

シンポジウム プログラム&講演要旨



極限環境微生物学会 第8回シンポジウム

～環境中における微生物機能～

日時： 2007年7月3日 (火)
午後1時～5時40分
6時～8時 懇親会

交通：東急田園都市線
すずかけ台駅下車
徒歩五分

開催場所：東京工業大学
すずかけ台キャンパス
すずかけホール
(大学会館) 3F
多目的ホール

参加費：正会員：3000円
非会員：5000円
学生は会員、非会員
共に無料

懇親会費：一般：5000円
学生：3000円

プログラム (敬称略)

13:00-13:10 開会の挨拶

13:10-13:50 演者：北島富美雄 (九州大学大学院理学研究院 助教)
演題：「Archaeaが生産するテトラエーテル
脂質を用いた環境温度の推定について」

13:50-14:30 演者：木庭啓介 (東京農工大学大学院共生科学技術研究院 特任准教授)
演題：「安定同位体を用いた窒素循環研究
-微生物機能へのアプローチを目指して」

14:30-15:10 演者：津田雅孝 (東北大学大学院生命科学研究科 教授)
演題：「生態系での細菌ゲノム情報発現
-遺伝学的手法を用いた発現遺伝子群の探索」

コーヒーブレイク

15:30-16:10 演者：福田雅夫 (長岡技術科学大学生物系 教授)
演題：「PCB分解菌の芳香族分解遺伝子発現制御と環境応答」

16:10-16:50 演者：高尾祥丈 (水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所
日本学術振興会特別研究員)
演題：「ウィルス研究から明らかになった海産原生生物
ラビリンチュラ類の分解特性の多様性」

16:50-17:30 演者：鎌形洋一 (産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門長)
演題：「難培養性環境微生物の培養化と
微生物種間ネットワークの解析」

17:30-17:40 開会挨拶

18:00-20:00 懇親会 (すずかけホールラウンジ)

問い合わせ先
為我井秀行 (日本大学)
htamegai@chs.nihon-u.ac.jp

極限環境微生物学会 第8回シンポジウム ～ 環境中における微生物機能 ～

日時:2007年7月3日(火)午後1時～5時40分 (6時より懇親会の予定)

場所:東京工業大学 すすかけ台キャンパス すすかけホール 3F 多目的ホール

交通:東急田園都市線すすかけ台駅下車徒歩5分 (横浜市緑区長津田町 4259)

概要

テーマ:「環境中における微生物機能」

近年環境DNAの解析技術が進んで、環境中における微生物叢の解析が盛んに行われている。しかし実際にこれらの微生物が生命活動を営み環境と関連を持つのかについてはまだ不明な点が多い。今回のシンポジウムではさまざまなアプローチでこれらの課題に取り組んでおられる先生をお招きしてお話を伺う。

プログラム(敬称略)

13:00-13:10 開会の挨拶

13:10-13:50 北島 富美雄(九州大学大学院理学研究院 助教)

「Archaeaが生産するテトラエーテル脂質を用いた環境温度の推定について」

13:50-14:30 木庭 啓介(東京農工大学大学院共生科学技術研究院 特任准教授)

「安定同位体を用いた窒素循環研究-微生物機能へのアプローチを目指して」

14:30-15:10 津田 雅孝(東北大学大学院生命科学研究科 教授)

「生態系での細菌ゲノム情報発現 -遺伝学的手法を用いた発現遺伝子群の探索-」

コーヒーブレイク

15:30-16:10 福田 雅夫(長岡技術科学大学生物系 教授)

「PCB分解菌の芳香族分解遺伝子発現制御と環境応答」

16:10-16:50 高尾 祥丈(水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所日本学術振興会特別研究員)

「ウイルス研究から明らかになった海産原生生物ラビリントウ類の分解特性の多様性」

16:50-17:30 鎌形 洋一(産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門 部門長)

「難培養性環境微生物の培養化と微生物種間ネットワークの解析」

17:30-17:40 閉会挨拶

18:00-20:00 懇親会(すすかけホールラウンジ)

シンポジウム要旨

Archaea が生産するテトラエーテル脂質を用いた環境温度の推定について

北島 富美雄(九州大学大学院理学研究院 助教)

【はじめに】

1. 温度変化と脂質組成

バクテリアやアーキアは、環境の変化に対応して、細胞膜の物性を維持するために、膜脂質の組成を変える。バクテリアでは、温度の変化に伴い、脂肪酸の鎖長、二重結合の数、メチル側鎖の数などを変える。アーキアの場合、膜脂質にエーテル脂質を含むことが知られているが、その中にはテトラエーテル型脂質のイソプレノイド鎖の部分に五員環を持つものがある(図1)。 *Sulfolobus* や *Thermoplasma* などの好熱性アーキアでは、このイソプレノイド鎖に含まれる五員環の数は、増殖時の温度が高いほど増大する [1]。このような性質は、脂質組成が一種の温度計として利用できることを示唆するものである。また、イソプレノイド鎖のような炭化水素は、比較的年代の古い地質試料中にも残ることがあり、たとえば、白亜紀の地層中から見い出されたものも報告されている [2]。有機物を利用した過去の水温を推定するための温度計としては、ハプト藻が生産する長鎖アルケノンを利用した地質温度計が知られているが、エーテル脂質は、これと同様に利用できることが期待できる。われわれは、この性質を陸上熱水系における堆積時の温度を推定するための温度計として利用する試みを続けてきた [3]。

一方、Marine Group の Crenarchaeota はその大部分が培養できないアーキアであるが、イソプレノイド鎖に含まれる五員環の数は、やはり表面海水温度 (SST) と相関があることが指摘され、TEX₈₆ という指標 (Marine Group に特有の Crenarchaeol とその異性体をパラメーターとして含んでいる) を用いた温度計が提案されている [4]。この温度計の適用範囲は 0 °C から 30 °C である。Marine Group に近縁の古

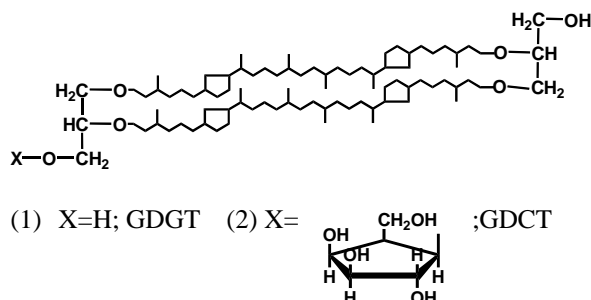


図 1. GDGT、GDCT の構造

細菌は、その後、海洋だけでなく中性・アルカリ性の陸水中にも発見されており [5]、TEX₈₆ を用いた温度計は、しだいに普及しつつある。しかし、この場合のエーテル脂質の生産者は、五員環数の温度依存性が最初に明らかになった好熱性アーキアではない。

2. 熱水系でのテトラエーテル脂質温度計

われわれは、これまで、好熱好酸性アーキアである *Sulfolobales* が生産するエーテル脂質に着目し、温度計として用いることを検討してきた。この温度計の適用範囲は 65 °C から 80 °C であり、酸性の熱水環境には Marine Group に近縁のアーキアが棲息しないところもあることから、陸上熱水系における温度計として、TEX₈₆ による温度計とはまた別の有用性を持つと期待できる。*Sulfolobales* は GDGT (Glycerol Dialkyl Glycerol Tetraether) の他に、グリセロール残基の一方がカルジトール残基となった GDCT (Glycerol Dialkyl Calditol Tetraether) を生産する(図1)。GDCT は *Sulfolobales* が特異的に生産するので、堆積物中から見い出された場合、生産者を特定するのに有利である。しかし、GDCT は分子量が大きく、このままの形では分析しにくいので、HI/LiAlH₄ 処理を行って、イソプレノイドに分解しな

なければならない。これは、時間と手間がかかるうえに、より多くのサンプル量も必要とする。GDGT は、分子構造そのものから生産者を特定することはできず、生産者に関する他の情報を必要とするが、分解を行うことなしに HPLC でより容易に分析できる点では有利である。われわれは、GDCT を用いた場合と GDGT を用いた場合、それぞれについて、熱水系において活用できる温度計の開発を試みた[3, 6]。

【実験】

1. GDCT 温度計 GDGT と GDCT では、平均環化率の温度依存性が異なっている。今までは、全エーテル脂質の環化率と温度の関係式しか利用できなかったが、われわれは、Sulfolobales を 65、70、75、80 °C で定常期まで培養し、新たに GDCT の平均環化率と温度の関係式を求めた。分析は、DeLong et al. [7] を一部改変した方法で、GDCT をイソプレノイドに分解し、GC-MS を用いて行った。得られた関係式を鹿児島県霧島温泉の 3 ヶ所（八幡地獄、湯の野地獄、銀湯）で採取した表層堆積物に当てはめ、古水温を推定した。

2. GDGT 温度計 Sulfolobales の 65、70、75、80°C の培養物の全脂質抽出物をメタノリシスし、Schouten et al. [4] の方法に従い、HPLC で分析した。Sulfolobales と Marine Group では、脂質組成が異なり、Sulfolobales は Crenarchaeol を生産しないため、TEX₈₆ をそのままの形で使うことはできない。そこで、GDGT 1 分子当たりの環化率（イソプレノイド鎖 1 本当当たりの環化率と区別して、C* で表す）を定義し、これと温度の関係式を求めた。また、銀湯で採取したコアサンプルを縦に 2 分割した後、さらに 2 分割した一方を 3cm ずつに分割し、それぞれから抽出した GDGT をメタノリシス後、HPLC で分析して古水温を推定した。また、TOC（全有機態炭素）測定およびアクリジンオレンジ染色による全菌数計測を行った。

【結果】

1. GDCT 温度計

1-1. 表層堆積物から得られた GDCT から推定した古水温は、全エーテル脂質から推定した古水温と 2 つの地点（八幡地獄、湯の野地獄）では 3 °C 以内で一致した。これは、GDCT による温度計の有効性を示すものである。

2. GDGT 温度計

2-1. 培養物の GDGT の環化率 (C*) と温度 (T) の間には、 $T=17.6C^*+7.0$ ($R^2=0.96$) の関係が見い出された。

2-2. 銀湯のコアサンプルの抽出物を HPLC-APCI-MS で分析したが、Marine Group に特有の Crenarchaeol とその異性体は検出できなかったため、ここには、Marine Group に近縁の Crenarchaeota は棲息していないと考えられる。また、Sulfolobales 以外の陸水における代表的な好熱性アーキアであり、やはりイソプレノイド鎖に五員環を持つ *Thermoplasma* の培養をここで採取した熱水から試みたが、増殖は確認できなかった。従って、この地点から得られる GDGT は、ほぼ Sulfolobales 由来と考えられる。また、コアサンプル内の生菌からの GDGT の寄与は、計測された全球菌数をすべて Sulfolobales の生菌数とみなしても、コアから得られた全 GDGT 抽出物の 1/100 以下と見積もられたため、無視できると考えられる。

2-3. 銀湯のコアでは、15cm 以深で 77°C 以上という高い推定温度が得られ、これは過去の地熱活動の活発さを示すものであると考えられる。また、9 から 12cm の部位で推定温度の低下、また、15 から 18cm の部位で TOC の低下が見られるとともに、この下の部位より堆積物の粒度が粗くなっていることから、まず堆積環境の変化が起こり、続いて温度が低下したことが示唆された。

【おわりに】

1. 五員環を持つテトラエーテル脂質を生産する好熱好酸性アーキアの分布

Sulfolobales は陸水に分布する好熱好酸性アーキアである。したがって、この菌が生産する脂質の分布は、Marine Group の Crenarchaeota の場合とは異なり、限定されたものとも予想される。しかし、五員環を持つテトラエーテル脂質を生産する好熱好酸性アーキアの分布は、今まで考えられていたよりはもう少し広い。たとえば、脂質そのものではないが、ODP で採取された海洋コアから *Sulfolobus* の rDNA が見い出されている[8]。また、最近、偏性好熱好酸性のアーキア (*Aciduliprofundum boonei*) が、深海底熱水噴出孔からは、はじめて単離されている[9]。このアーキアは五員環を持つテトラエーテル脂質を生産する。したがって、熱水系におけるテトラエーテル脂質温度計は、海洋を含め、もう少し広い範囲で利用できるかもしれない。

2. バクテリアが生産する五員環を持つテトラエーテル脂質

一方、バクテリアもエーテル脂質を生産することが最近さかんに報告されるようになってきた。これにはジエーテル型もテトラエーテル型もある。バクテリアのエーテル脂質は、アーキアのエーテル脂質のイソプレノイド鎖の部分がイソプレノイドではな

い炭化水素である。また、C-2 位の立体配置がアーキア型の sn-2,3 ではなく、バクテリア型の sn-1,2 である。こちらのテトラエーテル脂質の五員環数は、温度ではなく pH と相関があるらしい。また、炭化水素鎖の C-5、C-5' 位がメチル化されるが、その割合は温度と pH の両方に依存すると報告されている[10]。しかし、報告されている相関は必ずしも高くはなく、環境因子の何が脂質組成を主に決定しているのか、状況はまだ混沌としているとも言えるが、環境指標となる微生物由来の有機化合物が、現在、次々と提案されている。

【参考文献】

- [1] De Rosa M. et al. (1980) *Phytochemistry* **19**, 827-831.
 [2] Kuypers M. M. M. et al. (2001) *Science* **293**, 92-94.
 [3] Kitajima F. et al. (2003) *Geochim. Cosmochim. Acta* **67**, A220. [4] Schouten S. et al. (2002) *Earth Planet. Sci. Lett.* **204**, 265-274. [5] Pearson A. et al. (2004) *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5229-5237. [6] Kitajima F. et al. (2006) *Abstracts The Japan Geoscience Union Meeting 2006*, B220-P003. [7] DeLong E. F. et al. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1133-1138. [8] Inagaki F. et al. (2001) *Extremophiles* **5**, 385-392. [9] Reysenbach A.-L. et al. (2006) *Nature* **442**, 444-447. [10] Weijers J. W. H. et al. (2007) *Geochim. Cosmochim. Acta* **71**, 703-713.

シンポジウム要旨

安定同位体を用いた窒素循環研究

—微生物機能へのアプローチを目指して

木庭 啓介(東京農工大学大学院共生科学技術研究院 特任准教授)

ある生態系における物質循環像を描き出す際には、生息している生物群集の情報(特に機能情報)から駆動している物質循環を予想するアプローチと、物質の濃度変動を追跡することで物質循環像全体を予想するアプローチがあると考えられる。しかしこれまでの物質循環研究と言えればほとんどが後者を指している。その理由として、ある生態系に生息している生物群が持つ機能を類推することがきわめて困難であることが挙げられると発表者は考えている。しかし物質の濃度変動情報はおよそその物質循環像を描くことを可能にするものの、特に回転の速い生元素については、それらのフローを濃度情報のみで表現することは難しい。例えばリン酸は環境中で常に低濃度であり、その濃度の低さだけを議論するとすればリンの循環が行われていないという誤った結論に至ってしまう。そのため安定同位体の利用(ラベル化合物または同位体自然存在比として)が古くから行われてきた。

ところで近年の分子生物学的手法の発達は、ある環境に生息している微生物の群集構造について詳細な情報をもたらしてくれるようになった。そのため今後の物質循環研究は、ある環境中にどんな微生物が存在しているのかという最も基本的かつ重要な情報を手にした上での議論を行うことが可能になると期待される。例えば微生物の群集構造と生態系での物質循環について、分子生物学的手法と物質濃度・同位体比手法を駆使した研究は貧酸素水塊で盛んに行われてきている。これらの生態系では、メタンが物質循環の中で重要であり、かつ非常に特徴的な炭素同位体比を取ることが、微生物群集機能と物質循環を上手くつなげることを可能にしている点である。今後はこのような研究スタイルによって、物質循環

を駆動している主役である微生物群集構造と、そこから予想される機能群、そして発揮された機能の結果としての物質濃度を詳細に比較検討して行くことで、より良い理解が進むはずである。

しかし、重要な生元素の一つである窒素については、そのような形での研究スタイルはまだ確立されていないように思われる。微生物群集と機能の関係を解析する際には、例えばアンモニア酸化であれ脱窒であれ、様々な微生物が同じような機能を担っていることが困難を生んでいるように見受けられる。しかし、窒素固定における ^{15}N -DNA-SIPのような、手法の開発が今後様々な形で進むであろう。発表者はもう一方の物質濃度・同位体の分野での研究を行っているものとして、どのようなアプローチが微生物の機能に迫るために可能か、微生物生態研究と物質循環研究を積極的にリンクするためにどのようなアプローチが必要であるか、現在行っている研究の例をご紹介したい。

一つは、窒素同位体自然存在比($\cdot^{15}\text{N}$ 値)の利用である。残念ながらメタンのように生態系の中で特異的な同位体比を安定して持つ化合物は窒素循環の中では見あたらない。しかしアンモニウム、亜硝酸、硝酸、一酸化二窒素、窒素ガスという窒素循環を形作る物質は様々な酸化数を取っており、生成・消費が活発に行われていることから、自然界で $\cdot^{15}\text{N}$ 値は大きく変動する。すなわち $\cdot^{15}\text{N}$ 値の解析によって、窒素循環の再構築が可能であると期待できる。本発表ではこれら窒素化合物の中で、硝酸と一酸化二窒素に注目する。この2つの化合物は、好氣的環境で独立栄養的に生じる硝化と、嫌氣的で従属栄養的に生じる脱窒という、2つの相対するプロセスに関与している。

東京工業大学吉田尚弘教授の研究室では、一酸化二窒素の $\cdot^{15}\text{N}$ 値だけでなく、 $\cdot^{18}\text{O}$ 値、さらには直線分子である一酸化二窒素の中央と末端の窒素原子の同位体比の差 (Site Preference ; SP) の測定 (アイソトポマー測定) を行ってきた。そして近年、この SP によって硝化由来の一酸化二窒素と脱窒由来の一酸化二窒素を区別することが可能であるとの報告がなされている。このパラメーターがもたらす情報に、さらに硝酸についての $\cdot^{15}\text{N} \cdot \cdot^{18}\text{O}$ 値の情報も加えることでどのような解析が可能となっているか、森林地下水での研究を例として発表したい。

もう一つは ^{15}N ラベル化合物測定の簡便化である。上に挙げた窒素化合物中の ^{15}N 含有量を測定することは未だに煩雑であり、試料量を大量に必要とすることが多い (例えば 100 マイクログラム窒素)。そのため現在のところ、単一のプロセスにのみ着目して測定を行う、例えばアナモックス活性を測定する際は、発生する $^{29}/^{30}\text{N}_2$ のみの測定に終始してしまうことが多い。しかしラベル実験においては様々なプロセス (アナモックス活性測定であればアンモニウム同化、DNRA や一酸化二窒素の発生) がマイクロコブム中で同時駆動している可能性が多分にある。今後、

物質濃度変化と微生物群集構造とのマッチングを積極的に行ってゆくには、一つのプロセスだけに着目するのではなく同時進行している可能性のあるプロセスについて積極的に追跡して行く必要がある。特に競争関係にあるプロセス (脱窒と DNRA、アナモックス) の状況について濃度変動研究側から提供することは、機能ポテンシャルと実際に発揮されている機能との違いを解釈する際に非常に重要になると考えられる。

そこで現在、産業技術総合研究所の諏訪裕一博士のご協力の下、比較的安価である四重極質量分析計を利用し、硝酸の $\cdot^{15}\text{N} \cdot \cdot^{18}\text{O}$ 測定技術を応用した窒素酸素トレーサー測定技術を開発中である。硝酸、亜硝酸を一酸化二窒素に変換することでそれらの窒素と酸素のトレーサー含有量を、またアンモニウムについては硝酸に酸化して窒素のトレーサー含有量を比較的容易に測定することが可能である。この簡便な手法によって、主要な窒素化合物についてのトレーサー測定が可能となり、今まで見逃していた窒素フローを明らかにすることが可能となれば、微生物生態の情報とより良い議論が可能となると期待される。

シンポジウム要旨

生態系での細菌ゲノム情報発現

-遺伝学的手法を用いた発現遺伝子群の探索-

津田雅孝, 西山依里, 宮越昌利, 永田裕二, 大坪嘉行 (東北大・院生命科学)

様々な自然生態系から多種多様な生物現象を示す微生物株が数多く分離され、実験室で純粋培養したこれら微生物をいろいろな角度から検討することで、先人たちは個々の生物機能の詳細な分子メカニズムを明らかにしてきた。その一方で、複雑な物理的並びに化学的環境要因の大規模な変動に曝される複合生物系の自然生態系で、研究対象としてきた環境微生物が実験室で純粋培養したときと同じような様式で生物機能を発揮しているのかという、シンプルだが最も重要な問題は手をつけられなかった。一方、動植物病原細菌を扱う研究者は1990年代より、感染モデル生物を「培養装置」と見立て、この環境で菌の生存・増殖に必要な遺伝子や特異的に発現する遺伝子を探索・解析することで、病原細菌の「培養装置」での生きざまを明らかにし、病原性発揮に直接的並びに間接的に必要な遺伝子群の総合的理解を深めてきた^(1, 2)。このような方向性を持った研究は、微生物ゲノムの全塩基配列決定が容易になるにつれ、さらに進展している。他方、環境細菌においては、土壌などの自然環境を「培養装置」と見立て、本環境で生存・増殖に必要な遺伝子や特異的に発現する遺伝子を探索・解析する研究がなかったが、この数年の間に自然環境での微生物の特定遺伝子やゲノム全体の発現を解析する手法が急速に確立されてきた⁽³⁾ことから、このような研究が可能になりつつある。本講演では、土壌環境で実際に機能している遺伝子をどのように検索・解析するについて、我々の最近の研究例⁽⁴⁾を紹介する。

我々の研究室では、かつては *Pseudomonas* 属に分類されていた細菌で、土壌や水圏・植物表面などの多様な自然環境に常在する好気性 β -プロテオバクテリア *Burkholderia multivorans* の研究に取り組ん

でいる。本菌は、環境汚染物質も含めた極めて多様な有機化合物を *Pseudomonas* 以上に炭素・エネルギー源にできるが、ゲノムが3本環状染色体から構成される点でも通常環境細菌とは大きく異なる特徴をもつ⁽⁵⁾。*B. multivorans* ゲノムの全塩基配列を決定し、本菌が根圏土壌生態系で主要炭素源となる様々な芳香族化合物の好氣的分解酵素遺伝子群を数多くもつことを確認した⁽⁶⁾。現在、芳香族化合物をはじめとする多様な炭素・エネルギー源化合物の分解・代謝を中心としたゲノム微生物学的研究を実験室系で行っている。これと並行して、土壌で特異的に発現する本菌の遺伝子とこの環境での生存・増殖に必要な遺伝子の網羅的取得を、各々 In Vivo Expression Technology (IVET) (図1)⁽¹⁾ と Signature-Tagged Mutagenesis (STM) (図2)⁽²⁾ と呼ばれる遺伝学的手法で実施し、実験室系と生態系でのゲノム情報発現の違いの検討、この違いを規定する環境要因特定化、そして、ゲノムの各遺伝子への当該要因シグナルの情報伝達機構の解明を目指している。

我々が IVET に用いているプラスミド pEN3 では、*egf* がリジンと細胞壁前駆体ジアミノピメリン酸 (DAP) の合成に必要な酵素遺伝子 *dapB* で、レポーター遺伝子が *lacZ* である。*B. multivorans* ゲノム DNA 断片をプロモーターのない *dapB-lacZ* カセット上流に挿入した pEN3 誘導体ライブラリーを *B. multivorans* の *dapB* 欠損株ゲノムに相同組換えにより組み込んだ。取得した *B. multivorans* 誘導体ライブラリーを花崗岩質土壌に接種し、90日後にリジンと DAP、X-gal を含む最小寒天培地を用いて *B. multivorans* を回収した。1%未満の回収株で認められた白色コロニーでは土壌特異的に転写されるゲノム領域に pEN3 誘導体が挿入されたと推定された。こ

のような約 250 の土壌特異的発現遺伝子候補として、各種物質代謝 (41%)、物質透過系 (20%)、細胞表層成分合成系 (6%) に関わる遺伝子が 3/4 を占め、機能未知遺伝子が 1/6 ほどあった。物質代謝遺伝子にはアントラニル酸や μ -ヒドロキシ安息香酸、フェニル酢酸などの芳香族化合物分解に関わる遺伝子が約 2 割を占め、接種土壌にはこのような植物由来化合物が多く存在すると推定された。また、細胞表層成分合成系遺伝子の中には菌体外多糖合成酵素遺伝子があり、接種株の土壌粒子表面や粒子間隙での安定な定着・増殖に菌体外多糖が必要であろうと推定している。いくつかの「土壌特異的発現遺伝子候補」について土壌での候補遺伝子発現を LacZ 活性で測定し、上記の芳香族化合物分解や菌体外多糖合成に関わる遺伝子の土壌特異的転写を確認した。現在、このような遺伝子破壊株を作製して実験室系と土壌での挙動と、両環境での遺伝子発現制御の分子機構を検討している。

STM は基本的にはトランスポゾン挿入変異株ライブラリーから、目的とする遺伝子に変異がある株を効率よく negative screening する手法である⁽²⁾。我々は Tn5 をベースにした STM 系を使い、土壌での生存・増殖に必要な *B. multivorans* 遺伝子の取得を行っている。実際には、tag 部分が異なる 36 種のトランスポゾンを挿入した突然変異株を合計 7,000 ほど

取得し、tag 部分が異なる 36 のトランスポゾン挿入変異株をひとまとめにしたプールを 200 弱ほど作製した。現在までに、7 割のプールを IVET で用いた時と同じ花崗岩質土壌に接種、2 週間後に回収し、土壌での生存・増殖に必要な遺伝子に欠損がある 180 程の候補変異株を取得した。この中には、アミノ酸生合成系の突然変異株も存在し、遊離アミノ酸がほとんど存在しない土壌ではこれら変異株は増殖できないことを踏まえると、本 STM 系は、上記生合成系遺伝子以外の目的遺伝子取得にも有効と判断している。まだ目的遺伝子取得過程だが、取得変異株には物質取り込み輸送系やストレス応答の変異株が存在した。土壌では栄養分も少ないとともに様々な物理的並びに化学的要因によるストレスがたいへん多く、取得変異株は土壌環境で生存・増殖できないと推定している。今後、このような推定も考慮しながら各取得株の詳細な解析を進める予定である。

- 1) H. Rediers, et al.: Microbiol. Mol. Biol. Rev., 69, 217 (2005)
- 2) P. Mazurkiewicz, et al.: Nat. Rev. Genet., 7, 929 (2006)
- 3) S. Saleh-Lakha, et al.: J. Microbiol. Methods, 63, 1 (2005)
- 4) 津田雅孝ら: 化学と生物, 印刷中(2007年7月号)
- 5) E. Mahenthiralingam, et al: Nat. Rev. Microbiol., 3, 144 (2005)
- 6) Y. Ohtubo et al: in preparation

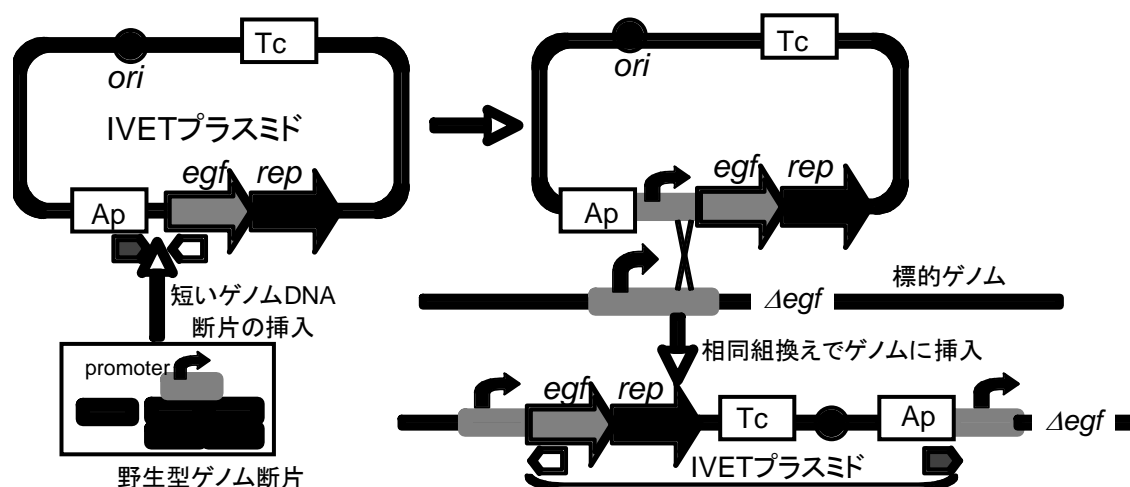


図1. IVETの原理. *egf*はあらゆる環境での生存・増殖に必須因子遺伝子で *rep*はレポーター遺伝子。IVETプラスミドは標的細菌株で複製不可能。本プラスミド上の *egf*と *rep*はいずれもプロモーターを欠く。

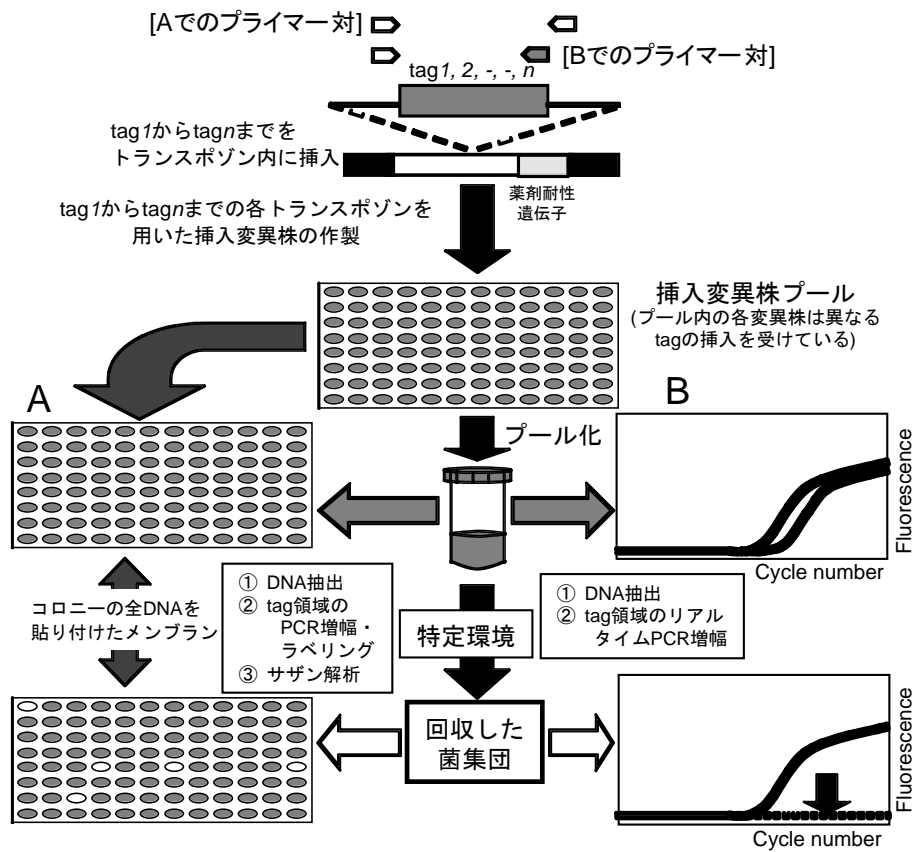


図2. STMの原理. 我々は「B」の手法を採用。[Bでのプライマー対]で、左側のプライマーは1種類の共通プライマー、右側のプライマーはtag毎で異なる可変プライマー。[共通プライマー]とn種の[可変プライマー]を同時に用いたPCRで、n個の特異的増幅断片の取得が可能。

シンポジウム要旨

PCB分解菌の芳香族分解遺伝子発現制御と 環境応答

福田 雅夫 (長岡技術科学大学生物系 教授)

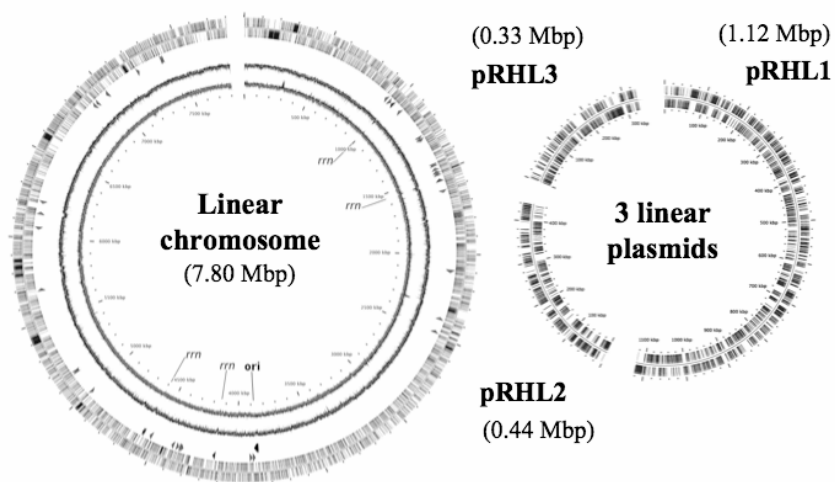
Rhodococcus sp. RHA1株は殺虫剤のリンデン (γ -HCH、 γ -BHCとも呼ぶ) 汚染土壌から分離されたPCB (ポリ塩化ビフェニル) 分解細菌でビフェニル代謝酵素系を利用してPCBを共代謝により分解する。PCB分解にかかわる酵素遺伝子の解析においてビフェニル/PCB分解経路上流の各ステップで複数のアイソザイムが関与することや多くの酵素遺伝子が2つの巨大な線状プラスミドに分かれてコードされていることから注目を集め、カナダ政府のプロジェクトとしてBritish Columbia大学に我々が協力する形でゲノム解析が進められた。一昨年にDNAシーケンスが完了してアノテーションを開始し、昨年秋に解析結果を報告することができた。その結果、RHA1株のゲノムは7.8 Mbの線状染色体、1.1 Mb、0.44 Mb、および0.33 Mbの3つの線状プラスミドで構成され、全体で9.7 Mbに及ぶ現時点で細菌最大のゲノムをもつことが明らかになった。アノテーションでは9,145のORFが見いだされ、その4割近くが機能未知であった。

ビフェニル代謝系酵素については多数のアイソザイム遺伝子が見いだされ、DNAアレイを用いた解析ではビフェニル/PCB分解経路下流のペンタジエン酸代謝経路の各ステップでも複数のアイソザイムが転写誘導されることが示唆された。さらにビフェニル生育時には300を超える遺伝子の転写レベルが上昇していることが示唆された。安息香酸やフタル酸での生育では転写レベルが上昇する遺伝子は100をはるかに下回るのに比べ、異常な数の遺伝子の転写レベル上昇である。ビフェニル/PCB分解経路上流のアイソザイム遺伝子は5つの遺伝子クラスターに配置されている。各遺伝子クラスターのビフェニルによる転写誘導が二成分制御系のBphS1T1により制御され

ていることをすでに明らかにしている。RNA1株にはBphS1T1と相同性の高いもう一つの制御遺伝子セットBphS2T2があり、ビフェニル以外のエチルベンゼンやトルエンなどの芳香族化合物が存在する場合はBphS1T1とBphS2T2が協調して各遺伝子クラスターの転写を誘導する。ビフェニルに対してはBphS2T2が応答しないため、BphS1T1のみが各遺伝子クラスターの転写を誘導する。しかしながら300を超える遺伝子の転写誘導が全てBphS1T1の支配下にあるとは考えにくく、これらの遺伝子の転写制御メカニズムに興味を持たれる。一方、ビフェニル/PCB分解経路上流酵素遺伝子の転写がグルコースにより抑制されることも見いだしている。DNAアレイを用いた解析では300近い遺伝子の転写レベルがグルコース存在下で低下していることが示唆された。*Rhodococcus*は放線菌の一種でグルコース抑制のメカニズムが明確になっていないが、ビフェニル水酸化酵素遺伝子(*bphAI*)プロモーターにおいてBphS1T1による転写誘導を受ける最小領域でグルコース抑制もかかることが示唆されている。

PCB汚染の浄化を考えると汚染土壌にRNA1株を導入して使用することが想定され、土壌中でのRHA1株の応答に興味を持たれる。そこで、農業環境技術総合研究所の小川直人博士(現・静岡大学農学部)らと共同で、RHA1株を滅菌土壌に接種して培養後、DNAアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを解析することを試みている。農業環境技術総合研究所のグループが試行錯誤の末、土壌から直接RNAを抽出する手法を確立した成果である。まだ具体的な結論を得るには至っていないが、土壌から直接調製したRNAでDNAアレイ解析が可能になった意義は大きいと考えている。

***Rhodococcus* sp. RHA1 genome, 9.7 Mb**



シンポジウム要旨

ウイルス研究から明らかになった

海産原生生物ラビリチュラ類の分解特性の多様性

高尾 祥文 (水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所日本学術振興会特別研究員)

1980年代の終わりに、海洋には夥しい量 (10^4 ~ 10^9 / ml) のウイルスおよびウイルス様粒子 (VLP: virus-like particle) が存在することが明らかとなって以降、様々な細菌や真核藻類に感染するウイルスが発見され、ウイルス感染が宿主の現存量変動に大きく影響していることが明らかとなった。またウイルス感染は、炭素や窒素、その他の栄養塩の循環に大きく寄与していると考えられており、海洋生態系においてウイルスの果たす役割の重要性に関する認識が高まりつつある。現在、海洋ウイルスに関する研究の多くは、細菌類や真核微細藻類を宿主とするウイルスを対象とするものであり、今日までに単離され研究材料として用いられている真核微細藻類感染性ウイルスの多くは *Phycodnaviridae* 科として分類される (もしくは *Phycodnaviridae* 科ウイルスと共通した性質を持つ) 大型 DNA ウイルスであるが、近年、小型 DNA ウイルスや RNA ウイルスも相次いで発見されている。これらのウイルスに関する分子生物学的な研究により、海洋ウイルスの多様性の一端も解明されつつあり、海産真核微細藻類に感染するウイルスに関する生態学的ならびに分子生物学的な理解は着実に深まりつつある。しかし無色従属栄養性原生生物を宿主とするウイルスに関する知見は非常に少ないのが現状である。

一方、ラビリチュラ類は海洋に生息する直径 5-20 μ m の無色の原生生物であり、クロミスタ界、ストラメノパイル生物群に属する生物群である。本生物群は極域から熱帯に至る沿岸域に広く分布し、現存量の豊富さ、ならびに高度不飽和脂肪酸の生産能力等の特徴から、海洋生態系における

重要な真核生物の分解者として注目されつつある。しかしながら、分類の混乱や検出・計数法の不備等の理由により、本生物群の詳細な生態学的知見は得られていない。

ウイルスは、宿主の存在なしには増殖することが不可能であり、その宿主特異性は非常に高いことが知られている。そのため、ウイルスの生態は宿主のそれと密接に関係しているおり、ウイルスの生理・生態について研究を行うことは、その宿主生物の生理・生態についても多くの知見をもたらすと考えられる。そこで、演者らは、日本各地の海域からラビリチュラ類感染性ウイルスの分離を行い、152株を確立した。これらのウイルス株は、その宿主域と遺伝学的・形態学的特徴に基づき「小型球形の1本鎖RNAウイルス (SssRNAV: ϕ 25 nm)」と「大型不定形ウイルス

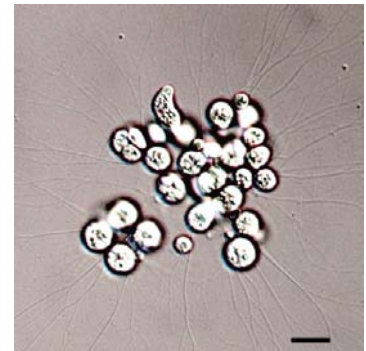


図1. ラビリチュラ類の光学顕微鏡像

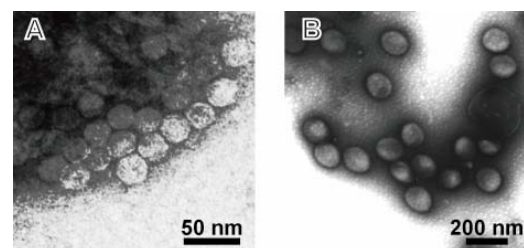


図2 ラビリチュラ類感染性ウイルス

A: SssRNAV B: SmDNAV

の2本鎖DNAウイルス(SmDNAV : ϕ 140 nm)の2タイプに群別され、それぞれのウイルスが宿主とする株はラビリンチュラ内で系統学的に大きく異なるクレードに属していることが明らかとなった。

さらに、2004年および2005年に広島県五日市港においてラビリンチュラ類感染性ウイルスの現存量調査を行ったところ、上述の2タイプのウイルスが検出された。前者は赤潮原因藻の一つ *Hakashiwo* による赤潮発生後に急増したのに対

し、後者は調査期間を通して急激な現存量の変化を示さず、両者の動態は著しく異なることが明らかとなった。両ウイルスの動態はそれぞれが宿主とするラビリンチュラ類の量的推移を反映していると考えられることから、ラビリンチュラ類群集中には、赤潮藻類の捕食ならびに死骸を積極的に分解するグループとその他の有機物を栄養源として有するグループとが共存しており、それぞれが全く性質の異なるウイルスの影響を受けている可能性が示唆された。

シンポジウム要旨

難培養性環境微生物の培養化と 微生物種間ネットワークの解析

鎌形 洋一 (産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門 部門長)

1. 地球上に存在する微生物の種の数はいくらいくらいか?

今日性質が解明され、命名されている微生物は5,000種にも満たないほどである。昆虫の65万種に比べれば、いかにその数が少ないかわかると同時に、微生物の種数が昆虫の種数より少ないはずはないであろうと思うのは当然のことである。それでは一体微生物の種数はどれくらいの数だけ存在するのであるか? その答えはもちろん誰も持ち合わせてはいない。ただ1990年、16S rRNA 遺伝子による多様性解析とは一線を画した研究として森林土壌を対象に、複雑微生物系全体から抽出した全DNAの解離曲線の解析結果から微生物種数を割り出した結果がある。それによれば土壌1グラムには 10^9 個オーダーの原核生物がいて、種数はおよそ10,000のオーダーであると推定された。しかし、2005年になって10,000種というのはひとつひとつの種の微生物が同じような数だけ存在していると仮定した値であり、実際には優占種と希少種がいてその種の総数は1グラムの土あたり1,000,000種のオーダーではないか、という驚くべき報告がなされた。ある特定の地理的位置にある森林土壌1グラムあたりの微生物種が1,000,000とすれば地球環境全体でいったい何種の微生物が存在するかは、天文学的数値とは言わないまでも、今日の我々の想像を大きく越えた値であることは疑いようがない。もっとも微生物の種とは何か、という本質的な点については今なお議論すべき問題は残している。だがその問題については敢えて問わないことにして、仮に地球上の全微生物種をさらに3桁多い1,000,000,000種とするだけでも、現在正確に記述された微生物種は全体のわずか0.0005%ということになる。

2. 難培養性微生物とは何か?

さて本演題である難培養微生物についてであるが、上述の0.0005%が培養可能な微生物であり、残りは培養困難微生物であると捉えるのは大きな誤りである。近代微生物学のおよそ100年の歴史の中で、正確な記述がなされてきたものは確かに5,000種程度であるが、培養されてもなんら記述されていない微生物も膨大であることは間違いのないところである。しかし、それを差し引いてもなお、多くの微生物が培養困難な微生物あるいは、(感覚的に)容易に培養できない微生物であることは疑う余地がない。活性汚泥、メタン発酵汚泥、ルーメン、バイオフィームなど微生物が非常に高密度に集積している系を顕微鏡で観察し、その後、適当な培地上で培養をして見ると、顕微鏡で見えた形態的多様性とは似ても似つかないほど、形状的に見てわずかな種類の微生物しかコロニーを形成していないことは、誰でも“直感的に”経験しているところである。

演者はこれまで多くの難培養微生物と対峙してきた経験から、難培養微生物を分類するとおおよそ以下のようなになると考えている。もちろんもっとさまざまな考え方や分類の仕方があることはご了承いただきたい。

(1) 生育速度が著しく遅い微生物：大腸菌の実験室での平均世代時間は30分である。筆者らの常識ではこの世代時間はいわば“非常識な”速さである。これまでに筆者らが培養に成功した微生物のうち平均世代時間が最も長かったのは1週間である。これは(基質濃度など条件によるが)液体培養でほぼ静止期に達するまで3ヶ月を要する長さである。実際の環境を考えた場合、有機物濃度が常に律速になっているが、それでも少しずつ供給されているような場

であれば増殖が速くなければならない必然性はない。

(2) 寒天でコロニーを形成しない微生物：これは先にも述べたが、そもそも寒天という物理化学的な足場の上でコロニーを作る微生物のほうが圧倒的に少ないと考えるべきである。自然界における微生物の生育の場とは鉱物粒子、植物遺体、動物消化管、水系、さらには他の微生物のバイオフィームなど多様であるから、寒天というのはむしろ特殊な場であると言えよう。

(3) 濁度として検知できない細胞数レベルで静止期を迎えてしまう微生物：このような微生物の代表例はアンモニア酸化細菌、鉄還元細菌、硫黄還元菌などであるが、その他にも同様の傾向を示すものもある。生成物阻害や基質や電子受容体の濃度律速で起きる場合が多い。

(4) 生育に一定以上の細胞濃度を必要とする微生物：微生物学の基礎は細胞ひとつからの生育を前提としている。したがって液体培養においては理論的にひとつの生きた細胞を接種すれば生育は開始するはずである。しかし、筆者らの経験では 10^3 から 10^5 以上の初期接種量が絶対必須な微生物が確かに存在する。これは *N*-アシルホモセリンラクトンによるクオラムセンシングと同様の効果を持つ生育因子あるいは近年 bacterial cytokine と呼ばれる Resuscitation promoting factor (Rpf) のような物質の存在を示唆するものである。

(5) 他の微生物の生育因子を必要とする微生物：これは上記(4)とも関連するが、異種微生物間のクロストークと呼べるような現象であり、精緻な解明が成されている例は少ないが、あらゆる環境が複雑微生物系によって成立している以上、異種微生物間のコミュニケーションや生育因子のやりとりはおそらく普遍的な現象ではないかと思われる。このような微生物は生育に必要な因子を供給する微生物が見つからない限り培養は困難である。筆者らは最近、活性汚泥中のある種の微生物(A)が別種の微生物(B)の生産する物質によって生育が著しく助長されることを見いだした。さらに微生物(B)の生産物は微生物(A)のみならず、種や属を越えた他の微生物(C)や微生物

(D)の生育を促進すること、さらに微生物(C)は属種の異なる微生物(G, F, I, J, K)の生産物によっても生育促進を受けることを明らかにした。これらのことは微生物間での物質のやり取りは我々が想像する以上に複雑多様であり、さまざまな微生物間のクロストークが行われていることを強く示唆するものである。

(6) 種間水素伝達を行う共生微生物：嫌気性微生物においては種間で主にやりとりされる分子は水素である。多くの嫌気性微生物は物質の分解過程で水素を発生する(水素発生型発酵微生物)。しかし、水素は一定以上の濃度まで蓄積すると、物質の嫌氣的酸化反応そのものを阻害してしまう。水素発生型嫌気性微生物群はこれを回避するために、発生する水素を速やかに除去する微生物を必要とする。特に脂肪酸や低級アルコール、芳香族化合物を分解する微生物にその傾向が顕著である。”水素除去者”は多くの場合、水素を用いて炭酸ガスを還元しメタンを作るメタン生成古細菌である。実際の複雑系を *in situ* hybridization などの手法で観察すると、水素発生を行う微生物を取り囲むように水素資化性メタン生成古細菌が存在している。このような水素発生型嫌気性微生物(嫌気共生細菌と呼ばれている)はほとんど例外なく分離培養が難しい。筆者らはこのような微生物の分離を試みてきたが、もっぱら分離にあたっては、水素を消費するメタン生成古細菌を共存させた共培養を行っている。

(7) 昆虫などに共生する微生物：昆虫の体内にはさまざまな微生物が共生しているのはよく知られている事実である。通常一種の昆虫に一種の微生物が共生しているが、時として複数種の微生物を共生させていることもある。最もよく研究されているもののひとつとしてはアブラムシの体細胞に共生している *Buchnera* と呼ばれる大腸菌と遠縁の微生物である。似たような細菌はカメムシを初めとする他の多くの昆虫にも見いだされている。数ある難培養微生物の中でこれらの微生物群はおそらく最も培養が難しい微生物であると考えられる。その最大の理由はこれらの微生物は宿主昆虫に極度に依存した生活環を持

ち、宿主とともに共進化したため、単独で生きてゆくために必要な多くの遺伝子を欠損させている。極言すればミトコンドリアのような運命をたどろうとしている微生物であり、もはや細胞の一器官の様相を呈しているといつてよいからである。

本講演では演者らが取り組んできた微生物の培養化の試みを通して得られた難培養性微生物の実体について概観したい。

極限環境微生物学会 極限シンポジウム委員会
委員長 為我井秀行 (日本大学)
副委員長 野尻 秀昭 (東京大学)
委員 伊藤 政博 (東洋大学)
佐藤 孝子 (海洋研究開発機構)
玉腰 雅忠 (東京薬科大学)
八波 利恵 (東京工業大学大学院)
道久 則之 (東洋大学)