

RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 35



2 0 2 1

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	中濱 一雄		
常務理事	樽井 直樹		
理事	左子 芳彦 鈴木健一朗 原山 重明 松下 一信	清水 昌 原島 俊 古川 謙介 横田 篤	
監事	下元 高文	藤井 智幸	
評議員	大島 敏久 笹川 千尋 関 達治 谷 吉樹 藤田 正憲	北本 勝ひこ 下田 親 武田 直久 土屋 英子 吉田 敏臣	

目 次

巻頭言	永井 和夫	1
-----	-------	---

■ 2019年度大型研究助成

遺伝子ドーピングによる希少系統群微生物の革新的分離培養法の構築	加藤創一郎	3
細菌における細胞外膜小胞への選択的タンパク質輸送機構の解明と 細胞外タンパク質生産場構築への応用	栗原 達夫	11
未だ活用できていない酢酸菌の新規な酸化的物質変換系の探索	薬師 寿治	27
化学物質の還元反応に寄与する異種微生物間の固体腐植を介した 細胞外電子伝達機構の解明	片山 新太	45

■ 2015年度寄付講座助成

光合成原核生物の新規菌株の分離分類とバイオリソース化および それらを含む複合微生物系の環境・エネルギー産業活用を目指した 研究シーズの開発		
光合成複合微生物系の環境・エネルギー活用シーズ開発	花田 智	61
光合成複合微生物系の形成・維持機構	Vera THIEL	67
新規酸素非発生型光合成細菌 <i>Chloracidobacterium</i> の発見と その特性	Marcus TANK	75
好熱性シアノバクテリアの多様性	花田 智	87
好気性光合成細菌の分布と多様性	花田 智	97

■ 2019年度 一般研究助成

DNA バーコードと標本を活用したビョウタケ目ヘソタケ科の 探索・分類・系統学的研究……………	細矢 剛	109
有用生物資源としての日本産クロボ菌類由来の担子菌酵母の菌株確立……………	田中 栄爾	110
昆虫病原糸状菌の選択的分離法と培養菌株の確立、および分類学的研究……………	伴 さやか	111
ハラタケ綱 (Agaricomycetes) における外生菌根菌の進化と 多様化の解明……………	佐藤 博俊	112
アフリカ (旧世界) で初めて分離された新世界型回帰熱ボレリア, <i>Candidatus Borrelia fainii</i> , の全ゲノム比較解析ならびに 表現型解析による分類・進化・系統学的検討……………	邱 永晋	113
渦鞭毛藻 - 自由生活性バクテリアの “緩やかな共生関係” の解明と その情報を利用した無菌化技術の開発……………	鈴木 重勝	114
鉱物による直接的な代謝促進を利用した難培養性微生物の 新規単離技術の確立……………	五十嵐健輔	115
嫌氣的芳香族系廃水処理に特化した DPANN 上門アーキアの培養と その生態学的意義の解明……………	黒田 恭平	116
地衣に共生する担子菌酵母の分布と多様性を紐解く……………	清水 公德	117
海生変形菌は存在するのか - 変形体および子実体形成能の検証から 分類学的定義を議論する……………	矢島 由佳	118
節足動物消化管の内外双方で異なる生活ステージを持つ 腸内外両生接合菌類の探索……………	出川 洋介	119
キノコ類 (子囊菌および担子菌) を起源とする新規抗生物質探索のための 分子育種法の構築……………	渡辺 賢二	120
黒酢醸造に関わる酢酸菌の優占化機構に関する研究……………	石井 正治	121
細菌性ウイルス様粒子 GTA による環境適応機構の分子基盤……………	清水 隆之	122
次世代型プレバイオティクスを用いた腸内細菌叢制御……………	中井 博之	123
<i>Frankia</i> 属放線菌の窒素固定と樹木との共生に関わる遺伝子の同定……………	九町 健一	124
二次代謝産物の生物学的意義解明による放線菌潜在能の開拓……………	木谷 茂	125
次世代バクテリアセラピーを可能にするための微生物の体内制御技術……………	黒田 章夫	126
海藻多糖フコイダンの微生物分解酵素系の解明とアミロイド線維抑制効果……………	大城 隆	127

細菌の菌体内外に生じるセレンナノ粒子の生成機構の解明と バイオアベイラビリティに関する研究	三原 久明	128
微生物がつくりだすガラクトオリゴ糖合成酵素の機能改変 -次世代型プレバイオティクスの生産基盤の構築-	田中 俊一	129
<i>Bacillus</i> 属細菌由来のべん毛モーター蛋白質を利用した ナトリウムイオンセンサープローブの開発	南野 徹	130
微生物のもつシームレスクローニング活性を利用した 新規シームレス DNA クローニングシステムの開発	本橋 健	131
メタノール濃度に応答するシグナル伝達と転写制御機構の解明	由里本博也	132
プロバイオティクス有用菌の消化管内定着性向上を目指した 基盤技術の創製	小川 哲弘	133
大腸菌の呼吸鎖変異株が示す異常代謝の解析と産業利用	横田 篤	134
ω 3 系高度不飽和脂肪酸の微生物変換の解析とその応用に関する研究	小川 拓哉	135
電氣的膜電位制御に基づく細菌間相互作用の制御法の開発と そのデバイス化の検討	長峯 邦明	136
分裂酵母孢子表層タンパク質の特性を生かした新奇の 異種タンパク質発現・分泌生産・孢子細胞表面提示システムの構築	今田 一姫	137
耐熱性シアノバクテリアと微小電極を使って単光子を捉える	山野井慶徳	138
シアノバクテリアを用いた非枯渇性資源生産基盤株の開発	景山 伯春	139
自己生成させたポルフィリン色素を光増感剤として利用する 光駆動型の微生物触媒反応によるバイオ水素生産	本田 裕樹	140
高耐熱性バイオポリエステル微生物生産のための遺伝子資源探索	柘植 丈治	141
地下圏の難分解性有機物を電気微生物分解してメタンを生成する 微生物群集中の電子授受機構の解明	石井 俊一	142
亜硝酸・硝酸イオントランスポーターが脱窒細菌の亜酸化窒素の 親和性へ及ぼす影響評価	寺田 昭彦	143
■ 2018年度若手研究者助成		
南北両極アイスコアに眠る古代菌類から見た過去 70 万年の 菌類の進化とその環境適応	辻 雅晴	145

巻 頭 言

永 井 和 夫*

現在および未来の私たち人類の生活を脅かしている、あるいは近い将来に脅かす可能性があるのは、どのようなコトあるいはモノだろうか？ 気候変動がもたらす自然破壊、環境変化による温暖化、地球温暖化による生態系の変化、地球の各地に広く生活する人類、人類が先頭に立って進めてきた、自分たちの生活快適さ追求に伴う植生の改変、自然状態ではあり得ない単一植物の大量集積栽培を含む自然界の改変 etc. 何れを取り挙げてみても、我らヒトの生活が地球環境の変化、現状形成に深く関わってきたと思われる。これからの地球の、全てとは言わず、多くの生物が一定のバランスを保ちながら平和に共存し、できれば互いに繁栄することが可能となる方策を提案したいものである。

このように考えると、エゴと言われるかも知れないが、ヒトの生活と他の生物の生存との間にどのように軽重をつけるか、という議論になるかも知れない。例えば、(ヒトにとっての)病原菌や有害生物は、無害化或いは積極的に排除し、有用生物は動・植物から細菌に至るまで大切に扱う、という感覚である。ただし、有用であるか、無用であるか、更には有害かを、結論することは容易ではなく、明確な判定点が得られるまでは、中間的な評価をせざるを得ないものも少なくないであろう。また、現段階では有用、有害あるいはその中間と評されるもの、更には有害物の効果を凌駕するほどのメリットを含むものも科学の進展によって明らかになるまでは、保存・保持が必要であるかも知れない。

それにしても、恣意的な考えにより現状を無視して快適さを追及するのは、ヒトのエゴで、少なくとも解決が可能であることが科学的に証明されるまでは、残念ながら、現状維持に甘んじざるを得ない、と思われる。すなわち凍結等による休眠処理が理解された時点で、その延長である未来像を考えてみたい。

既に多くの研究者が指摘或いは想定しているように、現在の状況がそのまま進展すると、地球の自浄機能だけでは早晚限界を迎えるであろうと思われる。特に、石炭、石油等に代表される化石燃料に依存したエネルギー消費は、二次産物、三次産物等のように環境悪化につながる影響で、すでに許容されない段階にある。しかし、専門家の意見によると、「太陽光、化学的に生成する水素ガスなど、地球温暖化の原因とならないエネルギー獲得システムの利用が、すでに実用段階あるいはその入り口に迫りつつあるのが現状」とのことなので、その早期実現化と特に人口密集地近郊における普及を大いに期待したいものである。

これからの地球の多くの生物が一定のバランスを保ちながら平和に共存し、できれば互い

*永井和夫
東京工業大学・中部大学名誉教授、元公益財団発酵研究所理事

に繁栄することが可能となる方策を提案したいものである。

さて話題は変わるが、ここで最近の難題の一つであるコロナウイルス（以下コロナと略称）についての現状に触れてみたい。わが国では、一時、患者数が病院の収容力を超える状況となったが、最近では入院する患者の数が日に日に減少する傾向が認められるようである。これは、各製薬企業によって開発されたワクチンの投与による効果が顕著に表れているから、と理解されている。このまま世の中からコロナが消滅すれば、“めでたし！”であるが、敵も去るもので、新たな変異株ができて、現状のワクチンの効果が減殺される可能性も考えておかねばならない。もうひとつのコロナに敵対する手段として、化学療法剤の併用が考えられよう。それぞれ互いに異なる作用機構をもつワクチンと化学療法剤を、同時に投与あるいは併用することにより、耐性コロナの出現はほぼなくなる、のではなからうか？ただし、ヒトとコロナの遺伝情報発現機構は重複している可能性が高い、とも考えられるので、これは素人の見やすい夢物語、に過ぎないことであるかも知れないが。

これからの地球では、全てとは言わず、より多くの生物が一定のバランスを保ちながら平和に共存し、できれば互いに繁栄することが可能となる方策を提案したいものである。

地球の温暖化現象にしても、コロナの跋扈にしても、原因のかなりの部分に人類の活動や繁栄があるように感じる。前者はヒトと言う名の動物が、文明と言う能力を快適さ増大のために過度（ヒト以外にはできないほど!?)に応用したことを、後者は地球上の生物は互いに共通の要素をかけて生存しているのだ、ということを理解しつつ互いに共存が可能となるありかたを模索すべきことを。

地球上には、現在未知の微生物群をはじめとして、人類がはまだ触れることができていない生物の存在が予想されている。本財団によるご支援でこの世界探訪が実り多いものであることを祈念する。

2019年度大型研究助成の研究報告

助成期間：2019年4月～2021年3月

遺伝子ドーピングによる希少系統群微生物の革新的分離培養法の構築

加藤 創一郎

国立研究開発法人産業技術総合研究所
〒062-8517 札幌市豊平区月寒東二条17-2-1

Isolation of rare-phylo microorganisms by a gene-doping strategy

Souichiro Kato

National Institute of Advanced Industrial Science & Technology (AIST)
2-17-2-1, Tsukisamu-Higashi, Toyohira, Sapporo, Hokkaido, 062-8517

Many attempts have been made to develop efficient methods of isolating uncultured microorganisms. The main strategy was to modify the culture conditions to be closer to the natural environment, but it is impossible to experimentally reproduce the environmental conditions. In this study, we aimed to construct a new culture method ("gene doping method") that enables the culture of difficult-to-culture microorganisms by conferring specific functions by gene engineering. (1) The gene engineering method for rare-taxa microorganisms (a phylum Verrucomicrobia) was investigated. By using transposome, an antibiotic resistance gene was successfully transferred Verrucomicrobia isolates. (2) We attempted to isolate microorganisms under conditions in which the concentration of H₂O₂ was artificially changed. Seven strains that are sensitive to low-concentration H₂O₂ were successfully isolated. (3) The catalase genes derived from *Escherichia coli* was introduced into the H₂O₂-sensitive isolates. Resistance to H₂O₂ was successfully conferred by heterologous expression of catalases in the H₂O₂-sensitive isolates, which implies the effectiveness of the gene-doping method.

Key words: Bacteria, rare-phylo, isolation, genetic modification, oxidative stress

緒言

微生物は驚くほど多様な代謝系・物質生産能を有し、機能化合物生産・食品製造・廃棄物処理等の幅広い分野で利用されている。しかし人類が分離培養に成功した微生物は、環境中の全微生物種のうちわずか1%にも過ぎないと言われている。栄養豊富な寒天培地で培養可能な微生物の数は、蛍光顕微鏡観察などにより計測される環境微生物数と比べ、2~3桁低いことがよく知られており、この現象は“great plate count anomaly”と呼ばれている (Staley & Konopka, 1985; Amann *et al.*, 1995)。また環境ゲノムデータを加味した進化系統解析により、バクテリアは全58門からなると推計されているが、そのうち半数以上の31門は分離の報告例がない「推定上の」系統群とされている (Hug *et al.*, 2016)。ヒトがホヤやナメクジウオなどとともに1つの門(脊索動物門)に分類

されていることを考えると、半数以上の門が未知のまま取り残されている現状はかなり異常と言えよう。加えて、これまでに分離培養され同定されたバクテリアの90%以上はわずか4つの門(*Proteobacteria* 門, *Firmicutes* 門, *Bacteroidetes* 門, *Actinobacteria* 門)に分類されている。すなわち、分離の報告例がある27門のうち実に23門は、ごくわずかな分離培養例しかない、いわゆる「希少系統群」なのである。例えば、一般的な土壌から直接DNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子を対象とした菌叢解析をおこなうと *Verrucomicrobia* 門や *Acidobacteria* 門に代表される希少系統群微生物が20-30%程度の存在比で検出されるが、一般的な培養法ではこれらの微生物はほとんど分離培養されてこない (Tanaka *et al.*, 2014)。以上のように、人類は微生物が持つ膨大な有用機能・遺伝子資源のほとんどを、利用どころか発見すらできていないのである。

近年の環境ゲノム・シングルセルゲノム解析の技術革新は、微生物を分離培養することなくそのゲノム情報へのアクセスを可能とした (Wang & Jia, 2016; Dance,

E-mail: s.katou@aist.go.jp

共同研究者: 北川 航 (国立研究開発法人産業技術総合研究所)。

2020)。しかし膨大な遺伝子配列データを得たとしても、利用できるのは既知微生物の既知遺伝子とある程度の相同性を持つ遺伝子のみであり、ほとんどは「hypothetical protein」として機能未知のまま放置されているのが実情である。既知のものから類推・想像すらできない真に新奇な微生物機能の発見には、該当の微生物の分離培養が不可欠である。近年発見された、石炭成分を直接メタンに変換可能な微生物 (Mayumi *et al.*, 2016) やポリエチレンテレフタレート (PET) 分解細菌 (Yoshida *et al.*, 2016)、耐性菌の出現頻度が極めて少ない新奇抗生物質生産菌 (Ling *et al.*, 2015) などは、分離培養によって初めて新奇の微生物機能が明らかにされた好例である。

これまでに数多くの微生物学者が培養困難な環境微生物の分離培養に向け様々な挑戦を続けてきた (Vartoukian *et al.*, 2010; Pham & Kim, 2012; Lewis *et al.*, 2021)。例を挙げると、寒天以外のゲル化剤の使用 (Tamaki *et al.*, 2009)、細胞内シグナル物質の添加 (Bruns *et al.*, 2002)、培地中の活性酸素種の除去 (Martin *et al.*, 1976; Tanaka *et al.*, 2014)、競合者や阻害物質の影響を物理化学的に排除した培養法 (Connon & Giovannoni, 2002; Zengler *et al.*, 2002)、拡散透過膜や中空糸膜を用いた *in situ* 培養法 (Kaeberlein *et al.*, 2002; Fujitani *et al.*, 2014) など様々な培養法が試験され、新規微生物の獲得を可能にしてきた。環境中の微生物を分離培養できない究極的な要因は、微生物が住む自然環境と実験室内での培養環境との乖離にあると言える。環境中の難培養微生物の分離培養を目的としたこれまでの研究では、実験室内での培養条件を自然環境に近づけることでその解決が図られてきた。しかし究極的には実験的に自然環境を完全に再現するのは不可能であり、未知微生物の培養化効率の飛躍的な向上には大きなブレークスルーが必要である。筆者らはそのブレークスルーとして、培養条件を改変するのではなく、分離対象とする未知微生物に遺伝子を導入し特定機能を人為的に付与することで実験室内の培養環境に適応させることができないか、という逆転の発想を提案する。本研究ではこの新たな培養技術、「遺伝子ドーピング法」について、特に希少系統群の難培養微生物の分離培養を目的とした基盤技術の開発ならびに原理実証を実施した。

実験方法

希少系統群微生物への遺伝子導入

Verrucomicrobia 門の既知菌株 *Lacunisphaera limnophila* DSM 26815^T、*Chthoniobacter flavus* DSM 22515^T は Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) より、*Coralimargarita akajimensis* NBRC 103620^T、

Rubritalea squalenifaciens NBRC 103619^T は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 (NBRC) より、*Verrucomicrobium spinosum* JCM18804^T は理化学研究所バイオリソース研究センター (JCM) よりそれぞれ分譲を受けた。すべての菌株は 25℃ 好気条件、*C. akajimensis* と *R. squalenifaciens* は Marine Broth 培地、それ以外の株は R2A 培地を使用して培養した。

遺伝子導入に用いるベクターとして、広範なグラム陰性菌で保持される pBHR1 (pBBR1 レプリコン)、およびグラム陰性・陽性菌で保持される pHRP308 (RSF1010 レプリコン) をそれぞれフナコシ、国立遺伝学研究所より入手し、薬剤耐性遺伝子の変更など一部を改変して使用した。プラスミドベクターの接合伝達は供与菌 (Donor) となる大腸菌株、受容菌 (Recipient) となる稀少系統微生物株、また接合伝達を仲介するプラスミド pRK2013 を持つヘルパー株 (Helper) の三者を用いる三親接合で行った。個別に液体培養した三株を同等の細胞数で混合したのち遠心分離で大半の上清を除去して三者の濃縮液を作製し、これを受容菌の培養に適した寒天培地上にスポット植菌・培養して接合伝達を促した。接合伝達体の選択にはベクター導入により耐性となる選択薬剤 (カナマイシン) に加え、カウンターセクションとして大腸菌と受容菌の耐性が本質的に異なるテトラサイクリンなどの抗生物質を添加した培地を用いた。エレクトロポレーションに用いる細胞は液体培養で OD₆₀₀ = 0.1-0.3 としたものを 10% glycerol 液で 2 回洗浄し、元の培養液の 1/20 容量の 10% glycerol 液で再懸濁したものをコンピテントセルとした。遺伝子導入は Bio-Rad 社の GenePulser Xcell を用い、1mm ギャップのキューベットに 0.1-1μg のプラスミドベクターを混合したコンピテントセル (40-80μL) を入れ、1.0-1.8kV、200Ω、25μF のパルス条件で行った。パルス後は選択圧なしで数時間から半日間回復培養し、その後選択薬剤を含む寒天培地に植菌して培養した。トランスポゾンによる遺伝子導入はゲノム DNA 上にランダムに導入される EZ-Tn5 transposase (Lucigen 社) を使用した。トランスポザーゼ酵素が認識する反復配列を 5' 末端に持つプライマーでカナマイシン耐性遺伝子とカタラーゼ遺伝子をタンデムにつないだ DNA 配列を PCR 増幅し、上記酵素と PCR 産物を 37℃ で反応させ “酵素-DNA 複合体” (トランスポゾーム) を形成させ、これをエレクトロポレーションに用いた。形質転換体の確認は選択薬剤マーカーであるカナマイシン耐性遺伝子の内部を特異的に増幅するプライマーセット (Det-kmr-F: ACAAGATGGATTGCACGC, Det-kmr-R: TTCCACCATGATATTCGGC, 590bp 増幅) およびカナマイシン耐性遺伝子-カタラーゼ遺伝子をスパンする領域を特異的に増幅するプライマーセット

(kmr-GE-check-F: GTTGGCTACCCGTGATATTG, kmr-GE-check-R: TTGGATCGAGAAGATCGAAG, 3,780bp増幅)を用いてPCR検出を行った。

過酸化水素感受性菌の分離培養

微生物培養に用いるPYG培地は既報の方法 (Tanaka *et al.*, 2014) に従い過酸化水素の発生が最も少ないPW手法 (リン酸無添加培地) を用いて調製した。過酸化水素添加培地は30%の過酸化水素を希釈し、最終濃度が40 μ Mとなるようにシャーレに成型する直前に培地に添加した。個化後の寒天培地の過酸化水素濃度は無添加のPW培地が1-2 μ M、過酸化水素添加培地は15-20 μ Mとなった。またこれらの中間的な濃度も初期添加量を調節することで作製した。

北海道札幌市に位置する北海道大学の構内の大野池の底泥をかき混ぜ、巻き上がった底泥を含む水サンプルを採取し微生物の分離源とした。水サンプルの入ったボトルを転倒攪拌した後、2時間静置することで大きい粒子を沈殿させ上清を得た。これを蒸留水にて10⁻⁴にまで段階希釈した後、50 μ lをPW培地に接種し20 $^{\circ}$ Cの暗所にて培養を行なった。寒天培地上に生育したコロニーをPW培地および過酸化水素添加培地に植え継ぎ、PWのみに再度コロニー形成が見られるものを過酸化水素感受性株とした。得られた分離株は16S rRNA 遺伝子解析 (Tanaka *et al.*, 2014) により微生物種を同定した。

寒天培地は-80 $^{\circ}$ Cにて一晩冷凍した後、室温にて三時間暗所に放置することで融解した。解凍後の離液 (上清) を回収し、既報の方法 (Tanaka *et al.*, 2014) に従って過酸化水素濃度の測定に用いた。測定の際となる高濃度 (mM オーダー) の過酸化水素は240nmの波長における透過係数43.6M⁻¹cm⁻¹を用いてその濃度を決定した。上記で測定した高濃度過酸化水素を1000倍希釈して発色試薬と反応し、得られる560nmの吸収を測定した値を低濃度 (μ M オーダー) の過酸化水素の標準とした。サンプルは同様に発色試薬と反応させて560nmの吸収を測定し、標準との相対的な値から過酸化水素濃度を求めた。サンプルと発色試薬 (試薬A: 200mM sorbitol, 200 μ M xylenol orange と試薬B: 500 μ M ferrous ammonium sulfate, 50mM H₂SO₄を24:1の割合で混合したもの) は等量混合して室温で45分反応した後測定した。

過酸化水素感受性菌への抗酸化酵素遺伝子導入

過酸化水素感受性株への遺伝子導入は広宿主域プラスミドベクターであるpHRP308 (RSF1010レプリコン) を一部改変したものを用いた。このプラスミドに大腸菌K-12株由来の二種類の異なるカタラーゼ遺伝子 *katG*,

katE (それぞれ Catalase-peroxidase HPI, Catalase HPII) をPCR増幅し、In-Fusion クローニングにてタンデムにベクターにクローニングした。また宿主での遺伝子発現の可能性を広げるため、*katGE*の上流および薬剤耐性遺伝子であるカナマイシン耐性遺伝子の上流には人工合成したバクテリアのコンセンサスプロモーター配列 (それぞれ TTGACAgctggggcgcctctggTATAAT および TTGACAtccaaacgagagtctaaTATAAT) を導入し、最終的なベクター pRSFkatGE を作製した。

過酸化水素感受性菌として単離されたOS-4株の形質転換にはエレクトロポレーション法を使用した。OD₆₀₀ = 0.3-0.4程度に液体培養した菌体を10% glycerol液で2回洗浄し、元の培養液の1/20容の10% glycerol液で再懸濁したものをコンピテントセルとした。遺伝子導入はBio-Rad社のGenePulser Xcellを用い、1mmギャップのキュベットに0.1-1 μ gのプラスミドベクターを混合したコンピテントセル (40-80 μ L) を入れ、1.6kV, 400 Ω , 25 μ Fのパルス条件で行った。パルス後は選択圧なしで半日程度回復培養し、その後選択薬剤を含む寒天培地に植菌して培養した。形質転換にはカタラーゼ遺伝子を搭載した上記ベクター (pRSFkatGE) および同ベクターでカタラーゼを搭載しないものをコントロール (空ベクター, pRSFbr) として用いた。

カタラーゼ搭載ベクターまたは空ベクターが導入されたOS-4株をR2A培地で液体培養し、10倍希釈で数段階の希釈をして各段階50 μ lずつをコロニーカウント用の菌液とした。これを過酸化水素濃度の異なる三種類の寒天培地プレート (固化後の最終濃度1.1 μ M, 6.7 μ M, 15.9 μ M) に五反復で接種し、20 $^{\circ}$ Cの暗所で一週間培養した。過酸化水素濃度1.1 μ Mのプレート (過酸化水素無添加培地) 上で100前後のコロニーが形成された希釈段階を選択し、この希釈段階において各濃度のプレートに形成されたコロニー数を計測し、五反復の平均値で各濃度間のコロニー形成数の比較を行った。

結果および考察

希少系統群微生物への遺伝子導入法の検討

本研究では、モデルとなる希少系統群として、土壌・淡水・海水等に幅広く存在しながら分離培養例が限られている *Verrucomicrobia* 門 (Freitas *et al.*, 2012) を選択した。 *Verrucomicrobia* 門に属する微生物種はこれまで28属65種が記載されているが、これは例えば Proteobacteria 門 (約500属, 2000種) と比較すると極めて少ないといえる。 *Verrucomicrobia* 門の微生物種を対象とした遺伝子操作に関する報告は、 *Verrucomicrobium spinosum* におけるトランスポゾンによるランダム変異

挿入に関する1例 (Domman *et al.*, 2011) のみであり、使用可能な遺伝子ベクターや外来遺伝子の導入・発現に関する報告例はなかった。また *Verrucomicrobia* 門の既知分離株のうちゲノム情報が報告されているものについて plasmid の保持を調べたが、plasmid を有しているものはなかった (Kant *et al.*, 2011; Wertz *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2019)。以上を踏まえ、*Verrucomicrobia* 門の既知微生物種のうち、一般的な培地で好気培養が可能なもののでできるだけ多くの系統群から選抜し、Table 1 に示す計5株を使用し遺伝子導入法を検討した。

グラム陰性、グラム陽性の幅広い微生物で機能することが知られている広宿主域ベクター pBHR1 および pHRP308 を使用し、エレクトロポレーションもしくは接合伝達法により遺伝子導入を試みた。その結果、どちらのベクターでも複数の菌株で抗生物質耐性を指標とした1次スクリーニングでは形質転換された候補株が得られるものの、その後安定した継代培養ができなかった。

この結果は、*Verrucomicrobia* 門微生物の細胞への plasmid の導入や抗生物質耐性遺伝子の発現自体には問題はないが、プラスミドの複製や保持の点で問題が生じていることを示唆している。この結果を受け、plasmid 等の遺伝子ベクターを使用しないトランスポゾーム法を適用した (Fig.1)。PCR 増幅したカナマイシン耐性遺伝子に transposase を結合したトランスポゾームをエレクトロポレーションにより *Verrucomicrobia* 門微生物に導入した結果、*C. akajimensis* および *R. squalenifaciens* の2菌株で遺伝子導入された株の取得に成功した (Fig.2)。遺伝子、タンパクの発現確認には至っていないが、これは *Verrucomicrobia* 門微生物における遺伝子導入の初めての事例となる。一方で試験した5株のうち3株では遺伝子導入株の取得に至っておらず、この手法が *Verrucomicrobia* 門において一般的に適用可能であるかは定かではない。

Table 1. Phylogenetic information of phylum *Verrucomicrobia* strains used in this study.

Class	Order	Family	Genus/Species/Strain
<i>Opitutae</i>	<i>Opitutales</i>	<i>Opitutaceae</i>	<i>Lacunisphaera limnophila</i> DSM 26815 ^T
	<i>Puniceicoccales</i>	<i>Puniceicoccaceae</i>	<i>Coralimargarita akajimensis</i> NBRC 103620 ^T
<i>Spartobacteria</i>	<i>Chthoniobacterales</i>	<i>Chthoniobacteraceae</i>	<i>Chthoniobacter flavus</i> DSM 22515 ^T
<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Rubritaleaceae</i>	<i>Rubritalea squalenifaciens</i> NBRC 103619 ^T
		<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> JCM 18804 ^T

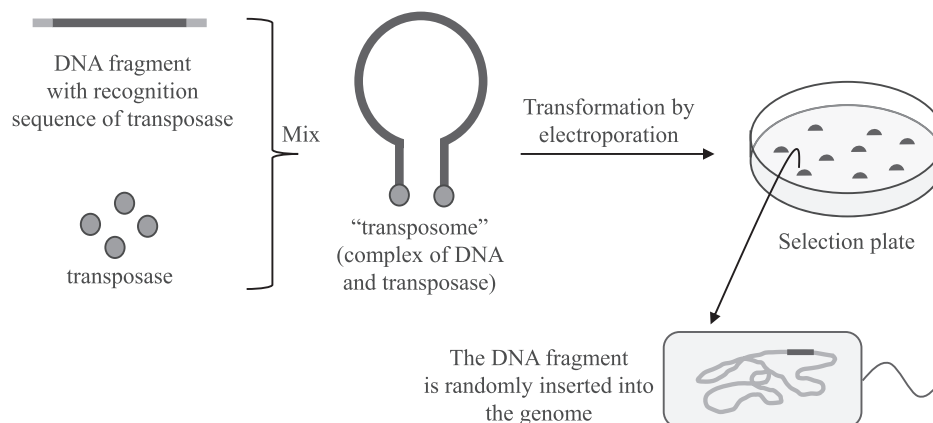


Fig. 1. Summary of the transposome method. DNA fragments to be inserted into the genome (recognition sequence of transposase was added) were mixed with transposases to obtain "transposome" (the complex of DNA end transposase). The transposome was transformed by electroporation into the target bacterial cells. The transformed strains were obtained by selection plate (e.g., containing antibiotics), and the presence of inserted DNA fragment was confirmed by specific PCR.

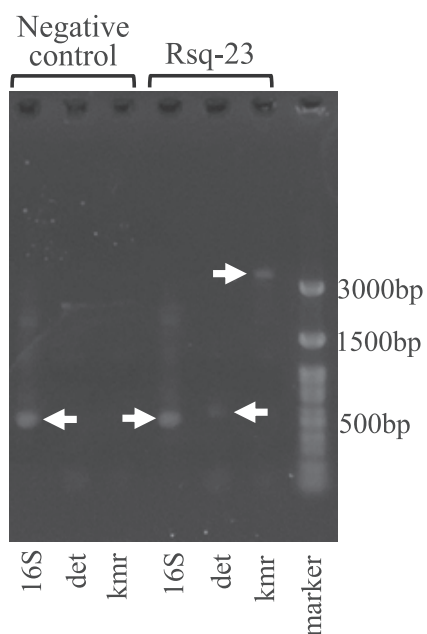


Fig. 2. PCR detection of gene transformation to a *Verrucomicrobia* strain (*Rubritalea squalenifaciens*). Rsqr-23: the genome of transformed *R. squalenifaciens* strain (DNA fragment was successfully introduced into the genome) was used as the PCR template, Negative control; the genome of *R. squalenifaciens* strain without transformation was used as the PCR template, 16S: using universal primers for 16S rRNA gene (a positive control, expected product size: 500bp), det; using a primer set for kanamycin resistance gene (a transformed gene, expected product size: 590bp), and kmr: using a primer set for the spanning region of kanamycin resistance gene and catalase gene (transformed genes, expected product size: 3780bp). The white arrows indicate PCR products with expected sizes.

過酸化水素感受性菌の分離培養

環境微生物への遺伝子導入により付与する機能として、本研究では酸化ストレス耐性という機能に着目した。寒天平板培地でのコロニー形成は、大気下という多くの環境微生物にとっては特殊な環境での増殖を伴うプロセスである。特に20%の酸素に直接さらされるというのは多くの微生物にとって大きな酸化ストレスがかかると考えられる。加えて、筆者らのグループでは、一般的な寒天培地の作製時に、培地に含まれるリン酸と寒天を同時にオートクレーブ処理することで過酸化水素が発生すること、またそれにより環境微生物の少なくとも一部が生育阻害を受けることを報告している (Tanaka *et al.*, 2014)。以上のことから、環境微生物に抗酸化酵素遺伝

子を導入し発現させることで、通常の培養法では分離培養困難な微生物の取得が可能になると考えた。

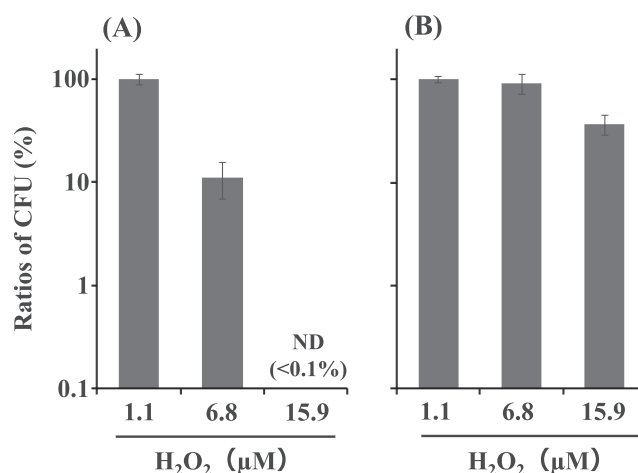
その原理実証に向け、一般的な培地作製法で発生する10 μ M オーダーの過酸化水素によりコロニー形成が阻害される微生物の分離培養を試みた。リン酸と寒天を別々にオートクレーブ滅菌し培地を調整することで、過酸化水素濃度を極めて低濃度 (1-2 μ M) しか含まない寒天培地を作製し北海道大学敷地内の大野池の底泥を分離源とし微生物を分離培養した。既報 (Tanaka *et al.*, 2014) と同様に、低濃度過酸化水素培地では、通常の調整法で作製した培地と比較して得られるコロニー数が多い傾向にあった。低濃度過酸化水素培地で得られた約300のコロニーを対象としコロニーPCR法による16S rRNA 遺伝子断片を増幅しシーケンス解析に供した。RDP Classifierによる系統分類解析により配列が類似するものを同一の系統群としてまとめた結果、120の系統群に分類された。このうち存在頻度が高かった系統群について、低濃度過酸化水素培地では生育可能かつ過酸化水素添加培地 (終濃度約15 μ M) では生育できない株を選別した。その結果、OS-1, OS-2, OS-3, OS-4の4株が選別され、これらが過酸化水素感受性菌であることが確認された。

過酸化水素感受性菌への抗酸化酵素遺伝子導入

前項にて得られた4株に加えて、筆者らの過去の研究で得られていた3株の過酸化水素感受性菌も以降の実験に使用した。以上計7株の過酸化水素感受性菌の分類学的情報をTable 2に示す。大腸菌由来の2種のカタラーゼ, *katG* と *katE* を広宿主域ベクター pHRP308 に搭載し, Table 2 に示した過酸化水素感受性株に対し, エレクトロポレーション法より形質転換を試みた。その結果, OS-4 株について plasmid 保有株の取得に成功した。OS-4 株について *katGE* を持たない空ベクター株を同様に作製し, 異なる過酸化水素濃度下でのコロニー形成を比較した (Fig. 3)。その結果, 空ベクター株では元株と同様, 低過酸化水素培地 (1.1 μ M) では良好なコロニー形成がみられたものの, コロニー数は過酸化水素 6.8 μ M 条件で約 1/10, 過酸化水素 15.9 μ M 条件では 1/1000 以下にまで低下し, 極めて感受性が高いことが示された。一方でカタラーゼ発現株では, 過酸化水素 6.8 μ M 条件では有意なコロニー数低下がみられず, また過酸化水素 15.9 μ M 条件においてもコロニー数低下は 1/2 程度に抑えられていた。この結果は, 一般的な培地では分離培養できない過酸化水素感受性株を, 外来遺伝子の導入により分離可能な状態に改変することが可能であることを示している。

Table 2. Phylogenetic information of H₂O₂-sensitive isolates used in this study.

Strain	Class	Closest relative (identity, %)
OS-1	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i> T118 (99.2)
OS-2	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodoferrax</i> sp. strain GR-4 (99.4)
OS-3	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Pelomonas</i> sp. 7A-202 (100)
OS-4	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Curvibacter</i> sp. AEP1-3 (99.6)
SO-S41	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pleomorphomonas oryzae</i> (89.0)
SE-S32	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Prosthecomicrobium hirschii</i> (95.1)
SE-S63	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylocella silvestris</i> (92.3)

**Fig. 3.** Comparison of colony forming units (CFUs) on agar solidified media with different concentrations of H₂O₂. (A) strain OS-4 with pRSFbr (an empty vector) and (B) strain OS-4 with pRSFkatGE containing catalase genes. Data are represented as averages from five replicate agar plates. Error bars represent standard deviations.

考察と展望

本研究では希少系統群微生物である *Verrucomicrobia* 門微生物を対象とした遺伝子導入法の開発、ならびに一般的な培地では培養ができない過酸化水素感受性菌への遺伝子導入による可培養化を通し、難培養性微生物への遺伝子導入（遺伝子ドーピング）による可培養化の実現可能性を示すことができた。しかし今後、環境中の微生物への直接遺伝子導入による可培養化、ひいては新奇微生物の分離培養の実現に向けては、検討が必要な課題およびそれを解決するための更なる研究開発が必要である。

本技術の適用に際しまず検討すべき項目は、どの微生物を対象として遺伝子導入を試みるべきか、である。これはその対象の範囲から「標的型遺伝子導入」と「非標的型遺伝子導入」の2つに大別できる。「標的型」では

本研究で使用した *Verrucomicrobia* 門微生物のように、ある特定の環境に相当数存在しているながら分離培養が困難な特定の系統群を対象とする。この場合、その対象の系統群で効率的な遺伝子導入法、その系統群で（できれば特異的に）機能するベクターなどの構築が必要となる。また例えば門レベルで分離培養例が存在しないような系統群を対象とすることも理論的には可能である。この場合、メタゲノムデータからその系統群が保持しているプラスミドの配列を特定し、塩基配列合成によりプラスミドを再構築するなどの手段により、未培養系統群で機能するベクターを得るような工夫が必要であろう。また標的型遺伝子導入においては、単純に抗生物質耐性遺伝子などを導入するだけでも、他の系統群微生物との競合を排除でき分離培養の可能性をあげられるであろう。加え

て、メタゲノムデータから対象とする微生物のゲノムを再構築できていれば、そのゲノムデータから自律的な生育を困難にしている遺伝子欠損を割り出し、遺伝子ドーピングにより補填することが可能となるであろう。

もう一方の「非標的型」では、土壌や水圏などの多様な微生物が生息する環境を対象とし、特定の微生物種ではなく存在するすべての微生物に対し遺伝子導入・機能付与を試み、分離培養効率の全体的な向上、および系統的に新規性の高い微生物の分離確率向上を目的とする。この場合、できるだけ多岐にわたる微生物系統群で機能する遺伝子導入法、および超広宿主域ベクターの開発が必要となる。遺伝子導入法としては、本研究で使用したエレクトロポレーション法は有用な候補であるが、加えてリポソーム等の膜小胞を利用した細胞融合法（真核生物では一般的な手段であるが原核生物での適用例は乏しい）など、新たな技術開発を行う余地もあるであろう。非標的型においては、本研究でも使用した過酸化水素分解酵素のような、実験室培養で生じるストレスを軽減するような遺伝子の導入が有効であろう。

我々のグループでのこれまでの研究（Tanaka *et al.*, 2014; Kato *et al.*, 2018; 2020）で、多くの環境微生物が寒天培地調整時に発生する微量の過酸化水素により生育阻害を受けることが明らかとされている。しかし好気条件下で生育する微生物にとっては、酸素呼吸の過程の電子伝達系にて活性酸素種が発生することは不可避であり、何らかの活性酸素除去機構は備えられているはずである。実際、本研究で使用した SO-S41 株のゲノム解析の結果、過酸化水素感受性でありながらカタラーゼや alkyl hydroperoxide reductase といった過酸化水素分解酵素を保持していることが明らかとされた（原著論文 1）。本研究で分離培養した過酸化水素感受性菌が、細胞内で発生する過酸化水素の除去機構を持ちながら、なぜ培地中の微量の過酸化水素により生育が阻害されるのか、その理由は不明である。その理由を明らかにすることで、外来遺伝子の導入ではなく、内在しながら機能を果たしていない遺伝子の活性化による可培養化のような技術につながるかもしれない。

要 約

環境中に存在する難培養性微生物の分離培養に向け、これまで多くの試みがなされてきた。これまでの研究では、培養条件を改変し自然環境に近づけることでその解決が図られてきたが、究極的には実験的に自然環境を完全に再現するのは不可能である。本研究では、遺伝子導入による特定機能の付与、すなわち遺伝子ドーピングにより、難培養微生物を人為的に改変し実験室内での培養を可能

にできないか、という発想に基づき研究を行った。(1) 分離例が非常に少ない希少系統群微生物 (*Verrucomicrobia* 門) を対象とし、遺伝子導入法を検討した。トランスポソームを用いた手法により、*Verrucomicrobia* 門の微生物で初めて遺伝子導入に成功した。(2) 寒天培地中の過酸化水素濃度を変えた条件で微生物の分離培養を試み、通常の培地調整時に発生するレベルの過酸化水素に感受性を持つ環境微生物の分離に成功した。(3) 分離した過酸化水素感受性株に大腸菌由来のカタラーゼ遺伝子を導入し発現させた。感受性株への遺伝子導入により、培地調整時に発生する過酸化水素に対する抵抗性を付与可能であることを実証し、本手法の有用性が示された。今後環境微生物への直接遺伝子導入の実験を行うことで、本手法が新規微生物の分離培養に有効であることが示されると期待される。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 加藤創一郎. 2021. 培養困難な微生物たちとそれらを培養したい研究者たち. 第67回日本放線菌学会学術講演会 (3月9日, オンライン開催)

原著論文

- 1) Watanabe, M., Igarashi, K., Kato, S., Kamagata, Y., & Kitagawa, W. Complete genome sequence of *Alphaproteobacteria* bacterium strain SO-S41. *Microbiol. Resour. Announc.* **10**: e0053621.

謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また、本研究の遂行にご協力いただいた国立研究開発法人産業技術総合研究所の三浦愛技術補佐員、北海道大学大学院農学院基礎環境微生物学分野の学生諸氏に感謝の意を表します。

文 献

- Amann, R.L., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Bruns, A., Cypionka, H. & Overmann, J. 2002. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3978-3987.
- Cannon, S.A. & Giovannoni, S.J. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:

- 3878–3885.
- Dance, A. 2020. The search for microbial dark matter. *Nature* **582**: 301–303.
- Domman, D.B., Steven, B.T. & Ward, N.L. 2011. Random transposon mutagenesis of *Verrucomicrobium spinosum* DSM 4136(T). *Arch. Microbiol.* **193**: 307–312.
- Freitas, S., Hatosy, S., Fuhrman, J.A., Huse, S.M., Welch, D.B., Sogin, M.L. & Martiny, A.C. 2012. Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia. *ISME J.* **6**: 1499–1505.
- Fujitani, H., Ushiki, N., Tsuneda, S. & Aoi, Y. 2014. Isolation of sublineage I *Nitrospira* by a novel cultivation strategy. *Environ. Microbiol.* **16**: 3030–3040.
- Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K. *et al.* 2016. A new view of the tree of life. *Nat. Microbiol.* **1**: 16048.
- Kaeberlein, T., Lewis, K. & Epstein, S.S. 2002. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**: 1127–1129.
- Kant, R., van Passel, M.W., Sangwan, P. *et al.* 2011. Genome sequence of “*Pedospaera parvula*” Ellin514, an aerobic Verrucomicrobial isolate from pasture soil. *J. Bacteriol.* **193**: 2900–2901.
- Kato, S., Yamagishi, A., Daimon, S. *et al.* 2018. Isolation of previously uncultured slow-growing bacteria by using a simple modification in the preparation of agar media. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**: e00807-18.
- Kato, S., Terashima, M., Yama, A., Sato, M., Kitagawa, W., Kawasaki, K. & Kamagata, Y. 2020. Improved isolation of uncultured anaerobic bacteria using medium prepared with separate sterilization of agar and phosphate. *Microbes Environ.* **35**: ME19060.
- Lewis, W.H., Tahon, G., Geesink, P., Sousa, D.Z. & Ettema, T.J.G. 2021. Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**: 225–240.
- Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J. *et al.* 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **517**: 455–459.
- Martin, S.E., Flowers, R.S. & Ordal, Z.J. 1976. Catalase: its effect on microbial enumeration. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 731–734.
- Mayumi, D., Mochimaru, H., Tamaki, H., Yamamoto, K., Yoshioka, H., Suzuki, Y., Kamagata, Y., & Sakata, S. 2016. Methane production from coal by a single methanogen. *Science* **354**: 222–225.
- Pham, V.H. & Kim, J. 2012. Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends Biotechnol.* **30**: 475–484.
- 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.
- 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 microorganism cultivability. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 7659–7666.
- Song, J., Kang, I., Joung, Y. *et al.* 2019. Genome analysis of *Rubritalea profunda* SAORIC-165T, the first deep-sea verrucomicrobial isolate, from the northwestern Pacific Ocean. *J. Microbiol.* **57**: 413–422.
- Vartoukian, S.R., Palmer, R.M. & Wade, W.G. 2010. Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **309**: 1–7.
- Wang, J. & Jia, H. 2016. Metagenome-wide association studies: fine-mining the microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 508–522.
- Wertz, J.T., Kim, E., Breznak, J.A., Schmidt, T.M. & Rodrigues, J.L. 2012. Genomic and physiological characterization of the Verrucomicrobia isolate *Geminisphaera colitermitum* gen. nov., sp. nov., reveals microaerophily and nitrogen fixation genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 1544–1555.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T. *et al.* 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science* **351**: 1196–1199.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M. & Keller, M. 2002. Cultivating the uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 15681–15686.

細菌における細胞外膜小胞への選択的タンパク質輸送機構の解明と 細胞外タンパク質生産場構築への応用

栗原 達夫

京都大学化学研究所
〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

Elucidation of the mechanism of selective protein transport to
bacterial extracellular membrane vesicles and its application to
the construction of extracellular protein production platform

Tatsuo Kurihara

Institute for Chemical Research, Kyoto University
Gokasho, Uji, Kyoto 611-0011

A Gram-negative cold-adapted bacterium, *Shewanella vesiculosa* HM13, isolated from the intestinal contents of horse mackerel (*Trachurus japonicus*), abundantly produces extracellular membrane vesicles containing a protein with a molecular mass of about 49 kDa, named P49, as their major cargo protein. Whole genome sequence analysis of this bacterium revealed a gene cluster upstream of the P49 gene that encodes proteins similar to the components of the type II secretion system (T2SS), which is involved in protein translocation across the outer membrane in Gram-negative bacteria. Disruption of the genes in this gene cluster abolished P49 transport to the membrane vesicles and caused its accumulation in the cells, suggesting that the T2SS-like machinery is responsible for P49 secretion. Genes coding for proteins that are probably involved in the synthesis of cell-surface polysaccharides were also found around the P49 gene. The mutant strains obtained by disrupting these genes secreted P49, but P49 in the extracellular space was not associated with the membrane vesicles. These results suggest that P49 is translocated to the extracellular space by the T2SS-like machinery and loaded onto the membrane vesicles by interaction with their surface polysaccharides. When GFP was fused to the C-terminus of P49 and expressed in *S. vesiculosa* HM13, the fusion protein was found in the membrane vesicles besides the cells. Thus, P49 may be useful as a carrier for the production of foreign proteins as cargoes of the membrane vesicles. It was also found that the membrane vesicle productivity of *S. vesiculosa* HM13 was enhanced by increasing L-lysine concentration in the culture medium, and the sensor protein homolog involved in this response was identified.

Key words: membrane vesicle, cargo protein, protein secretion, protein transport, cell-surface polysaccharide

緒 言

細菌が生産する細胞外膜小胞 (extracellular membrane vesicle) は、細胞間コミュニケーション、環境中の栄養素の利用など、生理的に重要な多くの機能を担っている (Schwechheimer & Kuehn, 2015; Watanabe, 2016; Toyofuku, 2019; Caruana & Walper, 2020)。ワクチンや

ドラッグデリバリーのキャリア、生体触媒等としての応用も期待されている (Toyofuku *et al.*, 2015; Gerritzen *et al.*, 2017; Turner *et al.*, 2019; Li & Liu, 2020)。本研究は、膜小胞高生産性細菌を用いて、膜小胞形成の分子機構、特に特定のタンパク質が膜小胞に輸送される仕組みを明らかにし、膜小胞をプラットフォームとしたタンパク質の細胞外生産系開発の基盤を構築することを目指して実施したものである。

本研究で用いた膜小胞高生産性細菌は、外来タンパク質の分泌生産系構築に適した低温適応細菌を探索する過程で発見された。低温適応細菌は、極地、深海、高山な

E-mail: kurihara@scl.kyoto-u.ac.jp
共同研究者：川本 純 (京都大学化学研究所).
小川拓哉 (京都大学化学研究所).

どの低温環境に広く棲息している (Yumoto, 2013). これらの細菌は低温での使用に有用な低温活性酵素の生産者として酵素工学的な観点から注目されているほか、熱安定性が低い外来タンパク質などを生産する宿主としても有用と期待される (Margesin, 2017). 筆者らは、以前、南極海水由来の低温適応細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を宿主とした外来タンパク質低温生産系を構築し、熱安定性の低いタンパク質の生産に有用であることを示した (Miyake *et al.*, 2007). このシステムを更に有用なものとするべく、外来タンパク質の分泌生産に適した低温適応細菌を探索することにした. 分泌タンパク質は遠心分離や濾過操作によって簡便に細胞と分離できるため、分泌生産することで純度の高い外来タンパク質を容易に取得できるようになるものと考えられる. *S. livingstonensis* Ac10 はタンパク質分泌生産能に優れた株ではないため、宿主として有望な低温適応細菌を新たに探索することにした. 高純度のタンパク質を培養上清中に著量生産する株を探索した結果、アジの腸管内容物から *Shewanella vesiculosa* HM13 と命名した低温適応細菌が得られ、本菌が特定タンパク質を積荷とした膜小胞を分泌高生産することが見いだされた. そこで、本菌を宿主として、外来タンパク質を膜小胞の積荷として分泌生産するシステムを開発することを目指して研究を進めることにした. そのような応用開発を進める上では、本菌の膜小胞生産機構や膜小胞へのタンパク質の積み込み機構を理解することが重要と考えられ、それらの解明を本研究の主な目的とした. 細胞外膜小胞の生産は細菌に普遍的に備わった機能であるが、その分子機構には依然として不明な点が多い. 膜小胞高生産性細菌を用いた研究を進めることによって、膜小胞生産に関する普遍的に重要な仕組みが明らかにされてくることも期待される.

実験方法

低温菌の分離と分泌タンパク質の分析

魚類腸管内容物を LB 培地 [1% (w/v) Tryptone, 0.5% (w/v) Yeast extract, 1% (w/v) NaCl (pH 7.0)] に懸濁し、懸濁液上清を LB 寒天培地に塗布した. 4°C で数日間保温し、出現したコロニーを 5 mL の LB 培地に植菌し、4°C で約 48 時間培養した. 培養液を遠心分離に供し、得られた上清中のタンパク質をトリクロロ酢酸 (TCA) を用いて沈殿させたのち、SDS-PAGE によって分析した.

各種細菌株の培養条件

培養は、特に断らない限り、5 mL の LB 培地を用いて好氣的に行った. 必要に応じて、リファンピシン 50 µg/mL、カナマイシン 50 µg/mL、クロラムフェニコール 30 µg/mL

を添加した. *S. vesiculosa* HM13 と *S. livingstonensis* Ac10 は 4°C または 18°C, *Shewanella oneidensis* MR-1 は 30°C, *Escherichia coli* MG1655 と *Pseudomonas putida* KT2440 は 37°C で培養した.

膜小胞の調製

培養液を 6,000 ~ 6,800 x g で 10 分間の遠心分離に供して細胞を回収した. 上清は 13,000 ~ 15,000 x g で 10 ~ 15 分間の遠心分離に供した. 得られた上清を 0.45 µm のポアサイズのフィルター濾過に供することで細胞を完全に除去した. 濾液を 100,000 x g で 2 時間の超遠心分離に供し、膜小胞を沈殿させた. 得られた膜小胞は Dulbecco リン酸緩衝液 (135.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.9 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1.5 mM KH₂PO₄) に 0.2 M NaCl を追加した緩衝液 (DPBSS) に懸濁した (Chutkan *et al.*, 2013). 超遠心分離で得られた上清は post-vesicle fraction (PVF) として回収した. 遠心分離はすべて 4°C で行った.

シヨ糖密度勾配超遠心法による膜小胞画分の分析

上記操作で得られた膜小胞画分をシヨ糖密度勾配 (20, 32.5, 45, 57.5, 70% w/v; 各 6.25 mL) に重層し 103,745 x g, 4°C で 15 時間の超遠心分離に供した. その後、底から 1 mL ずつ分取し、各画分のタンパク質を TCA で沈殿させたのち、SDS-PAGE で分析した.

膜小胞の定量

供試菌を定常期 (OD₆₀₀=3.0) まで培養したのち、上述の方法で膜小胞を調製した. 膜小胞の定量では、DPBSS 中で親油性蛍光色素 FM4-64 を終濃度 5 µg/mL になるように添加し、20 分間、室温でインキュベートした (McBroom *et al.*, 2006). その後、膜中の FM4-64 の蛍光強度を励起波長 515 nm, 蛍光波長 635 nm で測定した.

リン脂質と脂肪酸の分析

細胞と膜小胞からメタノール/クロロホルム (2:1, vol/vol) を用い、Bligh-Dyer 法によってリン脂質を抽出した (Bligh & Dyer, 1959). 得られたリン脂質抽出物をエレクトロスプレーイオン化トリプル四重極型質量分析計 Sciex API 3000 LC/MS/MS (Applied Bio-Systems) で分析した (Cho *et al.*, 2012). 一方、リン脂質のアシル鎖をメチルエステル化し、Clarus 680 ガスクロマトグラフと Clarus SQ 8C 質量分析計からなる GC-MS (Perkin-Elmer) で分析した (使用カラム: Agilent J&W GC column DB-1) (Tokunaga *et al.*, 2017).

透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

既報 (Yokoyama *et al.*, 2017) と同様の方法で膜小胞の TEM 観察を行った。親水化処理を施した炭素被覆銅グリッドに 2 μ L の膜小胞サンプルを吸着させ、2% 酢酸ウラニルで二回処理することでネガティブ染色した。TEM 観察には、JEM-1400 透過型電子顕微鏡 (日本電子) を 120kV の加速電圧で用いた。観察像の取得には JEM-1400 に内蔵の CCD カメラを使用した。

緩衝液中でのインタクトな膜小胞の構造は、クライオ電子顕微鏡法によって -175 $^{\circ}$ C で観察した。ここでは、サイドエントリー型クライオホルダー (Model 626.DH holder, Gatan Inc.) を使用した。サンプルはマイクログリッド (lacey carbon film, Ted Pella Inc.) に載せ、既報 (Yokoyama *et al.*, 2017) と同様に処理した。

電界放出型走査電子顕微鏡 (FE-SEM) 観察

膜小胞を分泌する細胞の表層構造を観察するため、野生型の *S. vesiculosa* HM13 を 1mL の LB 培地中、18 $^{\circ}$ C で OD₆₀₀ = 1.0 に到達するまで静置培養し、得られた細胞を終濃度 1% のグルタルアルデヒド溶液で固定した。FE-SEM 解析は既報 (Koyama *et al.*, 2015) の方法に基づいて行った。サンプルはオスミウムプラズマコーター (POC-3, 盟和商事) を用いてオスミウムでコーティングし、FE-SEM (JSM-6700F, 日本電子) を用いて加速電圧 5kV で観察した。

遺伝子破壊

相同組み換えによる遺伝子破壊には *S. vesiculosa* HM13 での自律複製能をもたないプラスミド pKNOCK-Km^r を用いた (Alexeyev, 1999)。標的遺伝子の内部配列を PCR で増幅し、pKNOCK-Km^r に挿入後、*Escherichia coli* S17-1/ λ pir を介して接合伝達によって *S. vesiculosa* HM13 に導入した (Cho *et al.*, 2012)。この際の実験菌としては、あらかじめ取得しておいたリファンピシン耐性を獲得した突然変異株 (*S. vesiculosa* HM13-Rif^r) を用いた。シングルクロスオーバーの相同組み換えでゲノム上の標的遺伝子にプラスミドが挿入された遺伝子破壊株を、カナマイシンとリファンピシンを含む LB 寒天培地を用いて選抜した。

P49 融合型 GFP を発現する *S. vesiculosa* HM13 の作製

GFP 遺伝子をゲノム上の P49 遺伝子のコーディング領域 3' 末端に挿入することで P49 融合型 GFP を発現する *S. vesiculosa* HM13 を作製した。具体的には、P49 の C 末端領域をコードする約 500bp の DNA 断片 (終止コドンは含まない) と GFP 遺伝子の融合物を挿入した pKNOCK-Km^r を作製し、*E. coli* S17-1/ λ pir を介して接合

伝達によって *S. vesiculosa* HM13-Rif^r に導入した。シングルクロスオーバーの相同組み換えでゲノム上の P49 遺伝子下流に GFP 遺伝子が挿入された株を、カナマイシンとリファンピシンを含む LB 寒天培地を用いて選抜した。

対照実験用に P49 に融合されていない GFP を発現する *S. vesiculosa* HM13 も作製した。具体的には、P49 遺伝子のプロモーターを含むと考えられる 5' 非翻訳領域 500bp の下流に GFP 遺伝子を接続した DNA 断片を pJRD215-Cm^r に挿入し、*E. coli* S17-1/ λ pir を介して接合伝達によって *S. vesiculosa* HM13 の P49 欠損株に導入した。目的の株はカナマイシン、リファンピシン、クロラムフェニコールを含む LB 寒天培地を用いて選抜した。

膜小胞局在性タンパク質の網羅的同定

LB 培地で好氣的に培養した *gspD2* 破壊株 Δ hm3349 (Δ gspD2) 由来の膜小胞画分に回収されたタンパク質 (600 μ g) を、既報 (Park *et al.*, 2012) と同様の方法で二次元電気泳動に供し、ペプチドマスフィンガープリンティング法で同定した。同定されたタンパク質については BLAST (Altschul *et al.*, 1997) と HHpred (Söding *et al.*, 2005) で相同性解析を行ったほか、PSORTb version 3.0.2 (Yu *et al.*, 2010) を用いて局在性解析を行った。

結 果

S. vesiculosa HM13 の分離と同定

低温での外来タンパク質分泌生産用宿主として適した低温適応微生物を魚類腸管内容物から探索した。その結果、*Pseudomonas* 属、*Shewanella* 属、*Flavobacterium* 属の数種の細菌株が得られた。特に、アジの腸管内容物から得られた株において、培養上清に単一の著量の分泌タンパク質が見いだされたため、本菌を対象として研究を進めた。本菌の全ゲノム解析を行い、16S rRNA 遺伝子配列 (アクセッション番号: LC460999, LC461000) の系統解析、および ANI (Average Nucleotide Identity) 解析によって、本菌は *Shewanella vesiculosa* と同定された。アジ (*Horse Mackerel*) から分離された No.13 と呼称していた株であったことから、本菌を *Shewanella vesiculosa* HM13 と命名した (寄託機関: RIKEN BRC-JCM, ID: JCM 33296)。本菌は 4~25 $^{\circ}$ C で生育し、18 $^{\circ}$ C で最も良好に生育した。倍加時間は 4 $^{\circ}$ C で 4.1h、18 $^{\circ}$ C で 1.8h であった (Fig.1A)。

S. vesiculosa HM13 によるタンパク質の分泌生産

S. vesiculosa HM13 が約 49kDa のタンパク質を単一の主要分泌タンパク質として生産していることを見いだした (Fig.1B)。この分子質量に基づいて、本タンパク質

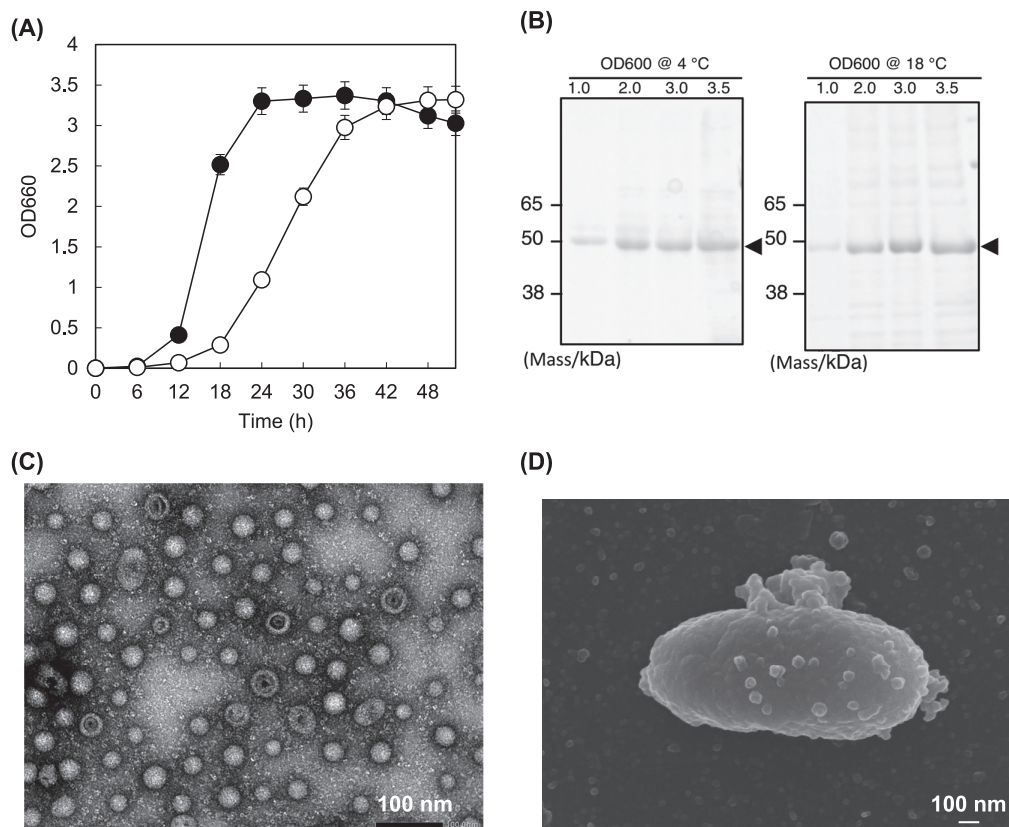


Figure 1. Characterization of *S. vesiculosa* HM13. (A) Growth of *S. vesiculosa* HM13. The cells were grown at 4°C (open circles) and 18°C (closed circles) in LB medium. Bars represent the SD values calculated from three independent experiments. (B) Secretory protein production by *S. vesiculosa* HM13. The cells were grown at 4 and 18°C to the indicated OD₆₀₀, and 1 mL aliquots of the culture supernatants were subjected to TCA precipitation and SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. The major protein bands of about 49 kDa are indicated by arrowheads. (C) Negative-stained TEM image of extracellular membrane vesicles produced by *S. vesiculosa* HM13. (D) FE-SEM image of the *S. vesiculosa* HM13 cell grown at 18°C. (Reproduced from Chen, C. *et al.* (2020) *Front. Microbiol.* **10**: 3001 with modifications with permission from Frontiers Media SA.)

をP49と命名した。培養上清中のP49は培養時間の経過とともに増加し、定常期後期（OD₆₀₀=3.0）では4°Cで3.6mg/L、18°Cで5.3mg/Lの生産量が見られた。培養上清中に高純度で存在することから、本菌を宿主とし、P49をキャリアとして用いることで、高純度の外来タンパク質を分泌生産するシステムの構築が可能になることが期待された。

P49のN末端アミノ酸配列を決定し、全ゲノム配列（4,279 ORF）と照合した結果、*hm3347*がP49をコードすることが見いだされた（アクセッション番号：LC431027）。本遺伝子にコードされる473アミノ酸残基のうち、シグナル配列と考えられるN末端22残基が切除されて451残基の成熟型のP49が生成すると考えられ

た。BLAST解析の結果、*Shewanella sediminis* HAW-EB3の機能未知タンパク質Ssed_3019（アクセッション番号：ABV37623）と28%の相同性が認められたが、機能が明らかでないタンパク質との有意な配列相同性は見いだされず、一次構造からの機能推定は困難であった。

S. vesiculosa HM13によるP49を積荷とした細胞外膜小胞の生産

P49の局在性をSOSUI_{GramN} (https://harrier.nagahama-bio.ac.jp/sosui/sosuigramn/sosuigramn_submit.html) (Imai *et al.*, 2008) で解析したところ、外膜への局在性が推測された。培養上清に見いだされたP49について外膜への局在性が推測されたことから、P49が培養上清中

の外膜に由来する膜と相互作用していることが示唆された。そこで、*S. vesiculosa* HM13が外膜に由来する細胞外膜小胞を生産し、その積荷としてP49が存在する可能性を検討することにした。

P49の局在性解析のため、本菌の培養上清をシヨ糖密度勾配超遠心分離に供した。各画分をSDS-PAGEで解析した結果、P49が30-40%のシヨ糖を含む画分に存在することが見いだされた。また、P49を含む画分をTEMで解析した結果、多数の膜小胞が存在することが見いだされた (Fig. 1C)。これらの結果は、P49が膜小胞の積荷として存在することを示唆するものと考えられた。観察された膜小胞は30-100nm程度の直径を有していた。大多数の膜小胞は一重膜で囲まれていたが、複数の膜で囲まれているように見える膜小胞も観察された。

膜小胞とP49はシヨ糖密度勾配を用いない超遠心分離により沈殿として回収することもできた。P49が膜小胞に積み込まれていることを確かめるため、この沈殿画分をプロテアーゼ消化実験に供した。界面活性剤非存在下でトリプシンによって処理した場合、P49は分解されなかったが、1% Triton X-100存在下で処理した場合、P49はほぼ完全に分解された。この結果は、P49が膜によってトリプシンの作用から保護されていることを示しており、P49が膜小胞の積荷タンパク質であることが結論された。

次に、*S. vesiculosa* HM13の膜小胞生産性を他のグラム陰性細菌と比較した (Fig. 2)。膜小胞の定量には、膜染色性蛍光試薬FM4-64を用いた。*S. vesiculosa* HM13と近縁の低温菌*S. livingstonensis* Ac10は4℃と18℃で生育させ、他の細菌については、それぞれの至適温度で生育させた。その結果、*S. vesiculosa* HM13による膜小胞の生産量は、18℃において、4℃の3倍程度であり、いずれの温度においても、*S. livingstonensis* Ac10よりもはるかに著量の膜小胞を生産することがわかった。また、18℃における*S. vesiculosa* HM13の膜小胞生産性は、*S. oneidensis* MR-1、*P. putida* KT2440、*E. coli* MG1655よりも高いことが示された。

S. vesiculosa HM13が生産する細胞外膜小胞の特徴

上述のように*S. vesiculosa* HM13の培養上清から回収した膜小胞の大部分は直径30-100nm程度の球形であることがTEM観察によって見いだされている。動的光散乱法による解析では、膜小胞の平均直径が80-100nmであると見積もられた。これらの特徴については、4℃で培養した場合と18℃で培養した場合とで、顕著な差がなかった。クライオ電子顕微鏡法では、脂質二重膜と考えられる電子密度の高い領域に囲まれた膜小胞が観察された。一重膜で囲まれた膜小胞に加えて、二重膜で囲

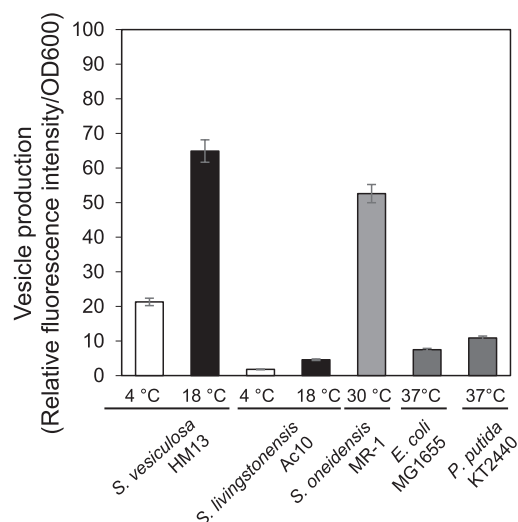


Figure 2. Production of membrane vesicles by *S. vesiculosa* HM13 and other Gram-negative bacteria. The cells were grown in LB medium at the temperatures indicated. The membrane vesicles were collected when the OD₆₀₀ of the culture reached 3.0. *n* = 3. (Reproduced from Chen, C. *et al.* (2020) *Front. Microbiol.* **10**: 3001 with permission from Frontiers Media SA.)

まれた膜小胞も観察された。一方、FE-SEMを用いて*S. vesiculosa* HM13の細胞を観察したところ、細胞表面に多数の出芽構造が見いだされた (Fig. 1D)。これらの出芽の大きさは膜小胞の大きさと同等であったことから、本菌は溶菌を伴わない細胞表面からの出芽によって膜小胞を生産するものと考えられた。

次に、*S. vesiculosa* HM13の膜小胞と細胞のリン脂質組成の解析を行った (Fig. 3A)。主要なリン脂質は細胞と膜小胞のいずれについても、ホスファチジルエタノールアミン (PE) では16:0/16:1 PE, 13:0/15:0 PE, ホスファチジルグリセロール (PG) では16:1/16:1 PGであった。*sn*-1位と*sn*-2位の両方に不飽和脂肪酸鎖をもつリン脂質 (16:1/16:1 PE, 16:1/18:1 PE, 16:1/20:5 (EPA) PE, 16:1/18:1 PG, 16:1/20:5 (EPA) PG) は膜小胞において、細胞より著しく少なかった。

一方、細胞と膜小胞のリン脂質画分から調製した脂肪酸メチルエステルをGC-MSで分析した (Fig. 3B)。その結果、細胞については、パルミトレオイル基 (C16:1)、パルミトイル基 (C16:0)、イソペンタデカノイル基 (iC15:0) が主要なリン脂質アシル鎖であり、それぞれ42.3%、18.7%、11.3%を占めることがわかった。膜小胞については、パルミトイル基 (C16:0)、イソペンタデカノイル基 (iC15:0)、パルミトレオイル基 (C16:1)、

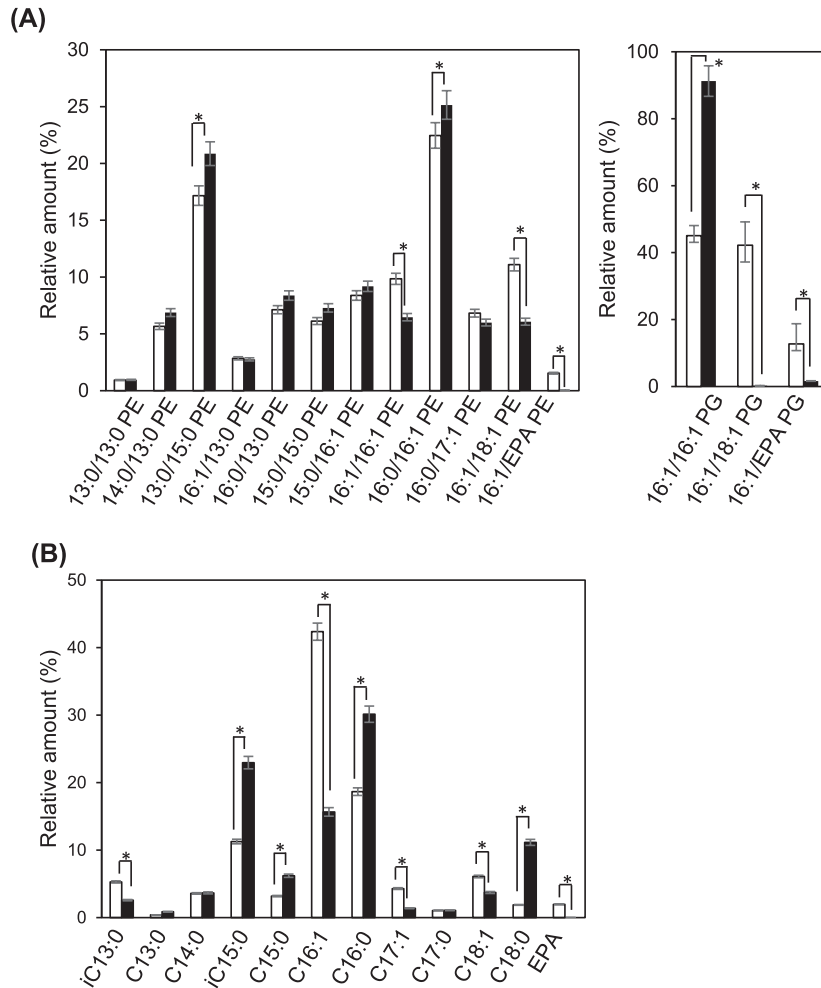


Figure 3. Phospholipid and fatty acyl chain compositions of membrane vesicles and the cells of *S. vesiculosa* HM13. (A) The cells were grown in LB medium at 4°C to the stationary phase. Phospholipids were extracted from the cells (white) and membrane vesicles (black) and subjected to electrospray ionization-mass spectrometry analysis. $n=3$. * $p<0.001$ (Student's t -test). (B) Methyl-esterified fatty acids were prepared from the phospholipid extracts and analyzed by GC-MS. $n=3$. * $p<0.001$ (Student's t -test). (Reproduced from Chen, C. *et al.* (2020) *Front. Microbiol.* **10**: 3001 with permission from Frontiers Media SA.)

ステアロイル基 (C18:0) が主要なリン脂質アシル鎖であり、それぞれ 30.1%, 23.0%, 15.7%, 11.2% を占めることがわかった。細胞と比較すると、膜小胞では飽和のアシル鎖、特にパルミトイル基 (C16:0)、イソペンタデカノイル基 (iC15:0)、ステアロイル基 (C18:0) の含量が高いことが見いだされた。

P49 遺伝子を含む遺伝子クラスターの特徴

P49 の膜小胞への積み込み機構についての手がかりが得られることを期待して、P49 遺伝子周辺の遺伝子群を解析した。 *S. vesiculosa* HM13 の全ゲノム解析の結果、P49 遺伝子 (*hm3347*) の上流には、II 型タンパク質

分泌装置 (T2SS) サブユニットのホモログをコードする遺伝子群 (*hm3349*, *hm3354*, *hm3358*, *hm3359*, *hm3360*) が存在することが見いだされた (Fig. 4, Table 1)。T2SS はグラム陰性細菌のタンパク質分泌装置の一種で、ペリプラズム画分から細胞外へのタンパク質の移行に参与する (Naskar *et al.*, 2021)。本菌のゲノム上には、P49 遺伝子上流の遺伝子群とは別に、典型的な T2SS をコードする遺伝子群 (*hm0375-hm0386*) が存在することも見いだされた。このことから、P49 遺伝子上流遺伝子群がコードする T2SS 様分泌装置が P49 の細胞外への輸送を担う専用の装置である可能性が考えられた。



Figure 4. Organization of the gene cluster containing the P49 gene. Characteristics of the genes constituting the cluster are summarized in Table 1. (Reproduced from Chen, C. *et al.* (2020) *Front. Microbiol.* **10**: 3001 with modifications with permission from Frontiers Media SA.)

Table 1. Predicted functions and localization of proteins encoded by the gene cluster containing the P49 gene.

Gene	Function of the protein predicted by its sequence	Localization*	Accession
<i>hm3363</i>	Wza, EpsE, polysaccharide export protein	OM	LC431043
<i>hm3362</i>	WecA, enzyme of enterobacterial common antigen biosynthesis, undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyl 1-phosphatetransferase	IM	LC431042
<i>hm3361</i>	WecA, enzyme of enterobacterial common antigen biosynthesis, undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyl 1-phosphatetransferase	IM	LC431041
<i>hm3360</i>	GspG2, Type II secretion system, major pseudopilin	IM	LC431040
<i>hm3359</i>	GspE2, Type II secretion system, secretion ATPase	CP	LC431039
<i>hm3358</i>	GspF2, Type II secretion system, inner membrane platform protein	IM	LC431038
<i>hm3357</i>	Prepilin-type cleavage/methylation domain-containing protein	ND	LC431037
<i>hm3356</i>	Prepilin-type cleavage/methylation domain-containing protein	ND	LC431036
<i>hm3355</i>	Prepilin-type cleavage/methylation domain-containing protein	ND	LC431035
<i>hm3354</i>	GspK2, Type II secretion system, minor pseudopilin	IM	LC431034
<i>hm3353</i>	Hypothetical protein, no putative conserved domains	ND	LC431033
<i>hm3352</i>	Hypothetical protein, no putative conserved domains	IM	LC431032
<i>hm3351</i>	Hypothetical protein, no putative conserved domains	ND	LC431031
<i>hm3350</i>	Hypothetical protein, no significant similarity found	ND	LC431030
<i>hm3349</i>	GspD2, Type II secretion outer membrane pore forming protein, secretin	OM	LC431029
<i>hm3348</i>	Hypothetical protein, no significant similarity found	ND	LC431028
<i>hm3347</i>	P49, no putative conserved domains, a cargo protein of EMVs	ND	LC431027
<i>hm3346</i>	Hypothetical protein, no putative conserved domains	ND	LC431026
<i>hm3345</i>	GdpD, uncharacterized hypothetical proteins similar to the catalytic domains of phosphoinositide-specific phospholipase and glycerophosphodiester phosphodiesterases	IM	LC431025
<i>hm3344</i>	LptA, phosphoethanolamine transferase for periplasmic glucans, alkaline phosphatase superfamily	IM	LC431024
<i>hm3343</i>	Wzx, a subfamily of the multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-like proteins, flippase assisting in the membrane translocation of lipopolysaccharides including those containing O-antigens	IM	LC431023
<i>hm3342</i>	NfnB, nitroreductase family protein	CP	LC431022
<i>hm3341</i>	Ugd, UDP-glucose 6-dehydrogenase	CP	LC431021

*Protein localization was predicted with PSORTb version 3.0.2 (<http://www.psorb.org/psorb/>). Abbreviations are as follows: OM, outer membrane; IM, inner membrane; CP, cytoplasm; ND, not determined.

(Reproduced from Chen, C. *et al.* (2020) *Front. Microbiol.* **10**: 3001 with modifications with permission from Frontiers Media SA.)

一方、P49 遺伝子の下流および T2SS 様分泌装置遺伝子群の上流には、細胞表層成分の生合成への関与が推定される遺伝子群が見いだされた (Fig.4, Table 1). これらのうち、*hm3363* は多糖の細胞外への移行を担う Wza のホモログ、*hm3362* と *hm3361* は細胞表層多糖生合成の初発反応を触媒する WecA の N 末端領域と C 末端領域のホモログ、*hm3343* は細胞表層多糖生合成前駆体の細胞質画分からペリプラズム画分への移行を担う Wzx のホモログをそれぞれコードすることが見いだされた (Woodward & Naismith, 2016; Caffalette *et al.*, 2020). これらの遺伝子群がコードする表層成分との相互作用を介して P49 が膜小胞に積み込まれる可能性が考えられた。

P49 遺伝子近傍遺伝子群の破壊が P49 の局在性に及ぼす影響

P49 遺伝子の近傍に存在する遺伝子群が P49 の膜小胞への積み込みに関与する可能性を検討するため、それらの遺伝子群を破壊し、P49 の局在性に及ぼす影響を調べた。相同組み換えによって標的遺伝子にプラスミドを挿入する手法で *hm3359*, *hm3358*, *hm3354*, *hm3349*, *hm3347*, *hm3345*, *hm3344*, *hm3343*, *hm3342* の破壊株を得た。これらの遺伝子破壊株と親株を 18℃ で培養し、培養上清中の膜小胞を FM4-64 を用いて定量した結果、各遺伝子破壊株において親株の 33-90% の膜小胞生産性

が見られた。このことから、いずれの遺伝子も膜小胞生産には必須でないことが示された。また、TEM 観察の結果、各遺伝子破壊株と親株が生産する膜小胞の形状には顕著な差異がないことがわかった。各株の膜小胞の平均直径は 31.5 ± 4.7 nm (親株), 46.4 ± 9.2 nm ($\Delta hm3359$), 33.7 ± 9.0 nm ($\Delta hm3358$), 38.1 ± 6.2 nm ($\Delta hm3354$), 38.4 ± 9.4 nm ($\Delta hm3349$), 37.1 ± 5.6 nm ($\Delta hm3347$), 42.8 ± 7.8 nm ($\Delta hm3345$), 39.4 ± 5.5 nm ($\Delta hm3344$), 36.7 ± 8.9 nm ($\Delta hm3343$), 37.7 ± 5.4 nm ($\Delta hm3342$) (各 n=50) であった。

次に、各遺伝子破壊株と親株における P49 の局在性を調べた。各株を 18℃ で培養したのち、細胞画分、膜小胞画分、培養上清から膜小胞を除いた画分 (post-vesicle fraction (PVF)) に分画し、各画分中の P49 を Western blot 法で分析した (Fig.5)。親株については細胞と膜小胞の両方にバンドが観察された。P49 欠損株 ($\Delta hm3347$) ではこのバンドが消失したことから、P49 を特異的に検出できていることが確かめられた。遺伝子破壊株のうち、T2SS サブユニットのホモログをコードする遺伝子の破壊株 ($\Delta hm3359$ ($\Delta gspE2$), $\Delta hm3358$ ($\Delta gspF2$), $\Delta hm3354$ ($\Delta gspK2$), $\Delta hm3349$ ($\Delta gspD2$)) については、細胞画分の P49 は残存したのに対し、膜小胞画分の P49 は消失した。また、これらの遺伝子破壊株では少量の P49 が PVF に検出された。これらの結果は、P49 遺伝子

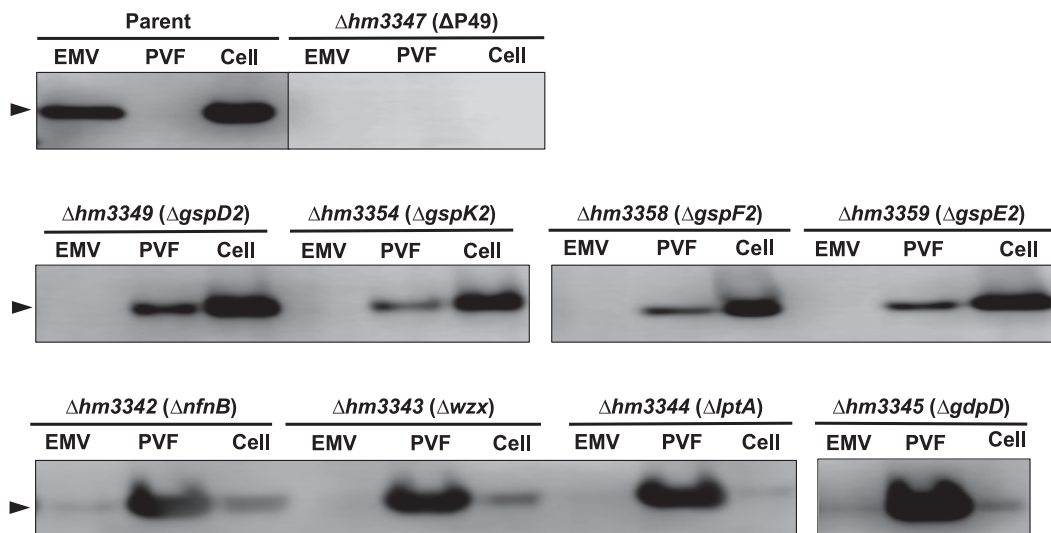


Figure 5. Effects of gene disruption on localization of P49. Localization of P49 in the parent strain (*S. vesiculosa* HM13-Rif^r) and the gene-disrupted mutants grown at 18℃ were analyzed by western blotting with anti-P49 antibody. The cellular fraction, PVF, and the extracellular membrane vesicle fraction (EMV) corresponding to 50 μ L culture were subjected to the analysis. The positions of P49 are indicated with arrowheads.

上流にコードされる T2SS 様分泌装置が P49 の細胞外膜小胞への移行において必須の役割を担っていること、また、この T2SS 様分泌装置が存在しない場合、少量の P49 が膜小胞には積み込まれない状態で細胞外に分泌されることを示している。一方、P49 遺伝子の下流の遺伝子群を破壊した株 ($\Delta hm3345$ ($\Delta gdpD$), $\Delta hm3344$ ($\Delta lptA$), $\Delta hm3343$ (Δwzx), $\Delta hm3342$ ($\Delta nfnB$)) では、大部分の P49 は PVF に存在し、細胞画分や膜小胞画分には微量の P49 しか存在しなかった。これらの結果は、T2SS 様分泌装置によって細胞表層あるいは細胞外に移行した P49 が膜小胞に積み込まれるためには、P49 遺伝子の下流の遺伝子群がコードするタンパク質によって合成される表層成分が必要であることを示唆するものと考えられる。

P49 をキャリアとした外来タンパク質の膜小胞への積み込み

外来タンパク質を膜小胞の積荷として分泌生産することが可能か検討するため、P49 の C 末端に GFP を融合したタンパク質 (P49-GFP) を *S. vesiculosa* HM13 を宿主として生産した。対照実験用に、P49 に融合されていない GFP を生産する株 ($\Delta P49/pGFP$) も作製した。これらの株における GFP の局在性を抗 GFP 抗体を用いた Western blotting で解析した結果、P49-GFP の一部が膜小胞に存在することが認められたのに対し、P49 と融合していない GFP は膜小胞画分には検出されなかった (Fig. 6)。以上の結果から、P49 をキャリアとして外来タンパク質を膜小胞に積み込むことが可能であるものと考えられた。一方、P49-GFP を生産する株においては、P49 から切り離されたと考えられる GFP のバンドも観察され、P49 と GFP の間を切断するプロテアーゼの存在が示唆された。

S. vesiculosa HM13 が生産する細胞外膜小胞のプロテオーム解析

S. vesiculosa HM13 の膜小胞の特性と生産機構に関する手がかりを得ることを目的として、膜小胞のプロテオーム解析を行った。膜小胞中に微量しか存在しないタンパク質を検出し同定する上では、大量に存在する P49 を除去した膜小胞を用いることが望ましいと考えられた。そこで P49 の膜小胞への輸送に必須の *hm3349* (*gspD2*) を破壊した株を用いて実験を進めることとした。本遺伝子破壊株については、上述のように膜小胞の P49 は消失するが、膜小胞の生産自体は損なわれない。本株を 18°C で LB 培地にて培養し、超遠心分離によって得られた膜小胞画分を二次元電気泳動に供し、SYPRO Ruby で染色した。検出されたスポットについて、ペプ

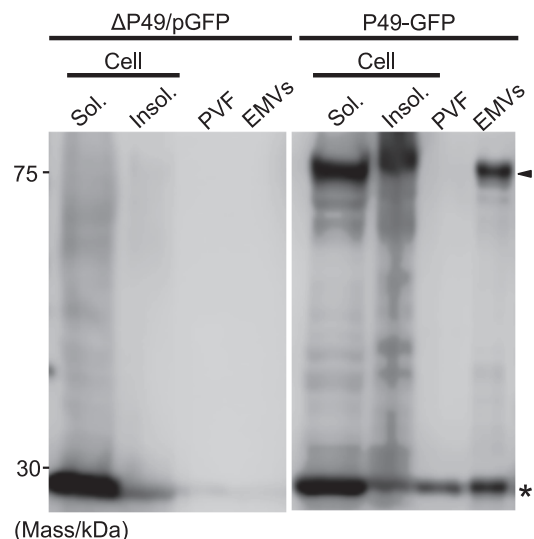


Figure 6. Localization of GFP fused to the C-terminus of P49. The fusion protein was produced in *S. vesiculosa* HM13 (P49-GFP). As a control, GFP without being fused to P49 was produced ($\Delta P49/pGFP$). The cells were grown in LB medium at 18°C to the stationary phase. Distribution of the proteins in the insoluble fraction of the cells (Insol.), the soluble fraction of the cells (Sol.), PVF, and extracellular membrane vesicles (EMVs) was analyzed by western blotting with anti-GFP antibody. The samples prepared from 100 μ L culture were subjected to the analysis. Asterisk and arrowhead indicate the position of GFP and GFP fused to P49, respectively. (Reproduced from Chen, C. *et al.* (2020) *Front. Microbiol.* **10**: 3001 with permission from Frontiers Media SA.)

チドマスフィンガープリンティング法によってタンパク質を同定した (Table 2)。同定されたタンパク質の多くは細胞質や内膜への局在が推測されるタンパク質であった。この結果は、種々のグラム陰性細菌において存在が報告されている外膜と内膜の両方で囲まれた膜小胞が、本菌によっても生産されている可能性を示唆するものと考えられる (Pérez-Cruz *et al.*, 2015)。

センサータンパク質ホモログ HM1275 による膜小胞生産制御

膜小胞画分に見いだされた HM1275 について、データベース中のタンパク質との相同性を BLAST と HHpred によって解析した結果、本タンパク質がメチル基受容走化性タンパク質 (MCP) と相同性を有し、シグナル受容に参与する PAS ドメイン (Henry & Crosson, 2011) と MCP シグナリングドメイン (Falke *et al.*, 1997; Ud-Din

Table 2. Proteins found in the membrane vesicles produced by $\Delta gspD2$.

Gene	Function of the protein predicted by its sequence	E-value ^a	Localization ^b	Accession
<i>hm67</i>	Siderophore biosynthesis protein PvsD	4.8×10^{-2}	IM	LC533412
<i>hm433</i>	50S ribosomal protein L	4.2×10^{-2}	C	LC533413
<i>hm594</i>	HDOD domain-containing protein	3.6×10^{-2}	C	LC533414
<i>hm679</i>	DNA-directed RNA polymerase omega subunit	7.6×10^{-3}	C	LC533415
<i>hm841</i>	Mechanosensitive ion channel family protein	1.3×10^{-2}	IM	LC533416
<i>hm858</i>	Lysine-sensitive aspartokinase 3	4.0×10^{-2}	C	LC533417
<i>hm1275</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein	3.3×10^{-2}	IM	LC533418
<i>hm1305</i>	Zinc chelation protein SecC	3.1×10^{-2}	Not predictable	LC533419
<i>hm1390</i>	Error-prone, lesion bypass DNA polymerase V (UmuC)	5.1×10^{-2}	C	LC533420
<i>hm1529</i>	Hypothetical protein	3.2×10^{-4}	Not predictable	LC533421
<i>hm2195</i>	tRNA (carboxy-S-adenosyl-L-methionine) synthase CmoA	3.6×10^{-2}	C	LC533422
<i>hm2235</i>	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	4.5×10^{-2}	Not predictable	LC533423
<i>hm3132</i>	Pyruvate oxidase	4.8×10^{-2}	IM	LC533424
<i>hm3337</i>	Hypothetical protein	4.5×10^{-2}	IM	LC533425
<i>hm3779</i>	RNA polymerase-binding protein DksA (C4-type zinc finger protein)	5.4×10^{-2}	C	LC533426

^a The E-value is the number of hits expected with a similar score by chance when searching the database with the amino acid sequence of each protein.

^b The subcellular localization of each protein was predicted using a subcellular localization prediction tool, PSORTb version 3.0.2. IM, inner membrane; C, cytoplasm.

(Reproduced from Yokoyama, F. *et al.* (2021) *Front. Microbiol.* 12: 629023 with modifications with permission from Frontiers Media SA.)

& Roujeinikova, 2017) を有することが見いだされた。この結果から、本タンパク質が環境中の何らかの分子に応答するセンサータンパク質として機能する可能性が考えられた。

HM1275 が環境に応答して膜小胞の生産を制御する可能性を探るべく、まず、*S. vesiculosa* HM13 の膜小胞生産性が培地成分によってどのように変動するかを調べた。貧栄養培地である M79 培地 [1g/L KH_2PO_4 , 1g/L NH_4NO_3 , 10g/L NaCl, 0.2g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10mg/L FeSO_4 , 10mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5% (w/v) casamino acid] を基本培地として、ここに種々の化合物を添加し、膜小胞生産量を調べた結果、本菌の膜小胞生産量が培地中の L-リシン濃度の増加に伴って増加することが見いだされた (Fig.7)。この L-リシン濃度に依存した膜小胞生産性向上に HM1275 が関与するか検討するため、*hm1275* 破壊株 ($\Delta hm1275$) を用いて同様の実験を行った。その結果、 $\Delta hm1275$ においては、L-リシン誘導的な膜小胞生産量増加が著しく抑制されていることが見いだされた (Fig.7)。 $\Delta hm1275$ に HM1275 を発現するプラスミドを導入した場合、HM1275 をコードしないプラスミドを導入した場合と比べて高濃度 L-リシン存在下での膜小胞生産量が増加したことから、L-リシン濃度依存的な膜小胞生産量増加に HM1275 が関与するものと考えられた。

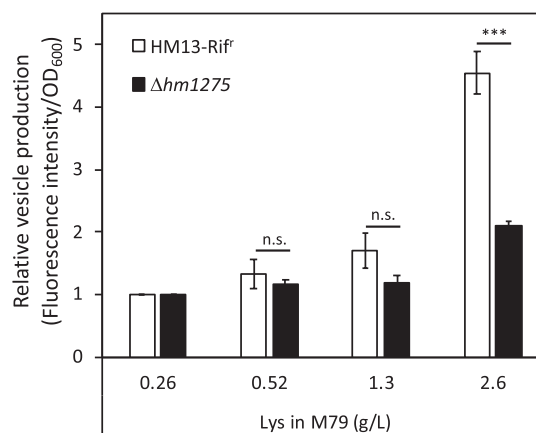


Figure 7. Vesicle production by $\Delta hm1275$ and the parent strain (*S. vesiculosa* HM13-Rif) cultured at different Lys concentrations. The vesicle production was quantified by lipid staining with FM4-64. Each value of vesicle production was divided by that of cells grown in M79 containing 0.26 g/L Lys to compare relative vesicle production in each condition. The data are the means \pm relative standard errors of the values from three independent batches. Statistical analysis was performed using two-tailed unpaired Student's *t*-test. n.s. and *** indicate $p \geq 0.1$ and $p < 0.01$, respectively. (Reproduced from Yokoyama, F. *et al.* (2021) *Front. Microbiol.* 12: 629023 with permission from Frontiers Media SA.)

考 察

本研究で新たに分離された低温適応グラム陰性細菌 *S. vesiculosa* HM13 は、主要積荷タンパク質として分子質量約 49kDa の P49 を含む細胞外膜小胞を生産することが見いだされた (Fig.1). P49 は膜小胞の全タンパク質の 90% 以上を占めるが、このように高純度の特定タンパク質を積み込んだ膜小胞を生産することは、本菌の注目すべき特徴と言える。また、近縁の *Shewanella* 属低温菌や他のグラム陰性細菌と比較して本菌が高い膜小胞生産性を有することも特筆される (Fig.2)。本菌を宿主とし、P49 をキャリアとすることで、高純度の外来タンパク質を細胞外膜小胞の積荷として高生産できることが期待される。また、外来タンパク質を積み込むことによって、様々な機能を膜小胞に付与できると考えられ、例えば、ワクチンや生体触媒の開発にも繋がるものと期待される (Toyofuku *et al.*, 2015; Gerritzen *et al.*, 2017; Turner *et al.*, 2019; Li & Liu, 2020)。本菌は低温適応細菌であり、0℃付近での培養も可能であるため、熱安定性の低いタンパク質の生産にも有用と考えられる (Miyake *et al.*, 2007)。このような応用展開を図る上でも、本菌の膜小胞生産機構やタンパク質の膜小胞積み込み機構を理解することは重要であり、本研究でそれらの解明に取り組んだ。

グラム陰性細菌の細胞外膜小胞の生産機構としては、二種類の異なる機構が知られている。一つは外膜からの出芽によるもので、もう一つは explosive cell lysis と呼ばれる細胞溶菌を伴うものである (Schwechheimer & Kuehn, 2015; Toyofuku *et al.*, 2019)。後者では、細胞溶菌で生成する膜断片が会合することで膜小胞が生成する。*S. vesiculosa* HM13 の膜小胞生産機構に関する知見を得るため、本菌の膜小胞と細胞のリン脂質組成を解析したところ、特定のリン脂質が膜小胞画分で濃縮されていることが見いだされた (Fig.3)。また、P49 と外膜タンパク質 Omp74 について、細胞画分と膜小胞画分における存在比を比較したところ、P49 に比べて、Omp74 は膜小胞に移行しにくいことが見いだされた。さらに、細胞表層を FE-SEM で解析した結果、膜小胞と同程度の大きさの出芽構造が多数観察された。以上の結果から、本菌は、特定成分が濃縮された膜小胞を、外膜からの出芽によって生産するものと考えられた。

P49 の膜小胞への積み込み機構を解析するために行った P49 遺伝子周辺遺伝子群の破壊実験では、T2SS 様分泌装置 (T2SS-2) の関与を示す結果が得られた。新生 P49 は N 末端にシグナル配列をもつことが推定されているので、Sec トランスロコンの働きで内膜を透過してペリプラズム画分に移行すると考えられる。T2SS はグラ

ム陰性細菌の分泌タンパク質の外膜透過を担うことが知られているので、P49 遺伝子上流にコードされる T2SS-2 が P49 の外膜透過を担うものと考えられた (Fig.4, Table 1)。T2SS-2 成分の遺伝子破壊株で P49 の膜小胞移行が見られなくなったことは、この考えを支持するものと言える (Fig.5)。一方、これらの T2SS-2 欠損株では、少量の P49 が PVF に見られた。この結果は、T2SS-2 に依存しない P49 分泌機構の存在を示唆している。本菌は、T2SS-2 とは別に、典型的な T2SS をコードする遺伝子群を有することから、これらがコードする T2SS (T2SS-1) が T2SS-2 非存在下での P49 の細胞外移行を担っている可能性が考えられる。T2SS-1 で分泌される P49 のコンフォメーションと T2SS-2 で輸送される P49 のコンフォメーションが異なっていると考えれば、T2SS-2 存在下でのみ P49 が膜小胞に積み込まれることを説明できるが、この仮説の妥当性については、さらなる検討が必要である。

P49 遺伝子周辺遺伝子群の破壊株のうち、表層成分生合成への関与が示唆された *hm3342*, *hm3343*, *hm3344*, *hm3345* の破壊株では、膜小胞と細胞の P49 は激減し、主として PVF に存在することが見いだされた (Fig.5)。この結果は、これらの遺伝子群の関与で生合成される表層成分が、P49 と膜小胞および細胞との相互作用に必須であることを示すものと考えられる。これらの遺伝子群のうち、*hm3343* は Wzx フリップアーゼのホモログをコードする。Wzx はリポ多糖の O 抗原多糖と莢膜多糖の生合成に関与することが知られている (Woodward & Naismith, 2016; Caffalette *et al.*, 2020)。*S. vesiculosa* HM13 の細胞と膜小胞の糖脂質の解析では、いずれの場合も O 抗原多糖を持たないリポオリゴ糖のみが検出されたことから、*hm3343* が O 抗原多糖の生合成に関与することは考えにくい。一方、本菌は多糖を生合成しており、*hm3343* 破壊株ではその生産がほぼ見られなくなることが明らかとなった。以上の結果から、*hm3343* は表層多糖の生合成に関与するものと考えられ、その表層多糖が P49 と膜小胞および細胞との相互作用に関与するものと考えられた。

以上の結果から考えられる P49 の膜小胞への積み込み機構モデルを Fig.8 に示した。Sec トランスロコンの働きでペリプラズム画分に移行した P49 は、T2SS 様分泌装置の働きで細胞外に移行し、表層多糖との相互作用によって膜小胞に積み込まれるものと考えられる。

P49 をキャリアとした外来タンパク質の膜小胞への積み込みについては、P49 の C 末端に融合させた GFP が膜小胞に移行することが見いだされた (Fig.6)。しかし、その移行量は少なく、今後、P49 の膜小胞移行に必要な領域の絞り込みや、融合方法の検討によって、積み込み

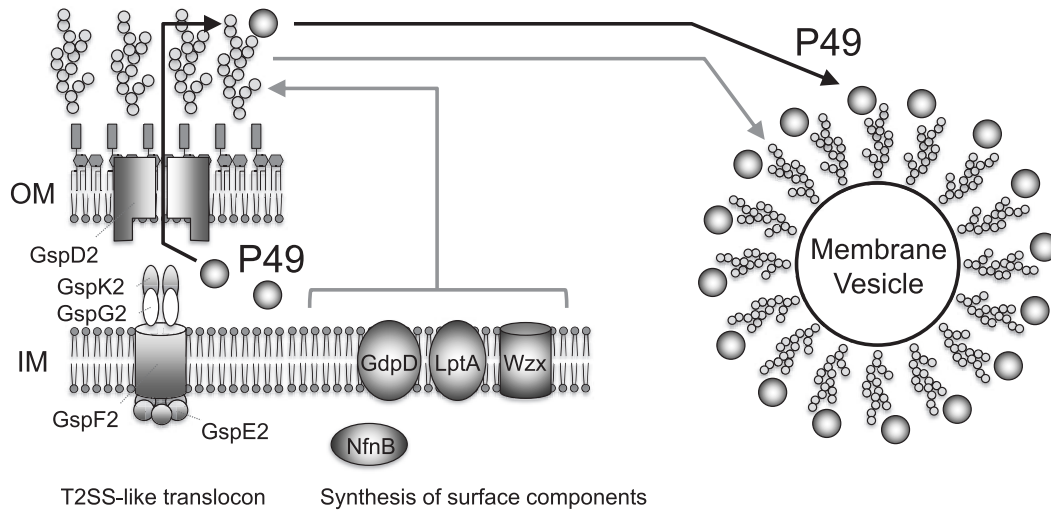


Figure 8. Proposed model of P49 loading onto extracellular membrane vesicles of *S. vesiculosa* HM13. In this model, P49 is translocated across the outer membrane (OM) to the extracellular space via the T2SS-like translocon and then loaded onto the membrane vesicles through the interaction with their surface component that is synthesized by NfnB, Wzx, LptA, and GdpD encoded by *hm3342*, *hm3343*, *hm3344*, and *hm3345*, respectively.

量を向上させることが必要と思われる。P49に融合させたGFPを発現させた株では、融合タンパク質とともに、P49から切り離されたと考えられるGFPも膜小胞画分に見られた。この結果は、融合部位を切断するプロテアーゼの存在を示唆している。融合タンパク質の生産量向上のためには、このプロテアーゼ活性を抑制することも重要と思われる。

本研究では、*S. vesiculosa* HM13の膜小胞生産制御に関わるセンサータンパク質ホモログの同定にも成功した。本菌の膜小胞の生産量は、培地中のL-リシン濃度が増加するに従って増加するが、このL-リシン濃度への応答にメチル基受容走化性タンパク質ホモログHM1275が関与することが示された (Fig.7)。本菌はアジの腸管内容物から分離されたが、魚の腸管内の環境は魚の摂食状況によって大きく変動する。環境変化に適切に応答する上で、魚の主要な食物由来成分であるL-リシンに応答するシステムを本菌が有していることは理にかなったものと考えられる。

HM1275は内膜に局在することがPSORTbを用いた解析によって推測されているが、本研究では膜小胞画分中に同定された (Table 2)。この結果は、本タンパク質が外膜-内膜小胞 (outer-inner membrane vesicles) に存在する可能性を示している。種々のグラム陰性細菌が、このような二重の膜構造を持つ膜小胞を細胞外膜小胞のマイナーな成分として生産することが報告されており (Pérez-Cruz *et al.*, 2015)、*S. vesiculosa* HM13でも二重

の膜構造を持つように見える膜小胞が電子顕微鏡で観察されている。この結果は、HM1275が外膜-内膜小胞に存在することを支持するものと捉えることができる。一方、HM1275が膜小胞画分に存在することの生理的意義については今のところ不明である。本タンパク質がセンサーとして機能するためには細胞中の内膜に存在することが必要と考えられる。従って、膜小胞中のHM1275は積極的な生理的役割は有しておらず、タンパク質の品質管理の一環として、細胞から排除されたものなのかもしれない (McBroom & Kuehn, 2006)。別の可能性として、HM1275を膜小胞に積み込み、他の細胞に本タンパク質を輸送することで細菌細胞の集団挙動を制御しているということもあるかもしれない。しかし、内膜タンパク質が膜小胞を介して他細胞の内膜に輸送されて機能する仕組みが存在するのかわかりませんが、膜小胞中のHM1275の生理的意義については、今後、さらなる検討が必要である。本タンパク質が膜小胞に存在することの生理的意義は不明であるものの、環境中の成分に応答した膜小胞生産制御に関与するタンパク質を同定したことは、本研究の重要な成果の一つとして位置づけられる。

本研究によって、膜小胞高生産性細菌*S. vesiculosa* HM13における積荷タンパク質の膜小胞輸送機構の概略や膜小胞生産制御機構の一端を明らかにすることができた。また、効率は低いものの、積荷タンパク質と融合させることで外来タンパク質を膜小胞に移行させることが可能であることも見いだした。今後は、外来タンパク質

を膜小胞に効率的に積み込むシステムの開発を進めるとともに、外膜の出芽や膜小胞の形成に関与する因子の同定や機能の解明にも取り組みたいと考えている。

要 約

アジの腸管内容物から分離されたグラム陰性低温適応細菌 *S. vesiculosa* HM13 は、分子質量約 49kDa のタンパク質 P49 を主要な積荷とする細胞外膜小胞を高生産する。本菌の全ゲノム解析の結果、P49 遺伝子上流に、分泌タンパク質の外膜透過に関与する T2SS のホモログをコードする遺伝子群が見いだされた。これらの破壊によって P49 の膜小胞移行が見られなくなったことから、T2SS 様分泌装置が P49 の分泌を担うと考えられた。P49 遺伝子の周辺には、細胞表層糖鎖生成への関与が示唆される遺伝子群も見いだされた。これらの破壊株では、P49 は細胞外に分泌されたものの、膜小胞へは積み込まれなかった。これらの結果から、P49 は T2SS 様分泌装置によって細胞外に輸送され、表層糖鎖との相互作用によって膜小胞に積み込まれると考えられた。P49 の C 末端に GFP を融合させたタンパク質を *S. vesiculosa* HM13 を宿主として発現させると、一部が膜小胞に移行することが見いだされたことから、P49 は、膜小胞をプラットフォームとした外来タンパク質生産におけるキャリアとして有用と考えられた。一方、*S. vesiculosa* HM13 の膜小胞生産性が、培地中の L-リシン濃度の増加に伴って向上することを見いだすとともに、この応答に関与するセンサータンパク質ホモログを同定した。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 横山文秋, 川本純, 小川拓哉, 今井友也, 栗原達夫. 2019. バイオフィーム分散関連タンパク質 BdlA ホモログの細菌ベシクル中からの同定. 第33回日本バイオフィーム学会学術集会 (7月5-6日, 久留米)
- 2) 栗原達夫. 2019. 細菌生体膜機能発現の分子基盤: 膜リン脂質・膜小胞研究の新展開. 第33回ケミカルバイオロジー研究所セミナー/第105回生物科学フロンティアセミナー (8月7日, 堺)
- 3) 釜阪紘平, Chen Chen, 小川拓哉, 川本純, 栗原達夫. 2019. 細菌の菌体外膜小胞を介した選択的タンパク質分泌における細胞表層構造の役割. 第92回日本生化学会大会 (9月20日, 横浜)
- 4) 釜阪紘平, 陳晨, 川本純, 小川拓哉, 栗原達夫. 2019. 細菌の細胞外膜小胞へのタンパク質積み込みにおける膜表層構造の機能. 第20回極限環境生物学会年会 (11月16-17日, 京都)
- 5) 横山文秋, 今井友也, 川本純, 小川拓哉, 栗原達夫. 2019. 低温菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 のセンサータンパク質によるベシクル生産およびバイオフィーム分散の

制御. 第20回極限環境生物学会年会 (11月16-17日, 京都)

- 6) Yokoyama, F., Imai, T., Kawamoto, J., Ogawa, T. & Kurihara, T. 2020. Regulation of vesiculation and biofilm dispersion of *Shewanella vesiculosa* HM13 in response to extracellular environment. 3rd Bacterial Cell Biology Conference (February 26-29, Nassau, Bahamas)
- 7) 釜阪紘平, 陳晨, 川本純, 小川拓哉, 栗原達夫. 2020. 菌体外膜小胞へのタンパク質輸送における細胞表層構造制御タンパク質の機能. 日本農芸化学会2020年度大会 (3月27日, 福岡 (誌上))
- 8) 横山文秋, 今井友也, 川本純, 小川拓哉, 栗原達夫. 2020. 細菌のセンサータンパク質によるベシクル生産とバイオフィーム分散の誘導. 日本農芸化学会2020年度大会 (3月27日, 福岡 (誌上))
- 9) 栗原達夫. 2020. 膜小胞高生産性細菌におけるタンパク質の膜小胞への輸送機構. 日本農芸化学会2020年度大会 (3月27日, 福岡 (誌上))
- 10) 釜阪紘平, 川本純, 小川拓哉, 栗原達夫. 2020. 細胞外膜小胞へのタンパク質輸送における Wzx フリップアーゼホモログの機能. 第93回日本生化学会大会 (9月16日, 横浜 (Web))
- 11) 中野咲梨, 小川拓哉, 川本純, 栗原達夫. 2020. 低温菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 における膜小胞生産への膜リン脂質の関与. 第21回極限環境生物学会年会 (10月31日, Web)
- 12) 都築大空, 釜阪紘平, Liu Yuying, 今井友也, 川本純, 小川拓哉, 栗原達夫. 2020. *Shewanella vesiculosa* HM13 の表層糖鎖合成酵素による細胞外膜小胞構造と積荷タンパク質輸送の制御. 第21回極限環境生物学会年会 (10月31日, Web)
- 13) 栗原達夫. 2020. 細菌の細胞外膜小胞へのタンパク質輸送機構. 令和2年度日本農芸化学会東北支部シンポジウム (11月7日, Web)
- 14) Kurihara, T. 2020. Mechanistic analysis of protein transport to extracellular membrane vesicles of a hypervesiculating bacterial strain, *Shewanella vesiculosa* HM13. ASEMV2020 (Annual meeting of the American Society for Exosomes and Microvesicles) (November 18, Web)
- 15) 栗原達夫. 2021. 膜小胞高生産性細菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 における細胞外膜小胞生産の分子基盤. 日本農芸化学会2021年度大会 (3月20日, 仙台 (Web))
- 16) 都築大空, 釜阪紘平, Liu Yuying, 今井友也, 川本純, 小川拓哉, 栗原達夫. 2021. 細胞外膜小胞高生産菌の積荷タンパク質輸送における表層糖鎖合成酵素の機能. 第67回日本生化学会近畿支部例会 (5月29日, Web)
- 17) 釜阪紘平, 都築大空, 川本純, 今井友也, 小川拓哉, 栗原達夫. 2021. *Shewanella vesiculosa* HM13由来細胞外膜小胞への新奇タンパク質輸送機構に関する研究. 日本農芸化学会関西支部第515回講演会 (6月5日, Web)

原著論文

- 1) Chen, C., Kawamoto, J., Kawai, S., Tame, A., Kato, C., Imai, T. & Kurihara, T. 2020. Isolation of a novel bacterial strain capable of producing abundant extracellular membrane vesicles carrying a single major cargo protein and analysis of its transport mechanism. *Front. Microbiol.* **10**: 3001.
- 2) Kamasaka, K., Kawamoto, J., Chen, C., Yokoyama, F., Imai,

- T., Ogawa, T. & Kurihara, T. 2020. Genetic characterization and functional implications of the gene cluster for selective protein transport to extracellular membrane vesicles of *Shewanella vesiculosa* HM13. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **526**: 525–531.
- 3) Di Guida, R., Casillo, A., Yokoyama, F., Kawamoto, J., Kurihara, T. & Corsaro, M.M. 2020. Detailed structural characterization of the lipooligosaccharide from the extracellular membrane vesicles of *Shewanella vesiculosa* HM13. *Mar. Drugs.* **18**: 231.
- 4) Kawano, K., Yokoyama, F., Kawamoto, J., Ogawa, T., Kurihara, T. & Futaki, S. 2020. Development of a simple and rapid method for *in situ* vesicle detection in cultured media. *J. Mol. Biol.* **432**: 5876–5888.
- 5) Yokoyama, F., Imai, T., Aoki, W., Ueda, M., Kawamoto, J. & Kurihara, T. 2021. Identification of a putative sensor protein involved in regulation of vesicle production by a hypervesiculating bacterium, *Shewanella vesiculosa* HM13. *Front. Microbiol.* **12**: 629023.
- その他 (総説・書籍)
- 1) 栗原達夫. 2021. 新奇細菌に見いだされた細胞外膜小胞へのタンパク質積み込み機構. *生化学* **93**: 252–256.
- 2) Kawamoto, J. & Kurihara, T. 2021. Membrane vesicles produced by *Shewanella vesiculosa* HM13 as a prospective platform for secretory production of heterologous proteins at low temperatures. *Methods Mol. Biol.* in press.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389–3402.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911–917.
- Caffalette, C.A., Kuklewicz, J., Spellmon, N. & Zimmer, J. 2020. Biosynthesis and export of bacterial glycolipids. *Annu. Rev. Biochem.* **89**: 741–768.
- Caruana, J.C. & Walper, S.A. 2020. Bacterial membrane vesicles as mediators of microbe-microbe and microbe-host community interactions. *Front. Microbiol.* **11**:432.
- Cho, H.-N., Kasai, W., Kawamoto, J., Esaki, N. & Kurihara, T. 2012. Characterization of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase from a polyunsaturated fatty acid-producing bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. *Trace Nutr. Res.* **29**: 92–99.
- Chutkan, H., MacDonald, I., Manning, A. & Kuehn, M.J. 2013. Quantitative and qualitative preparations of bacterial outer membrane vesicles. *Methods Mol. Biol.* **966**: 259–272.
- Falke, J.J., Bass, R.B., Butler, S.L., Chervitz, S.A. & Danielson, M.A. 1997. The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 457–512.
- Gerritzen, M.J.H., Martens, D.E., Wijffels, R.H., van der Pol, L. & Stork, M. 2017. Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform. *Biotechnol. Adv.* **35**: 565–574.
- Henry, J.T. & Crosson, S. 2011. Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**: 261–286.
- Imai, K., Asakawa, N., Tsuji, T., Akazawa, F., Ino, A., Sonoyama, M. & Mitaku, S. 2008. SOSUI-GramN: high performance prediction for sub-cellular localization of proteins in Gram-negative bacteria. *Bioinformatics* **2**: 417–421.
- Koyama, S., Tsubouchi, T., Usui, K. *et al.* 2015. Involvement of flocculin in negative potential-applied ITO electrode adhesion of yeast cells. *FEMS Yeast Res.* **15**: fov064.
- Li, R. & Liu, Q. 2020. Engineered bacterial outer membrane vesicles as multifunctional delivery platforms. *Front. Mater* **7**:202.
- Margesin, R. 2017. *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, Second Edition. Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland.
- McBroom, A.J., Johnson, A.P., Vemulapalli, S. & Kuehn, M.J. 2006. Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J. Bacteriol.* **188**: 5385–5392.
- McBroom, A.J. & Kuehn, M.J. 2006. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response: outer membrane vesicles relieve envelope stress. *Mol. Microbiol.* **63**: 545–558.
- Miyake, R., Kawamoto, J., Wei, Y.-L., Kitagawa, M., Kato, I., Kurihara, T. & Esaki, N. 2007. Construction of a low-temperature protein expression system using a cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. strain Ac10, as the host. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4849–4856.

保存機関に寄託した菌株

Shewanella vesiculosa HM13 (寄託機関: RIKEN BRC-JCM, ID: JCM 33296)

謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また、本研究の遂行にご協力いただいた京都大学生存圏研究所の今井友也教授、京都大学化学研究所の二木史朗教授、河野健一助教(現・薬学研究科)、京都大学大学院農学研究科の植田充美教授(現・名誉教授)、青木航助教、海洋研究開発機構の加藤千明博士、多米晃裕博士、University of Naples “Federico II”のMaria Michela Corsaro 博士ならびに京都大学化学研究所分子微生物科学研究領域の学生諸氏に感謝の意を表します。

文 献

Alexeyev, M.F. 1999. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of Gram-negative bacteria. *Biotechniques* **26**: 824–826.

- Naskar, S., Hohl, M., Tassinari, M. & Low, H.H. 2021. The structure and mechanism of the bacterial type II secretion system. *Mol. Microbiol.* **115**: 412–424.
- Park, J., Kawamoto, J., Esaki, N. & Kurihara, T. 2012. Identification of cold-inducible inner membrane proteins of the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, by proteomic analysis. *Extremophiles* **16**: 227–236.
- Pérez-Cruz, C., Delgado, L., López-Iglesias, C. & Mercade, E. 2015. Outer-inner membrane vesicles naturally secreted by Gram-negative pathogenic bacteria. *PLoS One* **10**: e0116896.
- Schwechheimer, C. & Kuehn, M.J. 2015. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 605–619.
- Söding, J., Biegert, A. & Lupas, A.N. 2005. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **33**: 244–248.
- Tokunaga, T., Watanabe, B., Kawamoto, J. & Kurihara, T. 2017. Synthesis and functional assessment of a novel fatty acid probe, ω -ethynyl eicosapentaenoic acid analog, to analyze the in vivo behavior of eicosapentaenoic acid. *Bioconjug. Chem.* **28**: 2077–2085.
- Toyofuku, M. 2019. Bacterial communication through membrane vesicles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **83**: 1599–1605.
- Toyofuku, M., Nomura, N. & Eberl, L. 2019. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**: 13–24.
- Toyofuku, M., Tashiro, Y., Hasegawa, Y., Kurosawa, M. & Nomura, N. 2015. Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **226(Pt A)**: 65–77.
- Turner, K.B., Dean, S.N. & Walper, S.A. 2019. Bacterial bioreactors: Outer membrane vesicles for enzyme encapsulation. *Methods Enzymol.* **617**:187–216.
- Ud-Din, A.I.M.S. & Roujeinikova, A. 2017. Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. *Cell Mol. Life Sci.* **74**: 3293–3303.
- Watanabe, K. 2016. Bacterial membrane vesicles (MVs): novel tools as nature- and nano-carriers for immunogenic antigen, enzyme support, and drug delivery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 9837–9843.
- Woodward, L. & Naismith, J.H. 2016. Bacterial polysaccharide synthesis and export. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **40**: 81–88.
- Yokoyama, F., Kawamoto, J., Imai, T. & Kurihara, T. 2017. Characterization of extracellular membrane vesicles of an Antarctic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, and their enhanced production by alteration of phospholipid composition. *Extremophiles* **21**: 723–731.
- Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R. *et al.* 2010. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* **26**: 1608–1615.
- Yumoto, I. 2013. Cold-adapted Microorganisms. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

未だ活用できていない酢酸菌の新規な酸化的物質変換系の探索
- PQQ 依存性脱水素酵素 9 と PQQ 依存性グルコース脱水素酵素の機能解析と応用 -
薬 師 寿 治

山口大学 中高温微生物研究センター
〒753-8515 山口市吉田1677-1

Exploring uncharacterized substrate-oxidation systems in acetic acid bacteria
- Characterization and application of PQQ-dependent dehydrogenase 9
and PQQ-dependent glucose dehydrogenase -

Toshiharu Yakushi

Research Center for Thermotolerant Microbial Resources, Yamauchi University
1677-1, Yoshida, Yamaguchi 753-8515

Acetic acid bacteria are widely used for industrial purposes because they can incompletely oxidize sugars, alcohols, polyols, carbohydrates, and their related compounds. Genetic information of uncharacterized membrane-bound dehydrogenases is increasing due to development of the genome sequencing technology. Here, we characterized the pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent dehydrogenase 9 (PQQ-DH9), a homolog of PQQ-dependent glycerol dehydrogenase (GLDH), and PQQ-dependent glucose dehydrogenase (GdhM) of *Gluconobacter* sp. strain CHM43. For characterization of PQQ-DH, we used a plasmid to express PQQ-DH9. The expression host was a derivative strain of CHM43, which lacked the genes for GLDH and the membrane-bound alcohol dehydrogenase and consequently had minimal ability to oxidize primary and secondary alcohols. The membranes of the transformant exhibited considerable D-arabitol dehydrogenase activity, whereas the reference strain did not, even if it had PQQ-DH9-encoding genes in the chromosome. This suggests that PQQ-DH9 is not expressed from the chromosome. The activities of the membranes containing PQQ-DH9 and GLDH suggested that PQQ-DH9 similar to GLDH oxidized a wide variety of secondary alcohols but had higher Michaelis constants than GLDH with regard to linear substrates such as glycerol. Cyclic substrates such as *cis*-1,2-cyclohexanediol were readily oxidized by PQQ-DH9. Lactobionic acid is used in foods and humectants and produced by oxidation of lactose by GdhM of acetic acid bacteria. However, the rate of lactose oxidation by GdhM is much lower than that of glucose oxidation. We constructed GdhM-over-expression strains to examine the properties of GdhM and to produce lactobionic acid efficiently. We constructed the plasmids with different promoters for expression of GdhM of *Gluconobacter* sp. CHM43. The *gdhM*-knock out strain harboring the plasmids carrying the *gdhM* gene under control of a ribosomal protein promoter showed the productivity of lactobionic acid of 1.1 mM/h. The K_M values of the membranes that contain high levels of GdhM for maltose, isomaltose, cellobiose, and lactose were much higher than that for glucose.

Key words: Pyrroloquinoline quinone; lactobionic acid; acetic acid bacteria; orphan enzyme

緒 言

酢酸菌は他の微生物にはあまり見られない酸化的物質変換能を持つ。その細胞膜の外側（すなわちペリプラズ

ム側）に存在する脱水素酵素（以下、表層脱水素酵素と呼ぶ）は、基質の酸化に伴い、還元力を細胞膜中のユビキノンに伝達する。還元型のユビキノンはユビキノール酸化酵素によって再酸化され、酸素が水へと還元される反応で終結する。*Gluconobacter* 属酢酸菌は、膜結合グリセロール脱水素酵素（GLDH；ポリオール脱水素酵素またはソルビトール脱水素酵素とも呼ばれる）によってD-ソルビトールをL-ソルボースに酸化する。L-ソルボースは、ほぼ化学量論的なレベルで培養液に蓄積され、工業

E-mail: juji@yamaguchi-u.ac.jp

共同研究者：赤壁 善彦（山口大学大学院創成科学研究科）
片岡尚也（山口大学中高温微生物研究センター）
後藤 勝（東邦大学理学部）
阿野嘉孝（愛媛大学大学院農学研究科）

用ビタミンC生産の前駆体に使用される (Pappenberger & Hohmann, 2014). 本研究で研究材料にしている *Gluconobacter* sp. CHM43 のゲノムに含まれる表層脱水素酵素を全て書き込んだ模式図を Fig.1 に示す (Matsumoto *et al.*, 2018). 例えばグルコース脱水素酵素 (GdhM) はグルコースを酸化してグルコン酸 (正確にはグルコノラクトン) を生じる. アルコール脱水素酵素 (ADH) はエタノールを酸化してアセトアルデヒドを生じる. いずれの酵素もユビキノンを還元するので, 酸化反応の多様性は表層脱水素酵素の多様性で説明ができる. 本研究の目的は, 新しい脱水素酵素の探索であり, ①新しい表層脱水素酵素による新しい物質酸化系の探索と, ②既知の表層脱水素酵素による新しい物質酸化系の探索を進めた.

ゲノム情報の解析に伴い, 多くの「オーファン表層脱水素酵素」が見いだされたが, 機能未知のままとなっている. 酢酸菌で初めて完全ゲノム配列が発表された *Gluconobacter oxydans* ATCC621H 株では, 4種のピロロキノリンキノン (PQQ) 依存型のオーファン表層脱水素酵素が見いだされたが, 二つは未だ基質が不明のままである. 一方, 既知の酵素であっても広い基質特性を持つ酵素では, 新しい反応が発見される. 「本来の」基質の10分の1程度の活性しか示すことができない基質であっても, 酵素が10倍高濃度になれば, 「本来の」基質

で進む反応速度に近づく. 私たちは, 表層脱水素酵素を過剰発現させた組み換え酢酸菌を用いて, 野生株では遅い酸化反応を高効率で行わせることに成功している (Kataoka *et al.*, 2015). ゲノム解析の結果として蓄積した膨大な遺伝子情報と組み換え酢酸菌技術の成熟という二つの要因が今回の研究を進める駆動力である.

Gluconobacter sp. CHM43 株のドラフトゲノムには, 基質が明らかではないオーファン PQQ 依存性脱水素酵素 9 (PQQ-DH9) の遺伝子が存在する (Matsumoto *et al.*, 2018). PQQ-DH9 は膜結合型 GLDH のホモログであるが, 機能は不明なままとなっている (Yakushi *et al.*, 2018). PQQ-DH9 は, 2つの遺伝子産物 (GLF_2583 と GLF_2584) で構成されており, それぞれ GLDH の膜貫通サブユニット SldB と触媒サブユニット SldA に類似している. GLF_2583 および GLF_2584 タンパク質は, CHM43 株の対応する SldB (GLF_2777) および SldA (GLF_2776) に対してそれぞれ 97% および 82% のアミノ酸配列の同一性を持つ.

GLDH は幅広い基質特異性を持つ. 分子の末端から2番目の炭素で D-エリスロ配置の「第2級アルコール」を酸化する (Hann *et al.*, 1938; Kulhánek, 1989). グリセロールと D-ソルビトールは GLDH によって酸化され, 化学日焼け剤として使用されるジヒドロキシアセトンと, ビタミンCの前駆体として使用される L-ソルボ-

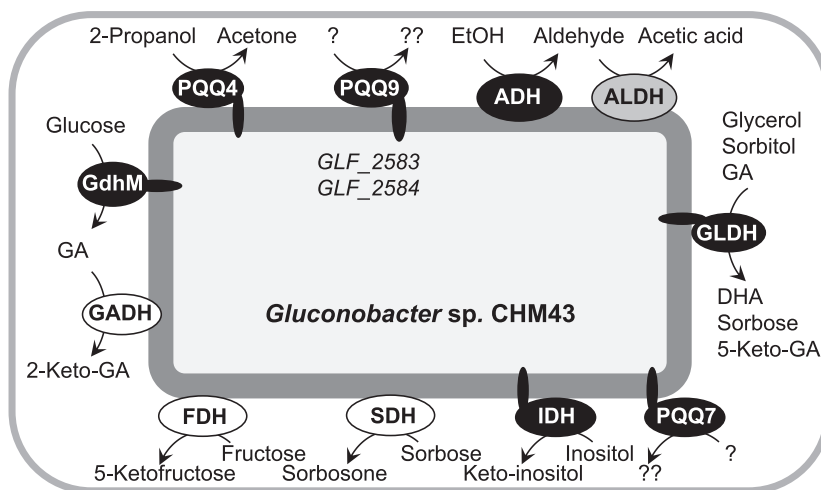


Fig. 1. Membrane-bound dehydrogenases in *Gluconobacter* sp. CHM43. Black, white, and gray indicate PQQ-, FAD-, and molybdopterin-dependent enzymes, respectively. IDH, inositol dehydrogenase; PQQ7, PQQ-dependent dehydrogenase 7; ADH, alcohol dehydrogenase; ALDH, aldehyde dehydrogenase; GLDH, glycerol dehydrogenase; PQQ9, PQQ-dependent dehydrogenase 9; PQQ4, PQQ-dependent dehydrogenase 4; SDH, sorbose dehydrogenase; FDH, fructose dehydrogenase; GADH, gluconate dehydrogenase; GdhM, glucose dehydrogenase; DHA, dihydroxyacetone; GA, gluconic acid.

スをそれぞれ生成する (Gupta *et al.*, 2001). GLDH による 1-(2-ヒドロキシエチル)アミノ-1-デオキシ-D-ソルビトールの酸化は、抗糖尿病薬ミグリトールの前駆体である 6-(2-ヒドロキシエチル)アミノ-6-デオキシ-L-ソルボースを生成する (Yang *et al.*, 2008). 最近、D-フルクトースや L-リボースなどの単糖が GLDH の基質リストに追加された (Ano *et al.*, 2017; Yakushi *et al.*, 2018). 本研究では、遺伝子欠失とプラスミドを用いた過剰生産の組み合わせを使用して組換え *Gluconobacter* 株を作製した。作製した菌株の膜画分の脱水素酵素活性測定を様々な基質を用いて行った。それぞれの基質で見られた反応速度を比較することで、PQQ-DH9 の基質特異性の解析を試みた。

ラクトビオン酸はラクトースの還元末端を酸化することで得られる。ラクトビオン酸は、カルシウム塩として食品やサプリメントに含まれ、腸管でのカルシウムの吸収を促進する作用を持つ有用な物質である (Kiryu *et al.*, 2009). ラクトビオン酸の食品への添加とその安全性を考慮して酢酸菌の使用が検討されてきたが、効率の良い生産を行うためには酢酸菌の改良育種が考えられる。GdhM はグルコースの他にラクトースも酸化するが、酢酸菌野生株の場合、ラクトースはグルコースよりもはるかに遅い速度でしか酸化されない。本研究では、ラクトースをより高い速度で酸化し、短い反応時間で大量のラクトビオン酸を生成させることを目的に GdhM 過剰発現株を構築した。しかし、組換え株の生育と GdhM 活性は不安定だったので、*G. oxydans* 由来のリボソームタンパク質 GOX0452 をコードする遺伝子のプロモーター領域を使用した GdhM 発現プラスミドを構築した (Kallnik *et al.*, 2010). GdhM の基質特異性を明らかにするために、グルコースを含むさまざまな二糖類に対する酵素活性を測定した。本研究により明らかになった GdhM のラクトースに対する親和性と反応性の低さを克服し、ラクトビオン酸生産能の向上を試みた。

実験方法

試薬

酵母エキスとハイポリペプトンは、それぞれオリエンタル酵母工業株式会社製と日本製薬株式会社製を用いた。遺伝子工学系の試薬は東洋紡株式会社製を用いた。2,3-ブタンジオールは和光純薬工業株式会社製を用いた。ラクトビオン酸は東京化成工業株式会社製を用いた。他の試薬は高純度の市販品を用いた。2-ヘキサノール、シクロヘキサノール、1-シクロヘキシルエタノールはエタノールに溶解し、酵素活性測定に用いた。

微生物の培養

本研究で用いた酢酸菌は Table 1 に示す。酢酸菌 *Gluconobacter* sp. CHM43 株 (NBRC 101659; <http://www.nite.go.jp/en/nbrc/index.html>) (Moonmangmee *et al.*, 2000), その $\Delta adhAB$ 誘導体である SEI46 株、および $\Delta adhAB \Delta slsBA$ 誘導体である TORI4 株を用いた (Yakushi *et al.*, 2018)。また、*G. oxydans* NBRC 3293 株とその $\Delta gdhM$ 誘導体 HK3 株も用いた (Sriherfyna *et al.*, 2021)。グルコノバクター属菌株は、ソルビトール培地 (1 リットルあたり D-ソルビトール 50g, 酵母エキス 3g, およびハイポリペプトン 3g) あるいはグルセロール培地 (1 リットルあたりグリセロール 10g, 酵母エキス 5g, およびハイポリペプトン 5g) で培養した。代謝物分析のために、10,000×g で 5 分間、4℃ で遠心分離して細胞を除去した。上清を 0.4 μm ポアのフィルターに通し高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析を行った。プラスミド構築に大腸菌株 DH5α (Hanahan, 1983) を用い、LB 培地で培養した。テトラサイクリン、カナマイシン、ならびにアンピシリンは、終濃度それぞれ 10 μg mL⁻¹, 50 μg mL⁻¹, ならびに 100 μg mL⁻¹ で使用した。

プラスミド構築

PCR を用いて遺伝子のクローニングを行った。Marmur の方法 (Marmur, 1961) で調製された CHM43 株のゲノム DNA, ex-GLF_2583-Xba (+) (5'-tctagaacctcaccttctacag-3'; XbaI 認識部位に下線) と ex-GLF_2584-Kpn (-) (5'-ggtacctgcccgcatcaagaatg-3'; KpnI 認識部位に下線) のオリゴヌクレオチドペア、Herculase DNA Polymerase (Stratagene) による PCR を行った。PQQ-DH9 をコードする遺伝子 (*pqq9*) を含む約 2.7kb の PCR 産物を XbaI および KpnI で消化してから、pCM62 のマルチクローニング部位に挿入することで p62SGLDH2-11 と名付けたプラスミドを構築した (Marx & Lidstrom, 2001)。

pJJ264, pJJ384, および pJJ452 は、pBBR1 p264, pBBR1 p384, および pBBR1 p452 の SacI-SalI 断片 (~450b) を pBBR1MCS-4 の SacI-SalI 部位に挿入することによって構築した。

Gluconobacter oxydans 621H 株のゲノム DNA を親鎖、プライマーとして 621H-gdhM (+) (5'-ggtaccatgagcacaacatcccg-3', KpnI 認識部位に下線) と 621H-gdhM (-) (5'-aagcttccgagggtcctgtcaga-3', HindIII 認識部位に下線) を用い、Herculase II fusion DNA polymerase によって PCR を行った。この 2.6kb の PCR 産物を KpnI と HindIII で消化し、*gdhM* 遺伝子を持つ 2.6kb の断片を得た。この DNA 断片を pBBR1MCS-4 の KpnI-HindIII 部位に挿入し、pGdhM を構築した。

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<i>Gluconobacter</i> sp.		
CHM43	Wild type	(Moonmangmee <i>et al.</i> , 2000)
SEI46	CHM43 $\Delta adhAB$	(Yakushi <i>et al.</i> , 2018)
TORI4	CHM43 $\Delta adhAB \Delta sldBA$	(Yakushi <i>et al.</i> , 2018)
UCD1	CHM43 $\Delta gdhM$	This study
<i>Gluconobacter oxydans</i>		
ATCC 621H	Wild type	ATCC
NBRC 3293	Wild type	NBRC
HK3	NBRC3293 $\Delta gdhM$	(Sriherfyna <i>et al.</i> , 2021)
Plasmids		
pBBR1MCS-2	Km ^R , <i>mob</i> , P _{lacZ}	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS-4	Ap ^R , <i>mob</i> , P _{lacZ}	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pCM62	Tc ^R , <i>mob</i> , P _{lacZ}	(Marx & Lidstrom, 2001)
pKOS6b	Km ^R , <i>mob codBA</i>	(Kostner <i>et al.</i> , 2013)
pBBR1p264	pBBR1MCS-2, P _{GOX0264}	(Kallnik <i>et al.</i> , 2010)
pBBR1p384	pBBR1MCS-2, P _{GOX0384}	(Kallnik <i>et al.</i> , 2010)
pBBR1p452	pBBR1MCS-2, P _{GOX0452}	(Kallnik <i>et al.</i> , 2010)
p62SGLDH2-11	pCM62, a 2.7-kb <i>pqq9</i> fragment from CHM43	(Nguyen <i>et al.</i> , 2021)
pGdhM	pBBR1MCS-4, a 2.6-kb <i>gdhM</i> fragment from 621H	This study
pJ793	pKOS6b, a 1.4-kb $\Delta gdhM$ fragment from CHM43	This study
pJJ264	pBBR1MCS-4, P _{GOX0264}	This study
pJJ384	pBBR1MCS-4, P _{GOX0384}	This study
pJJ452	pBBR1MCS-4, P _{GOX0452}	This study
pER264	pBBR1p264, a 2.6-kb <i>gdhM</i> fragment from CHM43	This study
pER384	pBBR1p384, a 2.6-kb <i>gdhM</i> fragment from CHM43	This study
pER452	pBBR1p452, a 2.6-kb <i>gdhM</i> fragment from CHM43	This study

CHM43株のゲノムDNAを親鎖、プライマーとしてCHM-Ex-gdhM-5-Sal(+)(5'-gtcgacgtgagcaaatgaacc-3', SalI認識部位に下線)とCHM-Ex-gdhM-3-HinKpn(-)(5'-ggtaccaagctttatgttacagatgaatcctg-3', KpnI, HindII認識部位に下線)を用い、Herculase II fusion DNA polymeraseによってPCRを行った。この2.6kbのPCR産物をKpnIとSalIで消化し、*gdhM*遺伝子を持つ2.6kbの断片を得た。このDNA断片をpJJ264, pJJ384, ならびにpJJ452のKpnI-SalI部位に挿入し、それぞれpER264, pER384, pER452を構築した。構築したプラスミドを用いたエレクトロポレーションで酢酸菌を形質転換した(Yakushi *et al.*, 2018)。

CHM43株のゲノムDNAを親鎖、プライマーとして

CHM- $\Delta gdhM$ -5-Sal(+)(5'-gtcgacgttctgtgacgacgg-3'; SalI認識部位に下線)とCHM- $\Delta gdhM$ -5-Nco(-)(5'-ccatggccggaggatgtgctc-3'; NcoI認識部位に下線)を用い、Herculase II fusion DNA polymeraseによってPCRを行い、生じた産物をSalIとNcoIで消化し0.7kbのDNA断片を得た。同様にCHM- $\Delta gdhM$ -3-Nco(+)(5'-ccatggcaggaccgtctgcc-3'; NcoI認識部位に下線)とCHM- $\Delta gdhM$ -3-Kpn(-)(5'-ggtacctctcctgacatgacgag-3'; KpnI認識部位に下線)を用い、生じた産物をNcoIとKpnIで消化し0.7kbのDNA断片を得た。これら2つのDNA断片を、あらかじめSalIとKpnIで消化しておいたpKOS6b(Kostner *et al.*, 2013)に連結しpJ793($\Delta gdhM$)を得た。

菌株の構築

エレクトロポレーション法により、CHM43株を pJ793 ($\Delta gdhM$) で形質転換し、 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、カナマイシンを含むソルビトール培地でスクリーニングした。この形質転換株を $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ のフルオロシトシンを含むソルビトール培地でスクリーニングすることにより UCD1 ($\Delta gdhM$) 株を得た。

休止菌体の調製

UCD1 ($\Delta gdhM$)/pER452 を 2mL のソルビトール培地を用いて 30°C で 24 時間培養し、これを前培養とした。1mL の前培養液を 100mL のソルビトール培地に接種し、 30°C で 24 時間培養した。培養液を $8,000 \times g$ で 10 分間、 4°C で遠心分離して細胞を回収し、50 mL の 100mM 酢酸ナトリウム (pH 6.0) で 2 回洗浄した。この懸濁液を 4°C 、 $8,000 \times g$ で 10 分間遠心し、2mL の 100mM 酢酸ナトリウム (pH 6.0) に懸濁した。細胞の濁度は 600 nm で測定した。

膜画分の調製

pCM62 プラスミドを保有する TORI4 ($\Delta adhAB \Delta sldBA$) および SEI46 ($\Delta adhAB$) 株および p62SGLDH2-11 ($pqq9^+$) プラスミドを保有する TORI4 株を、テトラサイクリン $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ を含む 100mL のソルビトール培地で培養した。指数関数増殖期の後期に達するまで 30°C で振とう培養した。 4°C で $10,000 \times g$ で 10 分間遠心分離することにより、細胞を回収し 2 mM CaCl_2 を含む 10 mM MES-KOH (pH 6.0) で 2 回洗浄した。細胞を 4 倍量の同バッファーに再懸濁した (細胞の湿重量 1 g あたり 4 mL)。Phenylmethylsulfonyl fluoride を 0.5 mM となるように加えた細胞懸濁液をフレンチプレス ($1,100 \text{ kg cm}^{-2}$) に 2 回通した。 $10,000 \times g$ 、 4°C で 10 分間遠心分離して未破砕細胞を除去した後、上清を $100,000 \times g$ 、 4°C でさらに 1 時間遠心分離した。沈殿物を同じ緩衝液に再懸濁し、膜画分として使用した。

酵素活性測定

酵素活性は、 25°C でフェナジンメトサルフェート (PMS) 還元活性を 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCPIP) とのカップリングによって 522 nm で分光的に測定した。反応液は、酵素、 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0)、 0.2 mM PMS、 0.11 mM DCPIP、および 100 mM 基質から成り、基質に依存した DCPIP の吸光度変化を追跡した。なお、2-ヘキサノール、シクロヘキサノールおよび 1-シクロヘキシルエタノールはエタノールに溶解し、終濃度 25 mM で使用した。1 分あたりに変換される基質の分子数 (μmol) を酵素活性のユ

ニット (U) として定義した。DCPIP のミリモル吸光係数は $8.6 \text{ (mM}^{-1}\text{)}$ を用いた (Armstrong, 1964)。

速度論解析

酵素活性の K_M 値は、Kaleida Graph を使用して、実験データをミカエリス-メンテン式にフィッティングすることによって求めた。触媒効率を評価するために、 K_{cat}/K_M の代わりに V_{max}/K_M を求めた。Lineweaver-Burk プロットを作成し、その傾きの逆数を V_{max}/K_M とした。

EDTA 処理とホロ酵素形成

EDTA ストック溶液の pH を NaOH で 6.0 に調整した。 10 mM MES-KOH (pH 6.0) に 10 mg タンパク質 mL^{-1} を含む膜懸濁液を、2, 5, 10, および 20 mM EDTA 存在下に 4°C で一晩インキュベートした。

EDTA 処理した膜懸濁液を超遠心分離 ($100,000 \times g$, 1 時間, 4°C) で沈殿させ、 2 mM CaCl_2 を含む 10 mM MES-KOH (pH 6.0) に再懸濁した。このステップをもう 1 回繰り返し、得られた膜懸濁液を $5 \mu\text{M}$ PQQ および 2 mM CaCl_2 存在下 25°C で 30 分間インキュベートすることによりホロ酵素を形成した。

休止菌体反応

休止菌体懸濁液 ($\text{OD}_{600}=10$) と 100 mM 酢酸ナトリウム (pH 6.0)、 100 mM ラクトースからなる 5 mL の反応混合物を、8 つの穴 (穴径 2 mm) のあるキャップ付きの 50 mL 容プラスチックチューブ内で、 200 rpm 、 30°C で 24 時間振とうした。反応混合物の一部 ($500 \mu\text{L}$) を定期的に採取し、 $12,000 \text{ rpm}$ 、 4°C で 5 分間遠心分離することで細胞を除去し、上清を孔径 $0.4 \mu\text{m}$ のフィルターに通し定量分析に用いた。

膜画分を用いたバイオトランスフォーメーション

膜画分 (1.0 mg mL^{-1} のタンパク質)、 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) と 100 mM 基質からなる 5 mL の反応液を、8 つの穴 (穴径 2 mm) のあるキャップを備えた 50 mL プラスチックチューブ内で、 150 rpm 、 30°C で 24 時間振とうした。反応混合物 $500 \mu\text{L}$ を定期的に採取し、 $100,000 \times g$ および 4°C で 1 時間超遠心分離した後、沈殿を廃棄し上清を得た。これを孔径 $0.4 \mu\text{m}$ のフィルターに通し定量分析に用いた。

ラクトース酸化産物の加水分解

反応後の休止細胞からの $500 \mu\text{L}$ の反応液を $500 \mu\text{L}$ の 2.0 M HCl と混合し、 95°C で 45 分間保温した。その後、約 $200 \mu\text{l}$ の 5.0 M NaOH で中和し、生成物を HPLC で分析した。加水分解および中和による容積増加分を HPLC

クロマトグラフでの濃度算出の際に補正した。

分析方法

ろ過されたサンプルは、屈折計 (RI) 検出器とフォトダイオードアレイ (PDA) を備えた HPLC システム (島津製作所) を使用して分析した。SUGAR SP0810, 8.0mm ID×300mm L (昭和電気株式会社) を使用し、移動相として蒸留脱イオン水を用いて、80℃、流速 0.5mL min⁻¹ で分析を行った。あるいは、RSpak KC-811, 8.0mm ID×300mm L (昭和電気株式会社) を使用し、移動相として 0.1% リン酸を用いて、60℃、流速 0.5mL min⁻¹ で分析を行った。定量はピークの面積あるいは高さを使用した。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準として、改変ローリー法により決定した (Dulley & Grieve, 1975)。

結果と考察

PQQ-DH9 は、GLDH 欠損株における L-ソルボース産生を補完する

PQQ-DH9 の特性を明らかにするために、CHM43 の $\Delta adhAB \Delta sldBA$ 株で広宿主域プラスミドベクター pCM62 を使用して *GLF_2583* および *GLF_2584* 遺伝子の発現を試みた。この菌株は、野生株に大量に生産される第一級アルコール脱水素酵素 (ADH) および第二級

アルコール脱水素酵素 (GLDH) の両方の遺伝子を欠いている (Matsushita *et al.*, 2003; Yakushi & Matsushita, 2010)。したがって、PQQ-DH9 の遺伝子 (*pqq9*) を含む pCM62 である p62sGLDH2-11 を持つ $\Delta adhAB \Delta sldBA$ 株 (以下、*pqq9*⁺ 株と呼ぶ) およびコントロールベクター pCM62 を保有する株 (以下、対照株と呼ぶ) を構築した。比較のために、コントロールベクター pCM62 を持つ $\Delta adhAB$ 株 (以下、*sldBA*⁺ 株と呼ぶ) を構築した。この菌株は GLDH をコードする *sldBA* 遺伝子を染色体に持つ。

グルコノバクター菌株を D-ソルビトールで培養することにより、*in vivo* で PQQ-DH9 の機能を調べた。つまり、L-ソルボースの生成とそれに伴う D-ソルビトールの消費を評価した (Fig.2)。比較のために、pCM62 を保有する野生型 CHM43 を含めた。GLDH 欠損株 ($\Delta sldBA \Delta adhAB$) の増殖は野生型株と同様であったが、L-ソルボースの産生は見られなかった (Fig.2)。*pqq9*⁺ 株は、野生型よりも低い速度で L-ソルボースを生産した。ソルボース産生速度は、野生株、*sldBA*⁺、*pqq9*⁺、および対照株で、それぞれ 7.0、6.7、2.7、および 0.056mM h⁻¹ であった。L-ソルボースが蓄積しない対照株による D-ソルビトールの消費は、おそらく D-ソルビトールの同化によるものと思われる (Soemphol *et al.*, 2012)。以上の結果は、PQQ-DH9 がグルコノバクターのソルビトール酸化システムにおける初発脱水素酵素として機能できる

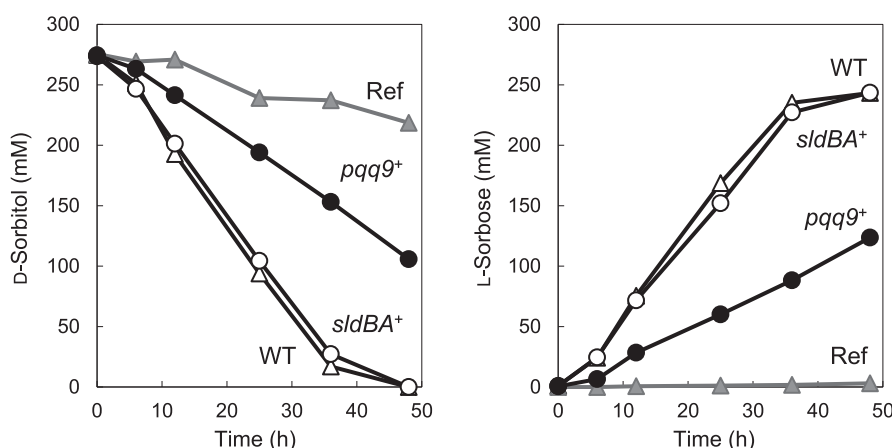


Fig. 2. PQQ-DH9 complements deficiency in L-sorbose production by the $\Delta adhAB \Delta sldBA$ strain. *Gluconobacter* strains were cultivated on sorbitol medium. The wild-type strain harboring pCM62 (WT, white triangles), the $\Delta adhAB \Delta sldBA$ strain harboring pCM62 (Ref, gray triangles), the $\Delta adhAB$ strain harboring pCM62 (*sldBA*⁺, white circles), the $\Delta adhAB \Delta sldBA$ strain harboring pCM62 (Ref for the reference strain), and the $\Delta adhAB \Delta sldBA$ strain harboring p62sGLDH2-11 (*pqq9*⁺, black circles). D-Sorbitol and L-sorbose levels in the medium were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC).

ことを示している。

PQQ-DH9の発現

上記のように、PQQ-DH9をコードする遺伝子をゲノムに有する対照株 (pCM62を持つ $\Delta adhAB \Delta sldBA$)は、ごくわずかな量のL-ソルボースしか産生しなかった。この結果は、本実験で使用した培養条件下では、この遺伝子がゲノムからほとんど発現されないことを示唆している。膜画分のD-アラビトール脱水素酵素活性を測定したところ、 $pqq9^+$ 株の膜は $0.20 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ の活性を示したが、対照株の膜画分は検出限界未満の活性であった (Fig.3)。これらの結果は、PQQ-DH9がクリプティック酵素であることを示唆する。PQQ-DH9の発現を誘導する培養条件の探索は重要な問題と捉えており、現在調査中である。対照的に $sldBA^+$ 株の膜は、GLDHを持つのでより高い活性 ($0.41 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)を示した (Fig.3)。PQQ-DH9の至適pHは5.0~6.0で、GLDHの至適pHと同様であった。以上の結果は、構築されたプラスミドによって、PQQ-DH9がグルコノバクター株で機能的に発現できたことを示している。

PQQ-DH9の基質特異性

PQQ-DH9の基質特異性を評価するために、膜画分を用いて様々な基質の脱水素酵素活性をpH 5.0で測定し

た。対照株は、膜結合型グルコース脱水素酵素により、多種多様な基質、特に糖に対してかなり高い活性を示した (Table 2)。そこで、 $pqq9^+$ 株または $sldBA^+$ 株の比活性から対照株の比活性を差し引くことにより、PQQ-DH9およびGLDHの酵素活性を評価することとした。いずれの場合もその結果を Δ 活性と呼ぶ (Table 2)。 $sldBA^+$ 株の膜と同様に、 $pqq9^+$ 株の膜は多種多様な基質を酸化した。 $pqq9^+$ 株は $sldBA^+$ 株よりも、シス-1,2-シクロヘキサンジオールを基質に高い Δ 活性を示した。さらに、L-リボースは両方の膜によってよく酸化された。ただし、グリセロール、リビトール、D-マンニトール、D-ソルビトール、イソプロパノール、および1,2-ブタンジオールは、 $pqq9^+$ 膜によって低い速度でしか酸化されなかった。つまり、 $pqq9^+$ 膜はこれらの基質に関して、 $sldBA^+$ 膜よりもはるかに低い酸化活性であった。

PQQ-DH9は、トランス異性体よりもシス型の1,2-シクロヘキサンジオールを高い速度で酸化した (Table 2)。 $pqq9^+$ 膜の Δ 活性値は、シス型とトランス型でそれぞれ $520 \text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ と $10 \text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ であった。ただし、 $sldBA^+$ 株は $240 \text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ および $230 \text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ でそれぞれシス型およびトランス型を酸化した。この結果は、Moonmangmee らによる以前の観察と一致していた (Moonmangmee *et al.*, 2001)。

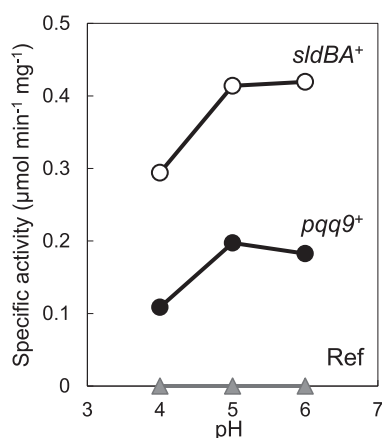


Fig. 3. D-Arabitol dehydrogenase assay indicates the functional expression of PQQ-DH9.

D-Arabitol dehydrogenase activity in the membranes of the $\Delta adhAB$ strain harboring pCM62 ($sldBA^+$, white circles), the $\Delta adhAB \Delta sldBA$ strain harboring pCM62 (Ref for the reference strain, gray triangles), and the $\Delta adhAB \Delta sldBA$ strain harboring p62sGLDH2-11 ($pqq9^+$, black circles) grown on sorbitol medium were determined by PMS/DCPIP assay with 100 mM D-arabitol in 50 mM Na^+ -acetate (pH 4.0, 5.0, and 6.0) at 25 °C. The membranes of the reference strain (Ref) had activities below the detection limit ($0.001 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).

Table 2. Substrate specificities of pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenase 9 and glycerol dehydrogenase

	Reference	<i>pqq9</i> ⁺		<i>sldB</i> A ⁺
	Specific activity (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹) ^a	Specific activity (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹) ^a	Δ activity (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹) ^b	Δ activity (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹) ^c
Glycerol	4.0 ± 5	18 ± 10	14	490
<i>meso</i> -Erythritol	0 (<i>n</i> = 2)	190 (<i>n</i> = 2)	190	330
D,L-Threitol	0 (<i>n</i> = 2)	3.1 (<i>n</i> = 2)	3.1	25
Xylitol	0 (<i>n</i> = 2)	0 (<i>n</i> = 2)	0	3.3
Ribitol	0 (<i>n</i> = 2)	28 (<i>n</i> = 2)	28	260
D-Arabitol	0	170 ± 20	170	400
L-Arabitol	0	0	0	4.6
Galactitol	0 (<i>n</i> = 2)	0 (<i>n</i> = 2)	0	8.5
D-Mannitol	0	27 ± 10	27	210
D-Sorbitol	2.8 ± 3	55 ± 10	52	410
Inositol	31 ± 19	0 ± 0	<0	<0
Isopropanol	8.0 ± 8	35 ± 10	27	240
2-Butanol	26 (<i>n</i> = 2)	140 (<i>n</i> = 2)	114	380
2-Hexanol	7.0 (<i>n</i> = 2)	30 (<i>n</i> = 2)	23	78
1,2-Butanediol	2.1 (<i>n</i> = 2)	80 (<i>n</i> = 2)	78	460
1,3-Butanediol	11 (<i>n</i> = 2)	65 (<i>n</i> = 2)	54	140
2,3-Butanediol	26 ± 8	400 ± 50	370	770
2,4-Pentanediol	25 ± 7	85 ± 4	60	240
1,2-Cyclopentandiol	119 (<i>n</i> = 2)	350 (<i>n</i> = 2)	230	630
<i>cis</i> - 1,2-Cyclohexanediol	35 ± 13	550 ± 90	520	240
<i>trans</i> - 1,2-Cyclohexanediol	0 ± 0	10 ± 0.4	10	230
1-Cyclohexylethanol	6.3 (<i>n</i> = 2)	22 (<i>n</i> = 2)	16	43
Cyclohexanol	5.1 (<i>n</i> = 2)	84 (<i>n</i> = 2)	79	270
Glyceraldehyde	63 (<i>n</i> = 1)	140 (<i>n</i> = 1)	77	120
D-Xylose	220 ± 90	120 ± 50	<0	23
D-Ribose	14 ± 3	90 ± 30	76	120
L-Ribose	25 ± 2	200 ± 7	180	210
D-Arabinose	9.8 (<i>n</i> = 2)	5.2 (<i>n</i> = 2)	<0	18
L-Arabinose	157 (<i>n</i> = 2)	120 (<i>n</i> = 2)	<0	16
D-Lyxose	5.5 ± 3	100 ± 10	95	89
D-Galactose	240 ± 100	130 ± 10	<0	45
D-Gluconate	140 ± 40	130 ± 10	<0	82

^aSpecific activity was calculated from three independent enzyme assays, shown in mean value ± standard deviation. Otherwise, results of the numbers (*n*) of enzyme assays indicated in parentheses were used for the calculation of mean value.

^bΔ activity in the *pqq9*⁺ membrane was calculated by subtracting the mean specific activity of the reference strain from the corresponding mean specific activity of the *pqq9*⁺ strain.

^cΔ activity in the *sldB*A⁺ membrane was calculated by subtracting the specific activity of the reference strain (*n* = 1) from the corresponding specific activity of the *sldB*A⁺ strain (*n* = 1).

基質に対するミハエリス定数

グリセロール, L-リボース, D-アラビトール, 2,3-ブタンジオール, および1,2-シクロヘキサジオールのシスおよびトランス異性体に関して, *pqq9*⁺ および *sldBA*⁺ 株の膜画分の脱水素酵素の K_M 値を算出した (Table 3). グリセロール, D-アラビトール, および2,3-ブタンジオールに関する *pqq9*⁺ 膜の K_M 値は, *sldBA*⁺ 膜の K_M 値よりも高かった. ただし, L-リボースとシス-1,2-シクロヘキサジオールに関する2つの膜の K_M 値は同等であった. 私たちが示唆したように, GLDHがピラノース型のL-リボースを酸化してL-リボノラクトンを生成すると考えると (Yakushi *et al.*, 2018), 環状基質に対するPQQ-DH9の親和性はGLDHの環状基質に対する親和性に匹敵すると示唆される. しかし, 鎖状基質に対するPQQ-DH9の親和性は, GLDHのそれよりも低いと示唆される.

1,2-シクロヘキサジオールに対する *pqq9*⁺ 膜の K_M 値は, シス異性体よりもトランス異性体の方が高かったが, 1,2-シクロヘキサジオールに関する *sldBA*⁺ 膜の K_M 値は, シス異性体よりもトランス異性体の方が低かった. 2つの酵素がシス異性体とトランス異性体を区別するメカニズムは興味深いものであり, 構造解析を含むさらなる生化学的分析が必要である.

酵素活性に対するEDTAの影響

EDTAに対する脱水素酵素の感受性を調べた. PQQはCa²⁺を介して酵素に結合しているため (Ghosh *et al.*, 1995), EDTAはCa²⁺をキレート化することによってPQQ依存性酵素を可逆的に不活性化する. *pqq9*⁺ および *sldBA*⁺ 膜の両方で, 最大20mMのさまざまな濃度の

Table 3. K_M values (mM) of membrane-associated dehydrogenases with regard to various substrates^a

	<i>pqq9</i> ⁺	<i>sldBA</i> ⁺
Glycerol	450 ± 40	8.4 ± 0.7
L-Ribose	41 ± 2	61 ± 3
D-Arabitol	88 ± 4	5.5 ± 0.3
2,3-Butanediol	9.4 ± 0.4	1.8 ± 0.2
<i>cis</i> -1,2-Cyclohexanediol	2.8 ± 0.3	4.6 ± 0.6
<i>trans</i> -1,2-Cyclohexanediol	19 ± 3	0.49 ± 0.07

^aThe K_M values were determined by a phenazine methosulfate/2,6-dichlorophenol indophenol assay using membranes from the *pqq9*⁺ and *sldBA*⁺ strains grown on sorbitol medium with various concentrations of the substrate in 50mM Na⁺-acetate (pH 5.0) at 25°C, followed by data analysis using KaleidaGraph (ver. 4.5, Synergy Software).

EDTAで処理した (Fig.4). 20mM EDTAでは, *sldBA*⁺ 膜はEDTAの非存在下で対照膜の活性の60%を保持したが, *pqq9*⁺ 膜はそれらの活性の80%を失った. これらの結果は, EDTA処理を行うとPQQ-DH9がGLDHよりも安定性が低いことを示唆する. EDTAを除去した後, 5μM PQQと2mM Ca²⁺を添加することにより, 活性は回復した. したがって, 酵素からのPQQおよびCa²⁺の離脱は, EDTA処理に起因する活性の低下を説明し, PQQ-DH9がPQQ依存的に機能することを示す. これは, PQQ-DH9がGLDHよりも容易にPQQとCa²⁺を遊離することを示唆する.

D-アラビトール, 2,3-ブタンジオール, シス-1,2-シクロヘキサジオール, およびL-リボースの酸化生成物

「材料と方法」で説明した方法により, *sldBA*⁺ と *pqq9*⁺ の膜画分を使用して得られたD-アラビトール, 2,3-ブタンジオール, シス-1,2-シクロヘキサジオール, およびL-リボースの酸化生成物を調べた. 2つの膜からの反応生成物は互いに近い保持時間で溶出された. D-アラビトール, 2,3-ブタンジオール, シス-1,2-シクロヘキサジオール, L-リボースの酸化生成物については, それ

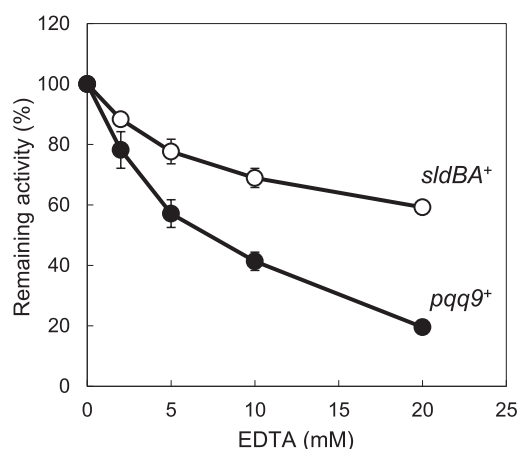


Fig. 4. Effects of EDTA treatment on dehydrogenase activity. The membranes of the $\Delta adhAB$ strain harboring pCM62 (*sldBA*⁺, white circles) and the $\Delta adhAB \Delta sldBA$ strain harboring p62sGLDH2-11 (*pqq9*⁺, black circles) were treated with 2, 5, 10, and 20mM EDTA on ice overnight. Then, D-arabitol dehydrogenase activity in the EDTA-treated membrane was determined by PMS/DCPIP assay in 50mM Na⁺-acetate (pH 5.0) at 25°C. The remaining activity relative to that of the control membrane was expressed as a percentage.

ぞれ 20.5, 30.3, 43.2, および 20.6 分 (Fig.5 および 非表示データ) であった. この結果から, PQQ-DH9 によって生じる生成物は GLDH によって生じる生成物と同じであると結論付けた.

反応時間 0 の場合, 保持時間 31.9 分と 32.9 分で 2,3-ブタンジオールの HPLC クロマトグラムに 2 つのピークが見られた (Fig.5). どちらも 2 つの膜との酸化反応の結果として消費された. 31.9 分と 32.9 分に溶出されたアイソフォームをそれぞれ基質 A と B と呼ぶ. 市販の 2,3-ブタンジオールは, 2S,3S-, 2R,3R-, および メソ型の 3

つのアイソフォームの混合物であり, 基質 B はこれらのアイソフォームの一つであると考えられる. 基質 B は基質 A よりも遅い速度で消費され (Fig.6), *sldB*⁺ 膜よりも *pqq9*⁺ 膜によってゆっくりと酸化された (Fig.6). *sldB*⁺ 膜によって生成された酸化生成物のピーク強度 (30.3 分の保持時間) は *pqq9*⁺ 膜によって生成されたものよりも高かったため (Fig.6), ピーク強度の違いは基質 B の消費量の違いに対応すると解釈できた (Fig.6). したがって, PQQ-DH9 と GLDH が 2,3-ブタンジオールを立体異性体特異的に酸化することが示唆さ

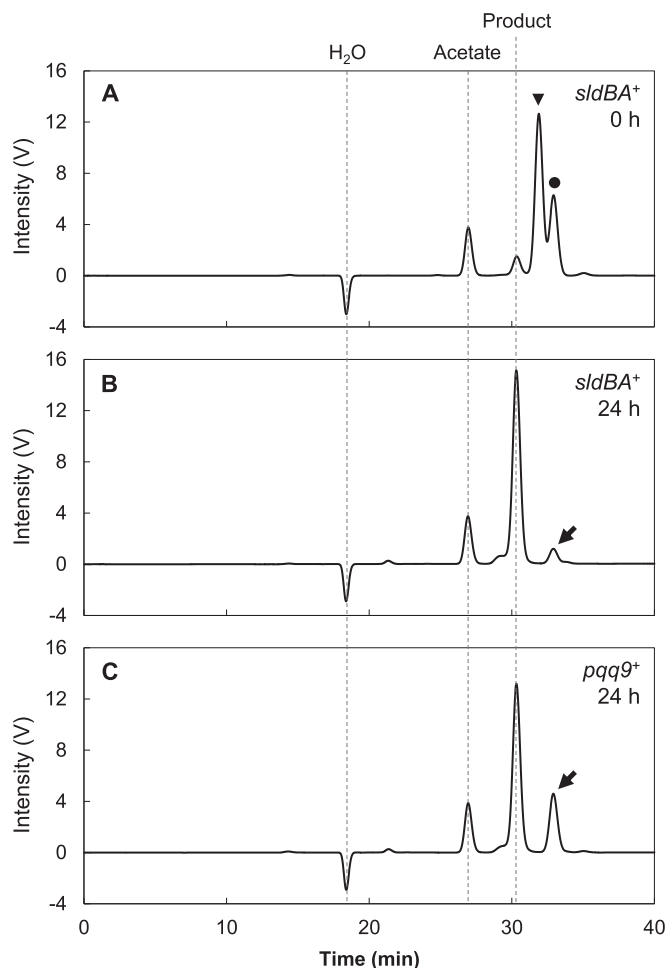


Fig. 5. High-performance liquid chromatography (HPLC) chromatograms of the reaction products resulting from the action of the membranes on several substrates.

The reaction products were run on an organic acid column and were detected with a refractive index (RI) detector. The reaction products resulting from the oxidation of 2,3-butanediol by the *sldB*⁺ (A and B) and *pqq9*⁺ (C) membranes for 0 h (A) and 24 h (B and C). The inverted triangle and black circle indicate the peaks attributable to the substrates A and B, respectively. The black arrows indicate the peaks attributable to the remaining substrate B after the 24-h reactions. The dashed lines indicate the trough attributable to water, the peak attributable to the reaction product, and the peak attributable to acetate, which was used as a buffer in the oxidation reactions.

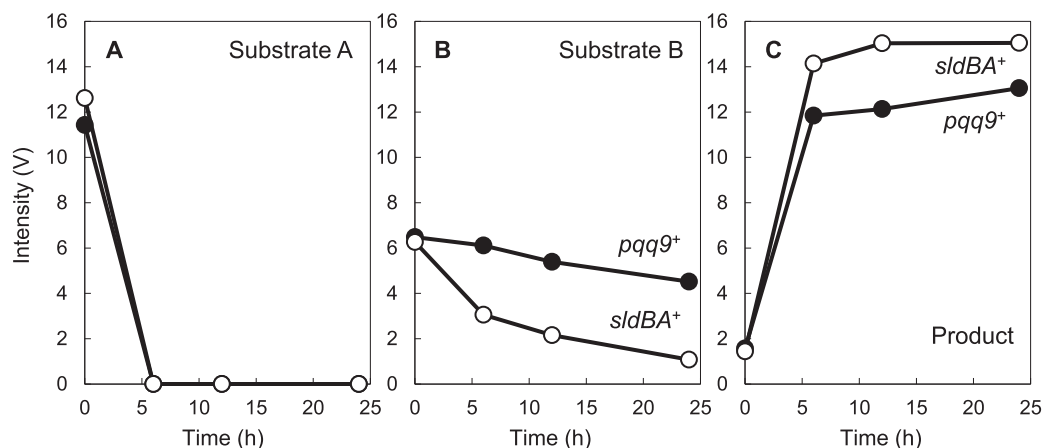


Fig. 6. Time course of 2,3-butanediol oxidation by the membranes.

2,3-Butanediol was treated with the *sldBA*⁺ (white) and *pqq9*⁺ (black) membranes for 0, 6, 12, and 24 h. The reaction products were run on an organic acid column and detected with a refractive index (RI) detector. The peak intensities of substrate A (31.9 min retention time), substrate B (32.9 min retention time), and the product (30.3 min retention time) are shown in panels A, B, and C, respectively.

れる。2,3-ブタンジオールの酸化生成物はアセトインであり、これは乳製品、化粧品、製薬業界、および化学合成で使用される物質である。*G. oxydans* DSM2003株は、(2*S*,3*S*)-および(2*R*,3*R*)-2,3-ブタンジオールからそれぞれ(3*S*)-アセトインおよび(3*R*)-アセトインを生成し、メソ-2,3-ブタンジオールを(3*S*)-アセトインへ立体選択的に変換する(Wang *et al.*, 2013)。(3*S*)-アセトインと(3*R*)-アセトインは本研究のHPLCでは単一のピークとして現れるため、酸化生成物(30.3分の保持時間)にはアセトインの3*S*-および3*R*-異性体が含まれている可能性がある。

メタゲノムや*G. oxydans*のオーファンPQQ依存性脱水素酵素を特徴づけるためにいくつかの試みがなされてきた(Peters *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2017; Mientus *et al.*, 2017)。本研究ではGLF_2583-2584タンパク質をPQQ-DH9として特徴付けた。これは、GLDHに類似しているが、基質特異性が異なっていた。鎖状基質(グリセロール、リビトール、D-マンニトールなど)については、PQQ-DH9はGLDHよりも低い速度で酸化し低い親和性を示した。一方、シス-1,2-シクロヘキサジオールやピラノース型のL-リボースなどの環状基質を、GLDHと同等の親和性と速度で酸化した。*pqq9*⁺膜の反応生成物は、HPLCで*sldBA*⁺膜の反応生成物と同様の保持時間を示したため、2-ケト-シクロヘキサノールがシス-1,2-シクロヘキサジオールから生成され、L-リボースはGLDH触媒作用との類似性に基づいてL-リボノ-1,5-ラクトン、続いてL-リボン酸に変換されると考えられる

(Yakushi *et al.*, 2018)。私たちの実験では染色体発現レベルの活性が検出されなかったため、PQQ-DH9はクリプティック酵素であることが示唆された。PQQ-DH9の発現のための培養条件は、この酵素の生理学的役割を理解するための重要な問題として今後検討する。

酢酸菌グルコース脱水素酵素の単糖類に対する基質特異性

酢酸菌のグルコース脱水素酵素の基質特異性に関しては、過去に精製酵素を用いた報告があるが、研究グループによって幾つかの相違点があった。私たちの研究室では*G. oxydans* NBRC 12528(発表当時は*Gluconobacter suboxydans* IFO 12528)の本酵素の基質特異性は非常に高いと報告した(Ameyama *et al.*, 1981)。一方で、Buchertは*G. oxydans* ATCC 621株からキシロース脱水素酵素として本酵素を精製し調査したところ、D-グルコース、D-ガラクトース、D-マンノース、L-アラビノースがD-キシロースの50%以上の速度で反応することを報告している(Buchert, 1991)。比較的最近発表された研究にも相違点が認められる。Meyerらは*G. oxydans* ATCC 621H株の*GdhM*を過剰発現、精製し、基質特異性を評価した(Meyer *et al.*, 2013)。一方、Petersらは人工電子受容体を用いた酵素アッセイ系にATCC 621H株の*gdhM*遺伝子を持つ変異株と*gdhM*欠損株の菌体懸濁液を用いて、様々な糖類に対する反応性を調査した(Peters *et al.*, 2013)。Meyerらは、D-マンノースとD-アルトロースに対する活性は無いと報告している一方で、Petersらは有ると報告しており、両者の主張が異なっ

いる。

ここでは、*G. oxydans* NBRC 3293 株の *gdhM* 遺伝子欠損株とその株に ATCC 621H 株の *gdhM* 遺伝子を過剰発現させた株との比較から、本酵素の基質特異性を再検討することとした (Fig.7)。なお、NBRC 12528 の GdhM と ATCC 621H 株の GdhM のアミノ酸配列は同一である。私たちの実験系では、D-グルコースに対して最も高い反応速度を示し、次いでD-アロース、D-キシロース、D-マンノース、L-アラビノース、D-ガラクトース、D-アルト

ロースの順で反応した。最も速度が低いD-アルトロースでも対グルコースの10%程度の活性を示した。一方で、L-グルコース、リボース (D-, L-共に)、D-アラビノースには反応性を示さなかったことから、広くアルドースを酸化するもののそのエナンチオマーには反応しないといった特異性が認められた。以下に解析するマルトースについても過去の研究には相違点が認められるが、これについては用いた試薬の純度によって、混入するD-グルコースの影響が大きいと考えられる。

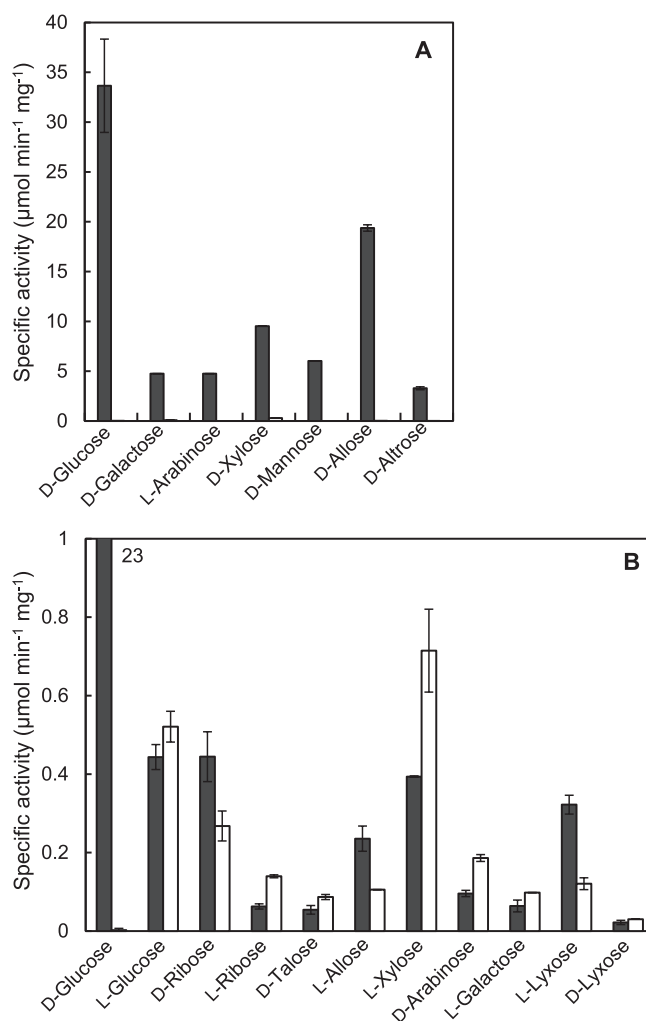


Fig. 7. PMS-DCIP reductase activities in the membranes on various substrates.

For the membrane preparation, the cells were cultured in glycerol medium at 30°C. *G. oxydans* HK3 ($\Delta gdhM$) / pBBR1MCS-4 (vector) and *G. oxydans* HK3 ($\Delta gdhM$) / pGdhM ($gdhM^+$) are indicated with black bar and white bar, respectively. A. Substrates that show high activity. Results of D-galactose, L-arabinose, D-xylose and D-mannose were from single assays. B. Substrates that show low activity. The membranes of *G. oxydans* HK3 ($\Delta gdhM$) / pGdhM ($gdhM^+$) showed activity of $23 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ in this enzyme assay. Mean values and standard deviations of other substrates were calculated from triplicate assays. All enzyme activities were examined with 100mM substrate in 50mM K^+ -phosphate (pH 6.0).

gdhM 遺伝子の発現に用いるプロモーターの検討

前節で構築し使用した組換え *Gluconobacter* 株はその膜画分に高い GdhM 活性を持つが、生育が不安定で、最終的には生育することができなくなってしまった。今後の安定的な酵素の解析や組換え株を用いた生産試験を見据え、安定に GdhM を高発現する組換え株を構築する試みを行った。 *Gluconobacter* sp. CHM43 株はタイで分離された耐熱性酢酸菌であり (Moonmangmee *et al.*, 2000)、熱だけでなく様々なストレスに対する耐性を持つと期待されたので、以後は CHM43 株を宿主とし、CHM43 株の *gdhM* 遺伝子を発現する試みを行った。はじめに、CHM43 株の *gdhM* 遺伝子を破壊し、UCD1 (Δ *gdhM*) 株を作製した。

pJJ264, pJJ384, ならびに pJJ452 は、ATCC 621H 株のリボソームタンパク質をコードする *GOX0264*, *GOX0384*, *GOX0452* 遺伝子のプロモーター領域 ($P_{GOX0264}$, $P_{GOX0384}$, $P_{GOX0452}$) 約 450b をそれぞれ含み、その下流にマルチクローニングサイトを持つ pBBR1MCS-4 (Kovach *et al.*,

1995) の誘導体である (Kallnik *et al.*, 2010)。CHM43 株のゲノム DNA から PCR にて増幅した *gdhM* 遺伝子を含む DNA 断片を pJJ264, pJJ384, ならびに pJJ452 にクローニングし、pER264, pER384, および pER452 と名付けた。UCD1 (Δ *gdhM*)/pER264 および UCD1 (Δ *gdhM*)/pER384 は比較的生育が遅く、安定性も悪かったが、UCD1 (Δ *gdhM*)/pER452 は安定して速く生育した (Fig. 8)。一方、GdhM 活性については三者でほとんど変わらなかった。本実験により、GdhM の高発現は生育に悪影響を与えると示唆された。よって、UCD1 (Δ *gdhM*)/pER452 (*gdhM*⁺) は、その安定した増殖と GdhM 活性により、以後の解析に用いる株として最も優れていると判断した。

GdhM の二糖類に対する脱水素酵素活性と速度論

ラクトース、マルトース、イソマルトース、セロビオースには共通して、D-グルコースに由来する還元末端を有する。Kiryu らによって、酢酸菌の GdhM がこれらの二糖類を酸化することが報告されている (Kiryu *et al.*, 2019; Kiryu *et al.*, 2020)。ここでは、本研究で構築した菌株を用いて、GdhM によるこれら二糖類の酸化能を評価した (Fig. 9)。最も活性が高かったのは D-グルコースであり、次にセロビオース、イソマルトース、マルトース、およびラクトースの順であった。セロビオースに対

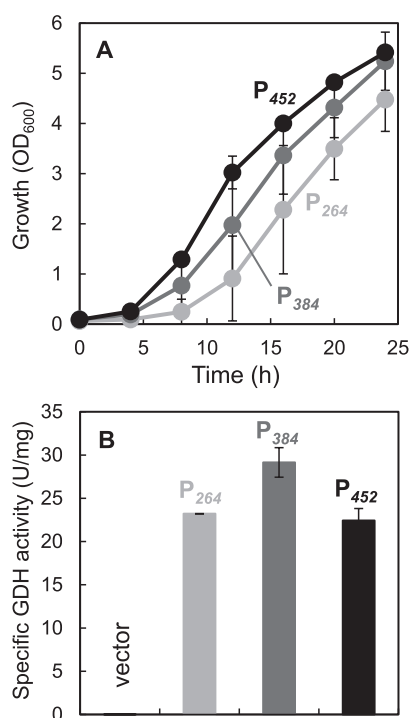


Fig. 8. The growth of GdhM-overexpression strains.

The cells were cultivated on sorbitol medium containing 500 μ g mL⁻¹ ampicillin (A). After the culture, cells were harvested and the membrane fractions were prepared. The specific glucose dehydrogenase activity in the membranes were measured (B). UCD1 (Δ *gdhM*)/pER264 (*gdhM*⁺), right gray; UCD1 (Δ *gdhM*)/pER384 (*gdhM*⁺), gray; UCD1 (Δ *gdhM*)/pER452 (*gdhM*⁺), black.

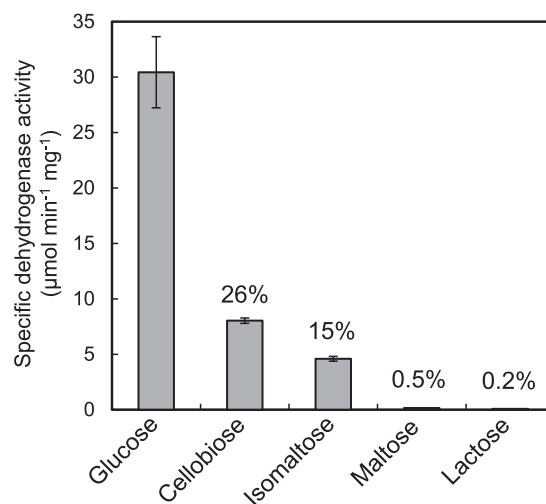


Fig. 9. The specific disaccharide dehydrogenase activity in the membranes of the UCD1 (Δ *gdhM*)/pER452 (*gdhM*⁺) strain. The cells were cultivated on sorbitol medium containing 500 μ g mL⁻¹ ampicillin. After the culture, cells were harvested and the membrane fractions were prepared. The specific glucose and disaccharide dehydrogenase activities in the membranes were measured. The each number above bar indicates the relative activity on each substrate to that on glucose.

する活性はイソマルトースと同様であり、マルトースとラクトースの酸化活性は非常に低く、D-グルコース酸化活性の1%を下回った。

これらの二糖類に対するミハエリス定数の算出を試みた (Fig.10). セロビオースとイソマルトースの基質濃度活性曲線は互いに類似していた。 K_M 値はD-グルコー

スのそれの10倍程度高いものであった。ラクトースとマルトースの基質濃度活性曲線も互いに類似していたが、ほぼ直線となり、ミハエリス・メンテンの式でのフィッティングはできなかった。したがって、Lineweaver-Burkプロットの傾きの逆数をとることで、 V_{max}/K_M 値を求め、触媒効率の指標として用いることにした (Table 4)。マ

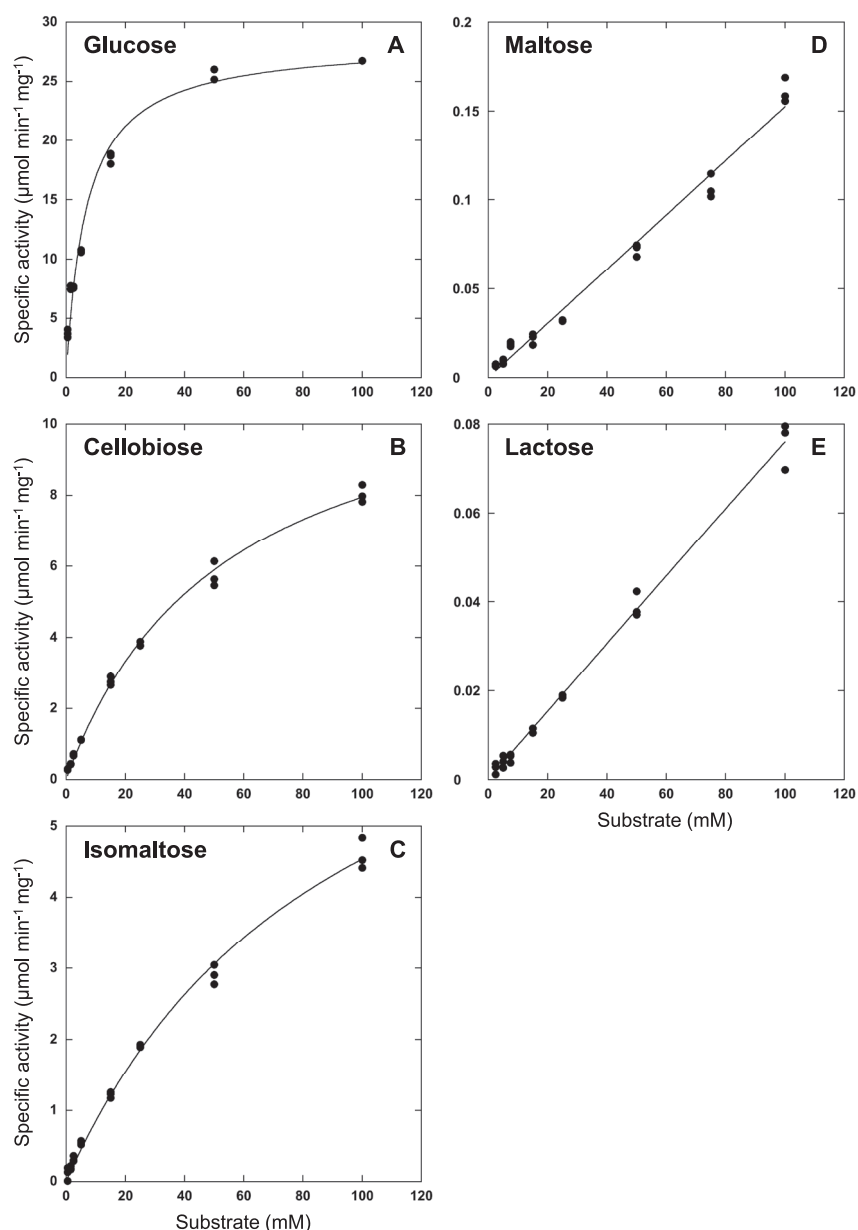


Fig. 10. The activity curves of GdhM on the several disaccharides. The UCD1 ($\Delta gdhM$)/pER452 ($gdhM^+$) strain was cultivated on sorbitol medium containing $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin. After the culture, cells were harvested and the membranes were prepared. The specific dehydrogenase activity on the several disaccharides in the membranes were measured with different concentrations of substrates. The data were fitted to the Michaelis-Menten equation with KaleidaGraph ver. 4.5 (Synergy Software, Reading, PA, USA).

Table 4. K_M , V_{max} , and V_{max}/K_M values of the membranes of UCD1 ($\Delta gdhM$)/pER452 ($gdhM^+$) strain with regard to various substrates

	K_M (mM) ^a	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) ^a	V_{max}/K_M ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{mM}^{-1}$) ^b
Glucose	6.8 ± 0.8	28 ± 1	3.2
Cellobiose	53 ± 3	12 ± 0.4	0.25
Isomaltose	94 ± 9	8.8 ± 0.5	0.12
Maltose	–	–	1.2 × 10 ⁻³
Lactose	–	–	7.3 × 10 ⁻⁴

^aThe K_M and V_{max} values were determined by a phenazine methosulfate/2,6-dichlorophenol indophenol assay using the membranes of UCD1 ($\Delta gdhM$)/pER452 ($gdhM^+$) strain with various concentrations of the substrate, followed by fitting the data to the Michaelis-Menten equation using KaleidaGraph (ver. 4.5, Synergy Software).

^bA slope of the Lineweaver-Burk plot is K_M/V_{max} , and the reciprocal of the slope is V_{max}/K_M . Thus, the V_{max}/K_M ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{mM}^{-1}$) value was calculated with Lineweaver-Burk plot.

ルトースとラクトースの V_{max}/K_M 値は、グルコースのそれの 1,000 分の 1 から 10,000 分の 1 となった。GdhM はこれら二糖類の還元性を持つグルコース部分を酸化すると考えられる。反応速度や親和性の違いは、立体障害によるものと思われるが、単糖間の結合様式による説明は現在のところ難しそうである。

ラクトビオン酸の生産

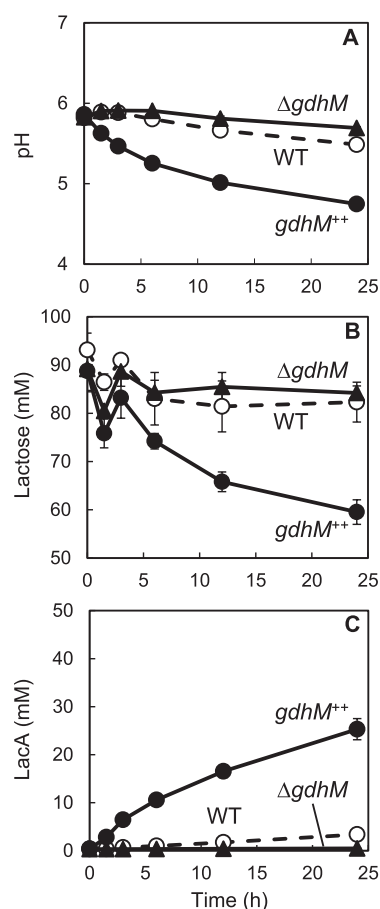
前節の速度論解析から、酢酸菌の GdhM によるラクトース酸化は、グルコースと比較してかなり不利であることが示唆された。しかしながら、本研究で構築した GdhM 過剰発現株は野生株の 10 倍程度高い活性を示すため、ここではラクトビオン酸 (LacA) の生産試験を行った。菌の生育に依存しない休止細胞反応でのラクトビオン酸生産を試みた。UCD1 ($\Delta gdhM$)/pER452 ($gdhM^+$) は 24 時間で 25.3 mM のラクトビオン酸を生成し、生成速度は 1.1 mM h⁻¹ であった (Fig. 11)。CHM43/pJJ452 と比較すると、約 8 倍速かった。酵素の特性からは物質生産に不向きのように見える場合でも、酵素の高生産によって生産性が向上する例と言える。

反応生成物

休止菌体反応後、生成物を塩酸で加水分解し、HPLC で分析した (非表示データ)。反応前加水分解生成物中にグルコースおよびガラクトースが検出された。反応後の加水分解生成物は、ガラクトースおよびグルコン酸のピークを示した。したがって、反応前のラクトースがラクトビオン酸に変換されたことが確認された。

要 約

酢酸菌は細胞表層の酸化系を用いて様々な化合物を不完全に酸化する特徴を持つ。近年のシーケンシング技術の発展により、多くの膜結合型酵素が機能未知のまま残

**Fig. 11.** Lactobionic acid production with the resting cells.

The wild-type CHM43/pJJ452 (vector) indicated as WT, UCD1 ($\Delta gdhM$)/pJJ452 (vector) indicated as $\Delta gdhM$, UCD1 ($\Delta gdhM$)/pER452 ($gdhM^+$) indicated as $gdhM^+$, strains were cultivated on Sorbitol medium containing 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin. After the culture, cells were harvested and the cell suspensions were prepared. This strain produced 25.3 mM of LacA in 24 h, and LacA production rate was 1.1 mM h⁻¹. The error bars represent the standard deviation of three experiments. A, pH; B, Lactose consumption; C, Lactobionic acid (LacA) production.

されている。本研究では、グルコノバクター属 CHM43 株のピロロキノリンキノン (PQQ) 依存性脱水素酵素 9 (PQQ-DH9) を特徴づけた。本遺伝子産物は PQQ 依存性グリセロール脱水素酵素 (GLDH) のホモログである。CHM43 の派生株である発現宿主は、GLDH および膜結合型アルコール脱水素酵素の遺伝子を欠いており、第一級および第二級アルコールを酸化する能力がほとんどない。形質転換体の膜画分は D-アラビトール脱水素酵素活性を示したが、ベクターのみを持つ対照株は、染色体に PQQ-DH9 をコードする遺伝子が残されているが、活性をほとんど示さなかった。これは、PQQ-DH9 がゲノムで発現されていないことを示唆する。PQQ-DH9 と GLDH を含む膜の活性は、GLDH と同様に、PQQ-DH9 は多種多様な第二級アルコールを酸化したが、グリセロールなどの鎖状基質に関しては GLDH よりも反応速度が遅くミカエリス定数も高かった。シス-1,2-シクロヘキサジオールなどの環状基質は、PQQ-DH9 によって容易に酸化された。

ラクトビオン酸は、食品や保湿剤などに使用される有用な物質である。酢酸菌は、ラクトースを酸化することでラクトビオン酸を生成できるグルコース脱水素酵素 (GdhM) を持っている。ただし、GdhM によるラクトースの酸化はグルコースの酸化よりもはるかに遅いため、ラクトビオン酸を効率的に生成するには GdhM の過剰発現が有効と考えた。プロモーターを検討し、リボソームタンパク質プロモーターと *gdhM* 遺伝子を持つプラスミドを構築した。このプラスミドを用いて *gdhM* ノックアウト株を形質転換し、過剰発現株を構築した。この形質転換株は安定して増殖し、親株よりも 10 倍程度高い活性を示した。さらに、ラクトースに加えて、マルトース、イソマルトース、セロビオースに対する K_M 値を決定した。ラクトースおよびマルトースに対する K_M 値は計算できないほど高かった。ラクトースに対する GdhM の親和性と反応速度が低いにもかかわらず、GdhM 過剰発現株を使用すると、ラクトビオン酸がより短時間で 1.1mM h^{-1} の速度で生成された。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) Thuy Minh Nguyen, Naoya Kataoka, Osao Adachi, Kazunobu Matsushita, Toshiharu Yakushi. Characterization of a cryptic, membrane-bound PQQ-dependent dehydrogenase of *Gluconobacter* sp. CHM43. 日本農芸化学会2020年度中四国支部大会 (第57回講演会) (2020年9月17-18日, 徳島, オンライン)
- 2) 内田侑里, ケオケン トラボン, 片岡尚也, 松下一信, 薬師 寿治. 2021. グルコノバクター属酢酸菌の膜結合型グルコース脱水素酵素によるラクトビオン酸生産と二糖類

酸化の改善. 日本農芸化学会2021年度大会 (2021年3月18-21日, 仙台, オンライン)

原著論文

- 1) Nguyen, T.M., Naoki, K., Kataoka, N., Matsutani, M., Ano, Y., Adachi, O., Matsushita, K. & Yakushi, T. 2021. Characterization of a cryptic, pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenase of *Gluconobacter* sp. strain CHM43. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 85: 998-1004.

その他 (総説・書籍・特許など)
なし

謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。本研究は、山口大学農学部応用微生物学研究室で実施されたものであり、Nguen Mihn Thuy 博士、内田侑里君、古谷晃一君、小池尚史君、松本奈実博士、松下一信先生、ならびに足立収生先生に感謝申し上げます。また、本研究の遂行にご協力いただいた地方独立行政法人大阪産業技術研究所の桐生高明博士に感謝の意を表します。

文 献

- Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K. & Adachi, O. 1981. D-Glucose dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*: Solubilization, purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.* 45: 851-861.
- Ano, Y., Hours, R.A., Akakabe, Y., Kataoka, N., Yakushi, T., Matsushita, K. & Adachi, O. 2017. Membrane-bound glycerol dehydrogenase catalyzes oxidation of D-pentones to 4-keto-D-pentones, D-fructose to 5-keto-D-fructose, and D-psicose to 5-keto-D-psicose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81: 411-418.
- Armstrong, J.M. 1964. The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol. *Biochim. Biophys. Acta* 86: 194-197.
- Buchert, J. 1991. A xylose-oxidizing membrane-bound aldose dehydrogenase of *Gluconobacter oxydans* ATCC 621. *J. Biotechnol.* 18: 103-113.
- Dulley, J.R. & Grieve, P.A. 1975. A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal. Biochem.* 64: 136-141.
- Ghosh, M., Anthony, C., Harlos, K., Goodwin, M.G. & Blake, C. 1995. The refined structure of the quinoprotein methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* at 1.94 Å. *Structure* (London, England : 1993). 3: 177-187.
- Gupta, A., Singh, V.K., Qazi, G.N. & Kumar, A. 2001. *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 445-456.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.

- Hann, R.M., Tilden, E.B. & Hudson, C.S. 1938. The oxidation of sugar alcohols by *Acetobacter suboxydans*. J. Am. Chem. Soc. **60**: 1201-1203.
- Kallnik, V., Meyer, M., Deppenmeier, U. & Schweiger, P. 2010. Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. J. Biotechnol. **150**: 460-465.
- Kataoka, N., Matsutani, M., Yakushi, T. & Matsushita, K. 2015. Efficient production of 2,5-diketo-D-gluconate via heterologous expression of 2-ketogluconate dehydrogenase in *Gluconobacter japonicus*. Appl. Environ. Microbiol. **81**: 3552-3560.
- Kiryu, T., Kiso, T., Koma, D., Tanaka, S. & Murakami, H. 2019. Identifying membrane-bound quinoprotein glucose dehydrogenase from acetic acid bacteria that produce lactobionic and cellobionic acids. Biosci. Biotechnol. Biochem. **83**: 1171-1179.
- Kiryu, T., Kiso, T., Nakano, H., Ooe, K., Kimura, T. & Murakami, H. 2009. Involvement of *Acetobacter orientalis* in the production of lactobionic acid in Caucasian yogurt ("Caspian Sea yogurt") in Japan. J. Dairy Sci. **92**: 25-34.
- Kiryu, T., Kiso, T., Sato, H. & Murakami, H. 2020. Oxidation of isomaltose, gentiobiose, and melibiose by membrane-bound quinoprotein glucose dehydrogenase from acetic acid bacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. **84**: 507-517.
- Kostner, D., Peters, B., Mientus, M., Liebl, W. & Ehrenreich, A. 2013. Importance of *codB* for new *codA*-based markerless gene deletion in *Gluconobacter* strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. **97**: 8341-8349.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M. & Peterson, K.M. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene **166**: 175-176.
- Kulhánek, M. 1989. Microbial dehydrogenations of monosaccharides, p 141-182. In Neidleman S.L. (ed), Advances in Applied Microbiology, vol 34. Academic Press.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. **3**: 208-218.
- Marx, C.J. & Lidstrom, M.E. 2001. Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. Microbiology. **147**: 2065-2075.
- Matsumoto, N., Hattori, H., Matsutani, M., Matayoshi, C., Toyama, H., Kataoka, N., Yakushi, T. & Matsushita, K. 2018. A single-nucleotide insertion in a drug transporter gene induces a thermotolerance phenotype in *Gluconobacter frateurii* by increasing the NADPH/NADP⁺ ratio via metabolic change. Appl. Environ. Microbiol. **84**: e00354-18.
- Matsushita, K., Fujii, Y. & Ano, Y., *et al.* 2003. 5-keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 1959-1966.
- Meyer, M., Schweiger, P. & Deppenmeier, U. 2013. Effects of membrane-bound glucose dehydrogenase overproduction on the respiratory chain of *Gluconobacter oxydans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **97**: 3457-3466.
- Mientus, M., Kostner, D., Peters, B., Liebl, W. & Ehrenreich, A. 2017. Characterization of membrane-bound dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans* 621H using a new system for their functional expression. Appl. Microbiol. Biotechnol. **101**: 3189-3200.
- Moonmangmee, D., Adachi, O., Ano, Y., Shinagawa, E., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N. & Matsushita, K. 2000. Isolation and characterization of thermotolerant *Gluconobacter* strains catalyzing oxidative fermentation at higher temperatures. Biosci. Biotechnol. Biochem. **64**: 2306-2315.
- Moonmangmee, D., Fujii, Y., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N., Matsushita, K. & Adachi, O. 2001. Purification and characterization of membrane-bound quinoprotein cyclic alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter frateurii* CHM 9. Biosci. Biotechnol. Biochem. **65**: 2763-2772.
- Nguyen, T.M., Naoki, K., Kataoka, N., Matsutani, M., Ano, Y., Adachi, O., Matsushita, K. & Yakushi, T. 2021. Characterization of a cryptic, pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenase of *Gluconobacter* sp. strain CHM43. Biosci. Biotechnol. Biochem. **85**: 998-1004.
- Pappenberger, G. & Hohmann, H.-P. 2014. Industrial Production of L-Ascorbic Acid (Vitamin C) and D-Isoascorbic Acid, p 143-188. In Zorn H, Czermak P (ed), Biotechnology of Food and Feed Additives, vol 143. Springer Berlin Heidelberg.
- Peters, B., Mientus, M., Kostner, D., Daniel, R., Liebl, W. & Ehrenreich, A. 2017. Expression of membrane-bound dehydrogenases from a mother of vinegar metagenome in *Gluconobacter oxydans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **101**: 7901-7912.
- Peters, B., Mientus, M., Kostner, D., Junker, A., Liebl, W. & Ehrenreich, A. 2013. Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multideletion strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. **97**: 6397-6412.
- Soemphol, W., Saichana, N., Yakushi, T., Adachi, O., Matsushita, K. & Toyama, H. 2012. Characterization of genes involved in D-sorbitol oxidation in thermotolerant *Gluconobacter frateurii*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **76**: 1497-1505.
- Sriherfyna, F.H., Matsutani, M., Hirano, K., Koike, H., Kataoka, N., Yamashita, T., Nakamaru-Ogiso, E., Matsushita, K. & Yakushi, T. 2021. The auxiliary NADH dehydrogenase plays a crucial role in redox homeostasis of nicotinamide cofactors in the absence of the periplasmic oxidation system in *Gluconobacter oxydans* NBRC3293. Appl. Environ. Microbiol. **87**: e02155-20.
- Wang, X., Lv, M., Zhang, L., Li, K., Gao, C., Ma, C. & Xu, P. 2013. Efficient bioconversion of 2,3-butanediol into acetoin using *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. Biotechnol. Biofuels **6**: 155.
- Yakushi, T., Komatsu, K., Matsutani, M., Kataoka, N., Vangnai, A.S., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. 2018. Improved heterologous expression of the membrane-bound quinoprotein quinate dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans*. Protein Expr. Purif. **145**: 100-107.
- Yakushi, T. & Matsushita, K. 2010. Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. **86**: 1257-1265.
- Yakushi, T., Terada, Y., Ozaki, S., Kataoka, N., Akakabe, Y., Adachi, O., Matsutani, M. & Matsushita, K. 2018. Aldopentoses as new substrates for the membrane-bound, pyrroloquinoline quinone-dependent glycerol (polyol) dehydrogenase of *Gluconobacter* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol. **102**: 3159-3171.
- Yang, X.-P., Wei, L.-J., Lin, J.-P., Yin, B. & Wei, D.-Z. 2008. Membrane-bound pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* M5, responsible for production of 6-(2-hydroxyethyl) amino-6-deoxy-L-sorbose. Appl. Environ. Microbiol. **74**: 5250-5253.

化学物質の還元反応に寄与する異種微生物間の 固体腐植を介した細胞外電子伝達機構の解明

片山新太

東海国立大学機構名古屋大学未来材料・システム研究所

〒464-8603 名古屋市千種区不老町

Mechanism of extracellular electron transfer mediated by solid-phase humic substance between different microorganisms contributing to the reducing reactions of chemicals

Arata Katayama

Institute of Materials and Systems for Sustainability, Nagoya University,

Tokai National Higher Education and Research System

Furo-Cho, Chikusa, Nagoya 464-8603

Mechanism of extracellular electron transfer (EET) mediated by humin, a humic substance insoluble at any pH, was studied using anaerobic pentachlorophenol-dechlorinating consortium, carbon dioxide (CO₂)-reducing acetogenic consortium, anaerobic nitrogen fixing consortium and nitrate reducing *Pseudomonas stutzeri*. Although EET by humin has been observed in the anaerobic dehalogenation, nitrate reduction and iron reduction, which have positive E⁰ (standard redox potential, versus standard hydrogen electrode, at pH=7), the EET from humin was newly found to support or promote the anaerobic microbial reactions with E⁰ < -250 mV: CO₂-reducing acetogenesis and anaerobic nitrogen fixation. It was demonstrated that the energy network in the anaerobic microbial world based on EET via humin contained the microbial reactions with wider redox potentials. In the CO₂-reducing acetogenesis by the enriched consortium and nitrate reduction by *P. stutzeri*, humin donated extracellular electrons even to the microbial reactions with more reduced E⁰ than the average redox potential of humin. This indicated that humin contained the redox-active moieties heterogeneously, with wide redox potentials from the reduced to the oxidized. Further study should be carried out to elucidate the heterogeneity in the redox potential in humin. The similar microbial community structures of nitrogen fixing consortia enriched with and without humin and the promotion in the nitrogen-fixing activity of both consortia using the EET from humin demonstrated that anaerobic nitrogen-fixing bacteria obtained in the absence of humin can also utilize the extracellular electrons of solid-phase humin, indicating the strategy to isolate the humin-utilizing microorganisms from the environments. In addition to *P. stutzeri*, isolation of new microorganisms utilizing EET of humin would accelerate the study on the EET of humin among different microorganisms contributing the reducing reactions of chemicals. It is also expected that the EET of humin is applied to the technologies for environmental microbial remediation and microbial electrosynthesis.

Key words: humin, extracellular electron mediator, CO₂-reducing acetogenic consortium, anaerobic nitrogen-fixing consortium, *Pseudomonas stutzeri*

緒言

地圏環境では、動物の排泄物や生物の死骸は分解されるとともに縮重合反応を起こし、いわゆる腐植物質（フ

ミン質）として環境中に残留する。腐植物質は、酸・アルカリへの溶解度によって、酸・アルカリ両方に可溶のフルボ酸、アルカリに可溶で酸に不溶の腐植酸、酸・アルカリ両方に不溶のヒューミン（ここでは、固体であることを明瞭にするために固体腐植ヒューミンとして示す）に分類されている（Fig.1）。フルボ酸と腐植酸は、ほぼ有機物からなるが、固体腐植ヒューミンは無機物（アルミノケイ酸塩）が50%以上を占める有機無機複合体

E-mail: katayama.arata@nagoya-u.jp

共同研究者：笠井拓哉・出町豊子（東海国立大学機構名古屋大学未来材料・システム研究所）

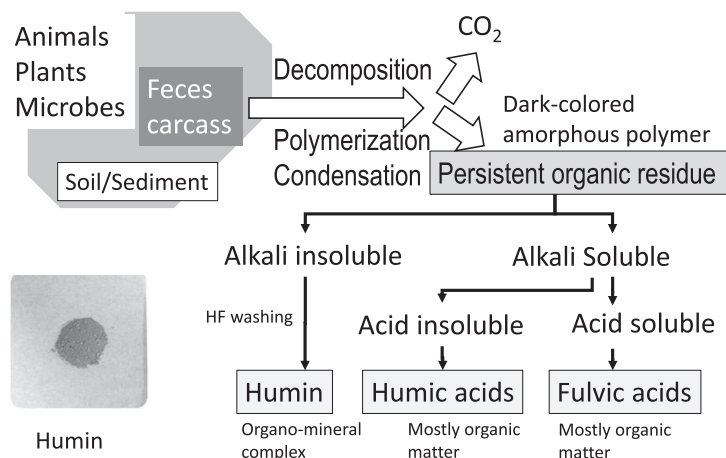


Fig. 1 Formation and Classification of humic substances

である。鉄還元菌の研究から、腐植酸を電子受容体として利用する *Geobacter* 属細菌が発見 (Lovley *et al.*, 1996) されて以来、腐植物質の細胞外電子伝達機能に関する多くの研究が進められ、腐植酸が電子受容体であるばかりで無く、電子供与体としても働くことが示されたが、研究の殆どは水溶性腐植酸かそのモデル化合物アントラキノン-2,6-ジスルホン酸 (AQDS) を細胞外電子伝達物質として用いた研究であった (Lovley *et al.*, 1999)。AQDS を電子供与体として用いた硝酸イオンの脱窒反応の促進 (Van Trump *et al.*, 2011) や、AQDS を電子受容体として用いたクレゾールの微生物分解の促進 (Cervantes *et al.*, 2008) 等が報告されている。一方、地圏環境では腐植物質の殆どが水に溶けていない形で存在することから、固体の腐植物質の細胞外電子伝達能が調べられ、腐植酸は固体でも *Geobacter* 属細菌の電子受容体として働き鉄還元反応を促進することが明らかにされたが、酸にもアルカリにも不溶の固体腐植ヒューミンには、細胞外電子伝達能が無いと報告された (Roden *et al.*, 2010)。この様な状況の中で、我々はペンタクロロフェノールの嫌気性脱塩素微生物に関する研究の中で、固体腐植ヒューミンが嫌気性脱塩素菌 (おそらくは *Dehalobacter* 属細菌) に細胞外電子供与体として機能することを見いだした (Zhang & Katayama, 2012)。更に、固体腐植ヒューミンの細胞外電子伝達機能によって、難燃性有機ハロゲン化合物の嫌気性脱臭素反応 (Zhang *et al.*, 2013)、鉄還元反応、アンモニア生成型硝酸還元反応 (Zhang *et al.*, 2015b)、および脱窒反応 (Xiao *et al.*, 2016) などの幅広い微生物呼吸が促進されることを明らかにしてきた。

水田や底質の嫌気環境での電子授受に関する共生系として、水素を介した微生物共生系があることが知られて

いるが、地圏に広く分布する上に、多様な微生物の細胞外電子伝達を可能とする固体腐植ヒューミンを介した異種微生物共生系の方が、より重要である可能性が示唆される。これまで、微生物還元された固体腐植ヒューミンからの電子が当該微生物に直接供給されるという細胞外電子伝達が起きていることが明らかにされてきた。フラビン、AQDS、水溶性腐植酸などの水溶性電子伝達物質による細胞外電子伝達の場合は、その物質自身が細胞内 (または細胞膜内) へ取り込まれて電子輸送が起ると考えられる (Liu *et al.*, 2018) が、固体の細胞外電子伝達物質ではこのメカニズムを想定することは難しい。一方、細胞外固体電極と直接電子授受を行う能力を持つ電気微生物 (*Geobacter* 属や *Shewanella* 属細菌) では、導電性繊維や c 型チトクロームタンパクを介する細胞外電子伝達メカニズムが明らかにされてきた (Lovley 2017)。しかし、固体腐植ヒューミンの細胞外電子伝達では、それ自身が固体電極と直接電子伝達の能力を持たないと考えられる微生物 (*Pseudomonas stutzeri* 等) でも、細胞外電子伝達による還元反応促進が観察 (Xiao *et al.*, 2016) され、固体腐植ヒューミン特有の電子伝達メカニズムが想定される。固体腐植ヒューミンの化学構造に関する研究から、その有機画分に含まれるキノン構造およびペプチドグリカン構造の細胞外電子伝達機能への関連性が示唆されている (Pham & Katayama, 2018) (Fig. 2A)。そこで本研究では、固体腐植ヒューミンを介した細胞外電子伝達メカニズムの解明へ向け、微生物群集構造解析によって固体腐植ヒューミンを介した異種微生物間の細胞外電子共生系を解析するとともに、酸化還元反応の標準電位が還元的な二酸化炭素還元反応や窒素固定反応に対する固体腐植ヒューミンからの電子供与の有無を調べ、固体腐植ヒューミン自体の酸化還元電位

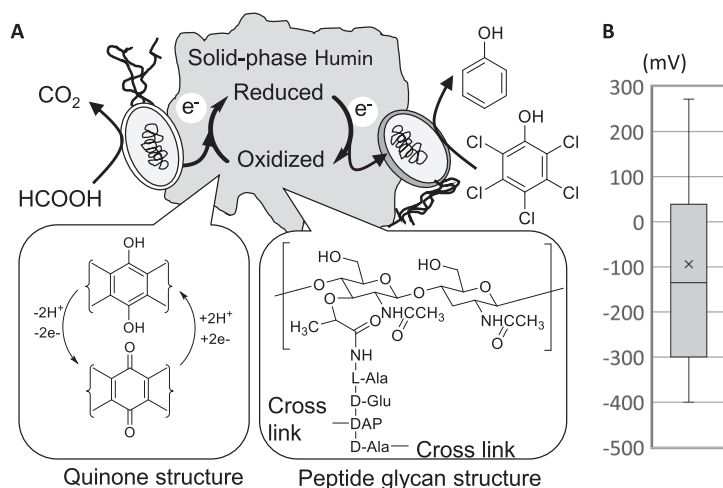


Fig. 2 Scheme of extracellular electron transfer via humin for different microorganisms with the redox reaction centers in humin (A) and the redox potentials of humin reported (B) (Pham *et al.*, 2021)

と細胞外電子伝達反応の関係を考察した。

実験方法

固体腐植ヒューミンの調製

鎌島水田土壌, 名古屋大学農場連用圃畑土壌, 茨城黒ボク畑土壌, 弥富グライ水田土壌, 荒子川底質から固体腐植ヒューミンを常法により抽出した (Zhang *et al.*, 2015a). 即ち, 土壌または底質試料を風乾し 1mm のふるいでふるった後, 100g の土壌を 150mL の 2% フッ化水素酸, 0.1M NaOH 水溶液で洗浄した. 洗浄は, 24時間振とうし 8,000×g で 15分遠心分離後, デカンテーションすることによって行った. 計 10 回の洗浄を行った後, 超純水で中性になるまで洗浄し, 最終的に pH を 7.0-7.5 に調製し, 凍結乾燥した.

酸化型・還元型の固体腐植ヒューミンの調製

鎌島土壌由来の固体腐植ヒューミンを 0.5M NaCl 溶液中に懸濁し, 嫌気チャンバー (Coy-7450000, COY, Grass Lake, MI, USA) 内に設置した電気化学システムで, 酸化および還元を行った. 電気化学システムは, ポテンシオスタット (オートマチックポーラリゼーションシステム HSV-110, 北斗電工, 大阪) にらせん状にした白金電極 (直径 0.8mm, 長さ 1m) を作用電極とカウンター電極として取り付け, また参照電極として Ag/AgCl 電極 (+0.199V 標準水素電極 (SHE) 基準) を取り付けたものである. 設定した酸化還元電位を 24 時間保って, 固体腐植ヒューミンが酸化還元平衡に達した後, 濾過して減圧乾燥した.

酢酸を電子供与体とする固体腐植ヒューミン依存性嫌気性ペンタクロロフェノール脱塩素微生物群の集積

嫌気性条件に保ち乳酸を継続添加してペンタクロロフェノール (PCP) 脱塩素活性を長期間維持している鎌島土壌を微生物源として用いた (Yoshida *et al.*, 2007). 無機塩培地 A (NH_4Cl 1.00g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.10g/L, K_2HPO_4 0.4g/L, NaHCO_3 4.00g/L, 1mL/L SL-10 微量要素液, 1mL/L セレン-タングステン溶液 (Widdel *et al.*, 1983)) 20mL を, あらかじめ鎌島土壌由来の固体腐植ヒューミン 1g を加えておいた 50mL 嫌気培養瓶に分注した. 窒素と炭酸ガスの混合気 ($\text{N}_2:\text{CO}_2=4:1$) を培地中に 45 分間通気し, 培地 pH を 7.0 ± 0.2 に調製した. 嫌気培養瓶は, プチルゴム栓とアルミシールで密閉し, 121°C 20 分オートクレーブした. 冷却後, ビタミン溶液 (Hollinger *et al.*, 1988), 酢酸ナトリウム溶液 (最終濃度 10mM), PCP 溶液 (最終濃度 20 μM) を各 1mL 加えた. 微生物源を 2mL 接種するとともに, 還元剤として 0.2mM のトリニトリル酢酸チタン溶液を 100 μL 加えた. 暗条件 30°C で 2 週間培養して PCP 脱塩素活性を確認した後, 同じ培地に 10% の割合で植継を行った. これを繰り返して安定な PCP 脱塩素微生物群集を得た.

PCP およびその脱塩素代謝産物は, トルエン-アセトニトリルで抽出した後, DB-5ms カラム (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) を取り付けられたカラムガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (島津 QP2010, 島津, 京都) で定量分析した.

固体腐植ヒューミンを電子供与体とする独立栄養型の二酸化炭素還元酢酸生成微生物群の集積

上記の酢酸を電子供与体とする嫌気性PCP脱塩素微生物群を接種源として、培地中の酢酸ナトリウム濃度を10mMから1mMに減らして培養し、安定なPCP脱塩素活性とともに、酢酸ナトリウム濃度が2週間の培養中1mM以下には減少しなくなった。そこで、更に酢酸ナトリウムの添加をやめて植継を繰り返し、最終的に固体腐植ヒューミンを電子供与体とする二酸化炭素還元嫌気性酢酸生成微生物群を得た。この嫌気性酢酸生成微生物群を、固体腐植ヒューミンの有無、炭酸イオンの有無、接種源の有無、で組み合わせた条件で培養し、0日、5日、10日、15日後に酢酸の生成状況を調べ、固体腐植ヒューミンが電子供与体、二酸化炭素が炭素源となっていることを確認した。

有機酸の定量は、逆相カラム (Puresil C18, Waters, Milford, MA, USA) を取り付けた高速液体クロマトグラフ (島津 LC-10AT, 京都) で行った。溶離液には0.1%リン酸溶液を用いた。培地試料は、孔径0.2 μ mのメンブレンフィルター (Omni-pore™, Merck, Darmstadt, Germany) を通したものをを用いた。ヘッドスペース中のH₂, CO₂, CH₄はモレキュラーシーブ5Aカラムを付けた熱伝導度検出器およびポラパックQをつけた水素炎検出器からなる島津14Bガスクロマトグラフ (京都) で定量分析した。

嫌気性窒素固定微生物群の集積と窒素固定活性試験

鎌島土壌を接種源とし、窒素欠乏Ashby培地 (Ashby, 1907) を改変したMNDA培地を用いて集積した。MNDA培地の組成は、マンニトール20g/L, K₂HPO₄ 0.2g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2g/L, NaCl 0.2g/L, K₂SO₄ 0.1g/L, CaCO₃ 5g/Lである。50mL容の嫌気培養瓶に20mLの培地を分注し、窒素ガスをバブリングしてプチルゴム栓とアルミシールで密閉し、オートクレーブ後、ヘッドスペースを窒素ガスで再度置換し嫌気性条件とした。固体腐植ヒューミン添加培地では、あらかじめ0.3gの固体腐植ヒューミンを添加しておいた。固体腐植ヒューミン添加培地と無添加培地の2種類を用い、暗条件下30℃で培養した。当初4週間のインターバルで植継いだが、11世代目からは2週間のインターバルとした。

窒素固定活性は、アセチレン還元活性試験とケルダール窒素定量の2種類の方法で評価した。アセチレン還元活性試験は、窒素固定酵素が構造類似のアセチレン還元反応を起こしてエチレンを生成することを利用した簡便な活性試験である (Hardy *et al.*, 1973)。あらかじめヘリウムでバブリングしたMNDA培地2mLを加えた10mL容の嫌気性培養瓶に、ヘリウムでヘッドスペース

を置換後、2mLの微生物群を接種し、アセチレン200 μ Lを加えて暗条件30℃で1週間培養した。培養後、ヘッドスペース中の残留アセチレンと生成エチレンを水素炎検出器付き島津GC-14Bガスクロマトグラフ (京都) で定量分析した。培養物中の全窒素量の増加は、培養物を105℃で乾燥後にCHNアナライザーで元素分析することによって評価した。

固体腐植ヒューミン無添加培地で集積した微生物群を用いて各種因子の影響を調べた。酸化型・還元型の固体腐植ヒューミンの影響は、MNDA培地の緩衝液をCaCO₃から30mM HEPESに変えたマンニトールを含まない培地で集積微生物群を洗浄後、30℃で2週間飢餓培養し、マンニトールを含まないMNDA HEPES培地中で窒素固定活性を調べ、酸化型・還元型の固体腐植ヒューミンの効果を評価した。窒素固定活性は、アセチレン還元活性と窒素量の増加の二つの方法で評価した。また、窒素固定活性に対する異なる固体腐植ヒューミンの影響、微量元素 (SL-10, Widdel *et al.*, 1983) およびビタミン (Hollinger 1988) の影響、還元剤の種類の影響 (15mM Na₂S, 1.7mM L-システイン塩酸塩, 0.025mM トリニトリル酢酸チタン) を、アセチレン還元活性に対する影響により評価した。

Pseudomonas stutzeri を用いた脱窒試験

無処理、または酸化型 (+615mV, SHE基準)、還元型 (-400mV, SHE基準) に調製した鎌島土壌由来の固体腐植ヒューミンを0.15gずつ50ml容の嫌気培養瓶に入れ、静菌培地 (Na₂HPO₄ 4.58g/L, NaH₂PO₄ 2.13g/L, KCl 0.13g/L, SL-10溶液1ml/L, セレン-タングステン溶液1ml/L (Widdel *et al.*, 1983), ビタミン溶液1ml/L (Hollinger *et al.*, 1988), レサズリン溶液1ml/L) を10mlずつ分注し、プチルゴム栓とアルミシールで密閉した後、N₂を培地中に吹き込んで嫌気状態にした。LB培地で培養した *Pseudomonas stutzeri* JCM 20778株を20,000gで15分遠心分離し、静菌培地で3回洗浄した後、JCM 20778株の懸濁液を注射器で0.5mlずつ嫌気培養瓶中の静菌培地に接種し、最終菌体密度を菌体数1.6 \times 10¹¹個/60mlとした。更に嫌気培養瓶のヘッドスペースの5mlを、ガスタイトシリンジを用いてアセチレンと置換した (アセチレンは亜酸化窒素の窒素への変換を防ぐ阻害剤として加えた)。0.1N NaNO₃を0.4mlずつ (0.4mmol/容器) 入れて30℃ 80rpmで7日間、振盪培養した。培養後、イオンクロマトグラフィー (メトロームジャパン, 東京) で硝酸イオンと亜硝酸イオンを定量し、電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフィー (GC-2014, 島津, 京都) で亜酸化窒素ガスを定量した。また、無処理の固体腐植ヒューミンの実験時の酸化還元電位を上述した電気化学

システムで測定した。なお、*Pseudomonas stutzeri* JCM 20778 株は、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センターから提供された。

微生物群集構造解析

微生物群集構造は、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR 増幅してシーケンスを調べることによって解析した。プライマーとして、Pro341F (5'- CCT ACG GGN BGC ASC AG-3') と Pro805R (5'- GAC TAC NVG GGT ATC TAA TCC-3') を用いた (Takahashi *et al.*, 2014)。PCR 反応には、5 μ L テンプレート DNA (5ng/ μ L), 2.5 μ L Pro341F と Pro805R プライマー (各 2 μ M), および 12.5 μ L KAPA HiFi HotStart Ready mix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) を用いた。PCR 増幅反応は、以下の様に行った。初期活性化を 94 $^{\circ}$ C 30 秒、次に 94 $^{\circ}$ C 10 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒を 10 サイクル、更に 94 $^{\circ}$ C 10 秒、59 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒を 10 サイクル、また更に 94 $^{\circ}$ C 10 秒、58 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒を 10 サイクル、そして最終の延長反応を 72 $^{\circ}$ C 4 分を行った。PCR 増幅 DNA は、AMPure XP kit (Beckman Coulter Genomics Inc., Brea, CA, USA) を用いてメーカーの指示に従って純化した。PCR 増幅は、1% アガロースゲル電気泳動で確認した。純化 DNA の濃度を、QuantiFluor dsDNA System (Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA) で測定し、Miseq reagent kit v3 (600 cycle, Illumina Inc., San Diego, CA, USA) を用いた Miseq プラットホームでシーケンスした。各リードの基本シーケンスに対して、USEARCH v6.1 (Edgar, 2010) を用いてキメラチェックを行った。QIIME 2 (Bolyen *et al.*, 2019) を用いて、97% 以上の類似度の DNA 配列を持つものをオペレーショナル分類単位 (OTU) としてクラスター解析を行い、Green-gene データベース (ver. 13_8) を参照して、分類学的位置を決定した (McDonald *et al.*, 2012)。

結果および考察

酢酸を電子供与体とする脱塩素微生物群の解析

固体腐植ヒューミンによって PCP の嫌気性脱塩素反応が促進される系では、電子供与体としてギ酸を用いて固体腐植ヒューミンを最終電子受容体として還元する微生物と固体腐植ヒューミンを電子供与体として用い PCP を最終電子受容体とする嫌気性脱塩素菌 (*Dehalobacter* と推定される) の異種微生物間の細胞外電子伝達が起こる (Fig. 2A)。これまで、クローニングによる解析ではペンタクロロフェノール脱塩素微生物群中に、固相の電極に電子授受できる電気活性微生物 (*Geobacter* 属、

Shewanella 属細菌) は検出されなかった (Zhang & Katayama, 2012) ので、*Geobacter* 属細菌の生育しやすい酢酸を電子供与体として用いて集積培養を行い、次世代シーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子を解析した (Fig. 3)。集積した微生物群は、主にプロテオバクテリア門 (36%)、ファーミキューテス門 (38%)、バクテロイデス門 (21%) で構成されていた。プロテオバクテリア門の殆どは *Azospira* 属であった。ファーミキューテス門は主に *Lachnospiraceae* 科 (7.3%)、*Ruminococcaceae* 科 (5.4%)、またバクテロイデス門の殆どは、*Bacteroides* 属であった。固体腐植ヒューミン酸化細菌で且つ嫌気性脱塩素細菌と考えられる *Dehalobacter* 属が微生物群集の 3% を占めたのに対し、*Geobacter* 属は 0.3% に過ぎなかった。電子の流れ (エネルギーの流れ) の上流に位置する固体腐植ヒューミン還元菌の方が、下流となる固体腐植ヒューミン酸化菌よりも優占すると考えられるので、*Geobacter* 属細菌は主要な固体腐植ヒューミン還元菌では無いものと推定された。また、嫌気性条件下では水素を介した共生系が、しばしばみられるが、この PCP 脱塩素微生物群に水素を電子供与体として加えても固体腐植ヒューミン無しでは脱塩素反応が起こらなかった。更に還元型ヒューミンを加えると、水素添加無しの条件で脱塩素反応が進んだ (Zhang & Katayama, 2012) ことから、脱塩素反応の電子供与体

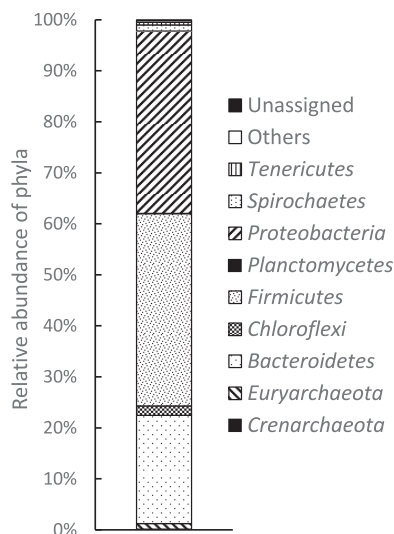


Fig. 3 Microbial community structure of humin-dependent pentachlorophenol-dechlorinating anaerobic consortium, based on 16S rRNA gene sequence. "Others" include phyla with relative abundance less than 0.5%, namely Spirochaetes, Crenarchaeota, Cyanobacteria, Actinobacteria, OD1, SAR406, and Thermotogae. (Modified from Laskar *et al.*, 2019)

は固体腐植ヒューミンであると結論づけられる。以上のことから、このPCP脱塩素集積微生物群では、以下のような異種微生物間で固体腐植ヒューミンを介した細胞外電子授受が行われていたものと考えられる。まず、この微生物群集の中で主要なプロテオバクテリア門 (*Azospira* 属)、ファーミキューテス門 (*Lachnospiraceae* 科や *Ruminococcaceae* 科)、バクテロイデテス門 (*Bacteroides* 属) の全部または一部が酢酸をエネルギー源として固体腐植ヒューミンを最終電子受容体として還元し、次に還元型固体腐植ヒューミンに蓄積された細胞外電子を *Dehalobacter* 属が利用して固体腐植ヒューミンを酸化するとともに、PCPを脱塩素したものと推定される。これらのいずれの菌も、これまで電気活性は報告されていないことから、固体腐植ヒューミンは非電気活性微生物の電気共生系を可能とするものと考えられた。更なる固体腐植ヒューミン還元菌の特定とその解明には、固体腐植ヒューミン還元菌を特異的に集積する系を構築して解析することが必要と考えられた。

細胞外電子の流れを反応電位に基づいて考察した。PCPの脱塩素反応の標準電位は、+333mVよりも高い (Table 1) こと、および鎌島土壌由来の常法で調製した固体腐植ヒューミンの酸化還元電位は、-100mV~+100mV程度の範囲にある (Zhang & Katayama, 2012)。またこれまでサイクリックボルタンメトリ測定で推定された固体腐植ヒューミンの酸化還元電位は、多くが

-300mV~+40mV (SHE基準) にあり、例外的なものを含めると-400mV~+275mV (SHE基準) の範囲にあることが報告されている (Fig. 2B)。従って、ギ酸または酢酸の酸化を行う嫌気性菌から、固体腐植ヒューミンに電子供与が起こり、次いで、固体腐植ヒューミンから脱塩素微生物へ電子供与が起こってPCPが脱塩素されるという細胞外電子の流れは、物理化学的に妥当であると考えられる。なお、ギ酸を用いたPCP脱塩素微生物群の活性に比べ、酢酸を用いたものは、活性が弱かった。これは、ギ酸酸化の標準電位が、-425mV (SHE基準) であるのに対し、酢酸の場合は-290mV (SHE基準) で、還元力が低いことも要因として考えられる。

固体腐植ヒューミンを電子供与体とする二酸化炭素還元-酢酸生成微生物群の集積と解析

固体腐植ヒューミン以外に電子供与体の無い条件下、二酸化炭素 (CO₂) を還元して酢酸を生成する嫌気微生物群を集積した。酢酸以外の有機酸 (ギ酸、プロピオン酸、乳酸など) は検出されなかった。培地中に共存するPCPの脱塩素反応、およびメタン生成が見られた。Fig. 4に、培養期間中の酢酸生成を示す。固体腐植ヒューミン、CO₂/HCO₃⁻、集積微生物群の接種がそろった条件では、20mL培養液あたり (培養瓶あたり) 12μmolの酢酸が15日間で生成した。CO₂/HCO₃⁻を添加しなかった条件では10日まで酢酸生成が見られなかった。この

Table 1 Redox potentials of reactions

Reaction	Chemical equations	E ^{0'} ^a	Reference
Formate oxidation	HCOOH → CO ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻	-425	Sokol <i>et al.</i> , 2019
Dechlorination	pentachlorophenol + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 2,3,4,5 - tetrachlorophenol + HCl	+399	Dolfing & Novak, 2015
	2,3,4,5 - tetrachlorophenol + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 3,4,5 - trichlorophenol + HCl	+424	
	3,4,5 - trichlorophenol + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 3,5 - dichlorophenol + HCl	+415	
	3,5 - dichlorophenol + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 3 - chlorophenol + HCl	+388	
	3 - chlorophenol + 2H ⁺ + 2e ⁻ → phenol + HCl	+333	
Denitrification	NO ₃ ⁻ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → NO ₂ ⁻ + H ₂ O	+433	Clauwaert <i>et al.</i> , 2007
	NO ₂ ⁻ + 2H ⁺ + e ⁻ → NO + H ₂ O	+350	
	NO + H ⁺ + e ⁻ → $\frac{1}{2}$ N ₂ O + $\frac{1}{2}$ H ₂ O	+1175	
	$\frac{1}{2}$ N ₂ O + H ⁺ + e ⁻ → $\frac{1}{2}$ N ₂ + $\frac{1}{2}$ H ₂ O	+1355	
Iron reduction	Fe(OH) ₃ + 3H ⁺ + e ⁻ → Fe ²⁺ + 3H ₂ O	+32	Fetter, 1999
CO ₂ -reducing acetogenesis	2CO ₂ + 8H ⁺ + 8e ⁻ → CH ₃ COOH + 2H ₂ O	-290	Schuchmann & Müller, 2016
CO ₂ -reducing methanogenesis	CO ₂ + 8H ⁺ + 8e ⁻ → CH ₄ + 2H ₂ O	-240	Cord-Ruwisch <i>et al.</i> , 1988
Nitrogen fixation	N ₂ + 8H ⁺ + 8e ⁻ + 16ATP → 2NH ₃ + H ₂ + 16ADP + 16Pi	-278	深川ら, 1992

^a Redox potential at standard conditions (25°C, solutes 1M, H₂ gas 1atm, pH=7), versus Standard Hydrogen electrode.

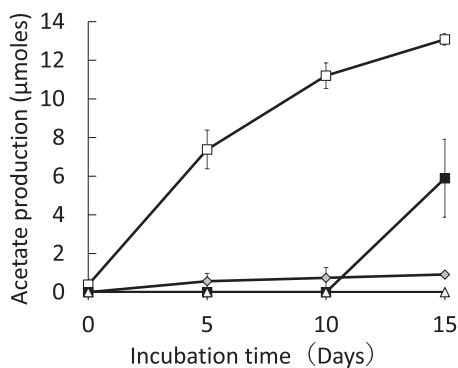


Fig. 4 Autotrophic reductive acetogenesis in the consortium with humin as electron donor under the conditions with humin, CO₂/HCO₃⁻ and acetogenic consortium (□), under the conditions without addition of CO₂/HCO₃⁻ (■), under the condition without humin (◇), and under the condition only with medium (△). (Modified from Laskar *et al.*, 2020)

ことは、酢酸生成がCO₂/HCO₃⁻を還元して生成したものであること示している。CO₂/HCO₃⁻を添加しなかった条件でも15日後に酢酸生成が見られたのは、植継によるCO₂/HCO₃⁻持ち込みのためと考えられる。固体腐植ヒューミンの無い場合は、殆ど酢酸生成が見られなかった。また微生物接種無しの条件では、酢酸生成は見られなかった。以上のことから、固体腐植ヒューミンが電子供与体として酢酸生成に必須であることが示された。

二酸化炭素を還元して酢酸生成を行う生化学反応は、Wood-Ljungdahl経路(WL経路)として知られている。その経路で働くformyltetrahydrofolate synthaseをコードする遺伝子がこの微生物群に含まれることを、特異的プライマー(Henderson *et al.*, 2010)を用いたPCR増幅により確認した。また、この集積した酢酸生成微生物群に一酸化炭素(CO)を添加すると、酢酸生成が固体腐植ヒューミン存在下でのみ観察された。COは、WL経路で必須のCarbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase複合体の基質である。この点からも、酢酸生成における固体腐植ヒューミンへの依存性が示された。一方で、CO添加時のメタン生成量は固体腐植ヒューミンの有無によって影響を受けなかった。CO/CO₂の標準電位は-520mV(SHE基準)と低い(Schuchmann & Müller, 2014)ためと考えられる。

Fig. 5に、この酢酸生成微生物群の群集構造を示した。Clostridiales目(ファーミキューテス門)が全体の71.8±2.5%に達した。次いで、Bacteroidales目(バクテロイデス門, 11.8±2.2%), Rhodocyclales目(βプロテオバクテリア門9.2±1.5%)であった。WL経路による酢酸生成を行うこの酢酸生成微生物群にファーミキュー

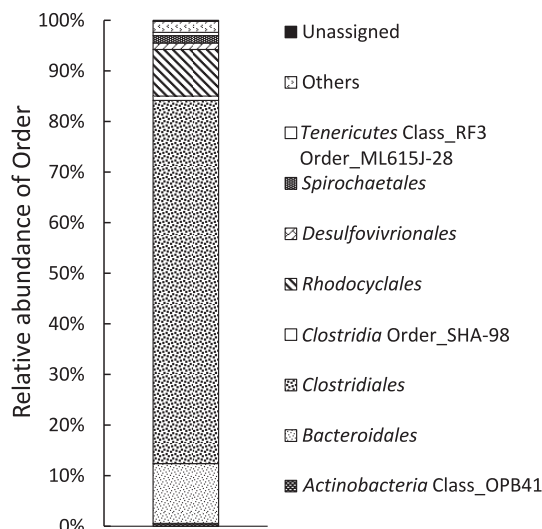


Fig. 5 Microbial community structure of autotrophic acetate producing consortium with humin as electron donor, based on 16S rRNA gene sequence. The data shows the average of four replicates. “Others” denotes the populations less than 0.5% abundance. “Unassigned” represents the genes that were not assigned to any taxonomic position by blast sequencing. (Modified from Laskar *et al.*, 2020)

テス門が優占することは、WL経路の多くがファーミキューテス門に検出される(Ragsdale & Pierce, 2008)こととよく一致している。Clostridiales目に含まれる主要な微生物は、Lachnospiraceae科(21.6±1.3%)とRuminococcaceae科(16.4±0.7%)であった。

今回用いた固体腐植ヒューミンは、抽出したものをそのまま用いたものである。これまで報告された固体腐植ヒューミンの酸化還元電位は、-300mV~+40mVの範囲のものが殆どで(Fig. 2B)、それよりも還元的な固体腐植ヒューミンは、河川底質などの還元的環境から得られたものに限定されている(Pham *et al.*, 2021)。鎌島土壌から常法により抽出した固体腐植ヒューミンの酸化還元電位は、-100mV~+100mV程度の範囲にある(Zhang & Katayama, 2012)。PCPの脱塩素反応の場合は、その標準電位が>+300mVである(Table 1)ことから、固体腐植ヒューミンが脱塩素反応の電子供与体となることは、物理化学的に妥当であることは上述した通りである。一方、CO₂を還元して酢酸を生成する反応の標準電位は-290mV(Table 1)であり、固体腐植ヒューミンの持つ電位よりも、より還元的な電位である。また、副生成物としてメタン生成も観察されたが、その標準電位も-240mV(Table 1)であって、固体腐植ヒューミンの電位よりも還元的な電位である。WL経路を有する酢酸生成菌は、CO₂還元に必要なとされる高度な還元条件を細胞

内の酸化還元分岐反応によって生成できることが知られているが、それでも CO_2 還元からの酢酸生成における電位は、*Acetobacterium woodii* で報告された -340mV (SHE 基準) が限界と考えられている (Bar-Even, 2013). そのため、一見、物理化学的にあり得ない反応にみえるが、固体腐植ヒューミンの酸化還元官能基の電位は不均一であることも指摘されており (Pham *et al.*, 2021), 高度に還元された固体腐植ヒューミンの酸化還元官能基が一部に存在し、酢酸生成菌の電子供与体となったものと想像される。

固体腐植ヒューミンによる嫌気性窒素固定微生物群の窒素固定促進

窒素を殆ど含まずマンニトールを炭素源とする嫌気性 MNDA 液体培地を用い、培地中に固体腐植ヒューミン

を添加したヒューミン添加集積群集と、無添加の無添加集積群集の2種類の窒素固定微生物群を集積した。アセチレン還元活性および窒素含量変化を用いて、窒素固定活性に対する鎌島土壌由来の固体腐植ヒューミンの効果を調べたところ、Fig.6A に示すように、ヒューミン添加集積群集および無添加集積群集ともに、固体腐植ヒューミン添加によってアセチレン還元活性が高まった。特に、ヒューミン添加集積群集は、窒素含量を大きく増加させた (対照条件の 342%, Fig.6B)。無添加集積群集では、この増加は対照条件の 127% であった。ヒューミン添加集積群集における促進効果が固体腐植ヒューミンによる化学反応で無いことは、接種無しの場合には窒素含量の増加が見られないことから明らかである。次に、アセチレン還元活性を指標に、異なる由来の固体腐植ヒューミン (名古屋大学附属農場畑土壌、茨城

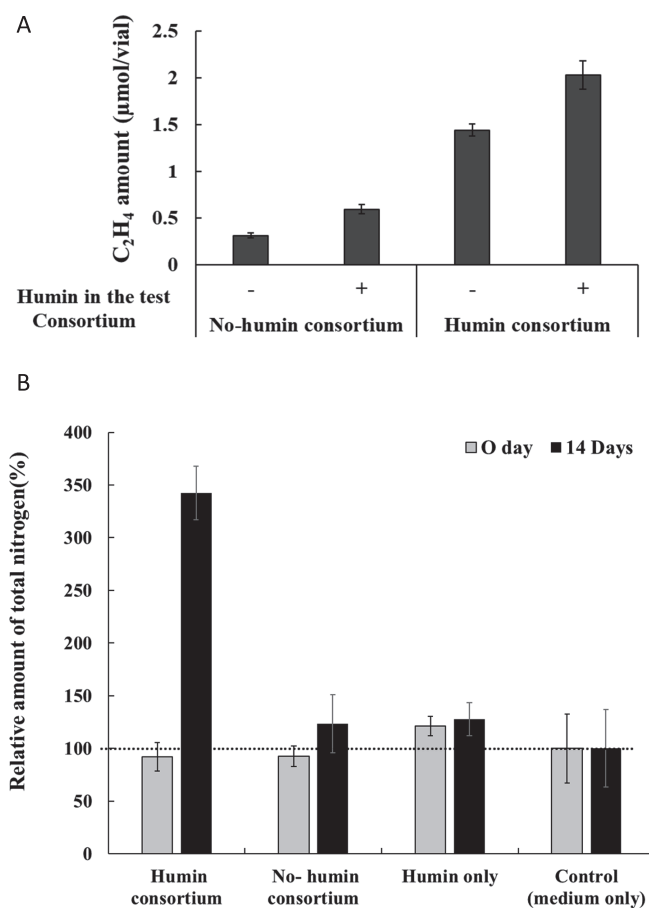


Fig. 6 Promotion of nitrogen fixation of consortium in a nitrogen-deficient medium: (A) Acetylene reduction activity of no-humin consortium (enriched without humin) and humin consortium (enriched with humin). Activity test was carried out under the conditions with (+) and without (-) humin for both consortia. (B) Changes in the relative total nitrogen content in the cultures under four conditions during 14 days of incubation: humin consortium, no-humin consortium, humin only and control (medium only as 100%). (Reproduced from Dey *et al.*, 2021)

黒ボク畑土壌, 弥富グライ水田土壌, 荒子川底質) を用いて無添加集積群集に対する効果を試験したところ, いずれの固体腐植ヒューミンも窒素固定促進効果を示した. また, 固体腐植ヒューミン自体が培養液を還元的雰囲気にしていただけの可能性も考えられたため, 還元試薬として Na_2S , システイン塩酸塩, トリニトリロ酢酸チタン (III) を, 無添加集積群集に添加して効果を調べたところ, 還元試薬を添加すると, むしろアセチレン還元活性が低下した. 従って, 固体腐植ヒューミンが還元剤として機能している可能性は否定された. また, 固体腐植ヒューミンが微量元素の供給源となっている可能性を調べるために, MNDA 液体培地に微量元素 SL-10 溶液とビタミン溶液を添加し, その効果をヒューミン添加集積群集, 無添加集積群集の両方で調べた. 微量元素およびビタミン溶液が添加されることによって, 両集積

群集ともアセチレン還元活性が高まったが, そこに固体腐植ヒューミンを添加すると更にアセチレン還元活性が高まった. このことは, 微量元素およびビタミン類による窒素固定促進効果と固体腐植ヒューミンによる窒素固定効果が異なることを示している.

固体腐植ヒューミンの窒素固定促進効果が, 細胞外電子伝達によるものであることを調べるために, 電気化学的に酸化還元した固体腐植ヒューミンを調製して, 炭素源無しの条件下, 無添加集積群集 (洗浄後に飢餓培養したもの) に添加して影響を調べた. Fig.7A に示すようにアセチレン還元活性は, 抽出したままの固体腐植ヒューミン (以下, 無処理ヒューミン) や酸化型の固体腐植ヒューミン (+400mV, SHE 基準, 以下, 酸化型ヒューミン) を添加した系では活性が全く見られなかったが, 還元型の固体腐植ヒューミン (-400mV, SHE 基

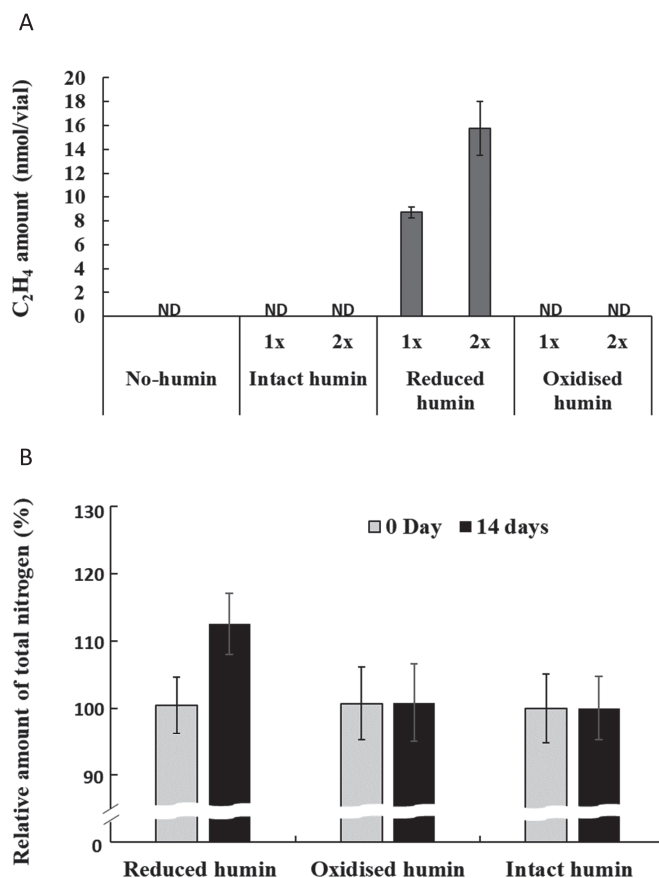


Fig. 7 Effect of humin with different redox potentials. (A) Acetylene reducing activity of the no-humin consortium (enriched without humin) tested with reduced, oxidized, and intact humin and without humin. Humin (Kamajima humin) concentration was set at two levels shown by “1 x” and “2 x”, indicating 15g/L and 30g/L, respectively. ND denotes not detected. (B) Effect of humin preparation on the nitrogen fixation activity of the no-humin consortium, tested using reduced, oxidized, and intact humin, as shown by the change in the relative nitrogen content during 14 days of incubation. Gray bars denote the nitrogen content at 0 day (100 %) and black bars denote those after 14 days of incubation. (Reproduced from Dey *et al.*, 2021)

準, 以下, 還元型ヒューミン) を添加した系ではアセチレン還元活性がみられ, その活性は添加量に比例して増加した. また, 窒素含量の変化をみると, 還元型ヒューミンを加えた条件でのみ窒素含量の増加が見られた (Fig.7B). このことから, 固体腐植ヒューミンによる窒素固定促進効果は, 固体腐植ヒューミンが炭素源となっているのでは無く, 細胞外電子伝達による効果であることが明らかとなった. 窒素固定の標準酸化還元電位は, -278mV とされている (Table 1). また, 各種の水溶性細胞外電子伝達物質を用いてニトロゲナーゼ酵素の活性化を行った実験では, -360mV (SHE 基準) よりも還元的な酸化還元官能基を持つ水溶性細胞外電子伝達物質のみが窒素固定を促進したことが報告されている (Badalyan *et al.*, 2019). ここでは, 還元型ヒューミンは -400mV (SHE 基準) で調製したことから, 固体腐植ヒューミンから窒素固定菌への電子供与反応は, 物理化学的に妥当であったと考えられる.

Fig.8にヒューミン添加集積群集と無添加集積群集の

群集構造を示す. ヒューミン添加集積群集では, ファーミキューテス門が73-77%を占めた. *Clostridiales* 目に属する *Clostridium* 属, *Ruminococcus* 属, *Oxobacter* 属が主であった. 他の *Clostridiales* 目として, *Desulfosporosinus* 属, *Ethanoligenens* 属, *Coprococcus* 属, *Oscillospira* 属, *Caloramator* 属が検出された. *Clostridiales* 目以外には, *Sporolactobacillus* 属 (*Bacillales* 目), *Phyllobacterium* 属 (*Rizobiales* 目), *Sphingomonas* 属 (*Sphingomonadales* 目), *Ralstonia* 属 (*Burkholderiales* 目)が数パーセントを占めた. アーキア (殆どは *Methanobacterium*) が22-26%を占め, ヒューミン添加集積群集の特徴となっていた. 無添加集積群集は殆どバクテリアからなっており, ファーミキューテス門, 特に *Clostridiales* 目に属する *Clostridium* 属, *Pelosinus* 属, *Ruminococcus* 属が96%を占めた. 他に小数ではあるが, *Sporolactobacillus* 属 (*Bacillales* 目), *Methylobacterium* 属, *Mesorhizobium* 属, *Phyllobacterium* 属 (以上, *Rhizobiales* 目), *Sphingomonas* 属 (*Sphingomonadales* 目), *Pelomonas* 属, *Ralstonia* 属,

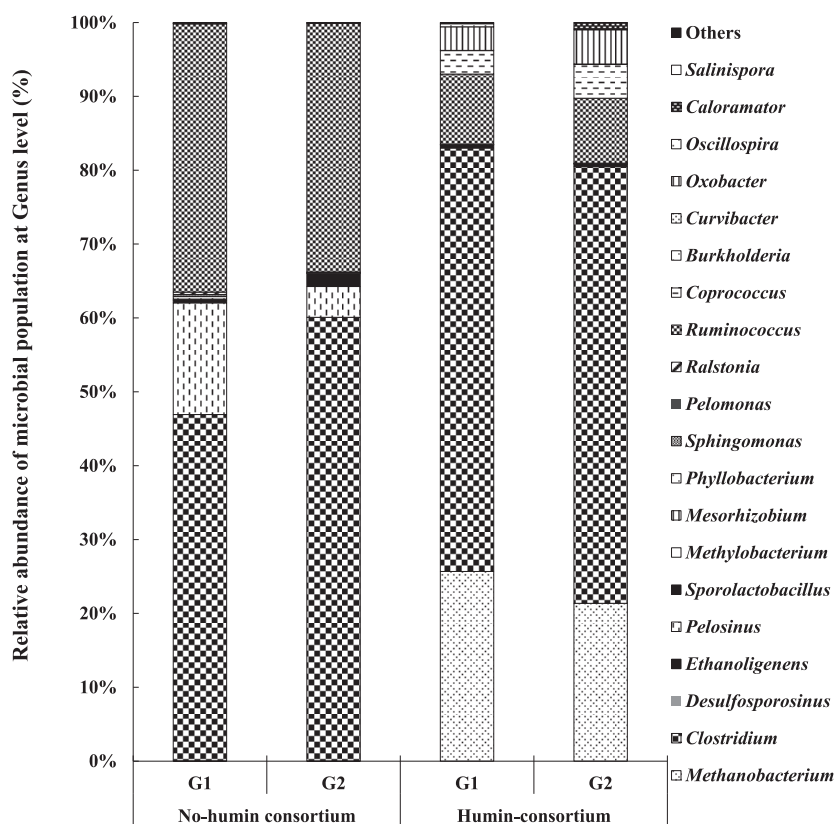


Fig. 8 Microbial community structures of the no-humin and humin consortia based on 16S rRNA gene sequencing. The data shows the community structures of two replicates (G1 and G2) of the consortia, individually. "Others" denotes the taxonomic groups with less than 0.02 % abundance. (Modified from Dey *et al.*, 2021)

Burkholderia 属, *Curvibacter* 属, *Salinispora* 属 (以上, *Burkholderiales* 目) が見られた. アーキアは, 0.02% しか検出されなかった. *Clostridium* 属および *Ruminococcus* 属は両方の集積群集で主要微生物として検出された. 両集積群集に共通して見られた, *Methanobacterium* 属, *Clostridium* 属, *Desulfosporosinus* 属, *Ethanoligenens* 属, *Pelosinus* 属, *Sporolactobacillus* 属, *Methylobacterium* 属, *Mesorhizobium* 属, *Phyllobacterium* 属, *Sphingomonas* 属, *Pelomonas* 属, *Ralstonia* 属は, 窒素固定遺伝子の系統樹でクラスター I, II, III にまたがる窒素固定菌である. これらの一部または多くの窒素固定菌が, 固体腐植ヒューミンから細胞外電子を受け取ることによって窒素固定を促進したのと考えられる. また, 一方, 主要微生物群の中にはマンニトールを利用して固体腐植ヒューミンを還元する微生物も存在したはずである. 10% 以上を占める主要微生物として検出された *Ruminococcus* 属細菌は, 窒素源としてオリゴペプチド, アンモニア, 尿素を利用する事が報告されている (Kim *et al.*, 2014) が, 窒素固定能があることは報告が無い (Vos *et al.*, 2009). これらのことは, *Ruminococcus* 属がマンニトールをエネルギー源とする固体腐植ヒューミン還元微生物の一つであることを示唆している. 他の窒素固定菌の生成するアンモニアを窒素源として利用して増殖したものと考えられる. これまで, *Geobacter* 属細菌を除き, 窒素固定菌の多くは電気活性微生物として報告されていない. PCP 脱塩素微生物群と同様に, 嫌気性窒素固定微生物群でも, 固体腐植ヒューミンは非電気活性微生物間の細胞外電子伝達を可能としているものと推定される.

ヒューミン添加集積群集と無添加集積群集の間で, 共通する微生物種が多く見られたこと, 無添加集積群集でも固体腐植ヒューミン添加によって窒素固定促進が見られたことは, 固体腐植ヒューミンによって窒素固定促進する窒素固定菌は, 固体腐植ヒューミンを用いて集積しなくても得られることを示唆している. 固体腐植ヒューミンと電子授受を行う微生物の分離は, 固体腐植ヒューミンの無い条件で増殖させることによって分離することが困難なことが理由で難しいと考えられてきたが, この結果は, 細胞外電子を利用できる窒素固定菌の分離をする際には, 固体腐植ヒューミンの無い条件で増殖させても固体腐植ヒューミンの細胞外電子を利用できる菌の取得が可能であることを示唆しており, 今後, 分離株を用いた研究が期待される.

Pseudomonas stutzeri を用いた硝酸還元試験

静菌培地で固体腐植ヒューミンを電子供与体とする条件で, *P. stutzeri* JCM 20778 株を 7 日間培養した. 固体腐植ヒューミン無し, または *P. stutzeri* 接種無しの条件で

は, 全く硝酸還元反応が進まず, 固体腐植ヒューミンと *P. stutzeri* の両方があるときのみ硝酸還元反応が進んだ. 還元型ヒューミンと無処理ヒューミンを加えた条件では, 亜硝酸イオン (NO_2^-), 亜酸化窒素ガス (N_2O) が検出されたが, 酸化型ヒューミンを加えた条件では, NO_2^- だけが少量検出された. 硝酸還元量を比較すると, 還元型ヒューミン > 無処理ヒューミン > 酸化型ヒューミンの順となった. Table 1 の式に従って, 固体腐植ヒューミンから *P. stutzeri* に供給された細胞外電子量を推定すると, 固体腐植ヒューミン 1g 当たり, それぞれ還元型ヒューミンは $355 \mu\text{Eq/g}$, 無処理ヒューミンは $258 \mu\text{Eq/g}$, 酸化型ヒューミンは $7 \mu\text{Eq/g}$ となった. 硝酸還元反応の標準電位は, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ が +433mV (SHE 基準), NO_2^-/NO が +350mV (SHE 基準), $\text{NO}/\text{N}_2\text{O}$ が +1175mV (SHE 基準) である (Table 1). これに対して, 固体腐植ヒューミンは還元型ヒューミン -400mV (SHE 基準), 酸化型ヒューミン (+615mV (SHE 基準) で調製したものと, 無処理ヒューミンの酸化還元電位測定値は +367mV (SHE 基準) であった. 従って, 還元型ヒューミンは, NO_3^- から N_2O までの 3 反応のいずれの標準電位よりも還元的な状態にあるので, N_2O 生成は物理化学的に妥当と考えられた. 一方, 無処理ヒューミンは, 2 段階目の NO_2^-/NO 反応よりも酸化的状態にあるので, 硝酸還元反応は NO_2^- で止まることが予想されたが, N_2O 生成が見られた. 更に, 酸化型ヒューミンは, はじめの $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ の反応の標準電位より酸化的状態にあるので, 全く反応が進まないものと予想されたが, 少量ではあるが NO_2^- を生成した. 24 時間の電気化学処理では, まだ十分に酸化しきれない反応部位が残っており, *P. stutzeri* に電子供与したのと考えられる. このことはまた, 固体腐植ヒューミンには細胞外電子伝達物質として酸化還元電位の異なる部位が存在しており, 多様な微生物反応に対して電子供与していることを示唆している. この多様な酸化還元部位を示唆する結果は, 二酸化炭素還元-酢酸生成微生物群でも観察された固体腐植ヒューミンが平均的酸化還元電位では, 反応が説明できなかったこととよく一致している. 細胞外電子伝達機構を調べる上で, 固体腐植ヒューミンの不均一性の取り扱いが課題であることが示された.

要 約

固体腐植ヒューミンと微生物の間での細胞外電子伝達メカニズムを, 嫌気性 PCP 脱塩素微生物群, CO_2 還元-酢酸生成微生物群, 嫌気性窒素固定微生物群, 硝酸還元 *Pseudomonas stutzeri* を用いて検討した. 微生物群集の 16S rRNA 遺伝子に基づく群集構造解析から, 以下の様な

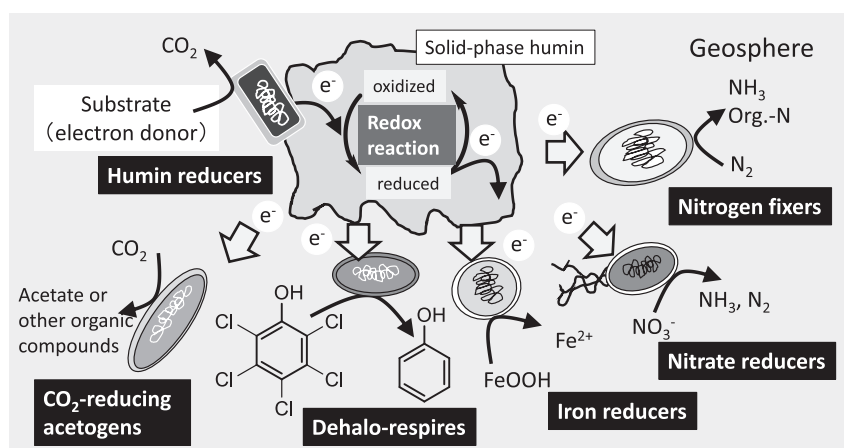


Fig. 9 Energy network in anaerobic microbial world based on extracellular electron transfer via humin, a solid-phase humic substance

固体腐植ヒューミンを介した異種微生物間の細胞外電子伝達系が推定された (Fig. 9)。嫌気性 PCP 脱塩素微生物群では, *Azospira* 属, *Lachnospiraceae* 科, *Ruminococcaceae* 科, *Bacteroides* 属に属する全部または一部の細菌が, 酢酸を利用して固体腐植ヒューミンを還元し, *Dehalobacter* 属細菌が, 還元型ヒューミンの細胞外電子を利用 (ヒューミン酸化) し, 且つ PCP 脱塩素反応を起こしたものと推定された。CO₂ 還元-酢酸生成微生物群では, 固体腐植ヒューミンを唯一のエネルギー源とする条件で, 優占する *Lachnospiraceae* 科, *Ruminococcaceae* 科に属する細菌が酢酸生成を行ったと推定された。窒素固定微生物群では, *Ruminococcus* 属細菌がマンニトールを利用して固体腐植ヒューミンを還元し, *Clostridium* 属細菌を主とする嫌気性窒素固定微生物群が還元型固体腐植ヒューミンの細胞外電子を利用して窒素固定活性を高めていたものと推察された。*Pseudomonas stutzeri* は, 固体腐植ヒューミンを細胞外電子源として利用して脱窒反応を行う事が明らかとなった。以上の様に多様な異種微生物間での固体腐植ヒューミンを介した細胞外電子授受が推定されたが, これらの微生物の殆どは, これまで細胞外電子伝達能の知られていない非電気活性微生物である。固体腐植ヒューミンが, 非電気活性微生物間の細胞外電子伝達物質として機能している可能性が高く, 今後の研究によって新規な細胞外電子伝達機構の解明が期待される。

これまで固体腐植ヒューミンの細胞外電子伝達では, E⁰ (標準反応電位, pH=7, 標準水素電極 (SHE) 基準) がプラス側にある嫌氣的脱ハロゲン反応, 硝酸還元反応, 鉄還元反応に対する電子供与反応が知られていたが, 本

研究では E⁰ が -250mV よりも還元的な反応である CO₂ 還元-酢酸生成反応, 嫌気性窒素固定反応に対しても, 固体腐植ヒューミンから電子供与して微生物反応を支持・促進できることが新たに明らかとなった。固体腐植ヒューミンの細胞外電子伝達に基づく嫌気微生物生態系でのエネルギーネットワークに, より還元的な反応も含まれることが明らかとなった (Fig. 9)。一方, CO₂ 還元-酢酸生成反応および硝酸還元反応に関する研究で, 固体腐植ヒューミンの平均酸化還元電位よりも還元的な E⁰ を持つ反応に対しても, 固体腐植ヒューミンから当該微生物に対して電子供与が起こることが見いだされた。このことから, 固体腐植ヒューミンは, 酸化型から還元型にわたる広い酸化還元電位を有する多様な部位を持つことが示唆された。固体腐植ヒューミンの酸化還元電位の不均一性を明らかにする研究を実施することが必要である。また, 固体腐植ヒューミン添加条件と無添加条件で集積した窒素固定微生物群の群集構造がよく似ていたこと, および固体腐植ヒューミンの添加によって両微生物群とも窒素固定反応を促進した事から, 固体腐植ヒューミンの無い条件で得られた嫌気性窒素固定菌も固体腐植ヒューミンの細胞外電子を利用できる事が示され, 固体腐植ヒューミン利用細菌の分離の可能性が明らかとなった。*P. stutzeri* に加えて, 新たな分離株の取得によって, 固体腐植ヒューミンの細胞外電子伝達機構の研究の進展が期待される。

また一方で, 固体腐植ヒューミンを電気化学的に還元して微生物へ細胞外電子を連続的に供給するシステム (生物電気化学システム) を開発することによって, 多

様な環境浄化・物質生産技術への応用が期待される。本研究で用いた微生物（群）を例とすれば、地下水を汚染する有機塩素化合物を脱塩素反応により無害化する微生物の生物電気化学的活性化技術や、同じく地下水を汚染する硝酸イオンの脱窒除去反応の生物電気化学的促進技術などの環境浄化技術への発展が期待される。地下水系の微生物の活性化技術では、養分注入による2次の汚染の防止が課題となっているが、生物電気化学システムの利用によって養分注入が不要にできると思われる。また、生物電気化学システムを酢酸生成微生物に応用すれば、二酸化炭素を原料とする酢酸生成技術として、二酸化炭素削減とともに有用物質を生産する技術への発展が期待される。また窒素固定反応を促進する生物電気化学システムは、現在、世界エネルギー消費量の1%強を占めるハーバーボッシュ法による窒素固定技術の省エネルギー型代替技術としての発展が期待される。以上の様に、固体腐植ヒューミンの細胞外電子伝達に関する研究は、環境微生物学における基礎研究だけでなく応用技術開発の面でも大きな発展が期待される。

本研究で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) Laskar, M., Awata, T., Kasai, T. & Katayama, A. 2019. Homoacetogenesis induced autotrophic dechlorination in a humin dependent pentachlorophenol-dechlorinating consortium, Water and Environmental Technology Conference 2019 (July 13-14, Osaka, Japan)
- 2) Katayama, A. 2019. Characterization of humin, insoluble humic substance, as versatile extracellular electron mediator for bioelectrochemical systems, The 10th National Conference on Environmental Chemistry (August 15-19, Tianjing, China)
- 3) Katayama, A. 2019. Management of nitrogen fertilizer for energy-saving agricultural systems, The 10th National Conference on Environmental Chemistry (August 15-19, Tianjing, China)
- 4) Laskar, M., Awata, T., Kasai, T. & Katayama, A. 2019. Humin functions as the electron donor in reductive acetogenesis, International Society for Microbial Electrochemistry and Technology, ISMET7, Global Conference (October 7-11, Okinawa, Japan)
- 5) Kasai, T., Dey, S., Mitsushita, J., Awata, T. & Katayama, A. 2019. Promotion of biological nitrogen fixation with solid-phase humin, International Society for Microbial Electrochemistry and Technology, ISMET7, Global Conference (October 7-11, Okinawa, Japan)
- 6) Katayama, A., Pham, D.M. & Kasai, T. 2019. Humin, insoluble humic substances, as the external electron donor for multiple microbial reducing reactions, International Society for Microbial Electrochemistry and Technology, ISMET7, Global Conference (October 7-11, Okinawa, Japan)
- 7) Dey, S., Kasai, T., Mitsushita, J., Awata, T. & Katayama, A.

2019. Acceleration of biological nitrogen fixation using humin as external electron mediator, International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2019 (November 1-3, Nagoya, Japan)
- 8) Laskar, M., Awata, T., Kasai, T. & Katayama, A. 2019. Carbon-dioxide fixation by humin-dependent mixed consortium exercises humin's alternate functionality in electron-transfer, International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2019 (November 1-3, Nagoya, Japan)
- 9) 笠井拓哉, ラスカーマハスウェタ, 栗田貴宣, 片山新太. 2020. 固体腐植ヒューミンによる生物学的CO₂固定・資源化反応の促進, 日本農芸化学会2020年度大会 (3月25-28日, 福岡+Online)
- 10) Dey, S., Kasai, T. & Katayama, A. 2020. Promotion of biological nitrogen fixation using extracellular electron mediator – Humin, The Water and Environment Technology Conference, WET2020-online (November 7-8, Online)
- 11) Katayama, A. 2021 Humin, an insoluble fraction of humic substances, as a key extracellular electron mediator in anaerobic microbial world, Vebleo webinar 2021 on Materials Science, Engineering and Technology online (March 20, Online)
- 12) 笠井拓哉, ラスカーマハスウェタ, 片山新太. 2021. 固体腐植物質による生物学的二酸化炭素資源化反応の促進, 日本農芸化学会2021年度大会 (3月18-21日, 仙台+Online)
- 13) Pham D.M., Kasai, T. & Katayama, A. 2021. How do solid-phase humic substances (humin) serve as extracellular electron mediator in multiple anaerobic microbial reactions? 日本農芸化学会2021年度大会 (3月18-21日, 仙台+Online)
- 14) Dey S., Kasai T. & Katayama A. 2021. Promotion of nitrogen-fixation activity of diverse heterotrophic diazotrophs by supplying extracellular electrons from humin, a solid-phase humic substance. 日本農芸化学会2021年度大会 (3月18-21日, 仙台+Online)

原著論文

- 1) Laskar, M., Awata, T., Kasai, T. & Katayama, A. 2019. Anaerobic dechlorination by a humin-dependent pentachlorophenol-dechlorinating consortium under autotrophic conditions induced by homoacetogenesis, Int. J. Environ. Res. Public Health 16: 2873.
- 2) Lakser, M., Kasai, T., Awata, T. and Katayama, A. 2020. Humin assists reductive acetogenesis in absence of other external electron donor, Int. J. Environ. Res. Public Health 17: 4211.
- 3) Dey, S., Awata, T., Mitsushita, J., Zhang, D.D., Kasai, T., Matsuura, N. & Katayama, A. 2021. Promotion of biological nitrogen fixation activity of an anaerobic consortium using humin as an extracellular electron mediator, Sci. Rep.11: 6567.

総説

- 1) Pham, D.M., Kasai, T., Yamaura, M. & Katayama, A. 2021. Humin: No longer inactive natural organic matter, Chemosphere 269: 128697.

謝 辞

本研究の実施に当たり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心から御礼申し上げます。また、本研究の一部は、科学研究費補助金を利用して行われました。本研究実施に尽力していただいた東海国立大学機構名古屋大学工学研究科の学生の皆様（Mahasweta Lasker, Sujana, Dey, 三下純平, 能登健仁, 小田垣隆伍, 氏林亮太）に深く御礼申し上げます。固体腐植ヒューミンの電気化学特性評価にご協力頂いた東海国立大学機構名古屋大学未来材料・システム研究所 Duyen Minh Pham 博士, 次世代シークエンサーを用いた微生物群集構造解析にご助力頂いた栗田貴宣博士（現、大阪工業大学工学部）、各種機器分析をサポートして頂いた東海国立大学機構名古屋大学未来材料・システム研究所の太田象三博士、および同生命農学研究科の厚味智子氏に深く感謝申し上げます。

文 献

- Ashby, S. F. 1907. Some observations on the assimilation of atmospheric nitrogen by a free living soil organism. *Azotobacter chroococcum* of Beijerinck. *J. Agr. Sci.* **2**: 35-51.
- Badalyan, A., Yang, Z. & Seefeldt, L. C. 2019. A voltammetric study of nitrogenase catalysis using electron transfer mediators. *ACS Catal.* **9**: 1366-1372.
- Bar-Even, A. 2013. Does acetogenesis really require especially low reduction potential? *BBA - Bioenergetics* **1827**: 395-400.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R. *et al.* 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **37**: 852-857.
- Cervantes, F.J., Gutiérrez, C.H., López, K.Y., Estrada-Alvarado, M.I., Meza-Escalante, E.R., Texier, A.C., Cuervo, F. & Gómez, J. 2008. Contribution of quinone-reducing microorganisms to the anaerobic biodegradation of organic compounds under different redox conditions. *Biodegradation* **19**: 235-246.
- Clauwaert, P., Rabaey, K., Aelterman, P., De Schampelaere, L., Pham, T.H., Boeckx, P., Boon, N. & Verstraete, W. 2007. Biological denitrification in microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* **41**: 3354-3360.
- Cord-Ruwish, R., Seitz, H.-J. & Conrad, R. 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Arch. Microbiol.* **149**: 350-357.
- Dolfing, J. & Novak, I. 2015. The Gibbs free energy of formation of halogenated benzenes, benzoates, and phenols and their potential role as electron acceptors in anaerobic environments. *Biodegradation* **26**: 15-27.
- Edgar, R. C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460-2461.
- Fetter C.W. 1999. Contaminant Hydrology, second edition, Waveland Press, Long Grove, Illinois.
- 深川勝之, 村上定暁, 中西弘 1992. 活性汚泥法における微生物反応の酸化還元電位. 衛生工学研究論文集, **28**: 105-112
- Hardy, R. W. F., Burns, R. C. & Holsten, R. D. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 47-81.
- Henderson, G., Leahy, S.C., Janssen, P.H. 2010. Presence of novel, potentially homoacetogenic bacteria in the rumen as determined by analysis of formyltetrahydrofolate synthetase sequences from ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 2058-2066.
- Hollinger, C., Hahn, D., Harmsen, H., Ludwig, W., Schumacher, W., Tindall, B., Vazquez, F., Weiss, N., Zehnder, A.J.B. 1988. *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch. Microbiol.* **169**: 313-321.
- Kim, J.N., Henriksen, E.D., Cann, I.K.O. & Mackie, R.I. 2014. Nitrogen utilization and metabolism in *Ruminococcus albus* 8. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 3095-3102.
- Liu, X.B., Shi, L., Gu, J.-D. 2018. Microbial electrocatalysis: Redox mediators responsible for extracellular electron mediator. *Biotechnol. Adv.* **36**: 1815-1827.
- Lovley, D.R., Coates, J.D., Blunt-Harris, E.L., Phillips, E.J.P. & Woodward, J.C. 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* **382**: 445-448.
- Lovley, D.R., Fraga, J.L., Coates, J.D. & Blunt-Harris, E.L. 1999. Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* **1**: 89-98.
- Lovley, D.R. 2017. Happy together: microbial communities that hook up to swap electrons. *ISME J.* **11**: 327-336.
- McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A., Andersen, G.L., Knight, R., & Hugenholtz, P. 2012. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* **6**: 610-618.
- Pham, D.M. & Katayama, A. 2018. Humic as an external electron mediator for microbial pentachlorophenol dechlorination: exploration of redox active structures influenced by extraction methods. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **15**: 2753.
- Ragsdale, S.W. & Pierce, E. 2008. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *BBA - Proteins Proteom.* **1784**: 1873-1898
- Roden, E.E., Kappler, A., Bauer, I., Jiang, J., Paul, A., Stoesser, R., Konishi, H. & Xu, H. 2010. Extracellular electron transfer through microbial reduction of solid-phase humic substances. *Nat. Geosci.* **3**: 417-421.
- Schuchmann, K. & Müller, V. 2014. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: A model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**: 809-821.
- Schuchmann, K. & Müller, V. 2016. Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 4056-4069.
- Sokol, K.P., Robinson, W.E., Oliveira, A.R., Zacarias, S., Lee, C.-Y., Madden, C., Bassegoda, A., Hirst, J., Pereira, I.A.C. & Reisner, E. 2019. Reversible and selective interconversion of hydrogen and carbon dioxide into formate by a semiartificial formate hydrogenlyase mimic. *J. Am. Chem. Soc.* **141**: 17498-17502.
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T. & Nishijima, M. 2014. Development of a prokaryotic universal primer for simul-

- taneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. PLoS One **9**: e105592.
- Van Trump, J.I., Wrighton, K.C., Cameron Thrash, J.C., Weber, K.A., Andersen, G.L. & Coates, J.D. 2011. Humic acid-oxidizing, nitrate-reducing bacteria in agricultural soils. mBio, **2**: e00044-11.
- Widdel, F., Kohring, G.-W. & Mayer, F. 1983. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. Arch. Microbiol. **134**: 286-294.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W. (Eds.). 2009. Genus I. Ruminococcus. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edition. Volume 3: The Firmicutes. Springer, New York, 1016-1018
- Xiao, Z.X., Awata, T., Zhang, D.D., Zhang, C.F., Li, Z.L. & Katayama, A. 2016. Enhanced denitrification of *Pseudomonas stutzeri* by a bioelectrochemical system assisted with solid-phase humin, J. Biosci. Bioeng. **122**: 85-91.
- Yoshida N., Yoshida, Y., Handa, Y., Kim, H-K., Ichihara, S. & Katayama, A. 2007. Polyphasic characterization of a PCP-to-phenol dechlorinating microbial community enriched from paddy soil, Sci. Total Environ. **381**: 233-242.
- Zhang, C.F. & Katayama, A. 2012. Humin as an electron mediator for microbial reductive dehalogenation, Environ. Sci. Technol. **46**: 6575-6583.
- Zhang, C.F., Li, Z.L., Suzuki, D., Ye, L.Z., Yoshida, N. & Katayama, A. 2013. A humin-dependent Dehalobacter species is involved in reductive debromination of tetrabromobisphenol A. Chemosphere **92**: 1343-1348.
- Zhang, C.F., Zhang, D.D., Xiao, Z.X., Li, Z.K., Suzuki, D. & Katayama, A. 2015a. Characterization of humins from different natural sources and the effect on microbial reductive dechlorination of pentachlorophenol. Chemosphere **131**: 110-116.
- Zhang, D.D., Zhang, C.F., Xiao, Z.X., Suzuki, D. & Katayama, A. 2015b. Humin as an electron donor for enhancement of multiple microbial reduction reactions with different redox potentials in a consortium, J. Biosci. Bioeng. **119**: 188-194.

2015年度寄付講座助成の研究報告

助成期間：2015年10月～2021年3月

光合成複合微生物系の環境・エネルギー活用シーズ開発

花田 智*

東京都立大学大学院理学研究科

光合成複合微生物系の環境・エネルギー活用シーズ開発寄付講座

〒192-0397 八王子市南大沢1-1

Photosynthetic microbial communities – application to environmental and energy issues –

Satoshi HANADA*

Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

Minami-Osawa 1-1, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan

Photosynthetic microbial communities are widely distributed in terrestrial environments including geothermal springs and riverbed. Microbial communities mainly composed of photosynthetic prokaryotes have attracted considerable attention as potential solutions for environmental and energy issues. In our studies, we applied culture-independent and culture-dependent methods to clarify the microbial diversity of photosynthetic microbial communities with a special focus on thermophiles and epilithic river biofilms. We found unexpected diversity of photosynthetic bacteria and successfully isolated novel bacteria in several phylogenetic lineages. We also determined spatial and temporal distribution of bacterial members and their metabolisms within photosynthetic microbial communities in geothermal springs. These studies found the efficient cooperation of cyanobacteria and anoxygenic photosynthetic bacteria for development and maintenance of the community. We believe that our achievements help to establish photosynthetic microbial communities which are useful for industrial and environmental applications.

第一章 はじめに

光合成は、光エネルギーを化学エネルギーに変換する過程で、地球上のすべての生物を支える最も重要な生物反応である。光合成生物は大型の高等植物へと進化を遂げてきたが、その起源は約30億年前の細菌にさかのぼり、現地球でも光合成をする細菌は生態系における主要一次生産者のひとつである。シアノバクテリアを含む光合成原核生物を主体とする微生物生態系は、地球上の太陽光の当たるさまざまな環境に発達している。これら光合成複合微生物系は、資源・環境問題の解決や宇宙開発

において、高いポテンシャルを持っている (Thiel *et al.*, 2018)。しかし、光合成複合微生物系の主要構成者である光合成原核生物の活用研究だけでなく、それらの基礎的な研究も十分に進んでいない。

現在までに光合成原核生物は、細菌界の七つの門に見つかっているが、その系統的、生理的多様性の理解も不十分である。光合成細菌の多様性およびその反応機構について、これまで、海洋などの水圏や土壌圏において広く研究され、なかでも中温性の光合成細菌については、遺伝子・酵素レベルで詳しく調べられてきた。最近、高温環境に生息する光合成細菌が実に多様であり、未知系統群が多数分布していることが示されるようになってきたが、分離培養法によって取得された種はわずかで、その全容解明には至っていない (Tank *et al.*, 2017)。

細菌による光合成は、生命が誕生したころの古地球の高温環境でも進行していたと予想される。それらの好熱性光合成細菌系統群が起源となり、真核生物の植物に至る光合成生物の多様化が進み、地球上の生態系が発達し

E-mail: photomic2015@gmail.com

*花田 智 現 産業技術総合研究所 satohana@tmu.ac.jp

教員: Vera Thiel (東京都立大学大学院理学研究科,
現, Leibniz Institute DSMZ).

Marcus Tank (東京都立大学大学院理学研究科,
現, Leibniz Institute DSMZ).

てきた (Hanada, 2019). 地下から熱水が噴出する陸上温泉は、古地球環境を模した環境として、地球科学的研究だけでなく、生命・生態系の進化研究に広く利用されている。

本寄付講座では、エネルギー・環境問題の解決に資する光合成複合微生物系の維持・制御のための基礎的な技術開発や活用シーズの発見を目指し、新規光合成原核生物の発見・特性解明とともに、高温環境に発達する好熱性光合成複合微生物系の機能解明を目的とした。

第二章 研究成果の概要

1. 光合成複合微生物系の形成・維持機構

米国イエローストーン国立公園の温泉で発達した光合成複合微生物系を対象に各種オミックス解析を実施して、その構成種および代謝能を明らかにし、そこには多様な光合成細菌が分布していることを見出した (Thiel *et al.*, 2016; Thiel *et al.*, 2017). さらに詳細な機能解析のために、シアノバクテリアが優占化し、約3mm厚まで生長する長野県中房温泉の微生物マット (Fig.1) を研究対象として、その層構造を明らかにした (Martinez *et al.*, 2019). すなわち、その表層部にはシアノバクテリアが優占するが、酸素濃度の減少していく中央部には多様な光合成細菌が共存しており、さらに最深部からは未培養の *Chlorobi* 細菌が検出された (Thiel *et al.*, 2019). 微小センサーを活用した透過光波長分布解析から、微生物マットの深度ごとの光合成細菌の分布も明らかにした。さらに、現地培養装置を開発し、現地温泉水中で微生物マットに異なる波長の光を照射し、群集構造の変化を観察することで、各光合成細菌の他菌に与える影響を明らかにすることができた (Nishida *et al.*, 2018).

温泉微生物マットを形成する主要種のひとつである糸状性酸素非発成型光合成細菌 *Chloroflexus aggregans* に関しては、1995年の発見以来、その光独立栄養生育能は実証されていなかった (Hanada *et al.*, 1995). 本研究では分離株を用いて、硫化水素に依存した光嫌気独立栄養生育能を初めて確認することに成功した (Kanno *et al.*, 2019; Kawai *et al.*, 2019a). 加えて、水素依存的光嫌気独立栄養生育能および水素依存的好気呼吸独立栄養生育能を有することも明らかになってきた (Kawai *et al.*, 2019b). さらに、微生物マットの遺伝子転写解析から、本菌が日照量に応じて、電子源 (硫化水素、水素、有機物等) を使い分けていることを明らかにした (Kawai *et al.*, 2021). 以上から、*Chloroflexus* が多様なエネルギー代謝を有し、シアノバクテリアと協調して、効果的に光合成複合微生物系を形成していることが分かった。



Fig. 1 Microbial mats developed at geothermal springs (Nakabusa hot springs, Nagano).

2. 新規酸素非発成型光合成細菌 *Chloracidobacterium* の発見とその特性

Chloracidobacterium 属細菌は、Tank らによって2015年に *Acidobacteria* 門に初めて見つかった新規系統の好熱性光合成細菌である (Tank & Bryant, 2015). 温泉微生物マットを構成する光合成細菌の一つとして光合成複合微生物系の理解に重要であるばかりでなく、本菌は始原的な光合成特性と植物型の代謝的特徴も併せ持つことから光合成の進化の面からも興味をもたれている (Tank *et al.*, 2018). 本研究では本菌の有する I 型の光合成反応中心の分光学的・生化学的特徴を明らかにした (Zill *et al.*, 2018; He *et al.*, 2019). さらに、イエローストーン国立公園 (米国) から新たに *Chloracidobacterium* 属細菌を分離することに成功し、それらのゲノムおよび生理学的性質の比較から多様性を明らかにした (Saini *et al.*, 2021). また、ゲノムには炭酸固定関連遺伝子が見つからないが、その生育には CO_2 の添加が促進的に働くことが示された。安定同位体標識した CO_2 を用いたトレース解析から、本菌が CO_2 を炭素源として菌体に取り込んでいることを明らかにし、ホスホエノールピルビン酸からオキサロ酢酸に至るアナプレロティック反応を介してアスパラギン酸やメチオニンに取り込まれていることを示した (Saini *et al.*, in preparation).

3. 好熱性シアノバクテリアの多様性

陸上温泉などの高温環境における好熱性シアノバクテリアの系統的多様性、遺伝的多様性、生理的多様性に関

する研究はまだ少なく、その系統分類も進んでいない。本研究では陸上温泉を対象にした環境DNA解析からその分布と多様性を調査し (Martinez *et al.*, 2019; Thiel *et al.*, 2016; Thiel *et al.*, 2017), これまでに考えられていた以上に系統的に多様なシアノバクテリアが高温域まで分布していることを明らかにした。なかには新規未培養系統群と考えられるものも見つかった。さらに、いくつかの好熱性シアノバクテリア株の培養に成功し、ゲノム情報、分子系統および窒素固定能、赤色光利用性や生育可能温度域、生育可能pHなどの生理学的特性を明らかにした。また、温泉微生物マットにおける他菌との共生関係も推定された。これらの成果は光合成微生物複合系の形成・維持・生産性を理解・制御する上で重要な知見である。

4. 好気性光合成細菌の分布と多様性

好気性光合成細菌は、主に酸素呼吸で生きるとともに光エネルギーも利用するため、光合成能の進化および活用を考える上で重要な細菌群である。本研究では非培養法および培養法によって河川環境における好気性光合成細菌の分布と多様性を明らかにした (Hirose *et al.*, 2016; Sato-Takabe *et al.*, 2020)。特に河床礫バイオフィルムの光合成複合微生物系において、その主要構成メンバーであることが示され、さらにそのなかには未培養系統群の存在が示唆された。光合成細菌が有する光合成色素バクテリオクロフィルの近赤外蛍光を検出できる装置 (Fig. 2) を組み立て、光合成細菌の効率的な検出・分離法を確立した。その結果、新規好気性光合成細菌の分離培養に成功し、ベータプロテオバクテリアの *Aquabacterium* 属に

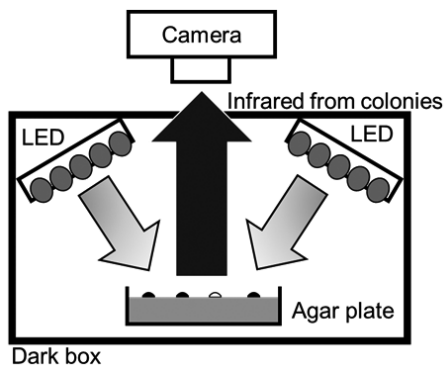


Fig. 2 Bacteriochlorophyll-containing colony detection system. Infrared signals from bacteriochlorophyll *a* are detected by a digital camera through the long-pass filter under LED (590 nm) illumination.

初めて好気性光合成細菌を見出し新種提案した (Hirose *et al.*, 2020)。また河川環境から高頻度に検出される *Tabrizicola* 属細菌にも光合成能が広く認められることを発見した (Tarhriz *et al.*, 2019)。さらに *Roseobacter* 属 (Muramatsu *et al.*, 2020)、*Litoreibacter* 属 (Kanamuro *et al.*, 2021) に光合成能を有する新種細菌を分離培養し、光合成能が広くプロテオバクテリアに分布していることを明らかにした。

第三章 おわりに

本寄付講座では、環境DNA解析を主体とする非培養法および新規開発した培地・培養法を活用することで、陸水環境から新規細菌を発見し、その系統および生理学的特性を明らかにした。本寄付講座から報告した新規細菌を Table 1 にまとめた。これまで考えられていたよりも多様な細菌の系統群に光合成能が見出されたことは特筆に値する。系統的にも生理的にも多様な新規光合成原核生物を分離培養できたことは、本寄付講座の大きな成果であり、これらの研究成果は生物進化、地球環境の形成・保全、の観点からも意義深いものであると確信している。また、陸上温泉に発達する光合成複合微生物系である微生物マットの解析では、構成種およびそれらの代謝活性の時空間的分布を明らかにすることができた。その成果により、太陽から降りそそぐ幅広い波長の光を効率的に化学エネルギーに変換できる複合微生物系の形成・制御法の確立に大きく近づいた。

多くの新規細菌が分離培養できた一方で、非培養法で検出・推定されながら、純粋培養に成功していない系統群も多数ある。メタゲノム解析により未培養ながらそれらのゲノム情報を取得できており、培養法の確立ならびに共培養系・複合微生物系での活用方策の提案に着手につながっている。それら細菌には、C1化合物利用能、窒素固定能、異化的硫黄代謝能などの新しい代謝特性もみつかってきており、微生物機能の利用性拡大に貢献できる成果である。

シアノバクテリアおよび酸素非発生型光合成細菌が混在する光合成複合微生物系は、炭酸固定による温室効果ガスの削減、光エネルギーを使った物質生産だけでなく、宇宙開発でも期待が高まる生物機能を有する。複合微生物系を思いのままに制御するにはまだまだ包括的かつ完全な全体像の解明が求められるが、本寄付講座は国際的にも当該研究分野を先導し、先駆的な知見を提供することができたと考えている。本寄付講座から発表した研究成果、提供した細菌培養株、収集した環境ゲノム情報が今後の研究の大きな礎となり、本研究分野がさらに発展することを切に願っている。

Table 1 List of new species found in our study

Species	Culture collection	Phylum	Features	References
<i>Chloracidobacterium</i> sp.	n.y.	<i>Acidobacteria</i>	Thermophilic, AAPB	Saini <i>et al.</i> , 2021
<i>Ca. Chlorohelix allophototropha</i>	n.y.	<i>Chloroflexota</i>	Photosynthesis, Type I reaction center	Tsuji <i>et al.</i> , 2020a
<i>Chlorogloeopsis</i> sp.	NBRC 108921	<i>Cyanobacteria</i>	Thermophilic, N ₂ fixation	In preparation
<i>Leptolyngbya</i> sp.	n.y.	<i>Cyanobacteria</i>	Thermophilic, far-red utilization	In preparation
<i>Ca. Chlorobium canadense</i>	n.y.	<i>Chlorobi</i>	Purple sulfur bacteria	Tsuji <i>et al.</i> , 2020b
<i>Ca. Thermonerobacter thiotrophicus</i>	n.y.	<i>Chlorobi</i> (<i>Ca. Kapabacteria</i>)	Thermophilic, sulfate reduction	Thiel <i>et al.</i> , 2019
<i>Roseobacter cerasinus</i>	DSM 110091 NBRC 114115	(<i>Alpha</i> -) <i>Proteobacteria</i>	AAPB	Muramatsu <i>et al.</i> , 2020
<i>Litoreibacter roseus</i>	DSM 110109 NBRC 114114	(<i>Alpha</i> -) <i>Proteobacteria</i>	AAPB	Kanamuro <i>et al.</i> , 2021
<i>Aquabacterium pictum</i>	DSM 106757 NBRC 111963	(<i>Beta</i> -) <i>Proteobacteria</i>	AAPB	Hirose <i>et al.</i> , 2020
<i>Caldichromatium japonicum</i>	DSM 110881 JCM 39101	(<i>Gamma</i> -) <i>Proteobacteria</i>	Thermophilic, purple sulfur bacteria	Saini <i>et al.</i> , 2020
<i>Hydrogenobacter</i> sp.	n.y.	<i>Aquificae</i>	H ₂ -oxidation, N ₂ -fixation	Nishihara <i>et al.</i> , 2018

n.y., not yet.

AAPB, aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の平成27年度寄付講座助成で行われたもので、ここに感謝の意を表します。そして研究は、寄付講座特任助教（永島咲子）、寄付講座特任研究員（広瀬節子、佐藤剛、菅野菜々子）、特別研究員（高部由季）の協力のもとに実施しました。また、松浦克美東京都立大学名誉教授をはじめとして、東京都立大学大学院理学研究科生命科学専攻環境微生物学研究室の春田伸教授および国内外の多数の共同研究者の皆様のご支援とご協力、光合成複合微生物研究室（Photonic Lab.）に在籍した大学院生・卒研生の皆さんの協力の賜物です。あわせて感謝します。

文 献

Hanada, S., Hiraishi, A., Shimada, K. & Matsuura, K. 1995. *Chloroflexus aggregans* sp. nov., a filamentous phototrophic bacterium which forms dense cell aggregates by active gliding movement. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:676–681.
Hanada, S. 2019. Evolution of Photosynthetic System, *In*

Yamagishi A, Kakegawa T, Usui T (eds.), *Astrobiology: From the Origins of Life to the Search for Extraterrestrial Intelligence*, pp. 137-152, Springer, Singapore.

- He, Z., Ferlez, B., Kurashov, V., Tank, M., Golbeck, J. H. & Bryant, D. A. 2019. Reaction centers of the thermophilic microaerophile, *Chloracidobacterium thermophilum* (*Acidobacteria*) I: biochemical and biophysical characterization. *Photosynth. Res.* **142**: 87-103.
Hirose, S., Matsuura, K. & Haruta, S. 2016. Phylogenetically diverse aerobic anoxygenic phototrophic bacteria isolated from epilithic biofilms in Tama River, Japan. *Microbes Environ.* **31**: 299–306.
Hirose, S., Tank, M., Hara, E., Tamaki, H., Mori, K., Takaichi, S., Haruta, S. & Hanada, S. 2020. *Aquabacterium pictum* sp. nov., the first aerobic bacteriochlorophyll *a*-containing fresh water bacterium in the genus *Aquabacterium* of the class *Betaproteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**: 596–603.
Kanamuro, M., Sato-Takabe, Y., Muramatsu, S., Hirose, S., Muramatsu, Y., Takaichi, S. & Hanada, S. 2021. *Litoreibacter roseus* sp. nov., a novel bacteriochlorophyll *a*-containing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **71**: 004679.
Kanno, N., Haruta, S. & Hanada, S. 2019. Sulfide-dependent photoautotrophy in a filamentous anoxygenic phototrophic bacterium, *Chloroflexus aggregans*. *Microbes Environ.* **34**:304-309.
Kawai, S., Kamiya, N., Matsuura, K. & Haruta, S. 2019a.

- Symbiotic growth of a thermophilic sulfide-oxidizing photoautotroph and an elemental sulfur-disproportionating chemolithoautotroph and cooperative dissimilatory oxidation of sulfide to sulfate. *Front. Microbiol.* **10**:1150.
- Kawai, S., Nishihara, A., Matsuura, K. & Haruta, S. 2019b. Hydrogen-dependent autotrophic growth in phototrophic and chemolithotrophic cultures of thermophilic bacteria, *Chloroflexus aggregans* and *Chloroflexus aurantiacus*, isolated from Nakabusa hot springs. *FEMS Microbiol. Lett.* **366**:fnz122.
- Kawai, S., Martinez, J.N., Lichtenberg, M., Trampe, E., Kuhl, M., Tank, M., Haruta, S., Nishihara, A., Hanada, S. & Thiel, V. 2021. *In-situ* metatranscriptomic analyses reveal the metabolic flexibility of the thermophilic anoxygenic photosynthetic bacterium *Chloroflexus aggregans* in a hot spring cyanobacteria-dominated microbial mat. *Microorganisms* **9**:652.
- Martinez, J.N., Nishihara, A., Lichtenberg, M., Trampe, E., Kawai, S., Tank, M., Kuhl, M., Hanada, S. & Thiel, V. 2019. Vertical distribution and diversity of phototrophic bacteria within a hot spring microbial mat (Nakabusa hot springs, Japan). *Microbes Environ.* **34**:374-387.
- Muramatsu, S., Kanamuro, M., Sato-Takabe, Y., Hirose, S., Muramatsu, Y., Takaichi, S. & Hanada, S. 2020. *Roseobacter cerasinus* sp. nov., isolated from a fish farm. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**: 4920–4926.
- Nishida, A., Thiel, V., Nakagawa, M., Ayukawa, S. & Yamamura, M. 2018. Effect of light wavelength on hot spring microbial mat diversity. *PLoS One.* **13**:e0191650.
- Nishihara, A., Matsuura, K., Tank, M., McGlynn, S., Thiel, V. & Haruta, S. 2018. Nitrogenase activity in thermophilic chemolithoautotrophic bacteria in the phylum *Aquificae* isolated under nitrogen-fixing conditions from Nakabusa Hot Springs. *Microbes Environ.* **33**:394-401.
- Saini, M. K., ChihChe, W., Soulier, N., Sebastian, A., Albert, I., Thiel, V., Bryant, D. A., Hanada, S., & Tank, M. 2020. *Caldichromatium japonicum* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic phototrophic purple sulphur bacterium of the *Chromatiaceae* isolated from Nakabusa hot springs, Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**: 5701-5710.
- Saini, M. K., Sebastian, A., Shirotori, Y., *et al.* 2021. Genomic and phenotypic characterization of *Chloracidobacterium* isolates provides evidence for multiple species. *Front. Microbiol.* **12**: 1567.
- Sato-Takabe, Y., Hirose, S., Hori, T. & Hanada, S. 2020. Abundance and spatial distribution of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in Tama River, Japan. *Water* **12**: 150.
- Tank M. & Bryant D.A. 2015. *Chloracidobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov.: An anoxygenic microaerophilic chlorophotoheterotrophic acidobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**: 1426–1430.
- Tank, M., Thiel, V., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2017. A panoply of phototrophs: an overview of the thermophilic chlorophototrophs of the microbial mats of alkaline siliceous hot springs in Yellowstone National Park, WY, USA. *In* Hallenbeck P. (ed), *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*, pp. 87-137, Springer, Cham.
- Tank M., Costas A.M.G. & Bryant D.A. 2018. Genus: *Chloracidobacterium*. *In* Whitman WB (ed), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, pp.1-9, Wiley.
- Tarhriz, V., Hirose, S., Fukushima, S., Hejazi, M.A., Imhoff, J.F., Thiel, V. & Hejazi, M.S. 2019. Emended description of the genus *Tabrizicola* and the species *Tabrizicola aquatica* as aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **112**: 1169–1175.
- Thiel, V., Wood, J.M., Olsen, W.T., Tank, M., Klatt, C.G., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2016. The dark side of the Mushroom Spring microbial mat: life in the shadow of Chlorophototrophs. I. Microbial diversity based on 16S rRNA gene amplicons and metagenomic sequencing. *Front. Microbiol.* **7**:919.
- Thiel, V., Hugler, M., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2017. The dark side of the Mushroom Spring microbial mat: life in the shadow of Chlorophototrophs. II. Metabolic functions of abundant community members predicted from metagenomic analyses. *Front. Microbiol.* **8**:943.
- Thiel, V., Garcia Costas, A.M., Fortney, N.W., Martinez, J.N., Tank, M., Roden, E.E., Boyd, E.S., Ward, D.M., Hanada, S. & Bryant, D.A. 2019. “*Candidatus* Thermonerobacter thiotrophicus,” A non-phototrophic member of the *Bacteroidetes/Chlorobi* with dissimilatory sulfur metabolism in hot spring mat communities. *Front. Microbiol.* **9**: 3159.
- Thiel, V., Tank, M., & Bryant, D.A. 2018. Diversity of chlorophototrophic bacteria revealed in the omics era. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 21–49.
- Tsuji, J.M., Shaw N.A., Nagashima, S., Venkiteswaran, J.J., Schiff, S.L., Hanada, S., Tank, M. & Neufeld, J.D. 2020a. Anoxygenic phototrophic *Chloroflexota* member uses a Type I reaction center. *bioRxiv.* 2. *bioRxiv.* 2020.07.07.190934.
- Tsuji, J.M., Tran, N., Schiff, S.L., Venkiteswaran, J.J., Molot, L.A., Tank, M., Hanada, S. & Neufeld, J.D. 2020b. Anoxygenic photosynthesis and iron–sulfur metabolic potential of *Chlorobia* populations from seasonally anoxic Boreal Shield lakes. *ISME J.* **14**: 2732–2747.
- Zill, J.C., He, Z., Tank, M., *et al.* 2018. ¹⁵N photo-CIDNP MAS NMR analysis of reaction centers of *Chloracidobacterium thermophilum*. *Photosynth. Res.* **137**: 295–305.

光合成複合微生物系の形成・維持機構

Vera THIEL*

東京都立大学大学院理学研究科

光合成複合微生物系の環境・エネルギー活用シーズ開発寄付講座

〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1

Development and maintenance of photosynthetic microbial communities

Vera THIEL*

Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

Minami-Osawa 1-1, Hachioji, Tokyo 192-0397

In this study, we analyzed cyanobacteria-dominated microbial mats in Nakabusa hot springs (Nagano, Japan). To elucidate development of the mats, we identified microbial community members and their vertical distribution. The upper layer was dominated by cyanobacteria and middle to deeper layers contained various anoxygenic photosynthetic bacteria. Illumination of different wavelength detected effects of each phototroph on other bacterial members. Furthermore, we found that *Chloroflexus aggregans*, a major anoxygenic photosynthetic bacteria in the mats possessed multiple modes for the autotrophic growths. Meta-transcriptomic analysis of the mats indicated that *C. aggregans* changed its metabolisms depending on the amount of solar irradiation during a day. These results showed the cooperation of cyanobacteria and anoxygenic photosynthetic bacteria to efficiently develop and maintain the photosynthetic microbial community.

Key words: microbial mat, hot spring, cyanobacteria, anoxygenic photosynthesis

緒言

光合成複合微生物系は二酸化炭素を吸収し、無機物からの有機物を生産する場として、生産業、温室効果ガス対策や宇宙開発でも注目されている。そのひとつである温泉微生物マットは微生物種構成が単純で、複合微生物

系を理解するためのモデルとしても研究されている。これまでも国内外の温泉を対象に幅広い研究が行われ、特に Thomas D. Brock 博士 (1926-2021) (<https://www.youtube.com/watch?v=YdkTW30Gv64>) による *Thermus aquaticus* の発見をはじめとして、米国イエローストーン国立公園の温泉に発達する微生物マットを対象にした研究報告が多数ある (Tank *et al.*, 2017)。微生物マットは、シアノバクテリアや酸素非発生型光合成細菌をはじめとして多様な微生物が群集を形成していることが知られるが (Thiel *et al.*, 2016; Thiel *et al.*, 2017)、まだ培養されていない微生物も含まれ、その群集形成・維持機構について未解明な部分が多い。

本研究では弱アルカリ性硫黄泉である長野県中房温泉に発達する微生物マットを主な対象として、その層構造、光吸収分布、各光合成細菌の役割を現地培養法およびオミックス解析を用いて解析した。中房温泉には一年を通して野外に 90℃ 以上の温泉水が安定に流れ出している環境がある。流れに伴い温度勾配が形成され、各温度域の温泉流水中には微生物マットが安定して発達しており (Everroad *et al.*, 2012)、また微生物学的な基礎的知見

E-mail: photomic2015@gmail.com

*Vera THIEL 現 Leibniz Institute, DSMZ vet20@dsMZ.de

共同研究者：花田 智 (東京都立大学大学院理学研究科、
現 産業技術総合研究所)。
永島咲子 (東京都立大学大学院理学研究科、
現 神奈川大学)。
佐藤 剛 (東京都立大学大学院理学研究科、
現 神奈川大学)。
菅野菜々子 (東京都立大学大学院理学研究科、
現 関西学院大学)。
福島俊一 (東京都立大学大学院理学研究科、
現 大阪大学)。
Martinez, J. N. (東京都立大学大学院理学研究科、
現 University of St. La Salle, 広島大学)。
春田 伸 (東京都立大学大学院理学研究科)。

も集積してきていることから (Nakagawa & Fukui, 2002; 春田, 2012), 本研究を遂行するのに好適な環境である。

実験方法

試料採取と微小センサーを用いた解析

長野県中房温泉の56℃から64℃の温泉流水中に発達する緑色の微生物マットを採取した。深度ごとの分光放射照度は、ハロゲン光源のもと、80 μ m径の微小センサー・光ファイバー分光計 (USB2000+; Ocean Optics, Florida, USA) を用いて測定した。マットの層構造解析のためには、層構造を崩さないように自作のコルクボーラーを用いてマットをくり抜き、メスを用いて約1mm厚ごとの層に切り分けた。微生物マットからのDNAやRNA抽出については既報論文に詳細に示した (Nishida *et al.*, 2018; Martinez *et al.*, 2019; Kawai *et al.*, 2021)。

PCR アンプリコン解析

細菌の16S rRNA 遺伝子断片を対象とするユニバーサルプライマーを用いてPCR増幅し、増幅産物の塩基配列はイルミナ社 MiSeq プラットホームを用いて取得した。得られた配列データは常法に従い処理し、rRNA 遺伝子塩基配列データベースとの相同性検索を行った (Nishida *et al.*, 2018; Martinez *et al.*, 2019)。

微生物マットの現地培養

採取した微生物マットをホモジナイズし、マイクロ培養コンテナ (2 \times 1.6 \times 0.5cm³) に分注した。コンテナ上部は透明なアクリル板で覆い、上部からLED (5mA) (OSR5CA5B61P, 625nm; SX534IR-730, 730nm; TSHF5410, 890nm; 秋月電子通商) を用いて光を照射した。コンテナは温泉水中 (50℃ \sim 56℃, pH7.3) に設置し、培養した。

Chloroflexus の独立栄養条件での培養

無機培地を下記のように調製し、光照射条件、55℃で培養した。培地組成 (1リットルあたり): 0.1g (NH₄)₂SO₄, 0.15g KH₂PO₄, 0.16g K₂HPO₄ (pH7.0)。ここに既報 (Hanada *et al.*, 1995) に従いビタミン混合液、微量ミネラル溶液を添加した。培養容器の気相は、N₂:CO₂ (80%:20% [v/v]) で満たして嫌気条件とし、オートクレーブ滅菌後、NaHCO₃ および Na₂S をそれぞれ終濃度 50mM, 1.5mM となるよう無菌的に添加した。

RNA-Seq 解析

微生物マットから抽出した全RNAからRibo-Zero

bacteria kit (イルミナ社) を用いてリボソームRNAを除去した。ランダムプライマーを用いてcDNAを合成し、NextSeq 500 (イルミナ社) で塩基配列情報を取得した。得られたデータは情報に従い処理したのち (Kawai *et al.*, 2021), 各遺伝子の転写量は、各試料の全リード数あたりの相対値として評価・比較した。

結果および考察

シアノバクテリア優占微生物マットの層構造と微生物種の分布

アルカリ硫黄泉のひとつ、長野県中房温泉に発達するシアノバクテリア優占微生物マット (約5mm厚) を採取し、その層構造 (垂直分布) について解析した (Martinez *et al.*, 2019)。まずハロゲン光源照射下で、微小センサーを用いて上部1mmについて深度ごとの分光放射照度を測定した (Fig.1)。この結果から、マット表層部からクロロフィル *a* およびフィコシアニンによる吸収が強いことが分かる。バクテリオクロロフィル *a* や *c* の吸収は深部になるほど顕著で、また表層から1mm下までこれらバクテリオクロロフィルが吸収する光が届いていることを示している。

次いで、5mm厚の微生物マットを約1mmずつ五つの層に分け、DNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子を対象にPCRアンプリコン解析した (Martinez *et al.*, 2019)。主要構成種である光合成細菌についての結果を Fig.2 に示す。表層部にはクロロフィル *a* (Chl *a*) およびフィコシアニンを有するシアノバクテリア (*Thermosynechococcus*) が優占するが、中央部から底部にかけてバクテリオクロロフィル *a* (BChl *a*) をもつ糸状性酸素非発生型光合成細菌 *Roseiflexus* が多く分布していた。またバクテリオクロロフィル *c* (BChl *c*) を有する糸状性酸素非発生型光合成細菌 *Chloroflexus* は特に上部に多いことが分かった。さらに存在量は1%以下と少ないものの、新規光合成細菌 *Chloracidobacterium* や未培養 *Chlorobi* 細菌も検出された。また、深度ごとに酸素要求性の異なる化学合成細菌が分布していることが示された (data not shown)。これらのうちいくつかは新たに分離培養に成功している (Saini *et al.*, 2020; Iino *et al.*, 2020; Nishihara *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2021)。以上の結果から、微生物マットの層構造について Fig.3 のようにまとめることができる。

さらに、光の波長 (625nm, 730nm, 890nm) およびそれらを利用する光合成細菌と他細菌の関係を探った (Nishida *et al.*, 2018)。微生物マットを採取し、2 \times 1.6 \times 0.5cm³ サイズの培養槽に入れ、現地で自然の温泉水を供給しながら培養した。各培養槽にはLED光源を用いて異なる波長の光を照射した。20日間の培養後、

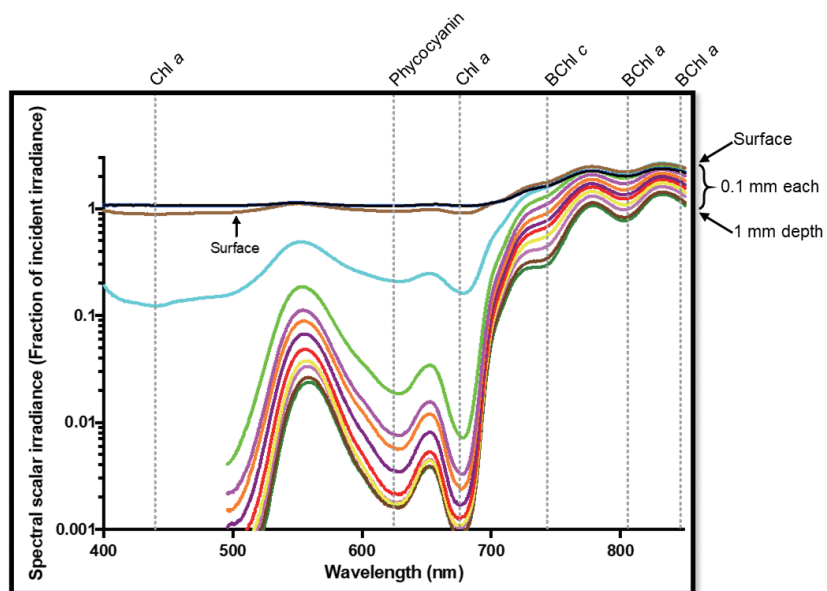


Fig. 1 Spectral irradiance measured in different depths in the hot spring microbial mat.

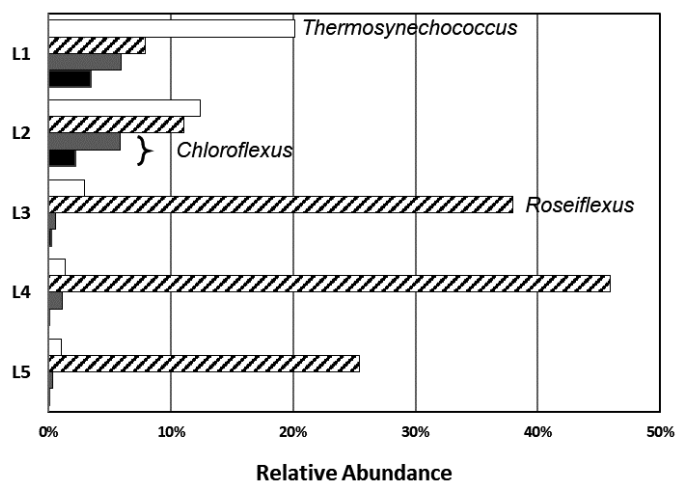


Fig. 2 Vertical distribution of photosynthetic members in the hot spring microbial mat. L1 to L5 indicate mat layers (L1, surface; L5, bottom).

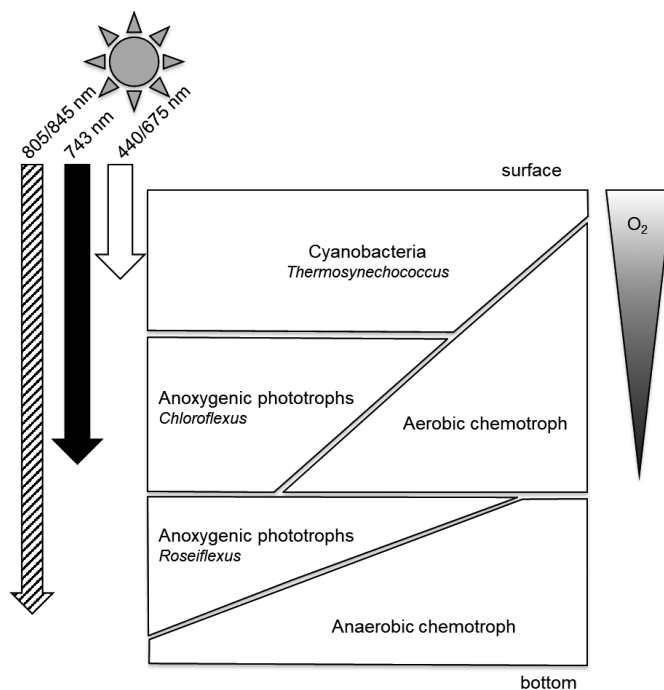


Fig. 3 Schematic representation of the hot spring microbial mats.

DNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子を対象にしたPCRアンプリコン解析を行った。予想した通り、625nm 照射条件では *Thermosynechococcus* シアノバクテリアが優占化し、730nm と 890nm の照射ではそれぞれ *Chloroflexus* と *Roseiflexus* が優占化することが確認できた。*Thermosynechococcus* の増加に伴い、好気従属栄養細菌である *Thermus* をはじめとする多様な細菌が増加することが明らかになった。一方、*Chloroflexus* と *Roseiflexus* 等の酸素非発酵型光合成細菌の増加は、硫黄不均化菌などの硫黄代謝を活性化することが示された。以上から、微生物マットにおける光合成に伴う炭素、硫黄循環の直接的な知見を得ることができた。

シアノバクテリア優占微生物マットにおける酸素非発酵型光合成細菌 *Chloroflexus* の役割

糸状性酸素非発酵型光合成細菌 *Chloroflexus aggregans* は長野県中房温泉に発達するシアノバクテリア優占微生物マットにおける主要な光合成細菌のひとつであり、国内外で多数の分離株の報告があるが、まだその生理機能に不明な点がある。基準株のゲノム解析からは炭酸固定経路（3-hydroxypropionate bi-cycle）の遺伝子セットが見つかっているが（Klatt *et al.* 2007）、独立栄養の炭酸固定生育は確認されていない。そこで中房温泉の微生物マットから新規に *C. aggregans* 株を分離し、その生理性

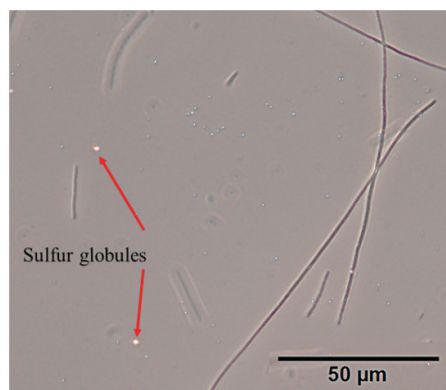


Fig. 4 Phase contrast photomicrograph of the culture of *C. aggregans* with sulfide.

状を解析し、基準株と比較した（Kanno *et al.* 2019）。新規分離株 ACA-12 の 16S rRNA 遺伝子塩基配列は、基準株 MD66 と 98.9% の相同性を示した。ACA-12 株は、硫化水素を唯一の電子源、CO₂ を唯一の炭素源とした培地で、嫌気照射の下、増殖することが確認できた。その増殖に伴い、硫化水素濃度の減少および元素硫黄の蓄積が観察された（Fig. 4）。基準株についても同様の条件で試験したところ、わずかながら増殖することが確認できた。

上述したように微生物マットに730nmの光を照射して現地で培養した実験では *Chloroflexus* と硫黄不均化細菌の強い関係が示唆されている。これらの知見も基に、Kawaiらは *C. aggregans* と硫黄不均化細菌 *Caldimicrobium thiodismutans* (中房温泉分離株) (Kojima *et al.*, 2016) の共培養系を確立し解析した (Kawai *et al.*, 2019a)。その結果、硫黄不均化細菌による元素硫黄の除去が *C. aggregans* の硫化水素依存的な光独立栄養を促進するとともに、*C. aggregans* による硫化水素の消費が硫黄不均化細菌の生育を支えることが分かった (Kawai *et al.*, 2019a)。また中房温泉から分離した *C. aggregans* 株に水素ガス依存的な光合成独立栄養生育能および酸素呼吸独立栄養生育能があることも明らかになってきた (Kawai *et al.*, 2019b)。

微生物マットにおける *C. aggregans* の多様な代謝能の使い分け、役割を明らかにするため、微生物マットの転写解析を実施した (Kawai *et al.*, 2021)。現地においてマット試料を経時的に採取して、RNAを抽出し、RNA-Seq解析に供した。*Chloroflexus* の炭酸固定経路の鍵酵素遺伝子に着目すると、夜明け前および夕方に転写量が高くなっており (Fig.5)、一次生産者として働いていると考えられた。夜明け前にはヒドロゲナーゼ遺伝子の転写も活発で (data not shown, Fig.7 in Kawai *et al.*, 2021)、水素酸化による化学独立栄養生育していると考えられた。日照量が大きくシアノバクテリアの光合成の活性化

による酸素濃度が400 μ mol/Lを超える日中には、シアノバクテリアによって供給される有機物を酸化して、もっぱら好気呼吸で従属栄養的に生育していると考えられた。夕方には酸素濃度が減少し、硫黄や水素酸化酵素遺伝子の転写量の上昇が検出されたことから (data not shown, Fig.7 in Kawai *et al.*, 2021)、嫌気的な光合成が活発化していると考えられた。また夜間には発酵代謝に切り替わることが示唆された。

さらに、*C. aggregans* には滑走運動能が知られており、その運動は他細菌や環境 (光や酸素、温度) によって影響を受けることから、微生物マット内での動的な分布変化もあることが予想される (Hanada *et al.*, 2002; Morohoshi *et al.*, 2015)。

結 語

シアノバクテリアが優占化する微生物マットの層構造を、特に光合成微生物およびその代謝活性に注目して明らかにしてきた。層ごとに異なる波長の光を使い分け、また日周サイクルに応じた代謝変化を示すことができた。現地培養装置の開発も進めたが (Cantrell *et al.* 2017)、メタゲノム解析からは新規系統の光合成細菌や異化的硫黄代謝能を有する未培養細菌も発見され (Thiel *et al.* 2019)、未解明な部分も残されている。本研究では、

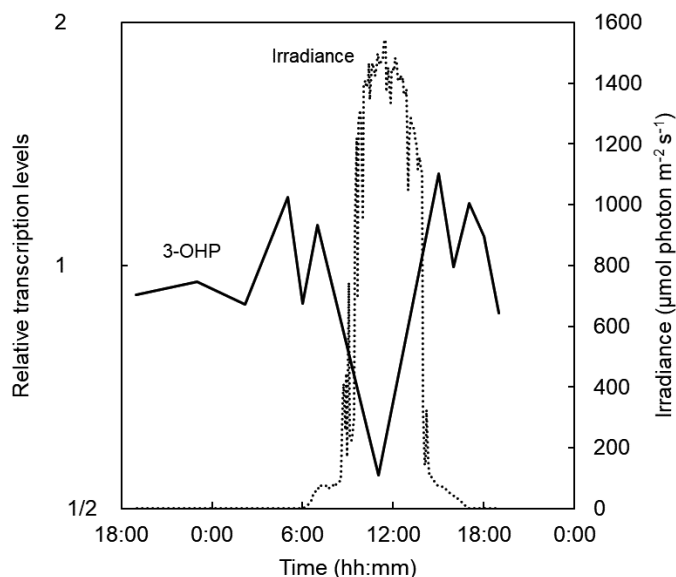


Fig. 5 Relative transcription level of genes encoding key enzymes of the 3-hydroxypropionate (3-OHP) bi-cycle and the photon irradiance (400–700 nm). The mean values of the relative transcription levels of key 3-OHP enzymes, malonyl-CoA reductase and propionyl-CoA synthase are shown.

微生物マットの炭素代謝、硫黄代謝が明らかになってきたが、近年、陸上温泉から多様な窒素固定細菌も見出されるようになり (Nishihara *et al.* 2018; Chen *et al.* 2021)、窒素循環、エネルギー分配を含む、全容解明に大きく近づいている。

要 約

シアノバクテリアが優占化し、5mm厚まで生長した長野県中房温泉の微生物マットについて、その形成機構を解析した。まず層構造について、表層部にはシアノバクテリアが優占するが、中央部から深部にかけて多様な酸素非発生源型光合成細菌が分布していることがわかった。微生物マットに異なる波長の光を照射し、群集構造の変化を観察することで、各光合成細菌の他菌に与える影響を明らかにした。また主要な酸素非発生源型光合成細菌である *Chloroflexus aggregans* が、多様な独立栄養生育能を有することを発見した。さらに、微生物マットの転写解析から、本菌が日照量に応じて、電子源（硫化水素、水素、有機物等）を使い分けていることを明らかにした。以上から、シアノバクテリアと他の酸素非発生源型光合成細菌が協調し、光合成微生物複合系を効果的に形成している様子を示すことができた。

本助成で得られた研究成果の報告

- 1) Thiel, V., Wood, J.M., Olsen, M.T., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2016. The dark side of the Mushroom Spring microbial mat: life in the shadow of chlorophototrophs. Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM) (March 13-16, Jena, Germany)
- 2) 花田智. 2016. 原始的な光合成—酸素非発生源型光合成—. 第89回日本細菌学会総会 (3月23-25, 大阪)
- 3) Thiel, V. 2017. From Kiel to Pennsylvania and Tokyo. Following the call of photosynthetic bacteria. Retirement Symposium for Prof. Dr. Johannes F. Imhoff. (March, Kiel, Germany)
- 4) Nishihara, A., McGlynn, S.E., Thiel, V., Matsuura, K. & Haruta, S. 2017. Biological nitrogen fixation coupled to chemolithotrophic sulfur metabolisms in thermophilic microbial community developed at geothermal springs. JpGU-AGU Joint Meeting 2017 (May 20-25, Chiba)
- 5) 花田智. 2017. 分離培養の進展を阻害しているのは「分離できない」って思い込み以外の何ものでもない。環境微生物系学会合同学会2017 (8月29-31日, 仙台)
- 6) 花田智. 2017. 温泉バイオマット—温泉に存在する特殊な微生物生態系—. 生命科学系学会合同年次大会ConBio2017 (12月6-9日, 神戸)
- 7) 花田智. 2017. 極限の世界から. 第7回日本微生物学連盟フォーラム「微生物—変わり者たちの素顔」 (12月16日, 東京)
- 8) 花田智. 2018. 古地球生態系での酸素非発生源型光合成細菌

菌の役割. 第59回日本植物生理学会年会, 第3回光合成細菌ワークショップ (3月27日, 札幌)

- 9) Thiel, V. 2018. 50 years studying Yellowstone's Mushroom Spring microbial mats. Current Topics in Bio and Food Technology Seminar, Flensburg University of Applied Sciences (June 29, Flensburg, Germany)
- 10) Thiel, V., Tank, M., Martinez, J.N., Trampe, E.C.L., Lichtenberg, M., Kühl, M., Hanada, S. 2018. Microbial diversity and activity in a hot spring associated oxygenic phototrophic microbial mat disclosed by a comprehensive multi-method study. 16th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (ISPP) (August 5-9, Vancouver, Canada)
- 11) Tank, M., Thiel, V., Bryant, D.A., Hanada, S. 2018. Hot springs microbial mats are treasure chests for the isolation of novel chlorophotrophic bacteria. 16th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (ISPP) (August 5-9, Vancouver, Canada)
- 12) 菅野菜々子. 2018. 温泉微生物マットの大黒柱：光合成細菌の一次生産者としての役割とその能力. 自由集会「ジグソーパズルのピースを埋める—単一微生物種にフォーカスする若手研究者たち—」. 日本微生物生態学会第32回大会 (7月11-13日, 沖縄)
- 13) 花田智. 2018. 酸素非発生源型光合成の複雑なタペストリー. 日本微生物資源学会第25会大会 (6月13-15日, つくば)
- 14) Nishihara, A., McGlynn, S.E., Thiel, V., Tank, M., Nobu, M. K., Tamaki, H. & Haruta, S. 2019. Evidence of active nitrogen fixation in hyperthermophilic bacteria from terrestrial hot springs. 日本微生物生態学会第33回大会 (9月10-13日, 山梨)
- 15) Martinez, J.N. 2020. Vertical distribution of phototrophic bacteria exhibits niche differentiation within hot spring-associated microbial mat. Friday Seminar, Department of Biology, The State University of New York-Oneonta, (February 21, Oneonta, NY, USA)

原著論文

- 1) Fukushima, S., Morohoshi, S., Hanada, S., Matsuura, K. & Haruta, S. 2016. Gliding motility driven by individual cell-surface movements in a multicellular filamentous bacterium *Chloroflexus aggregans*. FEMS Microbiol. Lett. **363**: fnw056.
- 2) Thiel, V., Wood, J.M., Olsen, M.T., Tank, M., Klatt, C.G., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2016. The dark side of the mushroom spring microbial mat: Life in the shadow of chlorophototrophs. I. Microbial diversity based on 16S rRNA gene amplicons and metagenomic sequencing. Front. Microbiol. **7**: 919.
- 3) Bernstein H.C., McClure R.S., Thiel V., Sadler N.C., Kim Y.-M., Chrisler W.B., Hill E.A., Bryant D.A., Romine M.F., Jansson J.K., Fredrickson J.K. & Beliaev A.S. 2017. Indirect interspecies regulation: Transcriptional and physiological responses of a cyanobacterium to heterotrophic partnership. mSystems. **2**: e00181-16.
- 4) Thiel, V., Tank, M., Tomsho, L.P., Burhans, R., Gaya, S.E., Hamilton, T.L., Schuster, S.C. & Bryant, D.A. 2017. Draft genome sequence of *Anoxybacillus ayderensis* strain MT-Cab

- (Firmicutes). *Genome Announc.* **5**: e00547-17.
- 5) Thiel, V., Drautz-Moses, D.I., Purbojati, R.W., Schuster, S.C., Lindemann, S. & Bryant, D.A. 2017. Genome sequence of *Prosthecochloris* sp. strain HL-130-GSB from the phylum *Chlorobi*. *Genome Announc.* **5**: e00538-17.
 - 6) Thiel V., Hügler M., Ward D.M. & Bryant D.A. 2017. The dark side of the Mushroom Spring microbial mat: Life in the shadow of chlorophototrophs. II. metabolic functions of abundant community members predicted from metagenomic analyses. *Front. Microbiol.* **8**:943.
 - 7) Tank, M., Liu, Z., Frigaard, N.U., Tomsho, L.P., Schuster, S.C. & Bryant, D.A. 2017. Complete genome sequence of the photoautotrophic and bacteriochlorophyll e-synthesizing green sulfur bacterium *Chlorobaculum limnaeum* DSM 1677T. *Genome Announc.* **5**: e00529-17.
 - 8) Nishida, A., Thiel, V., Nakagawa, M., Ayukawa, S. & Yamamura, M. 2018. Effect of light wavelength on hot spring microbial mat biodiversity. *PLoS One.* **13**: e0191650.
 - 9) Nishihara A., Haruta S., McGlynn S.E., Thiel V. & Matsuura K. 2018. Nitrogen fixation in thermophilic chemosynthetic microbial communities depending on hydrogen, sulfate, and carbon dioxide. *Microbes Environ.* **33**: 10–18.
 - 10) 福島俊一, 春田伸. 2018. 糸状性細菌の滑走運動. *生物工学会誌***96**: 240-265.
 - 11) Thiel, V., Costas, A.M.G., Fortney, N.W., Martinez, J.N., Tank, M., Roden, E.E., Boyd, E.S., Ward, D.M., Hanada, S. & Bryant, D.A. 2019. “*Candidatus* Thermoneobacter thiotrophicus,” a non-phototrophic member of the *Bacteroidetes/Chlorobi* with dissimilatory sulfur metabolism in hot spring mat communities. *Front. Microbiol.* **10**: 3159.
 - 12) Nishihara, A., Thiel, V., Matsuura, K., McGlynn, S.E. & Haruta, S. 2018. Phylogenetic diversity of nitrogenase reductase genes and possible nitrogen-fixing bacteria in thermophilic chemosynthetic microbial communities in Nakabusa Hot Springs. *Microbes Environ.* **33**: 357–365.
 - 13) Nishihara, A., Matsuura, K., Tank, M., McGlynn, S.E., Thiel, V. & Haruta, S. 2018. Nitrogenase activity in thermophilic chemolithoautotrophic bacteria in the phylum *Aquificae*; isolated under nitrogen-fixing conditions from Nakabusa Hot Springs. *Microbes Environ.* **33**: 394–401.
 - 14) Martinez, J.N., Nishihara, A., Lichtenberg, M., Trampe, E., Kawai, S., Tank, M., Kühl, M., Hanada, S. & Thiel, V. 2019. Vertical distribution and diversity of phototrophic bacteria within a hot spring microbial mat (Nakabusa Hot Springs, Japan). *Microbes Environ.* **34**: 374–387.
 - 15) Kanno, N., Haruta, S. & Hanada, S. 2019. Sulfide-dependent Photoautotrophy in the Filamentous Anoxygenic Phototrophic Bacterium, *Chloroflexus aggregans*. *Microbes Environ.* **34**: 304–309.
 - 16) Kawai, S., Martinez, J.N., Lichtenberg, M., Trampe, E., Kühl, M., Tank, M., Haruta, S., Nishihara, A., Hanada, S. & Thiel, V. 2021. In-Situ Metatranscriptomic analyses reveal the metabolic flexibility of the thermophilic anoxygenic photosynthetic bacterium *Chloroflexus aggregans* in a hot spring cyanobacteria-dominated microbial mat. *Microorganisms* **9**: 652.
 - 17) Martinez, J.N., Kawai, S., Saini, M.K., Tank, M., Hanada, S. & Thiel, V. 2020. Draft genome sequence of a filamentous anoxygenic phototrophic bacterium, “*Candidatus* Roseilinea sp. strain NK_OTU-006,” recovered from metagenomic data of a hot spring microbial mat. *Microbiol. Resour. Announc.* **9**: e01104-20.
 - 18) Saini, M.K., Chihche, W., Soulier, N., Sebastian, A., Albert, I., Thiel, V., Bryant, D.A., Hanada, S. & Tank, M. 2020. *Caldichromatium japonicum* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic phototrophic purple sulphur bacterium of the *Chromatiaceae* isolated from Nakabusa hot springs, Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**: 5701–5710.
- その他 (総説・書籍・特許など)
- 1) Hanada, S. 2016. (Research Highlight) Anoxygenic photosynthesis :A photochemical reaction that does not contribute to oxygen reproduction. *Microbes Environ.* **31**: 1-3.
 - 2) Thiel, V., Tank, M. & Bryant, D.A. 2018. Diversity of Chlorophototrophic Bacteria Revealed in the Omics Era. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 21–49.
 - 3) Tank, M., Thiel, V., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2017. A panoply of phototrophs: An Overview of the thermophilic chlorophototrophs of the microbial mats of alkaline siliceous hot springs in Yellowstone National Park, WY, USA, *In* Hallenbeck, P.C. (ed.), *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Environmental and Applied Aspects*, pp. 87-137, Springer International Publishing, Switzerland.
 - 4) Hanada, S. 2019. Evolution of Photosynthetic System, *In* Yamagishi A, Kakegawa T, Usui T (eds.), *Astrobiology: From the Origins of Life to the Search for Extraterrestrial Intelligence*, pp. 137-152, Springer, Singapore.
 - 5) 花田智 (訳), 2016. 微生物 - 目には見えない支配者たち -, Money, N.P. (著), サイエンスパレット031, 全205ページ, 丸善出版, 東京.

謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また、本研究の遂行にご協力いただいた Kühl 博士 (University of Copenhagen, Denmark), Lichtenberg 博士 (University of Copenhagen, Denmark), Trampe 博士 (University of Copenhagen, Denmark), Hügler 博士 (DVGW-Technologiezentrum Wasser, Germany), Bryant 博士 (Pennsylvania State University, USA), Wood 博士 (Montana State University, USA), Olsen 博士 (Montana State University, USA), Klatt 博士 (Montana State University, USA), Ward 博士 (Montana State University, USA), 山村雅幸博士 (東京工業大学), 西田暁史博士 (東京工業大学, 現 早稲田大学), Cantrell 博士 (Georgia Institute of Technology, USA), Sutton 博士 (Georgia Institute of Technology, USA), Tan 博士 (Georgia Institute of Technology, USA), Duca 博士 (Georgia Institute of Technology, USA), Balayan 博士 (Georgia Institute of Technology, USA), Rennie 博士 (Georgia

Institute of Technology, USA), Stockton 博士 (Georgia Institute of Technology, USA), Rajesh 博士 (Wheeler High School, USA), 河合繁博士 (海洋研究開発機構), 西原亜理沙博士 (産業技術総合研究所), 中房温泉社長・百瀬孝仁氏, 嶋田敬三東京都立大学名誉教授ならびに光合成複合微生物寄付講座 (Photomic Lab.) の学生諸氏に感謝の意を表します。

文 献

- Cantrell, T., Sutton, S.A., Tan, G. *et al.* 2017. *In situ* culturing with isolation-chip technology in hydrogeothermal springs. American Geophysical Union, Fall Meeting #V51C-0369.
- Chen, Y., Nishihara, A. & Haruta, S. 2021. Nitrogen-fixing ability and nitrogen fixation related genes of thermophilic fermentative bacteria in the genus *Caldicellulosiruptor*. *Microbes Environ.* **36**:ME21018
- Everroad, C. R., Otaki, H., Matsuura, K. & Haruta, S. 2012. Diversification of bacterial community composition along a temperature gradient at a thermal spring. *Microbes Environ.* **27**:374-381.
- Hanada, S., Hiraishi, A., Shimada, K. & Matsuura, K. 1995. *Chloroflexus aggregans* sp. nov., a filamentous phototrophic bacterium which forms dense cell aggregates by active gliding movement. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:676-681.
- Hanada, S., Shimada, K. & Matsuura, K. 2002. Active and energy-dependent rapid formation of cell aggregates in the thermophilic photosynthetic bacterium *Chloroflexus aggregans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**:275-279.
- 春田伸. 2012. 陸上温泉に分布する光合成細菌の系統分類と種分化に関する研究. *IFO Research Communications*, **26**: 39-47.
- Iino, T., Kawai, S., Yuki, M., Dekio, I., Ohkuma, M. & Haruta, S. 2020. *Thermaurantimonas aggregans* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic heterotrophic aggregating bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**:1117-1121.
- Kanno, N., Haruta, S. & Hanada, S. 2019. Sulfide-dependent photoautotrophy in a filamentous anoxygenic phototrophic bacterium, *Chloroflexus aggregans*. *Microbes Environ.* **34**:304-309.
- Kawai, S., Kamiya, N., Matsuura, K. & Haruta, S. 2019a. Symbiotic growth of a thermophilic sulfide-oxidizing photoautotroph and an elemental sulfur-disproportionating chemolithoautotroph and cooperative dissimilatory oxidation of sulfide to sulfate. *Front. Microbiol.* **10**:1150.
- Kawai, S., Nishihara, A., Matsuura, K. & Haruta, S. 2019b. Hydrogen-dependent autotrophic growth in phototrophic and chemolithotrophic cultures of thermophilic bacteria, *Chloroflexus aggregans* and *Chloroflexus aurantiacus*, isolated from Nakabusa hot springs. *FEMS Microbiol. Lett.* **366**:fnz122.
- Kawai, S., Martinez, J.N., Lichtenberg, M., Trampe, E., Kuhl, M., Tank, M., Haruta, S., Nishihara, A., Hanada, S. & Thiel, V. 2021. *In-situ* metatranscriptomic analyses reveal the metabolic flexibility of the thermophilic anoxygenic photosynthetic bacterium *Chloroflexus aggregans* in a hot spring cyanobacteria-dominated microbial mat. *Microorganisms* **9**:652.
- Klatt, C. G., Bryant, D. A. & Ward, D. M. 2007. Comparative genomics provides evidence for the 3-hydroxypropionate autotrophic pathway in filamentous anoxygenic phototrophic bacteria and in hot spring microbial mats. *Environ. Microbiol.* **9**:2067-2078.
- Kojima, H., Umezawa, K. & Fukui, M. 2016. *Caldimicrobium thiodismutans* sp. nov., a sulfur-disproportionating bacterium isolated from a hot spring, and emended description of the genus *Caldimicrobium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**:1828-1831.
- Martinez, J.N., Nishihara, A., Lichtenberg, M., Trampe, E., Kawai, S., Tank, M., Kuhl, M., Hanada, S. & Thiel, V. 2019. Vertical distribution and diversity of phototrophic bacteria within a hot spring microbial mat (Nakabusa hot springs, Japan). *Microbes Environ.* **34**:374-387.
- Morohoshi, S., Matsuura, K. & Haruta, S. 2015. Secreted protease mediates interspecies interaction and promotes cell aggregation of the photosynthetic bacterium *Chloroflexus aggregans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **362**:1-5.
- Nakagawa, T. & Fukui, M. 2002. Phylogenetic characterization of microbial mats and streamers from a Japanese alkaline hot spring with a thermal gradient. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **48**:211-222.
- Nishida, A., Thiel, V., Nakagawa, M., Ayukawa, S. & Yamamura, M. 2018. Effect of light wavelength on hot spring microbial mat diversity. *PLoS One* **13**:e0191650.
- Nishihara, A., Matsuura, K., Tank, M., McGlynn, S., Thiel, V. & Haruta, S. 2018. Nitrogenase activity in thermophilic chemolithoautotrophic bacteria in the phylum *Aquificae* isolated under nitrogen-fixing conditions from Nakabusa Hot Springs. *Microbes Environ.* **33**:394-401.
- Saini, M.K., ChihChe, W., Soulier, N., Sebastian, A., Albert, I., Thiel, V., Bryant, D.A., Hanada, S. & Tank, M. 2020. *Caldichromatium japonicum* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic phototrophic purple sulphur bacterium of the *Chromatiaceae* isolated from Nakabusa hot springs, Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**:5701-5710.
- Tank, M., Thiel, V., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2017. A panoply of phototrophs: an overview of the thermophilic chlorophototrophs of the microbial mats of alkaline siliceous hot springs in Yellowstone National Park, WY, USA. *In* Hallenbeck P. (ed), *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*, pp. 87-137, Springer, Cham.
- Thiel, V., Wood, J.M., Olsen, W.T., Tank, M., Klatt, C.G., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2016. The dark side of the Mushroom Spring microbial mat: life in the shadow of chlorophototrophs. I. Microbial diversity based on 16S rRNA gene amplicons and metagenomic sequencing. *Front. Microbiol.* **7**:919.
- Thiel, V., Hugler, M., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2017. The dark side of the Mushroom Spring microbial mat: life in the shadow of Chlorophototrophs. II. Metabolic functions of abundant community members predicted from metagenomic analyses. *Front. Microbiol.* **8**:943.
- Thiel, V., Garcia Costas, A.M., Fortney, N.W., Martinez, J.N., Tank, M., Roden, E.E., Boyd, E.S., Ward, D.M., Hanada, S. & Bryant, D.A. 2019. "*Candidatus* Thermonerobacter thiotrophicus," A non-phototrophic member of the *Bacteroidetes/Chlorobi* with dissimilatory sulfur metabolism in hot spring mat communities. *Front. Microbiol.* **9**:3159.

新規酸素非発生型光合成細菌 *Chloracidobacterium* の発見とその特性

Marcus TANK*

東京都立大学大学院理学研究科
光合成複合微生物系の環境・エネルギー活用シーズ開発寄付講座
〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1

Characterization of novel anoxygenic photosynthetic bacteria *Chloracidobacterium*

Marcus TANK*

Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University
Minami-Osawa 1-1, Hachioji, Tokyo 192-0397

Chloracidobacterium is reported to be the first phototrophic bacterium in the phylum *Acidobacteria* in 2015. For this novel thermophilic phototroph, we clarified the biochemical properties of the photosynthetic reaction center and determined phylogenetic diversity of the genus *Chloracidobacterium* through isolation of several strains from hot springs and their comparative genomics. *Chloracidobacterium* does not possess gene sets for autotrophic carbon fixing pathways but addition of CO₂ to the culture stimulated the growth. Stable isotope tracer analysis revealed CO₂ utilizing metabolic pathways in *Chloracidobacterium*.

Key words: *Acidobacterium*, type I reaction center, anaplerotic reaction, hot spring

緒 言

細菌による光合成は、生命が誕生したころの古地球の高温環境でも進行していたと予想される。それらの好熱性光合成細菌系統群が起源となり、真核生物の植物に至る光合成生物の多様化が進み、地球上の生態系が発達してきた。これまでも多様な光合成細菌が世界各地で見つかっているが、まだ人類が知らない未培養の光合成細菌の存在も示唆されている。酸素非発生型光合成細菌は、細菌の五つの門から見つかっていたが、著者は2015年に新たに *Acidobacteria* 門に属する好熱性光合成細菌 *Chloracidobacterium* 属を発見した (Tank & Bryant,

2015a)。本菌は始原的な光合成生物である偏性嫌気性の緑色硫黄酸素非発生型光合成細菌に見られる特徴 (I型光合成反応中心, クロロソーム) を示す一方で、植物型の光合成生物の代謝的特徴 (ケトカロテノイド合成や酸素依存的なクロロフィル合成) も併せ持つ細菌である。しかし分離株は一例のみであり、研究が進んでいなかった。そこで本研究では、本菌の生理生化学的特性を明らかにするとともに、この新規系統の好熱性光合成細菌をさらに陸上温泉から分離培養し、それらを分子系統学的、代謝学的、生理・生化学的、遺伝学的に特徴づけることを目的とした。

実験方法

Chloracidobacterium 属細菌の培養

Chloracidobacterium 属細菌は、Tank & Bryant (2015a, b) に従って CTM 培地 (*C. thermophilum* Midnight Medium) でタンゲステンランプによる 20-50 μmol photons m⁻²s⁻¹ の照射下でおよそ 51°C にて培養した。固体 NMR 測定用の ¹⁵N 標識培地ではバクトペプトンとアミノ酸混合の代わりに単一窒素源として 100 mg の ¹⁵N 標識藻類アミノ酸混合試薬 NLM-2161 (Cambridge

E-mail: photomic2015@gmail.com

*Marcus TANK 現 Leibniz Institute, DSMZ mat19@dsMZ.de

共同研究者: 花田 智 (東京都立大学大学院理学研究科,
現 産業技術総合研究所).
Vera Thiel (東京都立大学大学院理学研究科,
現 Leibniz Institute DSMZ)
永島咲子 (東京都立大学大学院理学研究科,
現 神奈川大学).
春田 伸 (東京都立大学大学院理学研究科).

Laboratories, Tewksbury, MA, USA) を用いた。

反応中心タンパク質 (RC) の調製

Chloracidobacterium (Cab.) thermophilum の細胞を 150mM のリン酸緩衝液 (pH7.2) 中でリゾチーム (3mg/mL) とともに室温、暗所に 25 分静置した後、フレンチ・プレス (138MPa) でライセート (細胞溶解液) を回収した。ライセートはさらに超遠心 (220,000×g, 2 時間) にて膜画分を回収した。膜画分を 5-25% (w/v) のショ糖密度勾配にかけ 18 時間の超遠心で深緑色のクロロソーム画分の下の方の茶褐色の RC を含む画分を得た。回収した反応中心膜画分をリン酸緩衝液へ懸濁し、超遠心で洗浄した。限外濾過フィルター (Centricon Plus-20 centrifugal filter devices; Amicon®, Millipore Corporation, Bedford, USA) で濃縮して測定試料とした。実験によってはさらに 0.6M の炭酸ナトリウムを含むリン酸バッファーに懸濁し、4℃で一晩静置した。RC 精製のための可溶性は n-dodecyl-β-maltoside (β-DDM; 終濃度 1% w/v) で行った。超遠心 (200,000×g) 後の上清を 10-50% (w/v) のショ糖密度勾配超遠心にて RC 画分を得た。限外濾過 (50-kDa molecular mass cut-off; Millipore, Billerica, MA, USA) で濃縮した。クロロソームによって集められた光エネルギーを RC へ伝達する FMO タンパク質を含む画分は更に DEAE-Sepharose カラムで精製して FMO タンパク質を除去した。精製した RC は Genesys 10 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) による吸光度測定、Varian Cary 50 UV-Vis 分光光度計を組み込んだ装置による明暗差スペクトル測定に使用した。また、SDS-PAGE 法による分析を行い、ポリアクリルアミドゲルから回収したタンパク質はトリプシン処理の後、ペンシルバニア州立大学の Huck 生命科学研究所のプロテオミクスおよび質量分析施設にて LC-MS-MS による分析に供した。

固体 NMR 測定

固体 NMR 測定は Avance-III 400-MHz NMR spectrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany) を使用した Photo-CIDNP (TPPM) MAS-NMR 法にて行った (Fischer *et al.*, 1992; Bennett *et al.*, 1995)。観測核種として ¹⁵N で標識されたアミノ酸を使用し、ヒスチジンのアミノ基を標準とした。対照とした亜鉛型バクテリオククロフィル *a* (Zn-BChl *a*) は ¹⁵N 標識硫酸を窒素源として培養した *Rhodobacter sphaeroides* からメタノール抽出した Mg-BChl *a* を酢酸亜鉛を含むバッファーに高温 (90℃) で保温し精製して調製した (Tsukatani *et al.*, 2012)。得られた ¹⁵N 間距離情報から分子構造を構築するための理論・基底関数は B3LYP/6-31G(d) (Becke,

1993; Rassolov *et al.*, 2001) を使い、計算上の溶媒は THF として、量子化学計算プログラム Gaussian 09 (revision D. 01. Gaussian Inc., Wallingford, UK) にて計算した。

高速液体クロマトグラフィー

精製した RC の色素組成は Frigaard *et al.* (1997) の方法に従い、C18 カラムを備えた Agilent 1100 HPLC システム (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) の RP-HPLC により行った。

EPR 測定

連続波 (CW)-EPR 実験は E-500 ELEXSYS EPR 分光計 (Bruker BioSpin Corp., Billerica, MA, USA) にて行った。低温の X バンド過渡 EPR (trEPR) 実験は共振器と液体ヘリウムクライオスタットを備えた E300 EPR 分光器 (Bruker BioSpin Corp., Billerica, MA, USA) を使用して実施した。

時間分解吸光度変化の測定

840nm での時間分解電荷再結合速度測定は室温でポンププローブ分光計 (Biologic LLC, Decatur, AL, USA) を使用して室温で測定した。840nm での減衰速度は Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) のアルゴリズムを使用してフィッティングした。

酸化還元滴定

Cab. thermophilum のクロロソーム除去膜を用いて Ferlez *et al.* (2016) の方法に従って実施した。溶液電位は Ag/AgCl 参照電極 (Microelectrodes Inc., Bedford, NH, USA) に接続された高インピーダンスデジタル電圧計にて測定し、同時にサンプリングされた各電位 (-300 ~ -600mV) の試料の trEPR スペクトルを測定した。

分子系統解析

16S rRNA 遺伝塩基配列を決定し、MUSCLE を用いてアライメントした。Maximum likelihood 法による系統樹作成には RAxML を用いた。系統解析には Type Strain Genome Server (TYGS) (Meier-Kolthoff & Göker, 2019) プラットホームのソフトウェアを使用した。

ゲノム解析

細菌株からゲノム DNA を抽出し、RS-II プラットホームまたは PacBio Sequel プラットホーム (Pacific Biosciences of California, Inc., CA, USA) を用いて、塩基配列情報を取得した。既報に従いアッセンブルおよび品質確認を行い、RAST アノテーションシステム (Aziz

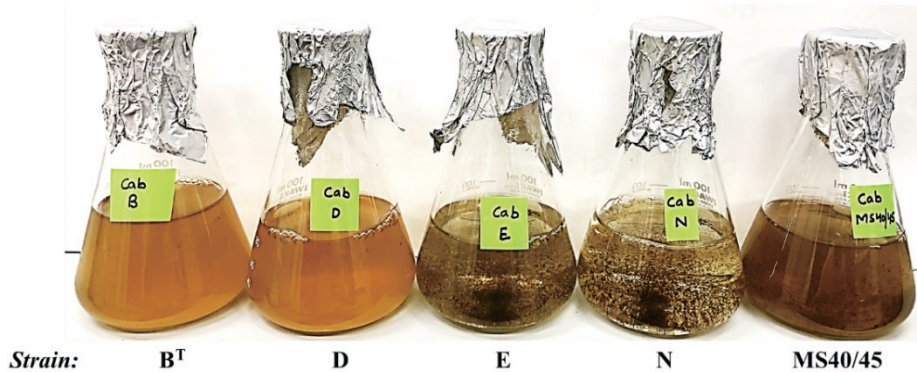


Fig. 1 Culture appearance of different *Chloracidobacterium* strains in liquid CTM medium grown at 50°C on day 10.

et al., 2008) によりアノテーションを行った。

NaH¹³CO₃ 標識実験

安定同位体 ¹³C で標識した NaH¹³CO₃ (Cambridge Isotope Laboratory, Inc., Andover, MA, USA) を培地に添加し、培養した。培養過程から経時的に細胞を回収し、細胞破碎後、IRMS (Thermo Scientific, MA, USA) で δ¹³C を測定した。¹³C 標識された細胞内アミノ酸は Snijders *et al.* (2016) に従い、GCMS を用いて検出・定量した。

結果および考察

新規 *Chloracidobacterium* 属細菌の分離培養と比較解析

イエローストーン国立公園 (Mushroom Spring および Octopus Spring) の pH 8.2, 50–60°C のアルカリ温泉微生物マット由来のシアノバクテリアの集積培養 (Bryant *et al.*, 2007) から *Acidobacteria* 門の *Chloracidobacterium* 属細菌を分離した (Fig. 1)。B^T 株は *Cab. thermophilum* の基準株である (Tank & Bryant, 2015a)。Fig. 1 に示すようにいくつかの株では細胞集塊を形成するなどその増殖形態に違いが見られた。基準株を含む 8 株について 16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統樹を作成した (Fig. 2)。Mushroom Spring から得られた D 株は、Octopus Spring 基準株と同系統であったが (相同性 99.9%)、他の 6 株は別系統の別種と考えられた。また至適生育温度、酸素要求性/感受性にも違いが見られた (data not shown)。

Chloracidobacterium 属細菌分離株について、そのゲノム情報を比較した (Table 1)。ゲノムサイズ、染色体数、

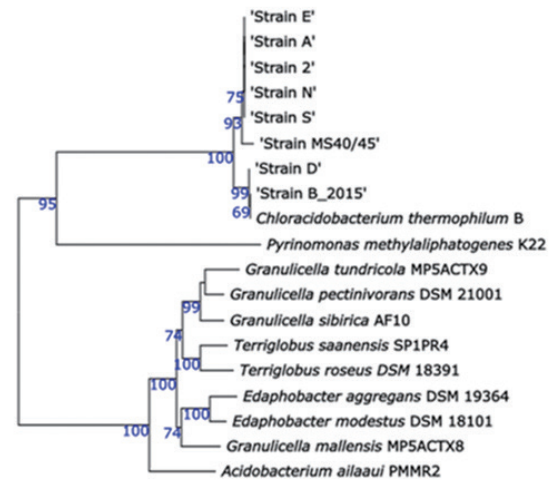


Fig. 2 16S rRNA gene sequence-based phylogenetic tree showing the phylogenetic position of *Chloracidobacterium* spp.

GC 含量などは類似していた。Average Nucleotide Identity (ANI%), digital DNA:DNA hybridization (dDDH) を解析したところ、上述の分子系統樹 (Fig. 2) と一致して、D 株は基準株 B^T 株と高い相同性があり、98% ANI, 84% dDDH で、同種と考えられた。相互に類似性が高かった A 株、S 株、2 株、N 株、E 株の五つの株は、基準株 B^T 株や他の株 (MS40/45 株) と、93%~95% ANI, 53%~58% dDDH で、別種と考えられた。また、MS40/45 株は他と 92% ANI, 45% dDDH の低い値を示し、種レ

Table 1 Genomic features of *Chloracidobacterium* spp.

Characteristics	Strains							
	B ^T	D	2	A	S	N	E	MS40/45
Source*	OS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Temp. (°C)	51-61	52	52	52	52	60	52	40-45
Size (M bp)	3.8	3.6	3.8	3.8	3.8	3.7	3.8	3.7
Number of chromosomes	2	2	2	2	2	2	2	2
GC mol%	61.3	61.5	62.2	62.1	62.1	62.2	62.2	62.7
CDS	3424	3161	3339	3411	3407	3217	3325	3097
tRNA	48	46	47	47	48	47	49	46
rRNA operon	1	1	1	1	1	1	1	1

*MS, Mushroom Spring; OS, Octopus Spring

ベルで異なると考えられた。以上から、これら8株は三つの種に分けられ、既知基準種 *Cab. thermophilum* に続く、*Chloracidobacterium* 属細菌の二つの新種の発見といえる。

Chloracidobacterium thermophilum 光合成反応中心の Photo-CIDNP-NMR 分析

Chloracidobacterium はシアノバクテリアが優占する温泉微生物マットの下層から見つかる。マット下層の光合成生物は光吸収に関して様々な適応進化を遂げている (Revsbech *et al.*, 2016; Thiel *et al.*, 2016, 2017, 2018)。 *Cab. thermophilum* B^T 株は至適温度 51.6°C、至適 pH 5.0-7.0 の好熱性微好気細菌であり、系 I 型のホモ二量体反応中心 (RC) を有し、その周りにバクテリオクロロフィル (BChl) *c* を主要成分とする集光器官クロソーム (chlorosome) および BChl *a* を含む FMO タンパク質が結合していることがわかっている (Wen *et al.*, 2011)。系 I 型 RC を持つ光合成細菌として、*Firmicutes* 門のヘリオバクテリアや *Chlorobi* 門細菌が知られているが、これらと異なり、*Cab. thermophilum* は生育に酸素を要求する。その上、RC には3種類のクロロフィル、BChl *a*, Chl *a*, Zn-BChl *a'* が含まれるという特徴がある (Tsukatani *et al.*, 2010, 2012; Tank & Bryant, 2015a)。しかし、これらそれぞれのクロロフィルの役割はよくわかっていない。Zn-BChl は亜鉛結合型のバクテリオクロロフィルで、これまで *Alphaproteobacteria* の酸素非発生

型好気性光合成細菌である *Acidiphilium rubrum* の他には報告例がなかった (Wakao *et al.*, 1996)。

本研究では ¹⁵N 標識した *Cab. thermophilum* B^T 株の RC の光化学的電荷分離反応を白色光連続照射した超高速 Magic Angle Spinning 法を使った固体 NMR で計測し、3 種類の光励起蛍光シグナル (シグナル強度の高い順に、化学シフト値 216 ppm, 250.1 ppm, 191.4 ppm) を得た (Fig. 3a のスペクトル B, D)。実験的および量子化学的な ¹⁵N NMR データに基づいて観測された信号をそれぞれ Chl *a* の N-II, N-IV, N-III (Fig. 3b) によるものと同定し、一次電子受容体であることが実証された (Zill *et al.*, 2018)。Chl *a* および 8¹-OH Chl *a* は、それぞれ緑色硫黄細菌およびヘリオバクテリアの主要な電子受容体であることが示されているため、Chl *a* 分子はすべての既知のホモ二量体系 I 型光合成反応中心でこの役割を果たす。*Cab. thermophilum* の RC にはフィトールでエステル化されたバクテリオクロロフィル (BChl) *a_p*, Δ2,6-フィタジエノールでエステル化されたクロロフィル (Chl) *a_{PD}*, フィトールでエステル化された亜鉛 (Zn)-BChl *a'* が約 32:24:4 のモル比で存在する。RC の Photo-CIDNP-NMR 分析により、RC に含まれる 3 種類の (バクテリオ)クロロフィルの内 Chl *a* が RC の一次電子受容体であることが明らかになったため、RC でのモル存在比から一次供与体が Zn-BChl *a'* であると考えられた。これはさらに、¹⁴N と ⁶⁷Zn による hyperfine sublevel correlation (⁶⁷Zn-HYSCORE) スペクトルの測定によって確かめる

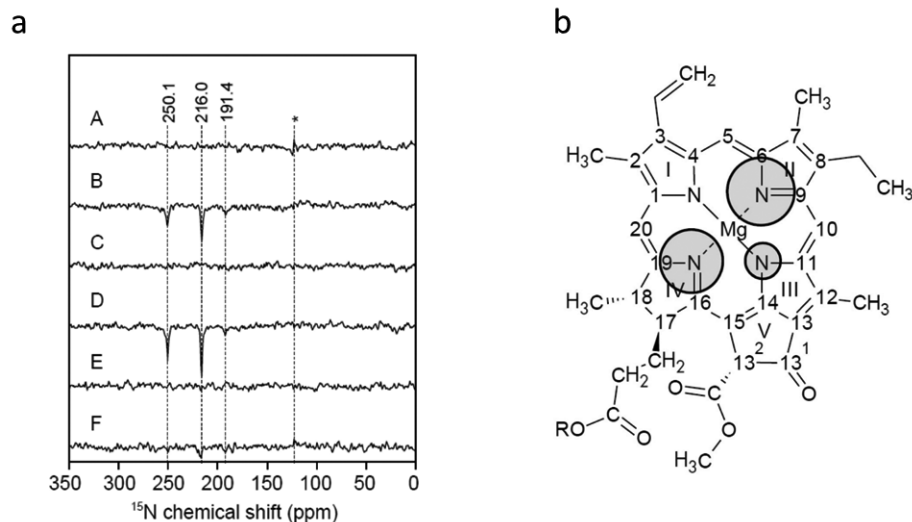


Fig. 3 (a) ^{15}N -photo-CIDNP effect observed on *Cab. thermophilum* B^T: A, dark, cycle delay=12s, 16,300 scans; B, light, cycle delay=12s, 16,300 scans; C, dark, cycle delay=4s, 45,000 scans; D, light, cycle delay=4s, 45,000 scans; E, dark, cycle delay=0.5s, 345,000 scans; F, light, cycle delay=0.5s, 345,000 scans, *spectrometer signal. (b) ^{15}N photo-CIDNP MAS NMR intensity pattern of *Cab. thermophilum*.

ことができた (Charles *et al.*, 2019, 2020).

Chloracidobacterium thermophilum 光合成反応中心の分光学的諸性質の解析

Cab. thermophilum B^T の RC 標品を高度に精製し、詳細な構造情報を得、他の系 I 型 RC との類似点や相違点を明らかにすることを目的とした。*Cab. thermophilum* の RC に結合するクロソームの BChl *c* を除去するため、リン酸バッファーで膜画分を洗浄し、シヨ糖密度勾配で RC 画分と分離した。さらに BChl *a* を含む FMO タンパク質を除去するため、陰イオン交換クロマトグラフィーで RC を精製した (Fig. 4a)。*Cab. thermophilum* のゲノムには、緑色硫黄細菌の RC に見られる PscC, PscD をコードする遺伝子が見つからない (Garcia Costas *et al.*, 2012)。PscC は、PscA に強固に結合し、RC の電荷分離反応によって酸化した一次電子供与体 (P840⁺) に電子を供与する二組の膜に結合した *c* 型チトクロムである。また PscD は、PscB の FA/FB クラスタからフェレドキシンへの電子伝達を促進させる役割を持つ。*Cab. thermophilum* から精製した RC には粗精製の段階では認められた PscB が精製過程で除去された。精製 RC の SDS-PAGE 解析では、16kDa の *c* 型のチトクロム

と 25kDa のペプチドが検出され、それらは、質量分析の結果、PscA と同じオペロン上にコードされているチトクロム *c* とカロテノイド結合タンパク質 (CBP) 複合体 (Tsukatani *et al.*, 2012) と同定された (Figs. 4a,b)。

以前の結果及び逆相 HPLC, LC-MS により、*Cab. thermophilum* の RC に含まれるクロロフィル, BChl *a_p*, Chl *a_{PD}*, Zn-BChl *a_p'* の比率は 7.1:5.4:1 であった。*Heliobacterium modesticaldum* の RC との比較から、RC あたり 32 の BChl *a_p*, 24 の Chl *a_{PD}*, 4 の Zn-BChl *a_p'* が含まれると推定された。RC の高解像度の明暗差スペクトルからは一次電子供与体 P840 に相当する 839nm に Zn-BChl *a_p'* のスペシャルペアの特徴 (Charles *et al.*, 2019) が観測された。およそ 815nm 付近には一次電子供与体の電荷分離によって生成された局所電場に起因する、近隣の BChl *a* のものと推定される電気化学的バンドシフトが生じた。

クロソームを除去した膜サンプルを用いて P840⁺ と PscB に結合した [F_A/F_B]⁻ の電荷再結合速度を 840nm で測定した。PSI の 60ms (Vassiliev *et al.*, 1997), *H. modesticaldum* (Heinrich & Golbeck, 2007) の 70ms と比べると比較的遅い 156ms で 47% の再結合反応が観測された。P840⁺ と PscA 内の F_X⁻ では同様に PSI で

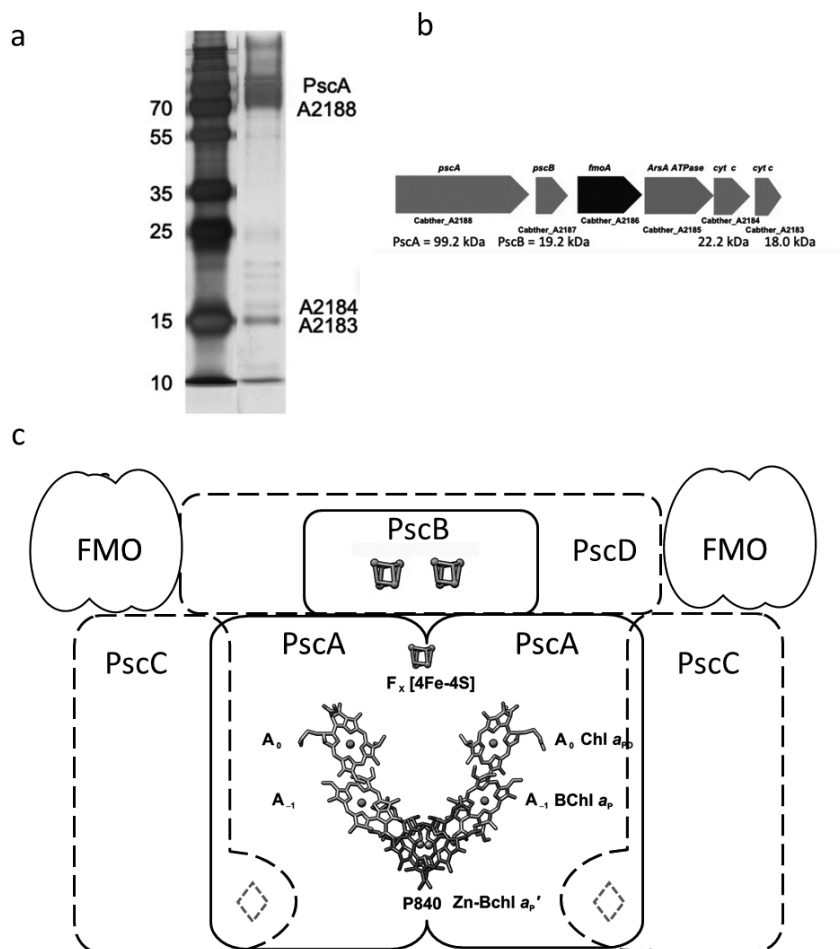


Fig. 4 Preparation of highly purified RCs from *Cab. thermophilum* B^T. (a) Twice linear 5 to 25% sucrose gradients used to prepare a crude RC fraction devoid of the carotenoid-binding protein CbpA. The crude RCs were further purified by chromatography on DEAE- cellulose and were analyzed on SDS-PAGE gels stained with silver. Markers and their sizes are shown to the left, and selected proteins are identified by the locus tag numbers for the corresponding genes. (b) The organization of the reaction center operon that includes *pscA*, *pscB*, and *fmoA* as well as a gene encoding an *ArsA*-like ATPase and two predicted *c*-type cytochrome lipoproteins. (c) Schematic illustration of the RC complex in *Cab. thermophilum* based on the RC complex model proposed by *Cba tepidum* (Frigaard *et al.*, 2003). Subunits that were absent in genome analysis (Garcia Costas *et al.*, 2012) are shown by the dotted line. The arrangement model of electron transport chain cofactors in RC of *Cab. thermophilum* is based on the position of the cofactors in the structure of the *H. modesticaldum* homodimeric type-1 RC (PDB entry 5VHK; Gisriel *et al.*, 2017). The electron transport chain comprises a P840 special pair of Zn-BChl *a_p* molecules (Charles *et al.*, 2019); the accessory Chls A₋₁, which are most likely Mg-BChl *a_p* (or possibly Zn-BChl *a_p*); and the primary acceptor Chls A₀, which are Chl *a_{PD}* (Zill *et al.*, 2018). Zn²⁺ ions are shown as gray spheres, and Mg²⁺ ions are shown as green spheres. The intrasubunit [4Fe-4S] cluster F_x is ligated by two cysteine residues from each PscA subunit of the RC homodimer. The esterifying alcohol tail groups have been omitted for clarity (Redrawn from He *et al.*, 2019).

1.5ms, *H. modesticaldum* で15msであるところ、20msで53%の再結合であった。EPRにより測定された電荷再結合速度は90Kの低温では80msのP840⁺とF_X⁻との再結合が観測され、低温では効率が低いことが示された。過渡EPR (trEPR) によるF_Xの中間電位測定の結果、*H. modesticaldum* (-504±10mV) (Ferlez *et al.*, 2016) より77mV低い-581±7mVであった。

リン酸緩衝液で洗浄した膜をtrEPRで測定したところ、スピン偏極したP⁺F_X⁻ラジカルペアのシグナルが観測された。項間交差の結果として、BChlアンテナ分子からの三重交差に特徴的な弱い偏波パターンが見られた。これはアンテナの励起状態の殆どがP840に効果的に移動していることを示す。F_Xが還元状態のときには一次ラジカルペアにおける一重項—三重項混合の結果としてのP⁺A₀⁻ラジカルペア再結合のシグナルが観測された。このことから、一次電子受容体がChl *a*で一次電子供与体が(Zn-) BChl *a*であると推測された。

クロロフィル蛍光測定では839nmに光励起酸化還元差スペクトルのピークを持ち、P840⁺付近のカロテノイドによるバンドシフトも明らかにした。F_X[4Fe-4S]クラスターの酸化還元中間電位はおおよそ-581mVでP⁺F_X⁻のスピン偏極ラジカル対の分光学的特徴はヘリオバクテリアや緑色硫黄細菌とよく似ていた。さらに、他のRCsのホモ二量体系IのRCと同様に、A₀⁻からF_Xへ直接電

子が伝達されることがわかった。分離膜画分の洗浄実験ではPscBサブユニットはヘリオバクテリアのPshBより強くRCに結合していた。*Cab. thermophilum*のRCは他のホモ二量体のRCに似た特性と、系I型により似ている特性もある。これらの違いはおそらく電子伝達系を酸素から保護し、この微好気細菌の酸素耐性にも寄与すると考えられる。これらのことから推測された*Cab. thermophilum* RCの電子伝達系モデルをFig.4cに示した。

Chloracidobacterium thermophilum の二酸化炭素代謝

Chloracidobacterium 属細菌の基準種 *Cab. thermophilum* B^Tのゲノム解析から、本菌はこれまでに見つかっているいずれの独立栄養性炭酸固定経路も有していないと考えられた (Garcia Costas *et al.*, 2012; Tank & Bryant, 2015a, 2015b; Tank *et al.*, 2018)。しかし、培養系にCO₂を添加すると本菌の増殖が促進されることが観察された (Fig.5)。そこで、¹³Cで標識したNaHCO₃を用いて、細胞への¹³Cの取り込みを確認するとともにその取り込み代謝経路を解析した。NaH¹³CO₃を添加した培地で培養した菌体を回収し、質量分析によって¹³Cの取り込み量を測定したところ、菌体全炭素量3%~4%の割合で¹³Cが検出された。

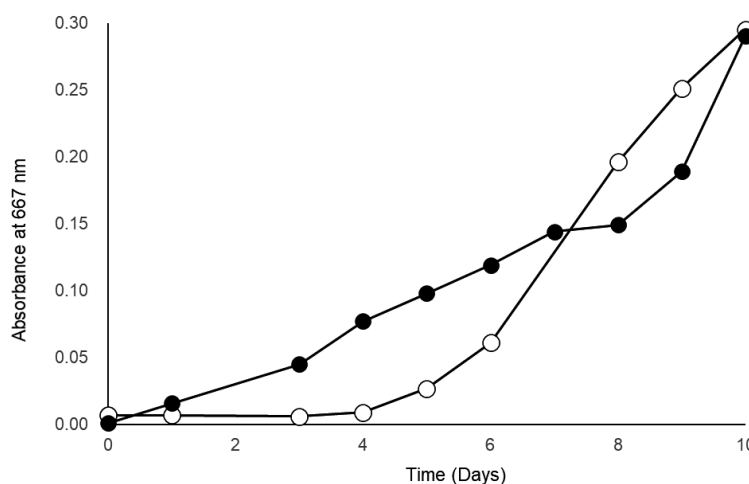


Fig. 5 Growth curve showing the effect of bicarbonate on growth of *Cab. thermophilum* B^T. Open circle, without NaHCO₃; Closed circle, with NaHCO₃.

CO₂の取り込みとその代謝経路を探るため、GCMSによる¹³C標識化合物の同定を試みた。得られた結果とゲノムからみつける代謝酵素の情報をもとに炭素代謝フローをFig.6のように推定できた。アスパラギン酸およびメチオニンへの¹³C標識が見られたことから、CO₂はこれらアミノ酸の前駆体であるホスホエノールピルビン酸からオキサロ酢酸に至るアナプレロティック反応によって取り込まれると考えられた。また、アラニンおよびグルタミン酸への顕著な¹³Cの取り込みもあり、これ

らの前駆体であるピルビン酸やαケトグルタル酸を経由する取り込みも考えられた。ただし、既報のよく知られた酵素、ピルビン酸デヒドロゲナーゼやαケトグルタル酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子はなく、代わりに2オキソ酸：フェレドキシン酸化還元酵素がこれらの反応を触媒していると推定される。さらに興味深いことにゲノム情報からリジンの生合成経路を欠いていると予想されていたが、¹³C標識されたリジンも検出され、未知代謝酵素を有している可能性が示唆された。

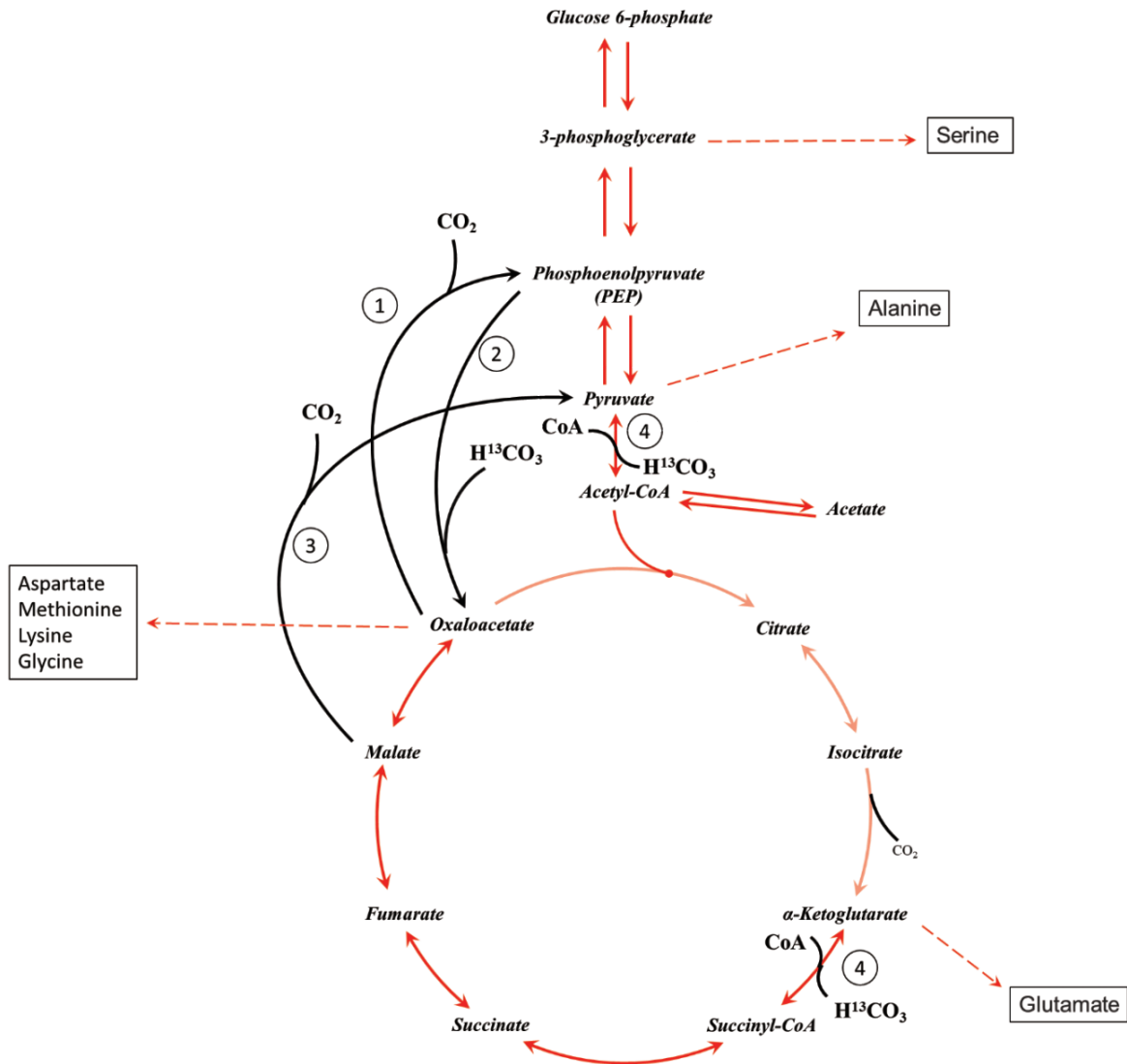


Fig. 6 Metabolic route for *Cab. thermophilum* B^T based on the genomic data and ¹³C proteogenic isotope tracing via GCMS.
 1, phosphoenolpyruvate carboxykinase; 2, phosphoenolpyruvate carboxylase; 3, NAD-dependent malic enzyme; 4, 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase

結 語

本研究では、*Acidobacteria* 門に見つかった好熱性光合成細菌 *Chloracidobacterium* 属細菌について、その系統的多様性、ゲノム情報および生理生化学的特性を明らかにできた。我々は、系I型光合成反応中心複合体を持つ光合成細菌について、他にもそのタンパク質構造解析 (Günther *et al.*, 2018) や新規系統の分離培養 (Tsuji *et al.*, 2020a; Tsuji *et al.*, 2020b) を報告しており、*Chloracidobacterium* 属細菌を含むこれら始原的な光合成細菌に関する知見は、光合成生物の進化だけでなく、地球環境の形成の観点からも意義深い。

要 約

Chloracidobacterium 属細菌は、2015年に *Acidobacteria* 門に初めて見つかった新規系統の好熱性光合成細菌である。本研究では光合成反応中心の生化学的特徴を解明するとともに、新たに複数の *Chloracidobacterium* 属細菌株を分離することに成功し、それらのゲノム比較から種の多様性を明らかにした。また、ゲノムには炭酸固定関連遺伝子が見つからないが、その生育にはCO₂の添加が促進的に働くことが示され、安定同位体標識したCO₂を用いたトレース解析から、本菌のCO₂利用代謝経路を明らかにした。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) Thiel, V., Tank, M., Martinez, J.N., Trampe, E.C.L., Lichtenberg, M., Kühn, M., Hanada, S. 2018. Microbial diversity and activity in a hot spring associated oxygenic phototrophic microbial mat disclosed by a comprehensive multi-method study. 16th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (ISPP) (August 5-9, Vancouver, Canada)
- 2) Tank, M., Thiel, V., Bryant, D.A., Hanada, S. 2018. Hot springs microbial mats are treasure chests for the isolation of novel chlorophototrophic bacteria. 16th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (ISPP) (August 5-9, Vancouver, Canada)

原著論文

- 1) Thiel, V., Tank, M., Tomsho, L.P., Burhans, R., Gaya, S.E., Hamilton, T.L., Schuster, S.C. & Bryant, D.A. 2017. Draft genome sequence of *Anoxybacillus ayderensis* strain MT-Cab (*Firmicutes*). *Genome Announc.* **5**: e00547-17
- 2) Orf, G.S., Collins, A.M., Niedzwiedzki, D.M., Tank, M., Thiel, V., Kell, A., Bryant, D.A., Montano, G.A. & Blankenship, R.E. 2017. Polymer-chlorosome nanocomposites consisting of non-native combinations of self-assembling

bacteriochlorophylls. *Langmuir*. **33**: 6427–6438.

- 3) Tank, M., Liu, Z., Frigaard, N.U., Tomsho, L.P., Schuster, S.C. & Bryant, D.A. 2017. Complete genome sequence of the photoautotrophic and bacteriochlorophyll *e*-synthesizing green sulfur bacterium *Chlorobaculum limnaeum* DSM 1677^T. *Genome Announc.* **5**: e00529-17.
- 4) Zill, J.C., He, Z., Tank, M., Ferlez, B.H., Canniffe, D.P., Lahav, Y., Bellstedt, P., Alia, A., Schapiro, I., Golbeck, J.H., Bryant, D.A. & Matysik, J. 2018. ¹⁵N photo-CIDNP MAS NMR analysis of reaction centers of *Chloracidobacterium thermophilum*. *Photosynth. Res.* **137**: 295–305.
- 5) Günther, L.M., Löhner, A., Reiher, C., Kunsel, T., Jansen, T.L.C., Tank, M., Bryant, D.A., Knoester, J. & Köhler, J. 2018. Structural variations in chlorosomes from wild-type and a *bchQR* mutant of *Chlorobaculum tepidum* revealed by single-molecule spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* **122**: 6712–6723.
- 6) He, Z., Ferlez, B., Kurashov, V., Tank, M., Golbeck, J.H. & Bryant, D.A. 2019. Reaction centers of the thermophilic microaerophile, *Chloracidobacterium thermophilum* (*Acidobacteria*) I: biochemical and biophysical characterization. *Photosynth. Res.* **142**: 87–103.
- 7) Tsuji, J.M., Shaw, N.A., Nagashima, S., Venkiteswaran, J.J., Schiff, S.L., Hanada, S., Tank, M. & Neufeld, J.D. 2020. Anoxygenic phototrophic Chloroflexota member uses a Type I reaction center. *bioRxiv*. 2020.07.07.190934. (posted 2020-08-28)
- 8) Tsuji, J.M., Tran, N., Schiff, S.L., Venkiteswaran, J.J., Molot, L.A., Tank, M., Hanada, S. & Neufeld, J.D. 2020. Anoxygenic photosynthesis and iron-sulfur metabolic potential of *Chlorobia* populations from seasonally anoxic Boreal Shield lakes. *ISME J.* **14**: 2732–2747.
- 9) Saini, M. K., Sebastian, A., Shirotori, Y., Soulier, N.T., Garcia Costas, A.M., Drautz-Moses, D.I., Schuster, S.C., Albert, I., Haruta, S., Hanada, S., Thiel, V., Tank, M., and Bryant, D.A. 2021. Genomic and phenotypic characterization of *Chloracidobacterium* isolates provides evidence for multiple species. *Front. Microbiol.* (in press)

その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) Thiel, V., Tank, M. & Bryant, D.A. 2018. Diversity of chlorophototrophic bacteria revealed in the Omics Era. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 21–49.

謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また、本研究の遂行にご協力いただいた Bryant 博士 (Pennsylvania State University, USA)、Tomsho 博士 (Pennsylvania State University, USA)、Burhans 博士 (Pennsylvania State University, USA)、Gay 博士 (Pennsylvania State University, USA)、Hamilton 博士 (Pennsylvania State University, USA)、Schuster 博士

(Pennsylvania State University, USA), Blankenship 博士 (Washington University, USA), Orf 博士 (Washington University, USA), Collins 博士 (Los Alamos National Laboratory, USA), Montaña 博士 (Los Alamos National Laboratory, USA), Niedzwiedzki 博士 (Washington University, USA), Kell 博士 (Kansas State University, USA), Liu (Pennsylvania State University, USA), Frigaard 博士 (University of Copenhagen, Denmark), Zill 博士 (University of Leipzig, Germany), He 博士 (Pennsylvania State University, USA), Ferlez (Pennsylvania State University, USA), Canniffe (Pennsylvania State University, USA), Lahav 博士 (The Hebrew University of Jerusalem, Israel), Bellstedt 博士 (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Germany), Alia 博士 (University of Leiden, Netherlands), Schapiro 博士 (The Hebrew University of Jerusalem, Israel), Golbeck 博士 (Pennsylvania State University, USA), Matysik 博士 (University of Leipzig, Germany), Günther, 博士 (University of Bayreuth, Germany), Löhner 博士 (University of Bayreuth, Germany), Reiher 博士 (University of Bayreuth, Germany), Kunsel 博士 (University of Groningen, Netherlands), Jansen 博士 (University of Groningen, Netherlands), Knoester, 博士 (University of Groningen, Netherlands), Köhler 博士 (University of Bayreuth, Germany), Ferlez 博士 (Pennsylvania State University, USA), Kurashov 博士 (Pennsylvania State University, USA), Golbeck, 博士 (Pennsylvania State University, USA), Tsuji 博士 (University of Waterloo, Canada), Shaw 博士 (University of Waterloo, Canada), Tran 博士 (University of Waterloo, Canada), Schiff, 博士 (University of Waterloo, Canada), Venkiteswaran 博士 (University of Waterloo, Canada), Molot, 博士 (York University), Neufeld 博士 (University of Waterloo, Canada), Sebastian 博士 (Pennsylvania State University, USA), Soulier 博士 (Pennsylvania State University, USA), Garcia Costas 博士 (Pennsylvania State University, USA), Drautz-Moses 博士 (Nanyang Technological University, Singapore), Schuster 博士 (Nanyang Technological University, Singapore), Albert 博士 (Pennsylvania State University, USA), Ward 博士 (Montana State University, USA), Moran 博士 (Pacific Northwest National Laboratory, USA), Kim 博士 (Pacific Northwest National Laboratory, USA), 嶋田敬三東京都立大学名誉教授ならびに光合成複合微生物寄付講座 (Photomic Lab.) の学生諸氏に感謝の意を表します。

文 献

- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A. *et al.* 2008. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**: 1–15.
- Becke, A.D. 1993. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**: 5648–5652.
- Bennett, A.E., Rienstra C.M., Auger M., Lakshmi K. V. & Griffin R.G. 1995. Heteronuclear decoupling in rotating solids. *J. Chem. Phys.* **103**: 6951–6958.
- Bryant, D.A., Garcia Costas, A.M., Maresca, J.A. *et al.* 2007. *Candidatus* Chloracidobacterium thermophilum: An aerobic phototrophic acidobacterium. *Science* **317**: 523–526.
- Charles, P., Kalendra, V., He, Z., Khatami, M.H., Golbeck, J.H., van der Est, A., Lakshmi, K. V. & Bryant, D.A. 2020. Two-dimensional ^{67}Zn HYSCORE spectroscopy reveals that a Zn-bacteriochlorophyll: A P' dimer is the primary donor (P840) in the type-1 reaction centers of *Chloracidobacterium thermophilum*. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**: 6457–6467.
- Charles, P., Kalendra, V., He, Z., Khurshov, V., van der Est A., Golbeck, J.H., Bryant, D.A. & Lakshmi, K.V. 2019. Elucidating the Role of Zinc-Bacteriochlorophyll A' in the Primary Photochemistry of *Chloroacidobacterium thermophilum* Reaction Centers. *Biophys. J.* **116**: 419a.
- Ferlez, B., Cowgill, J., Dong, W., Gisriel, C., Lin, S., Flores, M., Walters, K., Cetnar, D., Redding, K.E. & Golbeck, J.H. 2016. Thermodynamics of the electron acceptors in *Heliobacterium modesticaldum*: An exemplar of an early homodimeric type I photosynthetic reaction center. *Biochemistry* **55**: 2358–2370.
- Fischer, M.R., Hoff, A.J., de Groot, H.J.M., Raap, J. & Lugtenburg, J. 1992. ^{13}C Magic angles spinning NMR study of the light-induced and temperature-dependent changes in *Rhodobacter sphaeroides* R26 reaction centers enriched in $[4\text{-}^{13}\text{C}]$ tyrosinet. *Biochemistry* **31**: 11038–11049.
- Frigaard N.U., Chew, A.G, Li, H., Maresca, J.A. & Bryant, D.A. 2003. *Chlorobium tepidum*: Insights into the structure, physiology, and metabolism of a green sulfur bacterium derived from the complete genome sequence. *Photosynth. Res.* **78**: 93–117.
- Frigaard, N.U., Takaichi, S., Hirota, M., Shimada, K. & Matsuura, K. 1997. Quinones in chlorosomes of green sulfur bacteria and their role in the redox-dependent fluorescence studied in chlorosome-like bacteriochlorophyll *c* aggregates. *Arch. Microbiol.* **167**: 343–349.
- Garcia Costas, A.M., Liu, Z., Tomsho, L.P., Schuster, S.C., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2012. Complete genome of *Candidatus* Chloracidobacterium thermophilum, a chlorophyll-based photoheterotroph belonging to the phylum *Acidobacteria*. *Environ. Microbiol.* **14**: 177–190.
- Gisriel, C., Sarrrou, I., Ferlez, B., Golbeck, J.H., Redding, K.E. & Fromme, R. 2017. Structure of a symmetric photosynthetic reaction center-photosystem. *Science* **357**:1021-1025.
- Günther, L.M., Löhner, A., Reiher, C., Kunsel, T., Jansen, T.L.C., Tank, M., Bryant, D.A., Knoester, J. & Köhler, J. 2018. Structural variations in chlorosomes from wild-type and a bchQR mrtant of *Chlorobaculum tepidum* revealed by single-molecule spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* **122**: 6712–6723.

- Heinrich, M. & Golbeck, J.H. 2007. Heliobacterial photosynthesis. *Photosynth. Res.* **92**: 35–53.
- Meier-Kolthoff, J.P. & Göker, M. 2019. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat. Commun.* **10**: 1–10.
- Rassolov, V.A., Ratner, M.A., Pople, J.A., Redfern, P.C. & Curtiss, L.A. 2001. 6-31G* basis set for third-row atoms. *J. Comput. Chem.* **22**: 976–984.
- Revsbech, N.P., Trampe, E., Lichtenberg, M., Ward, D.M. & Kühl, M. 2016. *In situ* hydrogen dynamics in a hot spring microbial mat during a diel cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 4209–4217.
- Snijders, A.M., Langley, S.A., Kim, Y.M. *et al.* 2016. Influence of early life exposure, host genetics and diet on the mouse gut microbiome and metabolome. *Nat. Microbiol.* **2**: 1–8.
- Tank, M. & Bryant, D.A. 2015a. *Chloracidobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov.: An anoxygenic microaerophilic chlorophotoheterotrophic acidobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**: 1426–1430.
- Tank, M. & Bryant, D.A. 2015b. Nutrient requirements and growth physiology of the photoheterotrophic Acidobacterium, *Chloracidobacterium thermophilum*. *Front. Microbiol.* **6**: 226.
- Tank M., Costas A.M.G. & Bryant D.A. 2018. *Chloracidobacterium*. In Whitman, W.B. (ed.) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, pp. 1–9. Wiley,
- Thiel, V., Drautz-Moses, D.I., Purbojati, R.W., Schuster, S.C., Lindemann, S. & Bryant, D.A. 2017. Genome sequence of *Prosthecochloris* sp. strain HL-130-GSB from the phylum Chlorobi. *Genome Announc.* **5**: .
- Thiel V., Tank M. & Bryant D.A. 2018. Diversity of Chlorophototrophic Bacteria Revealed in the Omics Era. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 21–49.
- Thiel, V., Wood, J.M., Olsen, M.T., Tank, M., Klatt, C.G., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2016. The dark side of the mushroom spring microbial mat: Life in the shadow of chlorophototrophs. I. Microbial diversity based on 16S rRNA gene amplicons and metagenomic sequencing. *Front. Microbiol.* **7**: 919.
- Tsuji, J.M., Shaw, N.A., Nagashima, S., Venkiteswaran, J.J., Schiff, S.L., Hanada, S., Tank, M. & Neufeld, J.D. 2020a. Anoxygenic phototrophic *Chloroflexota* member uses a Type I reaction center. *bioRxiv*. 2020.07.07.190934.
- Tsuji, J.M., Tran, N., Schiff, S.L., Venkiteswaran, J.J., Molot, L.A., Tank, M., Hanada, S. & Neufeld, J.D. 2020b. Anoxygenic photosynthesis and iron–sulfur metabolic potential of *Chlorobia* populations from seasonally anoxic Boreal Shield lakes. *ISME J.* **14**: 2732–2747.
- Tsukatani, Y., Romberger, S.P., Golbeck, J.H. & Bryant, D.A. 2012. Isolation and characterization of homodimeric type-I reaction center complex from *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*, an aerobic chlorophototroph. *J. Biol. Chem.* **287**: 5720–5732.
- Tsukatani, Y., Wen, J., Blankenship, R.E. & Bryant, D.A. 2010. Characterization of the FMO protein from the aerobic chlorophototroph, *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*. *Photosynth. Res.* **104**: 201–209.
- Vassiliev, I.R., Jung, Y.S., Mamedov, M.D., Semenov, A.Y. & Golbeck, J.H. 1997. Near-IR absorbance changes and electrogenic reactions in the microsecond-to-second time domain in photosystem I. *Biophys. J.* **72**: 301–315.
- Wakao, N., Yokoi, N., Isoyama, N. *et al.* 1996. Discovery of natural photosynthesis using Zn-containing bacteriochlorophyll in an aerobic bacterium *Acidiphilium rubrum*. *Plant Cell Physiol.* **37**: 889–893.
- Wen, J., Tsukatani, Y., Cui, W., Zhang, H., Gross, M.L., Bryant, D.A. & Blankenship, R.E. 2011. Structural model and spectroscopic characteristics of the FMO antenna protein from the aerobic chlorophototroph, *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1807**: 157–164.
- Zill, J.C., He, Z., Tank, M., Ferlez, B.H., Canniffe, D.P., Lahav, Y., Bellstedt, P., Alia, A., Schapiro, I., Golbeck, J.H., Bryant, D.A. & Matysik, J. 2018. ¹⁵N photo-CIDNP MAS NMR analysis of reaction centers of *Chloracidobacterium thermophilum*. *Photosynth. Res.* **137**: 295–305.

好熱性シアノバクテリアの多様性

花田 智*

東京都立大学大学院理学研究科
光合成複合微生物系の環境・エネルギー活用シーズ開発寄付講座
〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1

Diversity of thermophilic cyanobacteria

Satoshi HANADA*

Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University
Minami-Osawa 1-1, Hachioji, Tokyo 192-0397

This study applied environmental DNA analyses to terrestrial hot springs and determined distribution and diversity of thermophilic cyanobacteria in the thermal environments. We detected more diverse cyanobacteria than expected and found cyanobacteria in novel lineages. We successfully cultivated thermophilic cyanobacteria and clarified their genomic information, molecular phylogeny, and physiology such as N₂-fixing ability, far-red light utilizing ability, growth temperature and growth pH.

Key words: Cyanobacteria, hot springs, microbial mats

緒言

シアノバクテリアは酸素発生型光合成能を有する唯一の細菌群で、系統的にはひとつの門に限定的に分布している。シアノバクテリアは地球生態系の1次生産に大きく貢献しているだけでなく、農業、産業、医療への利用技術の開発も進んでいる。古くから研究される微生物の一つであるが、形態的特徴による分類体系が中心であった (Castenholz, 2001)。海洋、湖沼や土壌圏に生息するシアノバクテリアに関する生態機能や多様性についての研究に比べて、陸上温泉などの高温環境におけるシアノバクテリアの系統的多様性、遺伝的多様性、生理的多様性に関する研究はまだ少なく、未知、未培養の好熱性シ

アノバクテリアの存在が指摘される。また、シアノバクテリアは生育に伴い二酸化炭素を吸収すると、その環境はアルカリ化する。そのため、シアノバクテリアは一般的にアルカリ性条件に抵抗性を示す (Stal, 2012)。しかし、pH9.5以上の高アルカリ環境で生育するシアノバクテリアは報告例が少なく、特に好熱性の種はほとんど見つかっていない。本研究では、陸上温泉における好熱性シアノバクテリアの分布と多様性を明らかにするとともに、耐アルカリ/好アルカリ性好熱性シアノバクテリアを探索することを目的とした。

実験方法

PCR アンプリコン解析

微生物マットからのDNA抽出にはMO BIO Power Biofilm DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いた。抽出したDNA試料を鋳型として、プライマー515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')およびプライマー806R (5'-GGACTACHVHHHTWTCTAAT-3')を用いて、16S rRNA遺伝子のV4領域をPCR増幅した。酵素はTakara Taq HS polymerase (Takara Bio, Japan)を使用した。精製PCR産物はdsDNA BR assay (Life Technologies)とQubit 3.0 fluorometer (Invitrogen)を

E-mail: photomic2015@gmail.com

*花田 智 現 産業技術総合研究所 satohana@tmu.ac.jp

共同研究者：永島咲子 (東京都立大学大学院理学研究科、
現 神奈川大学)。
佐藤 剛 (東京都立大学大学院理学研究科、
現 神奈川大学)。
Martinez, J. N. (東京都立大学大学院理学研究科、
現 University of St. La Salle, 広島大学)。
春田 伸 (東京都立大学大学院理学研究科)。

使用して定量後、2-step tailed PCR法によりライブラリーを作製した。ライブラリーの定量には Synergy H1 (Bio Tek) および QuantiFluor dsDNA System を用いた。Illumina Miseq システムと MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いて、2x300bp の条件でペアエンドシーケンス解析を行った。得られた配列データから、Fastx toolkit (ver. 0.0.14) を用いてプライマー配列に一致したリードを抽出し、Qiime2 (ver. 2020.8) によりプライマー配列と3'末端の50bp、キメラ配列、ノイズ配列を除去することで代表配列および OTU 表を出力した。取得した代表配列を公的データベース Greengene (ver. 13_8) の OTU (97% 相同性) と比較することで系統推定を行った。

シアノバクテリアの培養

シアノバクテリアの培養には BG11 培地あるいは窒素源を除いた BG11₀ 培地を用いた (Rippka *et al.*, 1979)。採取した試料を BG11 培地に接種し、白色 LED 照射 ($3\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 12 時間周期の明暗サイクル) 条件で培養した。好アルカリ性のシアノバクテリアの培養には、培地の pH を 20mM の N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid (CHES) を用いて採集地の pH に調整した。分離培養には 1mL の滅菌水中で白金耳あるいはホモジナイザーベッセルを用いて菌塊片を破碎し、懸濁液を 1.3% (w/v) 寒天 (Bacto™ Agar; BD, NJ, USA) あるいは 0.8% (w/v) ジェランガム (gellan gum; 和光純薬工業, 大阪) 培地に塗布した。これを 3 回以上繰り返した細菌塊を形態観察及びシーケンス解析試料とした。形態観察は位相差蛍光顕微鏡 (ECLIPSE E600; Nikon, 東京) にて行った。715nm 以上を透過する蛍光フィルターでシアノバクテリアのクロロフィル *a* の自家蛍光を特異的に検出し、イメージングソフトウェア (NIS-Elements D, Nikon, 東京) で撮影した。

アルカリ耐性や最適 pH を調べるために pH7.0~11.0 の各 pH にて培養試験を行った。培養は培養プレートに 800 μl の BG11 培地、100 μl の 200 μM の Good's buffer (HEPES, tricine, CHES, CAPS; 同仁化学研究所, 熊本)、100 μl の懸濁培養液を混合して 30 $^{\circ}\text{C}$ あるいは 40 $^{\circ}\text{C}$ 連続照射好気条件下で行った。増殖量は 11 日後のクロロフィル *a* 量を Grimme & Boardman (1972) に従って推定した。

16S rRNA 遺伝子塩基配列

細菌菌体からの DNA 抽出は DNeasy PowerBiofilm Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用したビーズ破碎法にて行った。抽出した DNA は分光光度計 BioSpec-nano (島津製作所, 京都) で定量した。抽出した DNA を鋳型として、PCR 法により 16S rRNA 遺伝子を増幅した。PCR にはシアノバクテリアの 16S rRNA 遺伝子特異的プライマー

106F (5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGT-3') (Nübel *et al.*, 1997) および PLG2.3R (5'-CTTCAYGYAGCGGAGTTG CAGC-3') (Urbach *et al.*, 1992), PCR 酵素 Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ) を用いた。PCR 産物は NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nager, Landsmeer, The Netherlands) にて精製し、分光分析とアガロースゲル電気泳動による検出・定量の後、シーケンス反応の鋳型とした。シーケンス反応には、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を使用し、PCR と同じプライマーにて実施した。シーケンス反応後の精製には BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。塩基配列決定には DNA シーケンサー ABI3130xl (Applied Biosystems) を使用した。

分子系統解析

得られた 16S rRNA 遺伝子塩基配列は SeqMan Pro (DNASar, Inc., Madison, WI, USA) にてコンティグ化した後、NCBI の BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いた相同性検索により得られた近縁種の塩基配列とともに系統解析に供した。アライメント処理を実行するプログラムには Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) を用いた。系統解析は MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) にて行い、最尤法にて系統樹を作成した。

ゲノム解析

分離株から抽出・精製した DNA からライブラリーを調製し、GridION X5 (Oxford Nanopore) および HiSeq 2000 (Illumina) を使用し塩基配列情報を取得した。GridION X5 で得られた配列から、Porechop (v. 0.2.3) によりアダプター配列のトリミングを行い、Filtlong (v. 0.2.0) および Canu (v. 1.8) によりエラー配列を取り除いた。HiSeq 2000 で得られた配列から、Cutadapt (v. 1.0) によりアダプター配列のトリミングを行い、SeqKit (v. 0.11.0) および Sickle (v. 1.33) によりエラー配列を取り除いた。GridION X5 および HiSeq 2000 から得られた塩基配列のハイブリッド・アセンブルは Unicycler (v. 0.4.7) を用いて行った。アセンブル配列のアノテーション解析には Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST, v. 1.073) を使用した。

結果および考察

陸上温泉におけるシアノバクテリアの分布と多様性

長野県中房温泉において 45 $^{\circ}\text{C}$ ~65 $^{\circ}\text{C}$ の温泉流水中に発達する微生物マットを採取し、DNA を抽出して、16S rRNA 遺伝子を対象にしたアンプリコン解析に供した。

得られた塩基配列を系統解析した結果を Table 1 に示す。60℃を超える試料からは優占的に *Thermosynechococcus* 属の配列が得られた。本シアノバクテリアは、生理・生化学的にもよく研究されてきた単細胞性好熱性シアノバクテリアの一つで、これまでに中房温泉だけでなく、日本各地の温泉から報告があり、類縁種は世界中の陸上温泉からも見つかる（Katoh *et al.*, 2001; 春田, 2012; Papke *et al.*, 2003; Thiel *et al.*, 2016）。また高温域からは *Chlorogloeopsis* に分類される配列も見つかった。本系統群は、中温性のヘテロシスト形成性糸状性シアノバクテリアとして知られている。過去には好熱性株も報告されているが、その遺伝学的、生理・生化学的研究は進んでいない（春田, 2012; Castenholz, 2001; Estrella *et al.*, 2017）。一方、北米等の同じような温度域の陸上温泉から高頻度に報告されている *Mastigocladus* 属は中房温泉からは検出されなかった。

60℃以下の温度域からは、*Leptolyngbya* 系統群の実に多様な配列が検出された。*Leptolyngbya* 系統群も上述の *Chlorogloeopsis* と同様に中温性のシアノバクテリアとして知られていたが、最近、高温環境からの検出例が増えてきている（Strunecky *et al.*, 2019）。しかし、培養され、生理生化学性状が調べられた例はまだ少ない。中房温泉から検出された *Leptolyngbya* 系統群には、熊本の温泉からの分離株（*Leptolyngbya* sp. O-77, Table 1）や中国四川省の温泉から最近、報告された配列と相同性がみられるものもあったが（Group B や Group E, Table 1）、新規配列も見つかった。

Leptolyngbya シアノバクテリアの分布と系統学的・生理学的多様性

Leptolyngbya はヘテロシスト非形成性・非分岐型の糸状性シアノバクテリアの一群である（Komarek, 2014）。

Leptolyngbya は系統的に多様で、淡水から海水環境まで広く見つかる。上述したように、長野県中房温泉の弱アルカリ性硫化水素泉に発達する微生物マットには、45℃～60℃の温度域に七つの系統（Groups A～G, Table 1）の *Leptolyngbya* が混在していることが示唆された。中には、これまで他の環境でほとんど見つからない系統や未記載の系統もあった。これら試料から好熱性 *Leptolyngbya* シアノバクテリアの分離培養を試みた。中房温泉から採取した微生物マット試料を BG11 液体培地に接種し、継代培養を繰り返したのち、糸状性シアノバクテリア培養系を選別していった。さらに、マイクロシリンジ（0.5×25mm; TERUMO, 東京）を用いて倒立顕微鏡（IX73; OLYMPUS, 東京）下で糸状体を分取した。得られた培養系から 16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定し系統解析した結果、アンプリコン解析で検出されていた七つのグループの *Leptolyngbya* のうち、四つの系統の *Leptolyngbya* シアノバクテリア（Group B, C, D, E）が培養できたことがわかった。Group C については、配列の違いから二つのサブグループ C1 と C2 に分けられた（Fig. 1）。

得られた *Leptolyngbya* シアノバクテリアについて、形態を比較した（Fig. 2）。既報の *Leptolyngbya* シアノバクテリアに観察されていたように、細胞凝集を形成すること、ヘテロシスト等の分化細胞を作らないこと、薄い莢膜に覆われた多細胞糸状性であること、糸状体に分岐が見られないこと、という形態学的特徴を示した。しかし、Group E に分類される *Leptolyngbya* シアノバクテリアには、他と異なり、偽分岐（短い分岐）がみられることを発見した。

続いて、増殖温度域を比較した。いずれの *Leptolyngbya* シアノバクテリアも 60℃では生育が見られず、Group D および E の増殖最高温度は 57℃であった。興味深い

Table 1 A list of cyanobacteria detected from Nakabusa Hot Springs

Phylogenetic group	Cultured relatives	Temp. (°C)
<i>Thermosynechococcus</i>	<i>Thermosynechococcus</i> sp. NK55	45-60
<i>Chlorogloeopsis</i>	<i>Chlorogloeopsis</i> sp. ON57a	57-69
<i>Leptolyngbya</i> Group A	n.r.	45
<i>Leptolyngbya</i> Group B	<i>Leptolyngbya</i> sp. PKUAC-SCTA121	45-50
<i>Leptolyngbya</i> Group C	<i>Leptolyngbya</i> sp. O-77	45-60
<i>Leptolyngbya</i> Group D	<i>Leptolyngbya</i> sp. Nb3F1	45-60
<i>Leptolyngbya</i> Group E	<i>Leptolyngbya</i> sp. PKUAC-GDTS1-24	60
<i>Leptolyngbya</i> Group F	n.r.	45
<i>Leptolyngbya</i> Group G	n.r.	45-50

n.r., not reported (not cultivated yet)

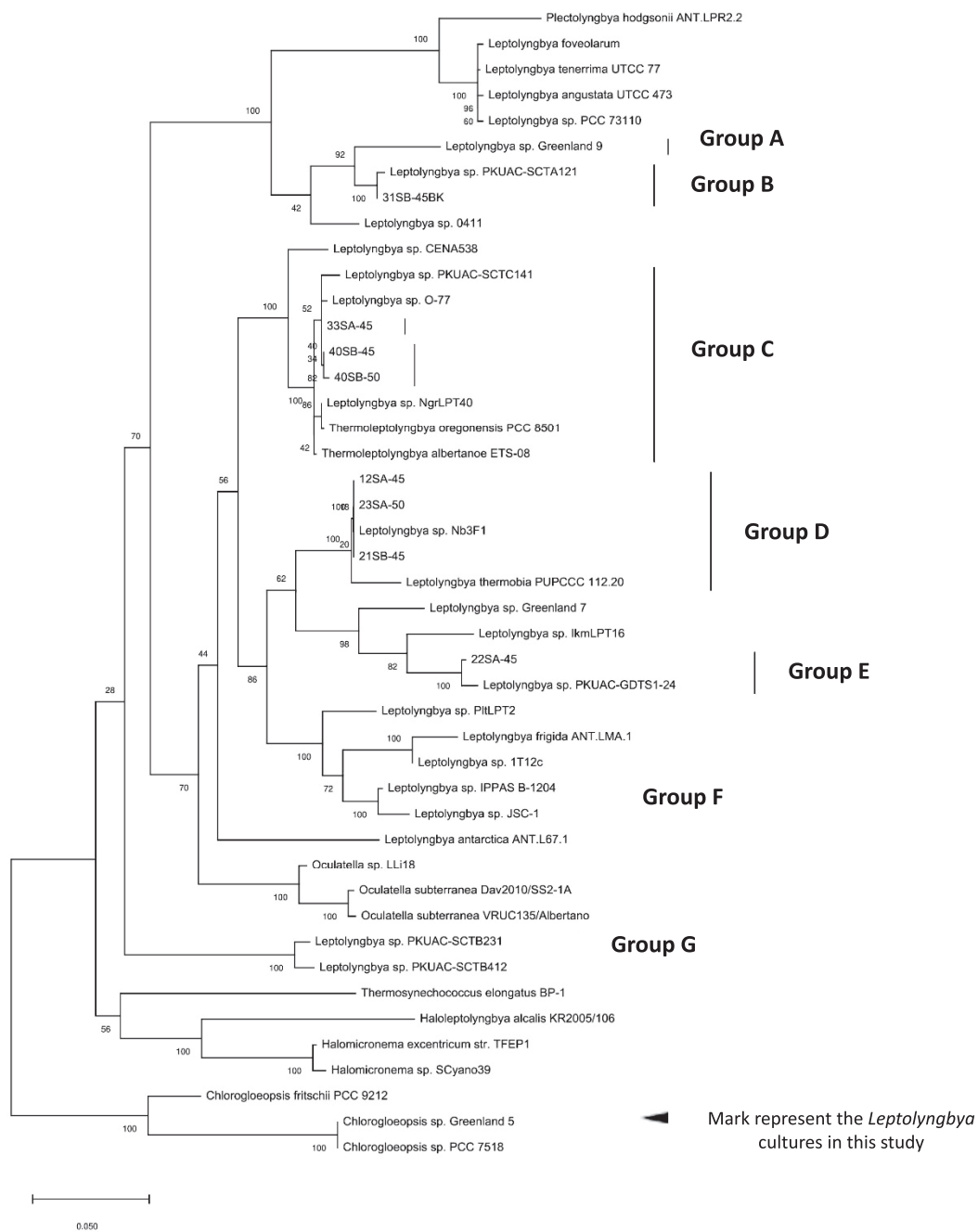


Fig. 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences for *Leptolyngbya* obtained from Nakabusa Hot Springs and the relatives.

Phylogenetic tree was inferred by using the Maximum Likelihood method. The robustness of the tree was tested with 100 bootstrap replicates and the bootstrap values are shown at the nodes.

好熱性シアノバクテリアの多様性

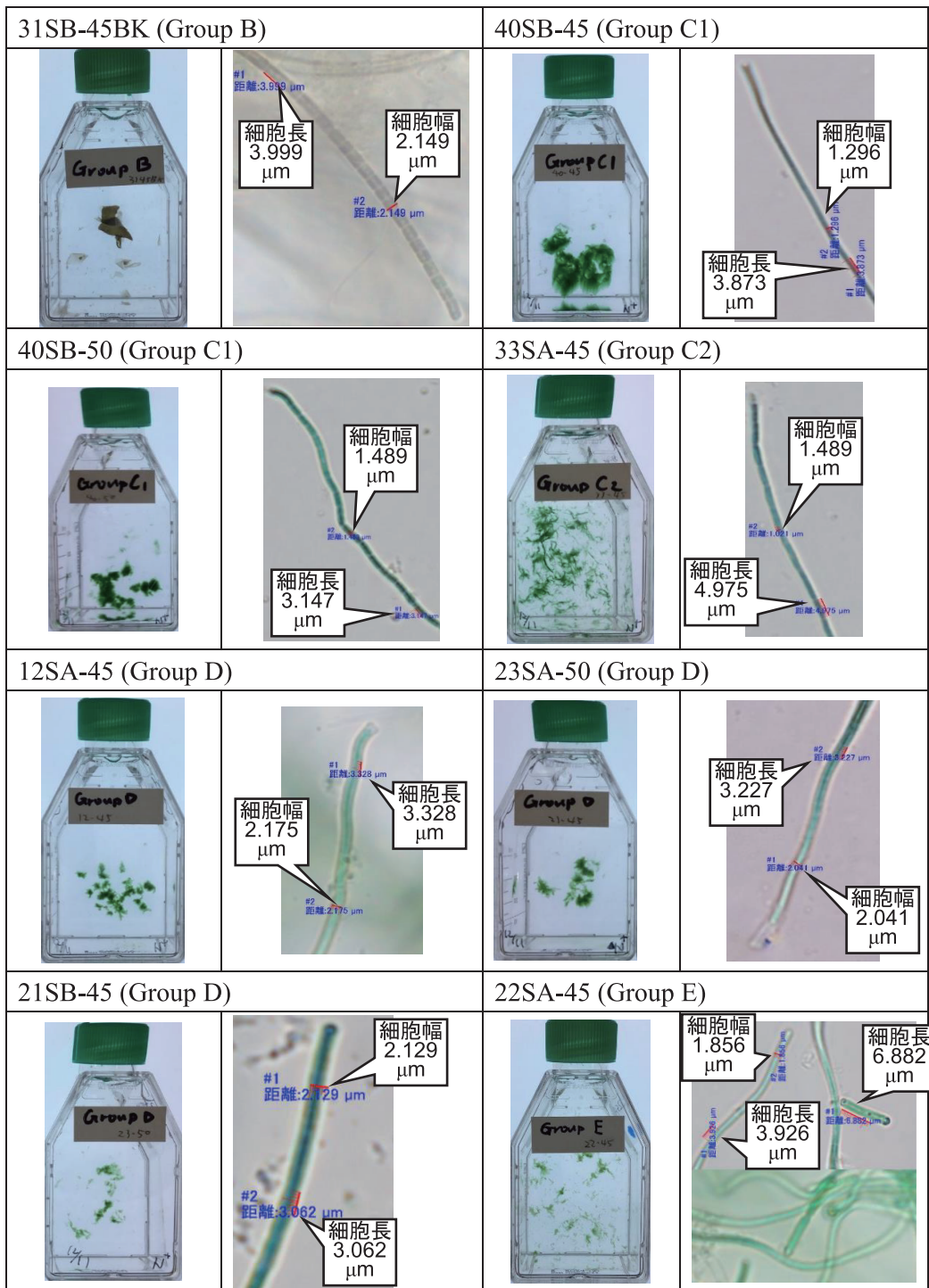


Fig. 2 Photo images of the *Leptolyngbya* cultures (left) and their microscopic images (right)

ことに Group C では、サブグループ C1 とサブグループ C2 で増殖温度が異なり、C1 が 55℃ で増殖能を示したのに対し、C2 は 55℃ では生育しなかった。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく分子系統と増殖温度特性には関連性があると思われた。また今回調べたすべてのグループの *Leptolyngbya* シアノバクテリアが窒素化合物無添加 BG11 培地での生育を示し、窒素固定能が確認された。

Group D に分類される *Leptolyngbya* シアノバクテリアとして、2017 年に中房温泉から大久保 & 宮下によって *Leptolyngbya* sp. Nb3F1 が分離され、近赤外光を吸収する特殊なクロロフィル、クロロフィル *f* を有することが示された (Ohkubo & Miyashita, 2017)。本研究で得られた *Leptolyngbya* シアノバクテリアについても近赤外光利用性を調べたところ、*Leptolyngbya* sp. Nb3F1 同様に Group D の *Leptolyngbya* シアノバクテリアのほか、Group E シアノバクテリアも近赤外光照射条件 (ハロゲンランプ照射、<700nm カットフィルター) で増殖能を示した。Group E シアノバクテリアの近赤外光利用能については、本研究が初めての報告である。

以上から、中房温泉という限られた地域において多様な好熱性シアノバクテリアが分布していることが明らかになった。培養株も多系統から得られ、分子系統と生理学的知見に基づいた好熱性シアノバクテリアの系統分類学的研究の礎を築くことができた。60℃ 以上の高温領域には *Thermosynechococcus*, *Chlorogloeopsis* が主に検出され、これらはよく研究されている北米の温泉シアノバクテリアとは異なる系統であることが示唆される (春田 2012; Papke *et al.* 2003)。60℃ 以下の温度域に観察された *Leptolyngbya* は、日本国外の温泉シアノバクテリアと相同性がみられるものもあったが、一か所の温泉地からこれほどまでに多系統の *Leptolyngbya* シアノバクテリアが検出された例は他にない。中房温泉は年間を通して温泉水が安定に流出しており環境変動は小さいと考えられる。微生物マット内に異なるマイクロニッチが形成されていることが考えられるとともに、*Leptolyngbya* の生理学的多様性が多種共存を可能にしているのではないだろう

か。生理学的多様性の一つとして近赤外光の利用能が挙げられる (Ohkubo & Miyashita, 2017)。1 cm 程度まで厚く発達する微生物マットにおいて、深度ごとに届く光の波長が異なることが示されている (Nishida *et al.*, 2018; Martinez *et al.*, 2019)。シアノバクテリアの系統的・生理的多様性を生み出す環境因子に興味をもたれ、本研究の知見および得られた培養株は、今後の研究に大きく貢献できると期待される。

好熱性 *Chlorogloeopsis* シアノバクテリアの比較ゲノム解析

Chlorogloeopsis は形態に基づく分類法で subsection V に分類されている糸状性ヘテロシスト形成性シアノバクテリアである (Castenholz, 2001)。なかには、クロロフィル *d* やクロロフィル *f* を合成する種がいる等、生理的に多様な種がみつまっている (Airs *et al.*, 2014; Antonaru *et al.*, 2020)。その多くは、中温性であるが、好熱性株の存在も知られていた。しかし、好熱性株の生態学的、遺伝学的知見はほとんどない。本研究および近年の研究で温泉地に *Chlorogloeopsis* が分布していることが知られるようになってきた (春田, 2012)。上述した長野県中房温泉だけでなく、宮城県鬼首温泉からも見つかり、分離株が報告されている (春田, 2012)。本研究では、鬼首温泉より分離された、*Chlorogloeopsis* 属の ON57a 株 (=NBRC 108921) について、全ゲノム解読を行った。その結果、ON57a 株は 4.9 Mbp の環状ゲノムを持ち、GC 比率は 42.4% であった。アノテーション解析により、4890 個のタンパク質遺伝子、4 セットの rRNA 遺伝子、49 個の tRNA を持つことが分かった。*Chlorogloeopsis* 属ではこれまで、*Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912, *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212, *Chlorogloeopsis* sp. PCC 7702 の 3 株でゲノム配列が報告されている。Average Nucleotide Identity (ANI) 法による解析では、*Chlorogloeopsis* sp. PCC 7702 と 99% 相同を示した一方、*Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912, *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212 とは 80% 程度であった (Table 2)。*Chlorogloeopsis* 属内での分類を整理する上で有効な知見である。

ON57a 株のゲノムから窒素固定関連遺伝子セットが

Table 2 Pairwise Average Nucleotide Identity (ANI) analyses for genome sequenced *Chlorogloeopsis* strains.

	ON57a	PCC 7702	PCC 6912	PCC 9212
ON57a	100%	99.46%	80.00%	79.93%
PCC 7702	-	100%	79.79%	79.82%
PCC 6912	-	-	100%	99.93%
PCC 9212	-	-	-	100%

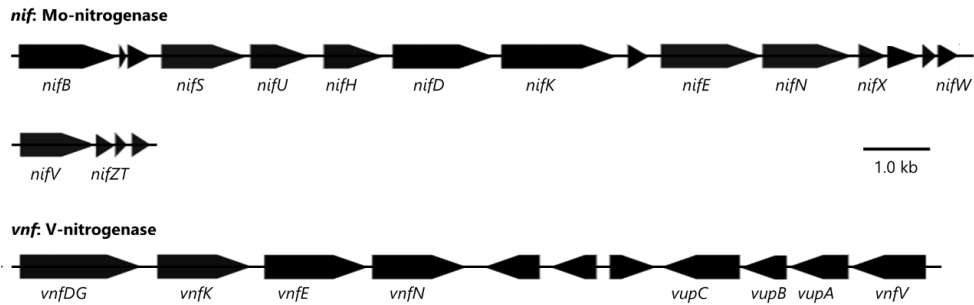


Fig. 3 Maps of the two nitrogenase gene clusters in *Chlorogloeopsis* sp. ON57a.

二つ見つかった (Fig.3). 遺伝子セットの一つは, *nifB*, *nifS*, *nifU*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifW* オペロンと *nifV*, *nifZ*, *nifT* オペロンからなり, これらは酵素活性部位にモリブデンを配位する Mo 型ニトロゲナーゼの発現・成熟に必要な遺伝子として知られる. オペロン構造を他の近縁 *Chlorogloeopsis* 属シアノバクテリアと比較すると, *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 および *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212 では, *nifD* と *nifK* の間に約 8.2kbp の別の遺伝子群が入っており, *nifD* と *nifK* は分断されているが, ON57a および *Chlorogloeopsis* sp. PCC 7702 ではこのような分断配列が見られなかった. もう一つの遺伝子セットはバナジウム (V) 型ニトロゲナーゼで, *vnfDG*, *vnfK*, *vnfE*, *vnfN* を含む. *Chlorogloeopsis* sp. PCC 7702 も同様の遺伝子群を保有しているが, 活性部位をコードする *vnfDG* の大部分を欠損している. ON57a はバナジウム (主にバナジン酸) を細胞内に取り入れるための膜貫通型の輸送タンパクをコードする *vupA*, *vupB*, *vupC* を有していた. ON57a はモリブデン枯渇等で Mo 型ニトロゲナーゼが活用できない環境でも, V 型ニトロゲナーゼを使って窒素固定生育できると考えられた.

好アルカリ性好熱性シアノバクテリアの培養とその生理学的性質

山梨県の桃の木温泉 (pH9.6, 42.6°C), 奈良県の入之波温泉五色湯 (pH9.1, 26.8°C), 和歌山県の佐部温泉 (pH9.7, 29°C) からシアノバクテリアが優占する微生物マットを温泉水とともに採集した (Fig.4A, D, G). これらの試料を BG11 培地に対して 1/2 あるいは 1/10 量の現地温泉水とともに移植し, 12 時間ごとの明暗サイクル条件下, 桃の木温泉試料は 42.0°C, pH9.5, 入之波温泉試料は 25°C, pH9.0, 佐部温泉試料は 25°C, pH9.5 で培養した. 桃の木温泉から分離した MO17-1 株は上述の *Leptolyngbya* シアノバクテリアに類似した形態学的特徴を示した (Fig.4C). 固化剤としてジェランガムを用い

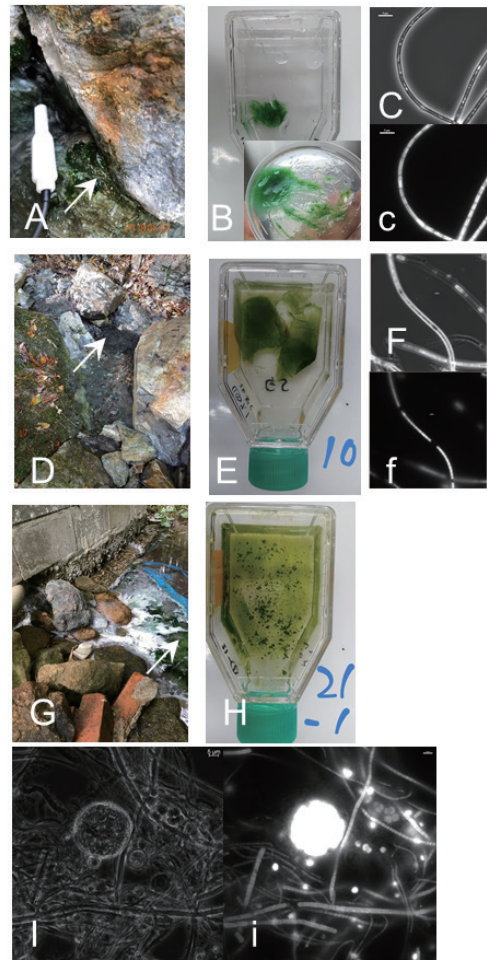


Fig. 4 Photo images of the cyanobacteria from alkaline hot springs; A-C, Cyanobacteria from Momonoki hot spring; D-F, Cyanobacteria from Goshikiyu hot spring; G-I, Cyanobacteria from Sabe hot spring; A, D, G Sampling sights with showing the mats sampled (white arrow); B, E, H Cyanobacteria cultures; C, F, I Phase contrast and fluorescence microscopy analysis. of samples obtained from alkaline hot springs. Observation of the same microscopy field by phase contrast (C, F, I), autofluorescence (c, f, i).

結 語

て平板培養すると、Fig.4Bに示すようにジェランガムを分解している様子が観察された。五色湯から採取した試料から培養できたシアノバクテリアも *Leptolyngbya* シアノバクテリアと同様の形態学的特徴を示した (Fig.4F)。佐部温泉は前述二つの採集地より構成種が多様で、シアノバクテリア、硫黄酸化細菌、非光合成細菌などがマットを構成していた。顕微鏡観察から *Leptolyngbya* シアノバクテリア、*Anabaenopsis*, *Synechococcus*, *Chroococcales*, *Nostoc* 様の形態が観察されたが、集積培養系で増殖したのは主に Fig.4Iに示す繊維状の *Leptolyngbya* シアノバクテリアだった。

桃の木温泉からの分離株 MO17-1 および佐部温泉からの集積培養系 SB21-1 を対象にして、アルカリ耐性や最適 pH を調べた。Good's buffer を用いて pH7.0~11.0 の各 pH にて培養試験を行った (Fig.5)。その結果、MO17-1 の増殖最適 pH は 8.5~9.0 で、pH 11.0 においても生育が確認された。SB21-1 は、最適 pH は 8.0~8.5 で、pH 11.0 においても生育が確認された。どちらも最適 pH は中性付近であったが、高 pH 画分では光合成の影響で pH が上昇した可能性が考えられた。これら分離株は好アルカリ性ではなかったが、増殖可能な pH の範囲が広いことが示された。なお、pH8.5 において Tricine と TAPS での生育を比較すると TAPS での生育が悪く、TAPS はシアノバクテリアの生育に阻害的に働くことが示された。

陸上温泉における好熱性シアノバクテリアについては国内外で古くから研究があり、近年でも遺伝子解析法を中心とした研究結果が報告されていた (春田, 2012; Papke *et al.*, 2003; Thiel *et al.*, 2016; Estrella *et al.*, 2017; Strunecky *et al.*, 2019)。しかし本研究のように一つの温泉地を対象に培養法と次世代シーケンサーによる遺伝子解析を組み合わせて解析した例はほとんどない。本研究で解析した長野県中房温泉郷からは実に多様な系統のシアノバクテリアがみつかり、これまでに多様なシアノバクテリアが限られた高温温度域に共存していることは初めての発見である。形態学および生理学的特性の違いが共存を可能にしていると考えられ、系統分類だけでなく、生態および応用利用の点からも興味深い。

シアノバクテリアは他の細菌群に比べ生理的多様性が低いこともあり、細菌の系統分類指標 (International Code of Nomenclature of Prokaryotes) に則った系統分類は困難を伴う。ゲノム情報の解読・活用が期待されるが、分離株のゲノム情報はまだまだ限定的である。本研究では系統的にも生理的にも興味をもたれている好熱性 *Chlorogloeopsis* シアノバクテリアのゲノム情報を解析した。 *Chlorogloeopsis* シアノバクテリアについて生理・形態学的特徴、16S rRNA 遺伝子塩基配列、16S-23S ITS 塩基配列での比較解析も進められているが、本研究のゲノ

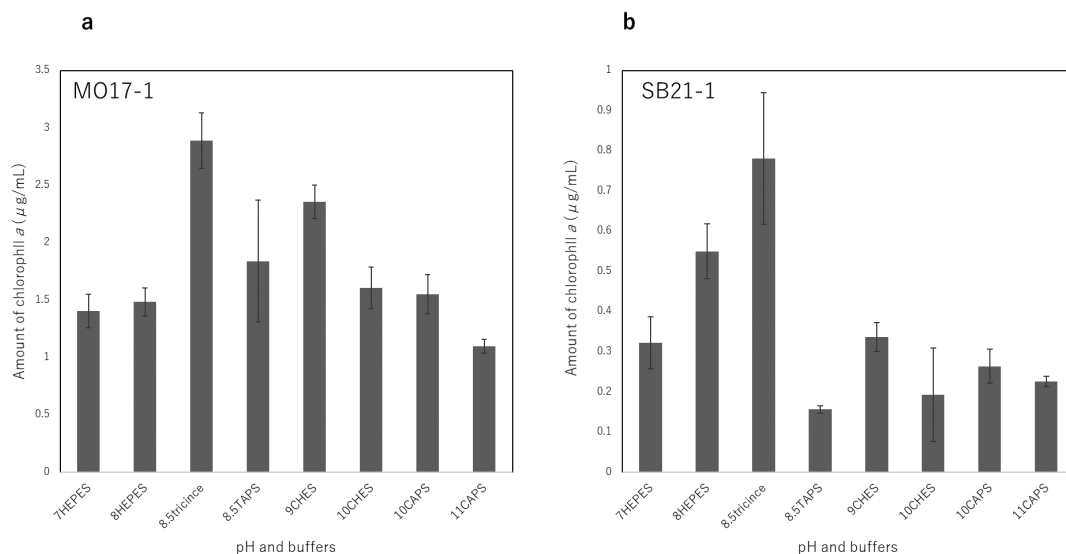


Fig. 5 Growth of cyanobacteria collected from alkaline spring sources. The cells were cultured in BG11 liquid medium. The pH of the medium was adjusted using various 20 mM Good's buffers (HEPES, tricine, TAPS, CHES, CAPS). a, cyanobacteria from Momonoki hot spring (Yamanashi); b, cyanobacteria from Sabe hot spring (Wakayama). After culturing on a culture plate under continuous irradiation aerobic conditions for 11 days, the amount of growth was estimated by the amount of chlorophyll *a*. Data are means \pm SE, *n* = 3.

ム解析により、より明確な系統分類学的知見を得ることができた。

顕著に好アルカリ性を示すシアノバクテリアの取得には至らなかったが、その探索過程でシアノバクテリアに嫌気性紅色硫黄光合成細菌が共存している様子が観察された (data not shown)。シアノバクテリアの硫黄代謝および硫黄細菌との共生関係に興味もたれる。緑色硫黄細菌が優占する微生物マット (リトルソルトスプリング, フロリダ) から単離された *Leptolyngbya* sp. *hensonii* 株に酸素非発生型光合成能が報告されている (Hamilton *et al.*, 2018)。またイタリアの鉱泉から単離されたシアノバクテリア *Pseudanabaena* FS39 は、酸素発生型光合成と硫黄酸化を伴う酸素非発生型光合成を切り替えられることが示されている (Klatt *et al.*, 2015)。このようなシアノバクテリアの報告例はまだ少ないが、高温硫黄泉でのシアノバクテリアの生理・生態研究は、硫黄泉での光合成複合微生物系での役割だけでなく、光合成の進化や古地球生態系の形成過程の究明にも貢献できると期待される。

要 約

本研究では、陸上温泉を対象に環境 DNA 解析から好熱性シアノバクテリアの分布と多様性を明らかにした。予想されていた以上に多様なシアノバクテリアが見つかり、新規未培養系統群も見つかった。またいくつかの好熱性株の培養に成功し、ゲノム情報、分子系統および窒素固定能、赤色光利用性や生育可能温度域、生育可能 pH などの生理学的特性を明らかにした。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 花田智. 2017. 酸素非発生型光合成 - 光合成の起源と進化 -. ラン藻ゲノム交流会 (6月24日, 東京)
- 2) 花田智. 2017. 分離培養の進展を阻害しているのは「分離できない」って思い込み以外の何ものでもない. 環境微生物系学会合同学会2017 (8月29-31日, 仙台)
- 3) 花田智. 2017. 温泉バイオマット - 温泉に存在する特殊な微生物生態系 -. 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (12月6-9日, 神戸)
- 4) 花田智. 2017. どうなるシアノバクテリアの新種提案? - シアノバクテリアの国際命名規約に絡む厄介な問題 -, 研究集会「シアノバクテリアの生態学的多様性と系統分類」京都大学生態学研究センター, 日本微生物資源学会 (11月23日, 京都)
- 5) 花田智. 2017. 極限の世界から. 第7回日本微生物学連盟フォーラム「微生物 - 変わり者たちの素顔」 (12月16日, 東京)
- 6) 花田智. 2018. 古地球生態系での酸素非発生型光合成細

菌の役割. 第59回日本植物生理学会年会, 第3回光合成細菌ワークショップ (3月27日, 札幌)

- 7) Thiel, V., Tank, M., Martinez, J.N., Trampe, E.C.L., Lichtenberg, M., Köhl, M., Hanada, S. 2018. Microbial diversity and activity in a hot spring associated oxygenic phototrophic microbial mat disclosed by a comprehensive multi-method study. 16th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (ISPP) (August 5-9, Vancouver, Canada)
- 8) 菅野菜々子. 2018. 温泉微生物マットの大黒柱: 光合成細菌の一次生産者としての役割とその能力. 自由集会「ジグソーパズルのピースを埋める - 単一微生物種にフォーカスする若手研究者たち -」. 日本微生物生態学会第32回大会 (7月11-13日, 沖縄)
- 9) Martinez, J.N. 2020. Vertical distribution of phototrophic bacteria exhibits niche differentiation within hot spring-associated microbial mat. Friday Seminar, Department of Biology, The State University of New York-Oneonta, (February 21, Oneonta, NY, USA)

原著論文

- 1) Thiel, V., Wood, J.M., Olsen, W.T., Tank, M., Klatt, C.G., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2016. The dark side of the Mushroom Spring microbial mat: life in the shadow of Chlorophototrophs. I. Microbial diversity based on 16S rRNA gene amplicons and metagenomic sequencing. *Front. Microbiol.* 7:919.
- 2) Thiel V., Hügler M., Ward D.M. & Bryant D.A. 2017. The dark side of the Mushroom Spring microbial mat: Life in the shadow of chlorophototrophs. II. metabolic functions of abundant community members predicted from metagenomic analyses. *Front. Microbiol.* 8:943.
- 3) Bernstein H.C., McClure R.S., Thiel V., Sadler N.C., Kim Y.-M., Chrisler W.B., Hill E.A., Bryant D.A., Romine M.F., Jansson J.K., Fredrickson J.K. & Beliaev A.S. 2017. Indirect interspecies regulation: transcriptional and physiological responses of a cyanobacterium to heterotrophic partnership. *mSystems.* 2: e00181-16.
- 4) Nishida, A., Thiel, V., Nakagawa, M., Ayukawa, S. & Yamamura, M. 2018. Effect of light wavelength on hot spring microbial mat biodiversity. *PLoS One.* 13: e0191650.
- 5) Martinez, J.N., Nishihara, A., Lichtenberg, M., Trampe, E., Kawai, S., Tank, M., Köhl, M., Hanada, S. & Thiel, V. 2019. Vertical distribution and diversity of phototrophic bacteria within a hot spring microbial mat (Nakabusa hot springs, Japan). *Microbes Environ.* 34: 374-387.
- 6) Kawai, S., Martinez, J.N., Lichtenberg, M., Trampe, E., Köhl, M., Tank, M., Haruta, S., Nishihara, A., Hanada, S. & Thiel, V. 2021. In-situ metatranscriptomic analyses reveal the metabolic flexibility of the thermophilic anoxygenic photosynthetic bacterium *Chloroflexus aggregans* in a hot spring cyanobacteria-dominated microbial mat. *Microorganisms.* 9: 652.

その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) Hanada, S. 2016. (Research Highlight) Anoxygenic photosynthesis: A photochemical reaction that does not contribute to oxygen reproduction. *Microbes Environ.* 31: 1-3.

- 2) Thiel, V., Tank, M. & Bryant, D.A. 2018. Diversity of chlorophototrophic bacteria revealed in the Omics Era. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 21–49.
- 3) Tank, M., Thiel, V., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2017. A panoply of phototrophs: An overview of the thermophilic chlorophototrophs of the microbial mats of alkaline siliceous hot springs in Yellowstone National Park, WY, USA, *In* Hallenbeck, P.C. (ed.), *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Environmental and Applied Aspects*, pp. 87-137, Springer International Publishing, Switzerland
- 4) Hanada, S. 2019. Evolution of photosynthetic system, *In* Yamagishi A, Kakegawa T, Usui T (eds.), *Astrobiology: From the Origins of Life to the Search for Extraterrestrial Intelligence*, pp. 137-152, Springer, Singapore.
- 謝 辞
- 本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また、本研究の遂行にご協力いただいたYoon博士(九州大学)、中房温泉社長・百瀬孝仁氏、光合成複合微生物寄付講座(Photomic Lab.)の学生諸氏に感謝の意を表します。
- 文 献
- Airs, R.L., Temperton, B., Sambles, C., Farnham, G., Skill, S.C., and Llewellyn, C.A. 2014. Chlorophyll *f* and chlorophyll *d* are produced in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* when cultured under natural light and near-infrared radiation. *FEBS Lett.* **588**:3770-3777.
- Antonaru, L.A., Cardona, T., Larkum, A.W.D. & Numberg, D.J. 2020. Global distribution of a chlorophyll *f* cyanobacterial marker. *ISME J.* **14**:2275-2287.
- Castenholz, R.W. 2001. Phylum BX. Cyanobacteria. *In* Boone, D.R., Castenholz, R.W. and Garity, G.M. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 1, pp. 473-599. Springer, New York.
- Estrella Alcaman, M., Alcorta, J., Bergman, B., Vasquez, M., Polz, M. & Diez, B. 2017. Physiological and gene expression responses to nitrogen regimes and temperatures in *Mastigocladus* sp. strain CHP1, a predominant thermotolerant cyanobacterium of hot springs. *Syst. Appl. Microbiol.* **40**:102-113.
- Grimme L.H. & Boardman N.K. 1972. Photochemical activities of a particle fraction P1 obtained from the green alga *Chlorella fusca*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**: 1617–1623.
- Hamilton T.L., Klatt J.M., De Beer D. & Macalady J.L. 2018. Cyanobacterial photosynthesis under sulfidic conditions: Insights from the isolate *Leptolyngbya* sp. strain hensonii. *ISME J.* **12**: 568–584.
- 春田伸. 2012. 陸上温泉に分布する光合成細菌の系統分類と種分化に関する研究. *IFO Research Communications*, **26**: 39-47.
- Katoh, H., Itoh, S., She, J.-R. & Ikeuchi, M. 2001. Functional analysis of *psbV* and a novel *c*-type cytochrome gene *psbV2* of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* strain BP-1. *Plant Cell Physiol.* **42**:599-607.
- Klatt J.M., Al-Najjar M.A.A., Yilmaz P, Lavik G., de Beer D. & Polerecky L. 2015. Anoxygenic photosynthesis controls oxygenic photosynthesis in a cyanobacterium from a sulfidic spring. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 2025–2031.
- Komarek, J., Kastovsky, J., Mares, J. & Johanse, J.R. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia.* **86**:295-335.
- Kumar S., Stecher G. & Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**: 1870–1874.
- Martinez, J.N., Nishihara, A., Lichtenberg, M., Trampe, E., Kawai, S., Tank, M., Kuhl, M., Hanada, S. & Thiel, V. 2019. Vertical distribution and diversity of phototrophic bacteria within a hot spring microbial mat (Nakabusa hot springs, Japan). *Microbes Environ.* **34**:374-387.
- Nishida, A., Thiel, V., Nakagawa, M., Ayukawa, S. & Yamamura, M. 2018. Effect of light wavelength on hot spring microbial mat diversity. *PLoS One.* **13**:e0191650.
- Nübel U., Garcia-Pichel F. & Muyzer G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3327–3332.
- Ohkubo, S. & Miyashita, H. 2017. A niche for cyanobacteria producing chlorophyll *f* within a microbial mat. *ISME J.* **11**: 2368-2378.
- Papke, R.T., Ramsing, N.B., Bateson, M.M. & Ward, D.M. 2003. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environ. Microbiol.*, **5**: 650-659.
- Rippka R., Deruelles J. & Waterbury J.B. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 1-61.
- Stal L.J. 2012. Cyanobacterial mats and stromatolites. *Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time*, pp. 65–125. Springer Netherlands.
- Strunecky, O., Kopejtká, K., Goecke, F. *et al.* 2019. High diversity of thermophilic cyanobacteria in Rupite hot spring identified by microscopy, cultivation, single-cell PCR and amplicon sequencing. *Extremophiles.* **23**:35-48.
- Thiel, V., Wood, J.M., Olsen, W.T., Tank, M., Klatt, C.G., Ward, D.M. & Bryant, D.A. 2016. The dark side of the Mushroom Spring microbial mat: life in the shadow of Chlorophototrophs. I. Microbial diversity based on 16S rRNA gene amplicons and metagenomic sequencing. *Front. Microbiol.* **7**:919.
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680.
- Urbach E., Robertson D.L. & Chisholm S.W. 1992. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* **355**: 267–270.

好気性光合成細菌の分布と多様性

花 田 智*

東京都立大学大学院理学研究科
光合成複合微生物系の環境・エネルギー活用シーズ開発寄付講座
〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1

Distribution and diversity of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria

Satoshi HANADA*

Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University
Minami-Osawa 1-1, Hachioji, Tokyo 192-0397

We analyzed distribution and diversity of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria in river and seacoast using culture-dependent and culture-independent methods. This study discovered aerobic anoxygenic photosynthetic bacterial species in eight lineages in *Proteobacteria*. Phylogenetic studies on these novel aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria provided important insights into evolutionary history and diversification of photosynthetic bacteria. Ecological studies on aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria in Tama River, Japan indicated that aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria ubiquitously exist in river water and epilithic biofilms from upper to middle reaches throughout the year. The population of photosynthetic bacteria in river environments were higher than expected. These results strongly suggest that aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria play important roles in material cycles in river.

Key words: aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria, bacteriochlorophyll, river epilithic biofilm, *Proteobacteria*

緒 言

シアノバクテリア以外の光合成細菌は、光合成で酸素を発生しないことから非酸素発生型光合成細菌と呼ばれている。古くから知られている典型的な非酸素発生型光合成細菌である紅色細菌、緑色硫黄細菌、糸状性光合成

細菌などは嫌気条件でのみ光合成を行い、好気条件では光合成色素や光合成器官を作らず、生育できないか、または呼吸により生育する。1978年に日本人の研究者らにより好気条件で光合成色素バクテリオクロフィル *a* を作る細菌が発見された (Sato, 1978; Harashima *et al.*, 1978)。本菌は、嫌気光合成条件では生育できず、好気性光合成細菌, aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria (AAPB) と呼ばれる。発見当初は例外的な光合成細菌と思われていたが、その後、海洋表層に広く分布し、物質循環に大きく寄与していることが報告されるようになった (Kolber *et al.*, 2000, 2001; Koblížek, 2015)。これまでに報告されている好気性光合成細菌の多くはアルファプロテオバクテリアに属しているが、最近では、ベータプロテオバクテリアやガンマプロテオバクテリアに属するものも見つかってきた (Yutin *et al.*, 2007; Yurkov & Costonyi, 2009; Koblížek, 2015)。しかしまだ分離株の数は少なく、環境DNA解析からはまだまだ多様な好気性光合成細菌が分布している可能性が指摘されている。

好気性光合成細菌は光合成によるATP生産が可能のため、栄養塩飢餓環境においても高い生残性を示すと考え

E-mail: photomic2015@gmail.com

*花田 智 現 産業技術総合研究所 satohana@tmu.ac.jp

共同研究者：広瀬節子 (東京都立大学大学院理学研究科)、
高部由季 (東京都立大学大学院理学研究科、
現 東京大学大気海洋研究所)、
永島咲子 (東京都立大学大学院理学研究科、
現 神奈川大学)、
福島俊一 (東京都立大学大学院理学研究科、
現 大阪大学)、
Vera Thiel (東京都立大学大学院理学研究科、
現 Leibniz Institute DSMZ)、
Marcus Tank (東京都立大学大学院理学研究科、
現 Leibniz Institute DSMZ)、
春田 伸 (東京都立大学大学院理学研究科)。

られており、さまざまな環境に分布しその物質循環に寄与していることが予想されている。好気性光合成細菌の研究は主として外洋に注目されてきており、湖沼での研究 (Mašín *et al.*, 2008, 2012; Fauteux *et al.*, 2015; Yurkov & Hughes, 2017) は報告されるようになってきたが、他の環境での研究は遅れている (Waidner & Kirshman, 2005; Jiang *et al.*, 2010)。

本研究では、光合成色素バクテリオクロロフィル蛍光検出法を導入し、分子生態学的手法および分離培養法を用いて、河川や沿岸部における好気性光合成細菌の多様性と分布を明らかにすることを目的とした。

実験方法

蛍光顕微鏡による光合成細菌の細胞計数

バクテリオクロロフィル *a* の自家蛍光を蛍光顕微鏡 Nikon ECLIPSE E600 と CCD カメラ Hamamatsu DIGITAL CAMERA C11440 ORCA-Flash 4.0 で検出し、環境試料中の光合成細菌の細胞数を計数した (Sato-Takabe *et al.*, 2016)。キセノンランプを光源とし、励起光 350–550 nm で、830 nm 以上の蛍光を検出した。ただし、クロロフィル由来する蛍光も観察されてしまうため、クロロフィル蛍光を有する細胞を励起光 440–490 nm、検出光 715 nm 以上で別に計数し、除外した。また全菌数は DAPI 染色し計数した (励起光 355–375 nm、検出光 400 nm 以上)。

微生物群集の 16S rRNA, 18S rRNA 遺伝子アンプリコン解析

試料から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子 V4 領域および 18S rRNA 遺伝子 V1-V2 領域を PCR 増幅した。増幅産物の塩基配列は次世代シーケンサー Illumina Miseq を用いて解析した。

バイオフィーム試料の光合成関連色素解析

バイオフィーム試料をガラス繊維フィルターで吸引ろ過し、ジメチルホルムアミドと超音波抽出器を用いて色素抽出を行った後、超高速液体クロマトグラフィー Shimadzu UHPLC Nexera X2 SR (Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8 RRHT カラムを装着) を用い、Suzuki *et al.* (2015) に従い光合成色素の解析を行った。

好気性光合成細菌の分離培養

環境から採取した試料を有機物含有の PE 培地 (Hanada *et al.*, 1995) を 1/10 に希釈した寒天培地に塗布し、30°C 好気暗条件で培養を行った。生育したコロニーのうち、バクテリオクロロフィルの赤外自家蛍光を

発するコロニーを選択し (Hirose *et al.*, 2016)、純化した。

分離株の系統分類解析

16S rRNA 遺伝子の塩基配列情報を取得し、分子系統解析した (Tamura *et al.*, 2013)。既報の確立されたプロトコールに従い、脂肪酸およびキノン分析、生化学試験を実施した (Hanada *et al.* 2002; Mori *et al.*, 2018)。ゲノム解析には、単離株から抽出した全 DNA を次世代シーケンサー Illumina Miseq を用いてゲノムデータを取得した。アセンブリには SPAdes version 3.7.1 を用い、アノテーションは Prokka version 1.11 を用いて行った。

結果および考察

河川環境における好気性光合成細菌の分布と多様性

河川水中や川底に付着している微生物は一次生産者として、また分解者として河川生態系に重要であるが (Allan, 1995)、これまで好気性光合成細菌の研究はほとんどなかった (Hirose *et al.* 2012)。東京都南西部を流れる多摩川を対象として、上流から中流にかけて、釜の淵 (青梅市)、小作 (羽村市)、永田橋 (福生市)、小宮 (八王子市) の 4 地点から 2017 年 5 月および 6 月に試料を採取した。蛍光顕微鏡を用いて、河川水中の浮遊性細菌数を計数した結果を Fig. 1 に示す。調査した 4 地点の全菌数とバクテリオクロロフィル含有細胞 (Aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria, AAPB) 数を比較すると、それぞれ $1.6 \times 10^5 \sim 4.3 \times 10^5$ 細胞 mL^{-1} 、 $1.5 \times 10^4 \sim 4.4 \times 10^4$ 細胞 mL^{-1} 、で調査地点間の大きな違いはなかった。光合成細菌の全細菌数に占める割合は調査した 4 地点で 6.1–19.6% であった。またクロロフィル含有細胞 (シアノバクテリア) 数は小宮では検出限界以下 ($< 3.4 \times 10^3$ 細胞 mL^{-1}) であったが、他地点では計数でき、その数は $2.1 \times 10^3 \sim 3.2 \times 10^4$ 細胞 mL^{-1} であった。シアノバクテリアの多いサンプルにバクテリオクロロフィル含有細胞数が多い傾向がみとめられ、両者の共存が示唆された。一方、釜の淵と永田橋の試料において河川水中の粒子付着性分画についても細菌数を調べたところ、全菌数に占める光合成細菌の割合は 52.2% と高かった (data not shown)。光合成細菌は、多摩川上流域および中流域の河川水に広く存在しており、沿岸海洋において観察されていたように (Waidner & Kirshman 2007, Lami *et al.* 2009)、河川水中においても粒子付着性の割合が高いと考えられた。

多摩川の 5 地点、釜の淵 (青梅市)、小作 (羽村市)、永田橋 (福生市)、小宮 (八王子市)、日野 (日野市) において、2016 年 6 月および 8 月に川底のバイオフィームを採取し、分散後、寒天平板培地で培養した。すべての

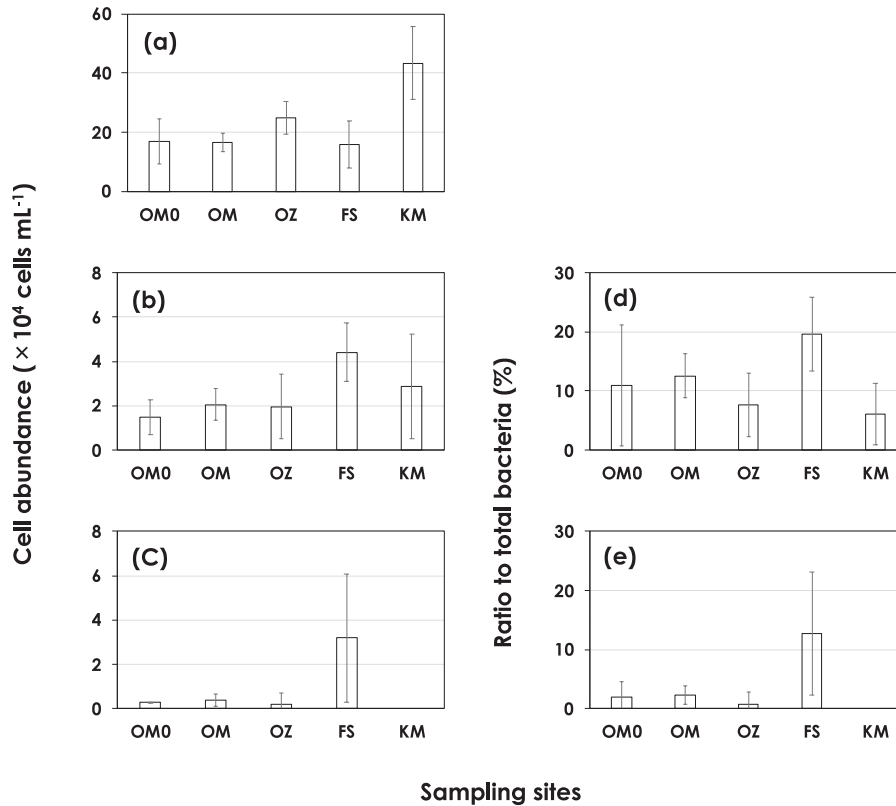


Fig. 1 Bacterial cell abundance in the free-living fraction in the Tama River. Cell abundances of the total bacteria (a), aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria (AAPB) as bacteriochlorophyll-containing bacteria (b), cyanobacteria as chlorophyll-containing bacteria (c), and the relative ratios of AAPB (%) (d) and cyanobacteria (%) (e) in total bacteria. The cell numbers were counted using the infra-red epifluorescence microscopy ($n=8$). OM0, OM: Ome, OZ: Ozaku, FS: Fussa, KM: Komiya. The sample of OM0 was collected in May 2017. Other four samples (OM, OZ, FS and KM) were collected in June 2017. Asterisks indicate 'under detection limit'. Error bars show standard error of eight sets of the counting data.

試料からバクテリオクロフィル含有コロニーが検出され、そのコロニー数を計数したところ、 $2.93 \times 10^5 \sim 29.67 \times 10^5$ CFU cm^{-2} of biofilmであった。河川水中だけでなく川底バイオフィーム中においても光合成細菌が普遍的に存在することがわかった。バクテリオクロフィル含有コロニー数は、6月に比べて8月のバイオフィームに多い傾向があった。これらバイオフィーム試料のうちクロフィル含量が多くバイオマス生産量が高い試料と、クロフィル含量が少なくバイオマス生産量が低い試料を選択して、単離株を得、16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析した。100株の単離株は25系統に分かれ、それらはアルファプロテオバクテリアまたはベータプロテオバクテリアに属していた (Fig. 2)。いずれの試料でも、

アルファ4グループ (*Sphingomonadales* 目) の割合が高く、それらは主に *Porphyrobacter* 属と考えられた。

続いて、多摩川の釜の淵 (青梅市) において一年を通して季節ごとに川底バイオフィームを採取し、PCR アンプリコン解析および色素分析を実施した。18S rRNA 遺伝子を対象にしたアンプリコン解析の結果、珪藻、緑藻のほかに後生動物、卵菌類が検出された。藻類の割合は、春、夏よりも秋から冬にかけて多くなる傾向が見られた。藻類の中では年間を通じて緑藻よりも珪藻が優占していた。色素分析の結果、珪藻の色素であるフコシアニンが多く検出されアンプリコン解析の結果を支持した。また、16S rRNA 遺伝子を対象にしたアンプリコン解析では、プロテオバクテリア、バクテロイデテス、シ

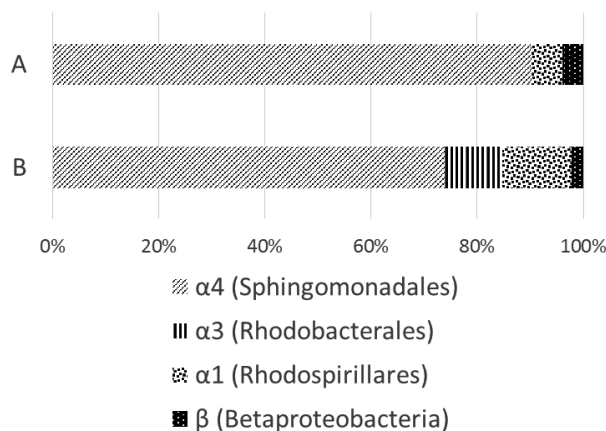


Fig. 2 The ratio of AAPB isolates belonging to each phylogenetic group isolated from two different biofilms in the Tama River. A: In the biofilm with the highest value of Chl *a*/protein. *n*=50. B: In the biofilm with the lowest value of Chl *a*/protein. *n*=46. α1, α3, α4, and β indicate alpha-1 (*Rhodospirillales*), alpha-3 (*Rhodobacterales*), and alpha-4 (*Sphingomonadales*) subclasses of *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria*.

アノバクテリアが優占種として検出された。春にはプロテオバクテリアが多く7~9割を占めていたが、冬はプロテオバクテリアの割合が3~5割に減った一方、シアノバクテリアが増え2~5割となっていた。これまでの研究で多摩川川底バイオフィームからロドバクター科、スフィンゴモナス科、エリスロバクター科などのプロテオバクテリアに属する好気性光合成細菌を分離培養していた (Hirose *et al.*, 2016)。アンプリコン解析では、これら好気性光合成細菌のなかでもロドバクター属細菌が多く、67% (春)、59% (夏)、52% (秋)、89% (冬) を占めた。河川水の流速に注目して結果を比較すると、流速が遅い地点 (0.1m/s~0.2m/s) で、流速が速い地点 (1.5m/s~1.6m/s) に比べて、単位面積当たりのクロロフィル量が大きく (遅い地点 23.45mg/m²~141.12mg/m², 速い地点 0.48mg/m²~1.37mg/m²)、バイオマス生産量が多かった。全細菌に占める好気性光合成細菌の割合は全試料平均 1.75% であったが、クロロフィル量 74.34mg/m² 以上の試料で 9.66%、クロロフィル量 23.45mg/m² 以上の試料で 5.70%、と多く、クロロフィル量 21.21mg/m² 以下の試料で 0.84% と低くなる傾向が見られた。クロロフィル量が多くよく発達したバイオフィームには、好気性光合成細菌の存在比が高くなると考えられた。

以上の結果から、多摩川の上流および中流域では河川水、川底バイオフィームのどちらにも好気性光合成細菌が普遍的に存在することがわかった。存在量は試料により異なったが河川水浮遊性画分では全細菌の 19.6%、川底バイオフィームでの場合は全細菌の 15% を占める場合があることが示された。バイオフィームにおける好気性光合成細菌の細胞数および全細菌数あたりの割合について、上流から中流にかけての各地点間では顕著な違いは認められなかった。これは河川水中についても同様であった。上流域と中流域では河川水の栄養塩濃度が異なることが知られているが、栄養塩濃度の違いが好気性光合成細菌の分布に与える影響は小さいと考えられた。また、バイオフィーム中の好気性光合成細菌の割合は、どの季節でも、流速が遅く、クロロフィル量が多いバイオフィームにおいて、高くなる傾向がみられた。流速が遅い場所ではクロロフィル量の多い厚いバイオフィームが発達し、間隙に溶存物質が保持される (Battin *et al.*, 2003)。海洋においてもクロロフィル量と好気性光合成細菌数に同様の相関があるとの報告がある (Jiao *et al.*, 2007)。河川環境における好気性光合成細菌の分布についても、好気性光合成細菌の有機物の利用性の高さが強く関係していると考えられた。

川底バイオフィームから分離した新規好気性光合成細菌 *Aquabacterium pictum* の新種提案

多摩川の川底バイオフィームから分離培養したバクテリアオククロフィル含有細菌について、系統解析した。まず、分離株の中から好気性光合成細菌の特徴（嫌気条件下では照射下でも生育しない）を示すものを選抜した。16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析し、既知種との相同性が低いものとして W35^T 株を得た。W35^T 株は絶対好気性・非運動性の細菌で、有機物を含む寒天培地上にピンクベージュ色のコロニーを形成した。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析の結果、ベータプロテオバクテリアに属すると考えられた (Fig.3)。最近縁種は *Aquabacterium commune* B8^T で 97.9% の類似性を示した。 *Aquabacterium* 属の近縁基準株、 *A. tepidophilum*

YIM730274^T, *A. parvum* B6^T および *A. olei* NHI-1^T とのゲノム類似性 (ANI) を調べたところ、78-79% であった。基質の利用性、酵素活性、リン脂質、脂肪酸やキノンの種類と割合などを解析した多相分類比較の結果、W35^T 株が *Aquabacterium* 属の他のメンバーと明確に区別できることを示したため、基準株を W35^T (DSM 106757^T=NBRC11963^T) とする *Aquabacterium* 属の新種 *Aquabacterium pictum* sp. nov を提案した。

Aquabacterium pictum W35^T は *Aquabacterium* 属細菌の中でバクテリアオククロフィル *a* の生産が確認された初めての光合成細菌である。また、ベータプロテオバクテリアに属する好気性光合成細菌として記載された3例目の細菌である。

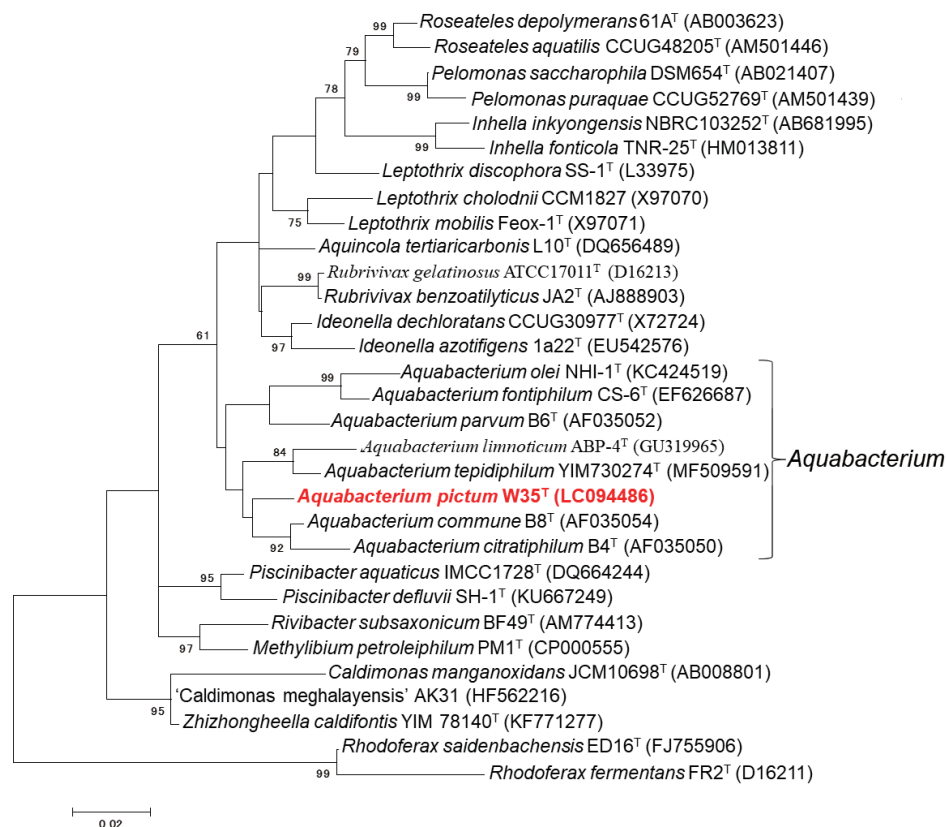


Fig. 3 Maximum-likelihood tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic position of W35^T and related *Burkholderiales* members within the *Betaproteobacteria*. The tree was reconstructed using the MEGA 6.0 software program. Bootstrap values over 50% are shown at the nodes. Bar, 0.02 nucleotide substitutions per site. *Rhodoferrax saidenbachensis* ED16^T (FJ755906) and *Rhodoferrax fermentans* FR2^T (D16211) were used as outgroups.

魚類養殖場海水から分離した新規好気性光合成細菌 1:
Roseobacter cerasinus sp. nov.

海洋の好気性光合成細菌の生態について主に外洋に注目されていたが、比較的有機物含量の高い沿岸部については調べられていなかった。しかし、先行研究での分子生態学的解析から、魚類養殖場に通年で多様な光合成細菌が多く分布していることが指摘された (Sato-Takabe *et al.*, 2016)。本研究では愛媛県愛南町の養魚場のいけす内から海水試料を採取し、培養法を用いて、新規バクテリオクロフィル含有細菌を探索した。探索の結果、好気性光合成細菌の特性を示す AI77^T 株を分離した。

16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析したところ、本株は *Roseobacter ponti* MM-7^T 株に近縁 (97.8%) であったが (Fig. 4)、ゲノム情報に基づくデジタル DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる相対類似度は 18.70% と低かった。さらに、その他の生理性状試験の結果ももとに、本株を *Roseobacter* 属の新種と結論づけた。 *Roseobacter cerasinus* と命名し、AI77^T (=DSM 110091^T=NBRC 114115^T) を基準株とした。AI77^T は既報の近縁種と異なり、種々の薬剤に対する耐性能があり、ゲノム解析結果からも薬剤耐性に関連する遺伝子群が多数確認された。

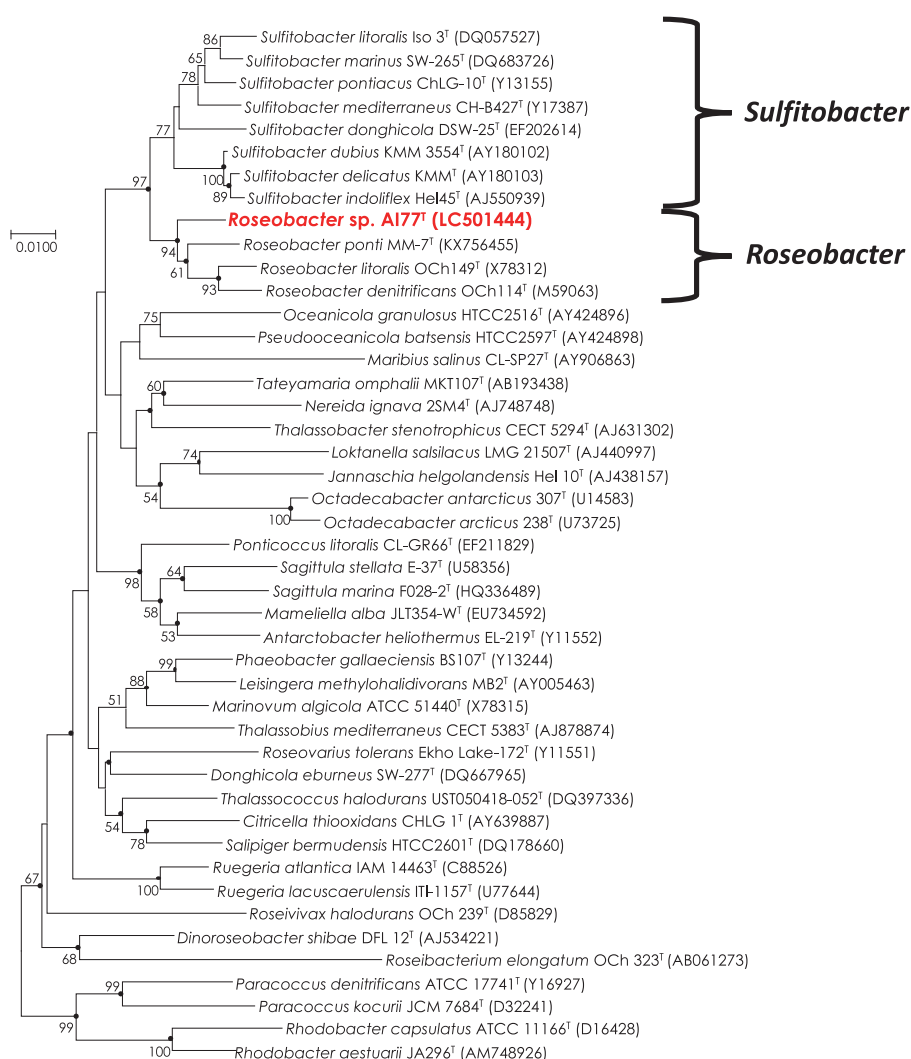


Fig. 4 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain AI77^T and closely related species. Bootstrap values were expressed as a percentage of 1000 replicates and only those higher than 50% are shown. Filled circles indicated on the nodes were also recovered in the maximum-likelihood tree (Muramatsu *et al.*, 2020, Fig. S4). *Stappia stellulata* IAM 12621^T (GenBank accession no. D88525) was used as an outgroup (not shown). Bar, 0.01 substitution per nucleotide position.

魚類養殖場海水から分離した新規好気性光合成細菌 2: *Litoreibacter roseus* sp. nov.

上記同様に愛媛県愛南町の養魚場から分離培養した結果、好気性光合成細菌の特性を示す K6^T 株が得られた。本株は、*Litoreibacter ponti* GJSW-31^T 株に近縁 (98.56%) であったが (Fig.5), デジタル DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる相対類似度は 19.40% と低く、その他の生理性状試験の結果から *Litoreibacter* 属の新種と結論づけた。*Litoreibacter roseus* と命名し、K6^T (=DSM 110109^T=NBRC 114114^T) を基準株として新種記載した。これまで *Litoreibacter* 属細菌に光合成色素バクテリオク

ロロフィル *a* の生産が知られておらず、本 K6^T 株は *Litoreibacter* 属で初めての光合成細菌の発見である。

Tabrizicola 属細菌における光合成能の発見

Tabrizicola 属は、アルファプロテオバクテリアに属するグラム陰性、好気・化学栄養性の桿菌で、2013年に *Tabrizicola aquatica* RCRI19^T を基準株として新属提案されて以来、非光合成細菌と認識されていた (Tarhriz *et al.*, 2013)。しかし、広範囲な系統解析の結果、近縁の系統群には光合成能を有する細菌が知られるようになってきた。本研究では、*Tabrizicola aquatica* RCRI19^T につ

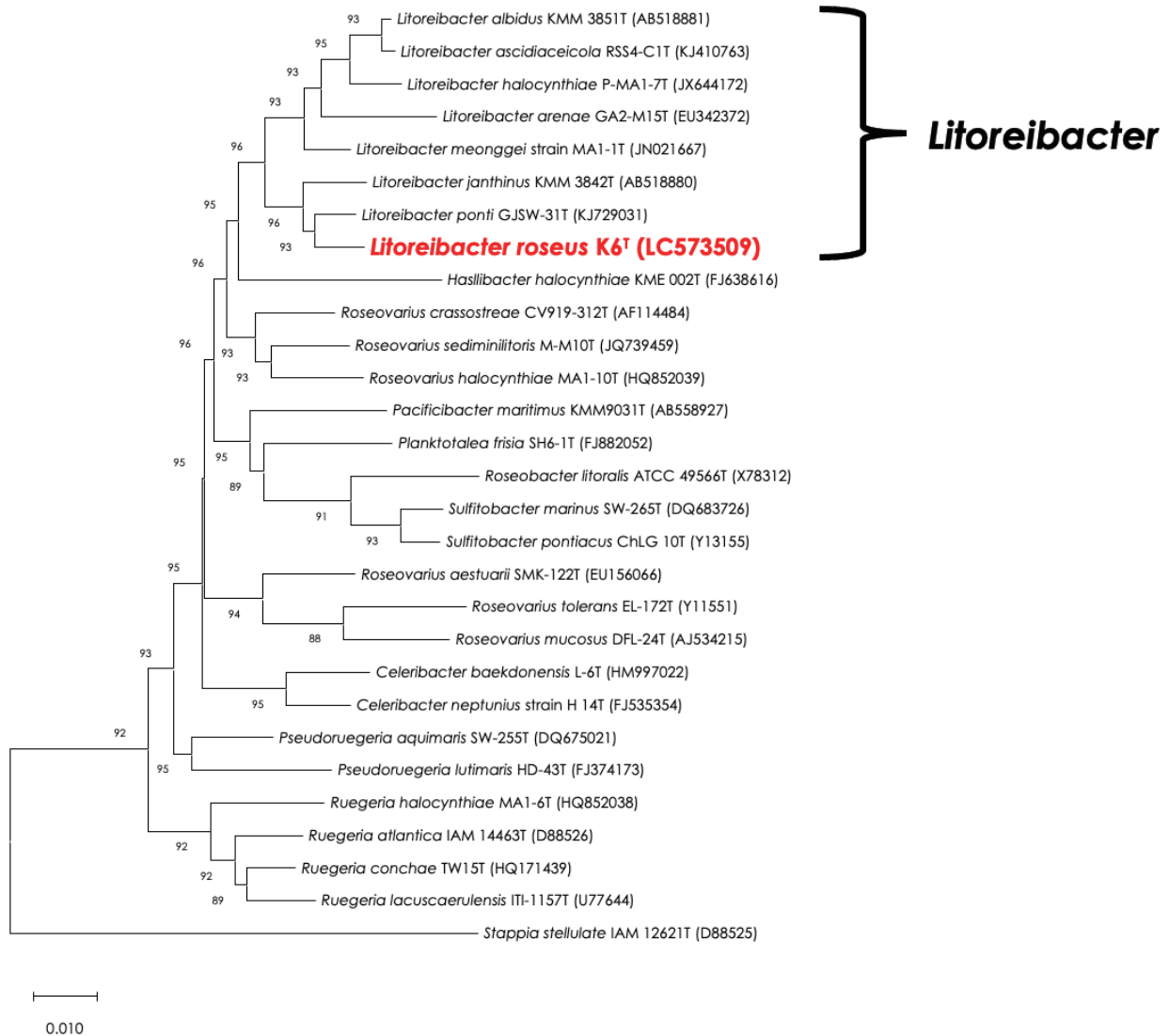


Fig. 5 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain K6^T and some closely related taxa. Bootstrap values were expressed as a percentage of 1000 replicates and only those higher than 50% are shown.

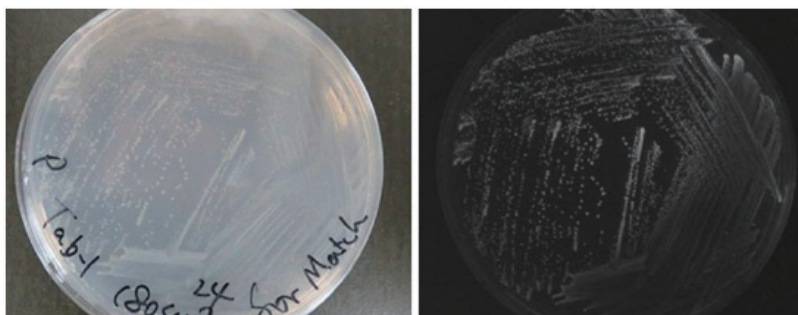


Fig. 6 The autofluorescence of *Tabrizicola aquatica* strain RCRI19^F grown under aerobic, heterotrophic low light conditions. For the detection of bacteriochlorophyll *a* autofluorescence, LED's with maximum emission at 375 nm, 500 nm and 590 nm, respectively, were used for excitation and a long-pass filter allowed the detection of fluorescent light longer than 850 nm. Left: A photograph of an agar plate with colonies grown. Right: Fluorescence image of the same plate.

いて改めて生理・生化学、遺伝学的特性を調べた。その結果、RCRI19^F株のゲノムに光合成色素と光合成器官合成に必要な全ての遺伝子が存在すること、好気従属栄養、低照度条件下で光合成色素バクテリオクロロフィル *a* を合成することが明らかになった (Fig.6)。ただし、嫌気光条件では生育せず、好気性光合成細菌の特性を示した。そのため、*Tabrizicola aquatica* を好気性酸素非発生型光合成細菌として記載を修正した。本研究の成果によって、環境中での好気性光合成細菌の分布・生態について理解を深めることができた。

これまでに *Tabrizicola* 属に属する細菌は7種記載されている。本研究で調べた基準種 *T. aquatica* RCRI19^F のほかに *Tabrizicola sediminis*, *Tabrizicola alkalilacus*, *Tabrizicola piscis*, *Tabrizicola algicola* の4種 (Liu *et al.*, 2019; Phurbu *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2020) がバクテリオクロロフィル *a* を合成するが、残りの2種、*Tabrizicola fusiformis* (Ko *et al.*, 2018), *Tabrizicola oligotrophica* (Sheu *et al.*, 2020) は色素合成が認められず、ゲノム中にも光合成遺伝子の存在が認められないことが明らかになった。本研究が同じ属に属する近縁種の間にも光合成能を持つ菌と持たない菌がいることを明らかにする発端となり、光合成細菌の進化研究のための新たな知見を提供することができた。

結 語

本研究で新種に分類される好気性光合成細菌を河川環境から1種、沿岸地域から2種分離培養することができ、既報細菌群も含め、プロテオバクテリアの多様な系統群に光合成能が広がっていることを示すことができた。*Chloroflexota* 門に属する既知の光合成細菌は、本稿で紹介

したプロテオバクテリア門の光合成細菌と同様に系II型の反応中心をもつ。本稿では詳細を割愛したが、我々の研究でカナダの淡水湖から、系I型反応中心をもつ *Chloroflexota* 門光合成細菌 '*Candidatus Chlorohelix allophototropha*' を発見した (Tsuji *et al.*, 2020)。今後、これら分離株を用いた比較系統解析により、酸素非発生型光合成の進化の変遷への重要な手がかりを与えてくれることが強く期待される。

好気性光合成細菌は、これまで外洋の表層水に優占的に存在する細菌群として知られていたが、我々の研究により、養魚場のような沿岸部や河川にも普遍的に分布していることが明らかになった。時には全細菌の約半数を好気性光合成細菌が占めることもあり、自然環境の物質循環に大きく寄与していることが示唆される。

要 約

河川および沿岸部を対象に、分子生態学的手法および分離培養法を用いて、好気性光合成細菌の分布と多様性を解析した。本研究で、新たにプロテオバクテリアの8つの系統に光合成色素合成能をもった細菌種がいることが明らかになった。これら好気性光合成細菌の系統解析は、細菌界における光合成能の獲得進化および多様化について重要な知見を提供できる。また、多摩川を対象にした時空間的分布調査から、好気性光合成細菌は一年を通して上流中流の河川水および川底バイオフィルムに普遍的に存在することが示された。光合成細菌の全細菌に占める割合が10~20%になる環境もあり、これまで考えられていたよりも、河川環境の物質循環に重要な役割を果たしていると考えられた。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 花田智. 2016. 原始的な光合成-酸素非発生型光合成-. 第89回日本細菌学会総会 (3月23-25, 大阪)
- 2) 永島賢治, Verméglio, A., 永島咲子, 井上和仁. 2016. 紅色細菌*Rubrivivax gelatinosus*の循環的な光合成電子伝達経路において機能しうる新規な膜結合型多ヘムチトクロムc. 第57回日本植物生理学会年会 (3月18-20日, 盛岡)
- 3) 花田智. 2017. 分離培養の進展を阻害しているのは「分離できない」って思い込み以外の何ものでもない. 環境微生物系学会合同学会2017 (8月29-31日, 仙台)
- 4) 広瀬節子, 松浦克美, 春田伸, 花田智. 2017. 河床礫バイオフィルムから単離したβプロテオバクテリア*Burkholderiales*目に属する新規好気性光合成細菌. 環境微生物系学会合同学会2017 (8月29-31日, 仙台)
- 5) 高部由季, 鈴木聡, 花田智. 2017. 日本沿岸域における酸素を発生しない光合成を行う細菌の炭素循環への高い寄与. 環境微生物系学会合同学会2017 (8月29-31日, 仙台)
- 6) 花田智. 2017. 極限の世界から. 第7回日本微生物学連盟フォーラム「微生物-変わり者たちの素顔」 (12月16日, 東京)
- 7) 花田智. 2018. 古地球生態系での酸素非発生型光合成細菌の役割. 第59回日本植物生理学会年会, 第3回光合成細菌ワークショップ (3月27日, 札幌)
- 8) 永島賢治, 永島咲子, 佐藤剛, 井上和仁. 2019. 光合成細菌*Rubrivivax gelatinosus*の光合成における代替的な電子伝達循環経路の発見. 第60回日本植物生理学会年会 (3月13-15日, 名古屋)
- 9) 中小路堇, 成廣隆, 延優, 嶋田敬三, 春田伸, 花田智. 2019. アンモニア酸化をする酸素非発生型光合成細菌の探索. 日本農芸化学会2019年度大会 (3月24-27日, 東京)
- 10) 花田智. 2018. 酸素非発生型光合成の複雑なタペストリー. 日本微生物資源学会第25会大会 (6月13-15日, つくば)
- 11) 金室晶貴, 高部由季, 鈴木聡, 花田智. 2018. 養殖場環境における培養可能な酸素非発生型好気性光合成細菌の多様性. 日本資源微生物学会第25会大会 (6月13-15日, つくば)
- 12) 高部由季, 嶋田敬三, 花田智, 高市真一. 2018. 好気性光合成細菌のカロテノイド〜スフェロイデノンの特殊性」光合成セミナー (7月21-22日, 神戸)
- 13) 高部由季, 中井亮佑. 2018. 光合成関連遺伝子*pufM*を有する細菌の多様性. 日本海洋学会秋季大会 (9月25-29日, 東京)
- 14) 高部由季, 原田二郎, 嶋田敬三, 花田智, 高市真一. 2019. 好気性光合成細菌のカロテノイド~その進化と役割. 第60回日本植物生理学会年会, 第4回光合成細菌ワークショップ (3月12日, 名古屋)

原著論文

- 1) 広瀬節子. 2015. 上流河川の川底の光合成微生物. 都生研会誌51:56-58.
- 2) Hirose, S., Matsuura, K. & Haruta, S. 2016. Phylogenetically diverse aerobic anoxygenic phototrophic bacteria isolated from epilithic biofilms in Tama River, Japan. *Microbes Environ.* **31**: 299-306.

- 3) Sun, L., Toyonaga, M., Ohashi, A., Matsuura, N., Turlousse, D.M., Meng, X.Y., Tamaki, H., Hanada, S., Cruz, R., Yamaguchi, T. & Sekiguchi, Y. 2016. Isolation and characterization of *Flexilinea flocculi* gen. nov., sp. nov., a filamentous, anaerobic bacterium belonging to the class anaerolineae in the phylum *Chloroflexi*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**: 988-996.
- 4) Kasuno, M., Kimura, H., Yasutomo, H., Torimura, M., Murakami, D., Tsukatani, Y., Hanada, S., Matsushita, T. & Tao, H. 2016. An evaluation of sensor performance for harmful compounds by using photo-induced electron transfer from photosynthetic membranes to electrodes. *Sensors* **16**: 438.
- 5) Sun, L., Toyonaga, M., Ohashi, A., Turlousse, D.M., Matsuura, N., Meng, X.Y., Tamaki, H., Hanada, S., Cruz, R., Yamaguchi, T. & Sekiguchi, Y. 2016. *Lentimicrobium saccharophilum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium representing a new family in the phylum *Bacteroidetes*, and proposal of *Lentimicrobiaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**: 2635-2642.
- 6) Thiel, V., Drautz-Moses, D.I., Purbojati, R.W., Schuster, S.C., Lindemann, S. & Bryant, D.A. 2017. Genome sequence of *Prosthecochloris* sp. strain HL-130-GSB from the phylum *Chlorobi*. *Genome Announc.* **5**: e00538-17.
- 7) Tank, M., Liu, Z., Frigaard, N.U., Tomsho, L.P., Schuster, S.C. & Bryant, D.A. 2017. Complete genome sequence of the photoautotrophic and bacteriochlorophyll *e*-synthesizing green sulfur bacterium *Chlorobaculum limnaeum* DSM 1677T. *Genome Announc.* **5**: e00529-17.
- 8) Yasutake, Y., Kusada, H., Ebuchi, T., Hanada, S., Kamagata, Y., Tamura, T. & Kimura, N. 2017. Bifunctional quorum-quenching and antibiotic-acylase MacQ forms a 170-kDa capsule-shaped molecule containing spacer polypeptides. *Sci. Rep.* **7**: 8946.
- 9) Kusada, H., Tamaki, H., Kamagata, Y., Hanada, S. & Kimura, N. 2017. A novel quorum-quenching N-acylhomoserine lactone acylase from *Acidovorax* sp. strain MR-S7 mediates antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**: e00080-17.
- 10) Nagashima, K.V.P., Sasaki, M., Hashimoto, K., Takaichi, S., Nagashima, S., Yu, L.J., Abe, Y., Gotou, K., Kawakami, T., Takenouchi, M., Shibuya, Y., Yamaguchi, A., Ohno, T., Shen, J.R., Inoue, K., Madigan, M.T., Kimura, Y. & Wang-Otomo, Z.Y. 2017. Probing structure-function relationships in early events in photosynthesis using a chimeric photocomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: 10906-10911.
- 11) Imhoff, J., Sun, M., Wiese, J., Tank, M. & Zeeck, A. 2018. First evidence of dehydroabietic acid production by a marine phototrophic *Gammaproteobacterium*, the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* MT86. *Mar. Drugs* **16**: 270.
- 12) Kimura, N., Watanabe, T., Suenaga, H., Fujihara, H., Futagami, T., Goto, M., Hanada, S. & Hirose, J. 2018. *Pseudomonas furukawaii* sp. nov., a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **68**: 1429-1435.
- 13) Wasai, S., Kanno, N., Matsuura, K. & Haruta, S. 2018. Increase of salt tolerance in carbon-starved cells of *Rhodospseudomonas palustris* depending on photosynthesis

- or respiration. *Microorganisms* **6**: 4.
- 14) Kanno N, Matsuura K, Haruta S. 2018. Different metabolic responses to carbon starvation between light and dark conditions in the purple photosynthetic bacterium, *Rhodospseudomonas palustris*. *Microbes Environ.* **33**:83-88
 - 15) Mori K., Yamaguchi K. & Hanada S. 2018. *Sulfurovum denitrificans* sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing epsilon-proteobacterium isolated from a hydrothermal field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **68**: 2183–2187.
 - 16) Tarhriz, V., Hirose, S., Fukushima, S., Hejazi, M.A., Imhoff, J.F., Thiel, V. & Hejazi, M.S. 2019. Emended description of the genus *Tabrizicola* and the species *Tabrizicola aquatica* as aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **112**: 1169–1175.
 - 17) Sato-Takabe Y., Hamasaki K. & Suzuki S. 2019. High temperature accelerates growth of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in seawater. *Microbiologyopen* **8**: e00710.
 - 18) Suzuki, S., Nakanishi, S., Tamminen, M., Yokokawa, T., Sato-Takabe, Y., Ohta, K., Chou, H.Y., Muziasari, W.I. & Virta, M. 2019. Occurrence of *sul* and *tet(M)* genes in bacterial community in Japanese marine aquaculture environment throughout the year: Profile comparison with Taiwanese and Finnish aquaculture waters. *Sci. Total Environ.* **669**: 649–656.
 - 19) Hirose, S., Tank, M., Hara, E., Tamaki, H., Mori, K., Takaichi, S., Haruta, S. & Hanada, S. 2020. *Aquabacterium pictum* sp. nov., the first aerobic bacteriochlorophyll *a*-containing fresh water bacterium in the genus *Aquabacterium* of the class *Betaproteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**: 596–603.
 - 20) Sato-Takabe, Y., Hirose, S., Hori, T. & Hanada, S. 2020. Abundance and spatial distribution of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in Tama River, Japan. *Water* **12**: 150.
 - 21) Tsuji, J.M., Tran, N., Schiff, S.L., Venkiteswaran, J.J., Molot, L.A., Tank, M., Hanada, S. & Neufeld, J.D. 2020. Anoxygenic photosynthesis and iron-sulfur metabolic potential of *Chlorobia* populations from seasonally anoxic Boreal Shield lakes. *ISME J.* **14**: 2732–2747.
 - 22) Muramatsu, S., Kanamuro, M., Sato-Takabe, Y., Hirose, S., Muramatsu, Y., Takaichi, S. & Hanada, S. 2020. *Roseobacter cerasinus* sp. nov., isolated from a fish farm. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**: 4920–4926.
 - 23) Kanamuro, M., Sato-Takabe, Y., Muramatsu, S., Hirose, S., Muramatsu, Y., Takaichi, S. & Hanada, S. 2021. *Litoreibacter roseus* sp. nov., a novel bacteriochlorophyll *a*-containing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **71**: 004679.
 - 24) Tsuji, J.M., Shaw, N.A., Nagashima, S., Venkiteswaran, J.J., Schiff, S.L., Hanada, S., Tank, M. & Neufeld, J.D. 2020. Anoxygenic phototrophic *Chloroflexota* member uses a Type I reaction center. *bioRxiv*. 2020.07.07.190934. (posted 2020-08-28)

その他（総説・書籍・特許など）

- 1) Hanada, S. 2016. (Research Highlight) Anoxygenic photosynthesis: A photochemical reaction that does not contribute to oxygen reproduction. *Microbes Environ.* **31**: 1-3.
- 2) 高部由季 (2020) 総説: 海洋における酸素非発生型好気性光

合成細菌の巧妙な生残戦略. 海の研究 **29**:189–216.

- 3) 花田智, 2016. 微生物の有害性(変色), 高島浩介, 久米田裕子, 土戸哲明, 古畑勝則 (監修), 有害微生物の制御と管理, pp. 172-177, テクノシステム, 東京.
- 4) Hanada, S. 2019. Evolution of photosynthetic system, *In* Yamagishi A, Kakegawa T, Usui T (eds.), *Astrobiology: From the Origins of Life to the Search for Extraterrestrial Intelligence*, pp. 137-152, Springer, Singapore.
- 5) 花田智 (訳), 2016. 微生物-目には見えない支配者たち-, Money, N.P. (著), サイエンスパレット**031**, 全205ページ, 丸善出版, 東京.

謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また、本研究の遂行にご協力いただいた北海道大学の鈴木光次教授、愛媛大学沿岸環境科学研究センターの鈴木聡教授、同大林由美子講師、とらや水産株式会社山下勇造氏、嶋田敬三東京都立大学名誉教授ならびに光合成複合微生物寄付講座 (Photomic Lab.) の学生諸氏に感謝の意を表します。

文 献

- Allan, J.D. 1995. *Stream Ecology: Structure and Function of Running Waters*. Chapman and Hall, London ISBN 0 412 35530 2.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D. & Hansen, C.M.E. 2003. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* **42**: 439-441.
- Fauteux, L., Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., Borrego, C.M., Garcia-Chaves, M.C., & Del Giorgio, P.A. 2015 Patterns in abundance, cell size and pigment content of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria along environmental gradients in northern lakes. *PLoS One* **10**: 1-17.
- Han, J.E., Kang, W., Lee, J.Y. *et al.* 2020. *Tabrizicola piscis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a Korean indigenous freshwater fish, *Acheilognathus koreensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**:2305-2311.
- Hanada, S., Hiraishi, A., Shimada, K. & Matsuura, K. 1995. Isolation of *Chloroflexus aurantiacus* and related thermophilic phototrophic bacteria from Japanese hot springs using an improved isolation procedure. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **41**: 119-130.
- Hanada, S., Takaichi, S., Matsuura, K. & Nakamura, K. 2002. *Roseiflexus castenholzii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, filamentous, photosynthetic bacterium that lacks chlorosomes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:187-193.
- Harashima, K., Shiba, T., Totsuka, T., Shimidu, U. & Taga, N. 1978. Occurrence of bacteriochlorophyll *a* in a strain of an aerobic heterotrophic bacterium. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1627-1628
- Hirose, S., Matsuura, K. & Haruta, S. 2016. Phylogenetically diverse aerobic anoxygenic phototrophic bacteria isolated from epilithic biofilms in Tama River, Japan. *Microbes. Environ.* **31**:

- 299-306.
- Hirose, S., Nagashima, K.V.P., Matsuura, K. & Haruta, S. 2012. Diversity of purple photosynthetic bacteria, inferred from *pufM* gene, within epilithic biofilm in Tama River, Japan. *Microbes Environ.* **27**: 327-329.
- Jiang, H., Deng, S., Huang, Q., Dong, H. & Yu, B. 2010. Response of aerobic anoxygenic phototrophic bacterial diversity to environment conditions in saline lakes and Daotang River on the Tibetan Plateau, NW China. *Geomicrobiol. J.* **27**: 400-408.
- Jiao, N.; Zhang, Y.; Zeng, Y.; Hong, N.; Liu, R., Chen, F. & Wang, P. 2007. Distinct distribution pattern of abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the global ocean. *Environ. Microbiol.* **9**: 3091-3099.
- Ko, D.J., Kim, J.S., Park, D.S., Lee, D.H., Heo, S.Y., Seo, J.W., Kim, C.H. & Oh, B.R. 2018. *Tabrizicola fusiformis* sp. nov., isolated from an industrial wastewater treatment plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **68**:1800-1805.
- Koblížek, M. 2015. Ecology of aerobic anoxygenic phototrophs in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 854-870.
- Kolber, Z.S., Plumley, F.G., Lang, A.S., Beatty, J.T., Blankenship, R.E., Van Dover C.L., Vetriani, C., Koblížek, M., Rathgeber, C. & Falkowskiet, P.G. 2001. Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* **292**: 2492-2495.
- Kolber, Z.S., Van Dover, C.L., Niederman, R.A. & Falkowski, P.G. 2000. Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean. *Nature* **407**: 177-179.
- Lami, R., Áuperová, Z., Ras, J., Lebaron, P. & Koblížek, M. 2009. Distribution of free-living and particle-attached aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in marine environments. *Aquat. Microb. Ecol.* **55**: 31-38.
- Liu, Z.X., Dorji, P., Liu, H.C., Li A.H. & Zhou Y.G. 2019. *Tabrizicola sediminis* sp. nov., one aerobic anoxygenic photoheterotrophic bacteria from sediment of saline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **69**:2565-2570.
- Mašín, M., Cuperova, Z., Hojerova, E., Salka, I., Grossart, H.-P. & Koblížek, M. 2012. Distribution of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in glacial lakes of northern Europe. *Aquat. Microb. Ecol.* **66**: 77-86.
- Mašín, M., Nedoma, J., Pechar, L. & Koblížek, M. 2008. Distribution of aerobic anoxygenic phototrophs in temperate freshwater systems. *Environ. Microbiol.* **10**: 1988-1996.
- Mori, K., Yamaguchi, K. & Hanada, S. 2018. *Sulfurovum denitrificans* sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing epsilonproteobacterium isolated from a hydrothermal field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **68**:2183-2187.
- Ohkubo, S., & Miyashita, H. 2017. A niche for cyanobacteria producing chlorophyll *f* within a microbial mat. *ISME J.* **11**: 2368-2378.
- Park, C. Y., Chun, S.J., Jin, C., Le, V. V., Cui, Y., Kim, S. Y. , Ahn, C. Y., & Oh, H. M. 2020. *Tabrizicola algicola* sp. nov. isolated from culture of microalga *Ettlia* sp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**:6133-6141.
- Phurbu, D., Wang, H., Tang, Q., Lu, H., Zhu, H., Jiang, S., Xing, P. & Wu, Q.L. 2019. *Tabrizicola alkalilacus* sp. nov., isolated from alkaline Lake Dajiacuo on the Tibetan Plateau. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **69**:3420-3425.
- Sato, K. 1978. Bacteriochlorophyll formation by facultative methylo-trophs, *Protaminobacter ruber* and *Pseudomonas* AM1. *FEBS Lett.* **85**: 207-210
- Sato-Takabe, Y., Nakao, H., Kataoka, T., Yokokawa, T., Hamasaki, K., Ohta, K., & Suzuki, S. 2016. Abundance of common aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in a coastal aquaculture area. *Front. Microbiol.* **7**: 1996.
- Sheu, C., Li, Z.H., Sheu, S.Y., Yang, C.C. & Chen, W.M. 2020. *Tabrizicola oligotrophica* sp. nov. and *Rhodobacter tardus* sp. nov., two new species of bacteria belonging to the family *Rhodobacteraceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**:6266-6283.
- Suzuki, K., Kamimura, A. & Hooker, S.B. 2015. Rapid and highly sensitive analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton using ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) with the first derivative spectrum chromatogram (FDSC) technique. *Marine Chemistry* **176**: 96-109.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**:2725-2729.
- Tarhriz, V., Thiel, V., Nematzadeh, G., Hejazi M.A., Imhoff, J.F. & Hejazi, M.S. 2013 *Tabrizicola aquatica* gen. nov. sp. nov., a novel alphaproteobacterium isolated from Qurugol Lake nearby Tabriz city, Iran. *Antonie van Leeuwenhoek.* **104**:1205-1215.
- Tsuji, J.M., Shaw, N.A., Nagashima, S., Venkiteswaran, J.J., Schiff, S. L., Hanada, S., Tank, M. & Neufeld, J.D. 2020. Anoxygenic phototrophic *Chloroflexota* member uses a Type I reaction center - bioRxiv, - biorxiv.org
- Waidner, L.A. & Kirchman, D.L. 2005. Aerobic anoxygenic photosynthesis genes and operons in uncultured bacteria in the Delaware River. *Environ. Microbiol.* **7**: 1896-1908.
- Waidner, L.A. & Kirchman, D.L. 2007. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria attached to particles in turbid waters of the Delaware and Chesapeake estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3936-3944.
- Yurkov, V. & Csotonyi, J.T. 2009. New light on aerobic anoxygenic phototrophs. *In* Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C. & Beatty, J.T. (eds), *The Purple Phototrophic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration* vol. 28, pp. 31-55, Springer, Dordrecht, the Netherlands.
- Yurkov, V. & Hughes, E. 2017 Aerobic anoxygenic phototrophs: Four decades of mystery. *In* Hallenbeck, P.C. (ed.), *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*. pp. 193-214, Springer International Publishing, Switzerland, ISBN-13: 978-3319513638.
- Yutin, N., Suzuki, M.T., Teeling, H., Weber, M., Venter, J.C., Rusch, D.B. & Bèjà, O. 2007. Assessing diversity and biogeography of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in surface waters of the Atlantic and Pacific Oceans using the Global Ocean Sampling expedition metagenomes. *Environ. Microbiol.* **9**: 1464-1475.

2019年度一般研究助成の研究報告

助成期間：2019年4月～2021年3月

DNA バーコードと標本を活用したビョウタケ目ヘソタケ科の探索・分類・系統学的研究

細 矢 剛

【目的】 ビョウタケ目は、子囊菌類の中で最も多様な菌群である。本菌群の一部は植物の根にも多数共存していることが示されており、腐生的であるばかりでなく、生植物とも相互作用する「多能な」菌群であることが示唆されるようになった。この主要なグループがヘソタケ科である。ヘソタケ科は褐色で球形の細胞からなる托外被層を有するのが特徴的だが、属あるいは種レベルでの識別をするための顕著な形態的特徴に乏しいため、形態分類が難しい。しかし、本菌群は日本には広範囲に分布し、培養も比較的容易であるため、国立科学博物館には多数の標本と菌株が保存されている。一方、ITS-5.8S シークエンスを種の同定・識別領域とするバーコード的手法は、菌類において広く利用されつつあり、既知種のバーコード配列があれば、未同定の試料を同定できる可能性が高い。そこで、本研究では、これらの資源をもとに、バーコード的手法を利用して、ヘソタケ科の主要な属である *Mollisia*・*Pyrenopeziza* 類縁菌において種のまとまりを見出し、日本産ヘソタケ科の多様性を把握するとともに、同定結果を再検討した。

【方法】 コロナ禍であったため、国内での新規の採集は限られたが、茨城県のほか、北海道・青森・秋田・長野・佐賀など国内各地で採集を行い、100点以上の採集品と、その大部分から培養株を得た。これらに加え、国立科学博物館に保存されていた株のバーコード配列データを取得し、186の標本から得られた配列を解析対象とした。これらのデータから、CD-HITにて98.5%以上の相同性をもつ配列どうしをまとめた。

【結果・考察】 全部で65のクラスターが得られた。クラスターの約半数がシングルトンであったが、残りからは2~19点の標本を内包する約30のクラスターが検出された(図1)。そこで、各クラスターに含まれる最長の配列を代表配列としてNCBIデータベースからタイプ種由来か、カルチャーコレクションに保存されている菌株に由来し、98.5%以上の相同性をもつ配列をBLAST検索して抽出し、これらとともにNJ法で系統解析を行ったところ、これらのクレードの多くは既知種と近い遺伝的距離を有し、高いブートストラップ値(≥90)で支持されたため(図2)、バーコード領域をもとにして複数の既知種が存在することが示唆された。次に、文献情報などをもとに、これらのクレードを構成する標本と、既知種の形態を比較した結果、その形態はよく一致し、

配列の類似性によるクラスター化の妥当性が示唆され、複数の種を既知種と同定することができた。一部は検討中だが、これらの中には、*Mollisia* 9種、*Phialocephala* 8種、*Neomollisia* 1種、*Pyrenopeziza* 1種が含まれ、13種の日本新産種を明らかにすることができた。また48のクラスターは現時点では、該当する既知種の配列がなく、配列未取得の種であり、未記載種である可能性もある(図1)。

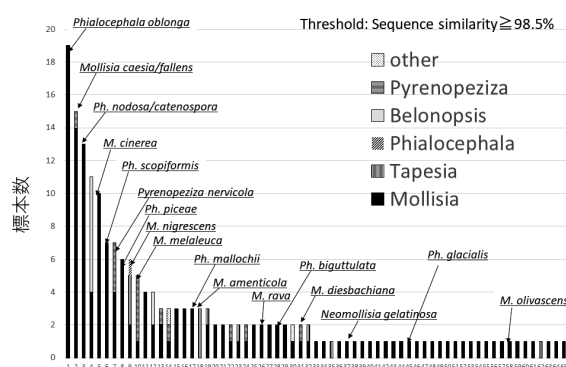


図1 配列相同性に基づいた各クラスターの同定結果

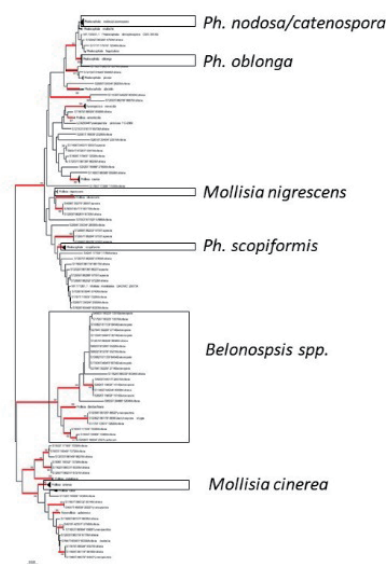


図2 ITS-5.8SのNJ法による解析結果

以上の結果より、日本に存在するヘソタケ科は従来の認識よりもずっと多様であることが確認された。

有用生物資源としての日本産クロボ菌類由来の担子菌酵母の菌株確立

田中 栄 爾

【目的】担子菌酵母は、主に野外の様々な分離源からスクリーニングによって分離され、物質生産や酵素生産などの有用な生物資源として農芸化学分野で研究が進められてきた。一方で、分子系統学的研究により、多くの担子菌酵母は植物病原菌として知られるクロボ（黒穂）菌類の無性世代であることが明らかにされてきた。このことから、クロボ菌類の無性世代の菌株は、これまでの方法では得ることができなかった担子菌酵母の分離源と考えられ、潜在的な有用生物資源といえる。本研究では、野外で採集した日本産のイネ科植物やタデ科植物に寄生するクロボ菌類を確実に同定し、そのクロボ胞子を発芽させて無性世代である担子菌酵母の菌株を確立することを目的とした。また、これらの菌株を菌株保存機関に寄託して広く利用可能な状態にすることも目的とした。

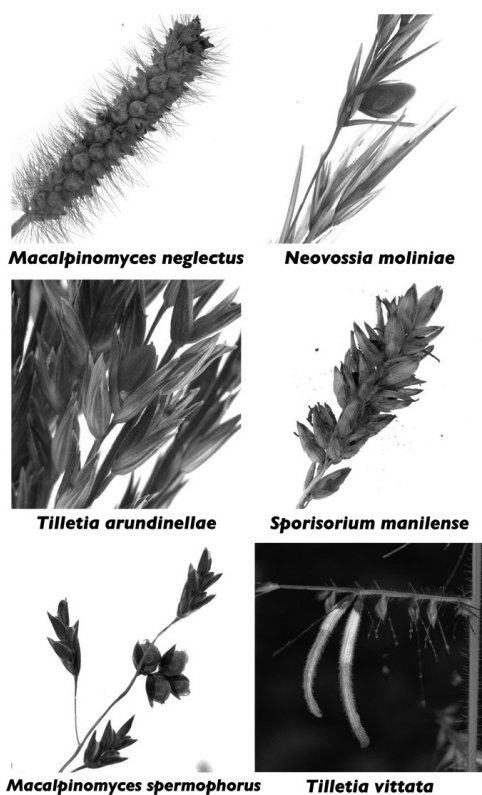


図1 イネ科植物を宿主とするクロボ菌の例

【方法】黒穂病の病徴があるイネ科植物やタデ科植物などを日本各地で採集した。それらの黒穂胞子を光学顕微

鏡と走査電子顕微鏡を用いて形態学的観察をおこなった。また、DNAを抽出し、ITS領域と18S rDNA領域の塩基配列を解読した。これらの情報から種の同定を試みた。さらに、黒穂胞子を蒸留水に懸濁したものを水寒天培地上に散布し、黒穂胞子の発芽を観察した。18℃もしくは4℃の条件下に置き、4℃条件のものは3ヶ月、6ヶ月後に18℃に移した後に、発芽する様子を観察した。発芽した場合、単一の黒穂胞子由来の菌株を分離培養した。

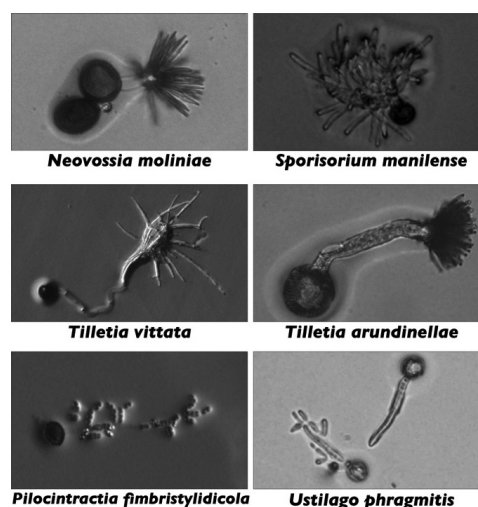


図2 黒穂胞子からの発芽の例

【結果・考察】これまで分類学的に未確定の種を含めイネ科、カヤツリグサ科、タデ科の植物から25種以上のクロボ菌類の分離培養に成功した。そのうち、ヒデリコを宿主とする *Pilocintractia fimbristylidicola*、ハイヌメリを宿主とする *Sporisorium manilense*、トダシバを宿主とする *Tilletia arundinellae*、チヂミザサを宿主とする *Tilletia vittata*、ヨシを宿主とする *Ustilago phragmitis* の5種を日本新産種のクロボ菌として記載した。また、ヨシを宿主とする *Neovossia moliniae* について日本で2例目の記録として記載した。それ以外に、分類学的に確実な菌株として、キンエノコロを宿主とする *Macalpinomyces neglectus*、ギョウギシバを宿主とする *Ustilago cynodontis*、イヌビエを宿主とする *Moesziomyces antarcticus*、カゼクサを宿主とする *Macalpinomyces spermophorus* を菌株保存機関に寄託した。分類学的に未確定な種については新種である可能性も含めて検討中である。

昆虫病原糸状菌の選択的分離法と培養菌株の確立および分類学的研究

伴 さやか

【目的】昆虫（節足動物含む）病原性真菌のうち、いわゆる冬虫夏草類（ボタntaxe目；フンタマカビ綱；チャワntaxe亜門；子囊菌門）には500種近くが知られている。うち300種程度が日本に生息すると言われている。1900年代に日本で小林義雄博士・清水大典氏によって記載された約150種のタイプ標本のほとんどは、国立科学博物館（TNS）に収蔵されている。しかしそのタイプ標本の多くは、ホルマリン浸漬などの理由からDNA情報が得られないため、これら希少種の分子生物学的な系統位置を把握することは分類学上重要な課題となっている。本研究では、それらの種のタイプ標本の採取地（タイプ・ロカリティー）近くからの再採取を行い、分離培養株と標本が揃っているコレクションの確立を目指す。また、本菌群の一部は絶対寄生性ともいえる宿主との密接な関係性により、通常の培地や培養方法では培養が難しく、生態的にも明らかになっていない。そこで特に生育の遅い *Ophiocordyceps* 科の菌種を宿主昆虫や環境中から直接検出したり、分離株を得られることを目指し、培養条件の改善と抗真菌剤への耐性の有無を検討した。

【方法】採集調査は国内で2番目に多数の種のタイプ・ロカリティーである東京大学秩父演習林（埼玉県秩父市大滝）の広葉樹混生林を中心に行った。得られた標本から、子嚢胞子または分生子を顕微鏡観察下で単～複数個の胞子を釣菌して培養株を得た。同定は標本と培養株の形態観察と rRNA ITS 領域の塩基配列により行った。分離後の標本は乾燥させ、栃木県立博物館へ寄託した。

生育試験では昆虫細胞培養用の2種類の液体培地〔グレース改変培地：Grace's Insect TC Medium (BioConcept, 関東化学), グルコース 26.68g/L, 酵母エキス 3.3g/L〕, 及び SF-4 Baculo Express ICM (BioConcept, 関東化学) を試した。一方、選択培地の開発を目的に、*Ophiocordyceps sobolifera* NBRC 114805 をモデルとして9種類の抗真菌剤への薬剤感受性試験を行った。

【結果・考察】秩父東大演習林の大血川溪畔林と栃本地区（入川沿い）にある広葉樹混生林の区域を中心として、2019年は19種23標本28菌株、2020年は7種26標本25株を得た。その他の関東地域で採取されたものも含めて95標本を収集した。グレース改変培地で *Ophiocordyceps* 属（特に旧 subgenus *Neocordyceps*）の生育が改善され、

生育菌体に出芽型細胞（budding cell, 酵母状細胞）の形成が認められた。一方、*O. sobolifera* の薬剤感受性試験では全ての薬剤に対して感性であった。過去の調査で、近縁の *Purpureocillium lilacinum* や *Cordycipitaceae* 科の *Lecanicillium* 属種、*Beauveria bassiana* はアゾール系薬剤への耐性があることがわかっていた。しかし、今回の結果からは抗真菌剤を添加するだけの選択培地の開発は難しく、選択分離培養については異なるアプローチをする必要があると考えられた。

最終的に確立した28種53株 (*Beauveria* 属, *Cordyceps* 属, *Metarhizium* 属, *Ophiocordyceps* 属, *Perennicordyceps* 属, *Polycephalomyces* 属, *Pleurocordyceps* 属, *Pochonia* 属, *Tolyocladium* 属, *Clavicipitaceae* 科未同定種) を千葉大学真菌医学研究センター (IFM) に寄託し、遺伝子や宿主・採取地等の情報を付与して公開する。



図1 *Ophiocordyceps purpureostromata* (Kobayasi) G.H. Sung et al.



図2 *Pleurocordyceps sinensis* (Q.T. Chen, S.R. Xiao & Z.Y. Sh) Y.J. Yao et al.

ハラタケ綱 (Agaricomycetes) における外生菌根菌の進化と多様化の解明

佐藤 博 俊

【目的】 温帯・熱帯林の優占樹種の相利共生菌である外生菌根菌は、様々な日外生菌根菌 (たとえば、腐生菌や寄生菌) の系統から平行進化したとされる。外生菌根菌は菌根菌の中でも特に多様な菌群として知られているが、その適応放散がどのようなタイミングでどのような系統で生じたかは十分に理解が進んでいない。本研究では、外生菌根菌の種群の大半を含む系統群であるハラタケ綱 (Agaricomycetes) を対象として分子系統推定を行うことによって、外生菌根菌の進化と多様化のパターンを探ることを目的とした研究を行った。

【方法】 分子系統推定を行うために、DNA 試料として日本国内の野外調査で採集した、あるいは海外の標本庫から入手したハラタケ綱菌類の標本を 185 種選別した。以前の研究において開発した PCR プライマーを用いて、104 個の核シングルコピー遺伝子の塩基配列の PCR 増幅を行い、その後ハイスループットシーケンサーであるイルミナ社の MiSeq を用いて同時並列的に塩基配列の解読を行った。104 個の各シングルコピー遺伝子のうち、89 遺伝子について十分な配列数を解読することができたので、以後の解析ではこれらの遺伝子配列を使用して解析を進めた。これらの新規に配列解読した種に加えて、私がこれまでの研究で同遺伝子配列の配列解読をしたイグチ目菌 37 種についても解析に加えた。さらに、ゲノム解読の進んでいるハラタケ綱菌類 128 種についても、ゲノムデータベース上で相同な遺伝子配列を検索することによって、これらの菌群の同遺伝子配列情報を解析に加えた。合計 350 の菌種の 89 遺伝子の配列に対して多重整列 (multiple alignment) を行った後、エキソン部位とイントロン部位の識別を行い、インデルの多いイントロン部位は解析から除外した。最終的に、89 遺伝子のエキソン部位 20,652 塩基の連結配列に基づいて、最尤法による分子系統推定を行った。

また、ハラタケ綱菌に見られる外生菌根菌の系統群の種多様性を DNA 塩基配列に基づいて評価する試みを行った。この解析を行うため、国際塩基配列データベースからハラタケ綱菌類のバーコード領域 (核 ITS 領域) の塩基配列をダウンロードした後、97% 以上類似する配列を操作分類群 (近似的な種) としてまとめた。その

後、研究の数が増えるにしたがってどの程度、操作分類群の数が増えるかの累積曲線を作成し、累積曲線が頭打ちになる点を推定することによって外生菌根菌の系統群それぞれの種数推定を行った。

【結果・考察】 分子系統推定の結果、350 種のハラタケ綱菌から、ワカフサタケ属菌 (*Hebeloma*)、アセタケ属菌 (*Inocybe*)、フウセンタケ属菌 (*Cortinarius*)、キツネタケ属菌 (*Laccaria*)、テングタケ属菌 (*Amanita*)、キシメジ属菌 (*Tricholoma*)、シメジ属菌 (*Lyophyllum*)、イッポンシメジ属菌 (*Entoloma*)、ヌメリガサ属菌 (*Hygrophorus*)、ピロデルマ属菌 (*Piloderma*)、ヌメリイグチ亜目菌 (*Suillineae*)、ニセシヨウロ亜目菌 (*Sclerodermatineae*)、ヒダハタケ亜目菌 (*Paxillineae*)、イグチ亜目菌 (*Boletineae*)、イボタケ科菌 (*Thelephoraceae*)、ニンギョウタケモドキ属 (*Albatrellus*)、ベニタケ科 (*Russulaceae*)、オツネタケ属 (*Coltricia*)、ウスタケ科 (*Gomphaceae*)、ロウタケ属 (*Sebacina*)、セレンディピタ属 (*Serendipita*) およびアンズタケ目 (*Cantharellales*) の合計 22 の系統で外生菌根性が平行的に進化したことが示された。これらの中で、アンズタケ目、ウスタケ科、ヌメリイグチ亜目菌およびニセシヨウロ亜目菌が相対的に起源の古い外生菌根菌の系統であり、逆にピロデルマ属菌、ヒダハタケ亜目菌、ニンギョウタケモドキ属、ロウタケ属およびセレンディピタ属は相対的に起源の新しい外生菌根菌の系統で、それ以外は中間的な時期に外生菌根性が起源したことが示唆された。また、種数推定の結果で 1,000 種を超える種数を誇る種数の豊富な系統群として推定されたのは、フウセンタケ属 (3,892 種)、アセタケ属 (3,144 種)、ベニタケ科 (2,593 種)、イグチ亜目 (1,160 種) およびイッポンシメジ属菌 (1,150 種) であり、いずれも中間的な時期に外生菌根性が起源した系統群であった。このような結果は、外生菌根菌において同調的に種多様化が起こった可能性を示している。同調的な種多様化が起こった原因としては、被子植物との共種分化および共進化が関係しているのではないかと私は考えている。この仮説について検証するため、今後は分岐年代推定なども行っていく予定である。

アフリカ（旧世界）で初めて分離された新世界型回帰熱ボレリア, *Candidatus Borrelia fainii*, の全ゲノム解析ならびに表現型解析による分類・進化・系統学的検討

邱 永 晋 (QIU Yongjin)

【目的】回帰熱はボレリア属細菌による感染症の一種で、適切な治療が行われなかった場合、高い致死率を示すことが知られている。本疾患は節足動物によって伝播される人獣共通感染症で、中央アジア、サブサハラ周辺アフリカ、南欧、北アメリカで罹患例が報告されている。回帰熱ボレリア属細菌は、地理的・遺伝子学的にアフリカ大陸に分布する旧世界型と北米大陸に分布する新世界型に大別される。これまで、新世界型回帰熱ボレリアのアフリカ内での検出が散発的に報告されていたが、申請者らはザンビア共和国において発熱患者ならびに洞窟性コウモリから新世界型回帰熱ボレリアを世界で初めて分離し、その新規ボレリア属細菌の菌種名を *Candidatus Borrelia fainii* と提唱した (図1)。本研究では、アフリカ (旧世界) で分離された、新世界型回帰熱ボレリアである *Candidatus Borrelia fainii* のゲノム情報、形態情報、病原性情報を取得することを目的とした。

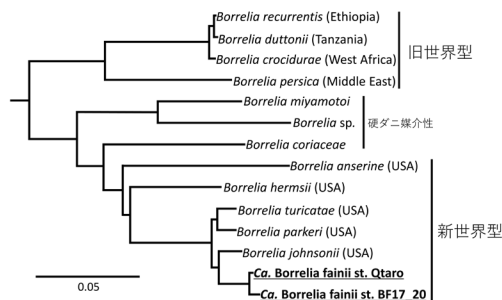


図1 回帰熱ボレリア属細菌の系統樹

【方法】発熱患者から分離した *Ca. Borrelia fainii* Qtaro 株を BSK-M 培地を用いて増菌させた。Qiagen 社の DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて DNA の抽出を行った。次世代シーケンサーの MiSeq (イルミナ) でショートリードシーケンスを、MinION (オックスフォードナノポアテクノロジー) でロングリードシーケンスを実施した。二つの次世代シーケンサーで得られた配列をハイブリッドアセンブルし、ドラフトゲノムを決定した。

増菌させた *Ca. Borrelia fainii* Qtaro 株を 10^6 個/200 μ l に調整し、8週令のマウス (C3H ならびに BALB/c) に 10^6 個と 10^3 個の細菌を腹腔内接種した。26日間にわたり体重の計測と尾からの血液採取を2日おきに実施した。採取した血液から簡易 DNA 抽出キット version2 (カ

ネカ) を用いて DNA を抽出した。 *Borrelia* 属細菌のフラジェリン蛋白遺伝子を標的とした nested PCR で *Ca. Borrelia fainii* の検出を試みた。

透過型電子顕微鏡による *Ca. Borrelia fainii* の形態学的観察をネガティブ染色法にて実施した。

【結果・考察】ハイブリッドアセンブルの結果、951,503bp のゲノム (GC 含量 28.4%, CDS 数 863) を持つことが分かった。旧世界型回帰熱ボレリアの *Borrelia duttonii* は、931,674bp のゲノム (GC 含量 27.6%, CDS 数 857)、新世界型回帰熱ボレリアの *Borrelia turicatae* は 917,330bp のゲノム (GC 含量 29.1%, CDS 数 856) を持つ。

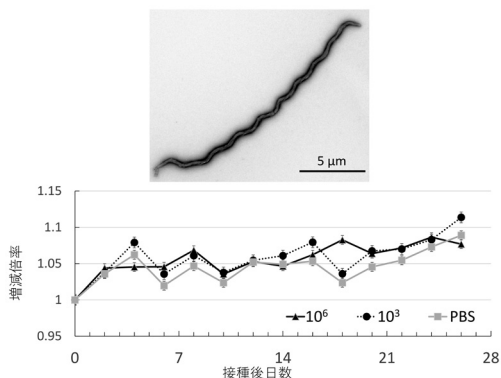


図2 *Ca. Borrelia fainii* Qtaro 株の電子顕微鏡像 (上) と接種実験時のマウス (C3H) 体重の増減 (下)

Ca. Borrelia fainii Qtaro 株のマウス (C3H ならびに BALB/c) への接種実験では、両系統のマウスにおいて非接種群と比較し体重の変化に有意な差は認められなかった (図2下)。また、どの血液サンプルからも *Ca. Borrelia fainii* の遺伝子は検出されなかった。 *Ca. Borrelia fainii* は、両系統のマウスにおいて感染性を示さないと考えられた。

電子顕微鏡観察では、長さ 20μ m で太さ 300 nm の螺旋状の形態が認められた (図2上)。

近年、中国のコウモリからも *Ca. Borrelia fainii* の遺伝子が検出されたという報告がなされており (Han *et al.*, EID. 2020; Li *et al.*, PLoS Negl Trop Dis. 2021)、かなり広範囲に本ボレリア菌種が分布していると予想される。また、現在の旧世界型と新世界型に大別されている回帰熱ボレリアの分類が分布実態に即していないと考えられ、世界的な回帰熱ボレリアの分布と多様性の解明が必要である。

渦鞭毛藻－自由生活性バクテリアの“緩やかな共生関係”の解明と その情報を利用した無菌化技術の開発

鈴木 重勝

【目的】自由生活性バクテリアは一部の藻類と相互作用しており、藻類の成長や増殖に対して影響を及ぼすことが知られている。そのため、藻類とバクテリアの相互作用の理解は、藻類培養株の維持管理や、藻類細胞の無菌化プロセスの最適化に重要である。渦鞭毛藻 *Prorocentrum shikokuense* は赤潮形成種であり、無菌状態では増殖しないことから、藻類と自由生活性バクテリアとの相互作用の解析に適している。本研究では、*P. shikokuense* の複数の培養株を（図1）用いて、その共存バクテリアとの相互作用を明らかにすることを目的として、研究を行った。さらに、バクテリアの代謝産物をもとに新規培地を開発し、その有効性を検証した。

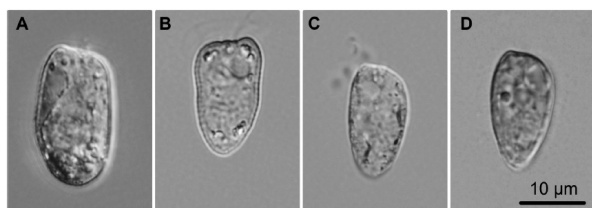


図1 *Prorocentrum shikokuense* の培養株
A: NIES-682, B: NIES-900, C: NIES-2010, D: NIES-3444

【方法】*Prorocentrum shikokuense* NIES-900 株には、大きく2種類の共存バクテリアが含まれていた、それらのバクテリアを単離培養し、illuminaとNanoporeシーケンサーを用いてシーケンスを行い、ゲノム配列を決定した。DFASTを用いて遺伝子モデルを予測し、産生可能な代謝産物をKEGGにより予測した。IMK培地をベースに予測されたバクテリアの5つの代謝産物を加えた新規培地（mIMK）を開発し、マイクロピペット法により *P. shikokuense* の複数の培養株（NIES-682, NIES-900, NIES-2010, NIES-3666）の無菌化を試みた。さらに、共存バクテリアのセルロース資化性を検証するために、0.5%カルボキシメチルセルロース含有培地で培養し、コンゴレッドによる染色を行った。

【結果・考察】メタゲノム解析の結果、*Prorocentrum shikokuense* NIES-900 株の共存バクテリアは、主にAlteromonadales bacterial strain D9とCytophagales bacterial strain C3の2種で構成されていた。それらの単離培養株を確立し、ゲノム解析を行ったところ、それぞ

れ5.3Mbpと6.5Mbpであり、4,831遺伝子と5,501遺伝子がコードされていた。これらの遺伝子をもとに代謝経路のマッピングを行い、代謝産物を予測したところ、D9株がリボフラビン、ビタミンB6、葉酸、トレハロース、インドール酢酸を合成できることが示唆された。そこで、これらの代謝産物を添加したmIMK培地を開発した。この培地を用いて産地や採集年が異なる *P. shikokuense* 4培養株の無菌化を試みたところ、無菌化に成功した。NIES-900株以外の3株でもメタゲノム解析を行い、共存バクテリアの種組成は大きく異なるが、同様の代謝産物を産生可能であることが予測された。つまり、*P. shikokuense* はバクテリアよりこれらの代謝産物の供給を受けていることが示唆される。C3株のゲノムにはそれらの代謝経路の遺伝子は見られなかったが、細胞外分泌が予測されるホスホリパーゼ遺伝子とセルラーゼ遺伝子がコードされていた。細胞外セルロースの分解活性を調べるために、カルボキシメチルセルロース含有培地でバクテリアを培養し、コンゴレッドで染色した。その結果、C3株のみが細胞外セルロースの分解活性を示した。渦鞭毛藻の細胞はセルロース性の殻板で囲まれており、バクテリアが死細胞の殻板へ付着する様子が観察されることから、C3株は渦鞭毛藻の殻板を分解し炭素源として利用できると考えられる。したがって、D9株が代謝産物を *P. shikokuense* に供給し、その増殖を促進し、C3株が *P. shikokuense* の殻板を分解することで炭素源をD9株に供給するという相互作用モデルを提案する（図2）。

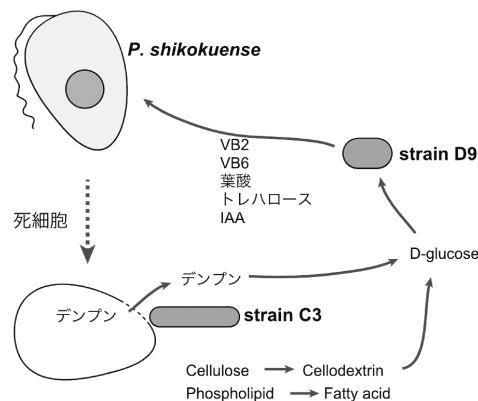


図2 *Prorocentrum shikokuense* と共存バクテリアの相互作用モデル

鉱物による直接的な代謝促進を利用した難培養性微生物の新規単離技術の確立

五十嵐 健 輔

【目的】 環境中の多くの微生物が難培養性であることの理由の一つとして、他の微生物や鉱物によって与えられる補因子や生理活性物質が実験室内では供給されないことが挙げられる。磁硫化鉄(グライタイト, Fe_3S_4)は様々な嫌気環境に存在しており、その結晶構造は生物がもつ鉄イオウクラスターに類似していることが知られている。この鉱物は、特に嫌気性で独立栄養性の細菌とアーキアの増殖を促進する活性をもつことが純粋培養系の実験で示されている。更に近年では、細菌の代謝において細胞外の鉄イオウクラスターを取り込む機構が報告されている。以上から、細胞外の鉄イオウクラスターを要求する微生物は、グライタイトの存在下で生育可能になるという仮説を考案した。本研究では、このグライタイトのもつ増殖促進作用を利用して、環境微生物の増殖促進手法を確立し、更には難培養性の微生物を培養・単離することを目的とした。

【方法】 グライタイトの合成は、既報による無機合成法に従って行った。また、グライタイトにニッケルをドーピングした改変グライタイトの合成も行った。グライタイト結晶をリン酸緩衝液中で嫌気的に加熱することで、増殖促進性の成分を含む抽出液を調製した。種々の嫌気環境(水田土壌、森林土壌、河川底泥など)由来の微生物源を、グライタイト(添加濃度 20g/L)、または、その抽出物を添加した液体培地を用い、独立栄養条件($\text{H}_2 + \text{CO}_2$ 、または CO)、および従属栄養条件(酢酸またはエタノール)で集積培養(静置、20~35℃)した。グライタイトによる促進効果の評価は、菌密度の直接計数法と各種クロマトグラフィーによる代謝産物(メタン、有機酸など)の定量により行った。集積培養物の菌叢解析は、16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を対象とした次世代シーケンシング(MiSeq または iSeq 100)により行った。分離培養実験では、グライタイト粒子、および、その抽出物を添加した寒天またはゲラングム平板培地を用いた。なお、グライタイトは空気酸化しやすいため、グライタイトを扱う全ての実験操作は、嫌気雰囲気下で行った。

【結果・考察】 本実験で試したいずれの微生物源を用いた培養でも、特に独立栄養条件では、グライタイト添加特に増殖の促進効果が見られ、それは特に水田土壌で顕著であった(図 1, A)。このことから、環境中の複雑な微生物群集に対してもグライタイトによる増殖促進効果が有効であることが示された。集積培養物の菌叢解析の

結果、独立栄養条件のいずれの培養でも、グライタイト添加時には増殖の速い酢酸生成菌が徐々に優占化していく傾向が見られた。グライタイトを直接混合した平板培地を用い、種々の環境微生物源からの分離培養を試みた結果、特に水田土壌でのコロニー形成数の増加が確認された(図 1, B)。またこのコロニー形成の促進は、グライタイトの抽出液を添加した際にも観察された。ニッケルをドーピングしたグライタイトでは、コロニー形成率上昇に更に効果的であった。硫化ナトリウムによる培地の還元は、グライタイトの促進効果の発現に必要であることが示された。分離培養の結果、16S rRNA 遺伝子ベースで既知の株との比較的低い相同性を示す複数の株、即ち代表例として *Tepidibacter formicigenes* (95%) や、*Aquipluma nitroreducens* (96%) に最近縁株をもつ株などを取得することに成功した。これらの株は、グライタイト非存在下でも増殖するものの、グライタイト存在下で増殖促進を示した。また、既知の株と高い相同性を示す単離株(例えば、*Clostridium magnum* strain FM5, 99%)であっても、グライタイト存在下で著しい増殖促進を示した。増殖促進を示した単離株の共通性質として、鉄イオウタンパク質がキー酵素として機能する炭素固定経路や電子伝達系をもつことが示され、グライタイト由来の鉄イオウクラスター供給と代謝促進との関係性が示唆された。本研究により、グライタイトを用いた微生物群集の活性化と、それを利用した単離法についての基礎技術が確立したと考えられる。今後の研究では、グライタイトによる促進機構の解明、および真に難培養である微生物の単離を試みる予定である。

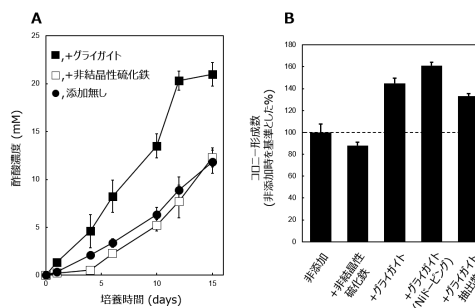


図 1 グライタイトによる増殖促進効果。(A) 水田土壌を植菌源として独立栄養条件($\text{H}_2 + \text{CO}_2$)で培養した際の酢酸生成量の推移。(B) グライタイト添加が水田土壌懸濁物からのコロニー形成効率へ与える影響。

嫌氣的芳香族系廃水処理に特化した DPANN 上門アーキアの培養とその生態学的意義の解明

黒田 恭平

【目的】アーキアは土壌や淡水、海水、深海、地下水、温泉のような様々な環境に幅広く存在しており、地球上の窒素循環や炭素循環、嫌気廃水処理技術等において重要な役割を果たしている。このようにアーキアは自然環境と人工環境の双方にとって必須の微生物である。一方、培養の難しさのためにその生理機能は未知であるものが多い。しかし近年の急速なゲノム解析の進歩により、他のアーキアと共生するなどの新しい代謝機能をもつ DPANN 上門（提唱された当時の Diapherotrites 門, Parvarchaeota 門, Aenigmarchaeota 門, Nanoarchaeota 門, Nanohaloarchaea 門の頭文字から命名）に属するアーキアが明らかになり始め、研究者たちの間でもしばしば研究されている。DPANN アーキアは細胞とゲノムサイズが小さく、一部の系統群が他のアーキアに共生する可能性が示唆されている。また我々の既往の研究により、この系統群は嫌気性廃水処理汚泥中に多く存在することが明らかになっている。本研究では、嫌氣的芳香族系廃水処理システムを中心とした廃水処理汚泥から DPANN アーキアのゲノムを回収し、その生理機能の予測を行った。加えて、嫌気環境下で DPANN アーキアの培養を行い、その培養系の群集構造変化から DPANN アーキアの生態学的意義の推測を行った。

【方法】ポリエチレンテレフタレート製造模擬廃水を処理する upflow anaerobic sludge blankt (UASB) 反応槽保持汚泥、活性汚泥、下水消化汚泥から抽出した DNA は、NovaSeq6000 (150bp×2) によるショットガンシーケンス解析に供した。DNA 配列データはクオリティトリミング等を行い、megahit や SPAdes によるアセンブリを行った。Binning 後、得られた Bin は CheckM により completeness, contamination の推定を行った。各 Bin の系統学的位置の推定には GTDB-Tk を使用した。DPANN アーキアの培養では、Widdel 培地を基本培地として、37℃の嫌気環境下で静置培養を行った。植種源には UASB 反応槽保持汚泥を用いた。培養系は基質にそれぞれギ酸 (F)、酢酸 (Ac)、メタノール+水素 (MH)、二酸化炭素+水素 (CH)、植種汚泥の採取時期が異なるフェノール添加系 (P1, P2)、フェノールに酢酸、メタノール+水素 (5mM) を添加した系 (PAc, PMH)、フェノールに阻害剤として塩化アンモニウム (5g-N/L) を加えた系 (PNH)、フェノールに塩化ナトリウム (5g-Na/L) を加えた系 (PNa) を全量 20mL で作成した。PNH と PNa

は 2 本ずつ作製し、培養 78, 109 日目にそれぞれフェノールに合わせて酢酸 (PNHAc, PNaAc) とメタノール+水素 (PNHMH, PNaMH) を 5mM ずつ添加した。基質濃度はすべて 5mM に設定した。発生メタンガス量は TCD 型ガスクロマトグラフィーで測定した。16S rRNA 遺伝子解析は各培養系から DNA を抽出後、Univ515F-909R プライマーセットを用いて PCR 増幅を行い、MiSeq により遺伝子配列を得た。16S rRNA 遺伝子配列は QIIME2 により解析した。DPANN アーキアとメタン生成アーキアの相関を Spearman の順位相関に基づいて解析した。

【結果・考察】本研究において 4 種類の廃水処理汚泥のメタゲノム解析を行った結果、Woesearchaeota, Pacearchaeota, Iainarchaeota, Micarchaeota に属する 5 種の DPANN アーキアの高品質ゲノムを得た (ゲノムサイズ 0.62–0.93 Mb)。最も DPANN アーキアのゲノムを回収した UASB 反応槽保持汚泥を植種源とし、培養実験及びその 16S rRNA 遺伝子解析を行った結果、F, CH を除くすべての系において DPANN グループに属する WCHD3-30 が検出された (原核生物全体での存在割合 0.027–5.5%)。その他の DPANN アーキアとして YLA114 が MH, P1, P2, PAc, PMH, PNaAc, PNaMH の系に存在していた (0.018–2.0%)。これら嫌気性 DPANN アーキアは、阻害剤に塩化アンモニウムを用いると検出されなかったことから、高濃度のアンモニアが嫌気性 DPANN アーキアの生育を阻害する可能性が考えられた。相関解析の結果、WCHD3-30 は *Methanoregula*, *Methanosaeta* 及び *Methanosarcina* との間に正の相関がみられた ($p < 0.05$)。YLA114 は *Methanoregula*, *Methanosaeta* との間に正の相関がみられた ($p < 0.05$)。特に、WCHD3-30 と YLA114 は共に *Methanoregula* (WCHD3-30: $r_s = 0.62$; YLA114: $r_s = 0.48$), *Methanosaeta* (WCHD3-30: $r_s = 0.49$; YLA114: $r_s = 0.48$) と強い相関があった。さらに WCHD3-30 と YLA114 との間にも正の相関がみられた ($r_s = 0.47$)。以上の結果から、目レベルで異なる WCHD3-30 と YLA114 の生育には同じ系統のメタン生成アーキアが関与している可能性が考えられ、これまで報告されている DPANN アーキアの生理学的機能 (アーキアに寄生、アミノ酸等を獲得) から、これら嫌気性 DPANN アーキアはメタン生成アーキアを宿主として生育していることが示唆された。

地衣に共生する担子菌酵母の分布と多様性を紐解く

清水 公徳

【目的】 地衣体は、菌類の仲間である地衣類と藻類の共生体である。地衣体には地衣類、藻類の他にも多くの微生物が共生あるいは寄生しているが、種の構成については明らかになっていない。近年、地衣体には担子菌酵母が普遍的に共生していることが示唆された。本研究では、ツエハナゴケ (*Cladonia rei*) を用いて地衣体に共生する担子菌酵母の特徴を調査するため、微生物学および分子生物学的検討を行った。

【方法】 千葉および神奈川の8地点で採取した *C. rei* について担子菌酵母の分離を試みた。担子菌酵母の分離は、地衣体を細かく磨り潰し、その微小片を培養することで担子菌酵母を出現させた。また、分離された担子菌酵母菌株について、生育速度や形態などの諸性状を解析した。続いて、地衣体には複数種類の担子菌酵母が共生することが明らかになったため、真核生物のリボソーム DNA-ITS 領域（以下、ITS 領域）を用いてメタゲノム解析を行い、地衣体内の担子菌酵母の種類や割合について解析を試みた。さらに、本研究で用いた *C. rei* は形態的にヒメレンゲゴケ (*Cladonia ramulosa*) と考えられていたが、種の異同に疑義が生じたため千葉県内にて採取された地衣体標本の ITS 領域の塩基配列を調べた。

【結果・考察】 千葉および神奈川県内8地点で採取した *C. rei* から41株の担子菌酵母が分離された。これらは、ITS 領域の塩基配列から25種類に分けられた。また、塩基配列データベースとの比較の結果、今回分離した25種類の担子菌はいずれも Microsporomycetaceae 科に分類されることが示唆された。また、系統解析の結果、これらの担子菌は、*Lichenzyma* 属または *Microsporomyces* 属に所属する少なくとも6系統に分類されることが示唆された。なお、Microsporomycetaceae 科 *Lichenzyma* 属に所属する *L. pisutiana* は、地衣体から分離報告されたものである。平板培地上に形成される集落はオレンジ色から淡褐色で、表面は滑らかな様子を呈した。生育速度

の比較では、半年で数 mm の菌糸生育にとどまる地衣類に比べて分離された担子菌酵母の生育ははるかに早く、平板培地上では一週間ほどで同程度のサイズの集落を形成した。また、単一の地衣体から複数の異なる担子菌酵母が分離される例が認められたことから、地衣体内には複数種類の担子菌酵母が共生することが明らかになった。地衣体から抽出された全ゲノム DNA を鋳型として、真核生物全般の ITS 領域を対象とする PCR プライマーにより ITS 領域を増幅し、増幅産物についてメタゲノム解析を行ったところ、地衣体に含まれる担子菌酵母の割合は地衣類（60~75%）や藻類（25~40%）と比較して圧倒的に低い（0.1%未満）ことが明らかになった。そこで、同じ DNA を鋳型として担子菌酵母特異的プライマーにより増幅された ITS 領域を用いてメタゲノム解析を行ったところ、いずれの地衣体にも10種類以上の異なる担子菌酵母が存在することが示唆された。これらは、*Halobasidium* 属、*Septobasidium* 属、*Microsporomyces* 属に所属することが推定されるが、これらの菌群が地衣との共生関係を示唆する報告はいまだかつて存在しない。また、メタゲノムにより検出された10種以上の担子菌酵母のうち、分離培養されたものは1種だけであったことから、地衣体に共生する担子菌として分離に至っていない種が相当数残されているものと考えられた。逆に、分離された担子菌の中にもメタゲノムのデータとして現れないものもあることから、地衣体ごとに共生する担子菌は大きく異なっていることが示唆された。本研究で供試したツエハナゴケは形態的にヒメレンゲゴケと同一とされたものだが、*C. rei* と *C. ramulosa* の種の異同について ITS 領域の塩基配列をもとに分類学的再検討を行った。その結果、供試した地衣体の塩基配列はヨーロッパ産の *C. ramulosa* のものとは異なり、*C. rei* と一致した。このことから、本研究で用いたサンプルは *C. rei* であると結論付けられた。

海生変形菌は存在するのか - 変形体および子実体形成能の検証から分類学的定義を議論する

矢 島 由 佳

【目的】 変形菌は子実体と多核単細胞の変形体を形成するステージを生活環に持つアメーバ様の陸生生物として、他の生物から分けられてきた。しかし所謂「例外」も知られ、特に近年では子実体も変形体も報告のない水生アメーバが、分子系統解析の結果から変形菌に属する可能性が複数報告されている。陸生変形菌は、一部の種類が陸水中でも変形体や子実体形成することが知られており、変形菌としての特徴を示せる状態で水中にも適応できることが示唆される。ところが2007年に海生ウニから単離された単核アメーバは、分子系統解析の結果変形菌に属する可能性が示唆されたものの、変形体も子実体も確認されず、その後の追加報告もない。そこで本研究では、一般に陸生生物と考えられている変形菌を海で探索し、さらに含塩環境での変形体および子実体形成能の検証から、変形菌の分類学的定義を議論することを目的とした。

【方法】 海生変形菌の探索は、太平洋および噴火湾沿岸の4地点を定期観察地とし2019年および2020年に実施した。海水および汽水、海砂、海藻、ウニを対象とし、温室培養および寒天培養によりアメーバ様生物の単離培養を行った。寒天培養には素寒天、MY75S、MY75S 30%、および Erdschreiber 培地を用い含塩/非含塩ならびに冠水/非冠水条件を調製し、また温室培養には人工海水にて温室環境を調製し、10℃および室温で培養を行なった。アメーバ様生物が見られた培養物から単離を行い、変形体および子実体形成が見られるか培養を続け、またアメーバまたはシストを用いてDNA抽出を行なった。変形菌の明色孢子群、暗色孢子群用プライマーおよび真核生物用プライマーを用いて18S rRNA部分配列を増幅させ、相同性検索および系統解析を行なった。超微細形態は透過型電子顕微鏡観察にて検討を行なった。さらに陸生変形菌および陸水性変形菌の調査も同時に行い、得られた変形菌の耐塩性を検討した。含塩環境から得られた変形菌に近縁と推定されるアメーバは、陸生変形菌の近縁種と Mating test を実施し、変形体形成の有無を検証した。

【結果・考察】 海藻は19種が得られ、海藻片を基物とした人工海水による温室培養、海藻片を寒天培地上に接種または海藻表面粘液を寒天培地に塗布した培養を実施したが、得られたアメーバ様生物に変形菌に近縁なものは見られなかった。ウニは2種が得られ、先行研究に従い体腔液を寒天培地に塗布し培養を行ない、海砂は海中と砂浜で採取し、海砂上に滅菌した稲藁を載せた人工海水

による温室培養と、海砂の寒天培地への塗布による培養を行なったが、これらからも変形菌に近縁なアメーバ様生物は見られなかった。海水および汽水是寒天培地への直接塗布と、それぞれを濾過したメンブレンの寒天培養を行い、汽水を濾過したメンブレンの素寒天・非冠水培地の10℃培養物から変形菌の Trichiales に近縁と推定されるアメーバ様生物が得られた(図1)。

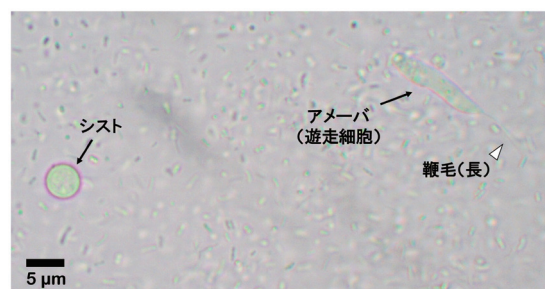


図1 得られたアメーバ様生物

このアメーバ様生物は非含塩培地条件から単離されたため、耐塩性検証のため含塩培地に接種したところ、MY75S 30%寒天培地で増殖が確認された。アメーバ形以外に、変形菌の遊走細胞で見られるコマ形で鞭毛を持ち螺旋状の運動をする姿も観察された。ミトコンドリアのクリステは管状であったが、ミトコンドリア核と鞭毛装置は現在まで観察されていない。また継続中の培養で変形体形成は見られず、近縁と推定される陸生変形菌との Mating test では変形体形成は見られていない。以上の結果から、得られたアメーバ様生物は変形菌の特徴が一部確認されるものの、その特定にはさらなる検討が必要であり、またアメーバ期の変形菌の分類形質自体もさらなる研究が必要であると考えられる。

陸生変形菌を用いた耐塩性試験では、*Didymium* 属種で含塩条件でのアメーバの増殖が見られた。先行研究のウニで得られたアメーバも *Didymium* 属に近縁とされることから、本属にはアメーバ状態で含塩環境にも適応できる種が存在すると考えられる。また非含塩条件で変形体形成した種が、含塩条件ではアメーバ増殖するものの変形体形成が見られないという結果が得られた。したがって、含塩条件でその形成が見られないとしても変形体形成能を持たないことを意味せず、現行の分類学的定義が直ちに否定されるわけではないことが示唆された。

節足動物消化管の内外双方で異なる生活ステージを持つ腸内外両生接合菌類の探索

出川 洋介

【目的】 接合菌類キクセラ亜門には節足動物の腸内菌と糞・土壌などに生育する糸状の腸外菌が知られるが、双方の特徴を併せ持つ腸内外両生菌と称すべき生態群を新たに発見した。本研究では、カマドウマ科昆虫から得た腸内外両生菌類の未記載種 *Kickxellales* (未記載属) sp.1 の分子系統解析を行い、近縁の既知種が腸内外両生菌である可能性を検証した。また、コオロギ科昆虫から得た近縁種 sp.2 と宿主交換実験、胞子の付着様式の観察による比較をして、宿主特異性について考察した。

【方法】 長野県産カマドウマ科昆虫およびコオロギ科昆虫の糞より *Kickxellales* sp.1, sp.2 を検出し嫌気条件下で胞子を発芽させ分離菌株を確立した。18S および 28S rDNA 領域の塩基配列を決定し最尤法系統樹を構築して系統関係を推定した。自然界ではこの2種は各科の宿主昆虫からしか検出されない。未感染のフタホシコオロギ (コオロギ科) を飼育し2種の胞子を摂食させ、糞からの菌の出現率、解剖による腸管内 (前胃表面の剛毛密生部) への胞子付着数の計測を行い、宿主特異性を検証した。また、走査型電子顕微鏡により胞子の腸内 (前胃表面の剛毛) への付着様式を観察した。

【結果・考察】 系統解析の結果、sp.1 は、既知のキクセラ目菌の *Myconymphaea yatsukahoi* と系統的に類縁だと新たに判明した。同種は2001年に菅平高原の昆虫死骸より記載発表されて以後、再発見例が無かった。野外調査の結果、同種が小型の尿酸排泄動物の糞に発生することが判明し倍脚綱動物が宿主候補と考えられた。そこで、タイプ標本産地で2019年7-10月、イシムカデ目58個体、オオムカデ目27個体を採集し糞を培養した結果、イシムカデ目からのみ19個体の糞から本種が検出された。また、他の6カ所で同様な検討をした結果、3カ所の糞から本属菌が得られ、群馬県産株は胞子長径が顕著に短い未記載種であった。腸内ステージは未確定だが本種は腸内に滞留して増殖すると判断され、昆虫に加え倍脚綱にも腸内外両生菌類が存在する可能性が判明した。今後、昆虫に限らず節足動物全般の探索が必要と考えられる。

次に *Kickxellales* sp.1 (カマドウマ科より分離) と sp.2 (コオロギ科より分離) の胞子をフタホシコオロギに摂食させたところ、糞からは2種とも出現したが sp.2 に比べ sp.1 の出現率は顕著に低かった。また胞子摂食後2日目に解剖をして腸内 (前胃表面) への付着胞子数を計測した結果、sp.1 が sp.2 に比べ著しく少なかった (図1)。

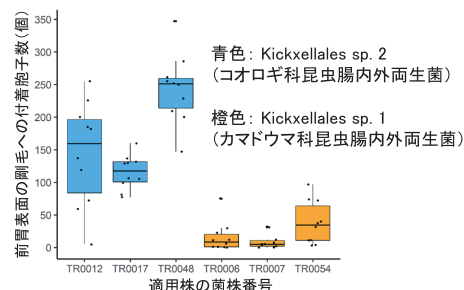


図1 胞子を摂食させたフタホシコオロギの前胃の剛毛表面への付着胞子数 (2種について3株ずつを適用)

この結果より2種には宿主特異性が存在すると考えられ、「宿主の前胃の剛毛の形態と胞子の修飾構造 (菌列) の形態との対応関係により宿主特異性が成立する」という作業仮説を考えた。そこでマダラカマドウマとフタホシコオロギの前胃の剛毛の形態を詳しく観察したが、ともに羽状の枝毛であり著しい差はなかった。次に2種の胞子の各宿主の前胃の剛毛への付着様式を詳しく観察した。その結果、sp.1 では胞子片端で6面×縦9列の菌列において6個並ぶ菌と菌の間隙に剛毛が数カ所で挟まり付着していた (図2: 1-2, 3)。他方、sp.2 の胞子には6面×縦5列の菌列があるが (図2: 4)、腸内では菌列以外の部分が全て溶解し (図2: 5)、菌列のみが縦に並んだ6本の腕が開裂して折れ曲がり随所で絡まっていた (図2: 6)。

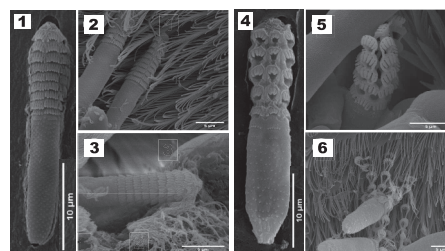


図2 各種の胞子とその前胃表面の剛毛への付着の様子。1-3: *Kickxellales* sp.1 (カマドウマ科昆虫腸内外両生菌)、4-6: *Kickxellales* sp.2 (コオロギ科昆虫腸内外両生菌)

いずれも菌列の菌と菌の間隙に剛毛を挟むという原理を用いる点は共通で、各宿主の剛毛の形態に明瞭な差はないため上述の作業仮説は棄却される。しかし、菌列の数や配置、二次変化 (溶解) の有無等、2種の戦略は際立って異なり、宿主特異性に関連する可能性が高いが、これが宿主の何に対応するのか現段階ではわからない。

キノコ類 (子囊菌および担子菌) を起源とする新規抗生物質探索のための分子育種法の構築

渡 辺 賢 二

【目的】キノコ (担子菌類) は他の生物種とは異なるユニークな二次代謝産物を生産することが知られている。一方、キノコのゲノム情報が解読されるにつれ、既にキノコより単離されている二次代謝産物よりも多くの二次代謝産物生成遺伝子がゲノム中に存在すると示唆されたため、多くの生成遺伝子は休眠型であると考えられた。これら休眠型生成遺伝子を強制的に発現させることで、化学構造として新規な二次代謝産物の獲得が期待される。しかしながら、キノコは遺伝子操作が一般的に困難であるため、これまでにそのような研究例は報告されていない。そこで、本研究ではキノコのレギュレーター遺伝子改変に基づく生成経路の活性化ならびに新規化合物の獲得を目的に研究に着手した。

【方法】レギュレーター遺伝子 *laeA* 破壊による二次代謝変動
本研究では、キノコのモデル生物で我々が遺伝子操作系を確立したウシグソヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* を用いた。*C. cinerea* のゲノム情報をもとに、レギュレーター遺伝子を探索したところ、*Aspergillus fumigatus* のレギュレーター遺伝子 *laeA* と 49% の相同性を示す CC1G_00498 遺伝子 (*CclaeA*) を見出した。そこでプロトプラスト-PEG 法にて *CclaeA* を破壊し、得られた破壊株 ($\Delta CclaeA$) の化合物生産を調べた。その結果、 $\Delta CclaeA$ において、保持時間 4.7 分に化合物 **1** (m/z 744.4871 [$M+H$]⁺) の分子イオンピークが観測された。マスペクトルから化合物 **1** の分子式は $C_{35}H_{66}O_{10}N_7$ であると推定され、データベース検索から化合物 **1** は新規化合物であることが示唆された。

化合物 1 の単離・構造決定と鉄 (III) 結合能評価
 $\Delta CclaeA$ を MYG 培地 (6.75L) にて培養し、培養物の酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、さらに HPLC を用いて化合物 **1** を 3.3mg 単離することに成功した。NMR による構造解析を行ったところ、化合物 **1** は 3 回繰り返し型のアシル化ヒドロキシオルニチン構造を含む新規化合物であることが判明した。3 つの *N*-ヒドロキシオルニチンの絶対配置は改良マーフィー法で 3 種とも L 体と決定した (図 1)。また、化合物 **1** はその構造から鉄に配位し鉄取り込みを促進する化合物 (シデロフォア) と予想された。単離した化合物 **1** に対して鉄投与試験を行ったところ、鉄投与後にピークの保持時間が変化し、鉄結合体に該当するマスペクトルが観測された。以上から化合物 **1** はシデロ

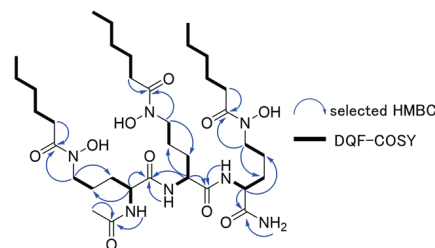


図 1 化合物 **1** (coprinoferrin) の構造決定

フォアだと決定し、**coprinoferrin** (CPF) と命名した。活性を確認するため $\Delta CclaeA/\Delta cpf1$ (CPF 生成遺伝子欠損株) に対して外部より CPF を投与する化学的相補試験を行った。その結果、培養 8 日目では陰性対照 (DMSO) と比較して固体培地上の CPF 投与域において菌糸成長が促進されていることが確認された。培養 16 日目では CPF 側においてのみ子実体形成が確認された (図 2)。以上のことから、CPF は *C. cinerea* の菌糸成長促進作用・子実体形成作用を有する生理活性分子であることが判明した。

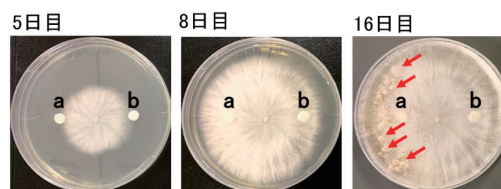


図 2 $\Delta CclaeA/\Delta cpf1$ に対する化学的相補試験 (a: CPF, b: DMSO)

【結果・考察】*C. cinerea* は、CPF を産生・分泌することで外部の鉄を効率的に体内に取り込んでいると考えられる。そして取り込まれた鉄が菌糸成長の促進・子実体形成に重要な働きを有すると本研究から示唆された。CPF の生成遺伝子クラスターはブナシメジなどの 200 種類を超える担子菌種で高度に保存されており、実際に CPF 類似生成遺伝子クラスターを有する担子菌種において CPF の生産が確認された。また、一般に子囊菌由来 *laeA* は二次代謝産物生産を正に制御するのに対し、予想外にも担子菌由来 *CclaeA* は CPF の生産を負に制御していた。本研究は *LaeA* タンパク質の二次代謝制御における新たな機能を世に提示するものであり、本機能の解明により生成遺伝子の休眠・覚醒化の理解、ひいては効率的な新規天然物獲得法の樹立へとつながると期待される。

黒酢醸造に関わる酢酸菌の優占化機構に関する研究

石井 正 治

【目的】 壺造り純米黒酢は、鹿児島県霧島市福山町において200年以上前から伝統的手法により醸造されている。黒酢の発酵には麹菌、酵母、酢酸菌、乳酸菌が関与しているが、麹以外の培養菌を加えることなしに、素焼きの壺の中で、糖化、アルコール発酵、酢酸発酵が自然に進行するという特徴がある。酢酸菌については、壺内壁に定着する多種の細菌の中から酢酸発酵中に *Acetobacter pasteurianus* が自然に優占化することが分かっている。 *Acetobacter* 属酢酸菌は一般的にエタノールの不完全酸化により酢酸を一時的に蓄積する性質を持ち、食酢醸造に利用されているが、先行研究において、 *A. pasteurianus* の類縁菌である *Acetobacter aceti* の培養液を壺に添加しても、酢酸生産過程に大きな影響はなく、 *A. aceti* は経時的に淘汰され、最終的には *A. pasteurianus* が優占化することが示されており、壺内の何らかの物理化学的要因や *A. pasteurianus* に特有の代謝特性が、壺内での優占化に関わっていると予想される。本研究では、黒酢醸造において *A. pasteurianus* が優占化するメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】 黒酢醸造中に *A. pasteurianus* が優占化し始める時期は、発酵液中のエタノールと乳酸の濃度が上昇し始める時期と一致している。そこで、 *A. pasteurianus* の標準株 NBRC 3283、黒酢由来 *A. pasteurianus* の3菌株 (BV1, BV2, BV3)、および、 *A. aceti* NBRC 14818 を用いて、エタノール、乳酸、酢酸に対する耐性を比較した。培養にはグルコースとグリセロールを炭素源とし、5~7%のエタノール、0.5~1%の乳酸、または、1~6%の酢酸を添加した寒天培地を用い、この上に段階希釈した酢酸菌培養液をスポットし、コロニー生育を観察した。共培養試験は、液体培地に *A. pasteurianus* 各菌株と *A. aceti* を等量植菌し、一定培養時間後に培養液からDNAを回収し、菌株特異的プライマーを用いた定量PCRにより各菌株の存在割合を算出した。

黒酢熟成中の菌叢解析は、壺寄せ直後から約2週間おきに、液面下20cmの深さの発酵液をホールピペットでサンプリングし、DNA回収後、16S rDNA V4領域をPCR増幅した。PCR産物を精製後、Illumina Miseqを用いたシーケンス解析後、BLASTNによる菌種同定を行った。

【結果・考察】 耐性試験の結果、 *A. pasteurianus* は標準菌株、黒酢由来株ともに、 *A. aceti* に比べてエタノールと乳酸に対して高い耐性を示し、特にエタノールにおい

てその差が顕著であった(図1)。エタノールと乳酸は、黒酢醸造中にそれぞれ7%と0.8%程度まで上昇するが、この濃度で *A. pasteurianus* の各菌株と *A. aceti* の共培養を行ったところ、 *A. pasteurianus* の標準菌株、黒酢由来株ともに有意に優占化したことから、エタノールと乳酸に対する耐性の違いが黒酢中での *A. pasteurianus* の優占化の主要因であることが示唆された。

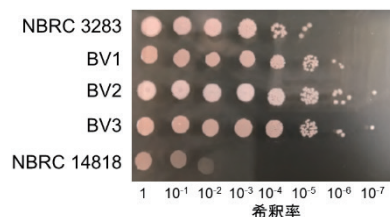


図1 酢酸菌株の7%エタノール含有培地での生育

黒酢発酵中に優占化する *A. pasteurianus* は、種菌または種酢としては添加していないため、壺内壁に定着している菌株が発酵中に増殖すると考えられている。黒酢醸造においては、酢酸発酵終了後の発酵液を複数の壺から一つの壺に合わせる「壺寄せ」と呼ばれる操作の後に、数ヶ月以上の熟成を行うため、壺内壁への菌株の定着は、壺寄せ後の熟成期間中に起こると予想される。16S rDNA配列のアンプリコン解析により、黒酢熟成過程における経時的な細菌叢変化を解析したところ、壺寄せ直後には *Lactobacillus* 属の乳酸菌が細菌の90%近くを占めていたが、169日目あたりから *Komagataeibacter* 属や *Gluconacetobacter* 属の酢酸菌が優占種となり、熟成後期の253日目から酢酸菌の優占種が *A. pasteurianus* に交代した(図2)。この結果により、長期間の熟成が壺内部における *A. pasteurianus* の相対的残存量の増加をもたらし、同菌株の壺内壁への定着に有利に働くことが示された。

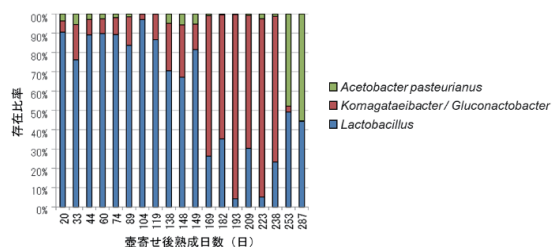


図2 黒酢熟成期間中の細菌叢の変遷

細菌性ウイルス様粒子 GTA による環境適応機構の分子基盤

清水 隆之

【目的】近年、細菌における新たな遺伝子水平伝搬機構として、細菌性ウイルス様粒子 Gene Transfer Agent (GTA) による形質導入機構が明らかになってきた。GTA は、細胞密度や栄養飢餓などのストレス状態に応じて細胞内で産生され、自身のゲノム DNA を内部に封入し細胞外に排出し、他個体に DNA を受け渡す機能を持つ。しかし、この応答の制御機構や制御を受ける意義の理解は不十分であった。申請者のこれまでの研究から、硫化水素由来のパールスフィド応答性転写因子 SqrR が GTA 関連遺伝子の制御に関わることを見出していた。本研究では、SqrR を介した新規 GTA 制御機構の解明に加えて、GTA が制御を受ける意義を考察するために、ストレス条件下での GTA の生育への有効性の解明を目的とした。

【方法】GTA 制御機構に対する SqrR の寄与を検証するために、野生株 (WT) と *sqrR* 遺伝子欠損株 (Δ *sqrR*) を用いて解析を行った。GTA 産生・放出量は GTA 抗体を用いたウェスタンによって検出した。細胞外に放出された GTA による他個体への DNA 導入活性は、リファンピシン (Rif) 耐性株から放出された GTA を Rif 感受性株に感染させることで得られた Rif 耐性株の数から算出した。また、GTA の生育への影響を解析するために、GTA 関連遺伝子の欠損株 (Δ GTA) を作成した。WT と Δ GTA を炭素飢餓培地で 7 日、14 日、21 日培養した時の生残性を、コロニー形成率と ATP 量で定量した。

【結果・考察】GTA 制御機構への SqrR の寄与を検証するために、GTA 産生量・放出量を log 期および定常期で検出したところ、WT よりも Δ *sqrR* で GTA 量が多いことがわかった。培養液中に放出された GTA の細菌への DNA 導入活性についても、WT よりも Δ *sqrR* の方が高い活性を示し、 Δ *sqrR* で機能的な GTA が多く産生・放出されることがわかった。この原因を調べるために、GTA 関連遺伝子の転写量を比較したところ、GTA を構成する因子とその制御因子の転写量が Δ *sqrR* で高いことがわかった (図 1A)。一方で、硫化水素処理はこれら遺伝子の転写量に影響を与えなかった。硫化水素処理は、細胞内レドックス状態に影響を及ぼすことが考えられたため、WT における GTA 関連遺伝子の転写量に対する過酸化水素の影響を検証したところ、WT では同様の転写量変化が観察されたが、 Δ *sqrR* では変化は見られなかった。以上のことから、レドックスに応答した GTA 制御機構に SqrR が関与することが明らかになった。SqrR は

パールスフィドの代謝制御に関わり、パールスフィドは活性酸素種 (ROS) の消去に関わることから、SqrR がパールスフィドと ROS のバランスを適切に制御することでレドックスに応答した GTA 制御に関与していると考えられる。

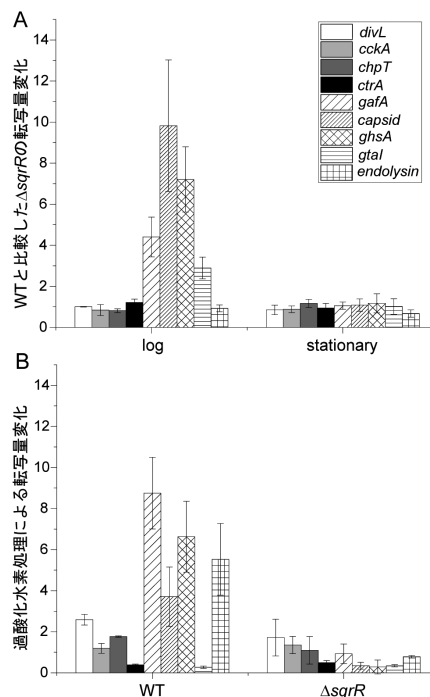


図 1 GTA 関連遺伝子の転写量変化

GTA が細胞内外のストレス状態に応じて産生・放出されることの生物学的な意義を考察するために、ストレス条件下での細胞の生残性を検証した。GTA は炭素飢餓で特に誘導されるため、WT と Δ GTA を炭素飢餓条件にさらした際の生残性を調べた。飢餓 7 日目の生残性は Δ GTA の方が高かったが、その後は WT と Δ GTA で差はなかった。飢餓 21 日後の細胞を富栄養な培地で復帰培養した後、再度飢餓におくと、7 日目で観察されていた生残性の差がなくなった。1 度目の飢餓での差は GTA 放出に伴う溶菌が原因で Δ GTA の生残性が高くなったと考える。一方、2 度目の飢餓で差がなくなったのは、GTA による遺伝子構造の変化に基づく飢餓応答能の向上が考えられる。以上より、GTA は細胞が各種ストレスに恒常的に適応するのに重要な役割を持つ可能性が示唆された。

次世代型プレバイオティクスを用いた腸内細菌叢制御

中井博之

【目的】 腸内常在菌叢バランスの崩壊により様々な疾患が発生することや様々な疾患に特徴的な腸内常在菌叢がこれまでに報告されてきており、ヒトの健康保持増進や健康寿命の伸長の観点から腸内細菌叢制御の重要性への認識が高まってきている。そこで本研究では、ヒト腸管内でビフィズス菌や乳酸菌に代表される有用腸内細菌のみを「狙い撃ち」で増殖させ、効率的な腸内細菌叢改善を通じた疾患予防・治療を可能とする『次世代型プレバイオティクス』を開発する。

【方法】 腸内細菌叢を構成する細菌は善玉菌・悪玉菌・日和見菌の3つに大別され、その組成を制御する目的として難消化性のオリゴ糖がプレバイオティクスとの名で上市され流通しているが、これまで主にヒトによる消化耐性と善玉菌の増殖促進の観点から開発されてきており、腸内に常在する日和見菌の資化によって起こる損失等は考慮されてこなかった。その要因として、ヒト腸内常在菌叢の全貌が明らかとなつてこなかったことが挙げられる。しかし近年ヒト腸内細菌叢最優勢種が明らかとなり、その殆どが日和見菌であることが判明した。さらに日和見菌の一部の細菌の増殖がヒトに慢性的なダメージを与えていることも明らかになってきている。そこで本研究では、オリゴ糖合成に有用な糖質関連酵素（主に糖質加リン酸分解酵素：ホスホリラーゼ）を活用して独自で調製した新規オリゴ糖を含むオリゴ糖ライブラリーを対象とし、上記ヒト腸内常在菌叢最優勢種等を用いたハイスループット資化性試験を実施することで、有用腸内細菌のみを増殖させ、効率的な腸内細菌叢改善を可能とする次世代型プレバイオティクスを探索した。

【結果・考察】 水溶液中で行われるグリコシド結合の消長の際に脱水縮合反応を進行させること、単糖を重合させる反応は本質的に困難である。また糖転移酵素等による合成反応では基本的に元のグリコシド結合と同じ結合しか生成しないため、多種多様なオリゴ糖の大量調製は困難を極める。そこで今回、申請者が独自に見出してきたホスホリラーゼを活用することで、新規なオリゴ糖を含む多種多様なオリゴ糖を大量調製した。ホスホリラーゼは、無機リン酸存在下でオリゴ糖を含む糖質を分解して糖1リン酸を生成する反応を触媒すると同時に、糖1リン酸と糖受容体を出発物質とした際はオリゴ糖合成反応を効率良く触媒する。そこで分解反応による糖1リン酸生産と目的とするオリゴ糖合成反応を組み合わせ

『汎用的オリゴ糖合成技術』（図1）を用いて、下記の評価系に用いるg単位でのオリゴ糖調製を可能とした。

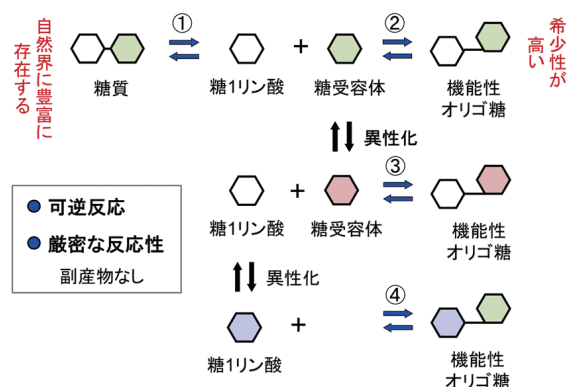


図1 多種多様なオリゴ糖合成に適応可能な汎用的製造技術

次に、ヒト腸内常在菌叢最優勢種、善玉細菌、悪玉菌等を配置した使い捨てのグリセロールストックから植菌スタンプを用いて、調製したオリゴ糖を含む培地が分注された96穴プレートに植菌し、OD600を指標に嫌気チャンバー内で培養した各細菌の生育度を測定した（図2）。その結果、ビフィズス菌や乳酸菌、その他の有用腸内細菌、各々を選択的に増殖可能なオリゴ糖を複数見出すことが出来た。

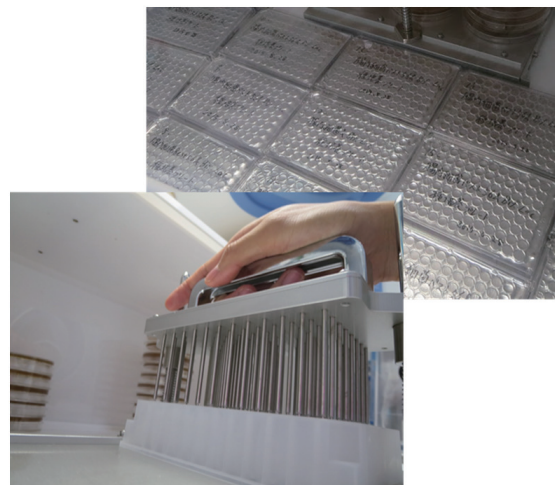


図2 ヒト腸内常在菌叢最優勢種等を用いたハイスループット資化性試験

Frankia 属放線菌の窒素固定と樹木との共生に関わる遺伝子の同定

九 町 健 一

【目的】 *Frankia* 属は窒素固定能を持つ放線菌である。窒素固定は単独または植物との共生状態で行われる。共生の宿主はハンノキやグミ・モクマオウ等の200種以上の樹木であり、共生の場合は根に形成される根粒内である。*Frankia* は、窒素固定酵素を酸素による失活から守るため、厚い脂質多重膜で覆われたユニークな球状構造体(ベシクル)を菌糸の先端に分化させる(図1)。本課題では窒素固定やベシクル分化が異常な変異株の詳細な表現型解析と、それらの変異原因遺伝子の同定に取り組んだ。

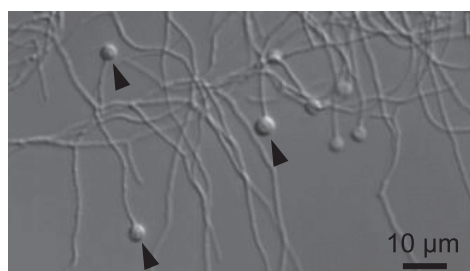


図1 *Frankia* の窒素固定専用構造体ベシクル(矢印)。

【方法】 ベシクルのサイズと膜厚の評価は暗視野顕微鏡により行った。変異株の細胞をアンモニアを含まない(N-)液体培地で培養することにより、復帰変異細胞またはサプレッサー変異細胞を濃縮した。これらの細胞をN-固体培地で培養し、単一コロニー由来の復帰変異株またはサプレッサー変異株を得た。ゲノム解析は民間業者または米国の共同研究者に委託した。根粒着生試験の宿主植物としてモクマオウ(*Casuarina glauca*)を用いた。

【結果・考察】

ベシクルをほとんど形成しないG23D3変異株—わずかに形成されるベシクルを顕微鏡で観察した結果、サイズは小さく脂質多重膜の発達も乏しかったことから、この変異株はベシクル分化に多面的な異常を示すことが分かった。N-条件において菌糸細胞で誘導される窒素代謝遺伝子(グルタミン合成酵素)の発現調節は正常だった。また、微好気状態では窒素固定活性を示した。以上の結果から、この変異株では一般的な窒素応答に関わる制御系(*ntr*制御系)は正常であり、ベシクル分化に特化したマスター制御遺伝子に変異していると考えられた。この変異株は根粒着生も全く行えなかった。単離された復帰変異株は、非共生での窒素固定能に加えて共生

窒素固定能も回復していた。従って、G23D3変異株の原因遺伝子は共生・非共生の窒素固定に必須である。ゲノム解析によりアミノ酸変化を伴いつつ表現型の異なる変異株を持たない変異を探索した結果、9個の原因変異候補を見出した。

ベシクル多重膜の発達が異常なN9D9変異株—酸素感受性蛍光色素による染色により、ベシクル内の酸素濃度を調べた。変異株のベシクルは野生株のものに比べて蛍光強度が弱く(図2)、ベシクル内の酸素濃度が上昇していることが示唆された。変異株と復帰変異細胞のゲノム解析を行い、変異株では変異しているが復帰変異細胞では野生型に復帰している塩基を探索した。その結果、そのような塩基がヘリックス・ターン・ヘリックス型の転写因子をコードする遺伝子中に見いだされ、これがN9D9変異株の変異原因遺伝子だと予想された。

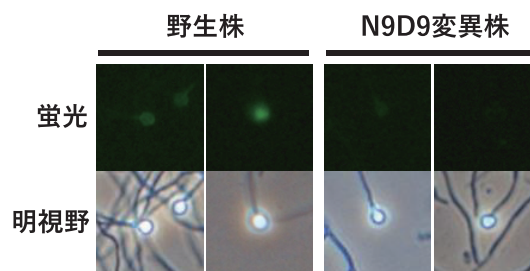


図2 酸素感受性蛍光色素によるベシクルの染色像。

ベシクルの見た目は正常だが共生・非共生ともに窒素固定が行えないN3H4変異株—変異株とサプレッサー変異株のゲノム解析の結果から、 NAD^+ 合成酵素が変異原因遺伝子であることが予想された。N-条件由来の細胞粗抽出タンパク質の NAD^+ 合成活性は、変異株では野生株より著しく低かった。一方、サプレッサー変異株は野生株と同等の活性を示した。大腸菌で合成した組換えタンパク質を用いて活性測定を行った結果、変異型の組換えタンパク質は NAD^+ 合成活性をほとんど示さなかった。加えて、N-条件で培養した変異株の細胞内 NAD(H) 濃度は、野生株とサプレッサー株に比べて著しく低かった。以上の結果から、N3H4変異株の変異原因遺伝子は NAD^+ 合成酵素遺伝子であり、窒素固定に大量に必要とされる NAD(H) を十分量合成できないことにより、共生・非共生双方での窒素固定に異常を示すと考えられた。

二次代謝産物の生物学的意義解明による放線菌潜在能の開拓

木 谷 茂

【目的】放線菌は、構造多様な生理活性物質を二次代謝産物とする微生物である。しかし、この二次代謝産物の放線菌における「真の生物学的意義」は不明である。一方、1つの放線菌が多くの二次代謝クラスターを有するが、その大半は発現しておらず、この潜在する物質生産能を覚醒できれば、生理活性物質の有効な探索技術となりうると考えられる。

本研究では、放線菌代謝物の他種放線菌に対する二次代謝誘導能を解析し、「微生物二次代謝産物の生物学的役割」の一端を示すこと、また二次代謝誘導能を活用し、休眠天然物を生産覚醒させる有用物質探索技術を確立することを目指した。

【方法】二次代謝シグナル生産菌 *Streptomyces albus* J1074 株を各種放線菌 50 種との固体培地 3 種を用いた共培養に供した。また、放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 株の色素系抗生物質の休眠生産を覚醒する海綿共生放線菌 *Blastococcus* sp. ST9 株をゲノム DNA 情報がある放線菌 5 種と液体培地 3 種を用いた共培養に供した。次に、固体培地はメタノールにて、また液体培地は *n*-ブタノールにて抽出し、その濃縮乾固物を DMSO に再溶解させ、共培養による代謝物プロファイルの変化を逆相 HPLC により解析した。

【結果・考察】*S. albus* J1074 株は、その二次代謝シグナルを介して、放線菌 *Streptomyces avermitilis* のエバーメクチン生産を誘導する。そこで、*S. albus* が他種放線菌の二次代謝を誘導する可能性があると考え、共培養時の代謝物を解析した。この代謝物解析では、2 菌株を非接触状態にて培養し、拡散性シグナル物質による代謝物変動を期待した。NBRC 供託放線菌株と研究室所有の放線菌株の計 50 菌株の代謝物を解析したところ、18% (9

菌株) の放線菌が *S. albus* との共培養に応答して、その代謝物生産が増加することが分かった。また、4 菌株では、化合物生産が共培養時にのみ検出されたのに対し、残りの 5 菌株では、既存物質の生産性が共培養により向上していることが明らかとなった。化合物生産が共培養時にのみ検出された 4 菌株について精査したところ、1 つの化合物の生産は、*S. albus* が産生する二次代謝シグナルに依存したが、他の化合物は二次代謝シグナルに応答しない共培養依存的な物質であることが分かった。したがって、*S. albus* は二次代謝を誘導する新たなシグナルを有する可能性が示唆された。また、1 つの放線菌種が、*S. albus* の代謝物プロファイルを変化させたことから、放線菌間の代謝物による相互作用が示唆された。

一方、研究代表者が単離した海綿共生放線菌 *Blastococcus* sp. ST9 株は、*S. lividans* の休眠する色素系抗生物質生産を覚醒する。そこで、*Blastococcus* sp. ST9 株をゲノム DNA 情報がある放線菌種と液体培地にて共培養させ、その代謝物プロファイルの変化を観察したところ、新たな化合物の生産を共培養時に検出した。これまでに、この共培養依存的物質を精製する工程を確立できたことから、今後は、NMR などにより構造を解析し、*Blastococcus* sp. ST9 株と *S. avermitilis* 間の共培養メカニズムを解析する予定である。

以上より、放線菌間に代謝物を介したシグナルトークが存在すること、またそのシグナルトークが放線菌の潜在的な物質生産能を開拓することに活用できることが示唆された。今後は、覚醒物質や誘導物質の構造同定のさらなる解析により、微生物二次代謝産物の真の生物学的意義が明らかとなることが期待される。

次世代バクテリアセラピーを可能にするための微生物の体内制御技術

黒田 章 夫

【目的】 遺伝子改変微生物を使った治療（バクテリアセラピー）の研究が世界で進んでいる。例えば、尿素サイクル異常症の患者は窒素をうまく代謝できず、血中の高濃度アンモニアによって脳障害を引き起こす。アルギニンを生産する遺伝子改変大腸菌はアンモニアを効率的に除去できるので、アメリカ食品医薬品局 (FDA) はこの遺伝子改変大腸菌を経口で投与して、尿素サイクル異常症の治療に使う研究に許可を出した。しかしながらバクテリアセラピーを一般化するには、遺伝子改変細菌は①治療が終わると死滅すること、②環境中で生存できないことなど、生育を厳密に制御できることが求められる。

生物の利用するリンは、+5 価のリン酸 ($H_2PO_4^-$) もしくはリン化合物である。一方、本研究で利用する亜リン酸 ($H_2PO_3^-$) は +3 価のリンであり、天然にはほとんど存在しない。我々は、大腸菌に亜リン酸の取り込みと代謝に必要な遺伝子を導入し、同時に大腸菌本来のリン酸輸送タンパク質の遺伝子を欠失させることで、通常のリン酸培地では生育できず、亜リン酸に依存して生育する改変大腸菌（亜リン酸依存性株）を作り出した。亜リン酸依存性株は、亜リン酸のない一般環境や体内では増殖できないことから、人為的に亜リン酸を投与することによってその増殖を制御することが可能であると考えられた (図1)。本研究では、亜リン酸依存性株の増殖・生存特性の解明、また将来バクテリアセラピーに利用するための改変を目的とした。

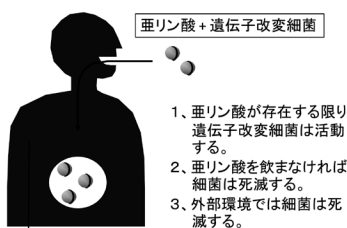


図1 亜リン酸依存性株を使った体内制御

【方法】 大腸菌野生株 (MG1655) および亜リン酸依存性株 (RN1008: $\Delta pitA::frr$, $\Delta pitB::frr$, $\Delta phnC::frr$, $phoA::frr$ $\Delta glpT::frr$, $\Delta ugpB::frr$, $\Delta uhpT::frr$, $\Delta (pstSCAB-phoU) 560::Km^r$, Ptac4071-*ptxD*/pTWV229, *htxABCDE*/pSTV28) を、MOPS-グルコース培地 (リン酸あるいは亜リン酸濃度 1.0mM) を用いて 37°C で培養し、対数増殖期の培養液から RNAprotect Bacteria Reagent と RNeasy Mini

Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出して解析した。細胞外多糖 (EPS) 量は Total Carbohydrate Assay Kit (Cell Biolabs) を用いた硫酸-フェノール法で測定した。RN1008 株の *phoR* 破壊は KEIO クローン JW0390 株 (*phoR::Km^r*) を用いて調整した P1 lysate を用いて行った。

【結果・考察】 亜リン酸依存性株 (RN1008) の増殖、生存率等を解析した結果、次の二点について顕著な表現型の変化が見出された。(i) 生存特性: RN1008 株は亜リン酸が存在しなければ増殖できないものの、亜リン酸が存在すれば野生株よりも (野生株のリン酸培地の生存よりも) 長く生存できることがわかった。(ii) EPS 分泌の亢進: 寒天培地上における EPS 産生量が RN1008 株では野生株に比べて 6 倍以上に亢進していることが明らかとなった。

RNAseq 解析による原因特定を試みた結果、リン酸レギュロン支配下のストレス応答 (*sodA*)、生存性 (*yjfK*)、EPS 生産 (*waaH*, *cpsB*, *ugd*) 等の遺伝子の発現量が大幅に上昇しており、これらの関与が示唆された。RN1008 株ではリン酸輸送体 *pstSCAB* 遺伝子が破壊されており、その下流に存在するレギュレーター因子 *phoU* 遺伝子が共に破壊されていることが原因と考えられた。

リン酸レギュロンは PhoU が欠損すると転写因子である PhoB が恒常的に活性化する。RNAseq 解析では、RN1008 において予想どおり PhoB 支配下遺伝子群の発現が上昇した。そこでセンサーキナーゼ *phoR* 遺伝子を破壊することによって PhoB の活性化を抑制した。*phoR* 破壊株の生存率および EPS 産生を調べた結果、ともに野生株と同等に戻ることが明らかとなった。つまり、RN1008 株における生存率向上および EPS 産生亢進のいずれもリン酸レギュロンの活性化によってもたらされる表現型であることが明らかとなった。また今回生存特性が異なる亜リン酸依存性株を得たことから、バイオセラピーに利用できる宿主のバラエティーを増やすことができたとと言える。

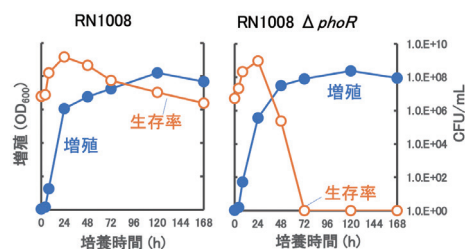


図2 亜リン酸依存性株の生存特性

海藻多糖フコイダンの微生物分解酵素系の解明とアミロイド線維抑制効果

大 城 隆

【目的】 フコイタンは、L-フコースを主構成糖とする、側鎖に硫酸基やウロン酸残基が結合した分子量 100,000 ~ 1,000,000 の褐藻類特有の硫酸化多糖類であるが、その分解代謝の詳細は明らかになっていない。フコイタンには、抗ウイルス作用、抗ガン作用、抗凝血作用などの生理活性が報告されており、健康食品、医薬品としての期待がもたれているが、構造と活性の関連性は不明な点が多い。そこで我々の研究室では、規則的な分解産物を生成できる酵素を利用したフコイタン分解について検討を行ってきた。今までに、オキナワモズクフコイタン資化性微生物 *Luteolibacter algae* H18 が有するフコイタン分解に関与する酵素群のうち、フコイタンデアセチラーゼとフコイタン低分子化酵素を見出し、詳細な解明を実施した。さらに H18 株がフコイタンを分解する際に脱硫酸化反応が起こることを明らかにしている。そこで本研究では、フコイタン脱硫酸化酵素を研究の対象にした。また、予備的な検討ではあるが、フコイタンがアルツハイマー病の原因とされているアミロイド線維の形成を阻害することを明らかにしている。本研究では、フコイタンのアミロイド線維形成阻害についての詳細な評価も行った。

【方法】 H18 株をオキナワモズクフコイタンを単一炭素源とする合成培地で培養し、得られた菌体からフコイタン脱硫酸化酵素を精製した。N 末端アミノ酸配列とゲノム情報より見出された目的遺伝子を、pCold I ベクターにより大腸菌で発現させ、粗酵素を Hi Trap で精製した後、酵素化学的性質検討に用いた。酵素活性は、フコイタンから遊離する硫酸基をバリウム沈殿法により定量することにより測定した。アミロイド線維形成阻害は、インシュリンをモデルタンパク質として用い、アミロイド線維と特異的に結合する色素、チオフラビン T がもたらす蛍光強度を測定することにより評価した。

【結果・考察】 H18 株から精製した酵素の N 末端アミノ酸配列を基に、約 50kDa のタンパク質をコードする脱硫酸化酵素遺伝子 *fsut107* を見出した。組換え大腸菌から精製した *Fsut107* を用いて酵素化学的諸性質を検討したところ、本酵素はオキナワモズク以外にオオウキモフコイタンにも作用することがわかった。*Fsut107* のアミノ酸配列について BLAST 解析を行った結果、本酵素は既に報告されているフコイタン脱硫酸化酵素やアルシルスルファターゼよりも、PhoD ファミリーに属するアルカリホスファターゼに類似していることが明らかになった

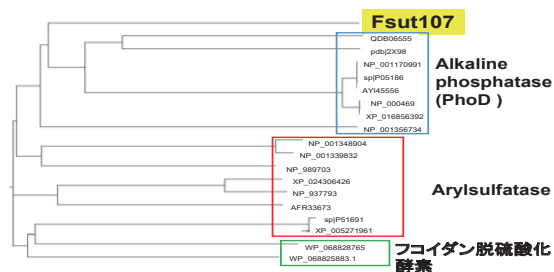


図1 *Fsut107* とスルファターゼ、ホスファターゼのアミノ酸配列の系統樹解析

(図1)。そこで、ホスファターゼ、スルファターゼの活性測定に一般的に用いられる人工基質に対する活性を見たところ、*p*-ニトロフェニルホスフェート (pNPP) に対する活性が検出された一方、*p*-ニトロフェニルサルフェートに対する活性は認められなかった。本酵素のオキナワモズクフコイタンと pNPP に対する反応性を比較すると、最大活性はフコイタンを基質にした方が高く、親和性は pNPP を基質にした方が高かった。

オキナワモズク、コンブ、アカモク由来フコイタンのアミロイド線維形成阻害について検討した。その結果、フコイタンを加えない場合、インキュベート5時間過ぎから蛍光の上昇すなわち、アミロイド線維形成が見られたのに対し、フコイタンを添加すると、すべての場合で蛍光上昇の遅延、線維形成の阻害効果が見られ、なかでもアカモクフコイタンに非常に強い阻害効果が認められた (図2)。これらフコイタンをオートクレーブ処理し、

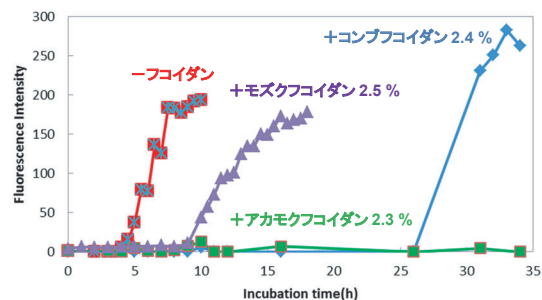


図2 フコイタンによるアミロイド線維形成阻害

分子量を約 10 ~ 20 万から数千程度へと低分子化しても効果を有していた。さらに、添加量についても検討したところ、0.5% の添加でも効果が認められた。

細菌の菌体内外に生じるセレンナノ粒子の生成機構の解明と バイオアベイラビリティに関する研究

三原久明

【目的】セレンは主に、セレンタンパク質として種々の生理機能を発揮する。一方、ある種の細菌は、異化作用や無毒化作用により、セレン酸や亜セレン酸を、毒性の低い元素状セレンナノ粒子 (SeNPs) に還元して細胞内外に蓄積・排出するが、SeNPsの形成機構は不明である。本研究では、SeNPsの生成に関わる遺伝子、タンパク質を同定し、SeNPs生成機構を解明することを目的とした。また、細菌が生成するSeNPsが、ラットの微量栄養素としてのセレン源になり得るかも検討した。

【方法】偏性嫌気性異化的金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* のゲノム上に存在する *extHIJKLMNOPQS* に注目し、*extK_L* を同菌内でリコンビナント発現させ、その産物である Cyt c 様セレンタンパク質 (MHSEP) を生化学的に解析した。*extI* 欠損株を作製し、その表現型を調べ、ExtI と ExtH の細胞内局在を解析した。また、SeNPsの形成と外膜小胞 (OMV) の関連について調べるため、*Escherichia coli* BW25113 (WT) および *ompC*、*ompA*、*nlpI*、*tolA* 遺伝子の各遺伝子破壊株について、SeNPsの比較を行った。さらに、セレン欠乏状態ラットに *E. coli* 由来 SeNPs、亜セレン酸または人工 SeNPs を経口投与後、血清、尿、糞便及び各臓器を採取し、LC-ICP-MS で血清中セレンタンパク質を定量することでセレン欠乏状態からの回復を評価した。

【結果・考察】MHSEPは、サブユニット当たり5つのヘムと1つのセレンシステイン残基 (Sec) をもち、還元型メチルビオロゲンを電子供与体とした亜セレン酸還元反応を触媒することを見出した (図1)。部位特異的変異解析により、MHSEPの活性にはSecが必須であることが示された。*extI* 遺伝子がコードするExtIは外膜タンパク質と予想され、*extH* 遺伝子の産物ExtHはロダネーゼ様リポタンパク質であると推定された。*in silico* 解析および、ウエスタンブロット解析により、ExtIは外膜タンパク質であることが示され、*extI* 遺伝子欠損株の解析より、ExtIは亜セレン酸の取り込みおよびSeNPsの形成に関与する可能性が示唆された。一方、ロダネーゼ様ExtHは内膜と外膜に局在することが示された。*extI* 遺伝子の欠損はExtHの外膜への局在に影響を与えた。外膜画分のゲルろ過解析を行ったところ、ExtIはExtHと複合体を形成する可能性が示唆された。

E. coli BW25113 (WT) を亜セレン酸含有培地で培養す



図1 MHSEPが触媒する亜セレン酸還元反応

ると、40-100 nm の SeNPs を細胞外に生成する。SeNPs に付着しているタンパク質を解析した結果、外膜タンパク質である *OmpC*、*OmpA* を含む複数のタンパク質が確認された。外膜構造に関わる *ompC*、*ompA*、*nlpI*、*tolA* 遺伝子の各遺伝子破壊株を亜セレン酸含有培地で培養し、SeNPs生成の様子を位相差顕微鏡で観察した結果、 ΔtolA および ΔompC において、SeNPsが細胞表面もしくは内部に蓄積・凝集している状態が観察された (図2)。 ΔtolA および ΔompC では、SeNPsの細胞外への放出が出来ないことが示唆された。 ΔtolA 、 ΔompC は WT に比べ約2倍量のOMVを生産する。 ΔtolA では外膜の不完全さから細胞分裂位や極に大きなOMVが過剰に形成されることが報告されており、細胞外へのSeNPs放出には、外膜構造の完全性が必要であることが示唆された。

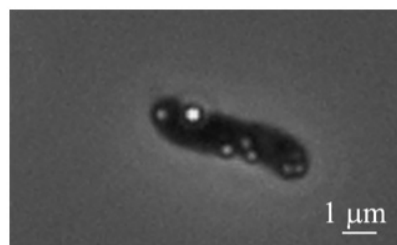


図2 SeNPsを生成した *E. coli* ΔtolA 株の光学顕微鏡像

E. coli 由来 SeNPs のラット投与時には他の化学形態で観察されたセレン欠乏状態からの回復が観察されなかった。また、セレンの臓器への分布もほとんど観察されなかった。経口摂取された *E. coli* 由来 SeNPs は吸収がされにくいことが示され、動物にとっては、セレン栄養源としての生理的活性を有しないことが示唆された。

微生物がつくりだすガラクトオリゴ糖合成酵素の機能改変 - 次世代型プレバイオティクスの生産基盤の構築 -

田 中 俊 一

【目的】 ミルクオリゴ糖には様々な結合様式と重合度のもがあり、その種類は200を超える。この構造的多様性こそが、数多のプレバイオティクスとしての生理機能を発揮する基盤となっている。一方、ミルクオリゴ糖を模倣する食品素材としてガラクトオリゴ糖（GOS）が利用されているが、その製造に使われる微生物由来β-ガラクトシダーゼは主に直鎖型GOSを作るため、構造的多様性に乏しいのが現状である。そこで本研究では、GOSの機能をよりミルクオリゴ糖に近づけることを志向し、分枝型GOSを効率的に産生するような改変型酵素の作出を目指した。

【方法】 我々の先行研究から、抗体様ペプチド（以降、spMBと呼ぶ）を*Bacillus circulans*由来β-ガラクトシダーゼ（以降、BgaDDと呼ぶ）の基質結合部位周辺に結合させることで産生GOSを直鎖型β-1,4から分枝型β-1,3に改変できうことが分かっている。この知見を基に、本研究ではまず、spMBがBgaDDの特異性を改変するメカニズムを解明するために、spMBとBgaDDの複合体の結晶化ならびにX線結晶構造解析を行った。X線回折データの取得は大型放射光施設SPring-8にて実施した。その後、得られた構造情報に基づく変異体設計によって、分岐型GOSの産生能が向上した改変型酵素の創出に取り組んだ。なお、酵素反応によって産生されたGOSの解析には、ULTRON AF-HILIC-CDカラム（信和化工）を設置したLC-20AD HPLCシステム（島津製作所）を用いた。

【結果・考察】 本研究対象であるBgaDDとspMBの複合体のX線結晶構造解析に成功した。その構造から、spMBはBgaDDの活性中心近傍に結合し、GOSの3糖目および4糖目部分の結合に対して立体的な障害を与えていることが確認された。図1Aに示すように、野生型BgaDDにおいては、GOSは触媒中心から糖結合ポケットの外側へ直線的に結合しており、産生されるGOSは直線的なもの（つまり直鎖型GOS）に強く限定されると考えられる。一方で、spMBの活性中心近傍への結合は、GOSの3糖目および4糖目部分の結合に対して立体的な障害を与えており、そのためにGOSは直線的ではなく曲がった状態で結合していた。つまり、直鎖型糖よりも分枝型糖の産生に適した反応場が、spMBの結合によって作り出されていることが明らかとなった。

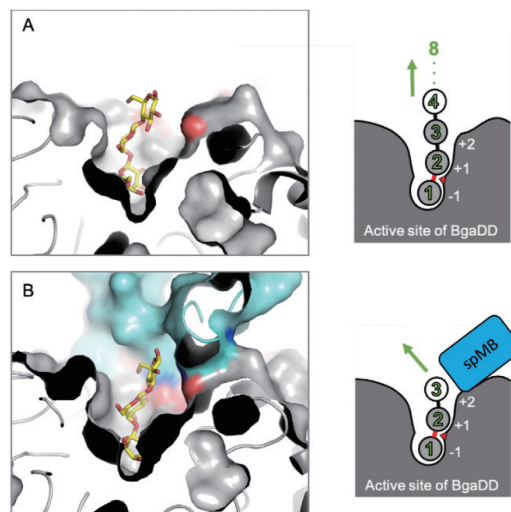


図1 spMBによるBgaDDの基質特異性改変メカニズム
3糖GOS（黄色スティック）周辺の構造を示す。
(A) 野生型BgaDDによるGOS産生
(B) spMBが結合した状態でのBgaDDによるGOS産生

続いて、得られた構造情報を基に、分枝型糖への特異性をさらに高めるような改良型spMBの創出を検証した。spMBを構成するアミノ酸のうち、GOSの3糖目ならびに4糖目部分に立体障害を与えているアミノ酸（Y31, S83）を選択し、それぞれより嵩高いアミノ酸へと変異を導入した。その結果、表1に示すように、spMB/S83Y（spMB/SY）、spMB/S83W（spMB/SW）はその側鎖の大きさに応じて分枝型糖（β-1,3結合）の比率を向上させた。つまり、より大きな立体的障害を設計することで、分枝型糖への特異性を大きく向上させることに成功した。

表1 産生GOSの直鎖型と分枝型の比率

		BgaDD	BgaDD	BgaDD	BgaDD
			+spMB	+spMB/SY	+spMB/SW
3糖GOS	直鎖型	92%	60%	37%	28%
	分枝型	8%	40%	63%	72%
4糖GOS	直鎖型	95%	40%	38%	26%
	分枝型	5%	60%	62%	74%

今後は、直鎖型を好む野生型酵素と分枝型を好む改変型酵素の組合せ反応等を試験し、構造的多様性の広いGOSの産生を検討する予定である。

Bacillus 属細菌由来のべん毛モーター蛋白質を利用した ナトリウムイオンセンサープロープの開発

南 野 徹

【目的】運動性細菌は、べん毛と呼ばれるらせん繊維状の運動器官をスクリューのように回転させて水中を泳ぐ。回転運動を駆動しているのは、べん毛繊維の根元にある直径約45ナノメートルの回転分子モーターである。べん毛モーターは回転子と、その周りに配置される約10個の固定子複合体から構成される。イオンチャンネルとして働く固定子複合体が細胞の外側から内側に向かって流れる一価のカチオン流を回転力に変換する。固定子は環境変化を感知するバイオセンサーとしても働く。固定子のペプチドグリカン結合ドメイン（以降、PGBドメインと呼ぶ）が環境変化を感知すると、べん毛モーターの周りに配置される固定子の数が制御される。これまでに、我々は *Bacillus subtilis*（枯草菌）のべん毛モーターの固定子として働く MotPS 複合体がナトリウムイオン (Na^+) を直接感知するセンサーとして働くこと、 Na^+ を取り除くと機能状態から機能しない状態へと可逆的に構造変化することを見出した。本研究では、MotPS 複合体が Na^+ を感知する仕組みを利用し、生体内各所で Na^+ の濃度変化をリアルタイムで計測できる蛍光タンパク質プロープを開発することを目的とした。

【方法】軟寒天培地を用いて5mM NaCl存在下でも運動能を示す *motPS* 変異株を単離し、DNAシーケンス解析により変異点を同定した。MotPS複合体のPGBドメインはMotSの68番目のグルタミン残基から242番目のセリン残基で構成される（以降、MotS₍₆₈₋₂₄₂₎と呼ぶ）。MotS₍₆₈₋₂₄₂₎のX線結晶構造解析を行うため、*Escherichia coli* BL (DE3) Star株内でMotS₍₆₈₋₂₄₂₎を大量発現できるプラスミドを構築した。MotS₍₆₈₋₂₄₂₎を発現・精製し、300mM NaClおよび300mM KClという条件下で結晶化した。大型放射光施設SPring-8のビームラインB41XUおよびB45XUにより得られた結晶のX線回折強度データを収集した。 Na^+ に依存したMotS₍₆₈₋₂₄₂₎の構造変化をとらえるため、精製したMotS₍₆₈₋₂₄₂₎の遠紫外円偏光二色性スペクトルの測定を行った。

【結果・考察】MotS₍₆₈₋₂₄₂₎に存在する Na^+ センサー領域を同定するため、 Na^+ 濃度が5mMでも部分的に機能できる *motPS* 変異体を単離した。DNAシーケンス解析から、MotS₍₆₈₋₂₄₂₎の113番目のアラニンがスレオニンに置換していることが判明した。このA113Tを有するMotPS複合体を単離精製して高速原子間力顕微鏡を用

いて一分子観察したところ、このPGBドメインは Na^+ を取り除いても機能状態の構造が維持されていた。

300mM NaClおよび300mM KClという条件下で成長させたMotS₍₆₈₋₂₄₂₎結晶からそれぞれ1.9Åおよび2.2Å程度の分解能のX線回折強度データを収集することに成功した。両者の原子モデルを構築し精密化したところ、 Na^+ の有無による構造の違いが確認できなかった(図1)。

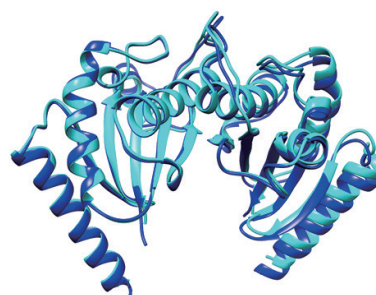


図1 Na^+ の有無によるMotS₍₆₈₋₂₄₂₎の構造比較。
青、300mM NaCl、シアン、300mM KCl。

MotS₍₆₈₋₂₄₂₎の $\beta 1$ 鎖に存在する113番目のアラニンは $\alpha 1$ ヘリックスに存在する98番目のバリリンと疎水結合を形成していた。113番目のアラニン残基がスレオニンに置換すると、スレオニン側鎖のメチル基が98番目のバリリン残基と疎水結合するとともに、スレオニン側鎖の水酸基が99番目のアスパラギン残基との間で水素結合を形成できる。このことから、 Na^+ がない状態でもA113T変異によってMotS₍₆₈₋₂₄₂₎の $\alpha 1$ ヘリックスと $\beta 1$ 鎖との間の相互作用が安定になるものと推察された。さらに、結晶中ではMotSの68番目のグルタミン残基から82番目のセリン残基までの領域が安定な2次構造をとっていないことから、この領域の構造が Na^+ によって安定化されるのではないかと考えた。そこで、MotS₍₆₈₋₂₄₂₎の遠紫外円偏光二色性スペクトル測定を行った結果、MotS₍₆₈₋₂₄₂₎の α ヘリックス含量が300mM NaCl存在下に比べて25mM NaCl存在下では有意に減少していた。さらに、68番目のグルタミン残基から77番目のリジン残基を欠失させたMotS₍₇₈₋₂₄₂₎では、 Na^+ に依存した α ヘリックス含量の変化が見られなかった。以上の結果から、MotSの68番目のグルタミン残基から77番目のリジン残基の領域が Na^+ センサーとして機能することが示唆された。

微生物のもつシームレスクロニング活性を利用した新規シームレス DNA クローニングシステムの開発

本橋 健

【目的】近年、急速に普及しているシームレスクロニング法は、古典的な制限酵素とリガーゼを使用するクロニング法と比較し、効率が高い。バイオ試薬各社は複数DNA断片を同時にベクターへクロニングできるキットを競って発売している。これに対し、これまでのシームレスクロニング法とはまったく異なるアプローチで、より効率の高いシームレスクロニング法である Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) 法を開発した。この方法は、通常研究室で使用する一般的な大腸菌株 (JM109, DH5 α など) から「ある一定条件下」で調製した粗抽出液を用いると、DNA断片を効率良くベクターへシームレスに挿入できる。この方法を使用すると、一般的な大腸菌株の粗抽出液でシームレスクロニングできるため、特別な試薬を必要とせず、超低コストにクロニングできる。しかし、SLiCE法では大腸菌粗抽出液を用いるため、ヌクレアーゼなどの混入もある。そのため反応条件等を工夫し、より安定に、かつ高い効率でSLiCEクロニングを行う方法を検討した。

【方法】一般のシームレスクロニング法と同様に、SLiCE法はベクターの両末端と15bp程度の相同配列をもつDNA断片をPCRなどにより調製し、それをベクターに挿入できる。反応に用いる Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) は、市販のタンパク質抽出液や Triton X-100 を含む緩衝液を用いて簡単に調製できる。しかし、SLiCEはバクテリアの粗抽出液であるため、ヌクレアーゼをはじめ様々な夾雑物を含むことが予想される。そこで、その反応条件について、市販のシームレスクロニング法との比較も含めて詳細に検討した (図1)。

また、効率良くシームレスクロニングできる特徴を活かして、いくつかの応用法も検討した。

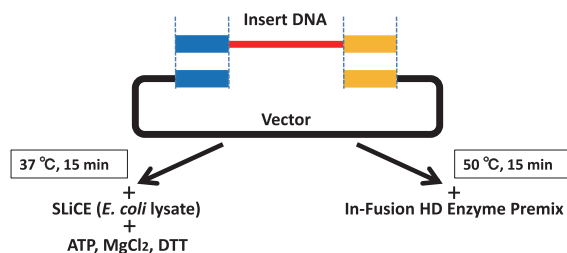


図1 SLiCE法とIn-Fusion法の概要

【結果・考察】シームレスクロニングでは、市販品が多数発売されているため、それと同様のクロニング効率を持つことが大切である。クロニング効率を市販のシームレスクロニングキットと比較を行った。図1に示すように反応温度が異なるもののほぼ同様のプロトコルでその効率を比較したところ、コロニーの形成率、クロニング効率ではほぼ市販キットと同様の結果を示した (図2)。この結果から、SLiCE法およびIn-Fusion法などのシームレスクロニング法では、インサート：ベクターのモル比は、1:1~3:1程度で効率良く反応が進み、過剰のインサートDNA断片 (10:1以上) は反応を阻害することが分かった。

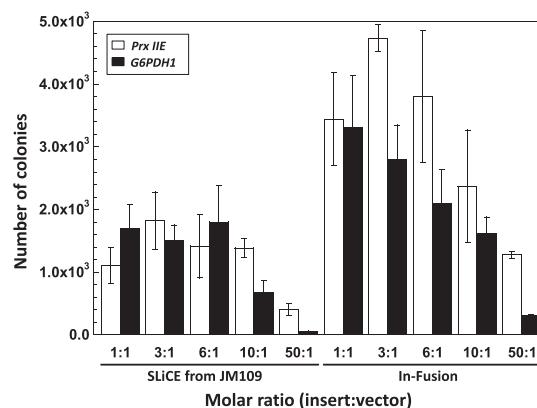


図2 SLiCE法とIn-Fusionのクロニング効率

これ以外に、反応時間は30分程度で十分であり、通常15分で十分なクロニング効率を得ることができた。クロニング時のDNA断片精製は、通常のアガロースゲル電気泳動からの精製、およびシリカカラムを用いた精製サンプルでクロニング効率が高いだけでなく、未精製DNA断片やExoSAP-IT処理したDNA断片でもクロニングできた。

また、SLiCEの高いクロニング活性を利用して、多断片DNAの同時クロニングやSLiCEを用いた部位特異的突然変異法であるSLiP法のプロトコルも確立した。SLiCE法は、特別な菌株を必要とせず、研究室で通常使用する大腸菌から調製できるため、0.4円/反応という超低コストでシームレスクロニングできる方法である。

メタノール濃度に応答するシグナル伝達と転写制御機構の解明

由里本 博也

【目的】強力なメタノール誘導性プロモーターを利用した異種タンパク質生産宿主として広く利用されているメタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) では、メタノール濃度に応答してメタノール誘導性遺伝子の発現レベルが制御される。メタノール資化性酵母はメタノール濃度が約0.05~0.2%の範囲内で日周変動する植物葉面にも棲息しており、この濃度範囲においてメタノール誘導性遺伝子の発現レベルが高く、通常の異種タンパク質生産時のメタノール濃度0.5%以上ではその発現レベルが低下する(図1)。本研究では、本酵母が持つポテンシャルを最大限に引き出し、低濃度から高濃度までのメタノール濃度に応じた効率的な生育と異種タンパク質生産の両立を可能にするため、メタノール濃度に応答した転写制御機構とそのシグナル伝達機構の解明を目的とした。

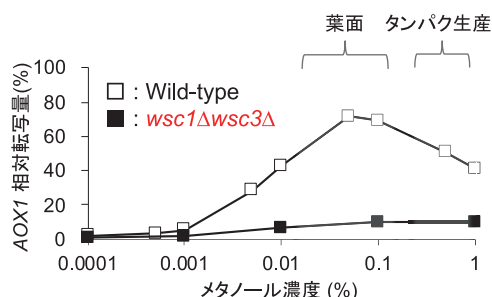


図1 メタノール濃度に応答したメタノール誘導性遺伝子(AOX1)の発現レベルとWscタンパク質の関与

【方法】我々はこれまでに、細胞表層においてメタノール濃度の感知に寄与するWscタンパク質(Wsc1, Wsc3)を同定し、これらがメタノール濃度に依存した転写活性化レベルの制御に関与することを明らかにした(図1)。また、Wscタンパク質はメタノールと細胞表層ストレスの両者に応答し、cell wall integrity (CWI) 経路を経て下流の遺伝子発現を制御するが、これまでの解析により、メタノール誘導性遺伝子の発現はCWI経路から分岐する未知の経路を経て、メタノール誘導性遺伝子発現に必要な転写因子Mxr1に伝達されることが考えられた。そこで本研究では、メタノール濃度に応答する遺伝子発現制御におけるMxr1の役割を明らかにするため、Mxr1のリン酸化動態を解析し、Mxr1の機能領域を同定するために、ドメイン欠失体を用いた解析を行った。

【結果・考察】Mxr1-FLAGを発現する*K. phaffii*細胞をグルコース培地から様々な濃度のメタノール培地にシフトし、30分後にタンパク質を抽出してPhos-tag SDS-PAGEに供した。抗FLAG抗体を用いたイムノブロット解析を行った結果、Mxr1のリン酸化レベルがメタノール濃度が高くなるにつれて顕著に減少することを見出した。さらに、抗FLAG抗体を用いた免疫沈降により精製したMxr1-FLAGタンパク質について、抗ホスホセリン抗体および抗ホスホスレオニン抗体を用いたイムノブロット解析を行ったところ、Mxr1のセリン残基がメタノール濃度非依存的に脱リン酸化され、スレオニン残基がメタノール濃度依存的にリン酸化されることがわかった。また、他のメタノール資化性酵母のMxr1ホモログタンパク質間で高度に保存されたアミノ酸領域に含まれるスレオニン残基に着目し、その変異体を用いてメタノール誘導性遺伝子の発現レベルを解析した結果、スレオニン残基の1つが0.1%以上のメタノール濃度での遺伝子発現制御に寄与している可能性が示唆された。

次に、メタノール濃度依存的な遺伝子発現制御に重要なMxr1における機能領域を同定するため、*mxr1Δ*株においてMxr1のドメイン欠失体発現株を作成し、メタノール誘導性遺伝子(AOX1)の発現レベルを解析した。全長1155アミノ酸から成るMxr1のN末端付近にはDNA結合ドメインがあるため、C末端側から段階的に欠失させた変異体を設計した。各変異体を*mxr1Δ*株で発現し、各種メタノール濃度誘導時のAOX1 mRNA量をMxr1全長を持つ株と比較した結果、Mxr1の中程のドメインに0.1%以上の高濃度でのメタノール濃度依存的な遺伝子発現制御に重要な領域があること、さらにN末端側のドメインに0.01%以下の低濃度での遺伝子発現制御に重要な領域があることがわかった(図2)。今後は、各ドメイン内でのリン酸化部位を同定し、上流のシグナル伝達因子との関連を明らかにしたい。

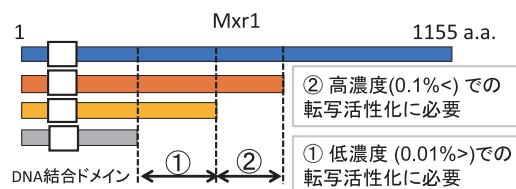


図2 Mxr1ドメイン欠失体を用いた機能領域の解析

プロバイオティクス有用菌の消化管内定着性向上を目指した基盤技術の創製

小川 哲 弘

【目的】近年の健康志向の高まりから、プロバイオティクスの開発が盛んに進められている。その中において、これら有用菌の定着性の低さがボトルネックとなり、機能の発揮が制限されていた。今後、プロバイオティクス開発を進展させる上で、この点は克服すべき大きな課題である。当研究室では、これまで大腸菌をモデルとして、バイオフィーム形成の分子機構について研究を行ってきた。細菌はバイオフィームを介して腸管内に定着することから、バイオフィーム形成能を高めることで、有用細菌の腸管での定着性を強化出来ると考えた。また、普遍性の高いバイオフィーム形成機構を示すことで、幅広い細菌に利用可能な技術へと発展することが期待された。こうした中、大腸菌において、新規シグナル因子2',3'-環状ヌクレオチドがバイオフィーム形成を抑制することが報告された。しかし、このメカニズムには不明な点があった。そこで、本研究では、2',3'-環状ヌクレオチドを介した大腸菌の新規バイオフィーム形成機構の解明を行った。この成果に基づいて、高いバイオフィーム形成能を示す大腸菌変異株を選択した。そして、これらの株が、マウス腸管内で高い定着性を示すことの実証を試みた。これにより、遺伝子組換えプロバイオティクスの、将来的な臨床利用に向けた基盤技術の創製を目指した。

【方法】不活性型リボソームを蓄積する変異株を、大腸菌非必須遺伝子破壊株コレクション (Keio collection) から取得した。これらの株をアミノ酸飢餓条件下で培養することで、バイオフィーム形成を誘導した。形成されたバイオフィームを、クリスタルバイオレット法により定量した。定着性評価には、5, 7, 9, 11週齢のマウスを用いた。また、大腸菌の可視化を目的とし、自家発光可能なバクテリア由来ルシフェラーゼ遺伝子を、アンピシリン耐性遺伝子をコードするプラスミドにて導入した。マウスにカルベニシリンを投与し、あらかじめ常在菌を駆除した後、このプラスミドにて形質転換した大腸菌株の培養液を、マウスに経口投与した。その後、糞便を経時的に採取した。ルシフェラーゼ発光量を指標に、グラム当たりの糞便中に含まれる大腸菌細胞数を算出し、これに基づいて定着性を評価した。また、In vivo イメージング (IVIS) により、接種した大腸菌のマウス腸管での定着の様子を観察した。

【結果・考察】2',3'-環状ヌクレオチドは、大腸菌が持つRNase Iによる宿主RNAの分解産物として生成する。バイオフィームが形成されるためには、環境変化にตอบสนองしてRNase Iが阻害される必要があるが、そのメカニズムは不明であった。RNase Iはリボソームと相互作用することが知られている。また、バイオフィーム形成条件下では、リボソームは構造変化を介して不活性型へと変換されるが、この現象は「リボソームの休眠」と呼ばれる。以上を踏まえ、我々は、この不活性型リボソームが特異的にRNase Iを阻害するとの仮説を立てた。そこで、細胞内に不活性型リボソームを蓄積する変異株のバイオフィーム形成能を調べた。その結果、これら変異株では、野生株と比較して有意に高いバイオフィーム形成能を示した。一方、これら株においてRNase Iをプラスミドから過剰発現させると、バイオフィーム形成能は低下した。更に、不活性型リボソームがRNase Iと結合し、RNA分解が抑制されることを、*in vitro*で示した。以上より、2',3'-環状ヌクレオチドの合成が、RNase Iおよび不活性型リボソームにより制御されることが分かった。

次に、RNase I欠損株 (Δrna 株) および上述の不活性型リボソーム蓄積株の、マウス腸管内での定着性を調べた。これら株の培養液をマウスに経口接種した後、腸管内での定着性を解析した。その結果、実験に用いた全ての週齢マウスで、これらの株がコントロール株に比べて高い腸内定着能を示すことが分かった (図1)。また、これらの株が盲腸から大腸にかけて定着の様子が観察された。

今回明らかにした2',3'-環状ヌクレオチド、およびリボソームの休眠は細菌に共通することから、本バイオフィーム形成機構を応用することで、細菌に普遍的な腸管内定着性技術の確立が期待される。

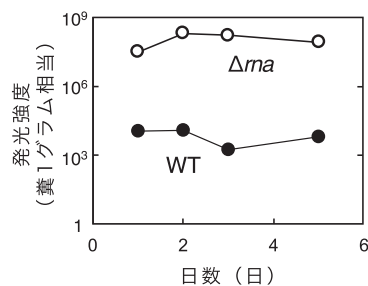


図1 RNase I欠損株のマウス腸内定着性

大腸菌の呼吸鎖変異株が示す異常代謝の解析と産業利用

横田 篤

【目的】大腸菌の呼吸鎖はNADH脱水素酵素（NDH）と末端酸化酵素（Cyt）から成り、プロトン駆動力（PMF）形成能の異なる成分を含む（図1）。我々は大腸菌のエネルギー代謝と糖代謝の関係を解析中に、PMF形成能の高い二つの呼吸鎖酵素である、I型NADH脱水素酵素（NDH-I）と、*bo*型末端酸化酵素（*Cytbo*）を同時に欠失させた変異株（ $\Delta\Delta$ 株）が、生育の低下、中枢代謝の活性化及び、グルタミン酸と酢酸の異常蓄積を示すことを見出した。本研究では、このような $\Delta\Delta$ 株における野生株では観察されない異常な代謝を引き起こす原因を明らかにすることを目的とした。

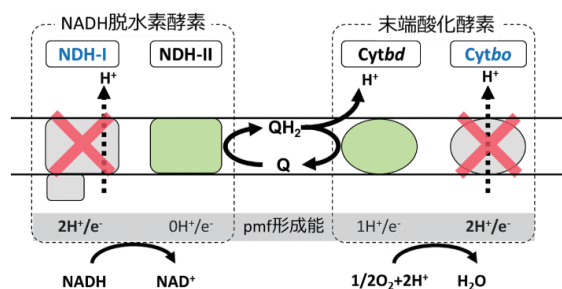


図1 大腸菌の呼吸鎖成分とそのPMF形成能。

【方法】 $\Delta\Delta$ 株におけるグルタミン酸と酢酸の蓄積が、エネルギーレベルの低下、または酸化還元バランスの偏りのどちらのエネルギー代謝の攪乱によって引き起こされているのかを明らかにするために、 $\Delta\Delta$ 株においてNADH再酸化系の強化を試みた。そこで、大腸菌が有する*ndh*にコードされるPMF形成能が無いII型NADH脱水素酵素（NDH-II）を $\Delta\Delta$ 株において過剰発現させる系を構築し、エネルギーレベルに影響を与えずに酸化還元バランス（ NAD^+/NADH 比）の是正を試みた。 $\Delta\Delta$ 株とその親株である野生株 *Escherichia coli* W1485株（W株）、さらに $\Delta\Delta$ 株に低コピープラスミド pMW119 に *ndh* をクローニングしたIPTG誘導型 *ndh* 過剰発現プラスミド（pMW119/*ndh*）を導入したNDH+株について、50g/Lのグルコースを含む無機塩発酵培地を用いたジャーフェーマンターによるバッチ培養を行った。これらの株について、生育、糖消費、NDH活性、呼吸活性、 NAD^+/NADH 比、及び有機酸やグルタミン酸濃度を測定した。

【結果・考察】 $\Delta\Delta$ 株においてNDH-IIの過剰発現を誘導したNDH+株は、100 μM のIPTG添加誘導時（NDH+100）に非誘導時（NDH+0）と比較して最大生育量が増加し、W株と同程度となった。一方、*ndh*誘導時の比増殖速度や糖消費速度は $\Delta\Delta$ 株と同程度の値を示したことから、 $\Delta\Delta$ 株における最大生育量の低下は主に酸化還元バランスの偏りによって引き起こされている一方、比増殖速度の低下や糖消費速度の上昇はエネルギーレベルの低下によって引き起こされていることが示唆された。また、NDH活性及び、呼吸活性を測定したところ、NDH+株は *ndh*誘導時に $\Delta\Delta$ 株と比較して約2倍のNDH活性を示し、呼吸活性も約1.3倍に上昇していた。さらに、NDH+株は *ndh*誘導時に野生株と同程度の NAD^+/NADH 比を示した。このことから、NDH-IIの過剰発現により、 $\Delta\Delta$ 株における酸化還元バランスが野生株並みに改善されたことが確認された。有機酸生産量を調べたところ、 $\Delta\Delta$ 株では最大約9g/Lの酢酸を生成した一方、NDH+株では *ndh*誘導時に野生株同様に培地中に酢酸はほとんど検出されなかった（図2）。これに対して、グルタミン酸の異常蓄積はNDH-IIを過剰発現しても解消されなかった（図2）。

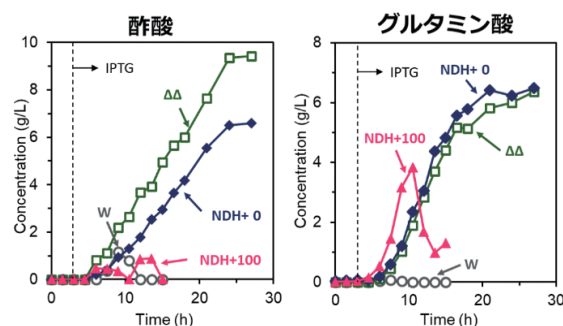


図2 $\Delta\Delta$ 株及びNDH-II過剰発現株による酢酸及びグルタミン酸生成量の変化。

以上の結果から、NDH-IIの過剰発現はNADHの再酸化能を強化し、NADHによって阻害されるTCAサイクルが活性化されたことで、酢酸へと向かっていたカーボンフローがTCAサイクル方向へ流れたと考えられた。これにより菌体を形成する前駆体物質の供給が増加したことで、最大生育量が増加したと思われる。一方、 $\Delta\Delta$ 株におけるグルタミン酸の異常蓄積に関して、酸化還元バランスの影響は限定的であると考えられた。

ω3系高度不飽和脂肪酸の微生物変換の解析とその応用に関する研究

小川 拓哉

【目的】 エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) は ω-3 系高度不飽和脂肪酸の一種であり、人の健康維持・増進に有益な脂肪酸である (図1)。これまでに EPA/DHA 生産性の真正細菌や真核微生物が発見され、これらの微生物を利用した EPA/DHA 生産系の開発を目指して研究が進められてきた。既往の研究によって EPA/DHA の生合成に関する理解は深まったが、一方で、EPA/DHA の分解や変換といった他の代謝経路や代謝制御の研究報告は乏しく、EPA/DHA 代謝の包括的な理解には至っていない。EPA 生産菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は EPA の *de novo* 合成能を持つとともに、細胞外 DHA から EPA をつくるユニークな代謝変換能を有する。微生物による EPA/DHA 代謝の知見を広げ、それらの応用可能性を検証するため、本 DHA-EPA 変換を担う代謝酵素の同定と機能解析に取り組んだ。

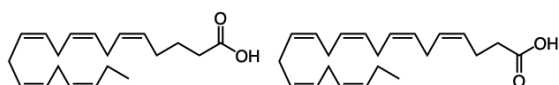


図1 EPA (左) と DHA (右) の化学構造

【方法】 DHA から EPA へ変換される過程で2炭素と C=C 二重結合が1つ失われることから、β酸化、あるいは類似の代謝反応によって本変換が進むことを想定し、4位の C=C 二重結合の還元に必要な2,4-ジエノイル-CoA還元酵素 (DECR, FadH)、および、β酸化反応の初発ステップを担うアシル-CoA脱水素酵素 (ACDH, FadE) に注目した。*S. livingstonensis* Ac10 が持つ複数の FadH および FadE ホモログについて、遺伝子破壊株の脂質組成の分析と、組換え酵素を用いた *in vitro* アッセイを行い、本代謝変換への関与を検討した。また、β酸化を介して DHA から EPA を生じるには、β酸化を1サイクルで終結する必要がある。この代謝制御機構を調べるため、*in vitro* での DHA-EPA 変換の再構成、および、EPA を細胞膜リン脂質へ導入するアシル基転移酵素 PlsC1 の遺伝子破壊株の作製とその脂質分析を行った。

【結果・考察】 本菌が持つ6つの FadH ホモログについて遺伝子破壊株を作製したところ、*sl_1351* 破壊株における DHA-EPA 変換は親株と比べて7.4倍低下した。また、*Sl_1351* の組換え酵素を調製し *in vitro* で酵素活性を検討

したところ、DHA の2,4-ジエノイル-CoA 体に対して DECR 活性を示した。これらのことから、DHA から EPA への変換に *Sl_1351* の寄与が重要であることがわかった。次に、本菌が持つ2つの FadE ホモログ (*Sl_1016*, FadE1; *Sl_1037*, FadE2) についても遺伝子変異解析を行ったところ、*fadE1* 破壊株において DHA-EPA 変換が低下した。また、特異抗体を用いて発現レベルを調べた結果、培養液への DHA の添加によって FadE1 の発現が上昇した一方で、FadE2 の発現レベルは低いまだだった。さらに、*in vitro* アッセイの結果、組換え FadE1 は DHA-CoA に対して ACDH 活性を示した。以上のことから、FadE1 が DHA-EPA 変換に必要な ACDH であることがわかった。

Sl_1351 (FadH) や *Sl_1016* (FadE1) は大腸菌 *Escherichia coli* の既知のβ酸化酵素群に高い相同性を示すことから、DHA は典型的なβ酸化酵素群によって EPA へと変換されることが強く示唆された (図2)。しかし、組換え酵素を用いて *in vitro* で DHA-EPA 変換の再現を試みたところ、十分量の補酵素の存在下では EPA のβ酸化が進むことが示唆された。したがって、β酸化を介して EPA を選択的に生じるには、β酸化酵素群のほかに別の因子が必要であることが考えられた。*S. livingstonensis* Ac10 において、EPA は主に細胞膜リン脂質のアシル鎖として存在し、アシル基転移酵素 PlsC1 の働きにより EPA はリン脂質へ導入される。そこで、*plsC1* 破壊株を作製し DHA-EPA 変換能を分析したところ、本変異株においては EPA の蓄積は認められなかった。このことから、EPA の蓄積に PlsC1 が関わることを示唆された。変換によって DHA から生じた EPA は PlsC1 によって素早く細胞膜へ取り込まれることで、さらなるβ酸化を免れる可能性が考えられ、現在、その詳細な分子機序の解明に向けて研究を進めている。

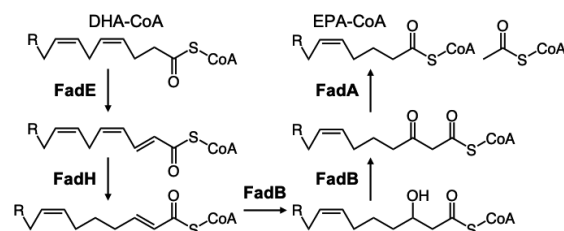


図2 想定される DHA-EPA 変換反応

電気的膜電位制御に基づく細菌間相互作用の制御法の開発とそのデバイス化の検討

長 峯 邦 明

【目的】 細菌は化学物質を介した相互作用により互いの機能（代謝活性、遊走、毒性発現等）を制御している。特に枯草菌では K^+ イオンをシグナル伝達物質とした膜電位依存的な代謝活性制御、及びシグナル伝達物質としての K^+ イオン分泌の膜電位依存の制御が明らかにされ、細菌の電気生理研究が加速しつつある。ここで膜電位とは、細菌の細胞内膜に蓄積された電位差である。

本研究の最終目標は、細菌と電極を一体化し、(1)デバイス化細菌への電気刺激印加によるシグナル伝達物質分泌制御と、(2)デバイス化細菌が周辺細菌からのシグナル伝達物質を受容した時の代謝活性変化の計測、という2つの機能を実現する送受信型細菌/電極ハイブリッドデバイスの確立である。これにより細菌間相互作用の把握と攪乱を実現したい。本助成期間ではその基礎研究として①電気刺激による膜電位制御法の確立と②細菌代謝活性の電気化学計測法の確立を目的とした。

【方法】膜電位制御実験

本実験で用いた *Bacillus subtilis* (枯草菌) は -140mV ~ -75mV の静止膜電位を有する。この静止膜電位より負に帯電することを過分極、より正に帯電することを脱分極と呼ぶ。膜電位はカチオン性蛍光膜電位プローブ Thioflavin T で可視化した。過分極では Thioflavin T が細菌内に蓄積し細菌から発せられる蛍光輝度が増加、脱分極では細菌外に放出され蛍光輝度が減少する。図1(a)に実験系の概略図を示す。電気刺激用電極には、通電時の水の電気分解による溶液 pH 変化を抑えるために高電気二重層容量の導電性高分子 poly (ethylene dioxythiophene) (PEDOT) を被覆した炭素電極対 (電極間距離 1mm) を用いた。Thioflavin T 処理した枯草菌を付着させた寒

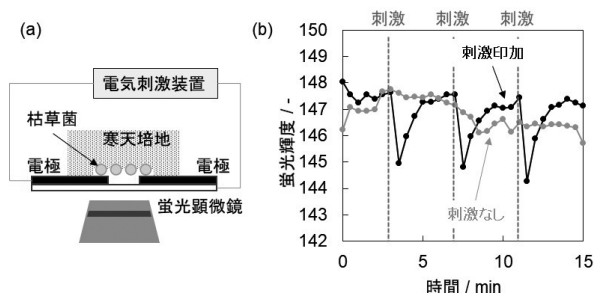


図1 (a) 実験セットアップ, (b) 枯草菌への電気刺激時の蛍光輝度変化。

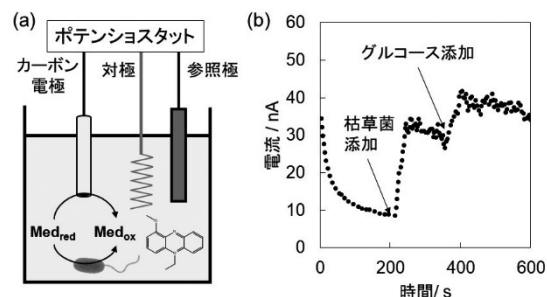


図2 (a) 実験セットアップ, (b) グルコースに対する枯草菌の電流応答。

天ゲルを電極対表面に貼付し、矩形パルス電流印加（電流 10mA, パルス幅 9.9ms, 周波数 100Hz, 印加時間 2.5s）を3回繰り返した時の蛍光輝度変化を30秒間隔で撮影した。

細菌の電気化学的代謝活性計測

ここでいう代謝は酸素を利用した好氣的代謝である。酸素を代替する酸化還元体（メディエータ）を用い、呼吸電子伝達鎖の酵素により還元されたメディエータを細胞外電極で酸化することで間接的にその活性を計測した。測定溶液である各種メディエータを含むリン酸緩衝液へ作用極、対極、および Ag/AgCl 参照極を設置し（図2(a)）、そこへの枯草菌、及び栄養源である 20mM グルコースの添加に伴う電流変化を計測した。

【結果・考察】 図1(b)に、繰り返し電気刺激印加時の蛍光輝度変化を示す。刺激印加により膜電位の過分極を反映した一過的かつ可逆的な蛍光輝度の増加が得られた。この過分極応答は生細菌でのみ得られ、細菌非存在下、及びオートクレーブ処理細菌や脱共役剤カルボニルシアニド *m*-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP) 処理細菌ではほとんど変化が無かった。現在、刺激前後の周辺 K^+ イオン濃度変化を定量しており分泌制御の可能性を引き続き調べている。

図2(b)は 1-methoxy-5-ethylphenazinium をメディエータとした枯草菌のグルコース代謝活性計測の結果である。枯草菌添加後の電流増加は内因性の代謝活性に起因する。その後、グルコース添加に伴い電流が増加したことから本手法の妥当性が示された。現在、高分子を用いた本メディエータと枯草菌の電極への固定化を引き続き検討している。

分裂酵母胞子表層タンパク質の特性を生かした 新奇の異種タンパク質発現・分泌生産・胞子細胞表面提示システムの構築

今田 一 姫

【目的】 分裂酵母の胞子は直径約3 μ mの球形で、凹凸のある強固な胞子壁に覆われている。胞子壁は主に多糖類からなるが、胞子壁の最外層はIsp3タンパク質によって構成されている。Isp3は減数分裂時に大量に発現し、将来の胞子の細胞質となる部分に蓄積する。前胞子が完成すると、細胞質部分に蓄積していたIsp3は、胞子の細胞外である子のう側に分泌され、その後胞子壁の多糖類層の外側にIsp3が定着し、Isp3層を形成する(図1)。

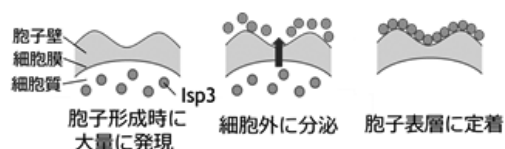


図1 Isp3の胞子形成過程における挙動

本研究は、胞子形成時に大量に発現する分裂酵母の胞子表層タンパク質Isp3の発現系とその挙動を利用して、異種タンパク質発現生産系を構築することを目的とする。胞子の細胞外である子のう側に分泌されるのに必要な領域を用いることでタンパク質の分泌生産システムを、胞子壁の最外層として定着するのに必要な領域を用いることで胞子表層に任意のタンパク質を提示する新しいタンパク質発現システムを構築できると考えられる。

【方法】 Isp3は182アミノ酸(aa)からなるタンパク質である。Isp3はプロリンが5つ連続する配列や、塩基性アミノ酸が連続する配列など、特徴的な配列を有している。Isp3の挙動に関わる配列を特定するため、この配列を特徴的な配列を元に分割し、GFPを融合させることで可視化した。本研究では、Isp3の一部分のC末端側にGFPを融合させたIsp3-GFPと、Isp3の一部分のN末端側にGFPを融合したGFP-Isp3を発現させるためのプラスミドを作製した。各種GFP融合Isp3の発現には、*isp3*プロモーターと*nmt1*ターミネーターを組合せて用いた。これらのプラスミドを分裂酵母の野生型株または*isp3 Δ* 株に導入し、GFPの蛍光観察を行うことでIsp3の局在を確かめ、Isp3が①分泌されない、②分泌されるが定着しない、③分泌され定着する細胞の割合を求めた(図2)。さらに、胞子が子嚢から遊離した後の胞子表層への定着を確認するため、胞子形成誘導後3日後と7日

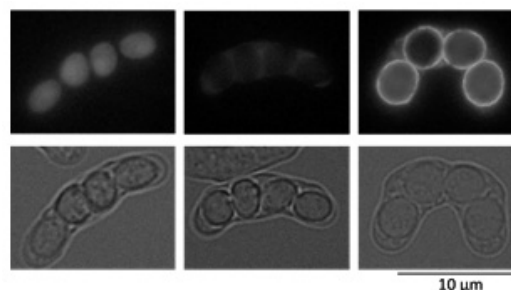


図2 GFP融合Isp3の局在

- (左) 胞子細胞外に分泌されない
- (中) 胞子細胞外に分泌されるが定着しない
- (右) 胞子細胞外に分泌され、胞子表層に定着する

後の遊離胞子においても蛍光観察を行い、GFP融合Isp3の胞子表層定着安定性を確認した。

【結果・考察】 Isp3の胞子細胞外への分泌と胞子表層への定着に必要な領域は明確には見つからず、領域の組合せによっては分泌率や定着率が低下するといった結果となった。このことから、Isp3の挙動には構造も重要である可能性が考えられる。胞子細胞外への分泌は、GFPにIsp3のN末端側20aaまたはC末端側52aaの領域を付与することで見られた。特にN末端側が分泌に重要であり、さらにN末端側52aaの領域で胞子壁の多糖類層に結合していることが示唆された。Isp3の胞子表層への安定的な定着には、Isp3の中央領域が必要であり、この領域は元のIsp3と結合することで定着に寄与していることが示唆された。胞子が遊離した後も安定して定着し続けるためには、この領域により元のIsp3層への組み込みが重要で、Isp3のN末端側による多糖類層への結合だけでは不十分であった。

このようなIsp3の各領域による挙動の違いを利用することにより、分泌率は高いが胞子表層へは定着しない*isp3 Δ* 株におけるIsp3(1-20aa)を用いた分泌生産システム、遊離直後は胞子表層へ定着するが時間経過とともに定着率が低下する*isp3 Δ* 株におけるIsp3(1-79aa)を用いた一時的な細胞表面への提示システム、遊離後も安定して胞子表層へ定着する野生型株におけるIsp3(1-47aa)を用いた胞子細胞表面への持続的な提示システムなど、用途に応じたタンパク質発現系を構築することができると考えられる。

耐熱性シアノバクテリアと微小電極を使って単光子を捉える

山野井 慶 徳

【目的】 自然界で行われている光合成では光電変換効率が約 100% を示し、デバイスに応用することができれば、高性能な光電変換素子を作製できる。そのため、光合成の反応中心である光化学系 I (PSI) や光化学系 II (PSII) を部品として光応答素子に組み込む試みが行われている。本研究では、PSI に着目し、生体-人工ハイブリッド電極の作製を行った。

【方法】 光化学系を用いた光電極を作製した時に問題となるのは、これらの電極接着時の配向性である。ルーメン側、ストロマ側以外の部分で PSI が電極と接触すると、タンパク質でおおわれているので絶縁性が高く、光電変換効率が落ちるといった問題がある。本研究では、PSI の配向性を高めるために、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の Psa E サブユニットに 6 つのシステインを導入し、図 1 に示すような白金ナノ粒子 (PtNP) ナノシートとの積層構造電極とした。加えて、電子伝達材料である Cyt *c* を積層させて電極と電解液中の犠牲試薬 (電子供給源) との電子伝達効率を高める試みを行った。

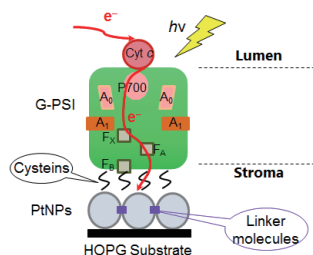


図 1 Cyt *c*-PSI-PtNP で構成された光電極の模式図

【結果・考察】 デバイスを作製するために、まず PtNP を合成し、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により PtNP の平均直径が 5.0 ± 1.0 nm であることを確認した。その後、Langmuir-Blodgett (LB) 法により PtNPs ナノシートを形成し、HOPG 基板上に貼り付けた。原子間力顕微鏡 (AFM) で観察したところ、ナノシートの厚さは 6 nm 程度であり、単分子膜の厚さとほぼ一致していた。その後、N-PSI (未処理の PSI) と Pt-S 結合と水素結合を介して PtNP を接続する分子ワイヤを固定化した。一方、陽極電流を発生させる設計では、ストロマ側に位置するタンパク質に 6 個のシステインを挿入して G-PSI (遺伝子組み換え PSI) を形成した。G-PSI は Pt-S 結合を介して PtNP と直接接続することができ、そのストロマ側が基質の方向

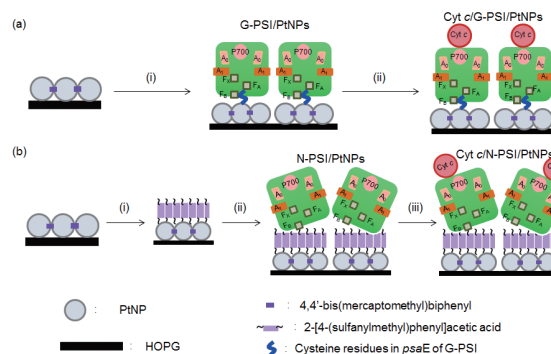


図 2 HOPG 上に (a) N-PSI と Cyt *c*、(b) G-PSI と Cyt *c* を固定化した電極の模式図

を向いていることが予想された。Cyt *c* とタンパク質コネクター BS³ の混合溶液を、PSI 層の上に滴下した (図 2)。

光電気化学測定及び可視吸収分光測定を行い、デバイスの性能を調査した。PSI/PtNPs の光電流を測定した。その結果、N-PSI の平均光電流密度は 13.8 nA/cm^2 であり、G-PSI の平均光電流密度 7.7 nA/cm^2 の約 2 倍であった。また、波長依存性光電流測定では、PSI の Q バンド吸収と同様のスペクトル形状を示し、PSI に由来する光電流であることが証明された。

次に、光導波路を用いて、PSI の可視吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルから、内部量子効率 (IQE) を算出した。その結果、G-PSI/PtNPs の IQE は N-PSI/PtNPs の IQE の約 2 倍となり、G-PSI の方向性が制御された結果であると考えられる。さらに、PSI 上に Cyt *c* をドロップキャストした後、N-PSI と G-PSI の光電流密度を測定したところ、それぞれ 42.3 nA/cm^2 と 14.4 nA/cm^2 に飛躍的に向上した。これは電子メディエーターとしての Cyt *c* が PSI 中の P700⁺ の還元を促進することに成功したことを示唆している。Cyt *c*/N-PSI/PtNPs の効率、Cyt *c*/G-PSI/PtNPs の効率をはるかに上回っていた。

この現象を明らかにするために、Cyt *c*/N-PSI/PtNPs の AFM 測定を行った。その結果、Cyt *c* の一部は N-PSI の上だけでなく、N-PSI の周囲にも固定化されていた。N-PSI の配向が不適切なため、最初は一部の PSI が利用されないと考えていたが、末端に結合した Cyt *c* によって PSI が活性化され、最終的には N-PSI の効率が大幅に向上した。

シアノバクテリアを用いた非枯渇性資源生産基盤株の開発

景山 伯春

【目的】 シアノバクテリアは光合成能を有し、増殖力が強いので、バイオ燃料等の有用物質生産プラットフォームとしての応用が期待できる。農作地等の土地利用との競合の観点から海洋を利用した培養が望ましいが、海洋性のシアノバクテリアは一般に遺伝子操作が困難である。その一方で、淡水性シアノバクテリアには容易に遺伝子操作できる株が知られている。これらの淡水性シアノバクテリアが海水レベルの塩濃度で増殖力を保ったまま培養可能となれば、有用物質の生産基盤株として利用できる。淡水性シアノバクテリアを耐塩性化する為には、まずシアノバクテリアの耐塩性機構を理解する必要がある。そこで、本研究では耐塩性シアノバクテリアを用いて塩ストレス耐性機構の分子基盤解析を行った。

【方法】 耐塩性シアノバクテリア *Halothece* sp. PCC7418 の細胞抽出液に含まれる蛋白質を2段階クロマトグラフィーの手法を用いて分離し、塩ストレス環境下において蓄積量が顕著に増加する蛋白質をN末端アミノ酸配列解析によって同定した。同定した蛋白質をコードする遺伝子を *Halothece* sp. PCC7418 からクローニングした後、大腸菌細胞内に導入して発現させた組み換え蛋白質を得た。この組み換え蛋白質は、酵素活性の生化学的解析に用いると共に、抗体作製の抗原として使用した。調製したウサギポリクローナル抗体を用いることで、対象蛋白質の細胞内動態を調査した。また、クローニングした遺伝子を発現ベクターに組み込み、これを淡水性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 に導入した。

【結果・考察】 *Halothece* sp. PCC7418 において強く塩誘導される蛋白質として、基本代謝酵素の一つであるI型のフルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ (FBA) (H2846と命名) を同定した。FBAは解糖系や糖新生に必須の酵素である(図1)。系統解析により、II型FBAがシアノバクテリアにおいて普遍的に存在するのに対して、H2846と相同性の高いI型FBAは耐塩性シアノバクテリアのみにおいて存在していることが明らかになった。また、H2846蛋白質の生化学的な機能解析を行い、フルクトース1,6-ビスリン酸を基質とする開裂反応の基本パラメータを求めた。 K_m 値は $21\mu\text{M}$ となり、これは既知のシアノバクテリアや高等植物由来のI型FBAと比較して概ね同レベルだった。

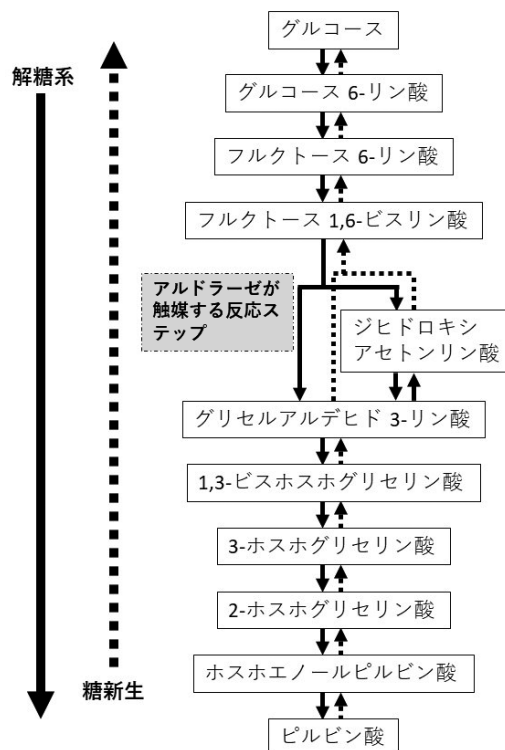


図1 解糖系と糖新生

続いて塩ストレス条件下における遺伝子発現パターン、蛋白質蓄積パターン、細胞内局在および複合体形成能について調査した。その結果、H2846蛋白質が細胞質とペリプラズム空間に局在し、ホモ六量体と推定される複合体を形成していることを明らかにした。さらに、H2846遺伝子を淡水性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 株に導入することで、耐塩性強化株を作出することができた。その後、H2846と *Halothece* sp. PCC7418 に存在するII型FBA (H2847と命名) との酵素活性比較解析をさらに詳細に行い、H2846の活性のみが塩ストレス環境下で上昇することを見出した。さらに、H2846の酵素活性は、*Halothece* sp. PCC7418 が塩ストレス環境下で合成・蓄積するグリシンペタインによって安定化することが明らかになった。これらの結果は、耐塩性シアノバクテリアにおいて、塩誘導されたI型FBAが基本代謝活性を保つことで耐塩性を増強していることを示唆している。

自己生成させたポルフィリン色素を光増感剤として利用する 光駆動型の微生物触媒反応によるバイオ水素生産

本田 裕 樹

【目的】水素は次世代のエネルギーキャリアとして注目され、今後の需要拡大が見込まれる。一方、工業的な水素生産は化石燃料の使用に依存しており、水素社会の実現に向けて、太陽光エネルギーを利用する水素生産系の構築に期待が寄せられる。本研究では、生体触媒の機能を巧みに活用した水素生産、具体的には、光-化学エネルギー変換能と水素生産能を同時に付与した組換え大腸菌を触媒とする新たな光水素生産系の構築を目指した。

【方法】①ポルフィリン色素の生合成経路の強化と、②高活性な水素生成能を示す [FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子群の発現、を同時に大腸菌に施し、生合成された色素による光エネルギー変換と、得られた還元力を用いる酵素での水素生産の共役により光水素生産の達成を目指した。

大腸菌 BL21 (DE3) での色素合成能の強化に向け、*Rhodobacter capsulatus* 由来アミノレブリン酸合成酵素 HemA、大腸菌由来 HemBCD を高生産させた。2YT 培地で培養後、陰イオン交換樹脂 (DEAE sephadex A-25) に色素を吸着させ、洗浄、溶出を経て上清から色素を精製した。吸光度、ESI-MS、HPLC 分析から色素を同定した。

精製した色素による光エネルギー変換能の確認には、色素、酵素への電子伝達を担うメチルビオローゲン (以下、MV)、電子供与体トリエタノールアミン (TEOA) を含む溶液に対して光照射 (405nm) し、光照射時間依存的な還元型 MV の生成を吸光度測定で追跡した。

大腸菌への水素生成能の付与に向け、[FeFe]-ヒドロゲナーゼおよび修飾酵素 (*Clostridium acetobutylicum* 由来) を生産させた。組換え大腸菌の懸濁液に、色素、MV、TEOA を加え、光照射時の水素生産を検討した。また、光水素生産への色素分子の適用可能性を明らかにするため、大腸菌懸濁液に色素エオシン Y (EY) と TEOA を添加し、光照射依存的な水素生産を検討した。

【結果・考察】以下の4つの実験から、色素分子の光増感反応と酵素反応を共役させる光水素生産系を構築した。

第1に大腸菌の色素合成能の強化により、培養液は赤く呈色し色素の合成が確認された。培養液上清から色素を精製し、各種分析を経て、生成された色素の主要成分は亜鉛が配位したウロポルフィリン III (Zn-UroIII) と同定された。

第2に、精製した Zn-UroIII を用いて MV の光触媒的還元を試みた。緩衝液中で MV と TEOA を添加し光を照射した際、光照射依存的に還元型 MV が生成した。MV は各種の金属酵素 (例えばヒドロゲナーゼやニトロゲナーゼ) への電子伝達体としての使用例が知られる。大腸菌で合成した色素による MV 光還元反応は、酵素反応との共役による光駆動型生体触媒反応の構築につながる。

第3に、精製した Zn-UroIII、TEOA、MV、水素生成能を付与した大腸菌を含む懸濁液へ光を照射したところ、光照射依存的に水素が生成した (図1)。水素生成量は微量であるが、生合成された色素を光増感剤とした光水素生産系が構築可能なことを示した。一方、当初予定した、色素合成能と物質生産能の両方を同時に組み込んだ大腸菌を用いる生体光触媒系の構築は、両者の条件が大きく異なるために未達成である。

第4に、EY と TEOA、大腸菌細胞の懸濁液を用いて、色素分子と大腸菌細胞による光水素生産が可能なのか検討した。懸濁液に 530nm の単色光を照射すると水素が生成した。EY と酵素間の電子伝達には MV の添加は不要で、シンプルかつ高効率 (見かけの量子収率 14%) な光水素生産が達成された。本結果は、本研究で掲げた色素による光増感反応によって酵素を光駆動するという考えをヒントとしており、新規な光水素生産系の提案につながる成果を得た。

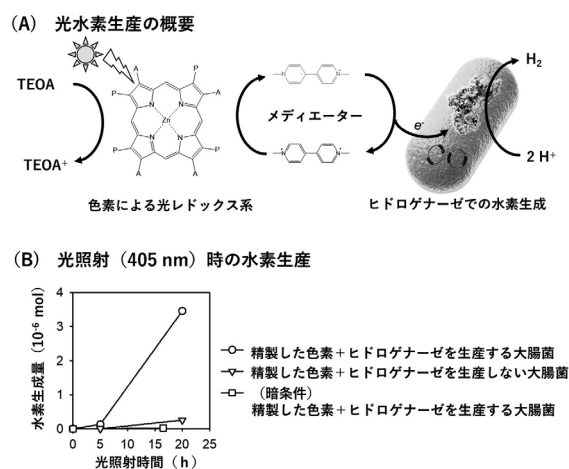


図1 精製した色素を用いた光水素生産

高耐熱性バイオポリエステル微生物生産のための遺伝子資源探索

柘植 丈治

【目的】 微生物が炭素貯蔵物質として細胞内に蓄積するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、海洋環境でも生分解が可能なバイオプラスチックとして、その利用に注目が集まっている。PHAの中でも α 位にメチル基が付いた3-ヒドロキシ-2-メチルブタン酸 (3H2MB) をモノマーユニットとするP (3H2MB) は、既存のPHAと比較して高耐熱性のポリマーである。現在、遺伝子組換え大腸菌を用いたP (3H2MB) の生産量 (蓄積量) は乾燥菌体重量の10wt%程度であり、PHAの生産量としては低い値である。P (3H2MB) の生合成経路において律速段階と考えられるのが、モノマー供給に関わるR特異的水和反応であり、その反応を触媒するR特異的エノイルCoAヒドラーゼ (*R*-ヒドラーゼ、PhaJ) が、基質であるチグリルCoAに対して活性が低いことが原因と考えられる。そこで本研究では、P (3H2MB) 生合成におけるモノマー供給酵素遺伝子を他細菌由来の*phaJ* 遺伝子に置き換えることで、P (3H2MB) 生産量の増強が可能かを調べることを目的とした。

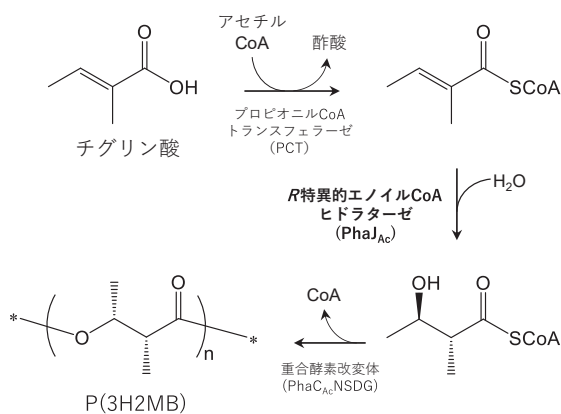


図1 P (3H2MB) の人工生合成経路

【方法】 *Aeromonas caviae* 由来のPHA生合成オペロンを組み込んだ大腸菌 (β 酸化欠損株) に、種々の細菌由来の*phaJ* 遺伝子を発現させ、チグリル酸を炭素源として30℃で76時間振とう培養した。チグリル酸は生育阻作用を示すため、4g/Lを2回に分けて培地に添加した。PHA含有量は細胞から回収したPHAの重量を用いて算出し、モノマー組成はガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を用いて調べた。

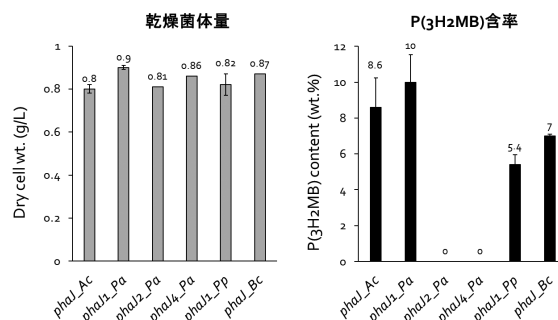


図2 種々の*phaJ* 遺伝子を用いたP (3H2MB) 合成結果

【結果・考察】 この研究で調査した*phaJ* 遺伝子は、*A. caviae* FA440 由来 *phaJ*_{Ac}、*Pseudomonas aeruginosa* DSM1707 株由来 *phaJ*_{Pa}、*phaJ*_{2Pa}、*phaJ*_{4Pa} の3種類、*Pseudomonas putida* KT2440 株由来の *phaJ*_{1Pa}、*Bacillus cereus* YB-4 株由来の *phaJ*_{BC} の合計6種類である。このうち、*P. aeruginosa* DSM1707 由来の *phaJ*_{2Pa} および *phaJ*_{4Pa} は、炭素鎖数6~12の基質に対して高い活性を示す中鎖特異的ヒドラーゼをコードしている。それ以外の*phaJ* 遺伝子は、炭素鎖数4~6の基質に対して高い活性を示す短鎖特異的ヒドラーゼをコードしている。

培養実験の結果、P (3H2MB) の合成が確認できたものは全て短鎖特異的ヒドラーゼを発現させたものであり、中鎖特異的ヒドラーゼ (*phaJ*_{2Pa} と *phaJ*_{4Pa}) ではP (3H2MB) の合成は確認できなかった。これまで用いていた *phaJ*_{Ac} 遺伝子よりもP (3H2MB) の合成量が増加したのは、*P. aeruginosa* 由来の *phaJ*_{1Pa} 遺伝子が発現させた場合のみで、収量は1.3倍に増加した。

次に、大腸菌の粗酵素液を用いて、PhaJ_{Ac} および PhaJ_{1Pa} のエノイル CoA に対する活性を測定した。PhaJ_{Ac} は、クロトニル CoA に対して7500U/mgの活性値 (A) を示したが、3H2MBの前駆体であるチグリル CoA には0.18U/mg (B) であり、その活性比 (B/A) は 2.4×10^{-5} と低い値であった。一方で PhaJ_{1Pa} では、クロトニル CoA に対して4200U/mgの活性値であるのに対して、チグリル CoA には0.16U/mgであり、その活性比は 3.7×10^{-5} であった。これより、PhaJ_{1Pa} は PhaJ_{Ac} よりもチグリル CoA に対して相対的に若干高い活性を有することが分かった。

以上のことから、チグリル CoA に対するR特異的ヒドラーゼ活性を上昇させることができれば、P (3H2MB) 収量を増加できる可能性が示唆された。

地下圏の難分解性有機物を電気微生物分解してメタンを生成する 微生物群集中の電子授受機構の解明

石井 俊一

【目的】海底下2kmの石炭層を含む下北沖掘削コア中から、メタン生成を行う地下圏微生物群が、低品位炭（褐炭）を基質としたDHSバイオリクター中にて集積された。その後、当該微生物群集を生物電気化学セル（Bioelectrochemical system, BES）に播種し、褐炭からの電気メタン生成運転を行った。本研究では、BES中の電極上に形成されるバイオフィーム中の微生物群集が、どのように褐炭を生分解し、電気エネルギーを介してメタンを生成するのかを明らかにするため、メタオミクス解析を行った。

【方法】炭素織布電極間に600mVの電圧印加を行うBES培養の2年および4.5年時に、陽極、陰極、および浮遊菌を回収し、DNAとRNAを共抽出した。その後、回収された核酸を用いて、メタゲノムおよびメタトランスクリプトームシーケンスを行った。DNAのリードは、CLC Genomics Workbenchを用いてDe novoアセンブリーし、Contigを作成後、Metagenome assembled genome (MAG)を作成した。Open reading frame (ORF)をMetaGeneMarkにより作成後、RNAリードをマッピングし、各遺伝子の相対発現量をRPKMで算出した。ORFはKAASを用いて機能アノテーションし、CXXCHドメインの検出により電極との電子授受を担うシトクロームCを同定した。

【結果・考察】単一コピーの保存遺伝子であるRpsCを使用した群集構造解析の結果、2年間の集積培養を行ったBES中においても、播種源のDHSバイオリクター中に存在する褐炭分解を担うと推測される各種バクテリアと、メタン生成を担うMethanobacterium属アーキアが保持されている事が分かった。しかし、陽極と陰極での微生物構造の差異は少なく、唯一、Desulfomicrobiumに属する硫酸還元菌が、陰極において多く見られた。これは、陰極において直接あるいは間接的に電極酸化・硫酸還元反応が行われている事を示唆している。4.5年が経過したBESにおいて、電子を収奪する陽極には発電性のGeoalkalibacter属細菌が集積しており、電子が供給される陰極にはCoriobacteriia綱、Thioalbus属、Anaerolineaceae科に属する細菌が見られ、播種源であるDHSリアクターの群集には見られない微生物群の増殖が確認された。また、メタン生成を担うMethanobacterium属アーキアも、播種源とは別の微生物が見られ、BES内で『電気』を

使用して褐炭分解のメタン生成を行う新たな機能性微生物群集が形成された事が示唆された。

続いて、両電極および浮遊菌群における全遺伝子発現解析を行った。その結果、陽極で増殖したGeoalkalibacter属細菌は、エタノールを栄養基質とし、多ヘム型シトクロームCによって電極への電子輸送を行う発電菌である事が示唆された（図1）。興味深いことに、浮遊状態においては、鞭毛遺伝子と別の多ヘム型シトクロームC（46ヘムや23ヘムなど非常に多くのヘム鉄を有する）を高発現しており、明らかに電極上と浮遊菌状態で異なる遺伝子発現挙動を示した（図1）。これは、この微生物が電気に依存して生きている事を強く示唆する結果である。陰極で高い遺伝子発現を示した微生物は、陰極に優占的に集積されている微生物群ではなく、水素資化性のメタン生成を行うMethanobacterium属アーキア、エタノール資化性の硫酸還元反応を行うDesulfomicrobium属細菌、ペプチドや多糖を栄養基質とするAnaerolineae綱細菌であった。この中でMethanobacterium属アーキアは、電流に伴い電子と水素イオンから生成される水素を使用することから、間接的電気合成微生物である事が示唆された。

以上の結果より、BESを用いて低品位炭（褐炭）の微生物電気分解反応を行うと、各電極上に特異的な微生物群集が集積し、陽極では直接電子授受が起こり、陰極では水素を介してメタンが生成される事が示された。また、エタノールが低品位炭分解における重要な中間代謝産物である事が分かった。

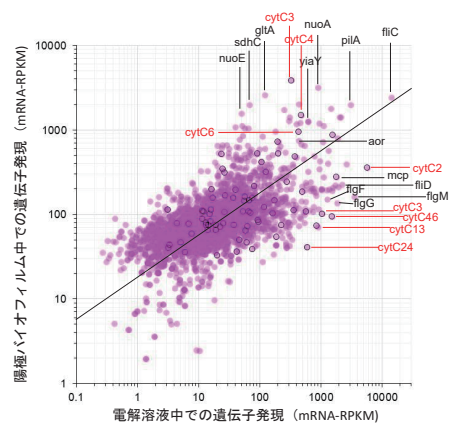


図1 BES中におけるGeoalkalibacterの遺伝子発現挙動

亜硝酸・硝酸イオントランスポーターが脱窒細菌の亜酸化窒素の親和性へ及ぼす影響評価

寺田 昭彦

【目的】 二酸化炭素の約 265 倍の温室効果を有する亜酸化窒素 (N_2O) は、農耕地や排水処理施設などで発生しており、削減が強く求められている。 N_2O の生成はアンモニア酸化微生物や従属栄養性の脱窒細菌による複数の反応経路が存在する一方、 N_2O の消費は脱窒反応の最終段階である N_2O 還元酵素を保有する細菌 (N_2O 還元細菌) や菌類による呼吸反応に依存している。これまで申請者は、 N_2O 還元速度が高く、かつ N_2O 親和性の高い細菌群の集積・単離を目指し、*Azospira* sp. strain I13 をはじめとする細菌種の動力学的特性を評価してきた。優れた N_2O 還元活性を示す *Azospira* sp. strain I13 のゲノムを確認すると、脱窒反応を担う遺伝子を全て保有していることを明らかにした。さらに、この菌株は他の *Azospira* 属の細菌と異なり、亜硝酸・硝酸イオントランスポーター遺伝子 (*nrt*) を保有しておらず、亜硝酸・硝酸イオンを効率的に細胞膜に取り込めない可能性が高いことを示した。この特徴は、 N_2O と亜硝酸・硝酸イオンが共存する環境下において、優先的に N_2O を電子受容体として利用できる可能性を示唆している。言い換えれば、従来の脱窒細菌のように N_2O 生成細菌として機能してしまう懸念が無く、 N_2O 消費を促進できる可能性が高い。そこで本研究は、脱窒細菌の亜硝酸・硝酸トランスポーターの有無や脱窒の遺伝子型が、 N_2O 還元能力に及ぼす影響を評価した。さらに、 N_2O 排出削減の有用細菌として、*Azospira* sp. strain I13 の利用可能性を検証すべく、酸素暴露後の N_2O 還元性能や温度依存性などの生理学特性評価を行った。

【方法】 本研究では、脱窒の遺伝子型や N_2O 消費に関する生理学的特性が類似している一方、*Azospira* sp. strain I13 (I13 株) と異なり *nrt* を有する *Azospira suillum* PS、研究室で単離された脱窒細菌 *Alicyclophilus denitrificans* strain I51 (I51 株) を含む 5 菌種を選定した。バイアル内を嫌気状態とした後、各細菌懸濁液に供給し、 NO_3^- を電子受容体、酢酸塩を電子供与体として、嫌気条件下での NO_3^- 還元速度の算出を行った。

次に、 NO_3^- 還元速度が 5 種類の中で最も高かった I51 株、最も低かった I13 株を対象に、 NO_3^- トランスポーターの阻害剤存在下での脱窒性能の評価を行った。阻害剤として塩素酸ナトリウムを異なる濃度で添加し、酢酸塩の存在下、安定同位体 ^{15}N でラベルされた NO_3^- ($^{15}\text{NO}_3^-$)

と非ラベルの N_2O ($^{44}\text{N}_2\text{O}$) を電子受容体として添加し、嫌気条件下で培養を行った。これにより、電子受容体である NO_3^- と N_2O のどちらが優先的に使われるかを体系的に評価した。

I13 株の N_2O 消費性能の回復能力を調査するため、好気環境への暴露により失活した N_2O 消費活性の回復ダイナミクスに関する評価を行った。評価には 10 mL のチャンバー内で溶存 N_2O および溶存酸素を精緻に追跡可能なマイクロレスピレーションシステム (Unisense, Aarhus, Denmark) を用いた。チャンバー内に I13 株の懸濁液を接種し、 N_2O と酢酸塩を供給した。チャンバーに挿入された微小電極にて溶存 N_2O と溶存酸素濃度を追跡し、 N_2O 消費活性の回復を定量的かつ時系列的に評価した。さらに、Michaelis-Menten 式およびアレニウス式を用い、I13 株の N_2O に対する親和性および比増殖速度の温度依存性をそれぞれ評価した。

【結果・考察】 $^{15}\text{NO}_3^-$ 還元速度を評価したところ、I13 株が最も低い値を示し、還元速度は同等の N_2O 消費性能を持ち *nrt* を保有する *Az. suillum* PS よりも 37% 低い値となった。試験に用いた 5 種類の N_2O 還元細菌のうち、*nrt* を欠損しているのは I13 株のみであり、 $^{15}\text{NO}_3^-$ トランスポーターの有無との関連性が示された。最も高い $^{15}\text{NO}_3^-$ 還元速度を示した I51 株の脱窒速度は、塩素酸塩の濃度上昇に伴い線形的に減少し、60 mg/L で完全に脱窒反応が阻害された。一方、I13 株の脱窒速度は適用した塩素酸塩の濃度範囲において影響を受けなかった。これより、 $^{15}\text{NO}_3^-$ トランスポーターが NO_3^- 還元活性に関与していることを示唆した。

次に、 ^{15}N でラベルした NO_3^- と N_2O の共存下での脱窒速度を評価したところ、I13 株は NO_3^- 還元よりも優先的に N_2O 還元が進行する傾向を示し、 NO_3^- 還元が優先して進行した I51 株と逆の傾向となった。I13 株は N_2O を効率的に消費するシンクとして機能することを示した。

さらに、酸素暴露後の I13 株の N_2O 消費活性は、他の細菌よりも早く回復した。一方、I13 株の N_2O に関する活性化エネルギーは既往研究で報告されている脱窒細菌よりも高かった ($114.0 \pm 22.6 \text{ kJ mol}^{-1}$)。低温環境下では N_2O 消費活性が低下するため、排水処理施設への適用には検討の余地を残した。

2018年度若手研究者助成の研究報告

助成期間：2018年4月～2021年3月

南北両極アイスコアに眠る古代菌類から見た過去70万年の菌類の進化とその環境適応

辻 雅 晴

【目的】 地球環境は過去70万年の間、氷期と間氷期を繰り返しながら大きく変動しており、このような過去の環境変動や生物起源物質は、南北両極の氷床に低温状態で連続して保存されている。南極や北極に生息している菌類は-40℃を下回る極限環境でも生存可能であることから、有機物の最終分解者として、極地での物質循環や生態系の維持に重要な役割を果たしている。しかし、菌類が過去の環境変動に対し、どのように適応し、進化してきたのかは未だに不明であり、このことが極地における生態系がどのように変遷し、維持されてきたのかを理解する上で障害となっている。そこで、本研究は、有機物の最終分解者である菌類が、氷期や間氷期のような過去の環境変動に対してどのように適応し進化してきたのかを、南北両極のアイスコアに眠る菌類を分離し、そのゲノムや生理生態学的な特徴を現世の菌類と比較することにより解明することを目的としている。

【方法】 アイスコアから菌類を分離する方法として、アイスコアを溶解させ、その溶けた水をフィルター過に変えることで、集菌する方法を採用した。また、アイスコアの表面は、ヒビ割れ、コアを採掘した人や外気などにより汚染されている可能性があるため、どのような菌類が実験環境による菌類の可能性のあるのかという情報を得て、その情報を分離した菌類の情報から差し引く必要があると考えた。そこで、実験環境由来の菌類を確認するため、未使用の培地と、クリーンベンチでの作業中に未使用の培地の蓋をしない状態で置いたものを併せてインキュベータで培養した。また、コアの外側25%から分離した菌も実験環境由来の菌類であると考え、コアの中心75%から分離した菌類のみをアイスコア由来の菌類と定義する事とした。

【結果・考察】 南極・みずほ基地(70°41'S, 44°19'E)の約1000年前、6000年前および約9000年前のコアから菌類の分離を試みた。その結果、約1000年前のコアからは担子菌類の5株、計2種を分離した。これらの菌株は全て菌類の分類に広く使用されているITS領域の配列で既知の種の配列と99%の相同性があった。約6000

年前からは計2株を分離。1株は近縁種が昭和基地から分離されている菌とITS領域の遺伝子配列で97%の相同性があった。もう1株は現生の菌類とはITS領域の配列で86%の相同性だったことから新属の可能性があったことが分かった。さらに、約9000年前からは2種の菌類を分離した。両種ともITS領域の配列で既知の菌類とは約56-64%の相同性だった。

次にドームふじ(77°19'S, 39°70'E)のアイスコアから約3000年前、4000年前、5000年前までの3つコアを利用し、菌類の培養を試みた。その結果、約3000年前のコアからは、5株の菌類を培養する事ができ、そのうち4株についてITS領域のシーケンスに成功した。これらの菌株は、既知の種の配列と95%の相同性があり、*Alternaria* sp. と *Aspergillus versicolor* とそれぞれ同定した。約4000年前のコアから分離した7株のうち3株についてはDNAの増幅が得られ、シーケンスに成功した。この3株は既知の種の配列と90~95%の相同性がありそれぞれ *Cladosporium iridis*, *Arthrimum* sp., *Vestigium* sp. と同定した。また5000年前のコアから分離した13株のうち7株についてはDNAの増幅に成功した。7株のうち4株は *Cystobasidium* sp., 2株は *Vestigium* sp., 残り1株は *Botryotinia* sp. だった。 *Cystobasidium* sp. は昭和基地周辺から報告された *C. ongulense* とITS領域で93%の相同性が、 *Arthrimum* sp. は最近縁種であった *Arthrimum marii* と94%の相同性が、さらに *Botryotinia* sp. は *Botryotinia ranunculi* と75%の相同性しかなかったことから属レベルまでの同定に留めた。

みずほ基地、ドームふじのコアから分離した菌類は共に、分離に使用したコアの年代が古くなるに連れ既知の菌類との遺伝子の相同性が低くなる傾向があった。このことから、今回分離した菌類は、古代菌類であったと考えた。本研究によりアイスコアから古代菌類の分離方法が確立した事から、今後生きた古代菌類の情報を得られる事になり、ゲノム解析による菌類の進化の解明や機能性遺伝子の産業利用など様々な分野への応用が期待できる。

発酵研究所助成研究報告集 第35号【非売品】

令和3年12月10日 印刷

令和3年12月20日 発行

編集委員長 横田 明
編集委員 大島敏久, 加藤暢夫, 高橋洋子
藤田正憲

発行人 樽井直樹

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
大阪市福島区玉川4丁目7-13