭

鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター
nakagiri@muses.tottori-u.ac.jp

目的：これまで菌類（真菌類）は一般に好気性生物と考えられ，低酸素条件での菌類の探索や分離は行われてこなかった．しかし，嫌気環境において不完全な脱窒反応（NO_3^- から N_2O まで還元）を行う菌類の存在が報告されている．水中は酸素が欠乏しやすく，水中の基質の分解に関与する菌類の中には低酸素環境に適応した未知の菌類が生息している可能性がある．本研究では，水界（淡水域）の低酸素環境の植物遺体を分離源にし，低酸素分離法という新たな分離法によって，水生菌などの菌類を分離して，その性状など多様性を明らかにすること，さらに新たな菌類遺伝資源となる未知の菌を探索して，その系統位置を明らかにすることを目指して研究を行った．

方法：基質の採集 — 2014年6月，7月，9月に，鳥取県鳥取市上町の樗谿（おうちだに）公園内の大宮池で，水底（低酸素）に堆積した枯死葉（コナラ，アラカシ，サクラ）を各10枚ずつ採集した．

菌の分離 — 低酸素分離法を用いた菌の分離：低酸素や中酸素条件に適応している菌を選択的に分離するため，様々な酸素条件で前培養と本培養を行う2段階培養法を開発した．まず前培養として，3種類の溶存酸素（DO）条件（低：3.4 – 24.4%，中：31.8 – 52.0%，高：71.2 – 100.4%）の液体培地で1週間基質を培養した後に，本培養として，3種類の気相酸素条件（低：約0%，中：10%，高：大気 O_2 約20%）の寒天培地上で基質の本培養を行った．基質から伸長した菌糸や分生子を純粋分離し，培養株を得た．

菌の培養・同定 — 分離株は光学顕微鏡による形態観察および ITS，LSU D1/D2 領域やヒストン H3 遺伝子の塩基配列に基づく相同性検索によって菌の種同定や分類位置の確定を行った．

酸素条件に対する性状調査 — 分離株を3種類の酸素条件（低：N_2 100%，中：O_2 10%，高：O_2 20%）で培養し，酸素条件に対する菌糸生長速度およびコロニー中の分生子形成領域の拡大速度を調べた．

結果・考察：3種類の酸素条件で分離された菌は，コナラの葉で13属/11属/9属（低/中/高酸素条件の順），アラカシの葉で7属/8属/10属，サクラの葉で1属/1属/2属であった．培養性状調査の結果から，分離菌株は低酸素条件で菌糸生長および分生子形成が良好な低酸素菌2属2種（*Aspergillus* sp., *Dactylaria* cf. *obtriangularia*），中酸素条件で良好な中酸素菌1属1種（*Trametes* sp.）が分離されたほか，高酸素条件で良好な高酸素菌が7属7種，広範囲の酸素濃度に適応している菌6属6種に類別された．しかし，分離条件と分離株の性状には明瞭な対応は見られなかった．これは，本研究で用いた低酸素条件では，低酸素菌以外も生育が可能であったためと考えられる．今後，より効率的に低酸素菌を分離するためには，分離の際に嫌気条件を用いたり微好気条件での長期培養を行うなど，より選択圧を高めた分離法の改良が必要である．一方，低酸素菌である *Dactylaria* cf. *obtriangularia*（ビョウタケ目，ズキンタケ綱）および低酸素培養で分離された水生不完全菌 *Sigmoidea* sp. 7L341（所属目不明，クロイボタケ綱）は未記載種と考えられ，低酸素培養による新たな分離法を改良することで，未知の菌類の発見に貢献できる可能性が示唆された．

黒麹菌および *Aspergillus niger* のカビ毒産生，分生子形態およびゲノムデータに基づく類縁関係の解明

清 水 公 徳

千葉大学真菌医学研究センター
shimizuk@rs.tus.ac.jp

目的：*Aspergillus niger* は長年，発酵生産などに利用されてきたことから，これまで“安全”とされてきたが，近年フモニシンなどの発がん性を有するカビ毒産

生が認められるようになった．わが国で焼酎の製造に用いられている黒麹菌は主として *Aspergillus foetidus*（*Aspergillus awamori*）とされてきたが，近年の欧米の研究者は系統解析の結果を根拠に *A. niger* のシノニムとして取り扱うようになり物議を醸している．そこで，本研究では黒麹菌 *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger*, および類縁菌 *Aspergillus usamii* について，DNA 塩基配列によるタイピング，二次代謝産物産生性およびフモニシン産生遺伝子ホモログの保持状況などから本菌群に関する類縁関係の解明を試みた．

方法：*A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger* および *A. usamii* として登録されている千葉大学真菌医学研究センター保存菌株を用い，ミトコンドリアチトクロム *b* 遺伝子（cyt*b*），核リボゾーム RNA 遺伝子（ITS）によるタイピング，フモニシン産生遺伝子ホモログの保持状況，フモニシン産生に関するプロファイルをまとめた．また，*A. niger* のフモニシン産生遺伝子クラスター内遺伝子 *fum8* の機能解析を行った．

結果・考察：供試した *A. awamori*, *A. foetidus* および *A. usamii* 株の中には，*A. niger* タイプ株と同じ遺伝子型（ITS, cyt*b* いずれも）の株が見出された．逆に *A. niger* と同定・保存されているにもかかわらず，ITS, cyt*b* の塩基配列が明確に異なる菌株も存在した．これらのことから，*Aspergillus* 属 Section Nigri に分類されているグループ内の種分類について，さらなる検討・整理が必要であることが確認された．また，供試菌株がフモニシン産生遺伝子 *fum8* の相同遺伝子を保持するかどうかについて検討したところ，*A. niger* タイプ株と同じ遺伝子型の株ではおよそ 8 割程度からは *fum8* 遺伝子が検出されたが，それとは異なる遺伝子型の株では *fum8* 遺伝子ホモログは検出されなかった．さらに，フモニシン産生に関するプロファイルを検討したところ，*fum8* 遺伝子が検出された株からはフモニシンが確認され，そうでない株からはフモニシンが検出されなかった．以上をまとめると，*A. niger* グループには複数の種が混在し再整理が必要だが，*A. niger* タイプ株のグループにのみ，フモニシン産生遺伝子 *fum8* をもちフモニシンを生産する株が含まれることが示唆された．また，*A. niger* がもつ *fum8* 遺伝子がフモニシン生合成に直接関わっているかどうかについて，遺伝子破壊株を取得し解析したところ，*fum8* 遺伝子破壊株ではフモニシン産生が失われ，さらに，*fum8* 遺伝子破壊株に *fum8* 遺伝子を再導入した株ではフモニシン産生が回復したことから，*fum8* 遺伝子を含む遺伝子クラスターはフモニシン生合成に関わることが明らかになった．現在，フモニシンを含む二次代謝産物の産生時期と生育ステージや形態形成との関連性を調べることを目的として，RNAseq を用いた遺伝子発現比較解析が進行中である．

放線菌におけるイミノ糖生合成系の解明と大量生産システムの開発

炭　谷　順　一

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

目的：1-デオキシノジリマイシン（DNJ）などのイミノ糖は，グリコシダーゼの強力な阻害剤として機能することが知られている．DNJ 生合成経路については未だ不明であるが，*Bacillus* 属から大腸菌にグルコシダーゼ阻害能を付与する遺伝子断片が得られている．我々も *Streptomyces lividans* にグルコシダーゼ阻害能を付与する遺伝子断片を DNJ 生産菌 *S. lavendulae* から取得しており，その断片中に *Bacillus* 属菌株から得られた 3 つの遺伝子（*gabT1, yktc1, gutB1*）が共通して存在していることを明らかにしている．しかしこの 3 遺伝子だけでは DNJ の合成には至らないことも推定されている．そこで，本研究では DNJ を代表とするイミノ糖の生合成に関与する酵素群を同定するとともに諸反応を明らかにすることで，イミノ糖およびイミノ糖含有オリゴ糖の高効率生産システムを開発することを目的とした．

方法：単離した DNJ 生合成に関与すると考えられる遺伝子のうち，初発反応である糖へのアミノ基転移を触

媒する酵素遺伝子 *gabT1* の異種宿主における発現を試みた．放線菌における発現では，宿主として *S. lividans* TK24，発現プラスミドとして pSEV1 系を用い，大腸菌における発現では，宿主として *E. coli* JM109（DE3），発現プラスミドとして pET16b/20b を用い，*gabT1* 遺伝子は大腸菌のコドン使用頻度に最適化した配列を全合成して用いた．また，いずれの発現産物も N 末端あるいは C 末端に His-tag が付加するよう発現プラスミドを構築した．

結果・考察：放線菌の系では，*gabT1* 遺伝子単独では形質転換体が得られなかったが，*yktc1* と *gutB1* を共存させると形質転換体が得られ，菌体内で一部不溶性タンパクが検出されるものの，可溶性タンパクとして発現していることが抗 His-tag 抗体を用いた western blot によって確認された．*gabT1* 遺伝子単独で形質転換体が得られなかったのは，GabT1 によって生成したアミノ糖の蓄積が生育に悪影響を及ぼすことが推察された．しかし放線菌の系では発現量が少なく，また発現産物の分解も見られたため大腸菌の系で発現を試みた．*gabT1* オリジナルの配列では発現産物が検出できなかったので，大腸菌のコドン使用頻度に合わせた遺伝子配列を全合成して発現を試みた．その結果，一部不溶性タンパクが検出されるものの，放線菌の系よりも可溶性タンパクとしての収量が多いことがわかったので，大量培養を行い，Ni-chelating Sepharose を用いたアフィニティクロマトで電気泳動的に均一な標品を得た．得られた発現産物を用いて，GabT1 の基質および反応産物の同定を試みた．アミノ基受容体として各種単糖およびそのリン酸化物，アミノ基供与体として γ-アミノ酪酸，β-アラニン，6-アミノヘキサン酸，各種 α-アミノ酸等を用い，ピリドキサール 5'-リン酸および DTT 共存下で反応を試みた．その結果，いずれの組合せを用いた反応でも明確な反応産物を検出することはできなかった．今後は，他の糖リン酸についても検討するとともに，Yktc1 および GutB1 についても基質と反応産物を明らかにすることで，DNJ 生合成経路の解明を行っていきたい．

放線菌線状プラスミドを利用した高分子遺伝子導入法の開発と応用

小　松　　護

北里大学北里生命科学研究所
komatsu@lisci.kitasato-u.ac.jp

目的：我々は，エバーメクチンの工業生産菌である *Streptomyces avermitilis* の大規模欠失体（SUKA）が異種微生物由来の二次代謝産物生産のための汎用宿主として利用出来ることを報告してきた．しかしながら，*S. avermitilis* の制限系により，ポリケチド化合物の様に全長 100 kb を超える生合成遺伝子群を含む BAC クローンの導入効率が極めて低いことが問題であった．そこで，同種ならびに異種間で接合伝達する *S. avermitilis* 由来の線状プラスミド（SAP1：約 94 kb）を利用した遺伝子導入法を開発した．

方法：*Streptomyces lividans* は制限系をほとんど有しておらず，容易に高分子 DNA を導入できることから，*S. lividans* に SAP1 を保持させ，目的の遺伝子群を SAP1 上に導入した後，SUKA 株に接合伝達できると推測した．そこで，5 種の溶原化ファージ（ϕC31，R4，TG1，ϕK38-1，ϕBT1）に対応する *S. avermitilis* 染色体上の *attB* 配列をタンデムに配列した人工遺伝子を設計し，相同的組換えにより SAP1 上に導入した．*S. lividans* に SAP1ベクターを導入し，接合伝達の供与菌とした．

結果・考察：SAP1 ベクターを保持する *S. lividans* に対し，プロトプラスト形質転換法により，二次代謝産物生合成遺伝子を保持する組込み型の種々の BAC クローン（100～200 kb 程度）を導入した．その結果，*S. lividans* 形質転換体において，二次代謝産物生合成遺伝子群を保持する BAC クローンが SAP1 ベクター上に組込まれていることが確認された．接合伝達は，可溶性デンプンを炭素源とする合成培地に少量の酵母エキス（0.2%）を添加したスラント状寒天培地が最適であり，供与菌（*S. lividans* 形質転換体）と受容菌（SUKA 株）の胞子混合液を塗布した後，4 日間程培養するこ

とで接合体が得られた．また，受容菌の胞子懸濁液量を供与菌に対し10～20倍使用することで効率良く接合体が得られた．パルスフィールド電気泳動の結果，接合体がSAP1ベクター上に組込まれた完全長のBACクローンを安定に保持していることが確認された．接合体において，二次代謝産物の生産について調べた結果，導入した二次代謝産物生合成遺伝子群に由来する目的の化合物の生産が確認された．本研究成果により，これまで困難であった *S. avermitilis* SUKA株に対する巨大DNA分子の導入が可能となり，SUKA株を更に多種多様な二次代謝産物の異種生産ならびに生合成解析のための汎用宿主として利用することが期待される．

海洋性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* の菌体外 RNA 生産メカニズムの解明による効率的 RNA 発酵生産手法の開発

梅　影　　創

豊橋技術科学大学大学院工学研究科
umekage@ens.tut.ac.jp

目的：海洋性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* は，菌体外に自身の核酸を放出する性質を持つだけでなく，培養液中のRNアーゼ活性は殆ど検出されないことに着目し，当研究室では本菌を利用した組み換えRNAの菌体外生産法の開発に取り組んでいる．これまでにshRNAや環状RNAなどの様々な機能性RNAの菌体外生産に成功しているものの，生産量が低いことが問題になっている．また，本菌がどのようなプロセスを経て菌体外に核酸を放出するのかということについてもほとんど分かっていない．当研究室の先行研究では，クオラムセンシングを阻害するシクロデキストリン存在下において菌体外RNA生産量が増加する知見が得られている．そこで，本研究では，クオラムセンシングを足掛かりに菌体外核酸生産メカニズムを解明することを目的とした．

方法：本研究ではDSMZ（Germany）から分譲された *Rhodovulum sulfidophilum* DSM 1374株を使用した．本菌の菌体外核酸は，培養上清からイソプロパノール沈殿により得た．

結果・考察：先ず，本菌の菌体外核酸は，裸の状態で放出されているタイプと，GTA（gene transfer agent）と呼ばれるファージ様粒子に4.5 kb程度のdsDNAを内包して放出されるタイプの二つに分類されることが分かった．このGTAは，シクロデキストリン存在下の培養では，GTAの生産が確認されなかったことから，本菌のGTA生産にはクオラムセンシングが関与することが示唆された．また，グローバルレギュレーターである *ctrA* 遺伝子を破壊するとGTA生産が行われなくなることも見出した．さらに，ゲノム解析により *ctrA* 遺伝子のプロモーター付近にCtrA結合サイトが予測され，ゲルシフトアッセイによってCtrAとの結合が確かめられた．これにより，CtrAは *ctrA* 遺伝子の転写を正に制御することが示唆された．以上から，本菌のGTA生産には，クオラムセンシングによる制御と *ctrA* 遺伝子による制御を受けることが分かった．

次に，本菌のクオラムセンシング機構の詳細な知見を得ることを目的として，本菌の生産するオートインデューサーであるアシルホモセリンラクトン（AHL）の同定を試みた．AHL検知株を用いた従来のAHL検出手法では，本菌のAHL生産を確認することができなかったが，TLCによるAHL粗抽出工程を組み込んだ改良型AHL検出方法を考案することによって，本菌が長鎖のAHLを生産することを確かめることができた．

最後に，順遺伝学的観点から菌体外核酸高生産化に関わる遺伝子の検出を目指し，紫外線突然変異を利用した菌体外核酸高生産株の取得を試みた．紫外線照射後，RNAポリメラーゼβサブユニット遺伝子の変異によるリファンピシン耐性化を指標に変異株を107株取得した．得られた変異株の菌体外RNA生産を個別に定量した結果，野生株と比較して菌体外RNA生産量が約1.7倍に増産する変異株を見出すことに成功した．

今後，本菌のクオラムセンシング機構の解明，突然変異株の変異解析を進めることで，本菌のRNA生産機

構を解明し，培養方法等も考慮に入れながら菌体外RNAの効率的な発酵生産方法を確立していきたい．

放線菌 *Streptomyces ficellus* による効率的寄生雑草防除剤生産法の開発

原　田　和　生

大阪大学大学院薬学研究科
harada6@phs.osaka-u.ac.jp

目的：*Orobanche* spp. や *Striga* spp. をはじめとする寄生雑草はアフリカを中心に繁殖し，当地の食糧生産に甚大な被害を与えている．岡澤らはノジリマイシン（NJ）が寄生雑草の種子発芽，幼根伸長を選択的に阻害することを見出しており，本薬剤の寄生雑草防除剤としての可能性を示している．NJ の市場流通品は放線菌 *Streptomyces ficellus* の培養により生産されているが，生産コストが高く，現状では寄生雑草防除剤への広範な適用は困難である．本研究では NJ の効率的生産方法の開発を指向し，発酵生産培地組成最適化および NJ 生合成機構解析を行った．

方法：Argoudelis らが示した発酵生産培地成分のうちファーマメディア（PM）を市販の様々な培地成分に置換し，培養を行った．培養液中の NJ はトリメチルシリル化処理後，ガスクロマトグラフィーにより定量した．NJ 生合成機構解析では，NJ 生産が観測されない継代培地培養時と，NJ 生産が活発に行われているバクトペプトン（BP）含有培地での培養時の菌体からそれぞれ mRNA を抽出し，Illumina-Hiseq による RNA シークエンスを行った．

結果・考察：従来の発酵生産培地成分のうち PM に代わる成分を探索したところ，マリンブロス（MB），BP を用いた場合に高い NJ 生産性が確認された．25 g/L の MB を添加した場合，NJ 生成量は 750 mg/L に達した．この値は同量の PM を添加した場合に比べ約17倍であった．BP では，15 g/L 添加した場合に NJ 生成が最大となり 2.9 g/L に達した．これは PM を添加した場合に比べ約67倍に相当する．さらに廃糖蜜，炭酸カルシウムを半減させても，生成量が低下しなかった．最終的に原料コストは従来法と比べ8.5%にまで削減できた．

続いて，NJ 生合成関連遺伝子の探索を目的として，BP 含有培地および継代培地で培養した菌体からそれぞれ mRNA を抽出し，RNA シークエンスを行った．その結果，4074個の独立したコンティグ配列を取得した．このうち，継代培地培養時と比較し BP 含有培地培養時で 5 倍以上の発現量を示したコンティグは 388 個であった．NCBI BLAST による相同性解析を行ったところ，デオキシノジリマイシン（DNJ）を生産する *Bacillus* 属菌から単離された生合成遺伝子 *gabT1, yktC1, gutB1* と相同性が高い配列を含むコンティグを見いだした．続いて，当該 3 遺伝子で構成されるオペロン領域をクローニングし，大腸菌に導入した．IPTG による発現誘導を行ったところ，タンパク質の発現は確認されたが，NJ は検出されなかった．NJ は DNJ の前駆体と考えられており，*Bacillus* 属菌において DNJ は *gabT1, yktC1, gutB1* の 3 遺伝子で生合成されることが示されている．したがって，*S. ficellus* 由来の当該 3 遺伝子についても，これらのみで NJ あるいは DNJ が生成されると期待していたが，*S. ficellus* における NJ 生合成では，上記 3 遺伝子以外の因子も必要である可能性が示唆された．今後本コンティグにコードされた他の遺伝子群の機能解析を進める予定である．

未利用バイオマスからの水素生産を目指した超好熱菌の分子育種

折　田　和　泉

東京工業大学大学院生命理工学研究科
iorita@bio.titech.ac.jp

目的：硫黄還元超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* は糖質性基質を含む栄養豊富培地において水素を発生しながら硫黄非依存的に増殖し水素発酵菌として有望である．本研究では，本菌の水素生産能の強化と利用炭素源の拡張を目的として 1）水素発生に関わる代謝経

路の解明と2）未利用バイオマスであるキチンからの水素生産能の強化を行った．本菌の硫黄非依存増殖では糖やピルビン酸と同時にアミノ酸/ペプチドも代謝されるが，その詳細や水素発生における寄与については不明な点が多かった．そこで，ピルビン酸やアミノ酸酸化に関わることが推測される二つの酸化還元酵素遺伝子を破壊し，生育への影響評価，および増殖基質と最終代謝産物のマスバランス解析によりそれぞれの酵素の役割を解析した．また本菌は超好熱菌にめずらしくキチン資化性を有している．そこで，我々が明らかにした発現制御遺伝子の破壊や強力プロモーターの挿入によってキチン代謝遺伝子クラスターの高発現を試みた．

方法：*T. kodakarensis* は人工海水をベースとした栄養豊富培地に硫黄またはピルビン酸を添加した培地を用いてオイルバス中85℃で嫌気的に培養した．発生気体はアルミニウムバッグによって捕集し，ガスクロマトグラフィーによって濃度を測定した．発生気体の体積は真空捕集瓶を用いて，発生気体通気後の圧力差を測定することで換算して求めた．培養上清中の有機酸は，イオンクロマトグラフィーによって測定した．各種アミノ酸は酸加水分解後に誘導体化し，HPLC により測定した．

結果・考察：1）*Thermococcales* 目超好熱菌ではピルビン酸酸化酵素として pyruvate: ferredoxin oxidoreductase（Por）が知られているが，アミノ酸酸化への関与が推定されている 2-ketovalerate: ferredoxin oxidoreductase（Vor）もピルビン酸を基質とできることが報告されている．水素再取込みの影響を排除するために，cytosolic hydrogenase（Hyh）遺伝子を破壊した株を親株としてこれらの酵素遺伝子を破壊した．ピルビン酸添加培地におけるマスバランスを評価したところ，Por 欠損株ではアミノ酸消費量，ピルビン酸消費量，アラニン生成量がほぼ一致し，また CO_2 と H_2 の発生量が有機酸の生成量とよく一致していた．一方，Vor 欠損株では分岐鎖アミノ酸の酸化が顕著に低下したが，ピルビン酸酸化の亢進が観察された．これらの結果から，Por と Vor はそれぞれピルビン酸と分岐鎖アミノ酸の酸化に特異的かつ重要な役割を果たしていることが示された．消費基質あたりの水素収率はVor欠損よって親株の31％から82％に増加していた．2）キチン代謝遺伝子クラスターの高発現では，いずれの組換え株もキチン添加時に菌体あたりの水素発生量が増加した．特にキチナーゼの発現量が増大した強力プロモーター挿入株では水素発生能が親株の約２倍に増加しており，本菌のキチンからの水素生産にはキチナーゼ発現量が重要な要因であることを明らかにした．

微生物代謝産物多様化のメカニズム解析と有用代謝物の医薬利用に関する基礎研究

蓮　見　惠　司

東京農工大学大学院農学研究院
hasumi@cc.tuat.ac.jp

目的：本研究は脳梗塞治療に有効な SMTP-7 を含む微生物二次代謝物群 SMTP（*Stachybotrys microspora* triprenyl phenol）の構造多様化のメカニズム解析と有用な同族体の利用を目的とした．微生物二次代謝の多様化メカニズムを知ることは，微生物の生存戦略の理解に通じるとともに，有用な代謝物の利用にも貢献する．真菌 *S. microspora* が生産する SMTP は，プラスミノーゲンの活性化を促進する新規化合物の一群であり，我々は，これまでに50種以上の SMTP 同族体を同定してきた．SMTP-7 は，血栓溶解，脳梗塞改善に有用である．SMTP はクロマンラクタムとそれに結合するにイソプレン側鎖および N-側鎖から構成され，ポリケタイド合成系とイソプレノイド経路が融合した経路により生合成されると推測される．最近，SMTP の生合成の鍵となる前駆体 pre-SMTP を発見し，本化合物が，N-側鎖部分が異なる多様な同族体を生み出すメカニズムを提供することが示された．本研究では，これまでに単離されていないイソプレン側鎖構造の異なる新規同族体を７種同定し，それらの構造活性相関を解析した．

方法：SMTP 同族体の中で最も単純な構造の SMTP-0 を用い，微生物変換によりイソプレン側鎖構造の異なる新規同族体を単離・構造決定し，可溶性エポキシドハイドロラーゼ（soluble epoxide hydrolase; sEH）に対する阻害作用を評価した．

結果・考察：微生物変換により得られた同族体は，イソプレン側鎖の水酸基修飾，カルボキシ基修飾，鎖切断＋カルボキシ基修飾に大別された．sEH は，C 末端領域にエポキシドハイドロラーゼ活性（Cterm-EH）を，N 末端領域に脂質リン酸ホスファターゼ活性（Nterm-phos）をもつバイファンクショナル酵素であり，SMTP-0 は，それぞれの活性に対し IC50 6 μM および 14 μM の阻害を示す．得られた同族体の阻害活性は，イソプレン側鎖長に応じて増加し，カルボキシ基修飾により減弱した．水酸基修飾は末端に水酸基が導入された同族体では，Cterm-EH 選択的な阻害の傾向が見られた．イソプレン側鎖末端に水酸基をもち，Cterm-EH 選択的阻害を示す SMTP-0a は細胞レベルでの Cterm-EH 阻害は大きく減弱しており，これは SMTP-0a の細胞局在の減少と一致する結果であった．

本研究の結果，SMTP 同族体のイソプレン側鎖が $_{S}$EH 阻害に関わる pharmacophore であり，その差長と極性基の導入が阻害活性の強さと選択性に大きく影響し，さらには細胞への局在を変化させることが示された．

メタン生成アーキアの水素依存的な発現制御機構の解明

新　里　尚　也

琉球大学熱帯生物圏研究センター
naoya-s@comb.u-ryukyu.ac.jp

目的：水素資化性のメタン生成菌は二酸化炭素を水素で還元する事によりメタンを生成する．一部のメタン生成菌は，水素濃度に応じてメタン生成系酵素の発現を制御し，幅広い水素濃度においても効率的なメタン生成を行っていると考えられているが，その機構はほとんど解っていない．そこで本研究では，水素濃度により顕著に発現変動する *Methanothermobacter thermautotrophicus* ΔH 株のメタン生成経路の鍵酵素である，メチル CoM 還元酵素アイソザイム（MCR I & II）の発現制御機構の解明を目的とした．

方法：本研究では，まず第一に，*mcr* オペロンの上流領域を対象としたゲルシフトアッセイを行ってプロモーター領域を明らかにするとともに，それらの領域と相互作用する転写制御因子の探索を行った．また，本菌株の水素濃度変化に対する細胞応答を網羅的に把握することを目的に，水素の利用条件を制御して生育させた細胞を用いて，マイクロアレイによる比較発現解析を行った．さらには，発現解析により見出された，水素濃度依存的に発現変動する遺伝子の一部について，補足された *mcr* の転写因子候補タンパク質が転写制御に関与している可能性を蛍光フットプリント解析により検証した．

結果・考察：*mcr* オペロンの上流領域を対象としたゲルシフトアッセイの結果，*mcrI* オペロンのリプレッサー候補として DNA 結合タンパク質である MTH126 を補足した．本タンパク質は，アデノシル化合物と相互作用する CBS ドメインを持っており，ATP 等を介して細胞内エナジーステイタスを検知している可能性が考えられた．マイクロアレイによる比較発現解析の結果からは，低水素濃度条件下では，タンパク質合成系を始めとした生体分子の合成系が全体的に抑制されている一方で，メタン生成によるエネルギー合成経路の発現は維持されていることが示された．しかしながら，メタン生成は，F420 還元型ヒドロゲナーゼ（*frh*）を始めとした補酵素 F420 依存型の酵素が低水素濃度条件下で高発現しており，メタン生成が F420 によって還元力が供給される系にシフトしている様子がうかがえた．この結果は，本菌株が水素飢餓条件を，生合成や増殖を抑えつつも，メタン生成を維持して乗り切る生存戦略を備えていることを示唆していた．また，水素濃度依存的に発現変動する遺伝子の一部について MTH126 を用いた蛍光フットプリント解析を行った結

果，上述のF420還元型ヒドロゲナーゼ，ならびに，その翻訳後修飾に関わるプロテアーゼ（MTH737）のプロモーター領域と相互作用する可能性が示された．この他にも，ヒスチジンキナーゼであるMTH174のプロモーター領域とも相互作用する可能性が示された．この結果は，MTH126が*mcr*に加えて，水素濃度依存的に発現変動する他のメタン生合成系酵素の転写も同様に制御している可能性が高いこと，また，シグナル伝達に関わるヒスチジンキナーゼの発現を制御することで，その下流で発現変動する複数の遺伝子の制御にも関わるグローバルレギュレーターのひとつである可能性を示唆していた．

アカパンカビの重複配列を変異させる分子機構の全容解明とその遺伝子工学的応用

本　田　信　治

福井大学テニュアトラック推進本部
s-honda@u-fukui.ac.jp

目的：地球上に生息する生物は驚くべき特殊能力を持ち，その能力の応用は様々な形で人類の発展に貢献してきた．アカパンカビ（*Neurospora crassa*）は，Repeat induced point mutation（RIP）と呼ばれるトランスポゾンなどの利己的な遺伝子に対する強力なゲノム防御を持つ．このRIPは生殖期にゲノム上の約500 bp以上で80%以上相同性のある重複配列を認識し，両方の配列を高頻度に塩基置換させる．面白いことに，このRIPは利己的な遺伝子のみならず，相同する配列をすべて変異させるため，アカパンカビには相同性が高いファミリー遺伝子がほとんど存在せず，他の生物とは異なる独自の進化を遂げてきた．また，このRIPの現象は人為的に目的遺伝子を破壊する手法として，アカパンカビ研究者に利用されてきた．しかし，RIPは1987年に発見されたが，逆遺伝学手法により生殖期特有のDNAメチル化酵素ドメインを持つ遺伝子*rid-1*（RIP defective-1）が唯一RIPに関与する遺伝子として同定されているのみで，その他の分子機構はまったく謎のままである．そこで本研究では，網羅的なスクリーニングによりRIPに関わる遺伝子の同定を行う．そして，RIPの分子機構を解き明かすことで，この特殊能力の工学的応用を目指す．

方法：最近アカパンカビの大規模プロジェクトにより作製されたKOライブラリーにおいて，それぞれKOされた遺伝子は遺伝子組み換えによって大腸菌由来のハイグロマイシン抵抗遺伝子（*hph*遺伝子）にすべて入れ替わっている．そこで，この*hph*遺伝子を重複させた後に交配させ，RIPによって重複した*hph*遺伝子が破壊されたかどうかを子孫株のハイグロマイシン感受性を調べることにより，このKO遺伝子がRIPに関与するかを検査する．まずはスクリーニングにあたり，Bioinformatics解析を行い，生殖期に発現し，核内への局在が予想されている蛋白質から始める．

結果・考察：RIP実行蛋白質RID-1とゲノム上にRIPが起きた痕跡は，アカパンカビの近縁種のみに存在し，酵母にはない．同様に，RIPに関与する他の遺伝子もアカパンカビ近縁種のみに存在し，酵母にはないと考えた．そこでBioinformatics解析を行い，アカパンカビの近縁種に共通する遺伝子6,272個から，酵母には保存されていない遺伝子2,350個を抽出した．次に，RIPは核内で起きる現象であることから，細胞外に分泌する蛋白質と細胞膜に局在する蛋白質を除いた（1,536個）．更に，核に局在する可能性が少しでもある蛋白質を抽出した（970個）．最後に，RIPは生殖期特異的に起きる現象であることから，無生殖期の分生子には発現してない遺伝子を抽出した（243個）．同様に，RIPが起きる特異的な生殖期に発現が上昇する遺伝子群の絞り込みを行った．そして，これらに対してスクリーニングを行ったところ，欠損させるとRIPを著しく低下させる遺伝子を同定することに成功した．これらの中には新規のヒストンメチル化酵素などが含まれ，一部は生殖期の特定な時期に発現していることを確かめた．一連の解析により，RIPはクロマチン活動を介する生殖器特異的な分子経路によりなされることが示唆された．

相同組換え酵素の細胞内直接導入による相同組換え効率上昇技術の開発を目指した基盤研究

水 谷 治

独立行政法人酒類総合研究所
mizutani@nrib.go.jp

目的：部位特異的組換え酵素とそのターゲット配列を用いた遺伝子組換え技術は，多くの生物において幅広く用いられている．特に Cre-*loxP* システムは非常に研究が進んでおり，糸状菌においてもマーカー遺伝子回収技術の一つとして利用されている．このシステムを簡便に利用するために，我々は核酸を酵素キャリアとして Cre 酵素を効率良く菌体外から核内に導入しうる事を麹菌において見出し，簡便，且つ迅速に Cre-*loxP* システムを利用できる方法を開発した．そこで本研究では，細胞内への Cre 酵素直接導入の応用開発を目指し，酵素キャリアの検討，麹菌以外の微生物でも Cre 酵素の直接導入法を試みた．加えて，Cre 酵素以外のタンパク質においても直接導入が可能かを調べるために，相同組換えに関与する酵素を用いて相同組換え効率を指標に予備的検討を行った．

方法：*loxP* を搭載した *sC* マーカー遺伝子を麹菌染色体上の遺伝子と置換することで酵素キャリアの検討に必要な株を造成した．この株を用いて，大腸菌由来リボソーマル RNA（rRNA）を用いてマーカー遺伝子の除去を試みた．その確認は，マーカーが除去されるとセレン酸耐性になるのを利用し，最終的にはゲノム PCR にて行った．麹菌以外の微生物においても Cre 酵素直接導入が可能かを調べるために，酵母を宿主として *loxP* を搭載した *ura3* マーカー遺伝子をアデニン合成遺伝子プロモーターに挿入した．この株に Cre 酵素及び，酵素キャリアを用いて，酢酸リチウム法により *ura3* マーカー遺伝子の除去を試みた．除去株の確認は 5-FOA 耐性，コロニーの白色化及びコロニー PCR にて行った．Cre 酵素以外のタンパク質では，相同組換え経路で重要な働きを担う RecA を選択し，相同組換え効率を指標に予備的検討を行うこととした．麹菌 *recA* ホモログ遺伝子高発現プラスミドを作成し，これを一過的に麹菌細胞内で発現させた時のターゲット DNA の相同組換え効率を測定した．

結果・考察：rRNA が酵素キャリアとなりうるか検討した結果，DNA を酵素キャリアとした時よりも得られるマーカー遺伝子除去候補株は，75% 程減少するが，得られた候補株の 90% 以上において，実際にマーカー遺伝子が除去されていた．この結果から，rRNA においてもキャリアとなりうることが明らかとなった．酵母においても Cre 酵素直接導入法が可能かを調べた結果，麹菌の時ほど効率は良くないが，酵素キャリアとして核酸を用いることで，マーカー遺伝子の除去が可能であった．以上の結果より，様々な生物で Cre 酵素タンパク直接導入によるマーカー遺伝子回収が可能であることが示唆された．また，麹菌において，本当に RecA を導入することで相同組換え効率が上昇するか不明であったので，一過性的に *recA* 遺伝子を高発現させることにより，相同組換え効率が上昇するかを試みた．その結果，極若干ではあるが，上昇することが示唆された．今後は，相同組換え経路に関与する他の遺伝子の検討や導入における濃度や条件を検討していきたい．

新規発見「白麹菌特異的スフィンゴ脂質」の発酵における挙動・局在及びその意義の解析

北 垣 浩 志

佐賀大学農学部
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

目的：白麹菌スフィンゴ脂質の一つ，グルコシルセラミドは多量に発酵もろみに存在すると考えられるが，その発酵における挙動，局在，意義はこれまで解析されていない．酵母は他の生物種と違いグルコシルセラミドを持たないという特徴を持つ．そこで麹菌の生産するグルコシルセラミドの発酵における挙動，局在，発酵への意義を解析した．

方法：脂質の解析はTLCにスポットしてクロロホルム・メタノール・酢酸・水（20：3.5：2.3：0.7）で展開し，50%硫酸をスプレーすることにより行った．麹からのスフィンゴ脂質の抽出はクロロホルム・メタノール（1:1）で行った．酵母は焼酎酵母S-2及び実験室酵母BY4743を用いた．詳細はAppl. Environ. Microbiol.（81(11): 3688-98, 2015）に記載してある．

結果・考察：白麹菌のグルコシルセラミドは発酵もろみ中に多量に存在することがわかった．その局在を調べるため，精製グルコシルセラミドを酵母に添加してその挙動や局在を調べた．その結果，グルコシルセラミドは酵母の細胞表層及び酵母内部に局在していた．このとき，グルコシルセラミドはセラミドやスフィンゴシン塩基には分解されていなかった．

白麹菌グルコシルセラミドは高濃度で酵母に接触することがわかったことから，白麹菌グルコシルセラミドの酵母の発酵への影響を調べた．白麹菌のグルコシルセラミドは酵母にアルカリ耐性，エタノール耐性，香気成分の改変（エステル成分の上昇）をもたらした．この原因を探るために，脂質二重膜に取り込まれる蛍光色素TMA-DPH（trimethylammonium diphenylhexatriene）を酵母に加えて蛍光寿命を調べると，グルコシルセラミドを加えた酵母では蛍光色素の蛍光寿命が短いことがわかった．この結果はグルコシルセラミドを加えた酵母では脂質二重膜のパック度合いが低下しており水分子の浸潤が増加していることを示している．酵母はグルコシルセラミドの生合成経路を持たず，スフィンゴ脂質を構成する脂肪酸の長さがC26と他の生物種と比べて例外的に長い（他の生物種は18-24）という特殊性がある．一方グルコシルセラミドを構成している脂肪酸の長さは約20と短い．これらのことから，グルコシルセラミドは酵母の中に取り込まれるとスフィンゴ脂質のラフトの構造を緩め，酵母に生理機能を賦与していると考えられた．

最後に実際の産業で使われている麹でグルコシルセラミドの含量を調べたところ，麹に含まれるグルコシルセラミドの含量はさまざまであったことから，グルコシルセラミドの含有量が麹の新たな品質指標になると考えられた．

以上の研究から，日本の伝統的な発酵において，麹に含まれている白麹菌グルコシルセラミドが酵母に移行し，ストレス耐性の賦与や香気成分の改変を行うことが明らかになった．

生体機能分子Anti-sense RNAによる細菌のQuorum sensing情報伝達の抑制

平川秀忠

群馬大学先端科学研究指導者育成ユニット
hirakawa@gunma-u.ac.jp

目的：我々は，光合成細菌*Rhodopseudomonas palustris*の*p*-Coumaroyl-homoserine lactone（*p*C-HSL）クオラムセンシング機構の解析を行ってきた過程で，レセプター遺伝子*rpaR*に対するアンチセンスRNAを発見した．我々は，このRNAをasrpaRと命名し，その発現と機能解析を行った．

方法：ノーザンブロッティングによりRNAの検出および，サイズの確認を行った．5’と3’末端の決定は，プライマー伸長反応と3’RACE解析により行った．RpaR蛋白の検出と定量は，特異的抗体を用いたウエスタンブロッティングにより行った．クオラムセンシングの活性評価は，標的遺伝子の発現定量，表現型であるバイオフィルム形成能および，*p*C-HSLシグナル産生量の定量測定により行った．

結果・考察：asrpaRは約450塩基からなる非翻訳性の転写物であることがわかった．*rpaR*遺伝子の78塩基下流に*p*C-HSL合成遺伝子である*rpaI*が*rpaR*と同方向にコードされている．RpaR:*p*C-HSL複合体が，*rpaR-rpaI*遺伝子間の領域に結合すると，*rpaI*と共にasrpaRの転写が活性化された．しかしながら，asrpaRの転写方向は*rpaR*と*rpaI*のそれとは逆方向であり，その転写開始点は*rpaR*のストップコドンから40塩基上流に位置していた．asrpaRは，*rpaR* mRNAの3’領域と塩基対を形成し，RpaRの翻訳を阻害した．一方で，*rpaR*

mRNAの安定性や転写活性には影響を与えなかった. asrpaR強制発現プラスミドを導入した株では，RpaR蛋白量が低下し，クオラムセンシングの活性低下（*p*C-HSL産生量並びにバイオフィルム形成能の低下）が観察された. それに対して，asrpaRノックダウン株（asrpaRの染色体上のプロモーター領域にステムループ構造を導入して転写活性を落とした株）においては，親株と比べてRpaR蛋白量が高く，より強いクオラムセンシング活性を有していた.

以上の結果から，asrpaRはクオラムセンシングの抑制因子であり，RpaR:*p*C-HSL複合体はシグナル合成酵素RpaIの発現を誘導し，*p*C-HSLシグナルの増幅を行う一方で，asrpaRの転写をも誘導してクオラムセンシングの活性抑制を行っている. 本菌は2つの制御系を巧妙に駆使することでクオラムセンシングの活性を最適なレベルに調節していると推察される. 一方で，本RNAによる標的抑制の分子機構を明らかにすることで，新たなクオラムセンシング阻害剤のアイデア創出につながると期待される.

腸内細菌の共生機構

高　橋　恭　子

日本大学生物資源科学部
ktaka@brs.nihon-u.ac.jp

目的：腸管は生体で最大の免疫系を有する. 一方，腸管の管腔には莫大な数の腸内細菌が免疫系に排除されてしまうことなく共生している. 近年，腸内細菌叢の構成やその乱れと，様々な疾患との関連が次々と報告されてきている. 本研究では，腸管における共生の形成・維持の分子機構を明らかにし，健康の維持・増進に応用することを目的とした. 特に，腸内細菌からの刺激を常に最前線で受け取る腸管上皮細胞（IEC）に焦点を当て，腸内細菌による宿主IECのエピジェネティックな制御が共生の成立・維持の分子基盤の1つになるのではないかと考え，DNAメチル化とマイクロRNA（miRNA）発現に着目して解析を行った.

方法：通常および無菌環境下で飼育したBALB/cマウスの小腸上部・中部・下部および大腸からIECを調製した. Toll interacting protein（Tollip）の発現はウェスタンブロットにより解析し，ルシフェラーゼレポーターアッセイおよびインヒビター導入試験により，翻訳制御に関わる3' 非翻訳領域とmiRNAの同定を行った. 一方，大腸IECから調製したゲノムDNAについてメチル化CpG結合タンパク質MBD2を用いたプルダウンアッセイを行い，次世代シーケンスにより解析した. また，マイクロアレイによりmiRNA発現を網羅的に解析した. 候補分子について，定量RT-PCRによりmRNA発現を測定し，ヒト腸管上皮細胞株へのsiRNAあるいはインヒビターの導入試験により機能解析を行った.

結果・考察：まず，微生物菌体成分を認識する受容体であるToll-like receptor（TLR）からのシグナルの抑制因子であるTollipの発現制御機構の解析を行った. 小腸に比べて大量の腸内細菌が生息する大腸においてのみTollipの高い発現が認められ，さらに，その機構として，大腸に比べて小腸で顕著に高い発現を示すmiR-31を介した翻訳抑制が関わることが明らかとなった. 一方，腸内細菌により5' 領域中のCpG配列のメチル化頻度が増大あるいは低下する遺伝子集団が特定された. 腸内細菌によりDNAメチル化を介して発現が抑制された*Gm7120*遺伝子について，腸管におけるIgA抗体産生や制御性T細胞の誘導に関わるレチノイン酸の合成酵素RALDH1の発現調節に関わることが明らかになった. さらに，IECにおけるmiRNAの発現が腸内細菌により影響を受けることが示された. miR-21-5pは，腸内細菌の菌体成分により発現が増大し，このmiRNAにより発現が制御されるタンパク質が存在した. さらに，miR-21-5pが上皮透過性の調節に関わることが示唆された. 以上の結果により，腸内細菌が宿主IECの遺伝子発現，機能を調節することにより自ら共生の成立に関わること，この制御の少なくとも一部はDNAメチル化やmiRNAといったエピジェネティック

な機構を介することが示された.

感染時細菌の遺伝子発現変動と病原性発揮に関する研究

白　土　明　子

金沢大学医薬保健研究域
ashira@staff.kanazawa-u.ac.jp

目的：感染状態の細菌と宿主とは相互に感知して遺伝子発現を変動させ，その総和が感染成立や細菌排除を決定すると考えられる．本研究は，宿主への感染時に発現変動して宿主傷害性や感染維持に働く細菌遺伝子を見出すことを目的とした．

方法：宿主と細菌との両者に遺伝学的手法を適用できる，キイロショウジョウバエへの大腸菌の感染実験系を用いた．大腸菌をショウジョウバエに感染させて一定時間後に遺伝子のプロモーター活性とmRNAレベルを調べた．また，細菌感染を受けたショウジョウバエの生存率の変化，ショウジョウバエ抽出液中の生菌数をコロニー形成数で調べて宿主傷害性と感染維持の指標とした．宿主免疫の解析には，液性応答因子の抗菌ペプチド産生を担うImd経路因子の遺伝子変異体，細胞応答を担う昆虫マクロファージを抑制した貪食抑制体ハエを用いた感染実験を行い，細菌病原性への液性応答または細胞性応答の寄与を調べた．

結果と考察：発現亢進する遺伝子群の中に，ストレス応答性のシグマ因子，転写調節因子，二成分制御系因子が含まれているとわかった．次に，これらの遺伝子のそれぞれについて，変異菌株を感染させた際のハエの生存率の低下程度を親菌株と比較して調べた．すると，親菌株よりも宿主を殺さない変異菌株と，その逆に宿主を早く殺す変異菌株とが見つかった．一方，感染後のハエ抽出液中細菌のコロニーアッセイを行うと，親菌株よりも宿主から早く排除される種類が見つかった．二つの実験結果およびデータベースの情報を考え合わせ，感染時の振る舞いを変化させる細菌遺伝子の候補を選んだ．このうち，シグマ因子RpoSの制御下遺伝子に着目して解析したところ，転写因子やカタラーゼをコードする遺伝子の中に，細菌の感染維持に必要な種類が見つかった．つづいて，宿主免疫とこれらの遺伝子の関係を調べた．自然免疫機構は液性応答と細胞性応答から構成され，ショウジョウバエにも両者が存在する．免疫応答の欠損体ショウジョウバエを宿主とした感染実験を行うと，上記遺伝子の欠損時の性質が液性応答欠損体ハエで保たれ，かつ，貪食抑制体ハエでは親菌株との違いが見られなくなる細菌遺伝子が見つかった．このような細菌遺伝子の発現様式を調べると，宿主感染時のRpoS発現亢進に伴って発現が誘導されており，その結果として宿主による貪食殺菌への抵抗性が増すとわかった．モデル生物キイロショウジョウバエとヒトとでは，自然免疫機構が高度に保存されていることから，ヒトへの細菌感染時にも同様の機構が存在する可能性がある．

乳幼児期における口腔常在フローラの成立過程の解明

竹　下　　徹

九州大学大学院歯学研究院
taketooo@dent.kyushu-u.ac.jp

目的：ヒトの常在細菌叢（フローラ）の定着は無菌状態で誕生した新生児期から始まり，幼少期に一定の細菌種からなるフローラが成立した後は成長に伴いゆっくりと変化していくと考えられている．しかしながら数多くの知見が報告されてきた腸管フローラと比べ口腔フローラの成熟については未だ不明な点が多い．本研究では口腔フローラの構築過程を明らかにするために，乳幼児期の舌苔フローラの経時的変化について細菌DNAを利用した網羅的な細菌群集解析法を用いて分析・観察を行った．

方法：出生後半年未満の乳児6名を選出し，対象者の母親より研究に関する同意を得たのち舌苔の定期的な採取を依頼した．検体の採取は最も短い被験児で生誕後500日まで週一回程度の間隔で継続して行った．検

体から抽出したDNAより細菌共通配列をプライマーとしたPCR法を用いて細菌16S rRNA遺伝子を網羅的に増幅回収したのち半導体シーケンサーIon PGMを用いて塩基配列を解読した．得られた塩基配列は細菌群集解析ソフトウェアであるUPARSE等を用いて，97%の塩基配列相同性を認めたものを同一の菌種（Operational taxonomic unit，OTU）として分類し，各OTUに相当する菌種の推定を行った．

結果・考察：次世代シーケンサーを用いることで一検体あたり18308±8681リードの16S rRNA遺伝子の塩基配列が解読され，753のOTU，すなわち菌種に分類された．検出OTU数は日数の経過とともに徐々に増加する傾向が認められたが，多くの被験者において生誕400日程度で頭打ちになり，700日以降も検体を採取することができた二名の被験者においては一定化していた．細菌構成は被験者ごとに大きく異なる一方で，フローラ構築に関してある一定のパターンが認められた．初期の舌苔は*Streptococcus*と*Rothia*の二菌属が大勢を占める比較的単純な構成であり，菌種としては主に*Streptococcus mitis*，*Streptococcus salivarius*，および*Rothia mucilaginosa*に該当するものであった．生後200日に近づくと検出される菌種の多様性が高まり，*Neisseria flavescens*，*Fusobacterium nucleatum*，*Haemophilus parainfluenzae*，*Granulicatella adiacens*等も上記の菌に並び優勢な菌種として検出されるようになった．続いて*Veillonella*，*Prevotella*，*Porphyromonas*属の菌の構成比率の増加が認められた．

本研究によってはじめて乳幼児の口腔常在フローラの経時的変化が網羅的視点から観察され，多様な細菌がある程度の秩序をもって進めていく口腔常在フローラの成立過程が明らかとなった．本研究の結果は今後の口腔常在フローラの管理・育成を目指した新たな口腔疾患予防管理法の開発に向けてきわめて重要な基盤データとなると考えられる．

ポリ乳酸ステレオコンプレックスの高効率生分解システム開発に資するD乳酸ポリマー分解酵素生産菌の探索とカクテル分解酵素製剤開発

田　口　精　一

北海道大学大学院工学研究院
staguchi@eng.hokudai.ac.jp

目的：我々は高光学純度D体乳酸ポリマー［P(enriched LA-co-3HB)］をバイオマス原料から一段階で微生物合成できるバイオプロセスを新規に開発したことで，D体乳酸ポリマーの生分解性を検討することが可能となった．本研究では，ポリ乳酸ステレオコンプレックスの高効率生分解システム開発を最終目標として，まず微生物合成されたD体乳酸ポリマーを基質にして環境中からこれまで報告例のない分解微生物を探索・分離し，本ポリマーの分解に直接関与する酵素を精製し，各種酵素学的性質について検討する．

方法：土壌を微生物分離源としてD体乳酸ポリマーを唯一炭素源とした集積培養により分解微生物を単離した．本細菌は，16S rDNAの塩基配列を決定することで同定した．培養はD体乳酸ポリマーを唯一炭素源とした最少液体培地で行い，培養上清から分解酵素を精製した．酵素1ユニットはD体乳酸ポリマー乳化液を基質として30℃で反応させ，その650 nmの濁度を1分間に0.1減少する酵素量と定義した．酵素精製は60%飽和硫安により沈殿した画分をHiTrap Desaltingカラムで脱塩した後，ショ糖密度勾配等電点電気泳動により精製した．

結果・考察：集積培養によりD体乳酸ポリマーを含む寒天培地上で最も高い分解性を示した細菌を1株単離した．D体乳酸ポリマー分解能を有する細菌はグラム陰性の桿菌であり，16S rDNAの塩基配列から*Variovorax* sp. C34と同定した．この細菌はポリヒドロキシ酪酸［P(3HB)］およびD体乳酸ポリマーを含むプレート上でハローを形成した．一方，P(3HB)分解酵素として多くの研究例がある*Alcaligenes faecalis* T1由来のデポ

リメラーゼを発現させた組換え大腸菌では，P(3HB) プレート上でのみハローを形成したが，D 体乳酸ポリマープレート上では観察されなかった．これらの結果から，本細菌が生産する分解酵素はこれまで報告例のない新規なD 体乳酸ポリマー分解酵素であると考えられた．精製された分解酵素の比活性は 51.9 U/mg であり，分子量は SDS-PAGE により 42 kDa と計算された．各種ポリマー乳化液に対して精製した分解酵素の基質特異性を検討したところ，本酵素は P(3HB) およびD 体乳酸ポリマーに対して強い活性を示したが，D 体ポリ乳酸（PDLA）およびL体ポリ乳酸（PLLA）に対して活性を示さないプレートアッセイと同様の結果を示した．次に部分メタノリシスによって調製した PDLA および PLLA のオリゴマーに対する分解性を MALDI-TOF MS により分析した結果，本酵素は PLLA のオリゴマーを分解しなかったが，PDLA のオリゴマーに対しては，少なくとも30量体以下のオリゴマーを加水分解することがわかった．以上の結果から，分離した *Variovorax* sp. C34 の生産する分解酵素はD 体乳酸ポリマーおよび PDLA を分解するこれまでにない新規な酵素であると考えられた．

ダイオキシン受容体による細菌感染に対する宿主免疫応答の制御機構

木 村 彰 宏

慶應義塾大学医学部
kimura@hospk.ncgm.go.jp

目的：ダイオキシン受容体（Aryl hydrocarbon receptor: AhR）はダイオキシンによる毒性作用において中心的な役割を担っている．著者らは最近この AhR が「Th17 の分化に関与している」ことや「リポ多糖（LPS）による自然免疫応答を抑制する」ことを発見したが，免疫応答における AhR の役割については不明な点が多く残されている．本研究ではリステリアなどの細菌感染における AhR の作用機序を明らかにしていくとともに，生体内や環境中に多数存在することが知られている AhR リガンドと細菌感染症との関連についても明らかにしていく．

方法：野生型（WT）マウスと AhR 欠損（KO）マウスにリステリア菌を感染させ，生存率と血清中の炎症性サイトカインを ELISA で測定した．また，WT および AhR KO マウスから腹腔マクロファージを単離し，リステリア感染による炎症性サイトカイン産生を ELISA で比較した．

マウスマクロファージ様細胞株（RAW）に AhR を安定発現させ，コントロールと共にリステリアを感染させた後，活性酸素（ROS）の誘導を ROS 検出キットで測定した．

リステリア感染による AhR の AIM プロモーターへのリクルートをクロマチン免疫沈降法により検出した．

結果・考察：ダイオキシン受容体として知られている AhR がリステリア感染に対して抵抗性を示す重要な因子の一つであることを解明した．リステリア感染によりマクロファージにおいて AhR が誘導され，AhR 欠損マウスではコントロールマウスに比べ細菌感染に対する感受性が上がっていた．一方で，AhR 欠損マクロファージではリステリア感染による炎症性サイトカインの産生がコントロール細胞に比べ有意に上昇していた．従って，AhR による細菌感染に対する抵抗性の促進は炎症性サイトカインによるものでないことが示された．さらに解析を進めたところ AhR はリステリア感染により誘導されるマクロファージの細胞死を抑制していることが明らかになった．AhR は apoptosis inhibitor of macrophage（AIM）という因子を誘導することでマクロファージの細胞死を抑制していた．AIM のプロモーター領域に AhR 結合配列があることを確認し，リステリア感染後 AhR がその領域にリクルートされることで AIM を誘導していることを解明した．AhR は細胞内に侵入したリステリアを処理するのにも重要な役割を担っていることが判明した．リステリアなどの細菌処理において重要な役割を担っているのが ROS であり，AhR はこの ROS の産生を促進することで細菌

処理を行っていた．これまでにAhRはさまざまな免疫応答を制御していることが示されてきたが，本研究において環境応答因子の一つであるAhRが細菌感染においても重要な役割を担っていることが証明された．

杯細胞特異的オートファジー欠損マウスにおける腸内フローラの変化と大腸炎増悪化の分子機構

川　島　博　人

静岡県立大学薬学部，現 星薬科大学薬学部
h-kawashima@hoshi.ac.jp

目的：炎症性腸疾患の発症と，オートファジー関連遺伝子の一塩基多型の相関が報告されているが，その分子病態機構には不明な点が多い．本研究では，独自に樹立した大腸杯細胞特異的Creリコンビナーゼ発現マウスを用いて，オートファジーの形成に必須な働きをするE1様酵素Atg7のコンディショナルノックアウトマウスを樹立し，オートファジーの機能不全と炎症性腸疾患発症の関連性を実験的に証明するとともに，腸内フローラの変化に着目してその分子病態機構を解明することを目的とする．

方法：大腸杯細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現する*GlcNAc6ST-2-Cre* Tgマウス（Kawashima *et al.*, J. Immunol. 2009）を*Atg7*$^{flox/flox}$マウスと掛け合わせ，大腸杯細胞特異的オートファジー欠損（cKO）マウスを作製した．次に，野生型マウスおよびcKOマウスにおけるデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発性大腸炎の症状を体重減少および下痢・血便の程度，組織損傷の程度をスコア化することにより評価するとともに，腸内フローラの変化，抗菌ペプチド産生，ムチン分泌に着目して大腸炎増悪化機構の解析を試みた．

結果・考察：DSS誘発性大腸炎を惹起したところ，cKOマウスでは大腸炎感受性が顕著に亢進することを見出した．さらに，抗生物質の事前投与でその大腸炎症状は有意に抑制されたことから，cKOの大腸炎感受性に腸内細菌が関与することが示唆された．そこで定常時および炎症初期における組織への腸内細菌の侵入を腸内細菌特異的蛍光プローブを用いたFISH法により評価した．その結果，大腸炎の発症に先立ってcKOマウス大腸への腸内細菌の侵入が強く起こることを見出した．腸内細菌叢と大腸上皮は杯細胞の分泌するムチンにより隔てられており，ムチンは大腸炎に対する防御に必須である．そこでさらにムチン分泌の差異をELISAにより解析し，cKOマウスではムチン分泌が顕著に低下することを見出した．次に腸内細菌叢の変化について16S rRNAの多型に基づくPCRにより解析したところ，cKOマウス大腸では特定の腸内細菌が有意に増加することが明らかとなった．さらにその原因を探るために野生型マウスおよびcKOマウス大腸のDNAマイクロアレイ解析を行い，腸内細菌叢制御と関連する4つの抗菌ペプチド遺伝子の発現がcKOマウス大腸で顕著に低下することを見出した．またそれらの遺伝子発現誘導に関わるTh2サイトカイン，およびTh2サイトカイン誘導性の上皮由来サイトカインIL-25がcKOマウスにおいて有意に発現低下することがわかった．以上より，大腸杯細胞のオートファジーは，抗菌ペプチドの発現，正常な腸内細菌叢の維持，およびムチン分泌を維持することで，大腸炎の防御に寄与することが示唆された．

エピジェネティック制御に基づく天然物探索法を利用した植物内生糸状菌からの多様な新規有用天然物の創出

浅　井　禎　吾

東北大学大学院薬学研究科
teigoasai@gmail.com

目的：糸状菌のゲノム解読が進み，数多くの二次代謝物生合成遺伝子が通常培養では休眠状態にあることがわかってきた．これらの休眠遺伝子を活用することができれば，多様な新規物質の発見につながると期待される．化学物質を用いてエピジェネティクス状態を人為的に変化させる「ケミカルエピジェネティクス」

は，休眠型二次代謝物の生産を誘導するための有効な方法の一つである．これまでに，遺伝子発現の抑制に寄与するエピジェネティック因子であるヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の低分子阻害剤を用いた二次代謝活性化法を確立しており，数多くの新規二次代謝物の取得に成功した．この方法は，探索資源に潜在する二次代謝能を引き出すものであるため，探索資源の生合成遺伝子の“質”がきわめて重要になる．すなわち，多様性に富み，特徴ある生合成系を有する菌群をいかにして選択するかが，新規性の高い二次代謝物発見の鍵となる．そこで，本研究では，宿主体内という特殊な環境下で生育する内生糸状菌に着目した．植物および節足動物から多様な糸状菌を分離し，ケミカルエピジェネティクスを用いた天然物探索を行い，多様な休眠型新規二次代謝物の獲得を目指した．

方法：東北大学薬学部付属薬用植物園で栽培されている薬用植物および青葉山に棲息する節足動物を収集した．収集した資料は，エタノールおよび次亜塩素酸で表面を殺菌し，切片とした後に糸状菌選択培地を用いて内生糸状菌を分離した．分離した内生菌はrRNA遺伝子のD1/D2領域の塩基配列に基づいて同定し，系統樹解析を行った．また，得られた内生菌は，HDAC阻害剤添加条件で培養し，それぞれ非添加時と比較して培養中の二次代謝プロファイルの変化を調査した．二次代謝プロファイルが顕著に変化した菌については，天然物化学的手法により，休眠型二次代謝物の同定を行った．

結果・考察：東北大学薬学部付属薬用植物園で栽培されている薬用植物25種について内生糸状菌の分離を試みた．全ての植物から内生糸状菌が分離され，およそ30種の菌を分離した．植物ごとに内生する菌が異なっており，また，系統的に多岐にわたる糸状菌が分離された．節足動物についても，15種から28種の内生菌が分離され，節足動物にも一般的に内生菌が存在することが示された．また，分離した植物内生糸状菌は子嚢菌門に属していたが，節足動物からは子嚢菌門に加えて接合菌門に属する糸状菌が分離されるという特徴があった．また，植物内生糸状菌として代表的な*Xylaria*属菌が草食節足動物から分離されたことは，食物連鎖によって菌が取り込まれることを示唆しており，節足動物が多様な糸状菌の良い分離源であることが示された．得られた内生糸状菌に対してケミカルエピジェネティクスを用いた天然物探索を適応することで，休眠型二次代謝物として数多くの新規物質の取得に成功した．また，イチイ内生糸状菌が生産するイソクロメン型新規ポリケタイドから，抗アデノウィルス活性を示す化合物を見出した．本研究では，ケミカルエピジェネティクスによって，通常の培養条件では検出されない内生糸状菌の二次代謝物の生産量を増大させることで，多様な新規物質を取得できた．本手法が糸状菌培養をベースとした医薬品探索の再興の一助となることを期待したい．

下水処理システムにおける薬剤耐性菌の消長と水系への拡散実態の解明および対策方法の提案

古　川　隼　士

大分工業高等専門学校
t-furukawa@oita-ct.ac.jp

目的：本研究では，下水処理システムにおけるバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）とその耐性遺伝子である*vanA*および*vanB*遺伝子の存在実態を明らかにし，下水処理水が流入する放流先河川へのVREの拡散実態を把握することを目的とした．

方法：下水試料は，大分県内の下水処理場の最初沈澱池流入口（流入下水），エアレーションタンク（タンク水），最終沈澱池越流口（二次処理水），および塩素消毒槽（消毒水）から採取した．試料採取は，2013年6月および11月（計2回），ならびに2014年1月，10月，および12月（計3回）に実施した．なお，2014年10月および12月の下水試料については，耐性遺伝子の定量のみ実施した．各下水試料からの腸球菌の計数，および単離・回収はメンブランフィルター法（mEI培地，

腸球菌選択培地）に従って実施した．培養後，各下水試料の腸球菌数を計数し，コロニーをランダムに単離・回収した．回収した腸球菌株に対して，バンコマイシンに対する感受性を明らかにするために，最少発育阻止濃度（MIC）試験を実施した．また，下水試料中のバンコマイシン耐性遺伝子を定量するために，市販のDNA抽出キットを用いて各下水試料からゲノムDNAを抽出した．その後，リアルタイム定量PCR法によって，各下水試料中の*vanA*および*vanB*遺伝子を定量した．

河川水から回収した腸球菌についても，計数とMIC試験を実施したが，方法は下水試料と同様の方法で実施した．

結果・考察：流入下水，タンク水，二次処理水，および消毒水の腸球菌数の平均値は，それぞれ1.9×10^6 cfu/100 mL, 1.9×10^5 cfu/100 mL, 9.0×10^3 cfu/100 mL, および2.0 cfu/100 mLであった．下水処理プロセスによって，流入下水中の腸球菌数は減少し，塩素消毒によって10 cfu/100 mL以下まで削減された（除去率5 log以上）．下水処理プロセスは効果的に腸球菌を除去できることが確認された．

計3回の調査を通して，流入下水，タンク水，二次処理水，および消毒水から，それぞれ159株，158株，157株，および31株の腸球菌株を単離・回収し，MIC試験に供した．ほとんどの腸球菌株は，バンコマイシン濃度2.0 μg/mLに対して発育を阻害された．すなわち，多くの腸球菌株がバンコマイシンに対して感受性を示した．バンコマイシン濃度2.0 μg/mLに対して耐性を示した腸球菌株は全部で16株であり，このうちの2株は高濃度のバンコマイシン（＞128 μg/mL）に対して耐性を示した．下水試料中では，培養可能なVRE（バンコマイシン濃度2.0 μg/mL以上に抵抗性を示す菌株）は全体の約3％程度であった．

各下水試料から抽出したゲノムDNAを用いて，*vanA*および*vanB*遺伝子を定量した．各耐性遺伝子は消毒水を含むすべての下水試料から検出された．*vanA*および*vanB*遺伝子の最も高い平均コピー数は，それぞれ4.1×10^3 copies/mL（二次処理水），および1.5×10^3 copies/mL（二次処理水）であった．したがって，処理過程において腸球菌は効果的に除去（除去率＞5 log）されるが，耐性遺伝子は処理システムに残存したまま，水環境に放流されている可能性が示唆された．一方で，下水処理場の放流先河川，および放流水合流点の上下流から回収した腸球菌株についてMIC試験を実施したが，バンコマイシンに耐性を示す菌は全体の2％以下にとどまり，高濃度のバンコマイシン耐性を有する腸球菌株はいなかった．

酵母遺伝学的解析系を用いた植物病原菌宿主感染戦略の分子レベルでの解明

田　淵　光　昭

香川大学農学部
mtabuchi@ag.kagawa-u.ac.jp

目的：多くの病原菌は，Ⅲ型分泌装置と呼ばれる構造物を介して宿主細胞中にエフェクターと呼ばれる病原因子を注入することで感染を成立させていることが知られている．*Ralstonia solanacearum*（青枯病菌）は，ナス科植物を含む200種以上もの植物に感染する農業上重要な病原菌であり，70種類以上ものエフェクターを有している．本研究では，酵母発現系を用いた青枯病菌エフェクターの分子機能の解明を目的とした．

方法：酵母内で誘導発現が可能な青枯病菌エフェクター発現プラスミドを構築し，酵母に形質転換後，誘導培地において増殖阻害を引き起こすエフェクターを選択した．

結果・考察：酵母に増殖阻害を引き起こした青枯病菌エフェクターの一つRSp1022は，ChaCドメインと呼ばれるあらゆる生物種に保存された機能未知ドメインを有していた．本研究ではRSp1022について更に機能解析を進めた．まず，RSp1022の機能を推定するため三次構造予測サイトにより立体構造を予測したところRSp1022は，グルタチオン分解に関わるヒトγ-グルタミルシクロトランスフェラーゼ（GGCT）と構造的に

類似していることが予測された．そこで，RSp1022が酵母内でグルタチオンを標的にしているかを調べたところ，RSp1022過剰発現酵母細胞ではコントロールと比べて3割程度にまで細胞内グルタチオン濃度の低下が見られた．次に，実際にRSp1022精製タンパク質がGGCT活性を有するかを明らかにするため，大腸菌で発現させたRSp1022のGGCT活性を測定したところ，RSp1022は全くGGCT活性を有さなかった．ところが，酵母で発現させたRSp1022は，非常に強いGGCT活性が検出された．これより酵母細胞内にはRSp1022の活性化に必要な因子が存在すると考え，大腸菌から精製した不活性なRSp1022に酵母粗タンパク質抽出液を添加したところ，添加したタンパク質量に依存してGGCT活性の上昇が確認された．さらに，酵母粗タンパク質抽出液からRSp1022活性化因子の精製を試みたところ，大腸菌で発現させた不活性なRSp1022の活性化を指標として各種クロマトグラフィーにより最終的に単一タンパク質まで精製した．精製された活性化因子を質量分析により解析したところ酵母細胞質チオレドキシンであるTrx1とTrx2が同定された．大腸菌で発現，精製した酵母および植物チオレドキシンは，試験管内でRSp1022を濃度依存的に活性化した．さらに，チオレドキシンにより完全に活性化させた活性型RSp1022と酵母内在性ChaCタンパク質であるGcg1について酵素の触媒効率を表すk_{cat}/K_M値を比較したところ，活性型RSp1022は，Gcg1の94倍もの高い触媒効率を有していた．これらの結果より，RSp1022は，宿主細胞質中でチオレドキシンにより活性化され，宿主内在性のChaCタンパク質よりもはるかに高い活性で宿主細胞内のグルタチオンを枯渇させる能力を有することが明らかになった．

平成26年度若手研究者助成の研究報告

助成期間：平成26年４月～平成27年３月

IFO Res.Commun. 29
2015

サンゴと共生藻の共生関係が成立する際の藻体内におけるグルコース代謝の変化

丸　山　真一朗

自然科学研究機構基礎生物学研究所環境光生物学研究部門
maruyama@nibb.ac.jp

目的：渦鞭毛藻の一種で，褐虫藻と呼ばれる単細胞微細藻類（*Symbiodinium* spp.）は，サンゴ・イソギンチャク等の様々な刺胞動物類に共生することで知られる．近年，環境変動によりサンゴの白化と呼ばれる熱帯海域の貴重な共生生態系の崩壊が起こるなど，深刻な被害が出ているが，その詳細なメカニズムはよく分かっていない．本研究では，刺胞動物と共生することが知られる褐虫藻を用いて，共生成立の鍵となる光合成から，その最終産物としてのグルコース代謝まで，様々なレベルのオミクスデータを通して解析し，褐虫藻における光合成産物の生産と代謝の共生進化を理解することを目的とした．

方法：褐虫藻の代表的なモデル種である *Symbiodinium minutum* において，宿主に渡すグルコースの元となる光合成産物の生産に関わる遺伝子を同定するため，スーパーコンピュータを用いた全ゲノム規模での分子系統解析を行うとともに，環境条件の変動と遺伝子発現量の関係性を調べるため，RNAseq データを用いた網羅的転写産物量解析を行った．また，褐虫藻培養株を用いたメタボローム解析を行い，環境条件の変化に伴う代謝産物変動を推定した．

結果・考察：褐虫藻のゲノム中では，他の真核生物では見られないほど，遺伝子ファミリーの多重化，遺伝子重複が起こっていることが分った．特に光合成における光受容に主要な役割を果たす光受容アンテナタンパク質 Light Harvesting Complexes（LHC）の重複遺伝子数は特筆すべきものがあり，本研究により，褐虫藻の進化の過程で LHC が遺伝子間および遺伝子内重複を幾度も繰り返して現在のような多様な遺伝子ファミリーを構成するに至ったことが示され，その系統学的・進化的な多様性獲得の詳細が初めて明らかにされた．またこうした複雑な遺伝子重複パターンは *S. minutum* だけでなく他種の *Symbiodinium* でも見られたことから，遺伝子重複をもたらしたゲノム再編成が *S. minutum* の種分化以前あるいは *Symbiodinium* 属が分化する以前には既に確立していたことが示唆された（Maruyama *et al.* 2015 PLOS ONE）．また，メタボローム解析においてグルコース関連の多様な代謝産物に関する知見を得た結果，褐虫藻細胞内において，高温処理によりグルコース 6-リン酸などリン酸化六炭糖類の蓄積量が減少することが示唆された．このことから，水温上昇に伴い光合成活性が減少し，リソースとしてのグルコースが褐虫藻体内で他の代謝経路により消費されるとともに，共生状態においては宿主への糖供給の減少へとつながる可能性があると予想される．

発酵研究所助成研究報告　第29号【非売品】
平成27年12月10日　印刷
平成27年12月20日　発行

編集委員長　中瀬　崇
編集委員　伊藤忠義，大竹久夫
桑原正章，徳増征二
永井和夫，波多野和徳
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