

NUMBER 23

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

**RESEARCH  
COMMUNICATIONS**

**2009**

財団法人 発酵研究所

# RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 23



2009

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA (IFO)

Published by

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

*17-85, JUSO-HONMACHI 2-CHOME*

*YODOGAWA-KU, OSAKA 532-8686, JAPAN*

# 財団法人発酵研究所

理事長	森田 桂	
常務理事	中濱 一雄	
理事	大嶋 泰治 杉野 幸夫 早石 修 山田 秀明	岡見 吉郎 波多野和徳 別府 輝彦
監事	磯野 正雄	田浦 清
評議員	木村 光 竹内 昌男 富田 房男 中瀬 崇 本田 武司	駒形 和男 武田 光子 豊島久真男 古川 謙介 松原 謙一
顧問	坂野 勲	

## 目 次

第3回助成研究報告会の開催 .....	1
食品から分離された <i>Alicyclobacillus</i> 属細菌の種内遺伝的集団に関する研究 …後藤 慶一 …	5
自然生態系における無酸素環境下に分布する嫌気性原核微生物の 系統分類学的研究 .....	上木 厚子 …15
新規微生物間共生培養法によるメタン生成古細菌の分離培養と系統分類 .....	井町 寛之 …39
好熱性アーキア <i>Vulcanisaeta distributa</i> 及び関連菌株の地理的分布と 遺伝学的多様性に関する研究 .....	伊藤 隆 …57
小地域における微生物類の種多様性に関する集中的研究 .....	徳増 征二 …73
バイオフィルムを利用した環境修復技術の開発 .....	森川 正章 …99
III型分泌装置の Walker型 ATPase を中心としたタンパク質分泌メカニズム .....	林 史夫…117
マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム .....	宮田 真人…131

### 第3回助成研究報告会の開催

第3回助成研究報告会を平成21年6月4日千里ライフサイエンスセンター5階サイエンスホールに於いて開催した。今回は平成18～20年度に助成を受けた8名の研究者が3年間に得た研究成果を口頭発表した。参加者は約120名であった。

開会に先立ち、森田理事長から「微生物科学技術に関わる各分野の先生方からの支援でこの研究助成事業が順調に進んでいることを感謝し、今後も微生物科学の基礎を支える研究の助成をしてゆきたい。今回も新しい息吹を感じる研究報告がなされるのを喜んでいる。この研究報告会にはいろいろな分野の研究者に参加を頂いているので、活発な質疑応答をして、お互いにより理解を深めることが出来る有意義な会にしていきたい。」旨の開会の挨拶があった。

続いて助成研究者による研究報告がなされた。二つの研究課題のうち『(1) 微生物の分類学的研究および培養株の保存に関する研究』については駒形和男評議員（東京大学名誉教授）の座長のもとに、1. 食品から分離された *Alicyclobacillus* 属細菌の種内遺伝的集団に関する研究（後藤慶一）、2. 自然生態系における無酸素環境下に分布する嫌気性原核微生物の系統分類学的研究（上木厚子）、3. 新規微生物間共生培養法によるメタン生成古細菌の分離培養と系統分類（井町寛之）、4. 好熱性アーキア *Vulcanisaeta distributa* 及び関連菌株の地理的分布と遺伝学的多様性に関する研究（伊藤 隆）、5. 小地域における微少菌類の種多様性に関する集中的研究（徳増征二）の5題の発表があり、次いで『(2) 健康や環境に関する微生物の研究』については豊島久真男評議員（理化学研究所顧問）の座長のもとで、6. バイオフィルムを利用した環境修復技術の開発（森川正章）、7. III型分泌装置の Walker 型 ATPase を中心としたタンパク質分泌メカニズム（林 史夫）、8. マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム（宮田真人）の3題の発表が行なわれた。各演者の報告内容は本研究報告集に述べられている。8題の研究報告に対し、それぞれ核心に触れる質問や関連コメントがあり、活発な質疑応答と議論がなされて、お互いの理解を深める大変有益な報告会となった。今回は若手研究者の参加も増え、真に盛会であった。

報告会のあと、参加者の殆どが出席した懇親会が開催された。駒形和男評議員の挨拶に続き豊島久真男評議員の発声で乾杯をして、立食式のパーティが始められた。料理もお酒も盛り沢山で話も盛り上がりを見せた。報告会では時間の制約などで論議が尽くされなかった演題について、出席者と演者との間で詳細な質疑応答などもなされていた。これに加えて異分野の微生物研究者の間での和やかな歓談と交流が見られた。本報告会と懇親会がいろいろな分野の微生物科学研究者の交流の場になれば主催者側として誠に幸いである。

報告会と懇親会の模様の一部を以下の写真で紹介します。

(文) 坂野 勲

RESEARCH COMMUNICATIONS



森田 桂 理事長



座長 駒形和男評議員



座長 豊島久真男評議員



報告会

RESEARCH COMMUNICATIONS



後藤 慶一氏



上木 厚子氏



井町 寛之氏



伊藤 隆氏



徳増 征二氏



森川 正章氏



林 史夫氏



宮田 真人氏



懇親会

# 平成18年度研究助成の研究報告

助成期間：平成18年4月～平成21年3月



# 食品から分離された *Alicyclobacillus acidoterrestris* の 種内遺伝的集団に関する研究

後藤 慶一

三井農林株式会社 食品総合研究所 品質技術研究室

〒426-0133 静岡県藤枝市宮原 223-1

## Genetic diversity within *Alicyclobacillus acidoterrestris* isolated from foods

Keiichi Goto

Laboratory of Quality Control R & D, Food Research Laboratories, Mitsui Norin Co., LTD.  
223-1, Miyabara, Fujieda-shi, Shizuoka, 426-0133, Japan

We investigated the intraspecies genotypic variation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* to elucidate the correlation of phylogenetic relatedness and their spoilage ability (guaiacol producing ability) using 197 *A. acidoterrestris* strains. Phylogenetic analysis of the 197 *A. acidoterrestris* strains based on the 16S rRNA gene, *gyrB* gene and ribopattern revealed the presence of several groups and the rich genetic diversity of the species. Although levels of diversity varied between groups, the groups were mostly conserved in each analysis. The guaiacol production activity of the *A. acidoterrestris* strains varied widely among the strains under 5 hr incubation. Although most of the *A. acidoterrestris* strains (195/197) demonstrated relatively strong guaiacol production activity over 10 hr incubation, a few strains showed weak activity. Therefore, at least 24 hr cultivation is necessary to detect less active *A. acidoterrestris* strains. Comparison of the guaiacol production activity with the phylogenetic relatedness based on 16S rRNA gene, *gyrB* gene and ribopattern showed no correlation between them.

Key words: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, 16S rRNA gene, *gyrB* gene, ribopattern, guaiacol

## 緒 言

*Alicyclobacillus* 属細菌は、好熱性、好酸性、好気性のグラム陽性有孢子細菌で、*A. acidocaldarius* を基準種とし、これまでに19種、1亜種、2遺伝子種が報告されている。本属の一部の菌種の孢子が食品や飲料の殺菌工程をかいくぐり、異臭（特にグアイアコール）を伴った腐敗を引き起こすことで知られているが（Cerny *et al.*, 1984; Sprittstoesser *et al.*, 1994; Borlinghaus *et al.*, 1997; Wisse *et al.*, 1998; Eiroa *et al.*, 1999; Duong & Jensen, 2000; Jensen, 2000），本細菌の好熱性および好酸性という特殊な性質上、通常の培養方法では分離・培養が困難であったため、2000年以前は原因究明を含めた詳細な検討が行われる

ことはほとんどなかった。しかしながら、近年食品業界で本細菌が食品有害菌として取り扱われるようになってきたことを皮切りに、本細菌の分離法や検査法が確立され、国内外で研究が取り込まれるようになった。その結果、*Alicyclobacillus* 属は以前に比べて分類学的、食品微生物学的に非常に整理されることとなったが、同時に種内に表現形質の多様性があることが指摘されつつある。さらに、近年の調査では多くの新種の存在、また種内に遺伝的に異なる多数の集団が存在することが示唆されている。

そこで本研究では、*Alicyclobacillus* 属細菌の中でも最も重要な管理対象菌種である *A. acidoterrestris* について 16S rRNA 遺伝子、*gyrB* 遺伝子およびリボタイプ解析を行い、総合的に種内の遺伝的集団の存在を明らかにするとともに、その集団の相互関係を分類学および食品微生物学的な側面（異臭生成能および孢子耐熱性）から解明することを目的とした。

Table 1 Primers for 16S rRNA gene analysis

Primers for PCR amplification	
Forward primer	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
Reverse primer	5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3'
Primers for sequencing	
Forward primer 1	5'-GAGAGTTGATCMTGGCTCAGGA-3'
Forward primer 2	5'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-3'
Forward primer 3	5'-GGTTAAGTCCCGCAACGA-3'
Reverse primer 1	5'-TACCGCGGCTGCTGGCA-3'
Reverse primer 2	5'-TCGTTGCGGGACTTAACC-3'
Reverse primer 3	5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3'

Table 2 Primers for *gyrB* gene analysis

Primers for PCR amplification	
UP-1G (Forward)	5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA YGCN GNGGNAARTTYGG-3'
UP-2r (Reverse)	5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTC NACRTCNGCRTCNGTCAT-3'
Primers for sequencing	
UP-1S (Forward)	5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA-3'
<i>gyrS</i> -2F (Reverse)	5'-GAACAAGCSTTTTTRAATKCCGG-3'
<i>gyr</i> -Int-R (Reverse)	5'-CCGCGVACYTCRCTGTTGCC-3'
<i>gyrS</i> -4R (Reverse)	5'-GATTCCAGYACRCTTTTTCGCCG-3'
UP-2rS (Reverse)	5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC-3'

## 実験方法

**試料と培養方法** *A. acidoterrestriis* の基準株および参考株は ATCC (American Type Culture Collection) および DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) より購入した。さらに、国内外の食品企業10社および麻布大学から菌株を入手した。これら計212株を pH 3.7 に調整した YSG 寒天培地 (Goto *et al.*, 2007) にて 45°C で培養した。

**16S rRNA 遺伝子の解析** PrepMan® Ultra Reagent (Applied Biosystems 社製) を用いて 212 株より DNA を抽出した。得られた DNA 溶液を PCR 反作用 DNA template として用い、弊社開発の PCR 用プライマーを使用し、16S rRNA 遺伝子を PCR 反応で増幅させた (Table 1)。得られた PCR 反応産物は QuickStep™2 PCR Purification Kit (EdgeBioSystems 社製) を用いて精製した。PCR 反応産物を Big-Dye Terminator 反作用 template として用い、弊社開発のシーケンス反作用プライマーを

使用しシーケンス反応を行った (Table 1) . 得られた反応溶液は AutoSeq™G-50 (GE ヘルスケア バイオサイエンス社製) を用いて精製し, ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) を用いて塩基配列の解読を行った. 得られた塩基配列は国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) を用いた相同性比較により同定を行った.

**gyrB 遺伝子の解析** *gyrB* 遺伝子の塩基配列は, Yamamoto & Harayama (1995) および Kasai ら (2000) の方法に従い, 増幅した PCR 断片より決定した. *gyrB* 遺伝子の増幅に用いたプライマー配列を Table 2 に示した. 増幅した PCR 断片は, 0.8% low-melting-point agarose (SeaPlaque GTG ; FMC Bioproducts 社製) を用いて精製し, QIAquick gel extraction kit (Qiagen 社製) を用いてアガロースゲルより精製された PCR 断片を取り出した. シーケンス反応は, ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製) を用い, UP-1S, *gyrS*-2F, *gyr*-Int-R, *gyrS*-4R および UP-2rS のプライマー (Table 2) に基づいて行った. 得られたシーケンス反応産物より, ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) を用いて塩基配列の解読を行った.

**系統解析** 決定した 16S rRNA 遺伝子, *gyrB* 遺伝子の塩基配列および *gyrB* のアミノ酸配列を用いて系統解析を行った. マルチプルアライメントは CLUSTAL W version 1.8 (Thompson *et al.*, 1994) を用いて行った. アライメントによる欠損箇所は考慮せず, これらの系統解析から除外した. 系統樹は, MEGA 3.1 (Kummer *et al.*, 2004) を用い, 近隣結合法 (Saitou & Nei, 1987) , Kimura's two-parameter モデル (Kimura, 1980) および最大節約法 (Lake, 1987) に基づいて作成した. 系統樹における個々の枝の頑健性は, ブートストラップ法 (Felsenstein, 1985) を用いて評価した.

**リボタイピング解析** YSG 寒天培地上にて 45°C, 1 晩 (12-16 時間) 培養した *A. acidoterrestris* を *EcoRI* で制限酵素処理し, Riboprinter Microbial Characterization System (Duppont Qualicon 社製) を用い, 機器の取り扱い説明書に従って分析を行った. それぞれのバンドパターン (リボパターン) は, 近接するスタンダードマーカセットに基づき, Riboprinter に内蔵されたソフトウェアにより標準化

した. 得られたリボパターンは BioNumerics ver.2.5 (Applied Maths 社製) を用い, UPGMA 法に基づいて系統解析を行った.

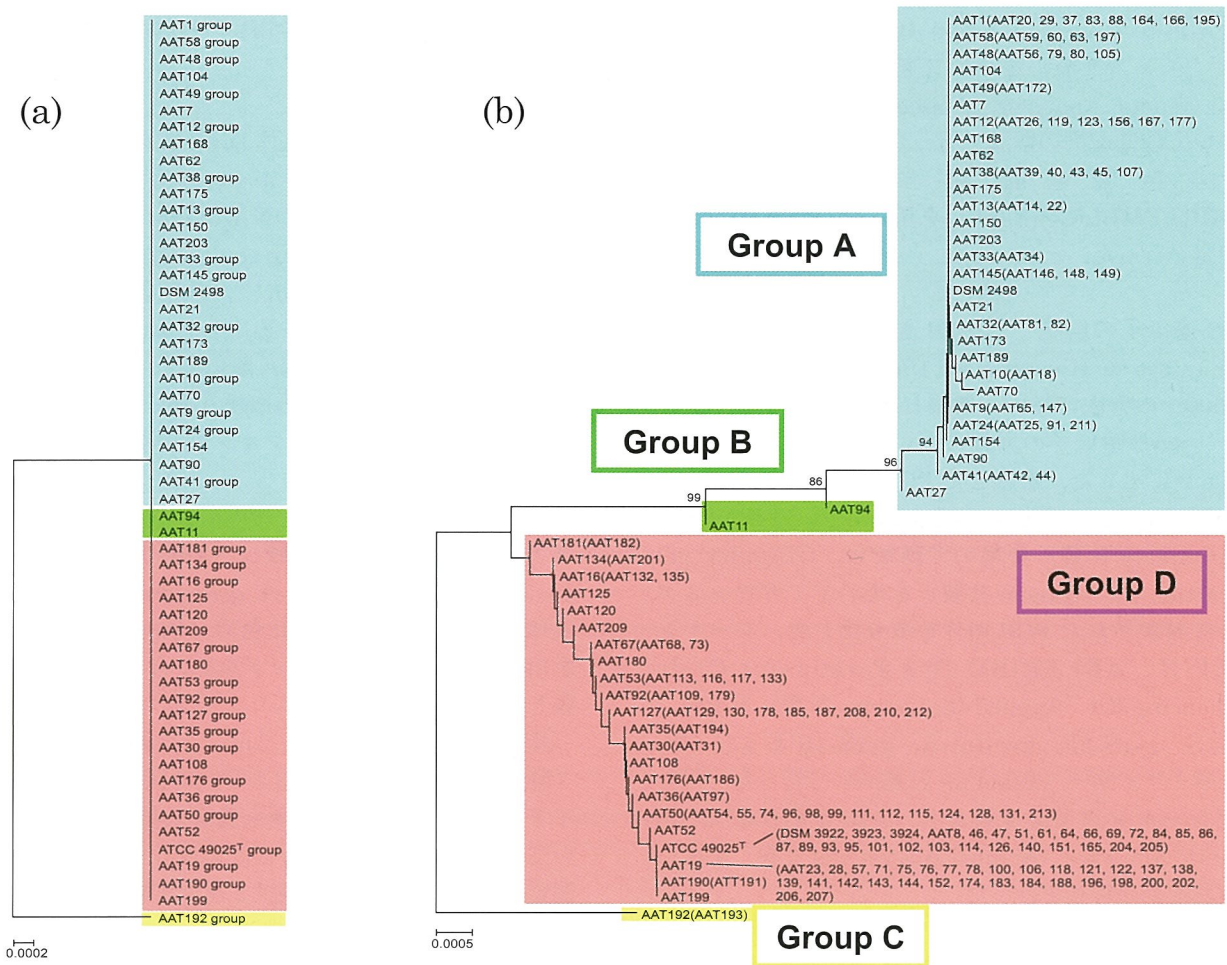
**DNA 類似性試験** 染色体 DNA は Qiagen Blood & Cell Culture DNA Maxi Kit (Qiagen 社製) を用いて調製した. 調製した DNA は Optimum™ MAX Ultracentrifuge (Beckman coulter 社製) の超遠心機を用い, CsCl 密度勾配法により精製した. 脱塩は Ultrafree-4 Centrifugal Filter Unit (Millipore 社製) を用いて行った. DNA 類似度は Ezaki らの手法に従って求めた. 試験は 3 回繰り返し, その平均を求めた. ハイブリダイゼーションは 65°C で 3 時間の条件で実施した.

**グアイアコール生産性試験** YSG 寒天培地上にて 45°C で 18 時間前培養した *A. acidoterrestris* を, YSG 液体培地を用いて懸濁し, 比色計 (BioMérieux 社製) を用いてマックファーランド 0.5 に合わせた. この調製した菌液 0.1 mL をバニリン添加の YSG 液体培地 (極東製薬工業(株)社製) 2 mL に接種し, 45°C にて 3 時間, 5 時間, 10 時間および 24 時間培養した. グアイアコール検出キット (極東製薬工業(株)社製) を用いて呈色させたサンプルを分光光度計 (470 nm) にて測定した. それぞれの測定は 2 連で実施した.

## 結果と考察

**16S rRNA 遺伝子の解析** 16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (約 1,500 bp) を決定した. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果, 212 株中 15 株は *A. acidoterrestris* とは異なる種であることが判明したため, これら 15 株については以後の試験から除外した.

*A. acidoterrestris* と同定された 197 株の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を Fig. 1 に示した. 多型部位を除いた系統樹 (Fig. 1(a)) では, 197 株の *A. acidoterrestris* は 2 つのクラスターに分かれ, 大部分の株 (195 株) は 1 つの巨大なクラスターを形成した. なお, 残りの 2 株は主要クラスターとは別となっているものの, その違いは 2 塩基のみであることから, これら 2 株も *A. acidoterrestris* に属すると考えられた. これは DNA 類似度の結果からも支持された (Table 3). 一方, 多型部位を考慮した系統樹 (Fig. 1(b)) では, 197 株の *A. acidoterrestris* は大きく 4 つのグループに分かれ (Group A~D), より多様性が見られる結果となった. Group A (73 株) は全体的に相同性が高いのに対し, Group D (120 株) は一部で相同性の高いクラスターが



**Fig. 1** Phylogenetic neighbor-joining trees based on 16S rRNA gene sequence (1,482 nt).  
 (a) Excluding polymorphic sites.  
 (b) Including polymorphic sites.

**Table 3** DNA-DNA relatedness

Species	Strain	Group	Similarity (%)		
			ATCC 49025 <sup>T</sup>	DSM 12489 <sup>T</sup>	DSM 14558 <sup>T</sup>
<i>A. acidoterrestris</i>	ATCC 49025 <sup>T</sup>	D	100	24	23
	DSM 3924	D	89	26	19
	DSM 3923	D	86	26	20
	DSM 2498	A	75	23	27
	AAT 92	D	72	29	26
<i>A. hesperidum</i>	DSM 12489 <sup>T</sup>	-	30	100	25
<i>A. acidiphilus</i>	DSM 14558 <sup>T</sup>	-	20	31	100

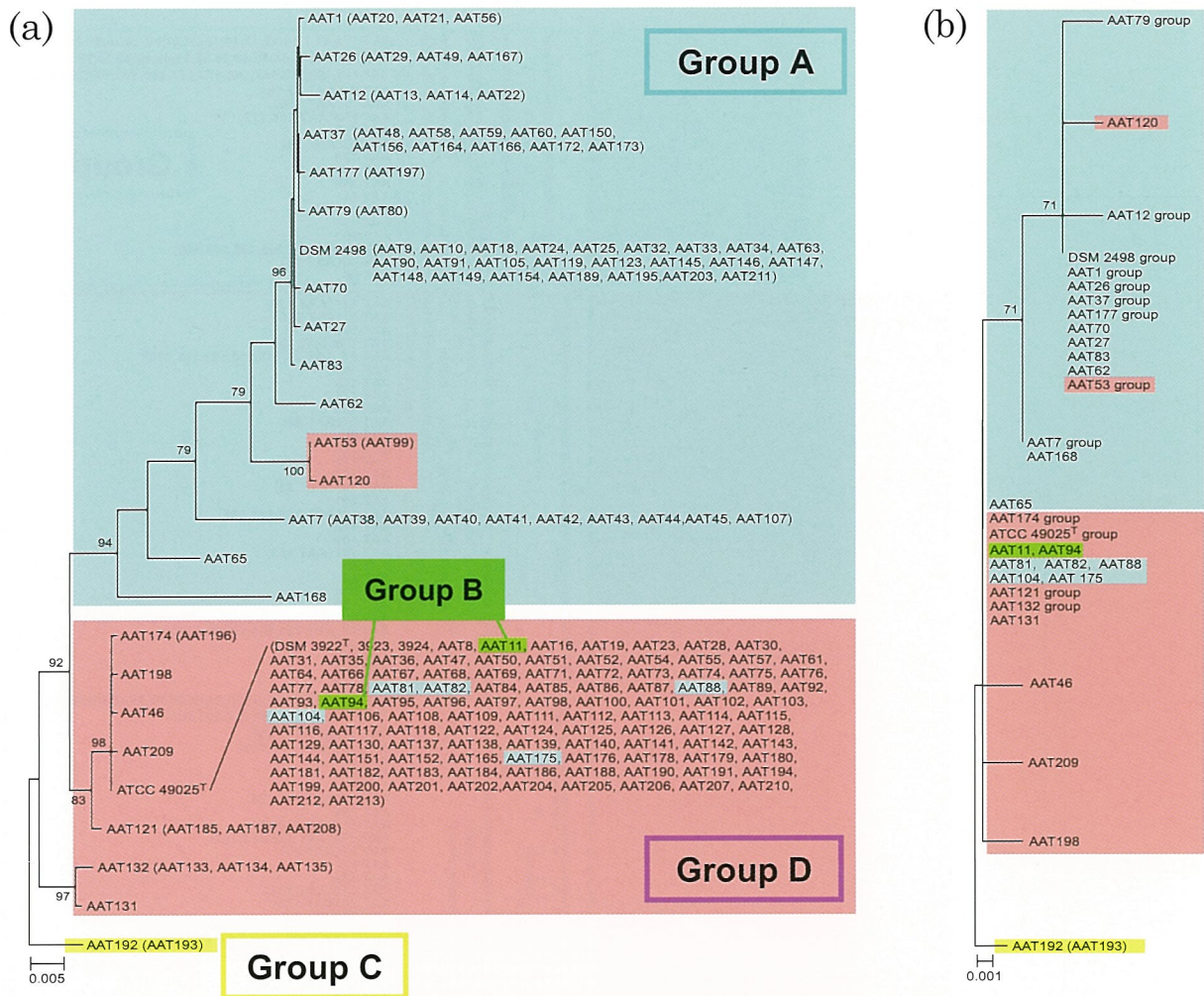


Fig. 2 Phylogenetic neighbor-joining tree based on *gyrB* gene sequence (1,170 nt, a) and *gyrB* amino acid sequence (390 aa, b).

存在するものの、Group A に比べて多様性が見られた。Group B (2株) および C (2株) は、その他のグループとは明らかに異なっていた。

また、これら4つのグループに含まれる菌株とそれらの分離源との関連を調べたところ、グループによる関連性などは見られず、様々な地域から様々な遺伝型の菌株が分離された(詳細は割愛)。有孢子細菌の場合、その耐久性から世界中に分散することが可能で、植生との関わりも薄いことからこの様な結果になったものと推察した。

***gyrB* 遺伝子の解析** *gyrB* 遺伝子の塩基配列(約1,170 bp)を決定し、系統解析を行った。16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹 (Fig. 1(b)) と同様に、*gyrB* 遺伝子の塩基配列に基づく系統樹 (Fig. 2(a)) においても197株の *A. acidoterrestris* は大きく2つのグループ

に分かれた (Group A および D)。Group C も同様に、その他のグループとは異なるクラスターを形成した。しかしながら、16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹 (Fig. 1(b)) において Group B に含まれていた2株は、*gyrB* 遺伝子に基づく系統樹では Group D (Fig. 2(a)) に含まれる結果となった。さらに、16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹 (Fig. 1(b)) において Group A に含まれていた5株と Group D に含まれていた3株が、*gyrB* 遺伝子に基づく系統樹 (Fig. 2(a)) ではそれぞれ Group D と A に含まれる結果となった。*gyrB* のアミノ酸配列に基づく系統樹 (Fig. 2(b)) では、197株の *A. acidoterrestris* は10個の異なるグループに分かれ、遺伝子の場合に比べて多様性は減少した。このような矛盾が何に起因するかについては今後の課題であるが、系統をまたがる置換が同じ種で複数見られたことは生物学的に大変興味深い。

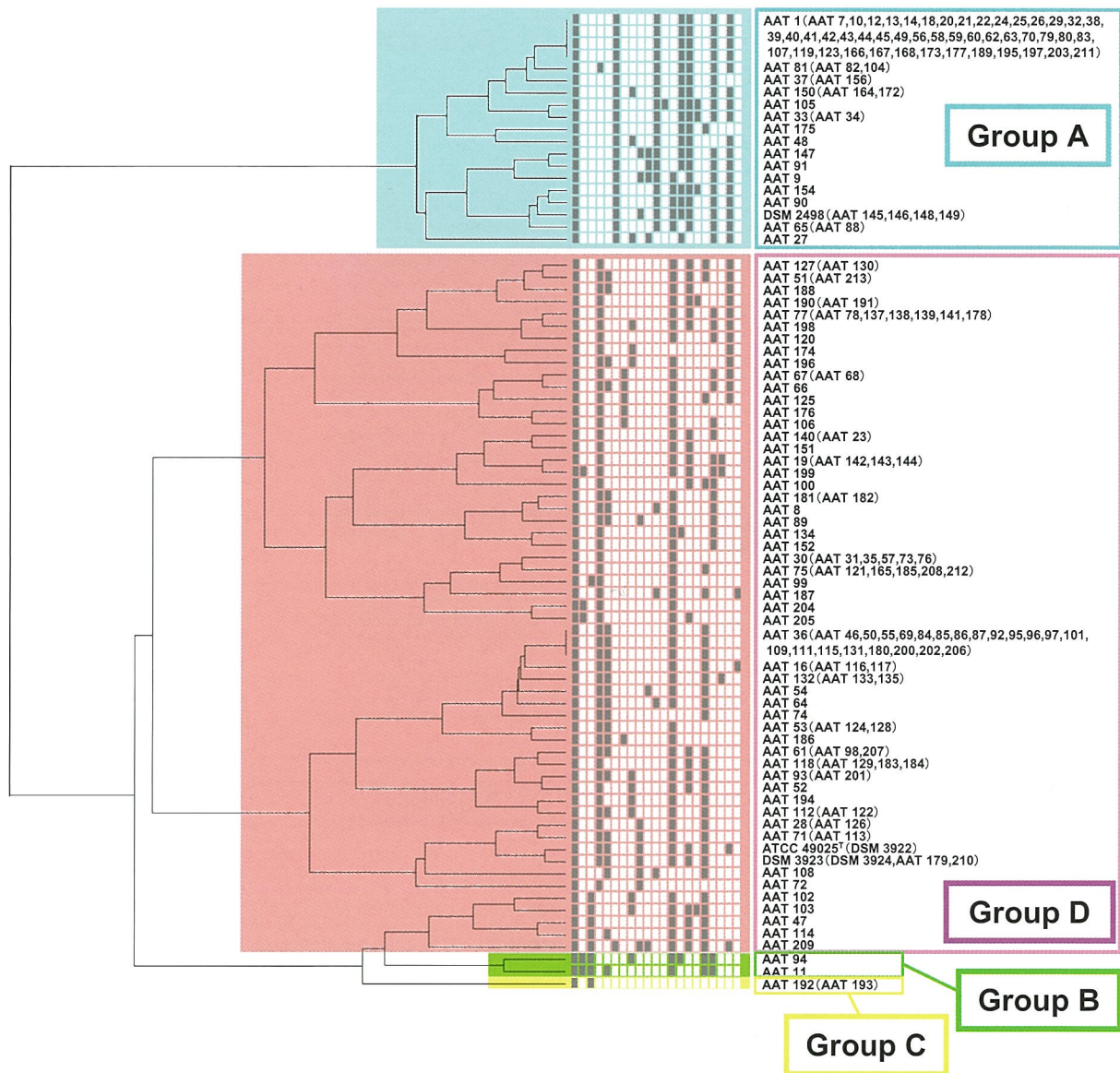


Fig. 3 Phylogenetic tree based on ribopattern.

リボタイピング解析 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹 (Fig. 1(b)) および *gyrB* 遺伝子に基づく系統樹 (Fig. 2(a)) と同様に、リボタイピング解析に基づく系統樹 (Fig. 3) においても 197 株の *A. acidoterrestris* は大きく 2つのグループに分かれた (Group A および D). Group B および C は、Group D に隣接してはいるものの、これらのリボパターンは Group D とは異なる結果となった。また、16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹 (Fig. 1(b)) と同様に、Group A のリボパターンは類似性が高かったものの、Group D のリボパターンはより多様性が見られる結果となった。

グアイアコール生産性 グアイアコール生産性試験の結果 (Fig. 4) より、培養時間 3~5 時間において *A. acidoterrestris* のグアイアコール生産性は菌株ごとに大きく異なる結果となった。しかし、これらの菌株ごとのグアイアコール生産性の違いは 16S rRNA 遺伝子、*gyrB* 遺伝子およびリボパターンといった遺伝的な系統関係と関連するものではなかった。培養時間 10~24 時間においては、大部分の株 (195 株) が高いグアイアコール生産性を示したが、2 株 (AAT 115 および 198) については低いグアイアコール生産性しか示さなかった。これら 2 株については、同じ Group D

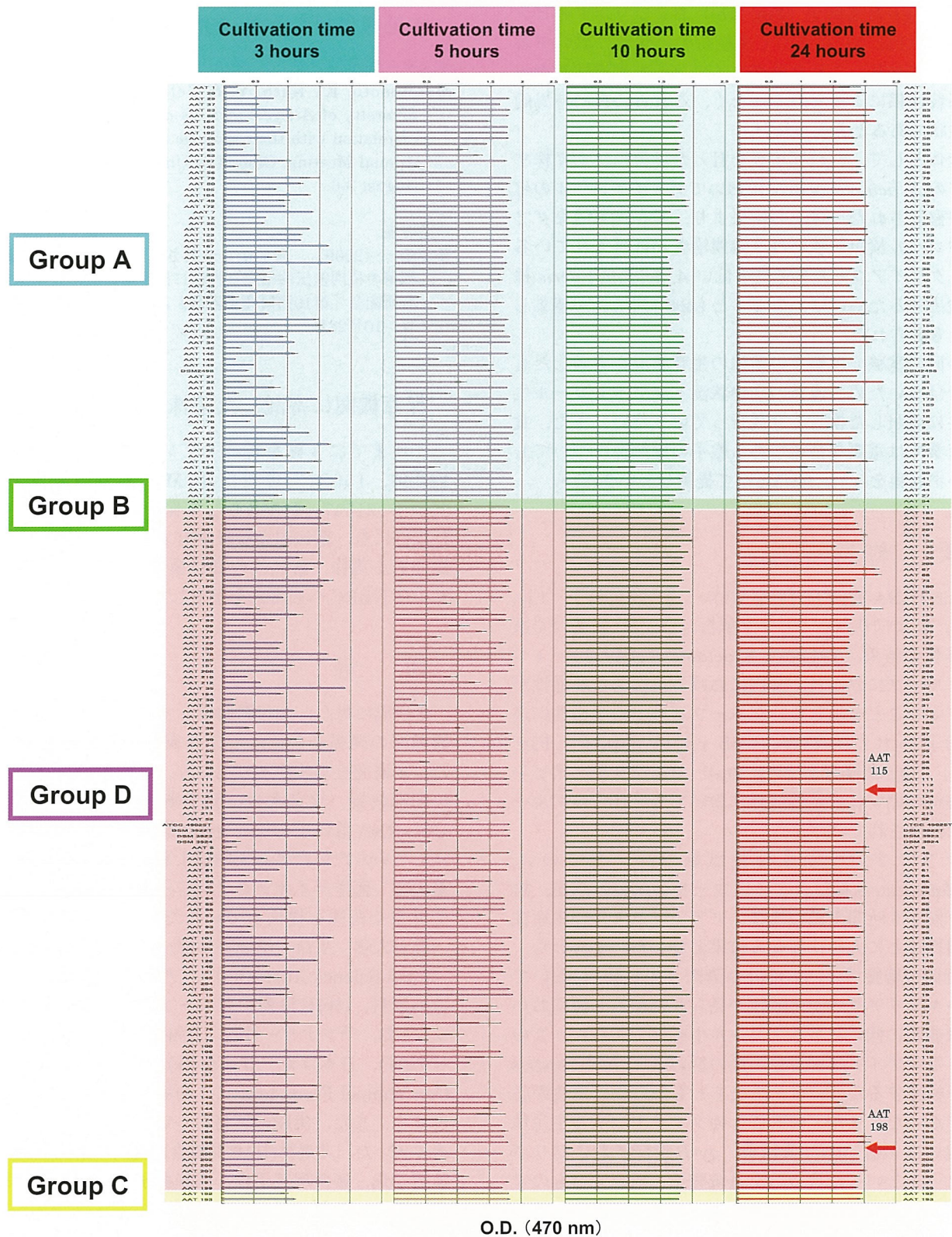


Fig. 4 Guaiacol production after 3, 5, 10 and 24 h cultivation.  
The 197 *A. acidoterrestris* strains are arranged in order of the 16S rRNA gene tree [Fig. 1(b)].

には含まれるものの、16S rRNA 遺伝子 (Fig. 1(b)), *gyrB* 遺伝子 (Fig. 2(b)) およびリボタイピング解析 (Fig. 3) に基づく系統樹のいずれにおいても異なっており、これらのグアイアコール生産性が遺伝的系統関係によるものではなく、これらの株に特異的な性状であると考えられた。

全体として、24時間培養を行った場合には197株すべての *A. acidoterrestris* においてグアイアコールの生産が確認された。以上の結果より、現在標準的なグアイアコール検出試験では3時間培養が推奨されているが、グアイアコール生産性の低い *A. acidoterrestris* 株を検出するためには、少なくとも24時間培養が望ましいと考えられた。

今回の試験では個々の菌株の生育状況を考慮したものではないため、菌株の生育状況とグアイアコール生産性に着眼した検討を今後行っていきたい。また、食品産業では重要な情報である胞子の耐熱性についてもデータ収集を行い、知見として提供していきたい。

## 要 約

16S rRNA 遺伝子 (Fig. 1(b)), *gyrB* 遺伝子 (Fig. 2(a)) およびリボタイピング解析 (Fig. 3) に基づく系統解析の結果、197株の *A. acidoterrestris* は3~4つのグループに分かれ、種内における遺伝的な多様性が存在することを示した。グループごとでの多様性に違いは見られたものの、16S rRNA 遺伝子 (Fig. 1(b)), *gyrB* 遺伝子 (Fig. 2(a)) およびリボタイピング解析のいずれの系統解析においてもこれらのグループは保存されていた。

グアイアコール生産性試験では、全ての *A. acidoterrestris* 株はグアイアコールを生産したが、培養時間が5時間未満の場合、グアイアコールの生産性は菌株ごとに大きく異なる結果となった。すなわち、10時間の培養では、大部分の菌株 (195株) において高いグアイアコール生産性が見られたが、2株においては非常に低いグアイアコール生産性であった。このようなグアイアコール生産性の低い *A. acidoterrestris* 株を検出するためには、少なくとも24時間の培養が必要であった。また、菌株ごとのグアイアコール生産性の違いは16S rRNA 遺伝子、*gyrB* 遺伝子およびリボパターンといった遺伝的な系統関係と関連するものではなかった。

今後は、一部の菌株に見られた16S rRNA 遺伝子と *gyrB* 遺伝子での結果の不一致、および芽胞の耐熱性とグループの相関性などについて、全ゲノムを視野に入れた検討した調査により解明していきたい。

## 本助成で得られた研究成果の報告

ポスター発表

Matsumoto, K., Kato, Y. & Goto, K. (2008). Genetic diversity of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and the correlation with their spoilage ability. IAFP 2008 95th Annual Meeting, Ohio, The United States of America, August 3-6.

口頭発表

後藤慶一 (2009), 食品から分離された *Alicyclobacillus* 属細菌の種内遺伝的集団と性状に関する研究, 日本清涼飲料研究会「第19回研究発表会」, 日本教育会館一橋ホール, 10月28日

## 保存機関に寄託した菌株

これまでに3株を寄託している (IAM 15085, 15086, 15087: 現在は JCM へ移管され, JCM 21546, 21547, 21548として保管されている)。それ以外にも、遺伝的な特徴を有する菌株、性状的に特徴のある菌株、耐熱性の高い菌株などについて JCM および NBRC への寄託を予定している。

## 謝 辞

本研究に対し、3年間助成して頂いた財団法人発酵研究所の関係者各位に心より御礼申し上げます。また、本研究を実施するにあたり、ご指導いただいた横田明准教授 (東京大学 分子細胞生物学研究所)、16S rRNA 遺伝子および *gyrB* 遺伝子の塩基配列を決定していただいた笠井宏朗博士および猪又幸江様 (北里大学 海洋バイオテクノロジー釜石研究所)、そして貴重な菌株を提供していただいた古畑勝則准教授 (麻布大学 生命・環境科学部)、Dr. Nancy Jensen (Food Science Australia)、アサヒ飲料(株)、(株)えひめ飲料、(株)日清製粉グループ本社、キリンビバレッジ(株)、サントリー(株)、大和製罐(株)、ニチレイフーズ(株)、日本コカ・コーラ(株)、明治乳業(株)および Gan-Shmuel Foods Ltd. にこの場を借りて御礼申し上げます。また、実験の実務について、終始前向きに努めて頂いた三井農林(株)食品総合研究所の餅田薫氏、加藤裕子氏、藤田理英子氏、西堀綾子氏および松本幸平氏に深謝します。

## 文 献

Borlinghaus, A. & Engel, R. (1997). *Alicyclobacillus*



- incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies - Method development and validation. *Fruit Processing* **7**: 262-266.
- Cerny, G., Hennlich, W. & Poralla, K. (1984). Fruchtsaftverderb durch Bacillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderbserregers. *Z. Lebens. Unters. Forsch.* **179**: 224-227.
- Duong, H.-A. & Jensen, N. (2000). Spoilage of iced tea by *Alicyclobacillus*. *Food Australia* **52**: 292.
- Eiroa, M. N. U., Junqueira, V. C. A. & Schmidt, F. (1999). *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *J. Food Protection* **62**: 883-886.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 224-229.
- Felsenstein, J. (1981). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **30**: 783-791.
- Goto, K., An, S.-Y., Kasai, H. & Yokota, A. (2007). Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1276-1285.
- Jensen, N. (2000). *Alicyclobacillus* in Australia. *Food Australia* **52**: 282-285.
- Kasai, H., Tamura, T. & Harayama, S. (2000). Intrageneric relationship among *Micromonospora* species deduced from gyrB based phylogeny and DNA relatedness. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 127-134.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- Kumar S, Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment briefings. *Bioinformatics* **5**: 150-163.
- Lake, J. A. (1987). A rate-independent technique for analysis of nucleic acid sequences: evolutionary parsimony. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 167-191.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sprittstoesser, D. F., Churey, J. J. & Lee, C. Y. (1994). Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *J. Food Protection* **57**: 1080-1083.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* **76**: 4350-4354.
- Wisse, C. A. & Parish, M. (1998). Isolation and enumeration of sporeforming, thermo-acidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. *Dairy. Food Environ. Sanitation* **18**: 504-509.
- Yamamoto, S. & Harayama, S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of gyrB genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1104-1109.

# 自然生態系における無酸素環境下に分布する 嫌気性原核微生物の系統分類学的研究

上 木 厚 子

山形大学農学部生物資源学科  
〒997-8555 鶴岡市若葉町1-23

## Phylogeny of anaerobic bacteria isolated from anoxic environments

Atsuko Ueki

Faculty of Agriculture, Yamagata University  
Wakaba-machi 1-23, Tsuruoka, Yamagata 997-8555, Japan

Various anaerobic bacterial strains including sulfate-reducing and fermentative bacteria were isolated from some anoxic environments. All sulfate-reducing bacterial strains isolated from the estuarine sediment were affiliated with the class *Deltaproteobacteria* and incompletely oxidized organic electron donors to mainly acetate. Cell morphology and the ranges of substrate utilization were distinct depending on the affiliation of the strain. Of the isolates belonging to the novel lineages, two novel genera and species as well as two novel species of sulfate-reducing bacteria were described. Butyrate-oxidizing sulfate-reducing bacterial strains isolated from sewage sludge digesters were characterized comprehensively and a novel species of the genus *Desulfovibrio* was described based on the characteristics of the strains. Strictly anaerobic Gram-negative rods isolated from irrigated rice field soil and a methanogenic reactor treating cattle waste were characterized. All isolates were sensitive to bile and most of them required hemin for growth. Many strains decomposed xylan, and vitamin B<sub>12</sub> stimulated the growth of propionate-producing strains. Based on the characterization, novel species of the genus *Bacteroides* as well as the genus *Prevotella* were described. Various anaerobic bacterial strains in the class *Clostridia* were isolated from a methanogenic reactor. One novel cellulolytic species in the genus *Clostridium* was described. In addition, of the four aminolytic isolates characterized, a novel genus and species of strictly anaerobic Gram-positive coccus was described.

Key words: anaerobic bacteria, sulfate-reducing bacteria, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Clostridium*

### 緒 言

地球上には、湛水土壤や湿地、水圏の底泥、さらには動物の消化管内などに代表される無酸素環境が広く分布しており、ここでは多様な嫌気性微生物が活発な生命活動を営むことにより、地球上の物質循環や人類の生活の維持にとって不可欠の役割を果たしている。無酸素環境で増殖できる生物は、真核生物のうちの少数のグループ（単細胞性の菌類や原生動物）を除いて、基本的に原核生物（細菌および古細菌）である。

嫌気性微生物のエネルギー獲得の方式は、独立栄養性である酸素非発生型光合成を除くと、基本的に発酵と嫌気呼吸に大別でき、無酸素環境下における微生物反応は、この発酵と嫌気呼吸による有機物の酸化分解に依存して進行する。

発酵性細菌は、基質となる有機物を最終発酵産物に変換する過程で、基本的に基質レベルのリン酸化により ATP を生成するが、一般に生成物として、酢酸、プロピオン酸、酪酸、乳酸、コハク酸などの有機酸やアルコール、さらに H<sub>2</sub>などを排出する。一方、嫌気呼吸性の微生物は、有機物（特に発酵性細菌などによって生成された短鎖脂肪酸など）や H<sub>2</sub>を電子供与体とし、最終電子受容体として、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Fe<sup>3+</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>などを利用してこれらを異化的に還元することにより、

E-mail: uatsuko@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

共同研究者：鈴木大典（名古屋大学エコトピア科学研究所）

有機物の分解と物質循環に寄与している。SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>濃度が高い海洋環境では硫酸還元が卓越していると考えられているが、有機物の嫌氣的分解の最末端段階では一般的に、発酵性および嫌気呼吸性の微生物によって生成された、主として酢酸およびH<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>をメタン生成古細菌が利用することによりメタンを生成する。このため、有機物を含む無酸素環境からは通常メタンが放出される。

大気中メタンは、温室効果への寄与率がCO<sub>2</sub>に次いで大きい温室効果ガスである。産業革命以前の大気中濃度（715 ppb）に比べ、現在は約2.5倍程度（1774 ppb）にまで増加しており、環境問題の上から懸念されてきた。大気中へのメタン放出源としては、メタン生成古細菌によって生成されたメタンを起源とする生物的メタン放出と、化石燃料やバイオマスの燃焼などによる非生物的メタン放出とに大別でき、大気中へのメタン放出源として、非生物的メタンもかなりの割合を占めている（Wuebbles & Hayhoe, 2002）。しかし、生物学的かつ人為的メタン放出源として、水田土壌や反芻動物などが重要視されてきている。一方可燃性ガスであるメタンを回収することにより、化石エネルギーに替わるエネルギーを得ることができる。下水汚泥、各種廃水、生ゴミなどの廃棄物系バイオマスを嫌氣的に処理し、廃棄物の減量化を図りながらメタンを回収し、これをガス発電および熱回収などによりエネルギー源として利用する様々なシステムが、世界的に稼働している。ヨーロッパでは特に、メタン発酵リアクターの利用と共に、有機性廃棄物の埋め立て地（landfill）からのメタンの回収が進んでいる。以上のように、無酸素環境下における微生物活動は、地球上における物質循環、環境問題およびエネルギー問題のいずれにとっても重要である。

無酸素環境中に棲息する微生物のうち、嫌気呼吸性の硫酸還元細菌や三価鉄還元細菌、あるいはメタン生成古細菌といった機能の明確なグループについては近年その研究がかなり進展している。しかし発酵性細菌については、これまでは哺乳動物関連試料由来の種について主として研究されてきており、動物以外の環境から分離された細菌に関わる研究は、セルロース分解細菌といった特定のグループ以外についてはあまり行われてきていない。このため本研究は、海洋底泥、水田土壌、さらにメタン発酵槽等といった様々な無酸素環境から採取した試料から分離した嫌気性細菌株について、その生理学的特徴や系統分類学的位置づけを明らかにすることを目的とし、（1）港湾底泥と嫌気消化都市下水汚泥から分離した *Deltaproteobacteria* 綱硫酸還元細菌、（2）ほとんどの既知の種が主にヒト

の糞便や口腔、さらに反芻動物の第一胃などの哺乳動物関連試料から由来し、環境試料由来の種の記載例がほとんどなかった発酵性の偏性嫌気性グラム陰性桿菌である *Bacteroidetes* 門 *Bacteroides* 属類縁細菌、

（3） *Firmicutes*（低G+Cグラム陽性細菌）門 *Clostridium* 属類縁細菌、の各新規系統の分離菌株について細胞学、生理・生化学、化学分類学および系統学的な包括的な特徴付けを行った。得られた結果に基づき、各菌株について新属・新種あるいは新種としての記載を公表すると共に、環境中に分布する嫌気性細菌の栄養要求性や多様性について考察した。

## 実験方法

### 硫酸還元細菌について

**使用菌株** 山形県酒田港新井田川の河口付近の水深約2mの堆積物を、表面から深さ約10cmまで採取した。この希釈試料より乳酸塩を電子供与体とした培地を用いて、嫌気性ロールチューブ法（Holdeman *et al.*, 1977）により直接コロニー分離した菌株（MSL86<sup>T</sup>, MSL71<sup>T</sup>, MSL79<sup>T</sup>）と、堆積物試料を接種源として、プロピオン酸塩を電子供与体基質として含む海水培地を用いた集積培養を経て、嫌気性ロールチューブ法を用いたコロニー分離による純化操作を繰り返すことにより分離した、プロピオン酸塩を電子供与体として増殖する菌株（Pro1<sup>T</sup>とPro16）を海洋性硫酸還元細菌として使用した。

下水処理場の都市下水汚泥嫌気消化槽（神奈川県横浜市および山形県鶴岡市）から採取した汚泥試料を接種源として、酪酸塩を電子供与体とした培地を用いて硫酸還元細菌の集積培養を行い、この集積培養より横浜市の汚泥試料由来の2菌株（BSY<sup>T</sup>とBSY-C）と鶴岡市の汚泥試料由来の3菌株（BST, BST-B およびBST-C）を分離した。これら5菌株の生理的特徴は類似しており、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく分離菌株間の類似性値は約99から100%だった。本研究では、代表菌株として選択したBSY<sup>T</sup>株とBST株を用いた。

**培地と培養方法** 各菌株の培養には、基本培地として3種類の硫酸還元細菌用培地を使用した（Suzuki *et al.*, 2007）。海洋性硫酸還元細菌の培養に用いた海水培地（Seawater medium）は海水を基本成分とする培地であり、これに寒天（Difco）を1.5%（w/v）になるように加えた寒天培地を嫌気性ロールチューブ法による菌株の分離やスラント培地での菌株の維持に使用した。また、海洋性分離菌株の一般生理試験には、淡水

性硫酸還元細菌用培地へ1.5または3% (w/v) になるようにNaClを添加して海洋性硫酸還元細菌用培地に改変した、酵母エキス(0.05%, w/v)を含む半合成培地を使用した。嫌気消化汚泥分離菌株の培養には、炭酸塩で緩衝化した酵母エキス無添加の合成培地を使用し、これに寒天を1.5% (w/v) になるように加えた培地を嫌気性ロールチューブ法による菌株の分離やスラント培地での維持に使用した。菌株の継代や接種等の全ての実験操作は、海洋性分離菌株についてはO<sub>2</sub>除去N<sub>2</sub>ガス気流下で、嫌気消化汚泥分離菌株についてはO<sub>2</sub>除去N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(95%/5%)混合ガス気流下で行い、試験管の口を、ブチルゴム栓またはブチルゴムの中栓付きのねじ蓋で封じて培養した(Holdeman *et al.*, 1977)。分離菌株の維持や培養には通常、分離に用いた各電子供与体(乳酸塩、プロピオン酸塩または酪酸塩、各20 mM)を添加した培地を用いた。

各分離菌株の電子供与体利用性試験等の生理的試験には通常合成培地または半合成培地を使用した。海洋性分離菌株については目的に応じて調製した海水培地も用いた。H<sub>2</sub>を電子供与体とする場合は、炭素源として酢酸塩(最終濃度5 mM)を培地に添加し、試験管内の気相をH<sub>2</sub>ガスに置換したが、H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>での独立栄養増殖を試験するときは酢酸塩を培地へ添加しなかった。培養は通常30℃で行った。各菌株の増殖は、細胞を接種した液体培地の入った試験管を分光光度計(HITACHI U-1000 SPECTROPHOTOMETER)に直接挿し込んで、通常は660 nmの光学密度(O.D.)を経時的に測定することで追跡した。

#### 発酵性細菌について

**使用菌株** 山形県鶴岡市の山形県農研センターの試験水田から土壌を採取し、これより鋤込まれていた植物残渣(主として稲わら)または水稻の根を分け取り、これをホモジナイズしたものを分離源として分離した菌株(KB7<sup>T</sup>株およびA42株)(Akasaka *et al.*, 2003)と、牛舎(1,000頭規模)の排泄物を収集して処理している北海道別海町資源循環施設の中温性メタン発酵槽(1,500 m<sup>3</sup>)から採取した試料を分離源とする菌株(上述した水田由来の2菌株以外)を用いた。

**培地と培養方法** 培養にはPY培地(無機塩類の他、ペプトン10 g/l、酵母エキス5 g/l、還元剤のcysteine-HCl·H<sub>2</sub>O 300 mg/lおよび酸化還元指示薬であるレサズリン等を含む)を基本培地として用いた(Holdeman *et al.*, 1977; Ueki *et al.*, 2006a)。菌株の継代や接種等の全ての実験操作は、通常O<sub>2</sub>除去N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(95%/5%)混合ガス気流下で行い、試験管の

口をブチルゴム栓またはブチルゴムの中栓付きのねじ蓋で封じて培養した。嫌気性ロールチューブ法による菌株の分離と、菌株の継代と維持のためのスラント培地には、PY培地に各0.25 g/lのグルコース、セロビオース、マルトースおよび可溶性デンプンと、さらに寒天(Difco)を15 g/l添加したPY4S培地を用いた。セルロース分解細菌の集積培養を含む一部の菌株の分離には、ペプトンと酵母エキスの濃度をPY培地の10分の1に減らした1/10 PY培地を基本培地として用いた(Nishiyama *et al.*, 2009)。糖利用性の菌株の液体培養にはPY培地にグルコースを10 g/l添加したPYG培地を通常用い、基質利用性試験等にはグルコースの代わりにそれぞれの基質を添加した培地を用いた。糖利用性のない菌株の場合は、それぞれ利用できるアミノ酸をグルコースの代わりに添加して用いた。ヘミンを添加する場合は最終濃度10 mg/lで添加し、ビタミンB<sub>12</sub>要求性をもつ菌株についてはB-ビタミン混合液またはシアノコバラミン(ビタミンB<sub>12</sub>)(10 μg/l)をPY培地に添加して培養した(Akasaka *et al.*, 2004)。培地pHは通常7.0~7.2に調整し、培養は通常30℃で行った。各菌株の増殖は、培養液を接種した液体培地の入った試験管を分光光度計(HITACHI U-1000 SPECTROPHOTOMETER)に直接挿し込んで、660 nmの光学密度(O.D.)を経時的に測定することで追跡した。細胞および生理・生化学的な特徴付けは定法に従って行った。

**化学分析** 各菌株の培養後の生成物(揮発性脂肪酸、不揮発性脂肪酸、アルコール、ガス)は全てガスクロマトグラフィーにより定量した。硫酸塩、亜硫酸塩、チオ硫酸塩はイオンクロマトグラフィーにより定量した。硫酸還元細菌の亜硫酸還元酵素(desulfovibrin)の存在はPostgate(1959)の方法により、シトクロムの有無とその型は、酸化還元差スペクトル法を用いて確認した。

細胞から抽出したDNAをYamasa GCキット(Yamasa Shoyu)を用いてP1 nucleaseにより分解し、HPLC(Hitachi L-7400)を用いてμBondapak C18カラム(Waters)により、ゲノムDNAのG+C mol%を測定した。イソプレノイドキノンはKomagata & Suzuki(1987)の方法に従って抽出し、質量分析計(JMS-SX102A; JEOL)を用いて分析した。菌体脂肪酸組成は、Miller(1982)の方法によりメチルエステル化し、ガスクロマトグラフ(Hitachi G-3000)を用いて分析した。ECL法(Miyagawa *et al.*, 1979)に基づくピークの同定は、TechnoSuruga Co., Ltdに依頼した。細胞壁アミノ酸

組成分析は Schleifer & Kandler (1972) の方法に準じて行った。

**16S rRNA 遺伝子塩基配列決定および系統解析**  
16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅は, *Bacteria* に特異的なプライマー 27f とユニバーサルプライマー 1492r により Ampli Taq Gold™ DNA polymerase を用いて行った。塩基配列決定用 PCR 反応には Thermo sequenase cycle sequencing kit (Amersham LIFE SCIENCE) を用いて, LIC-4000 sequencer (LI-COR model 4000L) で配列決定するか, または ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing ready reaction kit を使用し, ABI Prism 3730 automatic DNA sequencer (Applied biosystems) により配列決定した。

16S rRNA 遺伝子塩基配列を DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) から入手し, 塩基配列のホモロジー検索を BLAST program (Altschul *et al.*, 1997) を用いて行った。不確定の塩基やギャップは手作業で取り除いた。系統樹は CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) を用いて近隣結合法 (Saitou & Nei, 1987) により作成した。また, 系統樹の分岐パターンの系統学的信頼度はブートストラップ検定で求め, 各菌株間の類似性は塩基置換距離より求めた。

## 結 果

***Deltaproteobacteria* 網硫酸還元細菌について**  
酒田港堆積物から分離した硫酸還元細菌について 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析を行うと共に, 表現型の網羅的特徴付けを行った。これらの菌株は全て *Deltaproteobacteria* 綱に配属された。このうち, 最近縁種との 16S rRNA 遺伝子塩基配列の類似性が低く, その表現型の特徴も近縁種と異なった 4 菌株をそれぞれ基準菌株として, 以下の 4 系統の新規細菌の記載を公表した。また都市下水汚泥嫌気消化槽から分離した硫酸還元細菌 BSY<sup>T</sup> 株についても同様に網羅的な特徴付けを行い, BSY<sup>T</sup> 株を基準菌株として新種を記載した。以下に各新規系統の種の記載を示す。

### *Desulfopila aestuarii* の記載

#### *Desulfopila Suzuki et al.* 2007 の記載

*Desulfopila* (De.sul.fo.pi'la. L. pref. *de* form; L. n. *sulur* sulfur; L. fem. n. *pila* pillar; N.L. fem. n. *Desulfopila* a sulfate-reducing pillar).

中温性。偏性嫌気性。細胞はグラム陰性, 非孢子形成の桿菌。硫酸塩と他の無機硫黄酸化物とフマル酸塩

を電子受容体基質として利用する。有機性の電子供与体基質を主に酢酸塩まで酸化する。基準種は *Desulfopila aestuarii*。

#### *Desulfopila aestuarii Suzuki et al.* 2007 の記載

*Desulfopila aestuarii* (*ae.stu.a'ri.i.* L. n.; *aestus* tides; L. gen. n. *aestuarii* of an estuary).

上述したこの属の特徴に加え, 以下の特徴を持つ。細胞は先の丸いグラム陰性の桿菌で, 幅は 0.7~1.2 μm, 長さは 1.9~3.8 μm である。一本の極鞭毛により運動する。カタラーゼとオキシダーゼの活性は陰性である。スラント培地上でグレー色の薄く広がったコロニーを形成する。増殖範囲は, NaCl 濃度 0~5.0% (w/v) (最適 NaCl 濃度 1.0%, w/v), 10~40°C (最適温度 35°C), pH 6.3~8.5 (最適 pH 7.5~7.6) である。硫酸還元のための電子供与体基質として, ギ酸塩, ピルビン酸塩, 乳酸塩, フマル酸塩, エタノール, 1-プロパノール, ブタノールおよびグリセロールを利用し, 酢酸塩, プロピオン酸塩, 酪酸塩, リンゴ酸塩, コハク酸塩, メタノール, グリシン, アラニン, セリン, アスパラギン酸塩, グルタミン酸塩および H<sub>2</sub> を利用しない。硫酸塩, 亜硫酸塩, チオ硫酸塩およびフマル酸塩を電子受容体基質として利用する。電子受容体基質非存在下でピルビン酸塩とフマル酸塩を発酵し, 乳酸塩とリンゴ酸塩を発酵しない。ゲノム DNA G+C 含量は 54.4 mol% である。主要な菌体脂肪酸は C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:1</sub>ω7, C<sub>16:1</sub>ω5 および C<sub>17:1</sub>ω6 である。主要な呼吸鎖キノンはメナキノン MK-8(H<sub>4</sub>) である。基準菌株 MSL86<sup>T</sup> 株 (=JCM 14042<sup>T</sup> = DSM18488<sup>T</sup>) は日本列島の日本海側に位置する河口堆積物から分離された。

Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A. & Ueki, K. (2007). *Desulfopila aestuarii* gen. nov., sp. nov., a novel, Gram-negative, rod-like sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 520-526.

### *Desulfoluna butyratoxydans* の記載

#### *Desulfoluna Suzuki et al.* 2008 の記載

*Desulfoluna* (De.sul.fo.lu'na. L. pref. *de* from; L. n. *sulfur* sulfur; L. fem. n. *luna* the figure of a half moon, a crescent, lune; N.L. fem. n. *Desulfoluna* a sulfate-reducing crescent).

中温性。偏性嫌気性。細胞はグラム陰性, 非孢子形成の湾曲桿菌。硫酸塩と他の無機硫黄酸化物を電子受容体基質として利用する。有機性の電子供与体基質を主に酢酸塩まで酸化する。基準種は *Desulfoluna butyratoxydans*。

***Desulfoluna butyratoxydans* Suzuki et al. 2008**の記載

*Desulfoluna butyratoxydans* (bu.ty.rat.o'xy.dans. N.L. n. *butyras -atis* butyrate; N.L. part. adj. *oxydans* oxidizing; N.L. part. adj. *butyratoxydans* butyrate-oxidizing).

上述したこの属の特徴に加え、以下の特徴を持つ。細胞の幅は0.8~0.9 $\mu\text{m}$ 、長さは1.6~3.4 $\mu\text{m}$ である。一本の極鞭毛により運動する。カタラーゼとオキシダーゼの活性は陰性である。スラント培地上でグレー色の薄く広がったコロニーを形成する。増殖範囲は、NaCl濃度1.0~6.5% (w/v) (最適NaCl濃度2.0%, w/v), 10~35 $^{\circ}\text{C}$  (最適温度30 $^{\circ}\text{C}$ ), pH 5.7~8.5 (最適pH 6.3) である。硫酸還元のための電子供与体基質として、ギ酸塩、酪酸塩、ピルビン酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、エタノール、1-プロパノール、ブタノール、グリセロールおよび $\text{H}_2$ を利用し、酢酸塩、プロピオン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、メタノール、グリシン、アラニン、セリン、アスパラギン酸塩およびグルタミン酸塩を利用しない。硫酸塩、亜硫酸塩およびチオ硫酸塩を電子受容体基質として利用し、フマル酸塩を利用しない。電子受容体基質非存在下でピルビン酸塩とリンゴ酸塩を発酵し、乳酸塩とフマル酸塩を発酵しない。ゲノムDNA G+C含量は62.0 mol% である。主要な菌体脂肪酸は $\text{C}_{14:0}$ 、 $\text{C}_{16:0}$ 、 $\text{C}_{16:1}\omega 7$ 、 $\text{C}_{18:1}\omega 9$ 、 $\text{C}_{18:1}\omega 7$ および $\text{C}_{14:0}$  3-OH である。主要な呼吸鎖キノンはメナキノン MK-8( $\text{H}_4$ ) である。基準菌株 MSL71<sup>T</sup> 株 (=JCM 14721<sup>T</sup> = DSM 19427<sup>T</sup>) は日本列島の日本海側に位置する河口堆積物から分離された。

Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A. & Ueki, K. (2008). *Desulfoluna butyratoxydans* gen. nov., sp. nov., a novel, Gram-negative, butyrate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 826-832.

***Desulfovibrio portus* Suzuki et al. 2009**の記載

*Desulfovibrio portus* (por'tus. L. gen. n. *portus* of harbour, port, estuary of a river, pertaining to the original habitat of the type strain).

細胞はグラム陰性の湾曲した桿菌で、幅は0.7~1.0 $\mu\text{m}$ 、長さは1.8~2.3 $\mu\text{m}$  である。偏性嫌気性である。一本の極鞭毛により運動し、非孢子形成である。カタラーゼとオキシダーゼの活性は陰性である。スラント培地上でグレー色の薄く広がったコロニーを形成する。デスルフォビリジンとc型のシトクロムを含む。

増殖範囲は、NaCl濃度0.15~6.5% (w/v) (最適NaCl濃度2.0%, w/v), 10~40 $^{\circ}\text{C}$  (最適温度35 $^{\circ}\text{C}$ ), pH 5.7~8.5 (最適pH 6.5) である。有機性の電子供与体基質を主に酢酸塩まで酸化する。硫酸還元のための電子供与体基質として、ギ酸塩、ピルビン酸塩、乳酸塩、フマル酸塩、リンゴ酸塩、コハク酸塩、エタノール、1-プロパノール、ブタノールおよび $\text{H}_2$ を利用し、酢酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩、メタノール、グリセロール、グリシン、アラニン、セリン、アスパラギン酸塩およびグルタミン酸塩を利用しない。硫酸塩、亜硫酸塩およびチオ硫酸塩を電子受容体基質として利用し、フマル酸塩を利用しない。電子受容体基質非存在下でピルビン酸塩、フマル酸塩およびリンゴ酸塩を発酵し、乳酸塩を発酵しない。ゲノムDNA G+C含量は62.1 mol% である。主要な菌体脂肪酸は $\text{C}_{16:0}$ 、 $\text{C}_{18:1}\omega 9$ 、*iso*- $\text{C}_{15:0}$ 、*anteiso*- $\text{C}_{15:0}$ 、*iso*- $\text{C}_{17:0}$ 、*anteiso*- $\text{C}_{17:0}$  および *iso*- $\text{C}_{17:1}\omega 9$  である。主要な呼吸鎖キノンはメナキノン MK-6( $\text{H}_2$ ) である。基準菌株 MSL79<sup>T</sup> 株 (=JCM 14722<sup>T</sup> = DSM 19833<sup>T</sup>) は日本列島の日本海側に位置する河口堆積物から分離された。

Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A. & Ueki, K. (2009). *Desulfovibrio portus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium in the class *Deltaproteobacteria* isolated from an estuarine sediment. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **55**: 125-133.

***Desulfobulbus japonicus* Suzuki et al. 2007**の記載

*Desulfobulbus japonicus* (ja.po'ni.cus. N.L. masc. adj. *japonicus* pertaining to Japan, where the type strain was originally isolated).

細胞はグラム陰性の桿菌で、幅は0.8~1.6 $\mu\text{m}$ 、長さは1.4~2.9 $\mu\text{m}$ 、である。一本の極鞭毛により運動する。非孢子形成である。カタラーゼとオキシダーゼの活性は陰性である。偏性嫌気性である。スラント培地上でグレー色の薄く広がったコロニーを形成する。増殖範囲は、NaCl濃度1.0~7.0% (w/v) (最適NaCl濃度3.0%, w/v), 15~35 $^{\circ}\text{C}$  (最適温度35 $^{\circ}\text{C}$ ), pH 6.1~7.5 (最適pH 6.7) である。利用する電子供与体基質を主に酢酸塩まで酸化する。硫酸還元のための電子供与体基質として、ギ酸塩、プロピオン酸塩、ピルビン酸塩、乳酸塩、フマル酸塩、リンゴ酸塩、エタノール、1-プロパノール、ブタノール、グリセロール、アラニン、グルコース、フルクトースおよび $\text{H}_2$ を利用し、酢酸塩、酪酸塩、コハク酸塩、メタノール、グリシン、セリン、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、セロビオースおよびスクロースを電子

供与体基質として利用しない。アラビノース、リボース、キシロース、ガラクトース、マンノース、ラムノース、ソルボース、ラクトースおよびメリビオースを電子供与体基質として利用しない。硫酸塩とチオ硫酸塩を電子受容体基質として利用し、亜硫酸塩とフマル酸塩を利用しない。電子受容体基質非存在下でピルビン酸塩と乳酸塩を発酵し、フマル酸塩とリンゴ酸塩を発酵しない。ゲノム DNA G+C 含量は 46.0~48.6 mol% である。主要な菌体脂肪酸は C<sub>15:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>17:1</sub>ω6 および C<sub>18:1</sub>ω7 である。主要な呼吸鎖キノンはメナキノン MK-5(H<sub>2</sub>) である。基準菌株 Pro1<sup>T</sup> 株 (= JCM 14043<sup>T</sup>=DSM 18378<sup>T</sup>) は日本列島の日本海側に位置する河口堆積物から、プロピオン酸塩を電子供与体として用いた集積培養を経て分離された。ほとんど同じ特徴を持つ参照菌株 Pro16 株 (= JCM 14044 = DSM 18379) も同じ試料から分離された。

Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A. & Ueki, K. (2007). *Desulfovulbus japonicus* sp. nov., a novel, Gram-negative, propionate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 849-855.

#### *Desulfovibrio butyratiphilus* Suzuki et al. の記載 (in press)

*Desulfovibrio butyratiphilus* (bu.ty.ra.ti.phi'lus. N.L. n. butyras -atis butyrate; N.L. masc. adj. philus from Gr. adj. philos, friendly to, loving; N.L. masc. adj. butyratiphilus butyrate-loving).

細胞はグラム陰性の湾曲した桿菌で、幅は 0.8~0.9 μm, 長さは 2.4~5.6 μm である。偏性嫌気性である。一本の極鞭毛により運動する。非孢子形成である。カタラーゼとオキシダーゼの活性は陰性である。スラント培地上でグレー色の薄く広がったコロニーを形成する。デスルフォビリジンと c 型のシトクロムを含む。増殖のために炭酸塩または炭酸水素塩を要求する。増殖範囲は、NaCl 濃度 0~2.0% (w/v) (最適 NaCl 濃度 0.5%, w/v), 25~40°C (最適温度 35°C), pH 6.2~8.0 (最適 pH 7.1) である。硫酸還元のための電子供与体基質として、酪酸塩、2-メチル酪酸塩、吉草酸塩、ピルビン酸塩、乳酸塩、エタノール、1-プロパノール、ブタノールおよび H<sub>2</sub> を利用する。ほとんどの有機性の電子供与体基質を酢酸塩へ酸化するが、2-メチル酪酸塩および吉草酸塩は酢酸塩とプロピオン酸塩へ酸化する。H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> で化学合成独立栄養的に弱く増殖する。ギ酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、イソ酪酸塩、イソ吉草塩、カプリル酸塩、クロト

ン酸塩、フマル酸塩、リンゴ酸塩、コハク酸塩、メタノール、2-プロパノール、グリセロール、グリシン、アラニン、セリン、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、グルコース、フルクトースおよびイーストエキスを利用しない。硫酸塩およびチオ硫酸塩を電子受容体基質として利用し、亜硫酸塩、硝酸塩およびフマル酸塩を利用しない。電子受容体基質非存在下でピルビン酸塩を発酵し、酪酸塩、乳酸塩、フマル酸塩およびリンゴ酸塩を発酵しない。ゲノム DNA G+C 含量は 63.3 mol% である。主要な菌体脂肪酸は C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:1</sub>ω7 および C<sub>18:1</sub>ω7 である。主要な呼吸鎖キノンはメナキノン MK-6(H<sub>2</sub>) である。基準菌株 BSY<sup>T</sup> 株 (= JCM 15519<sup>T</sup>=DSM 21556<sup>T</sup>) は横浜市の都市下水汚泥嫌気消化槽から分離された。参照菌株 BST 株 (= JCM 15520) は鶴岡市の都市下水汚泥嫌気消化槽から分離された。

Suzuki, D., Ueki, A., Shizuku, T., Ohtaki, Y. & Ueki, K. *Desulfovibrio butyratiphilus* sp. nov., a novel, Gram-negative, butyrate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an anaerobic municipal sludge digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (in press).

**Bacteroidetes** 門 **Bacteroides** 属類縁細菌について水田土壌および牛舎廃水メタン発酵槽中からそれぞれ植物残渣 (主として稲わら残渣) 等を分け取り、これらを試料として分離した菌株の中に含まれていたグラム陰性偏性嫌気性桿菌株について網羅の特徴付けを行った。これらは 16S rRNA 遺伝子塩基配列の比較から **Bacteroidetes** 門に配属されたが、いずれも既知の種との配列類似性は低かった。本研究ではこのうち、水田土壌から分離した *Prevotella* 属の 1 系統とメタン発酵槽から分離した *Bacteroides* 属の 2 系統の細菌についてそれぞれ新種としての記載を公表した。さらに、メタン発酵槽から分離し、それぞれ *Bacteroides* 属および *Prevotella* 属に配属された 2 菌株についても同様の特徵付けを行った。各新規系統の種および菌株の記載を以下に示す。

#### *Bacteroides propionicifaciens* Ueki et al. 2008 の記載

*Bacteroides propionicifaciens* (pro.pi.on.i.ci.fa'ci.ens. N.L. n. acidum propionicum propionic acid; L. v. facio make; N.L. part. Adj. propionicifaciens propionic acid-producing).

細胞は小型桿菌 (幅 0.7~0.8 μm, 長さ 1.3~2.1 μm) で、長いまたは糸状性の細胞がしばしば生じ

る。偏性嫌気性、グラム陰性、非運動性で孢子を形成しない。ヘミンおよびビタミン B<sub>12</sub> を必須に要求するが、ヘミンおよびビタミン B<sub>12</sub> 無添加の PY4S 寒天培地で継代維持は可能である。増殖範囲は 5~35°C (最適温度 30°C), pH 5.7~8.9 (最適 pH 7.9 で弱い好アルカリ性), 0~4% (w/v) NaCl (最適 NaCl 濃度 1%, w/v)。ヘミンおよびビタミン B<sub>12</sub> 非存在下 (PY4S 寒天培地等) で増殖した細胞には通常カタラーゼ活性は検出されないが、ヘミンおよびビタミン B<sub>12</sub> 存在下で増殖した細胞には活性が検出される。オキシダーゼ、硝酸還元活性およびウレアーゼ活性はもっていない。胆汁抵抗性はない。アラビノース、フルクトース、ガラクトース、グルコース、マンノース、セロビオース、マルトース、グリコーゲン、可溶性デンプン、デキストリン、アミグダリン、乳酸塩、ピルビン酸塩を利用する。ラクトース、エスクリン、フマル酸塩の弱い利用性を示す。リボース、キシロース、ラムノース、ソルボース、メリビオース、スクロース、トレハロース、メレジトース、ラフィノース、CMC、セルロース、キシラン、イヌリン、ペクチン、サリシン、グリセロール、ズルシトール、イノシトール、マンニトール、ソルビトール、エタノール、リンゴ酸塩、コハク酸塩を利用しない。ヘミンおよびビタミン B<sub>12</sub> 存在下でのグルコースからの主要な生成物は酢酸とプロピオン酸で、少量のコハク酸も生成する。ガスは生成しない。最終 pH は 5.1。ヘミンおよびビタミン B<sub>12</sub> 非存在下で長時間培養すると乳酸が生成される。デンプンとエスクリンを加水分解する。ゼラチンを液化化しない。インドールと硫化水素を生成しない。ゲノム DNA の G+C 含量は 46.2~47.5 mol% である。主な菌体脂肪酸は anteiso-C<sub>15:0</sub> および iso-C<sub>15:0</sub> である。主要な呼吸鎖キノンはメナキノン MK-8(H<sub>0</sub>) と MK-9(H<sub>0</sub>) である。基準菌株 SV434<sup>T</sup> (= JCM 14649<sup>T</sup> = DSM 19291<sup>T</sup>) は牛舎からの排泄物等を収集して処理しているメタン発酵槽の稲わら残渣から分離した。同じメタン発酵槽から分離した参考株 S562 (= JCM 14650 = DSM 19346) も、ほぼ同様の系統および表現型の特徴を持っていた。

Ueki, A., Abe, K., Kaku, N., Watanabe, K. & Ueki, K. (2008) *Bacteroides propionicifaciens* sp. nov., isolated from rice-straw residue in a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 346-352.

***Bacteroides graminisolvens* Nishiyama et al. 2009 の記載**

*Bacteroides graminisolvens* (gra.mi.ni.sol'vens. L.

neut. n. *gramen* grass; L. v. *solvere* dissolve; N.L. part. adj. *graminisolvens* grass-dissolving).

細胞は小型桿菌で、長めの細胞は少し湾曲しており (幅 0.4~0.6 μm, 長さ 1.2~4.5 μm), 細胞は連結しない。PY4S 寒天上のコロニーは円形で、光にかざすと虹色の光沢を示す。偏性嫌気性、グラム陰性、非運動性で孢子を形成しない。ヘミン要求性がある。ビタミン要求性はない。増殖範囲は 5~40°C (最適温度 30~35°C), pH 6.1~8.2 (最適 pH 7.2), 0~4% (w/v) NaCl (最適 NaCl 濃度 0%, w/v)。オキシダーゼ、カタラーゼ、硝酸還元活性は陰性。胆汁抵抗性はない。アラビノース、キシロース、フルクトース、ガラクトース、グルコース、マンノース、セロビオース、ラクトース、マルトース、メリビオース、スクロース、ラフィノース、キシロオリゴ糖、グリコーゲン、可溶性デンプン、デキストリン、ペクチン、キシラン、アミグダリンおよびサリシンを利用する。リボース、ラムノース、イヌリン、エスクリンおよびピルビン酸塩をわずかに利用する。ソルボース、トレハロース、メレジトース、CMC、セルロース、グリセロール、ズルシトール、イノシトール、マンニトール、ソルビトール、エタノール、フマル酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩およびコハク酸塩を利用しない。グルコースからの主要な生成物はコハク酸で、この他に少量のピルビン酸、酢酸、プロピオン酸を生成するが、キシランからはプロピオン酸と酢酸を主に生成する。ガスは生成しない。最終 pH は 4.9~5.2。デンプンとエスクリンを加水分解する。ゼラチンを液化化しない。インドールと硫化水素を生成しない。ウレアーゼを生成しない。ゲノム DNA の G+C 含量は 38.0 mol% である。主な菌体脂肪酸は anteiso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>17:0</sub> 3-OH, iso-C<sub>15:0</sub> および anteiso-C<sub>13:0</sub> である。主要な呼吸鎖キノンはメナキノン MK-10(H<sub>0</sub>) である。基準菌株 XDT-1<sup>T</sup> (= JCM 15093<sup>T</sup> = DSM 19988<sup>T</sup>) は牛舎からの排泄物等を収集して処理しているメタン発酵槽の稲わら残渣から分離した。

Nishiyama, T., Ueki, A., Kaku, N., Watanabe, K. & Ueki, K. (2009). *Bacteroides graminisolvens* sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 1901-1907.

**WK042 株の記載** 細胞は小型桿菌 (幅 0.4~0.7 μm, 長さ 1.5~4.0 μm) で、グラム陰性、非運動性で孢子を形成しない。偏性嫌気性。ヘミン要求性があり、ビタミン B<sub>12</sub> によって増殖が促進される。増殖範囲は 10~40°C (最適温度 35°C), pH 5.7~9.0 (最



適 pH 7.7 で弱い好アルカリ性), 0~2% (w/v) NaCl (最適 NaCl 濃度 0%, w/v). オキシダーゼ, カタラーゼ, 硝酸還元活性は陰性. 胆汁抵抗性はない. PYG 培地での最終 pH は 4.9. 基質利用性の範囲は狭く, アラビノース, キシロース, グルコース, マンノース およびエスクリンを利用してよく増殖する. マルトース, グリコーゲン, 可溶性デンプン, デキストリン, ペクチンを利用するが, 増殖は遅い. ラムノースとピルビン酸塩で弱い増殖を示す. リボース, フルクトース, ガラクトース, ソルボース, セロビオース, ラクトース, メリビオース, スクロース, トレハロース, ラフィノース, メレジトース, CMC, セルロース, キシラン, イヌリン, アミグダリン, サリシン, ズルシトール, イノシトール, マンニトール, ソルビトール, エタノール, グリセロール, フマル酸塩, 乳酸塩, リンゴ酸塩, コハク酸塩を利用しない. グルコースから酢酸, プロピオン酸およびコハク酸を主要生成物として作る. ガスは生成しない. デンプンとエスクリンを加水分解する. ゼラチンを液化しない. インドールと硫化水素を生成しない. ウレアーゼを生成しない. ゲノム DNA の G+C 含量は 41.0 mol% である. 主な菌体脂肪酸は anteiso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>17:0</sub> 3-OH および C<sub>15:0</sub> である. 主要な呼吸鎖キノンはメナキノン MK-11(H<sub>0</sub>) である. 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく最近縁種である *Bacteroides massiliensis* との配列類似性は 92.1% であり, 両者の表現型も著しく異なるため, WK042 株は *Bacteroides* 属の新種と見なされる. このため, WK042 株 (= JCM 15092 = DSM 21004) を基準菌株として, *Bacteroides paurosaccharolyticus* sp. nov. と命名して新種を提案する予定である. 本菌株は牛舎からの排泄物等を収集して処理しているメタン発酵槽の稲わら残渣から分離された.

***Prevotella paludivivens* Ueki et al. 2007** の記載  
*Prevotella paludivivens* (pa.lu.di.vi'v'ens. L. n. palus, -udis swamp, marsh; L. v. vivo to live; N.L. part. adj. paludivivens living in swamps).

細胞は小型桿菌 (幅 0.7~0.8 μm, 長さ 1.3~2.1 μm) で, 長い細胞が混じる. PY4S 寒天培地上のコロニーは半透明で表面は滑らかである. 偏性嫌気性, グラム陰性, 非運動性で孢子を形成しない. ヘミン要求性がある. ビタミン要求性はないが, ビタミン存在下の方が, 安定した増殖の時間経過を示す. 増殖範囲は 10~40°C (最適温度 30°C), pH 4.7~7.6 (最適 pH 5.7~6.7), 0~1% (w/v) NaCl (最適 NaCl 濃度 0%, w/v). グルコース添加条件での最終 pH は約

4.5. オキシダーゼ, カタラーゼ, 硝酸還元活性は陰性. 胆汁抵抗性はない. アラビノース, リボース, キシロース, フルクトース, ガラクトース, グルコース, マンノース, ラムノース, セロビオース, ラクトース, マルトース, スクロース, CMC, 可溶性デンプン, キシラン, ペクチンおよびサリシンを利用する. ピルビン酸塩とフマル酸塩を利用する. ソルボース, トレハロース, メレジトース, セルロース, イヌリン, グリセロール, イノシトール, マンニトール, 乳酸塩, リンゴ酸塩およびコハク酸塩を利用しない. グルコースからの主要な生成物は酢酸とコハク酸である. ガスは生成しない. デンプンとエスクリンを加水分解する. ゼラチンを液化しない. インドールと硫化水素を生成しない. ウレアーゼを生成しない. ゲノム DNA の G+C 含量は 39.2 mol% である. 主な菌体脂肪酸は anteiso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>15:0</sub>, C<sub>15:0</sub> および iso-C<sub>17:0</sub> 3-OH である. 主要な呼吸鎖キノンはメナキノン MK-11(H<sub>0</sub>) と MK-11(H<sub>2</sub>) である. 基準菌株 KB7<sup>T</sup> (= JCM 13650<sup>T</sup> = DSM 17968<sup>T</sup>) は水田土壤中の稲わら残渣から分離した. 系統学的にも表現型的にもほぼ同様の特徴を示した A42 株 (= JCM 13651 = DSM 17969) は同じ水田の水稲の根から分離した.

Ueki, A., Akasaka, H., Satoh, A., Suzuki, D. & Ueki, K. (2007). *Prevotella paludivivens* sp. nov., a novel strictly-anaerobic, Gram-negative, hemicellulose-decomposing bacterium isolated from plant residue and rice roots in irrigated rice-field soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1803-1809.

**WR041 株の記載** 本菌株は牛舎からの排泄物等を収集して処理しているメタン発酵槽の稲わら残渣から分離した. 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく最近縁種は本研究で新種としての記載を行った上記の *Prevotella paludivivens* KB7<sup>T</sup> (塩基配列の類似性は 97.5%) である. 両者の細胞形態, 基質利用性等を含むその他の表現型の特徴は概ね同じであるが, 基質利用性の点で, KB7<sup>T</sup> 株がイヌリンを利用しないのに対して本菌株はイヌリンを利用して良く増殖し, 酢酸とコハク酸を生成する点と, 前者はリボースの弱い利用性があるが, 後者は利用しない点が異なる. ヘミン要求性がある. ビタミン添加によって増殖を促進されない. 増殖範囲は 10~40°C (最適温度 35°C), pH 4.8~8.2 (最適 pH 6.8), 0~2% (w/v) NaCl (最適 NaCl 濃度 0%, w/v). 最終 pH は 4.7~4.8. ゲノム DNA の G+C 含量は 35.1 mol%. 主な菌体脂肪酸は anteiso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>17:0</sub> 3-OH, iso-C<sub>15:0</sub> および iso-C<sub>14:0</sub> である. 主要な呼吸鎖キノンはメナキノン MK-11(H<sub>0</sub>)

と MK-12(H<sub>2</sub>) である。系統のおよび表現型の特徴から本菌株は *Prevotella* 属に配属される。哺乳動物以外の試料からの本属の分離例としては、上述した *P. paludivivens* について 2 例目である。本菌株と *P. paludivivens* の特徴には共通点が多いものの、異なる点もあり、本菌株と *P. paludivivens* KB7<sup>T</sup> 株間の DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行って DNA の相同性を決定した上で、本菌株の帰属を決定する必要がある。

**Firmicutes** 門 *Clostridium* 属類縁細菌について牛舎排泄物メタン発酵槽から分離した *Firmicutes* 門 *Clostridium* 属類縁細菌について系統分類学的特徴付けを行い、セルロース分解とアミノ酸分解をそれぞれ特徴とする 2 系統の細菌について新種または新属・新種としての記載を公表した。またその他に、異なる 3 系統のアミノ酸分解性の菌株について同様の特徴付けを行った。以下にその記載を示す。

***Clostridium sufflavum* Nishiyama et al. 2009 の記載**

*Clostridium sufflavum* (suf. fla'vum. L. neut. adj. *sufflavum* light yellow, referring to its yellow pigment production).

Clostridia cluster III に属す。偏性嫌気性。細胞は僅かに湾曲した桿菌（幅 0.5~0.6 μm, 長さ 2.0~5.0 μm）で単独か対で存在する。周鞭毛により運動する。グラム染色性は陰性であるが、KOH 試験では陽性に反応する。細胞の顕微鏡観察では胞子は確認できない。PY4S 寒天培地や PYG 液体培地で増殖した細胞は 80℃ で 10 分間の熱処理後は増殖しないが、セルロース（ろ紙断片）を基質として増殖した細胞は熱処理後も増殖するため、胞子または耐熱性細胞を形成する。コロニーは半透明で、不定形である。増殖範囲は 20~33℃（最適温度 33℃）、pH 5.9~8.2（最適 pH 7.4）。0~0.5% (w/v) NaCl（最適 NaCl 濃度 0%, w/v）。オキシダーゼ、カタラーゼ、硝酸還元活性は検出されない。キシロース、フルクトース、グルコース、セロビオース、キシロオリゴ糖、セルロース（ろ紙）およびキシランを利用する。これらの基質から酢酸、エタノール、H<sub>2</sub> および CO<sub>2</sub> を生成する。リボース、CMC およびソルビトールを僅かに利用する。アラビノース、ガラクトース、マンノース、ラムノース、ラクトース、マルトース、メリビオース、スクロース、トレハロース、メレジトース、ラフィノース、グリコーゲン、イヌリン、ペクチン、イノシトール、マンニトール、アミグダリンおよびサリシンを利用し

ない。エスクリンとデンプンを加水分解しない。インドール、硫化水素、レシチナーゼおよびリパーゼを生成しない。牛乳の消化および凝固をしない。肉を消化しない。ゲノム DNA の G+C 含量は 40.7 mol%。細胞壁ペプチドグリカンのジアミノ酸として *meso*-DAP を含む。主要な菌体脂肪酸は iso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>14:0</sub> および C<sub>16:0</sub> dimethylacetal (DMA) である。呼吸鎖キノンを持っていない。基準菌株 CDT-1<sup>T</sup> (=JCM 14807<sup>T</sup>=DSM 19573<sup>T</sup>) は、牛舎排泄物を処理しているメタン発酵槽の稲わら残渣を分離源とするろ紙断片を用いた集積培養を経て分離された。

Nishiyama, T., Ueki, A., Kaku, N. & Ueki, K. (2009). *Clostridium sufflavum* sp. nov., isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 981-986.

***Anaerosphaera aminiphila* の記載**

***Anaerosphaera Ueki et al.* の記載 (in press)**

*Anaerosphaera* (A.na.e.ro.spha'e.ra. Gr. prep. *an* not; Gr. n. *aer* air; *anaero* not living in air; L. fem. n. *sphaera* a sphere; N.L. fem. n. *Anaerosphaera* sphere not living in air).

Clostridia cluster XIII に属す。偏性嫌気性グラム陽性非運動性球菌。耐熱性細胞または胞子を形成する。炭水化物利用しない。アミノ酸またはペプトンを発酵的に利用する。細胞壁ペプチドグリカンのジアミノ酸としてリジンを含む。基準種は *Anaerosphaera aminiphila*。

***Anaerosphaera aminiphila Ueki et al.* (in press) の記載**

*Anaerosphaera aminiphila* (a.mi.ni.phi'la. N.L. n. *aminum* amine; Gr. adj. *philos* loving; N.L. fem. adj. *aminiphila* amino acid-loving).

上述したこの属の特徴に加えて以下の特徴を持つ。細胞の直径は 0.7~0.9 μm で、2 細胞が対になる場合が多いが、連鎖はしない。顕微鏡観察では胞子の存在を確認できないが、80℃ で 10 分間の熱処理後も生存している細胞が全細胞の約 0.1% (MPN 計数に基づく) の割合で存在する。オキシダーゼとカタラーゼ活性はない。増殖範囲は 10~37℃（最適温度 35~37℃）、pH 5.8~7.8（最適 pH 6.7）、0~4% (w/v) NaCl（最適 NaCl 濃度 0%, w/v）。PY 培地から少量の酢酸と酪酸および微量のプロピオン酸を生成する。糖、有機酸、アルコール等を利用しない。L-グルタミン酸塩、L-グルタミン、L-ヒスチジンを利用して活発に増殖し、高濃度の酢酸と酪酸を生成する。H<sub>2</sub> は生成しない。L-アルギニンを利用して増殖して酢酸を生成するが、酪酸は生成しな

い。この他のアミノ酸は利用しない。オキシダーゼとカタラーゼ活性を持っていない。エスクリンを加水分解するが、デンプンとゼラチンは分解しない。硫化水素を生成し、インドールは生成しない。硝酸還元、レシチナーゼ、リパーゼおよびウレアーゼ活性を持っていない。牛乳の消化および凝固をしない。肉を消化しない。胆汁耐性を持たない。ゲノム DNA の G+C 含量は 32.5 mol%。主な菌体脂肪酸は C<sub>17:1</sub>ω8, C<sub>18:1</sub>ω7 DMA および C<sub>16:0</sub> であり、不飽和の脂肪酸および DMA が全成分の 60% 以上を占める。細胞壁アミノ酸として、リジンの他、グルタミン酸、グリシン、アラニンおよびアスパラギン酸を含む。呼吸鎖キノンを持っていない。基準菌株 WN036<sup>T</sup> (=JCM 15094<sup>T</sup> =DSM 21120<sup>T</sup>) は、牛舎排泄物を処理しているメタン発酵槽の稲わら残渣から分離された。

Ueki, A., Abe, K., Suzuki, D., Kaku, N., Watanabe, K. & Ueki, K. *Anaerospaera aminiphila* gen. nov., sp. nov., a glutamate-degrading, Gram-positive anaerobic coccus isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press).

**FH042 株の記載** 偏性嫌気性。細胞は 1 本の極鞭毛により運動するやや湾曲した桿菌（幅 0.7~1.0 μm, 長さ 2.6~6.0 μm）で、長い（~30 μm）細胞が混じる場合があるが連鎖はしない。グラム染色性は陰性であるが、KOH 試験ではグラム陽性の反応を示す。顕微鏡による観察では孢子の存在は確認されないが、80℃で10分間の熱処理後の細胞は液体培地で増殖するため、耐熱性細胞または孢子を形成する。オキシダーゼとカタラーゼ活性はない。増殖範囲は 10~35℃（最適温度は 30℃であるが、30℃以上の培養では定常期の細胞は溶菌し易い）、pH 5.3~8.2（最適 pH 6.1）、0~2% (w/v) NaCl（最適 NaCl 濃度 0%, w/v）。PY 培地でも一定の増殖を示し、少量の酢酸および酪酸を生成する。各種の糖類や有機酸等を PY 培地に添加して培養しても、増殖は PY 培地の場合と比べて改善されず、これらの基質の利用性は認められない。L-アルギニンおよび L-リジンを利用して増殖し、それぞれ酢酸と酪酸および少量の H<sub>2</sub> を生成する。酢酸と酪酸の生成比率は前者で概ね 1:1 であるのに対し、後者では 2:1 である。各培地での最終 pH は前者が 7.8 で、後者が 5.2。L-セリンについても弱い利用性を示して酢酸を生成する。その他のアミノ酸は利用しない。エスクリンとデンプンを加水分解しない。硫化水素を生成する。インドール、レシチナーゼおよびリパーゼを生成しない。牛乳の消化および凝固をしない。

い。肉を消化しない。ゲノム DNA の G+C 含量は 49.0 mol%。細胞壁ペプチドグリカンのジアミノ酸として *meso*-DAP を含む。主な菌体脂肪酸は C<sub>18:1</sub>ω9 DMA, C<sub>17:2</sub>, C<sub>16:0</sub> DMA および C<sub>14:0</sub> であり、偶数 DMA が主要成分である。呼吸鎖キノンを持っていない。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく最近縁種は *Anaerovorax odorimutans* (Clostridia cluster XI)（類似性 94.4%）である。最近縁種はアミノ酸を利用せず、その他の特徴も本菌株のものと大きく異なる。このため、本菌株は新規系統を代表すると判断される。

**WN011 株の記載** 偏性嫌気性。細胞は 1 本の極鞭毛により運動し、細胞の両端が尖った湾曲した小型桿菌（幅 0.4~0.6 μm, 長さ 1.2~2.3 μm）で、連鎖しない。グラム染色性は陰性であるが、KOH 試験ではグラム陽性の反応を示す。顕微鏡による観察では孢子の存在は確認されず、80℃で10分間の熱処理後の細胞は増殖しない。オキシダーゼ、カタラーゼ、硝酸還元活性はない。増殖範囲は 15~40℃（最適温度 30~35℃）、pH 5.8~7.5（最適 pH 6.7）、0~2% (w/v) NaCl（最適 NaCl 濃度 0%, w/v）。基質無添加の PY 培地でも良く増殖し、酢酸、酪酸、イソ吉草酸および H<sub>2</sub> を生成し、この他に微量のプロピオン酸とイソ酪酸を生成する。糖および有機酸等を PY 培地に添加して培養してもその増殖は PY 培地の場合と比べて改善されず、これらの基質の利用性は認められない。各種アミノ酸（L-リジン、L-グリシン、L-セリンおよび L-スレオニン）を利用して増殖する。各培地での最終 pH は 6.4~6.6。その他のアミノ酸は利用しない。硫化水素を生成する。エスクリンを加水分解するがデンプンを分解しない。インドール、レシチナーゼおよびリパーゼを生成しない。牛乳の消化および凝固をせず、肉を消化しない。ゲノム DNA の G+C 含量は 39.4 mol%。細胞壁ペプチドグリカンのジアミノ酸として *meso*-DAP を含む。主な菌体脂肪酸は *iso*-C<sub>15:0</sub> DMA, *iso*-C<sub>15:0</sub> aldehyde, *iso*-C<sub>15:0</sub> および *anteiso*-C<sub>15:0</sub> DMA 等であり、C<sub>15</sub> 化合物が約 70% を占め、さらに DMA および aldehyde を主要成分として持つ。呼吸鎖キノンは検出されない。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく最近縁種は *Clostridium boltae* (Clostridia cluster XIVb)（類似性 93.5%）である。最近縁種はグルコースを初めとする糖を利用する点で本菌株と特徴を異にする他、細胞形態や発酵生成物等も大きく異なる。このため、本菌株は新規系統を代表すると判断される。

**SH021 株の記載** 偏性嫌気性。細胞は1本の極鞭毛により運動する直桿菌(幅 $0.7\mu\text{m}$ ,長さ $2.6\sim 10\mu\text{m}$ )で,連鎖しない。グラム染色性は陽性。顕微鏡観察では胞子の存在は確認されないが,  $80^\circ\text{C}$ で10分間の熱処理後の細胞は液体培地で増殖するため,耐熱性細胞または胞子を形成する。オキシダーゼとカタラーゼ活性はない。増殖範囲は $15\sim 40^\circ\text{C}$ (最適温度 $30\sim 35^\circ\text{C}$ ), pH  $6.1\sim 8.2$ (最適 pH  $6\sim 7$ ),  $0\sim 2\%$ (w/v) NaCl(最適 NaCl 濃度 $0\%$ , w/v)。PY 培地でも弱いながら増殖し,プロピオン酸,酪酸,イソ吉草酸および微量の酢酸とイソ酪酸を生成する。糖および有機酸等をPY 培地に添加して培養しても増殖はPY 培地の場合と比べ改善されず,これらの基質の利用性は認められない。L-アラニンとL-セリンを利用して増殖し,酢酸とプロピオン酸およびイソ吉草酸を生成する。さらにL-イソロイシンおよびL-ロイシンを利用してイソ吉草酸を生成する。L-スレオニンからプロピオン酸と酪酸を生成する。 $\text{H}_2$ はいずれの基質からも生成しない。各培地での最終 pH は $6.4\sim 6.6$ 。その他のアミノ酸は利用しない。硫化水素を生成する。エスクリンとデンプンを加水分解しない。インドール,レシチナーゼおよびリパーゼを生成しない。牛乳の消化および凝固をしない。肉を消化しない。ゲノム DNA の G+C 含量は $42.0\text{ mol}\%$ 。細胞壁ペプチドグリカンのジアミノ酸として meso-DAP を含む。主な菌体脂肪酸は iso- $\text{C}_{15:0}$  DMA, iso- $\text{C}_{15:0}$  aldehyde, iso- $\text{C}_{15:0}$  および anteiso- $\text{C}_{15:0}$  DMA 等であり,  $\text{C}_{15}$  化合物が $50\%$ 以上を占め,さらに DMA および aldehyde が主要成分として検出される。呼吸鎖キノンの TLC 分析では,メナキノンの存在を示すスポットが検出される(現在さらに検討中)。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく最近縁種は *Clostridium lactatifermentans* (Clostridia cluster XIVb) (類似性 $94.8\%$ )である。最近縁種とはアミノ酸の利用性等の点では共通点があるものの,糖の利用性(最近縁種はグルコースやキシロースを利用する)や,細胞の特徴等が本菌株のものと大きく異なる。このため,本菌株は新規系統を代表すると判断される。

## 考 察

**硫酸還元細菌について** 本研究で特徴付けを行った酒田港堆積物から分離した4系統の硫酸還元細菌は全て *Deltaproteobacteria* 綱 (Kuever *et al.*, 2005) に配属されたものの,この綱の中で各菌株は概ね目レベルで離れて配置され,同じ環境から採取した試料から多系統の新規硫酸還元細菌を分離した結果となった。本

研究室ではこの4系統の硫酸還元細菌の他にも,同じ試料から2系統の硫酸還元細菌を分離している (Fig. 1)。硫酸還元細菌は,嫌氣的有機物分解の中間代謝物として位置づけることが可能な各種有機酸やアルコール,さらに  $\text{H}_2$ 等を硫酸還元のための電子供与体として利用することにより,有機物の嫌氣的分解過程で重要な位置を占めている。本研究で明らかになったように,酒田港堆積物から分離した硫酸還元細菌はいずれも,ギ酸塩,ピルビン酸塩,乳酸塩およびエタノールといった硫酸還元反応の一般的な電子供与体利用性を示す一方で,プロピオン酸塩,酪酸塩,コハク酸,セリンといった化合物は一つの系統の分離菌株しか利用しなかった。これらの結果は,海洋堆積物中では,電子供与体利用性を含む生理的性質を異にする多様な硫酸還元細菌グループが,それぞれ異なる生態学的役割を担うことにより,互いに補完し合いながら,硫酸還元細菌群集全体として,嫌氣的有機物分解過程とイオウ循環において重要な機能を果たしていることを示している。なお, *Desulfopila aestuarii* は呼吸鎖キノンとして MK-8( $\text{H}_2$ )を持っていた。メナキノンは硫酸還元細菌ではその存在がこれまであまり知られていなかったキノンである。また酪酸塩を酸化する海洋性硫酸還元細菌の多くは完全酸化型であるが, *Desulfoluna butyratoxydans* は,酪酸塩を不完全酸化する点で,貴重な新規海洋性硫酸還元細菌である。なお, *Desulfobulbus* 属の種はいずれもプロピオン酸塩を不完全酸化するが,これまでに記載されている海洋性の種の記載は全てヨーロッパ地域からの分離菌株に基づくものばかりであった。本研究で記載した *Desulfobulbus japonicus* は日本の沿岸堆積物からのこの属の初めての種の記載となった。

酪酸を電子供与体として下水汚泥嫌気消化槽から分離した *Desulfovibrio butyratiphilus* BSY<sup>T</sup>株と BST 株は,16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく *Desulfovibrio putealis* に近縁 ( $95.3\%$ )に位置づけられたが,酪酸塩,2-メチル酪酸塩,吉草酸塩等を電子供与体として利用する点で, *Desulfovibrio* 属の種ではこれまで知られていない電子供与体利用性を持っていた。また,菌体脂肪酸組成も,既知の *Desulfovibrio* 属の種で一般的に知られているものとは大きく異なった (Kuever *et al.*, 2005; Ueki & Suto, 1979)。BSY<sup>T</sup>株と BST 株は横浜市と山形県鶴岡市という距離的にも離れた下水汚泥の消化槽を分離源として集積培養により分離された。これらの菌株の集積培養には,硫酸還元細菌には一般的にはあまり用いられていない  $\text{N}_2$ と  $\text{CO}_2$ の混合ガス ( $95:5$ )を気相として用いた。上述した酒田港堆積物由来の海洋性菌株は全て  $\text{N}_2$   $100\%$  気

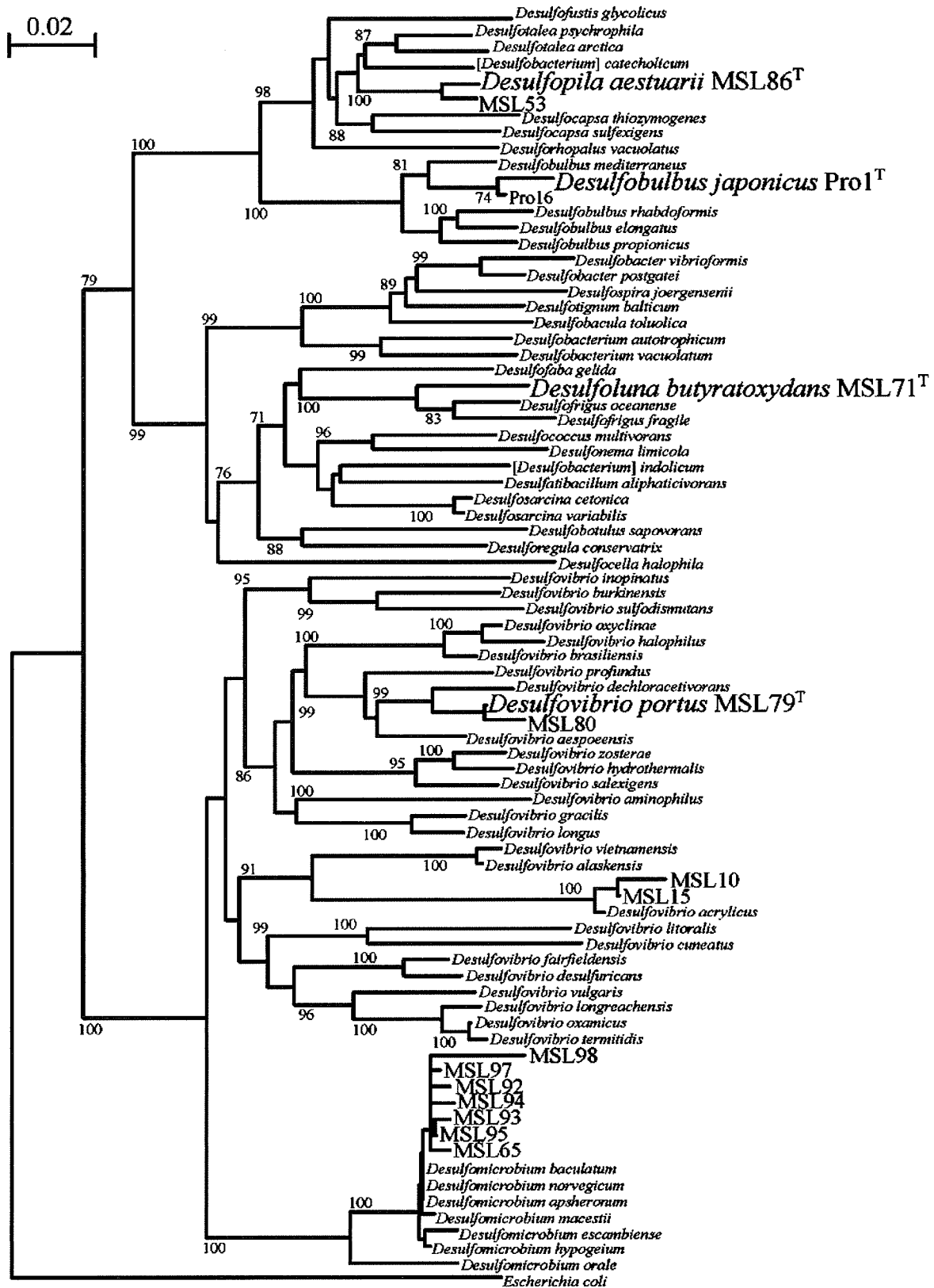


Fig. 1 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationship of *Desulfopila aestuarii* MSL86<sup>T</sup>, *Desulfoluna butyratoxydans* MSL71<sup>T</sup>, *Desulfovibrio portus* MSL79<sup>T</sup>, *Desulfobulbus japonicus* Pro1<sup>T</sup>, other isolates (with "MSL" as strain numbers) and some related species in the class Deltaproteobacteria based on 16S rRNA gene sequences. Bar, 2% estimated difference in nucleotide sequence position.

相で問題なく増殖するのに対し、この両菌株は N<sub>2</sub> 100% 気相では増殖しなかった。両菌株は弱いながらも独立栄養的にも増殖できるが、有機化合物を電子供与体として従属栄養的に増殖する場合も、気相に CO<sub>2</sub> がないと増殖しなかった。異なる試料から、全く同じ系統の、既知の種とは大きく性質を異にする新規系統の硫酸還元細菌が集積・分離されたのは、用いたこの気相の組成も大きく影響している可能性がある。環境中に棲息する未培養の微生物の分離培養は、この例のように、非常に微妙な各微生物種の環境中におけるニッチの違いを、培養条件にいかに関与させるかが重要であることを示唆しているように思われる。

BSY<sup>r</sup>株と BST 株の 2 菌株と、最近縁種である *D. putealis* の次に近縁な種 (*Desulfovibrio sulfodismutans* および *Desulfovibrio carbinolicus*) との配列類似性は約 90.5% と低く、*Desulfovibrio* 属の種で構成される系統樹上でも、両菌株は *D. putealis* と共に深く分岐したクラスターを形成する。*Desulfovibrio* 属は系統的には非常に幅広い種を含んでおり、この属の基準種である *Desulfovibrio desulfuricans* と BSY<sup>r</sup>株との配列類似性は 86.7% である。同様に、酒田港堆積物からの分離菌株の中でこの属に含まれる *Desulfovibrio portus* MSL79<sup>r</sup>株と *D. desulfuricans* との配列類似性は 85.4% である。*Desulfovibrio* 属には現在、この 2 種を含め 50 種以上が含まれているが、この属の種はいずれも湾曲桿菌であり、電子供与体の利用性が不完全酸化型である点などの生理学的な共通性もあるものの、系統学的にはこのように、一つの属としては極めて幅広い種が包含されている。

**Bacteroidetes 門 *Bacteroides* 属類縁細菌について**  
**Bacteroidetes 門の *Bacteroides* 属類縁細菌**  
 (*Bacteroides* 属、*Prevotella* 属および *Porphyromonas* 属等) は、いずれも偏性嫌気性グラム陰性の非孢子形成桿菌であり、これまで記載されている種のほとんどが、ヒト糞便、口腔、臨床関連、ルーメン等の哺乳動物由来試料から分離されたものである (Paster *et al.*, 1994; 坂本, 2007)。環境試料から直接抽出した DNA を用いた細菌のクローン解析では、環境中の様々な無酸素環境中に、関連の細菌が分布していることが明らかになってきているが (Chouari *et al.*, 2005; Godon *et al.*, 1997; Levén *et al.*, 2007)、環境中から *Bacteroides* 属類縁細菌を実際に分離した例は非常に限られている (Whitehead *et al.*, 2005)。本研究では、水田土壌 (Akasaka *et al.*, 2003) およびメタン発酵槽から分離した *Bacteroides* 属類縁細菌についてそ

の特徴付けを行い、3 系統の分離菌株について新種としての記載を公表し、その他の 2 系統の分離菌株についても特徴付けを終了した。

筆者らは、本研究より以前に、水田土壌の植物残渣から分離した *Bacteroides* 属類縁の偏性嫌気性グラム陰性桿菌の 2 系統の新属・新種 (*Paludibacter propionigenes* および *Xylanibacter oryzae*) に関する記載を公表した (Ueki *et al.*, 2006a, b)。上述したように既知の *Bacteroides* 属類縁種のほとんど大部分は哺乳動物関連試料由来であり、この 2 系統の種を含め、筆者らが分離し、記載した種は、動物以外の試料から分離された種の記載としては *Bacteroides* 属では 2 例目、*Prevotellaceae* 科の種としては初めて (*X. oryzae*) と 2 例目 (*Prevotella paludivivens*) であった (Fig. 2)。我々が水田土壌およびメタン発酵槽から分離したこれらの *Bacteroides* 属類縁種の主な特徴を、既知の種のものとして以下に比較した。

これらの菌株の細胞形態はいずれも桿菌であり、長さを異にする長い細胞を含む場合が多いが、これは *Bacteroides* 属類縁細菌の一般的特徴である。培養条件によっては、ほとんどが糸状性の細胞で占められる場合もある (Fig. 3)。増殖の最適温度は 30℃ または 35℃ で、ヒトの体温である 37℃ では増殖が悪いかまたは増殖しなかった。メタン発酵槽由来の菌株は弱アルカリ性の条件を最適とするものが複数系統あり、これらの菌株は pH 6.0 以下では増殖が遅くなる傾向があった。家畜排泄物等を処理するメタン発酵系の場合、アンモニアの蓄積に伴って発酵液の pH が上昇するケースが多く、これらの細菌の増殖における pH 条件には、このような環境条件が反映していると考えられる。既知の *Bacteroides* 属の種には胆汁耐性をもつかあるいは胆汁によって増殖促進を受けるものが多い (坂本, 2007)。しかし、本研究で用いたいずれの分離菌株も低濃度の胆汁 (oxgall または bile salts) 存在下で増殖が阻害された (Table 1)。

哺乳動物由来の *Bacteroides* 属類縁細菌は一般にヘミン要求性を持つ。筆者らの分離菌株についても *Porphyromonadaceae* 科に属す *P. propionigenes* 以外は全て増殖にヘミンを必須に要求した。このため培養実験等のために液体培地でこれらの菌株を培養する時はいずれもヘミンを添加して培養した。しかし、ヘミン存在下で速い速度で増殖した培養の定常期細胞を接種源として新しい培地に接種した場合、その増殖が著しく遅れる菌株が多く、再現性のある増殖経過を得ることが困難な場合が多かった。この傾向は、ヘミンがなくても唯一速い増殖速度を示した *P. propionigenes* においても同様であった。このこと

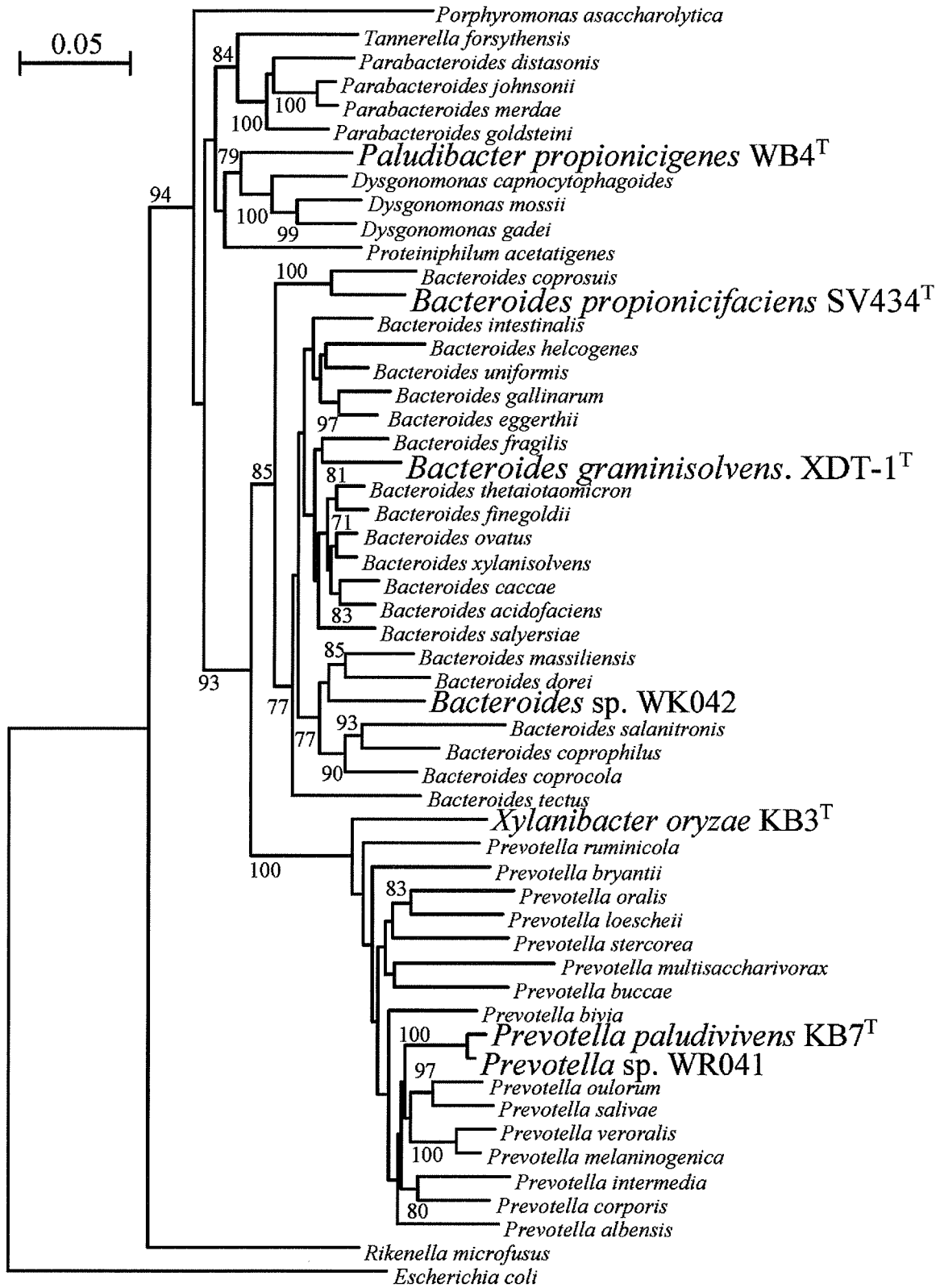


Fig. 2 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationship of *Paludibacter propionigenes* WB4<sup>T</sup>, *Bacteroides propionificiens* SV434<sup>T</sup>, *Bacteroides graminisolvens* XDT-1<sup>T</sup>, *Bacteroides sp.* WK042, *Xylanibacter oryzae* KB3<sup>T</sup>, *Prevotella paludivivens* KB7<sup>T</sup>, *Prevotella sp.* WR041 and some related species in the families (*Porphyromonadaceae*, *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*) in the order *Bacteroidales* based on 16S rRNA gene sequences. Bar, 5% estimated difference in nucleotide sequence position.

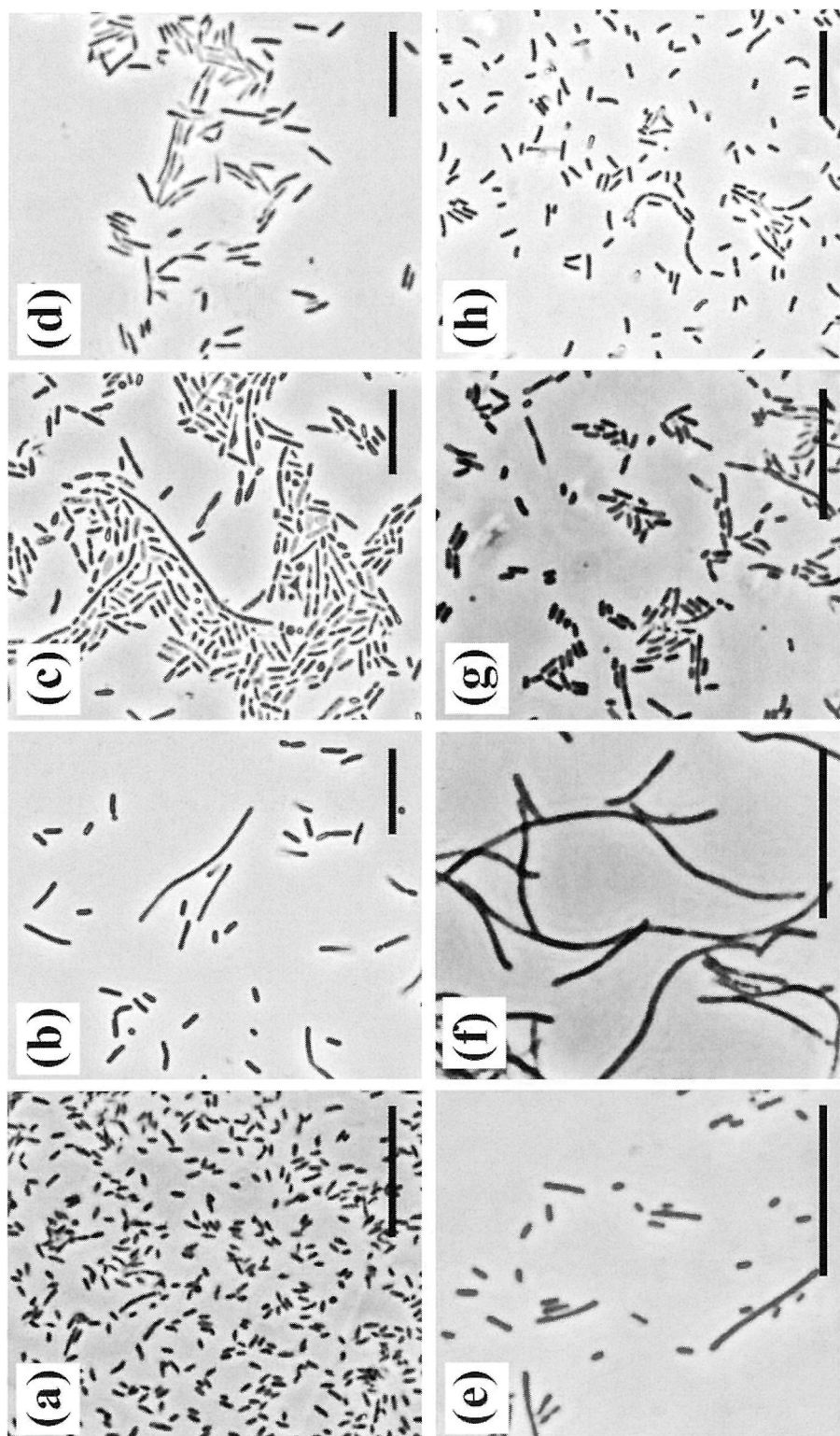


Fig. 3 Phase-contrast photomicrographs of cells of isolates in the phylum *Bacteroidetes*. (a), *Paludibacter propionigenes* WB4<sup>T</sup>; (b), *Bacteroides propionificiens* SV434<sup>T</sup>; (c), *Bacteroides graminisolvens*. XDT-1<sup>T</sup>; (d), *Bacteroides* sp. WK042; (e) and (f), *Xylanibacter oryzae* KB3<sup>T</sup>; (g), *Prevotella paludivivens* KB7<sup>T</sup>; (h), *Prevotella* sp. WR041. Except for (e), cells grown anaerobically on agar slants of PY4S medium. (e) cells grown anaerobically in PYHVG liquid medium. Bar, 10  $\mu$ m.



Table 1 Physiological characteristics of isolates in the phylum *Bacteroidetes*.

Characteristics	<i>Paludibacter propionigenes</i>	<i>Bacteroides propionifaciens</i>	<i>Bacteroides graminisohvens</i>	<i>Bacteroides sp.</i>	<i>Xylamibacter oryzae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella sp.</i>
	WB4 <sup>T</sup>	SV434 <sup>T</sup>	XDT-1 <sup>T</sup>	WK042	KB3 <sup>T</sup>	KB7 <sup>T</sup>	WR041
Source	Plant residue in rice-field soil	Methanogenic reactor	Methanogenic reactor	Methanogenic reactor	Plant residue in rice-field soil	Plant residue in rice-field soil	Methanogenic reactor
Cell shape	Short Rods	Rods	Rods	Rods	Short to filamentous	Rods	Rods
Optimum growth conditions							
Temperature (°C)	30	30	30-35	35	30	30	35
pH	6.6	7.9	7.2	7.7	5.7-6.2	5.7-6.7	6.8
Catalase	—	±	—	—	—	—	—
Hemin requirement	—	+	+	+	+	+	+
Vitamin B <sub>12</sub> requirement	—	Es	St	St	St	—	—
Products from glucose	A, P, s	A, P, l, s	A, P, py, s	A, P, S	A, P, s	A, S, m	A, S
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	—	—	—	—	—	—	—
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	—	—	—	—	—	—	—
Growth in bile	—	—	—	—	—	—	—
Utilization of substrates							
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	—	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	—	+	+	+
Sucrose	—	—	+	—	+	+	+
Trehalose	—	—	—	—	+	—	—
Cellulose powder	—	—	—	—	—	—	—
Soluble starch	+	+	+	w+	+	+	+
Pectin	—	—	+	w+	+	+	+
Xylan	—	—	+	—	+	+	+
Inulin	—	—	w+	—	—	—	+

Symbols: +, positive; —, negative; w+, weakly positive; ±, variable; Es, essential; St, stimulatory.

Products: A, acetate; P, propionate; py, pyruvate; l, lactate; m, malate; S/s, succinate. Lower-case letters indicate minor products.

は、増殖に適した条件下で速い速度で増殖したこのグループの細菌の細胞は、定常的に達すると急速に増殖能力を失うかまたは死滅することを示しているものと思われ、増殖にヘミンを必須に要求する栄養要求性と共に、これらの系統の細菌を難培養にしている原因の一つと考えられた。

分離菌株のうち *Prevotella* 属に配属された菌株以外は全て酢酸と共にプロピオン酸を主な発酵生成物としたが、これらのプロピオン酸生成菌株のうち *P. propionigenes* 以外はビタミン B<sub>12</sub> を必須に要求するか、あるいはビタミン B<sub>12</sub> によって増殖が促進された。ビタミン B<sub>12</sub> は、プロピオン酸生成経路の一つであるメチルマロニル CoA 経路に必須の補酵素である。筆者らが調べた結果では、これら菌株を分離したメタン発酵槽の汚泥中にはビタミン B<sub>12</sub> が高濃度で含まれていた。また、水田土壤中の稲わら残渣の抽出液にもビタミン B<sub>12</sub> が含まれていた (Akasaka *et al.*, 2004)。ヒトの大腸内における腸内細菌によるビタミン B<sub>12</sub> の生成は、ヒトの健康にとっても必須のものであることがよく知られている。ビタミン B<sub>12</sub> は *Propionibacterium* 属細菌のようなプロピオン酸生成細菌の他、メタン生成古細菌も生成することが知られている。既知の *Bacteroides* 属類縁細菌は一般に酢酸とコハク酸を主な生成物とし、プロピオン酸はあまり生成しないグループであると認識されてきている。しかし、自らの細胞内ではビタミン B<sub>12</sub> を合成できないグループが、他のビタミン B<sub>12</sub> を合成できる微生物からのビタミン B<sub>12</sub> 供給に依存して、無酸素環境中で活発なプロピオン酸生成を行っている可能性が示された。

基質利用性の点では、キシランおよびペクチンの他、キシロースおよびセロビオースなどの植物バイオマス関連の基質分解能を持つものが多かった。特に、*Bacteroides graminisolvens* と *X. oryzae* の2種はビタミン B<sub>12</sub> 存在下でキシランを分解してプロピオン酸を最も主要な生成物とした。この結果は、最近報告されたヒト大腸内に棲息する *Bacteroides* 属細菌による植物バイオマスの分解に伴うプロピオン酸生成の結果と一致するものである (Chassard *et al.*, 2007, 2008)。*Bacteroides* 属類縁種の一部は、セルロース分解性はないものの、環境中においてセルロース分解性の種と共に、キシランやペクチンといった植物バイオマス分解という点で機能しているように思われる。

化学分類学的特徴としては、いずれも既知の哺乳動物由来の種と同一の傾向があり、主な菌体脂肪酸は anteiso-C<sub>15:0</sub> および iso-C<sub>15:0</sub> 等の分岐奇数鎖脂肪酸であり、その他に iso-C<sub>17:0</sub> 3-OH を主とするヒドロキシ脂

肪酸をほとんどの菌株が持っていた (Miyagawa *et al.*, 1979; Moore *et al.*, 1994)。いずれの菌株からも呼吸鎖キノンとしてメナキノンが検出された (Table 2) (Shah & Collins, 1983)。

以上のように水田土壌やメタン発酵槽といった哺乳動物以外の環境に棲息する *Bacteroides* 属類縁の嫌気性細菌は、既知の類縁細菌と基本的に共通の細胞、生理、および化学分類学的特徴を持っていた。しかし、特に増殖温度や胆汁耐性といった点で、これらの種は明らかに哺乳動物由来の種とは異なる生理学的特徴をもっていた。一方、環境試料由来の細菌で、ヘミン要求性があることが確認されている細菌の種は、嫌気性細菌に限らずおそらくこれまでに知られていない、動物の身体に棲息する *Bacteroides* 属類縁種のヘミン要求性は一般に、血液の存在や病原性との関連で考察されてきており、環境中に棲息する *Bacteroides* 属類縁細菌が同様のヘミン要求性を持つことは、動物の身体の中で棲息する同じグループの細菌の由来を考える上で興味深い。特に水田土壌などに棲息している *Bacteroides* 属類縁細菌が、動物の身体から分布を広げて水田土壌中に定着したとは考えにくく、元来環境中で植物バイオマスの分解等に関与していたこのグループの細菌の一部が、哺乳動物の体内に入り込みその分布域を広げたのではないかと推察される。

**Firmicutes 門 *Clostridium* 属類縁細菌** について本研究ではいずれも牛舎排泄物を処理しているメタン発酵槽から分離した *Firmicutes* 門の *Clostridium* 属類縁細菌 (Cato *et al.*, 1986; Collins *et al.*, 1994) について特徴付けを行った。このうちセルロース分解性の *Clostridium sufflavum* CDT-1<sup>r</sup> 株はろ紙を基質として用いた集積培養を経て分離したものである。本菌株は、フルクトースを除いて、基本的にセルロースおよびヘミセルロース関連の糖類のみを利用し、植物細胞壁分解に特化した細菌と考えられた。本菌株は、ろ紙断片を含む培地に接種後、ろ紙が黄色みを帯びるようになり、これをきっかけにろ紙が目に見えてほぐれ始め、暫くするとろ紙は完全にばらばらになった。セルロース分解細菌としてよく知られている好熱性嫌気性細菌であり本菌株と同じ Cluster III (Collins *et al.*, 1994) に属す *Clostridium thermocellum* も、カロテノイド系の黄色色素を生成することが知られている。この色素は、細胞が生成するセルラーゼのセルロース基質への結合を促進すると考えられている。黄色色素は本菌株においても同様の機能を果たしているものと推察されるものの、同じ *Clostridium* 属のセルロース分解性の種でもこの色素を生成しないものも多く、本

Table 2 Chemotaxonomic characteristics of isolates in the phylum *Bacteroidetes*.

Characteristics	<i>Paludibacter proptoniceigenes</i>	<i>Bacteroides proptoniceifaciens</i>	<i>Bacteroides graminisolvans</i>	<i>Bacteroides</i> sp. WK042	<i>Xylanimicrobium oryzae</i> KB3 <sup>T</sup>	<i>Prevotella paltudivivens</i> KB7 <sup>T</sup>	<i>Prevotella</i> sp. WR041
DNA G+C content (mol%)	39.3	46.2-47.5	38.0	41.0	43.6	39.2	35.1
Major respiratory quinones	MK-8(H <sub>4</sub> )	MK-8 MK-9	MK-10	MK-11	MK-12(H <sub>2</sub> ) MK-13(H <sub>2</sub> )	MK-11 MK-11(H <sub>2</sub> )	MK-11 MK-12
Cellular fatty acids (%)							
Saturated straight-chain							
C <sub>15:0</sub>	19.0	2.8	4.0	12.9	4.7	10.1	4.6
C <sub>16:0</sub>	4.9	2.5	3.0	7.2	3.1	3.3	4.3
Saturated branched-chain							
anteiso-C <sub>13:0</sub>	—	1.7	7.0	6.9	—	1.9	1.0
iso-C <sub>14:0</sub>	0.3	—	2.0	1.0	—	7.9	7.8
iso-C <sub>15:0</sub>	1.1	6.3	8.9	6.7	3.7	11.9	8.2
anteiso-C <sub>15:0</sub>	30.8	41.2	33.4	24.5	42.2	27.3	43.5
iso-C <sub>17:0</sub>	0.3	16.1	—	1.4	3.3	0.1	0.4
anteiso-C <sub>17:0</sub>	0.8	14.0	1.2	1.4	—	0.2	0.5
Hydroxy acids							
C <sub>16:0</sub> 3-OH	2.4	—	1.3	3.0	—	6.8	6.0
iso-C <sub>17:0</sub> 3-OH	6.2	—	20.0	15.5	21.8	9.1	10.0
anteiso-C <sub>17:0</sub> 3-OH	17.9	—	3.6	2.0	3.7	2.1	2.9

—, not detected.

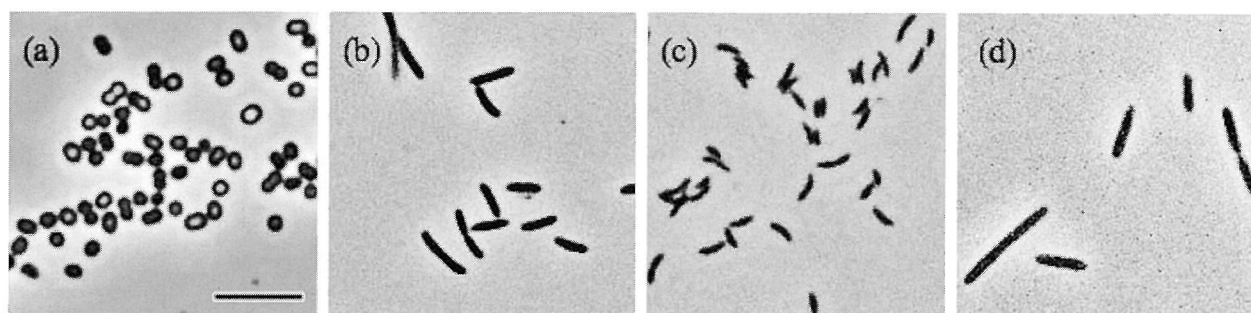


Fig. 4 Phase-contrast photomicrographs of cells of isolates in the class *Clostridia*. (a), *Anaerosphaera aminiphila* WN036<sup>T</sup>; (b), FH042; (c), WN011; (d), SH021. Bar, 5 μm.

菌株における黄色色素のセルロース分解における意義について興味を持たれる。

その他の4系統 (Fig. 4) の菌株は全てアミノ酸分解性で、糖非分解性であった。このうち *Anaerosphaera aminiphila* WN036<sup>T</sup> 株は、偏性嫌気性球菌であり、低い割合で耐熱性細胞を形成することを確認した。既知の偏性嫌気性球菌の種は全て哺乳動物由来であり (Finegold *et al.*, 2002; Murdoch, 1998), また本菌株の最近縁種を含む嫌気性球菌は孢子を形成しないことが基本的特徴の一つとなっている (Ezaki *et al.*, 2001; Holdeman *et al.*, 1986)。本菌株と最近縁種 (*Peptoniphilus asaccharolyticus*) との 16S rRNA 遺伝子塩基配列の類似性が非常に低く (89.9%), 本菌株は動物以外の系から初めて分離されたグラム陽性偏性嫌気性球菌であり (Song *et al.*, 2003), さらに孢子を形成していると思われる特徴を持つといった点で、本菌株は偏性嫌気性球菌の系統分類学にとって貴重な位置を占める菌株と思われる。なお、糖非分解性の嫌気性細菌の種については、そのアミノ酸の利用性等が詳細に調べられていない場合がほとんどであるが、本菌株は L-グルタミン酸塩を含む4種のアミノ酸を利用して良く増殖した。本菌株は基質無添加の PY 培地ではほとんど増殖しない点で、基質利用性が明らかにならない時点ではいわば難培養性の菌株であるが、L-グルタミン酸などの存在下では良好な増殖を示す。なお、本菌株は L-アルギニンも利用するが他のアミノ酸を利用した場合は異なり、酪酸は生成しない。L-アルギニンを利用してオルニチンに変換する嫌気性細菌の種が知られており、L-アルギニンからの生成物を確認する必要がある。

その他のアミノ酸利用性の3菌株は全て桿菌であったが (Fig. 4), このうち2菌株は酢酸と酪酸および H<sub>2</sub> を生成した。この2菌株は、WN036<sup>T</sup> 株と同様酪酸を生成するものの、L-グルタミン酸を全く利用せず、代わりに L-リジンを利用した。L-アルギニンと L-ヒス

チジンの利用性は、WN036<sup>T</sup> 株と共通であったが、生成物が同じでも利用するアミノ酸の種類はこのように異なった。なお、FH042 株は L-セリンでも弱い増殖を示したものの、本菌株は基本的に L-アルギニンおよび L-リジンのみしか増殖基質としては利用できず、その基質利用性の範囲は非常に狭いものであった。その他の2菌株 (WN011 株と SH021 株) は、これに比べ利用できるアミノ酸の種類が多く、このことは両者が PY 培地でもある程度増殖し、系統的にも比較的近く位置づけられる関係 (Cluster XIVa と XIVb) にあることとも一致した。

*C. sufflavum* CDT-1<sup>T</sup> 株を含む各分離菌株の化学分類学的特徴を比較した (Table 3)。 *A. aminiphila* WN036<sup>T</sup> 株以外は細胞壁ペプチドグリカンのジアミノ酸として meso-DAP を含んでいた。また、一般に、*Clostridium* 属関連の種は呼吸鎖キノンを持っていないと考えられてきているものの、一部の種にはその存在が確認されている。本研究で用いた5系統の菌株のうち、1菌株についてはさらにその存在を確認する必要があるものの、それ以外の菌株はやはり呼吸鎖キノンを持っていなかった。この結果は同じ発酵性の嫌気性細菌でも、*Bacteroides* 属類縁の種がメナキノンを持っていることと対照的である。菌体脂肪酸組成は、偶数鎖を主とするもの、奇数の分岐鎖を主とするものなど、系統毎にその組成は大きく異なったが、WN011 株と SH021 株は極めてよく似た組成を持っていた。このように分離菌株の菌体脂肪酸組成は系統毎にその組成には大きな違いがあったが、共通して DMA が主な成分として検出され、また aldehyde も主要な成分として検出される場合があった。*Clostridium* 属関連細菌の菌体脂肪酸組成についての体系だった分析例はこれまであまりなく、その系統分類と菌体脂肪酸組成の関係については未整理の段階であるように思われる。しかし、近年 DMA を主成分として持つ *Clostridium* 属関連の新種の記載が多く報告

**Table 3** Chemotaxonomic characteristics of isolates in the class *Clostridia*.

Strain	Cluster	G + C (%)	Cell wall	Respiratory	Major cellular fatty acids (%)
CDT-1 <sup>T</sup>	III	40.7	<i>meso</i> -DAP	-	isoC <sub>15:0</sub> (16), isoC <sub>14:0</sub> (15), C <sub>16:0</sub> DMA (12), anteisoC <sub>15:0</sub> (9), isoC <sub>15:0</sub> DMA (7)
WN036 <sup>T</sup>	XIII	32.5	lysine	-	C <sub>17:1</sub> ω8 (14), C <sub>18:1</sub> DMA (12), C <sub>16:0</sub> (9), C <sub>16:1</sub> (7), C <sub>17:1</sub> ω9(7), C <sub>16:0</sub> aldehyde (7), C <sub>16:0</sub> DMA (6)
FH042	XI	49.0	<i>meso</i> -DAP	-	C <sub>18:1</sub> DMA (21), C <sub>17:2</sub> (13), C <sub>16:0</sub> DMA (12), C <sub>14:0</sub> (12), C <sub>16:0</sub> aldehyde (6), C <sub>18:0</sub> DMA (6)
WN011	XIVa	39.4	<i>meso</i> -DAP	-	isoC <sub>15:0</sub> DMA (28), isoC <sub>15:0</sub> aldehyde (24), isoC <sub>15:0</sub> (10), anteisoC <sub>15:0</sub> DMA (9), C <sub>14:0</sub> DMA (5)
SH021	XIVb	42.2	<i>meso</i> -DAP	±	isoC <sub>15:0</sub> DMA (20), isoC <sub>15:0</sub> aldehyde (17), isoC <sub>15:0</sub> (7), anteisoC <sub>15:0</sub> DMA (6), C <sub>16:1</sub> (4), C <sub>18:1</sub> DMA (4)

DMA, dimethylacetal.

されている。本研究結果やそのような記載からも、DMA および aldehyde は、*Clostridium* 属関連細菌の菌体脂肪酸組成分析において検出される特徴的な主要成分と考えられる。なお DMA はエーテルリン脂質であるプラズマローゲン由来と考えられている。

以上のように、本研究では、様々な無酸素環境から嫌気性細菌を分離し、その系統分類学的特徴を明らかにした。本研究で得られた新規系統の嫌気性細菌の種は、環境中に棲息する膨大な微生物多様性からみると、ほんのわずかな部分を反映しているに過ぎない。しかし、本研究で得られた新規系統の種は、それぞれ特徴ある生理学的特徴を示しており、無酸素環境中における嫌気性細菌の各系統的グループの機能を知る手がかりを与えているものと考えられる。

## 要 約

様々な無酸素環境から分離した嫌気性細菌の系統分類学的特徴付けを行い、以下のような新規系統の種の記載を行った。

山形県酒田港堆積物から集積培養および直接コロニー分離によって分離した硫酸還元細菌株は全て *Deltaproteobacteria* 綱に属し、電子供与体を不完全酸化したが、その系統的 position、細胞形態、硫酸還元電子供与体等の基質利用性はそれぞれ異なり、非常に多様であった。これらの分離菌株の中から2系統の新属・新種および2系統の新種に関する記載を公表した。2カ所の異なる都市下水汚泥嫌気消化槽から同じ系統の酪酸酸化硫酸還元細菌を分離した。分離菌株は *Desulfovibrio* 属に配属されたが、酪酸塩の他、2メチル酪酸塩および吉草酸塩等を電子供与体として酸化する点で、この属の既知の種とその特徴が大きく異なり、分離菌株を基準菌株とする新種の記載を公表した。

既知の種のほとんどが哺乳動物由来の試料から分離された種である偏性嫌気性グラム陰性桿菌である *Bacteroides* 属類縁の新規細菌株を水田土壌および家畜廃水メタン発酵槽から分離した。それぞれの菌株について網羅的特徴付けを行い、*Bacteroides* 属と *Prevotella* 属の新種としての記載を公表した。これらの菌株は胆汁耐性がなく、ほとんどが増殖にヘミンを要求した。さらに、多くの菌株がキシラン分解能を持ち、ビタミン B<sub>12</sub> によって増殖を促進され、酢酸およびプロピオン酸を主要な生成物とした。

メタン発酵槽から分離した *Clostridium* 属類縁菌株の特徴付けを行い、このうちセルロース分解性の *Clostridium* 属の新種と、L-グルタミン酸等のアミノ

酸分解性のグラム陽性偏性嫌気性球菌の新属・新種の記載を公表した。この他、L-リジンや L-アルギニンから酢酸や酪酸を生成する菌株や、L-スレオニン等からプロピオン酸を生成する菌株などの特徴を明らかにした。

## 本研究助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 阿部国広, 上木厚子, 加来伸夫, 上木勝司 (2006). 家畜廃水メタン発酵槽から分離した *Bacteroidetes* 門嫌気性細菌の増殖と微量栄養素要求性. 第22回日本微生物生態学会大会 (東京).
- 2) 西山智美, 阿部国広, 上木厚子, 加来伸夫, 上木勝司 (2006). 家畜廃水メタン発酵槽から分離したセルロースおよびキシラン分解性新規偏性嫌気性細菌. 第22回日本微生物生態学会大会 (東京).
- 3) 鈴木大典, 上木厚子, 上木勝司 (2006). 酒田港堆積物から分離した *Deltaproteobacteria* 綱の新規硫酸還元細菌. 第22回日本微生物生態学会大会 (東京).
- 4) 鈴木大典, 上木厚子, 上木勝司 (2007). 酒田港堆積物から分離した *Desulfovibrio* 属の新規硫酸還元細菌. 第23回日本微生物生態学会大会 (愛媛).
- 5) 阿部国広, 菅原祥道, 上木厚子, 加来伸夫, 上木勝司 (2007). 家畜廃水メタン発酵槽汚泥試料各画分から分離した発酵性嫌気性細菌の系統的・生理的特徴. 第23回日本微生物生態学会大会 (愛媛).
- 6) 西山智美, 石谷いづみ, 阿部国広, 上木厚子, 加来伸夫, 上木勝司 (2007). 牛舎廃水メタン発酵槽内の植物残渣から分離した3系統の新規クロストリジア. 第23回日本微生物生態学会大会 (愛媛).
- 7) Suzuki, D., Ueki, A. & Ueki, K. (2008). Diversity of phylogenetic, physiological and chemotaxonomic characteristics of novel sulfate-reducing bacterial species isolated from estuarine sediment in Japan. The 12<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology (Cairns, Australia).
- 8) Ueki, A., Kaku, N. & Ueki, K. (2008). Characterization of anaerobic bacteria relating to the *Bacteroides-Prevotella* group isolated from plant residue samples in flooded rice field soil and methanogenic reactor. The 12<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology (Cairns, Australia).
- 9) 菅原祥道, 高橋のり子, 加来伸夫, 上木勝司, 上木厚子 (2008). 牛舎廃水メタン発酵槽から分離した新規系統通性嫌気性プロピオン酸生成細菌の特徴. 日本農芸化学東北支部第143回大会 (弘前).
- 10) 鈴木大典, 上木厚子, 雫寿子, 大瀧斉美, 上木勝司 (2008). 嫌気消化都市下水汚泥から分離した酪酸酸化 *Desulfovibrio* 属新規硫酸還元細菌. 第24回日本微生物生態学会大会 (札幌).

### シンポジウムでの講演

- 1) 上木厚子 (2008). 嫌気性微生物生態系とメタン生成. 日本農芸化学会中部支部第153回例会シンポジウム「無酸素下で働く微生物-嫌気性菌の世界」(名古屋).
- 2) 上木厚子 (2009). 無酸素環境中における微生物の機能

と新規分離嫌気性細菌の特徴。理研 BioResource Center 国際シンポジウム「研究基盤用微生物を考える」(東京)。

Gram-negative, butyrate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an anaerobic municipal sludge digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (in press).

## 原著論文

- 1) Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A. & Ueki, K. (2007). *Desulfopila aestuarii* gen. nov., sp. nov., a novel, Gram-negative, rod-like sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 520-526.
- 2) Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A. & Ueki, K. (2007). *Desulfobulbus japonicus* sp. nov., a novel, Gram-negative, propionate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 849-855.
- 3) Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A. & Ueki, K. (2007). Diversity of substrate utilization and growth characteristics of sulfate-reducing bacteria isolated from estuarine sediment in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **53**: 119-132.
- 4) Ueki, A., Akasaka, H., Satoh, A., Suzuki, D. & Ueki, K. (2007). *Prevotella paludivivens* sp. nov., a novel strictly-anaerobic, Gram-negative, hemicellulose-decomposing bacterium isolated from plant residue and rice roots in irrigated rice-field soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1803-1809.
- 5) Ueki, A., Abe, K., Kaku, N., Watanabe, K. & Ueki, K. (2008). *Bacteroides propionicifaciens* sp. nov., isolated from rice-straw residue in a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 346-352.
- 6) Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A. & Ueki, K. (2008). *Desulfoluna butyratoxydans* gen. nov., sp. nov., a novel, Gram-negative, butyrate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 826-832.
- 7) Nishiyama, T., Ueki, A., Kaku, N. & Ueki, K. (2009). *Clostridium sufflavum* sp. nov., isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 981-986.
- 8) Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A. & Ueki, K. (2009). *Desulfovibrio portus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium in the class *Deltaproteobacteria* isolated from an estuarine sediment. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **55**: 125-133.
- 9) Nishiyama, T., Ueki, A., Kaku, N., Watanabe, K. & Ueki, K. (2009). *Bacteroides graminisolvens* sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 1901-1907.
- 10) Ueki, A., Abe, K., Suzuki, D., Kaku, N., Watanabe, K. & Ueki, K. *Anaerosphaera aminiphila* gen. nov., sp. nov., a glutamate-degrading, Gram-positive anaerobic coccus isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (in press).
- 11) Suzuki, D., Ueki, A., Shizuku, T., Ohtaki, Y. & Ueki, K. *Desulfovibrio butyratiphilus* sp. nov., a novel,

## 保存機関に寄託した菌株

本研究に関連する以下の基準菌株および参照菌株を JCM および DSM に寄託した。

## (1) 硫酸還元細菌

- Desulfopila aestuarii* MSL86<sup>T</sup> = JCM 14042<sup>T</sup> = DSM 18488<sup>T</sup>  
*Desulfobulbus japonicus* Pro1<sup>T</sup> = JCM 14043<sup>T</sup> = DSM 18378<sup>T</sup>  
*Desulfobulbus japonicus* Pro16 = JCM 14044 = DSM 18379  
*Desulfoluna butyratoxydans* MSL71<sup>T</sup> = JCM 14721<sup>T</sup> = DSM 19427<sup>T</sup>  
*Desulfovibrio portus* MSL79<sup>T</sup> = JCM14722<sup>T</sup> = DSM 19338<sup>T</sup>  
*Desulfovibrio butyratiphilus* BSY<sup>T</sup> = JCM 15519<sup>T</sup> = DSM 21556<sup>T</sup>  
*Desulfovibrio butyratiphilus* BST = JCM 15520

(2) *Bacteroidetes* 門 *Bacteroides* 属類縁細菌

- Prevotella paludivivens* KB7<sup>T</sup> = JCM 13650<sup>T</sup> = DSM 17968<sup>T</sup>  
*Prevotella paludivivens* A42 = JCM 13651 = DSM 17969  
*Bacteroides propionicifaciens* SV434<sup>T</sup> = JCM 14649<sup>T</sup> = DSM 19291<sup>T</sup>  
*Bacteroides propionicifaciens* S562 = JCM 14650 = DSM 19346  
*Bacteroides graminisolvens* XDT-1<sup>T</sup> = JCM 15093<sup>T</sup> = DSM 19988<sup>T</sup>  
*Bacteroides* sp. WK042 = JCM 15092 = DSM 21004

(3) *Firmicutes* 門 *Clostridium* 属類縁細菌

- Clostridium sufflavum* CDT-1<sup>T</sup> = JCM 14807<sup>T</sup> = DSM 19573<sup>T</sup>  
*Anaerosphaera aminiphila* WN036<sup>T</sup> = JCM 15094<sup>T</sup> = DSM 21120<sup>T</sup>

## (4) その他

- プロピオン酸生成 *Actinobacteria* 門細菌 WR061 = JCM 15804 = DSM 22130  
 プロピオン酸生成 *Actinobacteria* 門細菌 WR054 =

JCM 15805

プロピオン酸生成 *Actinobacteria* 門細菌 SH081 =  
JCM 15806 = DSM 22129

*Betaproteobacteria* 綱細菌 A48 = JCM 14971 = DSM  
19867

*Betaproteobacteria* 綱細菌 A25 = JCM 14972 = DSM  
19866

*Betaproteobacteria* 綱細菌 RR54 = JCM 14973 =  
DSM 19865

## 謝 辞

嫌気性細菌の系統分類学に関わる研究を進める上で、本助成（平成18年4月～平成21年3月）を頂いたことは、私にとってたいへん励みになりました。財団法人発酵研究所の関係者の皆様にご心よりお礼申し上げます。また、本研究室に所属し関連の研究に携わった多くの大学院生、卒論学生に感謝いたします。実験をサポートして頂いている大瀧斉美さん、研究室の同僚教員に感謝いたします。なお、海洋性硫酸還元細菌に関わる特徴付けは、共同研究者でもある鈴木大典博士がその学位論文研究として行ったものです。

## 文 献

本文中で引用した文献のうち、上記の「本研究助成で得られた研究成果の報告 原著論文」の中に含まれているものは、以下の文献リストから除いた。

Akasaka, H., Izawa, T., Ueki, K. & Ueki, A. (2003).

Phylogeny of numerically abundant culturable anaerobic bacteria associated with degradation of rice plant residue in Japanese paddy field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**: 149-161.

Akasaka, H., Ueki, K. & Ueki, A. (2004). Effects of plant residue extract and cobalamin on growth and propionate production of *Propionicimonas paludicola* isolated from plant residue in irrigated rice field soil. *Microbes Environ.* **19**: 112-119.

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.

Cato, E. P., George, W. L. & Finegold, S. M. (1986). Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23<sup>AL</sup>. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1141-1200. Edited by P. H. A. Sneath. Baltimore: Williams & Wilkins.

Chassard, C., Goumy, V., Leclerc, M. & Del'homme, C. (2007). Characterization of the xylan-degrading microbial community from human faeces. *FEMS Microbiol. Ecol.* **61**: 121-131.

Chassard, C., Delmas, E., Lawson, P. A. & Bernalier-Donadille, A. (2008). *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1008-1013.

Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J. & Sghir, A. (2005). Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environ. Microbiol.* **7**: 1104-1115.

Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. & Farrow, J. A. E. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 812-826.

Ezaki, T., Kawamura, Y., Li, N., Li, Z.-Y., Zhao, L. & Shu, S. (2001). Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1521-1528.

Finegold, S. M., Song, Y. & Liu, C. (2002). Taxonomy-General comments and update on taxonomy of clostridia and anaerobic cocci. *Anaerobe* **8**: 283-285.

Godon, J.-J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F. & Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2802-2813.

Holdeman, L. V., Cato, E. P. & Moore, W. E. C. (1977). *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th edn. Blacksburg, VA: Virginia Polytechnic Institute and State University.

Holdeman Moore, L. V., Johnson, J. L. & Moore, W. E. C. (1986). Genus *Peptostreptococcus* Kluyver and van Niel 1936, 401<sup>AL</sup>. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1083-1092. Edited by P. H. A. Sneath. Baltimore: Williams & Wilkins.

Komagata, K. & Suzuki, K. (1987). Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol.* **19**: 161-207.

Kuever, J., Rainey, F. A. & Widdel, F. (2005). Class IV. *Deltaproteobacteria* class nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Part C, 2nd edn, pp. 922-1144. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.

Levén, L., Eriksson, A. R. B. & Schnürer, A. (2007). Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**: 683-693.

Miller, L. T. (1982). Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxyl acids. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 584-586.

Miyagawa, E., Azuma, R. & Suto, E. (1979). Cellular fatty acid composition in Gram-negative obligately anaerobic rods. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **25**: 41-51.



- Moore, L. V. H., Bourne, D. M. & Moore, W. E. C. (1994). Comparative distribution and taxonomic value of cellular fatty acids in thirty-three genera of anaerobic Gram-negative bacilli. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 338-347.
- Murdoch, D. A. (1998). Gram-positive anaerobic cocci. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 81-120.
- Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Olsen, I. & Fraser, G. J. (1994). Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related species. *J. Bacteriol.* **176**: 725-732.
- Postgate, J. R. (1959). A diagnostic reaction of *Desulphovibrio desulphuricans*. *Nature* **183**: 481-482.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- 坂本光央 (2007) . *Bacteroides* 属と類縁細菌群の分類の現状. *Microbiol. Cult. Coll.* **23**: 1-16.
- Schleifer, K. H. & Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**: 407-477.
- Shah, H. N. & Collins, M. D. (1983). Genus *Bacteroides* A chemotaxonomical perspective. *J. Appl. Bacteriol.* **55**: 403-416.
- Song, Y., Liu, C., McTeague, M. & Finegold, S. M. (2003). 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant gram-positive anaerobic cocci. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1363-1369.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Ueki, A. & Suto, T. (1979). Cellular fatty acid composition of sulfate-reducing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **25**: 185-196.
- Ueki, A., Akasaka, H., Suzuki, D. & Ueki, K. (2006a). *Paludibacter propionicigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 39-44.
- Ueki, A., Akasaka, H., D. Suzuki, D. & K. Ueki. (2006b). *Xylanibacter oryzae* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, xylanolytic bacterium isolated from rice-plant residue in flooded rice-field soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2215-2221.
- Whitehead, T. R., Cotta, M. A., Collins, M. D., Falsen, E. & Lawson, P. A. (2005). *Bacteroides coprosuis* sp. nov., isolated from swine-manure storage pits. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2515-2518.
- Wuebbles, D. J. & Hayhoe, K. (2002). Atmospheric methane and global change. *Earth-Science Rev.* **57**: 177-210.

# 新規微生物間共生培養法によるメタン生成古細菌の 分離培養と系統分類

井 町 寛 之

独立行政法人海洋研究開発機構 海洋・極限環境生物圏領域

〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15

## Cultivation of novel methanogenic *Archaea* by using the co-culture method

Hiroyuki Imachi

Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology  
(JAMSTEC),

2-15 Natsushima-cho, Yokosuka 237-0061, Japan

We have developed a new method, which we named the co-culture method, for cultivating H<sub>2</sub>-utilizing methanogens. Since the method mimics the *in situ* interspecies H<sub>2</sub> flow between substrate-oxidizing H<sub>2</sub>-producing heterotrophs and H<sub>2</sub>-consuming methanogens, it could provide a low H<sub>2</sub> partial pressure like that in natural environments. Therefore, this method could be an improvement over traditional methods, and could enrich for the numerically or functionally dominant methanogens in natural environments. Using the co-culture method with propionate as a substrate, we successfully isolated three novel methanogens strains. We characterized physiological and genetic features of these strains, and then we proposed the new order *Methanocellales*, the new family '*Methanoregulaceae*' and the novel genus *Methanolinea* in addition to the proposal of the new species for each strain. Next, we extended our co-culture method to various environmental samples. As a result, we successfully cultivated some uncharacterized methanogens belonging to the orders *Methanocellales* and *Methanomicrobiales* in co-culture enrichments and eventually isolated a new methanogen strain TNR, within the order *Methanomicrobiales*. In addition to use of the co-culture method, we introduced a continuous-flow bioreactor system for cultivation of anaerobic microbes including methanogens from deep-sea sediment. We have successfully made an anaerobic microbial consortium that produces methane after 289 days of the bioreactor operation and cultivated three methanogens belonging to the genera *Methanobacterium*, *Methanococcoides* and *Methanosarcina*. These results strongly suggest that these culturing methods developed in this study, i.e., the co-culture method and the continuous-flow bioreactor system, are effective ways to cultivate fastidious but ecologically important methanogens that would otherwise escape conventional isolation strategies.

Key words: methanogenic *Archaea*, methanogen, hydrogen, syntroph, co-culture

## 緒 言

メタン生成古細菌（以下、メタン菌と記載）は水素、ギ酸、酢酸やメチル化合物等のごく限られた低分子の基質のみをエネルギー源としてメタン（CH<sub>4</sub>）を生成するという特徴を有する絶対嫌気性古細菌の総称

である。現在までに認識されているメタン菌の環境中での役割は、（1）嫌気環境下における有機物分解の最終ステップを担う重要な微生物群である、（2）温室効果ガスであるメタンを生成する微生物群である、また（3）メタン菌の発生するメタンガスは燃料として利用できることから、嫌気性廃水処理あるいは天然ガスの生成における重要な微生物群として認識されている、とこの3つを挙げることができる。すなわち、メタン菌は人類にとって重要な課題である環境、エネ

E-mail: imachi@jamstec.go.jp

共同研究者：鎌形洋一（独立行政法人産業技術総合研究所）

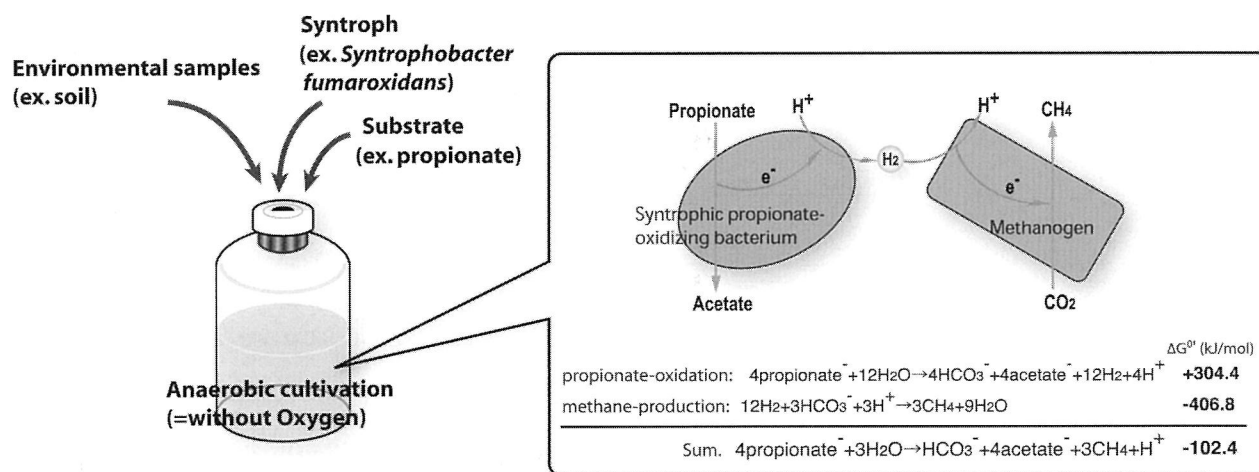


Fig. 1 Co-culture method for cultivation of  $\text{H}_2$ -utilizing methanogens used in this study.

ルギーおよび経済問題に直結している極めて重要な微生物群であると言えるであろう。加えて、最近では、メタン菌は地球外生命体の候補の1つであるとの推定や生命誕生の初期に出現した原始的な生命体であると考えられる研究者もおり (Atreya, 2007), 環境やエネルギー問題に留まらず, 知的好奇心を強く刺激する興味深い生物としても注目を集めている。従って, メタン菌の環境中での役割やその生態の理解を目指す研究は重要であり, その研究方法の1つのアプローチとしてメタン菌を培養, 分離し, その詳細な生理学的・遺伝学的特徴を捉えることは重要であると考えられる。

2009年4月現在まで記載・命名されているメタン菌は31属113種である。しかしながら, 16S rRNA 遺伝子等に基づいた環境中の微生物群集構造解析により, 未だ人為的に培養がなされたことのないメタン菌が環境中には多く存在することが明らかとなっている (Chouari *et al.*, 2005; Sekiguchi & Kamagata, 2004; Evans *et al.*, 2009; Mihajlovski *et al.*, 2008)。事実, いくつかのグループのメタン菌は, 分子遺伝学的な解析等から大気中へのメタン生成に大きく寄与していることが指摘されているものの, 分離株が得られていないためにそれらの詳細な生理学的特徴や生態までは明らかになってはいない。これら未培養とされているメタン菌はなぜ, 実験室で培養することができないのか? その原因の1つとして我々は, 従来のメタン菌の培養方法にあるのではないかと考えた。

従来, メタン菌の分離・培養は自然環境中ではあり得ない極めて高い水素分圧 (例えば 200 kPa) で行われる (多くのメタン菌の利用可能な基質は水素である)。このような実際の環境とはかけ離れた条件下で培養を行った場合, 増殖速度が速く, かつ水素に対す

る親和性が低いメタン菌が選択的に集積培養される可能性が高い。従って, 実際の環境を模擬した低分圧の水素をコンスタントに供給可能な系を構築できれば, 現在まで培養されていないメタン菌を培養することができるのではないかと考えられる。そこで, 我々は低分圧 (数 10 Pa) の水素をコンスタントにゆっくりと供給することによりメタン菌を培養する方法として, 「嫌気共生培養法」-嫌気共生細菌と呼ばれる発酵性細菌とメタン菌の水素を介した微生物異種間の共生関係を利用した培養法-を考案した (Fig. 1)。

嫌気共生培養法を理解していただくためには, まず二酸化炭素以外の有効な電子受容体のない嫌気 (メタン生成) 環境下における有機物分解過程について思い出していただく必要がある。嫌気環境下において有機物が最終的にメタンと二酸化炭素へと無機化されていく過程では, 代謝能の異なる複数種の微生物が関与し, そしてお互いが共生関係を保つことでその分解反応が進んでいく, という完全な分業体制が確立している (Schink, 1997)。その中で, 最たる微生物間の分業・共生関係は, 中間代謝産物と呼ばれる脂肪酸, アルコール類, および単純な芳香族化合物の分解に見られる。これら中間代謝産物の分解に関与する細菌群は水素資化性のメタン菌等と共生することのみ生育可能であることから, 嫌気共生細菌と呼ばれている。プロピオン酸の分解を例に説明すると, プロピオン酸を分解する細菌は, プロピオン酸を酸化分解する過程で水素 (もしくはギ酸) を生成するが, この反応自体は標準状態で吸エルゴン反応であり熱力学的に見れば反応は自発的に進行し得ない (Fig. 1)。しかしながら, 生成される水素が速やかに除去され, 系内の水素分圧が極めて低く維持されるような条件下 (理論的に

計算すると 37°C, pH 7 における水素分圧は 0.5~25 Pa) においては自発的なプロピオン酸の酸化分解反応が認められる。従って、プロピオン酸酸化共生細菌がプロピオン酸を酸化分解する過程において、水素を除去する反応、すなわち水素利用性のメタン菌がプロピオン酸酸化共生細菌と共に存在し、両者の間に水素の速やかな種間伝達が成り立つ場合にのみ、プロピオン酸酸化共生細菌が生育できることとなる。加えて、嫌気プロピオン酸分解共生培養系の倍加時間は約 5~7 日と極めて遅いことが知られている (Stams *et al.*, 1992; Imachi *et al.*, 2000; Imachi *et al.*, 2007)。これらのことは、プロピオン酸をはじめとする中間代謝産物を基質とし嫌氣的に培養を行えば、嫌気共生細菌が基質を分解することで低分圧の水素をコンスタントかつゆっくりとメタン菌へ供給してくれるため、低水素分圧下で優占的に生育してくる (= おそらく分類学上新規な) 水素資化性メタン菌を選択的に培養できる可能性があることを示唆している。

本報告では、嫌気共生培養法を用いて水田土壌から Rice Cluster I (RC-I) と呼ばれる目レベルで新規なメタン菌 (SANAE 株) を、嫌気性汚泥から *Methanomicrobiales* 目に属する新科および新属を代表するメタン菌 (NOBI-1 株と SMSP 株) を、分離に成功したので、その分離過程および詳細な菌学的特徴の決定について述べる。続いて、嫌気共生培養法を様々な環境サンプルに適用した結果、新規なメタン菌を培養することに成功した結果を述べる。さらに、嫌気共生培養法の考え方をベースに考案したバイオリアクターを用いた深海底堆積物環境からのメタン菌の培養結果について述べる。最後に、エタノールから直接メタンを生成するユニークなメタン菌 HASU 株の分離とその菌学的特徴について述べる。

## 実験方法

**植種源に用いた環境サンプル** メタン菌の培養には、一般的にメタン菌の生息環境と言われている湖沼の底泥や水田土壌等 11 種類の嫌気環境サンプルを準備した (以下、サンプルの種類 [採取場所]: サンプルの略称名の順に記載する, 1. 海洋沿岸底泥 [新潟県柏崎市]: KO, 2. 諏訪湖底泥 [長野県諏訪市]: SL, 3. 生妻池底泥 [長野県松本市]: SP, 4. 梓川底泥 [長野県松本市]: AR, 5. 蓮田底泥 [新潟県長岡市]: LF, 6. 長野水田土壌 [長野県松本市]: NR, 7. 中之島町水田土壌 [新潟県長岡市]: NRP, 8. 才津水田土壌 [新潟県長岡市]: SRP, 9. 台南市水田土壌 [台湾台南市]: TNR, 10. パームオイル製造廃水を処理していた嫌気性グラニュー

ル汚泥 [本研究室]: MP, 11. ビール製造廃水を処理していた嫌気性グラニュー汚泥 [採取場所は共同研究先企業との取り決めにより非公開]: SMS)。海洋、河川、湖沼および蓮田等の土壌サンプルは地中 20 cm ほど掘り下げた嫌気層と思われる地点から採取した。上記の 11 サンプルに加えて、深海底堆積物からのメタン菌の培養には地球深部探査船「ちきゅう」により下北半島東方沖で採取されたコアサンプル (水深 1,180 m) を用いた (Kobayashi *et al.*, 2008)。

**嫌気共生培養法によるメタン菌の培養に用いた培地および培養条件** 培地は Widdel と Pfennig の方法に従って作成した (Widdel & Pfennig, 1981)。海洋沿岸底泥サンプルからの微生物の培養には、上記の培地に塩化ナトリウムを最終濃度で 20 g/l 加えた。メタン菌の培養には、嫌気共生細菌とメタン菌の共生系によって分解される基質である、エタノール (10 mM), 酪酸 (20 mM) およびプロピオン酸 (20 mM) を唯一のエネルギー源として用いた。加えて、従来のメタン菌の培養方法と同様、高濃度の水素 (ca. 150 kPa in head space) および高濃度のギ酸 (40 mM) を基質とした培養も行った。さらに、もう 1 つの培養条件として、プロピオン酸 (20 mM) を唯一の炭素源とした培地に、中温性のプロピオン酸酸化共生細菌である *Syntrophobacter fumaroxidans* strain MPOB (DSM 10017) (Harmesen *et al.*, 1998) を添加した培養系 (植種量 5% [vol/vol]) を作成した。ただし、*S. fumaroxidans* は耐塩性を持たない細菌であるため、海洋サンプルからの培養系には添加しなかった。培養は 37°C で行った。継代培養は、ガスクロマトグラフを用いてメタンガスの生成量を測定し、メタンガスの発生量から基質の消費量を算定し、基質消費量が約 60% 以上となった後に行った。集積培養系からのメタン生成菌の分離は、液体培地を用いた希釈培養法、寒天培地を用いたロールチューブ法およびディープアガー法を用い、それらの操作を繰り返すことで行った。

**塩基配列の解析** 集積培養液中の菌体からの DNA 抽出はビーズビーター法を用いて行った。抽出した DNA を鋳型にして古細菌の 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅を行った。その増幅には古細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的な Ar109f (Großkopf *et al.*, 1998)/1490R (Weisburg *et al.*, 1991) のプライマーセットを用いた。PCR 増幅産物は MinElute Purification Kit (Qiagen) を用いて精製後、TOPO TA cloning kit (Invitrogen) を用いてクローン化し、クローンライブラリを作成した。各クローンライブラリからランダ

ムに10クローンを選択し塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列は、Ribosomal Database Project (RDP) の Chimera Check プログラムを用いてキメラ配列の判定を行い、BLAST search によって同姓検索を行った。その後、分子系統解析ソフト ARB (Ludwig *et al.*, 2004) によりアライメントを行い、近隣結合法を用いて系統樹の作成を行った。系統樹の樹形の確からしさは PAUP\* 4.0 プログラムを用いて 1,000 回のブートストラップ解析により検証した。

分離株の 16S rRNA 遺伝子および *mcrA* 遺伝子 (メタン生成の鍵酵素である methyl-coenzyme M reductase の alpha subunit をコードする遺伝子) の決定にはアーキアの 16S rRNA 遺伝子に特異的な Arch21F (DeLong, 1992)/1490R のプライマーセットおよび *mcrA* 遺伝子に特異的な ME1/ME2 のプライマーセット (Hales *et al.*, 1996) を用いた。

**Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法による検出** FISH 法は Amann らの手法に準拠して行った (Amann *et al.*, 1995)。実験に使用した 16S rRNA を標的とした DNA プロブは、古細菌に特異的な ARC915 (Stahl & Amann, 1991), *Methanomicrobiales* 目のメタン菌に特異的な MG1200 (Raskin *et al.*, 1994), RC-I に特異的な RCI648 (5'-CTCCCAGTCCCAAGCAA-3') (Weber *et al.*, 2001), SANAE 株に特異的な SANAE1136 (5'-GTGTACTCGCCCTCCTCG-3'), NOBI-1 株に特異的な NOBI633 (5'-GATTGCCAGTTTCTCCTG-3'), TNR 株に特異的な TNR625 (5'-TATCCCCGGACGCCCAT-3') および SMSP 株に特異的な SMSP129 (5'-TATCCCCTTCCATAGGGTAGATT-3') である。本研究では 4 種類の DNA プロブ (SANAE1136, NOBI633, TNR625 および SMSP129) の設計を行い、その設計には分子系統解析ソフト ARB の Probe design プログラムを用いた。各 DNA プロブには 5' 末端に Cy3 を蛍光標識として付加した。なお RCI648 プロブは、現在 GenBank に登録されている Rice Cluster I に属する塩基配列をほぼ全て網羅できるように、既存のプロブ (Weber *et al.*, 2001) に若干の修正を加え設計し直した。また、ハイブリダイゼーション条件はハイブリダイゼーションバッファーにホルムアミドを添加することで調整を行った (30% [vol/vol] ARC915; 5% MG1200; 15% RCI648; 25% SANAE1136; 10% NOBI633; 35% TNR625; 35% SMSP129)。

深海底堆積物からメタン菌を培養するためのバイオリアクター 深海底堆積物からのメタン菌の培養には環境工学分野の微生物学的廃水処理技術の 1 つである downflow hanging sponge (DHS) リアクターを用いた (Agrawal *et al.*, 1997; Machdar *et al.*, 2000; Tandukar *et al.*, 2006)。DHS リアクターは、高さ 1.5 m, 断面 10 cm×10 cm の密閉型アクリル製リアクターを使用し、内部にポリプロピレン製のネットリングにポリウレタンスポンジをはめ込んだスポンジ担体 (size:  $\phi$ 27 mm×32 mm) 150 個をランダムに充填した。水理学的滞留時間は 84 時間に設定し、10°C に保った恒温器内で連続運転を行った。基質は、COD 濃度 200 mg/L (TOC 76.3 mg-C/L) (グルコース: 90 mg/L, 酢酸: 45 mg/L, プロピオン酸: 45 mg/L, 酵母エキス: 20 mg/L), pH 7.5 に調整した人工海水を用いた。

## 結果と考察

**嫌気共生培養法による Rice Cluster I (RC-I) メタン菌の分離** 水田は温暖化効果ガスであるメタンの主要な発生源の 1 つであり、その生成されるメタンの大部分を RC-I 古細菌群が担っていることが過去の研究より強く示唆されていた (Conrad *et al.*, 2006)。しかしながら、分離株がないために、その詳細な生理学的情報は不明であり、水田からのメタン生成のメカニズムを解明するための重要な基礎的情報がない状況にあった。そこで、水田土壌から RC-I メタン菌の純粋分離株の取得を試みた。

まず、RC-I メタン菌を培養するための適切な植種源を探すために、新潟県長岡市周辺の数カ所の水田から土壌を採取した。それら水田土壌から DNA を抽出し、古細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いてクローン解析を行った。各クローンライブラリから 50 クローンをランダムに回収して解析を行った結果、すべての水田土壌から RC-I に属するクローンが回収され、その割合は全古細菌中の 3-10% 程度であった。そこで、それら水田土壌の中で最も多く RC-I に属するクローン配列が回収された水田土壌を培養に用いた。最初の戦略としては、過去の研究により RC-I は水素資化性のメタン菌であることが推定されていたので、水素 (ca. 150 kPa) を基質として水田土壌を 37°C で嫌気的に培養を行った。その結果、微生物の増殖とメタン生成が培養開始から 3 日後に観察された。顕微鏡で観察したところ、その集積培養系内にはメタン菌に特有な  $F_{420}$  の自家蛍光を持つ桿菌が生育していた。培養されてきたメタン菌を同定するために、古細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解

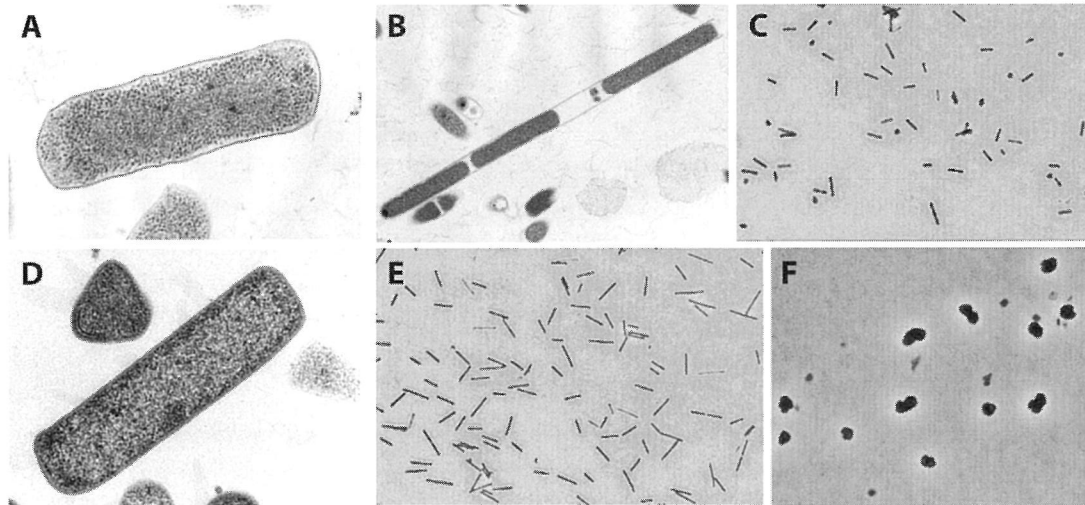
析を行った。その結果、回収したすべてのクローンは RC-I ではなく、すでに分離されているメタン菌である *Methanobacterium bryantii* と非常に近縁であった (16S rRNA 遺伝子の相同性は 99%)。さらに、我々は水素を基質として液体および固形培地で何度か RC-I の培養を試みたが、それらの試みはすべて失敗に終わった。RC-I の代わりに生育してきたメタン菌はすべて *Methanobacterium* 属に属する菌株と非常に近縁なものであった。

そこで、RC-I メタン菌の分離の戦略を見直すことにした。上記で行った方法、すなわち、水素ガスを培地に直接添加する方法は、従来、水素資化性のメタン菌の分離培養に使われてきた方法である。しかしながら、私は RC-I メタン菌を培養するにはこの従来法に問題があるのではないかと考えた。すなわち、水素ガスを直接培地に添加する従来の集積培養法での水素分圧は RC-I が生息する水田土壌の水素分圧と比較して約 1,000-10,000 倍高い。従って、このような実際の環境とはかけ離れた条件下で培養を行った場合、増殖速度が速く、かつ水素に対する親和性が低いメタン菌が選択的に集積培養される可能性が高い。事実、以前の研究においても従来の集積培養法は実際の自然環境よりも高濃度な基質を添加しているために増殖速度の早い微生物が生育してしまうことが問題であることは指摘されており、それらの論文では実際の環境に類似した低い基質濃度で培養することにより、今まで培養できなかった微生物の分離に成功したことを報告している (Connon *et al.*, 2002; Kaeberlein *et al.*, 2002; Rappé *et al.*, 2002)。従って、実際の環境を模擬し、水素を低分圧で連続的に供給可能な系を構築できれば、現在まで培養されていないメタン菌を培養することができるのではないかと考えた。そこで、我々は低分圧 (数 10 Pa) の水素を連続的にゆっくりと供給できる系として嫌気共生細菌と呼ばれる発酵性細菌と水素資化性メタン菌の水素を介した微生物異種間の共生関係に着目した「嫌気共生培養法」を考案し (Fig. 1)、RC-I メタン菌の培養に再度試みた。

プロピオン酸を基質として用いた「嫌気共生培養法」により再び RC-I メタン菌の培養を試みた。培養開始から約 3 ヶ月後、プロピオン酸の減少に伴ってメタンが生成し、その際の培養系内の水素分圧は 30 Pa 以下と非常に低く保たれていた。集積培養系内の微生物を観察してみると、プロピオン酸分解細菌である *Syntrophobacter* 属細菌様の球菌とメタン菌に特有の F<sub>420</sub> の自家蛍光を持つ桿菌が培養されていた。これらの観察結果は、本集積培養系内ではプロピオン酸を分解する嫌気共生細菌と水素利用性のメタン菌が共生関

係を構築していることを強く示唆するものであった。次に、本プロピオン酸集積培養系内に生育しているメタン菌を同定するために 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行った。続いて、RC-I に属する古細菌が確かに集積培養系内に培養されているかを確かめるために RC-I の 16S rRNA に特異的な DNA プロンプを用いた FISH 法を集積培養系に適用した。その結果、集積培養系に優占的に存在しているプロピオン酸分解細菌と思われる菌体以外の桿菌から蛍光が得られ、本クローン配列を持つ RC-I メタン菌が集積培養系内に確かに培養できていることが確認された。続いて、プロピオン酸集積培養系内から RC-I の純粋分離を試みた。プロピオン酸集積培養系を植種源としてメタン菌が一般的に単独で利用可能な基質 (水素、ギ酸および 2 級アルコール類等) を用いて培養を行った。しかしながら、その際、高分圧の水素や高濃度のギ酸で培養を行うと、先のプロピオン酸集積培養系に対して行った古細菌のクローン解析では全く検出されていなかった *Methanoculleus* 属に属するすでに分離されているメタン菌と非常に近縁な古細菌が生育してきた。そこで、プロピオン酸集積培養系をさらにプロピオン酸により希釈培養を繰り返し行い、RC-I メタン菌の優占度合いをさらに高めた後に、再度、水素やギ酸等の基質として液体培地や固形性培地を用いた希釈培養を行った。その結果、デューブアガー法により約 1 年をかけて RC-I に属するメタン菌 SANAE 株を分離することに成功した (Fig. 2A)。

以上の結果は、他のメタン菌と比較して RC-I メタン生成古細菌は水素に対する基質親和性が高いことを強く示唆している。従って、この水素に対する高い水素親和性が RC-I メタン菌が水田土壌に優占して存在できている理由の 1 つであろうと考えられる。現在、分離株の水素に対する親和性を含めた生化学的な研究ならびにゲノム解析 (独立行政法人製品評価基盤技術機構との共同研究) を進めており、これらの詳細なデータは水田からのメタン放出機構を解明して行くための重要な知見になって行くものと考えている。加えて、嫌気共生培養法は RC-I メタン菌に限らず、他の未培養なメタン生成古細菌の分離にも適用可能である。実際に、プロピオン酸を基質とした嫌気共生培養法を *Methanomicrobiales* 目に属する未培養メタン菌群を多く含んでいる嫌気性消化汚泥および嫌気性グラニユール汚泥に適用した結果、この未培養メタン菌群に属するメタン菌 NOBI-1 株 (Fig. 2B) および SMSP 株 (Fig. 2C) の分離に成功した。この結果は、嫌気共生培養法を用いれば従来法では培養が困難であったメタン菌を培養できることを強く指示するものであった。



**Fig. 2** Novel methanogens that were isolated in this study and their characteristics. (A) *Methanocella paludicola* strain SANAE. (B) *Methanolinea tarda* strain NOBI-1. (C) *Methanoregula formicica* strain SMSP. (D) '*Methanotalea mesophila*' strain MRE50. (E) '*Methanolinea rotundus*' strain TNR. (F) *Methanofollis ethanolicus* strain HASU.

SANAE 株は上述したように RC-I に属する初めての分離例である。この成果はドイツ Max-Planck Institute (MPI) の Ralf Conrad の研究グループとの熾烈な競争に打ち勝った成果である。本分離菌株が縁となり Conrad グループと共同研究を展開することとなった。Conrad グループは RC-I グループを初めて発見し、現在まで報告されている RC-I に関する研究はほぼすべてこの研究グループからによるものである。彼らも RC-I を含んだ集積培養系を持っていたが、その集積培養系から RC-I を分離することができなかったため、メタゲノム的なアプローチを用いることで集積培養系の状態から RC-I の全ゲノム配列を決定していた (Erkel *et al.*, 2006)。彼らが持つ集積培養系から RC-I メタン菌の分離を我々が試みたところ、世界で 2 例目となる RC-I に属するメタン菌 MRE50 株を分離することに成功した (Fig. 2D)。この菌株の分離に成功したことで、全ゲノム情報が決定された RC-I メタン菌の純粋菌株が 2 株揃ったことになった。これらの菌株とゲノム情報を生かしながら、何故、特定の環境中 (例えば水田) に RC-I メタン菌が優占的に生育してくるのかを調査したいと考えている。

#### 新規メタン生成古細菌 SANAE 株、NOBI-1 株および SMSP 株の菌学的特徴の決定

**SANAE 株の菌学的特徴** メタン菌 SANAE 株の分類学的位置の決定は、基本的には Boone & Whitman のメタン菌記載のための提案 (1988) に従った。まず、菌株の純粋性の確認であるが、SANAE 株を顕

微鏡で観察すると、その大多数は桿状の菌体であるが極まれに球形の菌体も存在し、標的以外の微生物の存在が疑われた。そこで、thioglycollate 培地や AC 培地など無菌試験に用いられている培地を用いて純粋性の確認を行った。さらに培養法だけでは分離株の純粋性を証明するのは不十分だと考え、(1) 他のメタン菌のグループや細菌 (domain Bacteria) の 16S rRNA に特異的な DNA プロブ (Amann *et al.*, 1990; Daims *et al.*, 1999) を用いて FISH 法を行う、

(2) 細菌の 16S rRNA 遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR を行う、(3) 培養系から DNA を抽出し古細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析および T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 解析 (Liu *et al.*, 1997) を行う、(4) 分離株の 16S rRNA 特異的な DNA プロブを作成し FISH 法を行う等の分子遺伝学的手法を用いた確認も行った。ここで各結果の詳細には触れないが、以上の実験から得られた結果は、SANAE 株の純粋性を十分に示すものであった。分離株 SANAE はグラム陰性の運動性のない桿菌であり、その細胞の大きさは幅 0.3-0.6 $\mu\text{m}$ 、長さ 1.8-2.4 $\mu\text{m}$  であった。分離株は培養温度 25-40 $^{\circ}\text{C}$  で生育し、至適生育温度は 35-37 $^{\circ}\text{C}$  であった。また生育 pH は 6.5-7.8 であり、至適生育 pH は 7 であった。塩化ナトリウムの要求性はなく、塩化ナトリウム濃度 5 g/l で生育は完全に阻害された。本分離株は水素およびギ酸を基質として利用可能であり、その生育には酢酸 (1 mM) を要求し、酵母抽出液 (0.01% [w/vol]) を添加することによって増殖

が促進された。水素 (ca. 150 kPa) を基質に用いて、至適生育条件下 (37°C, pH 7) で培養を行った際の倍加時間は 4.2 日であった。また、分離株の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長ならびに *mcrA* 遺伝子の部分配列を決定し分子系統解析を行った結果、SANAE 株は RC-I に属する目レベルで新しいメタン菌であることが確認された。以上の結果から本分離株を新属新種のメタン菌 *Methanocella paludicola* と命名し、同時に新目 *Methanocellales* を提案した。最終的にこの提案は International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) 誌に受理された。

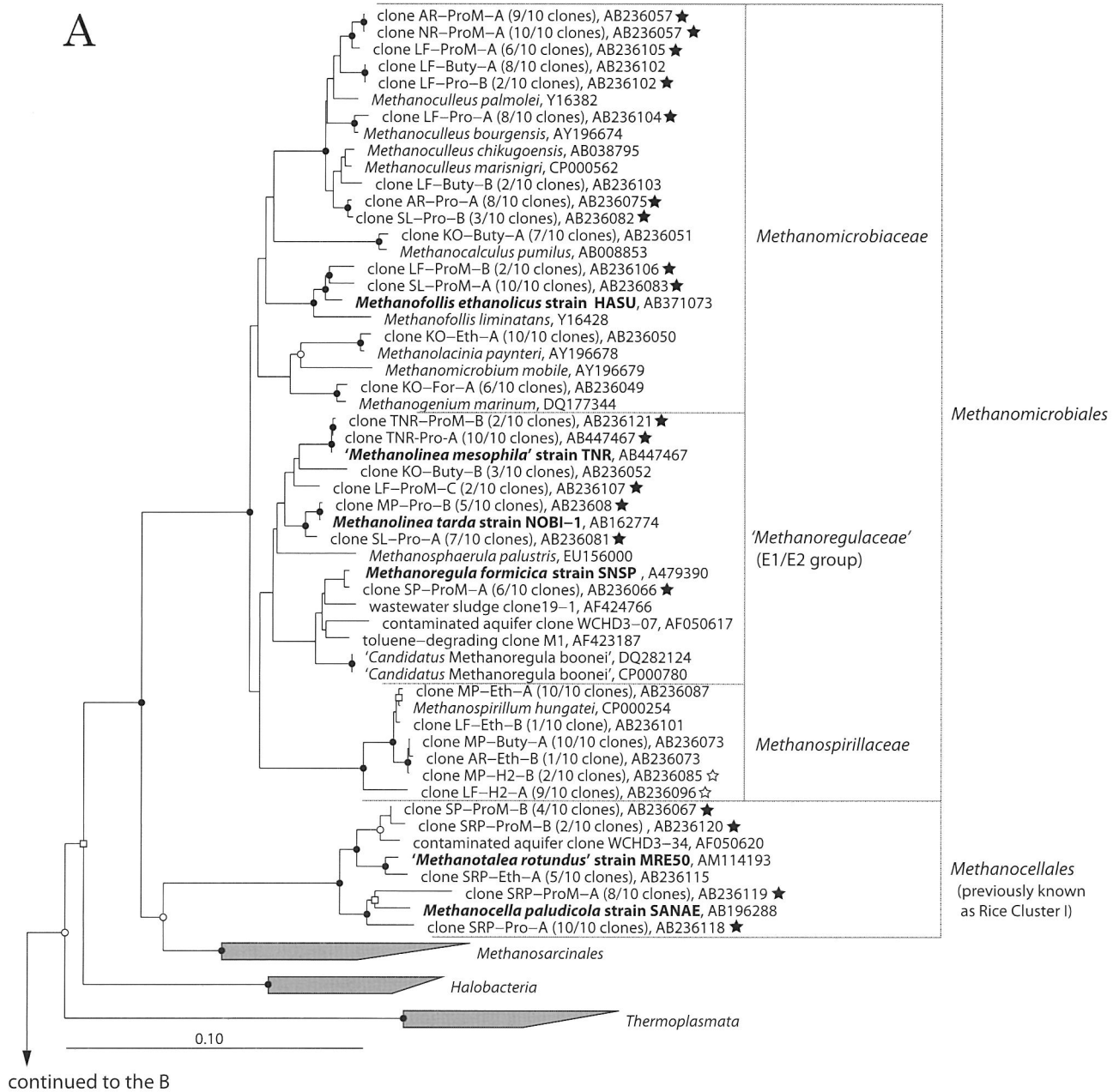
**NOBI-1 株の菌学的特徴** 続いて、SANAE 株と同様の方法で分離株の純粋性の確認を行った後に、もう 1 つの分離株である NOBI-1 株の菌学的特徴の決定を行った。NOBI-1 株はグラム染色反応陰性で運動性のない桿菌である。その細胞のサイズは幅 0.7-1.0 $\mu\text{m}$  で長さは 2 $\mu\text{m}$  であった。鞘を形成しながら長く伸びて生育する場合もあり、特にプロピオン酸培養系において長さが 8 $\mu\text{m}$  程度になる細胞も観察された。最初の集積培養は 37°C で行っていたにも関わらず、その至適生育温度は 50°C であった。至適生育条件下 (50°C, pH 7) での倍加時間は約 6 日であった。この倍加時間は現在までに報告されているメタン菌の中では最も遅いものであった。NOBI-1 株の基質特異性を調査したところ、水素もしくはギ酸でのみ生育が確認できた。生育には酢酸および酵母エキスが必要であった。DNA の G+C 含量は 56.3 mol% であった。16S rRNA 遺伝子のほぼ全長ならびに *mcrA* 遺伝子の部分配列を決定し分子系統解析を行った結果、NOBI-1 株は *Methanomicrobiales* 目に属する属レベルで新しい古細菌のものであることが明らかとなった。以上の結果を踏まえ、NOBI-1 株を *Methanolinea tarda* と命名した (Fig. 2B)。

**SMSP 株の菌学的特徴** 上記の 2 株と同様の方法で、嫌気性グラニユール汚泥から分離した SMSP 株の菌学的特徴の決定を行った。SMSP 株は長さ 1.0-2.6 $\mu\text{m}$ 、幅 0.5 $\mu\text{m}$  の桿菌であり、長さ 7 $\mu\text{m}$  程度になる菌体も観察された。細胞分裂する部位は細胞の中央ではなく、非対称に細胞分裂が起きているように観察された。また、培養後期になると直径が 0.5-1.0 $\mu\text{m}$  の球菌状になる特徴があった。この球菌状の菌体も SMSP 株であるという確証を得るために SMSP 株の 16S rRNA に特異的な DNA プローブ SMSP129 を作成し、FISH 法を適用した。その結果、球菌状の菌体

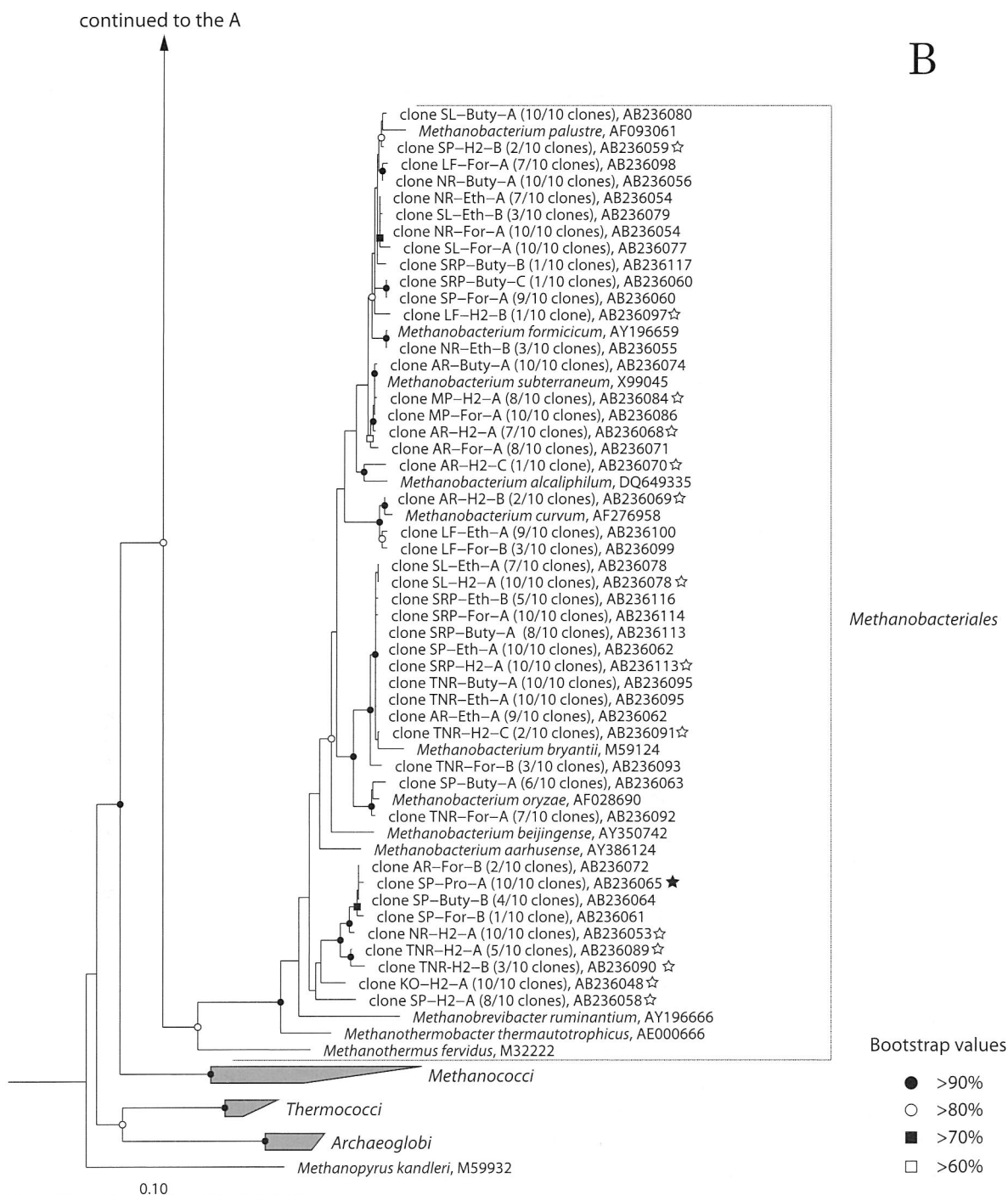
からも蛍光を確認し、球菌状の菌体も SMSP 株であることが証明された。水素およびギ酸を利用することで菌体の増殖ならびにメタンを生成した。至適生育温度は 33°C、至適生育 pH は 7.4 であった。生育には酢酸および酵母エキスが必要であった。0.5 mM co-enzyme M を培地に添加すること劇的に菌体収量が上がった。16S rRNA 遺伝子のほぼ全長ならびに *mcrA* 遺伝子の部分配列を決定し分子系統解析を行った結果、SMSP 株は *Methanomicrobiales* 目に属しており、まだ正式な記載となっていない '*Candidatus Methanoregula boonei*' (Brauer *et al.*, 2006) と近縁であることが明らかとなった (16S rRNA 遺伝子の相同性が 96.3%, *McrA* アミノ酸配列での相同性は 85.4%)。しかしながら、16S rRNA 遺伝子の相同性が 97% 以下であること (Stackebrand & Goebel, 1994)、'*Candidatus M. boonei*' の至適生育 pH は 5 であり SMSP 株のそれとは大きく異なることから別種にすべきであると判断した。一方、16S rRNA 遺伝子の相同性、細胞の形態や分裂様式および生育可能な温度域が類似していることから、SMSP 株と '*Candidatus M. boonei*' は同属にすべきであるとも判断した。以上の結果を踏まえ、*candidatus* の状態にある *Methanoregula* 属を一度削除し、SMSP 株を新属 *Methanoregula* の代表菌株 *Methanoregula formicica* とし、加えて SMSP 株を *Methanomicrobailes* 目の新科 *Methanoregulaceae* の代表として近日中に提案する予定である (Fig. 2C)。

**嫌気共生培養法の様々な環境サンプルへの適用による新規メタン菌の培養** 嫌気共生培養法を用いれば分類学上新規なメタン菌を分離培養できるということが上記の 3 株 (*Methanocella paludicola* SANAE 株、*Methanolinea tarda* NOBI-1 株 および *Methanoregula formicica* SMSP 株) の分離によって十分に手応えが掴めた。そこで、さらなる人為的に培養がされていない分類学的に新規なメタン菌を培養するために本嫌気共生培養法を様々な嫌気環境から採取した 9 種類のサンプルに適用した。上記の研究ではプロピオン酸のみを基質として用いていたが、本研究ではプロピオン酸に加え、エタノールおよび酪酸もメタン菌を培養するための基質とした。エタノールおよび酪酸もプロピオン酸と同様、嫌気共生細菌と水素資化性メタン菌の水素を介した種間伝達による共生系によって分解される基質である。また、嫌気共生培養系の対照系として、同じ環境サンプルを植種源に用い、従来のメタン生成古細菌の培養法と同様、高濃度の水素および高濃度のギ酸でも培養を行った。合計 52 個の集積培養系を作成した。





**Fig. 3** Phylogenetic tree showing the placement of 16S rRNA gene sequences/clones related with the study using the co-culture approach. Methanogens isolated in this study are indicated in bold face. Closed stars indicate phylotypes recovered from propionate enrichment cultures. Opened stars demonstrate phylotypes retrieved from hydrogen enrichment cultures. The name of each phylotype is composed of the sample name, an abbreviation of the substrate for cultivation (H2: hydrogen, For: formate, Eth: ethanol, Buty: butyrate, Pro: propionate, ProM: propionate + *S. fumaroxidans*), and the phylotype (for example, SRP-Pro-A is phylotype A recovered from the propionate enrichment culture cultivated from the environmental sample SRP). The number in parenthesis indicates the number of identical clones obtained per number of clones analyzed for each phylotype. The accession numbers are also shown after each phylotype name. The phylotypes indicated by the same accession numbers have the same sequences (e.g. SP-For-A and SRP-Buty-C, and AR-ProM-A and NR-ProM-A). The tree was constructed based on a distance matrix analysis of 16S rRNA gene sequences (neighbor-joining tree). 16S rRNA gene sequences of three strains (*Desulfurococcus mobilis* (GenBank accession no. M36474), *Sulfolobus acidocaldarius* (U05018), and *Aeropyrum pernix* (NC000854)) were used to root the tree (not shown). The scale bar indicates the estimated number of base changes per nucleotide sequence position. The symbols at branch nodes indicate bootstrap values.



従来法（高濃度の水素および高濃度のギ酸）を用いたメタン菌の培養。水素およびギ酸の全ての集積培養系は、培養日数3-5日程度で微生物の増殖が確認され、基質の減少に伴ってメタンが生成されていた（データ省略）。集積培養系内を顕微鏡で観察すると、細胞の形態から判断しておおよそ1~2種類の微生物が優占して存在しており、これらの微生物はメタン菌に特有の F<sub>420</sub> の自家蛍光を持っていた。従って、これら

の集積培養系内にはメタン菌が優占的に培養されていることが示唆された。これら培養されてきたメタン菌を16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析により同定を行った。その結果、水素およびギ酸の培養系内からは合計29種類の異なる phylotypes が検出され (Fig. 3) , その大部分の26 phylotypes は *Methanobacterium* 属に属した。また残りの2 phylotypes は *Methanospirillum* 属に、1 phylotype

は *Methanogenium* 属に属した。さらに20 phylotypes は、既知のメタン菌の 16S rRNA 遺伝子と 97% 以上の高い相同性を持ち、16S rRNA 遺伝子間の相同性が 97% 以上であると同一種である可能性が高いことから (Stackebrandt & Goebel, 1994), 既知のメタン菌と近縁な株が培養されていると考えられた。一方、残りの 9 phylotypes は 95-96% の相同性を示すであった。これらの phylotype はおそらく新種レベルでの分類学的新規性はあるが、*Methanobacterium* 属や *Methanospirillum* 属といった良く研究されているメタン菌のグループである。従って、従来の培養法である高濃度の水素および高濃度のギ酸を基質とした集積培養系からは、現在までに分離されていてかつ限定されたメタン菌種しか培養されてこないという結果であった。

嫌気共生培養法を用いた低水素分圧条件下でのメタン菌の培養 エタノール集積培養系では 1 週間程度で微生物の増殖が確認できたが、酪酸およびプロピオン酸を基質とした集積培養系では 1-3 ヶ月以上とその増殖は遅かった。特にプロピオン酸集積培養系内の微生物の増殖は極めて遅く、中には培養開始から半年後によくメタン生成を確認できた培養系も存在した。これら全ての集積培養系内では基質の分解に伴ってメタンが生成されており、この時の集積培養系内の水素分圧はエタノール培養系では約 20-100 Pa, 酪酸およびプロピオン酸の集積培養系では約 20 Pa 程度と低く保たれていた。顕微鏡によりこれら集積培養系内を観察したところ、すべての集積培養系内において数種の形態の異なる微生物が存在しており、その中にはメタン菌に特有の  $F_{420}$  の自家蛍光を持つ微生物も確認された。以上の結果から、すべての集積培養系において嫌気共生細菌とメタン菌が水素を介した共生関係を構築していることが示唆された。しかしながら、海洋底泥と長野水田土壌を植種源としたプロピオン酸培養系は 1 年以上培養を行ってもメタン生成を確認することができなかった。従って、以後の解析はこれら 2 つのプロピオン酸集積培養系を除いて行った。

続いて、培養系内に生息するメタン菌を同定するために、古細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行った。その結果、得られた 52 phylotypes は全て *Euryarchaeota* 門に属した (Fig. 3)。うち 23 phylotypes は高濃度の水素および高濃度のギ酸を基質とした集積培養系と同様に *Methanobacterium* 属 (19 phylotypes) や *Methanospirillum* 属 (4 phylotypes) に属する phylotype も存在した。一方で残りの 29 phylotypes のうちの 25 phylotypes は

*Methanomicrobiales* 目 (20 phylotypes) と *Methanocellales* 目 (5 phylotypes) に属していた。*Methanomicrobiales* 目では、*Methanoculleus* 属 (9 phylotypes), *Methanofollis* 属 (2 phylotypes), *Methanocalculus* 属 (1 phylotype) および *Methanoplanus* 属 (1 phylotype) に属していた。加えて、本研究を通じて提案した *Methanolinea* 属に属する配列 (6 phylotypes) や '*Candidatus Methanoregula boonei*' (1 phylotype) に近縁な配列も得られた。これらの phylotype に加え、酢酸資化性のメタン菌である *Methanosaeta* 属に属する 4 つの phylotype が 4 つのプロピオン酸集積培養系から得られた。プロピオン酸が分解されると水素や二酸化炭素以外に酢酸も生成されることから、この酢酸の分解に *Methanosaeta* 属メタン菌が関わっていると考えられた。実際に顕微鏡を用いてそれらこれらプロピオン酸集積培養系内を観察したところ、*Methanosaeta* 属様の桿菌が存在していた。

*Methanosaeta* 属に属する 4 phylotypes を除く得られた 48 phylotypes は水素資化性のメタン菌由来であると考えられた。これら 48 phylotypes のうちいくつかの phylotype は既に分離されているメタン菌の 16S rRNA 遺伝子と 97% 以上の高い相同性を示した (34/48 phylotypes, 71%) が、96% 以下の相同性を示し、分類学上新種あるいは新属以上で提案可能と思われるメタン菌由来の phylotypes も検出された (14/48 phylotypes, 29%)。これらの phylotypes の大部分は *Methanomicrobiales* 目と *Methanocellales* 目に属しており、1 つのエタノール集積培養系、2 つの酪酸集積培養系と 8 つのプロピオン酸集積培養系内から検出された。続いて、これら集積培養系を植種源に用いて、一般的にメタン菌が単独で利用可能な基質である水素やギ酸等を基質として希釈培養、ロールチューブおよびディープアガー法により新規なメタン菌の分離を試みた。これらの培養系にはメタン菌以外の微生物の増殖を抑制するために抗生物質であるバンコマイシンあるいはペニシリンを添加した。その結果、台南市水田土壌を植種源としたプロピオン酸培養系から、*Methanolinea* 属に属する新種と考えられる TNR 株の分離に成功した (Fig. 2E)。しかしながら、他の集積培養系からの培養では、高濃度の水素や高濃度のギ酸を基質として培養を行うと、先のクローン解析では検出されなかった *Methanobacterium* 属や *Methanoculleus* 属等の既知のメタン菌の 16S rRNA 遺伝子と 97% 以上の相同性をもつ古細菌が優占化してしまい、新規なメタン菌を分離には至らなかった。最終的に分離株を得るために従来の培養法 (高濃度の水

素やギ酸を基質として培養する方法)には間違いなく限界があり, この問題を克服するための新しい手法の開発が望まれる。

本研究では嫌気共生培養系を様々な嫌気環境サンプルに適用することにより, 未培養であったメタン菌を培養できるということが再確認できた。これら未培養であったメタン菌を培養することができた理由は様々に考えられるが, その大きな要因の一つは, 嫌気共生培養系の特徴である低分圧の水素(あるいは低濃度のギ酸)を連続的に供給可能な条件を試験管内に作り出すことによって, 水素に対して基質親和性の高いメタン菌を選択的に培養できたためだと考えられる。本研究で培養されたメタン菌の水素に対する基質親和性は今のところ水素に対する  $K_m$  値を測定していないため不明であるが, これらの基質親和性はおそらく既知のメタン菌よりは高いと推察される。事実, 本研究において, これら分類学的に新規と思われるメタン菌は高濃度の水素や高濃度のギ酸を基質とした培養系では全く培養されず, その一方で, 培養された新規なメタン菌は, 水素が最も低い分圧で供給されるプロピオン酸を基質とした嫌気共生培養系内において特に優占的に培養されてきた。現在まで水素資化性のメタン菌の水素に対する基質親和性については *Methanobacterium* 属や *Methanospirillum* 属等について調べられている (Kristjansson *et al.*, 1982; Robinson & Tiedje, 1984; Smatlak *et al.*, 1996; Karadagli & Rittmann, 2005)。これらメタン菌の水素に対する見かけの  $K_m$  値は, *Methanobacterium* 属で 272-2, 444 Pa, *Methanospirillum* 属で 339-679 Pa である。本研究ではエタノール, 酪酸およびプロピオン酸を基質として培養を行ったが, これらの基質の分解が可能な水素分圧の範囲を熱力学的理論式に従って計算を行った場合 (37°C, 1 気圧, pH 7 条件下), エタノールは 0.5-27,000 Pa, 酪酸は 0.5-60 Pa, プロピオン酸は 0.5-28 Pa 7) であった (実際に本研究で得た嫌気共生培養系の基質の分解時に生成される水素の分圧はすべてこの理論値内であった)。この理論式で算出された水素分圧と *Methanobacterium* 属および *Methanospirillum* 属のメタン菌の水素に対する  $K_m$  値を単純に比較して論じることができないが, 酪酸やプロピオン酸を基質とした嫌気共生培養系においては *Methanobacterium* 属と *Methanospirillum* 属に属するメタン菌は, 水素に対してより高い基質親和性を持つメタン菌と共存した場合, 優占的に生育することが難しいことが考えられる。事実, 本研究において高分圧の水素および比較的水素分圧が高いエタノールを基質とした培養系で優占的に生育したメタン菌の多くは

*Methanobacterium* 属や *Methanospirillum* 属に属しており, 一方, 酪酸やプロピオン酸を基質とした低い水素分圧の培養系内に優占的に生育した多くのメタン菌は, *Methanobacterium* 属と *Methanospirillum* 属以外のメタン菌, すなわち *Methanomicrobiales* 目 (*Methanospirillum* 属を除く) や *Methanocellales* 目に属するメタン菌であった。これらのことから, *Methanocellales* spp. や *Methanomicrobiales* spp. (*Methanospirillum* spp. を除く) は *Methanobacterium* spp. や *Methanospirillum* spp. よりも水素に対する基質親和性が高いと我々は推察している。この推察は過去のいくつかの研究によっても支持されている。例えば Lu らは水稻が培養されている恒温器に  $^{13}\text{CO}_2$  を加えて研究を行ったところ, *Methanocellales* メタン菌は水素分圧が低いときに  $^{13}\text{CO}_2$  を多く取り込み, 水素分圧が高い条件では *Methanobacteriales* 目や *Methanosarcinales* 目のメタン菌が  $^{13}\text{CO}_2$  を多く取り込んだと報告している (Lu *et al.*, 2005)。また, *Methanocellales* 目に属するクローン配列は水田や湿地帯等の比較的水素濃度が低いと考えられている嫌気環境から多く検出されている (Conrad *et al.*, 2006; Großkopf *et al.*, 1998; Juottonen *et al.*, 2005)。加えて, *Methanocellales* メタン菌と同様に *Methanomicrobiales* 目に属するクローン配列も水素分圧が数十 Pa 程度と極めて低く保たれないと分解が進行しないフタル酸やトルエンの嫌気的分解系 (Wu *et al.*, 2001; Ficker *et al.*, 2000) や水田, 湖沼の底泥や湿地帯等から頻繁に検出されている (Cadillo-Quiroz *et al.*, 2008; Nüsslein *et al.*, 2001)。今後, 分離株の詳細な水素に対する基質親和性を調査すれば自然環境中におけるメタン菌の群集構造と水素濃度の関係が明らかになると考えられる。

**Flow-through 型バイオリアクターによる深海底メタン菌の培養の試み** 深海底堆積物から莫大な量のメタンが生成されていることが知られている。その生成されるメタンの約半分はメタンの炭素同位体比の解析結果から生物起源であると推定されている。しかしながら, 深海底環境における生物学的なメタン生成については不明な点が多い。実際に生物学的にメタンの生成が起きている深海底堆積物やメタンハイドレートを含むコアサンプルを分子遺伝学的な手法で解析しても今までに知られているメタン菌に近縁な配列が検出されることは極めて稀である。従って, どの微生物が深海底環境においてメタンの生成に寄与しているのかよくわかっていないのが現状である。その謎を解明するための 1 つのアプローチとして深海底堆積物からメタ

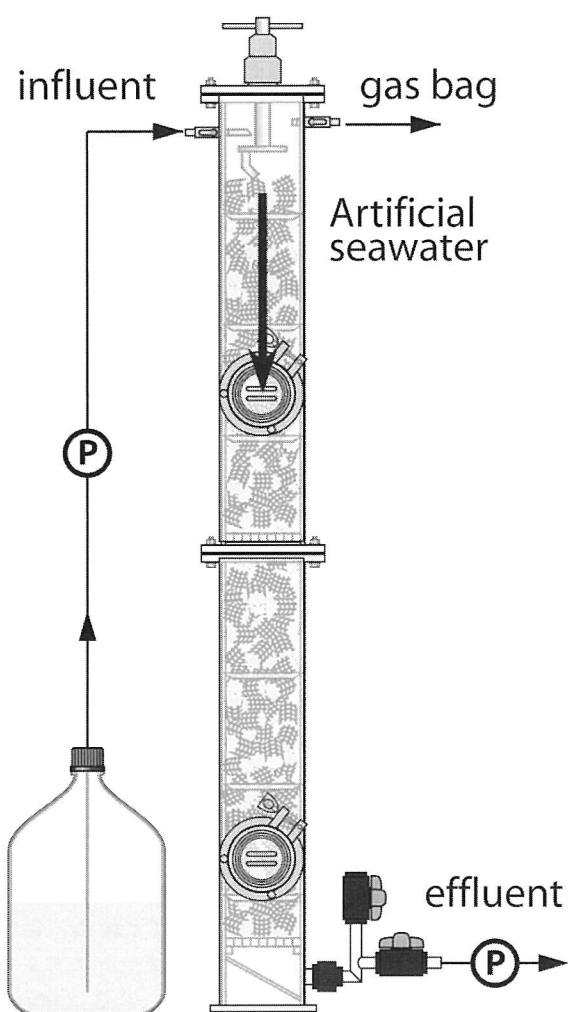


Fig. 4 Schematic diagram of the flow-through DHS bioreactor system.

### Operation conditions

▶ Temperature	10 °C
▶ HRT	84 hours
▶ Number of sponge	150
▶ Total void volume	3.0 L

### Artificial seawater

#### TOC 76.3 mg-C/L, pH 7.5

Glucose	85	mg/L
Acetate	58	mg/L
Yeast Extract	20	mg/L
Propionate	30	mg/L
NH <sub>4</sub> Cl	530	mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100	mg/L
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4,000	mg/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,000	mg/L
NaCl	25,000	mg/L
NaHCO <sub>3</sub>	2,000	mg/L
Vitamine solution	1	mL
Trace mineral solution	1	mL

ン生成菌を培養し、その生理学的・遺伝学的特徴を捉えることが必要であると考えられる。しかしながら、従来のバッチ式の培養法（バイアル瓶等を使った閉鎖条件下での培養方法）に依存した方法では安定的に深海底メタン生成菌を増殖させることは非常に困難であることが経験的に知られている。そこで我々は、このような状況を打破すべく新規な培養技術を開発・導入することで、これまで困難とされてきた深海底メタン菌の分離・培養を試みている。その培養方法の1つとして我々は廃水処理分野で使われているリアクターを参考にした微生物培養リアクターを用いて深海底堆積物からメタン菌の培養を行っている (Fig. 4)。数ある廃水処理リアクターの形式の中から、我々は散水ろ床方式の生物膜法である下降流懸垂型スポンジ (Downflow Hanging Sponge: DHS) リアクターに着目した (Agrawal *et al.*, 1997; Machdar *et al.*, 2000; Tandukar *et al.*, 2006)。その理由は、(1) DHS リアク

ターはスポンジ担体を微生物の固定担体として用いることから、増殖が極度に遅いと考えられる海底下微生物群をリアクターの内部に長期間に渡って保持することが可能であること、(2) DHS リアクターの特性としてスポンジ担体が気相中にさらされていることから、液体状および気体状基質をスポンジの内部にまで効率的に供給することができるため、その結果として菌体量を稼ぐことができること、(3) 加えて、DHS リアクターに限らずリアクターのような flow-through 型の培養方法は低濃度の基質を連続的に供給することができるため、エネルギーフラックスの低い海底下環境に準じた条件で培養が可能であること、代謝産物による増殖抑制や阻害の軽減をすることができる等のメリットがある。本稿では、DHS リアクターを用いて深海底堆積物からメタンを生成する嫌気性微生物群集を得ることができたのでその結果について報告する。

DHS リアクターを利用した深海底微生物の連続培養現在、DHS リアクターは約 600 日間連続運転を行っている。毎日流出水の pH と酸化還元電位 (oxidation-reduction potential; ORP) の測定を行い、pH は 7.2-7.6 程度で推移し、ORP は -250 - -300 mV 程度とメタン生成菌が生育可能な嫌気状態が保たれていた。加えて、2 ヶ月毎に流入および流出水の詳細な水質分析およびリアクター気相中気相部のガス組成の分析を行った。メタンは DHS リアクターの運転開始から 289 日目で初めて検出され、運転日数が経過するにつれその濃度は増加する傾向にあった (541 日目で 1.4%)。生成されたメタンの炭素同位体比を測定した結果、-75‰ と“同位体的に軽い”メタンが生成されていることから、リアクター内部で生成されるメタンは生物由来であることが推察された (Whiticar *et al.*, 1986)。水質分析の結果では、グルコースが完全に消費されていることがリアクターの運転初期から確認されたが酢酸とプロピオン酸の減少は全く観られなかった。酢酸の濃度は流出水の方が高くなっていることから、グルコースが微生物により代謝されて酢酸が生成されていると考えられた。これらガス分析と水質分析の結果、そして CO<sub>2</sub> の炭素同位体比の値が重くなっているという結果から、本リアクターのメタン生成は水素資化性のメタン菌が担っていると考えられた。従来研究においても深海底環境から生成するメタンの大部分は水素由来のメタン生成と考えられており、事実、植種源に使った下北半島東方沖コアサンプルを用いた放射性同位体実験の結果も水素由来のメタン生成が優位であることを示していた (データ省略)。従って、水素資化のメタン生成が優位に起きていることから考えれば本 DHS リアクターは実際の深海底堆積物環境を模擬できていると考えられる。

微生物種の同定および純粋分離株取得の試み 培養されてきた微生物種の同定を行うため、運転開始 358 日目にリアクターからスポンジ担体を採取し、細菌 (domain *Bacteria*) および古細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行った。その結果、細菌として検出されたクローンのほぼすべては深海底環境から分離された菌もしくは検出されたクローンに近縁であった。クローンの近縁種の多くは糖類を分解してエネルギーを得るような代謝様式を持つ通性嫌気性細菌 (e.g., *Photobacterium* 属細菌) であり、グルコースが分解されているという水質分析の結果と一致するものであった。一方、古細菌は解析したクローンの内、約 50% が従来知られているメタン菌のグループである *Methanobacterium* 属、*Methanococcoides* 属と

*Methanosarcina* 属に属していた。検出されたクローンはすべて酢酸を利用するメタン菌に近縁ではなく、酢酸が全く利用されていないという水質分析の結果と一致するものであった。また、これらメタン菌に近縁なクローン以外の残りのクローンは、Deep-Sea Archaeal Group (DSAG) や Rice Cluster III 等のクローン配列のみから構成される未培養グループに属していた。DSAG は海底堆積物に普遍的かつ優占的に存在していることが知られており、海底下環境において重要な役割を果たしていることが推定されている未培養古細菌群である (Teske & Sørensen, 2008)。これらクローン解析の結果と水質分析の結果から、本リアクター内では通性あるいは絶対嫌気性の発酵性細菌がグルコースを分解し、その分解産物として生成された水素および CO<sub>2</sub> を水素資化性メタン菌が利用しメタンを生成するという food-web が構築されていると考えられた。さらに同サンプルに FISH 法を適用した。その結果、様々な細胞形態を持つ微生物を検出することに成功した。通常、海底堆積物のような微生物の代謝活性が著しく低いサンプルに通常の FISH 法を適用し検出することは不可能であるが、この結果は DHS リアクターを用いることで深海底微生物のような低活性の微生物の代謝を活性化することができることを強く示唆するものであった。続いて、リアクター内のスポンジを植種源として従来のバッチ式の集積培養法によってメタン菌等の各種標的微生物の純粋分離株の取得を試みた。その結果、クローン解析で古細菌の優占種として推定された 3 種のメタン菌で *Methanococcoides* 属、*Methanobacterium* 属および *Methanosarcina* 属に属するメタン菌をほぼ純粋培養することに成功した。これらの結果より、DHS リアクターのような flow-through 型のバイオリアクターを用いた培養法は深海底メタン生成菌等の難培養性微生物を培養に有効な方法の 1 つであることがと強く示唆された。

新規エタノール資化性メタン生成古細菌の分離 嫌気共生培養法によるメタン菌培養の項において、エタノール、酪酸やプロピオン酸等の基質の嫌気環境下における分解は、それらの基質を分解する嫌気共生細菌とその分解によって生成される水素を除去する役割を担う水素資化性のメタン菌の 2 種の微生物の共生によって進行することを説明した。しかし、ここで疑問に思うのはこれら比較的低分子な有機物をなぜわざわざ 2 つの微生物が連携して分解しなければならないのか? ということである。そこで、エタノール、酪酸やプロピオン酸から直接メタンを生成するメタン菌が存在していてもおかしくはないと思い、そのような代謝

を持つメタン菌の培養を試みた。培養方法は単純で、嫌気性培地の入った血清バイアル瓶に各基質と3種類の抗生物質（バンコマイシン、ペニシリンGそしてカナマイシン）を添加して培養を行った。抗生物質を添加する理由はエタノール、酪酸やプロピオン酸を分解する嫌気共生細菌の増殖を抑えるためと、メタン菌を含めた古細菌の多くは抗生物質が効かないからである。いくつかの嫌気環境から採取してきた環境サンプルを接種し上記の培地を用いて培養を行った結果、蓮田土壌よりエタノールからメタンを生成するメタン菌 HASU 株を培養することに成功した。エタノール資化性メタン菌としては過去に *Methanogenium organophilum* の1種のみが知られており (Widdel, 1986; Widdel *et al.*, 1988), 本分離株がエタノールからメタンを生成するメタン菌としては2例目となる。一方、酪酸やプロピオン酸の培養系からは培養開始から1年以上経過してもメタンの生成および微生物の増殖は認められなかった。

HASU 株は運動性のない不定形球菌であり、その直径は2-3 $\mu$ mであった。増殖は14-40 $^{\circ}$ C (至適生育温度37 $^{\circ}$ C) と pH 6.5-7.5 (至適生育 pH 7.0) で観察された。ゲノム DNA の G+C 含量は 60.9 mol% であった。エタノール以外にも1-プロパノール、1-ブタノール、水素およびギ酸を利用して増殖とメタン生成を行った。HASU 株はエタノールをメタンと酢酸に転換した。16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を決定し分子系統解析を行った結果、*Methanofollis* 属に属していることが明らかとなった。他の *Methanofollis* 属古細菌との生理学的な性質と比較したところ共通する項目も多く見られたため、HASU 株を *Methanofollis* 属の新種 *Methanofollis ethanolicus* と命名した (Fig. 2F)。

## 要 約

メタン菌を培養するための新規培養法である嫌気共生培養法を用いることで人為的に分離されていない分類学的に新規なメタン菌の培養を試みた。その結果、水田土壌や嫌気性汚泥に優占的に存在し、かつ未培養古細菌群に属するメタン菌を分離・培養することに成功した。これらの分離株は詳細な菌学的特徴の決定を行った後に、それぞれ、新目 (*Methanocellales*)、新科 ('*Methanoregulacea*')、および新属 (*Methanolinea*) を代表する新規なメタン菌として記載・命名を行った。

これら3株の新規なメタン菌を培養できたことで嫌気共生培養法の有効性が十分に証明できたと考え、さらに9種類の環境サンプルに嫌気共生培養法を適用す

ることで新規なメタン菌の培養を試みた。その結果、*Methanocellales* 目や *Methanomicrobiales* 目に属する新属あるいは新種を代表するメタン菌の培養に成功した。加えてこの研究の過程において、メタン菌の系統分類群ごとに水素に対する基質親和性が異なることを見いだした。

さらに嫌気共生培養法をベースに新たに考案した flow-through 型のバイオリアクターを用いて、深海底堆積物からメタン菌の培養を試みた。その結果、リアクター運転開始から289日後にメタンの生成が確認された。水質・ガス分析および16S rRNA 遺伝子と *mcrA* 遺伝子に基づいたクローン解析の結果から水素資化性のメタン菌がリアクター内部で生育しているものと推察された。本リアクターからメタン菌の培養を試みた結果、*Metanobacterium* 属、*Methanosarcina* 属、*Methanococcoides* 属に属する3種のメタン菌を培養することに成功し、ほとんど知見が無かった深海底環境からのメタン生成機構を解明するための足がかりを掴むことができた。

エタノール、酪酸およびプロピオン酸を直接メタンに転換するメタン菌の培養を試みた。その結果、エタノールからメタンを生成するユニークなメタン菌 HASU 株を分離することに成功した。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) Imachi, H., Sakai, S., Sekiguchi, Y., Ohashi, A., Harada, H. & Kamagata, Y. (2006). A novel cultivation method for capturing uncultivated methanogenic *Archaea*, 11th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-11), Vienna, Austria, A167.
- 2) Sakai, S., Imachi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A. & Harada, H. (2006). Characterization of a novel methanogenic *Archaea*, a first cultured representative of Rice Cluster I. 11th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-11), Vienna, Austria, A485.
- 3) Hatamoto, M., Imachi, H., Ohashi, A. & Harada, H. (2006). Cultivation and identification of anaerobic microbes degrading long-chain fatty acids in methanogenic sludges. 11th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-11), Vienna, Austria, p.257.
- 4) Imachi, H. (2008). *Archaea* responsible for global methane emission and oxidation. The 8th International Symposium Global Renaissance by Green Energy Revolution, Nagaoka, Japan, p.50-53. (招待講演)
- 5) Sakai, S., Yamaguchi, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Conrad, R., Kamagata, Y. & Imachi, H. (2008). Isolation of Rice Cluster I methanogens playing a key role of global methane

- emission. The 8th International Symposium Global Renaissance by Green Energy Revolution, Nagaoka, Japan, p.87.
- 6) Yashiro, Y., Sakai, S., Yamaguchi, T. & Imachi, H. (2008). Cultivation of uncultivated methanogenic *Archaea* by using co-culture method. 12th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-12), Cairns, Australia, p.175.
  - 7) Sakai, S., Conrad, R. & Imachi, H. (2008). Isolation and characterization of Rice Cluster I methanogens. 12th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-12), Cairns, Australia, p.62.
  - 8) Imachi, H., Yashiro Y., Miyashita, A., Aoi, K., Yamaguchi, T., Nunoura, T., Inagaki, F. & Takai, K. (2008). Cultivation of marine subsurface microbes using continuous-flow bioreactor. 7th International Symposium for Subsurface Microbiology (ISSM 2008), Shizuoka, Japan, p.157.
  - 9) Yashiro, Y., Sakai, S., Yamaguchi, T., Araki, N. & Imachi, H. (2009). Isolation of uncultivated methanogen using co-culture method. The International Symposium "Green Technology for Global Carbon Cycle in Asia", Nagaoka, Japan, p.172. (Best Poster Award 受賞)
  - 10) Aoi, K., Yashiro, Y., Miyashita, A., Yamaguchi, T. & Imachi, H. (2009). Cultivation of methanogens from deep-sea sediment using continuous-flow bioreactor. The International Symposium "Green Technology for Global Carbon Cycle in Asia", Nagaoka, Japan, p.177.
  - 11) 井町寛之 (2006) . 難培養性メタン生成古細菌 Rice Cluster I の分離と特性, 日本土壤微生物学会シンポジウム, 仙台. (招待講演)
  - 12) 矢代悠人, 酒井早苗, 山口隆司, 井町寛之 (2007) 嫌気共生培養法による新規なメタン生成古細菌の分離・培養, 第25回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会, 長岡.
  - 13) Sakai, S., Imachi, H., Yamaguchi, T., Ohashi, A., Conrad, R. & Kamagata, Y. (2007). Isolation of a thermophilic Rice Cluster I methanogen. 第23回日本微生物生態学会, 松山, p.57.
  - 14) 井町寛之, 宮下藍, 矢代悠人, 山口隆司, 布浦拓郎, 稲垣史生, 高井研 (2008) . 微生物学的廃水処理技術を利用した深海底微生物の培養の試み, 第20回日本 Archaea 研究会 那覇, p.16.
  - 15) 井町寛之 (2008) . 深海底堆積物環境の微生物資源-資源量・多様性・培養の試み-, 日本微生物資源学会第15回大会シンポジウム, 千葉. (招待講演)
  - 16) 青井健, 矢代悠人, 山口隆司, 井町寛之 (2008) 廃水処理リアクターを利用した難培養性微生物の培養の試み, 第26回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会, 長岡.
  - 17) 井町寛之, 金田一智規, 山口隆司, 大橋晶良 (2009) 廃水処理リアクターを利用した難培養性微生物の培養, 第43回日本水環境学会年会, 山口, p.58.
  - 18) 青井健, 矢代悠人, 山口隆司, 井町寛之 (2009) 廃水処理リアクターを利用した深海底メタン生成菌の培養の試み, 第43回日本水環境学会年会, 山口, p.59.
  - (2007). Identification and cultivation of anaerobic, syntrophic long-chain fatty acid degrading microbes from mesophilic and thermophilic methanogenic sludges. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1332-1340.
  - 2) Hatamoto, M., Imachi, H., Fukayo, S., Ohashi, A. & Harada, H. (2007). *Syntrophomonas palmitatica* sp. nov., a novel anaerobic, syntrophic long-chain fatty acid-oxidizing bacterium isolated from a methanogenic sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2137-2142.
  - 3) Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Ohashi, A., Harada, H. & Kamagata, Y. (2007). Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy field: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the Rice Cluster I. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4326-4331. (本論文は2007年7月号の *Nature Reviews of Microbiology* 誌の Research Highlights のコーナーで紹介された [Jones, S. *Nature Rev. Microbiol.* **5**: 476.] .
  - 4) Imachi, H., Sakai, S., Sekiguchi, Y., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S. & Kamagata, Y. (2008). *Methanolinea tarda* gen. nov. sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 294-301.
  - 5) Sakai, S., Imachi, H., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H. & Kamagata, Y. (2008). *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon that is the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I' , and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 929-936.
  - 6) Imachi, H., Sakai, S., Nagai, H., Yamaguchi, T. & Takai, K. (2009). *Methanofollis ethanolicus* sp. nov., an ethanol-utilizing methanogen isolated from a lotus field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 800-805.
  - 7) Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Tseng, I.-C., Ohashi, A., Harada, H. & Kamagata, Y. (2009). Cultivation of methanogens under low-hydrogen conditions by using the coculture method. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 4892-4896.
  - 8) Yashiro, Y., Sakai, S., Ehara, M., Miyazaki, M., Yamaguchi, T. & Imachi, H. (2009). *Methanoregula formicica* sp. nov., a novel methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* in press.
  - 9) 酒井早苗, 井町寛之 (2007) . 水田土壌からのメタン生成キープレイヤー-Rice Cluster I メタン生成古細菌を“嫌気共生培養法”で純粋分離に成功-, 化学と生物, 第45巻12号, p.814-816.

### 保存機関に寄託した菌株

本研究を通じて分離した菌株は NITE Biological Resource Center (NBRC) , Japan Collection of Microorganisms (JCM) および German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) 等の

### 原著論文

- 1) Hatamoto, M., Imachi, H., Ohashi, A. & Harada, H.



菌株保存機関に寄託した。

*Syntrophomonas palmitatica* MPA<sup>T</sup> (=NBRC 102128<sup>T</sup> =JCM 14374<sup>T</sup> =DSM 18709<sup>T</sup>)

*Methanolinea tarda* NOBI-1<sup>T</sup> (=NBRC 102358<sup>T</sup> =JCM 12467<sup>T</sup> =DSM 16494<sup>T</sup>)

*Methanocella paludicola* SANAE<sup>T</sup> (=NBRC 101707<sup>T</sup> =JCM 13418<sup>T</sup> =DSM 17711<sup>T</sup>)

*Methanofollis ethanolicus* HASU<sup>T</sup> (=NBRC 104120<sup>T</sup> =JCM 15103<sup>T</sup> =DSM 21041<sup>T</sup>)

'*Methanolinea rotundus*' TNR<sup>T</sup> (=NBRC 105659<sup>T</sup>)

'*Methanotalea mesophila*' MRE50<sup>T</sup> (=NBRC 105507<sup>T</sup> =DSM 22066<sup>T</sup>)

*Methanoregula formicica* SMSPT<sup>T</sup> (=NBRC 105244<sup>T</sup> =DSM 22288<sup>T</sup>)

## 謝 辞

本研究に対し、3年間助成をして頂いた財団法人発酵研究所に深く感謝致します。本研究の一部は、大学院生であった酒井早苗博士（独立行政法人海洋研究開発機構）と幡本将史博士（広島大学）の学位論文の研究として行われました。また、本研究には多くの方のご協力をいただきました。特に高井研博士、稲垣史生博士、田角栄二博士（独立行政法人海洋研究開発機構）、関口勇地博士、花田智博士（独立行政法人産業技術総合研究所）、大橋晶良先生（広島大学）、原田秀樹先生（東北大学）、山口隆司先生、宮下藍さん、矢代悠人君、青井健君、永井寛之君（長岡技術科学大学）、Ralf Conrad 博士（Max Plank Institute for Terrestrial Microbiology, Germany）、I-Chen Tseng 博士（国立成功大学、台湾）には深く御礼申し上げます。

## 文 献

- Agrawal, L. K., Ohashi, Y., Mochida, E., Okui, H., Ueki, Y., Harada, H. & Ohashi, A. (1997). Treatment of raw sewage in a temperate climate using a UASB reactor and the hanging sponge cubes process. *Wat. Sci. Tech.* **36**: 433-440.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Amann, R. I., Binder, B., Olson, R., Chisholm, S., Devereux, R. & Stahl, D. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1919-1925.
- Atreya, S. (2007). The mystery of methane on Mars. *Sci. Am.* **296**: 42-51.
- Boone, D. & Whitman, W. (1988). Proposal of minimal standards for describing new taxa of methanogenic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 212-219.
- Bräuer, S., Cadillo-Quiroz, H., Yashiro, E., Yavitt, J. & Zinder, S. H. (2006). Isolation of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog. *Nature* **442**: 192-194.
- Cadillo-Quiroz, H., Yashiro, E., Yavitt, J. & Zinder, S. H. (2008). Characterization of the archaeal community in a minerotrophic fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of a novel hydrogenotrophic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 2059-2068.
- Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J. & Sghir, A. (2005). Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environ. Microbiol.* **7**: 1104-1115.
- Connon, S. & Giovannoni, S. (2002). High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3878-3885.
- Conrad, R., Erkel, C. & Liesack, W. (2006). Rice Cluster I methanogens, an important group of *Archaea* producing greenhouse gas in soil. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**: 262-267.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R. I., Schleifer, K.-H. & Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 434-444.
- DeLong, E. (1992). *Archaea* in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 5685-5689.
- Erkel, C., Kube, M., Reinhardt, R. & Liesack, W. (2006). Genome of Rice Cluster I archaea-the key methane producers in the rice rhizosphere. *Science* **313**: 370-372.
- Evans, P., Hinds, L., Sly, L., McSweeney, C., Morrison, M. & Wright, A. (2009). Community composition and density of methanogens in the foregut of the Tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 2598-2602.
- Ficker, M., Krastel, K., Orlicky, S. & Edwards, E. (1999). Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 254-260.
- Großkopf, R., Janssen, P. & Liesack, W. (1998). Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 960-969.
- Hales, B., Edwards, C., Ritchie, D., Hall, G., Pickup, R. & Saunders, J. (1996). Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 668-675.
- Harmsen, H. J. M., Van Kuyjk, B. L. M., Plugge, C. M.,

- Akkermans, A. D. L., De Vos, W. M. & Stams, A. J. M. (1998). *Syntrophobacter fumaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading sulfate-reducing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 1383-1387.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Ohashi, A. & Harada, H. (2000). Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3608-3615.
- Imachi, H., Sakai, S., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y. & Sekiguchi, Y. (2007). *Pelotomaculum propionicicum* sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic, propionate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1487-1492.
- Juottonen, H., Galand, P., Tuittila, E., Laine, J., Fritze, H. & Yrjälä, K. (2005). Methanogen communities and *Bacteria* along an ecohydrological gradient in a northern raised bog complex. *Environ. Microbiol.* **7**: 1547-1557.
- Kaeberlein, T., Lewis, K. & Epstein, S. (2002). Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**: 1127-1129.
- Karadagli, F. & Rittmann, B. E. (2005). Kinetic characterization of *Methanobacterium bryantii* M.o.H. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 4900-4905.
- Kobayashi, T., Koide, O., Mori, K., Shimamura, S., Matsuura, T., Miura, T., Takai, Y., Morono, Y., Nunoura, T., Imachi, H., Inagaki, F., Takai, K. & Horikoshi, K. (2008). Phylogenetic and enzymatic diversity of deep seafloor aerobic microorganisms in organics- and methane-rich sediments off Shimokita Peninsula. *Extremophiles* **12**: 519-527.
- Kristjansson, J. K., Schönheit, P. & Thauer, R. K. (1982). Different  $K_s$  values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Arch. Microbiol.* **131**: 278-282.
- Liu, W.-T., Marsh, T. L., Cheng, H. & Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4516-4522.
- Lu, Y., Lueders, T., Friedrich, M. & Conrad, R. (2005). Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing. *Environ. Microbiol.* **7**: 326-336.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. & Schleifer, K.-H. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1363-1371.
- Machdar, I., Sekiguchi, Y., Sumino, H., Ohashi, A. & Harada, H. (2000). Combination of a UASB reactor and curtain type DHS (downflow hanging sponge) reactor as a cost-effective sewage treatment system for developing countries. *Wat. Sci. Tech.* **42**: 83-88.
- Mihajlovski, A., Alric, M. & Brugère, J. (2008). A putative new order of methanogenic *Archaea* inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene. *Res. Microbiol.* **159**: 516-521.
- Nüsslein, B., Chin, K., Eckert, W. & Conrad, R. (2001). Evidence for anaerobic syntrophic acetate oxidation during methane production in the profundal sediment of subtropical Lake Kinneret (Israel). *Environ. Microbiol.* **3**: 460-470.
- Rappé, M., Connon, S., Vergin, K. & Giovannoni, S. (2002). Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**: 630-633.
- Raskin, L., Stromley, J., Rittmann, B. & Stahl, D. (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1232-1240.
- Schink B (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 262-280.
- Sekiguchi, Y. & Kamagata, Y. (2004). Microbial community structure and functions in methane fermentation technology for wastewater treatment. In Nakano M. M. & Zuber P. (eds.) *Strict and Facultative Anaerobes: Medical and Environmental Aspects*: 361-384. Horizon Bioscience, Norfolk, England.
- Smatlak, C. R., Gossett, J. M. & Zinder, S. H. (1996). Comparative kinetics of hydrogen utilization for reductive dechlorination of tetrachloroethene and methanogenesis in an anaerobic enrichment culture. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 2850-2858.
- Stackebrandt E & Goebel B (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846-849.
- Stahl, D. A. & Amann, R. I. (1991). Development and application of nucleic acid probes. In Stackebrandt E. & Goodfellow M. (eds.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*: 205-248. Wiley & Sons, New York.
- Stams, A. J. M., Grolle, K. C. F., Frijters, C. T. M. J. & Van Lier, J. B. (1992). Enrichment of thermophilic propionate-oxidizing bacteria in syntrophy with *Methanobacterium thermoautotrophicum* or *Methanobacterium thermoformicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 346-352.
- Tandukar, M., Uemura, S., Ohashi, A. & Harada, H. (2006). Combining UASB and the "forth generation" down-flow hanging sponge reactor for municipal wastewater treatment. *Wat. Sci. Tech.* **53**: 209-218.
- Teske, A. & Sørensen, K. (2008). Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *ISME J.* **2**: 3-18.
- Weber, S., Lueders, T., Friedrich, M. & Conrad, R. (2001).

- Methanogenic populations involved in the degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**: 11-20.
- Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D. & Lane, D. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
- Whiticar, M. J., Faber, E. & Schoell, M. (1986). Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO<sub>2</sub> reduction vs. acetate fermentation-isotope evidence. *Geochim. Cosmochim. Acta* **50**: 693-703.
- Widdel, F. (1986). Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 1056-1062.
- Widdel, F. & Pfennig, N. (1981). Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* **129**: 395-400.
- Widdel, F., Rouvière, P. & Wolf, R. (1988). Classification of secondary alcohol-utilizing methanogens including a new thermophilic isolate. *Arch. Microbiol.* **150**: 477-481.
- Wu, J.-H., Liu, W.-T., Tseng, I.-C. & Cheng, S.-S. (2001). Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology* **147**: 373-382.

# 好熱性アーキア *Vulcanisaeta distributa* 及び関連菌株の地理的分布と 遺伝学的多様性に関する研究

伊 藤 隆

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室  
〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

## Studies on the biogeography and genetic diversity of hyperthermophilic archaea, *Vulcanisaeta distributa* and related taxa

Takashi Itoh

Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center  
2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

The genus *Vulcanisaeta* was created in 2002 to encompass two hyperthermophilic archaeal species, *V. distributa* and *V. souniana*, isolated from several hot spring areas in eastern Japan. The *V. distributa* strains, which were all isolated from spouting hot spring or heated solfataric soil samples, are classified into the 16S rRNA gene-based subgroups, which are congruent with the geographic locations as well. On the other hand, the *V. souniana* strains, isolated from pipelined hot spring water, allocate in a different lineage. This may indicate that the geographic separation and the environmental difference promote the genetic diversification, leading to the speciation, among members of the genus *Vulcanisaeta*. In order to verify the hypothesis, we have tried to isolate strains from other locations, and conducted phylogenetic analyses on the 16S rRNA, *radA* and DEAD/DEAH box helicase genes. The comparison of gene organization of the 23S rRNA gene downstream regions (ca. 12k bases) was also conducted for several strains. The respective phylogenetic analyses on the 16S rRNA, *radA* and helicase genes revealed that the *V. distributa* strains and allied strains, isolated from Hokkaido to Kyushu, could be differentiated biogeographically. However, the phylogenetic positions of the strains from Hokkaido and Akita hot springs could be contradictory in the 16S rRNA/*radA* gene-phylogenies, implying that there have been functional constraint or homologous recombination in the genes of these strains. The genetic relatedness between *V. distributa* and *V. souniana* by the DNA-DNA hybridization study and the gene organization comparison, allowed us to deduce that the two species have diverged from the common ancestor more recently. Those results would underpin the usefulness of these *Vulcanisaeta* strains as model organisms to study the allopatric microbial speciation.

Key words: *Vulcanisaeta*, Hyperthermophilic archaea, Biogeography, Speciation, Evolution

### 緒 言

今日の細菌・アーキアの分類学において，“種”は系統分類学上の基本的単位となっている。しかし，基

E-mail: ito@jcm.riken.jp

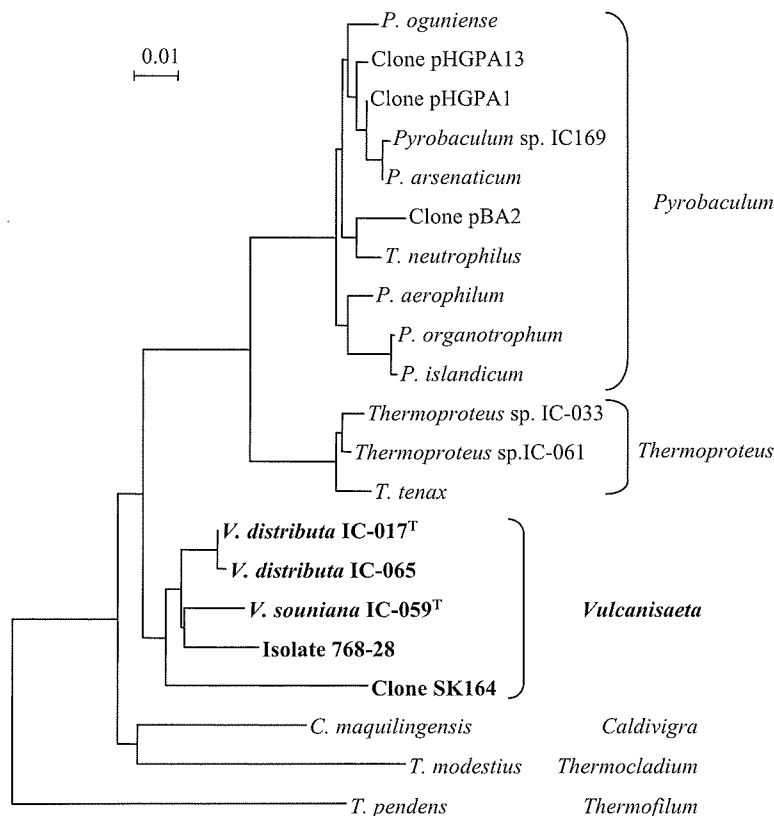
共同研究者：高品知典（東洋大学生命科学部），關 祐太（理研バイオリソースセンター微生物材料開発室，東洋大院・生命科学），角重瑠美（理研バイオリソースセンター微生物材料開発室，東洋大学生命科学部）

本的に有性生殖を有さない細菌・アーキアを理論的に“種”を定義することは難しく，もっぱらその取り扱いには実用的にとらえられている。すなわち，1) 系統学的な種は DNA-DNA 交雑値が 70% 以上（あるいは  $\Delta T_m$  値が 5℃ 以下）の菌株を含み，2) 表現性状で識別できない遺伝種（genospecies）は，何らかの識別性状が見つかるまでは異なる学名を提案しないことが望ましい（Wayne *et al.*, 1986）。その後，分子生物学的手法の発展によって“種”の概念を再評価する動きも出ており（Stackebrandt *et al.*, 2002; Gevers *et al.*,

2005), 近年では, ゲノム解析された微生物株の数が急激に増えてきていること, より簡便にゲノム類似度を推定できる Multilocus sequencing analysis (MLSA) 法や comparative genomic hybridization (CGH) 法などが発展してきていることによって“種”をより理論的にとらえることも試みられている (Gevers *et al.*, 2005; Achtman & Wagner, 2008). こうした傾向は実用的な“種”の定義を必ずしも否定するものではないが, より多角的に“種”概念を見つめ直す良い機会であろう (Burckley & Roberts, 2007).

さらに分子生物学の発展によって特定の微生物分類群の進化過程 (特に種分化) を生物地理学的に解明することも行われるようになってきた. これまで微生物の地理的分布はそのサイズの小ささや分布の広さ, 伝播の実態が特定できないために「everything is everywhere (the environment selects)」のようにとらえられているものも少なくない. しかし, 他の生物との共生や好熱性微生物に代表される極限環境微生物にお

いては生息地の物理的隔離によって伝播が比較的限られているために遺伝学的多様化や種分化を検討しやすい (Papke & Ward, 2004). 実際, 高温環境に生息するいくつかのアーキア・細菌種について地理的分布と遺伝学的多様化・種分化を関連づける試みが行われている (Whitaker *et al.*, 2003; Escobar-Párani *et al.*, 2005; Nesbø *et al.*, 2006; Whitaker, 2006). 特に '*Sulfolobus islandicus*' に関しては, 少なくとも 16S rRNA 遺伝子塩基配列がほとんど同じ ( $\geq 99.8\%$ ) アーキアが北半球の方々の温泉に分布しているが MLSA 解析ではそれぞれの地域ごとに区別することができることが判明している (Whitaker *et al.*, 2003). 現在では複数の '*Sulfolobus islandicus*' 菌株についてゲノム解析されて生物地理学的解析も行われている (Reno *et al.*, 2009). しかしこうしてモデルとして選別された生物種の分布パターンや注目される遺伝学的興味も様々であるために, 微生物の遺伝学的多様化, 種分化を理解するためにはより多くのモデル生物群について検討を行っていく必要性があろう. 本研究では, 我々がこれま



**Fig. 1** Unrooted 16S rRNA gene-based phylogenetic tree of the order *Thermoproteales*. Among the clade of the genus *Vulcanisaeta*, Isolate 768-28 is isolated from Russia, and clone SK164 is obtained from the North America. The clade of the genus *Pyrobaculum* includes a misclassified species, *Thermoproteus neutrophilus*.

**Table 1** Features of *Vulcanisaeta distributa* and *V. souniana*<sup>a</sup>

	<i>V. distributa</i>	<i>V. souniana</i>
Growth temperature (Max.)	99 °C (97 °C for IC-029 92 °C for IC-124)	89 °C
Growth pH range	2.7-6.0	3.5-5.0
NaCl tolerance	≤1.0 %	≤1.25 %
DNA G+C mol%	43.9-46.2	44.9-45.4
Source	Spouting hot spring Solfataric soil Hot mud	Hot spring (from an anthropogenic facility)
Number of strains described	15	2
Type strain	IC-017 <sup>T</sup>	IC-059 <sup>T</sup>

<sup>a</sup> cited from Itoh *et al.* (2002)

で日本各地の温泉から分離してきた好熱性アーキアである *Vulcanisaeta* 属菌株を用いて、これらが地理的分布と遺伝学的多様化・種分化を検討するのに好適なモデル微生物であることを示したい。

*Vulcanisaeta* 属は2002年に Itoh *et al.* によって提唱された *Crenarchaeota* 門, *Thermoproteales* 目, *Thermoproteaceae* 科に属する超好熱性アーキアの一属である (Fig. 1 参照)。この発表当時に報告されている菌株17株は全て東日本の火山活動による高温環境から分離された菌株である。生育至適温度 85~90°C, 至適 pH 4.0~4.5 で, 従属栄養性, 絶対嫌気性, 硫黄またはチオ硫酸を電子受容体として利用する桿菌状のアーキアである。*Thermoproteaceae* 科には他に *Thermoproteus*, *Pyrobaculum*, *Thermocladium*, *Caldivirga* の各属があるが, これらとは系統学的位置の違いの他, DNA G+C 含量, 生育温度, 生育 pH, ビタミンによる生育促進, デンプンの資化性などの表現性状によって区別することが可能である。本属には *V. distributa* と *V. souniana* の2種が報告されている。これら2種は 16S rRNA 遺伝子の相同性, DNA-DNA 交雑値, さらには生育温度, 耐塩性などの表現性状によって区別することができる (Table 1)。尚, *V. distributa* と命名した菌株は 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性, DNA-DNA 交雑値から少なくとも3つの遺伝種に分けることができるが, それらを区別する表現性状が見つかっておらず, すべて *V. distributa* の下におかれている。*Vulcanisaeta* 属菌株の地理的分布と 16S rRNA 遺伝子の多様性には次のような特徴がある (1) *V. distributa* 菌株は大きく4つの温泉地帯から分離されているが, それぞれの採集地から分離した

菌株はいずれも一つの (16S rRNA 遺伝子) 系統枝に含まれ, また大雑把ではあるが地理的に近いもの同士 (すなわち箱根と奥塩原の分離株, また玉川と後生掛の分離株) がより近縁な関係となっている, (2) *V. distributa* 菌株は全て野外に湧出する温泉水または硫黄孔で加熱された土壌, 噴泥等から分離されているが, *V. souniana* は造成温泉水 (噴気と貯留水を人為的に混合した温泉水) を引湯するパイプライン上にある三角堰様の建造物から漏出した温泉水より分離できたもので, *V. distributa* とは生息環境が異なることが推察されている, (3) 本属発表以後, 本属に属すると思われる好熱性アーキアはロシア (カムチャツカ半島), アメリカ (イエローストーン, ラーセン国立公園) で分離, 検出されているが (Fig. 1), これまでのところ *V. distributa* や *V. souniana* と 16S rRNA 塩基配列が一致もしくはほぼ一致するもの (>98% 相同性) は報告されていない (Prokofeva *et al.*, 2005; Siering *et al.*, 2006)。以上の事実から *V. distributa*, *V. souniana* の地理的分布と遺伝子多様化・種分化に関して, (I) *V. distributa* 菌株では地理的隔離によって種内の遺伝学的多様化が比較的早く進んでいる, (II) *V. souniana* 菌株では生息環境の相違によって遺伝学的多様化・種分化の促進に影響を及ぼした, ことを作業仮説として設定した。以上の作業仮説を実証していくために, 本研究ではより広範な地域での *Vulcanisaeta* 属菌株の分離を行うこと, 16S rRNA 遺伝子以外にもより多くの遺伝子解析を行うこと, さらに遺伝子構造解析を行うことによって, これら菌株が地理学的分布と遺伝子多様化・種分化に関する研究のモデル微生物となることを示したい。

尚, 本論文の内容のうち, 結果と考察に記された長崎・雲仙温泉から *Vulcanisaeta* 属菌株の分離とその 16S rRNA 塩基配列データ, *radA* 系統解析の一部は本研究助成が始まる以前の実験結果であることを付記しておく。

## 実験方法

**新規 *Vulcanisaeta* 属菌株の分離及び純化** 2007年6月28日に北海道川湯硫黄山(アトサヌプリ)と屈斜路湖畔にある和琴半島オヤコツ地獄より温泉が湧出している箇所にて温泉水ならびに硫気孔にある石(砂利)のサンプリングを行った。*Vulcanisaeta* 培地(pH 4.0-4.5, Itoh *et al.*, 2002)を使用し, N<sub>2</sub>嫌気条件下 85°C で集積培養を行い, *Vulcanisaeta* 属菌株様の桿菌が認められたサンプルについて限界希釈法(10倍)を2回繰り返す, さらに最確値法(Most probable number 法, MPN 法)を4回繰り返す純粋株の取得を試みた。MPN 法では *Vulcanisaeta* 培地中に細胞が10倍ごとに希釈される系列(10<sup>-1</sup>~10<sup>-10</sup>倍)を用意し, このうち 10<sup>-6</sup>~10<sup>-10</sup>倍希釈液をそれぞれ8分割してそれぞれ培養を行った。最も細胞が希釈された培地中に生育したものを以降の実験に使用した(複数ある場合は任意に一つの培養液を選択した)。北海道にてサンプリングした試料では川湯温泉由来の2試料, 和琴温泉由来の2試料から *Vulcanisaeta* 属菌株様の桿菌状細胞が観察でき, 限界希釈法とMPN法を繰り返した。3試料についてはほぼ一様な桿菌状形態を示す培養物を得ることができたが, 川湯温泉由来の一試料はMPN法を繰り返しても球菌と桿菌が混在しており, これらは共生関係にある可能性が示唆された。本培養物は一旦ペンディングとして, それ以外の3菌株を分離株として登録(IC-237, IC-238, IC-239)し, 以降の実験に用いた。

**使用菌株** 本研究に使用した *Vulcanisaeta* 属菌株はまとめて Table 2 に, 採集地の分布は Fig. 2 に示した。尚, *V. distributa* IC-124, IC-136, IC-141 を分離することができた後生掛, 蒸けの湯, 大沼はそれぞれの距離が近いことからここではこれら菌株の採集地は後生掛とした。*V. distributa* は先述の通り複数の遺伝種を含んでいるが, 本論文では原著に従い全ての既知株を *V. distributa* の下に表記する。一方, 雲仙で分離した菌株(IC-218, IC-219)や, 本研究で分離した菌株(IC-237, IC-238, IC-239)は, 系統的に *V. distributa* に極めて近いものもあるが, DNA-DNA 交雑実験を含めた詳細な分類学的実験が未了であること

からここでは *Vulcanisaeta* sp. として表記する。また *V. distributa* 菌株とこれらの *Vulcanisaeta* sp. の菌株を合わせて示すときは *V. distributa* 関連菌株と表記することとする。

**16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定** 16S rRNA 遺伝子塩基配列の決定は Itoh *et al.* (1998: 2002) の方法に従った。同遺伝子の増幅には A-20F と A-530F, A-1400R, A-1530R2 を使用した。塩基配列の決定には ABI 3100 Genetic Analyzer (ABI PRISM 社) を使用し, シークエンスプライマーとして A-20F, A-530F, A-1060F, A-520R, A-910R, A-1100R, A-1530R2 を使用した。

**DNA-DNA 交雑実験** DNA-DNA 交雑実験は Ezaki *et al.* (1987) の蛍光標識を使用したマイクロプレート法に拠った。

***radA* 遺伝子の塩基配列決定** *radA* 遺伝子の増幅は Sandler *et al.* (1999) の報告に基づき行った。すなわち, PCR プライマーとして以下のプライマーを使用し, タッチダウン法によって DNA 増幅を行った。増幅産物をアガロースゲル電気泳動した後, ゲルより回収し, クローニングを行い挿入塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定には最低2クローンの塩基配列を決定した。

増幅プライマー

prSJS254

5'-ACWGARTTYKYWGGWGARTTYGGWWSYGGWAA

prSJS255

5'-RTCWGGYCTWGCWGCWACYTGRRTTWGT

(W=A or T, Y=T or C, S=G or C, M=A or C, K=T or G, R=A or G, B=T or C or G, H=A or T or C, D=A or T or G, V=A or C or G, N=A or T or G or C)

**DEAD/DEAH box helicase 遺伝子の塩基配列決定** 後述の *V. distributa* IC-017<sup>†</sup> 株におけるフォスミドクローンの塩基配列解析及び PCR による遺伝子存在確認実験の結果, 供試した全ての *Vulcanisaeta* 菌株で 16S rRNA 遺伝子上流(5'末端側)に DEAD/DEAH box helicase 様遺伝子が存在することが示唆された。そこで遺伝子存在確認実験に使用した PCR プライマーを用いて同領域を増幅し, 塩基配列の決定を行った。使用したプライマーは次の通りである。

増幅プライマー

hel\_183F 5'-GCRGCBMTBTTCMMRTRAT

A-520R 5'-CAGCCGCCGCGGTAATAC

Table 2 List of the *Vulcanisaeta* strains studied

Location Strain	JCM No.	Source		pH	Medium pH <sup>a</sup>	Date	Publication
		Sample	Temperature (°C)				
Kawayu, Hokkaido <i>Vulcanisaeta</i> sp. IC-239	16161	Pebble	100	ND	4.0	06/2009	This study
Wakoto, Hokkaido <i>Vulcanisaeta</i> sp. IC-237	16159	Water	82	2.8	4.0	06/2009	This study
<i>Vulcanisaeta</i> sp. IC-238	16160	Water	88	2.6	4.0	06/2009	This study
Goshoukake (including Fukenoyu, and Ohnuma), Akita <i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-124	11216	Water	90	2.4	5.0	11/1994	Itoh <i>et al.</i> (2002)
<i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-136	14464	Soil	65	2.5	5.0	11/1994	Itoh <i>et al.</i> (2002)
<i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-140	14465	Mud	75	3.3	5.0	11/1994	Itoh <i>et al.</i> (2002)
Tamagawa, Akita <i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-135	11217	Water	90	1.6	5.0	11/1994	Itoh <i>et al.</i> (2002)
<i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-141	11218	Water	65	1.8	5.0	11/1994	Itoh <i>et al.</i> (2002)
Okushiohara, Tohigi <i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-029	11213	Soil	90	1.2	4.0	11/1993	Itoh <i>et al.</i> (2002)
<i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-030	14459	Soil	90	3.0	4.0	11/1993	Itoh <i>et al.</i> (2002)
<i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-032	14460	Water	85	3.4	4.0	11/1993	Itoh <i>et al.</i> (2002)
Ohwakudani, Kanagawa <i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-017 <sup>T</sup>	11212 <sup>T</sup>	Water	ND	2.0-2.5	3.5	09/1993	Itoh <i>et al.</i> (2002)
<i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-019	14458	Soil	85	2.7	3.5	09/1993	Itoh <i>et al.</i> (2002)
<i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-051	14461	Soil	90	1.4	6.0	02/1994	Itoh <i>et al.</i> (2002)
<i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-052	14462	Soil	90	2.1	6.0	02/1994	Itoh <i>et al.</i> (2002)
<i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-058	14463	Soil	85	2.7	4.0	02/1994	Itoh <i>et al.</i> (2002)
<i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-064	11214	Soil	90	1.4	4.0	02/1994	Itoh <i>et al.</i> (2002)
<i>Vulcanisaeta distributa</i> IC-065	11215	Soil	90	2.1	6.0	02/1994	Itoh <i>et al.</i> (2002)
Unzen, Nagasaki <i>Vulcanisaeta</i> sp. IC-218	14467	Water	88	2.1	5.0	04/2004	Unpublished
<i>Vulcanisaeta</i> sp. IC-219	14468	Water	88	2.1	2.5	04/2004	Unpublished
Soun-zan, Kanagawa <i>Vulcanisaeta soumitana</i> IC-059 <sup>T</sup>	11219 <sup>T</sup>	Water	ND	3.0-3.2	4.0	02/1994	Itoh <i>et al.</i> (2002)
<i>Vulcanisaeta soumitana</i> IC-060	14466	Water	ND	3.0-3.2	4.0	02/1994	Itoh <i>et al.</i> (2002)

<sup>a</sup> The strains were isolated by using the modified *Sulfolobus* medium as an enrichment medium at 85 °C and indicated pH (Itoh *et al.*, 1998, 2002).





Fig. 2 A map of Japan showing the sampling locations

シーケンスプライマー

A-120R 5'-ACGGCTCAGTAACACGT  
 hel\_2510R  
 5'-GCAGTTTAGGCATAGTAGTGTTA  
 hel\_2032R 5'-CTTATTGGTGTGTTATGAG  
 hel\_1473R 5'-TTTGGTCTGGTATCATGGA  
 hel\_1070R 5'-CTCTGGATTAGCTTYGTGAC  
 hel\_778R 5'-ATCCTCCTGACCCTCGCCGC

フォスミドクローンの作製と挿入塩基配列の決定  
 ゲノム DNA をパルスゲルフィールドゲル電気泳動に  
 供試し、33-48kb の大きさの DNA を分画した。この  
 DNA 末端を平滑処理後に pCC1Fos vector に挿入し  
 フォスミドライブラリーを構築した。フォスミドクロー  
 ンは 16S rRNA 遺伝子が挿入されているクローンを  
 PCR 法によってスクリーニングした後、陽性となった  
 クローンについて 16S rRNA 遺伝子が少なくとも挿入  
 部分の末端にないことを確認し、その後任意に一つの  
 クローンを選抜した。このクローンについてショット  
 ガンクローンライブラリーを構築し、96クローンにつ  
 いて塩基配列の決定を行った。さらにこれらの塩基配  
 列情報をアッセンブルし、長鎖 DNA 塩基配列を決定  
 した。尚、これらの作業はタカラバイオ株式会社に委  
 託した。長鎖 DNA 塩基配列情報の遺伝子構造の推定  
 とそのアノテーションは ORF Finder (NCBI) およ

び BLAST (Altschul *et al.*, 1997) を用いて行った。

系統解析法 遺伝子塩基配列、翻訳アミノ酸配列は  
 Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) を用いてアライ  
 メントを行い、必要に応じて手動による修正を行っ  
 た。系統解析は塩基またはアミノ酸の置換率を基に近  
 隣結合法 (Saitou & Nei, 1987) を用いて系統樹を作  
 成し、ブートストラップ (bootstrap) 検定を行った  
 (Felsenstein, 1985)。

## 結果と考察

**Vulcanisaeta** 属種の生理学的性状 本研究におい  
 て、*Vulcanisaeta* spp. IC-218, IC-219 では少なくと  
 も 95°C で生育可能なこと、また *Vulcanisaeta* spp.  
 IC-237, IC-238, IC-239 では最高生育温度は 98°C で  
 あることを見いだした。またこれら 5 菌株の生育 pH  
 範囲は 3~6 であった。以上の生理学的性質は既知の  
*V. distributa* 菌株と一致していた (Itoh *et al.*,  
 2002)。

**16S rRNA 遺伝子系統解析** 本研究及び未発表の研  
 究により、*Vulcanisaeta* spp. IC-218, IC-219, IC-  
 237, IC-238, IC-239 のほぼ全塩基配列を決定した。  
 一方、*Vulcanisaeta distributa* IC-017<sup>T</sup>, IC-065, IC-

124, IC-135, *Vulcanisaeta souniana* IC-059<sup>†</sup>についてはほぼ全塩基配列を決定してあるが、それ以外の *Vulcanisaeta* 属菌株は A20F と A-690R によって PCR 増幅された部分塩基配列である (Itoh *et al.*, 2002). 従って、全ての *Vulcanisaeta* 属菌株の系統的解析はアライメント終了後の 560 塩基について行った。その系統樹を Fig. 3a に示す。

本系統樹に見られるように、各採集地における分離株はブートストラップ値が低いものもあるが概ね一つのクラスターにまとまった (唯一の例外は IC-065)。広範なレベルで見れば北海道と秋田、箱根と奥塩原、雲仙に大きく分けることができた。しかし北海道と秋田の分離株では、和琴オヤコツ地獄と後生掛からの分離株がさらにクラスターを形成し、川湯硫黄山と玉川からの分離株もクラスターを形成し、採集地の地理的距離関係と矛盾していた。雲仙からの分離株は秋田・北海道の菌株に対して 1.6~2.1% の非相同性、箱根・奥塩原の分離株に対し 1.1~1.2% の非相同性を示した。一方、*V. souniana* はこれら *Vulcanisaeta distributa* 関連菌株とは離れたクラスターを形成し、また非相同性値も 2.5~3.6% であった。

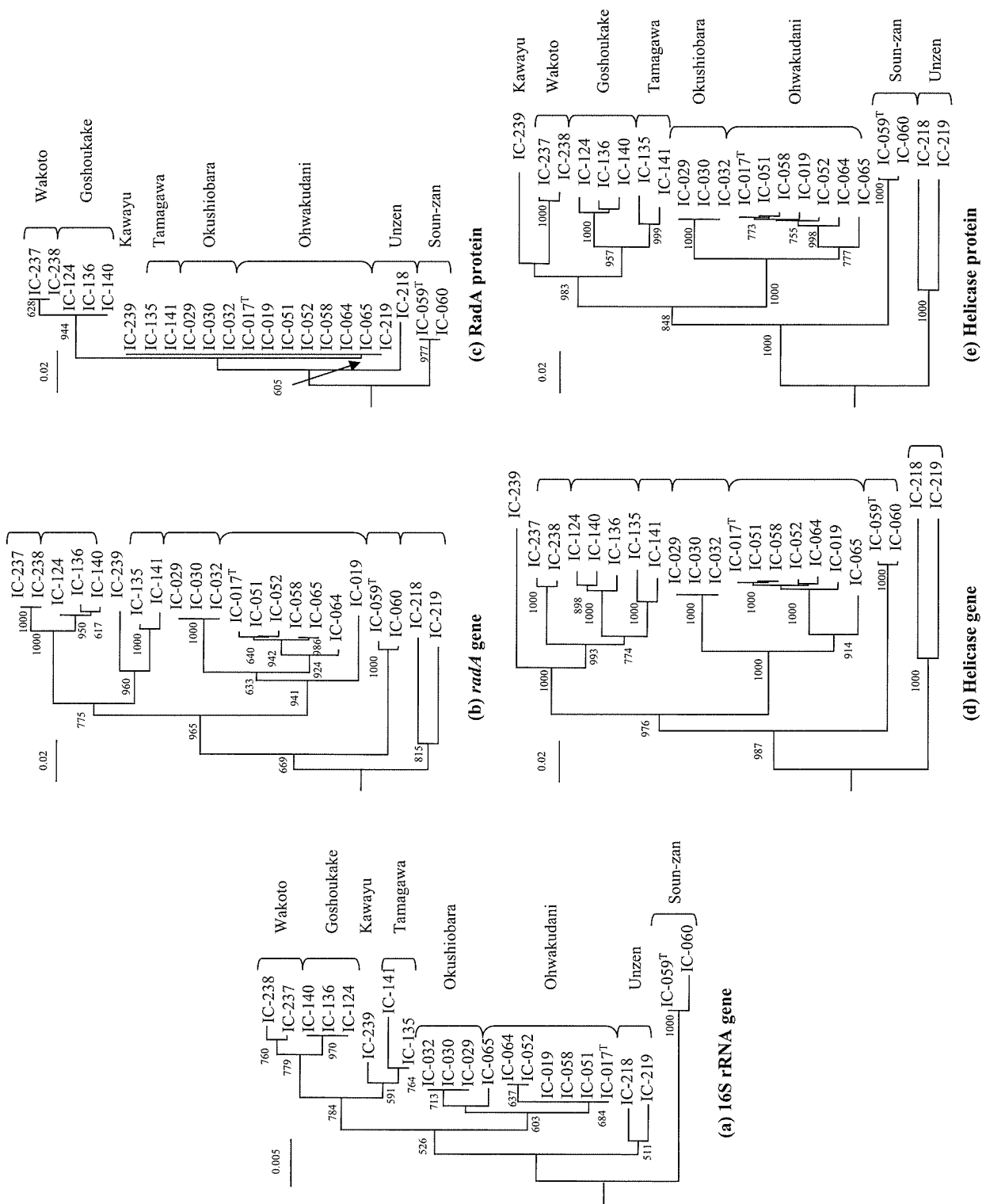
**radA 塩基配列及び RadA アミノ酸配列の系統解析**  
*radA* 遺伝子はアーキアにおける遺伝子の組換え・修復に関わる遺伝子で、細菌の *recA* 遺伝子、出芽酵母の *RAD51*, *DMC1* 遺伝子のホモログとして認められている。Sandler *et al.* (1999) によって本遺伝子の系統的マーカーとしての有用性が検討され、コドンの第 1 位、第 2 位塩基による *radA* 遺伝子の系統樹は 16S rRNA 遺伝子の系統樹と良い相関性を示すが、系統群によってはトポロジーが異なり、また系統群に特有の遺伝子 (アミノ酸) 配列の挿入があることが示されている。本研究では Sandler *et al.* (1999) の方法に従い、*Vulcanisaeta* 属菌株の *radA* 部分塩基配列を決定し、その塩基 (397 塩基) 及びアミノ酸 (132 アミノ酸) に基づく系統樹を作成した。 (Figs. 3b & 3c)

*Vulcanisaeta* 属菌株間における *radA* 遺伝子は 16S rRNA 遺伝子より置換率が高いが、その多くはアミノ酸を変化させない同義的遺伝子置換によるものである。*radA* 遺伝子の系統樹は 16S rRNA 遺伝子系統樹とほぼ同様な系統関係を示した。すなわち一つの採集地の分離株は概ね単一のクラスターを形成し (唯一の例外は IC-019)、また地理的分布との対応も *V. distributa* 属関連菌株では北海道・秋田、奥塩原・箱根、雲仙に分けることができたが、和琴オヤコツ地獄と後生掛がクラスターを形成し、川湯硫黄山と玉川が別のクラスターを形成した。一方、*V. souniana* と雲

仙温泉由来の分離株の系統位置関係は、雲仙温泉分離株が最も離れた位置にあったがそのブートストラップ値による統計的信頼度は低かった。*RadA* アミノ酸配列では *V. distributa* 関連菌株では川湯硫黄山、玉川、奥塩原、箱根大涌谷、雲仙温泉のうち一株が全て同じアミノ酸配列を有しており、また和琴オヤコツ地獄・後生掛温泉、雲仙温泉の他の一株は若干のアミノ酸配列の相違が見られた。*V. distributa* 関連菌株ではたとえ雲仙温泉からの分離株でもあってもその一つが他の *V. distributa* 関連菌株と同じアミノ酸配列であったことから、これら遺伝子の変異は主に遺伝学的浮動によって起こっているものと考えられる。*V. souniana* の *RadA* アミノ酸配列はブートストラップ値は低いものの *V. distributa* 関連菌株のものとは区別することができた。

**DEAD/DEAH box helicase 様タンパク質遺伝子とアミノ酸の系統解析**  
ヘリカーゼは遺伝子の組換え・修復時等において核酸をほぐす酵素群である。いくつかのサブファミリーを形成しているが、DEAD/DEAH box helicase もそのひとつである。さらにゲノム解析されている *Pyrobaculum* 属や *Caldivirga* 属では DEAD/DEAH box helicase 自身にいくつかのホモログが存在している可能性がある。今回供試した *Vulcanisaeta* 属菌株ではいずれも 16S rRNA 遺伝子の上流域に同一起源と思われる DEAD/DEAH box helicase 様遺伝子が存在した。したがって 16S rRNA 遺伝子とヘリカーゼ遺伝子に特異的なプライマーを使用することで単一の遺伝子断片を増幅することができ、これをダイレクトシーケンシングすることによって塩基配列を決定することができた。本研究において 2658 塩基、886 アミノ酸を決定し、系統解析を行った。

DEAD/DEAH box helicase 様遺伝子、アミノ酸に基づく系統樹を Figs. 3d & 3e に示す。本遺伝子の変異には非同義置換が多く、遺伝子由来の系統樹もアミノ酸由来のものも同様のトポロジーを有していた。実際、供試菌株間での非相同性は塩基ベースで最大 25.3%、アミノ酸ベースで最大 21.5% と大差がなかった。16S rRNA 遺伝子、*radA* 遺伝子と同様に、それぞれの採集地から分離されたものは一つのクラスターを形成し、また *V. distributa* 関連菌株は北海道・秋田、奥塩原・箱根、雲仙の 3 ブロックに分けることができた。一方、16S rRNA 遺伝子、*radA* 遺伝子とは異なり、後生掛と玉川由来の分離株が一つのクラスターを形成し、川湯硫黄山、和琴オヤコツ地獄もアミノ酸レベルではブートストラップ値が低いもののクラスターを形成した。



**Fig. 3** Comparison of the phylogenetic trees derived from the 16S rRNA genes (a), *radA* genes (b), RadA proteins (c), DEAD/DEAH box helicase genes (d) and DEAD/DEAH box helicase proteins (e). Each of the trees is constructed by the neighbor-joining method, and rooted with *Caldivirga maquilingsensis* as the outgroup organism. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values (1000 trial) with more than 50%. The bars represent substitution rates (%).

一方、雲仙由来の分離株は遺伝子、アミノ酸を用いても高いブートストラップ値で他の *Vulcanisaeta* 属菌株と系統学的に最も離れた位置にあった。

**長鎖遺伝子断片の比較** 長鎖遺伝子断片の比較を行うため *V. distributa* IC-017<sup>T</sup> 及び *Vulcanisaeta* sp. IC-218 についてはそれぞれ 16S rRNA 遺伝子を含む一フォスミドクロンの塩基配列の決定を行った。これら 2 菌株以外の菌株は、*V. distributa* IC-017<sup>T</sup> で得られたフォスミドクロンの塩基配列情報から 23S rRNA とその下流に存在するタンパク質遺伝子に対して設計したいくつかのプライマーを用いてロングレンジ PCR を行った。これより *V. souniana* IC-059<sup>T</sup> については CoA-binding protein をターゲットに約 15k 塩基、IC-135 では sodium/hydrogen exchanger をターゲットに約 14k 塩基の遺伝子断片を得ることができた。これらの遺伝子断片はショットガンライブラリー作製後に塩基配列の決定を行った。そのアノテーション情報を Tables 3-5 に示した。

*V. distributa* IC-017<sup>T</sup> 由来のフォスミドクロンにおいては 16S rRNA 遺伝子上流 (5' 末端) 側には *Archaeoglobus fulgidus* の Cytochrome oxidase subunit I と相同性の高い遺伝子、*Cladivirga maquilungensis* の type II secretion system protein subunit E, DEAD/DEAH box helicase 様遺伝子が存在したが、それ以外は特に相同性の高いタンパク質は検出できなかった。一方、23S rRNA 遺伝子下流 (3' 末端) 側には *Cladivirga maquilungensis* と相同性の高い膜輸送に関わるタンパク質遺伝子群が検出できた。一方、*Vulcanisaeta* sp. IC-218 ではフォスミドクロン中に *Cladivirga maquilungensis* と相同性の高いタンパク質遺伝子は先述の DEAD/DEAH box helicase 様タンパク質のみで、多くは '*Sulfolobus islandicus*', *S. solfataricus*, *Methanocaldococcus jannaschii*, '*Thermococcus onnurineus*' などのタンパク質遺伝子と高い相同性を示した。特に *Sulfolobus* 属種の precorrin 系タンパク質は E-value が極めて低く、また *Vulcanisaeta* 属菌株は *Sulfolobu* 属と同じような酸性温泉環境に生息していることから、比較的近い時期に遺伝子の水平移動を起こしたものと考えられた。*V. souniana* IC-059<sup>T</sup>, *V. distributa* IC-135 においては 23S rRNA 下流の塩基配列はほぼ *V. distributa* IC-017<sup>T</sup> と同じ遺伝子構造を持っていた。

**DNA-DNA 交雑実験** *V. distributa* IC-017<sup>T</sup>, *V. souniana* IC-059<sup>T</sup>, *Vulcanisaeta* spp. IC-218 及び IC-219 間の DNA-DNA 交雑値を Table 6 に示した。*V.*

*distributa* IC-017<sup>T</sup> と *V. souniana* IC-059<sup>T</sup> は以前の報告 (Itoh *et al.*, 2002) と同様に低い相同性を示し、また雲仙由来の菌株も *V. distributa*, *V. souniana* とは種レベルで異なることが示唆された。

***V. distributa* 関連菌株における遺伝子多様化の考察** 今回の研究において、採取地を増やしても遺伝子を変えても、各系統樹ごとに同じ採集地の *V. distributa* 関連菌株が単一のクラスターを形成したことは、作業仮説として挙げた地理的隔離によって遺伝子多様化が認められる、という仮説を支持するものと考えても良いだろう。採集地の温泉環境は早雲山温泉と後述する川湯温泉、玉川温泉を除いて大差なく、これらが遺伝学的浮動によって多様化したことを裏付けるものと思われる。一方、雲仙温泉では同じ温泉から遺伝学的にやや離れた菌株がとれていることや、箱根における繰り返しの分離によっても同一採集地内で若干の遺伝学多様性が認められている。同一の生息地であっても詳細に見れば異なる環境因子 (温度, pH, 温泉成分など) の下で様々な *Vulcanisaeta* 菌株が生息しているものと思われる。また、ある菌株は他の好熱性微生物と共生関係にあるものもあり、そのような菌株はフリーリビングに生活している菌株とは遺伝学的に相違があるかもしれない。分子生態学的手法を使えば、一定の生息地における *Vulcanisaeta* 属菌株の群集を解析できるかもしれないが (Siering *et al.*, 2006), むしろ培養というフィルターをはさむことによって採集地間の差がクリアーになったのかもしれない。

採集地の距離的關係と系統的關係の間に概ね相関があるように思えたが、秋田の 2 温泉 (玉川及び後生掛) 間の距離は約 7 km, 北海道の 2 温泉 (和琴オヤコツ及び川湯硫黄山) 間の距離は約 20 km しか離れていないにもかかわらず 16S rRNA 遺伝子と *radA* 遺伝子ではそれぞれの系統学距離が離れていること、さらに川湯硫黄山と玉川温泉、和琴オヤコツ地獄と後生掛の分離株がそれぞれ近縁であり一見地理的關係と矛盾していると思われた。しかし、DEAD/DEAH box helicase 様遺伝子とその翻訳アミノ酸配列では、少なくとも秋田の温泉由来の分離株は同じクラスターに含まれていた。こうした遺伝子間で異なる分子進化 (変異) のパターンを示すことはタンパク質 (あるいは遺伝子) の機能的制約、相同的組み換え、収束等によることが考えられよう。それぞれの遺伝子座の多様度を比較すると、DEAD/DEAH box helicase 遺伝子は *radA* 遺伝子よりも多様化が進んでおり、変異に対して抑制が少ない分だけより中立的に進化しているのかもしれない。DEAD/DEAH box helicase の変異は非

**Table 3** Putative gene structure of the *V. distributa* IC-017<sup>+</sup> gene fragments constructed in a fosmid clone

ORF No <sup>a</sup>	Frame <sup>b</sup>	Nucleotide range	Protein Length (aa)	Closest match by BLAST		E value <sup>c</sup>
				Putative Function	Organism	
01	+	24-1472	482	Cytochrome oxidase, subunit I (CydA-2)	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	8e-84
02	+	1465-2577	370	Cytochrome oxidase, subunit I (CydA-1)	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2e-60
03	+	3012-3359	115			
04	+	3360-3833	157			
05	+	4234-4734	169	Hypothetical protein	<i>Plesiocystis pacifica</i>	1.3
06	-	5173-5598	141			
07	+	5648-6769	373	Phosphatase	<i>Haloquadratum walsbyi</i>	0.49
08	+	6890-7588	232	Cobyrinic acid ac-diamide synthase	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	0.001
09	-	7880-9391	503	Type II secretion system protein E	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	2e-32
10	+	9468-9818	116			
11	+	9815-10450	211	Chromosome partitioning protein	<i>Fingoldia magna</i>	6e-05
12	-	10889-11677	262	Colanic acid fucosyltransferase	<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>	0.025
13	+	11843-14683	946	DEAD/DEAH box helicase domain containing protein	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	0.0
				16S rRNA		
				23S rRNA		
14	+	16419-19482	105			
15	-	20629-20946	192	Hypothetical protein	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	0.012
16	+	21331-21909	117	Translation initiation factor SU11	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	8e-31
17	+	21976-22329	135	Hypothetical protein	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	9e-08
18	+	22332-22739	196	DNA-directed RNA polymerase subunit E'	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	1e-63
19	-	22776-23366	515	Hypothetical protein	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	3e-15
20	-	23376-24923	246	ABC transporter related	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	3e-96
21	+	24926-25666	389	Major facilitator transporter	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	4e-163
22	+	25771-26940	149	Methyltransferase type II	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	1e-36
23	-	27023-27472	457	Chloride channel core	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	4e-108
24	+	27884-29257	273	Hypothetical protein	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	4e-56
25	+	29299-30120	459	Hypothetical protein Tpen_1181	<i>Thermoflum pendens</i>	5e-16
26	+	30154-31533	341	Sodium/hydrogen exchanger	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	1e-104
27	-	31816-32841	381	CoA-binding domain containing protein	<i>Caldivirga mquilingensis</i>	7e-132
28	-	32824-33969	191	Predicted protein	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	0.99
				34243-34818		

<sup>a</sup> ORFs containing >100 amino acids are shown

<sup>b</sup> Frames designated by + show the same direction as the sense strand of the 16S rRNA gene (5'→3').

<sup>c</sup> It describes the number of hits one can "expect" to see by chance when searching a database of a particular size.

**Table 4** Putative gene structure of the *Vulcanisaeta* sp. IC-218 gene fragments constructed in a fosmid clone

ORF No <sup>a</sup>	Frame <sup>b</sup>	Nucleotide range	Protein Length (aa)	Closest match by BLAST		E value <sup>c</sup>
				Putative Function	Organism	
01	+	261-1556	431	AAA ATPase	<i>Pyrobaculum caldifontis</i>	2e-25
02	+	1538-2050	170	Glutamate-putrescine ligase	<i>Shewanella baltica</i>	0.075
03	+	2480-3001	173	Unnamed protein product	<i>Microcystis aeruginosa</i>	3.1
04	-	3020-3373	117			
05	+	3588-4211	207	Glycerone kinase	<i>Atopobium vaginae</i>	0.30
06	+	5105-6868	587	Hypothetical protein	<i>Thermophilum pendens</i>	0.026
07	-	6913-7272	119	Hypothetical	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	1.1
08	-	7384-8136	262	GcrA-like	<i>Corynebacterium striatum</i>	1e-04
09	+	8272-11112	946	DEAD/DEAH helicase domain-containing protein	<i>Caldivirga maquiltingensis</i>	0.0
	+	11281-12792		16S rRNA		
	+	12850-15914		23S rRNA		
10	+	16980-18098	372	High-affinity nickel-transporter	<i>Sulfolobus islandicus</i>	3e-107
11	+	18102-19187	361	Precorin-8 methylmutase	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	1e-125
12	+	19187-19939	250	Precorin-3B C17 methyltransferase	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	2e-96
13	+	19927-20985	352	Cobalt-precorin-6A synthase	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	2e-139
14	+	20982-21581	199	Precorin-6Y C5,15-methyltransferase	<i>Sulfolobus islandicus</i>	4e-80
15	+	21578-22264	228	Precorin-2 C20-methyltransferase	<i>Sulfolobus islandicus</i>	2e-80
16	+	22424-23134	236	precorin-4 C11-methyltransferase	<i>Sulfolobus islandicus</i>	6e-107
17	+	23127-24116	329	Cobalamin biosynthesis protein CbiG	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	3e-126
18	+	24120-24824	234	Precorin-6y C5,15-methyltransferase	<i>Sulfolobus islandicus</i>	6e-84
19	+	24893-28594	1233	Cobalt chelatase	<i>Thermoproteus neutrophilus</i>	0.0
20	+	28594-29511	305	Hypothetical protein	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	2e-33
21	+	29548-30141	197	Hypothetical protein	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	3e-31
22	+	30098-30832	244	Periplasmic binding protein	<i>Desulforudis audaxviator</i>	2e-11
23	+	30814-31866	350	Transport system permease protein	<i>Methanospirillum hungatei</i>	2e-57
24	+	31853-32617	254	ABC-type Fe(III)-siderophore transport system	<i>Thermococcus onnurineus</i>	1e-53
25	+	32658-34619	653	Magnesium chelatase, ChII SU	<i>Thermococcus onnurineus</i>	2e-180

<sup>a</sup> ORFs containing >100 amino acids are shown

<sup>b</sup> Frames designated by + show the same direction as the sense strand of the 16S rRNA gene (5'→3').

<sup>c</sup> It describes the number of hits one can "expect" to see by chance when searching a database of a particular size.

Table 5 Putative gene structure of *V. souniana* IC-059<sup>a</sup> and *V. distributeda* IC-135 gene fragments amplified by the PCR

ORF No <sup>a</sup>	Frame <sup>b</sup>	Nucleotide range	Protein Length (aa)	Closest Match by BLAST		E value <sup>c</sup>
				Putative Function	Organism	
<i>V. souniana</i> IC-059						
01	+	3-584	193	5-Methylthioadenosine phosphorylase II	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	4e-84
02	+	675-1256	193	Hypothetical protein	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	0.008
03	+	1424-1804	126	Translation initiation factor SUII	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	2e-31
04	+	1807-2220	137	Hypothetical protein	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	4e-06
05	+	2254-2847	197	DNA-directed RNA polymerase subunit E'	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	7e-64
06	-	2865-4424	519	Hypothetical protein	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	3e-17
07	-	4424-5164	246	ABC transporter related	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	6e-96
08	+	5264-6433	389	Major facilitator transporter	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	3e-162
09	+	6498-6956	152	Methyltransferase type II	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	6e-38
10	-	7224-8372	382	Major facilitator transporter	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	6e-150
11	-	8520-10271	583	Chloride channel core	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	0.0
12	+	10378-11172	264	Hypothetical	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	1e-52
<i>V. distributeda</i> IC-135						
01	-	324-644	106	Transmembrane efflux proteins	<i>Streptomyces</i> sp	3.3
02	+	1026-1604	192	Hypothetical protein	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	0.014
03	+	1604-2017	137	Translation initiation factor SUII	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	1e-30
04	+	2014-2427	137	Hypothetical protein	<i>Thermoproteus neutrophilus</i>	2e-08
05	+	2460-3047	195	DNA-directed RNA polymerase subunit E'	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	2e-63
06	-	3057-3701	214	Hypothetical protein	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	0.003
07	-	3709-4611	300	Hypothetical protein	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	0.018
08	-	4614-5354	246	ABC transporter related	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	2e-96
09	+	5457-5885	142	Major facilitator transporter	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	4e-62
10	+	5969-6640	223	Major facilitator transporter	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	1e-81
11	+	6740-7198	152	Methyltransferase type II	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	7e-38
12	-	7318-9063	581	Chloride Channel Core	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	0.0
13	+	9160-9567	135	Hypothetical protein	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	1e-20
14	+	9567-9956	129	Hypothetical protein	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	4e-24
15	+	10001-11194	397	Hypothetical protein	<i>Thermoflum pendens</i>	2e-08
16	+	11481-12378	299	Sodium hydrogen exchanger	<i>Caldvirga maquilingsensis</i>	3e-79

<sup>a</sup> ORFs containing >100 amino acids are shown

<sup>b</sup> Frames designated by + show the same direction as the sense strand of the 16S rRNA gene (5'→3').

<sup>c</sup> It describes the number of hits one can "expect" to see by chance when searching a database of a particular size.

**Table 6** DNA-DNA hybridization study among the *Vulcanisaeta* strains

Strain	Relatedness (%) with biotinylated DNA			
	IC-017 <sup>T</sup>	IC-059 <sup>T</sup>	IC-218	IC-219
<i>V. distributa</i> IC-017 <sup>T</sup>	100	46	38	38
<i>V. souniana</i> IC-059 <sup>T</sup>	41	100	28	24
<i>Vulcanisaeta</i> sp. IC-218	35	28	100	59
<i>Vulcanisaeta</i> sp. IC-219	38	28	65	100

同義的置換の比率が高いが、本タンパク質はサブファミリーを形成しており、これらが相補的に働くことによって機能的制約に寛容なのかもしれない。一方、相同的組み換えは微生物のゲノム解析においてしばしば見いだされている現象である。実際、‘*Sulfolobus islandicus*’ においてはカムチャツカ半島の一定の生息地域において相同的組み換えが頻繁に起こっている可能性が指摘されている (Whitaker *et al.*, 2005)。しかしこれらの相同的組み換えは頻度の差はあるものの比較した遺伝子座間でランダムな組み合わせで起きている。北海道・秋田由来の *V. distributa* 関連菌株においてもより多くの遺伝子を調べることによって何らかの原因が推定できるかもしれない。また環境に適応した収束についても検討する必要はあろう。興味深いことに玉川温泉、川湯温泉は日本では有数の強酸性温泉として知られており、実際にこれまで *Vulcanisaeta* 属菌株が分離できた採取地の温泉水について pH を測定したものは玉川温泉、川湯温泉は pH 1.4~1.8 でそれ以外の温泉は 2.0~3.4 であった。これらの分離源由来の菌株が 16S rRNA 遺伝子や *radA* 遺伝子の系統樹において同じクラスターに含まれたことは何らかの必然性があったのかもしれない。しかし両採取地から分離した菌株の RadA タンパク質アミノ酸は他の多くの *V. distributa* 関連株と同じアミノ酸組成を有していたので RadA タンパク質自身は pH による大きな影響を受けていない。タンパク質自身だけではなくその発現過程においても収束の影響があった可能性もあるがその実証は容易ではない。

***V. souniana* における遺伝子多様化の考察** 箱根早雲山温泉から分離した *V. souniana* は *V. distributa* が得られている大涌谷の硫気荒原とは距離的に近いにもかかわらず (約 2 km) 種レベルで異なった分離株が得られた。早雲山温泉の温泉水は大涌谷とは尾根の反対側にある早雲地獄で造成されたものであるが、その硫気荒原としての環境は大涌谷と変わらないものと思

われる。*V. souniana* の 16S rRNA 遺伝子や RadA タンパク質に基づく系統学的位置は *V. distributa* 関連菌株とは区別できるものであった。また *radA* 遺伝子や DEAD/DAEH box helicase の変異度は距離的關係からは推定できないものであった。しかし、*V. souniana* と *V. distributa* は異なる 2 種であっても基準株間の DNA-DNA 相同性は 30~46% 有り、また 23S rRNA 遺伝子下流領域約 12 kbase の遺伝子構造は類似したものであり、これら菌株は比較的近い共通祖先を有していた可能性が高いものと思われる。したがって *V. souniana* の経た遺伝子多様化の過程は遺伝学的浮動だけで説明できず、環境適応や自然淘汰などによって進化速度に影響のあった結果と考えられよう。実際、*V. souniana* の菌株は *V. distributa* に比べて生育温度が若干低く、また僅かながら NaCl 耐性があることも、採取地の環境に適応した結果かもしれない (採取した温泉水に関するデータはないが、温泉施設が公開しているデータでは引湯される造成温泉水の温度は約 60℃ で、また一般に造成温泉水は若干の Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> が加わっている)。こうした適応 (特に温度変化) によって、遺伝子やそのアミノ酸配列にかかっている機能的制約が影響を受けた結果かもしれないが、その実証には *V. souniana* の生息地の確認やさらなる代謝・生理活性の解析、ゲノム解析を行わなければならない。

生物地理学的研究のモデル微生物としての ***Vulcanisaeta* 属** 因みに *Vulcanisaeta* 属の菌株ははどれほどの時間をかけて現在の多様化を形成したのであろうか。‘*Sulfolobus islandicus*’ の場合、それぞれ地熱地帯の活動時間から、北アメリカ (Yellowstone, Lassen) とロシア・カムチャツカ (Mutonovsky) の分離株の分岐時間をおよそ 91 万年以内と推定している (Reno *et al.*, 2009)。この数値を単純にそれぞれの地域で分離、検出で *Vulcanisaeta* 様アーキアの 16S rRNA 遺伝子のデータに当てはめ



ると日本国内で分離された *V. distributa* 関連菌株は約40万年かけて多様性を形成してきていることになる。実際にはそれほど単純化はできないかもしれないが、それでも万年のオーダーでゆっくりと変異していると考えても良いかもしれない。一方、*V. souniana* が分離できた温泉施設は1916年に設立されており、分離の時点において長くて78年程である。したがってもし *V. souniana* が本温泉施設の環境に適応して新たな種に分化したとすると *V. distributa* 関連菌株が多様化を形成した時間に比べるとかなり早い時間で種分化が起こっていることになる。

微生物の遺伝学的多様化や種分化のメカニズム、地理学的分布の解明は深遠な問題であるために、本研究結果だけでは推論の部分が多いのはやむを得ないことと考えている。これらの諸問題を解明して行くには数多くのモデル微生物を持ち、系統分類学、集団遺伝学、生態学など多角的な面から検討を行う必要がある。さしずめ *Vulcanisaeta* 属には種分化のプロセスの異なると思われる菌株があり、また全体的に遺伝子の多様化が顕著であり、そのプロセスを解析しやすいものと思われる。また先述の '*Sulfolobus islandicus*' と対比することでコスモポリタンに拡散した微生物種とエンデミックに地域に限定されている微生物種の違いを明確にできるかもしれない。また近年、極限環境微生物でも外来遺伝子の影響やゲノム構造の再編による種形成も注目を浴びている (Mongodin *et al.*, 2005; Allen *et al.*, 2007; Papke *et al.*, 2007; White *et al.*, 2008; Reno *et al.*, 2009) が、こうした現象が遺伝子塩基配列の多様化にどの様に関わってくるかを解明するためには *Vulcanisaeta* 属菌株のようなモデルも必要になるものと思われる。

## 要 約

我々がこれまで日本国内の野外に湧出する温泉水から分離した *Vulcanisaeta distributa* 菌株では16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づくグルーピングが分離源の分布と良く対応していることが示されている。一方、引湯した温泉設備からは別種である *V. souniana* が分離されている。したがって本属菌株においては地理的隔離と生息環境の相違が遺伝学的多様化や種分化に影響を及ぼした可能性がある。このことを実証していくために、北海道から同属菌株の単離を行い、また16S rRNA 遺伝子及び *radA*, DEAD/DEAH-box helicase 様遺伝子とその翻訳アミノ酸の系統学的解析を行った。また2菌株については16S rRNA 遺伝子を含むフォスミドクローンの塩基配列を決定し、他の2

菌株については23S rRNA 遺伝子を含む長鎖の遺伝子断片をPCR増幅した後に塩基配列を決定し、これらの遺伝子構造を比較した。

既知の *Vulcanisaeta* 属15菌株、未発表だった *Vulcanisaeta* 属2菌株、そして本研究によって分離することのできた北海道の温泉（川湯硫黄山及び和琴オヤコツ地獄）由来の3株を含めた *V. distributa* 関連菌株20株と *V. souniana* 2菌株について標記遺伝子及び翻訳アミノ酸に基づく系統学的解析を行った。RadA タンパク質を除き、各分子系統樹はお互いよく似ており、*V. distributa* 関連菌株では採集地ごとにクラスターを作成したこと、概ね近い採集地から分離した菌株がより近縁関係となっていることから、これら菌株では地理的隔離による遺伝学的浮動が遺伝子多様化の主な推進力であることを支持するものと考えられた。但し、16S rRNA, *radA* 遺伝子では川湯硫黄山と玉川（秋田）の分離株が、また和琴オヤコツ地獄と後生掛（秋田）の分離株がそれぞれ近い関係を示した。それに対してDEAD/DEAH box helicase 遺伝子では少なくとも秋田県同士の分離株はより近い系統関係を示した。Helicase 遺伝子では非同義置換が頻繁に起こっており、タンパク質への機能的制約は少ないことからより中立的に進化しているものと考えられた。これに対し16S rRNA 遺伝子や *radA* 遺伝子は機能的制約あるいは相同的組換え等も起こっているものと推定できた。一方、箱根大涌谷より分離した *V. distributa* 一菌株と、箱根早雲山から分離した *V. souniana* の23S rRNA 下流約12 kbp 遺伝子断片の遺伝子構造はよく似ていた。両菌株では30~46%のDNA-DNA 相同性を有することから、これらは同様な遺伝子構造を持った祖先型に由来し、生育環境の相違等によって遺伝子が多様化して種分化したものと推測した。

以上のように地理的分布と遺伝学的多様化を関連づけて説明できる微生物の例は極めて少なく、本研究に用いた *Vulcanisaeta* 属菌株は地理的分布と遺伝子多様化・種分化を考察するには格好のモデル微生物であることが示された。

## 保存機関に寄託した菌株

本研究で分離した菌株のうち、保存機関に寄託したのは次の菌株である。本研究に使用した菌株は全て保存機関に寄託されている (Table 2 参照)

<i>Vulcanisaeta</i> sp. IC-237	JCM 16159
<i>Vulcanisaeta</i> sp. IC-238	JCM 16160
<i>Vulcanisaeta</i> sp. IC-239	JCM 16161

## 研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 關 祐太, 高品知典, 伊藤 隆 (2007). 超好熱性アーキア *Vulcanisaeta distributa* 及び関連菌株における *radA* 遺伝子の多様性について. 2007年度日本農芸化学会大会 (東京).
- 2) 關 祐太, 高品知典, 伊藤 隆 (2007). *Vulcanisaeta* 属菌株における生息地の分布と遺伝学的多様性に関する考察. 日本微生物資源学会第14回大会 (札幌).
- 3) Yuta Seki, Tomonori Takashina, Takashi Itoh (2007). Diversity of *radA* genes in the genus *Vulcanisaeta* and related strains. 11th International Conference on Culture Collections (Goslar, Germany).
- 4) 關 祐太, 高品知典, 伊藤 隆 (2008). 超好熱性アーキア *Vulcanisaeta* 属における分離源と遺伝学的多様性に関する研究. 2008年度日本農芸化学会大会 (名古屋).
- 5) 關 祐太, 高品知典, 伊藤 隆 (2008). 超好熱性アーキア *Vulcanisaeta* 属における遺伝学的多様性の関係. 日本 Archaea 研究会第21回講演会 (那覇).
- 6) Takashi Itoh, Yuta Seki, Tomonori Takashina (2008). Distribution and diversity of the hyperthermophilic archaeal genus *Vulcanisaeta*. 12th International Symposium on Microbial Ecology (Cairns, Australia).
- 7) 關 祐太, 角重瑠美, 高品知典, 伊藤 隆 (2009). 好熱性アーキア *Vulcanisaeta* 属における遺伝学的多様性に関する研究. 2009年度日本農芸化学会大会 (福岡).
- 8) 關 祐太, 高品知典, 伊藤 隆 (2009). 好熱性アーキアにおける遺伝学的多様性と種分化について. 2009年度日本農芸化学会大会 (福岡).

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり3年間研究助成していただきました(財)発酵研究所に深く御礼申し上げます。また本研究課題を審査していただきました先生方にも感謝いたします。本研究において独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター情報解析技術室 深海薫博士に系統的解析の解釈について助言をいただきました。また長崎・雲仙温泉から *Vulcanisaeta* 属菌株の分離とその16S rRNA塩基配列データ, *radA* 系統解析の一部は吉川直人氏の修士論文研究の一部です。

## 文 献

- Achtman, M. & Wagner, M. (2008). Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 431-440.
- Allen, E. E., Tyson, G. W., Whitaker, R. J., Detter, J. C., Richardson, P. M. & Bansfield, J. F. (2007). Genome dynamics in a natural archaeal population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 1883-1888.
- 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.
- Buckley, M. & Roberts, R. J. (2006). A Report from American Society of Microbiology: Reconciling microbial systematics & genomics. American Academy of Microbiology, Washington DC.
- Escobar-Páramo, P., Ghosh, S. & DiRuggiero, J. (2005). Evidence for genetic drift in the diversification of a geographically isolated population of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus*. *Mol. Biol. Evol.* **22**: 2297-2303.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 224-229.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackbrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson F. L. & Swings, J. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 733-739.
- Itoh, T., Suzuki, K.-I. & Nakase, T. (1998). *Thermocladium modestius* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped, extremely thermophilic crenarchaeote. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **48**: 879-887.
- Itoh, T., Suzuki, K.-I. & Nakase, T. (2002). *Vulcanisaeta distributa* gen. nov., sp. nov., and *Vulcanisaeta souniana* sp. nov., novel hyperthermophilic, rod-shaped crenarchaeotes isolated from hot springs in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1097-1104.
- Mongodin, E. F., Hance, I. R., DeBoy, R. T., Gill, S. R., Daugherty, S., Huber R., Fraser, C. M., Stetter, K. & Nelson, K. E. (2005). Gene transfer and genome plasticity in *Thermotoga maritima*, a model hyperthermophilic species. *J. Bacteriol.* **187**: 4935-4944.
- Nesbø, C. L., Dlutek, M. & Doolittle, W. F. (2006). Recombination in *Thermotoga*: implications for species concepts and biogeography. *Genetics* **172**: 759-769.
- Papke, R. T. & Ward, D. M. (2004). The importance of physical isolation to microbial diversification. *FEMS Microbiol. Rev.* **48**: 293-303.
- Papke, R. T., Zhaxybayeva, O., Feil, E. J., Sommerfeld, K., Muise D. & Doolittle, W. F. (2007). Searching for species in haloarchaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 14092-14097.
- Prokofeva, M. I., Kublanov, I. V., Nercessian, O., Tourova, T. P., Kolganova, T. V., Lebedinsky, A. V., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Spring, S & Jeanthon, C. (2005). Cultivated anaerobic acidophilic/acidotolerant thermophiles from terrestrial and deep-sea

- hydrothermal habitats. *Extremophiles* **9**: 437-448.
- Reno, M. L., Held, N. L., Fields, C. J., Burke, P. V. & Whitaker, R. J. (2009). Biogeography of the *Sulfolobus islandicus* pan-genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 8605-8610.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sandler, S. J., Hugenholtz, P., Schleper, C., DeLong, E. F., Pace, N. & Clark, A. J. (1999). Diversity of *radA* genes from cultured and uncultured Archaea: comparative analysis of putative RadA proteins and their use as a phylogenetic maker. *J. Bacteriol.* **181**: 907-915.
- Siering, P. L., Clarke, J. M. & Wilson, M. S. (2006). Geochemical and biological diversity of acidic, hot springs in Lassen Volcanic National Park. *Geomicrobiol. J.* **23**: 129-141.
- Stackbrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. & Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1043-1047.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
- Wayne, L. G., Brenner, D., J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. & Trüper, H. G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 463-464.
- Whitaker, R. J. (2006). Allopatric origins of microbial species. *Phil. Trans. R. Soc. B* **361**: 1975-1984.
- Whitaker, R. J., Grogan, D. W. & Taylor, J. W. (2003). Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* **301**: 976-978.
- Whitaker, R. J., Grogan, D. W. & Taylor, J. W. (2005). Recombination shapes the natural population structure of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus*. *Mol. Biol. Evol.* **22**: 2354-2361.
- White, J. R., Escobar-Paramo, P., Mongodin, E. F., Nelson, K. E. & DiRuggiero J. (2008). Extensive genome rearrangements and multiple horizontal gene transfers in a population of *Pyrococcus* isolates from Vulcano island, Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 6447-6451.

# 小地域における微小菌類の種多様性に関する集中的研究

徳 増 征 二

筑波大学菅平高原実験センター  
〒386-2204 長野県上田市菅平高原 1278-294

## An intensive investigation on the species diversity of microfungi within a small place

Seiji Tokumasu

Sugadaira Montane Research Center, University of Tsukuba  
1278-294 Sugadaira-kogen, Ueda-shi, Nagano-ken 386-2204, Japan

A project was planned to investigate the possibility of practicing a large scale inventory for fungi in the future and a research on the species diversity of microfungi was conducted. Sixteen researchers investigating fungal taxonomy and ecology participated in this project. The research was performed on the premises of the Sugadaira Montane Research Center of University of Tsukuba being situated in the mountainous district of the central region of Japan since there are diverse ecosystems within the premises (about 35 hectares). Ecological or taxonomical groups of fungi studied were as follows; soil fungi, leaf litter fungi, leaf parasites, ophiostomatoid fungi (ambrosia fungi), ericoidal mycorrhizal fungi, zoosporic fungi (chytrids and chromistan organisms), aero-aquatic fungi, Hypocrealean fungi, Discomycetes, and Dacrymycetalean fungi. Each participant collected and isolated their target fungi using the traditional method for individual fungal group. Researchers identified established strains by the orthodox method mainly based on morphological characters and also attempted the molecular identification when necessary. They also tried to establish more strains of the same species for studying genetic variation within species. In any fungal group, the number of taxonomic entities that were able to be recognized was more than that of the expectation. Moreover, many new species and probably undescribed species, cryptic species and sibling species were discovered one after another. The fact that many undescribed taxonomic entities were discovered suggested that there are many troubles to execute the All Taxa Biodiversity Inventory (ATBI) for fungi at present. Finally 381 strains were deposited with NBRC and JCM during this study period.

Key words: inventory, microfungi, ecological groups, taxonomical groups, small area

---

E-mail: stokumasu@po13.ueda.ne.jp

〒386-2202 長野県上田市真田町本原 1787-7 (自宅)

共同研究者：広瀬大 (日本大学薬学部), 小川吉夫 (日本大学薬学部), 山岡裕一 (筑波大学大学院生命環境科学研究科), 細矢剛 (国立科学博物館植物研究部), 升屋勇人 (森林総合科学研究所森林微生物研究領域), 稲葉重樹 (製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源開発部門), 山口薫 (製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門), 栗原祐子 (オーピーバイオファクトリー株式会社石垣研究所), 中島千晴 (三重大学大学院生物資源学研究科), 本橋慶一 (岐阜大学流域圏科学研究センター), 白水貴 (鳥取大学農学部付属菌類きのこ遺伝資源研究センター), 埋橋志穂美 (筑波大学大学院生命環境科学研究科), 岡田元 (理化学研究所微生物材料開発室), 出川洋介 (筑波大学菅平高原実験センター), 廣岡裕吏 (USDA, ARS, Beltsville)

## 緒 言

菌類は主に陸域に生息する従属栄養, 多細胞レベルの真核微生物である。一般にキノコ, カビ, コウボと呼ばれ, 陸域生態系の主に植物遺体の分解者として広く認識されているが, 植物の病原菌, 藻類や維管束植物との共生菌 (地衣, 菌根, 内生菌), アメーバやセンチュウなど小動物の寄生・捕食者, 昆虫類の寄生・共生菌としても生活しており, 陸域生態系における役割は複雑そして重要である (Deacon, 2006)。

菌類はかつて隠花植物の仲間とされていたが, 1969年 Whittaker は5界説を発表し, 吸収により従属栄養

を行う多細胞レベルの真核生物を独立の界（菌類界）にすることを提唱した。Dictionary of The Fungiの最新版（Kirk *et al.*, 2008）によれば菌界には既に97,861種が記載されている。この数字は維管束植物と菌類種数の比率に基づいてHawksworth（1991）が推定した約150万という現存種数の約6.7%に過ぎない。この原因はいろいろ考えられるが、菌類の大半が微細で自然界で生息状況を目で見るができないことが第一に挙げられる。また、熱帯地方など生物多様性が高い地域での菌類調査がまだ極めて不十分であることも大きな要因である。

近年、気候温暖化による環境変化により大形の動物や植物の絶滅、分布域の移動が顕在化し、生物多様性の保全が緊急の課題となりつつある。多様性保全のためには対象となる地域に生息する種目録が基礎資料として必要であり、この作業（インベントリ inventory）を行うプロジェクトが各国で行われるようになった。例えばニュージーランドでは、ランドケア・リサーチ（Landcare Research <http://www.landcareresearch.co.nz/>）でインベントリを行っており、菌類の調査も活発に行われデータベースも整備されつつある。本邦でも環境省生物多様性センターを中心に動植物分布調査が行われている（環境省, 2007）。しかし、本邦ではまだ菌類、特に微小菌類に関する広範で組織的なインベントリ的研究は行われていない。その理由としては次節で述べられるような問題が考えられる。

生物のインベントリを実施するための最初の作業は生物を採集し、標本を同定することである。大形の動植物に関しては、本邦も含め既に生息種の調査が進み標本や図鑑類も整備されている温帯以北でこの作業は特に困難ではなく、アマチュアの協力も得やすい。これに対して肉眼的な大きさのキノコや明瞭な病斑を持つ植物病原菌を除く多くの菌類は、最初に分離という作業が必要である。これらの菌類の同定は、栄養体である菌糸が同定形質としての価値をほとんど持たないため培養によって形成させた生殖器官の形態に基づいて行なわれてきた。しかし、培養下で生殖器官誘導困難な菌類は非常に多い。属レベルまで同定できた菌株については既知種と未記載種に分け後者を新種記載する必要があるが、維管束植物のような検索表を備えたモノグラフが公表されている属は数少ない。また、菌類は生殖器官の形態的収斂が著しく、形態だけで同定することがしばしば困難である。そのため、菌株を培養して成長速度、コロニー形質、生理的特徴なども調べることが必要となり、そのためかなりの時間と手間を要する。こうした事情で新種記載の速度は遅く、また発見しても記載に至っていないものが多数あるこ

とは分類学者の間で常識となっている。一方、試料採集、分離から同定終了までに必要な作業は分類群や生態群によりかなり異なるため、一人の研究者が複数の分類群や生態群を研究することは通常難しい。このため、微小菌類のインベントリは専門的な知識を有する分類学者や生態学者からなるチームを組織する必要があるが、菌類研究者が少ない本邦においては容易でない。

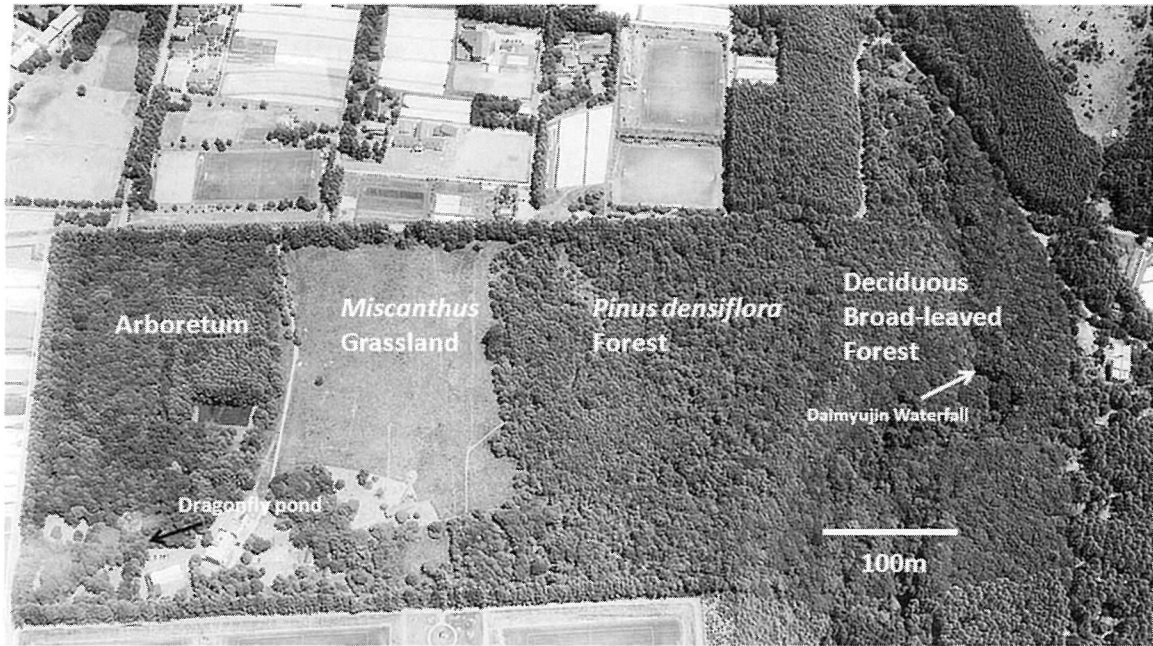
先述のように菌類は陸域の生態系の重要な構成者であり、動植物と共に環境変化の影響を受けると考えられるから、本邦においても菌類のインベントリの重要性は今後ますます認識され、実施要請が高まるものと予測できる。しかし、上述のように菌類の属性による難しさに加え研究者不足という現実があり、要請に即応できる状況には至っていない（佐橋, 2004）。そこで、本格的なインベントリ実施の可能性を探ることを目的として、試作的な研究を試みることにした。具体的には多様な分類群や生態群の研究者の協力を得て、比較的狭い場所において全員でそれぞれの菌群について事例研究を行い、基礎的情報の取得と技術的問題を検討した。同時に、この研究を通してできるだけ多くの菌株を確立し菌株保存機関に寄託することにより、こうした研究が本邦の遺伝子資源の充実にどのくらい資することができるか検討した。

## 実験方法

**調査地域** 調査地域として長野県上田市菅平高原にある筑波大学菅平高原実験センターを選定した（Fig. 1）。センターは北緯36度31分25秒、東経138度20分50秒に位置し、標高は約1,320 mである。気候的には冷温帯に属し、年平均気温は6.5℃、年間降水量は1,325 mmである。温かさの指数の値や残存する周囲の植生からこの地域の潜在自然植生はブナ林と推定される。

センターの約35 haの敷地は根子岳の南西向き緩斜面上にあり、南部に溪流（大明神沢）がある。1934年の開設当時、敷地の大半は草地であったが、その後刈り取りと計画的な人為排除という管理により南から北に向かって落葉広葉樹林、アカマツ成熟林、アカマツ若齢林、ススキ草原が成立している。その北側には約200種の樹木を植栽した樹木園があり、その一部にはブナ林の再生をめざしブナが植栽されている。

センターの土壌は典型的な火山灰由来のクロボク土で酸性土壌である。



**Fig. 1** Aerial photograph of the study place taken in 2005, the Sugadaira Montane Research Center, University of Tsukuba. In the center there are diverse ecosystems viz. *Miscanthus sinensis* dominating grassland, *Pinus densiflora* forest, deciduous broad-leaved forest, artificial mixed wood consisting of about 200 tree species, and aquatic ecosystems such as a mountain stream and small shallow ponds.

**研究組織** 平成18年度の助成を申請するにあたり、平成17年夏に本研究の趣旨をメールにて菌類を研究している大学教員、大学院生、遺伝子保存センターなどの研究者に送付し、賛同を得られた方々と共に助成を申請した。助成を受けた後に改めて参加者に研究を実施する分類群・生態群の確認を行い、事例研究を開始した。なお、研究開始後も希望者があれば参加を許可した（脚注参照）。主な事例研究は土壌菌類、針葉樹落葉生息菌類、生葉寄生菌類、オフィオストマ様菌類（ophiostomatoid fungi）、エリコイド菌根菌類、鞭毛菌類（卵菌類も含む）、半水生菌類、核菌類、盤菌類、アカキクラゲ菌類を対象とすることになった。

**調査方法** 様々な菌群が対象となったため、調査方法も多様であった。ここでは主な菌群の調査方法を以下に示す。

**土壌菌類** 2006年、2007年、2008年の5月と10月にセンター内のススキ草原、アカマツ林、樹木園から採集した表層土壌試料について改変希釈平板法、土壌平板法、改変加熱土壌平板法により菌の分離を行った。2008年5月にはススキ草原の土壌断面の表層、深さ20、40、60、80、100 cm から土壌を採取して土壌平板法と加熱土壌平板法で菌の分離を行った。用いた

分離方法の手順および同定培地は原則として徳増（1974a）、掃部、徳増（2000）に従った。分離・同定培地として2%麦芽エキス寒天培地（2%MA）とコーンミール寒天培地（CMA、ニッスイ）を用いた。土壌菌類の研究は徳増、広瀬、小川が主に担当した。

**針葉樹落葉生息菌類** 2006年、2007年、2008年にセンター内のアカマツ自然林内の4地点で有機物層における菌類の垂直分布調査を行った。採集地点では約20×20 cm<sup>2</sup>の有機物層を土壌表面から切り離し、紙袋に入れて実験室に持ち帰り、落葉直後の葉（L層葉）、やや分解の進んだL層葉（OL層葉）、F<sub>1</sub>層上部の葉（F<sub>11</sub>層葉）、下部の葉（F<sub>12</sub>層葉）、F<sub>2</sub>層の葉（F<sub>2</sub>層葉、ただし断片化している）に選別し、No.3653 試料では全層、No.3654、No.3655、No.3656の試料では上部3ないし4層を調査した。また、樹木園内のヤツガタケトウヒ、シラビソ、ウラジロモミの落葉を適時採集し調査した。調査時には葉全体あるいは適当な大きさに切断した葉試料を洗浄法および表面殺菌法（徳増、1980）で処理して表面付着の散布体を除去し、約24時間滅菌濾紙上で乾燥した葉をCMA平板上に移し、実験室内の棚に静置し培養した。平板を適当な間隔で光学顕微鏡を用い低倍率で観察し、試料上や培地上で孢子形成している菌を見つ

け、胞子を細い針で釣り出し新しい CMA 平板に移し純粋培養株を確立した。表面殺菌した試料も同様な方法で培養し、胞子からの分離と基質から伸び出した菌糸を移植して株を確立した。属および種の同定は可能な限り分離時に行い、同定できなかったものは、未同定株あるいは不稔株として保存、後日再培養して同定を試みた。同定用の培地として 2%MA、三浦培地 (LCA) と CMA を基本的な培地として用いた。本菌類の研究は徳増、広瀬が担当した。

**生葉寄生菌類** 2006, 2007 両年の 9 月を中心にセンター内において斑点症状を呈した植物葉を収集し、さく葉標本とした。この標本を実体顕微鏡下で観察し、菌体を確認後、単胞子分離を行い、純粋培養株を得た。また、標本からは徒手切片を作成しノマルスキー微分干渉顕微鏡にて斑点上に形成された菌体の観察を行い、形態的特徴から同定を行った。また、分離株から全 DNA の抽出を行い、各種プライマーを用いて核 DNA の部分塩基配列を解析、同定の補助データとして用いるほか、多様性の評価、系統関係の解析に用いた。本菌類の研究は中島、本橋が担当した。

**オフィオストマ様菌類** 研究は自生のアカマツ (マツ属) と樹木園内に植栽された本邦の亜高山帯に分布するシラビソ (モミ属)、カラマツ (カラマツ属)、ヤツガタケトウヒ (トウヒ属)、トドハダゴヨウ (マツ属)、外国産樹種であるグローカトウヒ (トウヒ属)、バンクスマツ (マツ属)、ストローブマツ (マツ属) の計 4 属 8 種の樹木を対象として行った。アカマツ林および樹木園内で、樹皮下キクイムシが穿孔した針葉樹の枯死木、風倒木、雪折れした樹幹、太い枝を採取し、実験室に持ち帰った。試料の樹皮を剥がし孔道内の樹皮下キクイムシ成虫を滅菌ピンセットで取り出し、1% 麦芽エキス寒天培地 (1%MA) 平板上に移し歩行させた。キクイムシ孔道壁と孔道下の辺材変色部から取り出した小片も同様に 1% MA 上に移し室温で培養した。虫の歩行跡や小片から生じてくるコロニーから菌糸または形成された胞子を 2%MA 培地、または 0.1% エビオス添加 2% 麦芽エキス寒天培地 (2%MEBA) に移植し純粋培養株を確立した。

純粋培養株は 2%MEBA および 1% 玄米フレーク寒天培地 (1%GFA) 平板上で培養し、子嚢果および分生子形成促進のため高圧蒸気滅菌したアカマツまたはシラビソの樹皮片をコロニー上に静置した。アナモルフのみ形成した菌株については必要に応じて同種と思われる菌株間、または既知種の株との交配試験を行い、子嚢殻形成を試みた。同定は主に生殖器官の形態

と交配試験の結果に基づいて行ったが、核 rDNA ITS 領域および 28S rDNA D1/D2 領域の塩基配列情報も参考にした。本菌類の研究は山岡と升屋が中心となり行った。

**エリコイド菌根菌類** ツツジ科植物の大半は、根系で子嚢菌類と共生しエリコイド菌根を形成する。エリコイド菌根菌類で優占することが多いミクソトリクム (Myxotrichaceae) 科菌類の種多様性と周辺植生の関係を明らかにすることを目的に、筑波大学菅平高原実験センター内で共生パートナーであるレンゲツツジが広く分布するアカマツ林、分布しないススキ草原、ミズナラ林において 2006 年 6 月に土壌を採取した。これらの土壌からミクソトリクム科菌を分離するため、無菌化したレンゲツツジ実生を用いたマイクロコズム内で 8 ヶ月間培養した (各土壌につき n=5)。培養後根を回収し、界面活性剤と滅菌水で洗浄し乾燥後、細根 (直径約 0.25 mm 以下) を約 5 mm ごとに切り分け、各個体 40 - 80 片、CMA 培地上に置き 15°C で培養した。定期的に観察を行い本科菌とみられる菌を分離培養し、形態観察と核 rDNA ITS 領域の塩基配列に基づく系統解析により同定を試みた。本菌類の研究は広瀬が担当した。

**鞭毛菌類** 2006 年 6 月、9 月、2007 年 4 月にセンター内の落葉広葉樹林、アカマツ林、ススキ草原、扱水林、樹木園内、研究用圃場、大明神沢およびトンボ池、ミズバショウ池から土壌・砂泥試料 35、水試料 2 を採取した。菌の分離は釣り餌を用いた釣菌法で行った。釣り餌としてはアカマツ花粉、アサの種子、タマネギの皮、蛇の抜け殻、クマゼミの翅を用いた。分離培養は水試料約 30 ml、または土壌試料 3 g に滅菌水 30 ml の混合液を入れたアイスクリームカップを各試料につき 10 個作成し、約 12 時間静置後 1 カップに一種類の釣り餌を水面に浮かべ、10°C および 20°C で培養した。花粉は培養開始後 3, 7, 14 日後に少量回収し抗生物質添加 Peptonized milk-Tryptone-Glucose 寒天培地 (PmTG) と 1/4 Yeast extract - Peptone - Soluble starch 寒天培地 (1/4 YpSs) 上に塗布し、花粉周辺に形成されたツボカビ類のコロニーを PmTG または 1/4 YpSs 平板上に植え継ぐことによって純粋培養株を確立した。その他の釣り餌は滅菌水で洗浄後、径 6 cm の CMA 平板上に移して培養を継続し、生じた菌体の一部を CMA や Peptone-Yeast extract-Glucose 寒天培地 (PYGA) の平板に移植、純粋培養株を得た。菌の同定は形態と、必要に応じて核 DNA 18S rDNA または ITS 領域の塩基配列データに基づく

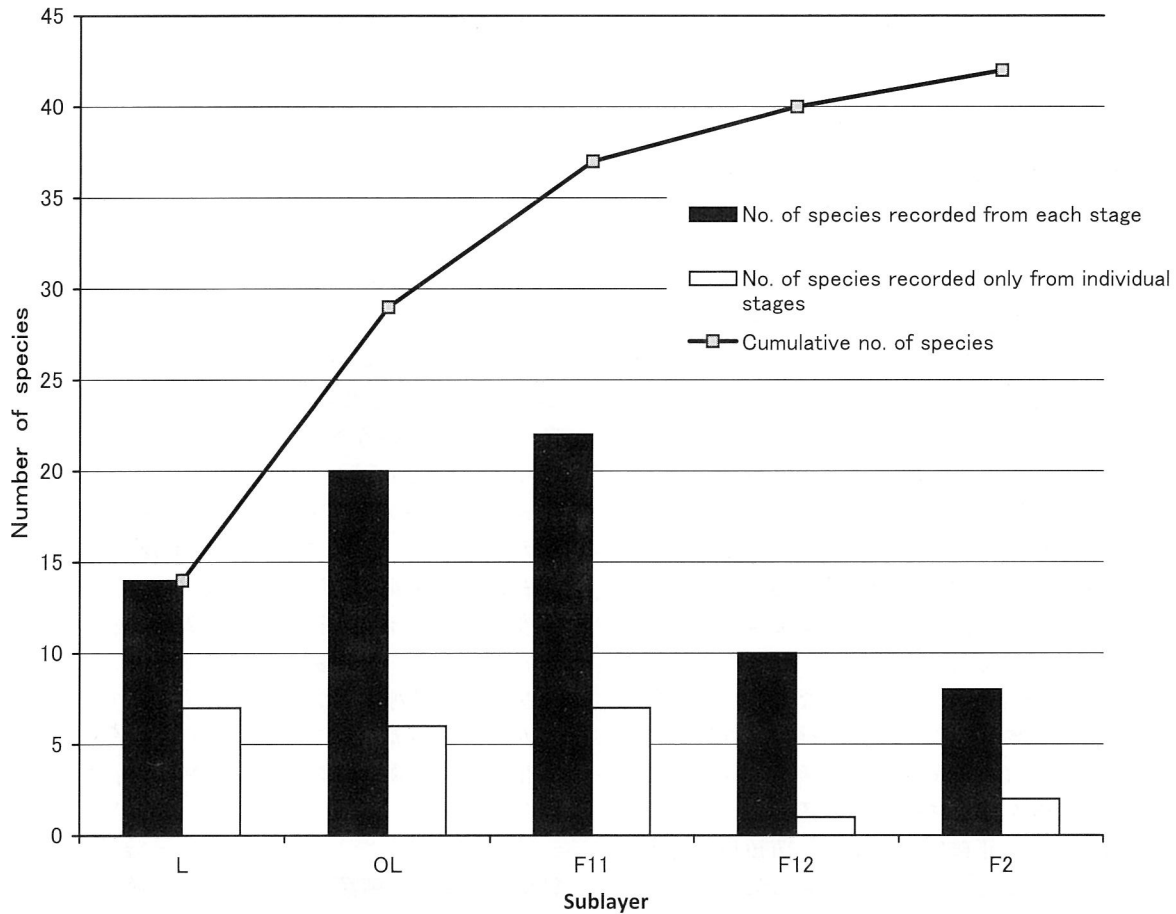


Fig. 2 Numbers of species recorded and those recorded only from individual sub-layers of the O horizon at a point in *Pinus densiflora* forest. The survey was done in June, 2006. Cumulative number of species rapidly increases from L to F<sub>11</sub> sublayer, then becomes slowly.

分子同定により行った。鞭毛菌類の研究は稲葉が担当した。

**半水生菌類** 2005年9月, 2006年6月, 2007年4月, 10月の計5回, センター内の通称トンボ池と呼ばれる小さい池, 大明神滝周辺, および同沢で浸水した材, 枝, 枯葉, 泡を採集した。採集した試料は湿室内に入れ15℃, 25℃で培養, 適時検鏡して形成されてきた胞子を細い針で釣りあげ分離培地(酵母・麦芽エキス寒天培地 YMA)に移植, 25℃で培養した。泡試料は適量をパスツールピペットで分離培地上に薄く広げ, 分生子を針で移植した。発芽した胞子を培養培地ジャガイモ・ショ糖寒天培地 (PSA), ジャガイモ・ニンジン寒天培地 (PCA) で培養し株を確立した。本菌類の研究は山口が担当した。

**核菌類** 2006年9月(2回), 2007年10月の計3回センター内で採集を行い, 直ちに分離を行うとともに

に乾燥標本を作製した。宿主植物からは0.5-1 mm 角の組織片を流水下で10から20分間洗浄後素寒天培地上に置き, 伸長してきた菌糸を単菌糸分離し, 株を確立した。宿主から胞子を噴出している場合は分生子塊を白金耳で掻き取り胞子懸濁水を作成, また子実体内部の胞子は柄付き針で中身を取り出し, 懸濁水や胞子塊を素寒天培地上に広げ培養し単胞子株を確立した。同定には PDA, 合成貧栄養培地 (SNA), オートミール寒天培地 (OA) を用いた。本菌類の研究は廣岡が担当した。

**盤菌類** 2006年から2008年において, 筑波大学菅平センター構内にて主に小型の子囊菌類(特に盤菌類)と微小菌類を採集し, センターおよび国立科学博物館で形態および分子情報による同定と分離を試みた。なお, 採集品は国立科学博物館の菌類標本庫に保存した。本菌類の研究は細矢が担当した。



アカキクラゲ類 菅平高原実験センター内にて随時野外調査を行い、アカキクラゲ類の子実体を採集した。採集された子実体は実験室に持ち帰って光学顕微鏡による詳細な形態観察を行い、種を同定した。同定できたものは孢子落下法により寒天平板上に落下した担子孢子または分生子から単孢子分離して菌株を確立した。本菌類の研究は白水が担当した。

小地域における微小菌類迅速同定のための DNA データベース構築 従来特定の場所や基質の菌類相は分離・培養法による結果に基づき評価されてきたが、不稔株や孢子形成しなくなった株は無視される傾向にあった。近年基質から直接 DNA を抽出し菌類特異的プライマーによる PCR を行う環境 DNA 法が積極的に導入されるようになった。後者の方法は、ごく基本的な分子生物学的手法を習得していれば容易に評価できることから地球温暖化の影響を評価するモニタリング調査などでは有効であると考えられる。ところで、一般に微小菌類相は場所や基質により異なるが、同所で同じ基質を繰り返し調査すると、同じ種が繰り返し出現する。このことは調査対象とした場所から分離された菌株に基づく DNA データベースを構築すれば分子による同定は迅速かつ正確に行えるから菌類相の変化も効率的に発見することができると考えられる。そこで本研究では菅平高原実験センター内で主にアカマツ落葉から分離された微小菌類の塩基配列データの充実を図り、1) 形態的に種同定が困難な不稔株および孢子形成不良株および孢子形成未同定株の塩基配列データによる分類群の特定、2) 形態情報に基づく種同定が煩雑化している *Penicillium* 属分離株の分子同定を試みた。

DNA 抽出は、2% 麦芽液体培地で 1 週間程培養した菌体から改変 CTAB 法により行った。PCR 法による増幅は、核 rDNA ITS 領域を対象とした。プライマーは、ITS1-F (Gardes & Bruns, 1993), ITS4 (White *et al.*, 1990) を用いた。PCR 産物を精製後、それらをテンプレートとしてシークエンスを行い、塩基配列を決定した (Hirose & Osono, 2006)。それらの配列データを基に、NCBI の BLAST 検索 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を行い、菌株の分類群を決定した。本研究は広瀬と徳増が担当した。

## 結 果

土壌菌類 調査地の土壌菌類相は徳増 (1974b) が詳しく調査・研究して報告している。彼は 162 種を確認し、子囊菌類 16 種、不完全菌類 94 種を報告した。今

回の土壌菌類の調査により不完全菌類は属レベルで先行研究により記載されたもののほとんど再発見できたが、子囊菌類に関しては、属、種数とも若干少なかった。これは試料数が少ないことが原因と考えられる。

2008 年 5 月にススキ草原において土壌を 100 cm の深さまで約 20 cm 間隔で採取、菌類の垂直分布を調査した。土壌断面からの試料を用いた比較では、40 cm 付近まで表層の生息菌が優占するが、ススキの根の先端の多くが集中する 60 - 70 cm では菌数が急激に減少し *Cylindrocarpon* 属菌が主な出現菌となった。このことはこの属菌が根の先端に集中的に分布する根表生息菌であるという報告と一致している (Matuuri & Stenton, 1964a, b)。さらに深い土壌では菌数が著しく減少するため平板の作成時に試料の増量をはかる必要があった。深さ 100 cm の土壌から不完全菌 *Calcarisporiella* 属菌が分離された。形態と生育可能温度域の特徴から当初高温性菌 *Calcarisporiella thermophila* の中温性株と考えたが、その後 18S rDNA 塩基配列に基づく系統解析により、本菌を含め *Calcarisporiella* 属菌が接合菌類クサレケカビ目と姉妹群をなす系統群である可能性が強く示唆された (広瀬ら、未発表)。

針葉樹落葉生息菌類 本研究ではアカマツ自然林における落葉生息菌類を中心に調査を行った。調査対象となったアカマツ林の落葉生息菌類相、その分布や生態についてはすでに詳しく研究されている (Tokumasu, 1996, 1998a, 1998b)。この情報を踏まえて落葉生息菌類のより完全な種レベルの菌類相の把握を目指して林内の 4 地点で調査を行った。4 地点での調査で出現した識別できる分類群は約 100 であった。これらについては形態による同定と DNA 塩基配列を用いた分子同定を試みた結果、先行研究で報告された種の大半は再分離できたことが判明した。

2006 年 6 月採集の試料 (識別番号 3653) における分解段階別の種数、その累加種数曲線、ある段階でのみ記録され種数を Fig. 2 に示す。累加種数曲線は  $F_{12}$  層葉から増加率が落ち、飽和状態になることが示唆される。事実、全出現種数に対する  $F_{11}$  層葉までに出現した種数の割合は約 88% に達した。なお、こうした傾向は 2006 年以前に行った予備実験でも確認していたので、残りの調査では L, OL,  $F_{11}$  の分解段階のみ調査を行った。

生葉寄生菌類 今回の調査で分離した斑点症状に関与する植物寄生菌 32 菌株を製品評価技術基盤機構に寄託した。これには 18 属が含まれ、種レベルまで同定さ

れたもの8種、未記載と思われる2種を含んでいる。今回の調査に先行して行ったセンター内の予備的な調査では糸状不完全菌類が多く採集されたが、本調査では分生子果不完全菌類が多く採集されかつ多様であった。

**オフィオストマ様菌類** 本調査期間中に対象樹種に穿孔していた樹皮下キクイムシは *Crypharus* 属2種、*Dryocoetes* 属3種、*Hylurgopus* 属2種、*Polygraphus* 属4種、*Tomicus* 属2種であった。虫体、孔道および辺材部から菌を分離した結果、*Ceratocystis* 属菌1種、*Ceratocystiopsis* 属菌1種、*Grosmannia* 属菌7種、*Ophiostoma* 属菌18種、*Leptographium* 属菌3種の計30種を同定した (Table 1)。このうち、*Ophiostoma* 属に明らかな未記載種が3種確認された。また、核 rDNA ITS 領域の塩基配列に基づく予備的な系統解析の結果は *Ceratocystis* 属を除く全ての属の16種に形態では区別できないが遺伝的に異なると考えられる株の存在が示唆された (山岡ら、未発表)。

分離された種の中には *Ophiostoma piceae* のように広範囲の樹種、キクイムシから分離された菌もあったが、特定の樹種あるいはキクイムシから特異的に分離された種もあった。たとえば、カラマツでは3種の樹皮下キクイムシから分離された菌12種のうち *Grosmannia* 属菌3種と *Ophiostoma* 属菌2種はカラマツのみから出現したから、落葉性のカラマツに穿孔するキクイムシは常緑性のマツ科樹木とは異なる菌類相を持つ可能性が高い。また、シラビソではトドマツキクイムシが優占して穿孔しており、*Grosmannia* 属菌3種、*Ophiostoma* 属菌8種が分離できたが、このうち *Grosmannia* 属菌1種、*Ophiostoma* 属菌4種がシラビソのみから記録された。同様にアカマツからも特異的に出現する種が3種存在した。

一方、トウヒ属のヤツガタケトウヒは同属のグローカトウヒと類似した菌類相を持っていたが、同種はマツ属のトドハダゴヨウヤストロブマツとも共通性の高い菌類相を持っていた。

**エリコイド菌根菌類** 釣り出し実験の結果、5種1変種のミクソトリクム科菌類が分離された (Table 2)。*Pseudogymnoascus roseus* (= *Geomyces pannorum* var. *pannorum*) と *Geomyces pannorum* var. *asperuatus* と *Oidiodendron* 属菌4種で、このうち2種は未記載種であった (Table 2)。

各植生土壌から分離されたミクソトリクム科菌の出現頻度は、最も普遍的なエリコイド菌根菌である

*Oidiodendron* 属の *O. maius* var. *maius*, *O. griseum*, *Oidiodendron* sp. 1が共生のパートナーの1種であるレンゲツツジの多いアカマツ林で最も高い頻度を示したの対して、腐生性の *Geomyces* 属菌はアカマツ林以外の植生から出現した。*Oidiodendron* sp. 2はミズナラ林のみから出現した。レンゲツツジ以外のパートナーの存在も考えられる。

**鞭毛菌類** 計37試料より、鞭毛菌類196菌株 (卵菌類150, サカゲツボカビ類2, 狭義のツボカビ類44) を分離した。同定の結果は少なくとも59分類群が含まれることを示唆した (Table 3)。

卵菌類は42分類群に同定できた。出現種数はミズカビ目 (Saprolegniales) が最も多く、8属16種と有性生殖器官非形成のため種まで同定できなかった10系統群が確認できた。このうち、*Aphanomyces irregularis* は日本新産種と考えられる。フハイカビ目 (Pythiales) は11種確認でき、3種は未記載種と考えられる。ミズキチオプシス目 (*Myzocytiopsis* 属) の *Myzocytiopsis* sp. は未記載種と考えられる。フシミズカビ目 (Leptomitales) では *Apodachlyella completa* のみが分離された。他に花粉、セミの翅から培地上で菌糸体を形成する不稔性の卵菌類が2種分離された。これらは18S rDNA 遺伝子と *cox2* 遺伝子の解析結果から目レベルの新規分類群である可能性が示唆された。また、*Saprolegnia terrestris* の菌糸体に *Olpidiopsis saprolegniae* var. *saprolegniae* (フクロカビモドキ目 *Olpidiopsidales*) が寄生しているのも確認できた。

サカゲツボカビ類では本邦未報告の *Hyphochytrium catenoides* (サカゲツボカビ科 *Hyphochytriaceae*) が2菌株分離できた。

ツボカビ類では8属16種が同定できた。フタナシツボカビ目 (*Rhizophydiales*) に属するものが多く、*Boothomyces*, *Kappamyces*, *Rhizophydium*, *Terramyces* の各属菌が得られた。ツボカビ目 (*Chytridiales*) では *Chytromyces*, *Rhizidium*, *Rhizoclostridium* の各属菌が分離できた。本邦においてツボカビ類の報告は多数あり多くの種が報告されているが (小林, 今野, 1986), 純粋培養株を確立して同定を行った例は少ない。

**半水生菌類** 本研究で51菌株を確立した。その内訳は、半水生菌類が13属23種、水生菌が4属4種であった。最終的に半水生菌37株 (13属19種), 水生菌3株 (3属3種) を NBRC に寄託した (Table 4)。分離株には *Scutisporus*, *Pseudaergerita*, *Peyronelina* の3



Table 2 Distribution of Myxotrichaceae species in three different plant vegetations surveyed by using rootlets of germfree *Rhododendron* seedlings.

Fungus	Vegetation		Site frequency (%)*		Frequency of occurrence (%)**		
	<i>Miscanthus sinensis</i> grassland	<i>Pinus densiflora</i> forest	<i>Pinus densiflora</i> forest	<i>Quercus mongolica</i> forest	<i>Miscanthus sinensis</i> grassland	<i>Pinus densiflora</i> forest	<i>Quercus mongolica</i> forest
<i>Pseudogymnoascus roseus</i>	100	0	0	80	nd***	0	nd
(= <i>Geomyces pannorum</i> var. <i>pannorum</i> )	0	0	0	40	0	0	nd
<i>Geomyces pannorum</i> var. <i>asperulatus</i>	20	60	60	0	0.7	8.8	0
<i>Oidiendron maius</i> var. <i>maius</i>	0	40	40	0	0	0.6	0
<i>Oidiendron griseum</i>	40	80	80	40	12.9	13.8	1.9
<i>Oidiendron</i> sp. 1	0	0	0	40	0	0	1.9
<i>Oidiendron</i> sp. 2	0	0	0	40	0	0	1.9

\*: Site frequency = number of the *Rhododendron* samples on which the species was recorded / total number of *Rhododendron* samples examined (5) x 100.

\*\* : Frequency of occurrence = number of the rootlet segments on which the species was recorded / total number of the rootlet segments examined (280 in *M. sinensis* grassland and 320 in other sites) x 100

\*\*\*: Not determined.

Table 3 Zoosporic fungi\* isolated in the Sugadaira Montane Research Center.

CHYTRIDIOMYCOTA	OOMYCOTA
<i>Boothiomyces</i> sp.	<i>Achlya diffusa</i>
<i>Chytriumyces</i> sp.	<i>Achlya megasperma</i>
<i>Chytriumyces</i> cf. <i>hyalinus</i>	<i>Achlya racemosa</i>
<i>Lobulomyces angularis</i> (clade 1)	<i>Achlya</i> sp. 1 (non-sexual)
<i>Entophlyctis</i> ? sp.	<i>Achlya</i> sp. 3 (non-sexual)
<i>Kappamyces</i> cf. <i>laurelensis</i>	<i>Achlya</i> sp. 4 (non-sexual)
<i>Kappamyces</i> sp.	<i>Aphanomyces</i> cf. <i>cladogamus</i>
<i>Rhizidium</i> sp.	<i>Aphanomyces</i> cf. <i>irregulare</i>
<i>Rhizoclostridium</i> sp.	<i>Aphanomyces</i> cf. <i>keratinophilus</i>
<i>Rhizophlyctis</i> sp.	<i>Aphanomyces</i> sp. 2 (non-sexual)
<i>Rhizophydium</i> sp. JEL-356	<i>Aphanomyces</i> sp. 3 (non-sexual)
<i>Rhizophydium</i> sp. PL-157	<i>Aphanomyces stellatus</i>
<i>Rhizophydium</i> sp. JEL-385	<i>Apodachlyella completa</i>
<i>Rhizophydium</i> cf. <i>brooksianum</i>	<i>Cornomyces</i> sp. 1
<i>Terramyces</i> sp.	<i>Cornomyces</i> sp. 2
	<i>Dictyuchus sterillis</i>
	<i>Leptolegnia?</i> sp.
	<i>Myzocytiopsis</i> sp. (new species)
	<i>Pythiopsis cymosa</i>
	<i>Pythium aquatile</i>
	<i>Pythium</i> cf. <i>aquatile</i>
	<i>Pythium</i> cf. <i>dimorphum</i>
	<i>Pythium</i> cf. <i>intermedium</i>
	<i>Pythium</i> cf. <i>irregulare</i>
	<i>Pythium</i> cf. <i>sylvaticum</i>
	<i>Pythium</i> sp. 8 (new species)
	<i>Pythium</i> sp. 10 (new species)
	<i>Pythium</i> sp. 12 (new species)
	<i>Pythium</i> sp. 3
	<i>Pythium</i> sp. 6
	<i>Pythium</i> sp. 9
	<i>Pythium</i> sp. 13
	<i>Pythium torulosum</i>
	<i>Saprolegnia anisospora</i>
	<i>Saprolegnia</i> cf. <i>monoica</i> var. <i>acidamica</i>
	<i>Saprolegnia ferax</i>
	<i>Saprolegnia</i> sp. 1 (non-sexual)
	<i>Saprolegnia</i> sp. 2 (non-sexual)
	<i>Saprolegnia</i> sp. 3 (non-sexual)
	<i>Saprolegnia terrestris</i>
	<i>Saprolegnia torulosa</i>
	<i>Scoliolegnia asterophora</i> ?
	<i>Scoliolegnia</i> species
	<i>Thraustotheca clavata</i>
	unknown <i>Saprolegniomycetidae</i> species

\* Including the Chromistan fungal analogues

Table 4 Aero aquatic and aquatic fungi isolated from submerged decaying plant materials.

Habitat / Fungus	Sampling site	Plant material
"Dragonfly pond"*		
<i>Candelabrum microsporum</i>	"Dragonfly pond"*	Decayed wood
<i>Clathrosporium</i> sp.	"Dragonfly pond"*	Decaying twigs
<i>Helicodendron conglomeratum</i>	"Dragonfly pond"*	Leaf litter
<i>Helicodendron luteo-album</i>	"Dragonfly pond"*	Decaying twigs
<i>Helicodendron</i> sp.	"Dragonfly pond"*	Leaf litter
<i>Helicodendron triglitzense</i>	"Dragonfly pond"*	Decaying twigs
<i>Helicoon fuscosporum</i>	"Dragonfly pond"*	Decaying twigs, leaf litter
<i>Pseudaegerita conifera</i>	"Dragonfly pond"*	Leaf litter
<i>Spirosphaera</i> sp.	"Dragonfly pond"*	Leaf litter
Daimyojin Waterfall & surroundings		
<i>Candelabrum spinulosum</i>	Surrounding of basin of a waterfall	Leaf litter
<i>Clathrosphaerina zalewskii</i>	Surrounding of basin of a waterfall	Leaf litter
<i>Helicodendron</i> sp.	Surrounding of basin of a waterfall	Leaf litter
<i>Helicomycetes colligatus</i>	Surrounding of basin of a waterfall	Leaf litter
<i>Helicomycetes scandens?</i>	Surrounding of basin of a waterfall	Hardly decayed wood
<i>Helicomycetes?</i>	Surrounding of basin of a waterfall	Leaf litter
<i>Helicoon fuscosporum</i>	Surrounding of basin of a waterfall	Leaf litter
<i>Helicosporium phragmitis</i>	Surrounding of basin of a waterfall	Leaf litter
<i>Peyronelina glomerulata</i>	Surrounding of basin of a waterfall	Decaying twigs
<i>Pseudaegerita corticalis</i>	Surrounding of basin of a waterfall	Hardly decayed wood
<i>Pseudaegerita ossiformis</i>	Surrounding of basin of a waterfall	Hardly decayed wood
<i>Pseudaegerita</i> sp.	Surrounding of basin of a waterfall	Litter
<i>Scutisporus</i> sp.	Surrounding of basin of a waterfall	Leaf litter
<i>Spirosphaera beverwijkiana</i>	Surrounding of basin of a waterfall	Leaf litter
<i>Spirosphaera minuta</i>	Surrounding of basin of a waterfall	Leaf litter
<i>Candelabrum clathrosphaeroides</i>	The side of a pool near a waterfall	Decayed wood
<i>Pseudaegerita ossiformis</i>	A pool near a waterfall	Decayed wood
<i>Candelabrum clathrosphaeroides</i>	A pool near a waterfall	Decayed wood
<i>Helicosporium gracile</i>	A pool near a waterfall	Decayed wood
Daimyojin-zawa stream & surroundings		
<i>Aegerita</i> sp.	The main stream of Daimyojin-zawa	Decaying twigs, wood, litter
<i>Candelabrum microsporum</i>	The main stream of Daimyojin-zawa	Decayed wood
<i>Candelabrum spinulosum</i>	The main stream of Daimyojin-zawa	Leaf litter
<i>Clathrosporium</i> sp.	A small spring beside the main stream	Decayed wood
<i>Clavariopsis?</i>	The main stream of Daimyojin-zawa	Scum
<i>Helicodendron</i> sp.	The main stream of Daimyojin-zawa	Leaf litter
<i>Helicomycetes?</i>	A small spring beside the main stream	Decaying twigs
<i>Heliscus lugdunensis</i>	The main stream of Daimyojin-zawa	Scum
<i>Pseudaegerita ossiformis</i>	The main stream of Daimyojin-zawa	Decaying twigs
<i>Pseudoclathrosphaerina evamariae</i>	A small spring beside the main stream	Decaying twigs
<i>Spirosphaera floriformis</i>	A small spring beside the main stream	Decayed wood, twigs
<i>Tetracladium setigerum</i>	A small spring beside the main stream	Leaf litter
<i>Triscelophorus monosporus</i>	The main stream of Daimyojin-zawa	Leaf litter
Swamp forest		
<i>Peyronelina glomerulata</i>	A small swamp forest	Leaf litter

\* A small pond beside the road is commonly known as "Dragonfly pond".

Table 5 Hypocrealean ascomycetes found on host materials in the Sugadaira Montane Research Center.

NBRC No.	Fungus	Host
102229	<i>Neonectria coccinea</i>	<i>Vitis coignetiae</i>
102230	<i>Nectria balsamea</i>	<i>Pinus koraiensis</i>
102231	<i>Bionectria</i> cf. <i>byssicola</i>	unidentified
102232	<i>Neonectria</i> sp.	unidentified
102233	<i>Neonectria coccinea</i>	unidentified
102234	<i>Neonectria coccinea</i>	unidentified
102235	<i>Bionectria</i> cf. <i>ochroleuca</i>	unidentified
102236	<i>Neonectria discophora</i>	unidentified
102238	<i>Neonectria veuillotiana</i>	unidentified
102239	<i>Neonectria coccinea</i>	unidentified
102240	<i>Bionectria</i> cf. <i>byssicola</i>	unidentified
102241	<i>Cosmospora vilior</i>	<i>Vitis coignetiae</i>
102242	<i>Nectria cucurbitula</i>	<i>Abies veitchii</i> f. <i>olivacea</i>
104594	<i>Neonectria coccinea</i>	unidentified
104595	<i>Neonectria coccinea</i>	unidentified
104596	<i>Nectriopsis</i> cf. <i>candidans</i>	<i>Badhamia macrocarpa</i> **
104597	<i>Bionectria sporodochialis</i>	unidentified
104598	<i>Haematonectria</i>	unidentified
104599	<i>Neonectria castaneicola</i>	<i>Rhododendron japonicum</i>
102237	<i>Ramularia rubella</i> *	<i>Rumex japonicus</i>
102243	<i>Alternaria alternata</i> *	<i>Rhododendron japonicum</i>
104600	<i>Phoma exigua</i> *	<i>Castanea crenata</i>

\* Not Hypocrealean fungus.

\*\* A myxomycete.

属に未記載種あるいは隠蔽種と考えられる株が6株存在した。前2属については既知種と形態的に異なる株が、*Peyronelina* 属では既知種と形態では区別できないが28S rDNAのD1/D2領域(603塩基)中19塩基が異なる株が分離された。

*Helicodendron*, *Pseudaegerita*, *Spirosphaera* の3属はそれぞれ3種が分離され、この調査地に多様な種が存在することが明らかになった。採集場所ごとの出現菌相の特徴として溪谷林内の大明神滝周辺では寄託しなかった *Helicodendron*, *Helicoon* 属菌を含め10属の半水生菌類が観察された。一方、トンボ池は直径約2.5mで水深も浅い小さな生息場所に過ぎなかったが5属7種が分離された。後者は *Helicodendron*, *Helicoon* 両属のような樽型の渦巻き状分生子を形成する種が他の場所に比べて高頻度で分離された (Table 4)。

**核菌類** 本研究で48標本を採集し、22菌株を分離し核菌類としては6属19菌株を確立した (Table 5)。菌株中には *Neonectria* 属の未記載種1種と *Nectriopsis* cf. *candidans* および *Nectria balsamea* の

2日本新産種が含まれていた。他に核菌類以外の病原菌3株の分離に成功した。

*Neonectria* sp. は溪流中に沈んだ枯枝上に子実体を形成しており、沈水性という生態、子嚢殻の性状、子嚢胞子の形態から当初 *Cosmospora* 属菌と考えたが、18S rDNAの塩基配列に基づく分子系統解析の結果 *Neonectria* 属菌であることが判明し、上述の特徴を持つ既知種がないことから新種と考えている。また、日本新産の *Nectria balsamea* はこれまで米国、カナダで針葉樹基質からのみ知られていたが、今回チョウセンゴヨウの枝枯れ症状の部位から発見された。病原性については今後検討する必要がある。他に粘菌類の子実体上や他の子嚢菌類の子実体上から *Nectriopsis* や *Cosmospora* が観察され、核菌類の寄生性の広さが再確認できた。

**盤菌類** 研究期間中に標本に基づいて同定を試みた結果、平成20年度末までに少なくとも子嚢菌類41種(複数種扱いのものも含む Table 6)と不完全菌類4種、接合菌類2種を確認した。なお、採集品は、国立科学博物館の菌類標本庫に保存した。

**Table 6** Ascomycetes collected in the Sugadaira Montane Research Center during the three year study period. (All specimens are deposited in the National Museum of Nature and Science)

Fungus	Main original habitat	No. of specimen collected
<i>Albotricha</i> sp.	on <i>Sasa</i> stem	1
<i>Ascocoryne cylichnium</i>	on wood	2
<i>Ascocoryne</i> sp.*		2
<i>Bisporella citrina</i>	decaying wood	1
<i>Brunnipila</i> sp.*	on <i>Quercus crispula</i> leaf	1
<i>Calycina</i> sp.*		1
<i>Chlorociboria aeruginascens</i> *		1
<i>Chlorociboria aeruginosa</i>		1
<i>Cistella</i> sp.	on <i>Pterocarya</i> petiole	2
<i>Cyathicula</i> sp.	on herb stem	1
<i>Dasyscyphella</i> sp.		2
<i>Helvella</i> sp.		1
<i>Hyalopeziza</i> sp.	on herb stem	1
<i>Hyaloscypha</i> sp.	on herb stem, on <i>Pterocarya</i> petiole	2
<i>Hymenoscyphus fructigenus</i>		1
<i>Hymenoscyphus</i> spp.*	leaf petiole of <i>Aesculus turbinata</i> , on herb stem	6
<i>Lachnellula</i> sp.	on <i>Larix kaempferi</i> twigs	5
<i>Lachnellula suecica</i>		2
<i>Lachnum ciliare</i>	on <i>Quercus crispula</i> leaf	4
<i>Lachnum radiatum</i>	on <i>Fagus crenata</i> leaf	4
<i>Lachnum</i> spp.*	on various plant materials	44
<i>Lambertella advenula</i>	on <i>Larix kaempferi</i> leaf	3
<i>Lambertella albida</i> *		2
<i>Lanzia</i> sp.		1
<i>Lasiosphaeria</i> sp.		1
<i>Lasiosphaeria strigosa</i>	rotten wood	1
<i>Micropodia</i> sp.		1
<i>Mollisia</i> spp.*	on various plant materials	10
<i>Nectria mariannaea</i>		1
<i>Orbilina</i> sp.		3
<i>Peziza</i> sp.		3
<i>Podostroma</i> sp.	on rotten stick	1
<i>Rutstroemia</i> sp.		1
<i>Scutellinia</i> sp.		1
<i>Strossmayeria</i> sp.*	rotten wood	2
<i>Tarzetta</i> sp.		1
<i>Trichopeziza mollissima</i>	on herb stem	2
<i>Trichopeziza</i> sp.	on herb stem	2
<i>Trichopezizella otanii</i>	on herb stem	1
<i>Trichopezizella</i> spp.	on herb stem	9

\* At least one living culture was established.

これらの菌の中で，*Strossmayeria* sp. は *Pseudospiropes* アナモルフをもち，系統関係上も興味深い菌である．日本ではまだ数箇所からしか採集されていない菌であるが，潜在的には九州から本州にかけて広く分布するものと考えられる (Hosoya, 2000) .

*Polydesmia pruinosa* はまだ日本からの正式な報告はなく，日本新産である．この種は他の菌（核菌類）に寄生的に発生する．

アカキクラゲ菌類 センター内からアカキクラゲ類 3 属 9 種の標本が得られた．また，これらの標本より単孢子分離によって 15 菌株が得られた．同定された 9 種のうち，*Dacrymyces capitatus*, *D. lacrymalis*, *D. variisporus* は日本新産種であった．

小地域における微小菌類迅速同定のための DNA データベース構築 形態的に種同定が困難な不稔株および孢子形成不良株および孢子形成未同定株の塩基配列



Table 7 Results of BLAST analyses based on ITS sequences for asporogenic isolates.

Strain no.	Label when isolated	GenBank Match Taxon	Similarity	Score (Expected value)
SUT269	Unidentified	<i>Coryascus verrucosus</i> [AJ224203] (Sordariales; Chaetomiaceae)	97%	920 (0.0)
SUT287	Basidiomycete sp.	<i>Tephroclybe ambusta</i> [AF357057] (Agaricales; Tricholomataceae)	94%	835 (0.0)
SUT295	Unidentified	<i>Leohumicola minima</i> [AY706329] (Leotiomycetes; mitosporic Leotiomycetes)	99%	953 (0.0)
SUT312	Unidentified	<i>Leohumicola minima</i> [AY706329] (Leotiomycetes; mitosporic Leotiomycetes)	88%	534 (0.0)
SUT355	Unidentified (as <i>Selenosporella</i> )	<i>Scolecobasidium humicola</i> [AY265334] (Ascomycota; mitosporic Ascomycota)	91%	811 (0.0)
SUT362	Unidentified	<i>Curreya proteae</i> [EU552117] (Pleosporales; Cucurbitariaceae)	92%	679 (3e-169)
SUT365	Sterile 2	<i>Phialea strobilina</i> [EF596821] (Pezizales; Pezizales incertae sedis)	94%	998 (0.0)
SUT368	Ascomycete	<i>Cordyceps sinensis</i> [EF488439] (Hypocreales; Ophiocordycipitaceae)	99%	773 (0.0)
SUT378	Sterile 3	<i>Meliniomyces bicolor</i> [EF093183] (Helotiales; mitosporic Helotiales)	91%	732 (0.0)
SUT379	Rhizomorpha	<i>Sistotrema alboluteum</i> [AJ606043] (Corticiales; Corticiaceae)	87%	412 (7e-112)
SUT383	Sterile 1 (36573S)	Uncultured <i>Mycosphaerellaceae</i> [FJ553167] (Capnodiales; Mycosphaerellaceae)	96%	941 (0.0)
SUT385	Sterile (as <i>Selenosporella</i> )	<i>Scolecobasidium humicola</i> [AY265334] (Ascomycota; mitosporic Ascomycota)	91%	846 (0.0)
SUT394	Sterile 1 (36571)	Uncultured <i>Cantharellaceae</i> [DQ273371] (Cantharellales; Cantharellaceae)	92%	754 (0.0)
SUT395	Fast growing sterile	<i>Rhizoctonia</i> sp. [AJ419929] (mitosporic Agaricomycotina)	98%	933 (0.0)
SUT396	Coelomycete	<i>Teratosphaeria microspora</i> [EU343298] (Capnodiales; Capnodiales incertae sedis)	95%	955 (0.0)
SUT397	Dark sterile	<i>Articulospora tetracladia</i> [EU998929] (Helotiales; Helotiaceae)	96%	996 (0.0)
SUT398	Dark sterile	<i>Botrytis</i> sp. [FJ169673] (Helotiales; Sclerotiniaceae)	99%	963 (0.0)
SUT405	Dark sterile	<i>Cryptosporiopsis ericae</i> [AY853167] (Helotiales; Dermateaceae)	99%	881 (0.0)
SUT409	Sterile 1 36601S	<i>Heyderia abietis</i> [AY789290] (Helotiales; Helotiaceae)	88%	647 (0.0)
SUT421	Unidentified	<i>Nectria mariannaeae</i> [EU273515] (Hypocreales; Nectriaceae)	97%	939 (0.0)
SUT429	Unidentified	<i>Eucosphaeria capensis</i> [EF110619] (Hypocreales; Hypocreales incertae sedis)	89%	1077 (0.0)

Table 8 Results of BLAST analyses based on ITS sequences for *Penicillium* isolates.

Strain no.	Results of species identification by an orthodox method*	GenBank Match Taxon	Similarity	Score (Expected value)
SUT255	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium lividum</i> [AY373922]	96%	990 (0.0)
SUT256	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium citreonigrum</i> [AY373908]	99%	924 (0.0)
SUT257	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp. [EU301636]	99%	961 (0.0)
SUT259	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp. [EU301636]	99%	959 (0.0)
SUT262	<i>Penicillium ochlochloron</i>	<i>Penicillium pulvillorum</i> [AF178526]	99%	915 (0.0)
SUT263	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium lividum</i> [AY373922]	99%	979 (0.0)
SUT264	<i>Penicillium</i> sp. ( <i>lividum</i> ?)	<i>Hamigera</i> sp. [EF634420]	99%	992 (0.0)
SUT265	<i>Eupenicillium lapidosum</i>	<i>Penicillium thomii</i> [AY373934], <i>P. spinulosum</i> [FJ430767], <i>P. glabrum</i> [DQ682590]	99%	926 (0.0)
SUT297	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i> [EU645714]	99%	922 (0.0)
SUT308	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp. [EU301636]	99%	909 (0.0)
SUT316	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp. [EU301636]	99%	976 (0.0)
SUT319	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium coprobium</i> [DQ339559]	99%	979 (0.0)
SUT320	<i>Penicillium</i> sp. ( <i>Talaromyces</i> )	<i>Penicillium</i> sp. [AB505424], <i>P. minioluteum</i> [AF380354]	99%	979 (0.0)
SUT321	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium ochrochloron</i> [AJ509865]	98%	939 (0.0)
SUT322	<i>Penicillium spinulosum</i>	<i>Penicillium spinulosum</i> [AY373933]	99%	981 (0.0)
SUT323	<i>Penicillium glabrum</i>	<i>Penicillium glabrum</i> [AY373915], <i>P. adameztioides</i> [DQ681325]	99%	926 (0.0)
SUT325	<i>Penicillium glabrum</i>	<i>Penicillium glabrum</i> [AY373915], <i>P. adameztioides</i> [DQ681325]	99%	926 (0.0)
SUT326	<i>Penicillium miczynskii</i>	<i>Penicillium</i> sp. [AY345343]	99%	977 (0.0)
SUT327	<i>Penicillium miczynskii</i>	<i>Penicillium</i> sp. [AY345343]	99%	977 (0.0)
SUT328	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Eupenicillium</i> sp. [EU644081]	99%	977 (0.0)
SUT330	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium thomii</i> [AY373934]	99%	981 (0.0)
SUT331	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium brevicompactum</i> [AY373899]	99%	926 (0.0)
SUT333	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium swiecickii</i> [AJ608946]	99%	926 (0.0)
SUT334	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium brevicompactum</i> [AY373898]	99%	983 (0.0)
SUT335	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium waksmanii</i> [AY373940], <i>P. miczynskii</i> [AY373924]	99%	926 (0.0)
SUT380	<i>Penicillium miczynskii</i>	<i>Penicillium</i> sp. [AY345343]	99%	992 (0.0)

\*: According to the monograph of Pitt (1979).

データによる分類群の特定の事例を Table 7 に示す。ほとんどの担子菌類や盤菌類は孢子から分離した場合、通常の培養で子実体形成することはなく、落葉生息菌類の生態学的研究では菌糸で分離されるので Sterile と表記されるのみである。また、孢子から分離しても培養で孢子形成しなくなった株は未同定 (Unidentified) と表記されるのみである。今回分子同定によって不稔株、未同定株の多くがかなり高い信頼度で既知種あるいは既知属まで同定できた (Table 7)。また、SUT383 や SUT394 株のように環境 DNA で存在が知られていながら株の存在しない菌も含まれていた。

形態情報に基づく種同定が煩雑でかつ熟練を要する菌の事例として *Penicillium* 属菌の分子同定の結果を Table 8 に示した。形態および培養による同定は Pitt (1979) のモノグラフに従って行った。その結果、種レベルまで同定できなかった株が多数あった。分子同定の結果と照合すると一般に特徴のはっきりしている種、例えば *P. glabrum* などは両者が一致していたが、同じ特徴的な種でも劣化して判別形質がはっきりしなくなった株は一致しなかった。例えば分子で *P. thomii* と同定された SUT33 は同種特有の菌核をほとんど作らなかったため sp. 扱いになっていた。また、SUT265 のように従来の方法で *Eupenicillium lapidosum* と同定されたが、分子では形態的に近い 3 種が併記された。形態で種名不明とした株の一部は 1979 年以降に記載された種と塩基配列が近かったが、塩基配列のみ登録されている株に一致する株が Table 8 に示した 26 株中 10 株もあった。これは自然界には未だ記載されていない *Penicillium* 属菌がかなり存在することを示唆している。

## 考 察

**土壤菌類** 土壤は非常に多様な微小生息場所の集合体であり、また菌類散布体を一時的に保留する機能もある。このため土壤からは極めて多様な菌類が分離できるが個々の菌の実際の生息場所を知ることは困難である。また、各種平板法で分離される菌の大半は孢子起源で、その種組成は用いた分離方法に大きく左右される傾向が強い (徳増, 1974a)。今回の調査においても同じ土壤試料を加熱処理した場合と非加熱の場合で出現菌相は大きく異なった。他方、同じ方法で異なる植生間を比較しても出現種の組成はほとんど同じであった。従来から植生の違いや気候の違いは土壤菌類の分布に強い影響を持つと考えられてきたが、データで裏付けられた例は少なく (Christensen, 1981)、今

回の結果もセンター敷地 (35 ha) 内では植生は異なっても優占属に違いは見られなかった。今回の結果は、小地域において表層土の土壤菌類相を平板法で調査する場合、平板数や採集地点を増やすより選択的分離法、例えば試料を加熱、各種薬剤処理などにより分離できる菌群を限定する方がより多くの種を発見、分離できることを示唆している。

深さ 100 cm 付近の土壤からは先述の *Calcarisporiella* sp. 以外にも表層土では発見しにくい成育の遅い菌が分離できた。深層土を入手することは簡単ではないが、従来注目されていない生息環境であるので、今後調査する必要があると考える。

**針葉樹落葉生息菌類** マツ属樹木の落葉は難分解性の基質で、分解に伴う菌類遷移がゆっくり進行し多くの種を観察・分離でき、さらに他の基質では稀にしか記録されない種が多いという特徴がある (Kendrick & Burges, 1962)。またマツ属の分布域が極めて広く様々な気候下に自生あるいは植栽されていることから、微小菌類の地理的分布の研究には極めて適した基質である (Tokumasu, 2001; Tokumasu & Aoki, 2002)。今回はマツ林内で直径 20 m の円の中に分布する 4 地点で調査を実施した。マツは周年落葉性であるため、L 層葉の菌類相は調査季節によって種組成に若干の違いがあった。しかし、より分解の進んだ葉層では、個々の種の出現頻度にばらつきがあったが季節によって種組成が大きく変わることなく安定していた。また、試料 3653 の結果 (Fig. 2) で示したように、L 層葉から F<sub>1</sub> 層上部の葉まで調査することで採集地点のマツ落葉生息菌のかなりの部分を観察できると考えられる。このことから、マツ落葉を基質する場合、マツ林内の 1 地点からの試料でもその林の落葉生息菌の全体像や特徴をかなり正確に把握できるものと考えられる。

樹木園内にはマツ科の樹木が小さな林として植栽されており、林床には落葉層が厚く堆積していた。今回の調査ではモミ属、トウヒ属、カラマツ属の落葉についても調査したところ、カラマツの落葉上の菌類相が極めて単純であること、モミ属、トウヒ属は相互によく似た菌類相をもっていたが、優占種はマツ属と異なることが判明した。この結果は、本来異所的に分布する樹種を同所で成育させることは腐生菌類の基質に対する様々な反応を観察する上で有効な方法であることを示唆している。

**生葉寄生菌類** 今回の調査では糸状不完全菌類と比較して分生子果不完全菌類が多く採集されかつ多様で

あった。これは本調査期間中の夏の天候が不順であったため、植物組織内に分生子果 (conidiomata) を形成し、比較的天候など外部環境の変化に強いと考えられる分生子果不完全菌の検出割合が高くなったものと思われる。また、我が国の亜熱帯・温帯地域にある平野部では、植栽された導入植物に糸状不完全菌類が優占する傾向があり、その被害も大きい。分生子果不完全菌類は属レベルの多様性が相対的に低くなることが知られている。菅平高原は冷温帯に属しており、樹木園に植栽されている本邦および北半球の寒帯、冷温帯から導入された樹種は順調に成育し全体として安定した森林の様相を呈している。今回の調査結果は、このような安定した環境下では重大な被害を与える糸状不完全菌類を中心とした植物寄生菌の比率は減少し、生育は遅いが環境の変化に強く、宿主限定的、内生的あるいは腐生的な生活環をもつことが知られる分生子果不完全菌類を中心とする多様な植物寄生菌相が成立することを示唆している。我が国の冷涼な地域における菌類調査報告としては澤田による東北地方菌類調査報告 (1950a, b, 1951, 1952a, b, 1958) が知られ、多くの新種および日本固有種が紹介されている。しかしながら、それらの菌株は保存されておらず、分子系統解析による菌類多様性解析や、我が国固有の生物資源を利用した研究が行えない状況にある。この問題解決のためにも新たに標本及び菌株を収集する必要があるが、今回のような調査を繰り返すことによりその充実が図られることが期待される。

**オフィオストマ様菌類** 樹皮下キクイムシに関係するオフィオストマ様菌類に関する研究は、ヨーロッパ、北アメリカ、東アジア等の温帯地域、亜寒帯地域を中心に行われてきたが、非常に狭い地域でそこに分布する菌を集中的に調査した例はほとんど無い。今回行った調査の結果、狭い範囲であっても非常に多くの種が分布し、樹種あるいはキクイムシの種と特異的な関係を有する菌類が存在することが明らかになった。今回得た情報を基に、他の地域で得られた情報と比較することにより、菌の分布と気候の関係、キクイムシや樹種との特異性について、より正確な情報が得られると考えられる。2000年、2001年に、栃木県の奥日光地区で樹皮下キクイムシに関係するオフィオストマ様菌類に関する調査を行ったが (山岡, 升屋, 未発表)、今回の調査結果と比較することにより、新知見が得られる可能性があると思われる。

また今回の調査で、未記載種と思われる菌が3種発見され、さらにまだ分類学的位置づけが決められない菌株が多数存在する。今後、詳細な形態観察、分子系

統学的解析、交配試験を行い、個々の種について分類学的位置づけを決定する必要がある。また、*Grosmannia* 属菌、*Ophiostoma piceae* complex については、特に重点的に分類学的再検討を行う必要がある。

**エリコイド菌根菌類** 今回の結果は比較的小地域においても共生菌類相は周辺の植生、特にパートナーとなるツツジ科植物の分布に敏感に反応していることを示した。このことは、小地域であっても植生が多様であれば多様なエリコイド菌類が息している可能性を示唆している。ツツジ科植物の菌根共生菌類に関するインベントリに関してはこの点を考慮に入れた調査地選択を行う必要がある。

**鞭毛菌類** 鞭毛菌類はその生活環に鞭毛をもち遊泳する相があることから、分離源として池や河川の水あるいは湿った土壌が広く用いられるが、今回はセンターの多様な環境から採取した土壌から多くのツボカビ類や卵菌類が出現した。これは鞭毛菌類の利用できる水環境のスケールが小さくかつ持続時間も短いことを示唆している。たとえば菅平では雪解け期に草原や森林の表面が水浸しになりやがて乾燥するが、この期間は鞭毛菌類にとってセンター全体が遊走子で分布を広げられる水域となり、乾燥するまでの時間は耐久胞子を形成するのに十分な時間であると考えられる。土壌は水と異なり採集、運搬、保存も極めて容易でありインベントリには適した試料であると言える。

鞭毛菌類の分離法としては釣り餌法が一般的で、釣り餌としてはアサの実やキュウリの種子などが使用される。また、小型のツボカビ類を分離する釣り餌としてマツの花粉が使われることが多い。釣り餌の種類の選択は出現菌の構成に大きく影響するので、今回のように複数の釣り餌の使用が望ましいと考える。

**半水生菌類** 半水生菌類は気中水棲菌類ともよばれ、菌糸体は水中の基質で成育するが胞子形成は気中で行う特徴がある。このため主な生息場所は水位が上下しやすい場所にある程度限定されることが考えられている。今回の調査ではトンボ池から5属7種が出現し、特に渦巻き状分生子を形成する種が高頻度で出現した。この結果はこの池が秋に周辺樹木から大量の枯葉を供給され、かつ水位が季節によりかなり変動するという環境を反映していると考えられる。半水生菌類の調査ではこうした環境の、小さい水域に注目し調査することが効率的な採集に結び付く可能性が高い。

**核菌類** 今回の調査は短期間の限定的な採集であったにもかかわらず、植物病原菌、植物腐生菌、さらには菌寄生菌と様々な特徴を持つ核菌類を採集・観察することができた。この結果から、本菌群は小地域における生態系においても高い種多様性あるいは機能的な多様性を持っていることが推測される。今回の調査は9月から10月と秋のみの採集であったため、季節に伴う対象菌類の変遷を追跡することができなかった。多様性をさらに明らかにするためには、年間を通して採集を行い、さまざまな宿主から核菌類の採集・分離を行う必要があると考える。

**盤菌類** 小型の盤菌類は子実体を発見して採集するが、子嚢の成熟状態は外見から判別することが難しい。子嚢が未熟な標本では属、種レベルの同定が困難であるため、今回も採集品の全てを同定することができなかった。また、孢子落下法による分離を試みたが、発芽困難のものが多く、株が確立できたのは少数に止まった。この状態の克服には比較的長い時間フィールドに滞在して採集、分離を試みるのが有効であると考えられる。また、今回は種レベルまで同定されていないものが多いが、今後標本の検討が進めば、同定ができるものも複数あると思われる。

全体として自然植生が多様で、かつ多様な樹種の植栽されている調査地は小型の盤菌類も多様であることが今回の調査で推定できた。

**アカキクラゲ菌類** アカキクラゲ菌類は肉眼で容易に発見できる明色の子実体を形成する種が多く、採集は容易であった。今回3属9種がセンター内から採集・同定された。センター内は樹木園があるため他の同じ気候帯の自然林より種多様性が格段に高い。このような場所での採集は同じ気候に属する森林の種多様性を研究する第1段階として極めて効率的であると考えられる。

**小地域における微小菌類迅速同定のためのDNAデータベース構築** 菌類のフロラ、遷移、群集生態学的研究では不稔株、分類学的な位置のまったく不明な株、再培養しても孢子形成しなくなった株をどう扱うかが非常に難しい問題となっている。こうした株の分類学的所属が判明すれば、菌類生態学や地理的研究の進展が大きく前進できると考えられる。Table 7に示した株は上記のいずれかのカテゴリーに属するもので、分子データによる類似度は80%以上で支持されている。逆説的な言い方であるが類似度が低い株が属する系統群は研究の進んでいない系統群とも言える。少

なくとも、同じ場所では繰り返し同じ分類群が不稔株、未同定株として分離されるから、こうした分子情報による同定は菌類群集の実態とその変遷を研究する場合極めて有効性が高いと言える。より精度を上げるためには調査地域で子実体が発見できる担子菌類や子嚢菌、病原菌類なども含めた菌類のデータベースの構築することが肝要であろう。本研究ではアカマツ林の有機物層生息菌類に関して核rDNA ITSの塩基配列データベースの構築を目指して作業を行った。今後こうした場所あるいは生息場所ごとの分子データの蓄積、データベース化が進めばより正確な分類群の特定が可能になり、菌類の生態学的研究の発展に大いに貢献できると考える。

*Penicillium* 属は世界中で長年精力的に研究され、記載種数も多く、分子データの蓄積も進んでいる代表的な属である。今回の結果は、個々の株は1株を除き99%の類似度でITS塩基配列データが登録されている株と一致した(Table 8)。また、同一株に99%以上一致する種が複数存在するものがあったことは、本属では形態の詳細な検討によって種が細かく分けられていることを反映していると考えられる。一方、26株中10株が分子データベースのsp.株と99%の類似度で一致したことは、自然界にまだ多くの未記載種が存在する可能性を強く示唆している。

**総合考察** 一般に大形の動植物ではインベントリとは地域を限定してそこに生息する種を全て調べて目録を作成することを意味する(ATBI: All-Taxon Biodiversity Inventory, intensive inventory)。これに対して種、属、科など特定の分類群に関して比較的広範な地域で分布を調べるタイプのインベントリ(extensive inventory)があり、昆虫やキノコなどを対象として行われている。後者は菌類の系統地理研究と方法が重なるので今後急速に発展してゆくものと思われるが、菌類の多様性と他の生物の多様性との関係や生態系における菌類の機能を研究する基盤として前者の実施が望まれている。しかし、このタイプのインベントリは緒言で述べたように解決せねばならぬ問題が多く、本邦ではまだ非現実的であるとされる(佐橋, 2004)。そこで、本研究では調査地域を狭めて、調査対象となる菌群を研究者が存在し実施可能なものに限定したインベントリ的研究を試行してみた。

すなわち、本研究は限定された調査地内で、参加者がそれぞれの研究対象とする生態群、分類群について既知種、未知種、あるいは普通種、稀産種を問わず網羅的に分離し、かつ、同種においてもできる限り多くの株を確保して相互に比較し同定するという方法によ

て行なった。

本研究では、381株をNBRCおよびJCMに寄託できた。この寄託菌株には明らかな新種、日本新産種に加え、同胞種、隠蔽種が多数含まれており、今後分類や系統の研究に大いに利用されることを期待している。また、稀産種に加え多くの普通種が寄託されたので、種同定で難渋することの多い生態や分布の研究者にとっても利用価値のあるものになると考える。一方、参加した研究者の研究対象でない分類群に属する分離株も多数あり、これらは寄託するまでに至らなかった。

本研究の調査地は約35haで、動植物のインベントリの対象地域に比べ著しく狭い。しかし、調査地には中部山地の典型的な植生二次遷移途中相であるススキ草原、アカマツ林、落葉広葉樹林（夏緑林）と人工林（樹木園）、溪流および人工池、人為攪乱地（圃場、建造物地域）と多様な生態系が存在する。参加者は対象とする菌群の特性やサイズに応じて調査地域の範囲をセンター全域（生葉寄生菌類、鞭毛菌類、核菌類、盤菌類、アカキクラゲ菌類）、特定の植生（土壤菌類、オフィオストマ様菌類、エリコイド菌根菌類）や水域（半水生菌類）、さらに狭く特定の植生の中の狭い範囲（針葉樹落葉生息菌類）に限定して調査を行った。その結果、いずれの菌群に関しても予想以上に多くの種が出現し、未記載種や日本新産種が発見されたことは、今回調査対象とならなかった微小菌群でもこうした多様な生態系を持つ狭い場所で集中的に研究することで幅広い分類群を効率的に収集できることを示唆している。調査地域の広さや環境については今後も検討を重ねる必要があるが、本研究はそうした検討のための貴重な基礎資料を提供できたと信じる。

本研究では多くの菌群で同定の補助的情報を得るため、形態に基づき同定された種、形態では種同定できなかった種、不稔菌糸について主に核rDNA ITS領域の塩基配列の相同性検索を実施した。その結果、研究者は新種、同胞種や隠蔽種が発見、確認が素早く行え、また同定の誤りを正すことができた。しかし、今回分離された不稔菌糸や同定できなかった株は高い信頼度で種や属まで決定できないものも多かった。これは現在使用できる塩基配列のデータベースが菌類全体から見るとまだ極めてわずかな分類群しかカバーしていないことに起因する。この点に関して狭い場所や特定の基質から出現する全菌についてのデータベースの構築は菌類の生態的研究に対しては極めて価値のあるものになると考える。

本研究では各研究者が対象菌群を分離する時同時に出現する対象外の菌を分離することを推奨した。分離

株を相互に交換して同定すれば、より効率的にインベントリが行えると考えたからである。しかし、この点に関しては準備不足のため十分に実施できたとはいえない。今後本格的なインベントリを企画する際には、この菌株の相互交換・同定システムを外部の専門家も含めて構築することが肝要と考える。

## 要 約

本研究は気候変動の顕在化に伴い本邦でも今後ますます重要性が認識され、実施要請が高まると予測できる特定の地域の菌類インベントリの実施の可能性を探ることを目的として、試作的なインベントリを試みたものである。具体的には多様な分類群や生態群の研究者の協力を得て、比較的狭い場所において全員でそれぞれの菌群について事例研究を行い、基礎的情報の取得と技術的問題を検討した。同時に、この研究を通してできるだけ多くの菌株を確立し菌株保存機関に寄託し、本邦の遺伝子資源を充実させることも目的とした。

本研究で調査を行った主な生態群は土壤菌類、針葉樹落葉生息菌、生葉寄生菌類、樹皮下穿孔虫に関連したオフィオストマ様菌類、エリコイド菌根菌類、半水生菌類、主な分類群は鞭毛菌類、核菌類、盤菌類、アカキクラゲ菌類であった。各研究グループは長野県上田市にある筑波大学菅平高原実験センターの約35haの敷地内に存在する植生二次遷移系列上のススキ草原、アカマツ林、落葉広葉樹林、人工林（樹木園）、小池および溪流の全体あるいは一部で調査を行った。研究は対象とする生態群、分類群について既知種、未知種、あるいは普通種、稀産種を問わず網羅的に分離し、かつ、同種においてもできる限り多くの株を確保して相互に比較し同定に供した。同定は形態形質、交配実験など伝統的な方法による結果と主に核rDNAのITS領域の塩基配列に基づく相同性検索あるいはITSや18S rDNA塩基配列に基づく系統解析結果との照合によって行なった。その結果、狭い調査地から全ての生態群、分類群において予想以上に多くの種が記録され、明らかな新種、日本新産種、多くの同胞種、隠蔽種が発見された。最終的に381菌株をNBRC、JCMに寄託できた。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 小川吉夫, 大園享司, 徳増征二 (2007). *Umbelopsis ramanniana* 種内グループの分布の空間的広がり. 日本菌学会第51回大会 (つくば).
- 2) 栗原祐子, Sukarno N., Ilyas M., Yuniarti E.,

Mangunwardoyo W., Saraswati R., 朴珠英, 稲葉重樹, Widyastuti Y., 安藤勝彦, 原山重明 (2007). カリマンタン島東部の低地熱帯雨林から分離された *Lecanicillium*・*Simplicillium* 属菌. 日本菌学会第51回大会 (つくば).

- 3) 山口薫, 岡根泉, 中桐昭 (2007). 菅平産半水生菌 *Scutisporus* 属菌の1新種について. 日本菌学会第51回大会, ポスター発表 (つくば).
- 4) 埋橋志穂美, 東條元昭, 柿島眞 (2009). 日本各地の土壌から分離された *Pythium* 属菌の多様性. 平成20年度日本植物病理学会大会 (松江).
- 5) 山岡裕一, 升屋勇人, 稲葉重樹, 山口薫, 鈴木里江子, 長倉理恵, 徳増征二 (2009). 針葉樹から分離されたオフィオストマキン科菌類2種について. 日本菌学会第53回大会 (鳥取).
- 6) 白水貴, 廣瀬大, 徳増征二 (2009). アカキクラゲ綱における新目 "*Unilacrymales*" の設立と *Cerinomycetaceae* 科の再定義. 日本菌学会第53回大会 (鳥取).
- 7) 徳増征二, 廣瀬大, 稲葉重樹, 小川吉夫 (2009). 不完全菌 *Calcarisporiella* 属菌の系統的位について. 日本菌学会第53回大会 (鳥取).
- 8) 佐藤美沙子, 廣瀬大, 小川吉夫, 大園享司, 徳増征二 (2009). *Umbelopsis ramanniana* の種内グループの世界規模での分布. 日本菌学会第53回大会 (鳥取).
- 9) 廣瀬大, 徳増征二 (2009). 本邦におけるツツジ科植物根系に生息する *Oidiodendron* 属の種多様性. 日本菌学会第53回大会 (鳥取).
- 10) 埋橋志穂美, 東條元昭, 柿島眞 (2009). 系統に基づく *Pythium* 属菌の分類学的再検討. 日本菌学会第53回大会 (鳥取).
- 11) 出川洋介, 白水貴 (2009). *Mortierella* 属を宿主とする菌寄生菌について. 日本菌学会第53回大会 (鳥取).

原著論文

- 1) Uzuhashi, S., Tojo, M., Kobayashi, S., Tokura, K. & Kakishima, M. (2008). First records of *Pythium aquatile* and *P. macrosporum* isolated from soils in Japan. *Mycoscience* **49**:276-279.
- 2) Yamaguchi, K., Degawa Y. & Nakagiri, A. (2009). An aero-aquatic fungus, *Peyronelina glomerulata*, is shown to have teleomorphic affinities with cyphelloid Basidiomycetes. *Mycoscience* **50**: 156-164.
- 3) Motohashi, K., Inaba, S., Anzai, K., Takamatsu, S. & Nakashima, C. (2009). Phylogenetic analyses of Japanese species of *Phyllosticta* sensu strict. *Mycoscience* **50**(4): 291-301.
- 4) Shirouzu T., Hirose D. & Tokumasu S. (2009). Taxonomic study of the Japanese Dacrymycetes. *Persoonia* **23**:16-34.

保存機関に寄託した菌株

本研究においては種レベルまで同定を目指すと同時に、将来同定あるいは記載される可能性のあると考えられる菌株もできるだけ多く確保し、寄託した。その

結果 NBRC に 377 株, JCM に 4 株寄託しており, 利用可能である。

全寄託菌株を以下に示す。分類群名は Dictionary of the Fungi 第10版 (Kirk *et al.*, 2008) に従った。不完全菌類はほとんどが子囊菌門に属するが, 明らかに担子菌門に属するもの (*Aegerita* 属菌) も含めてある。

クロミスタ界 (Chromista)

サカゲツボカビ門 (Hyphochitriomycota)

サカゲツボカビ綱 (Hyphochytriomycetes)

*Hyphochytrium catenoides* NBRC 102433

卵菌門 (Oomycota)

ミズカビ綱 (Oomycetes)

*Achlya diffusa* NBRC 102547

*Achlya megasperma* NBRC 102438

*Achlya racemosa* NBRC 102435

*Aphanomyces cf. cladogamus* NBRC 103816

*Aphanomyces cf. irregularis* NBRC 103813

*Aphanomyces cf. keratinophilus* NBRC 103821

*Aphanomyces stellatus* NBRC 102436

*Aphanomyces stellatus* NBRC 103817

*Apodachlyella completa* NBRC 103819

*Apodachlyella completa* NBRC 103820

*Cornomyces* sp. NBRC 103815

*Dictyuchus sterilis* NBRC 102548

*Myzocytiopsis* sp. NBRC 102434

*Pythiopsis cymosa* NBRC 102549

*Pythium aquatile* NBRC 103818

*Pythium cf. dimorphum* NBRC 103814

*Pythium macrosporum* NBRC 103881

*Pythium torulosum* NBRC 103812

*Saprolegnia anisospora* NBRC 102551

*Saprolegnia ferax* NBRC 102437

*Saprolegnia monoica* var. *acidamia* NBRC 102552

*Saprolegnia* sp. NBRC 102430

*Saprolegnia terrestris* NBRC 102432

*Saprolegnia torulosa* NBRC 102550

*Scoliolegnia cf. asterophora* NBRC 102431

*Thraustotheca clavata* NBRC 102439

菌類界 (Fungi)

ツボカビ門 (Chytridiomycota)

ツボカビ綱 (Chytridiomycetes)

*Boothomyces* sp. NBRC 102556

*Chytriomycetes cf. hyalinus* NBRC 102555

*Chytriomycetes cf. hyalinus* NBRC 103823

*Chytriomycetes* sp. NBRC 102554

- Entophlyctis?* sp. NBRC 103822  
*Kappamyces* cf. *laurelensis* NBRC 103824  
*Kappamyces* sp. NBRC 103830  
*Rhizidium* sp. NBRC 103827  
*Rhizoclostratium* cf. *globosum* NBRC 102553  
*Rhizophlyctis* cf. *rosea* NBRC 103831  
*Rhizophyidium* cf. *brooksianum* NBRC 103829  
*Rhizophyidium* sp. NBRC 103825  
*Rhizophyidium* sp. NBRC 103826  
*Rhizophyidium* sp. NBRC 103828  
*Terramyces* sp. NBRC 102557  
 接合菌門 (Zygomycota)  
 キクセラ亜門 (Kickxellomycotina)  
*Coemansia aciculifera* NBRC 102440  
*Coemansia aciculifera* NBRC 102441  
*Coemansia spiralis* sensu Linder NBRC 102442  
*Coemansia spiralis* sensu Linder NBRC 102443  
 ケカビ亜門 (Mucoromycotina)  
*Cunninghamella elegans* NBRC 105988  
*Gongronella butleri* NBRC 105989  
*Mortierella alpina* NBRC 105990  
*Mortierella elongata* NBRC 104547  
*Mortierella elongata* NBRC 104551  
*Mortierella gamsii* NBRC 104549  
*Mortierella globalpina* NBRC 104543  
*Mortierella globulifera* NBRC 105994  
*Mortierella humilis* NBRC 102320  
*Mortierella humilis* NBRC 105991  
*Mortierella minutissima* NBRC 104550  
*Mortierella minutissima* NBRC 105992  
*Mortierella parvispora* NBRC 104553  
*Mortierella pilulifera* NBRC 104548  
*Mortierella* sp. NBRC 104552  
*Mortierella verticillata* NBRC 105993  
*Umbelopsis nana* NBRC 102295  
*Umbelopsis nana* NBRC 105995  
*Umbelopsis ramanniana* NBRC 102500  
*Umbelopsis ramanniana* NBRC 102501  
*Umbelopsis ramanniana* NBRC 102502  
*Umbelopsis ramanniana* NBRC 105996  
*Umbelopsis roseonana* NBRC 102314  
*Umbelopsis vinacea* NBRC 105997  
*Umbelopsis vinacea* NBRC 105998  
*Zygorhynchus moelleri* NBRC 105999  
 担子菌門 (Basidiomycota)  
 ハラタケ亜門 (Agaricomycotina)  
 アカキクラゲ綱 (Dacrymycetes)
- Calocera cornea* NBRC 104528  
*Calocera viscosa* NBRC 104529  
*Calocera viscosa* NBRC 104530  
*Dacrymyces capitatus* NBRC 104531  
*Dacrymyces capitatus* NBRC 104532  
*Dacrymyces chrysospermus* NBRC 104533  
*Dacrymyces chrysospermus* NBRC 104534  
*Dacrymyces lacrymalis* NBRC 104535  
*Dacrymyces lacrymalis* NBRC 104536  
*Dacrymyces minor* NBRC 104541  
*Dacrymyces stillatus* NBRC 104537  
*Dacrymyces stillatus* NBRC 104538  
*Dacrymyces variisporus* NBRC 104539  
*Dacrymyces variisporus* NBRC 104540  
*Femsjonina peziziformis* NBRC 104542  
 ハラタケ綱 (Agaricomycetes)  
*Amanita muscaria* NBRC 104560  
*Asterophora lycoperdoides* NBRC 104525  
*Clitocybe clavipes* NBRC 104524  
*Mycena haematopus* NBRC 104527  
*Pholiota flammans* NBRC 104526  
*Suillus bovinus* NBRC 104556  
*Suillus grevillei* NBRC 104544  
*Suillus grevillei* NBRC 104561  
*Suillus laricinus* NBRC 104562  
*Suillus luteus* NBRC 104554  
*Suillus luteus* NBRC 104555  
*Suillus pictus* NBRC 104557  
*Suillus placidus* NBRC 104558  
*Suillus placidus* NBRC 104559  
*Suillus tomentosus* NBRC 104563  
 子囊菌門 (Ascomycota)  
 チャワಂತケ亜門 (Pezizomycotina)  
 チャワಂತケ綱 (Pezizomycetes)  
*Ceratocystis coeruleascens* NBRC 105826  
*Chlorociboria aeruginascens* subsp. *aeruginascens*  
 NBRC 102365  
*Chloroscypha* sp. NBRC 102216  
*Eupenicillium lapidosum* NBRC 105987  
*Haematonectria haematococca* NBRC 104598  
*Lambertella albida* NBRC 102368  
*Lophodermium pinastri* NBRC 104404  
*Lophodermium pinastri* NBRC 104405  
*Lophodermium* sp. NBRC 104406  
*Lophodermium* sp. NBRC 104407  
*Lophodermium* sp. NBRC 104408  
*Nectria balsame* NBRC 102230



- Nectria cucurbitula* NBRC 102242  
*Nectriopsis cf. candicans* NBRC 104596  
*Neonectria castaneicola* NBRC 104599  
*Neonectria coccinea* NBRC 102229  
*Neonectria coccinea* NBRC 102233  
*Neonectria coccinea* NBRC 102234  
*Neonectria coccinea* NBRC 102239  
*Neonectria coccinea* NBRC 104594  
*Neonectria coccinea* NBRC 104595  
*Neonectria discophora* NBRC 102236  
*Neonectria veuillotiana* NBRC 102238  
*Neosartorya fischeri* var. *glaber* NBRC 102294  
*Ophiostoma aoshimae* NBRC 104092  
*Ophiostoma brunneociliatum* NBRC 104093  
*Ophiostoma canum* NBRC 105827  
*Ophiostoma cf. brevisculum* NBRC 105441  
*Ophiostoma cf. neglectum* NBRC 105448  
*Ophiostoma cf. neglectum* NBRC 105451  
*Ophiostoma davidsonii* NBRC 104100  
*Ophiostoma davidsonii* NBRC 104099  
*Ophiostoma floccosum* NBRC 104094  
*Ophiostoma floccosum* NBRC 104095  
*Ophiostoma koreanum* NBRC 104101  
*Ophiostoma microcarpum* NBRC 104096  
*Ophiostoma minus* NBRC 104998  
*Ophiostoma minus* NBRC 104999  
*Ophiostoma piceae* NBRC 104097  
*Ophiostoma piceae* NBRC 104098  
*Ophiostoma quercus* NBRC 105452  
*Ophiostoma rectangulosporium* NBRC 105440  
*Ophiostoma* sp. NBRC 105442  
*Ophiostoma* sp. NBRC 105443  
*Ophiostoma* sp. NBRC 105444  
*Ophiostoma* sp. NBRC 105445  
*Ophiostoma* sp. NBRC 105446  
*Ophiostoma* sp. NBRC 105447  
*Ophiostoma* sp. NBRC 105453  
*Polydesmia pruinosa* NBRC 102369  
*Pseudogymnoascus roseus* NBRC 104409  
*Talaromyces flavus* NBRC 102293  
  
 不完全菌類 (Anamorphic fungi)  
*Acremonium cf. strictum* NBRC 102318  
*Acremonium murorum* NBRC 102317  
*Acrodonium crateriforme* NBRC 102313  
*Aegerita* sp. NBRC 102388  
*Aegerita* sp. NBRC 102396  
  
*Aegerita* sp. NBRC 104126  
*Allantophomopsis* sp. NBRC 102214  
*Alternaria alternata* NBRC 102243  
*Alternaria* sp. NBRC 104314  
*Alternaria tenuissima* NBRC 105943  
*Alternaria* sp. NBRC 104306  
*Anungitea* sp. NBRC 105921  
*Anungitea uniseptata* NBRC 104486  
*Arthrinium phaeospermum* NBRC 105944  
*Arthrotrichum oligospora* var. *microspora* NBRC 102296  
*Asterophoma alneum* NBRC 104321  
*Beauveria bassiana* NBRC 102367  
*Bionectria cf. byssicola* NBRC 102231  
*Bionectria cf. byssicola* NBRC 102240  
*Bionectria cf. ochroleuca* NBRC 102235  
*Bionectria sporodochialis* NBRC 104597  
*Botrytis cinerea* NBRC 102366  
*Botrytis cinerea* NBRC 105986  
*Calcarisporiella* sp. NBRC 105922  
*Calcarisporium arbuscula* NBRC 104489  
*Candelabrum clathrosphaeroides* NBRC 102394  
*Candelabrum microsporum* NBRC 102397  
*Candelabrum microsporum* NBRC 102398  
*Candelabrum spinulosum* NBRC 102391  
*Candelabrum spinulosum* NBRC 105945  
*Catenosublispora honiaraensis* NBRC 104487  
*Chaetopsina fulva* NBRC 102306  
*Chalara* sp. NBRC 105923  
*Chlonostachys cf. rosea* NBRC 102323  
*Chlonostachys cf. rosea* NBRC 102325  
*Chloridium chlamydosporum* NBRC 102319  
*Chloridium virescens* NBRC 105942  
*Chloridium virescens* NBRC 105946  
*Cladosporium cf. peruamazonicum* NBRC 104485  
*Cladosporium cladosporioides* NBRC 105947  
*Cladosporium cladosporioides* NBRC 105948  
*Cladosporium macrocarpum* NBRC 105949  
*Cladosporium* sp. NBRC 104310  
*Cladosporium* sp. NBRC 104313  
*Cladosporium* sp. NBRC 104315  
*Cladosporium sphaerospermum* NBRC 105950  
*Clathrosphaerina zalewskii* NBRC 104123  
*Clathrosporium* sp. NBRC 104127  
*Colletotrichum* sp. NBRC 104308  
*Colletotrichum* sp. NBRC 104309  
*Colletotrichum* sp. NBRC 104317

- Cordana pauciseptata* NBRC 105951  
*Corynespora cassicola* NBRC 104515  
*Cosmospora* sp. NBRC 102232  
*Cosmospora vilior* NBRC 102241  
*Cryptosporiopsis ericae* NBRC 105954  
*Curvularia geniculata* NBRC 102315  
*Curvularia protuberata* NBRC 104478  
*Curvularia protuberata* NBRC 104488  
*Curvularia protuberata* NBRC 105952  
*Curvularia* sp. NBRC 105924  
*Cylindrocarpon supersimplex* NBRC 104482  
*Dactylaria acerosa* NBRC 104481  
*Dactylaria fusiformis* NBRC 105953  
*Dendrostilbella* cf. *prasinula* JCM 14513  
*Dendrostilbella* cf. *prasinula* JCM 14514  
*Dictyosporium* sp. NBRC 104326  
*Epicoccum nigrum* NBRC 102302  
*Exophiala calicioides* JCM 14515  
*Geomyces pannorum* NBRC 105955  
*Geomyces pannorum* var. *asperlatus* NBRC 104490  
*Geomyces* sp. NBRC 104496  
*Geomyces* sp. NBRC 104497  
*Geomyces* sp. NBRC 104512  
*Geosmithia pallida* NBRC 105960  
*Grosmannia laricis* NBRC 104091  
*Haptocillium balanoides* NBRC 102297  
*Haptocillium rhabdosporum* NBRC 102303  
*Haptocillium sphaerosporum* NBRC 102304  
*Helicodendron conglomeratum* NBRC 102372  
*Helicodendron conglomeratum* NBRC 102373  
*Helicodendron conglomeratum* NBRC 102385  
*Helicodendron luteo-album* NBRC 102383  
*Helicodendron triglitzense* NBRC 102370  
*Helicomycetes colligatus* NBRC 102387  
*Helicoon fuscosporum* NBRC 102382  
*Helicoon fuscosporum* NBRC 102386  
*Helicosporium gracile* NBRC 102393  
*Helicosporium phragmitis* NBRC 102376  
*Heliscus lugdunensis* NBRC 104129  
*Helminthosporium velutinum* NBRC 104513  
*Helminthosporium velutinum* NBRC 104514  
*Lecanicillium fuisporum* NBRC 104479  
*Lecanicillium* cf. *evansii* NBRC 102299  
*Lecanicillium fuisporum* NBRC 102307  
*Lecanicillium* sp. NBRC 102305  
*Leptographium wingfieldii* NBRC 104997  
*Malbranchea* sp. NBRC 105925  
*Mariannaea elegans* NBRC 102301  
*Mariannaea* sp.1 NBRC 105926  
*Mariannaea* sp.2 NBRC 105927  
*Mariannaea* sp.3 NBRC 105928  
*Monacrosporium* sp. NBRC 105929  
*Monacrosporium* sp. NBRC 105930  
*Monacrosporium* sp. NBRC 106055  
*Monacrosporium* sp. NBRC 106056  
*Monochaetia* sp. NBRC 104319  
*Nigrospora sphaerica* NBRC 102309  
*Nigrospora sphaerica* NBRC 104484  
*Oidiodendron maius* NBRC 104491  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104492  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104493  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104494  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104495  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104498  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104499  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104500  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104501  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104502  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104503  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104504  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104505  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104506  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104507  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104508  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104509  
*Oidiodendron* sp. NBRC 104510  
*Oidiodendron tenuissimum* NBRC 104511  
*Paecilomyces carneus* NBRC 102322  
*Paecilomyces carneus* NBRC 102324  
*Passalora passaloroides* NBRC 104322  
*Penicillium brevicompactum* NBRC 102310  
*Penicillium* cf. *brevicompactum* NBRC 105962  
*Penicillium* cf. *brevicompactum* NBRC 105963  
*Penicillium* cf. *coprobium* NBRC 105961  
*Penicillium* cf. *lividum* NBRC 105964  
*Penicillium* cf. *miczynskii* NBRC 105965  
*Penicillium* cf. *swiecickii* NBRC 105966  
*Penicillium* cf. *thomii* NBRC 105967  
*Penicillium* cf. *thomii* NBRC 105968  
*Penicillium citrinum* NBRC 105969  
*Penicillium daleae* NBRC 105970  
*Penicillium glabrum* NBRC 102584  
*Penicillium glabrum* NBRC 105971  
*Penicillium glabrum* NBRC 105972

- Penicillium miczynskii* NBRC 105973  
*Penicillium miczynskii* NBRC 105974  
*Penicillium pseudostromaticum* NBRC 102308  
*Penicillium* sp. NBRC 105979  
*Penicillium* sp. NBRC 105980  
*Penicillium* sp. NBRC 105981  
*Penicillium* sp. NBRC 105982  
*Penicillium* sp. NBRC 105983  
*Penicillium* sp. NBRC 105984  
*Penicillium* sp. NBRC 105985  
*Penicillium* sp. NBRC 105975  
*Penicillium* sp. NBRC 105976  
*Penicillium* sp. NBRC 105977  
*Penicillium spinulosum* NBRC 105978  
*Periconia cookei* NBRC 104483  
*Pesotum fragrans* NBRC 104102  
*Pesotum fragrans* NBRC 104103  
*Pesotum* sp. NBRC 105457  
*Pesotum* sp. NBRC 105458  
*Pestalotiopsis* sp. NBRC 102211  
*Peyronelina glomerulata* NBRC 102381  
*Peyronelina glomerulata* NBRC 104128  
*Phaeoramularia dioscoreae* NBRC 104324  
*Phaeoramularia dioscoreae* NBRC 104325  
*Phialocephala* sp. NBRC 105931  
*Phialocephala* sp. NBRC 105932  
*Phialocephala* sp. NBRC 105933  
*Phoma exigua* NBRC 104600  
*Phoma* sp. NBRC 102212  
*Phomopsis* sp. NBRC 102206  
*Phomopsis* sp. NBRC 104307  
*Phomopsis* sp. NBRC 104320  
*Phyllosticta concentrica* NBRC 102207  
*Phyllosticta* sp. NBRC 102213  
*Pithomyces chartarum* NBRC 104480  
*Pleurophoma* sp. NBRC 104318  
*Pochonia chlamydosporia* NBRC 103141  
*Polyscytalum* sp. NBRC 105934  
*Pseudaegerita conifera* NBRC 102371  
*Pseudaegerita corticalis* NBRC 102375  
*Pseudaegerita ossiformis* NBRC 102374  
*Pseudaegerita ossiformis* NBRC 102392  
*Pseudaegerita ossiformis* NBRC 102399  
*Pseudocercospora pini-densiflorae* NBRC 102209  
*Pseudocercospora* sp. NBRC 104311  
*Pseudoclathrosphaerina evamariae* NBRC 104124  
*Pycnostysanus azaleae* JCM 14516  
*Pycnostysanus azaleae* NBRC 102316  
*Ramichloridium schulzeri* NBRC 102321  
*Ramularia rubella* NBRC 102210  
*Ramularia rubella* NBRC 102237  
*Ramularia* sp. NBRC 104323  
*Scutisporus* sp. NBRC 102377  
*Selenosporella curvispora* NBRC 105956  
*Septonema* sp. NBRC 105935  
*Septoria* cf. *hydrangeae* NBRC 104312  
*Septoria hydrocotyles* NBRC 104316  
*Septoria* sp. NBRC 102208  
*Septoria* sp. NBRC 102215  
*Simplicillium wallacei* NBRC 104403  
*Spirosphaera beverwijkiana* NBRC 102390  
*Spirosphaera* cf. *floriformis* NBRC 102384  
*Spirosphaera floriformis* NBRC 102380  
*Spirosphaera floriformis* NBRC 102395  
*Spirosphaera minuta* NBRC 102378  
*Spirosphaera* sp. NBRC 104125  
*Sporidesmium goidanichii* NBRC 102298  
*Sporidesmium goidanichii* NBRC 102311  
*Sporidesmium omahutaense* NBRC 105957  
*Sympodiella* sp. NBRC 105936  
*Tetracladium setigerum* NBRC 102389  
*Thysanophora penicillioides* NBRC 102312  
*Thysanophora penicillioides* NBRC 105937  
*Trichoderma asperellum* NBRC 105938  
*Trichoderma atroviride* NBRC 105939  
*Trichoderma koningii* NBRC 105940  
*Trichoderma polysporum* NBRC 105941  
*Trichoderma viride* NBRC 105958  
*Triscelophorus monosporus* NBRC 102379  
*Ulocladium chartarum* NBRC 105959  
*Verticicladium trifidum* NBRC 102300  
*Verticillium cephalosporum* NBRC 102326

## 謝 辞

最初に本研究に対して3年間助成して頂いた財団法人発酵研究所の関係者各位に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行のため敷地内での採集、実験室および設備の提供、宿泊施設の提供に格段の便宜を図ってくれた筑波大学菅平高原実験センターの教員、職員に感謝の意を表します。また、本研究で分離された菌株の寄託に関して便宜を図ってくださり、多くの未同定株を引き受けてくださった製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門に心よりお礼

申し上げます。

本研究は共同研究者の方々のご協力により遂行できました。特に若い大学院生の方々が積極的に参加ください、期間中に博士の学位を取得された方が4人も輩出しました。今後の活躍に期待したいと思います。

## 文 献

- Christensen, M. C. (1981). Species diversity and dominance in fungal communities. In *The Fungal Community*, Wicklow, D. T. & Carroll, G. C. (eds.), P.201-232. Marcel Dekker, New York.
- Deacon, J. (2006). *Fungal Biology* 4th edition, Blackwell Pub. Oxford, UK.
- Gardes, M. & Bruns, T. D. (1993). ITS primer with enhanced specificity for Basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology* **21**: 113-118.
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal distribution of biodiversity : magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* **95**: 641-655.
- Hirose, D. & Osono, T. (2006). Development and seasonal variations of *Lophodermium* populations on *Pinus thunbergii* needle litter. *Mycoscience* **47**: 242-247
- Hosoya, T. (2000). *Strossmayeria bakeriana* collected in the Imperial Palace, Tokyo. *Mem. Natn. Sci. Mus. Tokyo* **34**: 241-245.
- 掃部康弘, 徳増征二 (2000) . 子囊菌類分離のための土壤加熱処理法の再検討. *日菌報* **41**: 151-154.
- 環境省 (2007). 第3次生物多様性国家戦略 (本文). 環境省.
- Kendrick, W. B. & Burges, A. (1962). Biological aspects of the decay of *Pinus sylvestris* leaf litter. *Nova Hedwigia* **4**: 313-342.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W. & Stalpers, J. A. (eds.). (2008). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi* 10th. Edition. CAB International, Wallingford, UK.
- 小林義雄, 今野和子 (1986). 日本産水棲菌類図説. 自費出版.
- Matuuri, S. T. & Stenton, H. (1964a). Distribution and status in the soil of *Cylindrocarpon* species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **47**: 577-588.
- Matuuri, S. T. & Stenton, H. (1964b). The behavior in soil of spores of four species of *Cylindrocarpon*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **47**: 589-599.
- Pitt, J. I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London.
- 佐橋憲生 (2004) . 菌類の森. 日本の森林 / 多様性の生物学シリーズ2. 東海大学出版会.
- 澤田兼吉 (1950a) . 東北地方に於ける針葉樹の菌類 (I) スギの菌類. *林試研報* **45**: 29-53.
- 澤田兼吉 (1950b) . 東北地方に於ける針葉樹の菌類 (II) スギ以外の針葉樹の菌類. *林試研報* **46**: 111-150.
- 澤田兼吉 (1951) . 東北地方菌類調査報告 (I) 粉病菌科. *林試研報* **50**: 97-140.
- 澤田兼吉 (1952a) . 東北地方菌類調査報告 (II) 子囊菌類及び病原菌類. *林試研報* **53**: 135-194.
- 澤田兼吉 (1952b) . 東北地方菌類調査報告 (III) 銹菌類. *林試研報* **57**: 135-194.
- 澤田兼吉 (1958) . 東北地方菌類調査報告 (IV) 不完全菌類. *林試研報* **105**: 36-140.
- 徳増征二 (1974a) . 土壤生糸状菌類の分離方法の比較. *日菌報* **15**: 135-146.
- 徳増征二 (1974b) . 菅平高原産土壌菌類. 東京教育大学菅平高原生物実験所研究報告 No. 6, 33-59.
- 徳増征二 (1980) . アカマツ落葉分解に関与する菌類の観察. “微生物の生態7,” (微生物生態研究会編), pp. 130-144. 学会出版センター. 1980.
- Tokumasu, S. (1996). Mycofloral succession on *Pinus densiflora* on a moder site. *Mycoscience* **37**: 313-321.
- Tokumasu, S. (1998a). Fungal succession on pine needles fallen at different seasons: the succession of interior colonizers. *Mycoscience* **39**: 409-416.
- Tokumasu, S. (1998b). Fungal succession on pine needles fallen at different seasons: the succession of surface colonizers. *Mycoscience* **39**: 417-423.
- Tokumasu, S. (2001). Geographical distribution of *Sporidesmium goidanichii* in pine forests of Japan. *Mycoscience* **42**: 579-593.
- Tokumasu, S. & Aoki, T. (2002). A new approach to studying microfungal succession on decaying pine needles in an oceanic subtropical region in Japan. *Fungal Diversity* **10**: 167-183.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification & direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to methods and applications*, Innis, M. A., Gelf, D.H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (eds.), P.315-322, Academic Press, New York.
- Whittaker, R. H. (1969). New concepts of kingdoms of organisms. *Science* **163**: 150-160.

# バイオフィームを利用した環境修復技術の開発

森川 正章

北海道大学大学院 地球環境科学研究所  
〒060-0810 札幌市北区北10条西5丁目

## Development of bioremediation by utilizing biofilms

Masaaki Morikawa

Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University  
N-10 W-5, Sapporo 060-0810, Hokkaido

In most natural environments, bacteria exist in close association with surfaces and interfaces. They form multicellular dense aggregates glued together by extracellular polymeric substances, so called "biofilms." The biofilms yield the cells with high resistance to hostile environment stresses and with stable niches. Here, we compared performance of biofilms with that of planktonic cells of *Pseudomonas stutzeri* T102 in their naphthalene degradation activity and fitness to the naturally petroleum contaminated soils. Interestingly, T102 biofilms degraded naphthalene even faster than the planktonic cells after an induction period. It was indicated that this high degradation activity of the biofilms attributed to the production of super-activated cells. On the other hand, PCR-DGGE analysis suggested that the T102 biofilms survived for longer than ten weeks in the soils, when T102 planktonic cells were mostly eliminated. Naphthalene degradation activity of the contaminated soils containing T102 biofilms was higher than that with planktonic cells over the ten weeks. Introduction of T102 biofilms and planktonic cells did not significantly change bacterial community structure in the soils. These data demonstrate that introduction of useful alien bacterial cells as biofilms enables bioaugmentation more durable and more effective bioremediation technology.

Key words: biofilms, bioremediation, bioaugmentation, *Pseudomonas*, naphthalene degradation

### 緒 言

近年、微生物の汚染物質代謝能力を利用して環境浄化を行うバイオレメディエーション技術が注目を集めている。この技術は汚染物質分解微生物ないし分解遺伝子群の自律的増殖が期待できるため持続的な浄化が見込まれる。さらに、自然物質循環システムに則しているため環境への負荷が小さく、物理化学的手法と比較して毒性のある中間物質が生産されることが少ない安全な技術でもある (Pandey & Jain, 2002; Singh *et al.*, 2006)。バイオレメディエーション技術には、酸素や電子受容体などの栄養分を環境中へ導入して、土着の汚染物質分解微生物の活性を高めるバイオステイ

ミュレーションと、予め選抜した汚染物質分解微生物を汚染現場へ導入するバイオオーグメンテーションがある。後者のバイオオーグメンテーションは即効性が高く、幅広い汚染現場への応用が可能なることから盛んに研究されており、実際に高い効果を示した例も多い (McKew *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2005; Terry *et al.*, 2004)。しかしその一方において、汚染現場の過酷な環境や土着の微生物による淘汰により導入された有用微生物の活性が低下してしまい、予想したほどの効果が見られない場合もある (Vogel, 1996; Koteswara & Martin, 1990; Thompson *et al.*, 2005; Morikawa, 2006)。この問題を解決するための研究として、遺伝子改変や、コンソシアを用いた共代謝の利用、アルギン酸ゲルなど担体の利用などが報告されている (Thompson *et al.*, 2005)。なかでも、有用微生物を担体で包埋する方法が効果的であることが知られているが、その有効性の分子メカニズムは十分に

E-mail: morikawa@ees.hokudai.ac.jp  
共同研究者：奥山英登志，鷺尾健司

理解されていない (Terry *et al.*, 2004) . そのため、微生物を用いた環境浄化技術は未だ試行錯誤の段階にあると言える。

我々はバイオレメディエーション技術へのバイオフィルムの利用を提案している。バイオフィルムとは微生物が固体表面に構築する高次構造体で、細胞同士が密集して細胞外高分子物質 (Extracellular Polymeric Substances: EPS) に包まれている。また、バイオフィルムは微生物の主要な存在形態である。一般的にバイオフィルムを形成した微生物細胞は浮遊細胞と比較して、さまざまな薬剤や pH の変化、洗浄などの化学的および物理的ストレス、さらには原生動物による捕食などの生物的ストレスに対して高い抵抗性を示す (Potera, 1996; Davey & O'Toole, 2000; Morikawa, 2006; Harrison *et al.*, 2007) . つまり、バイオフィルムの優れた形質をバイオレメディエーション技術に応用することで、有用微生物の能力を最大限に生かした長期的かつ効果的な環境浄化技術の開発が可能になることが期待される。さらに、バイオフィルムを用いたバイオレメディエーション技術の分子メカニズムを解明すれば、これまで経験的にその有効性が報告されている固定化菌体法の分子メカニズムの理解にも役立つ。そこで、本研究ではバイオフィルムを用いたバイオレメディエーション技術の有用性を検証し、その分子メカニズムを解析することにより持続的バイオレメディエーション技術の基盤開発を目的とした。

## 実験方法

**バイオフィルム形成量の測定** 各菌株のバイオフィルム形成能は、クリスタルバイオレット (以下 CV) 染色法を用いて評価した。前培養液の OD<sub>600</sub> 値を測定し、新しい Y 培地を用いて OD<sub>600</sub>=0.3 となるように希釈した。この希釈培養液を新鮮な液体 Y 培地へと植菌 (1% v/v) し、1.5 ml 微量遠心チューブ (WATSON) へ 300 μl ずつ分注した。これらのサンプルを各菌株の至適温度 (Table 1 参照) で静置培養し、24 時間毎に 120 時間までサンプルを回収した。コントロールとしては未植菌の液体 Y 培地を 300 μl 分注したものをを用いた。微量遠心チューブ表面に付着したバイオフィルムを傷つけないように培養液を取り除き、滅菌水を用いて二回洗浄することで死細菌、残存浮遊細胞を取り除いた。0.1% (w/v) の CV 水溶液を 350 μl ずつ分注し、20 分間暗所に静置することでバイオフィルムを染色した。CV 水溶液を丁寧に取り除き、滅菌水で二回丁寧に洗浄した。バイオフィルムを染色した CV を 95% エタノール 300 μl で抽出し、吸

光度計 (UV-mini 1240, Shimazu) を用いて波長 590 nm における吸光度を測定し、この値をバイオフィルム形成量とした。全てのサンプルは三連で行い、平均値と標準偏差を算出した。

ここで、ガラス容器におけるバイオフィルム形成実験は 20 ml 密閉ガラス容器へ培地量を 3 ml に変更して行った。他の条件に関しては特に記載がない限りは上記と同じ条件である。

**汚染土壌中における浮遊細胞とバイオフィルム細胞の定着率の比較実験** 石油汚染土壌中へ *Pseudomonas stutzeri* T102 (以下 T102 と略す) 浮遊細胞を植菌した場合とバイオフィルム細胞を植菌した場合の定着率・生存率、さらに T102 の導入による土壌菌叢の変化を観察するために以下の実験を行った。

壁面バイオフィルムサンプル作製について、2 ml のスクリーキャップ付微量遠心チューブへ 400 μl の前培養液を用いてバイオフィルムを形成させた。培養上清を捨て、滅菌水でリンスして浮遊細胞を除去し、石狩油田跡から採集した石油汚染土壌を 0.5 g ずつ添加した。その後、フィルター滅菌した浮遊細胞培養上清を、浮遊細胞サンプルと同量添加した。こうすることで汚染土壌中へ持ち込まれる培地成分を全サンプルで統一した。このサンプルは、壁面に付着した状態のバイオフィルム細胞を用いるため「壁面バイオフィルム」サンプルとした。

粉砕バイオフィルム細胞のサンプル作製について、壁面バイオフィルムサンプルを 5 秒間ボルテクスして、バイオフィルム細胞を 0.5 g の石油汚染土壌中へと混ぜ込んだ。このサンプルを「粉砕バイオフィルム」サンプルとした。

浮遊細胞サンプルの作製について、2 ml のスクリーキャップ付微量遠心チューブへ石狩油田跡から採集した石油汚染土壌を 0.5 g ずつ添加した。T102 単一コロニーから 100 ml の液体 Y 培地へと植菌し、振とう培養 (30℃, 120 rpm, 9 時間) し、対数増殖期まで増殖した浮遊細胞の CFUs をバイオフィルム細胞サンプルと揃えて石油汚染土壌へ植菌した。植菌後、残った培養液を遠心分離 (12000 rpm, 4℃, 10 分間) し、その上清を 0.22 μm のフィルターを通すことにより滅菌培養上清を作製した。この滅菌培養上清 400 μl を浮遊細胞以外のサンプル (コントロールも含む) に植菌量と同量ずつ添加した。

未植菌のサンプルとして、滅菌培養上清 400 μl のみを 0.5 g の石油汚染土壌へと添加したものを、ネガティブコントロールとした。また、この後のバイオフィ

Table 1 Strains used in this study.

Bacterial strains	Characteristics	Cultivation temp.	references
<i>Arthrobacter</i> sp. CAB1	Catechol degrading bacterium	30 °C	(Kato <i>et al.</i> , 2001)
<i>Gordonia</i> sp. C3	DEHP degrading bacterium	30 °C	(unpublished)
" <i>Oleomonas sagaranensis</i> " HD1	Anaerobic alkane degrading bacterium	30 °C	(Kanamori <i>et al.</i> , 2002)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> T102	Naphthalene degrading bacterium	30 °C	(Hirano <i>et al.</i> , 2004)
<i>Rhodococcus</i> sp. T12	Branched alkane degrading bacterium	20 °C	(Kunihiro <i>et al.</i> , 2005)
<i>Rhodococcus</i> sp. TMP2	Branched alkane degrading bacterium	20 °C	(Kunihiro <i>et al.</i> , 2005)
<i>Shewanella</i> sp. SIB1	Catechol degrading bacterium	20 °C	(Kato <i>et al.</i> , 2001)
<i>Xanthobacter polyaromaticivoran</i> 127W	Microaerobic PAH degrading bacterium	30 °C	(Hirano <i>et al.</i> , 2004)
<i>Escherichia coli</i> K12 DH5α	<i>endA1</i> , <i>gyeA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) , <i>F</i> ( <i>traD36</i> , <i>proAB</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>f</sup> , <i>lacZAM15</i> ) <i>Amp</i> <sup>r</sup> , <i>lacZ</i>	37 °C	
pUC18			

ルム細胞・浮遊細胞の特性比較実験において、注意書きがない場合はバイオフィルムサンプルの総 CFUs に合わせて浮遊細胞を植菌して比較した。

土壌分解実験での培養方法は Crowley らの方法 (Park & Crowley, 2006) に従った。ペトリ皿の中に 2 ml の滅菌水を添加したキムワイプを敷き詰めた。この上に、0.5 g のナフタレンの結晶の入った 1.5 ml 微量遠心チューブを蓋の開いた状態で置いた。これによって内部の乾燥を防ぎ、さらに水蒸気に溶出したナフタレン (30 ppm) が供給される状態にした。ナフタレンの入った微量遠心チューブを中央にして上記 4 種類 (壁面バイオフィルム, 粉砕バイオフィルム, 浮遊細胞, ネガティブコントロール) のサンプルを 1 つずつペトリ皿内に並べた。ペトリ皿に蓋をしてパラフィルムで密閉した。こうすることで外部へ水蒸気が漏れることを防ぎながら、外部からの酸素の供給が行われる状態にした。これを静置培養 (30°C) して、植菌直後、48 時間後、1 週間後、その後 1 週間ごとに 10 週間後までサンプルを回収した。

石油汚染土壌からの DNA の抽出には、ISOIL for Beads Beating soil DNA extraction kit (ニッポンジーン) を用いた。方法はキットに付属される説明書に従った。得られた DNA 溶液を TE buffer で希釈し、吸光度計で吸光度 (260 nm) を測定した。この値から以下の式に従って DNA 濃度を求めた。

$$\text{DNA 濃度 } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{希釈率} \times 50$$

PCR の反応条件と合成オリゴヌクレオチドプライマーについて、今回の実験では PCR-DGGE 法だけでなく、様々な用途で PCR を利用した。その際の PCR 反

応液の組成、通常の PCR 反応条件、DGGE 用の PCR 反応条件、使用したプライマーをそれぞれ Table 2, Table 3, Table 4, Table 5 に示した。

DGGE 用の 16S rRNA 遺伝子断片の増幅について、DNA 用液を DNA 濃度が 20 ng/ $\mu$ l となるように TE buffer を用いて希釈した。これを鋳型 DNA 溶液として Table 4 に従って PCR 溶液を作製した。この際、プライマーには Table 5 の 16S 341-GC F と 16S 534 R を使用した。これらを 300  $\mu$ l PCR チューブへと加えてサーマルサイクラー (PTC-100™ MJ Research) にセットし、PCR を行った。また、これらの反応には KOD-Plus- キット (TOYOBO) に付属の試薬を使用した。

**T102** を植菌した土壌試料におけるナフタレン分解活性の評価 T102 を植菌した土壌のナフタレン分解活性を評価するため、それぞれの土壌サンプル全量を 20 ml の 100 ppm ナフタレン/BM 培地へと添加して、ナフタレン分解量を測定した。植菌土壌サンプルの作製・培養方法・DGGE 解析法は上記と同様に行なった。ネガティブコントロールとしてオートクレーブ処理した石油汚染土壌を用いた。

ガスクロマトグラフィーを用いたナフタレンの測定ヘキサン・アセトン抽出法によるナフタレンの抽出について、回収したサンプルに培養液と同量の抽出溶媒 (ヘキサン:アセトン=1:1 含 0.26 mM ビフェニル) を添加した。400 回手動攪拌して培養液中に残存するナフタレンを完全に抽出した。これらのサンプルを低

Table 2 Cocktail for PCR

Components	volume ( $\mu$ l)
10 $\times$ PCR Buffer	5
2 mM dNTPs	5
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2
Forward primer ( 10 pmol / $\mu$ l )	1
Reverse primer ( 10 pmol / $\mu$ l )	1
KOD -Plus- ( 1U / $\mu$ l )	1
Template DNA	1
Distilled water	34
Total	50



Table 3 Program for PCR

94 °C	2 min	20 cycle
↓		
94 °C	15 sec	
↓		
65 °C ※	30 sec	
↓		
68 °C	30 sec※	
↓		
4°C	∞	

※ Changed if necessary

Table 4 Cocktail for RT-PCR

Components	Volume (μl)
template DNA solution	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4
10×buffer	2
10 mM dNTPs	2
Ribonuclease inhibitor	0.5
AMV Reverse transcriptase	0.7
Random Primer	2
Total (+RNase Free Water.)	20

速遠心分離 (111.8×g, 10 min, 室温) して得られたヘキササン層 1 ml をガスクロマトグラフ (以下 GC) 用ガラスバイアルチューブに移した。

ガスクロマトグラフィー解析による分解率の算出について、ヘキササン・アセトン抽出法によって得た有機層をガスクロマトグラフィー (以下, GC-FID) によりナフタレン量を測定した。抽出溶媒中に含まれる内部標準物質である 0.26 mM ビフェニルとナフタレンのクロマトグラムピーク面積の値から算出した。

純粋培養系における T102 のナフタレン分解活性の評価 T102 バイオフィーム細胞のナフタレン分解能の評価について、T102 に由来する浮遊細胞とバイオ

フィルム細胞のナフタレン分解特性を比較するために、CFUs を揃えた状態での基質分解量を測定した。

「バイオフィーム形成量の測定」と同様の方法で 20 ml の密閉ガラス容器 (三商) にバイオフィームを形成させた。バイオフィームを傷つけないように滅菌水でガラス容器を洗浄し、終濃度 20 mg l<sup>-1</sup> (20 ppm) のナフタレンを含む BM 液体培地を 7 ml 添加した。プチラバーキャップとアルミシールを施して静置培養 (30°C) した。4 時間おきにサンプルを回収し、培養液中のナフタレンをヘキササン・アセトン抽出して、ガスクロマトグラフィー解析によりナフタレンの残存量を測定した。

この際 1 サンプルあたりの総 CFUs を測定した。全

Table 5 Primers used for PCR

Name	Nucleotide sequences	Tm (°C)
16S 341-GC F	5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG -3'	81.7
16S 534 R	5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG -3'	58.6
nahAc 52 F	5'- CAC CTG ATT CAT GGC GAY*GAA G -3'	59.5
nahAc 1244 R	5'- CCA CGA TAA CTG GTC TCG CC -3'	60.4
nahAc 503 F	5'- TAC GCA TCC CCC GCA AAG TTT -3'	60.4
nahAc 821 F	5'- GTG CTA AGC AGG AAC GGC TGA A -4'	60.4
nahAa 519 F	5'- CAC GTC CGC GAA GGT ACA AGC -3'	62.4
nahAa 894 R	5'- TGG TGC GCC GCA CAG GTA GGC -3'	66.3
nahAb 21 F	5'- TAC CCC ATT TGA AGA TAG CTT -3'	53
nahAb 357 R	5'- TCA GCT CAA ATC AAT CAT CAC A -3'	53
nahAc 820 F	5'- GTG CTA AGC AGG AAC GGC TGA A -3'	60.4
nahAc 1244 R	5'- CCA CGA TAA CTG GTC TCG CC -3'	60.4
nahAd 84 F	5'- GGC TTT GCA ACA AGA AGC -3'	53.5
nahAd 570 R	5'- CAT CAC ATT GTG CGT CTG -3'	53.5
16s 101 F	5'- GAC GGG TGA GTA ATG CTT GG -3'	58.9
16s 360 R	5'- GCA GTG GGG AAT ATT GCA CA -3'	57.3

※ Y : mixture of C/T

でのサンプルは三連で行い、平均値と標準偏差を算出した。

T102 浮遊細胞のナフタレン分解能の評価について、プレート上に形成させた T102 単一コロニーを 100 ml 液体 Y 培地へ植菌し、振とう培養 (30 °C, 120 rpm, 9 時間) した。指数増殖期に入った T102 培養液を 50 ml ファルコンチューブへと回収した。この培養液を遠心分離 (3,622×g, 10 min, 室温) してペレット化し、上清を完全に取り除いた後に 10 ml の液体 BM 培地で再懸濁した。滅菌した 20 ml 密閉ガラス容器に 20 ppm ナフタレンを含む BM 培地を 7 ml 添加し、そこへ総 CFUs がバイオフィルムの試料と同じになるように懸濁液を植菌した。そして、メチルラバーキャップで蓋をしてアルミシールで密閉した。これらのサンプルを静置培養 (30°C) し、4 時間ごとに 48 時間まで経時的にサンプルを回収した。その後、バイオフィルムサンプルと同様にしてナフタレン抽出・ナフタレン残存量測定を行なった。20 ppm ナフタレンを含む BM 培地のみを加えた未植菌サンプルを対照試料として用いた。それぞれの計測は三連で行い、平均値と標準偏差を算出した。

**RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR)** を用いた T102 浮遊細胞とバイオフィルム細胞の *nahA* 発現量の比較 RNA 抽出用の培養液へ RNA Protect Bacteria Reagent (QIAGEN) を 1 ml 加えてボルテクスすることにより菌体を懸濁した。懸濁液を室温で 5 分間静置し、遠心分離 (5,000×g, 10 min, 室温) して上清を除去後、-80°C で凍結保存した。その後、RNeasy mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付の手順に従い RNA を抽出した。この時、RNase-Free DNase Set (50) (QIAGEN) を用いて DNase 処理も同時に施した。得られた RNA 溶液について、吸光度計を用いて A<sub>260</sub> を測定し以下の式より RNA 量を算出した。

$$\text{RNA 量 (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 40 \times \text{希釈率}$$

cDNA 合成には、Reverse Transcription System (Promega) を用いた。RNA 量が 20 μg/10 μl になるよう調整したサンプル 5 μl を 70°C で 10 分間静置した。氷上で 3 分間静置した後、Table 5 の通りに cDNA 合成反応液を調製した。室温で 10 分間静置し、42°C で 50 分間静置した。その後、95°C で 5 分間静置したものを cDNA 溶液とした。

300 μl の微量遠心チューブに反応溶液 (Table 2 参

照)を調製して、サーマルサイクラー (Takara) を用いて Table 3 の設定で PCR を行った. プライマーは Table 4 のものを使用し, *nahAa* は *nahAa* 519 F と *nahAa* 894 R, *nahAb* は *nahAb* 21 F と *nahAb* 357 R, *nahAc* は *nahAc* 820 F と *nahAc* 1244 R, *nahAd* は *nahAd* 84 F と *nahAd* 570 R, 比較対象としての 16S rRNA 遺伝子領域は 16S 101 F と 16S 360 R を用いた. 反応終了後, サンプルを 8 $\mu$ l ずつ用いてアガロースゲル電気泳動し, 臭化エチジウム染色した. そして Fluoroimager を用いて各遺伝子の発現量を評価した.

## 結 果

石油関連化合物分解細菌のバイオフィーム形成量  
当研究室の保有する石油系化合物分解細菌 8 菌株のバイオフィーム形成量を経時的に測定した. 菌株ごとのバイオフィーム形成量を Fig. 1 に, 48時間培養した際のバイオフィームを CV 染色した写真を Fig. 2 に示した. 結果, *Pseudomonas stutzeri* T102 が最も高いバイオフィーム形成能を示した. 経時的なバイオフィーム形成量についても, *P. stutzeri* T102 は培養時間に

比例してバイオフィームの量が増加したのに対し, 他の菌株は長期間培養してもバイオフィームが増大しなかった. そのため, これらの細菌の中からナフトレン分解細菌である *P. stutzeri* T102 株をバイオフィーム高形成細菌として選抜した.

T102 は微量遠心チューブ (ポリプロピレン) だけではなく, ガラス容器にも分厚いバイオフィームを形成する. この場合, ポリプロピレンに形成した時とは異なり, 気液界面に特に分厚いバイオフィームを形成した (Fig. 2). また, 走査型電子顕微鏡写真 (Fig. 3) を見ると, 細胞同士が密集して複雑な立体構造を形成していることがわかった.

**T102 の石油汚染土壤中での生存率の比較** T102 バイオフィーム細胞と浮遊細胞における, 石油汚染土壤中での生存率の比較を行った. PCR-DGGE 法によって石油汚染土の全菌叢中における T102 の割合を経時的に測定した. DGGE ゲルの写真と, T102 のバンド強度を数値化したものを Fig. 4 (a) と (b) にそれぞれ示す.

浮遊細胞と壁面バイオフィームサンプルでは T102 のバンドが時間経過に従って徐々に薄くなり, 培養 6

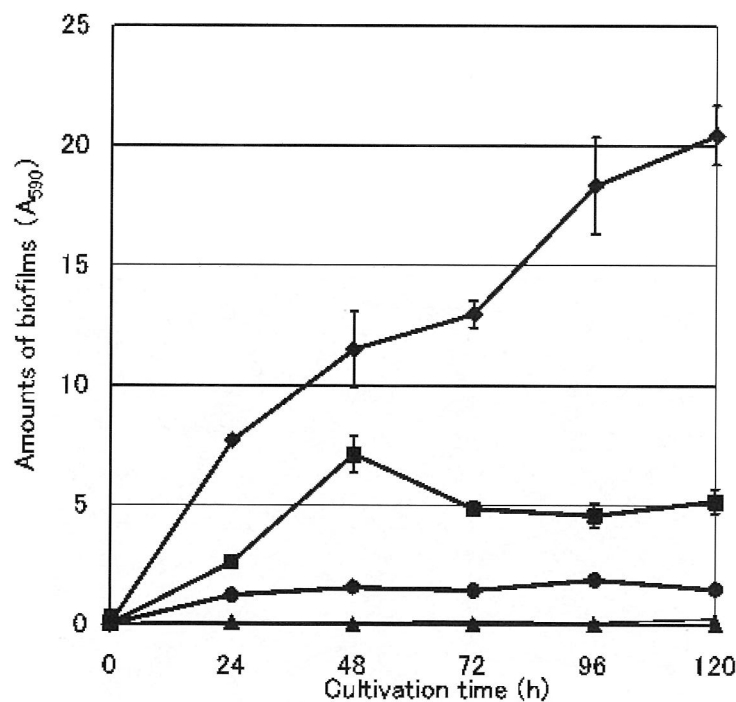
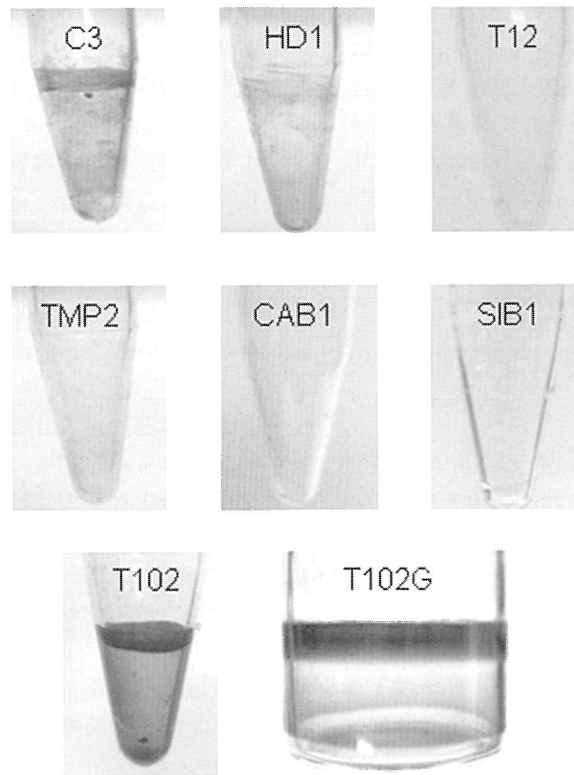
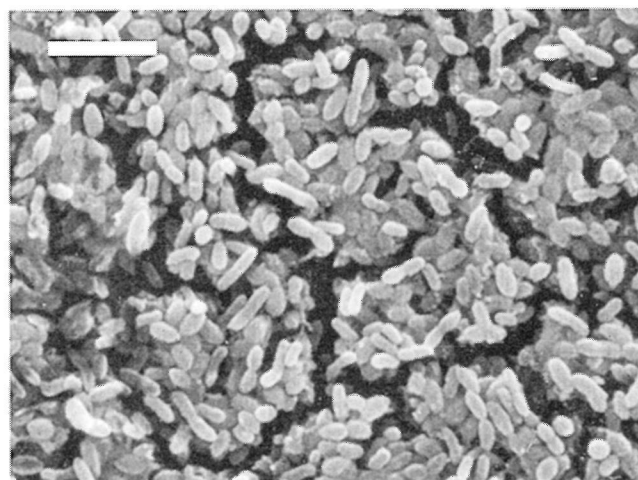


Fig. 1 Comparative biofilm formation by hydrocarbon degrading bacteria.

◆, *Pseudomonas stutzeri* T102 (Hirano et al., 2004); ■, *Gordonia* sp. C3 (unpublished); ●, "*Oleomonas sagaranensis*" HD1 (Kanamori et al., 2002); ▲, *Arthrobacter* sp. SIB1 (Kato et al., 2001), *Rhodococcus* sp. TMP2/T12 (Kunihiro et al., 2005), *Xanthobacter polyaromaticivorans* 127W (Hirano et al., 2004).

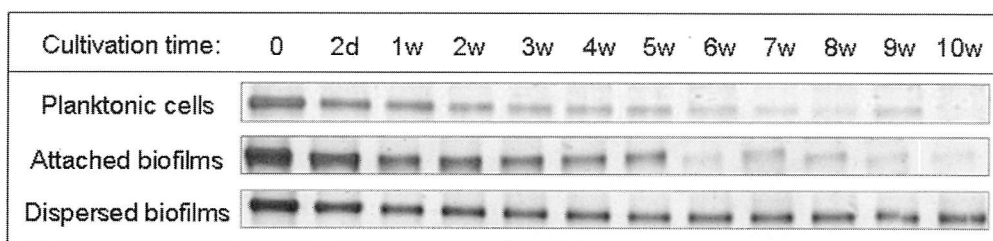


**Fig. 2** CV staining of hydrocarbon degrading bacterial biofilms. Biofilms were formed for 48 h at appropriate temperatures. Samples are *Gordonia* sp. C3, *Oleomonas sagaranensis* HD1, *Rhodococcus* sp. T12, *Rhodococcus* sp. TMP2, *Arthrobacter* sp. CAB1, *Shewanella* sp. SIB1, and *P. stutzeri* T102. T102G is the biofilms of *P. stutzeri* T102 formed in a glass bottle.



**Fig. 3** Scanning electron microscopy (SEM) of T102 biofilms. Bar indicates the size of  $5\mu\text{m}$

(a)



(b)

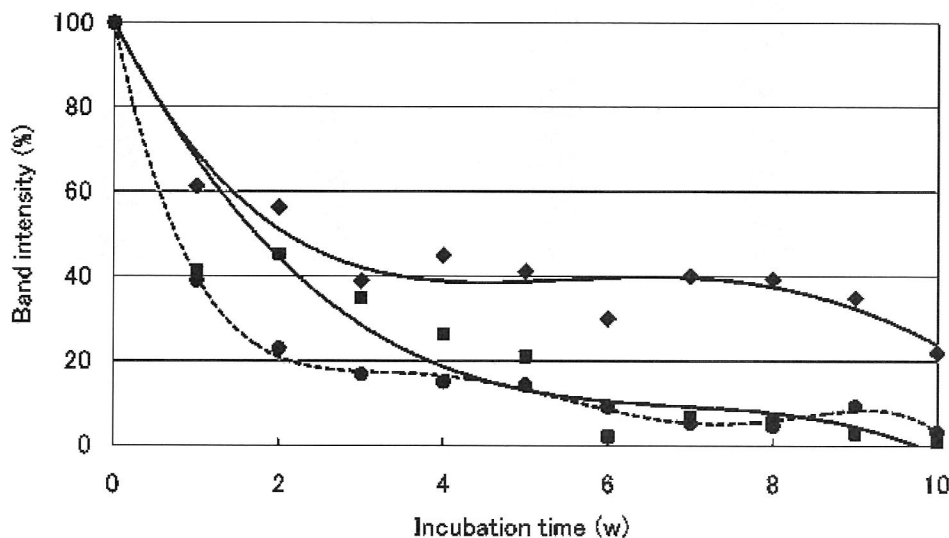


Fig. 4 Fitness of T102 cells in an oil cocontaminated soil.

a, Total DNA was extracted from the soil samples and analyzed by PCR-DGGE. b, the gel band of T102 was quantified by fluorimager. ◆, Dispersed biofilms; ■, Wall attached biofilms; ●, Planktonic cells

週間後にはほとんど検出されなくなった。特に、壁面バイオフィームサンプルでは6週間を境に急激にバンドが薄くなった。一方で、粉砕バイオフィームサンプルは時間経過と共に若干バンドが薄くなるものの、6週間以降も他のサンプルより遥かに濃いバンドを示し続けた。

DGGEゲル中でのT102に相当するバンドの濃さを数値化し、植菌時のバンドの濃さを100%としてグラフ化したものがFig. 4(b)である。浮遊細胞サンプルでは植菌2日後にはバンド強度が半減し、10週間後には植菌直後の3%程度しか検出されなかった。壁面バイオフィームサンプルでは、培養5週間目までは浮遊細胞よりも高いバンド強度を示したが6週間目に急激に生存率が低下し、10週間目には浮遊細胞と同様にほとんど検出されなかった。一方、粉砕バイオフィームサンプルは培養3週間目で40%程度までバンド強度が低下するものの、その後は30~40%程度の割合で安定

した。これらの結果は、T102バイオフィームは石油汚染土壤に混ぜ込んだ場合に浮遊細胞よりも安定に土壤に定着したことを示している。

**T102**を植菌した汚染土壤のナフタレン分解活性  
T102バイオフィーム細胞を汚染土壤へ投入した場合、浮遊細胞を植菌した場合よりも高い生存率を示した。しかし、バイオレメディエーション技術では、導入した菌株が土壤中で生存し続けることだけでなく、汚染浄化活性を保持し続けることが重要である。そのため、バイオフィームの有用性を示すためには、T102バイオフィームを導入した汚染土壤がナフタレン分解活性を保持していることを確認する必要がある。しかし、今回用いた汚染土壤中には既にナフタレン様物質が多量に含まれており、培養中には水蒸気を介してナフタレンを供給し続けた。そのため、土壤中で代謝されたナフタレン量を実測するのは難しい。

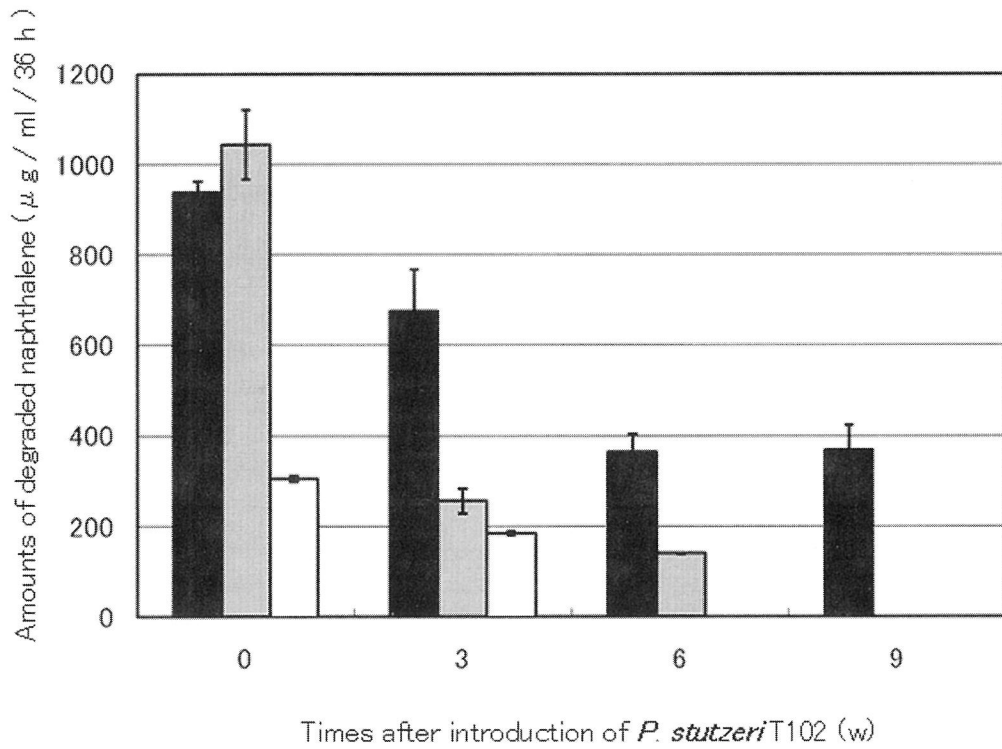


Fig. 5 Naphthalene degrading activities of the soils containing T102.  
Black bar, dispersed biofilms of T102; Gray bar, planktonic cells; White bar, no T102 cells.

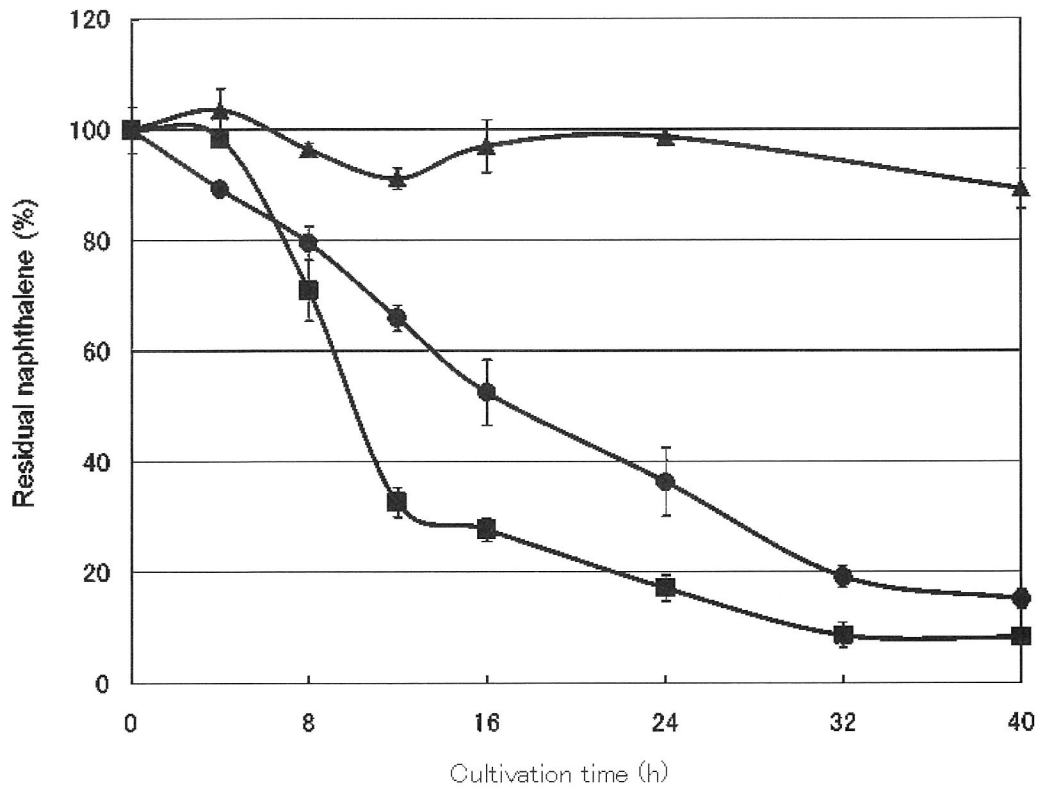


Fig. 6 Degradation of naphthalene by T102 biofilms and planktonic cells. ■, Biofilm cells; ●, planktonic cells; ▲, no inoculation.

そこで、T102を植菌した汚染土壌を、ナフタレンを単一炭素源とする培地へ移植した際のナフタレン減少量を測定し、T102導入土壌のナフタレン分解活性を評価した (Fig. 5)。T102を植菌した直後は浮遊細胞も粉砕バイオフィルムも36時間の間に全体の50% (1000 $\mu$ g) 程度のナフタレンを分解した。しかし、T102を土壌に導入してから3, 6, 9週間後では、浮遊細胞サンプルのナフタレン分解活性は時間経過と共に著しく低下した。3週間目では植菌当初の4分の1以下の分解活性しか示さず、全体の12% (250 $\mu$ g) のナフタレンしか分解しなかった。そして、9週間目には全くナフタレン分解活性を示さなかった。

一方で、粉砕バイオフィルムサンプルは時間経過と共に若干分解活性が低下するものの、培養3週間後でも植菌当初の71% (674 $\mu$ g)、6週間以降は39% (365 $\mu$ g) 程度のナフタレン分解活性を示し続けた。

これらのことから、バイオフィルム状態で汚染環境中に投入すると、T102は安定に土壌環境中に定着し、かつナフタレン分解活性を長期間維持できることがわかった。

純粋培養系における T102 浮遊細胞とバイオフィルム細胞のナフタレン分解活性の比較 以上、T102バイオフィルムはバイオレメディエーション技術に有効である可能性を示した。ここで、バイオフィルムを用いた浄化技術の基礎的な知見を得るために、純粋培養系での T102 バイオフィルムと浮遊細胞のナフタレン分解特性の比較を行なった。

最初に、ナフタレンを単一炭素源とする培地にバイオフィルム細胞と浮遊細胞を、生菌数を揃えて植菌した際のナフタレン分解量を経時的に測定した (Fig. 6)。浮遊細胞、バイオフィルム細胞ともに32時間でほぼ全てのナフタレンを分解した。しかしながら、バイオフィルムサンプルはナフタレン分解時に以下二点の傾向を示した。

- (i) バイオフィルムサンプルはナフタレン分解開始までにラグタイムが存在した。浮遊細胞はナフタレン添加直後からナフタレンを分解したのに対し、バイオフィルム細胞はナフタレン添加から分解を開始するまでに一定時間のラグタイムがあり、その後ナフタレン分解が開始した (Fig. 6 では4時間程度だが、ラグタイムは4~16時間の間で変化する)。
- (ii) 分解を開始したバイオフィルムサンプルは浮遊細胞サンプルよりも高いナフタレン分解活性を示した。一方、浮遊細胞は終始一定の速度 (2.5%/hour) でナフタレンを分解し続け

たのに対し、バイオフィルム細胞はラグタイム後に急速にナフタレンを分解した (8.5%/hour)。4時間から8時間の間は浮遊細胞の約3.5倍の分解速度を示し、16時間後には全体の70%のナフタレンを分解した。

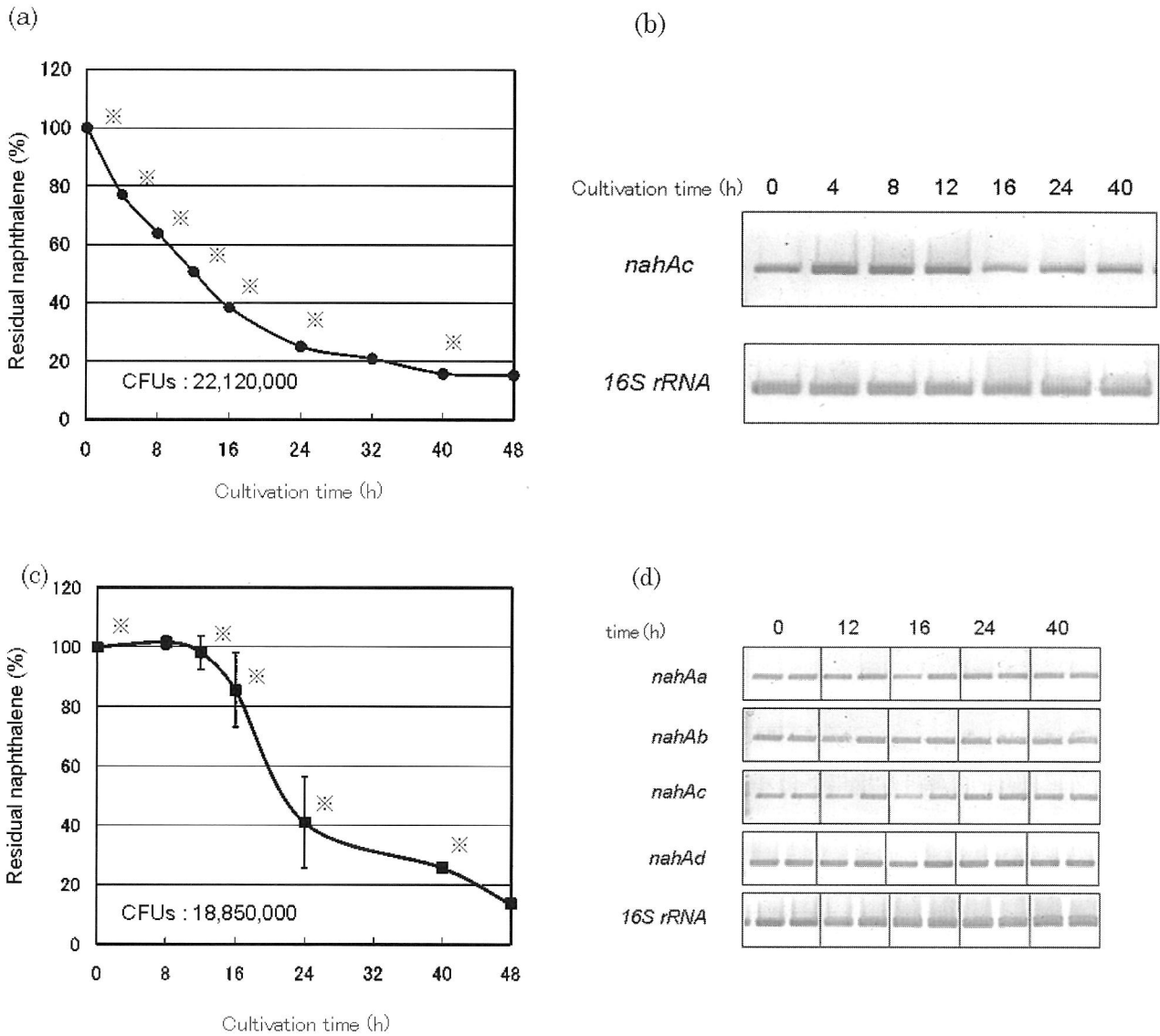
ここで純粋培養系におけるナフタレン分解実験では、全てのサンプルで15%前後のナフタレンが残存している。これは、使用したブチルラバーキャップに揮発したナフタレンが付着してしまい、微生物分解を受けなかったためと考えられる。これは、サンプルのブチルラバーキャップから抽出操作を行ったところ、付着したナフタレン成分が検出されたためである。したがって、以降の実験において、ナフタレンを15%前後まで減少したものは、ほぼ完全分解が行なわれたものと判断した。

#### T102 浮遊細胞とバイオフィルム細胞の *nahA* 発現量

バイオフィルムは高密度でEPSに覆われた構造をとるため、基質との接触効率が浮遊細胞よりも低い。そのため、ナフタレンジオキシゲナーゼの発現が浮遊細胞より遅くなる可能性がある。一方で、バイオフィルムはその細胞密度の高さから、代謝産物などによるシグナル伝達が厳密に同調して行なわれることが知られている (Potera, 1996; Davey & O'Toole, 2000)。これらのことから、バイオフィルム内の細胞の一部がナフタレンと接触した際に、他の細胞も一斉に遺伝子発現を促進させた可能性がある。そこで、ナフタレン分解における最も重要な酵素である *nahAc* の発現を RT-PCR によって経時的に調べた。また、バイオフィルム細胞についてはナフタレンジオキシゲナーゼの他の構成要素 (*nahAa*, *nahAb*, *nahAd*) の発現も調べた (Fig. 7)。

バイオフィルム細胞は分解前のラグタイムの段階から分解終了までの間、一定の割合で *nahAc* 発現量を発現していた (Fig. 7 (a), (b))。また、*NahAc* 以外のコンポーネント遺伝子 (*nahAa*, *nahAb*, *nahAd*) の発現も構成的であり、ナフタレン分解活性との間に相関性は見られなかった (Fig. 7 (c), (d))。浮遊細胞の *nahAc* 発現量を見ると、分解速度が一定なのに対して、植菌直後 (4~12時間) は発現量が高くなり、その後発現量が低下した。また、16S rRNA の発現量を基準として、浮遊細胞とバイオフィルム細胞の *nahAc* の発現レベルを比較してみると、浮遊細胞の方が常に高い発現量を示していた。

これらの結果から、バイオフィルム細胞で観察されたラグタイムと急速分解はナフタレンジオキシゲナーゼの急速な発現変化に起因しないことが示された。こ



**Fig. 7** Expression levels of *nahA* at different times. a, Degradation of naphthalene by planktonic T102 cells; b, expression levels of *nahAc* and 16S rRNA genes of planktonic cells at different times; c, degradation of naphthalene by T102 biofilms; d, expression levels of *nahAc* and 16S rRNA genes of planktonic cells at different times. Similar intensity of 16S rRNA bands verifies equal amount of template mRNA used for each experiment. CFUs are the values at 0 h. Asterisks indicated the time of sampling.

ここで、バイオフィーム細胞を用いた分解実験中に培養液中に遊離細胞が増加することが観察された。そこで、バイオフィームから遊離した浮遊細胞が、ナフタレンの急速分解に関わるのではないかと考え以下の実験を計画した。

**T102 バイオフィームから遊離した浮遊細胞の *nahAc* 発現** バイオフィームから遊離した浮遊細胞がナフタレンの急速分解に関わる可能性を検証するため、遊

離浮遊細胞の *nahAc* 発現を調べた (Fig. 8)。その結果、遊離浮遊細胞は顕著に高い *nahAc* の発現を示した。これは遊離浮遊細胞がナフタレンの急速分解に深く関わるという仮説を支持するものである。

**T102 バイオフィームから遊離した浮遊細胞と残留バイオフィームのナフタレン分解活性の比較** ナフタレン急速分解には、バイオフィームから遊離した浮遊細胞が深く関わる可能性が示唆された。しかしながら、



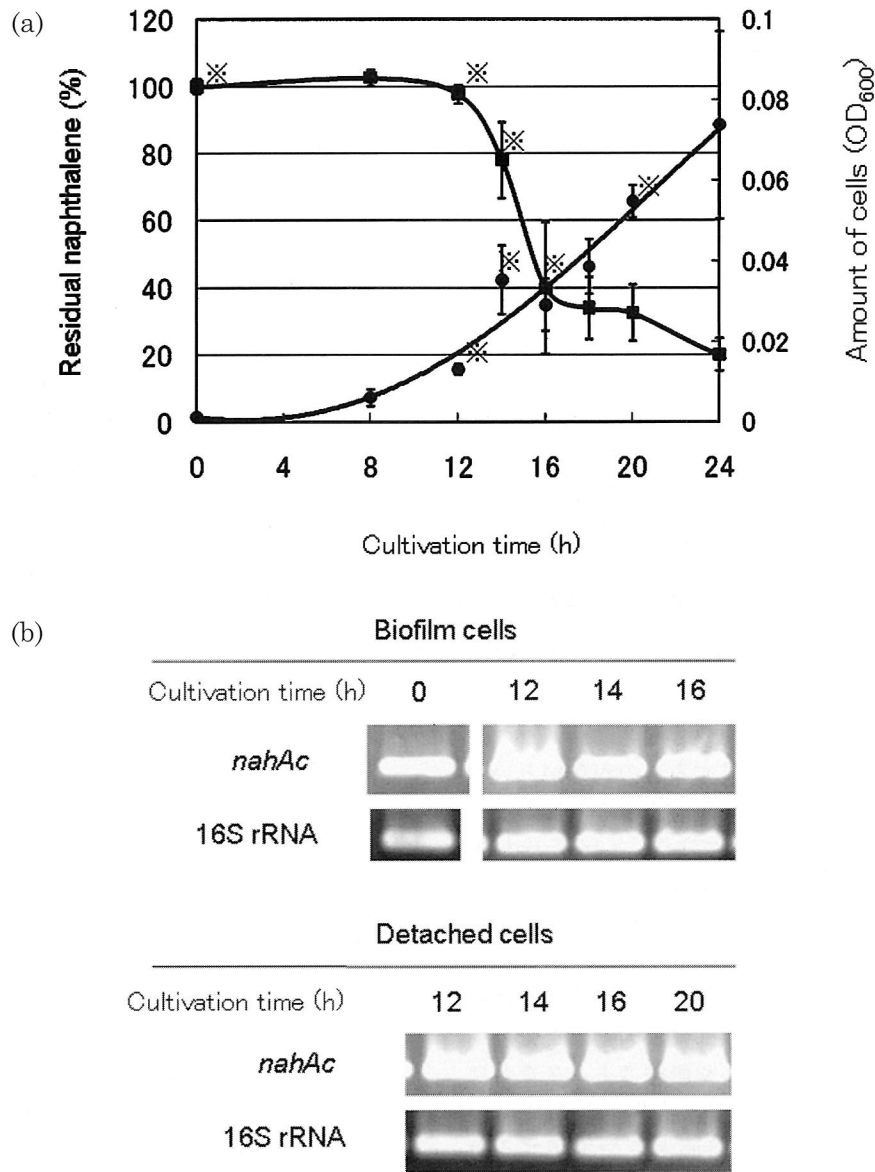


Fig. 8 Comparison of biofilm cells and detached cells.  
 a: ■, residual naphthalene; ●, amount of cells detached from biofilms.  
 b: expression levels of *nahAc* at different times.

これまでの実験ではバイオフィーム細胞と遊離浮遊細胞を併せたナフタレンの総分解量しか見ていない。これらを区別するため、バイオフィームサンプルからそれぞれの細胞を回収し、新鮮な培地に別々に植菌して分解量を測定した (Fig. 9)。その結果、バイオフィームから遊離した浮遊細胞は通常の浮遊細胞の約3倍の活性を示した。また、遊離浮遊細胞を取り除いた残留バイオフィームはほとんどナフタレン分解活性を示さなかった。これらの結果から、バイオフィームから遊離した

浮遊細胞が高いナフタレン分解活性を獲得して、基質の急速分解に貢献する可能性が示された。

### 考 察

**T102 株のバイオフィーム形成** 今回評価した8種類の石油関連化合物分解細菌の中で、*Pseudomonas stutzeri* T102 が最も高いバイオフィーム形成能力を示した (Fig. 1, Fig. 2)。多環式芳香族化合物を分解す

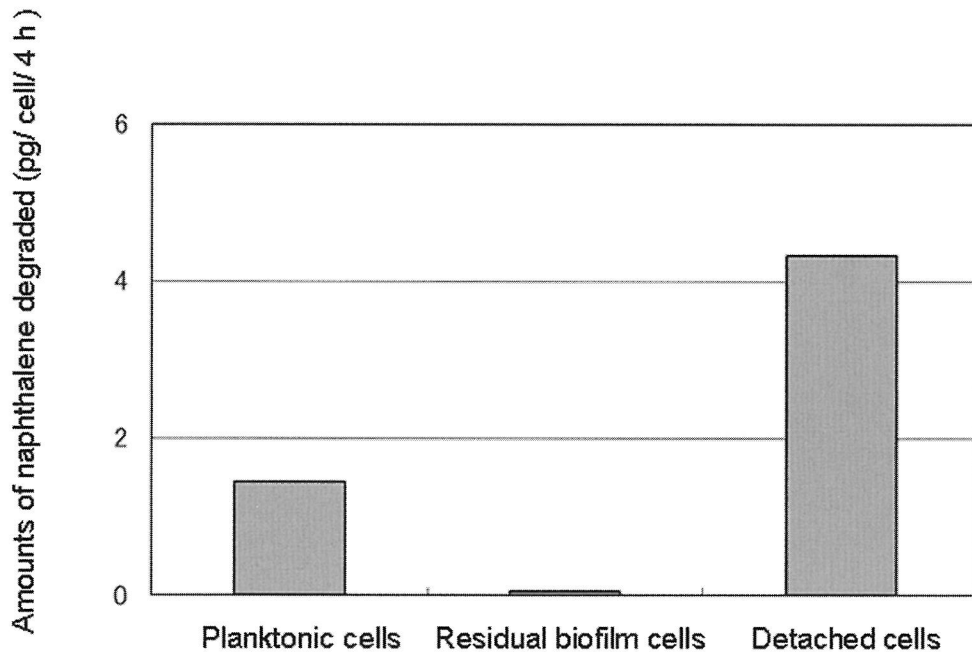


Fig. 9 Naphthalene degradation activities of planktonic cells, residual biofilm cells, and detached cells.

る細菌はバイオフィームを形成するものが多いという報告があり、バイオフィームを形成することによって基質の蓄積を行うと考えられている (Johnsen & Karlson, 2004; Johnsen *et al.*, 2005)。また、*P. stutzeri* のバイオフィームがフェノール分解に有用であるという研究もある (Viggiani *et al.*, 2006)。反面、バイオフィームは生物活性が低下した半休眠状態である可能性も高いため、積極的に目的物質を分解する状態ではなく、環境ストレスや飢餓ストレスなどに対応するための生存手段と捉えることもできる。

今回用いた細菌について、培養温度や使用する容器、培地などを変更してバイオフィーム形成量を調べた。その結果、T102 は Y 培地を用いた時に最も丈夫なバイオフィームを形成したが、他の菌株はどのような条件でもほとんどバイオフィームを形成しなかった。そのため、これらの菌株は元々バイオフィームを形成しないか、実験室での継続培養によりバイオフィーム形成能を失った可能性がある。

**T102 浮遊細胞とバイオフィーム細胞の石油汚染土壤中での定着率** T102 はバイオフィーム状態で石油汚染土壤中に混ぜ込むと、浮遊細胞よりも遥かに高い生存率、定着率を示した。これは、実際の汚染現場ではバイオフィームを利用した方が従来の方法よりも、汚染現場における定着率が高くなるという作業仮説を提唱する。この生存率の高さは、バイオフィームの高いス

トレス抵抗性に由来すると考えられる (Morikawa, 2006; Potera, 1996; Davey & O'Toole, 2000; Harrison *et al.*, 2007)。導入微生物の生物活性が低下する主要な要因として原生動物による捕食が挙げられるが、担体などに包埋し高次構造をとらせた細菌は捕食に対して高い耐性を持つことが知られている (Terry *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2006)。バイオフィームも高密度に密集しているため (Fig. 3)、担体を利用した場合と同様に、他の微生物からの捕食に対して高い抵抗性を獲得し、これが T102 の高い生存率につながったと考えられる。

**T102 を植菌した石油汚染土壤の菌叢** T102 を植菌した石油汚染土壤における菌叢を何も植菌しなかった土壤の菌叢と比較したところ、顕著な違いは観察されなかった (データ示さず)。これは、T102 バイオフィームをこの石油汚染土壤中へ植菌して定着させても、土壤中の微生物生態系へ与える影響が小さいことを示している。外部から単離した細菌を導入するバイオオーグメンテーション技術には、導入した細菌による菌叢の変化などの危険性が指摘されている (Boon *et al.*, 2000; Viñas *et al.*, 2005; Ueno *et al.*, 2006)。外来微生物を導入した場合に菌叢を変化させる要因として、導入した菌が抗生物質を生産する場合がある。中でもラムノリピッドやピオシアニンなどの抗生物質を生産する細菌を土壤へと導入した場合に菌叢が大きく

変化する (Ueno *et al.*, 2006) . そのため, T102 はこれらの物質を生産しない, もしくは土壌中にいる際にはあくまで休眠状態を取っており, 他の微生物に影響を与えない状態になっていると考えられる.

純粋培養系における T102 浮遊細胞とバイオフィーム細胞のナフタレン分解活性 純粋培養系において, バイオフィーム細胞を植菌したサンプルはナフタレン分解前にラグタイムを示す (Fig. 6-8) . これは, バイオフィームから *nahA* を高発現した浮遊細胞が遊離するための時間だと考えられる. *nah* 遺伝子群を持つ *Pseudomonas* 属の中の一部の菌株はナフタレンの分解を始めるまでに10時間前後のラグタイムを示す (Takizawa *et al.*, 1999) . しかし, T102 は浮遊細胞, バイオフィーム細胞ともにナフタレン添加前から *nahAc* を発現していた (Fig. 7) . よって, このラグタイムは発現の遅れによるものではない.

バイオフィームサンプルがナフタレンを急速分解する際には, 高いナフタレン分解活性を持つ浮遊細胞がバイオフィームから遊離していた (Fig. 8) . さらに, バイオフィーム細胞はナフタレン分解活性をほとんど示さないことがわかった (Fig. 9) . ここから, ナフタレン分解において大きな役割を果たしているのは遊離浮遊細胞で, 遊離浮遊細胞が放出されるまでの時間がラグタイムであると考えられる.

バイオフィーム内では同調的で速やかなシグナル伝達が起こることが知られている (Potera, 1996; Davey & O'Toole, 2000) . さらに, *nahA* をはじめとするナフタレン分解遺伝子群はナフタレン分解上流経路の最終産物であるサリチル酸の存在下で *nahR* によって転写量が高度に増加することが報告されている (Habe & Omori, 2003) . そのため, バイオフィーム内でナフタレン分解活性の高い個体が発生すると, 代謝物であるサリチル酸による急速なシグナル伝達が行なわれる可能性が高い. その結果, バイオフィーム内の個体群のナフタレン分解酵素遺伝子群の転写活性が次々と促進され, ナフタレン分解高活性の細胞数が急速に上昇する. そして, これらの高活性個体がバイオフィームから次々放出されたと考えられる.

一方, ナフタレン分解の初期反応には酸素が不可欠なため, ナフタレン代謝には好気的な環境が適している. バイオフィームは規則正しい格子構造をとり, バイオフィーム内での酸素の利用効率を高めるという報告があるが (Davey & O'Toole, 2000) , 純粋な酸素の利用効率を考慮すると明らかに浮遊細胞の方が有利である. さらに, ナフタレン代謝には活性酸素種 (ROS) が発生し, これが蓄積すると分解活性が抑制

されることも知られている (Kang *et al.*, 2007) . 細胞が密集したバイオフィーム状態ではナフタレン代謝の際に ROS が高い濃度で蓄積する可能性が高く, これは代謝活性の低下につながってしまうと考えられる. これらのことより, バイオフィーム内の個体がナフタレン分解を行なう際に遊離するのは合目的であると考えられる.

## 要 約

本研究では, バイオフィーム高形成ナフタレン分解細菌である *Pseudomonas stutzeri* T102 バイオフィームが汚染土壌中へ安定に定着するだけでなく, 高いナフタレン分解活性を持つ遊離浮遊細胞の供給源となることを示した. このように, バイオフィームの有用性を示すだけでなくバイオフィーム状態における分子メカニズムを解析することは, 実際にバイオレメディエーション技術において導入細菌の活性を制御するために大きな役割を果たすと考えられる. 従来の研究では, 優良細菌を担体に包埋する固定化菌体法が効果的であることが知られていたが, 有効性のメカニズムはほとんど理解されていない (Terry *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2006) . そのため, T102 という単一の菌体がバイオフィームという凝集状態を形成させた際に有用性が高まるという知見は大変興味深いことであり, 固定化菌体法の分子メカニズムの理解に貢献することが期待される.

## 本助成で得られた研究成果の報告

- 1) Hosokawa R, Nagai M, Morikawa M, Okuyama H. (2009). Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 1519-1528.
- 2) Iijima S, Washio K, Okahara R, Morikawa M. (2009). Biofilm formation and proteolytic activities of *Pseudoalteromonas* bacteria that were isolated from fish farm sediments. *Microbial Biotechnol.* **2**: 361-369.
- 3) Lim SP, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. (2009). Flexible exportation mechanisms of arthrofactin in *Pseudomonas* sp. MIS38. *J. Appl. Microbiol.* **107**: 157-166.
- 4) Ito H, Hosokawa R, Morikawa M, Okuyama H. (2008). A turbine oil-degrading bacterial consortium from soils of oil fields and its characteristics. *Int. Biodeter. Biodegr.* **61**: 223-232.
- 5) Takei D, Washio K, Morikawa M. (2008). Identification of alkane hydroxylase genes in *Rhodococcus* sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane. *Biotechnol. Lett.* **30**: 1447-1452.

## 保存機関に寄託した菌株

- 1) *Rhobiginosimarina momoshnimaensis* NBRC 101843 栽培漁業場底泥バイオフィームから単離した新属細菌. *Microbial Biotechnol.* **2**: 361-369.
- 2) *Pseudoalteromonas* sp. SB-B1 NBRC105233 栽培漁業場底泥バイオフィームから単離した、バイオフィーム依存的にプロテアーゼを生産する. *Microbial Biotechnol.* **2**: 361-369.
- 3) *Pseudomonas stutzeri* T102 NBRC105234 原油備蓄タンク底泥から単離したナフタレン分解細菌. 高いバイオフィーム形成能を有する. *Biosci Biotechnol Biochem.* **68**: 557-564.
- 4) *Rhodococcus* sp. TMP2 NBRC105241 水田より単離した分枝状アルカンを分解する細菌. *J. Biotechnol.* **115**: 129-136.

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なる助成を賜りました財団法人発酵研究所に厚く御礼申し上げます。本論文は、北海道大学大学院環境科学院の嶋田恒平君の修士論文をもとに作成しました。また論文の編集協力者である本間恵美さんに感謝いたします。

## 文献

- Boon, N., Goris, J., De, Vos, P., Verstraete, W. & Top, E. M. (2000). Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading comamonas testosterone strain, I2gfp. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2906-2913.
- Bouchez, T., Patureau, D., Dabert, P., Juretschko, S., Dore, J., Delgenes, P., Moletta, R. & Wangner, M. (2000). Ecological study of bioaugmentation failure. *Environ. Microbiol.* **2**: 179-190.
- Davey, M. E. & O'Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 847-867.
- Habe, H. & Omori, T. (2003). Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 225-243.
- Harrison, J. J., Ceri, H. & Turner, J. R. (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 928-938.
- Hirano, S., Kitauchi, F., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M. & Kanaya, S. (2004). Isolation and characterization of *Xanthobacter polyaromaticivorans* sp. nov. 127W that degrades polycyclic and heterocyclic aromatic compounds under extremely low oxygen conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 557-564.
- Johnsen, A. R. & Karlson, U. (2004). Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 452-459.
- Johnsen, A. R., Wick, L.Y. & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* **133**: 71-84.
- Kanamori, T., Rashid, N., Morikawa, M., Atomi, H. & Imanaka, T. (2002). *Oleomonas sagaranensis* gen. nov., sp. nov., represents a novel genus in the  $\alpha$ -proteobacteria. *FEMS Lett.* **217**: 255-261.
- Kang, Y., Lee, Y., Jung, H., Jeon, C., Mdsen, L. E. & Park, W. (2007). Overexpressing antioxidant enzymes enhances naphthalene biodegradation in *Pseudomonas* sp. strain As1. *Microbiology.* **153**: 3246-3254.
- Kato, T., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M. & Kanaya, S. (2001). Isolation and characterization of psychrotrophic bacteria from oil reservoir water and oil sands. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 794-800.
- Koteswara, R. G. & Martin, A. (1990). Explanation for the decline of bacteria introduced into lake water. *Microb. Ecol.* **20**: 231-244.
- Kunihiro, N., Haruki, M., Takano, K., Morikawa, M. & Kanaya, S. (2005). Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. strains TMP2 and T12 that degrade 2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane (pristane) at moderately low temperatures. *J. Biotechnol.* **115**: 129-136.
- McKew, B. A., Coulon, F., Yakimov, M. M., Denaro, R., Genovese, M. & Smith, C.J. et al. (2007). Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ. Microbiol.* **9**: 1562-1571.
- Morikawa, M. (2006). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *J. Biosci. Bioeng.* **101**: 1-8.
- Pandey, G. & Jain, R. K. (2002). Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5789-5795.
- Park, J. W. & Crowley, D. E. (2006). Dynamic changes in *nahAc* gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 1322-1329.
- Potera, C. (1996). Biofilms invade microbiology. *Science.* **273**: 1795-1797.
- Rahman, R. N., Ghazali, F. M., Salleh, A. B. & Basri, M. (2006). Biodegradation of hydrocarbon contamination by immobilized bacterial cells. *J. Microbiol.* **44**: 354-359.
- Singh, R., Paul, D. & Jain, R. K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol.* **14**: 389-397.
- Takizawa, N., Iida, T., Sawada, T., Yamauchi, K., Wang,

- Y., Fukuda, M. & Kiyohara, H. (1999). Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Biosci. Bioeng.* **87**: 721-731.
- Terry, J. G., Christopher, R. & Ian, L. P. (2004). New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Tech.* **34**: 447-494.
- Thompson, I. P., van der Gast, C. J., Ciric, L. & Singer, A. C. (2005). Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ. Microbiol.* **7**: 909-915.
- Ueno, A., Ito, Y., Yamamoto, Y., Yumoto, I. & Okuyama, H. (2006). Bacterial community changes in diesel-oil-contaminated soil microcosms biostimulated with Luria-Bertani medium or bioaugmented with a petroleum-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. *J. Basic. Microbiol.* **46**: 310-317.
- Viggiani, A., Olivieri, G., Siani, L., Di, Donato, A., Marzocchella, A., Salatino, P., Barbieri, P. & Galli, E. (2006). An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. *J. Biotechnol.* **123**: 464-477.
- Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M. J. & Solanas, A. M. (2005). Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7008-7018.
- Vogel, T. M. (1996). Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 311-316.

## III型分泌装置のWalker型ATPaseを中心とした タンパク質分泌メカニズム

林 史 夫

群馬大学大学院工学研究科応用化学・生物化学専攻

〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1

### Analysis of the Type III export mechanism based on the Walker-type ATPase

Fumio Hayashi

Department of Chemistry and Chemical Biology, Graduate School of Engineering,  
Gunma University

1-5-1, Tenjin-cho, Kiryu-shi, Gunma 376-8515, Japan

Type III protein export systems are biological nanomachines used by a broad range of gram-negative bacteria. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) constructs flagellar filaments using a Type III flagellar export apparatus, swims toward a preferable environment, and delivers virulence factor proteins into a eukaryotic host cell using a Type III secretion system (T3SS). In this study, we focused on the ATPase which is a member of the Type III protein export system, and aim to reveal the protein export mechanism by quantitative analyses of the ATPase activity. We purified T3SS-specific ATPase - InvC - and flagellar-specific ATPase - FliI -, and demonstrated that their positive co-operative ATPase activities, low turnover numbers, and low affinities for ATP. The ATPase activity was stimulated by the presence of phospholipids even if the protein concentration was relative low. It is suggested that this regulating mechanism of the ATPase activity by the interaction with phospholipids prohibits overconsumption of ATP by InvC and FliI not associated with an inner membrane, *in vivo*. In the tests of the effect of FliS (a chaperon in the flagellar export apparatus), FliC (a transported protein in the flagellar export apparatus), or FliS-FliC complex to FliI ATPase activity in the absence or presence of phospholipids, the ATPase activity was detected when FliI interacted with both phospholipids and FliC (including FliS-FliC complex). This suggests that when the condition to insert FliC into a transport channel was set up, FliI ATPase activity is expressed. The effect of SicP (a chaperon in the T3SS), SptP (an effector in the T3SS), or SicP- SptP complex to InvC ATPase activity was not examined because the large amount of SptP was not prepared. However, it seems that the effect of SptP or SicP- SptP complex to InvC ATPase is different from that of FliC or FliS-FliC complex to FliI ATPase, because the effect of SicP to InvC was different from that of FliS to FliI. In conclusion, based on the quantitative analyses of the ATPase activity, we revealed the novel regulation mechanisms. Furthermore, SlyD (peptidyl prolyl cis-trans isomerase) was identified as a candidate for InvC ATPase activator.

Key words: T3SS, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, InvC, ATPase, phospholipids

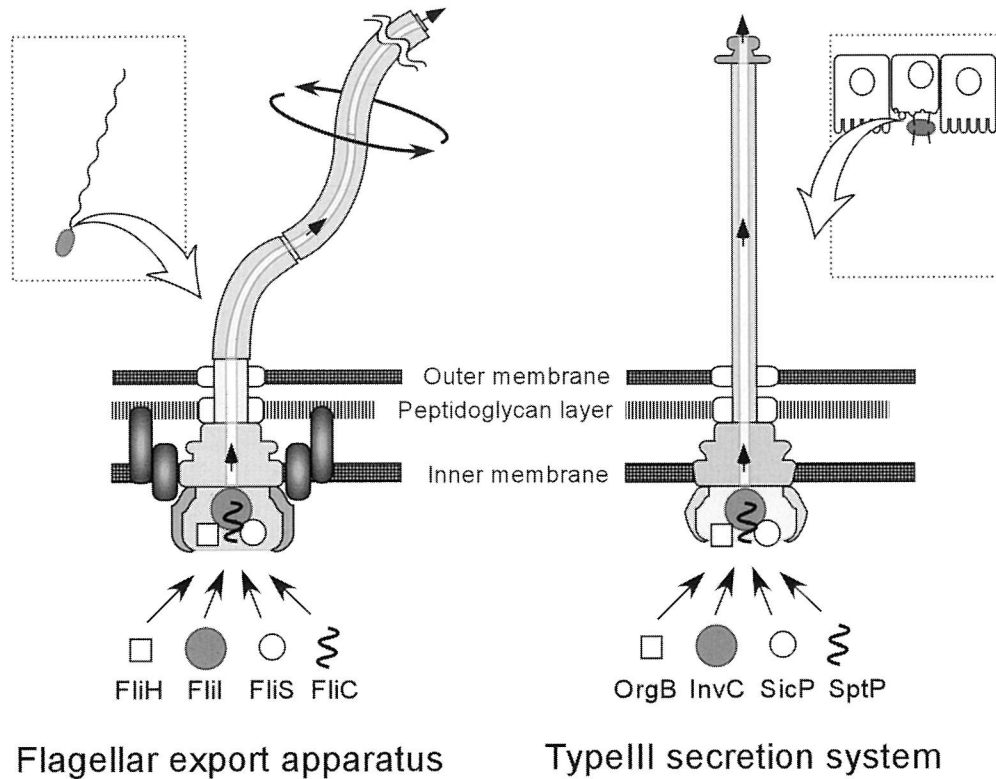
### 緒 言

III型タンパク質輸送装置はグラム陰性細菌が菌体

E-mail: hayashi@chem-bio.gunma-u.ac.jp

共同研究者：大澤研二（群馬大学大学院工学研究科応用化学・生物化学専攻）

内から菌体外へタンパク質を輸送するナノサイズの装置である。III型タンパク質輸送装置はべん毛輸送装置とIII型分泌装置（T3SS）が知られている（Fig. 1）。*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)などはべん毛輸送装置を使いべん毛繊維を構築し、好ましい環境に移動し、適切な環境ではT3SSを使いエフェクターを宿主細胞に注入して感



**Fig. 1** Type III protein export systems of *salmonella*. The virulence-associated type III secretion systems (T3SSs) deliver virulence protein factors into eukaryotic host cells, and the flagellar protein export apparatus is required for flagellar assembly and motility. Virulence protein factors (SptP in this figure) and flagellin (FliC in this figure) are exported by collaboration among the Walker-type ATPases (InvC and FliI), the chaperons (SicP and FliS), the ATPase-regulating proteins (OrgB and FliH), and other proteins.

染の成立に導く。平成20年の細菌性食中毒患者数は約10,000人に及び、そのうちサルモネラが原因だった患者数は約2,500人（国立感染症研究所感染症情報センター食中毒統計調査資料）、また、O157に代表される腸管出血性大腸菌の感染症報告数は年間3,000から4,000件で推移している（厚生労働省感染症発生動向調査）。

*S. Typhimurium* の T3SS を構成する可溶性のタンパク質には、T3SS 特異的 ATPase (InvC)、T3SS 特異的シャペロン (SicP など)、輸送されるタンパク質エフェクター (SptP など)、ATPase 活性制御タンパク質 (OrgB など) がある。InvC は Walker 型の ATPase で、内膜サイトゾル側のナノ注射器入り口付近に局在し、タンパク質の分泌に直接関係していると考えられている (Akedo & Galan, 2004)。SicP は細胞質中で SptP と複合体を形成し、SptP の安定性維持や分泌システムへの誘導を担っている (Stebbins & Galan, 2001, Galan & Wolf-Watz, 2006)。SptP はナノ注射器によって宿主細胞に注入され正常な宿主細胞

のシグナル伝達を攪乱する病原性のタンパク質である (Kubori & Galan, 2003)。OrgB は FliH との相同性から ATPase 活性制御タンパク質といわれている (Aguirre *et al.*, 2006)。実際 InvC と相互作用するが (Akedo & Galan, 2004)、ATPase 活性にどのような効果を示すかは不明である。FliH とはべん毛輸送装置における特異的 ATPase-FliI に作用し、その活性を阻害する可溶性タンパク質である (Minamino & MacNab, 2000)。InvC と FliI、OrgB と FliH が示すように、T3SS とべん毛輸送装置の構成タンパク質の多くが相同性を持ち (Brito *et al.*, 2004)、装置の構造も似ている (Cornelis, 2006)。べん毛輸送装置における特異的シャペロンは FliS など、輸送されるタンパク質は FliC などである。

1998年に *S. Typhimurium* の T3SS の超分子構造が発表されて以降 (Kubori *et al.*, 1998)、細菌の病原性解明のため、病原性タンパク質とそれが引き起こす病態の研究が精力的に行われてきた。一方、ナノサイズ注射器による病原性タンパク質分泌メカニズムの解

明に向けた報告は少ない。ましてや、定量性を伴った報告は非常に限られている。筆者らは T3SS 特異的 ATPase に着目し、InvC を大量調製し、細胞質膜の代用品である極性リポソーム（リン脂質）や SicP, SptP などのタンパク質因子によって、InvC の ATPase 活性がどのように変化するか、試験管内での詳細な定量的解析を行い、III 型分泌装置の分泌メカニズムの解明を目指した。また、べん毛輸送装置特異的 ATPase FliI に対してもリン脂質、FliS, FliC などのタンパク質因子の効果を実験し、T3SS との相同性、相違性も論じたい。

## 実験方法

**プラスミド構築** *S. Typhimurium* ゲノムを鋳型として、InvC, OrgB, SicP, SptP, SptP<sub>1-158</sub> のコード領域を各々 PCR で増幅した。FliI と FliS の大量発現プラスミドは難波教授（大阪大学）からいただいた。InvC と OrgB はタンパク質発現プラスミド pET-19b の *NdeI*, *BamHI* 部位に、SicP, SptP, SptP<sub>1-158</sub> はタンパク質発現プラスミド pET-3c の *NdeI*, *BamHI* 部位に挿入した。その際、InvC については、そのコード領域中に *NdeI* 部位があったため、InvC の一次構造が維持されるように部位特異的変異導入法で DNA 塩基配列を改変した。また、SptP と SptP<sub>1-158</sub> は、Ni-NTA ビーズを利用した精製を可能にするため、C 末端に 6 残基の His が付加するよう DNA 塩基配列を改変した。

***S. Typhimurium* InvC, FliI, SicP, FliS, FliC と *E. coli* SlyD の調製** InvC, FliI, SicP, FliS, OrgB, SptP, SptP<sub>1-158</sub> の発現プラスミドを、それぞれタンパク質発現用 *E. coli* BL21(DE3)pLysS 株に移入した。菌株の大量培養には 50 µg/ml のアンピシリンと 35 µg/ml のクロラムフェニコールを含む LB 液体培地（1% トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 1% NaCl）もしくは TB 液体培地（1.2% トリプトン, 2.4% 酵母エキス, 0.4% グリセロール, 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 72 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>）を用い、20°C もしくは 37°C で培養し、目的タンパク質の大量発現には 0.1 mM もしくは 1 mM IPTG 処理を施した。

InvC と FliI の調製は同じ方法を適用した。大量培養後の形質転換体を集菌し、50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT を含む Tris-HCl (pH 8.0) バッファーで再懸濁し、超音波処理で細胞を破碎し、遠心分離で粗抽出画分を得た。Ni-NTA agarose (Qiagen) で粗精製した後、Resource Q (GE Healthcare

Bioscience) によるイオン交換クロマトグラフィー、Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Bioscience) によるゲルろ過クロマトグラフィーで完全に精製した。

SicP と FliS の調製はほぼ同じ方法を適用した。大量培養後の形質転換体を集菌後、Phosphate buffered saline (PBS) で再懸濁し、超音波処理で細胞を破碎し、遠心分離で不溶性画分を得た。不溶性タンパク質を 8 M Urea, 10 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) バッファーで可溶化し、超遠心分離により可溶性画分を得た後、Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare Bioscience) によるゲルろ過クロマトグラフィーでタンパク質を巻き戻しつつ精製した。FliS は以上の操作で完全に精製され、SicP は更に Resource Q (GE Healthcare Bioscience) によるイオン交換クロマトグラフィー、Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare Bioscience) によるゲルろ過クロマトグラフィーで完全に精製した。

FliC は *S. Typhimurium* SJW1103 株を大量培養し、集菌後、ブレンダーでべん毛繊維を菌体から切り外し、遠心によりべん毛繊維画分を調製した。熱処理（65°C, 5 分間）により、べん毛繊維を単量体化させ、その他の不要タンパク質の多くを変性させた。その後、超遠心で得られた上清画分を HiLoad 26/10 Q Sepharose HP (GE Healthcare Bioscience) で展開し、FliC を精製した。

*E. coli* SlyD の調製は InvC 大量発現用大腸菌株を IPTG 処理をせず培養し、超音波処理と遠心分離で粗抽出画分を得た後、Ni-NTA agarose (Qiagen), Resource Q (GE Healthcare Bioscience), Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Bioscience) によるクロマトグラフィーで精製した。

目的タンパク質の精製度は SDS-PAGE で評価し、N 末端アミノ酸配列解析法で精製標品が目的タンパク質であることを確認した。タンパク質の定量はウシ血清アルブミン溶液をタンパク質濃度標準液とし、プロテインアッセイキット (BIO-RAD) に従った。

OrgB, SptP, SptP<sub>1-158</sub> の可溶性画分からの調製ではそれらタンパク質の凝集性から、不溶性成分からの調製では最適な巻き戻し条件決定の困難さから天然型タンパク質を大量に調製することはできなかった。

**ATPase 活性の測定** ATPase 活性の測定は (Minamino & MacNab, 2000) の方法に基づき、幾つかの変更を加えた。

InvC と FliI は様々な濃度の ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 30 mM NH<sub>4</sub>Cl, 30 mM KCl, 150 mM



NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) バッファーと、また、必要に応じて他種のタンパク質やリン脂質と共に、37°C で30分間反応させた。その反応液の一部と BIOMOL GREEN REAGENT (BIOMOL) とを室温で20分間反応させた後、 $A_{620}$  を測定した。標準試料は BIOMOL GREEN REAGENT に付属のリン酸標準液を用いた。

ATPase 活性の速度論的解析は、Sigma plot 10 (Systat Software Inc) を用いて非線形カーブフィッティング解析で行った。

**InvC と SlyD との相互作用解析** InvC (4 $\mu$ M) と SlyD (4 $\mu$ M) は 10 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) バッファー中で混合し、37°C で30分間反応させた。その後、10 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) バッファーで平衡化した Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Bioscience) で展開し、各溶出画分の 0.4 ml もしくは 0.8 ml を TCA 沈澱し、その全量を SDS-PAGE で展開した。

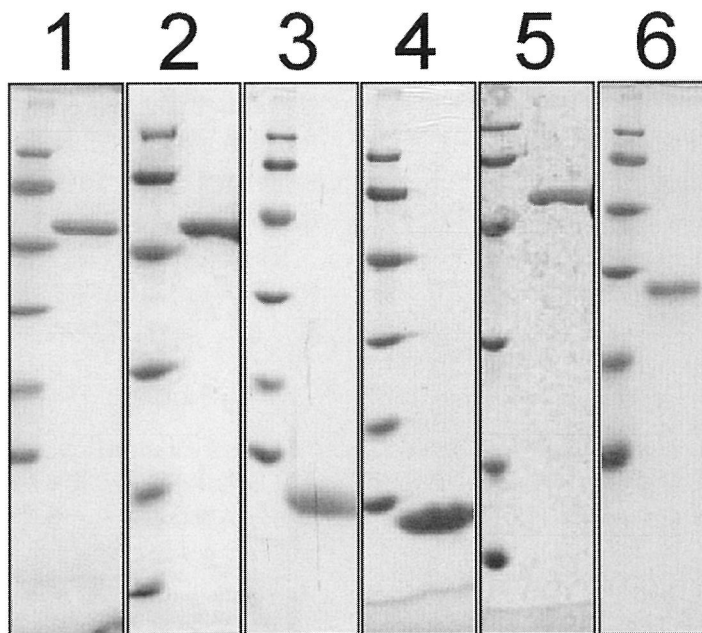
また、ATP と MgCl<sub>2</sub> を含まない反応溶液で同様の解析を行った。この時、ゲルろ過クロマトグラフィーには ATP と MgCl<sub>2</sub> を含まないバッファーを用いた。

**fliI 自然突然変異体**、それらを親株とした自然復帰突然変異体の単離 *S. Typhimulium* SJW1103 株の LB 液体培養標品に  $\chi$ -ファージ (運動性菌にのみ感染する) を添加し、半流動培地 (1% トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 1% NaCl, 0.3% 寒天, 8% ゼラチン) に画線した。37°C の終夜培養で出現したコロニーを運動性突然変異体とし、それら変異体と *fliI* 突然変異指標株との間で P22 ファージを用いた形質導入による交雑実験を行い、*fliI* に突然変異を持つ株を単離した。

*fliI* 突然変異体を半流動培地に植菌し 37°C で培養した。1日~数日後に植菌場所から出現したスウォームの外縁部から菌体を採取し、それを復帰体として保管した。

## 結 果

**InvC と FliI の ATPase 活性** *S. Typhimulium* InvC は 431 アミノ酸残基から成り (推定分子量 47.6 kDa), Walker motif を持つ Walker 型の ATPase である。我々は *S. Typhimulium* InvC の大量発現系を構築し、3段階のカラムクロマトグラフィーにより単量体型の InvC を精製した (Fig. 2)。精製した InvC は 4°C で保存しても24時間以降は凝集する



**Fig. 2** SDS-PAGE of the purified proteins. Panel 1, 2, 3, 4, 5, and 6 correspond to InvC, FliI, SicP, FliS, FliC, SlyD, respectively. In each panel, the right lane and the left lane are the purified protein and molecular weight markers (97.2, 66.4, 45.0, 29.0, 20.1, 14.3 kDa), respectively.

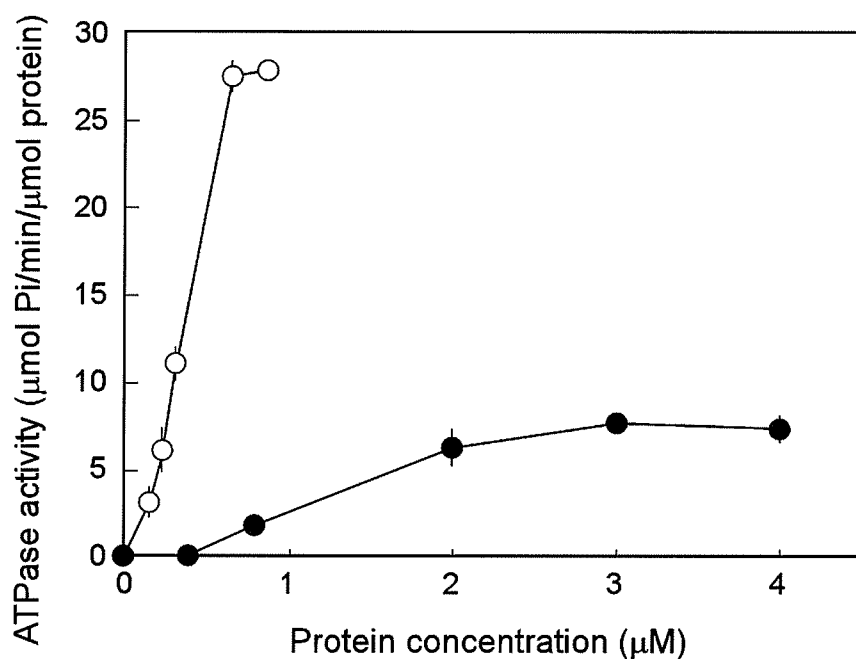


Fig. 3 Dependence of the ATPase activities of InvC (closed circle) and FliI (open circle) on protein concentration. The specific ATPase activity was measured at the various concentrations of protein. These data are average of three independent experiments. Vertical bars on plotted data are standard deviation.

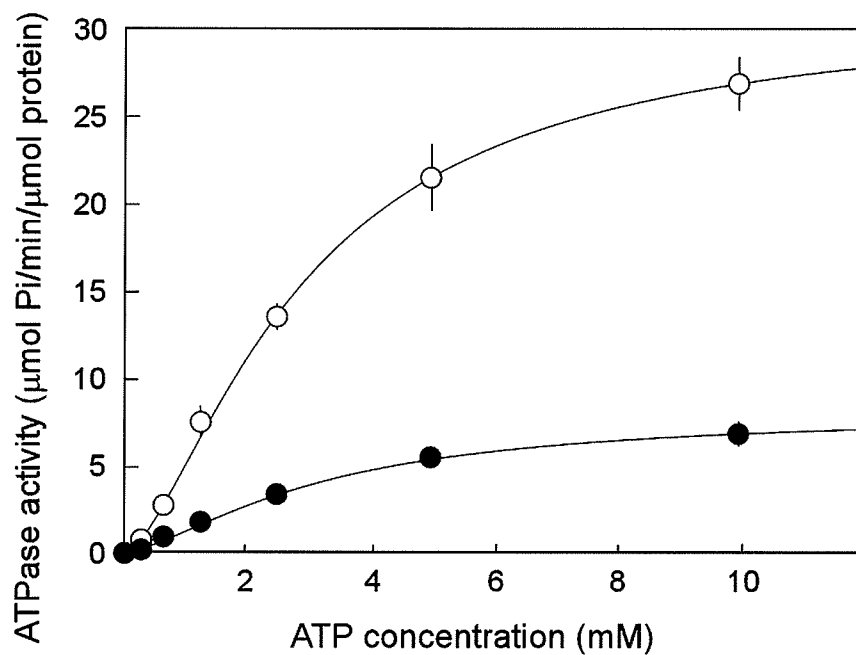


Fig. 4 Dependence of the ATPase activities of InvC (closed circle) and FliI (open circle) on ATP concentration. The specific ATPase activity was measured at the various concentrations of protein. These data are average of three independent experiments. Vertical bars on plotted data are standard deviation.

Table 1 Summary of kinetics parameters.

	InvC			FliI		
Concentration ( $\mu\text{M}$ )	4.0	4.0	0.8	0.64	0.64	0.32
Phospholipid ( $\mu\text{g/ml}$ )	---	800	800	---	200	200
$K_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	0.13	0.14	0.17	0.52	1.6	1.4
$K_{\text{m}}$ (mM)	3.2	3.5	4.3	2.9	3.9	3.2
$K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$4.0 \times 10$	$4.0 \times 10$	$4.0 \times 10$	$1.8 \times 10^2$	$4.1 \times 10^2$	$4.4 \times 10^2$
Hill coefficient	1.5	1.6	1.6	1.5	1.9	1.9

傾向が認められたため、種々の解析は精製後24時間以内に限定した。

最初に InvC の濃度依存的な ATPase 活性を調べた (Fig. 3) . 反応液中の InvC 濃度を 0 から 4 mM に増加させた時、ATPase 活性は InvC 濃度  $0.8\mu\text{M}$  から  $3\mu\text{M}$  にかけてシグモイド状に上昇し、3 mM 以上で一定になった。このことは単量体型の InvC が多量体を形成し、活性の上昇を制御する正の協同性能があることを示した。同様に、FliI の ATPase 活性も FliI 濃度の増加に伴いシグモイド状に上昇した (Fig. 3) . 最大活性は FliI が  $27.7\mu\text{mol/min}/\mu\text{mol protein}$  であることにに対し、InvC は  $7.6\mu\text{mol/min}/\mu\text{mol protein}$  であり、また、最大活性を示すタンパク質濃度が FliI は  $0.8\mu\text{M}$  であることにに対し、InvC は  $3\sim 4\mu\text{M}$  だった。このように、InvC の重合体形成能と最大活性の低さは、InvC はエフェクター等のタンパク質分泌速度を遅くしている仕組みであるように思える。

InvC において、活性が安定的に高かった濃度 ( $4\mu\text{M}$ ) で速度論的解析を行った (Fig. 4, Table 1) . この時のヒル係数 (1.5) は、InvC がアロステリック酵素であることと多量体の形成を示唆した。ただし、実際の多量体型 InvC はゲルろ過クロマトグラフィー法、光散乱測定法、ケミカルクロスリンク法では確認できず、多量体型 InvC は離散しやすく非常に不安定であると推測できた。

求められた分子活性 ( $k_{\text{cat}}$ ) は  $0.13\text{ s}^{-1}$  で、これは 1 分子の ATP の加水分解に 7~8 秒もの時間が必要であることを示している。また、ATP に対する  $K_{\text{m}}$  値は  $3.8\text{ mM}$  だった。例えば、ATP を基質とする  $F_1\text{-ATPase}$  の分子活性が  $77\text{ s}^{-1}$  であること、ATP に対する  $K_{\text{m}}$  値が  $0.5\text{ mM}$  であること (Jault *et al.*, 1996) とを比較すると、InvC の分子活性は非常に小さく、

ATP に対する  $K_{\text{m}}$  値は非常に大きいことがわかる。一方で、*Pseudomonas syringae* や *Escherichia coli* の T3SS 特異的 ATPase である HrcN や EscN の分子活性はそれぞれ  $0.052\text{ s}^{-1}$  と  $0.35\text{ s}^{-1}$  である (Pozidis *et al.*, 2003, Andrade *et al.*, 2007) ことから、遅い ATP 加水分解速度は T3SS 特異的 ATPase の共通の特徴であると考えられる。また、HrcN, EscN の  $K_{\text{m}}$  値はそれぞれ  $0.1\text{ mM}$ ,  $0.9\text{ mM}$  と報告され (Pozidis *et al.*, 2003, Andrade *et al.*, 2007) , *Yersinia enterocolitica* の T3SS 特異的 ATPase である YscN のキネティクス解析では  $K_{\text{m}}$  値が算出されていないが、グラフから約  $7.9\text{ mM}$  と読み取ることができ (Blaylock *et al.*, 2006) , 筆者らが明らかにした *S. Typhimulium* の InvC の  $K_{\text{m}}$  値 ( $3.2\text{ mM}$ ) を含めて考えると、T3SS 特異的 ATPase の ATP に対する親和性は一様でないと考えられる。

InvC の  $K_{\text{m}}$  値 ( $3.2\text{ mM}$ ) は二つの問題を提示した。一つは、細胞内の ATP 濃度が  $2\sim 3\text{ mM}$  であることから、InvC は最大の活性を発揮することできないこと、二つめは更に深刻で、ATP に対して高い親和性を示す他のタンパク質との ATP の取り合いに負け、実際の菌体中では InvC はほとんど ATP の加水分解ができない、と言う問題である。これら問題の解決には、局所的に ATP 濃度の高い空間ができ、その空間では ATP を利用するタンパク質が InvC しか存在しない、といった環境が菌体内中に作られるか、InvC の ATP に対する親和性が向上するかのどちらかを考えなければいけない。InvC の触媒効率 ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ) が  $4.0 \times 10\text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  と小さく、これは基質の拡散以外の要因によって InvC の ATPase 活性が規定されていることを示唆している。触媒効率は分子活性もしくは親和性の上昇により向上するので、これら二つを上昇さ

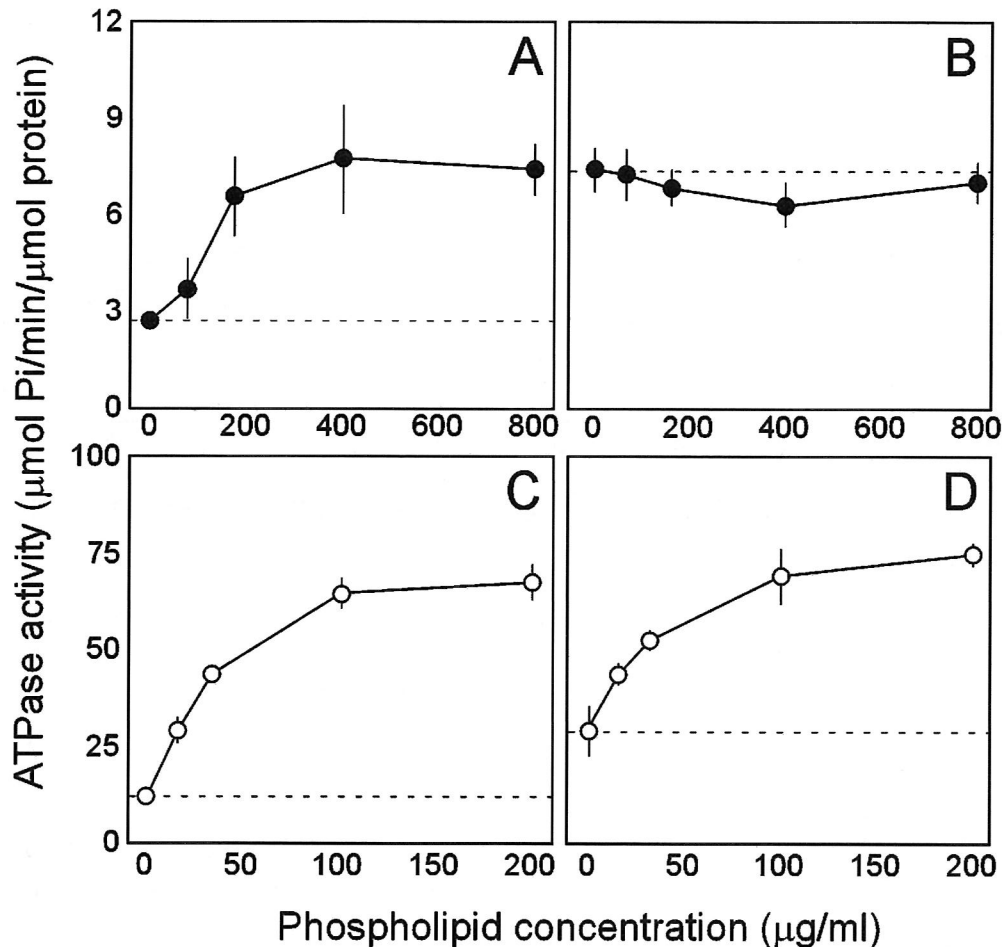


Fig. 5 Effects of various concentrations of phospholipids to the ATPase activities of InvC (closed circle) and FliI (open circle). The specific ATPase activity of 0.8  $\mu$ M (panel A) and 4.0  $\mu$ M (panel B) InvC and 0.32  $\mu$ M (panel C) and 0.64  $\mu$ M (panel D) FliI was measured at the various concentrations of phospholipids. These data are average of three independent experiments. Vertical bars on plotted data are standard deviation.

せる因子があると考えられた。

FliI において、活性が安定的に高かった濃度 (0.64  $\mu$ M) での速度論的解析の結果は、分子活性が InvC のそれと比べて約 4 倍大きく、ヒル係数、ATP に対する Km 値はほぼ同じであった (Table 1)。

**ATPase 活性の制御：InvC に対するリン脂質の効果**  
*S. Typhimulium* において、InvC と内膜との相互作用が報告されている (Akeda & Galan, 2004)。筆者らは、細胞膜との相互作用が InvC の分子活性や ATP に対する親和性を向上させる因子の一つではないかと考え、大腸菌の極性脂質 (リン脂質) 抽出物からリポソームを調製し、ATPase アッセイに用いた。

InvC の多くが多量体を形成している (「多量体形成率が高い」と呼ぶ) とされる濃度 (4  $\mu$ M) の時、

ATPase 活性はリン脂質濃度にかかわらず一定だった (Fig. 5)。一方、InvC が多量体をほとんど形成していない (「多量体の形成率が低い」と呼ぶ) とされる濃度 (0.8  $\mu$ M) の時、リン脂質濃度の増加に伴い ATPase 活性も増大し、リン脂質濃度が 400  $\mu$ g/ml 以上で、InvC 濃度が 4  $\mu$ M の時の活性とほぼ同じになった (Fig. 5)。また、400  $\mu$ g/ml リン脂質存在下での 0.8  $\mu$ M InvC と、リン脂質の存在に関わらず 4  $\mu$ M InvC とでは分子活性、ATP に対する親和性はほぼ同じであった (Table 1)。つまり、InvC 濃度が低くても膜との相互作用により、高い InvC 濃度と同等の活性を発揮できることを示した。このことは、菌体内で低濃度の InvC を発現しておけば、内膜と相互作用するまでは ATPase 活性をほとんど発揮せず、内膜と相互作用すると ATPase は活性化され ATPase 活性を発

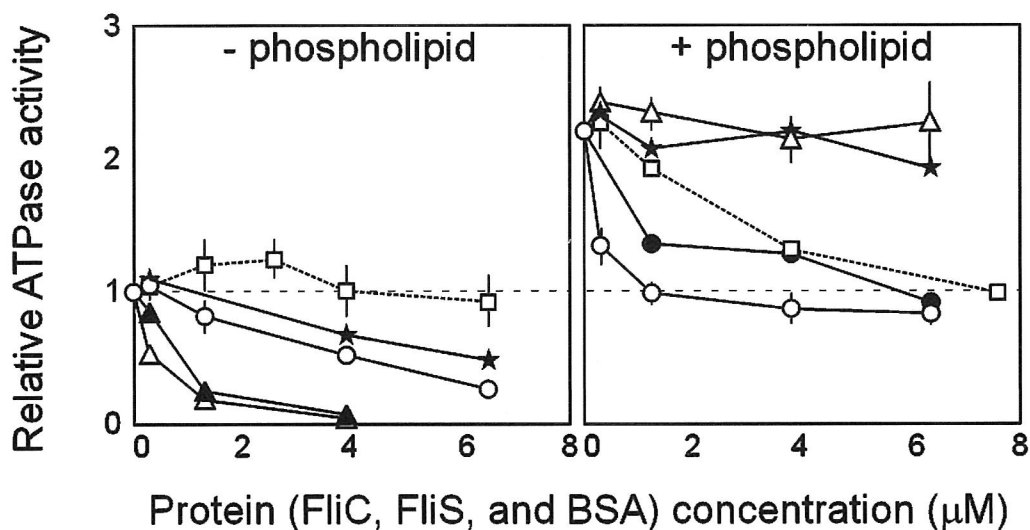


Fig. 6 Effects of FliS, FliC, and FliS-FliC complex to the ATPase activity of FliI. The specific ATPase activity of  $0.64\mu\text{M}$  FliI was measured at the various concentrations of FliS (open circle), FliC (open triangle), FliS-FliC complex (closed asterisk), FliC and BSA (closed triangle), FliS and BSA (closed circle), and BSA (open square). These data are average of three independent experiments. Vertical bars on plotted data are standard deviation.

揮できることを示唆している。つまり、膜との相互作用による ATPase 活性制御の一つと考えられる。一方で、リン脂質は更なる分子活性や ATP に対する親和性の増大には影響しなかった (Table 1)。

FliI に対するリン脂質の効果と InvC に対するそれとの相違点は、FliI の多量体形成率が高い濃度 ( $0.64\mu\text{M}$ ) の時も、形成率が低いと思われる濃度 ( $0.32\mu\text{M}$ ) の時も、リン脂質濃度の増加に伴い ATPase 活性も増大したこと、類似点は、 $0.64\mu\text{M}$ ,  $0.32\mu\text{M}$  のいずれにおいても、リン脂質濃度が充分であればほぼ同じ大きさの活性を示したこと、ATP に対する親和性には影響がなかったことであった (Fig. 5, Table 1)。

**ATPase 活性の制御：InvC に対する SicP の効果**  
InvC の ATPase 活性の制御にリン脂質の貢献が実証された。一方、ATP に対する低い親和性は改善されなかったため、次に、InvC に相互作用するタンパク質の効果を調べた。

GST-InvC を用いたプルダウンアッセイで、InvC と T3SS 特異的シャペロンである SicP との相互作用が示されている (Akeda & Galan, 2005)。また、InvC の ATPase 活性が SicP-SptP 複合体を解離させる、SptP をアンフォールディングすると提案されている (Akeda & Galan, 2005)。そこで、まず SicP が InvC の ATPase 活性に与える影響を調べた。InvC

の濃度 ( $0.8\mu\text{M}$ ,  $4\mu\text{M}$ )、SicP の濃度 ( $0\sim 6\mu\text{M}$ )、リン脂質の濃度 ( $0\sim 800\mu\text{g/ml}$ ) を幅広く検討したが、ATPase 活性に与える SicP の明確な影響は確認できなかった (データ未掲載)。リン脂質非存在下で  $4\mu\text{M}$  InvC,  $6\mu\text{M}$  SicP の時のキネティクス解析でも、SicP は InvC の分子活性や ATP に対する親和性に効果を与えなかった (データ未掲載)。

SptP や SicP-SptP 複合体が InvC の ATPase 活性に与える効果を調べたかったが、SptP (変異タンパク質を含む) の大量調製の困難さから実験できなかった。調製法を再検討し、SptP や SicP-SptP 複合体が InvC の ATPase 活性に与える効果を調べたい。

**ATPase 活性の制御：FliI に対する FliS, FliC, FliS-FliC 複合体の効果**  
T3SS において、輸送タンパク質 (エフェクター) やシャペロン-輸送タンパク質複合体の ATPase に対する効果は試験できなかったが、べん毛輸送装置における輸送タンパク質 (FliC)、シャペロン (FliS) の調製に成功したので、FliI の ATPase に対する輸送タンパク質、シャペロン、シャペロン-輸送タンパク質複合体の効果を調べた。

リン脂質非存在下での  $0.64\mu\text{M}$  FliI の活性を基準として、様々な条件における ATPase 活性を相対的に評価した (Fig. 6)。リン脂質非存在下では、 $0.32\mu\text{M}$  FliC (モル比で FliC/FliI=0.5) により FliI の ATPase 活性の約 50% が、 $3.8\mu\text{M}$  FliC (モル比で

FliC/FliI = 6) により約 95% が阻害された。FliS も FliC ほどの効果ではないものの、FliS 濃度依存的に ATPase 活性を阻害し、 $6.4 \mu\text{M}$  FliS (モル比で FliS/FliI = 10) により FliI の ATPase 活性の約 75% が阻害された。FliC と FliS との両方を同じモル数で添加したとき時の ATPase 活性の変化は FliS だけを添加した時のそれとほぼ同じであった。FliC と FliS とが安定な複合体を形成すること (Muskotal *et al.*, 2006, 本研究データ未掲載), FliI と FliS とは安定な複合体を形成しなかったことから (データ未掲載), FliC は FliI とよりも FliS との相互作用を優先し、FliS-FliC 複合体を形成し、その複合体は FliS と同じように FliI に相互作用し ATPase 活性を阻害したと思われる。FliS-FliC 間の会合定数が  $1.9 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$  と報告されており (Muskotal *et al.*, 2006), その値に基づくと両者の解離定数は  $52.6 \text{ nM}$  と算出できた。FliC-FliI 間の解離定数は FliS-FliC 間のそれより遙かに大きいと予想できた。FliC や FliS, FliS-FliC 複合体による ATPase 活性の阻害メカニズムはいかなるものであろうか。この解析における ATPase 活性の基準値は  $0.64 \mu\text{M}$  FliI の時、つまり、FliI の多量体形成により促進された時の活性である (Fig. 3)。このことを考慮すれば、FliC や FliS, FliS-FliC 複合体は FliI の多量体化とそれに伴う正の協同性を阻害しているのではないだろうか。

リン脂質存在下での FliC や FliS, FliS-FliC 複合体の ATPase 活性に対する効果はリン脂質非存在下でのそれらと大きく異なった。リン脂質により FliI の ATPase の相対活性が約 2.2 倍増大したのは、Fig. 5 で示した結果とほぼ同じである。FliC はその濃度が  $6.4 \mu\text{M}$  (モル比で FliC/FliI = 10) でも ATPase 活性に全く影響を与えなかったにもかかわらず、FliS はその濃度がわずかに  $0.32 \mu\text{M}$  (モル比で FliS/FliI = 0.5) でも著しく ATPase 活性を阻害した。そして、FliS-FliC 複合体は FliC が FliS の影響を打ち消すかのように ATPase 活性の大きさをほとんど変えなかった。FliS による ATPase 活性の阻害メカニズムをどのように考えればよいだろうか。注目すべき点は FliS の阻害効果は ATPase 活性の基準値までということである。このことは、FliS はリン脂質の効果も阻害したと見ることができる。また、FliS の精製法検討の過程で、FliS は膜成分と相互作用しやすい特徴を見いだした (データ未掲載)。これらを考慮すると、FliS が優先的にリン脂質と相互作用し、それにより FliI とリン脂質との相互作用を阻害しているのではないかと推察できる。FliC と FliS との両方を同じモル数で添加した時、FliI の ATPase 活性にあまり影響を与えていない

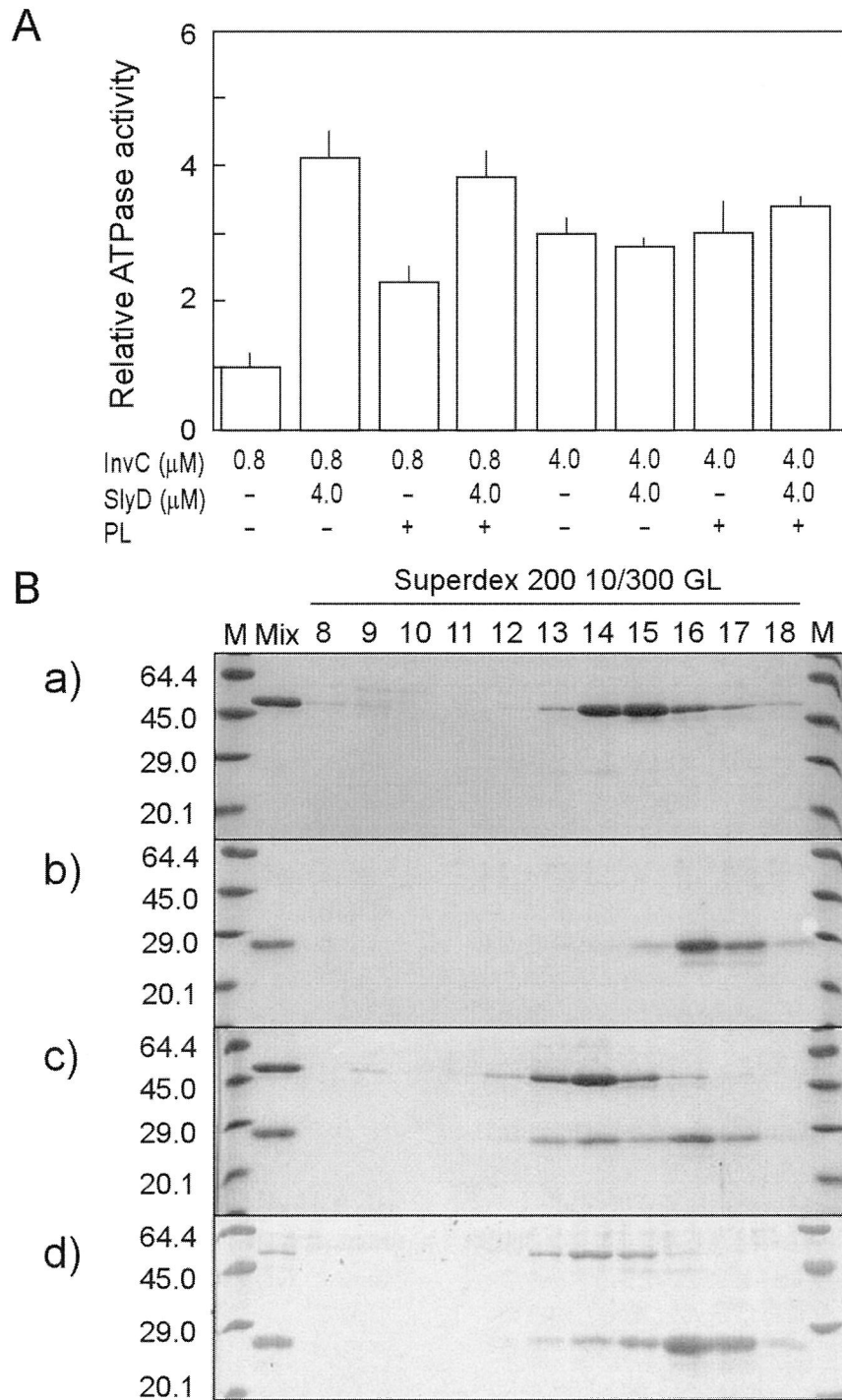
のは、FliS が FliC と複合体形成を好み、リン脂質とは相互作用しなくなったからだと考えることができる。BSA の添加 ATPase 活性には影響が無い、もしくは FliI を安定化するため活性が上昇すると考えていたが、リン脂質存在下では ATPase 活性を緩やかに阻害した。この緩やかな阻害も BSA がリン脂質に相互作用し、リン脂質と FliI との相互作用を阻害した結果と思われる。

**ATPase 活性の制御：新規制御タンパク質候補 SlyD**  
InvC や FliI の初期精製、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーの溶出画分で目的タンパク質の他に  $27 \text{ kDa}$  タンパク質が特徴的に濃縮された。N 末端アミノ酸配列解析の結果、そのタンパク質は大腸菌の SlyD であることが判明した。SlyD は 2 価の金属イオンとの結合により活性を制御するプロリン・シス/トランス・イソメラーゼで (Hottenrott *et al.*, 1997), SlyD の C 末端は金属イオン結合のための His 残基に富んでいる。また、その特徴を利用し Ni-NTA ビーズで SlyD を精製した報告もある (Mukherjee *et al.*, 2003)。このように、筆者らが適用した InvC や FliI の精製法では初期段階での SlyD の混入は充分予測できたが、InvC の精製においてのみ、Ni-NTA カラムクロマトグラフィー以降の精製過程でも目的タンパク質と SlyD との分離は困難であった。そこで、InvC と SlyD とは相互作用するのではないかと考え、InvC 大量発現株から SlyD を精製し、別に精製した InvC と混合して、ATPase 活性への影響と相互作用を試験管内で調べた。

リン脂質非存在下で InvC の多量体形成能の低い濃度 ( $0.8 \mu\text{M}$ ) における InvC の ATPase 活性を基準とした。 $0.8 \mu\text{M}$  InvC に対して  $4 \mu\text{M}$  SlyD (モル比で SlyD/InvC = 5) はリン脂質の有無にかかわらず、InvC の ATPase 活性を約 4 倍促進した (Fig. 7A)。InvC の ATPase の最大活性を増大した初めての結果である。一方、InvC の多量体形成能の高い濃度 ( $4 \mu\text{M}$ ) では、リン脂質の有無にかかわらず、SlyD 特異的な InvC の ATPase 活性の促進は見られなかった (Fig. 7A)。

InvC と SlyD との相互作用解析には、ゲルろ過クロマトグラフィーと SDS-PAGE を用いた (Fig. 7B)。InvC と SlyD をそれぞれ展開した時と比べ、溶出位置が高分子量側にシフトした。この結果は InvC と SlyD とが比較的安定な複合体を形成することを示唆した。

一方、SlyD による FliI の ATPase 活性に対する促進や FliI と SlyD との相互作用は、更なる検討を要するが、肯定できる明らかな結果は得られていない。こ



**Fig. 7** Effects of SlyD to InvC. **A**, The specific ATPase activity of 0.8 $\mu\text{M}$  and 4.0 $\mu\text{M}$  InvC was measured in the presence / absence of 0.8 mg/ml phospholipids (PL). These data are average of three independent experiments. Vertical bars on plotted data are standard deviation. **B**, SlyD- InvC interactions were examined using Superdex 200 10/300 GL column and SDS-PAGE. Four  $\mu\text{M}$  InvC (a), 4.0 $\mu\text{M}$  SlyD (b), 4.0 $\mu\text{M}$  InvC and 4.0 $\mu\text{M}$  SlyD (c), and 0.8 $\mu\text{M}$  InvC and 4.0 $\mu\text{M}$  SlyD (d) were respectively incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$  for 30 min, and the mixtures were respectively applied to a Superdex 200 10/300 GL column. Each elution fraction was concentrated by TCA (trichloroacetic acid) precipitation method and electrophoresed on a SDS-polyacrylamide gel. Lane M, molecular weight markers. Lane Mix, the mixture incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ . Lane 8~18, the fraction number of the column chromatography. Similar results were obtained in the conditions not including ATP and  $\text{MgCl}_2$ .

のように少なくとも InvC の ATPase 活性が SlyD により制御されていることは概ね正しいように思える。ペプチド結合の立体配座は普通トランス型であるが、プロリンは例外的に約 1/12 の割合でシス型をとる場合がある (Fischer & Schmid, 1999)。InvC の ATPase 活性の促進は SlyD のプロリン・シス/トランス・イソメラーゼ活性により構造変化を伴い活性化された可能性もある。また、InvC の ATPase 活性を活性化するパートナータンパク質は本来は別にあり、そのタンパク質の機能を部分的にでも模倣したタンパク質として SlyD が同定された可能性もある。4  $\mu$ M SlyD が 0.8  $\mu$ M InvC の ATPase 活性は促進するが 4  $\mu$ M InvC のそれは促進しないこと、そのような違いに対して複合体形成には差異がないことなども合理的に説明ができない。活性化因子としての SlyD の機能解明のためには更なる検討が必要である。

原子レベルの機能解明にむけた変異タンパク質作製候補の探索 ここまで述べてきたように、筆者らは InvC や FliI の ATPase 活性の定量的解析基盤を確立し、InvC や FliI 自身の多量体化による活性の制御、リン脂質、T3SS 特異的シャペロン、輸送されるタンパク質による ATPase 活性の制御を明らかにした。今後、タンパク質輸送能を欠いた InvC 変異体や FliI 変異体を単離、その変異アミノ酸を同定し、更にそのアミノ酸変異を導入した変異タンパク質を大量に調製し、種々の試験管内実験を行うことで、上述した幾つもの制御メカニズムの原子レベルでの解明に近づくことができる。

筆者らは既に遺伝学的基盤やスクリーニング方法が確立されているべん毛のシステムを用いてタンパク質輸送能を欠いた 129 株の FliI 変異体を単離した。更に、それぞれの変異体から運動性が復帰した自然復帰突然変異体を 146 株単離した。現在解析の途中だが、FliI と FliH との相互作用を示唆する結果も出ており、これら変異体や復帰体の解析は制御メカニズムの原子レベルでの解明に貢献すると期待している。

## 考 察

III 型タンパク質輸送装置において T3SS の InvC とべん毛輸送装置の FliI は、それぞれの装置において唯一の ATPase という酵素的特徴を持ったタンパク質である。本研究では、その ATPase 活性の詳細な定量的解析により、III 型分泌装置のタンパク質分泌メカニズムの解明を目指した。

InvC はアロステリック酵素でありホモ多量体を形

成することで単量体型の時よりも高い ATPase 活性を発揮すること (Fig. 3, 4)、低濃度の InvC はリン脂質との相互作用により ATPase 活性が促進されること (Fig. 5)、その時の速度論的解析 (Table 1)、これらは初の報告である。速度論的解析では、InvC の ATPase 活性は 1 秒間に 0.13 分子の ATP しか加水分解しない、言い換えれば 1 分子の ATP を加水分解するに 7~8 秒も必要とする低い活性だった。Schlumberger らは 1 体の *S. Typhimulium* において、エフェクターの一つである SipA の分泌速度を 7~60 分子/秒と算出した (Schlumberger *et al.*, 2005)。また、Kubori らは 10~100 個の T3SS が *S. Typhimulium* には存在すると報告している (Kubori *et al.*, 1998)。すべての T3SS が SipA の分泌に直接関与すると仮定すると、SipA は 1 個の T3SS あたり 1 秒間に 0.07~6 分子が分泌される計算になり、本研究で明らかになった InvC の ATPase 活性とをあわせて考えると、1 分子の ATP 加水分解により 0.5~46 分子の SipA が分泌される計算になった。分泌に直接関与する T3SS の数をもっと低く見積もれば 1 分子の ATP 加水分解あたり更に多くの SipA が分泌されることになる。FliI がホモ多量体を形成し、高い ATPase 活性を発揮すること (Fig. 3, 4)、多量体形成能が高いと思われる濃度の FliI はリン脂質との相互作用により ATPase 活性が促進されること (Fig. 5)、はこれまでの報告とも一致した (Auvray *et al.*, 2002; Claret, *et al.*, 2003; Minamino *et al.*, 2006)。多量体形成能が低いと思われる濃度でも FliI のリン脂質との相互作用による ATPase 活性の促進 (Fig. 5) は初の報告である。InvC と FliI とでは多量体形成能が高いと思われる濃度でのリン脂質の効果が異なったが、多量体形成能が低いと思われる濃度での効果は同じであった。

菌体内で InvC や FliI といった III 型タンパク質輸送特異的 ATPase が内膜と相互作用すること (Akedo & Galan, 2004; Auvray *et al.*, 2002) を考えると、この活性制御メカニズムは 1) 発現する ATPase 量を少量にすることで、ATPase がサイトゾル中に存在する時は ATPase 活性をほとんど発揮せず、内膜と相互作用しタンパク質輸送が可能になった時のみ ATPase 活性を発揮し輸送に寄与できる、つまり ATP の無駄遣いを回避できる、2) ATPase 合成に必要な N 源や C 源、ATP を節約できる、といった非常にリーズナブルなメカニズムであると思われる。

III 型タンパク質輸送装置特異的シャペロンである SicP と FliS は推測される分子量や等電点は類似している。しかし、実際、試験管内では SicP は機能構造



が2量体で InvC の ATPase 活性に対して影響を与えず、FliS は機能構造が単量体で FliI の ATPase 活性に対して影響を与えた (Fig. 6) . X 線結晶構造解析で示された両者の異なる構造 (Stebbins & Galan, 2001; Evdokimov *et al.*, 2003) などとも考えると, SicP と FliS の細かい機能は異なってもよいかもしれない. SicP の基質である SptP の精製の困難さから SptP や SicP-SptP 複合体が InvC の ATPase 活性に与える効果は今後の課題として残ったが, FliS の基質である FliC の調製に成功し, リン脂質存在下もしくは非存在下での FliC や FliS-FliC 複合体による FliI の ATPase 活性の変化 (Fig. 6) から, FliI が内膜と相互作用する環境で, FliC と相互作用しなければ, ATPase 活性が阻害されるメカニズムを発見できた. つまり, 輸送タンパク質をチャンネルに挿入可能な状態の時にだけ ATPase 活性を発揮できるメカニズムである. このメカニズムは FliS と SicP のそれぞれの III 型タンパク質輸送特異的 ATPase に対する効果の違いから, べん毛輸送装置特異的であると思われる. FliC や FliS-FliC 複合体による FliI の ATPase 活性の変化から, 制御メカニズムが見出されたように, SptP や SicP-SptP 複合体による InvC の ATPase 活性に与える効果を調べれば, T3SS の制御メカニズムに迫ることができるのではないかと期待している. InvC の ATPase 活性の仕事として, SptP のアンフォールディングと SicP-SptP 複合体の解離が提案されているので (Akeda & Galan, 2005) , SptP や SicP-SptP 複合体が InvC の ATPase 活性を増大するはずである.

FliI の ATPase の最大活性を増大させた因子はリン脂質であった. 一方, InvC の ATPase 活性を増大させた因子はこれまで見つかっていない. SlyD は InvC の活性を上昇させる新規の ATPase 活性制御タンパク質の候補である. 今後, 更なる試験管内での実験に加え, 生体内での実験も計画していきたい. ATPase の最大活性を増大させた因子はリン脂質や SlyD が見つかったが, ATP に対する低い親和性を増大させる因子は今回の研究で見つかっていない. FliI の変異体や復帰体の単離は, FliI とリン脂質, FliI と FliC, FliI と FliS とした相互作用とそれに伴う ATPase 活性の促進や阻害を原子レベルで調べるために非常に役立つ. また, FliI の ATP に対する低い親和性を増大させる因子を探し当てられる可能性もあり, 実際 FlhA もしくは FlhB とした内膜タンパク質の相互作用を示唆した. 本研究では, III 型タンパク質輸送装置特異的な ATPase の定量的評価系の確立と, リン脂質や可溶性タンパク質による活性制御に焦点を当ててきたが, 今後は内膜タンパク質の効果も評価できる実験系

を構築すべく, 準備を進めている.

筆者が一貫して進めてきた大量調製と試験管内評価により, III 型タンパク質輸送装置のこれまで知られていなかった制御メカニズムの一端を明らかにした. この手法の最終目標は試験管内での T3SS の再構築である. 再構築標品の利用は, III 型タンパク質輸送装置の詳細な解明の為の強力なツールになるであろう. また, 例えば, 粘膜ワクチンのデリバリーシステムのキャリアとしての開発など, 応用分野への適用も可能にしてくれると考えている.

## 要 約

III 型タンパク質輸送装置はグラム陰性細菌が菌体内から菌体外へタンパク質を輸送するナノサイズの装置である. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium などはべん毛輸送装置を使いべん毛繊維を構築し, べん毛を使って好ましい環境に移動し, 適切な環境にたどり着けば III 型分泌装置 (T3SS) を使いエフェクターを宿主細胞に注入し感染の成立に導く. 本研究では, III 型タンパク質輸送装置特異的 ATPase に着目し, ATPase 活性を指標としたタンパク質輸送メカニズムの解明を目指した. T3SS 特異的 ATPase - InvC - とべん毛輸送装置特異的 ATPase - FliI - を調製し, ATPase 活性の正の協同性, 遅い ATP 加水分解速度, 低い ATP に対する親和性を明らかにした. 低濃度の InvC や FliI は細胞質膜の代用品であるリン脂質由来のリポソームとの相互作用によって ATPase 活性が促進された. このリン脂質との相互作用による ATPase 活性の制御は InvC や FliI がサイトゾル中に局在するときは ATP を浪費しないようにする, ATP の無駄遣いを防ぐメカニズムだと考えられた. べん毛輸送装置のシャペロン (FliS) と輸送タンパク質 (FliC) を調製し, リン脂質の存在下, 非存在下で FliS, FliC, FliS-FliC 複合体が FliI の ATPase 活性に与える効果を調べたところ, FliI がリン脂質と FliC もしくは FliS-FliC 複合体と相互作用した時のみ, ATPase 活性を発揮した. つまり, 輸送タンパク質をチャンネルに挿入可能な状態の時にだけ ATPase 活性を発揮できるメカニズムであると考えられた. T3SS では, シャペロン (SicP) の基質である SptP の困難さから SptP や SicP-SptP 複合体が InvC の ATPase 活性に与える効果を知ることはできなかったが, SicP が InvC に与えた効果と FliS が FliI に与えた効果とは異なったため, T3SS はべん毛輸送装置とは制御メカニズムが異なる可能性がある. 以上, ATPase 活性の詳細な定量解析により, III 型タンパク

質輸送装置のこれまで知られていなかった制御メカニズムの一端を明らかにした。更に InvC の ATPase 活性を制御するタンパク質候補として、SlyD (プロリル・シス/トランス・イソメラーゼ) 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) Hayashi, F., Inobe, E., Minamino, T., Imada, K., Namba, K., Oosawa, K. (2006). ATPase activities of the TypeIII protein export systems. Meeting program of EABS & BSJ 2006, Okinawa.
- 2) Hayashi, F., Inobe, E., Minamino, T., Imada, K., Namba, K., Oosawa, K. (2007). ATPase activities of the TypeIII protein export systems. Bacterial Locomotion and Signal Transduction IX (BLAST IX). Laughlin, USA.
- 3) 林 史夫 (2007) . バイオナノデバイスの可能性. 第4回ナノテク研究会, 桐生 【招待講演】
- 4) 林 史夫 (2007) . 細菌所有のナノ注射器-III型タンパク質輸送装置-. 日本動物細胞工学会2007年度大会, 高崎 【招待講演】
- 5) 林 史夫 (2007) . サルモネラ菌の III 型分泌装置 InvC の ATPase 活性. 第81回日本細菌学会総会, 京都.
- 6) 伊野部江里, 林 史夫, 大澤研二 (2007) . III 型タンパク質輸送システムの FliI と InvC の ATPase 活性. 第43回日本生物物理学会年会, 横浜.
- 7) 林 史夫 (2008) . ATPase activities of *Salmonella* FliI and InvC. 2007年度「べん毛研究交流会」&「科学技術振興機構 ICORP 超分子ナノマシンプロジェクト終了報告会」合同会議, 京都.
- 8) 伊野部江里, 林 史夫, 大澤研二 (2008) . III 型分泌装置のシャペロンやエフェクターが InvC の ATPase 活性に及ぼす影響. 第44回日本生物物理学会年会, 福岡.
- 9) Hayashi, F., Inobe, E., Takeda, K., Oosawa, K. (2009). ATPase activities of T3SS specific ATPase InvC. Bacterial Locomotion and Signal Transduction X (BLAST X). Cuernavaca, Mexico.
- 10) 林 史夫 (2009) . サルモネラ菌 III 型分泌システム InvC ATPase 活性に対する SicP の効果. 第82日本細菌学会総会, 名古屋.

## 保存機関に寄託した菌株

本研究で単離した FliI 変異体 107 株のうち, 解析のすすんだ 7 株を NBRC に寄託した。

<i>Salmonella enterica</i> (HYO1719)	NBRC 105779
<i>Salmonella enterica</i> (HYO2499)	NBRC 105780
<i>Salmonella enterica</i> (HYO2627)	NBRC 105781
<i>Salmonella enterica</i> (HYO2764)	NBRC 105782
<i>Salmonella enterica</i> (HYO3033)	NBRC 105783
<i>Salmonella enterica</i> (HYO3238)	NBRC 105784
<i>Salmonella enterica</i> (HYO3673)	NBRC 105785

## 謝 辞

本研究に対し 3 年間にもわたり助成していただきました財団法人発酵研究所の関係者各位に厚くお礼申し上げます。本研究を実施するにあたり, 有意義な意見交換をしてくださいました群馬大学大学院応用化学・生物化学専攻大澤研二教授, 大阪大学大学院生命機能研究科難波啓一教授, 今田勝巳准教授, 南野徹助教, タンパク質の N 末端アミノ酸配列解析をしてくださった富山大学大学院医学薬学研究部奥野貴士准教授, fliI 変異体や復帰体の単離を進めてくださった大澤・林研究室の山口滋博士に深謝します。本研究は伊野部江里さんの修士論文の一部, 宮川竜太君, 竹田正幸君の卒業論文の一部であり, 研究室に配属されてから修士課程修了までの 3 年間, 精力的に実験を行ってくれた伊野部江里さんをはじめ, 宮川竜太君, 竹田正幸君及び本研究室の学生諸氏に感謝します。

## 文 献

- Aguirre, A., Cabeza, M.L., Spinelli, S.V., McClell, M., Garcia Vescovi, E. & Soncini, F.C. (2006). PhoP-induced genes within *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol.* **188**: 6889-6898.
- Akeda, Y. & Galan, J.E. (2004). Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. *J Bacteriol.* **186**: 2402-2412.
- Akeda, Y. & Galan, J.E. (2005). Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**: 911-915.
- Andrade, A., Pardo, J.P., Espinosa, N., Perez-Hernandez, G. & Gonzalez-Pedrajo, B. (2007). Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN. *Arch Biochem Biophys.* **468**: 121-127.
- Auvray, F., Ozin, A.J., Claret, L. & Hughes, C. (2002). Intrinsic membrane targeting of the flagellar export ATPase FliI: interaction with acidic phospholipids and FliH. *J Mol Biol.* **318**: 941-950.
- Blaylock, B., Riordan, K.E., Missiakas, D.M. & Schneewind, O. (2006). Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bacteriol.* **188**: 3525-3534.
- Brito, C.F., Carvalho, C.B., Santos, F., Gazzinelli, R.T., Oliveira, S.C., Azevedo, V. & Teixeira, S.M. (2004). *Chromobacterium violaceum* genome: molecular mechanisms associated with pathogenicity. *Genet Mol Res.* **3**: 148-161.
- Cornelis, G.R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol.* **4**: 811-825.
- Claret, L., Calder, S.R., Higgins, M. & Hughes, C. (2003).

- Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly. *Mol Microbiol.* **48**: 1349-1355.
- Evdokimov, A.G., Phan, J., Tropea, J.E., Routzahn, K.M., Peters, H.K., Pokross, M. & Waugh, D.S. (2003). Similar modes of polypeptide recognition by export chaperones in flagellar biosynthesis and type III secretion. *Nat Struct Biol.* **10**: 789-793.
- Fischer, G. & Schmid, F.X. (1999). Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase. In : *Molecular Chaperones and Folding Catalysts*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp461-489.
- Galan, J.E. & Wolf-Watz, H. (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573.
- Hottenrott, S., Schumann, T., Pluckthun, A., Fischer, G. & Rahfeld, J.U. (1997). The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J Biol Chem.* **272**: 15697-15701.
- Jault, J.M., Dou, C., Grodsky, N.B., Matsui, T., Yoshida, M. & Allison, W.S. (1996). The alpha3beta3gamma subcomplex of the F1-ATPase from the thermophilic bacillus PS3 with the betaT165S substitution does not entrap inhibitory MgADP in a catalytic site during turnover. *J Biol Chem.* **271**: 28818-28824.
- Kubori, T. & Galan, J.E. (2003). Temporal regulation of salmonella virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation. *Cell* **115**: 333-342.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E. & Aizawa, S.I. (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605.
- Minamino, T. & MacNab, R.M. (2000). FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol Microbiol.* **37**: 1494-1503.
- Minamino, T., Kazetani, K., Tahara, A., Suzuki, H., Furukawa, Y., Kihara, M. & Namba, K. (2006). Oligomerization of the bacterial flagellar ATPase FliI is controlled by its extreme N-terminal region. *J Mol Biol.* **360**: 510-519.
- Mukherjee, S., Shukla, A. & Guptasarma, P. (2003). Single-step purification of a protein-folding catalyst, the SlyD peptidyl prolyl isomerase (PPI), from cytoplasmic extracts of *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem.* **37**: 183-186.
- Muskotal, A., Kiraly, R., Sebestyen, A., Gugolya, Z., Vegh, B.M. & Vonderviszt, F. (2006). Interaction of FliS flagellar chaperone with flagellin. *FEBS Lett.* **580**: 3916-3920.
- Pozidis, C., Chalkiadaki, A., Gomez-Serrano, A., Stahlberg, H., Brown, I., Tampakaki, A.P., Lustig, A., Sianidis, G., Politou, A.S., Engel, A., Panopoulos, N.J., Mansfield, J., Pugsley, A.P., Karamanou, S. & Economou, A. (2003). Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J Biol Chem.* **278**: 25816-25824.
- Schlumberger, M.C., Muller, A.J., Ehrbar, K., Winnen, B., Duss, I., Stecher, B. & Hardt, W.D. (2005). Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 12548-12553.
- Stebbins, C.E. & Galan, J.E. (2001). Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**: 77-81.
- 国立感染症研究所感染症情報センター 感染症発生動向調査 感染症報告数一覧 (その1: 全数把握) (<http://idsc.nih.go.jp/idwr/ydata/report-Ja.html>).
- 厚生労働省 食中毒統計調査資料 平成20年(2008年)食中毒発生状況 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/10hassei/xls/H20joukyou.xls>)

# マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム

宮田 真人

大阪市立大学大学院理学研究科生物地球学専攻  
〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138

## Molecular mechanism of *Mycoplasma* gliding

Makoto Miyata

Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka City University  
Sumiyoshi-ku, Osaka, 558-8585, Japan

*Mycoplasmas*, known as the pathogen of human pneumonia bind to solid surfaces such as host cells, and exhibit gliding motility, smooth movements on the surface. We proposed a working model, where the gliding machinery locates near the cell pole of moving direction and string-like "legs" sticking from it pull the cell forward by catching and releasing sialic acids, using the energy of ATP hydrolysis. In this study, we studied the following subjects to clarify this model. (1) We isolated Gli521, a huge protein working as a gear in the gliding mechanism and clarified its shape under electron microscopy. The molecule of this protein is composed of three domains, and three molecules bind together to form a remarkable "triskelion" structure. (2) To know the structure supporting the gliding machinery, we treated the cells by Triton and observed the remaining structure under electron microscopy. "Jellyfish structure", the cytoskeleton was identified, including its detailed structures and component proteins. (3) We reduced the number of working legs of a gliding cell, analyzed its movements in details, and then detected the movements of single "leg".

Key words: mycoplasma, gliding motility, bacterial cytoskeleton

### 緒 言

ヒト肺炎の病原菌などで知られる“マイコプラズマ”は、病原性の細菌の1グループを指す。これまでに200種類以上が見つかっているが、一般的にマイコプラズマは、宿主組織の表面にはりつく能力に長けている。12種類が細胞の片側に膜突起を形成し、その突起部分で動物細胞やガラスなど固形物の表面にはりつき、突起のある側に向かって滑るように動く (Fig. 1(A))。この動きを“マイコプラズマの滑走運動”といい、それは長時間撮影ではじめて捉えられるようなものではなく、リアルタイムのビデオで実感できるレベルである (<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/~miyata/myco1.htm>)。その速度は、最速種の *Mycoplasma mobile* (マイコプ

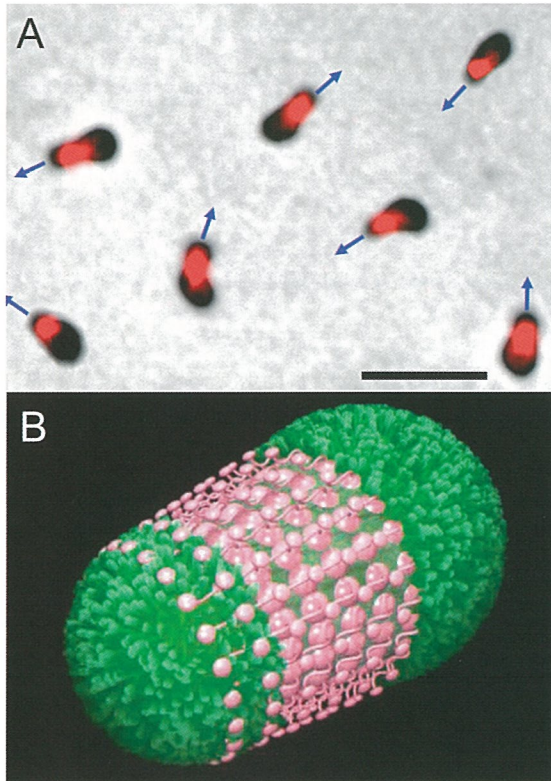
ラズマ・モービレ) では毎秒 2.5-4 $\mu$ m で、ヒトに肺炎を起こす *Mycoplasma pneumoniae* (マイコプラズマ・ニューモニエ) では毎秒 0.5-1 $\mu$ m である (Miyata, 2005; 宮田真人, 2006a; 宮田真人, 2006b; 宮田真人, 2006c)。

一見多様に見える生物の運動も、そのメカニズムは実は多様ではない。現在までによく知られているものは2つである。ひとつはATPなどのヌクレオチドを加水分解してモータータンパク質がレールタンパク質の上を動くもので、筋肉、鞭毛、アメーバ運動など、真核生物の運動のほとんどがこれに相当する。もうひとつは、細菌のべん毛の基部に存在するモーターで、このモーターは細胞外部から内部へのイオン通過に伴うエネルギーで回転する。マイコプラズマの滑走運動はそのどちらにも属さないユニークなもので、ごく最近まではそのメカニズムは全くの謎であった。

著者らは、1997年から、主に最速種である *M. mobile* を用いてこの謎に挑戦してきた。助成以前には、滑走装置の構造とその構成タンパク質、エネルギー

E-mail: miyata@sci.osaka-cu.ac.jp

共同研究者：中根大介、野中孝裕 (大阪市立大学・大学院理学研究科)、西坂崇之 (学習院大学・理学部物理)



**Fig. 1** Cell images of *M. mobile*. (A) Phase contrast microscopic image is overlaid by the fluorescent signal, showing the gliding machinery. The position of machinery was named as “neck”. Bar, 2  $\mu$  m. (B) Schematic illustration of cell surface. The gliding machinery involving 450 units locates at the cell neck. On the other part of cell surface, the proteins for antigenic variation are exposed, to escape from the host immune system.

源, 結合対象, 力学的性質, などを明らかにしてきた (Adan-Kubo *et al.*, 2006; Hiratsuka *et al.*, 2005; Jaffe *et al.*, 2004; Kenri *et al.*, 2004; Kusumoto *et al.*, 2004; Metsugi *et al.*, 2005; Miyata & Petersen, 2004; Miyata *et al.*, 2002; Miyata & Uenoyama, 2002; Miyata *et al.*, 2000; Seto *et al.*, 2005; Seto *et al.*, 2001; Seto & Miyata, 2003; Seto *et al.*, 2005; Shimizu & Miyata, 2002; Uenoyama *et al.*, 2004; Uenoyama & Miyata, 2005; Uenoyama & Miyata, 2005; 宮田真人, 2002; 宮田真人, 2004; 宮田真人, 2005). これらの結果から, 「滑走装置は 4 種類の巨大な膜タンパク質で形成されており, 細胞内部から細胞骨格様の構造 (くらげ構造) に支えられている. 滑走装置からは 50 ナノメートル長のやわらかい “あし” が多数

つきだしている (Fig. 1(B)). ATP の加水分解により装置の一部に動きが生じ, この “あし” が固形物表面のシアル酸をつかんだり, ひっばったり, はなしたりすることによって滑走運動が起こる」という作業仮説を提案した (Miyata, 2005; Seto *et al.*, 2005; Uenoyama *et al.*, 2004). 助成期間中に, 主に以下の 3 点について研究を行った. (1) 滑走装置の中でギアの役割を果たすと考えられるタンパク質, Gli521 の構造, (2) 滑走装置を細胞内部からささえる構造, (3) 滑走時における “あし” の動きを検出.

## 実験方法

**材料** *Mycoplasma mobile* 163K 株 (ATCC 43663) とその変異株を, 以前に報告したようにして培養し, 実験に用いた (Miyata *et al.*, 2000).

**タンパク質の単離と同定** Gli521 タンパク質は, 以前に報告した Gli349 タンパク質に準じた方法で *M. mobile* のカルチャーから精製した (Adan-Kubo *et al.*, 2006). すなわち, (i) 界面活性剤, TritonX-100 による菌体の可溶化, (ii) 硫酸アンモニウムを用いた塩析, (iii) ゲルろ過, である. また, タンパク質を限定的に分解し, ドメイン構造を明らかにした. タンパク質およびその分解物は SDS-PAGE で展開し, それぞれのバンドをトリプシンで分解した. 分解産物は MALDI-TOF (島津製作所, AXIMA) でその質量を測定し, その値からアルゴリズム, Profound (<http://hs2.proteome.ca/prowl/profoundXML/profoundAdv.html>) でそのタンパク質をコードするアミノ酸配列を特定した.

**電子顕微鏡観察** Gli521 タンパク質はロータリーシャドウイングにより白金を蒸着し, 白金をタンパク質のレプリカとして観察した. 菌体はモリブデンを用いたネガティブ染色を行い観察した. くらげ構造は, 電子顕微鏡用グリッドにカーボン膜をはったものに結合させた菌体を, TritonX-100 と核酸分解酵素で処理した後によく洗い, モリブデンで染色した. 試料は全て, 透過型電子顕微鏡 (Hitachi, H-7000) を用いて 75 kV で観察した.

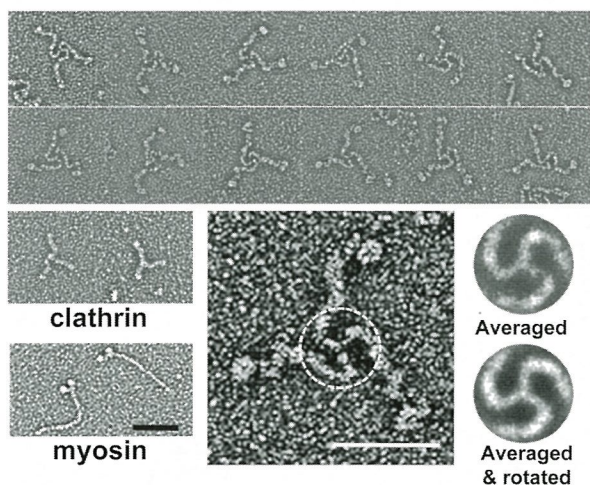
**光学顕微鏡による運動の観察** *M. mobile* のカルチャーから菌体を遠心分離法で集めて, 培地に懸濁した. スライドガラス, カバーガラス, 両面テープで作製した “トンネルスライド” に *M. mobile* の懸濁液を入れて, *M. mobile* をガラスに結合させた (Kusumoto *et al.*,

2004; Uenoyama *et al.*, 2004). トンネルスライドを位相差顕微鏡(オリンパス, IX70)のステージにセットし, 菌体を観察しながら緩衝液を交換した(Miyata *et al.*, 2002). 蛍光ラベルされたプラスチックビーズを菌体と混ぜて菌体をラベルした. ビーズの動きは高速ビデオカメラ(Digimo, LRH1600)に記録し, 中心位置の座標を抽出, 解析した.

## 結果と考察

**Gli521 タンパク質の構造** 521kDa の Gli521 タンパク質に結合するモノクローナル抗体を, 滑走しているマイコプラズマにかけると, マイコプラズマはガラスに結合したまま止まってしまう(Seto *et al.*, 2005). これに対し, 349 kDa の Gli349 に対するモノクローナル抗体を滑走しているマイコプラズマにかけると, マイコプラズマはガラスからはずれてしまう(Uenoyama *et al.*, 2004). これらのことから, Gli349 と Gli521 はそれぞれ“あし”と“ギア”の役割を果たしていると考えている. 著者らは以前に Gli349 タンパク質をマイコプラズマから単離精製し,

その分子形状と性質を明らかにした. 本研究ではその方法にならって Gli521 タンパク質を精製した(Adan-Kubo *et al.*, 2006). ロータリーシャドウイングを行って分子形状を観察したところ, 驚いたことに Gli521 の分子形状は“みつまた”であった(Fig. 2). 過去に, みつまた形状のタンパク質は, 真核生物で膜小胞を形成する役割をになっているクラスリンしか見つかっていない. Gli521 はクラスリンとアミノ酸配列における相同性は見られなかった(Jaffe *et al.*, 2004). みつまたの中心の部分は3回転対称の一定構造, すなわち, ともえ構造をとっているように見えた. みつまた構造を界面活性剤で処理すると, 分子はみつまたの一本のアームと同じ特徴を持つ Rod になった. Rod は一方の端が Hook 状で, もう一方が Oval 状だった. モノクローナル抗体を結合させた分子像を電子顕微鏡で調べることで, Hook が膜貫通セグメントを持つ C 末端側であることが示された. また, 限定分解の結果から, 分子がやわらかいヒンジでつながった3つのドメインで構成されていることが示された. 本研究で得られた結果と, これまでの知見を合わせて Gli521 の菌体表面における構造を考えたのが(Fig. 3(A))である. ともえ構造の中心, すなわち Hook の C 末端が膜貫通セグメントで, 膜にアンカーされている. 滑走運動が細胞の決まった方向に向いていることを考えると, Gli521 分子の Rod の N 末端側は細胞の軸に対して同じ方向を向いており, その先端に Oval が存在する可能性が高い.

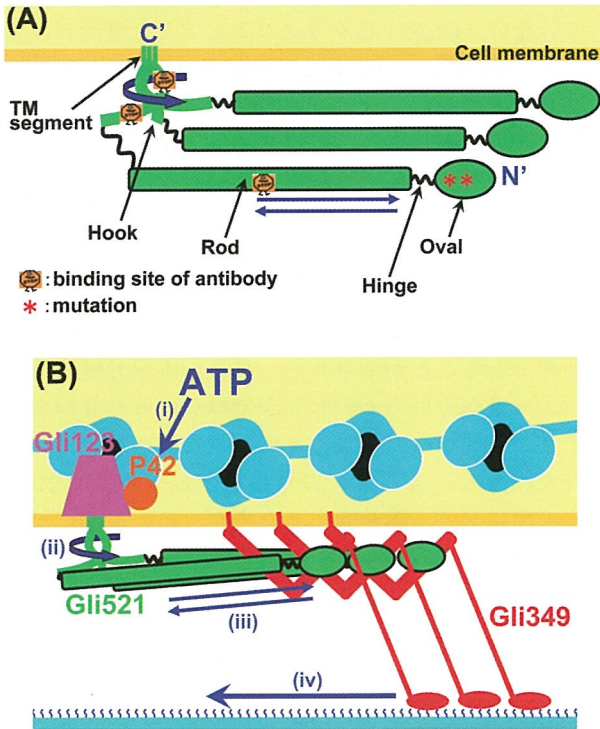


**Fig. 2** Electron microscopic image of Gli521 by rotary shadowing method. The typical trimer images are shown. The images of clathrin and myosin obtained through the same method are presented at the left lower. These images have the same magnification. Bar, 100 nm. The magnified image is shown at the middle lower. Bar, 100 nm. The part circled white is averaged and additionally overlaid by 120 and 240 degrees rotated images at the right lower.

**装置内における動きの伝達** Fig. 3(A)で示したそれぞれの位置を標的とするモノクローナル抗体は, 添加することでマイコプラズマの滑走運動を阻害する. このことは標的位置が細胞の外側に露出しており, 大きく動いていることを示唆している. 膜にダメージを与えて細胞質を除いた“ゴースト”が ATP の添加により細胞と同じ速度で滑走することから私達は, 滑走運動の直接のエネルギー源が ATP であると結論づけた(Uenoyama & Miyata, 2005). Gli123, Gli349, Gli521 と共に合成されるタンパク質, P42 はゴーストの滑走速度から予測される ATPase の特徴に似た活性を持つ. また, Gli123 タンパク質は開口部の方が広がっているガラスのような形状で, Gli349, Gli521 と細胞上の同じ位置に, ほぼ同数が存在しており, Gli349, Gli521 の細胞上での局在に重要である. これらのことから, 装置内での動きの伝達を Fig. 3(B)のように考えた. すなわち, P42 が ATP を加水分解することで生じた動きが Gli123 や, Gli521 の膜貫通セグメントをとおして外部に伝えられる (i). Gli521 の

Hook 部分は硬いみつまた構造で、軸を中心に動いている。この部分は回転している可能性もある (ii)。柔らかいヒンジを介して Hook とつながった Rod は円運動を往復運動として伝える“クランク”として働き、

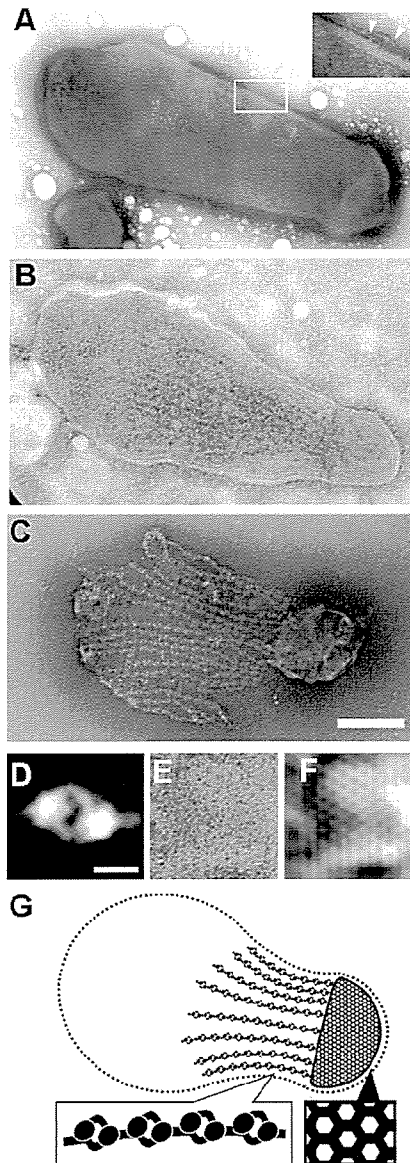
Oval が Gli349 の短い Rod を引っばる (iii)。それに伴って 50 nm のひも状部分がシアル酸をつかんでいる C 末端の球状部分を引っばり、滑走運動が生じる (iv)。



**Fig. 3** (A) Schematic illustration of Gli521 on cell surface. The domain structures were clarified by partial digestion of isolated molecule using proteases. Hook, Rod, and Oval are 145, 230, and 75 kDa in their sizes. The sum of Hook and Rod is 106 nm long, and Oval is 16 x 11 nm. The amino acid sequence predicted from genetic information suggests a transmembrane segment also at the N-terminus, but it is processed after synthesis. Hooks bind one another and form triskelion. The antibodies bind to the sites indicated and inhibit gliding and adhesion. The mutation points which rescue the inhibitory effects of the anti-Gli349 antibody are shown by asterisks. (B) Schematic illustration of gliding machinery unit. Oval of Gli521 holds the front part of Gli349 short rods. The positions of Gli123 and P42 are hypothetical. The unit of gliding machinery is supported by the tentacle part of jellyfish structure. P42 generates movements from ATP hydrolysis.

細胞内部からささえる構造 一般的にバクテリアには、細胞膜の外側にペプチドグリカンの層が存在し、この構造が細胞壁として働く。しかしマイコプラズマにはこのペプチドグリカンが全く存在しない。ではどのような構造が接着や滑走に必要な力を受け止めるのであろうか？ヒトを含む真核生物では、内部に存在するチューブリンやアクチンなどのタンパク質で構成される細胞骨格が細胞をささえている。近年、ほとんどのバクテリアで、チューブリンやアクチンのホモログが細胞骨格として働いていることが明らかになってきた (Gitai, 2005)。

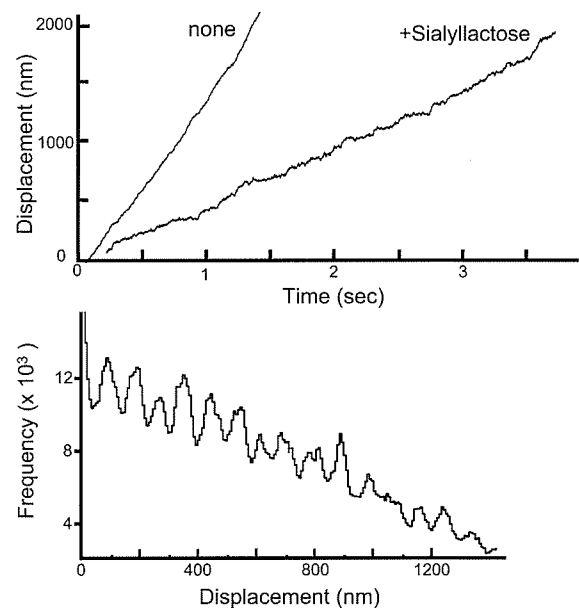
しかし、*M. mobile* にはそのどちらも存在しない。この謎に迫るため本研究では、電子顕微鏡グリッドの支持膜に結合したマイコプラズマの細胞膜をトライトン X-100 や核酸分解酵素などで除去し、残った構造を観察した。その結果、滑走装置の内側に Fig. 4 のようにくらげ様の構造が存在することが明らかになった。くらげの触手には長さ約 20 nm の回転対称体が 30 nm 周期に、傘には 12 nm 周期に格子構造が存在していた。くらげ構造は滑走装置と直接結合しているのだろうか？それに対する直接の答えではないが、Gli123, Gli349, Gli521 のそれぞれがない変異株において、くらげ構造の細部は保存されているものの、全体的な構造は野性株と異なり壊れていた。特に、Gli521 のない株でその傾向は顕著であった。また、触手にある回転対称体の数は滑走タンパク質の数と大きく異ならない。これらのことから、Fig. 3(B) のように滑走装置のそれぞれのユニットが触手の回転対称体に結合している可能性が考えられた。くらげ構造を溶液中で作製、単離し、その構成タンパク質10個を、ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法で同定した。PMF 法では、質量分析と遺伝情報をもちいてタンパク質を同定する。アミノ酸の配列からそれらタンパク質の機能を推定することは出来なかったが、興味深いことに2つのタンパク質が ATP 合成酵素の  $\alpha$ ,  $\beta$  サブユニットのそれぞれと明らかな相同性を持っていた。*M. mobile* はゲノム上の離れた位置に ATP 合成酵素の 8 サブユニットの全てを有している。また、くらげ構造の ATP 合成酵素サブユニットホモログの N 末端近辺には、既知のタンパク質と相同性のない配列が融合している。これらのことは、くらげ構造の ATP 合成酵素サブユニットホモログがくらげ構造特異的な役割を持っていることを意味している。滑走装置のユニットに結合していること、構成タ



**Fig. 4** Jellyfish structure, cytoskeleton supporting *M. mobile* gliding. (A) Negatively stained cell image. Magnification of surface image is shown in the inset. The filamentous structures, the gliding legs can be observed. (B) The cells were treated by 0.03% Triton X-100. The outline of cytoskeletal structure was observed by partial removal of cytoplasm. (C) The jellyfish structure was clearly observed by the treatment with 0.1% Triton X-100. (A, B, C) have the same magnification. Bar, 200 nm. (D) The particle images in tentacles were averaged for 970. Bar, 10 nm. (E) Magnified image of bell. (F) Fourier-transformed image of (E). The lattice pitch was 12 nm. (G) Schematic illustration of jellyfish structure.

ンパク質に ATP 加水分解能があること、が示唆されたことなどから、くらげ構造の滑走運動における役割には以下のような可能性が考えられた。(1) 滑走装置を内側からささえる、(2) 滑走のタンパク質を輸送、配置する、(3) 装置と同様に動いて動きを伝えたり協同性を作ったりする。もちろん、これらの役割の複数を果たしている可能性もある。

“あし”の動きを検出 著者らは Fig. 3(B) に示したように“あし”が動いて菌体を前方向に引っばっていると考えている。しかし、これまでにその動きを本当にとらえたことはなかった。動きを観察するには“あし”の本数が菌体あたり約 450 本、と多いことが大きな障壁である。そこで本研究では、滑走している菌体に、“あ



**Fig. 5** Stepwise movements of gliding motility. Upper: Displacement of bead attached to *M. mobile* cell, as a function of time. Brownian motion was reduced by the addition of 5% gelatin. The cell movement was fast and smooth in the absence of Sialyllactose (left). *M. mobile* cells paused for a while and occasionally showed “stepwise movements” in the presence of 4 mM Sialyllactose (right). Lower: Pairwise analysis of displacement. The histogram showing positional distance between bead positions at two random time points. The detection of peaks suggests the regularity of movements, and the peak distances reflect the smallest unit of displacements.



し”の直接の結合対象であるシアリルラクトースを加えて働いているあしの本数を減らした。また、*M. mobile* 菌体は、あしのみで固形物表面に結合するため、シアリルラクトースの添加によりガラスからはずれてしまう。これを防ぐために溶液中にゼラチンを加えることにより溶液の粘度を上げ、ブラウン運動を抑えた。これらの処理を行うことにより、菌体はガラス表面にとどまって時々動く、すなわちステップ状の動きを行うようになった (Fig. 5)。さらに動きを詳細に記録するために菌体の滑走装置付近に直径 200 ナノメートルの蛍光ビーズをつけ、その動きを高速・高解像度でビデオ撮影した。動きを詳細に解析した結果、マイコプラズマは 80 ナノメートルの長さを最小単位として動いていることが示された。現在のところ、80 ナノメートルが滑走装置のどの部分に対応するかはわからない。しかし、今後、さらに構造を詳細に明らかにすることで、80 ナノメートルという運動の単位が滑走装置のどの構造に由来するかが明らかになると期待される。

## 要 約

ヒト肺炎の病原菌などとして知られるマイコプラズマは、ユニークなメカニズムで宿主細胞など固形物の表面にはりつき、滑るように動く滑走運動を行う。私達はこれまでに、進行方向先端付近に滑走の装置が存在し、そこから突き出たひもの様な“あし”が、ATP加水分解のエネルギーを使って、シアル酸をつかんだりひっぱたりして菌体を前に引っばる、という作業仮説を提唱してきた。本研究では、この作業仮説を明らかにするために以下の3つについて研究した。(1) 滑走メカニズムでギアの役目を果たしている巨大タンパク質、Gli521 を単離し、その形状を電子顕微鏡で明らかにした。タンパク質一分子は3つのドメインから構成されており、さらに三分子が集合して特徴的な“みつまた”構造を構成していた。(2) 滑走装置をささえる構造を調べるために、菌体をトライトンで処理したのちに電子顕微鏡で観察した。その結果、細胞骨格である、“くらげ構造”を見出し、さらにその構造の詳細と構成タンパク質を明らかにした。(3) 菌体が滑走している時に働いている“あし”の動きを減らし、菌体の動きを詳細に解析することで、ひとつの“あし”の動きを検出することに成功した。

## 本研究で得られた研究成果の報告

口頭発表 (83件より抜粋)

- 1) 宮田真人 (2006). あたらしい生体運動メカニズム, マイコプラズマ滑走運動. 第54回日本化学療法学会総会

- (2006年5月, 京都市).
- 2) 宮田真人 (2007). 表面タンパク質の形態から考えるマイコプラズマ滑走運動のメカニズムと進化的由来. 第33回日本マイコプラズマ学会 (2006年6月, 東京都).
- 3) Nakane, D., Adan-Kubo, J., Kenri, T. & Miyata, M. (2007). Isolation and characterization of P1 adhesin involved in gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae*. 16th International Congress of International Organization for Mycoplasma (IOM) (Cambridge UK, July, 2006).
- 4) Miyata, M., Uenoyama, A., Adan-Kubo, J., Nagai, R. & Ohtani, N. (2007). Molecular mechanism of *Mycoplasma gliding*. 16th International Congress of International Organization for Mycoplasma (IOM) (Cambridge UK, July, 2006).
- 5) 宮田真人 (2007). マイコプラズマの滑走運動-あたらしい生体運動メカニズム- 第21回生体機能関連化学シンポジウム「若手フォーラム」(2006年9月, 京都市).
- 6) 中根大介, 宮田真人 (2007). マイコプラズマの細胞骨格はくらげ構造か? 2007年生体運動研究合同班会議 (2007年1月, 金沢市).
- 7) Nakane, D. & Miyata, M. (2007). Jellyfish structure of gliding bacterium, *Mycoplasma mobile*. BLASTX (Bacterial Locomotion and Signal Transduction) (Laughlin NV USA, January 2007).
- 8) 宮田真人 (2007). マイコプラズマの滑走運動-全く新しい生体運動メカニズム- 第44回レスピラシンポジウム (2007年3月, 大阪市).
- 9) Miyata, M. (2007). *Mycoplasmas* glide with a novel mechanism. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity. (Awaji Island Japan, September 2007).
- 10) Miyata, M. (2007). *Mycoplasma* gliding -a novel mechanism of biological surface motility-. The International Conference on Science of Friction (Irago Japan, September 2007).
- 11) 宮田真人 (2007). Gliding motility of *Mycoplasma*, a novel biomotility mechanism. 第45回日本放線菌学会学術講演会 (2007年10月, 東京都).
- 12) 宮田真人 (2007). マイコプラズマの滑走運動-あたらしい生体運動メカニズム-. 第30回日本分子生物学会年会 第60回日本生化学会大会 合同大会 (2007年12月, 横浜市).
- 13) 宮田真人 (2007). マイコプラズマの滑走運動-あたらしい生体運動メカニズム- *Mycoplasma gliding*; a novel mechanism of biomotility. 日本生物物理学会第45回年会 (2007年12月, 横浜市).
- 14) 中根大介, 宮田真人 (2008). もうひとつのマイコプラズマの細胞骨格, 今度はヒヨコ、(・e・)ノ. 2008年生体運動研究合同班会議 (2008年1月, 仙台市).
- 15) 宮田真人 (2008). マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム. 平成19年度第17回 北里研究所 学会賞受賞者特別講演会 (2008年1月, 東京都).
- 16) 宮田真人 (2008). マイコプラズマ滑走装置とそれをささえる構造. 第64回日本顕微鏡学会 (2008年5月, 京都市).
- 17) Miyata, M. (2008). The cytoskeletal structure for *Mycoplasma gliding*. The 108th general meeting of American Society for Microbiology. (Boston USA, June 2008).

- 18) Nakane, D., Kenri, T. & Miyata, M. (2008). High-Resolution quick imaging of cytoskeletal architectures of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma gallisepticum* using conventional electron microscopy. the 17th International Congress of International Organization for Mycoplasmaology (IOM) (Tainjin China, July, 2008).
- 19) 宮田真人 (2008). 病原細菌, マイコプラズマの滑走運動-構造とメカニズム-. 認定NPO法人 第5回可視技術ワークショップ「バイオイメーシングテクノロジーを用いた微生物多様性へのアプローチ」(2008年11月, 東京都).
- 20) 中根大介, 西坂崇之, 宮田真人 (2009). マイコプラズマ滑走運動の“あし”の動きを検出. 2009年生体運動研究合同班会議(2009年1月, 仙台市).
- 21) 宮田真人 (2009). マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム. 第82回日本細菌学会総会(2009年3月, 名古屋市).
- 22) 宮田真人 (2009). 病原性バクテリア, マイコプラズマの滑走運動-構造とメカニズム. 日本農芸化学会2009年度大会(2009年3月, 福岡市).

原著論文

- 1) Nagai, R., and Miyata, M. (2006). Gliding motility of *Mycoplasma mobile* can occur by repeated binding to N-acetylneuraminyllactose (sialyllactose) fixed on solid surfaces. *J. Bacteriol.* **188**: 6469-6475.
- 2) Hiratsuka, Y., Miyata, M., Tada, T. and Uyeda, T.Q. (2006). A microrotary motor powered by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 13618-13623 (selected for "This week in PNAS" and press release).
- 3) Ohtani, N. and Miyata, M. (2007). Identification of a novel nucleoside triphosphatase from *Mycoplasma mobile*: a prime candidate for motor of gliding motility. *Biochem. J.* **403**: 71-77.
- 4) Nakane, D. and Miyata, M. (2007). Cytoskeletal "Jellyfish" structure of *Mycoplasma mobile*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 19518-19523 (selected for cover illustration of another journal).
- 5) Uenoyama, A., Seto, S., Nakane, D. and Miyata, M. (2009). Regions on Gli349 and Gli521 protein molecules directly involved in movements of *Mycoplasma mobile* gliding machinery suggested by inhibitory antibodies and mutants. *J. Bacteriol.* **191**: 1982-1985.
- 6) Nakane, D. and Miyata, M. (2009). Cytoskeletal asymmetrical-dumbbell structure of a gliding mycoplasma, *Mycoplasma gallisepticum*, revealed by negative-staining electron microscopy. *J. Bacteriol.* **191**: 3256-3264.
- 7) Miyata, M. and Ogaki, H. (2006). Cytoskeleton of mollicutes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 256-264.
- 8) Miyata, M. (2007). Molecular mechanism of *Mycoplasma* gliding - a novel cell motility system. In (Lenz, P., ed) *Cell Motility*. Springer NewYork, 137-175.
- 9) Miyata, M. (2008). Centipede and inchworm models to explain *Mycoplasma* gliding. *Trends Microbiol.* **16**: 6-12.
- 10) 宮田真人 (2006). 患者といっしょに歩き回るマイコプラズマ. *化学療法の領域* **23**: 267-272.
- 11) 宮田真人 (2006). "walking pneumonia" の病原菌であるマイコプラズマは患者と同様に歩きまわる. *感染・炎症・免疫* **36**: 72-73.
- 12) 宮田真人 (2007). マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム-ユニークな生体運動- *日本細菌学雑誌* **62**: 347-361.
- 13) 宮田真人 (2007). 表面を・つかんではなす・マイコプラズマ. *表面科学* **28**: 198-203.
- 14) 宮田真人 (2008). 滑走する病原細菌, マイコプラズマの細胞骨格 -チューブリンでもアクチンでもない. 蛋白質核酸酵素 (PNE) **53**: 1752-1758 (表紙の図に採用).
- 15) 宮田真人 (2008). うごめく細菌 マイコプラズマユニークな運動メカニズム. *現代化学* **446**: 27-32 (表紙の図に採用).
- 16) 宮田真人 (2009). 実験室の厄介者, マイコプラズマのひみつ-モータータンパク質も細胞骨格も使わない細胞運動-. *生化学* **81**: 31-35.
- 17) 宮田真人, 中根大介 (2009). *Mycoplasma pneumoniae*の滑走運動. *生体の科学* **60**: 98-102.
- 18) Uenoyama, A., Seto, S., Nakane, D., Miyata, M. (2009). Regions on Gli349 and Gli521 protein molecules directly involved in movements of *Mycoplasma mobile* gliding machinery suggested by inhibitory antibodies and mutants. *J. Bacteriol.* **191**: 1982-1985.
- 19) Nakane, D. and Miyata, M. (2009). Cytoskeletal asymmetrical-dumbbell structure of a gliding mycoplasma, *Mycoplasma gallisepticum*, revealed by negative-staining electron microscopy. *J. Bacteriol.* **191**: 3256-3264.
- 20) Chen, J., Neu, J., Miyata, M. and Oster, G. (2009). Motor-substrate interactions in *Mycoplasma*. Motility explains non-Arrhenius temperature dependence. *Biophys. J.* **97**: 2930-2938.
- 21) Nonaka, T., Adan-Kubo, J. and Miyata, M. (2010). Triskelion structure of Gli521 protein involved in gliding mechanism of *Mycoplasma mobile*. *J. Bacteriol.* in press (selected for cover illustration).
- 22) Lesoil, C., Nonaka, T., Sekiguchi, H., Osada, T., Miyata, M., Afrin, R. and IkaiIkai, A. (2010). Molecular shape and binding force of *Mycoplasma mobile*'s leg protein Gli349 revealed by an AFM study. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* in press.
- 23) 宮田真人 (2009). マイコプラズマ滑走運動の装置とメカニズム. *顕微鏡* **44**: 210-214.
- 24) 宮田真人 (2009). 病原細菌, マイコプラズマ滑走運動-構造とメカニズム-. *可視化技術の最前線 '07-'08*: 87-95.

新聞報道

- 1) 肺炎要因細菌にクラゲ形の構造-大阪市立大学, 発見 朝日新聞夕刊 2007年11月20日.
- 2) 病原菌 クラゲ構造-肺炎を起こすマイコプラズマ 日本経済新聞夕刊 2007年11月20日.
- 3) クラゲ形「フレーム」-マイコプラズマ細胞内の構造解明 毎日新聞夕刊 2007年11月20日.
- 4) クラゲ状骨格確認-マイコプラズマ内部-菌動かす役割 大阪日々新聞朝刊 2007年11月21日.
- 5) 細菌内にクラゲ骨格確認 フジサンケイビジネス朝刊 2007年11月21日.
- 6) 走る細菌の秘密-体内からクラゲ様の構造物 しんぶん赤旗朝刊 2007年12月17日.

- 7) 細胞内にクラゲ形の構造-肺炎起す細菌マイコプラズマ読売新聞朝刊 2007年12月17日.

## 謝 辞

本研究は財団法人発酵研究所の研究助成により実施されたものです。ここに厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- Adan-Kubo, J., Uenoyama, A., Arata, T. and Miyata, M. (2006). Morphology of isolated Gli349, a leg protein responsible for glass binding of *Mycoplasma mobile* gliding revealed by rotary-shadowing electron microscopy. *J. Bacteriol.* **188**: 2821-2828.
- Gitai, Z. (2005). The new bacterial cell biology: moving parts and subcellular architecture. *Cell* **120**: 577-586.
- Hiratsuka, Y., Miyata, M. and Uyeda, T. Q. P. (2005). Living microtransporter by uni-directional gliding of *Mycoplasma* along microtracks. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**: 318-324.
- Jaffe, J. D., Miyata, M. and Berg, H. C. (2004). Energetics of gliding motility in *Mycoplasma mobile*. *J. Bacteriol.* **186**: 4254-4261.
- Jaffe, J. D., Stange-Thomann, N., Smith, C., DeCaprio, D., Fisher, S., Butler, J., Calvo, S., Elkins, T., FitzGerald, M. G., Hafez, N., Kodira, C. D., Major, J., Wang, S., Wilkinson, J., Nicol, R., Nusbaum, C., Birren, B., Berg, H. C. and Church, G. M. (2004). The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. *Genome Research* **14**: 1447-1461.
- Kenri, T., Seto, S., Horino, A., Sasaki, Y., Sasaki, T. and Miyata, M. (2004). Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. *J. Bacteriol.* **186**: 6944-6955.
- Kusumoto, A., Seto, S., Jaffe, J. D. and Miyata, M. (2004). Cell surface differentiation of *Mycoplasma mobile* visualized by surface protein localization. *Microbiology* **150**: 4001-4008.
- Metsugi, S., Uenoyama, A., Adan-Kubo, J., Miyata, M., Yura, K., Kono, H. and Go, N. (2005). Sequence analysis of the gliding protein Gli349 in *Mycoplasma mobile*. *Biophysics* **1**: 33-43.
- Miyata, M. (2005). Gliding motility of mycoplasmas - the mechanism cannot be explained by current biology. in Blanchard, A. and Browning, G. (eds.) *Mycoplasmas: pathogenesis, molecular biology, and emerging strategies for control.*: 137-163. Horizon Bioscience, Norfolk, U.K.
- Miyata, M. and Petersen, J. (2004). Spike structure at interface between gliding *Mycoplasma mobile* cell and glass surface visualized by rapid-freeze and fracture electron microscopy. *J. Bacteriol.* **186**: 4382-4386.
- Miyata, M., Ryu, W. S. and Berg, H. C. (2002). Force and velocity of *Mycoplasma mobile* gliding. *J. Bacteriol.* **184**: 1827-1831.
- Miyata, M. and Uenoyama, A. (2002). Movement on the cell surface of gliding bacterium, *Mycoplasma mobile*, is limited to its head-like structure. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**: 285-289.
- Miyata, M., Yamamoto, H., Shimizu, T., Uenoyama, A., Citti, C. and Rosengarten, R. (2000). Gliding mutants of *Mycoplasma mobile*: relationships between motility and cell morphology, cell adhesion and microcolony formation. *Microbiology* **146**: 1311-1320.
- Seto, S., Kenri, T., Tomiyama, T. and Miyata, M. (2005). Involvement of P1 adhesin in gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae* as revealed by the inhibitory effects of antibody under optimized gliding conditions. *J. Bacteriol.* **187**: 1875-1877.
- Seto, S., Layh-Schmitt, G., Kenri, T. and Miyata, M. (2001). Visualization of the attachment organelle and cytoadherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *J. Bacteriol.* **183**: 1621-1630.
- Seto, S. and Miyata, M. (2003). The attachment organelle formation represented by localization of cytoadherence protein and formation of electron-dense core in the wild-type and mutant strains of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **185**: 1082-1091.
- Seto, S., Uenoyama, A. and Miyata, M. (2005). Identification of 521-kilodalton protein (Gli521) involved in force generation or force transmission for *Mycoplasma mobile* gliding. *J. Bacteriol.* **187**: 3502-3510.
- Shimizu, T. and Miyata, M. (2002). Electron microscopic studies of three gliding mycoplasmas, *Mycoplasma mobile*, *M. pneumoniae*, and *M. gallisepticum*, by using the freeze-substitution technique. *Curr. Microbiol.* **44**: 431-434.
- Uenoyama, A., Kusumoto, A. and Miyata, M. (2004). Identification of a 349-kilodalton protein (Gli349) responsible for cytoadherence and glass binding during gliding of *Mycoplasma mobile*. *J. Bacteriol.* **186**: 1537-1545.
- Uenoyama, A. and Miyata, M. (2005). Gliding ghosts of *Mycoplasma mobile*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**: 12754-12758.
- Uenoyama, A. and Miyata, M. (2005). Identification of a 123-kilodalton protein (Gli123) involved in machinery for gliding motility of *Mycoplasma mobile*. *J. Bacteriol.* **187**: 5578-5584.
- 宮田真人 (2002) . マイコプラズマの滑走運動. 日本細菌学会雑誌 **57**: 581-595.
- 宮田真人 (2004) . 未知のメカニズム, マイコプラズマの滑走運動-レールのないすべり運動?. 生物物理 **44**: 218-221.
- 宮田真人 (2005) . マイコプラズマの滑走運動-新たな生体運動メカニズム. 蛋白質核酸酵素 (PNE) **50**: 239-245.
- 宮田真人 (2006a) . マイコプラズマの滑走運動-ここまでわかった未知の構造と生体運動メカニズム. 顕微鏡 **41**: 39-44.
- 宮田真人 (2006b) . マイコプラズマの細胞運動メカニズム ATPで滑走するバクテリア. BioNics **3**: 52-58.
- 宮田真人 (2006c) 電顕に期待するもの . 細胞工学 **25**: 1186-1187.

発酵研究所研究報告 第23号【非売品】

平成21年12月10日 印刷

平成21年12月25日 発行

編集責任者 駒形和男

編集委員 今中忠行, 杉山純多  
中瀬 崇, 波多野和徳  
本田武司, 渡邊 信

発行人 中濱一雄

発行所 財団法人発酵研究所  
大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

TEL. 06 - 6300 - 6555

FAX. 06 - 6300 - 6814

印刷所 日本印刷出版株式会社  
大阪市福島区吉野1丁目2番7号